

## 7. STRESZCZENIE

Przedstawiona rozprawa opisuje wyniki badań nad poszukiwaniem nowych oraz modyfikacją istniejących procedur oznaczania amin biogennych w żywności. Znaczenie badań rozprawy dla nauki i zdrowia wynika z roli jaką pełnią aminy biogenne (AB) w organizmie człowieka oraz powszechności ich występowania w produktach spożywczych zawierających białko, takich jak: ryby, mięso, sery i ich przetwory oraz produkty otrzymywane w wyniku fermentacji, czyli piwo i wino. W rozprawie doktorskiej wybrano do badań napoje alkoholowe, ponieważ etanol może tłumić aktywność oksydazy aminowej: monoaminooksydazy (MAO) oraz diaminooksydazy (DAO), hamując tym samym rozkład amin biogennych w organizmie i zwiększając ich toksyczność, zaś duże stężenie AB w żywności może powodować negatywne skutki fizjologiczne oraz przyczyniać się do zatruc i alergii pokarmowych. Ponadto AB decydują o cechach organoleptycznych produktów spożywczych, są miernikami jakości i przydatności do spożycia żywności, a więc analiza ich zawartości jest niezbędna.

Na podstawie przeglądu stanu badań w tematyce oznaczania amin biogennych określone zostały cele pracy. Doniesienia literaturowe wskazywały, że najczęściej stosowaną techniką do oznaczania AB w różnych produktach spożywczych jest wysokosprawna chromatografia cieczowa, ale stosuje się także chromatografię jonowymienną, metody elektromigracyjne oraz elektrochemiczne. Analiza amin biogennych jest trudna z powodu ich budowy chemicznej, ponieważ grupa aminowa nie jest wyróżnikiem struktury, co nie pozwala na ich oznaczanie w sposób bezpośredni i czuły za pomocą metod spektroskopowych, a tym samym detektorów detekcji UV-Vis bądź luminescencji w chromatografii cieczowej. Skutkiem tego jest konieczność stosowania etapu tworzenia pochodnych amin biogennych ze związkami zawierającymi grupę chromoforową. W pracy przyjęto hipotezę o konieczności modyfikacji procedur oznaczania AB za pomocą nowych i stosowanych związków. Spośród dotychczas stosowanych metod otrzymywania pochodnych przeprowadzono modyfikacje procedur stosując: chlorek dansylu, 1,3-dinitro-2-chloro-5-trifluorometylobenzen, 1-fluoro-2-nitro-4-trifluorometylobenzen i izotiocyanian 3,5-bis(trifluorometylo)fenylu. Przegląd literaturowy pozwolił na sformułowanie hipotez, że należy poszukiwać nowych metod analizy amin biogennych o parametrach konkurencyjnych do istniejących. Drugą hipotezą było sprawdzenie możliwości wykorzystania nowych związków do konwersji chemicznej AB.

Przedstawione hipotezy pozwoliły na sformułowanie następujących celów rozprawy:

- a. opracowanie procedur analizy amin biogennych bez stosowania syntezy pochodnych amin ,
- b. modyfikacja znanych metod analizy chromatograficznej poprzez zastosowanie nowych odczynników.
- c. optymalizacja etapu przygotowania próbek żywności do oznaczania amin biogennych w matrycach żywnościowych w fazie stałej i ciekłej.

W ramach pracy doktorskiej oznaczono następujące aminy: histaminę, tyraminę, tryptaminę, fenyloetyloaminę, putrescynę, kadawerynę, sperminę i spermidynę w winie, piwie, mięsie, rybach i serze. Do oznaczenia AB metodą wysokosprawnej chromatografii ciekłowej wykorzystano chlorek dansylu. Opracowano nowe procedury syntezy ww. związków z 1,3-dinitro-2-chloro-5-trifluorometylobenzenem, 1-fluoro-2-nitro-4-(trifluorometylo) benzenem oraz izotiocyanianem 3,5-bis(trifluorometylo) fenyłu. Budowę pochodnych amin biogennych potwierdzono metodami spektroskopowymi UV-Vis i  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  NMR oraz dla części uzyskanych związków wykrystalizowano monokryształy i wyznaczono strukturę rentgenowską.

