

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ VE ZRAJÍCÍCH SÝRECH

TOMÁŠ KOMPRDA^a, VLASTIMIL DOHNAL^b
a OLGA CWIKOVÁ^a

^a Ústav technologie potravin, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno,
^b Katedra chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Hradec Králové, Rokytanského 62, 500 03 Hradec Králové
komprda@mendelu.cz

Došlo 17.12.13, přijato 16.1.14.

Klíčová slova: tyramin, histamin, polyaminy, kapalinová chromatografie, zrající sýry

Úvod

Biogenní aminy (BA) a polyaminy (PA) vznikají ve zrajících sýrech (obecně fermentovaných potravinách) především bakteriální dekarboxylací příslušných prekurzorových aminokyselin. Kvantitativně a toxikologicky významné BA a PA vyskytující se ve zrajících sýrech lze podle chemické struktury rozdělit na heterocyklické (histamin, tryptamin), aromatické (tyramin, 2-fenylethylamin) a alifatické (putrescin, kadaverin, spermidin, spermin). PA jsou v současnosti klasifikovány jako samostatná skupina z důvodů biochemických (možnost alternativní syntetické dráhy) a toxikologických; kromě spermidinu a sperminu je do této skupiny řazen i jejich prekurzor putrescin (chemicky diamin)¹.

Toxikologický význam tyraminu spočívá v jeho působení jako nepřímého sympatomimetika: vazokonstrikce s důsledkem hypertenze, migrény, krvácení do mozku a srdečního selhání u citlivých jedinců. Klinickými projevy vyššího příjmu histaminu jsou snížení krevního tlaku, astma, záněty spojivek, kopřivka a břišní křeče. PA jsou selektivně přijímány rakovinnými buňkami a mohou tedy usnadňovat růst tumoru. Hodnoty nad 100 mg tyraminu nebo histaminu na kg potravinu je již možno považovat za nebezpečné pro alergiky a osoby konzumující léčiva s funkcí inhibitorů monoaminoxidasy².

Zrající sýry, zvláště ve vysokém stupni zralosti, patří mezi nejrizikovější potraviny pro citlivé skupiny konzumentů. Cílem práce tedy bylo navrhnout expeditivní metodu stanovení BA/PA v tomto typu výrobků a ověřit ji na reálných vzorcích eidamského sýra.

Experimentální část

Použitý materiál

V experimentu byl analyzován zrající sýr eidamského typu od dvou různých výrobců (A a B), vyrobený za alternativního použití dvou různých startovacích kultur (M a N) ve dvou různých tučnostech (30 a 45 %; obsah tuku v čerstvé hmotě sýra). Startovací kultura M sestávala ze směsi kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus helveticus*; kultura N se skládala ze směsi kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.

Po 20 týdnech zrání byly od každé varianty (kombinace výrobce-startér-tučnost) náhodně odebrány tři bloky sýra pro analýzu BA/PA.

Příprava vzorku

Každý blok sýra byl uprostřed podélně rozříznut a rozdělen na okrajovou část (O) o síle 3 cm a zbylou vnitřní část (V). Obě části byly analyzovány zvlášť.

Přístrojové vybavení

Pro stanovení BA a PA ve vzorcích zrajících sýrů byl použit kapalinový chromatograf HP 1100 (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) sestávající z kvartérní pumpy (model G1311A), vakuového odplyňovače (model G1322A), automatického dávkovače (model G1313A) a fotometrického UV/VIS detektoru s nastavitelnou vlnovou délkou (model G1314A).

BA a PA byly separovány na koloně Zorbax Eclipse XDB C18 (150 mm × 4,6 mm, velikost částic 5 μm; Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) s předkolonou Meta Guard ODS-2 (30 mm × 4,6 mm, velikost částic 5 μm; MetaChem Technologies, Torrance, CA, USA).

