

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2019

Bc. Miroslava Jonáková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Vývoj metody pro stanovení biogenních aminů v potravinách

Bc. Miroslava Jonáková

Diplomová práce

2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Miroslava Jonáková**
Osobní číslo: **C17515**
Studijní program: **N1407 Chemie**
Studijní obor: **Analytická chemie**
Název tématu: **Vývoj metody pro stanovení biogenních aminů v potravinách**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. V teoretické části práce se nejprve zaměřte na charakteristiku biogenních aminů. Popište jejich vlastnosti, účinky na lidský organismus a výskyt v potravinách. Dále prostudujte možnosti jejich stanovení pomocí moderních analytických metod. Zaměřte se také na stanovení těchto látek ve vzorcích potravin, např. v sýru nebo víně. a popište konkrétní způsob jejich analýzy včetně přípravy vzorku před analýzou.
2. V experimentální části práce optimalizujte metodu HPLC-UV-MS stanovení derivátů biogenních aminů. Nalezněte vhodné podmínky derivatizace dansylchloridem a optimální podmínky separace připravených derivátů. Vyvinutou metodu validujte.
3. Validovanou metodu využijte při stanovení biogenních aminů v reálných vzorcích, jako např. víno nebo sýr. Aplikujte vhodné postupy z prostudované literatury a upravte podmínky tak, aby vedly k úspěšné izolaci analytů ze vzorků.
4. Získané poznatky řádně komentujte a konkrétní výsledky porovnejte s odbornou literaturou. V závěru zhodnoťte vhodnost použití metody HPLC-UV-MS pro stanovení biogenních aminů.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Blanka Švecová, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2019**

Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47 b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 9. 5. 2019

Bc. Miroslava Jonáková

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí této diplomové práce paní Ing. Blance Švecové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky, vstřícné jednání, trpělivost a za poskytnutí veškerého laboratorního vybavení. Zvláštní poděkování patří také mé rodině a příteli za podporu při mém studiu.

Anotace

Tato diplomová práce se zabývá vývojem a validací metody pro stanovení biogenních aminů v potravinách. V teoretické části jsou popsány toxikologické vlastnosti biogenních aminů, jejich vznik, rozdělení, výskyt a reaktivita. Dále je zde popsáno stanovení biogenních aminů pomocí chromatografických metod. Experimentální část je zaměřena na optimalizaci a validaci HPLC-UV/MS metody pro stanovení biogenních aminů ve formě dansyl derivátů. Validovaná metoda je aplikována na 10 vzorků vín (červených, bílých a jednoho růžového) a 5 vzorků zrajících sýrů.

Klíčová slova

biogenní aminy, dansyl deriváty, kapalinová chromatografie, spektrofotometrická detekce, hmotnostní detekce, víno, sýr

Title: Development of the method for determination of biogenic amines in food

Annotation

This thesis deals with the development and validation of a method of the determination of biogenic amines in food. The toxicological properties of biogenic amines, their formation, distribution, occurrence and reactivity are described in the theoretical part. Further, the determination of biogenic amines using chromatographic methods is described as well. The experimental part is focused on the optimization and validation of HPLC-UV/MS method of the determination of biogenic amines as dansyl derivatives. The validated method is applied to the analysis of 10 samples of wine (red, white and one pink) and 5 samples of ripened cheeses.

Keywords

biogenic amines, dansyl derivatives, liquid chromatography, spectrophotometric detection, mass detection, wine, cheese

Obsah

| | |
|--|-----------|
| ÚVOD | 13 |
| 1 TEORETICKÁ ČÁST | 14 |
| 1.1 Biogenní aminy..... | 14 |
| 1.1.1 Charakteristika biogenních aminů | 14 |
| 1.1.2 Toxikologické účinky | 15 |
| 1.1.3 Vznik a rozdělení biogenních aminů | 16 |
| 1.1.4 Výskyt biogenních aminů | 18 |
| 1.1.5 Reaktivita biogenních aminů | 20 |
| 1.2 Stanovení biogenních aminů..... | 21 |
| 1.2.1 Chromatografické metody použitelné pro analýzu biogenních aminů | 22 |
| 1.2.2 Elektromigrační separační metody použitelné pro analýzu biogenních aminů | 27 |
| 1.3 Biogenní aminy v sýrech | 28 |
| 1.4 Biogenní aminy ve víně | 32 |
| 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 36 |
| 2.1 Přístroje a zařízení | 36 |
| 2.1.1 Kapalinový chromatograf | 36 |
| 2.1.2 Další zařízení | 36 |
| 2.1.3 Spotřební materiál..... | 36 |
| 2.2 Chemikálie a standardní látky | 37 |
| 2.2.1 Chemikálie..... | 37 |
| 2.2.2 Standardní látky | 37 |
| 2.2.3 Vzorky vín | 38 |
| 2.2.4 Vzorky sýrů | 39 |
| 2.3 Pracovní postupy | 39 |
| 2.4 Podmínky chromatografické analýzy | 42 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3 | VÝSLEDKY A DISKUZE | 43 |
| 3.1 | Optimalizace postupu derivatizace | 43 |
| 3.2 | Optimalizace chromatografických podmínek | 44 |
| 3.2.1 | Volba stacionární fáze | 44 |
| 3.2.2 | Optimalizace složení mobilní fáze | 44 |
| 3.2.3 | Optimalizace gradientové eluce | 45 |
| 3.2.4 | Optimalizace průtoku mobilní fáze a velikosti nástřiku | 45 |
| 3.2.5 | Optimalizace podmínek hmotnostní detekce | 45 |
| 3.3 | Validační parametry chromatografické metody | 47 |
| 3.3.1 | Meze detekce a stanovitelnosti | 47 |
| 3.3.2 | Kalibrační závislosti standardů | 48 |
| 3.3.3 | Opakovatelnost | 50 |
| 3.4 | Optimalizace podmínek zakoncentrování derivátů biogenních aminů | 53 |
| 3.4.1 | Stanovení výtěžnosti | 53 |
| 3.5 | Výsledky analýzy vzorků | 54 |
| 3.5.1 | Výsledky analýzy vína | 54 |
| 3.5.2 | Výsledky analýzy sýrů | 58 |
| 4 | ZÁVĚR | 61 |
| 5 | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 62 |
| 6 | PŘÍLOHY | 71 |

Seznam ilustrací

| | |
|---|----|
| Obrázek 1 Alifatické biogenní aminy | 16 |
| Obrázek 2 Aromatické biogenní aminy | 17 |
| Obrázek 3 Heterocyklické biogenní aminy | 17 |
| Obrázek 4 Vznik a přeměna biogenních aminů s alifatickým řetězcem..... | 18 |
| Obrázek 5 Procentuální zastoupení biogenních aminů ve vybraných druzích potravin..... | 19 |
| Obrázek 6 Hlavní reakce biogenních aminů..... | 20 |
| Obrázek 7 Instrumentace HPLC | 22 |
| Obrázek 8 Schéma dansylace | 25 |
| Obrázek 9 Schéma derivatizace biogenních aminů pomocí izobutylchlormravenčanu | 26 |
| Obrázek 10 Ukázková separace standardů derivátů biogenních aminů..... | 46 |
| Obrázek 11 Ukázkový chromatogram vzorku vína Rulandské šedé (Znovín Znojmo) | 56 |
| Obrázek 12 Ukázkový chromatogram vzorku sýra Tvarůžky | 59 |

Seznam tabulek

| | |
|---|----|
| Tabulka 1 Chromatografické a detekční charakteristiky standardů..... | 47 |
| Tabulka 2 Meze detekce a stanovitelnosti analyzovaných biogenních aminů | 48 |
| Tabulka 3 Parametry kalibračních závislostí (závislosti ploch píků na koncentraci)..... | 49 |
| Tabulka 4 Intraday (jednodenní) opakovatelnost | 51 |
| Tabulka 5 Interday (vícedenní) opakovatelnost..... | 52 |
| Tabulka 6 Charakteristika vzorků vín..... | 55 |

Seznam zkratek

| | |
|------------------|---|
| ACN | acetonitril |
| AGM | agmatin |
| APCI | chemická ionizace za atmosférického tlaku |
| AQC | 6-aminochinolyl-N-hydroxysukcinimidyl karbamát |
| Ben-Cl | benzoylchlorid |
| CAD | kadaverin |
| CGE | kapilární gelová elektroforéza |
| CIEF | kapilární izoelektrická fokusace |
| CITP | kapilární izotachoforéza |
| CNBF | 2-chlor-1,3-dinitro-5-(trifluormethyl)benzen |
| CZE | kapilární zónová elektroforéza |
| Dbz-Cl | dabsylchlorid |
| Dns-Cl | dansylchlorid |
| EAC | ethyl-akridinsulfonylchlorid |
| ELISA | enzymatický imunosorbentní test |
| ETA | ethylamin |
| ESI | ionizace elektrosprejem |
| FNBT | 1-fluor-2-nitro-4-(trifluormethyl)benzen |
| FMOc | 9-fluorenylmethylchlorformiát |
| GC | plynová chromatografie |
| GC-MS | plynová chromatografie s hmotnostní detekcí |
| HIS | histamin |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| HPLC-MS | spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem |
| HPLC-DAD | HPLC s detektorem diodového pole |
| HPLC-ELSD | HPLC s detektorem rozptylu světla |
| HPTLC | vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie |
| HRMS | hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením |
| IBCF | izobutylchlormravenčan |
| ITP | izotachoforéza |
| ISO | isoamylamin |
| LC-ELSD | kapalinová chromatografie s detektorem rozptylu světla |

| | |
|---------------------|--|
| LOD | mez detekce |
| LOQ | mez stanovitelnosti |
| MEKC | micelární elektrokinetická kapilární chromatografie |
| MET | methylamin |
| NP-HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie s normálními fázemi |
| NITC | 1-naftylizothiokyanát |
| NQS | 1,2-naftochinon-4-sulfonát |
| OHFB | <i>o</i> -heptafluorbutyryl |
| OPA | <i>o</i> -ftaldialdehyd |
| PDA | detekce fotodiodového pole |
| PEA | fenylethylamin |
| PITC | fenylisothiokyanát |
| PUT | putrescin |
| PVP | polyvinylpyrrolidon |
| RP-HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi |
| RSD | relativní směrodatná odchylka |
| SDS | dodecylsíransodný |
| SPD | spermidin |
| SPE | extrakce na tuhou fázi |
| SPM | spermin |
| SPME | mikroextrakce na tuhou fázi |
| THF | tetrahydrofuran |
| TOF | analyzátor doby letu |
| TRYP | tryptamin |
| TYR | tyramin |
| UPLC | ultraúčinná kapalinová chromatografie |
| UPLC/Q-TOFMS | ultraúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem, kvadrupolem a analyzátozem doby letu |
| UHPLC-MS | ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem |
| UHPLC-UV | ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detektorem |
| UV-VIS | ultrafialový-viditelný detekční systém |

ÚVOD

Biogenní aminy jsou dusíkaté sloučeniny organického původu. U rostlin jsou stavebními látkami pro biosyntézu fytohormonů a v živočišných tkáních plní funkci tkáňových hormonů a souvisí se stabilizací buněčné membrány a růstem buněk. Biogenní aminy jsou ale také zároveň považovány za nebezpečné látky vyskytující se v potravinách, které vznikají dekarboxylací aminokyselin pomocí mikrobiálních a enzymatických reakcí. Tyto sloučeniny se tvoří v průběhu skladování a zpracování některých potravin mikrobiologickou činností. Pokud jsou přítomny ve vysokých koncentracích mohou způsobovat zdravotní problémy spotřebitelům. Mezi hlavní potraviny, ve kterých se vyskytují biogenní aminy, patří například mléčné výrobky (převážně zrající sýry), víno, ryby, maso a pivo.

U některých druhů sýra je stanovení biogenních aminů používáno jako hygienická kontrola kvality při jejich výrobě. Hlavními faktory, které ovlivňují tvorbu biogenních aminů v sýrech, jsou pH (5-6,5), koncentrace solí, dostupnost vody, teplota, doba zrání, skladování a množství přítomných bakterií. Doba zrání sýrů je považována za kritický faktor akumulace biogenních aminů. Čím delší je doba dozrávání, tím vyšší je celkový obsah aminů v sýrech.

Zvýšený obsah biogenních aminů ve víně je považován za znehodnocující, a obvykle se vyskytuje u vín, které dlouhodobě zrají v sudech, nebo i lahvích. Zvýšený obsah aminů se vyskytuje u vín méně kyselých, a proto mívají červená vína vyšší koncentraci biogenních aminů než vína bílá. Přítomnost biogenních aminů ve vínech je také spojována s nedostatečnou hygienou během výroby vína.

Pro vlastní stanovení biogenních aminů se používá celá řada elektromigračních a chromatografických technik, avšak nejpoužívanější technikou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Před vlastní analýzou je však nezbytné provést derivatizaci vhodným činidlem, které by umožnilo detekci analytů.

Cílem této diplomové práce je optimalizovat a validovat metodu pro stanovení biogenních aminů v potravinách. Jako nápoj bylo pro analýzu biogenních aminů vybráno víno a z mléčných výrobků byly vybrány zrající sýry.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Biogenní aminy

1.1.1 Charakteristika biogenních aminů

Biogenní aminy jsou biologicky významné dusíkaté sloučeniny přítomné v rostlinných, živočišných a mikrobiálních buňkách. Některé biogenní aminy jsou například protoalkaloidy rostlin, stavebními látkami pro biosyntézu fytohormonů, v živočišných tkáních plní funkci tkáňových hormonů a jsou prekurzory hormonů nadledvinek (catecholaminy). Aminy mohou ve své molekule vázat různý počet aminoskupin, nejčastěji se však jedná o jednu, dvě, popřípadě tři aminoskupiny. Podle počtu uhlovodíkových zbytků (-R) aminy rozdělujeme na primární ($R-NH_2$), sekundární (R_2-NH) a terciární (R_3-N).

Biogenní aminy jsou považovány za nebezpečné látky vyskytující se v potravinách. V evropských právních předpisech neexistuje prahová hodnota pro tyto látky, s výjimkou histaminu, který je kontrolován především v produktech rybolovu. Tyto sloučeniny se tvoří během skladování a zpracování některých potravin mikrobiologickou činností. Pokud jsou přítomny ve vysokých koncentracích, mohou mít toxikologické účinky a způsobují zdravotní problémy spotřebitelům, zejména citlivým osobám. Histamin je nejvíce studovaným aminem kvůli jeho schopnosti způsobovat bolesti hlavy, pokles krevního tlaku a zažívací potíže. Tyramin je často spojován s migrénou a se zvýšeným krevním tlakem. Ostatní aminy, jako je například putrescin a kadaverin, mají nižší hodnotu farmakologické aktivity, mohou však zesilovat účinky histaminu a tyraminu [1-11].

Biogenní aminy jsou významné zejména díky jejich fyziologické funkci, která souvisí se stabilizací buněčné membrány a růstem buněk, tzn., podílejí se na DNA a RNA proteosyntéze. Při obnově a růstu tkání například při pooperačním zotavování, jsou považovány za významné mikrokomponenty potravin. Avšak u jedinců, u nichž se vyskytují například různá nádorová onemocnění, by měl být jejich příjem omezen na minimum [12].

1.1.2 Toxikologické účinky

Biogenní aminy jsou pro lidský organismus nepostradatelné, ale ve vyšších koncentracích se mohou projevovat jako látky psychoaktivní, které působí jako přenašeči v centrálním nervovém systému. Dále mohou působit jako vasoaktivní látky, které přímo nebo nepřímo ovlivňují cévní systém.

Obsah biogenních aminů v potravinách je studován zejména kvůli jejich toxicitě. Jak již bylo uvedeno výše, biogenní aminy mají řadu účinků, které nepříznivě ovlivňují lidský organismus. Biogenní aminy nejčastěji způsobují bolest hlavy, migrénu, vyrážku, nevolnost, trávicí obtíže, zvýšený nebo naopak snížený krevní tlak.

Histamin je spojován s řadou potravinových otrav, které mohou mít různou intenzitu. Příjem histaminu do 40 mg může způsobit lehkou, do 100 mg střední a vyšší než 100 mg intenzivní otravu. Maximální přípustná hladina histaminu v potravinách by měla být do $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a tyraminu do $800 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Hodnota přes $1080 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ tyraminu je považována za toxickou. U putrescinu, sperminu, spermidinu a kadaverinu nebyly prokázány žádné nepříznivé zdravotní účinky, ale mohou reagovat s dusitanem za vzniku karcinogenních nitrosoaminů. Tryptamin a agmatin se obvykle vyskytují v nízkých koncentracích a jejich výskyt není spojován s nežádoucím působením na lidský organismus [11-13].

Histamin je biologicky aktivní sloučenina, která může způsobovat řadu komplikací v lidském těle. Přímo stimuluje srdce, působí na hladké svaly vnitřních orgánů (kontrakce nebo uvolnění), stimuluje smyslové a motorické neurony a zvyšuje sekreci žaludečních kyselin. Jak již bylo uvedeno výše, histamin je spojován s řadou otrav. Charakteristické příznaky histaminové otravy zahrnují vyrážku, kopřivku, edém a lokalizovaný zánět. Gastrointestinální postižení je charakterizováno zvracením, průjmem a břišními křečemi. Ostatní příznaky zahrnují zvýšený krevní tlak, bolest hlavy, mravenčení a pocity pálení v ústech [14].

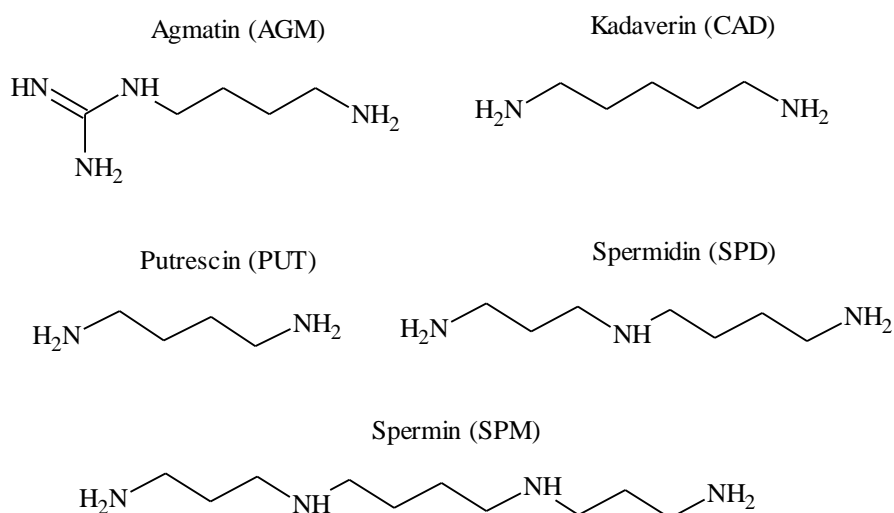
Stanovení přesné prahové hodnoty je velmi obtížné, protože toxická dávka je silně závislá na účinnosti detoxikace mechanismu každého jednotlivce. Malé dávky biogenních aminů v potravinách jsou metabolizovány za vzniku méně aktivních degradačních procesů pomocí enzymu diaminoxidázy. Naproti tomu vysoké dávky biogenních aminů nedokáže tento enzymový systém eliminovat. Při nedostatečné činnosti enzymu diaminoxidázy, která může

být způsobena například gastrointestinální chorobou nebo sekundárním působením léků a alkoholu, nejsou metabolizovány ani malé dávky biogenních aminů [11-13].

1.1.3 Vznik a rozdělení biogenních aminů

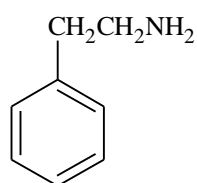
Biogenní aminy vznikají převážně mikrobiální dekarboxylací aminokyselin, kdy primární aminoskupina je součástí těchto kódovaných aminokyselin, a dále také mohou vznikat transaminací aldehydů a ketonů. Tyto reakce probíhají ve všech potravinách, ve kterých se vyskytují bílkoviny nebo volné aminokyseliny. Aminy vznikají také během alkoholové fermentace, mohou být tvořeny bakteriemi mléčného kvašení a vznikají v průběhu zrání vína. Biogenní aminy jsou také přítomny v moštu a pivu. Dominantními biogenními aminy ve víně jsou histamin, tyramin, putrescin, kadaverin a ethylamin. Obecně nejvyšší koncentrace těchto sloučenin se vyskytují ve fermentovaných potravinách, které obsahují mnohem vyšší množství než nefermentované potraviny [1,8-10,15].

Biogenní aminy lze rozdělit podle struktury na alifatické (Obrázek 1), aromatické (Obrázek 2) a heterocyklické (Obrázek 3). Mezi alifatické aminy řadíme agmatin, kadaverin, putrescin, spermidin, spermin, mezi aromatické řadíme například fenylethylamin a tyramin a mezi heterocyklické řadíme histamin a tryptamin.

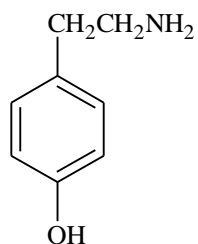


Obrázek 1 Alifatické biogenní aminy [9]

Fenylethylamin (PEA)

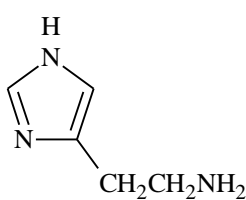


Tyramin (TYR)

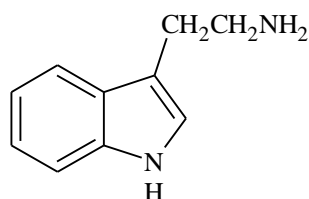


Obrázek 2 Aromatické biogenní aminy [9]

Histamin (HIS)

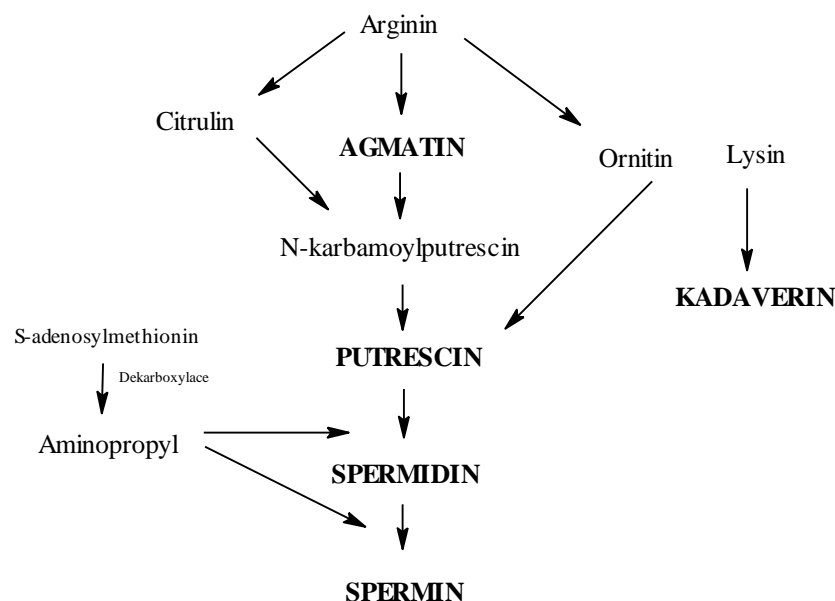


Tryptamin (TRYP)



Obrázek 3 Heterocyklické biogenní aminy [9]

Alifatické biogenní aminy vznikají způsobem, jaký ilustruje Obrázek 4. Rozkladem bílkovin a následnou dekarboxylací vzniká z ornitinu putrescin a z lysinu kadaverin. Putrescin může také vznikat dekarboxylací argininu, kdy jako meziprodukt vzniká agmatin a z něho následně putrescin. Z putrescinu také vzniká následnou methyloací spermidin a spermin.



