

## ***Z výzkumu a praxe***

### **STANOVENÍ VYBRANÝCH BIOGENNÍCH AMINŮ V PIVU**

Ing. MARTIN KRÍŽEK, CSc., Mgr. VĚRA HLAVATÁ  
Jihočeská univerzita, zemědělská fakulta, Č. Budějovice

**Klíčová slova:** *biogenní aminy, pivo, stanovení*

#### **ÚVOD**

Biogenní aminy v poživatinách představují jedny z nežádoucích zplodin konečného rozkladu bílkovin. Proces jejich vzniku je katalyzován zpravidla mikrobiálními enzymy a postupuje od bílkovin přes peptidy k aminokyselinám, jejichž dekarboxylace vede ke vzniku aminů. Při tomto ději vzniká např. z ornithinu či argininu putrescin, z lysinu kadaverin, z histidinu histamin, z tyrosinu tyramin.

V odborné literatuře nacházíme v zásadě dva důvody pro sledování biogenních aminů v poživatinách. Hlavním z nich je toxicita těchto nízkomolekulárních organických látek, dalším pak snaha o nalezení souvislosti mezi obsahem aminů v potravinách a jejich jakostí.

Sledování aminů může být zdrojem cenné informace v takových potravinářských provozech, v nichž stěžejní roli hraje činnost mikroorganismů, jako je např. výroba kysaného zelí, vína či piva.

Biogenní aminy jsou vasoaktivní látky. Histamin vyvolává rozšíření cév a pokles krevního tlaku. Obvyklým příznakem otravy histaminem je bušení srdce, žaludeční nevolnost, silná bolest hlavy a dušení. Do jisté míry obdobné účinky na lidský organismus vykazuje tyramin, typické jsou migrénové stavy. Na rozdíl od histaminu krevní tlak vzrůstá.

U putrescinu a kadaverinu je více než vlastní

toxicita závažné synergické působení, umocňující farmakologický efekt nebezpečnějšího histaminu a tyraminu. Podobný vliv má též alkohol v alkoholických nápojích, kde se již za rizikové považují koncentrace histaminu přesahující 2 mg/l [1]. Intoxikacemi biogenními aminy jsou ohroženy zejména osoby léčené některými antidepresivy potlačujícími činnost enzymu monoaminooxidasy (MAO) či diaminooxidasy.

Po požití i malého množství fermentovaného nápoje se u pacientů s psychiatrickými onemocněními, užívajících antidepresivní léky, které obsahují monoaminooxidase inhibitor, mohou projevit známé akutní i chronické projevy otravy. Synergismus těchto léčiv, ethanolu a biogenních aminů představuje pro konzumenta zdravotní riziko [2]. Byla popsána [3] silná reakce pacienta léčeného MAO inhibitorem, který pil bezalkoholové irské pivo. Vzhledem k tomu, že obsah histaminu a tyraminu je v těchto pivech obdobný jako v běžném alkoholickém pivu, doporučuje se v této práci zařadit nealkoholické pivo mezi poživatiny zakázané konzumovat nemocným, léčeným těmito preparáty.

#### **STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ V POŽIVATINÁCH**

Potřeba vypracování vhodné metodiky pro stanovení biogenních aminů je patrna v různých



oborech, ale vzhledem k rozdílným vlastnostem přírodních materiálů lze jen těžko nalézt postup univerzální. Obsah biogenních aminů ve vzorcích je obvykle malý a navíc srovnatelný s koncentracemi složek chemicky podobných, jež zpravidla působí rušivě. Citlivé stanovení se zpravidla neobejde bez selektivní separace od příbuzných látek nesoucích často též aminovou funkční skupinu a bez vhodně volené derivatizace.

Pro stanovení biogenních aminů v poživatinách používá většina autorů tenkovrstvou chromatografii (TLC) [4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12], plynovou chromatografii (GC) [7, 13, 14, 15, 16], chromatografii iontových párů [17, 18, 19], a zejména pak vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) v nejrůznějších úpravách.

