

*Halina Gawarska, Dorota Sawilska-Rautenstrauch, Halina Ścieżyńska,
Maria Minorczyk¹⁾, Jacek Postupolski*

WYSTĘPOWANIE WOLNYCH AMIN BIOGENNYCH: HISTAMINY, TYRAMINY, PUTRESCYNY I KADAWERYNY W OWOCACH I WARZYWACH ORAZ ICH PRODUKTACH

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego
Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
Zakład Badania Żywności i Przedmiotów Użytku
Kierownik: dr *J. Postupolski*
Zakład Toksykologii Środowiskowej¹⁾
Kierownik: prof. dr hab. *J. Ludwicki*

Badano występowanie czterech amin biogenych: histaminy, tyraminy, putrescyny i kadaweryny w owocach i warzywach oraz ich przetworach. Analizie chemicznej poddano 39 próbek owoców i warzyw, soków owocowych, przecierów warzywnych, produktów konserwowych oraz poddanych procesowi fermentacji. Zawartość poszczególnych amin w próbkach oznaczono metodą HPLC z udziałem detektora UV przy dł. fali 254 nm. Spośród czterech amin biogenych oznaczonych w produktach pochodzenia roślinnego putrescyna występowała w najwyższej zawartości.

Hasło kluczowe: aminy biogenne, owoce, warzywa, środki spożywcze, HPLC.
Key words: biogenic amines, fruits, vegetables, foodstuffs, HPLC.

W żywych komórkach roślin, ludzi i zwierząt aminy biogenne powstają w wyniku naturalnych procesów biochemicznych zachodzących na poziomie komórkowym. W żywności tworzą się w wyniku działalności bakterii w procesie dekarboksylacji wolnych aminokwasów z udziałem odpowiednich dekarboksylaz. Wysokie zawartości amin stwierdza się w produktach poddanych procesowi fermentacji, długo dojrzewających i zanieczyszczonych mikroorganizmami takimi, jak *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* (1, 2).

Aminy biogenne ze względu na budowę chemiczną dzielimy na monoaminy: histamina (HIS) i tyramina (TYR) oraz poliaminy: putrescyna (PUT), kadaweryna (KAD), spermidyna (SPD) i spermina (SPN).

Histamina w żywności wytwarzana jest z wolnej histydyny. Zaliczana jest do trwałych związków chemicznych, nie rozkłada się pod wpływem działania podwyższonej temp. (180–220°C) podczas takich procesów, jak smażenie, pieczenie i autoklawowanie. Może być obecna w produktach mrożonych. Zawartość histaminy w rybach i produktach rybnych powyżej 1000 mg/kg powoduje zatrucie histaminowe z zaburzeniem oddychania, a nawet może spowodować śmierć. Pierwsze objawy zatrucia mogą pojawić się przy dawce histaminy w żywności powyżej 50 mg/kg:

ból głowy, zaczerwienienie twarzy i szyi, pieczenie ust, pokrzywka; powyżej 200 mg/kg objawy nasilają się, mają przebieg ostry z zaburzeniem oddychania i obniżeniem ciśnienia krwi. Stopień nasilenia objawów chorobowych jest uzależniony od wrażliwości osobniczej. Badania wykazały, że obecność tyraminy, putrescyny i kadaweryny znacznie zwiększają działanie toksyczne histaminy (2, 3). Egzogenne aminy biogenne spożyte z żywnością są unieczynniane poprzez oksydazy aminowe. Proces detoksykacji amin może być zakłócony w przypadku występowania inhibitorów tych oksydaz, lub w przypadku spożycia zbyt dużej dawki amin biogennych. Histamina pobrana z dietą w dużym stopniu ulega metabolizmowi do N-metylohistaminy i kwasu metyloimidazolooctowego przy udziale enzymu N-metylotransferazy histaminowej (HMT), ale w większości poprzez oksydację do kwasu imidazolooctowego z udziałem enzymu dwuaminooksydazy (DAO), obecnego w jelicie cienkim przewodu pokarmowego. Metabolity histaminy w 68% do 80% są wydalone z moczem (3, 4). Zawartość histaminy w rybach i produktach rybnych jest limitowana 200 mg/kg (rozporządzenie WE 1441/2007) (5). Wysoka zawartość histaminy najczęściej stwierdzana jest w niektórych gatunkach ryb, serach, winie i produktach poddawanych procesowi fermentacji.

