

Zeitschrift:	Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène
Herausgeber:	Bundesamt für Gesundheit
Band:	81 (1990)
Heft:	1
Artikel:	Beitrag zur Bestimmung biogener Amine in Käse : Vergleich einer verbesserten HPLC- mit einer IC-Methode und Anwendung bei verschiedenen Käsesorten = Contribution to the determination of biogenic amines in cheeses : comparison of a HPLC- and an IC-metho...
Autor:	Bütikofer, U. / Fuchs, Doris / Hurni, D.
DOI:	https://doi.org/10.5169/seals-982605

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 25.01.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Beitrag zur Bestimmung biogener Amine in Käse Vergleich einer verbesserten HPLC- mit einer IC-Methode und Anwendung bei verschiedenen Käsesorten

Contribution to the Determination of Biogenic Amines in Cheeses
Comparison of a HPLC- and an IC-Method and Application
to Several Cheeses

U. Bütkofer, Doris Fuchs, D. Hurni und J. O. Bosset
Eidgenössische Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Liebefeld-Bern

Einleitung

Die in Käse vorkommenden biogenen Amine, wie z. B. Tryptamin, β -Phenylethylamin, Isopentylamin, Putrescin, Cadaverin, Histamin und Tyramin, entstehen durch Decarboxylierung aus den entsprechenden freien Aminosäuren, durch Aminierung stickstofffreier Stoffwechselprodukte oder durch hydrolytische Spaltung stickstoffhaltiger Verbindungen (1). Ihre hypo- oder hypertonische Wirkung bei sehr hohen Konzentrationen sind bekannt (2, 3). Auswirkungen auf den Organismus sind z. B. allgemeine Rötung der Haut, Jucken, Schwindel, Migräne, Kopfweh, Magenbeschwerden, Erbrechen und Diarrhöe. Die rasche und quantitative Bestimmung dieser Amine ist deshalb für die Nahrungsmittelindustrie von besonderem Interesse. Ein ausführlicher Übersichtsartikel über die Bedeutung und Analytik biogener Amine in Lebensmitteln (4) zeigt den aktuellen Wissensstand. Eingehend wurden solche Verbindungen in Wein (5) untersucht.

Für die Bestimmung der erwähnten biogenen Amine eignet sich besonders eine Vorsäulenderivatisierung mit anschliessender HPLC-Trennung (5). Mehrere Autoren schlagen eine Vorsäulenderivatisierung mit OPA (ortho-Phthaldialdehyd) vor (6–12). Eigene Versuche (13) haben gezeigt, dass die zu grosse Instabilität des OPA-Histaminderivates eine quantitative Bestimmung von Histamin nicht zulässt. Bei der Vorsäulenderivatisierung mit Dansychlorid (5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonylchlorid) (14–19) wurde eine deutlich bessere Auf trennung der Aminderivate erzielt. Eine von Etter et al. (20) kürzlich entwickelte HPLC-Methode zur Bestimmung solcher Komponenten ist für die Aufnahme in das schweizerische Lebensmittelbuch vorgesehen. Die vorliegende Arbeit schlägt einige wichtige Verbesserungen der vorher erwähnten Methode vor und ver-

gleicht sie mit einer ionenchromatographischen Routinemethode (21). Weitere bekannte Käsesorten wurden mit der neuen HPLC-Methode auf ihren Gehalt an biogenen Aminen untersucht (Maximal- und Medianwerte).

Experimenteller Teil

Probenwahl

Die für diese Arbeit verwendeten reifen Käseproben entstammen alle dem Detailhandel der Schweiz.

Die verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1. Chemikalien

Substanz	Abk.	Hersteller	Qualität
Tryptamin-hydrochlorid	TRY	Calbiochem	(A Grade)
β-Phenylethylamin	PHA	Fluka	puriss.
Isopentylamin	ISO	Merck	zur Synthese
Putrescin-dihydrochlorid	PUT	Calbiochem	(A Grade)
Cadaverin	CAD	Fluka	purum
Histamin-dihydrochlorid	HIT	Calbiochem	(B Grade)
1,7-Diaminoheptan	IS*	Fluka	purum
Tyramin-hydrochlorid	TYA	Calbiochem	(B Grade)
Spermidin-trihydrochlorid	SPD	Fluka	puriss.
Spermin-tetrahydrochlorid	SPM	Fluka	puriss.
4-Azaheptamethylendiamin	IS*	Merck	zur Synthese
Dansylchlorid		Fluka	puriss.
Natrium-L-Glutaminat		Fluka	purum
Natriumcarbonat wasserfrei		Merck	zur Analyse
Perchlorsäure 70%		Merck	zur Analyse
Trichloressigsäure		Merck	zur Analyse
tri-Natriumcitrat-di-hydrat		Merck	für Aminosre.ana
Natriumchlorid		Merck	zur Analyse
Natriumhydroxid		Merck	zur Analyse
Brij 35		Merck	zur Analyse
Pentachlorphenol		Merck	zur Synthese
Salzsäure rauchend		Merck	zur Analyse
Schwefelsäure		Merck	zur Analyse
Essigsäure		Merck	zur Analyse
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan	TRIS	Fluka	BioChemika
Ethylacetat		Merck	zur Synthese
Aceton		Merck	zur Analyse
Ethanol		Merck	zur Chromatogr.
Acetonitril		Fluka	zur Chromatogr.
deionisiertes Wasser		Millipore	Milli-Q

* Interner Standard.

Apparate für die Probenvorbereitung

Heraeus Zentrifuge Typ Labofuge A

Sorvall Mixer

Büchi Rotavapor Typ RE 121

Geräte für die HPLC-Bestimmung

Die HPLC-Bestimmung der dansylierten biogenen Amine wurde mit einem HPLC-Gerät von Hewlett Packard Typ HP 1090 mit binärem Gradientensystem DR5, integriertem Säulenofen und gekühltem Autosampler durchgeführt. Die Detektion erfolgte in Serie mit einem Fluoreszenz-Detektor Typ HP 1046 und einem UV-Diodenarray-Detektor HP 1040.