Obrázek 4 Vznik a přeměna biogenních aminů s alifatickým řetězcem [12]

Aromatický fenylethylamin vzniká působením fenylalanindekarboxylasy z fenylalaninu a z aminokyseliny tyrosinu vzniká působením triosyndekarboxylasy tyramin, který je substrátem pro další důležité aminy jako je například adrenalin, dopamin a noradrenalin. Heterocyklický histamin vzniká z histidinu působením enzymu histidindekarboxylasy a tryptamin vzniká z aminokyseliny tryptofanu [9,11,12,16].

1.1.4 Výskyt biogenních aminů

Stanovení biogenních aminů v potravinách a nápojích se provádí z bezpečnostních důvodů. Histamin, tyramin, putrescin a kadaverin jsou hlavní sloučeniny, které se běžně stanovují v kvašených nápojích jako je víno a pivo. Jejich obsah ve víně souvisí s ročníkem, odrůdou hroznů, a především způsobem výroby vína. I když jsou biogenní aminy přítomny po alkoholovém kvašení, vytváří se hlavně během malolaktické fermentace červených vín. Obecně platí, že koncentrace aminů ve víně jsou vyšší než v pivu. Pokud je pivo kontaminováno bakteriemi mléčného kvašení jak již během vaření, tak v průběhu uskladnění, hodnoty koncentrací jednotlivých aminů se zvyšují. Obsah biogenních aminů ve správně uvařeném a skladovaném pivu zpravidla nepřekročí hodnoty jednotek $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Současná legislativa a doporučení stanovená pro histamin ve víně a pivu, uvádí maximální povolený obsah několika $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ [10].

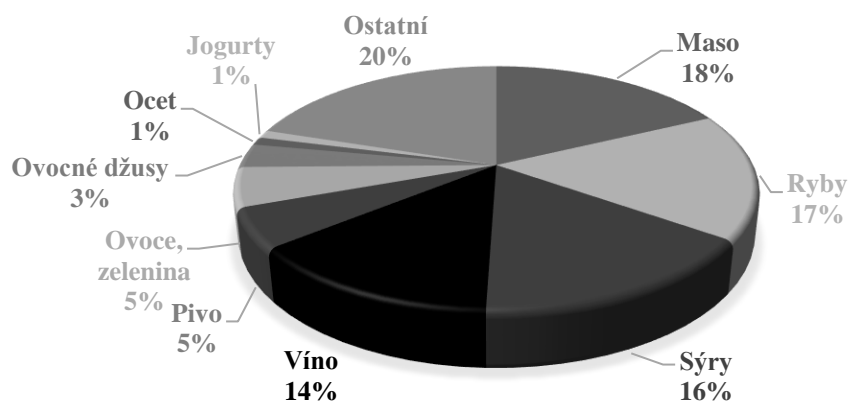
Při výrobě fermentovaných salámů a zrajících sýrů také vzrůstá koncentrace biogenních aminů. Tento nárůst je nejvýraznější v počáteční fázi výroby a je závislý na přítomnosti mikroorganismů. V některých případech obsahují tyto výrobky až $1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ histaminu, $580 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ putrescinu, $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ sperminu a $90 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ spermidinu [11].

Hlavními biogenními aminy v mase, rybách a sýrech bývají histamin, kadaverin, putrescin a tyramin. Během uchovávání masa se obsah biogenních aminů zvyšuje vlivem enzymové aktivity přítomné mikroflóry, a proto se některé aminy využívají jako indikátory kvality a čerstvosti masa. Jako příklad lze uvést čerstvé vepřové maso, které obsahuje přibližně $7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ kadaverinu a putrescinu, zatímco zkažené maso obsahuje přes $60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ těchto aminů [11].

Biogenní aminy se vyskytují také v rybím mase. V čerstvém mase je jejich obsah poměrně nízký, například maso tuňáka obsahuje maximálně $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ histaminu a maximálně $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ tyraminu. Koncentrace biogenních aminů však roste při nevhodném skladování. Při skladování ryb při teplotě kolem $0 \text{ }^\circ\text{C}$ vznikají biogenní aminy v zanedbatelném množství. Při vyšších teplotách hodnoty histaminu rapidně rostou až na hodnoty kolem $3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ u makrel a u tuňáka dokonce na hodnotu $8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ [11].

Biogenní aminy se také vyskytují v rostlinných materiálech, jako jsou například banány, pomeranče, rajčata, špenát, zelí a slad [11].

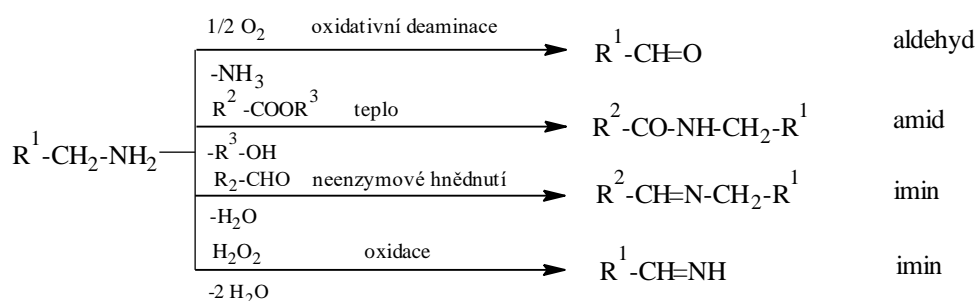
Procentuální zastoupení biogenních aminů v rostlinných i živočišných potravinách ilustruje Obrázek 5 [10].



Obrázek 5 Procentuální zastoupení biogenních aminů ve vybraných druzích potravin [10]

1.1.5 Reaktivita biogenních aminů

Biogenní aminy jsou poměrně reaktivní látky, které podléhají převážně enzymatickým reakcím. Při těchto reakcích může docházet ke vzniku různých derivátů biogenních aminů, dále mohou oxidativní deaminací poskytovat aldehydy. Při zvýšené teplotě a při dlouhodobějším skladování reagují biogenní aminy s triacylglyceroly za vzniku amidů mastných kyselin. Při reakcích neenzymového hnědnutí vznikají z aminů příslušné iminy, které také mohou vznikat oxidací aminů, například peroxidem vodíku. S bílkovinami reagují biogenní aminy za vzniku β -*N*-substituovaných derivátů diaminopropionové kyseliny. Ve vínech a ostatních alkoholických nápojích vznikají reakcí tryptaminu s aldehydy deriváty β -karbolinu. Obrázek 6 ilustruje hlavní reakce biogenních aminů [11].



Obrázek 6 Hlavní reakce biogenních aminů [11]

1.2 Stanovení biogenních aminů

Stanovení biogenních aminů je důležité zejména proto, že mohou mít přímý nebo nepřímý účinek na nervový systém a cévy. Mohou způsobovat vyrážku, bolest hlavy, nevolnost, pokles nebo naopak zvýšení krevního tlaku, bušení srdce, v krajních případech až krvácení do mozku a anafylaktický šok¹. U některých druhů sýra je stanovení biogenních aminů používáno též jako hygienická kontrola kvality při jejich výrobě nebo jako indikátor stupně proteolýzy² a charakteristiky některých druhů sýrů.

Stanovení biogenních aminů není příliš jednoduché, zejména kvůli rozmanitosti struktur těchto aminů, jejich nízké koncentraci a složitosti matric některých vzorků. Díky vysoké citlivosti a rozlišení se nejčastěji využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s obrácenými fázemi. Před vlastní analýzou se provádí izolace biogenních aminů, například pomocí extrakce kapalina-kapalina, kdy se jako rozpouštědla používají nejčastěji toluen, chloroform, dichlormethan, ethylacetát, ethanol nebo isohexan. Tato technika však vyžaduje velké množství organických rozpouštědel i vzorku, a proto je snaha o vývoj jiných technik. Nejobvyklejší metodou extrakce je extrakce na tuhou fázi (SPE), jejíž alternativou je mikroextrakce na tuhou fázi (SPME), při které se používá menší objem rozpouštědla a je využívána zejména z ekonomických a časových důvodů. Izolace biogenních aminů se také provádí pomocí kyselin, jako je například kyselina chlorovodíková, chloristá nebo trichloroctová [1,8,10,12,17].

Pro vlastní stanovení biogenních aminů se používá řada analytických technik, jako je například kapilární zónová elektroforéza (CZE), chromatografie na tenké vrstvě (TLC), plynová chromatografie (GC) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), která je nejpoužívanější. Před vlastní analýzou pomocí HPLC a CZE je potřeba provést derivatizaci vhodným činidlem, které by umožnilo spektrofotometrickou nebo fluorimetrickou detekci analytů. Pro eluci se používá gradientový eluční program sestávající z vody a acetonitrilu nebo methanolu. Derivatizace se provádí nejčastěji pomocí dansylchloridu nebo *o*-ftaldialdehydu. Před použitím plynové chromatografie je taktéž potřeba provést derivatizaci, která se provádí například pomocí izobutylchlormravenčanu (IBCF) [1,8,10,12,17].

¹ Anafylaktický šok – akutní stav vznikající v důsledku přecitlivělosti alergie k některým cizorodým látkám [18]

² Proteolýza – štěpení bílkovin na menší části [18]

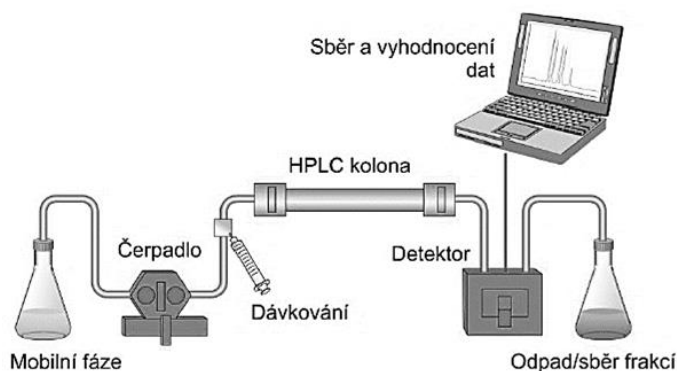
1.2.1 Chromatografické metody použitelné pro analýzu biogenních aminů

Chromatografie patří mezi separační techniky, která využívá dělení složek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je pohyblivá neboli mobilní a druhá nepohyblivá neboli stacionární. Obě fáze jsou vzájemně nemísitelné. Při dělení látek dochází k opakovanému transportu molekul mezi stacionární a mobilní fází a dochází k opakovanému ustavování rovnováhy. Určujícím faktorem pro rychlost migrace složky v chromatografickém systému jsou interakce složky a obou fází. Vzorek je umístěn na začátek stacionární fáze a pohybem mobilní fáze přes fázi stacionární je touto soustavou unášen. Silněji jsou zadržovány ty látky, které mají vyšší afinitu ke stacionární fázi. Tímto způsobem jsou od sebe odděleny jednotlivé složky analyzovaného vzorku [19-21].

1.2.1.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

V kapalinové chromatografii se jako mobilní fáze používá kapalina. V praxi se nejčastěji využívá HPLC s normálními (NP-HPLC) nebo obrácenými (RP-HPLC) fázemi. V systému s normálními fázemi je stacionární fáze polárnější než fáze mobilní a v systému s obrácenými fázemi je tomu naopak. Stacionární fáze bývá zakotvena na povrchu absorbentu, který je nejčastěji tvořen silikagelem (NP-HPLC) nebo modifikovaným silikagelem (RP-HPLC).

Mobilní fáze se do systému přivádí pístovým nebo membránovým čerpadlem, které musí odolat tlaku až 60 MPa. V HPLC se nejčastěji používá stacionární fáze typu C18. K detekci látek lze obecně použít fotometrické, refraktometrické, fluorescenční, elektrochemické, vodivostní nebo hmotnostní detektory. Výsledky analýz jsou vyobrazeny na chromatogramu v podobě píků, kdy eluční čas odpovídá dané látce (kvalita) a plocha píku odpovídá její koncentraci (kvantita) [19,21,22]. Obrázek 7 ilustruje instrumentální uspořádání kapalinového chromatografu.



Obrázek 7 Instrumentace HPLC [23]

1.2.1.2 Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií

V současnosti se již běžně používá k separaci a identifikaci látek spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (HPLC-MS). Toto spojení bylo v minulosti velmi obtížné, protože analýza pomocí kapalinového chromatografu probíhá za atmosférického tlaku, zatímco hmotnostní spektrometr pracuje za vakua. Dalším problémem byl nadbytek mobilní fáze, který je nezbytné před zavedením do hmotnostního spektrometru odstranit [24,25].

Hmotnostní spektrometr se skládá ze třech základních částí. První částí je iontový zdroj, který slouží k převedení neutrálních částic na částice nabitě, kdy dochází k takzvané ionizaci. Další částí je hmotnostní analyzátor sloužící k rozdělení iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Třetí částí je detektor, který slouží k detekci iontů po jejich rozdělení podle m/z [25,26].

V současné době se nejčastěji využívá ionizace za atmosférického tlaku, jako je například ionizace elektrosprejem (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Při ionizaci elektrosprejem prochází eluát z chromatografické kolony kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí (3-5 kV). Malé kapičky, které vznikají na výstupu z kapiláry, nesou kladný nebo záporný náboj podle polaroty vloženého napětí. Odpařováním rozpouštědla dochází k postupnému zmenšování kapiček a zároveň ke zvýšení hustoty povrchového napětí. Nakonec vznikají protonované (při snímání kladných iontů) nebo deprotonované (při snímání záporných iontů) molekulární ionty, které jsou podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) děleny v hmotnostním analyzátoru [25,26].

Chemická ionizace za atmosférického tlaku je podobná jako ESI, ale na kapiláru není vloženo napětí. U konce kapiláry je umístěna výbojová jehla a na konci kapiláry dochází k rozprašování eluátu pneumatickým zmlžovačem. Vzniklý aerosol je odpařen při vysoké teplotě (až 600 °C). Vložením napětí na výbojovou jehlu dochází ke vzniku koronárního výboje, a tím jsou ionizovány molekuly mobilní fáze. Ionty, které vznikly z mobilní fáze, následně ionizují molekuly analytu, které jsou zaznamenávány v hmotnostním analyzátoru [25,26].

Pro spojení HPLC-MS se nejčastěji používají kvadrupolové analyzátory. Dále se využívají sektorové analyzátory, analyzátory doby letu (TOF), iontová cyklotronová rezonance nebo orbitální past. Také se používají analyzátory s iontovou pastí, které se skládají z prstencové

elektrody a dvou koncových elektrod, na které je vloženo napětí. Ionty putují do pasti vstupním otvorem krátkými napěťovými pulzy a podle poměru napětí vloženého na kruhovou elektrodu a dvě koncové elektrody jsou ionty zadržovány uvnitř pasti. Při změně napětí jsou ionty vypuzovány do detektoru podle poměru m/z . Při detekci iontů se využívají elektronové násobiče, fotonásobiče a faradayovy klece [24-29].

1.2.1.3 Derivatizace a derivatizační činidla pro HPLC

Stanovení biogenních aminů pomocí kapalinové chromatografie obvykle vyžaduje derivatizaci, protože tyto sloučeniny nemají adekvátní absorpční vlastnosti ve viditelné a ultrafialové oblasti nebo fluorescenční vlastnosti.

Derivatizační reakce může být předkolonová nebo postkolonová. Při předkolonové derivatizaci probíhají derivatizační reakce před nadávkováním analyzovaných vzorků do přístroje. Při postkolonové derivatizaci je reaktor umístěn mezi kolonu a detektor.

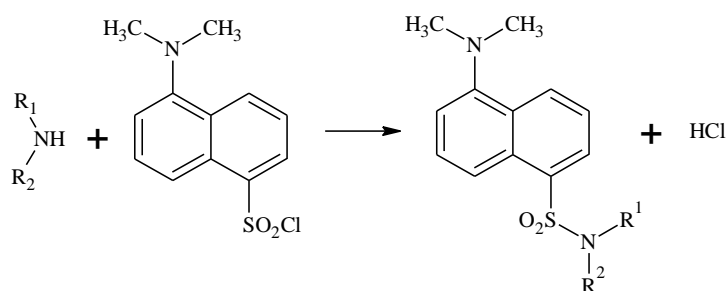
V posledních letech se mezi nejpožívanější derivatizační činidla pro biogenní aminy řadí především dansylchlorid (Dns-Cl), *o*-ftaldialdehyd (OPA), benzoylchlorid (Ben-Cl), 6-aminochinolyl-*N*-hydroxysukcinimidyl karbamát (AQC), diethylethoxymethylenmalonát (DEEMM), 4-chlor-3,5-dinitrobenzotrifluorid (CNBF), naftalen-2,3-dikarboxaldehyd (NDA) a 9-fluorenylmethylchlorformiát (FMOC). Z těchto reakčních činidel se však nejčastěji používá dansylchlorid. S tímto činidlem vznikají stabilní deriváty, které mohou být detekovány pomocí UV/VIS nebo fluorescenční spektrometrie. Nicméně, dansylchlorid je nespecifické činidlo, které může reagovat i s jinými látkami, jako jsou například fenoly nebo alifatické alkoholy. *O*-ftaldialdehyd se často používá při derivatizaci biogenních aminů ve víně. Vzhledem k jeho nestabilitě se obvykle používá spolu s jinými činidly, jako je *N*-acetylcystein nebo merkptoethanol, čímž dochází ke zlepšení citlivosti stanovení a stability derivátů. Nevýhodou *o*-ftaldialdehydu ale je, že reaguje pouze s primárními aminy a jejich fluorescenční deriváty jsou nestabilní, zatímco dansylchlorid reaguje s primárními i sekundárními aminoskupinami a poskytuje velmi stabilní deriváty.

V menší míře se používají i jiná derivatizační činidla, jako je například fenylisothiokyanát (PITC) nebo 1-naftylisothiokyanát (NITC). Některá další novější derivatizační činidla mají výhody, jako například dobrá selektivita a citlivost. Jako příklad lze uvést 2, 6-dimethyl-4-chinolinkarboxylové kyseliny (DMQCOSu), nebo ethyl-akridinsulfonylchlorid (EAC) [8,10,12].

1.2.1.4 Dansylchlorid

Dansylchlorid (Dns-Cl, 5-N,N'-dimethylaminonaftalen-1-sulfonylchlorid) je jedno z nejpoužívanějších derivatizačních činidel, které poskytuje deriváty jak s aminy, tak s některými fenoly. Reakce s primárními, sekundárními aminy a aminokyselinami probíhá v alkalickém prostředí a za několikanásobného nadbytku činidla. Rychlost dansylační reakce je závislá na hodnotě pH. Při rostoucím pH prostředí roste i rychlost hydrolyzy derivátů. Optimální hodnota pH prostředí se pohybuje v rozmezí 9,5-10.

Dansyl deriváty aminů fluoreskují při vlnových délkách $\lambda_{em} = 470-530$ nm s excitačním zářením $\lambda_{ex} = 340-380$ nm. Nevýhodou dansylace je poměrně dlouhá doba reakce, která se pohybuje až do šedesáti minut a vyšší reakční teplota, kdy je zapotřebí 60-100 °C. Výhodou je naopak jednoduchý derivatizační krok, a skutečnost, že vzniklé deriváty jsou stabilní až po dobu dvou týdnů. Dansyl deriváty jsou žluté krystalické látky, které jsou rozpustné v organických rozpouštědlech a v závislosti na hodnotě pH jsou částečně rozpustné ve vodě. Obrázek 8 ilustruje obecné schéma reakce dansylchloridu s aminy [30,31].



Obrázek 8 Schéma dansylace [30]

1.2.1.5 Plynová chromatografie (GC)

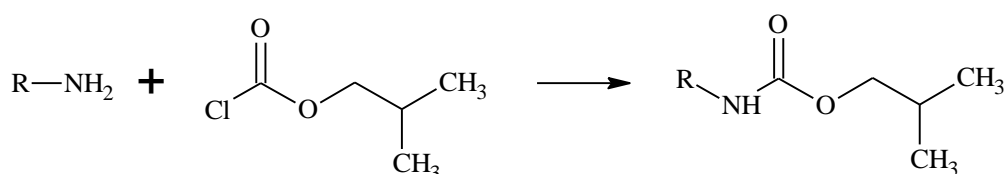
Další metodou, kterou lze analyzovat biogenní aminy je plynová chromatografie, která se ale v porovnání s HPLC používá méně často.

V plynové chromatografii je mobilní fází inertní plyn, nejčastěji dusík nebo helium. Aby mohl být vzorek unášen kolonou, musí být nejprve převeden do plynného skupenství, což se uskutečňuje vyhříváním injektorem. Dávkování vzorku do kolony se provádí přes pryžové septum. Kolona je umístěna v termostatu, který je vyhříván na určitou teplotu,

vhodnou pro separaci, častěji je však aplikován teplotní gradient. Mezi nejpoužívanější detektory řadíme plamenově ionizační detektor a hmotnostní detektor [19,22].

1.2.1.6 Derivatizace a derivatizační činidla pro GC

Derivatizace biogenních aminů se před separací pomocí GC provádí proto, aby došlo ke zvýšení těkavosti a ke snížení polaritý biogenních aminů. Plynová chromatografie pro separaci biogenních aminů se nejčastěji používá ve spojení s hmotnostním detektorem (GC-MS). Mezi nejpoužívanější derivatizační činidla pro GC patří izobutylchlormravenčan (IBCF) a *o*-heptafluorbutyryl (OHFB). Izobutylchlormravenčan reaguje rychle a poskytuje stabilní produkty. Obrázek 9 ilustruje schéma derivatizace biogenních aminů pomocí izobutylchlormravenčanu [10,17,32,33].



Obrázek 9 Schéma derivatizace biogenních aminů pomocí izobutylchlormravenčanu [33]

1.2.1.7 Chromatografie v plošném uspořádání

Jedná se o kapalinovou chromatografii, která spočívá v tom, že stacionární fáze má podobu tenké vrstvy. Při papírové chromatografii (PC) je to vlastní chromatografický papír, při tenkovrstvé chromatografii (TLC) je sorbent, nejčastěji silikagel, křemelina nebo polyamid, nanesen v tenké vrstvě, která je umístěna na různých podložkách (například sklo, hliníková destička). Chromatografie v plošném uspořádání je jednoduchá, levná metoda, která není náročná na instrumentaci a je nejčastěji používaná pro separace jednoduchých směsí [19,22].

V dnešní době dochází také u tenkovrstvé chromatografie k její modernizaci. Vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie (HPTLC) je nejvyspělejší formou tenkovrstvé chromatografie a zahrnuje použití chromatografických vrstev s nejvyšší separační účinností a použití modernější techniky přístrojů oproti klasické tenkovrstvé chromatografii. Na rozdíl od jiných

separačních technik (HPLC, GC) jsou náklady na systém HPTLC, stejně jako údržba a náklady na úpravu vzorku poměrně nízké [34].

1.2.2 Elektromigrační separační metody použitelné pro analýzu biogenních aminů

Při stanovení biogenních aminů se ze skupiny elektromigračních separačních metod nejčastěji používají kapilární zónová elektroforéza (CZE), micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC) a izotachoforéza (ITP). Elektromigrační metody jsou založené na elektroforetické migraci iontů ve stejnosměrném elektrickém poli. I přes nižší citlivost, ve srovnání s jinými separačními metodami (HPLC), jsou tyto metody rychlé, efektivní a levné z hlediska spotřeby činidel. Stejně jako u chromatografických metod je před vlastní analýzou potřebná derivatizace. Nejčastěji se používá předkolonová derivatizace dansylchloridem [10,12,22].

Kapilární zónová elektroforéza se pro stanovení biogenních aminů používá zejména díky její vysoké citlivosti, rychlosti analýzy a finanční dostupnosti. Při stanovení biogenních aminů se používá kapilární zónová elektroforéza s amperometrickou, nepřímou UV detekcí nebo laserovou fluorescenční detekcí, kapilární elektroforéza s elektrochemiluminiscenční detekcí nebo kapilární zónová elektroforéza s konduktometrickou detekcí, pomocí které lze stanovit biogenní aminy ve víně nebo pivu v hodnotách ppm bez předchozích úprav. Optimální hodnota pH elektrolytu pro stanovení biogenních aminů se pohybuje v rozmezí 5-7. Pro získání lepších výsledků je do elektrolytu přidávána kyselina adipová nebo methanol, který umožňuje oddělení sodíku od biogenních aminů, který ruší jejich stanovení [35-37].

Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie je považována za jednu z nejúčinnějších elektromigračních technik pro stanovení aminů, polyaminů a jejich derivátů. Po předchozí derivatizaci například pomocí 6-aminochinolylní-N-hydroxysukcinimidylkarbamátu (AQC) lze stanovit biogenní aminy v mléčných produktech [36].

Izotachoforéza i kapilární izotachoforéza se používají například pro stanovení biogenních aminů v moči pacientů, v mořské vodě nebo ve slaných výrobcích [38].

1.3 Biogenní aminy v sýrech

Stanovení biogenních aminů v sýrech je možné použít jako parametr hygienické kvality výroby nebo jako indikátor stupně rozložení bílkovin. Sýry patří mezi potraviny s vysokým obsahem bílkovin, a dekarboxylací aminokyselin pomocí mikrobiálních a enzymatických reakcí mohou vzniknout biogenní aminy. Při zrání sýra dochází k degradaci kaseinu a k akumulaci volných aminokyselin, které mohou být převedeny na biogenní aminy pomocí bakteriálních dekarboxyláz. Hlavními faktory, které ovlivňují tvorbu biogenních aminů, jsou pH (5-6,5), koncentrace solí, dostupnost vody, teplota, doba zrání, skladování a množství přítomných bakterií. Doba zrání sýrů je považována za kritický faktor akumulace biogenních aminů. Proteolýza vyskytující se během zrání může ve skutečnosti zvýšit uvolňování aminokyselin z kaseinu, což následně vede k akumulaci biogenních aminů. Čím delší je doba dozrávání, tím vyšší je celkový obsah aminů v sýrech. V případě, že je na výrobu sýra použito pasterizované mléko, je obsah biogenních aminů nižší, protože bakterie způsobující vznik aminů jsou při pasterizaci odstraněny. Celkový obsah tyraminu, histaminu a kadaverinu by neměl překročit hodnotu 900 mg·kg⁻¹ sýra. Prozatím však neexistuje žádná zákonná horní hranice pro biogenní aminy obsažené v sýrech [1,14,39-41].

Kmen *Lactobacillus buchneri* a *Lactobacillus 30a* v potravinách způsobují nejčastěji tvorbu histaminu, putrescinu a tyraminu. Enterokoky jsou považovány za hlavní tvůrce tyraminu. Již nízké koncentrace zástupců kmene *Enterobacteriaceae* mohou způsobovat tvorbu kadaverinu a putrescinu [1,39-42].

Většina metod pro stanovení biogenních aminů v sýrech zahrnuje extrakci kyselinou, následuje krok čištění za účelem selektivního oddělení aminů a aminokyselin.

Pro přípravu vzorků se běžně používá rozemletý nebo nakrájený sýr, ke kterému se přidává určité množství kyseliny chlorovodíkové nebo chloristé a vnitřní standard (IS), kterým bývá nejčastěji 1,7- diaminoheptan nebo norvalin. Tato směs je následně homogenizována. Vzorky bývají před dalším zpracováním čištěny a zakoncentrovány nejčastěji pomocí extrakce na tuhou fázi.

Takto upravené vzorky je potřeba před vlastní analýzou pomocí HPLC derivatizovat z důvodu jejich detekce, protože tyto sloučeniny nemají adekvátní absorpční vlastnosti ve viditelné a ultrafialové oblasti spektra. Při předkolonové derivatizaci bývá nejčastějším derivatizačním činidlem dansylchlorid. Mezi další derivatizační činidla, používaná při stanovení biogenních

aminů v sýrech patří například 6-aminochinolyl-N-hydroxysukcinimidyl karbamát (AQC), 9-fluorenylmethoxykarbonylchlorid (FMOc), benzoylchlorid (Ben-Cl) nebo dabsylchlorid (Dbs-Cl). Různí autoři uvádějí odlišné derivatizační podmínky. K reakční směsi se také obvykle přidává 1,7-diaminoheptan jako vnitřní standard (IS). Tato směs se zahřívá ve vodní lázni a ve tmě po dobu 30 minut až jedné hodiny při 40-65 °C. K odstranění přebytku derivatizačního činidla se používá L-prolin nebo hydroxid amonný a jednotlivé extrakční podíly jsou sušeny proudem dusíku [1,4,5,14,41,43-48].

Vlastní analýza biogenních aminů se nejčastěji provádí pomocí kapalinové chromatografie v systému s obrácenými fázemi (RP-HPLC). Kolony používané pro stanovení biogenních aminů v sýrech obsahují nejčastěji reverzní fázi typu C18. Eluce se provádí pomocí gradientového systému rozpouštědel, který se nejčastěji sestává z acetonitrilu a vody, popřípadě acetonitrilu a mravenčanu amonného, octanového pufru a methanolu nebo octanu sodného a acetonitrilu. Další možností, jak stanovit biogenní aminy v sýrech je ultraúčinná kapalinová chromatografie (UPLC). UPLC je kapalinová chromatografie, při které se využívá vyšších tlaků (i více než 60 MPa), než u HPLC a stacionární fáze, které mají velikost částic menší než 2 μm. Extrakce, derivatizace a detekce biogenních aminů se provádí stejným způsobem a za použití totožných derivatizačních činidel jako u HPLC. Zvláště spojení UPLC s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (HRMS) otevřelo vynikající možnosti ke zlepšení rozlišení, citlivosti a rychlosti analýzy biogenních aminů ve vzorcích potravin [1,14,43,49-58].

Při stanovení biogenních aminů v sýrech se nejčastěji používá HPLC s UV detekcí nebo detekcí diodového pole (DAD), a to při vlnových délkách pohybujících se nejčastěji kolem hodnot $\lambda = 250-275$ nm [1,43,44,57,59]. Dále se také používá HPLC s fluorescenční detekcí (HPLC-FLD). Při použití fluorescenčního detektoru se využívá měření při excitační vlnové délce $\lambda_{ex} = 285$ nm a emisní vlnové délce $\lambda_{em} = 315$ nm [10,55,57,59,60]. Také je možné použít HPLC s detektorem rozptylu světla (HPLC-ELSD), kdy není nutná derivatizace [41]. Při stanovení biogenních aminů v sýrech se také používá HPLC s hmotnostním spektrometrem, konkrétně HPLC-MS/MS. Přístrojové vybavení s trojitým kvadrupolem nabízí mnoho výhod, jako je například vyšší citlivost, dynamický rozsah a spolehlivost [56].

Stanovení biogenních aminů v sýrech je možné provést také pomocí enzymatického imunisorbentního testu (ELISA). Jedná se o analytickou metodu, která se využívá ke kvantitativnímu stanovení různých antigenů. Je založena na vysoce specifické interakci antigenu a protilátky, přičemž na jednu z těchto dvou látek je kovalentně navázán enzym. Enzym katalyzuje chemickou přeměnu substrátu, který je přidán do reakční směsi, na produkt, který je barevný. Stanovuje se pak spektrofotometricky nebo fluorimetricky [39,61].

Ke stanovení biogenních aminů v sýrech se také používají elektromigrační techniky, jako je například kapilární zónová elektroforéza (CZE), kapilární gelová elektroforéza (CGE), kapilární izotachoforéza (CITP), kapilární izoelektrická fokusace (CIEF) a micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) [27].

Doposud bylo publikováno mnoho studií zabývajících se stanovením obsahu biogenních aminů v sýrech. Tyto obsahy se lišily zejména v závislosti na druhu sýra a odlišné době zrání. Čím vyšší byla doba dozrávání, tím vyšší byl celkový obsah aminů v sýrech. V případě, že na výrobu sýra bylo použito pasterizované mléko, byl obsah biogenních aminů nižší, protože bakterie způsobující vznik aminů jsou při pasterizaci odstraněny.

Ve studii [1] byl analyzován sýr Parmigiano Reggiano. Obsah biogenních aminů se pohyboval v rozmezí přibližně 4,5 – 76 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sýra. Nejvyšší obsah byl stanoven u putrescinu (75,87 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), následoval tyramin (29,89 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) a histamin (28,55 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Nejnižší obsah byl stanoven u sperminu (4,46 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

Nejvíce zastoupeným aminem ve zrajících sýrech, které byly analyzovány ve studii [41] byl tyramin, kterého bylo nalezeno 117 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Druhým nejzastoupenějším aminem byl putrescin, kterého bylo stanoveno 83 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Dalšími v pořadí byly histamin (58 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), fenylethylamin (51 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), spermidin a kadaverin (oba kolem 31 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), spermin (27 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) a nejméně zastoupeným aminem byl agmatin (5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).

Ve studii [14] byl analyzován sýr Feta, který byl vyroben ze 70 % z ovčího mléka a 30 % z mléka kozího, u kterého byl zkoumán obsah biogenních aminů v závislosti na době zrání (1-120 dní). Celkový obsah biogenních aminů po 120 dnech zrání byl 617 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Shodně pro všechny doby zrání, putrescin, histamin a tyramin, byly přítomny v nejvyšších koncentracích. Konkrétně, po 120 dnech zrání bylo zjištěno 246 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ tyraminu, 193 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ putrescinu, 85 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ histaminu, zatímco fenylethylamin a tryptamin byly

přítomny v nižších koncentracích, které se pohybovaly okolo $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Výsledky dále ukázaly, že obsah biogenních aminů se při zrání ze 3 na 15 dní zvýšil desetinásobně, mírně se změnil z 15 na 60 dní a téměř se zdvojnásobil z 60 na 120 dní. Závěrem lze shrnout, že nízké pH a vysoký obsah soli v sýru Feta nevytváří příznivé podmínky pro dekarboxylaci aminokyselin, a proto je obsah biogenních aminů poměrně nízký v porovnání s jinými zrajícími sýry.

Studie [43] uvádí, že obsah biogenních aminů u vzorků skladovaných při $4 \text{ }^\circ\text{C}$ byl nižší než 20 mg na 100 g sýra, zatímco zrání po dobu 18 dní při $15 \text{ }^\circ\text{C}$ vedlo k masivnímu nárůstu celkového množství biogenních aminů až do 230 mg na 100 g sýra. Průměrný obsah biogenních aminů byl stanoven na 7 mg na 100 g, zatímco pouze 5 % všech sýrů mělo hodnoty vyšší než 162 mg na 100 g sýra.

Ve studii [49] byly analyzovány různé druhy rakouského, německého a českého sýra. Celková množství biogenních aminů se ve vzorcích lišila. Některé vzorky obsahovaly až 313 mg biogenních aminů na 100 g sýra, zatímco pouze některé z analyzovaných vzorků obsahovalo maximálně 90 mg biogenních aminů na 100 g sýra. Histamin byl nalezen ve většině vzorků, ale pouze 5 % sýrů obsahovalo víc než 17 mg histaminu na 100 g sýra. U tyraminu, který se také vyskytoval ve většině vzorků, byl stanoven nejvyšší obsah 160 mg na 100 g sýra. Nejvyšší hodnota putrescinu byla 84 mg na 100 g. Kadaverin byl nalezen v polovině vzorků, přičemž nejvyšší koncentrace byla 126 mg na 100 g sýra. Posledním analyzovaným aminem byl tryptamin, který se vyskytoval přibližně v 15 % vzorků s nejvyšší koncentrací 8 mg na 100 g vzorku.

Ve studii [40] byly analyzovány brazilské sýry. V největším počtu vzorků byly nalezeny spermin, dále histamin a fenylethylamin. Nejvyšší stanovené obsahy byly: 111 mg kadaverinu, 21 mg tyraminu, 20 mg histaminu a 17 mg putrescinu na 100 g vzorku. Spermin, agmatin, fenylethylamin, spermidin a tryptamin se pohybovaly v nízkých hladinách – pod hodnotu 4 mg na 100 g sýra.

Ve studii [55] byly analyzovány sýry typu camembert, gouda, edam či parmezán. Obsahy biogenních aminů se značně lišily nejen v typu sýra, ale také v rámci druhů sýra. Nejvyšší obsah histaminu byl 116 mg na 100 g vzorku sýra Tiroler Almkäse. Nejvyšší stanovený obsah tyraminu byl 49 mg na 100 g v sýru Cantal a putrescinu 52 mg na 100 g vzorku v olomouckých tvarůžkách. Maximální koncentrace kadaverinu byla 75 mg na 100 g v olomouckých tvarůžkách a v sýru camembert bylo stanoven 27 mg kadaverinu na 100 g

sýra. Nejnižší obsahy biogenních aminů byly stanoveny v sýrech typu gouda a edam. Zajímavé je, že sýry s dlouhou dobou dozríváním jako Parmigiano Reggiano a Grana Padano vykazovaly velmi nízké obsahy biogenních aminů.

1.4 Biogenní aminy ve víně

Množství biogenních aminů ve víně je ovlivněno několika faktory, jako je například stupeň zrání hroznů, druh půdy a obsah dusíkatých látek v hroznové šťávě. Zvýšený obsah biogenních aminů se obvykle vyskytuje u vín, které dlouhodobě zrají v sudech, popřípadě v lahvích. Jsou považovány za znehodnocující komponenty spolu s kyselinou mléčnou, máselnou, octovou, ethylacetátem a diethylsukcinátem. Zvýšený obsah aminů se vyskytuje u vín méně kyselých, proto také červená vína mají vyšší koncentraci biogenních aminů než vína bílá. Nejnižší množství biogenních aminů nalezneme v mladých vínech, které jsou přímo lahvovány a nejsou podrobeny dalšímu zrání. Přítomnost biogenních aminů ve vínech je také spojována s nedostatečnou hygienou během výroby vína [62,63].

Obecně platí, že u alkoholických nápojů je toxická dávka 8 až 20 mg·l⁻¹ pro histamin, 25 až 40 mg·l⁻¹ pro tyramin, zatímco už 3 mg·l⁻¹ fenylethylaminu mohou způsobit negativní fyziologické účinky.

Víno obsahuje nízké koncentrace biogenních aminů, proto je jejich stanovení poměrně obtížné. Nejvyužívanější technikou je vysokoúčinná kapalinná chromatografie (HPLC). Samotné biogenní aminy nevykazují fluorescenci ani nevykazují dostatečnou absorpci ve viditelné a ultrafialové oblasti záření, proto se pro zvýšení citlivosti detekce a selektivity při tomto stanovení využívá předkolumnové derivatizace, kdy jsou připravovány fluoreskující deriváty aminů [6,8,64-67].

Ke vzorkům vín bývá v prvním kroku přidán polyvinylpyrrolidon (PVP), který se používá na předběžnou úpravu vzorku. PVP odstraňuje ze vzorků látky, jako jsou například fenolické sloučeniny a aminokyseliny, které mají negativní vliv na derivatizaci a následnou detekci [6,8,66-71].

Takto upravené vzorky bývají před vlastní analýzou pomocí HPLC derivatizovány. Jako fluorescenční derivatizační činidla se nejčastěji používají *o*-ftaldialdehyd (OPA), dansylchlorid (DnS-Cl), dabsylchlorid (Dbs-Cl) a 6-aminochinolyl-N-hydroxysukcinimid-

karbamát (AQC), 1,2-naftochinon-4-sulfonát (NQS), 2-chlor-1,3-dinitro-5-(trifluormethyl)benzen (CNBF) a 1-fluor-2-nitro-4-(trifluormethyl)benzen (FNBT). Optimální pH pro derivatizační reakci je 7,5, ale víno má obvykle hodnotu pH okolo 3 díky obsahu organických kyselin, proto se ke vzorkům přidává hydrogenuhličitan sodný, popřípadě boritanový pufr, který pH zvyšuje. K reakční směsi se také obvykle přidává 1,7-diaminoheptan jako vnitřní standard (IS). Tato směs se zahřívá ve vodní lázni a ve tmě po dobu 30 minut až jedné hodiny při 40-65 °C. Následujícím krokem bývá zakoncentrování a přečištění derivátů nejčastěji metodou SPE, kdy se používají kolonky se sorbentem C18 a SAX, eluce je provedena nejčastěji pomocí acetonitrilu [6,8,64-74].

Vlastní analýza biogenních aminů ve vínech se provádí nejčastěji pomocí HPLC v systému s obrácenými fázemi (RP-HPLC) a s gradientovou elucí, které nejčastěji sestává z vodného pufru a acetonitrilu, methanolu či mravenčanu amonného. Jako vodná složka mobilní fáze se používá například roztok dihydrogenfosforečnanu draselného nebo hydrogenfosforečnanu sodného, upraveného na pH 5,8 pomocí kyseliny fosforečné. Některé mobilní fáze představují pufr, který je tvořen například tris-(hydroxymethyl)aminomethanem, kyselinou octovou a vodou (pH 8) nebo se používá boritanový pufr (pH 9-9,5). Stacionární fáze používaná pro stanovení biogenních aminů ve vínech je nejčastěji stacionární fáze typu C18 [6,8,24,66,75,76].

Při stanovení biogenních aminů ve víně pomocí HPLC se nejčastěji využívá fluorescenční detekce, kdy se využívá excitační vlnové délky $\lambda_{ex} = 320-340$ nm a emisní vlnové délky $\lambda_{em} = 450$ nebo 523 nm [8,68,76]. Dále se využívá spektrometrická detekce při 230, 254 a 280 nm s využitím detektoru diodového pole (DAD) [27,77] a spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (HPLC-MS). Využívá se zejména hmotnostní spektrometrie s chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI-MS). Ke stanovení biogenních aminů se také používá ultraúčinná kapalinová chromatografie (UPLC) ve spojení s hmotnostním spektrometrem vybaveným kvadrupolem a analyzátozem doby letu (UPLC/Q-TOFMS) [6,27-29,66].

Ke stanovení biogenních aminů ve víně se také používají elektromigrační techniky, jako je například kapilární zónová elektroforéza (CZE), kapilární gelová elektroforéza (CGE), kapilární izotachoforéza (CITP), kapilární izoelektrická fokusace (CIEF) a micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC). Tyto techniky se v dnešní době spojují s hmotnostním spektrometrem, který umožňuje stanovení biogenních aminů bez předchozí

derivatizace. Využívá se spojení kapilární elektroforézy, hmotnostního spektrometru s analyzátozem doby letu (CE-TOF-MS) nebo iontovou pastí (CE-IT-MS) [27,78,79].

Doposud bylo publikováno mnoho studií zabývajících se stanovením obsahu biogenních aminů ve vínech. Obecně se vyšší množství biogenních aminů vyskytuje u starších vín, které zrály po delší dobu v sudech nebo v lahvích a u méně kyselých vín. U vzorků červených, bílých a v některých studiích i růžových vín byl nejčastěji zkoumán vliv odrůdy hroznu, typ vinifikace, pH vín, malolaktická fermentace a skladování v lahvích na obsah biogenních aminů. Většina biogenních aminů se do vína dostává v průběhu jeho výroby, zatímco putrescin se běžně vyskytuje již v hroznech. Vyšší koncentrace putrescinu v hroznech je způsobena nízkou hladinou draslíku v půdě [76,80-82].

Ve studii [6] byla analyzována červená i bílá řecká vína. V červených vínech bylo stanoveno nejvyšší množství putrescinu ($3,15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), následoval ethylamin a histamin (oba přibližně $2,64 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), methylamin a tyramin (oba přibližně $1,58 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), isoamylamin ($1,24 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a fenylethylamin ($0,72 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), kadaverin ($0,53 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), spermidin ($0,34 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a nejmenší obsah připadl sperminu ($0,21 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). U bílých vín byly hodnoty stanovovaných biogenních aminů srovnatelné. V nejvyšší koncentraci byl stanoven putrescin ($2,54 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a spermin nebyl detekován v žádném vzorku bílého vína.

Ve studii [8] bylo analyzováno celkem 32 řeckých vín. Agmatin a tryptamin se vyskytovaly pouze v několika málo vzorcích, tyramin, methylamin, ethylamin a isoamylamin byly přítomny přibližně v polovině vzorků, putrescin a kadaverin byly obsaženy ve většině vzorků a histamin se vyskytoval ve všech analyzovaných vzorcích. V této studii bylo stanoveno nejvyšší množství putrescinu ($9,07 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), následoval isoamylamin ($2,02 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), histamin ($1,65 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), tryptamin ($1,32 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), tyramin ($1,16 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), ethylamin ($0,71 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), agmatin ($0,63 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), methylamin ($0,59 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a nejméně bylo stanoveno kadaverinu ($0,21 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

V další studii [66] bylo analyzováno 47 vzorků bílých, 45 červených a 8 růžových vín, z toho bylo 88 suchých, 7 polosladkých a 5 sladkých. Nejvíce převládajícími aminy byly ethylamin a putrescin, které byly přítomny ve většině vzorků. Kadaverin, methylamin a tyramin byly přítomny přibližně ve dvou třetinách vzorků a histamin a spermidin byly stanoveny přibližně v polovině vzorků. Koncentrace jednotlivých aminů se pohybovala od stopového množství až po $8,17 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (isoamylamin v červeném víně). V bílých vínech bylo stanoveno nejvyšší množství fenylethylaminu ($7,82 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), následoval histamin ($5,95 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), isoamylamin, kadaverin a spermin (všechny přibližně $4,63 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), putrescin ($3,22 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), ethylamin,

methyamin a tyramin (všechny okolo $2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a spermidin ($1,26 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). V červených vínech bylo stanoveno nejvyšší množství isoamylaminu ($8,17 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a fenylethylaminu ($8,15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a nejmenší obsah připadl methyaminu ($0,66 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Ostatní biogenní aminy v červených vínech byly stanoveny ve srovnatelných koncentracích, jako u bílých vín. V růžových vínech bylo stanoveno, na rozdíl od bílých a červených vín, nejvyšší množství kadaverinu ($4,49 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a histaminu ($4,43 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a nejméně bylo stanoveno spermidinu ($0,29 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

V ostatních prostudovaných publikacích byly stanoveny srovnatelné koncentrace biogenních aminů v červených i bílých vínech.

Ve studii [68] autoři analyzovali červená vína a vedle klasické předkolonové derivatizace byla provedena také derivatizace přímo na analytické koloně. Obě metody poskytly srovnatelné výsledky, avšak při použití derivatizace přímo na koloně byly stanoveny nepatrně vyšší obsahy biogenních aminů. Technika derivatizace na koloně se tedy zdá být dobrou alternativou ke klasické předkolonové derivatizaci.

Ve studii [75] autoři stanovovali biogenní aminy ve 30 vzorcích tureckých červených vín. Tryptamin byl stanoven ve většině vzorků, jeho nejvyšší obsah byl $7,95 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Aminy spojené s nedostatečnými hygienickými podmínkami, jako je putrescin a kadaverin, byly přítomny v malých množstvích (putrescin $5,92 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a kadaverin $3,94 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). V nejvyšším množství byl obsažen agmatin ($9,14 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a v nejmenším tyramin ($0,23 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

V další studii [76] analyzovali 163 vzorků vín (z toho: 24 bílých, 10 růžových a 129 červených), ze tří regionů Španělska. V této studii byl také studován vliv pH na obsah biogenních aminů. U vzorků vín, které měly pH nižší než 3,6 byla stanovena koncentrace histaminu menší než $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, což je v souladu s poznatkem, že čím nižší je hodnota pH, tím nižší je obsah histaminu. Vliv pH na obsah ostatních biogenních aminů nebyl prokázán. Při malolaktické fermentaci a krátkodobém skladování v lahvích (3-6 měsíců) došlo ke zvýšení koncentrace histaminu, zatímco delší doby uchovávání vedly ke snížení obsahu histaminu. U ostatních biogenních aminů, s výjimkou putrescinu, také došlo ke změně koncentrací, ale nebyly tak výrazné jako u histaminu. Putrescin byl dominantním biogenním aminem, který byl stanoven v množství až $47,3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Ostatní aminy byly přítomny ve víně v podstatně nižší koncentraci. Obsah tryptaminu a kadaverinu byl menší než $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístroje a zařízení

2.1.1 Kapalinový chromatograf

Stanovení biogenních aminů bylo provedeno na kapalinovém chromatografu Agilent 1100 Series LC/MSD trap SL (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) vybaveným spektrofotometrickým a hmotnostním detektorem, odplyňovačem mobilní fáze Vacuum Degasser DG 3014 (Ecom, Praha, ČR), kvartérní pumpou, termostatovaným automatickým dávkovačem a termostatem kolony.

