

РАЗРАБОТКА МЕТОДОЛОГИИ ВЫЯВЛЕНИЯ БИОГЕННЫХ АМИНОВ В СИСТЕМЕ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА БЕЗОПАСНОСТИ МЯСНОГО ПРОДУКТА

Николаева А.С., Куликовский А.В., канд. техн. наук,
Вострикова Н.Л., канд. техн. наук

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности им. В.М. Горбатова», г. Москва

Аннотация. Биогенные амины являются продуктами распада аминокислот, и могут служить индикаторами порчи продуктов питания. Накопление биогенных аминов зависит от гигиенического качества сырья и ингредиентов, технологических процессов производства (копчение, ферментация), условий хранения. Содержание биогенных аминов не нормируется в нормативных документах РФ, отсутствуют аттестованные методики их определения. Проведенные исследования позволили подобрать условия хроматографического разделения и масс-спектрометрической идентификации гистамина, кадаверина и тирамина.

Ключевые слова. Биогенные амины, ВЭЖХ, кадаверин, гистамин, тирамин.

Введение

Биогенные амины играют важную роль в качестве источника азота и являются предшественниками для синтеза гормонов, алкалоидов, нуклеиновых кислот, белков и др. Однако пищевые продукты, содержащие большое количество биогенных аминов могут быть токсичными. Факторами, влияющими на образование биогенных аминов в продуктах, являются: доступность свободных аминокислот; наличие микроорганизмов, которые могут декарбоксилировать аминокислоты; благоприятные условия для развития данной микрофлоры и продуцирования ее ферментов. Обычно биогенные амины образуются при порче пищевой продукции, при этом существует риск накопления токсической дозы гистамина (свыше 100 мг/кг продукта) еще до того, как появятся органолептические изменения свежести[1]. Согласно техническому регламенту таможенного союза допустимая доза гистамина в рыбной продукции (в том числе в рыбных консервах) из тунца, скумбрии, лосося и сельди, допускается не более 100 мг/кг. При этом в предельно допустимая концентрация гистамина в США и Канаде допускается в сырье до 50 мг/кг (производители рыбных консервов контролируют сырье по норме 5 - 15 мг/кг гистамина), в Австралии - до 100 мг/кг, в Швеции - до 100 мг/кг в свежей рыбе и не более 200 мг/кг в соленой рыбе [2].

По данным ВОЗ гистамин может вызывать сильные аллергические реакции, а некоторые биогенные амины (например, кадаверин и путресцин), могут усиливать его аллергическое действие.

На данный момент существует несколько методов, определяющих свежесть продуктов (перекисное число, кислотное число, летучие жирные кислоты). Но все они направлены на определение продуктов окисления жира, в основе которых лежит идентификация альдегидов и перекисей титриметрическим и фотометрическим методами. Такие методы не могут дать объективную оценку биохимических изменений, происходящих в белках. Существующий потенциометрический метод определения amino-аммиачного азота основан на связывании аминогрупп и определении конечных продуктов расщепления белка, пептидов и аминокислот. Метод является неселективным и не может дать представление о содержании того или иного биогенного амина. Вследствие присутствия веществ, дающих перекрестный сигнал в структуру которых входят карбоксильные и аминогруппы возможно получение ложноположительных, ложноотрицательных результатов [3].

Учитывая различное токсическое воздействие на организм человека и возможные синергетические эффекты при употреблении с пищей алифатических, ароматических и гетероциклических биогенных аминов, необходимо количественное определение каждого конкретного вещества.

Производство безопасных продуктов невозможно без изучения путей метаболизма белков и механизмов действия органических контаминантов. Изучение химического состава пищи требует применения селективных и высокоточных методов, позволяющих оценить качество и безопасность сырья и готовой продукции.

Материалы и методы

Среди существующих методических подходов к определению гистамина и биогенных аминов можно назвать:

- полимерный, разработанный специалистами из университета Южной Каролины и основанный на использовании полимера, меняющего цвет в присутствии биогенных аминов [4];
- радиоизотопный, флуорометрический, иммуноферментный, колориметрический, газовой и масс-спектрометрии [5-6].

В настоящее время наиболее широко используемым методом является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, что соответствует требованиям регламента комиссии ЕС 2073/2005. Метод основан на экстракции биогенных аминов вместе с аминокислотами, растворами органических кислот из субстрата, с последующим применением полученного экстракта для хроматографического определения. Поскольку детектирование биогенных аминов как таковых затруднено, в данном методе используется пред- или постколоночная дериватизация — получение производных анализируемого вещества, обладающих иными аналитическими свойствами (например, иным УФ-спектром, флуоресценцией, термической стабильностью, летучестью и пр.).