Pro přípravu vzorků k analýze byl použit desintegrátor Heidolph Diax 900 (Heidolph Instruments, Schwabach, Německo), odstředivka Hettich Universal 32R (Hettich, Tuttingen, Německo), minitřepačka MS2 IKA (IKA Werke GmbH, Staufen, Německo), termostat EVATERM s kapacitou 25 lahvíček na vzorky o objemu 4 ml (Labicom, Olomouc, Česká republika), nylonový membránový filtr (13 mm, 0,45 μm; Chromatography Research Supplies, Addison, TX, USA); součástí laboratorního vybavení byla i bomba se stlačeným dusíkem (SIAD, a.s., Braňany, Česká republika).

Chemikálie

Vnitřní standard byl připraven rozpuštěním 100 mg 1,7-diaminoheptanu (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) ve 100 ml deionizované vody (koncentrace 1 mg ml⁻¹).

Zásobní roztok standardů BA/PA byl připraven jako směsný standard všech aminů určených k analýze (tryptamin, 2-fenylethylamin, putrescin, kadaverin, histamin, tyramin, spermidin, spermin) rozpuštěním 100 mg každého z aminů (ve formě hydrochloridů; Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) ve 100 ml deionizované vody (koncentrace standardu každého z aminů 1 mg ml⁻¹). Pracovní roztok směsného standardu BA/PA byl získán smísením 0,5 ml zásobního roztoku standardů BA/PA s 0,5 ml roztoku vnitřního standardu a následnou úpravou na objem 50 ml. Konečná koncentrace každého aminu byla 10 µg ml⁻¹.

Jako extrakční činidlo byla použita 0,1 M HCl připravená rozpuštěním 3,5 ml 35% HCl v deionizované vodě a doplněním na 1 litr. Derivatizační činidlo bylo připraveno rozpuštěním 5 mg dansylchloridu (DCI; 1-dimethylaminonafalen-5-sulfonylchlorid) v 1 ml propan-2-onu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Dále byly použity: nasycený roztok Na₂CO₃ (pH upraveno hydroxidem sodným na hodnotu 11,2); 10 mM roztok amoniaku (připravený rozpuštěním 1,48 ml 26% roztoku amoniaku v 1 dm³ deionizované vody); diethylether (p.a., Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika); acetonitril (ACN; pro gradientovou HPLC; Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika).

Extrakce

Vzorek sýra byl nastrohán na velikost částic cca 3 mm a 10 g bylo naváženo do plastové centrifugační zkuševky o objemu 85 ml. Po přidání 20 ml 0,1 M HCl a 0,5 ml roztoku vnitřního standardu byl vzorek 2 min extrahován za pomoci desintegrátoru. Suspenze byla odstředována při 755 g po dobu 10 min při teplotě 4 °C za účelem oddělení pevného podílu a tuku. Supernatant byl zfiltrován papírovým filtrem (Filtrak, č. 390) a pevný podíl byl opětovně extrahován stejným postupem. Spojené extrakty byly doplněny deionizovanou vodou do 50 ml a zfiltrovány přes nylonový membránový filtr.

Derivatizace

1 ml extraktu (standardu) byl smísen s 0,5 ml nasyceného roztoku Na₂CO₃ (pH upraveno na 11,2) v lahvičce na vzorky o objemu 4 ml, po 1 min byl přidán 1 ml derivatizačního činidla a směs byla protřepávána na laboratorní mini-třepačce 1 min. Poté byla lahvička na vzorky vložena do termostatu.

Derivatizace probíhala v temnu po dobu 1 hodiny při 40 °C při občasném protřepání v patnáctiminutových intervalech. Po ukončení derivatizační reakce byla směs ponechána v klidu 15 min, bylo přidáno 250 µl 10 mM roztoku amoniaku za účelem odstranění nezreagovaného DCI, směs byla třepána 1 min a poté ponechána v klidu 30 min.

Deriváty BA/PA byly extrahovány diethyletherem (3 × 1 ml). Organická fáze byla odpařena do sucha v proudu dusíku, pevný zbytek byl rozpuštěn v 0,5 ml acetonitrilu. Roztok byl filtrován přes nylonový membránový filtr 0,45 µm a poměrná část byla nadávkována na chromatografickou kolonu.