Použité kolony:

- Gemini® 5 µm C18 110 Å, 150 x 3 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)
- Ascentis Express C18, 2,7 µm, 150 x 3 mm (Supelco Analytical, Praha, ČR)
- Luna 3 µm PFP (2) 100 Å, 150 x 2 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)
- Gemini® 3 µm C18 110 Å, 150 x 3 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)

2.1.2 Další zařízení

Dále byla použita následující zařízení: analytické váhy KERN ABT 220-4M (Kern & Sohn, Baligen, Německo), filtrační aparatura mobilní fáze SCHOTT (S&S, Duran, Německo), pH metr SCHOTT GC 842 (Schott Glas, Mainz, Německo), automatické pipety (Biohit, Helsinky, Finsko), minitřepačka VORTEX 1 (IKA, Staufen, Německo), vodní lázeň Memmert WB 22 (Memmert GmbH, Schwabach, Německo), ultrazvuková lázeň (Bandelin Sonorex RK 52, Bandelin GmbH, Berlín, Německo), Visiprep™ SPE Vacuum Manifold SUPELCO (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), odstředivka NF 400 (Nüve, Ankara, Terecko), magnetická míchačka Color squid (IKA, Staufen, Německo) a běžné laboratorní sklo a nádoby.

2.1.3 Spotřební materiál

Membránový filtr Fisher MCE 0,45 µm, průměr 47 mm, stříkačkové filtry LUT Syringe Filters Nylon 13 mm, 0,45µm, (LABICOM, s.r.o., Olomouc, ČR), kolonky pro SPE Strata C18-E (55µm, 70 Å), 500 mg/3ml, Strata® SCX (55µm, 70 Å), 500 mg/6 ml (obě Phenomenex, Torrance, CA, USA), Discovery® DSC-SAX, 500 mg/3ml (Supelco Analytical, Praha, ČR).

2.2 Chemikálie a standardní látky

2.2.1 Chemikálie

- acetonitril pro MS, $\geq 99,9$ % (Honeywell, Seelze, Německo)
- methanol pro MS, $\geq 99,9$ % (Honeywell, Seelze, Německo)
- methanol, $\geq 99,9$ % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- aceton, $\geq 99,8$ % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- kyselina chloristá, ≥ 70 % (VEB Laborchemie Apolda, Berlín, Německo)
- kyselina chlorovodíková, 35 % (PENTA, Praha, ČR)
- hydroxid sodný, p.a. (J. T. Baker, Deventer, Nizozemsko)
- uhličitan sodný, $\geq 99,5$ % (PENTA, Praha, Česká republika)
- mravenčan amonný, ≥ 99 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- polyvinylpyrrolidon, Mr 10 000 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

2.2.2 Standardní látky

Ke stanovení biogenních aminů byly použity následující standardní látky od firmy Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo): fenylethylamin (≥ 99 %), histamin (≥ 97 %), isoamylamin (≥ 99 %), kadaverin (≥ 95 %), putrescin (≥ 99 %), spermidin (≥ 99 %), spermin (≥ 97 %), tryptamin (≥ 98 %), tyramin (≥ 99 %) a 1,7-diaminoheptan (≥ 98 %), dansylchlorid (≥ 98 %), L-prolin (≥ 99 %).

2.2.3 Vzoroký vín

- Lahvové víno Dornfelder 2012, pozdní sběr (červené suché), Vinařství Pod Zámkem, Valtice ČR, jakostní víno s přívlastkem (alk. 12,0 %, cukr 0,3 g·l⁻¹, kyseliny 5,3 g·l⁻¹).
- Stáčené sudové víno Frankovka 2018 (červené suché), moravské zemské víno (alk. 12,5 %), cukernatost hroznů při sběru 22 °C, země původu ČR, vyrobeno ve vinařství Rustikál, LIVING 2005 s.r.o., Lednice.
- Lahvové víno Frankovka 2018 (červené suché), víno z Chorvatska (alk. 11,0 %), plněno ve Vinařství Mutěnice, ČR.
- Lahvové víno Rulandské modré 2012 (červené suché), barrique výběr z hroznů, Skalák Víno Kyjov (alk. 13,0 %, zbytkový cukr 3,8 g·l⁻¹, kyseliny 5,5 g·l⁻¹).
- Lahvové Portské víno Porto Armilar (červené likérové víno), víno z Portugalska, vinařská oblast Douro (alk. 19 %). Vyrobeno v Portugalsku.
- Lahvové víno Rulandské šedé 2017 (bílé polosuché), odrůdové bílé víno jakostní ročníkové, Znovín Znojmo, ČR (alk. 12,5 %, cukr 10,4 g·l⁻¹, kyseliny 5,9 g·l⁻¹, cukerný extrakt 21,9 g·l⁻¹), rok lahvování 2018.
- Lahvové víno Rulandské šedé 2017 pozdní sběr (bílé polosuché), jakostní víno s přívlastkem, Společnost Rajhradské Klášterní s.r.o. ČR, (alk. 12 %, zbytkový cukr 15,6 g·l⁻¹, kyseliny 6,6 g·l⁻¹).
- Lahvové víno Muscat Alb Demidulce 2019 (bílé polosladké), jižní Moldávie (alk. 12,0 %), výrobce a stáčírna I. M. Chateau Vartley, s.r.l., Moldávie.
- Lahvové víno Veltlínské zelené 2017 (bílé suché), vinařská oblast Morava, Vinařství Habřina, Bořetice (alk. 11,5 %), víno z ČR.
- Lahvové Portugieser Weißherbst 2018 (růžové polosladké), Pfalz (alk. 10 %), vyrobeno v Německu.

2.2.4 Vzorčky sýrů

- Italský sýr parmezánského typu Grana Padano. Consorzio Latterie Virgilio, Itálie.
- Sýr hermelínového typu, Král sýrů provensálské bylinky, Pribina s.r.o. Příbyslav, ČR.
- Sýr hermelínového typu, Král sýrů originál, Pribina s.r.o. Příbyslav, ČR.
- Handkäse tvarůžky, výrobce: Käserei Loose GmbH, Leppersdorf, Německo.
- Romadur, měkký zrající sýr, Madeta a.s., České Budějovice, ČR.

2.3 Pracovní postupy

• Příprava mobilní fáze

Mobilní fázi A představoval 5 mM mravenčan amonný. Roztok byl připraven navážením 0,158 g do 500 ml baňky a doplněn redestilovanou vodou po rysku (pH 6,15). Připravená mobilní fáze A byla před použitím zfiltrována přes membránový filtr Fisher MCE 0,45 μm , průměr 47 mm. Jako mobilní fáze B byl použit acetonitril pro HPLC-MS.

• Příprava kyseliny chloristé a chlorovodíkové

Kyselina chloristá (0,4 M) byla připravena napipetováním 8,7 ml HClO_4 do 250 ml odměrné baňky, které byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Kyselina chlorovodíková (0,1 M) byla připravena napipetováním 4,41 ml 35 % kyseliny chlorovodíkové do 500 ml odměrné baňky, která byla následně doplněna destilovanou vodou po rysku.

• Příprava roztoku dansylchloridu

Roztok dansylchloridu byl připraven navážením 10 mg do 10 ml baňky a doplněn po rysku acetonem (koncentrace $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$).

• Příprava roztoku L-prolinu

Roztok L-prolinu byl připraven navážením 100 mg do 10 ml baňky, který byl doplněn destilovanou vodou a dále byl ředěn odpipetováním 1 ml do 10 ml baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku (koncentrace $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$).

- **Příprava roztoku hydroxidu sodného**

Roztok hydroxidu sodného (2 M) byl připraven rozpuštěním 20 g NaOH ve 250 ml destilované vody.

- **Příprava zásobních roztoků standardních látek**

Zásobní roztoky jednotlivých biogenních aminů (fenylethylaminu, isoamylaminu, histaminu, kadaverinu, putrescinu, spermidinu, sperminu, tryptaminu a tyraminu), jejichž koncentrace byla $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, byly připraveny tak, že bylo naváženo 50 mg každého aminu do 10 ml baňky a doplněny po rysku 0,4 M kyselinou chloristou. Z těchto zásobních roztoků byl připraven směsný roztok všech biogenních aminů tak, že bylo pipetováno 200 μl každého standardu z baňky o koncentraci $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ do 10 ml baňky, která byla následně doplněna 0,4 M kyselinou chloristou po rysku (koncentrace $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

- **Příprava kalibračních roztoků**

Ze směsného roztoku o koncentraci $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ každého biogenního aminu byla připravena kalibrační řada, která sestávala z osmi bodů o koncentraci 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5 a $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Byla připravena postupným pipetováním 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150 a 200 μl ze směsného roztoku o koncentraci $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ každého biogenního aminu do 10 ml odměrné baňky, která byla následně doplněna po rysku 0,4 M kyselinou chloristou.

- **Postup derivatizace**

Každý analyzovaný roztok byl před analýzou derivatizován následujícím postupem: 1 ml standardního roztoku (samotného standardu nebo směsi) byl pipetován do zkumavky s uzávěrem a bylo přidáno 50 μl 1,7-diaminoheptanu (vnitřní standard, IS), 150 μl 2 M hydroxidu sodného a 300 μl nasyceného roztoku uhličitanu sodného (pH 11). Zkumavka byla uzavřena a směs byla vortexována přibližně 30 sekund. Poté byl k roztoku přidán 1 ml dansylchloridu v acetonu (koncentrace $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), lékovka byla opět uzavřena a směs byla vortexována přibližně 30 sekund, a poté ponechána 60 minut na vodní lázni při $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ve tmě. Po ochlazení bylo přidáno 200 μl L-prolinu ($1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) a roztok byl ponechán 15 minut ve tmě. Po derivatizaci byly roztoky filtrovány do vialek, a poté analyzovány pomocí systému HPLC-UV/MS.

- **Úprava vzorků**

Před vlastní derivatizací bylo nutné vzorky vín upravit podle následujícího postupu. K 10 ml vína bylo naváženo 0,5 g polyvinylpirolidonu, který odstraňuje interferenty ze vzorku. Vzniklá směs byla 10 minut míchána na magnetickém míchadle, dále byla odstředěna při rychlosti otáček 3600 g po dobu 10 minut. Supernatant byl použit k derivatizaci a následné analýze.

Při analýze sýrů byly použity nakrájené, popřípadě nastrouhané vzorky (dle konzistence sýra). K 5 g sýra bylo přidáno 10 ml 0,4 M kyseliny chloristé a vzniklá směs byla přibližně 2 minuty vortexována. Následně byla směs umístěna do centrifugačních zkumavek a jednotlivé vzorky byly odstředěny po dobu 10 minut při otáčkách 3600 g. Poté byla provedena derivatizace a analýza pomocí systému HPLC-UV/MS.

2.4 Podmínky chromatografické analýzy

Pro stanovení biogenních aminů byly po optimalizaci metody použity následující podmínky:

Kolona: Gemini[®] 3 μm C18 110 Å, 150 x 3 mm

Mobilní fáze A: 5 mM mravenčan amonný

Mobilní fáze B: acetonitril

Průtok: 0,6 ml·min⁻¹

Gradientová eluce: 0 min.: 55 % MF B, 5-10 min.: 60 % MF B, 12 min.: 90 % MF B

Teplota kolony: 35 °C

Dávkovaný objem: 20 μl

Detekce: UV (254 nm), MS

Pro hmotnostní detekci byl použit iontový zdroj APCI v pozitivním módu a další nastavené podmínky byly následující:

Corona: + 4000

Nebulizer: 60.0 psi

Průtok sušícího plynu: 6 ml·min⁻¹

Sušící teplota: 350 °C

Vypařovací teplota: 450 °C

Scan rozdělen na čtyři segmenty: 1. 250-400 m/z, cílová hmota 355; 2. 500-900 m/z, cílová hmota 580; 3. 800-900 m/z, cílová hmota 845; 4. 1000-1300 m/z, cílová hmota 1135

Stabilita sloučeniny: 100 %

Trap drive level: 100 %

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Optimalizace postupu derivatizace

Na úvod experimentu byly optimalizovány podmínky derivatizace na standardech analyzovaných biogenních aminů. Ve studii [24] pracovali s roztokem dansylchloridu v acetonu o koncentraci $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Při přípravě roztoku o této koncentraci však bylo zjištěno, že nedochází k rozpuštění dansylchloridu a po vložení do ultrazvukové lázně došlo k vysrážení a zakalení roztoku. Z tohoto důvodu byl připraven roztok dansylchloridu v acetonu o koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, který byl používán po celou dobu a pro všechny experimenty. V prostudovaných publikacích [1,6,24] byl použit jako vnitřní standard 1,7-diaminoheptan. Nejprve byly postupně derivatizovány jednotlivé standardy analyzovaných biogenních aminů, a poté byla připravena směs všech standardů biogenních aminů, která byla následně derivatizována a analyzována.

Byl testován následující postup, který vycházel z publikace [24]: k 1 ml roztoku standardu nebo směsi bylo přidáno 50 μl vnitřního standardu (1,7-diaminoheptan, IS; o koncentraci $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Dále bylo ke směsi přidáno 150 μl 2 M NaOH a 300 μl nasyceného roztoku Na_2CO_3 jehož pH bylo upraveno na hodnotu 11 a vzniklá směs byla přibližně 30 sekund vortexována. Následně byl přidán 1 ml dansylchloridu (koncentrace $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) a směs byla opět 30 sekund vortexována. Poté byly zkumavky uzavřeny a vloženy do vodní lázně na 60 minut při $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ve tmě. Po uplynutí 60 minut byly deriváty ochlazeny a bylo přidáno 200 μl L-prolinu (koncentrace $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) a výsledná směs byla ponechána 15 minut ve tmě při laboratorní teplotě, poté zfiltrována do vialek a analyzována.

Také byla testována trojnásobná a pětinasobná množství směsného roztoku standardů za použití původního poměru ostatních látek, ale v tomto případě derivatizační reakce neproběhla kvantitativně. Také byla testována trojnásobná a pětinasobná množství všech použitých roztoků, což bylo v tomto případě téměř srovnatelné s původními podmínkami (1 ml vzorku + 1 ml činidla), avšak výsledky byly o něco nižší v porovnání s původními podmínkami.

Také byla testována derivatizace která probíhala po dobu 30 minut. Bylo zjištěno, že při kratší době derivatizace neprobíhá reakce kvantitativně, konkrétně při 30 minutách probíhá zhruba z 80 %. Z důvodu kvantitativního průběhu reakce byl tedy zvolen čas derivatizace 60 minut.

Tento postup derivatizace se ukázal být optimální, a proto byla dále pozornost zaměřena na optimalizaci chromatografických podmínek separace derivátů biogenních aminů.

Během provádění experimentální práce bylo také potvrzeno, že připravené deriváty jsou velmi stabilní až po dobu 14 dnů, jak uvádí publikace [30].

3.2 Optimalizace chromatografických podmínek

Pro optimalizaci chromatografických podmínek bylo testováno několik stacionárních fází. Dále byl také zkoumán vliv složení mobilní fáze, jejího průtoku, gradientu a objemu nástřiku na separaci biogenních aminů. K detekci byl použit spektrofotometrický detektor, na kterém byla provedena detekce derivátů biogenních aminů při 254 nm (dle prostudované literatury), a také hmotnostní detektor, jehož podmínky byly také upraveny a optimální podmínky jsou uvedeny v kapitole 2.4. Po optimalizaci metody byly tyto podmínky použity při analýze biogenních aminů ve vzorcích vín a sýrů.

3.2.1 Volba stacionární fáze

K separaci biogenních aminů se nejčastěji používá chromatografický systém s obrácenými fázemi (RP-HPLC), nejčastěji za využití stacionární fáze typu C18 [1,8,10,24,27]. Na kolonách se stacionární fází typu C18 docházelo k zadržování biogenních aminů, ale nedocházelo k rozdělení všech látek, a proto bylo testováno více kolon s různými rozměry a velikostmi částic. V této práci byly testovány tři kolony se stacionární fází typu C18, a také stacionární fáze pentafluorofenyl (PFP), který je dobrou alternativou ke kolonám typu C18. Separace na této koloně probíhala obdobným způsobem jako na kolonách typu C18, pouze nedocházelo k rozdělení fenylethylaminu a isoamylaminu. Ukázková separace standardů na koloně Luna 3 μm PFP (2) 100 \AA , (150 x 2 mm), je uvedena na **obrázku I** v příloze.

Nejlepší separace derivátů biogenních aminů bylo dosaženo na koloně Gemini[®] 3 μm C18 110 \AA , (150 x 3 mm), a proto byla tato kolona použita při validaci metody a analýze vzorků vín a sýrů.

3.2.2 Optimalizace složení mobilní fáze

Na základě prostudované literatury byl k separaci biogenních aminů jako jedna složka mobilní fáze nejprve použit 10 mM mravenčan amonný [24], který byl následně nahrazen

5 mM mravenčanem amonným z důvodu lepší ionizace derivátů biogenních aminů pro hmotnostní detekci. Čím menší je koncentrace pufru mobilní fáze, tím dochází k lepší ionizaci látek. Jako organická složka mobilní fáze byl testován methanol a acetonitril, oba určené pro hmotnostní detekci. Při použití methanolu nedocházelo k separaci jednotlivých standardů biogenních aminů a docházelo k rozštěpení píků na hmotnostním detektoru a ke chvostování píků při spektrofotometrické detekci, proto byl zvolen acetonitril pro hmotnostní detekci. Ukázkovou separaci biogenních aminů s použitím methanolu pro MS ilustruje **obrázek II** uvedený v příloze.

3.2.3 Optimalizace gradientové eluce

Při optimalizaci podmínek separace bylo testováno několik různých gradientů, aby bylo dosaženo co nejlepší separace biogenních aminů. Vybrané příklady dalších testovaných gradientových elucí jsou uvedeny v příloze na **obrázku III**. Jako nejlepší byla vyhodnocena gradientová eluce: 0 min: 55 % acetonitrilu, 5-10 min: 60 % acetonitrilu a 12 min: 90 % acetonitrilu. Za těchto podmínek byly rozděleny všechny analyzované biogenní aminy během 20 minut a byly dostatečně odděleny od píků derivatizačního činidla a různých jeho produktů, které se eluují do prvních 5 minut analýzy.

3.2.4 Optimalizace průtoku mobilní fáze a velikosti nástřiku

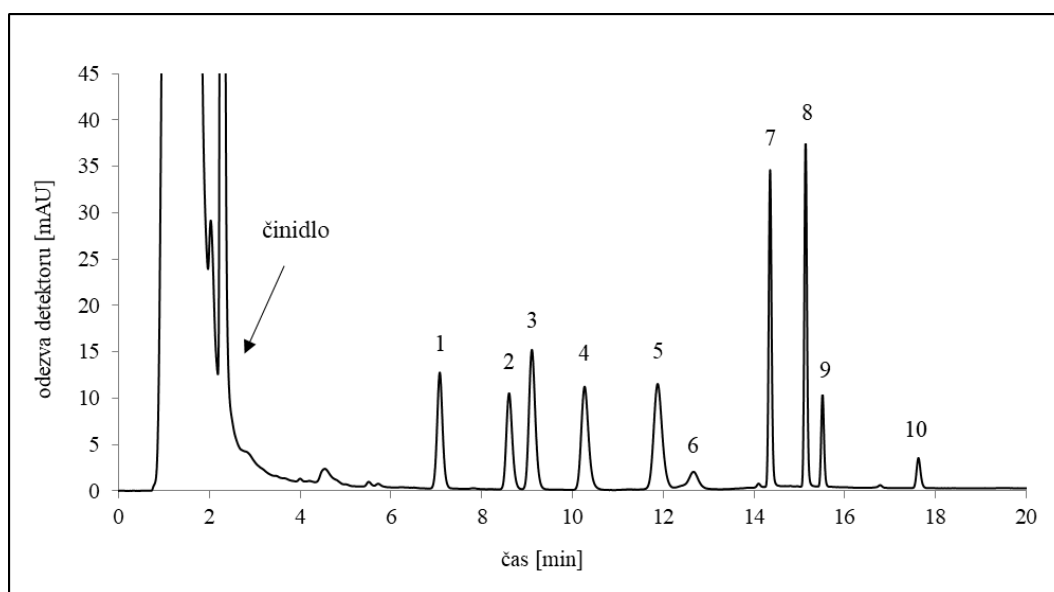
Pro zvolenou kolonu Gemini[®] 3 μm C18 110 Å, (150 x 3 mm), bylo testováno několik různých průtoků mobilní fáze a různých objemů nástřiku vzorku. Bylo testováno pět průtoků: 0,4; 0,45; 0,5; 0,6 a 0,7 ml·min⁻¹. Jako nejlepší byl zvolen průtok mobilní fáze 0,6 ml·min⁻¹. Při průtoku 0,7 ml·min⁻¹ již docházelo ke koeluci fenylethylaminu a isoamylaminu a 1,7-diaminoheptanu a tyraminu. Velikost nástřiku byla zvolena 20 μl , kdy byly dostatečně velké odezvy. U většího nástřiku (30 μl) již docházelo ke štěpení píků při hmotnostní detekci.

3.2.5 Optimalizace podmínek hmotnostní detekce

Jako první byl testován pozitivní a negativní mód ionizace. Při negativním módu nedocházelo k ionizaci derivátů biogenních aminů, a proto byl po celou dobu experimentu používán pozitivní mód. Dále byl testován průtok sušícího plynu a sušící teplota. Z důvod vyššího průtoku mobilní fáze byl používán nejvyšší možný průtok sušícího plynu, který přístroj umožňoval (6 ml·min⁻¹) a sušící teplota 350 °C byla zvolena dle doporučení výrobce, také

s ohledem na průtok mobilní fáze. Při analýze derivátů biogenních aminů byla nejprve použita jako cílová hmota průměrná hodnota molekulové hmotnosti derivátů všech analyzovaných biogenních aminů. Ale vzhledem k tomu, že hodnoty molekulových píků derivátů se pohybovaly od 321 do 1135, nebylo vhodné používat jejich průměrnou hodnotu, z toho důvodu, že nedocházelo k optimálnímu zaznamenání všech analyzovaných látek. Analýza byla tedy rozdělena na čtyři segmenty, ve kterých byly použity průměrné hodnoty molekulových hmotností navzájem si blízkých derivátů biogenních aminů a bylo tedy možné provést hmotnostní detekci všech derivátů biogenních aminů v jedné analýze. Optimální podmínky pro hmotnostní detekci jsou uvedeny v kapitole 2.4. Na **obrázku IV** v příloze jsou uvedeny extrahované iontové chromatogramy a na **obrázku V** v příloze jsou uvedena spektra dansyl derivátů standardů biogenních aminů.

Na obrázku 10 je zobrazena ukázková separace standardů biogenních aminů při optimálních podmínkách za použití spektrofotometrické detekce.



