

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Analýza vybraných biogenních aminů ve vzorcích piva  
Diplomová práce

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Eliška Trnková**  
Osobní číslo: **C21441**  
Studijní program: **N0531A130030 Hodnocení a analýza potravin**  
Téma práce: **Analýza vybraných biogenních aminů ve vzorcích piva**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

## Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na analýzu biogenních aminů v potravinářství, především v pivovarnictví. Popište možnosti využití derivatizačních postupů před vlastní analýzou sledovaných látek metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Presentujte možnosti prekoncentračních metod vhodných pro HPLC analýzu biogenních aminů.
2. V experimentální části proveďte optimalizaci podmínek derivatizace a následné HPLC separace vybraných biogenních aminů s využitím detektoru diodového pole (DAD). Provéřte možnosti zakoncentrování biogenních aminů, popř. jejich derivátů, před vlastní HPLC-DAD analýzou. Vyvinutou metodu aplikujte na reálné vzorky piva.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:  
Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Martin Adam, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2023**  
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.**  
děkan

---

**doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Analýza vybraných biogenních aminů ve vzorcích piva 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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 § 47b 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 2. 5. 2023

Bc. Eliška Trnková

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Martinu Adamovi, Ph.D. za jeho ochotu, rady, trpělivost, vstřícnost, přístup a profesionální vedení. Děkuji také své rodině a přátelům, kteří při mně celou dobu studia stáli a podporovali mě.

## **ANOTACE**

Tato diplomová práce je zaměřena na analýzu biogenních aminů ve vzorcích piva vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s detekcí diodovým polem. Teoretická část práce se zabývá biogenními aminy v potravinách, zejména v pivu, možnostmi stanovení a extrakce těchto látek z potravinové matrice a způsoby derivatizace. Dále je zmíněna výroba piva, původ a stanovení biogenních aminů v pivu. V experimentální části byly nejprve optimalizovány podmínky derivatizace biogenních aminů dansylchloridem, zakoncentrování připravených derivátů technikou MEPS a úpravy vzorků piva před derivatizací. Optimalizované podmínky byly použity pro analýzu reálných vzorků piv. Výsledky analýzy vzorků jsou prezentovány v další části práce, kde byl také porovnán obsah biogenních aminů v jednotlivých vzorcích.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Biogenní aminy, pivo, kapalinová chromatografie, derivatizace, mikroextrakce tuhou fází s využitím stříkačky

## **TITLE**

Analysis of Selected Biogenic Amines in Beer Samples

## **ANNOTATION**

This thesis deals with the analysis of biogenic amines in beer samples by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. The theoretical part of this thesis deals with biogenic amines in food, especially in beer, the possibilities of determination and extraction from the food matrix and methods of derivatization. Beer production, origin and determination of biogenic amines in beer are also mentioned. In the experimental part, the conditions of derivatization with dansyl chloride, extraction of derivatives using the MEPS technique and the treatment of beer samples were optimized. The optimized conditions were used for the analysis of beer samples. The results of the sample analysis are presented in the next part of the thesis, where the content of biogenic amines in individual samples was compared.

## **KEYWORDS**

Biogenic Amines, Beer, Liquid Chromatography, Derivatization, Microextraction by Packed Sorbent

# OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ .....	11
SEZNAM TABULEK .....	13
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....	14
ÚVOD .....	16
1 TEORETICKÁ ČÁST .....	17
1.1 Biogenní aminy .....	17
1.1.1 Vznik a rozdělení biogenních aminů .....	17
1.1.2 Výskyt a biologické účinky biogenních aminů.....	18
1.1.3 Nepříznivé účinky biogenních aminů na lidský organismus .....	20
1.1.4 Biogenní aminy v potravinách.....	23
1.2 Analýza biogenních aminů v potravinách.....	26
1.2.1 Extrakční techniky .....	27
1.2.2 Chromatografické techniky.....	34
1.2.3 Elektromigrační metody .....	41
1.3 Biogenní aminy v pivu .....	42
1.3.1 Proces výroby piva.....	42
1.3.2 Druhy piva a označování piva .....	44
1.3.3 Vznik biogenních aminů v pivu.....	45
1.3.4 Stanovení biogenních aminů v pivu.....	46
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	51
2.1 Přístroje a zařízení.....	51
2.1.1 Kapalinový chromatograf .....	51
2.1.2 Další zařízení .....	51
2.2 Chemikálie a standardní látky .....	52
2.2.1 Chemikálie .....	52
2.2.2 Standardní látky .....	52

2.3	Vzorky.....	52
2.4	Pracovní postupy.....	56
2.4.1	Příprava roztoků.....	56
2.4.2	Úprava vzorků.....	58
2.4.3	Derivatizace .....	58
2.4.4	Zakoncentrování dansylderivátů biogenních aminů .....	59
2.5	Podmínky analýzy vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.....	59
3	VÝSLEDKY A DISKUSE .....	60
3.1	Volba chromatografických podmínek.....	60
3.2	Výběr rozpouštědla pro přípravu zásobních roztoků biogenních aminů .....	61
3.3	Optimalizace derivatizačních podmínek .....	62
3.3.1	Koncentrace derivatizačního činidla.....	62
3.3.2	Teplota a čas derivatizační reakce .....	63
3.3.3	Odstranění přebytku derivatizačního činidla .....	68
3.4	Kalibrační závislosti.....	68
3.5	Optimalizace podmínek zakoncentrování derivátů biogenních aminů .....	70
3.5.1	Optimalizace mikroextrakce tuhou fází s využitím stříkačky .....	70
3.5.2	Kalibrace mikroextrakce tuhou fází s využitím stříkačky .....	74
3.6	Optimalizace úpravy vzorku před derivatizací .....	77
3.6.1	Odstranění oxidu uhličitého ze vzorků .....	77
3.6.2	Odstranění polyfenolických látek ze vzorků .....	78
3.6.3	Derivatizace reálných vzorků .....	78
3.7	Analýza reálných vzorků piva.....	79
3.7.1	Výsledky analýzy reálných vzorků bez kroku zakoncentrování .....	79
3.7.2	Výsledky analýzy reálných vzorků po zakoncentrování derivátů .....	84
4	ZÁVĚR .....	90
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	91



SEZNAM PŘÍLOH.....	98
PŘÍLOHY .....	99
Příloha I: Grafy kalibračních závislostí bez zakoncentrování .....	99
Příloha II: Grafy kalibračních závislostí po zakoncentrování .....	101
Příloha III: Chromatogramy reálných vzorků piv bez zakoncentrování.....	103
Příloha IV: Chromatogramy zakoncentrovaných derivátů ze vzorků piv .....	109

## SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Degradace histaminu u zdravého jedince, při intoxikaci a intoleranci .....	22
Obrázek 2: Jednotlivé kroky SPE .....	29
Obrázek 3: Zařízení pro MEPS – plynotěsné skleněné stříkačky a BIN se sorbentem C18 ....	33
Obrázek 4: Schéma HPLC systému.....	35
Obrázek 5: Obecné schéma dansylace aminu.....	39
Obrázek 6: Schéma výroby piva .....	43
Obrázek 7: Průběh gradientové eluce dansylderivátů biogenních aminů .....	60
Obrázek 8: Závislost plochy píku tyraminu na koncentraci kyselin použitých pro rozpuštění.....	61
Obrázek 9: Závislost plochy píku tryptaminu na koncentraci kyselin použitých pro rozpuštění.....	62
Obrázek 10: Závislost ploch píků tyraminu a tryptaminu na koncentraci Dns-Cl .....	63
Obrázek 11: Odezvové profily pro různé podmínky derivatizace tyraminu a tryptaminu .....	65
Obrázek 12: 3D vhodnostní profil pro derivatizaci tryptamin.....	65
Obrázek 13: 3D vhodnostní profil pro derivatizaci tyraminu.....	66
Obrázek 14: 3D vhodnostní graf pro derivatizaci tryptaminu a tyraminu .....	66
Obrázek 15: Pozorované vs. předpovězené hodnoty pro tryptamin .....	67
Obrázek 16: Pozorované vs. predikované hodnoty pro tyramin.....	67
Obrázek 17: Ukázkový chromatogram bodu kalibrace o koncentraci 2 mg/l .....	69
Obrázek 18: Závislost ploch píků na objemu elučního činidla při MEPS.....	72
Obrázek 19: Porovnání aplikovaných objemů vzorku pro zakoncentrování .....	73
Obrázek 20: Porovnání aplikace 10 × 100 µl a 5 × 200 µl vzorku.....	74
Obrázek 21: Ukázkový chromatogram zakoncentrovaných derivátů biogenních aminů .....	75
Obrázek 22: Porovnání LOD a LOQ přístroje a metody MEPS.....	76
Obrázek 23: Porovnání obsahu putrescinu, kadaverinu a tyraminu ve vzorcích piv.....	83
Obrázek 24: Celkový obsah jednotlivých biogenních aminů ve 12 analyzovaných vzorcích piva ..	84
Obrázek 25: Porovnání obsahu aminů v pivu Radegast ROG IPA bez extrakce a s extrakcí .....	86
Obrázek 26: Porovnání obsahu aminů v pivu Svijanský máz bez extrakce a s extrakcí .....	87
Obrázek 27: Porovnání obsahu aminů v pivu Primátor IPA bez extrakce a s extrakcí .....	87
Obrázek 28: Porovnání obsahu aminů v pivu Starobrno Medium bez extrakce a s extrakcí.....	88
Obrázek 29: Porovnání obsahu aminů v pivu Krakonoš bez extrakce a s extrakcí.....	88

Obrázek I - 1: Kalibrační závislost tryptaminu a fenylethylaminu.....	99
Obrázek I - 2: Kalibrační závislost isoamylaminu, sperminu a histaminu .....	99
Obrázek I - 3: Kalibrační závislost kadaverinu a tyraminu .....	100
Obrázek I - 4: Kalibrační závislost putrescinu a spermidinu.....	100
Obrázek II - 1: Kalibrační závislosti tyraminu, fenylethylaminu a spermidinu po zakoncentrování..	101
Obrázek II - 2: Kalibrační závislost kadaverinu, tryptaminu a isoamylaminu po zakoncentrování ...	101
Obrázek II - 3: Kalibrační závislost putrescinu, sperminu a histaminu po zakoncentrování ....	102
Obrázek III - 1: Chromatogram výčepního piva Gambrinus Originál 10 bez zakoncentrování ..	103
Obrázek III - 2: Chromatogram výčepního piva Braník světlý bez zakoncentrování .....	103
Obrázek III - 3: Chromatogram výčepního piva Radegast Rázná 10 bez zakoncentrování ...	104
Obrázek III - 4: Chromatogram svrchně kvašeného piva Radegast ROG IPA bez zakoncentrování	104
Obrázek III - 5: Chromatogram svrchně kvašeného piva Rebel IPA bez zakoncentrování ...	105
Obrázek III - 6: Chromatogram svrchně kvašeného piva Primátor IPA bez zakoncentrování ....	105
Obrázek III - 7: Chromatogram nepasterizovaného piva Krakonoš světlý ležák 12 bez zakoncentrování ....	106
Obrázek III - 8: Chromatogram nepasterizovaného piva Starobrno Medium bez zakoncentrování ..	106
Obrázek III - 9: Chromatogram nepasterizovaného piva Svijanský máz 11 % bez zakoncentrování....	107
Obrázek III - 10: Chromatogram pšeničného piva Primátor Weizen bez zakoncentrování ...	107
Obrázek III - 11: Chromatogram piva Bernard kvasnicové pivo 10 bez zakoncentrování ....	108
Obrázek III - 12: Chromatogram piva Staropramen Nefiltr Pšeničný bez zakoncentrování ..	108
Obrázek IV - 1: Srovnání chromatogramů piva Radegast ROG IPA po zakoncentrování (A) a bez zakoncentrování (B).....	109
Obrázek IV - 2: Srovnání chromatogramů piva Primátor IPA po zakoncentrování (A) a bez zakoncentrování (B).....	109
Obrázek IV - 3: Porovnání chromatogramů vzorku Krakonoš po zakoncentrování MEPS (A) a bez zakoncentrování (B).....	110
Obrázek IV - 4: Srovnání chromatogramů piva Starobrno po zakoncentrování (A) a bez zakoncentrování (B).....	110
Obrázek IV - 5: Srovnání chromatogramů piva Svijanský máz po zakoncentrování (A) a bez zakoncentrování (B).....	111

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Základní charakteristiky alifatických biogenních aminů.....	17
Tabulka 2: Základní charakteristiky aromatických a heterocyklických biogenních aminů .....	18
Tabulka 3: Biologický význam jednotlivých biogenních aminů v lidském organismu.....	19
Tabulka 4: Symptomy intoxikace biogenními aminy .....	21
Tabulka 5: Významné mikroorganismy produkující biogenní aminy v potravinách .....	24
Tabulka 6: Derivatizační činidla pro biogenní aminy .....	38
Tabulka 7: Kategorie piva dle extraktu původní mladiny .....	44
Tabulka 8: Vzorky světlých výčepních piv .....	53
Tabulka 9: Vzorky svrchně kvašených piv typu IPA .....	54
Tabulka 10: Vzorky nepasterizovaných světlých ležáků.....	55
Tabulka 11: Vzorky speciálních piv pšeničných, kvasnicových a nefiltrovaných.....	56
Tabulka 12: Příprava kalibrační řady kadaverinu a tyraminu.....	58
Tabulka 13: Chromatografické podmínky .....	59
Tabulka 14: Testované podmínky derivatizace .....	64
Tabulka 15: Retenční časy, rovnice regrese a koeficienty determinace jednotlivých biogenních aminů.....	69
Tabulka 16: Meze detekce a meze stanovitelnosti jednotlivých biogenních aminů.....	70
Tabulka 17: Parametry kalibrační řady zakoncentrovaných dansylderivátů BA .....	74
Tabulka 18: Meze detekce a stanovitelnosti jednotlivých biogenních aminů po extrakci metodou MEPS.....	76
Tabulka 19: Účinnost zakoncentrování derivátů .....	77
Tabulka 20: Obsah biogenních aminů v reálných vzorcích piva bez extrakce.....	81
Tabulka 21: Obsah biogenních aminů v reálných vzorcích po extrakci derivátů.....	86

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

- AQC – 6-aminochinolyln-N-hydroxysukcinimidylkarbamát
- BA – biogenní aminy
- BAI – Biogenic Amine Index (index biogenních aminů)
- BIN – Barrel Insert Needle (jehla s patronou)
- C2 – ethylsilikagel
- C8 – oktylsilikagel
- C18 – oktadecylsilikagel
- CZE – Capillary Zone Electrophoresis (kapilární zónová elektroforéza)
- DAD – Diode-Array Detector (detektor diodového pole)
- DAO – diaminooxidáza
- Dbs-Cl – dabsylchlorid
- DEEMM – diethylethoxymethylenmalonát
- DLLME – Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (disperzní kapalinová mikroextrakce)
- Dns-Cl – dansylchlorid
- EPM – extrakt původní mladiny
- EU – European Union (Evropská unie)
- FLD – Fluorimetric Detector (fluorimetrický detektor)
- FMOc – 9-fluorenylmethoxykarbonylchlorid
- GC – Gas Chromatography (plynová chromatografie)
- GC-MS – plynová chromatografie s detekcí hmotnostním spektrometrem
- HACCP – Hazard Analysis and Critical Control Points (Systém analýzy rizika a stanovení kritických kontrolních bodů)
- HF-LPME – Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction (mikroextrakce využívající duté vlákno)
- HILIC – Hydrophilic Interaction Chromatography (chromatografie hydrofilních interakcí)
- HPLC – High Performance Liquid Chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
- HPLC-DAD – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole
- HPLC-MS – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detekcí hmotnostním spektrometrem
- HPTLC – High Performance Thin Layer Chromatography (vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie)
- IEC – Ion-Exchange Chromatography (iontově-výměnná chromatografie)

IS – Internal Standard (vnitřní standard)

LC – Liquid Chromatography (kapalinová chromatografie)

LIF – Laser Induced Fluorescence (laserem indukovaná fluorescence)

LLE – Liquid-Liquid Extraction (extrakce z kapaliny do kapaliny)

LOD – Limit of Detection (mez detekce)

LOQ – Limit of Quantification (mez stanovitelnosti)

MAO – monoaminoxidáza

MEKC – Micellar Electrokinetic Chromatography (micelární elektrokinetická chromatografie)

MEPS – Microextraction by Packed Sorbent (mikroextrakce tuhou fází s využitím stříkačky)

MRM – Multiple Reaction Monitoring (monitorování vybraných reakcí)

MS – Mass Spectrometry (hmotnostní spektrometrie)

NPLC – Normal-Phase Liquid Chromatography (kapalinová chromatografie v systému s normálními fázemi)

NQS – 1,2-naftochinon-4-sulfonát

OPA – *o*-ftaldialdehyd

PAO – polyaminoxidáza

PDA – Photodiode-Array (detektor s fotodiodovým polem)

PT-SPE – Pipette Tip Solid Phase Extraction (extrakce tuhou fází ve špičce pipety)

PVP – polyvinylpyrrolidon

QI – Quality Index (index kvality)

RPLC – Reverse-Phase Liquid Chromatography (kapalinová chromatografie v systému s obrácenými fázemi)

SEC – Size-Exclusion Chromatography (chromatografie sterické vyluky)

SIM – Single Ion Monitoring (selektivní záznam iontu)

SPE – Solid-Phase Extraction (extrakce tuhou fází)

SPME – Solid-Phase Microextraction (mikroextrakce tuhou fází)

TLC – Thin Layer Chromatography (tenkovrstvá chromatografie)

UHPLC – Ultra High Performance Liquid Chromatography (ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie)

UV – Ultraviolet (ultrafialová oblast záření)

UV-Vis – Ultraviolet-Visible (ultrafialová-viditelná oblast záření)

## ÚVOD

Biogenní aminy jsou přirozenou složkou mnoha potravin živočišného i rostlinného původu. Jejich nízké koncentrace jsou v organismu nezbytné pro mnoho fyziologických funkcí, důležité je zejména jejich působení v nervovém a kardiovaskulárním systému. Jejich vysoké koncentrace však mohou působit toxicky. Za nejtoxičtější jsou považovány histamin a tyramin. Vznik biogenních aminů v potravinách je spojen s přítomností mikroorganismů, které jsou schopné je produkovat. Stanovení biogenních aminů v potravinářství je tak důležité nejen pro jejich nebezpečnost, ale také z hlediska kontroly dodržení správných hygienických postupů při výrobě a skladování potravin, jelikož vysoká koncentrace těchto látek je spolehlivým ukazatelem mikrobiální kontaminace.

Potravinami s významným výskytem biogenních aminů jsou zejména maso, ryby, sýry a fermentované potraviny a nápoje, jako jsou pivo a víno. Pivo je zlatavý alkoholický nápoj s typickou bílou pěnou, vůní a hořkou chutí. Pivovarnictví má v českých zemích dlouhou tradici a jako národ jsme největšími konzumenty piva na světě. Proces výroby piva je poměrně složitý a nákladný. Biogenní aminy v tomto nápoji mají různý původ, pocházejí zejména ze sladovnického ječmene, ale také vznikají při kroku kvašení. Monitorování jejich obsahu v pivu je důležité zejména pro odhalení mikrobiální kontaminace při výrobě, ale také kvůli jejich toxicitě. Ta se v pivu ještě zvyšuje kvůli obsahu ethanolu, který snižuje schopnost organismu tyto látky metabolizovat.

Samotná analýza biogenních aminů v pivovarnictví se provádí nejčastěji vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s různými typy detekce. Lze ale použít i další chromatografické nebo elektromigrační techniky. Jejich extrakce z piva obvykle není nutná, jelikož se jedná o poměrně jednoduchou matici. Nutná je naopak jejich derivatizace vhodným činidlem, aby bylo možné je vůbec detekovat. Různé extrakční techniky pak lze použít pro zakoncentrování těchto derivátů před samotnou analýzou.

Cílem této diplomové práce je optimalizovat podmínky derivatizace, následného zakoncentrování derivátů biogenních aminů ze vzorků piva a jejich separace technikou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí diodovým polem.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Biogenní aminy

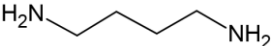
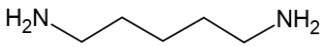
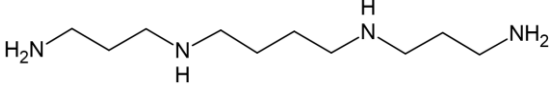
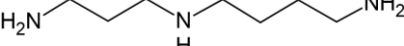
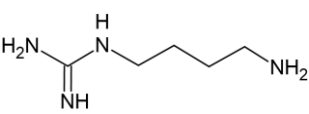
Biogenní aminy (BA) jsou biologicky aktivní nízkomolekulární dusíkaté látky odvozené od aminokyselin. Jedná se o látky polární nebo středně polární, chemicky i tepelně stabilní. Plní velké množství různých důležitých funkcí jak v živočišných tkáních, tak v rostlinných pletivech a mikrobiálních buňkách [1–5].

### 1.1.1 Vznik a rozdělení biogenních aminů

Biogenní aminy vznikají nejčastěji dekarboxylací aminokyselin. Ta spočívá v odstranění  $\alpha$ -karboxylové skupiny z původní aminokyseliny, za což jsou zodpovědné dekarboxylázy, které jako kofaktor obsahují pyridoxal-fosfát neboli vitamín B6. Vzniklé BA většinou nesou název odvozený právě od jejich prekurzorové aminokyseliny. Další reakcí, která vede ke vzniku BA, je transaminace karbonylových sloučenin nebo aminokyselin [1; 3; 4; 6; 7].

Podle struktury lze biogenní aminy rozdělit na alifatické, aromatické a heterocyklické. Podle počtu aminoskupin bývají klasifikovány na monoaminy, diaminy a polyaminy [1–3; 7; 8]. Vybrané alifatické aminy a jejich základní charakteristiky jsou uvedeny v tabulce 1. Některé alifatické BA mohou vznikat více různými způsoby. Například putrescin vzniká dekarboxylací ornithinu, který je vytvářen z argininu. Může ale také vzniknout katalýzou dalšího BA, agmatinu, který se rovněž tvoří z argininu, a to dekarboxylací. Putrescin je pak dále výchozí sloučeninou pro vznik sperminu a spermidinu [1; 2; 7–9].

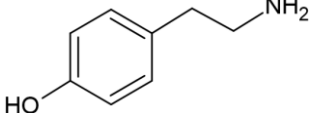
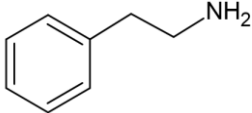
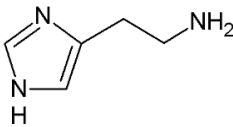
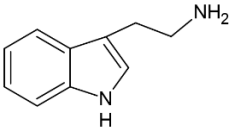
Tabulka 1: Základní charakteristiky alifatických biogenních aminů [1; 2; 8; 10]

Název	Prekurzorová aminokyselina	Sumární vzorec	Strukturní vzorec	Klasifikace podle počtu aminoskupin
putrescin	ornithin	$C_4H_{12}N_2$		diamin
kadaverin	lysin	$C_5H_{14}N_2$		
spermin	arginin, ornithin	$C_{10}H_{26}N_4$		polyamin
spermidin		$C_7H_{19}N_3$		
agmatin	arginin	$C_5H_{14}N_4$		



V tabulce 2 jsou uvedeny základní charakteristiky v potravinách nejvíce zastoupených aromatických a heterocyklických BA, z nichž všechny mají pouze jednu aminoskupinu. Jedná se tedy o monoaminy.

Tabulka 2: Základní charakteristiky aromatických a heterocyklických biogenních aminů [1; 2; 8; 10]

Název	Prekurzorová aminokyselina	Sumární vzorec	Strukturní vzorec	Klasifikace podle chemické struktury
tyramin	tyrosin	$C_8H_{11}NO$		aromatické
fenylethylamin	fenylalanin	$C_8H_{11}N$		
histamin	histidin	$C_5H_{10}N_3$		heterocyklické
tryptamin	tryptofan	$C_{10}H_{12}N_2$		

V potravinách se BA rozlišují na endogenní a exogenní. Endogenní BA jsou v nízkých koncentracích přirozeně součástí takřka všech potravin, jelikož se jedná o produkty metabolismu, nejčastěji působící jako neurotransmitery (katecholaminy, indolaminy a histamin). Exogenní BA jsou výsledkem dekarboxylázové aktivity fermentační mikroflóry, vznikají tedy buď v důsledku mikrobiální kontaminace potravin, nebo při cílené fermentaci. Mezi exogenní BA patří histamin, tryptamin, tyramin, putrescin, kadaverin, fenylethylamin, spermin a spermidin [1–3; 10].

### 1.1.2 Výskyt a biologické účinky biogenních aminů

Biogenní aminy jsou doslova všudypřítomné, lze je nalézt jak v rostlinných pletivech, tak živočišných tkáních i mikrobiálních buňkách, kde plní širokou škálu různých biologických úloh. V rostlinách se BA účastní obranných mechanismů a také jsou důležité pro růst a vývoj. Jmenovitě putrescin, spermin a spermidin mají vliv na buněčné dělení, kvetení a vývoj plodů. Některé BA jsou rostlinnými protoalkaloidy, prekurzory pro syntézu fytohormonů, alkaloidů a dalších sekundárních metabolitů [1; 2].

Tabulka 3: Biologický význam jednotlivých biogenních aminů v lidském organismu [1–3; 5; 7; 10; 11]

<b>Biogenní amin</b>	<b>Biologický význam</b>
histamin	lokální tkáňový hormon, neurotransmitter snižuje krevní tlak (vasodilatace) ovlivňuje sekreci žaludeční šťávy účastní se imunitní odpovědi a alergických reakcí stimuluje růst a diferenciaci buněk reguluje tělesnou teplotu, příjem potravy, ovlivňuje učení a paměť
putrescin	je prekurzorem sperminu a spermidinu stabilizuje makromolekuly (např. nukleové kyseliny) a subcelulární struktury (např. ribozomy) stimuluje růst a diferenciaci buněk podporuje nádorové bujení antioxidant
kadaverin	stabilizuje makromolekuly a subcelulární struktury stimuluje růst a diferenciaci buněk antioxidant
agmatin	stabilizuje makromolekuly a subcelulární struktury stimuluje růst a diferenciaci buněk
fenylethylamin	neurotransmitter reguluje hladinu noradrenalinu v krvi
tyramin	lokální tkáňový hormon, neurotransmitter, antioxidant zvyšuje krevní tlak (vasokonstrikce), hladinu glukózy v krvi ovlivňuje kontrakce hladké svaloviny
tryptamin	prekurzor hormonů serotoninu a melatoninu neurotransmitter, neuromodulátor zvyšuje krevní tlak (vasokonstrikce)
spermin	stimuluje růst a diferenciaci buněk antioxidant
spermidin	stimuluje růst a diferenciaci buněk antioxidant

V živočišných tkáních, a tedy i v lidském organismu, mají BA mnoho důležitých funkcí zejména v rámci nervového a kardiovaskulárního systému. BA fungují jako zdroje dusíku a prekurzory hormonů nebo jiných biologicky aktivních produktů. Hrají také významnou roli v regulaci tělesné teploty a trávení [2; 3; 7]. V tabulce 3 je uveden podrobný výčet fyziologických funkcí jednotlivých BA v lidském organismu.

Biogenní aminy jsou reaktivní látky, které jsou pomocí různých enzymů, zejména oxygenáz a methyltransferáz, transformovány na další biologicky aktivní sloučeniny. Například tyramin může být oxidován na oktopamin, který je neurohormonem a neuromodulátorem bezobratlých živočichů. Také může být methylován na *N*-methyltyramin, prekurzor synefrinu v hořkých pomerančích a hordeninu v ječmeni. Oxidací tryptaminu vzniká hormon a neurotransmitter serotonin, jehož následná acetylace a methylace vede ke vzniku dalšího hormonu, a to melatoninu. BA však poskytují mimo těchto enzymatických i jiné reakce. Jejich oxidační deaminací vznikají aldehydy, při skladování nebo zvýšené teplotě tvoří s triacylglyceroly amidy mastných kyselin a také se účastní Maillardových reakcí za vzniku iminů [1; 11].

### **1.1.3 Nepříznivé účinky biogenních aminů na lidský organismus**

Biogenní aminy jsou díky svým důležitým fyziologickým funkcím pro lidský organismus nepostradatelné, ve vysokých koncentracích však mohou působit škodlivě. Exogenní BA jsou v organismu metabolizovány pomocí enzymů monoaminoxidázy (MAO), diaminoxidázy (DAO), polyaminoxidázy (PAO) a *N*-methyltransferázy. MAO, DAO a PAO vznikají zejména v buňkách střevního epitelu a odbourávají extracelulární BA, zatímco *N*-methyltransferázy vznikají v ledvinách, játrech a mozku a degradují intracelulární BA. Pokud organismus přijímá z potravy nadměrná množství BA, enzymový systém není schopen je plně eliminovat, což vede k rozvoji toxických účinků. Toxicita BA je silně závislá na aktivitě těchto enzymů. Ta je u každého člověka individuální a ovlivňuje ji řada faktorů, jako jsou přítomnost inhibitorů MAO a DAO (některá antidepresiva, antiarytmika, antibiotika, antihistaminika, antimalarika atd.), alkohol, tabákový kouř, gastrointestinální choroby a samozřejmě genetické predispozice [1–3; 7; 11; 12].

Za nejtoxičtější BA pro člověka se považují histamin a tyramin. Jedná se o látky psychoaktivní a vasoaktivní, kdy histamin má vasodilatační účinek a tyramin má naopak vasokonstrikční účinek. Příznaky otravy BA se tedy týkají zejména kardiovaskulární a nervové soustavy, postižen však bývá také dýchací systém, trávicí systém a kůže. Příznaky, jejichž výčet je uveden v tabulce 4, se objevují několik minut až několik hodin po požití velkého množství BA a obvykle odezní do 24 hodin. Otrava histaminem je nejčastěji spojována s rybami z čeledi *Scombridae* (makrelovití), kam patří např. makrela nebo tuňák, jejichž maso přirozeně obsahuje velké množství volného histidinu (1–15 g/kg). Proto se pro intoxikaci histaminem vžilo označení „makrelová otrava“. Otrava histaminem však může být způsobena i dalšími potravinami, jako jsou sýry, jiné druhy ryb nebo mořské plody. Otrava tyraminem bývá někdy

označována jako „sýrový efekt“, jelikož tyramin je hlavním BA právě v sýrech, ve vyšších koncentracích se však vyskytuje také v masě a masných výrobcích [1–3; 7; 11–14].

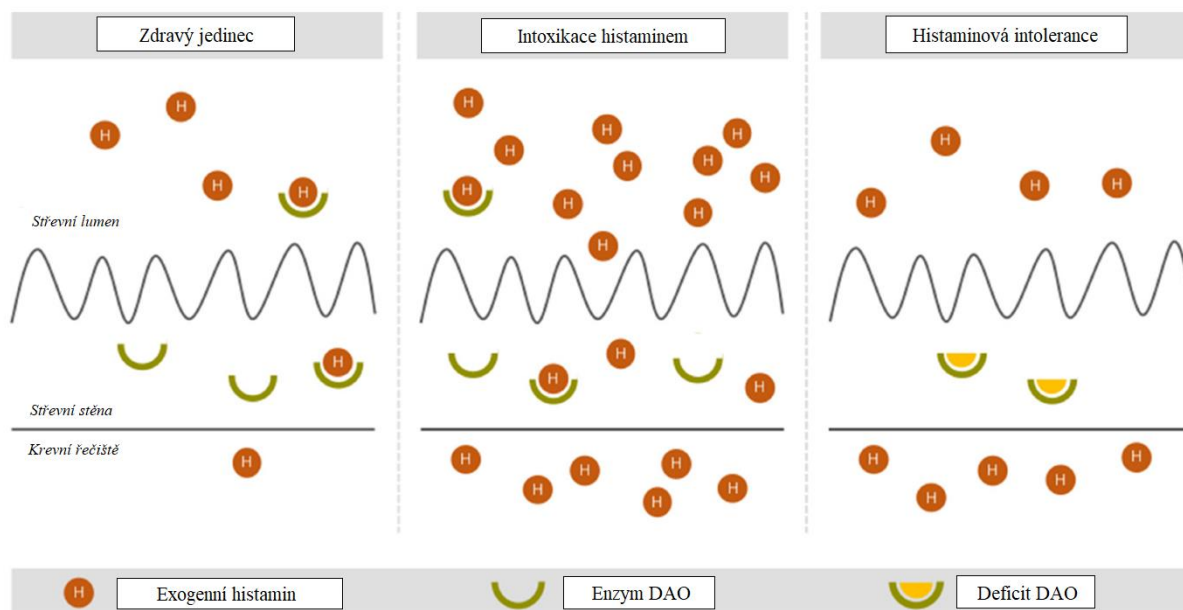
Tabulka 4: Symptomy intoxikace biogenními aminy [1–3; 12]

Lokalizace	Symptomy
kůže	vyrážka, kopřivka, svědění, lokální otok, zarudnutí obličeje a krku
trávicí systém	nevolnost, zvracení, průjem, bolest břicha, křeče
kardiovaskulární systém	hypotenze (histamin) nebo hypertenze (tyramin, tryptamin, fenylethylamin), extrasystola, bradykardie (putrescin, kadaverin) nebo tachykardie (histamin), palpitace
nervový systém	bolest hlavy až migréna, závratě, mdloby, návaly horka, pocení, mravenčení, křeče, pocit pálení v ústech, rozostřené vidění
dýchací systém	rýma, bronchostrikce, dýchací potíže

Toxicita biogenních aminů je dána nejen přítomností konkrétních BA v potravinách, ale také celkovou koncentrací BA ve všech zkonsumovaných potravinách, samotným množstvím potravin obsahujících BA a také přítomností jiných toxických látek. Za nebezpečné pro zdravého člověka se považují koncentrace histaminu vyšší než 500–1000 mg/kg potraviny. Jediným BA, jehož obsah v potravinách je v Evropské unii (EU) regulován, je v současné době pouze histamin, a to pouze v rybách a rybích produktech. Nařízení komise (EU) č. 1019/2013 udává nejvyšší přípustné množství histaminu v produktech rybolovu z ryb s vysokým množstvím histidinu, a to tak, že z 9 odebraných vzorků ryb mohou nejvýše 2 obsahovat 200 až 400 mg histaminu na 1 kg a v žádném vzorku rybí omáčky, která je vyrobena fermentací produktů rybolovu, nesmí koncentrace histaminu přesáhnout 400 mg/kg. Před vstupem České republiky do EU platila podstatně přísnější Vyhláška 298/1997 Sb., kterou byl obsah histaminu regulován také v pivu a vínu, a dokonce byla stanovena i přípustná množství tyraminu v sýrech a vínu [1; 14–16].

Vedle otravy histaminem existuje také histaminová intolerance. Ta je způsobena nízkou aktivitou enzymů, které histamin z potravy degradují, tedy zejména DAO. Jedná se většinou o nedostatečnou tvorbu DAO vlivem vrozené metabolické poruchy, ale také vlivem onemocnění střev, která vedou k poškození střevního epitelu, v němž právě k tvorbě DAO dochází. Hlavním a také prakticky jediným rozdílem mezi intolerancí a intoxikací histaminem je velikost dávky, která vyvolá nežádoucí příznaky. U pacienta trpícího histaminovou intolerancí jsou příznaky vyvolány normální dávkou histaminu z potravy, která u zdravého

člověka žádnou nežádoucí reakci nevyvolá. Intolerance histaminu se nejčastěji řeší dodržováním celoživotní nízkohistaminové diety [11; 12; 17].



Obrázek 1: Degradace histaminu u zdravého jedince, při intoxikaci a intoleranci [17]

Rozdíl mezi intoxikací histaminem a histaminovou intolerancí vysvětluje obrázek 1. Levá třetina znázorňuje degradaci normálního množství histaminu ze stravy u zdravého jedince. Histamin přechází ze střeva do střevní stěny, kde je inaktivován pomocí DAO, takže pouze jeho nepatrné množství přechází do krevního řečiště, což nestačí k vyvolání nežádoucí reakce. Prostřední třetina znázorňuje intoxikaci zdravého člověka histaminem, kdy se ze stravy do střevní stěny dostává velké množství histaminu (>500 mg/kg), inaktivační kapacita DAO je překročena, což vede k resorpci přebytečného histaminu do krve a k vyvolání příznaků intoxikace. Pravá třetina obrázku pak znázorňuje jedince trpícího histaminovou intolerancí, kdy do střeva přichází ze stravy normální množství histaminu. Ten však vlivem absence nebo inhibice DAO nemůže být degradován, a dostává se tak do krve, což vede k rozvoji nežádoucí reakce organismu. Příznaky intoxikace histaminem a histaminové intolerance pak bývají většinou totožné [12; 17].

Putrescin a kadaverin nejsou samy o sobě velkým zdravotním rizikem, jejich problémem však je, že mohou způsobit zvýšení toxicity jiných BA, a to zejména histaminu, jelikož blokují část kapacity pro jeho detoxikaci (DAO). Dalším nežádoucím účinkem je jejich reakce s dusitany za vzniku karcinogenních nitrosaminů. Z tohoto hlediska jsou tedy nejrizikovějšími potravinami masné výrobky, u nichž se dusitany a dusičnany používají jako konzervační

činnidla. Také polyaminy spermin a spermidin nejsou samy o sobě toxické. Způsobují však zvýšení střevní propustnosti, což může opět vést k zesílení toxických účinků ostatních biogenních aminů [1; 2; 7; 8; 11; 14].

#### **1.1.4 Biogenní aminy v potravinách**

Biogenní aminy jsou přirozenou součástí prakticky všech potravin, jelikož se jedná o běžné produkty metabolismu bílkovin. Pro syntézu biogenních aminů v potravinách musí být splněno několik předpokladů: přítomnost volných aminokyselin, přítomnost dekarboxyláza-pozitivních mikroorganismů, vhodné podmínky pro růst těchto mikroorganismů a také pro produkci a aktivitu jejich enzymů (optimální teplota a pH, koncentrace solí, cukrů, přítomnost kyslíku, kyseliny vinné atd.). Volné aminokyseliny se v potravinách vyskytují buď přirozeně, nebo se uvolňují proteolýzou během zpracování a skladování potravin. Mikroorganismy s dekarboxylační aktivitou mohou být buď přirozenou součástí mikroflóry určité potraviny, nebo se do potraviny dostávají kontaminací před, během nebo po zpracování potraviny, popřípadě při nevhodném skladování. Ve fermentovaných potravinách se na tvorbě BA podílejí používané startovací kultury [3; 8; 11; 18].

Schopnost dekarboxylovat aminokyseliny byla zjištěna u různých rodů grampozitivních i gramnegativních bakterií a také u některých kvasinek a plísní. Přehled významných producentů BA v konkrétních skupinách potravin je uveden v tabulce 5. Biogenní aminy těmto mikroorganismům slouží k ochraně v kyselém prostředí, aktivita jejich dekarboxyláz tedy stoupá s klesajícím pH [3; 4; 8].

##### **1.1.4.1 Potraviny živočišného původu**

Vhodnými potravinami pro tvorbu BA jsou zejména potraviny bohaté na bílkoviny, tedy maso, masné výrobky, sýry a ryby. Nejčastějšími BA v těchto potravinách jsou histamin, putrescin, kadaverin a tyramin. Jejich obsah v mase významně roste při skladování, a to vlivem enzymatické aktivity přítomné mikroflóry, což se dá dobře využít jako ukazatel čerstvosti masa. Pro tento účel bylo navrženo několik tzv. indexů biogenních aminů – BAI (Biogenic Amine Index), které ve výpočtu zohledňují koncentraci jednoho nebo více BA, popřípadě další parametry. Nejčastěji se pro určení hygienické jakosti vepřového a hovězího masa používá BAI, který vyjadřuje sumu koncentrací čtyř nejvýznamnějších BA (histamin, putrescin, kadaverin a tyramin) v mg/kg. Hodnota BAI <5 značí maso čerstvé, 5–20 maso přijatelné kvality (v počáteční fázi mikrobiálního rozkladu), 20–50 maso nízké kvality a hodnota >50 indikuje maso zkažené. Hygienická jakost ryb, konkrétně konzervovaného tuňáka, se posuzuje

podle tzv. indexu kvality – QI (Quality Index). Ten jej klasifikuje do tří tříd čerstvosti: třída 1 = čerstvá ryba (hodnota indexu 0–1), třída 2 = počátek kažení (index 1–10) a třída 3 = zkažená ryba (index >10). Tento původní QI byl později s úpravami přenesen i na další druhy ryb. Další tepelnou úpravou potravin, ve kterých již došlo k vytvoření BA, nelze dosáhnout snížení koncentrace těchto toxinů, jelikož se jedná o termostabilní látky [1; 10; 11; 14; 19; 20].

