



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

ZAVEDENÍ METODY KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY NA STANOVENÍ (BIOGENNÍCH) AMINŮ V RŮZNÝCH MATRICÍCH

DEVELOPMENT OF THE CAPILLARY ELECTROPHORESIS METHOD FOR THE DETERMINATION OF
(BIOGENIC) AMINES IN DIFFERENT MATRICES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Eva Šikutová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Veronika Řezáčová, Ph.D.

BRNO 2025

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP2019/2024 Akademický rok: 2024/25
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany
životního prostředí
Studentka: **Bc. Eva Šikutová**
Studijní program: Environmentální chemie a technologie
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **Ing. Veronika Řezáčová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Zavedení metody kapilární elektroforézy na stanovení (biogenních) aminů v různých matricích

Zadání diplomové práce:

- Vypracování literární rešerše na téma možností využití kapilární elektroforézy a jejích modifikací na stanovení aminů, bližší charakterizace biogenních aminů a jejich významu v souvislosti s výskytem v různých matricích.
- Vývoj elektroforetické metody stanovení vybraných aminů; aplikace metody v návaznosti na DGT vzorkovací techniku.
- Přehledné zpracování získaných výsledků a zhodnocení dalších aplikačních možností metody.

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2025:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Eva Šikutová
studentka

Ing. Veronika Řezáčová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Jozef Krajčovič, Ph.D.
vedoucí ústavu

V Brně dne 3.2.2025

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá zavedením metody kapilární elektroforézy na stanovení biogenních aminů. Teoretický blok se zaměřuje na popis biogenních aminů, jejich klasifikaci, vlastnosti, význam, výskyt a metody jejich stanovení. V experimentální části této práce byla vyvinuta a optimalizována metoda kapilární elektroforézy na stanovení vybraných aminů a získané parametry byly následně zpracovány a vyhodnoceny.

KLÍČOVÁ SLOVA

biogenní aminy, BAs, kapilární elektroforéza, CE, optimalizace metody

ABSTRACT

The thesis deals with the development of the capillary electrophoresis method for the determination of biogenic amines. The theoretical block focuses on the description of biogenic amines, their classification, properties, significance, occurrence and methods of their determination. In the experimental part of this work, a capillary electrophoresis method was developed and optimized for the determination of selected amines, and the obtained parameters were subsequently processed and evaluated.

KEYWORDS

biogenic amines, BAs, capillary electrophoresis, CE, method optimization

ŠIKUTOVÁ, Eva. *Zavedení metody kapilární elektroforézy na stanovení (biogenních) aminů v různých matricích*. Diplomová práce. Veronika ŘEZÁČOVÁ (vedoucí práce). Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2025.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji své vedoucí Ing. Veronice Řezáčové, PhD. za odborné vedení mé diplomové práce, cenné rady, užitečné připomínky, ochotu a pomoc během provádění experimentů.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	BIOGENNÍ AMINY	9
2.1.1	<i>Tvorba biogenních aminů</i>	9
2.1.2	<i>Klasifikace biogenních aminů</i>	11
2.1.2.1	Klasifikace podle počtu aminoskupin.....	12
2.1.2.2	Klasifikace podle chemické struktury	12
2.1.2.3	Klasifikace podle původu	12
2.1.3	<i>Vlastnosti biogenních aminů</i>	13
2.1.3.1	Chemické vlastnosti.....	13
2.1.3.2	Fyzikální vlastnosti.....	13
2.1.3.3	Senzorické a technologické vlastnosti.....	14
2.1.4	<i>Výskyt biogenních aminů</i>	14
2.1.4.1	Rostliny.....	15
2.1.4.2	Živočichové	16
2.1.4.3	Mikroorganismy	16
2.1.4.4	Potraviny.....	16
2.1.4.5	Ekosystémy.....	17
2.1.5	<i>Význam biogenních aminů</i>	18
2.1.5.1	Fyziologický význam	18
2.1.5.2	Biologický význam.....	20
2.1.5.3	Toxikologický význam.....	20
2.2	METODY STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	22
2.2.1	<i>Tenkvrstvá chromatografie</i>	22
2.2.2	<i>Vysokoučinná kapalinová chromatografie</i>	24
2.2.3	<i>Plynová chromatografie</i>	26
2.2.4	<i>Kapilární elektroforéza</i>	28
2.2.4.1	Modifikace kapilární elektroforézy	30
2.3	STANOVOVANÉ BIOGENNÍ AMINY A JEJICH VLASTNOSTI	32
2.3.1	<i>Histamin</i>	32
2.3.2	<i>Tyramin</i>	33
2.3.3	<i>Putrescin</i>	34
3	CÍL PRÁCE	36
3.1	VZORKOVACÍ TECHNIKA DGT (TECHNIKA DIFUZNÍHO GRADIENTU V TENKÉM FILMU)	36
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
4.1	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ.....	37
4.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	38
4.3	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ STANDARDŮ	38
4.4	OPTIMALIZACE SEPARAČNÍCH PODMÍNEK KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY	38
4.5	POUŽITÁ KAPILÁRA.....	40
4.6	TEPLOTA	40
4.7	UV DETEKCE.....	40
4.8	POUŽITÉ ELEKTROLYTY	40
4.9	DÁVKOVÁNÍ.....	41
4.10	SEPARAČNÍ NAPĚTÍ	41
4.11	PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍ ŘADY.....	41
4.12	OPAKOVATELNOST METODY	41
4.13	PŘÍPRAVA REÁLNÝCH VZORKŮ.....	41
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	42

5.1	ZAVEDENÍ METODY PRO AROMATICKÉ BIOGENNÍ AMINY	42
5.1.1	<i>UV detekce</i>	42
5.1.2	<i>Výběr základního elektrolytu</i>	43
5.1.3	<i>Optimalizace dávkování</i>	43
5.1.4	<i>Volba separačního napětí</i>	45
5.1.5	<i>Parametry optimalizované metody pro stanovení aromatických biogenních aminů</i>	46
5.1.6	<i>Kalibrační závislost</i>	46
5.1.7	<i>Limity detekce a limity kvantifikace</i>	47
5.1.8	<i>Opakovatelnost metody</i>	48
5.1.9	<i>Měření různých matric</i>	49
5.2	ZAVEDENÍ METODY NEPŘÍMÉ DETEKCE PRO ALIFATICKÉ BIOGENNÍ AMINY	53
5.2.1	<i>Stanovení základního elektrolytu</i>	53
6	ZÁVĚR	58
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	59
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	63
9	SEZNAM PŘÍLOH	65
10	PŘÍLOHY	66

1 ÚVOD

Biogenní aminy jsou organické dusíkaté sloučeniny, které se přirozeně vyskytují v životním prostředí, včetně vody, půdy, potravin a všech živých organismů. Hrají klíčovou roli v mnoha biologických procesech v těle rostlin, živočichů i člověka. Mnohé z nich působí jako neurotransmitery, hormony nebo intermediáty metabolických drah, a tím se podílejí na udržování homeostázy a správného fungování organismu. Přestože jsou pro fungování živých systémů nezbytné, při nadměrné akumulaci mohou vykazovat toxické účinky, a to jak na lidské zdraví, tak na ekosystémy. Jejich zvýšená koncentrace v různých typech prostředí může být ukazatelem mikrobiální kontaminace, rozkladu organické hmoty nebo nevhodného technologického zpracování biologických materiálů.

Z pohledu environmentální chemie představují biogenní aminy významné ukazatele kvality prostředí i zdravotní nezávadnosti potravin a biologických vzorků. Právě schopnost rychle a přesně detekovat tyto látky hraje zásadní roli při hodnocení stavu ekosystémů, kontaminace vody a půdy, nebo při sledování hygieny a bezpečnosti potravinářských výrobků. K tomu je však zapotřebí citlivých, selektivních a zároveň ekologicky šetrných analytických metod, které umožní spolehlivou analýzu i velmi nízkých koncentrací těchto sloučenin ve složitých matricích.

Jednou z možných metod, která tato kritéria splňuje, je kapilární elektroforéza (CE). Tato technika se vyznačuje vysokou citlivostí, nízkou spotřebou chemikálií a ekologickou šetrností. Ve spojení s technikou difuzního gradientu v tenkém filmu (DGT), jakožto vhodnou vzorkovací a koncentrační metodou, navíc nabízí možnost efektivního monitorování i velmi nízkých koncentrací aminů v komplexních matricích.

Tato diplomová práce se zaměřuje na zavedení a optimalizaci metody kapilární elektroforézy pro stanovení vybraných biogenních aminů v různých typech matric. Cílem je vytvořit analytický postup využitelný nejen v oblasti environmentální chemie, například pro sledování kontaminace vody a půdy, ale i v dalších oborech, jako je potravinářství nebo farmacie, kde mohou aminy ovlivňovat kvalitu a bezpečnost výrobků. Výsledná metodika může posloužit jako základ pro další výzkum i pro praktické aplikace při monitorování toxických látek v životním prostředí.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Biogenní aminy

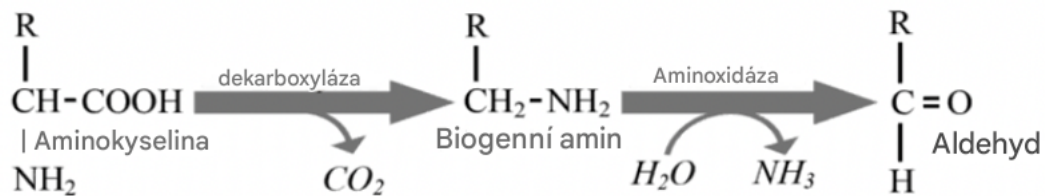
Biogenní aminy (BAs) jsou nízkomolekulární organické sloučeniny obsahující jednu nebo více aminoskupin, které vznikají přirozenými biologickými a chemickými procesy. Tyto látky se vyskytují v rostlinách, živočiších a mikroorganismech, kde zajišťují klíčové regulační funkce, například v oblasti metabolismu, růstu buněk a stresových odpovědí. Jsou produkovány enzymatickou dekarboxylací aminokyselin, transaminací nebo aminací karbonylových sloučenin, což jim poskytuje široké spektrum chemických vlastností a funkcí. Biogenní aminy jsou důležité nejen jako produkty biologických procesů, ale také jako indikátory environmentálních změn, kvality vody nebo půdy a mohou hrát významnou roli v biodegradaci organických látek [1].

V živých organismech mohou biogenní aminy působit jako neurotransmitery, hormonální regulátory nebo součást obranných mechanismů. V lidském těle například serotonin, dopamin a histamin hrají klíčové role při regulaci nálady, kognitivních funkcí nebo imunitních reakcí. Vedle toho polyaminy, jako spermin a spermidin, přispívají ke stabilizaci DNA a podporují buněčný růst a diferenciaci. V potravinářském kontextu jsou biogenní aminy přítomny jak přirozeně, tak jako produkty mikrobiální činnosti při fermentaci nebo skladování. Z pohledu environmentální chemie jsou biogenní aminy důležitými faktory v koloběhu dusíku a uhlíku. Tyto látky se často nacházejí v půdě a vodě, kde jejich koncentrace souvisí s mikrobiální aktivitou a rozkladem organické hmoty. Například kadaverin a putrescin mohou vznikat při anaerobních podmínkách v sedimentačních procesech vodních ekosystémů, což ovlivňuje biologickou rovnováhu i kvalitu vody. V půdním prostředí biogenní aminy podporují růst rostlin tím, že zlepšují dostupnost dusíku a aktivují metabolismus půdních mikroorganismů. Nadměrné koncentrace však mohou být pro organismy toxické a potenciálně přispívat ke karcinogenezi [2,3,4].

Díky své roli v biologických procesech a vztahu k environmentálnímu zdraví jsou biogenní aminy objektem intenzivního výzkumu v environmentální chemii. Vývoj analytických metod pro jejich detekci umožňuje přesnější hodnocení jejich přítomnosti a vlivu v různých ekosystémech. Současně se zkoumá jejich využití jako biomarkerů pro hodnocení kvality půd, vod nebo biodegradčních procesů [1].

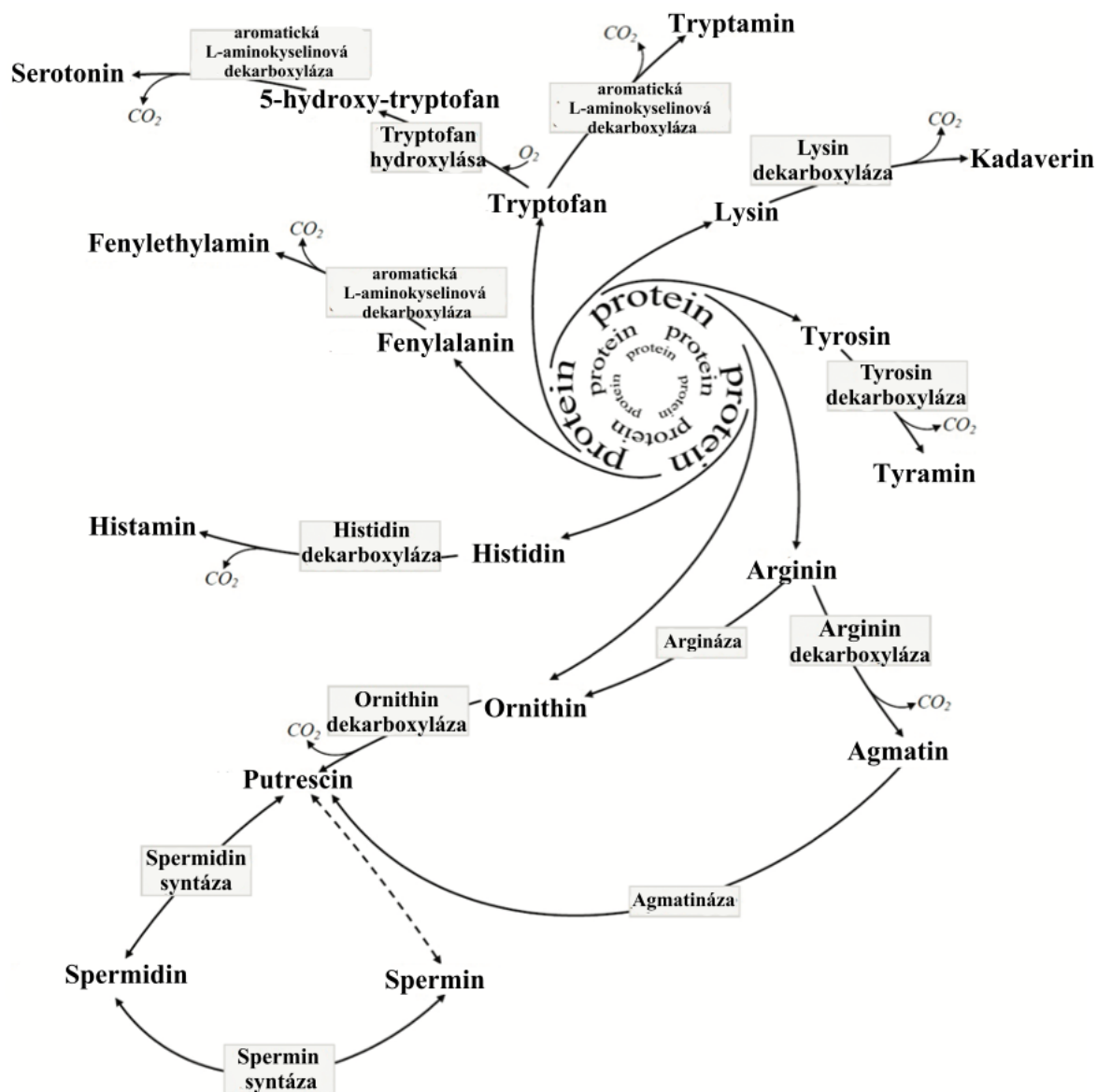
2.1.1 Tvorba biogenních aminů

Hlavní cestou tvorby biogenních aminů je dekarboxylace přirozených aminokyselin, kterou katalyzují enzymy některých bakterií (viz *Obrázek 1*). Dekarboxylace je proces, který zahrnuje odbourávání karboxylové skupiny – COOH z aminokyseliny, přičemž se uvolňuje oxid uhličitý. Účinný enzym, kterým je dekarboxylace katalyzována, se pak nazývá dekarboxyláza. Na vzniku biogenních aminů se mohou kromě mikrobiálních exogenních dekarboxyláz podílet i endogenní dekarboxylázy – tedy enzymy vlastní dané potraviny nebo surovině. Endogenní dekarboxylace je zvláště významná u rostlinných potravin, protože rostliny obsahují vlastní dekarboxylázy, které mohou být aktivovány během zpracování, skladování nebo poškození potravin, což vede k tvorbě biogenních aminů. Tento proces může ovlivnit organoleptické vlastnosti potravin, jako je chuť, vůně a textury a v některých případech může mít i vliv na jejich bezpečnost, pokud jsou biogenní aminy produkovány ve vysokých koncentracích. Kromě mikrobiálních enzymů mohou biogenní aminy vznikat také prostřednictvím aminace a transaminace aldehydů a ketonů. [1].



Obrázek 1: Dekarboxylace aminokyselin, převzato a upraveno z [1]

Mezi nejběžnější biogenní aminy patří histamin, který vzniká dekarboxylací aminokyseliny histidinu, tyramin z aminokyseliny tyrosinu, tryptamin a serotonin z aminokyseliny tryptofanu, fenylethylamin z aminokyseliny fenylalaninu, putrescin z aminokyseliny ornithinu, kadaverin z aminokyseliny lysinu a agmatin z aminokyseliny argininu (viz Obrázek 2). Tyto biogenní aminy jsou známé svými různými biologickými funkcemi, včetně vlivu na kardiovaskulární systém, nervový systém a metabolismus [1].

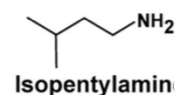
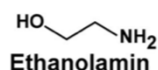


Obrázek 2: Mechanismus vzniku biogenních aminů, převzato a upraveno z [1]

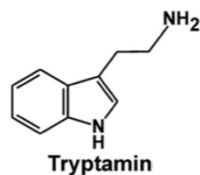
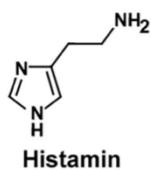
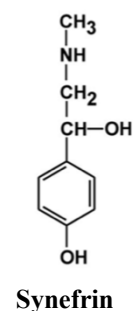
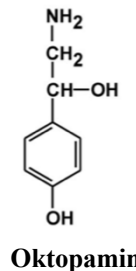
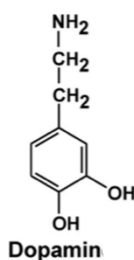
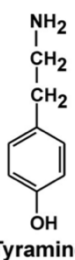
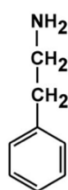
2.1.2 Klasifikace biogenních aminů

Biogenní aminy mohou být klasifikovány na základě několika kritérií, kterými jsou počet aminoskupin, chemická struktura (viz *Obrázek 3*) a biologický původ. V *Tabulce 1* jsou popsány názvy vybraných aminů, jejich molekulární chemické vzorce, molární hmotnost, rozdělení a prekurzory [2].

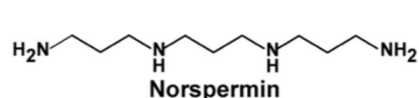
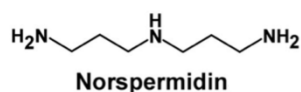
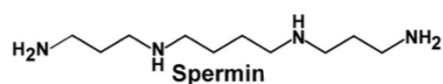
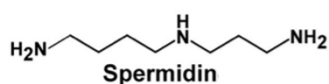
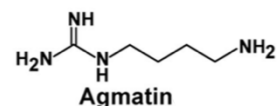
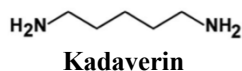
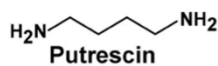
Alifatické aminy



Aromatické a heterocyklické aminy



Polyaminy



Obrázek 3: Chemické struktury některých biogenních aminů, převzato a upraveno z [4]

Tab. 1: Charakteristika vybraných biogenních aminů [2]

Název	Molekulární vzorec	Molární hmotnost [g·mol ⁻¹]	Klasifikace	Chemická struktura	Prekurzorová aminokyselina
Methylamin	CH ₃ N	31,06	Monoamin	Alifatická	Glycin
Etylamin	C ₂ H ₇ N	45,08	Monoamin	Alifatická	Alanin
Fenylethylamin	C ₈ H ₁₁ N	121,18	Monoamin	Aromatická	Fenylalanin
Tyramin	C ₈ H ₁₁ NO	137,18	Monoamin	Aromatická	Tyrosin
Dopamin	C ₈ H ₁₁ NO ₂	153,18	Monoamin	Aromatická	Tyrosin
Histamin	C ₅ H ₉ N ₃	111,15	Monoamin	Heterocyklická	Histidin
Tryptamin	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	160,22	Monoamin	Heterocyklická	Tryptofan
Serotonin	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	176,22	Monoamin	Heterocyklická	Hydroxytryptofan
Putrescin	C ₄ H ₁₂ N ₂	88,15	Diamin	Alifatická	Ornithin
Kadaverin	C ₅ H ₁₄ N ₂	102,18	Diamin	Alifatická	Lysin
Agmatin	C ₅ H ₁₄ N ₄	130,19	Polyamin	Alifatická	Arginin
Spermidin	C ₇ H ₁₉ N ₃	145,25	Polyamin	Alifatická	Arginin/ornithin
Spermin	C ₁₀ H ₂₆ N ₄	202,34	Polyamin	Alifatická	Arginin/ornithin

2.1.2.1 Klasifikace podle počtu aminoskupin

- Monoaminy obsahují jednu aminoskupinu a zahrnují látky jako tyramin, histamin a serotonin. Tyto sloučeniny působí především jako neurotransmitery a regulátory fyziologických funkcí.
- Diaminy obsahují dvě aminoskupiny a zahrnují putrescin a kadaverin, které vznikají během rozkladu bílkovin. Často signalizují degradaci organických materiálů.
- Polyaminy mají více než dvě aminoskupiny a patří sem spermin a spermidin. Tyto látky stabilizují DNA a podporují buněčný růst a proliferaci [2].

2.1.2.2 Klasifikace podle chemické struktury

- Alifatické aminy zahrnují putrescin, kadaverin a spermin, které vznikají při rozkladu organických látek. Jsou spojeny s katabolickými procesy.
- Aromatické aminy jako tyramin a fenylethylamin jsou zapojeny do regulačních funkcí, například při ovlivňování krevního tlaku.
- Heterocyklické aminy, jako histamin a serotonin, mají klíčovou roli v neurotransmisí a imunitních reakcích [2].

2.1.2.3 Klasifikace podle původu

- Endogenní aminy vznikají přirozeně v organismu, například histamin, který se uvolňuje v průběhu imunitních reakcí.
- Exogenní aminy vznikají během mikrobiálních procesů, jako je fermentace nebo rozklad potravin. Jsou často spojeny s nedostatečnou hygienou během výroby a skladování [2].

2.1.3 Vlastnosti biogenních aminů

Biogenní aminy vykazují řadu charakteristických fyzikálně-chemických vlastností. Tyto vlastnosti jsou zásadní nejen pro pochopení jejich chování v ekosystémech, ale také pro správnou interpretaci jejich role při hodnocení kvality, čerstvosti či zdravotní nezávadnosti potravinářských výrobků [1,2].

2.1.3.1 Chemické vlastnosti

Z chemického hlediska obsahují jednu nebo více aminoskupin ($-NH_2$), což jim propůjčuje zásaditý charakter. Díky své zásadité povaze mají biogenní aminy schopnost tvořit iontové páry s kyselinami, což se uplatňuje například při jejich izolaci, detekci a analytickém stanovení, například pomocí chromatografických metod [1,2].

