| CH 9.1. |
| --- |
| **STANOVENIE BIOGÉNNYCH AMÍNOV METÓDOU HPLC / FLD** |

## 1 PRINCÍP METÓDY

Biogénne amíny sa extrahujú zo vzoriek zriedenou kyselinou chloristou a analyzujú sa na chromatografickej kolóne s postkolónovou derivatizáciou s OPT (o-phthaldialdehyd). V zásaditom prostredí vzniká fluoreskujúci komplex, ktorý je detegovaný fluorescenčným detektorom.

## 2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná pre analýzu histamínu vo vzorkách živočíšnych tkanív, rybacích šalátov, výrobkov z rýb, piva, vína, putresínu, kadaverínu, tyramínu, spermínu, spermidínu a tryptamínu v živočíšnych tkanivách a pre analýzu tyramínu v syroch.

## 3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

### 3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 acetonitril
3.1.2 metanol
3.1.3 octan sodný trihydrát
3.1.4 kyselina octová
3.1.5 kyselina chloristá
3.1.6 o-phthaldialdehyd
3.1.7 kyselina boritá
3.1.8 KOH
3.1.9 BRIJ 35
3.1.10 histamín chlorid - HIS
3.1.11 tyramín hydrochlorid - TYR
3.1.12 putrescín (1,4-diaminobutane dihydrochloride) - PUT
3.1.13 kadaverín (1,5-diaminopentane dihydrochlorid) - CAD
3.1.14 spermín - SPM
3.1.15 spermidín trihydrochlorid - SPD
3.1.16 tryptamín - TRY
3.1.17 deionizovaná voda

### 3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 0,6 M kyselina chloristá (52 ml kyseliny chloristej (3.1.5) preniesť do 1 l odmernej banky a doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.19)).
3.2.2 borátový pufer (61,8 g kys.boritej (3.1.7) + 40 g KOH (3.1.8) navážiť, preniesť do 1 l odmernej banky a doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.19)).

3.2.3 derivatizačné činidlo (1,5 g BRIJ 35 (3.1.11) rozpustiť v 5 ml metanolu (3.1.2). Potom pridať 500 mg o-phthaldialdehydu (3.1.6) a nechať rozpustiť. Takto získaný roztok pridať k 500 ml borátového pufru (3.2.2))
3.2.4 eluent 1 : 13,32g trihydrátu otanu sodného (3.1.3) sa rozpustí v 800ml deionizovanej vody (3.1.19) a upraví sa pH kyselinou octovou (3.1.4), doplní deionizovanou vodou (3.1.19) do 1000ml.
3.2.5 eluent 2 : 21,28g trihydrátu otanu sodného (3.1.3) sa rozpustí v 600ml deionizovanej vody (3.1.1.19) a upraví sa pH kyselinou octovou (3.1.4). Pridá sa 230 ml acetonitrilu grade (3.1.1), doplní deionizovanou vodou (3.1.19) do 1000ml.

## 3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobné roztoky štandardov

3.3.1.1 Zásobný štandardný roztok histamínu **ZR1** (100 mg/l histamínu v 0,6 M $HClO_4$)
Navážiť 8,285 mg histamínchloridu (3.1.12) do 50 ml odmernej banky a rozpustiť v 50 ml 0,6 M $HClO_4$ (3.2.1).

3.3.1.2 Zásobný štandardný roztok tyramínu **ZR2** (100 mg/l tyramínu v 0,6M $HClO_4$ )
Navážiť 6,33 mg tyramínchloridu (3.1.13) do 50 ml odmernej banky a rozpustiť v 50 ml 0,6M $HClO_4$ (3.2.1).

3.3.1.3 Zásobný štandardný roztok putrescínu **ZR3** (100 mg/l putrescínu v 0,6 M $HClO_4$ )
Navážiť 9,132 mg 1,4-diaminobutane dihydrochloride (putescín) (3.1.14) do 50 ml odmernej banky a rozpustiť v 50 ml 0,6 M $HClO_4$ (3.2.1).