Geräte für die ionenchromatographische Bestimmung

Die ionenchromatographische Trennung der biogenen Amine erfolgte mit einem umgebauten Beckman-Spinco-Aminosäureanalysator mit Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung und UV-Detektion bei 570 und 440 nm mit einem Biotronik 2020-Photometer.

Analysenmethoden

HPLC-Bestimmung der biogenen Amine

Die HPLC-Bestimmung wurde nach einigen wichtigen Verbesserungen an der vorher erwähnten provisorischen Methode (20) für das schweizerische Lebensmittelbuch durchgeführt. Die Methodenänderungen sind im Text kursiv gedruckt.

5,0 g Käseprobe wurden zusammen mit 500 µl Diaminoheptanlösung (1000 mg/l) als interner Standard, 25 ml Acetonitril und 25 ml Perchlorsäurelösung (0,2 mol/l) in einen 100-ml-Mixbecher gegeben. Während mindestens 1 min wurde das Gemisch mit einem Sorvall-Mixer oder mit einem Stabhomogenisator behandelt. 10 ml des Gemisches wurden während 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert. 200 µl des klaren Überstandes wurden entnommen und zusammen mit 800 µl Acetonitril, 700 µl deionisiertem Wasser und 200 µl Natriumcarbonatlösung (0,2 g/ml) in einem 10-ml-Reagenzglas gut vermischt. Vorsichtig wurden 100 µl Dansylchloridlösung (50 mg/ml) in Aceton direkt in die Lösung zugegeben. *Die klare, orange Dansylchloridlösung darf nicht an der Glaswand ablaufen, da sonst die UV-Detektion des Putrescindansylates durch überschüssiges Dansylchlorid überlagert wird. Dansylchlorid löst sich fast vollständig auf (sehr wenig unlösliche Anteile).*

Die gelbe Lösung wurde während 30 min unter gelegentlichem Rühren bei 40 °C im Dunkeln stehengelassen. *Die Lösung muss gelb bleiben. (Auf die zweite Zu-*

gabe von Dansylchloridlösung wurde bewusst verzichtet.) 200 µl Natrium-L(+)-glutaminat (50 mg/ml) wurden zugegeben, um überschüssiges Dansylchlorid aufzubrauchen. Die Lösung wurde 1 h im gleichen Wasserbad unter gelegentlichem Umrühren stehengelassen. Die praktisch farblose Lösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, mit 1 ml Ethylacetat intensiv vermischt und anschliessend während 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Mit einer Eppendorffpipette wurde vorsichtig 1 ml der Ethylacetatphase entnommen und in einen 25-ml-Spitzkolben überführt. Am Rotavapor wurde das Ethylacetat bei max. 40 °C unter Wasserstrahlvakuum vollständig entfernt. 200 µl Acetonitril wurde zugegeben und kurz im Ultraschallbad behandelt. Die Lösung wurde 15 min stehengelassen und durch ein 0,45 µm ACRO LC13-Filter (Gelman, SKAN AG, Basel) klarfiltriert. Die so vorbereitete, leicht gelbliche Lösung soll spätestens am nächsten Tag mit HPLC bestimmt werden. Wenn nötig kann sie über Nacht im Kühlschrank gelagert werden.

Für die Bestimmung wurden 5,0 µl der filtrierten Lösung eingespritzt. Die chromatographische Trennung wurde auf einer 5 µm Hypersil ODS C₁₈ Trennsäule mit den Dimensionen 200 × 4,6 mm und einer Säulentemperatur von 35 °C durchgeführt. Die HPLC-Bestimmung erfolgte bei einem Fluss der mobilen Phase von 1,40 ml/min.

Die Detektion erfolgte im UV bei 254 nm (Referenzwellenlänge 400 nm). Der Fluoreszenzdetektor hatte die folgende Einstellung: Anregungswellenlänge 254 nm, Emissionswellenlänge 485 nm, Gain 13, Response time 2 s und Cut off filter 370 nm.

Der Gradient wies die folgenden Parameter auf:

Zeit	Eluent A	Eluent B
0 min	95%	5%
20 min	37%	63%
21 min	0%	100%
27 min	0%	100%
28 min	95%	5%
30 min	95%	5%

Die Eluenten setzten sich wie folgt zusammen:

Eluent A

- 30 ml Puffer pH 8 (0,1 mol/l Tris-(hydroxymethyl)aminomethan, 0,1 mol/l Essigsäure und deionisiertes Wasser: 2:1:2)
- 200 ml Ethanol
- 470 ml deionisiertes Wasser
- 300 ml Acetonitril

Eluent B

- 2,0 ml Puffer pH 8 (wie Eluent A)
- 450 ml Ethanol
- 100 ml deionisiertes Wasser
- 450 ml Acetonitril

Die ionenchromatographische Bestimmung der biogenen Amine

1,00 g geriebener Käse wurde in einen 100-ml-Mixerbecher eingewogen. 20,0 ml Extraktionslösung (siehe nächster Abschnitt) wurden zugegeben und das Gemisch während 1 min mit dem Sorvall-Mixer auf Stufe 6 homogenisiert. 10 ml der homogenisierten Probe wurden in zwei 10-ml-Zentrifugengläser verteilt und 10 min bei 4500 U/min zentrifugiert. 8 ml des klaren Überstandes wurden mit einer 0,45- μm -Membrane filtriert.