В условиях лаборатории ВНИИМП для оценки содержания биогенных аминов была разработана методика масс-спектрометрической идентификации с

использованием системы ВЭЖХ Agilent 1200 (США) и трех квадрупольного масс-спектрометра Agilent 6410В. Хроматографическое разделение проводили на колонке 150x2.1 мм Cogent Diamond Hydride column 100 А (4 мкм), в режиме градиентного элюирования условия при 30 °С. В качестве подвижной фазы использовались раствор 0,1 %-ный раствор муравьиной кислоты в воде и раствор 0,1 %-ный раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле. Расход подвижной фазы 0,4 мл/мин. Объем вводимой пробы 1 мкл.

Ионизацию проводили распылением в электрическом поле, оптимизированы параметры масс-спектрометрического детектирования: температура источника 100 °С; температура газа для десольватации 400 °С; расход газа для десольватации 12 л/мин; давление иглы распылителя 45 psi (3,1 Бар).

Условия детектирования оптимизировали в ручном режиме. Напряжение фрагментации определяли варьируя с шагом 5 В по максимальному отклику протонированного молекулярного иона, энергию диссоциации оптимизировали с шагом 1 В по максимальному отклику характерного дочернего иона, при этом, соотношение сигнал/шум молекулярного иона должно быть не менее 1:10.

Результаты

Биогенные амины идентифицировали по абсолютному времени удерживания хроматографических пиков целевых веществ, регистрируемых в режиме мониторинга множественных реакций. С использованием средств программного обеспечения MassHunter Workstation (Agilent, США) строили градуировочные зависимости площади пика от концентрации вещества в пробе. Коэффициент линейной корреляции полученных градуировочных зависимостей составил не менее 0,99.

Оптимизация условий детектирования, позволяет достичь предела количественного обнаружения на уровне 0,1 ppb. На рис. 1 представлена хроматограмма калибровочного раствора биогенных аминов с масс-спектрометрической регистрацией в режиме мониторинга множественных реакций (MRM).

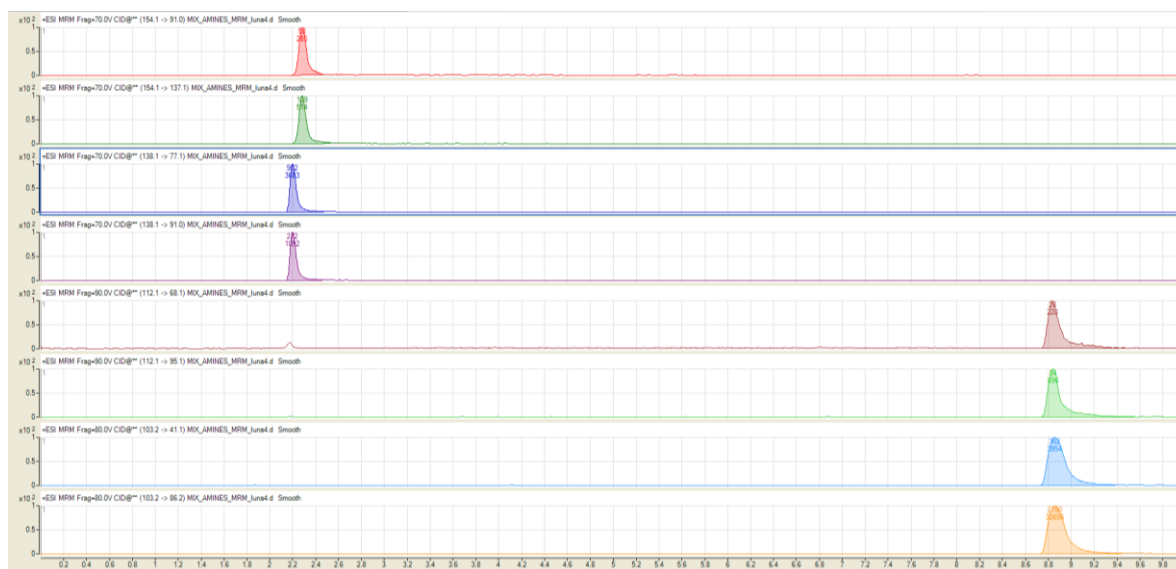


Рис. 1. Хроматограмма калибровочного раствора кадаверина, гистамина, тирамина и дофамина (ионизация распылением в электрическом поле (ESI) в режиме MRM).