Tabulka 5: Významné mikroorganismy produkující biogenní aminy v potravinách [1; 3; 8; 10; 21]

Potravina	Biogenní aminy	Mikroorganismy
ryby	histamin, tyramin, kadaverin, putrescin, agmatin	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Bacillus</i> spp., <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>Hafnia alvei</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Morganella psychrotolerans</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Photobacterium phosphoreum</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Raoultella ornithinolytica</i> , <i>Raoultella planticola</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i>
sýry	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, tryptamin, fenylethylamin	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>Escherichia coli</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Pediococcus damnosus</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Pseudomonas lundensis</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>
maso a masné výrobky	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, fenylethylamin, tryptamin	čeleď <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Micrococcus</i> spp., <i>Morganella morganii</i> , <i>Pediococcus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp.
fermentovaná zelenina	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, fenylethylamin, tryptamin	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Cronobacter sakazakii</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Pediococcus</i> spp., <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Serratia marcescens</i>
fermentované výrobky ze sóji	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, tryptamin, spermidin	<i>Bacillus</i> spp., <i>Candida versatilis</i> , <i>Clostridium</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Rhizopus oligosporus</i> , <i>Staphylococcus pasteurii</i> , <i>Trichosporon beigelii</i> , <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
víno	histamin, tyramin, putrescin, agmatin, fenylethylamin	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus hilgardii</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Pediococcus</i> spp.
pivo, cider	histamin, tyramin, putrescin, kadaverin	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Oenococcus oeni</i> , <i>Pediococcus</i> spp., <i>Sporolactobacillus</i> spp.

#### 1.1.4.2 Potraviny rostlinného původu

Také potraviny rostlinného původu jsou zdrojem BA. V ovoci a zelenině je nejhojnějším BA tyramin, ale také v nich lze nalézt konjugáty BA s mastnými nebo skořicovými kyselinami,

případně deriváty BA (protoalkaloidy). Citrusy obsahují velké množství putrescinu, ale také méně běžný BA synefrin. Banány obsahují jako hlavní BA tyramin, dále obsahují fenylethylamin, histamin a také méně časté BA dopamin, serotonin a norepinefrin. Volný histamin se vyskytuje v listech špenátu, rajčatech a lilku. Dalšími rostlinnými produkty, v nichž lze najít BA, jsou např. ořechy, čaj, kakao, luštěniny a obiloviny [1–3; 12; 19].

#### **1.1.4.3 Fermentované potraviny**

Zvláště významné svým obsahem BA jsou fermentované potraviny jak živočišného, tak rostlinného původu, jako jsou např. fermentované sójové produkty (sójová omáčka), uzeniny, sýry, rybí produkty, mléčné výrobky, fermentovaná zelenina (kysané zelí) nebo nápoje vyráběné kvašením (pivo a víno). Koncentraci BA ve fermentovaných potravinách ovlivňuje řada faktorů výrobního procesu, a to hygienická jakost vstupních surovin, mikrobiální složení, podmínky a délka fermentace. Hlavním BA ve fermentovaných potravinách je tyramin, významný je ale také obsah putrescinu, kadaverinu a histaminu. Vysoké koncentrace putrescinu a kadaverinu ve fermentovaných potravinách mohou vést ke změně jejich organoleptických vlastností, jako je např. kovová, masitá nebo hnilobná vůně u vína [2; 3; 9; 13; 14; 18].

#### **1.1.4.4 Prevence tvorby biogenních aminů v potravinách**

Obsah BA v potravinách je důležité monitorovat, a to z několika různých důvodů. Hlavním důvodem je samozřejmě jejich toxicita a potenciální zdravotní riziko spojené s jejich vysokým příjmem. Dalším důvodem je kontrola kvality potravin, jejich čerstvosti a bezpečnosti. Přítomnost BA v potravinách je v podstatě chemickým ukazatelem jejich znehodnocení. To jsou důvody pro prevenci tvorby BA v potravinách, která je v současnosti založena na regulaci dekarboxyláza-pozitivních mikroorganismů zajištěním hygienické kvality výchozích surovin a výrobních procesů (zejména fermentačních) a správným skladováním hotových potravin [3; 4; 11; 14].

Základem pro zajištění hygienické jakosti primárních surovin je dodržování správné hygienické a výrobní praxe a používání Systému analýzy rizika a stanovení kritických kontrolních bodů (HACCP, Hazard Analysis and Critical Control Points), což je na základě Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 o hygieně potravin povinností každého výrobce potravin [11; 12].

Stěžejním faktorem tvorby BA v potravinách je teplota, a to jak při výrobním procesu, tak při skladování. Optimální teplota, kdy je minimalizován růst mikroorganismů i aktivita jejich



proteolytických enzymů a dekarboxyláz, je méně než 4 °C. Zchlazení čerstvých ryb ihned po usmrcení a rychlé vykuchání snižují riziko tvorby a akumulace BA. Teplota je důležitá také při zrání a skladování fermentovaných potravin. Platí, že čím nižší teplota, tím nižší koncentrace BA v produktu. Některé skupiny bakterií jsou však schopny produkovat BA i při teplotách nižších než 5 °C, proto se často přistupuje k dalším ochranným opatřením. Velmi účinným opatřením je vakuové balení potravin, balení potravin v modifikované atmosféře např. CO<sub>2</sub>, ozařování gama paprsky, aplikace vysokého hydrostatického tlaku, potravinových aditiv nebo použití dekarboxyláza-negativních startovacích kultur mikroorganismů. Jednoduše lze vzniku a akumulaci BA v potravinách předejít také jejich tepelným ošetřením, případně použitím klasické konzervační techniky – pasterizace. Například sýry vyrobené z pasterovaného mléka obsahují nižší množství BA než sýry z čerstvého neošetřeného mléka [2–4; 6; 8; 9; 11; 18].

## **1.2 Analýza biogenních aminů v potravinách**

Stanovení biogenních aminů v potravinách je z mnoha důvodů velmi důležité, avšak ne úplně snadné, jelikož se jedná o látky vysoce polární s rozmanitou chemickou strukturou bez funkční skupiny vhodné pro selektivní detekci. Problémem je jejich nízká koncentrace v často velmi komplexních potravinových matricích bohatých na interferující sloučeniny. V potravinách se pak často vyskytuje několik BA současně, což také znesnadňuje analýzu. Přesto byla vyvinuta celá řada analytických metod pro stanovení BA v potravinách a nápojích. Drtivá většina těchto metod je založena na extrakci, derivatizaci a následné separaci a kvantifikaci [2; 5; 23; 24].

Prvním a nejdůležitějším krokem každého analytického postupu je vhodná úprava vzorku. Její postup se odvíjí od složitosti matrice konkrétní potraviny a také od množství a povahy interferujících sloučenin. U nápojů, např. u vína a piva, často před samotným stanovením BA stačí vzorek zfiltrvat, případně odstředit. Tuhé vzorky potravin, např. sýrů nebo masa, je však většinou nutné upravovat mechanicky (mletí, drcení, homogenizace atd.), což lze usnadnit rozpuštěním ve vhodném rozpouštědle. Obecně je cílem úpravy vzorku snížení vlivu matrice a zvýšení analytického signálu sledovaných analytů jejich zakoncentrováním. Pro izolaci BA z matrice se využívají extrakční techniky, např. klasická extrakce v systému kapalina-kapalina (Liquid-Liquid Extraction; LLE), extrakce tuhou fází (Solid-Phase Extraction; SPE), nebo dnes častější mikroextrakční techniky, jako jsou mikroextrakce tuhou fází (Solid-Phase Microextraction; SPME), disperzní kapalinová mikroextrakce (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction; DLLME), mikroextrakce využívající duté vlákno (Hollow Fiber Liquid Phase

Microextraction; HF-LPME) a mikroextrakce tuhou fází s využitím stříkačky (Microextraction by Packed Sorbent; MEPS) [2; 5; 24–26].

Pro separaci a kvantifikaci BA se nejčastěji využívají chromatografické techniky, zejména vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography; HPLC), méně často plynová chromatografie (Gas Chromatography; GC) a tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography; TLC), ale také techniky elektromigrační, hlavně kapilární zónová elektroforéza (Capillary Zone Electrophoresis; CZE). Nejpoužívanějšími způsoby detekce v HPLC jsou fotometrická (UV nebo UV-Vis), fluorimetrická (Fluorescent Detector; FLD) a hmotnostně spektrometrická (Mass Spectrometry; MS). Pro UV detekci a FLD je však nutné vložení chromoforu, respektive fluoroforu, prostřednictvím vhodného derivatizačního činidla [2; 5; 24; 25].

### **1.2.1 Extrakční techniky**

Nedílnou součástí analytického postupu je úprava vzorku, k níž se mimo jiné využívají extrakční techniky. Extrakční techniky jsou založeny na distribuci analytu mezi dvě nemísitelné fáze a slouží k jeho izolaci a zakoncentrování, zjednodušení matrice nebo výměně rozpouštědla před vlastní analýzou. V dnešní době se při používání těchto technik klade důraz na ekologii a upřednostňují se tedy tzv. „zelené“ extrakční techniky, jejichž podstatou je minimalizace spotřeby organických rozpouštědel, která zatěžují životní prostředí [5; 27–29].

#### **1.2.1.1 Extrakce kapalina-kapalina**

Extrakce v systému kapalina-kapalina (LLE) je tradiční jednoduchá technika přípravy vzorku před chromatografickou analýzou. Tato technika je založena na přechodu analytu z jedné kapalně fáze do druhé, přičemž tyto kapaliny musí být vzájemně nemísitelné. Obvykle se jedná o fázi vodnou a fázi organickou, kdy analyt se zpravidla nachází ve vodě a extrahuje se do organického rozpouštědla. Nejčastěji využívanými organickými rozpouštědly pro extrakci BA ze vzorků potravin jsou toluen, chloroform, dichlormethan, methanol, ethylacetát, ethanol, isohexan a také organické kyseliny, např. trichloroctová, chlorovodíková nebo chloristá. Nevýhodou LLE je právě velká spotřeba těchto rozpouštědel, která jsou často toxická, ale také časová náročnost a složitá automatizace. Je to však technika účinná a spolehlivá, ať už pro získání čisté látky ze vzorku, nebo pro odstranění interferentů z matrice [5; 11; 23; 24; 27; 30; 31].

Konkrétním příkladem LLE v analýze biogenních aminů v potravinách je použití u vzorku vína. To bylo nejprve odplyněno, odstředěno a zfiltrováno a po úpravě pH byla provedena extrakce

50 ml vzorku do 10 ml ethylacetátu. Po 20 min byla odebrána organická vrstva a extrakce byla ještě dvakrát opakována. Takto připravený extrakt byl derivatizován 2-chloro-1,3-dinitro-5(trifluoromethyl)-benzenem a analyzován pomocí HPLC s detekcí diodovým polem. Nejnižší obsah BA byl stanoven v šumivých a perlivých vínech (0,29 až 2,65 mg/l všech BA), nejvyšší naopak v červených i bílých sladkých desertních vínech (12,1–16,72 mg/l). Nejhojněji zastoupeným BA v analyzovaných vzorcích byl překvapivě tryptamin [32].

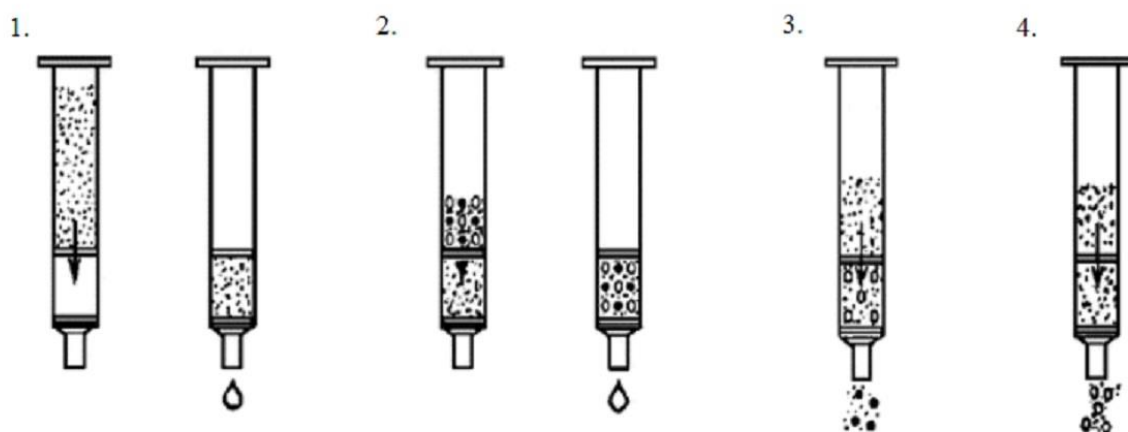
### **1.2.1.2 Extrakce tuhou fází**

Extrakce tuhou fází (SPE) je dnes asi nejvyužívanější extrakční technika, která se osvědčila jako dobrá alternativa ke klasické LLE. Výhodou této techniky právě oproti LLE je zejména nižší spotřeba organických rozpouštědel, možnost automatizace, velké množství komerčně dostupných sorbentů a úspora času. Je to také technika relativně jednoduchá, reprodukovatelná, přesná a účinná [5; 25; 27; 28].

Principem SPE je selektivní zachycení analytů ze vzorku v kapalně nebo plynně fází na tuhý sorbent, z něhož jsou následně uvolněny elucí vhodným rozpouštědlem. Podmínkou úspěšné extrakce je vyšší afinita analytu k sorbentu než k matici. Sorbenty pro SPE jsou nejčastěji uloženy v plastových nebo skleněných kolonkách, případně mohou být slisované se skelnými vlákny do disků. Jedná se většinou o silikagel s navázanými funkčními skupinami, které určují vlastnosti sorbentu. Pro SPE biogenních aminů se obvykle jako sorbent využívá oktadecylsilikagel (C18), který funguje na principu obrácených fází, jelikož se jedná o nepolární funkční skupinu [2; 5; 27; 28].

Obecně se proces SPE sestává ze čtyř základních kroků:

1. kondicionace sorbentu vhodným rozpouštědlem (aktivace sorbentu)
2. nanesení vzorku
3. promytí sorbentu (vymytí interferentů)
4. eluce analytů vhodným rozpouštědlem



Obrázek 2: Jednotlivé kroky SPE [31]

Tomuto postupu, který je znázorněn na obrázku 2, samozřejmě předchází výběr vhodného sorbentu pro konkrétní analyt [27; 28].

Příkladem využití SPE v analýze potravin může být zakoncentrování dansylderivátů biogenních aminů ze vzorků alkoholických nápojů na kolonce plněné oktadecylsilikagelem. Sorbent byl nejprve aktivován dvěma kolonovými objemy methanolu ( $2 \times 3$  ml) a dvěma objemy vody. Po aplikaci derivátů byl sorbent promyt směsí aceton-voda (20:80, V/V) a vysušen vakuem do sucha. Analyty byly eluovány jedním kolonovým objemem acetonitrilu. Eluát byl odpařen do sucha proudem dusíku a znovu rozpuštěn v 2 ml acetonitrilu. Takto připravený zakoncentrovaný roztok byl pak analyzován pomocí HPLC s fluorimetrickou detekcí. Tento způsob extrakce poskytl 95% výtěžnost. Ve vzorcích bílého, červeného a řeckého vína Retsina byl svým obsahem nejvýznamnější putrescin (0,294–3,148 mg/l). Ve vzorcích piva byl obsah BA vyšší než ve vínech. V nejvyšších koncentracích byl nalezen tyramin (1,511–6,056 mg/l), významně byly zastoupeny také putrescin (3,210–5,228 mg/l) a spermidin (1,196–4,454 mg/l) [33].

### 1.2.1.3 Mikroextrakce tuhou fází

Miniaturizovanou variantou SPE je mikroextrakce tuhou fází (SPME), která se v posledních letech stala hojně využívanou zejména díky svému ekologickému charakteru. Tato technika nevyžaduje využití organických rozpouštědel, případně pouze minimální množství (méně než 1  $\mu$ l). Další výhodou oproti SPE a klasické LLE je integrace odběru vzorku, extrakce a zakoncentrování analytů do jediného kroku. To činí tuto techniku rychlou, snadnou a pohodlnou, navíc je citlivá a také kompatibilní s chromatografickými systémy. Existují však

i nevýhody SPME, zejména omezený rozsah komerčně dostupných stacionárních fází, křehkost, omezená životnost a nižší sorpční kapacita vláken [2; 24; 27; 31; 34].

Podstatou SPME je rovnovážná sorpce analytů na stacionární fázi, kterou je potaženo křemenné vlákno. To je umístěno v kapiláře z nerezové oceli a celé zařízení funguje v podstatě jako stříkačka, kdy se vlákno vysouvá a zasouvá podle potřeby. K sorpci dochází buď přímo z kapalného vzorku (přímá SPME), nebo z plynné fáze nad vzorkem (headspace SPME). Desorpce je pak provedena buď vysokou teplotou po vložení vlákna do nástřikového portu plynového chromatografu, nebo vhodným rozpouštědlem pro následnou HPLC analýzu. Výhodnější a hlavně jednodušší je tedy spojení SPME s GC, což se uplatňuje především pro extrakci těkavých a částečně těkavých sloučenin ze vzorků životního prostředí, potravin a biologických vzorků [5; 27; 28; 31; 34].

Technika SPME byla využita k prekoncentraci při stanovení BA v pomerančovém džusu pomocí HPLC s UV detekcí. Stacionární fází byl ligand na bázi hydrazonu zachycený v sol-gelu. Vlákno se sorbentem bylo kondicionováno vodou v ultrazvuku a následně methanolem. Vzorky džusu byly po zalkalizování derivatizovány dansylchloridem, jehož přebytek byl následně odstraněn kyselinou glutamovou. SPME byla provedena přímo ponořením do vzorku, který byl míchán. Po extrakci byl sorbent vysušen, analyty byly desorbovány acetonitrilem pomocí ultrazvuku a extrakt byl nastříknut do systému HPLC. Nejvýznamněji zastoupeným BA ve všech vzorcích byl putrescin (0,55–2,21 mg/l), jehož přítomnost je charakteristická pro citrusové plody. Dále byly stanoveny tyramin, histamin a spermidin, jejichž přítomnost v pomerančích je také přirozená [35].

#### **1.2.1.4 Disperzní kapalinová mikroextrakce**

Relativně novou extrakční technikou je disperzní kapalinová mikroextrakce (DLLME). Tato technika je založena na využití dvou rozpouštědel, a to extrakčního a disperzního. Extrakční rozpouštědlo musí být ve vodě nerozpustné s vysokou hustotou a schopné extrahovat dané analyty. Nejčastěji se používají halogenovaná rozpouštědla, jako jsou chloroform, tetrachlormethan nebo tetrachlorethylen. Disperzní rozpouštědlo pak musí být mísitelné jak s vodou, tak s extrakčním činidlem. Může to být např. ethanol, methanol nebo acetonitril [2; 27; 30].

Principem DLLME je rychlé vstříknutí směsi extrakčního a disperzního rozpouštědla do vodného vzorku, čímž dojde k vytvoření velkého množství malých kapiček extrakčního rozpouštědla, které jsou dispergovány ve vodné fázi. Důsledkem je velmi velká plocha fázového rozhraní, a tedy velký prostor pro interakci analytů ze vzorku s extrakčním činidlem.

Po extrakci následuje odstředění, extrakt se usazuje na dno nádoby a konečně je analyzován vhodnou analytickou technikou, obvykle HPLC nebo GC [5; 27; 30; 34; 36].

S velkou extrakční plochou, kterou tato technika poskytuje, je spojena řada výhod, jako jsou rychlost a účinnost extrakce a vysoký obohacovací faktor. Dalšími přednostmi jsou jednoduchost, nízká cena a kompatibilita s běžnými chromatografickými technikami. Naopak nevýhodou může být nutnost odpaření horní vrstvy směsi po odstředění a také toxicita halogenovaných rozpouštědel, kterých se však používají pouze malá množství v řádech desítek mikrolitrů [27; 30; 36].

Tato technika byla využita současně pro extrakci i derivatizaci při stanovení BA v pivu metodou plynové chromatografie s detekcí hmotnostním spektrometrem (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS). Jako disperzní rozpouštědlo zde byl využit acetonitril a jako extrakční rozpouštědlo toluen. Směs těchto rozpouštědel byla spolu s derivatizačním činidlem (isobutylchlorformiát) rychle vstříknuta do zkumavky se vzorkem a vzniklá směs pak byla třepána. Po odstředění byla horní toluenová fáze po další úpravě (odstranění přebytku derivatizačního činidla atd.) analyzována GC-MS. V analyzovaných vzorcích byl nejvýznamnějším BA putrescin v koncentracích až 12,777 mg/l, což nebývá obvyklé, jelikož nejhojněji zastoupeným BA v pivech bývá zpravidla tyramin [37].

### **1.2.1.5 Mikroextrakce využívající duté vlákno**

Mikroextrakce využívající duté vlákno (HF-LPME) je další z extrakčních technik, které byly vyvinuty ve snaze snížit spotřebu toxických organických rozpouštědel. Je to metoda rovnovážné extrakce, která je prakticky miniaturizovanou formou klasické LLE. Při HF-LPME jsou analyty z vodného vzorku (donorové fáze) extrahovány prostřednictvím s vodou nemísitelného organického rozpouštědla, které je imobilizováno v pórech stěny dutého vlákna, do roztoku v dutině vlákna (akceptorová fáze). Akceptorový roztok je pak podroben analýze pomocí HPLC, GC nebo CE. Pokud je akceptorovým roztokem totéž organické rozpouštědlo, kterým jsou naplněny póry vlákna, jedná se o dvoufázový extrakční systém. Ten je přímo kompatibilní s GC a je vhodný zejména pro lipofilní látky málo rozpustné ve vodě. Pokud je akceptorovou fází vodný roztok, jedná se o třífázový extrakční systém, vhodný pouze pro ionizovatelné látky. Vodný roztok bude mít takové pH, aby v něm byly analyty co nejvíce ionizované, a tedy co nejvíce rozpustné ve vodě. Před extrakcí je naopak nutné upravit pH vzorku tak, aby byla ionizace analytů co nejvíce potlačena a jejich rozpustnost ve vodě tak co nejvíce snížena [27; 34; 38].

HF-LPME je velmi účinná technika čištění vzorku, zejména v třífázovém uspořádání. Je to technika poměrně levná a snadno automatizovatelná. Její hlavní výhodou je extrémně nízká spotřeba organických rozpouštědel, jelikož objem rozpouštědla v pórech vlákna je obvykle pouze 5–30  $\mu\text{l}$ . Další výhodou je vysoký obohacovací faktor – objem donorové fáze, tedy vzorku, může být až 1 litr, zatímco objem akceptorové fáze, tedy finálního extraktu, je obvykle 2–30  $\mu\text{l}$ . Také zde odpadá problém s „carry-over“ efektem, tedy s přenosem analytů mezi analýzami, jelikož duté vlákno je pouze na jedno použití. Za nevýhodu může být naopak považována relativně dlouhá doba extrakce, která se odvíjí od objemu vzorku (15–45 min, ale i 2 hodiny) [25; 27; 38; 39].

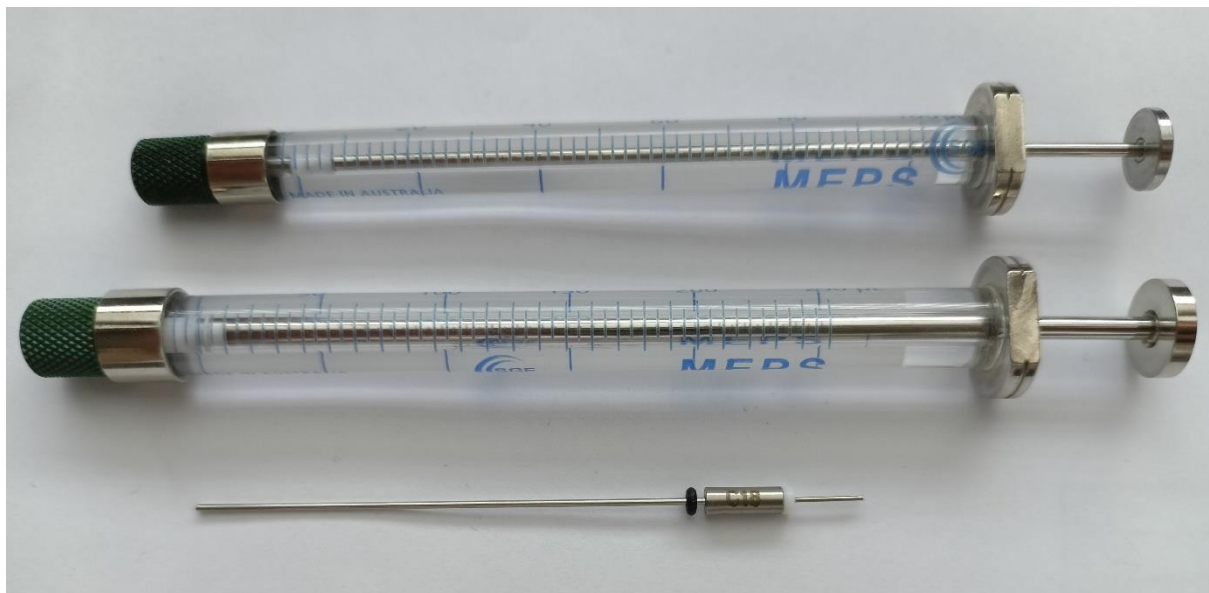
Technika HF-LPME s in-situ derivatizací dansylchloridem byla použita při stanovení BA ve vzorcích potravin (kečup a krevetová omáčka). Donorový roztok byl připraven smísením vzorku, jehož pH bylo upraveno na 9,5, s derivatizačním činidlem. Akceptorovým roztokem byla HCl o koncentraci 0,1 mol/l a organickým rozpouštědlem v pórech vlákna byl dihexylether. Při extrakci byl donorový roztok míchán pomocí magnetického míchadla. Po proběhnutí extrakce byla akceptorová fáze odebrána stříkačkou a aplikována do HPLC systému s UV detekcí pro separaci a kvantifikaci BA. Tato extrakční technika prokázala dobrou relativní výtěžnost (>86,7 %). Zatímco ve vzorcích kečupu nebyly detekovány žádné BA, ve vzorcích krevetové omáčky byly detekovány tryptamin, fenylethylamin, putrescin, histamin, tyramin a spermidin. Nejvyšší byla koncentrace tryptaminu, a to 57,9 mg/l [39].

#### **1.2.1.6 Mikroextrakce tuhou fází s využitím stříkačky**

Mikroextrakce tuhou fází s využitím stříkačky (MEPS) je novou miniaturizovanou formou extrakce tuhou fází, která se díky minimální spotřebě organických rozpouštědel dá považovat za techniku tzv. zelené chemie. U techniky MEPS jsou 1–2 mg sorbentu umístěny buď přímo mezi frity do stříkačky, nebo do patronky mezi stříkačku a jehlu. Obvykle se tedy zařízení pro MEPS skládá ze dvou částí, a to z plynotěsné skleněné stříkačky o objemu nejčastěji 100 nebo 250  $\mu\text{l}$  a komerčně dodávané patrony zabudované v jehle injekční stříkačky, která je známá jako BIN (Barrel Insert Needle) [27; 30; 40–42]. Všechny potřebné komponenty pro MEPS jsou zobrazeny na obrázku 3.

Postup při MEPS je v podstatě totožný s postupem SPE, tedy kondicionace sorbentu, aplikace vzorku, promytí a nakonec eluce analytu vhodným rozpouštědlem. Rozdíl je však v tom, že při MEPS dochází ke dvojnásobnému styku sorbentu se vzorkem, a to při nasátí do stříkačky a následném vytlačení ze stříkačky. To vede k efektivnějšímu zachycení analytů na sorbent,

což je také hlavní výhodou této techniky oproti klasické SPE. Další výhodou je možnost opakovaného použití (až 100 analýz) bez ztráty účinnosti, pokud jsou dodrženy správné promývací kroky po každé extrakci. Také relativně krátký extrakční čas (minuty), široký rozsah zpracovávaných objemů vzorků (10–1000  $\mu$ l), automatizovatelnost a možnost on-line spojení s HPLC a GC činí tuto techniku velmi oblíbenou [27; 30; 40; 41].



Obrázek 3: Zařízení pro MEPS – plynotěsné skleněné stříkačky a BIN se sorbentem C18

V MEPS se využívá několik typů komerčních i nekomerčních sorbentů nejčastěji na bázi oxidu křemičitého (nemodifikovaný, se skupinami C18, C8 a C2), ale také polystyren-divinylbenzen, iontově výměnné sorbenty, porézní grafitický uhlík nebo molekulárně vtištěné polymery. Výběr správného sorbentu na základě fyzikálně-chemických vlastností analytů je klíčovým faktorem účinnosti této techniky. Ta je ovlivněna také rychlostí průtoku při nanášení vzorku, výběrem správných rozpouštědel pro jednotlivé kroky extrakce a velikostí částic sorbentu [27; 30; 40; 41].

Technice MEPS je velmi podobná technika PT-SPE (Pipette Tip Solid Phase Extraction), při níž extrakce na tuhou fázi probíhá v pipetovací špičce, která je naplněná sorbentem. V dnešní době existuje několik typů komerčně dodávaných sorbentů v pipetovacích špičkách, většina z nich však není schopných dostatečné adsorpce v jednom pipetovacím kroku, a aplikace vzorku se tak musí několikrát opakovat. Využití tato technika našla zejména v analýze biologických vzorků [27; 30].



## 1.2.2 Chromatografické techniky

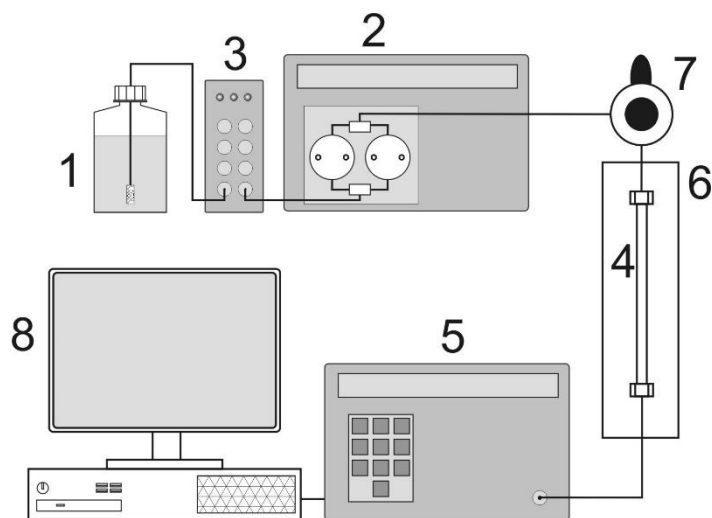
Chromatografické techniky jsou techniky separační, založené na dělení složek mezi stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou) fází. Při separaci dochází k opakovanému ustavování rovnováhy mezi analytem a stacionární fází a analytem a fází mobilní. K dosažení rovnovážného stavu však kvůli stálému pohybu mobilní fáze ve skutečnosti nedochází. Chromatografické techniky mohou být klasifikovány podle skupenství mobilní fáze (plynová chromatografie a kapalinová chromatografie), podle technického uspořádání (kolonová nebo planární) nebo podle separačního mechanismu (adsorpční, afinitní, gelová, rozdělovací a iontově výměnná). Často však dochází k uplatnění několika separačních principů najednou, nebo mechanismus separace není zcela znám [27; 29].

Obecný postup separace začíná aplikací vzorku na počátek tzv. chromatografického lože, což je systém dvou fází, mezi které se látka dělí. Jedná se zpravidla o kolonu, papír nebo tenkou vrstvu. Vzorek je unášen tokem mobilní fáze ke konci chromatografického lože, přičemž látka s vyšší afinitou ke stacionární fázi se v systému více zadržuje. Dochází k oddělování zón jednotlivých složek vzorku. Složky vzorku opouštějí lože (eluují) v pořadí podle rostoucí míry interakce se stacionární fází [27; 29].

### 1.2.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je dnes jednoznačně nejpoužívanější separační technikou v analytické praxi. Jedná se o metodu vysoce účinnou, robustní a všestrannou – lze s ní analyzovat až 80 % všech chemických látek, např. léčiva, polymery, biomolekuly, polární i nepolární organické sloučeniny a látky iontové povahy. V kapalinové chromatografii (Liquid Chromatography, LC) je mobilní fází kapalina a stacionární fází sorbent v koloně. HPLC je pak moderní formou LC, která využívá kolony s velmi malými částicemi (obvykle 3  $\mu\text{m}$  a méně) a velké průtoky mobilní fáze [29; 43–45].

Obrázek 4 schematicky zobrazuje typický HPLC systém. Mobilní fáze je ze zásobníku (1) čerpána vysokotlakým čerpadlem (2) přes odplyňovač (3) do separační kolony (4) umístěné v termostatu (6). Vzorek je dávkován pomocí autosampleru nebo dávkovací smyčky (7) přímo do toku mobilní fáze na počátek kolony. Eluát z kolony je veden do detektoru (5), jehož signál je zpracován počítačem s chromatografickou datovou stanicí (8) [27; 29].



Obrázek 4: Schéma HPLC systému [27]

1 – zásobník mobilní fáze, 2 – vysokotlaké čerpadlo, 3 – průtočný odplyňovač mobilní fáze, 4 – separační kolona, 5 – detektor, 6 – termostat kolony, 7 – dávkovač vzorků, 8 – počítač s chromatografickou datovou stanicí

Kolony v HPLC mají délku 2–30 cm a vnitřní průměr 0,1–6 mm. Jsou plněné velmi malými částicemi sorbentu s úzkou distribucí velikostí. To má za následek jak vysokou účinnost, tak ale i velmi vysoké pracovní tlaky (až 60 MPa), jimž musí kolona i samotné částice sorbentu odolat. Musí být tedy odolná mechanicky, ale také chemicky vůči působení mobilní fáze i separovaných látek [27; 29].

#### 1.2.2.1.1 Fázové systémy v kapalinové chromatografii

Podle povahy interakcí mezi složkami vzorku, stacionární a mobilní fází lze rozlišit různé typy neboli módy kapalinové chromatografie. Jednoznačně nejpoužívanější jsou v dnešní době **systemy s obrácenými fázemi** (RPLC, Reverse-Phase Liquid Chromatography), kde mobilní fáze je polárnější než fáze stacionární. Mobilní fází je většinou směs vody a methanolu nebo acetonitrilu. Stacionární fází je nejčastěji silikagel s chemicky vázanými nepolárními skupinami, jimiž jsou zejména oktadecyl (C18), oktyl (C8) a další alkylové nebo alkylarylové řetězce. Tento systém je vhodný pro separaci látek silně, středně i málo polárních, přičemž retence roste s klesající polaritou sloučenin [27; 29; 43; 45].

Kapalinová chromatografie v **systemu s normálními fázemi** (NPLC, Normal-Phase Liquid Chromatography) je tradiční technika, v níž je mobilní fáze méně polární než fáze stacionární. Mobilní fází je většinou dvousložková směs různě polárních organických rozpouštědel, např. 2-propanolu a *n*-hexanu. Stacionární fází je zde polární anorganický adsorbent, nejčastěji silikagel, ale také oxid hlinitý nebo silikagel s chemicky vázanými polárními skupinami,

např. aminovými nebo nitrilovými. Tento systém je vhodný pro separaci nepolárních a středně polárních látek, přičemž retence roste s polaritou sloučenin [27; 29; 43; 45].

Dalšími typy LC jsou iontově výměnná chromatografie (IEC, Ion-Exchange Chromatography) a gelová chromatografie neboli chromatografie sterické vyluky (SEC, Size-Exclusion Chromatography). Dále existuje celá řada speciálních technik, např. afinitní chromatografie, chirální HPLC, chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC, Hydrophilic Interaction Chromatography), chromatografie hydrofobních interakcí nebo micelární HPLC [27; 43].

#### 1.2.2.1.2 Detektory v kapalinové chromatografii

Pro detekci biogenních aminů po separaci HPLC se nejčastěji používá **spektrofotometrická detekce** v ultrafialové a viditelné oblasti elektromagnetického záření (UV-Vis). Jedná se o tradiční způsob detekce v HPLC, který je využíván až v 80 % aplikací této techniky. Jeho principem je měření poklesu intenzity záření ze zdroje vlivem přítomnosti absorbující látky v eluátu, který prochází průtočnou celou detektoru po opuštění separační kolony. Absorbance látky je pak podle Lambert-Beerova zákona přímo úměrná její koncentraci v eluátu. Většina BA však neabsorbuje záření z UV ani viditelné oblasti. Tento problém se řeší derivatizací vhodným činidlem, které do molekuly BA zanese chromofor [27; 29; 43; 45; 46].

Dnes je běžně používaným typem spektrofotometru **detektor s fotodiodovým polem** (Photodiode-Array, PDA nebo také Diode-Array Detector, DAD), který obsahuje až 1024 plošných fotodiod. Každá z těchto fotodiod detekuje záření určité vlnové délky a lze tak získat kompletní UV spektrum každého píku na chromatogramu, což lze využít k identifikaci jednotlivých složek eluátu. Při přímém spojení HPLC/DAD je výhodou získání okamžitého spektra bez nutnosti zastavení průtoku mobilní fáze [27; 29; 43; 45].

Citlivější detekční technikou pro derivatizované BA je **detekce fluorimetrická** (FLD). Principem je, že látka v cele detektoru absorbuje excitační (budící) záření z UV oblasti, které pak částečně emituje (vyzáří) ve formě sekundárního (fluorescenčního) záření o nižší energii. Emitované záření je detekováno kolmo k záření excitačnímu, aby nedocházelo k jejich mísení. Výhodami FLD jsou zejména její selektivita, extrémní citlivost a také možnost získat jak emisní, tak i excitační spektra detekovaných látek, což lze opět využít k jejich identifikaci [27; 29; 43; 45; 46].

Další možností detekce je **detekce hmotnostně spektrometrická** (MS). Nejen v analýze BA je běžně využíváno on-line (přímé) spojení HPLC s hmotnostním spektrometrem (HPLC-MS),

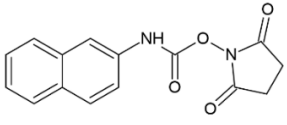
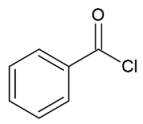
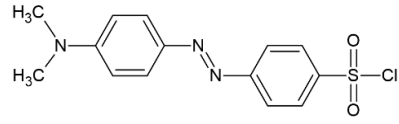
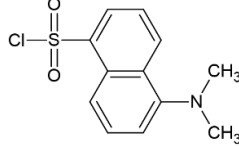
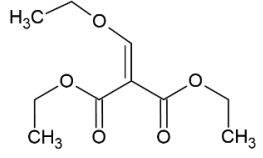
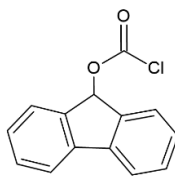
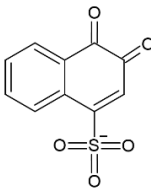
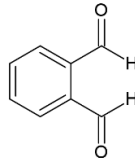
kteře poskytuje vysokou citlivost a rozlišení, možnost identifikace analytů a informace o jejich struktuře a molekulových hmotnostech. Toto spojení však nebylo zpočátku vůbec jednoduché. Zásadní problém činilo množství, a hlavně skupenství eluátu, jelikož ten je v HPLC kapalný, ale iontový zdroj MS pracuje s molekulami v plynné fázi. Proto bylo zapotřebí vyvinout metodu odstranění kapaliny před vstupem do detektoru, což se řeší používáním těkavých mobilních fází. Obrovský tlakový rozdíl mezi hmotnostním analyzátořem a eluátem z kolony a také vlastnosti samotných analytů (polarita, termolabilita, vysoká molekulová hmotnost atd.) působily značné obtíže [27; 29; 43–45].