3.3.1.4 Zásobný štandardný roztok kadaverínu **ZR4** (100 mg/l kadaverínu v 0,6 M $HClO_4$ )
Navážiť 8,567 mg 1,5-diaminopentane dihydrochlorid (kadaverínu) (3.1.15) do 50 ml odmernej banky a rozpustiť v 50 ml 0,6 M $HClO_4$ (3.2.1).

3.3.1.5 Zásobný štandardný roztok spermínu **ZR5** (100 mg/l spermínu v 0,6 M $HClO_4$ )
Navážiť 50 mg spermínu (3.1.16) do 50 ml odmernej banky a rozpustiť v 50 ml 0,6 M $HClO_4$ (3.2.1).

3.3.1.6 Zásobný štandardný roztok spermidínu **ZR6** (100 mg/l spermidínu v 0,6 M $HClO_4$ )
Navážiť 8,765 mg spermidínu (3.1.17) do 50 ml odmernej banky a rozpustiť v 50 ml 0,6 M $HClO_4$ (3.2.1).

3.3.1.7 Zásobný štandardný roztok tryptamínu **ZR7** (100 mg/l tryptamínu v 0,6 M $HClO_4$ )
Navážiť 5 mg tryptamínu (3.1.18) do 50 ml odmernej banky a rozpustiť v 50 ml 0,6 M $HClO_4$ (3.2.1).

3.3.2 Kalibračné roztoky štandardov

Do 50 ml odmerných baniek napipetovať objemy zásobného roztoku histamínu podľa tabuľky 1 a objemy zásobných roztokov biogénnych amínov podľa tabuľky 2 a doplniť po rysku 0,6 M kyselinou chloristou (3.2.1).

Tabuľka 1 Príprava kalibračných roztokov histamínu

| Koncentrácia HIS (mg/l) | Označenie roztoku | Prídavok zo zásobného roztoku ZR1 ( ml ) |
|---|---|---|
| 0,5 | **H1** | 0,25 |
| 1 | **H2** | 0,5 |
| 1,5 | **H3** | 0,75 |
| 2 | **H4** | 1,0 |
| 5 | **H5** | 2,5 |

Tabuľka 2 Príprava kalibračných roztokov biogénnych amínov

| Koncentrácia TYR,PUT,CAD, HIS, SPM, SPD, TRY (mg/l) | Koncentrácia SPD, TRY (mg/l) | Označenie roztoku | Prídavok zo zásobného roztoku ZR1, ZR2, ZR3, ZR4, ZR5 ( ml ) | Prídavok zo zásobného roztoku ZR6, ZR7 ( ml ) |
|---|---|---|---|---|
| 0,5 | **1** | **A1** | 0,25 | 0,5 |
| 1 | **2** | **A2** | 0,5 | 1,0 |
| 1,5 | **3** | **A3** | 0,75 | 1,5 |
| 2 | **4** | **A4** | 1,0 | 2,0 |
| 5 | **10** | **A5** | 2,5 | 5,0 |

## 4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1 kvapalinový chromatograf Agilent s fluorescenčným detektorom
4.2 chromatografická kolóna C -18, 125mm
4.3 chromatografická kolóna C-18, 250mm
4.4 peristaltické čerpadlo pre OPT roztok
4.5 spojky, reakčná sľučka, T-kus, tygónové hadičky
4.6 ultrazvukový kúpeľ
4.7 laboratórne sklo
4.8 homogenizátor
4.9 50 µl striekačka
4.10 filtračný papier
4.11 pH meter

## 5 PRACOVNÝ POSTUP

### 5.1 Príprava vzorky pre kontrolu kvality merania

5.1.1 Príprava negatívnej vzorky a fortifikovaných vzoriek

Na prípravu vzoriek sa používajú negatívne matrice. Vzorky sa fortifikujú na úrovni ustanoveného MRL (200mg/kg).
Navážiť 2 g zhomogenizovanej vzorky do Erlenmayerovej banky, pridať roztoky štandardov podľa tabuľky 3 pre histamín alebo tabuľky 4 pre stanovenie biogénnych amínov. Zmixovať na Vortexe. Nechať postáť 15 minút. Pokračovať podľa bodu 5.2.1

