

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

Czech Journal of
FOOD SCIENCES

Potravinářské vědy

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

4

VOLUME 16
August 1998
CS ISSN 0862-8653

An international journal published under the authorization by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic and under the direction of the Czech Academy of Agricultural Sciences

Mezinárodní vědecký časopis vydávaný z pověření Ministerstva zemědělství České republiky a pod gestí Česká akademie zemědělských věd

Abstracts from the journal is comprised in Agrindex of FAO (AGRIS database), Food Science and Technology Abstracts, Dairy Science Abstracts, Chemical Abstracts, PASCAL – CD-ROM (INIST), WLAS, TOXILINE PLUS and Czech Agricultural Bibliography.

Editorial board – Redakční rada

Chairman – Předseda

Ing. Zeno Šimůnek, CSc.

Members of the Editorial Board – Členové redakční rady

Ing. Miloslav Adam, CSc., Ing. Luisa Benešová, prof. Ing. Dušan Čurda, CSc., prof. Ing. Jiří Davídek, DrSc., Ing. Jan Drbohav, CSc., Ing. Jiřina Houšová, CSc., prof. Ing. Ivo Ingr, DrSc., prof. Ing. Jan Pokorný, DrSc., prof. Ing. Mojmír Rychtera, CSc., Ing. Olga Štiková, CSc., MUDr. Bohumil Turek, CSc., prof. Ing. Jan Velíšek, DrSc.

Foreign Members of the Editorial Board – Zahraniční členové redakční rady

Prof. Dr. Werner Baltes (Germany), Dr. Reto Battaglia (Switzerland), Ing. Milan Kováč, CSc. (Slovak Republic), Prof. Dr. Halina Kozłowska (Poland), Prof. Dr. Radomir Lászity (Hungary), O. Univ. Prof. Dr. Werner Pflannhauser (Austria), Prof. Ing. Alexander Pribela, DrSc. (Slovak Republic)

Editor-in-chief – Vedoucí redaktorka

RNDr. Marcela Braunová

Aim and scope: The journal publishes original scientific papers, preliminary reports, short communications and reviews. Paper are published in English, Czech, or in Slovak.

Periodicity: The journal is published six times a year. Volume 16 appearing in 1998.

Acceptance of manuscripts: Two copies of manuscript should be addressed to: RNDr. Marcela Braunová, editor-in-chief, Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2, Czech Republic, tel.: + 420 2 25 10 98, fax: + 420 2 242 538 39, e-mail: editor@login.cz. Both the dates of the reception of the manuscript and of the acceptance by the editorial board for publishing will be indicated in the printed contribution.

Subscription information: Subscription orders can be entered only by calendar year and should be sent to the contact address. Subscription price for 1998 is 84 USD (Europe) and 88 USD (overseas).

Cíl a odborná náplň: Časopis publikuje původní vědecké práce, předběžná a krátká sdělení a odborná review. Práce jsou publikovány v angličtině, češtině nebo ve slovenštině.

Periodicita: Časopis vychází šestkrát ročně. Ročník 16 vychází v roce 1998.

Přijímání rukopisů: Rukopisy ve dvou kopiích je třeba zaslat na adresu redakce: RNDr. Marcela Braunová, vedoucí redaktorka, Ústav zemědělských a potravinářských informací, Slezská 7, 120 56 Praha 2, Česká republika, tel.: 02/25 10 98, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: editor@login.cz. V uveřejněném příspěvku se uvádí jak datum doručení rukopisu do redakce, tak i jeho přijetí redakční radou k publikaci.

Informace o předplatném: Objednávky na předplatné jsou přijímány na celý rok na adrese: Ústav zemědělských a potravinářských informací, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Cena předplatného pro rok 1998 je 336 Kč.

The Occurrence of Fumonisin in Corn-based Commodities in the Czech Republic

Vladimír OSTRÝ, Jiří RUPRICH

National Institute of Public Health in Prague – Centre for the Hygiene of Food Chains, Brno,
Czech Republic

Abstract

OSTRÝ V., RUPRICH J. (1998): The occurrence of fumonisins in corn-based commodities in the Czech Republic. Czech J. Food Sci., 16: 117–121.

In the Czech Republic in 1995 and 1996, 210 samples of corn-based foodstuffs were examined for fumonisins. The immunochemical method ELISA was used for the analyses of fumonisins. The amount of fumonisin-positive samples was 89% in the extent of 9–4594 ng/g (arithmetical mean 180 ng/g). In 4% of the examined samples the concentration of fumonisins was found to be higher than 1000 ng/g. Maximal fumonisin concentrations were determined in a sample of crisp corn bread (max. 4594 ng/g), extruded corn products (max. 1178 ng/g) and in a polenta sample (max. 1243 ng/g). Corn flakes (max. 328 ng/g), pop corn (max. 128 ng/g), corn snack (max. 32 ng/g) rank among foodstuffs where the concentrations of fumonisins were relatively low. The highest estimation of the exposure dose can be expected for corn flour, i.e. 0.43 µg/person/day (arithmetical mean of measured values) and polenta, i.e. 0.28 µg/person/day (arithmetical mean of measured values). Lower estimations for exposure doses of fumonisins can be expected for pop corn, corn snack and corn flakes.

mykotoxiny; fumonisiny; kornové potraviny; ELISA; dietární expozice

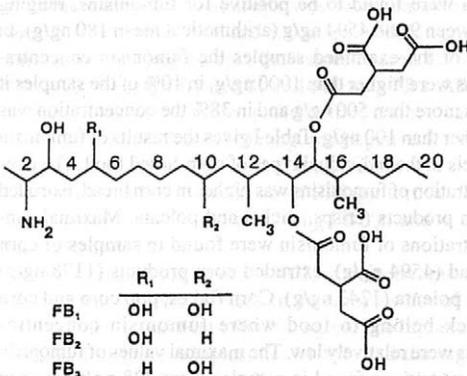
Fumonisin are mycotoxins which have lately become the object of professional interest of many research teams not only in the world but also in the Czech Republic. Fumonisin belong to the group of fusarial mycotoxins. At the present time 7 fumonisins have been isolated: B1, B2, B3, B4, A1, A2, C1. Under natural conditions the most frequently occurring fumonisins are B1, B2, B3. The most important are fumonisins B1 and B2 (further FB1 and FB2) (Fig.1) (Gelderblom et al., 1988; Gelderblom et al., 1991; Nelson et al., 1993).

Fumonisin are produced by some microscopical fungi of the genus *Fusarium* section *Liseola* (*F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. anthophilum*, and then *F. dlamini*, *F. napiforme*, *F. nygamai*, *F. oxysporum*). In addition to fumonisins the anamorphic genus *Fusarium* produces many other mycotoxins (e.g. trichothecenes, fusarin C, zearalenone, moniliformin) and biologically active products (e.g. gibberellins) (Bullerman, Tsai, 1994; Nelson et al., 1992, 1993).

The most important source of fumonisins is corn (maize) and corn-based food and feeds. It is possible to detect fumonisins in good-quality corn. Residues of fumonisins may occur in food raw materials of animal origin after consumption of fumonisin-contaminated feed by farm animals, i.e. fumonisin residues in milk are possible and probable in pork kidneys and liver (Hammer et al., 1996; Bullerman, Tsai, 1994; Shelby et al., 1994; Sydenham et al., 1991).

According to IARC/FAO/WHO fumonisins are classified as potential human carcinogens (class 2B). On the basis of studies from China and Transkei the potential contribution of high levels of fumonisins in the etiology of oesophageal tumors in humans was discussed (Chu, Li, 1994; Sydenham et al., 1990; Yoshizawa et al., 1994).

Fumonisin B1 is a promotor of the carcinogenic process, however they have no genotoxic and mutagenic ef-



1. Structures of fumonisins B1, B2 and B3

fects on the hitherto chosen models and they are cytotoxic to many mammalian and avian cells (Gelderblom et al., 1992; Norred et al., 1992; Wu et al., 1995).

In humans, fumonisins exposure may be implicated in atherosclerotic plaques formation too. These mycotoxins are structurally related to sphingosine, and may exert their biological activity through their ability to block enzymes involved in sphingolipid biosynthesis (Wang et al., 1992; Merrill et al., 1993; Thibault et al., 1997).

Toxic effects of fumonisins have been tested experimentally on many farm and laboratory animals. It was found that they could cause many diseases (equine leucoencephalomalacia, pulmonary edema in swine and liver tumors in rats). Fumonisins are phytotoxic for some weeds and crop plants (Colvin, Harrison, 1992; Gelderblom et al., 1992; Harrison et al., 1990; Mararas et al., 1988; Osweiler et al., 1992; Ross et al., 1993).

Fumonisins are detected most frequently by chromatographic methods (HPLC, HPLC-MS-MS, GC-MS, TLC) (Abouzied et al., 1996; Gelderblom et al., 1991; Selim et al., 1996; Shephard et al., 1990; Shelby et al., 1994; Stack, Eppley, 1992; Young, Lafontaine, 1993; Yoshizawa et al., 1994) and immunochemical methods (Abouzied, Pestka, 1994; Abouzied et al., 1996; Azcona-Oliveira et al., 1992; Schneider et al., 1995; Sydenham et al., 1996; Uslieber et al., 1994). Corn samples can be cleaned using the method of separation on solid phase (SPE), immunoaffinity chromatography and recently also the method of supercritical fluid extraction has been used (SCE) (Selim et al., 1996).

MATERIALS AND METHODS

The Source of Samples

In 1995 and 1996 we obtained 210 corn-based food samples through purchase in retail stores of the Czech Republic. The samples were divided into 10 types of food: corn bread, extruded corn products (crisps, corn sticks, etc.). Pop Corn, Corn Flakes, corn flour, corn paste, corn pastas, polenta, Corn Snack and other corn foods (e.g. sterilized corn in brine, corn beverage).

Samples were kept at -20°C by the time of analysis.

Analytical Method

The immunochemical method ELISA (Ridascreen[®] Fumonisin Fast, Art. No R3403, R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Germany) was used for the determination of fumonisins. A modified method recommended by the manufacturer was used for preparation of samples. The determination limit was determined by the manufacturer as 9 ng/g and the detection limit as 0.2 ng/g. The variation coefficient of repeatability was 7% at the level of 50 ng/g. Typical cross reactions were determined for fumonisin B1, B2 and B3 (100%, 40% and 100%, respectively). The recovery of fumonisin B1 was at the level of 50 ng/g (59,7%)

and at the level of 500 ng/g (73%) (Stack, Eppley, 1992). In the present study we determined a 70% recovery at the level of 300 ng/g in corn flour and the extent of determination of the method given by the calibration curve was 9–5625 ng/g.

In terms of the quality of work (QA/QC) certified reference material is not yet available (it is being prepared) and worldwide proficiency testing of laboratories for this analyte type is not yet in effect (Egmond, 1995). In order to ensure the quality of laboratory results we used testing material, corn flour with known levels of fumonisin B1 and B2 kindly provided from the US FDA, Washington D.C. (in the CFSAN laboratory of Dr. Mary W. Trucksess).

Fumonisin B1 (CAS 116355-83-0) from Sigma – Aldrich Prague, CZ, was used for addition into the samples.

Extraction of Corn Samples

The homogenized samples (5 g) were extracted with a 10 ml (for corn) or 30 ml (for extruded corn products) methanol/water mixture (75/25) for 5 minutes on a Polytron PT-3000 homogenizer (Kinematika, Switzerland).

The extract was centrifuged for 15 minutes at 3000 g. The supernatant was diluted 1 : 7.5 with a PBS buffer. The aliquot part of the extract was diluted 1 : 3 in a 10% mixture of methanol/PBS buffer and directly applied in the test.

Evaluation of Results

The MRX 1200 microplate reader (Dynatech Laboratories) was used for evaluation of the tests. Measurements were done at 450 nm. The results of measurements were processed using the software SILAB (SIMPO, Slovakia). The QUATTRO PRO for Windows software (version 5.0) was used for statistical evaluation of results.

RESULTS AND DISCUSSION

In 1995 and 1996 a total of 210 corn-based food samples was examined (products made from corn flour, corn flakes, pop corn, polenta, etc.). Eighty-nine per cent of the samples were found to be positive for fumonisins, ranging between 9 and 4594 ng/g (arithmetical mean 180 ng/g). In 4% of the examined samples the fumonisin concentrations were higher than 1000 ng/g, in 10% of the samples it was more than 500 ng/g and in 38% the concentration was higher than 100 ng/g. Table 1 gives the results of fumonisin levels in the individual types of corn-based food. The concentration of fumonisins was higher in corn bread, extruded corn products (crisps, sticks) and polenta. Maximal concentrations of fumonisin were found in samples of corn bread (4594 ng/g), extruded corn products (1178 ng/g) and polenta (1243 ng/g). Corn flakes, pop corn and corn snack belong to food where fumonisin concentrations were relatively low. The maximal values of fumonisin concentrations found in samples were 328 ng/g for corn flakes, 128 ng/g for pop corn and 32 ng/g for corn snack.

I. The concentration of the mycotoxin fumonisins (ng/g) in corn-based foods in the Czech Republic in 1995/1996

Comodities	Incidence (No. positive*/ total)		Mean** [min/max]
		Range	
Corn extruded bread	35/40	< 9-4594	368
Corn extruded products	35/36	< 9-1178	236
Pop Corn	23/24	< 9-126	31
Corn flakes	21/25	< 9-328	52
Corn flour	26/27	< 9-487	171
Corn instant porridge	18/19	< 9-788	124
Corn pastes	6/11	< 9-511	75
Polenta	6/7	< 9-1243	559
Corn snack	7/7	14-32	19
Other	10/14	< 9-682	136

* Contamination above 9 ng/g

** The concentration of fumonisins < 9 ng/g considered as 1/2 limit of determination = 4.5 ng/g

In several European countries corn-based food from retail outlets was examined for levels of fumonisin and the results were similar. In the Czech Republic Ostrý and Ruprich (1998) examined 127 food samples for gluten-free diet. Eighty-eight per cent of the samples were positive for fumonisin (FB1, FB2, FB3). The highest concentration of fumonisins was found in extruded corn products (i.e. 1808 ng/g).

Usleber et al. (1994) analyzed 19 samples of corn food from retail shops in Germany. Eighty-four per cent of the samples were contaminated with FB1, in spite of this the fumonisin concentration in the majority of samples was lower than 100 ng/g. The maximal value in polenta was 1000 ng/g FB1.

In Italy, Doko and Visconti (1994) published results of concentrations of FB1 and FB2 in corn and corn-based food. All the samples were positive, i.e. up to 5310 ng/g for FB1 and up to 1480 ng/g for FB2. The highest contamination with fumonisins was found in extruded corn, i.e. 6100 ng/g for FB1 and 520 ng/g for FB2. In ground corn, corn flour and polenta the values ranged between 420 and 3760 ng/g FB1 and 80 and 910 ng/g FB2. All the samples of sweet corn were positive for FB1, the values ranging between 60 and 790 ng/g, but negative for FB2. Lower values of fumonisin were found in pop corn (less than 60 ng of FB1/g and 20 ng of FB2/g), tortilla chips (less than 60 ng of FB1/g and 10 ng FB2/g) and in corn flakes (10 ng of FB1/g).

In Switzerland Pittet et al. (1992) examined corn-based food for the content of FB1. In 44 samples out of 120 (36.7%) they found FB1 (55-790 ng/g). The highest frequency of positive samples, i.e. 61.8%, and the highest concentration of FB1, i.e. 790 ng/g, was found in ground corn.

Zoller et al. (1994) in Switzerland tested 104 corn-based foods and corn-free foods. In ground corn and corn flour they found 406 ng/g (from 14 to 3400 ng/g) FB1 and 95 ng/g (5-900 ng/g) FB2. None of the corn-free samples contained detectable amounts of fumonisins.

Sanchis et al. (1994) published results of determinations of fumonisin B1 and B2 in 50 corn-based food samples (corn grits, corn flakes, snacks, corn flour and corn toasts) in Spain. The levels of contamination with FB1 were very low with a mean of 80 ng/g.

The determination of a substantiated and relevant-data-based hygienic limit is dependent on results of currently ongoing toxicological studies and determinations of NOAEL or LOAEL for the toxicologically most important effect (f.e. carcinogenic effect) (Gelderbloom et al., 1996; Marasas, 1997). In Switzerland the administrative hygienic limit for the content of fumonisins in corn-based products was proposed to be 1000 ng/g (Zoller et al., 1994). Our proposed preliminary administrative hygienic limit for corn products is also 1000 ng/g for the sum of FB1 and FB2 in order to prevent the access of highly contaminated food to the consumer (in our study it is ca 4% of samples). The concentration at the level of the hygienic limit can be measured relatively easily by commercial ELISA methods and can be verified with the HPLC method. ELISA is a very good alternative for quantitative screening of fumonisins in corn and corn-based products (Schneider et al., 1995; Sydenham et al., 1996; Usleber et al., 1994). Correlation coefficients of evaluations of the fumonisin content in corn (> 1000 ng/g) analyzed parallelly by the ELISA and HPLC methods were estimated in the value $r=0.996$ (Sydenham et al., 1996) and ($r>0.9, P<0.05$) (Abouzie et al., 1996).

The estimated dietary intake of various types of corn-based food is expressed in grams per person and day

II. The estimate of exposure doses of fumonisins from corn-based foods for the population in the Czech Republic in 1995/1996

Comodities	Intake of corn-based foods* (g/day/person)	An estimate of the exposure dose** (µg/day/person)
Corn extruded bread	0.30	0.11
Corn extruded products	0.18	0.04
Pop Corn	0.06	0.00
Corn flakes	0.23	0.01
Corn flour	2.5	0.43
Corn instant porridge	1.4	0.17
Corn pastes	2	0.15
Polenta	0.5	0.28
Corn snack	0.5	0.01
Other	1	0.14

* An estimate of dietary intake (Ruprich, 1997)

** Mean level of fumonisins

(Ruprich, 1997). The estimated dietary exposure dose to fumonisins for the population of the Czech Republic is described in Table II. The highest estimate of exposure dose can be expected from corn flour, i.e. 0.43 µg/person/day (mean of measured values) and polenta, i.e. 0.28 µg/person/day (mean of measured values). The lowest estimated exposure dose can be expected from pop corn, corn snacks and corn flakes.

The estimated average daily intake of fumonisins in Switzerland given by Zoller et al. (1994) is 2 µg/person per day.

Acknowledgements

The authors of the present paper would like to thank their colleague Mrs. J. Jezová for her efficient technical assistance.

References

- ABOUZIED, M. M., PESTKA, J. J. (1994): Simultaneous screening of fumonisin B1 and zearalenone by line immunoblot: a computer-assisted multianalyte assay system. *J. AOAC*, **77**: 495–501.
- ABOUZIED M. M., AZCONA-OLIVEIRA J. I., HART L. P., PESTKA, J. J. (1996): Detection of fumonisins in fusarium cultures, corn and corn products by polyclonal antibody-based ELISA – relation to fumonisin B-1 detection by liquid chromatography. *J. Food Protect.*, **59**: 645–651.
- AZCONA-OLIVEIRA, J. I., ABOUZIED, M. M., PLATTNER R. D., PESTKA, J. J. (1992): Production of monoclonal antibodies to the mycotoxins fumonisin B1 in regions with high incidences of esophageal cancer. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 847–852.
- BULLERMAN L. B., TSAI W. Y. J. (1994): Incidence and Levels of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and Fumonisins in Corn and Corn-Based Foods and Feeds. *J. Food Protect.*, **57**: 54–1546.
- COLVIN B. M., HARRISON L. R. (1992): Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. *Mycopathologia*, **117**: 79–82.
- CHU F. S., LI G. Y. (1994): Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and other mycotoxins in moldy corn collected from the Peoples' Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 847–852.
- DOKOM B., VISCONTI A. (1994): Occurrence of fumonisins B1 a B2 in corn and corn-based human foodstuffs in Italy. *Food Additiv. Contamin.*, **11**: 433–439.
- EGMOND H. P. van (1995): Mycotoxins – regulations, quality assurance and reference materials. *Food Addit. Contamin.*, **12**: 321–330.
- GELDERBLOM W. C. A., JASKIEWICZ K., MARASAS W. F. O., THIEL P. G., HORAK R. M. (1988): Fumonisins – Novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**: 1806–1811.
- GELDERBLOM W. C. A., KRIEK N. P. J., MARASAS W. F. O., THIEL P. G. (1991): Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1 in rats. *Carcinogenesis*, **12**: 1247–1251.
- GELDERBLOM, W. C. A., MARASAS, W. F. O., VLEGGGAAR R. et al. (1992): Fumonisins: Isolation, chemical characterization and biological effects. *Mycopathologia*, **117**: 11–16.
- GELDERBLOM W. C. A., SMUTS C. M., SNYMAN S. D., CAWOOD M. E., VANDERWESTHUIZEN L., SWANEVELDER S. (1996): Effect of fumonisin B-1 on protein and lipid synthesis in primary rat hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.*, **34**: 361–369.
- HAMMER P., BLUTHGEN A., WALTE HG. (1996): Carry-over of fumonisin B-1 into the milk of lactating cows. *Milchwiss. Milk Sci. Int.*, **51**: 691–695.
- HARRISON L. R., COLVIN B. M., GREENE J. T., NEWMAN L. E., COLE J. R. (1990): Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *J. Vet. Diagnost. Invest.*, **2**: 217–221.
- MARASAS W. F. O. (1997): Risk assessment of fumonisins produced by *Fusarium moniliforme* in corn. *Cereal Res. Commun.*, **25** (3 Part 1): 399–406.
- MARASAS W. F. O., KELLERMANN T. S., GELDERBLOM W. C. A., COETZER J. A. W., THIEL P. G., LUGT J. J. van der (1988): Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **55**: 197–203.
- MERRILL A. H., VANECHTEN, G., WANG, E. et al. (1993): Fumonisin-B(1) inhibits sphingosine (sphingamine)N-acyltransferase and *de novo* sphingolipids biosynthesis in cultured neurons in situ. *J. Biol. Chem.*, **268**: 27299–27306.
- NELSON P. E., PLATTNER R. D., SHACKELFORD D. D., DESJARDINS A. E. (1992): Fumonisin B1 production by *Fusarium* sp. other than *F. moniliforme* in section Liseola and by some related species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 984–989.
- NELSON P. E., DESJARDINS A. E., PLATTNER R. D. (1993): Fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry and significance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **31**: 233–252.
- NORRED W. P., PLATTNER R. D., VESONDER R. F., BACON C. W., VOSS K. A. (1992): Effects of selected secondary metabolites of *Fusarium moniliforme* on unscheduled synthesis of DNA by rat primary hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.*, **30**: 233–237.
- OSTRÝ V., RUPRICH J. (1998): Determination of the mycotoxins fumonisins in gluten-free diet (corn-based commodities) in the Czech Republic. *Centr. Eur. J. Publ. Hlth.*, **6**: 57–60.
- OSWEILER C. D., ROSS P. F., WILSON T. M., NELSON P. E., WITTE S. T., CARSON T. L., RICE L. G., NELSON H. A. (1992): Characterization of an epizootic of pulmonary edema in swine associated with fumonisin in corn screenings. *J. Vet. Diag. Invest.*, **4**: 53–59.
- PITTET A., PARISOD V., SCHELLENBERG M. (1992): Occurrence of fumonisin B1 a B2 in corn-based products from the Swiss market. *J. Agr. Food Chem.*, **40**: 1352–1354.
- ROSS P. F., LEDET A. E., OWENS D. L., RICE L. G., NELSON H. A., OSWEILER G. D., WILSON T. M. (1993): Experimental equine leukoencephalomalacia, toxic hepatitis, and encephalopathy, caused by corn naturally contaminated with fumonisins. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **5**: 69–74.

- RUPRICH J. (Ed.) (1997): The Food Basket for Czech Republic – 1994. Prague, NIPH: 189.
- SANCHIS V., ABADIAS M., ONCINS L., SALA N., VINAS I., CANELA R. (1994): Occurrence of fumonisins B1 and B2 in corn-based products from the Spanish market. *Appl. Environ. Microbiol.*, *60*: 2147–2148.
- SCHNEIDER E., USLEBER E., MARTLBAUER E. (1995): Rapid detection of fumonisin B-1 in corn-based food by competitive direct dipstick enzyme immunoassay and enzyme-linked immunofiltration assay with integrated negative control reaction. *J. Agr. Food Chem.*, *43*: 2548–2552.
- SELIM M. I., ELSHARKAWY S. H., POPENDORF W. J. (1996): Supercritical fluid extraction of fumonisin B-1 from grain dust. *J. Agr. Food Chem.*, *44*: 3224–3229.
- SHEPHARD G. S., SYDENHAM E. W., THIEL P. G., MARASAS W. F. O. (1970): Quantitative determination of fumonisin B1 and B2 by High-Performance Liquid Chromatography with fluorescence detection. *J. Liq. Chromatogr.*, *13*: 2077–2087.
- SHELBY R. A., ROTTINGHAUS G. E., MINOR H. C. (1994): Comparison of Thin-layer Chromatography and competitive immunoassay methods for detecting fumonisin in maize. *J. Agr. Food Chem.*, *42*: 2064–2067.
- STACK M. E., EPPLEY R. M. (1992): Liquid chromatographic determination of fumonisin B1 and B2 in corn and corn products. *J. AOAC Int.*, *75*: 834–837.
- SYDENHAM E. W., SHEPHARD G. S., THIEL P. G., BIRD C., MILLER B. M. (1996): Determination of fumonisins in corn – evaluation of competitive immunoassay and HPLC techniques. *J. Agr. Food Chem.*, *44*: 159–164.
- SYDENHAM E. W., THIEL P. G., MARASAS W. F. O., SHEPHARD G. S., SCHALKWYK D. J. van, KOCH K. R. (1990): Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, southern Africa. *J. Agr. Food Chem.*, *38*: 1900–1903.
- SYDENHAM E. W., SHEPHARD G. S., THIEL P. G., MARASAS W. F. O. (1991): Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. *J. Agr. Food Chem.*, *39*: 2014–2018.
- THIBAUT N., BURGAT V., GUERRE P. (1997): Fumonisin – properties, sources and toxicity. *Rev. Med. Vet.*, *148*: 369–388.
- USLEBER E., STRAKA M., TERPLAN G. (1994): Enzyme immunoassay for Fumonisin B1 to corn-based food. *J. Agr. Food Chem.*, *42*: 1392–1396.
- WANG E., ROSS P. F., WILSON T. M. et al. (1992): Increases in serum sphingosine and sphingamine and decreases in complex sphingolipids in ponies given feed containing fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *J. Nutr.*, *122*: 1706–1716.
- WU W. D., LIU T. X., VESONDER R. F. (1995): Comparative cytotoxicity of fumonisin B-1 and moniliformin in chicken primary cell cultures. *Mycopathologia*, *132*: 111–116.
- YOSHIZAWA T., YAMASHITA A., LUO Y. (1994): Fumonisin occurrence in corn from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China. *Appl. Environ. Microbiol.*, *60*: 1626–1629.
- YOUNG J. C., LAFONTAINE P. (1993): Detection and characterization of fumonisins as their methyl esters by liquid chromatography/particle – beam mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, *7*: 352–359.
- ZOLLER O., SAGER F., ZIMMERLI B. (1994): Vorkommen von Fumonisinen in Lebensmitteln. *Mitt. Geb. Lebensm.-Unters. Hyg.*, *85*: 81–99.

