

# HPLC-Analyse von biogenen Aminen in Wein

Autor(en): **Fröhlich, D. / Battaglia, R.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **71 (1980)**

Heft 1

PDF erstellt am: **13.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-983497>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

*D. Fröhlich* und *R. Battaglia*, Kantonales Laboratorium Zürich

## HPLC-Analyse von biogenen Aminen in Wein

### Einleitung

Bekömmliche wie schädliche Wirkungen eines Weines können weitgehend durch Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen verursacht werden. Noch lange glaubte man, die «Kopfwehweine» mit dem SO<sub>2</sub>-Gehalt des Weines in Zusammenhang bringen zu müssen. Versuche in dieser Richtung müssen heute als gescheitert betrachtet werden.

Bei der Weinbereitung sind zwei Vorgänge von besonderer Bedeutung, was die geruchlich-geschmacklichen bzw. die gesundheitlichen Aspekte betrifft: die alkoholische Gärung und der biologische Säureabbau. Seine Technologie ist weitgehend maßgebend für das Auftreten gesundheitsschädlicher Stoffe, der sog. biogenen Amine. Diese sind Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. Sie entstehen durch Decarboxylierung der entsprechenden Aminosäuren. Ihre blutdrucksenkende — oder steigernde Wirkung vor allem in Anwesenheit von Aminooxidase-Inhibitoren wie Alkohol und Acetaldehyd sind sehr wohl bekannt. Beschwerden wie Kopfweg, Migräne, Erbrechen, Diarrhöe u. a. sind typische Vergiftungsmerkmale.

In den letzten Jahren häuften sich die Arbeiten über Vorkommen und Auswirkungen einzelner biogener Amine. Eine zusammenfassende Arbeit über Histamin und Tyramin in Lebensmitteln ist kürzlich von *A. Askar* erschienen (1). Dabei erstaunenswert sind die natürlich hohen Gehalte dieser Amine in Avocado, Himbeeren, Orangen, Tomaten und Spinat. Höhere Gehalte finden sich in mikrobiell hergestellten Lebensmitteln, wie z. B. Käse, Sauerkraut, Bier und Wein, bzw. bakteriell verdorbenen Lebensmitteln, z. B. Fisch und Fischprodukten. Weitere Vorkommen sind in Milch, Schokolade und Kakaoprodukten anzutreffen.

### Wirkungsweise

Ueber Wirkungsweise und Toxizität einzelner biogener Amine ist nicht sehr viel bekannt. Ueber kumulative oder synergistische Mechanismen weiß man nur wenig. Dies veranschaulicht um so mehr die Problematik der Materie. Anhand des Histamins, das z. B. in Wein auch schon in unserem Labor zu 30 mg/l nachgewiesen worden ist, sei dies verdeutlicht: Vergiftungen durch Histamin in Nah-

rungsmitteln sind sehr charakteristisch. Das Inkubationsstadium dauert durchschnittlich 30 Minuten bis 1 Stunde, kann aber auch kürzer sein. Die Kennzeichen einer Histaminintoxikation sind folgende: allg. Rötung der Haut (besonders der Haut im Gesicht), Nesselausschlag mit Jucken, Uebelkeit (kann zum Erbrechen führen), Magenkrämpfe, Kopfschmerzen, Schwindel und Sensoriumsstörungen. Die gleichen Störungen können auch bei allen anderen biogenen Aminen auftreten. Kritische Konzentrationen für eine Histaminvergiftung beim Menschen durch den Verzehr von Fischen werden mit 100 mg/100 g angegeben (*Simudu und Hibishi, Halstead und Courville* (1)). Eine Vergiftung durch alten Gouda-Käse wird auf einen Histamingehalt von 85 mg/100 g zurückgeführt (*Wirth et al.* (1)). Mengen von 180—400 mg Histamin/100 g Thunfisch haben zu Massenvergiftungen geführt (*Boyer et al.* (1)). Nach *Doeglas und Nater* (1) ist eine oral applizierte Histamineinzeldosis von 500 mg für den gesunden, erwachsenen Menschen toxisch. Nach *Peeters* (1) lösen Histaminmengen von 8—40 mg leichte, von 70—1000 mg mittlere — und von 1500—4000 mg schwere Vergiftungen aus. Die LD<sub>50</sub> per os beim Meerschweinchen wird mit 250 mg/kg angegeben (*Lang* (1)). Im Falle eines Magenkranken mit geschädigten Gefäßen haben bei einer Magenfunktionsprüfung schon 0,8 mg Histamin im Verlaufe einer halben Stunde zu einem tödlichen Kollaps geführt (*Wirth et al.* (1)). 3—8 mg subkutan und 0,05 bis 0,5 mg intravenös gelten als toxisch. Kumulative Wirkung mit Histamin haben Putrescin, Cadaverin und Spermin (*Parrot und Nicot* (1)). In diesem Zusammenhang ist nicht nur die in einem Lebensmittel aufgenommene Qualität der Amine ausschlaggebend, sondern ebenso wichtig ist der Aminooxidase-Spiegel des Darm-Lumens für den Abbau. So erklärt sich auch, weshalb viele Leute ohne Schwierigkeiten aminreiche Lebensmittel genießen können. Aus der Diskrepanz von 1000 mg Histamin oral gegen 0,05 mg intravenös manifestiert sich dessen schlechte Absorption aus nicht alkoholischen Lebensmitteln. Da andererseits Alkohol aber die Absorption des Histamins fördert bzw. mit dem Acetaldehyd den enzymatischen Abbau hemmt oder blockt, kann sich die Wirkung des Histamins voll entfalten.

