



# Rapport

## Dokumentationskrav til fødevarekvalitet, kemi og sensorik Multimetode (LC-MS/MS) – biogene aminer

Kirsten Jensen og Lam Ngoc Trac

4. august 2022

Proj.nr. 2008810

Version 1

KIJ/MT/LAMT

### *Baggrund*

Forsknings- og udviklingsarbejdet i projektet "Krav til fødevarekvalitet – kemisk dokumentation" fokuserer på afprøvning og udvikling af avancerede kemiske analysemetoder baseret på komplekse biologiske matricer, herunder velegnede oprensingsmetoder forud for analyse. Indsatsen i nærværende arbejde koncentrerer sig om en tidssvarende multimetode til biogene aminer, der kan bidrage til at dokumentere et sikkert kvalitetsprodukt. Der er tidligere indkørt en metode til analyse af den biogene amin cadaverin på grisekoteletter og tun, mens der p.t. ikke eksisterer en samlet analysemetode for relevante biogene aminer (BA) og flere typer kødmatricer, som fx fermenterede, fede kødprodukter. Afprøvning af muligheden for implementering af en multimetode til analyse af BA har afsat i de erfaringer, der tidligere er opnået med analyse af cadaverin i komplekse biologiske matricer med avanceret LC-MS/MS-teknik.<sup>1</sup>

### *Biogene aminer*

Biogene aminer er organiske baser med lav molekylvægt, der dannes via enzymer fra råvarer eller ved mikrobiel decarboxylering af aminosyrer under fermentering eller nedbrydning af proteiner.<sup>2</sup> Frie BA er fundamentale i den karakteristiske smag af modnede fødevarer og er desuden precursor for mange aromakomponenter. De findes i en lang række fødevarer: kød og kødprodukter, mejeriprodukter, fisk og fiskeprodukter, vin, øl, grøntsager, frugt, nødder og chokolade; i princippet i alle fødevarer, der produceres ved fermentering eller er udsat for mikrobiel forurening gennem fremstilling eller opbevaring.

BA kan udgøre en sundhedsrisiko via påvirkning af nervesystemet eller kredsløbet. Symptomerne efter et højt indtag kan være kvalme, opkast, vejrtrækningsproblemer, svedudbrud, hjertebanken, nedsat eller øget blodtryk samt migræne.

Det er ikke alene i forhold til toksicitet, at det vil være interessant at undersøge indholdet af BA i forarbejdede kødprodukter. Oprindelsen af BA gør dem velegnede som kemiske indikatorer for den hygiejniske kvalitet og friskhed, da de kan associeres til graden af fermentering og/eller nedbrydning.

De mest fremtrædende BA i kødprodukter er tyramin, cadaverin, putrescin og histamin. I frisk kød er det primært spermidin og spermin. Tyramin, cadaverin og putrescin dannes under lagringen af kød. I fermenterede kødprodukter findes der betragtelige mængder BA, ofte som en konsekvens af dårlig råvarekvalitet, kontaminering eller uegnede forhold under fremstilling eller opbevaring. pH og temperatur er nøglefaktorer i forhold til aktivitet af aminosyredecarboxylase, hvor bakterierne har optimum ved lavt pH og temperaturer mellem 20°C og 37°C.

Høje niveauer af BA kan forebygges ved et rigtigt valg af starterkulturer. Der er dog evidens for, at det er kontamineringsfloraen nærmere end starterkulturen, der er ansvarlig for dannelse af et øget BA-niveau i fermenterede kødprodukter.

Da indholdet af tyramin, putrescin og cadaverin normalt stiger i forbindelse med processering af kød og kødprodukter, mens indholdet af spermidin og spermin falder eller er konstant, er BA-indholdet foreslået som et indeks for hygiejne af råvarer (biogen-amin-indeks (BAI)). Anvendeligheden af BAI som kvalitetsindeks afhænger af produkterne, hvor tendensen er, at det er mest velegnet til vurdering af friskt kød og varmebehandlede produkter. BAI anvendes i dag i forbindelse med kvalitetssikring af fisk og skaldyr (seafood).