Received March 25, 1998

Souhrn

OSTRÝ V., RUPRICH J. (1998): Výskyt fumonisinů v potravinách na bázi kukuřice v České republice. *Czech J. Food Sci.*, *16*: 117–121.

V letech 1995 a 1996 bylo v České republice vyšetřeno 210 vzorků potravin na bázi kukuřice na obsah fumonisinů. K analýze fumonisinů byla využita imunochemická metoda ELISA. 89% vzorků bylo pozitivních na obsah fumonisinů v rozsahu 9–4 594 ng na g (aritmetický průměr 180 ng/g). U 4% vyšetřovaných vzorků byly stanoveny koncentrace fumonisinů větší než 1000 ng/g. Maximální koncentrace fumonisinů byly stanoveny ve vzorku kukuřičného křehkého chleba (4 594 ng/g), extrudovaných kukuřičných výrobků (1 178 ng/g) a ve vzorku polenty (1 243 ng/g). Corn flakes (max. 328 ng/g), pop corn (max. 128 ng/g) a corn snack (max. 32 ng/g) patří k potravinám, v nichž byly stanoveny poměrně nízké koncentrace fumonisinů. Nejvyšší odhad expoziční dávky je možné očekávat z kukuřičné mouky 0.43 μg/osobu/den (aritmetický průměr naměřených hodnot) a polenty 0.28 μg/osobu/den (aritmetický průměr naměřených hodnot). Nižší odhady expoziční dávky fumonisinů je možné očekávat z pop cornu, corn snacku a cornflakes.

mykotoxiny; fumonisiny; potraviny z kukuřice; ELISA; dietární expozice

Contact address:

MVDr. Vladimír Ostrý, CSc., Státní zdravotní ústav Praha, Centrum hygieny potravinových řetězců, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Česká republika, tel.: +420 5 41 21 35 47, fax: +420 5 41 21 29 53, e-mail: niph@chpr.anet.cz

Determination of Phthalic Acid Esters (PAEs) in Biological Materials by HPLC*

Alžbeta JAROŠOVÁ, Věra GAJDUŠKOVÁ¹, Josef RASZYK¹, Kamil ŠEVELA²

Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno; ¹Veterinary Research Institute, Brno;

²IInd Clinic of Internal Diseases, St. Ann's Faculty Hospital, Faculty of Medicine of the Masaryk University, Brno, Czech Republic

Abstrakt

JAROŠOVÁ A., GAJDUŠKOVÁ V., RASZYK J., ŠEVELA K. (1998): Determination of phthalic acid esters (PAEs) in biological materials by HPLC. Czech J. Food Sci., 16: 122-130.

Analytical procedures for the determination of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP) in plant and animal matrices (feeds, raw materials and foods) have been modified and tested. The procedures consist of freeze-drying of samples, extraction of phthalates, separation of analytes from co-extracts using gel permeation chromatography in Bio-beads S-X3 gel, clean-up of extracts or eluates with sulphuric acid, and detection and quantification by high-performance liquid chromatography with UV detection (diode array detector) at 224 nm. A rapid and simple method for the determination of DEHP, its metabolite mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) and DBP has been developed. The procedures were used within the monitoring of DEHP and DBP in feed and muscle and adipose tissue samples collected in the South Moravian region and investigations of the DEHP leaching from PVC sets used in patients treated by haemodialysis.

phthalate esters; analysis; feeds; foods; blood; gel permeation chromatography; clean-up with sulphuric acid; high-performance liquid chromatography

Phthalic acid esters (PAEs) are used for many purposes in the chemical industry and rank among widespread hazardous environmental pollutants. They can penetrate into the food chain (Castle et al., 1988; Petersen, 1991; Sharman et al., 1994; Nerín et al., 1993; Page, Lacroix, 1992, 1995) or directly into the human organism (Gerlai et al., 1987; Malik et al., 1993) from a variety of sources, such as plastics paints, inks and coating materials. The most frequently detected phthalates include di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP).

Several analytical procedures for the determination of phthalates in various matrices have been developed. One of their critical points is the separation of lipid co-extracts from PAEs, when various techniques, such as sweep-co-distillation (Page, Lacroix, 1995), absorption chromatography on Florisil or alumina (Holadová, Hajšlová, 1995), or gel permeation chromatography (GPC) are used (Petersen, 1991; Sharman et al., 1994; Nerín et al., 1993). DBP and DEHP are lipophilic compounds and therefore GPC can be carried out under con-

ditions similar to those used in the determination of polychlorinated biphenyls in biological matrices (Williams et al., 1995; Hess et al., 1995), and the extracts can be cleaned up with concentrated sulphuric acid (Thurén, Södergren, 1987). Methods based on the extraction of DEHP with various organic solvents without subsequent clean-up have been suggested for the determination of DEHP residues in blood and blood derivatives stored in PVC bags (Malik et al., 1993; Shintani, 1985; Pollack et al., 1984).

Gas chromatography (GC) with ECD or FID detectors (Petersen, 1991; Nerín et al., 1993; Page, Lacroix, 1992; Holadová, Hajšlová, 1995), gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS) (Sharman et al., 1994; Nerín et al., 1993; Holadová, Hajšlová, 1995), or high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection (diode array detector) (Gerlai et al., 1987; Malik et al., 1993; Dine et al., 1991; Shintani, 1985; Pollack et al., 1984) are currently used for the determination of PAEs in biological materials. The choice depends on the degree of extract purity.

*This work was worked out in Veterinary Research Institute and was supported by the Czech Ministry of Agriculture (grant RE 5562), the Czech Ministry of Health (grant no. 3427-3) and the Grant Agency of the Czech Republic (Project 525/96/0924).

Analytical procedures for PAEs require a high degree of purity of laboratory environment, glassware and chemicals (Holáková, Hajšlová, 1995).

The objectives of this study were: 1) optimization and verification of an analytical method for determination of PAEs in materials of plant and animal origin (feedstuffs, raw materials, foods) that would be suitable for laboratories engaged in the monitoring and control of hazardous pollutants; 2) optimization and verification of a rapid and sensitive method for the determination of DEHP, including its metabolite mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP), and DBP in blood.

MATERIAL AND METHODS

Material

Samples of commercial combined feeds for livestock ($n = 30$) were collected at feed processing plants and farms in the South Moravian region. Samples of porcine, bovine and avian muscle and adipose tissues ($n = 30$) were collected at slaughterhouses in the South Moravian region. Food samples (edible plant oil, butter) were purchased from retail shops in Brno. Porcine and poultry blood samples, used for development and verification of a rapid method for the determination of PAEs in blood, were collected at slaughterhouses in the Veterinary Research Institute in Brno. Blood samples to be analysed for DEHP ($n = 18$) were collected from sets applied to patients of the Haemodialysis Unit of St. Ann's Faculty Hospital in Brno.

Chemicals

Analytical standards: di-2-ethylhexyl phthalate and di-n-butyl phthalate were supplied by Supelco, Inc. (USA), mono-2-ethylhexyl phthalate was synthesised at the Institute of Chemical Technology, Department of Organic Chemistry (Prague, CR), all of them with 99.9% purity.

Stock and working solutions were prepared using acetonitrile and stored in a freezer ($-15\text{ }^{\circ}\text{C}$).

The solvents acetone, ethyl acetate, n-hexane, dichloromethane, and cyclohexane were analytical grade (Merck, Germany) and were redistilled in an all-glass apparatus. Acetonitrile was HPLC grade (J. T. Baker, Netherlands). Water was deionized and purified with a Mili-Q-Cartridge (Milipore, USA). Heparin was purchased from Léčiva (CR). All other chemicals (Merck) were analytical grade: sulphuric acid, sp. gr. 1.84; phosphate buffer, pH 2.8 ($0.005\text{ mol/dm}^3\text{ NaH}_2\text{PO}_4 + 85\%\text{ H}_3\text{PO}_4$); citrate buffer, pH 2.2 ($0.2\text{ mol/dm}^3\text{ Na}_2\text{HPO}_4 + 0.1\text{ mol/dm}^3$ citric acid).

Glassware

Flasks with ground stoppers (100 ml, 250 ml), pipettes, Petri dishes, test tubes with ground stoppers, vials with screw caps and teflon sealing, customized heart-shaped flasks with ground stoppers (50 ml), Hamilton syringes (1–5 ml).

Glass Cleaning

Vials, flasks and test tubes are washed, heated in a furnace at $390\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 4 hours and rinsed with acetone before use. Washed pipettes are only rinsed thoroughly with acetone.

Apparatuses and Devices

Homogenizer (Moulinex, France); freeze-drying apparatus LYOVAC 2 (FINN-AQUA, Germany); extraction apparatus Soxtec System HT 1043 (Tecator, Sweden); cooled centrifuge K70 (Janetzki, Germany); shaking apparatus 3006 (GFL, Germany); muffle furnace (Labora, CR); rotary vacuum evaporator (Heidolph, Germany); analytical balance AE 163 (Mettler, Switzerland).

Gel Permeation Chromatography (GPC)

Liquid chromatograph – isocratic pump LCP 400 and UV detector 2082 (ECOM, CR); stainless steel preparative columns: Variant 1 – column $500\text{ mm} \times 8\text{ mm I.D.}$, Variant 2 – a set of three in-line columns including 1st guard column $70\text{ mm} \times 25\text{ mm I.D.}$ and 2nd and 3rd columns $250\text{ mm} \times 25\text{ mm I.D.}$, packed with Bio-beads S-X3, 200–400 mesh (Labio, CR); linear injector loop 1–2 ml HPP 4001 (Laboratorní přístroje, CR).

High-performance Liquid Chromatography (HPLC)

Liquid chromatograph Varian 5000 (Varian, USA); injection loop 20 ml Rheodyne 7125 (USA); glass chromatographic column $150\text{ mm} \times 3\text{ mm I.D.}$ packed with Separon SGX C 18, particle size $5\text{ }\mu\text{m}$ (Tessek, CR); diode array detector Polychrom 9060 (Varian, USA); PC integrator with the software CSW Version 1.6 (DataApex, CR).

Analytical Procedures

Feeds and Foods of Animal and Plant Origin

Sample processing prior to extraction

Samples (fats, milk, cream, liquid milk products, frozen cream products, adipose tissue, muscles, other tissues, meat products, cheeses, eggs, feedstuffs, materials of plant origin) are homogenized (hard cheese samples are grated on a stainless steel grater), put into Petri dishes and weighed ($50\text{--}200\text{ g}$ in dependence on presumed fat content). The height of the layer should not exceed 1 cm. The samples are stored in a freezer and subsequently freeze-dried.

Extraction of PAEs

1. Extraction in Soxtec: Exactly weighed sample ($3\text{--}5\text{ g}$) is put into an extraction shell and PAEs are extracted with 60 ml hexane for 2 h. The extract is poured into a weighed flask, hexane is evaporated and the fat residue is weighed and stored in a freezer. The procedure is suitable for samples with a high fat content.

2. Extraction by shaking with an organic solvent: Freeze-dried sample ($5\text{--}15\text{ g}$, corresponding to $10\text{--}50\text{ g}$ of the original material) is put into an Erlenmeyer flask and PAEs

are extracted three times with 80 ml hexane on a shaking apparatus for 60, 30 and 30 min, respectively. The hexane extracts are pooled, concentrated in a rotary vacuum evaporator at max. 40 °C and evaporated to dryness with a stream of nitrogen prior to the separation of PAEs. The procedure is suitable for matrices of plant or animal origin with a low fat content.

Separation of co-extracts by GPC

V a r i a n t 1. One ml of sample, corresponding to 0.25 g of extracted fat, or an equivalent volume of sample extract dissolved in the mobile phase, is injected onto a 500 mm × 8 mm column. A dichloromethane + cyclohexane mixture (1 : 1) is used as the mobile phase. At the flow rate 1 ml/min, PAEs are eluted between 10th and 18th min.

V a r i a n t 2. Two ml of sample, corresponding to 0.5 g extracted fat, or an equivalent volume of sample extract dissolved in the mobile phase, are injected onto the first of an in-line set of three columns. A dichloromethane + cyclohexane mixture (1 : 1) is used as the mobile phase. At the flow rate 1 ml/min, PAEs are eluted between 27th and 37th min.

The PAEs fraction is concentrated in a rotary vacuum evaporator at 40 °C and dried with a stream of nitrogen. The residue is dissolved in 200 ml acetonitrile for HPLC determination.

Clean-up with concentrated sulphuric acid

Clean-up with concentrated sulphuric acid is necessary when the separation of PAEs from animal or plant co-extracts is incomplete.

The mobile phase is evaporated from the PAE fraction, the residue is dissolved in hexane and transferred into a test tube or vial with ground stopper, and the volume is adjusted to 1 ml. After the addition of 1 ml concentrated sulphuric acid, the content is vigorously shaken for 10 min and centrifuged and the hexane phase is removed. The H₂SO₄ phase is mixed with 2 ml of chilled hydrated H₂SO₄ prepared by the dilution of concentrated H₂SO₄ with distilled water to 65% (the dilution is done in an ice-water bath). PAEs are extracted by shaking with 1 ml hexane for 10 min. The phases are separated by centrifugation and the hexane phase is transferred into a test tube (vial). The extraction procedure is repeated twice using the same volume of hexane. The extracts are pooled, hexane is evaporated with a stream of nitrogen and the residue is dissolved in an appropriate volume of acetonitrile for HPLC determination.

Note: The separation by GPC can be omitted and co-extracts can be removed with concentrated sulphuric acid when samples with a low fat content are analysed.

Blood

Collection and storage of samples

Blood samples are collected into heparinized test tubes and analysed without delay. The samples must be frozen when a transport to a distant laboratory is necessary.

Extraction of DEHP and DBP

Six ml of blood sample are pipetted into a weighed vial containing 9 ml of ethyl acetate and the vial is weighed again. The content is shaken vigorously for 30 min and phases are separated in a cooled centrifuge at 3000 rpm (1600 g) for 30 min. The organic phase is transferred into a customized heart-shaped flask using a syringe. The extraction is repeated twice using 6 ml of ethyl acetate. The organic phases are pooled and concentrated in a rotary vacuum evaporator (water bath temperature ≤ 40 °C) and dried with a stream of nitrogen. The residue is diluted in an appropriate volume (100–500 ml) of acetonitrile for HPLC determination.

Extraction of MEHP

Three ml of citrate buffer are added to 6 ml of blood and MEHP is extracted with three portions of ethyl acetate (9, 6 and 6 ml) as described for DEHP and DBP.

Extraction of DEHP, DBP and MEHP

The extraction of DEHP and DBP is followed by the extraction of MEHP as described above and the fractions are pooled.

HPLC Conditions

A column packed with a Separon SGX C18 is used. UV absorption at 224 nm is monitored continuously using a diode array detector. The samples are injected in 20 µl of acetonitrile and eluted isocratically with the following mobile phases: acetonitrile–water (9 : 1), flow-rate 0.5 ml per min for DEHP and DBP in feeds and foods; acetonitrile–water (9 : 1), flow rate 0.8 ml/min for DEHP and DBP in blood; acetonitrile–phosphate buffer (7 : 3), flow rate 0.6 ml/min for MEHP in blood.

The external standard method is used for the calculation of analyte concentration. The result is read from a calibration line showing the dependence of peak area on analyte concentration and is expressed in mg/kg feed/food or in ng/g whole blood. The calibration line is constructed using at least four analyte concentrations ranging from 0 to 1000 ng per injection. The response of the diode array detector is linear within this range. The calibration lines are checked prior to the analysis of each set of samples using standards of the analytes under study. The identity of PAEs is regularly checked on the basis of elution times and analyte-specific spectrums.

QA/QC Conditions

Glass and chemicals shall be checked for possible contamination with PAEs before each analysis. All laboratory devices and utensils shall be washed and rinsed with hexane or acetone. Blank analysis shall be run along with each set of samples to check the purity of the procedure and to provide for the correction of chromatographic background. Extracts and eluates are concentrated in a rotary vacuum evaporator at a water bath temperature ≤ 40 °C and dried with a stream of nitrogen to avoid the loss of PAEs.

The dose of fat applied onto the GPC column depends on the parameters of the column and is proportional to the mass of the gel packing. Therefore, doses, flow rates ensuring effective separation of PAEs from fats, and elution time of the PAEs fraction must be tested. Two portions of the sample shall be applied onto the column and PAEs fractions shall be pooled if the weighed amount of fat is low. The mobile phase must be identical with the organic phase in which the Bio-beads S-X3 gel was swelled and packed into the column. Elution times of PAE fractions shall be checked with UV detector and recorded currently during GPC. All the parameters must be set accurately to avoid the passage of fats into the PAEs fraction.

All samples shall be analysed in duplicates. Fat and dry matter contents in the sample must be determined to allow the calculation of PAE concentration in whole samples.

The recovery of the procedure and repeatability of its results shall be checked regularly using samples fortified with a known amount of PAE.

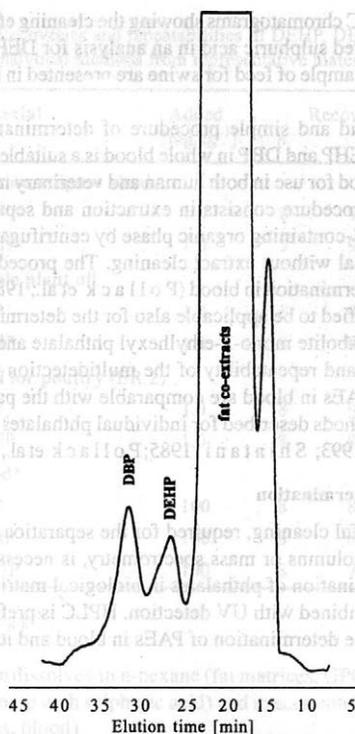
RESULTS AND DISCUSSION

Analytical Procedures

Analytical procedures for the determination of phthalates in plant and animal materials, suitable for various matrices, have been validated and implemented.

Freeze-drying of samples prior to extraction offers several advantages. PAEs are extracted with the nonpolar solvent *n*-hexane. No emulsification, common in the extraction of water-containing samples (such as milk, meat or green plant materials), occurs and no re-extraction of residues present in an liquid–liquid system is necessary. The extraction of PAEs from freeze-dried matrices is reproducible and the sensitivity can be increased by controlling the weighed amount. Extraction in Soxtec is recommendable for the determination of PAEs in fat and all matrices with a fat content higher than 15% and extraction by shaking with *n*-hexane is suitable for the processing of other materials.

The separation by GPC of PAEs from lipids and other co-extracts is usable also for other lipophilic analytes, such as pesticides or polychlorinated biphenyls. The Bio-beads S-X3 gel effectively separates not only the co-extracted lipids, but also many plant pigments. Several hundreds of extracts of biological materials can be cleaned in one packing under standard conditions. The set of three columns and injection of a large volume of sample extract (Variant 2) shall be preferred. Fig. 1 shows the result of GPC separation of DEHP and DBP from lipid co-extracts (porcine adipose tissue) using such a set. Several reproducible procedures for the separation of PAEs from co-extracts of plant materials and environmental samples by adsorption chromatography have been described (Holáková, Hajšlová, 1995; Russell, McDuffie, 1983). Their common disadvantage is that they are rather demanding



1. GPC separation of DEHP and DBP fraction and lipid co-extracts fraction from a porcine adipose tissue sample (Variant 2)

on the standardization of separation conditions for each series of analyses (Hess et al., 1995). Lipid co-extracts are eluted along with PAEs from sorbents (Florisil, alumina) and solid phase extraction columns (SPE) when lipid matrices, requiring a large amount of weighed sample are to be analysed (unpublished results of authors).

Clean-up of extracts or GPC eluates with concentrated sulphuric acid is a procedure similar to the processing of extracts to be analysed for polychlorinated biphenyls. The procedure described by Thuren and Södergren (1987), who used fuming sulphuric acid to clean extracts of surface water and fish tissues to be analysed for DEHP and DBP by gas chromatography, has been modified. This modification, consisting in the replacement of fuming sulphuric acid by its concentrated form, has been introduced because the freeze-dried samples are free of water reducing the cleaning effect of sulphuric acid. The principal step of re-extraction of PAEs from the sulphuric acid phase is hydration of the latter associated with deionization of phthalates and their passage into the nonpolar solvent. Hydration of sulphuric acid increases the yield of PAEs and enhances the cleaning effect (Thuren, Södergren, 1987). Sulphuric acid is used for the clean-up of eluates after GPC separation mostly when plant matrices are analysed (edible plant oils, simple and combined fe-

eds). HPLC chromatograms showing the cleaning effect of concentrated sulphuric acid in an analysis for DEHP and DBP of a sample of feed for swine are presented in Figs. 2 and 3.

The rapid and simple procedure of determination of DEHP, MEHP and DBP in whole blood is a suitable screening method for use in both human and veterinary medicine. The procedure consists in extraction and separation of the PAE-containing organic phase by centrifugation in a single vial without extract cleaning. The procedure of DEHP determination in blood (Pollack et al., 1984) has been modified to be applicable also for the determination of the metabolite mono-2-ethylhexyl phthalate and DBP. Recovery and repeatability of the multidetection procedure for PAEs in blood are comparable with the parameters of methods described for individual phthalates (Malik et al., 1993; Shintani, 1985; Pollack et al., 1984).

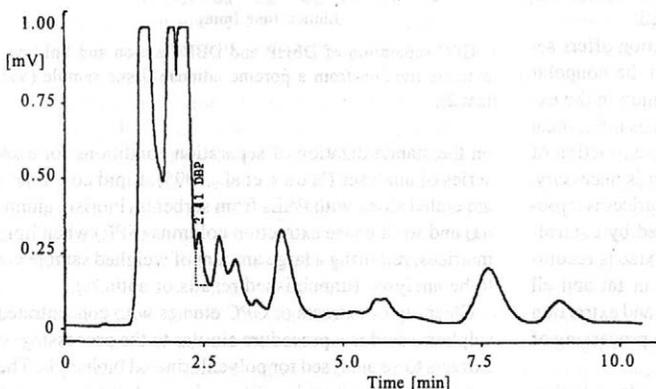
HPLC Determination

No careful cleaning, required for the separation in GC capillary columns or mass spectrometry, is necessary in the determination of phthalates in biological matrices by HPLC combined with UV detection. HPLC is preferably used for the determination of PAEs in blood and its deri-

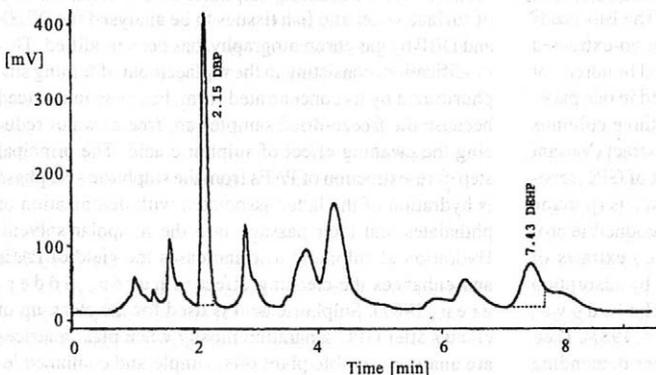
vatives (Gerlai et al., 1987; Malik et al., 1993; Shintani, 1985; Pollack et al., 1984). Combined with diode array detection, allowing the identification of phthalate spectra, HPLC was used also in food analyses (Sharma et al., 1994; Page, Lacroix, 1992; Page, Lacroix, 1995). The results obtained in the verification of the procedures and analyses of real samples have confirmed the suitability of HPLC for the determination of DEHP and DBP in animal and plant matrices.

QA/QC

Principal conditions of quality assurance and quality control, aimed at the avoidance of sample contamination during the analysis and ensuring quantitative and reproducible analysis of PAEs in various matrices, are defined in the preceding chapter. The recovery of the procedure and repeatability of its results should be checked regularly using samples fortified with a known amount of PAE. Since no biological reference materials with known concentrations of PAEs are available, recovery checks should be done using homogenized samples containing no residues exceeding the detection limit of the method and fortified with known amounts of DEHP and DBP. Alternatively, PAEs can be determined also in PAE-contaminated



2. HPLC chromatogram of GPC fraction DEHP and DBP from a feed sample without clean-up with sulphuric acid



3. HPLC chromatogram of GPC fraction DEHP and DBP from a feed sample after clean-up with sulphuric acid

samples provided that their concentration is determined in octaplicates, the same analysis is done in octaplicates after the addition of a known amount of PAE standard and recovery and repeatability of the procedure are assessed using the standard addition method. The recovery and repeatability of GPC separation of DEHP and DBP after the addition of a standard amount of PAE to a lipid extract before the injection onto GPC columns are shown in Table I.

