

Stanovení vybraných biogenních aminů metodou kapalinové chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí

Bc. Martin Beck

Diplomová práce
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Martin Beck**
Osobní číslo: **T12362**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Stanovení vybraných biogenních aminů metodou kapalinové chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí**

Zásady pro vypracování:

1. Zpracování literární rešerše výskytu biogenních aminů ve vodách (jejich produkce a degradace).
2. Výběr několika zástupců, pro které bude optimalizována metoda UPLC-MS/MS.
3. Aplikace metody při stanovení reálných vzorků.
4. Zpracování výsledků a jejich interpretace.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

Odborné vědecké články (web of science, PUBMED), odborná vědecká literatura.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Lucie Vydrová, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

10. února 2014

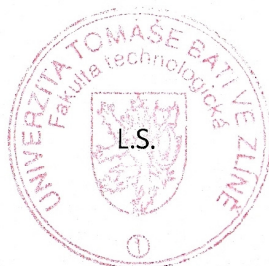
Termín odevzdání diplomové práce:

16. května 2014

Ve Zlíně dne 10. února 2014


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.

děkan




doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.

ředitel ústavu

Příjmení a jméno: BECK MARTIN

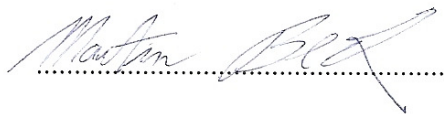
Obor: IOZP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 12.5.2014



¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá výběrem a optimalizací analytické metody vhodné pro stanovení vybraných biogenních aminů (putrescinu, histaminu, tyraminu a tryptaminu). V rámci optimalizace a validace metody byla prováděna měření, jak čistých standardů, tak standardů derivatizovaných dansylchloridem. Výsledkem těchto měření bylo zjištění, že derivatizovaná forma biogenních aminů je vhodnější pro stanovení metodou ultraúčinné kapalinové chromatografie (UPLC) ve spojení s hmotnostním spektrometrem (MS) jako detektorem.

Následně byla metoda kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostně-spektrometrickou detekcí využita ke stanovení sledovaných biologicky aktivních látek ve vzorcích sýru, který byl podroben skladovacímu experimentu. Získané výsledky byly zpracovány a interpretovány v rámci této diplomové práce.

Klíčová slova: biogenní aminy, ultraúčinná kapalinová chromatografie, tandemová hmotnostní spektrometrie, derivatizace, dansylchlorid

ABSTRACT

The aim of this thesis was selection and optimization of suitable analytical method for analysis of biogenic amines (putrescine, histamine, tyramine and tryptamine). The optimization and validation of this method were made by measurements of pure standards and derivatized standards with dansyl chloride. The result of these measurements was that the derivatized form of biogenic amines is more suitable for the analysis by ultra high performance liquid chromatography method (UPLC) in connection with tandem mass spectrometry (MS/MS).

Subsequently, the method UPLC-MS/MS was used to determine monitored biologically active compound in sample of cheese which has been subjected to the storage experiment. The results were processed and interpreted in this thesis.

Keywords: Biogenic amines, Ultra High Performance Liquid Chromatography, tandem mass spectrometry, derivatization, dansyl chloride

Poděkování:

Rád bych poděkoval vedoucímu mé diplomové práce Ing. Lucii Vydrové, Ph.D. za ochotu, čas a odborné vedení při zpracování této diplomové práce.

Rád bych poděkoval i Ing. Ludmile Zálešákové za přípravu vzorků a také ostatním pracovníkům Ústavu technologie potravin za pomoc.

Dále bych rád poděkoval rodině, kamarádům a spolužákům za motivaci a podporu při studiu.

Motto:

Aby člověk mohl žít čestně, musí se rvát, bít se, mýlit se, začínat a opět začínat, prohrávat a věčně zápasit. Tomu říkám charakter.

L. N. Tolstoj

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| ÚVOD | 9 |
| I TEORETICKÁ ČÁST | 10 |
| 1 BIOGENNÍ AMINY | 11 |
| 1.1 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ..... | 12 |
| 1.1.1 Vznik biogenních aminů aktivitou mikroorganismů..... | 12 |
| 1.2 VÝZNAM BIOGENNÍCH AMINŮ..... | 13 |
| 1.3 TOXIKOLOGIE BIOGENNÍCH AMINŮ | 13 |
| 1.3.1 Detoxikace biogenních aminů..... | 14 |
| 1.4 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ..... | 15 |
| 1.5 LIMITY BIOGENNÍCH AMINŮ..... | 17 |
| 2 ANALÝZA BIOGENNÍCH AMINŮ | 19 |
| 2.1 ÚPRAVA VZORKŮ PŘED ANALÝZOU | 19 |
| 2.2 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE | 21 |
| 2.2.1 Hmotnostní spektrometrie..... | 26 |
| II PRAKTICKÁ ČÁST | 33 |
| 3 CÍLE PRÁCE | 34 |
| 4 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE | 35 |
| 4.1 UPLC/MS/MS SYSTÉM PRO ANALÝZU..... | 35 |
| 4.2 SOFTWARE POUŽITÝ PRO ZPRACOVÁNÍ A PREZENTACI DAT | 35 |
| 4.3 CHEMIKÁLIE..... | 35 |
| 4.4 STANDARDY | 35 |
| 4.5 REÁLNÉ VZORKY | 36 |
| 5 VÝSLEDKY A DISKUZE | 37 |
| 5.1 OPTIMALIZACE HMOTNOSTNÍ DETEKCE PRO VYBRANÉ BIOGENNÍ AMINY | 37 |
| 5.2 OPTIMALIZACE UPLC–MS/MS..... | 47 |
| 5.2.1 Optimalizace teploty iontového zdroje | 47 |
| 5.2.2 Optimalizace teploty analytické kolony | 48 |
| 5.2.3 Optimalizace elučního gradientu..... | 49 |
| 5.2.3.1 Gradient A..... | 50 |
| 5.2.3.2 Gradient B..... | 50 |
| 5.2.3.3 Gradient C..... | 51 |
| 5.2.4 Volba vhodné mobilní fáze | 52 |
| 5.3 OPTIMALIZACE PODMÍNEK STANOVENÍ SMĚSI VYBRANÝCH BIOGENNÍCH AMINŮ | 53 |
| 5.4 ANALÝZA REÁLNÝCH VZORKŮ | 55 |
| 5.4.1 Kalibrace | 55 |
| 5.4.2 Analýza reálného vzorku..... | 57 |

| | |
|---|-----------|
| ZÁVĚR | 64 |
| SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 65 |
| SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK | 72 |
| SEZNAM TABULEK..... | 76 |
| SEZNAM PŘÍLOH..... | 77 |

ÚVOD

Poslední dobou je v souvislosti s životním prostředím kladen důraz na monitorování znečišťujících látek i ve velmi malých koncentracích. Mezi takové látky, které se mohou v životním prostředí běžně vyskytovat a jejich koncentrace je nízká, ale současně tyto látky mohou mít toxické účinky na člověka, patří některé biogenní aminy. Biogenní aminy vznikají činností různých mikroorganismů, které jsou schopny dekarboxylovat volné aminokyseliny na biogenní aminy. S tímto procesem se setkáváme často u potravin, avšak z potravin i jiných zdrojů biogenní aminy mohou přecházet do životního prostředí, kde by mohly narušovat funkci přírodních ekosystémů. Proto je důležité věnovat pozornost analytickým metodám, které jsou schopné detekovat biogenní aminy již ve velmi malých koncentracích, aby bylo možno přechod biogenních aminů do životního prostředí monitorovat.

Biogenní aminy se mohou podílet na metabolických procesech a vykazují různé biologické účinky. Pro člověka jsou některé biogenní aminy nepostradatelné, avšak ve zvýšených koncentracích se mohou stát jedem. V lidském těle jsou biogenní aminy metabolizovány, ale u některých biogenních aminů (polyaminy) může metabolizací docházet ke vzniku karcinogenních N-nitrosaminů.

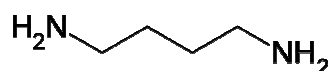
Pro stanovení biogenních aminů v různých maticích jsou vhodné různé analytické metody. Jednou z nejpoužívanějších je vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí. Dále je možno využít infračervenou spektroskopii nebo elektromigrační metody jako izotachoforéza a kapilární zónová elektroforéza. Lze však také využít také vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii ve spojení s hmotnostním spektrometrem jako detektorem (HPLC-MS/MS). Jedná se o univerzální a vysoce citlivou metodu.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOGENNÍ AMINY

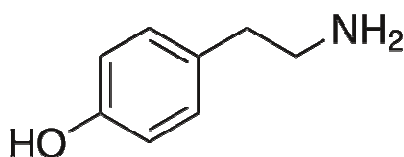
Biogenní aminy lze definovat jako nízkomolekulární dusíkaté látky, bazické povahy, odvozené od amoniaku, ve kterém mohou být vodíky nahrazeny jinou funkční skupinou (alkylovou, arylovou) [1, 2].

Podle chemické struktury dělíme biogenní aminy do několika skupin [1, 2, 3]. První skupinou jsou alifatické biogenní aminy. K zástupcům této skupiny se řadí putrescin, kadaverin, spermin a spermidin.



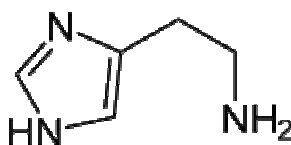
Obr. 1: Strukturální vzorec putrescinu

Další skupinou jsou aromatické biogenní aminy, do níž lze zařadit zástupce jako tyramin a 2-fenylethylamin.



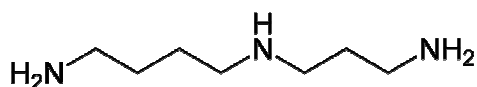
Obr. 2: Strukturální vzorec tyraminu

Třetí skupina nese označení heterocyklické biogenní aminy a mezi zástupce této skupiny patří histamin, tryptamin a serotonin.



Obr. 3: Strukturální vzorec histaminu

A poslední skupina polyaminy je zastupována biogenními aminy jako spermidin, spermin a putrescin.

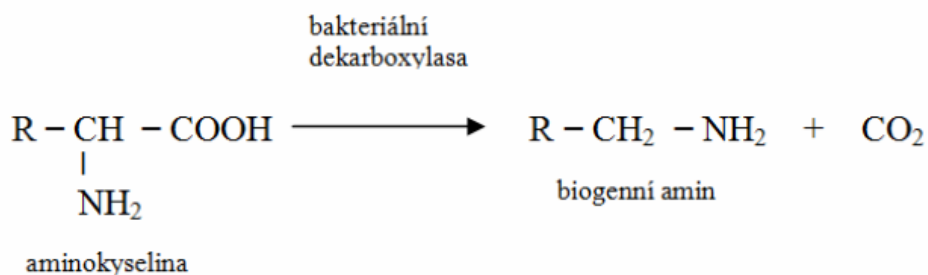


Obr. 4: Strukturální vzorec spermidinu

1.1 Vznik biogenních aminů

Biogenní aminy vznikají dekarboxylací aminokyselin, ke které dochází dvěma různými způsoby. Tím prvním je aktivita enzymů (dekarboxylas), které se vyskytují přirozeně v potravinách. Druhým a zároveň významnějším způsobem dekarboxylace je působení exogenních dekarboxylačních enzymů, které jsou produkovány některými mikroorganismy [4, 9, 11].

Decarboxylace probíhá tak, že se z aminokyseliny odbourá pomocí enzymu (dekarboxylasy) α - karboxylová skupina za vzniku příslušného aminu a oxidu uhličitého. Obecnou reakci dekarboxylace aminokyseliny je možno vidět na obrázku 5. Tímto mechanismem vzniká například histamin z aminokyseliny histidinu, tyramin z tyrosinu nebo kadaverin z lysinu [4].



Obr. 5: Dekarboxylace aminokyseliny na biogenní amin

Dalším, ale méně významným způsobem vzniku biogenních aminů je transaminace aldehydů a ketonů [4].

Pro vznik biogenních aminů je důležité, aby byly splněny následující podmínky[1,2]:

- dostupnost volných aminokyseliny v substrátu
- přítomnost mikroorganismů schopných aminokyseliny v substrátu dekarboxylovat
- optimální podmínky pro růst bakterií a aktivitu enzymů.

1.1.1 Vznik biogenních aminů aktivitou mikroorganismů

Ke vzniku biogenních aminů dekarboxylací aminokyselin dochází za určitých podmínek u široké škály mikroorganismů. Jsou to například rody *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseumonas*, *Shigella* a *Photobacterium* a

také bakterie mléčného kvašení, například *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Streptococcus*. Tyto mikroorganismy mohou dekarboxylovat jednu nebo více aminokyselin na příslušný biogenní amin. Mezi významné producenty biogenního aminu histaminu řadíme mikroorganismy jako *Morganella morgana*, některé kmeny *Klebsiella pneumoniae* a několik kmenů *Hafnia alvei* [2].

1.2 Význam biogenních aminů

I přesto, že se biogenní aminy vyskytují přirozeně v rostlinných pletivech a živočišných tkání, kde jsou potřebné pro celou řadu funkcí, ve vyšších koncentracích mohou být toxické [4].

Biogenní aminy mohou být využívány jako zdroj dusíku, ale své uplatnění nachází zejména jako prekurzory pro syntézu hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a bílkovin. Například vznik hormonu serotoninu z biogenního aminu tryptaminu [4].

Biogenní aminy mají velký význam i ve funkci lidského těla. Například histamin slouží jako lokální tkáňový hormon, který má vliv na krevní tlak. Také se může podílet na anafylaktickém šoku a alergických reakcích. Putrescin má za úkol stabilizaci nukleových kyselin, stabilizaci subcelulárních struktur (ribosomů). Mimo lidské tělo působí jako rostlinný hormon. Z funkcí tyraminu v lidském těle je možno zmínit jeho využití jako prekurzoru pro syntézu dopaminu, adrenalinu a nonadrenalinu a slouží také jako lokální tkáňový hormon. Dále má vliv na krevní tlak a na kontrakce hladkého svalstva. Biologickým významem biogenního aminu tryptaminu je vliv na krevní tlak, peristaltiku střev a psychiku člověka [4].

1.3 Toxikologie biogenních aminů

Za biogenní aminy, které mohou působit toxicky, můžeme považovat putrescin, kadaverin, tyramin, spermin, 2-fenylethylamin a histamin. K těm nejvíce toxickým patří aromatické biogenní aminy histamin a tyramin [2, 9]. Výskyt nadměrného množství biogenních aminů v organismu se může projevit například nevolností, dýchacími problémy, bušením srdce, nepravidelností tepu, zarudnutím kůže, otoky a bolestmi hlavy [4, 11].

Toxické účinky histaminu pro člověka spočívají v interakci s receptory na buněčné membráně. Tím histamin způsobí rozšíření periferních krevních cév, kapilár a tepen.

Dochází tak ke snížení krevního tlaku, které způsobuje závratě a bolest hlavy. Dále histamin vyskytující se ve střevním hladkém svalstvu způsobuje křeče v oblasti břišní dutiny, zvracení a průjem [3]. Histamin v lidském těle bývá také příčinou alergické a zánětlivé reakce. U alergických reakcí histamin zastává funkci antigenu, který síťuje molekuly protilátek. Po uvolnění histaminu do kůže dochází k jejímu rudnutí a tvorbě podlitin [1,10].

Jedním ze závažnějších důsledků toxického působení biogenních aminů je tzv. scombroid syndrom. K syndromu dochází po vstřebání histaminu z potravy v gastrointestinálním traktu. Nejčastěji spojované potraviny s tímto syndromem jsou ryby jako tuňák, makrela, treska a další z čeledi Scombridae a Scomberesocidae. Ve 100g rybího masa se nachází obvykle méně než 0,1 mg histaminu. Hranice koncentrace histaminu pro vyvolání scombroid syndromu se pohybuje okolo 20-100 mg histaminu ve 100g rybího masa. Mezi příznaky syndromu patří otok rtů nebo celého obličeje, průjem, bolesti hlavy, úzkost, poruchy zraku a mezi vážnější příznaky patří zvýšená tepová frekvence, vysoký nebo častěji nízký krevní tlak. Scombroid syndrom je možno léčit podáním antihistaminik a aktivního uhlí [1, 10].

1.3.1 Detoxikace biogenních aminů

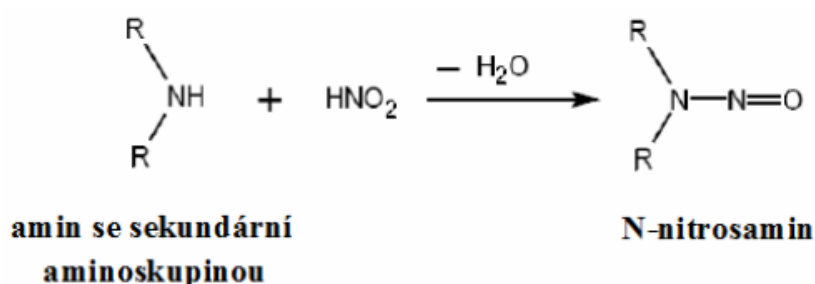
Po požití biogenních aminů v potravě dochází v lidském organismu k jejich detoxikaci. Prvním krokem toxikokinetiky je absorpce biogenních aminů ve střevech. Dále se pomocí vrátnicové žíly dostávají biogenní aminy do jater, kde jsou metabolizovány buď konjugací, nebo pomocí enzymů aminooxidas. V enzymatických reakcích se uplatňují zejména enzymy jako monoaminoxidasa, diaminoxidasa a též enzym histamin-*N*-methyltransferasa. Tyto enzymy působí katalyticky a způsobují deaminaci biogenních aminů za vzniku aldehydů, kyselin, amoniaku nebo peroxidu vodíku. V krvi se pak vyskytují jen tyto rozkladné produkty [1, 4].

Pokud je však příjem biogenních aminů v potravinách vysoký nebo člověk užívá léčiva inhibující detoxikační enzymy, může se stát, že tyto aminy nejsou kompletně detoxikovány, jejich koncentrace v krvi stoupá, a mohou se projevit jejich negativní účinky [4].

Negativní účinky biogenních aminů v organismu jsou ovlivňovány mnoha faktory. Významnou roli hraje snížená aktivita enzymů monoaminoxidasy a diaminoxidasy.

Snížení aktivity enzymů bývá způsobeno genetickou dispozicí jedince, některými léčivy (antidepresiva) nebo alkoholem [4].

Polyaminy (putrescin, spermidin a spermin) jsou řazeny mezi méně toxické biogenní aminy. Podléhají však stejným metabolickým procesům jako toxičtější biogenní aminy, to může vést ke změně metabolismu toxičtějších biogenních aminů. Další hrozbou u polyaminů se sekundární aminoskupinou (spermin, spermidin) je možný vznik N-nitrosaminů reakcí s kyselinou dusitou, který je naznačen na obrázku 6. K této reakci dochází při metabolických procesech v lidském těle [4, 10].



Obr. 6: Reakce biogenního aminu s kyselinou dusičnou za vzniku N-nitrosaminů

N-nitrosaminy jsou považovány za nebezpečné látky s karcinogenním účinkem [4, 6, 43].

Toxická účinnost biogenních aminů je stanovitelná velmi těžce. Závisí na individuálních parametrech každého organismu a na přítomnosti jiných výše zmíněných látek. Navrženy byly limitní hodnoty $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ u alkoholických nápojů. Prokázané toxické dávky u tyraminu byly $100\text{-}800 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a u fenylethylaminu $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ [1].

1.4 Výskyt biogenních aminů

Biogenní aminy se mohou vyskytovat všude tam, kde se vyskytují bílkoviny a jejich rozkladné produkty aminokyseliny rostlinného i živočišného původu. Z těchto aminokyselin pak zejména mikrobiální přeměnou vznikají biogenní aminy [4].

Výskyt biogenních aminů je sledován zejména v potravinách, které obsahují velké množství bílkovin, jako maso a masné výrobky. V masu se přirozeně vyskytují polyaminy spermin a spermidin. Ostatní biogenní aminy mohou v masu vznikat během jeho skladování. V takových případech se objevují biogenní aminy jako tyramin, kadaverin,

putrescin a histamin. Koncentrace těchto biogenních aminů může ve zkaženém masu dosahovat hodnot až $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [4, 51, 52].

U čerstvého rybího masa se vyskytují biogenní aminy jako histamin v koncentraci $0\text{-}10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a tyramin v koncentraci $0\text{-}2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Díky tomu, že rybí svalovina obsahuje velké množství aminokyseliny histidinu, je předpokládáno, že za přítomnosti mikroorganismů bude v rybí svalovině narůstat koncentrace biogenního aminu histaminu [4, 10, 42, 51].

Biogenní aminy se vyskytují také v mléce a mléčných výrobcích. Avšak u čerstvého mléka se koncentrace biogenních aminů pohybuje na velmi malé hodnotě okolo $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Kdežto u mléčných výrobků, u kterých proběhlo mléčné kvašení, se koncentrace biogenních aminů pohybuje na výrazně vyšších hodnotách. U jogurtů tyto hodnoty dosahují koncentrace $13 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a u zrajících sýrů $1000\text{-}2500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (koncentrace biogenních aminů jsou závislé na typu sýrů). V sýrech se stejně jako v rybím masu vyskytují nejvíce biogenní aminy histamin a tyramin [4, 47, 51].

Biogenní aminy se v nižších koncentracích vyskytují taky v ovoci a zelenině. Zde se vyskytují biogenní aminy jako tryptamin, tyramin a nonardenalin [4].

Ve výrobcích, u kterých bylo při výrobním procesu využito alkoholového kvašení, se někdy vyskytují zvýšené koncentrace některých biogenních aminů. Ke zvýšené produkci biogenních aminů dochází tehdy, když se při procesu alkoholového kvašení pomnoží nežádoucí mikroflóra produkující příslušné dekarboxylasy. U piva se objevují biogenní aminy jako např. tyramin, histamin a kadaverin, u vína pak histamin, tyramin a nejčastěji detekovaný putrescin. U vína červeného byly detekovány vyšší koncentrace biogenních aminů než u vína bílého [4, 39, 48, 49, 51].

Díky snadnému vzniku pomocí relativně běžných mikroorganismů ze substrátů živočišných a rostlinných původů a dále díky toxickým účinkům biogenní aminy představují zátěž pro životní prostředí. Proto se nabízí tyto látky monitorovat nejen v potravinách, ale i v celém životním prostředí, zejména v oblastech, které mohou mít dopad na lidské zdraví.

Jedním z cílů práce bylo také zhodnotit možnosti výskytu biogenních aminů ve vodách. V rámci zpracovávání literární rešerše byl ale zjištěn nedostatek odborných prací na toto téma. Biogenní aminy se mohou ve vodách vyskytovat, pokud

by mikroorganismy, mající dekarboxylasovou aktivitu, měly vhodné podmínky pro jejich tvorbu. Ve vodním prostředí povrchových vod působí mnoho faktorů, díky nimž je výskyt těchto biologicky aktivních látek minimalizován. Výskyt biogenních aminů v pitné vodě je vyloučen díky úpravám pitných vod, které neumožňují vytvoření podmínek pro růst patřičných mikroorganismů. Z tohoto důvodu není v České republice legislativa, která by stanovovala limitní hodnoty pro vybrané biogenní aminy.

V biologickém stupni čištění odpadních vod se mohou vyskytovat rody bakterií schopné produkovat biogenní aminy. Je však nutné brát v úvahu, že voda v biologickém stupni čištění obsahuje velké množství různých dusíkatých látek a metabolických produktů, které mohou mezi sebou navzájem interagovat. Proto nedochází k ovlivnění kvality vyčištěných vod, které jsou následně vypouštěny zpět do recipientu. Z tohoto důvodu nebylo dané téma více rozvíjeno.

1.5 Limity biogenních aminů

O limitní koncentraci biogenních aminů hovoří vyhláška 305/2004 Sb., která označuje druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné limity v potravinách vydaná Ministerstvem zdravotnictví. V příloze této vyhlášky je pak stanovena limitní hodnota pouze pro histamin v rybách a rybích výrobcích na hodnotu PM (přípustné množství) $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. U tohoto limitu je povoleno překročení o 100% u dvou vzorků z devíti [7].

Dále o limitních koncentracích biogenních aminů hovoří Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. Nařízení komise (ES) se stejně jako vyhláška 305/2004 Sb. zabývá pouze biogenním aminem histaminem v produktech z rybolovu. Ve směrnici jsou uvedeny limity, plán odběru vzorků a analytické metody pro stanovení histaminu u dvou kategorií potravin [8].

U první kategorie „Produkty rybolovu z druhů ryb spojovaných s vysokým množstvím histidinu“, do které patří druhy ryb čeledí Scombridae, Clupeidae, Engraulidae, Coryfenidae, Pomatomidae, Scombresosidae, je uveden plán vzorkování, ve kterém má být odebráno devět vzorků. Dva z těchto vzorků podle směrnice nesmí převyšovat limit $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ histaminu nebo nesmí ležet mezi hodnotami $100 - 200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ histaminu. Současně žádný z těchto vzorků nesmí obsahovat více jak $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ histaminu.

Směrnice dále určuje jako referenční analytickou metodu pro stanovení biogenních aminů vysokoúčinnou kapalinou chromatografií (HPLC) s UV-VIS nebo FLD detekcí [8].

U druhé kategorie zmíněné ve směrnici s názvem „Produkty rybolovu, které byly ošetřeny enzymatickým zráním v láku, vyrobené z druhů ryb, spojovaných s vysokým množstvím histidinu“ je uveden stejný plán vzorkování jako u předchozí skupiny. Limity koncentrace histaminu se však u této skupiny liší. Dva z devíti vzorků nesmí převyšovat limit $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ histaminu a nesmí ležet mezi $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a $400 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a žádný ze vzorků nesmí převyšovat koncentraci $400 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ histaminu. Jako referenční analytická metoda pro stanovení histaminu je jako v předchozím případě uvedena vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) [8].

2 ANALÝZA BIOGENNÍCH AMINŮ

Biogenní aminy lze stanovit širokou škálou analytických metod jako například vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s hmotnostně-spektrometrickým detektorem, infračervenou spektroskopií, plynovou chromatografií, tenkovrstvou chromatografií, kapilární zónovou elektroforézou, izotachoforézou a ninhydrinovou detekcí (AAA 400, Ingos, Praha). Následující kapitoly se zabývají prvními dvěma zmíněnými metodami [2, 3, 10, 11, 14-17, 32, 37, 52, 54, 55].

2.1 Úprava vzorků před analýzou

Biogenní aminy jsou sledovány zejména v různých typech potravin, popř. nápojů. Povaha matrice tedy určuje způsob odběru, úpravy a skladování vzorku před konečnou analýzou. Obecně lze říci, že při analýzách biogenních aminů v potravinách je nutné reprezentativně odebraný vzorek nejprve homogenizovat a potom provést následující kroky, jako je lyofilizace, vícenásobná extrakce, zakoncentrování a popř. derivatizace.

Jednou z potravin, ve které se sledují koncentrace biogenních aminů, jsou čerstvé ryby. Aby byla analýza důvěryhodná, je třeba dbát zejména na čerstvost vybraných ryb. Odebrané vzorky ryb se musejí uchovávat v ledu a během 1 až 6 hodin transportovat do laboratoře k analýze. Rybí svalovina musí být vyříznuta sterilním nožem, aby nedošlo k její kontaminaci. Reprezentativní rybí tkáň je následně rozřezána na malé kousky a homogenizována. K takto připravené suspenzi je přidáno extrakční činidlo (kyselina trichloroctová, kyselina chlorovodíková) a směs homogenizována mícháním nebo ultrazvukem. Následuje centrifugace, po které je supernatant dekantován. Zbytek sedimentu po centrifugaci je podroben vícenásobné extrakci s daným extrakčním činidlem. Spojené extrakty obsahující biogenní aminy jsou derivatizovány. Tím se rozumí převedení analyzované látky pomocí chemické reakce na látku s lepšími vlastnostmi pro stanovení. Tato úprava extraktu obsahující biogenní aminy se provádí pro zvýšení citlivosti metody nebo pro stanovení sledovaného analytu vybraným detektorem. Derivatizace může taktéž zvýšit rozlišení při separaci, popřípadě ji lze využít pro potlačení nežádoucí sorpce na analytické koloně [10, 13, 42, 43, 44].

Příkladem derivatizačního činidla pro biogenní aminy je dansylchlorid, který reaguje s primárními aminoskupinami biogenních aminů. Extrakt s extrakčním činidlem je

derivatizován přidáním hydrogenuhličitanu sodného, hydroxidu sodného a dansylchloridu (roztok dansylchloridu v acetonu). Roztok je míchán 45 minut při 45 °C ve tmě. Po té se nechá vychladnout na pokojovou teplotu a je přidán hydroxid amonný pro neutralizaci přebytečného dansylchloridu. Na závěr se do roztoku přidá aceton. Dalším derivatizačním činidlem biogenních aminů je benzoylchlorid, který je využíván zejména při stanovení polyaminů. Prvním krokem při derivatizaci benzoylchloridem je alkalizace extraktu přidáním roztoku hydroxidu sodného, poté je přidán benzoylchlorid (roztok benzoylchloridu v acetonitrilu) a vzorek je upraven sonikací. Přebytečný benzoylchlorid je odstraněn přidávkem roztoku chloridu sodného. Derivatizované polyaminy jsou dále extrahovány do diethyletheru, odpařeny v dusíkové atmosféře a zbytek po odpaření je rozpuštěn v methanolu. Následuje analýza vzorku pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem. Při stanovení biogenních aminů fluorescenčním detektorem se jako derivatizačního činidla využívá 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl karbamátu (AQC). [10, 13, 42, 43, 44].

Při sledování biogenních aminů v sýrech jsou vzorky homogenizovány a lyofilizovány s následnou extrakcí. V tomto případě bývá využíván roztok kyseliny chloristé (extrakční činidlo). Derivatizace může být provedena například dansylchloridem postupem zmíněným výše [9, 47].

U nápojů, které byly vyrobeny alkoholovým kvašením, jako například víno nebo pivo, postačí vzorky pro analýzu upravit pouze filtrací přes nylonový filtr (0,45 μm). Popřípadě u červeného vína, kde se vyskytují vyšší koncentrace biogenních aminů, je vzorek naředěn. Vzorky je možné i derivatizovat například dansylchloridem nebo pomocí CNBF (4-Chloro-3,5-dinitrobenzotrifluorid). První krok derivatizace pomocí CNBF spočívá v přidání $H_3BO_3-Na_2B_4O_7$ pufru (pH 9.5) k přefiltrovanému vzorku nápoje obsahující biogenní aminy. Dále je ke směsi přidán roztok CNBF v methanolu. Takto připravený roztok se nechá reagovat 30 minut při teplotě 60 °C. Poté se k roztoku přidá kyselina chlorovodíková, která zastaví derivatizační reakci. Na závěr se roztok přefiltruje.[41, 48, 49].

Biogenní aminy je možno stanovovat také v moči. Odebraný vzorek je nutno analyzovat do 24 hodin po odběru. Před analýzou se dané vzorky uchovávají při teplotě od -70 °C do -80 °C. Zde je třeba zabránit oxidaci katecholových skupin přidáním kyseliny trichloroctové. Poté je ke vzorku přidán 1-aminoheptan, který slouží jako vnitřní

standard. Vzorek moči se zcentrifuguje a supernatant je přefiltrován přes PTFE filtr (0,2 μm). Na závěr se vzorek ředí roztokem octanu amonného pro úpravu na vhodné pH (pH 4,0) [33, 53].

Biogenní aminy lze stanovovat i v majonézách a tatarských omáčkách. U takovýchto produktů je vzorek pro analýzu připraven následujícím způsobem. Ke vzorku se přidá kyselina trichloroctová a směs je ponechána den při 4 °C, aby došlo k oddělení fází. Následně se fáze obsahující kyselinu trichloroctovou a rozpuštěné biogenní aminy centrifuguje. Tento krok je vhodné opakovat 2x. K odstředěné fázi (s kyselinou trichloroctovou) je přidán nasycený vodný roztok Na_2CO_3 , acetonitril a dansylchlorid rozpuštěný v acetonu. Upravovaný vzorek se umístí do vodní lázně o teplotě 40 °C na jednu hodinu. Přebytný dansylchlorid je odstraněn roztokem glutamátu sodného. Směs se opět ponechá po dobu jedné hodiny v temperované vodní lázni (40 °C). Následuje ochlazení (20 °C), přidá se ethylester kyseliny octové a sledované analyty jsou extrahovány do organické fáze. Po extrakci je koncentrace upravena methanolem. Během celé úpravy vzorku je velmi důležité jeho důkladné promíchávání, a to ve všech krocích úpravy [45].

2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) patří mezi separační analytické metody. K rozdělení složek dochází tehdy, když je vzorek unášen mobilní fází analytickou kolonou. Podstatou separace je distribuce složek směsi mezi mobilní a stacionární fází. U kapalinové chromatografie je mobilní fází kapalina, která protéká kolonou obsahující stacionární nepohyblivou fází. Za distribuci složek mezi mobilní a stacionární fází jsou zodpovědné fyzikální a chemické pochody (například adsorpce, iontová výměna a chemická afinita), které působí mezi rozpuštěnými látkami a oběma fázemi. Výsledkem působení těchto pochodů je rozdělení jednotlivých složek vzorku při průchodu kolonou. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je využívána na stanovení netěkavých nebo málo těkavých látek. Dále nachází využití pro analýzu termicky méně stabilních látek a může být využita ke stanovení jak polárních, tak i nepolárních látek. Tuto analytickou metodu lze využít ke stanovení biogenních aminů [12, 13, 21, 46].

Při vysokoúčinné kapalinové chromatografii jsou zaznamenávány retenční charakteristiky jako retenční čas t_R . Retenční čas t_R je doba od nástřiku vzorku

do zaznamenání eluční křivky detektorem. t_R vypovídá a kvalitativním charakteru látky a lze jej vyjádřit podle vztahu (1) [13, 21].

$$t_R = t_M + t'_{R,i} \text{ [min]} \quad (1)$$

Kde je t_m mrtvý retenční čas a t'_R redukovaný retenční čas.

