



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM SPOJENÍ PREKONCENTRAČNÍ TECHNIKY DGT A KAPILÁRNÍ ZÓNOVÉ ELEKTROFORÉZY PRO ÚČELY ANALÝZY BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH

STUDY OF THE COUPLING OF THE DGT PRECONCENTRATION TECHNIQUE AND CAPILLARY ZONE
ELECTROPHORESIS FOR THE PURPOSE OF BIOGENIC AMINE ANALYSIS IN FOOD.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Hana Kopková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Miloš Dvořák, Ph.D.

BRNO 2026

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP2199/2025

Akademický rok: 2025/26

Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií

Studentka: **Bc. Hana Kopková**

Studijní program: Chemie přírodních látek

Studijní obor: bez specializace

Vedoucí práce: **Ing. Miloš Dvořák, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Studium spojení prekoncentrační techniky DGT a kapilární zónové elektroforézy pro účely analýzy biogenních aminů v potravinách

Zadání diplomové práce:

1. Zpracujte literární rešerši zabývající se biogenními aminy a jejich výskytu a významu v potravinách a také technikou DGT a CZE.
2. Optimalizujte techniku CZE pro stanovení biogenních aminů.
3. Vyberte vhodný adsorbent pro techniku DGT, proveďte základní testy adsorpce a desorpce biogenních aminů pro adsorpční gel.
4. Proveďte potřebné validační testy pro techniku DGT.
5. Aplikujte spojení technik DGT a CZE na stanovení biogenních aminů ve vybraných potravinářských matricích.
6. Zpracujte a diskutujte získané výsledky.

Termín odevzdání diplomové práce: 4.5.2026

Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Hana Kopková
studentka

Ing. Miloš Dvořák, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 3.2.2026

prof. Ing. Stanislav Obruča,
Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Biogenní aminy jsou přirozeně se vyskytující dusíkaté látky. Mohou však vykazovat toxické účinky a podílet se na projevech histaminové intolerance. Tato práce se zabývá spojením techniky DGT (Diffusive Gradient in Thin Film) a kapilární zónové elektroforézy s vodivostní detekcí za účelem analýzy potravin jakožto jednoduchý proces. Využití techniky DGT bylo studováno za účelem možnosti přečištění vzorku od matričních složek (např. soli) před následnou analýzou biogenních aminů pomocí kapilární zónové elektroforézy. V této práci bylo zaměřeno na rybí a ústřičné omáčky. Jako vhodné podmínky pro přečištění vzorku byl zvolen kationměničový sorbent Dowex® 50W-X8. Sorbent byl v nosiči z agarosového gelu. Byly zkoušeny prekoncentrace pomocí DGT jednotek i adsorpčního gelu bez difúzního gelu. Byly provedeny validační experimenty pro popis zvoleného systému, jako je vliv pH, sorpční kapacity, difúzní koeficient nebo difúzní mezní vrstva. Hodnoty koncentrace biogenních aminů v rybích omáčkách byla porovnána s nezávislou metodou komerčního analyzátoru aminokyselin. Výsledky naznačují, že je potřebné optimalizovat sorpční experimenty. Další rybí omáčka a ústřičná omáčka byla přečištěna pouze sorpčním gelem bez difúzního gelu. Výsledky naznačují, že pro rybí a ústřičné omáčky difúzní gel není nutný. Jiné potraviny testovány nebyly, ale existují potraviny, kde by difúzní gel mohl mít lepší využití, např. mléko.

ABSTRACT

Biogenic amines are naturally occurring nitrogenous compounds. However, they can exhibit toxic effects and contribute to symptoms of histamine intolerance. This study examines the coupling of the DGT (Diffusive Gradient in Thin Film) technique and capillary zone electrophoresis with conductivity detection for the analysis of food as a simple method. The use of the DGT technique was studied to determine the possibility of purifying the sample from matrix components (e.g., salts) prior to subsequent analysis of biogenic amines using capillary zone electrophoresis. This study focused on fish and oyster sauces. The cation-exchange sorbent Dowex® 50W-X8 was selected as a suitable condition for sample purification. The sorbent was in an agarose gel carrier. Preconcentration was tested using both DGT units and adsorption gel without a diffusion gel. Validation experiments were conducted to characterize the selected system, including the influence of pH, sorption capacity, diffusion coefficient, and diffusion boundary layer. The biogenic amine concentrations in fish sauces were compared with an independent method using a commercial amino acid analyzer. The results indicate that the sorption experiments need to be optimized. Additional fish sauce and oyster sauce were purified using only sorption gel without diffusion gel. The results suggest that diffusion gel is not necessary for fish and oyster sauces. Other foods were not tested, but there are foods where diffusion gel could be more effectively utilized, such as milk.

KLÍČOVÁ SLOVA

Biogenní aminy, DGT, kapilární zónová elektroforéza, rybí omáčka

KEY WORDS

Biogenic amines, DGT, capillary zone electrophoresis, fish sauce

KOPKOVÁ, Hana. *Studium spojení prekoncentrační techniky DGT a kapilární zónové elektroforézy pro účely analýzy biogenních aminů v potravinách*. Online, diplomová práce. Miloš DVOŘÁK (vedoucí práce). Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2026. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/171458>. [cit. 2025-09-22].

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

Tímto bych chtěla poděkovat mému vedoucímu diplomové práce Ing. Milošovi Dvořákovi Ph.D. a konzultantovi doc. Ing. Pavlu Divišovi Ph.D. za jejich trpělivost, ochotu, cenné rady, připomínky a čas věnovaný vedení této práce.

OBSAH

OBSAH.....	5
ÚVOD.....	7
TEORETICKÁ ČÁST	8
1.1 Biogenní aminy	8
1.1.1 Vznik v potravinách a význam	8
1.1.2 Vznik v nefermentovaných potravinách	9
1.1.3 Vznik ve fermentovaných potravinách	10
1.1.4 Význam v lidském těle	11
1.1.5 Toxicita biogenních aminů	11
1.2 Rybí omáčky	12
1.2.1 Výroba rybích omáček.....	12
1.3 Technika DGT	12
1.3.1 Princip techniky DGT	13
1.3.2 Agarósový gel.....	16
1.3.3 Sorbent.....	17
1.4 Kapilární zónová elektroforéza.....	18
1.4.1 Elektroosmotický tok.....	19
1.4.2 Kapiláry	19
1.4.3 Vodivostní detektor	19
1.5 Stanovení biogenních aminů v potravinách	20
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
1.6 Chemikálie	21
1.7 Postupy.....	21
1.7.1 Výběr elektrolytu.....	21
1.7.2 Výběr sorbentu	23
1.7.3 Výběr elučního činidla.....	23
1.7.4 Příprava sorpčního agarosového gelu	24
1.7.5 Příprava difúzního agarosového gelu	25
Příprava DGT jednotky	25
1.7.6 Sorpce na disk bez difúzního gelu	26
1.7.7 Přechištění rybí omáčky metodou sorpce	26
1.7.8 Validační experimenty.....	27

1.7.9 Stanovení biogenních aminů v potravinách.....	29
VÝSLEDKY A DISKUSE	31
1.8 Výběr elektrolytu pro kapilární zónovou elektroforézou.....	31
1.9 Výběr sorbentu.....	33
1.10 Výběr elučního činidla	35
1.11 Ověření sorpce na adsorpční disk bez difúzního gelu	37
1.12 Ověření přístupu přechištění reálné matrice	38
1.12.1 Ředěná nepřechištěná rybí omáčka	38
1.12.2 Přechištění rybí omáčky metodou sorpce	39
1.12.3 Srovnání obou přístupů přechištění rybí omáčky	40
1.13 Validační experimenty	41
1.13.2 Eluční faktor	43
1.13.3 Prekoncentrační krok	43
1.13.4 Vliv pH	44
1.13.5 Adsorpční izotermy a sorpční kapacita	45
1.13.6 Difúzní koeficient	48
1.13.7 Difúzní mezní vrstva	49
1.14 Stanovení biogenních aminů v potravinách	49
1.14.1 Stanovení biogenních aminů v rybí omáčce Orient Gourmet pomocí techniky DGT a sorpce bez difúzního gelu	49
1.14.2 Stanovení biogenních aminů v rybí omáčce Thai Pride	50
1.14.3 Stanovení biogenních aminů v ústřičné omáčce.....	51
ZÁVĚR.....	52
SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	53

ÚVOD

Biogenní aminy jsou látky vzniklé dekarboxylací aminokyselin. Jedná se o nízkomolekulární sloučeniny v rostlinách a živočiších. Mají různou strukturu.

Jsou očekávány v potravinách s obsahem bílkovin nebo volných aminokyselin, které jsou biochemicky nebo mikrobiálně metabolizovány. Množství biogenních aminů v potravine je ovlivněno typem potravy, přítomnými mikroorganismy a množstvím volných aminokyselin. Biogenní aminy jsou tepelně stabilní. Po pasterizaci však některé biogenní aminy zůstávají aktivní. U zpracování nedochází ke snižování biogenních aminů. Naopak při skladování může narůst jejich obsah.

Biogenní aminy mohou indikovat mikrobiální znehodnocení potravin, ačkoliv jejich přítomnost nemusí znamenat přímý růst mikroorganismů. U ryb a masa dochází při kažení k nárůstu množství histaminu, putrescinu i kadaverinu. Koncentrace se pohybují v řádech desítek až stovek $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$, v závislosti na podmínkách skladování. Přirozeně se vyskytují biogenní aminy v potravinách například v kakau (Fenylethylamin), černém pepři (pyrolidin).

Ve fermentovaných potravinách vznikají biogenní aminy mikrobiální činností. Obsah histaminu a tyraminu se liší v závislosti na druhu sýru. Mikroflóra v zelí závisí na době sklizně a zpracování a ta způsobí spontánní kvašení a vznik biogenních aminů. V sójových omáčkách v průběhu fermentace a ve víně v průběhu alkoholové fermentace vznikají biogenní aminy. Dozrávající sušené uzeniny mají zvýšené množství biogenních aminů.

Biogenní aminy, především histamin, jsou spojovány s otravou potravinami. Způsobuje migrény a nevolnost. První zmínka byla v Nizozemsku v roce 1967 a byla způsobena sýrem Gouda.

Rybí omáčky jsou vyráběny dvěma způsoby. Tradičním postupem a průmyslově. U tradičního postupu fermentace rybí omáčky trvá dlouho, probíhá spontánně a proces není kontrolován. U průmyslové metody se pro zkrácení doby fermentace přidává startovací kultura, nebo je snížen obsah soli na začátku fermentace nebo se využívá stlačený oxid uhličitý. To má za následek také snížené množství biogenních aminů v konečném produktu. Rybí omáčky jsou komplexní matricí obsahující biogenní aminy. Matriční látky mohou komigrovat se sledovanými analyty a tak je před analýzou potřebné zajistit přečišťovací krok.

Technika DGT je metoda sloužící k analýze těžkých kovů a organických látek ve vodách a půdě. Používá se jako jednoduchá přečišťující a prekoncentrační technika. U použití této techniky je potřeba zvolit správný sorbent, difúzní gel a provést validační experimenty, jako jsou sorpční kapacita, difúzní koeficient, difúzní mezní vrstva.

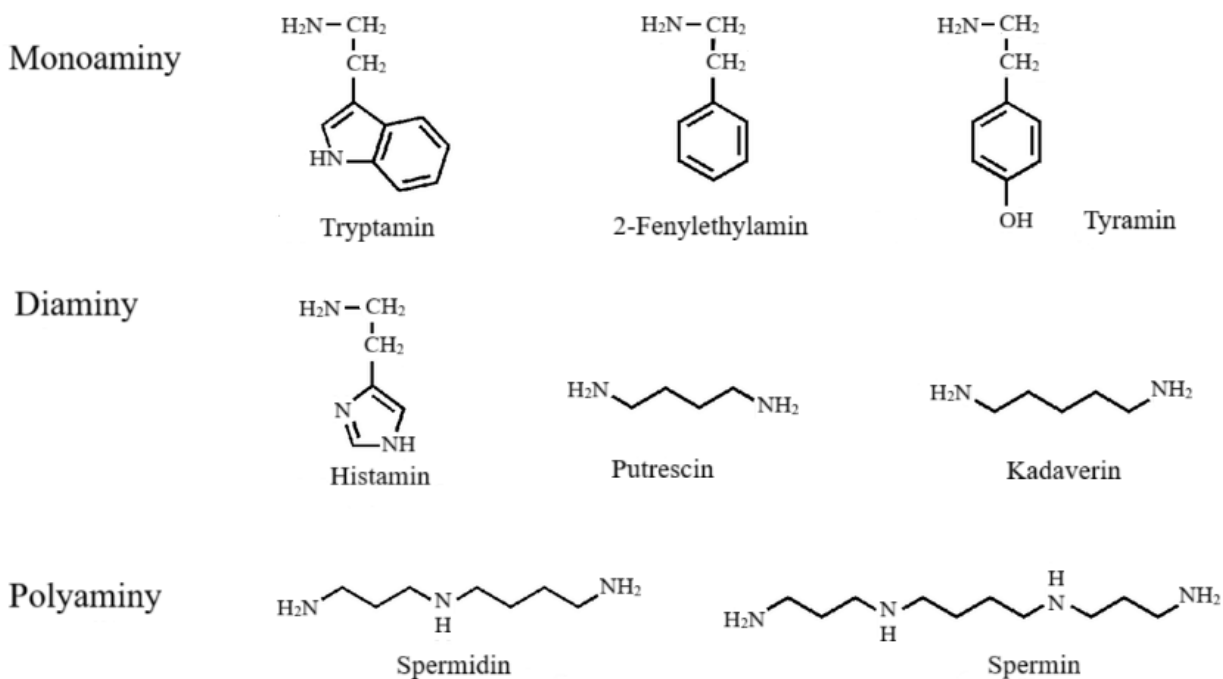
Kapilární zónová elektroforéza je technika založená na migraci látek v elektrickém poli. Hlavní výhodou této techniky je malé množství vzorku (v řádu μl) a umožňuje rychlejší optimalizaci metody. Vykazuje vyšší odolnost vůči rozdílným podmínkám analýzy jako je alkalické, alkoholové nebo kyselé prostředí. Dokáže analyzovat široké spektrum matic i přímou analýzou.

Pro analýzu biogenních aminů v potravinách se typicky využívají metody HPLC, s nutností předúpravy vzorků extrakcí, eluce z pevné matrice nebo zakoncentrování. U metod HPLC je vysoká spotřeba rozpouštědel pro přípravu mobilní fáze a analýzy trvají dlouhou dobu. A kolony mohou být poškozeny nevhodným použitím mobilních fází nebo rozpouštědlem ve vzorku.

TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Biogenní aminy

Biogenní aminy jsou dusíkaté látky vzniklé dekarboxylací aminokyselin, případně aminací či transaminací karbonylových sloučenin [1]. Mohou se tvořit a rozkládat během normálního metabolismu živočichů, rostlin a mikroorganismů [2]. Jedná se o nízkomolekulární sloučeniny s bazickou povahou. Jejich struktura může být alifatická, aromatická nebo heterocyklická [2]. Struktury některých základních biogenních aminů lze vidět na obrázku (obrázek 1).



Obrázek 1: Struktura některých biogenních aminů. [3]

1.1.1 Vznik v potravinách a význam

Biogenní aminy lze očekávat v potravinách obsahující bílkoviny nebo volné aminokyseliny a jsou vystaveny podmínkám, které umožňují mikrobiální nebo biochemickou aktivitu. Celkové množství vzniklých aminů však závisí na potravině a přítomných mikroorganismech. Mezi další faktory, které ovlivňují tvorbu biogenních aminů, patří dostupnost volných aminokyselin a příznivé podmínky pro růst mikroorganismu a produkci enzymu dekarboxylázy. [2] Tyto látky jsou v široké škále potravin. Jedná se například o rybí výrobky, masné výrobky, mléčné produkty, dále víno, pivo, ovoce, ořechové plody a čokoládu [2], [4]. Biogenní aminy v potravinách vznikají obvykle mikrobiálně dekarboxylací aminokyselin [4]. Některé biogenní aminy mohou však mít i toxický charakter. Na otravách potravinami se nejčastěji podílí alifatické biogenní aminy (putrescin, kadaverin), aromatické biogenní aminy (tyramin, fenyletylamin) a také heterocyklické biogenní aminy (histamin, tryptamin) [4]. Většina biogenních aminů je tepelně stabilní. Po pasterizaci zůstávají některé biogenní aminy stále aktivní. Během zpracování se nesníží množství vytvořeného biogenního aminu. Naopak, během skladování se může jejich obsah i zvýšit. [2]

1.1.2 Vznik v nefermentovaných potravinách

Přítomnost biogenních aminů u nefermentovaných potravin může být považována za známku nežádoucí mikrobiální aktivity. Jako indikátor mikrobiálního znehodnocení by mohla být použita hladina biogenních aminů. Avšak přítomnost aminů v potravinách nemusí nutně znamenat vysoký růst mikroorganismů znehodnocujících potraviny. Důvodem je, že ne všechny mikroorganismy mají dekarboxylázové enzymy. [5], [6]

Při znehodnocování kažením ryb a masa dochází k navýšení množství histaminu, putrescinu i kadaverinu a zároveň dochází ke snížení množství sperminu a spermidinu [2]. Obsah biogenních aminů (kadaverin, putrescin, spermin a spermidin) se například u pstruha duhového během skladování zvýšil. Konkrétní nárůst množství těchto aminů se lišil v závislosti na teplotě skladování [7]. Jiné aminy, jako je trimethylamin, jsou přítomny v rybách v závislosti na jejich čerstvosti [8]. V čerstvém a zpracovaném vepřovém mase je obsah adrenalinu, sperminu a spermidinu vysoký. Naopak histaminu, kadaverinu, putrescinu a tyraminu je v tomto mase nízké množství. [9] U variabilních skupin masných výrobků se obsah putrescinu, sperminu a spermidinu pohybuje v řádech desítek nebo stovek $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ [10]. Různé biogenní aminy jsou identifikovány v hovězím mase tepelně upraveném i tepelně neupraveném. Nejen v hovězím a ovčím svalu, ale také v jiných masných výrobcích je stanovován histamin a také faktory určující jeho syntézu. [5] Ve srovnání ryb a dalších druhů masa je v kuřecím mase, vepřovém mase a hovězím mase nejvýznamnější spermin, zatímco v rybách (kromě pstruha) je malé množství spermidinu a sperminu. V případě putrescinu je v rybách (kromě pstruha) jeho obsah vysoký ve srovnání s uvedenými druhy masa. [12]

V rostlinách při nedostatku hořčíku a draslíku a vysoké koncentraci amoniaku dochází ke kumulaci putrescinu a agmatinu. Dalšímu navýšení obsahu biogenních aminů je způsobeno mikrobiální kontaminací. Vysoké hladiny biogenních aminů se nacházejí v pomerančové šťávě, především noradrenalin a tryptamin. Vysoký obsah se také nachází v rajčatech (tyramin, tryptamin, histamin), v banánech (tyramin, noradrenalin, serotonin, tryptamin), v švestkách (tyramin, noradrenalin) nebo v listech špenátu (histamin). [9] Fenylethylamin se vyskytuje v čokoládě a také v cukrovinkách obsahující čokoládu. V těchto potravinách je přítomen, jelikož je přirozenou složkou kakaových bobů. Může být také obsažen v některých houbách ve vysokém množství. Vysoké množství pyrolidinu bylo zjištěno v černém pepři ($41\text{--}91 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) i v sójové omáčce. [12] Vysoké hladiny histaminu byly zjištěny v mořské řase *Furcellaria lumbricalis* v množství $600\text{--}2500 \text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny této řasy. Hordenin byl analyzován v řase *Mastocarpus stellatus*. Jeho množství je $1000\text{--}5500 \text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny. [13]

V kravském mléce je obsah biogenních aminů (spermidin, spermin a putrescin) nízký [11], například u kravského plemene Busha je obsah biogenních aminů také nízký. Vzorky mléka obsahují $0,7\text{--}0,11 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ kadaverinu a $0,15\text{--}0,18 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ sperminu. [14] Velmi nízké koncentrace biogenních aminů byly detekovány ihned po dojení. Nárůst přirozeně se vyskytujících bakterií ovlivňuje teplota skladování. Po šesti dnech skladování je v syrovém i sterilizovaném mléce zkažená chuť u různých teplot skladování. Biogenní aminy se však tvoří pouze u syrového mléka u skladování na 10°C , a to po šesti dnech. Akumulace putrescinu, tyraminu a histaminu je způsobena přítomností přirozeně se vyskytujícími mikroorganismy mléčného kvašení. [15] U krysího mléka je detekováno malé množství putrescinu (méně než

2,5 nmol·ml⁻¹) a sperminu (méně než 1 nmol·ml⁻¹). Spermidinu je v krysím mléce více a během laktace jeho množství stoupá. U mateřského mléka jsou koncentrace biogenních aminů zcela individuální. Koncentrace biogenních aminů se obecně příliš nemění během prvního měsíce laktace. Putrescin na konci čtvrtého měsíce laktace mírně stoupá. Zároveň stabilní zůstaly koncentrace spermidinu a sperminu. [16]

1.1.3 Vznik ve fermentovaných potravinách

Ve fermentovaných potravinách biogenní aminy vznikají dekarboxylací příslušných aminokyselin pomocí mikroorganismů, které mají substrátově specifické enzymy. [2] Mezi bakteriemi však nejsou příliš rozšířené aminokyselinové dekarboxylázy, avšak druhy mnoha rodů jsou schopny dekarboxylovat jednu či více aminokyselin. Jedná se například o druhy rodů *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia* nebo také *Lactobacillus*. [17]

Sýry jsou hned po rybách nejčastěji spojovány s otravou histaminem. Mezi různými druhy sýru se liší obsah histaminu i tyraminu. Liší se i obsah těchto aminů v rámci jednotlivých druhů. [5] Byly nalezeny různé biogenní aminy v různých druzích sýrů [5]. Ze Švýcarského sýra, který byl zapleten do otrav histaminem v roce 1980 v New Hampshire, byl izolován kmen *Lactobacillus buchneri*. Tento izolovaný kmen dokáže produkovat až 4070 nmol·ml⁻¹ histaminu v MRS bujónu doplněného o 0,1 % histidinu. [19]

Nakrájené zelí obsahuje velké množství původní mikroflóry. Tato mikroflóra se liší v závislosti na době sklizně, zpracování a hygieně během zpracování. Dochází pak ke spontánnímu kvašení. V průběhu kvašení dochází k vývoji mikrobiální populace. Nejdříve probíhá aerobní kvašení, následováno fakultativně anaerobním kvašením. Nakonec dochází ke kvašení pomocí bakterií mléčného kvašení (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*). To vede ke stabilnímu produktu. Kvůli různé variabilitě mikroflóry je očekáván i rozdílný obsah biogenních aminů. Při postupném vzniku mikropopulací se biogenní aminy (zejména putrescin) hromadí v nálevu kysaného zelí. [20], [2] Obsah histaminu v kysaném zelí byla naměřena na hladině 5,06 mg·100 g⁻¹. Tato hladina je nižší než hladina histaminu spojující s otravou histaminem (100 mg·100 g⁻¹). [20]

Miso je fermentovaná pasta vyráběná ze sójových bobů a obilovin za přítomnosti soli. [22] Sójová pasta miso rovněž obsahuje biogenní aminy (histamin, fenethylamin, tyramin, tryptamin), které vznikají v průběhu fermentace. Na tvorbu biogenních aminů v tomto produktu má vliv obsah soli. [22]

Ve zpracovaných masných výrobcích mohou být biogenní aminy ukazatelé nekvalitní suroviny. Mohou však také souviset s fermentačními procesy a mikrobiální aktivitou. [6] Fermentované masné výrobky vyrobené pomocí startovacích kultur *Lactobacillus phmtarutn* obsahují nižší množství biogenních aminů (17,21 µg·g⁻¹ sušiny histaminu a 66,35 µg·g⁻¹ sušiny tyraminu) v porovnání s výrobky s přídavkem glukon-D-laktonu (141 µg·g⁻¹ sušiny histaminu a 1249,16 µg·g⁻¹ sušiny tyraminu) a kontrolním vzorkem (18,64 µg·g⁻¹ sušiny histaminu a 1101,16 µg·g⁻¹ sušiny tyraminu). Současné tyto postupy mají vliv i na organoleptické vlastnosti těchto produktů. Klobásky s přídavkem glukon-D-laktonu vykazovaly nepříjemnou chuť lnu a byly hodnoceny jako méně přijatelné při senzorickém hodnocení. [23] Studie Maijala a Eerola poukazuje na zvýšené množství biogenních aminů během dozrávání sušených uzenin. V průběhu dozrávání bylo vyizolováno 42 kmenů mléčných bakterií. Většina amin-pozitivních kmenů

(kmen produkující biogenní aminy) byla izolována až na konci zrání spolu s nejvyššími hladinami aminů. V průběhu fermentace docházelo ke zvyšování koncentrace histaminu a tyraminu. Z celkového množství kmenů mléčných bakterií dokázalo 10 z nich produkovat 402–1087 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny tyraminu a 4 z těchto deseti kmenů vyprodukovalo 725–1083 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny histaminu. Možností snížení hladiny vznikajících biogenních aminů by mohla být omezení počáteční hladiny biogenních aminů a omezení těchto kultur. [24]

V červeném víně byla detekována přítomnost biogenních aminů v důsledku bakteriálního metabolismu. Mošty z odrůdy Villard noir obsahovaly nízké hladiny aminů ethanolaminu (2403,2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) a tyraminu (482,3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Kadaverin ani histamin nebyl detekován, naopak, po alkoholovém kvašení byly detekovány v nejvyšším množství (510,9 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ kadaverinu a 1111,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ histaminu). Zároveň došlo k jejich snížení po přirozené malolaktické fermentaci (102,18 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ kadaverinu a 444,6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ histaminu). V případě tyraminu došlo k navýšení jeho obsahu jak v případě alkoholové fermentace (2880,78 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), tak i v případě přirozené malolaktické fermentace (5075,66 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Obsah putrescinu, agmatinu a ethanolaminu se navýšil v průběhu alkoholového kvašení (438,57 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ putrescinu, 319,57 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ agmatinu a 20767,20 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ethanolaminu), ale v průběhu malolaktické fermentace k významným změnám nedochází. [25]

1.1.4 Význam v lidském těle

Některé biogenní aminy jsou důležité pro mnohé fyziologické funkce člověka i zvířat. Podílí se na regulaci tělesné teploty, dále regulují objem a pH žaludku a také mozkovou činnost [2].