I. Recoveries and repeatabilities of DEHP and DBP by GPC separation procedure from fat materials

Material PAE	Added [mg.kg ⁻¹]	n	Recovery ± R.S.D. [%]
Porcine adipose tissue			
DBP	1.0	8	99.7 ± 1.4
DEHP	1.0	8	99.3 ± 1.4
Porcine adipose tissue			
DBP	2.0	8	99.9 ± 1.5
DEHP	2.0	8	100.3 ± 1.8
Butter			
DBP	1.0	8	99.2 ± 1.7
DEHP	1.0	8	98.3 ± 1.9

The recovery and repeatability of clean-up with concentrated sulphuric acid were assessed using an a GPC eluate fraction of edible plant oil and feed samples (Table II). Table III shows recoveries and repeatabilities of the complete procedure of DEHP and DBP determination in feed and food samples and the rapid method of DEHP, MEHP and DBP determination in blood. The concentration of the added PAE standards (1–2 mg/kg) to representative samples of animal adipose tissue (extraction, GPC separation, HPLC determination) and edible plant oil and combined poultry feed (extraction, GPC separation, clean-up with concentrated sulphuric acid, HPLC determination) corresponds to current hygienic limits for DEHP and DBP laid down in the Czech Republic. The concentration of PAE standard added to whole porcine blood samples (100 ng/g) corresponds to approx. a threefold of the detection limit of the procedure. The added PAE standards

II. Recoveries and repeatabilities of DEHP and DBP by sulphuric acid clean-up procedure from plant materials

Material PAE	Added [mg.kg ⁻¹]	n	Recovery ± R.S.D. [%]
Edible plant oil			
DBP	1.0	8	97.9 ± 2.7
DEHP	1.0	8	96.9 ± 2.8
Feed for swine (A1)			
DBP	1.0	8	97.3 ± 3.5
DEHP	1.0	8	95.8 ± 3.8

III. Recoveries and repeatabilities of DEHP, DBP and MEHP by analytical methods from representative materials

Material PAE	Added [mg.kg ⁻¹]	n	Recovery ± R.S.D. [%]
Porcine adipose tissue			
DBP	1.0	8	98.6 ± 1.9
DEHP	1.0	8	97.0 ± 2.4
Edible plant oil			
DBP	1.0	8	97.7 ± 3.6
DEHP	1.0	8	96.4 ± 2.8
Feed for poultry (BR 2)			
DBP	1.0	8	95.8 ± 3.7
DEHP	1.0	8	94.4 ± 4.0
Blood*			
DBP	100	8	87.7 ± 3.9
DEHP	100	8	89.4 ± 4.2
MEHP	100	8	76.2 ± 6.3

* in ng.g⁻¹

were dissolved in n-hexane (fat matrices, GPC separation, clean-up with sulphuric acid) and in acetonitrile (plant matrices, blood).

Regression coefficients of calibration lines for HPLC determination of individual PAEs within the concentrations of 0–1000 ng per injection are $r = 0.993–1.000$.

The lowest per injection amount of DEHP, MEHP and DBP detectable by HPLC is 20 ng.

The detection limit of DEHP and DBP depends on the content of fat in the sample, ranging from 0.2 to 0.4 mg/kg for fats and from 0.01 to 0.10 mg/kg for animal and plant materials with a low fat content. The detection limit of DEHP, MEHP and DBP in blood is 30 ng/g whole blood.

Determination of PAE Concentrations in Biological Materials

The method of DEHP and DBP determination in feeds, raw materials and foods of plant or animal origin is currently used in the authors' laboratory within investigations of the distribution and accumulation of PAEs in the organisms of farm animals and within the monitoring of the presence of PAEs in the food chain. Table IV shows the occurrence of DEHP and DBP in feeds and muscular and adipose tissues of farm animals in the South Moravian region. Fig. 4 shows the chromatogram of HPLC determination of DEHP and DBP in a sample of porcine adipose tissue after the extraction and separation of PAEs by GPC. The method is currently used within the monitoring of PAE levels in selected commodities, carried out by the laboratories controlled by the State Veterinary Administration of the Czech Republic. The method of PAE determination in blood is used, in collaboration with medical

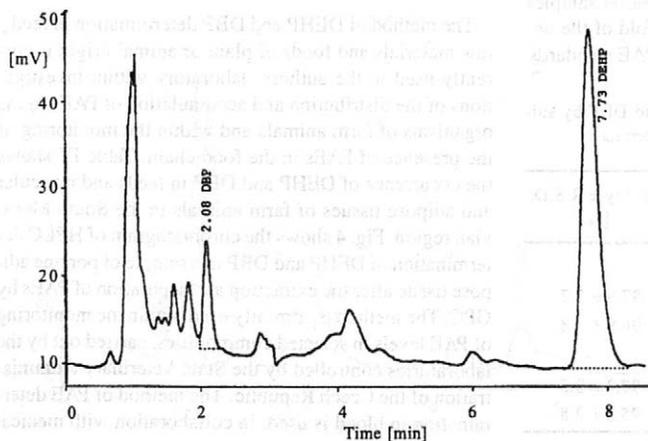
IV. Occurrence of DEHP and DBP (mg/kg) in combined feedstuffs, muscles and adipose tissues

Material	DBP	DEHP	Σ DBP+DEHP
Statistical value	[mg.kg ⁻¹]		
Combined feedstuffs for poultry			
<i>n</i>	6	6	6
Mean	0.562	0.592	1.153
Median	0.25	0.26	0.47
S.D.	0.885	0.624	1.486
Min	0.06	0.21	0.30
Max	2.36	1.77	4.13
Combined feedstuffs for swine			
<i>n</i>	20	20	20
Mean	0.318	0.224	0.542
Median	0.23	0.18	0.36
S.D.	0.226	0.139	0.335
Min	0.10	0.07	0.20
Max	0.96	0.49	1.29
Combined feedstuffs for cattle			
<i>n</i>	4	4	4
Mean	0.150	0.245	0.395
Median	0.14	0.24	0.38
S.D.	0.036	0.066	0.099
Min	0.12	0.17	0.30
Max	0.20	0.33	0.53
Porcine subcutaneous adipose tissue			
<i>n</i>	6	6	6
Mean	3.36	0.51	3.87
Median	3.54	0.53	4.02
S.D.	1.76	0.21	1.89
Min	1.37	0.20	1.79
Max	6.12	0.80	6.92

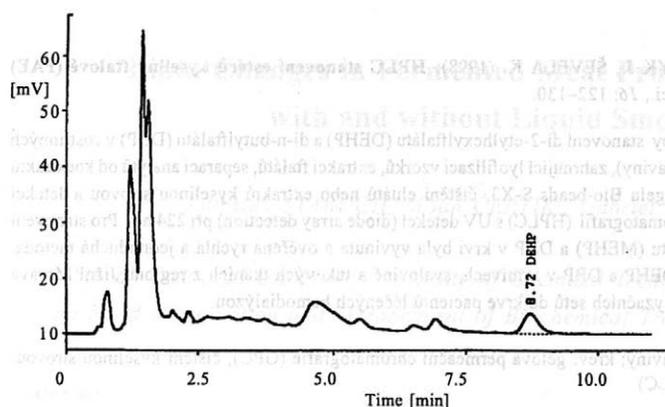
Material	DBP	DEHP	Σ DBP+DEHP
Statistical value	[mg.kg ⁻¹]		
Bovine kidney fat			
<i>n</i>	6	6	6
Mean	2.54	0.79	3.33
Median	2.19	0.60	3.09
S.D.	0.89	0.38	0.84
Min	1.76	0.55	2.61
Max	4.17	1.52	4.75
Chicken muscles			
<i>n</i>	9	9	9
Mean	0.17	0.11	0.28
Median	0.17	0.11	0.32
S.D.	0.06	0.08	0.10
Min	0.08	0.02	0.14
Max	0.24	0.30	0.43
Chicken intestinal fat			
<i>n</i>	9	9	9
Mean	0.37	0.62	0.99
Median	0.20	0.42	0.90
S.D.	0.22	0.46	0.47
Min	0.20	0.20	0.40
Max	0.68	1.71	1.91

institution, within investigations of possible adverse effects of PAEs eluted from plastic materials used in human medicine. The leaching of DEHP from PVC sets into blood of patients treated by haemodialysis and the result of HPLC

determination of DEHP in blood are shown in Table V and Fig. 5, respectively. Data on the occurrence of PAEs in biological materials and on their fate in the organism will be presented and discussed in detail in next papers.



4. Chromatogram of HPLC determination of DEHP and DBP in porcine adipose tissue



5. Chromatogram of HPLC determination of DEHP in blood

V. Leaching of DEHP from PVC sets into patients' blood upon haemodialysis

Time [h]	DEHP [ng.g ⁻¹] patients		
	1	2	3
0.00 a	< 30	< 30	< 30
b	37	33	< 30
2.00 a	92	124	94
b	182	164	247
3.45 a	195	197	256
b	242	233	261

a - blood sampling from suction needle

b - blood sampling from set

Acknowledgement

The authors wish to thank Ms. I. Malotová for her skilful technical assistance.

References

CASTLE A., MERCER J. R., STARTIN J. R., GILBERT J. (1988): Migration from plasticized films into food. 3. Migration of phthalate, sebacate, citrate and phosphate esters from film used for retail food packaging. *Food Addit. Contam.*, 5: 9-20.

DINE T., LUYCKX M., CAZIN M., BRUNET C. I., GIUDALIEZ F. (1991): Rapid determination by high performance liquid chromatography of di-2-ethylhexyl phthalate in plasma stored in plastic bags. *Biomed. Chromatogr.*, 5: 94-97.

GERLAI, I., PINTÉR, J., PICK, J. (1987): Determination of DEHP in blood products stored in plastic bags by HPLC. *Chromatographia*, 24: 403-406.

HESS P., BOER J. de, COFINO W. P., LEONARDS P. E. G., WELLS D. E. (1995): Critical review of the analysis of non- and mono-ortho-chlorobiphenyls. *J. Chromatogr.*, A, 703: 417-465.

HOLADOVÁ K., HAJŠLOVÁ J. (1995): A comparison of different ways of sample preparation for the determination of phthalic acid esters in water and plant matrices. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 59: 43-57.

MALIK S., KENNY M., AHMAD S. (1993): A method to measure di-2-ethylhexylphthalate from the serum of hemodialysis patient. *Toxicol. Environ. Chem.*, 37: 133-137.

NERÍN C., CACHO J., GANCEDO P. (1993): Plasticizers from printing inks in aselection of food packagings and their migration to food. *Food Addit. Contam.*, 10: 453-460.

PAGE B. D., LACROIX G. M. (1992): Studies into transfer and migration of phthalate esters from aluminium foil-paper laminates to butter and margarine. *Food Addit. Contam.*, 9: 197-212.

PAGE B. D., LACROIX G. M. (1995): The occurrence of phthalate esters and di-2-ethylhexyl adipate plasticizers in Canadian packaging and food sampled in 1985-1989: a survey. *Food Addit. Contam.*, 12: 129-151.

PETERSEN J. H. (1991): Survey of di-(2-ethylhexyl)phthalate plasticizer contamination of retail Danish milks. *Food Addit. Contam.*, 8: 701-706.

POLLACK G. M., SLAUGHTER R. L., BUCHANAN J. F., SHEN, D. D. (1984): High-performance liquid chromatographic procedure for the determination of di-(2-ethylhexyl)phthalate in human blood specimens. *J. Chromatogr.*, 311: 101-108.

RUSSELL D. J., McDUFFIE B. (1983): Analysis for phthalate esters in environmental samples: Separation from PCB's and pesticides using dual column Liquid chromatography. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 15: 165-183.

SHARMAN M., READ W. A., CASTLE L., GILBERT J. (1994): Levels of di-(2-ethylhexyl)phthalate and total phthalate esters in milk cream, butter and cheese. *Food Addit. Contam.*, 11: 375-385.

SHINTANI H. (1985): Determination of phthalic acid, mono-(2-ethylhexyl) phthalate and di-(2-ethylhexyl) phthalate in human plasma and in blood products. *J. Chromatogr.*, 337: 279-290.

THURÉN A., SÖDERGREN A. (1987): Clean-up with sulphuric acid prior to the gas chromatographic determination of phthalate esters. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 28: 309-315.

WILLIAMS L. L., GIESY J. P., VERBRUGGE D. A. et al. (1995): Polychlorinated biphenyls and 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin equivalents in eggs of red-breasted mergansers near Green Bay, Wisconsin, USA, in 1977-78 and 1990. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 29: 52-60.

Received June 22, 1998

Souhrn

JAROŠOVÁ A., GAJDŮŠKOVÁ V., RASZYK J., ŠEVELA K. (1998): **HPLC stanovení esterů kyseliny ftalové (PAE) v biologických materiálech.** Czech J. Food Sci., 16: 122–130.

Byly modifikovány a ověřeny analytické postupy stanovení di-2-ethylhexylftalátu (DEHP) a di-n-butylftalátu (DBP) v rostlinných a živočišných matricích (krmiva, suroviny a potraviny), zahrnující lyofilizaci vzorků, extrakci ftalátů, separaci analytů od koextraktů gelovou permeační chromatografií (GPC) na gelu Bio-beads S-X3, čištění eluátů nebo extraktů kyselinou sírovou a detekci a kvantifikaci vysoko účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s UV detekcí (diode array detection) při 224 nm. Pro stanovení DEHP, jeho metabolitu mono-2-ethylhexylftalátu (MEHP) a DBP v krvi byla vyvinuta a ověřena rychlá a jednoduchá metoda. Metody byly využity pro sledování výskytu DEHP a DBP v krmivech, svalovině a tukových tkáních z regionu Jižní Morava a ke studiu vyluhovatelnosti DEHP z PVC dialyzačních setů do krve pacientů léčených hemodialýzou.

estery kyseliny ftalové; analýza; krmiva; potraviny; krev; gelová permeační chromatografie (GPC); čištění kyselinou sírovou; vysoko účinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Contact address:

Ing. Alžběta Jarošová, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Ústav technologie potravin, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika, tel.: + 420 5 45 13 31 91; fax: + 420 5 45 21 20 44, e-mail: ualja@mendelu.cz

Lipid Changes in Fermented Meat Products during Ripening with and without Liquid Smoke Addition

Ladislav STARUCH, Milan ČERTÍK¹, Gabriel GREIF, Jan ŠAJBIDOR¹

Slovak Technical University – Faculty of Chemical Technology, Department of Saccharides and Food Preservation and ¹Department of Biochemical Technology, Bratislava, Slovak Republic

Abstract

STARUCH L., ČERTÍK M., GREIF G., ŠAJBIDOR J. (1998): Lipid changes in fermented meat products during ripening with and without liquid smoke addition. Czech J. Food Sci., 16: 131–134.

Smoking is a barrier effect preventing the development of undesirable microorganisms and subsequently their products. Smoking liquid preparations serve as a substitute for the classical processing of smoking meat products. From a chemical point of view these preparations are characterized as a mixture of phenolic, carbonyl and carboxyl compounds without the presence of carcinogenic substances. The comparison of smoking additives to traditional smoking procedures and their influence characteristics on the fats during ripening of fermented meat products will be discussed in this contribution. Smoking preparations have an antioxidative effect on meat lipids, which is confirmed by more increased suppression of the thiobarbituric acid number. As the consequence of the antioxidants presence in added liquid smoke (UTP) the changes in fatty acid composition were relatively small. The smoking preparation has shown to be an antioxidative substance.

liquid smoke; oxidative stability; oxidation; fatty acids; lipids; fermented meat sausage

It has been known that lipids undergo various degradation reactions during the production, ripening and storage of meat products. Mainly lipid structures, triacylglycerols are hydrolyzed by lipases to yield primary free fatty acids and glycerol. This process is not necessary because fatty acids are subjected to oxidation leading to the production of smelling and toxic metabolites, such as peroxides, hydroperoxides, epoxides, carbonyl compounds, etc. In this way, the hydrolysis and oxidation are responsible not only for a lipid decrease but also for a reduction of some essential lipid components (polyunsaturated fatty acids, tocopherols) in meat products. As a result, these unfavorable changes proceeding during the storage affect the nutritional and sensory quality of foods.

The technological processes of fermented meat products are aimed to minimize the undesirable changes in lipid structures and to obtain the finished meat products acceptable for human consumption. Therefore some additives are introduced into meat products during the production to improve their sensory properties or to prevent unfavorable processes. One of the oldest preservation methods is smoking. The liquid smoke is a natural smoke flavor generated during the controlled pyrolysis of hardwoods. The objective of this work is to investigate some changes in the characteristics (acid number, peroxide number, thiobarbituric number and the fatty acids composi-

tion) of lipids taking place during the ripening of fermented sausage with and without the liquid smoke addition.

MATERIAL AND METHODS

Sample Preparation

The samples of sausage "Malokarpatská saláma" were prepared on the basis of ČSN 57 6099. Meat mince was inoculated with starting culture S-Lac-1 (*Lactobacillus plantarum*, made in Saxa Ltd.) at a concentration of 1×10^6 CFU per gram of meat. Liquid smoke UTP 1 (produced by Slovenské lúčobné závody Hnúšťa) was added at a concentration of 10 g/kg. The sample without UTP-1 was smoked by traditional technology.

Lipid Isolation

Lipids were isolated from the homogenized sausage (1 g) according to the modified method of F o l c h et al. (1957). The sausage was extracted twice with the 100 ml chloroform/methanol mixture (2 : 1, v/v) for 2 h at a laboratory temperature with occasional stirring. After extraction, the mixture was filtered to remove the dough and the extracts were collected. 0.9% KCl (1.2 multiple of the total extract volume) was added, then the mixture was vigorously stirred for 1 min and centrifuged at 3000 g for 5 min until phase separation. The chloroform-lipid containing layer

was filtered through an anhydrous Na_2SO_4 and evaporated under vacuum (D a v í d e k et al., 1981).

Fatty acid determination

Fatty acids from the total lipids were released by alkaline hydrolysis (refluxing with 1M KOH in 95% ethanol for 1 h) and converted into their methyl esters (P r í b e l a, 1987). Fatty acid methyl esters were analyzed by means of gas chromatography (Carlo Erba 2 400 T, Italy) using a flame ionization detector and a glass capillary column (78 m \times 0.3 mm I.D.) coated with cyanopropylsiloxane SP 2340 (Supelco, Bellefonte, USA) under the following conditions:

Carrier gas: nitrogen, linear velocity 38 cm/s, injection temperature 220 °C, column temperature 180 °C, isotherm., detector FID.

The identification of the fatty acid methyl ester peaks was performed in accordance with the authentic standards (Supelco, Bellefonte, PA) and quantified with an SP 4000 integrator (Spectra-Physics, Germany). The degree of the fatty acid unsaturation IU was calculated in D/mole from the equation:

$$\text{IU} = [1 (\% \text{ monoenes}) + 2 (\% \text{ dienes}) + 3 (\% \text{ trienes}) + 4 (\% \text{ tetraenes})] / 100$$

Other analytical methods:

- titration method to define the acid and peroxide numbers (S c h o r m u l l e r, 1969)
- direct method to assess the thiobarbituric acid value by spectrophotometry (S c h o r m u l l e r, 1969).

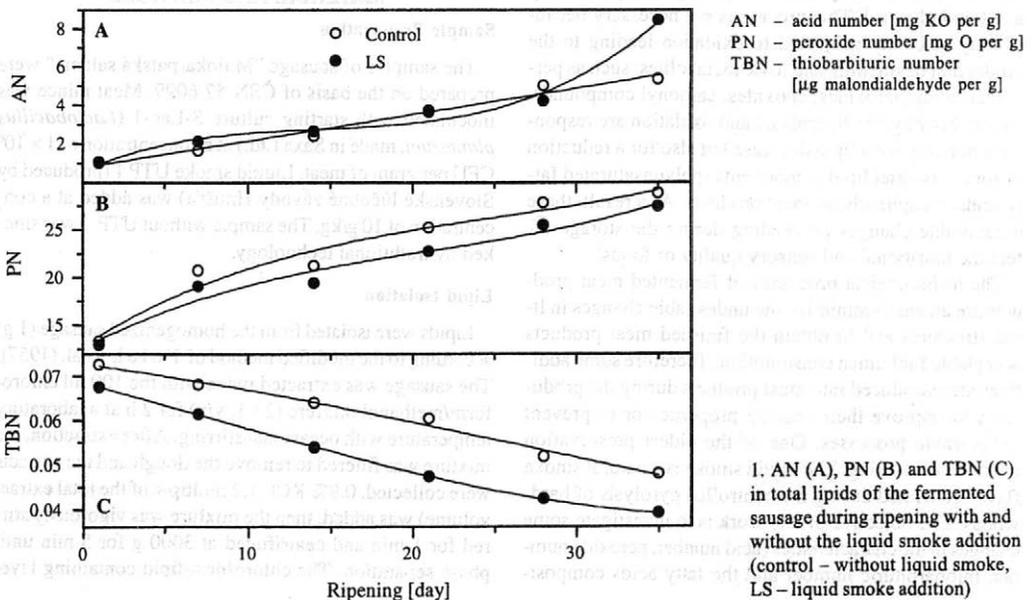
RESULTS AND DISCUSSION

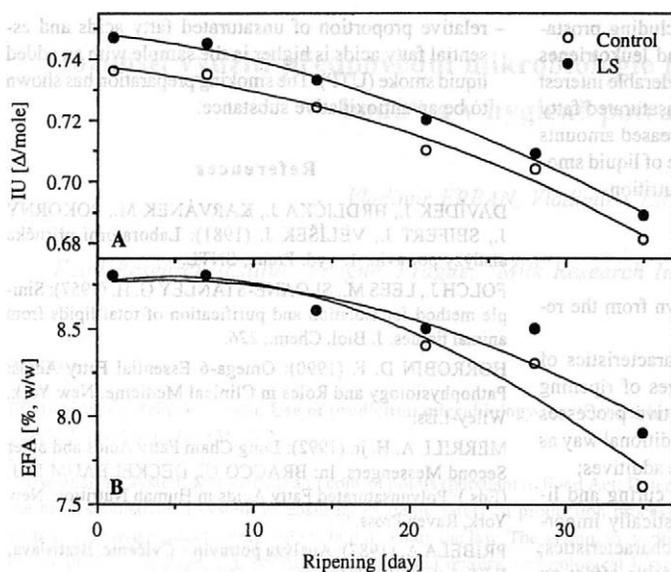
Differences in the selected lipid characteristics occurring during the ripening of fermented sausage in the presence as well as in the absence of liquid smoke have been investigated. Fig. 1A indicates that hydrolytic changes expressed by an acid number were the same in both experiments (with and without the liquid smoke) until the 28th day of ripening. After this time, the amount of free fatty acids increased more rapidly in the sausage produced with a liquid smoke than in the control.

The production of peroxides is shown in Fig. 1B. Although the peroxide number value was increasing with the time of ripening in both samples, an inhibitory effect of the liquid smoke on lipid properties was evident.

During ripening, the thiobarbituric number was slowly falling in both experiments and the lower values were detected in the sausage after the liquid smoke addition (Fig. 1C). It is remarkable that differences between two samples were still growing and they represented 7% on the first day and 20% on the last day of the experiment. A permanent decrease of the thiobarbituric number can be explained by the stabilization of organoleptic properties during the storage of the sausage. It means that the addition of liquid smoke to the sausage has a favorable effect on the product.

The fatty acid composition has a remarkable influence on the quality of the fermented sausage and its changes during the storage have an impact on the nutritional and sensory characteristics of the product. While the durable and thermally non-treated meat products require the pre-





2. Degree of fatty acid unsaturation (A) and the sum of essential fatty acids (C18:2, C18:3 and C20:4) (B) in total lipids of the fermented sausage during ripening with and without the liquid smoke addition (control – without liquid smoke, LS – liquid smoke addition)

sence of more stable saturated fatty acids, the occurrence of polyunsaturated fatty acids, particularly of the essential fatty acids, is very important from the nutritional point of view. Table I shows the fatty acid composition in the fermented sausage during ripening in the presence as well as in the absence of liquid smoke where the dominant fatty acid is the oleic acid. An important factor determining the nature of total lipids is the degree of the fatty acids unsaturation. Fig. 2A reveals that the lipids unsaturation decreases in both samples during ripening and the consistency of the sausage shows to be more favorable. Since the addition of liquid smoke inhibits the oxidation of

unsaturated fatty acid, which results in a higher degree of the fatty acids unsaturation, it moderates the degradability and oxidation reactions of unsaturated fatty acids. Also, it is noticeable that the amounts of essential fatty acids (linoleic, linolenic and arachidonic acids) are higher after 20 days of ripening in the presence of liquid smoke than without it (Fig. 2B). Although differences in the amount of essential fatty acids are small, the concentration of polyunsaturated fatty acids in meat products is usually low. The former acids play an important role in the structure and function of biological membranes (Horrobin, 1990). Moreover, the arachidonic acid is a precursor of the

I. Fatty acid composition of the fermented sausage during ripening with and without the liquid smoke addition

Ripening [days]	C/LS ^a	Fatty acids [% w/w]										
		C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:1	C20:2	C20:4	others ^b
1	C	1.3	23.3	3.6	13.1	46.9	7.3	1.2	1.6	1.0	0.3	0.4
	LS	1.1	23.0	3.6	13.1	46.8	7.3	1.2	1.6	1.6	0.3	0.4
7	C	1.4	23.4	3.6	13.0	46.8	7.4	1.1	1.6	1.0	0.3	0.4
	LS	1.1	23.2	3.6	13.1	46.7	7.4	1.1	1.6	1.6	0.3	0.3
14	C	1.2	23.5	3.6	13.6	46.8	7.2	1.1	1.5	0.7	0.3	0.5
	LS	1.2	23.3	3.6	13.3	46.6	7.3	1.1	1.6	1.3	0.2	0.5
21	C	1.2	23.5	3.6	14.4	46.8	7.1	1.0	1.5	0.3	0.3	0.3
	LS	1.0	23.3	3.6	14.3	46.6	7.3	0.9	1.6	0.8	0.3	0.3
28	C	1.3	23.8	3.6	14.0	46.6	7.0	1.0	1.3	0.3	0.3	0.8
	LS	1.3	23.4	3.6	14.2	46.6	7.3	0.9	1.4	0.3	0.3	0.7
35	C	1.4	24.8	3.6	14.3	45.2	6.6	0.8	1.2	0.3	0.2	1.6
	LS	1.3	24.3	3.5	14.6	45.0	6.7	0.9	1.4	0.3	0.3	1.7

^a C (control, without liquid smoke), LS (liquid smoke addition)

^b mainly C14:1, C15:1 and C17:0

biological active group of substances including prostaglandins, thromboxanes, prostacyclins and leukotrienes (Merrill, 1992). In as much as the considerable interest is at present focused on the role of polyunsaturated fatty acids in the human metabolism, their increased amounts in fermented meat products in the presence of liquid smoke will contribute to the human diet and nutrition.

