

# Application News

## No. L463

Nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia

### Hisztamin és Tiramin Mérése Prominence Amino Acid Rendszer Segítségével

A bomlásból származó hisztamin és tiramin, a hisztidin illetve a tirozin degradációjából keletkezik mikroorganizmusok hatására. Ha az elfogyasztott élelmiszer, előre feldolgozott termékek, vörös húsú halak mint tonhal, bonito, makrélá stb., nagy mennyiségű hisztamint tartalmaznak akkor ételmérgezési tünetek jelentkezhetnek úgy mint láz, kiütések, szívdobogás. Az erjesztett élelmiszereknél mint bor vagy sajt, szintén kapcsolódhat hasonló jelenség. Ezenkívül a tiramin is erősítheti a hisztamin toxicitását, és az élelmiszerrel összefüggő migrén okozójaként jelentették

Bár Japánban nincsenek speciális hisztammal kapcsolatos előírások, más országokban, beleértve az Egyesült Államokat és az EU-t, a hal- és halászati termékekre vonatkozóan a Codex (Nemzetközi Élelmiszer Szabványok) szabályozási határértékeket állapították meg. Mivel a tiramin és a hisztamin az aminosavakhoz hasonlóan aminosavcsoportot tartalmaz, a fluoreszcencia detektálása lehetséges az orto-ftalaldehiddel (OPA) való derivatizálással. Itt bemutatunk egy példát a tiramin és a hisztamin elemzésére a Prominence Amino Acid Analysis rendszer segítségével, amelyben a detektálást oszlop utáni fluoreszcencia származékképzéssel végezzük. Az ehhez az alkalmazáshoz rendelkezésre álló mozgófázis és reagens készlet tartalmazza a szükséges mozgófázisokat és reagenseket, így kiküszöböli a mozgófázis előkészítéséből adódó bizonytalanságot. Ezenkívül, mivel a minta előkezelése csak szűrést és hígítást tartalmaz ennél az alkalmazásnál, így az elemzés bonyolult feldolgozás nélkül is elvégezhető.

#### Standard minták elemzése

Az alkalmazott analitikai körülményeket az 1. táblázat tartalmazza, a hisztamin és a tiramin (egyenként 10 mg/l) standard oldatának elemzésével kapott kromatogramot az 1. ábra mutatja. A standard oldatok készítéséhez pH 2,2 nátrium-citrát puffert használtunk. Mozgófázisként az Aminosav Mobile Phase készletek (Na típusú) B és C fázisát használtuk, az elemzést gradiens elúcióval végeztük. Mivel a retenció erősen függ a pH-tól, így az elúenseket széndioxidcsapdával vagy inert atmoszférával érdemes védeni.

**Table 1** Analitikai Körülmények

Kolonna	: Shim-pack Amino-Na (100 mm L. x 6.0 mm I.D.)	
Ammónia csapda	: Shim-pack ISC-30 / S0504Na (50 mm L. x 4.0 mm I.D.)	
Mozgófázis	: Amino Acid Mobile Phase Kits (Na type, Mozgófázis B and C)	
Időprogram	Idő (perc)	B. Konc. (%)
	0	80
	15.00	65
	15.01	0
	20.00	0
	20.01	80
	25.00	Stop