Tyramina (4-hydroksyfenyloetyloamina) tworzy się w wyniku dekarboksylacji aminokwasu *L*-tyrozyny lub w wątrobie w wyniku hydroksylacji fenyletyloaminy. Wysokie zawartości mogą występować w niektórych owocach i warzywach (banany, awokado, pomidory, papryka, kapusta, szpinak), czekoladzie, serach, winie i piwie. U ludzi tyramina jest katabolizowana przez enzym monoaminooksydazę (MAO). Spożywanie żywności, zawierającej nawet niezbyt wysoki poziom tyraminy, przez pacjentów otrzymujących leki z grupy inhibitorów enzymu MAO było przyczyną wystąpienia u nich podwyższonego ciśnienia krwi, a także przełomu nadciśnieniowego. W badaniach laboratoryjnych udowodniono, że w kwaśnym środowisku żołądka szczurów tyramina w obecności nitrozwiazku, przekształca się w substancję mutagenną 3-diazoetyraminę wywołującą nowotwory jamy ustnej (2).

Putrescyna (1,4-diaminobutan) – diamina wykrywana w wysokich ilościach w produktach roślinnych. Prekursorem putrescyny jest ornityna – aminokwas niebiałkowy, tworzący się w procesie przemian wewnątrzkomórkowych z argininy w wyniku aktywności arginazy. Oddziaływanie bezpośrednie na roślinę czynników stresowych tj. niedobór składników mineralnych, niedobór wody, intensywne nasłanianie, powoduje wzrost aktywności arginazy i gromadzenie putrescyny (6). Putrescyna spożyta z żywnością jest łatwo wchłaniana z przewodu pokarmowego. W komórkach zwierzęcych bierze udział w procesie karcenogenezy i angiogenezy indukowanej przez nowotwory. W badaniach prowadzonych *in vitro* zaobserwowano wzmoczoną syntezę ornityny i poliamin w tym putrescyny służącą proliferacji komórek nowotworowych i nowych naczyń krwionośnych guza nowotworowego. Zastosowanie inhibitora dekarboksylazy ornitynowej *alfa*-difluorometyloornityny (DFMO) – powodowało zahamowanie syntezy putrescyny i zmniejszenie angiogenezy w komórkach rakowych człowieka (7, 8).

Kadaweryna (1,5-diaminopentan) jest dwuaminą powstałą w wyniku dekarboksylacji aminokwasu *L*-lizyny. Do produktów spożywczych bogatych w lizynę należą głównie produkty pochodzenia zwierzęcego i warzywa strączkowe (6, 13).

Środkami spożywczymi o najwyższej zawartości amin biogennych są przede wszystkim mięso, ryby i sery. Poziom tych związków w produktach może być wysoki i powodować ryzyko zatrucia oraz problemów zdrowotnych. Owoce, warzywa, alkohol, czekolada to inny rodzaj żywności, z której wyizolowano również aminy biogenne, ale w znacznie mniejszych ilościach. Zawartość amin biogennych w owocach i warzywach w dużym stopniu jest uzależniona od warunków uprawy roślin, procesu przetwarzania i przechowywania (9).

Celem pracy jest ocena występowania czterech amin biogennych: histaminy, tyraminy, putrescyny i kadaweryny w owocach i warzywach oraz ich przetworach. Zawartość poszczególnych amin oznaczono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