Separace

Jednotlivé BA a PA byly separovány gradientovou elucí H₂O/ACN (doba eluce 23 min: H₂O 35 % – 0 %; ACN 65 % – 100 %) na koloně Zorbax Eclipse XDB C18 (150 mm × 4,6 mm, velikost částic 5 µm) s předkolonou Meta Guard ODS-2 (30 mm × 4,6 mm, velikost částic 5 µm) při průtoku 0,8 ml min⁻¹.

Separované aminy byly detegovány pomocí fotometrického UV/VIS detektoru při 254 nm a identifikovány porovnáním retenčních časů s retenčními časy standardů jednotlivých BA/PA (příklad chromatogramu standardu BA/PA a reálného vzorku sýra je znázorněn na obr. 1). Koncentrace jednotlivých BA/PA ve vzorcích sýra byla vyjádřena v mg kg⁻¹ původní (čerstvé) hmoty sýra.

Zpracování výsledků

Koncentrace aminů ve vzorku (c_x ; v mg kg⁻¹) byla korigována podle koncentrace vnitřního standardu na základě rovnice: $c_x = c_{IS} \times A_x/A_{IS} \times RF_x$, kde c_{IS} je koncentrace vnitřního standardu (v mg kg⁻¹), A_{IS} je plocha píku vnitřního standardu (v jednotkách plochy), A_x je plocha píku daného BA/PA (v jednotkách plochy) a RF_x je faktor odezvy aminu: $RF_x = c_{xr}/c_{ISr} \times A_{ISr}/A_{xr}$, kde c_{xr} je koncentrace aminu v referenčním vzorku (v mg kg⁻¹), c_{ISr} je koncentrace vnitřního standardu přidaného k referenčnímu vzorku (v mg kg⁻¹), A_{ISr} je plocha píku vnitřního standardu v referenčním vzorku (v jednotkách plochy) a A_{xr} je plocha píku aminu v referenčním vzorku (v jednotkách plochy).

Opakovatelnost analytického postupu (vyjádřená jako relativní standardní odchylka, RSD) byla vyhodnocena na základě 10× opakovaného nástřiku směsi standardů BA/PA po derivatizaci a 5× opakovaného nástřiku extraktu vybraného vzorku sýra s nízkým obsahem BA/PA po derivatizaci.

Návratnost byla vyhodnocena na základě opakovaného (5×) měření BA/PA ve vybraném vzorku sýra s přidavkem směsi standardů BA/PA na hladině koncentrace 2 mg kg⁻¹. Návratnost (R) byla vypočtena jako: % R = [(CF – CU)/CA] × 100, kde CU je koncentrace aminu v původním vzorku, CA je koncentrace přidaného analytu a CF je koncentrace aminu ve vzorku s přidaným analytem (všechny koncentrace jsou v mg kg⁻¹).

Limit detekce (LOD) byl vypočten jako poměr signál/pozadí = 3 při použití roztoku standardů BA/PA.

Statistické vyhodnocení

Obsah aminů v každém vzorku byl měřen duplicitně. Průměry z těchto dvou měření, reprezentující danou část

Tabulka I
Kontrola kvality analytické metody

Amin	Validační parametr		
	limit detekce ^a [mg kg ⁻¹]	opakovatelnost ^b [RSD, %]	návratnost ^c [%]
Histamin	0,0014	4,9	96
Tyramin	0,0031	4,2	92
Tryptamin	0,0018	2,3	93
2-Fenyl-ethylamin	0,0033	5,2	90
Kadaverin	0,0014	2,9	89
Putrescin	0,0015	3,6	91
Spermidin	0,0008	2,6	86
Spermin	0,0009	5,7	84