Chemická reaktivita biogenních aminů závisí na typu a počtu funkčních skupin v jejich struktuře (viz *Tabulka 2*). Například aromatické aminy, jako tyramin či fenylethylamin, jsou náchylné k oxidaci, což může vést k tvorbě toxických meziproduktů nebo k jejich degradaci. Polyaminy, jako spermin a spermidin, se mohou vázat na DNA a proteiny, čímž ovlivňují jejich stabilitu a funkci. Histamin ovlivňuje imunitní odpověď organismu a serotonin hraje klíčovou roli v regulaci nálady a spánku. Tyto interakce mají zásadní biologické důsledky, mimo jiné v buněčném růstu, diferenciaci nebo ochraně před oxidačním stresem [1,2].

Tab. 2: Vybrané biogenní aminy, jejich struktura, chemicky podmíněná aktivita a typické zdroje [2]

Biogenní amin	Struktura	Chemicky podmíněná aktivita	Typické zdroje
Histamin	Heterocyklický	Imunitní reakce, neurotransmise	Ryby, sýry, fermentované nápoje
Tyramin	Aromatický	Regulace krevního tlaku	Fermentované potraviny, čokoláda
Putrescin	Alifatický	Rozklad proteinů, indikátor degradace	Rozkládající se organický materiál
Kadaverin	Alifatický	Toxický vliv, indikátor hnilobných procesů	Zkažené maso, ryby
Spermin	Polyamin	Stabilizace DNA, podpora buněčného růstu	Rostlinné a živočišné tkáně

2.1.3.2 Fyzikální vlastnosti

Fyzikálně se biogenní aminy vyznačují nízkou molární hmotností (obvykle do $200 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), polární strukturou a velmi dobrou rozpustností ve vodě, což jim umožňuje snadnou difúzi v živých organismech i potravinářských matricích. Vzhledem k těkavosti některých aminů, zejména diaminů jako kadaverin či putrescin, jsou významnými indikátory mikrobiálního rozkladu a často se podílejí na nepříjemném zápachu zkažených potravin [5].

Jejich bod varu a tepelné chování se liší dle molekulové struktury, ale obecně platí, že biogenní aminy jsou relativně stabilní vůči běžným kuchyňským úpravám, jako je vaření či pečení, což znamená, že zůstávají přítomné i v tepelně zpracovaných výrobcích [5].

2.1.3.3 Senzorické a technologické vlastnosti

Z technologického hlediska jsou biogenní aminy významné jako sensorické markery čerstvosti a hygienické kvality potravin. Putrescin a kadaverin jsou typické svým hnilobným zápachem, který je běžně spojován s degradací bílkovin. Aromatické aminy, jako je tyramin, mohou ovlivnit chuťové vlastnosti potravin a přispívat k nahořklému profilu u fermentovaných produktů [5].

Vzhledem ke své stabilitě a schopnosti vázat se na potravinovou matici, zejména bílkoviny a sacharidy, je jejich detekce analyticky náročná. Ve fermentovaných potravinách mohou vznikat přirozeně, ale jejich přítomnost ve vysokých koncentracích je nežádoucí a signalizuje neadekvátní výrobní nebo hygienické podmínky [5].

2.1.4 Výskyt biogenních aminů

Biogenní aminy se nacházejí v široké škále přírodních i zpracovaných materiálů. Jejich přítomnost byla zjištěna v tělech rostlin, živočichů a mikroorganismů, stejně jako v potravinách a ekosystémech. Výskyt těchto sloučenin je podmíněn jejich biologickou funkcí, enzymatickými procesy a přítomností mikroorganismů, které jsou schopny syntetizovat biogenní aminy enzymatickou dekarboxylací aminokyselin. Obsah a rozložení biogenních aminů závisí na typu substrátu, podmínkách skladování a přítomnosti mikrobiální aktivity [6].

Substráty bohaté na volné aminokyseliny, jako jsou například maso, ryby, mléko nebo fermentované produkty, poskytují ideální prostředí pro tvorbu biogenních aminů, neboť tyto látky slouží jako přímé prekurzory při enzymatické dekarboxylaci. Zvýšená mikrobiální aktivita, zejména za přítomnosti bakterií s dekarboxylačním potenciálem, vede ke zvýšené produkci těchto sloučenin [6].

Podmínky skladování, jako je například teplota, výrazně ovlivňují růst těchto mikroorganismů a následnou produkci biogenních aminů. Vyšší teploty skladování mohou urychlit růst mikroorganismů a zvýšit koncentraci biogenních aminů v potravinách. Naopak chlazení a zmrazování potravin mohou omezit mikrobiální růst, a tím snížit tvorbu biogenních aminů. Významný vliv má také hygienická kvalita zpracování a délka skladování. Kontaminace suroviny nevhodnými mikroorganismy či delší skladování často vede k nežádoucímu nárůstu koncentrace biogenních aminů, zejména putrescinu, kadaverinu nebo tyraminu [6].

Rovněž hodnota pH prostředí hraje významnou roli v metabolismu bakterií. Většina bakterií produkujících biogenní aminy preferuje neutrální až mírně alkalické podmínky (pH 6–8). Ekici & Omer (2020) poukázali na to, že úprava pH potravin může být účinnou strategií ke snížení produkce biogenních aminů [6].

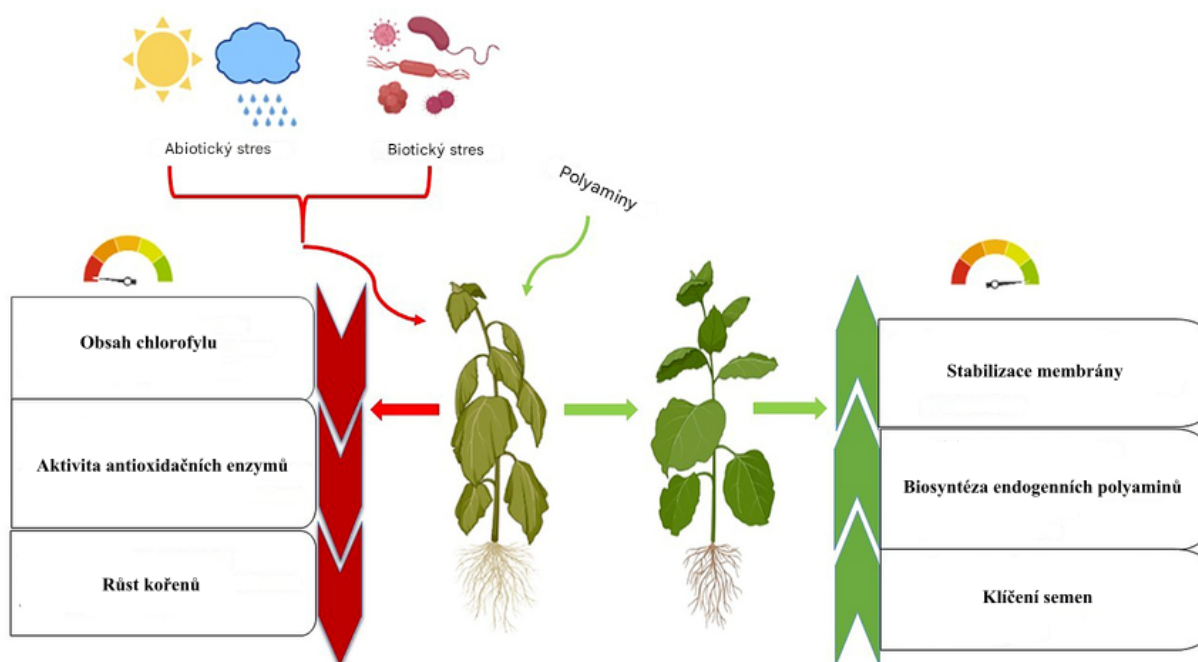
Množství soli ve výrobku může růst některých mikroorganismů podporovat nebo naopak inhibovat. Vysoké koncentrace soli se často používají ve fermentovaných potravinách, například solených rybách, ke kontrole nechtěných mikroorganismů. Některé halofilní bakterie však dokážou produkovat biogenní aminy i v těchto podmínkách. Gardini et al. (2016) zjistili, že některé kmeny bakterií mléčného kvašení byly schopné produkovat tyramin i při vysokém obsahu soli [6].

Přítomnost či nepřítomnost kyslíku také ovlivňuje metabolické dráhy bakterií. Například kadaverin je typicky produkován v anaerobních podmínkách, kdy dochází k rozkladu lysinu bakteriemi jako je *Clostridium spp.*, které prosperují bez přístupu kyslíku. Naopak histamin je často vytvářen v aerobním prostředí, a to bakteriemi jako *Morganella morganii* nebo *Pseudomonas spp* [6].

2.1.4.1 Rostliny

V rostlinách mají biogenní aminy významný vliv na regulaci růstu, vývoje a reakcí na environmentální stres, včetně sucha, zasolení a UV záření (viz *Obrázek 4*). Tyto sloučeniny jsou nezbytné pro buněčné dělení, diferenciaci a regulaci růstu rostlin. Putrescin byl identifikován nejen jako klíčový metabolit zapojený do tolerance a odolnosti rostlin vůči stresovým faktorům, ale také slouží jako prekurzor pro biosyntézu vyšších polyaminů, jako jsou spermidin a spermin [7].

Obsah biogenních aminů v rostlinách se může lišit v závislosti na druhu rostliny, vývojovém stádiu, agronomických podmínkách a expozici stresovým faktorům. Například exogenní aplikace putrescinu a spermidinu na listy rostlin brukve sítinovité (*Brassica juncea*) ve studii autorů Aoun, Hourmant, & Cabon (2008) prokázala ochranný účinek proti oxidačnímu stresu indukovanému kadmíem, což naznačuje jejich potenciální využití při zvyšování odolnosti rostlin vůči těžkým kovům. Polyaminy se podílejí také na vývoji pylu, kde regulují transkripci, strukturu buněčné stěny pylu, dynamiku cytoskeletu a hladiny reaktivních forem kyslíku [7].



Obrázek 4: Role polyaminů v rostlinách (zelené šipky indikují stimulační účinky polyaminů, červené šipky značí nepříznivé fyziologické procesy způsobené stresem), převzato a upraveno z [8]

2.1.4.2 Živočichové

V tělech živočichů jsou biogenní aminy přítomny jako endogenní látky s významnou fyziologickou funkcí. Mezi hlavní biogenní aminy vyskytující se u živočichů histamin, tyramin, serotonin, dopamin, noradrenalin a adrenalin. Každý z těchto aminů má specifickou roli v organismu a podílí se na různých fyziologických procesech. Tyto látky ovlivňují neurotransmisi, regulaci krevního tlaku, imunitní odpovědi, termoregulaci, metabolismus a další životně důležité funkce. Vyskytují se ve tkáních, jako je mozek, střeva, nadledviny nebo kůže [1]. Detailněji jsou fyziologické funkce biogenních aminů rozpracovány v kapitole 2.1.5.1 Fyziologický význam.

Koncentrace těchto aminů je regulována enzymatickými mechanismy, avšak může být narušena patologickými procesy nebo při rozkladu tkání po smrti zvířete, kdy může docházet k jejich akumulaci vlivem mikrobiální aktivity [1].

2.1.4.3 Mikroorganismy

Mikroorganismy představují významný zdroj biogenních aminů, přičemž jejich produkce je úzce spojena s enzymatickou aktivitou některých bakteriálních kmenů. Mezi klíčové mikrobiální producenty biogenních aminů patří bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*, jako jsou například *Enterobacter*, *Klebsiella* či *Escherichia*. Tyto bakterie jsou častými kolonizátory živočišných substrátů a při přítomnosti volných aminokyselin mohou tvořit značná množství histaminu, putrescinu a kadaverinu, zejména v prostředí s omezenou hygienou nebo při vyšších teplotách [6].

Podstatný vliv na tvorbu aminů mají i bakterie mléčného kvašení, především rody *Lactobacillus* a *Pediococcus*, náležející do čeledi *Lactobacillaceae*. Ačkoliv jsou tyto bakterie často využívány jako pozitivní mikrobiota při výrobě fermentovaných potravin, některé jejich kmeny disponují schopností dekarboxylace aminokyselin a podílejí se na produkci tyraminu a dalších biogenních aminů [6].

Významná je také čeleď *Pseudomonadaceae*, především druhy rodu *Pseudomonas*, které vykazují psychrotrofní charakter a jsou tedy schopné růst i při nízkých teplotách. Tyto bakterie jsou známy schopností tvořit kadaverin a putrescin i během chlazeného skladování, což je činí rizikovými producenty biogenních aminů zejména v živočišných substrátech [6].

2.1.4.4 Potraviny

Potraviny jsou jedním z hlavních zdrojů biogenních aminů pro lidskou populaci. Obzvláště vysoké koncentrace byly nalezeny v potravinách bohatých na proteiny a v těch, které prošly fermentačními procesy. Tyto potraviny zahrnují:

Maso a masné výrobky

Nejběžnější biogenní aminy nalezené v čerstvém i zpracovaném masu jsou histamin, tyramin, kadaverin nebo putrescin. Tvorbu těchto aminů ovlivňuje několik faktorů jako jsou například podmínky skladování, kdy při dlouhodobém skladování, zejména při nevhodných teplotách, může dojít ke zvýšené produkci biogenních aminů. Rovněž způsob zpracování a manipulace s masnými výrobky nebo výchozí kvalita masa použitého při zpracování hraje roli v akumulaci biogenních aminů [9].

Ryby a mořské plody

Zvláště vysoký obsah histaminu a dalších biogenních aminů je v nevhodně skladovaných rybách. Pro takto navozené histaminové otravy se zažil termín scombroid syndrom. Vzhledem k tomu, že většinou je původcem otravy rybí maso, je název scombroid odvozen z latinského označení čeledi makrelovití *Scombridae*. Otrava histaminem může nastat po konzumaci ryb obsahujících histamin v koncentracích vyšších než 500 mg/kg [9].

Tvorba histaminu je nejvíce závislá na teplotě. Například u tuňáka žlutoploutvého skladovaného při 22 °C po dobu 9 dnů dosáhla hladina histaminu 4 500 mg/kg, ve srovnání s pouhými 15 mg/kg při skladování při 0 °C. Správné chlazení tedy může výrazně pomoci kontrolovat jeho produkci [9].

Fermentované potraviny

Víno, pivo, sójová omáčka, fermentované mléčné výrobky, sýry a další fermentované produkty rovněž obsahují biogenní aminy. Nejběžnější biogenní aminy jsou tyramin, histamin a fenylethylamin. Tyto sloučeniny vznikají během fermentace mikroorganismy produkujícími dekarboxylázy [9].

Produkcí biogenních aminů ve fermentovaných potravinách může ovlivnit několik faktorů jako jsou podmínky skladování, výrobní postupy, podíl mikrobiální populace s dekarboxylázovou aktivitou, kvalita surovin nebo dostupnost volných aminokyselin [9].

Zelenina a ovoce

Biogenní aminy mohou být přítomny i v různé zelenině a ovoci, přičemž nejčastěji se vyskytujícím aminem v těchto potravinách je putrescin [10].

Mezi zeleninu a ovoce s vysokým obsahem putrescinu patří například lilek, kukuřice, zelené a fialové fazole, špenát, citrusové plody nebo banán. Mohou obsahovat až 200 mg/kg putrescinu. Vyšší hladiny biogenních aminů lze přičíst například bakteriální aktivitě během špatného skladování ovoce a zeleniny. Obsah putrescinu v zelenině můžeme snížit povarením [10].

2.1.4.5 Ekosystémy

Biogenní aminy, zejména kadaverin a putrescin, hrají důležitou roli v přírodních procesech a jejich přítomnost byla zjištěna také v půdě, vodě a organických odpadech. V půdě se podílejí na růstu mikroorganismů, regulují růst rostlin a indikují mikrobiální rozklad organických látek. Ve vodních ekosystémech mohou biogenní aminy ovlivňovat mikrobiální rovnováhu a kvalitu vody, zejména v anaerobních podmínkách sedimentů. Tyto sloučeniny mohou mít podstatný vliv také na biogeochemické cykly [3].

Expozice kadaverinu a putrescinu může významně ovlivnit expresi funkčních genů spojených s cyklováním uhlíku (C) a dusíku (N) ve vodních i sedimentačních ekosystémech. Zejména putrescin může zvýšit alfa diverzitu genů fixace uhlíku, zatímco v sedimentu může vést ke snížení diverzity genů cyklujících dusík. Směs kadaverinu a putrescinu může rovněž snižovat zastoupení genů souvisejících s redukční cestou acetyl-CoA a degradací ligninu ve vodním prostředí. Přítomnost těchto biogenních aminů může dále způsobovat pokles množství genů spojených s nitrifikací, denitrifikací a asimilací dusíku jak ve vodě, tak v sedimentu. Expozice kadaverinu a putrescinu tedy vykazuje inhibiční účinky na fixaci uhlíku i na dusíkové cykly, přičemž může zároveň podporovat degradaci uhlíkatých sloučenin [3].

2.1.5 Význam biogenních aminů

Biogenní aminy, jejichž přítomnost byla popsána v předchozí kapitole, se uplatňují v širokém spektru biologických a fyziologických procesů. Zatímco v některých případech působí jako klíčové metabolity nebo signální molekuly, v jiných mohou při nadbytku představovat zdravotní riziko. Význam těchto sloučenin lze rozdělit do tří hlavních oblastí: fyziologické, biologické a toxikologické aspekty [1].

2.1.5.1 Fyziologický význam

Biogenní aminy mají zásadní význam pro fyziologii živočichů (viz *Tabulka 3*), rostlin i mikroorganismů. Mezi nejvýznamnější patří histamin, tyramin, serotonin, dopamin, noradrenalin a adrenalin [11].

Histamin hraje klíčovou roli v imunitních reakcích. Uvolňuje se při alergických reakcích a způsobuje rozšíření cév, což vede k otokům a zánětlivým reakcím. Kromě toho se histamin podílí na regulaci kyseliny v žaludku, čímž podporuje trávení potravy [11].

Tyramin ovlivňuje vazomotorické funkce a jeho hladiny mohou interagovat s inhibitory monoaminoxidázy, což může vést k prudkému zvýšení krevního tlaku a způsobit hypertenzní krizi [12].

Serotonin se nachází ve vysokých koncentracích v trávicím traktu, kde reguluje mobilitu střev. Kromě toho ovlivňuje náladu, spánek a chuť k jídlu, čímž hraje významnou roli v psychickém a fyziologickém stavu organismu. Dysfunkce serotoninu je často spojována s depresemi a úzkostmi [11].

Dopamin je klíčový pro motorické funkce, motivaci a vnímání potěšení. Hraje zásadní roli v řízení pohybu, jeho nedostatek může být příčinou Parkinsonovy choroby, zatímco jeho nadměrná aktivita může být spojována s poruchami nálady nebo závislostmi [11].

Noradrenalin a adrenalin jsou úzce spojeny se stresovou odpovědí organismu. Noradrenalin zvyšuje srdeční frekvenci, krevní tlak a připravuje tělo na fyzickou námahu. Adrenalin, vznikající z noradrenalinu, má podobný účinek, ale navíc stimuluje metabolismus a zvyšuje výdej energie, což pomáhá tělu zvládnout stresové situace [11].

Další důležitou funkcí biogenních aminů je regulace krevního tlaku a tělesné teploty, což je zásadní pro udržení homeostázy. Polyaminy, jako spermin a spermidin, přispívají ke stabilizaci DNA a podporují buněčný růst a dělení, čímž hrají důležitou roli v regeneraci tkání. U rostlin jsou biogenní aminy zapojeny do reakcí na stresové faktory, jako je zasolení, sucho nebo útok patogenů [11].

Tab. 3: Vybrané biogenní aminy – jejich prekurzory a fyziologický význam [13]

Biogenní amin	Původní aminokyselina	Fyziologický význam
Histamin	Histidin	Lokální tkáňový hormon, vliv na krevní tlak a sekreci žaludeční šťávy, účast při anafylaktickém šoku a alergických reakcích
Kadaverin	Lysin	Stabilizace makromolekul (nukleové kyseliny) a subcelulárních struktur (ribosomy), stimulace diferenciac buněk, rostlinný hormon
Putrescin	Arginin (přes ornithin nebo citrulin)	Stabilizace makromolekul (nukleové kyseliny) a subcelulárních struktur (ribosomy), stimulace diferenciac buněk, rostlinný hormon
Agmatin	Arginin	Stabilizace makromolekul (nukleové kyseliny) a subcelulárních struktur (ribosomy), stimulace diferenciac buněk, rostlinný hormon
Fenylethylamin	Fenylalanin	Prekurzor tyraminu
Tyramin	Tyrosin	Prekurzor dopaminu, lokální tkáňový hormon, vliv na krevní tlak a kontrakce hladkého svalstva
Dopamin	3,4-dihydroxyfenylalanin (DOPA)	Mediátor sympatických nervů
Tryptamin	Tryptofan	Lokální tkáňové a rostlinné hormony (katecholaminy), vliv na krevní tlak, peristaltiku střev a na psychické funkce

2.1.5.2 Biologický význam

Biogenní aminy mají významný vliv na mikrobiální procesy a ekologické interakce. V mikroorganismech se podílejí na metabolismu dusíku a uhlíku, což je klíčové pro koloběh živin v přírodních i uměle vytvořených ekosystémech. Putrescin a kadaverin, které vznikají při degradaci proteinů, mohou fungovat jako zdroje dusíku pro mikroorganismy, zatímco polyaminy napomáhají stabilitě buněčných membrán a regulaci růstu [3].

V půdě podporují biogenní aminy růst symbiotických mikroorganismů, zejména rhizobií, které fixují atmosférický dusík v kořenech rostlin. Tím se přirozeně zvyšuje produktivita zemědělských plodin bez potřeby syntetických hnojiv. U rostlin dále polyaminy, jako je spermin a spermidin, přispívají k odolnosti vůči stresovým faktorům jako je zasolení, sucho nebo kontaminace těžkými kovy a hrají roli v růstu kořenů a zrání plodů [3].

Přítomnost biogenních aminů může zároveň sloužit jako indikátor mikrobiální aktivity v prostředích jako jsou odpadní vody nebo půdy zatížené antropogenní činností, kde signalizují efektivní biodegradační procesy a přítomnost aktivní mikrobiální populace [3].

2.1.5.3 Toxikologický význam

Z toxikologického hlediska jsou nejproblematictějšími biogenními aminy histamin, tyramin a β -fenylethylamin. Tyto sloučeniny mohou ve vyšších koncentracích vést k intoxikacím a hrozí tak nežádoucí zdravotní účinky [5].

Konzumace potravin s vysokým obsahem biogenních aminů může vyvolat příznaky podobné alergickým reakcím: pálení a brnění v ústech, zrudnutí obličeje, pocení, bolest hlavy, nevolnost, zvracení, závratě, bušení srdce a kožní vyrážky. U citlivých jedinců může dojít ke komplexnímu syndromu histaminové intolerance, který se projevuje symptomy gastrointestinálními (např. bolest břicha, průjem, zvracení), dermatologickými (např. kopřivka, svědění), respiračními (např. rýma, dušnost, astma), kardiovaskulárními (např. hypotenze, arytmie) i neurologickými (např. migréna). Závažnost těchto příznaků závisí na množství přijatých aminů (viz Tabulka 4), individuální citlivosti jedince a celkovém zdravotním stavu [5].

Tab. 4: Toxické dávky vybraných biogenních aminů [14]

Typ účinku	Biogenní amin	Obsah v potravine (mg/kg)
Bez zdravotního poškození	histamin	5–10
Mírný účinek	histamin	20–40
	tyramin	5–10
	tryptamin	25
	fenylethylamin	5
Toxický účinek	histamin	70–100
	tyramin	20–80
	fenylethylamin	30
Vysoce toxický účinek	histamin	1000
	tyramin	250

Spermin a spermidin mohou při vysoké dávce u zvířat vyvolat akutní pokles krevního tlaku, dýchací obtíže a známky nefrotoxicity. Existují také důkazy o jejich podílu na karcinogenezi, invazi nádorových buněk a tvorbě metastáz [5].