Obrázek 10 Ukázková separace standardů derivátů biogenních aminů

Podmínky analýzy: kolona Gemini® 3 μm C18 110 Å (150 x 3 mm); MF A 5 mM mravenčan amonný, MF B acetonitril; nástrík 20 μl ; teplota kolony 35 °C; průtok mobilní fáze 0,6 ml·min⁻¹; gradientová eluce 0 min.: 55 % MF B, 5-10 min.: 60 % MF B, 12 min.: 90 % MF B; UV detekce 254 nm.
Legenda: 1. tryptamin, 2. fenylethylamin, 3. isoamylamin, 4. putrescin, 5. kadaverin, 6. histamin, 7. 1,7-diaminoheptan (IS), 8. tyramin, 9. spermidin, 10. spermin

3.3 Validační parametry chromatografické metody

Po dokončené optimalizaci všech podmínek bylo přistoupeno k validaci metody. V této diplomové práci byly jako důležité validační parametry vybrány: meze detekce, meze stanovitelnosti, linearita, návratnost kalibrační řady a opakovatelnost (jednodenní i vícedenní).

V následující tabulce 1 jsou uvedeny retenční časy, molekulové hmotnosti biogenních aminů a hmotnosti molekulových pík derivátů při použití optimalizovaných podmínek separace.

Tabulka 1 Chromatografické a detekční charakteristiky standardů

| Analyt | Retenční čas [min] | Molekulová hmotnost [g·mol ⁻¹] | Molekulový pík [M+H] ⁺ |
|----------------|--------------------|--|-----------------------------------|
| tryptamin | 7,1 | 160,22 | 394 |
| fenylethylamin | 8,6 | 121,18 | 355 |
| isoamylamin | 9,1 | 87,16 | 321 |
| putrescin | 10,2 | 88,15 | 555 |
| kadaverin | 11,9 | 102,78 | 569 |
| histamin | 12,6 | 111,15 | 578 |
| tyramin | 15,2 | 137,18 | 604 |
| spermidin | 15,5 | 145,25 | 845 |
| spermin | 17,6 | 202,34 | 1135 |

3.3.1 Meze detekce a stanovitelnosti

Mezí detekce (Limit of Detection, LOD) se rozumí nejnižší detekovatelné množství analytu ve vzorku a mezí stanovitelnosti (Limit of Quantification LOQ) se rozumí nejnižší množství analytu ve vzorku, které lze kvantitativně stanovit s určitou definovanou přesností. Mez detekce představuje koncentraci, která je rovna trojnásobku šumu základní linie a mez stanovitelnosti představuje koncentraci, která poskytuje signál rovný desetinásobku šumu základní linie.

K určení šumu byla nejprve třikrát proměřena čistá mobilní fáze A, ze které byla odečtena hodnota šumu v časech, které byly blízké retenčním časům standardů. Hodnoty mezí detekce a stanovitelnosti analyzovaných biogenních aminů byly vyhodnoceny výpočtem z kalibračních závislostí výšek pík na koncentraci biogenních aminů a jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2 Meze detekce a stanovitelnosti analyzovaných biogenních aminů

| Analyt | LOD [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] | | LOQ [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] | |
|-----------------------|---|------------|---|------------|
| | UV detekce | MS detekce | UV detekce | MS detekce |
| tryptamin | 10,6 | 25,4 | 35,2 | 121,3 |
| fenylethylamin | 19,6 | 31,1 | 46,5 | 103,7 |
| isoamylamin | 13,8 | 21,7 | 41,5 | 72,4 |
| putrescin | 16,9 | 54,2 | 42,3 | 108,2 |
| kadaverin | 16,7 | 37,9 | 41,6 | 110,3 |
| histamin | 77,8 | 68,3 | 291,0 | 227,8 |
| tyramin | 17,7 | 94,5 | 53,2 | 315,1 |
| spermidin | 16,6 | 377,4 | 54,8 | 1257,9 |
| spermin | 70,4 | 359,0 | 234,7 | 1196,0 |

Hodnoty mezi detekce pro spektrofotometrickou detekci se pohybovaly řádově v desítkách $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, konkrétně v rozmezí 10,6 až 77,8 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. U hmotnostní detekce se hodnoty mezi detekce taktéž pohybovaly řádově v desítkách $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ s výjimkou spermidinu a sperminu, u kterých se hodnoty pohybovaly okolo 360 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Meze stanovitelnosti se u spektrofotometrické detekce pohybovaly v rozmezí od 35,2 do 291 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a u hmotnostní detekce v rozmezí od 72,4 do 1257,9 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. U spektrofotometrické detekce byla mez detekce a stanovitelnosti nejmenší pro tryptamin a nejvyšší pro histamin. Meze detekce a stanovitelnosti pro hmotnostní detekci byly nejnižší u isoamylaminu a nejvyšší u spermidinu. Jak je patrné z tabulky 2 pro stanovení biogenních aminů je citlivější spektrofotometrická detekce, u které bylo dosaženo nižších hodnot mezi detekce a stanovitelnosti pro všechny biogenní aminy, v porovnání s detekcí hmotnostní.

3.3.2 Kalibrační závislosti standardů

Kalibrační roztoky směsi standardů byly připraveny postupným ředěním zásobního roztoku, který měl koncentraci 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Každý bod kalibrace byl třikrát derivatizován a následně analyzován. Grafy kalibračních závislostí byly sestrojeny vynesemím závislosti plochy píků na koncentraci biogenních aminů. Také byly sestrojeny grafy kalibračních závislostí poměru ploch standardu a vnitřního standardu na koncentraci biogenních aminů.

Rozsah kalibračních závislostí pro spektrofotometrickou detekci se u většiny standardů pohyboval v rozmezí od 0,05 do 2 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, ale rozsah kalibrace pro spermin byl 0,25 až 2 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a pro histamin 0,5 až 2 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, protože body 0,25, respektive 0,1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, u těchto dvou

látek byly pod mezí stanovitelnosti. Kalibrační rozsah u hmotnostní detekce se pohyboval v rozmezí od 0,1 do 2 mg·l⁻¹ u většiny standardů s výjimkou histaminu (od 0,25 do 2 mg·l⁻¹) a tyraminu (od 0,5 do 2 mg·l⁻¹) a to ze stejného důvodu jako u spektrofotometrické detekce. Jednotlivé kalibrační grafy pro spektrofotometrickou i hmotnostní detekci jsou uvedeny v příloze na **obrázcích IV-X** a parametry kalibrační závislosti ploch píků na koncentraci jsou uvedeny v tabulce 3. Grafy kalibračních závislostí poměru ploch standardu a vnitřního standardu na koncentraci biogenních aminů jsou taktéž uvedeny v příloze na **obrázcích XI-XV**.

Po vyhodnocení záznamu z hmotnostního detektoru a vypočítání mezí detekce a stanovitelnosti bylo zjištěno, že v případě spermidinu a sperminu byly pouze dva body z kalibrační řady nad mezí stanovitelnosti, a tudíž nebyly pro tyto dvě látky nakonec kalibrační závislosti připraveny.

Tabulka 3 Parametry kalibračních závislostí (závislosti ploch píků na koncentraci)

| Analyt | UV detekce | | Návratnost [%] * | MS detekce | | Návratnost [%] * |
|-----------------------|-----------------|----------------|------------------|-----------------|----------------|------------------|
| | Rovnice regrese | R ² | | Rovnice regrese | R ² | |
| tryptamin | 46,058x+11,412 | 0,9813 | 92,34 | 23,189x+2,9774 | 0,9912 | 75,93 |
| fenylethylamin | 46,337x+1,0303 | 0,9923 | 93,66 | 26,311x+7,4735 | 0,9908 | 95,44 |
| isoamylamin | 69,721x+1,0378 | 0,9897 | 97,43 | 42,459x+9,3655 | 0,974 | 88,47 |
| putrescin | 61,329x-0,4834 | 0,9882 | 85,74 | 54,874x+0,9686 | 0,9907 | 82,27 |
| kadaverin | 69,657x+0,9321 | 0,9874 | 91,31 | 67,589x+9,6202 | 0,9826 | 83,52 |
| histamin | 7,8531x+0,0755 | 0,9601 | 117,46 | 17,754x+6,2008 | 0,9708 | 114,54 |
| tyramin | 76,04x+0,9069 | 0,9846 | 98,33 | 128,03x-18,203 | 0,9791 | 71,69 |
| spermidin | 18,842x-0,249 | 0,9832 | 90,48 | - | - | - |
| spermin | 9,3458x+1,4327 | 0,9722 | 105,93 | - | - | - |

* pro koncentraci 1 mg·l⁻¹ (n = 3)

Téměř ve všech případech bylo dosaženo uspokojivé lineariry, což dokazují korelační koeficienty, které se pohybují v rozmezí od 0,9601 do 0,9923 u spektrofotometrické detekce a od 0,9708 do 0,9912 u hmotnostní detekce. Nejmenší korelační koeficienty pro spektrofotometrickou detekci byly stanoveny pro histamin (0,9601) a spermin (0,9722). Také jejich směrnice má nejnižší hodnotu (jednociferná čísla) a tudíž jejich přímka nemá

takovou strmost v porovnání s ostatními biogenními aminy, u kterých se hodnota směrnice pohybuje ve dvojciferných číslech.

V literatuře se u kalibračních závislostí také objevuje parametr „recovery“, který by se dal přeložit jako návratnost kalibrační řady, což znamená, jak daný bod zapadá do kalibrační řady. Při stanovení tohoto parametru byl připraven derivát směsi biogenních aminů, který se lišil od bodů kalibrační řady. Hodnoty ploch tohoto bodu byly dosazeny do příslušné kalibrační řady. Ideální návratnost kalibrační řady je 100 %. Nejlepší návratnosti u spektrofotometrické detekce bylo dosaženo u tyraminu (98,33 %) a u hmotnostní detekce u fenylethylaminu (95,44 %). V některých případech se hodnoty návratnosti pohybovaly nad 100 %, například u histaminu pro spektrofotometrickou i hmotnostní detekci.

Kvantifikace biogenních aminů v reálných vzorcích byla provedena pomocí spektrofotometrické detekce, která je pro stanovení biogenních aminů citlivější v porovnání s hmotnostní detekcí. Výpočet byl proveden z kalibračních závislostí poměru ploch standardu a vnitřního standardu na koncentraci biogenního aminu, z důvodu lepších korelačních koeficientů. Korelační koeficienty se u těchto kalibračních závislostí pro spektrofotometrickou detekci pohybovaly v rozmezí 0,9853 (spermin) až 0,9969 (putrescin). Pro hmotnostní detekci se korelační koeficienty pohybovaly v rozmezí 0,9805 (tyramin) až 9944 (histamin).

3.3.3 Opakovatelnost

Opakovatelnost bývá měřena z důvodu vyhodnocení velikosti náhodné chyby při analýze. Opakovatelnost je přesnost měření, které je prováděno ve stejné laboratoři, jedním analytikem, na stejném přístroji a v co nejkratším čase.

Připravené derivatizované standardy biogenních aminů byly proměřeny vždy v rámci jednoho a deseti dnů na dvou koncentračních hladinách (0,1 a 1 mg·l⁻¹). Tímto způsobem byla zjištěna intraday (jednodenní) a interday (vícedenní) opakovatelnost výsledků.

Pro spektrofotometrickou detekci nebylo možné provést stanovení opakovatelnosti na hladině 0,1 mg·l⁻¹ pro histamin a spermin, protože jejich meze stanovitelnosti byly vyšší než tato hladina. U hmotnostní detekce bylo možné testovat opakovatelnosti na hladině 0,1 mg·l⁻¹ pro tryptamin, fenylethylamin a putrescin; isoamylamin a kadaverin byly také zařazeny,

přestože jejich meze stanovitelnosti byly mírně pod touto hladinou. Ostatní biogenní aminy nebyly na této hladině pro hmotnostní detekci testovány.

V tabulce 4 a 5 jsou uvedeny výsledky jako relativní směrodatné odchylky ploch píků (RSD) z pěti analýz, které byly provedeny v jednom dni a odchylky z deseti analýz, které byly provedeny po dobu deseti po sobě jdoucích pracovních dnů. Přestože hodnoty mezi stanovitelnosti spermidinu a sperminu byly pouze mírně nad hladinou $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ byly zahrnuty do testování opakovatelnosti pro hmotnostní detekci.

Tabulka 4 Intraday (jednodenní) opakovatelnost

| Analyt | Intraday $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (n=5) | | Intraday $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (n=5) | |
|-----------------------|---|-----------------------|---|-----------------------|
| | UV detekce RSD [%] | MS detekce RSD [%] | UV detekce RSD [%] | MS detekce RSD [%] |
| tryptamin | 3,2 | 5,9 | 0,2 | 2,7 |
| fenylethylamin | 1,0 | 7,2 | 0,4 | 1,9 |
| isoamylamin | 1,9 | 7,9 | 0,4 | 5,6 |
| putrescin | 0,6 | 7,8 | 0,8 | 2,8 |
| kadaverin | 1,4 | 9,3 | 0,3 | 5,3 |
| histamin | - | - | 1,0 | 3,0 |
| tyramin | 1,3 | - | 1,4 | 10,2 |
| spermidin | 2,3 | - | 1,7 | 5,3 |
| spermin | - | - | 1,7 | 7,4 |

Hodnoty RSD pro spektrofotometrickou detekci se u jednodenní opakovatelnosti testované na hladině $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ pohybovaly v rozmezí 0,6 až 3,2 % a pro hladinu $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 0,2 až 1,7 %. U hmotnostní detekce se pohybovaly hodnoty RSD na nižší hladině v rozmezí 5,9 až 9,3 % a pro vyšší testovanou hladinu se hodnoty RSD pohybovaly v rozmezí 1,9 až 10,2 %. Lepších výsledků bylo dosaženo u testované hladiny $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ve srovnání s hladinou $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, a také spektrofotometrická detekce poskytovala lepší výsledky v porovnání s hmotnostní detekcí. U spektrofotometrické detekce se hodnoty RSD pohybovaly pod 2 % a u hmotnostní detekce pod 10 % (s výjimkou tyraminu, 10,2 %).

Tabulka 5 Interday (vícedenní) opakovatelnost

| Analyt | Interday 0,1 mg·l ⁻¹ (n=10) | | Interday 1 mg·l ⁻¹ (n=10) | |
|-----------------------|--|-----------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| | UV detekce RSD [%] | MS detekce RSD [%] | UV detekce RSD [%] | MS detekce RSD [%] |
| tryptamin | 10,0 | 9,4 | 7,3 | 3,3 |
| fenylethylamin | 3,9 | 4,6 | 0,8 | 3,3 |
| isoamylamin | 2,8 | 5,3 | 0,6 | 3,3 |
| putrescin | 4,6 | 5,7 | 1,0 | 4,9 |
| kadaverin | 3,0 | 6,8 | 4,0 | 3,5 |
| histamin | - | - | 2,8 | 4,1 |
| tyramin | 1,3 | - | 1,7 | 6,6 |
| spermidin | 5,8 | - | 1,8 | 5,2 |
| spermin | - | - | 2,2 | 5,3 |

Hodnoty RSD pro hladinu 0,1 mg·l⁻¹, která byla testována v průběhu deseti po sobě jdoucích pracovních dnů, se pro spektrofotometrickou detekci pohybovaly v rozmezí 1,3 až 10,0 % a pro hladinu 1 mg·l⁻¹ se hodnoty pohybovaly v rozmezí 0,6 až 7,3 %. Pro hmotnostní detekci byly hodnoty na nižší testované hladině 4,6 až 9,4 % a na vyšší hladině 3,3 až 6,6 %. Stejně jako u jednodenní opakovatelnosti bylo lepších výsledků dosaženo u testované hladiny 1 mg·l⁻¹.

3.4 Optimalizace podmínek zakoncentrování derivátů biogenních aminů

Množství biogenních aminů ve vzorcích vín a sýrů je podle publikovaných dat poměrně malé. Z důvodu očekávaného malého množství biogenních aminů v reálných vzorcích byly optimalizovány podmínky zakoncentrování derivátů biogenních aminů na směsi standardů biogenních aminů. V prostudovaných publikacích se k extrakci biogenních aminů z potravinářských matric nejčastěji používají SPE kolonky typu C18 a SAX [6,66,68]. V této diplomové práci byly testovány tři druhy sorbentů. Jednalo se o sorbenty typu C18, SAX a SCX. Sorbent SCX nebyl v literatuře popsán, ale byl doporučen prodejcem pro tuto aplikaci.

V aplikačním listu výrobce bylo uvedeno, že aktivace kolonky se provádí trojnásobným množstvím jejího objemu, a proto byly kolonky nejprve aktivovány 9 ml methanolu a následně 9 ml redestilované vody. Následně bylo na kolonky aplikováno 5 ml roztoku derivátů. Proteklý podíl by jímán a analyzován, aby bylo zjištěno, zda dochází k zachycení analytů. Dále byla kolonka promyta 9 ml 5% methanolu, za účelem vymytí interferujících látek. Tento podíl byl také jímán a analyzován. V posledním kroku byl aplikován 1 ml acetonitrilu, do kterého by měly být analyty zakoncentrovány.

Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití kolonek se sorbentem C18, u kterých nedocházelo ke ztrátám analytů ani při promývání 5% methanolem. Stanovené výtěžnosti jsou uvedeny v následující podkapitole. U kolonek SAX nedocházelo k zachycení biogenních aminů na sorbentu, a proto nebyly dále používány při zakoncentrování derivátů ve vzorcích vín. U kolonek SCX také docházelo ke ztrátám analytů již při aplikaci vzorku, ale zajímavé je, že v porovnání s kolonkami typu C18 docházelo k vyššímu zachycení sperminu (98 %).

3.4.1 Stanovení výtěžnosti

Výtěžnost kolonek se sorbentem C18 byla stanovena z pěti opakovaných extrakcí výpočtem z ploch píků před a po zakoncentrování s přihlédnutím k zakoncentrovacímu faktoru.

Hodnoty výtěžnosti se pohybovaly od 52,9 % do 96,2 %. Nejvyšší výtěžnost byla stanovena pro isoamylamin (96,2 %). U tryptaminu a fenylethylaminu byla hodnota výtěžnosti přibližně 96 %, u putrescinu a kadaverinu přibližně 92,5 %, u tyraminu 81,7 %, u histaminu a spermidinu 79,7 % a nejmenší hodnota výtěžnosti byla stanovena pro spermin (53 %).

3.5 Výsledky analýzy vzorků

Po optimalizaci všech podmínek metody byla tato metoda aplikována na reálné vzorky vín a sýrů, ve kterých byla provedena kvalitativní a kvantitativní analýza biogenních aminů. Podle prostudované literatury bylo nejprve potřeba před vlastním derivatizačním postupem jednotlivé vzorky vín a sýrů upravit. Konkrétní postupy jsou uvedeny v kapitole 2.3 [1,6,8].

3.5.1 Výsledky analýzy vína

Jak je popsáno v literatuře [6,8,32,66], je nejprve zapotřebí vzorky vín upravit pomocí polyvinylpyrrolidonu, který odstraňuje interferenty (například fenolické sloučeniny a aminokyseliny) ze vzorku. Po této úpravě vzorků byla provedena derivatizace 1 ml vzorku. Také byla provedena derivatizace 3 a 5 ml vzorku při zachování stejného poměru ostatních chemikálií, i při trojnásobném, popřípadě pětinasobném množství chemikálií, avšak při těchto objemech nedocházelo ke kvantitativní reakci. Z tohoto důvodu byl dále pro všechny vzorky vín používán optimální postup derivatizace za použití 1 ml vzorku vína.

Dále byl na reálné vzorky vín aplikován optimalizovaný postup zakoncentrování derivátů biogenních aminů pomocí různých typů sorbentů (C18, SCX, SAX). Zřejmě kvůli přítomnosti přibližně 12 % ethanolu ve vzorku nedocházelo k úplnému zachycení analytu na žádném typu z testovaných kolonek. Zachycení analytu bylo pozorováno pouze u kolonky typu C18, ale pouze zhruba z 30 %. Zakoncentrovávání tedy nebylo dále na reálné vzorky vín aplikováno.

V této diplomové práci bylo analyzováno 10 vzorků vín, z toho 5 červených, 4 bílá a 1 růžové víno. V tabulce 6 je uvedeno rozdělení vín podle obsahu zbytkového cukru a podle barvy (charakteristika vín) a je zde uvedeno změřené pH jednotlivých vzorků vín.

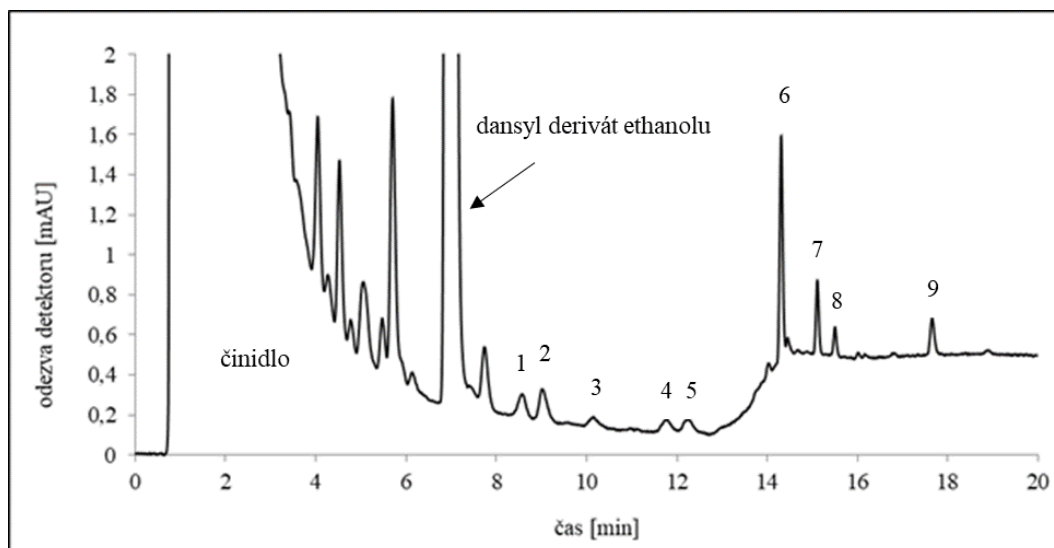
Tabulka 6 Charakteristika vzorků vín

| Vzorek vína | charakteristika vín | pH |
|--|---------------------|------|
| Dornfelder | červené suché | 4,05 |
| Frankovka (stáčená) | červené suché | 3,62 |
| Frankovka (lahvová) | červené suché | 3,52 |
| Rulandské modré | červené suché | 3,76 |
| Portské (Porto Armilar) | červené likérové | 3,50 |
| Rulandské šedé (Znovín Znojmo) | bílé polosuché | 3,46 |
| Rulandské šedé (Rajhradské Klášterní) | bílé polosuché | 3,41 |
| Muscat Alb Demidulce | bílé polosladké | 3,28 |
| Veltlínské zelené | bílé suché | 3,52 |
| Portugieser Weißherbst | růžové polosladké | 3,39 |

Hodnoty pH se u analyzovaných vzorků vín pohybovaly v rozmezí 3,28 až 4,05. Jak je patrné z tabulky 6, červená vína mají nepatrně vyšší hodnotu pH, a tudíž jsou méně kyselá v porovnání s víny bílými a růžovými. Podle literatury by měla vína s vyšší hodnotou pH obsahovat vyšší množství biogenních aminů.

Obsah biogenních aminů ve vínech byl analyzován za podmínek uvedených v experimentální části této diplomové práce. Obsahy biogenních aminů byly kvantifikovány pomocí spektrofotometrického detektoru. Hmotnostní detektor byl využit pro potvrzení sledovaných derivátů. U každého vzorku vína se v 7. minutě pravidelně objevoval pík s molekulovou hmotou 280, proto byl proveden pokus s roztokem 15% ethanolu, který byl derivatizován a zanalyzován pomocí HPLC-UV/MS. V této analýze se také objevil pík s molekulovou hmotou 280. Tímto pokusem i výpočtem bylo potvrzeno, že se jedná o dansyl derivát ethanolu.

Ukázkový chromatogram derivatizovaného vzorku vína Rulandské šedé (Znovín Znojmo) je uveden na následujícím obrázku 11.