1.1.5 Toxicita biogenních aminů

I když biogenní aminy jako jsou histamin, tyramin nebo putrescin jsou důležité pro mnoho důležitých funkcí, mohou tyto biogenní aminy vykazovat i toxický charakter při konzumaci potravin s vysokým obsahem těchto aminů. Mezi účinky biogenních aminů jsou psychoaktivní, vazoaktivní a jiné účinky. Symptomy pro nadměrnou konzumaci biogenních aminů jsou nevolnost, potíže s dýcháním, pocení, návaly horka. Mezi další příznaky patří bušení srdce, bolest hlavy, jasně červená vyrážka a pálení v ústech [4]. Nejznámější potravinové otravy, které způsobí biogenní aminy souvisí s histaminem.

První zaznamenaný případ otravy histaminem byl v Nizozemsku roku 1967. Tato otrava byla způsobena sýrem Gouda. [18] Za migrény a hypertenzní krize vyvolané u některých pacientů stravou mohly být způsobeny právě biogenními aminy, jako jsou tyramin nebo 3-fenylethylamin. Za původce několika otrav jídlem byl označen histamin. Tato intoxikace histaminem je způsobena potravinami s obsahem nadměrného množství tohoto aminu. S otravou histaminem je spojována konzumace ryb typu scombroid. Také jiné potraviny, například sýr, jsou spojovány s otravou histaminem. Ve fermentovaných potravinách (kysané zelí, víno, miso a další) je možný výskyt histaminu i jiných biogenních aminů. Mikroorganismus *Lactobacillus buchneri* by mohl být důležitý pro mléčný průmysl. Je důležitý kvůli účasti na případech otravy histaminem, které mají souvislost se sýry. Zvýšená toxicita histaminu se může zdát v případě přítomnosti dalších biogenních aminů v potravinách. Tyto další biogenní aminy mohou inhibovat enzymy, které metabolizují histamin v tenkém střevě. Četnost otrav histaminem je náročné odhadnout. A to z toho důvodu, že většina zemí nereguluje obsah histaminu v potravinách a také nevyžadují

oznámení v případě otravy. Navíc otrava histaminem je velmi podobná potravinové alergii. Otrava histaminem je tak i chybně diagnostikována. [18]

1.2 Rybí omáčky

1.2.1 Výroba rybích omáček

Metabolismem sacharidů, lipidů a bílkovin vznikají typické a chuťové látky. V průběhu fermentace vzniká v rybách široká škála volných aminokyselin, peptidů, alkoholů, aldehydů, ketonů i esterů. K tomu jsou potřeba endogenní a mikrobiální enzymy. [26] Maximální legislativní obsah histaminu v rybích omáčkách je podle Nařízení komise (EU) č. 1019/2013 kterým se mění příloha I nařízení (ES) č. 2073/2005, pokud jde o histamin v produktech rybolovu stanoven na $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. [27]

1.2.1.1 Výroba tradiční cestou

Výroba rybí omáčky tradiční cestou je založena na principu spontánní fermentace bez použití startovacích kultur. Je fermentována směs ryb a soli v poměru 3:1. [28] Obvykle v průběhu fermentace nedochází ke kontrolním opatřením. To způsobuje kolísavou kvalitu výrobku. Aby rybí omáčka byla prvotřídní kvality, je potřebná úplná fermentace trvající přibližně 12–18 měsíců. [29] Rod *Carnobacterium* byl dominantním rodem v průběhu prvních tří měsíců fermentace. Po šesti měsících jejich počet rychle klesá. Po 18 měsících se stal dominantním rodem *Lentibacillus*. To znamená, že v průběhu fermentace dochází ke změně mikrobiálních dominantních rodů v závislosti na době fermentace. [30] Dochází ke kombinovanému působení endogenních enzymů rybí tkáně a halotolerantních mikroorganismů podílejících se na degradaci bílkovin [28]. Pomocí proteáz, které pocházejí z ryb a halofilních bakterií, jsou během proteolýzy hydrolyzovány bílkoviny z ryb na peptidy a jednotlivé aminokyseliny. [31] Vzniklé peptidy a aminokyseliny dodávají chuť umami nebo hořkou chuť. [32]

1.2.1.2 Průmyslová výroba

Existují určité metody, jak zkrátit dobu fermentace a snížit náklady na výrobu. [26] Zkrátit dobu fermentace lze například snížením obsahu soli. V této rybí omáčce vzniklo velké množství volných aminokyselin (sladkých a umami) a biogenních aminů. Jako startovací kultura by mohl být použit mikroorganismus *Tetragenococcus*. [33] Druhým přístupem pro rychlou technologickou výrobu je použití stlačeného oxidu uhličitého pro regulaci růstu mikroorganismů. Touto cestou vyrobená rybí omáčka vykazuje příjemnou vůni. Byl snížen i obsah bakterií, biogenních aminů a štiplavých organických kyselin. Senzoricky byl snížena žluklá chuť, dále rybí, hnilobný a štiplavý zápach. [34] Další způsob zkrácení doby fermentace je použití startovacích kultur. Mohou být použity například *Virgibacillus* sp. SK33, *Virgibacillus* sp. SK37, *Staphylococcus* sp. SK1-1-5. Ve srovnání s kontrolním vzorkem bylo ve vzorku očkovaným *Virgibacillus* sp. SK33 o 50 % méně histaminu. Těkavé látky v naočkovaných vzorcích po 4 měsících fermentace měly podobný vzorec jako komerční produkt fermentovaný po dobu 12 měsíců. [29]

1.3 Technika DGT

Technika DGT (Diffusive Gradient in Thin Film) byla od roku 1994 využívána především pro stanovení stopových kovů v životním prostředí v kombinaci s běžnými spektroskopickými

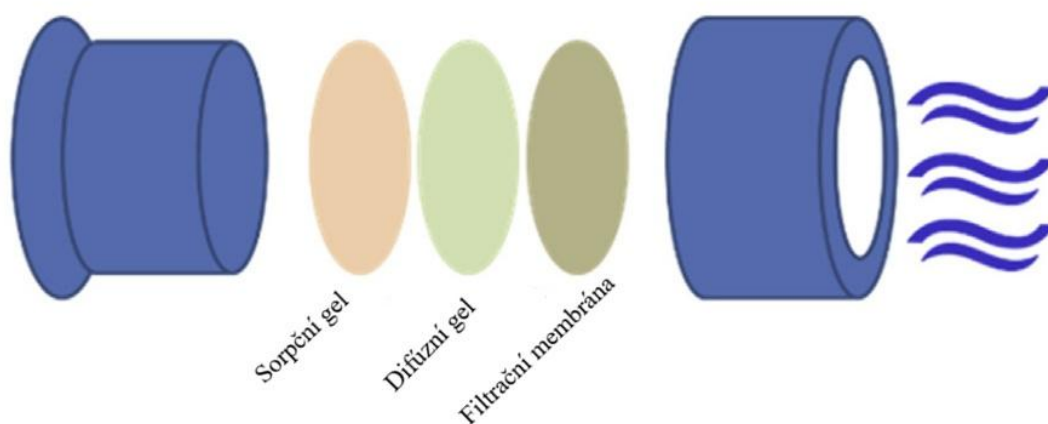
technikami. S postupným vývojem této techniky a rozšiřováním spektra používaných sorbentů se její využití rozšířilo i na další typy analytů, včetně organických látek. Poprvé byla využita na měření zinku v mořské vodě. [35] Hlavní výhodou této techniky jsou jednoduchost, citlivost a opakovatelnost. Dále také multielementární kapacita (pro více prvků současně) a možnost prekoncentrace. [36]

1.3.1 Princip techniky DGT

Technika DGT využívá sorpční vrstvu obsahující vhodný sorbent (např. iontoměnič), který má specifická vazebná místa pro cílové analyty. Tato sorpční vrstva je od analyzovaného roztoku oddělena difúzní vrstvou tvořenou iontově propustným gelem a ochrannou filtrační membránou. Transport analytů přes tuto vrstvu je řízen difúzí.

Analyty difundují z vnějšího roztoku přes difúzní gel k sorpční vrstvě, kde se vážou na aktivní místa sorbentu a postupně se akumulují. Díky přesně definované tloušťce difúzní vrstvy a známému difúznímu koeficientu analytu je transport hmoty dobře popsán, což umožňuje kvantitativní stanovení koncentrace analytu v roztoku. [35], [38]

Jednotlivé vrstvy jsou umístěny v držáku (pístu), obvykle vyrobeném z akrylonitril-butadienstyrenu. Sorpční gel je umístěn na spodní části pístu, zatímco vrchní kryt obsahuje expoziční okénko o definované ploše, které je v kontaktu s analyzovaným roztokem (viz. obrázek 2). [39]



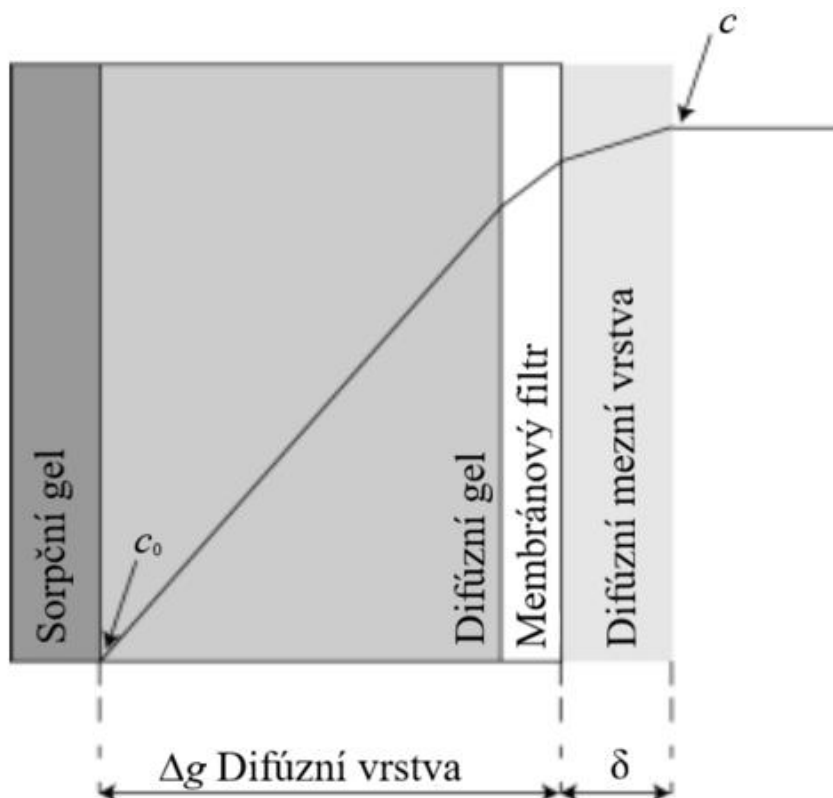
Obrázek 2: Schématické znázornění DGT jednotky v klasickém uspořádání. [40]

Technika DGT byla původně vyvinuta pro stanovení stopových kovů ve vodách, půdách a sedimentech. Stanovovány jsou především labilní formy analytů, které jsou schopny difundovat přes difúzní vrstvu a následně se vázat na sorpční materiál. Transport analytů je ovlivněn jejich velikostí a difúzními vlastnostmi – menší a mobilnější částice difundují snadněji, zatímco větší nebo silně vázané formy mají transport omezený. Velikost pórů difúzního gelu lze částečně ovlivnit jeho složením, což umožňuje selektivitu vůči různým typům analytů. [41]

Pro difúzní vrstvu lze použít různé typy hydrogelů. Zhang a Davison testovali například polyakrylamidové gely s různým stupněm zesíťování, agarósové gely nebo tzv. omezené gely

s velmi malými póry (< 1 nm). Volba typu gelu závisí na konkrétní aplikaci a vlastnostech stanovovaných analytů. [42]

Jak již bylo zmíněno, analyty difundují přes difúzní vrstvu o přesně definované tloušťce Δg do sorpční vrstvy, kde se vážou na funkční skupiny sorbentu. V průběhu expozice se v difúzní vrstvě ustavuje lineární koncentrační gradient mezi vnějším roztokem a povrchem sorpční vrstvy (viz obrázek 3), což je základní předpoklad pro kvantitativní vyhodnocení pomocí Fickova zákona difúze. [38]



Obrázek 3: Znázornění gradientu koncentrace analytu přes vazebnou sorpční a difúzní vrstvu v DGT v ustáleném stavu. [43]

1.3.1.1 Tok iontů

Zůstává-li gradient konstantní během doby nasycení, je možné podle Fickova prvního zákona difúze vypočítat tok iontů F z objemového roztoku přes difúzní vrstvu Δg [cm] podle rovnice (1) [38]:

$$F = D \cdot \frac{dc}{dx} = \frac{D \cdot (c - c_0)}{\Delta g}, \quad (1)$$

kde D [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$] je difúzní koeficient látky, která se analyzuje, c [$\text{ng} \cdot \text{cm}^{-3}$] představuje koncentraci v objemovém roztoku a c_0 [$\text{ng} \cdot \text{cm}^{-3}$] je koncentrace analytu na povrchu sorpční vrstvy. Tloušťka difúzní vrstvy Δg [cm] se skládá z difúzní gelu, filtrační membrány a difúzní mezní vrstvy.

Tok iontů může být také definován jako množství nasorbovaného iontu M [ng], které prošly difúzní plochou A [cm^2], za dobu expozice t [s] [44] vyjádřené pomocí rovnice (2):

$$F = \frac{M}{A \cdot t}. \quad (2)$$

Hmotnost iontů prodifundovaných do vrstvy sorbentu M [ng] lze analyticky určit. Díky tomu lze kvantifikovat koncentraci v původním roztoku c [ng·cm⁻³] spojením rovnic (1) a (2) ve tvaru:

$$c = \frac{M \cdot \Delta g}{D \cdot t \cdot A}, \quad (3)$$

kde D [cm²·s⁻¹] je difúzní koeficient látky, která se analyzuje, Δg [cm] je tloušťka materiálové difúzní vrstvy, A [cm²] je difúzní plocha, t [s] je doba expozice. [37]

1.3.1.2 Difúzní koeficient

Pro techniku DGT je difúzní koeficient důležitým parametrem. Tento parametr určuje rychlost transportu přes vrstvy k vazebnému gelu. Jsou rozlišovány koeficienty podle bariéry. Prvním je difúzní mezní vrstva o určité tloušťce δ_{DBL} , které náleží difúzní koeficient ve vodě D_w . Další vrstvou je filtrační membrána s tloušťkou δ_f , která má difúzní koeficient D_f . Další a poslední vrstva je difúzní gel o tloušťce δ_g s difúzním koeficientem D_g . Často se stává, že difúzní koeficient filtrační membrány a gelu si jsou tak blízké, že lze nastavit jednu hodnotu difúzního koeficientu. Ale difúzní koeficient ve vodě je obvykle vyšší o 10–30 % než difúzní koeficient v gelech. Je nezbytné znát přesnou hodnotu difúzního koeficientu analytu pro správný výpočet koncentrace v roztoku. Je to nezbytné z toho důvodu, protože tok iontů podle Fickova zákona je přímo úměrný difúznímu koeficientu. Hodnoty difúzních koeficientů při různých teplotách lze snadno přepočítat. Také lze tyto hodnoty experimentálně stanovit pomocí akumulace hmotnosti analytu v čase. Sklony přímek odrážejí difúzní koeficient konkrétní látky. V pravidelných intervalech jsou stanoveny koncentrace v zásobním roztoku c a hmotnost prošlého analytu M . Do grafu se vynese závislost M/c na čase t . Ze směrnice přímky k je vypočítán difúzní koeficient podle rovnice (4) upravené z [38]:

$$D_k = \frac{k \cdot \Delta g}{A}, \quad (4)$$

kde D_k [cm²·s⁻¹] je experimentální difúzní koeficient analytu, k [ml·s⁻¹] je směrnice přímky, Δg [cm] je tloušťka materiálové difúzní vrstvy a A [cm²] je difúzní plocha. [38]

1.3.1.3 Difúzní mezní vrstva

Difúzní mezní vrstva představuje tenkou vrstvu roztoku na rozhraní mezi vnějším roztokem a povrchem DGT zařízení, ve které je proudění výrazně omezeno a transport analytů je řízen převážně difúzí. Tloušťka této vrstvy závisí na hydrodynamických podmínkách systému – ve stojatých roztocích se obvykle pohybuje v rozmezí přibližně 0,1–1 mm, zatímco při intenzivním míchání dochází k jejímu ztenčování. Difúzní mezní vrstva je přítomna i za dynamických podmínek, avšak její tloušťka je výrazně menší. Vliv difúzní mezní vrstvy není zanedbatelný, a proto je nutné ji zohlednit při výpočtu koncentrací pomocí techniky DGT, zejména za podmínek omezeného proudění, aby byla zajištěna přesnost stanovení. Difúzní mezní vrstvu lze experimentálně stanovit na základě předpokladu, že celkový odpor proti difúzi analytu je dán součtem odporů jednotlivých vrstev, tedy difúzního gelu, filtrační membrány a vnější difúzní mezní vrstvy. Experimentálně se tloušťka difúzní mezní vrstvy určuje pomocí souboru DGT

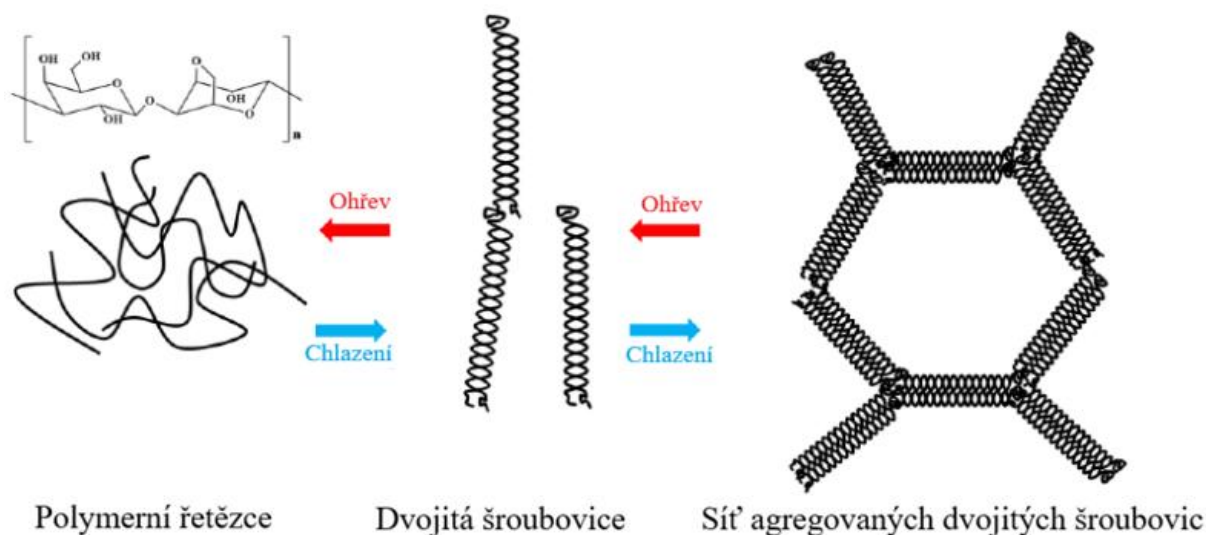
jednotek s různou tloušťkou difúzního gelu, které jsou vystaveny stejným podmínkám (proudění a koncentrace analytu). Následně se sestrojí graf závislosti převrácené akumulované hmotnosti $1/M$ na tloušťce difúzní vrstvy Δg . Z lineární závislosti lze ze směrnice a absolutního členu b vypočítat tloušťku difúzní mezní vrstvy δ podle příslušného vztahu (5):

$$\delta = \frac{b \cdot D_w}{a \cdot D_k}, \quad (5)$$

kde D_w [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$] je difúzní koeficient analytu ve vodě, D_k [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$] je experimentální difúzní koeficient analytu v gelu. [38]

1.3.2 Agarósový gel

Agarósa je lineární polysacharid, který je izolován z červených mořských řas rodu *Rhodophyta*. Základní jednotkou agarósy je agarobiósa. Agarobiósa je disacharid, který je složen z 1,3-vázané β -D-galaktopyranózy a 1,4-vázané 3,6-anhydro- α -L-galaktopyranózy. [45] Agarósa je důležitá pro biomedicínské aplikace. A to proto, že má reverzibilní teplotně citlivé gelační chování. Má také vynikající mechanické vlastnosti a biologickou aktivitu. Velikost póru v gelu lze ovlivnit koncentrací agarósy. [46] Při gelaci vodného roztoku agarósy při ochlazování roztoku dochází ke vzniku dvojitých šroubovic ze dvou agarósových jednotlivých řetězců stabilizovaných vodíkovými můstky. Následně dochází k seskupování dvojitých šroubovic do husté trojrozměrné sítě. [48] Schéma zesítení lze vidět na obrázku (obrázek 4). Mechanické vlastnosti agarósového hydrogelu jsou vůči iontům v přítomnosti gelu stabilní. Ale přidáním podpůrných solí se mění elasticita gelu, především u kompresního namáhání. [49] Agarósový gel byl testován pro použití v DGT jako levnější a ekologičtější varianta namísto polyakrylamidového gelu, který je karcinogenní. Tato možnost také nabízí jednodušší výrobní proces. [50] Agarósový difúzní gel pro DGT byl použit a testován pro organické molekuly. Difúze vykazovala lineární charakter pro tyto molekuly. Agarósový gel je tedy možné spolehlivě použít na DGT techniku pro organické molekuly. [51]



Obrázek 4: Struktura a mechanismus gelace agarósy, převzato a upraveno z [52]

1.3.3 Sorbent

Sorpční procesy zahrnují mechanismy, při nichž dochází k zachycování látek na nebo v jiné fázi, a dělí se na adsorpci a absorpci. Adsorpce je mezifázový jev, při kterém se molekuly jedné látky hromadí na povrchu jiné látky, obvykle pevné. Transport látek k povrchu sorbentu je zpravidla řízen difúzí. Absorpce naopak představuje proces, při kterém látka proniká do objemu jiné fáze. Adsorpce se dále dělí na fyzikální adsorpci a chemisorpci. [53] Fyzikální adsorpce je založena na slabých intermolekulárních interakcích, jako jsou van der Waalsovy síly nebo elektrostatické interakce, je obvykle rychlá a vratná a nedochází při ní ke vzniku chemických vazeb. Naproti tomu chemisorpce zahrnuje vznik chemických vazeb mezi adsorbátem a povrchem sorbentu, je specifitější a často méně vratná. Adsorpce může probíhat jak z plynné, tak z kapalně fáze. V případě kapalného prostředí je proces ovlivněn interakcemi s rozpouštědlem a dalšími složkami matrice, jako je pH nebo iontová síla roztoku. [53], [54]

1.3.3.1 Adsorpční (neiontové) sorbenty

Adsorpční (neiontové) sorbenty jsou často využívány například při extrakci na tuhé fázi (SPE). Jsou navrženy tak, aby umožňovaly přístup molekul do své pórovité struktury, přičemž transport do pórů je řízen difúzí. Sorpce je ovlivněna nejen velikostí molekul, ale také jejich chemickými vlastnostmi, zejména polaritou a schopností interagovat s povrchem sorbentu. [55] Sorpční kapacita těchto materiálů závisí především na měrném povrchu, velikosti a distribuci pórů a chemickém charakteru povrchu. Obecně platí, že vyšší měrný povrch vede k vyšší sorpční kapacitě. [56]

Významným zástupcem této skupiny je Amberlite XAD-16N, což je neiontová porézní pryskyřice na bázi kopolymeru styrenu a divinylbenzenu. Divinylbenzen zajišťuje zesíťování polymerní struktury a vytváří stabilní trojrozměrnou síť. Adsorpce na tomto materiálu probíhá převážně na principu fyzikální adsorpce, která je založena na slabých intermolekulárních interakcích, zejména van der Waalsových silách a hydrofobních interakcích mezi analytem a povrchem sorbentu. Tento mechanismus nevede ke vzniku chemických vazeb a je proto

obvykle vratný. Díky vysokému měrnému povrchu (přibližně $800 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) a vhodné velikosti pórů (cca 150 Å) je tento sorbent vhodný zejména pro adsorpci hydrofobních organických látek z vodných roztoků. Velikost částic se pohybuje v rozmezí 20–60 mesh. [57], [58]

1.3.3.2 Iontoměničové sorbenty

Iontoměniče jsou materiály nerozpustné ve vodě, které jsou schopny vyměňovat ionty s okolním roztokem. Nejčastěji se jedná o syntetické pryskyřice složené z polymerní matrice (např. polystyrenové nebo polyakrylové) a funkčních skupin, které zajišťují iontově výměnnou schopnost.