#### *Eksperimentelt*

Aktiviteterne i projektet omfatter

- Instrument setting for kvantificering af BA
- Ekstraktion og oprensning af BA i kødmatricer gennem fastfase
- Kalibreringskurver for BA
- Metodevalidering

#### *Instrument setting for kvantificering af BA*

De relevante BA, der indgår i afprøvningen, fremgår af bilag 1. Som intern standard anvendes 1,7-diamineheptane. LC-MS/MS-metode og -parametre er beskrevet i bilag 2.

#### *Ekstraktion og oprensning*

Ekstraktionen er udført med en oprensningsmetode som beskrevet i bilag 3.

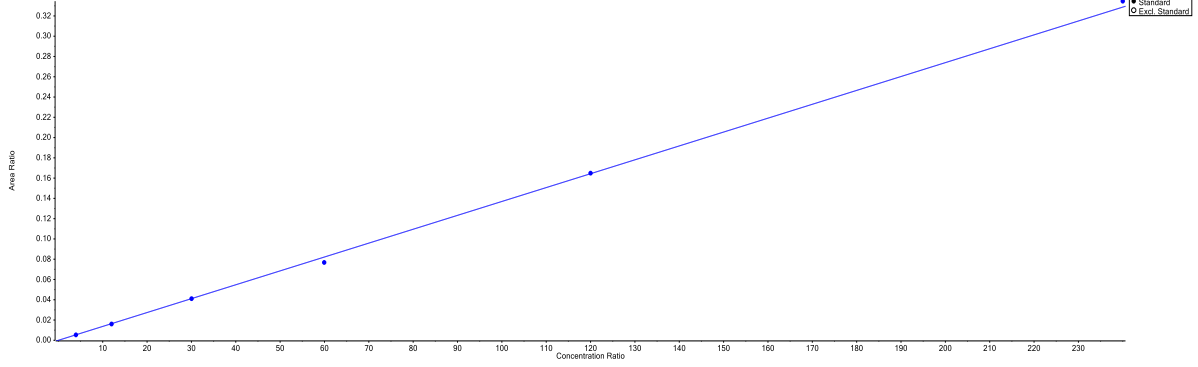
#### *Kalibreringskurver*

Der er fremstillet kalibreringskurver til LC-MS/MS-metoden, baseret på tilsætning af kendte mængder af de rene analytter til 0.1N perchlorsyre, som bruges til ekstraktion af BA. Kalibreringsprøver oprenses gennem fastfase. I nedenstående tabel er BA og intern standard vist, samt deres koncentrationer benyttet i kalibreringen.

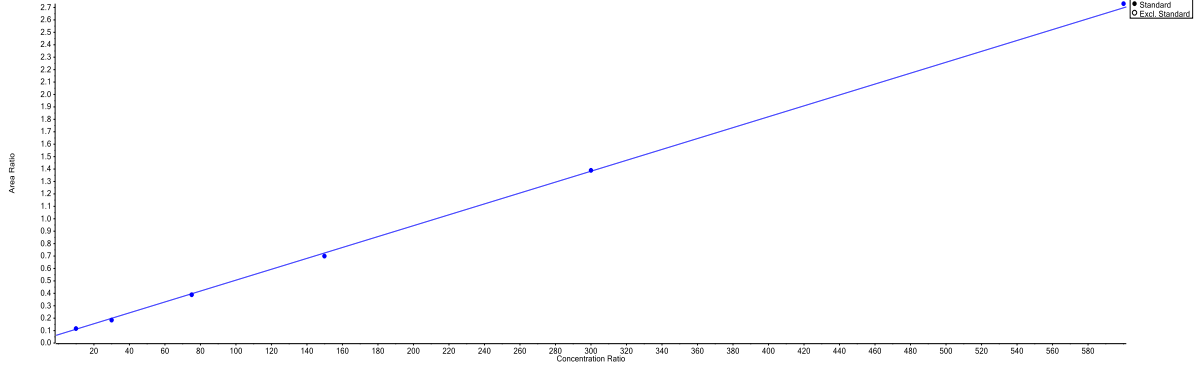
ID	Pkt. 1 (µg/L)	Pkt. 2 (µg/L)	Pkt. 3 (µg/L)	Pkt. 4 (µg/L)	Pkt. 5 (µg/L)	Pkt. 6 (µg/L)
Cadaverin	4	12	30	60	120	240
Intern standard	500	500	500	500	500	500
2-Phenylethlamine	10	30	75	150	300	600
Histamin	4	12	30	60	120	240
Putrescin	20	60	150	300	600	1200
Spermidin	40	120	300	600	1200	2400
Spermin	40	120	300	600	1200	2400
Tryptamin	4	12	30	60	120	240
Tyramin	10	30	75	150	300	600