Toxicita biogenních aminů závisí rovněž na jejich vzájemné interakci. Například putrescin a kadaverin mohou zvyšovat toxicitu histaminu tím, že soutěží o vazebná místa enzymů, a tím inhibují jeho odbourávání [5].

Zdravý organismus se dokáže adaptovat na zvýšený příjem biogenních aminů z potravy prostřednictvím efektivního detoxikačního mechanismu, jenž zahrnuje enzymy aminoroxidázy, které obsahují prostetickou skupinu FAD (flavinadenindinukleotid). Nejvýznamnějšími enzymy tohoto systému jsou monoaminoxidáza (MAO) a diaminoxidáza (DAO). Detoxikační proces probíhá především v tenkém střevě a játrech, kde dochází k dehydrogenaci aminů, což je podobné oxidační deaminaci. Tento proces probíhá přes intermediární imin, při jehož tvorbě vzniká peroxid vodíku (H_2O_2). Následně dochází k hydrolyze iminu, při níž se uvolňuje amoniak a vzniká aldehyd, který je následně oxidován na karboxylovou kyselinu [14].

Účinnost detoxikačního systému je individuálně variabilní a může být negativně ovlivněna faktory, jako je konzumace alkoholu nebo užívání některých léčiv, například psychofarmak, antialergik či léků podporujících vykašlávání. Toxické účinky biogenních aminů jsou závislé na aktivitě enzymů detoxikačního systému, přičemž při vysokých koncentracích těchto aminů enzymy již nejsou schopny je efektivně eliminovat, což může vést k selhání detoxikačních mechanismů [14].

2.2 Metody stanovení biogenních aminů

Nejčastěji používanými metodami pro analýzu biogenních aminů (BAs) jsou tenkovrstvá chromatografie (TLC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie (GC) a kapilární elektroforéza (CE). Každá z těchto metod má své specifické výhody a omezení, přičemž jejich volba závisí na povaze vzorku a požadovaných parametrech analýzy. Analýza biogenních aminů však přináší řadu výzev, jako je složitá matrice vzorku, přítomnost interferujících látek a koexistence několika biogenních aminů ve stejném vzorku, což může komplikovat jejich přesné stanovení, a proto se neustále vyvíjejí nové metody, které by umožnily rychlejší, spolehlivější a ekologicky šetrnou analýzu [15].

2.2.1 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) je jednoduchá a cenově dostupná analytická technika, která se často používá pro rychlou separaci a identifikaci biogenních aminů. Tento typ chromatografie je oblíbený pro svou rychlost, snadnost použití a schopnost zpracovávat malé objemy vzorku, což ho činí vhodným pro rutinní analýzy a screeningové testy v laboratorní praxi [16].

Ve studii publikované v [16] byla použita tenkovrstvá chromatografie (TLC) k separaci a identifikaci biogenních aminů v bakteriálních kulturách. Metoda umožnila detekci histaminu, tyraminu, putrescinu a fenylethylaminu bez nutnosti předchozí extrakce. Vzorky byly derivatizovány dansylchloridem pomocí modifikované metody, zahrnující přidání $250 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ hydrogenfosforečnanu disodného (pH 9), $4 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaOH a $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ dansylchloridu v acetonu, následně inkubované při $55 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 1 hodiny. Separace probíhala na TLC deskách se silikagelem 60 F254 za použití mobilní fáze chloroform : triethylamin (4 : 1). Po chromatografii byla deska postříkána směsí isopropanol : triethanolamin (8 : 2) k zesílení fluorescence. Detekce probíhala pomocí UV světla při 312 nm. Minimální detekovatelné koncentrace byly $1\ 000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ pro histamin a $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ pro ostatní aminy. Tato metoda byla úspěšně použita ke stanovení biogenních aminů produkovaných bakteriemi jako *Lactobacillus brevis*, *Serratia liquefaciens* a *Enterococcus faecium* [16].

Princip tenkovrstvé chromatografie

TLC je metoda založená na separaci složek vzorku pomocí rozdílné afinity k mobilní a stacionární fázi. Nejčastěji je využíván adsorpční mechanismus separace, případně kombinace adsorpce a rozdělovací rovnováhy [16].

Stacionární fází je tenká vrstva sorbentu, nejčastěji silikagelu (SiO_2), oxidu hlinitého (Al_2O_3) nebo celulózy, nanosená na pevné podložce, kterou může být skleněná destička, hliníková fólie nebo plast. Tato vrstva musí být homogenní, dostatečně přilnavá a tvořená jemnými částicemi o velikosti přibližně 1–5 μm [17].

Mobilní fází tvoří směs organických rozpouštědel, popřípadě ve směsi s vodou. Nejčastěji se využívá ethanol, aceton, chloroform, benzen nebo hexan. Volba vhodné mobilní fáze závisí na polaritě separovaných látek a typu stacionární fáze [17].

Vzorek se nanáší na startovací čáru, která je vyznačena několik milimetrů nad dolním okrajem destičky. Společně se vzorkem se často nanášejí i známé standardy za účelem následného porovnání polohy skvrn a výpočtu retenčního faktoru [17].

Po zaschnutí se destička vloží do vyvíjecí komory, jejíž dno obsahuje malé množství mobilní fáze. Vzestup mobilní fáze probíhá pomocí kapilárního efektu a pohybuje se vzhůru po povrchu stacionární fáze. V tomto procesu dochází k interakci jednotlivých složek vzorku se stacionární fází. Každá složka se pohybuje jinou rychlostí, v závislosti na své afinitě k mobilní a stacionární fázi – čím silnější interakce se stacionární fází, tím pomalejší migrace a naopak [17].

Separace pokračuje, dokud čelo mobilní fáze nedosáhne asi 1–2 cm pod horní okraj destičky, poté se vývoj přeruší, deska se vyjme, vysuší a následně analyzuje. Na *Obrázku 5* je zobrazen příklad TLC destičky s rozděleným vzorkem [17].

Výpočet retenčního faktoru

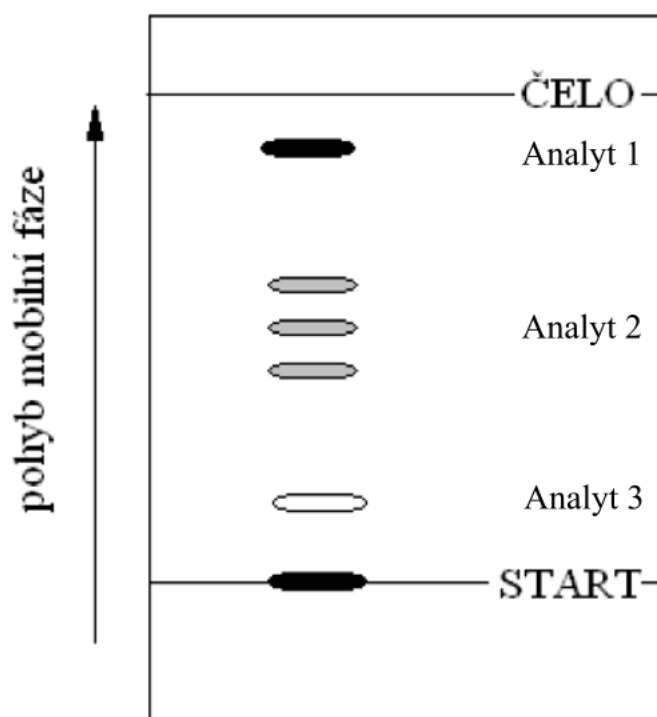
Každá separovaná složka je charakterizována tzv. retardačním faktorem R_f , což je bezrozměrná veličina udávající poměr migrace dané látky vůči čelu mobilní fáze:

$$R_f = \frac{b}{a}$$

kde:

- b je vzdálenost středu skvrny od startu (v mm),
- a je vzdálenost čela mobilní fáze od startu (v mm).

Tento faktor je specifický pro danou kombinaci stacionární a mobilní fáze a slouží k identifikaci látek na základě srovnání s R_f známých standardů [17].



Obrázek 5: TLC destička s rozděleným vzorkem, převzato a upraveno z [17]

Detekce složek

Po dokončení separace následuje detekce rozdělených složek. Barevné sloučeniny lze pozorovat přímo vizuálně, což je jednoduchý způsob detekce. V případě bezbarvých sloučenin se často používá fluorescenční detekce, při níž je stacionární fáze upravena fluorescenční látkou. Pod UV lampou (například 254 nm) lze pozorovat fluorescence pozadí, zatímco nefluoreskující sloučeniny se projeví jako tmavé skvrny [17].

Další možností je chemická detekce – destička se postříká detekčním činidlem, které reaguje s analytem za vzniku barevné sloučeniny. Typickými činidly jsou například ninhydrin (reakce s aminokyselinami), bromfenolová modř nebo jodová komora [17].

Příprava vzorku

Stejně jako u HPLC se vzorky biogenních aminů nejprve extrahují, aby se odstranily nežádoucí matrice a zvýšila se koncentrace analytu. Po extrakci je vzorek aplikován na startovací bod desky, kde je jemně nanesen malý objem pomocí mikropipety nebo kapilární pipety, následně se nechá zaschnout a pokračuje se vývojovým procesem v uzavřené komoře [16].

Výhody a omezení TLC

TLC je rychlá, levná a jednoduchá metoda, což ji činí ideální pro screeningové testy a předběžnou analýzu vzorků. Vysoká flexibilita v použití různých mobilních fází a stacionárních materiálů umožňuje optimalizaci podmínek pro analýzu specifických biogenních aminů. Na druhou stranu má TLC omezenou kvantitativní schopnost ve srovnání s metodami jako HPLC, což může být nevýhoda při potřebě přesného stanovení koncentrace analytu. Kromě toho jsou další nevýhodou nižší citlivost a rozlišení oproti pokročilejším metodám, což může komplikovat analýzu komplexních směsí [16].

2.2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jednou z nejrozšířenějších analytických metod pro stanovení biogenních aminů (BAs) díky své vysoké přesnosti, reprodukovatelnosti a širokému spektru aplikací. Tato metoda je založena na separaci složek vzorku pomocí pohyblivé (mobilní) a nepohyblivé (stacionární) fáze, přičemž každá analyzovaná látka vykazuje charakteristickou dobu zdržení. HPLC je zvláště vhodná pro analýzu biogenních aminů v potravinách, biologických vzorcích a farmaceutických produktech [15].

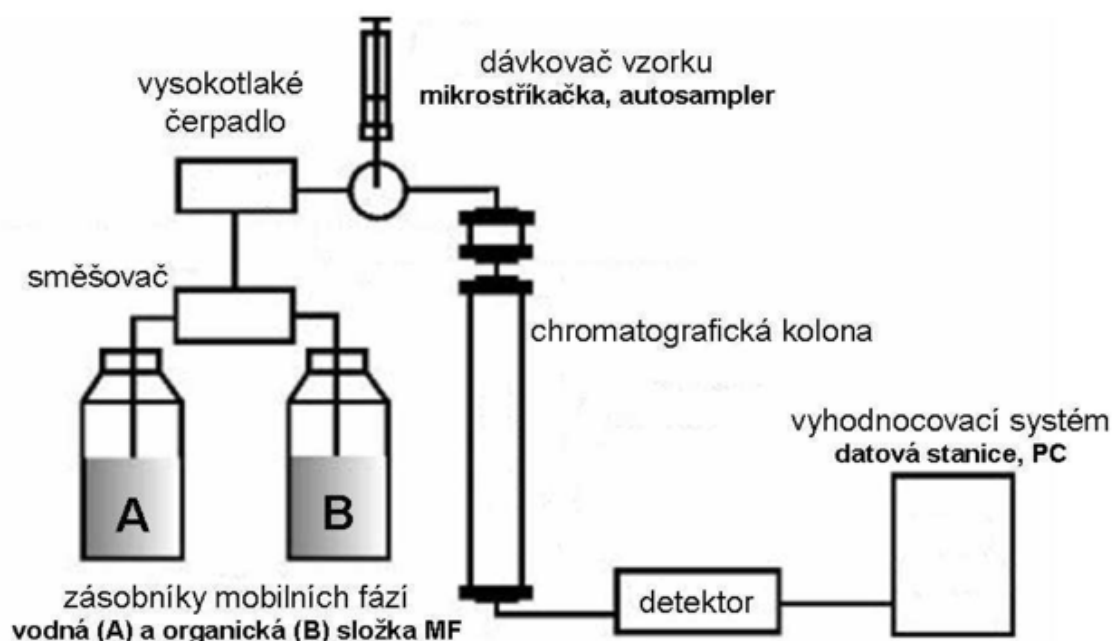
Například ve studii [15] byla použita metoda HPLC k analýze sperminu, spermidinu, histaminu, tryptaminu a fenylethylaminu v sušených fermentovaných klobásách. Detekce byla provedena pomocí HPLC s diodovým polem (DAD) po předkolonové derivatizaci dansylchloridem. Nalezené koncentrace biogenních aminů se pohybovaly v rozmezí: spermin 0–16,4 mg/kg, spermidin 0–10,7 mg/kg, histamin 50–100 mg/kg a tryptamin 1,2–82,3 mg/kg. Fenylethylamin byl nalezen v 17 z 30 vzorků, přičemž jeho koncentrace ve všech případech nepřekročila 25 mg/kg.

Princip metody

Princip HPLC spočívá v zavedení vzorku do mobilní fáze – kapaliny, která je pod vysokým tlakem čerpána přes kolonu obsahující stacionární fázi, což je obvykle tuhá látka nebo kapalina navázaná na pevný nosič. Separace biogenních aminů je založena na jejich rozdílné interakci s oběma fázemi, což ovlivňuje rychlost jejich průchodu kolonou [18].

V závislosti na typu stacionární fáze může být separace řízena hydrofobními interakcemi, iontovými výměnami nebo jinými mechanismy. Biogenní aminy jsou obvykle malé polární molekuly, což vyžaduje použití specifických kolon a mobilních fází pro jejich optimální separaci [18].

Základní instrumentace HPLC je znázorněna na *Obrázku 6*. Mobilní fáze, složená dle potřeby z vodné a organické složky, je pomocí vysokotlakého čerpadla dopravována do chromatografické kolony. Mezi čerpadlem a kolonou se nachází dávkovací zařízení, které umožňuje vstříknout vzorek do proudu mobilní fáze. Vzorek je poté unášen mobilní fází do kolony, kde dochází k separaci. Na výstupu z kolony je umístěn detektor, jehož signál je dále zpracováván pomocí připojeného počítače [18].



Obrázek 6: Základní instrumentace HPLC [18]

V koloně probíhá opakovaný proces sorpce (navázání) a desorpce (uvolnění) jednotlivých složek vzorku, přičemž rychlost, s jakou složky putují kolonou, je dána jejich afinitou k stacionární a mobilní fázi. Tento jev je kvantifikován tzv. distribuční konstantou, která udává poměr rovnovážných koncentrací látky v těchto fázích. Pro efektivní separaci dvou složek je zásadní, aby měly odlišné distribuční konstanty [18].

Z hlediska konstrukce kolony se nejčastěji používají tzv. částicové kolony, které jsou naplněny sorbentem s definovanými parametry jako je velikost částic či pórovitost. Alternativou jsou monolitické kolony, tvořené jedním kompaktním porézním blokem, který umožňuje vysoké průtokové rychlosti díky nízkému odporu vůči proudění kapaliny [18].

Výstupem analýzy je chromatogram, na němž jsou detekovány jednotlivé složky vzorku podle jejich retenčních časů a intenzity signálu, která odpovídá jejich koncentraci [18].

Příprava vzorků

Příprava vzorku je klíčovým krokem pro dosažení přesných a reprodukovatelných výsledků. Vzhledem ke složité matici vzorků, ve kterých se BAs běžně nacházejí, je obvykle nutné před samotnou analýzou provést extrakci a čištění vzorku. Nejčastěji se používají metody kapalinové extrakce (například s použitím kyseliny chloristé chlorovodíkové či methanolu), nebo extrakce na pevné fázi (SPE), které pomáhají odstranit interferující složky matrice [19,20].

Dalším důležitým krokem je derivatizace biogenních aminů, která zlepšuje jejich detekovatelnost pomocí chromatografického detektoru, protože původní molekuly nemusí obsahovat dostatečně silné chromofory nebo fluorofory. Používanými derivatizačními činidly jsou například dansylchlorid nebo benzoylchlorid, které reagují s aminovými skupinami za vzniku sloučenin s vyšší absorpční nebo fluorescenční schopností [19,20].

Detekční metody

Detekce složek může být provedena různými způsoby. Mezi nejčastěji používané detekční metody patří:

- UV-VIS detekce: Standardní metoda využívající absorpční vlastnosti derivatizovaných biogenních aminů při specifických vlnových délkách, obvykle v rozsahu 200–400 nm. Tato metoda je široce používaná díky své jednoduchosti a dostupnosti.
- Fluorescenční detekce: Poskytuje vyšší citlivost než UV-VIS detekce a je vhodná pro analýzu velmi nízkých koncentrací biogenních aminů. Používá derivatizační činidla, která po excitaci vyzařují fluorescenční světlo.
- Hmotnostní spektrometrie (HPLC-MS): Kombinace HPLC s hmotnostní spektrometrií umožňuje identifikaci a kvantifikaci biogenních aminů na molekulární úrovni. Tato metoda je tedy užitečná při analýze složitých vzorků [21].

Výhody a omezení

Mezi hlavní výhody HPLC patří její univerzálnost, schopnost analyzovat různé typy vzorků a možnost kvantitativní analýzy s vysokou přesností. Nicméně analýza pomocí HPLC může být časově a ekonomicky náročná, zejména kvůli nákladům na mobilní fázi, derivatizační činidla a údržbu přístrojů. Dalším omezením je potřeba složité přípravy vzorků a obtížná separace velmi podobných sloučenin [18].

2.2.3 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je analytická metoda často používaná pro separaci a stanovení těkavých a termostabilních sloučenin. Díky své vysoké separační schopnosti, citlivosti a možnosti připojení k různým detektorům je GC široce využívána zejména při analýze složitých matic [22].

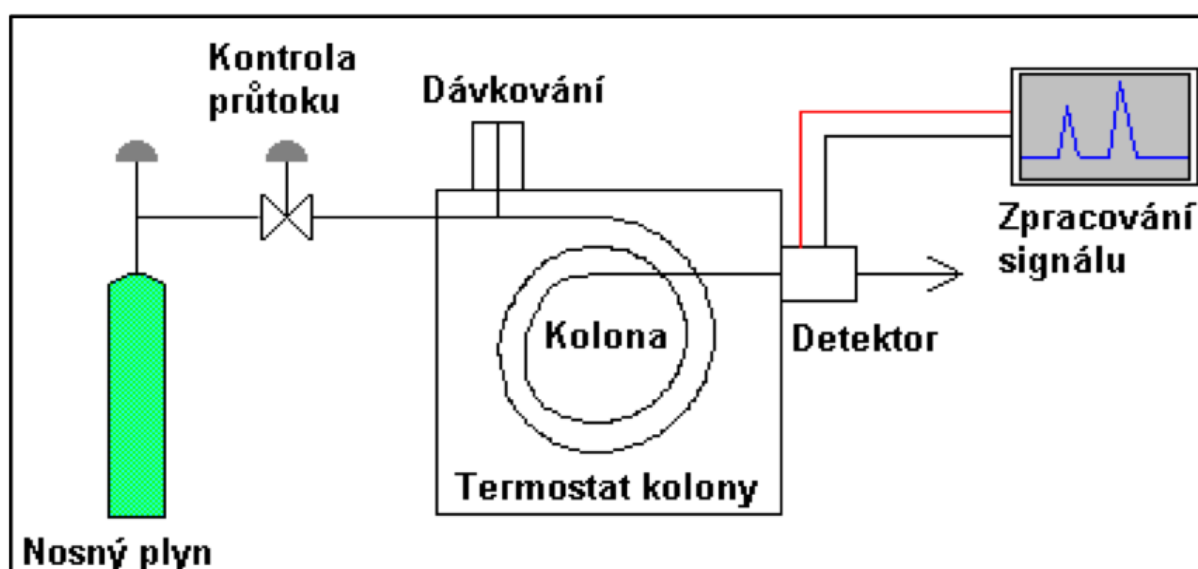
Autoři studie [22] použili plynovou chromatografii s plamenovou ionizační detekcí (GC/FID) k analýze biogenních aminů v lososech z Atlantiku. Cílové analyty zahrnovaly putrescin, kadaverin, histamin, tyramin, spermidin a heptylamin. Před analýzou byly aminy derivatizovány chloroformiátem propylu, což zvýšilo jejich těkavost a umožnilo lepší separaci na chromatografické koloně Phenomenex ZB-5. Metoda GC/FID vykazovala dobrou reprodukovatelnost, relativní standardní odchylky byly pod 10 % pro všechny analyty. Kvantifikační limit byl 10 ppm, zatímco detekční limity se pohybovaly v rozmezí 2–3 ppm.

Princip plynové chromatografie

Plynová chromatografie je analytická technika založená na separaci a analýze složek směsí v plynném stavu. Základem této techniky je rozdílná afinita jednotlivých analytů ke stacionární fázi a jejich těkavost. Mobilní fázi je inertní nosný plyn, který unáší těkavé složky vzorku skrze chromatografickou kolonu. Stacionární fázi tvoří nejčastěji polymerní materiál, který selektivně interaguje s jednotlivými složkami směsi v závislosti na jejich polaritě. Jednotlivé komponenty plynového chromatografu jsou zobrazeny na *Obrázku 7* [22].

Separace v GC probíhá na základě rozdílů v tlaku par a interakcích analytů se stacionární fází. Těkavější složky a látky s menší afinitou ke stacionární fázi procházejí kolonou rychleji než méně těkavé složky nebo ty, které se na stacionární fázi více vážou.

V případě GSC (gas-solid chromatography) se interakce zakládají na adsorpci analytů na pevný povrch stacionární fáze. V GLC (gas-liquid chromatography) je stacionární fáze tvořena netěkavou kapalinou navázanou na nosném materiálu nebo na vnitřním povrchu kapilární kolony a separace probíhá rozdělením mezi plynnou a kapalnou fází [23].



Obrázek 7: Plynový chromatograf

V GC se používají dva základní typy kolon – náplňové a kapilární. Dnes již méně používané náplňové kolony mají vnitřní průměr 1–4 mm, délku 1 m a více a jsou vyrobeny ze skla nebo nerezové oceli. Mají podobu trubice, která je naplněná nosným materiálem (např. silikagel, aktivní uhlí). Užší kolony jsou účinnější, mají však menší kapacitu pro vzorek. Účinnost kolony se zvyšuje i s její délkou, avšak delší kolony vyžadují zvýšené tlaky nosného plynu [23].

Kapilární kolony mají vnitřní průměr 0,1–0,5 mm a délku 10–150 m. Jsou vyrobeny z křemenného skla a na povrchu potaženy polyimidem pro zvýšení mechanické odolnosti a pružnosti. Stacionární fáze je nanášena tenkou vrstvou na vnitřní stěnu kolony a může být tvořena různými polymery, například methylsilikonovými polymery nebo polyestery. Kapilární kolony jsou velmi účinné, mají však malou kapacitu vzorku [23].

Nosný plyn musí být inertní, čistý a suchý – obvykle se používá helium, dusík, vodík nebo argon. Čistota plynu je zásadní pro zachování funkčnosti kolony a citlivosti detekce. Průtok nosného plynu je řízen pomocí tlakových regulátorů nebo elektronických systémů, které zajišťují konstantní průtok nebo tlak. Průtokové rychlosti se liší podle typu kolony – u kapilárních kolon jsou to jednotky ml/min, u náplňových desítky ml/min [23].