100 μl dieser Lösung wurden über eine Einspritzschlaufe in das System eingespritzt. Die Trennung erfolgte auf einer Trennsäule mit DC-6A Harz (Sarasin, Basel) mit den Dimensionen 85×5 mm bei einer Säulentemperatur von 65 °C und einem konstanten Pufferfluss von 26 ml/h. Die Detektion erfolgte bei 570 und 440 nm nach Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin bei einem Durchfluss von 14 ml/h. Das Trennprogramm lief während 32 min mit Puffer I und anschliessend während 50 min mit Puffer II. Zur Regenerierung und Konditionierung der Säule wurde während 20 min mit 0,2 mol/l Natronlauge und danach während 30 min mit Puffer I gearbeitet.

Extraktionslösung

50,0 g Trichloressigsäure und 1,00 ml 4-Azaheptamethylen-diaminlösung (Internaler Standard, 10 mmol/l) in einem 1-l-Messkolben mit deionisiertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Puffer I

98 g tri-Natriumcitrat-2-hydrat
292 g Natriumchlorid
250 ml Ethanol
5,0 ml 30%ige Brij-35-Lösung
1,0 ml Pentachlorphenollösung 0,5%
mit deionisiertem Wasser bis 5 l aufgefüllt, der pH-Wert wird gleichzeitig mit rauchender Salzsäure auf 5,65 korrigiert.

Puffer II

98 g tri-Natriumcitrat-2-hydrat
759 g Natriumchlorid
250 ml Ethanol
5,0 ml 30%ige Brij-35-Lösung
1,0 ml Pentachlorphenollösung 0,5%
mit deionisiertem Wasser bis 5 l aufgefüllt, der pH-Wert wird gleichzeitig mit rauchender Salzsäure auf 5,65 korrigiert.

Resultate und Diskussion

Der erste Teil dieses Abschnittes behandelt die analytische Auswertung und Überprüfung der vorgeschlagenen HPLC-Methode. Der zweite Teil diskutiert die HPLC-Messwerte, erhalten aus einem kleinen Screening-Test (Median- und Maximalwerte) mit 12 verschiedenen in- und ausländischen Käsesorten.

Chromatographische Auftrennung

Die HPLC-Trennung der biogenen Amine einer Käseprobe (Blaukäse) und des entsprechenden Aminstandardgemisches (je 100 ng/ μ l) ist aus Abbildung 1 ersichtlich (Oben: Fluoreszenzdetektion Ex: 254 nm, Em: 485 nm; unten: UV-Detektion bei 254 nm).

Abbildung 2 zeigt die IC-Trennung der biogenen Amine einer ähnlichen Käseprobe und ihres entsprechenden Aminstandardgemisches (je 50 nmol/ml) nach Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin und photometrischer Bestimmung bei 570 nm.

Die bei der HPLC-Bestimmung nach ca. 1 min und 6 min auftretenden Blindwert-Peaks stammen aus der Reaktion von Dansylchlorid mit den zur Derivatisierung verwendeten Reagenzien.

Wenn der Überschuss von Dansylchlorid mit Natrium-L-Glutaminat nicht quantitativ zerstört wurde, resultierte nach ca. 12 min ein zusätzlicher Peak, der die Bestimmung von Putrescin im UV zum Teil verunmöglichte. Es ist deshalb besonders wichtig, die Derivatisierung der Amine genau nach der angegebenen Vorschrift auszuführen.

Linearität

Der lineare Messbereich sämtlicher Amine wurde mit UV- und Fluoreszenzdetektion durch Einspritzen verschieden konzentrierter Standardgemische bestimmt. Für alle geprüften Amine wurden für Konzentrationen bis zu 1 g/kg Korrelationskoeffizienten grösser als 0,999 erhalten ($n = 18$). Wegen Interferenzen konnte von Spermin nur das Fluoreszenzsignal ausgewertet werden.

Nachweisgrenzen der HPLC- und IC-Bestimmung

Eine Aufstellung der berechneten Nachweisgrenzen aller untersuchten biogenen Amine für beide Detektionssysteme und Analysenmethoden befindet sich in Tabelle 2. Im Vergleich mit der UV-Detektion ergibt sich für die meisten Amine eine um Faktor 5–10 tiefere Nachweisgrenze für den Fluoreszenzdetektor, ausser für Tyramin (gleiche Empfindlichkeit) und Histamin (4mal schlechtere Empfindlichkeit).

