

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Analýza vybraných biogenních aminů ve vzorcích kimchi
Diplomová práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Michaela Vlčková**
Osobní číslo: **C22339**
Studijní program: **N0531A130030 Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Analýza vybraných biogenních aminů ve vzorcích kimchi**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

- Vypracujte literární rešerši zaměřenou na analýzu biogenních aminů v potravinářství, především v oblasti konzervace potravin rostlinného původu (např. kimchi...). Popište možnosti využití derivatizačních postupů před vlastní analýzou sledovaných látek metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Prezentujte možnosti prekoncentračních metod vhodných pro HPLC analýzu biogenních aminů.
- V experimentální části proveďte optimalizaci podmínek izolace a následné HPLC separace a kvantifikace vybraných biogenních aminů ze vzorků kimchi. Vyvinutou metodu aplikujte na reálné vzorky kimchi.

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

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

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

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2025**
Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

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

V Pardubicích dne 20. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem Analýza vybraných biogenních aminů ve vzorcích kimchi jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 5. 5. 2025

Bc. Michaela Vlčková

Poděkování

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

ANOTACE

Tato diplomová práce je zaměřena na analýzu biogenních aminů ve vzorcích kimchi pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s detektorem diodového pole a s hmotnostním spektrometrem. V teoretické části je pozornost zaměřena na biogenní aminy v kimchi a dalších fermentovaných potravinách. Dále je zde popsán vliv biogenních aminů na lidské zdraví a jakým způsobem je možné tyto látky analyzovat a detekovat. V experimentální části bylo optimalizováno nastavení hmotnostního spektrometru a extrakční postup při zpracování vzorků. Tyto podmínky byly použity pro analýzu reálných vzorků kimchi. Výsledky analýzy jsou prezentovány v poslední části práce, kde je vyhodnocen také vliv mikrobiálních kultur a doba procesů (fermentace a skladování v lednici) na obsah biogenních aminů v kimchi.

KLÍČOVÁ SLOVA

Biogenní aminy, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, kimchi

TITLE

Analysis of selected biogenic amines in kimchi samples

ANNOTATION

This thesis focuses on the analysis of biogenic amines in kimchi samples using high-performance liquid chromatography coupled with a diode array detector and a mass spectrometer. The theoretical part discusses biogenic amines in kimchi and other fermented foods, their effects on human health, and methods for their detection and analysis. The experimental section describes the optimization of the mass spectrometer setup and the sample extraction procedure. These optimized conditions were then applied to the analysis of real kimchi samples. The final part of the thesis presents the results of the analysis and evaluates the influence of microbial cultures and the duration of fermentation and refrigerated storage on the biogenic amine content in kimchi.

KEYWORDS

Biogenic amines, high-performance liquid chromatography, mass spectrometry, kimchi

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ	10	
SEZNAM TABULEK	12	
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	13	
ÚVOD	15	
1	TEORETICKÁ ČÁST	16
1.1	Biogenní aminy	16
1.1.1	Rozdělení a vznik biogenních aminů.....	16
1.1.2	Vliv biogenních aminů na lidské zdraví	17
1.1.2.1	Biologické účinky tyraminu a histaminu	17
1.1.2.2	Detoxikační mechanismy biogenních aminů	18
1.1.2.3	Toxické účinky biogenních aminů.....	19
1.1.3	Limity a legislativa pro biogenní aminy v potravinách.....	21
1.2	Biogenní aminy v potravinách.....	21
1.2.1	Biogenní aminy v potravinách živočišného původu.....	23
1.2.2	Biogenní aminy v potravinách rostlinného původu.....	25
1.2.3	Biogenní aminy ve fermentovaných potravinách	26
1.3	Kapalinová chromatografie	28
1.3.1	Derivatizace v kapalinové chromatografii.....	31
1.3.2	Extrakční techniky	32
1.4	Analýza biogenních aminů v potravinách pomocí kapalinové chromatografie ..	34
1.5	Kimchi	36
1.5.1	Biogenní aminy v kimchi	38
1.5.2	Stanovení biogenních aminů v kimchi	39
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
2.1	Přístroje a zařízení	43

2.1.1	Kapalinový chromatograf.....	43
2.1.2	Další zařízení	43
2.2	Chemikálie a standardní látky	43
2.2.1	Chemikálie.....	43
2.2.2	Standardní látky.....	44
2.3	Vzorky	44
2.4	Pracovní postupy	46
2.4.1	Příprava roztoku dansylchloridu.....	46
2.4.2	Příprava roztoku L-prolinu	46
2.4.3	Příprava zásobních roztoků biogenních aminů a vnitřního standardu.....	46
2.4.4	Příprava směsného roztoku biogenních aminů.....	47
2.4.5	Příprava kalibračních roztoků.....	47
2.4.6	Extrakce biogenních aminů ze vzorku.....	47
2.4.7	Derivatizace	48
2.4.8	Podmínky analýzy vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií	49
3	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	50
3.1	Volba chromatografických podmínek	50
3.2	Optimalizace podmínek hmotnostního spektrometru.....	52
3.3	Kalibrační závislosti	55
3.4	Optimalizace zpracování vzorků kimchi	58
3.5	Analýza reálných vzorků kimchi.....	60
3.6	Výsledky analýzy reálných vzorků kimchi	60
3.6.1	Trendy biogenních aminů v závislosti na době fermentace	60
3.6.2	Trendy biogenních aminů v závislosti na době skladování v lednici	63
3.6.3	Výsledky stanovení biogenních aminů v reálných vzorcích kimchi	66
4	ZÁVĚR.....	71
	POUŽITÁ LITERATURA	73

SEZNAM PŘÍLOH.....	78
PŘÍLOHY	79
Příloha I: Výsledky LC-MS analýz biogenních aminů.....	79
Příloha II: Grafy kalibračních závislostí HPLC-DAD.....	82
Příloha III: Ukázkové chromatogramy jednotlivých kategorií kimchi po 24hod fermentaci	85

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Vznik a metabolická degradace histaminu.....	19
Obrázek 2: Schéma vzniku biogenních aminů z prekurzorových aminokyselin.....	22
Obrázek 3: Schéma mikroextrakce využívající dutá vlákna.....	33
Obrázek 4: Ilustrační obrázek různých druhů kimchi.....	37
Obrázek 5: Reálný vzorek kimchi s kulturou <i>Bacillus cereus</i> fermentovaný 72 hodin a ponechaný 4 dny v lednici.....	45
Obrázek 6: Vzorek kimchi k optimalizaci podmínek hmotnostního spektrometru k optimalizaci zpracování vzorku.....	46
Obrázek 7: Vzorek před 2hodinovou extrakcí (A) a extrakt vzorku uchovávaný v lednici (B)	48
Obrázek 8: Podmínky hmotnostního spektrometru	49
Obrázek 9: Průběh gradientové eluce	50
Obrázek 10: Kalibrační závislosti tryptaminu při použití binární směsi acetonitril-voda a acetonitril-mravenčan amonný jako mobilní fáze	51
Obrázek 11: Závislosti ploch píků dansylderivátů na použitém napětí na detektoru	52
Obrázek 12: Kalibrační závislost tyraminu při testovaných podmínkách s měnícím se napětím	54
Obrázek 13: Kalibrační závislost tyraminu a putrescinu při optimalizovaných podmínkách ..	54
Obrázek 14: Ukázkový chromatogram bodu kalibrace (2,00 mg/l) z detektoru diodového pole.....	56
Obrázek 15: Ukázkový chromatogram bodu kalibrace (2,00 mg/l) z hmotnostního spektrometru	56
Obrázek 16: Porovnání průměrných poměrů ploch BA a IS při extrakci z 5 g a z 2,5 g vzorku	58
Obrázek 17: Chromatogram dansylderivátů biogenních aminů při extrakci z 2,5 g vzorku	59
Obrázek 18: Chromatogram dansylderivátů biogenních aminů při extrakci z 5 g vzorku	59
Obrázek 19: Detekované biogenní aminy v kimchi s kulturou <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	61
Obrázek 20: Trendy biogenních aminů v závislosti na době fermentace v přirozeně fermentovaném kimchi	61
Obrázek 21: Trendy biogenních aminů v závislosti na době fermentace v kimchi s kulturou <i>Bacillus cereus</i>	62
Obrázek 22: Trendy biogenních aminů v závislosti na době fermentace v kimchi s kulturou <i>Lactobacillus acidophilus</i>	62
Obrázek 23: Trendy biogenních aminů v závislosti na době skladování v lednici v přirozeně fermentovaném kimchi	63
Obrázek 24: Trendy biogenních aminů v závislosti na době skladování v lednici v kimchi s kulturou <i>Bacillus cereus</i>	64

Obrázek 25: Trendy biogenních aminů v závislosti na době skladování v lednici v kimchi s kulturou <i>Lactobacillus acidophilus</i>	65
Obrázek 26: Trendy biogenních aminů v závislosti na době skladování v lednici v kimchi s kulturou <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	65
Obrázek I - 1: Rozštěpené píky molekulových iontů dansylderivátů biogenních aminů při testovaném napětí.....	79
Obrázek I - 2: Chromatogram z hmotnostního spektrometru při napětí na detektoru 2,0 kV.....	79
Obrázek I - 3: Kalibrační závislost putrescinu při testovaných podmínkách s měnícím se napětím.....	80
Obrázek I - 4: Kalibrační závislost sperminu při testovaných podmínkách s měnícím se napětím.....	80
Obrázek I - 5: Kalibrační závislost spermidinu při testovaných podmínkách s měnícím se napětím.....	80
Obrázek I - 6: Píky molekulových iontů dansylderivátů biogenních aminů	81
Obrázek II - 1: Kalibrační závislost putrescinu a kadaverinu.....	82
Obrázek II - 2: Kalibrační závislost spermidinu a sperminu	82
Obrázek II - 3: Kalibrační závislost histaminu	83
Obrázek II - 4: Kalibrační závislost tryptaminu a fenylethylaminu	83
Obrázek II - 5: Kalibrační závislost isoamylaminu a tyraminu	84
Obrázek III - 1: Ukázkový chromatogram vzorku přirozeně fermentovaného kimchi po 24hod fermentaci	85
Obrázek III - 2: Ukázkový chromatogram vzorku kimchi s kulturou <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> po 24hod fermentaci	85
Obrázek III - 3: Ukázkový chromatogram vzorku kimchi s kulturou <i>Lactobacillus acidophilus</i> po 24hod fermentaci.....	86
Obrázek III - 4: Ukázkový chromatogram vzorku kimchi s kulturou <i>Bacillus cereus</i> po 24hod fermentaci	86

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Rozdělení biogenních aminů a jejich prekurzorové aminokyseliny.....	17
Tabulka 2: Biogenní aminy a jejich degradační enzymy.....	18
Tabulka 3: Příznaky při intoxikaci tyraminem, histaminem, putrescinem a kadaverinem.....	20
Tabulka 4: Seznam mikroorganismů, které nejsou schopny tvořit biogenní aminy a lze je použít k fermentaci potravin	28
Tabulka 5: Ingredience pro výrobu <i>Kkakdugi</i> a <i>Chonggak</i> kimchi	39
Tabulka 6: Kalibrační roztoky biogenních aminů	47
Tabulka 7: Podmínky chromatografické analýzy	49
Tabulka 8: Retenční časy biogenních aminů pro binární směs acetonitril-voda a acetonitril-mravenčan amonný.....	51
Tabulka 9: Retenční časy a hmoty molekulových iontů dansylderivátů biogenních aminů	53
Tabulka 10: Kalibrační rovnice a koeficienty determinace jednotlivých biogenních aminů ...	55
Tabulka 11: Limity detekce a limity kvantifikace jednotlivých biogenních aminů	58
Tabulka 12: Biogenní aminy v přirozeně fermentovaném kimchi	66
Tabulka 13: Biogenní aminy v kimchi s kulturou <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> ..	67
Tabulka 14: Biogenní aminy v kimchi s kulturou <i>Lactobacillus acidophilus</i>	68
Tabulka 15: Biogenní aminy v kimchi s kulturou <i>Bacillus cereus</i>	69

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

- ADC – arginin dekarboxyláza, arginine decarboxylase
- ADI – arginindeimináza, arginine deiminase
- AGDI – agmatindeimináza, agmatine deiminase
- APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku, Atmospheric Pressure Chemical Ionization
- APPI – fotoionizace za atmosférického tlaku, Atmospheric Pressure Photoionization
- BA – biogenní aminy
- BAI – index biogenních aminů, Biogenic Amine Index
- BMK – bakterie mléčného kvašení
- C18 – oktadecylsilikagel
- C8 – oktylsilikagel
- DAD – detektor diodového pole, Diode-Array Detector
- DAO – diaminooxidáza
- DbS-Cl – dabsylchlorid
- DLLME – disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina, Dispersive Liquid-Liquid Microextraction
- Dns-Cl – dansylchlorid
- EFSA – Evropský úřad pro bezpečnost potravin, European Food Safety Authority
- ESI – elektrosprejová ionizace, Electrospray Ionization
- FDNB – 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen
- GC – plynová chromatografie, Gas Chromatography
- HDC – histidin dekarboxyláza, histidine decarboxylase
- HF-LPME – mikroextrakce s využitím dutého vlákna, Hollow-Fiber Liquid Phase Microextraction
- HIT – histaminová intolerance
- HNMT – histamin-*N*-methyltransferáza
- HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie, High Performance Liquid Chromatography
- HPLC-MS – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií, High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
- IEC – iontově výměnná chromatografie, Ion-Exchange Chromatography
- IPC – iontově párová chromatografie, Ion-Pair Chromatography

LC – kapalinová chromatografie, Liquid Chromatography

LDC – lysin dekarboxyláza, lysine decarboxylase

LLC – rozdělovací kapalinová chromatografie, Liquid-Liquid Chromatography,

LLE – extrakce kapalina-kapalina, Liquid-Liquid Extraction

LOD – limit detekce, Limit Of Detection

LOQ – limit kvantifikace, Limit Of Quantitation

LSC – adsorpční kapalinová chromatografie, Liquid-Solid Chromatography,

MAO – monoaminoxidáza

MAOI – inhibitor monoaminoxidázy

MEPS – mikroextrakce se sorbentem v mikrostříkačce, Microextraction by Packed Sorbent

NBD-Cl – 4-chloro-7-nitro-1,2,3-benzoxadiazol

NBD-F – 4-fluoro-7-nitro-1,2,3-benzoxadiazol

NOAEL – hodnota dávky bez pozorovaného nepříznivého účinku, No Observed Adverse Effect Level

NP-HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s normálními fázemi, Normal-Phase High Performance Liquid Chromatography

OCT – ornitin karbamoyltransferáza, ornithine carbamoyltransferase

ODC – ornitin dekarboxyláza, ornithine decarboxylase

OPA – *o*-ftalaldehyd, *o*-phthalaldehyde

PAO – polyaminoxidáza

PIC – fenylisokyanát, phenyl isocyanate

PTC – putrescin transkarbamyláza, putrescine transcarbamylase

QI – index kvality, Quality Index

QPS – kvalifikovaná presumpce bezpečnosti, Qualified Presumption of Safety

RP-HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s obrácenými fázemi, Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography

SDME – mikroextrakce jednou kapkou, Single-Drop Microextraction

SPE – extrakce tuhou fází, Solid-Phase Extraction

SPME – mikroextrakce tuhou fází, Solid-Phase Microextraction

TDC – tyrosin dekarboxyláza, tyrosine decarboxylase

UV-Vis – ultrafialová-viditelná oblast záření, Ultraviolet-Visible

ÚVOD

Biogenní aminy jsou sloučeniny, které se podílejí na udržení životaschopnosti buněk a také na správném průběhu metabolických procesů organismu, jako jsou syntéza proteinů, syntéza hormonů a replikace DNA. Na druhou stranu, i přes jejich pozitivní účinky na fungování organismu, se nadměrný obsah biogenních aminů ukazuje jako toxický (průjem, otrava jídlem, zvracení, pocení nebo tachykardie). Navíc při reakcích s dusitany, které se mohou používat ke konzervaci potravin nebo ke zlepšení barvy a chuti, dochází ke vzniku karcinogenních nitrosoaminů. Mezi nejvíce sledované biogenní aminy spojené se zdravotními riziky při nadměrné konzumaci patří tryptamin, fenylethylamin, putrescin, kadaverin, histamin, tyramin, spermin a spermidin.

Kimchi je fermentovaná potravina, jejíž hlavní složkou je brukvovitá zelenina, zejména pekingské zelí a ředkev. Je významnou součástí korejské kuchyně a kulturní identity. Kimchi má zdravotní benefity, které jsou spojovány především s přítomností bakterií mléčného kvašení a s obsahem bioaktivních a fenolických látek. Mezi bakterie mléčného kvašení, které se podílejí na procesu fermentace a zároveň produkují látky, které mohou pozitivně ovlivňovat lidské zdraví patří například rody *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Pediococcus*. Kimchi je fermentovanou potravinou a může u něj docházet k výskytu biogenních aminů. Obsah biogenních aminů v kimchi může být ovlivněn výchozími surovinami, ale i kořeními přísadami, mezi které patří třeba solené fermentované rybí omáčky a fermentované mořské plody.

Mezi techniky používané pro analýzu biogenních aminů patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie se spektrometrickou detekcí. Derivatizace biogenních aminů je nutná pro tento typ detekce, protože biogenní aminy samy o sobě neobsahují chromofory a neabsorbují UV záření.

Cílem této diplomové práce je izolace, derivatizace a následná separace a kvantifikace vybraných biogenních aminů ze vzorků kimchi pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s detektorem diodového pole a hmotnostním spektrometrem.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Biogenní aminy

Biogenní aminy (BA) jsou bioaktivní nízkomolekulární dusíkaté organické látky. Podle polarity se dělí na polární a nepolární sloučeniny, podle počtu aminoskupin na monoaminy, diaminy a polyaminy, a dle chemické struktury na alifatické, aromatické a heterocyklické. Mimo jiné lze tyto látky rozdělit do dvou velkých skupin, a to na endogenní a exogenní. Endogenní BA jsou syntetizovány různými živočišnými tkáněmi a plní různé role v metabolismu mikroorganismů, rostlin, zvířat i lidí. Exogenní BA se do těla dostávají s potravou¹.

1.1.1 Rozdělení a vznik biogenních aminů

Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.1, BA lze klasifikovat na základě několika kritérií. Jejich klasifikace je shrnuta v Tabulce 1. Podle chemické struktury se klasifikují jako alifatické, kam patří putrescin, kadaverin, spermin a spermidin, aromatické, kam lze zařadit tyramin a fenyletylamin, a heterocyklické (histamin a tryptamin). Dále se klasifikují dle počtu aminoskupin na monoaminy (tyramin a fenyletylamin), diaminy (histamin, serotonin, tryptamin, putrescin a kadaverin) a polyaminy (agmatin, spermin a spermidin).

BA vznikají dekarboxylací aminokyselin, za kterou jsou odpovědné dekarboxylující a proteolytické enzymy. Na základě toho, jak se BA dostávají do těla, je lze rozdělit na endogenní a exogenní. Endogenní BA vznikají jako produkty metabolismu. Exogenní BA jsou přijímány s potravou. Vznik BA v potravinách je způsoben dekarboxyláza pozitivními mikroorganismy, které se do potravin dostávají během výrobního procesu, ať už jde o mikroorganismy přidávané do potravin například jako startovací kultury, nebo mikroorganismy kontaminující. Množení mikroorganismů, které produkují dekarboxylázu rozkládající aminokyseliny během fermentace a skladování, je tak hlavním důvodem nadměrného množství BA v tradičních fermentovaných potravinách. Endogenní BA zahrnují neurotransmitery produkované tkáněmi. Do této skupiny patří katecholaminy (dopamin, epinefrin a noradrenalin), indolaminy (serotonin, melatonin a 5-hydroxytryptamin) a histamin. Některé endogenní BA jsou nepostradatelnými složkami živých buněk, kde hrají aktivní roli v buněčné diferenciaci, regulaci funkce nukleových kyselin a v syntéze proteinů. Podílejí se také na vývoji mozku, růstu a regeneraci nervů, na správném udržování krevního tlaku a tělesné teploty. Mají také vliv na reakci na stres a stárnutí. Mezi exogenní BA patří putrescin, kadaverin, histamin, tyramin, tryptamin, spermin, spermidin a fenyletylamin. Konzumace produktů s vysokým obsahem těchto BA způsobuje mnoho zdravotních problémů²⁻⁵.

Názvy jednotlivých BA jsou pak odvozeny od názvu aminokyseliny, ze které vznikly. Například histamin vzniká dekarboxylací histidinu, tyramin z tyrosinu, tryptamin z tryptofanu a tak podobně. Jednotlivé prekurzorové aminokyseliny BA jsou uvedeny v Tabulce 1. Vznik BA v potravinách je komplexní proces, který je ovlivněn několika faktory. Tato problematika bude více rozvedena v kapitole 1.2.

Tabulka 1: Rozdělení biogenních aminů a jejich prekurzorové aminokyseliny¹

Biogenní amin	Vzorec	Klasifikace podle počtu aminoskupin	Chemická struktura	Prekurzorová aminokyselina
fenylethylamin	C ₈ H ₁₁ N	monoamin	aromatická	fenylalanin
tyramin	C ₈ H ₁₁ NO	monoamin	aromatická	tyrosin
dopamin	C ₈ H ₁₁ NO ₂	monoamin	aromatická	tyrosin
norepinephrin	C ₈ H ₁₁ NO ₃	monoamin	aromatická	tyrosin
histamin	C ₅ H ₉ N ₃	monoamin	heterocyklická	histidin
tryptamin	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	monoamin	heterocyklická	tryptofan
serotonin	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	monoamin	heterocyklická	hydroxytryptofan
putrescin	C ₄ H ₁₂ N ₂	diamin	alifatická	ornitin
kadaverin	C ₅ H ₁₄ N ₂	diamin	alifatická	lysin
agmatin	C ₅ H ₁₄ N ₄	polyamin	alifatická	arginin
spermidin	C ₇ H ₁₉ N ₃	polyamin	alifatická	arginin/ornitin
spermin	C ₁₀ H ₂₆ N ₄	polyamin	alifatická	arginin/ornitin

1.1.2 Vliv biogenních aminů na lidské zdraví

Některé BA hrají dvojí roli v lidském organismu, kdy za určitých okolností mohou být prospěšné, ale při příjmu ve vysokých koncentracích mohou mít škodlivé účinky⁶.

1.1.2.1 Biologické účinky tyraminu a histaminu

Tyramin v lidském těle plní několik prospěšných funkcí. Podporuje uvolňování noradrenalinu, adrenalinu a dopaminu. Ve studii⁷ bylo zjištěno, že derivát tyraminu (*N-trans-ρ*-kofeoyltyramin) inhiboval produkci prozánětlivých mediátorů. Díky tomu lze tyraminu přisuzovat protizánětlivé účinky. Dalším BA, který plní několik důležitých fyziologických rolí, je histamin. Tento BA působí jako neurotransmitter v centrálním nervovém systému, kde se podílí na regulaci bdělosti a pozornosti. Účastní se také imunitních odpovědí, buněčného růstu a diferenciac buněk. Histamin se také účastní imunitních a alergických reakcí a stimuluje produkci žaludeční kyseliny^{6,8}.

1.1.2.2 Detoxikační mechanismy biogenních aminů

Hlavními mechanismy detoxikace BA v lidském těle jsou enzymatické degradace. Klíčovou roli v těchto procesech hrají aminooxidázy, které lze rozdělit na monoaminooxidázy (MAO), diaminooxidázy (DAO) a polyaminooxidázu (PAO). V tabulce 2 je k BA přidělen příslušný enzym, který se podílí na degradaci.

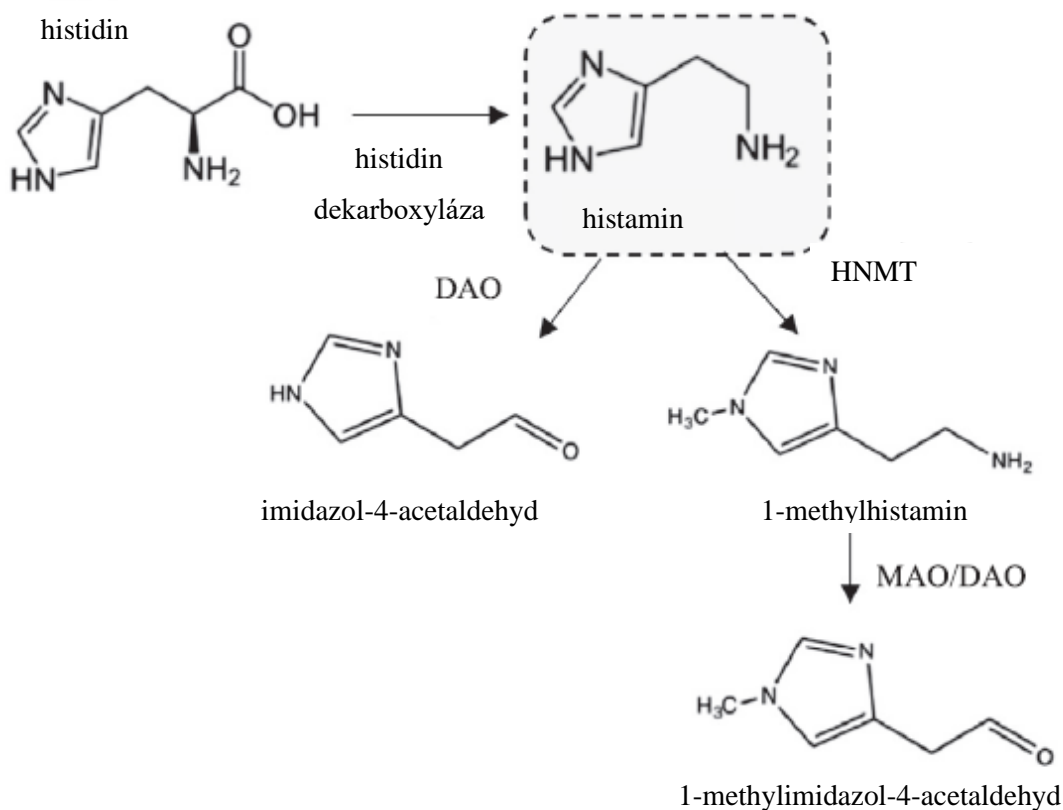
Tabulka 2: Biogenní aminy a jejich degradační enzymy

Biogenní amin	Enzym
tyramin	MAO-A, MAO-B
tryptamin	MAO
histamin	DAO, HNMT
putrescin	DAO
kadaverin	DAO
spermin	PAO
spermidin	PAO

MAO – monoaminooxidáza, MAO-A (izoforma MAO – detoxikace ve střevě), MAO-B (izoforma MAO – detoxikace v játrech), HNMT – histamin-*N*-methyltransferáza, DAO – diaminooxidáza, PAO – polyaminooxidáza

Histamin-*N*-methyltransferáza (HNMT) je enzym, který se podílí na metabolismu histaminu methylací, čímž vzniká methylhistamin. HNMT působí uvnitř buněk a je na rozdíl od DAO velmi selektivní pro histamin. Vzniklý methylhistamin je poté metabolizován MAO nebo DAO. Schéma vzniku histaminu a jeho enzymatických degradací je na obrázku 1.