Conclusions

The following conclusions can be drawn from the results obtained:

- changes observed in the fatty acid characteristics of sausage samples in the individual stages of ripening refer to certain regularities in destructive processes occurring in the samples smoked in a traditional way as well as in the samples with liquid smoke additives;
- both technological variants, traditional curing and liquid smoke preparations have no statistically important influence on the course of fatty acid characteristics;
- smoking preparations have an antioxidative effect on meat lipids, which is confirmed by more increased suppression of the thiobarbituric acid number;

- relative proportion of unsaturated fatty acids and essential fatty acids is higher in the sample with an added liquid smoke (UTP). The smoking preparation has shown to be an antioxidative substance.

References

- DAVÍDEK J., HRDLÍČKA J., KARVÁNEK M., POKORNÝ J., SEIFERT J., VELÍŠEK J. (1981): Laboratorní příručka analýzy potravin. 1. vyd. Praha, SNTL.
- FOLCH J., LEES M., SLOANE-STANLEY G. H. (1957): Simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226.
- HORROBIN D. F. (1990): Omega-6 Essential Fatty Acids: Pathophysiology and Roles in Clinical Medicine. New York, Wiley-Liss.
- MERRILL A. H. jr. (1992): Long Chain Fatty Acids and other Second Messengers. In: BRACCO U., DECKELBAUM R. J. (Eds.): Polyunsaturated Fatty Acids in Human Nutrition. New York, Raven Press.
- PRÍBELA A. (1987): Analýza potravín – Cvičenie. Bratislava, Edičné stredisko STU.
- SCHORMULLER J. (1969): Handbuch der Lebensmittelchemie. Bd. IV. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag.
- ČSN 57 6099. Masné výrobky. 1989.

Received March 16, 1998

Súhrn

STARUCH L., ČERTÍK M., GREIF G., ŠAJBIDOR J. (1998): Zmeny lipidov vo fermentovaných mäsových produktoch počas zrenia s a bez pridania tekutého udiaceho preparátu. *Czech J. Food Sci.*, 16: 131–134.

Údenie má zabrániť rozvoju nežiadúcich mikroorganizmov a ich následných produktov. Tekuté prípravky na údenie slúžia ako náhrada klasického spracovania údených mäsových produktov. Z chemického hľadiska sa tieto prípravky charakterizujú ako zmes fenolových, karboxylových a karboxylových zlúčenín bez prítomnosti karcinogénnych látok. Príspevok sa zaoberá porovnaním udiacich prípravkov s tradičným údením a ich vplyvom na charakteristiky tukov počas zrenia fermentovaných mäsových produktov. Udiaci preparáty majú antioxidatívny účinok na mäsové lipidy, čo potvrdzuje zvýšené potlačenie thiobarbiturového čísla kyslosti. Ako dôsledok prítomnosti antioxidantov v pridanom tekutom udiacom preparáte (UTP) boli zmeny v zložení mastných kyselín relatívne malé. Ukázalo sa, že prípravok na údenie je antioxidátnou látkou.

tekutý udiaci preparát; oxidačná stabilita; mastné kyseliny; lipidy; fermentovaná mäsová klobása (údenina)

Contact address:

Ing. Ladislav Staruch, CSc., Slovenská technická univerzita v Bratislave, Chemickotechnologická fakulta, Katedra sacharidov a konzervácie potravín, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika, tel.: + 421 7 532 55 59, fax: + 421 7 49 31 98

Možnosti využití předpovědní mikrobiologie při „Stanovení kritických bodů“ a v hygieně potravin

Vladimír ERBAN, Vladimír ČERNÝ¹

Food Research Institute Prague, Prague; ¹Milk Research Institute, Prague, Czech Republic

Abstract

ERBAN V., ČERNÝ V. (1998): Use of prediction microbiology for “Determination of critical points” and in food hygiene. Czech. J. Food Sci., 16: 135–142.

A risk analysis system with critical and control points (pursuant to Food Act: Determination of Critical Points – DCP) is currently the most sophisticated system of ensuring hygienic safety in production processes in the food industry. Introduction of DCP system to ensure product safety only is laid down by the law. The system in its principle allows to analyze and control any risks in any production stage, e.g. impairment of product quality, technological losses or risks to operation safety, etc. Prediction microbiology is an efficient tool for appropriate DCP introduction, and allows the exactest determination of acceptable levels and limit values (process parameters) of critical and control points in a DCP system for all risks of microbial type and verifications of determined values. Prediction microbiology helps to discriminate critical points and control points in an unambiguous manner, provides several variants of the setup of process parameters in which the same level of hygienic safety is observed. Prediction microbiology models are tools used in a decision process of risk assessment.

prediction microbiology; mathematical modelling; determination of critical points; food hygiene

Souhrn

ERBAN V., ČERNÝ V. (1998): Možnosti využití předpovědní mikrobiologie při „Stanovení kritických bodů“ a v hygieně potravin. Czech. J. Food Sci., 16: 135–142.

Systém analýzy nebezpečí s kritickými a kontrolními body (podle zákona o potravinách Stanovení kritických bodů – SKB) je v současnosti nejvíce propracovaný systém zabezpečení zdravotní nezávadnosti ve výrobních procesech potravinářského průmyslu. Zákonem je požadováno zavedení systému SKB pouze pro zabezpečení zdravotní nezávadnosti výrobků. Systém však ze svého principu umožňuje v jakékoliv výrobě analyzovat a zavést kontrolu libovolných nebezpečí, např. ohrožení kvality výrobku, technologických ztrát nebo ohrožení bezpečnosti provozu apod. Předpovědní mikrobiologie je účinný nástroj pro správné zavedení SKB a umožňuje zatím nejexaktnější stanovení přijatelných úrovní a limitních hodnot (parametrů procesu) kritických a kontrolních bodů v systému SKB pro všechna nebezpečí mikrobiálního typu a verifikace těchto stanovení. Předpovědní mikrobiologie napomáhá jednoznačně rozlišit kritické body od bodů kontrolních, poskytuje více variant nastavení parametrů procesu, u nichž je dodržena stejná úroveň zdravotní nezávadnosti. Modely předpovědní mikrobiologie jsou nástroje využívané v rozhodovacím procesu stanovení rizik (risk assessment).

předpovědní mikrobiologie; matematické modelování; stanovení kritických bodů; hygiena potravin

Většina prací o potravinářské mikrobiologii z období před zavedením předpovědní mikrobiologie (PM) definovala limitující podmínky pro růst mikroorganismů za předpokladu, že ostatní faktory byly blízko svému optimu. Avšak inhibice růstu patogenů často závisí na kombinaci faktorů s ochrannými vlastnostmi, z nichž žádný sám o sobě nemá dostatečnou úroveň samostatné inhibice. Za těchto podmínek matematické modely nejlépe zajišťují dosažení realistické předpovědi.

Podstatou předpovědní mikrobiologie je matematický popis růstu nebo poklesu počtu mikrobů v potravinách za specifických podmínek prostředí, které zahrnuje vnitřní faktory (pH, a_w) a vnější faktory (teplota, atmosféra, inhibiční látky). Matematický popis umožňuje tyto změny v růstu mikroorganismů předpovídat.

Na mikroorganismy nepochybně působí mnoho faktorů, avšak ve většině potravin mají významnější vliv pouze některé. PM předpokládá, že vliv faktorů je v podstatě

nezávislý na tom, je-li mikroorganismus v tekuté půdě nebo v potravíně (Whitting, 1995).

Ačkoliv modelování obvykle neodhaluje neočekávané chování mikroorganismu, kvantifikuje efekty interakcí mezi dvěma nebo více faktory a umožňuje interpolaci mezi kombinacemi hodnot faktorů, které nebyly přímo testovány.

Mnoho mikrobiologů a pracovníků zabývajících se zajišťováním kvality v potravinářském průmyslu cítí, že publikované mikrobiologické předpovědní modely jsou rozhodovací nástroje s velkými aplikačními možnostmi, ale zároveň se jim zdá, že přesahují jejich erudici. Od té doby, co využívají výsledky tradičních skladovacích testů a sledování patogenů pro nastavení kritických limitů v systému Stanovení kritických bodů (SKB), chápou možnosti počítačového modelování jako nástroje k zavedení a udržování systému SKB. Nejsou si však jisti, jak k nim přistupovat a jak aplikovat konkrétní modely na jejich reálné procesy a výrobky (Elit, 1996).

Současný pokrok nabízí počítačové programy předpovědních modelů, které umožňují redukovat a potenciálně i odstranit náročné problémy testování za stejných podmínek (Buchanan et al., 1993; McClure et al., 1994). Výhoda jejich používání spočívá v počítačové simulaci takových parametrů procesu, které zajistí zdravotní nezávadnost produktu na přijatelné úrovni, aniž by bylo nutné provádět novou sérii testů na výskyt možných patogenů.

Předpovědní mikrobiologie také umožňuje optimalizovat vhodné charakteristiky výrobku a aplikovat výhody vícenásobných bariér (hurdle technology).

Aby uživatel mohl využít možností poskytovaných předpovědní mikrobiologií musí mít znalosti o vlastnostech modelu a musí mít úplné znalosti o fyzikálních, chemických a mikrobiologických vlastnostech potraviny v každém kroku výroby a o vlivech výrobního procesu na fyziologické vlastnosti jednotlivých patogenů nebo mikroorganismů způsobujících onemocnění potravin.

Historie

Zatímco pojem předpovědní mikrobiologie je relativně nový, koncepce matematického popisu je stará. Přes 75 let je bezpečná výroba konzervovaných potravin založena na koncepci exponenciální destrukce mikroorganismů a jejich spor teplem. Koncepce D a z hodnot je jednou z nejvíce používaných parametrů popisu fyziologických vlastností mikroorganismů.

Jak bude rozvedeno dále nejstarší rovnicí esovitě růstové křivky živých organismů (logistická křivka) zformuloval Verhulst. Dalším vývojovým typem (1926–1930) je kinetický model růstu populace – Gompertzova funkce. Původně byla formulována v pojišťovnictví pro popis dat lidské mortality. Později byla použita pro popis růstu orgánů. V roce 1948 Monod dokázal, že specifická růstová rychlost není konstanta, ale závisí na koncentraci limitující živiny. Monodovy soustavy diferenciálních rovnic dobře popisují chování populace mikroorganismů s jejich vzájemnou interakcí s prostředím. Nepostihují však skuteč-

nost, že organismus indukuje za různých podmínek (aerobní – anaerobní, přítomnost – nepřítomnost jednotlivých substrátů apod.) různé sady enzymů a tím má zcela odlišné fyziologické vlastnosti (fyziologické stavy) a také principiálně různé růstové charakteristiky. Powell (1968) zavedl do systému Monodových rovnic další rovnice popisující závislost růstové rychlosti na relativním množství RNA, která je funkcí dostatečné hladiny substrátu v médiu.

Typy předpovědních modelů

Modely PM je možné tříditi několika způsoby. Jedním je dělení modelů prediktivní mikrobiologie podle typu použitých rovnic.

Jiné dělení používá Whitting (1995), který uvádí základní dělení podle typu modelu:

1. růstové modely, jejichž výsledkem je popis růstu mikroorganismů (růstová křivka);
2. modely inaktivace/přežívání mikroorganismů;
3. modely pravděpodobnosti výskytu mikrobiální populace nebo produkce mikrobiálních toxinů.

Modely každého typu jsou charakterizované jako primární, sekundární nebo terciální podle komplexnosti a použitelnosti běžným uživatelem.

Rozdělení podle typu rovnic

Empirické modely, které matematicky popisují naměřená data, jsou nejvíce známým typem. Příkladem může být mechanistický model tepelné inaktivace v čase využívající k předpovědi rychlosti tepelné inaktivace mikroorganismu D a z hodnot. Tyto hodnoty lze využít pro vyhodnocení tepelné inaktivace při procesní teplotě jiné než té, pro kterou byla původní hodnota D stanovena.

Deterministické modely popisují dynamiku růstu kultury pomocí fyziologických charakteristik, jako je doba lagu (fáze přípravy růstu), specifická růstová rychlost a maximální nárůst populace. Příkladem historicky nejstaršího modelu popisu je Verhulst-Pearlova rovnice:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N - kN^2 = \mu N (1 - N/k\mu) \quad [1]$$

kde: N – denzita populace

$k/\mu - 1/N_{\max}$

k – konstanta proporcionality

t – čas

μ – konstanta strmosti vyjadřující vliv buněčné

hustoty na rychlost poklesu rychlostní konstanty

Logistická křivka Verhulstova postihuje základní, už v polovině minulého století známou skutečnost, že základem růstu a množení populací buněk i jednotlivých mnohobuněčných jedinců je exponenciála, jejíž průběh je však s postupujícím růstem záporně modulován různými omezujícími vlivy. Jedná se o symetrickou funkci podle bodu inflexe popisující změny mezi počátečním a maximálním nárůstem populace.

Gompertzova funkce je dokonalejší a v současné době nejrozšířenějším popisem růstu mikrobiální populace. Za-

timco logistické typy modelů jsou založené na lineárním poklesu specifické růstové rychlosti jako funkce hustoty populace, je Gompertzova funkce založena na exponenciálním vztahu mezi těmito vlastnostmi, který lépe popisuje chování bakteriální kultury.

$$dN/dt = kt^{-a}N \quad [2]$$

kde: N, t, k – viz rovnice [1]

a – konstanta popisující stárnutí populace

Různé tvary a modifikace Gompertzovy rovnice uvádějí McMeekin et al. (1993) a Whiting, Buchanan (1994).

Po integraci a reparametrizaci [reparametrizací je dosaženo takových parametrů rovnice, které mají reálný význam vzhledem k popisované mikrobiální kultuře jako jsou fyziologické charakteristiky: doba lagu (fáze přípravy růstu), specifická růstová rychlost a maximální nárůst populace] dostává rovnice tvar:

$$N_{(t)} = C \exp[\exp(-B(t-M))] \quad [3]$$

kde: t – čas

$N_{(t)}$ – denzita populace v čase t

C – horní asymptotická hodnota, tj. max. nárůst

M – čas, ve kterém je absolutní růstová rychlost nejvyšší

B – relativní růstová rychlost v M

$B/2$ – specifická růstová rychlost v $t = M$

Tento základní parametrizovaný model však nezachycuje čas lagu. Gibson et al. (1987) proto tuto rovnici modifikovali do následujícího modelu:

$$\log N_{(t)} = A + D \exp[\exp(-B(t-M))] \quad [4]$$

kde: $N_{(t)}, t$ – viz rovnice [3]

A – hodnota spodní asymptoty

D – rozdíl hodnot horní a dolní asymptoty

M – čas, ve kterém je exponenciální růst maximální

B – směrnice křivky v bodě M

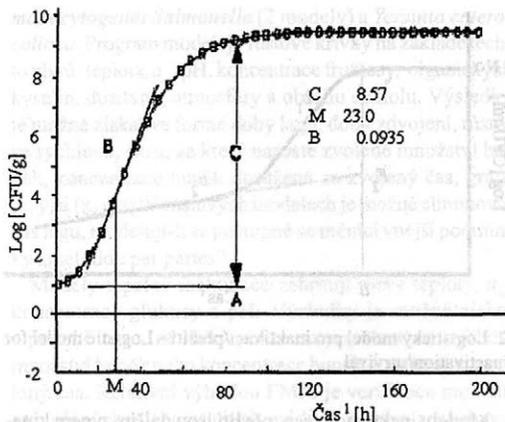
BD/e – směrnice tangenty v bodě M

$M - 1/B$ – doba lagu [h]

$0,818/BC$ – generační doba [h]

$A + C$ – maximální nárůst

Gompertzova funkce (obr. 1) popisuje chování mikrobiální kultury v závislosti na výchozích podmínkách, např. při výchozím pH, koncentraci substrátu nebo a_w . Nebere však v úvahu vliv kultury na prostředí jako je změna kyselosti, spotřeba substrátu a snižování a_w vlivem metabolismu, zejména v hodnotách limitních pro růst mikroorganismů. Pomocí těchto rovnic se také obtížně modeluje chování mikroorganismu v měnících se vnějších podmínkách například při chlazení, ohřívání, sušení apod. Přesto je rozšířená Gompertzova funkce v současnosti nejpoužívanější pro modelování růstu mikroorganismů v potravinářství (Gibson et al., 1988; Bratchell et al., 1989; Sutherland et al., 1995; Walls, Scott, 1996).



1. Gompertzův model růstu – Gompertz growth model

Monodův model, který problémy nekonstantních vnějších podmínek řeší soustavou diferenciálních rovnic, popisuje jak chování jednotlivých proměnných, tak i jejich vzájemné působení (Larsen, Kjærgaard, 1978; Baranyi, Roberts, 1994):

$$\frac{dz_1(t)}{dt} = k_1 \frac{c_1(t)}{K_c + c_1(t)} z_1(t) \quad [5]$$

$$\frac{dc_1(t)}{dt} = -\frac{1}{Y} \frac{dz_1(t)}{dt} \quad [6]$$

kde: z_1 – koncentrace biomasy

c_1 – koncentrace substrátu

μ – specifická růstová rychlost

$$\mu(t) = \frac{dz_1(t)}{dt} \quad [7]$$

k_1, K_c, Y – konstanty modelu závislé pouze na vnějších podmínkách podle funkce $D(t)$

Funkce $D(t)$ popisuje změnu vnějších podmínek, například kinetiku prochlazování výrobku, změny vlhkosti během sušení apod.

Avšak ani Monodův model nezachycuje přechod populace z jednoho fyziologického stavu do druhého jako například limitace substrátem. Powell (1968) tento problém řešil zavedením rovnice do Monodova modelu, která charakterizuje μ jako funkci relativního množství RNA vzhledem k obsahu RNA v klidové buňce.

Volesky a Votruba (1992) doporučují jednoduchý hyperbolický výraz. Rovnice má následující výraz:

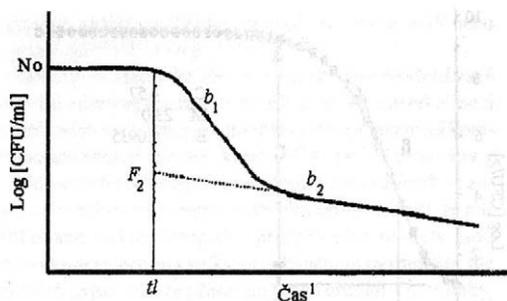
$$\mu = k((\text{RNA} - \text{RNA}_{\min}) - 1) S / (S + K_s) \quad [8]$$

kde: RNA_{\min} – RNA v nerostoucích buňkách

k – kinetická konstanta charakterizující růst mikroorganismu

S – koncentrace růst limitujícího substrátu

K_s – kinetický parametr charakterizující substrátovou limitaci



2. Logistický model pro inaktivaci/přežití – Logistic model for inactivation/survival

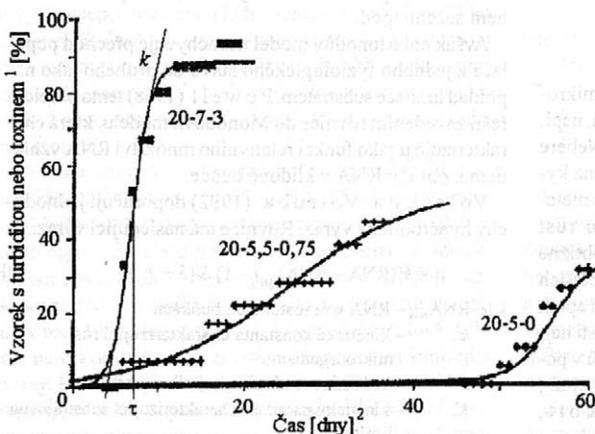
Modely inaktivací, resp. přežití jsou dalším typem kinetických modelů. Buchanan uvádí v USDA PMP (obr. 2) pro inaktivaci směsné kultury následující rovnici:

$$\log \frac{N}{N_0} = \log \left[\frac{F_1(1 + e^{-b_1 t})}{1 + e^{b_1(t-t_l)}} + \frac{(1 - F_1)(1 + e^{-b_2 t})}{1 + e^{b_2(t-t_l)}} \right] \quad [9]$$

- kde: b_1 – max. specifická rychlost odumírání hlavní populace
 b_2 – max. specifická rychlost odumírání subpopulace
 F_1 – frakce hlavní populace z výchozí populace (N_0)
 $(1 - F_1)$ = F_2 – frakce subpopulace z výchozí populace (N_0)
 t_l – čas lagu
 t – čas
 N – populace (log KTJ/ml) přežívající v čase t
 N_0 – výchozí populace v čase $t = 0$
 D – hodnota je dána $D = 2,3/b$ pro každou populaci

V případě, že se jedná homogenní populaci, je $(1 - F_1)$ rovno nule a celý člen druhé populace odpadá.

Vedle časových modelů tepelné inaktivace jsou jiné modely, které popisují destrukci nebo přežití v čase jako funkci obsahu chemických látek nebo některých chemických, případně fyzikálních vlastností potravin, jako je např. fermentace nebo skladování ve zchlazeném či mraženém stavu.



¹samples with turbidity or toxin [%]; ²time

2. Stochastický model lag fáze – Stochastic model of lag-phase

Stochastické modely popisují pravděpodobnost výskytu mikrobiální události, která je nezávislá na čase (např. pravděpodobnost vždy se vyskytujícího růstu nebo tvorby toxinu), nebo je časově závislá (pravděpodobnost výskytu události v daném čase).

Příkladem je rovnice pravděpodobnostního modelu (obr. 3) pro *Clostridium botulinum*:

$$P = P_{\max} / (1 + e^{k(-t)}) \quad [10]$$

- kde: P – pravděpodobnost růstu
 t – čas
 P_{\max} – maximální pravděpodobnost růstu
 k – pravděpodobnost růstu v jednotlivých vzorcích
 f – čas inflexe ($P = P_{\max}$)

Stochastické modely jsou zřejmě obecnější než modely deterministické, neboť berou v úvahu i náhodné fluktuační chyby. Při počtech jedinců vyšších než 10^4 je však relativní chyba mezi oběma typy metod menší než jedno procento. Proto jsou deterministické modely nejvíce používány, neboť jsou přehlednější a jednodušší. Prozatím jsou stochastické modely málo využívány pro zavádění SKB, i když zejména vzhledem k málo četným populacím by stochastické modely byly pro popis události v SKB výhodnější.

Dělení podle komplexnosti a využitelnosti

Primární modely popisují změny nárůstu biomasy nebo dalších mikrobiálních charakteristik v čase. Model může kvantifikovat koncentraci biomasy, tvorbu toxinů, koncentraci substrátu, absorpční nebo impedanci. Matematické rovnice popisují změny v čase při daných podmínkách. Příkladem primárních modelů jsou rychlost exponenciálního růstu, Gompertzovy funkce a tepelná inaktivace prvního řádu. Parametry rovnic mohou být reformulovány do derivovaných parametrů jako např. Gompertzův čas lagu nebo generační doba.

Sekundární modely popisují odezvy parametrů funkce těchto primárních modelů podle změn podmínek prostředí jako je teplota, pH, a_w apod. Příkladem sekundárních modelů jsou povrchové modely odpovědi, jak uvádějí B a t -

chell et al. (1989) pro směsnou kulturu salmonel. Funkce modelující parametry B , resp. M je polynom tvaru:

$$B(M) = a + b_1s + b_2t + b_3p + b_4s^2 + b_5t^2 + b_6p^2 + b_7st + b_8sp + b_9tp + e \quad [11]$$

kde: s – koncentrace NaCl

t – teplota

p – pH

a, b – konstanty

e – náhodná chyba

Výslednicí pro různé hodnoty s , t a p je povrchový model.

Terciální modely jsou počítačové softwarové nástroje, které převádějí primární a sekundární modely do formy aplikovaných programů a expertních systémů. Tyto programy mohou zahrnovat odpovědi na změny podmínek, porovnávat změny při různých podmínkách nebo srovnávat chování několika mikroorganismů. Měli jsme možnost porovnat dva softwarové programy: anglický program Food MicroModel (FMM) a americký Pathogen Modeling Program (PMP). Oba programy jsou založeny na Gompertzových rovnicích popisu růstu mikroorganismů, přičemž každý z nich má své specifické výhody, ať se týká modelů, snadnosti manipulace nebo různého speciálního zaměření.

PMP je jednodušší, názornější a snadněji zvládnutelný uživatelem. Obsahuje růstové modely, stejně jako FMM, pro osm mikroorganismů (*Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* a *Yersinia enterocolitica*). Navíc obsahuje modely netepelné inaktivace/přežívání pro *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* a *Staphylococcus aureus* v závislosti na obsahu NaCl, NaNO_3 a kyseliny mléčné. PMP také obsahuje časové pravděpodobnostní modely produkce toxinů (Time-to-Toxigenesis models) pro *Clostridium botulinum*.

Výsledkem jsou buď odpovídající křivky, nebo čas potřebný k dosažení daného efektu. Křivky jsou uváděny jako průměrné s 95% konfidenčním limitem. Výhodou tohoto způsobu je dobrá použitelnost pro aplikace do SKB. Největší výhodou však je možnost bezplatného získání ze sítě internetu.