Samotný hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, hmotnostního analyzátořa a detektoru. Tyto základní části jsou doplněny o vakuový systém a systém pro řízení a zpracování dat. Iontový zdroj slouží k převedení neutrálních molekul, jimiž analyty vycházející ze separační kolony obvykle jsou, na nabitě částice. Pro on-line HPLC-MS jsou vhodné zejména ionizace elektrosprejem a chemická ionizace za atmosférického tlaku. Hmotnostní analyzátoř slouží k separaci iontů podle poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ), což probíhá v plynné fázi za vysokého vakua. Nejčastěji se používají kvadrupóly, iontové pasti nebo analyzátořy doby letu. Jako detektory jsou využívány elektronásobiče, které intenzitu iontového toku převádí na elektrický signál [27; 29; 43].

#### **1.2.2.1.3 Derivatizace v kapalinové chromatografii**

Derivatizace je proces zavedení vhodných atomů nebo funkčních skupin do molekuly analyzované látky za účelem změny jejích vlastností. Většinou se jedná o snížení její polarity, zlepšení extrakce, chromatografické separace a zlepšení nebo přímo umožnění její detekce. Většina biogenních aminů nemá nativní fluorescenci a neabsorbuje v UV ani Vis oblasti nebo absorbuje při nízkých vlnových délkách, kde silně interferují složky matrice a mobilní fáze. Proto je pro jejich detekci v HPLC nezbytná derivatizace, tedy zavedení chromoforu pro detekci v oblasti vyšších vlnových délek (UV-Vis) nebo fluoroforu pro detekci fluorimetrickou. Také v případě použití MS detekce se BA často derivatizují, a to z důvodu snížení jejich polarity a tím zvýšení rozlišení na kolonách s reverzní fází [25; 29; 42; 47; 48]. Tabulka 6 shrnuje nejčastěji používaná činidla pro derivatizaci BA.

Tabulka 6: Derivatizační činidla pro biogenní aminy [25; 26; 42]

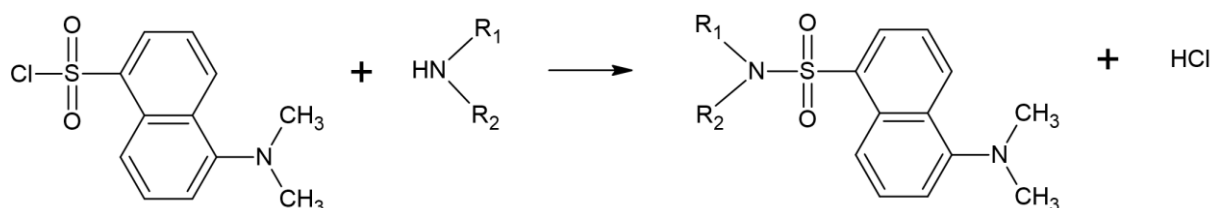
Název	Zkratka	Chemická struktura
6-aminochinolyl-N-hydroxysukcinimidylkarbamát	AQC	
benzoylchlorid	-	
dabsylchlorid (4-dimethylaminoazobenzen-4'-sulfonylchlorid)	Dbs-Cl	
dansylchlorid (5-dimethylaminonaftalen-1-sulfonylchlorid)	Dns-Cl	
diethylethoxymethylenmalonát	DEEMM	
9-fluorenylmethoxykarbonylchlorid	FMOC	
1,2-naftochinon-4-sulfonát	NQS	
o-ftaldialdehyd	OPA	

Derivatizační reakce v HPLC může být provedena buď off-line, tedy mimo chromatografický systém, nebo on-line, a to buď před separací (pre-column) nebo po separaci (post-column). Nejčastěji je používána metoda off-line derivatizace, protože je jednoduchá, levná a nevyžaduje žádné speciální vybavení. Předkolonová on-line derivatizace probíhá buď přímo na koloně,

nebo v reaktoru těsně před kolonou, k čemuž jsou zapotřebí přídatná čerpadla a směšovací komora. Reakce post-kolonová probíhá po separaci před vstupem do detektoru a vyžaduje speciální mikroreaktory, ve kterých lze provádět více operací zároveň (např. míchání a zahřívání). Také jsou kladeny vyšší nároky na výběr derivatizačního činidla, které musí být mísitelné s eluentem a jeho reakce s analyty musí být rychlá a pokud možno kvantitativní [25; 29].

I pro jednoduchou off-line derivatizaci je nutné zvolit vhodné reakční podmínky pro úplnost derivatizace a vznik stabilních derivátů, jedinečných pro každý analyt. Vzniklé deriváty BA obecně nejsou příliš stabilní, při vysoké teplotě a pH podléhají degradaci. Pro úplnost reakce je třeba použít dostatečně velký přebytek derivatizačního činidla, který je však před HPLC separací nutné odstranit. Derivatizace BA obecně probíhá většinou v rozmezí pH 9–11, kdy je amin v deprotonovaném stavu. Teplota a čas reakce jsou závislé na reakční kinetice každého derivatizačního činidla [26; 48].

Jednoznačně nejčastěji používaným činidlem pro derivatizaci biogenních aminů, ale také aminokyselin a peptidů, je **dansylchlorid** (5-dimethylaminonaftalen-1-sulfonylchlorid, Dns-Cl). Dansylchlorid má řadu výhodných vlastností, jeho diaminonaftalenová struktura vykazuje silnou fluorescenci a prostřednictvím  $\pi$ - $\pi$  interakcí zlepšuje chromatografickou separaci a jeho reaktivní sulfonylchloridová skupina umožňuje snadnou nukleofilní substituci primárními i sekundárními aminy za vzniku poměrně stabilních derivátů. Dansylderiváty BA lze detekovat spektrofotometricky při 250 a 320 nm, fluorimetricky při  $\lambda_{\text{ex}} = 350\text{--}370$  nm a  $\lambda_{\text{em}} = 490\text{--}530$  nm, ale i pomocí MS [25; 26; 29; 42; 48].



Obrázek 5: Obecné schéma dansylace aminu [29]

Dansylace BA se provádí v alkalickém prostředí za různých reakčních podmínek, nejčastěji se používají teploty 40–70 °C a reakční doba 10–60 minut. Přebytečné činidlo po reakci je třeba odstranit, jelikož může negativně ovlivnit chromatografickou separaci vzniklých derivátů. To se provádí nejčastěji amoniakem, případně aminokyselinami prolinem nebo kyselinou

glutamovou [26; 42]. Obecné schéma derivatizační reakce aminu dansylchloridem je uvedeno na obrázku 5.

### **1.2.2.2 Plynová chromatografie**

Plynová chromatografie je pro analýzu biogenních aminů ve srovnání s HPLC minoritní technikou, jelikož BA jsou látky polární a netěkavé. Proto je opět nutná jejich derivatizace, v GC nejčastěji pomocí isobutylchlorformiátu nebo anhydridu kyseliny heptafluoromáselné [24; 48; 49].

Principem GC je rovnovážná distribuce analytu mezi mobilní a stacionární fází na základě rozpouštění a adsorpce. Mobilní fází je inertní plyn, nejčastěji helium nebo vodík. Stacionární fází je nejčastěji kapalina na inertním nosiči, případně povrchově aktivní adsorbent. Separační kolony v GC jsou buď náplňové, které jsou v celém objemu naplněny chromatografickou náplní, nebo dnes častěji kapilární, v nichž je stacionární fáze zakotvena na jejich vnitřních stěnách buď přímo, nebo prostřednictvím nosičů. Existuje několik set stacionárních fází pro GC, např. nepolární skvalan a apiezon, nebo polární polyethylenglykol. Nejčastěji využívanými kolonami v GC jsou ty s nepolárními zesíťovanými polysiloxanovými fázemi, např. HP-5 (5 % fenylpolysiloxan a 95 % methylpolysiloxan) nebo DB-5 (5 % difenylpolysiloxan a 95 % dimethylpolysiloxan). Pro detekci se v GC nejčastěji používá plamenový ionizační detektor a hmotnostní spektrometr [27; 29].

### **1.2.2.3 Tenkovrstvá chromatografie**

Tenkovrstvá chromatografie je technikou kapalinové chromatografie v plošném uspořádání, stejně jako papírová chromatografie. K separaci látek zde dochází při průchodu rozpouštědla vrstvou sorbentu, který je v tenké vrstvě rozprostřen na tuhé podložce. Jako stacionární fáze slouží silikagel, oxid hlinitý, nebo dnes častěji silikagel s chemicky vázanými polárními nebo nepolárními fázemi. Mobilní fáze se musí zvolit tak, aby stacionární fázi nerozpouštěla. Jedná se nejčastěji o směsi organických polárních (methanol, ethanol, aceton apod.) nebo nepolárních (*n*-hexan, toluen, chloroform apod.) rozpouštědel. V TLC se chromatogram vyvíjí vzestupně ve vyvíjecích komorách, často sendvičového typu. Detekce se provádí buď vizuálně za použití detekčního činidla, které po nanesení na chromatogram poskytne barevnou reakci se separovanými látkami (např. Ehrlichovo činidlo), nebo instrumentálně (např. denzitometricky nebo spektrofotometricky). Miniaturizovanou formou této techniky je vysokoúčinná TLC (High Performance Thin Layer Chromatography, HPTLC) [29].

Pro analýzu BA touto technikou je opět nezbytná jejich derivatizace (např. Dns-Cl). Výhodou je, že TLC je technika jednoduchá, která nevyžaduje žádné speciální zařízení. Je však značně zdlouhavá, semikvantitativní a nepříliš citlivá [24; 49].

### 1.2.3 Elektromigrační metody

Druhou nejčastěji používanou technikou pro separaci a stanovení biogenních aminů v potravinách je kapilární zónová elektroforéza (CZE). Je oblíbená zejména pro rychlost separace, nízkou spotřebu vzorku i rozpouštědel a velkou účinnost separace. V porovnání s HPLC však CZE dosahuje nižší citlivosti při UV detekci, pro niž je opět zapotřebí, stejně jako pro FLD, biogenní aminy derivatizovat [24; 25; 47].

Elektromigrační metody obecně jsou založeny na rozdílné pohyblivosti iontů v elektrickém poli, která je dána jednak velikostí náboje, ale také tvarem a velikostí částic, podmínkami prostředí a samozřejmě i velikostí elektrického pole. Zařízení pro elektroforézu se skládá z anodového a katodového prostoru, separační kapiláry, zdroje stejnosměrného proudu a detektoru. V CZE se používají křemenné kapiláry, které mohou být pokryté vrstvou polyimidu pro lepší pružnost. Pro detekci se používá nejčastěji UV (DAD) detektor, umístěný před koncem kapiláry, na niž je vytvořeno detekční okno odstraněním části polyimidového obalu. Dále se využívá hmotnostní (MS, nebo MS/MS), konduktometrická, pulzní amperometrická nebo fluorimetrická detekce, avšak nejvyšší citlivost vykazuje detektor s laserem indukovanou fluorescencí (Laser Induced Fluorescence, LIF) [25; 27; 29; 49].

V CZE jsou anoda i katoda ponořeny do nádobek se základním elektrolytem, jímž je naplněna i separační kapilára. Vzorek je dávkován do jednoho konce kapiláry, a to buď hydrodynamicky, nebo elektrokineticky. Po aplikaci stejnosměrného elektrického proudu vzniká v kapiláře gradient elektrického pole, v němž se částice ze vzorku pohybují dle svých efektivních pohyblivostí k opačně nabitým elektrodám. Separované ionty pak tvoří v základním elektrolytu samostatné zóny [27; 29].

Dalšími elektromigračními technikami, které jsou použitelné pro analýzu BA v potravinách, jsou izotachoforéza a micelární elektrokinetická chromatografie (Micellar Electrokinetic Chromatography, MEKC) [24; 25].



### 1.3 Biogenní aminy v pivu

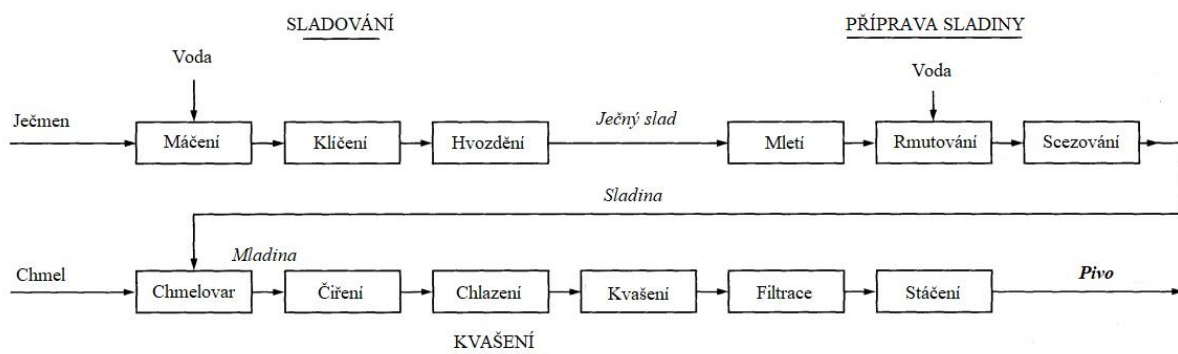
Pivo je celosvětově oblíbený alkoholický nápoj s velmi dlouhou historií. Má jedinečnou vůni a hořkou chuť díky složkám chmele a aromatickým produktům kvašení, povzbuzující a omamné účinky díky ethanolu a osvěžující efekt díky oxidu uhličitému. Je známé, že fermentované nápoje, jako je právě pivo a také víno, přináší řadu zdravotních benefitů, zejména svým obsahem vitamínů, minerálů a antioxidantů. Z hlediska alimentárních onemocnění je pivo považováno za bezpečný produkt díky přítomnosti ethanolu a oxidu uhličitého, nízkému pH a nízkému obsahu kyslíku, což jsou podmínky nepříznivé pro růst mikroorganismů. Přesto však existují mikroorganismy, které jsou schopné tyto podmínky tolerovat a způsobit tak kontaminaci, nebo dokonce kažení piva. Jedná se nejčastěji o bakterie mléčného kvašení, zejména rod *Lactobacillus*, které jsou díky jejich dekarboxylázové aktivitě nejvýznamnějším producentem biogenních aminů v pivu. Jejich zdrojem jsou zejména suroviny používané pro výrobu piva, ale také mohou být do hotového produktu zaneseny při výrobě nebo skladování, zejména pokud nejsou dodržovány správné hygienické postupy [8; 19; 50–52].

#### 1.3.1 Proces výroby piva

Základními surovinami pro výrobu piva jsou sladovnický ječmen, chmel, kvasinky a voda. Chmel otáčivý, jehož poddruh chmel evropský (*Humulus lupulus* var. *europaeus*) se používá právě pro výrobu piva, je dvoudomá vysoká popínavá rostlina. Používají se pouze sušené hlávky (šišky) samičích rostlin chmele. Chmel je nepostradatelnou ingrediencí, protože jeho složky působí jako čířidlo pro vysrážení bílkovin v mladině, mají antimikrobiální účinek a způsobují tvorbu typické pěny. Nejdůležitější složkou chmelu jsou hořké kyseliny (humulon, adhumulon, kohumulon, lupulon, adlupulon a kolupulon). Tyto sloučeniny podléhají izomeračním, oxidačním a polymeračním reakcím při výrobě piva. Sekundární produkty hořkých kyselin, které při těchto reakcích vznikají, dodávají pivu typickou hořkou chuť a aroma. Pivovarnická voda má velký vliv na kvalitu a charakter piva. Nejdůležitějším kritériem je tvrdost vody, tedy obsah vápenatých a hořečnatých síranů, chloridů, křemičitanů a hydrogenuhličitanů. Na výsledné vlastnosti piva má vliv také obsah solí manganu a železa, dusičnanů nebo chloridu sodného [19; 51; 53].

Pro výrobu sladu se v České republice využívají většinou různé odrůdy jarního dvouřadého ječmene (*Hordeum vulgare* convar. *distichon*). Ten nejprve až pět týdnů dozrává v silech, po předčištění se máčí ve vodě, což vede k nástupu enzymatických procesů a klíčení. Následuje dvoukrokové sušení neboli hvozdění naklíčeného sladu. Podle teploty sušení se rozlišují

jednotlivé druhy sladů – světlé slady se vyrábějí při nižší sušicí teplotě než slady tmavé. Hotový slad se pak nechává před dalším zpracováním určitou dobu odležet. Pro výrobu pšeničných piv a některých dalších speciálních druhů se používá pšeničný slad, který se však vždy mísí se sladem ječným [19; 53]. Na obrázku 6 je zobrazeno přehledné schéma celého procesu výroby piva.



Obrázek 6: Schéma výroby piva [19]

Příprava mladiny začíná šrotováním neboli mletím sladu. Následuje vystírání, tedy smísení sladu s vodou, a rmutování (zahřívání). Zahříváním škrobová zrna v rozemletém sladu bobtnají a vzniká z nich škrobový maz, ten se dále ztekucuje, a nakonec dochází ke zcukření. Dalším krokem je scezování, kdy se kapalná část, tzv. sladina, odděluje od tuhé části, tzv. mláta, které se využívá jako krmivo pro dobytek [19; 51; 53].

Po povaření sladiny s chmelem, respektive chmelovým granulátem nebo extraktem, se získá mladina. Tento krok se nazývá chmelovar a slouží k převedení hořkých látek z chmele, k jejich izomeraci, inaktivaci enzymů, vysrážení bílkovin, odstranění nežádoucích těkavých látek a zahuštění. Následuje vyčeření neboli odstranění hrubých kalů, tedy vysrážených bílkovin a nečistot ze sladu a chmele [19; 51; 53].

Před přidáním kvasinek je mladina zchlazena na zákvasnou teplotu (6 °C) a provzdušněna. Potom dochází k zakvašení kulturními pivovarskými kvasinkami rodu *Saccharomyces* a k hlavnímu kvašení, které vede k převedení cukrů na ethanol a oxid uhličitý. Podle použitého druhu kvasinek se kvašení rozlišuje na svrchní (*Saccharomyces cerevisiae*) a spodní (*Saccharomyces uvarum*). Svrchní kvašení probíhá při vyšších teplotách (až 24 °C), po ukončení kvašení kvasinky plavou na hladině a používá se zejména při výrobě pšeničných piv, piv typu „ale“, „stout“ a „porter“. Spodní kvašení probíhá při nižší teplotě (do 9 °C), po ukončení kvašení kvasinky sedimentují na dno kvasných nádob a používá se při výrobě piv plzeňského typu neboli ležáků [19; 51; 53].

Mladé pivo, které je produktem hlavního kvašení, se nechává ležet v tancích, kde dochází k dokvašení, dosažení chuťové zralosti a nasycení oxidem uhličitým. Konečnými kroky výroby piva jsou filtrace a pasterace, které výsledný produkt stabilizují, nejsou však nezbytné [51; 53].

### 1.3.2 Druhy piva a označování piva

Podle Vyhlášky č. 248/2018 Sb., o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí je pivo definováno jako „*pěnivý nápoj vyrobený zkvašením mladiny připravené ze sladu, vody, neupraveného chmele, upraveného chmele nebo chmelových výrobků, který vedle kvasným procesem vzniklého etanolu a oxidu uhličitého obsahuje i určité množství neprokvašeného extraktu*“ [54].

Pivo se dělí podle různých kritérií do několika druhů. Podle použitých kvasinek se rozlišují piva spodně kvašená a piva svrchně kvašená. Podle použitého sladu se rozlišují piva světlá, vyrobená ze světlých sladů, a piva tmavá a polotmavá ze sladů tmavých nebo karamelových. Podle obsahu alkoholu lze rozlišit piva nízkoalkoholická s 0,5–1,2 % obj. ethanolu, piva nealkoholická s maximálně 0,5 % obj. ethanolu a všechny ostatní druhy piv (stolní, výčepní, ležák, plné a silné pivo) s minimálně 1,2 % obj. ethanolu. Další vlastností, podle které se rozlišují jednotlivé druhy piv, je tzv. „extrakt původní mladiny“, lidově stupňovitost piva. Extrakt původní mladiny (EPM) vyjadřuje procentuální obsah zkvasitelných látek v mladině před jejím kvašením a přímo ovlivňuje obsah alkoholu v konečném produktu. Např. dvanáctistupňové pivo neboli „dvanáctka“, a tedy 12 % EPM, obsahovalo před kvašením 12 % zkvasitelného extraktu, což vedlo ke vzniku cca 5 % obj. ethanolu [53; 54]. Rozdělení piv do kategorií dle hmotnostních procent extraktu původní mladiny je uvedeno v tabulce 7.

Tabulka 7: Kategorie piva dle extraktu původní mladiny [54]

<b>Kategorie</b>	<b>EPM (% hm.)</b>
stolní pivo	≤ 6
výčepní pivo	7–10
ležák (spodně kvašené pivo)	11–12
plné pivo (svrchně kvašené)	11–12
silné pivo	≥ 13

Dalšími druhy piv jsou piva kvasnicová, do nichž se přidávají čisté kultury kvasinek dodatečně, piva ochucená, nefiltrovaná, piva pro diabetiky a piva z jiných obilovin, než je ječmen. Zejména

v zahraničí jsou populárními druhy svrchně kvašená piva porter, stout, ale, hoegaarden nebo spodně kvašená piva bock, export a pils. V České republice jsou zdaleka nejoblíbenějšími druhy světlá výčepní piva a ležáky, tedy piva vyrobená spodním kvašením [19; 53; 54].

Na obalu piva musí být kromě základních údajů daných Nařízením Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011 o poskytování informací o potravinách spotřebitelům uvedeny další upřesňující informace, které jsou dány Vyhláškou č. 248/2018 Sb., o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí [54; 55].

### 1.3.3 Vznik biogenních aminů v pivu

Biogenní aminy v pivu vznikají, stejně jako v ostatních potravinách a nápojích, pokud jsou přítomny prekurzorové aminokyseliny, dekarboxyláza-pozitivní mikroorganismy a pokud jsou vhodné podmínky pro jejich růst a enzymatickou aktivitu. V pivu se vyskytující BA lze rozdělit do dvou skupin. První skupinou jsou přirozené složky piva, které pochází zejména ze sladu, ale v menší míře i z chmele a kvasinek. Jedná se o agmatin, fenylethylamin, spermin a spermidin. Druhá skupina je spojena s mikrobiální kontaminací, a to zejména bakteriemi mléčného kvašení rodu *Pediococcus* a *Lactobacillus*, v menší míře však i enterobakteriemi nebo některými druhy kvasinek. Do této skupiny se řadí histamin, tyramin a kadaverin. Putrescin lze zařadit do obou skupin, jelikož je přirozeně přítomen v ječném sladu, ale také je produkován bakteriemi mléčného kvašení. Ty jsou v malé míře přítomny přirozeně (ze surovin), nebo v některém z kroků výroby nebyly dodrženy správné hygienické postupy [21; 51; 56–58].

Na obsah BA v pivu mají nezpochybnitelný vliv použité suroviny, podmínky výroby a také hygienické podmínky. Koncentrace BA ve sladu je závislá na použité odrůdě ječmene, jelikož bylo prokázáno, že různé odrůdy disponují různě velkou dekarboxylázovou aktivitou. Celkový obsah BA v hotovém pivu je však mnohem více ovlivněn technologií výroby piva (např. intenzitou klíčení, teplotou hvozdění atd.) než použitou odrůdou sladovnického ječmene. Hladina BA je ovlivněna také druhem použitých kvasinek. Opakované použití kvasinek má také vliv na obsah BA, avšak zda obsah zvyšuje nebo snižuje záleží na více faktorech, jako je např. použitá odrůda ječmene. K největším změnám koncentrace BA dochází při zpracování mladiny a hlavním kvašení, což lze vysvětlit vysokou enzymatickou aktivitou doprovázející tyto procesy. Nelze jednoznačně říci, při kterém výrobním kroku vznikají které BA, jelikož to je ovlivněno mnoha faktory. Pokud však dochází k poklesu hladiny putrescinu, je pravděpodobné,

že mohlo dojít k jeho přeměně na spermin nebo spermidin. Obsah těchto dvou BA se naopak může snižovat v důsledku jejich tepelného rozkladu [21; 56; 57; 59].

### 1.3.4 Stanovení biogenních aminů v pivu

Monitorování obsahu biogenních aminů ve fermentovaných alkoholických nápojích, zejména v pivu a vínu, je v poslední době věnována velká pozornost. Důvodem je jednak poměrně velká denní spotřeba těchto nápojů, a jednak obsah ethanolu, který snižuje aktivitu MAO, tedy enzymu odpovědného za detoxikaci BA v organismu. Proto i nízká množství BA z těchto nápojů mohou vést ke vzniku nežádoucích účinků, jako jsou bolest hlavy, nevolnost, zvracení a hypertenze. I přes tato rizika však v EU neexistují žádné zákonem stanovené bezpečnostní limity pro BA v alkoholických nápojích. Kromě zdravotního rizika je vysoký obsah BA v pivu indikátorem nízké úrovně hygieny výrobního a skladovacího procesu a ukazatelem kvality produktu [52; 57; 58; 60].

Pro stanovení biogenních aminů v pivu lze, stejně jako pro ostatní nápoje a potraviny, využít několik různých analytických metod. Nejčastěji se však využívá metoda RP-HPLC se spektrofotometrickou nebo fluorimetrickou detekcí po off-line derivatizaci. Příprava vzorků piva před analýzou je poměrně jednoduchá, většinou zahrnuje pouze odplynění pomocí ultrazvuku nebo třepáním, odstranění interferujících polyfenolických látek nejčastěji pomocí polyvinylpyrrolidonu (PVP) a odstředění, případně filtraci a naředění vodou nebo kyselinou (např. HCl nebo HClO<sub>4</sub>). Extrakce se pak provádí obvykle až po kroku derivatizace, a to většinou z kapaliny do kapaliny s následným odpařením a opětovným rozpuštěním v rozpouštědle vhodném pro HPLC systém, nebo pomocí SPE nebo miniaturizovaných forem SPE [50; 61; 62].

Separace BA ze vzorků piva se obvykle provádí na kratších kolonách (10 nebo 15 cm) plněných silikagelem modifikovaným nepolárními skupinami C18. Pro eluci se využívá gradient mobilních fází, jimiž jsou nejčastěji voda, mravenčan amonný, octan sodný nebo octanový pufr s acetonitrilem nebo methanolem. Derivatizace se většinou provádí dansylchloridem v alkalickém prostředí, které se zajistí přidávkem NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> nebo uhličitanového pufru. Jako vnitřní standard se využívá 1,7-diaminoheptan. Dansylace se obvykle provádí za zvýšené teploty (40–65 °C) v čase 30–60 min a přebytek Dns-Cl se odstraňuje prolinem nebo hydroxidem amonným. Dansylderiváty BA jsou pak detekovány při 254 nm spektrofotometricky nebo fluorimetricky při 320 nm ( $\lambda_{ex}$ ) a 523 nm ( $\lambda_{em}$ ) [52; 56; 61; 63].

Technika RP-HPLC s off-line dansylací a UV detekcí byla využita ve studii [60], která se zaměřila na 114 vzorků alkoholických i nealkoholických lahvových piv z českých pivovarů. Ty analyzovala ihned po nákupu a potom těsně před datem minimální trvanlivosti pro určení vlivu skladování na obsah BA. Histamin, fenylethylamin a tryptamin byly detekovány pouze ve velmi nízkých koncentracích. Nejčastěji se vyskytujícím BA byl tyramin, jehož koncentrace v jednom ze vzorků po zakoupení přesáhla 100 mg/l, před dobou expirace pak tuto hranici, která se považuje za nebezpečnou pro lidské zdraví, překročily dokonce tři vzorky. To dokazuje, že koncentrace tyraminu, ale i dalších BA, při skladování významně roste. Pouze tři vzorky ze všech neobsahovaly putrescin, jeho koncentrace však byla téměř u všech vzorků nižší než 50 mg/l a skladováním významně nevzrostla. Ačkoliv v polovině vzorků nebyl detekován žádný kadaverin, 15 vzorků alkoholického piva hned po zakoupení obsahovalo 50–100 mg/l kadaverinu a tento počet se skladováním zvýšil na 19. Kadaverin byl v koncentracích 14,5–28,7 mg/l detekován i v pěti nealkoholických pivech těsně před datem min. trvanlivosti. Spermin a spermidin byly stanoveny u více než 75 % vzorků v koncentracích pod 30 mg/l. Celková koncentrace všech BA přesáhla 100 mg/l u 25 % vzorků alkoholického piva, což je znepokojivé vzhledem k přítomnosti ethanolu, který je inhibitorem MAO.

Tyramin byl nejčastěji stanoveným BA také ve studii [52], která analyzovala 115 vzorků řemeslných piv z českých minipivovarů za použití stejné analytické techniky jako [60], pomocí níž zde bylo dosaženo meze stanovitelnosti (LOQ, Limit of Quantification) 0,13–0,52 mg/l. U piv z minipivovarů se obecně předpokládá, že je větší pravděpodobnost výskytu BA, jelikož tato piva často nejsou filtrována ani pasterizována a výroba není v tak velké míře automatizovaná a mechanizovaná jako průmyslová výroba. Stanovené koncentrace tryptaminu, fenylethylaminu, sperminu a spermidinu byly v souladu s výsledky studie [60]. Výrazný rozdíl však představoval obsah histaminu, který byl stanoven těsně po zakoupení u 20 % vzorků v koncentraci do 20 mg/l, ale před datem min. trvanlivosti už byl detekován u 30 % vzorků, přičemž 8 vzorků dokonce obsahovalo 20–50 mg/l histaminu. Ve všech vzorcích byl stanoven tyramin, jehož koncentrace před datem min. trvanlivosti překročila 100 mg/l dokonce u 10 vzorků. K významnému zvýšení koncentrace v průběhu skladování došlo u putrescinu a kadaverinu, které byly také hojně zastoupeny. Celková koncentrace všech BA přesáhla 100 mg/l u 18 % všech vzorků před datem minimální trvanlivosti, což může být považováno za nebezpečné vzhledem k tomu, že velkou část tvoří toxické BA tyramin a histamin.

Kromě nejrozšířenější RP-HPLC lze pro analýzu BA v pivu použít také ultra-vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC), kterou je možné dosáhnout ještě vyššího rozlišení a kratší doby analýzy. UHPLC využívá částice o průměru i méně než 2  $\mu\text{m}$ , což si žádá velmi vysoký pracovní tlak (100–150 MPa). Studie [64] aplikovala UHPLC techniku s UV a fluorescenční detekcí na vzorky piva a vína. Metoda UHPLC umožnila separovat 9 BA během necelých 14 min a poskytovala meze detekce (LOD, Limit of Detection) 0,02–0,18 mg/l a LOQ 0,06–0,59 mg/l. Ve všech třech vzorcích chilského piva byl hlavním BA putrescin, a to v koncentracích od 9,48 mg/l do 72,18 mg/l. Dále byly detekovány tyramin a fenylethylamin. Histamin nebyl detekován v žádném vzorku piva ani vína.

Další technikou, která byla využita k analýze BA v pivu, byla plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS) [37]. Extrakce BA z piva zde byla provedena simultánně s derivatizací isobutylchlorformiátem metodou DLLME. Separace byla provedena na 20 m dlouhé koloně s filmem nepolární stacionární fáze a jako nosný plyn bylo použito helium. Pro MS detekci v režimu selektivního záznamu iontu (SIM, Single Ion Monitoring) byla použita elektronová ionizace a kvadrupólový analyzátor. Tato metoda byla aplikována na 22 vzorků piv prodávaných v Portugalsku a bylo jí dosaženo LOD od 0,3 do 2,9  $\mu\text{g/l}$  a LOQ od 1,0 do 9,5  $\mu\text{g/l}$ . Nejhojnějším BA byl v těchto vzorcích putrescin, který byl nalezen ve všech vzorcích, a to v koncentracích od 2,097 do 12,777 mg/l. Následoval tyramin, jehož obsah se pohyboval od 0,394 do 5,916 mg/l, což jsou výrazně nižší koncentrace, než byly nalezeny ve vzorcích českých piv studii [52] a [60].

Jako nevhodná se ukázala technika kapalinové chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC) s detekcí tandemovou MS, která byla využita pro analýzu BA v nativním stavu v šesti vzorcích piva o různém obsahu ethanolu. HILIC je prakticky variantou systému s normálními fázemi, využívající hydrofilní stacionární fáze a polární organická rozpouštědla s menším obsahem vody jako fáze mobilní. Ačkoliv se tato technika osvědčila pro analýzu BA v sýrech, pro analýzu v pivu nebyla dostatečně citlivá ani specifická a poskytovala asi 20 $\times$  vyšší meze detekce a meze stanovitelnosti než technika RP-HPLC [27; 65; 66].

Kapilární elektroforéza s detekcí tandemovou hmotnostní spektrometrií (CE-MS/MS) byla aplikována na tři typy brazilského piva a také na víno [67]. Separace probíhala v křemenné kapiláře potažené polyvinylalkoholem a jako základní elektrolyt byla použita kyselina octová o koncentraci 0,5 mol/l. Pro MS/MS detekci v režimu monitorování vybraných reakcí (MRM,

Multiple Reaction Monitoring) byla použita ionizace elektrosprejem a trojitý kvadrupól. BA byly ve vzorcích piva analyzovány v nativním stavu pouze po přečištění pomocí PVP. Touto metodou bylo dosaženo LOD 1–2 µg/l a LOQ 3–8 µg/l, což jsou výrazně nižší hodnoty v porovnání s jinými metodami. Navíc došlo k selektivní detekci 9 BA během 10 min bez nutnosti derivatizace. Nejvyšší koncentrace ve všech třech vzorcích piva vykazoval putrescin (2,66–5,89 mg/l), celková koncentrace BA však v žádném vzorku nepřesahovala 15 mg/l.

Studie [50] se zaměřila na obsah BA v různých typech piv (spodně kvašená, svrchně kvašená, pšeničná, s divokými kvasinkami a vyráběná za pomoci bakterií mléčného kvašení) běžně dostupných v Polsku, z nichž některá byla vyrobena velkými pivovary a některá malými regionálními podniky, a také na změny v obsahu BA během fermentačního procesu. Byla použita technika HPLC-MS/MS v režimu MRM s ionizací elektrosprejem po off-line derivatizaci tosylchloridem, díky níž bylo dosaženo LOD 0,78–20 µg/l a LOQ 2,3–59 µg/l. Ve všech vzorcích byly nejhojněji zastoupeny agmatin (1,34 až 48,6 mg/l) a putrescin (3,284 až 19,0 mg/l), přičemž ve vzorcích vařených s divokými kvasinkami bylo stanoveno významně více putrescinu než agmatinu. Koncentrace tyraminu v jednotlivých vzorcích se velmi lišily (0,36968–70,24 mg/l), ale nezdá se, že v závislosti na druhu piva. Ve všech vzorcích byly stanoveny histamin a kadaverin, ale koncentraci 2 mg/l překročily pouze dva vzorky piva s divokými kvasinkami. U jednoho vzorku (spodně kvašený ležák, 12 % EPM) byla dosažena bezpečnostní hranice celkové koncentrace BA 100 mg/l (přesně 99,8 mg/l), tři vzorky obsahovaly 60–100 mg/l BA, dva vzorky 30–60 mg/l BA a v ostatních 7 vzorcích byla koncentrace všech BA nižší než 30 mg/l. V průběhu fermentačního procesu se koncentrace většiny BA výrazně nezměnila. Výjimkou je spermin, jehož koncentrace se zvyšovala až do konce bouřlivé fermentace a pak plynule klesala až pod počáteční hodnotu. Obecně byl obsah BA nižší v pivech vyrobených velkými pivovary než v řemeslných pivech vyrobených malými podniky.

Ve studii [56] aplikovali metodu HPLC-DAD/FLD s off-line dansylací na vzorky piva, surovin (ječmen, chmel a kvasinky), meziproductů (sladina, mladina, zelené pivo a zralé pivo) ze tří chilských minipivovarů. Tato metoda poskytla LOD od 0,003 do 1,4 mg/l (mg/kg) a LOQ od 0,009 do 4,6 mg/l (mg/kg). Tuhé vzorky surovin byly před derivatizací extrahovány HCl o koncentraci 0,1 mol/l, přečištěny pomocí PVP a zfiltrovány, zatímco meziproducty a pivo byly pouze odplyněny, přečištěny PVP a zfiltrovány. Ve sladovém ječmeni byl stanoven obsah BA 155,63–214,56 mg/kg, v němž byly hlavními zástupci putrescin, spermin a spermidin. Ve chmelu bylo nalezeno 123,56–174,1 mg/kg BA a kromě putrescinu, sperminu a spermidinu



vykazoval také vysoké hladiny tyraminu. Kvasinky obsahovaly 919,75–961,19 mg/kg BA, a to hlavně sperminu a spermidinu. U dvou pivovarů byla dynamika obsahu BA během procesu výroby velmi podobná, kdy došlo k poklesu od surovin po rmutování cca o 60 %. Většina BA vykazovala stejný trend, pouze spermin a spermidin vykazovaly vyšší pokles koncentrací. U třetího pivovaru však ve stejné fázi výroby došlo k mírnému nárůstu obsahu BA (cca o 3 %) v důsledku zvýšení koncentrace kadaverinu a tyraminu, které jsou indikátory mikrobiální kontaminace, k níž došlo pravděpodobně během rmutování. Od kroku vaření až po plnění do lahví už byly hladiny většiny BA konstantní u dvou pivovarů. U jednoho však došlo mezi rmutováním a varem k výraznému zvýšení koncentrace putrescinu (z 10,49 na 17,3 mg/l), kadaverinu (z 1,69 na 130,84 mg/l) a histaminu (z 0,69 na 4,23 mg/l), což muselo být způsobeno mikrobiální kontaminací. Také hotové pivo z tohoto pivovaru obsahovalo zvýšenou koncentraci BA, konkrétně 65,29 mg/l, zatímco pivo ze zbylých dvou pivovarů obsahovalo méně než 15 mg/l všech BA.