DAO je na rozdíl od HNMT neselektivní enzym pro histamin a bylo prokázáno, že při 20krát vyšší koncentraci putrescinu a kadaverinu došlo ke snížení metabolismu histaminu přibližně o 70–80 %. Naopak při 20krát vyšší koncentraci tyraminu, spermidinu nebo sperminu se metabolismus histaminu snížil asi jen o 32–45 %. Z čehož lze vyvodit, že putrescin a kadaverin zvyšují toxické účinky histaminu⁷⁻⁹.



Obrázek 1: Vznik a metabolická degradace histaminu¹⁰
 HNMT – histamin-*N*-methyltransferáza, DAO – diaminooxidáza, MAO – monoaminooxidáza

1.1.2.3 Toxické účinky biogenních aminů

Při nedostatečném metabolickém odbourávání BA může dojít k intoxikaci, která je spojená se zdravotními obtížemi, které popisuje tabulka 3. Nedostatečné odbourávání BA může být způsobeno sníženou aktivitou enzymů MAO/DAO. Snížená aktivita těchto enzymů může být genetická nebo způsobená gastrointestinálními poruchami (jako jsou zánětlivá střevní onemocnění nebo Crohnova choroba). U lidí, užívajících léky k léčbě deprese, které obsahují inhibitory monoaminooxidázy (MAOI), může být také aktivita těchto enzymů snížena. Dalším z faktorů, které mohou ovlivnit aktivitu těchto enzymů je nedostatek některých vitamínů, jako jsou vitamín C, B1 a B6. Navíc konzumace potravin s vysokým obsahem BA, například zrající sýry, fermentované potraviny a nedostatečně upravené ryby může přetížit enzymatické degradační dráhy. Zdravotní obtíže jsou nejvíce spojeny s intoxikací histaminem, tyraminem, putrescinem a kadaverinem. Dle studie¹¹ došlo k intoxikaci při perorálním podání 75 mg čistého tekutého histaminu, což je koncentrace, která se běžně vyskytuje v potravinách. U zdravých jedinců není konzumace potravin s koncentracemi histaminu do 50 mg spojená se zdravotními riziky. Konzumace potravin s obsahem histaminu nad 400 mg/kg se považuje za nebezpečnou.

Kromě histaminové intoxikace je s histaminem také spojená histaminová intolerance (HIT), což je potravinová intolerance, která vzniká u lidí, kteří mají snížené koncentrace enzymů degradujících histamin. Faktory, které přispívají k histaminové intoleranci, jsou genetické faktory, chronická onemocnění (zejména alergická a střevní onemocnění) a chronické infekce. U jedinců s HIT se mohou oproti zdravým osobám objevit zdravotní problémy již při konzumaci potravin s nízkým obsahem histaminu.

Tabulka 3: Příznaky při intoxikaci tyraminem, histaminem, putrescinem a kadaverinem⁷⁻⁹

Biogenní amin	Zdravotní obtíže
tyramin	gastrointestinální potíže: nevolnost, cytotoxicita ve střevním epitelu neurologické potíže: bolest hlavy, palpitace (vnímání vlastního srdečního tepu) a migréna oběhové potíže: pocení, bolest na hrudi, zvýšený krevní tlak respirační potíže: pocit stažení na hrudi další příznaky: horečka
histamin	gastrointestinální potíže: nevolnost, zvracení a průjem neurologické potíže: bolest hlavy, pálení, brnění, palpitace, svědění, mdloby a znečitlivění končetin oběhové potíže: nízký krevní tlak respirační potíže: bolest na hrudi a plicní edém kožní potíže: zčervenání, vyrážka, kopřivka, svědění, otok, lokální zánět, pálení další příznaky: pepřová chuť v ústech, otok obličeje
putrescin a kadaverin	dilatace cév, nízký krevní tlak, nízká srdeční frekvence cytotoxicita ve střevním epitelu

Putrescin a kadaverin jsou obecně méně toxické než histamin a tyramin, ale v masných výrobcích, kde se jako konzervační činidla používají dusitany, existuje riziko vzniku karcinogenních nitrosoaminů, protože tyto BA s dusitany reagují. Putrescin poskytuje reakci s dusitany nitrosopyrrolidin a kadaverin nitrosopiperidin. U tepelně opracovaných masných výrobků, které obsahují přidané dusitany, je riziko vzniku nitrosaminů ještě větší, protože tepelné opracování podporuje reakci mezi BA a dusitany. Mimo jiné, jak už bylo zmíněno v kapitole 1.1.2.2, putrescin a kadaverin mohou zvyšovat toxicitu histaminu kompetitivní inhibicí enzymů DAO zapojených v degradaci histaminu^{8,12,13}.

1.1.3 Limity a legislativa pro biogenní aminy v potravinách

Existují určité limity a legislativa týkající se BA v potravinách, ačkoli nejsou komplexní a specifické pro všechny biogenní aminy a potraviny.

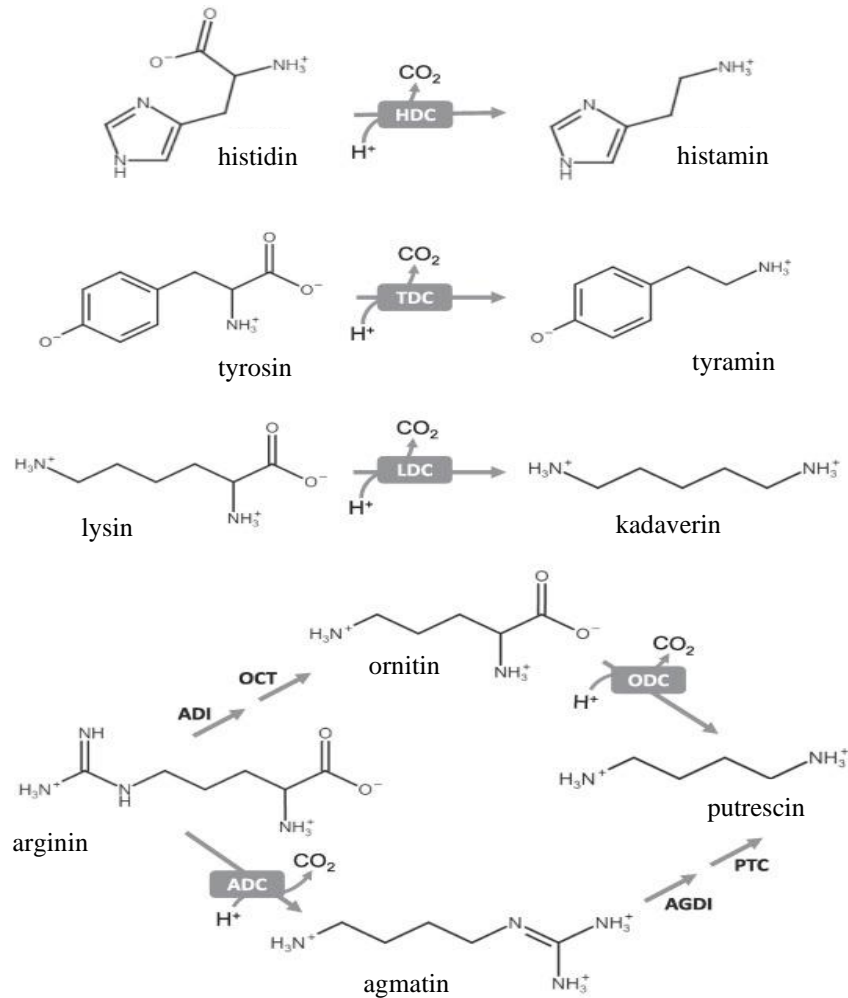
Specifická legislativa v EU se týká pouze histaminu v produktech rybolovu. Nařízení Evropské komise 2073/2005¹⁴ stanovuje kritéria bezpečnosti potravin pro histamin v rybách z čeledí makrelovití (*Scombridae*), sledřovití (*Clupeidae*), sardelovití (*Engraulidae*), lufarovití (*Pomatomidae*) a rohoretkovití (*Scomberesocidae*). Stanovuje se plán odběru vzorků, přičemž dva z devíti vzorků ryb mohou obsahovat 100–200 mg/kg histaminu, ale žádný vzorek nesmí překročit limit 200 mg/kg. Tato legislativa se také vztahuje na hladiny histaminu u produktů rybolovu, vyrobených z výše uvedených čeledí ryb, které byly ošetřeny enzymatickým zráním v láku. U těchto produktů mohou dva z devíti vzorků obsahovat 200–400 mg/kg histaminu a žádný nesmí překročit limit 400 mg/kg. Doposud nebyla stanovena žádná kritéria pro jiné BA nebo jiné potravinářské produkty, jako jsou například maso, mléčné výrobky nebo fermentované potraviny, a to navzdory tomu, že se biogenní aminy ve výše zmíněných potravinách vyskytují a představují i v těchto potravinách zdravotní rizika. Na tyto produkty se obecně vztahují stejné právní předpisy, které jsou platné pro ryby.

EFSA (Evropský úřad pro bezpečnost potravin) v roce 2011 navrhla hodnoty NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) pro některé BA. Pro tyramin je to 600 mg v jednom jídle pro zdravé jedince, kteří neužívají MAOI a 50 mg pro jedince užívající MAOI. Pro histamin je NOAEL 50 mg pro zdravé jedince^{7–9}.

1.2 Biogenní aminy v potravinách

BA se vyskytují v mnoha potravinách, zejména v rybích produktech, sýrech, vínech, pivech a dalších fermentovaných výrobcích. Nejhojněji zastoupenými BA v potravinách jsou histamin, tyramin, tryptamin, isoamylamin, fenylethylamin, putrescin, kadaverin, spermin a spermidin.

Jak již bylo zmíněno dříve, za tvorbou BA v potravinách stojí mikroorganismy a jejich enzymatická dekarboxylace aminokyselin. Schéma vzniku BA je na obrázku 2.



Obrázek 2: Schéma vzniku biogenních aminů z prekurzorových aminokyselin⁶

HDC – histidin dekarboxyláza, TDC – tyrosin dekarboxyláza, LDC – lysin dekarboxyláza, ODC – ornitin dekarboxyláza, ADC – arginin dekarboxyláza, ADI – arginin deimináza, OCT – ornitin karbamoyltransferáza, AGDI – agmatin deimináza, PTC – putrescin transkarbamyláza

Mezi bakterie schopné produkovat BA patří například *Escherichia*, *Enterobacter*, *Pseudomonads*, *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* a *Leuconostoc*. Proces vzniku BA v potravinách je ovlivněn několika vnějšími a vnitřními faktory. Mezi tyto faktory patří teplota skladování, pH, redoxní potenciál, aktivita vody, dostupnost kyslíku, dostupnost prekurzorových aminokyselin, mikroorganismy použité například při fermentaci a také hygienické podmínky během výroby a vlastnosti výchozích surovin. Teplota skladování a zpracování potravin zásadně ovlivňuje růst a aktivitu mikroorganismů a tím pádem i produkci jejich enzymů. Vyšší teploty obecně podporují růst mikroorganismů produkujících BA a zvyšují aktivitu dekarboxylačních enzymů. Pro mikroorganismy je nejvhodnější teplota pro tvorbu BA mezi 20 a 37 °C. Tvorba BA se snižuje při teplotách pod 5 °C nebo nad 40 °C.

Dostupnost kyslíku je dalším důležitým faktorem pro metabolismus bakterií, například *Enterobacter cloacae* produkuje více putrescinu v anaerobních podmínkách ve srovnání s aerobními. *Klebsiella pneumoniae* produkuje v anaerobním prostředí méně kadaverinu, ale získává schopnost produkovat putrescin.

Dalším faktorem je hodnota pH potravy, která má vliv na aktivitu dekarboxylačních enzymů. Optimální pH pro aktivitu těchto enzymů se může lišit v závislosti na konkrétním enzymu a mikroorganismu. Změny pH mohou přímo ovlivnit enzymovou aktivitu nebo nepřímo ovlivnit růst a metabolismus mikroorganismů. Mikroorganismy mohou také produkovat BA jako obranný mechanismus proti kyselému prostředí.

Redoxní potenciál a aktivita vody jsou další fyzikálně-chemické vlastnosti potravy, které mohou ovlivňovat růst různých mikroorganismů a tím tak ovlivnit i produkci BA. Chemické složení potravy, včetně obsahu cukrů, soli, vody a přítomnosti různých přísad, může také hrát roli v růstu mikroorganismů a aktivitě enzymů, a tím i ovlivnit tvorbu BA.

Množství volných aminokyselin v potravě je zásadní pro tvorbu BA. Suroviny bohaté na bílkoviny, jako jsou mléko, maso, ryby a sója, obsahují vysoké koncentrace aminokyselin, které slouží jako prekurzory BA. V rostlinných nápojích mohou být přítomny i endogenní polyaminy, které jsou přirozenou součástí metabolismu rostlin. Během fermentace nebo zrání může docházet ke zvyšování dostupnosti volných aminokyselin kvůli proteolytickým aktivitám mikroorganismů. Zpracování a konzervace potravin, které zahrnují právě fermentace nebo pasterizace, sterilizace, chlazení a použití konzervačních látek, mohou mít vliv na přítomnost a aktivitu mikroorganismů a enzymů podílejících se na tvorbě BA.

Nesprávné konzervační postupy mohou vést ke zvýšené produkci BA. Dodržování sanitárních podmínek během výroby a správné manipulace s potravinami jsou důležité pro minimalizaci kontaminace mikroorganismy, které mohou produkovat BA. Svou roli při vzniku BA má také kvalita surovin a výrobní postupy. Vysoké koncentrace BA v potravinách mohou být důsledkem špatné kvality surovin, kontaminace nebo nedodržování různých podmínek během zpracování. Používáním kvalitních surovin a dodržováním hygienických postupů, eliminováním dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů a mikroorganismů způsobujících kažení nebo používáním startovacích kultur, které neprodukují BA, lze eliminovat tvorbu BA^{4,5,15}.

1.2.1 Biogenní aminy v potravinách živočišného původu

Z potravin živočišného původu se BA sledují hlavně v rybách, mase a v příslušných výrobcích z nich. Nejčastěji sledovanými biogenními aminy jsou tryptamin, fenyletylamin, putrescin,

kadaverin, histamin, tyramin, spermidin a spermin, přičemž histamin a tyramin jsou obzvláště důležité z hlediska toxikologie a bezpečnosti potravin. Kromě identifikace toxikologických rizik může sledování BA v potravinách živočišného původu sloužit také jako ukazatel jejich kvality. Koncentrace některých BA, zejména histaminu a tyraminu, mohou v některých masných výrobcích dosáhnout hladin, které představují zdravotní riziko pro spotřebitele, zejména pro osoby užívající MAOI, což je přibližně 20 % evropské populace užívající antidepresiva. Koncentrace některých BA (tyramin, putrescin a kadaverin) se zvyšují během zpracování a skladování masa a masných výrobků, zatímco jiné (spermidin a spermin) klesají nebo zůstávají konstantní.

Výskyt BA je spojený s výskytem mikroorganismů, které způsobují kažení masa. Tato skutečnost vedla k pokusům o stanovení vztahu mezi kvalitou masa a koncentrací BA (jednotlivě nebo v kombinaci) v různých masných produktech. Tento vztah popisuje index biogenních aminů (BAI), který je vypočítán jako součet koncentrací histaminu, putrescinu, kadaverinu a tyraminu, a byl navržen jako ukazatel kvality čerstvosti masa a tepelně opracovaných masných výrobků. Hodnoty BAI pro jednotlivé stupně čerstvosti masa jsou následující: hodnota BAI <5 mg/kg ukazuje dobrou kvalitu a čerstvost masa, hodnota BAI mezi 5 a 20 mg/kg je pak pro maso přijatelné kvality, ale s počátečními známkami kažení, hodnota BAI mezi 20 a 50 mg/kg ukazuje na nízkou kvalitu masa a hodnoty BAI >50 mg/kg indikují zkažené maso. Použitelnost BAI jako ukazatele kvality závisí na typu potravin. Například u fermentovaných masných výrobků je použití tohoto indexu omezené, protože v těchto produktech je mikrobiální růst normální, a dokonce žádoucí pro dosažení vysoké kvality produktu. Dalším indexem popisující vztah mezi kvalitou dané potravin a obsahem BA je index kvality (QI) který lze popsat rovnicí (1):

$$QI = \frac{c_{HIS} + c_{PUT} + c_{CAD}}{1 + c_{SPD} + c_{SPM}} \quad (1)$$

kde c_{HIS} , c_{PUT} , c_{CAD} , c_{SPD} a c_{SPM} , představují koncentraci histaminu, putrescinu kadaverinu, spermidinu a sperminu.

Ve studii¹⁶ byl tento index používán k hodnocení kvality tuňákových konzerv a k hodnocení stupně rozkladu okouníka a fileťů z lososa. Hodnoty QI pro posouzení kvality byly v rozmezí 1–10. Hodnoty 0–1 byly ukazatelem dobré kvality, hodnoty 1–10 byly ukazatelem přijatelné

kvality a hodnoty přesahující 10 byly považovány za ukazatel ztráty kvality produktu až jeho rozkladu. Koncentrace histaminu se také používá jako indikátor čerstvosti a kvality ryb^{6,16,17}.

1.2.2 Biogenní aminy v potravinách rostlinného původu

Obsah BA v rostlinných potravinách je velmi variabilní a může záviset na mnoha faktorech, jako jsou odrůda dané potraviny, podmínky pěstování, skladování a zpracování. Proto i potraviny, u kterých se obecně předpokládá nízký obsah BA, mohou v určitých případech obsahovat vyšší množství těchto látek. Mezi BA, které se v rostlinných potravinách vyskytují nejčastěji, patří histamin, tyramin, kadaverin a putrescin.

Na základě studie¹⁸ bylo zjištěno, že putrescin je nejzastoupenějším biogenním aminem v čerstvé zelenině, luštěninách, ovoci a obilovinách. Lze ho detekovat prakticky ve všech rostlinných potravinách. Jeho obsah se mezi různými rostlinnými potravinami liší a někdy i v rámci stejného produktu. Mezi potraviny s vysokým obsahem putrescinu patří zelená paprika (až 148,9 mg/kg), zelené a fialové fazole (77,8 mg/kg u fialových fazolí), sladká kukuřice (až 119,2 mg/kg), špenát (až 119 mg/kg), kečup (průměrně 1,07 mg/kg), sójové boby (až 57,2 mg/kg) a hrách (až 54,44 mg/kg). Citrusové plody (pomeranče, mandarinky a grapefruity) a jejich šťávy také obsahují vysoké koncentrace putrescinu, v některých případech až 200 mg/kg. Vysoký obsah putrescinu byl také zjištěn v pšeničných klíčcích s koncentracemi až do 31 mg/kg. Banány a pistácie patří také mezi potraviny s vyšším obsahem putrescinu.

Vysoké koncentrace histaminu byly zjištěny pouze u lilku (až 100,6 mg/kg), špenátu (až 69,7 mg/kg) a avokáda (23 mg/kg). Rajčata také obsahují histamin, i když v nižších koncentracích (do 17 mg/kg). V ostatních rostlinných potravinách, jako například u chřestu, dýně a mangoldu, byl histamin detekován jen zřídka a ve velmi nízkých koncentracích (<2 mg/kg).

Tyramin byl detekován ve více potravinách než histamin, i když v nižších koncentracích, které nepřesáhly 10 mg/kg. Mezi potraviny obsahující tyramin patří lilek (až 2,27 mg/kg), rajčata (až 6,38 mg/kg), špenát (až 4,28 mg/kg), mangold (až 3,48 mg/kg), chřest (až 2,1 mg/kg), avokádo (až 5,44 mg/kg) a švestky (až 7,07 mg/kg).

U několika druhů zeleniny a luštěnin byl stanoven kadaverin v poměrně nízkých koncentracích, a to s průměrnými hodnotami, které nepřesáhly 8 mg/kg. Výjimkou byly koncentrace stanovené u cibule (29 mg/kg) a tofu (18 mg/kg).

Aby se předcházelo vysokému příjmu BA, doporučuje se konzumovat rostlinné potraviny v maximální čerstvosti. Správné postupy skladování, jako jsou udržování nízkých teplot a používání vhodných balicích metod, může také pomoci minimalizovat tvorbu těchto sloučenin^{18,19}.

1.2.3 Biogenní aminy ve fermentovaných potravinách

Fermentované potraviny představují širokou skupinu potravinářských produktů, mezi které patří fermentované mléčné, masné a sójové výrobky, dále fermentované alkoholické nápoje a zelenina. Tyto potraviny vznikají tradičními způsoby, které využívají k fermentaci mikroorganismy, které se přirozeně vyskytují v přírodě. Mezi fermentované potraviny patří jogurty, sýry, klobásy, rybí omáčka, sójová omáčka, pivo, víno a nakládaná zelenina. Fermentace probíhá často v otevřeném prostředí, což má za následek rozvoj komplexní mikrobiální mikroflóry, včetně mikroorganismů produkujících BA. Vysoká koncentrace těchto látek ve fermentovaných potravinách může představovat zdravotní riziko a také mít vliv na bezpečnost potravin.

K fermentaci potravin se používají různé mikroorganismy. Nejvýznamnější skupinou jsou bakterie mléčného kvašení (BMK). Bakterie mléčného kvašení jsou považovány za netoxické a nepatogenní bakterie. Některé druhy BMK však mohou produkovat BA. Mezi běžné mikroorganismy účastnící se fermentace potravin patří následující mikroorganismy:

- *Lactobacillus spp.* – tyto bakterie jsou často zodpovědné za produkci histaminu, tyraminu a putrescinu. Vyskytují se v mnoha fermentovaných potravinách, včetně sýrů, vín a fermentovaných sójových produktů. Některé druhy *Lactobacillus*, jako například *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus brevis* a *Lactobacillus hilgardii*, produkují různé BA ve víně, ačkoliv mají status QPS (kvalifikovaná presumpce bezpečnosti), který vydává EFSA a jde o postup hodnocení bezpečnosti mikroorganismů používaných v potravinářském průmyslu. QPS využívá znalostí o bezpečnosti konkrétních mikroorganismů k rozlišení těch, které nevzbuzují obavy (a mohou získat status QPS), od těch, které mohou představovat riziko a měly by být podrobeny úplnému posouzení bezpečnosti²⁰. Některé kmeny *Lactobacillus* se také používají jako startovací kultury pro fermentované maso. *Lactobacillus brevis* byl identifikován jako druh produkující vysoké hladiny tyraminu v kimchi. Rody *Lactobacillus* spolu s rodem *Enterococcus* jsou spojeny s produkcí BA v sýrech vyrobených z nepasterizovaného mléka.

- *Leuconostoc spp.* se účastní fermentace vína a zeleniny, jako je například kimchi. *Leuconostoc mesenteroides* je spojen s obsahem tyraminu nebo histaminu ve víně. Naopak *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc pentosus* a *Leuconostoc plantarum* byly vyhodnoceny jako kmeny, které jsou schopny redukovat tvorbu BA nebo nejsou vůbec schopny produkovat BA v kimchi.
- Kmeny *Pediococcus spp.* jsou přítomny při fermentaci vína, sójových produktů a ryb. *Pediococcus pentosaceus* se používá jako startovací kultura, která může omezit tvorbu biogenních aminů.
- Některé druhy rodu *Bacillus* se používají při fermentaci sójových produktů, jako je natto, což je tradiční japonský pokrm připravený z uvařených fermentovaných sójových bobů. Některé druhy, jako například *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* a *Bacillus amyloliquefacien*, mohou redukovat tvorbu BA.
- Druhy kmene *Staphylococcus spp.*, jako například *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus vitulinus*, *Staphylococcus hominis* a *Staphylococcus carnosus*, se používají jako startovací kultury při fermentaci masa a mohou potlačovat akumulaci BA.

Rody *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* a *Leuconostoc* běžně produkují BA v sýrech. Zvýšené koncentrace histaminu, které byly nad legislativními hodnotami považovanými za toxické, byly stanoveny u plísňového sýra, parmazánu, tvrdého sýra, polotvrdého sýra a měkkého sýra. Tyramin se vyskytuje ve většině fermentovaných mléčných výrobků, jako jsou plísňový sýr, sýr feta, tvrdý sýr, polotvrdý sýr, měkký sýr a fermentované mléko. Obecně jsou koncentrace BA nižší u sýrů s krátkou dobou zrání oproti sýrům s dlouhým zráním.

Schopnost mikroorganismů produkovat BA je vysoce variabilní a je specifická pro daný kmen a často i druh. Proto je při výběru startovacích kultur pro fermentaci potravin zásadní vybírat kmeny, které nejsou schopny produkovat BA. Využití startovacích kultur, které nejsou schopny produkovat BA (tabulka 4), je účinným nástrojem, jak kontrolovat obsah těchto látek ve fermentovaných potravinách²¹⁻²⁴.

Tabulka 4: Seznam mikroorganismů, které nejsou schopny tvořit biogenní aminy a lze je použít k fermentaci potravin²³

Fermentovaná potravina	Mikroorganismus
fermentované masné výrobky	<i>Staphylococcus xylosum</i> <i>Staphylococcus vitulinus</i> <i>Staphylococcus hominis</i> <i>Staphylococcus carnosus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus carvatus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus sakei</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i>
sýry	<i>Brevibacterium linens</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus paracasei</i>
kimchi	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Leuconostoc pentosus</i> <i>Leuconostoc plantarum</i> <i>Weissella cibaria</i> <i>Weissella paramesenteroides</i>

1.3 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (LC) je chromatografickou metodou, ve které je mobilní fází kapalina. LC zahrnuje různé techniky, od klasické sloupcové chromatografie, tenkovrstvé a papírové chromatografie, až po moderní vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC). Tento typ chromatografie se vyznačuje separacemi s vysokým rozlišením a použitelností u různých typů vzorků. Doby trvání analýz jsou v řádech několika minut až zhruba jedné hodiny. Moderní HPLC systémy jsou často automatizované, což umožňuje pohodlný provoz bez nutnosti stálé obsluhy. HPLC není omezena těkavostí nebo termální stabilitou vzorku. Díky tomu je ideální pro separaci široké škály látek, jako jsou makromolekuly, ionty, labilní přírodní produkty a další vysokomolekulární nebo méně stabilní sloučeniny, které nelze analyzovat pomocí plynové chromatografie (GC). Další výhodou HPLC je možnost gradientové eluce. Při separaci vzorků, které mají široké rozpětí retenčních časů lze docílit zkrácení doby separace pomocí měnícího se složení mobilní fáze. V HPLC se používají především náplňové kolony, jejichž parametry jsou zásadní pro dosažení optimální separace daného vzorku. Jedním z parametrů u kolon je velikost a porozita částic. Tyto kolony lze rozdělit následovně:

- kolony s porézními mikročásticemi, kde se používají jako nosiče stacionární fáze velmi malé částice porézního materiálu (typicky 5–10 μm , ale i menší),
- kolony s částečně porézními částicemi, jejichž částice mají pevné neporézní jádro a tenkou porézní vrstvu na povrchu, na které je nanесena stacionární fáze,
- pelikulární kolony, u kterých se používá neporézní jádro (např. skleněnou kuličku) s tenkou vrstvou stacionární fáze na povrchu.