Příprava vzorku

Biogenní aminy jsou netěkavé sloučeniny, a proto je opět nutná jejich derivatizace na těkavé deriváty, které lze následně separovat a detekovat. Často používanými derivatizačními činidly jsou například trifluoracetanhydrid (TFAA) nebo pentafluorbenzaldehyd (PFBA). Typické reakce pro zvýšení těkavosti zahrnují acylaci, silylaci, esterifikaci nebo oximaci [22].

Detekční metody

GC lze kombinovat s různými detektory, které poskytují jak kvalitativní, tak kvantitativní informace. Patří mezi ně například:

- Plamenově ionizační detektor (FID): Využívá se pro rutinní analýzu, protože poskytuje vysokou citlivost a široký lineární rozsah.
- Detektor elektronového záhytu (ECD): Používá se pro analýzu derivátů obsahujících halogeny, což zahrnuje některé derivatizované biogenní aminy.
- Hmotnostní spektrometrie (GC-MS): Nabízí možnost identifikace složek na molekulární úrovni, což je výhodné při analýze komplexních směsí [22].

Výhody a omezení

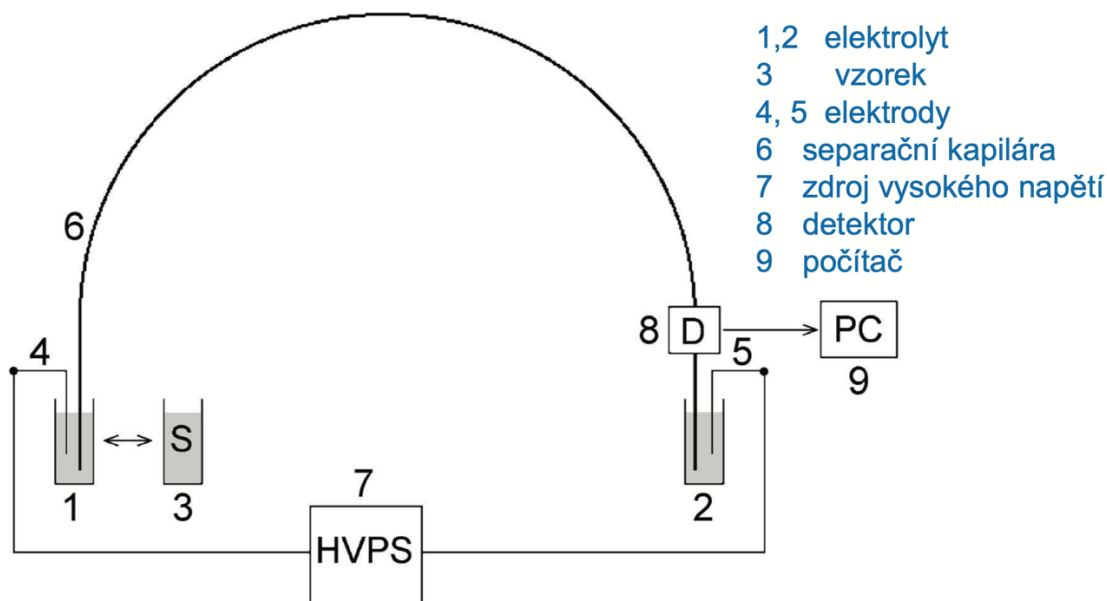
Mezi hlavní výhody GC patří vysoká citlivost, schopnost separace složitých směsí a široké možnosti kombinace s různými detekčními technikami. Nevýhodou je nutnost derivatizace netěkavých sloučenin, což může být časově náročné a vyžaduje použití specifických reagensů. Kromě toho je GC omezená na analýzu tepelně stabilních látek, což může být u některých biogenních aminů problematické [22].

2.2.4 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) je vysoce efektivní metoda, která nabízí jedinečné výhody při analýze nízkomolekulárních polárních látek, jako jsou biogenní aminy. CE se vyznačuje vysokou separační účinností, rychlostí analýzy a schopností zpracovávat vzorky s minimálními požadavky na jejich objem. Je vhodná pro analýzu biologických vzorků, jako jsou potraviny, léčiva nebo tělní tekutiny. Tato metoda navazuje na potřebu citlivé a selektivní analýzy biogenních aminů, zejména v souvislosti s jejich vlivem na kvalitu potravin a lidské zdraví [24].

Princip a základní charakteristika metody

Princip kapilární elektroforézy spočívá v separaci molekul na základě jejich rozdílné elektroforetické mobility, která je definována vztahem mezi elektrickým nábojem molekuly a její velikostí. Molekuly s vyšším nábojem a menší velikostí migrují rychleji než molekuly s nižším nábojem nebo větší velikostí. Tento proces probíhá v tenké kapiláře, obvykle křemenné, s vnitřním průměrem mezi 20 až 100 μm . Vysoké elektrické pole aplikované na kapiláru podporuje rychlou separaci, což je důležité při analýze složitých vzorků. *Obrázek 8* zobrazuje schéma přístroje pro kapilární elektroforézu [24].



Obrázek 8: Schéma přístroje pro kapilární elektroforézu [25]

Detekční metody

Detekce v CE závisí na povaze analyzovaných sloučenin a požadované citlivosti. Mezi nejčastěji využívané detekční metody v CE patří UV-VIS detekce, fluorescenční detekce a hmotnostní spektrometrie (CE-MS). Spojení CE a MS vyžaduje optimalizaci rozhraní mezi těmito systémy, nejčastější jsou elektrosprejové ionizační zdroje (ESI) [24].

Výhody a omezení

Významnou předností CE je vysoká separační účinnost, která umožňuje analýzu složitých směsí a identifikaci jednotlivých složek s vysokou přesností. Nízká spotřeba vzorků a činidel snižuje náklady a zároveň činí metodu ekologicky šetrnou. CE je také vysoce variabilní díky možnosti úpravy elektrolytů a stacionárních fází, což umožňuje analýzu široké škály sloučenin. Významná je rovněž možnost spojení CE s hmotnostní spektrometrií, která poskytuje kvalitativní i kvantitativní informace na molekulární úrovni [24].

Na druhou stranu je metoda citlivá na změny matrice vzorku, což může ovlivnit stabilitu elektroosmotického toku a reprodukovatelnost výsledků. Další omezení spočívá v nižší odolnosti vůči variabilitám ve složení a vlastnostech vzorku nebo podmínek během analýzy. Toto může při analýze vzorků s vysokým obsahem pevných částic nebo s vysokou viskozitou komplikovat separační proces [24].

2.2.4.1 Modifikace kapilární elektroforézy

Modifikace této techniky umožňují zlepšení separačních schopností, zvýšení citlivosti, rozšíření jejího využití na složitější typy vzorků nebo analýzu specifických látek, jako jsou biogenní aminy (BAs). Mezi modifikace CE patří například kapilární zónová elektroforéza (CZE), micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC), kapilární elektrochromatografie (CEC) a další [24].

Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

CZE je nejjednodušší mód kapilární elektroforézy, který využívá homogenní pufrová média. Separace analytů v CZE je založena na jejich rozdílné elektroforetické mobilitě, která závisí na jejich velikosti a náboji. Tato metoda je zvláště vhodná pro analýzu malých molekul, jako jsou aminy, které vykazují rozdílné kyselé a bazické vlastnosti [24].

Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)

MEKC je rozšířením CZE, které umožňuje separaci neutrálních a nabitých analytů. V MEKC se do pufru přidávají povrchově aktivní látky, jako je dodecylsírán sodný (SDS), které vytvářejí micely. Micely fungují jako pseudostacionární fáze, která interaguje s analyty na základě jejich hydrofobicity a elektrostatické interakce. Tato metoda je obzvláště užitečná pro separaci komplexních směsí biologicky aktivních aminů, které zahrnují jak nabitě, tak neutrální sloučeniny [24].

Autoři studie [24] použili kapilární zónovou elektroforézu (CZE) a micelární elektrokinetickou chromatografii (MEKC) k analýze biogenních aminů v potravinách, nápojích a biologických vzorcích. Cílové analyty zahrnovaly kadaverin, histamin, putrescin, spermidin, spermin a tyramin. Separace probíhala v CZE v boritanovém pufru s koncentrací $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pH 7,2 nebo $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pH 9,1, zatímco u micelární elektrokinetické chromatografie byl použit boritanový pufr s koncentrací $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pH 10 v přítomnosti $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ dodecylsíránu sodného. Před analýzou byly vzorky ošetřeny 6% kyselinou chloristou a přečištěny pomocí iontoměniče. Pro derivatizaci byla použita různá činidla, včetně orto-ftalaldehydu, fluoresceinisoithiokyanátu a 3-(2-furoyl)chinolin-2-karboxaldehydu, umožňující fluorescenční detekci. Pro detekci byly využity metody UV-VIS absorpce, laserem indukované fluorescence (LIF), elektrochemiluminiscence (ELCL) a hmotnostní spektrometrie (MS). Ke zvýšení citlivosti byly aplikovány techniky derivatizace, nepřímé detekce a on-line koncentrační metody, jako je field amplified sample stacking (FASS), který využívá rozdíl vodivosti mezi vzorkem a separačním elektrolytem, což vede k elektrokinetickému nahromadění analytů na rozhraní těchto dvou médií a sweeping, což je technika založená na interakci analytů s pohyblivou pseudofází (např. micely či cyklodextriny), která při průchodu kapilárou koncentruje analyt do zúžené zóny vhodné pro následnou separaci. Metody CZE a MEKC umožnily účinnou separaci biogenních aminů v různých potravinářských matricích, jako je víno, salám a pažitka. Detekční limity (LOD) se pohybovaly od $3,8 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (CZE-LIF) do $1000 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (MEKC-LIF), v závislosti na analyzovaném aminu a použité detekční metodě.

Kapilární elektrochromatografie (CEC)

Kapilární elektrochromatografie (CEC) je hybridní technika kombinující vlastnosti kapilární elektroforézy (CE) a kapalinové chromatografie (LC). Tato metoda využívá elektroosmotický tok (EOF) k pohybu mobilní fáze skrze kapiláru, která je naplněna stacionární fází obvykle v podobě pevné fáze nebo monolitického materiálu, který napodobuje chromatografickou kolonu [26].

Kapilární elektrochromatografie spojuje výhody vysokého rozlišení kapilární elektroforézy s vysokou selektivitou a kapacitou kapalinové chromatografie, což ji činí ideální pro analýzu komplexních směsí [26].

Ve studii [27] autoři použili kapilární elektrochromatografii s postkolonovou derivatizací k analýze biogenních aminů v mase tuňáka. Cílové analyty zahrnovaly histamin, kadaverin, spermidin a tyramin. Separace byla provedena v kapilární koloně plněné silikou o velikosti částic 4 μm , přičemž jako separační pufr byl použit 20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátový pufr s pH 7. Vzorky byly elektrokineticky injektovány při napětí 3 kV po dobu 5 sekund a následně eluovány při stejném napětí. Postkolonová derivatizace byla realizována kontinuálním přidavkem derivatizační směsi obsahující 3 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ orto-ftalaldehydu a N-acetylcysteinu v boritanovém pufru s pH 10 do T-junction konektoru před detekčním oknem. Detekce byla prováděna fluorescenčním detektorem při excitační vlnové délce 340 nm a emisní vlnové délce 450 nm. Metoda vykazovala dobrou reprodukovatelnost s relativní standardní odchylkou 2,4 % pro plošnou odpověď píků a 1,8 % pro retenční časy. Detekční limity se pohybovaly v rozmezí 0,1 až 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, v závislosti na analyzovaném aminu [27].

Tabulka 5 uvádí souhrn vybraných analytických metod použitých pro stanovení biogenních aminů v různých typech vzorků, včetně základních parametrů, jako jsou typ detekce, derivatizace a meze detekce.

Tab. 5: Přehled vybraných metod pro stanovení biogenních aminů

Použitá metoda	Analyty	Matrice	Derivatizace	Detekce	LOD	Studie
TLC	Histamin, tyramin, putrescin, fenyletylamin	Bakteriální kultury	Dansylchlorid	UV	1 000 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (histamin), 10 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (ostatní)	[16]
HPLC-DAD	Spermin, spermidin, histamin, tryptamin, fenyletylamin	Sušené klobásy	Dansylchlorid	DAD	–	[15]
GC-FID	Putrescin, kadaverin, histamin, tyramin, spermidin, heptylamin	Losos (Atlantik)	Chloroformiát propylu	FID	2–3 ppm	[22]
CZE, MEKC	Kadaverin, histamin, putrescin, spermidin, spermin, tyramin	Potraviny, nápoje, biologické vzorky	Orto-ftalaldehyd Fluoresceinisothiokyanát 3-(2-furoyl)chinolin-2-karboxaldehyd	UV, LIF, ELCL, MS	3,8 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ – 1 000 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	[24]
CEC	Histamin, kadaverin, spermidin, tyramin	Tuňák	Orto-ftalaldehyd + N-acetylcystein	FLD	0,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ – 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	[27]

2.3 Stanovované biogenní aminy a jejich vlastnosti

Pro zavedení metody kapilární elektroforézy na stanovení biogenních aminů byly vybráni tři zástupci, konkrétně histamin, tyramin a putrescin.

2.3.1 Histamin

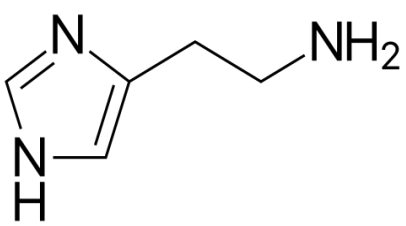
Histamin je nízkomolekulární organická sloučenina, která vzniká dekarboxylací esenciální aminokyseliny histidinu za katalýzy enzymem histidindekarboxylázou. Chemicky se jedná o derivát imidazolu, konkrétně 2-(1H-imidazol-4-yl)ethan-1-amin, který obsahuje jak aromatický imidazolový kruh, tak primární aminoskupinu [28].

Vzhledem ke své struktuře je histamin polární, snadno rozpustný ve vodě, což usnadňuje jeho interakce s biologickými membránami. Jeho struktura umožňuje k jeho detekci využít UV záření. Jeho molekula je malá, s molární hmotností $111,15 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, což je výhodné při kvantitativní analýze v komplexních maticích [28].

Histamin se vyskytuje ve formě bezbarvých krystalů, je teplotně stabilní do cca $80\text{--}85 \text{ }^\circ\text{C}$ (teplota tání), avšak při vyšších teplotách dochází k jeho rozkladu [28].

Souhrn strukturních a fyzikálně-chemických parametrů histaminu je uveden v *Tabulce 6* [28].

Tab. 6: Přehled vybraných fyzikálně-chemických vlastností histaminu [28]

Vlastnost	Hodnota
Systematický název	2-(1H-imidazol-4-yl)ethan-1-amin
Triviální název	Histamin
Sumární vzorec	$\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_3$
Strukturní vzorec	
Molární hmotnost	$111,15 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Teplota tání	$84 \text{ }^\circ\text{C}$
Teplota varu	$209\text{--}210 \text{ }^\circ\text{C}$
Rozpustnost ve vodě	Vysoká
Polarita	Vysoká
Skupenství	Pevná, krystalická látka

Z hlediska bezpečnosti je histamin klasifikován jako potenciálně nebezpečná látka, zejména při požití nebo parenterálním podání ve vyšších dávkách. Dle klasifikace GHS, histamin spadá do několika kategorií (viz *Obrázek 9*):

- **GHS06** – toxické látky
- **GHS07** – dráždivé látky
- **GHS08** – látky nebezpečné pro zdraví



Obrázek 9: Bezpečnostní piktogramy histaminu [28]

2.3.2 Tyramin

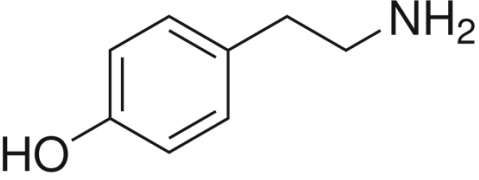
Tyramin představuje nízkomolekulární biogenní amin vznikající dekarboxylací aminokyseliny tyrosinu působením enzymu tyrosindekarboxylázy. Z chemického hlediska jde o 4-hydroxyderivát fenylethylaminu, konkrétně 4-(2-aminoethyl)fenol, což jej řadí mezi strukturálně jednoduché, avšak biologicky aktivní látky [29].

Molekula tyraminu obsahuje aromatický fenolový kruh a postranní řetězec zakončený primární aminoskupinou. Tato struktura mu propůjčuje výraznou polaritu a dobrou rozpustnost ve vodě, což je výhodné nejen z hlediska biologické dostupnosti, ale i pro jeho analytické stanovení ve složitějších matricích. Jeho molární hmotnost činí $137,18 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, skupenstvím se jedná o krystalickou pevnou látku bílé až nažloutlé barvy [29].

Tyramin se přirozeně nachází v celé řadě potravin, zejména těch fermentovaných. Z farmakologického hlediska může hrát roli zejména u jedinců léčených inhibitory monoaminoxidázy (MAO), kde nadměrný příjem tyraminu může vyvolat tzv. tyraminový syndrom charakterizovaný náhlým zvýšením krevního tlaku [29].

Souhrn jeho základních chemických a fyzikálních vlastností uvádí *Tabulka 7*.

Tab. 7: Přehled vybraných fyzikálně-chemických vlastností tyraminu [29]

Vlastnost	Hodnota
Systematický název	4-(2-aminoethyl)fenol
Triviální název	Tyramin
Sumární vzorec	$C_8H_{11}NO$
Strukturní vzorec	
Molární hmotnost	$137,18 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
Teplota tání	$164\text{--}165 \text{ }^\circ\text{C}$
Teplota varu	$166 \text{ }^\circ\text{C}$ při 2mmHg
Rozpuštnost ve vodě	Vysoká
Polarita	Vysoká
Skupenství	Krystalická pevná látka

Z hlediska bezpečnosti tyramin není klasifikován dle systému GHS, jelikož není běžně distribuován jako izolovaná chemická látka. Jeho biologická aktivita však může být významná zejména ve specifických klinických kontextech. U osob s omezenou funkcí enzymu monoaminoxidázy může způsobit závažné kardiovaskulární komplikace, a proto je jeho příjem v těchto případech nutno regulovat [29].

2.3.3 Putrescin

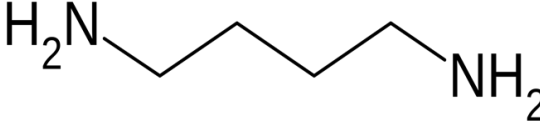
Putrescin, systematicky nazývaný butan-1,4-diamin, je biogenní polyamin patřící mezi nízkomolekulární organické látky. Vzniká zejména dekarboxylací aminokyseliny ornitinu za katalýzy enzymem ornitindekarboxylázou, případně mikrobiálními procesy během rozkladu bílkovin v těle či v potravinách. Chemicky se jedná o alifatický diamin se dvěma primárními aminoskupinami – jeho molekula je lineární, což podporuje jeho interakci s jinými biomolekulami prostřednictvím vodíkových vazeb [30].

Díky přítomnosti dvou volných aminových skupin je putrescin vysoce polární, velmi dobře rozpustný ve vodě, a v biologických systémech se účastní celé řady důležitých procesů, např. v buněčném růstu a proliferaci [30].

Za běžných podmínek je putrescin bezbarvá až nažloutlá kapalina s molární hmotností $88,15 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, která je známá svým intenzivně nepříjemným zápachem – právě díky tomu se často podílí na charakteristickém pachu rozkládající se organické hmoty [30].

Jeho fyzikálně-chemické vlastnosti jsou přehledně shrnuty v *Tabulce 8*.

Tab. 8: Strukturální a fyzikálně-chemické vlastnosti putrescinu [30]

Vlastnost	Hodnota
Systematický název	Butan-1,4-diamin
Triviální název	Putrescin
Sumární vzorec	$C_4H_{12}N_2$
Strukturální vzorec	
Molární hmotnost	$88,15 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Teplota tání	$27,5 \text{ }^\circ\text{C}$
Teplota varu	$158,5 \text{ }^\circ\text{C}$
Rozpustnost ve vodě	Vysoká
Polarita	Vysoká
Skupenství	Kapalina (za běžných podmínek)
Pach	Intenzivní zápach podobný piperidinu

Putrescin je z hlediska bezpečnosti zařazen mezi látky dráždivé a potenciálně toxické při požití a může způsobit podráždění pokožky i sliznic. Ve větších koncentracích může být zdraví nebezpečný – zejména při akumulaci v potravinách. V rámci GHS klasifikace bývá přiřazován k piktogramům dle dostupných údajů (viz Obrázek 10) [30].



Obrázek 10: Bezpečnostní piktogramy putrescinu [30]

3 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout elektroforetickou metodu pro stanovení biogenních aminů. Práce byla vypracována ve spolupráci s ÚCHPBT za účelem analýzy aminů po vzorkování DGT technikou z různých, především potravinářských matric. Optimalizovaná metoda, dle požadavků, má být co možná nejjednodušší, bez významných úprav analyzovaných DGT eluátů.

3.1 Vzorkovací technika DGT (technika difuzního gradientu v tenkém filmu)

Technika difuzního gradientu v tenkém filmu (DGT, z anglického Diffusive Gradients in Thin Films) představuje efektivní vzorkovací techniku pro monitoring biologicky dostupných forem chemických látek v různých matricích, včetně půdy, sedimentů a vody a umožňuje přímé *in situ* měření koncentrací. Princip DGT spočívá ve využití difuzní vrstvy a specifického sorpčního gelu, který váže cílové látky [31].

Princip DGT techniky

Základní konstrukci DGT jednotky tvoří difuzní gel a sorpční gel, přičemž oba jsou uchyceny v malé plastové sondě. Difuzní gel funguje jako selektivní bariéra, která umožňuje průchod analytů. Za tímto gelem se nachází sorpční gel, který analyzované látky zachycuje a akumuluje. Proces vzorkování probíhá na základě difúze, což znamená, že rychlost průchodu iontů je regulována tloušťkou difuzní vrstvy a dobou expozice. Tento přístup umožňuje stanovit průměrnou koncentraci látek v expozičním roztoku během vzorkovacího intervalu [31].

Matematický model DGT techniky, 1. Fickův zákon difuze, popisuje transport hmoty skrze difuzní vrstvu. Množství akumulovaného analytu M [mol] lze vyjádřit pomocí rovnice [31]:

$$M = \frac{C \cdot D \cdot t}{\Delta g}$$

kde:

- C je koncentrace analytu v roztoku [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$]
- D je difuzní koeficient daného analytu [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$],
- t je doba expozice [s],
- Δg je tloušťka difuzní vrstvy [m].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístroje a zařízení

K měření byly použity tyto přístroje:

- ³D Kapilární elektroforéza Agilent CE, Agilent Technologies (Waldbronn, Německo) model GF1600A (viz *Obrázek 11*) doplněný detektorem Agilent 35900E s diodovým polem, který pracuje v rozmezí vlnových délek 190–600 nm
- Analytické váhy HR-120-EC (A&D Instruments Ltd, Japonsko)
- 0,45 µm PTFE filtr (LABICOM, Olomouc, Česká republika),
- Spectrofotometer Specord 50 plus (Analytik Jena, Německo)
- Stuart Scientific Autovortex SA6
- Titrátor Schott TitroLine alpha plus s kombinovanou pH elektrodou WTW SenTix 81 v režimu měření pH
- Běžné laboratorní vybavení



Obrázek 11: ³D Kapilární elektroforéza Agilent CE, Agilent Technologies

4.2 Použité chemikálie

- Aminové standardy – histamin dihydrochlorid, tyramin hydrochlorid, putrescin dihydrochlorid (Sigma-Aldrich s.r.o.)
- Milli-Q voda, rezistivita $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ (Millipore Academic)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (LACHEMA a.s.)
- Hydrogenfosforečnan sodný (LACHEMA a.s.)
- Kyselina o-fosforečná 85% (PENTA s.r.o.)
- Imidazol (Sigma-Aldrich s.r.o.)
- β -cyklodextrin (Sigma-Aldrich s.r.o.)
- Kyselina benzoová (Sigma-Aldrich s.r.o.)
- NaOH (PENTA s.r.o.)
- Krystalová violet (Sigma-Aldrich s.r.o.)
- Kyselina octová (Sigma-Aldrich s.r.o.)
- Tris-acetát-EDTA pufr (Sigma-Aldrich s.r.o.)

