

Biogénne amíny - vznik, metódy stanovenia a výskyt v potravinách

ZLATICA KOHAJDOVÁ - JOLANA KAROVIČOVÁ

SÚHRN. Biogénne amíny vznikajú dekarboxyláciou aminokyselín. Fermentované mäsové výrobky obsahujú tyramín v množstve od 1 mg/100 g do 56 mg/100 g a putrescín v množstve od 1 mg/100 g do 19 mg/100 g výrobku. Obsah histamínu vo víne je približne 4,15 mg.dm⁻³. Mlieko obsahuje menej ako 1 mg.kg⁻¹ a syry viac ako 1 g.kg⁻¹ biogénnych amínov. Najčastejšie používanou metódou na stanovenie biogénnych amínov je vysokoúčinná kvapalinová chromatografia.

KĹÚČOVÉ SLOVÁ: biogénne amíny; toxicita; analýza

Biogénne amíny sa tvoria a degradujú rastlinným, živočíšnym a mikrobiálnym metabolizmom [1]. Vznikajú dekarboxyláciou aminokyselín alebo amináciou a transamináciou aldehydov a ketónov [2]. Väčšina biogénnych amínov v potravinách vzniká dekarboxyláciou voľných aminokyselín pôsobením bakteriálnych dekarboxyláz [3]. Faktory ovplyvňujúce dekarboxylázovú aktivitu mikroorganizmov sú uvedené v tab. 1. [4,5].

Odstránenie α -karboxylovej skupiny z aminokyseliny vedie k tvorbe korešpondujúcich biogénnych amínov [6]. Z histidínu, tyrozínu a tryptofánu vznikajú monoamíny histamín, tyramín a tryptamín. Diamíny putrescín a kadaverín vznikajú z ornitínu a lyzínu. Putrescín je prekursorom pre tvorbu polyamínov spermidínu a spermidínu [7].

Escherichia, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* a *Leuconostoc* a iné baktérie sú schopné tvoriť biogénne amíny. Lactobacily môžu produkovať histamín, tyramín a putrescín. Enterokoky sú typickými producentmi tyramínu a čeľaď *Enterobacteriaceae* je producentom putrescínu a kadaverínu [8]. V tab. 2 sú uvedené niektoré baktérie produkujúce biogénne amíny [3].

Ing. Zlatica KOHAJDOVÁ, Doc. Ing. Jolana KAROVIČOVÁ, PhD., Katedra sacharidov a konzervácie potravín, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

TAB. 1. Faktory ovplyvňujúce dekarboxylázovú aktivitu mikroorganizmov [4,5].
TAB. 1. The factors influencing the decarboxylase activity of microorganisms [4,5].

Faktory ¹	Vplyv na dekarboxylázovú aktivitu ²
pH	dekarboxylázová aktivita je silnejšia v kyslom prostredí (pH 4 až 5,5)
Obsah glukózy	0,5 až 2 % je optimálna pre rast mikroorganizmov vybavených dekarboxylázami, 3 % inhibujú syntézu dekarboxyláz
Teplota	20 až 37 °C je optimálna pre rast väčšiny mikroorganizmov vybavených dekarboxylázami, nízke teploty zastavujú ich rast
Koncentrácia NaCl	aktivuje tyrozíndekarboxylázu, inhibuje histidíndekarboxylázu
Koncentrácia NaNO ₂	aktivuje tyrozíndekarboxylázu
Množstvo prítomných amínov	histamín, agmatín a putrescín inhibujú histidíndekarboxylázu (<i>Photobacterium N-14</i>)

1 - factors, 2 - influence to the decarboxylation activity.

TAB. 2. Niektoré baktérie produkujúce biogénne amíny [3].
TAB. 2. Some bacteria producing biogenic amines [3].

Potraviny ¹	Baktérie ²	Vytvárané amíny ³
Ryby ⁴	<i>Morganella morganii</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Bacillus</i> spp., <i>Staphylococcus xylosus</i>	histamín, tyramín, kadaverín, putrescín, agmatín, spermidín, spermín
Syry ⁵	<i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. arabinose</i> , <i>Streptococcus faecium</i> , <i>S. mitis</i> , <i>Bacillus macerans</i> , <i>Propionibacterium</i> spp.	histamín, kadaverín, putrescín, tyramín, 2-fenyletylamín, tryptamín
Mäso a mäsové výrobky ⁶	rody <i>Pediococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , čelaď <i>Enterobacteriaceae</i>	histamín, kadaverín, putrescín, tyramín, 2-fenyletylamín, tryptamín
Fermentovaná zelenina ⁷	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus</i> spp.	histamín, kadaverín, putrescín, tyramín, tryptamín

1 - food, 2 - bacteria, 3 - amines formed, 4 - fish, 5 - cheeses, 6 - meat and meat products, 7 - fermented vegetables.

Biogénne amíny v potravinách môžu pochádzať z dvoch zdrojov. Sú prirodzenou súčasťou bunkových štruktúr alebo môžu vznikať v procese výroby a skladovania potravín ako výsledok metabolického pôsobenia mikroorganizmov. Biogénne amíny sa tak stávajú indikátorom mikrobiálnej kontaminácie a ich koncentrácia môže byť jedným z ukazovateľov kvality potravín [9].

V ovocí a zelenine, ktoré sú v neporušenom stave chránené pred bakteriálnou inváziou, je obsah biogénnych amínov nízky. Hladiny histamínu nižšie ako 1 mg.kg^{-1} a nízke obsahy ďalších biogénnych amínov sú charakteristické pre ovocné nektáre a džúsy [3]. V zreých rajčinách bol zaznamenaný výskyt histamínu ($11,1 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$), v jablkách tyramínu ($3,6 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$) a v listovej zelenine spermidínu ($11 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$) [10]. Fermentované mäsové výrobky sú charakteristické vysokým obsahom tyramínu (1–56 mg/100 g) a putrescínu (1–19 mg/100 g) [1].

