UNIVERZA V NOVI GORICI
FAKULTETA ZA ZNANOSTI O OKOLJU

UVAJANJE METODE HPLC ZA DOLOČANJE BIOGENIH AMINOV

DIPLOMSKO DELO

Andreja RAKAR

Mentor: prof. dr. Polonca Trebše

Nova Gorica, 2013

IZJAVA

Izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Rezultati, ki so nastali v okviru skupnega raziskovanja z drugimi raziskovalci, ali so jih prispevali drugi raziskovalci (strokovnjaki), so eksplicitno prikazani oziroma navedeni (citirani) v diplomskem delu.

Andreja Rakar

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici, prof. dr. Polonci Trebše, za vse nasvete, spodbudne besede in pomoč pri izdelavi diplomskega dela. Zahvaljujem se prof. dr. Mladenu Franku za pomoč pri analizi in obravnavi podatkov. Hvala tudi zaposlenim in mladim raziskovalcem v Laboratoriju za raziskave v okolju, ki so mi dali kakršen koli dober praktičen nasvet.

Hvala očetu in mami za spodbudo in usmeritve na moji poti. Hvala bratu. Hvala Primožu in najini Sari. Hvala tudi svojim pravim prijateljem.

POVZETEK

V svoji diplomski nalogi sem določala osem različnih biogenih aminov v vinu, sorte Teran PTP, katerega vinorodni okoliš je slovenski Kras in kras v slovenskem zamejstvu. Biogeni amini, ki sem jih določila in kvantificirala, so naslednji: putrescin, kadaverin, etanolamin, histamin, metilamin, tiramin, butilamin in triptamin.
Metoda, po kateri sem meritve izvajala, je modificirana metoda iz Priročnika mednarodnih metod za analizo vina in mošta. Oznaka metode je OIV-MA-AS315-18. Metoda temelji na pretvorbi biogenih aminov v fluorescentne derivate z uporabo ortoftalaldehida (OPA), ki je derivatizacijski reagent, ob prisotnosti 2-merkaptoetanola in boratnega pufra s pH vrednostjo 10,5. Nastale derivate ločimo z uporabo HPLC in nato s FLD detektorjem merimo intenziteto fluorescence pri 445 nm.
V desetih vzorcih Terana PTP sem zaznala biogene amine, putrescin, etanolamin, histamin, metilamin ter tiramin.
Vzorci vsebujejo največ putrescina, ki se nahaja v koncentracijskem območju od 5–80 mg/L ter etanolamina v koncentracijskem območju od 12–30 mg/L.
V vzorcih ni bilo zaznati, oziroma so pod mejo detekcije, kadaverin, triptamin in butilamin. Zaradi značilnosti uporabljene metode nisem zaznala standardov heksilamina, izopentilamina in 2-metilbutilamina in jih zato tudi v vinu nisem določala.

Ključne besede: biogeni amini, Teran PTP, derivatizacija, ortoftalaldehid (OPA)

ABSTRACT

In my diploma thesis I determine eight different biogenic amines in wine Teran PTP.
Qualified and quantified biogenic amines are: putrescine, cadaverine, ethanolamine, histamine, methylamine, tyramine, butylamine and tryptamine.
For the analyses I used a modified method from the Compendium of International methods of Analysis of Wines and Musts. The method code is OIV-MA-AS315-18. The method consists in the conversion of biogenic amines into fluorescent derivatives with the use of ortophtalaldehyde (OPA) in the presence of 2-mercaptoethanol and borate buffer with the pH value 10,5.
The fluorescent derivatives of biogenic amines were separated with the use of HPLC and detected with the use of FLD detector measuring the intensity of fluorescence at 445 nm.
In samples of Teran PTP I found different concentrations of putrescine, ethanolamine, histamine and tyramine.
The most widely represented biogenic amine in samples of Teran PTP is putrescine in the concentration range from 5 to 80 mg/L. The next most abundant biogenic amine is ethanolamine ranging from 12 to 30 mg/L.
Under the detection limits were cadaverine, tryptamine and butylamine.

Key words: biogenic amines, Teran PTP, derivatisation, ortophtalaldehyde (OPA)

KAZALO VSEBINE

1 UVOD 1

1.1 Cilj 2

2 TEORETIČNI DEL 3

2.1 Definicija 3
2.2 Kemijska struktura in delitev biogenih aminov 3
2.3 Nastanek biogenih aminov 3
2.4 Funkcija biogenih aminov 4
2.5 Toksičnost biogenih aminov 5
2.6 Biogeni amini in pripadajoči aminokislinski prekurzorji 7
2.7 Biogeni amini v vinu 8

2.7.1 Biološki razkis ali jabolčno-mlečnokislinska fermentacija 8
2.7.2 Izvor biogenih aminov v vinu 8
2.7.3 Mejne vrednosti koncentracij biogenih aminov v vinu 9
2.7.4 Faktorji, ki vplivajo na vsebnost biogenih aminov v vinu 11

2.8 Vinorodni okoliš Kras 13
2.9 Določanje biogenih aminov v vinu 14

2.9.1 Predpriprava in priprava vzorcev 14
2.9.2 Derivatizacija 14

2.10 Analitske metode za določanje biogenih aminov 16

3 EKSPERIMENTALNI DEL 18

3.1 Reagenti in raztopine 18

3.1.1 Vzorci vina 18
3.1.2 Raztopine 18

3.2 Derivatizacija biogenih aminov 19

3.2.1 Potek derivatizacije vzorcev vina 19

3.3 Instrumenti in oprema 20
3.4 Kromatografski pogoji 20
3.5 Določanje retencijskih časov biogenih aminov 21
3.6 Umeritev 21
3.7 Metoda standardnega dodatka 21
3.8 Statistične metode 22

4 REZULTATI IN RAZPRAVA 23

4.1 Optimizacija kromatografskih pogojev 23
4.2 Derivatizacija 23
4.3 Določanje retencijskih časov biogenih aminov in stabilnost derivatov 23
4.4 Stabilnost derivatov biogenih aminov 25
4.5 Umeritev 29

4.5.1 Prve umeritvene premice biogenih aminov 31
4.5.2 Druge umeritvene premice 32
4.5.3 Standardni dodatek 34

4.6 Primerjava podatkov 39

5 ZAKLJUČKI 41
6 VIRI 42

SEZNAM TABEL

Tabela 1: Farmakološki vplivi biogenih aminov na človeško telo..... 6
Tabela 2: Prikaz tabele iz PRILOGE II z naslovom: Največje vrednosti kemijskih parametrov, ki so zahtevane pri posameznih kakovostnih razredih vin, ki so pridelana na ozemlju Republike Slovenije 10
Tabela 3: Elucijski gradient metode. 21
Tabela 4: Retencijski časi posameznih biogenih aminov. 24
Tabela 5: Koncentracije biogenih aminov za pripravo umeritvenih premic 1. 30
Tabela 6: Koncentracija biogenih aminov za pripravo umeritvenih premic 2. 32
Tabela 7: Koncentracije biogenih aminov v standardnem dodatku. 34
Tabela 8: Vrednosti LOD, LOQ, enačbe umeritvenih premic za določevanje biogenih aminov ter korelacijski koeficient. 36
Tabela 9: Koncentracije biogenih aminov [mg/L] v vzorcih Terana PTP, izračunanih z uporabo umeritvenih premic 1. 38

KAZALO SLIK

Slika 1: Kemijske strukture primarnega, sekundarnega in terciarnega amina. 3
Slika 2: Potek dekarboksilacije histidina do histamina 4
Slika 3: Strukturne formule nekaterih biogenih aminov in pripadajočih aminokislinskih prekurzorjev 7
Slika 4: Reakcija med primarnimi amini in derivatizacijskim reagentom OPA. 15
Slika 5: Shema poteka derivatizacije. 20
Slika 6: Kromatogram standardne mešanice 8 biogenih aminov, pripravljenih v sintetičnem vinu. 25
Slika 7: Kromatogram za histamin ob prvem injiciranju ob času t=0 min od derivatizacije in po t'=3 h 15 min od prvega injiciranja. 26
Slika 8: Kromatogram za etanolamin ob prvem injiciranju ob času t=0 od derivatizacije in po času t'=6 h 30 min od prvega injiciranja. 27
Slika 9: Kromatogram za metilamin ob prvem injiciranju ob času t=0 od derivatizacije in po času t'=4 h 50 min od prvega injiciranja. 27
Slika 10: Kromatogram za tiramin ob prvem injiciranju ob času t=0 od derivatizacije in po času t'=4 h 50 min od prvega injiciranja. 28
Slika 11: Kromatogram vzorca Terana PTP ob injiciranju ob času t=0 od derivatizacije in po času t'=95 min od derivatizacije. 29
Slika 12: Umeritvene premice za histamin, kadaverin, tiramin, triptamin in metilamin. 31
Slika 13: Umeritvene premice za putrescin, etanolamin in butilamin. 31
Slika 14: Umeritveni premici za putrescin in etanolamin. 32
Slika 15: Umeritvene premice za butilamin, histamin, tiramin in triptamin. 33
Slika 16: Kromatogram Terana PTP z zaporedno številko 12/997 s standardnim dodatkom in brez standardnega dodatka. 35

1 UVOD

Biogeni amini (BA) so organske bazične spojine dušika, ki se naravno nahajajo v rastlinskih, živalskih in mikrobnih organizmih in imajo različne regulatorne funkcije. V normalno delujočem organizmu nastajajo v omejenih in kontroliranih količinah. Zaradi tega je dodaten vnos biogenih aminov v človeško telo lahko škodljiv in lahko povzroča različne neprijetne simptome in posledice.
Pogosto jih najdemo v različnih prehrambenih izdelkih (npr. sir, ribe in ribji izdelki, jajca, fermentirana zelenjava, sojini izdelki, piva in vino). Najpomembnejši med njimi so histamin, putrescin, kadaverin, tiramin, triptamin, spermin in spermidin. Nastajajo med procesom mikrobne dekarboksilacije ustreznih aminokislin in sicer zaradi kontaminacije z bakterijami (*Lactobacillus, Streptococcus, Pseudomonas*) (Stratton, 1991).
Neprijetni simptomi, ki so posledica toksičnosti biogenih aminov, so odvisni od količine in vrste biogenih aminov, ki jih zaužijemo. Poleg tega je toksičnost biogenih aminov lahko povečana s hkratnim uživanjem alkohola in nekaterih zdravil (Soufleros in sod., 1998 cit. po Maynard in Schenker, 1962; Bauza in Teissedre, 1995).

Vino je v svetu zelo široko konzumirano živilo. Zaradi varnosti potrošnikov je pomemben nadzor njegovih prehrambnih značilnosti oz. njegove kakovosti, saj vplivajo tudi na njegove senzorične značilnosti. Biogeni amini se v vinu pojavljajo zaradi številčnih dejavnikov in skoraj ne obstaja vino, ki ne bi vsebovalo biogenih aminov.

Koncentracija biogenih aminov v vinu se med državami in območji znotraj držav razlikuje in sega od nekaj mg do 50 mg ali preko, odvisno od vrste vina.
Histamin je izmed vseh biogenih aminov najbolj toksičen in zato so nekatere države postavile zgornjo dovoljeno koncentracijo histamina v vinu.
Nekatere države so omejile koncentracije histamina v vinu, npr. v primeru Nemčije je zgornja dovoljena koncentracija 2 mg/L, Belgije od 5–6 mg/L, Francije 8 mg/L in Švice 10 mg/L (Anli in Bayram, 2008). V Sloveniji je zgornja dovoljena koncentracija histamina v vinu 2 mg/L (Ur. l. RS, št. 43/2004).

Za nadzor kakovosti in varnosti živil so razvite ustrezne analizne metode, med katerimi so najpogosteje uporabljene tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC), ionska kromatografija, plinska kromatografija in kapilarna elektroforeza (Anli in Bayram, 2008; Önal, 2007).

Največkrat je uporabljena fluorimetrična detekcija s predkolonsko ali postkolonskimi derivatizacijskimi tehnikami. Pri tem se uporablja različne derivatizacijske reagente, kot so: O-ftalaldehid (OPA), dansil klorid, benzil klorid, fluorescin, 9-fluoroenilmetilkloroformat (FMOC), vartalen-2,3-dikarboksaldehid (Önal A., 2007).

1.1 **Cilj**

Nedavno je bila na UNG razvita visoko občutljiva metoda za določanje BA, ki temelji na laserski detekciji (Franko, 2008) in uporabi encima transglutaminaze za pretvorbo BA v amonij (Punakivi in sod., 2006). Tega kvantificiramo preko tvorbe indofenol modrega. Za preverjanje zanesljivosti novo razvite metode je nujna uporaba že uveljavljenih in standardiziranih analiznih metod. Zato je cilj diplomskega dela uvedba standardizirane HPLC-FLD metode za določevanje biogenih aminov, ki bo tudi sicer uporabna za okoljske raziskave, povezane z BA, kot tudi na drugih raziskovalnih področjih, ki jih goji UNG (npr. Center za raziskave vina, molekularna genetika in biotehnologija).
Metodo bom nato uporabila za meritve biogenih aminov v vzorcih terana.

2 TEORETIČNI DEL

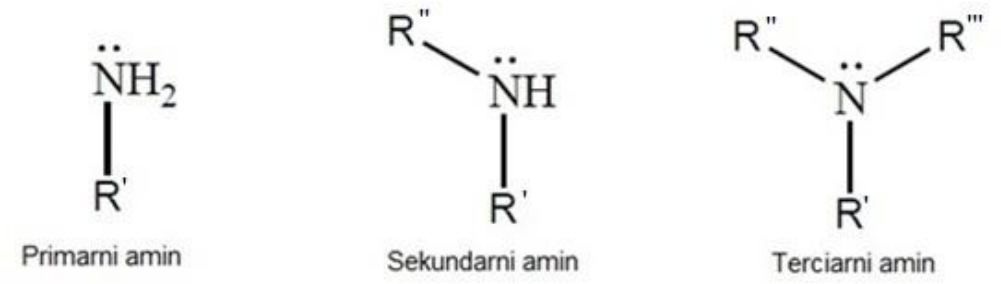
2.1 Definicija

Biogeni amini (BA) so bazične spojine dušika, ki nastanejo z dekarboksilacijo aminokislin ali aminiranjem ter transamiranjem aldehidov in ketonov (Silla Santos, 1996 cit. po Maijala in sod., 1993). So organske baze z nizko molekulsko maso in so sintetizirani ter razgrajeni kot posledica normalnih metabolnih aktivnosti v mikroorganizmih, rastlinah in živalih (Halász in sod., 1994).
Aminom rečemo, da so biogeni, če nastanejo zaradi dekarboksilacije aminokislin, ki jo izvedejo živi organizmi (Shalaby, 1996).

2.2 Kemijska struktura in delitev biogenih aminov

Biogeni amini se delijo na:

- primarne ($R'NH_2$), kjer sta na dušikov atom vezana dva vodikova atoma in ena alkilna ali aromatska skupina,
- sekundarne (R'R''NH), kjer so na dušikov atom vezani en vodikov atom in dve alkilni ali aromatski skupini in
- terciarne amine (R'R''R'''N), kjer so na dušikov atom vezane tri alkilne ali aromatske skupine.



Slika 1: Kemijske strukture primarnega, sekundarnega in terciarnega amina.

Biogeni amini se delijo še na (Halász in sod., 1994):

- alifatske di-, tri- in poliamine (putrescin, kadaverin, agmatin, spermin in spermidin),
- alifatske hlapne amine (etilamin, metilamin in etanolamin) ter
- aromatske in heterociklične amine (histamin, tiramin, feniletilamin in triptamin).

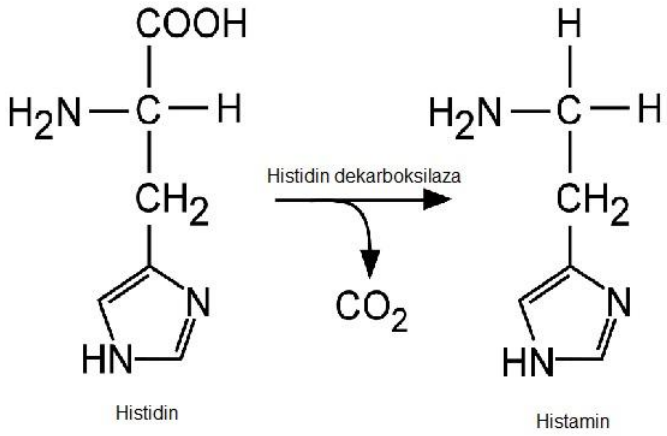
Na ***Sliki 1*** so prikazane kemijske strukture primarnih, sekundarnih in terciarnih aminov.

2.3 Nastanek biogenih aminov

Biogeni amini nastanejo endogeno kot posledica normalnih metabolnih aktivnosti pri živalih, rastlinah in mikroorganizmih. Endogeni nastanek biogenih aminov je po navadi rezultat dekarboksilacije pripadajočih aminokislin. Čeprav so biogeni amini komponente

sveže hrane in pijače, se lahko akumulirajo tudi zaradi mikrobnega delovanja (Halász in sod., 1994).
Do tega lahko pride zaradi kontaminacije z mikroorganzmi, ki so sposobni dekarboksilazne aktivnosti (Halász in sod., 1994).