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Přístroje a zařízení

#### 2.1.1 Kapalinový chromatograf

- Kapalinový chromatograf Nexera X2 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)
- DAD detektor Nexera X2 SPD-M30A (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)
- Čerpadla mobilní fáze A a B Nexera X2 LC-30AD (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)
- Degasér DGU-20A (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)
- Autosampler Nexera X2 SIL-30AC (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)
- Termostat kolony CTO-20AC (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)
- Kolona Gemini 3  $\mu\text{m}$  C18 110 Å, 150  $\times$  3 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)
- Software LabSolutions CS (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)

#### 2.1.2 Další zařízení

- Analytické váhy KERN ABT 220-4M (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- Automatické pipety Biohit Proline a Biohit m-Line (Biohit Oyj, Helsinky, Finsko)
- Mikrostříkačka Hamilton 100  $\mu\text{l}$  s ostrým hrotem (Hamilton Company, Bonaduz, Švýcarsko)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex TK 52 (Bandelin electronic, Berlín, Německo)
- Minitřepačka IKA Vortex 1 (IKA®-Werke, Staufen, Německo)
- Odstředivka Nüve NF 400 (Nüve sanayi malzemeleri imalat ve ticaret, Ankara, Turecko)
- Třepačka Vibramax 100 (Heidolph, Schwabach, Německo)
- Magnetická míchačka IKA Color squid (IKA®-Werke, Staufen, Německo)
- Magnetické míchadlo tyčinkové hladké (IKA®-Werke, Staufen, Německo)
- MEPS stříkačka 250  $\mu\text{l}$  (SGE Analytical Science, Austrálie)
- MEPS jehly C18 (SGE Analytical Science, Austrálie)
- pH metr SCHOTT CG 842 (SCHOTT AG, Mainz, Německo)
- Horkovzdušná sušárna Memmert UN30 (Memmert, Schwabach, Německo)

## 2.2 Chemikálie a standardní látky

### 2.2.1 Chemikálie

- aceton, p. a. (PENTA, Praha, Česká republika)
- acetonitril pro HPLC,  $\geq 99,9\%$  (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- dansylchlorid (Merck, Darmstadt, Německo)
- demineralizovaná voda připravená zařízením Milli-Q® (Merck, Darmstadt, Německo)
- destilovaná voda z centrálního rozvodu Univerzity Pardubice (Univerzita Pardubice, Česká republika)
- hydroxid sodný, p. a. (Merck, Darmstadt, Německo)
- kyselina chloristá,  $> 70\%$  (Laborchemie Apolda, Apolda, Německo)
- polyvinylpyrrolidon, Mr 10 000 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- uhličitan sodný bezvodý, p. a. (PENTA, Praha, Česká republika)

### 2.2.2 Standardní látky




1,7-diaminoheptan (98%), fenylethylamin ( $\geq 99\%$ ), histamin ( $\geq 97\%$ ), isoamylamin (95%), kadaverin (95%), L-prolin ( $\geq 99\%$ ), putrescin (99%), spermidin ( $\geq 99\%$ ), spermin ( $\geq 97\%$ ), tryptamin (98%), tyramin (99%)

Veškeré standardní látky pocházejí od firmy Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo).




## 2.3 Vzorky

Jako reálné vzorky byla použita běžně komerčně dostupná lahvová piva, zakoupená převážně v obchodě Albert Hypermarket. Pro analýzu BA bylo vybráno 12 vzorků 4 různých druhů piv. Konkrétně se jednalo o 3 zástupce piv světlých výčepních, jejichž seznam i se základními údaji je uveden v tabulce 8. Dále se jednalo o 3 zástupce svrchně kvašených piv typu IPA (India Pale Ale), jejichž seznam je v tabulce 9, o 3 zástupce nepasterizovaných světlých ležáků (tabulka 10) a 3 zástupce piv speciálních (pšeničné, kvasnicové a nefiltrované), jejichž údaje jsou v tabulce 11.




Tabulka 8: Vzorčky světlých výčepních piv

Obal	Značka	Název	Výrobce	Obsah alkoholu (% obj.)	% EPM	pH
	Gambrinus	Originál 10	Plzeňský Prazdroj, a. s. (Plzeň, Česká republika)	4,3	10	4,60
	Braník	Braník světlý	Pivovary Staropramen s. r. o. (Praha, Česká republika)	4,1	10	4,31
	Radegast	Rázná 10	Plzeňský Prazdroj, a. s. (Plzeň, Česká republika)	4,1	10	4,72




Tabulka 9: Vzorčky svrchně kvašených piv typu IPA

Obal	Značka	Název	Výrobce	Obsah alkoholu (% obj.)	% EPM	pH
	Radegast	ROG IPA	Plzeňský Prazdroj, a. s. (Plzeň, Česká republika)	4,6	10,7	4,50
	Rebel	India Pale Ale (silné svrchně kvašené polotmavé pivo)	Měšťanský pivovar Havlíčkův Brod a. s. (Havlíčkův Brod, Česká republika)	6,3	>13	4,44
	Primátor	IPA (India Pale Ale, polotmavé svrchně kvašené silné pivo)	Primátor a. s. (Náchod, Česká republika)	6,5	>13	4,73

Tabulka 10: Vzorky nepasterizovaných světlých ležáků

Obal	Značka	Název	Výrobce	Obsah alkoholu (% obj.)	% EPM	pH
	Krakonoš	Velikonoční pivo světlý ležák 12	Krakonoš s. r. o. (Trutnov, Česká republika)	5,1	12	4,98
	Starobrno	Starobrno Medium	Pivovar Starobrno (Brno, Česká republika)	4,7	11	4,73
	Svijany	Svijanský Máz 11 %	Pivovar Svijany a. s. (Svijany, Česká republika)	4,8	11	4,66

Tabulka 11: Vzorky speciálních piv pšeničných, kvasnicových a nefiltrovaných

Obal	Značka	Název	Výrobce	Obsah alkoholu (% obj.)	% EPM	pH
	Primátor	Weizen (světlé plné nefiltrované svrchně kvašené pšeničné pivo)	Primátor a. s. (Náchod, Česká republika)	4,8	11–12	4,58
	Bernard	Kvasnicové pivo 10	Rodinný pivovar Bernard a. s. (Humpolec, Česká republika)	4,2	10	4,53
	Staropramen	Nefiltr Pšeničný	Pivovary Staropramen s. r. o. (Praha, Česká republika)	5,0	11–12	4,29

## 2.4 Pracovní postupy

### 2.4.1 Příprava roztoků

#### 2.4.1.1 Příprava kyseliny chloristé

Kyselina chloristá o koncentraci 0,4 mol/l byla připravena do odměrné baňky o objemu 250 ml odměřením 8,7 ml HClO<sub>4</sub> (>70 % w/w) a doplněním destilovanou vodou po rysku. Kyselina chloristá o koncentraci 1 mol/l byla připravena do odměrné baňky o objemu 25 ml odměřením 2,175 ml HClO<sub>4</sub> (>70 % w/w) a doplněním destilovanou vodou po rysku.

#### **2.4.1.2 Příprava hydroxidu sodného a uhličitanu sodného**

Roztok hydroxidu sodného o koncentraci 2 mol/l byl připraven rozpuštěním 20 g NaOH ve 250 ml destilované vody. Nasycený roztok uhličitanu sodného (pH 11) byl připraven rozpuštěním 29,4 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 100 ml destilované vody.

#### **2.4.1.3 Příprava dansylchloridu**

Roztok dansylchloridu o koncentraci 1 g/l byl připraven navážením 10 mg dansylchloridu do odměrné baňky o objemu 10 ml a doplněním po rysku acetonem. Pro dokonalé rozpuštění dansylchloridu byla baňka umístěna na 10 min do ultrazvukové lázně. Tento roztok byl chráněn před světlem a uchováván nejvýše 24 hodin v chladničce.

#### **2.4.1.4 Příprava roztoku L-prolinu**

Nejprve byl připraven roztok L-prolinu o koncentraci 10 g/l navážením 100 mg do 10 ml odměrné baňky a doplněním destilovanou vodou po rysku. Odměření 1 ml tohoto roztoku do 10 ml odměrné baňky a doplněním destilovanou vodou po rysku byl poté připraven roztok L-prolinu o koncentraci 1 g/l.

#### **2.4.1.5 Příprava zásobních roztoků biogenních aminů**

Zásobní roztoky standardních látek (fenylethylaminu, histaminu, isoamylaminu, kadaverin, putrescin, spermidin, spermin, tryptamin a tyramin) o koncentraci 5 g/l byly připraveny do odměrných baněk o objemu 10 ml navážením 50 mg standardu a doplněním po rysku HClO<sub>4</sub> o koncentraci 0,4 mol/l. Některé roztoky (tyramin a tryptamin) musely být pro dokonalé rozpuštění standardních látek umístěny na 10 min do ultrazvukové lázně. Takto připravené zásobní roztoky byly uchovávány v chladničce.

#### **2.4.1.6 Příprava směsného roztoku biogenních aminů**

Směsný roztok všech BA o koncentraci 100 mg/l byl připraven odměřením 200 µl každého zásobního roztoku do odměrné baňky o objemu 10 ml a doplněním po rysku HClO<sub>4</sub> o koncentraci 0,4 mol/l.

#### **2.4.1.7 Příprava kalibračních roztoků**

Kalibrační roztoky byly připraveny ze směsného roztoku o koncentraci 100 mg/l každého BA do odměrných baněk o objemu 10 ml doplněním po rysku HClO<sub>4</sub> o koncentraci 0,4 mol/l. Pro kadaverin a tyramin byla připravena kalibrační řada o 14 bodech. Koncentrace jednotlivých



bodů kalibrační řady a odpovídající použité objemy směsného roztoku jsou uvedeny v tabulce 12. Pro ostatní BA, tedy fenylethylamin, histamin, isoamylamin, putrescin, spermidin, spermin a tryptamin) byla připravena kalibrační řada o těchto 8 bodech: 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5 a 2,0 mg/l.

Tabulka 12: Příprava kalibrační řady kadaverinu a tyraminu

<b>Koncentrace kalibračního bodu [mg/l]</b>	0,02	0,05	0,1	0,25	0,5	0,75	1,0	1,5	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	8,0
<b>Použitý objem směsného roztoku [μl]</b>	2	5	10	25	50	75	100	150	200	300	400	500	600	800

#### 2.4.1.8 Příprava roztoku vnitřního standardu

Zásobní roztok vnitřního standardu, tedy 1,7-diaminoheptanu, byl připraven postupem uvedeným v kapitole 2.4.1.5. Roztok 1,7-diaminoheptanu o koncentraci 20 mg/l byl připraven odměřením 40 μl zásobního roztoku o koncentraci 5 g/l do odměrné baňky o objemu 10 ml a doplněním po rysku HClO<sub>4</sub> o koncentraci 0,4 mol/l.

#### 2.4.2 Úprava vzorků

Vzorky piva bylo nejprve nutné zbavit CO<sub>2</sub>: asi 150 ml bylo přelito do Erlenmayerovy baňky o objemu 500 ml a třepáno pomocí třepačky Vibramax 100 při 750 ot/min po dobu 60 min. K 10 ml odplyněného vzorku bylo poté naváženo 0,5 g PVP a po dobu 15 min mícháno magnetickým míchadlem. Dále byla směs převedena do plastové centrifugační zkumavky o objemu 15 ml a odstředěna při 4000 ot/min po dobu 10 min. Supernatant byl použit pro derivatizaci a analýzu BA. U každého vzorku bylo změřeno pH pomocí pH metru SCHOTT CG 842.

#### 2.4.3 Derivatizace

Do plastové centrifugační zkumavky o objemu 15 ml byl odměřen 1 ml standardního roztoku nebo 1 ml upraveného vzorku piva zředěného v poměru 1:1 kyselinou chloristou o koncentraci 1 mol/l. Bylo přidáno 50 μl 1,7-diaminoheptanu o koncentraci 20 mg/l jako vnitřního standardu (IS, Internal Standard). Dále bylo přidáno 150 μl NaOH o koncentraci 2 mol/l a 300 μl nasyceného roztoku Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> o pH 11. Zkumavka byla uzavřena a směs byla míchána 30 s pomocí vortexu. Byla provedena kontrola pH této směsi, které bylo případně upraveno

na pH 9–11, což je rozmezí optimální pro derivatizaci dansylchloridem. Poté byl přidán 1 ml dansylchloridu v acetonu o koncentraci 1 g/l, zkumavka byla opět uzavřena a směs míchána 30 s pomocí vortexu. Derivatizace probíhala při teplotě 55 °C po dobu 40 min v horkovzdušné laboratorní sušárně. Po vychladnutí na laboratorní teplotu bylo přidáno 200 µl L-prolinu o koncentraci 1 g/l, směs byla promíchána několik sekund pomocí vortexu a ponechána 15 min ve tmě při laboratorní teplotě. Nakonec byla směs odstředěna při 4000 ot/min po dobu 5 min a supernatant byl zakoncentrován, respektive odměřen do nádobek s vložkou a analyzován systémem HPLC-DAD.

#### 2.4.4 Zakoncentrování dansylderivátů biogenních aminů

Pro post-derivatizační zakoncentrování BA byla použita technika mikroextrakce tuhou fází s využitím stříkačky (MEPS). Byla využita stříkačka o objemu 250 µl a jehla se sorbentem C18. Sorbent byl nejprve kondicionován 3 × 50 µl acetonitrilu (100 % obj.) a 3 × 50 µl acetonitrilu (5 % obj.). Poté bylo aplikováno 5 × 200 µl supernatantu po odstředění derivatizované směsi. Analyty zachycené na sorbentu byly eluovány 4 × 25 µl acetonitrilu (80 % obj.). Sorbent byl poté promyt 5 × 50 µl acetonitrilu (100 % obj.) pro zabránění carry-over efektu.

## 2.5 Podmínky analýzy vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

Veškeré roztoky derivátů byly do HPLC systému dávkovány pomocí autosampleru Nexera X2 SIL-30AC. Podmínky použité pro chromatografickou analýzu dansylderivátů BA jsou uvedeny v tabulce 13. Pro sběr a zpracování naměřených dat byl využit software LabSolutions CS.

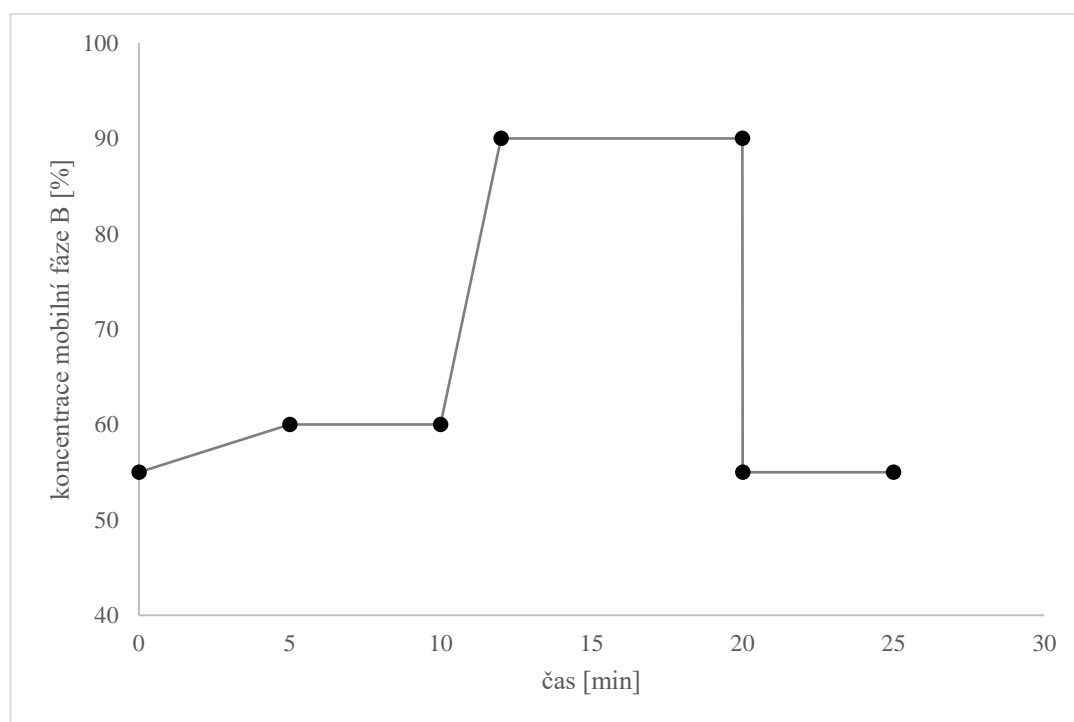
Tabulka 13: Chromatografické podmínky

<b>Separáčn</b>	Gemini 3 µm C18 110 Å (150 × 3 mm)
<b>Mobiln</b>	voda
<b>Mobiln</b>	acetonitril
<b>Gradientov</b>	0 min: 55 % mobiln
	5–10 min: 60 % mobiln
	12–20 min: 90 % mobiln
	20,01 min: 55 % mobiln
<b>Teplota separa</b>	35 °C
<b>Pr</b>	0,6 ml/min
<b>D</b>	10 µl

### 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

#### 3.1 Volba chromatografických podmínek

Na základě diplomové práce Miroslavy Jonákové [68] byla pro separaci dansylderivátů biogenních aminů zvolena kolona Gemini 3  $\mu\text{m}$  C18 110 Å o rozměrech 150  $\times$  3 mm. Dle prostudované literatury [33; 56; 63; 69–72] byly zvoleny mobilní fáze voda (A) a acetonitril (B). Dle práce [68] byly zvoleny také průtok mobilní fáze 0,6 ml/min, teplota kolony 35 °C a gradientová eluce, jejíž průběh znázorňuje obrázek 7. Gradientová eluce byla pouze drobně upravena, a to poklesem koncentrace mobilní fáze B na 55 % v čase 20,01 min tak, aby došlo k co nejrychlejšímu ustálení počátečního složení mobilní fáze před analýzou dalšího vzorku. Toto složení mobilní fáze již bylo konstantní až do konce analýzy, tedy do času 25 min. Byl zvolen objem nástřiku 10  $\mu\text{l}$ , který byl použit také v literatuře [33; 69; 71]. Tento objem nástřiku se ukázal jako dostačující pro analýzu BA. Dansylderiváty BA byly detekovány pomocí DAD při vlnové délce 254 nm, která je dle všech dostupných zdrojů vhodná pro všechny biogenní aminy.

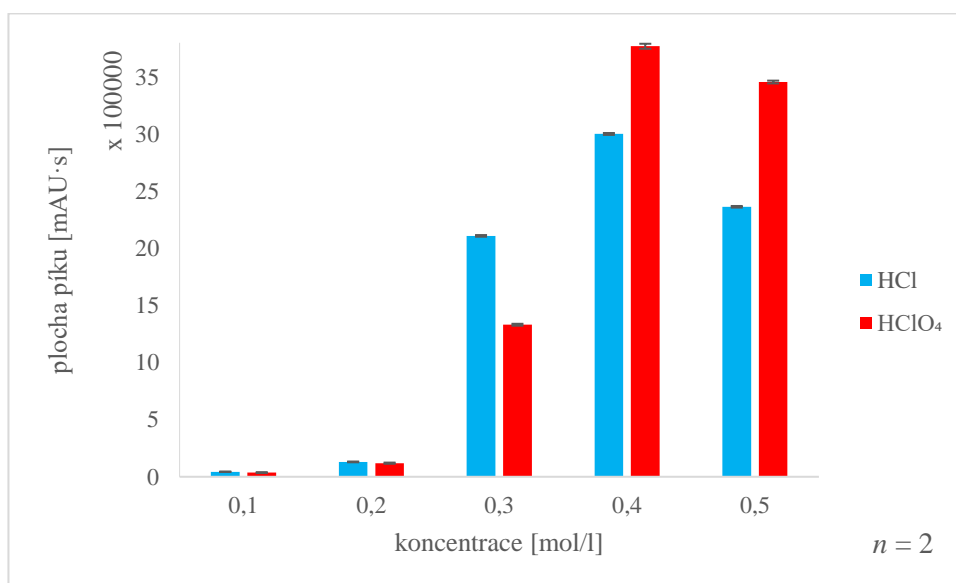


Obrázek 7: Průběh gradientové eluce dansylderivátů biogenních aminů

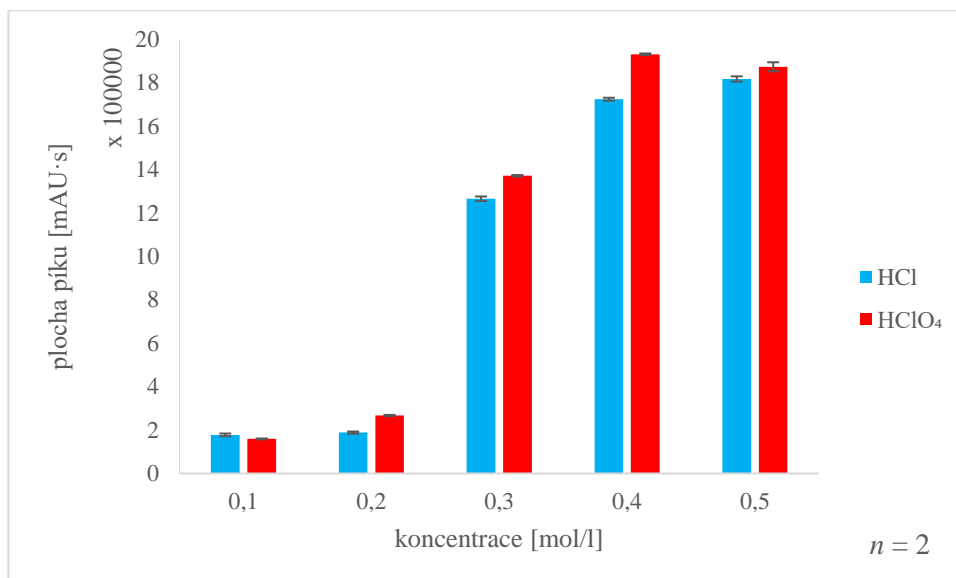
### 3.2 Výběr rozpouštědla pro přípravu zásobních roztoků biogenních aminů

Standardy tyraminu a tryptaminu byly použity pro výběr vhodného rozpouštědla pro přípravu zásobních roztoků BA. Tuhé standardy těchto dvou aminů byly vybrány, protože tryptamin eluuje jako první ze všech použitých BA ( $t_R = 6,1$  min) a tyramin naopak eluuje mezi posledními ( $t_R = 13,7$  min). Také se jedná o ekonomicky poměrně dostupné standardy, kterých bylo v laboratoři k dispozici větší množství než ostatních standardů BA.

Nejprve byly zásobní roztoky standardních látek připraveny rozpuštěním standardů v destilované vodě. Ve vodě však nedošlo k rozpuštění těchto standardů. Proto byly odměrné baňky se zásobními roztoky umístěny do ultrazvukové lázně, kde dokonalé rozpuštění trvalo více než hodinu. Derivatizované roztoky BA ve vodě pak nevykazovaly dostatečnou odezvu při analýze HPLC-DAD. Z tohoto důvodu bylo přistoupeno ke zkoušení přípravy standardů v kyselinách, konkrétně v kyselině chloristé a kyselině chlorovodíkové v rozmezí koncentrací 0,1–0,5 mol/l. V kyselinách se krystalické standardy rozpouštěly lépe než ve vodě, přesto však bylo nutné umístit odměrné baňky do ultrazvukové lázně. V ultrazvuku došlo k dokonalému rozpuštění za kratší čas než v případě standardů ve vodě. Po derivatizaci těchto roztoků byly vyhodnoceny a porovnány plochy píků obou aminů, což je zobrazeno na obrázku 8 pro tyramin a na obrázku 9 pro tryptamin. Jako nejvhodnější z těchto různě koncentrovaných kyselin byla vyhodnocena  $\text{HClO}_4$  o koncentraci 0,4 mol/l, ta byla tedy použita k rozpuštění všech standardů BA.



Obrázek 8: Závislost plochy píku tyraminu na koncentraci kyselin použitých pro rozpuštění



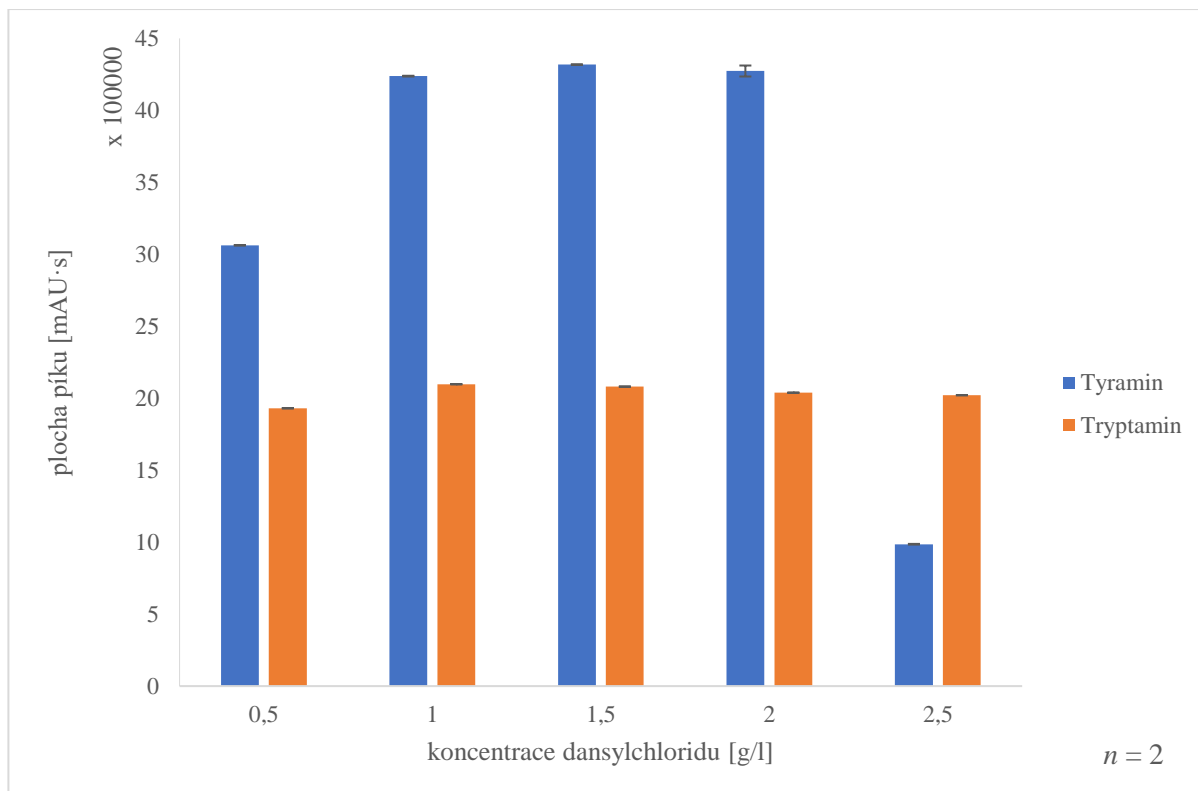
Obrázek 9: Závislost plochy píku tryptaminu na koncentraci kyselin použitých pro rozpuštění

### 3.3 Optimalizace derivatizačních podmínek

Derivatizační postup byl převzat z diplomové práce Miroslavy Jonákové [68] a upraven dle potřeby. Původní postup byl následující: 1 ml roztoku standardu v HClO<sub>4</sub> o koncentraci 0,4 mol/l + 50 µl IS (20 mg/l) + 150 µl NaOH (2 mol/l) + 300 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (nasycený roztok o pH 11), 30 s míchání pomocí vortexu, + 1 ml Dns-Cl v acetonu (1 g/l), 30 s míchání pomocí vortexu, derivatizace 60 min na vodní lázni ve tmě při 50 °C, po reakci ochlazení, + 200 µl L-prolinu (1 g/l), 15 min ve tmě při laboratorní teplotě, filtrace do chromatografických nádobek a analýza.

#### 3.3.1 Koncentrace derivatizačního činidla

Pro optimalizaci derivatizačních podmínek byly opět použity standardy tryptaminu a tyraminu. Nejprve byly testovány různé koncentrace derivatizačního činidla, tedy dansylchloridu v acetonu, konkrétně 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 a 2,5 g/l. Po derivatizaci byly porovnány plochy jednotlivých píků, což zobrazuje obrázek 10. Koncentrace 0,5 a 2,5 g/l poskytly nejnižší plochy pro oba aminy, a proto byly rovnou zamítnuty. Koncentrace 1,0; 1,5 a 2 g/l poskytly velmi podobné výsledky. Nakonec byla zvolena koncentrace 1 g/l, která poskytovala největší plochy píku tryptaminu. Lze říci, že koncentrace Dns-Cl měla vyšší vliv na plochu píku tyraminu než tryptaminu. Tryptamin však celkově poskytoval menší píky než tyramin, proto bylo (s ohledem na další aminy elující v kratších retenčních časech) přistoupeno právě ke koncentraci Dns-Cl, která se jevila jako nejvhodnější pro tryptamin.



Obrázek 10: Závislost ploch píků tyraminu a tryptaminu na koncentraci Dns-Cl

### 3.3.2 Teplota a čas derivatizační reakce

Dále byl testován vliv teploty a času derivatizační reakce na plochy píků tyraminu a tryptaminu. Testované podmínky, které byly navrženy programem Statistica pomocí ortogonálního centrálního kompozitního plánování, jsou uvedeny v tabulce 14. Optimální podmínky byly vyhodnoceny metodou odezvové plochy. Čas reakce byl pro oba testované aminy vyhodnocen jako nevýznamný faktor ( $p > 0,05$ ). Naopak teplota derivatizační reakce je významným faktorem ( $p < 0,05$ ) pro oba standardy. Odezvové profily prezentuje obrázek 11, zatímco 3D vhodnostní profily pro tryptamin prezentuje obrázek 12 a pro tyramin obrázek 13. Pro oba aminy je 3D vhodnostní graf uveden na obrázku 14. Graf předpovězených a pozorovaných hodnot pro tryptamin znázorňuje obrázek 15 a pro tyramin obrázek 16. Z těchto grafů je patrné, že naměřené hodnoty pro tryptamin se s předpokládanými hodnotami příliš neshodují, jelikož jednotlivé body neleží na lineární spojnici. Lepší je shoda naměřených hodnot s hodnotami předpokládanými pro tyramin. Rovnice (1) popisuje vliv parametrů teploty a času pro tryptamin a rovnice (2) pro tyramin. Proměnná  $X_1$  v rovnicích označuje teplotu a proměnná  $X_2$  čas. Statisticky významné proměnné v obou rovnicích jsou označeny červeně.

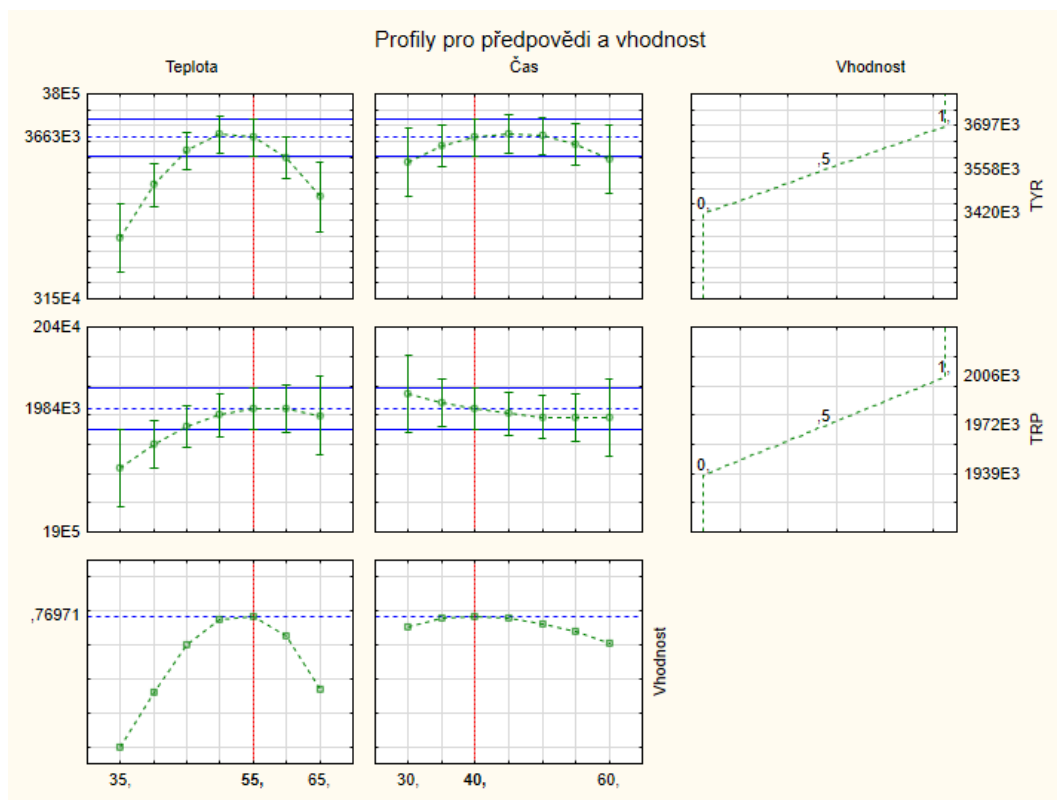
$$Y = 1975081 + 15484 \cdot X_1 - 8804 \cdot X_2 - 8249 \cdot X_1^2 + 2531 \cdot X_2^2 + 6845 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (1)$$

$$Y = 3683533 + 39472 \cdot X_1 + 6634 \cdot X_2 - 116678 \cdot X_1^2 - 37361 \cdot X_2^2 - 7314 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (2)$$

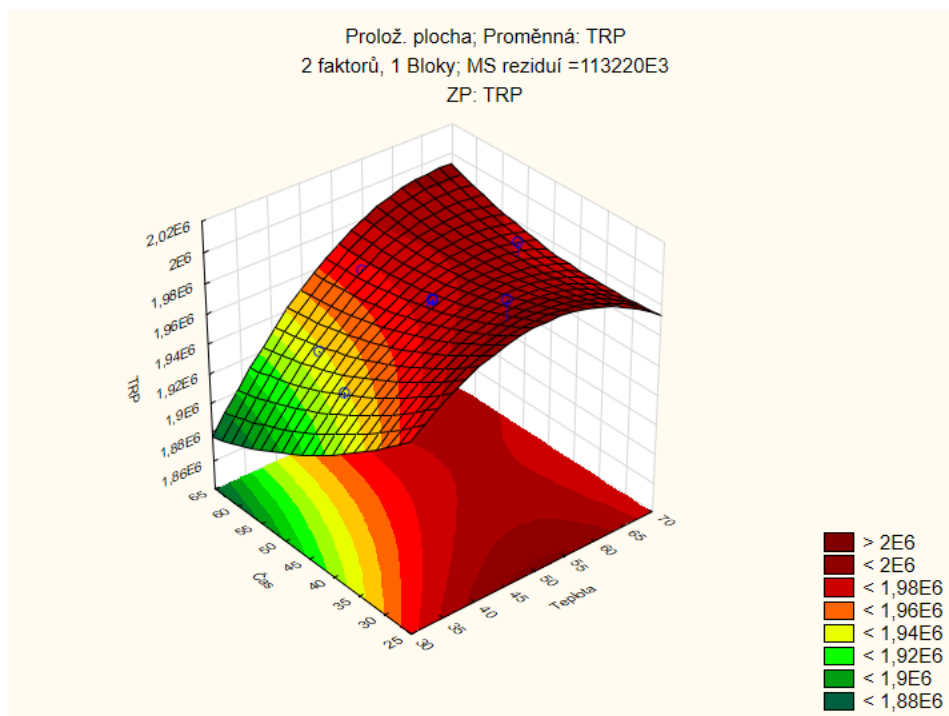
Jako optimální byly na základě obrázků 11–14 určeny tyto podmínky: čas derivatizační reakce 40 min a teplota 55 °C.