### Säureabbau beim Wein

Wie eingangs erwähnt, ist bei der Vinifikation die Art und Weise der Steuerung des biologischen Säureabbaus entscheidend für den Gehalt an biogenen Aminen. Davon ausgenommen sind Isoamyl- und Aethanolamin, die bereits während der alkoholischen Gärung anfallen. Ihre Entstehung ist noch nicht abgeklärt. Histamin, Tyramin, Putrescin, Cadaverin und wahrscheinlich auch 2-Phenyläthylamin entstehen während des Säureabbaus (2).

Wie Untersuchungen der letzten Jahre durch *Mayer, Pause und Vetsch* (2, 3) zeigten, läßt sich ein einwandfreier, «sauberer» Säureabbau nur mit einer einzigen Bakterienart, *Leuconostoc oenos*, erreichen. Uebrige Organismen, vor allem der Species *Pediococcus cerevisiae*, müssen durch Tiefhalten der pH-Werte — im Idealfall 3,2—3,3 vor dem Abbau — ausgeschaltet werden. Letztere produzieren die erwähnten biogenen Amine und sind Ursache der linden Weine und des «Ab-

bautons». Nach dem Säureabbau liegen die pH-Werte 0,2—0,3 Einheiten höher als vor dem Abbau. Allenfalls ungünstige Bakterienentwicklungen (Milchsäurekokken) müssen dann vor der Weiterlagerung abfiltriert werden. Soll ein einwandfreier Wein entstehen, sind bis zur Sterilfiltration periodisch mikrobiologische Kontrollen unumgänglich (3).

Für die Korrelation Kopfweh / biogene Amine im Wein gilt bis jetzt Histamin als die zuverlässigste Indikatorsubstanz. Als toxische Schwellwerte werden in Deutschland von *Marquardt* und *Werringlloer* (1) 2 mg/l, in Belgien von *Peters* (1) 5—6 mg/l, in Frankreich von *Henry* (2) 8 mg/l, in der Schweiz von *Mayer* (2) 4 mg/l, *Matthey* vom BAG in einer Stellungnahme 7—10 mg/l, und von der wissenschaftlichen Kommission der EWG 3,5—5 mg/l vorgeschlagen. Histaminanalysen werden in unserem Labor routinemäßig seit ca. zwei Jahren durchgeführt. Dafür gibt es zwei Gründe:

1. Weine mit Histamingehalten von über 4 mg/l können Kopfweh erzeugen beim Genuß von bereits 3—4 dl.
2. Seine Anwesenheit zeugt von einem zum mindesten teilweise fehlerhaften Säureabbau.