Podle typu funkčních skupin se rozlišují například silně kyselé kationtoměniče obsahující sulfonové skupiny a slabě kyselé kationtoměniče s karboxylovými skupinami. Princip jejich funkce spočívá v reverzibilní výměně iontů mezi roztokem a funkčními skupinami na povrchu sorbentu, přičemž dochází k zachování elektroneutality systému. [59]

Představitelem této skupiny je Dowex® 50W-X8, což je silně kyselé kationtoměničová pryskyřice na bázi kopolymeru styrenu a divinylbenzenu. Sulfonové skupiny přítomné v polymerní matrici slouží jako aktivní vazebná místa. [60] Označení 50W udává typ pryskyřice, zatímco X8 vyjadřuje stupeň zesíťování (8 %) divinylbenzenem, který ovlivňuje mechanické vlastnosti a propustnost materiálu. [60, 61]

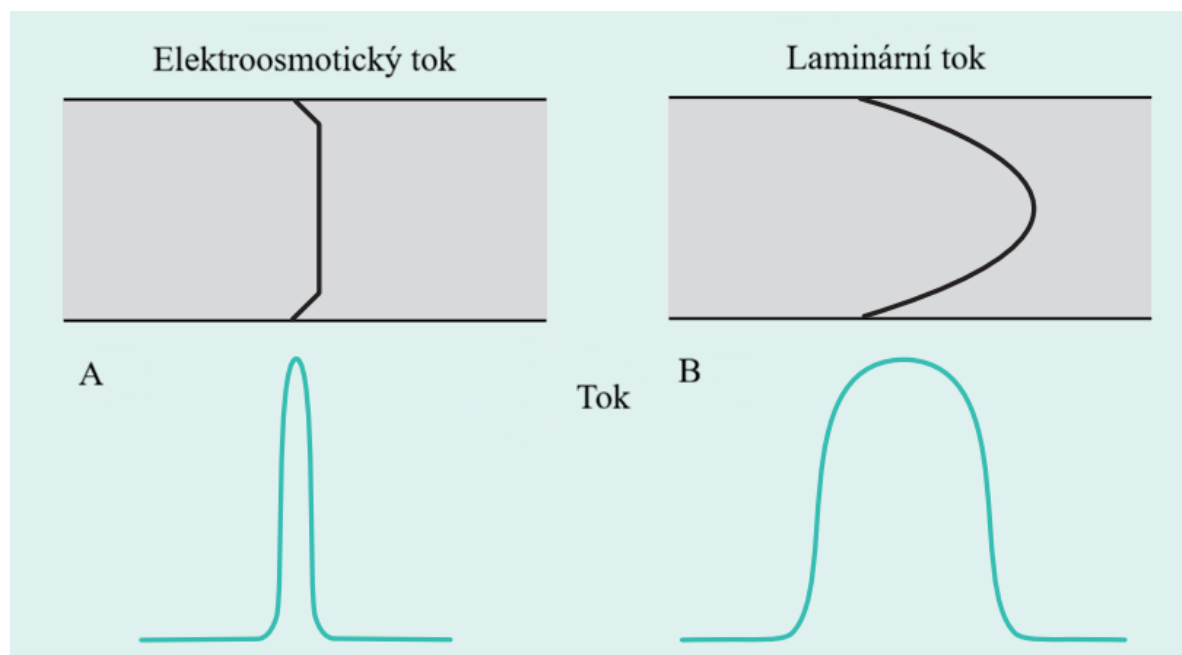
Tento sorbent se běžně využívá například při změkčování vody, kde zachycuje kationty vápníku a hořčíku, nebo při demineralizaci. Po vyčerpání kapacity je nutná regenerace, obvykle pomocí roztoků kyselin nebo solí. [59, 62]

1.4 Kapilární zónová elektroforéza

Arne Tiselius představil elektroforézu jakožto separační techniku v roce 1937. [63] Ten ji poprvé využil na zkoumání migrace proteinových směsí ve zkumavkách s pufrem [64]. Tato technika byla definována jako rozdílný pohyb nabitých částic v elektrickém poli. Rozdílný pohyb iontů vzniká v důsledku jejich přitahování nebo odpuzování. Arne Tiselius zjistil, že v elektrickém poli složky vzorku migrují směrem a rychlostí, která odpovídá náboji a pohyblivosti. Gelová elektroforéza má dlouhé časy analýzy a nízkou účinnost. Z tohoto důvodu se přešlo k separaci v úzkých kapilárách. Kapiláry mají vysoký elektrický odpor. Pak je tedy možné použít velmi silná elektrická pole ($100\text{--}500 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$). [65]

1.4.1 Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok je jev, při kterém dochází díky malé difúzi k pohybu celého roztoku v kapiláře ve formě pístu (viz. obrázek 5). Vzniká jako důsledek působení elektrického pole na elektrickou dvojvrstvu na vnitřní stěně. Povrch kapiláry je za normálních podmínek záporně nabitý a tok směřuje od anody ke katodě. Elektroosmotický tok unáší téměř všechny částice stejným směrem. Kationty, anionty i neutrální částice mohou být analyzovány v jednom běhu. A to je jeho velká výhoda. Při kapilární zónové elektroforéze je kapilára naplněna elektrolytem. Vzorek je dávkován na začátek kapiláry. Po zapnutí napětí dochází podle odlišných rychlostí migrace k separaci složek v oddělených zónách. [66]



Obrázek 5: Profil proudění a odpovídající zóny rozpuštěných látek poháněné elektrickým proudem (A) a tlakem (B). Převzato a upraveno z [66]

1.4.2 Kapiláry

Jako materiál kapiláry se používá tavený křemen (fused silica). Je dostatečně chemicky i elektricky inertní a propouští UV záření. Tyto trubičky mají velmi malý vnitřní průměr (obvykle 25–150 μm) a bez úpravy jsou velmi křehké. Aby kapiláry nebyly tak křehké, potahují se elastickou vrstvou polyimidů z vnější strany. Ale pro optickou detekci je nutné vytvořit okénko. To se vytváří tak, že polyamidová vrstva je spálena elektrickým obloukem nebo elektricky zahřátým drátem. V místě okénka dochází k poklesu odolnosti kapiláry a je na tom místě křehká. Pro zkrácení doby analýzy by se měla používat co nejkratší délka [67], ale dostatečně dlouhá, aby bylo dostatečné rozlišení separovaných iontů

1.4.3 Vodivostní detektor

Pro anorganické ionty a organické kyseliny je vhodný vodivostní detektor. Kontaktní měření vodivosti je pro úzké kapiláry nevhodné. To vedlo k vývoji bezkontaktních vodivostních detektorů. Detekční elektrody jsou tvořeny dvěma kovovými objímkami. Ty jsou umístěny těsně kolem kapiláry za sebou. Je využíváno vysokofrekvenční střídavé napětí, aby signál prošel stěnou kapiláry. Elektrody tedy nejsou v přímém kontaktu s elektrolytem nebo vzorkem.

Tímto detektorem je možné měřit malé anorganické ionty, malé sacharidy nebo aminokyseliny. Detekční limity mohou být v řádech až ppb. [68]

1.5 Stanovení biogenních aminů v potravinách

Stanovení biogenních aminů v potravinách je náročné, hlavně u pevných potravin, jako jsou například sýry nebo ryby. Byla vyvinuta metoda pro analýzu biogenních aminů v sýrech pomocí HPLC-DAD s derivatizací pomocí dansyl chloridu. Příprava vzorku byla však složitá. Bylo nutné vzorek homogenizovat, extrahovat do 0,2M kyseliny chloristé, následně byl vzorek centrifugován a supernatant byl smíchán s uhličitanem sodným. Následně proběhla derivatizace pomocí dansyl chloridu a vzorek byl ponechán v temnu. Pro zastavení reakce byl přidán L-prolin. [69] Metoda byla použita na analýzu sýrů z polského maloobchodu. Byl detekován kadaverin a putrescin 6,12–2871 mg/kg, resp. 5,74–441 mg·kg⁻¹. Tyraminu bylo nalezeno v koncentracích 5,62–646 mg·kg⁻¹ a histamin překračoval limit 100 mg·kg⁻¹. [70] Pro analýzy vína byla využita například RP-HPLC. Příprava vzorku také nebyla jednoduchá. Disíran draselný byl smíchán s roztokem standardů biogenních aminů a doplněn vínem. Směs byla míchána. Poté se vzala část vzorku a byla smíchána s roztokem tosylchloridu a triethylaminu. Byl dále přidán acetonitril a směs byla míchána. Poté se směs filtrovala přes membránový filtr. V červeném víně bylo detekováno 2,13 mg·l⁻¹ putrescinu, 2,17 mg·kg⁻¹ histaminu, kadaverinu bylo detekováno 1,31 mg·kg⁻¹ a tyraminu 0,877 mg·kg⁻¹. [71] Rybí omáčky byly analyzovány pomocí RP-HPLC s předkolonovou derivatizací s fluorescenční detekcí. Bylo detekováno 0–729 mg kg⁻¹, 0–1178 mg kg⁻¹ tyraminu, 0–1178 mg kg⁻¹ putrescinu a 0–1429 mg kg⁻¹ kadaverinu. [72]

Kapilární elektroforézou byly stanovovány biogenní aminy v pivu. Příprava vzorku piva je náročnější. Vzorek je nejdříve derivatizován uhličitanovým pufrem, dále smíchán s dalšími roztoky a ponechán po dobu dvou hodin v lázni o teplotě 50°C. Následně proběhla analýza na kapilární zónové elektroforéze s fluorescenční detekcí. Obsah biogenních aminů byl různý podle typu piva a podle fáze výrobního procesu. [73] Co se týkalo stanovení biogenních aminů ve víně pomocí kapilární zónové elektroforézy, tak víno bylo prvně nutné vyčistit. Bylo nutné odstranit fenolické látky pomocí poly(vinylpyrrolidonu). Směs byla promíchána a následně centrifugována. Supernatant byl filtrován přes membránu vyrobenou z celulósy. Vzorek byl přímo analyzován. [74] Pomocí kapilární zónové elektroforézy byly analyzovány rybí omáčky po stanovení biogenních aminů. Rybí omáčka byla před analýzou pouze filtrována přes celulósový filtr a naředěna vodou. Koncentrace histaminu v rybích omáčkách byla 120 mg kg⁻¹ a koncentrace tyraminu byla 50 mg kg⁻¹. [75]

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

1.6 Chemikálie

Název	M_r [g·mol ⁻¹]	Čistota	Výrobce	Země původu	CAS číslo
Kyselina octová	60,05	>99,8%	Sigma Aldrich	Německo	64-19-7
Amberlite® XAD16N	-	-	Sigma Aldrich	Francie	9003-69-4
Dowex® 50W-X8, hydrogen	-	-	BIO-RAD	Spojené státy americké	-
Agarósa	630,5	Čistý	Sigma Aldrich	Spojené státy americké	9012-36-6
Histamin dihydrochlorid	184,1	>99 %	Sigma Aldrich	Čína	56-92-8
Kadaverin dihydrochlorid	175,1	~98 %	Sigma Aldrich	Švýcarsko	1476-39-7
Putrescin dihydrochlorid	161,1	≥98 %	Sigma Aldrich	Švýcarsko	333-73-2
Tyramin hydrochlorid	173,6	≥98 %	Sigma Aldrich	Švýcarsko	60-19-5
Hydroxid draselný	56,11	>85 %	Lach-Ner, s. r. o.	Česká republika	1310-58-3

1.7 Postupy

1.7.1 Výběr elektrolytu

Byl připraven zásobní roztok kyseliny octové o koncentraci 10 M v objemu 20 ml. Z tohoto roztoku byly připraveny 3 roztoky elektrolytu o objemech 5 ml o koncentracích 1,5; 3 a 6 M.

Následně bylo připraveno 10 ml roztoku biogenních aminů (putrescin, histamin, kadaverin, tyramin) o koncentraci 50 mM a anorganických kationtů (amonný, draselný, sodný, vápenatý, hořečnatý) o koncentraci 15 mM. Následně bylo napipetováno 200 µl tohoto roztoku do polypropylenové (PP) vialky (Agilent CE PP vial, Agilent, Německo). Vialka byla uzavřena septem a roztok byl analyzován na kapilární zónové elektroforéze Agilent Technologies 7100 Capillary Electrophoresis instrument, Agilent, Německo. (viz. obrázek 6) za použití různých elektrolytů.

Tabulka 1: Parametry analýzy na kapilární zónové elektroforéze Agilent Technologies 7100 Capillary Electrophoresis

Parametr analýzy	Agilent Technologies 7100 Capillary Electrophoresis
Základní elektrolyt	3M kyselina octová
Teplota	25 °C
Výkon	6 W
Napětí	20 kV
Proud	300 μ A
Doba analýzy	6 min
Kapilára	Křemenná potažená polyamidovým polymerem, 50 μ m id (35 cm efektivní délka) celková délka 50 cm
promývání	80 s deionizovaná voda, 10 s BGE
Detektor	C ⁴ D
Dávkování	20 mbar/5s



Obrázek 6: Přístroj kapilární zónové elektroforézy.

1.7.2 Výběr sorbentu

Byl připraven směsný roztok biogenních aminů (putrescin, histamin, kadaverin a tyramin) o koncentracích $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ do objemu 10 ml do skleněné 20ml vialky se šroubovacím víčkem. Bylo odebráno 100 μl do PP vialky, bylo do ní přidáno 100 μl deionizované vody a vialka byla uzavřena septem. A vzorek byl analyzován v čase T_0 minut. Následně bylo naváženo 100 mg sorbentu (na principu fyzikální sorpce Amberlite® XAD16N/iontoměničový Dowex® 50 W8, viz obrázek 7) do skleněné 20 ml vialky (20ml EPA Screw Neck Vial, Chromservis). Následně byl k sorbentu přilít připravený roztok biogenních aminů a vialka byla třepána na třepáčce (300 rpm) po 20 min, kdy byl proveden kontrolní odběr 100 μl do PP vialky, bylo k ní přidáno 100 μl deionizované vody a vialka byla uzavřena septem. Roztok byl analyzován za vybraných podmínek na kapilární zónové elektroforéze. Pokud bylo nutné, roztok byl ponechán déle sorbován až po dobu tří hodin a byly prováděny kontrolní odběry pro sledování změny koncentrace roztoku. Po třech hodinách byla sorpce ukončena. Následně byl vybrán vhodný sorbent pro další experimenty.



Obrázek 7: Sorbent na principu iontové výměny Dowex® 50X 8 (vlevo) a sorbent na principu fyzikální adsorpce Amberlite® XAD16N (vpravo).

1.7.3 Výběr elučního činidla

Sorpce probíhala podle již uvedeného postupu s vybraným sorbentem Dowex® 50W (1.7.2). Následně byl připraven roztok elučního činidla 1M hydroxidu amonného. Byl odebrán vzorek 100 μl do PP vialky, bylo přidáno 100 μl deionizované vody a vialka byla uzavřena septem. Byla provedena eluce po dobu 60 minut do 2 ml elučního činidla ve stejné vialce se šroubovacím víčkem. Po uplynutí této doby byl opět odebrán vzorek 100 μl do PP vialky, smíchán se 100 μl deionizované vody a vialka byla uzavřena septem. Tento připravený vzorek byl analyzován a vyhodnocen. Stejným způsobem proběhl experiment s 0,25M hydroxidem sodným, 1M hydroxidem lithným, 3M kyselinou octovou a 1M hydroxidem draselným. Následně bylo vybráno vhodné eluční činidlo.

1.7.4 Příprava sorpčního agarósového gelu

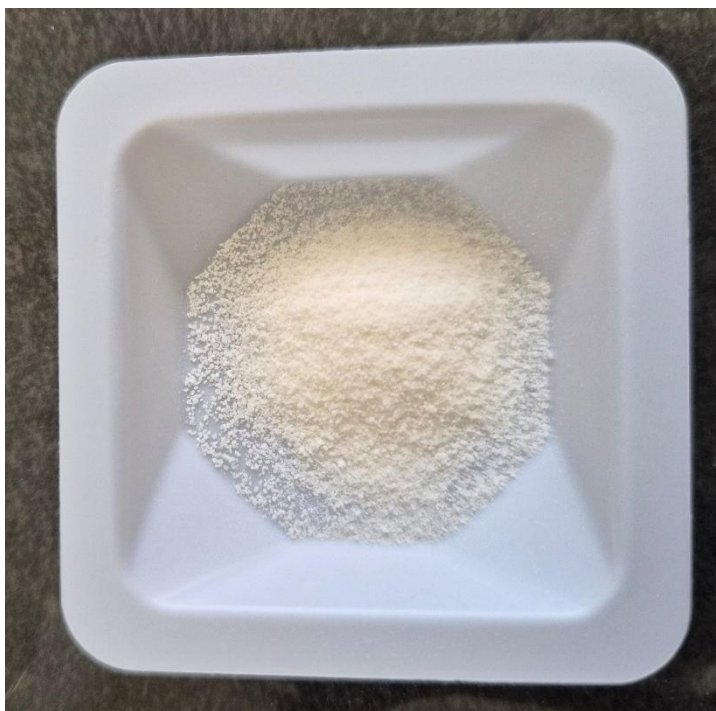
Z roztoku 1M kyseliny dusičné bylo vytaženo 6 skleněných destiček a 3 teflonové distanční vložky (spacer) s tloušťkou 50 μm a byly opláchnuty vodou a ponechány volně uschnout. Následně byl mezi dvě skla umístěn spacer. Skla držely při sobě svorkami na papír (viz. obrázek 8)



Obrázek 8: Složené 2 skleněné destičky s umístěným spacerem, které drží pomocí klipů na papír.

Do skleněné 10 ml zkumavky bylo naváženo 0,7 g sorbentu Dowex[®] 50 W. Do Erlenmayerovy baňky bylo naváženo 0,4 g agarósového prášku (viz. obrázek 9) a bylo k němu přidáno 20 ml deionizované vody. Erlenmayerova baňka byla zahřívána ve vodní lázni do rozpuštění agarósy, tak, aby nedošlo k varu. Před pipetováním gelu s adsorbentem byla připravená skla nahřáta nad vaříčem pro usnadnění pipetování gelu mezi dvěma skly. Následně bylo pomocí 5ml pipety napipetováno 5 ml roztoku 2% agarósy do zkumavky s naváženým sorbentem. Tato zkumavka byla vortexována (2500 min^{-1}) do homogenního roztoku. Následně byl roztok opět pomalu pipetován mezi připravená skla, aby nevznikly bublinky. Takto připravené hydrogely byly ponechány vychladnout ve vodorovné poloze, aby nedošlo k sedimentaci částic a byla zachována homogenita.

Po vychladnutí bylo sejmuto jedno ze skel a byla vykrájena kolečka o průměru 2,5 cm. Byl odejmut přebytečný hydrogel a kolečka byla následně pomocí proudu vody ze stříčky vyplaveny do nádoby s vodou pro jejich uchování.



Obrázek 9: Prášek agarósy pro přípravu sorpčních a difúzních gelů.

1.7.5 Příprava difúzního agarosového gelu

Z roztoku 1M kyseliny dusičné bylo vytaženo 6 skleněných destiček a 3 teflonové spacery s tloušťkou 0,25; 0,50 a 0,80 mm a byly opláchnuty vodou a ponechány volně uschnout. Následně byl mezi dvě skla umístěn spacer. Skla držely při sobě svorkami na papír.

Do Erlenmayerovy baňky bylo naváženo 0,4 g agarosového prášku a bylo k němu přidáno 20 ml deionizované vody. Erlenmayerova baňka byla zahřívána ve vodní lázni do rozpuštění agarósy, tak, aby nedošlo k varu. Byly nahřátá připravená skla nad vařičem pro usnadnění pipetování gelu mezi dvěma skly. Následně bylo pomocí 5ml pipety pomalu napipetováno 5 ml roztoku 2% agarósy mezi připravená skla tak, aby nevznikly bublinky. Takto připravené hydrogely byly ponechány vychladnout ve vodorovné poloze.

Po vychladnutí bylo sejmuto jedno ze skel a byla vykrájena kolečka o průměru 2,5 cm. Kolečka byla následně pomocí proudu vody ze stříčky vyplaveny do nádoby s vodou pro jejich uchování.

Příprava DGT jednotky

Na píst byl umístěn sorpční disk tak, aby částice sorbentu byly na vnější straně. Na sorpční gel byl umístěn difúzní gel. Jednotka byla uzavřena vnějším krytem s okénkem (viz. obrázek 10). Bylo nutné zajistit, aby mezi gely nebyla vzduchová bublinka nebo nečistoty.



Obrázek 10: Rozložený píst a kryt s okénkem a složený píst.

1.7.6 Sorpce na disk bez difúzního gelu

Bylo připraveno 10 ml roztoku směsi biogenních aminů (putrescin, histamin, kadaverin, tyramin) o koncentracích $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ každého z nich do skleněné 20ml vialky se šroubovacím víčkem. Byl odebrán vzorek o objemu $100 \mu\text{l}$ do PP vialky, bylo přidáno $100 \mu\text{l}$ vody a vialka byla uzavřena septem. Vzorek byl analyzován. Do této vialky byl přidán sorpční disk a vialka byla třepána na třepačce (300 rpm) po dobu 60 minut. Následně byl opět odebrán vzorek $100 \mu\text{l}$ a 2x zředěn do PP vialky a analyzován. Kapalina byla ze skleněné vialky vylita, disk a vialka byly 1 promyty 10 ml vody. Poté byly do vialky napipetovány 2 ml elučního činidla. Byl odebrán vzorek $100 \mu\text{l}$ elučního činidla do PP vialky společně s $100 \mu\text{l}$ vody. Vzorek byl analyzován. Vialka se sorpčním diskem byla opět třepána po dobu 60 min. Po této době byl opět odebrán vzorek podobně jako na začátku a analyzován.

1.7.7 Přechištění rybí omáčky metodou sorpce

1.7.7.1 Ředěná nepřechištěná rybí omáčka

Rybí omáčka Orient Gourmet byla 25x a 50x zředěná na 20 ml hydroxidem draselným tak, aby výsledná koncentrace hydroxidu draselného byla 1 M. Z těchto roztoků byl odebrán vzorek, který byl 2x zředěn deionizovanou vodou na objem $200 \mu\text{l}$ do PP vialky a vialka byla uzavřena septem. Vzorek byl analyzován na kapilární zónové elektroforéze.

1.7.7.2 Přechištění rybí omáčky

Byly zvoleny přístupy přechištění rybí omáčky-sorpce na volný adsorbent, adsorbent v agarosovém gelu a DGT jednotky. Bylo připraveno 50 ml roztoku 50x zředěné rybí omáčky. Tento roztok rybí omáčky byl rozpipetován po 10 ml do skleněných 20ml vialek se šroubovacím víčkem a do kádinky o objemu 100 ml. Do jedné vialky bylo nasypáno 3,44 mg sorbentu, do druhé vialky byl umístěn sorpční gel a do 100ml kádinky byla umístěna DGT jednotka s difúzním gelem o tloušťce 0,5 mm a zakryta parafilmem. Vialky byly třepány 60 minut na třepačce (300 rpm). Následně byl původní roztok odlit a do vialek bylo napipetováno 2 ml 1M

roztoku hydroxidu draselného. Roztok byl opět třepán 60 minut na třepačce (300 rpm). Po této době bylo z každé vialky odebráno 100 μl roztoku do PP vialky a roztok byl zředěn 2x deionizovanou vodou. Vialka byla uzavřena septem a vzorek byl analyzován.

1.7.8 Validační experimenty

1.7.8.1 Kinetika pro sorpce s využitím difúzního gelu (DGT) a bez něj

Pro sorpční kinetiku bylo připraveno 100 ml roztoku směsi biogenních aminů (putrescin, histamin, kadaverin a tyramin) o koncentracích 250 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Následně byl roztok rozpipetován do tří skleněných 20 ml vialek se šroubovacím víčkem a do tří 100ml kádinek po 10 ml roztoku. Do skleněných vialek byl vložen sorpční agarósový disk a do kádinek byly vloženy DGT jednotky s difúzním gelem o tloušťce 0,5 mm. Kádinka byla zakryta parafilmem. Byly odebírány vzorky po 0; 3; 7; 15; 30; 45; 60 minutách sorpce a dále po 20 minutách po dobu 120 min pro sorpční gel 180 minut pro DGT jednotky dokud odezvy měřených koncentrací nevykazovaly stabilní trend. Bylo odebíráno 50 μl a vzorek byl ředěn 2x deionizovanou vodou do PP vialek. Následně byl roztok odlit. DGT jednotka byla rozebrána. Všechny sorpční disky byly po oplachu deionizovanou vodou umístěny do skleněných 20ml vialek a byly přidány 2 ml elučního činidla. Vialky byly třepány na třepačce (300 rpm). Byly odebírány vzorky po 0; 3; 7; 15; 30; 45; 60 minutách eluce a dále po 20 minutách pod dobu 120 minut do ustálených hodnot odezev koncentrací. Bylo odebíráno 50 μl a vzorek byl ředěn 2x deionizovanou vodou do PP vialek. Následně byla určena optimální doba sorpce a eluce.

1.7.8.2 Eluční faktor

Bylo připraveno 50 ml roztoku směsi biogenních aminů (putrescin, histamin, kadaverin a tyramin) o koncentracích 10 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Následně byl do tří 20ml vialek se šroubovacím víčkem rozpipetován roztok po 10 ml roztoku. Před vložením adsorpčního disku byl odebrán vzorek pro analýzu na kapilární zónové elektroforéze a 2x zředěn deionizovanou vodou. Vzorek byl analyzován. Do vialek byl vložen sorpční disk a vialky třepány na třepačce (300 rpm) po dobu 60 min. Po 60 minutách byl opět odebrán vzorek stejným způsobem a analyzován. Původní roztok byl z vialky vylit a disk byl opláchnut vodou. Do vialky s diskem bylo nalito 10 ml elučního činidla a byl opět odebrán vzorek stejným způsobem a vzorek byl analyzován. Vialky byly opět třepány na třepačce (300 rpm) po dobu 60 min. Po 60 minutách byl opět odebrán vzorek stejným způsobem a vzorek byl analyzován. Byl stanoven eluční faktor podle rovnice (6):

$$f_e = \frac{c_e \cdot V_e}{(c_{s0} - c_{s60}) \cdot V_0}, \quad 6$$

kde c_e [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$] je koncentrace eluátu, V_e [l] je objem elučního činidla, c_{s0} [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$] je koncentrace roztoku před sorpcí, c_{s60} [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$] je koncentrace roztoku po 60 minutách sorpce a V_0 [l] je objem počátečního roztoku.

1.7.8.3 Prekoncentrační krok

Byl připraven roztok směsi biogenních aminů (putrescin, histamin, kadaverin a tyramin) o objemu 100 ml o koncentraci 250 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Roztok byl rozpipetován do devíti 20ml skleněných vialek po 10 ml roztoku. Opět byl odebrán vzorek 100 μl a analyzován. Do vialek byl umístěn

sorpční disk a roztoky byly třepány po dobu 60 minut. Po uplynutí doby byl opět odebrán vzorek stejným způsobem. Roztok byl z roztoku vylit a disky byly opláchnuty vodou. Následně bylo do vialek napipetováno eluční činidlo. Do tří vialek byly napipetovány 2 ml elučního činidla, do dalších tří 5 ml elučního činidla a do tří vialek bylo napipetováno 10 ml elučního činidla. Byly odebrány vzorky 50 μl a 2x zředěny do PP vialek a analyzovány. Vialky se sorpčním diskem byly třepány na třepačce (300 rpm) po dobu 60 minut. Následně byly opět odebrány vzorky k analýze obdobně jako v předchozích případech. Byla vyhodnocena účinnost prekoncentrace.