Tabulka 14: Testované podmínky derivatizace

Teplota [°C]	Čas [min]
35,9	45,0
40,0	35,0
40,0	55,0
50,0	45,0
50,0	45,0
50,0	30,9
50,0	59,1
50,0	45,0
50,0	45,0
60,0	35,0
60,0	55,0
64,1	45,0

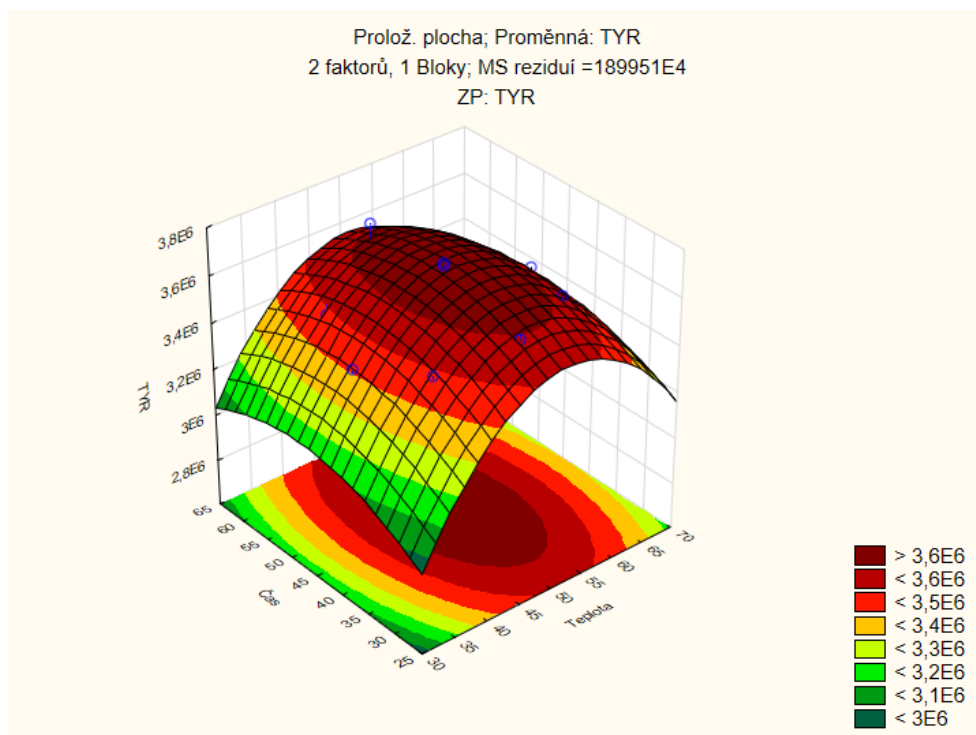


Obrázek 11: Odezvové profily pro různé podmínky derivatizace tyraminu a tryptaminu

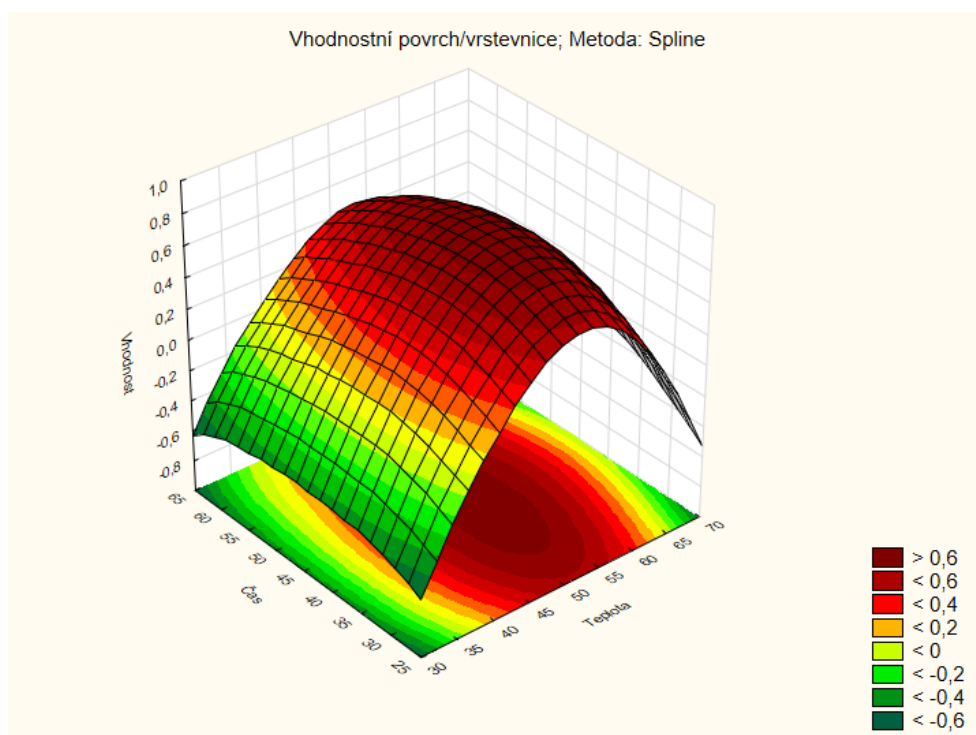


Obrázek 12: 3D vhodnostní profil pro derivatizaci tryptamin

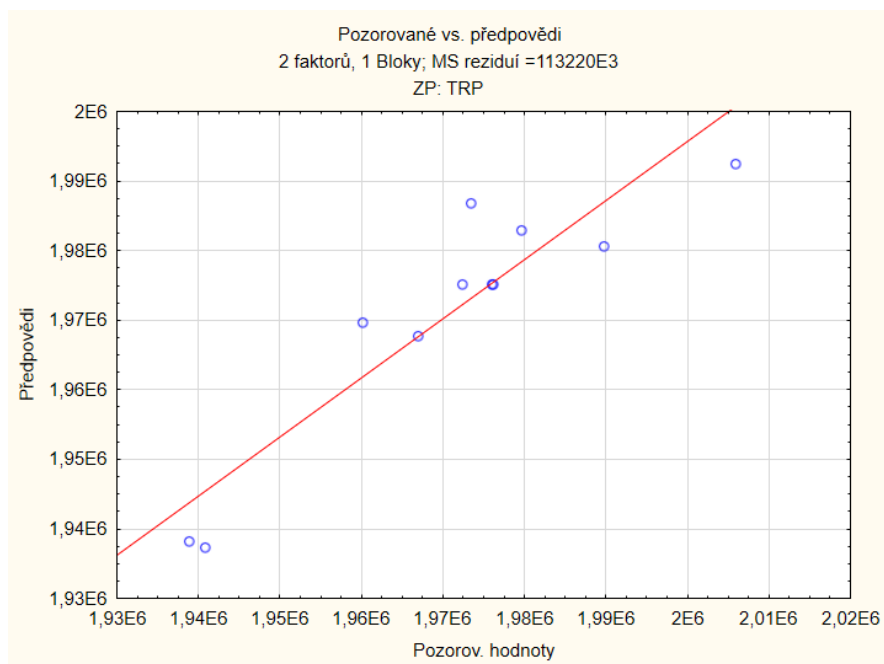




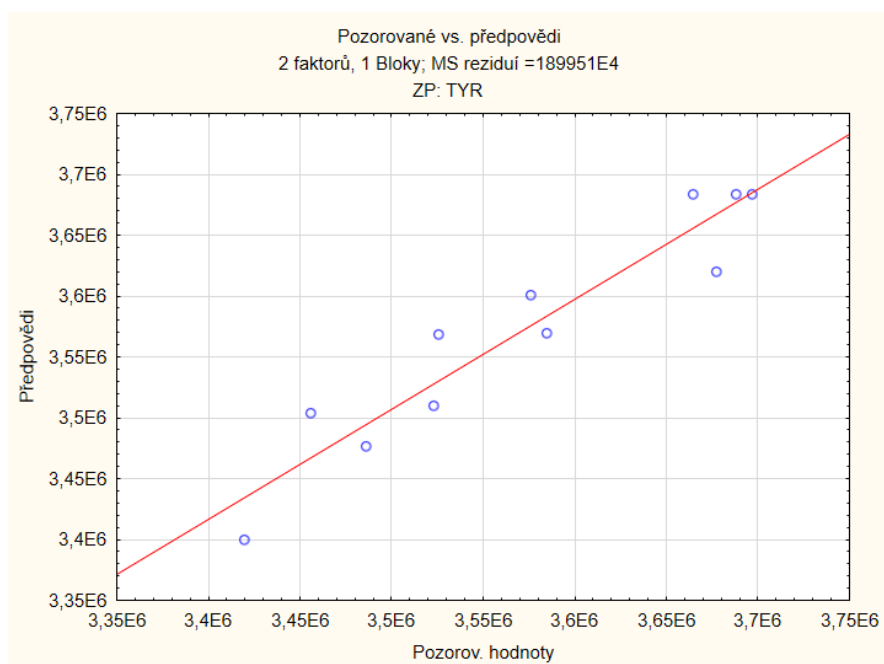
Obrázek 13: 3D vhodnostní profil pro derivatizaci tyraminu



Obrázek 14: 3D vhodnostní graf pro derivatizaci tryptaminu a tyraminu



Obrázek 15: Pozorované vs. předpovězené hodnoty pro tryptamin



Obrázek 16: Pozorované vs. predikované hodnoty pro tyramin

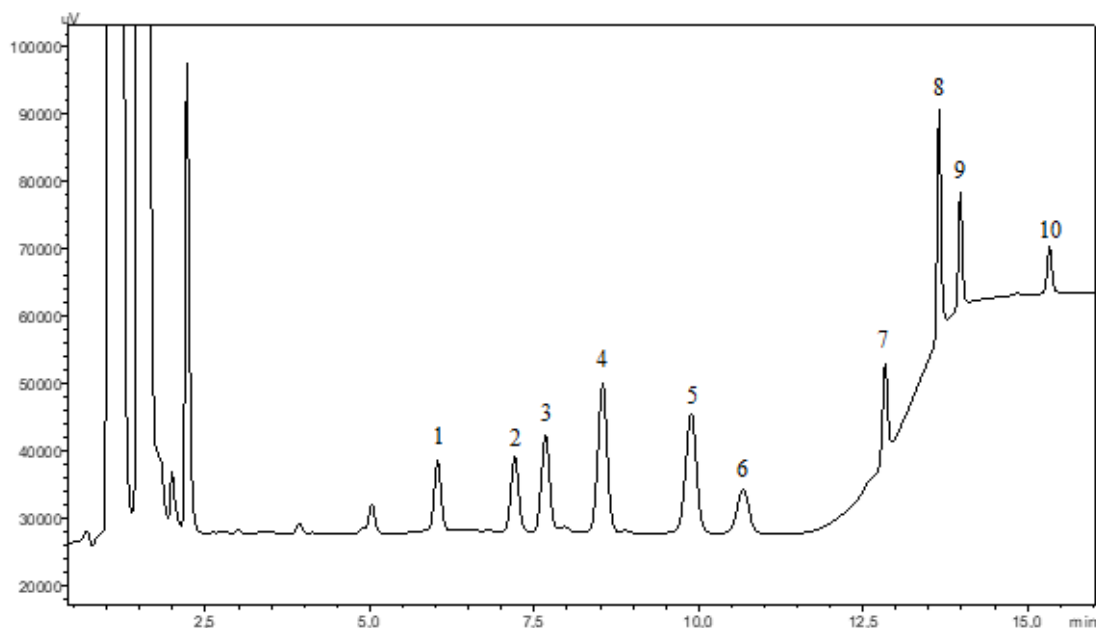
### 3.3.3 Odstranění přebytku derivatizačního činidla

Jako další byl testován postup pro odstranění přebytku derivatizačního činidla. Pro deriváty tyraminu a tryptaminu bylo použito buď 200  $\mu$ l L-prolinu o koncentraci 1 g/l, který byl použit v práci [68], nebo 200  $\mu$ l  $\text{NH}_4\text{OH}$  o koncentraci 25 % w/w, který byl použit např. ve studii [70]. Opět byly porovnány zaznamenané plochy píků derivátů tyraminu a tryptaminu. Použité činidlo nemělo vliv na velikost těchto ploch, proto byl dále používán roztok L-prolinu.

Před samotnou HPLC-DAD analýzou byl ještě testován rozdíl mezi odstředěním a filtrací směsi derivátů s L-prolinem. Odstředění bylo provedeno při 4 000 ot/min po dobu 5 min. Pro filtraci byl použit stříkačkový filtr s póry o velikosti 0,45  $\mu$ m. Po porovnání velikosti ploch píků derivátů tyraminu a tryptaminu po odstředění a po filtraci derivátů bylo zjištěno, že při filtraci pravděpodobně dochází ke ztrátě derivátů, jelikož tento postup poskytl menší plochy píků. Proto byly připravené deriváty v této práci po odstranění přebytečného Dns-Cl odstředovány 5 min při 4 000 ot/min.

### 3.4 Kalibrační závislosti

Kalibrační řada standardů byla připravena ředěním směsného roztoku standardů o koncentraci 100 mg/l. Každý bod kalibrace byl derivatizován dle optimalizovaného postupu, který popisuje kapitola 2.4.3, a to ve třech opakováních, přičemž každý roztok byl proměřen dvakrát. Ukázkový chromatogram jednoho bodu kalibrace (2 mg/l) prezentuje obrázek 17. Standardy BA eluují v časech 6,1 min (tryptamin) až 15,3 min (spermin), vnitřní standard (1,7-diaminoheptan) eluuje v čase 12,9 min. Vysoké píky v časech 1,2 až 2,5 min jsou zbytky derivatizačního činidla.



Obrázek 17: Ukázkový chromatogram bodu kalibrace o koncentraci 2 mg/l

1 – tryptamin, 2 – fenylethylamin, 3 – isoamylamin, 4 – putrescin, 5 – kadaverin, 6 – histamin,  
7 – 1,7-diaminoheptan (IS), 8 – tyramin, 9 – spermidin, 10 – spermin

Pro každý standard BA byl sestaven graf závislosti poměru průměrné plochy standardu a průměrné plochy vnitřního standardu na poměru koncentrace aminu a vnitřního standardu. Z těchto grafů poté byly sestaveny rovnice kalibračních závislostí. Veškeré grafy kalibračních závislostí jsou součástí přílohy I. Retenční časy jednotlivých standardů spolu s rovnicemi regrese a koeficienty determinace jsou uvedeny v tabulce 15.

Tabulka 15: Retenční časy, rovnice regrese a koeficienty determinace jednotlivých biogenních aminů

Biogenní amin	Retenční čas [min]	Rovnice regrese	Koeficient determinace ( $R^2$ )
tryptamin	6,1	$y = 10,546x - 0,014$	0,9954
fenylethylamin	7,3	$y = 12,943x - 0,009$	0,9975
isoamylamin	7,7	$y = 17,971x - 0,014$	0,9965
putrescin	8,7	$y = 30,699x - 0,001$	0,9963
kadaverin	10,0	$y = 22,844x + 0,152$	0,9947
histamin	10,8	$y = 11,297x - 0,002$	0,9962
tyramin	13,7	$y = 19,881x - 0,047$	0,9987
spermidin	14,0	$y = 10,133x + 0,019$	0,9961
spermin	15,3	$y = 4,9773x + 0,0080$	0,9919

Ze získaných rovnic kalibrační závislosti byly určeny meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) každého aminu pomocí maticového vzorce v programu Excel. Mez detekce je rovna trojnásobku šumu základní linie a vyjadřuje nejnižší detekovatelné množství analytu ve vzorku. Mez stanovitelnosti je rovna desetinásobku šumu základní linie a vyjadřuje nejnižší koncentraci analytu ve vzorku, kterou lze ještě spolehlivě kvantifikovat. LOD a LOQ pro standardy jednotlivých BA prezentuje tabulka 16.

Tabulka 16: Meze detekce a meze stanovitelnosti jednotlivých biogenních aminů

<b>Biogenní amin</b>	<b>LOD [mg/l]</b>	<b>LOQ [mg/l]</b>
tryptamin	$3,70 \cdot 10^{-2}$	$1,23 \cdot 10^{-1}$
fenylethylamin	$2,03 \cdot 10^{-2}$	$6,78 \cdot 10^{-2}$
isoamylamin	$2,24 \cdot 10^{-2}$	$7,45 \cdot 10^{-2}$
putrescin	$4,66 \cdot 10^{-3}$	$1,55 \cdot 10^{-2}$
kadaverin	$1,01 \cdot 10^{-2}$	$3,37 \cdot 10^{-2}$
histamin	$8,15 \cdot 10^{-3}$	$2,72 \cdot 10^{-2}$
tyramin	$5,57 \cdot 10^{-2}$	$1,86 \cdot 10^{-1}$
spermidin	$3,07 \cdot 10^{-2}$	$1,02 \cdot 10^{-1}$
spermin	$1,44 \cdot 10^{-2}$	$4,81 \cdot 10^{-2}$

Pro všechny BA bylo dosaženo velmi dobré linearit, což dokazují koeficienty determinace s hodnotou vyšší než 0,99. Meze detekce nabývaly hodnot od  $4,66 \cdot 10^{-3}$  mg/l pro putrescin do  $5,57 \cdot 10^{-2}$  mg/l pro tyramin. Hodnoty mezi stanovitelnosti se pohybovaly v rozmezí od  $1,55 \cdot 10^{-2}$  mg/l pro putrescin a  $1,86 \cdot 10^{-1}$  mg/l pro tyramin. Nejnižší LOD i LOQ má tedy putrescin.

### 3.5 Optimalizace podmínek zakoncentrování derivátů biogenních aminů

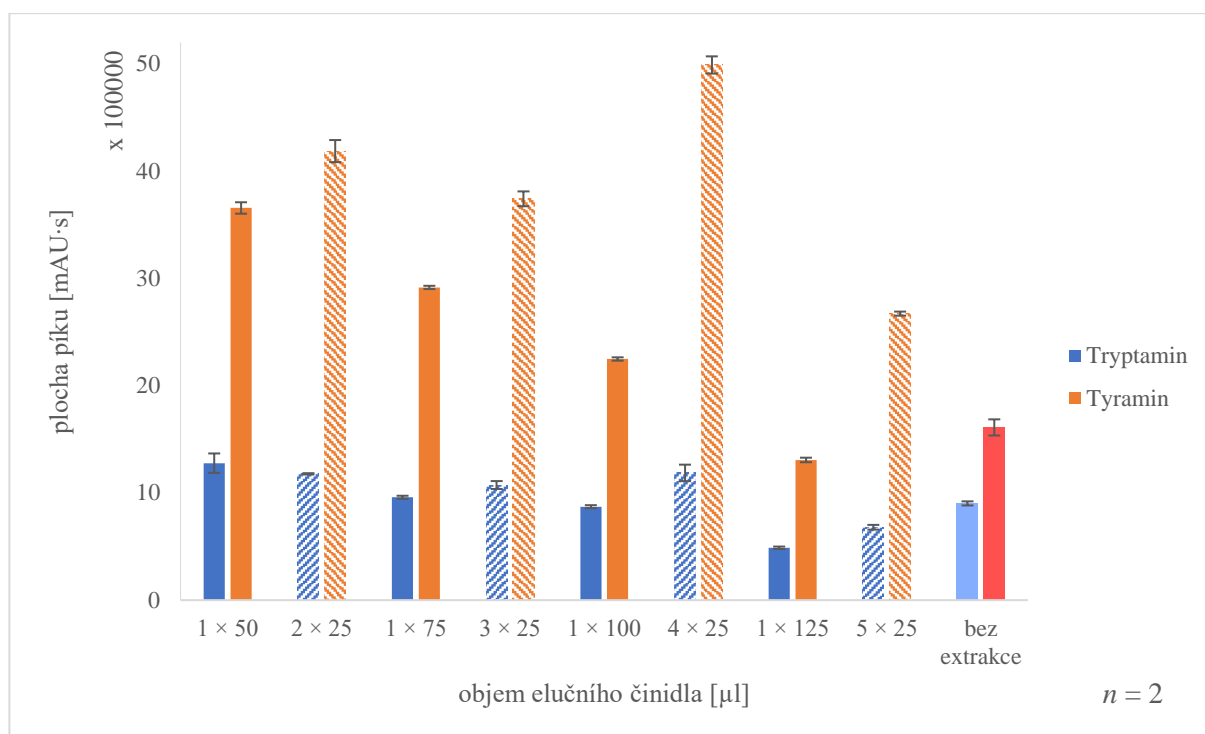
#### 3.5.1 Optimalizace mikroextrakce tuhou fází s využitím stříkačky

Pro post-derivatizační zakoncentrování BA byla vybrána metoda MEPS. Nejprve bylo nutné zvolit vhodná činidla pro kondicionaci sorbentu, promytí a eluci, což bylo provedeno na jehle se sorbentem C18. Na základě diplomové práce Veroniky Panáčkové [73], doporučení výrobce, další literatury [40; 41] a znalosti obecného postupu klasické SPE bylo pro kondicionaci použito  $3 \times 50 \mu\text{l}$  acetonitrilu (100 % obj.) a následně  $3 \times 50 \mu\text{l}$  acetonitrilu (5 % obj.). Poté bylo

naneseno 250  $\mu\text{l}$  derivatizovaného standardu tyraminu, respektive tryptaminu. Sorbent byl promyt 25  $\mu\text{l}$  deionizované vody a zachycené deriváty byly eluovány 50  $\mu\text{l}$  acetonitrilu o stejné koncentraci, jako má počáteční mobilní fáze při separaci, tedy 55 % obj. Uvedený postup kondicionace sorbentu se jevil jako ideální pro zachycení derivátů BA. Stejný postup byl opakován také bez kroku promytí deionizovanou vodou, kdy se ukázalo, že tento krok je zbytečný. Promytím se totiž odstraní pouze zbytky Dns-Cl a jeho sloučenin s L-prolinem, které se však v separační koloně téměř nezadržují. Tyto látky eluují v časech 1–2,2 min, tedy před deriváty všech BA, a na výsledném chromatogramu tak nepřekážejí. Proto není nutné je odstraňovat a riskovat tak ztrátu analytů promytím sorbentu. S krokem promytí totiž byly získány píky s menší plochou než bez tohoto kroku, což znamená, že musela být vymyta i část derivátů BA.

Dále bylo přistoupeno k výběru vhodného elučního činidla. Testovány byly různé koncentrace acetonitrilu, konkrétně 50, 55, 60, 70, 80 a 90 % obj. Acetonitril byl zvolen proto, že je také složkou mobilní fáze při následné chromatografické separaci. Byly porovnány plochy píku derivátu tryptaminu. Od koncentrace acetonitrilu 50 % obj. docházelo k růstu plochy píku až do koncentrace 80 % obj. U koncentrace 90 % obj. již k dalšímu významnému zvětšení plochy nedošlo, a proto byl jako eluční činidlo zvolen acetonitril (80 % obj.).

Bylo nutné zvolit vhodný objem elučního činidla tak, aby došlo k co nejúčinnější eluci analytů zachycených na sorbentu. Byly testovány objemy 50, 75, 100 a 125  $\mu\text{l}$ , a to jak jedním nasátím stříkačky, tak opakovaným nasátím 25  $\mu\text{l}$ . Opět byly porovnány plochy píků derivátů tyraminu a tryptaminu, což je uvedeno na obrázku 18. Eluce opakovaným nasátím 25  $\mu\text{l}$  činidla (šrafované sloupce) byla obecně účinnější než eluce jedním nasátím celého objemu (plné sloupce). To dokázalo i proměření roztoků po promytí sorbentu acetonitrem (100 % obj.) po eluci. Jako ideální byla zvolena eluce  $4 \times 25$   $\mu\text{l}$  acetonitrilu (80 % obj.), která poskytla největší plochu píku derivátu tyraminu a dostatečně velkou plochu derivátu tryptaminu. Lze říci, že zakoncentrování metodou MEPS má větší vliv na dansylderivát tyraminu než na derivát tryptaminu, což je způsobeno nižší polaritou derivátu tyraminu, který má vyšší retenci k nepolárnímu sorbentu typu C18.



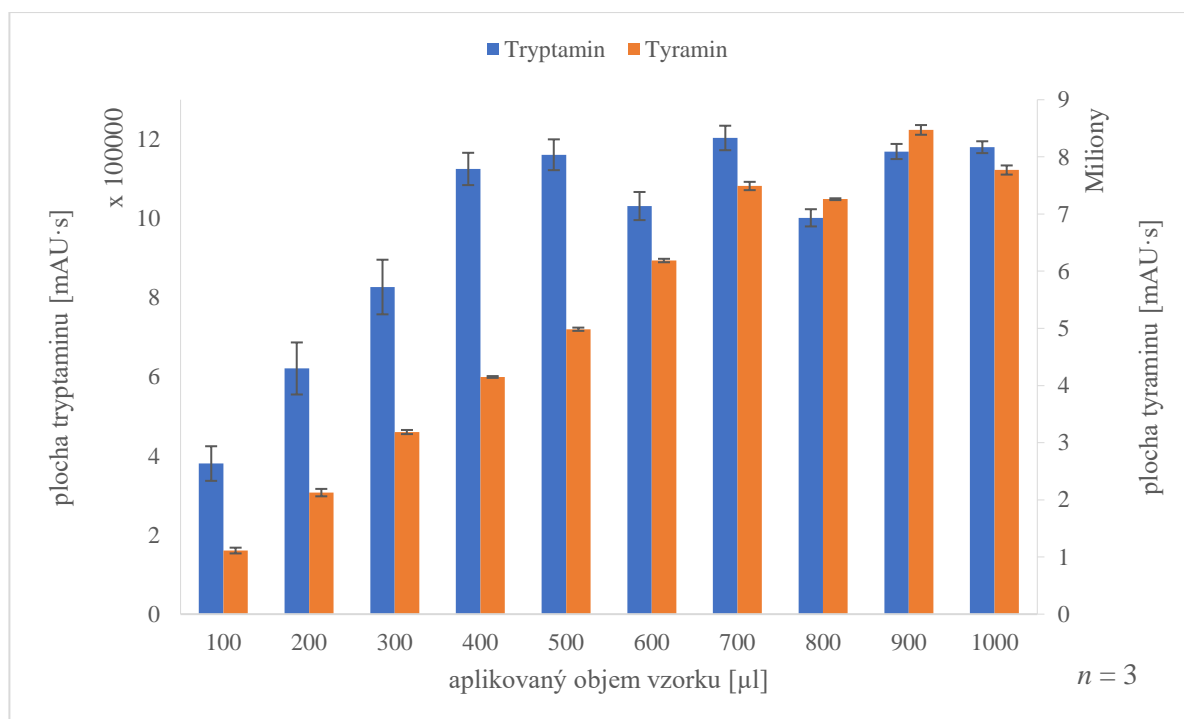
Obrázek 18: Závislost ploch píků na objemu elučního činidla při MEPS

Testován byl též vliv teploty elučního činidla na zakoncentrování derivátů BA. Kromě laboratorní teploty byly zkoušeny ještě teploty 40 a 50 °C a opět porovnány plochy píků derivátů. Ukázalo se, že zvýšená teplota elučního roztoku nevedla k žádné změně v eluční síle, protože nedošlo ke změnám ploch píků. Dále bylo tedy pracováno s elučním činidlem při laboratorní teplotě.

Také byla testována vhodnost sorbentu C18 pro zachycení derivátů BA porovnáním s ostatními dostupnými sorbenty, kterými byly C8, C2, SIL (nemodifikovaný silikagel) a M1 (směsný sorbent s 80 % C8 a 20 % kation-výměnných skupin). Jako jediný účinný se ukázal právě nepolární sorbent C18, který byl tedy dále pro zakoncentrování používán. Tento výsledek není překvapivý vzhledem k tomu, že C18 je také stacionární fází chromatografické kolony použité pro analýzu derivátů BA.

Jako další bylo nutné otestovat kapacitu sorbentu, tedy jak velký objem vzorku je vhodné nanést pro co nejefektivnější zakoncentrování. Testovány byly objemy vzorku od 100 do 1000 µl a veškeré testované objemy byly nasávány po 100 µl stříkačkou MEPS o objemu 250 µl. Kapacita sorbentu byla vyhodnocena na základě porovnání velikosti ploch píků tyraminu a tryptaminu v závislosti na aplikovaném objemu vzorku, jak uvádí obrázek 19. Ke zvyšování plochy tyraminu docházelo až do objemu vzorku 900 µl, u objemu 1 000 µl už ke zvýšení

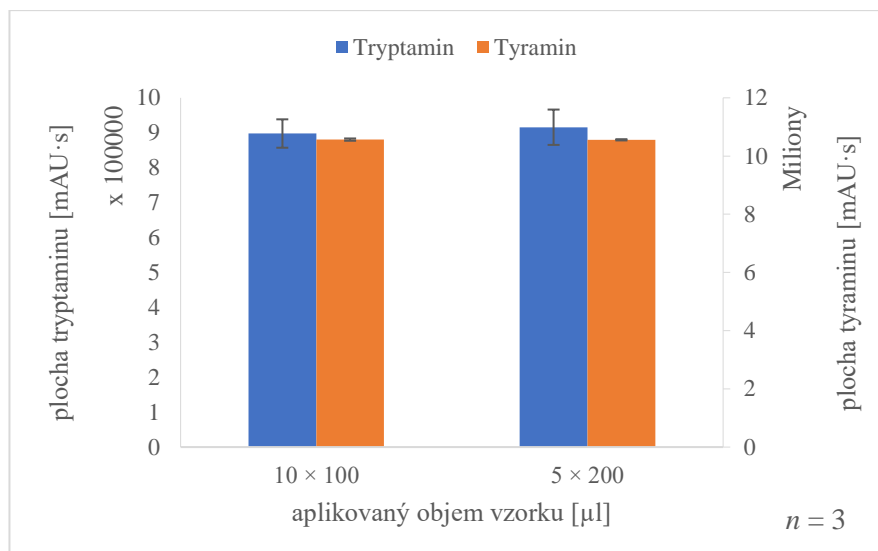
nedošlo. Pro tryptamin se plocha píku zvyšovala do objemu 400  $\mu\text{l}$  a při vyšších aplikovaných objemech už zůstávala s drobnými odchylkami konstantní. Nakonec byl jako kompromis zvolen objem vzorku 1 000  $\mu\text{l}$ .



Obrázek 19: Porovnání aplikovaných objemů vzorku pro zakoncentrování

Následně bylo testováno nanášení objemu 1 000  $\mu\text{l}$  vzorku po 100 a po 200  $\mu\text{l}$ . K tomuto kroku bylo přistoupeno z důvodu časové úspory a snížení opotřebení sorbentu díky redukci počtu extrakcí. Srovnání velikosti ploch pík poskytnutých zakoncentrováním  $10 \times 100 \mu\text{l}$  derivátů a  $5 \times 200 \mu\text{l}$  derivátů prezentuje obrázek 20. Aplikace  $5 \times 200 \mu\text{l}$  vzorku poskytla prakticky stejné výsledky jako aplikace po 100  $\mu\text{l}$ , proto bylo dále pro zakoncentrování derivátů BA metodou MEPS aplikováno  $5 \times 200 \mu\text{l}$  vzorku.





Obrázek 20: Porovnání aplikace 10 × 100 µl a 5 × 200 µl vzorku

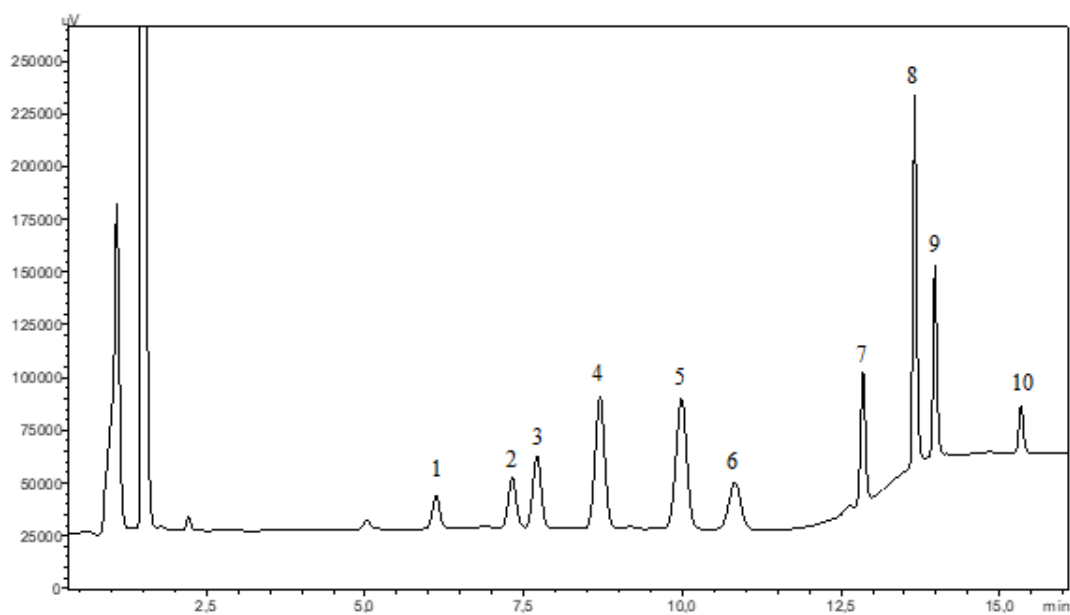
### 3.5.2 Kalibrace mikroextrakce tuhou fází s využitím stříkačky

Kalibrační řada standardů BA o 8 bodech v rozmezí od 0,05 do 2 mg/l byla připravena ze směšného roztoku dle postupu v kapitole 2.4.1.7. Derivatizace kalibrační řady byla provedena dle optimalizovaného postupu, který je popsán v kapitole 2.4.3, a na připravené deriváty byla aplikována optimalizovaná metoda MEPS, popsaná v kapitole 2.4.4. Zakoncentrované deriváty byly analyzovány HPLC-DAD. Kalibrační závislosti byly sestaveny jako závislost poměru plochy standardu BA a plochy vnitřního standardu na poměru koncentrace standardu a vnitřního standardu. Získané rovnice lineární regrese a koeficienty determinace pro všechny studované BA jsou prezentovány v tabulce 17.

Tabulka 17: Parametry kalibrační řady zakoncentrovaných dansylderivátů BA

Biogenní amin	Rovnice regrese	Koeficient determinace ( $R^2$ )
tryptamin	$y = 3,9178x - 0,0153$	0,9899
fenylethylamin	$y = 6,3072x - 0,0130$	0,9961
isoamylamin	$y = 9,4408x - 0,0211$	0,9947
putrescin	$y = 20,154x - 0,038$	0,9943
kadaverin	$y = 22,409x - 0,043$	0,9950
histamin	$y = 8,7984x - 0,0105$	0,9949
tyramin	$y = 21,221x - 0,016$	0,9959
spermidin	$y = 10,655x + 0,042$	0,9934
spermin	$y = 3,1865x + 0,0324$	0,9729

Téměř u všech studovaných analytů bylo dosaženo uspokojivé linearity, což dokazují hodnoty koeficientů determinace  $>0,99$ . Pouze pro tryptamin a spermin byly koeficienty determinace pod touto hodnotou, konkrétně 0,9899 pro tryptamin a 0,9729 pro spermin. Také směrnice těchto dvou aminů nabývaly nejnižších hodnot a kalibrační přímky tak měly nejmenší sklon. Grafy kalibračních závislostí pro všechny zakoncentrované BA jsou součástí přílohy II. Ukázkový chromatogram jednoho bodu kalibrační řady, konkrétně toho s koncentrací BA 2 mg/l, je na obrázku 21.



Obrázek 21: Ukázkový chromatogram zakoncentrovaných derivátů biogenních aminů

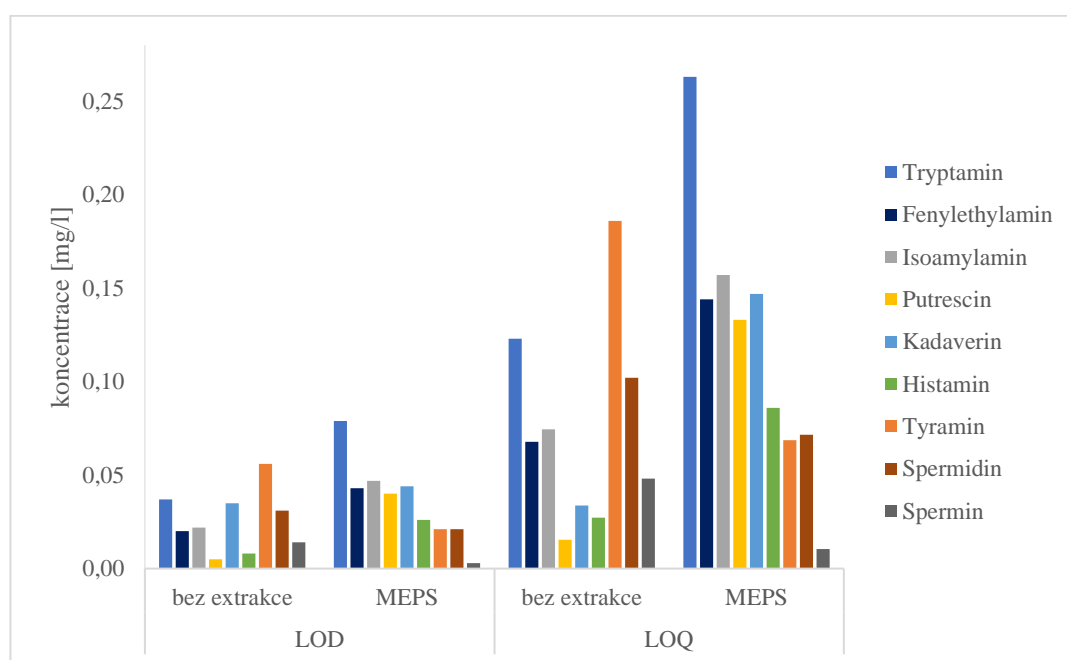
1 – tryptamin, 2 – fenylethylamin, 3 – isoamylamin, 4 – putrescin, 5 – kadaverin, 6 – histamin,  
7 – 1,7-diaminoheptan (IS), 8 – tyramin, 9 – spermidin, 10 - spermin

Meze detekce a meze stanovitelnosti v jednotkách mg/l metody MEPS byly určeny pomocí maticové funkce v programu Excel a jsou uvedeny v tabulce 18. Nejnižší LOD i LOQ byly určeny pro spermin, a to  $3,13 \cdot 10^{-3}$  mg/l, respektive  $1,04 \cdot 10^{-2}$  mg/l. Naopak nejvyšší LOD i LOQ byly určeny pro tryptamin, konkrétně  $7,89 \cdot 10^{-2}$  mg/l a  $2,63 \cdot 10^{-1}$  mg/l.

Tabulka 18: Meze detekce a stanovitelnosti jednotlivých biogenních aminů po extrakci metodou MEPS

Biogenní amin	LOD [mg/l]	LOQ [mg/l]
tryptamin	$7,89 \cdot 10^{-2}$	$2,63 \cdot 10^{-1}$
fenylethylamin	$4,31 \cdot 10^{-2}$	$1,44 \cdot 10^{-1}$
isoamylamin	$4,70 \cdot 10^{-2}$	$1,57 \cdot 10^{-1}$
putrescin	$3,99 \cdot 10^{-2}$	$1,33 \cdot 10^{-1}$
kadaverin	$4,40 \cdot 10^{-2}$	$1,47 \cdot 10^{-1}$
histamin	$2,58 \cdot 10^{-2}$	$8,59 \cdot 10^{-2}$
tyramin	$2,06 \cdot 10^{-2}$	$6,86 \cdot 10^{-2}$
spermidin	$2,15 \cdot 10^{-2}$	$7,16 \cdot 10^{-2}$
spermin	$3,13 \cdot 10^{-3}$	$1,04 \cdot 10^{-2}$

Hodnoty LOD a LOQ získané pro metodu MEPS byly graficky porovnány s hodnotami LOD a LOQ bez extrakce, což prezentuje obrázek 22. Z grafu je vidět, že přidáním extrakčního kroku před analýzou došlo ke zvýšení hodnot LOD i LOQ pro 6 z 9 biogenních aminů. Hodnoty LOD se zvýšily 1,25× pro kadaverin až 8× pro putrescin. Naopak ke snížení LOD došlo u tyraminu, spermidinu a sperminu, tedy u látek, které jsou nejméně polární ze studovaných BA a nejlépe se zadržují na sorbentu C18. Nejvíce patrné bylo snížení hodnoty LOD sperminu, konkrétně 4,7×. Hodnoty LOQ se zvýšily 2,1× pro isoamylamin až 8,6× pro putrescin. K výraznému snížení LOQ naopak došlo u tyraminu a hlavně u sperminu, jehož LOQ bylo pro MEPS 4,6× nižší.



Obrázek 22: Porovnání LOD a LOQ přístroje a metody MEPS

Porovnáním směrnice závislosti ploch píků na koncentraci pro zakoncentrované a nezakoncentrované deriváty byla vypočtena účinnost extrakce. Teoreticky by deriváty, na něž byla aplikována metoda MEPS, měly být zakoncentrovány 10×, aby bylo dosaženo účinnosti metody 100 %. Reálně však tak vysoké účinnosti nebylo dosaženo pro žádný ze standardů. Účinnosti zakoncentrování derivátů jednotlivých biogenních aminů metodou MEPS prezentuje tabulka 19. Nejvyšší účinnosti zakoncentrování, konkrétně 53,2 %, bylo dosaženo pro derivát tyraminu. Naopak nejnižší účinnost měla metoda MEPS pro derivát tryptaminu, a to 18,6 %.

Tabulka 19: Účinnost zakoncentrování derivátů

<b>Biogenní amin</b>	<b>Směrnice kalibrační závislosti bez extrakce</b>	<b>Směrnice kalibrační závislosti s extrakcí</b>	<b>Účinnost [%]</b>
tryptamin	38 058	70 878	18,6
fenylethylamin	46 721	115 476	24,7
isoamylamin	64 867	170 858	26,3
putrescin	110 756	365 450	33,0
kadaverin	83 316	406 265	48,8
histamin	40 797	159 637	39,1
tyramin	72 533	385 752	53,2
spermidin	36 568	194 331	53,1
spermin	17 967	57 317	31,9

### 3.6 Optimalizace úpravy vzorku před derivatizací

#### 3.6.1 Odstranění oxidu uhličitého ze vzorků

Dle prostudované literatury [50; 52; 56; 59; 60] bylo prvním krokem úpravy vzorků piva odstranění oxidu uhličitého. Bylo testováno odvdzušnění vzorků pomocí ultrazvukové lázně a pomocí třepačky. Oba postupy byly zhruba stejně časově náročné, odplynění trvalo 45 až 60 min. Při odplynění v ultrazvukové lázni však docházelo k poměrně výraznému zahřátí vzorku, a bylo tak nutné ho před dalším postupem zchladit, což vyžadovalo další čas. Tyto postupy byly porovnány pomocí velikostí ploch derivátů BA přítomných v reálných vzorcích. Jako vhodnější se pro odplynění vzorků ukázal postup třepání na třepačce. Při odplynění v ultrazvukové lázni patrně dochází ke ztrátě některých BA, jelikož plochy píků derivátů získané ze vzorků odplyněných tímto postupem byly menší než ze stejných vzorků, které byly

odplyněny třepáním na třepačce. Proto byl dále CO<sub>2</sub> ze všech reálných vzorků piv odstraňován třepáním pomocí třepačky.

### **3.6.2 Odstranění polyfenolických látek ze vzorků**

Dalším krokem bylo odstranění polyfenolických látek ze vzorků pomocí PVP. Tyto látky je nutné odstranit, jelikož Dns-Cl reaguje nejen s aminoskupinami BA, ale také s -OH skupinami fenolů. PVP je polymer s vysokou molekulovou hmotností, který tyto látky naváže a vzniklé velké molekuly jsou posléze odstraněny odstředěním nebo filtrací. K 10 ml odplyněného vzorku bylo naváženo 0,5 g PVP a tato směs byla 15 min míchána na magnetické míchačce. Nejprve byl reálný vzorek analyzován bez úpravy PVP, kdy se v získaném chromatogramu nacházelo vyšší množství píků než s tímto krokem a také šum základní linie byl vyšší. Dále byly testovány různé navážky PVP a různé časy míchání směsi vzorku a PVP magnetickým míchadlem. Konkrétně byly zkoušeny navážky 0,25; 0,5 a 1 g PVP a časy 15 a 30 min. Podle získaných chromatogramů nebyla navážka PVP 0,25 g dostatečná pro odstranění všech interferentů. Mezi navážkami 0,5 a 1 g nebyl prakticky žádný rozdíl. Mezi dvěma testovanými časy míchání směsi PVP s odplyněným vzorkem nebyl žádný rozdíl viditelný na získaných chromatogramech. Proto bylo dále pracováno s navážkou 0,5 g PVP a mícháním směsi po dobu 15 min pro všechny reálné vzorky.

Následoval krok odstředění směsi vzorku s PVP. Ten měl za úkol odstranění nejen polyfenolů vychytaných molekulami PVP, ale také případných tuhých složek vzorků (sedlina, kvasinky atd.). Bylo testováno odstředění směsi 10 min při 4 000 ot/min, odstředění za stejných podmínek s následnou filtrací supernatantu přes stříkačkový filtr, filtrace přes stříkačkový filtr bez kroku odstředění a také přímá derivatizace bez těchto kroků. Porovnáním chromatogramů bylo zjištěno, že krok odstředění nebo filtrace před derivatizací je nutný. Mezi chromatogramem odstředěného a filtrovaného vzorku nebyl významný rozdíl a provedení obou kroků bylo vyhodnoceno jako zbytečné. Proto bylo dále na všechny reálné vzorky aplikováno odstředění při 4 000 ot/min po dobu 10 min.