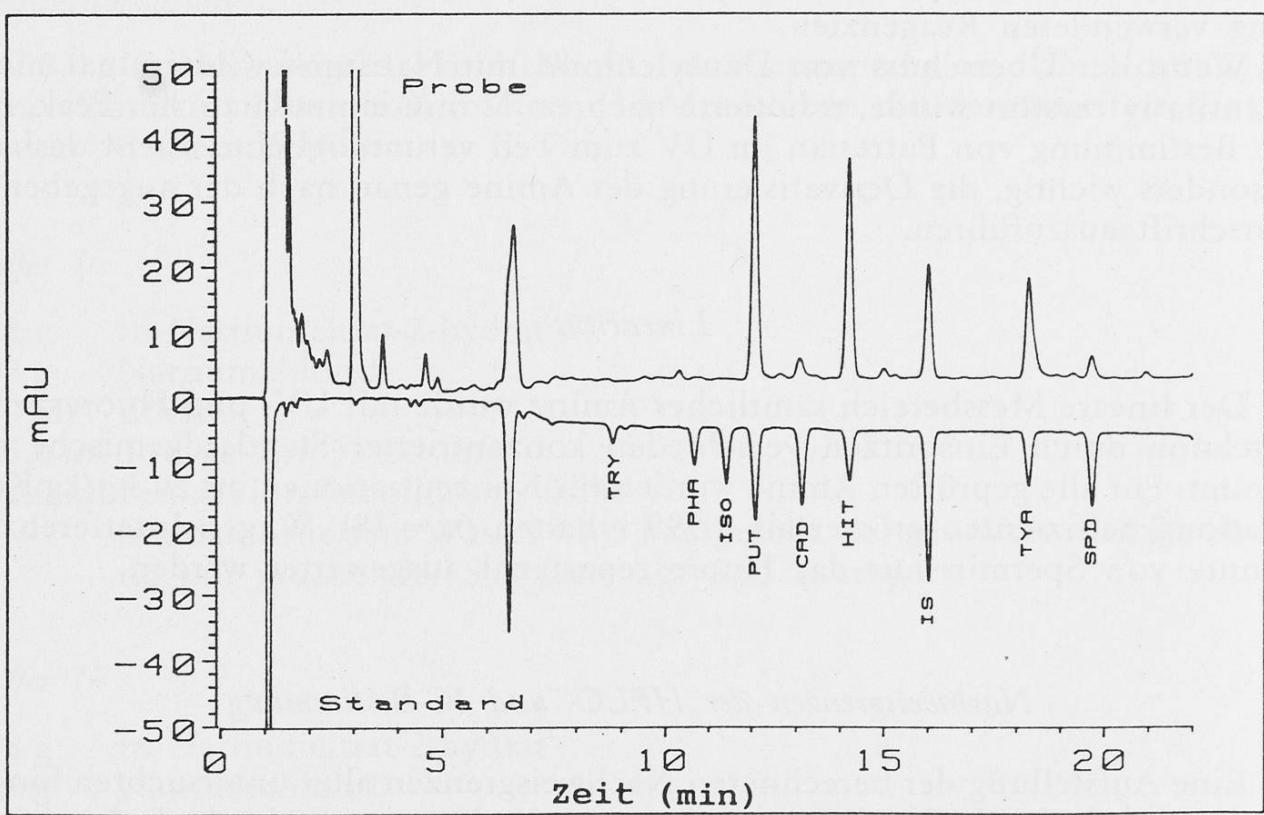
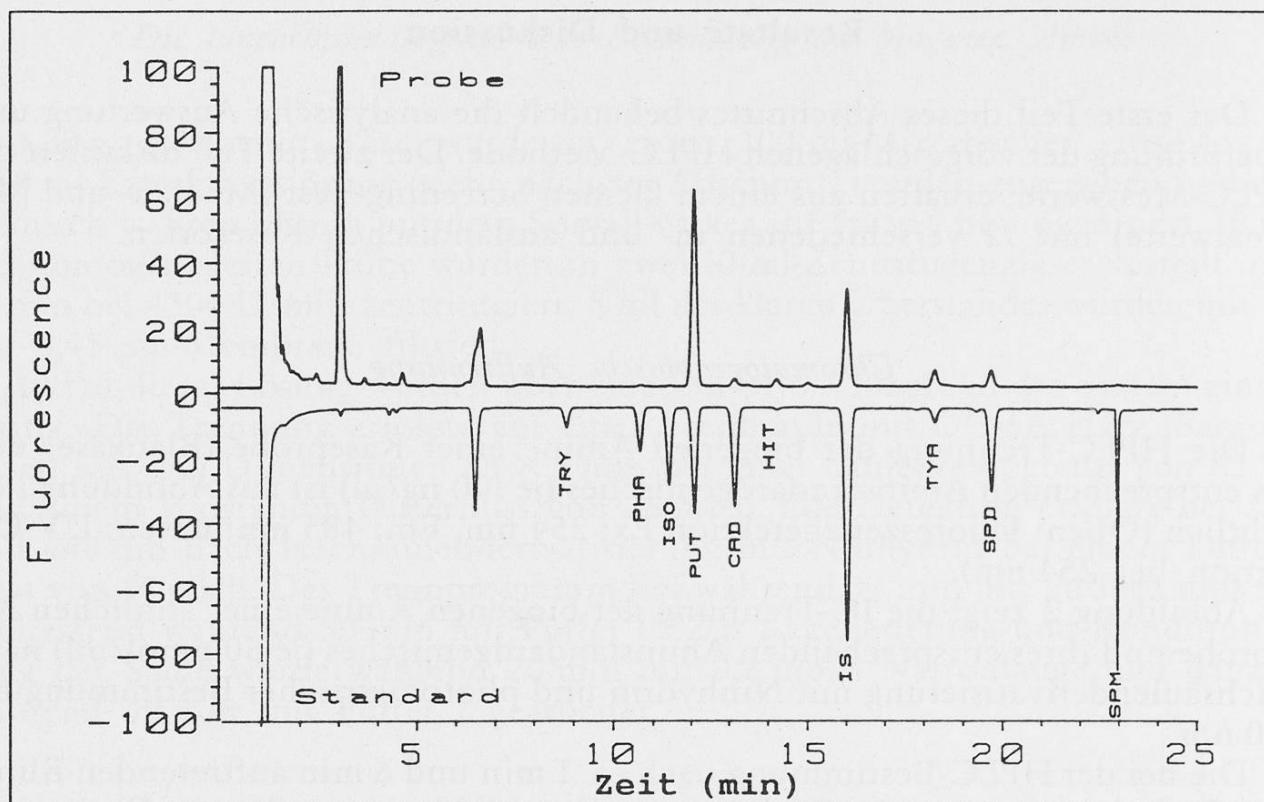


Abb. 1. HPLC-Bestimmung von biogenen Aminen in Standardgemisch und Käseprobe mit UV-Detektion bei 254 nm und Fluoreszenzdetektion Ex: 254 nm; Em: 485 nm nach Vorsäulenderivatisierung mit Dansylchlorid (Abkürzungen in Tabelle 1)

Wiederholbarkeit

Die Standardabweichung der Wiederholbarkeit S_r der HPLC-Bestimmung wurde anhand von Doppelbestimmungen der Standardlösungen wie folgt berechnet und ist in Tabelle 3 aufgeführt:

$$S_r = \sqrt{\frac{1}{2n} * \sum_{j=1}^n d_j^2}$$

Tabelle 2. Nachweisgrenzen einiger biogener Amine in Käse mittels HPLC- und IC-Bestimmung