Histamín je vo vínach zvyčajne prítomný v koncentrácii okolo $4,15 \text{ mg.dm}^{-3}$. Aromatické amíny (fenyletylamín, tyramín) sú prítomné v množstvách $1,7 \text{ mg.dm}^{-3}$ resp. $7,6 \text{ mg.dm}^{-3}$ [11]. Výskyt biogénnych amínov v mlieku je nízky (menej ako 1 mg.kg^{-1}), ale v syroch sa udáva obsah viac ako 1 g.kg^{-1} [12]. Množstvo tyramínu v syroch môže dosiahnuť hodnotu 500 mg.kg^{-1} [13]. V mliečne fermentovanej zelenine (mrkva, červená repa) sa vyskytujú kadaverín, histamín, putrescín, spermidín a tyramín v koncentrácii od 1 mg.kg^{-1} do 15 mg.kg^{-1} [14].

Podmienky pre tvorbu biogénnych amínov v potravinách sú:

- prístupnosť voľných aminokyselín (voľné aminokyseliny sa buď prirodzene vyskytujú v potravinách, alebo sa môžu tvoriť počas proteolýzy),
- prítomnosť baktérií vybavených dekarboxylázami aminokyselín,
- vhodné podmienky pre dekarboxyláciu aminokyselín [6].

Biogénne amíny, hlavne histamín, tyramín, putrescín, spermidín a spermidín, sú u živočíchov potrebné pre množstvo fyziologických funkcií [3]. Polyamíny sa podieľajú na syntéze DNA, RNA a proteínov, na stabilizácii bunkových membrán a na bunkovom raste [7]. Na druhej strane ich vysoké koncentrácie môžu zapríčiniť toxické efekty [9]. Najviac preštudovaným biogénnym amínom je histamín [15]. Ascar a Treptow [22] uvádzajú, že orálny príjem 8–40 mg histamínu vyvoláva prejavy ľahkej otravy, 40 až 100 mg stredné a viac ako 100 mg silné intoxikácie [3].

Zvýšený príjem histamínu môže viesť k bolestiam hlavy, nevoľnostiam, kožným vyrážkam, sčerveneniu, respiračným poruchám, srdcovým a žalúdočným problémom [6].

Otrava histamínom je často spojená s konzumáciou rýb z čeľade *Scombridae*, ako sú makrely, tuniaky a sardinky [16]. EÚ vydala legislatívne na-

riadenie týkajúce sa množstva histamínu obsiahnutého v surových rybách (menej ako 100 mg.kg⁻¹) a solených rybách (menej ako 200 mg.kg⁻¹) pre čelade *Scombridae* a *Clupeidae* [17]. Maximálny tolerovateľný obsah histamínu v rybách *Eugraulidae* a *Corynaenidae* podľa legislatívneho nariadenia EÚ je 400 mg.kg⁻¹ [18].

Tyramín môže vyvolať bolesti hlavy [2]. Jeho príjem v rozmedzí od 100 mg.kg⁻¹ do 800 mg.kg⁻¹ je považovaný za toxický [15]. Diamíny putrescín a kadaverín sú považované za látky umožňujúce toxicitu histamínu [2,15] a ich nahromadenie v potravinách je spojené so znížením ich mikrobiologickej kvality [15].

Sekundárne biogénne amíny môžu podliehať nitrozácii a vytvárať nitrozoamíny, ktoré sú považované za vysoko karcinogénne [19]. Nitrozoamíny sa často vyskytujú v mäsových výrobkoch, ktoré obsahujú dusitanové a dusičnanové soliace zmesi používané ako konzervačné činidlá [20]. Počas zahrievania alebo varenia môžu byť putrescín a kadaverín konvertované na pyrolidín a piperidín [19]. Tieto produkty môžu byť za určitých podmienok nitrozované obdobne ako sekundárne skupiny agmatínu, sperminu a spermidínu.

V črevnom trakte cicavcov pôsobí detoxikačný systém, ktorý dokáže metabolizovať normálny príjem biogénnych amínov potravou [3]. Biogénne amíny sú jeho účinkom metabolizované na fyziologicky menej aktívne metabolity [6]. Hlavnú úlohu v ňom zohrávajú enzýmy: monoaminoxidáza (MAO, EC 1.4.3.4) a diaminoxidáza (DAO, EC 1.4.3.6). Tieto majú však len určitú kapacitu, ktorá nezvládne nadmerný príjem biogénnych amínov. MAO a DAO pôsobia v črevnom epiteli, takže do krvného obehu sa dostávajú oxidačné produkty biogénnych amínov [3].

Prípadné zlyhanie činnosti DAO môže byť spôsobené genetickými predispozíciami, gastrointestinálnymi chorobami, inhibítormi DAO. MAO môžu byť inhibované niektorými liečivami [6].

Histamín - vznik, toxicita, metabolizmus v ľudskom organizme, nízkohistamínová technológia

Histamín vzniká z histidínu pomocou enzýmu L-histidín-dekarboxylázy (EC. 4.1.1.22) [9]. V ľudskom organizme sa histidín metabolizuje na kyselinu urokanovú pomocou histidinázy, ďalším produktom metabolizmu je glutamát a z neho vyniká α -ketoglutarát, ktorý vstupuje do citrátového cyklu alebo sa histidín metabolizuje na histamín.

Histidínanémia je vrodená chyba v metabolizme histidínu, jej dôsledkom je absencia enzýmu histidinázy. Táto anémia je spojená so zvýšeným vylučo-

vaním histamínu a jeho metabolitov. Preto ľudia, ktorí ňou trpia, sú náchylnejší na otravu histamínom ako zdraví jedinci [21].