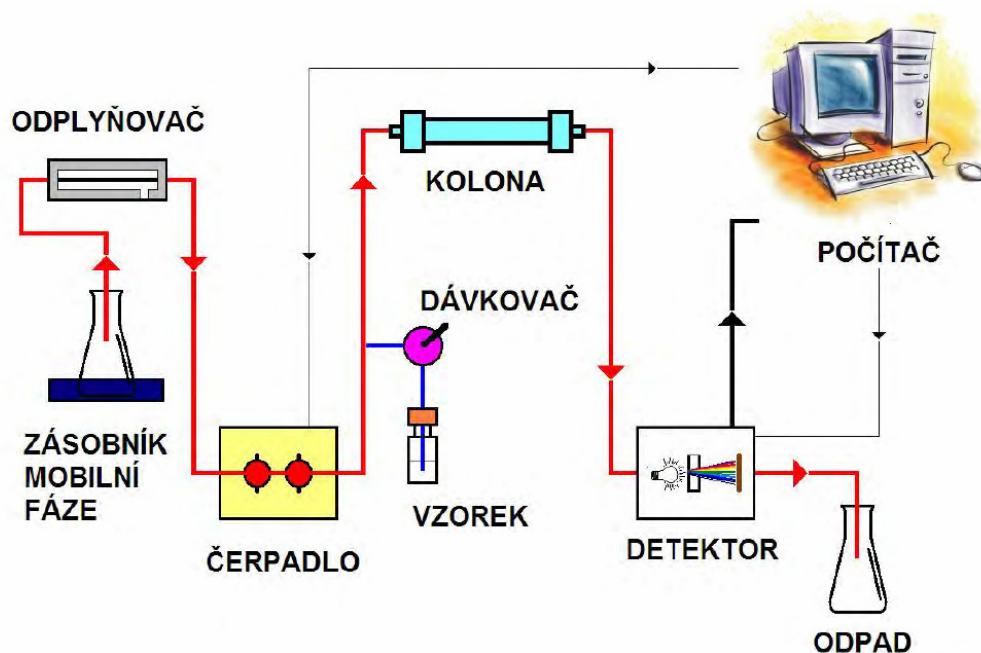
Míru separace dvou různých látek lze v chromatografickém systému vyjádřit rozlišením $R_{1,2}$. Rozlišení lze vyjádřit vztahem (2) [13, 21].

$$R_{1,2} = 2 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_1 - w_2} \quad (2)$$

Cílem separace je rozdělit dvě látky co nejlépe v přijatelné době trvání analýzy. Není tedy nutné dosáhnout co největšího rozlišení, ale v mnoha případech postačí rozlišení $R_{1,2} = 1,5$, kdy dochází k překrytí dvou sousedních peaků z 0,1%.

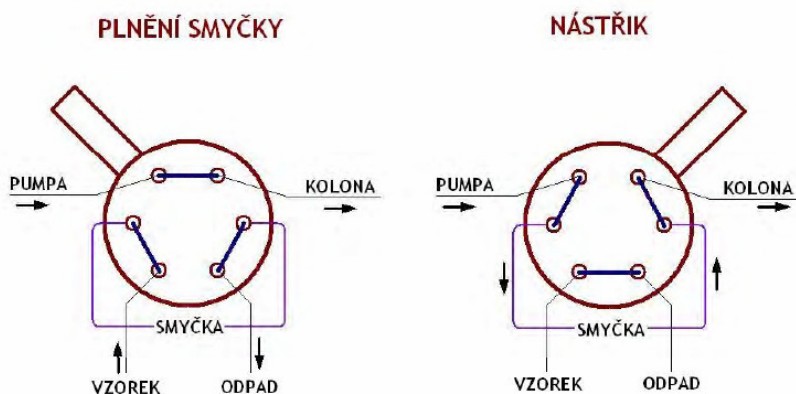
Rozlišení lze zvětšit zvýšením selektivity, kapacity nebo účinnosti kolony. Účinnost je ovlivněna délkou kolony, rychlostí mobilní fáze, velikostí sorbetu nebo změnou teploty. Faktor selektivity je možno ovlivnit změnou stacionární a mobilní fáze nebo změnou rychlosti průtoku mobilní fáze. Množství stacionární fáze v koloně, změna stacionární nebo mobilní fáze, gradientová eluce popř. změna teploty ovlivňuje kapacitní faktor [13, 21].

Kapalinový chromatograf je složen ze zásobníků mobilní fáze, směšovacího zařízení, degaserem, čerpadlem, dávkovacím zařízením, kolonou a detektorem (viz obrázek 7). Mobilní fáze je při stanovení biogenních aminů nejčastěji kyselina mravenčí, kyselina octová methanol, acetonitril a voda. Mobilní fáze je čerpána do směšovacího zařízení, které umožňuje měnit poměr rozpouštědel v průběhu analýzy, pak mluvíme o gradientové eluci, a pokud poměr rozpouštědel zůstává stejný po celou dobu analýzy, jedná se o eluci isokratickou. Výhodou gradientové eluce je lepší rozlišení peaků. Konstantní průtok mobilní fáze je zajištěn čerpadlem mobilní fáze. Toto čerpadlo pracuje při tlacích až 40 MPa a musí být z inertního materiálu. Nejčastěji používaná čerpadla jsou pístová nebo membránová [10, 12, 13, 21, 22, 33].



Obr. 7: Schéma kapalinového chromatografu [22]

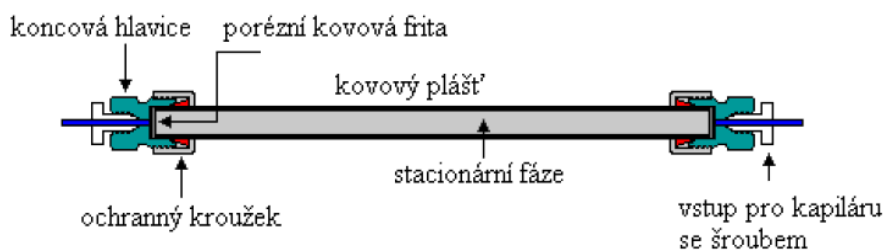
Dávkování vzorku do kapalinového chromatografu probíhá v injektoru. Vzorek je možno dávkovat pomocí šesticestného kohoutu (viz obrázek 8) nebo pomocí automatických dávkovačů [12, 22].



Obr. 8: Šesticestný dávkovací kohout [22]

Vzorek společně s mobilní fází pak prochází analytickou kolonou, již může předcházet předkolona. Tato obsahuje stejnou stacionární fází jako kolona a zabraňuje vnikání mechanických nečistot a látek, které se ireverzibilně vážou na danou stacionární fází. Předkolona prodlužuje životnost kolony. Kolony používané v HPLC (UPLC) se liší délkou, průměrem a velikostí částic. Tělo kolony musí být z inertního materiálu (nerez,

sklo nebo kompozit). Kolony by měly být odolné velkým tlakům a vnitřní povrch pláště kolony musí být dostatečně hladký. Stacionární fáze jsou polární sorbenty (silikagel, alumina, stacionární fáze chemicky zakotvené na inertním nosiči) či nepolární sorbety (chemicky vázané fáze). Velikost částic se pohybuje nejčastěji od 1,0 μm až po 5,0 μm a vnitřní průměr kolony se pohybuje v rozmezí od 2,1 mm po 5,0 mm. Pro stanovení biogenních aminů se používají nejčastěji kolony obsahující hydrofobní oktadecylové (C18) řetězce, případně modifikované oktadecylové (C18) řetězce o velikosti částic 1,7 μm až 5 μm . Mezi analytické kolony, na kterých mohou být vybrané biogenní aminy separovány, patří například: Synergi Hydro (250 \times 4,0 mm, 5 μm), Phenomenex; Acclaim Mixed Mode WCX (150 \times 2,1 mm, 3 μm) Dionex, kolona ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 (2,1 \times 150 mm, 1,7 μm) Waters a další. Schématické znázornění analytické kolony je zobrazeno na obrázku 9 [10, 11, 13, 21, 22, 33-36, 46, 50, 51].



Obr. 9: Schématické znázornění kolony pro HPLC [23]

Základní typy chromatografických systémů dělíme na systémy s použitím normální fáze a systémy s použitím reverzní fáze.

Chromatografie na normálních fázích je založena na adsorpci a desorpci analytů na polárnějších stacionárních fázích s použitím méně polární mobilní fáze. Stacionární fáze u chromatografie na normální fázi bývá silikagel chemicky modifikovaný polárními skupinami. Jako modifikátory jsou zde použity například propinaminové, kyanpropylové, diolové, hydroxylové nebo silanové skupiny. Dále se jako stacionární fáze využívá samotný silikagel nebo oxid hlinitý (alumina), který se uplatňuje v separaci nenasycených, nasycených a polyaromatických uhlovodíků. Chromatografie na normálních fázích se využívá k separaci polárních látek. Jako mobilní fáze se zde využívá organických rozpouštědel jako hexan, propanol a ethylether. Dnes je využívána spíše výjimečně [21, 24].

Běžně využívaným způsobem je chromatografie na reverzních neboli obrácených fázích, kde mobilní fáze je polárnější než stacionární fáze. Stacionární fáze bývá tvořena chemicky upravenými nosiči vyrobenými z oxidu křemičitého nebo porézního grafitu. Nejčastěji se ale používá chemicky upravený silikagel, na který jsou navázány hydrofobní oktadecylové (C18) a oktanové (C8) řetězce. Jako mobilní fáze se využívá směs vody a organických rozpouštědel, jako například acetonitril, methanol nebo tetrahydrofuran. Tímto způsobem je možno separovat silně nepolární, středně polární a polární látky [18, 21, 24, 40, 46].

K detekci separovaných analytů, unášených mobilní fází, se používají různé druhy detektorů, například hmotnostní detektor, fotometrický detektor, fluorescenční detektor, refraktometrický detektor, vodivostní detektor a elektrochemický detektor [21, 24].

Biogenní aminy stanovené pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie se nejčastěji detekují pomocí: hmotnostně-spektrometrického detektoru, dále spektrofotometrického detektoru v oblasti UV-VIS nebo je možné pro analýzu biogenních aminů využít fluorimetrický detektor [15, 25, 26, 40].

Mezi nejpoužívanější detektory ve spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií patří spektrofotometrický detektor v oblasti UV-VIS. Princip tohoto detektoru je založen na interpretaci změn, které nastávají v molekulách při absorpci záření v rozmezí vlnových délek od 190 do 800 nm. K vyhodnocení velikosti absorpce slouží fotonásobič nebo detektor diodového pole [12, 21, 24, 32, 41].

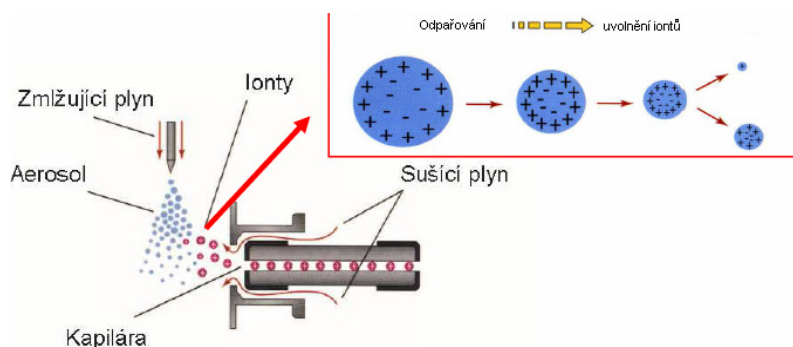
Fluorimetrický detektor patří mezi velmi selektivní a citlivé detektory. Poskytuje odezvu pouze pro látky vykazující fluorescenci. Při analýze biogenních aminů je třeba pro tuto metodu derivatizace. Detekovaná látka v cele detektoru absorbuje ultrafialové budící (excitační) záření, jehož pohlcená energie se zčásti vyzáří (emituje) ve formě fluorescenčního záření o nižší energii (vyšší vlnové délce) než má excitační záření. Emitované záření dopadá na fotoelektrický násobič, který poskytuje proud úměrný toku emitovaného fluorescenčního záření a koncentraci detekované látky v cele detektoru [10, 24, 26, 42, 44].

2.2.1 Hmotnostní spektrometrie

Jedná se o analytickou metodu, ve které dochází k separaci molekulových iontů a fragmentů analyzované látky, které vznikly ionizací molekul. K separaci dochází vlivem rozdílné efektivní hmotnosti ionizovaných částic, kterou značíme m/z , kde m je hmotnost a z náboj fragmentu. Hmotnostní spektrometry pracují ve čtyřech základních krocích. Nejprve je třeba převést vzorek do plynného stavu. Dalším krokem je ionizace molekul vzorku v plynné fázi. Dále hmotnostní spektrometr rozdělí ionty podle efektivní hmotnosti m/z . Na závěr jsou jednotlivé ionty detekovány [27].

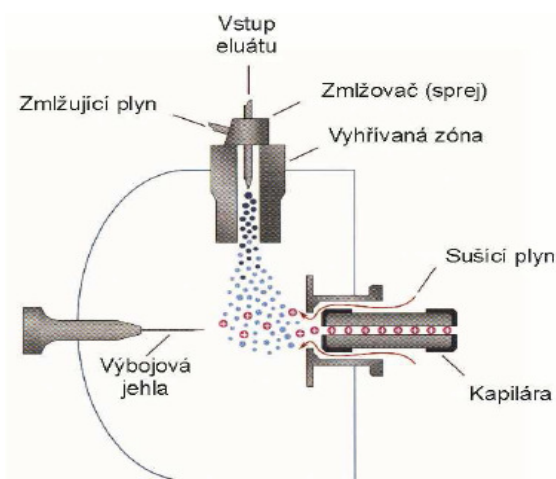
První dva kroky v hmotnostním spektrometru zajišťuje iontový zdroj. Jeho úkolem je převést analyt do plynné fáze a ionizovat, případně fragmentovat molekuly analytu. Metod ionizace vzorku existuje celá řada a volba konkrétní metody se odvíjí od vlastností látky jako je její těkavost, tepelná stabilita nebo molekulová hmotnost. Mezi metody ionizace, které se používají ve spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostního spektrometru, jsou ionizace elektrosprejem, chemická ionizace za atmosférického tlaku a fotoionizace za atmosférického tlaku. Pro analýzu biogenních aminů je možno použít všechny tři výše zmíněné ionizační techniky, avšak nejvíce se používá ionizace elektrosprejem pro její šetrnost a cenovou dostupnost [11, 27, 28].

Ionizace elektrosprejem je velmi šetrná ionizační technika. K fragmentaci iontů při tomto typu ionizace dochází jen málo. Metoda je také vhodná pro peptidy, proteiny, sacharidy a nukleové kyseliny. Princip metody spočívá ve vedení rozpuštěného analytu kovovou kapilárou, na kterou je vloženo napětí až 5 kV. U ústí kapiláry vznikají pomocí zmlžujícího plynu rozprášené kapky analytu, které nesou na svém povrchu velké množství nábojů. Po odpaření rozpouštědla dochází k zvětšení hustoty povrchového náboje na analytu. Při dosažení kritické hodnoty dochází k rozpadu na ještě menší kapičky. Při rozpadu dochází i k rozdělení původních nábojů. Tento jev se nazývá Coulombická exploze. Tento proces se opakuje a vede až k uvolnění iontů analytu. Poté dochází k transportu vzniklých iontů analytu z oblasti atmosférického tlaku, kde dochází k ionizaci, do oblasti vakua a hmotnostního analyzátoru. Schéma ionizace elektrosprejem je zobrazeno na obrázku 10 [28].



Obr. 10: Ionizace elektrosprejem [28]

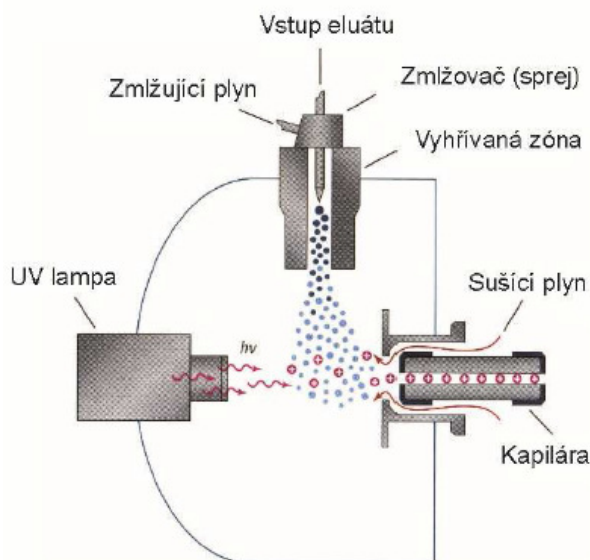
Další ionizační technikou, kterou lze využít ve spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a hmotnostním spektrometrem, je chemická ionizace za atmosférického tlaku. Jedná se o mírně tvrdší ionizační techniku ve srovnání s ionizací elektrosprejem. Proces chemické ionizace za atmosférického tlaku probíhá tak, že eluát je na konci kapiláry zmlžen do vyhřívané zóny. Na výbojovou jehlu je vloženo vysoké napětí (3-4 kV), čímž vzniká koronový výboj. Tento výboj ionizuje molekuly mobilní fáze, které jsou ve velkém přebytku. Ionizované molekuly mobilní fáze následně ion-molekulárními reakcemi ionizují molekuly analytu. Vzniklé ionty jsou následně usměrněny elektrodami do analyzátoru. Protiproud sušícího plynu (dusík) slouží k rozbití případných nekovalentních klastrů. Schéma chemické ionizace za atmosférického tlaku je znázorněno na obrázku 11 [28, 38].



Obr. 11: Chemická ionizace za atmosférického tlaku [28]

Třetí ionizační technikou, kterou lze využít ve spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostního detektoru, je fotoionizace za atmosférického tlaku. Jako zdroj UV záření pro ionizaci se zde využívá kryptonová výbojka s energií fotonů 10 eV.

Tato energie postačí k ionizaci nepolárních organických molekul analytu, ale není dost velká, aby došlo k ionizaci mobilní fáze (metanol, acetonitril, voda) nebo vzdušného kyslíku. Dochází tak k selektivní ionizaci analytu a mobilní fáze ionizována není. Fotoionizace za atmosférického tlaku lze využít pro ionizaci velmi nepolárních nebo labilních sloučenin a její schéma je zobrazeno na obrázku 12 [28].

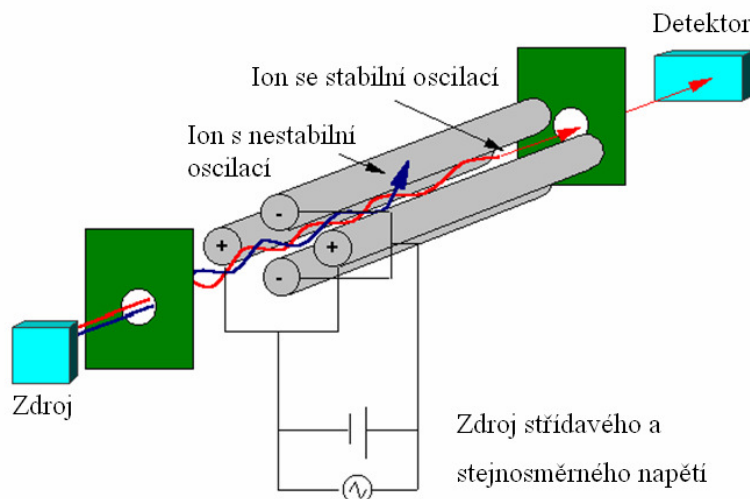


Obr. 12: Fotoionizace za atmosférického tlaku [28]

Dalším krokem analýzy je rozdělení iontů podle efektivních hmotností (poměr m/z) v hmotnostním analyzátoru. Hmotnostní analyzátor pracuje vždy za vysokého vakua. K separaci iontů dochází na základě různých fyzikálních principů. Často používané hmotnostní analyzátoři při stanovování biogenních aminů ve spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií jsou kvadrupóly, iontové pasti a analyzátoři doby letu (TOF – Time Of Flight) [29].

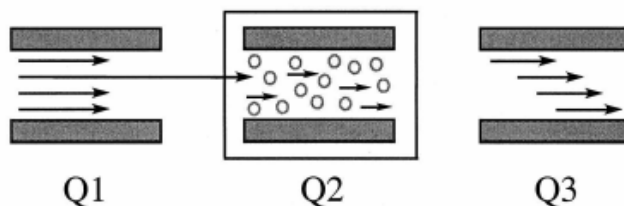
Kvadrupólový hmotnostní analyzátor je oblíbený pro svou jednoduchost a nízké pořizovací náklady. Dá se využít jak ve spojení s plynovou, tak i kapalinovou chromatografií. Kvadrupólový hmotnostní analyzátor pracuje tak, že na čtyři stejné kovové tyče je vloženo vysokofrekvenční napětí. Na dvě protilehlé tyče je vloženo kladné stejnosměrné napětí a na zbývající dvě je vloženo záporné stejnosměrné napětí. Analyzovaný ion je přiveden do středu osy kvadrupólu a začne oscilovat. V daný časový okamžik pro určitý poměr amplitudy V a napětí U jsou oscilace stabilní pouze pro ion s určitou hodnotou m/z , který proletí kvadrupólem a dostane se na detektor, všechny ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Plynulou změnou hodnot stejnosměrného

napětí U a amplitudy V jsou postupně propouštěny na detektor všechny ionty. Kvadrupólový hmotnostní analyzátor je tedy možno považovat za hmotnostní filtr. Princip funkce kvadrupólu je znázorněn na obrázku 13 [29, 30].



Obr. 13: Kvadrupólový hmotnostní analyzátor [30]

Při kvantitativní analýze se dá využít trojitého kvadrupólu. Jedná se tandemovou MS/MS analýzu, při které jsou spojené tři kvadrupóly za sebou. Střední kvadrupól Q2 slouží jako kolizní cela se zavedeným kolizním plynem, který způsobuje kolizní excitaci vybraných iontů kvadrupólovým analyzátozem Q1 a jejich následnou fragmentaci. Vzniklé fragmenty jsou analyzovány pomocí Q3. Znázornění funkce trojitého kvadrupólu je zobrazeno na obrázku 14 [29].

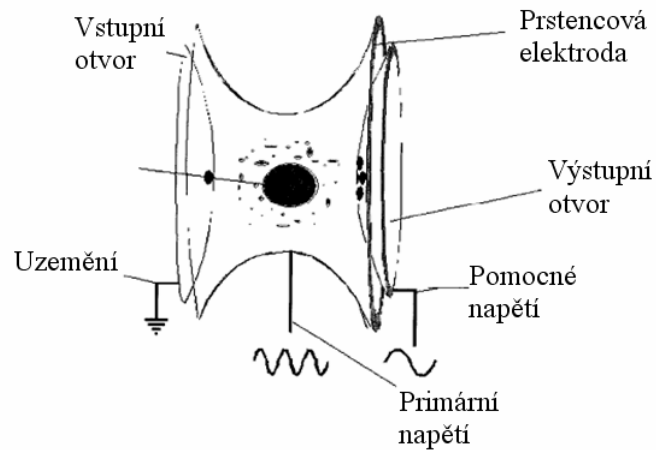


Obr. 14: Názorné schéma funkce trojitého kvadrupólu

Dále kvadrupólový analyzátor nachází uplatnění jako součást hybridních hmotnostních spektrometrů, kde má funkci filtru pro výběr požadovaného iontu [29, 53].

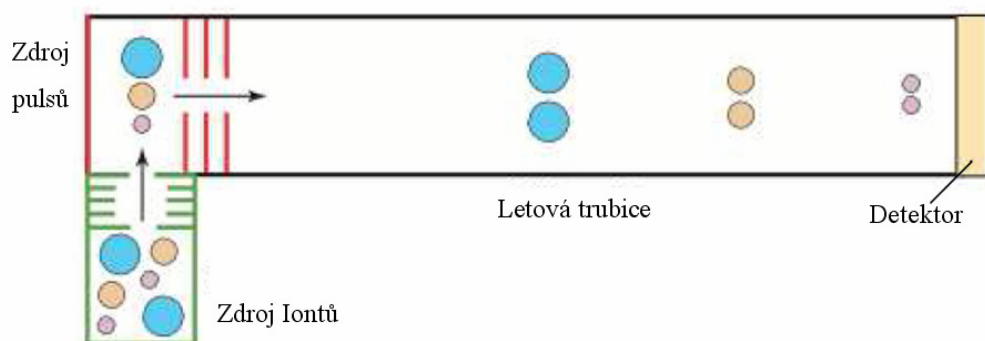
3D Iontová past se skládá se z prstencové elektrody a dvou koncových elektrod. Na tyto elektrody je vloženo napětí, jedná se tedy o trojrozměrnou verzi kvadrupólu. Do iontové pasti jsou krátkým napěťovým pulzem přivedeny analyzované ionty. Vhodnými

poměry napětí vloženého na kruhovou a dvě koncové elektrody jsou ionty zadrženy uvnitř pasti. Při změně napětí jsou ionty podle m/z z iontové pasti vypuzovány výstupním otvorem na detektor. Schéma 3D iontové pasti je zobrazeno na obrázku 15 [29].



Obr. 15: Schéma 3D iontové pasti [29]

Analyzátor doby letu měří dobu letu iontů potřebnou pro překonání určité dráhy. Analyzované ionty jsou urychleny napěťovým pulsem do letové trubice. Ionty pak letí takovou rychlostí, která odpovídá jejich poměru m/z . Ionty poté dopadají na detektor v různém čase. Ionty, které mají menší hodnotu m/z , se o stejné kinetické energii pohybují rychleji, dostanou se tedy dříve na detektor. Čas od urychlení iontu pulsem po dopadu na detektor se pohybuje řádově v ns až μ s. Princip funkce hmotnostního analyzátoru doby letu je znázorněn na obrázku 16 [29, 43, 50].



Obr. 16: Hmotnostní analyzátor doby letu (TOF) [29]

Tab. 1: Srovnání hmotnostních analyzátorů: kvadrupólu (Q), iontové pasti (IT) a analyzátoru doby letu (TOF) [29]

| Hmotnostní analyzátor | Rozlišovací schopnost [$\cdot 10^3$] | Správnost [ppm] | m/z rozsah (horní limit) [$\cdot 10^3$] | Rychlost [Hz] | Lineární dynamický rozsah | Cena |
|-----------------------|--|-----------------|---|---------------|---------------------------|---------|
| Q | 3 – 5 | nízká | 2 – 3 | 2 – 10 | $10^5 - 10^6$ | nízká |
| IT | 4 – 20 | nízká | 4 – 6 | 2 – 10 | $10^4 - 10^5$ | střední |
| TOF | 10 – 60 | 1 – 5 | 10 – 20 | 10 – 50 | $10^4 - 10^5$ | střední |

Pro analýzu biogenních aminů se nabízí použít tandemový hmotnostní analyzátor (MS/MS) s trojitým kvadrupólem (QqQ), na kterém je možno analyzovat biogenní aminy jako kadaverin, histamin, fenylethylamin, putrescin, spermin, spermidin, tyramin a tryptamin [10].

Poslední součástí hmotnostního spektrometru je detektor, který poskytuje analogový signál úměrný počtu dopadajících iontů. Detektory dělíme do dvou základních skupin. Do první skupiny patří detektory pro přímá měření jako Faradayova klec nebo fotografická deska. Tyto detektory se v současné době nevyužívají. Do druhé skupiny patří detektory násobičové, které jsou velmi často využívány. Násobičové detektory využívají efekt násobení elektronů uvolněných z první konverzní dynody po dopadu iontů. Jejich citlivost je velmi vysoká, jsou schopny poskytnout signál i pro jednotlivé ionty. Mezi násobičové detektory patří elektronový násobič, elektronový násobič s polem a fotonásobič [31].

Pokud bychom chtěli srovnat jednotlivé hmotnostní analyzátoři, vhodným ukazatelem pro srovnání může být mez detekce (LOD – limit of detection) a mez stanovitelnosti (LOQ – limit of quantification). Mez detekce odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významě odlišný od šumu. Podle uzance se mez detekce vyjadřuje jako trojnásobek šumu základní linie. Zatímco mez stanovitelnosti odpovídá koncentraci, při které je přesnost stanovení taková, že dovoluje kvantitativní vyhodnocení a je vyjádřena jako desetinásobek šumu základní linie. Následující tabulka (tab. 2) zobrazuje srovnání LOD a LOQ u třech typů hmotnostních analyzátorů pro vybrané analyty [11, 33, 43].

Tab. 2: Srovnání hmotnostních analyzátorů podle meze detekce a stanovitelnosti.

| Autor | Typ hmotnostního analyzátoru | LOD | LOQ |
|--------------------------|--|---|---|
| Ran Liu [43] | Hybridní analyzátor kvadrupól – analyzátor doby letu | 0,02 ng·l ⁻¹ -PUT | 0,07 ng·l ⁻¹ -PUT |
| Yong Li [11] | Trojité kvadrupól | 0,24 μg·l ⁻¹ -TRYP 0,15 μg·l ⁻¹ -PUT 0,64 μg·l ⁻¹ -HIM 0,08 μg·l ⁻¹ -TYR | 0,94 μg·l ⁻¹ -TRYP 0,61 μg·l ⁻¹ -PUT 1,51 μg·l ⁻¹ -HIM 0,33 μg·l ⁻¹ -TYR |
| Fabio Gosetti [33] | Hybridní analyzátor QTrap (kvadrupól- iontová past) | 0,30 μg·l ⁻¹ -TRYP 0,8 μg·l ⁻¹ -PUT 1,40 μg·l ⁻¹ -HIM 0,80 μg·l ⁻¹ -TYR | 1,00 μg·l ⁻¹ -TRYP 2,8 μg·l ⁻¹ -PUT 4,80 μg·l ⁻¹ -HIM 2,50 μg·l ⁻¹ -TYR |

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo:

- Zpracování literární rešerše výskytu a analýzy biogenních aminů
- Optimalizace a validace metody UPLC-MS/MS pro biogenní aminy histamin (HIM), putrescin (PUT), tyramin (TYR) a tryptamin (TRYP).
- Analýza reálných vzorků a jejich vyhodnocení
- Zhodnocení výsledků a přínosu práce

4 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE

4.1 UPLC/MS/MS systém pro analýzu

Hmotnostní spektrometr API 2000 od firmy AB Sciex, USA

Kapalinový chromatograf Dionex ultimate 3000, Německo

Analytická kolona s předkolonou ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 (3 × 50 mm, 1,8 μm), Agilent Technologies, USA

4.2 Software použitý pro zpracování a prezentaci dat

Analyst® Software - AB Sciex, USA

Microsoft Office 2010 (Word, Excel)

4.3 Chemikálie

Kyselina chloristá 70-72% pro analýzu ACS,ISO,Reag. Ph Eur – Merck

Dansyl chloride BioReagent, suitable for amino acid labeling, powder and chunks, ≥99% (HPLC) - Sigma-Aldrich

Acetonitril CHROMASOLV® Plus, for HPLC, ≥99.9% - Sigma-Aldrich

Kyselina mravenčí CHROMASOLV® pro LC-MS, ≥98% - Sigma-Aldrich

4.4 Standardy

Histamin approx. 97% – Sigma-Aldrich

Tyramin 99% – Sigma-Aldrich

Putrescin ≥98% – Sigma-Aldrich

Tryptamin 98% – Sigma-Aldrich

1,7-diaminoheptan 99% – Sigma-Aldrich

4.5 Reálné vzorky

Derivatizace a úpravy reálných vzorků pro stanovení vybraných biogenních aminů před analýzou byly prováděny na ústavu Technologie Potravin.

Jako reálný vzorek byl použit sýr holandského typu. Jednalo se o sýr s nízkodohřívanou sýřeninou, ve kterém se obsah sušiny rovnal 50 %. Vzorkování bylo provedeno z celé hmoty sýra. Vzorky byly odebírány v různých časových intervalech, jednalo se o 3–měsíční skladovací experiment. První odběr proběhl 1. den po výrobě (po prokysání sýrů) označen 1A1S. Další odběr byl proveden 28. den značen 1A2S (po měsíci zrání). Třetí odběr proběhl 56. den značen 1A3S (po 2 měsících zrání) a poslední vzorek byl odebrán 84. den značen 1A4S (po třech měsících zrání).

Sýry zrály ve zrací komoře při 12 ± 2 °C, zabaleny byly do komerční smrštitelné folie.

Derivatizace putrescinu, histaminu, tryptaminu a tyraminu a úprava vzorku byla prováděna následujícím způsobem. 1 g rozmělněného vzorku po lyofilizaci byl několikastupňově extrahován 0,6 M HClO_4 . Z přefiltrovaného extraktu byl odpipetován 1 ml do derivatizační nádoby spolu se 100 μl vnitřního standardu (1,7-heptandiamin, o koncentraci $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Dále byl přidán 1,5 ml karbamátového pufru (pH 11,0-11,1), 2 ml čerstvě připraveného roztoku dansylchloridu o koncentraci $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ v acetonu. Následovalo třepání v temnu po dobu 20 hodin. Po té se ke směsi přidalo 200 μl roztoku prolinu a po protřepání (1 hodinu) byly přidány 3 ml heptanu. Směs byla ručně protřepávána (3 minuty). 1 ml heptanové vrstvy byl odpipetován do vialky a odpařen při teplotě 60 °C do sucha pod proudem dusíku. Suchý odparek byl rozpuštěn v 1,5 ml acetonitrilu. Takto upravené vzorky byly skladovány při -8 °C až do jejich analýzy. Před vlastní analýzou byly vzorky 25-krát naředěny.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Optimalizace hmotnostní detekce pro vybrané biogenní aminy

Před analýzou reálných vzorků, bylo nutné parametry hmotnostního spektrometru vhodně nastavit – optimalizovat. Vybrané biogenní aminy lze analyzovat v derivatizované či nederivatizované podobě. V následujícím experimentu byly vyzkoušeny a porovnány obě varianty.

Standards derivatizovaných biogenních aminů byly připraveny v acetonitrilu a 0,1% kyselině mravenčí v poměru 1:1. Vzorky 1-12 byly derivatizovány dansylchloridem. Takto upravené standardy biogenních aminů (tryptaminu, tyraminu, histaminu, putrescinu) byly aplikovány do hmotnostního spektrometru. Při optimalizaci základního nastavení hmotnostního spektrometru byl využit pouze jeden ze tří kvadrupólů. Vzorky se dávkovaly přímo do hmotnostního spektrometru. Průtok byl u všech vzorků stejný a to $3 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. V tabulce 3 jsou zaznamenány podmínky, při kterých byla analýza jednotlivých biogenních aminů prováděna.