Biogenes Amin	Nachweisgrenze ¹ (HPLC-Bestimmung)		Nachweisgrenze ¹ (IC-Bestimmung)
	UV 254 nm	Fluoreszenz	
Tryptamin	5 mg/kg	1 mg/kg	nb
β -Phenylethylamin	5 mg/kg	1 mg/kg	8 mg/kg
Isopentylamin	5 mg/kg	0,5 mg/kg	4 mg/kg
Putrescin	5 mg/kg	0,5 mg/kg	1 mg/kg
Cadaverin	5 mg/kg	0,5 mg/kg	1 mg/kg
Histamin	5 mg/kg	20 mg/kg	2 mg/kg
Tyramin	5 mg/kg	5 mg/kg	8 mg/kg
Spermidin	5 mg/kg	1 mg/kg	nb
Spermin	nb	1 mg/kg	nb

¹ Berechnet als Signal/Rauschen: 3/1

nb = nicht bestimmt

Tabelle 3. Wiederholbarkeit der HPLC-Bestimmung mit UV- und Fluoreszenz-Detektion

Biogenes Amin	Standardabweichung der Wiederholbarkeit bei einer Konzentration von 100 mg/kg in Wasser	
	UV 254 nm	Fluoreszenz
Tryptamin	8 mg/kg	4 mg/kg
β -Phenylethylamin	15 mg/kg	8 mg/kg
Isopentylamin	9 mg/kg	10 mg/kg
Putrescin	2 mg/kg	3 mg/kg
Cadaverin	4 mg/kg	3 mg/kg
Histamin	4 mg/kg	5 mg/kg
Tyramin	5 mg/kg	5 mg/kg
Spermidin	5 mg/kg	5 mg/kg
Spermin	nb	5 mg/kg

nb = nicht bestimmt

Vergleich der HPLC- mit der IC-Methode

Der Vergleich der beiden Methoden wurde an folgenden 5 biogenen Aminen durchgeführt: Cadaverin, Histamin, β -Phenylethylamin, Putrescin und Tyramin. In den untersuchten Käseproben ist β -Phenylethylamin nicht oder nur in sehr tiefen Konzentrationen enthalten. Abbildung 3 zeigt die sehr gute Übereinstimmung der beiden Methoden über den gesamten Konzentrationsbereich für die Amine Putrescin, Cadaverin, Histamin und Tyramin. Die berechneten Korrelationskoeffizienten sind alle grösser als 0,99, ausser für β -Phenylethylamin $r = 0,92$ wegen schwieriger Integration bei der IC (siehe Abb. 2).

Eine statistische Auswertung der Übereinstimmung der beiden Bestimmungsmethoden wurde aufgrund der entsprechenden Regressionsgeraden (HPLC-Messwert als Abszissenwert, IC-Bestimmung als Ordinatenwert) ausgeführt (22). Aus den zugehörigen F-Tests ($F_{\alpha} = 0$ und $F_{\beta} = 1$) können mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% folgende Aussagen gemacht werden (Tabelle 4):

- sämtliche Steilheiten β der Regressionsgeraden sind statistisch nicht von 1 verschieden;
- sämtliche Nullpunktordinaten α sind statistisch nicht von Null verschieden.

Daraus können die folgenden Schlüsse gezogen werden:

Beide Methoden sind frei von Artefakten und systematischen Fehlern.

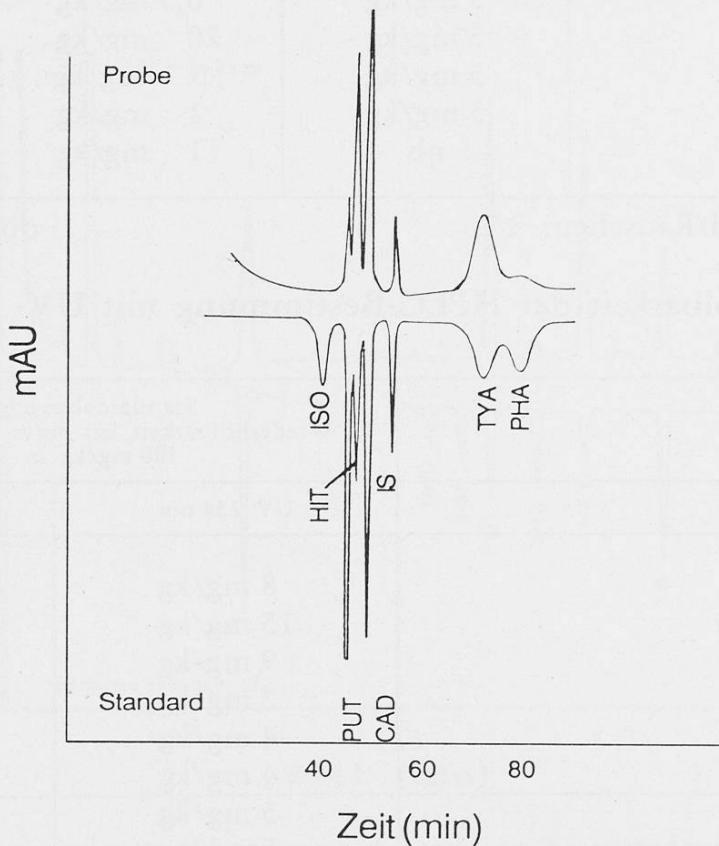


Abb. 2. IC-Bestimmung von biogenen Aminen in Standardgemisch und Käseprobe mit UV-Detektion bei 254 nm nach Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin (Abkürzungen in Tabelle 1)