Obrázek 11 Ukázkový chromatogram vzorku vína Rulandské šedé (Znovín Znojmo)

Podmínky analýzy: kolona Gemini® 3 μm C18 110 Å (150 x 3 mm); MF A 5 mM mravenčan amonný, MF B acetonitril; nástřik 20 μl ; teplota kolony 35 °C; průtok mobilní fáze 0,6 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$; gradientová eluce 0 min.: 55 % MF B, 5-10 min.: 60 % MF B, 12 min.: 90 % MF B; UV detekce 254 nm.
Legenda: 1. fenylethylamin, 2. isoamylamin, 3. putrescin, 4. kadaverin, 5. histamin, 6. 1,7-diaminoheptan (IS), 7. tyramin, 8. spermidin, 9. spermin

V literatuře [62,63] je popsáno, že obsahy biogenních aminů jsou vyšší u červených vín. U vzorků vín, které byly analyzovány v této diplomové práci byl však překvapivě obsah biogenních aminů v bílých vínech srovnatelný (v jednom případě i vyšší, Rulandské šedé, Znovín Znojmo) s obsahy biogenních aminů v červených vínech.

V prvním analyzovaném červeném vínu Dornfelder byl stanoven putrescin, jehož obsah byl 86,1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a tyramin s obsahem 65,2 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Dále byl v tomto vzorku nalezen fenylethylamin pod mezí stanovitelnosti. Ve vzorku stáčeného vína Frankovka byly přítomny biogenní aminy fenylethylamin, putrescin, kadaverin a histamin, jejichž obsahy ale byly pod mezí stanovitelnosti. V lahvové Frankovce byl stanoven tyramin s obsahem 223,6 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a dále zde byly přítomny fenylethylamin, isoamylamin a putrescin pod mezí stanovitelnosti. Ve vínu Rulandské modré byl v nejvyšším množství stanoven spermin, jehož obsah byl 246,1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, dále byl stanoven spermidin (199 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), putrescin (188,9 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) a nejméně bylo stanoveno fenylethylaminu (47,5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). Dále byly v tomto víně detekovány isoamylamin a histamin. V likérovém Portském vínu byl stanoven spermidin, jehož obsah byl 76,9 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, putrescin 68,2 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a kadaverin 45,9 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Pod mezí stanovitelnosti byly také přítomny fenylethylamin, isoamylamin a histamin.

Ve vínu Rulandské šedé (Znovín Znojmo) bylo nalezeno osm biogenních aminů. Dominantním biogenním aminem zde byl tyramin, kterého bylo stanoveno $1073 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, což zároveň představuje nejvyšší nalezené množství vůbec ze všech vzorků. Další v pořadí byly spermin ($663,4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), spermidin ($262,7 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), kadaverin ($252,7 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), fenylethylamin ($146,8 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) a putrescin ($81,3 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). Nejmenší množství bylo stanoveno isoamylaminu $61,7 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Histamin byl přítomen pod mezí stanovitelnosti. Ve vzorku vína Rulandské šedé (Rajhradské Klášterní) byl v nejvyšším množství stanoven putrescin s obsahem $78,0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Dále byl stanoven isoamylamin ($44,4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) a také byly detekovány fenylethylamin a histamin. Ve vínu Muscat Alb Demidulce byl těsně nad mezí stanovitelnosti stanoven isoamylamin, jehož obsah byl $42,0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Dále byly v tomto vzorku detekovány putrescin, histamin a spermin. Ve vínu Veltlínské zelené byl stanoven tyramin, jehož obsah byl $61,3 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a dále zde byl přítomen isoamylamin pod mezí stanovitelnosti. V růžovém vínu Portugieser Weißherbst byl stanoven pouze jeden biogenní amin, a to putrescin s obsahem $47 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Všechny tyto biogenní aminy byly také detekovány pomocí hmotnostní detekce, která je pro stanovení biogenních aminů méně citlivá v porovnání se spektrofotometrickou detekcí, a tudíž se obsahy těchto biogenních aminů pohybovaly většinou pod mezí stanovitelnosti.

V literatuře je popsáno, že v závislosti na době zrání a skladování vín dochází ke zvyšování obsahu biogenních aminů. Na základě tohoto poznatku byla analýza vzorků Rulandské modré, Rulandské šedé (Znovín Znojmo) a Portugieser Weißherbst provedena po ponechání těchto tří vzorků při laboratorní teplotě po dobu jednoho a dvou týdnů. Po analýze vzorků, které byly ponechány při laboratorní teplotě jeden týden byly zjištěny srovnatelné hodnoty jednotlivých biogenních aminů jak u červeného, bílého, tak u růžového vína. Po dvou týdnech byly tyto vzorky znovu derivatizovány a proměřeny. Bylo zjištěno, že u červeného a růžového vína jsou výsledky srovnatelné. U bílého vína došlo po 14 dnech k nárůstu obsahu isoamylaminu, kterého bylo stanoveno $88,9 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ oproti původním $61,7 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Nejzastoupenějším biogenním aminem v analyzovaných vzorcích vín byl putrescin, který byl stanoven v devíti vzorcích vín. Dalším v pořadí byl fenylethylamin, přítomný v sedmi vzorcích. Následovaly isoamylamin a histamin, které byly přítomny v šesti vzorcích, tyramin ve čtyřech vzorcích a kadaverin, spermidin a spermin byly přítomny ve třech vzorcích vín. V žádném analyzovaném vzorku vín nebyl nalezen tryptamin. Nejvyšší stanovené množství bylo $1073 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ tyraminu ve vínu Rulandské šedé (Znovín Znojmo).

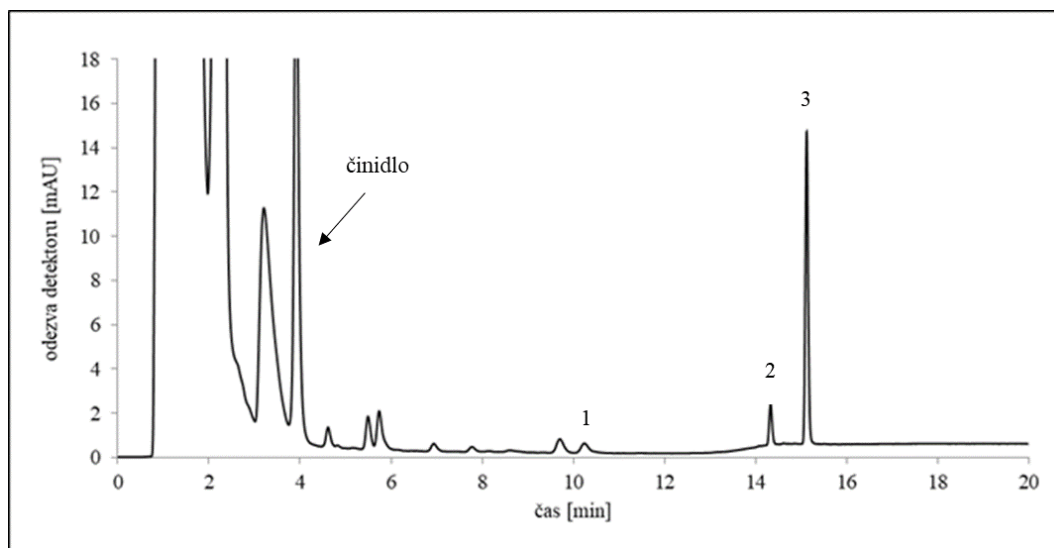
V porovnání s publikovanou literaturou byly ve vínech analyzovaných v této diplomové práci nalezeny podstatně nižší obsahy biogenních aminů. Z toho vyplývá, že místní vinaři dbají na správný technologický proces výroby, lahvování a uchovávání vín. Spotřebitel se tedy nemusí obávat rizik, které jsou spojeny s přítomností biogenních aminů ve vínech.

3.5.2 Výsledky analýzy sýrů

Stanovení biogenních aminů v sýrech je možné použít jako parametr hygienické kvality výroby. Jejich doba zrání je považována za kritický faktor akumulace biogenních aminů. Čím delší je doba zrání, tím vyšší je obsah biogenních aminů v sýrech.

V této diplomové práci bylo analyzováno celkem 5 vzorků různých druhů zrajících sýrů. Podle studií [1,40] byla extrakce biogenních aminů ze všech vzorků nejprve provedena pomocí 0,1 M kyseliny chlorovodíkové. Po vyhodnocení bylo zjištěno, že v této kyselině nedochází k dokonalé extrakci analyzovaných biogenních aminů. Proto byla vyzkoušena 0,4 M kyselina chloristá, která se ukázala být vhodnějším extrakčním činidlem, protože biogenní aminy se do ní extrahovaly podstatně více.

Na obrázku 12 je znázorněn ukázkový chromatogram biogenních aminů v sýrech, konkrétně se jedná o zrající sýr Tvarůžky.



Obrázek 12 Ukázkový chromatogram vzorku sýra Tvarůžky

Podmínky analýzy: kolona Gemini® 3 μm C18 110 Å (150 x 3 mm); MF A 5 mM mravenčan amonný, MF B acetonitril; nástřik 20 μl ; teplota kolony 35 °C; průtok mobilní fáze 0,6 ml·min⁻¹; gradientová eluce 0 min.: 55 % MF B, 5-10 min.: 60 % MF B, 12 min.: 90 % MF B; UV detekce 254 nm.
Legenda: 1. putrescin, 2. 1,7-diaminoheptan (IS), 3. tyramin

V prvním analyzovaném sýru parmezánského typu byl stanoven kadaverin s obsahem 81,3 μg na 100 g sýra. Dále byly přítomny isoamylamin a putrescin pod mezí stanovitelnosti. V sýru hermelínského typu s provensálskými bylinkami byl stanoven putrescin, jehož obsah byl 44,6 μg na 100 g sýra, a dále byl detekován isoamylamin. V sýru hermelínského typu Král sýrů originál byl stanoven putrescin s obsahem 37,1 μg na 100 g sýra. V tomto sýru byly také přítomny isoamylamin a tyramin, oba pod mezí stanovitelnosti. Dalším analyzovaným vzorkem byly Tvarůžky. V tomto zrajícím sýru byl v nejvyšším množství stanoven tyramin, jehož obsah byl 163,1 μg na 100 g sýra a dále byl stanoven putrescin, jehož obsah byl 20,5 μg na 100 g sýra. Ve vzorku sýra Romadur bylo stanoveno celkem šest biogenních aminů. Nejvíce zastoupeným biogenním aminem byl histamin, kterého bylo stanoveno 2760,1 μg na 100 g sýra, což je zároveň nejvyšší stanovené množství ze všech vzorků vůbec. Dále byly stanoveny tyramin (869,8 μg na 100 g sýra), kadaverin (275,6 μg na 100 g sýra), isoamylamin (8,9 μg na 100 g sýra) a nejméně bylo stanoveno putrescinu (8,8 μg na 100 g sýra). Pod mezí stanovitelnosti byl také přítomen fenylethylamin.

V literatuře je popsáno, že v závislosti na době zrání sýrů dochází ke zvyšování obsahu biogenních aminů. Na základě tohoto poznatku byla analýza vzorku Tvarůžky provedena po ponechání tohoto vzorku při laboratorní teplotě po dobu jednoho a dvou týdnů. Po analýze

vzorku, který byl ponechán při laboratorní teplotě jeden týden, byly zjištěny srovnatelné hodnoty obsahu jednotlivých biogenních aminů jako po analýze čerstvého vzorku sýra. Po dvou týdnech uchovávání bylo zjištěno, že došlo k vytvoření fenylethylaminu, který v čerstvém vzorku stanoven nebyl. Obsah fenylethylaminu byl 28,9 μg na 100 g sýra. Také došlo přibližně ke zdvojnásobení obsahu putrescinu, kterého bylo původně stanoveno 20,5 μg na 100 g sýra a po čtrnáctidenním „zráním“ 44,9 μg na 100 g sýra. Naopak je zajímavé, že v případě tyraminu došlo ke stanovení menšího množství po čtrnáctidenním skladování (29,9 μg na 100 g sýra) v porovnání s čerstvým vzorkem sýra (163,1 μg na 100 g sýra).

Nejzastoupenějším biogenním aminem v analyzovaných vzorcích zrajících sýrů byl putrescin, který byl stanoven ve všech vzorcích. Dalším v pořadí byl isoamylamin přítomný ve čtyřech vzorcích. Následoval tyramin, který byl přítomen ve třech vzorcích, fenylethylamin a kadaverin ve dvou vzorcích a nejméně zastoupeným aminem byl histamin, který byl přítomen pouze v jednom vzorku sýra. V žádném analyzovaném vzorku zrajících sýrů nebyly nalezeny tryptamin, spermidin a spermin. Nejvyšší množství biogenních aminů bylo stanoveno v sýru Romadur celkem 3923 μg na 100 g sýra. V nejvyšším množství byl stanoven histamin s obsahem 2760,1 μg na 100 g sýra.

V porovnání s literaturou byly ve vybraných vzorcích zrajících sýrů, které byly analyzovány v této diplomové práci, stanoveny podstatně menší množství biogenních aminů. To znamená, že v analyzovaných vzorcích není přítomné větší množství bakterií, které způsobují vznik biogenních aminů. Z toho vyplývá, že výrobci dbají na hygienický proces výroby, nebo že bylo na výrobu sýra použito pasterizované mléko, ve kterém jsou bakterie způsobující vznik biogenních aminů pasterizací odstraněny.

4 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat chromatografickou metodu pro stanovení biogenních aminů v potravinách a poté tuto metodu aplikovat na reálné vzorky vín a zrajících sýrů. Celkem bylo analyzováno 10 vzorků vín a 5 vzorků sýra.

Nejprve byl optimalizován postup převedení biogenních aminů na dansyl deriváty. Dále byly optimalizovány chromatografické podmínky, při nichž se také vycházelo z postupů, které byly uvedeny v literatuře. V této práci byl optimalizován výběr stacionární fáze, složení a průtok mobilní fáze, objem nástřiku a také byla optimalizována gradientová eluce a podmínky hmotnostního detektoru. Dále byla na standardech optimalizována metoda extrakce biogenních aminů na tuhou fázi. Při aplikaci této metody na vzorky vín však byl zjištěn negativní vliv matrice s přítomností alkoholu, kvůli kterému nedocházelo k záchytu derivátů biogenních aminů na sorbentech kolonky.

Po optimalizaci metody bylo přistoupeno ke stanovení validačních parametrů. V této diplomové práci byly jako důležité validační parametry vybrány: meze detekce, meze stanovitelnosti, linearita, návratnost kalibrační řady a jednodenní i vícedenní opakovatelnost.

Při analýze vzorků vín a sýrů bylo sledováno celkem devět biogenních aminů: fenylethylamin, histamin, isoamylamin, kadaverin, putrescin, spermidin, spermin, tryptamin a tyramin. Nejzastoupenějším biogenním aminem v analyzovaných vzorcích vín byl putrescin, který byl stanoven v devíti vzorcích vín, a na druhé straně v žádném vzorku nebyl přítomen tryptamin. V nejvyšším množství byl stanoven tyramin ($1073 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) ve vínu Rulandské šedé (Znovín Znojmo). Ve vzorcích vín se také pravidelně objevoval pík s molekulovou hmotou 280. Pokusem bylo potvrzeno, že se jedná o dansyl derivát ethanolu. Nejzastoupenějším biogenním aminem v analyzovaných vzorcích zrajících sýrů byl putrescin, který byl stanoven ve všech pěti vzorcích. Naproti tomu, v žádném analyzovaném vzorku zrajících sýrů nebyly nalezeny tryptamin, spermidin a spermin. Nejvyšší množství biogenních aminů bylo stanoveno v sýru Romadur – celkem $3923 \mu\text{g}$ na 100 g sýra.

V porovnání s literaturou bylo v této diplomové práci stanoveno podstatně menší množství biogenních aminů ve vzorcích vín i sýrů. Z toho vyplývá, že technologický proces výroby je dobře zvládnut, stejně tak jako hygiena zpracování, výroby a uchovávání potravin.

5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] INNOCENTE N., BIASUTTI M., PADOVESE M., MORET S. Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract. *Food Chemistry*. **2007**, 101 (3), 1285–1289. ISSN: 0308-8146.
- [2] HALASZ A., BARATH A., SIMON-SARKADI L., HOLZHAPEEL W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology*. **1994**, 5, 42–46. ISSN: 0924-2244.
- [3] SHALABY A. R. Multidetector, semiquantitative method for determining biogenic amines in foods. *Food Chemistry*. **1995**, 52, 367–372. ISSN: 0308-8146.
- [4] MORET S., SMELA D., POPULIN T., CONTE L. S. A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables. *Food Chemistry*. **2005**, 89, 355–361. ISSN: 0308-8146.
- [5] VINCI G., ANTONELLI M. L. Biogenic amines: quality index of freshness in red and white meat. *Food Control*. **2002**, 13, 519–524. ISSN: 0956-7135.
- [6] LOUKOU Z., ZOTOU A. Determination of biogenic amines as dansyl derivatives in alcoholic beverages by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection and characterization of the dansylated amines by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2003**, 996, 103–113. ISSN: 0021-9673.
- [7] MO DUGO G., VILASI F., LA TORRE G. L., PELLICANO, T. M. Reverse phase HPLC/DAD determination of biogenic amines as dansyl derivatives in experimental red wines. *Food Chemistry*. **2006**, 95, 672–676. ISSN: 0308-8146.
- [8] PROESTOS CH., LOUKATOS P., KOMAITIS M. Determination of biogenic amines in wines by HPLC with precolumn dansylation and fluorimetric detection. *Food Chemistry*. **2008**, 106 (3), 1218–1224. ISSN: 0308-8146.
- [9] MATOUŠ B., et. Al. *Základy lékařské chemie a biochemie*. Praha: Galén, 2010. ISBN: 978-807262-702-8.

- [10] ORDONEZ J. L., TRONCOSO A. M., GARCÍA-PARRILLA M. D. C., CALLEJÓN R. M. Recent trends in the determination of biogenic amines in fermented beverages - A review. *Analytica Chimica Acta*. **2016**, 939, 10–25. ISSN: 0003-2670.
- [11] VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J. *Chemie potravin II*. 3. vydání. Tábor: OSSIS, 2009. 644 s. ISBN: 978-80-86659-16-9.
- [12] ŮNAL A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food chemistry*. **2007**, 103 (4), 1475-1486. ISSN: 0308-8146.
- [13] LADERO V., CALLES-ENRIQUEZ M., FERNANDEZ M., ALVAREZ M. A. Toxicological effects of dietary biogenic amines, *Current Nutrition & Food Science*. **2010**, 6, 145-156. ISSN: 2212-3881.
- [14] VALSAMAKI K., MICHAELIDOU A., POLYCHRONIADOU A. Biogenic amine production in Feta cheese. *Food Chemistry*. **2000**, 71, 259-266. ISSN: 0308-8146.
- [15] PENA-GALLEGO A., HERNÁNDEZ-ORTE P., CACHO J., FERREIRA V. High-performance liquid chromatography analysis of amines in must and wine: a review. *Food Reviews International*. **2012**, 28, 71-96. ISSN: 1525-6103.
- [16] LIMA A. S., GLÓRIA M. B. A. Aminas bioativas em alimentos. *Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*. **1999**, 33, 70–79. ISSN: 0101-3637.
- [17] ALMEIDA C., FERNANDES J.O., CUNHA S.C. A novel dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) method for the determination of eighteen biogenic amines in beer. *Food Control*. **2012**, 25, 380-388. ISSN: 0956-7135.
- [18] Velký lékařský slovník. *Maxdorf* [online]. Maxdorf, © 1998-2018 [cit. 4. 10. 2018]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/>
- [19] CHURÁČEK J. a kol. *Analytická separace látek*. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN: 80-03-00569-8.
- [20] LAPA-GUIMARAES J., PICKOVA J. New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid. *Journal Chromatography A*. **2004**, 1045, 223–232. ISSN: 0021-9673.

- [21] NOVÁKOVÁ L., DOUŠA M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1. vydání. Praha: Europrint a.s., 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [22] ŠTULÍK K. a kol. *Analytické separační metody*. Praha: Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum, 2004. ISBN: 80-246-0852-9.
- [23] HPLC Analysis. In: *G.I.T. Laboratory Journal* [online]. Wiley-Blackwell © 2018. [cit. 30. 10. 2018]. Dostupné z: https://www.laboratory-journal.com/sites/git-labor.de/files/images/special/53056402__original.jpg
- [24] CZAJKOWSKA-MYSLEK A., LESZCZYŃSKA J. Liquid Chromatography–Single-Quadrupole Mass Spectrometry as a Responsive Tool for Determination of Biogenic Amines in Ready to-Eat Baby Foods. *Chromatographia*. **2018**, 81, 901–910. ISSN: 1612-1112.
- [25] HOLČAPEK M., JANDERA P. Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). *Chemické Listy*. **1998**, 92, 278–286. ISSN: 1213-7103.
- [26] NORKOVÁ R., JAKLOVÁ DYTRTOVÁ J., KAŠIČKA V. Ionizační techniky a rozhraní pro spojení kapilárních elektromigračních metod s hmotnostně spektrometrickou detekcí. *Chemické Listy*. **2013**, 107, 949–955. ISSN: 1213-7103.
- [27] YAN-YUN G., YAN-PING Y., QIAN P., YE H. Biogenic amines in wine: a review. *International Journal of Food Science and Technology*. **2015**, 50, 1523–1532. ISSN: 1365-2621.
- [28] GARCIA-VILLAR N., HERNANDEZ-CASSOU S., SAURINA J. Determination of biogenic amines in wines by pre-column derivatization and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2009**, 1216, 6387–6393. ISSN: 0021-9673.
- [29] JIA S., KANG Y.P., PARK J.H., LEE J., KWON S.W. Determination of biogenic amines in Bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) wines using a novel ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry. *Food Chemistry*. **2012**, 132, 1185–1190. ISSN: 0308-8146.

- [30] KOMÁREK K., FRANC J., CHURÁČEK J. Reakční chromatografie v organické analýze. Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1989. ISBN: 80-03-00153-6.
- [31] Derivatizační reakce v HPLC. HPLC.cz [online]. Mgr. Michal Douša Ph.D., HPLC.CZ © 1999-2016 [cit. 1. 11. 2018]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz>
- [32] SMITH A. Y., DU TOIT W. J., DU TOIT M. Biogenic Amines in Wine: Understanding the Headache. *South African Journal of Enology and Viticulture*. **2008**, 29, 2. ISSN: 2224-7904.
- [33] PAPAGEORGIOUA M., LAMBROPOULOUA D., MORRISONB C., NAMIEŚNIK J., PŁOTKA-WASYLKAC. Direct solid phase microextraction combined with gas chromatography – Mass spectrometry for the determination of biogenic amines in wine. *Talanta*. **2018**, 183, 276-282. ISSN: 0039-9140.
- [34] Instruments, Tools and Concepts for HPTLC. Camag [online]. CAMAG Scientific, Inc. © 2018 [cit. 14. 11. 2018]. Dostupné z: https://www.camag.com/en/tlc_hptlc/what_is_tlchptlc.cfm
- [35] KVASNIČKA F., VOLDŘICH M. Determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis with conductometric detection. *Journal of Chromatography A*. **2006**, 1103, 145-149. ISSN: 0021-9673.
- [36] OGURI S. Electromigration methods for amino acids, biogenic amines and aromatic amines. *Journal of Chromatography B*. **2000**, 747, 1-19. ISSN: 1570-0232.
- [37] MOLINA M., SILVA. In-capillary derivatization and analysis of amino acids, amino phosphonic acid-herbicides and biogenic amines by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*. **2002**, 23, 2333–2340. ISSN: 1522-2683.
- [38] XU Z., OKADA J., TIMERBAEV A. R., HIROKAWA T. Sensitive profiling of biogenic amines in urine using CE with transient isotachophoretic preconcentration. *Journal of Separation Science*. **2009**, 32, 4143–4147. ISSN: 1615-9314.