FMM je složitější počítačový program s přiměřeně větší možností různých výstupů. Obsahuje 21 modelů pro 15 mikroorganismů [*Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus* (2 modely), *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* (2 modely), *Bronchothrix thermosphacta*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* O157:H7, *Lactobacillus plantarum*, *Listeria monocytogenes* (3 modely), *Saccharomyces cerevisiae*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* (2 modely) a *Zygosaccharomyces bailii*]. Program obsahuje modely tepelné inaktivace pro *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria*

monocytogenes *Salmonella* (2 modely) a *Yersinia enterocolitica*. Program modeluje růstové křivky na základě těchto vlivů: teplota, a_w , pH, koncentrace fruktosy, organických kyselin, dusitanů, atmosféry a obsahu etanolu. Výsledky je možné získat ve formě doby lagu, doby zdvojení, růstové rychlosti, času, za který naroste zvolené množství buněk, koncentrace buněk dosažená za zvolený čas, grafů (x, y) a (x, y, z). V růstových modelech je možné eliminovat čas lagu, modelují-li se postupně se měnící vnější podmínky „metodou per partes“.

Modely tepelné inaktivace zahrnují vlivy teploty, a_w , koncentrace glukosy a pH. Výsledky je možné získat v podobě času, za který poklesne populace na zvolené množství buněk nebo koncentrace buněk dosažená za zvolený čas. Relativní výhodou FMM je verifikace modelů, vytvořených v laboratorních médiích na přirozených potravinách. Na základě těchto verifikací jsou hodnoty parametrů modelu nastaveny tak, aby byl model téměř vždy „na straně bezpečnosti“. To je výhoda při zběžném hodnocení procesu jako celku. Důsledkem však mohou být příliš rigidní požadavky na nastavování limitních hodnot kritických bodů. Dalším důsledkem je, že není možné nastavit statisticky objektivní tolerance limitních hodnot v kritických bodech a individuálně upravit limitní hodnoty v kaskádě kritických bodů podle možnosti daných procesem. Bohužel podstatnou nevýhodou tohoto jinak velmi dobrého programu je vysoká pořizovací cena.

Způsoby využití předpovědních modelů

Prediktivní modely pomáhají v rozhodování o osudu výrobku, který neprošel během výroby zvládnutým stavem (Elliot, 1993). Příkladem je otázka, zda ve zchlazeném masovém výrobku, který se nepodařilo zchladit na 4 °C během 2 hodin, může růst přeživší *E. coli* O157:H7 (obr. 4). Teplotní křivka je založena na rovnici $T = T_0 e^{-at}$ pro chlazení výrobku s výchozí teplotou (T_0) 70 °C na cílovou teplotu 4 °C za 3 hodiny (*Blankenship et al.*, 1998). Konstanta chlazení propočtena pro tyto podmínky je 0,0077/min. Podle literárních údajů je maximální růstová teplota pro *E. coli* O157:H7 46 °C. Této teploty je podle rovnice dosaženo přibližně za 44 min. Při užití optimální růstové teploty 37 °C a USDA PMP je možné předpovědět minimální lag fázi 84 minut. To je velmi konzervativní stanovení, protože teplota výrobku je v tomto optimálním rozmezí pouze několik minut. Během této doby je výrobek chlazen celkem 128 minut na teplotu 15 °C. Za jinak optimálních podmínek je generační doba při 15 °C 84 min. Po dalších 25 minutách je teplota nižší než 10 °C, což je pro *E. coli* O157:H7 minimální růstová teplota. Na základě těchto konzervativních výsledků a protože: (i) ohřívací proces má snížit nejméně o pět řádů populaci *E. coli* O157:H7, (ii) jakákoliv přežívající buňka může být zřejmě poškozená a těžko může zahájit růst za těchto podmínek chlazení a (iii) pravděpodobnost kontaminace ohřátého výrobku *E. coli* O157:H7 je zanedbatelná, může být učiněn závěr, že je velmi malá pravděpodobnost, aby byl výrobek zdravotně zá-

vadný z důvodu přítomnosti *E. coli* O157:H7 za analyzovaných podmínek (obr. 4).

Limity a validace předpovědních modelů

Některé modely jsou navrženy tak, aby byly zabezpečeny proti špatné předpovědi. To znamená, že modely předpokládají nejvyšší možnou růstovou rychlost nebo okamžitou produkci toxinů při daných podmínkách. Neodpovídá-li model realitě, bude vždy na straně bezpečnosti. Nevýhodou použití modelů s takovým stupněm vestavěného konzervatismu je, že matematické předpovědi mikrobiálního růstu nemohou stanovit skutečné limitní hodnoty KKB a přijatelné úrovně v systému HACCP. Takový model může buď omezovat sortiment potravin vyráběných daným procesem, nebo požadovat tak rigidní parametry technologického procesu, že výroba potraviny, která by jinak byla považována za bezpečnou, by nebyla technicky možná (přehřátí nebo překyselení apod.).

Dalším limitem matematických modelů předpovědi růstu mikroorganismů je jejich nutné zjednodušení pouze na určitý počet nejvýznamnějších faktorů ovlivňujících růstové charakteristiky mikroorganismů, jako jsou například teplota, pH, a_w (většinou docílená změnou koncentrace NaCl), méně se vyskytuje použití některých konzervačních látek (dusitany), aerobní a anaerobní prostředí, redox potenciál apod. Základní modely jsou většinou prováděny ve sterilních laboratorních médiích. Tyto laboratorní modely jsou pak verifikovány a porovnávány s konkrétními výsledky. V reálných procesech má však pro růst mikroorganismů zásadní význam složení potraviny a synergické, resp. antagonistické vztahy většinou směsných mikrobiálních populací.

Protože patogeny rostou ve většině potravin, je důležitou otázkou, zda narostou do významného množství dřív než mikroflóra kažení, která učiní potravinu pro konzumenta nepoživatelnou. Vzniká potřeba systematického modelování reprezentativních zástupců mikroorganismů kažení tak, aby terciální modely mohly vynášet komparativní (srovnávací) růstové křivky pro patogeny a mikroorganismy

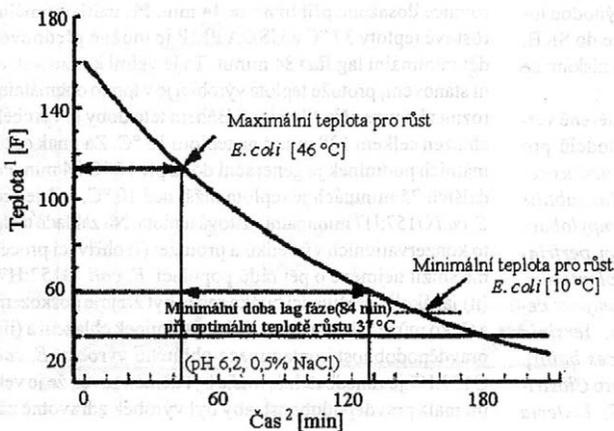
kažení. Protože však některé patogeny mají velmi nízkou infekční nebo toxickou dávku, kritériem by měl být růst – nerůst, a ne mikroflóra kažení, která má v tomto případě malý význam, přestože může ovlivňovat prostředí snižováním pH nebo produkcí bakteriocinu (Whiting, 1995).

Mnoho diskusí se zabývá potřebou validovat předpovědní modely pro různé potraviny. Hodnocení jednotlivých kritických bodů a jejich kritických limitů je pro úspěch celého systému důležitější než vytvářet seznamy potravin, pro které může být jednotlivý model použit. Příkladem je použití inokulovaných balení v konzervovaných potravinách na ověření navrženého teplotního procesu. Časový model tepelné inaktivace nebyl prověřován pro různé typy potravin dřív než byl přijat jako nástroj model předpovědi destrukce spor.

HACCP a předpovědní mikrobiologie

Na způsob aplikace HACCP je mnoho názorů. Protože systém HACCP není ještě absolutně dokonalý, je ještě mnoho prostoru pro další zlepšování (Elliot, 1993). Pracovní plán systému HACCP se snaží dosáhnout kontroly nebezpečí snižováním rizika (pravděpodobnosti), že se nebezpečí bude vyskytovat nebo i zvyšovat. Systém HACCP sám o sobě negarantuje, že se nebezpečí nebude vyskytovat. Je to nástroj k identifikaci potenciálních nebezpečí a těch parametrů procesu, jejichž pomocí je nebezpečí ovládáno.

Podle americké Národní poradní komise pro mikrobiologická kritéria pro potraviny je „stanovení rizik obvykle založeno na kombinaci zkušenosti, epidemiologických dat a informací z odborné literatury“. Dále „...tým HACCP má počáteční povinnost rozhodnout, která nebezpečí jsou významná a musí být zahrnuta do plánu HACCP. Toto rozhodnutí je pak prodiskutováno“. Dokonce i mezi experty, je mnoho odlišných názorů na pravděpodobnost výskytu nebezpečí. Rozhodnutí mohou být velmi subjektivní. Předpovědní mikrobiologie je tak relativně nejlepším nástrojem jak pro objektivní hodnocení nebezpečí, tak i pro stanovení limitů v jednotlivých kritických bodech.



4. Využití křivky chlazení výrobku pro předpověď růstu *E. coli* O157:H7 – Use of cooling curve of product for prediction of growth *E. coli* O157:H7

Porovnání podobnosti metodiky SKB a PM uvádí následující přehled:

Principy HACCP

1. Analýza nebezpečí: vytypování významných nebezpečí v závislosti na charakteristice výrobku.
2. Analýza procesu: určení parametrů procesu ovlivňujících nebezpečí a určení KKB.
3. Limity určujících veličin v KKB.
4. Nápravná opatření.
5. Verifikace.

Předpovědní modely pomáhají při stanovení kritických nebo kontrolních míst při zavádění SKB. Kritické nebo kontrolní body procesu mohou být v místech, kde model ukazuje, že určitá úroveň faktoru umožňuje nebo znemožňuje růst mikroorganismů. Kvantitativní stanovení chování mikrobů při určitých úrovních faktoru dává přijatelné rozmezí limitních hodnot v kritickém nebo kontrolním místě.

PM je jedním z nejdůležitějších nástrojů pro kvantifikaci přijatelné úrovně patogenů v systému SKB. Stanovení přijatelné úrovně kontaminace v každém bodě výrobního procesu je klíčovým momentem úspěšného zavedení SKB. Empiricky jsou však tyto přijatelné úrovně kontaminace prakticky neodhadnutelné. PM je jediným nástrojem, který umožňuje kvalifikovaně odhadnout tyto hodnoty. Validace systému individuálních kritických a kontrolních bodů může být zjednodušena, jestliže systém SKB byl již zaveden pro podobný typ potravin.

Mohou být stanoveny důsledky reformulace procesu na růst nebo inaktivaci mikroorganismů. Modelování ukazuje, které faktory mají nejvýznamnější vliv a mohou identifikovat alternativní nastavení parametrů procesu s podobnou nebo zlepšenou rezistencí procesu k růstu mikroorganismů.

Mohou být rychle stanoveny důsledky s kvantitativním vyhodnocením nevládnutého stavu procesu jako například špatné prosolení, porucha chlazení, nedostatečný ohřev. Tato znalost je významným nástrojem při rozhodování v rámci stanovení nápravných opatření, zda se má materiál znovu zpracovat, rychle využít (zkrátit dobu použitelnosti), nebo může-li být materiál použit jiným způsobem, a jakým – bez čekání na výsledky testů.

Díky možnosti vytvoření různých typů grafů mohou být modely názornou pomůckou pro vzdělávání pracovníků zejména netechnického typu. Modely mohou názorně ukázat význam správného chlazení nebo významu kvalitních surovin s nízkou bakteriální kontaminací.

Využití modelů významným způsobem šetří zdroje, čas a peníze. Modely umožňují racionální využívání práce laboratorní vytypováním úzkého rozmezí předpokládaných výsledných hodnot, které je daleko snadnější ověřovat,

Principy PM

1. Specifikace mikroorganismů (zkažení, patogeny).
2. Ekologie mikroorganismů – identifikace zdrojů a úrovně kontaminace surovin, vliv zpracování, skladování a distribuce.
3. Porovnání informací s předpokládanými hodnotami. Přijetí nebo zamítnutí procesu či produktu, nebo určení trvanlivosti výrobku.
4. Zahnutí informací do systému sledování (určení veličin a limitů, který indikuje zvýšený mikrobiální nárůst).
5. Verifikace.

a významně snižují riziko nesprávného odhadu při stanovení rozsahu výsevu u mikrobiologických rozborů.

Kromě významu pro zavádění SKB mají předpovědní modely uplatnění i v běžných kontrolách. Jedním ze základních problémů kontrolních rozborů je, že stanovené hodnoty mikrobiologického rozboru jsou platné k okamžiku rozboru. Výsledky rozboru jsou však podle jeho náročnosti známy až s dvou-, tří- i vícedenním zpožděním. Za tuto dobu však může být reálný stav kontaminace potravin zcela jiný. PM umožňuje provést reálný odhad skutečné zdravotní nezávadnosti na základě vlastností potravin, skladovacích podmínek a skutečného stavu potravin v okamžiku rozhodnutí o dalším nakládání s potravinou.

Hygienik se často dostává do nejistoty, jak rozhodnout o potravíně, jestliže jsou hodnoty rozborů ve fluktuální oblasti limitních hodnot pro schválení potravin. V takovém případě je PM účinným nástrojem objektivního rozhodování zda potravinu schválit s ohledem na vlastnosti potravin, skladovacích podmínek, na dobu do předpokládané spotřeby a způsobu pravděpodobného finálního zpracování nebo konzumace.

Dá se očekávat, že například v budoucnosti budou vyhlášky o mikrobiologických kritériích na potraviny koncipovány na základě PM, která umožňuje zohlednit všechny výše zmíněné vlivy na potraviny, jejich přibližné zastoupení v potravním koši, infekční dávky apod.

Seznam zkratk

FMM	Food MicroModel
HACCP	Hazard analysis critical control point (analýza nebezpečí s kritickými a kontrolními body)
KKB	kritický nebo kontrolní bod
PM	předpovědní mikrobiologie
USDA PMP	USDA Pathogen Modeling Program
SKB	stanovení kritických bodů

Literatura

BARANYI J., ROBERTS T. A. (1995): Mathematics of predictive microbiology. *Int. J. Food Microbiol.*, 26: 199–218.

- BLANKENSHIP L. C., CRAVEN S. E., LEFFLER R. G., CUSTER C. (1988): Growth of *Clostridium perfringens* in cooked chili during cooling. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 1104–1108.
- BRATCHELL N., GIBSON A. M., TRUMAN M., KELLY T. M., ROBERTS T. A. (1989): Predicting microbial growth: The consequences of quantity of data. *Int. J. Food Microbiol.*, 8: 47–58.
- ELLIOTT P. H. (1996): Predictive microbiology and HACCP. *J. Food Protect. (Suppl.)*: 48–53.
- GIBSON A. M., BRATCHELL N., ROBERTS T. A. (1987): The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slury. *J. Appl. Bacteriol.*, 62: 479–490.
- GIBSON A. M., BRATCHELL N., ROBERTS T. A. (1988): Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *Int. J. Food Microbiol.*, 6: 155–178.
- LARSEN R., KJAERGAARD L. (1978): A structured model for microbial growth and product formation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 5: 177–188.
- McMEEKIN T. A., OLLEY J., ROSS, T., RATKOWSKY D. A. (1993): *Predictive Microbiology: Theory and Application*. New York, John Wiley.
- POWELL E. O. (1968): Transient changes in the growth rates of microorganisms. In: MALEK I. (Ed.): *Proc. 4th Symp. Continuous Cultivation of Microorganisms*. Praha, Academia: 275.
- SUTHERLAND J. P., BAYLISS A. J., BRAXTON D. S. (1995): Predictive modeling of growth of *Escherichia coli* O157:H7: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *Int. J. Food Microbiol.*, 25: 29–49.
- VOLESKY B., VOTRUBA J. (1992): *Modeling and Optimization of Fermentation Processes*. Amsterdam, Elsevier.
- WALLS I., SCOTT V. N. (1996): Validation of predictive mathematical models describing the growth of *Escherichia coli* O157:H7 in raw ground beef. *J. Food Protect.*, 59: 1331–1335.
- WHITING R. C., BUCHANAN R. L. (1994): *Microbial modeling: IFT Scientific Status Summary*. Food Technol.
- WHITING R. C. (1995): *Microbial modeling*. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 35: 467–494.

Došlo 13. 1. 1998

Kontaktní adresa:

RNDr. Vladimír Erban, Výzkumný ústav potravinářský Praha, Radiová 7, 102 31 Praha 10-Hostivař, Česká republika, tel.: + 420 2 70 23 31, fax: + 420 2 70 19 83, e-mail: v.erban@vupp.cz

Závislost tepelného efektu metalizovaných fólií pro mikrovlnný ohřev na stupni jejich pokovení*

Jiřina HOUŠOVÁ, Karel HOKE, Jaroslav DOBIÁŠ¹

Food Research Institute Prague, Prague; ¹Institute of Chemical Technology – Department of Food Preservation and Meat Technology, Prague, Czech Republic

Abstract

HOUŠOVÁ J., HOKE K., DOBIÁŠ J. (1998): A relation between the heat effect of metallized films for microwave heating and the degree of their metallization. Czech J. Food Sci., 16: 143–149.

Microwave heating has become very popular. The microwave ovens are mostly used for defrosting and reheating of precooked foods. One problem with microwave cooking is that the microwave oven does not brown and crisp the food and that the food after microwave heating is soggy (Zuckerman, Miltz, 1992). There are only few possibilities how to overcome this problem. One of them is a method developed in recent years, involving the use of metallized thin layer susceptor. A susceptor consists of metallized plastic film laminated mostly on paperboard on top of which the food is placed. A susceptor absorbs part of microwave energy and converts it to heat which is transferred to the food by conduction or radiation. The temperature of susceptor may reach 175–260 °C (Zuckerman, Miltz, 1992) depending on properties of the metallized film and the food in contact. A great deal of information has been published on the susceptors application until now but only limited information on their parameters and heating performance is available. The relation between the degree of metallization of polyethylene terephthalate film (susceptor) of the Czech make and the rate of heat generation in film during microwave heating was followed in the present study. The method based on the measurement of temperature change in the sample of paraffin hydrocarbons was developed and used for testing of heat generation in susceptor at the microwave heating. The samples of metallized foils with optical density of metallization in the range from 0.0 till 0.448 were tested. The Luxtron temperature acquisition system model 755 with fiber optic probes was used for temperature monitoring and domestic type of microwave oven Moulinex FM 2915 Q 850 W for heating experiments. The maximum rate of heat generation was determined for films with optical density ranging from 0.20 to 0.26. The method used for heat generation testing is very sensitive to the quality of metallization – nonhomogeneous of metallization observed in some foil samples influenced local heating rate.

microwave heating, active container, metallized plastic film

Souhrn

HOUŠOVÁ J., HOKE K., DOBIÁŠ J. (1998): Závislost tepelného efektu metalizovaných fólií pro mikrovlnný ohřev na stupni jejich pokovení. Czech J. Food Sci., 16: 143–149.

Mikrovlnný ohřev se stále rozšiřuje. Jedním z problémů vaření pomocí mikrovln je, že v mikrovlnné troubě se nedosáhne zhnědnutí a křupavosti potravin a potravina po mikrovlnném ohřevu je navlhla (Zuckerman, Miltz, 1992). Existuje jen několik možností jak tento problém řešit. Jednou z nich je před lety vyvinutá metoda zahrnující použití tenké vrstvy kovového susceptoru. Susceptor se skládá z pokovené plastické fólie, která se většinou laminuje na karton v místě potraviny. Susceptor absorbuje část mikrovlnné energie a mění ji v teplo, které je dodáno potravíně vedením nebo radiací. Teplota susceptoru může dosáhnout 175 až 260 °C (Zuckerman, Miltz, 1992) v závislosti na vlastnostech kovového filmu a kontaktu s potravinou. Závislost mezi stupněm pokovení metalizované polyetyleneteraftalátové fólie (susceptor) české výroby a tepelným efektem, který vznikne v mikrovlnném poli, byla sledována v předložené studii. Metodika zkoušek vycházela z předpokladu vazby mezi množstvím tepla generovaného susceptorem při mikrovlnném ohřevu a rychlostí ohřevu, resp. tavením vzorku parafínu. K testování byly

*Práce vznikla s podporou NAZV ČR (projekt č. IE 095 0975040)

použity vzorky metalizované fólie s optickou hustotou od 0,000 do 0,448. Teplota parafinu byla měřena sondami termometrického systému LUXTRON 755 s optickými kabely. K vlastním zkouškám byla použita mikrovlnná trouba Moulinex 2918 Q 850 W. Výraznější tepelný efekt byl zaznamenán u fólií s optickou hustotou 0,20–0,26. Metoda použitá pro testování je velmi citlivá na kvalitu pokovení – nestejnornost pokovení u některých vzorků fólií má vliv na pozorované místní rozdíly teplot.

mikrovlnný ohřev; aktivní obal; pokovená plastická fólie

Metalizované polyetylenetereftalátové (PET) fólie, označované jako susceptory, tvoří základní prvek aktivních obalů potravin pro mikrovlnný ohřev. Na rozdíl od transparentních obalových materiálů, jimiž mikrovlny procházejí bez výraznější absorbece, a tím i bez výraznějšího tepelného efektu, a kovových materiálů, které mikrovlny zcela odrážejí, susceptory část energie dopadajících mikrovln pohlcují. Konverze pohlcené energie mikrovln v teplo má za následek rychlý vzrůst teploty susceptoru – uvádějí se hodnoty od 175 až do 260 °C (Risch, 1993; Zuckerman, Miltz, 1992) v závislosti na parametrech metalizované fólie i potravině, která je v kontaktu.

Tepelného efektu susceptoru je využíváno v případech, kdy i při mikrovlnném ohřevu je žádoucí dosáhnout pečicího efektu, tedy vysokou povrchovou teplotu potraviny, křupavou kůrku, typickou barvu a aroma pečeného výrobku (Harrison, 1989; Shepard, 1989; Miltz, Zuckerman, 1992; Dobíáš, 1992). Těchto znaků je docíleno změnou teplotního a vlhkostního profilu v potravine. Zatímco při čistém mikrovlnném ohřevu nepřesáhne povrchová teplota potraviny s běžným obsahem vlhkosti příliš 100 °C (Dobíáš et al., 1997) a obsah vlhkosti je právě nejvyšší v povrchové vrstvě, při ohřevu potraviny v aktivním obalu se susceptorem může povrchová teplota dosáhnout 130 i více stupňů při velmi nízkém obsahu vlhkosti (Turpin, 1989).

Susceptory jsou v průmyslově vyspělých zemích, zejména Spojených státech amerických, Japonsku, ale i západní Evropě využívány již déle než dvacet let. Zejména v USA představují významný prvek aktivní funkce obalu při mikrovlnném ohřevu, využívány především při balení tzv. „microwaveable popcorn“ a zmrazené pizzy. Mnohé z těchto aplikací jsou doposud patentově chráněny, což ovlivňuje i obsah a zaměření publikovaných informací (Woods, 1992).

V České republice je v současné době naprostý nedostatek praktických zkušeností s vlastnostmi susceptoru navzdory tomu, že se mezi producenty potravin množí poptávka po možnosti výroby potravinářských výrobků využívajících susceptory a navíc již existuje výrobce schopný v tuzemsku obalové materiály se susceptory vyrábět.

Motivem pro výzkumnou studii, část jejíž výsledků přináší tato publikace, bylo získat některé z chybějících poznatků a informací.

Publikace shrnuje výsledky experimentů, prováděných s cílem upřesnit vazbu mezi mírou pokovení metalizované fólie a tepelným efektem, který vznikne v mikrovlnném poli.

Studie byla provedena v rámci řešení projektu podporovaného NAZV, který sledoval vliv mikrovlnného ohřevu na případnou migraci složek obalů do potravin. Vzhledem k publikovaným hodnotám teplot, které mohou susceptory při mikrovlnném ohřevu dosáhnout i vzhledem ke konstrukci obalů se susceptory je problém migrace nežádoucích složek z obalu do potraviny reálný, což dokladuje zaměření řady publikací z posledních let (Olson et al, 1991; Mc Neal, Hollifield, 1993; Risch, 1993; Zuckerman, Miltz, 1995)

MATERIÁL A METODY

Metodika zkoušek vycházela z předpokladu vazby mezi množstvím tepla, generovaným metalizovanou polyetylenetereftalátovou fólií při mikrovlnném ohřevu a rychlostí ohřevu resp. tavením malého vzorku parafinu s testovanou fólií na dně. Při transparentnosti parafinu vůči mikrovlnám lze předpokládat, že teplo potřebné k jeho ohřevu a následně i k jeho tavení je v daném případě dodáváno pouze aktivní fólií.

První série zkoušek prokázala použitelnost této metody za předpokladu, že bude zabezpečena konstantní a stejnoměrná výška vrstvy parafinu nad testovanou fólií a konstantní vzdálenost testované fólie od míst, v nichž je při ohřevu monitorována teplota parafinu. Pro dosažení těchto podmínek byla upravena metodika přípravy vzorků parafinu a fólií a instalace měřících sond. Dalším předpokladem jsou stejné podmínky ohřevu, tj. stejné výkonové parametry magnetronu a teplota vzduchu v zařízení na počátku a v průběhu ohřevu.

Příprava vzorků pro ohřev

Pro zkoušky byly použity vzorky odebrané z náběhu výroby metalizované fólie Tenolan, tloušťka fólie 20 µm, výrobce Technoplast, a. s., Chropyně. Uvedený způsob získání vzorků nebyl zcela ideální (např. vzhledem k stejnoměrnosti pokovení), ale jiný zdroj nebyl v době zkoušek k dispozici. Ze vzorků fólií odebraných z výroby o rozměrech 50 × 100, resp. 50 × 50 mm s optickou hustotou od 0,006 až 0,445 byly podle šablony vystříženy kroužky o průměru 45 mm. Pokud to velikost vzorku fólie dovozovala, byly vystříženy dva kroužky, což umožnilo opakovat zkoušku mikrovlnného ohřevu (většina zkoušek).

Vystřížené kroužky fólie byly položeny na dno speciálně vyrobené misky z teflonu a k jejímu dnu přitisknuty vyjímatelným fixačním mezikroužkem. Rozměry misek

a fixačního mezikroužku a instalace vzorku fólie je patrná z obr. 1. Fólie byla pokládána na dno misky vždy pokovenou stranou nahoru, podle označení na fólii.