^a Poměr signál/pozadí = 3 (roztok standardů biogenních aminů a polyaminů), ^b vypočtena jako relativní standardní odchylka (RSD) měření analytické koncentrace aminů při 10× opakovaném nástřiku směsi standardů BA/PA po derivatizaci a 5× opakovaném nástřiku extraktu vybraného vzorku sýra s nízkým obsahem BA/PA, ^c vypočtena na základě opakovaného měření (6×) analytické koncentrace aminů ve vybraném vzorku sýra s přidávkem známého množství standardů BA a PA

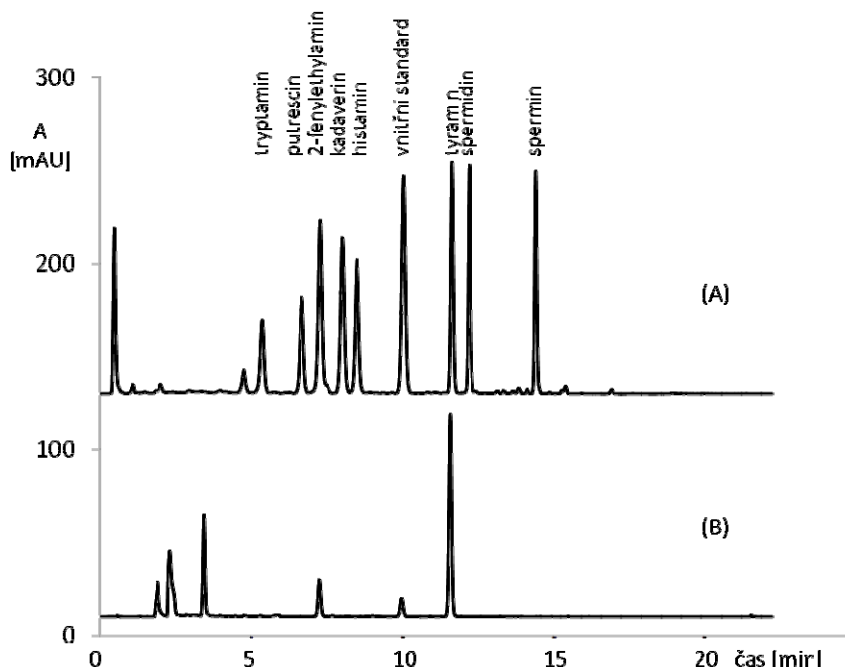
bloku sýra, byly použity pro statistické vyhodnocení. Programem Statistica verze 10 (StatSoft Inc., Tulsa, USA) byly vyhodnoceny rozdíly v obsahu aminů mezi kombinacemi výrobce-startovací kultura-tučnost-část sýra metodou jednoduchého třídění analýzy rozptylu, včetně Tukeyova *post-hoc* testu³. Podíl jednotlivých faktorů (výrobce, startovací kultura, tučnost, část sýra) na celkové variabilitě obsahu aminů v sýru byl vypočten pomocí obecného lineárního modelu (ANOVA hlavních efektů).

Výsledky a diskuse

Hodnoty limitu detekce, opakovatelnosti a návratnosti jsou pro jednotlivé BA a PA uvedeny v tab. I. Pro kvantitativně a toxikologicky významné aminy (tyramin, histamin, putrescin) se hodnoty uvedené v tab. I pohybují zhruba uprostřed škály údajů publikovaných pro zrající sýry. Konkrétně hodnoty RSD pro histamin se obvykle zjišťují v rozsahu 1,1 (cit.⁴) až 9,4 (cit.⁵), pro tyramin 1,8 (cit.⁴) až 5,0 (cit.⁶) a pro putrescin 1,3 (cit.⁴) až 6,6 (cit.⁵).

Hodnoty návratnosti zjištěné v předkládané studii obdobně nevybočují z rozsahu publikovaných hodnot pro histamin 67 (cit.⁷) až 98 (cit.⁸), tyramin 59 (cit.⁷) až 93 (cit.⁴) a putrescin 65 (cit.⁶) až 98 (cit.⁹). Stejně konstatování platí i pro ostatní testované aminy.