Tenkovrstvá chromatografie slouží pro svou jednoduchost a instrumentální nenáročnost hlavně pro rychlé orientační stanovení aminů. Dělení volných aminů plynovou chromatografií na náplňových kolonách bývá do značné míry komplikováno neúnosným chvostováním píků a z tohoto důvodu se i zde musí zpravidla přikročit k derivatizaci. Jako perspektivní se ukazuje dělení aminů na kapilárních kolonách [13].

Většina pracovišť používá dnes ke stanovení aminů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. Postupy stanovení biogenních aminů v poživatinách touto technikou mají některé společné rysy.

Po homogenizaci vzorku následuje extrakce aminů obvykle kyselinou chloristou či trichloroctovou. Po filtraci resp. centrifugaci je alikvotní podíl kyselého extraktu zalkalizován, volné aminy pak v tomto prostředí reagují s derivatizačním činidlem. Vzniklé deriváty jsou extrahovány do vhodného organického rozpouštědla a děleny na reverzní fázi HPLC. Pro derivatizaci aminů se nejčastěji používá tzv. dansylchlorid (5-dimethylaminonafthalen-1-sulfonylchlorid) [20, 21, 22]. Dansyl-deriváty lze detekovat jak UV/VIS detektorem, tak v případě požadavku vyšší citlivosti stanovení fluorimetricky [23]. Jistou nevýhodou těchto derivátů je jejich nižší stabilita a citlivost na světlo. V omezeném rozsahu se k derivatizacím využívá též p-toluensulfonylchlorid [24].

Dalším vhodným činidlem pro derivatizaci je benzoylchlorid, který byl použit pro stanovení aminů v tělních tekutinách [25], rostlinných tkáních [4] a silážích [26]. Benzamidy jsou na světle stabilní a lze je skladovat při nízké teplotě ( $-18^{\circ}\text{C}$ ) po několik měsíců [4].

Před reakcí s benzoylchloridem je nezbytné vzorek zalkalizovat. Při  $\text{pH} = 9-12$  proběhne Schotten-Baumannova reakce, při níž vznikají N-substituované benzamidy. Zbytek derivatizačního činidla přejde na benzoan (sodný). Aby reakce proběhla kvantitativně, doporučuje se provést ji v prostředí ultrazvukové lázně [26]. Následuje extrakce derivátů do diethyletheru. Výhodou extrak-

ce, kromě zakoncentrování stanovených látek, je i jejich oddělení od doprovodných rušivých složek, zejména aminokyselin. Odparek extraktu se obvykle rozpouští v mobilní fázi, kterou nejčastěji tvoří směs methanolu a vody či acetonitrilu a vody. Následuje dělení derivátů na reverzní fázi HPLC, avšak je popsáno i semikvantitativní dělení benzamidů na TLC [10].

## STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ V PIVU

Ke stanovení aminů v pivu lze použít kromě chromatografie též spektrofotometrické stanovení těchto látek po extrakci do organického rozpouštědla, reextrakci do HCl a derivatizaci o-ftalaldehydem [27]. Mnohem selektivnější je však separace aminů metodou HPLC iontových párů, zakončená tzv. „post column“ derivatizací o-ftalaldehydem [28]. Metoda byla s úspěchem využita nejen pro vzorky piva, ale též pro slad a chmel. Mez stanovitelnosti biogenních aminů touto technikou se pohybuje v rozmezí od 0,40 do 0,50 mg/l.

Pro vzorky piva se osvědčila též klasická HPLC separace dansyl-derivátů na reverzní fázi [29].

Na základě dřívějších zkušeností se vzorky siláží jsme upravili metodu založenou na HPLC separaci N-substituovaných benzamidů [26] tak, aby vyhovovala vzorkům piva.

## MATERIÁL A METODY

### Chemikálie

Putrescin dihydrochlorid pur., kadaverin dihydrochlorid pur., histamin dihydrochlorid pur., tyramin hydrochlorid pur., tryptamin hydrochlorid pur., 1,6-diaminohexan pur., 1,7-diaminoheptan pur. (vše Fluka AG, Buchs, Švýcarsko). NaOH p. a., NaCl p. a., methanol p. a., diethylether p. a., benzoylchlorid p. a.,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  č.,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  č. (vše Lachema, Neratovice),  $\text{HClO}_4$  p. a. (Apol-da, Německo).