Kalibreringskurverne kan findes i nedenstående figurer. Kurverne til spermidin og spermin kan ikke etableres, da de ikke kan genfindes ved fastfasen.

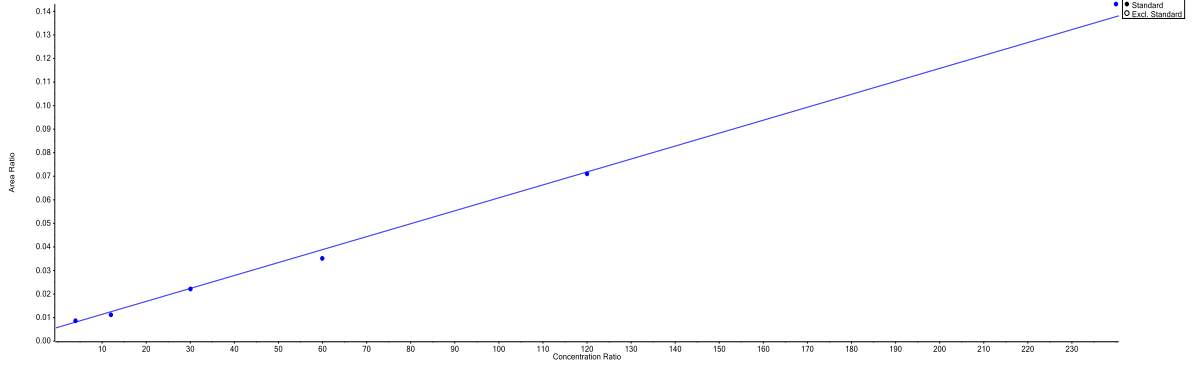
Calibration for Cadaverin:  $y = 0.00137x + 0.00000$  ( $r = 0.99957$ ) (weighting:  $1/x$ )



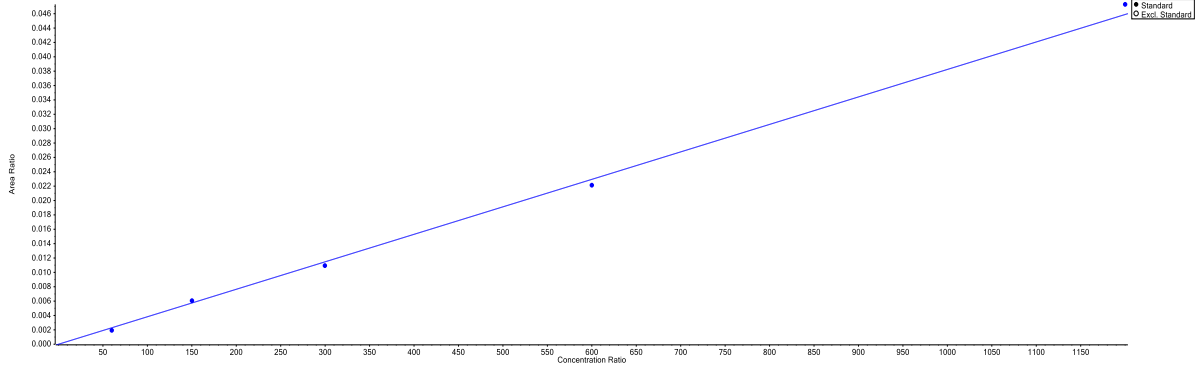
Calibration for 2-Phenylethylamine:  $y = 0.00438x + 0.08770$  ( $r = 0.99952$ ) (weighting:  $1/x$ )