Dalším parametrem je typ stacionární fáze, který určuje mechanismu separace. Na základě tohoto kritéria lze stacionární fáze rozdělit na:

- Kapalná stacionární fáze, které se používají pro rozdělovací kapalinovou chromatografii (Liquid-Liquid Chromatography – LLC). Kapalná fáze je mechanicky zakotvena na inertním nosiči. Nabízí širokou selektivitu díky možnosti volby různých nemísitelných kapalin.
- Vázané fáze (Bonded-Phase Chromatography). Organická stacionární fáze je chemicky vázána na povrch nosiče (často silikagelu). Jsou stabilnější než LLC kolony a usnadňují práci s gradientovou elucí a nabízí použití širokého spektra rozpouštědel. Existuje mnoho typů s různou polaritou (reverzní fáze a normální fáze). HPLC v systému s normálními fázemi (NP-HPLC) je typ kapalinové chromatografie, který využívá polární stacionární fáze a méně polární mobilní fáze. Tento přístup je často volen pro separaci látek, které jsou polární nebo mají střední polaritu a jsou rozpustné v organických rozpouštědlech. Mezi nejčastěji používané stacionární fáze patří silikagel a polární vázané fáze, jako jsou kolony s kyanoskupinami (-CN), aminovými skupinami (-NH₂) nebo diolové kolony. Jako mobilní fáze se používají méně polární rozpouštědla nebo jejich směsí. Typicky se používá například *n*-hexan a *n*-heptan. HPLC v systému s obrácenými fázemi (RP-HPLC) je nejpoužívanější technikou v moderní kapalinové chromatografii. Na rozdíl od NP-HPLC využívá nepolární stacionární fáze a polární mobilní fáze často obsahující vodu. Jako stacionární fáze se nejčastěji používají silikagelové částice, na jejichž povrchu jsou chemicky navázány nepolární organické skupiny, jako jsou alkylové řetězce s 8 (C8 – oktylsilikagel) nebo 18 (C18 – oktadecylsilikagel) uhlíky. Mobilní fáze se často skládá z pufovaného vodného roztoku a jednoho nebo více organických rozpouštědel, např. methanol nebo acetonitril.
- Kolony pro adsorpční chromatografii (Liquid-Solid Chromatography – LSC) používají tuhý sorbent (např. silikagel, alumina) s aktivními povrchovými centry. Separace je založena na rozdílné adsorpci složek vzorku na povrchu sorbentu. Tyto kolony jsou vhodné pro separaci izomerů.

- Kolony pro iontově-výměnnou chromatografii (Ion-Exchange Chromatography – IEC). Obsahují stacionární fázi s fixně vázanými iontovými skupinami. Tyto kolony jsou vhodné pro separaci nabitých molekul.
- Kolony pro iontově-párovou chromatografii (Ion-Pair Chromatography – IPC). U tohoto typu kolon se využívá přidávání iontového činidla do mobilní fáze, které interaguje s ionizovanými složkami vzorku za vzniku iontových párů, které se pak rozdělují mezi mobilní a stacionární fázi. Taková kolona umožňuje separaci iontových a ionizovatelných látek.

Při výběru konkrétního typu kolony je třeba brát v úvahu vlastnosti analyzovaných látek (například polarita, molekulová hmotnost a ionizovatelnost) a požadovaný mechanismus separace.

Pro detekci analytů se u HPLC používá celá řada detektorů. Volba konkrétního detektoru opět závisí na vlastnostech analyzovaného vzorku, požadované citlivosti, selektivitě a také na kompatibilitě s mobilní fází. Mezi nejčastěji používané detektory patří:

- UV-Vis (ultrafialová-viditelná oblast záření) detektory, které jsou vysoce citlivé pro mnoho organických sloučenin, které obsahují chromofory. Mohou být velmi selektivní při vhodné volbě vlnové délky. Velmi používaným detektorem je detektor diodového pole (DAD – Diode Array Detector), který umožňuje simultánní monitorování absorbance v širokém rozsahu vlnových délek.
- Refraktometrické detektory, které měří rozdíl v indexu lomu mezi čistou mobilní fází a eluátem z kolony. Jsou to univerzální detektory, které reagují na všechny rozpuštěné látky, pokud se jejich index lomu liší od indexu lomu mobilní fáze. Nevýhodou těchto detektorů je, že je nelze použít pro gradientovou eluci.
- Fluorescenční detektory jsou velmi citlivé a selektivní pro fluoreskující sloučeniny nebo sloučeniny, které lze převést na fluoreskující deriváty.
- Infračervené detektory jsou založeny na absorpci infračerveného záření analytem. Mohou být použity s gradientovou elucí v případech, kdy nejsou vhodné refraktometrické detektory.
- Elektrochemické (amperometrické) detektory jsou velmi citlivé a selektivní pro elektroaktivní sloučeniny (oxidovatelné nebo redukovatelné). Používají se pro analýzu fenolů, aminů, peroxidů a dalších.
- Konduktometrické detektory měří, jak se mění vodivost mobilní fáze v přítomnosti iontových analytů. Používají se především v iontové chromatografii pro analýzu anorganických a organických iontů.

- Hmotnostní spektrometrie je pokročilá a výkonná technika pro kvalitativní a kvantitativní analýzu, při které dochází k separaci iontů na základě jejich poměru hmotnosti ku náboji. Aby bylo vůbec možné detekovat analyzované látky, je za potřebí ionizace. Bez procesu ionizace by analyzované molekuly byly neutrální a neinteragovaly by s elektrickými a magnetickými poli v hmotnostním analyzátoru. V současnosti existuje široké spektrum ionizačních metod, které se využívají při spojení HPLC-MS (kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií), přičemž mezi nejrozšířenější patří ionizace za atmosférického tlaku, kam patří elektrosprejová ionizace (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). ESI generuje ionty prostřednictvím nabitých kapiček, které buď uvolňují ionty přímo z povrchu, nebo dochází k úplnému odpaření rozpouštědla, přičemž náboj zůstává na vzniklých iontech. Ačkoliv má ESI široké uplatnění není optimální pro ionizaci nepolárních sloučenin. U takových sloučenin je vhodnější použití APCI nebo APPI²⁵⁻²⁷.

1.3.1 Derivatizace v kapalinové chromatografii

Při použití UV detektorů nebo fluorescenčních detektorů se derivatizace používá k modifikaci chemické struktury vzorku, aby bylo vůbec možné analyty detekovat nebo zlepšit jejich detekovatelnost. Chemická derivatizace slouží k zavádění chromoforů do struktur analytů ke zlepšení UV absorpance a fluorescence. Jde o reakce derivatizačního činidla s cílovými funkčními skupinami analytu (hydroxylové, thiolové, aminové, karbonylové nebo karboxylové).

Derivatizaci lze provádět buď off-line, nebo on-line, přičemž každá metoda má své výhody a nevýhody. Off-line derivatizace je velmi využívána kvůli své jednoduchosti a nízkým nákladům, protože nevyžaduje žádné další vybavení kromě HPLC. U této metody je důležité, aby derivatizační reakce proběhla v přiměřeném čase a aby vznikající deriváty byly stabilní. Před chromatografickou analýzou je nezbytné odstranit přebytečné derivatizační činidlo a vedlejší produkty reakce.

Naopak on-line derivatizace probíhá přímo v chromatografickém systému a může být provedena buď před kolonou nebo za kolonou. Při předkolonové on-line derivatizaci se vzorek smísí s derivatizačním činidlem a pufrem ještě před vstupem do chromatografického systému. Použití této metody vyžaduje automatizované dávkovací systémy, jedno nebo více přídavných čerpadel, směšovací komoru a reaktor, kde je směs udržována při dané teplotě, aby byla zajištěna požadovaná kinetika reakce. Po vytvoření stabilních derivátů je výsledný roztok nastříknut do chromatografického systému, kde probíhá separace a následná detekce.

Použití post-kolonového reaktoru je spojeno s rozšířením chromatografických zón, přičemž ředění eluátu derivatizačním činidlem může vést ke snížení citlivosti detekce. Pro zajištění účinnosti post-kolonové derivatizace musí být reakční roztok plně kompatibilní s eluátem, nesmí docházet k precipitaci činidla ani derivátů a reakce by měla probíhat dostatečně rychle, aby se minimalizovala ztráta rozlišení. Mezi běžně používaná derivatizační činidla patří například 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen (FDNB), ninhydrin, dabsylchlorid (Dbs-Cl), benzoylchlorid, dansyl chlorid (DnS-Cl), fenylisokyanát (PIC), *o*-ftalaldehyd (OPA), fluoreskamin nebo benzofurany jako například, 4-chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (NBD-Cl) a 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (NBD-F)^{28–30}.

Při výběru derivatizačního činidla je třeba brát v potaz požadovanou detekční metodu a cílový analyt.

1.3.2 Extrakční techniky

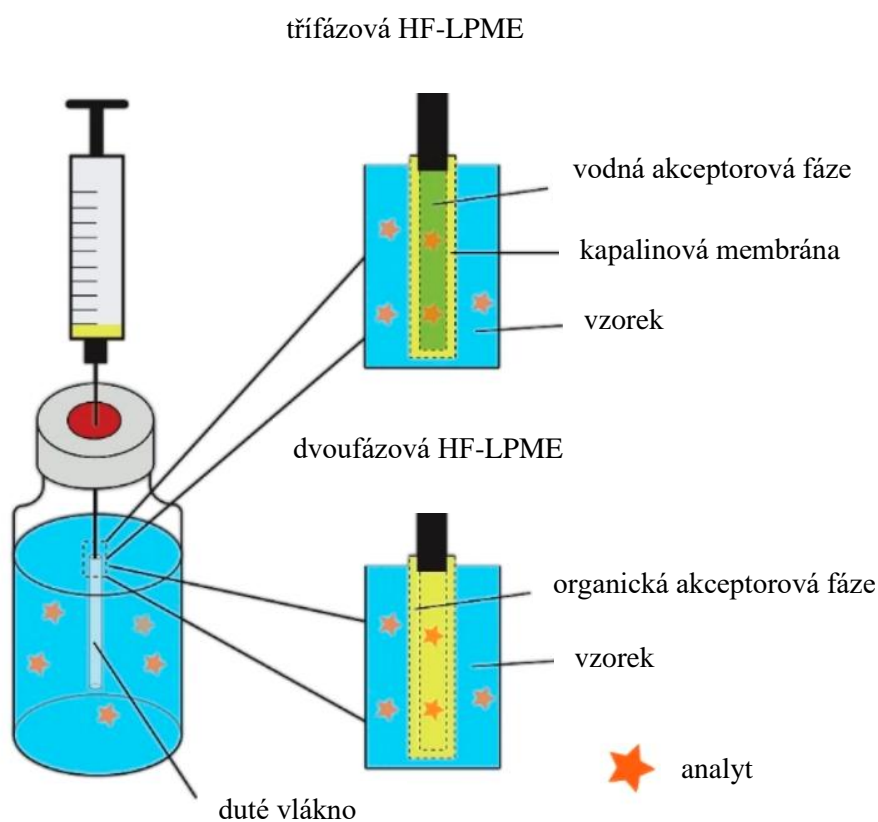
Extrakční techniky hrají klíčovou roli v analytické chemii, protože umožňují extrakci nebo zakoncentrování analytů ze složitých matic před jejich samotnou detekcí a kvantifikací. Před samotnou extrakcí je často nezbytná vhodná úprava vzorku, která může zahrnovat homogenizaci, sušení nebo úpravu pH. Extrakční postupy se liší v závislosti na vlastnostech analytu (polarita, těkavost a termická stabilita), matici vzorku (tuhá, kapalná a plynná) a cíli analýzy (kvalitativní, kvantitativní a stanovení stopových koncentrací).

Mezi extrakční techniky pro kapalné vzorky patří LLE (liquid-liquid extraction) a SPE (solid-phase extraction). LLE je technika založena na rozdílné rozpustnosti analytu ve dvou nemísitelných rozpouštědlech. LLE může být prováděna diskontinuálně nebo kontinuálně. U diskontinuální LLE je ustavena rovnováha mezi dvěma nemísitelnými fázemi a u kontinuální nemusí být rovnováhy dosaženo. Od klasické LLE je kvůli velké spotřebě organických rozpouštědel, které zatěžují životní prostředí, upouštěno a pozornost je upínána na miniaturizované metody, mezi které patří:

- Mikroextrakce jednou kapkou (SDME), kde je extrakční fází kapka organického rozpouštědla nemísitelného s vodou o objemu několika mikrolitrů umístěná na špičce jehly mikrostríkačky, která se běžně používá k dávkování vzorku v GC.
- Disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina (DLLME), kdy se do vzorku vstříkne extrakční rozpouštědlo (obvykle 20–100 μ l) a dispergační rozpouštědlo (0,5–2 ml). Tímto vzniká emulze, která se tvoří díky spolurozpustnosti dispergačního rozpouštědla se vzorkem a extrakčním rozpouštědlem. Cílový analyt se okamžitě extrahuje do dispergovaného

extrakčního rozpouštědla. Separace fází se provádí odstředěním a po oddělení obou fází je extrakt analyzován. Alternativně se oddělení fází dosáhne ochlazením zkumavky, kdy extrakt ztuhne.

- Mikroextrakce využívající dutá vlákna (HF-LPME) má třífázové nebo dvoufázové uspořádání. U třífázové HF-LPME jsou cílové analyty extrahovány z vodného vzorku přes kapalinovou membránu do vodné akceptorové fáze. Kapalinovou membránu tvoří organické rozpouštědlo nemísitelné s vodou, které je imobilizováno kapilárními silami v pórech stěny membrány z dutých vláken (polypropylen nebo podobný materiál). U dvoufázové HF-LPME je vzorek extrahován do organické akceptorové fáze. Schéma HF-LPME je na obrázku 3.



Obrázek 3: Schéma mikroextrakce využívající dutá vlákna³¹

SPE využívá sorpční materiál pro selektivní zachycení analytů z kapalného vzorku. Použití SPE se skládá z několika kroků. Tyto kroky zahrnují kondicionaci sorbentu vhodným rozpouštědlem, nanesení vzorku, promytí sorbentu vhodným rozpouštědlem, které neovlivní eluci cílových analytů, ale odstraní interferující látky, a eluci analytů vhodným rozpouštědlem. Obecně lze SPE sorbenty rozdělit podle polaritě na normální fáze, reverzní fáze a fáze

pro iontovou výměnu. Nejběžnější sorbenty jsou založeny na částicích oxidu křemičitého. Na povrchové silanolové skupiny jsou navázány funkční skupiny, které mění retenční vlastnosti. Sorbenty normální fáze mají polární funkční skupiny, např. kyanové, aminové a diolové (do této kategorie patří také nemodifikovaný oxid křemičitý). Naproti tomu sorbenty s reverzní fází mají nepolární funkční skupiny, např. oktadecyl, oktyl a methyl. Iontoměničové sorbenty mají na silanolové skupině navázanou například kyselinu benzensulfonovou. Variací SPE je mikroextrakce tuhou fází (SPME), což je technika, která využívá chemicky modifikované křemenné vlákno potažené sorbentem k extrakci analytů z kapalné nebo plynné fáze. Po vystavení vlákna vzorku se analyt sorbuje na povrch vlákna a následně je desorbován. Typ vlákna má vliv na účinnost extrakce. Další variací SPE je mikroextrakce s využitím injekční stříkačky (MEPS). Zařízení MEPS je injekční stříkačka, kde je sorbent umístěn v komoře v horní části jehly injekční stříkačky³¹.

1.4 Analýza biogenních aminů v potravinách pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Identifikace a kvantifikace BA ve vzorcích potravin jsou velmi důležité, protože BA jsou považovány za indikátory kvality a čerstvosti potravin. Nejčastěji používané metody pro analýzu BA jsou založeny na derivatizačních reakcích a separačních procesech, následovaných spektrofotometrickou detekcí. Derivatizace je pro tento typ detekce nezbytná, protože většina biogenních aminů postrádá chromofor. Někteří autoři^{32,33} navrhli maximální přípustné limity některých toxikologicky významných BA v potravinách, pro tyramin je to 100–800 mg/kg, ale podle EFSA je hodnota NOAEL pro tyramin 600 mg/kg, pro fenylethylamin 30 mg/kg, limit pro celkový obsah BA byl navržen na 1000 mg/kg a pro histamin 100 mg/kg. Tento limit je stanoven i Nařízením Evropské komise 2073/2005¹⁴, jak již bylo zmíněno v kapitole 1.1.3.

Ve studii³⁴ byly analyzovány BA ve vzorcích řeckého vína. Bylo analyzováno 100 vzorků vín (47 bílých, 45 červených a 8 růžových) vyrobených z různých odrůd hroznů a pocházejících z různých řeckých regionů, 88 z nich bylo suchých, 7 polosladkých a 5 sladkých vín. Vzorky vína byly předem ošetřeny polyvinylpyrrolidonem, aby se selektivně eliminovaly interferující fenolické sloučeniny. Deset BA, konkrétně methylamin, ethylamin, fenylethylamin, isoamylamin, putrescin, kadaverin, histamin, tyramin, spermidin a spermin, bylo stanoveno pomocí RP-HPLC s použitím 1,7-diaminoheptanu jako vnitřního standardu. Metoda zahrnovala předkolonovou derivatizaci aminů s DnS-Cl a následnou SPE extrakci přes C18 patrony. Separace dansylderivátů byla provedena na koloně Inertsil ODS-3 (5 μ m, 250 \times 4,6 mm) za použití 35minutové gradientové eluce s binárním systémem acetonitril-voda, při průtoku 1 ml/min

a detekce byla provedena měřením absorpance při 254 nm. Celkové množství 10 biogenních aminů ve vzorcích se pohybovalo v koncentracích do 19,1 mg/l, přičemž průměrná hladina byla 4,76 mg/l.

Ve studii³⁵ byly analyzovány BA ve vzorcích turecké suché fermentované klobásy nazývané sucuk. K analýze spermidinu, kadaverinu, sperminu, putrescinu, tyraminu, tryptaminu, histaminu a fenylethylaminu bylo předloženo třicet vzorků této klobásy. K extrakci BA z 2,0 g vzorku byla použita kyselina chloristá (0,4 mol/l) a separace dansylderivatů probíhala v systému RP-HPLC na koloně Spherisorb ODS2 150Å, 150 × 4,60 mm. K separaci byla použita gradientová eluce, kde byl použit vodný roztok octanu amonného (0,1 mol/l) jako mobilní fáze A a acetonitril jako mobilní fáze B. Gradientový eluční program byl zahájen při 50 % rozpouštědla B a ukončen při 90 % rozpouštědla B po 25 minutách. Systém byl ustalován po dobu 10 minut před další analýzou. Průtok mobilní fáze byl 1,0 ml/min a teplota kolony byla 40 °C. Na kolonu bylo nastříknuto 20 µl vzorku. Píky byly detekovány pomocí DAD detektoru při 254 nm. Kvantifikace byla provedena metodou vnitřního standardu (1,7-diaminoheptan). Histamin byl nalezen u 6 vzorků v koncentracích mezi 50 a 100 mg/kg a pouze v jednom vzorku byl detekován nad 100 mg/kg. Tryptamin byl detekován v 16 vzorcích a jeho koncentrace se pohybovaly v rozmezí od 1,2 do 82,3 mg/kg. Tyramin byl detekován ve všech vzorcích a jeho koncentrace byla v rozmezí od 2,4 do 676 mg/kg. Fenylethylamin byl nalezen v 17 vzorcích a koncentrace ve všech zjištěných vzorcích byly nižší než 25 mg/kg. Kdykoli byl součet koncentrací histaminu, tryptaminu, tyraminu a fenylethylaminu nižší než 200 mg/kg, bylo to považováno za indikátor dodržování hygieny a správné výrobní praxe. Z výsledků této studie 10 % vzorků překročilo tuto úroveň a lze z toho vyvodit, že mohlo dojít k nedodržování hygieny a správné výrobní praxe.

Ve studii³⁶ bylo analyzováno 35 vzorků zrajících sýrů, a to konkrétně plísňových měkkých sýrů (typy Brie a Camembert), sýry s modrou plísní (typy Roquefort a Gorgonzola) a tvrdé sýry (typy Grana Padano a Parmezán). Pro extrakci BA byla použita kyselina chloristá (0,2 mol/l). K separaci byla zvolena kolona Unisol C18 (150 × 4,6 mm, 3 µm) s předkolonou (10 × 3 mm, 3 µm). Teplota kolony byla udržována při 30 °C. Jako derivatizační činidlo byl použit DnS-Cl a pro jeho odstranění byl použit L-prolin. Jako mobilní fáze A byl použit acetonitril a jako mobilní fáze B byla použita voda. Gradientová eluce byla naprogramována následovně: počáteční složení mobilní fáze bylo 60 % mobilní fáze A, které se během 6 minut zvýšilo na 75 % a při tomto složení bylo udržováno po dobu 2 minut, následně došlo k navýšení na 95 % během 5 minut a toto složení bylo udržováno 7 minut, poté byla koncentrace mobilní fáze A snížena

na 60 % během 1 minuty a udržována 9 minut do ustálení rovnováhy. Celková doba analýzy byla 30 minut a objem nástřiku byl 10 µl. Jako vnitřní standard byl použit 1,7-diaminoheptan. Obsah BA se lišil v závislosti na typu sýra. Histamin byl detekován v 9 vzorcích v koncentračním rozmezí od 6 do 127 mg/kg. Nejvíce histaminu (127 mg/kg) obsahoval sýr Gorgonzola, což je víc, než povoluje Nařízení Evropské komise 2073/2005¹⁴. Tyramin byl detekován v 10 vzorcích v rozmezích koncentrace od 7 do 692 mg/kg. Nejvíce tyraminu obsahoval měkký sýr s pažitkou (692 mg/kg) a sýry Raclette (631 mg/kg). Kadaverin byl detekován v rozmezích od 10 do 208 mg/kg a putrescin od 6 do 170 mg/kg.

Výše uvedené studie popisují, že pro analýzu BA v potravinách se hojně používá RP-HPLC s kolonami C18 a gradientovou elucí. Jako derivatizační činidlo se používá DnS-Cl. Při použití tohoto činidla se objevují vedlejší produkty, jako jsou například dansylamid, dansylhydrazin nebo ethylamin, což nijak zásadně neovlivňuje analýzu BA, protože tyto látky eluují před BA³⁷. K detekci slouží spektrofotometrické detektory při vlnové délce 254 nm. Ke kvantifikaci se využívá metoda vnitřního standardu, kde se používá 1,7-diaminoheptan.

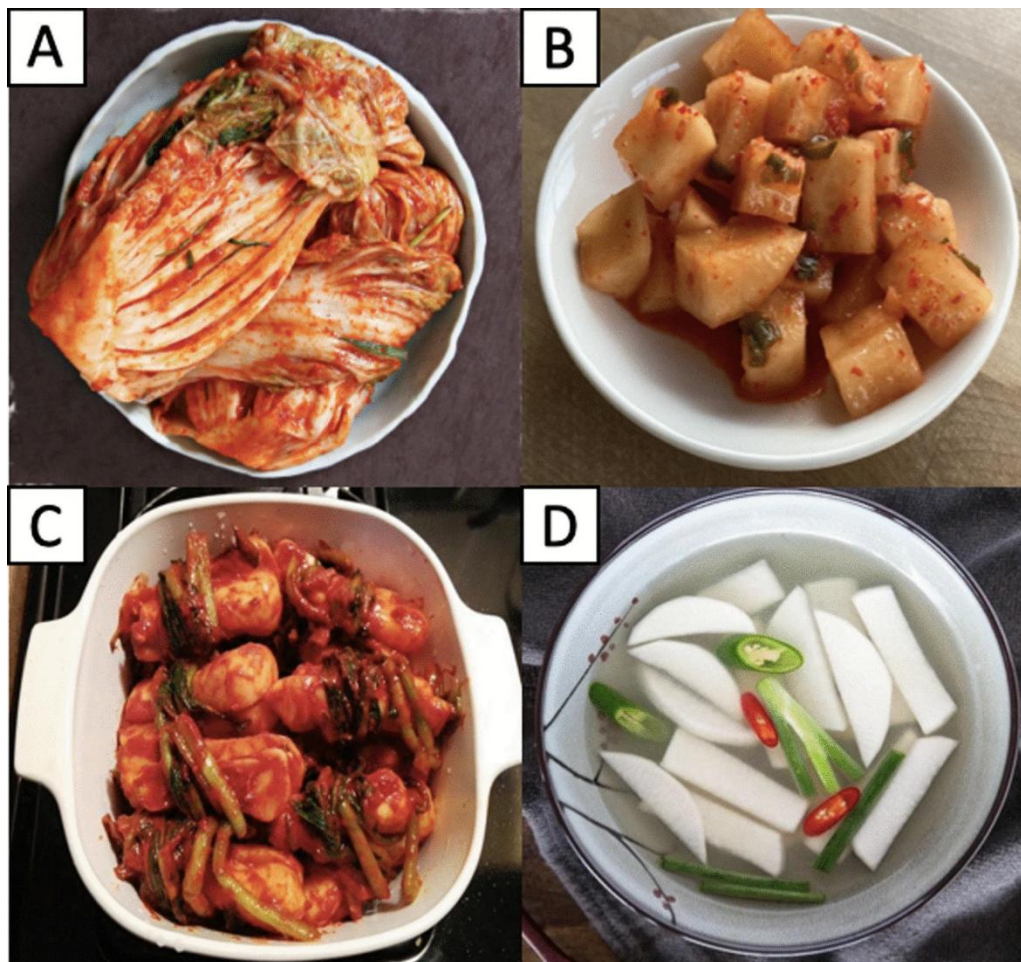
1.5 Kimchi

Kimchi je tradiční, kulturně významné a oblíbené korejské jídlo, které se vyrábí fermentací zeleniny. Kimchi je významným hráčem v korejském potravinářském průmyslu. Dnes je považováno za kulturní symbol pro Korejce. Kimjang, což je tradiční korejská komunitní činnost, kdy se vyrábí velké množství kimchi pro konzumaci během zimy, byla v roce 2013 zařazena na seznam nehmotného kulturního dědictví lidstva UNESCO. Roční spotřeba kimchi v Koreji v roce 2017 dosáhla 39,9 kg na osobu^{38,39}.

K výrobě kimchi se používají různé ingredience, přičemž hlavními složkami je zelenina a doplňují ji různé přísady a koření. Mezi hlavní ingredience patří brukvovitá zelenina, především ředkev a pekingské zelí. Jako sekundární ingredience se používají solené ryby, zázvor, česnek a červená paprika. Existuje více než 200 druhů kimchi v závislosti na použitých ingrediencích a regionálních a sezónních variacích. Typickým příkladem je *Baechu* kimchi, které se připravuje smícháním nasoleného pekingského zelí s ředkví, česnekem, zázvorem, zelenou cibulí a červenou paprikou. Často se také přidávají *Jeotgal* a *Aekjeot* (solené a fermentované rybí omáčky a mořské plody) jako koření přísady, protože obsahují aromatické sloučeniny, které významně přispívají k procesu zrání během fermentace kimchi. Zprávy o fermentovaných produktech z mořských plodů jako přísadách kimchi pocházejí

z 16. století⁴⁰. Po smíchání ingrediencí následuje fermentace, která typicky probíhá při nízkých teplotách (obvykle 2 až 10 °C) po dobu několika týdnů.

Mezi nejčastěji konzumované typy kimchi patří kimchi z pekingského zelí, kimchi z ředkve a kimchi z mladé ředkve. Populární variace kimchi v Koreji jsou na obrázku 4.