Biogeni amini so sekundarni metaboliti in nastanejo z delovanjem mikrobnih organizmov pri dekarboksilaciji prostih aminokislin, ki nastanejo zaradi encimske hidrolize beljakovin (Smith, 1980 cit. po Shalaby, 1996; Soleas in sod., 1999).
Pri dekarboksilaciji aminokislin igrajo ključno vlogo encimi, ki jim s skupnim imenom rečemo dekarboksilaze (histidin dekarboksilaza (HDA), tirozin dekarboksilaza (TDA), ornitin dekarboksilaza (ODA) itd. Iz proste aminokisline se odstrani α-karboksilna skupina, t.j. skupina, ki je vezana na α-ogljikov atom (tisti, na katerega sta vezani tako karboksilna kot aminska skupina) (Shalaby, 1996).
Encimi dekarboksilaze so prisotni v nekaterih mikroorganizmih in jim rečemo dekarboksilaza-pozitivni mikroorganizmi. Na ***Sliki 2*** je prikazan potek dekarboksilacije histidina do histamina.



Slika 2: Potek dekarboksilacije histidina do histamina
(vir: http://www.biyolojiegitim.yyu.edu.tr/k/histmn/pages/HISTAMIN_jpg.htm).

Koncentracije in vrste biogenih aminov se zelo razlikujejo med različnimi vrstami hrane in pijače. Poleg tega se koncentracija in vrsta biogenih aminov razlikuje tudi med isto vrsto hrane in pijače.
Prav tako kot v drugih rastlinah, biogeni amini nastanejo endogeno v vinski trti (*Vitis vinifera*) in se nahajajo v grozdju in listih.

2.4 **Funkcija biogenih aminov**

Biogeni amini predstavljajo zalogo dušika in prekurzorjev za sintezo hormonov, alkaloidov, nukleinskih kislin in beljakovin. Posledično vplivajo na procese v organizmu, kot je regulacija telesne temperature, regulacija rasti, zvišanje ali znižanje krvnega tlaka, izločanje raznih hormonov, višanje ali nižanje ravni krvnega sladkorja itd. Poleg naštetega so biogeni amini pomembni kot aromatične komponente hrane ter kot prekurzorji za nastanek karcinogenih N-nitrozo spojin (Silla Santos, 1996 cit. po Shahidi in sod., 1994).

Poliamini, kot so putrescin, spermin in spermidin, so nepogrešljive komponente vseh živih organizmov ter esencialni za rast, regulacijo delovanja nukleinskih kislin in sinteze

beljakovin. Kljub raznolikosti njihovih vlog v celičnem metabolizmu in rasti so v velikih količinah potrebni v hitro rastočih tkivih (Silla Santos, 1996 cit. po Bardócz, 1989).
V nizkih koncentracijah pa so esencialni za mnogo fizioloških procesov v telesu, kot so regulacija telesne temperature, volumen želodca, pH vrednost želodca ter razne možganske aktivnosti (Anli in Bayram, 2008).

2.5 Toksičnost biogenih aminov

Biogeni amini lahko povzročijo zdravstvene težave. Nezaželeni so v vseh vrstah hrane in pijače, saj se v slučaju prevelike zaužite količine absorbirajo v telo in povzročajo glavobol, respiratorne težave, tahikardijo srca, previsok ali prenizek krvni tlak (Silla Santos, 1996).
Največ zastrupitev, ki so povezane z biogenimi amini, se pojavlja zaradi histamina, ki je najbolj toksičen biogeni amin in ga zasledimo v siru, ribah, vinu, mesu in mesnih izdelkih (Brink in sod., 1990).
Toksikološki vplivi histamina so odvisni od zaužite koncentracije (količine) histamina, prisotnosti drugih biogenih aminov, aktivnosti encimov aminooksidaz, ki sodelujejo pri razgradnji biogenih aminov ter od prebavne fiziologije posameznika (Silla Santos, 1996).

Putrescin, spermin, spermidin in kadaverin nimajo stranskih učinkov na zdravje, ampak lahko reagirajo z nitritom do nastanka kancerogenih nitrozoaminov. Njihova koncentracija v živilih je povezana s starostjo hrane (Henandez-Jover in sod., 1997). Potencirajo lahko toksičnost histamina, saj zmanjšajo aktivnost encimov v želodcu, ki so odgovorni za razgradnjo biogenih aminov.

Tiramin, triptamin in β-feniletilamin spadajo med vazoaktivne amine. Zanimanje za vsebnost tiramina v hrani je predvsem zaradi reakcije z zdravili, ki so inhibitorji monoamin oksidaze (MAOI) in posledično lahko pride do hiperintenzivne krize.
Hipertenzivna kriza je stanje, pri katerem je zaradi nenadno zvišanega krvnega pritiska preko 230/120 zelo motena prekrvavitev možganov in miokarda. Tiramin na telo vpliva tudi neposredno s sproščanjem noradrenalina iz simpatičnega živčnega sistema, ki povzroča dvig krvnega tlaka (Nujna stanja, hiperintenzivna kriza. Vir: http://www.drmed.org/strok/nujna_stanja/02/02-06.php).

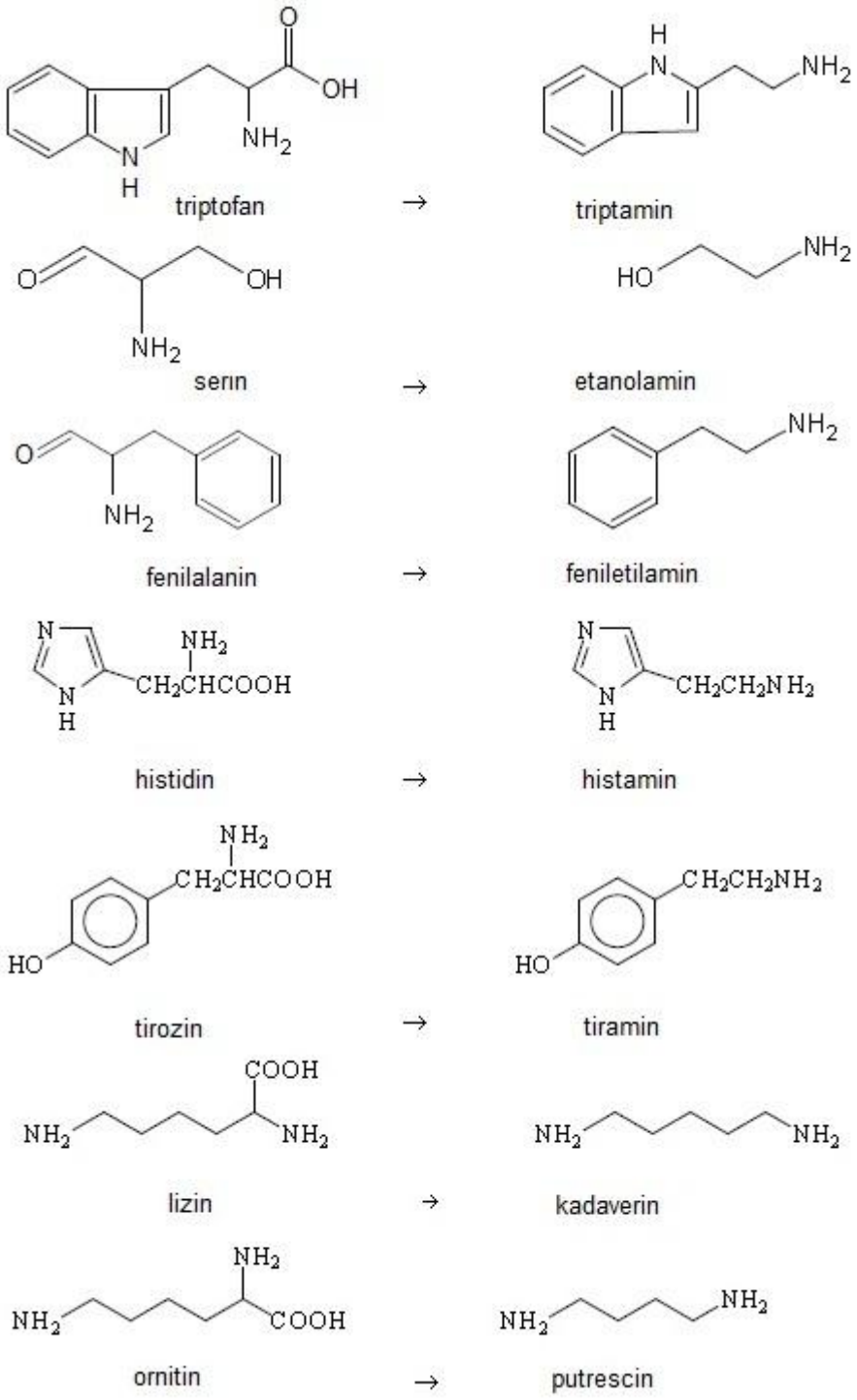
Razgradnjo biogenih aminov v človeškem telesu izvajajo encimi monoaminoksidaze (MAO) in diaminoksidaze (DAO).
Če s hrano zaužijemo preveliko količino biogenih aminov (količina je odvisna od posameznika), jih DAO in/ali MAO encimi niso sposobni razgraditi v celoti. Problematične so lahko tudi nizke količine zaužitih biogenih aminov, saj je encimska aktivnost mono ali diaminooksidaz lahko oslabljena zaradi sekundarnih učinkov nekaterih zdravil in alkohola (Anli in Bayram, 2008).
V ***Tabeli 1*** so našteti učinki biogenih aminov na telo.

Tabela 1: Farmakološki vplivi biogenih aminov na človeško telo (vir: Shalaby, 1996).

Biogeni amin	Prekurzor	Farmakološki vpliv
histamin	histidin	sprošča adrenalin in noradrenalin
		povzroča krčenje gladkih mišic maternice, želodca in respiratornih poti
		stimulira senzorične in motorične nevrone
		nadzoruje izločanje želodčne kisline
tiramin	tirozin	periferna vazokonstrikcija
		povečan srčni utrip
		povzroča krčenje gladkih mišic maternice
		poveča solzenje in slinjenje
		poveča dihanje
		poviša nivo krvnega sladkorja
		povzroča sproščanje noradrenalina iz simpatičnega živčnega sistema
		povzroča migreno
putrescin in kadaverin	ornitin in lizin	hipotenzija (nizek krvni tlak)
		bradikardija (srčni utrip pod 60 udarci/min)
		potencirajo toksičnost drugih aminov
triptamin	triptofan	hipertenzija (povišan krvni tlak)
beta-feniletilamin	fenilalanin	povzroča migreno
		hipertenzija
		povzroča sproščanje noradrenalina iz simpatičnega živčnega sistema

2.6 **Biogeni amini in pripadajoči aminokislinski prekurzorji**

Na ***Sliki 3*** so prikazane strukturne formule nekaterih biogenih aminov s pripadajočimi aminokislinami, iz katerih nastanejo.



Slika 3: Strukturne formule nekaterih biogenih aminov in pripadajočih aminokislinskih prekurzorjev (vir: Corzani, 2007).

2.7 **Biogeni amini v vinu**

V skladu z mnogimi raziskovalnimi izsledki v člankih je bilo do sedaj v vinih odkritih več kot 20 vrst različnih biogenih aminov in ti so: butilamin, kadaverin, 1,3-diaminopropan (propandiamin), dimetilamin, etanolamin, etilamin, heksilamin, histamin, tiramin, indol, isopropilamin, izopentilamin, metilamin, 2-metilbutilamin, morfolin, pentilamin, beta-feniletilamin, piperdin, propilamin, pirolidin, putrescin, serotonin, serotonin, spermin in 2-pirolidon (Lonvaud-Funel, 2001).

Najbolj pogosti biogeni amini v vinu so putrescin, tiramin, histamin in kadaverin (Lonvaud-Funel, 2001).

2.7.1 Biološki razkis ali jabolčno-mlečnokislinska fermentacija

Vinifikacija grozdja sestoji iz dveh glavnih procesov fermentacije. To sta alkoholna fermentacija in jabolčno-mlečnokislinska fermentacija. Alkoholna fermentacija mošta poteka s pomočjo vinskih kvasovk (*Saccharomyces cerviseae)*, ki pretvarjajo grozdni sladkor v etanol in ogljikov dioksid.
Jabolčno-mlečnokislinska fermentacija pa je proces, pri katerem pride do pretvorbe L-malične (jabolčne) v L-mlečno kislino (Anly in Bayram, 2008).
Jabolčno-mlečnokislinska fermentacija je prisotna pri večini rdečih in nekaj belih vrstah vin in poteka z delovanjem mlečnokislinskih bakterij. V vinu in moštu so zastopane mlečnokislinske bakterije iz rodov *Leuconostoc, Pecicoccus, Lactobacillus* in *Oenococcus.* Glavni razlog, zaradi katerega je pomembna jabolčno-mlečnokislinska fermentacija, je razkis medija, ki nastane s pretvorbo L-malične (jabolčne) v L-mlečno kislino.
Pomen jabolčno-mlečnokislinske fermentacije je zagotovitev določene stopnje stabilnosti mikroorganizmov in sprememba senzoričnih značilnosti vina, ki je posledica tvorbe sekundarnih metabolitov, ki nastajajo pri delovanju mikroorganizmov (Lonvaud-Funel, 2001 cit. po Lonvaud-Funel, 1999).

2.7.2 Izvor biogenih aminov v vinu

Biogeni amini so nezaželene spojine vina, zato se pojavlja težnja k zmanjšanju njihove vsebnosti. Potrebno je ugotoviti njihov izvor. Čeprav je bilo opravljenih veliko študij, pravega odgovora ne vedo. V glavnem velja, da biogeni amini v največji meri nastajajo med mlečnokislinsko fermentacijo, ki se jo zaradi tega jemlje kot ključni proces za nastanek biogenih aminov. Študije so pokazale, da znotraj jabolčno-mlečnokislinske fermentacije nastanejo putrescin, histamin in tiramin (Lonvaud-Funel, 2001).
Nekatere druge študije so pokazale, da so biogeni amini v glavnem produkt delovanja *Oenococcus oeni,* vendar spet druge študije pravijo, da so le vrste *Lactobacillus spp.* sposobne tvorbe biogenih aminov (Del Prete in sod. 2009, cit. po Lonvaud-Funel in Joyeux, 1994; Guerrini in sod., 2002; Moreno-Arribas in sod., 2003; Landete in sod., 2005; Costantini in sod., 2006).
Torrea Goñi in Ancìn Azpilicueta (2001) sta v člankih navedla, da je nastanek biogenih aminov posledica delovanja kvasovk med alkoholno fermentacijo.
V nekaterih študijah se celo omenja, da so biogeni amini indikatorji pomanjkljivih higienskih pogojev med samo proizvodnjo vina ali pa so povezani s slabimi sanitarnimi pogoji grozdja, kar velja predvsem za amine, kot so putrescin in kadaverin (Del Prete in sod., 2009 cit. po Leitao in sod., 2005).

Biogeni amini so naravno prisotni v grozdju brez zunanje mikrobne kontaminacije. Nekateri biogeni amini se pojavljajo v vinu takoj po končani alkoholni ali jabolčno-mlečnokislinski fermentaciji kot posledica normalnih presnovnih procesov kvasovk in bakterij (Del Prete in sod., 2009).
Sinteza biogenih aminov je lahko posledica obrambnega mehanizma mikroorganizmov kot odgovor na kisel pH vinskega medija (Arena in Manca de Narda, 2001).
Del Prete in sodelavci (2009) navajajo, da sta putrescin in etanolamin prisotna že v grozdnih jagodah, saj so to navedli že prej Broquedis in sod. (1989) ter Ough in sod. (1981). Ker sta prisotna že v grozdju, sta posledično tudi v moštu. Koncentracija etanolamina se med alkoholno fermentacijo poviša. Raven putrescina se po zaključku alkoholne fermentacije zniža. Vzrok je lahko v vezavi putrescina v metabolizem kvasovk, ker je prekurzor spermina in spermidina (Del Prete, 2009 cit. po Igarashi in Kashiwagi, 1999).
V splošnem lahko trdimo, da je raznolikost in vsebnost biogenih aminov preplet različnih klimatskih in geoloških faktorjev, ki so značilni za vinogradniške regije, raznolikih enoloških praks, kot so raznolikost grozdnih sort, dolžina in vrsta maceracije ter uporaba mikroorganizmov, ki sodelujejo pri procesu fermentacije. Vsebnost in raznolikost biogenih aminov je odvisna tudi od koncentracije aminokislin v moštu (Anli in sod., 2004).