За счет селективности детектора, исключается возможность наложения перекрёстных пиков, как это может происходить с использованием классического спектрофотометрического детектора. Однако нельзя исключать влияние матрицы на подавление общего ионного тока. Для минимизации эффекта матрицы и повышения чувствительности перспективным является использования специфических процедур подготовки проб, таких как твердофазная экстракция (ТФЭ). Помимо очистки процедура ТФЭ позволяет сконцентрировать биогенные амины за счет перевода анализируемых соединений из большого объема жидкой матрицы в твердую фазу концентрирующего сорбента.

В настоящее время наиболее широко используемым методом определения биогенных аминов является метод ВЭЖХ. Метод основан на экстракции биогенных аминов вместе с аминокислотами, растворами органических кислот из субстрата, с последующим применением полученного экстракта для хроматографического определения.

Поскольку детектирование биогенных аминов как таковых затруднено, в данном методе используется пред- или постколоночная дериватизация — получение производных анализируемого вещества, обладающих иными аналитическими свойствами (иным УФ-спектром или флуоресценцией). Несомненным преимуществом жидкостной масс-спектрометрии при определении биогенных аминов перед флуоресцентным и спектрофотометрическим (УФ-детектором) детектором является исключение процедуры дериватизации, сильно влияющей на сходимость результатов исследований. Недостатком газовой масс-спектрометрии в случае определения биогенных аминов является присутствие в пробе термолабильных веществ, которые могут искажать сигнал детектора. Таким образом, возможности разделения, однозначность идентификации делают

оптимальной техникой для исследования биогенных аминов метод жидкостной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС).

Заключение

Актуальность работы по изучению накопления биогенных метаболитов в мясных продуктах и сырье, связана с их тепловой обработкой особенно их изготовление на открытом огне, может быть причиной образования в них мутагенных соединений, к которым относятся также биогенные амины. Последние обладают наибольшей биологической активностью и являются ярко выраженными про-мутагенами в гепатоцитах человека. Биогенные амины легко трансформируются и становятся фактором, запускающим неконтролируемые свободно радикальные процессы, провоцирующие канцерогенез [7].

Для повышения безопасности пищи необходимо совершенствовать методологию оценки содержания потенциально опасных веществ и определения возможных путей снижения их образования в мясных продуктах в процессе их изготовления.

Для решения данной задачи в дальнейшем необходимо разработать систему оценки качества пищевых продуктов на основе животных и растительных компонентов. И выявить потенциальные биомаркеры, например биогенных аминов, которые могут служить надежным количественным параметром определения свежести продукции.

Литература:

1. Оценка содержания и аккумуляции биогенных аминов в мясной продукции / А.В. Куликовский, А.Н. Иванкин, А.С. Николаева, А.С. Князева // Все о мясе. –2016. –№5. –С. 32 – 35
2. Fish and Fishery Products Hazard and Controls Guide. US Food and Drug Administration. DHHS/PHS/FDA, Washington, D.C., 1998.
3. Биогенные метаболиты в системе экологического мониторинга безопасности сырья и продовольствия / А.Н. Иванкин, Ю.Г. Костенко, А.В. Кузнецов и др. // Экологические системы и приборы. – 2004. – № 8. – С. 5 – 11.
4. Kuznetsov, A.V. Cadaverin determination in meat and the possibility of using this indicator in meat freshness assessment / A.V. Kuznetsov, Yu.G. Kostenko, A.N. Ivankin // In Proceedings 49th International Congress of Meat Science and Technology 25–30 August 2003, Rio, Brazil. – 2003. – P. 283–284
5. Marc S. Maynor, et al., A Food Freshness Sensor Using the Multistate Response from Analyte-Induced Aggregation of a Cross-Reactive Poly (thiophene)/Organic Letters. – 2007. –Vol. 9. –No. 17. –P. 3217–3220.
6. Santos M. Biogenic amines: their importance in foods // International Journal of Food Microbiology. – 1996. – № 29. – P. 213–231
7. Barnes, DM. Effects of Biogenic Amines on Growth and the Incidence of Proventricular Lesions in Broiler Chickens // Poultry Science. – 2001. – Vol. 80. – № 3.