1.7.8.4 Vliv pH na sorpci

Bylo připraveno 50 ml roztoku směsi biogenních aminů (putrescin, histamin, kadaverin a tyramin) koncentrací o 1 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Následně byl roztok rozpipetován do devíti skleněných vialek se šroubovacím víčkem po 2,5 ml. Následně byl roztok doplněn deionizovanou vodou na objem 9 ml. Následně bylo ve třech vialkách upraveno pH pomocí kyseliny chlorovodíkové (1M) na pH 3 a ve třech dalších vialkách bylo pH upraveno pomocí 1M hydroxidu sodného na pH 11. Třetí trojice vialek zůstala bez úpravy (pH 5). Vialky byly doplněny deionizovanou vodou na objem 10 ml. Byl odebrán vzorek 100 μl do PP vialky a vzorek byl 2x zředěn a analyzován. Do vialek byl umístěn sorpční disk a vialky byly třepány 60 minut na třepačce (300 rpm). Po uplynutí doby byl opět odebrán vzorek stejným způsobem.

1.7.8.5 Sorpční izotermy a sorpční kapacita

Byly připraveny roztoky směsi biogenních aminů v triplicátech do skleněných 20ml vialek o objemu 10 ml a koncentracích 10; 25; 50; 100; 150; 200; 250 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Z každé koncentrace byl odebrán vzorek 100 μl a 2x zředěn do PP vialky a vzorek byl analyzován. Následně probíhala sorpce po dobu 60 minut na třepačce (300 rpm). Po této době byl odebrán vzorek a zpracován jako na začátku. Následně byl z vialek vylit původní roztok, vialky a disky byly opláchnuty vodou. Do vialek bylo napipetováno 10 ml elučního činidla. Opět byl odebrán vzorek a analyzován jako na začátku. Disky byly eluovány na třepačce (300 rpm) po dobu 60 minut. Po uplynutí této doby byl odebrán vzorek, zpracován stejně jako na začátku a analyzován.

1.7.8.6 Difúzní koeficient

Byl připraven roztok o objemu 2 l o koncentraci 10 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ biogenních aminů. Bylo sestaveno 15 DGT jednotek s difúzním gelem o tloušťce 0,5 mm. DGT jednotky byly umístěny na nosič a přemístěny do plastové nádoby, ve které byl prováděn experiment (viz. obrázek 11). Do krabice bylo umístěno magnetické míchadlo. Do krabice byl nalit roztok biogenních aminů tak, aby DGT jednotky byly ponořeny (1430 ml). Nádoba byla umístěna na magnetickou míchačku a roztok byl míchán na 300 rpm. Byly odebrány 3 DGT jednotky a vzorek roztoku (2x zředěn do PP vialky a analyzován) v časech 0; 1; 2; 3; 4 hodin. DGT jednotky byly rozebrány a sorpční gel byl umístěn do 20ml skleněné vialky a bylo přidáno 10 ml elučního činidla. Disk byl eluován po dobu 60 minut a následně byl odebrán vzorek 100 μl a byl zpracován jako na začátku a analyzován. Následně byl z naměřených koncentrací sestrojen graf nárůstu koncentrace v čase a z toho určen difúzní koeficient.



Obrázek 11: Nádoba s nosičem DGT jednotek na stanovení difúzního koeficientu a difúzní mezní vrstvy.

1.7.8.7 Difúzní mezní vrstva

Byl připraven roztok o objemu 2 l o koncentraci $25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ biogenních aminů. Bylo sestaveno 12 DGT jednotek s difúzním gelem o tloušťce 0; 0,25; 0,5; 0,8 mm (3 disky u každé tloušťky). DGT jednotky byly umístěny na nosič a přemístěny do krabice, ve které byl prováděn experiment. Do krabice bylo umístěno magnetické míchadlo. Do krabice byl nalit roztok biogenních aminů tak, aby pistony byly ponořeny (1430 ml). Krabice se umístila na magnetickou míchačku a roztok byl míchán na 300 rpm. Sorpce probíhala po dobu 60 minut (v průběhu byly odebírány vzorky po 10 min roztoku 100 μl , který byl 2x ředěn, do PP vialky a byl analyzován). DGT jednotky byly rozebrány a sorpční gely byly umístěny do 20ml skleněné vialky a bylo přidáno 10 ml elučního činidla. Disk byl eluován po dobu 60 minut a následně byl odebrán vzorek 100 μl a byl zpracován jako na začátku a analyzován. Následně byla stanovena difúzní mezní vrstva.

Pro výpočet byla použita hodnota difúzního koeficientu histaminu ve vodě $D_w = 4,61 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [76].

1.7.9 Stanovení biogenních aminů v potravinách

1.7.9.1 Stanovení biogenních aminů v rybí omáčce pomocí dvou metod

Bylo připraveno 100 ml roztoku 50x zředěné rybí omáčky Orient Gourmet (viz. obrázek 12). Do tří vialek se šroubovacím víčkem a třech 100ml kádinek bylo napipetováno 10 ml tohoto roztoku. Do vialek byl vložen sorpční disk a do kádinek byla vložena DGT jednotka s difúzním gelem o tloušťce 0,5 mm. Kádinky byly zakryty parafilmem. Sorpce na sorpční gel trvala 60 minut a sorpce na DGT jednotku trvala 120 minut na třepačce (300 rpm). Následně byl původní roztok vylit a disk byl opláchnut vodou. DGT jednotka byla rozebrána a sorpční gel byl umístěn do 20 ml skleněné vialky se šroubovacím víčkem. Do vialek k diskům byly přility 2 ml elučního

činidla. Eluce probíhala po dobu 60 minut na třepačce (300 rpm). Následně byl odebrán vzorek 100 μl a byl analyzován. Následně byla stanovena koncentrace analytů ve vzorku pomocí kalibrační přímky standardního přídatku v rozmezí 0–20 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

1.7.9.2 Stanovení biogenních aminů v rybí a ústřičné omáčce

Rybí omáčka Thai Pride a ústřičná omáčka byla 50x zředěná na objem 100 ml. Do skleněných 20ml vialek se šroubovacím víčkem bylo napipetováno 10 ml roztoku. Do vialek byl vložen sorpční disk. Vialky byly třepány na třepačce (300 rpm) po dobu 60 minut. Po uplynutí této doby byl roztok vylit, vialka a disk byly opláchnuty deionizovanou vodou. Do vialky s diskem byly nality 2 ml elučního činidla. Eluce probíhala po dobu 60 min na třepačce (300 rpm). Následně byl odebrán vzorek 100 μl a byl 2x zředěn do PP vialky a analyzován. Byla spočítána koncentrace biogenních aminů ve vzorku z externí kalibrační přímky, která měla rozsah 0–40 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Stejný postup byl i pro rybí a ústřičnou omáčku (viz. obrázek 12) s přídatkem 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ do nezředěných omáček.



Obrázek 12: Rybí omáčky a ústřičná omáčka použité pro stanovení biogenních aminů.

VÝSLEDKY A DISKUSE

1.8 Výběr elektrolytu pro kapilární zónovou elektroforézou

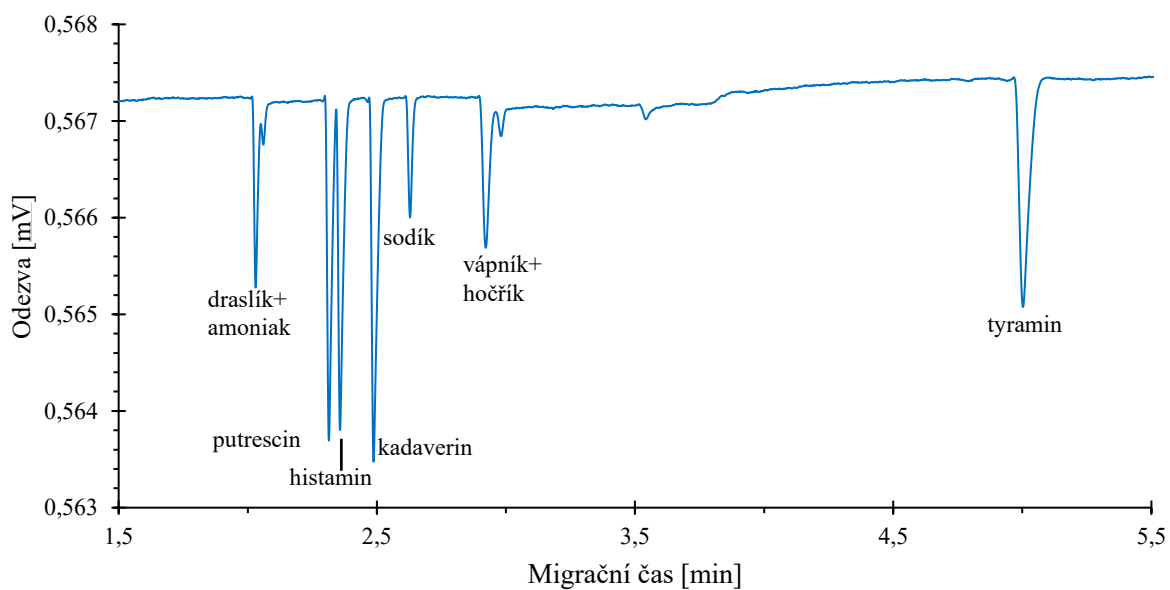
Pro kapilární zónovou elektroforézou bylo nutné zajistit stabilní systém s dostatečnou separací. Současně tak bylo potřeba najít i kompromis pro délku analýzy. Podle zkušeností a literatury [77] byla zvolena kyselina octová. Rozdílná koncentrace elektrolytu však má vliv na účinnost separace a stabilitu systému. Proto byla testována různá koncentrace kyseliny octové, a to konkrétně 1,5M, 3M a 6M kyseliny octové. Separace byla testována pomocí směsi anorganických kationtů a biogenních aminů.

U koncentrace kyseliny octové 1,5 M byla analýza rychlejší v porovnání s dalšími koncentracemi elektrolytu. Migrační čas nejrychlejších kationtů byl přibližně 2 minuty. Separace však byla nedostatečná a na elektroforetogramu (graf 1) lze vidět, že dochází ke slévání píků dohromady (například 1. a 2. pík nebo 2. a 3. pík). Naopak, u koncentrace kyseliny octové 6 M byla analýza výrazně delší. První pík kationtu měl migrační čas mezi 3 a 3,5 minuty. Další nevýhodou vysoké koncentrace elektrolytu byla horší stabilita. Po 4,5 minutách dochází ke nestabilitě základní linie a tak k nemožnosti rozpoznání jednotlivých píků. Tuto skutečnost znázorňuje elektroforetogram (graf 2). Ideální kompromis mezi délkou analýzy a separační schopností a současně stabilní systém reprezentuje elektrolyt 3M kyseliny octové. První zaznamenaný iont měl migrační čas 2,5 minuty. První 2 píky v tomto migračním čase jsou dobře separovány na rozdíl od prvních dvou píků u koncentrace elektrolytu kyseliny octové 1,5 M, které jsou téměř nerozeznatelné. Názornější porovnání délky analýz, stability systému a schopnosti separace v různých koncentracích elektrolytu kyseliny octové znázorňuje společný graf se všemi elektroforetogramy (graf 4).

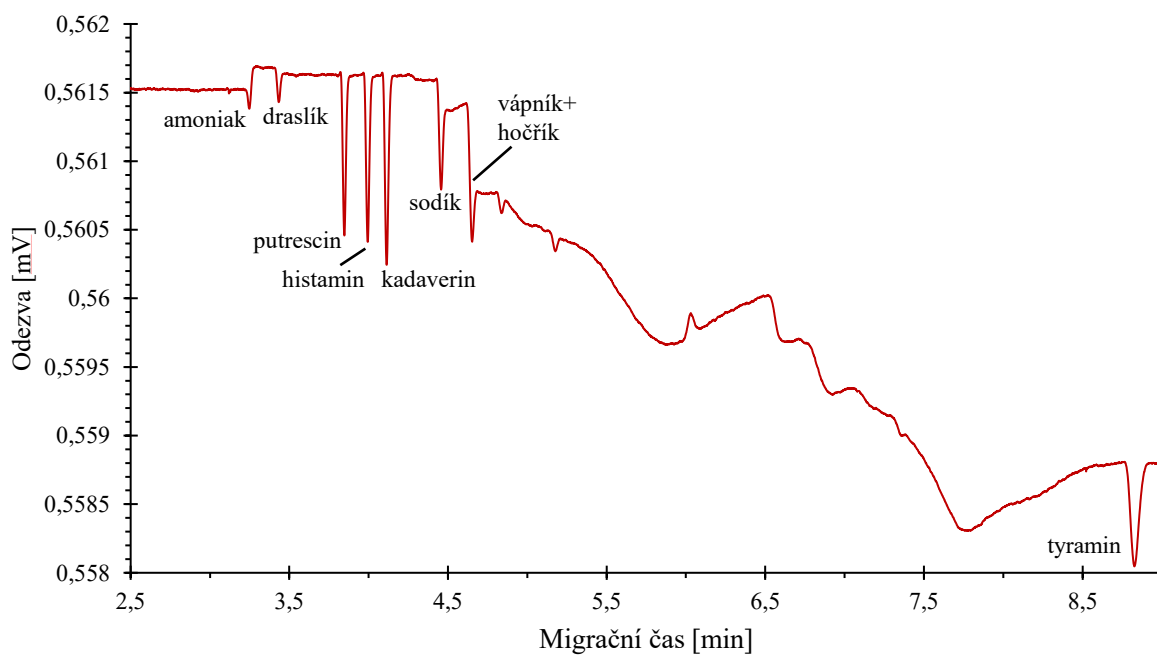
Byly stanoveny limity detekce a limity kvantifikace z kalibračních závislostí, které byly lineární v celém rozsahu ($0\text{--}40\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) s hodnotou spolehlivosti $>0,995$. Hodnoty limitů detekce a limitů kvantifikace pro sledované biogenní aminy jsou uvedeny v tabulce (tabulka 1)

Tabulka 2: Hodnoty limitu detekce a kvantifikace pro biogenní aminy.

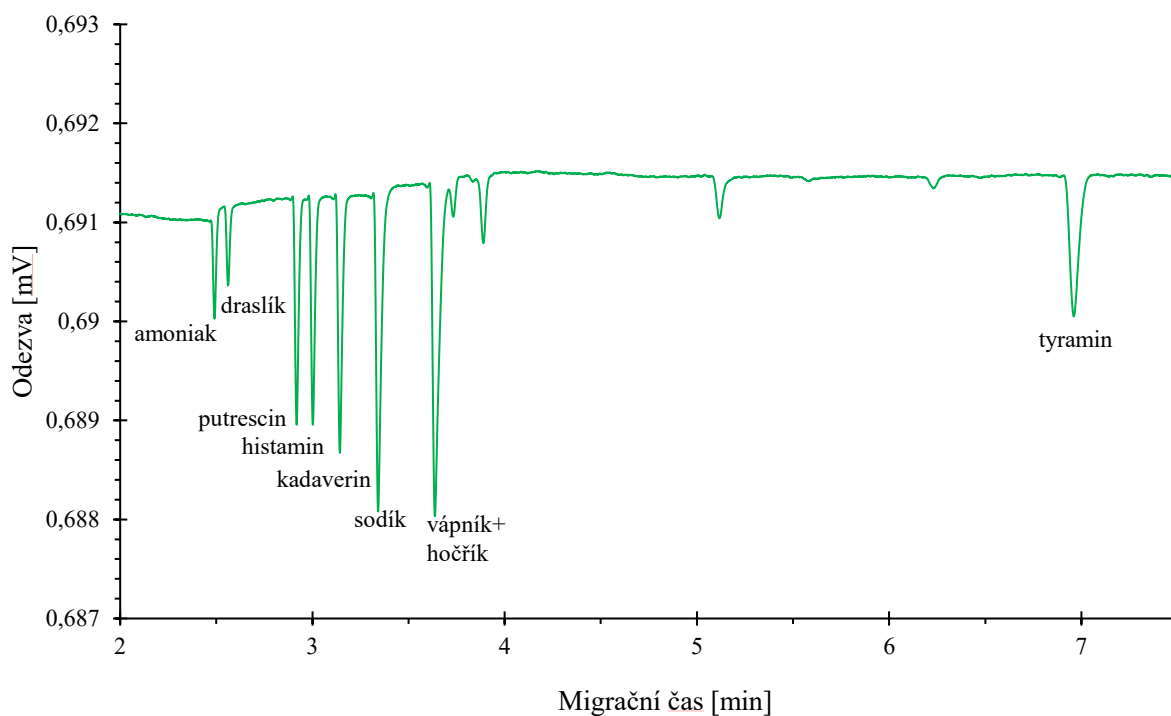
	LOD [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	LOQ [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]
putrescin	0,04	0,39
histamin	0,05	0,50
kadaverin	0,04	0,43
tyramin	0,14	1,42



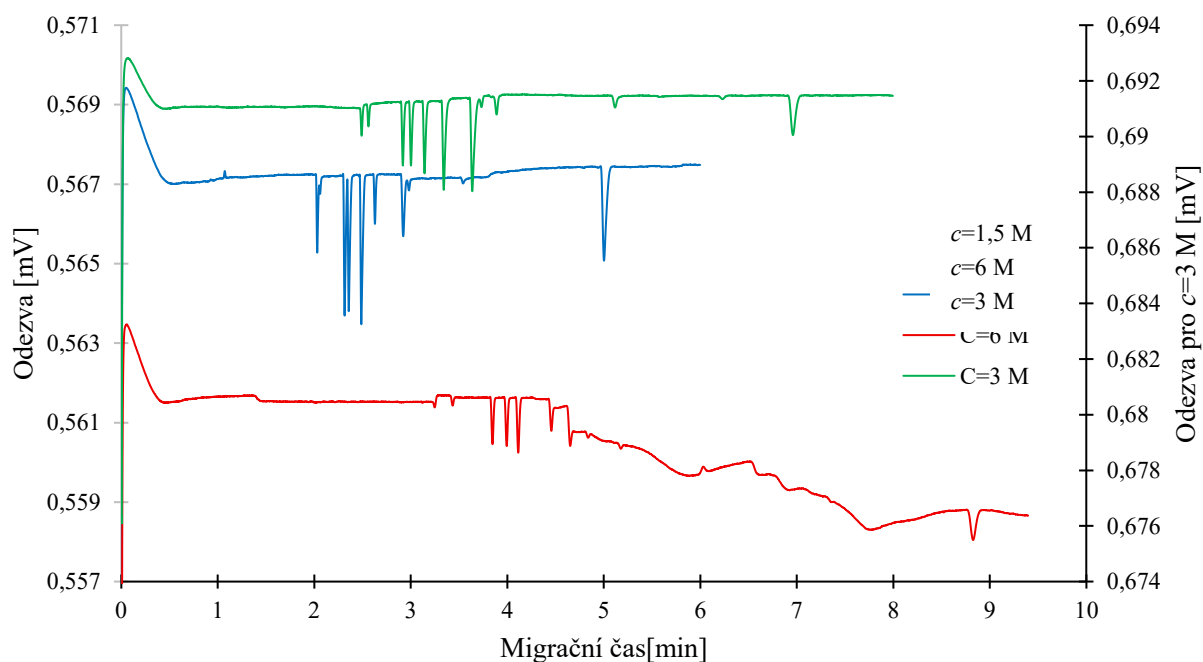
Graf 1: Elektroforetogram analýzy směsi anorganických kationtů a biogenních aminů v elektrolytu 1,5M kyseliny octové.



Graf 2: Elektroforetogram analýzy směsi anorganických kationtů a biogenních aminů v elektrolytu 6M kyseliny octové.



Graf 3: Elektroforetogram analýzy směsi anorganických kationtů a biogenních aminů v elektrolytu 3M kyseliny octové.



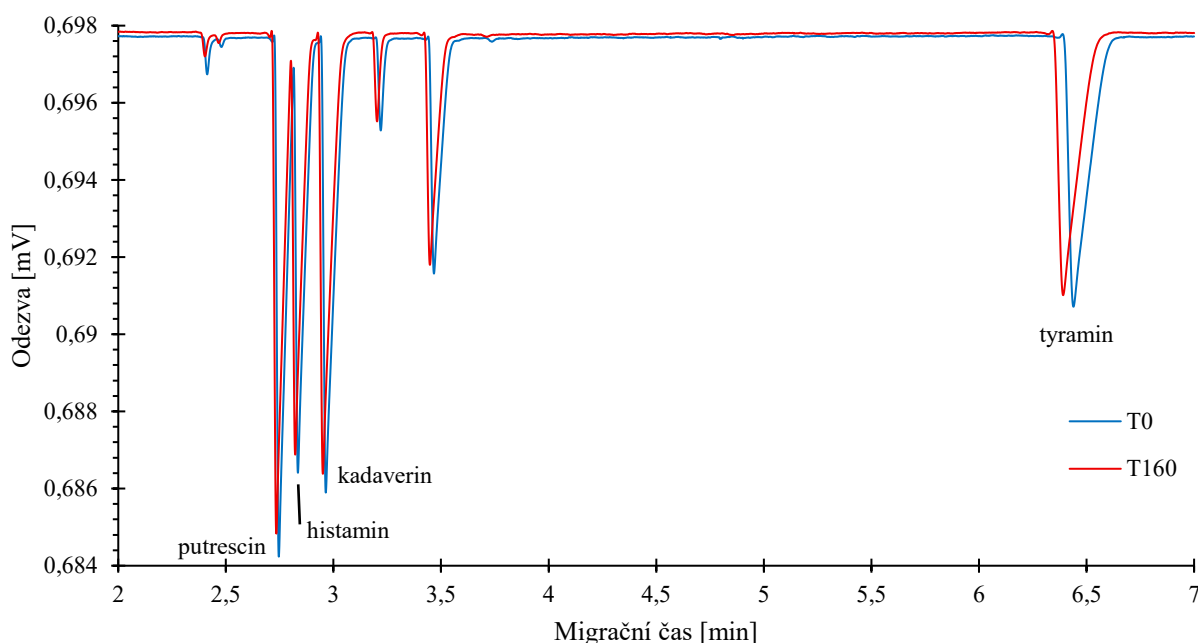
Graf 4: Elektroforetogramy analýzy směsi anorganických kationtů a biogenních aminů v elektrolytech o koncentracích 1,5M (modrý), 3M (zelený, vedlejší osa) a 6M (červený) kyseliny octové.

1.9 Výběr sorbentu

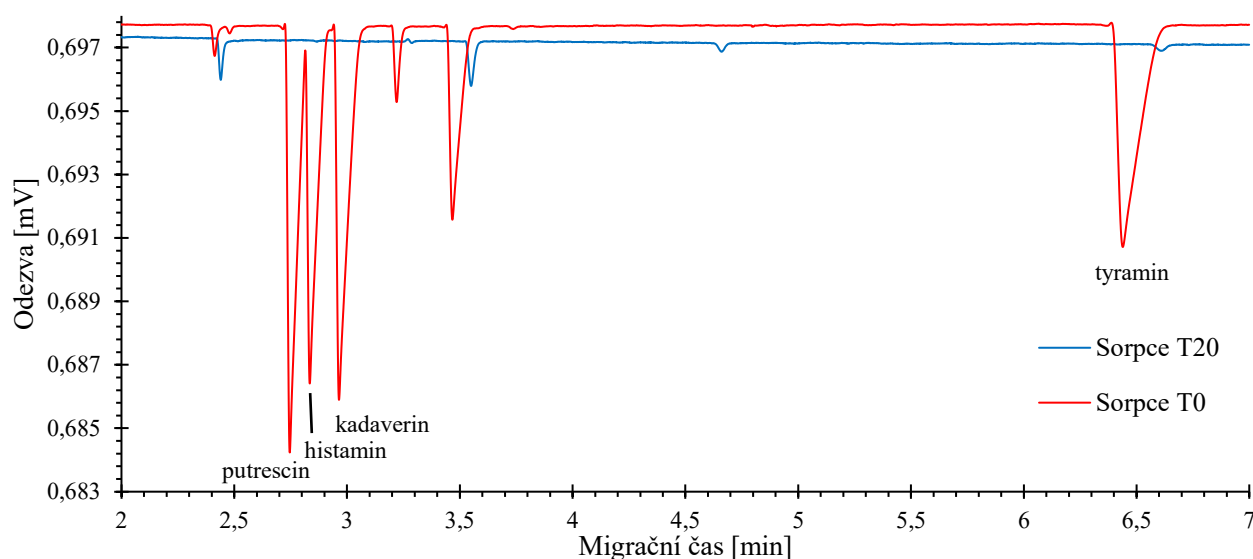
Pro sorpci byla nejdříve testována fyzikální sorpce na adsorbent Amberlite® XAD16N. Byla vybrána kvůli jednoduchosti sorpce na povrch pomocí slabých vazebných interakcí. Prvotní test proběhl s navázkou 100 mg sorbentu a zvolená koncentrace analytů byla $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ v objemu

10 ml. Sorpce byla neúčinná, po 160 minutách sorpce bylo navázáno minimální množství analytů. Tuto minimální změnu znázorňuje elektroforetogram analýzy roztoku analytů před sorpcí a po 160 minutách sorpce (graf 5). Tento typ sorbentu váže čistě neutrální látky. Pro námi zkoumané biogenní aminy je náročné tohoto stavu docílit současně pro všechny. A to hlavně z důvodu rozdílných hodnot pKa, které určují náboj aminu v konkrétním pH. Naše zkoumané biogenní aminy mají hodnotu pKa v zásadité oblasti, to znamená, že v neutrálním a kyselém pH mají kladný náboj. Což vysvětluje nevhodnost tohoto systému.

Druhým přístupem byla zvolena kationměničová sorpce. Byl zvolen sorbent Dowex® 50W X. Za testovací podmínky bylo zvoleno 100 mg sorbentu a koncentrace analytů $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ v objemu 10 ml. Tento model za těchto podmínek se ukázal jako velmi účinný a již po 20 minutách sorpce byl veškerý analyt nasorbovaný. Rozdíl mezi elektroforetogramem před sorpcí a po 20 minutách sorpce lze vidět v grafu (graf 6). Píky viditelné na elektroforetogramu po 20 minutách sorpce mohou být kontaminanty uvolněny ze samotného sorbentu.