### **3.6.3 Derivatizace reálných vzorků**

Před samotnou derivatizací vzorku upraveného dle optimalizovaného postupu bylo změřeno pH všech vzorků pH metrem. Naměřené hodnoty pH se pohybovaly v rozmezí 4,29 až 4,98. Postup derivatizace byl však optimalizovaný pro standardy BA rozpuštěné v HClO<sub>4</sub> o koncentraci 0,4 mol/l, jejichž pH nabývalo hodnot 0–0,5. Proto bylo nutné upravit pH vzorků piv na podobnou hodnotu jako bylo pH samotných standardů tak, aby po přidavku alkálií

(NaOH a Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) mělo pH vzniklé směsi hodnotu 9–11, což je pH optimální pro derivatizaci dansylchloridem. Pokud by pH vzorků nebylo sníženo, po alkalizaci by nabývalo hodnot >12,5 a derivatizace přítomných BA by neprobíhala. Jako první bylo testováno naředění vzorku HClO<sub>4</sub> o koncentraci 0,4 mol/l, která byla použita pro přípravu roztoků standardů, a to v poměru 1:1. Tato kyselina však neokyselila vzorek dostatečně a směs měla po alkalizaci příliš vysoké pH (cca 12) pro dokonalý průběh derivatizace. Proto byla použita silnější HClO<sub>4</sub> s koncentrací 1 mol/l. Po zředění vzorku v poměru 1:1 touto kyselinou již mělo pH po alkalizaci optimální hodnotu (cca 10) pro dansylaci. Takto byly tedy ředěny vzorky všech studovaných piv. Tento postup je v souladu s literaturou [52], kde byly vzorky ředěny kyselinou chloristou o koncentraci dokonce 1,2 mol/l.

### **3.7 Analýza reálných vzorků piva**

Analýza reálných vzorků piva sestávala ze tří optimalizovaných kroků. Prvním krokem byla úprava vzorku, která je popsána v kapitole 2.4.2, následovala derivatizace upraveného vzorku, kterou popisuje kapitola 2.4.3, a třetím krokem bylo zakoncentrování připravených derivátů technikou MEPS, což popisuje kapitola 2.4.4. Samotné stanovení BA ve vzorcích bylo provedeno HPLC s DAD detekcí při 254 nm. Každý vzorek byl derivatizován ve třech opakováních, které bylo vždy dvakrát proměřeno. Dansylderiváty v pivu byly analyzovány jak zakoncentrované, tak přímým nástřikem na separační kolonu bez kroku zakoncentrování. BA ve vzorcích měly být kvantifikovány pomocí zakoncentrovaných derivátů, nakonec však z důvodů popsaných níže v kapitole 3.7.2 byla kvantifikace provedena u derivátů analyzovaných přímo bez extrakce.

#### **3.7.1 Výsledky analýzy reálných vzorků bez kroku zakoncentrování**

Obsah biogenních aminů v reálných vzorcích byl vyhodnocen metodou kalibrační přímky, a to z poměrů ploch píků dansylderivátů BA a plochy píku vnitřního standardu. Po výpočtu z rovnice regrese bylo nutné vypočtenou koncentraci pro každý amin ještě vynásobit dvěma, jelikož vzorek byl před derivatizací ředěn kyselinou chloristou v poměru 1:1. Stanovené obsahy BA v jednotlivých vzorcích prezentuje tabulka 20.

Chromatogramy všech analyzovaných vzorků jsou součástí přílohy III. U všech analyzovaných vzorků se v čase 6,1 min objevoval pík, který byl na základě pokusu derivatizace ethanolu identifikován právě jako dansylderivát ethanolu. Plocha tohoto píku se zvětšovala s rostoucím

obsahem ethanolu ve vzorku. V čase 6,1 min však eluoval také dansylderivát tryptaminu, který tak z tohoto důvodu nebylo možné v reálných vzorcích stanovit, a to ani při jiné vlnové délce než při 254 nm. Také se na chromatogramech všech vzorků pravidelně objevoval pík v čase 14,3 min, který pravděpodobně patřil některé ze složek matrice, kterou se nepodařilo odstranit pomocí PVP (např. aminokyselina). V chromatogramech vzorků se stejně jako v chromatogramech standardů objevovaly píky zbytků dansylchloridu a jeho sloučenin s L-prolinem v časech 1,2 až 2,2 min. Kolem času 5 min se v chromatogramech vzorků objevují dva píky, v tomto čase je však pík přítomen i v chromatogramech standardů, pravděpodobně tedy pochází opět z derivatizačního činidla. V chromatogramu vzorku Primátor Weizen je přítomen poměrně výrazný pík v čase 12,5 min. Jeho původ je neznámý, ale mohl by patřit některé z látek pocházejících z pšeničného sladu.

V žádném z analyzovaných vzorků nebyly detekovány fenylethylamin a spermin. Isoamylamin byl detekován ve vzorcích dvou nepasterizovaných piv, ale nebylo možné ho spolehlivě stanovit, jelikož koeluoval s jinou látkou. Histamin byl stanoven pouze v jednom ze vzorků, konkrétně se jednalo o nepasterizovaný světlý ležák Krakonoš. Spermidin byl detekován u všech tří vzorků speciálních piv (nefiltrovaných, pšeničných nebo kvasnicových), ale pouze v pivu Staropramen Nefiltr Pšeničný byl jeho obsah pod limitem kvantifikace.

Ve všech analyzovaných vzorcích byly obsaženy putrescin, kadaverin a tyramin. Obsah putrescinu se pohyboval v rozmezí od  $0,532 \pm 0,010$  mg/l ve vzorku Staropramen Nefiltr Pšeničný do  $1,398 \pm 0,068$  mg/l v nepasterizovaném ležáku Krakonoš. Výskyt putrescinu v reálných vzorcích byl předpokládán, jelikož je přirozenou složkou ječného sladu. Obsah kadaverinu byl  $0,193 \pm 0,018$  mg/l ve vzorku světlého výčepního piva Braník až  $18,278 \pm 0,403$  mg/l v nepasterizovaném ležáku Krakonoš. Nejnižší obsah tyraminu byl stanoven ve vzorku Gambrinus Originál 10, a to  $0,502 \pm 0,101$  mg/l. Obsah tyraminu byl nejvyšší opět ve vzorku nepasterizovaného ležáku Krakonoš, konkrétně  $27,803 \pm 0,315$  mg/l.

Kadaverin a tyramin jsou spolu s histaminem, jehož obsah v pivu Krakonoš byl  $2,419 \pm 0,137$  mg/l, ukazateli mikrobiální kontaminace. Vzhledem k celkovému obsahu BA ve vzorku piva Krakonoš  $49,898 \pm 0,923$  mg/l lze tento vzorek považovat za potenciálně nebezpečný pro citlivé jedince, nebo pro zdravé jedince při vysoké spotřebě. Již konzumací čtyř půllitrů tohoto piva je dosažena hranice 100 mg BA, která je považována za nebezpečnou pro lidské zdraví. Ethanol, jehož je ve vzorku 5,1 % obj., tuto hranici ještě snižuje, proto by toto konkrétní pivo mohlo být považováno za rizikové. Jeho konzumaci by tak měli zvážít

zejména lidé užívající inhibitory monoaminoxidázy a lidé s nemocemi střev, ale i zdraví lidé by měli redukovat konzumované množství tohoto nepasterizovaného ležáku.

Tabulka 20: Obsah biogenních aminů v reálných vzorcích piva bez extrakce

Vzorek	Obsah biogenního aminu [mg/l]						BA celkem
	<i>Isoamylamin</i>	<i>Putrescin</i>	<i>Kadaverin</i>	<i>Histamin</i>	<i>Tyramin</i>	<i>Spermidin</i>	
Gambrinus Originál 10	<LOD	<b>0,701 ± 0,019</b>	<b>0,473 ± 0,091</b>	<LOD	<b>0,502 ± 0,101</b>	<LOD	<b>1,676 ± 0,211</b>
Braník světlý	<LOD	<b>0,573 ± 0,035</b>	<b>0,193 ± 0,018</b>	<LOD	<b>0,714 ± 0,105</b>	<LOD	<b>1,480 ± 0,158</b>
Radegast Rázná 10	<LOD	<b>0,737 ± 0,044</b>	<b>0,417 ± 0,030</b>	<LOD	<b>0,587 ± 0,099</b>	<LOD	<b>1,741 ± 0,173</b>
Radegast ROG IPA	<LOD	<b>0,570 ± 0,042</b>	<b>1,446 ± 0,085</b>	<LOD	<b>0,642 ± 0,098</b>	<LOD	<b>2,658 ± 0,225</b>
Rebel IPA	<LOD	<b>0,577 ± 0,009</b>	<b>0,995 ± 0,008</b>	<LOD	<b>5,953 ± 0,136</b>	<LOD	<b>7,525 ± 0,153</b>
Primátor IPA	<LOD	<b>0,635 ± 0,049</b>	<b>0,663 ± 0,074</b>	<LOD	<b>3,028 ± 0,140</b>	<LOD	<b>4,326 ± 0,263</b>
Krakonoš světlý ležák 12	<LOQ	<b>1,398 ± 0,068</b>	<b>18,278 ± 0,403</b>	<b>2,419 ± 0,137</b>	<b>27,803 ± 0,315</b>	<LOD	<b>49,898 ± 0,923</b>
Starobrno Medium	<LOD	<b>0,694 ± 0,018</b>	<b>0,207 ± 0,014</b>	<LOD	<b>1,003 ± 0,112</b>	<LOD	<b>1,904 ± 0,144</b>
Svijanský máz 11 %	<LOQ	<b>0,620 ± 0,028</b>	<b>7,314 ± 0,393</b>	<LOD	<b>0,584 ± 0,094</b>	<LOD	<b>8,518 ± 0,515</b>
Primátor Weizen	<LOD	<b>0,608 ± 0,020</b>	<b>0,754 ± 0,050</b>	<LOD	<b>0,682 ± 0,097</b>	<b>0,191 ± 0,071</b>	<b>2,235 ± 0,238</b>
Bernard Kvasnicové pivo 10	<LOD	<b>1,090 ± 0,075</b>	<b>0,518 ± 0,068</b>	<LOD	<b>0,951 ± 0,106</b>	<b>0,147 ± 0,058</b>	<b>2,706 ± 0,307</b>
Staroprámen Nefiltr Pšeničný	<LOD	<b>0,532 ± 0,010</b>	<b>0,338 ± 0,082</b>	<LOD	<b>0,524 ± 0,094</b>	<LOQ	<b>1,394 ± 0,186</b>

Druhý nejvyšší celkový obsah BA byl stanoven v pivu Svijanský máz, konkrétně  $8,518 \pm 0,515$  mg/l. Tento vzorek je stejného druhu jako na BA nejbohatší Krakonoš, tedy nepasterizovaný světlý ležák. Lze tedy usuzovat, že v nepasterizovaných pivech je obecně vyšší pravděpodobnost zvýšeného obsahu biogenních aminů, jelikož nedochází k usmrcení dekarboxyláza-pozitivních bakterií, které se do produktu mohly dostat během výroby nebo

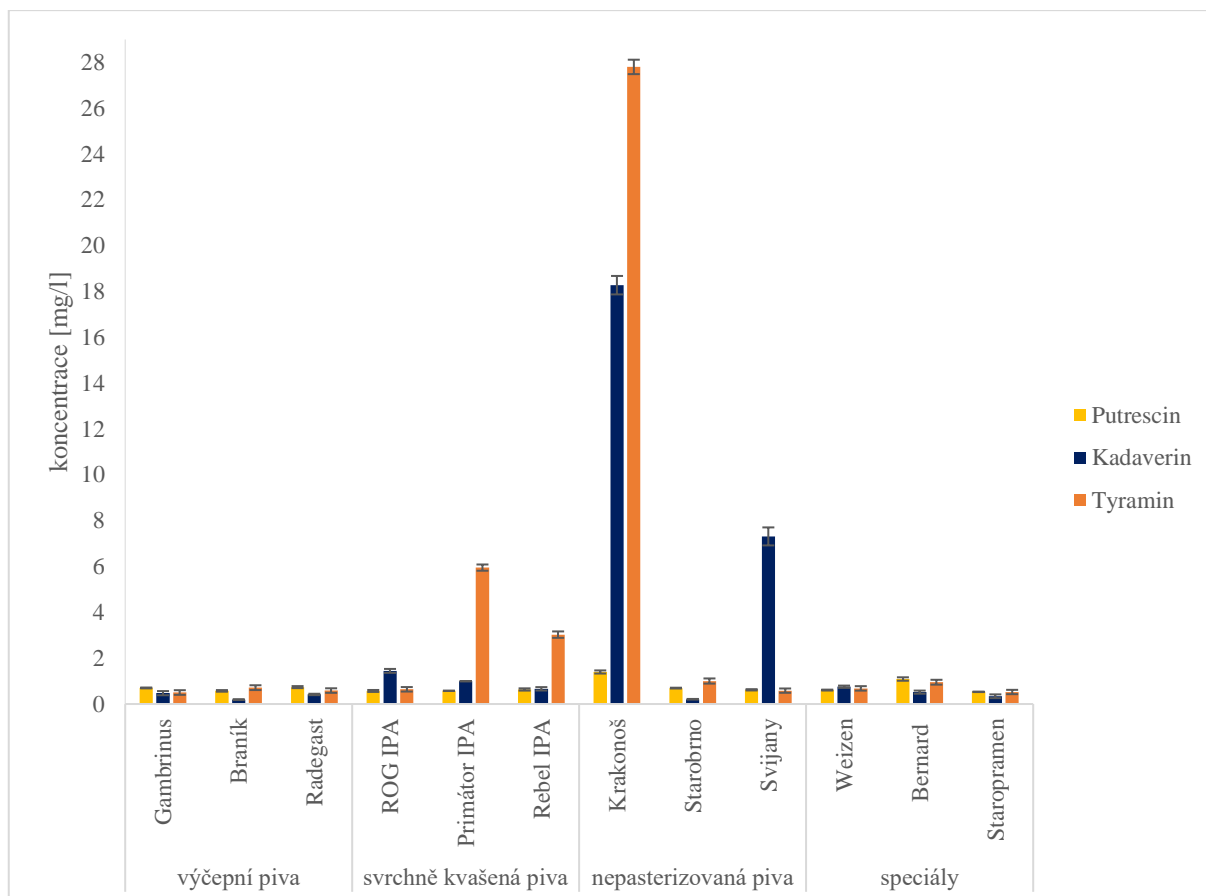


ze vstupních surovin. Další nepasterizovaný vzorek, tedy ležák Starobrno Medium, má však poměrně nízký celkový obsah BA, konkrétně  $1,904 \pm 0,144$  mg/l. Pravděpodobně tedy v obsahu BA hraje největší roli dodržování správných hygienických postupů při výrobě. Pokud se totiž mikroorganismy do piva nedostanou v žádné fázi výroby, není je potom třeba likvidovat pasterací.

U vzorků klasických výčepních piv byl celkový obsah BA nízký, a to v rozmezí od  $1,48 \pm 0,158$  mg/l u Braníku do  $1,741 \pm 0,173$  mg/l u vzorku Radegast Rázná 10. U těchto vzorků nebyl předpokládán vysoký obsah BA, jelikož jsou to piva pasterovaná, pocházející z velkých pivovarů, ve kterých se velmi dbá na striktní dodržování systému HACCP. To dokazuje také fakt, že u dvou vzorků ze tří tvoří téměř polovinu celkového obsahu BA putrescin, jehož výskyt je přirozený a většinou nesouvisí s mikrobiální kontaminací.

U vzorků svrchně kvašených piv byla celková koncentrace BA od  $2,658 \pm 0,225$  mg/l pro Radegast ROG IPA do  $7,525 \pm 0,153$  mg/l pro Rebel IPA. Lze tedy říci, že svrchně kvašená piva jsou na biogenní aminy bohatší než piva vyrobená spodním kvašením, která tvoří většinu zkonsumovaného piva v České republice. U vzorků Rebel IPA a Primátor IPA ( $4,326 \pm 0,263$  mg/l) tvořil většinu celkového množství BA tyramin, zatímco u třetího vzorku byl dominantním BA kadaverin.

Porovnání obsahu tří hlavních BA, které se vyskytovaly ve všech analyzovaných vzorcích, tedy putrescinu, kadaverinu a tyraminu, prezentuje obrázek 23.

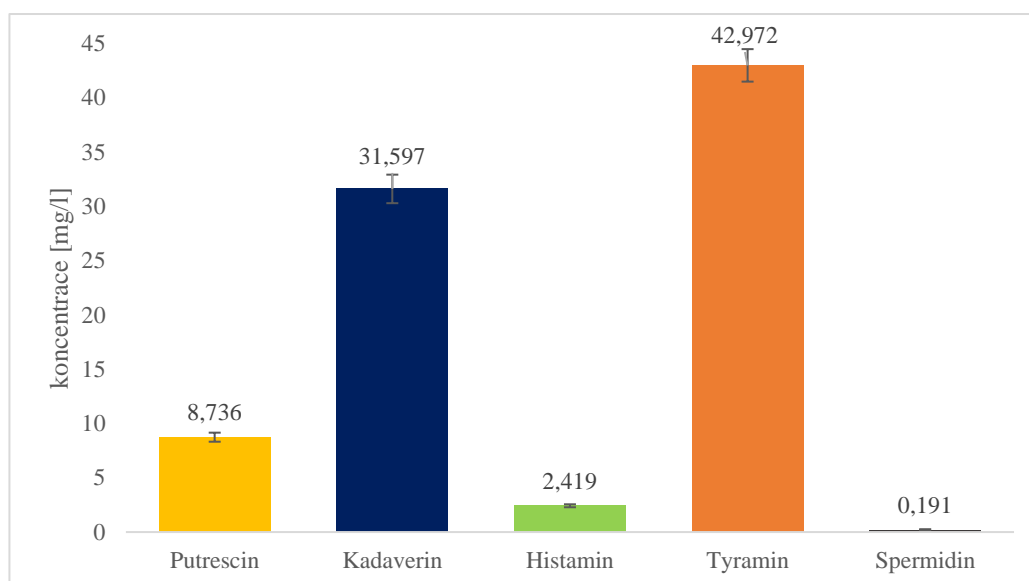


Obrázek 23: Porovnání obsahu putrescinu, kadaverinu a tyraminu ve vzorcích piv

Poslední kategorií analyzovaných piv jsou piva kvasnicová, pšeničná a nefiltrovaná. V nich se celkový obsah BA pohyboval v rozmezí  $1,394 \pm 0,186$  mg/l pro Staropramen Nefiltr Pšeničný až  $2,706 \pm 0,307$  mg/l pro Bernard Kvasnicové pivo 10. V obou jmenovaných vzorcích byl dominantním BA putrescin následován tyraminem, zatímco ve vzorku Primátor Weizen byl dominantní kadaverin. Ve všech těchto pivech byl detekován spermidin. Nejvyšší koncentrace spermidinu byla stanovena ve vzorku Primátor Weizen, konkrétně  $0,191 \pm 0,71$  mg/l, zatímco v pivu Staropramen Nefiltr koncentrace nebyla stanovena, jelikož se nacházela pod LOQ. Přítomnost spermidinu právě v těchto pivech lze vysvětlit přítomností kvasinek, v nichž se tento BA přirozeně vyskytuje. Primátor Weizen je pivo pšeničné svrchně kvašené a nefiltrované, což znamená, že obsahuje kvasinky, které běžně bývají odstraňovány filtrací. Bernard Kvasnicová 10 je pivo kvasnicové, což znamená, že kvasinky byly přidány do již hotového produktu. Toto pivo navíc není pasterizované, pravděpodobně proto také obsahuje nejvyšší celkové množství BA z těchto tří vzorků. Staropramen Nefiltr Pšeničný opět obsahuje kvasinky, které nebyly separovány filtrací. Všechna ostatní analyzovaná piva jsou filtrovaná, a kvasinky se v nich tedy nevyskytují, proto v nich spermidin nebyl detekován. Vzorek piva

Staropramen obsahoval nejnižší celkové množství BA ze všech analyzovaných vzorků. To může být dáno jednak nejnižším pH ze všech vzorků (4,29), nebo také přítomností jablečného a koriandrového extraktu.

Srovnání celkového obsahu jednotlivých BA v analyzovaných vzorcích piva uvádí obrázek 24. Nejzastoupenějším BA v analyzovaných vzorcích piva byl tyramin, jeho celková koncentrace ve všech vzorcích byla téměř 43 mg/l. Následoval kadaverin s celkovou koncentrací přes 31 mg/l a putrescin o obsahu téměř 9 mg/l. Celkový obsah histaminu a spermidinu byl nízký (2,419 mg/l, respektive 0,191 mg/l) vzhledem k tomu, že byly stanoveny každý pouze v jednom vzorku. Fakt, že je tyramin nejvíce zastoupeným BA ve vzorcích českých piv, je v souladu s výsledky studií [52] a [60]. Podle zjištění, že nejzastoupenějšími BA v analyzovaných vzorcích piva jsou tyramin a kadaverin, lze usuzovat, že v procesu výroby musely být přítomny dekarboxyláza-pozitivní mikroorganismy (např. laktobacily), které tyto dva zástupce BA vyprodukovaly. Tyto mikroorganismy mohly mít původ buď ve vstupních surovinách, které jimi byly kontaminované, nebo ke kontaminaci došlo až při výrobě kvůli nedodržení správných hygienických postupů.



Obrázek 24: Celkový obsah jednotlivých biogenních aminů ve 12 analyzovaných vzorcích piva

### 3.7.2 Výsledky analýzy reálných vzorků po zakoncentrování derivátů

Pro post-derivatizační zakoncentrování reálných vzorků piv byla použita optimalizovaná metoda MEPS, která je popsána v kapitole 2.4.4. Získané plochy píků zakoncentrovaných dansylderivátů měly být využity pro kvantifikaci BA ve vzorcích. V průběhu analýzy vzorků

však došlo k nasycení sorbentu v poslední MEPS jehle, která byla v laboratoři k dispozici. Vzhledem k době dodání nových BINů prodejcem, která byla odhadnuta na 5 týdnů, a k ceně jednoho balení s 5 BINy 13 000 Kč bez daně bylo přistoupeno ke kvantifikaci BA z nezakoncentrovaných vzorků. Tato extrakční technika se pro analýzu v běžné laboratoři ukázala jako velmi neekonomická, jelikož jednou jehlou plněnou sorbentem by bylo možné zakoncentrovat pouhých 6 vzorků. Také reprodukovatelnost této techniky je diskutabilní, jelikož jak se ukázalo při optimalizaci i následné analýze vzorků, velikost získané plochy píku analytu je velmi závislá na stavu sorbentu. Tedy zda analytik použije novou jehlu se sorbentem, nebo jehlu, na které bylo provedeno již např. 50 extrakcí. Životnost sorbentu 100 extrakcí, jak udává sám výrobce, je tedy pouze orientační.

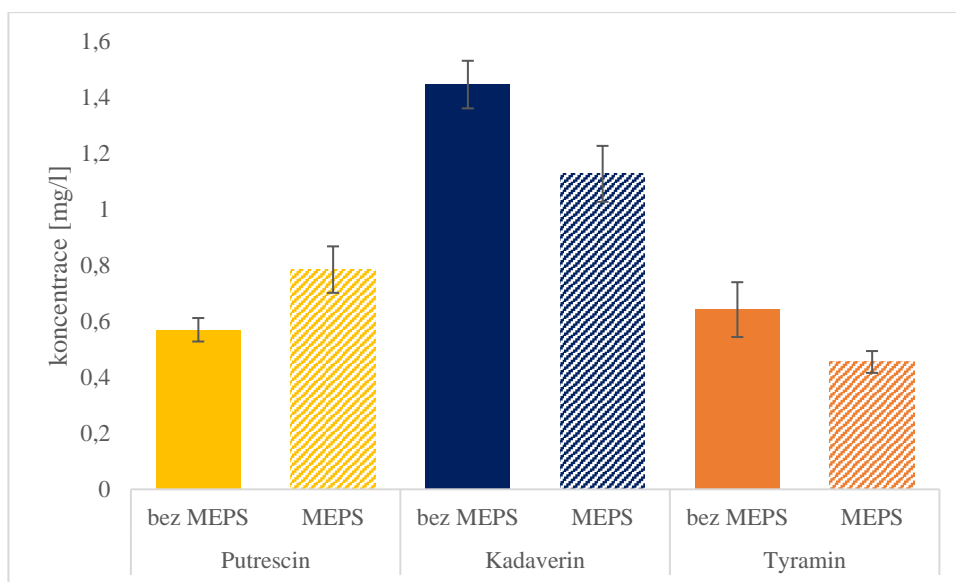
Přesto bylo provedeno zakoncentrování 5 vzorků, v nichž byly kvantifikovány BA stejným způsobem, jako u nezakoncentrovaných vzorků (kapitola 3.7.1), pouze za použití kalibrační přímky, která byla sestavena pro metodu MEPS. Stanovené koncentrace BA ve vzorcích po zakoncentrování prezentuje tabulka 21. Mezi výsledky s extrakcí a bez extrakce se vyskytují četné rozdíly. Po zakoncentrování bylo možné ve vzorcích stanovit isoamylamin. Ten byl nalezen v pivu Krakonoš, a to v koncentraci  $0,299 \pm 0,09$  mg/l, a ve vzorku Svijanský máz, konkrétně  $0,198 \pm 0,09$  mg/l. Tento BA je typický pro víno, v pivu příliš běžný není. Po zakoncentrování naopak nebyl detekován spermidin, který byl detekován ve třech vzorcích bez extrakce. Pravděpodobně by to mohlo být jeho vysokou retencí na použitý sorbent C18. Po zakoncentrování byl histamin stanoven nejen v pivu Krakonoš, ale také ve vzorku Svijanský máz, konkrétně  $0,173 \pm 0,052$  mg/l. Porovnání chromatogramů vzorků piv bez extrakce a s extrakcí jsou uvedeny v příloze IV.

Koncentrace BA v jednotlivých vzorcích piv stanovené bez extrakce a po extrakci technikou MEPS byly porovnány graficky. Obrázek 25 prezentuje srovnání pro vzorek Radegast ROG IPA, v němž byla po zakoncentrování stanovena nižší koncentrace kadaverinu o  $0,319$  mg/l a tyraminu o  $0,187$  mg/l. Koncentrace putrescinu u zakoncentrovaných derivátů byla naopak stanovena vyšší o  $0,215$  mg/l. Podobný trend platil pro stanovené obsahy BA ve vzorku piva Svijanský máz, jehož porovnání prezentuje obrázek 26. V tomto vzorku byl v případě stanoveného obsahu kadaverinu rozdíl mezi zakoncentrovaným a nezakoncentrovaným vzorkem dokonce  $2,984$  mg/l.

Tabulka 21: Obsah biogenních aminů v reálných vzorcích po extrakci derivátů

Vzorek	Obsah biogenního aminu [mg/l] <span style="float: right;">n = 6</span>					
	<i>Isoamylamin</i>	<i>Putrescin</i>	<i>Kadaverin</i>	<i>Histamin</i>	<i>Tyramin</i>	<b>BA celkem</b>
Radegast ROG IPA	<LOD	<b>0,785 ± 0,083</b>	<b>1,127 ± 0,100</b>	<LOD	<b>0,455 ± 0,039</b>	<b>2,367 ± 0,222</b>
Primátor IPA	<LOD	<b>0,550 ± 0,075</b>	<b>0,820 ± 0,094</b>	<LOD	<b>2,379 ± 0,297</b>	<b>3,749 ± 0,466</b>
Krakonoš světlý ležák 12	<b>0,299 ± 0,090</b>	<b>1,167 ± 0,087</b>	<b>11,601 ± 0,112</b>	<b>2,039 ± 0,051</b>	<b>27,783 ± 0,292</b>	<b>42,889 ± 0,632</b>
Starobrno Medium	<LOD	<b>0,623 ± 0,09</b>	<b>0,315 ± 0,082</b>	<LOD	<b>0,705 ± 0,042</b>	<b>1,643 ± 0,214</b>
Svijanský máz 11 %	<b>0,198 ± 0,090</b>	<b>0,667 ± 0,096</b>	<b>4,330 ± 0,100</b>	<b>0,173 ± 0,052</b>	<b>0,484 ± 0,030</b>	<b>5,852 ± 0,368</b>

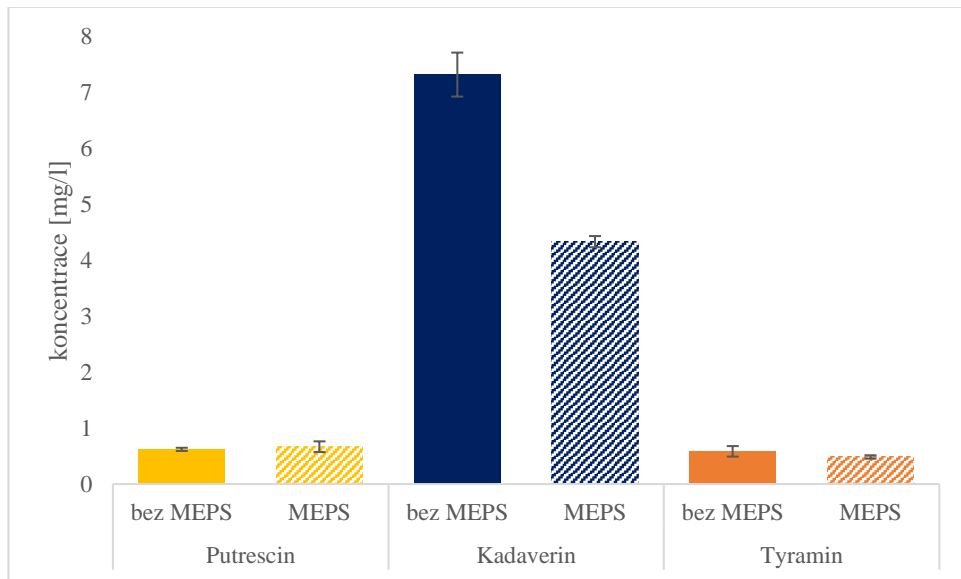
Obrázek 27 prezentuje srovnání pro vzorek Primátor IPA. Po zakoncentrování technikou MEPS byl stanoven o 0,085 mg/l nižší obsah putrescinu a o 0,649 mg/l nižší obsah tyraminu. Naopak kadaverinu bylo po zakoncentrování stanoveno o 0,157 mg/l více. Stejný trend platil také pro stanovené obsahy BA ve vzorku Starobrno Medium. Porovnání pro tento vzorek uvádí obrázek 28.



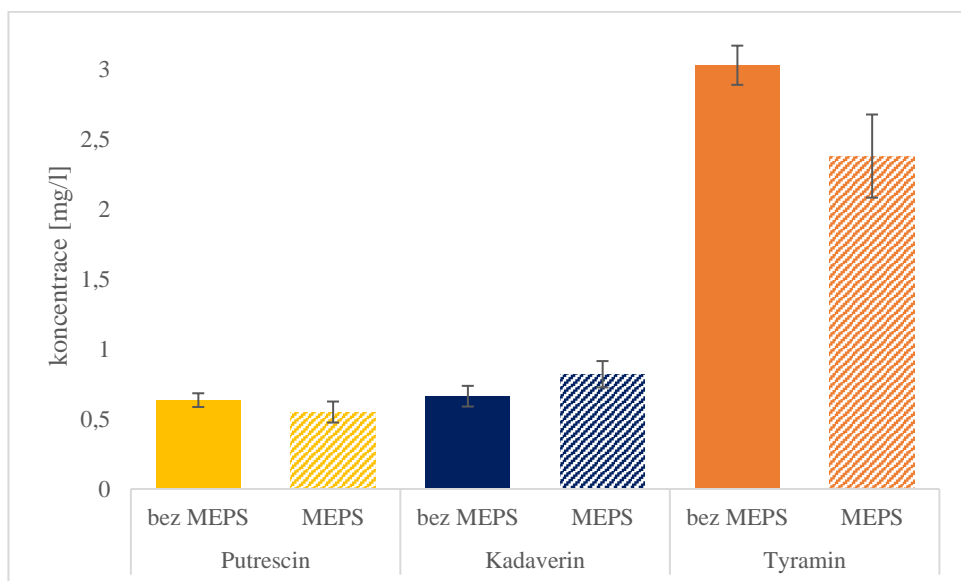
Obrázek 25: Porovnání obsahu aminů v pivu Radegast ROG IPA bez extrakce a s extrakcí

Srovnání výsledků pro vzorek nepasterizovaného světlého ležáku Krakonoš uvádí obrázek 29. V případě tohoto vzorku byl po zakoncentrování stanoven nižší obsah všech porovnávaných BA než bez zakoncentrování. Největší rozdíl byl zaznamenán u kadaverinu (rozdíl 6,677 mg/l).

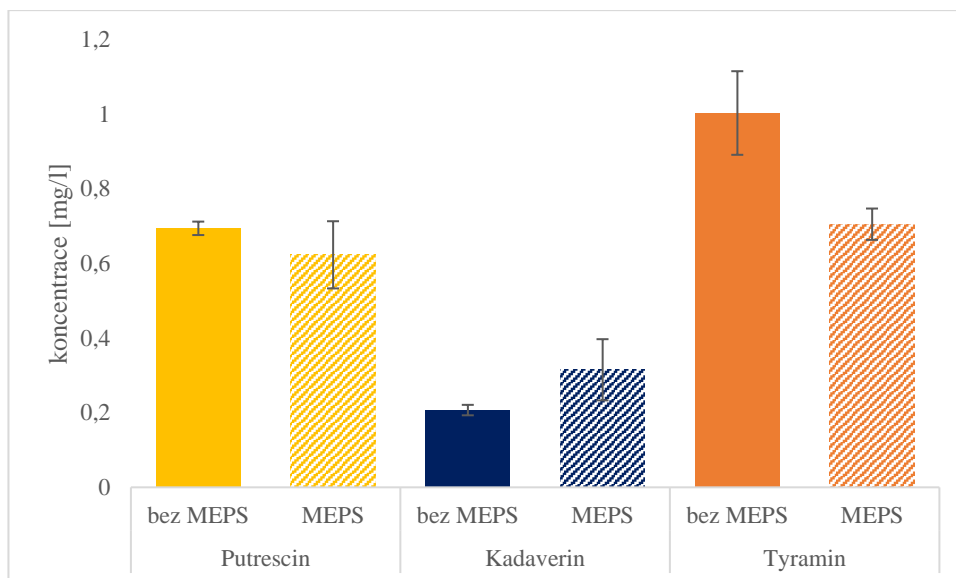
Naopak koncentrace tyraminu stanovená ze zakonzentrováných derivátů byla téměř totožná s koncentrací stanovenou bez extrakce.



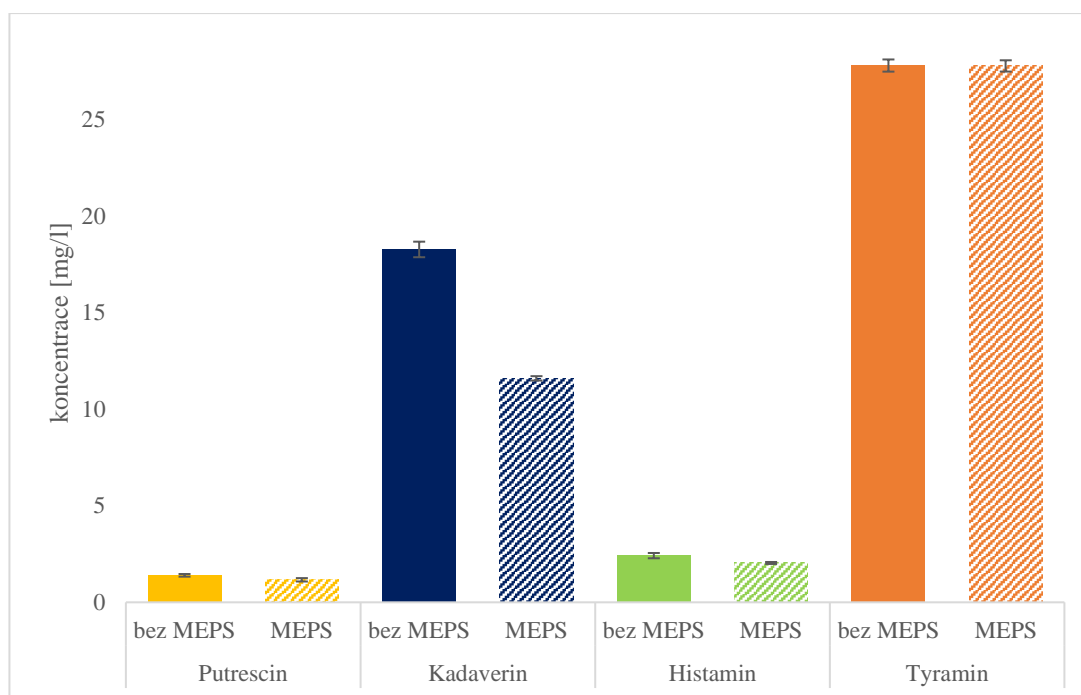
Obrázek 26: Porovnání obsahu aminů v pivu Svijanský máz bez extrakce a s extrakcí



Obrázek 27: Porovnání obsahu aminů v pivu Primátor IPA bez extrakce a s extrakcí



Obrázek 28: Porovnání obsahu aminů v pivu Starobrno Medium bez extrakce a s extrakcí



Obrázek 29: Porovnání obsahu aminů v pivu Krakonoš bez extrakce a s extrakcí

U všech vzorků bylo po zakoncentrování stanoveno nižší celkové množství BA než bez zakoncentrování. Ačkoliv by koncentrace BA stanovené po zakoncentrování technikou MEPS měly být stejné jako koncentrace stanovené z přímého nástřiku derivátů do HPLC systému, často byly výsledné koncentrace velmi odlišné. Důvodem mohou být jak odlišné chemické vlastnosti studovaných biogenních aminů, které vedou k rozdílné retenci vůči sorbentu C18,

tak interferující složky matrice (např. ethanol nebo aminokyseliny). Ty mohou blokovat část sorbentu, která potom již není volná pro sorpci analytů. Extrakcí pomocí MEPS patrně dochází ke ztrátě části dansylderivátů BA ze vzorků piva.

Technika MEPS se neprokázala jako vhodná pro zakoncentrování dansylderivátů biogenních aminů ze vzorků piva, a to hned z několika důvodů. Rutinní používání této extrakční techniky je neekonomické. Pokud je hlavním požadavkem analytika dosáhnout vysoké účinnosti extrakce, musí přistoupit k opakovanému nasávání menších objemů vzorku, čímž narůstá počet extrakcí provedených na jedné jehle se sorbentem. Tím se snižuje počet vzorků, jejichž celkovou extrakci lze provést na jedné jehle, vzhledem ke kapacitě sorbentu, která je 100 extrakcí. Při předpokládané ceně jednoho BINu cca 2 600 Kč bez daně se tak analýza většího množství vzorků může vyšplhat až na cenu v řádech desítek tisíc korun. Extrakce je také ovlivněna složkami matrice, takže při ní pravděpodobně dochází ke ztrátám derivátů BA. Účinnost extrakce je velmi proměnlivá v závislosti na povaze vzorku a konkrétního aminu. Pro některé BA by však tato technika mohla být vhodná, např. u tyraminu bylo dosaženo poměrně slušné účinnosti.



## 4 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat podmínky derivatizace dansylchloridem, následného zakoncentrování derivátů biogenních aminů ze vzorků piva a jejich separace technikou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí diodovým polem. Optimalizovaná metoda byla aplikována na celkem 12 vzorků piva čtyř různých druhů.

Teoretická část práce je zaměřena na biogenní aminy v potravinách, zejména v pivu, na možnosti jejich stanovení, zejména pomocí chromatografických technik, na možnosti extrakce z potravinové matrice a na způsoby derivatizace biogenních aminů. Stručně je zde popsána výroba piva a legislativa vztahující se k pivu.