2.7.3 Mejne vrednosti koncentracij biogenih aminov v vinu

Mejne koncentracije, izražene kot vsota vseh biogenih aminov prisotnih v vinu, niso določene. Dejanske koncentracije pa se gibljejo v območju od nekaj mg/L do približno 50 mg/L, kar je odvisno od vrste vina (Anli in Bayram, 2008). V nekaterih evropskih državah so predpisane mejne vrednosti koncentracij histamina. V Nemčiji je mejna koncentracija histamina v vinu 2 mg/L, v Belgiji je od 5–6 mg/L, Francija je postavila mejno koncentracijo histamina na 8 mg/L. V Švici (Shalaby, 1996) je dovoljena najvišja koncentracija histamina izmed vseh naštetih držav in znaša 10 mg/L (Anli in Bayram, 2008).
V Sloveniji imamo mejne (dovoljene) koncentracije histamina v alkoholnih pijačah zapisane v Pravilniku o pogojih, ki jih mora izpolnjevati grozdje za predelavo v vino, o dovoljenih tehnoloških postopkih in enoloških sredstvih za predelavo vina in o pogojih glede kakovosti vina, mošta in drugih proizvodov v prometu – PRILOGA II (Ur. l. RS, št. 43/2004). Vrednosti so prikazane na ***Tabeli 2.*** Najvišja dovoljena vsebnost histamina v alkoholnih pijačah je 2 mg/L.

Tabela 2: Prikaz tabele iz PRILOGE II z naslovom: Največje vrednosti kemijskih parametrov, ki so zahtevane pri posameznih kakovostnih razredih vin, ki so pridelana na ozemlju Republike Slovenije (vir: Ur. l. RS, št. 43/2004, PRILOGA II, str. 2).

Kemijski parameter		Največja dovoljena koncentracija
Malvidin diglukozid [mg/L]		15
Histamin [mg/L]		2
Procymidon in ostali botriticidi [mg/L]		20
Etilkarbamat [µg/L]		15
Topni sulfati kot K_2SO_4 [g/L]		2
Fosforna kislina kot P_2O_5 [mg/L]		1000
Natrij, izražen kot Na [mg/L]		60
Natrij, izražen kot NaCl [mg/L]		154
Nitrati, izraženi kot N_2O_5 [mg/L]		200
Kadmij - Cd [mg/L]		0,01
Železo - Fe [mg/L]	Belo in rose vino	10
	Rdeče vino	15
Kositer - Sn [mg/L]		1,0
Baker - Cu [mg/L]		1,0
Brom - Br skupaj [mg/L]		0,5
Brom v organski obliki [g/L]		Odsoten
Fluor - F [mg/L]		1
Srebro - Ag [mg/L]		0,3
Svinec - Pb [mg/L]		0,25
Cink - Zn [mg/L]		5
Aluminij- Al [mg/L]		5
Arzen - As [mg/L]		0,2
Bor kot borova kislina [mg/L]		80
Umetna barvila		Odsotna
Metanol [mg/L]	Belo in rose vino	150
	Rdeče vino	300
Skupno število mikroorganizmov (odprto vino)		100 celic/mL

2.7.4 Faktorji, ki vplivajo na vsebnost biogenih aminov v vinu

Pogoji, ki so pomembni pri nastanku biogenih aminov,. so vsebnost prostih aminokislin, prisotnost dekarboksilaza-pozitivnih organizmov, ustrezni pogoji za rast bakterij, sintezo encima dekarboksilaze in dekarboksilazno aktivnost (Silla Santos, 1996).

Nekateri faktorji povečajo koncentracijo aminokislinskih prekurzorjev v grozdju in kasneje vinu (sorta grozdja, geografska regija, letina, dolžina maceracije, staranje vina in dodajanje hranil).
Nekateri drugi faktorji pa vplivajo na diverziteto, rast, dekarboksilazno aktivnost in ekspresijo genov pri mikroorganizmih, ki so potencialni proizvajalci biogenih aminov. Omenjeni faktorji so: vsebnost hranil, pH, temperatura, koncentracija SO_2 in različni substrati in drugi produkti fermentacije.

2.7.4.1 Vinogradniški vplivi

Putrescin in drugi poliamini so že predhodno prisotni v grozdnih jagodah (Del Prete in sod., 2009 cit. po Ough in sod., 1981; Broquedis in sod., 1989).
Na koncentracijo putrescina v vinu verjetno bolj vpliva geografska lega vinograda, kot pa sama proizvodnja vina. Med drugim je znano, da je pomanjkanje natrija v tleh vinograda povezano z vsebnostjo biogenih aminov v grozdnih jagodah in posledično v vinu. Na vsebnost biogenih aminov v vinu vpliva tudi stopnja zrelosti grozdja ob obiranju in tip tal, na katerih uspeva vinograd (Lonvaud-Funel, 2001).
Soufleros in sod. (1998) navajajo, da na koncentracijo in vrsto aminokislin v grozdnih peškah vpliva tudi fertilizacija vinograda, klimatski pogoji ter sorte grozdja.
Na koncentracijo biogenih aminov pa vpliva tudi letina proizvodnje. Del Prete in sod. (2009) navajajo razliko v koncentraciji biogenih aminov (etanolamina, putrescina, tiramina in etilamina) v večih vrstah rdečih vin letnikov 2004 in 2005. Razlika naj bi bila posledica drugačnih vremenskih pogojev med letoma. Poleg tega avtor navaja tudi različne koncentracije biogenih aminov med različnimi vini (Merlot, Cabernet Franc, Syrah idr.).

2.7.4.2 Maceracija

Maceracija je vinarski proces, pri katerem se izločajo fenoli, beljakovine, polisaharidi in aminokisline, ki so prekurzorji biogenih aminov. Pri maceraciji so v stiku grozdni mošt in grozdna kožica in tako poteka izločanje zgoraj omenjenih spojin.
Dolžina maceracije vpliva tudi na koncentracijo biogenih aminov. Dlje kot traja postopek maceracije, večja je vsebnost biogenih aminov, čeprav nekateri avtorji tega ne navajajo. Kot primer vzamemo Soleas in sod. (1999), ki ne poročajo o morebitnih korelacijah med dolžino maceracije in koncentracijo biogenih aminov. Medtem ko Bauza in sod. (1995) navajajo pomembnost povezave med dolžino maceracije in vsebnostjo biogenih aminov v vinu.

2.7.4.3 Fizikalno-kemijski parametri vina

Različni fizikalno-kemijski parametri vina lahko posredno vplivajo na koncentracijo in raznolikost biogenih aminov, saj lahko vplivajo na koncentracijo in diverziteto

mikroorganizmov v vinu ter lahko vplivajo na aktivnost encimov dekarboksilaz. Parametri so opisani spodaj.

pH

pH določa biološko aktivnost bakterijskih organizmov in njihovo raznolikost v vinskem mediju. Višji kot je pH, večja je raznolikost mikroorganizmov, ker ima pH vlogo selektivnega faktorja mikroorganizmov v vinu. Pri visokem pH-ju je koncentracija biogenih aminov vedno velika, kar je posledica velike raznolikosti in večje rasti mikroorganizmov (Lonvaud-Funel, 2001 cit. po Lonvaud-Funel in Joyeux, 1994). Bela vina, ki imajo v glavnem nižje pH vrednosti od rdečih vin, imajo po navadi manjšo vsebnost biogenih aminov kot rdeča vina (Soufleros in sod., 1998).

Koncentracija SO_2

Koncentracija prostega SO_2 ima tudi vpliv na akumulacijo biogenih aminov v vinu. V glavnem visoke vrednosti SO_2 zmanjšajo nastajanje tiramina, saj inhibirajo razvoj mikroorganizmov z dekarboksilazno aktivnostjo. Pokazali so (Bauza in sod., 1995), da vrednosti SO_2 nad 100 mg/L zelo zmanjšajo nastanek biogenih aminov v vinu. Vidal-Carou in sod., 1990 navajajo, da najvišje koncentracije biogenih aminov zasledimo v rdečih vinih z nižjimi vrednostmi SO_2, medtem ko visoke koncentracije SO_2 lahko povežemo z nižjo koncentracijo histamina in tiramina.
Vpliv koncentracije SO_2 na koncentracijo tiramina je povezan tudi s pH vrednostjo. Višje pH vrednosti in višja koncentracija SO_2 povzročata zmanjšanje proizvajanja tiramina, pri nižjem pH in višji koncentraciji SO_2 pa je proizvodnja tiramina večja (Gardini in sod., 2005).

Temperatura

Na akumulacijo biogenih aminov v vinu lahko vpliva tudi temperatura fermentacije in shranjevanja vina. Temperatura shranjevanja nima bistvenega vpliva na koncentracijo biogenih aminov (Smit, 2007 cit. po Gonzales in Ancin, 2006). Vidal-Carou in sod. (1991) niso zasledili nastanka ali povečane količine biogenih aminov v vinu, shranjenem pri različnih temperaturah od 4°C do 35 °C za obdobje 93 do 125 dni. Edina razlika, ki so jo opazili, je zmanjšanje koncentracije histamina in tiramina (Anli in Bayram, 2008 cit. po Vidal-Carou, 1991). O zmanjšanju koncentracije histamina poroča tudi Bach (2012). Po podatkih Ough in sod. (1981) fermentacija pri temperaturi 21 °C pomeni manjšo vsebnost biogenih aminov. Fermentacija pri 10 °C in 32 °C pa v primeru, ki ga navaja Ough in sod. (1981) pomeni višjo koncentracijo biogenih aminov.

Vpliv sestave vina na aktivnost dekarboksilaz

Različne spojine v vinu lahko zavrejo ali pospešijo nastanek biogenih aminov. Mlečna kislina, ki je produkt jabolčno-mlečnokislinske fermentacije, inhibira aktivnost encima histidin dekarboksilaze (Lonvaud-Funel, 2001), medtem ko drugi avtorji navajajo, da ne vpliva na aktivnost ornitin dekarboksilaze (Smit, 2007 cit. po Mangani in sod., 2005). Druge spojine, ki lahko zavrejo nastanek biogenih aminov, so citronska kislina, glicerol, 2-merkaptoetanol, mlečna kislina in etanol. Moreno-Arribas in Lonvaud-Funel, (1999) sta zapisala, da kljub visokim koncentracijam omenjenih spojin v vinu ne moremo preprečiti nastanka tiramina (Smit, 2007 cit. po Moreno-Arribas in Lonvaud-Funel, 1999).

Pri visokih koncentracijah etanola (več kot 12 %) se aktivnost histidin dekarboksilaze zmanjša, kar vodi v zmanjšan nastanek histamina (Smit, 2007 cit. po Rollan in sod., 1995).

2.8 Vinorodni okoliš Kras

Tla

Tla kraških planot so sestavljena iz krednih apnencev, razen ozkega pasu ob obrobju planote tla sestavljajo apnenci iz eocena.
Pretežni del kraškega vinorodnega okoliša leži na obrobju Kraške planote na 200–400 m nadmorske višine, le nekatere drobne vzpetine segajo do 500 m nadmorske višine. Na Krasu ni stalnih vodnih tokov, padavinska voda pa takoj odteče v razjedeno propustno apnenčasto podlago. Tla so po večini zelo plitva, porasla s travinjem in kraškimi gmajnami. Na debelejše plasti zemlje naletimo v vrtačah in dolinah, kjer so vse najpomembnejše vinogradniške lege (Culiberg, 1999).
Tla na Krasu so rdeče-rjave barve in se imenujejo jerovica, jerina ali terra rossa.

Klima

Povprečne letne temperature zraka se gibljejo od 10,6 °C in 11,7 °C. Najtoplejši mesec je junij, ko je povprečna mesečna temperatura zraka med 19,8 °C in 21 °C. Najhladnejši mesec je januar in tedaj se temperature gibljejo med 1,6 °C in 2,8 °C. Razporeditev padavin je čez celo leto z vrhom novembra in na prehodu iz pomladi v poletje. Če gledamo padavine po letnih časih, pade največ padavin jeseni, najmanj pozimi in pomladi. Povprečna letna količina padavin na tem območju je med 1417 mm in 1683 mm (Culiberg, 1999).
Poleti pade večina padavin v kratkih nalivih in plohah tako, da deževnica hitro odteče v notranjost kraškega sveta. Ker so ob tem prisotne tudi visoke dnevne temperature, veliko vode tudi izhlapi (Belec, 1998).

2.9 **Določanje biogenih aminov v vinu**

2.9.1 Predpriprava in priprava vzorcev

Zaradi raznolike sestave vinskega matriksa je določanje biogenih aminov kompleksno. Uporabljajo se razni koraki predčiščenja ali predkocentriranja. Nekatere metode uporabljajo različne predpriprave realnih vzorcev, da bi tako odstranili moteče substance. Za odstranjevanje polifenolov, ki so moteče spojine pri določanju biogenih aminov, se pogosto uporablja polivinilpirolidon (PVP) (Busto in sod., 1994). Odstranitev motečih spojin je mogoča tudi z ekstrakcijo na trdnem nosilcu (SPE) ali ekstrakcijo tekoče-tekoče (LLE) (Anli in Bayram, 2008). Ekstrakcija tekoče-tekoče ima po navadi za posledico slabo analitsko ponovljivost (Busto in sod., 1994).
Dodatek polivinilpirolodona k vzorcem vina se je izkazal za najuspešnejšega pri odstranjevanju polifenolov. Tako pripravljene vzorce vina se nato še filtrira in pripravljeni so za derivatizacijo. Ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE) z uporabo kolon z anionsko izmenjavo, reverzno faznih C18 in polimernih kolon se uporablja za predčiščenje (clean-up) in predkoncentriranje aminov pred reakcijo derivatizacije (Hernández-Cassou in Saurina, 2011).

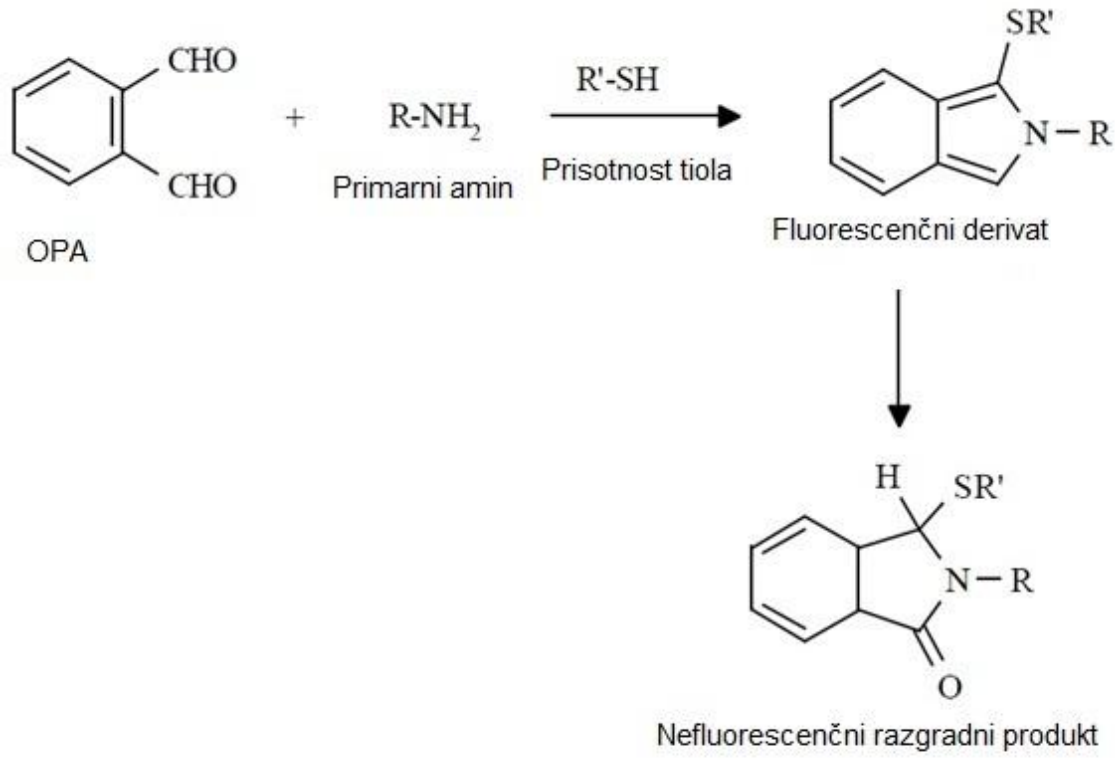
2.9.2 Derivatizacija

Biogeni amini absorbirajo pri nizkih valovnih dolžinah, kjer je veliko interferenčnih substanc. Da bi se izognili tem težavam, se uporabljajo različni derivatizacijski procesi, ki povzročijo pomik absorbance k višjim vrednostim valovnih dolžin in s tem izboljšajo mejo detekcije posamezne metode (UV-vis metode) (Busto in sod., 1994).

Derivatizacija se uporablja tudi zaradi majhne hlapnosti BA in odsotnosti kromoforov (pri BA z alifatsko strukturo).
Reakcija derivatizacije poteče preko aminske skupine z derivatizacijskimi reagenti ninhidrin, dansil in dabsil klorid, benzil klorid, fluorescin, naftalen-2,3-dikarboksidadehid, 9-fluoroenilmetil kloroformat (FMOC) in o-ftalaldehid (OPA). Našteti reagenti so ustrezni tudi za spektrofotometrične in fluorimetrične metode (Önal, 2007).

2.9.2.1 Ortoftalaldehid (OPA)

Med različnimi derivatizacijskimi reagenti je med najbolj uporabljanimi ortoftalaldehid (OPA). Najpomembnejša prednost tega reagenta je, da hitro reagira z BA pri sobni temperaturi. Slabost OPA je, da poteče derivatizacija le primarnih aminov in nestabilni derivati biogenih aminov (Busto in sod., 1994). Reakcija med OPA in primarnim aminom je prikazana na ***Sliki 4***.
OPA zlahka reagira s primarnimi amini v prisotnosti reagenta, kot je N-acetilcistein ali 2-merkaptoetanol (MCE) (Önal, 2007).