Áramlási sebesség : 0.6 mL/perc

Kolonna hőmérséklet : 60 °C

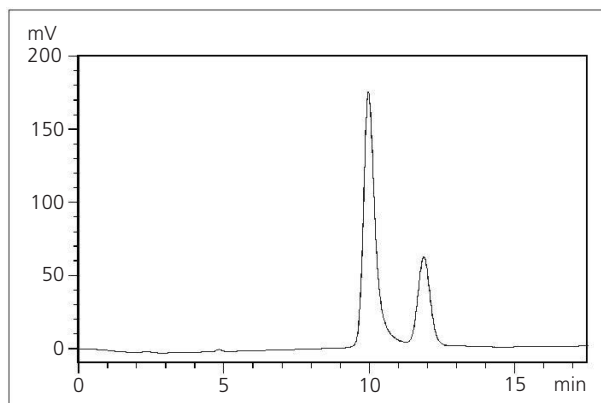
Reagens : Amino Acid Reagent Kits

Reagens áramlási sebessége : 0.2 mL/perc

Reakció hőmérséklete : 60 °C

Detektor : RF-20Axs, Ex at 350 nm, Em at 450 nm

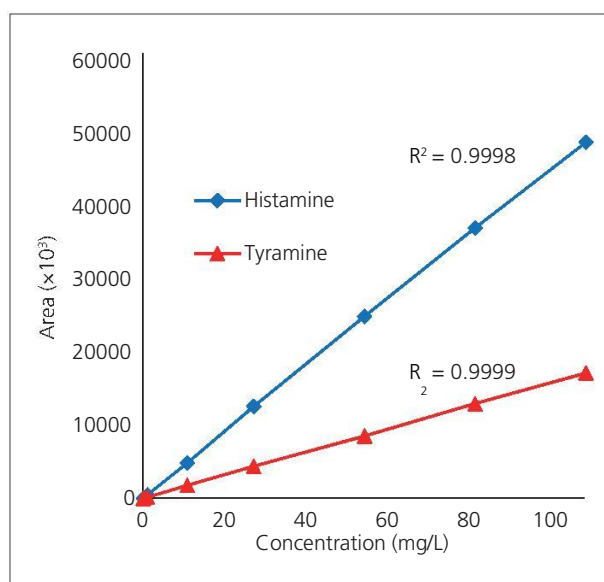
Injektált térfogat : 10 µL



**1. ábra** A hisztamin és a tiramin standard oldat kromatogramja (mindegyik 10 mg/l)

#### Linearitás

A 2. ábra a hisztamin és a tiramin linearitását mutatja 0,1 mg/l és 100 mg/l közötti koncentrációtartományban. Kiváló linearitást kaptunk, a determinációs együttható nagyobb, mint  $R^2 = 0,9998$  mindkét anyag esetében.



**2. ábra** A hisztamin és a tiramin linearitása (0,1-100 mg/l)

**■ Ismételhetőség**

A 2. és 3. táblázat a retenció idő és a csúcsterület relatív szórását (n = 6) mutatja, amelyet a hisztamin és tiramin standard oldatok (mindegyik 1 mg/L) ismételt elemzésénél kapunk. A hisztamin határértékei országonként eltérőek, de például a Codex-ben a halakban és halászati termékekben lebomláshoz kapcsolódó határérték 100 mg/kg. Jó ismételhetőséget kaptunk a kritérium körülbelül 1/100 koncentrációjában.

2. Táblázat: A hisztamin csúcsterület és retenció idő ismételhetősége

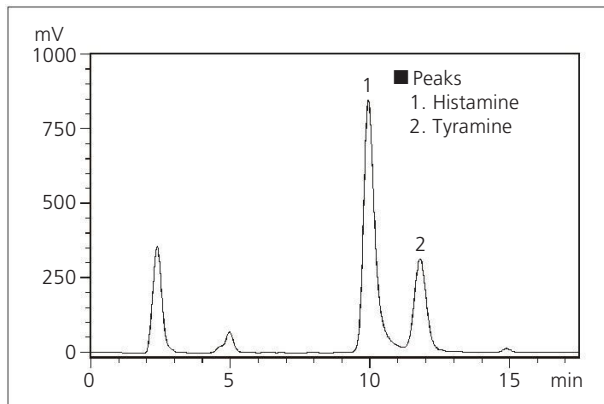
	R.t (perc)	Csúcsterület
1.	9.962	433,724
2.	9.983	431,874
3.	9.967	441,528
4.	9.962	429,887
5.	9.972	439,560
6.	9.993	434,818
Átl.	9.973	435,232
%RSD	0.12	1.03

2. Táblázat: A tiramin csúcsterület és retenció idő ismételhetősége

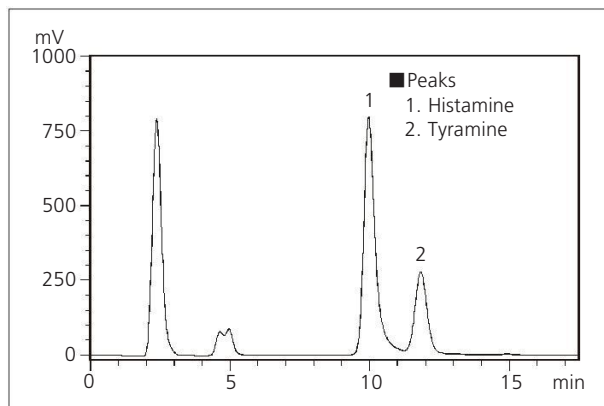
	R.t (perc)	Csúcsterület
1.	11.844	153,458
2.	11.871	155,582
3.	11.858	155,848
4.	11.855	154,509
5.	11.882	151,206
6.	11.911	153,960
Átl.	11.87	154,094
%RSD	0.20	1.09