### Analytik

Die biogenen Amine werden direkt im Wein, im alkalischen Milieu mit überschüssigem 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfochlorid (DANSCI) derivatisiert. Die Reaktions- und chromatographischen Bedingungen sind einer früheren Arbeit (4) zu entnehmen. Für Histamin isokratisch wurde eine Eichgerade von 0—10 ml/l Histamin in Rotwein erstellt. Es wurde eine Uebereinstimmung der Meßpunkte mit der Regressionsgeraden von >99,9% errechnet. Für die Reproduzierbarkeit der Derivatisierung wurde eine Standardabweichung von  $\pm 4,5\%$  (3 Werte) erhalten. Wir sind zur Zeit daran, das komplexe Stoffgemisch mittels eines Stufengradienten aufzutrennen. Abbildung 1 zeigt ein Schema der modular aufgebauten Apparatur: in unserem Falle werden sieben verschieden zusammen-

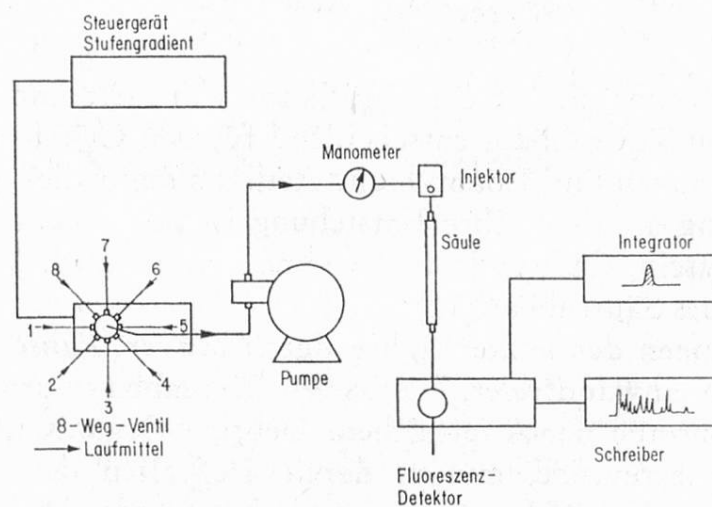


Abb. 1. Modular aufgebaute Apparatur eines Flüssigchromatographen mit Stufengradient