Po instalaci kruhových vzorků fólie bylo na dno místiček naváženo 10 g tuhého parafínu (frakce s bodem tání 58–62 °C). Parafin byl poté roztaven (použita stolní horkovzdušná trouba Tefal) a opětně schlazen ve vodě tak, aby výška jeho vrstvy byla stejnoměrná. Při navážce 10 g parafínu a uvedených rozměrech místiček činila výška jeho vrstvy nad fólií 9,5 mm.

Tímto způsobem byly připraveny i vzorky s fólií označenou jako nepokovená i vzorky parafínu bez instalované fólie. Tyto vzorky byly použity pro sledování míry vlivu teploty okolního vzduchu na teplotu vzorků.

Mikrovlnné zařízení použité ke zkouškám, monitorování teploty

K vlastním zkouškám byly použity mikrovlnná trouba Moulinex FM 2915 Q se štitkovým výkonem 850 W bez otočného talíře s pěti základními výkonovými stupni.

Pro porovnání tepelného efektu testovaných fólií byla při ohřevu průběžně měřena teplota parafínu ve dvou místech poblíž osy vzorku 6 mm nad fólií (obr. 1). Teplota byla měřena sondami termometrického systému LUXTRON 755 s optickými kabely, sondy byly instalovány do předem navrtaných otvorů při vnější fixaci jejich polohy. Sondami LUXTRONU byla měřena rovněž teplota vzduchu v mikrovlnné troubě pro sledování jejího vlivu na prohřívání vzorků vosku.

Parametry ohřevu

Při zkouškách byl vždy ohříván pouze jeden vzorek parafínu s fólií. Vzhledem k minimální absorpční schopnosti

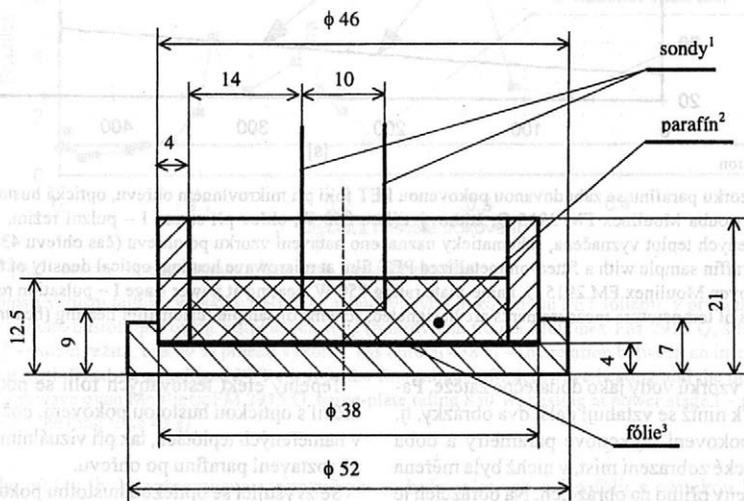
většiny testovaných vzorků bylo při ohřevu třeba použít dodatečnou zátěž. Tu tvořilo 200 ml vody rozdělených do dvou skleněných kádinek (počáteční teplota vody 20 °C). Vzorek parafínu s fólií byl umístěn ve středu vyjímatelné skleněné police položené na dně trouby (kádinky s vodou) vždy v identických místech za vzorkem vosku.

Průběh ohřevu parafínu byl monitorován při nastavení výkonového stupně I s pulzním režimem (provoz „on-off“, cca 60 % plného výkonu) po dobu 7,5 min u vzorků s malým tepelným efektem fólie, resp. do dosažení 80 °C v parafínu u vzorků s vysokým tepelným efektem fólie.

Mezi jednotlivými zkouškami byla dodržována 30minutová přestávka tak, aby výkonové parametry magnetronu i teplota vzduchu a její zvyšování při ohřevu byly obdobné. Oteplení vzduchu od dodatečné zátěže sledovala separátní zkouška.

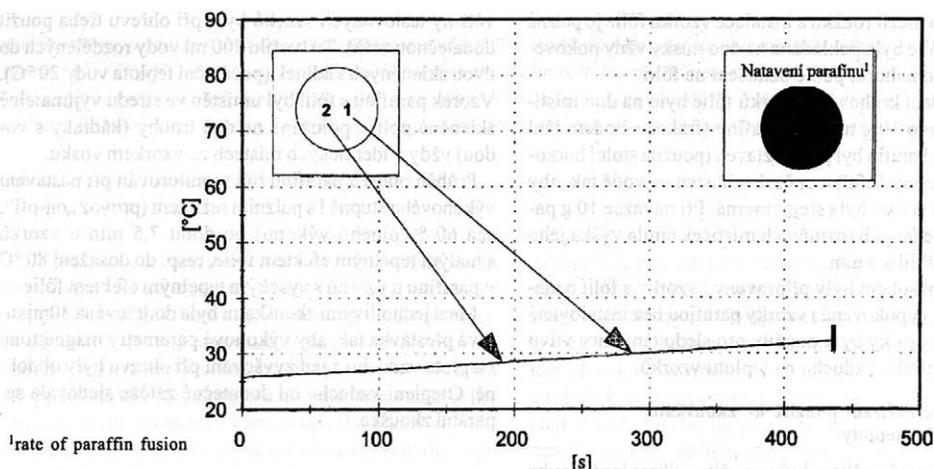
VÝSLEDKY A DISKUSE

Z naměřených hodnot byl pro každou zkoušku ohřevu zpracován grafický záznam časového vývoje teploty parafínu v obou měřených místech, který odrážel míru tepelné aktivity zabudované fólie. Jako příklad souvislosti intenzity prohřívání vzorků parafínu od míry pokovení v nich zabudované fólie uvádíme tři obrázky (obr. 2–4), z nichž první odpovídá zkoušce ohřevu vzorku parafínu bez fólie a dokumentuje míru prohřívání parafínu od okolního vzduchu v mikrovlnném zařízení, další dva zahřívání vzorků parafínu od fólie s malým a velkým tepelným efektem. Z obr. 2 je zřejmé, že k mírnému ohřevu vzorku docházelo v důsledku styku s okolním vzduchem, jehož teplota se během zkoušky ohřevu zvyšovala (v průměru o 6 °C po pěti minutách ohřevu) v důsledku přestupu tepla od sou-

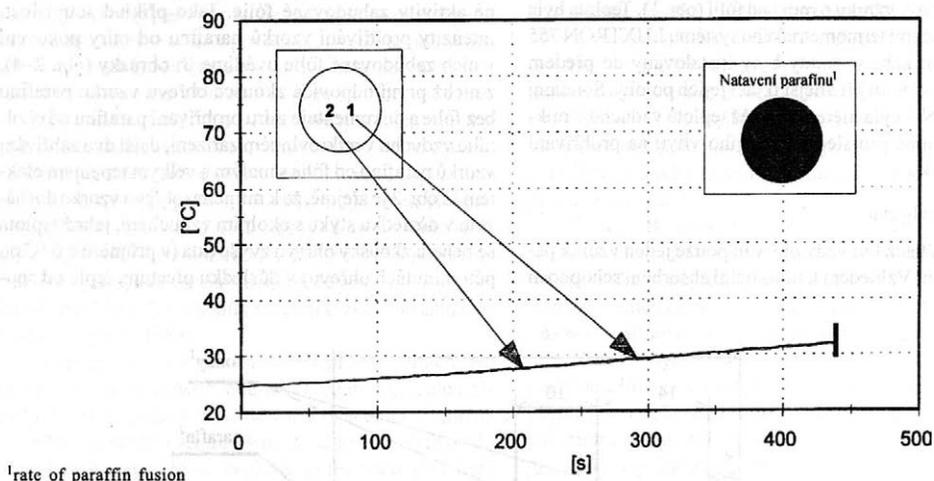


¹probes; ²paraffin; ³plastic film

1. Schéma umístění testované pokovené PET fólie a teploměrných sond ve vzorku parafínu, rozměry vzorku – Diagram of positions of a tested metallized PET film and heat measuring probes in a paraffin sample, sample dimensions



2. Vzrůst teploty vzorku parafinu bez zabudované pokovené fólie při mikrovlnném ohřevu – mikrovlnná trouba Moulinex FM 2915 Q, štítkový výkon 850 W, výkonový stupeň I – pulzní režim, cca 60 % plného výkonu (čas ohřevu 438 s) – Increase in paraffin sample temperatures without a fitted-on metallized film at microwave heating – microwave oven Moulinex FM 2915 Q, name-plate rating 850 W, power stage I – pulsation regime, ca. 60% of full capacity (heating time 438 s)

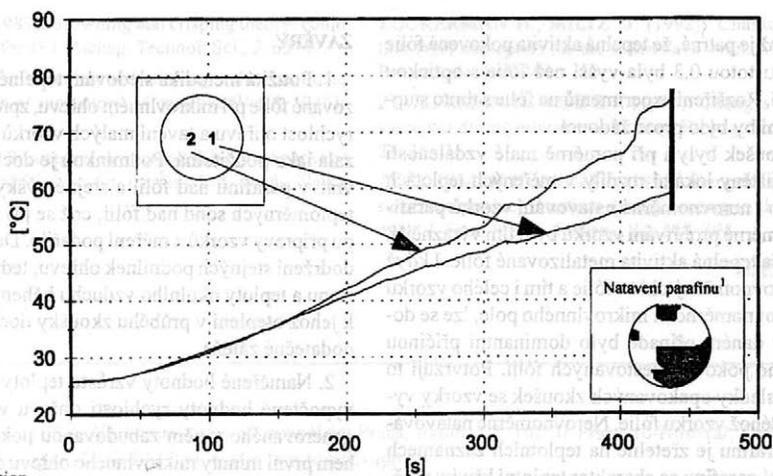


3. Vzrůst teploty vzorku parafinu se zabudovanou pokovenou PET fólií při mikrovlnném ohřevu, optická hustota pokovení fólie 0,060, mikrovlnná trouba Moulinex FM 2915 Q, štítkový výkon 850 W, ohřev při stupni I – pulzní režim, cca 60 % plného výkonu, místa měřených teplot vyznačena, schematicky naznačeno natavení vzorku po ohřevu (čas ohřevu 43 s) – Increase in temperatures of paraffin sample with a fitted-on metallized PET film at microwave heating, optical density of film metallization 0.060, microwave oven Moulinex FM 2915 Q, name-plate rating 850 W, heating at power stage I – pulsation regime, ca. 60% of full capacity, points of temperature measurements are designated, scheme of sample fusion after heating (heating time 43 s)

běžně ohřivaných vzorků vody jako dodatečné zátěže. Parametry zkoušek, k nimž se vztahují další dva obrázky, tj. optická hustota pokovení, výkonové parametry a doba ohřevu i schematické zobrazení míst, v nichž byla měřena teplota, jsou uvedeny přímo na obrázcích. Na obrázcích je schematicky znázorněno i případné roztavení parafinu po ohřevu (bílá barva – parafin roztaven v celém objemu, černá barva – parafin neroztaven, šedá barva – částečné roztavení parafinu).

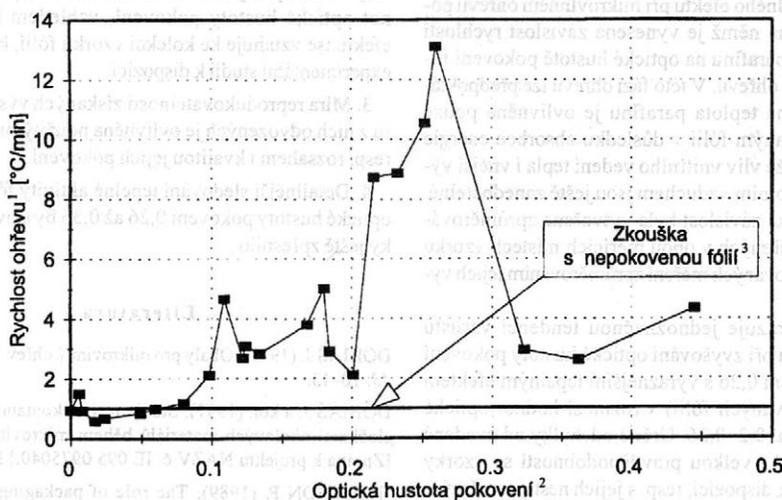
Tepelný efekt testovaných fólií se podle předpokladu měnil s optickou hustotou pokovení, což se projevilo jak v naměřených teplotách, tak při vizuálním posouzení stupně roztavení parafinu po ohřevu.

Se zvyšující se optickou hustotou pokovení měla rychlost ohřevu parafinu nejprve rostoucí tendenci, přitom výraznější změna v nárůstu sledovaných teplot byla pozorována v oblasti optické hustoty pokovení fólií 0,216 až 0,262. Další zvyšování stupně pokovení mělo za následek



¹rate of paraffin fusion

4. Vzrůst teploty vzorku parafinu se zabudovanou pokovenou PET fólií při mikrovlnném ohřevu, optická hustota pokovení fólie 0,201, mikrovlnná trouba Moulinex FM 2915 Q, štítkový výkon 850 W, ohřev při stupni I – pulzní režim, cca 60 % plného výkonu, místa měřených teplot vyznačena, schematicky naznačeno natavení vzorku po ohřevu (čas ohřevu 438 s) – Increase in temperatures of paraffin sample with a fitted-on metallized PET film at microwave heating, optical density of film metallization 0.201, microwave oven Moulinex FM 2915 Q, name-plate rating 850 W, heating at power stage I – pulsation regime, ca. 60% of full capacity, points of temperature measurements are designated, scheme of sample fusion after heating (heating time 43 s)



¹heating speed; ²optical density of metallization; ³test with unmetallized film

5. Závislost rychlosti vzrůstu teploty vzorků parafinu se zabudovanými pokovenými PET fóliemi, v první minutě mikrovlnného ohřevu, na míře optické hustoty pokovení testovaných fólií (mikrovlnná trouba Moulinex FM 2915 Q, štítkový výkon 850 W, ohřev při stupni I – pulzní režim, cca 60 % plného výkonu, čas ohřevu 438 s) – The relation between an increase in temperatures of paraffin sample with fitted-on metallized PET films in the first minute of microwave heating and the optical density of film metallization (microwave oven Moulinex FM 2915 Q, name-plate rating 850 W, heating at power stage I – pulsation regime, ca. 60% of full capacity, heating time 43 s)

pokles tepelného efektu (bylo zaznamenáno výrazně pomalejší prohřívání parafinu). Tomu odpovídalo i vizuálně posuzované tavení vzorků parafinu během ohřevu.

Tyto závěry se vztahují ke kolekci vzorků fólií, které byly pro zkoušku k dispozici. Vzhledem k tomu, že mezi vzorky

bylo relativně málo fólií s optickou hustotou pokovení v rozmezí hodnot 0,262 až 0,323 (obr. 5) nelze vyloučit, že oblast výraznějšího teplotního efektu metalizovaných fólií přesáhne i uvedenou krajní hodnotu 0,262. Hovoří pro to výsledky, které publikovali Zuckerman a Miltz

(1994), z nichž je patrné, že tepelná aktivita pokovené fólie s optickou hustotou 0,3 byla vyšší než fólie s optickou hustotou 0,25. Rozšíření experimentů na fólie s tímto stupněm pokovení by bylo proto žádoucí.

U řady zkoušek byly i při poměrně malé vzdálenosti obou sond zjištěny lokální rozdíly v měřených teplotách a pozorováno i nerovnoměrné natavování vzorků parafinu. Nerovnoměrné prohřívání vzorků bylo tím výraznější, čím vyšší byla tepelná aktivita metalizované fólie. I když může být nerovnoměrný ohřev fólie a tím i celého vzorku ovlivněn nerovnoměrností mikrovlnného pole, lze se domnívat, že v daném případě bylo dominantní příčinou nestejnoměrné pokovení testovaných fólií. Potvrzují to i rozdílné výsledky opakovaných zkoušek se vzorky vyštíženými z téhož vzorku fólie. Nerovnoměrné natavování vzorků parafinu je zřetelné na teplotních záznamech – po roztavení parafinu se charakter teplotní křivky změnil, teplota roztavené části vzorku kopírovala pulzní režim ohřevu (zapínání a vypínání magnetronu) a střídavě klesala a rostla. U vzorků s fóliemi s vysokým tepelným efektem byl vliv pulzního režimu zřetelný na naměřených teplotách prakticky již od počátku ohřevu.

Pouze určité rozmezí optimální míry pokovení fólie z hlediska jejího tepelného efektu při mikrovlnném ohřevu potvrzuje obr. 5, na němž je vynesena závislost rychlosti vzrůstu teploty parafinu na optické hustotě pokovení fólie pro 1. minutu ohřevu. V této fázi ohřevu lze předpokládat, že naměřená teplota parafinu je ovlivněna pouze teplem generovaným fólií v důsledku absorpce energie mikrovln, protože vliv vnitřního vedení tepla i vnější výměny tepla s okolním vzduchem jsou ještě zanedbatelné. Uvedená grafická závislost byla vytvořena zprůměrováním teplot naměřených v obou měřicích místech vzorku a v případě opakovaných měření zprůměrováním jejich výsledků.

Závislost vykazuje jednoznačnou tendenci vzrůstu tepelného efektu při zvyšování optické hustoty pokovení do hodnoty kolem 0,26 s výraznějším tepelným efektem (v případě testovaných fólií) v rozmezí hodnot optické hustoty pokovení 0,2–0,26. Určité odchylky od uvedené tendence souvisí s velkou pravděpodobností se vzorky fólií, které byly k dispozici, resp. s jejich nestejnoměrným pokovením a malým počtem opakování.

Zjištěná tendence odpovídá teoretickým představám o výkonnosti metalizovaných fólií při mikrovlnném ohřevu – při malé míře jejich pokovení je absorpce energie mikrovln nízká a následný vývoj tepla malý, při překročení určitého stupně pokovení se fólie chová jako kov, tedy zcela odráží mikrovlny což znamená, že k vývoji tepla nedochází. Prakticky obdobnou tendenci vykazuje závislost absorbované energie mikrovln na měřeném elektrickém odporu pokovené fólie (Turpin, 1989) i publikované výsledky experimentů, které popsali Zuckerman a Miltz (1994). Výsledky zpřesňují obecnou informaci, že optimum tepelného výkonu metalizovaných fólií se pohybuje kolem hodnoty 0,2 vyjádřeno v hodnotě optické hustoty.

ZÁVĚRY

1. Použitá metodika sledování tepelného efektu metalizované fólie při mikrovlnném ohřevu, zprostředkovaně přes rychlost ohřevu a tavení malých vzorků parafinu, se ukázala jako použitelná. Podmínkou je docílení stejnoměrné vrstvy parafinu nad fólií a stejné výšky měřicích konců teploměrných sond nad fólií, což se při popsaném postupu přípravy vzorků a měření podařilo. Další podmínkou je dodržení stejných podmínek ohřevu, tedy výkonu magnetronu a teploty okolního vzduchu během zkoušky ohřevu k jehož oteplení v průběhu zkoušky dochází od nezbytné dodatečné zátěže.

2. Naměřené hodnoty vzrůstu teploty parafinu i z nich vypočtené hodnoty rychlosti ohřevu v důsledku tepla, generovaného v něm zabudovanou pokovenou fólií, během první minuty mikrovlnného ohřevu dokumentují určité rozdíly v tepelné aktivitě testovaných fólií. Výraznější tepelný efekt byl zaznamenán při zkouškách ohřevu fólií, jejichž optická hustota pokovení ležela mezi hodnotami 0,216–0,262. U těchto vzorků docházelo poměrně rychle i k tavení parafinu. Fólie s nižšími i vyššími hodnotami optické hustoty pokovení nad uvedené rozmezí vykazovaly menší tepelný efekt. Uvedené rozmezí optimálních hodnot optické hustoty pokovení, vzhledem k tepelnému efektu, se vztahuje ke kolekci vzorků fólií, která byla pro experimentální studii k dispozici.

3. Míra reprodukovatelnosti získaných výsledků i závěrů z nich odvozených je ovlivněna použitými vzorky fólií, resp. rozsahem i kvalitou jejich pokovení.

4. Detailnější sledování tepelné aktivity fólií v rozsahu optické hustoty pokovení 0,26 až 0,36 by stávající poznatky ještě zpřesnilo.

Literatura

- DOBIÁŠ J. (1992): Obaly pro mikrovlnný ohřev. *Prům. Potravn.*, 43: 10–13.
- DOBIÁŠ J. a kol. (1997): Studium rizik kontaminace potravin složkami obalových materiálů během mikrovlnného ohřevu. [Zpráva k projektu NAZV č. IE 095 0975040.] Praha.
- HARRISON P. (1989): The role of packaging in achieving microwave browning and crisping. *J. Packag. Technol. Sci.*, 2: 5–10.
- Mc NEAL T. P., HOLLIFIELD H. C. (1993): Determination of volatile chemicals released from microwave heat – susceptors food packaging. *J. AOAC Int.*, 76: 1268–1275.
- MILTZ J., ZUCKERMAN H. (1992): Effect of metalization in plastic susceptors on browning. *Lebens. Wiss. Technol.*, 25: 467–469.
- OHLSON T., STTÖLMAN V., ERLÖV L. (1991): Migration från forpackningar avsedda attanvändas i mikrovågsugn. *Vår Föda*, 6: 317–327.
- RISCHS J. (1993): Safety assessment of microwave susceptors and other high temperature packaging materials. *Food Adit. Contamin.*, 10: 655–661.

SHEPPARD J. R. (1989): Browning and crisping theory: could microwaves brown food? *J. Packag. Technol. Sci.*, 2: 63–67.

TURPIN, C. (1989): Browning and crisping – the functions, design and operation of susceptors. *Microwave World*, 10 (6): 8–12.

WOODS K. (1992): Susceptors in microwavable food packaging. Firemní materiál Waddington Cartons Ltd, Leeds, Velká Británie.

ZUCKERMAN H., MILTZ J. (1992): Characterization of thin layer susceptors for the microwave oven. *J. Food Process. Preserv.*, 16: 193–204.

ZUCKERMAN H., MILTZ J. (1994): Changes in thin-layer susceptor during microwave heating. *Packag. Technol. Sci.*, 7: 21–26.

ZUCKERMAN H., MILTZ J. (1995): Temperature profiles at susceptor product interface during heating in the microwave oven. *J. Food Process. Preserv.*, 19: 385–398.

Došlo 30. 4. 1998

Kontaktní adresa:

Ing. Jiřina Houšová, CSc., Výzkumný ústav potravinářský Praha, Radiová 7, 102 31 Praha 10-Hostivař, Česká republika, tel.: + 420 2 70 23 31, fax: + 420 2 70 19 83, e-mail: housova@vupp.cz

**First 'green' trade exhibition in Prague
for 30 years attracts many international companies**

**HORTIFLORA EUROPE '98: Prague International Flower Show,
Horticulture and Gardening Exhibition, 8-11 October 1998
The Fairgrounds, Prague, Czech Republic**

Hortiflora Europe '98, the international Flower Show, Horticulture and Gardening Exhibition will take place from 8 to 11 October at the Fairgrounds in Prague, Czech Republic. This exhibition will be attended by highly qualified companies in the flowers and plants branch like:

Gasa Odense from Denmark, Guaber from Italy, Ludvig Svensson from Sweden and Kemira Agro from Finland. Professional growers and traders as well as the general public will have the opportunity to see the fresh flowers and live plants, combined with professional horticulture and gardening products. The **Holland Flower Council** will be present with a Pavilion of 10 leading Dutch flower exporters.

The following companies from the machinery and equipment branch will participate: Mountfield (CZ) representative of: Hozelock (UK), Roth (D), Mogatec (D), Garstelgarden (I) and Gardena (CZ/D) representative of BASF (D) and Brill (D) will participate.

Hortiflora '98 will be **fully supported by The Czech Ministry of Agriculture** and gives the international companies the unique chance to promote their business in the Czech Republic

For more information:

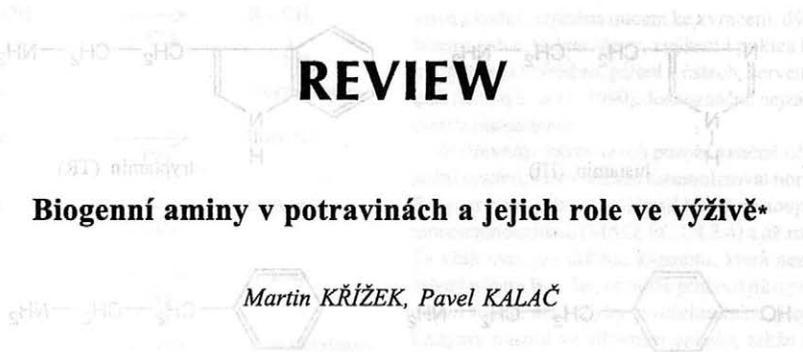
"Hortiflore-HOTLINE" - tel.: ++ 31 30 2400 525, fax: ++ 31 30 2400 637

Organisation and sales:

BTO Beurs- en Tentoonstellings- Organisatie BV
St. Jacobsstraat 331, 3511 BP Utrecht, the Netherlands
Tel.: ++ 31 30 2400 425, fax: ++ 31 30 2400 637
E-mail: bto.exhibitions@wxs.nl

*Member of the ITE Exhibitions Group
London-Hamburg-Paris-Milan-Moscow-Kiev*

horti
flora
EUROPE 98



REVIEW

Biogenní aminy v potravinách a jejich role ve výživě*

Martin KRÍŽEK, Pavel KALÁČ

Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Abstract

KRÍŽEK M., KALÁČ P. (1998): **Biogenic amines in foods and their roles in human nutrition.** Czech J. Food Sci., 16: 151–159.

Literature data on nature, effects on human health, factors affecting formation and occurrence of biogenic amines including polyamines in both non-fermented and fermented foods are reviewed. The proposed safety limits and trends in methods of analytical determination are also presented.

biogenic amines; amines formation; histamine; tryptamine; putrescine; spermidine; foods; nutritional effects

Aminy vznikající dekarboxylací přirozených aminokyselin působením živých organismů, příp. aminací a transaminací aldehydů a ketonů se označují jako biogenní. Některé z nich jsou přirozenou součástí potravin rostlinného i živočišného původu. Přehled nejvýznamnějších je uveden na obr. 1.