MATERIAŁ I METODY

Na zawartość histaminy, tyraminy, putrescyny i kadaweryny analizie chemicznej poddano 39 próbek produktów pochodzenia roślinnego pobranych z obrotu. Do analizy brano wyłącznie części jadalne warzyw i owoców. Soki, przecięry warzywne, warzywa w puszcze lub w opakowaniach z folii hermetycznie zamknięte przechowywano zgodnie z warunkami podanymi na opakowaniu. Próbkę produktów bezpośrednio przed ekstrakcją kwaśną były dokładnie rozdrobnione i homogenizowane do uzyskania jednorodnej masy. 5 g homogenatu homogenizowano z 10 cm³ roztworu wodnego HClO₄ o stęż. 0,2 mol/dm³ i odpowiednią ilością standardu wewnętrznego (1,3-diaminopropan). Do reakcji derywatywacji użyto nasyconego roztworu Na₂CO₃ i chlorku dansylu (7,5 mg/dm³). Pochodne amin biogennych z roztworu wodnego do warstwy organicznej ekstrahowano toluenem. Zawartość amin biogennych oznaczono za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (chromatograf cieczowy Waters Alliance) w odwróconym układzie faz (RP-HPLC) wyposażonego w kolumnę typu Kromasil C₁₈ termostatowaną w temp. 25°C, dł. fali 254 nm, temp. podajnika próbek wynosiła 4°C, przepływ fazy ruchomej 1 cm³/min. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitryl/woda, tryb eucji gradientowej (10). Krzywą kalibracji wykonywano w zakresie stężeń: 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 ppm (8).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W próbkach owoców, warzyw i ich produktów poddanych analizie stwierdzono występowanie czterech amin biogennych: putrescyny, tyraminy, kadaweryny i histaminy. Putrescyna występowała we wszystkich badanych próbkach i stanowiła najwyższą zawartość. W kiszzonej kapuście i ogórkach putrescynę oznaczono w ilości 179,7 mg/kg, w soku pomarańczowym – 137,8 mg/kg, soku pomidorowym 102,2 mg/kg, bananach 84,5 mg/kg i groszku konserwowym 51,7 mg/kg. Stężenie putrescyny w sokach pasteryzowanych było na podobnym poziomie, jak w żywności fermentowanej. Może to sugerować, że do produkcji soków użyto owoców przejrzałych. Najwyższą zawartość tyraminy oznaczono w soku pomidorowym – 122,3 mg/kg, kapuście kiszzonej – 79,6 mg/kg, groszku konserwowym 74,9 mg/kg i ba-

nanach 67,5 mg/kg. Histamina i kadaweryna w badanych próbkach mieściła się na podobnym poziomie od 0,1 mg/kg do 58,3 mg/kg i odpowiednio od 0,1 mg/kg do 66,6 mg/kg. Histamina podobnie jak kadaweryna w wysokich ilościach występuje w produktach wysokobiałkowych lub podanych procesowi fermentacji. W badanych próbkach najwyższe zawartości stwierdzono w kapuście kiszzonej – 58,3 mg/kg, groszku konserwowym – 36,2 mg/kg i koncentracie pomidorowym 21,7 mg/kg (tab. I).

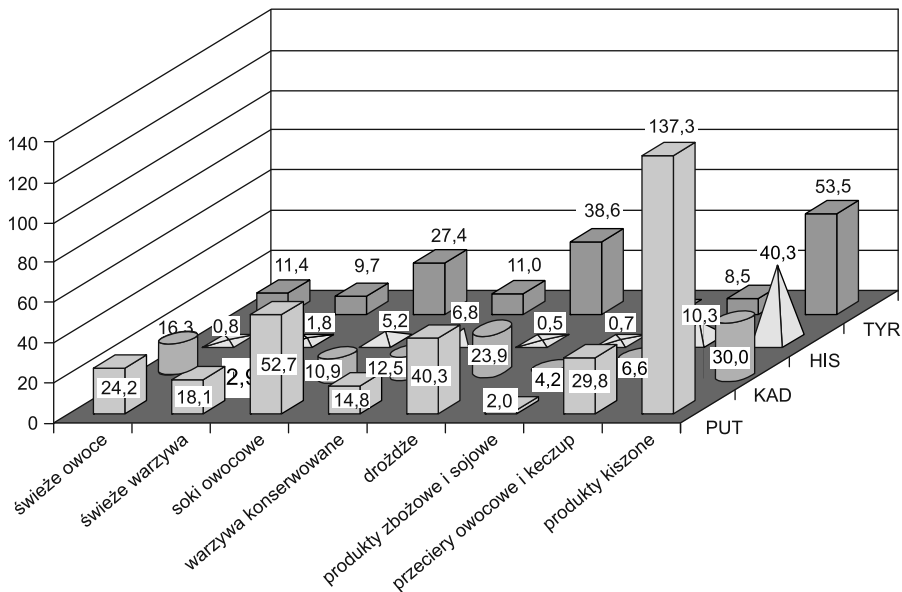
Tab e l a I. Zawartość amin biogennych w owocach, warzywach i ich przetworach (mg/kg) oznaczonych metodą HPLC