Graf 5: Elektroforetogram roztoku biogenních aminů před sorpcí (modrá) a po 160 minutách (červená) fyzikální sorpce.



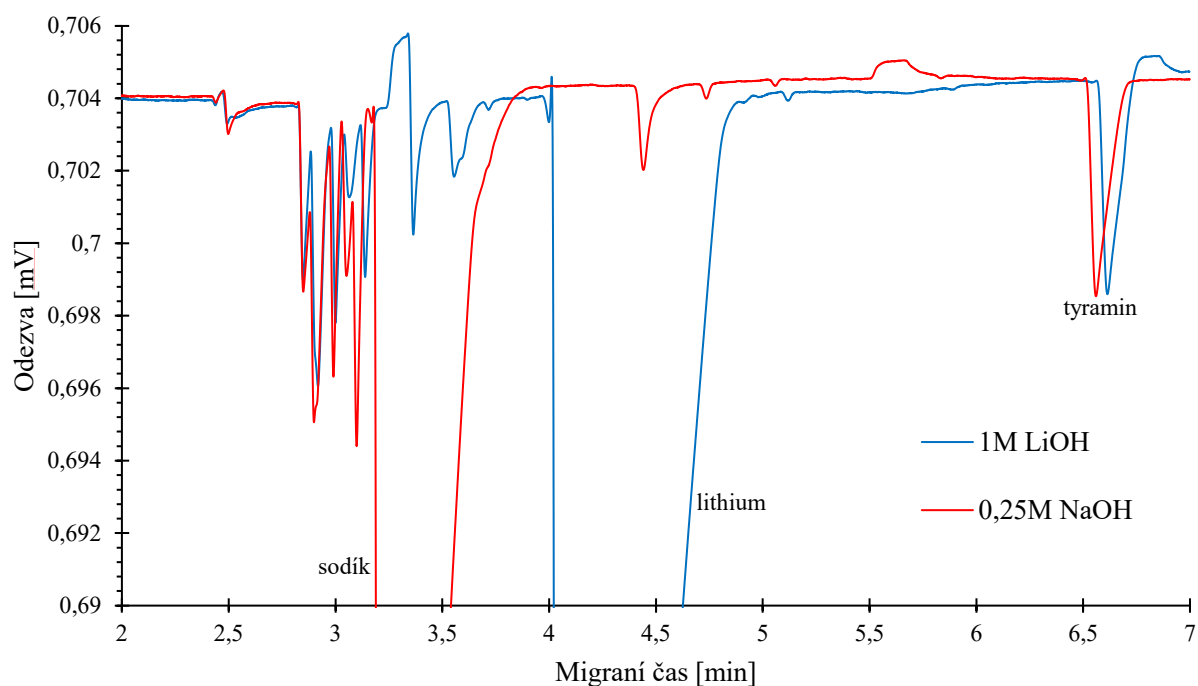
Graf 6: Elektroforetogram roztoku biogenních aminů před sorpcí (červená) a po 20 minutách (modrá) kotionměničové sorpce.

1.10 Výběr elučního činidla

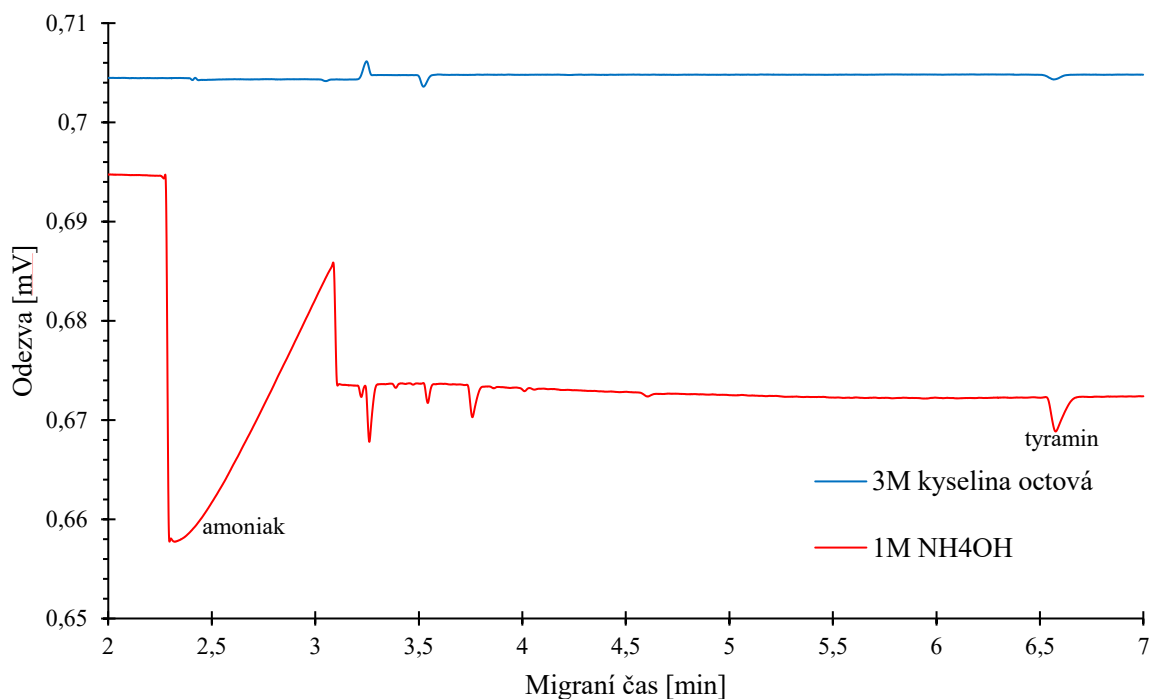
Po výběru vhodného sorbentu bylo nutné vybrat vhodné eluční činidlo. Pro uvolnění analytu bylo nutné v roztoku změnit pH, aby analyty přešly na neutrální formu, nebo najít látku s vyšší afinitou k danému sorbentu. Bylo vyzkoušeno několik hydroxidů a kyselina octová o koncentraci 3 M. Eluce probíhala do 2 ml elučního činidla. Tento objem byl zvolen, aby bylo využito co nejmenší množství činidla a došlo k zakoncentrování analytů ze vzorků.

Jako první byl otestován hydroxid sodný jakožto silná zásada. Bylo nutné zohlednit koncentraci tohoto roztoku hydroxidu kvůli migračnímu času blízkému s analyty. Z tohoto důvodu byla zvolena jen koncentrace 0,25 M. Nižší koncentrace mohla způsobit i nedostatečnou změnu pH a nedošlo tak k deprotonaci aminů, aby se uvolnily ze sorbentu. Dále byl testován hydroxid lithný, který méně ovlivňoval migraci analytů, jelikož jeho migrační čas je dostatečně delší než u analytů. Z elektroforetogramů (graf 7) je patrné velmi špatné rozlišení a komigrace matričních látek, které mohly být vyeluovány společně s analyty. Dalším zkoumaným možným elučním činidlem byl hydroxid amonný o koncentraci 1 M. Tato zásada dosahovala lepších výsledků eluce, ale nebyly zcela uspokojivé. Vysoké množství amonných iontů už dokázalo konkurovat biogenním aminům na sorbentu, ale zároveň zhoršilo stabilitu systému. Dále byla zkoumána možná eluce pomocí 3M kyseliny octové. V tomto případě nedošlo k žádnému uvolnění analytu ani k uvolnění matričních látek. Kyselina naopak snižuje pH, a tak biogenní aminy budou mít kladný náboj a budou se lépe udržovat na sorbentu. Elektroforetogramy změn po 90 minutách eluce do těchto dvou elučních činidel lze vidět na obrázku (graf 8). Na závěr bylo jako eluční činidlo vyzkoušeno 1M hydroxid draselný. Jeho hlavní výhodou byl jeho migrační čas, který je kratší než migrační časy biogenních aminů. Kvůli vysoké koncentraci draselných iontů dochází k mírnému prodloužení migračního času analytů a nedochází k jejich komigraci. Elektroforetogram eluátu po 90 minutách eluce je znázorněn na obrázku (graf 9). Pro další

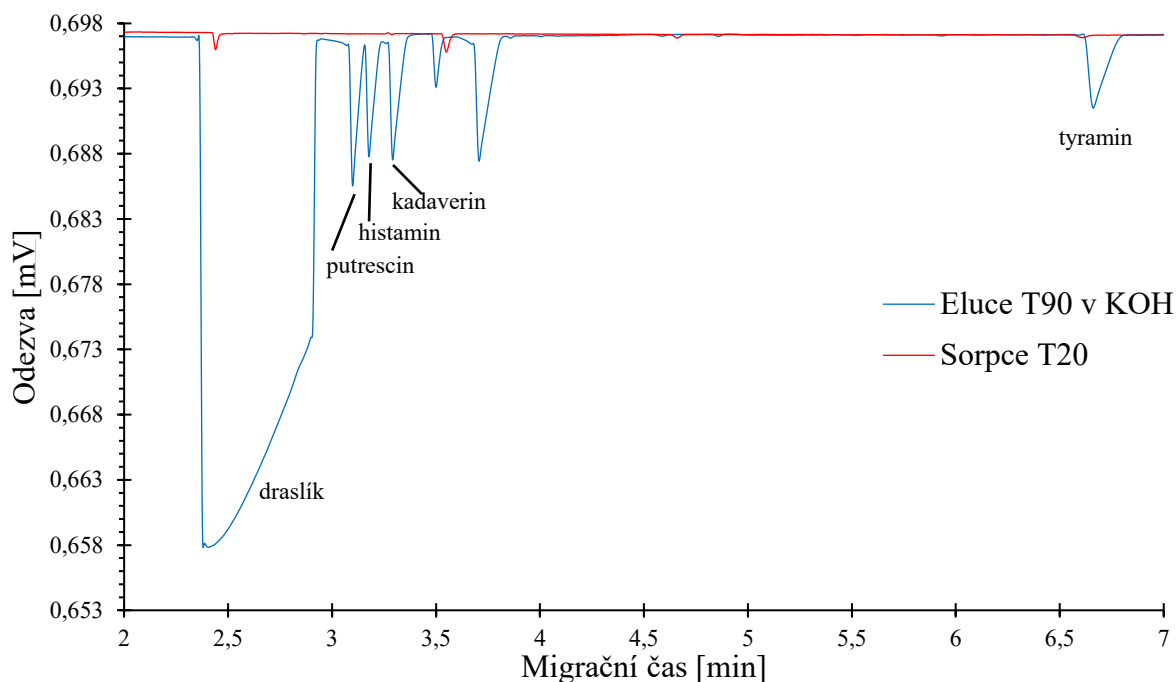
experimenty bylo jako eluční činidlo na základě tohoto experimentu zvolen 1M hydroxid draselný.



Graf 8: Elektroforetogram po 90 minutách eluce pomocí 1M LiOH (modrý) a 0,25M NaOH (červený)



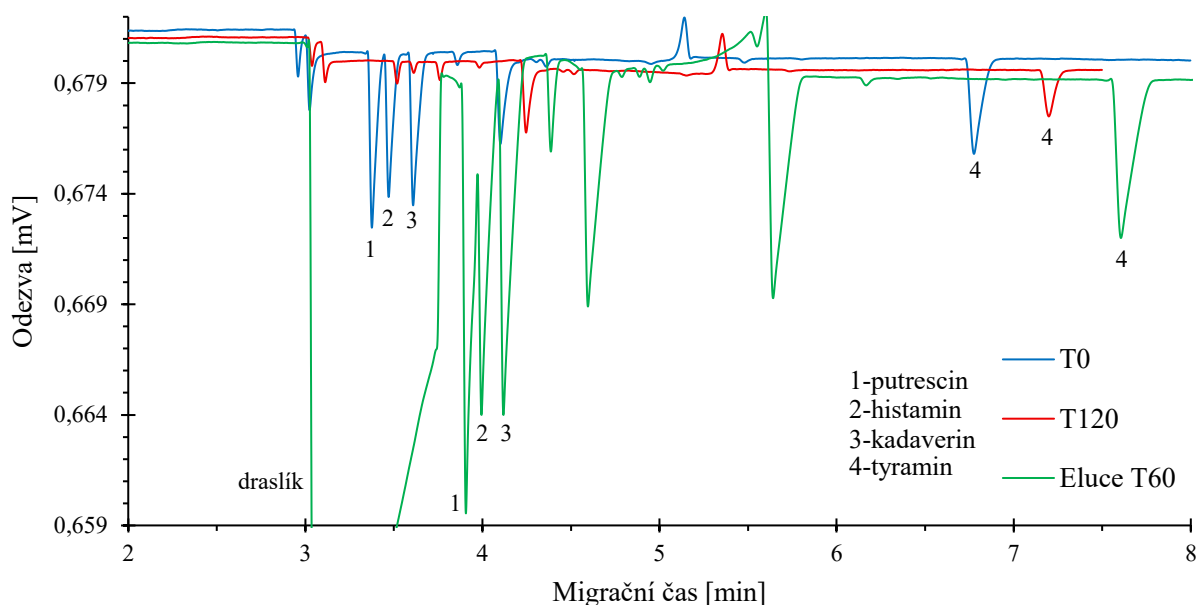
Graf 7: Elektroforetogram po 90 minutách eluce pomocí 3M kyseliny octové (modrý) a 1M NH₄OH (červený)



Graf 9: Elektroforetogram po 20 minutách sorpce (červený) a následná eluce po 90 minutách do 1M KOH (modrý).

1.11 Ověření sorpce na adsorpční disk bez difúzního gelu

Dále bylo ověřeno, zdali dochází k sorpci na sorbent, který je uzavřený v agarósovém gelu. Nebylo jisté, jak se sorbent v tomto případě zachová, aby nasorboval veškeré množství analytů. Pro tento experiment byl použit disk z 2% agarósy, ve kterém bylo 0,7 g/5 ml agarosového gelu. Kruhový disk byl o rozměrech 25 mm v průměru a tloušťkou 500 μm a obsahoval přibližně 3,44 mg částic sorbentu. Je tedy patrné, že bylo výrazně nižší množství částic sorbentu oproti předchozím experimentům, kde bylo použito 100 mg sorbentu na 10 ml roztoku biogenních aminů o koncentraci $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. V tomto případě bylo na roztok o stejném složení 1/3 méně sorbentu. Sorbent mohl mít současně i omezenou dostupnost díky gelu, a to mohlo způsobit neúplnou sorpci analytů společně s jeho sníženým množstvím, kdy sorbent mohl být již plně saturovaný. Disk byl eluován do 2 ml 1M KOH. Tento objem byl také zvolen za účelem zakoncentrování. Vyšší objemy by nedocílily dostatečného zakoncentrování a nižší objem by byl nedostatečný, aby byl disk ponořen. Sorpce, eluce i zakoncentrování byly úspěšné, jak dokazuje elektroforetogram (graf 10).



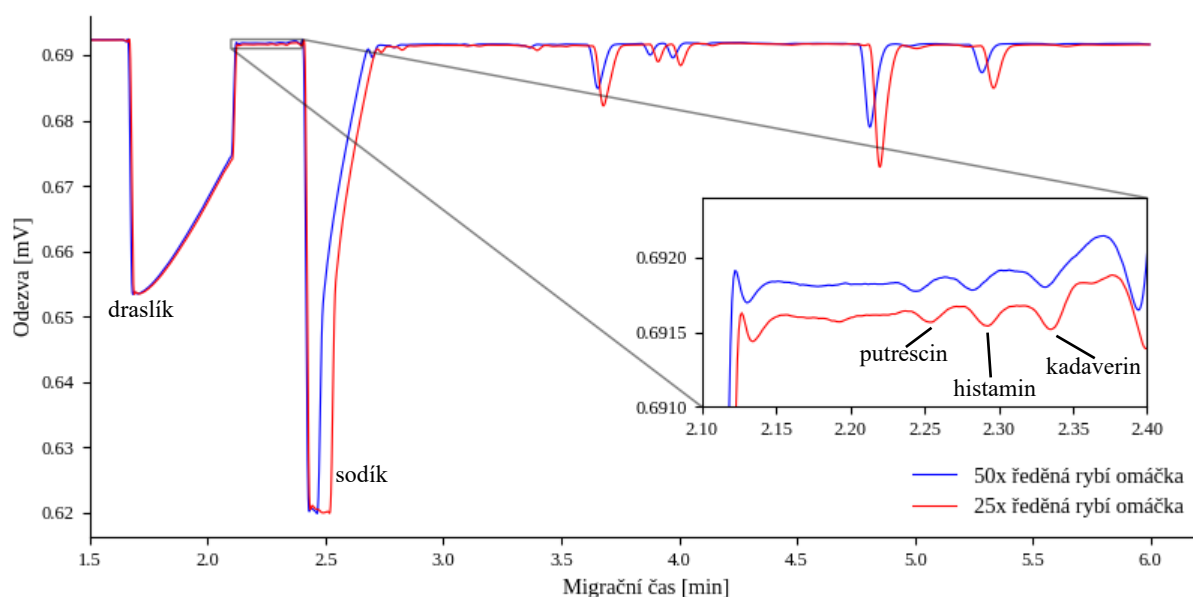
Graf 10: Elektroforetogram roztoku biogenních aminů před sorpcí (modrý), po 120 minutách sorpce (červený) na kationměničový sorbent v nosiči (agarósový gel) a také eluát biogenních aminů po 60 minutách eluce zvoleným elučním činidlem.

1.12 Ověření přístupu přечиštění reálné matrice

Za reálnou matici byla zvolena rybí omáčka Orient Gourmet. Byly srovnány přístupy pouze ředění, přечиštění pomocí volného sorbentu, sorbentu v gelu a pomocí DGT jednotky. Vyhodnocení a srovnání jednotlivých přístupů je v následujících odstavcích (1.12.1, 0, 1.12.3).

1.12.1 Ředěná nepřečištěná rybí omáčka

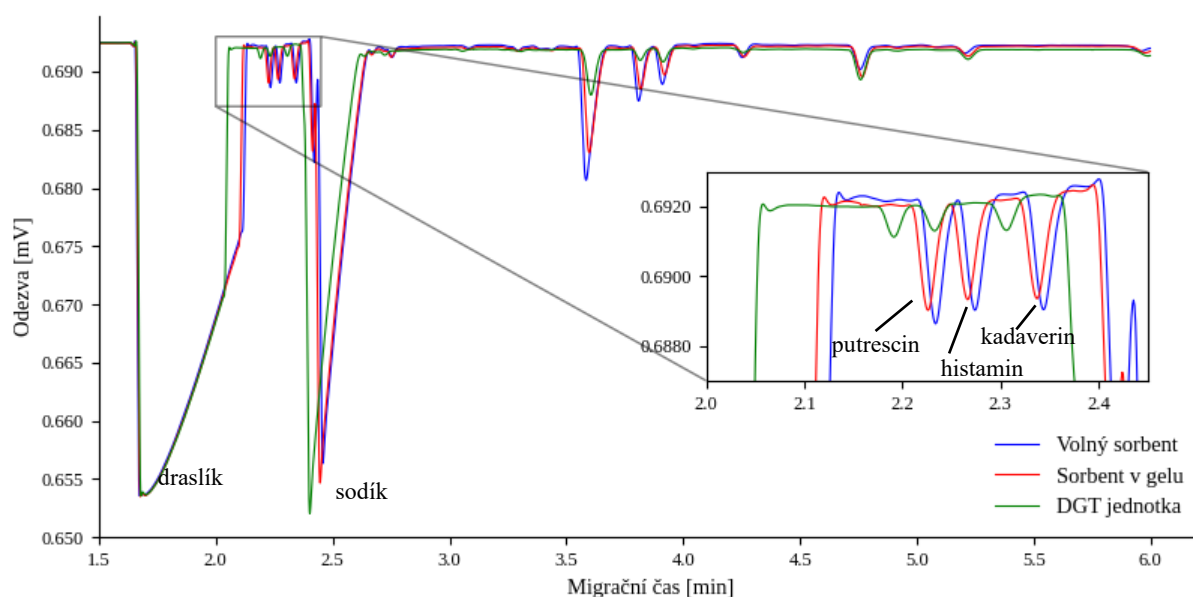
Rybí omáčka je komplexní matrice se spoustou matričních látek. Tyto potraviny obsahují vysoké množství soli. To komplikuje přímou analýzu rybí omáčky. Pro první nastínění byla analyzována rybí omáčka naředěná 25x a 50x. Rybí omáčka byla ředěná pomocí hydroxidu draselného, aby bylo docíleno podobných podmínek jako v eluátu po přечиštění této matrice. Z elektroforetogramu (graf 11) je patrné, že i přes velké ředění je stále v roztoku velmi velké množství sodných iontů, které mohou ovlivnit separaci a migraci biogenních aminů. Z přiblížení na oblast biogenních aminů je patrné, že analytů je tam velmi málo. Píky jsou malé a špatně integrovatelné. Z toho plyne, že je potřebné udělat předčišťovací a koncentrační krok.



Graf 11: Elektroforetogram 25x a 50x zředěné rybí omáčky se zaměřením na oblast biogenních aminů putrescin, histamin a kadaverin.

1.12.2 Přechystění rybí omáčky metodou sorpce

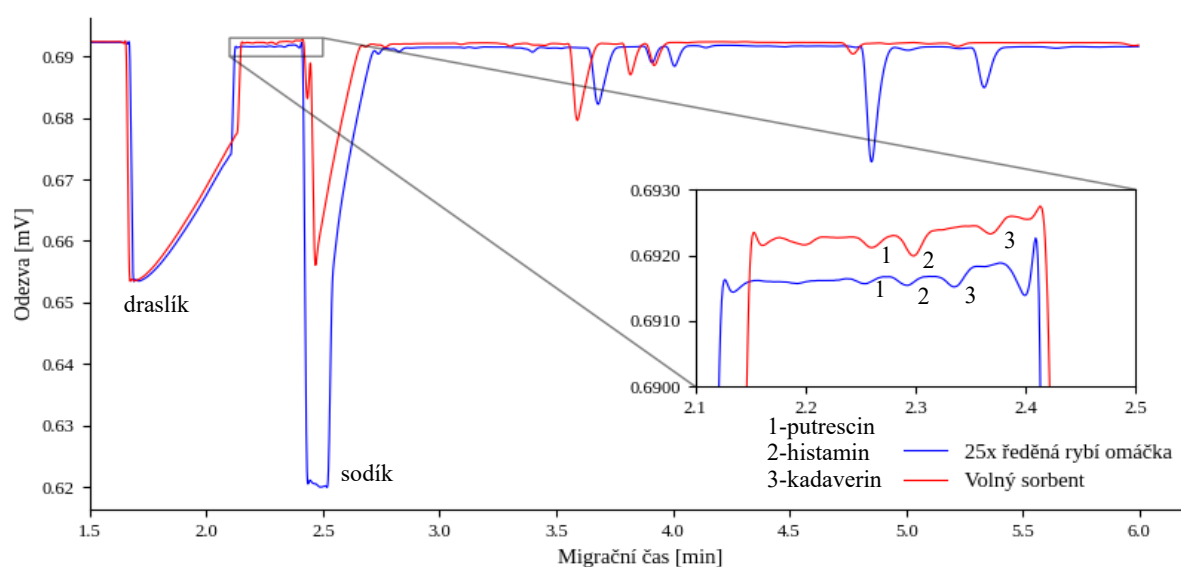
Byly vyzkoušeny tři přístupy pro sorpci biogenních aminů. Délka sorpce probíhala ve všech případech po dobu 60 minut a eluce probíhala do 2 ml 1M hydroxidu draselného po dobu také 60 minut. Prvním z nich byla navážka volného sorbentu. Hmotnost sorbentu byla zvolena tak, aby odpovídala množství sorbentu v disku agarósového gelu. Tento přístup měl velmi snadnou dostupnost analytů k sorbentu. Na druhou stranu byla s volným sorbentem velmi složitá manipulace. Nebylo možné snadno a efektivně odstranit původní roztok od sorbentu. Vždy zůstalo 200 μ l původního roztoku. V případě množství elučního činidla 2 ml je toto zbylé množství poměrně vysoké a způsobovalo kontaminace v eluátu matričními látkami. Druhým použitým přístupem byl sorbent v agarósovém gelu. V tomto případě byla účinnost procesu z hlediska sorpce sledovaných analytů mírně nižší než v předchozím případě. To mohlo být způsobeno mírně sníženou dostupností částic sorbentu. Také množství částic mohlo být trochu jiné než bylo množství volného sorbentu. Manipulace byla výrazně snadnější, je možné jednoduše vylít původní roztok a propláchnout bez ztráty částic. Posledním přístupem bylo použití DGT jednotky, která zahrnovala i difúzní gel fungující jako filtr. V tomto případě byla účinnost výrazně nižší oproti předchozím dvou přístupům. Pro DGT proces by bylo nutné ponechat sorpci výrazně delší čas. Proto byl pro další analýzy potravin zvolen přístup sorpce na sorbent v disku z agarósového gelu. Jaké jsou účinnosti procesů po eluci lze vidět na elektroforetogramu (graf 12).



Graf 12: Elektroforetogramy přečištěných rybích omáček se zaměřením na oblast biogenních aminů putrescinu, histaminu a kadaverinu, kde v zaměření je patrný mírný posun záznamu DGT jednotky dopředu.

1.12.3 Srovnání obou přístupů přečištění rybí omáčky

Z výsledků těchto experimentů je patrné, že přečišťující krok je nezbytný pro analýzu tohoto typu potravin, jako jsou rybí omáčky. Pokud byla rybí omáčka pouze zředěná, stále bylo na záznamu velké množství sodíku. Zároveň byly velmi malé píky biogenních aminů. Pokud byla rybí omáčka přečištěná, snížilo se množství matričních látek v eluátu oproti původní matici. Především sodných iontů bylo výrazně méně. Tento krok byl důležitý kvůli možnému ovlivnění migrace biogenních aminů v průběhu analýzy. Došlo i ke zlepšení odezvy biogenních aminů. Porovnání nepřečištěné a přečištěné rybí omáčky je vidět na elektroforetogramu (graf 13).