Obrázek 4: Ilustrační obrázek různých druhů kimchi³⁸

A – Baechu kimchi vyrobené ze zelí napa, B – *Kkakdugi* kimchi vyrobené z korejské ředkve, C – *Chonggak* kimchi vyrobené z ředkvičky, D – *Dongchimi* kimchi, typ vodnatého kimchi obvykle konzumovaného jako polévka v zimě

Kimchi kvůli svým vlastnostem získalo celosvětové uznání jako superpotravinu díky přítomnosti vitamínů, minerálů a antioxidantů (vitamín C, karotenoidy a fenolické látky). Kimchi prochází procesem fermentace a mezi mikroorganismy, které se v kimchi mohou vyskytovat patří především BMK. Mezi hlavní rody BMK v kimchi patří *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Weissella*. Přítomnost BMK má přínos pro lidské zdraví hned z několika důvodů. BMK v kimchi generují prospěšné látky, jako jsou organické kyseliny, oligosacharidy, kyselina γ -aminomáselná, kyselina linolová a ornitin. Studie

naznačují, že BMK izolované z kimchi mohou mít protiobeztní účinky, protože mohou ovlivňovat metabolismus tuků v těle. Studie na buněčných liniích a zvířatech ukázaly, že mohou snižovat akumulaci lipidů v adipocytech (tukových buňkách) a inhibovat genovou expresi související s adipogenezí (tvorbou tukových buněk) a lipogenezí (tvorbou tuků). Zároveň může docházet ke zvyšování exprese genů souvisejících s lipolýzou (rozkladem tuků)^{41,42}.

1.5.1 Biogenní aminy v kimchi

Biogenní aminy se do kimchi dostávají buď během fermentace nebo spolu s výchozími surovinami. Kimchi může fermentovat buď přirozeně nebo s využitím startovacích kultur, přičemž startovací kultury se používají především u komerčně vyráběného kimchi.

Během fermentačního procesu se v kimchi množí různé druhy BMK. Některé z těchto BMK jsou schopné produkovat BA. Mezi BMK, které se podílejí na produkci BA ve fermentovaných potravinách, včetně kimchi, patří například druhy *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lentilactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus casei* a *Leuconostoc mesenteroides*. Ve studii⁴³ byly nejvyšší koncentrace BA (s výjimkou tyraminu) zjištěny ve vzorcích kimchi, které fermentovalo přirozeně. Akumulace BA je tedy nevyhnutelným jevem i v přirozeně fermentovaném kimchi^{43,44}.

K výrobě kimchi se jako koření složky často používají fermentované rybí omáčky a solené fermentované mořské plody. Tyto ingredience samy o sobě mohou obsahovat značné množství BA. Pokud se tedy do kimchi přidají suroviny s vysokým obsahem BA, tyto sloučeniny se pak automaticky stanou součástí výsledného produktu. Studie ukázaly, že v některých druzích *Aekjeot* (korejská rybí omáčka) byly nalezeny BA jako například tryptamin, kadaverin, histamin a putrescin. Používání těchto surovin v kimchi tak může přispívat k celkovému obsahu BA. Kimchi vyrobené s *Aekjeot* nebo *Jeotgal* mělo vyšší obsah BA než kimchi vyrobené pouze se solí.

Množství vzniklých BA v kimchi ovlivňuje řada faktorů, včetně složení mikroflóry, dostupnosti volných aminokyselin, pH, teploty fermentace a obsah soli. V průběhu fermentace se může množství BA měnit v závislosti na aktivitě mikroorganismů, které je produkují nebo odbourávají. Například v některých přezrálých vzorcích kimchi bylo pozorováno snížení obsahu histaminu a putrescinu, což mohlo být způsobeno aktivitou mikroorganismů s antibakteriální aktivitou proti bakteriím produkujícím BA nebo s aktivitou mikroorganismů degradujících BA^{43,45}.

1.5.2 Stanovení biogenních aminů v kimchi

Ve studii³² byly stanovovány BA ve vzorcích *Kkakdugi* a *Chonggak* kimchi. Ingredience použité k výrobě těchto dvou druhů kimchi jsou v tabulce 5.

Tabulka 5: Ingredience pro výrobu *Kkakdugi* a *Chonggak* kimchi³²

Ingredience	<i>Kkakdugi</i> kimchi	<i>Chonggak</i> kimchi
solená ředkev	100 g	100 g
červená paprika (prášek)	3 g	3,5 g
česnek	3 g	3 g
zázvor	1,5 g	1,5 g
sezamová semínka	1 g	0,5 g
cukr	2 g	1,5 g
lepivá rýžová pasta	5 g	4 g
<i>myeolchiaekjeot</i> (rybí omáčka z ančoviček)	2 g	2 g
<i>saeujeotgal</i> (fermentované krevety)	2 g	2 g

Vzorky byly od 5 oblíbených výrobců kimchi v Koreji. Pro extrakci BA z 5 g vzorku bylo zvoleno 20 ml kyseliny chloristé (0,4 mol/l) a extrakce probíhala po dobu 2 hod při 4 °C. Poté byla směs odstředěna (3000 × g) při 4 °C. Supernatant (čirá kapalina nad sedimentem) byl odebrán a ke vzorku bylo přidáno dalších 20 ml kyseliny chloristé a směs byla opět odstředěna za stejných podmínek. Po odebrání druhého supernatantu byl objem extraktu upraven na 50 ml kyselinou chloristou (0,4 mol/l). Výsledný extrakt byl zfiltrován na Whatmanově papíru č. 1. Pro analýzu byla zvolena technika RP-HPLC s kolonou Nova-Pak C18 (150 mm × 4,6, 4 μm), kdy její teplota byla udržována při 40 °C. Objem nástřiku byl 10 μl. Byla použita gradientová eluce, kde mobilní fáze A byl vodný roztok octanu amonného (0,1 mol/l) a mobilní fáze B acetonitril. Program gradientové eluce začínal s 50% koncentrací mobilní fáze B a lineárně se koncentrace během 19 minut zvýšila na 90 %. K detekci byl zvolen UV-Vis detektor při vlnové délce 254 nm. Před samotnou analýzou byla provedena derivatizace následujícím způsobem. K 1 ml vzorku bylo přidáno 200 μl hydroxidu sodného (2 mol/l) a 300 μl nasyceného hydrogenuhličitanu sodného. K tomuto roztoku byly přidány 2 ml 1% roztoku dansylchloridu rozpuštěného v acetonu a derivatizační reakce probíhala po dobu 45 minut při 40 °C ve tmě. Poté byl roztok smíchán se 100 μl 25% hydroxidu amonného a po dobu 30 minut byl ponechán při pokojové teplotě. Objem roztoku vzorku byl upraven na 5 ml přidáním acetonitrilu. Roztok vzorku byl odstředěn při 3000 × g po dobu 5 minut a supernatant

byl zfiltrován pomocí filtru o velikosti pórů 0,2 μm . Průměrné koncentrace BA v *Kkakdugi* kimchi byly:

- fenylethylamin: $3,61 \pm 6,55$ mg/kg,
- putrescin: $334,64 \pm 427,97$ mg/kg,
- kadaverin: $27,28 \pm 54,44$ mg/kg,
- histamin: $55,94 \pm 44,45$ mg/kg,
- tyramin: $25,42 \pm 29,59$ mg/kg,
- spermidin: $9,40 \pm 6,68$ mg/kg,
- spermin: $1,03 \pm 1,31$ mg/kg.

Jeden vzorek obsahoval $127,78 \pm 26,78$ mg/kg histaminu, což překračuje toxickou hranici 100 mg/kg. Jiný vzorek *Kkakdugi* obsahoval velmi vysoké koncentrace putrescinu ($982,32 \pm 19,42$ mg/kg) a kadaverinu ($124,60 \pm 108,78$ mg/kg), což vedlo k překročení celkového limitu BA, který je 1000 mg/kg.

Průměrné koncentrace BA v *Chonggak* kimchi byly:

- tryptamin: $9,02 \pm 9,86$ mg/kg,
- fenylethylamin: $0,78 \pm 1,23$ mg/kg,
- putrescin: $269,07 \pm 349,93$ mg/kg,
- kadaverin: $64,08 \pm 65,51$ mg/kg,
- histamin: $58,73 \pm 46,02$ mg/kg,
- tyramin: $8,49 \pm 6,80$ mg/kg,
- spermidin: $9,06 \pm 2,99$ mg/kg,
- spermin: $6,23 \pm 8,79$ mg/kg.

Stejně jako u *Kkakdugi* kimchi, jeden vzorek *Chonggak* kimchi obsahoval vysokou hladinu histaminu ($131,20 \pm 7,90$ mg/kg), která také překračovala toxickou hranici. Tento vzorek rovněž obsahoval vysoké množství putrescinu ($853,70 \pm 36,80$ mg/kg) a kadaverinu ($112,10 \pm 3,60$ mg/kg), což vedlo k překročení limitu pro celkový obsah BA. Vyšší obsah BA může být způsoben použitím *myeolchiaekjeot* (rybí omáčka z ančoviček) a *saeujeotgal* (fermentované krevety), které, jak již bylo zmíněno v kapitole 1.5.1, mohou samy o sobě obsahovat BA.

Ve studii² byly analyzovány BA v 13 vzorcích *Pa* kimchi, kimchi z jarní cibulky, a v 13 vzorcích *Gat* kimchi, kimchi z brukve sítinovitě. Příprava vzorku, postup derivatizace a podmínky separace byly stejné jako ve studii³². Průměrné obsahy BA v *Pa* kimchi byly:

- tryptamin: $6,99 \pm 5,74$ mg/kg,
- fenylethylamin: $1,77 \pm 2,04$ mg/kg,
- putrescin: $78,79 \pm 79,00$ mg/kg,
- kadaverin: $44,07 \pm 42,85$ mg/kg,
- histamin: $155,85 \pm 139,26$ mg/kg,
- tyramin: $66,88 \pm 74,91$ mg/kg,
- spermidin: $9,91 \pm 4,89$ mg/kg,
- spermin: $21,75 \pm 8,94$ mg/kg.

Koncentrace histaminu byla u 6 vzorků 2–3× vyšší, než je limit 100 mg/kg.

Průměrné koncentrace BA v *Gat* kimchi byly:

- tryptamin: $11,22 \pm 8,23$ mg/kg,
- fenylethylamin: $3,44 \pm 4,30$ mg/kg,
- putrescin: $134,96 \pm 220,53$ mg/kg,
- kadaverin: $20,5 \pm 18,52$ mg/kg,
- histamin: $58,44 \pm 75,77$ mg/kg,
- tyramin: $76,15 \pm 65,91$ mg/kg,
- spermidin: $20,31 \pm 6,35$ mg/kg,
- spermin: $31,30 \pm 22,35$ mg/kg.

Koncentrace histaminu byla u 2 vzorků 2–3× vyšší, než je limit 100 mg/kg a jeden vzorek obsahoval velmi vysokou hladinu putrescinu, což vedlo k překročení navržené bezpečné celkové koncentrace BA 1000 mg/kg.

V případě těchto dvou studií byly překročeny bezpečné koncentrace histaminu ve vzorcích kimchi a v některých případech byla dokonce překročena navržená bezpečná celková koncentrace BA, což může vést ke zdravotním rizikům spojených s příjmem vysokých koncentrací BA.

Ve studii⁴⁶ bylo zkoumáno, jak jednotlivé ingredience přidávané do kimchi mohou ovlivňovat obsah BA. K analýze byla použita RP-HPLC s kolonou C18 a tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Elektrosprejová ionizace byla použita v režimu pozitivních iontů a teplota zdroje byla nastavena na 150 °C. Napětí na kapiláře bylo 4 kV, teplota desolvatace byla 350 °C, průtok desolvatačního plynu byl 200 l/h. Byl použit lineární gradientový eluční systém s 0,1% vodným roztokem kyseliny heptafluormásečné (mobilní fáze A) a methanolem (mobilní fáze B). Průtok mobilní fáze byl 0,12 ml/min. Kimchi, se kterým byly upravené vzorky srovnávány bylo připraveno ze soleného zelí, vody a ingrediencí, jejichž množství se v jednotlivých vzorcích lišilo, konkrétně, mletá bílá ředkev, prášek z červené papriky, mletý česnek, mletý zázvor, mletá velšská cibule, rybí omáčka a kaše z lepivé rýže. Množství jednotlivých ingrediencí bylo odstupňované na bez přídavku, nízké (poloviční množství použité v kontrolním vzorku) a vysoké (dvojnásobné množství použité v kontrolním vzorku). Při vysokém přídavku rybí omáčky se obsah histaminu a kadaverinu výrazně zvýšil, zatímco při přídavku prášku z červené papriky se obsah kadaverinu, histaminu, fenylethylaminu, tyraminu, agmatinu a tryptaminu snížil. Ve skupině, kde byl měněn obsah mleté bílé ředkve, se obsah putrescinu, sperminu, tryptaminu a histaminu snižoval se zvyšujícím se množstvím této ingredience. Stejný trend byl pozorován pro kadaverin, putrescin a tryptamin, ve skupině vzorků, kde se měnil obsah mletého zázvoru. Výsledky této studie naznačují, že počáteční obsah BA, jako jsou kadaverin, putrescin, histamin, fenylethylamin, tyramin a tryptamin, pocházel hlavně z rybí omáčky, zatímco agmatin, spermidin a spermin pocházely hlavně ze zeleniny, přičemž hlavní ingredience kimchi, solené zelí, ovlivňovalo hlavně množství spermidinu.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístroje a zařízení

2.1.1 Kapalinový chromatograf

- Kapalinový chromatograf Nexera X2 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko),
- degasér DGU-20A (Shimadzu, Kyoto, Japonsko),
- čerpadla mobilní fáze A a B Nexera X2 LC-30AD (Shimadzu, Kyoto, Japonsko),
- autosampler Nexera X2 SIL-30AC (Shimadzu, Kyoto, Japonsko),
- termostat kolony CTO-20AC (Shimadzu, Kyoto, Japonsko),
- DAD detektor Nexera X2 SPD-M30A (Shimadzu, Kyoto, Japonsko),
- LC-MS-2010EV (Shimadzu, Kyoto, Japonsko),
- software LabSolutions Version 5.71 SP2 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko),
- software LabSolutions LCMSsolution Version 3.20.216 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko).

2.1.2 Další zařízení

- Analytické váhy KERN ABT 220-4M (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo),
- automatické pipety Biohit Proline a Biohit m-Line (Biohit Oyj, Helsinky, Finsko),
- minitřepačka IKA Vortex 1 (IKA®-Werke, Staufen, Německo),
- ultrazvuková lázeň Sonorex TK 52 (Bandelin electronic, Berlín, Německo),
- nožový mlýn GRINDOMIX GM 200 (Retsch, Düsseldorf, Německo),
- domácí tyčový mixér (Moulinex, Caen, Francie),
- odstředivka Sorvall ST4 Plus-MD (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA),
- odstředivka Nüve NF 400 (Nüve, Ankara, Turecko),
- pH metr SCHOTT CG 842 (SCHOTT AG, Mainz, Německo),
- horkovzdušná sušárna Memmert UN30 (Memmert, Schwabach, Německo).

2.2 Chemikálie a standardní látky

2.2.1 Chemikálie

- Aceton, p. a. (PENTA, Praha, Česká republika),
- acetonitril pro HPLC, $\geq 99,9\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo),
- dansylchlorid (Merck, Darmstadt, Německo),
- demineralizovaná voda připravená zařízením Milli-Q® (Merck, Darmstadt, Německo),
- destilovaná voda z centrálního rozvodu (Univerzita Pardubice, Česká republika),
- hydroxid sodný, p. a. (Merck, Darmstadt, Německo),

- kyselina chloristá, > 70% (Laborchemie Apolda, Apolda, Německo),
- uhličitan sodný bezvodý, p. a. (PENTA, Praha, Česká republika).

2.2.2 Standardní látky

Byly použity standardy 1,7-diaminoheptan (98%), fenylethylamin ($\geq 99\%$), histamin ($\geq 97\%$), kadaverin (95%), L-prolin ($\geq 99\%$), isoamylamin (99%), putrescin (99%), spermidin ($\geq 99\%$), spermin ($\geq 97\%$), tryptamin (98%) a tyramin (99%). Veškeré standardní látky pocházely od firmy Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo).

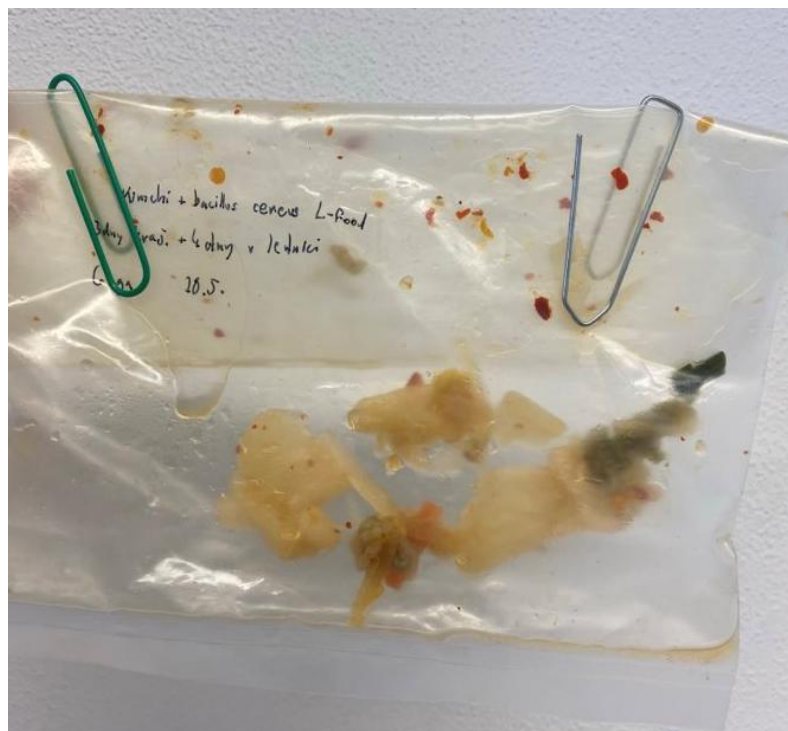
2.3 Vzorky

Jako reálné vzorky byly použity vzorky kimchi, jejichž příprava je uvedena v diplomové práci A. Gogy⁴⁷. Jednalo se o 24 následujících vzorků:

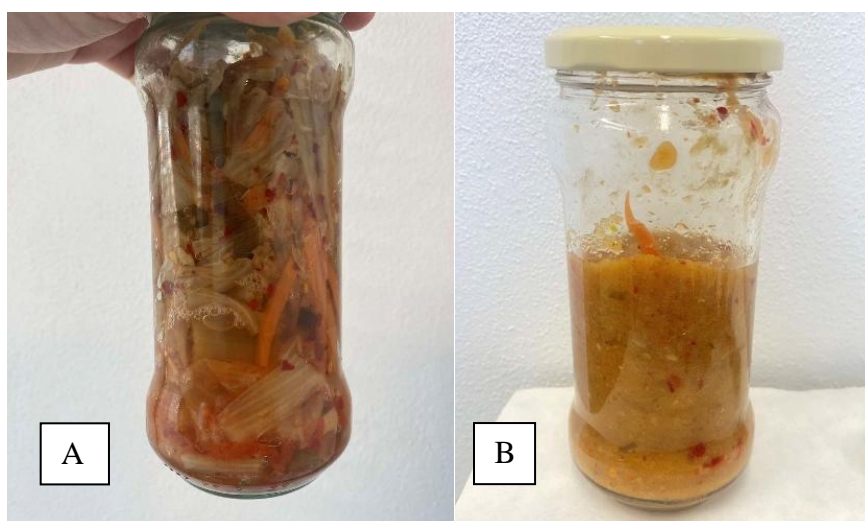
- Kimchi s kulturou *Bacillus cereus* fermentované 24 hodin,
- kimchi s kulturou *Bacillus cereus* fermentované 48 hodin,
- kimchi s kulturou *Bacillus cereus* fermentované 72 hodin,
- kimchi s kulturou *Bacillus cereus* fermentované 72 hodin a ponechané 3 dny v lednici,
- kimchi s kulturou *Bacillus cereus* fermentované 72 hodin a ponechané 4 dny v lednici,
- kimchi s kulturou *Bacillus cereus* fermentované 72 hodin a ponechané 6 dní v lednici,
- kimchi s kulturou *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* fermentované 24 hodin,
- kimchi s kulturou *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* fermentované 72 hodin,
- kimchi s kulturou *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* fermentované 72 hodin a ponechané 3 dny v lednici,
- kimchi s kulturou *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* fermentované 72 hodin a ponechané 4 dny v lednici,
- kimchi s kulturou *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* fermentované 72 hodin a ponechané 6 dní v lednici,
- kimchi s kulturou *Lactobacillus acidophilus* fermentované 24 hodin,
- kimchi s kulturou *Lactobacillus acidophilus* fermentované 48 hodin,
- kimchi s kulturou *Lactobacillus acidophilus* fermentované 72 hodin,
- kimchi s kulturou *Lactobacillus acidophilus* fermentované 72 hodin a ponechané 1 den v lednici,
- kimchi s kulturou *Lactobacillus acidophilus* fermentované 72 hodin a ponechané 4 dny v lednici,

- kimchi s kulturou *Lactobacillus acidophilus* fermentované 72 hodin a ponechané 5 dní v lednici,
- kimchi přirozeně fermentované 24 hodin,
- kimchi přirozeně fermentované 48 hodin,
- kimchi přirozeně fermentované 72 hodin,
- kimchi přirozeně fermentované 72 hodin a ponechané 2 dny v lednici,
- kimchi přirozeně fermentované 72 hodin a ponechané 4 dny v lednici,
- kimchi přirozeně fermentované 72 hodin a ponechané 5 dní v lednici,
- kimchi přirozeně fermentované 72 hodin a ponechané 6 dní v lednici.

Reálný vzorek kimchi s kulturou *Bacillus cereus* fermentovaný 72 hodin a ponechaný 4 dny v lednici je na obrázku 5. Jako vzorek pro optimalizaci podmínek hmotnostního spektrometru a k optimalizaci zpracování vzorku sloužilo kimchi po 5denní přirozené fermentaci. Tento vzorek je na obrázku 6.



Obrázek 5: Reálný vzorek kimchi s kulturou *Bacillus cereus* fermentovaný 72 hodin a ponechaný 4 dny v lednici



Obrázek 6: Vzorek kimchi k optimalizaci podmínek hmotnostního spektrometru a k optimalizaci zpracování vzorku, A – před homogenizací, B – po homogenizaci

2.4 Pracovní postupy

2.4.1 Příprava roztoku dansylchloridu

Roztok dansylchloridu o koncentraci 1 g/l byl připraven v odměrné baňce o objemu 10 ml navážením 10 mg dansylchloridu a rozpuštěním v acetonu. Baňka byla ještě umístěna na 10 min do ultrazvukové lázně, aby došlo k úplnému rozpuštění dansylchloridu. Po doplnění acetonu po rysku byl takto připravený roztok uchováván v temnu maximálně 24 hodin.

2.4.2 Příprava roztoku L-prolinu

Zásobní roztok L-prolinu o koncentraci 10 g/l byl připraven do 10ml odměrné baňky navážením 100 mg L-prolinu a rozpuštěním v destilované vodě. Po doplnění po rysku byl připraven pracovní roztok L-prolinu o koncentraci 1 g/l odměřením 1 ml zásobního roztoku do 10ml odměrné baňky a doplněním destilovanou vodou po rysku.

2.4.3 Příprava zásobních roztoků biogenních aminů a vnitřního standardu

Jednotlivé zásobní roztoky standardů biogenních aminů a vnitřního standardu 1,7-diaminoheptanu o koncentraci 5 g/l byly připraveny do odměrných baněk o objemu 10 ml navážením 50 (\pm 0,2) mg standardu a doplněním po rysku HClO₄ o koncentraci 0,4 mol/l. Pro dokonalé rozpuštění byly roztoky tyraminu a tryptaminu před doplněním po rysku umístěny na 10 min do ultrazvukové lázně. Takto připravené zásobní roztoky byly uchovávány v lednici. Pracovní roztok 1,7-diaminoheptanu o koncentraci 20 mg/l byl připraven odměřením 40 μ l zásobního roztoku do odměrné baňky o objemu 10 ml a doplněním po rysku HClO₄ o koncentraci 0,4 mol/l.

2.4.4 Příprava směsného roztoku biogenních aminů

Směsný roztok biogenních aminů o koncentraci 100 mg/l byl připraven odměřením 200 μ l každého zásobního roztoku do odměrné baňky o objemu 10 ml a doplněním HClO₄ o koncentraci 0,4 mol/l po rysku.

2.4.5 Příprava kalibračních roztoků

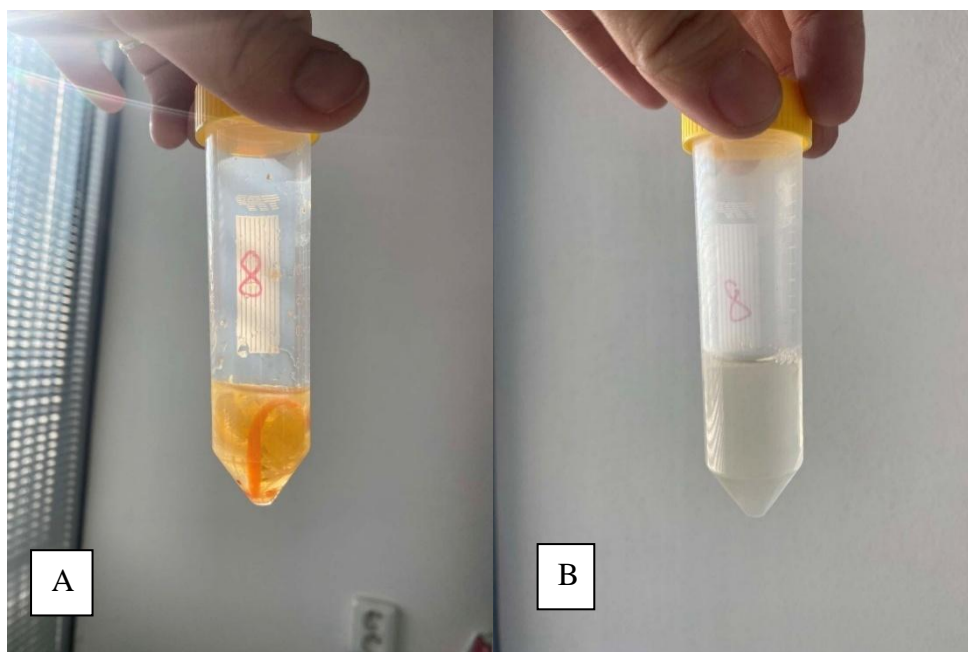
Volba koncentrací kalibračních roztoků biogenních aminů byla na základě diplomové práce E. Trankové⁴⁸. Osm kalibračních roztoků bylo připraveno ze směsného roztoku biogenních aminů o koncentraci 100 mg/l. Kalibrační roztoky byly připravovány do 10 ml odměrných baněk a doplňovány po rysku HClO₄ o koncentraci 0,4 mol/l. Tabulka 6 popisuje použité objemy směsného roztoku biogenních aminů a výsledné koncentrace kalibračních roztoků.