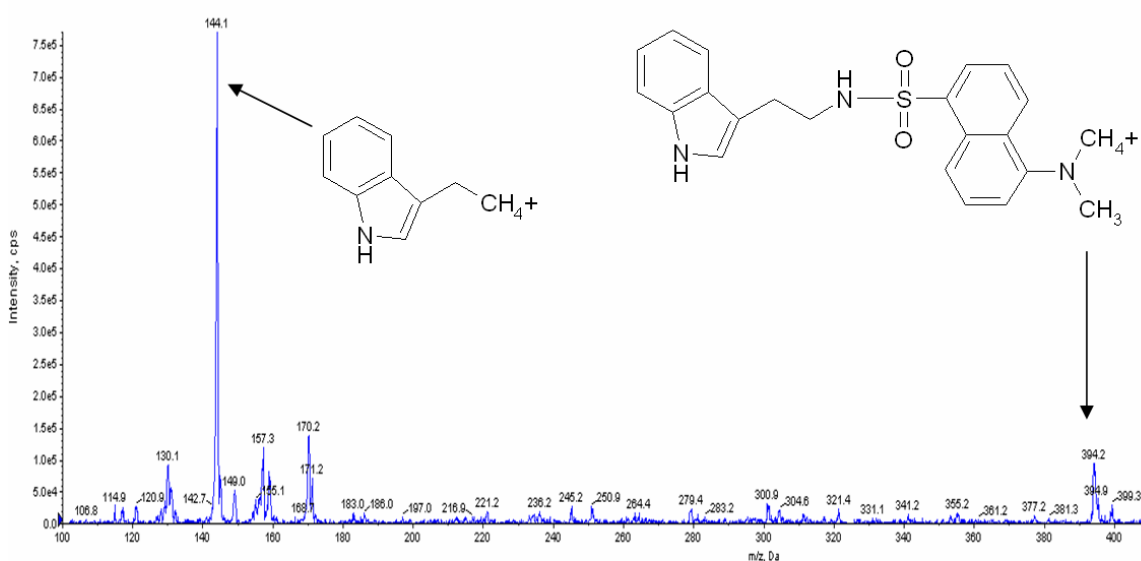
Tab. 3: Optimalizace nastavení hmotnostního detektoru pro analýzu jednotlivých biogenních aminů derivatizovaných dansylchloridem

| číslo vzorku | biogenní amin | Zkratka | koncentrace [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$] | Curtain gas | Ion Spay Voltage | Declustering Potential | Polarita ionizace |
|--------------|---------------|---------|---|-------------|------------------|------------------------|-------------------|
| 1 | Tryptamin | TRYP | 5 | 12 | 4500 | 75 | + |
| 2 | Tryptamin | TRYP | 5 | 12 | -4500 | -75 | - |
| 3 | Tryptamin | TRYP | 1 | 12 | -4500 | -75 | - |
| 4 | Histamin | HIM | 5 | 10 | 4500 | 75 | + |
| 5 | Histamin | HIM | 5 | 10 | -4500 | -75 | - |
| 6 | Histamin | HIM | 1 | 10 | 4500 | 75 | + |
| 7 | Tyramin | TYM | 5 | 12 | 4500 | 75 | + |
| 8 | Tyramin | TYM | 5 | 12 | -4500 | -75 | - |
| 9 | Tyramin | TYM | 1 | 12 | 4500 | 75 | + |
| 10 | Putrescin | PUT | 5 | 10 | 4500 | 75 | + |
| 11 | Putrescin | PUT | 5 | 10 | -4500 | -75 | - |
| 12 | Putrescin | PUT | 1 | 10 | 4500 | 75 | + |

Tab. 4: Molekulové hmotnosti analyzovaných biogenních aminů a derivatizovaných biogenních aminů

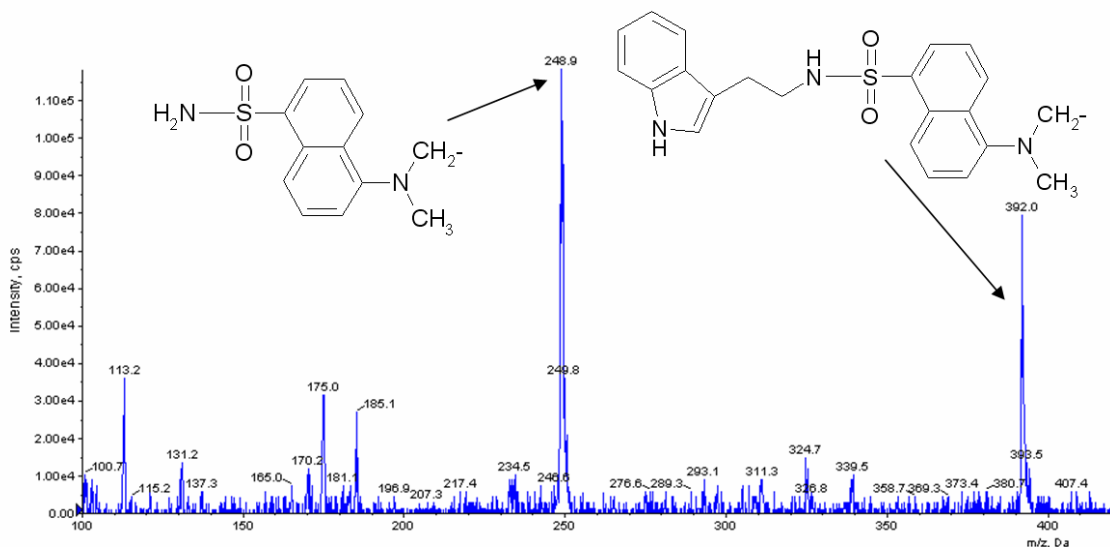
| Látka | zkratka | molekulová hmotnost [g·mol ⁻¹] |
|-----------|-------------|--|
| Histamin | HIM | 111,15 |
| | HIM + dns1 | 344,44 |
| | HIM + dns2 | 577,73 |
| Putrescin | PUT | 88,15 |
| | PUT + dns1 | 321,44 |
| | PUT + dns2 | 554,74 |
| Tyramin | TYM | 137,18 |
| | TYM + dns1 | 370,47 |
| | TYM + dns2 | 603,77 |
| Tryptamin | TRYP | 160,22 |
| | TRYP + dns1 | 393,51 |
| | TRYP + dns2 | 626,8 |

V tabulce 4 je zobrazen přehled molekulových hmotností jednotlivých biogenních aminů a biogenních aminů po derivatizaci. K vybraným biogenním aminům se při derivatizaci může připojit jeden (dns1) či dva (dns2) dansylchloridy a tomu také odpovídá molekulová hmotnost.



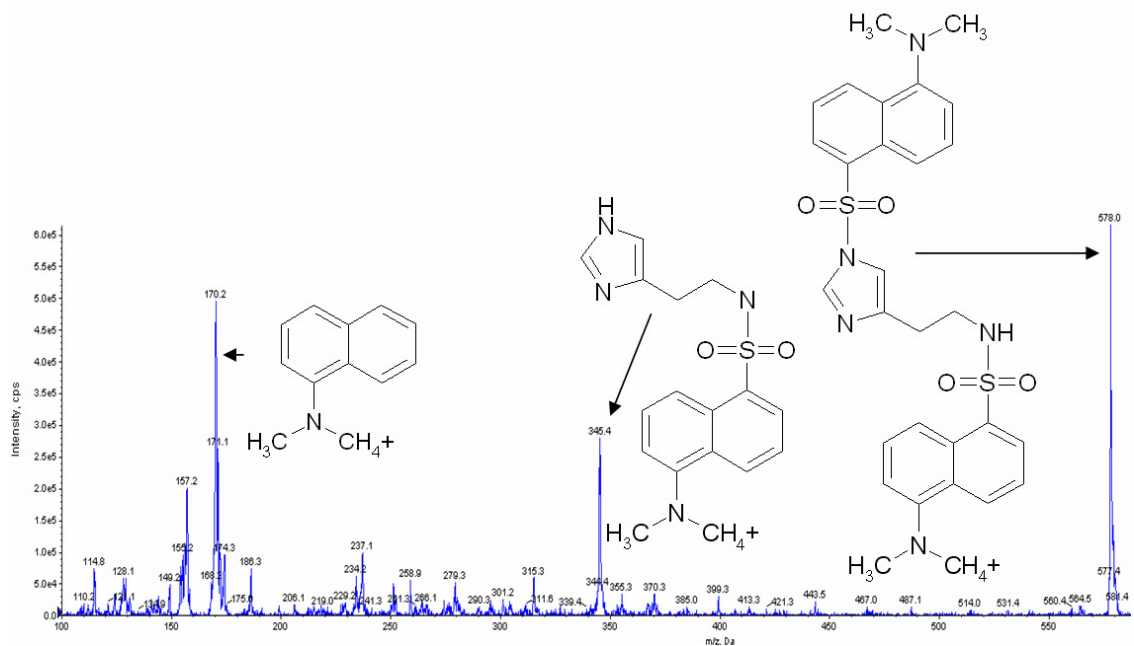
Obr. 17: Hmotnostní spektrum tryptaminu derivatizovaného dansylchloridem (koncentrace 5 mg·l⁻¹, pozitivní ionizace)

Na obrázku 17. je zobrazeno hmotnostní spektrum vzorku derivatizovaného tryptaminu (vzorek č.1). Při této detekci bylo využito pozitivní ionizace. Ve spektru je patrný molekulový iont při 394,2 m/z. Tento iont má však malou intenzitu. Větší intenzita byla zaznamenána pro hmotu 144,1 m/z, která pravděpodobně patří dceřinému iontu, jehož struktura je znázorněna taktéž na obrázku 19.



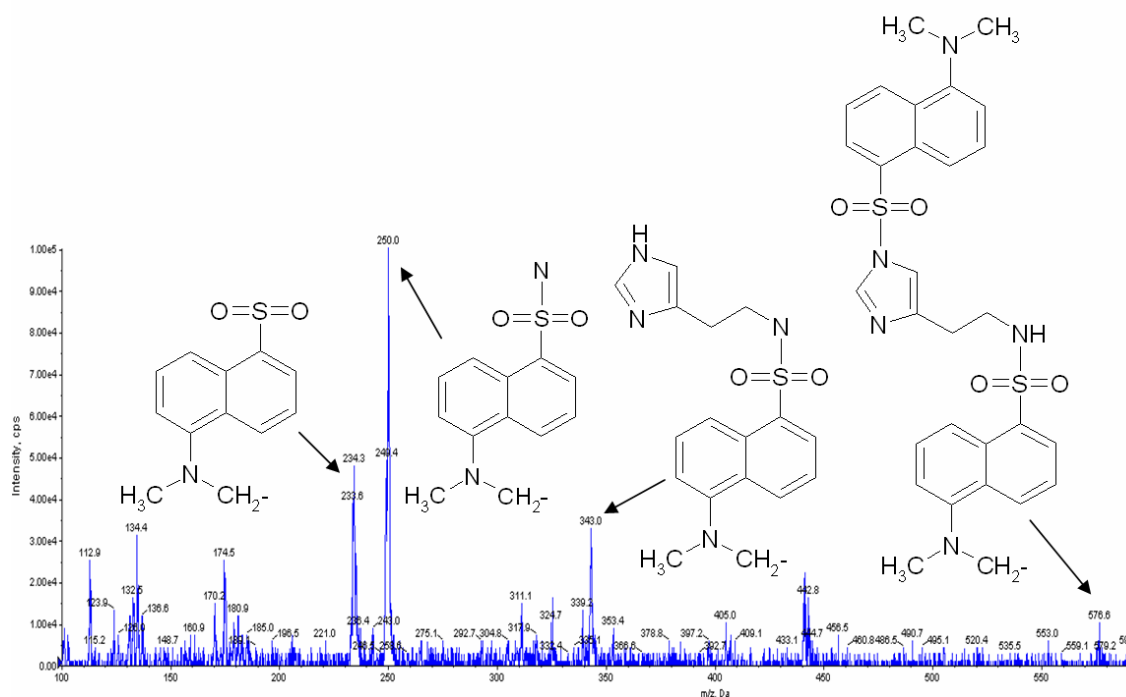
Obr. 18: Hmotnostní spektrum tryptaminu derivatizovaného dansylchloridem (koncentrace $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, negativní ionizace)

Hmotnostní spektrum na obrázku 18 je také spektrum derivatizovaného tryptaminu. Podmínky této analýzy se liší od předchozího případu v polaritě ionizace, která byla změněna na negativní. Molekulový iont 392,0 m/z odpovídá derivatizovanému tryptaminu. Tento iont má přibližně stejnou intenzitu jak při pozitivní, tak při negativní ionizaci. Další významnou hmotou ve spektru je hmotu 248,9 m/z, která může odpovídat fragmentu.



Obr. 19: Hmotnostní spektrum histaminu derivatizovaného dansylchloridem (koncentrace $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, pozitivní ionizace)

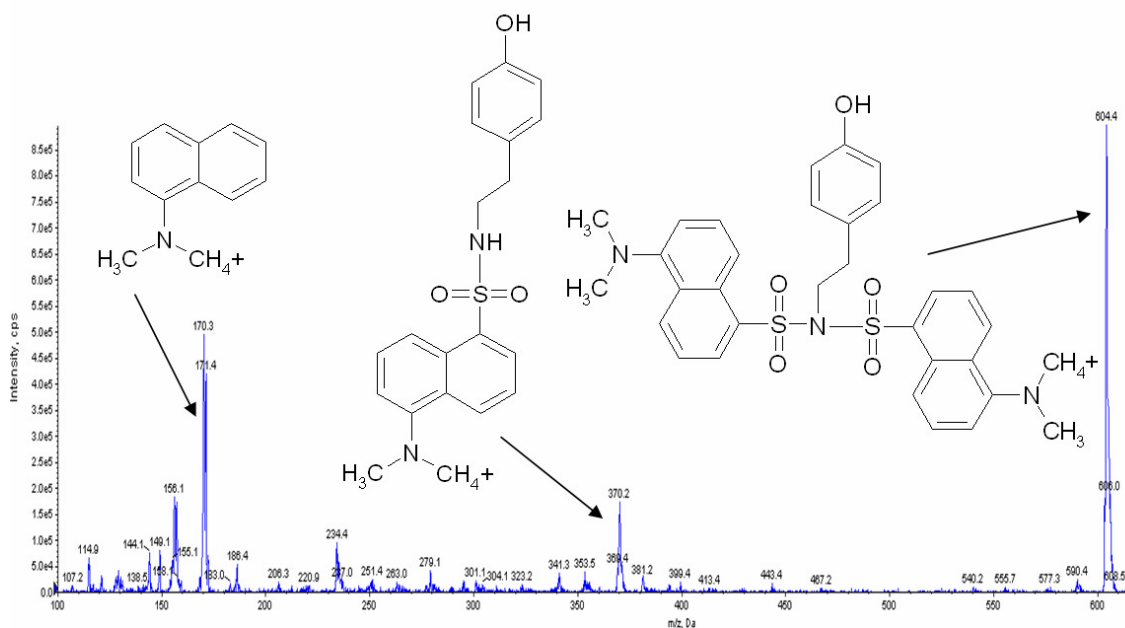
Při analýze vzorku č. 4 největší intenzity, při pozitivní ionizaci, dosahoval molekulový iont $578,0 \text{ m/z}$ – derivatizovaný histamin s dvěma navázanými dansylchloridy. Dále je ve spektru patrný molekulový iont $345,4 \text{ m/z}$, což je také derivatizovaný histamin, ale pouze s jedním navázaným dansylchloridem. Hmota $170,2 \text{ m/z}$ patří dceřinému iontu – fragment dansylchloridu. Hmotnostní spektrum je zobrazeno na obrázku 19.



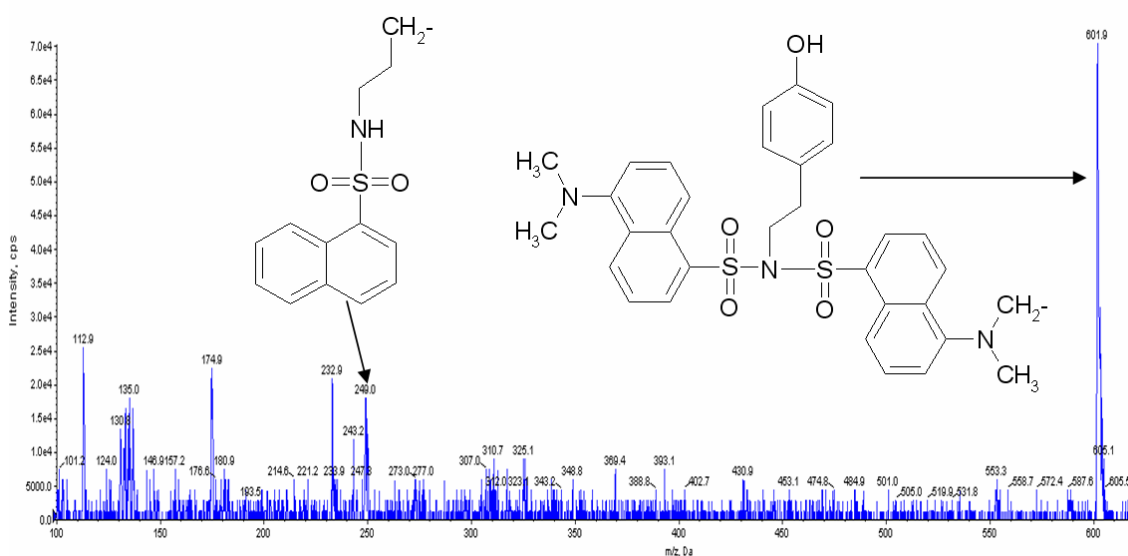
Obr. 20: Hmotnostní spektrum histaminu derivatizovaného dansylchloridem (koncentrace 5 mg·l⁻¹, negativní ionizace)

Po změně polarity ionizace u vzorku histaminu na negativní se hmotnostní spektrum výrazně změnilo. Molekulové ionty charakteristické pro derivatizovaný histamin (343,0 m/z a 576,5 m/z) měly výrazně sníženou intenzitu. Zároveň jsou v tomto spektru patrné dceřiné ionty 234,3 m/z a 250,0 m/z. Jejich struktura je vyznačena na obrázku 20.

U vzorku 7 se na hmotnostním spektru, jak můžeme vidět na obrázku 21, objevily tři významné hmoty. Nevětší intenzitu dosahoval molekulový iont při 504,4 m/z, který odpovídal tyraminu s dvěma navázanými dansylchloridy. O poznání menší intenzitu vykazovala hmota 370,2 m/z odpovídající tyraminu s navázaným pouze jedním dansylchloridem. Při 170,3 m/z je vidět signál dceřiného iontu.

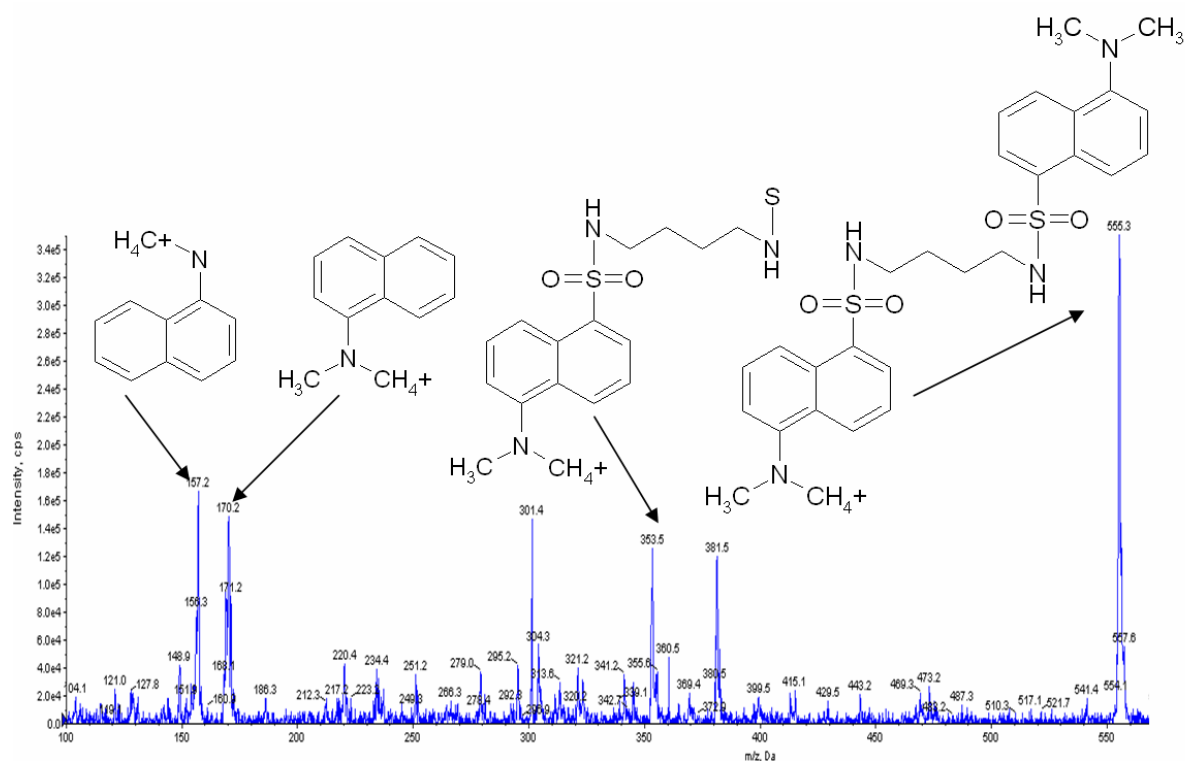


Obr. 21: Hmotnostní spektrum tyraminu derivatizovaného dansylchloridem (koncentrace $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, pozitivní ionizace)



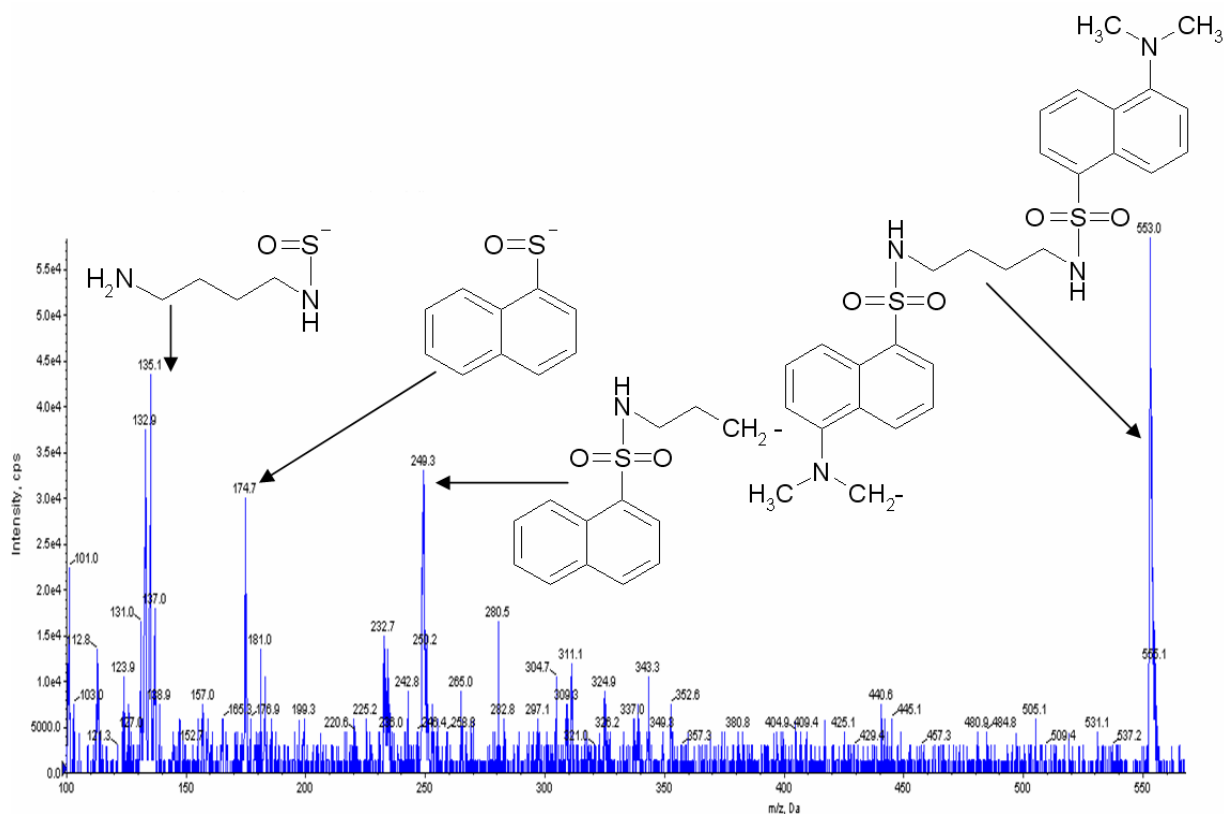
Obr. 22: Hmotnostní spektrum tyraminu derivatizovaného dansylchloridem (koncentrace $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, negativní ionizace)

Analýza vzorku 8 (derivatizovaný tyramin) se lišila od předchozí analýzy změnou polaritativy ionizace na negativní. Na spektru (viz obrázek 22) se objevil jeden významný molekulový iont $501,9 \text{ m/z}$, což odpovídá sledovanému standardu. Avšak i přes to, že tento molekulový iont měl v rámci spektra velkou intenzitu, tak při pozitivní ionizaci byla jeho intenzita vyšší. Hmotnost $249,0 \text{ m/z}$ odpovídá dceřinému iontu derivatizovaného tyraminu.



Obr. 23: Hmotnostní spektrum putrescinu derivatizovaného dansylchloridem (koncentrace $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, pozitivní ionizace)

U vzorku 10 (obrázek 23), patří nejintenzivnější signál molekulovému iontu $555,3 \text{ m/z}$, což je dvojitě derivatizovaný putrescin. Spektrum dále obsahuje i molekulový iont putrescinu s jedním navázaným dansylchloridem – $353,5 \text{ m/z}$ a dceřiné ionty.



Obr. 24: Hmotnostní spektrum putrescinu derivatizovaného dansylchloridem (koncentrace $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, negativní ionizace)

Při negativní ionizaci derivatizovaného putrescinu (č. 11) obsahovalo spektrum (obrázek 24) více hmot než u pozitivní ionizace. Molekulový iont s největší intenzitou ($553,0 \text{ m/z}$) patří sledovanému derivatizovanému putrescinu. Ovšem také tento analyt zde vykazoval nižší intenzitu než při pozitivní ionizaci.

Obecně lze tvrdit, že se pro analýzu sledovaných biogenních aminů hodí spíše pozitivní ionizace. Při pozitivní ionizaci dosahovaly intenzity molekulových iontů vyšších intenzit a docházelo méně k fragmentaci těchto molekul.

Tab. 5: Srovnání intenzit odezvy (cps) při analýze derivatizovaných biogenních aminů o dvou různých koncentracích

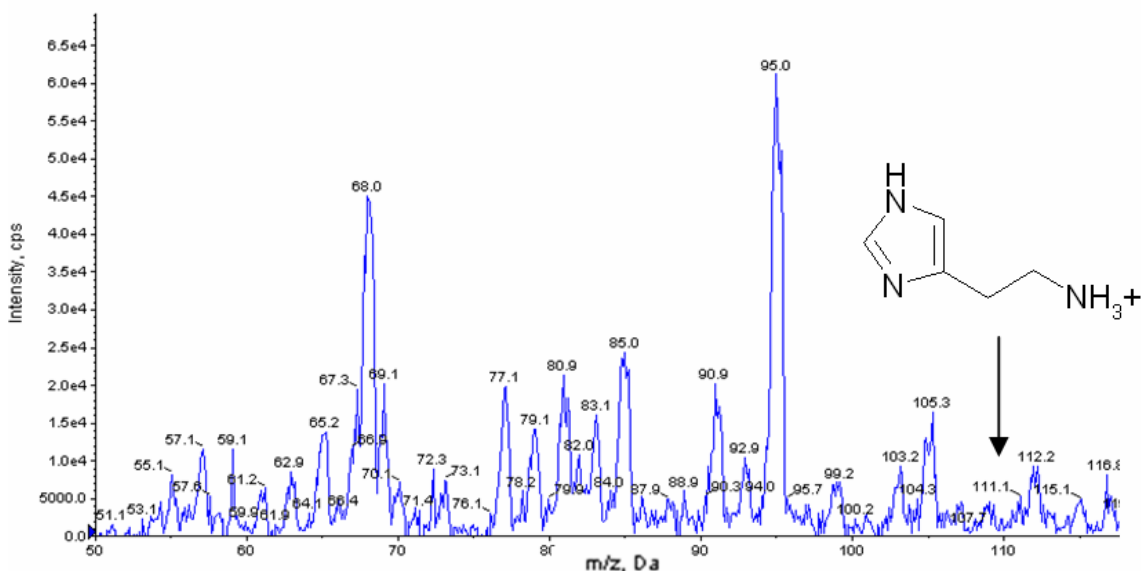
| Látka | zkratka | m/z | Intenzita cps (counts per second) | |
|-----------|---------|-------|---|---|
| | | | c_1 $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ | c_2 $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ |
| Histamin | HIM | 578,0 | $4,0 \cdot 10^4$ | $6,0 \cdot 10^5$ |
| Tyramin | TYM | 604,4 | $1,3 \cdot 10^5$ | $8,5 \cdot 10^5$ |
| Tryptamin | TRYP | 392,0 | $1,5 \cdot 10^4$ | $7,8 \cdot 10^4$ |
| Putrescin | PUT | 555,3 | $6,0 \cdot 10^4$ | $3,5 \cdot 10^5$ |

V tabulce 5 můžeme vidět rozdíl intenzity při různých koncentracích u čtyř derivatizovaných biogenních aminů. Byly testovány dvě koncentrace – $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Na základě výsledků této zkoušky můžeme tvrdit, že koncentrace je tedy přímo úměrná intenzitě a peaku.

Pro srovnání byly hmotnostním spektrometrem analyzovány i vzorky obsahující nederivatizované biogenní aminy. Nastavení podmínek analýzy u každého biogenního aminu bylo optimalizováno a je zaznamenáno v tabulce 6.

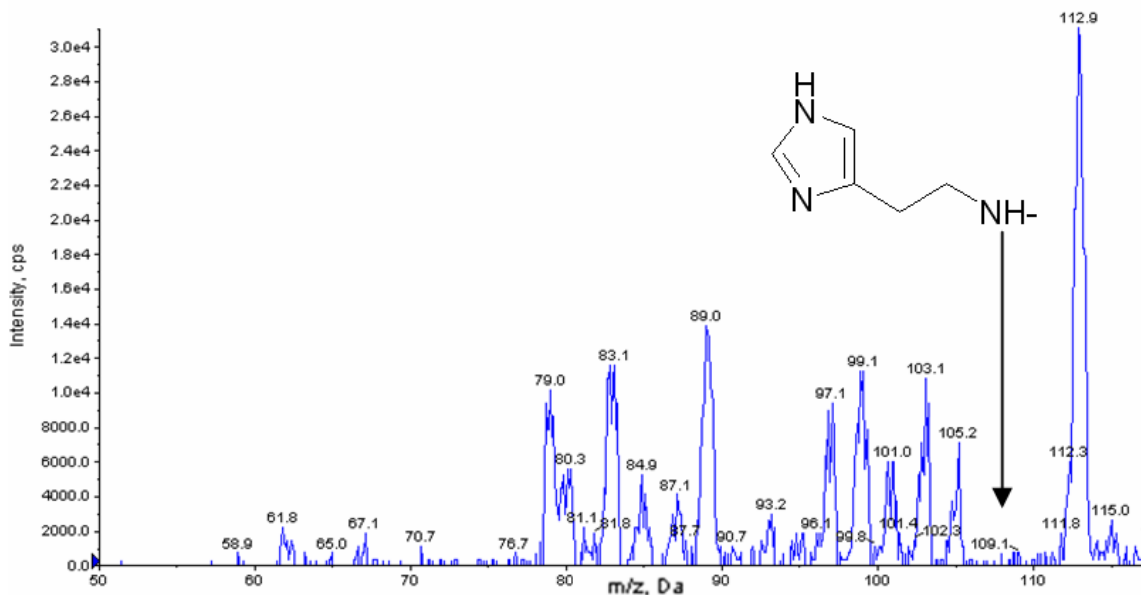
Tab. 6: Optimalizace nastavení hmotnostního detektoru pro analýzu jednotlivých biogenních aminů, které nebyly derivatizovány

| číslo vzorku | biogenní amin | Zkratka | koncentrace [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$] | Curtain gas | Ion Spay Voltage | Declustering Potencial | Polarita ionizace |
|--------------|---------------|---------|---|-------------|------------------|------------------------|-------------------|
| 13 | Histamin | HIM | 5 | 10 | 4500 | 75 | + |
| 14 | Histamin | HIM | 5 | 10 | -4500 | -75 | - |
| 15 | Putrescin | PUT | 5 | 10 | 4500 | 75 | + |
| 16 | Putrescin | PUT | 5 | 10 | -4500 | -75 | - |
| 17 | Tryptamin | TRYP | 5 | 12 | 4500 | 75 | + |
| 18 | Tryptamin | TRYP | 5 | 12 | -4500 | -75 | - |
| 19 | Tyramin | TYM | 5 | 12 | 4500 | 75 | + |
| 20 | Tyramin | TYM | 5 | 12 | -4500 | -75 | - |



Obr. 25: Hmotnostní spektrum nederivatizovaného histaminu (koncentrace $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, pozitivní ionizace)

Na obrázku 25 vidíme hmotnostní spektrum vzorku, který obsahoval histamin. Při této analýze bylo použito pozitivní ionizace. Molekulový iont histaminu (111,1 m/z) dosahuje velmi malé intenzity oproti ostatním hmotám ve spektru.



Obr. 26: Hmotnostní spektrum nederivatizovaného histaminu (koncentrace 5 mg·l⁻¹, negativní ionizace)

Obdobný výsledek byl u nederivatizovaného histaminu dosažen i při negativní ionizaci. Na spektru histaminu (obrázek 26), je vidět nižší intenzita molekulového iontu – 109,1 m/z než v předchozím případě.

Po proměření ostatních nederivatizovaných biogenních aminů bylo zjištěno, že intenzity sledovaných molekulových iontů ve spektrech nejsou příliš významné jak pro pozitivní, tak pro negativní ionizaci, viz přílohy.

Srovnáním derivatizovaných a nederivatizovaných spekter daných biogenních aminů je zřejmé, že derivatizované molekulové ionty mají vyšší intenzitu. Můžeme tedy tvrdit, že derivatizace vybraných biogenních aminů výrazně zvyšuje citlivost metody a výsledky analýzy jsou více reprezentativní.