Zaletą zastosowanych odczynników było ograniczenie niepożądanych zjawisk redukujących matrycę i skrócenie czasu analizy amin biogennych w matrycach żywnościowych. Otrzymane pochodne zastosowane zostały do oznaczania: histaminy, tyraminy, tryptaminy, fenyloetyloaminy w napojach alkoholowych techniką wysokosprawnej chromatografii ciekłowej i chromatografii ciekłowej sprzężoną ze spektroskopią mas.

Opracowano nową metodę oznaczania całkowitej zawartości AB za pomocą  $^{19}\text{F}$  NMR, z wykorzystaniem pochodnych fluorowanych, w winach i piwach, uzyskując wyniki zawartości oznaczanych związków zgodne z wynikami uzyskanymi metodami chromatograficznymi, przy znacznym skróceniu czasu analizy.

Realizując cel modyfikacji etapu przygotowania próbek zoptymalizowałam procedury ekstrakcji, które pozwoliły na wyodrębnianie badanych związków z matrycy próbek żywnościowych.

Zastosowałam metodę spektroskopową  $^{19}\text{F}$  NMR do oznaczania sumy amin biogennych. Te metody potwierdziły celowość poszukiwania nowych metod oznaczania AB. Modyfikacja reakcji syntezy ww. amin z chlorkiem dansylu, pozwoliła na oznaczenia tych związków w winach, piwach, rybach i serach techniką HPLC z bardzo dobrymi parametrami dokładności, precyzji i powtarzalności, potwierdzonymi analizą statystyczną wyników. Zastosowanie nowych związków do otrzymywania pochodnych: histaminy, tyraminy,

fenyloetyloaminy i tyrozyny pozwoliło na otrzymanie czystych wzorców oraz wyeliminowanie produktów ubocznych reakcji, przy zachowaniu zwalidowanych parametrów jakości analiz. Przeprowadzone badania, nad opracowaniem układów do oznaczania amin za pomocą nowych związków, wskazują że są to metody pozwalające na ich zastosowanie w analizie żywności w matrycach stałych i ciekłych zapewniające parametry czułości, dokładności i powtarzalności porównywalnej z metodami chromatograficznymi lub innymi elektromigracyjnymi.

Rozprawa doktorska opublikowana została w 5 publikacjach naukowych z listy A MNiSW o sumarycznym IF = 16,435, (IF=25,05 z lat 2021-2022), które były cytowane 100 razy.

Opracowane nowe techniki i zmodyfikowane chromatograficzne oznaczenia AB wskazują na możliwość ich stosowania w kontroli jakości surowców, półproduktów i produktów końcowych oraz monitorowania procesów fermentacji napojów, więc ma znaczenie dla rozwoju technologii produkcji żywności. Wyniki rozprawy przyczynią się także do zaproponowania nowych norm stężenia amin w żywności w celu poprawy jakości produkowanej żywności oraz zapewnienia bezpieczeństwa żywności na każdym etapie produkcji i obrotu produktami żywnościowymi.

31.05.2022.  
Anna Piasta

## 8. SUMMARY

Presented doctoral thesis describes results of search for new and modified methods of biogenic amines (BA) determination in food. The impact of studies on science and human health comes out from the significant role of biogenic amines in human body and appearance of the amines in food products reach in proteins such as: fish, meat, cheese and products of fermentation processes beer and wine. The selection of alcoholic beverages was based on the assumption that ethanol inhibits activity of amine oxidase, reducing the decomposition of biogenic amines in human organism resulting in the increased toxicity of amines. High concentration of BA in food can cause negative physiological reactions resulting in food allergies and even toxic effects. Moreover, BA have main impact on organoleptic properties of food products, they are indicators of quality and freshness of food for consumers, and hence their analysis is highly desirable.