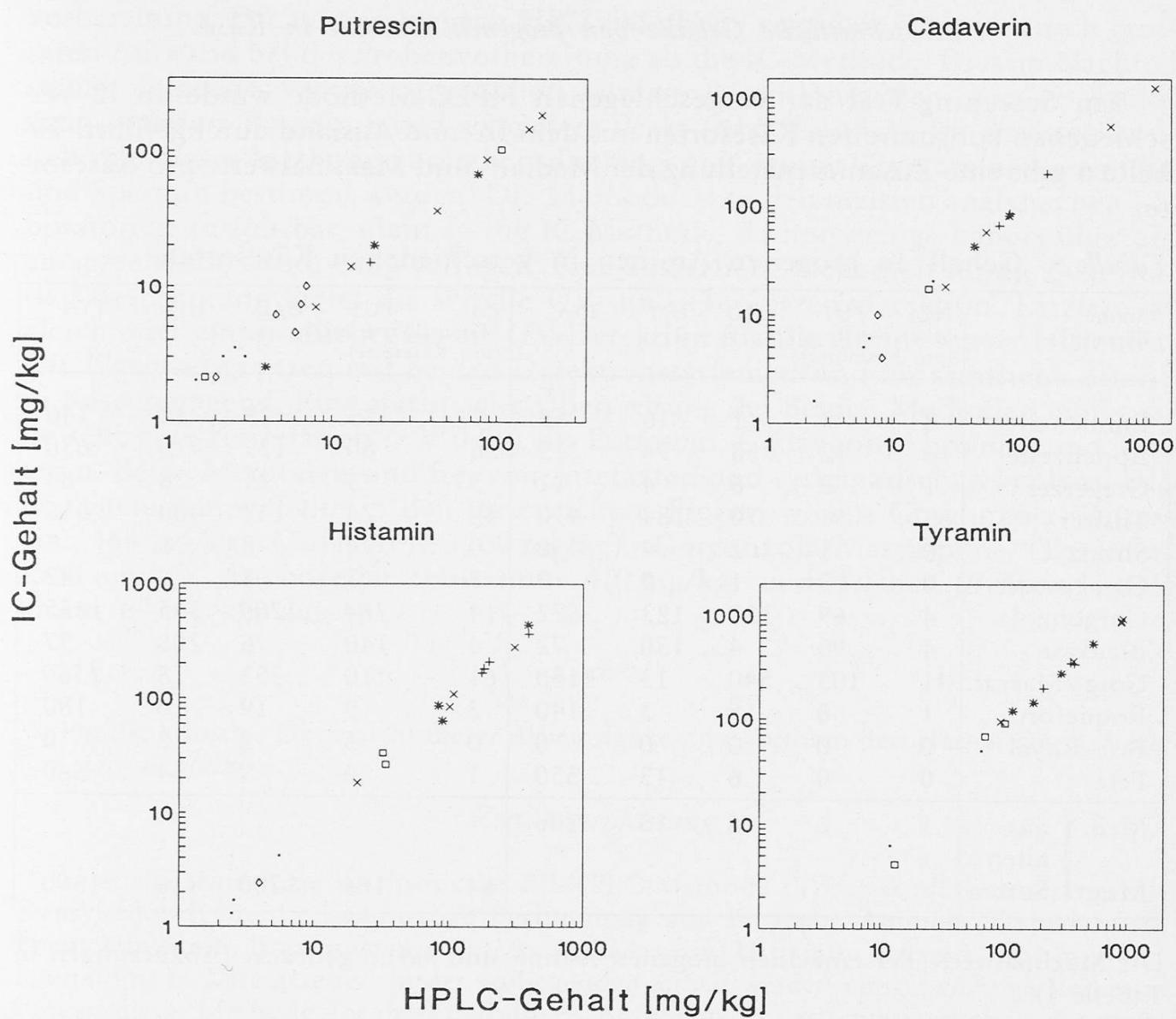


Abb. 3. Vergleich der HPLC- und der IC-Bestimmung der biogenen Amine Putrescin, Cadaverin, Histamin und Tyramin

• Greyerzer	+ Tilsiter	* Appenzeller
□ Emmentaler	x Gorgonzola	◊ Camembert

Tabelle 4. Übereinstimmung der HPLC- und IC-Methode

Biogene Amine	Anzahl Proben	Korrelationskoeffizient r	Testgrößen für F-Test		
			$F (\alpha = 0)$	$F (\beta = 1)$	Tab. $P = 95\%$
Cadaverin	20	0,999	0,67	4,12	4,41
Histamin	18	0,992	0,83	0,01	4,49
β -Phenylethylamin	5	0,918	0,52	0,41	10,13
Putrescin	23	0,998	0,02	3,05	4,34
Tyramin	17	0,999	1,27	1,27	4,55

Durchschnittliche Gehalte von biogenen Aminen in Käse

Ein Screening-Test der vorgeschlagenen HPLC-Methode wurde an 12 verschiedenen konsumreifen Käsesorten aus dem In- und Ausland durchgeführt. Tabelle 5 gibt eine Zusammenstellung der Median- und Maximalwerte pro Käsesorte.

Tabelle 5. Gehalt an biogenen Aminen in verschiedenen Käsesorten

Amine Käsesorte	PHA Medianwerte mg/kg, n = 3 (pro Käsesorte)	PUT	CAD	HIT	TYA	PHA Maximalwerte mg/kg, n = 3 (pro Käsesorte)				
Emmentaler	2	2	1	16	65	7	113	19	34	140
Appenzeller	16	12	58	94	315	26	80	127	410	650
Greyerzer	1	2	6	4	11	3	3	21	6	88
Tilsiter	53	11	70	184	410	64	24	147	400	510
Sbrinz	0	1	2	4	0	0	4	8	6	5
Camembert	0	3	1	0	0	2	7	8	6	22
Gorgonzola	4	69	120	123	822	14	164	1200	335	1255
Blaukäse	4	90	4	130	72	4	140	6	208	97
Gorg./Mascar.	41	103	540	13	1150	61	110	553	18	1560
Roquefort	1	8	15	3	140	2	9	19	4	180
Brie Royal	0	0	0	0	0	0	5	2	2	0
Feta	0	0	6	13	550	1	0	7	14	560
Med. } aus all. Sorten	1	6	6	13	106					
Max. } Sorten						64	164	1200	410	1560

Die Maximalwerte der einzelnen biogenen Amine sind *kursiv* gedruckt (Abkürzungen in Tabelle 1).