Slika 4: Reakcija med primarnimi amini in derivatizacijskim reagentom OPA (vir: Coppex, 2000).

2.9.2.2 Fluorenilmetilkloroformat (FMOC)

Uporaba FMOC-a omogoča analizo biogenih aminov: putrescin, spermin, kadaverin, spermidin istočasno s histaminom, feniletilaminom, tiraminom in aminokislinami argininom, ornitinom, fenilalaninom, histidinom in tirozinom. Meritve fluorescence derivatov potekajo z vzbujanjem pri 263 nm in detekcijo pri 313 nm. Z reagentom FMOC lahko hkrati z biogenimi amini določamo tudi aminokisline v vinu (Bauza in sod., 1995).

2.9.2.3 Dansil klorid

Dansil klorid je najširše uporabljeni reagent za derivatizacijo biogenih aminov. Pri derivativazciji dobimo visoko fluorescenco, relativno stabilne sulfonamide, ki se jih izolira z ekstrakcijo na trdnem nosilcu (SPE).
Raztopina dansil klorida je dodana filtriranemu vzorcu vina skupaj z internim standardom in pufrom, ki se ga doda toliko, da je pH raztopine 10,5. Nato se doda še aceton/voda v razmerju 3/1. Reakcijsko mešanico se nato premeša in inkubira za 25 min pri temperaturi 65 °C v temnem prostoru (Busto in sod., 1994).

2.10 Analitske metode za določanje biogenih aminov

V literaturi so podatki o različnih analiznih metodah za določanje biogenih aminov v hrani. Glavne so naslednje metode: tankoplastna kromatografija (TLC – thin layer chromatography), plinska kromatografija (GC – gas chromatography), kapilarna elektroforeza (CE – capillary electrophoresis) in visokotlačna tekočinska kromatografija (HPLC) (Önal, 2007). Nedavno pa je bila na UNG razvita tudi visoko občutljiva metoda za določanje BA, ki temelji na laserski detekciji (Franko, 2008) in uporabi encima transglutaminaze za pretvorbo biogenih aminov (BA) v amonij (Punakivi in sod., 2006), ki ga kvantificiramo preko tvorbe indofenol modrega.

Tankoplastna kromatografija je bila ena izmed prvih uporabljenih tehnik za določanje biogenih aminov v hrani (Halász, 1994). Enostavno in hitro TLC metodo sta opisala Garcia-Moruno in sod., 2005. Z metodo se določa sposobnost bakterij za proizvodnjo biogenih aminov. Uporabljen je tekoči medij, ki vsebuje aminokislinske prekurzorje. Z metodo lahko določamo fluorescentne derivate histamina, tiramina, putrescina in feniletilamina. Metoda ne daje lažno pozitivnih rezultatov. Potrebna oprema je foto kamera in UV transiluminator.

Med vsemi metodami za določanje biogenih aminov so najpogosteje uporabljene metode visokotlačne tekočinske kromatografije (HPLC). Metode vključujejo pred ali po kolonsko derivatizacijo in različne oblike detekcij pripadajočih derivatov biogenih aminov. Derivatizacija biogenih aminov je potrebna zaradi majhne hlapnosti in odsotnosti kromoforov. O derivatizacijskih reagentih sem pisala v poglavju 2.9.2.

Za različne HPLC metode so potrebni tudi različni koraki predobdelave vzorcev, ki jih želimo analizirati. Različne ekstrakcije na trdnih nosilcih se izvajajo z uporabo različnih kolon (SAX, SCX, C_{18} in mešane metode SCX in C_{18}) (Hernández-Cassou in Saurina, 2011). Izvajajo se tudi ekstrakcije s klorovodikovo kislino (Önal, 2007 cit. po Fernandes in Ferreira, 2000). Detekcija derivatov poteka z uporabo fluorescenčnih, UV in elektrokemijskih detektorjev (Önal, 2007).

Med metodami tekočinske kromatografije je tudi metoda ločbe MECC (micellar electrokinetic chromatography) v povezavi z LIF (laser-induced detection) detekcijo. Uporablja se za kvantifikacijo večjega števila biogenih aminov in aminokislin v vinu (Önal, 2007 cit. po Nouadje in sod., 1997).

Metode kapilarne elektroforeze (CE) so pomembne z vidika porabe časa, saj so časi analiz kratki in pa zaradi visokih resolucij. Problem se pojavlja v občutljivosti, ki se izboljša ob povezavi CE z MS (mass spectrometry) detekcijo namesto UV detekcije. Kvasnicka in Voldrich (2006) sta razvila direktno metodo, ki ne potrebuje derivatizacije ali predčiščenja vzorca. Metoda je občutljiva in hitra, saj traja manj kot 15 min (Önal, 2007).

Plinska kromatografija je redkeje uporabljena metoda za določanje biogenih aminov. Fernandes in Ferreira (2000) sta razvila visoko občutljivo in natančno metodo plinske kromatografije z masno spektromatrijo (GC-MS). Trajanje ene meritve obsega 18 min. Z metodo lahko sočasno določamo diamine, poliamine in aromatske amine v sokovih in različnih vinih. Pri metodi je potrebna derivatizacija, kjer se tvorijo hlapni derivati z o-heptafluorobutirilom (Önal, 2007).
PCR (polymerase chain reaction) ali po slovensko verižna reakcija s polimerazo je še ena izmed možnih metod za določanje biogenih aminov. Tehnike s PCR omogočajo

zaznavo vsebnosti bakterijskega encima dekarboksilaze. Z metodo ne dobimo kvantitativnih (koncentracije biogenih aminov) in kvalitativnih (vrste biogenih aminov) podatkov, lahko le ocenimo možnost nastanka biogenih aminov (Coton in sod., 1998a cit. po Smit, 2007).

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 Reagenti in raztopine

Pri analiziranju sem uporabila naslednje kemikalije in reagente:

- putrescin dihidroklorid, 99,8 % čistost, Sigma-Aldrich,
- histamin dihidroklorid, čistost ≥ 98 % (TLC), Sigma-Aldrich,
- metilamin hidroklorid, čistost ≥ 98 %, Sigma-Aldrich,
- tiramin hidroklorid, čistost ≥ 98 %, Sigma-Aldrich,
- triptamin hidroklorid, čistost 99 %, Sigma-Aldrich,
- kadaverin dihidroklorid, čistost ~99 %, Sigma-Aldrich,
- 2-metilbutilamin, čistost ≥ 97 %, Sigma-Aldrich,
- etanolamin, puriss. p.a., ACS reagent, ≥99.0%, Sigma-Aldrich,
- heksilamin, čistost 99 %, Sigma-Aldrich,
- butilamin, čistost 99,5 %, Sigma-Aldrich
- izopentilamin, čistost ≥ 98 %, Sigma-Aldrich,
- boratni pufer ($Na_2B_4O_7$*$10H_2O$), Sigma-Aldrich,
- ortoftalaldehid, čistost ≥ 99,0 %, Sigma-Aldrich,
- natrijev hidroksid, ACS reagent, ≥ 97 %, Sigma-Aldrich,
- metanol, za tekočinsko kromatografijo ≥ 99,8 %, Merck,
- etanol, absolutni, čistost 99,8 %, Sigma-Aldrich,
- tetrahidrofuran, za tekočinsko kromatografijo, čistost ≥ 99,9 %, Sigma-Aldrich,
- Natrijev acetat, čistost 99 %, ACROS ORGANICS,
- L (+)-tartarna kislina, ≥ 99,9 %, Appli Chem,
- 2-merkaptoetanol, čistost 99 %, Appli Chem
- klorovodikova kislina 31%, ITRIJ in
  deionizirana voda s prevodnostjo 18 MΩ*cm.

3.1.1 Vzorci vina

Analizirala sem 10 vzorcev vina Teran PTP, ki je pridelano iz grozdja sorte Refošk na absolutnih vinogradniških legah slovenskega vinorodnega podokoliša Kras in italijanskem krasu v provinci Gorica in provinci Trst (uradno ime Terrano D.O.C.) (Vanzo A. in sod., 2012). Vzorce sem dobila označene z oznakami: 12/995, 12/997, 12/1007, 12/1008, 12/1009, 12/1011, 12/1081, 12/1084, 12/1088 ter 12/1090.

3.1.2 Raztopine

Standardne raztopine posameznih biogenih aminov, standardne mešanice biogenih aminov, sintetično vino, boratni pufer ter raztopino ortoftalaldehida sem pripravila po postopkih, opisanih spodaj:

- raztopine posameznih biogenih aminov: zatehtala in pipetirala sem različne mase in volumne posameznih biogenih aminov (od 0,005 g–0,020 g) ter jih v 0,100 L bučki raztopila v 0,1 M raztopini klorovodikove kisline do oznake za 0,100 L.

- Sintetično vino: zatehtala sem 3,500 g tartarne (vinske) kisline ter jo prenesla v 1 L bučko. V bučko sem dodala približno 200 mL deionizirane vode. Nato sem dodala 120 mL absolutnega etanola in dopolnila z deionizirano vodo do oznake. Raztopini sem nato umerila vrednost pH na 3,5.

- Standardna mešanica biogenih aminov: zatehtala in pipetirala sem različne mase oziroma volumne (od 0,020 g–0,100 g L) biogenih aminov ter raztopino pripravila v sintetičnem vinu. Pripravila sem 250 mL standardne mešanice biogenih aminov, iz katere sem nato pripravila delovne raztopine za izdelavo umeritvenih premic za posamezne biogene amine.

- Boratni pufer: zatehtala sem 3,81 ± 0,01 g natrijevega tetraborata ($Na_2B_4O_7$) in ga raztopila v deionizirani vodi v 0,100 L bučki in dopolnila do oznake. Raztopino je bilo potrebno mešati (približno 30 min), da se je snov raztopila. Tako pripravljeni raztopini sem z 10 M natrijevim hidroksidom uravnala pH na vrednost 10,5. Raztopino sem pripravljala tedensko.

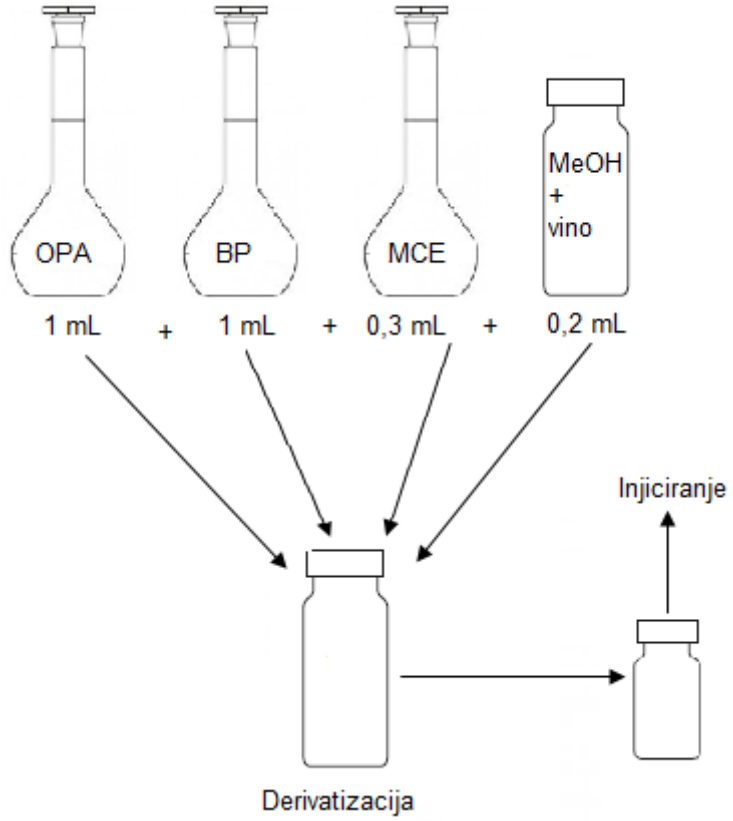
- Raztopina ortoftalaldehida (OPA): raztopino sem pripravila v 50 mL bučki. Zatehtala sem 20,0 ± 0,1 mg ortoftalaldehida, ga raztopila v metanolu ter dopolnila do oznake. Raztopino sem pripravljala dnevno ter jo zavarovala pred svetlobo.

3.2 **Derivatizacija biogenih aminov**

Za derivatizacijo biogenih aminov sem uporabila raztopino ortoftalaldehida, 2-merkaptoetanol in raztopino boratnega pufra s pH vrednostjo 10,5. Derivatizacija poteka pri sobni temperaturi.

3.2.1 Potek derivatizacije vzorcev vina

Postopek, po katerem sem delala derivatizacijo, je v skladu s standardom OIV-MA-AS315-18.
V prvo 25 mL stekleno vialo sem pipetirala 1 mL vzorca vina in nato še 1 mL metanola ter mešala 60 s. V drugo vialo sem pipetirala 1 mL raztopine ortoftalaldehida, 1 mL boratnega pufra in 0,3 mL (300 µL) 2-merkaptoetanola in mešala 60 s.
Iz prve viale (metanol in vzorec vina) sem odpipetirala 0,2 mL (200 µL) raztopine metanola in vzorca vina in prenesla v drugo vialo. To raztopino sem mešala 60 s, vzorec prenesla v 2 mL vialo in injicirala v HPLC in pomerila vrednosti. Na ***Sliki 5*** je shema reakcije derivatizacije.



Slika 5: Shema poteka derivatizacije. Okrajšave: OPA – ortoftalaldehid, MCE – 2-merkaptoetanol in BP – boratni pufer.

3.3 Instrumenti in oprema

Pred analizo vzorcev vina, sem vse vzorce filtrirala z acetatceluloznimi filtri s premerom por 0,45 µm znamke Sartorious.
pH meter, katerega sem uporabljala za umerjanje pH vrednosti, je znamke Hanna instruments HI 8417.
Uporabljala sem avtomatske pipete znamke BIOHIT (1 mL), Brand (5 mL) ter BIOHIT 200 µL.
Deionizirano vodo s prevodnostjo 18 MΩ*cm sem pridobila s sistemom znamke NanoPure ultrapure water systems Barnstead.
Vzorce sem analizirala na tekočinskem kromatografu Agilent 1100 s fluorescenčnim detektorjem Agilent 1100 Series G1321A. Programska oprema za upravljanje s sistemom je Software ChemStation for LC 3D systems.

3.4 Kromatografski pogoji

Kolona: Supelco Discovery C18 (250 mm x 4,6 mm), premer delcev je 5 µm.
Stacionarna faza: oktadecilsilan, C18.
Mobilna faza: metanol (A) / natrijev acetat (0,05 M) in tetrahidrofuran (THF) (v/v) v razmerju 96:4 (B)

Pretok: 1 mL/min
Volumen injiciranja: 25 µL
Dolžina ene meritve: 95 min
Temperatura kolone: 35 °C

Detektor: Fluorescenčni detektor
Exc = 356 nm in Em = 445 nm

Elucijski gradient:

Tabela 3: Elucijski gradient metode.

Čas [min]	Mobilna faza A	Mobilna faza B
0,00	80	20
15,00	70	30
23,00	60	40
42,00	50	50
55,00	35	65
60,00	35	65
70,00	80	20
95,00	80	20

3.5 Določanje retencijskih časov biogenih aminov

Pripravila sem raztopine različnih koncentracij vsakega biogenega amina posebej. Po postopku, omenjenem v prejšnjem poglavju, sem izvedla derivatizacijo in injicirala derivatizirane vzorce vina v HPLC sistem.

3.6 Umeritev

Iz standardne mešanice biogenih aminov sem pripravila štiri delovne raztopine (v koncentracijskem območju od 0,4 mg/L do 80 mg/L), s katerimi sem izdelala umeritvene premice biogenih aminov v mešanici.

3.7 Metoda standardnega dodatka

Pri metodi standardnega dodatka se redčenje vzorca vina pri postopku derivatizacije razlikuje od postopka, opisanega v točki 3.2.1.
Postopek je sledeči:
1 mL vzorca vina dodamo 1,5 mL metanola in 0,5 mL raztopine standardnega dodatka z znano koncentracijo biogenih aminov vialo ter premešamo.
Nato sledi že opisani postopek derivatizacije vzorca, ki je opisan v točki 3.2.1.