Typický chromatogram směšného standardu BA/PA a reálného vzorku jednoho z testovaných eidamských sýrů

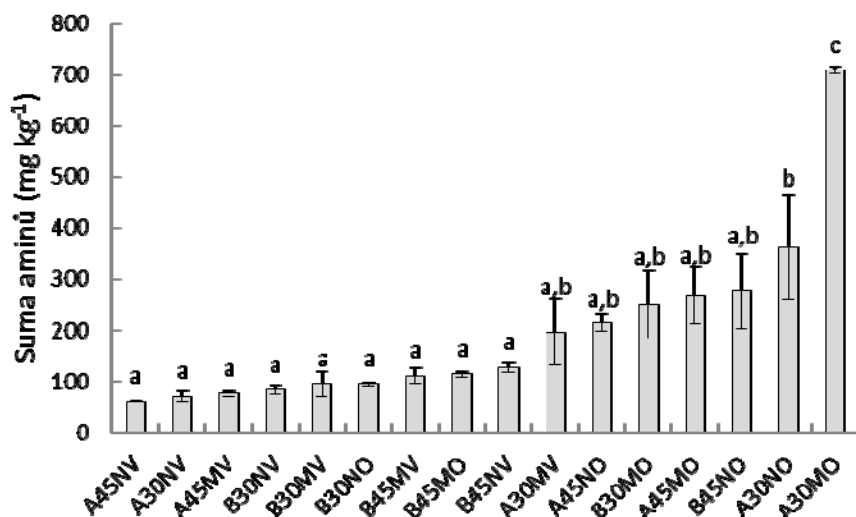


Obr. 1. Separace biogenních aminů a polyaminů gradientovou elucí H₂O/acetonitril na koloně Zorbax Eclipse XDB C18 (150 mm × 4,6 mm, velikost částic 5 μm) při průtoku 0,8 ml min⁻¹ za použití fotometrického UV/VIS detektoru při 254 nm; (A) směšný standard; (B) typický vzorek testovaného eidamského sýra

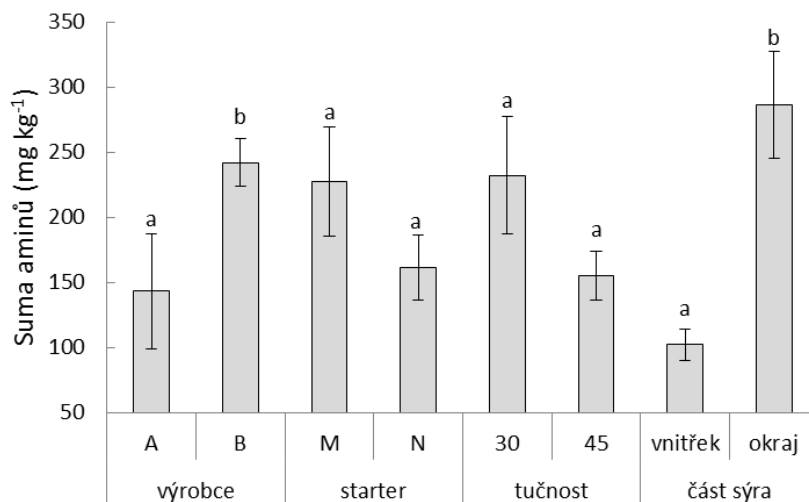
(výrobce A, startovací kultura M, tučnost 30 %, vnitřek sýra) je uveden na obr. 1.