Die untersuchten Käsesorten wiesen grosse Gehaltsunterschiede auf. Auch innerhalb der Käsesorten sind grosse Streuungen feststellbar. Die höchsten Amingehalte sind in den Sorten Gorgonzola und Gorgonzola/Mascarpone gefunden worden. Von den in der Schweiz produzierten Käsesorten wiesen die beiden Käsesorten Appenzeller und Tilsiter mittelhohe Aminkonzentrationen auf.

Die Unterschiede in den Amingehalten sind auf unterschiedliche Proteolysen in den entsprechenden Käsesorten zurückzuführen.

Schlussfolgerung

Die in dieser Arbeit beschriebene HPLC-Methode weist gegenüber der ursprünglichen Version (20) folgende Vorteile auf: kein Artefakt bei der UV-Bestimmung von Putrescin, Zeitersparnis bei der Probenvorbereitung, genau definierte Fluoreszenz-Parameter und Hinweis auf visuelle Kriterien bei der Proben-

vorbereitung. Die vorgeschlagene HPLC-Methode erfordert einen deutlich grösseren Aufwand bei der Probenvorbereitung als die IC-Methode. Diesem Nachteil stehen folgende Vorteile gegenüber: kürzere Retentionszeiten, bessere Auflösung, stabilere Basislinie und schmalere Peaks (Abb. 1 und 2). Im weiteren können mit dieser Methode zusätzlich die biogenen Amine Tryptamin, Spermidin und Spermin bestimmt werden. Die Methode ist in den meisten analytischen Laboratorien ausführbar, nicht so die IC-Methode, da nur wenige Labors über die entsprechende Ausrüstung verfügen. Eine zusätzliche Sicherheit für die quantitative Bestimmung bietet die serielle UV- und Fluoreszenzdetektion. Letztere ist gleich oder empfindlicher als die UV-Detektion für alle Amine ausser Histamin. Die Nachweisgrenzen mit beiden Detektionssystemen sind für sämtliche Amine in Käse genügend. Eine statistische Überprüfung der beiden Methoden ergibt eine sehr gute Korrelation ($r > 0,99$) für Putrescin, Cadaverin, Histamin und Tyramin. Beide Methoden sind frei von Artefakten und systematischen Fehlern. Die höchsten Amingehalte in den untersuchten Proben wiesen Gorgonzola (Putrescin: 164 mg/kg, Cadaverin: 1200 mg/kg), Gorgonzola/Mascarpone (Tyramin: 1560 mg/kg), Appenzeller (Histamin: 410 mg/kg) und Tilsiter (β -Phenylethylamin: 64 mg/kg) auf.

Dank

Für die kritische Durchsicht dieser Arbeit danken die Autoren den Herren Dr. R. Sieber und Dr. E. Flückiger.

Zusammenfassung

Es wurde eine neue provisorische RP-HPLC-Methode (Vorsäulenderivatisierung mit Dansylchlorid) für die quantitative Bestimmung von biogenen Aminen (Tryptamin, β -Phenylethylamin, Isopentylamin, Putrescin, Cadaverin, Histamin, Tyramin, Spermin und Spermidin) in Käse getestet. In der vorliegenden Arbeit werden einige wichtige Verbesserungen dieser Methode vor ihrer definitiven Aufnahme in das schweizerische Lebensmittelbuch vorgeschlagen und analytisch belegt. Folgende analytische Parameter wurden bestimmt: Linearität des Messbereiches, Nachweisgrenzen mit UV- und Fluoreszenz-Detektion und Wiederholbarkeit. Ein statistischer Vergleich mit einer ionenchromatographischen Methode (Bestimmung nach Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin) ergab eine sehr gute Übereinstimmung ($r > 0,99$) für alle überprüften biogenen Amine ausser β -Phenylethylamin ($r = 0,92$). Beide Methoden sind frei von Artefakten und systematischen Fehlern. Die HPLC-Methode weist folgende Vorteile auf: bessere Auflösung, stabilere Basislinie, Auftrennung von zusätzlichen Aminen, kürzere Retentionszeiten und schmalere Peaks. Diese Vorteile wiegen den einzigen Nachteil der deutlich aufwendigeren Probenvorbereitung bei weitem auf. Ein Screening-Test mit 12 verschiedenen in- und ausländischen Käsesorten zeigte, dass die Gorgonzola- und Gorgonzola/Mascarpone-Proben die höchsten Amingehalte aufwiesen.

Résumé

Une nouvelle méthode par RP-HPLC (après dérivation en précolonne avec du chlorure de dansyl) a été testée pour le dosage des amines biogènes (tryptamine, β -phényléthylamin).

amine, isopentylamine, putrescine, cadavérine, histamine et tyramine) dans le fromage. Le présent travail propose et évalue quelques améliorations importantes de cette méthode avant son adoption définitive dans le Manuel suisse des denrées alimentaires. Les critères analytiques suivants ont été considérés: le domaine de linéarité, les limites de détection dans l'UV et par fluorescence ainsi que la répétabilité de la méthode. Une comparaison statistique de cette dernière avec une méthode de dosage par chromatographie ionique (après dérivatisation en postcolonne avec de la ninhydrine) montre une excellente concordance des deux méthodes pour toutes les amines biogènes considérées ($r > 0,99$) sauf pour la β -phénylethylamine ($r = 0,92$) ainsi que l'absence d'interférence (ou artéfact) et d'erreur systématique dans l'une et l'autre méthode d'analyse. La méthode de dosage par HPLC offre les avantages suivants: une meilleure résolution, une ligne de base plus stable, la possibilité de séparer d'autres amines, des temps de rétention plus courts ainsi que des pics plus étroits. Son unique désavantage est de nécessiter un travail de préparation des échantillons plus important. Un test effectué sur 12 différentes sortes de fromage a révélé que ce sont les échantillons de Gorgonzola/Mascarpone qui ont les plus fortes teneurs en amines biogènes.