Dalším krokem byla optimalizace hmotnostního spektrometru MS/MS módu. U každého z vybraných biogenních aminů byla stanovena pomocí MS analýzy hmota matečného iontu pomocí software Analyst, který pro MS/MS analýzu vybral reprezentativní hmoty dceřiných iontu (fragmentů), nastavil optimální napětí ionizace a deklasterační potenciál. S těmito hodnotami jsou vybrané biogenní aminy následně

analyzovány pomocí MS/MS. Hmoty matečných a dceřiných iontů vybraných analytů jsou zobrazeny v tabulce 7.

Tab. 7: Hmoty matečných a dceřiných iontů vybraných biogenních aminů pro MS/MS analýzu

| Vybraný analyt | Matečný Iont [Da] | Dceřiný iont [Da] |
|----------------|-------------------|-------------------|
| Putrescin | 555,288 | 170,2 |
| | | 169,7 |
| | | 168,3 |
| Histamin | 578,241 | 170,1 |
| | | 169,2 |
| | | 154,2 |
| Tyramin | 604,247 | 170,1 |
| | | 171,1 |
| | | 155,2 |
| Tryptamin | 394,205 | 144,2 |
| | | 130,1 |
| | | 170,2 |

5.2 Optimalizace kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí

Při spojení kapalinového chromatografu s hmotnostním detektorem je nutné optimalizovat parametry jako teplota iontového zdroje, teplota analytické kolony, vhodný výběr mobilní fáze a průběh gradientové eluce. Tyto parametry mohou mít významný vliv na intenzitu a tvar peaku výsledného záznamu. Proto je třeba najít takové hodnoty těchto parametrů, aby záznam analýzy vybraných biogenních aminů byl co nejreprezentativnější.

5.2.1 Optimalizace teploty iontového zdroje

Teplota iontového zdroje může mít na záznam MS/MS analýzy velký vliv. Bylo vyzkoušeno několik nastavení pro každý vybraný biogenní amin. Intenzity peaků pro vybrané biogenní aminy v závislosti na teplotě jsou zobrazeny v tabulce 8. V případě nevhodně zvolené teploty může docházet k nedostatečné ionizaci či k tepelnému rozkladu sledovaných látek již ve zdroji.

Tab. 8: Porovnání intenzity signálu odezvy LC-MS/MS při různých teplotách ionizace pro vybrané biogenní aminy

| Vybraný biogenní amin | Intenzita signálu při 450 °C csp | Intenzita signálu při 470 °C csp | Intenzita signálu při 480 °C csp |
|-----------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Putrescin | 1330 | 1433 | 1940 |
| Histamin | 2080 | 4000 | 3560 |
| Tyramin | 1050 | 2000 | 1690 |
| Tryptamin | 1500 | 3260 | 3180 |

Z tabulky 8 je patrné, že zvýšení teploty iontového zdroje prospívá intenzitě signálu při MS/MS analýze vybraných biogenních aminu (LC-MS/MS chromatogramy jsou uvedeny v příloze). U histaminu, tyraminu a tryptaminu byla optimální teplota iontového zdroje 470 °C. U putrescinu se optimální teplota iontového zdroje rovnala až 480 °C. Jelikož všechny čtyři vybrané analyty byly analyzovány současně, bylo třeba zvolit optimální teplotu na základě kompromisu. Proto byla zvolena pro současně stanovení 470 °C.

5.2.2 Optimalizace teploty analytické kolony

Chromatografickou analýzu významně ovlivňuje teplota kolony, velký vliv má jak na separaci látek, tak na celkový charakter chromatografického záznamu. Je tedy důležité najít optimální teplotu kolony, při které by byla směs vybraných biogenních aminů dostatečně rozdělena na jednotlivé frakce, a současně docílit co největší intenzity odezvy pro každou frakci. U vybraných biogenních aminu byly testovány čtyři různé teploty analytické kolony. Retenční časy a intenzity peaků jsou zaznamenány v tabulce 9.

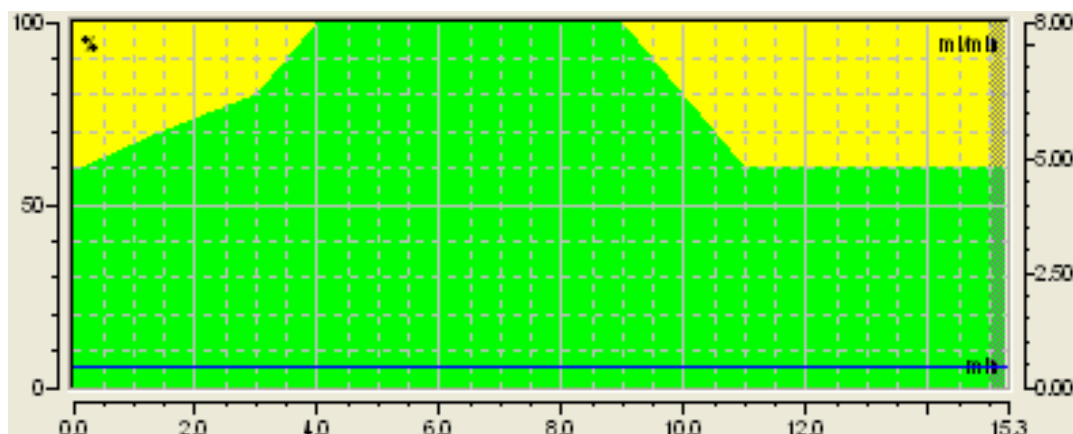
Tab. 9: Intenzita a retenční čas chromatografického záznamu u vybraných biogenních aminů v závislosti na změně teploty

| Analyt | Koncentrace [mg·l ⁻¹] | Teplota kolony [°C] | Retenční čas [min] | Intenzita peaku [csp] |
|------------------|--------------------------------------|------------------------|-----------------------|--------------------------|
| Putrescin | 1 | 20 | 2,89 | 2360 |
| Putrescin | 1 | 25 | 2,84 | 2306 |
| Putrescin | 1 | 30 | 2,77 | 2193 |
| Putrescin | 1 | 35 | 2,64 | 2413 |
| Histamin | 1 | 20 | 3,28 | 7413 |
| Histamin | 1 | 25 | 3,24 | 9220 |
| Histamin | 1 | 30 | 3,12 | 9427 |
| Histamin | 1 | 35 | 3,08 | 7873 |
| Tyramin | 1 | 20 | 4,45 | 3387 |
| Tyramin | 1 | 25 | 4,39 | 3320 |
| Tyramin | 1 | 30 | 4,29 | 2974 |
| Tyramin | 1 | 35 | 4,18 | 2506 |
| Tryptamin | 1 | 20 | 2,16 | 2713 |
| Tryptamin | 1 | 25 | 2,15 | 2800 |
| Tryptamin | 1 | 30 | 2,06 | 2967 |
| Tryptamin | 1 | 35 | 1,99 | 3080 |

Nejreprezentativnější chromatografický záznam byl dosažen u putrescinu a tryptaminu při 35 °C. U histaminu bylo teplotní optimum o 5 °C menší než u předchozích dvou. Oproti tomu tyramin měl teplotní optimum při 20 °C. Pokud bychom stanovovali vybrané biogenní aminy současně, je třeba navrhnout takovou teplotu kolony, která bude kompromisem mezi vedenými optimy. V našem případě by teplota kolony pro stanovení všech vybraných biogenních aminu byla 30 °C.

5.2.3 Optimalizace elučního gradientu

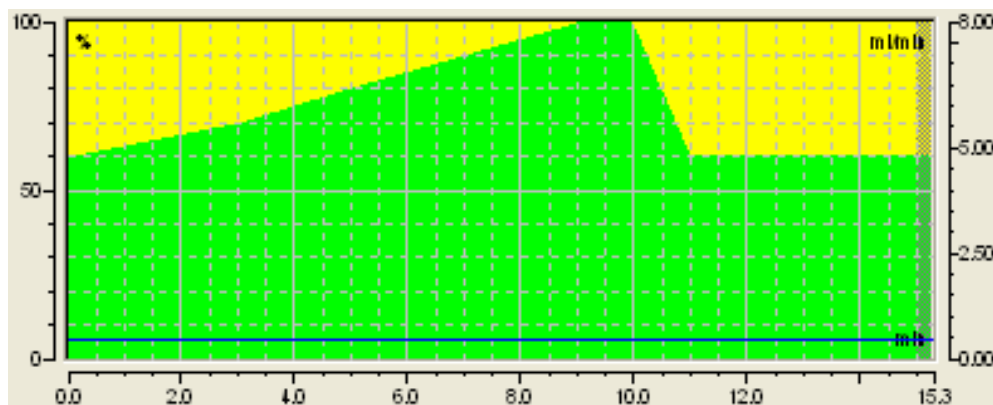
Stejně jako předchozí parametry má i gradient eluce vliv na chromatografický záznam. Průběh elučního gradientu může ovlivnit jak retenční čas, tak i tvar a intenzitu peaku. V našem případě byla jako mobilní fáze pro analýzu vybraných biogenních aminů použita voda (A žlutá) ve směsi s acetonitrilem (B zelená). Poměr těchto látek a průběh gradientu je zobrazen v následujících tabulkách a grafech.

5.2.3.1 *Gradient A*

Obr. 27: Průběh elučního gradientu A

Tab. 10: Průběh elučního gradientu varianta A

| Čas [min] | Průtok [ml·min ⁻¹] | Acenotinril B [%] | Voda pro HPLC A [%] |
|-----------|--------------------------------|-------------------|---------------------|
| 0,00 | 0,45 | 60 | 40 |
| 0,10 | 0,45 | 60 | 40 |
| 0,14 | 0,45 | 70 | 30 |
| 3,00 | 0,45 | 80 | 20 |
| 4,00 | 0,45 | 100 | 0 |
| 9,00 | 0,45 | 100 | 0 |
| 11,00 | 0,45 | 60 | 40 |
| 15,00 | 0,45 | 60 | 40 |

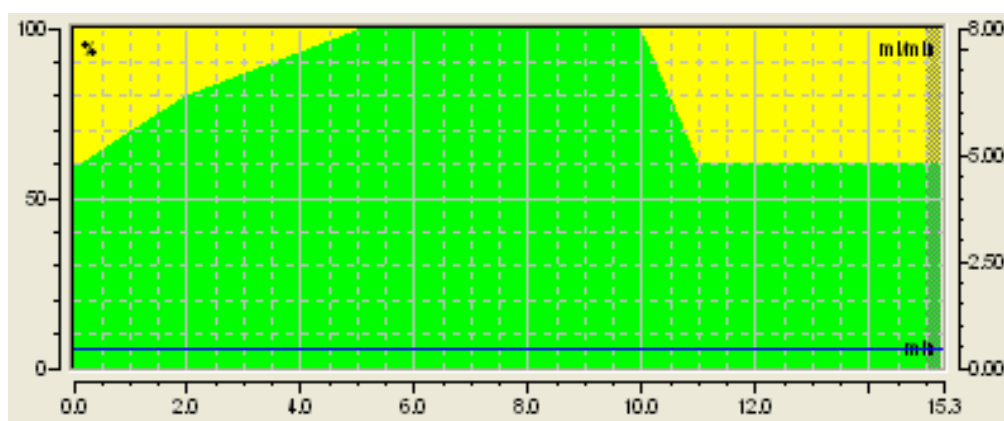
5.2.3.2 *Gradient B*

Obr. 28: Průběh elučního gradientu B

Tab. 11: Průběh elučního gradientu B

| Čas [min] | Průtok [ml·min ⁻¹] | Acenotintril B [%] | Voda pro HPLC A [%] |
|-----------|--------------------------------|--------------------|---------------------|
| 0,00 | 0,45 | 60 | 40 |
| 0,10 | 0,45 | 60 | 40 |
| 3,00 | 0,45 | 70 | 30 |
| 5,00 | 0,45 | 80 | 20 |
| 9,00 | 0,45 | 100 | 0 |
| 10,00 | 0,45 | 100 | 0 |
| 11,00 | 0,45 | 60 | 40 |
| 15,00 | 0,45 | 60 | 40 |

5.2.3.3 Gradient C



Obr. 29: Průběh elučního gradientu C

Tab. 12: Průběh elučního gradientu varianta C

| Čas [min] | Průtok [ml·min ⁻¹] | Acenotintril B [%] | Voda pro HPLC A [%] |
|-----------|--------------------------------|--------------------|---------------------|
| 0,00 | 0,45 | 60 | 40 |
| 0,10 | 0,45 | 60 | 40 |
| 1,00 | 0,45 | 70 | 30 |
| 2,00 | 0,45 | 80 | 20 |
| 5,00 | 0,45 | 100 | 0 |
| 10,00 | 0,45 | 100 | 0 |
| 11,00 | 0,45 | 60 | 40 |
| 15,00 | 0,45 | 60 | 40 |

Tab. 13: Závislost retenčního času a intenzity peaku na typu gradientu

| Biogenní amin o koncentraci 1 mg·l ⁻¹ | Typ gradientu | Retenční čas [min] | Intenzita peaku csp |
|--|---------------|--------------------|---------------------|
| Putrescin | A | 2,64 | 1580 |
| Putrescin | B | 3,02 | 1120 |
| Putrescin | C | 2,46 | 1833 |
| Histamin | A | 3,14 | 8053 |
| Histamin | B | 3,74 | 5433 |
| Histamin | C | 2,86 | 5853 |
| Tyramin | A | 4,45 | 3747 |
| Tyramin | B | 5,93 | 2253 |
| Tyramin | C | 3,89 | 3400 |
| Tryptamin | A | 2,02 | 3246 |
| Tryptamin | B | 2,05 | 3067 |
| Tryptamin | C | 1,90 | 3486 |

V tabulce 13 vidíme porovnání třech typů elučních gradientů. Z tabulky je patrné, že u biogenních aminů putrescinu, tyraminu a tryptaminu je nejvýhodnější pro analýzu použít eluční gradient C, při kterém mají peaky největší intenzitu (viz příloha). U Histaminu se ukázalo, že pro jeho analýzu je výhodnější použít gradient typu A, při kterém dosahovala intenzita peaku 8053 csp. Jako nejméně vhodný typ gradientu se jevil typ B, peaky u všech čtyř biogenních aminů jsou velmi nereprezentativní a jejich intenzita slabá (viz přílohy). Pro současné stanovení vybraných biogenních aminů se nabízí použít eluční gradient C. I když histamin při gradientu C nevykazoval tak dobré vlastnosti jako při gradientu A, eluční gradient typu C se jeví jako reprezentativní i pro histamin.

5.2.4 Volba vhodné mobilní fáze

Zvolení vhodné mobilní fáze ve spojení LC-MS popř. LC-MS/MS je velmi důležité vzhledem k ionizaci sledovaných analytů. V našem případě byly vyzkoušeny dvě mobilní fáze. První z nich byla acetonitril a voda a jako druhá byla použita mobilní fáze acetonitril a 0,1 % kyselina mravenčí. Přídavek kyseliny mravenčí do mobilní fáze by mohl zlepšit ionizační vlastnosti u hmotnostní detekce.

Tab. 14: Srovnání retenčního času a intenzity peaku dvou mobilních fází u vybraných analytů

| Mobilní fáze: | acetonitril a voda | | acetonitril a 0,1 % kyselina mravenčí | |
|----------------|--------------------|---------------------|---------------------------------------|---------------------|
| Vybraný analyt | Retenční čas [min] | Intenzita peaku csp | Retenční čas [min] | Intenzita peaku csp |
| Putrescin | 2,46 | 1833 | 2,37 | 2173 |
| Histamin | 3,14 | 8053 | 3,02 | 4540 |
| Tyramin | 3,89 | 3400 | 3,83 | 8740 |
| Tryptamin | 1,90 | 3486 | 1,86 | 6453 |

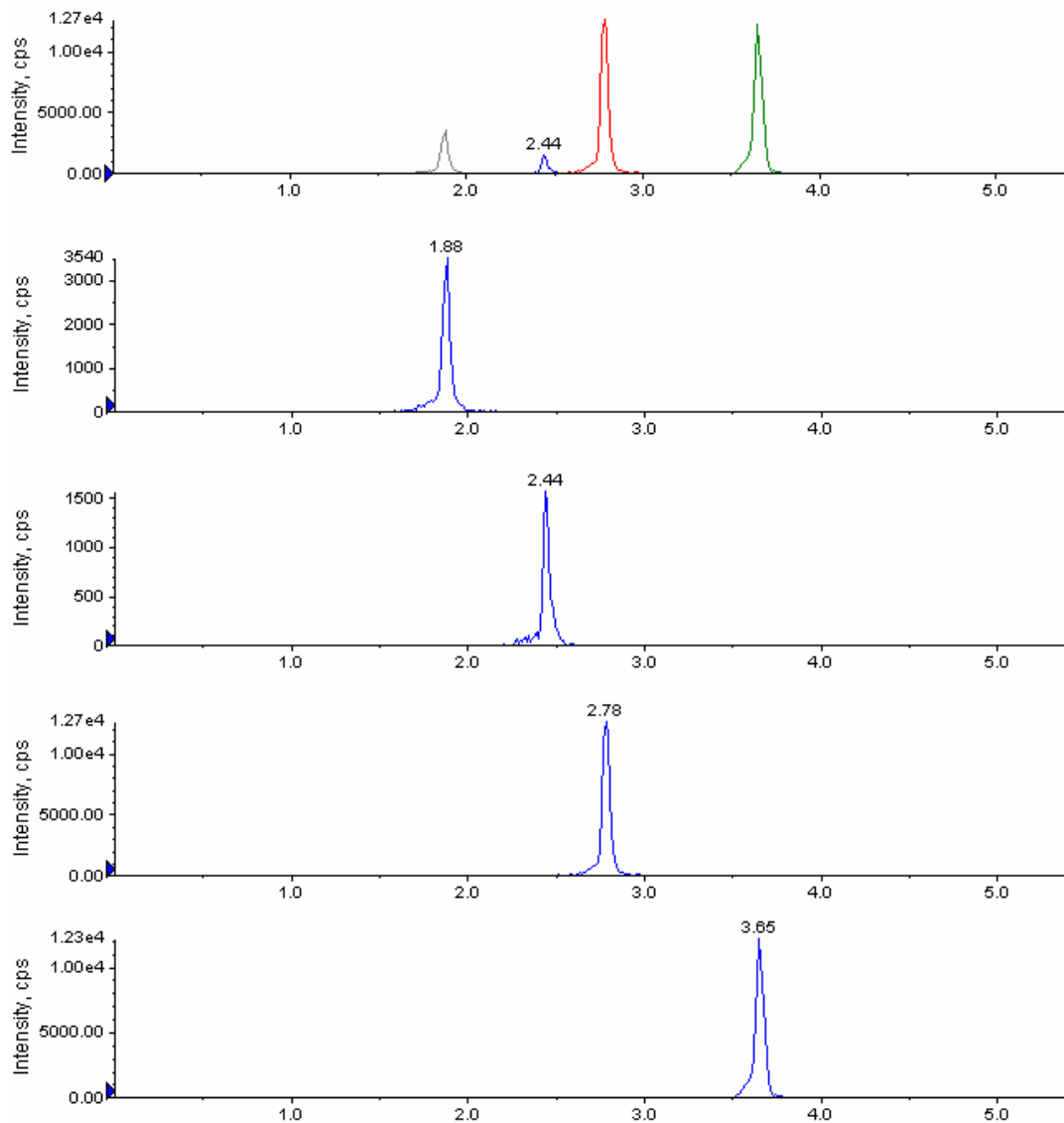
Z tabulky 14 je patrné, že došlo změnou mobilní fáze z acetonitrilu a vody na acetonitril a 0,1 % kyseliny mravenčí k výraznému zlepšení intenzity peaku u putrescinu, tyraminu a tryptaminu. Oproti tomu u histaminu došlo změnou mobilní fáze o výrazné zhoršení intenzity peaku. Avšak jak u histaminu, tak i u putrescinu, tryptaminu a tyraminu s použitou mobilní fází acetonitril a 0,1 % kyselina mravenčí byly všechny peaky dostatečně intenzivní (viz příloha). Proto byla pro analýzu směsi těchto vybraných biogenních aminů jako mobilní fáze zvolena varianta acetonitril a 0,1 % kyselina mravenčí.

5.3 Optimalizace podmínek stanovení směsi vybraných biogenních aminů

Pro stanovení všech čtyř biogenních aminů současně bylo třeba nastavit v softwaru Analyst hmoty matečných iontů a jejich fragmentů pro všechny analyty. Od každého matečného iontu byl vybrán pouze jeden nejvýraznější fragment. V tabulce 15 jsou zaznamenány vybrané přechody matečných a dceřiných iontů od patřičných analytů.

Tab. 15: Hmoty matečných a dceřiných iontů sledovaných při UPLC–MS/MS

| Vybraný analyt | Matečný Iont [Da] | Dceřiný iont [Da] |
|----------------|-------------------|-------------------|
| Putrescin | 555,288 | 170,2 |
| Histamin | 578,241 | 170,1 |
| Tyramin | 604,247 | 170,1 |
| Tryptamin | 394,205 | 144,2 |



Obr. 30: Chromatogram směsi vybraných biogenních aminů (Koncentrace standardu $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$)

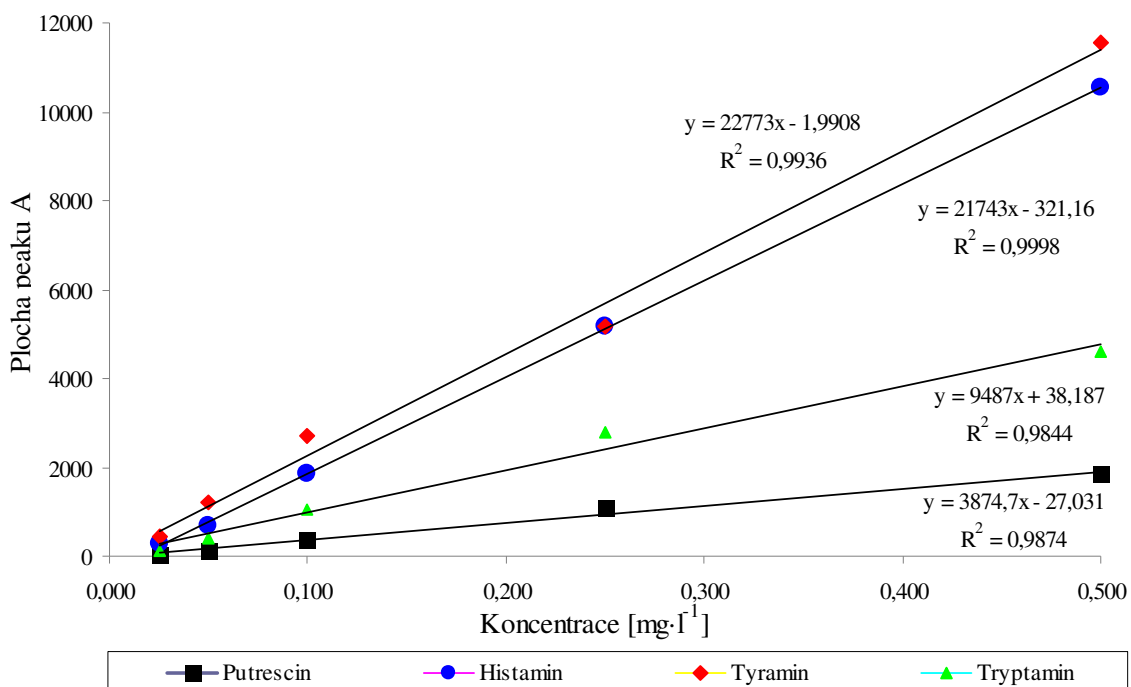
Na obrázku 30 je zobrazen LC-MS/MS chromatogram směsi biogenních aminů putrescinu ($T_r = 2,44 \text{ min}$), histaminu ($T_r = 2,78 \text{ min}$), tyraminu ($T_r = 3,65 \text{ min}$), a tryptaminu ($T_r = 1,88 \text{ min}$). Pod souhrnným zobrazením všech peaků je zobrazen každý peak zvlášť. Z obrázku je patrné, že při použití MS/MS detekce, není nutné separovat látky do různých retenčních časů, jelikož detektor analyzuje ionty o různých hmotnostech zvlášť.

5.4 Analýza reálných vzorků

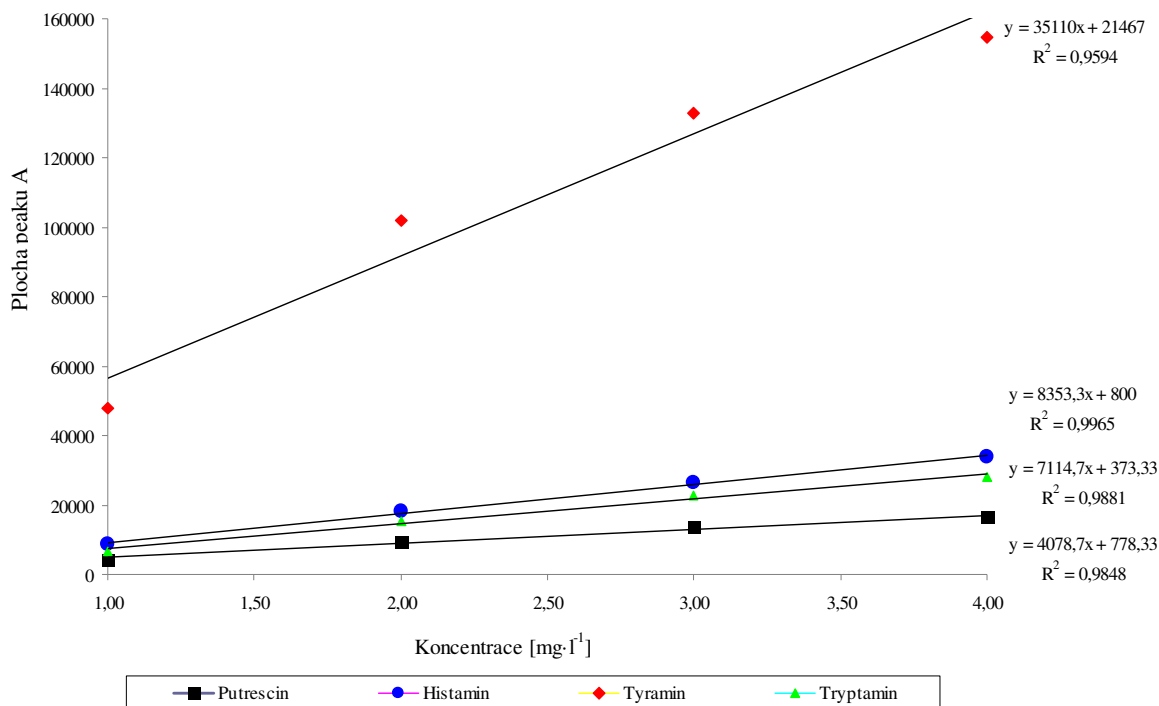
Pro stanovení reálných vzorků, v nichž byl sledován výskyt histaminu, putrescinu, tyraminu a tryptaminu, bylo nutné nejprve provést kalibraci pro každý z vybraných analytů. Na jejich základě se vyhodnotily koncentrace biogenních aminů v daných reálných vzorcích

5.4.1 Kalibrace

Pro kalibraci byla použita směs standardů vybraných biogenních aminů. Pro vysoký rozptyl koncentrací vybraných biogenních aminů v reálných vzorcích byly vytvořeny kalibrace dvě. První kalibrace – Kalibrace A obsahovala směsné standardy v rozmezí koncentrací 0,025 až 0,5 mg·l⁻¹ (viz obrázek 31). Druhá kalibrace – Kalibrace B byla zaměřena na vyšší koncentrace a kalibrační roztoky byly v rozmezí 1 až 4 mg·l⁻¹ (viz obrázek 32.). Kalibrace byla měřena metodou UPLC–MS/MS, stejně jako reálné vzorky.



Obr. 31: Kalibrační přímky A (koncentrace vybraných biogenních aminů: 0,025 mg·l⁻¹; 0,05 mg·l⁻¹; 0,1 mg·l⁻¹; 0,25 mg·l⁻¹ a 0,5 mg·l⁻¹)



Obr. 32: Kalibrační přímky B (koncentrace vybraných biogenních aminů:
1 mg·l⁻¹; 2 mg·l⁻¹; 3 mg·l⁻¹ a 4 mg·l⁻¹)

Obsah sledovaných analytů byl stanoven pomocí rovnic lineárních regresí kalibračních křivek.

Důležitými parametry při validaci metody je určení meze detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ).

Mez detekce a stanovitelnosti byla určena z linie šumu, kde mez detekce je třikrát větší než úroveň šumu a mez stanovitelnosti převyšuje linii šumu desetkrát. Linie šumu byla odečtena ze spektra směsi vybraných biogenních aminů o koncentraci 0,05 mg·l⁻¹ a byla určena na 6,7 csp. Hodnoty LOD a LOQ byly vypočteny ze vztahů (3) a (4).

$$LOD = \frac{c}{H/s} \cdot 3 \quad (3)$$

$$LOQ = \frac{c}{H/s} \cdot 10 \quad (4)$$

Kde c je koncentrace analytu, s je úroveň šumu a H je úroveň signálu analytu.

Tab. 16: Mez detekce a stanovitelnosti u vybraných biogenních aminů

| Vybraný biogenní amin | LOD [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] | LOQ [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] |
|-----------------------|---|---|
| Putrescin | 27,53 | 91,78 |
| Histamin | 5,289 | 17,63 |
| Tyramin | 3,107 | 10,36 |
| Tryptamin | 8,855 | 29,52 |

5.4.2 Analýza reálného vzorku

Odběry vzorků byly prováděny v různých intervalech, přičemž byla sledována koncentrace biogenních aminů v závislosti na stáří sýru. Ve čtyřech různých časech 1 den po prokysání sýru, 28. den, 56 den a 84 den. Každý ze vzorků byl dvakrát extrahován (extrakce A a B) a dvakrát derivatizován (derivatizace X a Y). Od každého odběru byly analyzovány čtyři vzorky.

Tab. 16: Analýza putrescinu ve vzorku sýru

| Označení vzorku | Plocha Peaků A_1 (nástřík 1) | Plocha Peaků A_2 (nástřík 2) | Plocha Peaků A_3 (nástřík 3) | Průměr ploch peaků $A_{\text{prům}}$ | Koncentrace vypočtená z rovnice lin. regrese C_{lin} [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$] |
|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|---|
| 1 A X | 285 | 256 | 224 | 255 | 0,073 |
| 1 A Y | 99 | 120 | 141 | 120 | 0,038 |
| 1 B X | 304 | 409 | 253 | 322 | 0,090 |
| 1 B Y | 74 | 103 | 107 | 95 | 0,031 |
| 28 A X | 54 | 91 | 70 | 72 | 0,025 |
| 28 A Y | 99 | 54 | 41 | 65 | 0,024 |
| 28 B X | 132 | 99 | 128 | 120 | 0,038 |
| 28 B Y | 66 | 25 | 33 | 41 | 0,018 |
| 56 A X | 87 | 249 | 277 | 204 | 0,060 |
| 56 A Y | 318 | 372 | 364 | 351 | 0,098 |
| 56 B X | 277 | 185 | 273 | 245 | 0,070 |
| 56 B Y | 236 | 198 | 265 | 233 | 0,067 |
| 84 A X | 62 | 58 | 46 | 55 | 0,021 |
| 84 A Y | 219 | 223 | 275 | 239 | 0,069 |
| 84 B X | 58 | 54 | 41 | 51 | 0,020 |
| 84 B Y | 37 | 66 | 46 | 50 | 0,020 |

Koncentrace putrescinu byla vyhodnocena z kalibrace A. Z výsledků, které lze vidět v tabulce 16 je patrné, že putrescin se ve vzorcích vyskytoval ve velmi malém množství. Jeho koncentrace se pohybuje nad limitem detekce, ale nedosahuje limitu kvantifikace. Můžeme tedy tvrdit, že putrescin se ve vzorcích objevuje v množství, které nelze použitou metodou přesně stanovit.

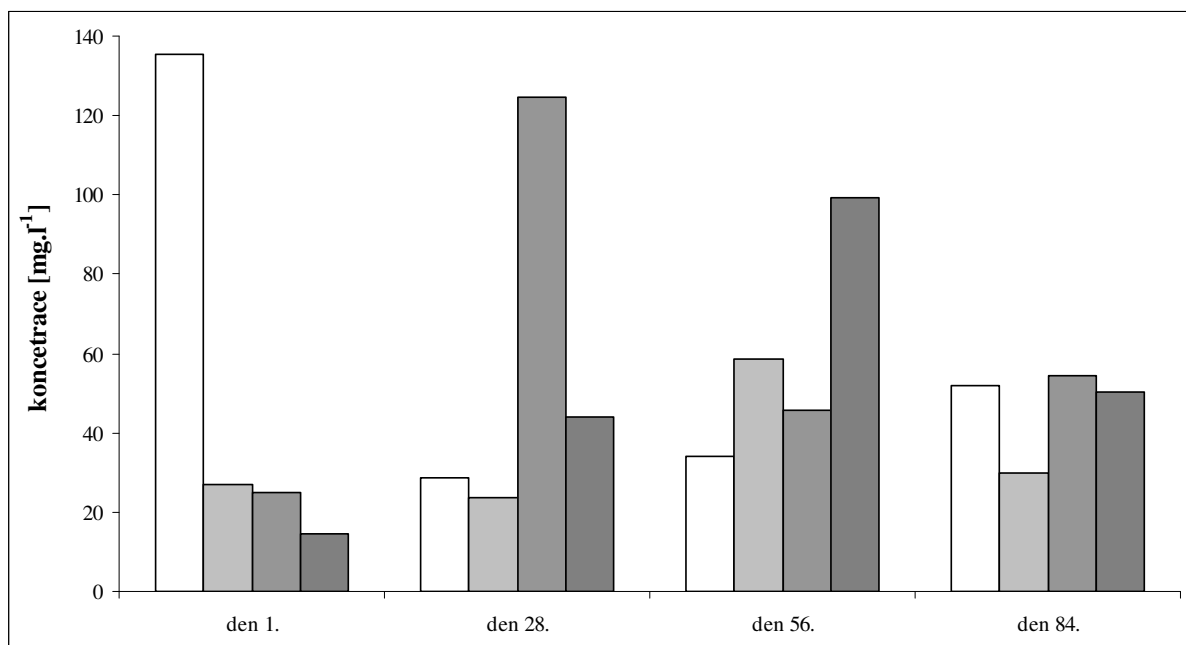
Tab. 17: Analýza histaminu ve vzorku sýru

| Označení vzorku | Plocha Peaků A_1 (nástřík 1) | Plocha Peaků A_2 (nástřík 2) | Plocha Peaků A_3 (nástřík 3) | Průměr ploch peaků $A_{\text{prům}}$ | Koncentrace vypočtená z rovnice lin. regrese c_{lin} [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$] |
|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|---|
| 1 A X | 260 | 169 | 184 | 204 | 0,024 |
| 1 A Y | 87 | 116 | 41 | 81 | 0,019 |
| 1 B X | 70 | 124 | 105 | 100 | 0,019 |
| 1 B Y | 58 | 41 | 17 | 39 | 0,017 |
| 28 A X | 12 | 70 | 74 | 52 | 0,017 |
| 28 A Y | 87 | 37 | 79 | 68 | 0,018 |
| 28 B X | 74 | 83 | 31 | 63 | 0,018 |
| 28 B Y | 70 | 62 | 29 | 54 | 0,017 |
| 56 A X | 17 | 8 | 8 | 11 | 0,015 |
| 56 A Y | 46 | 58 | 12 | 39 | 0,017 |
| 56 B X | 37 | 46 | 66 | 50 | 0,017 |
| 56 B Y | 50 | 66 | 74 | 63 | 0,018 |
| 84 A X | 41 | 58 | 12 | 37 | 0,016 |
| 84 A Y | 50 | 83 | 74 | 69 | 0,018 |
| 84 B X | 25 | 58 | 46 | 43 | 0,017 |
| 84 B Y | 29 | 41 | 8 | 26 | 0,016 |

U biogenního aminu histaminu byla koncentrace stejně jako u putrescinu vyhodnocena z kalibrace A o menších koncentracích. Limit kvantifikace u histaminu je roven $17,63 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. A jak se můžeme přesvědčit v tabulce 17, hladina koncentrace histaminu drží na stejné úrovni, a to zhruba okolo limitu kvantifikace.