Tabulka 6: Kalibrační roztoky biogenních aminů

Koncentrace kalibračního roztoku (mg/l)	0,10	0,25	0,50	0,75	1,00	1,50	2,00	3,00
Objem směsného roztoku BA (μ l)	10	25	50	75	100	150	200	300

2.4.6 Extrakce biogenních aminů ze vzorku

Postup extrakce BA byl na základě článku³ a byl lehce upraven. Na analytických vahách bylo do 50ml centrifugační zkumavky naváženo 2,5 g vzorku kimchi a bylo přidáno 10 ml HClO₄ o koncentraci 0,4 mol/l. Extrakce probíhala v lednici po dobu 2 hodin. Následně byl vzorek odstředěn při 4 °C a 4700 ot/min (Sorvall ST4 Plus-MD) po dobu 10 min. Supernatant (čirá kapalina nad sedimentem) byl odebrán a ke vzorku bylo opět přidáno 10 ml HClO₄ o koncentraci 0,4 mol/l a vzorek byl znovu odstředěn za stejných podmínek. Poté byl tento supernatant přidán k dříve odebranému supernatantu a objem byl doplněn na 25 ml HClO₄ o koncentraci 0,4 mol/l. Takto připravený extrakt byl zfiltrován na skládaném filtračním papíře a uchováván v lednici. Na obrázku 7 je vzorek před 2hodinovou extrakcí a výsledný extrakt vzorku uchováván v lednici.



Obrázek 7: Vzorek před 2hodinovou extrakcí (A) a extrakt vzorku uchovávaný v lednici (B)

2.4.7 Derivatizace

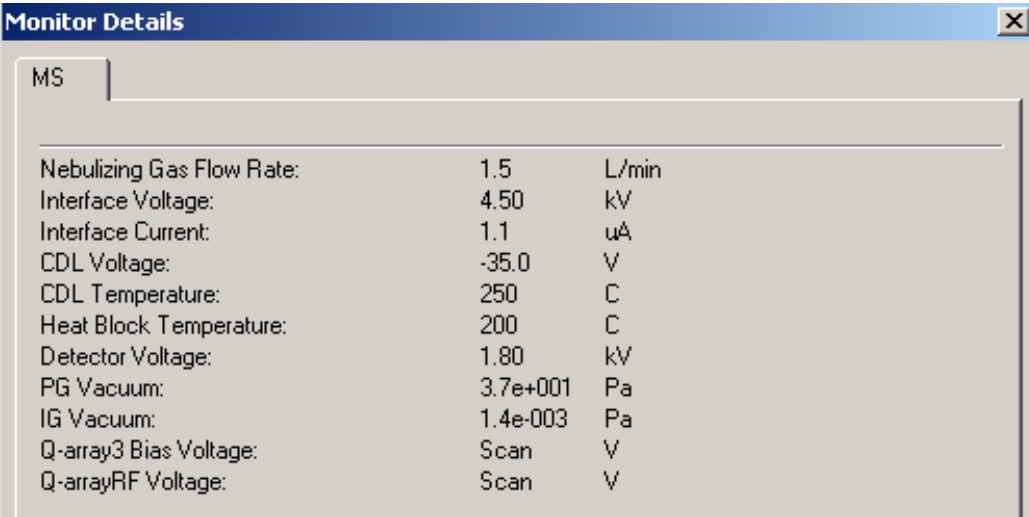
Postup derivatizace byl převzat z diplomové práce E. Trnkové⁴⁸ a její postup byl následující. Do plastové centrifugační zkumavky o objemu 15 ml byl odměřen 1 ml standardního roztoku nebo 1 ml extraktu kimchi. Poté bylo přidáno 50 μ l roztoku 1,7-diaminoheptanu o koncentraci 20 mg/l, který sloužil jako vnitřní standard (IS, Internal Standard). K této směsi bylo dále přidáno 150 μ l NaOH o koncentraci 2 mol/l a 300 μ l nasyceného roztoku Na_2CO_3 s pH 11. Směs byla intenzivně míchána 30 sekund. Následně bylo zkontrolováno pH a v případě potřeby upraveno HClO_4 (0,4 mol/l) na rozmezí pH 9–11, což je potřebná hodnota pH pro derivatizaci dansylchloridem. Do připravené směsi byl přidán 1 ml roztoku dansylchloridu v acetonu o koncentraci 1 g/l a směs byla míchána 30 sekund. Derivatizace probíhala při 55 °C po dobu 40 minut v laboratorní sušárně. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 200 μ l roztoku L-prolinu o koncentraci 1 g/l, směs byla krátce promíchána a ponechána ve tmě při laboratorní teplotě 15 minut. Na závěr byla směs odstředěna (4000 ot/min, 5 minut, Nüve NF 400), supernatant byl odebrán do 15 ml centrifugační zkumavky, promíchán a následně převeden do vzorkovací nádoby a analyzován pomocí systému HPLC-DAD/MS. Pokud zjištěné plochy u vzorků byly vyšší než u nejkonzentrovanejšího kalibračního roztoku, tak byl vzorek přiměřeně zředěn mobilní fází a znovu zanalyzován.

2.4.8 Podmínky analýzy vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

Pro analýzu dansylderivátů BA byla zvolena RP-HPLC s gradientovou elucí a s kolonou Gemini C18 110 Å, 150 × 3 mm, 3 μm (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Před separační kolonou byla umístěna předkolona Supelguard Ascentis C18 2 cm × 2,1 mm, 3 μm (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Binární směs mobilní fáze byla tvořena roztokem mravenčanu amonného (5 mmol/l) s vodou (mobilní fáze A) a acetonitrilem (mobilní fáze B). Ostatní podmínky analýzy jsou uvedeny v tabulce 7. U hmotnostního spektrometru probíhala analýza od 4–17 min a skenovány byly hmoty v rozmezí 250–1250 *m/z*. Ostatní podmínky hmotnostního spektrometru jsou na obrázku 8.

Tabulka 7: Podmínky chromatografické analýzy

Program gradientové eluce	0 min: 55 % mobilní fáze B, 5–10 min: 60 % mobilní fáze B, 12–20 min: 90 % mobilní fáze B, 20,01 min: 55 % mobilní fáze B
Teplota separační kolony	35 °C
Průtok mobilní fáze	0,6 ml/min
Dávkovaný objem	10 μl



The image shows a screenshot of a software window titled "Monitor Details" with a close button (X) in the top right corner. The window displays a list of mass spectrometer parameters and their values. The parameters are listed on the left, and their corresponding values and units are listed on the right. The parameters include: Nebulizing Gas Flow Rate (1.5 L/min), Interface Voltage (4.50 kV), Interface Current (1.1 μA), CDL Voltage (-35.0 V), CDL Temperature (250 C), Heat Block Temperature (200 C), Detector Voltage (1.80 kV), PG Vacuum (3.7e+001 Pa), IG Vacuum (1.4e-003 Pa), Q-array3 Bias Voltage (Scan V), and Q-arrayRF Voltage (Scan V).

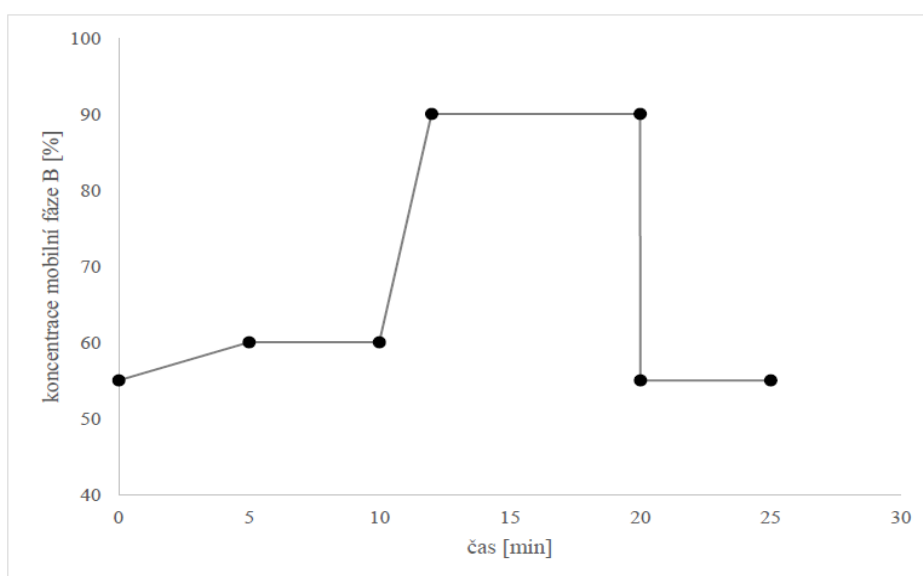
Parameter	Value	Unit
Nebulizing Gas Flow Rate:	1.5	L/min
Interface Voltage:	4.50	kV
Interface Current:	1.1	μA
CDL Voltage:	-35.0	V
CDL Temperature:	250	C
Heat Block Temperature:	200	C
Detector Voltage:	1.80	kV
PG Vacuum:	3.7e+001	Pa
IG Vacuum:	1.4e-003	Pa
Q-array3 Bias Voltage:	Scan	V
Q-arrayRF Voltage:	Scan	V

Obrázek 8: Podmínky hmotnostního spektrometru

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Volba chromatografických podmínek

Na základě diplomové práce E. Trnkové⁴⁸ a prostudovaných článků^{32,34,46} byla pro analýzu BA zvolena RP-HPLC s kolonou Gemini C18 110 Å, 150 × 3 mm, 3 μm (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Před samotnou kolonou byla umístěna předkolona Supelguard Ascentis C18 2 cm × 2,1 mm, 3 μm (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Složení mobilních fází pro detekci pomocí DAD při 254 nm bylo převzato z diplomové práce E. Trnkové⁴⁸, kde binární směsí byl acetonitril-voda. Stejně tak byly převzaty objem nástřiku 10 μl, průtok mobilní fáze 0,6 ml/min, teplota separační kolony 35 °C a samotný průběh gradientové eluce. Průběh gradientové eluce je zobrazen na obrázku 9.



Obrázek 9: Průběh gradientové eluce⁴⁸

Kvůli potřebné ionizaci elektrosprejem (ESI) při detekci pomocí MS byla mobilní fáze při tomto typu detekce převzata z diplomové práce M. Jonákové⁴⁹. Jako mobilní fáze A byl vodný roztok mravenčanu amonného (5 mmol/l) a jako mobilní fáze B byl acetonitril. Bylo prověřeno,

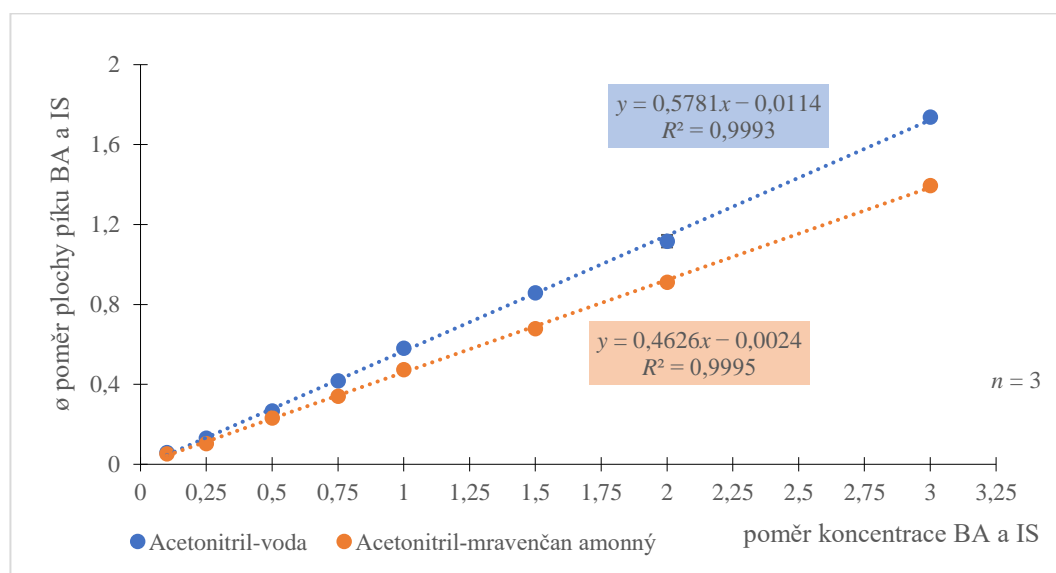
zda lze tuto binární směs použít i pro detekci pomocí DAD. Jak je prezentováno v tabulce 8, při použití této binární směsi docházelo k minimálnímu posunu retenčních časů jednotlivých BA. Jak je vidět na obrázku 10, kde jsou pro ukázkou kalibrační závislosti tryptaminu při použití těchto dvou binárních směsí, nedocházelo ani k poklesu linearit. Z tohoto důvodu byla binární směs acetonitril-mravenčan amonný zvolena i pro detekci pomocí DAD.

Kalibrační závislosti BA při použití binární směsi acetonitril-mravenčan amonný jsou více komentovány v kapitole 3.3.

Tabulka 8: Retenční časy biogenních aminů pro binární směs acetonitril-voda a acetonitril-mravenčan amonný

Biogenní amin	Retenční čas [min] pro binární směs acetonitril-voda	Retenční čas [min] pro binární směs acetonitril-mravenčan amonný
tryptamin	6,1	6,1
fenylethylamin	7,2	7,3
isoamylamin	7,7	7,7
putrescin	8,6	8,7
kadaverin	9,8	9,9
histamin	10,7	10,8
1,7-diaminoheptan (IS)	12,8	12,8
tyramin	13,6	13,7
spermidin	13,9	13,9
spermin	15,2	15,2

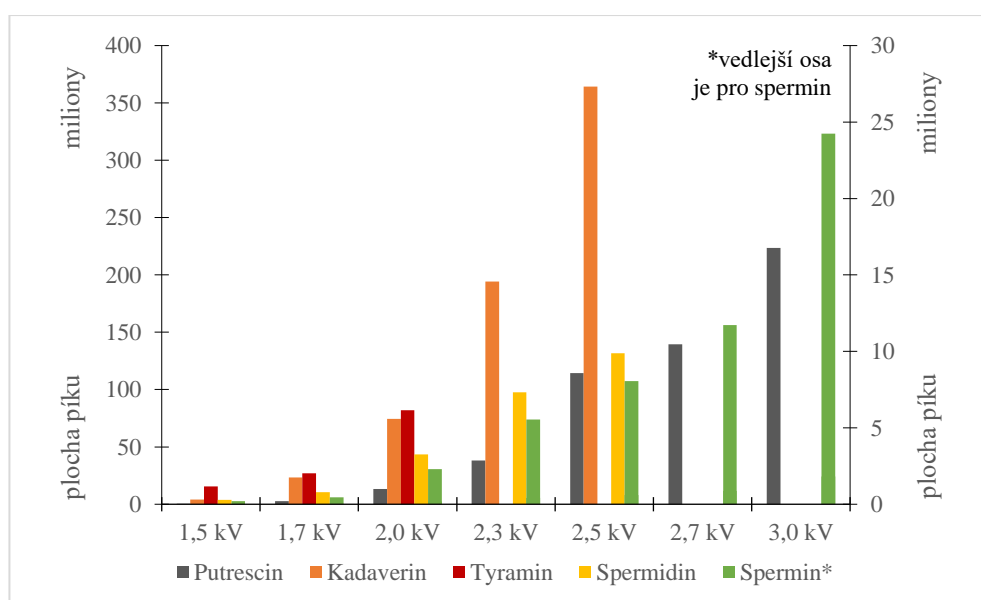
IS – vnitřní standard



Obrázek 10: Kalibrační závislosti tryptaminu při použití binární směsi acetonitril-voda a acetonitril-mravenčan amonný jako mobilní fáze

3.2 Optimalizace podmínek hmotnostního spektrometru

U hmotnostního spektrometru byla provedena optimalizace napětí na detektoru. Bylo testováno napětí 1,5; 1,7; 2,0; 2,3; 2,5; 2,7 a 3,0 kV. Optimalizace byla prováděna s kimchi po pětidenní přirozené fermentaci. Skenování iontů bylo v pozitivním módu. Mobilní fází byla binární směs acetonitril-mravenčan amonný (5 mmol/l). Hmoty molekulových iontů dansylderivátů jednotlivých BA byly převzaty z diplomové práce M. Jonákové⁴⁹ a jsou uvedeny v tabulce 9 spolu s naměřenými retenčními časy. Vyhodnocovány byly píky molekulových iontů pro dansylderiváty putrescinu, kadaverinu, tyraminu, spermidinu a sperminu, protože jiné BA se v tomto vzorku nevyskytovaly. Jak je vidět na obrázku 11, s rostoucím napětím na detektoru rostla i plocha píků příslušných molekulových iontů dansylderivátů a citlivost detektoru tak byla při vyšších napětích vyšší.



Obrázek 11: Závislosti ploch píků dansylderivátů na použitém napětí na detektoru

Na druhou stranu, při použití napětí 2,3 a 2,5 kV docházelo ke štěpení píku molekulového iontu dansylderivátu tyraminu a pík už nebylo možné vyhodnotit. Při použití napětí 2,7 a 3,0 kV docházelo ke štěpení a znemožnění vyhodnocení nejen u píku molekulového iontu dansylderivátu tyraminu, ale i u dansylderivátů kadaverinu a spermidinu. V příloze I na obrázku I - 1 jsou záznamy rozštěpených píků molekulových iontů a na obrázku I - 2 je záznam chromatogramu z hmotnostního spektrometru při napětí 2,0 kV.

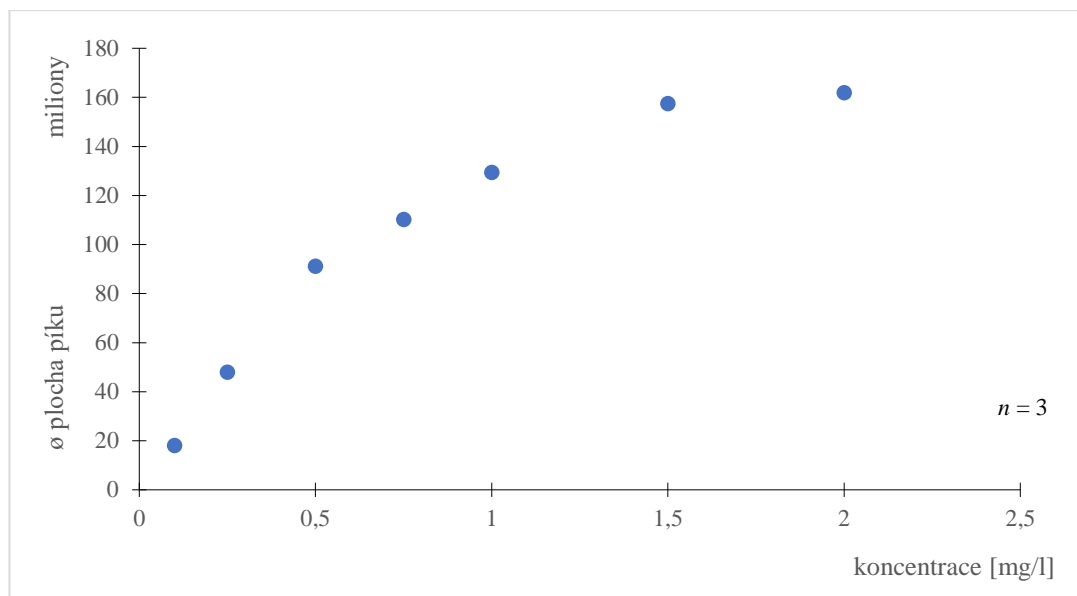
Tabulka 9: Retenční časy a hmoty molekulových iontů dansylderivátů biogenních aminů

Biogenní amin	Retenční čas [min]	Molekulový iont dansylderivátu biogenního aminu [m/z]
tryptamin	6,1	394
fenylethylamin	7,3	355
isoamylamin	7,6	321
putrescin	8,7	555
kadaverin	10,0	569
histamin	10,8	578
1,7-diaminoheptan (IS)	12,8	597
tyramin	13,7	604
spermidin	14,0	845
spermin	15,3	1135

IS – vnitřní standard

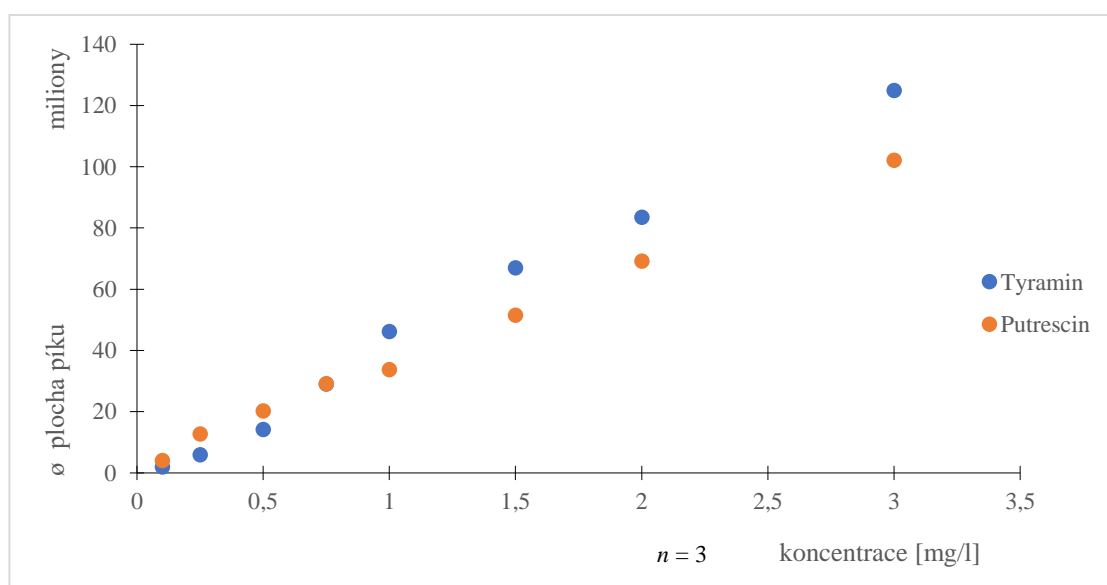
Pro zachování vysoké odezvy u píků, kde nedocházelo ke štěpení při napětí 2,5 kV a k eliminaci štěpení píku dansylderivátu tyraminu při tomto napětí, bylo nastavení podmínek následující. Skenování probíhalo v pozitivním módu. Měnilo se jen napětí na detektoru v různých časech a sledovaná hmota m/z v těchto časech. Od 4,0–12,0 minuty bylo napětí na detektoru 2,5 kV a sledované hmoty byly v rozmezí 250–700 m/z . Od 12,1–14,6 minuty bylo napětí sníženo na 2,2 kV, aby se zamezilo štěpení píku u dansylderivátu tyraminu, který eluuje v čase 13,7 min, a sledované hmoty byly 500–1000 m/z . V čase od 14,7–17,0 minuty bylo napětí opět zvýšeno na 2,5 kV a sledované hmoty byly v rozmezí 1000–1250 m/z .

Při volbě těchto podmínek sice bylo dosaženo vysoké odezvy, ale silně na úkor linearity kalibračních závislostí u putrescinu, sperminu, spermidinu a tyraminu. U tyraminu docházelo pro kalibrační roztoky o koncentraci 3,00 mg/l ke štěpení píků a nebylo je tak možné vyhodnotit. Kalibrační roztoky byly měřeny ve třech opakováních a kalibrační závislosti byly sestrojeny ze závislosti průměrné plochy molekulového iontu dansylderivátu BA na koncentraci BA. Kalibrační závislost tyraminu je na obrázku 12. Kalibrační závislosti putrescinu, sperminu a spermidinu jsou uvedeny v příloze I na obrázcích I - 3 až I - 5.



Obrázek 12: Kalibrační závislost tyraminu při testovaných podmínkách s měnícím se napětím

Z tohoto důvodu bylo napětí na detektoru sníženo na 1,8 kV na základě ladících parametrů přístroje. Skenování bylo opět v pozitivním módu v rozmezí hmot 250–1250 m/z . Při tomto napětí bylo dosaženo lepší linearit kalibračních závislostí, jak je demonstrováno na obrázku 13, kde jsou ukázkové kalibrační závislosti tyraminu a putrescinu. S použitím MS s ionizací pomocí ESI se nepodařilo zásadně zlepšit linearitu ve srovnání s výsledky získanými z DAD. Hmotnostní spektrometr byl při analýze reálných vzorků využit pouze pro kvalitativní analýzu BA před samotnou kvantifikací na DAD, a to ověřením, zda dochází k eluci píků příslušných molekulových iontů dansylderivátů.



Obrázek 13: Kalibrační závislost tyraminu a putrescinu při optimalizovaných podmínkách

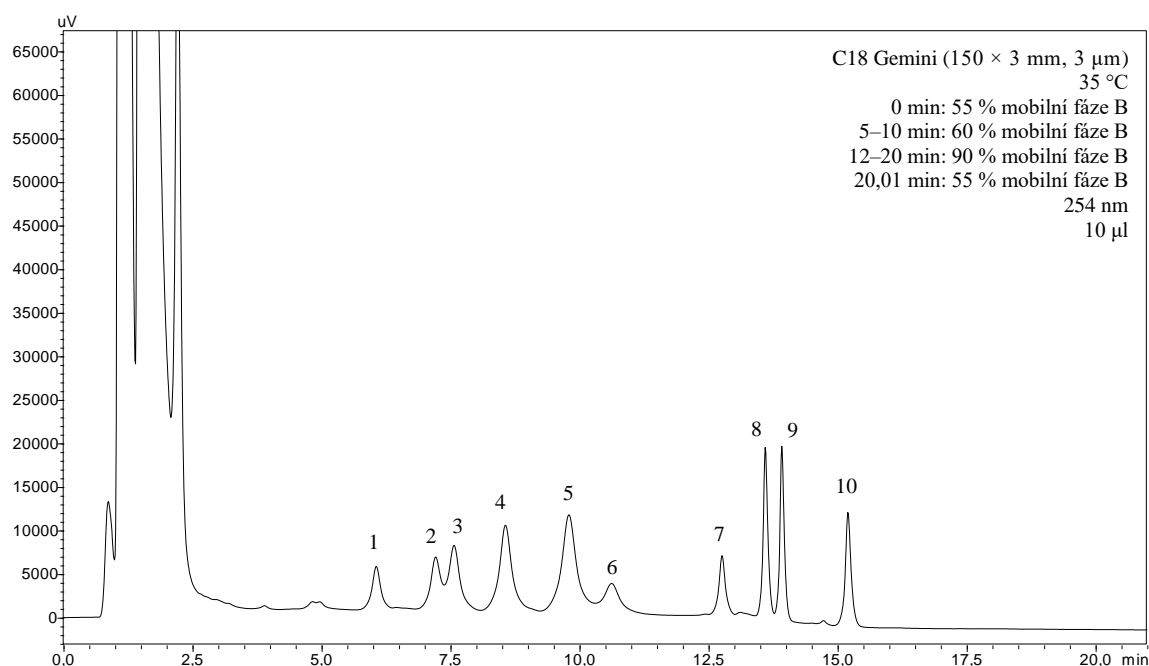
3.3 Kalibrační závislosti

Kalibrační roztoky byly připraveny ze směsného roztoku BA o koncentraci 100 mg/l, jak je popsáno v kapitole 2.4.5. Tyto vzorky byly derivatizovány podle postupu popsaného v kapitole 2.4.7, a to ve třech opakováních, které byly následně proměřeny pomocí systému HPLC-DAD/MS, kde mobilní fáze byla binární směs acetonitril-mravenčan amonný (5 mmol/l). Podmínky analýzy jsou uvedeny v kapitole 2.4.8. Pro devět sledovaných biogenních aminů, konkrétně tryptamin, fenylethylamin, isoamylamin, putrescin, kadaverin, histamin, tyramin, spermidin a spermin, byly sestrojeny kalibrační závislosti. Pro kalibrační body v rozmezí od 0,10 mg/l do 3,00 mg/l byly sestrojeny grafy závislosti průměrného poměru plochy dansylderivátu biogenního aminu a plochy vnitřního standardu na poměru koncentrace standardu biogenního aminu a vnitřního standardu. Kalibrační rovnice a koeficienty determinace pro jednotlivé BA jsou v tabulce 10. Retenční časy již byly zmíněny v kapitole 3.1 v tabulce 8.