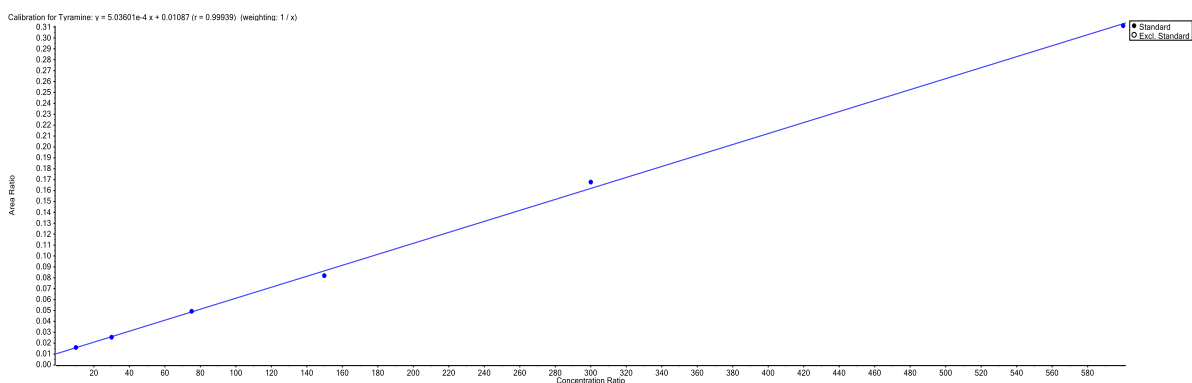
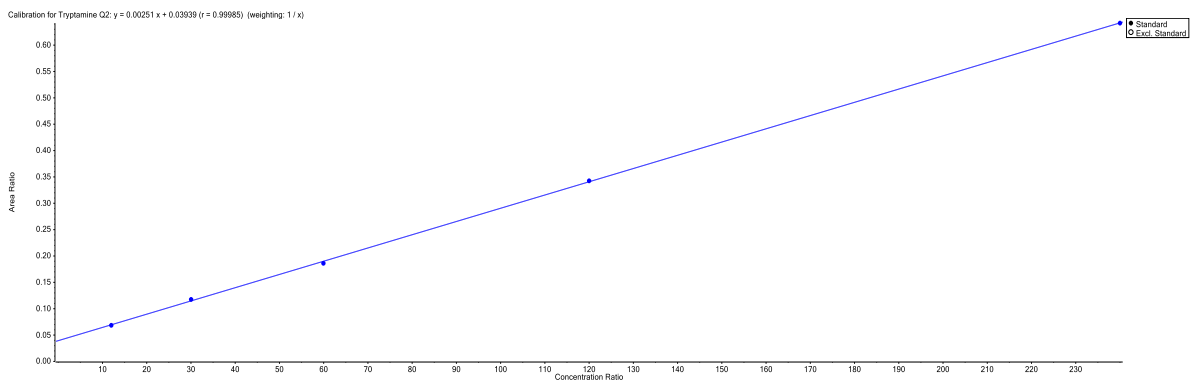


Calibration for Histamin:  $y = 5.49414e-4x + 0.00590$  ( $r = 0.99741$ ) (weighting:  $1/x$ )



Calibration for Putrescine:  $y = 3.82400e-5x + 0.00000$  ( $r = 0.99901$ ) (weighting:  $1/x$ )





## Metodevalidering

### LOD og LOQ

Metodens samlede LOD og LOQ blev evalueret ved 5 gentagne analyser på samme prøve. Koncentrationen, der bruges til bestemmelse af LOD og LOQ, svarer til punkt 2 på kalibreringskurven, og prøver behandles gennem fastfase. Standardafvigelsen (SD) blev beregnet for stofferne baseret på de 5 analyser.