V ľudskom organizme je histamín uložený v tukových bunkách a v bazofilných granulocytoch, čo je jeden z druhov bielych krviniek. Odtiaľ sa pri alergickej reakcii uvoľňuje do krvného obehu. Druhým zdrojom je potrava. Príjem histamínu potravou môže viesť k rovnakým ťažkostiam ako jeho uvoľnenie z telových depozitov. Prejavy sú obdobné ako pri alergii na určité potraviny, takže sa intoxikácia často diagnostikuje ako alergická reakcia [3].

Otravy histamínom v potravinách prebiehajú veľmi charakteristicky. Prvé príznaky sú často veľmi slabé. Pretože ide o intoxikáciu, je inkubačná doba veľmi krátka - 30 až 60 minút [3,22]. Príznaky otravy histamínom sú nasledovné: sčervenanie kože (hlavne na tvári), žihľavovité vyrážky so svrbením, nevoľnosť (ktorá môže viesť až k zvracaniu), hnačka, žalúdočné kŕče, bolesti hlavy a závraty [22,23].

Histamín spôsobuje svoj toxický účinok v interakcii s receptormi, ktoré sú lokalizované v bunkových membránach respiračného, kardiovaskulárneho, gastrointestinálneho, imunologického systému a na pokožke [21].

Histamín zapríčiňuje rozširovanie krvných kapilár a artérií. Sťahovanie črevného hladkého svalstva sprostredkované H_1 receptormi vyvoláva hnačku, kŕče a zvracanie. Vylučovanie žalúdočných štiav je regulované histamínom prostredníctvom H_2 receptorov umiestnených na stenách buniek. Bolesť a svrbenie môžu byť spôsobené zmyslovou a motorickou nervovou stimuláciou, ktorá je spôsobená H_1 receptormi [4,23].

Antagonisti receptorov H_1 (napr. Claritin) sú používané na liečenie alergií a antagonisti H_2 receptorov (napr. Tagamet) na liečenie žalúdočných vredov. V r. 1983 bol objavený receptor H_3 , ktorého antagonisti (napr. Perceptin) sa používajú na liečenie porúch centrálnej nervovej sústavy, ďalej na liečenie porúch spánku, pamäti (napr. pri Alzheimerovej chorobe) a pod. [24].

Užívanie antihistaminík prvej generácie (Hydrozon, Promethazin) môže viesť k riziku srdcových aritmií a epileptickým prejavom. U mladých pacientov môže dochádzať pri užívaní vysokých dávok týchto liekov ku kŕčovitým prejavom.

Druhá generácia antihistaminík (Astemizol, Terfenadin, Fexofenadin) vykazuje vyššiu selektivitu na H_1 receptory, nedochádza k sedatívnemu účinku a má tiež niektoré doplnujúce antialergické vlastnosti [25].

Histamín je sťahovač priedušiek a spolupôsobí pri vzniku astmy. N-metylácia katalyzovaná histamín-N-metyltransferázou (HMT) je primárnou cestou pre biotransformáciu histamínu v prieduškovom epiteli. Na liečenie astmy je možné použiť také H_1 antihistaminiká, ktoré neinhibujú HMT [26].

Toxicita histamínu môže byť zvýšená spolupôsobením určitých faktorov:

- existencia látok umožňujúcich toxicitu histamínu (putrescín, kadaverín) [23] - tieto amíny v tráviacom trakte prednostne reagujú s MAO a DAO, čo má za následok zvýšenie hladiny histamínu v krvi [27],
- prítomnosť inhibítorov enzýmov degradujúcich biogénne amíny - aminoguanidín, anserín, karnozín, agmatín a tyramín inhibujú DAO a β -fenyletylamín, tryptamín, oktopamín majú inhibičný účinok na HMT,
- tiež poranenia črevnej mukózy môžu znížiť funkciu detoxikačných enzýmov [23].

Metabolizmus histamínu v ľudskom tele prebieha dvomi cestami:

- dusík v imidazolovom cykle je metylovaný pomocou HMT za vzniku N-metylhistamínu [23]. HMT je veľmi selektívna pre detoxifikáciu histamínu a vyžaduje S-adenozylmetionín ako donór metylu [6]. N-metylhistamín je ďalej oxidovaný MAO na kyselinu N-metylimidazoloctovú,
- pôsobením DAO je histamín oxidovaný na kyselinu imidazoloctovú, ktorá sa viaže na ribózu [23].

HMT je v ľudskom organizme zastúpená hlavne v pečeni a DAO v črevnom trakte. Účinok aminooxidáz je maximálny v neutrálnom až alkalickom prostredí a pre ich činnosť je nutná prítomnosť kyslíka. Optimálna teplota pre činnosť DAO je 37 °C, ale je aktívna od 20 °C do 63 °C. Pri 20 °C si zachováva 50 % svojej aktivity. Optimálne pH pre činnosť DAO je 7 (rozsah 5 až 10).

Časť histamínu sa rýchlo premieňa na inaktívny N-acetylhistamín črevnými baktériami, zvyšok sa absorbuje a inaktivuje počas jeho prechodu cez črevnú stenu. Histamín môže byť absorbovaný aj cez mukózne membrány úst a hrdla a obísť zažívací proces, počas ktorého sa histamín detoxifikuje.

Obličky majú schopnosť detoxifikovať histamín v krvi. Bolo zistené, že väčšia časť histamínu podávaného intravenózne bola metylovaná v obličkách a vylúčená močom. Menšia časť bola vylúčená v nezmenenej forme tiež močom [21].