**■ Élelmiszerek elemzése**

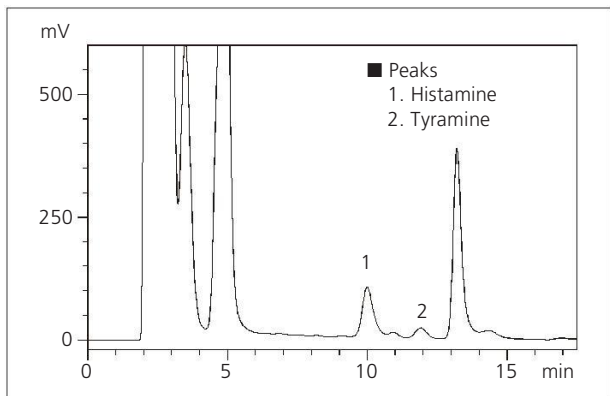
A 3-8. ábrák példákat mutatnak be a kereskedelmi halászati szós, bor és szójaszós elemzésére. Az előkezelés abból állt, hogy 10-szeres hígítást készítettünk pH 2,2-es nátrium-citrát-pufferoldattal, és egy 0,2 µm pórusátmérőjű membránszűrőn átszűrtük a mintákat. Ami a vörösbort és a fehérbort illeti, mindkettőhöz 50 mg/L hisztamint és tiramint adcionáltunk.



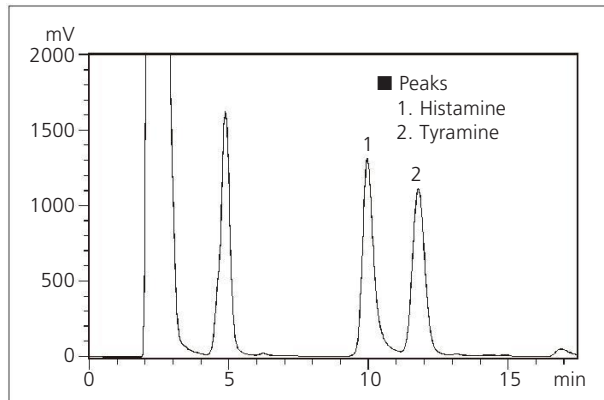
5. ábra Vörösbor kromatogramja



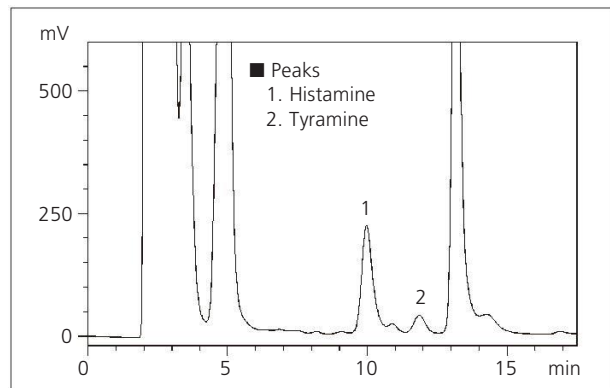
6. ábra Fehérbor kromatogramja



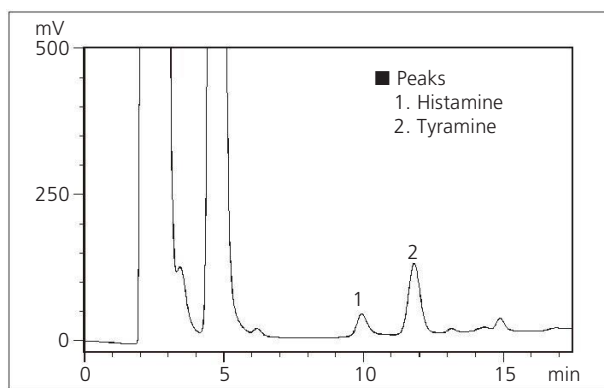
3. ábra „A” halszós kromatogramja



7. ábra „A” szójaszós kromatogramja



4. ábra „B” halszós kromatogramja



8. ábra „B” szójaszós kromatogramja