Graf 13: Elektroforetogramy analyzované pouze 25x zředěné rybí omáčky a přečištěné rybí omáčky volným sorbentem, s přiblížením na oblast biogenních aminů.

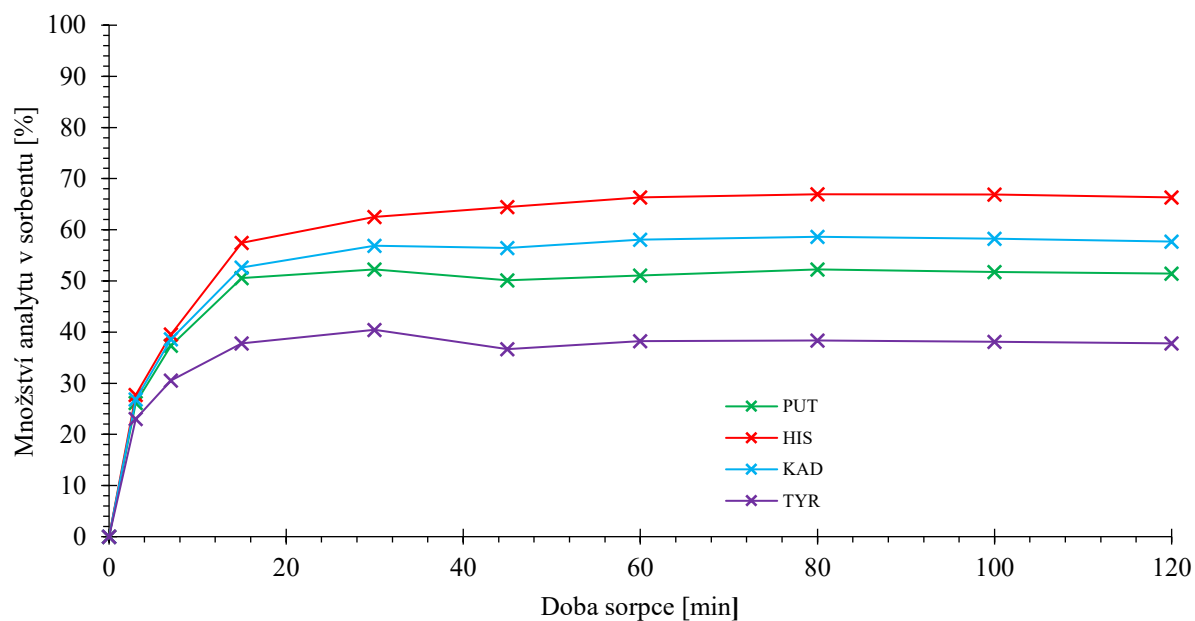
1.13 Validační experimenty

Tyto experimenty byly potřebné pro zjištění optimálních podmínek, kdy je sorpce na sorbent neúčinnější. Mezi tyto parametry patří sorpční kinetika a kapacita, vliv pH na sorpci, eluční faktor, difúzní koeficient analytů v difúzním gelu a difúzní mezní vrstva a prekoncentrační krok.

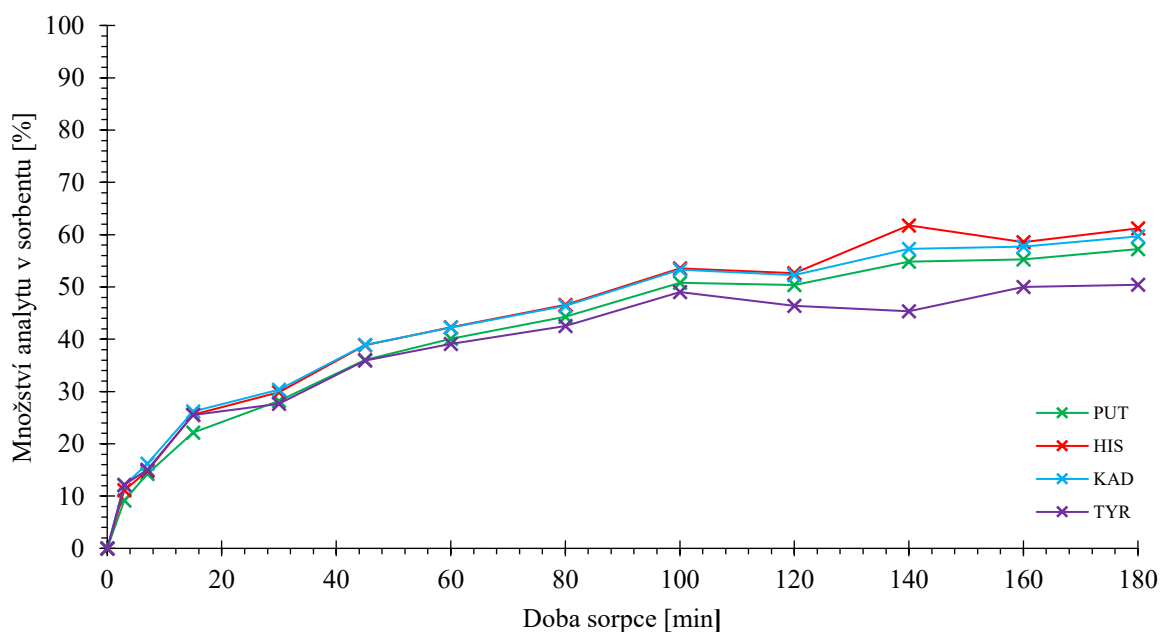
1.13.1.1 Kinetika pro sorpce s využitím difúzního gelu (DGT) a bez něj

Experiment by měl ukázat, po jaké době expozice bude ustanovena rovnováha mezi sorbentem a roztokem. Sorpční kinetika a ustanovení rovnováhy byly měřeny v případě sorbentu v agarósovém gelu a také u DGT jednotky. V případě sorpce na sorbent v agarósovém gelu byla rychlost sorpce rychlá a prudký nárůst nasorbované látky na sorbent probíhal v průběhu prvních 20 minut. Poté se rychlost sorpce zpomalila a pozvolný nárůst koncentrace v sorbentu probíhal mezi 30 a 40 minutami sorpce. Po 40 minutách byla ustanovena rovnováha až do stálých hodnot. Pro sorbent v agarósovém gelu byla určena hodnota pro dobu sorpce 60 minut. Průběh nárůstu množství nasorbované látky [%] v závislosti na čase je vidět v grafu (graf 14). Bylo nasorbováno 30–70 % analytů v závislosti na konkrétním biogenním aminu, kde se odchylka v každém bodě grafu pohybuje v rozmezí 2–9 %. RSD, která byla vztažena na odchylku, byla mezi 9 a 24 %. V DGT jednotce byla doba ustanovení rovnováhy výrazně pomalejší. I rychlost sorpce byla pozvolnější než pro předchozí případ. První nejrychlejší nárůst byl pomalejší a trval po dobu prvních 60 minut. Následně se rychlost sorpce zpomalila a sorpce do ustáleného stavu trvala dalších 60 minut. K ustanovení rovnováhy došlo až po 120 minutách expozice DGT jednotky roztoku analytů. Bylo nasorbováno 40–60 % analytů v závislosti na konkrétním biogenním aminu. Tato závislost lze vidět v grafu (graf 15) a odchylka v každém bodě grafu se pohybuje v rozmezí 0,9–8 %. RSD vztažená na odchylku se pohybuje v rozmezí 1–20 %, výjimečně 50 %. U eluce byl proveden obdobný experiment. Průběh prudkého nárůstu rychlosti eluce probíhal v průběhu prvních pár minut. Následných 25 minut byl nárůst pozvolný. Od 25. minuty došlo k ustanovení rovnováhy mezi sorpcí a elucí. Pro účely dalších experimentů na základě těchto výsledků byla zvolena doba eluce 60 minut. Bylo vyeluováno 20–55 % nasorbovaných analytů v závislosti na konkrétním biogenním aminu. Odchylka v každém bodě byla v rozmezí 2–20 %, výjimečně 25 %. V tomto případě se RSD pohybovala v rozmezí 1–26 %, výjimečně až 30 %. Závislost množství vyeluované látky na čase expozice sorbentu v disku elučnímu činidlu je vidět v grafu (graf 16). Postup a průběh elučních procesů byly totožné pro oba případy, a tak byl znázorněn pouze jeden.

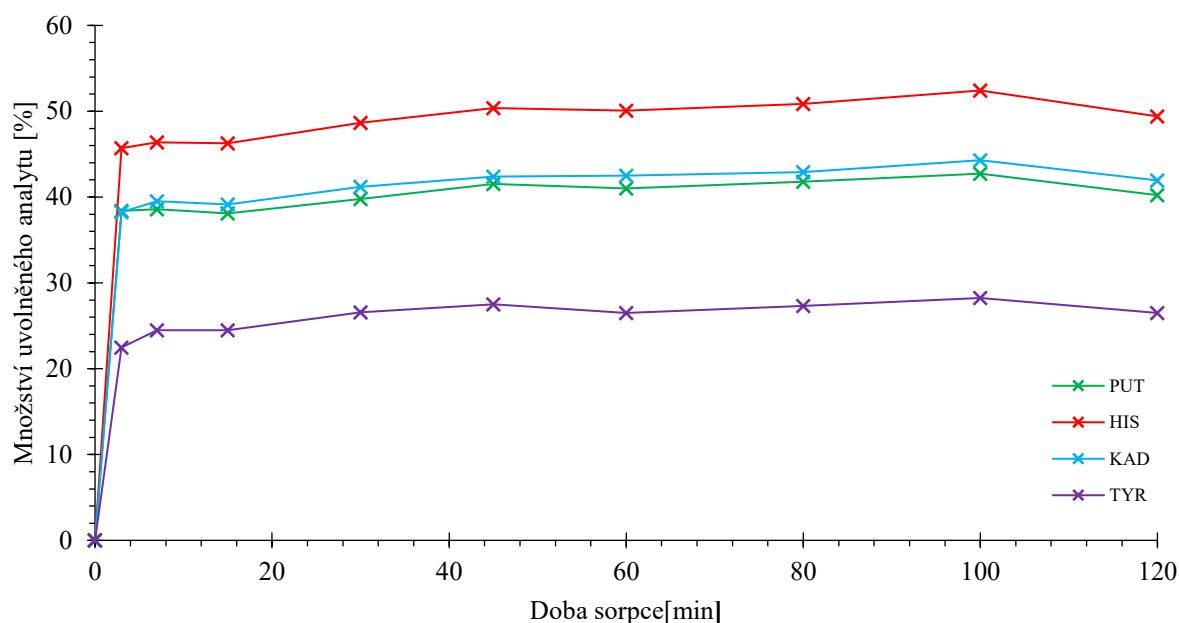
Tyto výsledky nejsou zcela uspokojující a to zejména vzhledem k vysokým hodnotám RSD. Kromě zvýšení množství počtu experimentu by se měla zvážet optimalizace přípravy sorbentu a disků a také podmínky adsorpce a eluce.



Graf 14: Závislost množství nasorbovaných analytů [%] na době expozice analytů sorbentu pro sorbent v agarósovém gelu.



Graf 15: Závislost množství nasorbovaných analytů [%] na době expozice analytů sorbentu při použití DGT jednotky.



Graf 16: Závislost množství uvolněných analytů [%] na době expozice analytů elučnímu činidlu.

1.13.2 Eluční faktor

Eluční faktor použitelný dále pro výpočty je potřebné zvolit za podmínek, které budou blízké reálným matricím. Pro stanovení elučního faktoru byla tedy zvolena koncentrace standardů $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ kvůli blízkosti očekávané koncentrace v reálných matricích po ředění. Eluční účinnost by se měla ideálně pohybovat mezi 60 a 80 %. V našem případě ale byla eluční účinnost výrazně nižší. A to jen 30 % a to v závislosti na konkrétním biogenním aminu. Hodnoty eluční účinnosti f_e pro jednotlivé biogenní aminy jsou uvedeny v tabulce (tabulka 3). RSD nepřekračuje hodnotu 5 %, což je velmi dobrý výsledek. Pokud je nízká koncentrace biogenních aminů, může docházet k obsazování nejsilnějších vazebných míst na sorbentu a tyto ztráty jsou vyšší kvůli silným interakcím a neochoty se uvolnit. To mohlo způsobit nižší účinnost eluce.

Tabulka 3: Hodnoty experimentálních elučních účinností pro biogenní aminy.

	f_e [%]	Δf_e [%]	RSD [%]
putrescín	31,34	0,53	1,70
histamin	34,85	0,56	1,60
kadaverin	33,16	0,96	2,91
tyramin	51,68	1,69	3,26

1.13.3 Prekoncentrační krok

Důležitým krokem pro DGT techniku a tyto procesy je schopnost zakoncentrování analytů. Tento krok je nutný i pro možnost identifikace i kvantifikace analytů. Pokud by k tomuto kroku nedošlo, mohlo by dojít ke komplikaci u kvantifikace. V tomto experimentu byly testovány tři koncentrační poměry, a to 1:1, 1:2 a 1:5. Eluce tedy probíhala do objemů 10; 5 a 2 ml 1M hydroxidu draselného. Tyto hodnoty byly zvoleny jakožto maximální použitelné množství, aby nedošlo k vyředění, 5 ml jakožto střední hodnota (zdali je účinnější než nižší množství) a 2 ml

byly zvoleny jakožto nejnížší možné použitelné množství elučního činidla, aby byl disk celý ponořen. Původní koncentrace roztoku byla $250 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ v 10 ml roztoku.

Zakoncentrování bylo přepočítáno jak na původní množství analytů, tak také na nasorbované množství analytů, a to z toho důvodu, že v tomto případě nedošlo k nasorbování veškerého množství analytů. Koncentrace analytů byla výrazně vyšší než bylo možné nasorbovat. Při eluci do 2 ml bylo zakoncentrování na původní množství analytů od 0,94 do 1,13 násobek s odchylkami 0,03–0,13 (RSD 1,89–11,23 %) a zakoncentrování na nasorbované množství bylo od 2,44 do 3,27 násobek s odchylkami 0,05–1,10 (RSD 1,93–6,51 % s výjimkou 33,76 % u tyraminu). Eluční objem 5 ml 1M hydroxidu draselného zakoncentroval analyty na původní množství o 0,35 do 0,71 násobek s odchylkou 0,01–0,03 (RSD 1,63–4,69 %). Zakoncentrování na nasorbované množství analytů bylo mezi 0,99 a 1,13 násobkem s odchylkou 0,01–0,04 (RSD 0,46–14,01 %). Eluce do 10 ml elučního činidla zakoncentrovala analyty na původní roztok o 0,18–0,30 násobek s odchylkou 0,05–0,06 (RSD 4,95–11,25 %). Zakoncentrování analytů vztažené na nasorbované množství analytů se pohybovalo v rozmezí 0,44–0,48 násobku s odchylkou 0,10–0,18 (RSD 9,71–14,71 %). Tato nižší čísla mohou být způsobena nejen přebytkem analytů, ale také eluční účinností, která se v případě vyšší koncentrace pohybovala okolo 50 %. Všechny spočítané hodnoty zakoncentrování jsou uvedeny v tabulce (tabulka 4).

Tabulka 4: Vypočítané hodnoty experimentálního zakoncentrování analytů po eluci do různých objemů.

objem elučního činidla [ml]	analyt	zakoncentrování na původní množství analytů [násobek]	Δ zakoncentrování na původní množství analytů [násobek]	RSD [%]	zakoncentrování na nasorbované množství [násobek]	Δ zakoncentrování na nasorbované množství [násobek]	RSD [%]
2	Putrescin	1,13	0,13	11,23%	2,44	0,05	1,93%
	Histamin	1,70	0,05	3,10%	2,73	0,06	2,22%
	Kadaverin	1,33	0,03	1,89%	2,56	0,17	6,51%
	Tyramin	0,94	0,03	2,77%	3,27	1,10	33,76%
5	Putrescin	0,60	0,01	1,66%	1,13	0,04	3,21%
	Histamin	0,71	0,01	1,63%	1,10	0,01	0,46%
	Kadaverin	0,64	0,01	1,92%	1,13	0,01	1,17%
	Tyramin	0,37	0,02	4,69%	0,99	0,14	14,01%
10	Putrescin	0,24	0,05	4,95%	0,44	0,12	10,06%
	Histamin	0,30	0,06	6,06%	0,45	0,10	9,71%
	Kadaverin	0,27	0,06	6,92%	0,46	0,12	11,66%
	Tyramin	0,18	0,05	11,25%	0,48	0,18	14,71%

1.13.4 Vliv pH

Jak již bylo zmíněno dříve, hodnoty pH jsou klíčové pro ovlivnění kationměničové sorpce biogenních aminů. Jejich stav je závislý na hodnotě pH.

Během tohoto experimentu byly vybrány tři hodnoty pH, a to pH 3, dále proběhlo měření bez úpravy pH (pH na hodnotě 5) a poslední sorpce proběhla při hodnotě pH 11. Bylo sorbováno z roztoku o koncentraci $250 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a objemu 10 ml. Při úpravě pH na hodnotu 3 bylo

nasorbováno významné množství analytů. A to 56,59 až 68,67 % s odchylkou 0,58 až 0,99 (RSD 1,74–2,74 %). Tyraminu bylo nasorbováno velmi málo, i když bylo kyselé pH. Bylo nasorbováno $9,31 \pm 1,94$ % (RSD 34,86 %). To mohlo být způsobeno velkým množstvím H^+ iontů, které mají vyšší afinitu k sorbentu než tyramin, ale menší než ostatní biogenní aminy. Pokud probíhala sorpce bez úpravy pH, bylo množství nasorbovaného velmi podobné. Ale v případě tyraminu byla sorpce výrazně lepší oproti předchozímu případu. Bylo nasorbováno 55,21–67,14 % množství biogenních aminů s odchylkou 2,15–5,27 % (RSD 3,90–7,84 %). V případě tyraminu bylo nasorbováno $36,62 \pm 1,11$ % (RSD 3,02 %). V případě pH 11 byla velmi malá sorpce jak u tyraminu, tak i u histaminu sorpční účinnost klesla. V případě histaminu byla účinnost sorpce $32,68 \pm 2,29$ % (RSD 7,01 %). U tyraminu byla sorpční účinnost $20,29 \pm 2,71$ % (RSD 13,37 %). Tyto biogenní aminy se nevážou v takto zásaditém prostředí, jelikož v pH 11 mají neutrální náboj a nedochází tak k jejich sorpci. Naopak, sorpční účinnost putrescinu i kadaverinu vzrostla. A to konkrétně na hodnotu $73,22 \pm 2,29$ % (RSD 7,01 %) pro putrescin a $84,25 \pm 0,68$ % (RSD 0,81 %) pro kadaverin. Na první pohled to působí zvláště. Při pH mohou být tyto diaminy monoprotonované a nemají konkurenci vodíkových protonů. V tomto případě mohlo dojít k vazbě těchto aminů lépe než v předchozích případech, kde byla konkurence vodíkových můstků i dalších biogenních aminů vyšší. Všechny hodnoty včetně odchylek a RSD pro všechny biogenní aminy při různých pH jsou v tabulce (tabulka 5).

Tabulka 5: Hodnoty nasorbovaného množství analytů při různých hodnotách pH včetně odchylek a RSD

pH	analyt	nasorbované množství analytů [%]	Δ nasorbované množství analytů [%]	RSD [%]
3	put	56,59	0,66	2,74
	his	68,67	0,58	1,74
	kad	59,89	0,99	3,08
	tyr	9,31	1,94	34,86
Bez úpravy (5)	put	55,21	2,15	3,90
	his	67,14	5,27	7,84
	kad	58,24	3,38	5,80
	tyr	36,62	1,11	3,02
11	put	73,22	0,69	0,94
	his	32,68	2,29	7,01
	kad	84,25	0,68	0,81
	tyr	20,29	2,71	13,37

1.13.5 Adsorpční izotermy a sorpční kapacita

Důležitým parametrem techniky DGT je sorpční kapacita použitého sorbentu. Pro její stanovení byly využity adsorpční izotermy, které umožňují posoudit, jaký model nejlépe popisuje experimentální data.

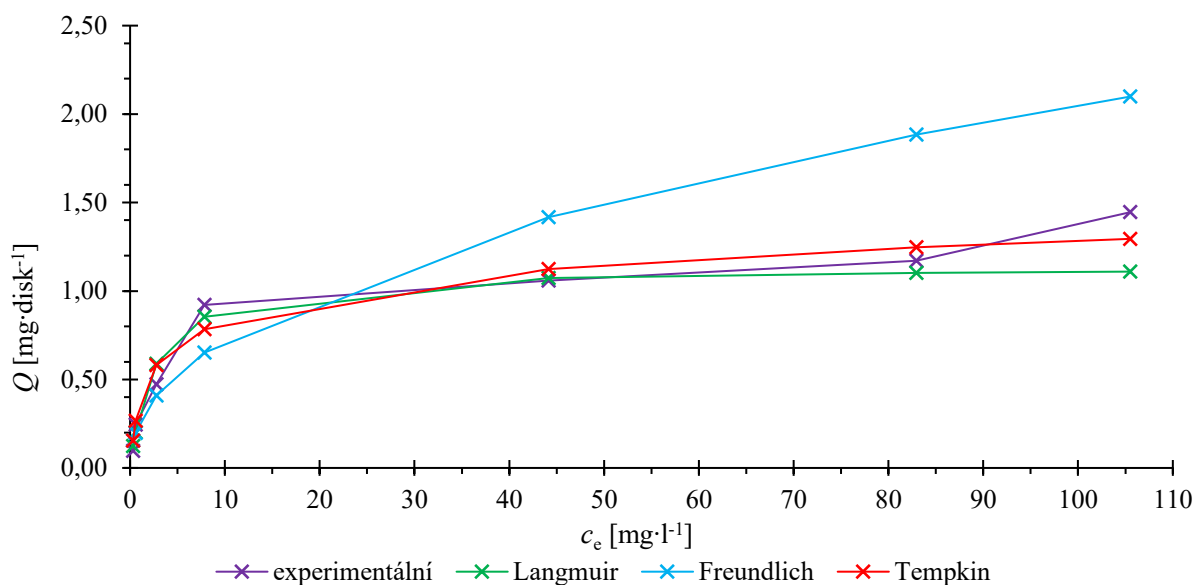
Pro většinu studovaných biogenních aminů byl průběh izoterem podobný, s výjimkou tyraminu. Závislost nasorbovaného množství na rovnovážné koncentraci vykazuje v počáteční oblasti strmý nárůst, který se postupně zpomaluje až do dosažení nasycení sorbentu. Tento průběh

odpovídá typickému chování popsanému Langmuirovým modelem. V případě Freundlichovy izotermy je nárůst pozvolnější a nedochází k jednoznačnému ustavení maxima. U tyraminu se však průběh Freundlichovy izotermy více přibližuje experimentálním datům než u ostatních analytů. V experimentálních datech byl pozorován odlehlý bod v nejvyšší koncentraci, jehož příčina nebyla objasněna. Přehled těchto závislostí je uveden na obrázcích (putrescin – graf 17, histamin – graf 18, kadaverin – graf 19, tyramin – graf 20).

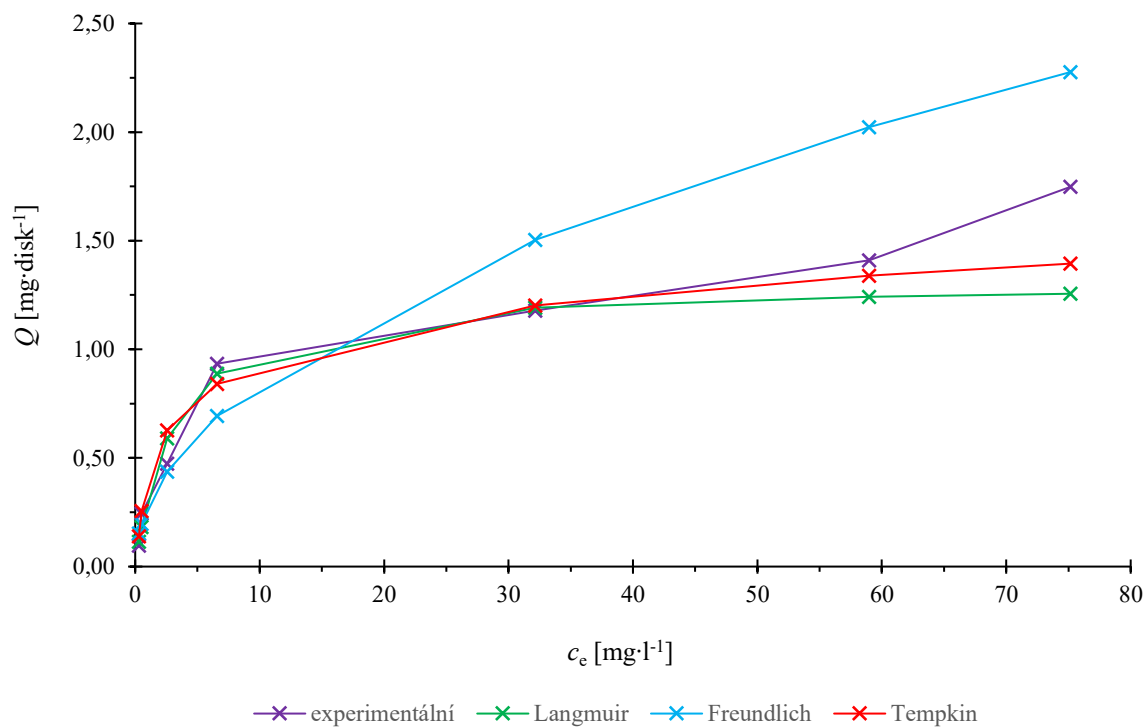
Z Langmuirovy izotermy byla stanovena sorpční kapacita sorbentu. Pro putrescin činí $1,14 \pm 0,16 \text{ mg} \cdot \text{disk}^{-1}$ (RSD 14,18 %), pro histamin $1,31 \pm 0,15 \text{ mg} \cdot \text{disk}^{-1}$ (RSD 11,39 %) a pro kadaverin $1,18 \pm 0,15 \text{ mg} \cdot \text{disk}^{-1}$ (RSD 12,48 %). V případě tyraminu byla sorpční kapacita nižší, a to $0,66 \pm 0,04 \text{ mg} \cdot \text{disk}^{-1}$ (RSD 6,00 %). Hodnoty relativní směrodatné odchylky jsou mírně vyšší, nicméně stále přijatelné. Pro jejich snížení by bylo vhodné provést opakování experimentu.