Tabulka 10: Kalibrační rovnice a koeficienty determinace jednotlivých biogenních aminů

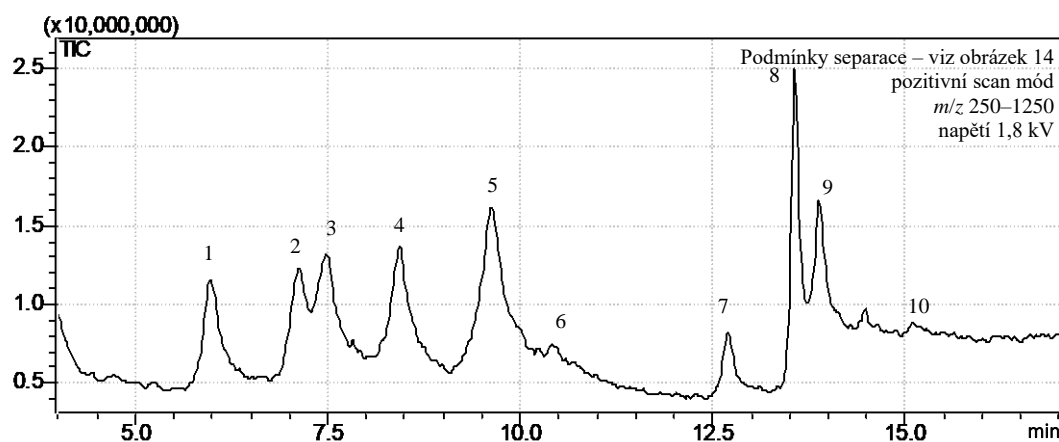
Biogenní amin	Rovnice regrese	Koeficient determinace (R^2)
tryptamin	$y = 0,4626x - 0,0024$	0,9995
fenylethylamin	$y = 0,3493x + 0,0105$	0,9995
isoamylamin	$y = 0,4589x + 0,0634$	0,9994
putrescin	$y = 1,3078x + 0,0458$	0,9993
kadaverin	$y = 1,6018x + 0,0429$	0,9996
histamin	$y = 0,3345x + 0,0201$	0,9988
tyramin	$y = 0,9624x + 0,0183$	0,9991
spermidin	$y = 0,8419x + 0,0688$	0,9982
spermin	$y = 0,6923x + 0,0853$	0,9958

Koeficienty determinace pro všechny BA měly hodnotu vyšší než 0,99, což dokazuje, že bylo dosaženo velmi dobré linearit. Ukázkový chromatogram z detektoru diodového pole je na obrázku 14. Dansylderiváty BA eluují v časech od 6,1 min do 15,2 min. Vnitřní standard (1,7-diaminoheptan) eluuje v čase 12,8 min. Vysoké píky do 2,5 min jsou vedlejší produkty derivatizační reakce. Chromatogram bodu kalibrace 2,00 mg/l z hmotnostního spektrometru je na obrázku 15. Píky molekulových iontů dansylderivátů pro tento kalibrační bod jsou v příloze I na obrázku I - 6.



Obrázek 14: Ukázkový chromatogram bodu kalibrace (2,00 mg/l) z detektoru diodového pole

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



Obrázek 15: Ukázkový chromatogram bodu kalibrace (2,00 mg/l) z hmotnostního spektrometru

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

Pro každý sledovaný BA byl stanoven limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ). Limit detekce představuje nejnížší detekovatelné množství analytu ve vzorku a často se vyhodnocuje jako trojnásobek šumu základní linie. Limit kvantifikace představuje nejnížší koncentraci analytu, při níž je přesnost měření dostatečná k tomu, aby umožnila spolehlivé kvantitativní vyhodnocení a často se vyhodnocuje jako desetinásobek šumu základní linie. V případě těchto kalibračních závislosti bylo stanovení LOD a LOQ provedeno na základě získaných statistických parametrů z kalibrační křivky, protože u DAD nebylo možné určit šum ani při velkém zvětšení

základní linie. Za hodnotu LOQ lze prohlásit takovou hodnotu, která splňuje podmínku přesnosti a správnosti. Splnění podmínky přesnosti bylo ověřeno s využitím Horwitzovy rovnice⁵⁰ a hodnoty RSD_{\max} (2) (kde c je bezrozměrnou hodnotou koncentrace, například g/g).

$$RSD_{\max} = 2^{(1-0,5 \cdot \log c)} \quad (2)$$

Pro každý bod kalibrace byla spočítána RSD_{\max} a pro každý BA byla spočítána relativní směrodatná odchylka RSD ze získaných ploch píků pro odpovídající bod kalibrace. Obě hodnoty jsou v procentech. Podmínka přesnosti je splněna tehdy, když hodnota RSD je menší než hodnota RSD_{\max} . Splnění podmínky správnosti bylo ověřeno následujícím způsobem. Do získané kalibrační rovnice byl dosazen průměrný poměr plochy píku dansylderivátu standardu BA a vnitřního standardu pro daný bod kalibrace. Podmínka správnosti je pak splněna, pokud se vypočítaná koncentrace liší od skutečné koncentrace do 20 %. Podmínka přesnosti nebyla splněna pro kalibrační bod 0,10 mg/l u histaminu a sperminu. Ostatní BA podmínku přesnosti splňovaly. Podmínka správnosti nebyla splněna pro kalibrační bod 0,10 mg/l u putrescinu, kadaverinu, histaminu, spermidinu a sperminu. U těchto BA byl kalibrační bod o koncentraci 0,10 mg/l z kalibrační závislosti vyřazen a kalibrační závislosti byly v rozmezí koncentrací 0,25–3,00 mg/l. U ostatních BA byla tato podmínka splněna. Grafy kalibračních závislostí jsou v příloze II na obrázcích II - 1 až II - 5. Hodnoty LOD byly spočítány podle rovnice (3), která je odvozená ze skutečnosti, že hodnota LOD je obvykle vyhodnocována jako 3σ a LOQ jako 10σ , kdy σ je hodnota šumu. Hodnoty LOD a LOQ pro jednotlivé BA jsou v tabulce 11.

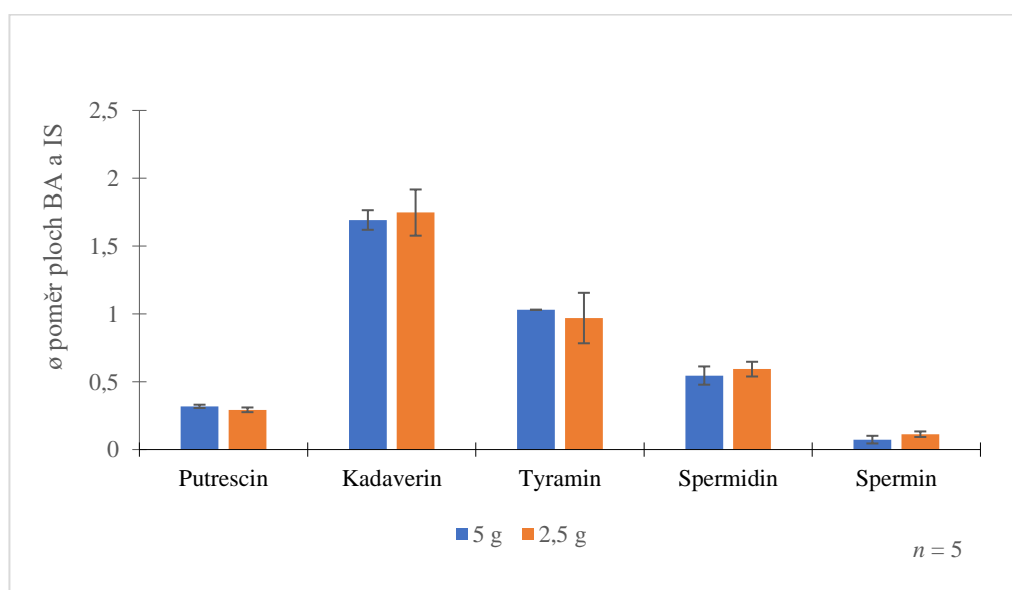
$$LOD = \frac{3}{10} \cdot LOQ \quad (3)$$

Tabulka 11: Limity detekce a limity kvantifikace jednotlivých biogenních aminů

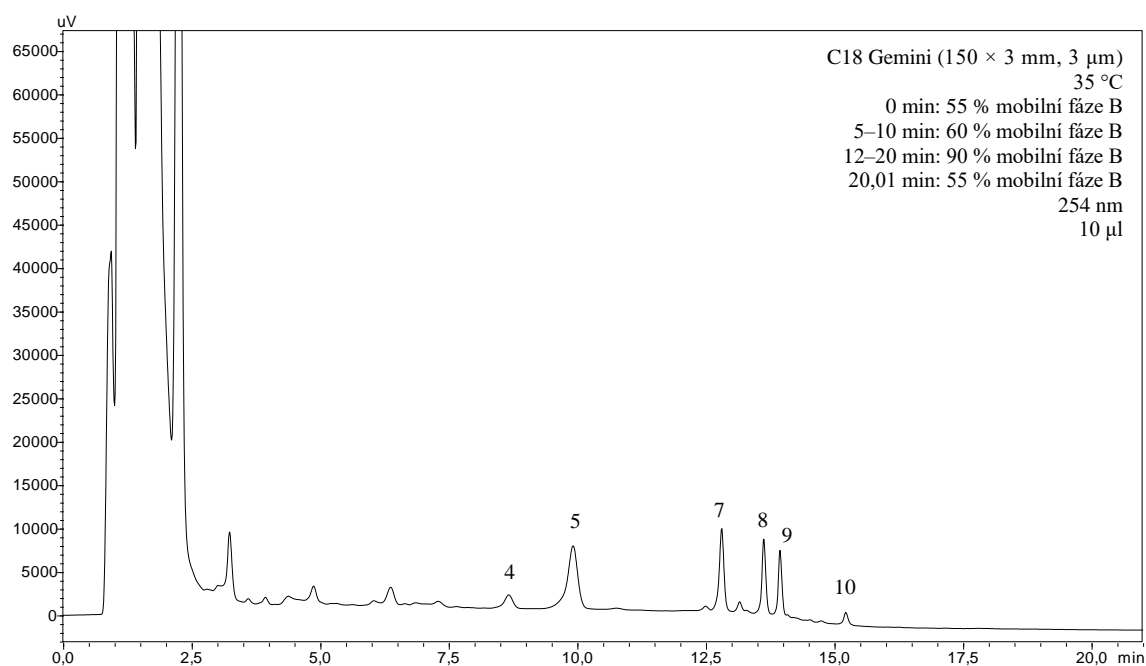
Biogenní amin	LOD [mg/l]	LOQ [mg/l]
tryptamin	0,030	0,10
fenylethylamin	0,030	0,10
isoamylamin	0,030	0,10
putrescin	0,075	0,25
kadaverin	0,075	0,25
histamin	0,075	0,25
tyramin	0,030	0,10
spermidin	0,075	0,25
spermin	0,075	0,25

3.4 Optimalizace zpracování vzorků kimchi

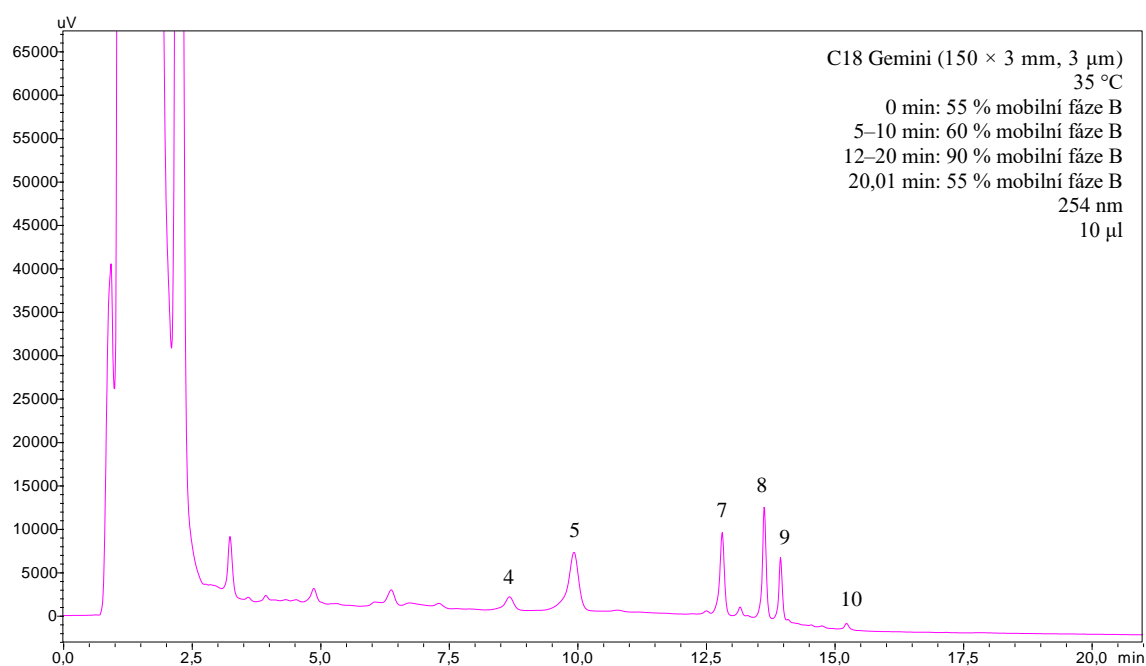
K analýze bylo předloženo malé množství všech reálných vzorků, a proto bylo vyzkoušeno, zda extrakce 10 ml HClO₄ (0,4 mol/l) z 2,5 g vzorku neovlivní výsledky analýzy oproti postupu popsanému v článku⁴⁶, kde bylo k extrakci použito 20 ml HClO₄ (0,4 mol/l) z 5 g vzorku. Jak je vidět na obrázku 16, zpracování 2,5 g vzorku poskytovalo stejně výsledky jako zpracování 5 g vzorku. Každý postup zpracování vzorku byl proveden pětkrát a po derivatizaci proměřen pomocí HPLC-DAD/MS. Ukázkové chromatogramy jsou na obrázku 17 (2,5 g vzorku) a 18 (5 g vzorku). Při analýze reálných vzorků bylo tedy přistoupeno k extrakci BA z 2,5 g vzorku.



Obrázek 16: Porovnání průměrných poměrů ploch BA a IS při extrakci z 5 g a z 2,5 g vzorku



Obrázek 17: Chromatogram dansylderivátů biogenních aminů při extrakci z 2,5 g vzorku
 4 – putrescin, 5 – kadaverin, 7 – vnitřní standard (1,7-diaminoheptan), 8 – tyramin, 9 – spermidin,
 10 – spermin



Obrázek 18: Chromatogram dansylderivátů biogenních aminů při extrakci z 5 g vzorku
 4 – putrescin, 5 – kadaverin, 7 – vnitřní standard (1,7-diaminoheptan), 8 – tyramin, 9 – spermidin,
 10 – spermin

3.5 Analýza reálných vzorků kimchi

Reálné vzorky kimchi byly zpracovány v pěti opakováních dle postupu popsaného v kapitole 2.4.6 a následně byly extrakty kimchi derivatizovány dle postupu popsaného v kapitole 2.4.7. Stanovení BA v kimchi bylo provedeno pomocí RP-HPLC-DAD při 254 nm. Před samotným vyhodnocením píků z DAD bylo na hmotnostním spektrometru ověřeno, zda dochází k eluci molekulových iontů příslušných dansylderivátů BA.

3.6 Výsledky analýzy reálných vzorků kimchi

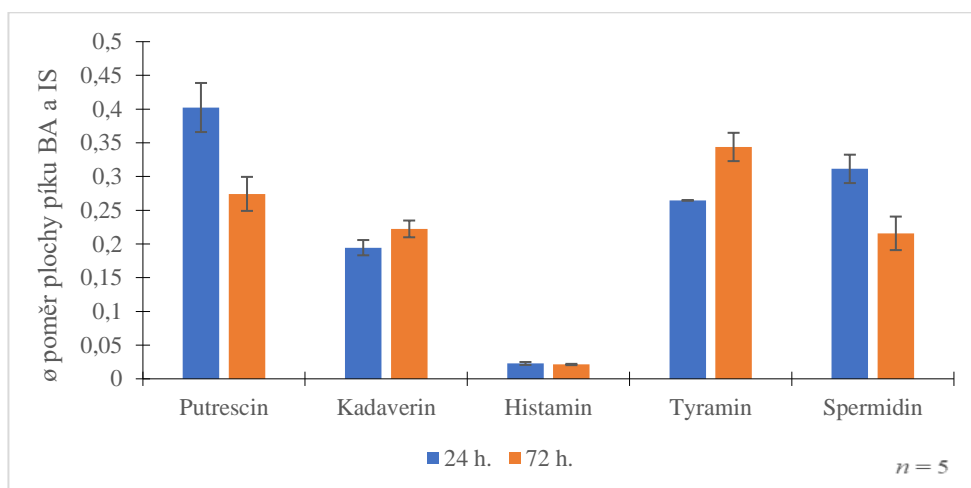
V kapitole 1.2.3 bylo popsáno, že na tvorbě BA v potravinách se mohou podílet různé kultury mikroorganismů. V této kapitole byla také zmínka o tom, že některé mikroorganismy mohou redukovat tvorbu BA. Reálné vzorky byly při vyhodnocování rozděleny do čtyř kategorií, a to přirozeně fermentované kimchi, kimchi s kulturou *Bacillus cereus*, kimchi s kulturou *Lactobacillus acidophilus* a kimchi s kulturou *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. U těchto čtyř kategorií byly sledovány trendy, jak se mění plochy píků dansylderivátů BA v závislosti na době fermentace a v závislosti na době skladování v lednici. Tyto trendy jsou popsány v kapitole 3.6.1 a 3.6.2. K vyhodnocení trendů byly použity plochy píků, protože jak je uvedeno dále v kapitole 3.6.3, některé BA byly pod limitem kvantifikace a trendy nebylo možné vyhodnotit z koncentrací.

Obsah biogenních aminů v reálných vzorcích byl vyhodnocen metodou kalibrační přímky, a to z průměrného poměru ploch píků dansylderivátů BA a ploch píků vnitřního standardu, po proměření pomocí HPLC-DAD. Ukázkové chromatogramy jednotlivých kategorií kimchi po 24hod fermentaci jsou uvedeny v příloze III na obrázcích III - 1 až III - 4. Výsledné koncentrace BA jsou uvedeny v mg/kg, protože koncentrační limity dané legislativou pro histamin jsou uváděny v mg/kg vzorku. Takto vyjádřené jsou i navržené maximální přípustné limity některých toxikologicky významných BA a také limit pro celkový obsah BA (kapitola 1.4). Proto i u reálných vzorků byla koncentrace vyjádřena v mg/kg, kvůli případnému porovnání s navrženými limity v kapitole 1.4 a limity danými legislativou. Výsledky stanovení BA v reálných vzorcích kimchi jsou uvedeny v kapitole 3.6.3.

3.6.1 Trendy biogenních aminů v závislosti na době fermentace

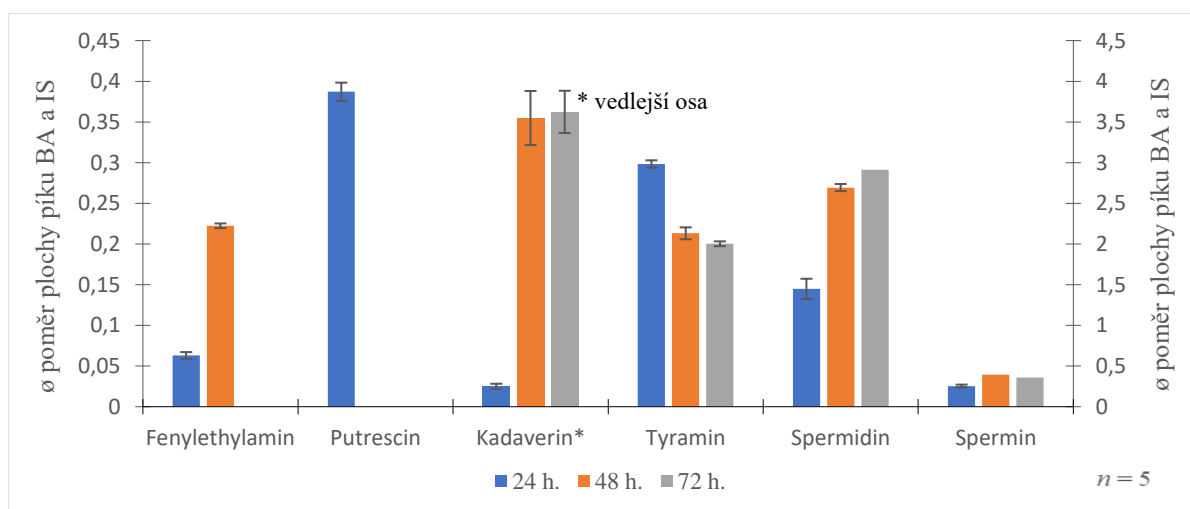
Vyhodnocení trendů BA bylo z průměrného poměru plochy píku dansylderivátu BA a IS po proměření pomocí HPLC-DAD. Jednotlivé kategorie vzorků kimchi byly předloženy po 24hod, 48hod a 72hod fermentaci. Pouze vzorky kimchi s kulturou *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* byly předloženy po 24hod a 72hod fermentaci. Na obrázku 19 je vidět, že v obou vzorcích kimchi

s kulturou *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (po 24hod a 72hod fermentaci) byly detekovány putrescin, kadaverin, histamin, tyramin a spermidin. U putrescinu a spermidinu byl pozorován pokles plochy píku po 72hod fermentaci oproti ploše po 24hod fermentaci. Naopak u kadaverinu a tyraminu je pozorován nárůst.



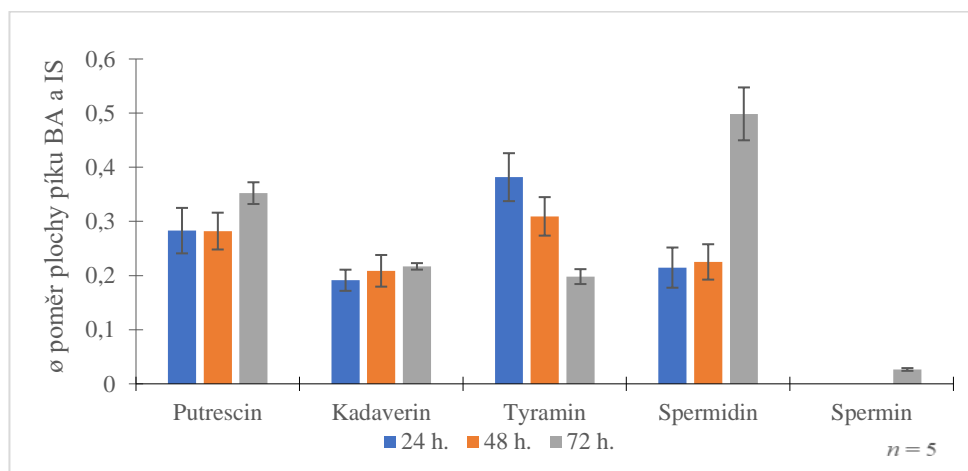
Obrázek 19: Detekované biogenní aminy v kimchi s kulturou *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*

Ve vzorcích kimchi z kategorie přirozeně fermentované byly po 24hod fermentaci detekovány fenylethylamin, putrescin, kadaverin, tyramin, spermidin a spermin. Ve vzorku po 48hod fermentaci byly detekovány fenylethylamin, kadaverin, tyramin, spermidin a spermin. Ve vzorku po 72hod fermentaci byly detekovány kadaverin, tyramin, spermidin a spermin. Jak je vidět na obrázku 20, u přirozeně fermentovaného kimchi byl s rostoucí dobou fermentace rostoucí trend u kadaverinu a spermidinu. Klesající trend byl u tyraminu.



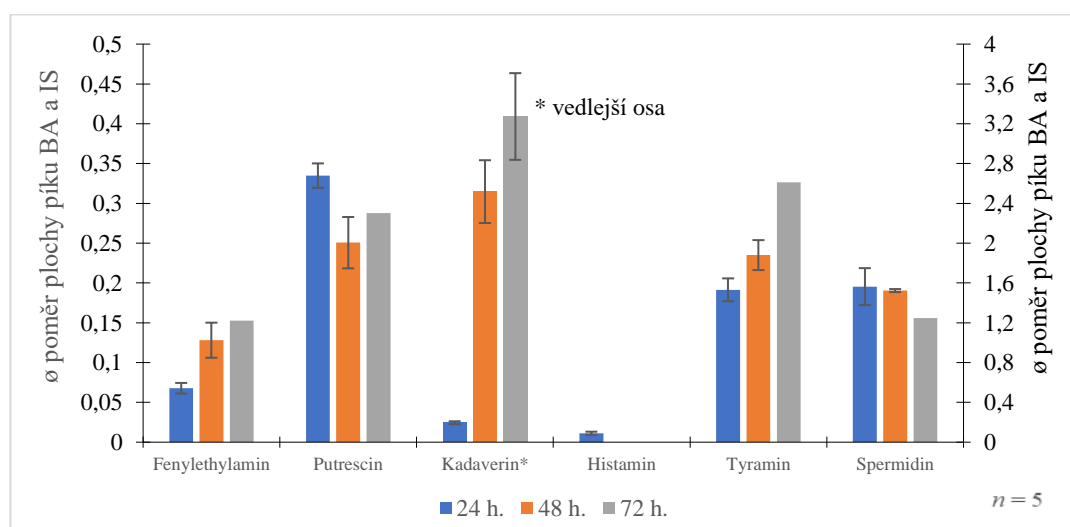
Obrázek 20: Trendy biogenních aminů v závislosti na době fermentace v přirozeně fermentovaném kimchi

U vzorků kimchi s kulturou *Bacillus cereus* byly po 24hod, 48hod a 72hod fermentaci detekovány putrescin, kadaverin, tyramin a spermidin. Spermin byl detekován až u vzorku po 72hod fermentaci. Na obrázku 21 je vidět, že u vzorků s touto kulturou byl s rostoucí dobou fermentace rostoucí trend u putrescinu, kadaverinu a spermidinu. Klesající trend s rostoucí dobou fermentace byl u tyraminu.



Obrázek 21: Trendy biogenních aminů v závislosti na době fermentace v kimchi s kulturou *Bacillus cereus*

Ve vzorcích kimchi s kulturou *Lactobacillus acidophilus* byly po 24hod, 48hod a 72hod fermentaci detekovány fenylethylamin, putrescin, kadaverin, tyramin a spermidin. U vzorku po 24hod fermentaci byl navíc detekován histamin. Na obrázku 22 je vidět, že rostoucí trend se zvyšující se dobou fermentace byl u fenylethylaminu, kadaverinu a tyraminu. Naopak klesající trend s rostoucí dobou fermentace byl u spermidinu.