4.3 Příprava roztoků standardů

Standardy biogenních aminů byly dodány ve formě bílých práškových látek. Pro potřeby analýzy byly nejprve připraveny zásobní roztoky jednotlivých analytů o koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Příprava probíhala rozpuštěním odpovídajícího množství standardu v ultračisté vodě (Milli-Q).

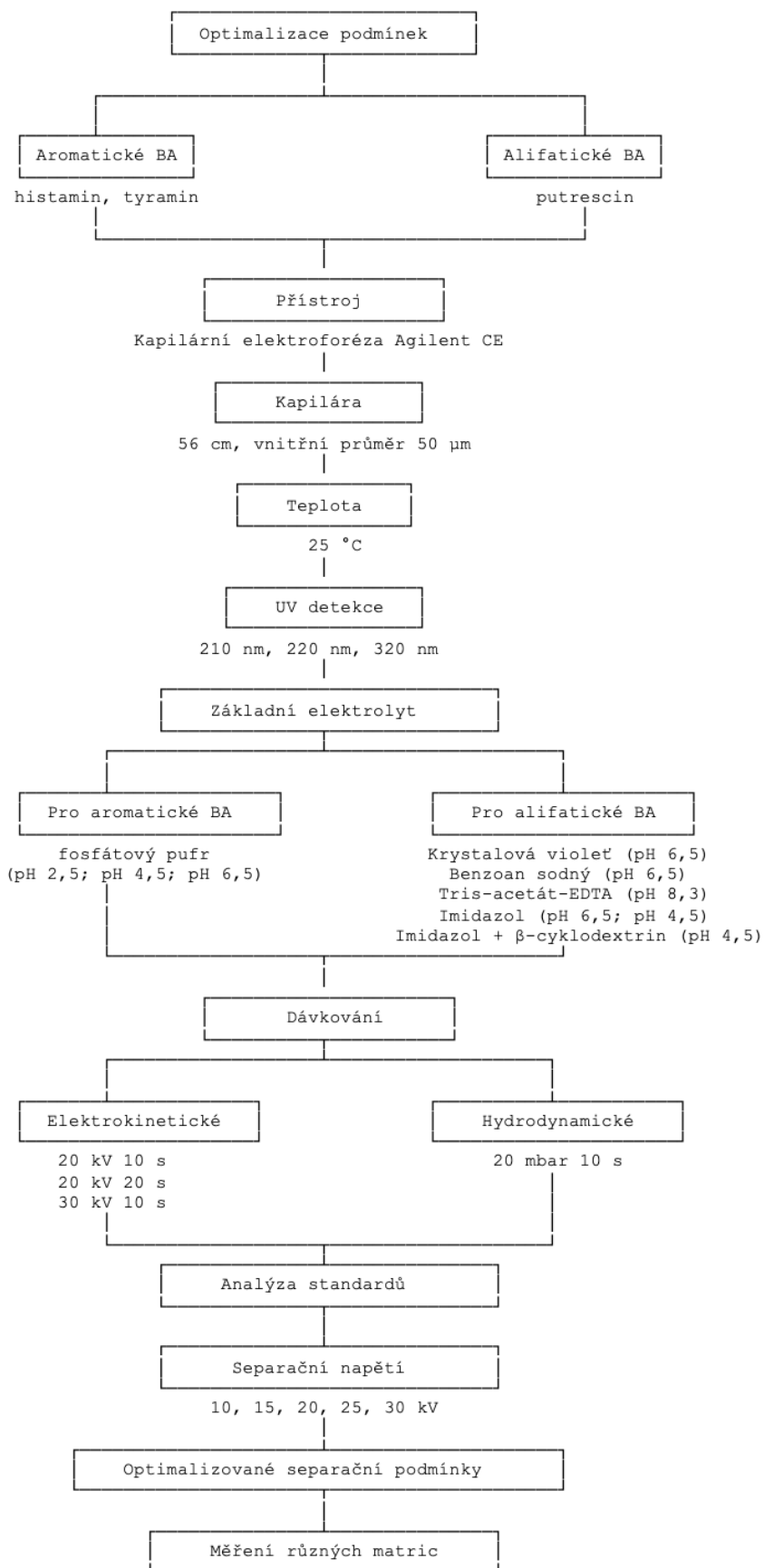
Hotové zásobní roztoky byly uchovávány zmrazené při teplotě $-18 \text{ }^\circ\text{C}$, aby byla zajištěna jejich stabilita po dobu experimentů.

Pro jednotlivá měření byly ze zásobních roztoků připravovány pracovní roztoky odpovídajících koncentrací ředěním ultračistou vodou. Tyto pracovní roztoky byly skladovány v chladničce při teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$ a používány maximálně po dobu tří dnů od přípravy, aby se předešlo možné degradaci analyzovaných látek.

4.4 Optimalizace separačních podmínek kapilární elektroforézy

Optimalizace byla provedena systematickým testováním a vyhodnocováním jednotlivých parametrů ovlivňujících elektroforetický děj a elektroosmotický tok. Proces optimalizace probíhal iterativně, přičemž docházelo k postupnému testování několika parametrů jako je například složení a pH elektrolytu nebo typ dávkování.

Jednotlivé kroky optimalizačního procesu jsou znázorněny v blokovém schématu na *Obrázku 12*.



Obrázek 12: Schéma optimalizace separačních podmínek

4.5 Použitá kapilára

Na základě literární rešerše [32], kde autoři k separaci biogenních aminů využili kapiláru o celkové délce 56 cm a vnitřním průměru 50 μm , byla zvolena kapilára ve stejném rozmezí. Efektivní délka kapiláry (vzdálenost od začátku po detekční okénko) byla 47,5 cm. Před počátkem analýz byla kapilára denně promývána: 10 minut 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztokem NaOH, 10 minut Milli-Q vodou a následně 10 minut základním elektrolytem. Před každým měřením probíhala prekondicionace, a to promýváním 1 minutu 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaOH, 1 minutu Milli-Q vodou a 3 minuty základním elektrolytem.

4.6 Teplota

Všechny analýzy byly prováděny za běžných laboratorních podmínek (25 °C). Vyšší teploty by mohly vést k chemickým přeměnám elektrolytu nebo samotných vzorků, a proto nebyly testovány.

4.7 UV detekce

Pro určení optimální detekční vlnové délky byla zaznamenána UV/VIS spektra standardních roztoků biogenních aminů pomocí spektrometru Specord 50 plus. Na základě těchto spekter byla pro stanovení aromatických aminů jako nejvhodnější zvolena vlnová délka v rozmezí 210–220 nm, která odpovídá maximální absorbanci, a tedy i nejvyšší citlivosti detekce. Pro alifatické aminy vycházela vhodná detekční vlnová délka z vlastností základního elektrolytu.

4.8 Použité elektrolyty

Při výběru základního elektrolytu se vycházelo ze studie [32], ve které byl pro analýzu aromatických biogenních aminů pomocí kapilární elektroforézy úspěšně použit 75 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátový pufr o pH 6,5. Tento pufr byl připraven rozpuštěním dihydrogenfosforečnanu draselného (KH_2PO_4) a hydrogenfosforečnanu sodného (Na_2HPO_4) v Milli-Q vodě, přičemž pH bylo upraveno na požadovanou hodnotu 6,5. Pro optimalizaci podmínek byly dále připraveny fosfátové pufrы o pH 2,5 a 4,5. Pufr o pH 4,5 a koncentraci 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ byl připraven ze stejných chemikálií smíchaných v jiném poměru, zatímco pufr o pH 2,5 byl vytvořen pomocí kyseliny fosforečné a dihydrogenfosforečnanu draselného (KH_2PO_4).

Pro zavedení metody nepřímé detekce alifatického biogenního aminu putrescinu byla vyzkoušena řada elektrolytů. Při jejich výběru se vycházelo z obecného předpokladu absorpce UV/VIS záření tímto roztokem, takže neabsorbující analyt by měl vykazovat záporný pík. Byl vyzkoušen barevný iont krystalová violeť. Dále byl připraven benzoan sodný, často uváděný jako součást elektrolytu pro nepřímou detekci, neutralizací kyseliny benzoové hydroxidem sodným. Následně byl vyzkoušen roztok 15 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ imidazolu ve fosfátovém pufru o pH 6,5 a ve vodě s úpravou pH na hodnotu 4,5 pomocí kyseliny octové. Dalším použitým elektrolytem byl Tris-acetát-EDTA pufr o pH 8,3. Ve studii [33] byl pro analýzu biogenních aminů bez derivatizace úspěšně použit elektrolyt na bázi imidazolu a α -cyklodextrinu. Na základě této studie byl připraven elektrolyt rozpuštěním 15 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ imidazolu a 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ dostupného β -cyklodextrinu v ultračisté vodě s úpravou pH kyselinou octovou na hodnotu 4,5.

4.9 Dávkování

Po stanovení vhodného elektrolytu byly optimalizovány podmínky dávkování vzorku do kapiláry. Byly testovány dvě metody dávkování:

- Hydrodynamické dávkování, provedené přetlakem 20 mbar po dobu 10 sekund.
- Elektrokinetické dávkování, realizované aplikací napětí 20 kV po dobu 10 sekund, 20 kV po dobu 20 sekund a 30 kV po dobu 10 sekund.

Cílem optimalizace bylo nalezení takových podmínek dávkování, které umožní dosažení maximální intenzity signálu při zachování dobré separace jednotlivých analytů.

4.10 Separální napětí

V rámci optimalizace metody bylo pro stanovení histaminu a tyraminu testováno různé separální napětí. Konkrétně se jednalo o napětí 10, 15, 20, 25 a 30 kV. Používané separální napětí ovlivňuje jak délku analýzy, tak kvalitu separace jednotlivých analytů.

4.11 Příprava kalibrační řady

Pro stanovení kalibračních závislostí byly připraveny směsné standardní roztoky obsahující histamin a tyramin v koncentracích 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 a 100 mg·l⁻¹. Standardy byly připraveny ředěním zásobních roztoků jednotlivých analytů o koncentraci 1 000 mg·l⁻¹. Každá koncentrace byla měřena třikrát za optimalizovaných podmínek. U každé koncentrace byly zprůměrovány retenční časy a plochy píků a tyto průměrné hodnoty byly použity k sestavení kalibračních křivek pro jednotlivé analyty.

4.12 Opakovatelnost metody

Opakovatelnost metody byla ověřena desetinasobnou analýzou standardního roztoku histaminu a tyraminu (50 mg·l⁻¹) za optimalizovaných podmínek. U každého měření byly zaznamenány retenční časy a plochy píků (A), ze kterých byly následně vypočteny průměrné hodnoty a relativní směrodatná odchylka (RSD).

4.13 Příprava reálných vzorků

Vzorky červeného a bílého vína byly po filtraci přes 0,45 μm membránový filtr analyzovány bez dalších úprav. Vzorky černého a zeleného čaje byly připraveny extrakcí jednoho čajového sáčku ve 100 ml horké vody, následně ochlazeny na laboratorní teplotu a přefiltrovány přes 0,45 μm membránový filtr.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Zavedení metody pro aromatické biogenní aminy

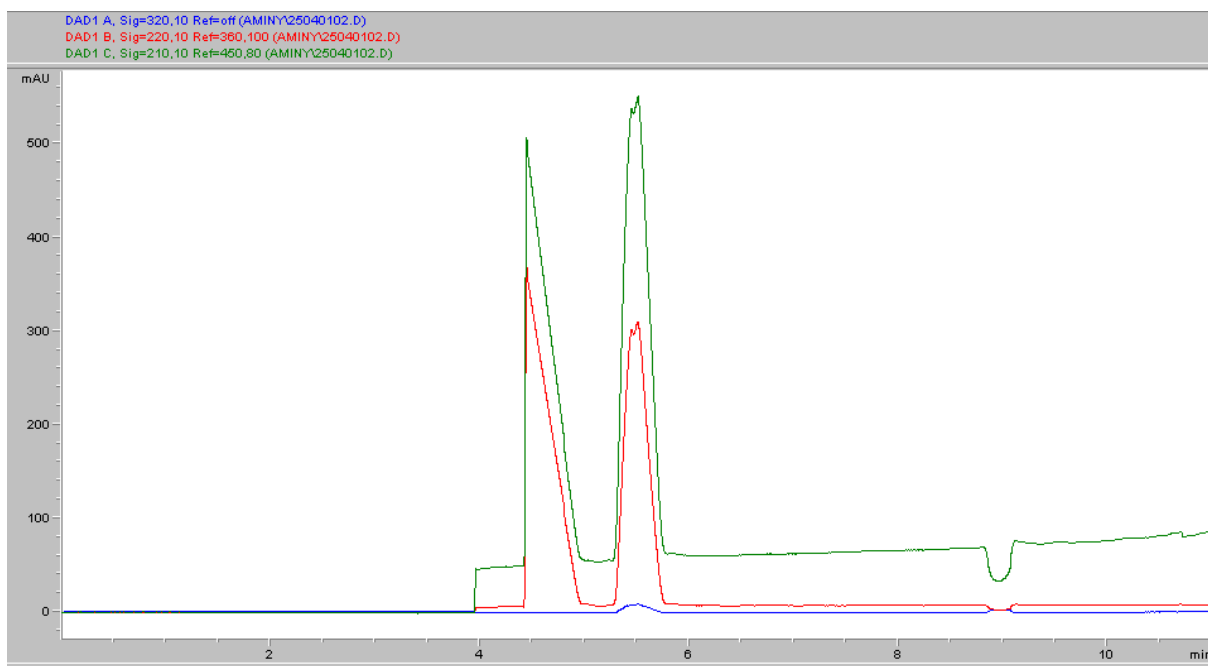
5.1.1 UV detekce

Pro určení optimální detekční vlnové délky byla zaznamenána UV/VIS spektra standardních roztoků biogenních aminů (viz *Obr. v Příloze 1*).

Pro ověření optimální detekční vlnové délky byly porovnány elektroferogramy získané při analýze roztoku standardů o koncentraci $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ve fosfátovém pufru o pH 6,5 při třech různých nastaveních: 320 nm, 220 nm a 210 nm.

Jak je patrné z *Obrázku 13*, při vyšších vlnových délkách (např. 320 nm) byla odezva detektoru velmi nízká a píky histaminu a tyraminu nebyly rozlišitelné. Při 220 nm již došlo k výraznému zlepšení signálu, avšak maximální odezva byla dosažena při 210 nm.

Tato vlnová délka tak byla potvrzena jako nejvhodnější, umožnila dosáhnout nejvyšší citlivosti detekce a byla vybrána pro vyhodnocení dalších měření.



Obrázek 13: Srovnání elektroferogramů $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ standardů ve fosfátovém pufru o pH 6,5 při různých detekčních vlnových délkách (320 nm – modrá linie, 220 nm – červená linie, 210 nm – zelená linie)

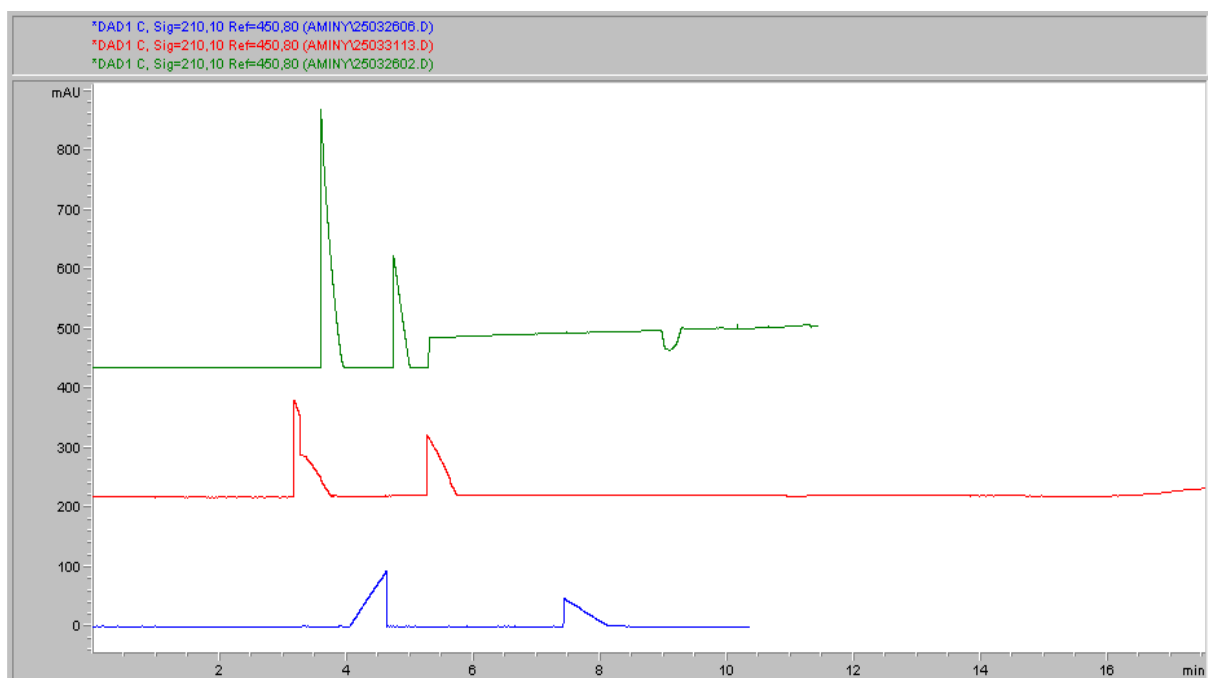
5.1.2 Výběr základního elektrolytu

Na základě literární rešerše byly jako základní elektrolyty, podobně jako ve studii [32], testovány fosfátové pufrы o různé hodnotě pH. Konkrétně šlo o pufrы o koncentraci $75 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ s následujícími hodnotami pH:

- pH 2,5 (modrá linie),
- pH 4,5 (červená linie),
- pH 6,5 (zelená linie).

Všechny tři pufrы samostatně vykazovaly stabilní a nízkou základní linii, a byly proto vyhodnoceny jako vhodné pro další optimalizaci separačních podmínek (viz *Obr. v Příloze 2*).

Následně byla analyzována při použití uvedených základních elektrolytů směs histaminu a tyraminu (obě látky v koncentraci $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Nejlepší separace píků byla pozorována při použití pufru o pH 6,5, který tak byl zvolen jako nejvhodnější pro další experimenty (viz *Obrázek 14*).



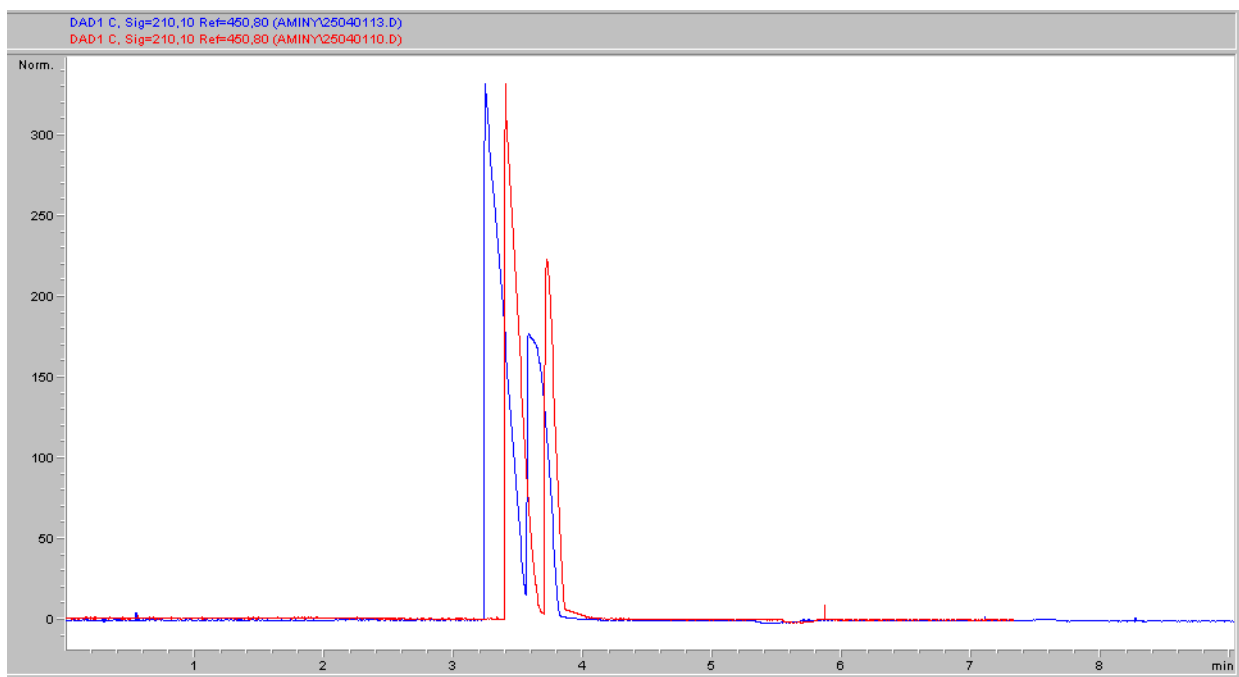
Obrázek 14: Separace histaminu a tyraminu ($50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) v základních elektrolytech (pH 2,5 – modrá linie, pH 4,5 – červená linie, pH 6,5 – zelená linie)

5.1.3 Optimalizace dávkování

Při výběru vhodné metody dávkování vzorku bylo provedeno měření po hydrodynamickém dávkování (20 mbar po dobu 10 s) a elektrokinetickém (20 kV po dobu 10 s) dávkování.

Z elektroforetických záznamů je zřejmé, že elektrokinetické dávkování vedlo k dosažení lepší separace analytů a ostřejších, symetričtějších píků ve srovnání s hydrodynamickým dávkováním. Naopak při hydrodynamickém dávkování byly pozorovány méně symetrické píky s nižší separací, což by mohlo negativně ovlivnit přesnost kvantifikace.