Vzhľadom na to, že zvýšený obsah histamínu v potravinách môže viesť k zdravotným rizikám u konzumentov [3], je pri výrobe potravín nutné použiť tzv. nízkohistamínovú technológiu, ktorá zahŕňa:

- vysokú kvalitu suroviny (bez prítomnosti histamínu) a vhodné výrobné podmienky,
- zabránenie rastu a aktivite mikroorganizmov vykazujúcich dekarboxylázovú aktivitu, zabránenie aktivite endogénnych proteáz a dekarboxyláz aminokyselín,

- pri použití štartovacích bakteriálnych kultúr obmedzujúcich spontánnu fermentáciu je potrebné vyberať kmene, ktoré nie sú vybavené dekarboxylázami.

Celý výrobný proces by mal byť zahrnutý do špeciálneho systému kvality, do systémového manažmentu kvality DIN EN ISO 9000, zahŕňajúceho analytickú kontrolu v kritických bodoch [3,6].

Analytické metódy stanovenia biogénnych amínov

Na stanovenie biogénnych amínov môžu byť použité rôzne metódy. Komplexná matica vzorky, prítomnosť potenciálne interferujúcich zložiek a výskyt niekoľkých biogénnych amínov súčasne sú typické problémy pri analýze biogénnych amínov [28].

Najobvyklejším predseparačným krokom vzhľadom k zásaditému charakteru amínov je ich extrakcia zo vzorky zriedenou kyselinou chloristou alebo kyselinou trichlóroctovou. Pre mliečne výrobky sa osvedčila jednoduchá extrakcia metanolom za zvýšenej teploty [3].

Na extrakciu je možné použiť tiež iónovo-párovú extrakciu, kde sú amíny prevedené ako iónové páry do organickej fázy. V porovnaní s extrakciou typu kvapalina-kvapalina vykazuje iónovo-párová extrakcia vyšší výťažok a vyššiu čistotu extraktov [19].

Využíva sa tiež extrakcia do tuhej fázy (SPE), ktorá je v porovnaní s klasickou extrakciou účinnejšia. Na SPE extrakciu môžu byť použité sorbenty ako napr. polystyrén, Amberlit CG-120, kationový vymieňač iónov alebo kation-výmenné extrakčné disky.

Výťažnosť SPE v slabo kyslom prostredí je viac ako 95 %. Nižšia výťažnosť v silne kyslom prostredí je prisudzovaná vyššej retenčnej kapacite, ktorá pravdepodobne zabraňuje elúcii amínov. Účinnosť SPE sa znižuje aj s narastajúcou molekulovou hmotnosťou biogénnych amínov [29].

Najčastejšie používanou metódou na stanovenie biogénnych amínov je vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC). Pri HPLC sa využíva pred alebo pokolónová derivatizácia vzorky [19]. Na predkolónovú derivatizáciu sa používajú benzoylchlorid, dansylchlorid, 9-fluorenylchloromravčan, fluoresceín a dabsylchlorid [27]. Na pokolónovú derivatizáciu sa používajú ninhydrín a *o*-ftalaldehyd (OPA) v prostredí 2-merkaptóetanolu [30].

Najpoužívanejším derivatizačným činidlom je dansylchlorid. Dansylderiváty sa dajú po HPLC separácii detegovať UV/VIS detektorom alebo v prípade požiadavky vyššej citlivosti tiež fluorimetricky [3]. Dabsylchlorid reaguje s primárnymi aj sekundárnymi aminoskupinami a jeho deriváty sú

stabilné pri izbovej teplote [28]. OPA reaguje len s primárnymi aminoskupinami a vytvára intenzívne fluoreskujúce produkty [19].

Pred reakciou s benzoylchloridom je nutné vzorku alkalizovať. Pri pH 9–12 prebehne reakcia, pri ktorej vznikajú N-substituované benzamidy [31]. Benzoylderiváty sú veľmi stabilné a vykazujú vysokú citlivosť pri UV detekcii [17].

HPLC sa používa na stanovenie biogénnych amínov v rôznych potravinách.

Leuschner a Hammes [32] zisťovali obsah biogénnych amínov v majonézach, haringoch a rybacích šalátoch inokulovaných laktobacilmi. Vzorky sa extrahovali 0,6 M kyselinou chloristou, homogenizovali, filtrovali a analyzovali HPLC. Mobilná fáza obsahovala kyselinu 1-hexánsulfónovú a acetonitril. Biogénne amíny po derivatizácii *o*-ftaldialdehydom boli detegované fluorimetricky, pričom absorpcia reakčného produktu bola meraná v prípade histamínu pri 210 nm a tyramínu pri 320 nm).

Autori využili túto metódu aj na stanovenie histamínu a tyramínu produkovaného *Brevibacterium linens* počas zrenia syra Münster [33], na sledovanie tvorby biogénnych amínov laktobacilmi počas zrenia syra Gouda [34] a na sledovanie tvorby tyramínu *Lactobacillus curvatus* LTH 972 [35].

Bockhardt a kol. [36] stanovovali biogénne amíny v syroch, červenom víne a salámach. Vzorky extrahovali 0,1 M kyselinou chlorovodíkovou, centrifugovali, filtrovali, derivatizovali dabsylchloridom (70 °C, 15 min) a analyzovali metódou HPLC na kolóne Spherisorb ODS 2 (150 x 4,6 mm), 3 µm lineárnou gradientovou elúciou (eluent A: 4 % dihydrogénfosforečnan, dimetylformamid, 0,18 % trimetylamin, pH 6,55 a eluent B: 80 % acetonitril, 10 % tercbutyléter, 10 % voda). Dabsylamíny boli detegované UV detektorom pri 436 nm.

Masson a kol. [1] sledovali produkciu tyramínu *Carnobacterium divergens* v mäsovej zmesi. Vzorky extrahovali, derivatizovali dansylchloridom a dansylamíny separovali na kolóne Spherisorb ODS 2 (125 x 4 mm), 5 µm. Vzorky boli eluované gradientovou elúciou eluentom A: octan amónny (0,1 M) a eluentom B: acetonitril. Biogénne amíny detegovali UV detektorom pri 254 nm.