Jak je patrné z obr. 2, obsah sumy všech aminů (BA + PA) v jednotlivých vzorcích sýra se pohyboval ve značném rozsahu, a to od 60 do 709 mg kg⁻¹. Hodnotě mediánu

(121 mg kg⁻¹) se nejvíce blížila vnitřní část vzorku sýra výrobce B o tučnosti 45 % vyrobeného pomocí startovací kultury N (B45NV). Uvedená čísla se neodchyľují od obsahu aminů naměřených v sýrech eidamského⁶ či ementálského¹⁰ typu; poněkud vyšší hodnoty (rozsah 180 až



Obr. 2. Obsah celkových aminů (suma biogenních aminů¹ + polyaminů²) ve vzorcích eidamského sýra po 20 týdnech zrání (průměr ± střední chyba průměru; $n = 3$); ¹ histamin + tyramin + tryptamin + kadaverin; ² putrescin + spermidin + spermin; A, B – výrobce; N, M – startovací kultury (M: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus helveticus*; N: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*); 30, 45 – tučnost sýra; O – okrajová vrstva 3 cm, V – vnitřek sýra; a, b, c – průměry označené různými písmeny se liší při $P < 0,05$ (jednostupňové třídění analýzy rozptylu s následným Tukeyovým testem)



Obr. 3. Vliv výrobce, startovací kultury, tučnosti a části sýra na celkový obsah aminů (suma biogenních aminů¹ + polyaminů²) ve vzorcích eidamského sýra po 20 týdnech zrání (průměr ± střední chyba průměru; vliv daného ukazatele hodnocen vždy bez ohledu na ostatní ukazatele; $n = 24$); ¹ histamin + tyramin + tryptamin + kadaverin; ² putrescin + spermidin + spermin; M – *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus helveticus*; N – *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*); okraj = 3 cm; a, b – průměry označené různými písmeny se v rámci daného ukazatele liší při $P < 0,05$ (jednostupňové třídění analýzy rozptylu s následným Tukeyovým testem)

818 mg kg⁻¹) jsou uváděny pro sýr typu Gouda¹¹.

Pro bližší objasnění vlivu jednotlivých testovaných faktorů (výrobce, startovací kultura, tučnost, část sýra) na obsah BA/PA v předkládané studii byl vypočten průměrný obsah sumy všech aminů (BA+PA) ve vzorcích sýra pouze při zohlednění daného faktoru bez ohledu na ostatní faktory (např. průměrný obsah aminů ve všech sýrech vyrobených pomocí startovací kultury M bez ohledu na to, který producent je vyrobil a bez ohledu na tučnost sýra a část sýra, byl srovnán s průměrným obsahem aminů ve všech sýrech vyrobených za použití startovací kultury N).

Výsledky jsou uvedeny na obr. 3. Startovací kultura N měla tendenci ($P > 0,05$) snižovat obsah aminů ve srovnání s kulturou M; obdobně se projevovала vyšší tučnost sýra ($P > 0,05$). Naopak rozdíly mezi výrobci byly průkazné ($P < 0,05$). Největší rozdíly v obsahu aminů byly zaznamenány v případě jejich distribuce v různých částech sýra: obsah sumy aminů byl ve vnější třicentimetrové vrstvě více než dvojnásobný ve srovnání s vnitřkem sýra ($P < 0,05$). Tento nálezní potvrzuje obdobné údaje ohledně zrajících sýrů eidamského⁶ i ementálského typu¹⁰.

V procentech vyjádřený podíl jednotlivých faktorů testovaných v předkládaném experimentu na celkovou variabilitu obsahu aminů v sýru, kvantifikovaný pomocí obecného lineárního modelu (ANOVA hlavních efektů), byl ve vzestupném pořadí následující: startovací kultura (8 %, $P = 0,090$) < tučnost sýra (11 %, $P = 0,049$) < výrobce (19 %, $P = 0,011$) < část sýra (62 %, $P = 0,00001$).

Rozhodující vliv tedy měla část sýra: rizikovi konzumentů (alergici, pacienti konzumující léčiva s aktivitou inhibitorů monoaminoxidasy) by se měli vyhnout konzumaci sýrů ve vyšším stupni zralosti nebo alespoň u tohoto typu sýra před konzumací odstranit svrchní vrstvu o síle 3 cm.

Výrazný vliv výrobce ($P < 0,05$) je poukazem na nutnost dodržovat při produkci sýra přísná hygienická pravidla, především zabránit mikrobiální kontaminaci vstupní suroviny i příslušných technologických zařízení.