LOD blev beregnet som  $3 \times SD$ , og LOQ som  $10 \times SD$ . De opnåede resultater fremgår af nedenstående tabel.

### Genfindning

De rene stoffer er spiket til kødmatricer (grisekød/koteletter) til slutkoncentrationer svarende til pkt. 2 og 4 i kalibreringskurven. Der gennemføres dobbeltbestemmelse til hvert punkt. De opnåede resultater er vist i nedenstående tabel:

ID	LOD ( $\mu\text{g/g}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/g}$ )	Genfindning * (%)
Cadaverin	0,02	0,07	111-120
2-Phenylethylamine	0,09	0,29	87-100
Histamin	0,10	0,32	167-331
Putrescin	0,26	0,88	121-138
Spermidin	Ikke opnået	Ikke opnået	Ikke opnået
Spermin	Ikke opnået	Ikke opnået	Ikke opnået
Tryptamin	0,07	0,22	92-111
Tyramin	0,15	0,49	97-119

\* Y:\Projects Archive\IP2008810\_SAF 124 AP1 Krav til fodevarekvalitet - kemisk dokumentation\Fagligt\Lab K\Biogenic amines\_Metode udvikling\_20210805.xlsx.

Der opnås ikke LOD og LOQ til spermidin og spermin på grund af lav genfindning af disse forbindelser. Genfindingerne er acceptable for cadaverin, 2-phenylethylalmin, tryptamin og tyramin. Til gengæld skal man være opmærksom på, at denne afprøvning har afsæt i tidligere indkøring af cadaverin, hvori der fokuseres på at opnå LOD og LOQ for cadaverin i et lavt koncentrationsområde. Dette koncentrationsområde er lavt for de testede BA i forhold til deres grænseværdier, der er sat i fødevarer.<sup>3,4</sup> Det bør derfor være muligt at opnå bedre resultater for alle BA ved indkøring i et højere koncentrationsområde.

#### *Konklusion*

En metode til analyse af BA er udviklet og valideret. BA er først ekstraheret og oprenset igennem Oasis WCX fastfase og derefter kvantificeret ved brug af LC-MS/MS. Analysemetoden viser lovende resultater, men der er stadig plads til at forbedre prøveforberedelsen til at omfatte alle de relevante aminer.

#### *Referencer*

1. Alexi, N. et al. Potential of novel cadaverine biosensor technology to predict shelf life of chilled yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). Food Control, Volume 119, 2021.
2. Stadnik, J & Z.J. Dolatowski. Biogenic amines in meat and fermented meat products. Acta Sci.pol.technol.aliment.9 (3) 2010, 251-263.
3. Visciano, P.; Schirone, M.; Paparella, A., An Overview of Histamine and Other Biogenic Amines in Fish and Fish Products. Foods 2020, 9 (12), 1795.
4. Mah, J.-H.; Park, Y. K.; Jin, Y. H.; Lee, J.-H.; Hwang, H.-J., Bacterial Production and Control of Biogenic Amines in Asian Fermented Soybean Foods. Foods 2019, 8 (2), 85.

## Bilag 1.

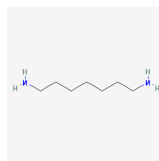
Vigtigste bioaktive komponenter i fødevarer produceret ved fermentering, eller som har været udsat for mikrobiel forurening gennem fremstilling eller opbevaring.<sup>1)</sup>

Compound ID	Structure	logP (Est)
Putrescine	<chem>NCCCCC[NH2]</chem>	-0.79
Cadaverine	<chem>NCCCCCCC[NH2]</chem>	-0.49
Spermidine	<chem>NCCCCNCCCC[NH2]</chem>	-0.84
Spermine	<chem>NCCCCNCCCCNCCCC[NH2]</chem>	-0.96
2-Phenylethylamine	<chem>NCCc1ccccc1</chem>	1.46
Histamine	<chem>NCC1=CN=CN=C1</chem>	-0.96
Tyramine	<chem>NCCc1ccc(O)cc1</chem>	0.72
Tryptamine	<chem>NCC1=CNC2=CC=CC=C12</chem>	1.38