3.8 Statistične metode

Za vse izračune sem uporabila programsko opremo MS Excel 2007.
Računala sem povprečne, maksimalne in minimalne vrednosti koncentracij biogenih aminov.
Poleg tega sem računala tudi meje detekcije (LOD) in kvantifikacije (LOQ).
Grafe umeritvenih premic sem prav tako izdelala s pomočjo programske opreme MS Excel 2007.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Optimizacija kromatografskih pogojev

Analizo biogenih aminov smo želeli v celoti izvesti skladno z navodili v standardu (Method OIV-MA-AS315-18, 2009). Vendar sem po nekaj poskusih analiz ugotovila, da je mobilna faza, sestavljena iz raztopine natrijevega hidrogen karbonata in acetonirila, neustrezna za naš HPLC sistem. Težave so se pojavljale zaradi zamašitve (določenega dela) ventila na sistemu, zaradi katere nisem mogla izvesti meritev. Izvedla sem lahko samo eno meritev za posamezen vzorec, saj se je ob naslednjem injiciranju HPLC samodejno ustavil.
Zaradi tega smo se odločili za menjavo mobilne faze. Uporabili smo mobilno fazo, sestavljeno iz (A) 0,05 M raztopine natrijevega acetata v vodi in tetrahidrofurana v volumskem razmerju (v/v) 96:4 ter (B) metanol, katero so pri svojem delu uporabili Soleas in sod. (1999).
Uporabila sem enak elucijski gradient, kot je naveden v metodi OIV-MA-AS315-18, 2009. Vrednost pretoka skozi kromatografsko kolono je ostala 1 mL/min.
Zaradi zamenjave mobilne faze sem morala določati retencijske čase posameznih biogenih aminov, saj so zaradi drugačnih topil mobilne faze, kot so navedena v standardu OIV-MA-AS315-18, retencijski časi izoindolov različni. Elucijski gradient metode je ponazorjen v ***Tabeli 3***.

4.2 Derivatizacija

Med reakcijo derivatizacije poteče tvorba derivatov med biogenimi amini in derivatizacijskim reagentom, ki je v mojem primeru ortoftalaldehid (OPA). Derivati oddajajo fluorescenco pri določeni valovni dolžini.
Signal, ki ga pridobimo z instrumentom, je posledica fluorescence derivatov. Signal je podan z enoto LU (luminiscent unit), kar lahko prevedemo kot intenziteta luminiscence. Derivati različnih biogenih aminov imajo različno intenziteto luminiscence, kar je posledica strukturnih formul molekul biogenih aminov. Intenziteta signala istega derivata biogenega amina pa je odvisna od koncentracije biogenega amina v mediju, kjer ga določamo ter od časa, ki je pretekel od derivatizacije do meritve vzorca. Slednje izvemo iz standardne metode OIV-MA-AS315-18, kjer je navedeno, da so derivati nestabilni.

4.3 Določanje retencijskih časov biogenih aminov in stabilnost derivatov

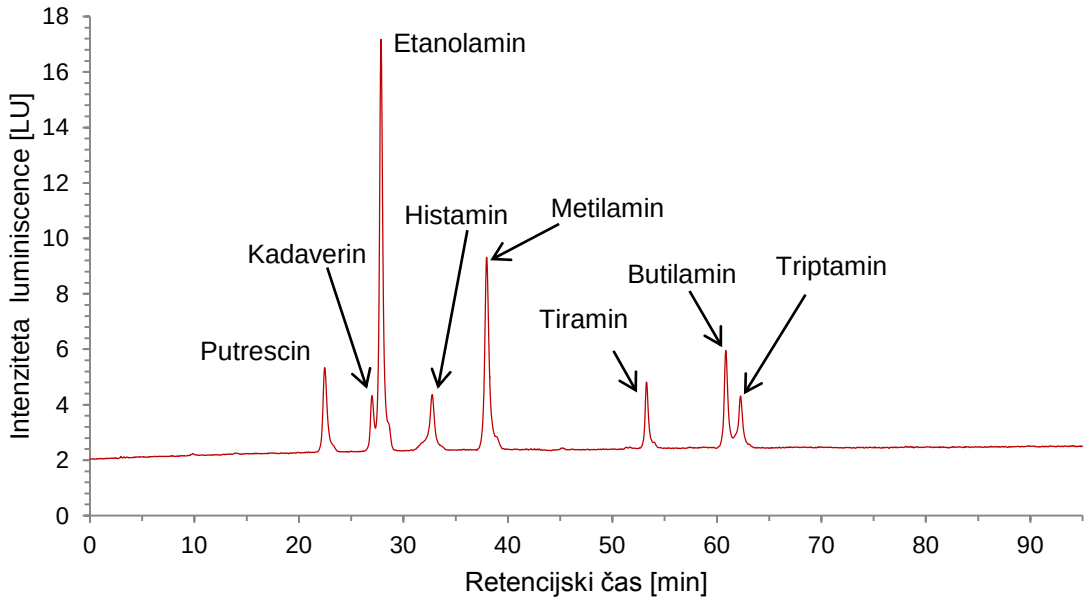
Pripravila sem raztopine različnih koncentracij vsakega biogenega amina posebej. Želela sem imeti matriks, ki bo čim bolj podoben realnim vzorcem, zato sem uporabila sintetično vino, ki sem ga pripravila, kot navajajo Vera in sod. (2010). Po standardnem postopku (OIV-MA-AS315-18) sem izvedla derivatizacijo in injicirala derivatizirane vzorce v HPLC sistem. Za vsako raztopino posameznega biogenega amina sem izvedla dve meritvi. Tako sem poleg retencijskega časa, ugotovila tudi stabilnost derivatov biogenih aminov. Stabilnost derivatov je pomembna, saj nas zanima, ali lahko derivatiziramo večje število vzorcev hkrati ter jih postavimo v avtomatski vzorčevalnik, da meritve potečejo v nekaj urnih zamikih. Če je stabilnost derivatov nekaj ur, se skrajša delo v laboratoriju in se v enem dnevu lahko analizira večje število vzorcev, ker potekajo injiciranja avtomatsko.

Derivatiziran vzorec standardne raztopine prenesem v 2 mL vialo ter v najkrajšem času injiciram v HPLC sistem.
Čas ene meritve traja 95 min. Po koncu ene meritve injiciram sveže derivatiziran vzorec standardne raztopine drugega biogenega amina in tako nadaljujem, dokler ne pomerim vseh standardnih raztopin posameznih biogenih aminov. Sekvenco merjenja vzorcev sem nastavila tako, da se v različnih časovnih intervalih ponovi injiciranje vzorca, ki je že bil pomerjen neposredno po derivatizaciji. Zaradi nestabilnosti derivatov se vrednosti intenzitete luminiscence [LU] izoindolov po določenem časovnem intervalu spreminjajo.
Po določenem časovnem intervalu se signal, ki ga dobim pri retencijskem času, značilnem za posamezni biogeni amin, zmanjša pod mejo detekcije oziroma toliko, da meritev ni več znotraj sprejemljive meje odstopanja. Zato je potrebno vzorce derivatizirati in jih v najkrajšem času injicirati v sistem.

Tabela 4: Retencijski časi posameznih biogenih aminov.

Biogeni amin	Retencijski čas [min]
Putrescin	22,3
Kadaverin	26,9
Etanolamin	27,7
Histamin	33,4
Metilamin	37,8
Tiramin	53,1
Butilamin	60,9
Triptamin	62,8

Retencijski časi se pri meritvah spreminjajo. Spreminjajo se lahko zaradi majhnih razlik v razmerju raztopin mobilne faze, ki nastanejo zaradi same priprave (0,05 M raztopina natrijevega acetata in tetrahidrofurana) in različnih temperaturnih pogojev v prostoru, kjer potekajo meritve (temperatura topil). Razlika v retencijskem času nastane tudi med meritvijo standardne raztopine posameznega biogenega amina, meritvijo standardne mešanice biogenih aminov ter realnim vzorcem vina. Pomembno je, da upoštevam retencijske čase, ki sem jih pridobila iz meritev standardnih mešanic biogenih aminov oziroma, vzorcev vina s standardnim dodatkom.
Retencijski časi posameznih biogenih aminov, ki so prikazani v ***Tabeli 4***, so povzeti iz retencijskih časov, ki jih imajo pri meritvi standardne mešanice biogenih aminov.



Slika 6: Kromatogram standardne mešanice 8 biogenih aminov, pripravljenih v sintetičnem vinu.

Na ***Sliki 6*** je prikazan kromatogram standardne mešanice osmih biogenih aminov. Biogeni amini na kromatogramu so (po vrsti z leve): putrescin, kadaverin, etanolamin, histamin, metilamin, tiramin, butilamin in triptamin. Ločljivost je dobra, le v primeru kadaverina in etanolamina ter butilamina in triptamina, kjer sta si vrhova zelo blizu, lahko pride do napak, saj se v primeru večje širine vrha enega ali drugega, vrhova prekrijeta in enega od njiju ne moremo nedvoumno potrditi.

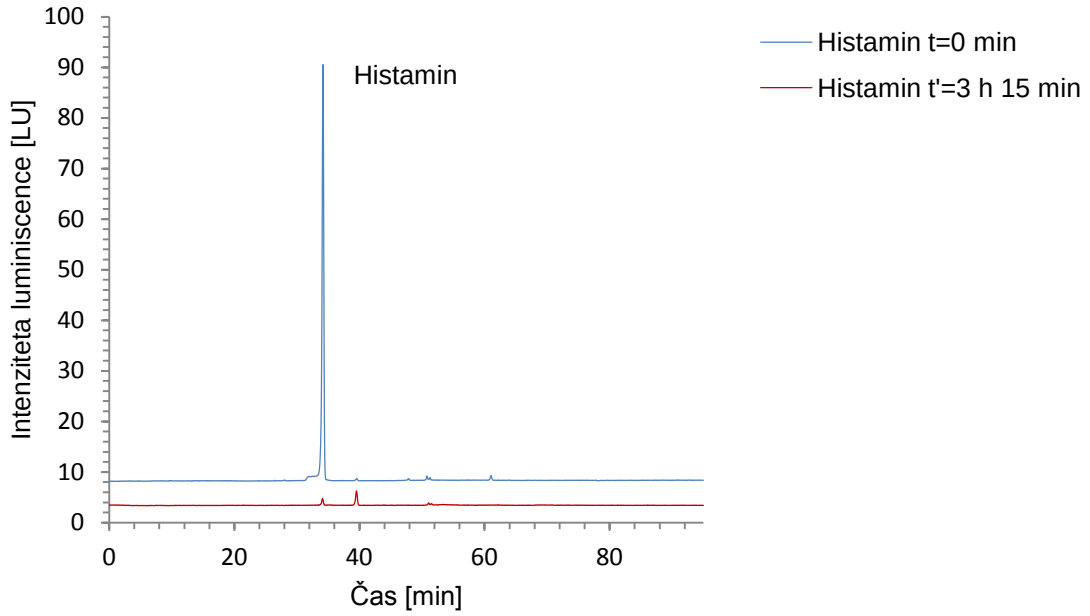
4.4 Stabilnost derivatov biogenih aminov

Višine kromatografskih vrhov derivatov biogenih aminov se s časom zmanjšujejo. Kot primer so prikazani kromatogrami histamina, etanolamina, metilamina in tiramina, pridobljeni iz meritev, ki so bile izvedene v različnih časovnih intervalih od reakcije derivatizacije standardnih raztopin. Prvo injiciranje vzorca v sistem izvedemo ob času t=0 od derivatizacije. Naslednje injiciranje vzorca po izteku meritve, ki znaša 95 min, ali pa po nekaj zaporednih meritvah. Kar pomeni, da je od derivatizacije preteklo 95 min, če izvedemo dve zaporedni injiciranji istega vzorca.

Derivati različnih biogenih aminov nimajo enake stabilnosti, kar je verjetno posledica same molekulske strukture posameznega biogenega amina, vendar natančnih podatkov o stabilnosti posameznih derivatov nimamo, ker to ni bil cilj naloge in tega nisem ugotavljala.

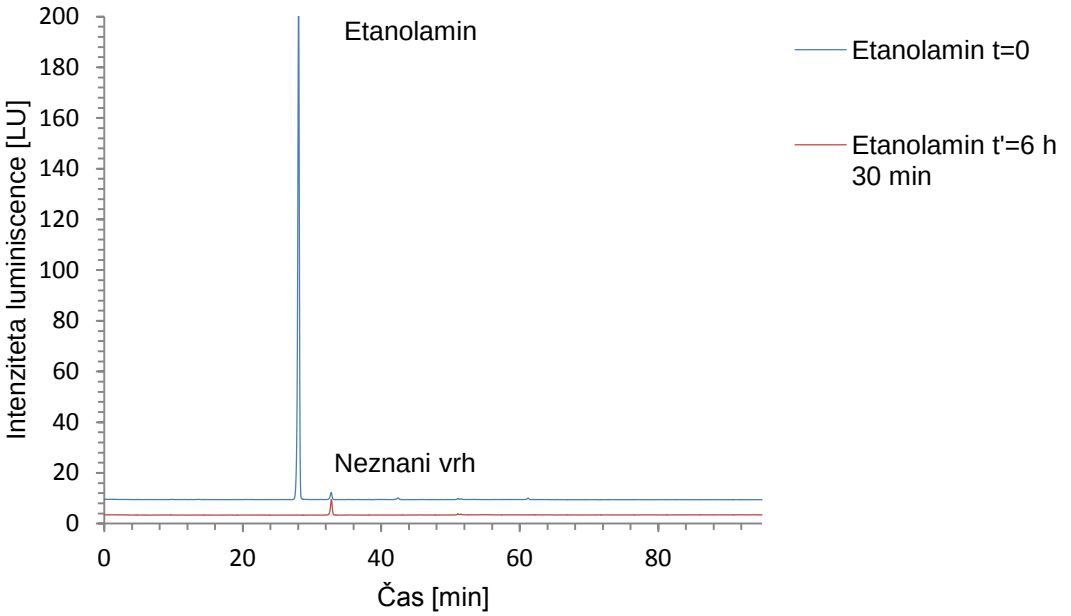
Na slikah spodaj (***Slika 7, 8, 9*** *in* ***10***) je ponazorjen padec intenzitete luminiscence [LU] določenega biogenega amina v različnih časovnih intervalih med posameznimi merjenji. Prvo injiciranje je v času t=0, kar je neposredno po derivatizaciji vzorca standardne raztopine biogenega amina. Naslednja meritev istega vzorca poteče po različnih časovnih intervalih, ki so zabeleženi poleg kromatogramov. Na ***Sliki 11*** je

prikazan kromatogram vzorca Terana PTP, pridobljen neposredno po derivatizaciji, in kromatogram, pridobljen po preteku 95 min od derivatizacije.



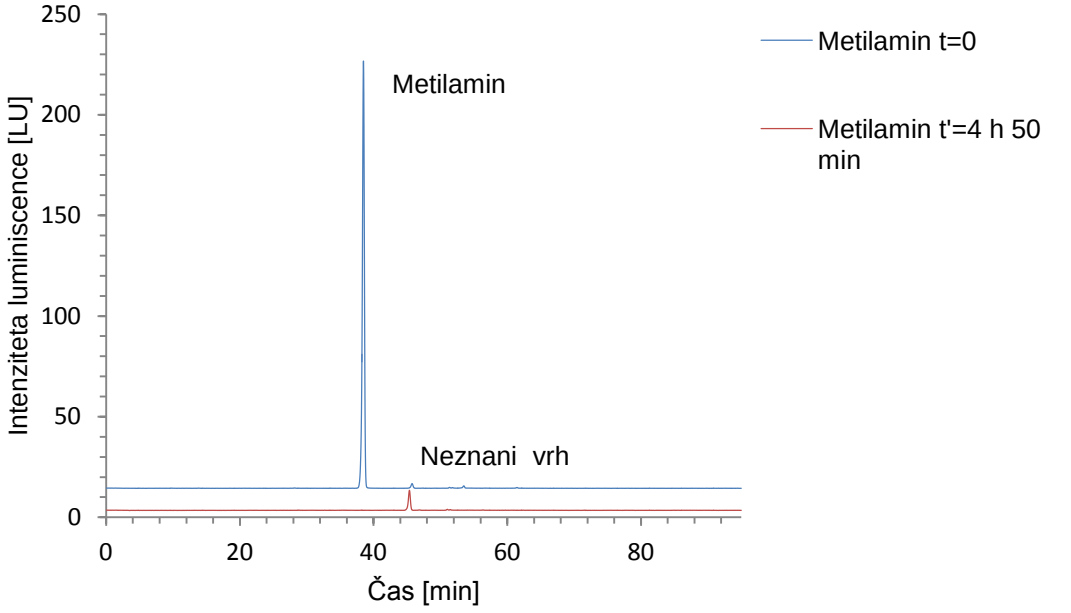
Slika 7: Kromatogram za histamin ob prvem injiciranju ob času t=0 min od derivatizacije in po t'=3 h 15 min od prvega injiciranja.

Ob prvem injiciranju standardne raztopine histamina po času t=0 od derivatizacije je intenziteta signala približno 90 LU. Po časovnem intervalu 3 h in 15 min poteče drugo injiciranje istega vzorca in iz ***Slike 7*** je viden padec intenzitete luminiscence na vrednost, ki ne doseže vrednosti 10 LU. Ob tem pa lahko vidimo drugi neznani vrh, za katerega domnevam, da je razpadni produkt derivata med ortoftalaldehidom (OPA) in biogenim aminom v tem primeru histaminom.