Závěr

Stanovení biogenních aminů a polyaminů metodou vysokotlaké kapalinové chromatografie po extrakci 0,1 M HCl a předkolumnové derivatizaci dansylchloridem bylo standardizováno pro použití v matici zrajících sýrů, které jsou z hlediska sledovaných analytů jednou z nejrizikovějších potravin. Zjištěné hodnoty limitu detekce (0,0008 mg kg⁻¹, spermidin – 0,0033 mg kg⁻¹, 2-fenylethylamin) i návratnosti (84 %, spermin – 96 %, histamin) prokázaly vhodnost navržené metody pro stanovení uvedených toxikologicky zajímavých látek v daném typu potravin. Z aplikace metody pro analýzu širokého spektra sýrů eidamského typu s různým obsahem tuku, od různých výrobců, resp. při použití různých startovacích mikrobiálních kultur vyplynuly následující závěry: 1) Cel-

kový obsah sumy všech aminů v tomto typu výrobku se může pohybovat v širokém rozmezí od desítek po stovky mg kg⁻¹ a může nabývat hodnot, které již nejsou bezpečné pro rizikové skupiny konzumentů. 2) Vnější část sýra je v uvedeném kontextu podstatně nebezpečnější než část vnitřní, rizikovým spotřebitelům lze doporučit odstranění vnější třicentimetrové vrstvy vyzrálého sýra před jeho konzumací. 3) Důsledným dodržováním přísných hygienických zásad může daný výrobce podstatně omezit tvorbu biogenních aminů ve svém produktu.

LITERATURA

1. Komprda T., Rejchrtová E., Sládková P., Zemánek L., Vymlátílová L.: *Dairy Sci. Technol.* 92, 367 (2012).
2. McCabbe-Sellers B. J., Staggs C. G., Bogle M. L.: *J. Food Compos. Anal.* 19, S58 (2006).
3. Anděl J.: *Základy matematické statistiky*. Matfyzpress, Praha 2005.
4. Novella-Rodríques S., Veciana-Nogués M. T., Vidal-Carou M. C.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 5117 (2000).
5. Standara S., Veselá M., Drdák M.: *Nahrung* 44, 28 (2000).
6. Komprda T., Smělá D., Novická K., Kalhotka L., Šustová K., Pechová P.: *Food Chem.* 102, 129 (2007).
7. Moret S., Conte L. S.: *J. Chromatogr. A* 729, 363 (1996).
8. Jin-feng P., Ke-teng F., Dong-hua X., Bin D., Ju-Yi Y., Xiao-mei C., Ying Z., Jing-fu L.: *J. Chromatogr. A*, 1209, 70 (2008).
9. Innocente N., Biasutti A., Padovese A., Moret S.: *Food Chem.* 101, 1285 (2007).
10. Petridis K. D., Steihart H.: *Dtsch. Lebensmitt. Rundsch.* 92, 114 (1996).
11. Leuschner R. G. K., Kurihara R., Hammes W. P.: *Int. J. Food Microbiol.* 44, 15 (1998).

T. Komprda^a, V. Dohnal^b, and O. Cwiková^a
^aDepartment of Food Technology, Mendel University, Brno; ^bDepartment of Chemistry, University of Hradec Králové): **Chromatographic Determination of Biogenic Amines and Polyamines in Ripening Cheeses**

The objective of the study was to standardize determination of biogenic amines (BA) and polyamines (PA) in ripening cheeses by LC after their extraction with aqueous HCl and derivatization with dansyl chloride, and to verify the method using the cheeses with expected high contents of BA and PA. The central and edge parts of twenty-week-old Edam cheeses from two sources, with two fat contents and using two starter cultures were analyzed. The limits of detection and recoveries ranged from 0.008 to 0.0013 mg kg⁻¹ and from 84 % to 96 %, respectively. Total amines (BA+PA) in the cheeses ranged from 60 to 709 mg kg⁻¹.