- [39] STRATTON J. E., HUTKINS R. W., TAYLOR S. L. Biogenic Amines in Cheese and other Fermented Foods: A Review. *Journal of Food Protection*. **1991**, 54 (6), 460-470. ISSN: 1944-9097.
- [40] VALE S. M., GLHIA B. A. Biogenic amines in Brazilian cheeses. *Food Chemistry*. 1998, 63 (3), 343-348. ISSN: 0308-8146.
- [41] SPIZZIRRI U. G., RESTUCCIA D., CURCIO M., PARISI O. I., IEMMA F., PICCI N. Determination of biogenic amines in different cheese samples by LC with evaporative light scattering detector. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2013**, 29, 43-51. ISSN: 0889-1575.
- [42] RECSEI P.A., SNELL E.E. Histidine decarboxylase of *Lactobacillus* 30a. Comparative properties of wild type and mutant proenzymes and their derived enzymes. *Journal of Biological Chemistry*. **1982**, 257, 7196-7202. ISSN: 0021-9258.
- [43] FIECHTER G., SIVÉC G., MAYER H. K. Application of UHPLC for the simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in ripened acid-curd cheeses. *Journal of Chromatography B*. **2013**, 927, 191-200. ISSN: 1570-0232.
- [44] SI-JIN L., JUAN-JUAN X., CHANG-LU M., CHUN-FENG G. A comparative analysis of derivatization strategies for the determination of biogenic amines in sausage and cheese by HPLC. *Food Chemistry*. **2018**, 266, 275–283. ISSN: 0308-8146.
- [45] PRETI R., ANTONELLI M. L., BERNACCHIA R., VINCI G. Fast determination of biogenic amines in beverages by a core-shell particle column. *Food Chemistry*. **2015**, 187, 555–562. ISSN: 0308-8146.
- [46] BRUCKNER H., FLASSIG S., KIRSCHBAUM J. Determination of biogenic amines in infusions of tea (*Camellia sinensis*) by HPLC after derivatization with 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride (Fmoc-Cl). *Amino Acids*. **2012**, 42, 877–885. ISSN: 1438-2199.
- [47] JIA S., RYU Y., KWON S. W., LEE J. An in situ benzylation-dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic droplets for determination of biogenic amines by liquid chromatography-ultraviolet analysis. *Journal of Chromatography A*. **2013**, 1282, 1–10. ISSN: 0021-9673.

- [48] KRAUSE I., BOCKHARDT A., NECKERMAN H., HENLE T., KLOSTERMEYER H. Simultaneous determination of amino acids and biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography of the dabsyl derivatives. *Journal of Chromatography A*. **1995**, 715 (1), 67–79. ISSN: 0021-9673.
- [49] MAYER H. K., FIECHTER G. UHPLC analysis of biogenic amines in different cheese varieties. *Food Control*. **2018**, 93, 9–16. ISSN: 0956-7135.
- [50] HE Y., ZHAO X.-E., WANG R., WEI N., SUN J., DANG J. Simultaneous determination of food-related biogenic amines and precursor amino acids using in situ derivatization ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2016**, 64, 8225–8234. ISSN: 1520-5118.
- [51] JIA S., KANG Y. P., PARK J. H., LEE J., KWON S. W. Simultaneous determination of 23 amino acids and 7 biogenic amines in fermented food samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2011**, 1218, 9174–9182. ISSN: 0021-9673.
- [52] SENTELLAS S., NÚÑEZ Ó., SAURINA J. Recent advances in the determination of biogenic amines in food samples by (U)HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2016**, 64, 7667–7678. ISSN: 1520-5118.
- [53] SAMKOVÁ E., DADÁKOVÁ E., PELIKÁNOVÁ T. Changes in biogenic amine and polyamine contents in smear-ripened cheeses during storage. *European Food Research and Technology*. **2013**, 237, 309–314. ISSN: 1438-2385.
- [54] JIA S., KANG Y. P., PARK J. H., LEE J., KWON S. W. Determination of biogenic amines in Bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) wines using a novel ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry. *Food Chemistry*. **2012**, 132, 1185–1190. ISSN: 0308-8146.
- [55] MAYER H.K., FIECHTER G., FISCHER E. A new ultra-pressure liquid chromatography method for the determination of biogenic amines in cheese. *Journal of Chromatography A*. **2010**, 1217, 3251–3257. ISSN: 0021-9673.
- [56] GIANOTTI V., CHIUMINATTO U., MAZZUCCOA E., GOSETTI F., BOTTARO M., FRASCAROLO P., GENNARO M.C. A new hydrophilic interaction liquid

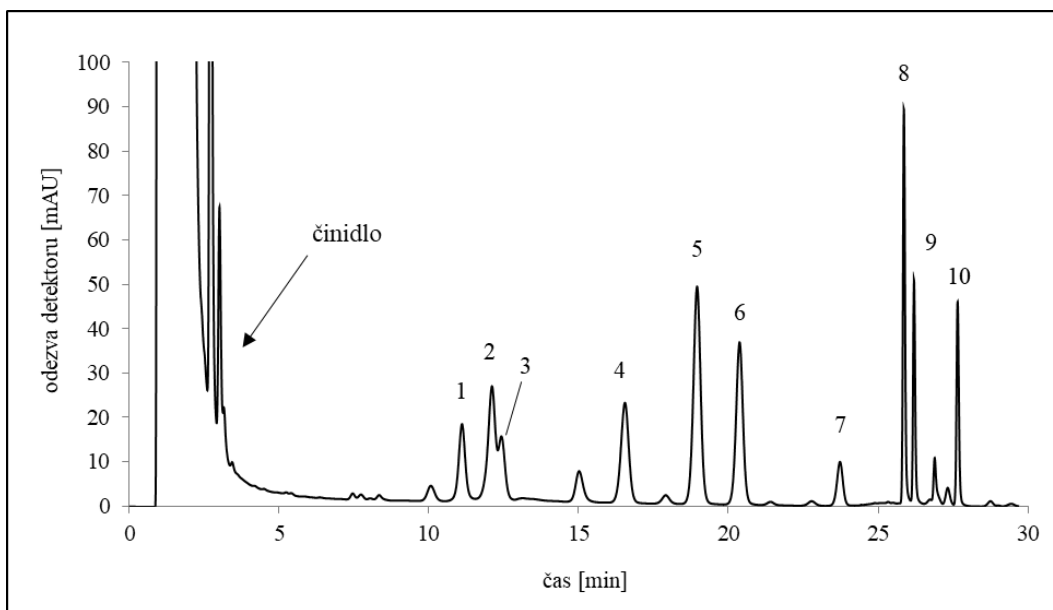
- chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of seven biogenic amines in cheese. *Journal of Chromatography A*. **2008**, 1185, 296–300. ISSN: 0021-9673.
- [57] BARANOWSKA I., PŁONKA J. Simultaneous Determination of Biogenic Amines and Methylxanthines in Foodstuff—Sample Preparation with HPLC-DAD-FL Analysis. *Food Analytical Methods*. **2015**, 8, 963-972. ISSN: 1936-9751.
- [58] DADÁKOVÁ E., KŘÍŽEK M., PELIKÁNOVÁ T. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*. **2009**, 116, 365–370. ISSN: 0308-8146.
- [59] ÖNAL A., TEKKELI S. E. K., ÖNAL C. A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*. **2013**, 138, 509–515. ISSN: 0308-8146.
- [60] HUANG K.-J., JIN C.-X., SON, S.-L., WEI C.-Y., LIU Y.-M., LI J. Development of an ionic liquid-based ultrasonic-assisted liquid–liquid microextraction method for sensitive determination of biogenic amines: Application to the analysis of octopamine, tyramine and phenethylamine in beer samples. *Journal of Chromatography B*. **2011**, 879, 579–584. ISSN: 1570-0232.
- [61] SCHNEIDERKA P., et al. Kapitoly z klinické biochemie 2. vydání. Praha: Karolinum 2004. ISBN: 80-246-0678.
- [62] GLORIA M., WATSON B., SIMON-SARKADI L., DAESCHEL M. A survey of Biogenic amines in Oregon Pinot noir and Cabernet Sauvignon wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. **1998**, 49, 279-282. ISSN: 0002-9254.
- [63] SASS-KISS A., SZERDAHELYI E., HAJOS G. Study of biologically active amines in grapes and wines by HPLC. *Chromatographia*. **2000**, 51, 316-320. ISSN: 1612-1112.
- [64] BENEDEUCE L., ROMANO A., CAPOZZI V., LUCAS P., BARNAVON L., BACH B., VUCHOT P., GRIECO F., SPANO G. Biogenic amine in wines. *Annals of Microbiology*. **2010**, 60, 573-578. ISSN: 1869-2044.

- [65] SOUFLEROS E., BARRIOS M.L., BERTRAND A. Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *American Journal of Enology and Viticulture*. **1998**, 49, 266–269. ISSN: 00029254.
- [66] SOUFLEROS E. H., BOULOUMPASI E., ZOTOU A., LOUKOU Z. Determination of biogenic amines in Greek wines by HPLC and ultraviolet detection after dansylation and examination of factors affecting their presence and concentration. *Food Chemistry*. **2007**, 101, 704–716. ISSN: 0308-8146.
- [67] GERBAUX V., MANOMY C. Les amines biogènes dans les vins de Bourgogne-1ere partie: teneurs, origine et maîtrise dans les vins. *Revue Française D'oenologie*. **2000**, 183, 25–28. ISSN: 0395-899.
- [68] BUSTO O., MIRACLE M., GUASCH J., BORRULL F. Determination of biogenic amines in wines by high-performance liquid chromatography with on-column fluorescence derivatization. *Journal of Chromatography A*. **1997**, 757, 311-318. ISSN: 0021-9673.
- [69] LEHTONEN E., SAARINEN M., VESANTO M., RIEKKOLA M., LEBENSM Z. *Unters Forsch*. **1992**, 194, 434.
- [70] SAITO K., HORIE M., NAKAGOMI K., NAKAZAWA H. *Analytical Science & Technology*. **1992**, 8, 675. ISSN: 2288-8985.
- [71] SAITO K., HORIE M., NOSE N. High-performance liquid chromatography of histamine and 1-methylhistamine with on-column fluorescence derivatization. *Journal of Chromatography A*. **1992**, 595,163-168. ISSN: 0021-9673.
- [72] JASTRZEBSKA A., PIASTA A., KOWALSKA S., KRZEMINSKI M., SZŁYK E. A new derivatization reagent for determination of biogenic amines in wines. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2016**, 48, 111–119. ISSN: 0889-1575.
- [73] PIASTA A., JASTRZEBSKA A., KRZEMINSKI M.P., MUZIOŁ T.M., SZŁYK E. New procedure of selected biogenic amines determination in wine samples by HPLC. *Analytica Chimica Acta*. **2014**, 834, 58–66. ISSN: 1873-4324.

- [74] ISOHERRANEN N., SOBACK S., 1999. Chromatographic methods for analysis of aminoglycoside antibiotics. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. **1999**, 82 (5), 1017–1045. ISSN: 1060-3271.
- [75] ANLI R. E., VURALB N., YILMAZA Ý. S., VURALC H. The determination of biogenicamines in Turkish red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2004**, 17, 53–62. ISSN: 0889-1575.
- [76] LANDETE J. M., FERRER S., POLO L., PARDO I. Biogenic Amines in Wines from Three Spanish Regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53, 1119-1124. ISSN: 0021-8561.
- [77] ANLI R.E., VURAL N., YILMAZ S., VURAL Y.H. The determination of biogenic amines in Turkish red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2004**, 17, 53–62. ISSN: 0889-1575.
- [78] GINTEROVA P., MARAK J., STANOVA A., MAIER V., SEVCIK J., KANIANSKY D. Determination of selected biogenic amines in red wines by automated on-line combination of capillary isotachopheresis-capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography B*. **2012**, 904, 135–139. ISSN: 1570-0232
- [79] SIMO C., MORENO-ARRIBAS M.V., CIFUENTES A. Ion-trap versus time-of-flight mass spectrometry coupled to capillary electrophoresis to analyze biogenic amines in wine. *Journal of Chromatography A*. **2008**, 1195, 150–156. ISSN: 0021-9673.
- [80] BROQUEDIS M., DUMERY B., BOUCARD J. Mise en évidence de polyamines (putrescine, cadaverine, nor-spermidine, spermidine, spermin) dans les feuilles et les grappes de *Vitis Vinifera* L. *Connaiss. Vigne Vin*. **1989**, 23, 1-6.
- [81] ADAMS D. O. Accumulation of putrescine in grapevine leaves showing symptoms of potassium deficiency or spring fever. In Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine. *American Society for Enology and Viticulture*: Davis, CA. **1991**, 126-131. ISSN: 0002-9254.
- [82] SILVEIRA V. A., MALAVOLTA R. L., BROETTO E. F., Effect of potassium on dry matter production and concentration of putrescine, spermidine and spermine in *Eucaliptus grandis* progenies. *Journal of Forest Science*. **2001**, 59, 13-25. ISSN:1212-4834.

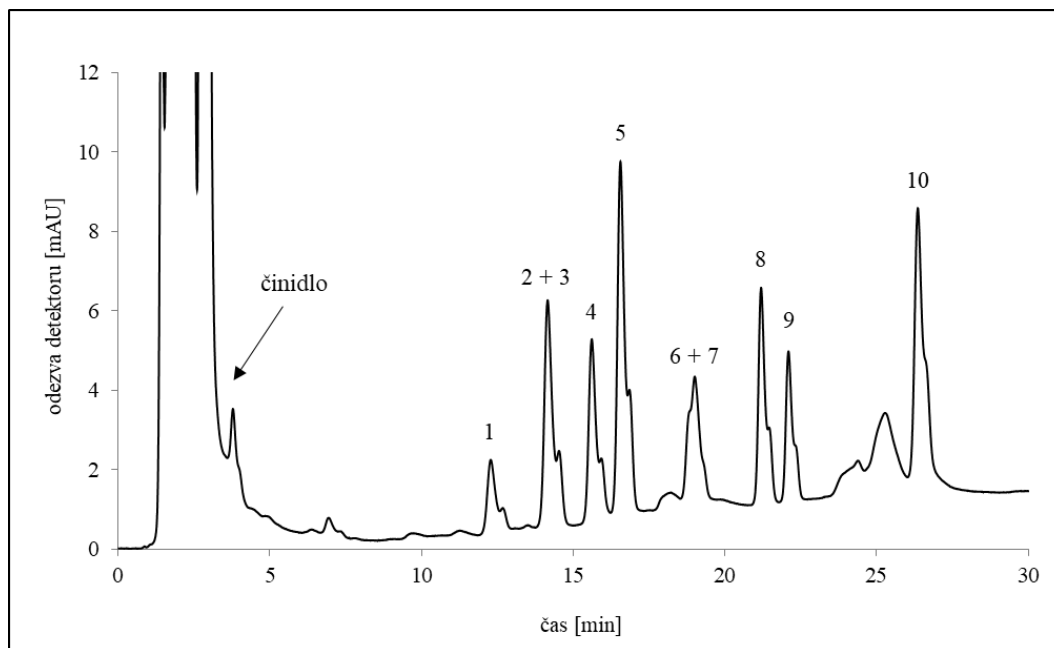
6 PŘÍLOHY

| | |
|---|----|
| Obrázek I Ukázková separace standardů na koloně Luna 3 μm PFP | 72 |
| Obrázek II Ukázková separace standardů za použití methanolu jako mobilní fáze B..... | 72 |
| Obrázek III Příklady testovaných gradientových elucí | 73 |
| Obrázek IV Extrahované iontové chromatogramy dansyl derivátů standardů biogenních aminů | 74 |
| Obrázek V Hmotnostní spektra dansyl derivátů standardů biogenních aminů | 75 |
| Obrázek VI Kalibrační graf: tryptamin, fenylethylamin a isoamylamin, UV detekce | 76 |
| Obrázek VII Kalibrační graf: putrescin, kadaverin a tyramin, UV detekce | 76 |
| Obrázek VIII Kalibrační graf: histamin, spermidin a spermin, UV detekce | 76 |
| Obrázek IX Kalibrační graf: putrescin, kadaverin a tyramin, MS detekce | 77 |
| Obrázek X Kalibrační graf: tryptamin, fenylethylamin, isoamylamin a histamin, MS detekce ... | 77 |
| Obrázek XI Kalibrační graf poměr ploch píku standardu a IS: tryptamin, fenylethylamin a isoamylamin, UV detekce..... | 78 |
| Obrázek XII Kalibrační graf poměr ploch píku standardu a IS: putrescin, kadaverin a tyramin, UV detekce | 78 |
| Obrázek XIII Kalibrační graf poměr ploch píku standardu a IS: histamin, spermidin a spermin, UV detekce | 78 |
| Obrázek XIV Kalibrační graf poměr ploch píku standardu a IS: putrescin, kadaverin a isoamylamin, MS detekce..... | 79 |
| Obrázek XV Kalibrační graf poměr ploch píku standardu a IS: tryptamin, fenylethylamin, tyramin a histamin, MS detekce | 79 |



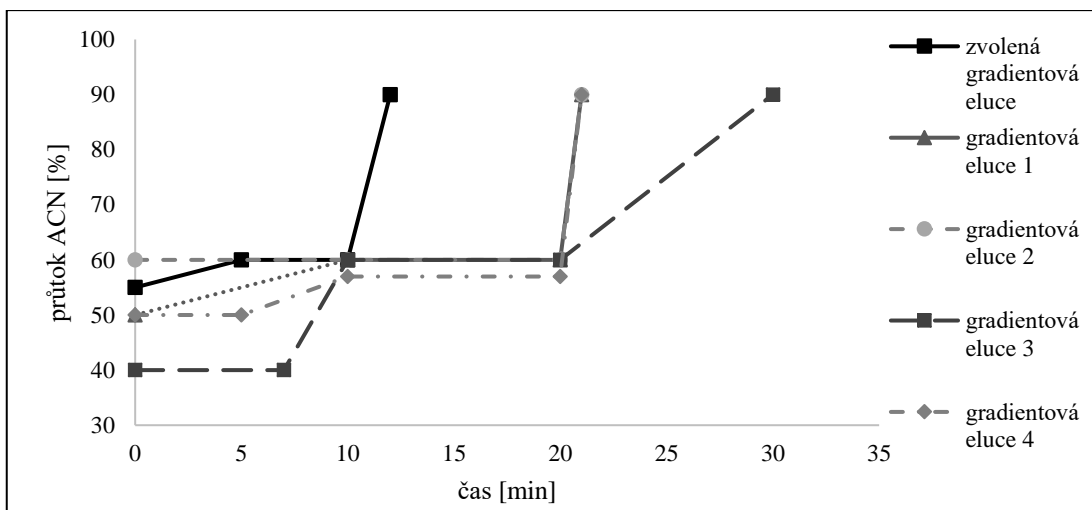
Obrázek I Ukázková separace standardů na koloně Luna 3 µm PFP

Podmínky analýzy: kolona Luna 3 µm PFP (2) 100 Å, (150 x 2 mm); MF A 5 mM mravenčan amonný, MF B acetonitril; nástřik 20 µl; teplota kolony 35 °C; průtok mobilní fáze 0,3 ml·min⁻¹; gradientová eluce 0-10 min.: 50 % MF B, 20 min.: 60 % MF B, 21 min.: 90 % MF B; UV detekce 254 nm.
Legenda: 1. tryptamin, 2. fenylethylamin, 3. isoamylamin, 4. putrescin, 5. kadaverin, 6. histamin, 7. 1,7-diaminoheptan (IS), 8. tyramin, 9. spermidin, 10. spermin