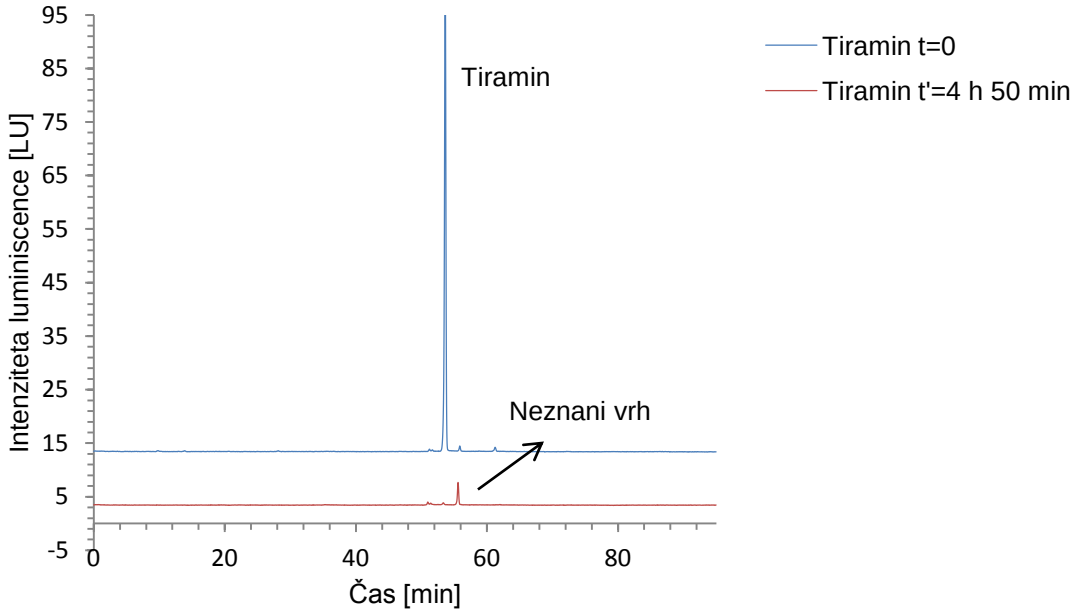
Slika 8: Kromatogram za etanolamin ob prvem injiciranju ob času t=0 od derivatizacije in po času t'=6 h 30 min od prvega injiciranja.

Na ***Sliki 8*** je intenziteta luminiscence ob prvem injiciranju derivatiziranega vzorca standardne raztopine etanolamina približno 200. Ob naslednjem injiciranju vzorca, ki poteče po času 6 h in 30 min pa ob istem retencijskem času ne zaznamo več nobenega kromatografskega vrha. Zaznamo drugi manjši neznani vrh, ki se sicer nekoliko nižje pojavi tudi pri prvi meritvi standardnega vzorca. Neznani vrh je lahko razpadni produkt derivata etanolamina in OPA reagenta.



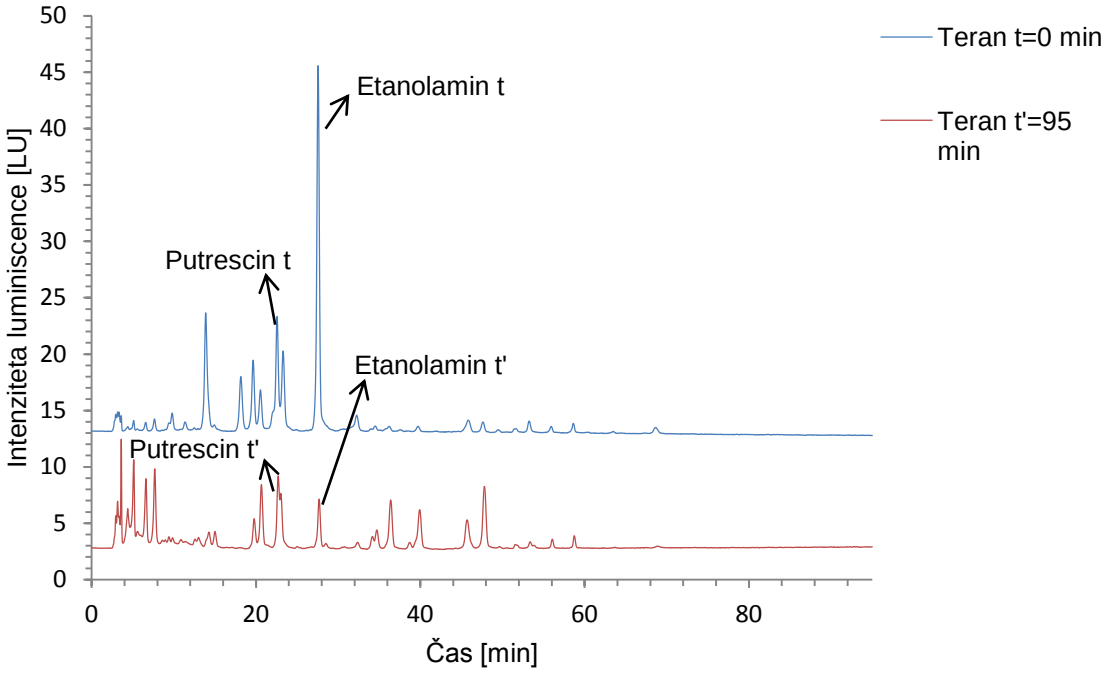
Slika 9: Kromatogram za metilamin ob prvem injiciranju ob času t=0 od derivatizacije in po času t'=4 h 50 min od prvega injiciranja.

Na ***Sliki 9*** je intenziteta luminiscence derivata metilamina ob prvem injiciranju derivatiziranega vzorca približno 215 luminiscenčnih enot [LU]. Po času 4 h in 50 min od prvega injiciranja poteče naslednje injiciranje istega vzorca in vrednosti luminiscence ne moremo več odčitati, ker kromatografskega vrha pri istem retencijskem času ni več zaznati.



Slika 10: Kromatogram za tiramin ob prvem injiciranju ob času t=0 od derivatizacije in po času t'=4 h 50 min od prvega injiciranja.

Višina kromatografskega vrha, ki pripada tiraminu (***Slika 10***), je ob prvem injiciranju standardnega vzorca nekaj nad vrednostjo 100 LU. Po časovnem intervalu 4 h in 50 min vrha pri retencijskem času za tiramin ni več zaznati.



Slika 11: Kromatogram vzorca Terana PTP ob injiciranju ob času t=0 od derivatizacije in po času t'=95 min od derivatizacije.

Na ***Sliki 11*** sta prikazana kromatograma vzorca Terana PTP. Kromatogram modre barve je pridobljen z meritvijo vzorca neposredno po derivatizaciji (t=0). Kromatogram rdeče barve je pridobljen z meritvijo vzorca po pretečenih 95 min od derivatizacije. Označeni so kromatografski vrhovi putrescina in etanolamina. Intenziteta luminiscence putrescina je pri t=0 približno 10 LU. Po 95 min se intenziteta signala zmanjša približno na vrednost 6 LU. Vrednost intenzitete fluorescence je nižja za 40 %. Intenziteta luminiscence etanolamina je ob času t=0 približno 30 LU. Ob injiciranju po 95 min od derivatizacije je intenziteta okoli vrednosti 4 LU. Intenziteta luminiscence se po 95 min od derivatizacije zmanjša za približno 85 %. Na ***Sliki 11*** niso vidne vrednosti luminiscenc, saj je kromatogram za t=0 premaknjen po ordinatni osi navzgor, da je padec intenzitete luminiscence lahko viden.

4.5 Umeritev

Za izdelavo umeritvenih premic sem pripravila po štiri redčitve standardne mešanice biogenih aminov. Umeritev sem izvedla dvakrat. Med eno in drugo umeritvijo sta pretekla dva meseca, zato sem za drugo umeritev pripravila novo standardno mešanico biogenih aminov.
Dve umeritveni premici sem pripravila zato, da bi lahko primerjala njune naklone in s tem ugotovila, ali lahko računam koncentracijo biogenih aminov z umeritveno premico, ki sem jo pripravila dva ali en mesec pred meritvijo posameznega vzorca.

Zanima nas sprememba naklona med prvo in drugo umeritveno premico biogenih aminov. To pa zato, ker želimo zaradi vpeljave standardizirane metode zagotoviti, da lahko računamo koncentracije tudi po umeritveni premici, ki je bila narejena pred določenim časovnim obdobjem, v našem primeru dva meseca prej.

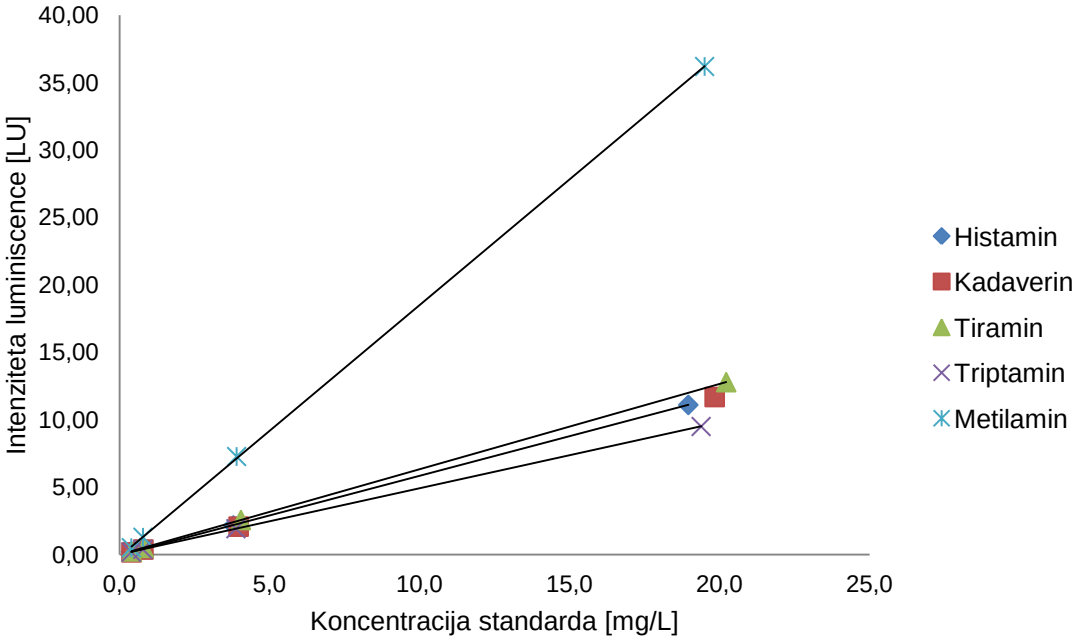
Tabela 5: Koncentracije biogenih aminov za pripravo umeritvenih premic 1.

Biogeni amin	Koncentracija aminov v standardni mešanici za redčenje [mg/L]	Redčitev standardne mešanice (2x) [mg/L]	Redčitev standardne mešanice (10x) [mg/L]	Redčitev standardne mešanice (50x) [mg/L]	Redčitev standardne mešanice (100x) [mg/L]
Putrescin	84,3	42,14	8,43	1,69	0,84
Kadaverin	39,7	19,84	3,97	0,79	0,40
Etanolamin	81,0	40,48	8,10	1,62	0,81
Histamin	37,9	18,96	3,79	0,76	0,38
Metilamin	39,0	19,50	3,90	0,78	0,39
Tiramin	40,4	20,22	4,04	0,81	0,40
Heksilamin	79,7	39,83	7,97	1,59	0,80
Izopentilamin	81,1	40,55	8,11	1,62	0,81
2-metilbutilamin	79,7	39,85	7,97	1,59	0,80
Butilamin	59,2	29,60	5,92	1,18	0,59
Triptamin	38,8	19,39	3,88	0,78	0,39

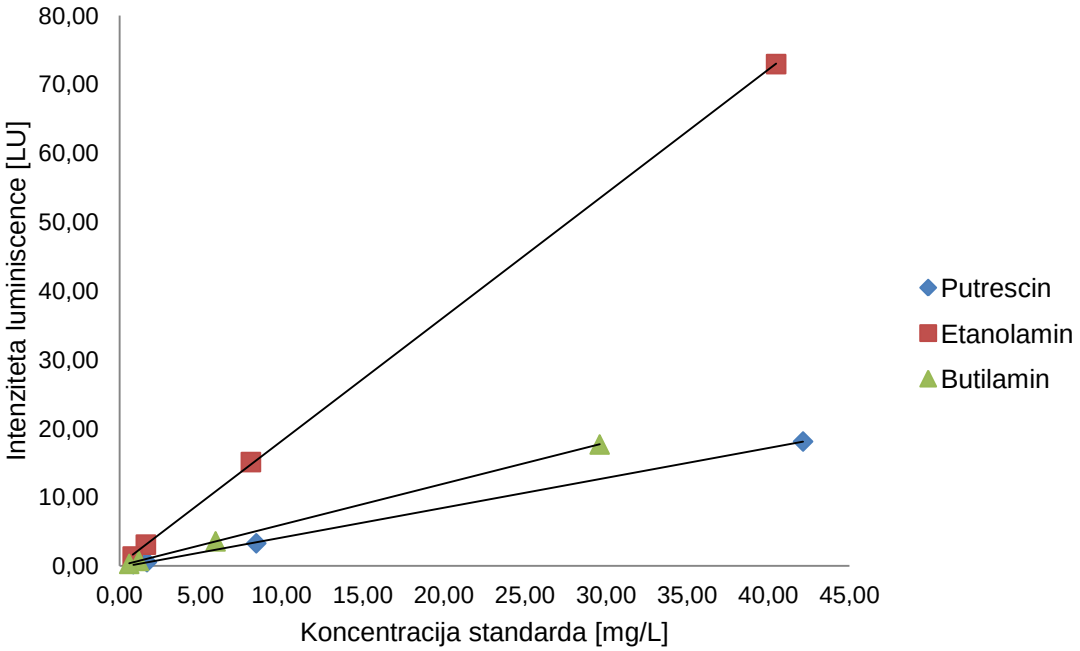
V ***Tabelah 5*** in ***6*** so podane koncentracije biogenih aminov v delovnih raztopinah, ki sem jih uporabljala za izdelavo umeritvenih premic. Za izdelavo druge umeritvene premice putrescina sem pripravila standardno mešanico z višjo koncentracijo putrescina, kot je bila uporabljena pri izdelavi prve umeritvene premice. To sem storila, ker je pri meritvi vzorca 12/1090 koncentracija putrescina presegla zgornjo točko prve umeritvene premice pri koncentraciji ~42 mg/L.
Standardno mešanico biogenih aminov sem pripravila v 250 mL merilni bučki, medtem ko sem delovne raztopine pripravila v 50 mL merilnih bučkah.
Vse raztopine sem pred svetlobo zaščitila z aluminijasto folijo. Meritve delovnih raztopin za pripravo umeritvenih premic sem izvedla na dan pripravljene standardne mešanice biogenih aminov.
Standardno mešanico aminov sem hranila v temi pri približno 4 °C (hladilnik).

4.5.1 Prve umeritvene premice biogenih aminov

Na ***Slikah 12*** in **13** so prikazane umeritvene premice prve umeritve.



Slika 12: Umeritvene premice za histamin, kadaverin, tiramin, triptamin in metilamin.

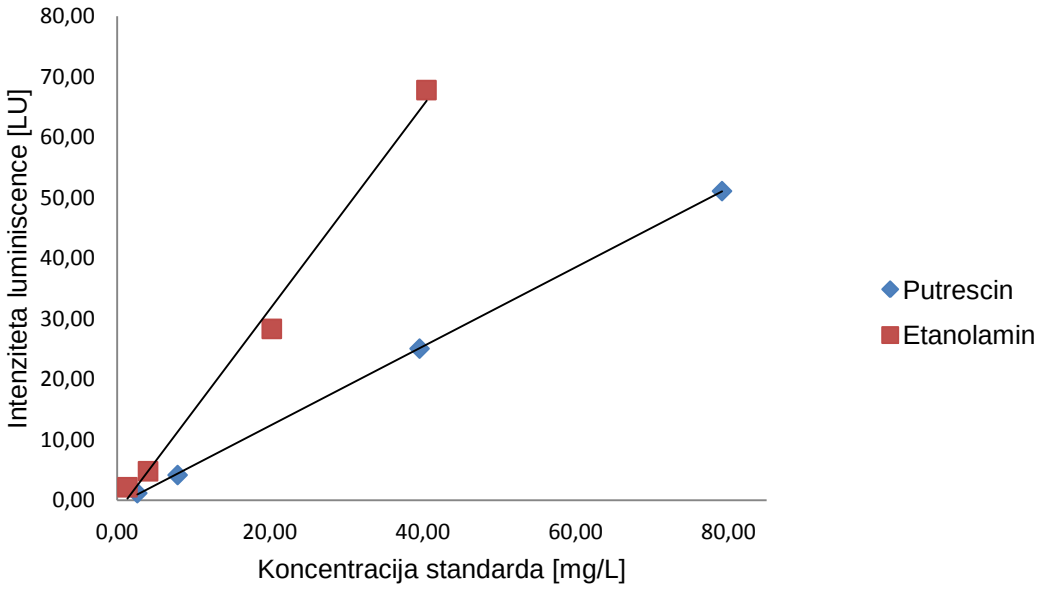


Slika 13: Umeritvene premice za putrescin, etanolamin in butilamin.