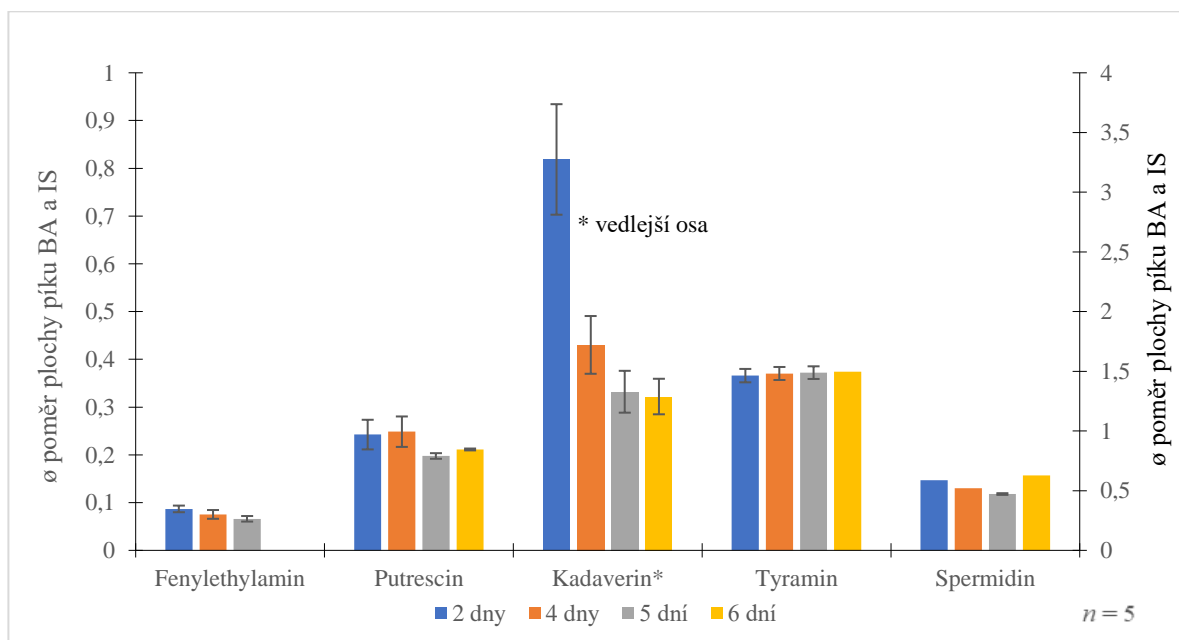


Obrázek 22: Trendy biogenních aminů v závislosti na době fermentace v kimchi s kulturou *Lactobacillus acidophilus*

3.6.2 Trendy biogenních aminů v závislosti na době skladování v lednici

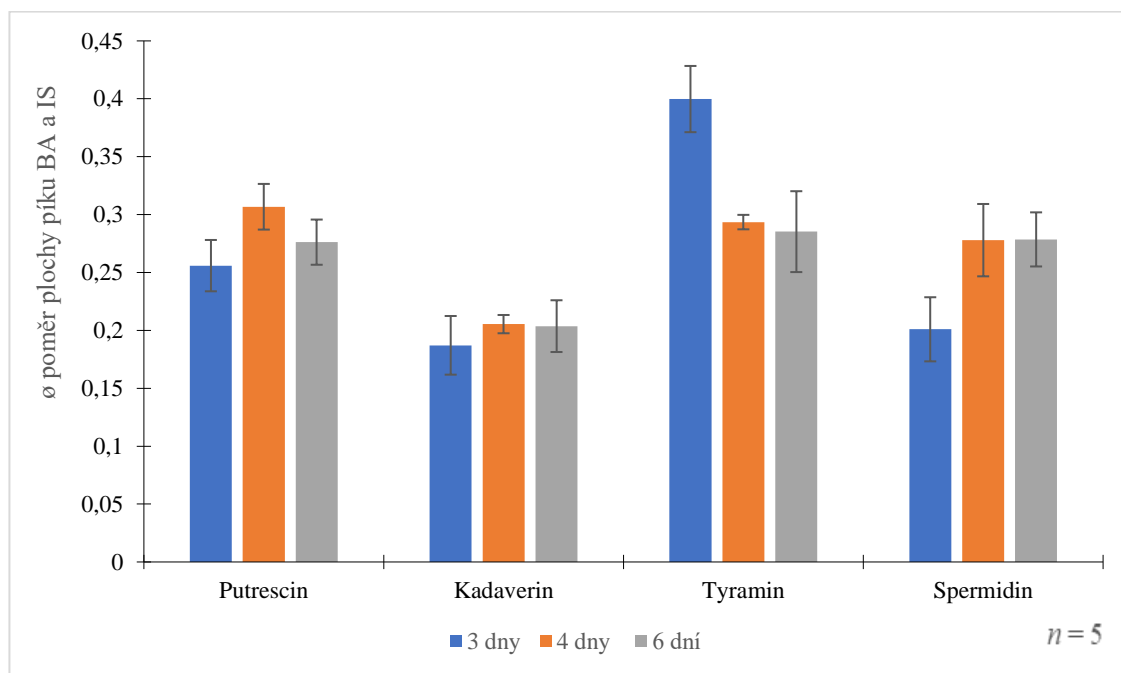
Vzorky kimchi byly 72 hod fermentovány a poté skladovány v lednici. Doby skladování v lednici se pro jednotlivé kategorie kimchi lišily. Přirozeně fermentované kimchi bylo předloženo po dvoudenním, čtyřdenním, pětidenním a šestidenním skladování v lednici. Kimchi s kulturou *Bacillus cereus* bylo předloženo po třídenním, čtyřdenním a šestidenním skladování v lednici. Kimchi s kulturou *Lactobacillus acidophilus* bylo předloženo po jednodenním, čtyřdenním a pětidenním skladování v lednici. Kimchi s kulturou *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* bylo předloženo po třídenním, čtyřdenním a šestidenním skladování v lednici. U jednotlivých kategorií kimchi byly opět sledovány trendy BA v závislosti na době skladování v lednici, jejichž vyhodnocování bylo opět z průměrného poměru plochy píku dansylderivátu BA a IS.

Ve vzorcích přirozeně fermentovaného kimchi po dvoudenním, čtyřdenním a pětidenním skladování v lednici byly detekovány fenylethylamin, putrescin, kadaverin, tyramin a spermidin. Ve vzorku po šestidenním skladování byly detekovány putrescin, kadaverin, tyramin a spermidin. Na obrázku 23 je vidět, že u fenylethylaminu a kadaverinu byl klesající trend s rostoucí dobou skladování v lednici. V závislosti na době skladování v lednici byl trend kadaverinu opačný oproti trendu tohoto BA v závislosti na době fermentace. Tyramin nevykazoval žádný trend v závislosti na době skladování, ačkoliv v závislosti na době fermentace byl trend klesající.



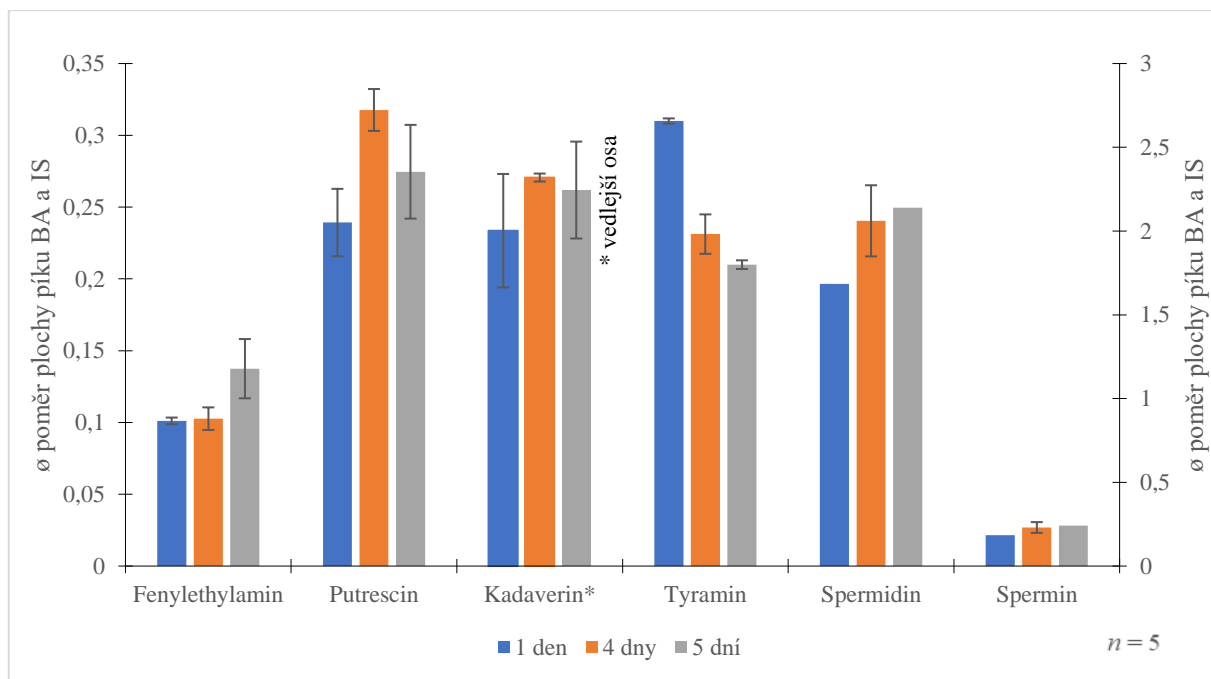
Obrázek 23: Trendy biogenních aminů v závislosti na době skladování v lednici v přirozeně fermentovaném kimchi

Ve vzorcích kimchi s kulturou *Bacillus cereus* byly po třídním, čtyřdním a šestidenním skladování detekovány putrescin, kadaverin, tyramin a spermidin. Rostoucí trend s rostoucí dobou skladování v lednici byl u kadaverinu a spermidinu. Naopak klesající trend s rostoucí dobou skladování v lednici byl u tyraminu (obrázek 24). Stejné trendy těchto BA byly pozorovány i v závislosti na době fermentace.



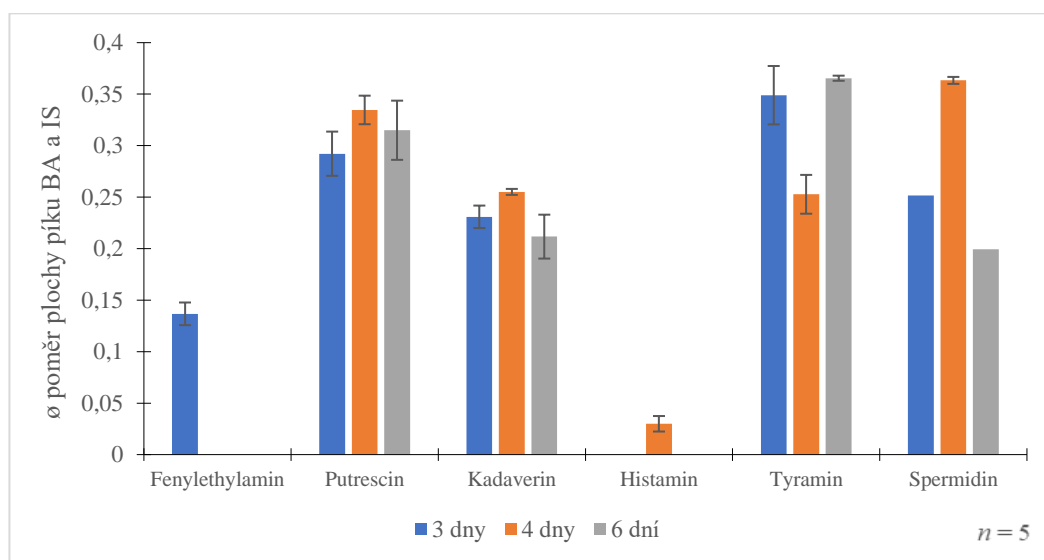
Obrázek 24: Trendy biogenních aminů v závislosti na době skladování v lednici v kimchi s kulturou *Bacillus cereus*

Ve všech vzorcích kimchi s kulturou *Lactobacillus acidophilus* (po jednodenním, čtyřdním a pětidenním skladování v lednici) byly detekovány fenylethylamin, putrescin, kadaverin, tyramin, spermidin a spermin (obrázek 25). Klesající trend s rostoucí dobou skladování v lednici byl u tyraminu, což je opačný trend než při závislosti na době fermentace. Rostoucí trend s rostoucí dobou skladování v lednici byl u fenylethylaminu, spermidinu a sperminu. Trend spermidinu je v závislosti na době fermentace opačný než trend v závislosti na době fermentace.



Obrázek 25: Trendy biogenních aminů v závislosti na době skladování v lednici v kimchi s kulturou *Lactobacillus acidophilus*

Jak je vidět na obrázku 26 vzorky kimchi s kulturou *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* nevykazovaly v závislosti na době skladování v lednici žádné trendy. Ve vzorku po třídenním skladování v lednici byly detekovány fenylethylamin, putrescin, kadaverin, tyramin a spermidin. Ve vzorku po čtyřdenním skladování v lednici byly detekovány putrescin, kadaverin, histamin, tyramin a spermidin. Ve vzorku po šestidenním skladování v lednici byly detekovány putrescin, kadaverin, tyramin a spermidin.



Obrázek 26: Trendy biogenních aminů v závislosti na době skladování v lednici v kimchi s kulturou *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*

3.6.3 Výsledky stanovení biogenních aminů v reálných vzorcích kimchi

Ve všech vzorcích přirozeně fermentovaného kimchi, kromě kimchi po 24hod fermentaci, byl stanoven kadaverin ve výrazně vyšších koncentracích, než byly koncentrace ostatních biogenních aminů. Nejvyšší koncentraci kadaverinu (22,35 mg/kg) obsahoval vzorek po 72hod fermentaci. Na základě dat, které jsou v tabulce 12, lze říct, že delší doba fermentace vedla k vyšším koncentracím kadaverinu. Naopak s delší dobou skladování v lednici se koncentrace kadaverinu snižovaly. U tyraminu se koncentrace s delší dobou fermentace snižovala, ale při skladování v lednici se koncentrace tohoto BA lehce zvyšovala. Putrescin byl stanoven pouze ve vzorcích po 24hod fermentaci a po šestidenním skladování v lednici. Nejvyšší koncentrace fenylethylaminu byla ve vzorku po 48hod fermentaci (6,06 mg/kg). Při skladování v lednici se koncentrace tohoto BA snižovala a u vzorku po šestidenním skladování v lednici byl pod limitem detekce. Spermidin byl stanoven pouze ve vzorku po 72hod fermentaci.

Tabulka 12: Biogenní aminy v přirozeně fermentovaném kimchi

Doba procesu	Obsah biogenních aminů [mg/kg]					
	Fenylethylamin	Putrescin	Kadaverin	Tyramin	Spermidin	Spermin
Fermentace						
24 hodin	1,50 (6,73 %)	2,61 (2,89 %)	<LOQ	2,91 (1,51 %)	<LOQ	<LOQ
48 hodin	6,06 (1,29 %)	<LOD	21,88 (9,36 %)	2,02 (5,53 %)	<LOQ	<LOQ
72 hodin	<LOD	<LOD	22,35 (7,16 %)	1,89 (1,19 %)	2,64 (0,48 %)	<LOQ
Skladování v lednici						
2 dny	2,18 (7,89 %)	<LOQ	20,17 (14,14 %)	3,61 (13,60 %)	<LOQ	<LOD
4 dny	1,85 (12,23 %)	<LOQ	10,47 (14,06 %)	3,66 (10,16 %)	<LOQ	<LOD
5 dní	1,59 (8,78 %)	<LOQ	8,03 (13,20 %)	3,68 (9,42 %)	<LOQ	<LOD
6 dní	<LOD	1,27 (6,88 %)	7,78 (11,55 %)	3,70 (0,52 %)	<LOQ	<LOD

hodnoty v závorce jsou hodnoty RSD (relativní směrodatná odchylka, $n = 5$)

Jak je vidět v tabulce 13, u vzorků kimchi s kulturou *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* byl ve všech vzorcích stanoven tyramin. Koncentrace tyraminu byla po 72hod fermentaci vyšší než po 24hod fermentaci. Po čtyřdenním skladování v lednici se koncentrace tohoto BA snížila oproti koncentraci po třídenním skladování v lednici a nejvyšší koncentrace tohoto BA byla u vzorku po šestidenním skladování v lednici (3,61 mg/kg). Fenylethylamin byl stanoven pouze u vzorku po třídenním skladování v lednici, u ostatních vzorku byl tento BA pod limitem detekce. Putrescin byl stanoven pouze u vzorku po 24hod fermentaci, u ostatních vzorků byl tento BA pod limitem kvantifikace. Spermidin byl stanoven pouze u vzorků po 24hod fermentaci a po čtyřdenním skladování v lednici, u ostatních vzorků byl pod limitem kvantifikace.

Tabulka 13: Biogenní aminy v kimchi s kulturou *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*

Doba procesu	Obsah biogenních aminů [mg/kg]						
	Fenylethylamin	Putrescin	Kadaverin	Histamin	Tyramin	Spermidin	Spermin
Fermentace							
24 hodin	<LOD	2,73 (9,40 %)	<LOQ	<LOQ	2,56 (0,18 %)	2,88 (6,76 %)	<LOD
72 hodin	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3,38 (6,11 %)	<LOQ	<LOD
Skladování v lednici							
3 dny	3,61 (8,04 %)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3,44 (12,40 %)	<LOQ	<LOD
4 dny	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOD	2,44 (2,98 %)	3,50 (5,18 %)	<LOD
6 dní	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOD	3,61 (5,84 %)	<LOQ	<LOD

hodnoty v závorce jsou hodnoty RSD ($n = 5$)

Ve vzorcích kimchi s kulturou *Lactobacillus acidophilus*, jak je vidět v tabulce 14, byl ve všech vzorcích stanoven fenylethylamin, jehož nejvyšší koncentrace byla ve vzorku po 72hod fermentaci. Koncentrace tohoto BA se s rostoucí dobou fermentace zvyšovala, stejně tak se zvyšovala i koncentrace tohoto BA se zvyšující se dobou skladování v lednici. Kadaverin byl ve vzorku po 24hod fermentaci pod limitem kvantifikace, ale byl stanoven ve vzorcích po 48hod a 72hod fermentaci a jeho koncentrace se s delší dobou fermentace zvyšovala. Při skladování v lednici se po čtyřdenním skladování koncentrace kadaverinu zvýšila oproti koncentraci po jednodenním skladování, ale po pětidenním skladování v lednici se koncentrace opět snížila. Nejvyšší

koncentrace kadaverinu byla stanovena ve vzorku po 72hod fermentaci (20,16 mg/kg). Tyramin byl stanoven u všech vzorků této kategorie a s rostoucí dobou fermentace se jeho koncentrace zvyšovala. Nejvyšší koncentrace tyraminu byla u vzorku po 72hod fermentaci. S rostoucí dobou skladování v lednici se koncentrace tyraminu snižovala.

Tabulka 14: Biogenní aminy v kimchi s kulturou *Lactobacillus acidophilus*

Doba procesu	Obsah biogenních aminů [mg/kg]						
	Fenylethylamin	Putrescin	Kadaverin	Histamin	Tyramin	Spermidin	Spermin
Fermentace							
24 hodin	1,64 (9,89 %)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,80 (7,51 %)	<LOQ	<LOD
48 hodin	3,37 (17,22 %)	<LOQ	15,45 (12,53 %)	<LOD	2,25 (9,13 %)	<LOQ	<LOD
72 hodin	4,06 (9,82 %)	<LOQ	20,16 (13,31 %)	<LOD	3,20 (10,27 %)	<LOQ	<LOD
Skladování v lednici							
1 den	2,59 (2,32 %)	<LOQ	12,23 (16,91 %)	<LOD	3,03 (7,57 %)	<LOQ	<LOQ
4 dny	2,64 (7,67 %)	<LOQ	14,21 (1,03 %)	<LOD	2,21 (5,94 %)	<LOQ	<LOQ
5 dní	3,63 (15,01 %)	<LOQ	13,75 (12,89 %)	<LOD	1,99 (7,23 %)	<LOQ	<LOQ

hodnoty v závorce jsou hodnoty RSD ($n = 5$)

Ve všech vzorcích z kategorie kimchi s kulturou *Bacillus cereus* (tabulka 15) byl stanoven tyramin. S rostoucí dobou fermentace se koncentrace tohoto BA snižovala. Nejvyšší koncentraci tyraminu obsahoval vzorek po třídním skladování v lednici (3,96 mg/kg). S rostoucí dobou skladování v lednici se koncentrace tyraminu snižovala. Spermidin byl stanoven až u vzorku po 72hod fermentaci. U ostatních vzorků byl pod limitem kvantifikace. Putrescin a kadaverin byly ve všech vzorcích pod limitem kvantifikace.

Tabulka 15: Biogenní aminy v kimchi s kulturou *Bacillus cereus*

Doba procesu	Obsah biogenních aminů [mg/kg]				
	Putrescin	Kadaverin	Tyramin	Spermidin	Spermin
Fermentace					
24 hodin	<LOQ	<LOQ	3,78 (11,60 %)	<LOQ	<LOD
48 hodin	<LOQ	<LOQ	3,02 (11,49 %)	<LOQ	<LOD
72 hodin	<LOQ	<LOQ	1,87 (6,94 %)	5,11 (9,56 %)	<LOQ
Skladování v lednici					
3 dny	<LOQ	<LOQ	3,96 (7,15 %)	<LOQ	<LOD
4 dny	<LOQ	<LOQ	2,86 (2,12 %)	<LOQ	<LOD
6 dní	<LOQ	<LOQ	2,72 (12,24 %)	<LOQ	<LOD

hodnoty v závorce jsou hodnoty RSD ($n = 5$)

Z výsledků je zřejmé, že druh mikrobiální kultury použité při fermentaci má dopad na typy a množství produkovaných biogenních aminů ve výsledném kimchi, což potvrzuje tvrzení v kapitole 1.2.3, kde bylo napsáno, že schopnost mikroorganismů produkovat biogenní aminy je vysoce variabilní a často je specifická pro daný kmen a často i druh. Například koncentrace tyraminu se u přirozeně fermentovaného kimchi a kimchi s kulturou *Bacillus cereus* s delší dobou fermentace snižovala, ale u kimchi s kulturami *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* a *Lactobacillus acidophilus* se koncentrace tyraminu zvyšovala. Dalším příkladem, že použité kultury ovlivňují typy BA, je to, že histamin, jehož koncentrace nebylo možné stanovit, protože byly pod limitem kvantifikace, byl detekován pouze u kimchi s kulturou *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* a u kimchi s kulturou *Lactobacillus acidophilus*. U všech ostatních vzorků byl histamin pod limitem detekce. U žádného ze vzorků nebyl překročen limit daný legislativou pro obsah histaminu. Fenylethylamin byl významněji přítomen v přirozeně fermentovaném kimchi a v kimchi s kulturou *Lactobacillus acidophilus*, ale většinou pod limitem detekce v kimchi s kulturou *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. V kimchi s kulturou *Bacillus cereus* nebyl fenylethylamin vůbec detekován. Ve srovnání s analýzami kimchi, které jsou popsány v kapitole 1.5.2, byl celkově obsah kvantifikovaných BA ve všech vzorcích výrazně nižší a u žádného vzorku nebyl detekován tryptamin. V kimchi s kulturou

Saccharomyces cerevisiae var. *boulardii* nebyl spermin detekován v žádném ze vzorků. V kimchi s kulturou *Bacillus cereus* byl spermin detekován pouze ve vzorku po 72hod fermentaci. Spermidin a kadaverin byly detekovány ve všech vzorcích kimchi. Putrescin byl také detekován ve všech vzorcích kimchi kromě vzorků přirozeně fermentovaného kimchi po 48hod a 72hod fermentaci.

S rostoucí dobou fermentace docházelo u většiny BA u všech kategorií kimchi k nárůstu, jak je prezentováno v kapitole 3.6.1. S rostoucí dobou skladování v lednici docházelo ke snižování koncentrace tyraminu u kimchi s kulturami *Lactobacillus acidophilus* a *Bacillus cereus*, ale u přirozeně fermentovaného kimchi docházelo u tyraminu ke zvyšování koncentrace. U všech vzorků kimchi s kulturou *Bacillus cereus* a u vzorků přirozeně fermentovaného kimchi, které byly skladovány v lednici, byl spermin pod limitem detekce, ačkoliv byl detekován ve vzorcích po 24hod, 48hod a 72hod fermentaci. Naopak v kimchi s kulturou *Lactobacillus acidophilus* byl spermin detekován až u vzorků, které byly skladovány v lednici. Z čehož lze vyvodit, že vhodná doba fermentace a vhodná doba skladování v lednici může napomoci k regulaci tvorby a obsahu BA v kimchi.

4 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se věnuje analýze biogenních aminů, které představují potenciální zdravotní riziko při zvýšené konzumaci, zejména ve fermentovaných potravinách, jako je například kimchi. Cílem této diplomové práce bylo izolovat vybrané biogenní aminy ze vzorků kimchi a poté tyto látky derivatizovat, separovat a analyzovat pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

V teoretické části práce jsou popsány biogenní aminy, včetně jejich rozdělení, vzniku a vlivu na lidské zdraví při nadměrném příjmu z potravy. Dále je tato část věnována výskytu biogenních aminů v různých typech potravin, včetně fermentovaných potravin a kimchi, faktorům ovlivňujících jejich tvorbu a možnostem jejich stanovení.

V experimentální části byla provedena optimalizace zpracování vzorku. Biogenní aminy ze vzorků kimchi byly extrahovány pomocí kyseliny chloristé o koncentraci 0,4 mol/l. Bylo zjištěno, že extrakce z 2,5 g vzorku vedla ke stejným výsledkům jako extrakce z 5 g vzorku. Pro detekci biogenních aminů pomocí systému HPLC-DAD byla nutná derivatizace dansylchloridem, protože samotné biogenní aminy neobsahují chromofory absorbující UV záření. Dále byly optimalizovány podmínky hmotnostního spektrometru, kde byl testován vliv napětí na detektoru na jeho citlivost. Pro testované napětí bylo dosaženo vysokých odezev dansylderivátů, ale silně na úkor linearity a také docházelo ke štěpení píků u některých dansylderivátů. Pro detekci biogenních aminů bylo nakonec zvoleno napětí na detektoru 1,8 kV na základě ladících parametrů přístroje. Vyhodnocení kalibračních roztoků biogenních aminů pomocí MS neposkytovalo tak lineární závislosti jako pomocí DAD, a proto MS sloužil pouze pro kvalitativní analýzu eluujících molekulových iontů dansylderivátů, zatímco stanovení bylo provedeno na základě kalibračních závislostí vyhodnocením píků dansylderivátů z detektoru diodového pole při vlnové délce 254 nm.