Tab. 18: Analýza tyraminu ve vzorku sýru

| Označení vzorku | Plocha Peaku A ₁ (náštrík 1) | Plocha Peaku A ₂ (náštrík 2) | Plocha Peaku A ₃ (náštrík 3) | Průměr ploch peaků A _{prům} | Koncentrace vypočtená z rovnice lin. regrese C _{lin} [mg·l ⁻¹] | Skutečná Koncentrace vzorku C _{real} [mg·l ⁻¹] |
|-----------------|--|--|--|--------------------------------------|---|---|
| 1 A X | 149000 | 250000 | 236000 | 211667 | 5,42 | 135,43 |
| 1 A Y | 25300 | 22700 | 26200 | 24733 | 1,09 | 27,15 |
| 1 B X | 23500 | 21300 | 22800 | 22533 | 0,99 | 24,74 |
| 1 B Y | 13200 | 12500 | 13600 | 13100 | 0,58 | 14,38 |
| 28 A X | 15900 | 29400 | 32700 | 26000 | 1,14 | 28,55 |
| 28 A Y | 19900 | 21700 | 23400 | 21667 | 0,95 | 23,79 |
| 28 B X | 191000 | 195000 | 203000 | 196333 | 4,98 | 124,52 |
| 28 B Y | 44000 | 37200 | 38900 | 40033 | 1,76 | 43,95 |
| 56 A X | 32600 | 93400 | 81900 | 69300 | 1,36 | 34,06 |
| 56 A Y | 95000 | 112000 | 105000 | 104000 | 2,35 | 58,77 |
| 56 B X | 79500 | 65300 | 112000 | 85600 | 1,83 | 45,67 |
| 56 B Y | 142000 | 154000 | 186000 | 160667 | 3,97 | 99,12 |
| 84 A X | 45100 | 46300 | 50300 | 47233 | 2,07 | 51,86 |
| 84 A Y | 63000 | 66500 | 61200 | 63567 | 2,79 | 29,79 |
| 84 B X | 47900 | 49400 | 51600 | 49633 | 2,18 | 54,49 |
| 84 B Y | 40500 | 48900 | 48400 | 45933 | 2,02 | 50,43 |



Obr. 33: Změna koncentrace tyraminu v čase u vzorků sýru

U tyraminu bylo pro vyhodnocení koncentrace použito kalibrace B. Z tabulky 18 můžeme vyčíst, že až na několik anomálií (1 A X, 28 B X, 56 B Y a 84 A Y) koncentrace tyraminu v čase rostla a ustálila se zhruba na koncentraci $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Zvýšené koncentrace u třech uvedených vzorků mohly být způsobeny vnější kontaminací zanesenou do vzorku během úpravy. Proto bylo vhodné tyto hodnoty vyloučit pomocí Grubsova testu pro vyloučení odlehlých hodnot. Grafické srovnání změny koncentrací tyraminu v čase je zobrazeno na obrázku 33. Pro vyloučení odlehlých odnot byl použit Grubsův test. Testovací kritérium T bylo vypočteno podle vztahu (5).

$$T = \frac{|x_i - \bar{x}|}{s} \quad (5)$$

Kde T je testovací kritérium pro Grubsův test, s směrodatná odchylka, \bar{x} průměr a x_i naměřená hodnota.

Tab. 19: Vyloučení odlehlých odnot pomocí Grubsova testu

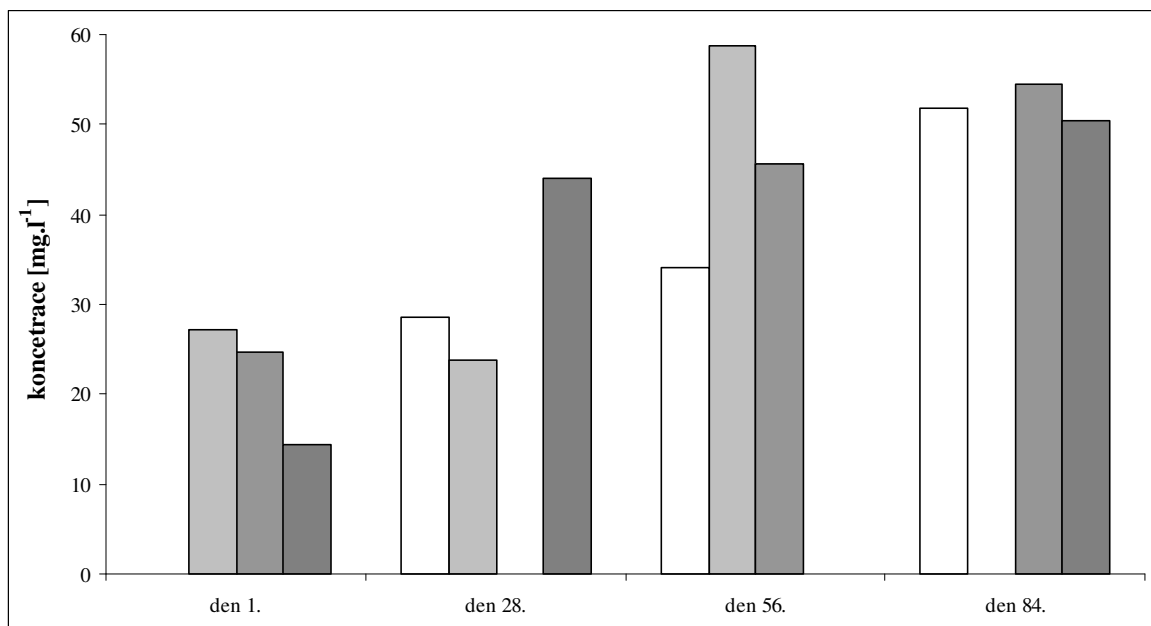
| Délka zrání sýru | Koncentrace Vzorku c [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$] | průměr koncentrací c_{prum} [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$] | směrodatná odchylka s | Kritérium T |
|------------------|--|--|-----------------------|-------------|
| 1. den | 135,4 | 50,4 | 49,3 | 1,725 |
| | 27,2 | | | 0,472 |
| | 24,7 | | | 0,521 |
| | 14,4 | | | 0,731 |
| 28. den | 28,5 | 55,2 | 40,7 | 0,655 |
| | 23,8 | | | 0,772 |
| | 124,5 | | | 1,703 |
| | 43,9 | | | 0,276 |
| 56. den | 34,1 | 59,4 | 24,5 | 1,034 |
| | 58,8 | | | 0,026 |
| | 45,7 | | | 0,560 |
| | 99,1 | | | 1,690 |
| 84. den | 51,9 | 46,6 | 9,8 | 0,536 |
| | 29,8 | | | 1,716 |
| | 54,5 | | | 0,805 |
| | 50,4 | | | 0,391 |

Pokud porovnáme vypočtené kritérium T u všech vzorků v tabulce 19. s kritickou hodnotou $T_{\alpha 0,05} = 1,689$ (kritická hodnota s hladinou významnosti 0,05% pro 4 měřené hodnoty), je patrné, že čtyři vyznačené hodnoty (vzorky 1AX, 28BX, 56BY a 84AY) tuto kritickou hodnotu přesahují. Tyto hodnoty byly vyloučeny a grubsův test byl opakován.

Tab. 20: Ověření vyloučení odlehlých odnot pomocí Grubsova testu

| Délka zrání sýru | Koncentrace Vzorku c [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$] | průměr koncentrací $c_{\text{prům}}$ [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$] | směrodatná odchylka s | Kritérium T |
|------------------|--|--|-------------------------|-------------|
| 1. den | 27,15 | 22,1 | 5,5 | 0,919 |
| | 24,74 | | | 0,480 |
| | 14,38 | | | 1,403 |
| 28. den | 28,55 | 32,1 | 8,6 | 0,413 |
| | 23,79 | | | 0,967 |
| | 43,95 | | | 1,378 |
| 56. den | 34,06 | 46,2 | 10,1 | 1,202 |
| | 58,77 | | | 1,245 |
| | 45,67 | | | 0,053 |
| 84. den | 51,86 | 52,3 | 1,7 | 0,262 |
| | 54,49 | | | 1,288 |
| | 50,43 | | | 1,102 |

Pokud opět porovnáme vypočtené kritérium T u všech vzorků i v tabulce 20. s kritickou hodnotou $T_{\alpha_{0,05}} = 1,412$ (kritická hodnota s hladinou významnosti 0,05 % pro 3 měřené hodnoty), zjistíme, že žádná hodnota toto kritérium nepřevyšuje. Můžeme tedy tvrdit, že v souboru po vyloučení vzorků 1 A X, 28 B X, 56 B Y a 84 A Y není žádná odlehlá hodnota. Grafické znázornění měření po vyloučení odlehlých hodnot je zobrazeno na obrázku 34.



Obr. 34: Změna koncentrace tyraminu v čase u vzorků sýru po vyloučení odlehlých hodnot

Z obrázků 36. je také patrné, že koncentrace tyraminu v čase rostla. První den se jeho koncentrace pohybovala od $14,38 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ do $27,15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. 28. den koncentrace tyraminu mírně vzrostla a pohybovala se v rozmezí od $23,79 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ do $43,95 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a později 56. vzrostla až na rozsah od $34,06 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ až po $58,77 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Při posledním odběru 84. den se koncentrace opět mírně zvýšila a pohybovala se v intervalu od $50,43 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ do $54,49 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Úprava a odběry vzorku byly prováděny několikrát vedle sebe, bylo zde několik kroků, u kterých mohlo dojít k odchylkám, což je patrně důvod mírného kolísání naměřených hodnot koncentrace tyraminu.

Tab. 20: Analýza tryptaminu ve vzorku sýru

| Označení vzorku | Plocha Peaků A_1 (nástřík 1) | Plocha Peaků A_2 (nástřík 2) | Plocha Peaků A_3 (nástřík 3) | Průměr ploch peaků $A_{\text{prům}}$ | Koncentrace vypočtená z rovnice lin. regrese C_{lin} [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$] |
|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|---|
| 1 A X | 41 | 37 | 17 | 32 | 0,017 |
| 1 A Y | 17 | 12 | 12 | 14 | 0,015 |
| 1 B X | 37 | 12 | 26 | 25 | 0,016 |
| 1 B Y | 12 | 4 | 4 | 7 | 0,015 |
| 28 A X | 4 | 29 | 21 | 18 | 0,016 |
| 28 A Y | 33 | 21 | 21 | 25 | 0,016 |
| 28 B X | 17 | 25 | 25 | 22 | 0,016 |
| 28 B Y | 37 | 4 | 0 | 14 | 0,015 |
| 56 A X | 4 | 17 | 12 | 11 | 0,015 |
| 56 A Y | 4 | 21 | 37 | 21 | 0,016 |
| 56 B X | 25 | 17 | 37 | 26 | 0,017 |
| 56 B Y | 17 | 66 | 33 | 39 | 0,018 |
| 84 A X | 12 | 17 | 21 | 17 | 0,016 |
| 84 A Y | 12 | 21 | 8 | 14 | 0,015 |
| 84 B X | 8 | 17 | 4 | 10 | 0,015 |
| 84 B Y | 8 | 12 | 4 | 8 | 0,015 |

U biogenního aminu tryptaminu byla pro vyhodnocení koncentrace opět použita kalibrace A. Stanovená koncentrace tryptaminu byla nízká – nepřevyšovala limit kvantifikace ($0,030 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Přítomnost tryptaminu byla potvrzena (tabulka 19), avšak jeho koncentrace nebylo možné přesně stanovit.

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo optimalizovat metodu UPLC-MS/MS pro analýzu biogenních aminů putrescinu, histaminu, tyraminu a tryptaminu. Pro analýzu byl použit hmotnostní spektrometr API 2000 od firmy AB sciex (USA), separace se prováděla pomocí kapalinového chromatografu Dionex ultimate 3000 (Německo) na analytické koloně ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 (3 x 50; 1,8 μm) s předkolonou Agilent technologies (USA).

Optimálním nastavením LC-MS/MS pro současnou analýzu vybraných biogenních aminů bylo:

- Teplota iontového zdroje (elektrospej) 470 °C
- Teplota analytické kolony 30 °C
- Eluční gradient typu C (rychlý nástup acetonitrilu)
- Mobilní fáze acetonitril a 0,1 % kyselina mravenčí v poměru určeným elučním gradientem
- Optimalizace ostatních parametrů hmotnostního detektoru (napětí iontového spreje a deklasterační potenciál) využito nastavení doporučené výrobcem (software Analyst)

Za těchto podmínek byl retenční čas u putrescinu roven 2,44 min, u histaminu 2,78 min, u tyraminu 3,65 min a u tryptaminu 1,88 min.

Ve vzorcích sýru s nízkodohřívanou sýřeninou (holandského typu) byla stanovena po 1 dni zrání koncentrace tyraminu v rozmezí 14,38 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ až 27,15 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, po 28 dnech zrání byla koncentrace tyraminu v rozmezí 23,79 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ až 43,95 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, po 56 dnech zrání se koncentrace tyraminu pohybovala od 34,06 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ do 58,77 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a u posledního odběru po 84 denním zrání sýru se koncentrace tyraminu pohybovala od 50,43 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ do 54,49 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Můžeme tedy tvrdit, že koncentrace tyraminu vykazovala v čase vzrůstající charakter. Odběry a úpravy jednotlivých vzorků, které byly prováděny nezávisle na sobě, způsobily mírný rozptyl koncentrací. Avšak limitní koncentrace tyraminu není legislativou stanovena. U biogenních aminů putrescinu, histaminu a tryptaminu se jejich koncentrace pohybovala nad hranicí detekce, ale pod úrovní kvantifikace. Můžeme tedy tvrdit, že putrescin, histamin a tryptamin se ve vzorcích vyskytoval ve velmi malém množství, které nesouvisí se zráním sýru.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] JANOUŠKOVÁ, Magda. *Biogenní aminy* [online]. 2010 [cit. 2013-10-25]. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta. Vedoucí práce Danuše Lefnerová. Dostupné z: <<http://theses.cz/id/b0dmp3/>>.
- [2] BRÝDLOVÁ, Nikola. *Biogenní aminy v pivu, získané od konkrétního dodavatele*. [online]. 2010 [cit. 2013-10-25]. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce František Buňka. Dostupné z: <<http://theses.cz/id/yobo9p/>>.
- [3] VAVŘÍK, Tomáš. *Současné stanovení vybraných volných aminokyselin a biogenních aminů pomocí kapalinové chromatografie* [online]. 2012 [cit. 2013-10-25]. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce František Buňka. Dostupné z: <<http://theses.cz/id/2kkrxu/>>.
- [4] HUDCOVÁ, Kateřina. *Stanovení biogenních aminů v produktech živočišného původu z farmářské produkce* [online]. 2012 [cit. 2013-10-25]. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce Helena Velichová. Dostupné z: <<http://theses.cz/id/7um9s0/>>.
- [6] DOSTÁL, J.; KAPLAN, P.; et al. *Lékařská chemie II.*; Masarykova univerzita: Brno, 2003. 77 - 82 str. ISBN 80-210-2731-2.
- [7] Příloha k vyhlášce č 305/2004 Sb. Sběrka zákonů č. 305/2004, částka 100, s. 6400
- [8] Nařízení komise (ES) 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny.
- [9] BUŇKOVÁ, Leona et al. Monitoring of biogenic amines in cheeses manufactured at small-scale farms and in fermented dairy products in the Czech Republic. *Elsevier: Food Chemistry*. 2013, č. 141, 548–551.
- [10] SAGRATINI, G. et al Simultaneous determination of eight underivatized biogenic amines in fish by solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Elsevier: Food Chemistry*. 2011, č. 132, 537–543.
- [11] LI, Yong et al. Simultaneous determination of ten biogenic amines in a thymopolypeptides injection using ultra-performance liquid chromatography

- coupled with electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. *Elsevier: Journal of Chromatography B*. 2013, č. 929, s. 33-39.
- [12] CHURÁČEK, Jaroslav. *Pokroky v teorii a instrumentaci moderních analytických metod*. druhé přepracované vydání. Pardubice: Vysoká škola chemicko-technologická v Pardubicích, 1988.
- [13] High Performance Liquid Chromatography, HPLC. VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE. [online]. [cit. 2014-01-23]. Dostupné z: http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/hplc/HPLC/hplc.html
- [14] KRAJANCOVÁ, Pavla. *ANALÝZA BIOGENNÍCH AMINŮ V SÝRECH INFRAČERVENOU A RAMANOVOU SPEKTROMETRIÍ*. Olomouc, 2011. Diplomová práce. UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI. Vedoucí práce Ing. David Milde, Ph.D.
- [15] HONG, Joo Yeon. Profiling analysis of biogenic amines and their acidic metabolites in mouse brain tissue using gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2013, č. 940, 94–103.
- [16] ROMANO, Andrea. Determination of biogenic amines in wine by thin-layer chromatography/densitometry. *Food Chemistry*. 2012, č. 135, 1392–1396.
- [17] GINTEROVÁ, Pavlína. Determination of selected biogenic amines in red wines by automated on-line combination of capillary isotachopheresis–capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography B*. 2012, č. 904, 135–139.
- [18] SÝKORA, David et al. MODERNÍ STACIONÁRNÍ FÁZE PRO RP-HPLC. *Chemické listy*. 2007, č. 101, 190–199.
- [19] SMĚLÁ, Dana et al. CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ V TRVANLIVÝCH SALÁMECH BĚHEM FERMENTACE A SKLADOVÁNÍ. *Chemické listy*. 2004, č. 98, 432–437.
- [20] HOLČAPEK, MICHAL a PAVEL JANDERA. SPOJENÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE (HPLC/MS). *Chemické listy*. 1998, č. 98, 278 - 286.

- [21] HANKOVÁ, Lucie. *Vývoj HPLC metody na stanovení meziproductů Silodosinu a její optimalizace, identifikace nečistot metodou LC/MS*. Olomouc, 2014. Diplomová práce. UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI. Vedoucí práce Přemysl Indrák.
- [22] CVAČKA, Josef. Instrumentace pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. *Univerzita Karlova v Praze: Přírodovědecká fakulta* [online]. 2010. vyd. [cit. 2014-01-23]. Dostupné z: www.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc2.pdf
- [23] *Chromatografická kolona* [online]. 2009 [cit. 2014-01-23]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Teorie/hplc_column.html
- [24] CHURÁČEK, Jaroslav et al. *Analytická separace látek*. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1990.
- [25] DANG, Andy et al. The use of aqueous normal phase chromatography as an analytical tool for food analysis: Determination of histamine as a model system. *Food Chemistry*. 2013, č. 141, 4226–4230.
- [26] ORDÓÑEZ, J.L. et al A survey of biogenic amines in vinegars. *Food Chemistry*. 2013, č. 141, 2713–2719.
- [27] HOLČAPEK, Michal et al. Hmotnostní spektrometrie v organické analýze. *Universita Pardubice* [online]. 2012 [cit. 2014-01-25]. Dostupné z: http://holcapek.upce.cz/teaching/01_Uvod.pdf
- [28] HOLČAPEK, Michal et al. Ionizační techniky. *Universita Pardubice* [online]. 2012 [cit. 2014-01-25]. Dostupné z: http://holcapek.upce.cz/teaching/02_IonizacniTechniky.pdf
- [29] HOLČAPEK, Michal. Hmotnostní analyzátoary. *Universita Pardubice* [online]. 2012 [cit. 2014-01-26]. Dostupné z: http://holcapek.upce.cz/teaching/03_HmotnostniAnalyzatory.pdf
- [30] Quadrupole Mass Spectrometry. *The Chemistry Hypermedia Project* [online]. 2003 [cit. 2014-01-27]. Dostupné z: <http://www.files.chem.vt.edu/chem-ed/ms/quadrupo.html>

- [31] POUSTKA. *METODY SEPARACE A DETEKCE IONT Ů* [online]. VŠCHT v Praze, 2007 [cit. 2014-01-27]. Dostupné z: <http://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20MS%20SEPARACE%20A%20DETEKCE%20IONTU%20102007.pdf>
- [32] NĚMCOVÁ, Irena, Ludmila ČERMÁKOVÁ a Petr RYCHLOVSKÝ. *Spektrometrické analytické metody I*. Praha: Karolinum, 1997.
- [33] GOSETTI, Fabio, Eleonora MAZZUCCO, Maria Carla GENNARO a Emilio MARENGO. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013, vol. 405, 2-3. DOI: 10.1007/s00216-012-6269-z.
- [34] THERMO SCIENTIFIC - DIONEX. *Matual for Acclaim Mixed Mode WCX* [online]. [cit. 2014-01-30]. Dostupné z: <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/66620-Man-065221-02-Acclaim-MM-WCX1-Jul09.pdf>
- [35] PHENOMENEX. *The ultimate guide to HPLC/UPLC reverse phase selectivity* [online]. [cit. 2014-01-30]. Dostupné z: <http://www.phenomenex.com/Info/WebDocumentServe/reversedguide.pdf>
- [36] ACQUITY. *UPLC columns* [online]. [cit. 2014-01-30]. Dostupné z: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001140en.pdf>
- [37] COURY, Charity a Ann M. DILLNER. ATR-FTIR characterization of organic functional groups and inorganic ions in ambient aerosols at a rural site. *Atmospheric Environment*. 2009, vol. 43, issue 4, s. 940-948. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2008.10.056.
- [38] NING, Shujing, Jinmao YOU, Zhiwei SUN, Shijuan ZHANG a Zhongyin JI. Fluorescence Probe of 10-Phenyl-acridone-2-sulfonyl Chloride and Its Application for Determination of Free Aliphatic Amines in Environmental Samples by HPLC with Fluorescence Detection and APCI-MS. *Chromatographia*. 2012, vol. 75, 19-20, s. 1107-1116. DOI: 10.1007/s10337-012-2298-1.
- [39] ČUŠ, Frannc et al. Analytical determination of Dolenjska region wines quality. *Food Control*. 2013, č. 33, s. 274-280.

- [40] H.A. DE JONG, Wilhelmina et al. Current status and future developments of LC-MS/MS in clinical chemistry for quantification of biogenic amines. *Clinical Biochemistry*. 2011, č. 44, s. 95-103.
- [41] DANG, Andy et al. The use of aqueous normal phase chromatography as an analytical tool for food analysis: Determination of histamine as a model system. *Food Chemistry*. 2013, č. 141, s. 4226-4230
- [42] PARK, Joon Shik et al. Monitoring the contents of biogenic amines in fish and fish products consumed in Korea. *Food Control*. 2010, č. 21, s. 1219-1226.
- [43] LIU, Ran et al. Determination of polyamines in human urine by precolumn derivatization with benzoyl chloride and high-performance liquid chromatography coupled with Q-time-of-flight mass spectrometry. *Talanta*. 2011, č. 83, s. 751-756.
- [44] REA, S., CECCHINI, S., STOCCHI, R., LOSCHI, A. R., & RICCIUTELLI, M. Chemical and physical traits and evaluation of biogenic amine content by RP-HPLC technique in Ciauscolo salami. *Industrie Alimentari (Italy)*, 2005, č.443, s. 38-45.
- [45] FIALOVÁ, Jana et al. VÝSKYT RODU *Lactobacillus* A BIOGENNÍCH AMINŮ V LABORATORNĚ VYROBENÉ MAJONÉZE A TATARSKÉ OMÁČCE. *Chemické Listy*. 2013, č. 107, s. 308-312.
- [46] DADÁKOVÁ, Eva, Martin KŘÍŽEK a Tamara PELIKÁNOVÁ. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*. 2009, vol. 116, issue 1. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.02.018.
- [47] SPIZZIRRI, U. Gianfranco, Donatella RESTUCCIA, Manuela CURCIO, Ortensia I. PARISI, Francesca IEMMA a Nevio PICCI. Determination of biogenic amines in different cheese samples by LC with evaporative light scattering detector. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2013, vol. 29, issue 1, s. 43-51. DOI: 10.1016/j.jfca.2012.09.005.

- [48] HERNÁNDEZ-ORTE, P., A.C. LAPEÑA, A. PEÑA-GALLEGO, J. ASTRAIN, C. BARON, I. PARDO, L. POLO, S. FERRER, J. CACHO, V. FERREIRA. Biogenic amine determination in wine fermented in oak barrels: Factors affecting formation. *Food Research International*. 2008, vol. 41, issue 7, s. 697-706. DOI: 10.1016/j.foodres.2008.05.002.
- [49] TANG, Tao, Tianyu SHI, Kun QIAN, Pingliang LI, Jianqiang LI, I. CAO, L. POLO, S. FERRER, J. CACHO, V. FERREIRA. Determination of biogenic amines in beer with pre-column derivatization by high performance liquid chromatography: Factors affecting formation. *Journal of Chromatography B*. 2009, vol. 877, 5-6, s. 2713-2719. DOI: 10.1016/j.jchromb.2008.12.064.
- [50] PAWAR, Rahul S., Erich RESTUCCIA, Ali Reza FARDIN-KIA, Jeanne I. RADER, Jianqiang LI, Yongsong CAO, L. POLO, S. FERRER, J. CACHO, V. FERREIRA. Determination of selected biogenic amines in *Acacia rigidula* plant materials and dietary supplements using LC–MS/MS methods: Factors affecting formation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014, vol. 88, 5-6, s. 457-466. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.09.012.
- [51] LI, Guoliang, Lihua DONG, Aihong WANG, Wenli WANG, Na HU, Jinmao YOU, L. POLO, S. FERRER, J. CACHO, V. FERREIRA. Simultaneous determination of biogenic amines and estrogens in foodstuff by an improved HPLC method combining with fluorescence labeling: Factors affecting formation. *LWT - Food Science and Technology*. 2014, vol. 55, issue 1, s. 457-466. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.06.028.
- [52] RABIE, Mohamed A., Cidalia PERES, F. Xavier MALCATA, Wenli WANG, Na HU, Jinmao YOU, L. POLO, S. FERRER, J. CACHO, V. FERREIRA. Evolution of amino acids and biogenic amines throughout storage in sausages made of horse, beef and turkey meats: Factors affecting formation. *Meat Science*. 2014, vol. 96, issue 1, s. 355-361. DOI: 10.1016/j.meatsci.2013.05.042.

- [53] HÄKKINEN, Merja R., Antti ROINE, Seppo AURIOLA, Antti TUOKKO, Erik VESKIMÄE, Tuomo A. KEINÄNEN, Terho LEHTIMÄKI, Niku OKSALA, Jouko VEPSÄLÄINEN, V. FERREIRA. Analysis of free, mono- and diacetylated polyamines from human urine by LC–MS/MS: Factors affecting formation. *Journal of Chromatography B*. 2013, vol. 941, issue 1, s. 81-89. DOI: 10.1016/j.jchromb.2013.10.009.
- [54] GINTEROVÁ, Pavlína, Jozef MARÁK, Andrea STAŇOVÁ, Vítězslav MAIER, Juraj ŠEVČÍK, Dušan KANIANSKY, Terho LEHTIMÄKI, Niku OKSALA, Jouko VEPSÄLÄINEN, V. FERREIRA. Determination of selected biogenic amines in red wines by automated on-line combination of capillary isotachopheresis–capillary zone electrophoresis: Factors affecting formation. *Journal of Chromatography B*. 2012, vol. 904, issue 1, s. 135-139. DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.07.018.
- [55] SPIZZIRRI, Zhongqi, Jiro OKADA, Andrei R. TIMERBAEV, Takeshi HIROKAWA, Juraj ŠEVČÍK, Dušan KANIANSKY, Terho LEHTIMÄKI, Niku OKSALA, Jouko VEPSÄLÄINEN, V. FERREIRA. Sensitive profiling of biogenic amines in urine using CE with transient isotachophoretic preconcentration: Factors affecting formation. *Journal of Separation Science*. 2009, vol. 32, 23â 24, s. 4143-4147. DOI: 10.1002/jssc.200900519.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|-----------|---|
| BA | Biogenní aminy |
| PM | Přípustné množství |
| ES | Evropská směrnice |
| HPLC | Vysokoučinná kapalinová chromatografie |
| UPLC | Ultraúčinná kapalinová chromatografie |
| t_R | Retenční čas |
| t_m | Mrtvý retenční čas |
| t'_R | Redukovaný retenční čas |
| n | Počet teoretických pater v analytické koloně |
| w | Šířka peaku |
| H | Výškový ekvivalent jednoho teoretického patra v analytické koloně |
| L | Délka analytické kolony |
| $R_{1,2}$ | Rozlišení separace |
| C18 | Oktadecilový řetězec |
| C8 | Oktanový řetězec |
| UV | Ultrafialová oblast světla |
| VIS | Viditelná oblast světla |
| MS | Hmotnostní spektrometrie |
| m/z | Poměr hmotnosti ku náboji molekulového iontu |
| TOF | Analyzátor doby letu |
| Q | Kvadrupól |
| IT | Iontová past |
| QqQ | Trojité kvadrupól |
| LOD | Limit detekce |

| | |
|------------|--|
| LOQ | Limit kvantifikace |
| UPLC-MS/MS | Ultraúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí |
| LC-MS/MS | Kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí |
| HIM | Histamin |
| PUT | Putrescin |
| TYR | Tyramin |
| TRYP | Tryptamin |
| dns | Dansylchlorid |
| ACN | Acetonitril |
| csp | Count per second |
| c | koncentrace |
| mg | miligram |
| g | gram |
| kg | kilogram |
| l | litr |
| °C | Stupně celsia |
| PTFE | Polytetrafluorethen (teflon) |
| mm | milimetr |
| µm | mikrometr |
| kV | kilovolt |
| eV | elektronvolt |
| U | Napětí |
| V | volt |
| FLD | Fluorescenční detektor |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| Obr. 1: Strukturální vzorec putrescinu..... | 11 |
| Obr. 2: Strukturální vzorec tyraminu..... | 11 |
| Obr. 3: Strukturální vzorec histaminu | 11 |
| Obr. 4: Strukturální vzorec spermidinu | 11 |
| Obr. 5: Dekarboxylace aminokyseliny na biogenní amin..... | 12 |
| Obr. 6: Reakce biogenního aminu s kyselinou dusičnou za vzniku N-nitrosaminů | 15 |
| Obr. 7: Schéma kapalinového chromatografu [22]..... | 23 |
| Obr. 8: Šesticestný dávkovací kohout [22]..... | 23 |
| Obr. 9: Schématické znázornění kolony pro HPLC [23]..... | 24 |
| Obr. 10: Ionizace elektrosprejem [28] | 27 |
| Obr. 11: Chemická ionizace za atmosférického tlaku [28]..... | 27 |
| Obr. 12: Fotoionizace za atmosférického tlaku [28]..... | 28 |
| Obr. 13: Kvadrupólový hmotnostní analyzátor [30]..... | 29 |
| Obr. 14: Názorné schéma funkce trojitého kvadrupólu | 29 |
| Obr. 15: Schéma 3D iontové pasti [29] | 30 |
| Obr. 16: Hmotnostní analyzátor doby letu (TOF) [29]..... | 30 |
| Obr. 17: Hmotnostní spektrum tryptaminu derivatizovaného dansylchloridem (koncentrace 5 mg·l ⁻¹ , pozitivní ionizace)..... | 38 |
| Obr. 18: Hmotnostní spektrum tryptaminu derivatizovaného dansylchloridem (koncentrace 5 mg·l ⁻¹ , negativní ionizace) | 39 |
| Obr. 19: Hmotnostní spektrum histaminu derivatizovaného dansylchloridem (koncentrace 5 mg·l ⁻¹ , pozitivní ionizace)..... | 40 |
| Obr. 20: Hmotnostní spektrum histaminu derivatizovaného dansylchloridem (koncentrace 5 mg·l ⁻¹ , negativní ionizace) | 41 |
| Obr. 21: Hmotnostní spektrum tyraminu derivatizovaného dansylchloridem (koncentrace 5 mg·l ⁻¹ , pozitivní ionizace)..... | 42 |
| Obr. 22: Hmotnostní spektrum tyraminu derivatizovaného dansylchloridem (koncentrace 5 mg·l ⁻¹ , negativní ionizace) | 42 |
| Obr. 23: Hmotnostní spektrum putrescinu derivatizovaného dansylchloridem (koncentrace 5 mg·l ⁻¹ , pozitivní ionizace)..... | 43 |

| | |
|--|----|
| Obr. 24: Hmotnostní spektrum putrescinu derivatizovaného dansylchloridem (koncentrace $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, negativní ionizace) | 44 |
| Obr. 25: Hmotnostní spektrum nederivatizovaného histaminu (koncentrace $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, pozitivní ionizace) | 45 |
| Obr. 26: Hmotnostní spektrum nederivatizovaného histaminu (koncentrace $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, negativní ionizace)..... | 46 |
| Obr. 27: Průběh elučního gradientu A | 50 |
| Obr. 28: Průběh elučního gradientu B | 50 |
| Obr. 29: Průběh elučního gradientu C | 51 |
| Obr. 30: Chromatogram směsi vybraných biogenních aminů (Koncentrace standardu $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$)..... | 54 |
| Obr. 31: Kalibrační přímky A (koncentrace vybraných biogenních aminů: $0,025 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$; $0,05 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$; $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$; $0,25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) | 55 |
| Obr. 32: Kalibrační přímky B (koncentrace vybraných biogenních aminů: $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$; $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$; $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a $4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) | 56 |
| Obr. 33: Změna koncentrace tyraminu v čase u vzorků sýru..... | 59 |
| Obr. 34: Změna koncentrace tyraminu v čase u vzorků sýru po vyloučení odlehlých hodnot..... | 62 |