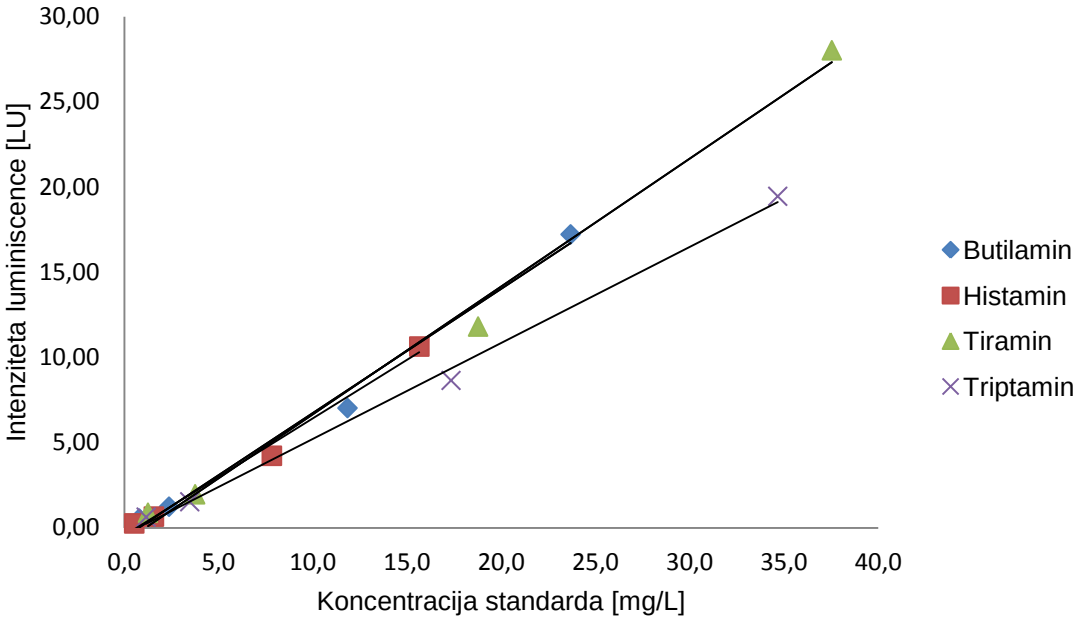
4.5.2 Druge umeritvene premice

Tabela 6: Koncentracija biogenih aminov za pripravo umeritvenih premic 2.

Biogeni amin	Koncentracija amina v standardni mešanici [mg/L]	Redčitev standardne mešanice (5x) [mg/L]	Redčitev standardne mešanice (10x) [mg/L]	Redčitev standardne mešanice (50x) [mg/L]	Redčitev standardne mešanice (150x) [mg/L]
Putrescin	395,8	79,16	39,58	7,92	2,64
Kadaverin	105,0	21,01	10,50	2,10	0,70
Etanolamin	202,4	40,48	20,24	4,05	1,35
Histamin	78,3	15,65	7,83	1,57	0,52
Metilamin	132,1	26,42	13,21	2,64	0,88
Tiramin	187,7	37,54	18,77	3,75	1,25
Heksilamin	459,6	91,92	45,96	9,19	3,06
Izopentilamin	450,6	90,12	45,06	9,01	3,00
2-metilbutilamin	442,8	88,56	44,28	8,86	2,95
Butilamin	118,4	23,68	11,84	2,37	0,79
Triptamin	173,4	34,67	17,34	3,47	1,16



Slika 14: Umeritveni premici za putrescin in etanolamin.



Slika 15: Umeritvene premice za butilamin, histamin, tiramin in triptamin.

Na ***Slikah 14*** in **15** so prikazane umeritvene premice druge umeritve.

Umeritvenih premic 2-metilbutilamina, izopentilamina in heksilamina nisem pridobila, saj teh biogenih aminov z uporabljeno metodo nisem zaznala.

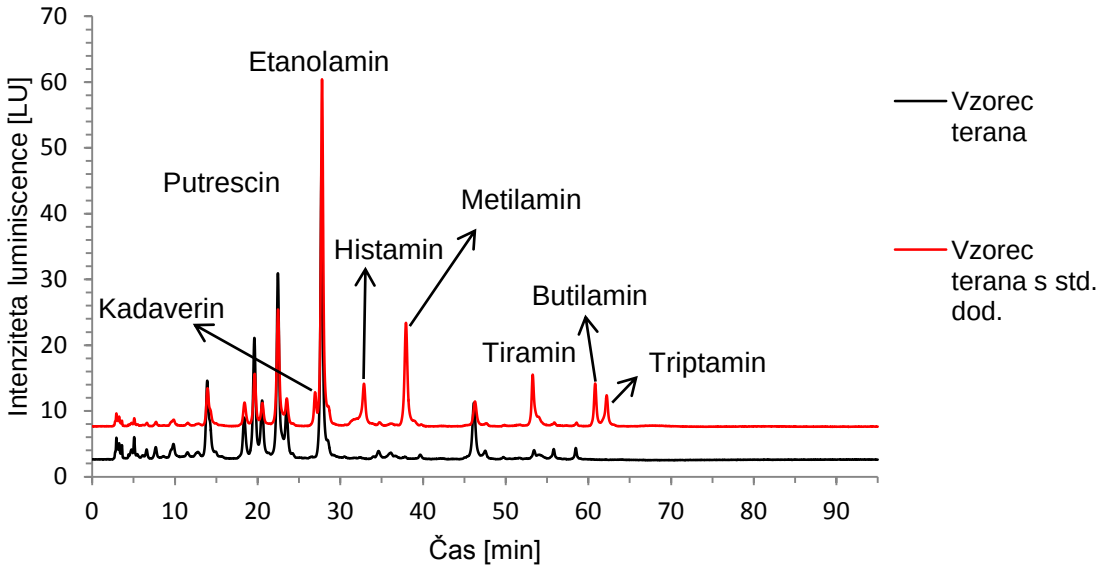
4.5.3 Standardni dodatek

Zaradi določanja kromatografskih vrhov v kompleksnem matriksu, kot je vino, se poslužimo metode standardnega dodatka. V vinu je mnogo interferenčnih vrhov, ki ne pripadajo biogenim aminom. Zaradi tega si določanje vrhov poenostavimo z metodo standardnega dodatka, s katero lahko natančno potrdimo identiteto posameznih vrhov.

Tabela 7: Koncentracije biogenih aminov v standardnem dodatku.

Biogeni amin	Dodatek 1 [mg/L]	Dodatek 2 [mg/L]
Putrescin	27,91	11,16
Kadaverin	25,97	10,39
Etanolamin	40,48	16,19
Histamin	29,89	11,96
Metilamin	22,54	9,02
Tiramin	29,63	11,85
Heksilamin	57,45	22,98
Izopentilamin	56,33	22,53
2-metilbutilamin	73,80	29,52
Butilamin	29,60	11,84
Triptamin	25,25	10,10

V ***Tabeli 7*** so prikazane koncentracije biogenih aminov v standardni mešanici, ki sem jih pripravila za uporabo kot standardni dodatek.
Pri 8 vzorcih sem uporabila standardno mešanico Dodatek 1, pri dveh vzorcih pa sem uporabila standardni dodatek Dodatek 2. Omenjena vzorca imata oznako 12/1007 in 12/1088.



Slika 16: Kromatogram Terana PTP z zaporedno številko 12/997 s standardnim dodatkom in brez standardnega dodatka.

Na ***Sliki 16*** je primer kromatograma za vzorec Terana PTP s številko 12/997. Združena sta dva kromatograma in sicer črne barve je kromatogram vzorca vina brez dodane standardne mešanice biogenih aminov, z rdečo barvo pa je obarvan kromatogram vzorca vina s standardnim dodatkom mešanice biogenih aminov. S standardnim dodatkom sem lahko natančno potrdila identiteto posameznih kromatografskih vrhov, ki pripadajo biogenim aminom. V dotičnem primeru s standardnim dodatkom potrdimo, da manjši vrh, ki se pojavlja pri retencijskem času, ki ustreza za tiramin, ne pripada tiraminu, temveč drugi spojini, ki je prisotna v vinu.
Za druge kromatografske vrhove pa v tem primeru z določanjem ni bilo težav.

Tabela 8: Vrednosti LOD, LOQ, enačbe umeritvenih premic za določevanje biogenih aminov ter korelacijski koeficient.

Biogeni amin	Putrescin	Kadaverin	Etanolamin	Histamin	Metilamin	Tiramin	Butilamin	Triptamin
Umeritvena premica 1								
LOD [mg/L]	0,01	0,02	0,003	0,003	0,01	0,01	0,01	0,01
LOQ [mg/L]	0,05	0,06	0,01	0,01	0,02	0,04	0,04	0,02
Enačba premice 1 y=kx+n	y = 0,4335x - 0,1968	y = 0,5948x – 0,1423	y = 1,7986x + 0,2008	y = 0,5867x - 0,0308	y = 1,864x - 0,1363	y = 0,6329x - 0,0089	y = 0,5966x + 0,0135	y = 0,4897x + 0,0079
R^2	0,9998	0,9997	0,9999	1	1	1	1	1
Umeritvena premica 2								
LOD [mg/L]	0,01	0,01	0,003	0,003	0,004	0,01	0,01	0,01
LOQ [mg/L]	0,03	0,05	0,01	0,01	0,01	0,03	0,03	0,02
Enačba premice 2	y = 0,655x - 0,7793	y = 0,7898x - 0,3251	y = 1,6807x - 2,0008	y = 0,6861x - 0,4402	y = 2,227x - 1,8129	y = 0,7496x - 0,8207	y = 0,7281x - 0,5341	y = 0,5628x - 0,403
R^2	0,9999	0,999	0,9927	0,9896	0,9939	0,9933	0,9908	0,9967
k1	0,4335	0,5948	1,7986	0,5867	1,864	0,6329	0,5966	0,4897
k2	0,655	0,7898	1,6807	0,6861	2,227	0,7496	0,7281	0,5628
k1/k2	0,66	0,75	1,07	0,86	0,84	0,84	0,82	0,87

Meja zaznave (LOD) je med različnimi biogenimi amini drugačna. Meja zaznave je izračunana iz razmerja 3-kratne standardne deviacije slepega vzorca (sintetično vino) pri pripadajočem retencijskem času posameznega amina in naklona umeritvenih premic pripadajočih aminov. Meja kvantifikacije pa je desetkratno razmerje med standardno deviacijo slepega vzorca in naklona umeritvene premice pripadajočih biogenih aminov.

V ***Tabeli 8*** so podane vrednosti LOD, LOQ, R^2 (korelacijski koeficient) ter enačbe premic, ki sem jih pridobila iz obeh umeritev. Med drugim je izračunano tudi razmerje naklonov premic med prvo in drugo umeritvijo.
Če primerjamo rezultate obeh umeritev, imata najnižji LOD histamin in etanolamin, ki je 0,003 mg/L. LOD z vrednostjo 0,01 mg/L dosegajo pri prvi kalibraciji putrescin, metilamin, tiramin, butilamin in triptamin. Meja zaznave kadaverina je pri koncentraciji 0,02 mg/L.
Pri drugi umeritvi se vrednosti meje zaznave razlikujejo v nekaj primerih. Metilamin ima mejo zaznave pri koncentraciji 0,004 mg/L, medtem ko so za putrescin, tiramin, butilamin in triptamin meje zaznave enake kot pri prvi kalibraciji. Kadaverin ima pri drugi kalibraciji mejo zaznave 0,01 mg/L.
Korelacijski koeficienti so v primerjavi z drugo kalibracijo nekoliko višji kot pri prvi kalibraciji, kar je posledica slabše natančnosti pri drugi kalibraciji. Vrednosti R^2 so pri obeh kalibracijah v vseh primerih, razen enega, nad vrednostjo 0,99.
Koeficienti med nakloni premic iz prve kalibracije in nakloni premic iz druge kalibracije imajo v primerih histamina, metilamina, tiramina, butilamina in triptamina vrednosti nad 0,8 in so med seboj primerljivi. Koeficient naklonov premic pri etanolaminu je 1,07, kar pomeni, da je primerljivost še večja, kot je pri preostalih biogenih aminih.
Za putrescin je vrednost koeficienta 0,66 in je nekoliko nižja od ostalih biogenih aminov. To je lahko tudi posledica, ker sem pri drugi kalibraciji za najvišjo točko umeritvene premice pripravila raztopino s koncentracijo ~80 mg/L putrescina. To je približno dva krat večja koncentracija putrescina kot pri prvi kalibraciji. Koeficient naklonov kadaverin je 0,75 in je nižji v primerjavi s histaminom, metilaminom, tiraminom in triptaminom.

Tabela 9: Koncentracije biogenih aminov [mg/L] v vzorcih Terana PTP, izračunanih z uporabo umeritvenih premic 1.

Biogeni amin	Putrescin	Kadaverin	Etanolamin	Histamin	Metilamin	Tiramin	Butilamin	Triptamin
Zaporedna številka Terana PTP	Koncentracija [mg/L]							
12/1011	20,46 ± 0,16	< 0,02	22,18 ± 0,46	0,58 ± 0,05	< 0,004	0,99 ± 0,27	< 0,01	< 0,01
12/995	15,21 ± 0,72	< 0,02	21,59 ± 1,04	< 0,003	0,17 ± 0,00	< 0,01	< 0,01	< 0,01
12/997	68,26 ± 3,54	< 0,02	25,19 ± 0,32	< 0,003	0,44 ± 0,20	< 0,01	< 0,01	< 0,01
12/1007	43,46 ± 0,43	< 0,02	27,8 ± 0,8	6,54 ± 0,69	0,62 ± 0,07	< 0,01	< 0,01	< 0,01
12/1008	28,16 ± 2,09	< 0,02	22,03 ± 1,25	5,93 ± 0,05	0,201 ± 0,005	< 0,01	< 0,01	< 0,01
12/1009	49,17 ± 1,77	< 0,02	26,99 ± 0,07	< 0,003	0,15 ± 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
12/1081	5,09 ± 0,09	< 0,02	12,27 ± 0,17	< 0,003	< 0,004	< 0,01	< 0,01	< 0,01
12/1084	8,25 ± 0,14	< 0,02	15,82 ± 1,76	< 0,003	< 0,004	0,4 ± 0,1	< 0,01	< 0,01
12/1088	< 0,01	< 0,02	17,68 ± 1,72	0,36 ± 0,05	0,14 ± 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
12/1090	78,71 ± 4,64	< 0,02	23,94 ± 1,08	6,90 ± 0,37	0,33 ± 0,00	10,6 ± 2,6	< 0,01	< 0,01

V ***Tabeli 9*** so podane koncentracije biogenih aminov, ki sem jih detektirala v posameznih vzorcih. Nekatere koncentracije biogenih aminov so pod mejo detekcije in so ustrezno označene.
Biogeni amin putrescin sem detektirala v devetih vzorcih, etanolamin je bil prisoten v vseh desetih vzorcih vina, v sedmih vzorcih sem detektirala metilamin. Pet vzorcev vina pa vsebuje histamin.
Povprečna koncentracija detektiranih biogenih aminov v vzorcih vina je 25,2 ± 26,3 mg/L za putrescin, 21,2 ± 5,1 mg/L za etanolamin ter 4,06 ± 3,30 mg/L za histamin. Povprečna koncentracija metilamina je 0,31 mg/L ter tiramina je 4,32 mg/L s povprečnim standardnim odmikom 5,44 mg/L.
Koncentracije kadaverina, triptamina in butilamina so bile pod mejo detekcije v vseh analiziranih vzorcih vina.
Najvišja koncentracija putrescina je bila v vzorcu s številko 12/1090 in znaša 78,7 ± 4,6 mg/L. V istem vzorcu sta bili določeni tudi najvišji koncentraciji tiramina 10,50 ± 2,70 mg/L in histamina, ki je 6,90 ± 0,40 mg/L vina.
Najnižja koncentracija putrescina med vzorci, v katerih je bil določen putrescin, je 5,10 ± 0,1 mg/L in je bila izmerjena v vzorcu s številko 12/1081. V vzorcu s številko 12/1081 je bila izmerjena tudi najnižja koncentracija etanolamina in sicer 15,8 ± 1,80 mg/L vina. Poleg tega je koncentracija histamina pod mejo detekcije, ki znaša 0,003 mg/L.
V vzorcu s številko 12/1088 je koncentracija putrescina pod mejo detekcije zaradi prekrivanja kromatografskega vrha s kromatografskim vrhom interferenčne spojine, ki se nahaja v vinu.

Z metodo standardnega dodatka sem opravila eno meritev za posamezen vzorec vina. S pomočjo standardnega dodatka sem lahko natančno določila kromatografske vrhove, ki pripadajo posameznim biogenim aminom in se pojavljajo pri določenem retencijskem času. Metode nisem uporabila za računanje koncentracij biogenih aminov, saj nisem imela enakega volumskega razmerja med topili in reagenti ter vzorcem vina.

V Sloveniji je predpisana zgornja meja koncentracije histamina v alkoholnih pijačah in sicer znaša 2 mg/L. Koncentracija histamina v vzorcu 12/1090 je 6,9 ± 0,4 mg/L in presega zgornjo dovoljeno koncentracijo histamina v vinu. Poleg vzorca 12/1090 je koncentracija histamina presežena še v dveh vzorcih, in sicer 12/1007 in 12/1008.