### Příprava tlumivého roztoku

12,50 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 32,88 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  se za horka rozpustí a roztok se doplní do 50 ml destilovanou vodou. Vzhledem k vysokému stupni nasycení roztok snadno krystalizuje, a proto je občas nutno před použitím vyloučené krystaly znovu rozpustit mírným zahřátím ve vodní lázni.

### Přístroje

Vysokotlaký lineární dávkovač HPP 4001 (Lab. přístroje, n. p., Praha), UV/VIS detektor LCD 2563 (Lab. přístroje, n. p., Praha), Chromatografický integrátor Apex (Data Apex, s. s. r. o., ČR), Kolona 150×3 mm SGX-C<sub>18</sub>, 5 μm (Tessek, s. s. r. o., Praha), Ultrazvuková lázeň UC AJ 1 (Tesla, Vráble), Třepačka na mikrozkuřavky ML-1 (PREMED, Polsko)



### Stanovení putrescinu, kadaverinu a tryptaminu

Ke 40 ml vzorku piva odplyněného pod vakuem se přidá 0,25 ml vnitřního standardu 1,6-diaminohexanu (2000 mg/l), 2 ml NaOH (9,8 mol/l), 0,3 ml benzoylchloridu. Po 2,5 minuty intenzivního třepání v zábrusové zkumavce je roztok vystaven účinkům ultrazvuku. Dále je reakční směs nasycena 16 g (nadbytek) NaCl, následuje extrakce benzamidů 10 ml diethyletheru. 1 ml etherového extraktu se odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v 300  $\mu$ l mobilní fáze pro HPLC (63% [v/v] methanol ve vodě). Pro HPLC se nastříkuje 10  $\mu$ l roztoku benzamidů. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min. Vlnová délka detektoru je nastavena na 256 nm.

### Stanovení histaminu a tyraminu

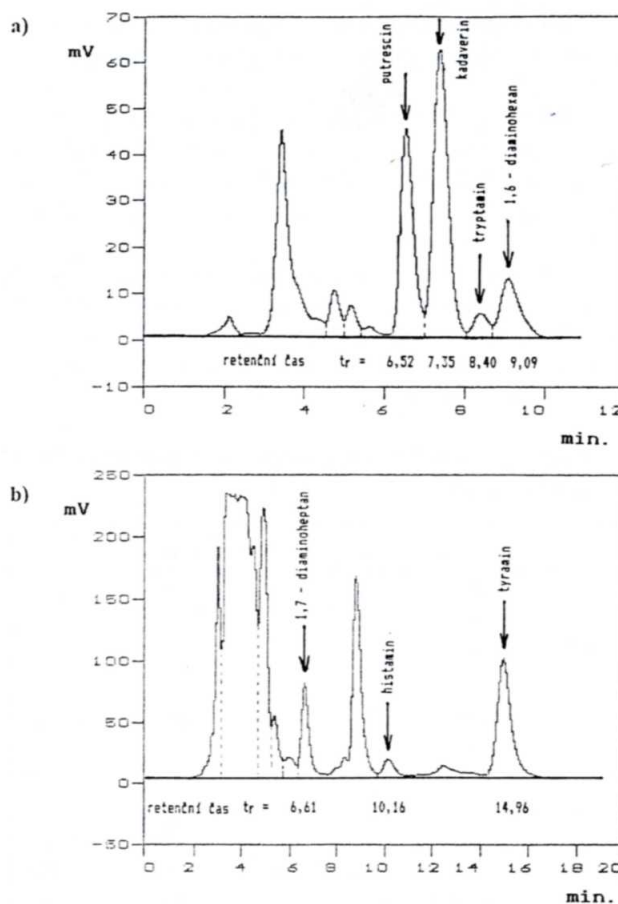
K 35 ml vzorku piva odplyněného pod vakuem se přidá 0,25 ml vnitřního standardu 1,7-heptandiaminu (2 000 mg/l), 2 ml NaOH (9,8 mol/l), 0,3 ml benzoylchloridu. Po 2,5 minuty intenzivního třepání je směs vystavena účinkům ultrazvuku. Dále se směs nasatí 16 g NaCl a přidá se množství koncentrované  $\text{HClO}_4$ , předem zjištěné postupem, uvedeným dále. Poté se k reakční směsi přidají 2 ml tlumivého roztoku (příprava viz výše). Následuje extrakce benzamidů diethyletherem. 5 ml etherového extraktu se odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v 400  $\mu$ l mobilní fáze pro HPLC (71% [v/v] methanol ve vodě). Separační kolona a ostatní podmínky separace jsou stejné jako při stanovení putrescinu a kadaverinu. Záznam analýzy je patrný z obr. 1.