SEZNAM TABULEK

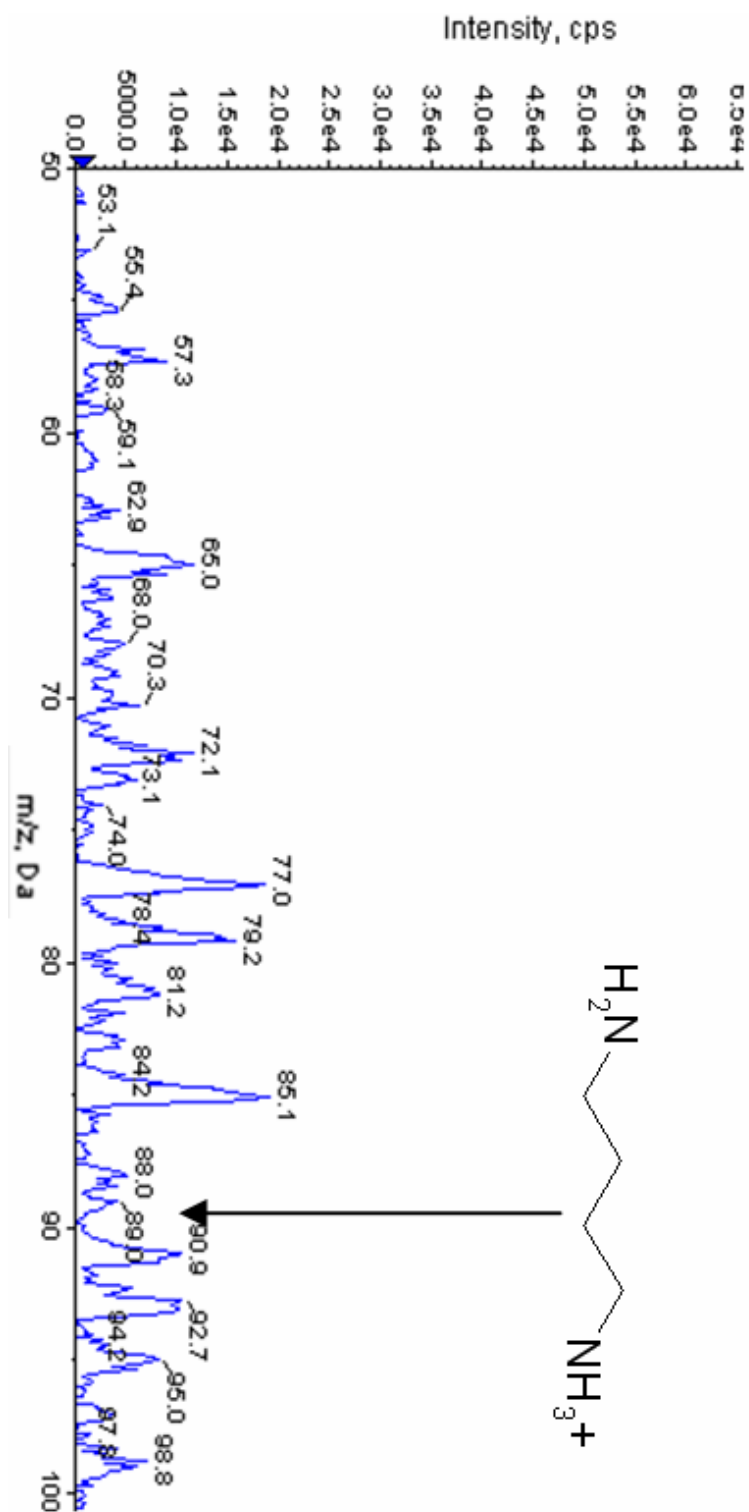
| | |
|---|----|
| <i>Tab. 1: Srovnání hmotnostních analyzátorů: kvadrupólu (Q), iontové pasti (IT) a analyzátoru doby letu (TOF) [29]</i> | 31 |
| <i>Tab. 2: Srovnání hmotnostních analyzátorů podle meze detekce a stanovitelnosti</i> | 32 |
| <i>Tab. 3: Optimalizace nastavení hmotnostního detektoru pro analýzu jednotlivých biogenních aminů derivatizovaných dansylchloridem</i> | 37 |
| <i>Tab. 4: Molekulové hmotnosti analyzovaných biogenních aminů a derivatizovaných biogenních aminů</i> | 38 |
| <i>Tab. 5: Srovnání intenzit odezvy (csp) při analýze derivatizovaných biogenních aminů o dvou různých koncentracích</i> | 44 |
| <i>Tab. 6: Optimalizace nastavení hmotnostního detektoru pro analýzu jednotlivých biogenních aminů, které nebyly derivatizovány</i> | 45 |
| <i>Tab. 7: Hmoty matečných a dceřiných iontu vybraných biogenních aminů pro MS/MS analýzu</i> | 47 |
| <i>Tab. 8: Porovnání intenzity signálu odezvy LC-MS/MS při různých teplotách ionizace pro vybrané biogenní aminy</i> | 48 |
| <i>Tab. 9: Intenzita a retenční čas chromatografického záznamu u vybraných biogenních aminů v závislosti na změně teploty</i> | 49 |
| <i>Tab. 10: Průběh elučního gradientu varianta A</i> | 50 |
| <i>Tab. 11: Průběh elučního gradientu B</i> | 51 |
| <i>Tab. 12: Průběh elučního gradientu varianta C</i> | 51 |
| <i>Tab. 13: Závislost retenčního času a intenzity peaku na typu gradientu</i> | 52 |
| <i>Tab. 14: Srovnání retenčního času a intenzity peaku dvou mobilních fází u vybraných analytů</i> | 53 |
| <i>Tab. 15: Hmoty matečných a dceřiných iontů sledovaných při UPLC–MS/MS</i> | 53 |
| <i>Tab. 16: Mez detekce a stanovitelnosti u vybraných biogenních aminů</i> | 57 |
| <i>Tab. 16: Analýza putrescinu ve vzorku sýru</i> | 57 |
| <i>Tab. 17: Analýza histaminu ve vzorku sýru</i> | 58 |
| <i>Tab. 18: Analýza tyraminu ve vzorku sýru</i> | 59 |
| <i>Tab. 19: Vyloučení odlehlých odnot pomocí Grubsova testu</i> | 60 |
| <i>Tab. 20: Analýza tryptaminu ve vzorku sýru</i> | 63 |

SEZNAM PŘÍLOH

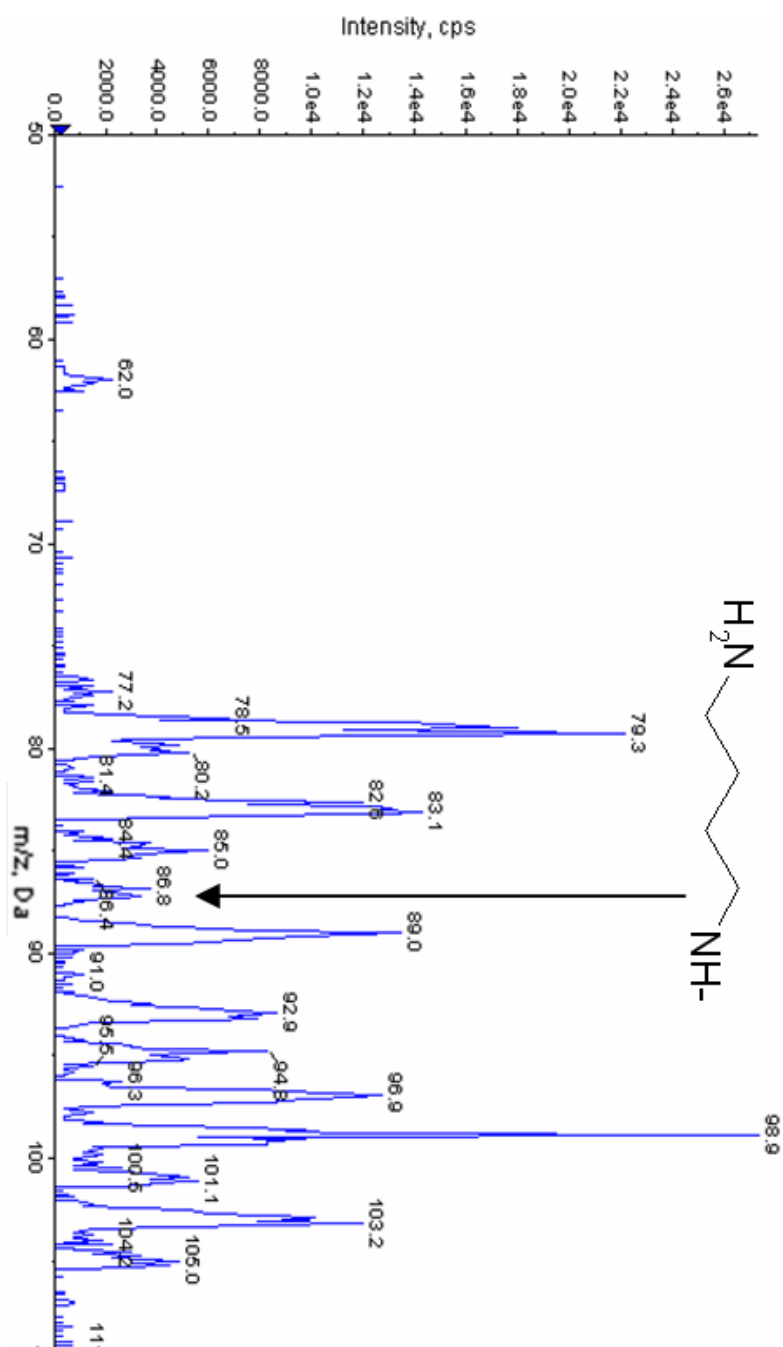
| | |
|---|----|
| Příloha P I: Hmotnostní spektrum nederivatizovaného putrescinu (koncentrace 5 mg·l ⁻¹ , pozitivní ionizace) | 79 |
| Příloha P II: Hmotnostní pspektrum nederivatizovaného putrescinu (koncentrace 5 mg·l ⁻¹ , negativní ionizace)..... | 80 |
| Příloha P III: Hmotnostní spektrum nederivatizovaného tryptaminu (koncentrace 5 mg·l ⁻¹ , pozitivní ionizace)..... | 81 |
| Příloha P IV: Hmotnostní spektrum nederivatizovaného tryptaminu (koncentrace 5 mg·l ⁻¹ , negativní ionizace)..... | 82 |
| Příloha P V: Hmotnostní spektrum nederivatizovaného tyraminu (koncentrace 5 mg·l ⁻¹ , pozitivní ionizace) | 83 |
| Příloha P VI: Hmotnostní spektrum nederivatizovaného tyraminu (koncentrace 5 mg·l ⁻¹ , - negativní ionizace)..... | 84 |
| Příloha P VII: MS/MS spektrum putrescinu ve spojení s UPLC (1 mg·l ⁻¹ , teplota iontového zdroje 450 °C) | 85 |
| Příloha P VIII: MS/MS spektrum putrescinu ve spojení s UPLC (1 mg·l ⁻¹ , teplota iontového zdroje 480 °C) | 86 |
| Příloha P IX: MS/MS spektrum histaminu ve spojení s UPLC (1 mg·l ⁻¹ , teplota iontového zdroje 450 °C)..... | 87 |
| Příloha P X: MS/MS spektrum histaminu ve spojení s UPLC (1 mg·l ⁻¹ , teplota iontového zdroje 470 °C) | 88 |
| Příloha P XI: MS/MS spektrum tyraminu ve spojení s UPLC (1 mg·l ⁻¹ , teplota iontového zdroje 450 °C)) | 89 |
| Příloha P XII: MS/MS spektrum tyraminu ve spojení s UPLC (1 mg·l ⁻¹ , teplota iontového zdroje 470 °C) | 90 |
| Příloha P XIII: MS/MS spektrum tryptaminu ve spojení s UPLC (1 mg·l ⁻¹ , teplota iontového zdroje 450 °C) | 91 |
| Příloha P XIV: MS/MS spektrum tryptaminu ve spojení s UPLC (1 mg·l ⁻¹ , teplota iontového zdroje 470 °C) | 92 |
| Příloha P XV: MS/MS spektrum putrescinu ve spojení s UPLC (1 mg·l ⁻¹ , eluční gradient A)..... | 93 |

| | |
|---|-----|
| Příloha P XVI: MS/MS spektrum histaminu ve spojení s UPLC (1 mg·l ⁻¹ , eluční gradient A)..... | 94 |
| Příloha P XVII: MS/MS spektrum tyraminu ve spojení s UPLC (1 mg·l ⁻¹ , eluční gradient A)..... | 95 |
| Příloha P XVIII: MS/MS spektrum tryptaminu ve spojení s UPLC (1 mg·l ⁻¹ , eluční gradient A)..... | 96 |
| Příloha P XIX: MS/MS spektrum putrescinu ve spojení s UPLC (1 mg·l ⁻¹ , eluční gradient B))..... | 97 |
| Příloha P XX: MS/MS spektrum histaminu ve spojení s UPLC (1 mg·l ⁻¹ , eluční gradient B)..... | 98 |
| Příloha P XXI: MS/MS spektrum tyraminu ve spojení s UPLC (1 mg·l ⁻¹ , eluční gradient B)..... | 99 |
| Příloha P XXII: MS/MS spektrum tryptaminu ve spojení s UPLC (1 mg·l ⁻¹ , eluční gradient B)..... | 100 |
| Příloha P XXIII: MS/MS spektrum putrescinu ve spojení s UPLC (1 mg·l ⁻¹ , eluční gradient C)..... | 101 |
| Příloha P XXIV: MS/MS spektrum histaminu ve spojení s UPLC (1 mg·l ⁻¹ , eluční gradient C)..... | 102 |
| Příloha P XXV: MS/MS spektrum tyraminu ve spojení s UPLC (1 mg·l ⁻¹ , eluční gradient C)..... | 103 |
| Příloha P XXVI: MS/MS spektrum tryptaminu ve spojení s UPLC (1 mg·l ⁻¹ , eluční gradient C)..... | 104 |
| Příloha P XXVII: MS/MS spektrum putrescinu ve spojení s UPLC (1 mg·l ⁻¹ , mobilní fáze acetonitril a 0,1 % kyselina mravenčí)..... | 105 |
| Příloha P XXVIII MS/MS spektrum histaminu ve spojení s UPLC (1 mg·l ⁻¹ , mobilní fáze acetonitril a 0,1 % kyselina mravenčí)..... | 106 |
| Příloha P XXIX: MS/MS spektrum tyraminu ve spojení s UPLC (1 mg·l ⁻¹ , mobilní fáze acetonitril a 0,1 % kyselina mravenčí)..... | 107 |
| Příloha P XXX: MS/MS spektrum tryptaminu ve spojení s UPLC (1 mg·l ⁻¹ , mobilní fáze acetonitril a 0,1 % kyselina mravenčí)..... | 108 |

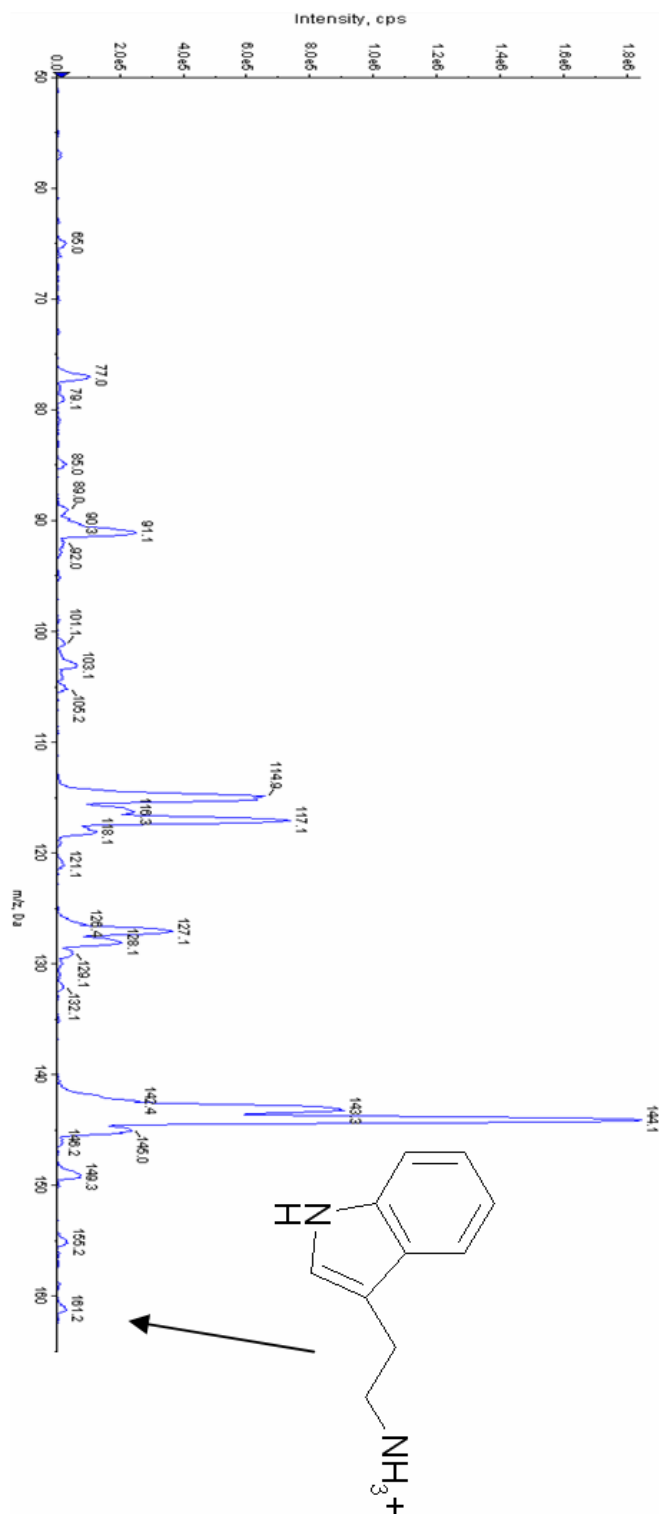
**PŘÍLOHA PI: HMOTNOSTNÍ SPEKTRUM
NEDERIVATIZOVANÉHO PUTRESCINU
(KONCENTRACE 5 MG·L⁻¹, POZITIVNÍ IONIZACE)**



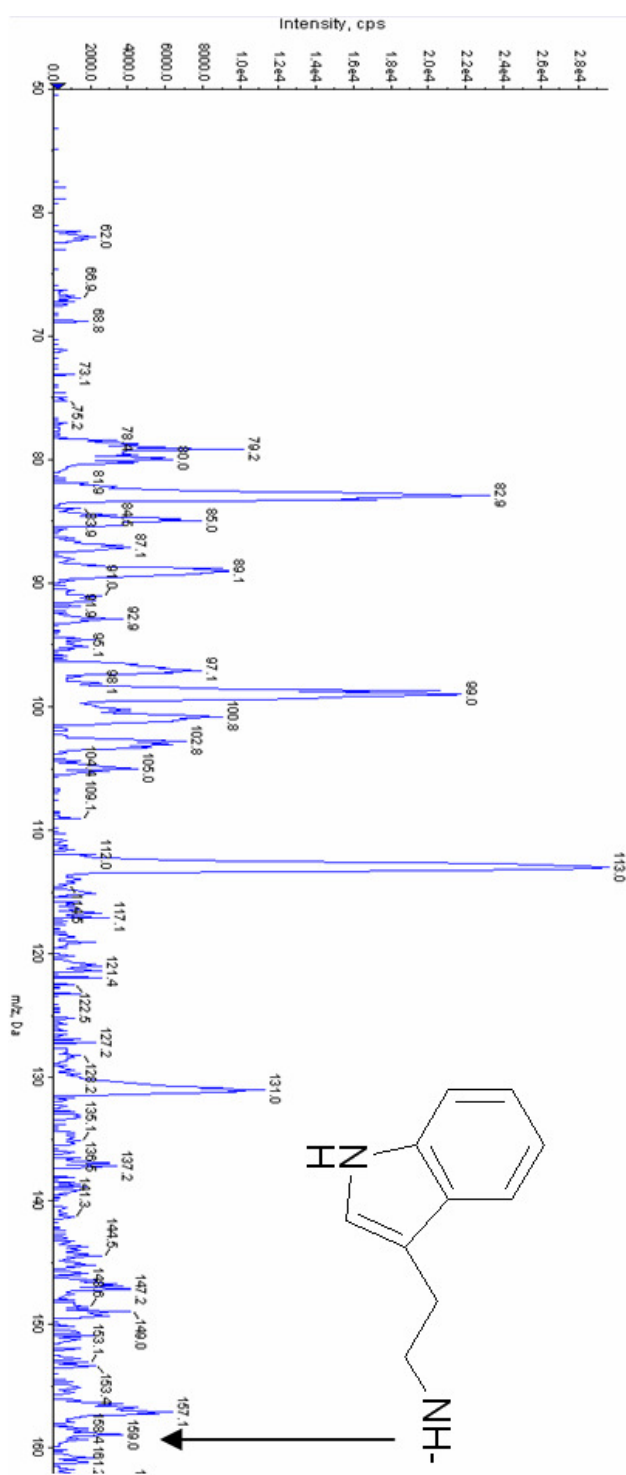
**PŘÍLOHA P II: HMOTNOSTNÍ PSPEKTRUM
NEDERIVATIZOVANÉHO PUTRESCINU
(KONCENTRACE 5 MG·L⁻¹, NEGATIVNÍ IONIZACE)**



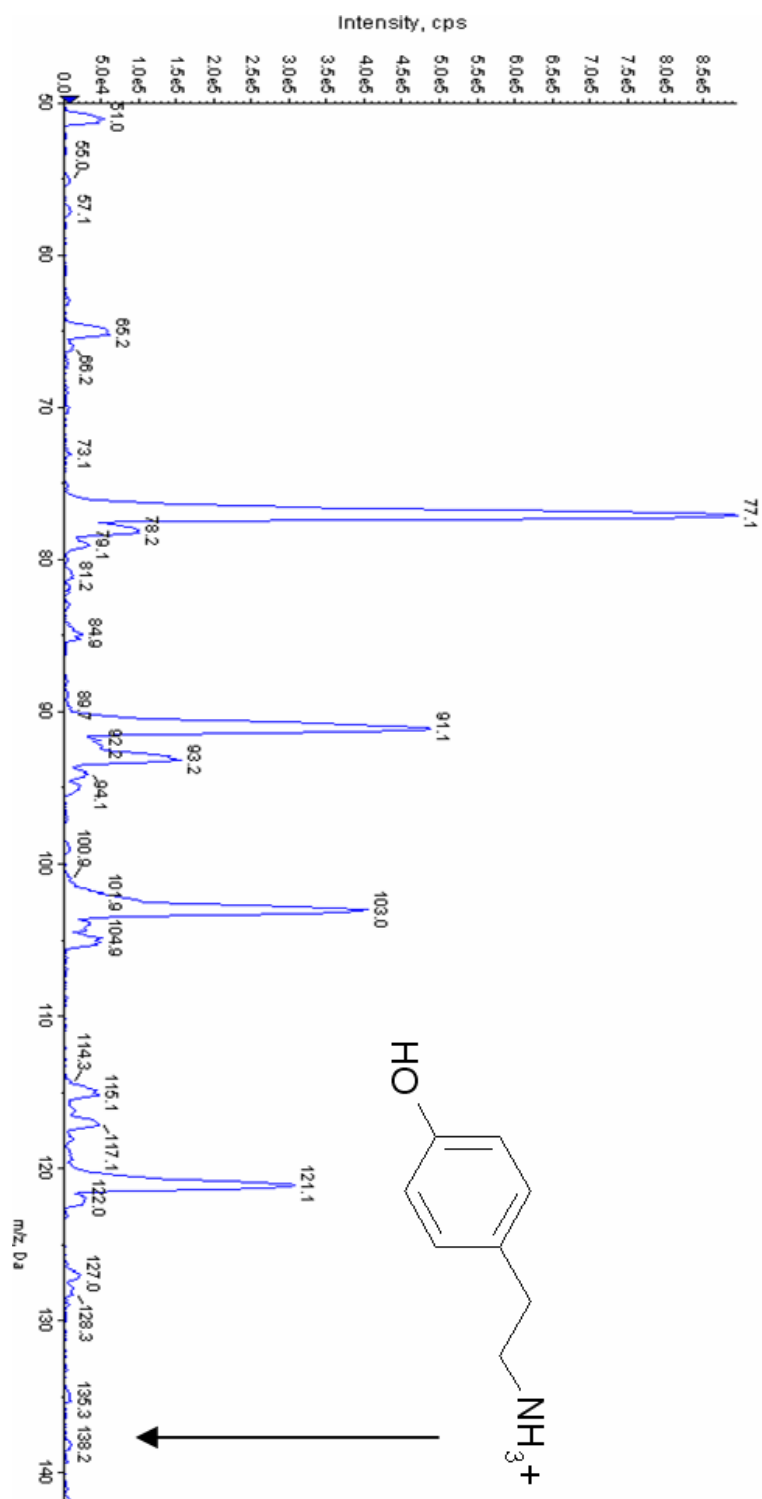
**PŘÍLOHA P III: HMOTNOSTNÍ SPEKTRUM
NEDERIVATIZOVANÉHO TRYPTAMINU
(KONCENTRACE 5 MG·L⁻¹, POZITIVNÍ IONIZACE)**



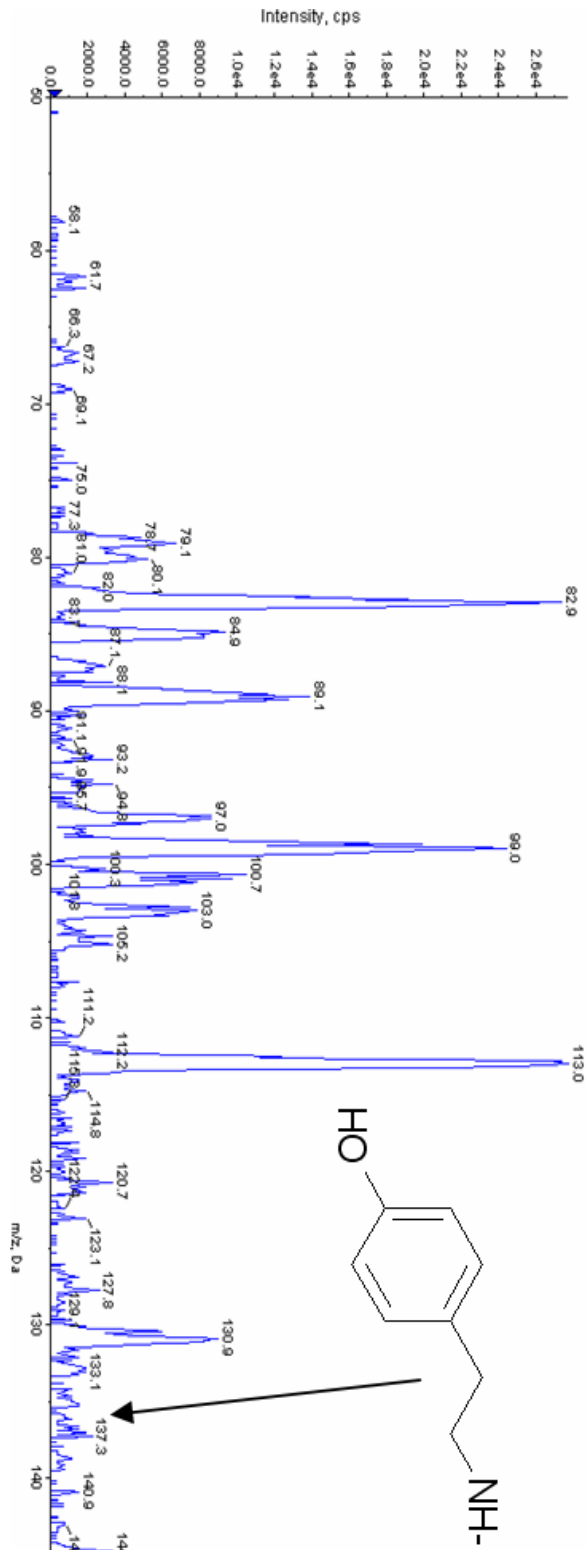
**PŘÍLOHA P IV: HMOTNOSTNÍ SPEKTRUM
NEDERIVATIZOVANÉHO TRYPTAMINU
(KONCENTRACE 5 MG·L⁻¹, NEGATIVNÍ IONIZACE)**



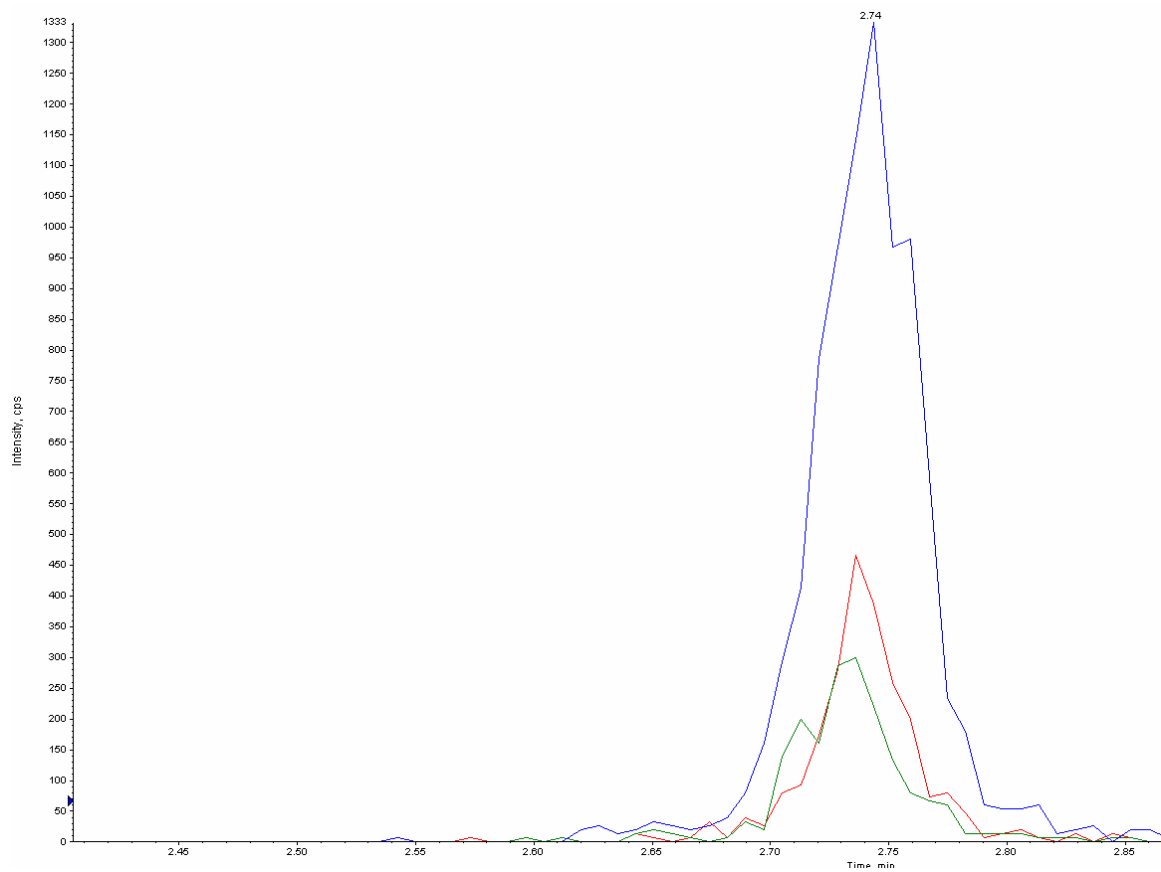
**PŘÍLOHA P V: HMOTNOSTNÍ SPEKTRUM
NEDERIVATIZOVANÉHO TYRAMINU
(KONCENTRACE 5 MG·L-1, POZITIVNÍ IONIZACE)**