Byla optimalizována teplota a čas derivatizační reakce, koncentrace derivatizačního činidla a odstranění jeho přebytku. Zvolena byla teplota 55 °C a čas 40 min, dansylchlorid o koncentraci 1 g/l a odstranění jeho přebytku L-prolinem. Pro zakoncentrování derivátů byla zvolena technika mikroextrakce tuhou fází s využitím stříkačky. U mikroextrakce byl proveden výběr vhodného sorbentu, byly optimalizovány koncentrace, objem a teplota elučního činidla a testována kapacita sorbentu. Nakonec bylo nutné optimalizovat také úpravu vzorků piva před derivatizací. Vzorek bylo nutné odplynit, přefiltrovat polyvinylpyrrolidonem a nakonec upravit pH.

Pro optimalizovanou metodu byly určeny meze detekce a meze stanovitelnosti jednotlivých biogenních aminů. Pro optimalizovanou metodu mikroextrakce byla vypočítána extrakční účinnost pro jednotlivé biogenní aminy.

U 12 vzorků piva byl sledován obsah devíti biogenních aminů, konkrétně tryptaminu, fenylethylaminu, isoamylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu, sperminu a spermidinu. Ve všech analyzovaných vzorcích piva se vyskytovaly putrescin, kadaverin a tyramin. Naopak v žádném vzorku nebyly detekovány fenylethylamin a spermin. Tryptamin nebylo možné ve vzorcích stanovit, protože eluoval ve stejný čas jako dansylderivát ethanolu. Nejzastoupenějším biogenním aminem byl tyramin, následovaly kadaverin a putrescin. Nejvyšší celkový obsah biogenních aminů byl stanoven v nepasterizovaném světlém ležáku Krakonoš, konkrétně 49,898 mg/l. Tato koncentrace je sice poloviční než koncentrace uváděná jako zdraví nebezpečná, avšak pro citlivé jedince může být i přesto považována za rizikovou.

Použitá technika zakoncentrování dansylderivátů biogenních aminů, tedy mikroextrakce tuhým sorbentem s využitím stříkačky, se ukázala jako neekonomická. Také při ní docházelo ke ztrátám části derivátů a k velkému vlivu matrice vzorků, který ovlivňoval její účinnost.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VELÍŠEK, J. a J. HAJŠLOVÁ. *CHEMIE POTRAVIN 2*. Rozšířené a přepracované 3. vydání. Havlíčkův Brod: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [2] KABIR, A., A. MOCAN, S. PICCOLANTONIO, E. SPERANDIO, H. I. ULUSOY a M. LOCATELLI. Analysis of Amines. In: SILVA, A. S., S. F. NABAVI, M. SAEEDI a S. M. NABAVI. *Recent Advances in Natural Products Analysis*. Elsevier, 2020, s. 569–591. ISBN 978-0-12-817519-4.
- [3] SAAD, B. a R. TOFALO. *Biogenic Amines in Food: Analysis, Occurrence and Toxicity*. Londýn: The Royal Society of Chemistry, 2020. ISBN 978-1-78801-581-3.
- [4] ABDULLAH, K. O., R. M. REBIN, P. S. MOHAMMED ABEEN, A. A. ZANIAR a K. EKICI. Presence of biogenic amines in food and their public health implications: A review. *Journal of Food Protection*. 2021, **84**(9), 1539–1548.
- [5] GERHARDTOVÁ, I., J. SOKOL, M. MALIAROVÁ, N. MARTINKA a T. JANKECH. Stanovenie biogénnych amínov vo vzorkách potravín a nápojov. *Chemické listy*. 2022, **116**, 528–535.
- [6] PRESTER, L. Biogenic amines in ready-to-eat foods. In: KOTZEKIDOU, P., ed. *Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods*. Elsevier, 2016, s. 397–416. ISBN-978-0-12-802008-1.
- [7] TSAFACK, P. B. a A. TSOPMO. Effects of bioactive molecules on the concentration of biogenic amines in foods and biological systems. *Heliyon*. 2022, **8**(9), e10456.
- [8] SARKADI, L. S. Biogenic Amines in Fermented Foods and Health Implications. In: FRIAS, J., C. MARTINEZ-VILLALUENGA a E. PEÑAS. *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*. Elsevier, 2017, s. 625–651. ISBN 978-0-12-802549-9.
- [9] DOEUN, D., M. DAVAATSEREN a MS CHUNG. Biogenic amines in foods. *Food Science and Biotechnology*. 2017, **26**, 1463–1474.
- [10] WÓJCIK, W., M. ŁUKASIEWICZ a K. PUPPEL. Biogenic amines: formation, action and toxicity - a review. *Journal of the science of food and agriculture*. 2021, **101**(7), 2634–2640.
- [11] EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods: EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). *EFSA Journal*. Parma, 2011, **9**(10), 2393.

- [12] KOVACOVA-HANUSKOVA, E., T. BUDAY, S. GAVLIAKOVA a J. PLEVKOVA. Histamine, histamine intoxication and intolerance. *Allergologia et Immunopathologia*. 2015, **43**(5), 498–506.
- [13] Histamin. In: *Informační centrum bezpečnosti potravin* [online]. Praha: Ministerstvo zemědělství [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: <https://bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76786.aspx>
- [14] RUIZ-CAPILLAS, C. a A. M. HERRERO. Impact of Biogenic Amines on Food Quality and Safety. *Foods*. 2019, **8**(2), 62.
- [15] NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 1019/2013, kterým se mění příloha I nařízení (ES) č. 2073/2005, pokud jde o histamin v produktech rybolovu. In: Úřední věstník Evropské unie. 2013, ročník 2013, číslo 1019. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/HTML/?uri=CELEX:32013R1019&qid=1669828695255&from=EN>
- [16] Vyhláška č. 298/1997 Sb., kterou se stanoví chemické požadavky na zdravotní nezávadnost jednotlivých druhů potravin a potravinových surovin, podmínky jejich použití, jejich označování na obalech, požadavky na čistotu a identitu přídatných látek a potravních doplňků a mikrobiologické požadavky na potravní doplňky a látky přídatné. In: Sbíрка zákonů, 1997, ročník 1997, číslo 298. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1997-298>
- [17] COMAS-BASTÉ, O., S. SÁNCHEZ-PÉREZ, M. T. VECIANA-NOGUÉS, M. LATORRE-MORATALLA a M. DEL CARMEN VIDAL-CAROU. Histamine Intolerance: The Current State of the Art. *Biomolecules*. 2020, **10**(8), 1181
- [18] GAO, X., C. LI, R. HE, Y. ZHANG, B. WANG, Z.-H. ZHANG a Ch.-T. HO. Research advances on biogenic amines in traditional fermented foods: Emphasis on formation mechanism, detection and control methods. *Food Chemistry*. 2023, **405**(A), 134911.
- [19] BELITZ, H.-D., W. GROSCH a P. SCHIEBERLE. *Food Chemistry*. 4. Berlín: Springer, 2009. ISBN 978-3-540-69934-7.
- [20] MIETZ, J. L. a E. KARMAS. CHEMICAL QUALITY INDEX OF CANNED TUNA AS DETERMINED BY HIGH-PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY. *Journal of Food Science*. 1977, **42**(1), 155–158.
- [21] KALACĚ, P. a M. KRĚŽEK. A Review of Biogenic Amines and Polyamines in Beer. *Journal of the Institute of Brewing*. 2003, **109**, 123–128.

- [22] *Narizení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 852/2004 o hygieně potravin*. In: Úřední věstník Evropské unie, 2004, ročník 2004, číslo 852. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/HTML/?uri=CELEX:32004R0852&from=EN>
- [23] KAROVIČOVÁ, J. a Z. KOHAJDOVÁ. Biogenic Amines in Food. *Chemical Papers*. 2005, **59**(1), 70–79.
- [24] ORDÓÑEZ, J. L., A. M. TRONCOSO, M. D. C. GARCÍA-PARRILLA a R. M. CALLEJÓN. Recent trends in the determination of biogenic amines in fermented beverages – A review. *Analytica Chimica Acta*. 2016, **393**, 10–25.
- [25] MOHAMMED, G. I., A. S. BASHAMMAKH, A. A. ALSIBAAI, H. ALWAEEL a M. S. EL-SHAHAWI. A critical overview on the chemistry, clean-up and recent advances in analysis of biogenic amines in foodstuffs. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016, **78**, 84–94.
- [26] SENTELLAS, S., Ó. NÚÑEZ a J. SAURINA. Recent Advances in the Determination of Biogenic Amines in Food Samples by (U)HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016, **64**(41), 7667-7898.
- [27] ČÁSLAVSKÝ, J. a J. G. K. ŠEVČÍK. *Organická analýza*. Český Těšín: 2 THETA, 2022. ISBN 978-80-88279-17-4.
- [28] POOLE, C. F. *Solid-Phase Extraction*. Elsevier, 2020. ISBN 978-0-1281-6907-0.
- [29] CHURÁČEK, J. a kol. *Analytická separace látek*. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 80-03-00569-8.
- [30] POOLE, C. F. *Liquid-Phase Extraction*. Elsevier, 2020. ISBN 978-0-1281-6912-4.
- [31] SELF, R. *Extraction of Organic Analytes from Foods - A Manual of Methods*. Cambridge: Royal Society of Chemistry (RSC), 2005. ISBN 978-1-61583-360-3.
- [32] PIASTA, A. M., A. JASTRZĘBSKA, M. P. KRZEMIŃSKI, T. M. MUZIOŁ a E. SZYK. New procedure of selected biogenic amines determination in wine samples by HPLC. *Analytica Chimica Acta*. 2014, **834**, 58–66.
- [33] LOUKOU, Z. a A. ZOUTOU. 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**(1–2), 103–113.

- [34] NERÍN, C., J. SALAFRANCA a M. AZNAR. Critical review on recent developments in solventless techniques for extraction of analytes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009, **393**, 809–833.
- [35] BASHEER, C., W. WONG, A. MAKAHLEH, A. A. TAMEEM, A. SALHIN, B. SAAD a K. H. LEE. Hydrazone-based ligands for micro-solid phase extraction-high performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in orange juice. *Journal of Chromatography A*. 2011, **1218**(28), 4332–4339.
- [36] CUNHA, S. C., J. O. FERNANDES a M. B. P. P. OLIVEIRA. Current Trends in Liquid-Liquid Microextraction for Analysis of Pesticide Residues in Food and Water. In: STOYTCHIEVA, M., ed. *Pesticides - Strategies for Pesticides Analysis*. Rijeka: InTech, 2011, s. 1–26. ISBN 978-953-307-460-3.
- [37] ALMEIDA, C., J. O. FERNANDES a S. C. CUNHA. 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**(1), 380–388.
- [38] PEDERSEN-BJERGAARD, S. a K. E. RASMUSSEN. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid–liquid extraction. *Journal of Chromatography A*. 2008, **1184**(1–2), 132–142.
- [39] SAAID, M., B. SAAD, A. S. M. ALI, M. I. SALEH, C. BASHEER a H. K. LEE. In situ derivatization hollow fibre liquid-phase microextraction for the determination of biogenic amines in food samples. *Journal of Chromatography A*. 2009, **1216**(27), 5165–5170.
- [40] YANG, L., R. SAID a M. ABDEL-REHIM. Sorbent, device, matrix and application in microextraction by packed sorbent (MEPS): A review. *Journal of Chromatography B*. 2017, **1043**, 33–43.
- [41] MOEIN, M. M., A. ABDEL-REHIM a M. ABDEL-REHIM. Microextraction by packed sorbent (MEPS). *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2015, **67**, 34–44.
- [42] JAIN, A. a K. K. VERMA. Strategies in liquid chromatographic methods for the analysis of biogenic amines without and with derivatization. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2018, **109**, 62–82.
- [43] DONG, M. W. *Modern HPLC for Practicing Scientists*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2006. ISBN 978-0-471-72789-7.

- [44] NOVÁKOVÁ, L., M. DOUŠA a kol. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha: vlastním nákladem, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [45] POOLE, C. F. *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*. 2. Elsevier, 2017. ISBN 978-0-12-805393-5.
- [46] ÖNAL, A., S. E. K. TEKKELI a C. ÖNAL. A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*. 2013, **138**(1), 509–515.
- [47] ERIM, F. B. Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2013, **52**, 239–247.
- [48] MUNIR, M. A. a K. H. BADRI. The Importance of Derivatizing Reagent in Chromatography Applications for Biogenic Amine Detection in Food and Beverages. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2020, **2020**, 5814389.
- [49] ÖNAL, A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*. 2007, **103**(4), 1475–1486.
- [50] NALAZEK-RUDNICKA, K., W. WOJNOWSKI a A. WASIK. Occurrence and Levels of Biogenic Amines in Beers Produced by Different Methods. *Foods*. 2021, **10**(12), 2902.
- [51] CIONT, C., A. EPURAN, A. D. KEREZSI, T. E. COLDEA, E. MUDURA, A. PASQUALONE, H. ZHAO, R. SUHAROSCHI, F. VRIESEKOOOP a O. L. POP. Beer Safety: New Challenges and Future Trends within Craft and Large-Scale Production. *Foods*. 2022, **11**(17), 2693.
- [52] LORENCOVÁ, E., R. N. SALEK, M. ČERNÍKOVÁ, L. BUŇKOVÁ, A. HÝLKOVÁ a F. BUŇKA. Biogenic amines occurrence in beers produced in Czech microbreweries. *Food Control*. 2020, **117**, 107335.
- [53] CHLÁDEK, L. *Pivovarnictví*. 1. Praha: Grada Publishing, a. s., 2007. ISBN 978-80-247-6623-2.
- [54] *Vyhláška č. 248/2018 Sb., o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí*. In: Sbíрка zákonů, 2018, ročník 2018, číslo 248. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2018-248>
- [55] *Nářízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011 o poskytování informací o potravinách spotřebitelům*. In: Úřední věstník EU. 2011. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/cs/ALL/?uri=CELEX:32011R1169>

- [56] GALARCE, O., K. HENRÍQUEZ-AEDO, D. PETERSSEN, C. PEÑA-FARFAL a M. ARANDA. A Selective Chromatographic Method to Determine the Dynamic of Biogenic Amines During Brewing Process. *Food Analytical Methods*. 2016, **9**, 3385–3395.
- [57] ROMERO, R., M. G. BAGUR, M. SÁNCHEZ-VIÑAS a D. GÁZQUES. The influence of the brewing process on the formation of biogenic amines in beers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2003, **376**, 162–167.
- [58] POVEDA, J. M., P. RUIZ, S. SESEÑA a M. L. PALOP. Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria during a craft brewing process. *LWT - Food Science and Technology*. 2017, **85(A)**, 129–136.
- [59] HALÁSZ, A., Á. BARÁTH a W. H. HOLZAPFEL. The biogenic amine content of beer; the effect of barley, malting and brewing on amine concentration. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Lebensmittelforschung A*. 1999, **208**, 418–423.
- [60] BUŇKA, F., P. BUDINSKÝ, M. ČECHOVÁ, V. DRIENOVSKÝ, V. PACHLOVÁ, D. MATOULKOVÁ, V. KUBÁŇ a L. BUŇKOVÁ. Content of biogenic amines and polyamines in beers from the Czech Republic. *Journal of the Institute of Brewing*. 2012, **118(2)**, 213–216.
- [61] AFLAKI, F., V. GHOULIPOUR, N. SAEMIAN a M. SALAHINEJAD. A simple method for benzoyl chloride derivatization of biogenic amines for high performance liquid chromatography. *Analytical Methods*. 2014, **6**, 1482–1487.
- [62] TIRİS, G., R. S. YANIKOĞLU, B. CEYLAN, D. EGELI, E. K. TEKKELI a A. ÖNAL. A review of the currently developed analytical methods for the determination of biogenic amines in food products. *Food Chemistry*. 2023, **398**, 133919.
- [63] LOUKOU, Z. a A. ZOUTOU. A Comparative Survey of the Simultaneous Ultraviolet and Fluorescence Detection in the RP-HPLC Determination of Dansylated Biogenic Amines in Alcoholic Beverages. *Chromatographia*. 2003, **58**, 579–585.
- [64] ANGULO, M. F., M. FLORES, M. ARANDA a K. HENRIQUEZ-AEDO. Fast and selective method for biogenic amines determination in wines and beers by ultra high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry*. 2020, **309**, 125689.

- [65] NALAZEK-RUDNICKA, K., P. KUBICA a A. WASIK. Discrepancies in determination of biogenic amines in beer samples by reversed phase and hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*. 2020, **159**, 105574.
- [66] GIANOTTI, V., U. CHIUMINATTO, E. MAZZUCCO, F. GOSETTI, M. BOTTARO, P. FRASCAROLO a M. C. GENNARO. 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**(2), 296–300.
- [67] DANIEL, D., V. B. DOS SANTOS, D. T. R. VIDAL a C. L. DO LAGO. Determination of biogenic amines in beer and wine by capillary electrophoresis–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2015, **1416**, 121–128.
- [68] JONÁKOVÁ, M. *Vývoj metody pro stanovení biogenních aminů v potravinách*. Pardubice, 2019. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická.
- [69] INNOCENTE, N., M. BIASUTTI, M. PADOVESE a S. MORET. Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract. *Food Chemistry*. 2007, **101**(3), 1285–1289.
- [70] PRETI, R., M. L. ANTONELLI, R. BERNACCHIA a G. VINCI. Fast determination of biogenic amines in beverages by a core–shell particle column. *Analytical Methods*. 2015, **187**, 555–562.
- [71] PAWUL-GRUBA, M., T. KILJANEK, A. MADEJSKA a J. OSEK. Development of a High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector (HPLC-DAD) Method for Determination of Biogenic Amines in Ripened Cheeses. *Molecules*. 2022, **27**(23), 8194.
- [72] AI, Y., Y. N. SUN, L. LIU, F. Y. YAO, Y. ZHANG, F. Y. GUO, W. J. ZHAO, J. L. LIU a N. ZHANG. Determination of Biogenic Amines in Different Parts of *Lycium barbarum* L. by HPLC with Precolumn Dansylation. *Molecules*. 2021, **26**(4), 1046.
- [73] PANÁČKOVÁ, V. *Analýza vybraných polyfenolických látek v ječném a pšeničném sladech*. Pardubice, 2016. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická.



## **SEZNAM PŘÍLOH**

Příloha I: Grafy kalibračních závislostí bez zakoncentrování

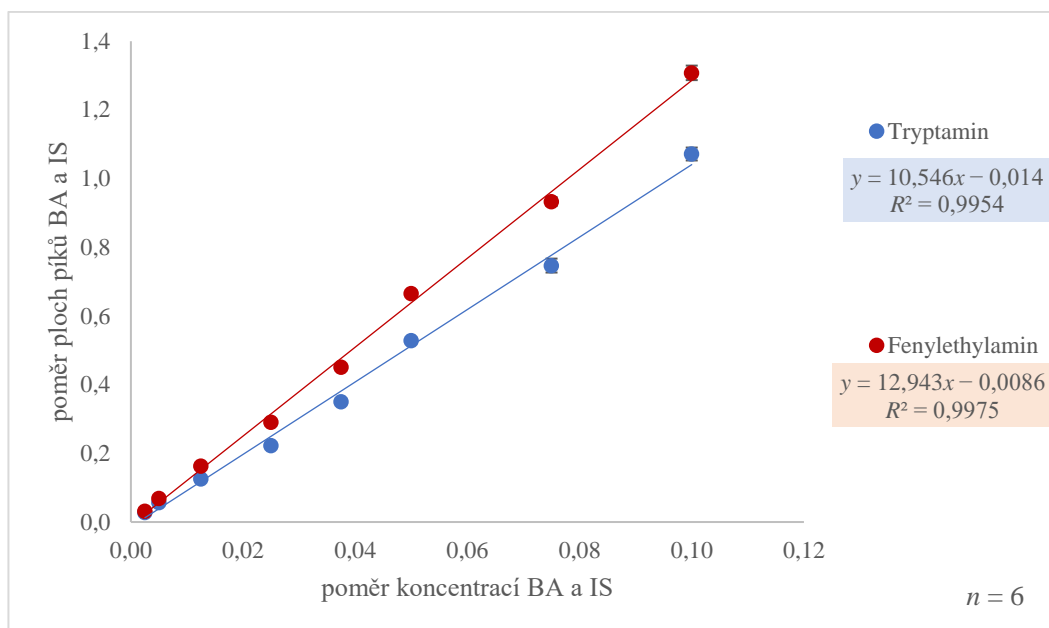
Příloha II: Grafy kalibračních závislostí po zakoncentrování

Příloha III: Chromatogramy reálných vzorků piv bez zakoncentrování

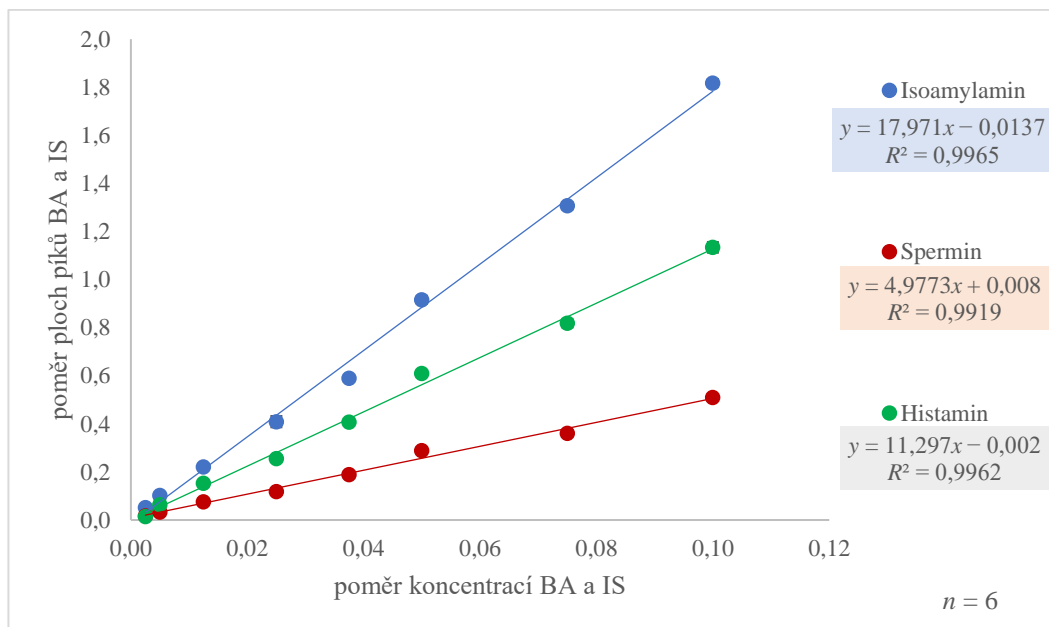
Příloha IV: Chromatogramy zakoncentrovaných derivátů ze vzorků piv

# PŘÍLOHY

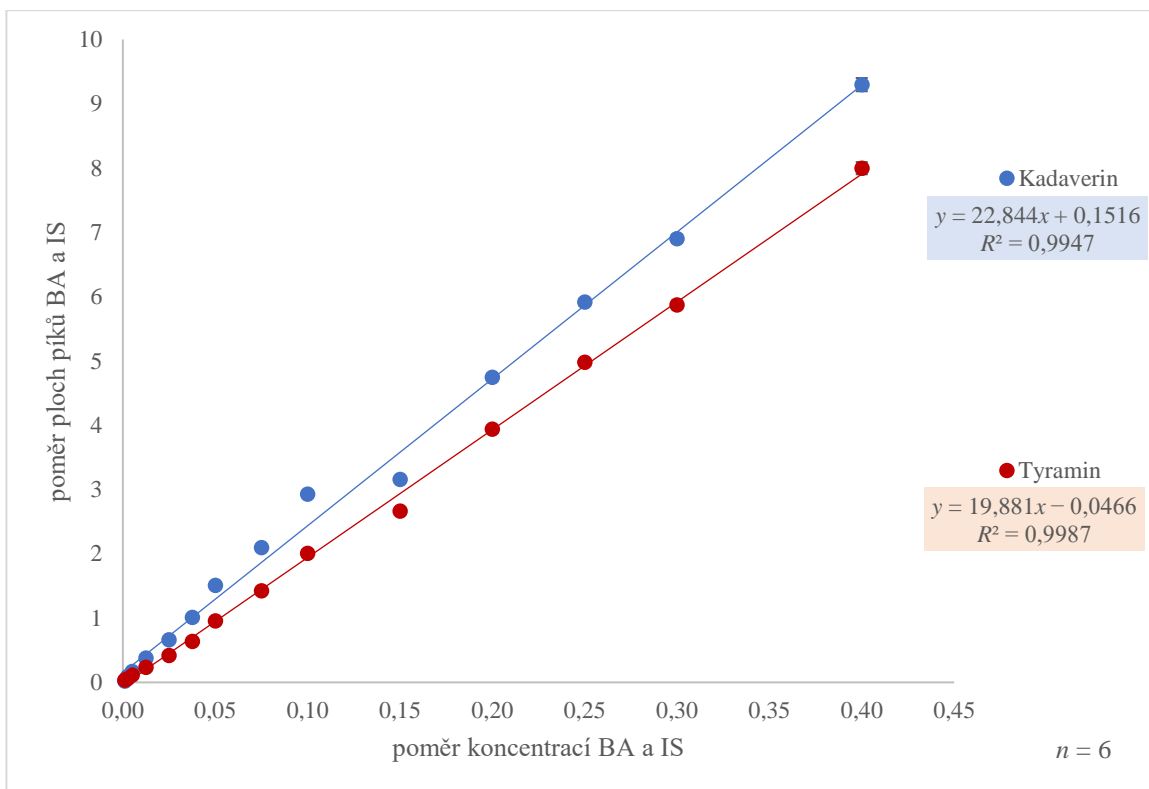
## Příloha I: Grafy kalibračních závislostí bez zakoncentrování



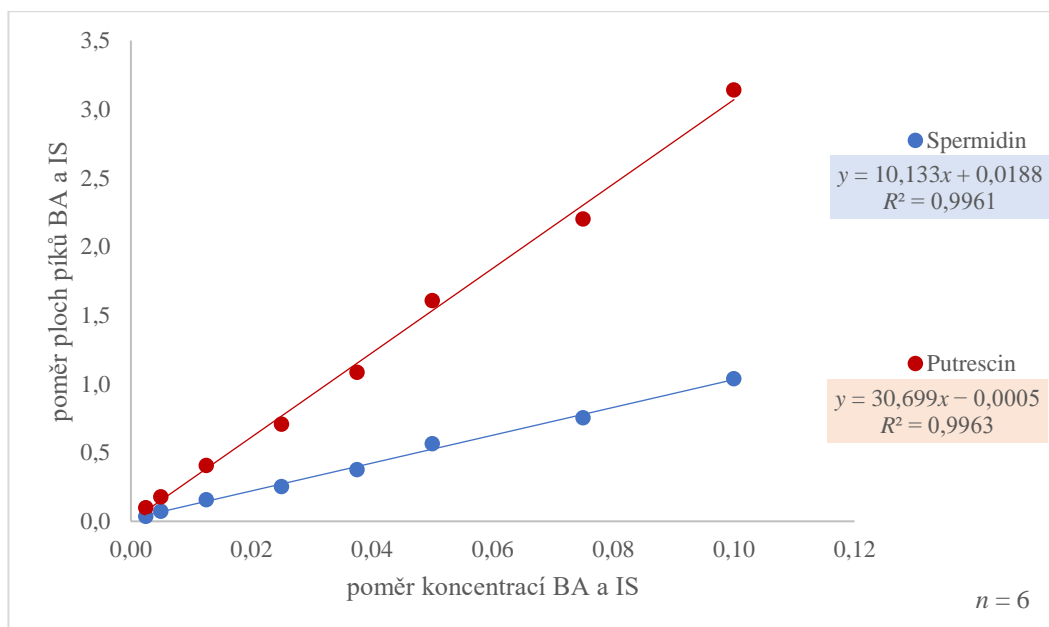
Obrázek I - 1: Kalibrační závislost tryptaminu a fenylethylaminu



Obrázek I - 2: Kalibrační závislost isoamylaminu, sperminu a histaminu

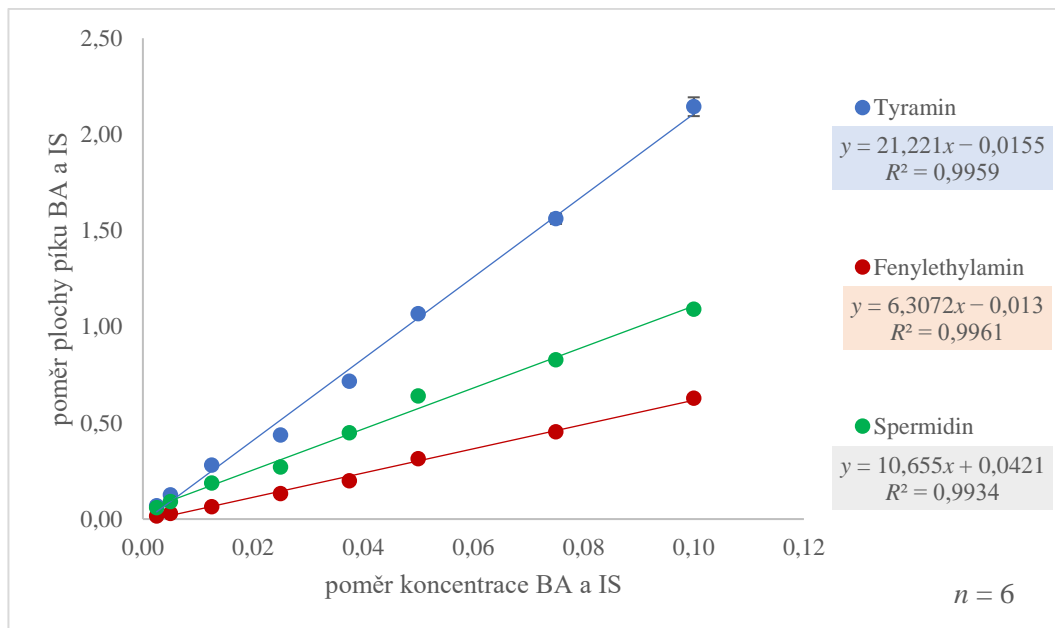


Obrázek I - 3: Kalibrační závislost kadaverinu a tyraminu

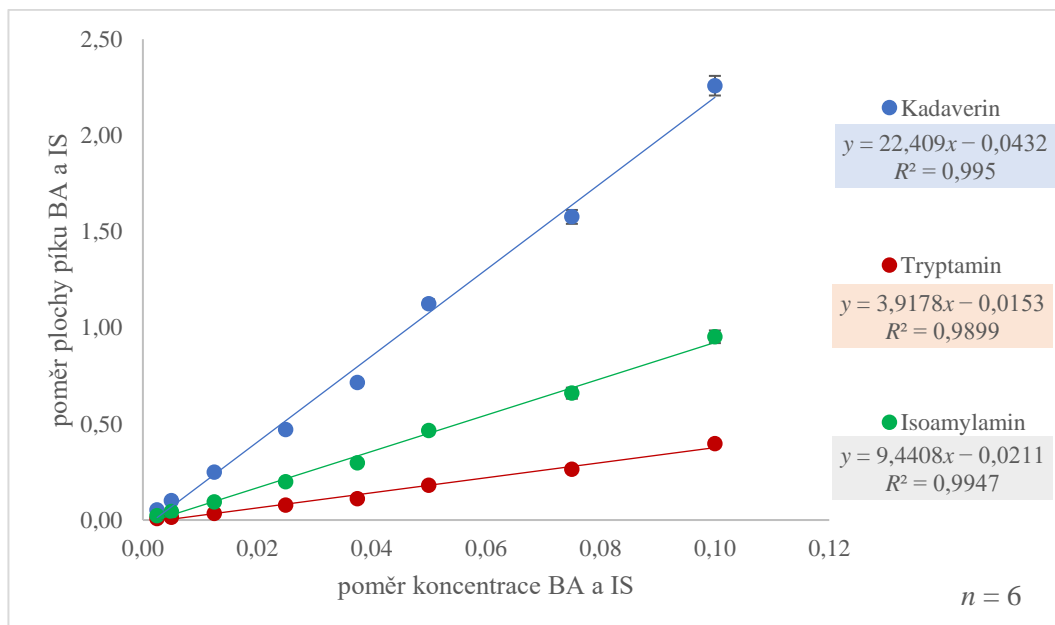


Obrázek I - 4: Kalibrační závislost putrescinu a spermidinu

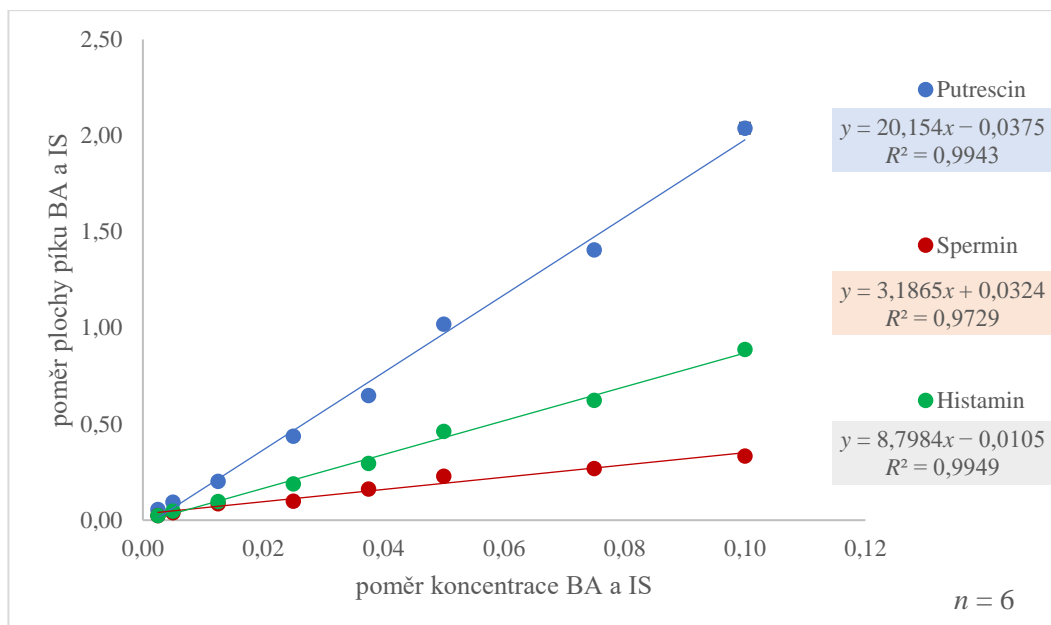
## Příloha II: Grafy kalibračních závislostí po zakoncentrování



Obrázek II - 1: Kalibrační závislosti tyraminu, fenylethylaminu a spermidinu po zakoncentrování

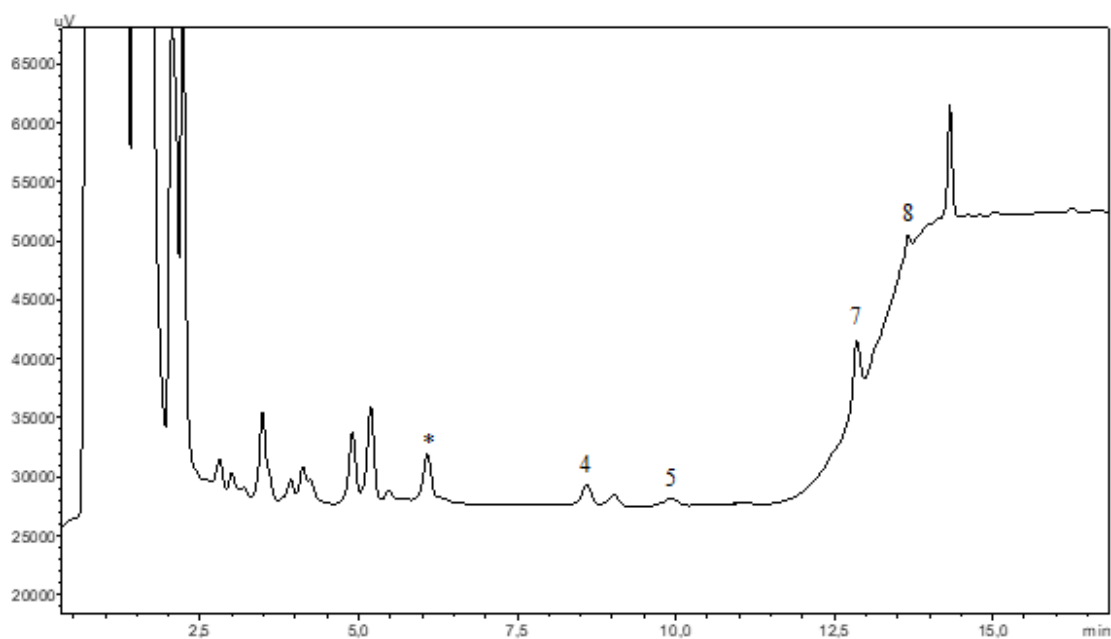


Obrázek II - 2: Kalibrační závislost kadaverinu, tryptaminu a isoamylaminu po zakoncentrování

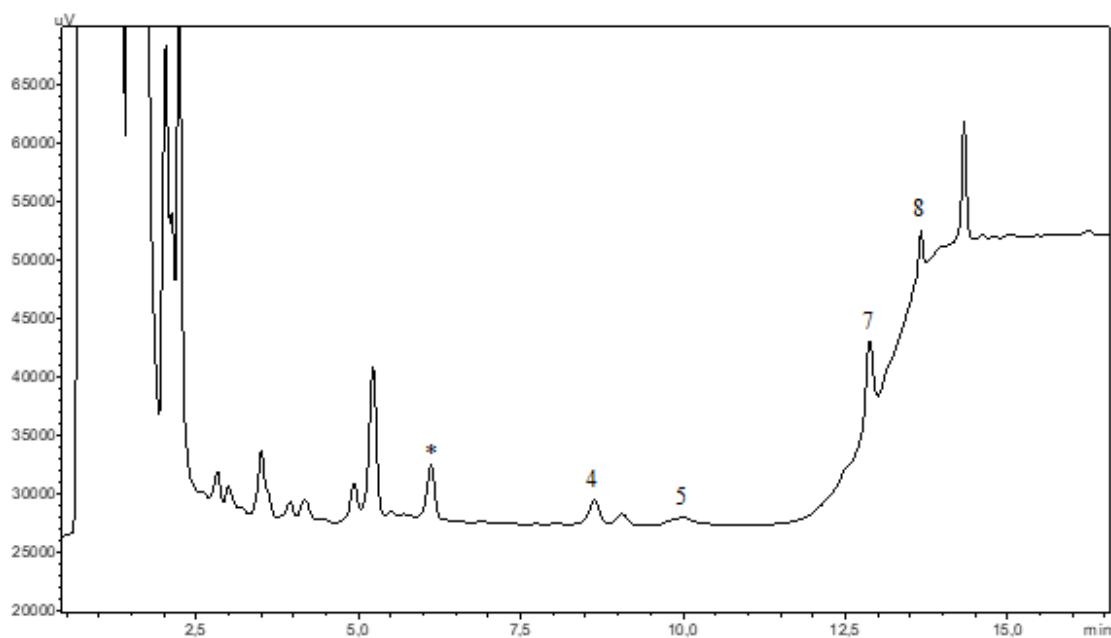


Obrázek II - 3: Kalibrační závislost putrescinu, sperminu a histaminu po zakoncentrování