### DISKUSE

Při vypracování tohoto analytického postupu pro vzorky piva bylo nutno vyhledat vhodný poměr mezi objemem vzorku a množstvím přidávaných činidel vzhledem k obsahům jednotlivých aminů v pivu.

Při ověřování metodiky se ukázalo, že výtěžek extrakce derivatizovaného tyraminu souvisí s pH roztoku před extrakcí. Proto bylo nutno upravit pH roztoku přidávkou koncentrované  $\text{HClO}_4$  jednotně na hodnotu pH = 6,0 a dále přidat tlumivý roztok. Množství přidávané  $\text{HClO}_4$  bylo zjištěno titrací zalkalizovaného vzorku piva (po reakci s benzoylchloridem) do hodnoty pH = 6,0. Množství  $\text{HClO}_4$  souvisí tedy zejména s koncentrací NaOH a před sériovými analýzami je nutno jej zjistit.

Při dělení derivatizovaných aminů na koloně s reverzní fází při použití isokratické eluce nebylo možno stanovit koncentrace všech aminů v jediném nástřiku. Při pH = 6 nezbytném pro kvantitativní extrakci derivatizovaného tyraminu, se extrahují též některé složky vzorku, které se eluují současně s derivatizovaným putrescinem a ruší jeho stanovení. V isokratickém režimu separace by pro



Obr. 1 Chromatografický záznam analýzy piva DIA při eluci: a) 63,5 %, b) 71,0 % (v/v) roztokem methanolu ve vodě

dokonalé rozdělení bylo nutno výrazně snížit koncentraci methanolu v mobilní fázi, doba analýzy by se však neúnosně prodloužila a citlivost stanovení histaminu a tyraminu by značně poklesla.

Z těchto důvodů musel být každý vzorek piva derivatizován dvakrát. V jednom objemu, s regulovaným pH extrakce, byl stanoven histamin a tyramin, ve druhém pak putrescin, kadaverin a tryptamin. Jako vnitřní standard byl při stanovení histaminu a tyraminu použit 1,7-diaminohexan a při stanovení putrescinu, kadaverinu a tryptaminu 1,6-diaminohexan.

Analýzy byly vyhodnoceny metodou kalibračních křivek připravených pro jednotlivé aminy ze standardních roztoků v koncentračním rozmezí 5–25 mg/l.

Kalibrační křivky byly sestaveny jako závislost poměru plochy píku aminu k ploše píku vnitřního standardu na poměru koncentrace aminu ke koncentraci vnitřního standardu.

Korelační koeficienty ( $r$ ) vypočtené z těchto závislostí byly pro histamin — 0,9987, tyramin — 0,9997, tryptamin — 0,9973, putrescin — 0,9980 a kadaverin — 0,9979.

Při vyhodnocení kalibračních křivek s ohledem na plochu nejmenšího detekovatelného píku byla zjištěna mez detekce jednotlivých aminů. Tato



hodnota byla pro všechny sledované aminy prakticky shodná a činila v průměru 0,3 mg aminu na litr vzorku.