Summary

A new provisional RP-HPLC method (precolumn derivatization with dansyl chloride) for quantitative determination of biogenic amines (tryptamine, β -phenylethylamine, isopentylamine, putrescine, cadaverine, histamine and tyramine) in cheese has been tested. The present paper proposes and evaluates several major improvements of this method before its final admission to the Swiss Food Manual. The domaining following criteria of analysis were considered: determination of the linearity range, limits of detection by UV and fluorescence as well as repeatability. Comparison with an ion chromatographic method (postcolumn derivatization with ninhydrine) showed excellent agreement for all biogenic amines considered ($r > 0.99$) except for β -phenylethylamine ($r = 0.92$). Both methods were free from artifacts and systematic errors. The HPLC method offers the following advantages: higher resolution, a more stable baseline, separation of additional amines, shorter retention times and narrower peaks. Its only disadvantage is the longer sample preparation. From a screening test carried out with 12 Swiss and foreign cheese varieties, Gorgonzola and Gorgonzola/Mascarpone samples had the highest biogenic amine content.

Literatur

1. *Van Boekel, M. J. and Arentsen-Stasse, P.*: Determination of aromatic biogenic amines and their precursors in cheese by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **389**, 267–272 (1987).
2. *Joosten, H. M.*: The biogenic amine contents of Dutch cheese and their toxicological significance. *Neth. Milk. Dairy J.* **42**, 25–42 (1988).
3. *Askar, A. und Treptow, H.*: Biogene Amine in Lebensmitteln: Vorkommen, Bedeutung und Bestimmung. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart 1986.
4. *Schmitt, R.*: Bedeutung und Analytik biogener Amine in Lebensmitteln – eine Übersicht. *Lebensmittel-Technologie* **22**, 167–172 (1989).
5. *Fröhlich, D. und Battaglia, R.*: HPLC-Analyse von biogenen Aminen in Wein. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **71**, 38–44 (1980).

6. Buteau, C. and Duitschaever, C. L.: Stability of the o-phthaldialdehyd-histamine complex. *J. Chromatogr.* **212**, 23–27 (1981).
7. Buteau, C., Duitschaever, C. L. and Ashton, G. C.: High-performance liquid chromatographic detection and quantitation of amines in must and wine. *J. Chromatogr.* **284**, 201–210 (1984).
8. Davis, T. P., Gherke, C. W., Cunningham, D., Kuo, K. C. and Gerhardt, K.: High-performance liquid-chromatographic separation and fluorescence measurement of biogenic amines in plasma, urine and tissue. *Clinical Chem.* **24**, 1317–1324 (1978).
9. Subden, R. E., Brown, R. G. and Noble, A. C.: Determination of histamines in wines and musts by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **166**, 310–312 (1978).
10. Himuro, A., Nakamura, H. and Tamura, Z.: Fluorometric determination of secondary amines by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization. *J. Chromatogr.* **264**, 423–433 (1983).
11. Auvin-Guette, C. and Rips, R.: Polyamines and corresponding aminoacids measured together. *Chromatographia* **26**, 60–62 (1988).
12. Vidal-Carou, M. C., Izquierdo-Pulido, M. L. and Mariné-Font, A.: Spectrofluorometric determination of histamine in wines and other alcoholic beverages. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **72**, 412–415 (1989).
13. Hurni, D.: Die HPLC-Bestimmung der biogenen Amine in Käse. Diplomarbeit Ingenieurschule Burgdorf 1989.
14. Hui, J. Y., Taylor, S. L.: High pressure liquid chromatographic determination of putrefactive amines in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **66**, 853–857 (1983).
15. Rosier, J. and Van Peteghem, C.: A screening method for the simultaneous determination of putrescine, cadaverine, histamine, spermidine, spermine in fish by means of HPLC of dansyl derivatives. *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **186**, 25–28 (1988).
16. Schmitt, R. E., Haas, J. und Amadò, R.: Bestimmung von biogenen Aminen mit RP-HPLC zur Erfassung des mikrobiellen Verderbs von Schlachtgeflügel. *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **187**, 121–124 (1988).
17. Eaton, J. L. and Mullins, E.: Quantitative high-performance thinlayer chromatography of dansyl derivatives of biogenic amines. *Anal. Biochem.* **172**, 484–487 (1988).
18. Yen, G. C.: Determination of biogenic amines in fermented soybean foods by HPLC. *J. Chinese Agri. Chem. Soc.* **24**, 211–227 (1986).
19. Chiavari, G., Galletti, G. C. and Vitali, P.: HPLC determination of catabolic amines in silage using their dansyl derivatives and an electrochemical detector. *Chromatographia* **27**, 216–220 (1989).
20. Etter, R., Dietrich, Silvia und Battaglia, R.: Bestimmung von biogenen Aminen in Lebensmitteln. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **81**, 106–119 (1990).
21. Lavanchy, P., Bühlmann, Ch. et Steiger, G.: Détermination des amines biogènes de quelques fromages fabriqués en Suisse. *Schweiz. Milchw. Forsch.* **14** (3), 3–6 (1985).
22. Riedwyl, H.: Regressionsgerade und Verwandtes, S. 34–37. Paul Haupt, Bern 1980.

U. Bütkofer
 Doris Fuchs
 D. Hurni
 Dr. J. O. Bosset
 Sektion Chemie
 Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft
 CH-3097 Liebefeld-Bern