Eerola a kol. [37] využili HPLC na sledovanie biogénnych amínov v salámach. Biogénne amíny extrahovali 0,4 M kyselinou chloristou a derivatizovali dansylchloridom (40 °C, 45 min). Po derivatizácii pridali amoniak na odstránenie interferujúcich pík v blízkosti kadaverínu. Separácia bola uskutočnená použitím kolóny Spherisorb ODS 2 (125 x 4 mm), 5 µm, s gradientovou elúciou (octan etylový, acetonitril). Limit stanovenia bol 1–5 mg.kg⁻¹.

Túto metódu použili aj Montel a kol. [38] na stanovenie biogénnych

amínov vo francúzskych salámach, Majjala a kol. [39] pri sledovaní tvorby biogénnych amínov počas zrenia fermentovaných salám, Masson a kol. [40] pri stanovení histamínu a tyramínu v mäse.

Koutsoumanis a kol. [41] stanovovali obsah biogénnych amínov v morských rybách. Vzorky extrahovali 6% kyselinou trichlóroctovou, centrifugovali, filtrovali, derivatizovali dansylchloridom a analyzovali na kolóne Lichrospher 100 RP-18 (125 x 3 mm), 5 μ m za použitia gradientovej elúcie s eluentom: voda, acetonitril. Detekciu uskutočnili pomocou UV detektora (MD-91-0) pri 254 nm.

Mendez a kol. [42] analyzovali biogénne amíny v čerstvých a mrazených sardinkách. Biogénne amíny extrahovali zo vzoriek 10 % kyselinou trichlóroctovou a separovali na kolóne Spheri-5, C₁₈ (220 x 4,6 mm), nasledovala pokolónová derivatizácia a fluorimetrická detekcia (excitácia 360 nm, emisia 455 nm).

Mendez [43] stanovoval obsah biogénnych amínov v portugalských rybách. Vzorky extrahoval 10% kyselinou trichlóroctovou a amíny separoval na kolóne Spheri-5, C₁₈ (220 x 4,6 mm). Nasledovala pokolónová derivatizácia s fluorescenčnou detekciou (excitácia 360 nm, emisia 455 nm).

Belajová a Kolesárová [44] sledovali obsah biogénnych amínov vo víne metódou HPLC. Biogénne amíny prítomné vo víne boli analyzované po predkolónovej derivatizácii dansylchloridom a extrakcii toluénom. Separácia amínov prebiehala izokratickou elúciou s mobilnou fázou: acetonitril, 0,1 M octan amónny (55 : 45, v/v) v kolóne RP Separon SGX C₁₈ (150 x 3 mm), 5 μ m. Derivatizované amíny boli monitorované pri 254 nm.

Křižek a Hlavatá [31] vypracovali chromatografickú metódu na stanovenie biogénnych amínov v pive. Vzorky derivatizovali benzoylchloridom (2,5 min), vzniknuté benzamidy extrahovali dietyléterom, extrakty odparili do sucha a rozpustili v mobilnej fáze pre HPLC (63 %, v/v, metanol vo vode). Na analýzu použili kolónu SGX C₁₈ (150 x 3 mm), 5 μ m a na detekciu UV/VIS detektor (LCD 2563) pri 256 nm.

Hornero-Mendez a Gerrido-Fernandez [13] uskutočnili analýzu biogénnych amínov vo fermentovaných zeleninových šťavách. Metóda bola založená na derivatizácii amínov benzoylchloridom v silne alkalickom prostredí, benzoylamíny boli extrahované dietyléterom a po odparení bol zvyšok rozpustený v metanole a analyzovaný na HPLC RP Spherisorb ODS 2 (125 x 4 mm), 5 μ m. Na detekciu benzoylamínov použili UV detektor pri 225 nm a pri 254 nm (pre agmatín).

Prehľad niektorých metód používaných v kvapalinovej chromatografii je uvedený v tab. 3.

Kolóny používané pri GC analýze biogénnych amínov sú buď kapilárne

TAB. 3. Prehľad niektorých metód používaných v kvapalinovej chromatografii.
TAB. 3. Overview of several methods using in the liquid chromatography.

Vzorka ¹	Extrakčné činiteľ ²	Derivatizačné činiteľ ³	Použitá kolóna ⁴	Mobilná fáza ⁵	Detektor ⁶	Literatúra ⁷
ryby, kvasená kapusta, víno ⁸	6% kyselina chloristá	<i>o</i> -ftalaldehyd (40 °C, 20 min)	Inersil ODS 2 (250 x 4,6 mm), 5 µm	fosforečnanový tlmivý roztok (pH 7) - acetonitril (825:125, v/v)	fluorimetrický (excitácia 340 nm, emisia 455 nm)	Beljaars [18]
rôzne potraviny ⁹	10% kyselina trichlóroctová	dansylchlorid (40 °C, 20 min)	Nucleosil C ₁₈ (250 x 8 mm), 4 µm	metanol - acetonitril - voda (2:1:1, v/v/v)	UV detektor 254 nm	Greif [27]
kapustová šťava ¹⁰	10% kyselina trichlóroctová	dansylchlorid (40 °C, 20 min)	Nucleosil C ₁₈ (250 x 8 mm), 4 µm	metanol - acetonitril - voda (2:1:1, v/v/v)	UV detektor 254 nm	Greif [9]
ryby ¹¹	0,1 M kyselina chlorovodíková	<i>o</i> -ftalaldehyd	µ Bondapak C ₁₈ (300 x 3,9 mm), 10 µm	A: 0,2 M octan sodný, 10 mM kyselina oktan- sulfónová B: metanol, acetonitril, sodná soľ kyseliny oktan- sulfónovej (1:9:1)	fluorimetrický (excitácia 340 nm, emisia 455 nm)	Vale [8]
mäso ¹²	6% kyselina chloristá	dansylchlorid	Spherisorb ODS 2 (125 x 4 mm), 5 µm	0,1 M octan amónny, acetonitril	UV detektor 254 nm	Masson [1]
ryby	5% kyselina trichlóroctová	fluoresceín	Phenomenex IB-SIL (100 x 4,6 mm), 5 µm	0,02 M fosforečnanový tlmivý roztok (pH 7,2) - acetonitril	fluorimetrický (excitácia 390 nm, emisia 475 nm)	Gingerich [2]