Hodnota výtěžku extrakce, zjištěná jako průměr pěti paralelních analýz vzorku piva se standardním přidavkem aminů činila pro: putrescin 95,4 %, kadaverin 89,5 %, tryptamin 101,8 %, histamin 88,7 % a tyramin 93,2 %.

Z jedné lahve piva bylo dále provedeno sedm paralelních analýz s cílem zjistit chybu stanovení aminů popsanou metodou (*tab. 1*). Histamin a tyramin byl stanoven v pivu DIA, ostatní aminy ve světlém 10% pivu.

*Tabulka 1. Statistické vyhodnocení sedmi paralelních analýz aminů v pivu (mg/l)*

č.	Histamin	Tyramin	Tryptamin	Putrescin	Kadaverin
1.	5,63	24,4	1,66	11,5	35,9
2.	5,11	23,2	1,80	10,5	35,9
3.	5,74	22,2	1,46	9,06	34,1
4.	5,71	22,5	1,40	9,38	34,6
5.	5,91	19,7	1,27	9,04	35,8
6.	6,75	21,1	1,51	11,0	34,0
7.	6,09	17,2	1,48	11,3	36,2
$\bar{x}$	5,85	21,5	1,51	10,2	35,2
$x_{\min}$	5,11	17,2	1,27	9,04	34,0
$x_{\max}$	6,75	24,4	1,80	11,5	36,2
$s_x$	0,50	2,40	0,17	1,08	0,96
$S_r$ el (%)	8,54	11,2	11,4	10,5	2,74

## ZÁVĚR

Metoda je rychlá, dostatečně citlivá a vyznačuje se dobrou opakovatelností stanovení. Postup je vypracován pro jednoduchou isokratickou konfiguraci HPLC, použití gradientové eluce může stanovení ještě zefektivnit.

## LITERATURA

- [1] DAVÍDEK, T.—DAVÍDEK, J.: Biogenic amines. In: Davidek, J. (Ed.): Natural toxic compounds of foods. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1995, s. 108—123.
- [2] STRATTON, J. E.—HUTKINS, R. W.—TAYLOR, S. L.: J. Food Protection, **54**, 6, 1991, s. 460.
- [3] MURRAY, J. A.—WALKER, J. F.—DOYLE, J. S.: Lancet I (8595), 1988, s. 1167.
- [4] FLORES, H. E.—GALSTON, A. W.: Plant. Phys., **69**, 1982, s. 701.
- [5] HASHIMOTO, T.—YUKIMUNE, Y.—YAMADA, Y.: Planta, **178**, 1989, s. 131.
- [6] KREMMER, T.—HOLCZINGER, L.—BOLDIZSAR, M.: J. Chromatogr., **286**, 1984, s. 371.
- [7] SLEMR, J.: Fleischwirtsch., **61**, 1981, 6, s. 921.
- [8] SLOCUM, R. D. et al.: Plant. Phys., **89**, 1989, s. 512.
- [9] TIBURCIO, A. F.—KAUR-SAWHNEY, R.—GALSTON, A. W.: Plant Cell Phys., **29**, 1988, 7, s. 1 241.
- [10] TORRIGIANI, P. et al.: Plant Phys., **84**, 1987, s. 148.
- [11] TORRIGIANI, P.—SCOCCHIANTI, V.—BAGNI, N.: Phys. Plant., **74**, 1988, s. 427.
- [12] WANG, Ch. Y.: J. Food Qual., **11**, 1988, s. 289.