Pro posouzení vhodnosti jednotlivých modelů byla provedena jejich linearizace a vyhodnoceny hodnoty koeficientu determinace (R^2). Pro putrescin vykazuje Langmuirova izoterma nejlepší shodu s experimentálními daty ($R^2 = 0,975$), následovaná Temkinovou ($R^2 = 0,960$) a Freundlichovou izotermou ($R^2 = 0,886$). Obdobný trend byl pozorován i pro histamin (Langmuir: $R^2 = 0,967$; Temkin: $R^2 = 0,959$; Freundlich: $R^2 = 0,917$) a kadaverin (Langmuir: $R^2 = 0,972$; Temkin: $R^2 = 0,961$; Freundlich: $R^2 = 0,895$).

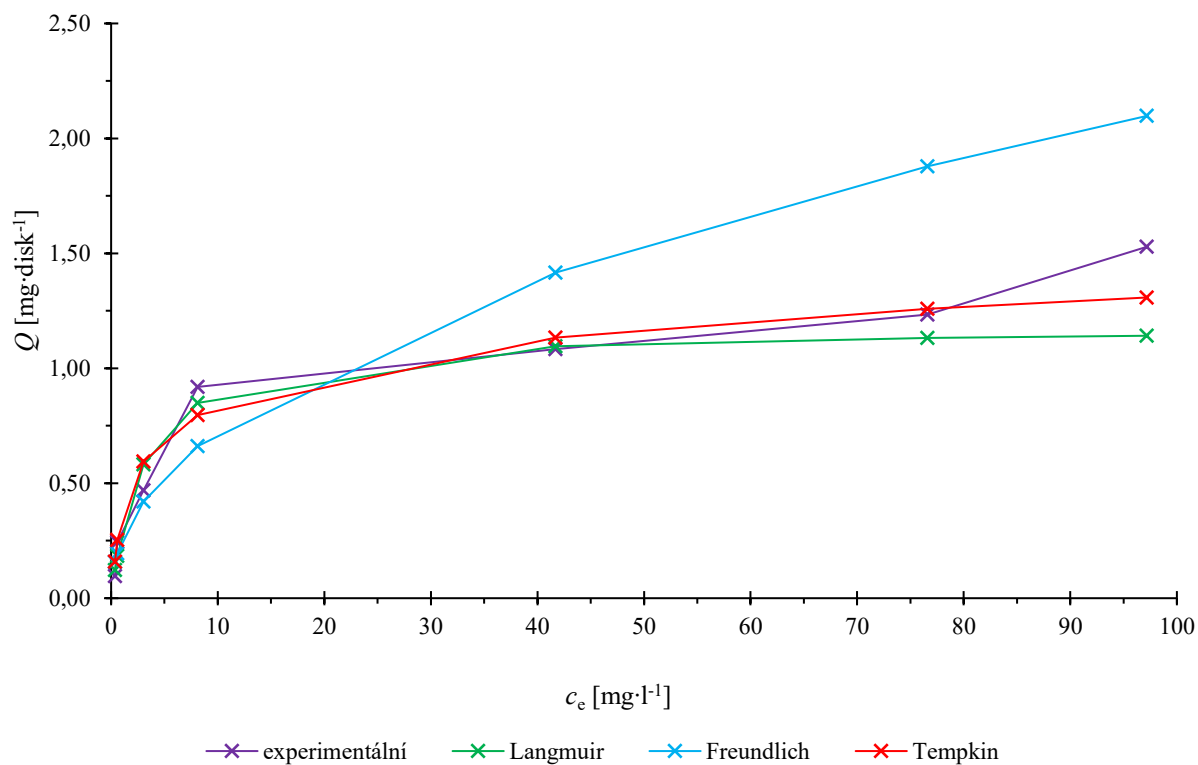
V případě tyraminu vykazují srovnatelnou shodu všechny tři modely (Langmuir: $R^2 = 0,921$; Temkin: $R^2 = 0,980$; Freundlich: $R^2 = 0,943$), což může naznačovat složitější mechanismus sorpce. Výsledky naznačují, že sorpce neprobíhá na ideálně homogenním ani čistě heterogenním povrchu a pravděpodobně má smíšený charakter.



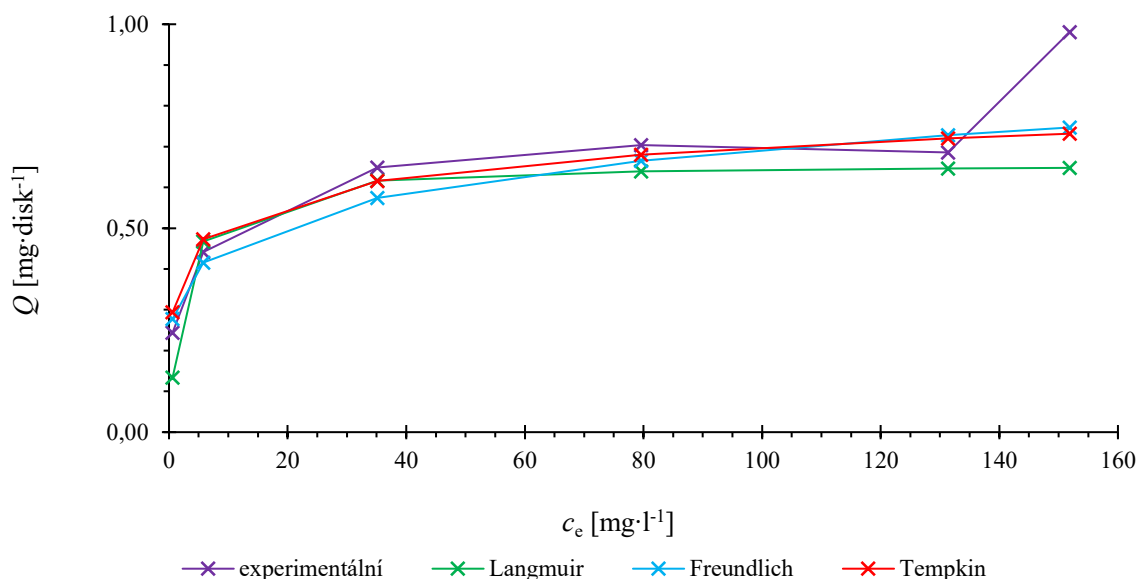
Graf 17: Graf porovnání izoterm pro určení modelu sorpce pro putrescin.



Graf 18: Graf porovnání izoterem pro určení modelu sorpce pro histamin.



Graf 19: Graf porovnání izoterem pro určení modelu sorpce pro kadaverin.

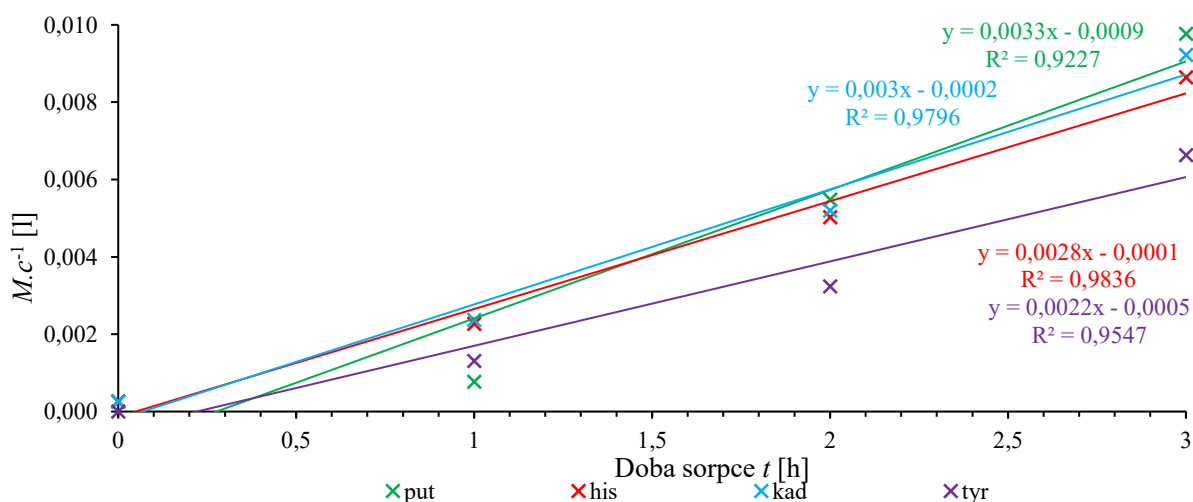


Graf 20: Graf porovnání izotermem pro určení modelu sorpce pro tyramin.

1.13.6 Difúzní koeficient

Byl stanoven difúzní koeficient. To je jeden z dalších důležitých parametrů k validaci DGT technik.

Tento pokus byl proveden jako lineární kumulace v čase. To znamená, že docházelo k nárůstu analytů v sorbentu lineárně. Tato lineární závislost hodnot $M \cdot c^{-1}$ [ml] na době expozice DGT jednotek roztoku analytů t [h] je znázorněna v grafu (graf 21). Pomocí těchto měření byly následně stanoveny difúzní koeficienty pro putrescin, histamin, kadaverin a tyramin. Difúzní koeficienty se pohybovaly v rozmezí $9,37 \cdot 10^{-6} \pm 3,44 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ až $1,47 \cdot 10^{-5} \pm 2,07 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (RSD 1,41–36,74 %) v závislosti na konkrétním biogenním aminu. Konkrétní hodnoty k jednotlivým biogenním aminům jsou shrnuty v tabulce (tabulka 6). Odchylka u tyraminu vychází poměrně vysoká. To mohlo být způsobeno nehomogenitou částic sorbentu v sorpčním gelu nebo také chybou při přípravě difúzního gelu.



Graf 21: Závislost hodnot $M \cdot c^{-1}$ [ml] na době expozice DGT jednotek roztoku analytů t [h]

Tabulka 6: Hodnoty experimentálních difúzních koeficientů biogenních aminů s odchylkami a hodnotami RSD.

analyt	D_e [cm ² ·s ⁻¹]	ΔD_e [cm ² ·s ⁻¹]	RSD [%]
putrescin	$1,47 \cdot 10^{-5}$	$2,07 \cdot 10^{-7}$	1,41
histamin	$1,44 \cdot 10^{-5}$	$4,91 \cdot 10^{-7}$	3,40
kadaverin	$1,31 \cdot 10^{-5}$	$5,29 \cdot 10^{-7}$	4,03
tyramin	$9,37 \cdot 10^{-6}$	$3,44 \cdot 10^{-6}$	36,74

1.13.7 Difúzní mezní vrstva

V rámci validačních experimentů byla dále stanovena difúzní mezní vrstva. Je to vrstva na povrchu membrány. V této vrstvě dochází k transportu látek difúzí. Tloušťka této vrstvy je nejčastěji ovlivněna hydrodynamickými podmínkami systému. Hlavním ovlivněním podmínek systému je například intenzita míchání.

Difúzní mezní vrstva byla stanovena na hodnotu $\delta = 484,96 \pm 20,07$ μm (RSD 4,14 %). Tato hodnota již není zanedbatelná pro další výpočty. Přenos látky v kapalně fázi je významně ovlivněn odporem, který je v kapalně fázi. V literatuře byla difúzní mezní vrstva stanovena na hodnotu 230 ± 32 μm [78]. Stanovená difúzní mezní vrstva je dvojnásobně vyšší. To mohlo být způsobeno rozdílnou teplotou nebo rozdílnou rychlostí míchání. Tyto dva parametry významně ovlivňují difúzi a tloušťku difúzní mezní vrstvy.

1.14 Stanovení biogenních aminů v potravinách

1.14.1 Stanovení biogenních aminů v rybí omáčce Orient Gourmet pomocí techniky DGT a sorpce bez difúzního gelu

Byly stanoveny biogenní aminy v rybí omáčce Orient Gourmet pomocí dvou přístupů a následně byly výsledky porovnány.

Při použití techniky DGT byly stanoveny výrazně nižší koncentrace biogenních aminů než při použití metody založené pouze na sorpci bez difúzního gelu a následné eluci. V případě DGT se koncentrace pohybovaly v rozmezí $8,60 \pm 3,63$ $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ až $16,75 \pm 1,14$ $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (RSD 9,17–40,01 %), zatímco při použití sorpční metody bez difúzního gelu byly zjištěny hodnoty $7,18 \pm 1,02$ $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ až $59,96 \pm 5,18$ $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (RSD 8,65–25,32 %).

Rozdíl mezi metodami může být způsoben nedostatečnou dobou sorpce při použití DGT jednotky. V reálné matici může být sorpce pomalejší než v modelových roztocích, zejména pokud jsou biogenní aminy vázány na větší molekulární komplexy, které nemohou snadno difundovat přes difúzní gel. Optimální doba sorpce byla stanovena při vyšších koncentracích, než jaké odpovídají reálným vzorkům, což mohlo vést k podhodnocení koncentrací při použití DGT. Pro potvrzení tohoto předpokladu by bylo vhodné experiment zopakovat s delší dobou sorpce.

Relativní směrodatné odchylky byly v některých případech poměrně vysoké. Přestože by DGT měla díky řízené difúzi poskytovat reprodukovatelnější výsledky, pro snížení odchylek by bylo

vhodné provést větší počet opakování. Souhrn výsledků pro jednotlivé biogenní aminy a použité přístupy je uveden v tabulce (tabulka 7).

Rybí omáčka byla dále analyzována podle aplikačního listu [0 na komerčním analyzátoru aminokyselin Shimadzu Nexera s postkolonovou derivatizací pracujícím na principu HPLC. Koncentrace histaminu byla stanovena na $47,3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Tato hodnota je bližší výsledkům získaným metodou sorpce bez difúzního gelu ($59,96 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) než metodě DGT.

Rozdíly mezi metodami mohou být způsobeny odlišnou přípravou vzorků. Pro analýzu na aminokyselinovém analyzátoru byla rybí omáčka ředěna $100\times$, zatímco pro sorpční experiment pouze $50\times$. Dalším zdrojem nepřesnosti mohlo být nastavení kalibrační závislosti vzhledem k odlišnému ředění vzorku. Z časových důvodů nebylo možné provést detailnější srovnání ani ověřit vliv matrice. Toto srovnání bylo prozatím využito pouze k tomu, zdali nedochází k příliš velkým (řádrovým) odchylkám mezi navrhovanou a zaužívanou metodou.

Aminokyselinový analyzátor je běžně využíván pro rutinní analýzy, avšak jedná se o finančně náročné zařízení s vyššími nároky na obsluhu a spotřebu činidel. Nevýhodou je také delší doba analýzy (přibližně 25 minut). Naproti tomu kapilární zónová elektroforéza představuje rychlejší a ekonomičtější alternativu s kratší dobou analýzy (přibližně 6 minut). Technika DGT navíc umožňuje jednoduchou předúpravu vzorku a může být kombinována s různými analytickými metodami.

Tabulka 7: Vypočítané výsledky koncentrací biogenních aminů v rybí omáčce Orient Gourmet.

analyt	s difúzním gelem			bez difúzního gelu		
	$c_{\text{DGT}} [\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}]$	$\Delta c_{\text{DGT}} [\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}]$	RSD [%]	$c [\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}]$	$\Delta c [\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}]$	RSD [%]
putrescin	8,63	0,97	9,17	29,81	5,69	19,08
histamin	16,75	1,14	20,80	59,96	5,18	8,65
kadaverin	11,57	2,59	19,94	35,86	9,08	25,32
tyramin	8,60	3,63	40,01	7,18	1,02	14,18

1.14.2 Stanovení biogenních aminů v rybí omáčce Thai Pride

Pro stanovení biogenních aminů v druhé rybí omáčce Thai Pride byla použita už pouze metoda sorpce bez difúzního gelu. Byly zvoleny dva přístupy, a to bez přídavku analytů a s přídavkem analytů v původní rybí omáčce.

V přístupu bez přídavku biogenních aminů měla rybí omáčka změřené koncentrace biogenních aminů v rozmezí $21,74\text{--}66,58 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (RSD $11,68\text{--}26,73 \%$) v závislosti na konkrétním biogenním aminu. Takové odchylky mohly být způsobeny tím, že byla nehomogenní distribuce částic v gelu. To mohly být obecně hlavní důvody odchylek. V případě, kdy do rybí omáčky byl přidán přídavek $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, byly odezvy výrazně lepší. Koncentrace analytů byla stanovena na $47,28\text{--}135,23 \pm 1,13\text{--}14,33 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (RSD $2,39\text{--}10,59 \%$). Tyto hodnoty jsou už na hranici sorpčních kapacit sorpčních disků a nemusí být tyto hodnoty zcela přesné. Pro zpřesnění výsledku by bylo nutno provést více testů, různá ředění matrice a přesnější kalibrace s přídavkem standardu. Hodnoty stanovených koncentrací pro jednotlivé biogenní aminy pro jednotlivé přístupy jsou uvedeny v tabulce (tabulka 8).

Tabulka 8. Spočítané hodnoty koncentrace biogenních aminů v rybí omáčce Thai Pride s přidavkem a bez přidavku biogenních aminů.

analyt	Bez přidavku			S přidavkem 100 mg·l ⁻¹ BA		
	<i>c</i> [mg·l ⁻¹]	Δc [mg·l ⁻¹]	RSD [%]	<i>c</i> [mg·l ⁻¹]	Δc [mg·l ⁻¹]	RSD [%]
putrescin	29,88	3,49	11,68	102,31	9,19	8,98
histamin	39,15	9,51	24,29	113,54	5,33	4,70
kadaverin	66,58	16,76	25,18	135,23	14,33	10,59
tyramin	21,74	5,81	26,73	47,28	1,13	2,39

1.14.3 Stanovení biogenních aminů v ústříčné omáčce

Podobně jako v předchozím případě byly použity dva přístupy pro analýzu biogenních aminů v ústříčné omáčce.

V případě analýzy ústříčné omáčky bez přidavku biogenních aminů byla stanovena koncentrace biogenních aminů pod limitem kvantifikace a nebylo je tedy možné stanovit. Mohlo by být zvoleno menší ředění, ale z časových důvodů nebylo možné změřit znovu.

ZÁVĚR

Cílem práce bylo ověřit použití spojení metody DGT a kapilární zónové elektroforézy za účelem analýzy potravin. Metoda byla ověřena na čtyřech biogenních aminech, a to putrescinu, histaminu, kadaverinu a tyraminu.

V rámci experimentální části byla vyvinuta a optimalizována metoda pro stanovení biogenních aminů pomocí kapilární zónové elektroforézy, přičemž optimalizace probíhala na standardních roztocích analytů. V rámci optimalizace kapilární zónové elektroforézy bylo nalezeno za optimální elektrolyt kyselina octová o koncentraci $3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Při hodnocení výsledků adsorpčních experimentů byl za dostatečně vhodný adsorbent zvolen kationměničový adsorbent Dowex[®] 50W-X8. V rámci experimentů s elučními činidly byl jako účinné eluční činidlo zvolen hydroxid draselný o koncentraci $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Pro přechištění a zakoncentrování rybí omáčky byl zvolen adsorbent ukotvený v agarósovém gelu bez difúzního gelu na základě testování různých přístupů přechištění rybí omáčky.

Za ideální dobu adsorpce pro adsorbent v agarósovém gelu bez difúzního gelu zvolen čas 60 minut a pro DGT jednotku (s difúzním gelem) 120 minut na základě sorpční kinetiky. Při elučním experimentu byl za vhodnou dobu eluce vybrán čas 60 minut. Eluční faktor byl stanovován při koncentraci zásobního roztoku podobné reálným vzorkům ($10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) na hodnoty $31,34 \pm 0,53\%$ pro putrescin, $34,85 \pm 0,56 \%$ pro histamin, $33,16 \pm 0,96 \%$ pro kadaverin a pro tyramin byla hodnota elučního faktoru $51,68 \pm 1,69 \%$.

V rámci optimalizace prostředí bylo nalezeno za optimální prostředí pH 5 (bez úpravy prostředí). Z experimentu lineární akumulace v čase ze směsného roztoku byla stanovena sorpční kapacita adsorbentu na hodnoty $1,14 \pm 0,16 \text{ mg} \cdot \text{disk}^{-1}$ pro putrescin, $1,13 \pm 0,15 \text{ mg} \cdot \text{disk}^{-1}$ pro histamin, $1,18 \pm 0,15 \text{ mg} \cdot \text{disk}^{-1}$ pro kadaverin a pro tyramin $0,66 \pm 0,04 \text{ mg} \cdot \text{disk}^{-1}$.

Effektivní difúzní koeficienty byly stanoveny na hodnoty $1,47 \cdot 10^{-5} \pm 2,07 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pro putrescin, $1,44 \cdot 10^{-5} \pm 4,91 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pro histamin, $1,33 \cdot 10^{-5} \pm 5,29 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pro kadaverin a pro tyramin $9,37 \cdot 10^{-6} \pm 3,44 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ na základě časového odběru DGT jednotek a analýzy eluátu. Z experimentu použití různých tloušťek difúzního gelu byla stanovena difúzní mezní vrstva, která má hodnotu $484,96 \pm 20,07 \text{ } \mu\text{m}$ v intenzivně míchaném roztoku.

V rybí omáčce Orient Gourmet byly stanoveny metodou kapilární zónové elektroforézy po aplikaci DGT techniky koncentrace pro putrescin $8,63 \pm 0,97 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, histamin $16,75 \pm 1,14 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, kadaverin $11,57 \pm 2,59 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a tyramin $8,60 \pm 3,63 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Při použití jako prekoncentrační techniky pouze adsorpčního gelu byly elektroforézou stanoveny koncentrace putrescinu $8,29,81 \pm 5,69 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, histaminu $59,96 \pm 5,18 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, kadaverinu $35,86 \pm 9,08 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a tyraminu $7,18 \pm 1,02 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Hodnota histaminu stanovena přímou analýzou na komerčním analyzátoru aminokyselin byla $47,3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Kapilární zónovou elektroforézou po aplikaci adsorpčního gelu byla v rybí omáčce Thai Pride stanovena koncentrace putrescinu $29,88 \pm 3,49 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, histaminu $39,15 \pm 9,51 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, kadaverinu $66,58 \pm 16,76 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a tyraminu $21,74 \pm 5,81 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Ústříčná omáčka stanovovaná stejným postupem jako rybí omáčky. Biogenní aminy se pohybovaly pod limitem kvantifikace a nebylo je tedy možné stanovit.

Spojení techniky DGT a kapilární zónové elektroforézy má potenciál se zařadit mezi současné metody stanovení biogenních aminů. Hlavním nedostatkem byl velký rozptyl hodnot v důsledku neoptimálních podmínek procesu, na které by bylo potřebné se zaměřit a provést více měření. Výhodou bylo možnost zjednodušit přechištění na samotný adsorpční gel.