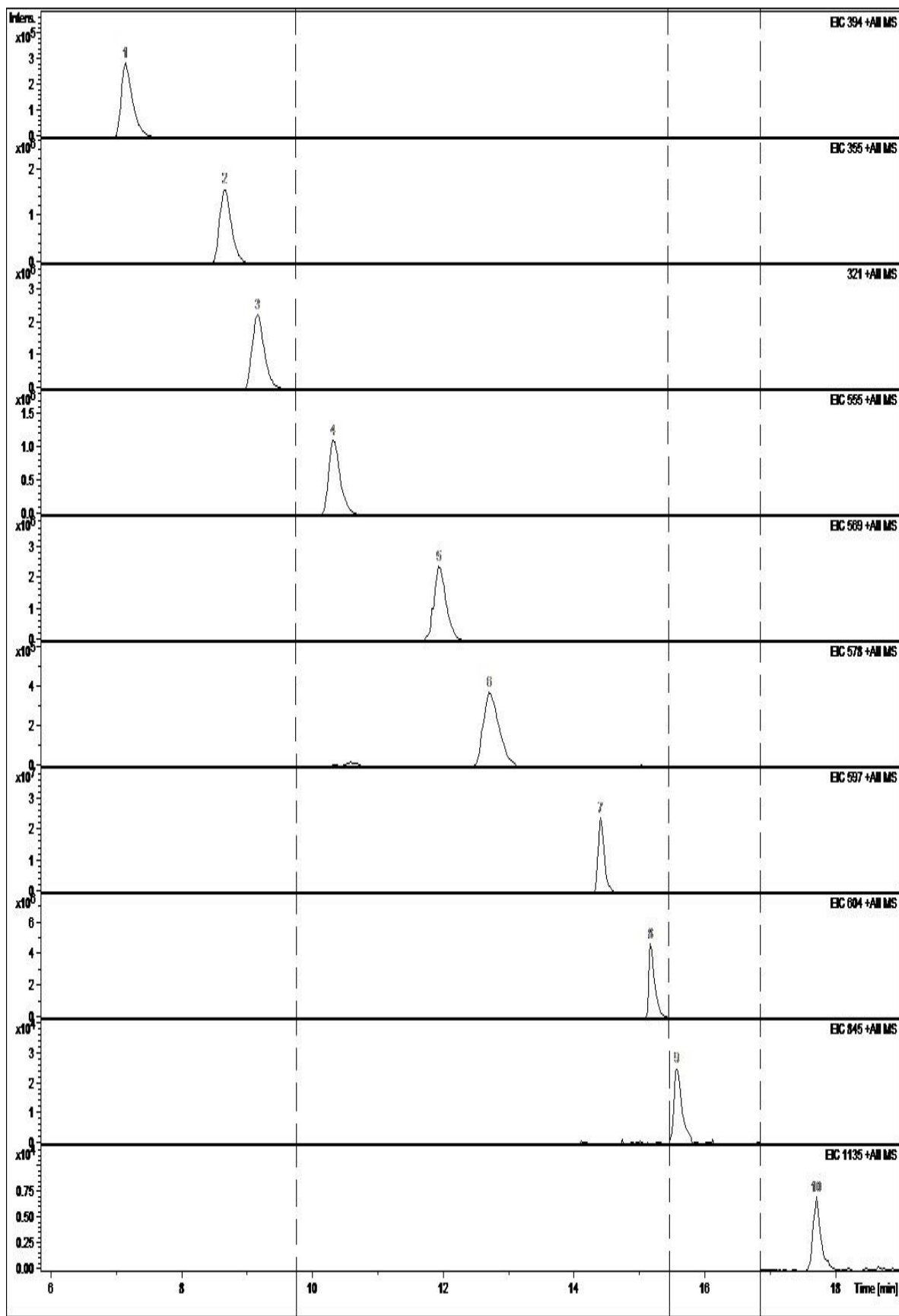


Obrázek II Ukázková separace standardů za použití methanolu jako mobilní fáze B

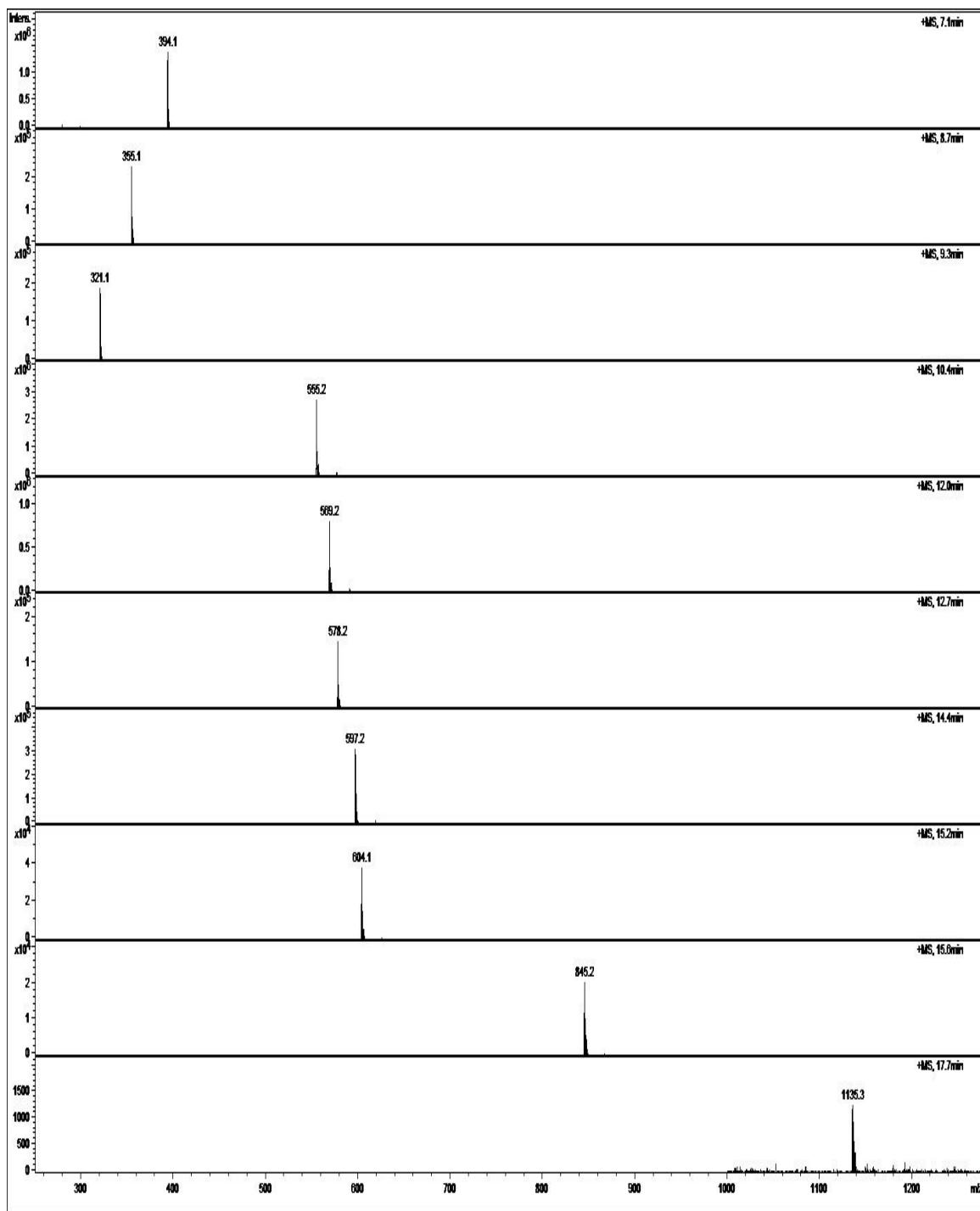
Podmínky analýzy: kolona Gemini® 5 µm C18 110 Å, (150 x 3 mm); MF A 5 mM mravenčan amonný, MF B methanol; nástřik 20 µl; teplota kolony 35 °C; průtok mobilní fáze 0,5 ml·min⁻¹; gradientová eluce 0-5 min.: 60 % MF B, 20 min.: 85 % MF B, 30 min.: 90 % MF B; UV detekce 254 nm.
Legenda: 1. tryptamin, 2. fenylethylamin, 3. isoamylamin, 4. putrescin, 5. kadaverin, 6. histamin, 7. 1,7-diaminoheptan (IS), 8. tyramin, 9. spermidin, 10. spermin



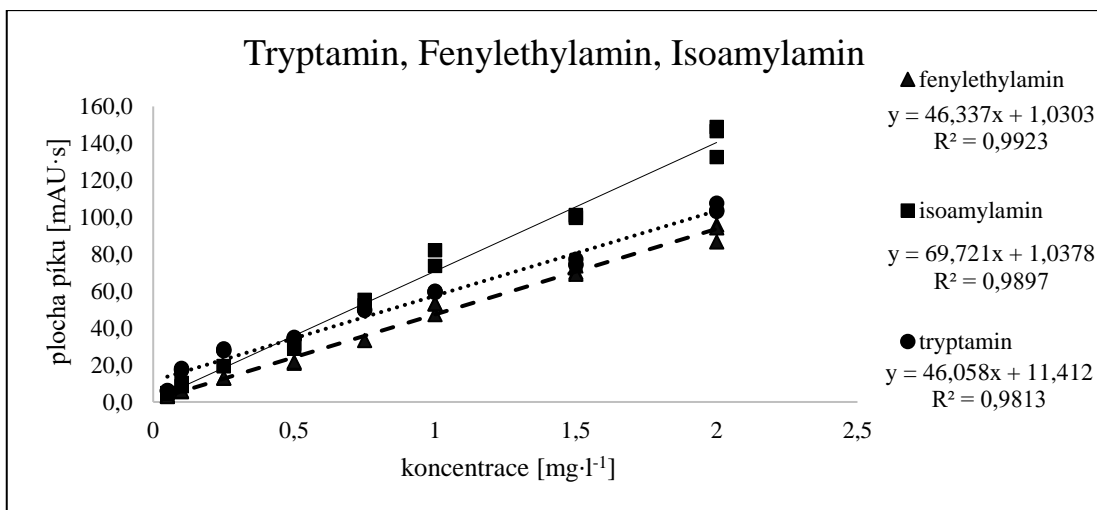
Obrázek III Příklady testovaných gradientových elucí



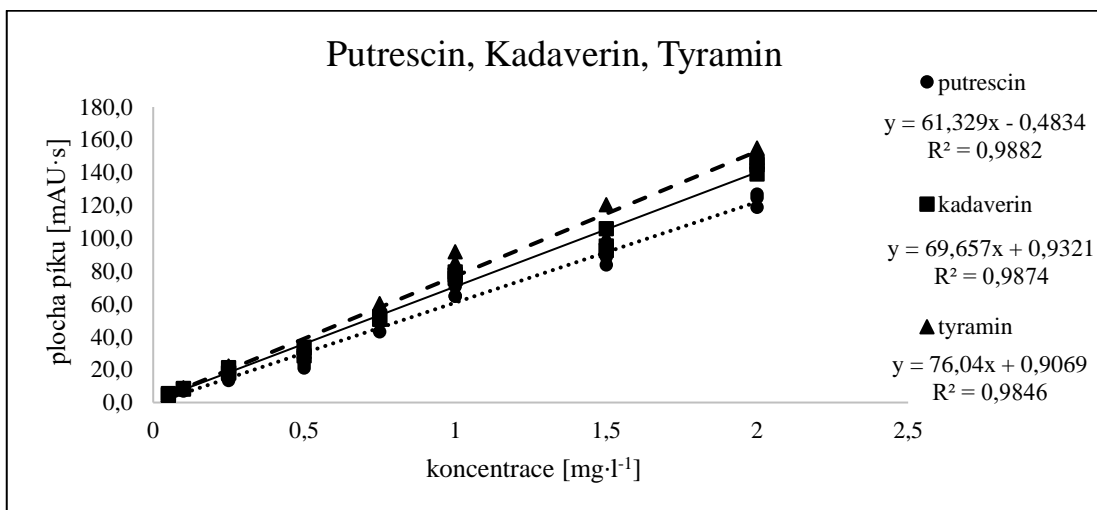
Obrázek IV Extrahované iontové chromatogramy dansyl derivátů standardů biogenních aminů



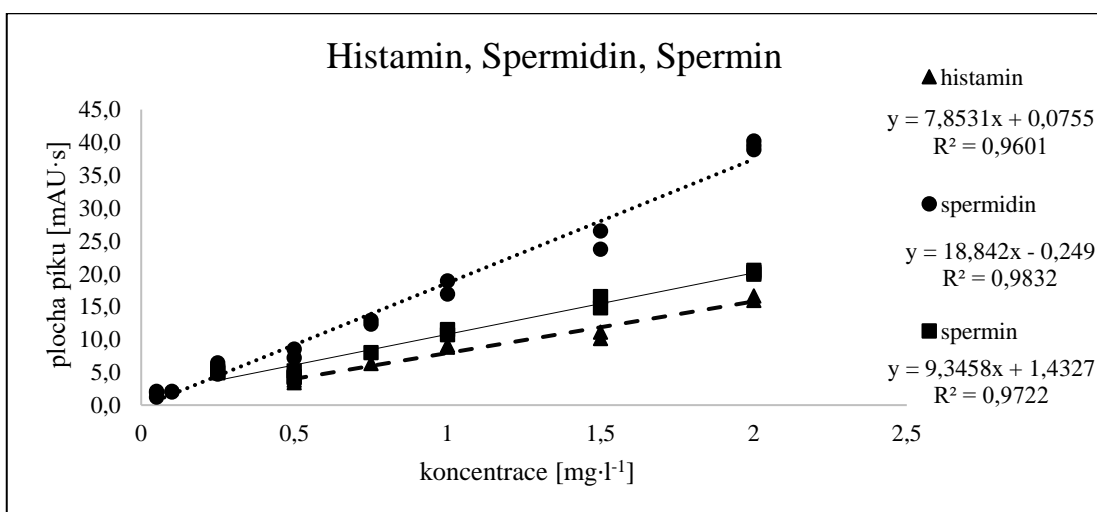
Obrázek V Hmotnostní spektra dansyl derivátů standardů biogenních aminů



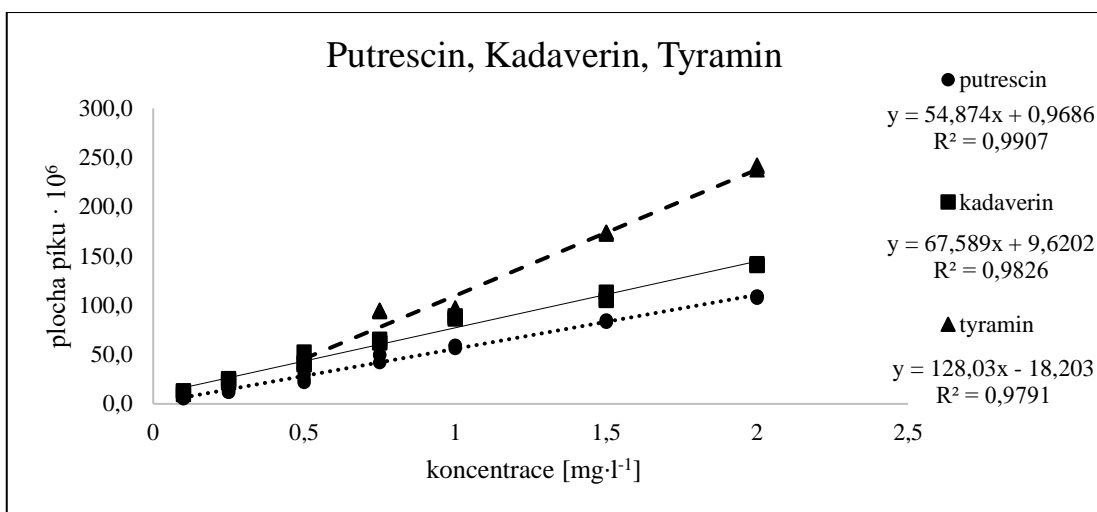
Obrázek VI Kalibrační graf: tryptamin, fenylethylamin a isoamylamin, UV detekce



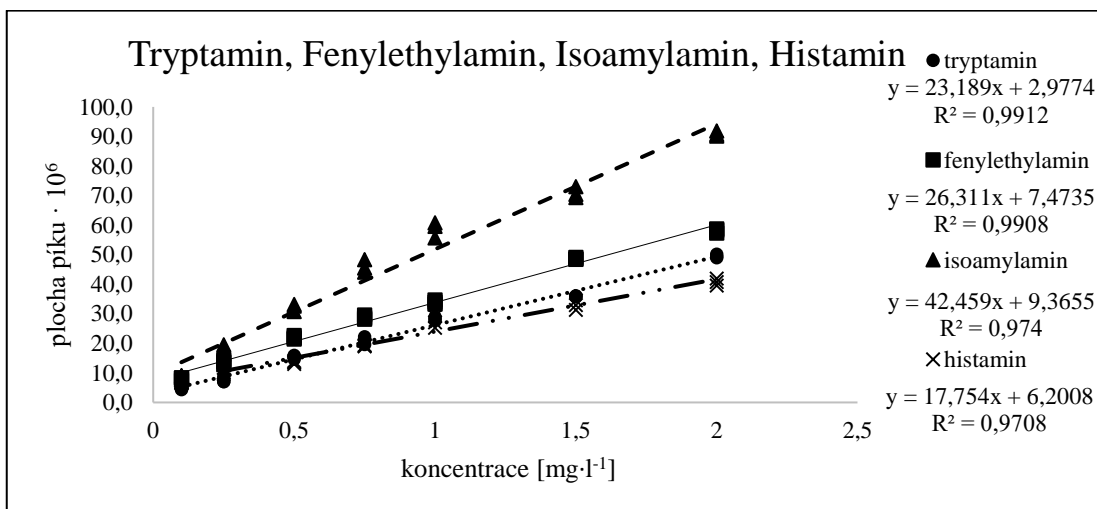
Obrázek VII Kalibrační graf: putrescin, kadaverin a tyramin, UV detekce



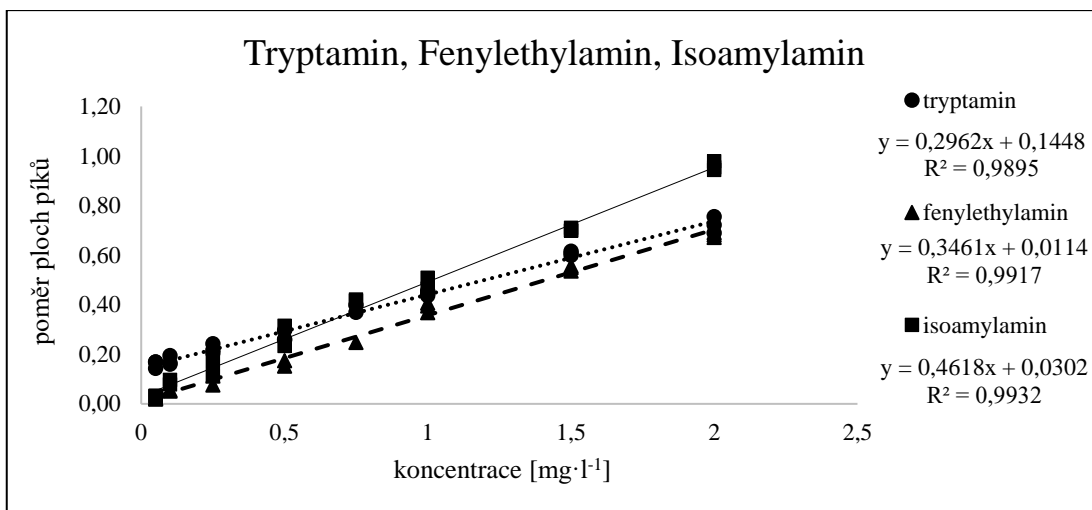
Obrázek VIII Kalibrační graf: histamin, spermidin a spermin, UV detekce



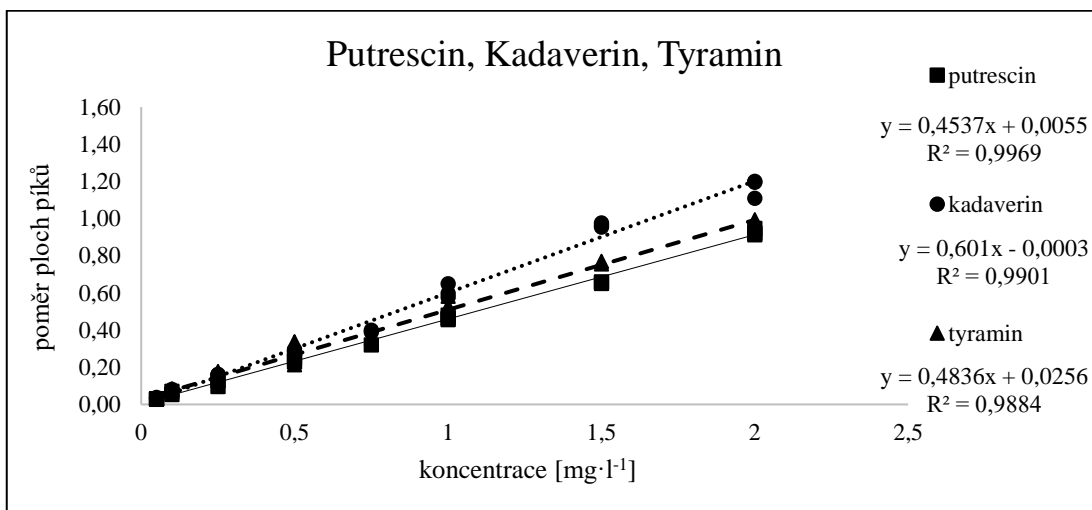
Obrázek IX Kalibrační graf: putrescin, kadaverin a tyramin, MS detekce



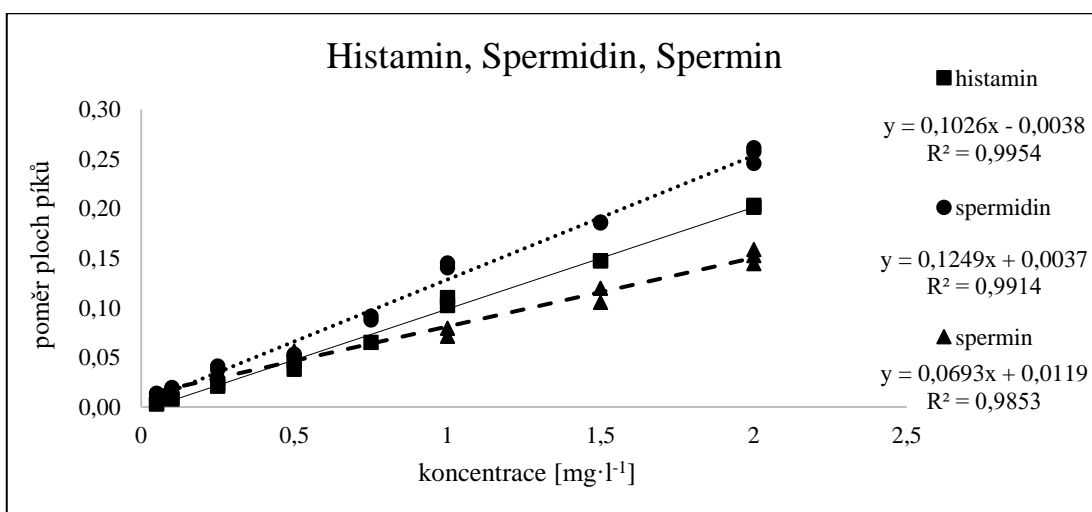
Obrázek X Kalibrační graf: tryptamin, fenylethylamin, isoamylamin a histamin, MS detekce



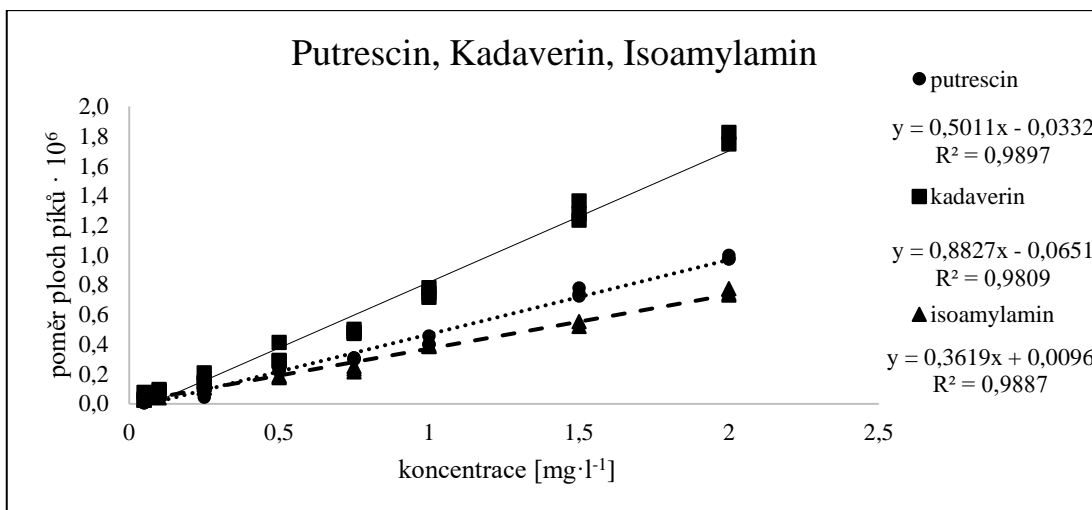
Obrázek XI Kalibrační graf poměr ploch píku standardu a IS: tryptamin, fenylethylamin a isoamylamin, UV detekce



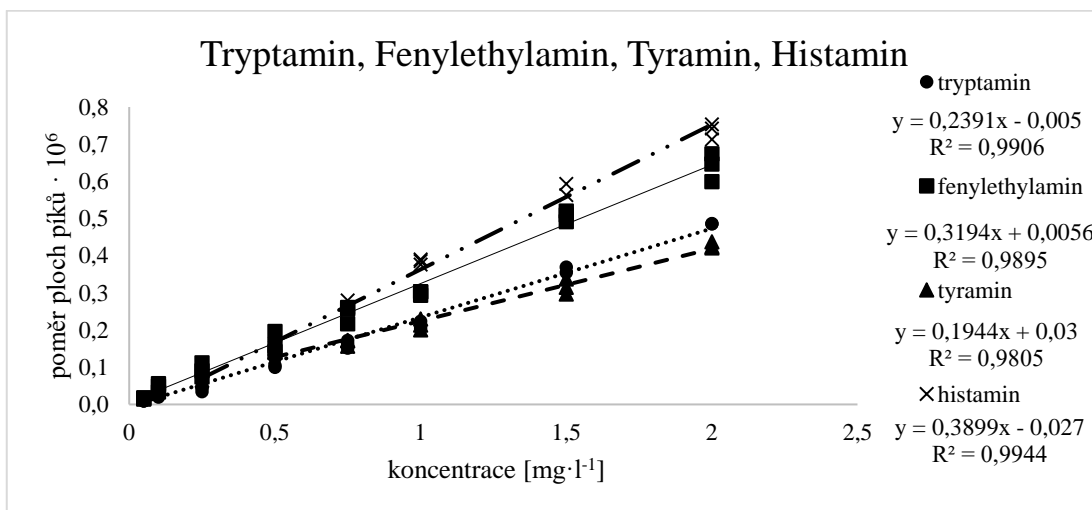
Obrázek XII Kalibrační graf poměr ploch píku standardu a IS: putrescin, kadaverin a tyramin, UV detekce



Obrázek XIII Kalibrační graf poměr ploch píku standardu a IS: histamin, spermidin a spermin, UV detekce



Obrázek XIV Kalibrační graf poměr ploch píkú standardu a IS: putrescin, kadaverin a isoamylamin, MS detekce



Obrázek XV Kalibrační graf poměr ploch píkú standardu a IS: tryptamin, fenylethylamin, tyramin a histamin, MS detekce