- [13] BAKER, G. B. et al.: J. Chromatogr., **392**, 1987, s. 317.
- [14] HASHIMOTO, T.—YUKIMUNE, Y.—YAMADA, Y.: Planta, **178**, s. 123.
- [15] SUZUKI, S.—MATSUI, Y.—TAKAMA, K.: Microbios Letters, **38**, 1988, s. 105.
- [16] YAMANAKA, H.—SHIOMI, K.—KIKUCHI, T.: J. Food Hyg. Soc. Japan, **30**, 1989, 2, s. 170.
- [17] CHANG, S. F.—AYRES, J. W.—SANDINE, W. E.: J. Dairy Sci., **68**, 1985, s. 2 840.
- [18] REUVERS, Th. B. A. et al.: J. Food Sci., **51**, 1986, 1, s. 84.
- [19] SUZUKI, S. et al.: J. Chromatogr., **508**, 1990, s. 225.
- [20] ANTILA, P. et al.: Milchwissenschaft, **39**, 1984, 2, s. 81.
- [21] ROSIER, J.—van PETEGHEM, C.: Z. Lebensm. Unters. Forsch., **186**, 1988, s. 25.
- [22] CHAVARI, G.—GALETTI, G. C.—VITALI, P.: Chromatographia, **27**, 1989, 5, s. 216.
- [23] WALTER, H. J. P.—GEUNS, J. M. C.: Plant. Phys., **83**, 1987, s. 232.
- [24] HAYASHI, T. et al.: J. Chromatogr., **145**, 1978, s. 141.
- [25] REDMOND, J. W.—TSENG, A.: J. Chromatogr., **170**, 1979, s. 479.
- [26] KRÍŽEK, M.: Arch. Anim. Nutr., **41**, 1991, 1, s. 97.
- [27] IZQUIERDO-PULIDO, M. L. et al.: Food Chemistry, **42**, 1991, s. 231.
- [28] IZQUIERDO-PULIDO, M. L. et al.: J. AOAC International, **76**, 1993, 5, s. 1 027.
- [29] DUMONT, E.—DeGEETER, H.—HUYGHEBAERT, A.: Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent. **57**, 1992, 4b, s. 1 911.

Lektoroval RNDr. Petr Voznica  
Do redakce došlo 25. 6. 1995

**Křížek, M.—Hlavatá, V.: Stanovení vybraných biogenních aminů v pivu.** Kvas. prům., **41**, 1995, č. 9, s. 265—269.

Je popsána metoda pro stanovení biogenních aminů v pivu, založená na isokratické HPLC separaci N-substituovaných benzamidů. Výtěžky použitého způsobu extrakce z matrice byly pro putrescin 95,4 %, kadaverin 89,5 %, tryptamin 101,8 %, histamin 88,7 % a tyramin 93,2 %.

Metoda je rychlá, dostatečně citlivá a vyznačuje se dobrou opakovatelností stanovení.

**Křížek, M.—Hlavatá, V.: Assessment of Biogenic Amines in Beer.** Kvas. prům., **41**, 1995, No. 9, p. 265—269.

Method is described for biogenic amines assessment in beer, outgoing from isocratic HPLC N-substituted benzamides separation. Yields gained from applied matrix extraction method attained at Putrescin 95,4%, Cadaverine 89,5%, Tryptamine 101,8%, Histamine 88,7% and Tyramine 93,2%.

The method is considered as rapid, sufficiently sensitive and is significant by good assessment repeatability.

**Křížek, M.—Hlavatá, V.: Bestimmung ausgewählter biogener Amine im Bier.** Kvas. prům., **41**, 1995, Nr. 9, S. 265—269.

Es wird eine Methode zur Bestimmung biogener Amine im Bier beschreiben, die auf der iso-

kratischen HPLC-Separation der N-substituierten Benzamide basiert. Die Ausbeuten des applizierten Extraktionsverfahrens aus der Matrix waren für Putrescin 95,4 %, für Kadaverin 89,5 %, Tryptamin 101,8 %, Histamin 88,7 % und für Tyramin 93,2 %. Die Methode ist schnell, genügend empfindlich und gut reproduzierbar.

**Крижек, М.—Главата, В.: Определение избранных биогенных аминов в пиве. Квас. прум., 41, № 9, стр. 265—269.**

Описан метод для определения биогенных аминов в пиве, основанный на изократической HPLC сепарации N-замещенных бензамидов. Выходы примененного способа экстракции из матрицы для путресцина составляли 95,4 %, для кадаверина 89,5 %, для триптамина 101,8 %, для гистамина 88,7 % и для тирамина 93,2 %.

Метод — быстрдействующий, достаточно чувствительный, отличается удовлетворительной повторяемостью определения.