Podle chemické struktury se uvedené biogenní aminy (BA) člení na *aromatické* (tyramin – TY a 2-fenylethylamin – FEA), *heterocyklické* (histamin – HI a tryptamin – TR) a *alifatické diaminy* (putrescin – PUT a kadaverin – KAD) a *polyaminy* (spermidin – SPD, spermin – SPM, příp. agmatin – AGM). Někdy se diaminy zjednodušeně řadí mezi polyaminy a heterocyklické aminy se řadí do skupiny aromatických.

Pohled na BA prošel v závislosti na míře poznání značnými změnami. Původně se jim přisuzovala značná toxicita, PUT a KAD byly dokonce označovány jako ptomainy neboli mrtvolné jedy. Nyní se za toxické považují HI a v menší míře i TY a FEA. U skupiny polyaminů (SPD, SPM, PUT, příp. KAD) přijímaných potravou byly dokonce za určitých podmínek prokázány příznivé účinky na organismy (Bar dó c z, 1993).

V posledních dvou desetiletích značně zesílil výzkum podmínek vzniku BA v potravinách a jejich účinků na lidské zdraví. Je zaměřen především dvěma směry – na zdravotní nezávadnost potravin a na BA jako ukazatele bakteriálního rozkladu bílkovin. Zájem o tuto problematiku

se projevuje i četností publikovaných přehledů literatury. Ty se zabývají buď histaminem (Taylor, 1986; Slo r a c h, 1991), nebo častěji BA jako celou skupinou (A s k a r, T r e p t o w, 1986; B r i n k et al., 1990; S t r a t t o n et al., 1991; H a l á s z et al., 1994; D a v í d e k, D a v í d e k, 1995; S h a l a b y, 1996; S i l l a S a n t o s, 1996).

Cílem tohoto přehledu je poskytnout souhrnné informace o výskytu a podmínkách vzniku BA v potravinách, jejich účincích na lidské zdraví a o metodách jejich stanovení.

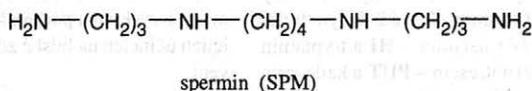
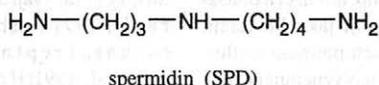
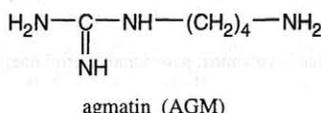
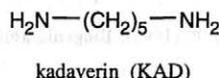
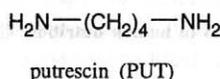
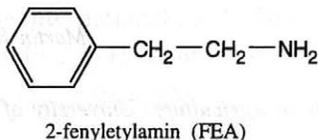
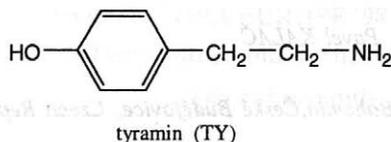
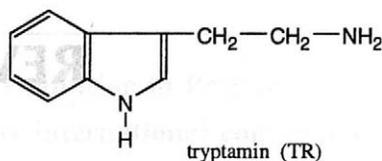
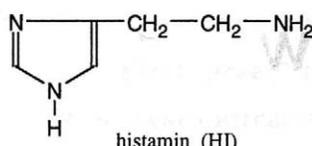
Podmínky vzniku

Protože naprostá většina BA v potravinách vzniká dekarboxylací volných aminokyselin působením bakteriálních dekarboxylas (obr. 2), pro tvorbu významnějšího množství BA jsou nutné tři podmínky:

- dostupnost volných aminokyselin,
- výskyt bakterií vybavených dekarboxylasami aminokyselin,
- podmínky umožňující růst bakterií, biosyntézu dekarboxylas a jejich aktivitu.

Významným předpokladem tvorby BA je proteolýza, ať již autolytická, či bakteriální. Dekarboxylasy aminokyselin nejsou u bakterií zcela běžné, ale vyskytují se v druzích mnoha rodů, zejména *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Photobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella* a *Shigella* a mléčných bakterií rodů

* Přehled vznikl za podpory Grantové agentury ČR č. projektu 203/96/0316.



1. Biogenní aminy běžné v potravinách

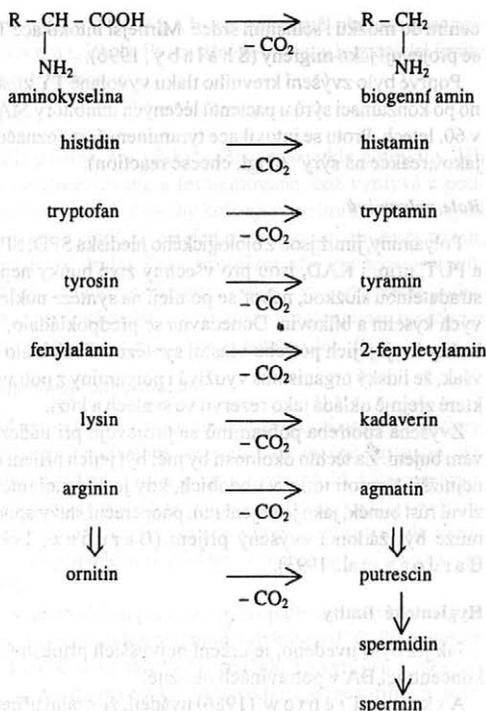
Lactobacillus, *Pediococcus* a *Streptococcus* (Straub et al., 1995; Shalaby, 1996; Silla Santos, 1996). Přehled charakteristických bakterií schopných dekarboxylovat aminokyseliny pro různé potraviny je uveden v tab. I. Schopnost dekarboxylas aminokyselin je velmi různá. Dokonce i různé kmeny jednoho druhu se mohou lišit v produkci BA až o tři řády. Je proto téměř nemožné najít korelaci mezi obsahy BA a počty gramnegativních bakterií (H a l á s z et al., 1994). Vzhledem k různorodosti druhů a kmenů jsou různé i optimální podmínky pro tvorbu BA, jako jsou teplota, pH, přístup kyslíku či obsah chloridu sodného.

Většina aminů včetně HI je tepelně stálá. Některé dekarboxylasy si uchovávají aktivitu i po pasteraci, takže obsah BA může vzrůstat i během skladování potravin (Brink et al., 1990).

Obsah aminů obsažených v potravinách lze snížit několika způsoby (Davídek, Davídek, 1995):

- přidávkem enzymu diaminoxidasy (DAO; EC 1.4.3.6) oxidovat BA za přítomnosti kyslíku na aldehydy,
- přidávkem sacharidů umožnit reakci s aminy vedoucí k neenzymovému hnědnutí,
- vyluhovat část aminů do varné lázně pokud se nekonsumuje.

Tyto úpravy však mají jen omezené použití; rozhodující opatření spočívají v prevenci vzniku BA. Ta se liší podle jednotlivých druhů a skupin potravin, u nichž bude podrobněji uvedena. Obecně lze obsahy BA omezit náročným dodržováním hygieny suroviny a zpracování, což potlačí činnost bakterií způsobujících kažení. Při použití startérových bakteriálních kultur omezujících spontánní



2. Schéma vzniku biogenních aminů z jejich prekurzorů

fermentaci je třeba vybírat kmeny, které nejsou vybaveny dekarboxylasami.

Biologické účinky

Biogenní aminy, zejména HI, TY, PUT, SPD a SPM, jsou u živočichů potřebné pro řadu fyziologických funkcí. Při nadměrném příjmu potravou však mohou vyvolávat projevy otravy. Ovlivňují krevní tlak (HI snižuje, TY zvyšuje), HI má psychoaktivní účinky. Projevy intoxikace jsou ner-

vové a kožní, zejména nucení ke zvracení, dýchací potíže, bušení srdce, bolení hlavy, zvýšení i pokles krevního tlaku, zrudnutí v obličejí, pálení v ústech, červená vyrážka na kůži (B r i n k et al., 1990). Jednoznačně nejzávažnější jsou otravy histaminem.

Ve střevním traktu savců působí značně účinný detoxikační systém, který dokáže metabolizovat normální příjem BA potravou. Hlavní roli hrají hojně zastoupené enzymy monoaminooxidasa (MAO; EC 1.4.3.4) a již zmíněná DAO. Ty však mají jen určitou kapacitu, která nezvládne nadměrný příjem BA. Ten se může projevit již u potravin, které dosud nejeví sensoricky postřehnutelné projevy kažení. Enzymy působí ve střevním epitelu, takže do krevního oběhu se dostávají již produkty oxidace BA. Aktivitu těchto enzymů snižuje alkohol, především však některé léky, tzv. inhibitory MAO. Nejvýraznější je to u některých psychofarmak. Nepříznivě působí zejména klasická antidepressiva Tranylcypromin, Nardil, Anuredal a Imipramin, z nichž některá jsou nyní nahrazována preparáty s jinými farmakodynamickými účinky. Nežádoucí účinky byly zjištěny rovněž u izoniazidu používaného při léčbě tuberkulózy a u některých antimalarik. Velmi podstatné je, že detoxikační schopnost organismu je značně individuální a zhoršuje se např. při některých onemocněních.

Proto je obtížné stanovit jednoznačně nejvyšší přijatelné koncentrace jednotlivých aminů. Škodlivé účinky dvou nejvýznamnějších – HI a TY – mohou být zesíleny jednak ostatními současně přijímanými BA, zejména PUT a KAD, které vyčerpávají část detoxikační kapacity aminooxidas, jednak dosud neidentifikovanými látkami, které se předpokládají v potravinách, u nichž došlo k bakteriální degradaci bílkovin. Tyto látky by zřejmě měly po vstřebání vyvolat uvolňování HI vázaného v žírných buňkách a v dalších tělních rezervoárech, čímž by zesilovaly účinky HI přijatého potravou.

Některé BA jsou posuzovány jako potenciální karcinogeny. Zahříváním PUT může vznikat pyroolidin, z KAD piperidin. Tyto produkty mohou být za určitých podmínek

I. Významné bakterie produkující biogenní aminy (S h a l a b y, 1996)

Potraviny	Bakterie	Vytvářené aminy
Ryby	<i>Morganella morganii</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Bacillus</i> spp., <i>Staphylococcus xylosum</i>	HI, TY, KAD, PUT, AGM, SPM, SPD
Sýry	<i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. arabinose</i> , <i>Streptococcus faecium</i> , <i>S. mitis</i> , <i>Bacillus macerans</i> , <i>Propionibacterium</i> spp.	HI, KAD, PUT, TY, FEA, TR
Maso a masné výrobky	rody <i>Pediococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Micrococcus</i> čeled' Enterobacteriaceae	HI, KAD, PUT, TY, FEA, TR
Fermentovaná zelenina	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus</i> spp.	HI, KAD, PUT, TY, TR
Fermentované produkty ze sýjí	<i>Rhizopus oligosporus</i> , <i>Trichosporon beiglii</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	HI, KAD, PUT, TY, TR

nitrozovány obdobně jako sekundární aminokupiny AGM, SPD a SPM (S h a l a b y, 1996).

Obsahy v pokusných dietách, které nevyvolaly u krys pozorovatelné nežádoucí účinky, byly 2 000 mg/kg diety pro TY, 1 000 mg/kg pro SPD, ale jen 200 mg/kg pro SPM (T i l et al., 1997).

Otrava histaminem

Histamin, který může zasahovat do řady fyziologických funkcí, je dvojího původu. V lidském organismu je uložen v žírných buňkách a v basofilních granulocytech, což je jeden z druhů bílých krvinek. Odtud se při alergické reakci uvolňuje do krevního oběhu. Druhým zdrojem je potrava.

Příjem HI potravou může vést ke stejným potížím, jako jeho uvolnění z tělních depozit. Projevy jsou obdobné jako alergie na určité potraviny, takže se intoxikace často mylně diagnostikuje jako alergická reakce. Otrava HI se však dá rozlišit podle toho, zda se již dříve vyskytla alergie na stejnou potravinu, zda došlo k projevům u více lidí a zda lze v dané potravíně předpokládat vysoký obsah HI (B r i n k et al., 1990).

Rychlost, s jakou se dostaví účinky po příjmu HI (někdy dokonce do pěti minut) nasvědčuje vstřebávání alespoň části HI, příp. i dalších BA již z ústní dutiny, tedy dříve než může být detoxikován střevními aminoxidasami (S i l l a S a n t o s, 1996). I když se pro otravu HI traduje zesilující účinek dalších současně přijatých BA, existují názory, že se tyto synergické účinky neuplatňují (C l i f f o r d et al., 1991).

Incubační doba je vesměs do 30 minut po požití. Projevy obvykle trvají několik hodin, někdy však až několik dnů. Otrava HI se proti jiným intoxikacím potravinami odlišuje projevy na kůži. Otravu lze rychle překonat podáním antihistaminik (S l o r a c h, 1991).

Metabolismus HI v lidském organismu je dvojitý:

- dusík v imidazolovém cyklu je metylován pomocí histamin-N-metyltransferasy (EC 2.1.1.8) za vzniku N-methylhistaminu, který je dále oxidován MAO na N-metylimidazoloctovou kyselinu;
- působením DAO je oxidován na imidazoloctovou kyselinu, která se váže na ribosu (S t r a t t o n et al., 1991).

V zemích s velkou spotřebou mořských ryb patří otravy histaminem k nejběžnějším typům otrav potravinami (S l o r a c h, 1991). Proto se často používá pojmu skombrotoxikosa, neboť původcem jsou především tzv. skombroidní ryby a výrobky z nich. Jedná se o čeledi makrelovitě (Scombridae), představovanou zejména makrelami a tuňáky, rohoretky (Scomberesocidae, např. saira), ale také o ryby z čeledi sledřovitě (Clupeidae), především sledě, sardinky a ančovičky.

Otravy tyraminem

Tyramin je nejúčinnější ze skupiny tzv. vasoaktivních aminů, tj. látek, které zvyšují krevní tlak. Účinky TR a FEA jsou slabší. TY může při podávání léků inhibujících MAO vyvolat hypertenzní krizi se silnými bolestmi hlavy, krvá-

cením do mozku i selháním srdce. Mírnější intoxikace TY se projevují jako migrény (S h a l a b y, 1996).

Poprvé bylo zvýšení krevního tlaku vyvolané TY zjištěno po konzumaci sýrů u pacientů léčených inhibitory MAO v 60. letech. Proto se intoxikace tyraminem často označuje jako „reakce na sýry“ (angl. cheese reaction).

Role polyaminů

Polyaminy, jimiž jsou z biologického hlediska SPD, SPM a PUT, příp. i KAD, jsou pro všechny živé buňky nepostradatelnou složkou, neboť se podílejí na syntéze nukleových kyselin a bílkovin. Donedávna se předpokládalo, že buňky kryjí jejich potřebu vlastní syntézou. Prokázalo se však, že lidský organismus využívá i polyaminy z potravy, které zřejmě ukládá jako rezervu ve svalech a kůži.

Zvýšená spotřeba polyaminů se projevuje při nádorovém bujení. Za těchto okolností by měl být jejich příjem co nejnížší. Naproti tomu v obdobích, kdy je žádoucí intenzivní růst buněk, jako je hojení ran, pooperační stavy apod., může být žádoucí zvýšený příjem (B a r d ó c z, 1993; B a r d ó c z et al., 1993).

Hygienické limity

Jak již bylo uvedeno, je určení nejvyšších přípustných koncentrací BA v potravinách obtížné.

A s k a r a T r e p t o w (1986) uvádějí, že orální příjem 8–40 mg histaminu vyvolá projevy lehké otravy, 40 až 100 mg střední a nad 100 mg silné intoxikace. Na základě vyhodnocení 250 skombrotoxikosa navrhli B a r t o l o m e w et al. (1987) považovat obsah HI v rybách do 50 mg/kg za bezpečný, 50–200 mg/kg za potenciálně toxický, 200 až 1 000 mg/kg za pravděpodobně toxický a nad 1 000 mg/kg za toxický a nebezpečný pro spotřebu. Některé země stanovily maximální obsah HI v rybách legislativně – např. Francie 100 mg/kg, Česká republika, Švédsko a Izrael 200 mg/kg, USA 500 mg/kg. V Evropské unii se od roku 1991 pro hodnocení partie čerstvých ryb z čeledi makrelovitě a sledřovitě odeberá devět kusů. U dvou z nich se připouští obsah HI v rozmezí 100–200 mg/kg, u zbývajících sedmi musí být nižší než 100 mg/kg (cit. S h a l a b y, 1996).

Ve Švýcarsku je hygienický limit obsahu HI ve víně 10 mg/l, v ČR 20 mg/kg; v literatuře se však objevují návrhy snížit limit HI v alkoholických nápojích na 2 mg/l (B r i n k et al., 1990).

Pro přijatelný obsah tyraminu se běžně uvádí široké rozpětí 100–800 mg/kg. V ČR je nyní přípustné množství pro sýry 200 mg/kg, pro červená vína 50 mg/kg a pro ostatní potraviny 100 mg/kg. Příjem 10–80 mg TY může vyvolat otoky, více než 100 mg migrénu (A s k a r, T r e p t o w, 1986). Pro pacienty léčené inhibitory MAO by neměl příjem TY překročit 6 mg během čtyř hodin. Za riziková se považují např. piva s obsahem TY nad 10 mg/l (T a i l o r et al., 1995).

Nejméně údajů je o fenyletylaminu, jehož obsah do 30 mg/kg je pokládán za přijatelný. Obsah do 100–200 mg

na 1 kg HI + TY + FEA by rovněž neměl představovat riziko (N o u t, 1994). Pro ostatní BA nebyly hygienické limity dosud navrženy.

Výskyt

Při posuzování výskytu BA se obvykle potraviny dělí na nefermentované a fermentované, což vyplývá z podstaty vzniku BA. Obsahy kolísají ve velmi širokém rozpětí až několika řádů, a to nejen mezi různými druhy potravin, ale i uvnitř druhů. Proto je obtížné až nemožné uvést průměrné i tabulkové hodnoty. Údaje o výskytu BA se budou týkat především HI a TY. Obsahy polyaminů, o nichž je zatím jen málo údajů, jsou uvedeny v tab. II.

Nefermentované potraviny

Z této skupiny jsou nejzávažnější skombroidní ryby. Mořské ryby obsahují ve svalovině značná množství volného histidinu – od 1 g/kg u sledě po 15 g/kg u tuňáka. V ulovených rybách je vesměs do 10 mg/kg HI, ve výrobcích z dobře ošetřených surovin do 50 mg/kg, ale v nejhorších případech se zjišťují až tisíce mg/kg (S l o r a c h, 1991).

Nejúčinnějším preventivním opatřením je rychlé a účinné zchlazení a udržení teploty ryb kolem 0 °C. Při teplotách nad 10 °C je již tvorba HI značná. To vyplývá ze skutečnosti, že většina rizikových bakterií je mezofilních. Rozporné jsou názory na vznik BA během skladování zmrazených ryb. Solení ryb tvorbu HI snižuje, protože chlorid sodný inhibuje aktivitu histidindekarboxylasy (EC 4.1.1.22). Pečením ryb část BA vytěká, ale sterilaci v konzervách se již obsah nemění (S h a l a b y, 1996).

U ryb, ale i u dalších druhů nefermentovaných potravin, u nichž je tvorba BA způsobena především bakteriální kontaminací, je snaha využít obsahu BA jako kvalitativního kritéria. Během kažení ryb i masa obvykle vzrůstá obsah HI, PUT a KAD, zatímco původní obsah SPD a SPM klesá. K a r m a s (1981) proto navrhl tzv. index biogenních aminů (BAI) jako poměr obsahů (v mg/kg) HI + PUT + KAD a l + SPD + SPM. Při hodnotě BAI < 1 je kvalita pokládána za výbornou, při BAI > 10 za velmi špatnou. S i m s et al. (1992) však pokládají pro korelaci se senzorickým hodnocením požitelné/nepožitelné za spolehlivější kritérium součet obsahu PUT + KAD.

Maso a nefermentované masné výrobky obsahují jen málokdy hladiny BA, které by představovaly vážnější zdravotní rizika.

V ovoci a zelenině, které jsou v neporušeném stavu chráněny vůči bakteriální invazi, je obsah BA nízký (Z i e g l e r et al., 1994). Hladiny zejména PUT se mohou zvýšit během mechanického zpracování, při němž může dojít ke kontaminaci především dekarboxylujícími bakteriemi čeledi Enterobacteriaceae (S i m o n - S a r k a d i et al., 1994). Hladiny HI < 1 mg/l a nízké obsahy dalších BA jsou charakteristické pro ovocné nektary a džusy (M a x a , B r a n d e s, 1993). Zvýšené obsahy TY se zjistily v rajčatech, banánech a švestkách, HI ve špenátu a FEA v kakau a výrobcích z něj (H a l á s z et al., 1994; D a v í d e k, D a v í d e k, 1995; S i l l a S a n t o s, 1996). Během skladování jedlých hub za méně příznivých podmínek vznikaly PUT a KAD, nikoli HI a TY. Biogenní aminy zřejmě nejsou příčinou občasných nevolností spojovaných s konzumací hub (K a l a č, K ř í ž e k, 1997).

II. Obsahy putrescinu, spermidinu a sperminu v některých potravinách (B a r d ó c z et al., 1993)

Potravina	Aminy (mg/kg i mg/l)		
	putrescin	spermidin	spermin
Vepřové maso libové	3,1	2,8–4,7	29–68
Hovězí maso vařené	1,9–2,8	5,4–6,5	22–32
Kuřecí maso	2,8	9,0	57
Treska	26–30	1,0–1,5	2,9–6,2
Mléko polotučné	0,1	0,3–0,6	0,2–0,4
Sýr čedar „mladý“	10–20	77–104	23–37
Sýr čedar vyzrálý	650	190	22–38
Chléb bílý	1,5–1,8	8,0	3,5
Rýže vařená	1,0	1,4	8–10
Brambory vařené	20	15	5,0
Salát hlávkový	3,2–4,8	4,0–8,0	0
Rajčata	9–122	2,0	0
Hrášek zelený vařený	5,7	62	32–69
Jablka	0,4–1,7	2,4	0
Hrušky	24	15–73	8–47
Pomeranče	95–140	9,0	0

Fermentované potraviny

Co do četnosti otrav histaminem jsou na druhém místě sýry, které navíc mohou obsahovat i značná množství TY (Stratton et al., 1991). Zatímco mléko obsahuje vesměs méně než 1 mg histaminu na 1 litr, sýry obvykle obsahují v 1 kg desítky až stovky mg HI, TY, PUT a KAD, jednotky až desítky mg FEA a velmi malá množství TR. U několika aminů však obsahy mohou výjimečně dosáhnout až tisíců mg/kg, přičemž závisí zejména na ošetření výchozí suroviny a technologických faktorech, jako jsou teplota sýření, doba zrání, použití startérových a plísňových kultur. Nižší obsahy BA proto mají sýry holandského typu, vyšší sýry poloměkké, švýcarského typu a plísňové. Výrazně vyšší obsahy měly sýry vyrobené z nepasterovaného mléka (Schneeller et al., 1997).

Obdobná situace je u sušených a fermentovaných trvanlivých masných výrobků. Na chlazeném mase dominují druhy rodu *Pseudomonas* produkující PUT a enterobakterie vytvářející zejména KAD. Výsledný obsah BA ve výrobku proto závisí jak na ošetření suroviny, tak na použitých startérových kulturách laktobacilů i pediokoků, ale rovněž na použité technologii. Obsahy běžných BA se pohybují v rozpětí jednotek až stovek mg/kg.

Zatímco jednorázová konzumace sýrů a fermentovaných masných výrobků není obvykle příliš vysoká, odlišná situace je u vína a piva. Vína obvykle obsahují v 1 litru jednotky mg HI a TY, málo časté jsou hodnoty 10–30 mg HI a desítky až stovky mg TY. Obsahy BA v evropských a českých pivech jsou uvedeny v tab. III. Nejvyšší obsahy byly zjištěny u spontánně kvašených belgických piv, sporně kvašená piva patří mezi typy s nižšími hladinami. Nejvíce BA vzniká během hlavního kvašení, suroviny jich vnášejí jen málo. Za indikátory kontaminace především mléčnými bakteriemi se považují zvýšené obsahy TY a KAD (Izquierdo-Pulido et al., 1996; Kalač et al., 1997). Obsah TY může být vyšší než 10 mg/l i v nealkoholických pivech, která jsou riziková pro osoby léčené inhibitory MAO.

Pro kvašené zelí se pro 1 kg udávají hodnoty desítky mg HI a TY pro zelí a zejména pro lác, někdy i hodnoty 100 až 200 mg (Mayer et al., 1973; Taylor et al., 1978; Ziegler et al., 1994). Lze předpokládat, že část BA vytéká při tepelných úpravách.

Fermentované výrobky ze sóji, jako jsou omáčka, miso či tempeh, rovněž obsahují různé vysoké hladiny BA v závislosti na složení mikroflóry i podmínkách fermentace.

Metody stanovení

Pro stanovení biogenních aminů byla v minulosti vyvinuta řada analytických postupů. Tyto metody jsou obvykle účelově vypracovány pro typ materiálu, v němž mají být aminy stanoveny.

Kromě vzorků požívatin i krmiv přicházejí v praxi nejčastěji v úvahu vzorky tělních tekutin (v oblasti medicíny i fyziologie). Menší část prací se zabývá výhradně stanovením diaminů a polyaminů, některé řeší pouze analýzu aromatických aminů.

Pro účely potravinářské mají význam především postupy zaměřené na stanovení aromatických a heterocyklických biogenních aminů, či nejlépe na biogenní aminy jako celek, tedy včetně diaminů a polyaminů.

Ke stanovení aminů se nejčastěji používá tenkovrstvá chromatografie (TLC), plynová chromatografie (GC) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).

Stanovení biogenních aminů je poměrně náročné s ohledem na obvykle značné nároky na citlivost a přesnost stanovení a rovněž na nikoli nevýznamný vliv matrice na předseparační kroky.