1 - sample, 2 - extracting reagent, 3 - derivatizing reagent, 4 - column used, 5 - mobile phase, 6 - detector, 7 - reference, 8 - fish, sauerkraut, wine, 9 - different food, 10 - cabbage juice, 11 - fish, 12 - meat.

alebo náplňové [3]. Separácia biogénnych amínov na náplňových kolónach nedáva uspokojivé výsledky z dôvodov nepravidelných pík. Separácia amínov na kapilárnych kolónach v spojení s hmotnostným detektorom dosiahla vysoký stupeň citlivosti a selektivity, avšak zariadenia sú značne nákladné [27].

TLC je jednoduchá, rýchla a časovo nenáročná metóda, ktorá nevyžaduje špeciálne vybavenie a je vhodná na rutinné stanovenie biogénnych amínov v praxi [28]. Kompletne rozdelenie amínov je možné len mnohonásobnou vyvíjacou technikou. Výsledkom jej použitia je lepšie oddelenie amínov od ostatných interferujúcich látok a získanie intenzívnych škvrn [45].

Na analýzu biogénnych amínov je možné použiť aj automatický analyzátor aminokyselín.

Halász a kol. [46] zisťovali obsah biogénnych amínov v kvasenej kapuste. Vzorky extrahovali 0,6 M kyselinou chloristou, extrakty predseparovali na kolóne Dowex 50W X8 (4 x 1 cm). Eliminovali tým voľné aminokyseliny a zakoncentrovali amíny. Samotnú analýzu uskutočnili na automatickom analyzátore aminokyselín Biotronic LC 2000 v K^+ citrátovom systéme. Prietok tlmivého roztoku bol 40 ml.h^{-1} a teplota kolóny 67°C . Po reakcii s ninhydrínom nasledovala kolorimetrická detekcia pri 570 nm. Autori touto metódou stanovovali aj obsah biogénnych amínov v pive [47].

Kapilárna elektroforéza sa často využíva na stanovenie biogénnych amínov v rybách.

Gallardo a kol. [17] sledovali úroveň histamínu v rybách kapilárnou elektroforézou. Vzorky extrahovali 6% kyselinou chloristou, centrifugovali, filtrovali a analyzovali (plnená silikónová kapilára, $75 \mu\text{m} \times 57 \text{ cm}$) s použitím fosforečnanového tlmivého roztoku (pH 2,44) a UV detekcie pri 214 nm.

Gardana a kol. [48] použili na stanovenie histamínu v rybách kapilárnu elektroforézu. Histamín extrahovali zo vzorky 10% HCl, extrakt filtrovali a analyzovali (systém P-ACE 5500 CE, silikónová kapilára $57 \text{ cm} \times 50 \mu\text{m}$, napätie 20 KV, teplota kolóny 30°C) s fosforečnanovým tlmivým roztokom (pH 3). Na detekciu použili DAD detektor (210 nm). Detekčný limit metódy bol 100 mg.kg^{-1} .

Hopper a Sciacchitano [49] použili na stanovenie biogénnych amínov v rybách metódu kapilárnej zónovej elektroforézy s UV detekciou pri 210 nm. Vzorky extrahovali 50% metanolom, filtrovali a dávkovali do silikónovej kapiláry ($72 \text{ cm} \times 50 \mu\text{m}$). Na elúciu použili 0,02 M citrátový tlmivý roztok (pH 2,5).

Pri stanovení biogénnych amínov elektrochemickými biosenzormi sa využívajú enzýmy aminooxidázy, ktoré sú imobilizované do polymérnych membrán. Pôsobením týchto enzýmov na biogénne amíny dochádza k produkcii

peroxidu vodíka, ktorý je potom možné stanoviť [50].

Esti a kol. [50] použili túto metódu pri sledovaní obsahu biogénnych amínov vo vákuovo balenom ovocí. Pomocou diaminoxidázy sa zistil celkový obsah biogénnych amínov, polyaminoxidáza bola selektívna na stanovenie spermidínu a sperminu. Vzniknutý H_2O_2 bol detegovaný pomocou platínovej elektródy polarizovanej na 650 mV, pričom ako porovnávacia elektróda bola použitá argentschloridová elektróda.

Male a kol. [51] využili na stanovenie celkového histamínu, putrescínu a kadaverínu biosenzory. V biosenzorovom systéme použili enzým DAO imobilizovaný do pórovitej nylonovej membrány. Enzýmová membrána bola pripojená na ampérometrickú elektródu, ktorá slúžila na stanovenie celkovej koncentrácie histamínu, putrescínu a kadaverínu akumulovaného v rybách počas skladovania. Na detekciu vznikajúceho H_2O_2 bola použitá platínová elektróda polarizovaná na 400 mV (potlačenie elektroaktívnych interferencií a minimalizácia znečistenia elektródy) a argentschloridová elektróda ako porovnávacia elektróda.

Práca je vypracovaná v rámci riešenia grantu VEGA 1/6227/99 „Biokonzervácia rastlinných a živočíšnych surovín s použitím probiotických baktérií ako promótorov ľudského zdravia, za účelom zníženia cudzorodých látok a zvýšenia výživovej hodnoty“.