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] SANTOS, M.H.Silla, 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology* [online]. Elsevier BV, **29**(2-3), 213-231 [cit. 2025-10-26]. ISSN 0168-1605. Dostupné z: doi:10.1016/0168-1605(95)00032-1.
- [2] TEN BRINK, B., C. DAMINK, H.M.L.J. JOOSTEN a J.H.J. HUIS IN 'T VELD, 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology* [online]. Elsevier BV, **11**(1), 73-84 [cit. 2025-10-26]. ISSN 0168-1605. Dostupné z: doi:10.1016/0168-1605(90)90040-c.
- [3] LEE, Jae-Ick a Young-Wan KIM, 2012. Rapid Detection Methods for Biogenic Amines in Foods. *Korean Journal of Food Science and Technology* [online]. Korean Society of Food Science and Technology, 2012-4-30, **44**(2), 141-147 [cit. 2025-11-18]. ISSN 0367-6293. Dostupné z: doi:10.9721/kjfst.2012.44.2.141
- [4] SCHWENKE, K. D., 1988. A. Askar und H. Treptow: Biogene Amine in Lebensmitteln — Vorkommen, Bedeutung und Bestimmung. 197 Seiten, 34 Abb., 47 Tab. Verlag Eugen Ulmer. Stuttgart 1986. Preis: 58,— DM. *Food / Nahrung* [online]. Wiley, **32**(4), 420-420 [cit. 2025-10-26]. ISSN 0027-769X. Dostupné z: doi:10.1002/food.19880320433
- [5] SANTOS-BUELGA, CELESTINO, ANA NOGALES-ALARCON a ABEL MARINE-FONT, 1981. A Method for the Analysis of Tyramine in Meat Products: Its Content in Some Spanish Samples. *Journal of Food Science* [online]. Wiley, **46**(6), 1794-1795 [cit. 2025-10-27]. ISSN 0022-1147. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2621.1981.tb04487.x
- [6] VIDAL-CAROU, M.C., M.L. IZQUIERDO-PULIDO, M.C. MARTÍN-MORRO a MARINÉ-FONT, 1990. Histamine and tyramine in meat products: Relationship with meat spoilage. *Food Chemistry* [online]. Elsevier BV, **37**(4), 239-249 [cit. 2025-10-27]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/0308-8146(90)90104-c
- [7] DAWOOD, A, 1988. The occurrence of non-volatile amines in chilled-stored rainbow trout (*Salmo irideus*). *Food Chemistry* [online]. Elsevier BV, **27**(1), 33-45 [cit. 2025-10-28]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/0308-8146(88)90034-9
- [8] GAJEWSKA, R.; GANOWIAK, Z. Evaluation of degree of freshness and value of fish and fish product t intake based on histamine and trimethylamine analysis. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 1992, 43.3-4: 245-251.
- [9] HALÁSZ, Anna, Ágnes BARÁTH, Livia SIMON-SARKADI a Wilhelm HOLZAPFEL, 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science* [online]. Elsevier BV, **5**(2), 42-49 [cit. 2025-11-04]. ISSN 0924-2244. Dostupné z: doi:10.1016/0924-2244(94)90070-
- [10] KALAČ, Pavel, A.R. KRAUSOVÁ, E. THEOBALD, B. SPIEGELHALDER a R. PREUSSMANN, 2005. Pharmacologically-Active Amines in Some Marine Algae and Algal Food Products. *Food Chemistry* [online]. Elsevier BV, **90**(1-2), 77-82 [cit. 2025-11-12]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2004.03.044
- [11] BARDÓCZ, Susan, George GRANT, David S. BROWN, Ann RALPH a Arpad PUSZTAI, 1993. Polyamines in food—implications for growth and health. *The Journal of Nutritional Biochemistry* [online]. Elsevier BV, **4**(2), 66-71 [cit. 2025-11-13]. ISSN 0955-2863. Dostupné z: doi:10.1016/0955-2863(93)90001-d

- [12] PFUNDSTEIN, B., A.R. TRICKER, E. THEOBALD, B. SPIEGELHALDER a R. PREUSSMANN, 1991. Mean daily intake of primary and secondary amines from foods and beverages in West Germany in 1989–1990. *Food and Chemical Toxicology* [online]. Elsevier BV, **29**(11), 733-739 [cit. 2025-11-12]. ISSN 0278-6915. Dostupné z: doi:10.1016/0278-6915(91)90181-6
- [13] BARWELL, Clive J, A.R. TRICKER, E. THEOBALD, B. SPIEGELHALDER a R. PREUSSMANN, 1993. Pharmacologically-Active Amines in Some Marine Algae and Algal Food Products. *Journal of Home* [online]. The Haworth Press, 1993-10-14, **1**(1), 77-82 [cit. 2025-11-12]. ISSN 1054-4682. Dostupné z: doi:10.1300/j280v01n01_04
- [14] BERISHA, K., H. BYTYÇI, Zs. MEDNYÁNSZKY, E. KISS a L. SIMON-SARKADI, 2021. Amino acid and biogenic amine composition of Busha cattle milk. *Acta Alimentaria* [online]. Akademiai Kiado Zrt, 2021-3-5, **50**(1), 144-152 [cit. 2025-11-15]. ISSN 0139-3006. Dostupné z: doi:10.1556/066.2020.00226
- [15] GLORIA, M BEATRIZ A, PATRICIA RL SARAIVA, JULIANA C S RIGUEIRA, SEBASTIÃO C C BRANDÃO a L. SIMON-SARKADI, 2010. Bioactive amines changes in raw and sterilised milk inoculated with *Pseudomonas fluorescens* stored at different temperatures. *International Journal of Dairy Technology* [online]. Wiley, 2010-10-3, **64**(1), 45-51 [cit. 2025-11-15]. ISSN 1364-727X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1471-0307.2010.00637.x
- [16] ROMAIN, N, G DANDRIFOSSE, F JEUSETTE, P FORGET a Arpad PUSZTAI, 1992. Polyamine Concentration in Rat Milk and Food, Human Milk, and Infant Formulas1. *Pediatric Research* [online]. Springer Science and Business Media, **32**(1), 58-63 [cit. 2025-11-13]. ISSN 0031-3998. Dostupné z: doi:10.1203/00006450-199207000-00011
- [17] RICE, S. L., R. R. EITENMILLER, P. E. KOEHLER a J.H.J. HUIS IN 'T VELD, 1976. Biologically Active Amines in Food: A Review. *Journal of Milk and Food Technology* [online]. International Association for Food Protection, 1976-5-1, **39**(5), 353-358 [cit. 2025-10-26]. ISSN 0022-2747. Dostupné z: doi:10.4315/0022-2747-39.5.353.
- [18] STRATTON, Jayne E.; HUTKINS, Rovert W. a TAYLOR, Steve L. Biogenic Amines in Cheese and other Fermented Foods: A Review. Online. *Journal of Food Protection*. 1991, roč. 54, č. 6, s. 460-470. ISSN 0362-028X. Dostupné z: <https://doi.org/10.4315/0362-028x-54.6.460>. [cit. 2025-11-18].
- [19] SUMNER, S S; SPECKHARD, M W; SOMERS, E B a TAYLOR, S L. Isolation of histamine-producing *Lactobacillus buchneri* from Swiss cheese implicated in a food poisoning outbreak. Online. *Applied and Environmental Microbiology*. 1985, roč. 50, č. 4, s. 1094-1096. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/aem.50.4.1094-1096.1985>. [cit. 2025-11-18].
- [20] TAYLOR, STEVE L.; LEATHERWOOD, MATTHEW; LIEBER, ELLEN R. a TAYLOR, S L. HISTAMINE IN SAUERKRAUT. Online. *Journal of Food Science*. 1978, roč. 43, č. 3, s. 1030-1030. ISSN 0022-1147. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1978.tb02481.x>. [cit. 2025-11-18].
- [21] FUKUSHIMA, D.; KOEHLER, P.E.; LIEBER, ELLEN R. a TAYLOR, S L. Soy proteins for foods centering around soy sauce and tofu. Online. *Journal of the American Oil*

- Chemists' Society*. 1981, roč. 58, č. 3Part2, s. 346-354. ISSN 0003-021X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/bf02582376>. [cit. 2025-11-18].
- [22] CHIN, K.-D. Henry; KOEHLER, P.E.; LIEBER, ELLEN R. a TAYLOR, S L. Effect of Salt Concentration and Incubation Temperature on Formation of Histamine, Phenethylamine, Tryptamine and Tyramine During Miso Fermentation. Online. *Journal of Food Protection*. 1986, roč. 49, č. 6, s. 423-427. ISSN 0362-028X. Dostupné z: <https://doi.org/10.4315/0362-028x-49.6.423>. [cit. 2025-11-18].
- [23] BUNČIĆ, S., Lj. PAUNOVIĆ, V. TEODOROVIĆ, D. RADIŠIĆ, G. VOJINOVIĆ, D. SMILJANIĆ a M. BALTIĆ, 1993. Effects of gluconodeltalactone and *Lactobacillus plantarum* on the production of histamine and tyramine in fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* [online]. Elsevier BV, **17**(4), 303-309 [cit. 2026-03-14]. ISSN 0168-1605. Dostupné z: [doi:10.1016/0168-1605\(93\)90200-z](https://doi.org/10.1016/0168-1605(93)90200-z)
- [24] MAIJALA, Riitta, Susanna EEROLA, V. TEODOROVIĆ, D. RADIŠIĆ, G. VOJINOVIĆ, D. SMILJANIĆ a M. BALTIĆ, 1993. Contaminant lactic acid bacteria of dry sausages produce histamine and tyramine. *Meat Science* [online]. Elsevier BV, **35**(3), 387-395 [cit. 2026-03-14]. ISSN 0309-1740. Dostupné z: [doi:10.1016/0309-1740\(93\)90043-h](https://doi.org/10.1016/0309-1740(93)90043-h)
- [25] BUTEAU, Carole; DITSCHAEVER, C. L.; ASHTON, G. C.; RADIŠIĆ, D.; VOJINOVIĆ, G. et al. A Study of the Biogenesis of Amines in a Villard Noir Wine. Online. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1984, roč. 35, č. 4, s. 228-236. ISSN 0002-9254. Dostupné z: <https://doi.org/10.5344/ajev.1984.35.4.228>. [cit. 2026-03-14].
- [26] LI, Hang, Guantian LI, Yunchen BI a Song LIU, 2024. Fermented Fish Products: Balancing Tradition and Innovation for Improved Quality. *Foods* [online]. MDPI, 2024-8-16, **13**(16) [cit. 2026-04-24]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: [doi:10.3390/foods13162565](https://doi.org/10.3390/foods13162565)
- [27] Nařízení Komise (EU) č. 1019/2013 ze dne 23. října 2013, kterým se mění příloha I nařízení (ES) č. 2073/2005, pokud jde o histamin v produktech rybolovu. In: *Úřední věstník Evropské unie*. 24.10.2013. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32013R1019>
- [28] HAKIMI, S., M.N. ISMAIL, M.N.A. AYUB a F. AHMAD, 2022. A review on fish sauce processing, free amino acids and peptides with sensory properties. *Food Research* [online]. Rynnye Lyan Resources, 2022-8-31, **6**(5), 33-47 [cit. 2026-04-22]. ISSN 2550-2166. Dostupné z: [doi:10.26656/fr.2017.6\(5\).562](https://doi.org/10.26656/fr.2017.6(5).562)
- [29] YONGSAWATDIGUL, J., S. RODTONG, N. RAKSAKULTHAI a F. AHMAD, 2007. Acceleration of Thai Fish Sauce Fermentation Using Proteinases and Bacterial Starter Cultures. *Journal of Food Science* [online]. Wiley, 2007-10-26, **72**(9), 33-47 [cit. 2026-04-22]. ISSN 0022-1147. Dostupné z: [doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00532.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00532.x)
- [30] MA, Xinxiu, Xue SANG, Congyang YAN, Yanan ZHANG, Jingran BI, Gongliang ZHANG, Hongshun HAO a Hongman HOU, 2022. Dynamics of Bacterial Composition and Association with Quality Formation and Biogenic Amines Accumulation during Fish Sauce Spontaneous Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. American Society for Microbiology, 2022-7-12, **88**(13), 33-47 [cit. 2026-04-22]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: [doi:10.1128/aem.00690-22](https://doi.org/10.1128/aem.00690-22)
- [31] ZHU, Wenhui, Hongwei LUAN, Ying BU, Jianrong LI, Xuepeng LI, Yuyu ZHANG, Hongshun HAO a Hongman HOU, 2021. Changes in taste substances during fermentation

- of fish sauce and the correlation with protease activity. *Food Research International* [online]. Elsevier BV, **144**(5), 110349 [cit. 2026-04-22]. ISSN 0963-9969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2021.110349
- [32] ZHAO, Cindy J., Andreas SCHIEBER, Michael G. GÄNZLE, Jianrong LI, Xuepeng LI, Yuyu ZHANG, Hongshun HAO a Hongman HOU, 2016. Formation of taste-active amino acids, amino acid derivatives and peptides in food fermentations – A review. *Food Research International* [online]. Elsevier BV, **89**(5), 39-47 [cit. 2026-04-22]. ISSN 0963-9969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2016.08.042
- [33] LI, Yan, Wenjing LI, Chunsheng LI, et al., 2023. Novel insight into flavor and quality formation in naturally fermented low-salt fish sauce based on microbial metabolism. *Food Research International* [online]. Elsevier BV, **166**(16), 112586 [cit. 2026-04-24]. ISSN 0963-9969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2023.112586
- [34] NOMA, Seiji, Lisa KOYANAGI, Shuhei KAWANO, et al., 2020. Application of Pressurized Carbon Dioxide during Salt-Reduced Sardine Fish Sauce Production. *Food Science and Technology Research* [online]. Japanese Society for Food Science and Technology, **26**(2), 195-204 [cit. 2026-04-24]. ISSN 1344-6606. Dostupné z: doi:10.3136/fstr.26.195
- [35] DAVISON, W., H. ZHANG, N. RAKSAKULTHAI, et al., 1994. In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. *Nature* [online]. Springer Science and Business Media, **367**(6463), 546-548 [cit. 2026-04-24]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/367546a0
- [36] DENNEY, Susan, John SHERWOOD a James LEYDEN, 1999. In situ measurements of labile Cu, Cd and Mn in river waters using DGT. *Science of The Total Environment* [online]. Elsevier BV, **239**(1-3), 71-80 [cit. 2026-04-24]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/s0048-9697(99)00304-6
- [37] ZHANG, Hao., William. DAVISON a James LEYDEN, 1995. Performance Characteristics of Diffusion Gradients in Thin Films for the in Situ Measurement of Trace Metals in Aqueous Solution. *Analytical Chemistry* [online]. American Chemical Society (ACS), 1995-10-1, **67**(19), 3391-3400 [cit. 2026-04-24]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac00115a005
- [38] DAVISON, William a Hao ZHANG, 2016. Principles of Measurements in Simple Solutions. *Diffusive Gradients in Thin-Films for Environmental Measurements* [online]. Cambridge University Press, 2016-7-31, 10-31 [cit. 2026-04-24]. Dostupné z: doi:10.1017/cbo9781316442654.003
- [39] DGT RESEARCH. *Loaded DGT passive samplers for deployment in solution* [online]. [cit. 2026-04-25]. Dostupné z: <https://www.dgtresearch.com/product-category/research/loaded-dgt-devices-for-deployment-in-solution-research/page/2/>
- [40] GAO, Yue, Chunyang ZHOU, Camille GAULIER, et al., 2019. Labile trace metal concentration measurements in marine environments: From coastal to open ocean areas. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. Elsevier BV, **116**(19), 92-101 [cit. 2026-04-24]. ISSN 0165-9936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2019.04.027
- [41] ZHANG, Hao, William DAVISON a William DAVISON, 2000. Direct In Situ Measurements of Labile Inorganic and Organically Bound Metal Species in Synthetic

- Solutions and Natural Waters Using Diffusive Gradients in Thin Films. *Analytical Chemistry* [online]. American Chemical Society (ACS), 2000-8-17, **72**(18), 4447-4457 [cit. 2026-04-25]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac0004097
- [42] ZHANG, Hao a William DAVISON, 1999. Diffusional characteristics of hydrogels used in DGT and DET techniques. *Analytica Chimica Acta* [online]. Elsevier BV, **398**(2-3), 329-340 [cit. 2026-04-25]. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:10.1016/s0003-2670(99)00458-4
- [43] REICHSTÄDTER, Marek. *Application of diffusive gradients in thin films technique in food- and environmental analysis*. Brno, 2020. Also available at: https://www.vutbr.cz/studenti/zav_prace/detail/129384. Doctoral Thesis. Joint PhD of Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Food Science and Biotechnology and Vrije Universiteit Brussel, Faculty of Sciences and Bioengineering Sciences, Analytical, Environmental and Geo- Chemistry. Supervisors Pavel Diviš and Yue Gao.
- [44] DIVIŠ, Pavel, Hana DOČEKALOVÁ a Veronika SMETKOVÁ, 2003. Hloubkové profily labilních kovových species v sedimentech a jejich in situ měření technikou difuzního gradientu v tenkém filmu. *Chemické listy* [online]. **97**(12), 1184-1189 [cit. 2026-04-25]. ISSN 0009-2770. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2003_12_1184-1189.pdf
- [45] FATIN-ROUGE, Nicolas; MILON, Antoine; BUFFLE, Jacques; GOULET, Richard R. a TESSIER, André. Diffusion and Partitioning of Solutes in Agarose Hydrogels: The Relative Influence of Electrostatic and Specific Interactions. Online. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2003, roč. 107, č. 44, s. 12126-12137. ISSN 1520-6106. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jp0303164>. [cit. 2026-04-25].
- [46] JIANG, Feng; XU, Xin-Wei; CHEN, Fu-Quan; WENG, Hui-Fen; CHEN, Jun et al. Extraction, Modification and Biomedical Application of Agarose Hydrogels: A Review. Online. *Marine Drugs*. 2023, roč. 21, č. 5, s. 299. ISSN 1660-3397. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/md21050299>. [cit. 2026-04-25].
- [47] ZHAO, Jing; MARCZYNSKI, Matthias; HENKEL, Manuel; LIELEG, Oliver; CHEN, Jun et al. Agarose-based hydrogels with tunable, charge-selective permeability properties. Online. *Journal of Applied Polymer Science*. 2023, roč. 140, č. 34, s. 299. ISSN 0021-8995. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/app.54303>. [cit. 2026-04-25].
- [48] RUSS, Natalie; ZIELBAUER, Birgitta I.; KOYNOV, Kaloian; VILGIS, Thomas A.; CHEN, Jun et al. Influence of Nongelling Hydrocolloids on the Gelation of Agarose. Online. *Biomacromolecules*. 2013, roč. 14, č. 11, s. 4116-4124. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/bm4012776>. [cit. 2026-04-25].
- [49] SACCO, Pasquale; PIAZZA, Francesco; MARSICH, Eleonora; ABRAMI, Michela; GRASSI, Mario et al. Ionic Strength Impacts the Physical Properties of Agarose Hydrogels. Online. *Gels*. 2024, roč. 10, č. 2, s. 94. ISSN 2310-2861. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/gels10020094>. [cit. 2026-04-25].
- [50] EISMANN, Carlos Eduardo; MENEGÁRIO, Amauri Antonio; GERALDO DE OLIVEIRA, Edson; ELIAS, Lucas Pellegrini; MARTINS VIANA, José Lucas et al. A simple, green and low-cost agarose-based binding layer for simultaneous determination of cations and anions

- in aquatic systems using DGT. Online. *Analytical Methods*. 2023, roč. 15, č. 27, s. 3310-3317. ISSN 1759-9660. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/d3ay00682d>. [cit. 2026-04-25].
- [51] CHALLIS, Jonathan K.; HANSON, Mark L.; WONG, Charles S.; ELIAS, Lucas Pellegrini; MARTINS VIANA, José Lucas et al. Development and Calibration of an Organic-Diffusive Gradients in Thin Films Aquatic Passive Sampler for a Diverse Suite of Polar Organic Contaminants. Online. *Analytical Chemistry*. 2016, roč. 88, č. 21, s. 10583-10591. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02749>. [cit. 2026-04-25].
- [52] JIANG, Feng; XU, Xin-Wei; CHEN, Fu-Quan; WENG, Hui-Fen; CHEN, Jun et al. Extraction, Modification and Biomedical Application of Agarose Hydrogels: A Review. Online. *Marine Drugs*. 2023, roč. 21, č. 5, s. 299. ISSN 1660-3397. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/md21050299>. [cit. 2026-04-25].)
- [53] ZHOU, Yanan; DAI, Xin; ZHANG, Jingyuan; GAO, ShuJuan a LU, Xu. Guide for application of macroporous adsorption resins in polysaccharides purification. Online. *EFood*. 2024, roč. 5, č. 1, s. 563-567. ISSN 2666-3066. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/efd2.130>. [cit. 2026-04-27].
- [54] AGBOOLA, Omowumi D. a Nsikak U. BENSON, 2021. Physisorption and Chemisorption Mechanisms Influencing Micro (Nano) Plastics-Organic Chemical Contaminants Interactions: A Review. *Frontiers in Environmental Science* [online]. Frontiers Media, 2021-5-28, **9** [cit. 2026-04-27]. ISSN 2296-665X. Dostupné z: doi:10.3389/fenvs.2021.678574
- [55] AHMAD, Akil, Jamal Akhter SIDDIQUE, Mohammad Asaduddin LASKAR, Rajeev KUMAR, Siti Hamidah MOHD-SETAPAR, Asma KHATOON a Rayees Ahmad SHIEKH, 2015. New generation Amberlite XAD resin for the removal of metal ions: A review. *Journal of Environmental Sciences* [online]. Elsevier BV, **31**, 104-123 [cit. 2026-04-27]. ISSN 1001-0742. Dostupné z: doi:10.1016/j.jes.2014.12.008
- [56] SIGMA-ALDRICH. *Product Information: AMBERLITE XAD POLYMERIC RESINS* [online]. Sigma-Aldrich [cit. 2026-04-27]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/413/889/xad16pis.pdf>
- [57] DUPONT. *DuPont™ AmberLite™ XAD™ 16N Polymeric Adsorbent Resins* [online]. DuPont, © 2020 [cit. 2026-04-27]. Dostupné z: <https://www.dupont.com/products/amberlitexad16n.html>
- [58] BENCHCHEM. *Amberlite XAD-16 Polymeric Adsorbent|RUO* [online]. BenchChem [cit. 2026-04-27]. Dostupné z: <https://www.benchchem.com/product/b1165960>
- [59] DE DARDEL, Francois a Thomas V. ARDEN, 2002. Ion Exchangers. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* [online]. Weinheim, Germany, 2002-1-15 [cit. 2026-04-27]. ISBN 3527306730. Dostupné z: doi:10.1002/14356007.a14_393
- [60] BENCHCHEM. *DOWEX(R) 50 WX8 | 11119-67-8* [online]. BenchChem [cit. 2026-04-28]. Dostupné z: <https://www.benchchem.com/product/b1175059>
- [61] THE DOW CHEMICAL COMPANY. *DOWEX™ 50WX8 50-100 mesh* [online]. Lenntech [cit. 2026-04-28]. Dostupné z: <https://www.lenntech.com/Data-sheets/Dowex-50-WX8-50-100-L.pdf>

- [62] UNIVERSITY OF CALIFORNIA, IRVINE. *Ion Exchange Resins* [online]. Irvine: Department of Chemistry, University of California, Irvine [cit. 2026-04-28]. Dostupné z: <https://www.chem.uci.edu/~unicorn/M3LC/handouts/AdditionalNotes/ionexchangeresins.pdf>
- [63] LAUER, Henk H. a ROZING, Gerard P. *High Performance Capillary Electrophoresis: A Primer*. Second completely revised edition. Agilent Technologies, 2014. Publication number: 5990-3777EN. s. 2.
- [64] TISELIUS, Arne, 1937. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Transactions of the Faraday Society* [online]. Royal Society of Chemistry (RSC), **33**, 524 [cit. 2026-04-26]. ISSN 0014-7672. Dostupné z: doi:10.1039/tf9373300524
- [65] JORGENSEN, James W. a Krynn DeArman. LUKACS, 1981. Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. *Analytical Chemistry* [online]. American Chemical Society (ACS), 1981-7-1, **53**(8), 1298-1302 [cit. 2026-04-26]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac00231a037
- [66] LAUER, Henk H. a ROZING, Gerard P. *High Performance Capillary Electrophoresis: A Primer*. Second completely revised edition. Agilent Technologies, 2014. Publication number: 5990-3777EN. s. 9.
- [67] LAUER, Henk H. a ROZING, Gerard P. *High Performance Capillary Electrophoresis: A Primer*. Second completely revised edition. Agilent Technologies, 2014. Publication number: 5990-3777EN. s. 118.
- [68] [ZEMANN, Andreas J., Erhard SCHNELL, Dietmar VOLGGER a Günther K. BONN, 1998. Contactless Conductivity Detection for Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry* [online]. American Chemical Society (ACS), 1998-2-1, **70**(3), 563-567 [cit. 2026-04-27]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac9707592]
- [69] PAWUL-GRUBA, Marzena, Tomasz KILJANEK, Anna MADEJSKA a Jacek OSEK, 2022. Development of a High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector (HPLC-DAD) Method for Determination of Biogenic Amines in Ripened Cheeses. *Molecules* [online]. Weinheim, Germany: MDPI, 2022-11-24, **27**(23), 8194 [cit. 2026-04-27]. ISBN 3527306730. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27238194
- [70] PAWUL-GRUBA, Marzena, Edyta DENIS, Tomasz KILJANEK a Jacek OSEK, 2025. Prevalence of Biogenic Amines and Their Relation to the Bacterial Content in Ripened Cheeses on the Retail Market in Poland. *Foods* [online]. Weinheim, Germany: MDPI, 2025-7-15, **14**(14), 2478 [cit. 2026-04-27]. ISBN 3527306730. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods14142478
- [71] SALIMOVA, Anna, Alexandra VASILIEVA, Evgeniy BELYAEV, Konstantin SAKHAROV a Sergey ANDREEV, 2025. A New Approach to the Determination of Biogenic Amines in Wine. *Molecules* [online]. Weinheim, Germany: MDPI, 2025-12-24, **31**(1), 71 [cit. 2026-04-27]. ISBN 3527306730. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules31010071
- [72] R., Stute, Petridis K., Steinhart H. a Biernoth G., 2002. Biogenic amines in fish and soy sauces. *European Food Research and Technology* [online]. Weinheim, Germany: Springer

- Science and Business Media, 2002-8-1, **215**(2), 101-107 [cit. 2026-04-27]. ISBN 3527306730. ISSN 1438-2377. Dostupné z: doi:10.1007/s00217-002-0509-y
- [73] CORTACERO-RAMÍREZ, Sonia, David ARRÁEZ-ROMÁN, Antonio SEGURA-CARRETERO a Alberto FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, 2007. Determination of biogenic amines in beers and brewing-process samples by capillary electrophoresis coupled to laser-induced fluorescence detection. *Food Chemistry* [online]. Weinheim, Germany: Elsevier BV, **100**(1), 383-389 [cit. 2026-04-27]. ISBN 3527306730. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2005.09.037
- [74] DANIEL, Daniela, Vagner Bezerra DOS SANTOS, Denis Tadeu Rajh VIDAL, Claudimir Lucio DO LAGO a Sergey ANDREEV, 2015. Determination of biogenic amines in beer and wine by capillary electrophoresis–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. Weinheim, Germany: Elsevier BV, **1416**(1), 121-128 [cit. 2026-04-27]. ISBN 3527306730. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2015.08.065
- [75] NGUYEN, Thi Anh Huong, Hasara Savindi RUPASINGHE, Quang Huy NGUYEN, et al., 2025. Quality control of fish sauce by simultaneous determination of histamine and tyramine with capillary electrophoresis and contactless conductivity detection. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. Weinheim, Germany: Elsevier BV, **138**(1), 106997 [cit. 2026-04-27]. ISBN 3527306730. ISSN 0889-1575. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2024.106997
- [76] GAVRYUSHENKO, Dmytro A., N. ATAMAS a Oleg K. MYRONENKO. *Structural-dynamic behavior of histamine in solution: the role of water models* [online]. 8. ledna 2026 [cit. 2026-04-28]. Preprint dostupný v archivu arXiv:2601.04874 [q-bio.BM]. Dostupné z: <https://doi.org/10.48550/arXiv.2601.04874>
- [77] GUBARTALLAH, Elbaleeq A., Ahmad MAKAHLEH, Joselito P. QUIRINO a Bahrudin SAAD, 2018. Determination of Biogenic Amines in Seawater Using Capillary Electrophoresis with Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection. *Molecules* [online]. MDPI, 2018-5-8, **23**(5), 1112 [cit. 2026-05-04]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23051112
- [78] WARNKEN, Kent W., Hao ZHANG, William DAVISON, et al., 2006. Accuracy of the Diffusive Gradients in Thin-Films Technique: Diffusive Boundary Layer and Effective Sampling Area Considerations. *Analytical Chemistry* [online]. Weinheim, Germany: American Chemical Society (ACS), 2006-5-3, **78**(11), 3780-3787 [cit. 2026-04-27]. ISBN 3527306730. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac060139d
- [79] SHIMADZU CORPORATION, 2014. *Analysis of Histamine and Tyramine Using Prominence Amino Acid Analysis System*. Application News, No. L463. Kyoto: Shimadzu Corporation, September 2014 [online]. [cit. 2026-05-002]. Dostupné na: https://www.shimadzu.com/an/sites/shimadzu.com.an/files/pim/pim_document_file/applications/application_note/10783/jpl214027.pdf