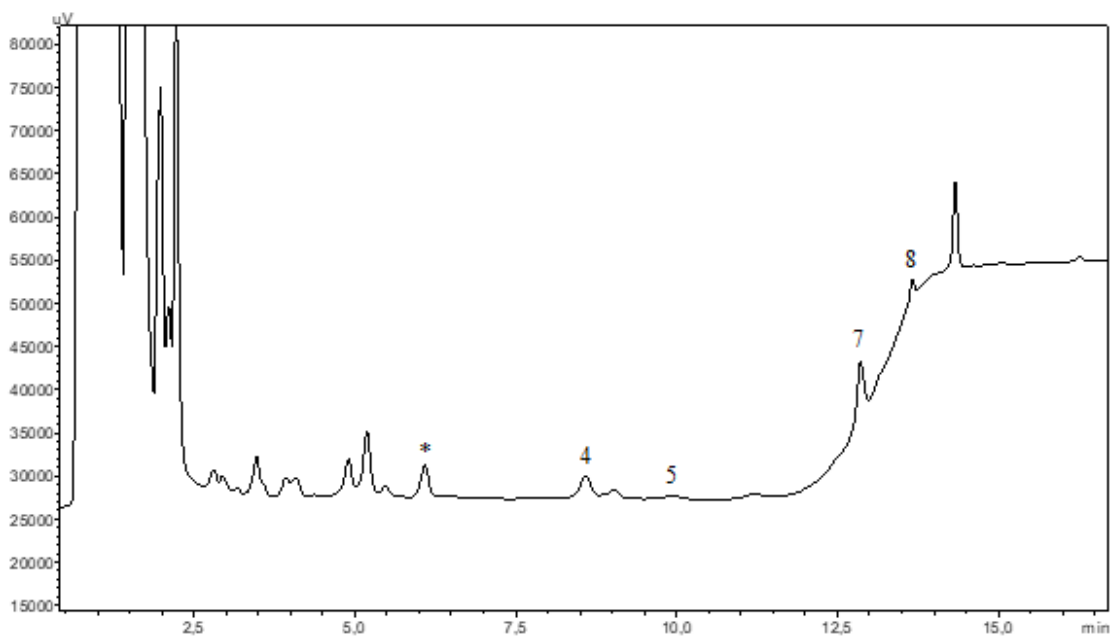
### Příloha III: Chromatogramy reálných vzorků piv bez zakoncentrování



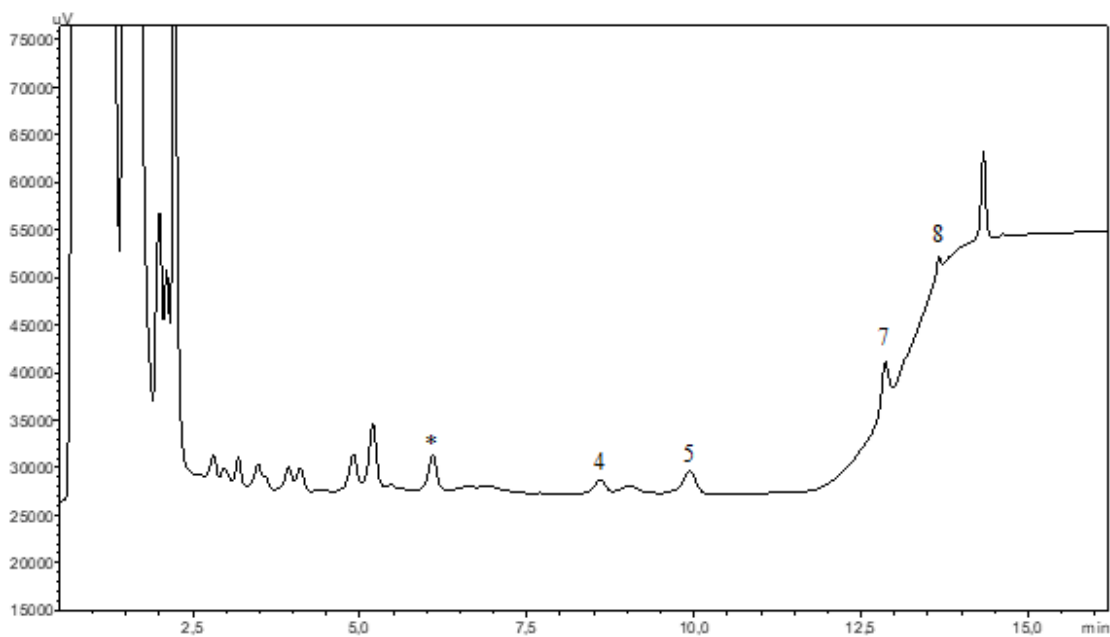
Obrázek III - 1: Chromatogram výčepního piva Gambrinus Originál 10 bez zakoncentrování  
4 – putrescin, 5 – kadaverin, 7 – 1,7-diaminoheptan (IS), 8 – tyramin, \* – ethanol



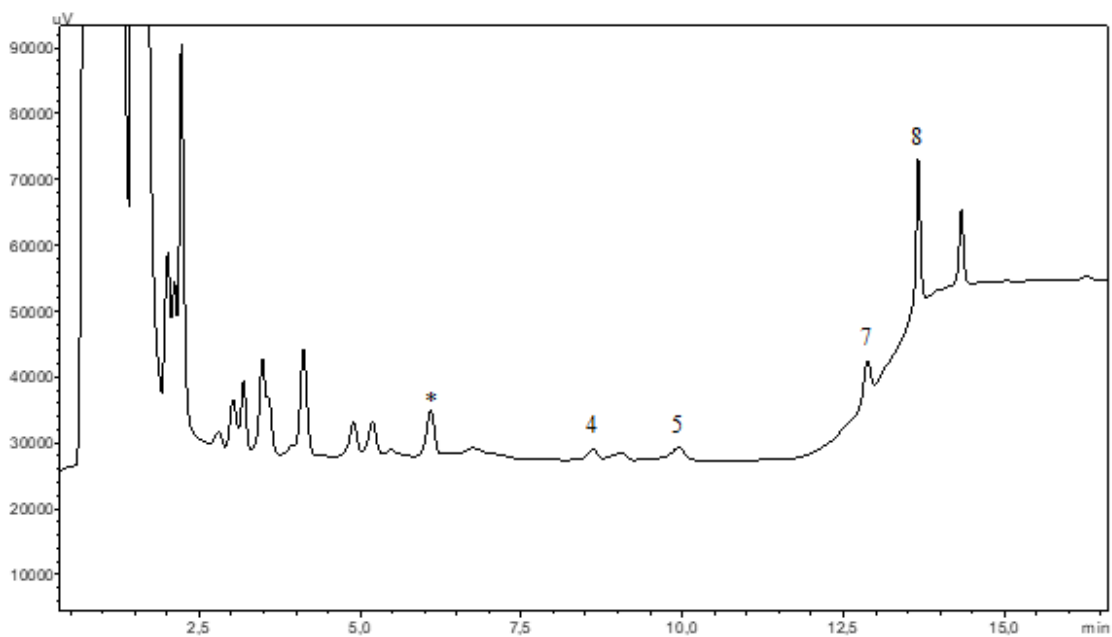
Obrázek III - 2: Chromatogram výčepního piva Braník světlý bez zakoncentrování  
4 – putrescin, 5 – kadaverin, 7 – 1,7-diaminoheptan (IS), 8 – tyramin, \* – ethanol



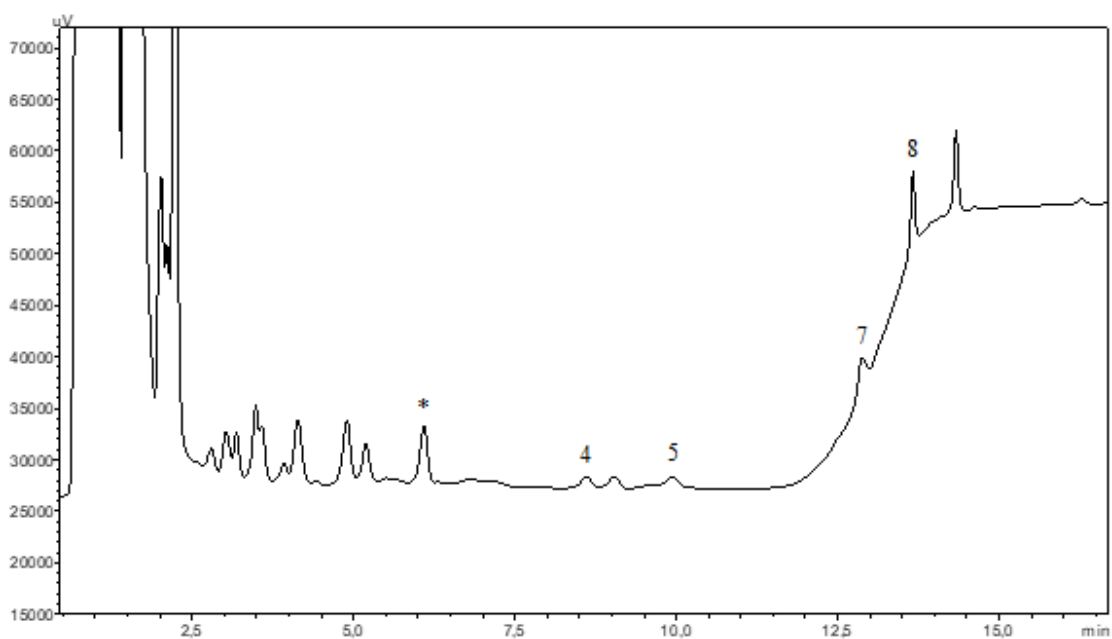
Obrázek III - 3: Chromatogram výčepního piva Radegast Rázná 10 bez zakoncentrování  
 4 – putrescin, 5 – kadaverin, 7 – 1,7-diaminoheptan (IS), 8 – tyramin, \* – ethanol



Obrázek III - 4: Chromatogram svrchně kvašeného piva Radegast ROG IPA bez zakoncentrování  
 4 – putrescin, 5 – kadaverin, 7 – 1,7-diaminoheptan (IS), 8 – tyramin, \* – ethanol

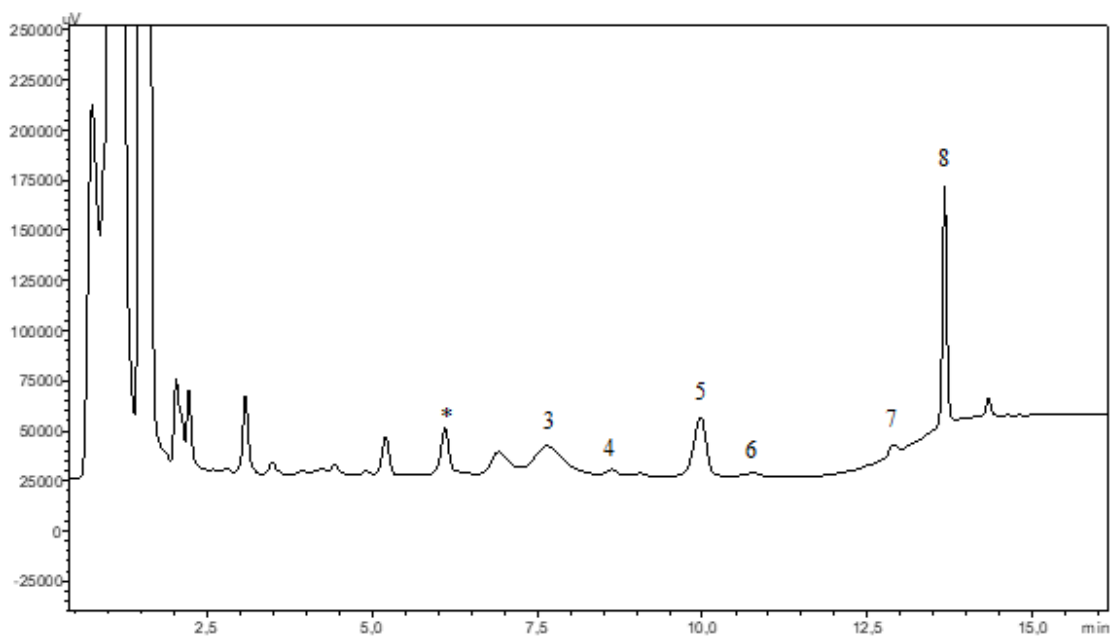


Obrázek III - 5: Chromatogram svrchně kvašeného piva Rebel IPA bez zakoncentrování  
 4 – putrescin, 5 – kadaverin, 7 – 1,7-diaminoheptan (IS), 8 – tyramin, \* – ethanol

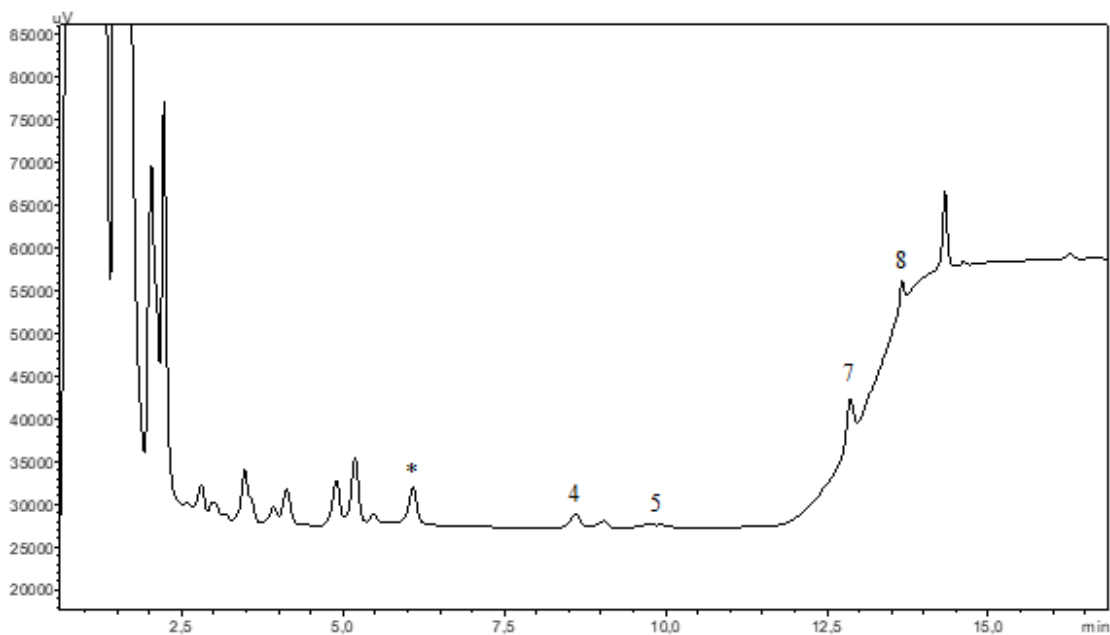


Obrázek III - 6: Chromatogram svrchně kvašeného piva Primátor IPA bez zakoncentrování  
 4 – putrescin, 5 – kadaverin, 7 – 1,7-diaminoheptan (IS), 8 – tyramin, \* – ethanol

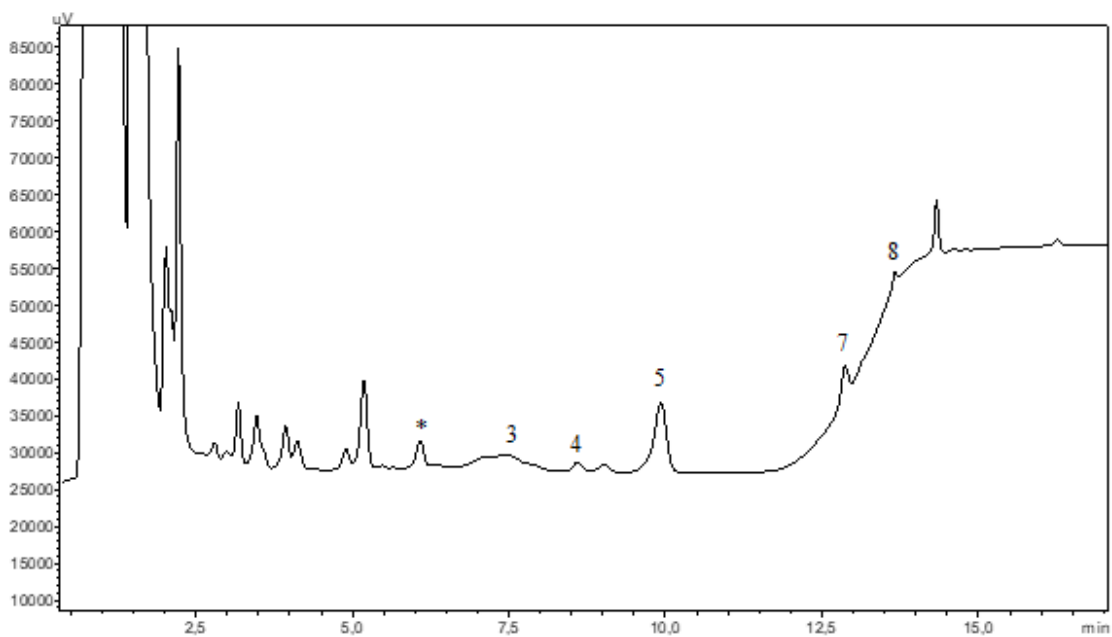




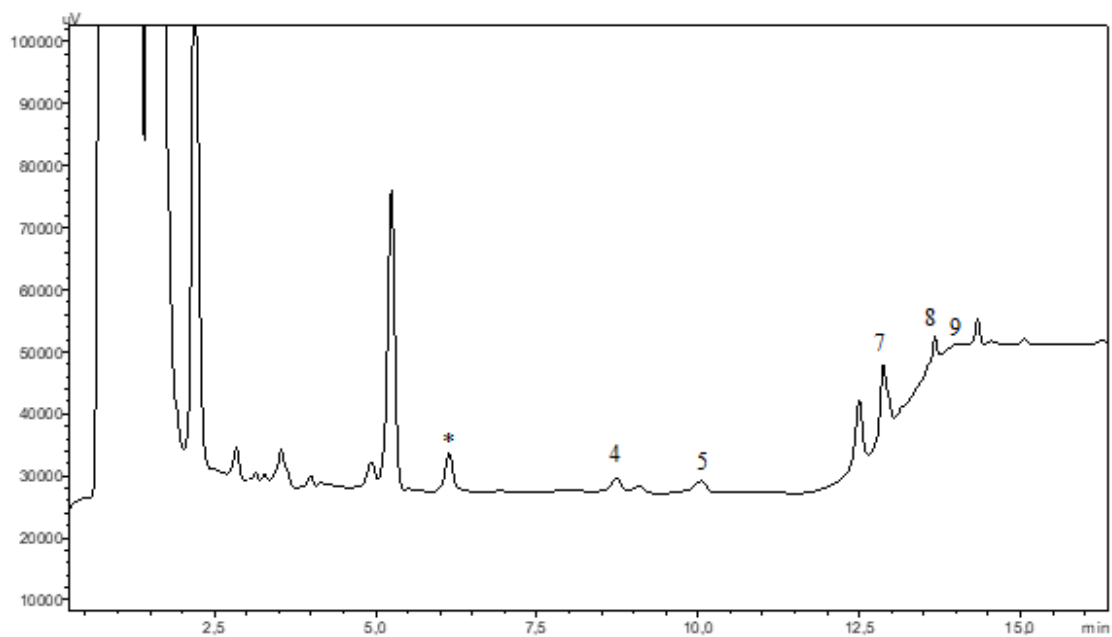
Obrázek III - 7: Chromatogram nepasterizovaného piva Krakonoš světlý ležák 12 bez zakoncentrování  
 3 – isoamylamin, 4 – putrescin, 5 – kadaverin, 6 – histamin, 7 – 1,7-diaminoheptan (IS), 8 – tyramin,  
 \* – ethanol



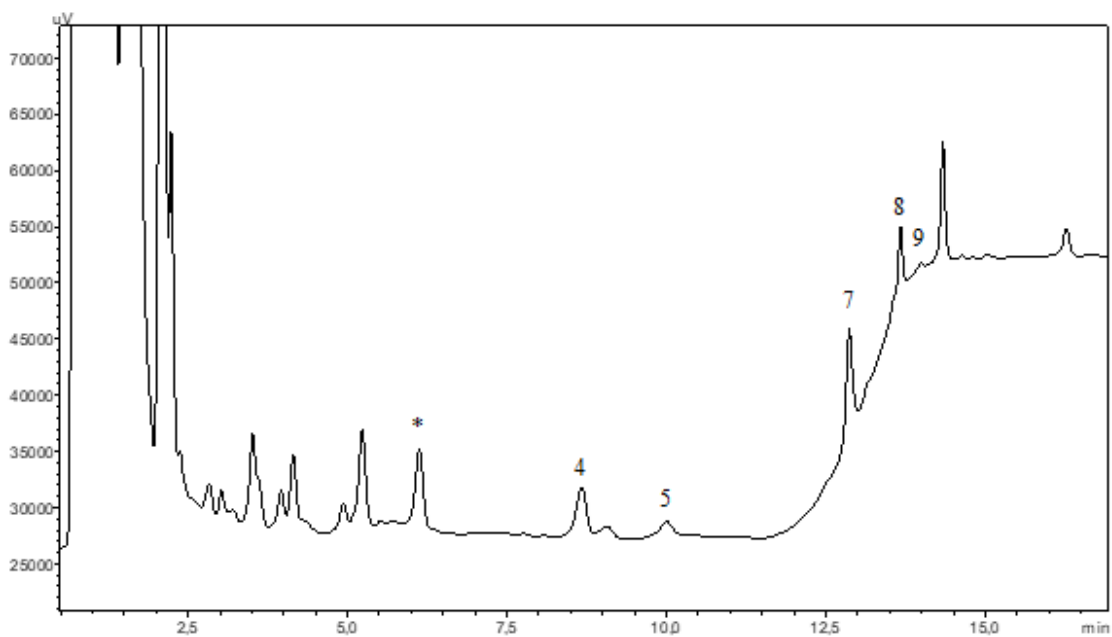
Obrázek III - 8: Chromatogram nepasterizovaného piva Starobrno Medium bez zakoncentrování  
 4 – putrescin, 5 – kadaverin, 7 – 1,7-diaminoheptan (IS), 8 – tyramin, \* – ethanol



Obrázek III - 9: Chromatogram nepasterizovaného piva Svijanský máz 11 % bez zakoncentrování  
 3 – isoamylamin, 4 – putrescin, 5 – kadaverin, 7 – 1,7-diaminoheptan (IS), 8 – tyramin, \* – ethanol

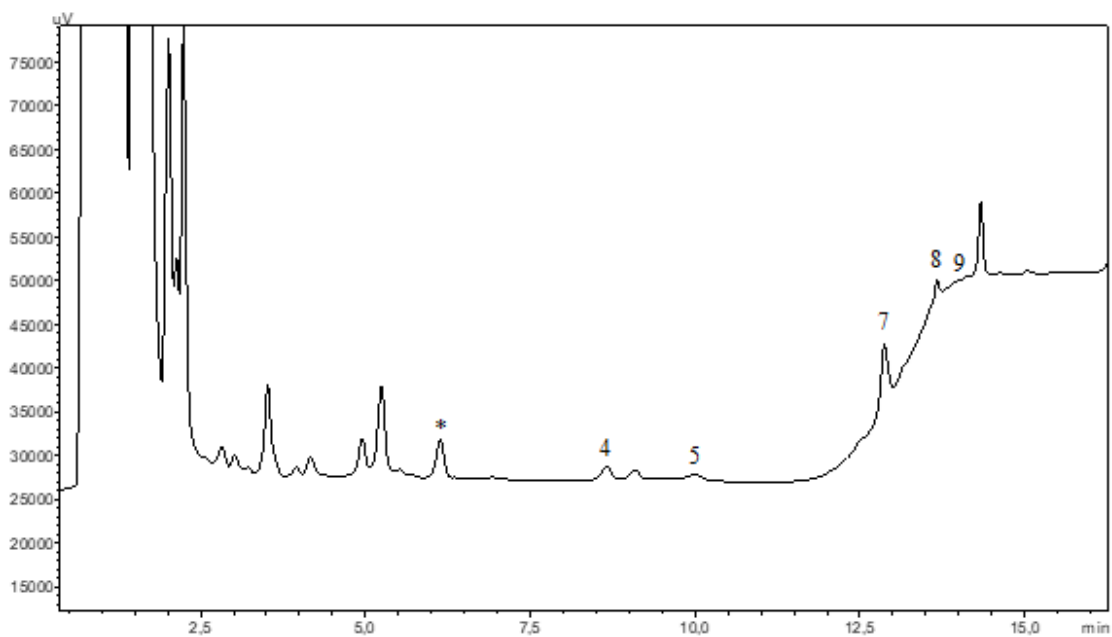


Obrázek III - 10: Chromatogram pšeničného piva Primátor Weizen bez zakoncentrování  
 4 – putrescin, 5 – kadaverin, 7 – 1,7-diaminoheptan (IS), 8 – tyramin, 9 – spermidin, \* – ethanol



Obrázek III - 11: Chromatogram piva Bernard kvasnicové pivo 10 bez zakoncentrování

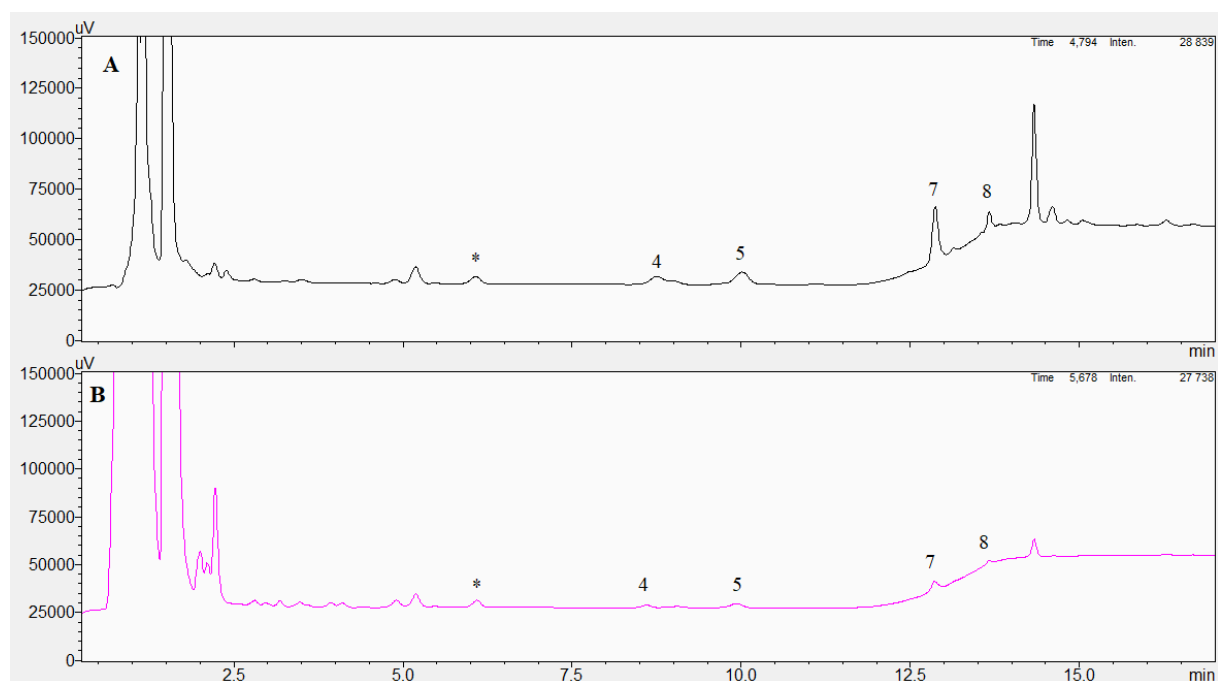
4 – putrescin, 5 – kadaverin, 7 – 1,7-diaminoheptan (IS), 8 – tyramin, 9 – spermidin, \* – ethanol



Obrázek III - 12: Chromatogram piva Staropramen Nefiltr Pšeničný bez zakoncentrování

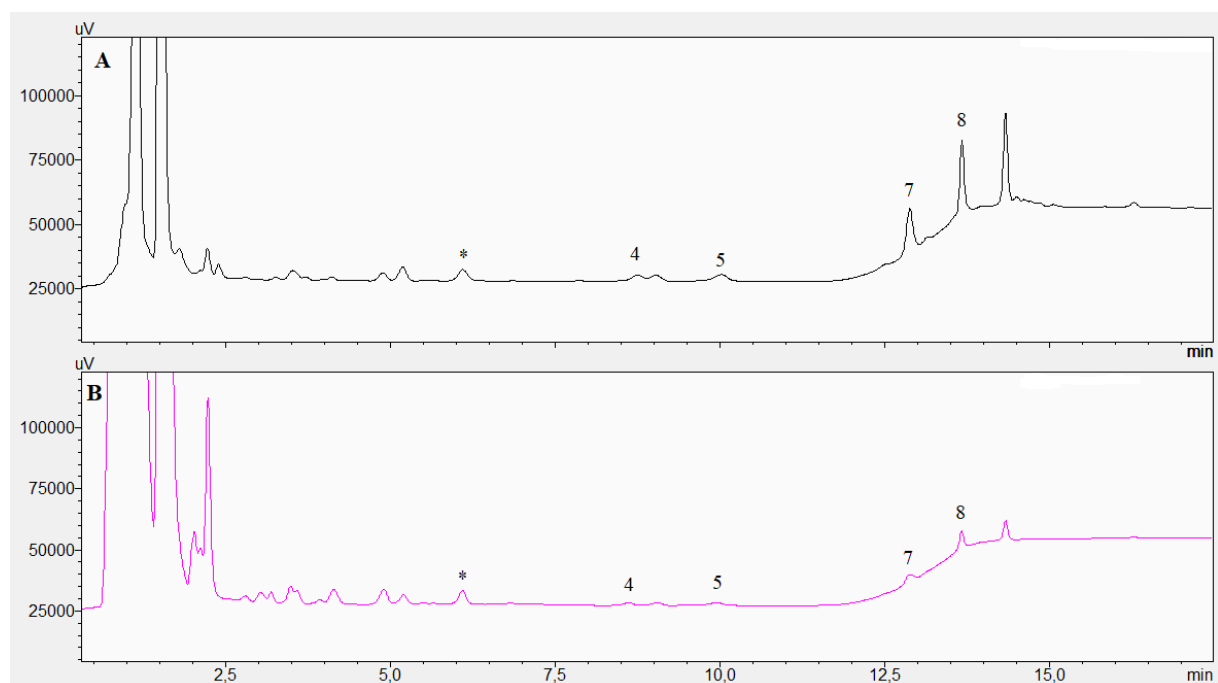
4 – putrescin, 5 – kadaverin, 7 – 1,7-diaminoheptan (IS), 8 – tyramin, 9 – spermidin, \* – ethanol

## Příloha IV: Chromatogramy zakoncentrovaných derivátů ze vzorků piv



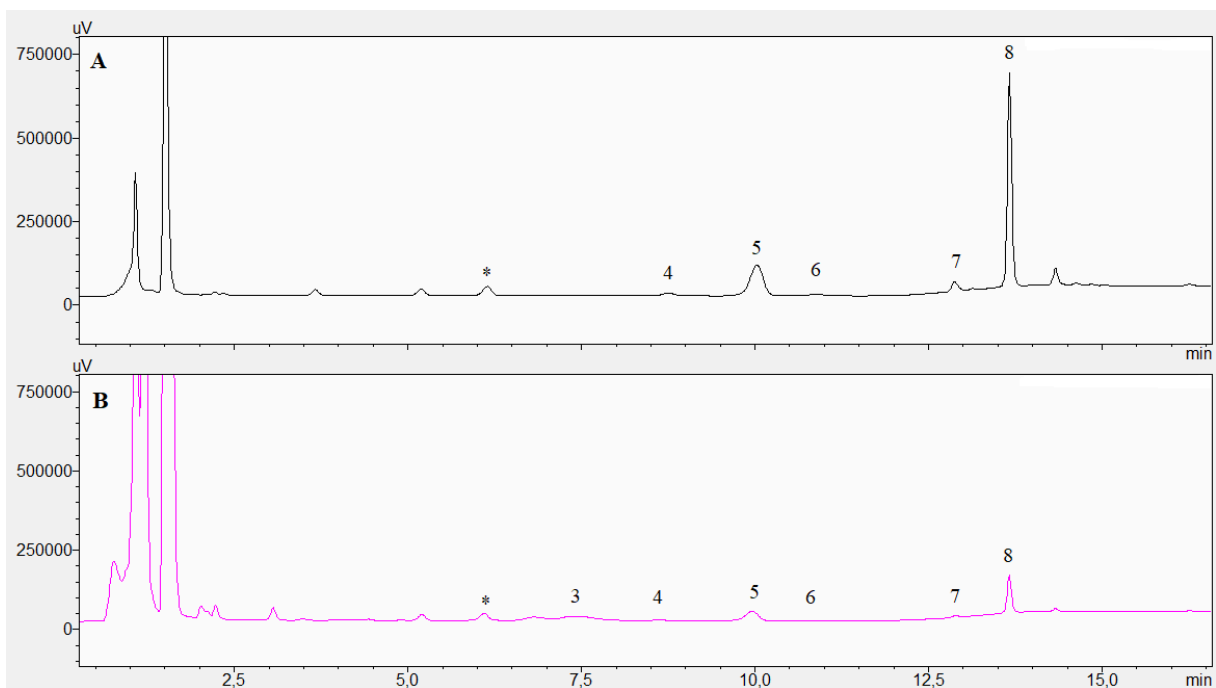
Obrázek IV - 1: Srovnání chromatogramů piva Radegast ROG IPA po zakoncentrování (A) a bez zakoncentrování (B)

4 – putrescin, 5 – kadaverin, 7 – 1,7-diaminoheptan (IS), 8 – tyramin, \* – ethanol



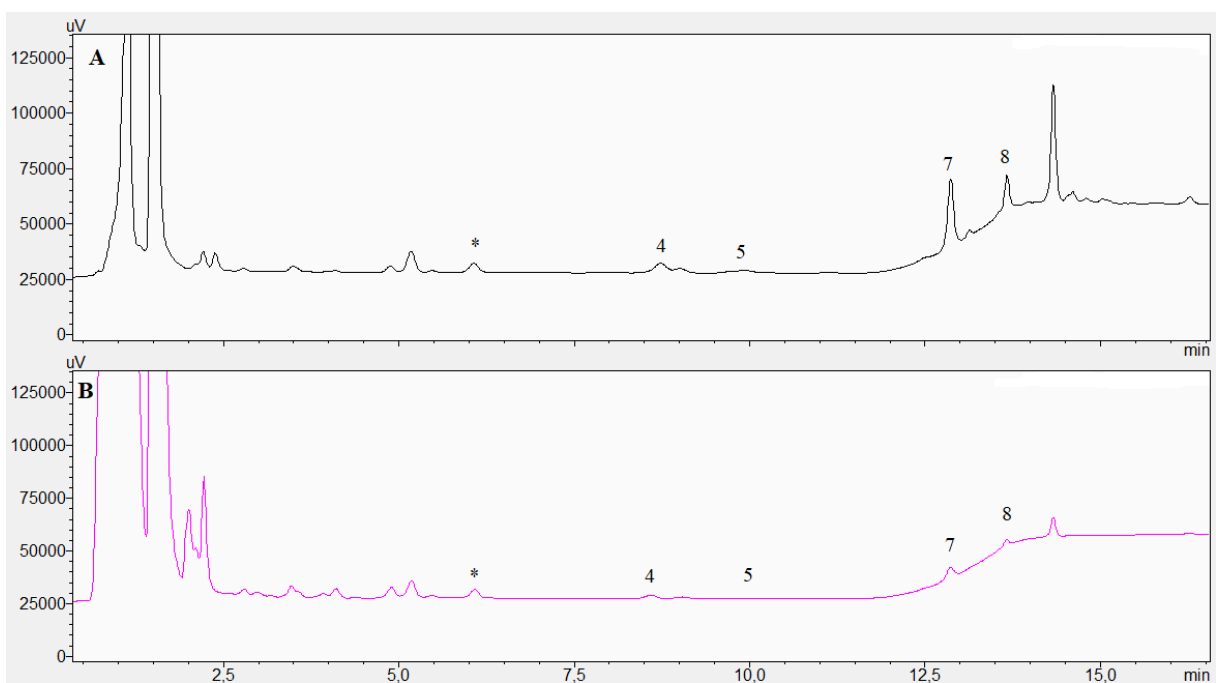
Obrázek IV - 2: Srovnání chromatogramů piva Primátor IPA po zakoncentrování (A) a bez zakoncentrování (B)

4 – putrescin, 5 – kadaverin, 7 – 1,7-diaminoheptan (IS), 8 – tyramin, \* – ethanol



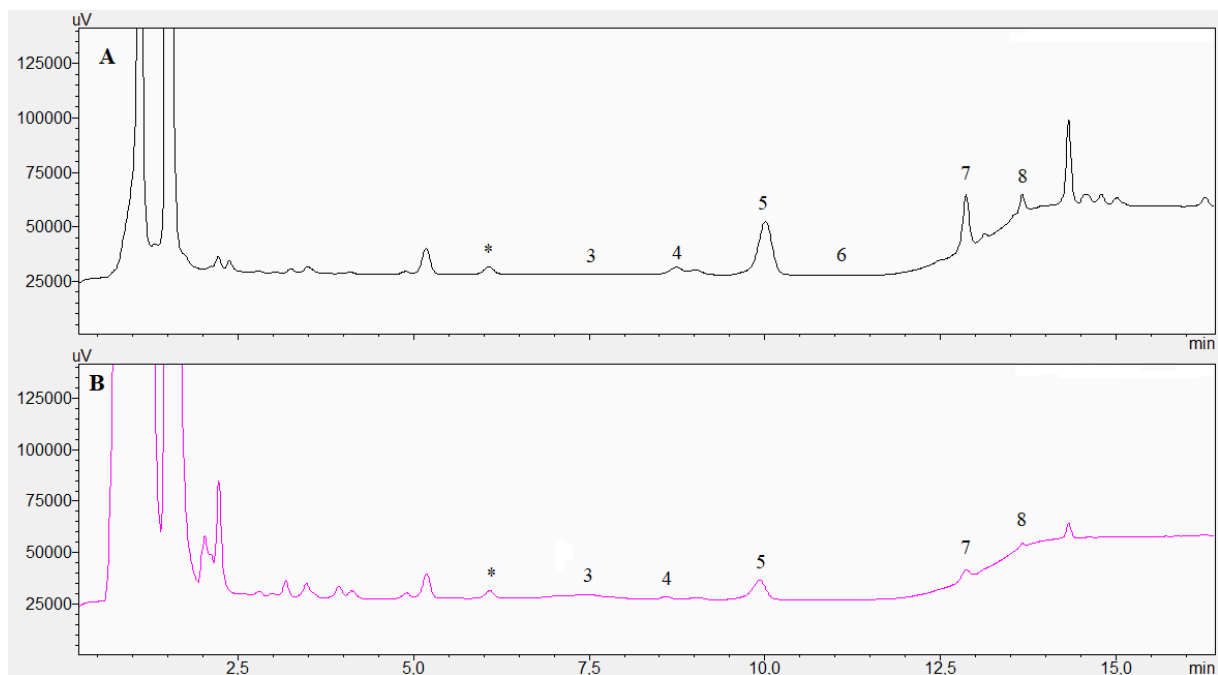
Obrázek IV - 3: Porovnání chromatogramů vzorku Krakonoš po zakoncentrování MEPS (A) a bez zakoncentrování (B)

3 – isoamylamin, 4 – putrescin, 5 – kadaverin, 6 – histamin, 7 – 1,7-diaminoheptan (IS), 8 – tyramin,  
\* – ethanol



Obrázek IV - 4: Srovnání chromatogramů piva Starobrno po zakoncentrování (A) a bez zakoncentrování (B)

4 – putrescin, 5 – kadaverin, 7 – 1,7-diaminoheptan (IS), 8 – tyramin, \* – ethanol



Obrázek IV - 5: Srovnání chromatogramů piva Svijanský máz po zakoncentrování (A) a bez zakoncentrování (B)

3 – isoamylamin, 4 – putrescin, 5 – kadaverin, 6 – histamin, 7 – 1,7-diaminoheptan (IS), 8 – tyramin,  
\* – ethanol