Tab l e I. Contents of biogenic amines in fruits, vegetables and their products(mg/kg) determined by HPLC

Produkt	Liczba próbek	Putrescyna	Kadaweryna	Histamina	Tyramina	Suma amin
Avokado	2	7,2–13,9	0,1–4,4	0,1–2,4	7,6–23,8	28,3–31,2
Banany	2	82,9–84,5	22,9–30,0	0,51–3,0	2,1–67,5	117,0–174,6
Brzoskwinie	2	1,1–7,4	16,5–18,7	0,1	0,2–0,4	20,2–24,2
Kiwi	2	0,8–1,3	0,7–2,1	0,2–0,7	0,2–18,0	3,2–20,7
Pomidory	2	25,3–25,9	0,1–7,0	0,1–4,5	0,1–7,1	25,0–44,5
Koncentrat pomidorowy	4	22,5–59,2	0,4–14,5	0,7–21,7	1,4–12,0	25,0–107,4
Orzechy, migdały	2	7,4–8,6	10,0–29,6	0,7–1,4	0,5–2,2	22,3–38,2
Soki owocowe i warzywne	3	8,5–137,8	0,5–29,1	4,6–13,7	17,7–122,3	31,3–267,3
Napoje owocowe	3	3,3–14,5	0,5–7,9	0,4–2,8	1,2–9,5	9,8–22,0
Groszek konserwowy	2	44,0–51,7	13,1–66,6	0,1–36,2	1,0–74,9	58,2–229,4
Fasola konserwowa	4	0,5–1,9	3,2–7,3	0,8–6,6	0,7–2,2	7,9–16,9
Oliwki	2	4,4–5,7	0,4–0,8	1,0–2,1	1,7–4,6	8,7–11,9
Kapusta kiszona, ogórki	3	69,6–179,7	15,8–51,3	20,7–58,3	20,8–79,6	134,0–368,0
Produkty sojowe i zbożowe	4	0,4–3,5	0,4–2,7	0,1–1,3	0,1–2,7	0,8–9,1
Drożdże	2	37,6–42,9	4,6–43,2	0,2–0,7	38,3–38,9	81,3–125,1

Suma czterech amin biogennych była najwyższa w produktach kiszonych i wynosiła 368 mg/kg, w sokach owocowych i warzywnych – 267,3 mg/kg i bananach 174,6 mg/kg. Wykonane oznaczenia zawartości amin biogennych potwierdzają, że putrescyna jest najczęściej występującą aminą w produktach pochodzenia roślinnego, a produkty poddane procesowi fermentacji zawierają najwyższy poziom amin biogennych (ryc. 1).

Najwyższą średnią zawartość putrescyny stwierdzono w przetworach warzywnych – 79,0 mg/kg, w sokach owocowych – 45,5 mg/kg i drożdżach – 40,3 mg/kg a tyraminy w drożdżach – 38,6 mg/kg.



Ryc. 1. Średnia zawartość amin biogenne (mg/kg) w produktach pochodzenia roślinnego oznaczona metodą HPLC.

Fig. 1. Average biogenic amines content (mg/kg) in vegetable products determined by HPLC.

Od 2009 r. na zlecenie EFSA są gromadzone dane dotyczące poziomu amin biogennych w żywności i napojach. Stwierdzono, że stosowanie niskiej jakości surowców, zanieczyszczonych mikrobiologicznie i niewłaściwe warunki przechowywania, mogą spowodować wzrost poziomu amin biogennych. Suma amin może być wykorzystana jako marker stanu higieny żywności (13, 14).