4.6 **Primerjava podatkov**

Dobljene podatke iz svojega dela sem želela primerjati s podatki, ki so bili primerljivi z vidika sorte grozdja, geografskega in klimatskega območja. Podatki, ki sem jih primerjala, so objavljeni v prispevku Čuš in sod., 2011. Opravili so analize vsebnosti biogenih aminov v rdečih sortnih vinih, Cvičku PTP, Teranu PTP, rdečih zvrsteh, belih zvrsteh ter belih sortnih vinih. Zanimajo me vina rdečih sort, Teran PTP ter rdeče zvrsti. Vzorci so bili različnih letnikov od 2004 do 2009. Teran PTP, ki sem ga analizirala, je letnik 2011.
Čuš in sod. (2011) so pri določanju biogenih aminov uporabljali metodo po prirejenem postopku, ki je objavljen v prispevku Gómez-Alonso in sod. (2007). Uporabljali so boratni pufer (pH 9), metanol, interni standard (2,4,6-trimetilfenilamin hidroklorid) in derivatizacijski reagent dietiletoksimetilenmalonatom (DEEMM). Meritve so potekale s tekočinsko kromatografijo z reverzno fazo ločbe in UV-vis detekcijo derivatov biogenih aminov in DEEMM aminoenonov. Za kromatografsko ločbo so uporabljali kolono ACE HPLC 5 C18-HL z velikostjo delcev 5 µm in dimenzij 250 mm x 4,6 mm. Ločba je potekala pri 16 °C gradientno. Uporabljali so mobilno fazo, sestavljeno iz (A) 25 mM

pufer natrijevega acetata pH 5,8 z 0,02 % natrijevim azidom ter (B) mešanico acetonitril: metanol v razmerju 80:20 (v:v). Spojine so identificirali na podlagi retencijskih časov in UV-vis spektrov derivatov pripadajočih derivatov. Kvantifikacijo spojin so naredili s pomočjo interne standardne metode.
V vzorcih vina so določali histamin, tiramin, putrescin, kadaverin in feniletilamin. Kadaverin in feniletilamin v večini vzorcev nista presegla meje kvantitativne določitve oziroma meje zaznave. Meje kvantitativne določitve so bile naslednje: putrescin 0,3 mg/L, tiramin 0,3 mg/L, kadaverin 0,5 mg/L, histamin 0,5 mg/L in feniletilamin 0,1 mg/L.

Opravili so analize sedmih vzorcev Terana PTP, dva letnika 2009, dva letnika 2008 in trije letnika 2007.
Koncentracije putrescina so bile pri dveh vzorcih Terana PTP letnikov 2007 in 2008 višje od 8 mg/L. Histamin so določili v šestih od sedmih vzorcev izbranega Terana PTP. V enem vzorcu izbranega Terana PTP letnik 2008 so določili vsebnost histamina s koncentracijo 7,3 mg/L. Poleg tega sta mejo 2 mg/L histamina presegla dva vzorca Terana PTP letnika 2007. Feniletilamin je bil določen v enem vzorcu iz letnika 2007 s koncentracijo 0,3 mg/L. Koncentracije tiramina so bile v vseh vzorcih izbranega Terana PTP pod 2 mg/L, v dveh vzorcih letnika 2008 in 2009 pa pod mejo določanja. Koncentracije kadaverina so bile v vseh vzorcih pod mejo kvantitativne določitve.
Vzorci, ki sem jih analizirala, so vsi letnika 2011. Od desetih analiziranih vzorcev je pri treh vzorcih (12/1007, 12/1008 in 12/1090) koncentracija histamina večja od 2 mg/L.

5 ZAKLJUČKI

V okviru diplomske naloge sem vpeljala standardizirano metodo za določanje biogenih aminov v rdečih sortah vin. Metodo sem uporabila za merjenje koncentracij biogenih aminov v Teranu PTP, ki je pridelano iz grozdja sorte Refošk na absolutnih vinogradniških legah slovenskega vinorodnega podokoliša Kras in italijanskem krasu v provinci Gorica in provinci Trst (uradno ime Terrano D.O.C.).

Vzorce Terana PTP sem filtrirala z acetatceluloznimi filtri s premerom por 0,45 µm. Biogene amine v vzorcih sem detektirala tako, da sem jih derivatizirala z ortoftalaldehidom (OPA), ki je široko uporabljan reagent za derivatizacijo. Derivatizacija je potekala ob prisotnosti 2-merkaptoetanola in boratnega pufra s pH 10,5. Omenjena pH vrednost je potrebna za tvorbo derivatov biogenih aminov in OPA.
Metoda z derivatizacijo z OPA nam da nestabilne derivate biogenih aminov, zato je pri delu potrebna večja natančnost, kar pomeni, da je potrebno zagotoviti čim bolj enake pogoje za meritev in za samo derivatizacijo vzorcev.

Smiselno bi bilo uvesti ekstrakcijo motečih spojin oz. izolacijo biogenih aminov, saj je brez standardnega dodatka zanesljivost identifikacije kromatografskih vrhov biogenih aminov manjša.

Ugotovila sem, da je mobilna faza, sestavljena iz (A) natrijevega acetata in tetrahidrofurana v volumskem razmerju 96:4 in (B) metanola, ustrezna v povezavi s standardom OIV-MA-AS315-18. Za nadaljnjo optimizacijo je potrebno nekoliko spremeniti elucijski gradient, saj nisem uspela popolnoma ločiti signalov vseh biogenih aminov.

Meje zaznavnosti (LOD) in meje kvantifikacije (LOQ) so izračunane le za standardno mešanico biogenih aminov. V realnih vzorcih vina so LOD in LOQ vsekakor višje, zaradi motečih spojin in večjega nihanja bazne linije kromatograma.

Biogeni amini, ki sem jih detektirala v desetih vzorcih Terana PTP, so putrescin, etanolamin, histamin, metilamin in tiramin. Etanolamin je bil prisoten v vseh desetih vzorcih, putrescin pa v devetih.

Najvišjo koncentracijo putrescina izmed vseh vzorcev sem izmerila v vzorcu s številko 12/1090. V istem vzorcu je prisoten histamin s koncentracijo 6,90 mg/L, ki je tudi najvišja izmerjena izmed vseh vzorcev.

Najširše zastopana biogena amina v Teranu PTP sta bila putrescin in etanolamin. Prvega sem določila v devetih vzorcih, slednjega pa v desetih vzorcih od skupnih desetih vzorcev vina.

Metoda, s katero sem analizirala vzorce, se je izkazala za ustrezno metodo za določanje biogenih aminov v vinu. Zaradi dolžine trajanja meritve je primerna za manjše število vzorcev.

6 VIRI

Anli R. E. in Bayram M. 2008. Biogenic amines in wines. *Food reviews international.* 25, 1: 86–102.

Anli R. E., Vural Nilüfer, Yilmaz Semiranis in Vural Y. Halil. 2004. The determination of biogenic amines in Turkish red wines. *Journal of Food Composition and Analysis,* 17, 53–62.

Arena M. E. in Manca de Narda M. C. 2001. Biogenic amine production by *Lactobacillus. Journal of Applied Microbiology,* 90, 158–162.

Bach B., Le Quere S., Vuchot P. in Grinbaum M., Barnavon. 2012. Validation of a method for the analysis of biogenic amines: Histamine in instability during wine sample storage. *Analytica Chimica Acta,* 30, 732: 114–119.

Bardócz S. 1989. Polyamines in tissue regeneration. In: U. Barharch and Y. M. Heimer (Eds), Physiology of Polyamines. Vol. 1, C. R. C. Press, Boca Ratón, FL, U. S. A., pp. 96–106.

Bauza T. in Teissedre P. L. 1995. Les amines biogènes du vin. Metabolisme et toxité. Bull. OIV, 68: 42–67.

Bauza T., Blaise A. in Cabanis J. C. 1995. Determination of biogenic amines and their precursor amino acids n wines of the Vallèe du Rhône by high performance liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A,* 707, 373–379.

Belec B. 1998. Slovenija: Pokrajina in ljudje. Ljubljana, Založba Mladinska Knjiga: 735 str.

Brink B., Damink C., Joosten H. M. L. J. in Huis in't Veld J. H. J. 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology,* 11, 73–84.

Broquedis M., Dumery B. in Buchard J. 1989. Mise en evidence de polyamines (putrescine, cadaverine, non-spermidine, spermidine et spermine) dans les feuille et les prappes de *Vitis vinifera L. Connaissane de a Vigne et du Vin,* 23, 1–6.

Busto O., Valero Y., Guasch J. in Borrull F. 1994. Solid phase extraction applied to the determination of biogenic amines in wines by HPLC. *Chromatographia,* 38, 9/10: 571–578.

Corzani C., 2007. Food safety in wine: optimization of analytical controls and evaluation of production technologies. PhD in food science. Faculty of Agriculture. Str. 2-3. URL: http://amsdottorato.cib.unibo.it/1056/ (dostopno dne: 15. 01. 2013).

Costantini A., Cerosimo M., Del Prete V. in Garcia-Moruno E. 2006. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria: Screening by PCR, thin-layer chromatography, and high-performance liquid chromatography of strains isolated from wine and must. *Journal of Food Protection,* 69, 2: 391–396.

Coton E., Rollan G., Bertrand A. in Lonvaud-Funel A. 1998a. Histamine-producing lactic acid bacteria in wines: Early detection, frequency, and distribution. *American Journal of Enology and Viticulture,* 49, 199–204.

Culiberg M., 1999. Kras: pokrajina, življenje, ljudje. Ljubljana, ZRC SAZU: 321 str.

Čuš F., Gerič Stare B., Bach B. in Barnavon L. 2011. Vsebnost biogenih aminov in hlapnih fenolov ter prisotnost kvasovke *Brettanomyces bruxellensis* v slovenskih vinih. Vinarski dan 2011. Čuš F. (ur.). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: str. 5-24.

Del Prete V., Costantini A., Cecchini F., Morassut M. in Garcia-Moruno E. 2009. Occurrence of biogenic amines in wine: The role of grapes. *Food Chemistry,* 112, 2: 474–481.

Franko M. 2008. Thermal lens spectrometric detection in flow injection analysis and separation techniques, *Applied Spectroscopy Rev*iew, 43, 4: 358–388.

Fernandes J. O. in Ferreira M. A. 2000. Combined ion-pair extraction and gas chromatography-mass spectrometry for the simultaneous determination of diamines, polyamines and aromatic amines in Port wine and grape juice. *Journal of Chromatography A*, 886, 183–195.

García-Moruno E., Carrascose A. V., Muñoz R. 2005. A rapid and inexpensive method for the determination of biogenic amines from bacterial cultures by thin-layer chromatography. *Journal of Food Protection,* 68, 625–629.

Gardini F., Zaccarelli A., Belletti N., Faustini F., Cavazza A., Martuscelli M., Mastrocola D. in Suzzi G. 2005. Factors influencing biogenic amine production by a strain of *Oenococcus Oeni* in a model system. *Food Control,* 16, 7: 609–616.

Gómez-Alonso S., Hermosín-Gutiérrez I in Garciá-Romero E. 2007. Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium ion as aminoenone derivatives in wine and beer samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 55, 608-613.

Gonzales Marco A. in Ancín Azpilicueta C. 2006. Amine concentrations in wine stored in bottles at different temperatures. *Food Chemistry,* 99, 680–685.

Guerrini S., Mangani S., Granchi L. in Vincenzini M. 2002. Biogenic amine production by *Oenococcus oeni. Current Microbiology,* 44, 374–378.

Halász A., Baráth Á., Simon-Saraldi L. in Holzapfel W. 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology,* 5, 2: 42–49.

Hernández-Cassou in Saurina J. 2011. Derivatization strategies for the determination of biogenic amines in wines by chromatographic and electrophoretic techniques. *Journal of Chromatography* B, 879, 1270–1281.

Hernandez-Jover T., Izquierdo-Pulido M., Veciana-Nogues M. T., Marine-Font A. in Vidal-Carou M. C. 1997. Biogenic amines and polyamine contents in meat and meat products. *Journal of Agricultural Food Chemistry,* 45, 2098–2102.

Igarashi K. in Kashiwagi K. 1999. Polyamine transport in bacteria and yeast. *Biochemical Journal,* 344, 633–642.

Kvasnicka F. in Voldrich M. 2006. Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis with conductometric detection. *Journal of Chromatography A,* 1103, 145–149.

Landete J. M., Ferrer S. in Pardo I. 2005. Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine? *Journal of Applied Microbiology,* 99, 580–586.

Leitao M., Marques A. P. in Romao S. 2005. A survey on biogenic amines in commercial Portuguese wines. *Food Control,* 16, 199–204.

Lonvaud-Funel A. in Joyeux A. 1994. Histamine production by wine lactic acid bacteria: Isolation of a histamine-producing strain of *Leuconostonoc oenos. Journal of Applied Bacteriology,* 77, 401–407.

Lonvaud-Funel A. 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek,* 76, 317–331.

Lonvaud-Funel A. 2001. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters,* 199, 1: 9–13.

Maynard L. S. in Schenker V. J. 1962. Monoamine-oxidase inhibition by ethanol in vitro. *Nature,* 196: 575–576.

Mangani S., Guerrini S., Granchi L. in Vincenzini M. 2005. Putrescine accumulation in wine: Role of *Oenococcus oeni. Current Microbiology,* 51, 6–10.

Moreno-Arribas in Lonvaud-Funel A. 1999. Tyrosine decarboxylase activity of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine and *L. Brevis* ATCC 367. *FEMS Microbiology Letters,* 180, 55–60.

Moreno-Arribas M. V., Polo M. C., Jorganes F. in Muñoz R. 2003. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology,* 84, 117–123.

Nouadje G., Siméon N., Dedieu F., Nertz M., Puig Ph. in Couderc F. 1997. Determination of twenty eight biogenic amines and amino acids during wine aging by micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A, 765, 2: 337–343.*

Nujna stanja. Hiperintenzivna kriza. Združenje zdravnikov družinske medicine Slovenije. URL: http://www.drmed.org/strok/nujna_stanja/02/02-06.php (dostopno dne: 05. 03. 2013).

OIV-MA-AS315-18. Analysis of biogenic amines in musts and wines using HPLC. 2009: str.1–9.

Önal A. 2007. A review: Current analytical methods for determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 103, 4: 1475–1486.

Ough C. S., Daudt C. E. in Crowell E. A. 1981. Identification of new volatile amines in grapes and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 29, 938–941.

Punakivi, K., Smolander, M., Niku-Paavola, M.-L., Mattinen J. and Buchert J. 2006. Enzymatic determination of biogenic amines with transglutaminase. *Talanta,* 68,1040–1045.

Rollan G. C., Coton E. in Lonvaud-Funel A. 1995. Histidine decarboxylase activity of *Leuconostonoc oenos* 9204. *Food Microbiology,* 12, 455–461.

Shahidi F., Pegg R. B. in Sen N. P. 1994. Absence of volatile N-nitrosoamines in nitrite-cured seal meal. *Meat science.* 37, 327–336.

Shalaby A. R. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International,* 29, 7: 675–690.

Silla Santos M. H. 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29, 2–3: 213–231.

SLIKA 2:
http://www.biyolojiegitim.yyu.edu.tr/k/histmn/pages/HISTAMIN_jpg.htm. (dostopno dne: 22. 11. 2012).

Smit A. Y. 2007. Evaluating the influence of winemaking practices on biogenic amine production by wine microorganisms. Master thesis. Stellenbosch University.

Smith T. A. 1980. Amines in food. *Food Chemistry,* 6, 169–200.

Soleas G. J., Carey M. in Goldberg D. M. 1999. Method development and cultivar-related differences of nine biogenic amines in Ontario wines. *Food Chemistry,* 64, 1: 49–58.

Soufleros E., Barrios M. in Bertrand A. 1998. Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *American Journal of Enology and Viticulture,* 49, 3:266–278.

Stratton J.E., Hutkins R.W. and Taylor S.L. 1991. Biogenic amines in cheese and their fermented food: a review. *Journal of Food Protection*, 54: 460–470.

Torrea Goñi D. in Ancin Azpilicueta C. 2001. Influence of Yeast Strain on Biogenic Amines Content in Wines: Relationship with the Utilization of Amino Acids during Fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 3: 185–190.

Ur. l. RS, št. 43/2004. PRILOGA II. Pravilnik o pogojih, ki jih mora izpolnjevati grozdje za predelavo v vino, o dovoljenih tehnoloških postopkih in enoloških sredstvih za pridelavo vina in o pogojih glede kakovosti vina, mošta in drugih proizvodov v prometu.

Vanzo A., Šuklje K., Jenko M., Čuš F., Bavčar D. in Lisjak K. 2012. Polifenolni potencial terana. Bioaktivne spojine terana. Lisjak K. (ur.). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: str. 29.

Vera L., Mestres M., Boqué R., Busto O. in Guasch J. 2010. Use of synthetic wine for models transfer in wine analysis by HS-MS e-nose. *Sensors and Actuotors B: Chemical*, 143, 2: 689–695.

Vidal-Carou M. C., Codony-Salcedo R. in Mariné-Font A. 1990. Histamine and tyramine in Spanish wines: Relationships with total sulfur dioxide level, volatile acidity and malo-lactic fermentation intensity. *Food Chemistry, 35*, 217–227.

Vidal-Carou M. C., Codony-Salcedo R. in Mariné-Font A. 1991. Changes in the concentration of histamine and tyramine during wine spoilage at various temperatures. *American Journal of Enology and Viticulture,* 42, 145–149.