Literatúra

1. MASSON, F. - JOHANSSON, G. - MONTEL, M. C.: Tyramine production by strain of *Carnobacterium divergens* inoculated in meat-fat mixture. *Meat Science*, 52, 1999, s. 65-69.
2. GINGERICH, T. M. - LORCA, T. - FLICK, G. J. - PIERSON, M. D. - MCNAIR, H. D.: Biogenic amine survey and organoleptic changes in fresh, stored and temperature - abused bluefish (*Pomatomus saltatrix*). *Journal of Food Protection*, 62, 1999, č. 9, s. 1033-1037.
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. SILLA-SANTOS, M. H.: Biogenic amines: their importance in food. *International Journal of Food Microbiology*, 29, 1996, s. 213-231.
5. BEUTLING, D.: Biogene amine in der Ernährung. *Archiv für Lebensmittellhygiene*, 47, 1996, s. 97-104.
6. BODMER, S. - IMARK, C. - KNEUBÖHL, M.: Biogenic amines in foods: histamine and food processing. *Inflammatory Research*, 48, 1999, s. 296-300.
7. KALAČ, P. - ŠPIČKA, J. - KRÍŽEK, M. - PELIKÁNOVÁ, T.: Changes in biogenic amines concentration during sauerkraut storage. *Food Chemistry*, 69, 2000, s. 309-314.
8. VALE, S. - GLÓRIA, B. A.: Biogenic amines in Brazilian cheeses. *Food Chemistry*, 63, 1998, č. 3, s. 343-348.
9. GREIF, F. - GREIFOVÁ, M. - DVORAN, J. - KAROVIČOVÁ, J. - BUCHTOVÁ, V.: Štúdium rastu

- a produkcie biogénnych amínov niektorými mikroorganizmami za modelových podmienok. *Czech Journal of Food Science*, 17, 1999, č. 1, s. 15-21.
10. KOLESÁROVÁ, E.: Výskyt a vznik biogénnych amínov v potravinách. *Bulletin potravinárskeho výskumu*, 34, 1995, č. 3-4, s. 109-122.
 11. SOUFLEROS, E. - BARRIOS, M. L. - BERTRAND, A.: Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 1998, č. 3, s. 266-277.
 12. LEUSCHNER, R. G. K. - KURIHARA, R. - HAMMES, W. P.: Formation of biogenic amines by proteolytic enterococci during cheese ripening. *Journal of Science and Food Agriculture*, 79, 1999, s. 1141-1144.
 13. HORNERO-MÉNDEZ, D. - GARRIDO-FERNÁNDEZ, A.: Rapid HPLC analysis of biogenic amines in fermented vegetable brines. *Journal of Food Protection*, 60, 1997, č. 4, s. 414-419.
 14. KOVÁCS, A. - SOMON-SARKADI, L. - GANZLER, K.: Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 836, 1999, s. 305-313.
 15. PETÄJÄ, E. - EEROLA, S. - PETÄJÄ, P.: Biogenic amines in cold-smoked fish fermented with lactic acid bacteria. *European Food Research and Technology*, 210, 2000, s. 280-285.
 16. CARLOS, M. A. - MASCINI, M.: Diamine oxidase and putrescine oxidase immobilised reactions in flow injection analysis: comparison in substrate specificity. *Talanta*, 50, 1999, s. 141-148.
 17. GALLARDO, J. M. - SOTELO, C. G. - PEREZ-MARTIN, R. I.: Determination of histamine by capillary zone electrophoresis using a low-pH phosphate buffer: application in the analysis of fish and marine product. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 204, 1997, s. 336-340.
 18. BELJAARS, P. R. - DIJK, D. V. - JONKER, K. M. - SCHOUT, L. J.: Liquid chromatographic determination of histamine in fish, sauerkraut and wine: interlaboratory study. *Journal of AOAC International*, 81, 1998, č. 5, s. 991-998.
 19. FERNANDES, J. O. - FERREIRA, M. A.: Combined ion-pair extraction and gas chromatography - mass spectroscopy for the simultaneous determination of diamines, polyamines and aromatic amines in port wine and grape juice. *Journal of Chromatography A*, 886, 2000, s. 183-195.
 20. BOVER-CID, S. - SCHOPPEN, S. - IZQUIERDO-PULIDO, M. - VIDAL-CAROU, M. C.: Relationship between biogenic amine contents and the size of dry fermented sausages. *Meat Science*, 51, 1999, s. 305-311.
 21. LEHANE, L. - OLLEY, J.: Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology*, 58, 2000, s. 1-37.
 22. ASCAR, A. - TREPTOW, H.: Biogene Amine in Lebensmitteln. Stuttgart : Ulme, 1986. 197 s.
 23. BENTLEY, S. - BOTTARELLI, A. - BONARDI, S.: Istamina e riflessi sanitari. *Ingegneria Alimentare*, 5, 1995, s. 32-35.
 24. SANSON, C.: Histamine control of sleep, learning and memory. *Drug Discovery Today*, 5, 2000, s.94-95.
 25. TAGLIALATELA, M. - TIMMERMAN, H. - ANNUNZIATO, L.: Cardiotoxic potential and CNS effect of first-generation antihistamines. *Trends in Pharmacological Sciences*, 21, 2000, s. 52-56.
 26. YAN, L. - GALINSKI, R. E. - BERNSTEIN, J. A. - LIGETT, S. B. - WEINSHILBOUM, R. M.: Histamine N-methyltransferase pharmacogenetics: association of common functional polymorphism with asthma. *Pharmacogenesis*, 10, 2000, s. 261-266.
 27. GREIF, G. - GREIFOVÁ, M. - DRDÁK, M.: Stanovenie biogénnych amínov v potravinách živočíšneho pôvodu metódou HPLC. *Potravinárske Vědy*, 15, 1997, č. 2, s. 119-129.