0.5      10  
5.5      50  
5.51     95  
7        95  
7.01     10  
8        10

**Flow Rate:** 0.6 mL/min  
**Col. Temp.:** Ambient  
**Detector:** SCIEX 4000 QTRAP®  
**Sample: Analyte**

	RT (min)
1. Tyramine	3.67
2. Putrescine	4.34
3. Cadaverine	4.36
4. Histamine	4.40
5. 2-Phenylethylamine	4.57
6. Tryptamine	4.78
7. Spermidine	4.90
8. Spermine	5.18



Som intern standard anvendes 1,7-diamineheptane

<sup>1)</sup> Phenomenex application note TN-0312.

## Kvantificering af BA i grisekød (koteletter) med LC-MS/MS:

Kolonne: Kinetex 2,6 µm C18 100A, 100x3 mm

Mobil fase A: 5% acetonitril og 0.13% HFBA i vand

Mobil fase B: 5% vand og 0.13% HFBA i acetonitril.

Flow rate: 0,45 mL/min.

Injektion: 4 µL

Gradient:	Time (min)	%B
	0.01	0
	0.3	0
	7.00	100
	9.00	100
	9.30	0
	13.00	0

Valve:	0-3 min. sent to waste
	3-7 min. sent to MS
	7 min. sent to waste

Detector: SCIEX 6500 Qtrap

MS Parameters:

ESI in positive polarity, 2 MRM transitions per compound

ID	Q1	Q3	DP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
Cadaverine	103,1	86	26	13	12
Cadaverine Q	103,1	69	26	21	8
Int-st	131,1	114	20	15	10
Int-st Q	131,1	97	20	15	14
2-Phenylethlamine	122	105	25	26	10
2-Phenylethlamine Q	122	77	25	20	10
Histamine	112	95	25	27	10
Histamine Q	112	68	25	33	10
Putrescine	89	30	25	30	10
Putrescine Q	89	72	25	13	10
Spermidine	146	72	25	30	10
Spermidine Q	146	112	25	20	10
Spermine	203	129	25	16	10
Spermine Q	203	112	25	24	10
Tryptamine	161	115	25	42	10
Tryptamine Q	161	127	25	34	10
Tyramine	138	121	25	25	10
Tyramine Q	138	93	25	25	10
Tryptamine Q2	161	144	25	30	10

### Oprensningsmetode af BA i grisekød (koteletter)

Frosne kødprøver optøs ved 0-10°C og blendes. Der afvejes 2 g prøve, der overføres til et PP-centrifugerør, hvor der tilsættes 30 mL 0.1 N HClO<sub>4</sub>. Blandingen homogeniseres med mikserstav i 30 sek. ved 20.000 rpm, omrystes i 15 min ved stuetemperatur, og centrifugeres ved 4.500 rpm, 4°C i 60 min. Der anvendes en Oasis WCX 60 mg 3CC kolonne til fastfaseekstraktion.

Kolonnen blev konditioneret med 1 mL 100% methanol og ekvibreret med 1 mL vand (LC-MS grade). 1 mL prøveekstrakt i 10 mL PP-glas blev tilsat 100 µL intern standard (5 mg/L 1,7-diamineheptane i 0.1 N HClO<sub>4</sub>). Lige inden ekstraktet blev tilsat kolonnen (gravity flow), blev det blandet med 15 µL 25% NH<sub>4</sub>OH. Kolonnen blev vasket med 1 mL vand (LC-MS grade) samt 1 mL 100% methanol og herefter tørret i 2 min. Elueringen blev foretaget med 2 x 0,9 mL 3% myresyre i MeOH. Eluatet blev opkoncentreret under nitrogen flow (53°C) til ca. 100 µL og rekonstitueret med 500 µL mobil fase A (600 mL i alt).