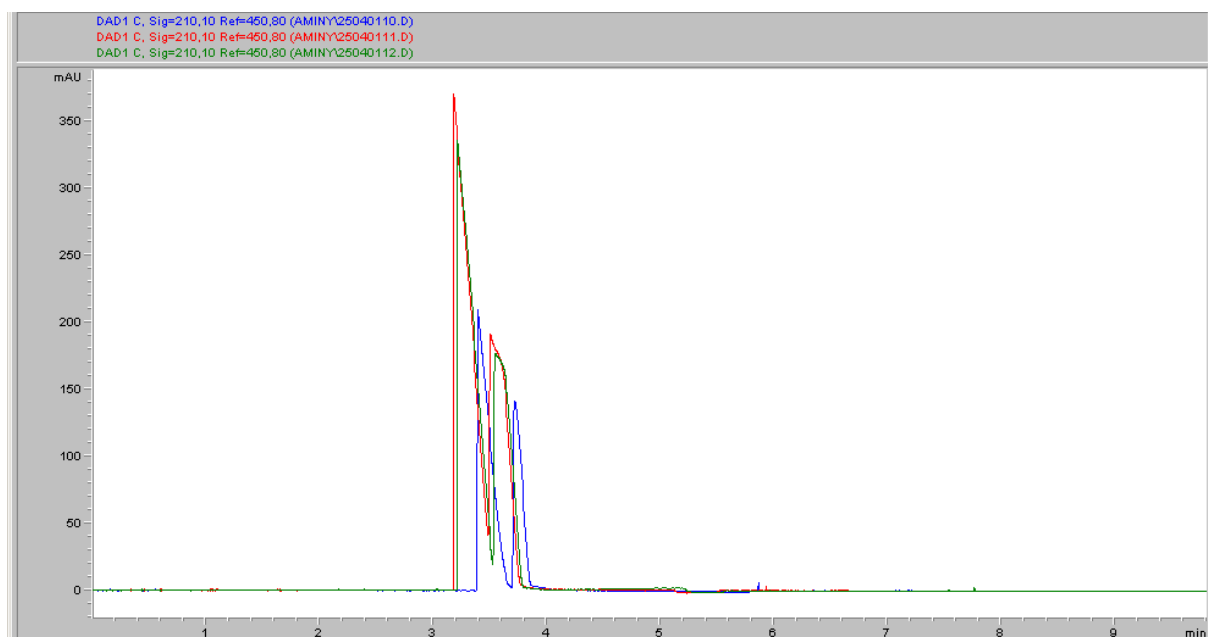
Porovnání výsledků je znázorněno na *Obrázku 15*.



Obrázek 15: Porovnání hydrodynamického dávkování a elektrokinetického dávkování $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ standardů ve fosfátovém pufru o pH 6,5 (20 mbar 10 s – modrá linie, 20 kV 10 s – červená linie)

Na základě výše uvedeného byla pro další optimalizaci vybrána elektrokinetická metoda dávkování. Byly testovány různé parametry pracovního napětí a doby dávkování (viz Obrázek 16):

- 20 kV po dobu 10 s
- 20 kV po dobu 20 s
- 30 kV po dobu 10 s.



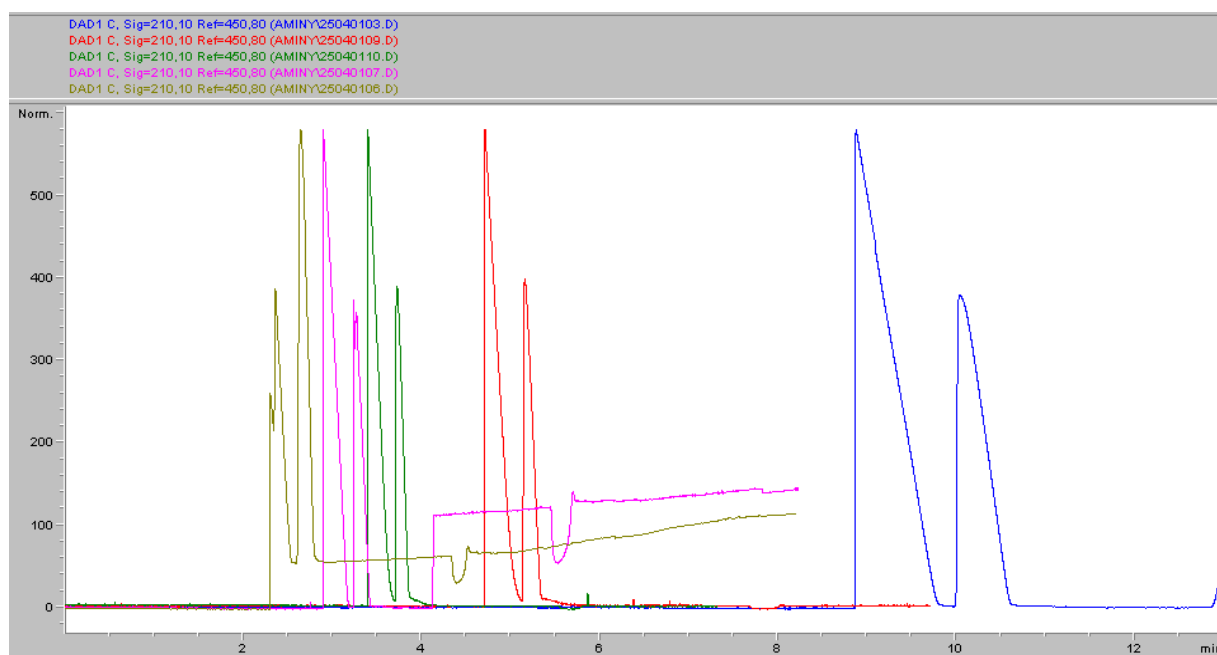
Obrázek 16: Optimalizace elektrokinetického dávkování $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ standardů ve fosfátovém pufru o pH 6,5 – porovnání různých napětí a časů (20 kV 10 s – modrá linie; 20 kV 20 s – červená linie; 30 kV 10 s – zelená linie).

Výsledky potvrdily, že dávkování při 20 kV po dobu 10 sekund představovalo nejvhodnější podmínky z hlediska intenzity signálu, tvaru píků a rozlišení analytů.

5.1.4 Volba separačního napětí

Byly testovány různé parametry separačního napětí (viz *Obrázek 17*):

- 10 kV
- 15 kV
- 20 kV
- 25 kV
- 30 kV



Obrázek 17: Optimalizace separačního napětí (v pořadí zleva 30, 25, 20, 15 a 10 kV) 50 mg·l⁻¹ standardů ve fosfátovém pufru o pH 6,5

Na základě vyhodnocení elektroferogramů bylo jako nejvhodnější zvoleno separační napětí 20 kV, které poskytlo optimální kompromis mezi dobou analýzy a kvalitou separace analytů.

5.1.5 Parametry optimalizované metody pro stanovení aromatických biogenních aminů

Na základě provedené optimalizace byla navržena metoda kapilární elektroforézy pro stanovení aromatických biogenních aminů, konkrétně histaminu a tyraminu. Cílem bylo dosažení co nejvyšší citlivosti detekce, dobré separace analytů a opakovatelnosti měření při zachování jednoduchosti a rychlosti analýzy. Přehled optimalizovaných experimentálních podmínek je uveden v *Tabulce 9*.

Tab. 9: Shrnutí optimalizovaných podmínek metody pro stanovení aromatických biogenních aminů

Parametr	Optimalizovaná hodnota
Teplota analýzy	Laboratorní (25 °C)
Délka a vnitřní průměr kapiláry	56 cm; 50 μm
Detekční vlnová délka	210 nm
Základní elektrolyt	75 mmol·l ⁻¹ fosfátový pufr (pH 6,5)
Typ dávkování	Elektrokinetické
Pracovní napětí pro dávkování	20 kV
Doba dávkování	10 s
Separační napětí	20 kV

5.1.6 Kalibrační závislost

Pro sestavení kalibračních přímk biogenních aminů byly připraveny směsné roztoky histaminu a tyraminu v koncentracích: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 a 100 mg·l⁻¹. Všechny roztoky byly analyzovány metodou kapilární elektroforézy za optimalizovaných podmínek separace.

Odezva detektoru byla vyhodnocena jako plocha píků (v mAU). Na základě získaných dat byly sestaveny kalibrační přímky pro oba analyty.

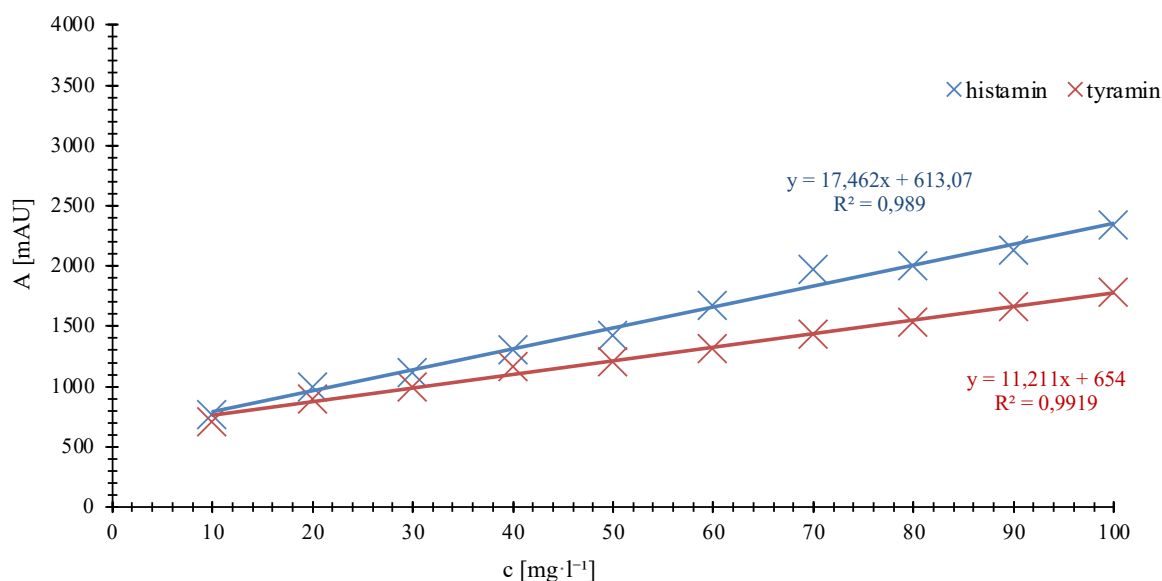
Pro histamin byla získána kalibrační rovnice:

$$y = 17,462x + 613,07 \quad (R^2 = 0,9890)$$

Pro tyramin:

$$y = 11,211x + 654,00 \quad (R^2 = 0,9919)$$

kde y představuje odezvu detektoru v mAU a x koncentrace standardu v mg·l⁻¹. Průběh kalibračních křivek je uveden na *Obrázku 18*.



Obrázek 18: Kalibrační křivky standardů histaminu a tyraminu

5.1.7 Limity detekce a limity kvantifikace

Limit detekce (LOD) udává nejnižší koncentraci analytu, která je ještě jednoznačně detekovatelná při hladině spolehlivosti 95 %. Limit kvantifikace (LOQ) pak představuje nejnižší koncentraci, kterou lze kvantifikovat s přijatelnou přesností na hladině spolehlivosti 99 %. Tyto limity lze přibližně odhadnout jako trojnásobek, respektive desetinásobek šumu detektoru. [34].

LOD a LOQ byly vypočteny podle následujících vztahů:

$$\text{LOD} = 3,3 \cdot \left(\frac{\sigma}{k}\right)$$

$$\text{LOQ} = 10 \cdot \left(\frac{\sigma}{k}\right)$$

kde σ je směrodatná odchylka plochy šumu detektoru (v mAU) a k je směrnice kalibrační přímky [34].

Na základě experimentálního vyhodnocení šumu ve vybraném časovém úseku byla σ odhadnuta na 5 mAU. Výpočty LOD a LOQ pro jednotlivé analyty jsou uvedeny v *Tabulce 10*.

Tab. 10: Limity detekce a kvantifikace přístroje stanovených analytů

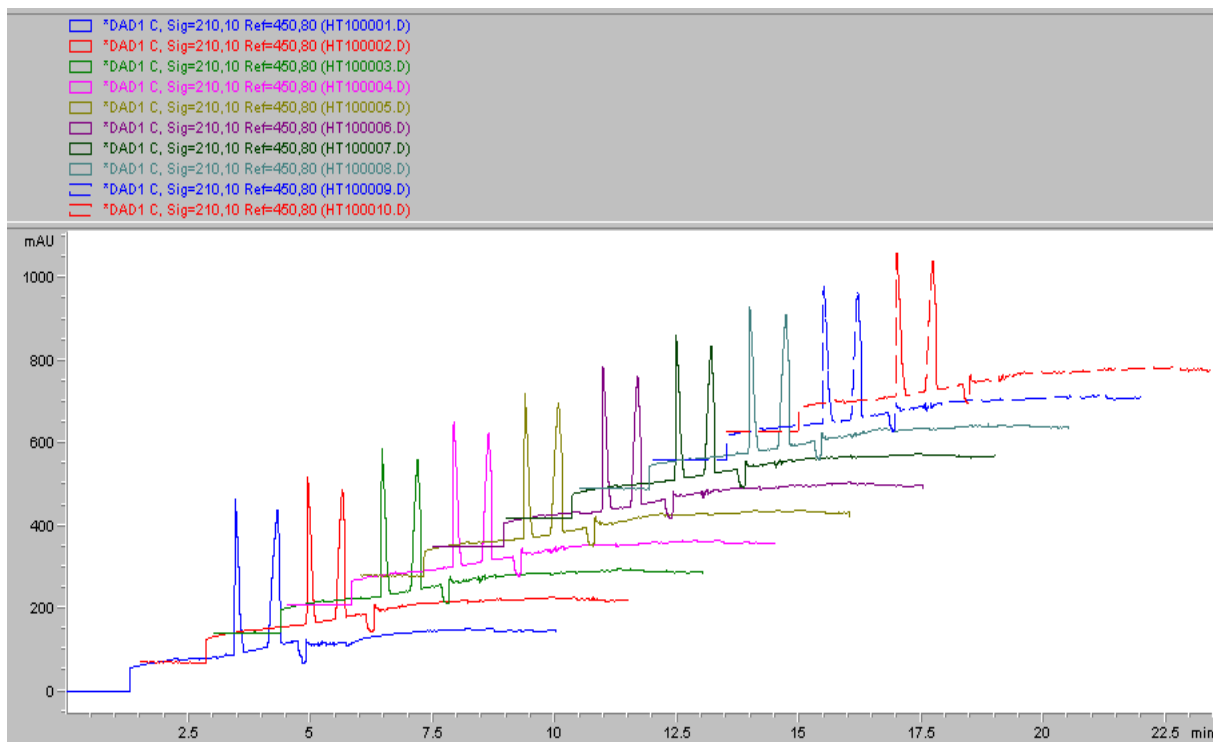
Analyt	Směrnice (k)	LOD [mg·l ⁻¹]	LOQ [mg·l ⁻¹]
Histamin	17,462	0,95	2,86
Tyramin	11,211	1,47	4,46

Z výsledků je patrné, že histamin vykazuje nižší limity detekce i kvantifikace než tyramin, což odpovídá také pozorovaným plochám píků v elektroforetickém záznamu.

5.1.8 Opakovatelnost metody

Pro ověření opakovatelnosti metody byla analyzována směs standardů histaminu a tyraminu, každý o koncentraci $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, za konstantních separačních podmínek: Elektrokinetické dávkování 20 kV 10 s, fosfátový pufr o pH 6,5. Měření bylo provedeno desetkrát za sebou.

Na *Obrázku 19* je patrná dobrá opakovatelnost metody, což dokládá stabilita polohy píků a jejich relativní velikosti napříč jednotlivými měřeními.



Obrázek 19: Opakovatelnost metody pro histamin a tyramin ($50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$)

Z výsledků 10 opakování analýzy histaminu a tyraminu ($50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) byla vypočtena průměrná plocha a retenční čas pro každou látku, viz *Tabulka 11*. Relativní směrodatná odchylka (RSD) ploch píků byla 3,42 % pro histamin a 11,95 % pro tyramin. U histaminu tak byla prokázána dobrá opakovatelnost. Vyšší RSD u tyraminu může souviset s jeho tendencí k adsorpci na stěny kapiláry, což může vést k občasným výkyvům intenzity signálu [35]. Přesto dosažená variabilita zůstává vzhledem k charakteru analyzované látky akceptovatelná. Retenční časy vykazovaly RSD 1 % pro histamin a 1,5 % pro tyramin, což potvrzuje stabilitu separačního procesu.

Tab. 11: Průměrná plocha a retenční čas histaminu a tyraminu

Analyzovaná látka	Průměrná plocha (A)	RSD plochy (%)	Průměrný retenční čas (min)	RSD retenčního času (%)
Histamin	1480,17	3,42 %	3,46 min	1,00 %
Tyramin	1431,83	11,95 %	4,19 min	1,50 %

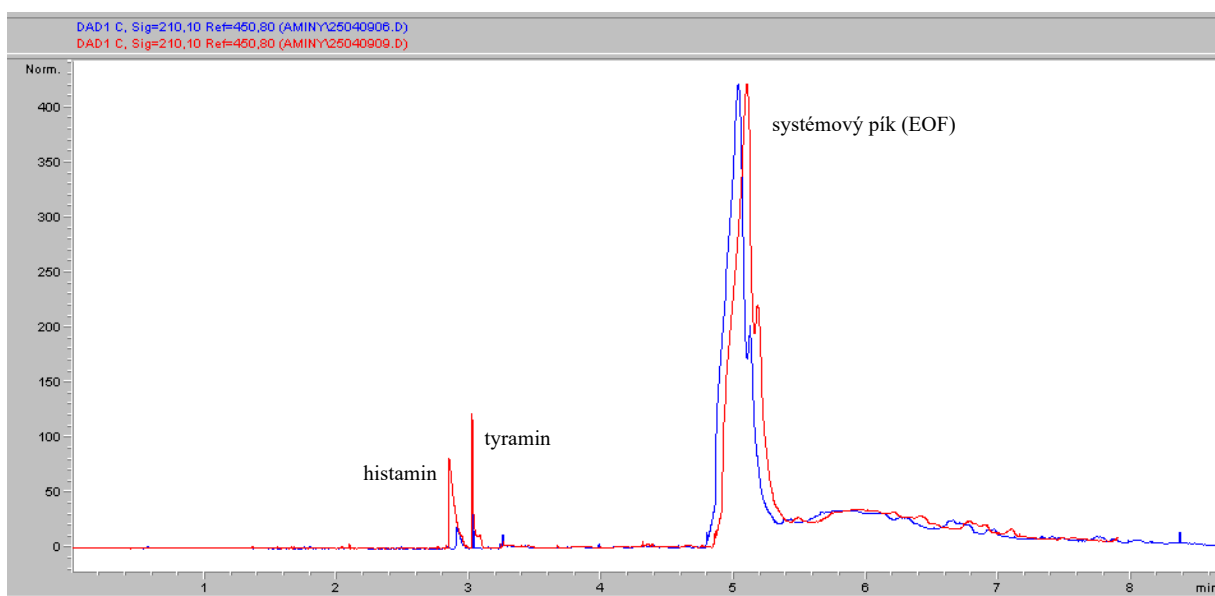
5.1.9 Měření různých matic

Po úspěšné optimalizaci metody následovala analýza reálných vzorků, u nichž se očekával výskyt biogenních aminů, konkrétně histaminu a tyraminu. Vybrané matrice zahrnovaly červené a bílé víno, černý a zelený čaj.

Červené víno

Jedním z analyzovaných vzorků bylo červené víno, konkrétně Rulandské modré (vinařství Vajbar). Vzorek byl nejprve přefiltrován přes 0,45 μm membránový filtr a následně analyzován bez dalších úprav. Pro ověření přítomnosti biogenních aminů byl vzorek dále obohacen známým množstvím histaminu a tyraminu ($20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

Na základě porovnání elektroforetických záznamů (*Obrázek 20*) bylo patrné, že po přidavku standardních roztoků došlo ke zvýšení intenzity píků v retenčních časech odpovídajících histaminu a tyraminu. To potvrzuje, že obě látky byly ve vzorku přítomny již před obohacením.



Obrázek 20: Analýza červeného vína (modrá linie – samotný vzorek, červená linie – vzorek obohacený $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ histaminu a tyraminu)

Výsledky měření jsou shrnuty v *Tabulce 12* níže.

Tab. 12: Vyhodnocení obsahu histaminu a tyraminu v červeném víně před a po obohacení ($20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$)

Vzorek	Retenční čas (min)	Plocha (mAU)	Přiřazený analyt
Červené víno	2,901	43	Histamin
Červené víno	3,028	14,2	Tyramin
Víno + $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ standardy	2,850	206,3	Histamin
Víno + $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ standardy	3,021	77,5	Tyramin

Výpočet koncentrace byl proveden dle zjednodušeného vztahu pro metodu jednoho standardního přídávku [36]:

$$c_i = \frac{A_i}{A_{iS} - A_i} \cdot c_S$$

kde:

- c_i je hledaná koncentrace ve vzorku [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$],
- A_i je plocha píku vzorku bez standardu [mAU],
- A_{iS} je plocha píku vzorku se standardem [mAU],
- c_S je koncentrace přidaného standardu [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]

Dosazením:

- Histamin:

$$c_{\text{histamin}} = \frac{43}{206,3 - 43} \cdot 20 = 5,27 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$$

- Tyramin:

$$c_{\text{tyramin}} = \frac{14,2}{77,5 - 14,2} \cdot 20 = 4,49 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$$

Porovnání vypočtených koncentrací s limity detekce a kvantifikace jsou uvedeny v *Tabulce 13*.

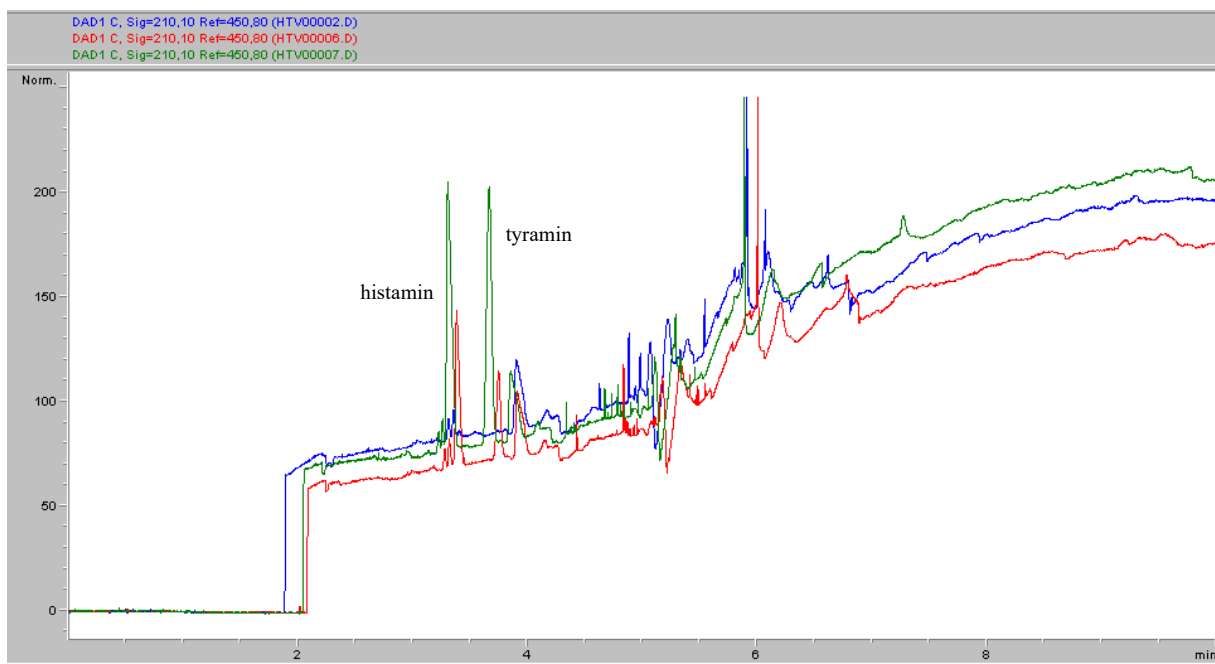
Tab. 13: Porovnání vypočtených koncentrací s hodnotami LOD a LOQ

Analyt	Vypočtená koncentrace [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	LOD [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	LOQ [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]
Histamin	5,27	0,95	2,86
Tyramin	4,49	1,47	4,46

Výsledky potvrzují, že obě látky byly v červeném víně přítomny již před obohacením. V obou případech byla vypočtená koncentrace vyšší než mez kvantifikace (LOQ), což znamená, že bylo možné histamin i tyramin ve vzorku jednoznačně kvantifikovat.