Tabuľka 3 Príprava fortifikovaných vzoriek pre stanovenie histamínu

| **Koncentrácia HIS vo vzorke ( mg/kg )** | **Prídavok roztoku ZR1 ( ml )** |
|---|---|
| 0 | 0 |
| 200 | 0,4 |

Tabuľka 4 Príprava fortifikovaných vzoriek pre stanovenie biogénnych amínov

| **Koncentrácia TYR, PUT, CAD, HIS, SPM, SPD, TRY vo vzorke ( mg/kg )** | **Prídavok roztoku ZR1, ZR2, ZR3, ZR4, ZR5, ZR6, ZR7 ( ml )** |
|---|---|
| 0 | 0 |
| 200 | 0,4 |

## 5.2 Príprava vzorky

5.2.1 Príprava vzorky pre stanovenie biogénnych amínov v rybách, svale a syre

10 g zhomogenizovanej vzorky do Erlenmayerovej banky, zaliať približne 70 ml 0,6M kyseliny chloristej (3.2.1) a sonikovať 15 min. v ultrazvukovom kúpeli. Vzorku kvantitatívne preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po rysku 0,6 M kyselinou chloristou (3.2.1). Extrakt prefiltrovať cez filtračný papier, preniesť do vialky a aplikovať na kolónu.

5.2.2 Príprava vzorky pre stanovenie histamínu pivách a vínach

Vzorky piva a vína sa odplynia na ultrazvukovej lázni a aplikujú sa priamo bez úpravy na chromatografickú kolónu. Ak je potrebné riedia sa s 0,6M kys. chloristou (3.2.1).

***Poznámka:*** V prípade, že sa vzorka koncentračne vymyká z rozsahu meranej kalibračnej krivky je pri opakovanom meraní upravená tak, aby koncentračne spadala do kalibračného rozsahu.

## 5.3 Chromatografická analýza

**LC-podmienky pre histamín**

Chromatografická kolóna C-18, 125 mm
Mobilná fáza: eluent 1 (3.2.2.4) : eluent 2 (3.2.2.5)
Prietok mobilnej fázy: 1 ml/min.
Prietok OPT činidla (: 0,5 ml/min.
Detekcia fluorescenčná: excitačná vlnová dĺžka 330 nm
emisná vlnová dĺžka 464 nm
Gradientová elúcia

**LC-podmienky pre biogénne amíny**

Chromatografická kolóna C -18e, 250
Mobilná fáza: eluent 1 (3.2.2.4) : eluent 2 (3.2.2.5)
Prietok mobilnej fázy: 1 ml/min.
Prietok OPT činidla 0,5 ml/min.

Detekcia fluorescenčná: excitačná vlnová dĺžka 330 nm
emisná vlnová dĺžka 464 nm
Gradientová elúcia

## 6 VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV MERANIA

Koncentrácia zložky je úmerná hodnotám plochy píkov. Ich vyhodnotenie je vykonané porovnaním týchto plôch s plochami píkov nameraných v kalibračných roztokoch.

$$C_V = C_S \cdot R \quad \text{(mg/kg)}$$

$C_V$ - koncentrácia amínu v mg/kg

$C_S$ - koncentrácia amínu určená z kal. krivky (mg/l)

R - stupeň riedenia

## 7 LITERATÚRA

1. Leo M. L. Nollet, Food Analysis by HPLC, 2nd Edition 1992, p. 883- 896
2. AOAC Official Method 2005, 18th Edition, AOAC Official Method 957.13: Histamine in seafood, Chapter 35, p. 17-19
3. Deng-Fwu Hwang, Sheng-Hsiung Chang, Chyuan-Yuan Shiua, Tuu-jyi Chai, High – performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in fish implicated in food poisoning, Journal of Chromatography B 693, 1997, p. 23–30
4. G. Vinci, M.L. Antonelli, Biogenic amines: quality index of freshness in red and white meat, Food Control 13, 2002, p. 519–524

## 8 ZOZNAM SKRATIEK

HPLC - kvapalinový chromatograf / kvapalinová chromatografia/
OPT - orto – phthaldialdehyd