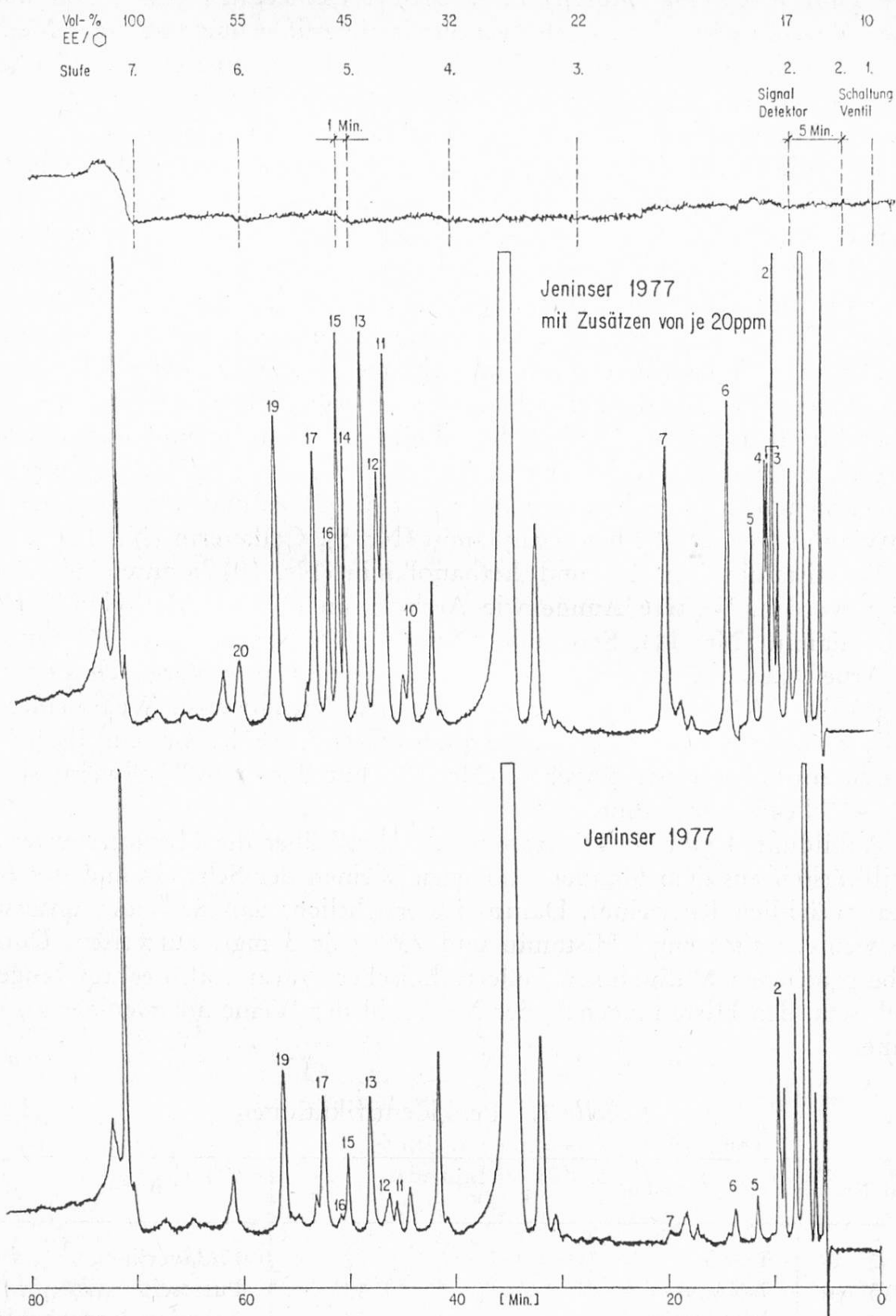


Abb. 2. Oben: Arbeitsweise des Stufengradienten EE = Essigsäureäthylester  
Mitte: DANS-amide eines Ostschweizer Rotweines mit Zusätzen von je 20 ppm  
Unten: DANS-amide eines Ostschweizer Rotweines

gesetzte Laufmittel (sog. Stufen) in zeitlich verschiedenen Abständen über ein Achtweg-Ventil automatisch vom Steuergerät abgerufen und von einer Membranpumpe durch die Säule befördert. Die in den Injektor eingespritzte Probe wird aufgetrennt und die einzelnen Peaks vom Fluoreszenz-Detektor auf den Schreiber übertragen. Die Quantifizierung kann über die Peakhöhen oder mit einem Integrator über die Peakflächen erfolgen. In Abbildung 2 oben ist die Arbeitsweise des Stufengradienten dargestellt. Die einzelnen Stufen (Konzentrationen) sind von rechts nach links numeriert. Von der Schaltung des Ventils bis zum Eintreffen des neuen Gemisches beim Detektor dauert es fünf Minuten bei einem Fluß von 1,3 ml/min. Der effektive Uebergang von einer Stufe zur andern dauert eine Minute (5. Stufe im Diagramm). Die siebte Stufe dient zur Regenerierung der Säule. Die achte Stufe (im Diagramm nicht mehr sichtbar) entspricht der ersten Stufe und dient der Wiedergleichung des ursprünglichen Systems. Die gesamte Analysenzeit dauert 1 h 40 min. Die Abbildung 2 (mitte und unten) zeigt die Analyse eines Ostschweizer Rotweins. Der Tabelle 1 sind die Peakidentifikationen zu entnehmen. Die schon von *Mayer et al.* (2) gefundenen biogenen Amine Isopentylamin (Nr. 2), 2-Phenyläthylamin (Nr. 5), Cadaverin (Nr. 12), Putrescin (Nr. 13), Histamin (Nr. 17) und Aethanolamin (Nr. 19) konnten mit Zusätzen bestätigt werden. Weitere Amine wie Aethylamin (Nr. 6), Methylamin (Nr. 7), Aethylendiamin (Nr. 11), Serotonin (Nr. 15), Octopamin (Nr. 16) wurden in dieser Arbeit durch Cochromatographie identifiziert. Als Vergleich sind in Abbildung 3 die DANS-Derivate der Amine eines Westschweizer Weißweines zu sehen. Mit wenigen Ausnahmen sind die qualitativen Verhältnisse sehr ähnlich. Auffallend ist ein hoher Putrescingehalt (Nr. 13). Für Rot- wie Weißweine sind weitere 10—15 Peaks unbekannt.

In Abbildung 4 gibt ein Diagramm Aufschluß über die Histaminverteilung in 100 willkürlich aus dem Handel erhobenen Weinen der Schweiz und des Auslandes (hauptsächlich Rotweine). Daraus ist ersichtlich, daß 87% der untersuchten Weine weniger als 9 mg/l Histamin und 73% nur 3 mg/l aufweisen. Durch die kurz besprochenen Maßnahmen kellererntechnischer Natur sollte es auf lange Sicht möglich sein, den Histamingehalt der Mehrzahl der Weine auf weniger als 4 mg/l zu senken.