28. SHALABY, A. R.: Simple, rapid and valid thin layer chromatographic method for determining biogenic amines in food. *Food Chemistry*, 65, 1999, s. 117-121.
29. COBO, M. - SILVA, M.: Continuous solid-phase extraction of low-molecular-mass amines coupled on-line with liquid chromatography and peroxyate chemiluminescence-based detection. *Journal of Chromatography A*, 848, 1999, s. 105-115.
30. ROMERO, R. - GAZQUEZ, D. - BAGUR, G. - SANCHES, M.: Optimisation of chromatographic parameters for the determination of biogenic amines in wines by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 871, 2000, s. 75-83.
31. KŘÍŽEK, M. - HLAVATÁ, V.: Stanovení vybraných biogenních aminů v pivu. *Kvasní Průmysl*, 41, 1995, č. 9, s. 265-268.
32. LEUSCHNER, R. G. K. - HAMMES, W. P.: Formation of biogenic amine in mayonnaise, herring and tuna fish salad by *Lactobacilli*. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50, 1999, s. 159-164.
33. 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.
34. LEUSCHNER, R. G. K. - KURIHARA, R. - HAMMES, P.: Effect of enhanced proteolysis on formation of biogenic amines by lactobacilli during Gouda cheese ripening. *International Journal of Microbiology*, 44, 1998, s. 15-20.
35. STRAUB, B. W. - TICHACEK, P. S. - KICHERER, M. - HAMMES, W. P.: Formation of tyramine by *Lactobacillus curvatus* LTH 972. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 199, 1994, č. 1, s. 9-12.
36. BOCKHARDT, A. - KRAUSE, I. - KLOSTERMEYER, H.: Determination of biogenic amines by RP-HPLC of the dabsyl derivatives. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 203, 1996, s. 65-70.
37. EEROLA, S. - HINKKANEN, R. - LINDFORS, E. - HIRVI, T.: Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. *Journal of AOAC International*, 76, 1993, č. 3, s. 575-577.
38. MONTEL, M. CH. - MASSON, F. - TALON, R.: Comparison of biogenic amine content in traditional French dry sausages. *Sciences des Aliments*, 19, 1999, s. 247-254.
39. MAIJALA, R. L. - EEROLA, S. - LIEVONEN, S. - HILL, P. - HIRVI, T.: Formation of biogenic amines during ripening of dry sausages as affected by starter culture and thawing time of raw material. *Journal of Food Science*, 60, 1995, č. 6, s. 1187-1190.
40. MASSON, F. - TALON, R. - MONTEL, M. C.: Histamine and tyramine production by bacteria from meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 32, 1996, s. 199-207.
41. KOUTSOUMANIS, K. - LAMPROPOULOU, K. - NYCHAS, G. J. E.: Biogenic amines and sensory changes associated with the microbial flora of Mediterranean gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) stored aerobically at 0, 8 and 15 °C. *Journal of Food Protection*, 62, 1999, č. 4, s. 398-402.
42. MENDES, R. - GONCALVES, A. - NUNES, M. L.: Changes in free amino acids and biogenic amines during ripening of fresh and frozen sardine. *Journal of Food Biochemistry*, 23, 1999, s. 295-306.
43. MENDES, R.: Changes in biogenic amines of major Portuguese bluefish species during storage at different temperatures. *Journal of Food Biochemistry*, 23, 1999, s. 33-43.
44. BELAJOVÁ, E. - KOLESÁROVÁ, E.: Stanovenie biogénnych amínov vo víne metódou HPLC. *Bulletin potravinárskeho výskumu*, 35, 1996, č. 3, s. 127-134.
45. SHALABY, A. R.: Multidetector, semiquantitative method for determining biogenic amines in food. *Food Chemistry*, 52, 1995, s. 367-372.
46. HALÁSZ, A. - BARÁTH, A. - HOLZAPFEL, H.: The influence of starter culture selection

- on sauerkraut fermentation. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung, 208, 1999, s. 434-438
47. HALÁSZ, A. - BARÁTH, A. - HOLZAPFEL, W. H.: The biogenic amine content of beer, the effects of barley, malting and brewing on amine concentration. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung, 208, 1999, s. 418-423.
48. 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 the Science of Food and Agriculture, 79, 1999, s. 91-94.
49. MOPPER, B. - SCIACCHITANO, J.: Capillary zone electrophoresis of histamine in fish. Journal of AOAC International, 77, 1994, č. 4, s. 881-884.
50. ESTI, M. - VOLPE, G. - MASSIGNAN, L. - COMPAGNON, D. - NOTTE, E. L. - PALESCHI, G.: Determination of amines in fresh and modified biosensors. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 1998, s. 4233-4237.
51. MALE, K. B. - BOUVRETTE, 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. 1012-016.

Do redakcie došlo 26.2.2001.

Biogenic amines - formation, methods of determination and occurrence in food

KOHAJDOVÁ, Z. - KAROVIČOVÁ, J.: Bull. potrav. Výsk., 40, 2001, p. 75-89.

SUMMARY. Biogenic amines are formed by decarboxylation of amino acids. Fermented meat products contain tyramine from 1 mg/100 g to 56 mg/100 g and putrescine from 1 mg/100 g to 19 mg/100 g of the product. The histamine content in wine is approximately 4.15 mg.dm⁻³. Milk contains up to 1 mg.kg⁻¹ and cheeses more than 1 g.kg⁻¹ of biogenic amines. The mostly used method for the determination of biogenic amines is high performance liquid chromatography.

KEYWORDS: biogenic amines; toxicity; analysis