Bílé víno

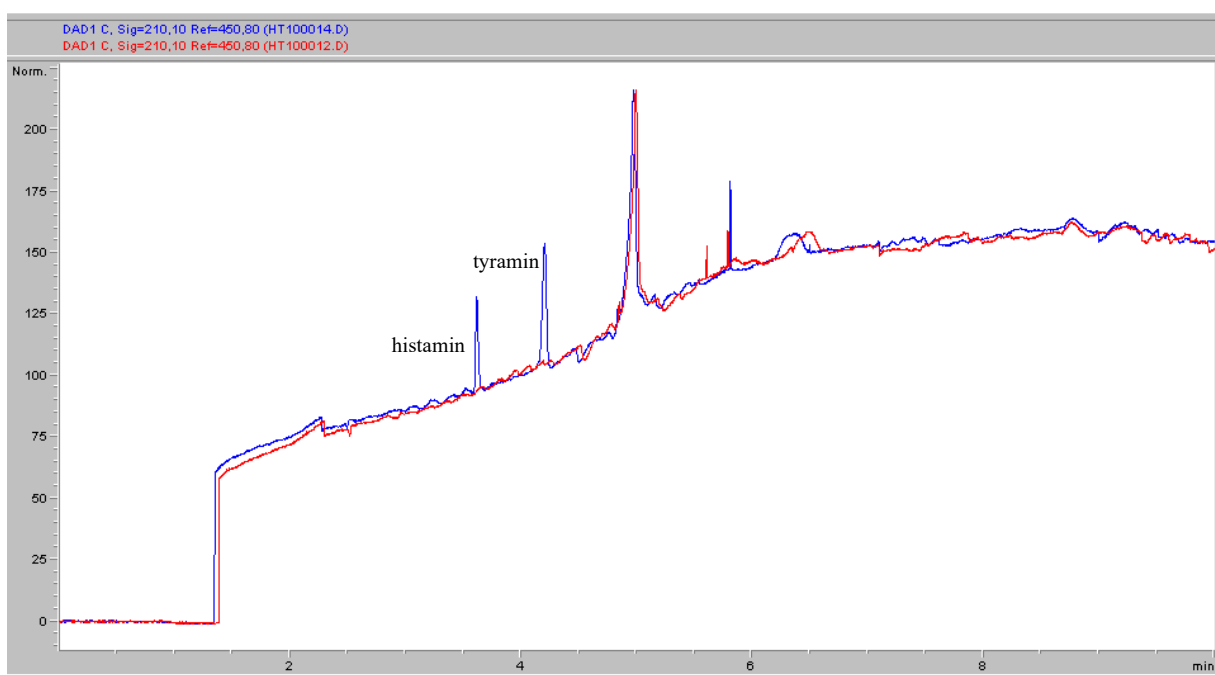
Dalším reálným vzorkem bylo bílé víno Irsai Oliver (vinařství Vajbar). Po filtraci přes $0,45 \mu\text{m}$ membránový filtr a následné analýzy bez dalších úprav byly píky vína stěží detekovány (viz *Obrázek 21*), což ukazuje na velmi nízký obsah těchto biogenních aminů, případně jejich absenci. Po obohacení vzorku o $20 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ histaminu a $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ tyraminu (červená linie) a následně o $45 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ histaminu a $35 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ tyraminu (zelená linie) došlo k postupnému nárůstu odpovídajících píků, což potvrzuje funkčnost metody i v této matici.



Obrázek 21: Analýza bílého vína (modrá linie – čistý vzorek, červená linie – obohacení $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ histaminu, $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ tyraminu; zelená linie – obohacení $45 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ histaminu, $35 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ tyraminu)

Černý čaj

Ve vzorku černého čaje Ahmad Tea Earl Grey nebyla po filtraci přes $0,45 \mu\text{m}$ membránový filtr detekována přítomnost histaminu ani tyraminu (viz Obrázek 22), což naznačuje jejich nepřítomnost nebo koncentraci pod mezí detekce použité metody. Pro ověření správné funkčnosti metody v této matici byl vzorek obohacen o histamin ($20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a tyramin ($10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Po obohacení (modrá křivka) byly jasně detekovány odpovídající píky, což potvrzuje, že metoda umožňuje stanovení těchto biogenních aminů při vyšších koncentracích.

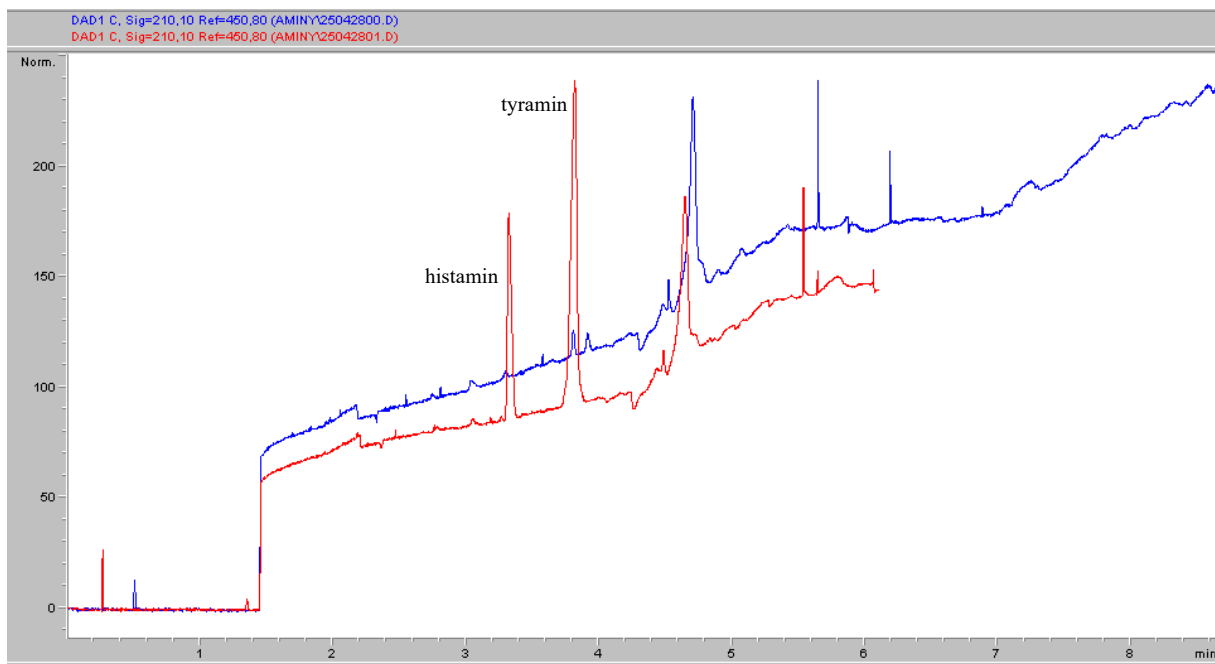


Obrázek 22: Analýza černého čaje (červená linie – původní vzorek, modrá linie – vzorek obohacený o $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ histaminu a $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ tyraminu)

Zelený čaj

Zelený čaj Ahmad Tea Green Tea na tom byl podobně jako čaj černý. Po filtraci přes 0,45 μm membránový filtr byl vzorek analyzován bez dalších úprav. Pro ověření přítomnosti histaminu a tyraminu byl vzorek následně obohacen o standardy těchto aminů ($20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

Elektroferogram (viz *Obrázek 23*) ukazuje porovnání neobohaceného (modrá linie) a obohaceného (červená linie) vzorku. V červené křivce jsou jasně patrné píky odpovídající histaminu a tyraminu. Na stejných retenčních časech jsou v neobohaceném vzorku patrné slabé píky, což naznačuje, že oba biogenní aminy byly ve vzorku přítomny, avšak v koncentracích blízko detekčního limitu.



Obrázek 23: Analýza zeleného čaje (červená linie – původní vzorek, modrá linie – vzorek obohacený o $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ histaminu a $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ tyraminu)

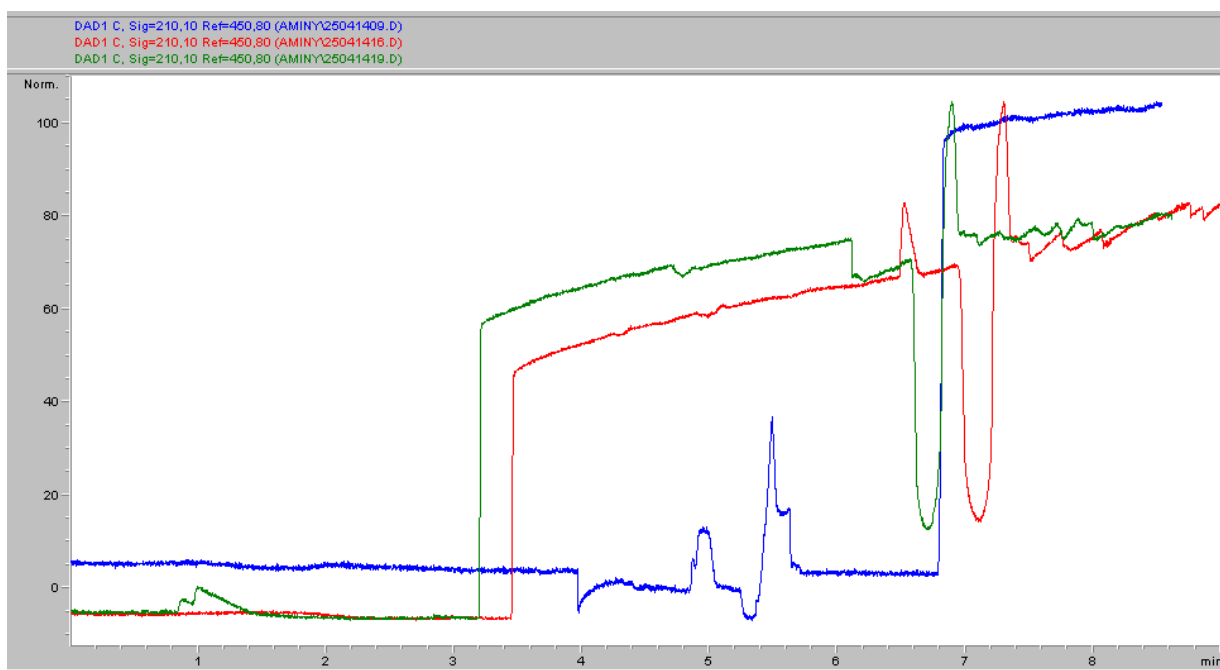
5.2 Zavedení metody nepřímé detekce pro alifatické biogenní aminy

5.2.1 Stanovení základního elektrolytu

Cílem této části bylo otestovat možnosti nepřímé detekce s využitím různých UV/VIS absorbujících elektrolytů pro stanovení alifatického zástupce biogenních aminů – putrescinu. Byly testovány systémy na bázi krystalové violeti, benzoanu sodného, imidazolu, TAE pufru a β -cyklodextrinu. U jednotlivých základních elektrolytů byla sledována základní linie a změny elektroferogramu při analýze putrescinu. Pokud samotný základní elektrolyt nevykazoval při opakovaných měřeních stabilní linii, byl z dalších testů vyloučen. Následují tedy výsledky, kdy byl testován přídavek putrescinu.

Krystalová violet' ve fosfátovém elektrolytu (pH 6,5)

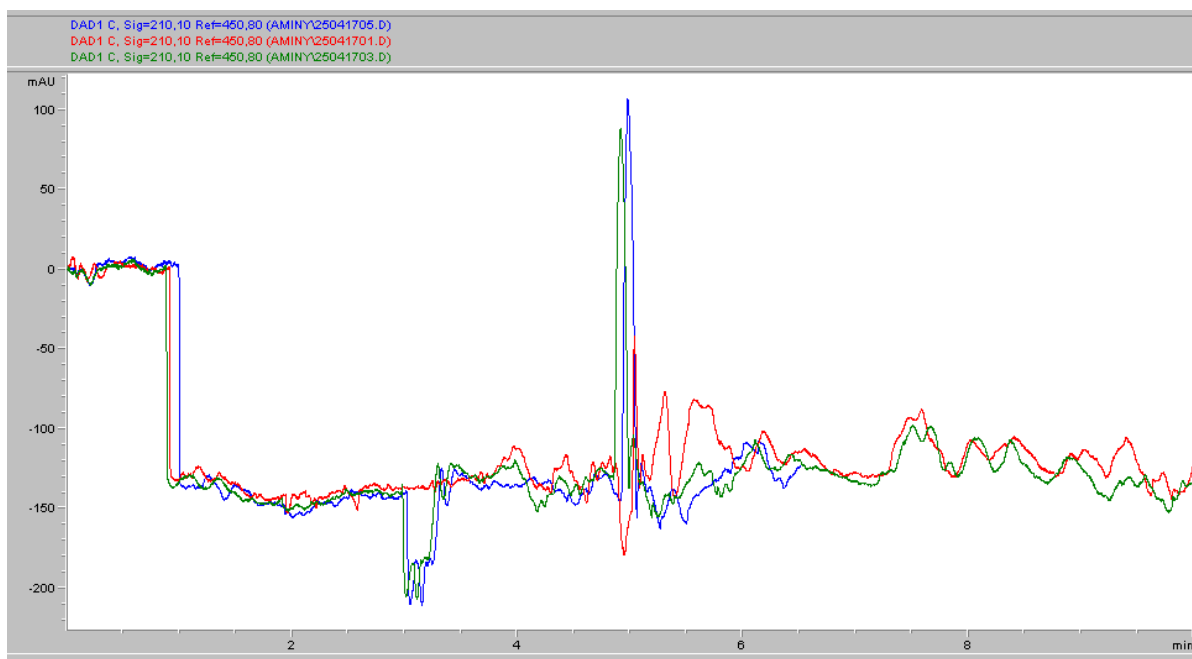
Při použití fosfátového pufru s krystalovou violetí (pH 6,5) byly testovány standardy putrescinu o koncentraci $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Elektroferogram (Obrázek 23) ukazuje odlišnosti v signálu mezi jednotlivými koncentracemi, avšak bez konzistentního trendu. Změny v retenčních časech a nesoulad intenzit mezi vzorky svědčí o nízké stabilitě systému a možné interferenci s jinými složkami nebo nevyvážeností interakce barviva s analytem. Za daných podmínek se tak tento elektrolyt neukázal jako vhodný pro spolehlivou detekci putrescinu.



Obrázek 23: Elektroferogram základního elektrolytu krystalová violet' + fosfátový pufr, pH 6,5 (modrá linie – základní elektrolyt, červená linie – standardní roztok $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ putrescinu, zelená linie – standardní roztok $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ putrescinu)

Benzoan sodný ve fosfátovém elektrolytu (pH 6,5)

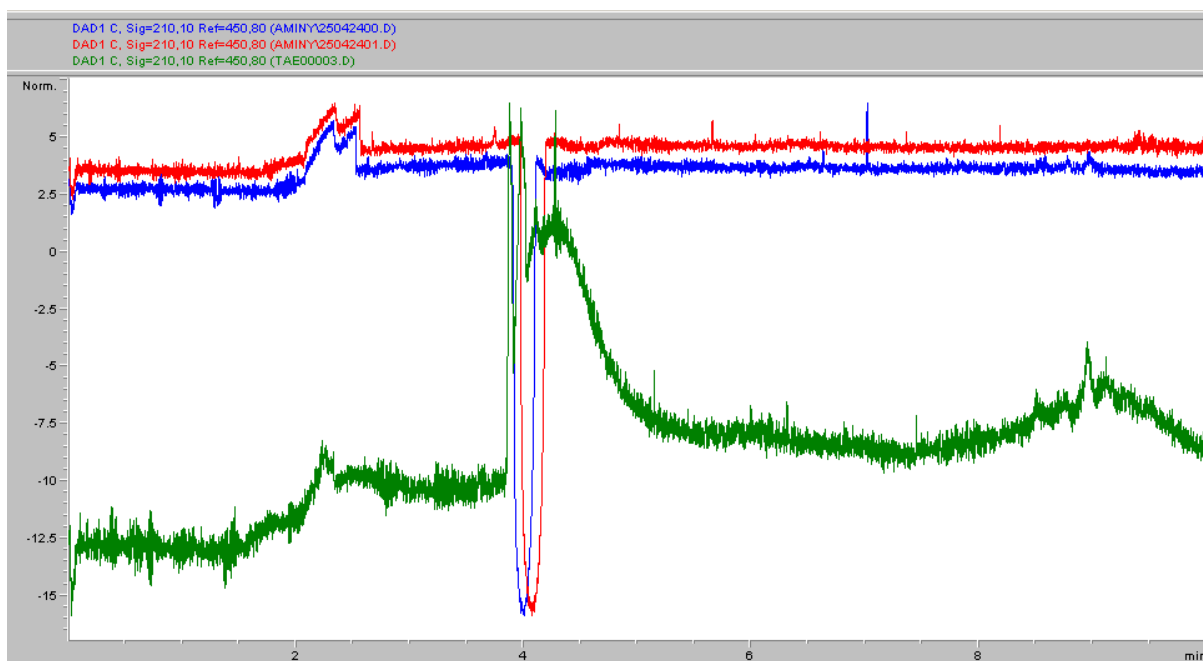
Benzoan sodný byl testován jako UV-absorbující složka elektrolytu. Záporný pík v cca 3. minutě, který by mohl indikovat putrescin, má však stejnou velikost pro rozdílné koncentrace putrescinu (viz Obrázek 24). Toto vylučuje použití tohoto základního elektrolytu pro další optimalizační kroky.



Obrázek 24: Elektroferogram základního elektrolytu – benzoan sodný (červená linie – základní elektrolyt, zelená linie – standardní roztok $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ putrescinu, modrá linie – standardní roztok $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ putrescinu)

Tris-acetát-EDTA (pH 8,3)

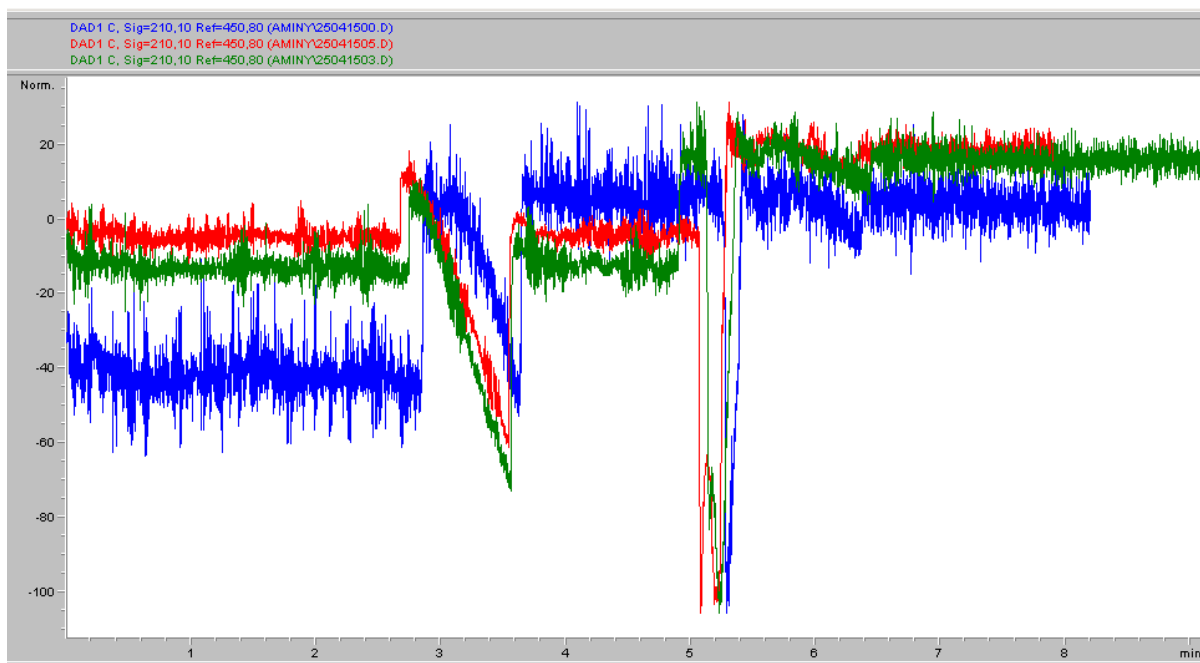
Při použití TAE elektrolytu nebyl po analýze standardního roztoku $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ putrescinu pozorován vznik nových výrazných píků, ani výrazná změna základní linie, viz Obrázek 25. Toto naznačuje nízkou schopnost detekce putrescinu v tomto prostředí.



Obrázek 25: Elektroferogram základního elektrolytu – TAE pufr (zelená linie – základní elektrolyt, modrá linie – standardní roztok $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ putrescinu, červená linie – standardní roztok $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ putrescinu)

Imidazol ve fosfátovém pufru (pH 6,5)

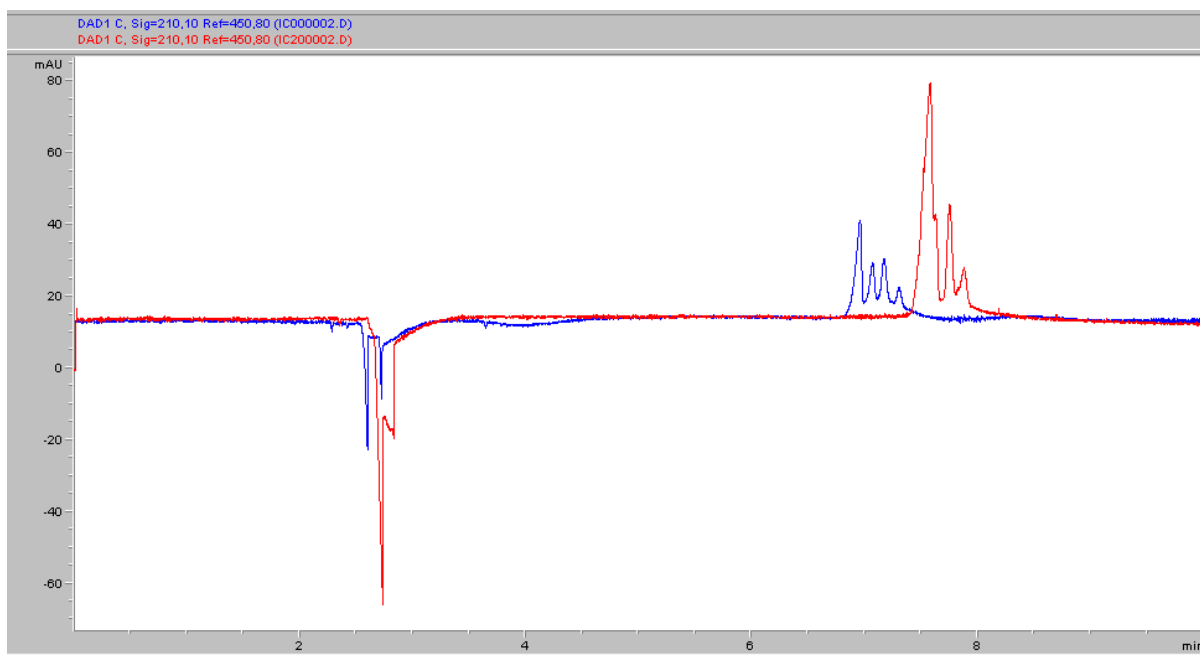
Kombinace imidazolu s fosfátovým pufrům nevykazovala žádný další záporný pík oproti samotnému elektrolytu, viz *Obrázek 26*. Nedošlo ke vzniku žádného nového píku, ani k modifikaci profilu základní linie, a metoda tak nepřinesla dostatečně citlivou odezvu.