WNIOSKI

1. Tylko świeże owoce i warzywa zawierają aminy biogenne poniżej 10 mg/kg.
2. Spożywanie soków owocowych pasteryzowanych i bananów zawierających wysokie zawartości putrecyny może niekorzystnie wpływać na efekt terapeutyczny ludzi leczonych na choroby nowotworowe.
3. Wskazane jest dalsze monitorowanie zawartości amin biogennych we wszystkich grupach produktów spożywczych w celu zapewnienia jakości higieny i bezpieczeństwa żywności.

H. Gawarska, D. Sawilska-Rautenstrauch, H. Ścieżyńska, M. Minorczyk,
J. Postupolski

OCCURRENCE OF FREE BIOGENIC AMINES: TYRAMINE, PUTRESCINE
AND CADAVERINE IN FRUITS, VEGETABLES AND THEIR PRODUCTS

Summary

The aim of the study was to assess the prevalence of four biogenic amines: histamine, tyramine, putrescine and cadaverine in fruits, vegetables and their products. In total, 39 samples of products available in the market were analysed. The contents of the biogenic amines were determined by RP-HPCL in acid extracts with added dansyl chloride (DCL). Of the four study amines, putrescine proved to be most abundant, and was found at a similar level in fruit juices and fermented products. The total level of the four amines was highest in the pickled products, from 134.0 mg/kg to 368 mg/kg in fruit juices and vegetables, 117.0 mg/kg to 174.6 in bananas and 58.2 mg/kg to 229 mg/kg in preserved peas. Considering the high levels of biogenic amines in fruits, vegetables and their products, it is advisable to store this data to enable assessment of consumer exposure.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bodmer S., Kneubüh C.I.*: Biogenic amines in foods: Histamine and food processing. *Inflamm. Res.*, 1999; 48: 296-300. – 2. *Shalaby A.R.*: Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research Int.*, 1996; 29(7): 675-690. – 3. *J. E. Straton J.E., Hutkins R.W., Taylor S.L.*: Biogenic amines in cheese and other fermented foods. *J. Food Prot.*, 1991; 54(6): 460-470. – 4. *G Joosten H.M.L.*: The biogenic amine contents of Dutch cheese and their toxicological significance. *Neth. Milk Dairy. J.*, 1988; 42: 25-42. – 5. Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 1441/2007 z dnia 5 grudnia 2007 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych. – 6. *Kubiś J.*: Poliaminy i ich udział w reakcji roślin na warunki stresowe środowiska. *Kosmos – Problemy nauk biologicznych*. 2006; 55(2-3): 209-215. – 7. *Graboń W.*: Arginina – podstawowy aminokwas w procesie nowotworzenia. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2006; 60: 483-489. – 8. *Takigawa M., Enomoto M., Nishida Y., Pan H.O., A. Kinoshita A., Suzuki F.*: Tumor angiogenesis and polyamines: alpha-difluoromethylornithine, an irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase inhibits B 16 melanoma-induced angiogenesis *in ovo* and the proliferation of vascular endothelial cells *in vitro*. *Cancer Res.*, 1990; 50: 4131-4138. – 9. *Molderings G.J., Kribben B., A. Hejnen A., Schröder D., Brüß M., Göthert M.*: Intestinal tumor and agmatine (decarboxylated arginine). *Cancer (Online)*, 2004; 101(4): 858-868. – 10. *Malle et al.*: Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. *J. AOAC Inter.*, 1996; 79(1): 43-49.
11. *Moret S., Conte L.S.*: High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods. An analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. *J. Chromatography A.*, 1996; 729: 363-369. – 12. *Moret S., Smela D., Populin T., Conte L.F.*: A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables. *Food Chemistry*, 2005; 89: 355-361. – 13. *Doyle M.E., Steinhart C.E. and Cochran B.A.*: Marcel Dekker. New York, Food Safety, 1993: 254-259. – 14. EFSA (European Food Safety Authority), Guidance – Biogenic Amines, Guidance on using the reporting format for in food. Parma, 2011.

Adres: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24.