Dnes jsou již prakticky opuštěny postupy založené na přímém fotometrickém stanovení aminů v požívatinách, hlavně z důvodu malé selektivity stanovení. Svůj význam si však stále udržuje tenkovrstvá chromatografie.

Hlavní předností TLC je její rychlost a cenová nenáročnost. Pro rychlá rutinní stanovení aminů zejména v potravinářské praxi lze tuto metodu doporučit (Gajewska et al., 1991; Shalaby, 1995). Je však nutné mít na paměti,

III. Obsah aminů (mg/l) v evropských (Izquierdo-Pulido et al., 1996) a českých pivech (Kalač et al., 1997)

Biogenní amin	Evropská piva (n = 195)			Česká piva (n = 78)		
	\bar{x}	$s_{\bar{x}}$	x_{\max}	\bar{x}	$s_{\bar{x}}$	x_{\max}
Histamin	1,2	2,4	21,6	0,55	1,08	9,2
Tyramin	6,5	9,0	67,5	6,85	5,19	22,5
2-Fenylethylamin	0,4	0,8	8,3	–	–	–
Tryptamin	0,4	1,0	5,4	1,21	1,46	9,7
Putrescin	4,8	2,3	15,2	8,84	7,06	30,7
Kadaverin	2,4	6,1	39,9	12,9	12,3	49,1
Agmatin	10,5	5,8	40,9	–	–	–
Spermidin	0,7	1,0 6,8	–	–	–	–
Spermin	0,3	0,7	3,9	–	–	–

že předseparace a rovněž derivatizace aminů je i při TLC nezbytná.

Nearomatické biogenní aminy neabsorbují záření v UV/VIS oblasti a bez vhodné derivatizace je není možné detekovat způsoby běžnými v kapalinové chromatografii. Rovněž doprovodné rušivé složky musí být odděleny citlivě volenou předseparací.

Nejobvyklejším předseparačním krokem je vzhledem k bazicitě aminů jejich extrakce ze vzorku zředěnou kyselinou chloristou či trichloroctovou. Pro mléčné výrobky se rovněž osvědčila jednoduchá extrakce metanolem za zvýšené teploty (60 °C) (R e u v e r s , 1986). Jiné postupy doporučují extrakci roztokem citranu sodného, oxyseleni extraktu zředěnou kyselinou trichloroctovou a centrifugační oddělení vysrážených bílkovin (J o o s t e n , O l i e m a n , 1986). Velice podrobný a kvalitně diskutovaný přehled úprav různých potravinových vzorků a variant jejich extrakce podali M o r e t a C o n t e (1996).

Po izolaci aminů ze vzorku následuje zpravidla alkalizace alikvotního podílu extraktu a derivatizace aminů vhodným činidlem zpravidla na bázi chloridů aromatických kyselin.

Nejrozšířenějším derivatizačním činidlem je tzv. dansylchlorid (5-dimethylaminonaftalen-1-sulfonylchlorid). Dansylderiváty lze po HPLC separaci detekovat jak UV/VIS detektorem, tak v případě požadavku vyšší citlivosti stanovení též fluorimetricky. Toto derivatizační činidlo patří bezesporu k nejpoužívanějším a je široce využíváno od konce 70. let do současnosti. Deriváty lze dělit jak na TLC (S h a l a b y , 1995), tak na HPLC (M a l l e e t a l . , 1996; G r e i f e t a l . , 1997). Ve všech třech citovaných pracích se jedná o stanovení aminů v mase a sýrech. Jelikož rozhodující roli hraje předúprava vzorku, lze dansylaci s úspěchem použít také pro všechny typy analyzovaných materiálů (N a k a z a t o e t a l . , 1994).

Nižší stabilita dansylderivátů při jejich uchování v laboratoři a rovněž jejich fotolabilita však vedly některé pracovníky k volbě jiných činidel, např. benzoylchloridu (R e d m o n d , T s e n g , 1979; S l o c u m e t a l . , 1989; K ř í ž e k , 1991) i p-toluensulfonylchloridu (H a y a s h i e t a l . , 1978).

Biogenní aminy lze na reverzní fázi HPLC též separovat nederivatizované, ve formě iontových párů, např. s oktansulfonanem (C h a n g e t a l . , 1985) i heptansulfonanem (R e u v e r s e t a l . , 1986). Po separaci následuje tzv. post-column derivatizace, nejčastěji o-ftaldialdehydem. Tento postup nalezl uplatnění např. při stanovení biogenních aminů v pivu (I z q u i e r d o - P u l i d o e t a l . , 1993), vínu (B u s t o e t a l . , 1995) i mase (H e r n á n d e z - J o v e r e t a l . , 1996).

Ke stanovení aminů v sýrech a čokoládě byla rovněž použita plynová chromatografie. Se stanovením nederivatizovaných aminů se vzhledem k častým problémům s chvostováním píků setkáváme zřídka. Situace je tedy do jisté míry, byť z jiných příčin, podobná HPLC.

Pro sýry a čokoládu vypracovali B a k e r a W o n g (1987) metodu separace aminů na kapilární koloně (SE-54).

Jako derivatizační činidlo použili pentafluorobenzoylchlorid, přičemž výhodou byla možnost ECD detekce. Náplňová kolona (OV-17 s SP-1000) se uplatnila při stanovení aminů v rybím mase (Y a m a k a , S h i o m i , 1989). Jako derivatizační činidlo byl použit etylester kyseliny chlorovodíkové.

Vybrané biogenní aminy lze v poživatinách stanovovat též metodou enzymové imunoanalýzy. Stanovení např. histaminu v sýrech je vysoce selektivní a citlivé (R a u c h e t a l . , 1991).

Kromě patrně nevyužívanější vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi je pro stanovení aminů v poživatinách velmi výhodná práce v režimu ionexové chromatografie. Touto technikou byly úspěšně stanoveny nejběžnější biogenní aminy PUT, KAD,SPM, SPM, AGM, HI a TY (N a k a m u r a , W a d a , 1979; S i m o n - S a r k a d i , H o l z a p f e l , 1994; T r e v i n o e t a l . , 1997). Postup je vysoce vhodný zejména pro pracoviště, vybavená analyzátořem aminokyselin. Při vhodně voleném postupu pak lze kromě aminů stanovit současně široké spektrum aminokyselin.

V posledních letech se intenzivně rozvíjí nová analytická technika – kapilární zónová elektroforéza (CZE). Vzhledem k tomu, že detekce separovaných látek je podobně jako u HPLC založena na absorpci UV záření, je derivatizační krok obvykle nevyhnutelný. Byla popsána metoda stanovení jak alifatických, tak aromatických biogenních aminů derivatizovaných isothiokyanátem fluoresceinu ve vzorcích sójové omáčky (R o d r i g u e z e t a l . , 1996).

Vysokou citlivostí se vyznačuje detekce založená na snímání intenzity laserem indukované fluorescence (LIF) aminových derivátů. Pro vzorky vína ji využili N o u a d j e t a l . (1997).

Pro vzorky poživatin byla rovněž navržena separace aminů derivatizovaných benzoylchloridem. Dělení probíhá v režimu micelární elektrokinetické kapilární chromatografie a doba trvání analýzy polyaminů a aromatických aminů nepřesahuje 35 minut (K ř í ž e k , P e l i k á n o v á , 1998).

Literatura

- ASKAR A., TREPTOW H. (1986): Biogene Amine in Lebensmitteln. Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer: 197 s.
- BAKER G. B., WONG J. T. F. (1987): Simultaneous extraction and quantification of several bioactive amines in cheese and chocolate. *J. Chromatogr.*, 392: 317–331.
- BARDÓCZ S. (1993): The role of dietary polyamines. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 47: 683–690.
- BARDÓCZ S., GRANT G., BROWN D. S., RALPH A., PUSZTAI A. (1993): Polyamines in food – implications for growth and health. *J. Nutr. Biochem.*, 4: 66–71.
- BARTOLOMEW B. A., BERRY P. R., RODHOUSE J. C., GILBERT R. J. (1987): Scombrototoxic fish poisoning in Britain: features of over 250 suspected incidents from 1976–1986. *Epidem. Inf.*, 99, 1987: 775–782.
- BRINK B. ten, DAMINK C., JOOSTEN H. M. L. J., HUIS in't VELD J. H. J. (1990): Occurrence and formation of bio-

- logically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, *11*: 73–84.
- BUSTO O., GUASCH J., BORRULL F. (1995): Improvement of a solid-phase extraction method for determining biogenic amines in wines. *J. Chromatogr. A*, *718*: 309–317.
- CLIFFORD M. N., WALKER R., IJOMAH P., WRIGHT J., MURRAY C. K., HARDY R. (1991): Is there a role for amines other than histamine in the aetiology of scombrototoxicosis? *Food Addit. Contam.*, *8*, 1991: 641–652.
- DAVÍDEK T., DAVÍDEK J. (1995): Biogenic Amines. In: DAVÍDEK J. (Ed.): *Natural Toxic Compounds of Foods. Formation and change during processing and storage*. Boca Raton, Florida, CRC Press: 108–123.
- GAJEWSKA R., LIPKA E., GANOWIAK Z. (1991): Poziom histaminy i tyraminy w wybranych srodkach spozywczych. *Rocz. PZH*, *42*: 1–7.
- GREIF G., GREIFOVÁ M., DRDÁK M. (1997): Stanovenie biogénnych amínov v potravinách živočíšneho pôvodu metódou HPLC. *Potrav. Vědy*, *15*: 119–129.
- HALÁSZ A., BARÁTH Á., SIMON-SARKADI L., HOLZAPFEL W. (1994): Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Technol.*, *5*: 42–49.
- HAYASHI T., SUGIURA T., KAWAI S., OHNO T. (1978): High speed LC determination of putrescine, spermidine and spermine in human urine. *J. Chromatogr.*, *145*: 141–146.
- HERNÁNDEZ-JOVER T., IZQUIERDO-PULIDO M., VECIENA-NOGUES M. T., VIDAL-CAROU M. C. (1996): Ion-pair high-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in meat and meat products. *J. Agric. Food Chem.*, *44*: 2710–2715.
- CHANG S.-F., AYRES J. W., SANDINE W. E. (1985): Analysis of cheese for histamine, tyramine, tryptamine, histidine, tyrosine and tryptophane. *J. Dairy Sci.*, *68*: 2840–2844.
- IZQUIERDO-PULIDO M., VIDAL-CAROU M. C., MERINÉ-FONT A. (1993): Determination of biogenic amines in beers and their raw materials by ion-pair liquid chromatography with postcolumn derivatization. *J. AOAC Int.*, *76*: 1027–1032.
- IZQUIERDO-PULIDO M., HERNÁNDEZ-JOVER T., MARINÉ-FONT A., VIDAL-CAROU M. C. (1996): Biogenic amines in European beers. *J. Agric. Food Chem.*, *44*: 3159–3163.
- JOOSTEN H. M. L. J., OLIEMAN C. (1986): Determination of biogenic amines in cheese and some other foods by HPLC. *J. Chromatogr.*, *366*: 311–318.
- KALÁČ P., HLAVATÁ V., KRÍŽEK M. (1997): Concentrations of five biogenic amines in Czech beers and factors affecting their formation. *Food Chem.*, *58*: 209–214.
- KALÁČ P., KRÍŽEK M. (1997): Formation of biogenic amines in four edible mushroom species stored under different conditions. *Food Chem.*, *58*: 233–236.
- KARMAS E. (1981): Biogenic amines as indicators of seafood freshness. *Food Sci. Technol.*, *17*: 20–23.
- KRÍŽEK M. (1991): The determination of biogenic amines in silage. *Arch. Anim. Nutr.*, *41*: 97–104.
- KRÍŽEK M., PELIKÁNOVÁ T. (1998): Determination of seven biogenic amines in foods by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr. A* (v tisku).
- MALLE P., VALLE M., BOUQUELET S. (1996): Assay of biogenic amines in fish decomposition. *J. AOAC Int.*, *79*: 43–49.
- MAXA E., BRANDES W. (1993): Biogene Amine in Fruchtsäften. *Mitteil. Klosterneuburg*, *43*: 101–106.
- MAYER K., PAUSE G., KUENSCH U., TEMPERLI A. (1973): Analytische Untersuchungen an Sauerkrautsaft. *Mitt. Geb. Lebensm. Hyg.*, *64*: 519–523.
- MORET S., CONTE L. S. (1996): HPLC evaluation of biogenic amines in foods. *J. Chromatogr. A*, *729*: 363–369.
- NAKAMURA M., WADA Y. (1979): Polyamine content in fresh and processed pork. *J. Food Sci.*, *44*: 515–518.
- NAKAZATO M., SAITO K., MOROZUMI S. (1994): Determination of putrefactive non-volatile amines in foods following sample cleanup by solid-phase extraction. *Jap. J. Toxicol. Environ. Health*, *40*: 203–209.
- NOUADJE G., SIMÉON N., DEDIEU F., NERTZ M., PUIG Ph., COUDERC F. (1997): Determination of twenty eight amines and amino acids during wine aging by micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatogr. A*, *765*: 337–343.
- NOUT M. J. R. (1994): Fermented foods and food safety. *Food Res. Int.*, *27*: 291–296.
- RAUCH P., RYCHETSKÝ P., HOCHEL I., VOLDŘICH M., BÍLEK R., GUESDON J. L. (1991): Enzymová imunoanalýza histaminu v poživatinách. *Potrav. Vědy*, *9*: 9–16.
- REDMONT J. W., TSENG A. (1979): HPLC determination of putrescine, cadaverine, spermidine and spermine. *J. Chromatogr.*, *170*: 479–481.
- REUVENS Th. B. A. (1986): A rapid ion-pair HPLC procedure for the determination of tyramine in dairy products. *J. Food Sci.*, *51*: 84–86.
- RODRIGUEZ I., LEE H. K., LI S. F. Y. (1996): Separation of biogenic amines by micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A*, *745*: 255–262.
- SHALABY A. R. (1995): Multidetector, semiquantitative method for determining biogenic amines in foods. *Food Chem.*, *52*: 367–372.
- SHALABY A. R. (1996): Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.*, *29*: 675–690.
- SCHNELLER R., GOOD P., JENNY M. (1997): Influence of pasteurised milk, raw milk and different ripening cultures on biogenic amine concentrations in semi-soft cheeses during ripening. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, *204*: 265–272.
- SILLA SANTOS M. H. (1996): Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, *29*: 213–231.
- SIMON-SARKADI L., HOLZAPFEL W. H. (1994): Determination of biogenic amines in leafy vegetables by amino acid analyser. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, *198*: 230–233.
- SIMON-SARKADI L., HOLZAPFEL W. H., HALÁSZ A. (1994): Biogenic amine content and microbial contamination of leafy vegetables during storage at 5°C. *J. Food Biochem.*, *17*: 407–418.
- SIMS G. G., FRAN G., YORK R. K. (1992): Quality indices for canned skipjack tuna: correlation of sensory attributes with chemical indices. *J. Food Sci.*, *57*: 1112–1115.

- SLOCUM R. D., FLORES H. E., GALSTON A. W. (1989): Improved method for HPLC analysis of polyamines, agmatine and aromatic monoamines in plant tissue. *Plant Physiol.*, **89**: 512–517.
- SLORACH S. A. (1991): Histamine in Food. In: UVNÄS, B. (Ed.): *Histamine and Histamine Antagonists*. Berlin, Heidelberg, Springer Verlag: 511–520.
- STRATTON J. E., HUTKINS R. W., TAYLOR S. L. (1991): Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *J. Food Protect.*, **54**: 460–470.
- STRAUB B. W., KICHERER M., SCHILCHER S. M., HAMMES W. P. (1995): The formation of biogenic amines by fermentation organisms. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, **201**: 79–82.
- TAILOR S. A., SHULMAN K. I., WALKER S. E., MOSS J., GARDNER D. (1995): Hypertensive episode associated with phenelzine and tap beer. A reanalysis of the role of pressor amines in beer. *Psychopharmacol.*, **14**: 5–14.
- TAYLOR S. L. (1986): Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *CRC Rev. Toxicol.*, **17**: 91–128.
- TAYLOR S. L., LEATHERWOOD M., LIEBER E. R. (1978): Histamine in sauerkraut. *J. Food Sci.*, **43**: 1030–1032.
- TIL H. P., FALKE H. E., PRINSEN M. K., WILLEMS M. I. (1997): Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats. *Food Chem. Toxicol.*, **35**: 337–348.
- TREVINO E., BEIL D., STEINHART H. (1997): Determination of biogenic amines in mini-salami during long-term storage. *Food Chem.*, **58**: 385–390.
- YAMAKA H., SHIOMI K. (1989): Cadaverine as a potential index for decomposition of salmonid fish. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **30**: 170–174.
- ZIEGLER W., HAHN M., WALLNÖFER P. R. (1994): Verhalten biogener Amine bei der Zubereitung ausgewählter pflanzlicher Lebensmittel. *Dtsch. Lebensm. Rdsch.*, **90**: 108–112.

Kontaktní adresa:

Doc. Ing. Martin Krížek, CSc., Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, Katedra chemie, 370 05 České Budějovice, Česká republika, tel: + 420 38 467 43, fax: + 420 38 498 69, e-mail: krizek@zf.jcu.cz

Year	Number of articles	in USD	per year
1991	17	177	10.5
1992	19	177	12.5
1993	19	177	12.5
1994	19	177	12.5
1995	12	143	12.0
1996	8	84	8.0
1997	4	38	4.0
1998	4	38	4.0
1999	4	38	4.0
2000	4	38	4.0

INSTITUTE OF AGRICULTURAL AND FOOD INFORMATION

Slezská 7, 120 56 Praha 2, Czech Republic

Fax: + 420 2 24 25 39 38, e-mail: editor@login.cz

In this institute scientific journals dealing with the problems of agriculture and related sciences are published on behalf of the Czech Academy of Agricultural Sciences. The periodicals are published in the Czech or Slovak languages with summaries in English or in English with summaries in Czech or Slovak.

Subscription to these journals be sent to the above-mentioned address.

Journal	Number of issues per year	Yearly subscription in USD	
		Europe	overseas
Rostlinná výroba (Plant Production)	12	177,-	195,-
Czech Journal of Animal Science (Živočišná výroba)	12	177,-	195,-
Zemědělská ekonomika (Agricultural Economics)	12	177,-	195,-
Lesnictví – Forestry	12	177,-	195,-
Veterinární medicína (Veterinary Medicine – Czech)	12	145,-	152,-
Czech Journal of Food Sciences (Potravinařské vědy)	6	84,-	88,-
Zemědělská technika (Agricultural Engineering)	4	56,-	58,-
Plant Protection Science (Ochrana rostlin)	4	56,-	58,-
Czech Journal of Genetics and Plant Breeding (Genetika a šlechtění)	4	56,-	58,-
Zahradnictví (Horticultural Science)	4	56,-	58,-

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The responsibility for the contents of a manuscript rests with the authors. They are strongly advised to get a critical review before submitting a manuscript. The Editorial Board will decide on publication, after considering the manuscripts scientific importance, contribution and quality, and the opinions and reviews by experts.

The manuscript should be typed with a wide margin, double spaced on standard A4 paper. A PC diskette with the complete text and including references, tables and figure legends of graphical documentation should be provided with manuscript, indicating the used editor program.

Manuscript should consist of the following sections: Title page, Abstract, Keywords, an instruction, Materials and Methods, Results, Discussion, References, Tables, Legends to figures.

The Title page must contain a informative title, complete name(s) of the author(s), the name(s) and address(es) of the institution(s) where the work was done, and the telephone, fax and e-mail numbers of the corresponding author.

The **Abstract** shall not exceed 120 words. It should state in short and concise form what was done and how, and should contain basic numerical and statistical data from the results. Keywords follow the abstract; they are ranked from general to specific terms, and are written in lower case letters and separated by semicolons.

The introduction (without a subtitle) should consist of a short review of literature relevant and important for the study. The reason(s) for the work may be included.

In **Materials and Methods**, the description of experimental procedures should be sufficient to allow replication. Abbreviations can be used if necessary; first use of an abbreviation should be just after its complete name or description. The International System of Units (SI) and their abbreviations should be used.

Results should be presented clear and concise.

The **Discussion** should interpret the results, without unnecessary repetition. Sometimes it is possible or advantageous to combine Results and Discussion in one section.

If Acknowledgments are needed, they are next.

References in the text to citations consist of author's name and year of publication. If there are more than two authors, only the first is named, followed by the phrase 'et al.'. The list of References should include only publications quoted in the text. These should be in alphabetical order under the first author's name, citing all authors, year (in brackets), full title of the article, abbreviation of the periodical, volume number, first and last page numbers.

Tables and Figures shall be enclosed separately. Tables are numbered in Roman, Figures in Arabic numerals. Each of them must be referred to in the text. Figures should be restricted to material essential for documentation and understanding of the text. Duplicated documentation of data in both tables and figures is not acceptable. All illustrative material must be of publishing quality. Both line drawing and photographs are referred to as figures. They cannot be redrawn by publisher. Photographs should have high contrast. Each figure should be accompanied by a concise, descriptive legend.

Reprint: Thirty (30) reprint of each paper are supplied free of charge.

POKYNY PRO AUTORY

Autor je plně odpovědný za původnost práce a za její věcnou i formální správnost. O uveřejnění práce rozhoduje redakční rada se zřetelem k lektorským posudkům, vědeckému významu a přínosu i kvalitě práce.

Rukopis (text, tabulky, literatura, abstrakt a závěr) musí být psány s dvojitými mezery mezi řádky na papíru formátu A4. K rukopisu je vhodné přiložit disketu s textem práce, popř. grafickou dokumentaci pořízenou na PC s uvedením použitého programu.

Vědecké práce musí mít toto členění: titulní strana, abstrakt a klíčová slova, krátký přehled literatury (bez nadpisu úvod), materiál a metody, výsledky, diskuse, literatura, tabulky a obrázky včetně popisů.

Titulní strana musí obsahovat název práce, plné jméno autorů, název a adresu instituce, kde byla práce dělána, akademické, vědecké a pedagogické tituly, číslo telefonu a faxu a e-mail adresu kontaktního autora.

Souhrn musí vyjádřit všechno podstatné, co je obsaženo ve vědecké práci, má obsahovat základní číselné údaje včetně statistických hodnot. Nemá překročit 120 slov. Klíčová slova (KEY words, index terms) se připojují po vynechání řádku pod souhrn. Řadí se směrem od obecnějších výrazů ke konkrétním; začínají malým písmenem a oddělují se středníkem.

Materiál a metody: Model pokusu musí být popsán podrobně a výstižně. Popis metod by měl umožnit, aby kdokoli z odborníků mohl práci opakovat. Metody se popisují pouze tehdy, jsou-li původní. Zkratky jsou používány jen pokud je to nutné; první použití zkratky musí být uvedeno úplným popisem nebo vysvětlením. V názvu práce a v souhrnu je vhodné zkratky nepoužívat. Používané měrové jednotky musí odpovídat soustavě měrových jednotek SI.

Výsledky: Doporučuje se nepoužívat k vyjádření kvantitativních hodnot tabulek a dát přednost grafům, anebo tabulky shrnout v statistickém hodnocení naměřených hodnot. Tato část práce by neměla obsahovat teoretické závěry ani dedukce, ale pouze faktické nálezy.

Diskuse obsahuje zhodnocení práce. Je přípustné spojení s předchozí kapitolou (Výsledky a diskuse).

Literatura: Odkazy na literaturu v textu se provádějí uvedením jména autora a roku vydání publikace. Při větším počtu autorů se v textu uvádí první z nich a za jméno se doplní zkratka „et al.“. V části Literatura se uvádějí jen práce citované v textu. Citace se řadí abecedně podle jména prvního autora: příjmení (verzálkami), zkratka jména, rok vydání (v závorce), plný název práce, úřední zkratka časopisu, ročník, první–poslední stránka; u knih je uvedeno místo vydání a vydavatel.

Tabulky a obrázky: Tabulky, obrázky a fotografie se dodávají zvlášť a všechny musí být citovány v práci. Akceptovány budou jen obrázky, které jsou nezbytné pro dokumentaci výsledků a umožňují pochopení textu. Není přípustné dokumentovat výsledky jak v tabulkách, tak na grafech. Všechny ilustrativní materiály musí mít kvalitu vhodnou pro tisk. Fotografie i grafy jsou v textu uváděny jako obrázky a musí být průběžně číslovány. Každý obrázek musí mít stručný a výstižný popis.

Separáty: Autor obdrží zdarma 30 separátních výtisků práce.

CONTENTS

Ostrý V., Ruprich J.: The occurrence of fumonisins in corn-based commodities in the Czech Republic	117
Jarošová A., Gajdůšková V., Raszyk J., Ševela K.: Determination of phthalic acid esters (PAEs) in biological materials by HPLC	122
Staruch L., Čertík M., Greif G., Šajbidor J.: Lipid changes in fermented meat products during ripening with and without liquid smoke addition	131
Erbán V., Černý V.: Use of prediction microbiology for "Determination of critical points" and in food hygiene (in Czech)	135
Houšová J., Hoke K., Dobiáš J.: A relation between the heat effect of metallized films for microwave heating and the degree of their metallization (in Czech)	143
REVIEW	
Křížek M., Kalač P.: Biogenic amines in foods and their roles in human nutrition (in Czech)	151

OBSAH

Ostrý V., Ruprich J.: Výskyt fumonisinů v potravinách na bázi kukuřice v České republice	117
Jarošová A., Gajdůšková V., Raszyk J., Ševela K.: HPLC stanovení esterů kyseliny ftalové (PAE) v biologických materiálech	122
Staruch L., Čertík M., Greif G., Šajbidor J.: Změny lipidů v fermentovaných masových produktech počas zrenia s a bez pridania tekutého udiaceho preparátu	131
Erbán V., Černý V.: Možnosti využití předpovědní mikrobiologie při „Stanovení kritických bodů“ a v hygieně potravin	135
Houšová J., Hoke K., Dobiáš J.: Závislost tepelného efektu metalizovaných fólií pro mikrovlnný ohřev na stupni jejich pokovení	143
REVIEW	
Křížek M., Kalač P.: Biogenní aminy v potravinách a jejich role ve výživě	151