Obrázek 26: Elektroferogram základního elektrolytu – imidazol + fosfátový pufr, pH 6,5 (modrá linie – základní elektrolyt, červená linie – standardní roztok 50 mg·l⁻¹ putrescinu, zelená linie – standardní roztok 100 mg·l⁻¹ putrescinum)

Imidazol + β -cyklodextrin (pH 4,5)

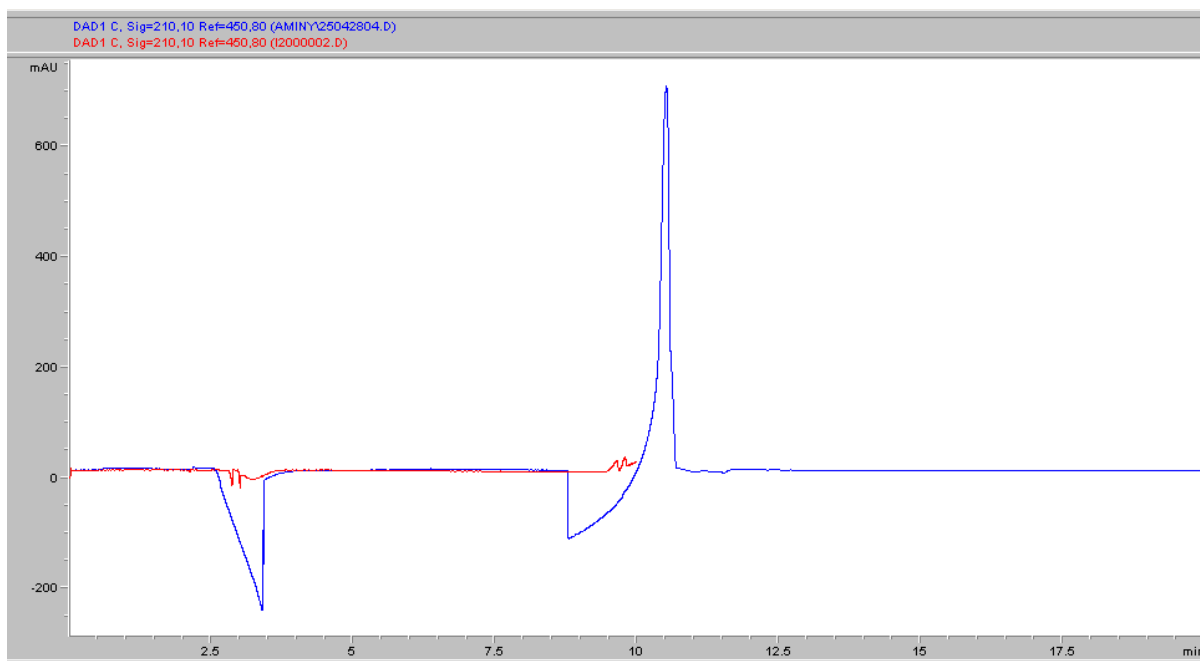
Tento elektrolyt byl testován na základě [32]. Do elektrolytu byl však použit namísto α -cyklodextrinu dostupný β -cyklodextrin. Při použití elektrolytu obsahujícího imidazol a β -cyklodextrin (pH 4,5) nebyly po přidavku putrescinu pozorovány žádné významné změny v elektroferogramu (viz *Obrázek 27*). Ačkoliv došlo k mírnému nárůstu aktuálních píků elektrolytu a cyklodextrinu mohou v některých případech ovlivnit separaci díky interakcím s analytickými molekulami, v tomto systému se jeho přítomnost nijak výrazně neprojevila. Z výsledků vyplývá, že β -cyklodextrin neposkytl zlepšení detekovatelnosti putrescinu v daných podmínkách a ani tento elektrolyt není vhodný pro stanovení alifatických aminů.



Obrázek 27: Elektroferogram základního elektrolytu – imidazol + β -cyklodextrin, pH 4,5 (modrá linie – základní elektrolyt, červená linie – standardní roztok $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ putrescinu)

Imidazol (pH 4,5)

Elektrolytický systém založený pouze na imidazolu při pH 4,5 rovněž nevedl k očekávanému výsledku, viz Obrázek 28. Při analýze standardů o různých koncentracích byl záznam odlišný než pro samotný základní elektrolyt, pro různé koncentrace putrescinu však stejný.



Obrázek 28: Elektroferogram základního elektrolytu – imidazol, pH 4,5 (červená linie – základní elektrolyt, modrá linie – standardní roztok $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ putrescinu)

Z provedených měření vyplývá, že žádný z testovaných základních elektrolytů neposkytl pro nepřímou detekci putrescinu dostatečně výraznou, selektivní ani reprodukovatelnou odezvu. Pokud došlo ke změnám průběhu záznamu, nešlo o charakteristické píky, které by odpovídaly detekci putrescinu.

Pro další rozvoj metody stanovení alifatických biogenních aminů by bylo vhodné zvážit následující možnosti:

- Použití α -cyklodextrinu, podobně jako v [33].
- Zařazení jiných UV-aktivních složek elektrolytu s vhodnějšími spektrálními vlastnostmi. Například ve studii [37] byla k dosažení lepší selektivity při separaci aminů použita kombinace 18-crown-6 etheru a UV-aktivního činidla imidazolu v základním elektrolytu.
- Zavedení derivatizačních technik, které umožní přímou detekci putrescinu klasickou UV/VIS metodou. V práci [38] byla vyvinuta metoda pro stanovení putrescinu založená na derivatizaci pomocí salicylaldehyd-5-sulfonátu (SAS).
- Použití jiného typu detekce. Například ve studii [39] byla použita metoda kapilární elektroforézy s laserem indukovanou fluorescenční detekcí (CE-LIF), která umožnila vysoce citlivou detekci v řádu $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ putrescinu po derivatizaci pomocí 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolu.
- Využití micelárních technik s přidavkem dodecylsíranu sodného (SDS). Ve studii [40] byla k separaci a detekci putrescinu použita micelární kapalinová chromatografie (MLC) s využitím dodecylsíranu sodného (SDS) jako součásti mobilní fáze. Vzorky rybí omáčky byly analyzovány metodou přímého dávkování bez předchozí extrakce, po derivatizaci pomocí 3,5-dinitrobenzoylchloridu.

6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout metodu kapilární elektroforézy vhodnou pro stanovení biogenních aminů. Důraz byl kladen na jednoduchost, rychlost a minimální přípravu vzorku bez nutnosti derivatizace. V práci byly prezentovány bližší charakteristiky biogenních aminů a jejich význam v souvislosti s výskytem v různých maticích. Rovněž byly diskutovány možnosti využití kapilární elektroforézy a dalších metod na stanovení biogenních aminů.

V první části experimentální práce byla úspěšně optimalizována metoda pro stanovení aromatických biogenních aminů, konkrétně histaminu a tyraminu. Byl proveden výběr vhodné detekční vlnové délky, kdy jako nejvhodnější byla zvolena hodnota 210 nm, která poskytovala nejvyšší citlivost detekce. Pro separaci analytů byl jako nejvhodnější základní elektrolyt zvolen 75 mmol·l⁻¹ fosfátový pufr o pH 6,5. Optimalizací způsobu dávkování vzorku bylo zjištěno, že elektrokinetické dávkování při 20 kV po dobu 10 sekund poskytuje vhodný kompromis mezi velikostí signálu a kvalitou separace. Separační napětí pro optimální analýzu bylo stanoveno na 20 kV.

Metoda vykázala dobrou opakovatelnost, kdy relativní směrodatná odchylka (RSD) ploch píků byla 3,42 % pro histamin a 11,95 % pro tyramin. Retenční časy byly stabilní s RSD do 1,5 %. Kalibrační přímky vykazovaly uspokojivou linearitu a limity detekce a kvantifikace byly stanoveny v řádu jednotek mg·l⁻¹. Úspěšné ověření metody na vzorcích červeného a bílého vína a černého a zeleného čaje prokázalo, že metoda je přímo využitelná pro některé matrice.

Ve druhé části experimentální práce byla prováděna optimalizace podmínek pro nepřímou detekci alifatického biogenního aminu putrescinu. Testováno bylo několik elektrolytů obsahujících UV-absorbující složky, avšak žádný z testovaných systémů neposkytl jednoznačně detekovatelný signál putrescinu. I přes tyto výsledky byly získány poznatky, které mohou posloužit pro další optimalizaci metody, například prostřednictvím derivatizačních technik nebo alternativních detekčních systémů.

Celkově lze konstatovat, že vyvinutá metoda kapilární elektroforézy je vhodná pro stanovení aromatických biogenních aminů v DGT eluátech, pro jejichž analýzu byla vyvíjena, a představuje rychlý, jednoduchý a efektivní nástroj pro jejich analýzu v různých typech nejen potravinářských vzorků.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Erdag, D., Merhan, O., & Yildiz, B. (2018). Biochemical and pharmacological properties of biogenic amines. *Biogenic amines*, 8, 1-14.
- [2] Wójcik, W., Łukasiewicz, M., & Puppel, K. (2021). Biogenic amines: formation, action and toxicity—a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(7), 2634-2640.
- [3] Su, W., Yu, Q., Yang, J., Han, Q., Wang, S., Hédenc, P., Wang, X., Wan-Yan, R., & Li, H. (2023). Cadaverine and putrescine exposure influence carbon and nitrogen cycling genes in water and sediment of the Yellow River. *Journal of environmental sciences*, 142, 236-247.
- [4] Luengo, J. M., & Olivera, E. R. (2020). Catabolism of biogenic amines in *Pseudomonas* species. *Environmental microbiology*, 22(4), 1174–1192. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14912>
- [5] Dasa, F., Bejo, W., & Abdo, T. (2022). Importance and toxicity of biogenic amines in fresh and processed foods. *Journal of Food Technology and Nutrition Science*, 147, 24-26.
- [6] Uçar, Y., & Özoğul, F. (2024). Biogenic Amines in Seafood. *Food Bulletin*, 3(1), 9–15. <https://doi.org/10.61326/foodb.v3i1.258>
- [7] Masson, P. H., Takahashi, T., & Angelini, R. (2017). Molecular mechanisms underlying polyamine functions in plants. *Frontiers in plant science*, 8, 14.
- [8] Kaur, Y., & Das, N. (2023). Roles of polyamines in growth and development of the Solanaceous crops under normal and stressful conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(8), 4989-5010.
- [9] Naila, A., Flint, S.H., Fletcher, G.C., Bremer, P.J., & Meerdink, G. (2010). Control of Biogenic Amines in Food—Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science*, 75, R139 - R150.
- [10] Sánchez-Pérez, S., Comas-Basté, O., Rabell-González, J., Veciana-Nogués, M. T., Latorre-Moratalla, M. L., & Vidal-Carou, M. C. (2018). Biogenic Amines in Plant-Origin Foods: Are they Frequently Underestimated in Low-Histamine Diets? *Foods*, 7(12), 205. <https://doi.org/10.3390/foods7120205>
- [11] Sánchez-Jiménez, F., Ruiz-Pérez, M. V., Urdiales, J. L., & Medina, M. A. (2013). Pharmacological potential of biogenic amine–polyamine interactions beyond neurotransmission. *British journal of pharmacology*, 170(1), 4-16.
- [12] Blenau, W., & Baumann, A. (2001). Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 48, 13-38. <https://doi.org/10.1002/arch.1055>
- [13] Janoušková, M. (2010). *Biogenní aminy* [Bakalářská práce, Masarykova univerzita, Lékařská fakulta]. <https://is.muni.cz/th/c5ria/>

- [14] Kalhotka, L. (2007). *Biogenní aminy*. Masarykova univerzita. Dostupné z https://is.muni.cz/el/1411/podzim2007/BVMI0322p/um/Biogenni_aminy_2007_MU.pdf.
- [15] Torre, C.D., & Conte-Junior, C.A. (2013). Chromatographic methods for biogenic amines determination in foods of animal origin. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 50, 430-446.
- [16] García-Moruno, E., Carrascosa, A. V., & Muñoz, R. (2005). A rapid and inexpensive method for the determination of biogenic amines from bacterial cultures by thin-layer chromatography. *Journal of food protection*, 68(3), 625-629.
- [17] Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. (2016). *Kvalitativní analýza – tenkovrstvá chromatografie (TLC)* [Výukový materiál]. https://is.muni.cz/el/sci/jaro2016/C7640/um/18_IA_tenkovrstva_chromatografie_TLC_navod.pdf
- [18] Masarykova univerzita, Lékařská fakulta. (2013). *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC): Analýza metabolických markerů: stanovení inosinu, adenosinu a jejich 2'-deoxy forem*. Dostupné z https://is.muni.cz/el/1431/podzim2013/C8102/um/HPLC_spec_metody.pdf
- [19] Grinias, J. P., Wong, J. M. T., & Nesbitt, K. M. (2017). Using benzoyl chloride derivatization to improve small-molecule analysis in biological samples by LC–MS/MS. *LCGC North America*, 35(10), 760–768.
- [20] Jubele, A. (2018). *Chromatographic determination of amines in food samples* [Diplomová práce, University of Helsinki Department of Chemistry Laboratory of Analytical Chemistry]. HELDA. <http://hdl.handle.net/10138/273519>
- [21] Navarro-Abril, A., Saurina, J., & Sentellas, S. (2022). Simultaneous Determination of Amino Acids and Biogenic Amines by Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry for Assessing Wine Quality. *Beverages*, 8(4), 69.
- [22] Nakovich, L. (2003). *Analysis of Biogenic Amines by GC/FID and GC/MS* [Diplomová práce, Virginia Polytechnic Institute and State University]. VTechWorks. <https://vtechworks.lib.vt.edu/handle/10919/35027>
- [23] Masarykova univerzita, Lékařská fakulta. (2018). *Chromatografie: Učební text* [Výukový materiál]. https://is.muni.cz/el/med/jaro2018/BLIT0222p/um/Chromatografie_ucebni_text.pdf
- [24] Chiu, T., Lin, Y., Huang, Y., & Chang, H. (2006). Analysis of biologically active amines by CE. *ELECTROPHORESIS*, 27.
- [25] Fischer, J., & Česla, P. (n.d.). *Kapilární elektroforéza: Interaktivní návod* [Výukový materiál]. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. <https://dokumenty.upce.cz/FCHT/kbbv-vk/pokrocila-instrum-analyza/kapilarni-elektroforeza.pdf>

- [26] Colón, L.A., Reynolds, K.J., Alicea-Maldonado, R., & Fermier, A.M. (1997). Advances in capillary electrochromatography. *ELECTROPHORESIS*, 18.
- [27] Oguri, S., Okuya, Y., Yanase, Y., & Suzuki, S. (2008). Post-column derivatization capillary electrochromatography for detection of biogenic amines in tuna-meat. *Journal of chromatography A*, 1202(1), 96-101.
- [28] National Center for Biotechnology Information (2025). PubChem Compound Summary for CID 774, Histamine. Dostupné z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Histamine>.
- [29] National Center for Biotechnology Information (2025). PubChem Compound Summary for CID 5610, Tyramine. Dostupné z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tyramine>.
- [30] National Center for Biotechnology Information (2025). PubChem Compound Summary for CID 1045, Putrescine. Dostupné z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Putrescine>.
- [31] Zhu, Q., Ji, J., Tang, X., Wang, C., & Sun, H. (2023). Bioavailability assessment of heavy metals and organic pollutants in water and soil using DGT: A review. *Applied Sciences*, 13(17), 9760.
- [32] Lange, J., Thomas, K., & Wittmann, C. (2002). Comparison of a capillary electrophoresis method with high-performance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples. *Journal of Chromatography B*, 779(2), 229-239.
- [33] He, L., Xu, Z., Hirokawa, T., & Shen, L. (2017). Simultaneous determination of aliphatic, aromatic and heterocyclic biogenic amines without derivatization by capillary electrophoresis and application in beer analysis. *Journal of Chromatography A*, 1482, 109-114.
- [34] Dolan, J. (2021). *Chromatographic measurements, part 5: Determining LOD and LOQ based on the calibration curve*. Separation Science. Dostupné z <https://www.sepscience.com/hplc-solutions-126-chromatographic-measurements-part-5-determining-lod-and-loq-based-on-the-calibration-curve-6959>
- [35] Obma, A., Hemwech, P., Phoolpho, S. et al. (2022). Silica nanolayer coated capillary by hydrothermal sol-gel process for amines separation and detection of tyramine in food products. *Scientific Reports*, 12(1), 7460.
- [36] HPLC.cz. (n.d.). *Evaluation of HPLC results*. Dostupné z http://www.hplc.cz/teorie/evaluation_hplc.html.
- [37] A. Elbashir, A., & Y. Aboul-Enein, H. (2010). Application of crown ethers as buffer additives in capillary electrophoresis. *Current Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 101-113.
- [38] Inoue, G., Kaneta, T., Takayanagi, T., Kakehi, J., Motose, H., & Takahashi, T. (2013). Determination of polyamines in *Arabidopsis thaliana* by capillary electrophoresis using salicylaldehyde-5-sulfonate as a derivatizing reagent. *Analytical Methods*, 5(11), 2854-2859.

[39] Elbashir, A. A., Krieger, S., & Schmitz, O. J. (2014). Simultaneous determination of polyamines and acetylpolyamines in human urine by capillary electrophoresis with fluorescence detection. *Electrophoresis*, 35(4), 570-576.

[40] Chin-Chen, M., Bose, D., Esteve i Romero, J., Peris Vicente, J., Rambla-Alegre, M. & Carda Broch, S. (2011). Determination of Putrescine and Tyramine in Fish by Micellar Liquid Chromatography with UV Detection Using Direct Injection. Dostupné z <https://doi.org/10.2174/187406500115010022>.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BA	biogenní amin
FAD	flavinadenindinukleotid
MAO	monoaminoxidáza
DAO	diaminoxidáza
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
TLC	tenkovrstvá chromatografie
GC	plynová chromatografie
CE	kapilární elektroforéza
SPE	extrakce na pevné fázi
TFAA	trifluoracetanhydrid
PFBA	pentafluorbenzaldehyd
ECD	detektor elektronového záchytu
MS	hmotnostní spektrometrie
FID	plamenově ionizační detektor
ESI	elektrosprejový ionizační zdroj
CEC	kapilární elektrochromatografie
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
SDA	dodecylsírán sodný
LIF	laserem indukovaná fluorescence
ELCL	elektrochemiluminiscence
FASS	field amplified sample stacking
LOD	detekční limity
IEF	izoelektrická fokusace
CZE	kapilární zónová elektroforéza

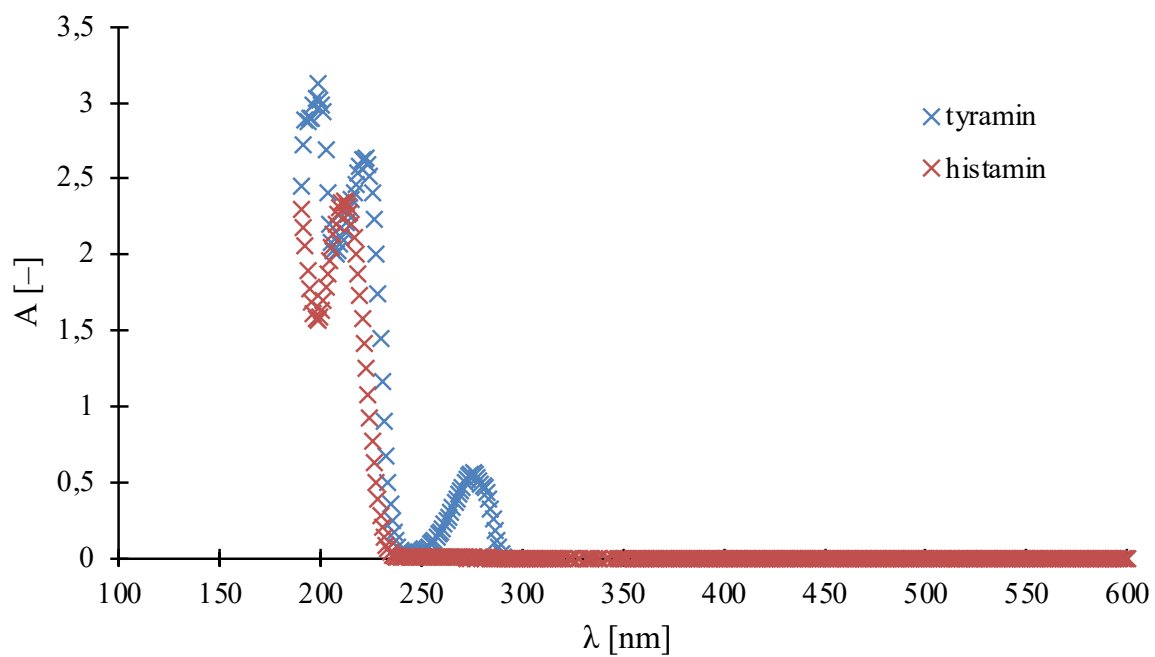
LC kapalinové chromatografie
EOF elektroosmotický tok
DGT difuzní gradienty v tenkém filmu
RSD relativní směrodatná odchylka
CE-LIF kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescenční detekcí

9 SEZNAM PŘÍLOH

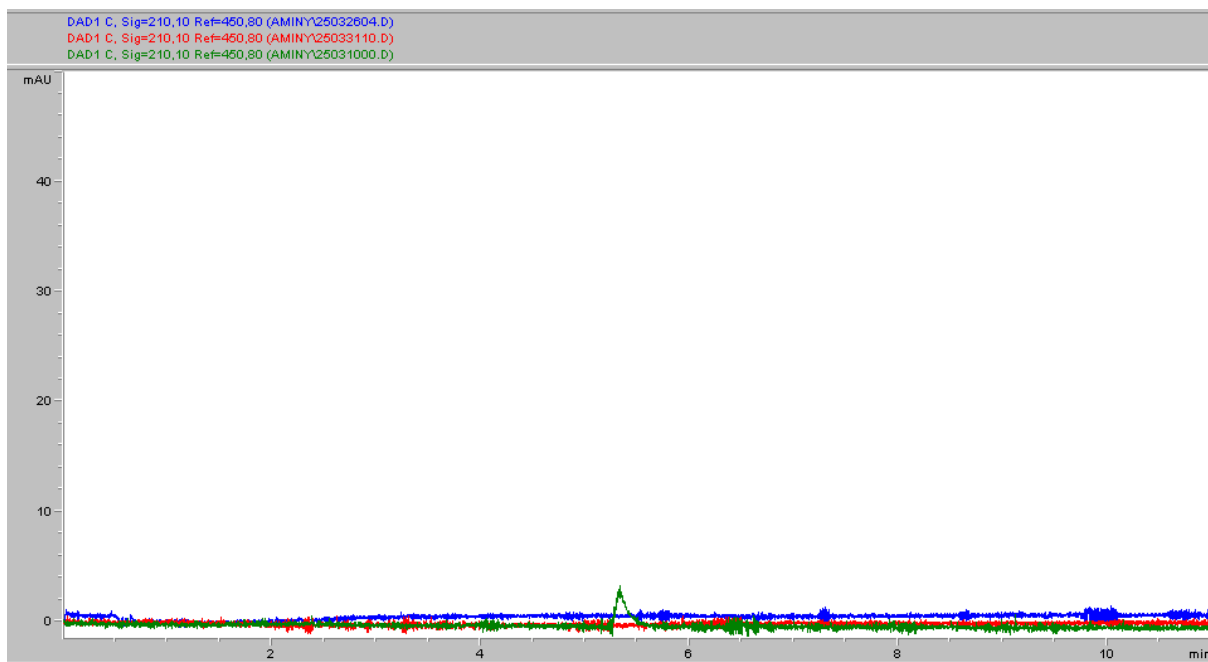
Příloha 1: UV/VIS spektra standardních roztoků biogenních aminů

Příloha 2: Základní linie testovaných pufrů

10 PŘÍLOHY



Obrázek 29: UV/VIS spektra standardních roztoků biogenních aminů



Obrázek 30: Základní linie testovaných pufrů (pH 2,5 – modrá linie, pH 4,5 – červená linie, pH 6,5 – zelená linie)