Literature survey in the field of biogenic amines determination allowed on formulation the scope of thesis. Literatures data indicates, that the most commonly used are chromatographic methods, among which high performance liquid chromatography (HPLC) was prevailing. The main difficulty in biogenic amines analysis comes out from their chemical composition, because the amine group is not sufficiently distinctive structure factor, what causes the detection by the spectroscopic methods using UV-VIS detectors are not useful for that purpose. In order to overcome this inconvenience, the stage of amines derivatization with compounds, which have additional chromophore group, was introduced. In the presented work the hypothesis on improvement of the derivatization stage by applying new or modification the known methods was imposed. Modifications of the derivatizing methods were studied for reactions of BA's with: dansyl chloride, 2-chloro-1,3-dinitro-5-(trifluoromethyl)-benzene, 1-fluoro-2-nitro-4-(trifluoromethyl)benzene and 3,5-bis-(trifluoromethyl)phenyl isothiocyanate.

Second hypothesis suggests search for new analytical techniques of BA analysis with parameters competitive to the existing. The third hypothesis was focused on the elucidating of BA new derivatizing compounds and verification of their usefulness in new determination procedure.

Results of BA determination food matrices and alcoholic beverages provides information important for raw materials quality analysis and final products content. The methods developed in the research work can be used for monitoring the technology processes during fermentation stage of wine and beer and in meat quality assessment in wholesale and

retail trade. The knowledge of the amines level in food will increase food safety and cause the life quality improvement.

Presented hypothesis allowed on formulation the following aims of thesis:

- a) development of new methods BA analysis without procedure of derivatives synthesis,
- b) modification of the existing chromatographic methods by application of new derivatizing reagents,
- c) optimization of food sample preparation stage for determination of BA in liquid matrices.

In the presented doctoral thesis, the following amines were determined: histamine, tyramine, tryptamine, phenylethylamine, putrescine, cadaverine, spermine and spermidine in wine, beer, meat, fish and cheese. Biogenic amines were determined by HPLC technique with dansyl chloride as derivatizing compound. In search for new procedures of BA's derivatives synthesis reactions with 2-chloro-1,3-dinitro-5-(trifluoromethyl)-benzene (CNBF), 1-fluoro-2-nitro-4- (trifluoromethyl)benzene (FNBT) and 3,5-Bis-(trifluoromethyl)phenyl isothiocyanate (CNBF) were elaborated. Obtained derivatives were characterized by  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  NMR and single crystal X-ray structure analysis. The main advantage of the applied derivatives were: limitation of matrices reduction reactions, analysis time minimization and the same or better parameters of precision and detection limits of: HIS, TYR, TRP and FEN determination in alcoholic beverages obtained by HPLC- VIS and LC-MS techniques.

New method of the total amount of BA determination in wine and beer by  $^{19}\text{F}$  NMR based on fluorinated derivatives of BA was developed. The NMR analytical data when compared to the chromatographic methods revealed the same quality parameters but analysis time was much shorter.

The most important substantive achievement of the dissertation was the synthesis of new derivatives of amines, confirmation of their structures by spectroscopic methods and development of analytical procedures determination of biogenic amines in food samples.

PhD thesis results were published in 5 scientific publications indexed with Scopus and Web of Knowledge data bases and on the List A of Polish Ministry of Science and Higher Education. The 5 papers sum of IF was 16,435, (IF=25,05 for the 2021-2022), and 100 citations.

Elaborated new analytical technics of chromatographic determination of BA's indicates usefulness of their applications for food quality assessment and monitoring of fermentation processes of beverages, hence it has implication on development of food technology production. Results of thesis will be useful for new standards of biogenic amines concentrations in food for improvement of food quality and safety assessment on each stage of production and marketing.

31.05.2022 152  
Anna Piasta