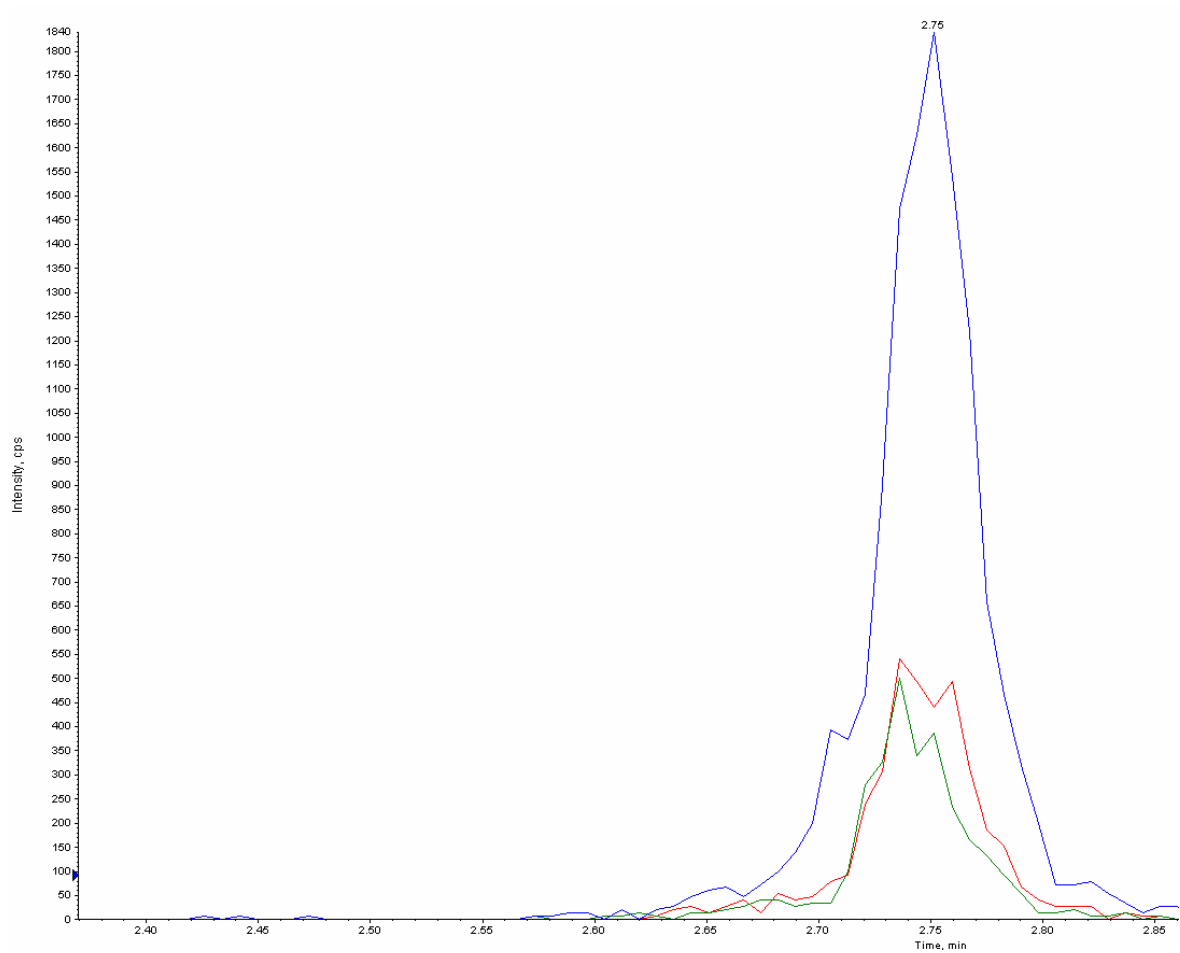
**PŘÍLOHA P VI: HMOTNOSTNÍ SPEKTRUM
NEDERIVATIZOVANÉHO TYRAMINU
(KONCENTRACE 5 MG·L⁻¹, - NEGATIVNÍ IONIZACE)**



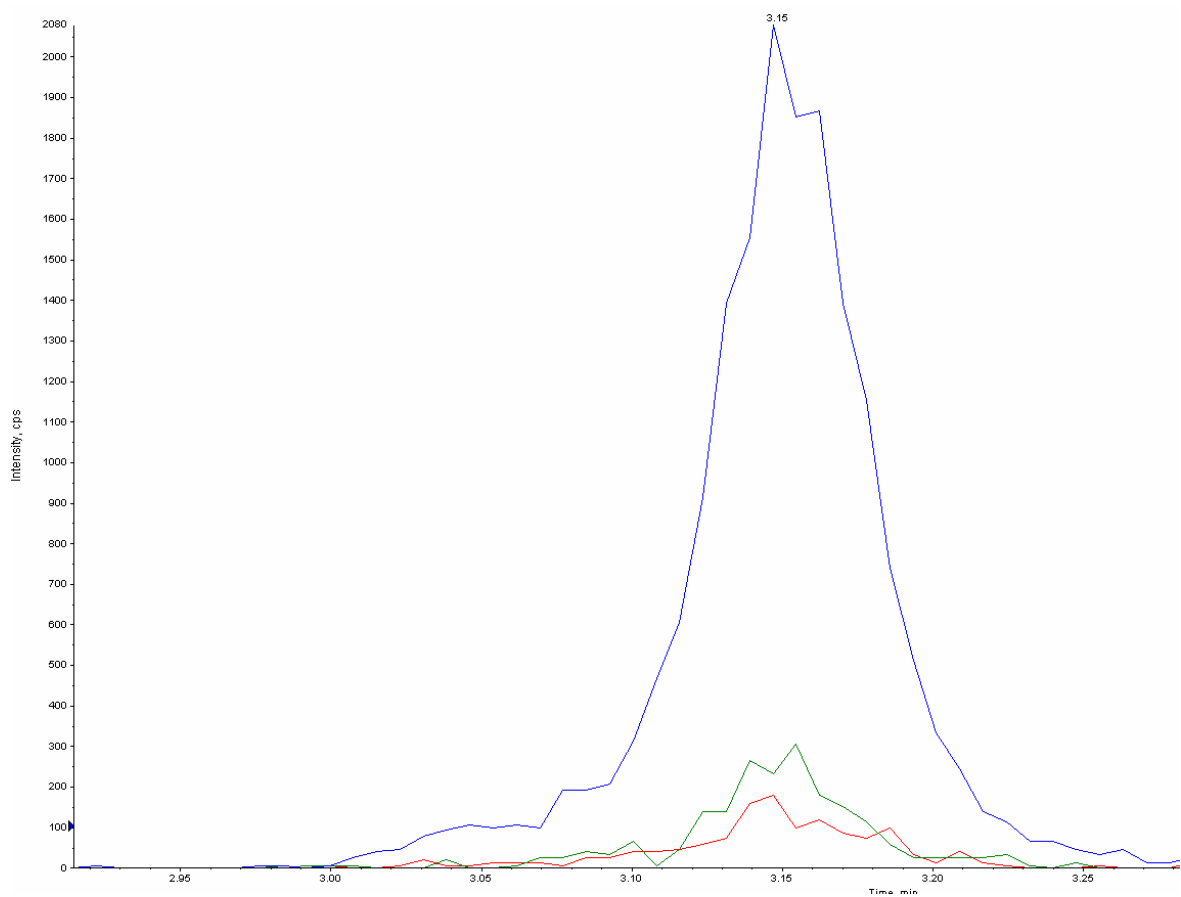
**PŘÍLOHA P VII: MS/MS SPEKTRUM PUTRESCINU
VE SPOJENÍ S UPLC
(1 MG·L⁻¹, TEPLOTA IONTOVÉHO ZDROJE 450 °C)**



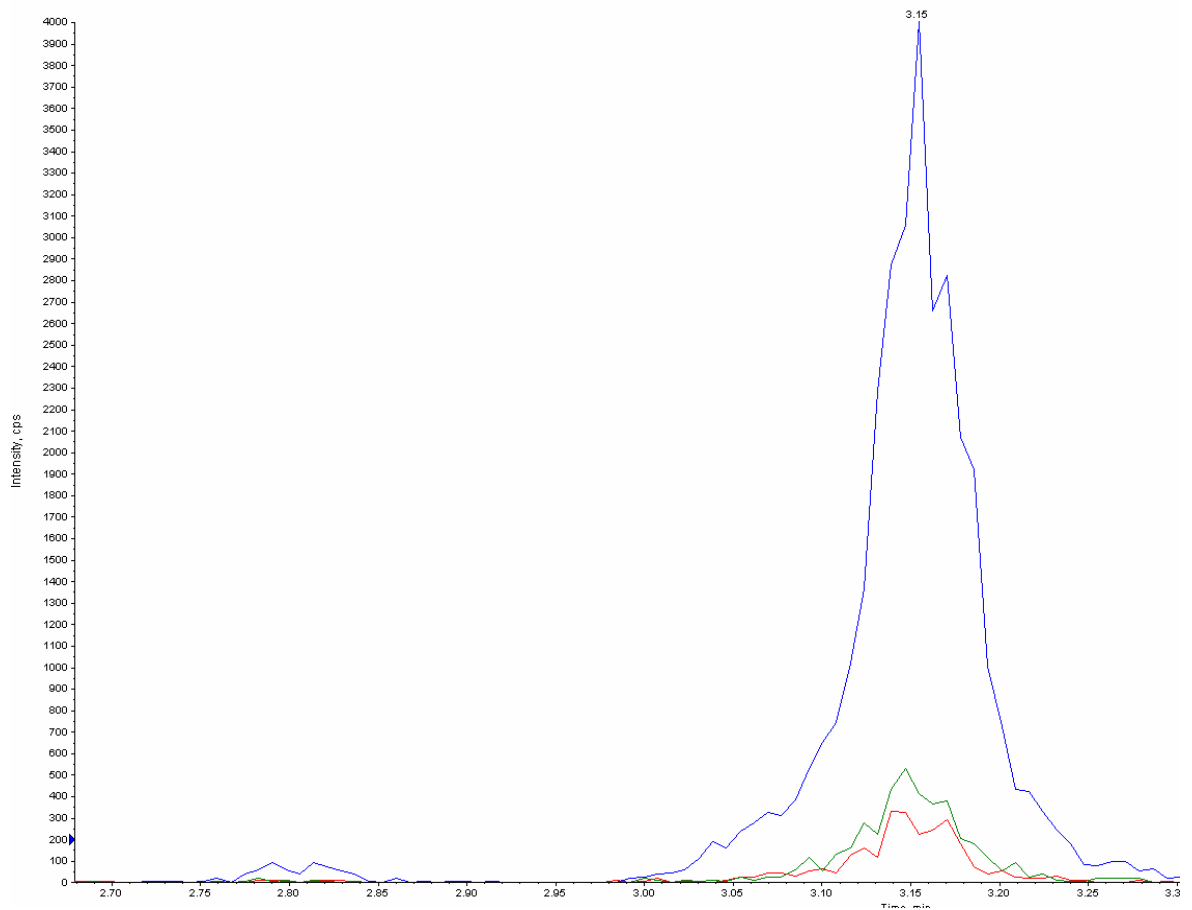
**PŘÍLOHA P VIII: MS/MS SPEKTRUM PUTRESCINU
VE SPOJENÍ S UPLC
(1 MG·L⁻¹, TEPLOTA IONTOVÉHO ZDROJE 480 °C)**



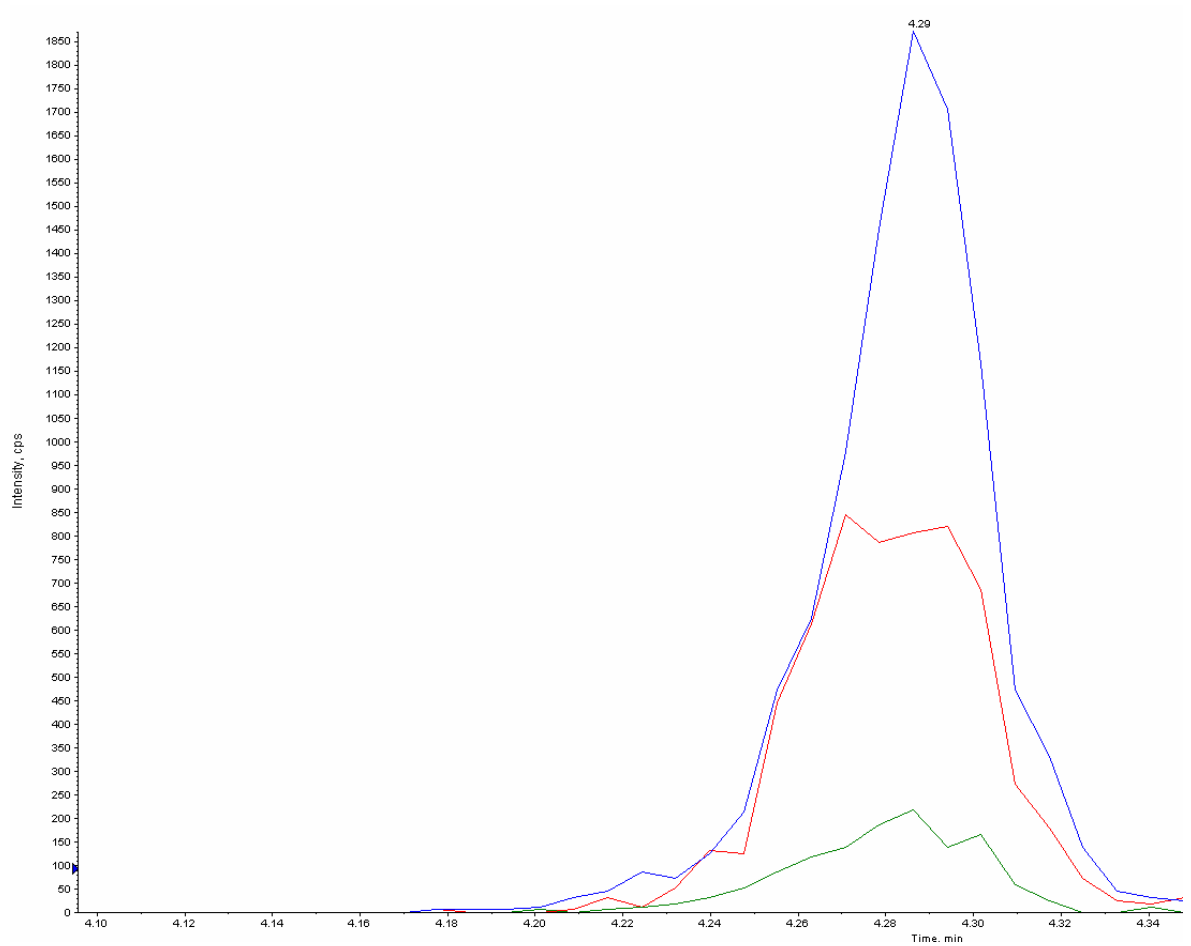
**PŘÍLOHA P IX: MS/MS SPEKTRUM HISTAMINU
VE SPOJENÍ S UPLC
(1 MG·L⁻¹, TEPLOTA IONTOVÉHO ZDROJE 450 °C)**

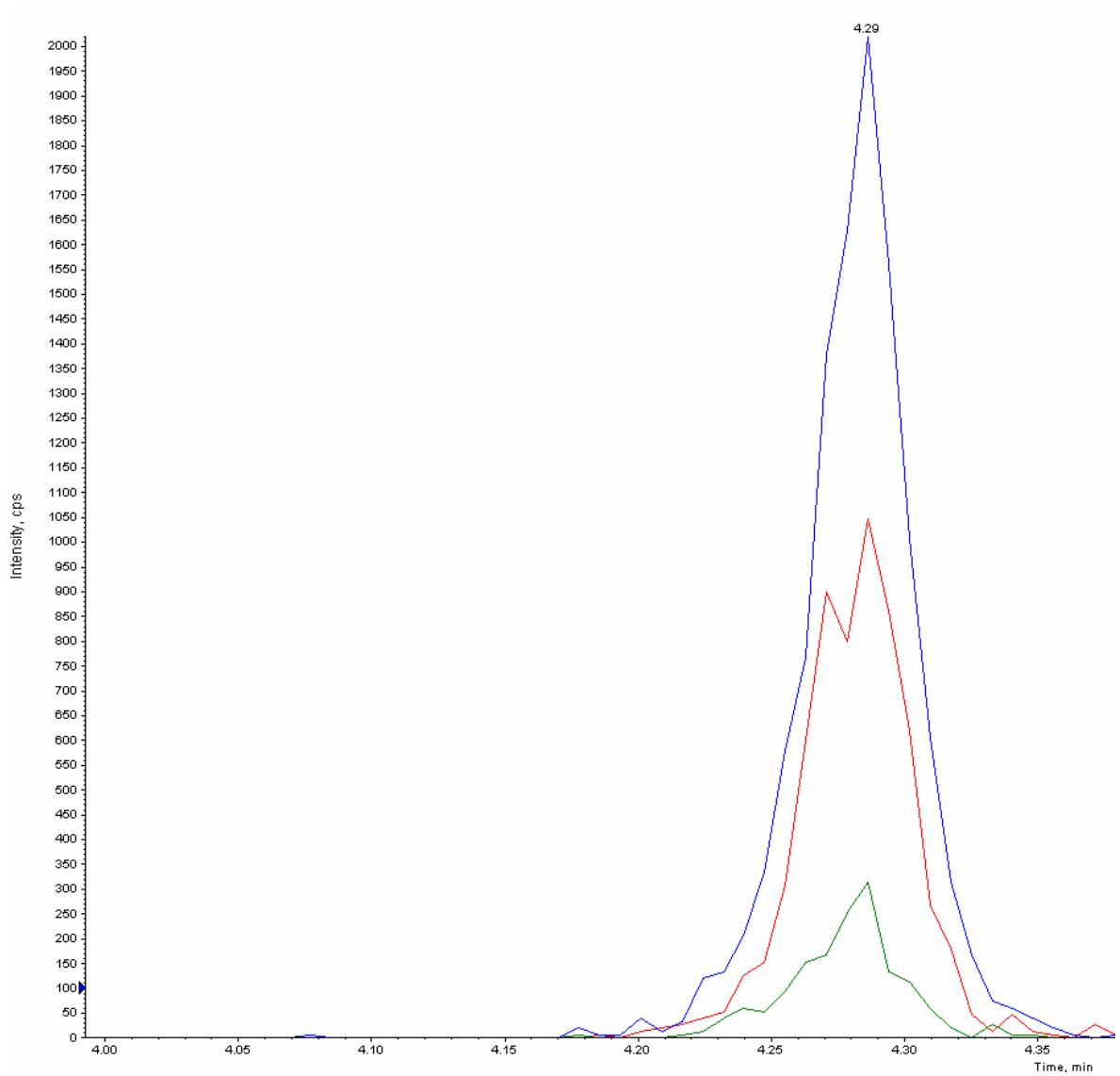


**PŘÍLOHA P X: MS/MS SPEKTRUM HISTAMINU
VE SPOJENÍ S UPLC
(1 MG·L⁻¹, TEPLOTA IONTOVÉHO ZDROJE 470 °C)**

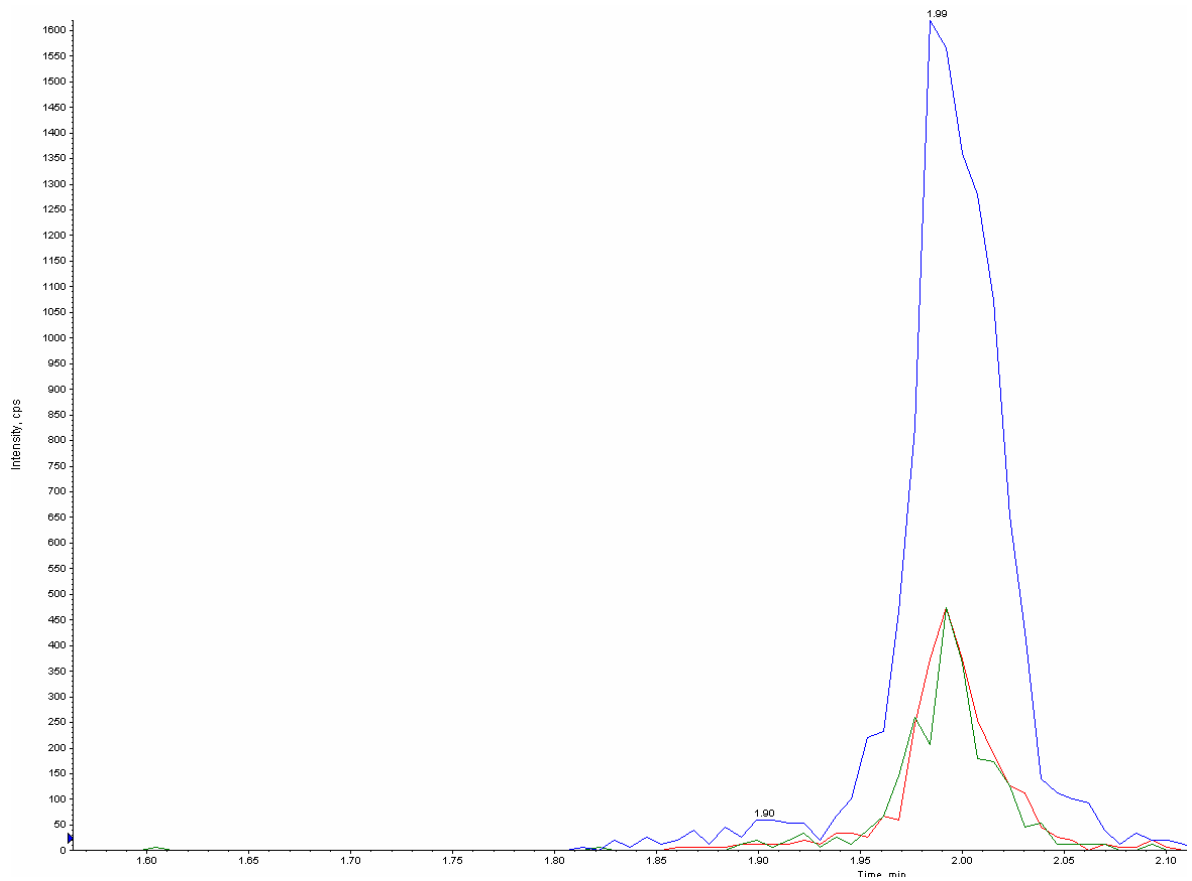


**PŘÍLOHA P XI: MS/MS SPEKTRUM TYRAMINU
VE SPOJENÍ S UPLC
(1 MG·L⁻¹, TEPLOTA IONTOVÉHO ZDROJE 450 °C)**

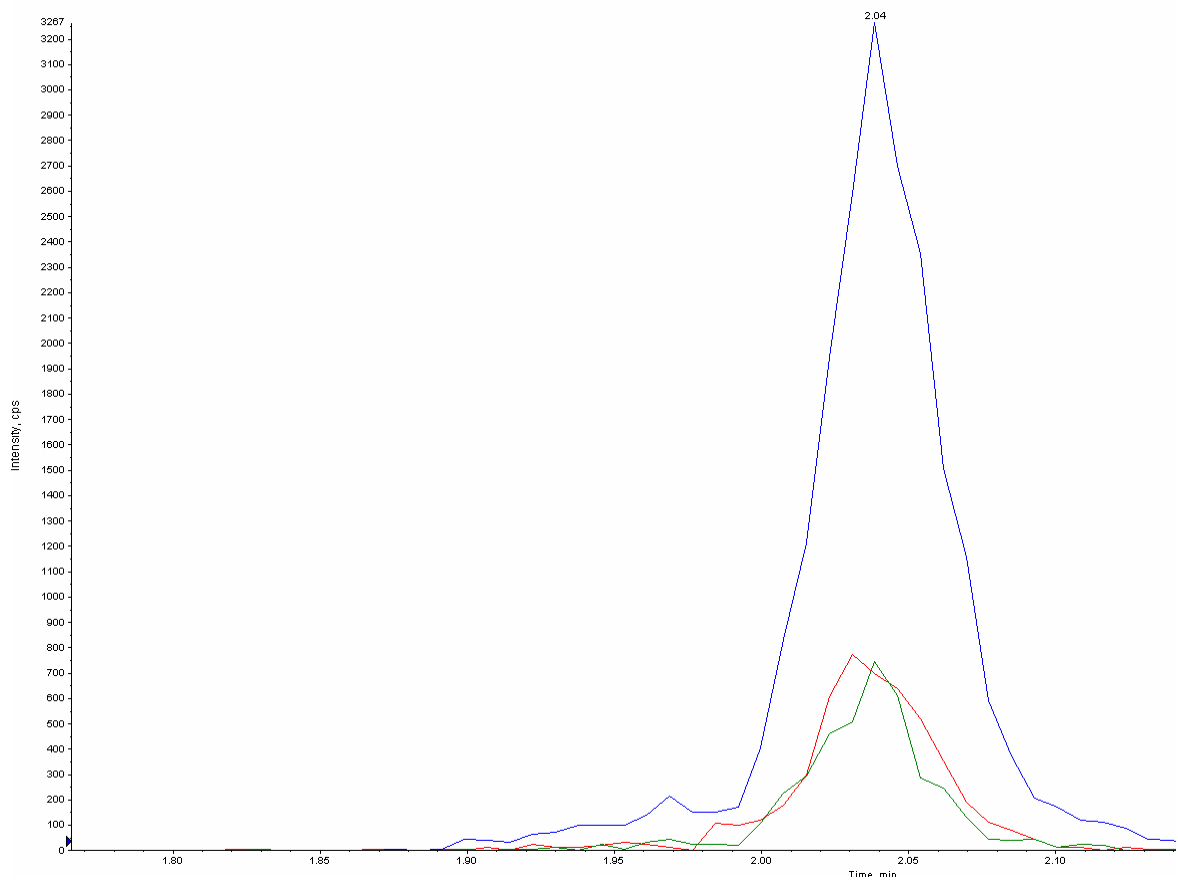


PŘÍLOHA P XII: MS/MS SPEKTRUM TYRAMINU**VE SPOJENÍ S UPLC****(1 MG·L⁻¹, TEPLOTA IONTOVÉHO ZDROJE 470 °C)**

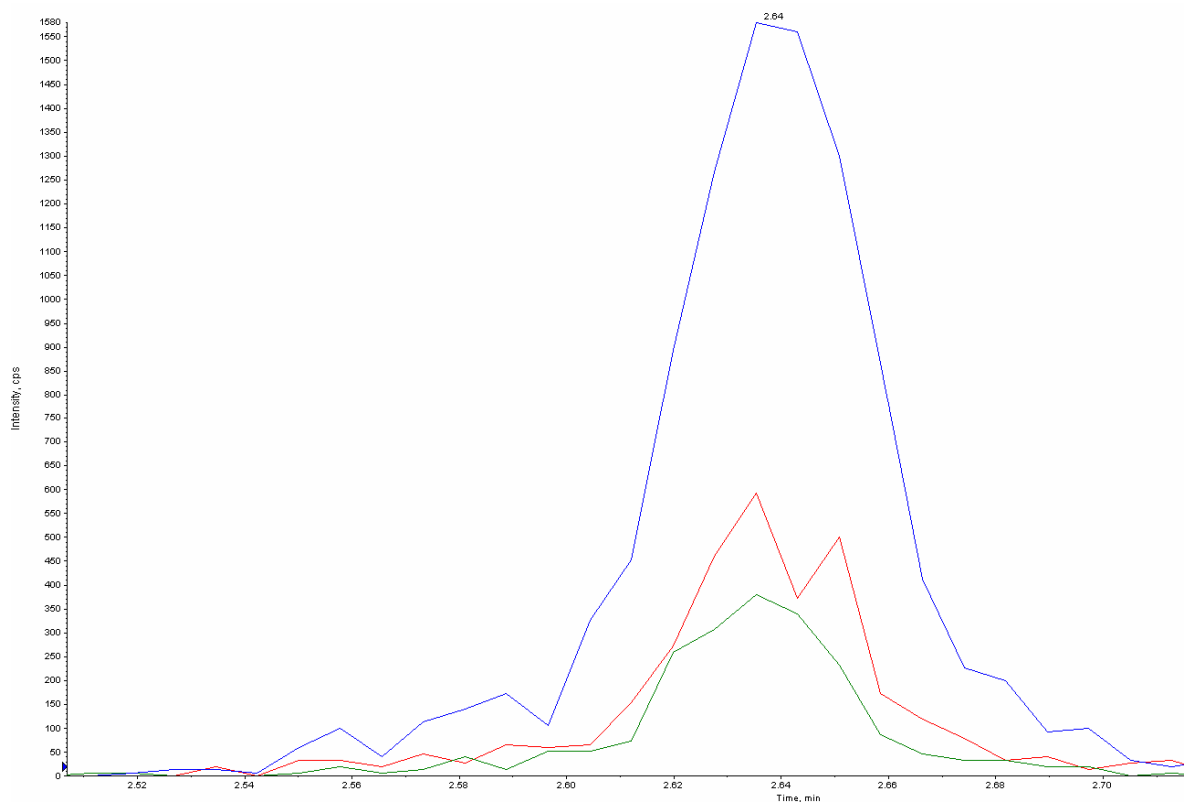
**PŘÍLOHA P XIII: MS/MS SPEKTRUM TRYPTAMINU
VE SPOJENÍ S UPLC
(1 MG·L⁻¹, TEPLOTA IONTOVÉHO ZDROJE 450 °C)**



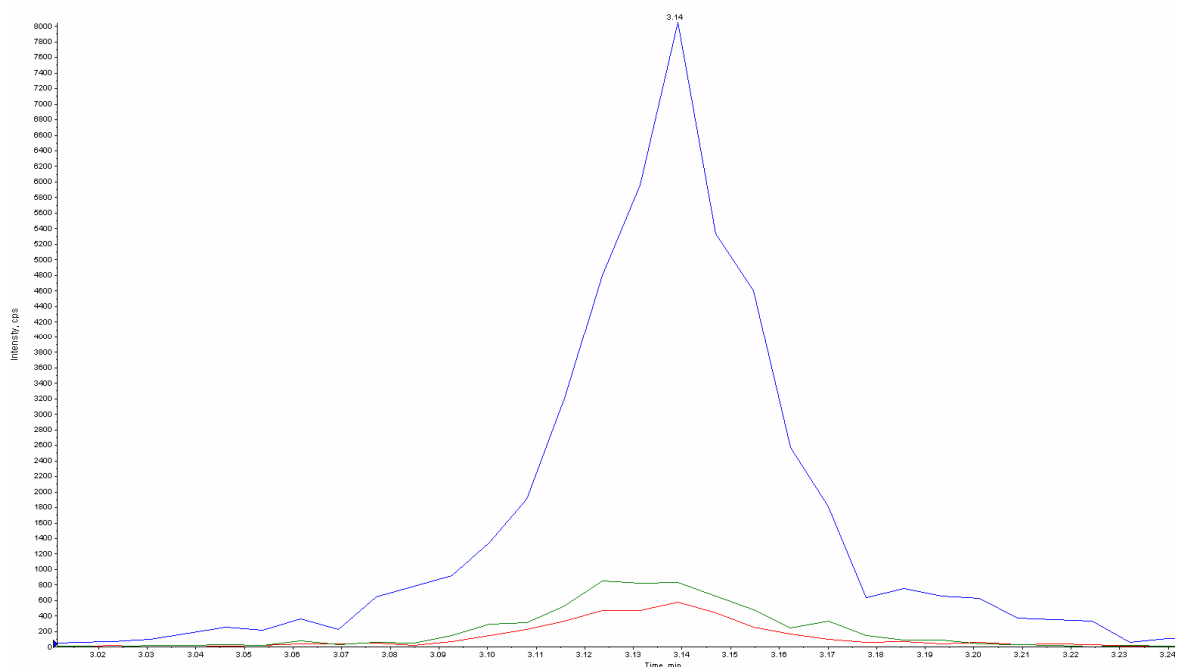
**PŘÍLOHA P XIV: MS/MS SPEKTRUM TRYPTAMINU
VE SPOJENÍ S UPLC
(1 MG·L⁻¹, TEPLOTA IONTOVÉHO ZDROJE 470 °C)**



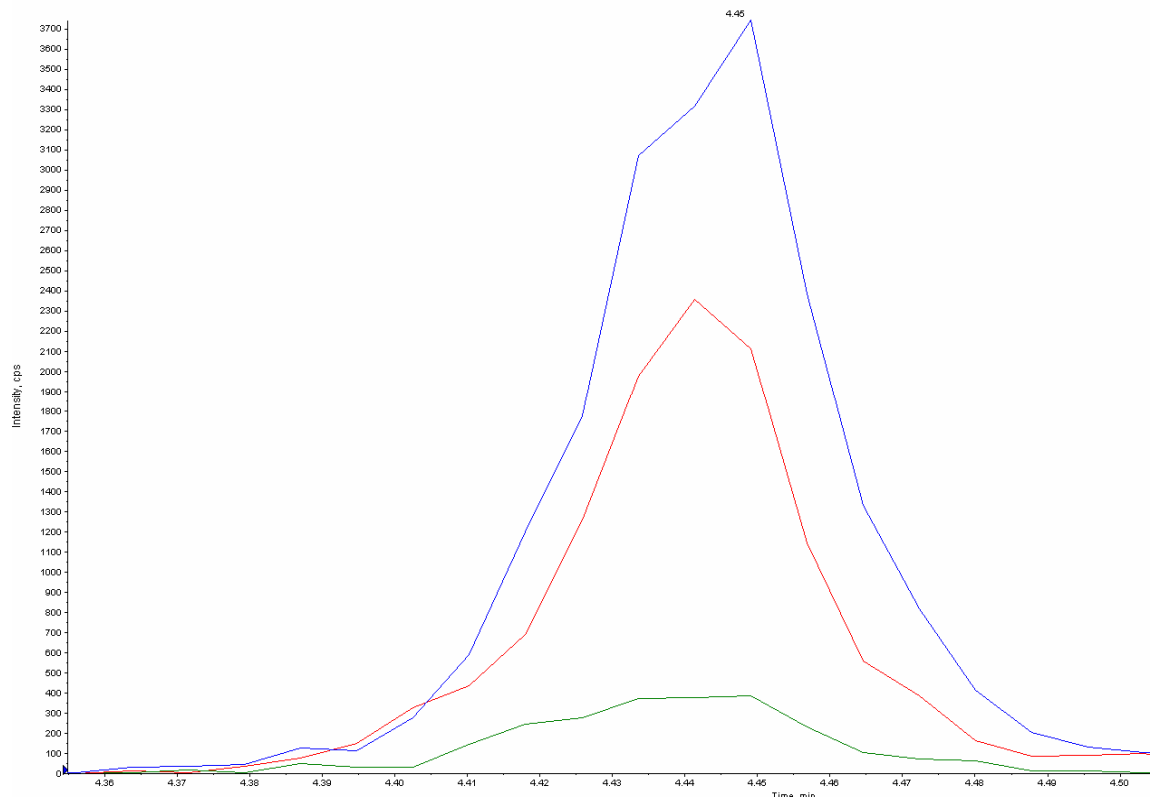
**PŘÍLOHA P XV: MS/MS SPEKTRUM PUTRESCINU
VE SPOJENÍ S UPLC
(1 MG·L⁻¹, ELUČNÍ GRADIENT A)**