*Tabelle 1.* Peakidentifikationen

Peak Nr.	Amine	Peak Nr.	Amine
2	Isopentylamin	12	Cadaverin
3	Isobutylamin	13	Putrescin
4	Butylamin	14	1-Amino-2-propanol
5	2-Phenyläthylamin	15	Serotonin 40 ppm
6	Aethylamin	16	Octopamin
7	Methylamin	17	Histamin
10	Cystamin 5 ppm	19	Aethanolamin
11	Aethylendiamin	20	Normetanephrin 40 ppm

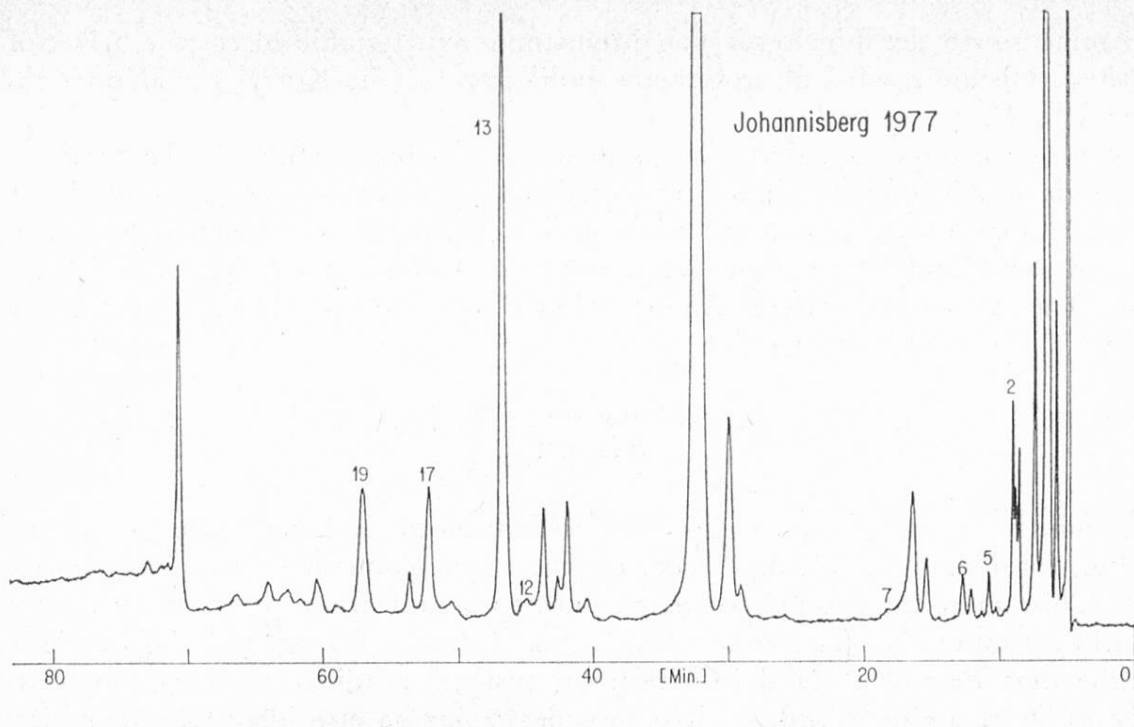


Abb. 3. DANS-amide eines Westschweizer Weißweines

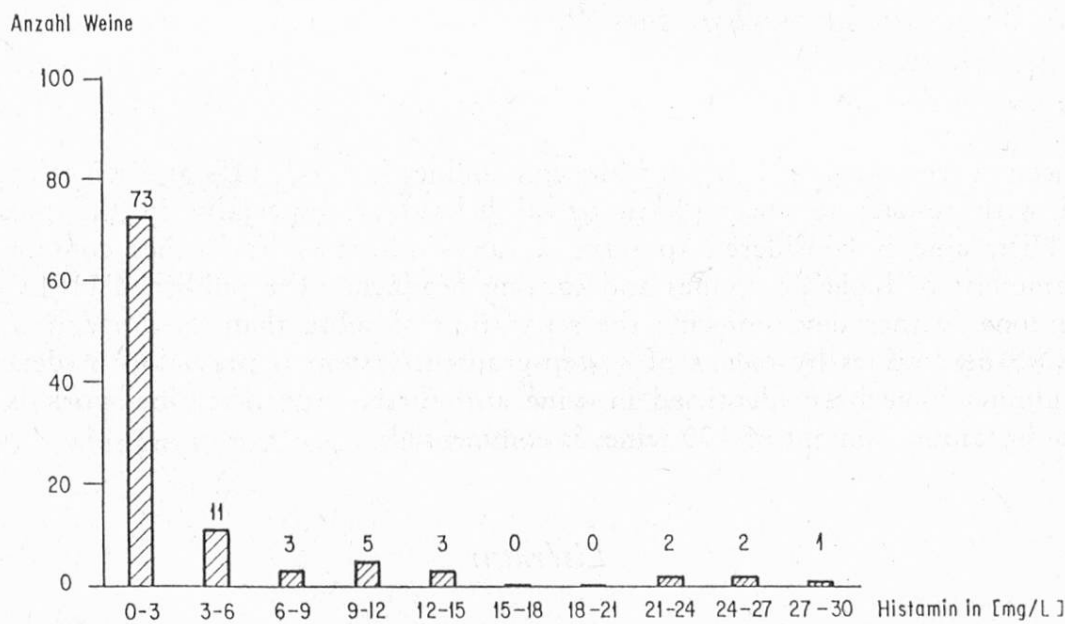


Abb. 4. Histamingehalte von vorwiegend Rotweinen (ca. 60% schweizerische und ca. 40% ausländische)

Eine geeignete Methode zur Quantifizierung der bereits gefundenen und weiteren biogenen Aminen bzw. deren Identifizierung wird Gegenstand unserer nächsten Arbeiten sein.

### Zusammenfassung

Die Entstehung und Bedeutung von biogenen Aminen in Lebensmitteln, insbesondere in Wein, wird zusammengefaßt, unter Hinweis auf die physiologische Wirkung der ein-

zelenen Amine sowie des Einflusses von Monoaminoxidaseinhibitoren wie Alkohol und Acetaldehyd. Histamin wird als geeigneter Indikator für die Korrelation Kopfwegh/biogene Amine in Wein erachtet.

Die von uns bereits publizierte isokratische HPLC-Bestimmung für Histamin wurde weiter entwickelt. Mit Hilfe eines Stufengradienten gelingt es, die Dansylderivate von mehr als 20 biogenen Aminen innerhalb von 100 Minuten aufzutrennen. Es wurden in Weinproben des Handels auf diese Weise über 10 Amine identifiziert. Die Identifizierung und Quantifizierung weiterer Amine ist im Gang, und die Verteilung der Histamingehalte in 100 Weinen ist dargestellt.