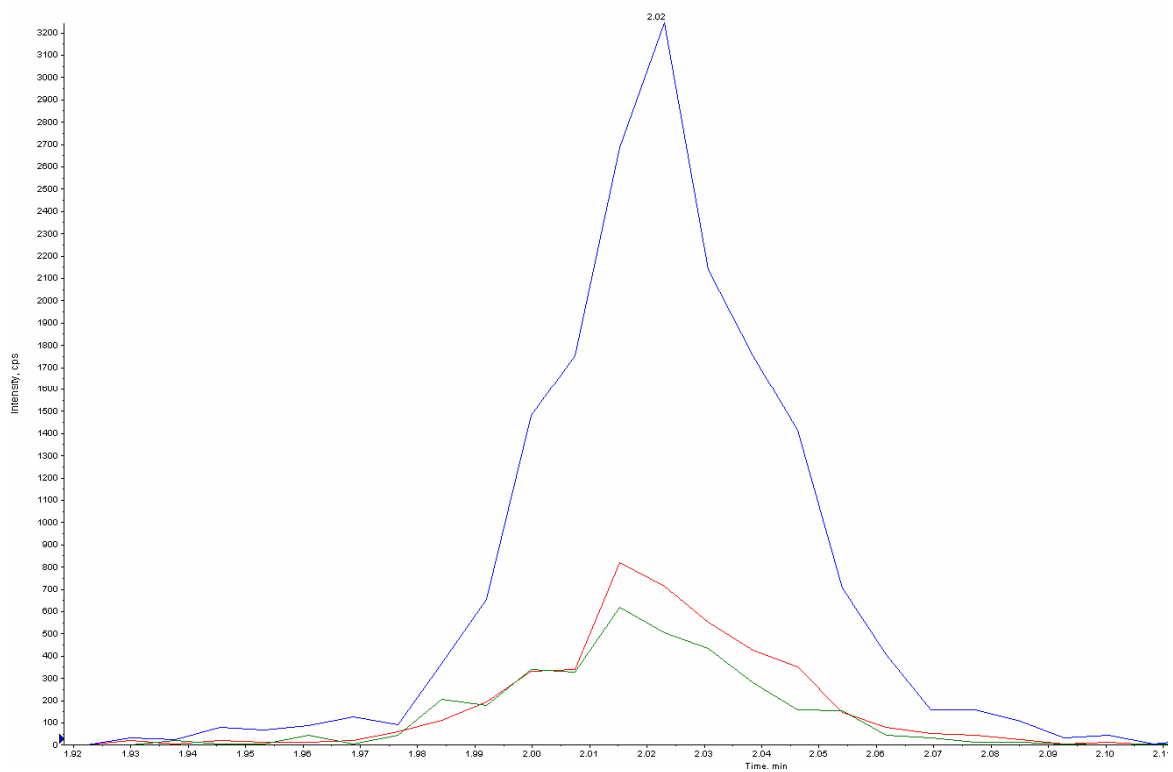
**PŘÍLOHA P XVI: MS/MS SPEKTRUM HISTAMINU
VE SPOJENÍ S UPLC
(1 MG·L⁻¹, ELUČNÍ GRADIENT A)**



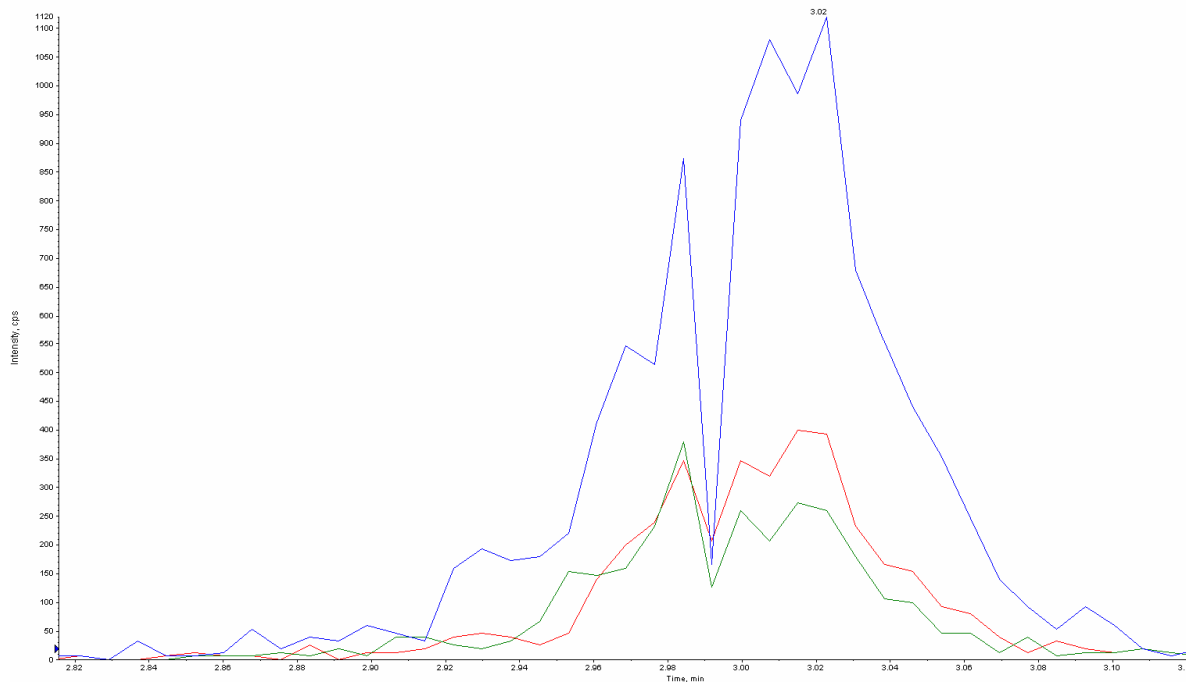
**PŘÍLOHA P XVII: MS/MS SPEKTRUM TYRAMINU
VE SPOJENÍ S UPLC
(1 MG·L⁻¹, ELUČNÍ GRADIENT A)**



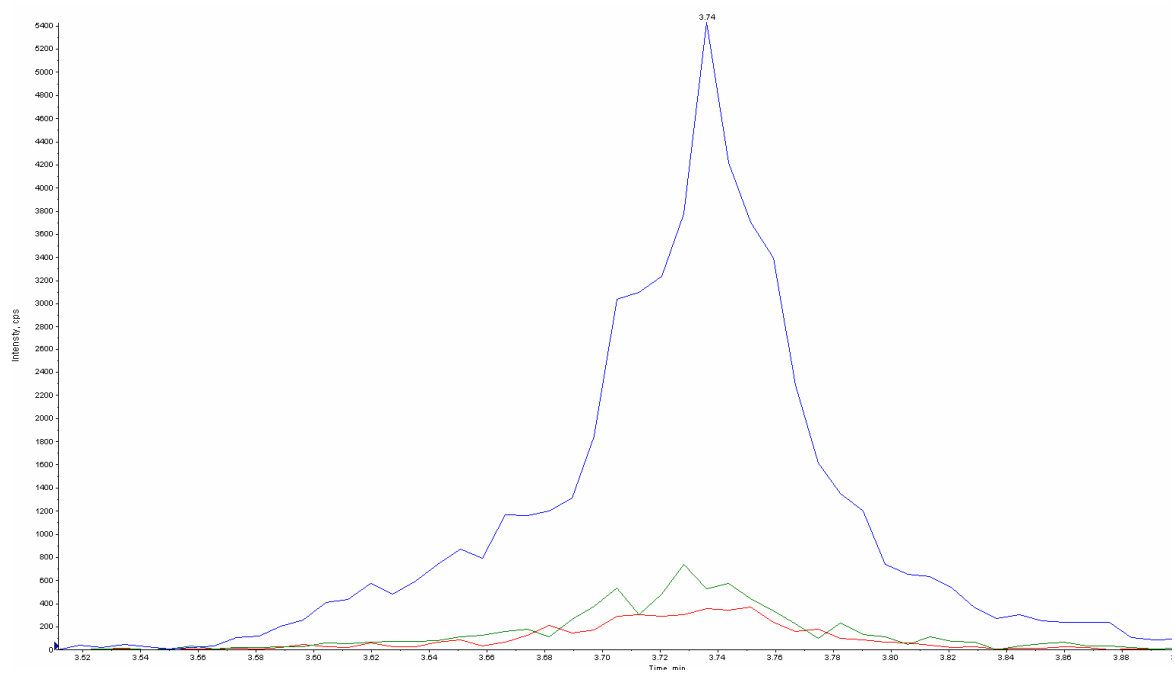
**PŘÍLOHA P XVIII: MS/MS SPEKTRUM TRYPTAMINU
VE SPOJENÍ S UPLC
(1 MG·L⁻¹, ELUČNÍ GRADIENT A)**



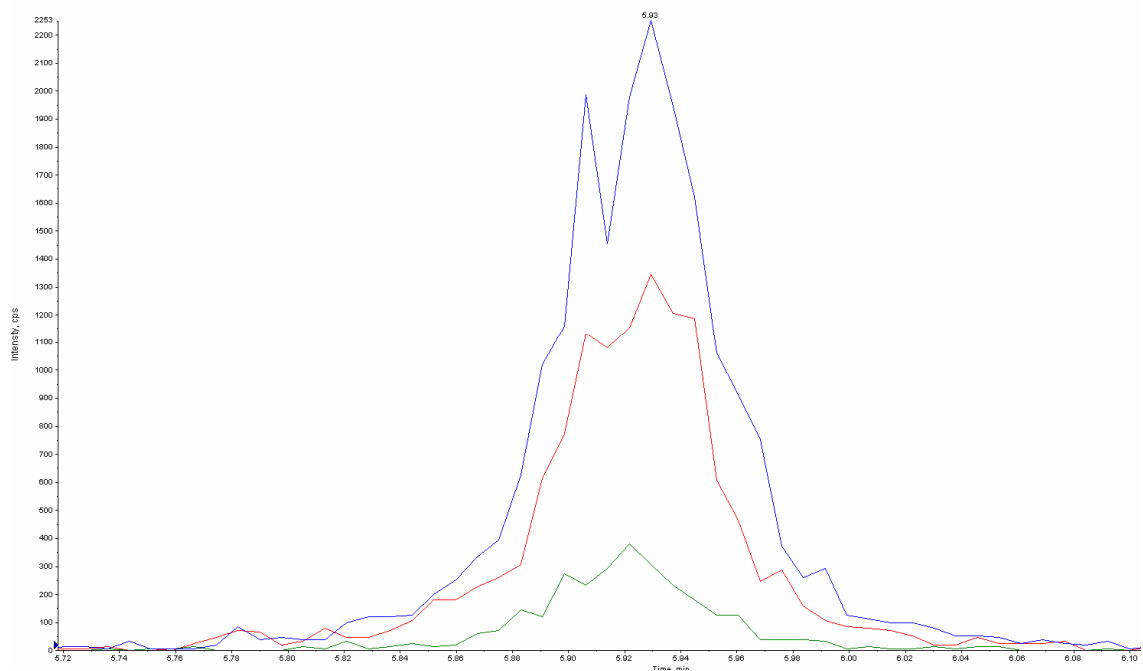
**PŘÍLOHA P XIX: MS/MS SPEKTRUM PUTRESCINU
VE SPOJENÍ S UPLC
(1 MG·L⁻¹, ELUČNÍ GRADIENT B))**



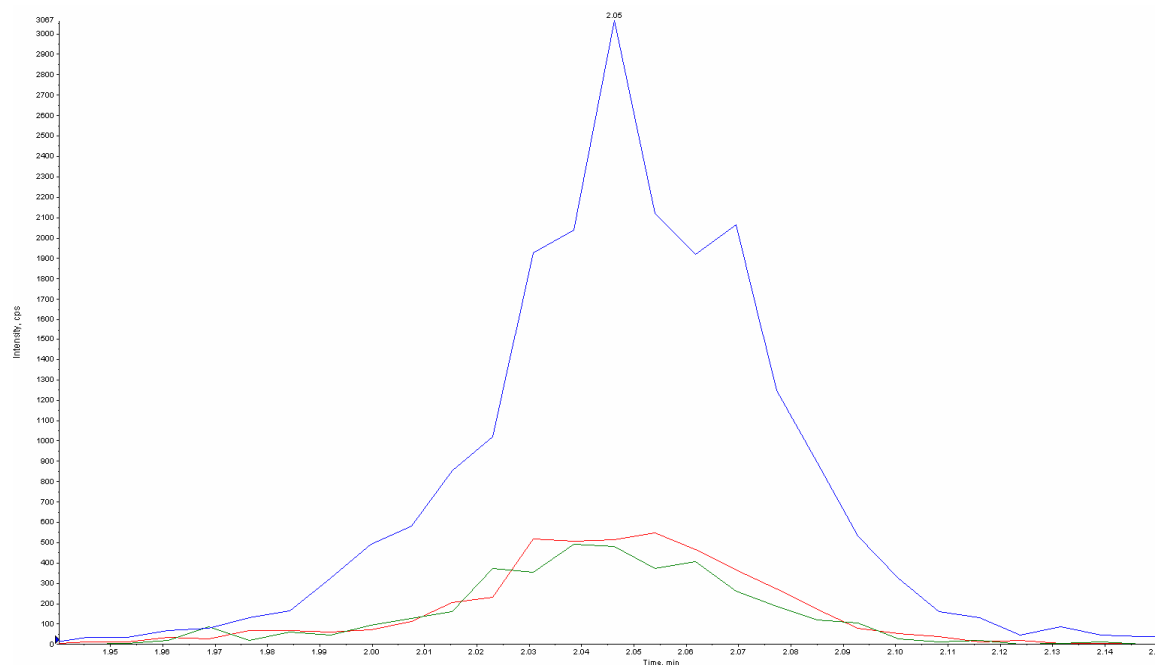
**PŘÍLOHA P XX: MS/MS SPEKTRUM HISTAMINU
VE SPOJENÍ S UPLC
(1 MG·L⁻¹, ELUČNÍ GRADIENT B)**



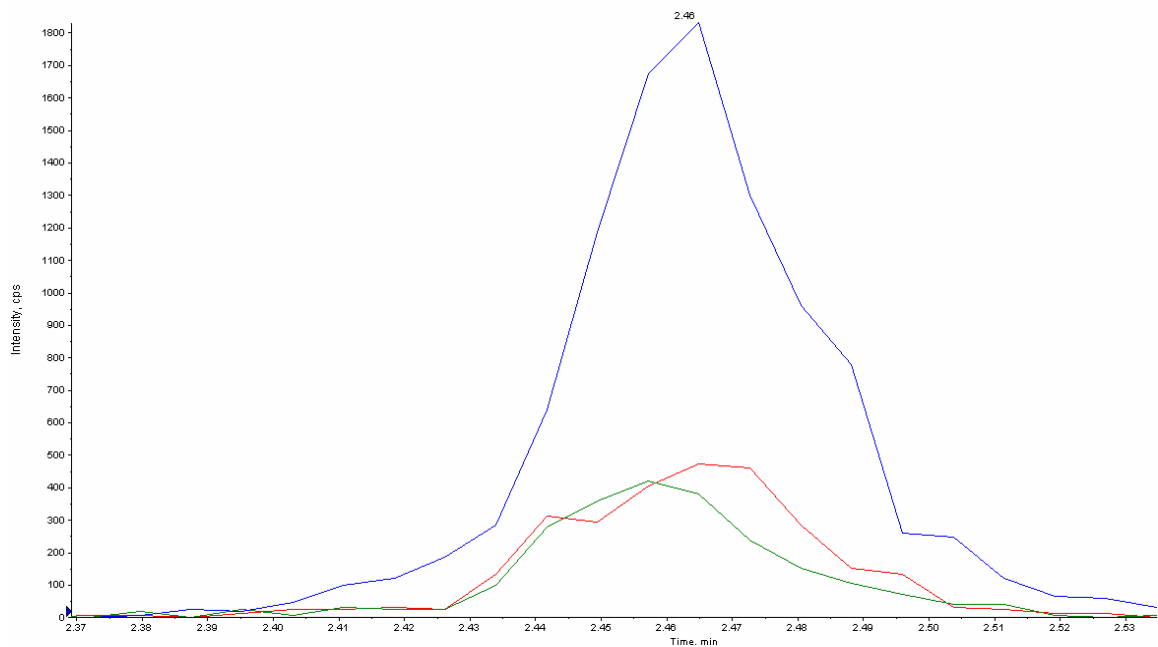
**PŘÍLOHA P XXI: MS/MS SPEKTRUM TYRAMINU
VE SPOJENÍ S UPLC
(1 MG·L⁻¹, ELUČNÍ GRADIENT B)**



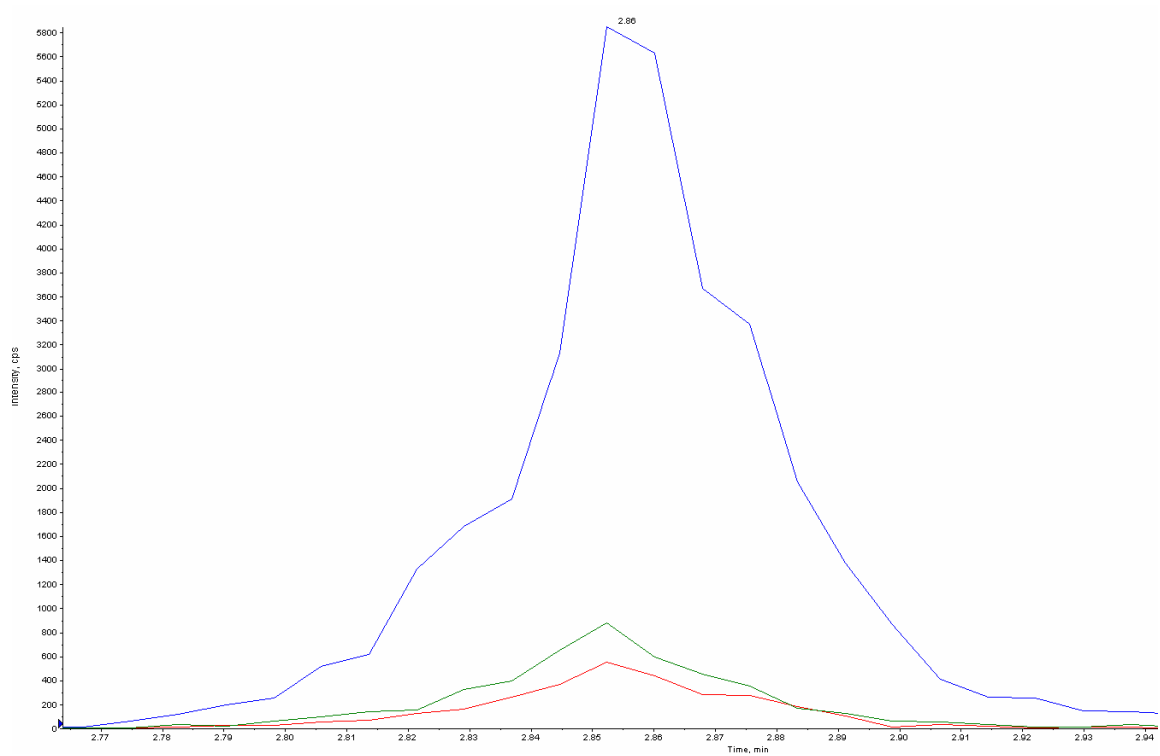
**PŘÍLOHA P XXII: MS/MS SPEKTRUM TRYPTAMINU
VE SPOJENÍ S UPLC
(1 MG·L⁻¹, ELUČNÍ GRADIENT B)**



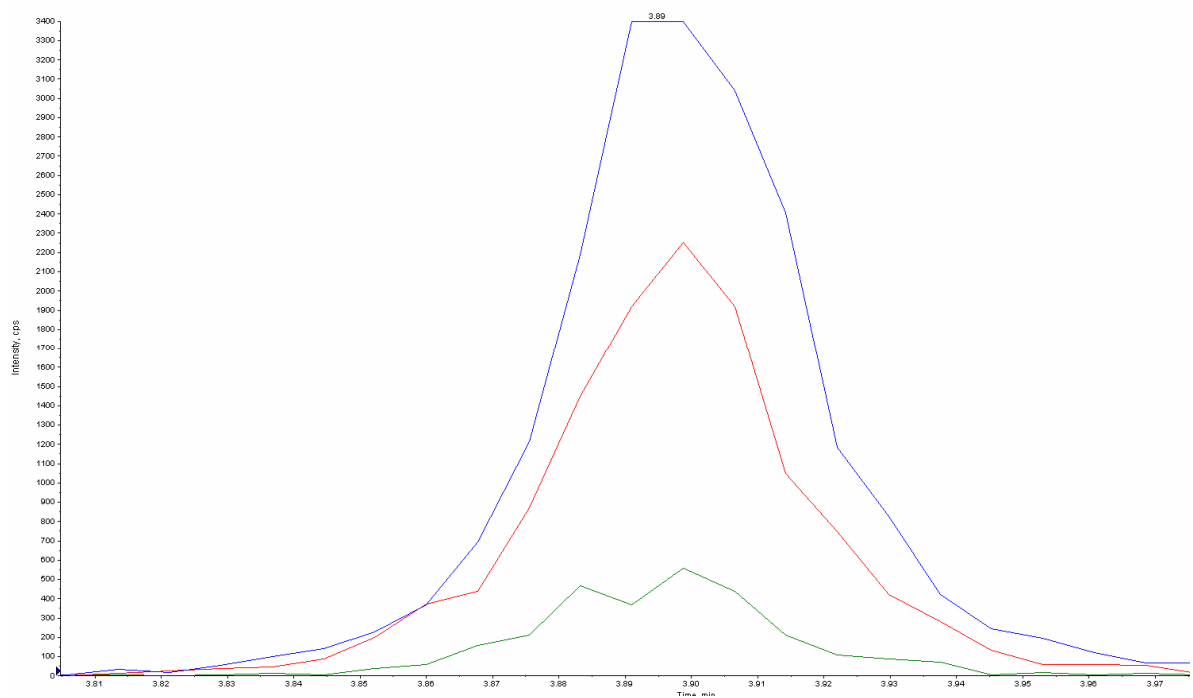
**PŘÍLOHA P XXIII: MS/MS SPEKTRUM PUTRESCINU VE SPOJENÍ
S UPLC
(1 MG·L⁻¹, ELUČNÍ GRADIENT C)**



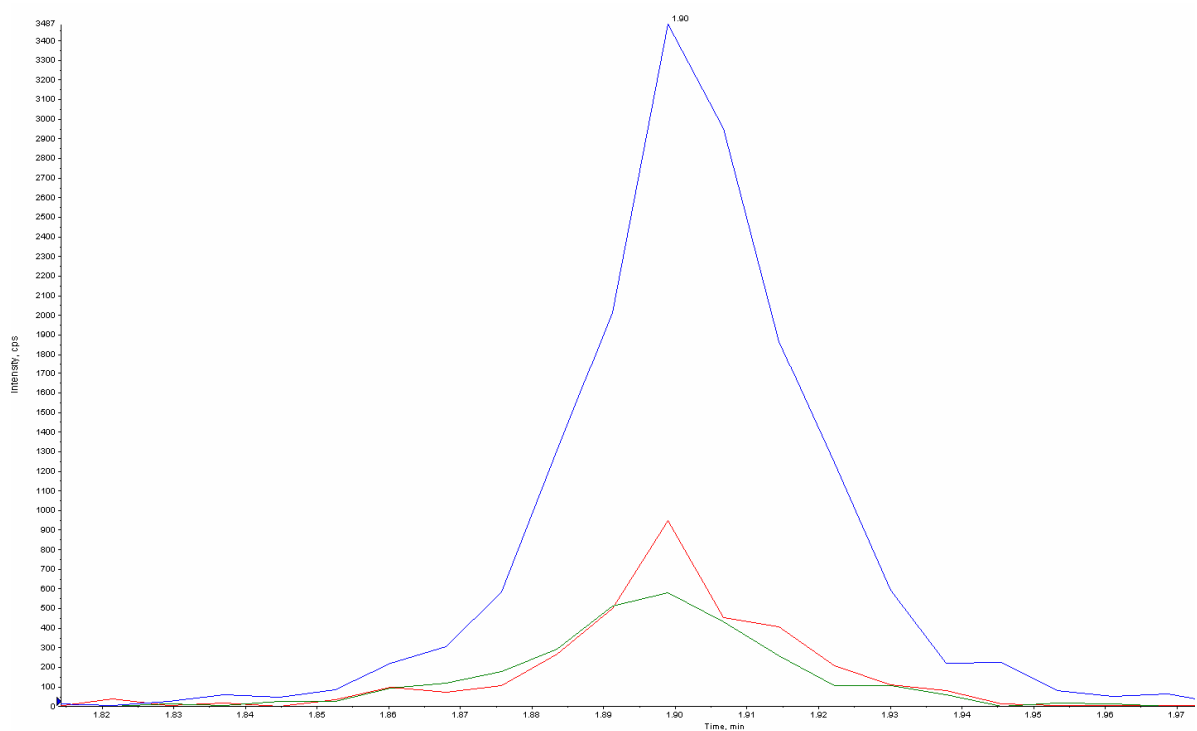
**PŘÍLOHA P XXIV: MS/MS SPEKTRUM HISTAMINU
VE SPOJENÍ S UPLC
(1 MG·L⁻¹, ELUČNÍ GRADIENT C)**



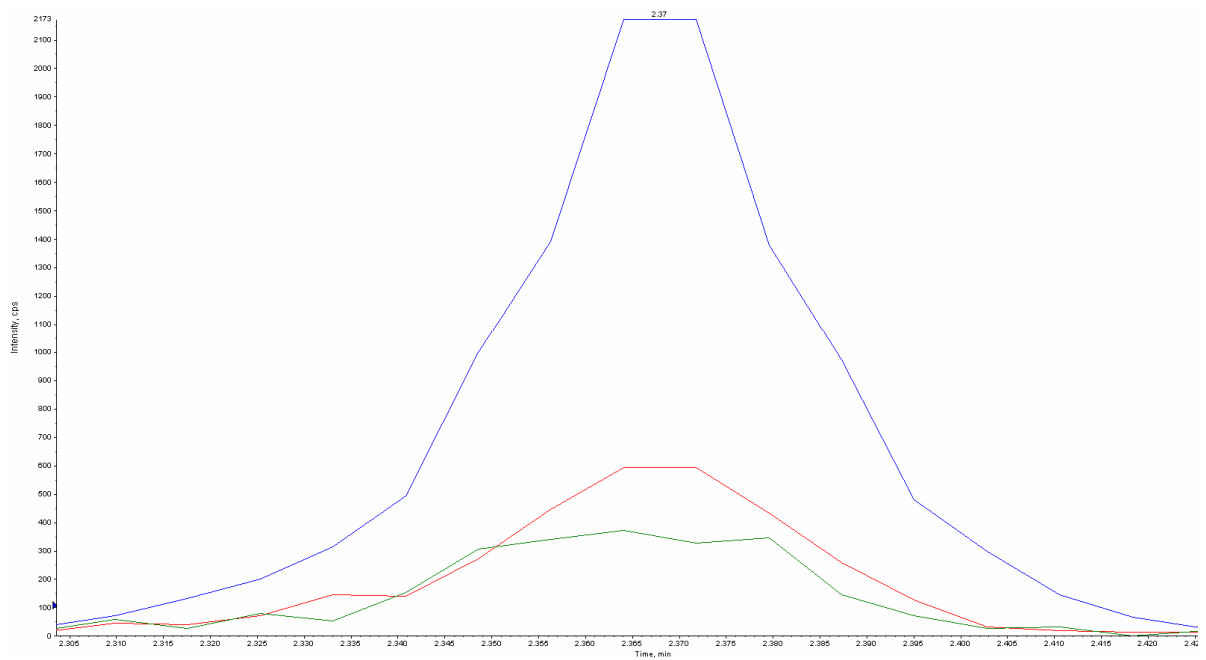
**PŘÍLOHA P XXV: MS/MS SPEKTRUM TYRAMINU
VE SPOJENÍ S UPLC
(1 MG·L⁻¹, ELUČNÍ GRADIENT C)**



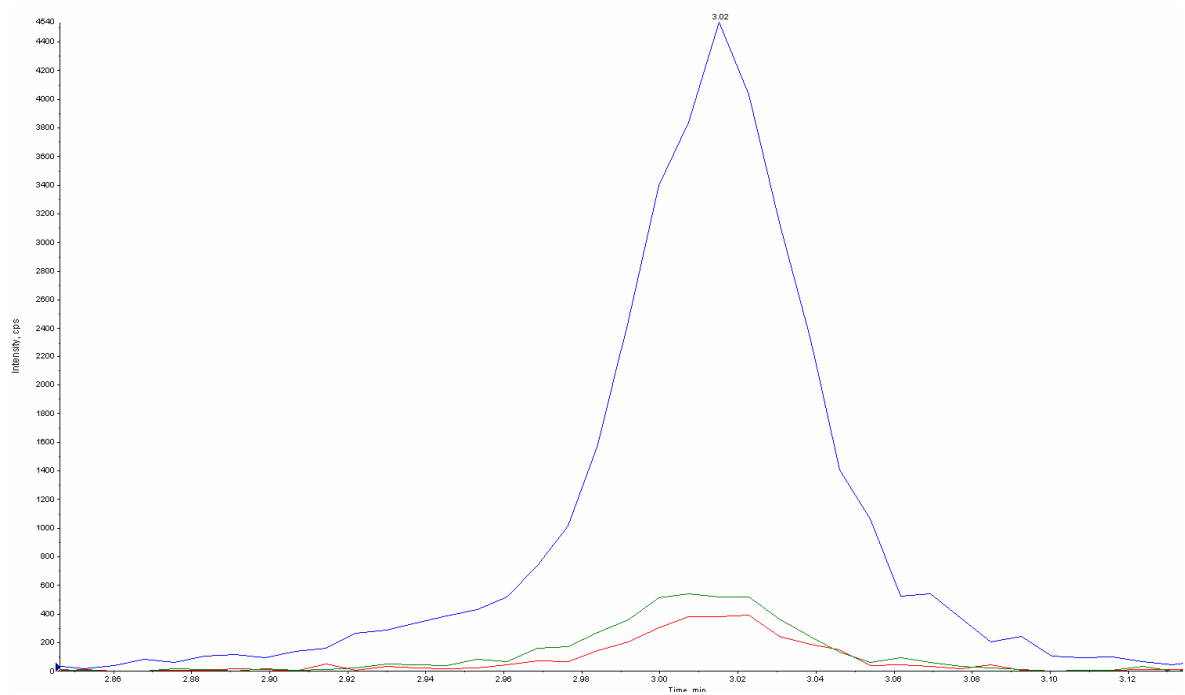
**PŘÍLOHA P XXVI: MS/MS SPEKTRUM TRYPTAMINU
VE SPOJENÍ S UPLC
(1 MG·L⁻¹, ELUČNÍ GRADIENT C)**



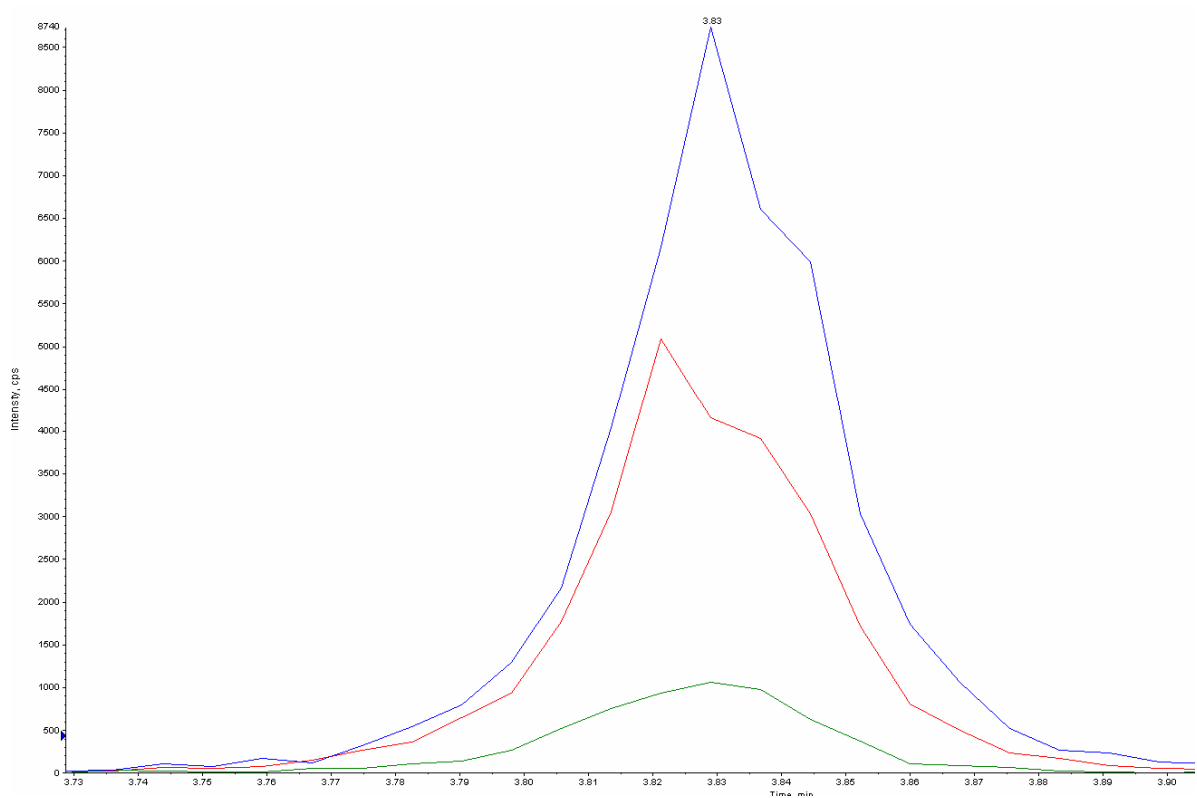
**PŘÍLOHA P XXVII: MS/MS SPEKTRUM PUTRESCINU
VE SPOJENÍ S UPLC
(1 MG·L⁻¹, MOBILNÍ FÁZE ACETONITRIL A 0,1 % KYSELINA
MRAVENČÍ)**



**PŘÍLOHA P XXVIII MS/MS SPEKTRUM HISTAMINU
VE SPOJENÍ S UPLC
(1 MG·L⁻¹, MOBILNÍ FÁZE ACETONITRIL A 0,1 % KYSELINA
MRAVENČÍ)**



**PŘÍLOHA P XXIX: MS/MS SPEKTRUM TYRAMINU
VE SPOJENÍ S UPLC
(1 MG·L⁻¹, MOBILNÍ FÁZE ACETONITRIL A 0,1 % KYSELINA
MRAVENČÍ)**



**PŘÍLOHA P XXX: MS/MS SPEKTRUM TRYPTAMINU
VE SPOJENÍ S UPLC
(1 MG·L⁻¹, MOBILNÍ FÁZE ACETONITRIL A 0,1 % KYSELINA
MRAVENČÍ)**