### *Résumé*

On résume brièvement la présence et la signification physiologique des amines biogènes dans le vin, considérant le rôle de l'alcool comme agent bloquant l'action des monoaminoxidases. L'histamine est considérée comme substance indicatrice pour les vins contenant des quantités d'amines biogènes et causant des maux de tête. La méthode HPLC de dosage d'histamine déjà décrite a été développée: un système gradient a été employé afin de séparer plus de 20 amines biogènes, dont plus de 10 ont pu être identifiées dans des vins. La répartition de la teneur en histamine de 100 vins est donnée. Les travaux pour identifier et doser d'autres amines biogènes sont en progrès.

### *Summary*

The occurrence and significance of biogenic amines in foodstuffs and wines are briefly reviewed with respect to their physiological behaviour, especially in the presence of alcohol. Histamine is considered to serve as an «indicator» for wines containing substantial amounts of biogenic amines and causing headache. The published HPLC-method has undergone further development: the separation of more than 20 biogenic amines as their DANS-derivatives by means of a step-gradient-system is presented in detail. More than 10 amines have been identified in wine and further identification work is in progress. The histamine-content of 100 wines is commented.

### *Literatur*

1. *Askar, A.*: Histamin und Tyramin in Lebensmitteln. *Alimenta* **18**, 7—14 (1979).
2. *Mayer, K. und Pause, G.*: Nichtflüchtige biogene Amine in Wein. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **64**, 171—179 (1973).
3. *Mayer, K. und Vetsch, A.*: Biologischer Säureabbau in Wein: Ungünstige Selektierwirkung der schwefligen Säure. *Schweiz. Z. Obst- Weinbau* **114**, 642—647 (1978).
4. *Battaglia, R. und Fröhlich, D.*: HPLC-determination of histamine in wine. *J. High. Res. Chromatog. u. Chromatog. Commun.* **2**, 100—101 (1978).

D. Fröhlich  
Dr. R. Battaglia  
Kantonales Laboratorium Zürich  
Postfach  
CH-8030 Zürich