U 24 vzorků kimchi, jejichž typ fermentace byl různý (přirozená, s kulturami *Bacillus cereus*, *Lactobacillus* a *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*) byl sledován obsah tryptaminu, fenylethylaminu, isoamylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu. Dále bylo u jednotlivých kategorií kimchi sledováno, jak se měnil obsah biogenních aminů v závislosti na době fermentace a na době skladování v lednici. Výsledky analýzy ukázaly, že v žádném z předložených vzorků nebyl detekován tryptamin a isoamylamin, ale naopak ve všech vzorcích byl detekován spermidin a kadaverin. Dále bylo zjištěno, že druh mikrobiální kultury použité při fermentaci ovlivňuje typy a množství produkovaných

biogenních aminů ve výsledném produktu. Například koncentrace tyraminu se s delší dobou fermentace snižovala u přirozeně fermentovaného kimchi a kimchi s kulturou *Bacillus cereus*, zatímco u kimchi s kulturami *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* a *Lactobacillus acidophilus* se zvyšovala. Bylo také pozorováno, že histamin se vyskytoval pouze u kimchi s kulturami *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* a *Lactobacillus acidophilus*. V neposlední řadě bylo zjištěno, že doba fermentace a doba skladování v lednici mohou ovlivnit koncentrace a typy jednotlivých biogenních aminů, přičemž trendy se lišily v závislosti na typu biogenního aminu a použité mikrobiální kultuře. Například s delší dobou fermentace docházelo u většiny biogenních aminů k rostoucímu trendu, zatímco s delší dobou skladování v lednici byly pozorovány klesající trendy u některých biogenních aminů (tyramin u kimchi s kulturami *Lactobacillus acidophilus* a *Bacillus cereus* a kadaverin u přirozeně fermentovaného kimchi). Tato zjištění naznačují, že vhodnou volbou mikrobiální kultury a optimalizací procesních parametrů (doba fermentace a doba skladování v lednici) lze regulovat tvorbu a obsah biogenních aminů v kimchi. Získané výsledky potvrzují teoretické poznatky, že typ mikrobiální kultury hraje roli v bezpečnosti a kvalitě fermentovaných potravin z hlediska obsahu biogenních aminů.

POUŽITÁ LITERATURA

1. Wójcik, W., Łukasiewicz, M. & Puppel, K. Biogenic amines: formation, action and toxicity – a review. *J Sci Food Agric* 101, 2634–2640 (2021).
2. Lee, J.-H., Jin, Y. H., Park, Y. K. & Yun Se Jin and Mah, J.-H. Formation of Biogenic Amines in Pa (Green Onion) Kimchi and Gat (Mustard Leaf) Kimchi. *Foods* 8, 109 (2019).
3. Lee, J. H., Jin, Y. H., Lee, J.-H., Park, Y. K. & Mah, J.-H. Determination of biogenic amine-producing lactic acid bacteria in kimchi varieties through in vitro analysis and low temperature fermentation. *Food Sci Biotechnol* 33, 2301–2312 (2024).
4. Ekici Kamil & Omer Abdullah Khalid. Biogenic amines formation and their importance in fermented foods. *BIO Web Conf* 17, 232 (2020).
5. Vinci, G. & Maddaloni, L. Biogenic Amines in Alcohol-Free Beverages. *Beverages* 6, 17 (2020).
6. del Rio, B., Fernandez, M., Redruello, B., Ladero, V. & Alvarez, M. A. New insights into the toxicological effects of dietary biogenic amines. *Food Chem* 435, 137558 (2024).
7. Patel, A., Thompson, A., Abdelmalek, L., Adams-Huet, B. & Jialal, I. The relationship between tyramine levels and inflammation in metabolic syndrome. *Horm Mol Biol Clin Investig* 40, 1 (2019).
8. Ruiz-Capillas, C. & Herrero, A. Impact of Biogenic Amines on Food Quality and Safety. *Foods* 8, 62 (2019).
9. Fatih, O., Muhammed, C. T., İlbey, K. O. & Ebru, K. The Role of Biogenic Amines in Nutrition Toxicology: Review. *Int J Nutr* 5, 21–29 (2020).
10. Dala-Paula, B. M., Custódio, F. B. & Gloria, M. B. A. Health concerns associated with biogenic amines in food and interaction with amine oxidase drugs. *Curr Opin Food Sci* 54, 101090 (2023).
11. Wöhrle, S., Hemmer, W., Focke-Tejkl, M., Rappersberger, K. & Jarisch, R. Histamine intolerance-like symptoms in healthy volunteers after oral provocation with liquid histamine. *Allergy Asthma Proc* 25, 305–311 (2003).

12. del Rio, B., Redruello, B., Linares, D. M., Ladero, V., Ruas-Madiedo, P., Fernandez, M., Martin, M. C. & Alvarez, M. A. The biogenic amines putrescine and cadaverine show in vitro cytotoxicity at concentrations that can be found in foods. *Sci Rep* 9, 120 (2019).
13. Hakl, R. & Litzman, J. Histamine intolerance. *Vnitr Lek* 69, 37–40 (2023).
14. EVROPSKÁ KOMISE. Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. In: Úřední věstník EU, L 338, 22.12.2005, s. 1–26 [cit. 27. 4. 2025]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=celex:32005R2073>
15. Moniente, M., Botello-Morte, L., García-Gonzalo, D., Pagán, R. & Ontañón, I. Analytical strategies for the determination of biogenic amines in dairy products. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 21, 3612–3646 (2022).
16. Bogdanović, T., Petricevic, S., Brkljaca, M., Listeš, I. & Pleadin, J. Biogenic amines in selected foods of animal origin obtained from the Croatian retail market. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 37, 1–16 (2020).
17. Ruiz-Capillas, C. & Jiménez-Colmenero, F. Biogenic Amines in Meat and Meat Products. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44, 489–499 (2004).
18. Sánchez-Pérez S, Comas-Basté O, Rabell-González J, Veciana-Nogués M.T., Latorre-Moratalla M.L. & Vidal-Carou M.C. Biogenic Amines in Plant-Origin Foods: Are they Frequently Underestimated in Low-Histamine Diets? *Foods* 7, 205 (2018).
19. Świder, O., Roszko, M. & Wójcicki, M. The inhibitory effects of plant additives on biogenic amine formation in fermented foods – a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 64, 1–26 (2023).
20. Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA). QPS: Qualified Presumption of Safety. In: EFSA [bez data], [cit. 27. 4. 2025]. Dostupné z: <https://www.efsa.europa.eu/cs/glossary/qps>
21. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific Opinion on Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal* 9, 2393 (2011).

22. Spano, G., Russo, P., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Alexandre, H., Grandvalet, C., Coton, E., Coton, M., Barnavon, L., Bach, B., Rattray, F., Bunte, A., Magni, C., Ladero, V., Alvarez, M., Fernández, M., Lopez, P., de Palencia, P. F., Corbi, A., Trip, H. & Lolkema, J. S. Biogenic amines in fermented foods. *Eur J Clin Nutr* 64, S95–S100 (2010).
23. Saha Turna, N., Chung, R. & McIntyre, L. A review of biogenic amines in fermented foods: Occurrence and health effects. *Heliyon* 10, e24501 (2024).
24. Gao, X., Li, C., He, R., Zhang, Y., Wang, B., Zhang, Z. H. & Ho, C. T. Research advances on biogenic amines in traditional fermented foods: Emphasis on formation mechanism, detection and control methods. *Food Chem* 405, 134911 (2023).
25. Medhe, S. Mass Spectrometry: Detectors Review. *Annu Rev Chem Biomol Eng* 3, 51–58 (2018).
26. Snyder, L. R., Kirkland, J. J. & Dolan, J. W. *Introduction to modern liquid chromatography*. 3rd ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2011. ISBN 978-0-470-16754-0.
27. Awad, H., Mona M., K. & El-Aneed, A. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization. *Appl Spectrosc Rev* 50, 158–175 (2015).
28. Mohammed, G. I., Bashammakh, A. S., Alsibaai, A. A., Alwael, H. & El-Shahawi, M. S. A critical overview on the chemistry, clean-up and recent advances in analysis of biogenic amines in foodstuffs. *TrAC* 78, 84–94 (2016).
29. David, V., Moldoveanu, S. C. & Galaon, T. Derivatization procedures and their analytical performances for HPLC determination in bioanalysis. *BMC* 35, e5008 (2021).
30. Chhanikar, P., Gupta, K. & Umekar, M. Derivatizing Reagents for Detection of Organic Compounds By HPLC. *Asian J Appl Chem Res* 9, 1–13 (2021)
31. Hansen, F. A. & Pedersen-Bjergaard, S. Emerging Extraction Strategies in Analytical Chemistry. *Anal Chem* 92, 2–15 (2020).
32. Jin, Y. H., Lee, J. H., Park, Y. K., Lee, J.-H. & Mah, J.-H. The Occurrence of Biogenic Amines and Determination of Biogenic Amine-Producing Lactic Acid Bacteria in Kkakdugi and Chonggak Kimchi. *Foods* 8, 73 (2019).

33. Santos, M. H. S. Biogenic amines: their importance in foods. *Int J Food Microbiol* 29, 213–231 (1996).
34. Soufleros, E. H., Bouloumpasi, E., Zotou, A. & Loukou, Z. Determination of biogenic amines in Greek wines by HPLC and ultraviolet detection after dansylation and examination of factors affecting their presence and concentration. *Food Chem* 101, 704–716 (2007).
35. Genççelep, H., Kaban, G., Aksu, M. İ., Öz, F. & Kaya, M. Determination of biogenic amines in sucuk. *Food Control* 19, 868–872 (2008).
36. Pawul-Gruba, M., Kiljanek, T., Madejska, A. & Osek, J. Development of a High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector (HPLC-DAD) Method for Determination of Biogenic Amines in Ripened Cheeses. *Molecules* 27, 8194 (2022).
37. Czajkowska-Mysłek, A. & Leszczyńska, J. Liquid Chromatography–Single-Quadrupole Mass Spectrometry as a Responsive Tool for Determination of Biogenic Amines in Ready-to-Eat Baby Foods. *Chromatographia* 81, 901–910 (2018).
38. Surya, R. & Nugroho, D. Kimchi throughout millennia: a narrative review on the early and modern history of kimchi. *J Ethn Food* 10, 5 (2023).
39. Oktay, S. & Ekinçi, E. K. Medicinal food understanding in Korean gastronomic culture. *J Ethn Food* 6, 4 (2019).
40. Önal, A., Tekkeli, S. E. K. & Önal, C. A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chem* 138, 509–515 (2013).
41. Kim, M.-S., Yang, H. J., Kim, S.-H., Lee, H. & Lee, M. S. Effects of Kimchi on human health: A protocol of systematic review of controlled clinical trials. *Medicine* 97, e0163 (2018).
42. Sharma, A. & Lee, H.-J. Revisiting the potential anti-obesity effects of kimchi and lactic acid bacteria isolated from kimchi: a lustrum of evidence. *J Ethn Food* 11, 36 (2024).

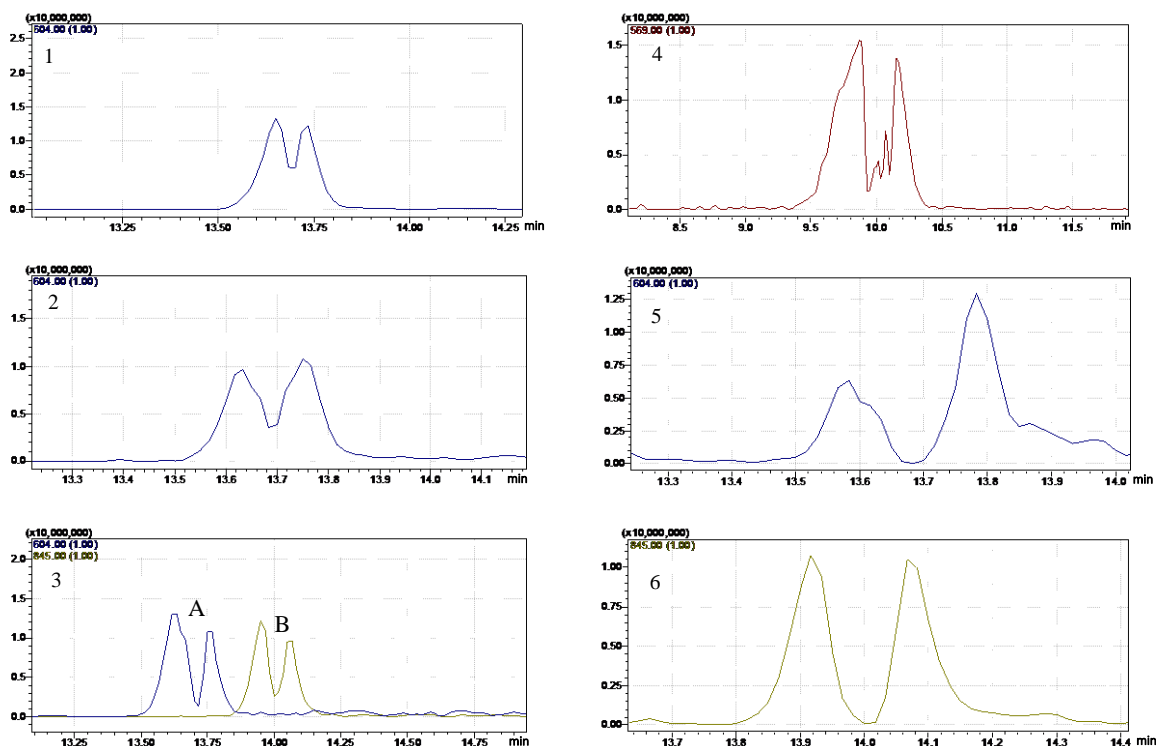
43. Lee, J., Young Hoon, J., Pawluk, A. & Mah, J.-H. Reduction in Biogenic Amine Content in Baechu (Napa Cabbage) Kimchi by Biogenic Amine-Degrading Lactic Acid Bacteria. *Microorganisms* 9, 2570 (2021).
44. Patra, J. K., Das, G., Paramithiotis, S. & Shin, H.-S. Kimchi and Other Widely Consumed Traditional Fermented Foods of Korea: A Review. *Front Microbiol* 7, 1493 (2016).
45. Jin, Y. H., Lee, J., Pawluk, A. M. & Mah, J.-H. Inhibitory effects of nicotinic acid, glycine, and other food additives on biogenic amine formation in Baechu kimchi fermentation. *LWT* 155, 112921 (2022).
46. Kim, S.-Y., Dang, Y.-M. & Ha, J.-H. Effect of various seasoning ingredients on the accumulation of biogenic amines in kimchi during fermentation. *Food Chem* 380, 132214 (2022).
47. Goga, A. Mikrobiologické faktory ovlivňující chuť a složení kimchi. Pardubice, 2025. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická.
48. Trnková, E. Analýza vybraných biogenních aminů ve vzorcích piva. Pardubice, 2024. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická.
49. Jonáková, M. Vývoj metody pro stanovení biogenních aminů v potravinách. Pardubice, 2019. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická.
50. Gustavo González, A. & Ángeles Herrador, M. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC* 26, 227–238 (2007).

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I: Výsledky LC-MS analýz biogenních aminů.....	79
Příloha II: Grafy kalibračních závislostí HPLC-DAD.....	82
Příloha III: Ukázkové chromatogramy jednotlivých kategorií kimchi po 24hod fermentaci...85	

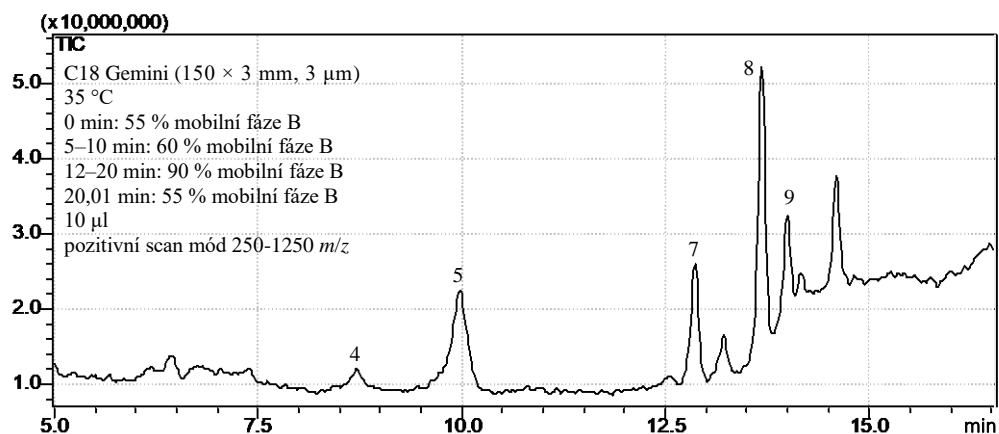
PŘÍLOHY

Příloha I: Výsledky LC-MS analýz biogenních aminů



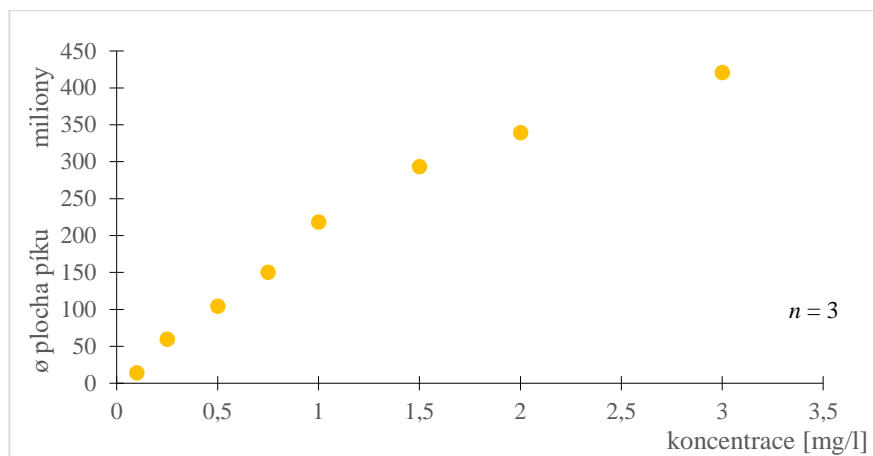
Obrázek I - 1: Rozštěpené píky molekulových iontů dansylderivátů biogenních aminů při testovaném napětí

1 – dansylderivát tyraminu při napětí 2,3 kV, 2 – dansylderivát tyraminu při napětí 2,5 kV,
3 – dansylderivát tyraminu (A) a spermidinu (B) při napětí 2,7 kV, 4 – dansylderivát kadaverinu při napětí 3,0 kV, 5 – dansylderivát tyraminu při napětí 3 kV, 6 – dansylderivát spermidinu při napětí 3,0 kV, podmínky separace viz obrázek I - 2

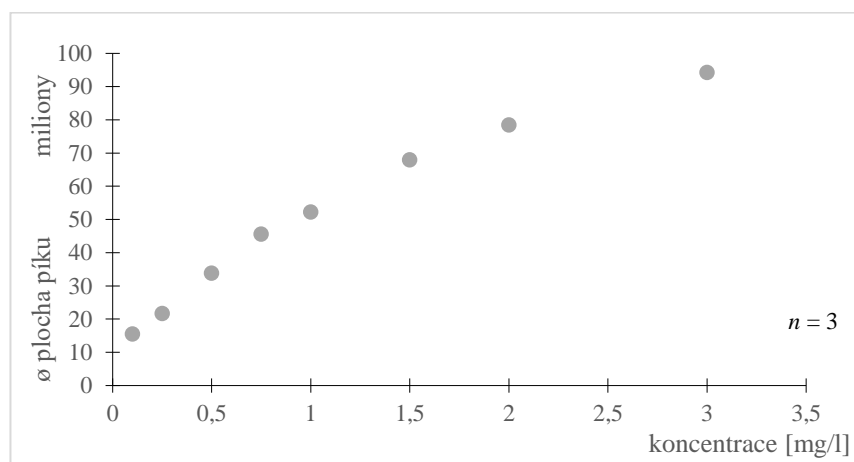


Obrázek I - 2: Chromatogram z hmotnostního spektrometru při napětí na detektoru 2,0 kV

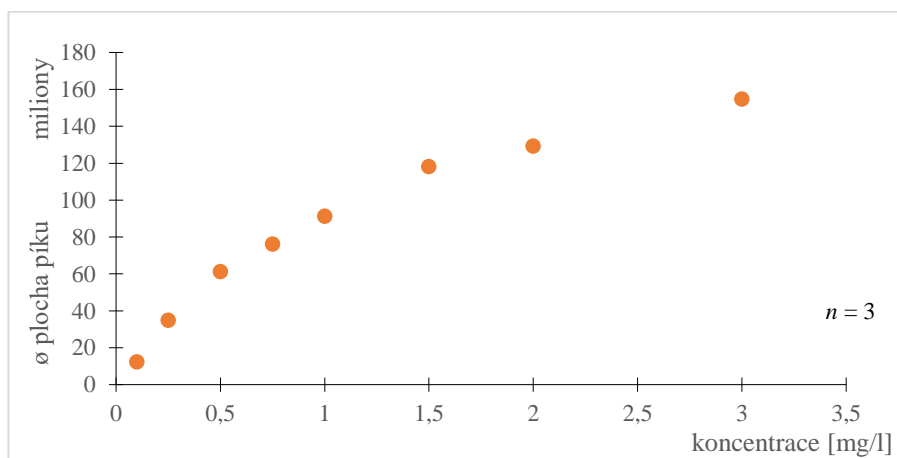
4 – putrescin, 5 – kadaverin, 7 – vnitřní standard, 8 – tyramin, 9 – spermidin



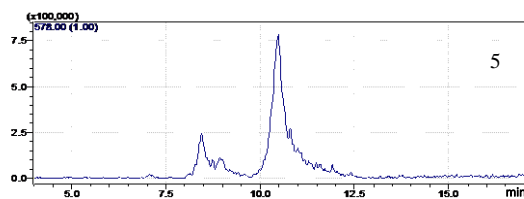
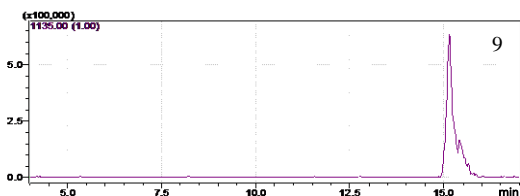
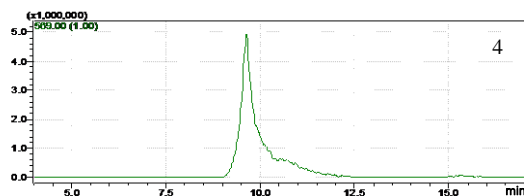
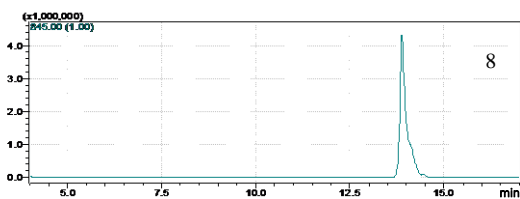
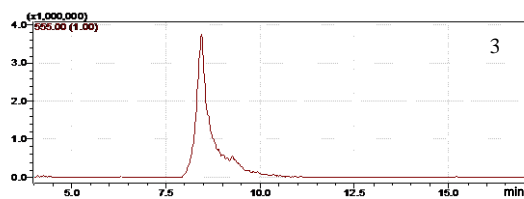
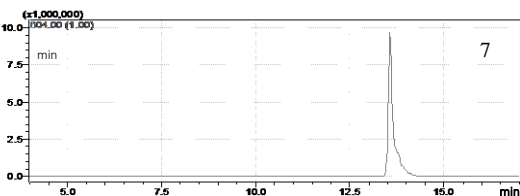
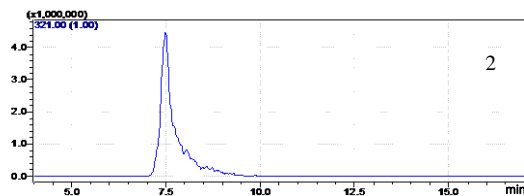
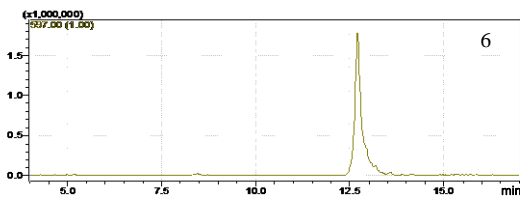
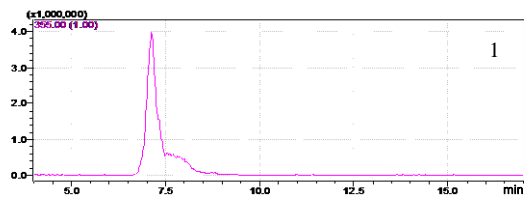
Obrázek I - 3: Kalibrační závislost putrescinu při testovaných podmínkách s měnícím se napětím



Obrázek I - 4: Kalibrační závislost sperminu při testovaných podmínkách s měnícím se napětím



Obrázek I - 5: Kalibrační závislost spermidinu při testovaných podmínkách s měnícím se napětím

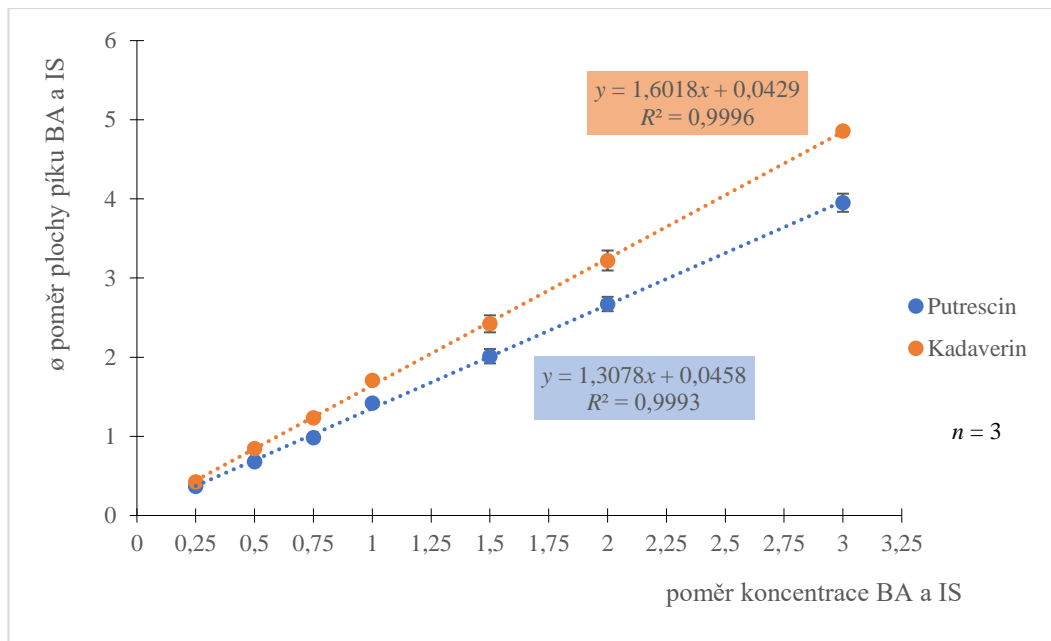


C18 Gemini (150 × 3 mm, 3 μm)
 35 °C
 0 min: 55 % mobilní fáze B
 5–10 min: 60 % mobilní fáze B
 12–20 min: 90 % mobilní fáze B
 20,01 min: 55 % mobilní fáze B
 10 μl
 pozitivní scan mód
 napětí na detektoru 1,8 kV

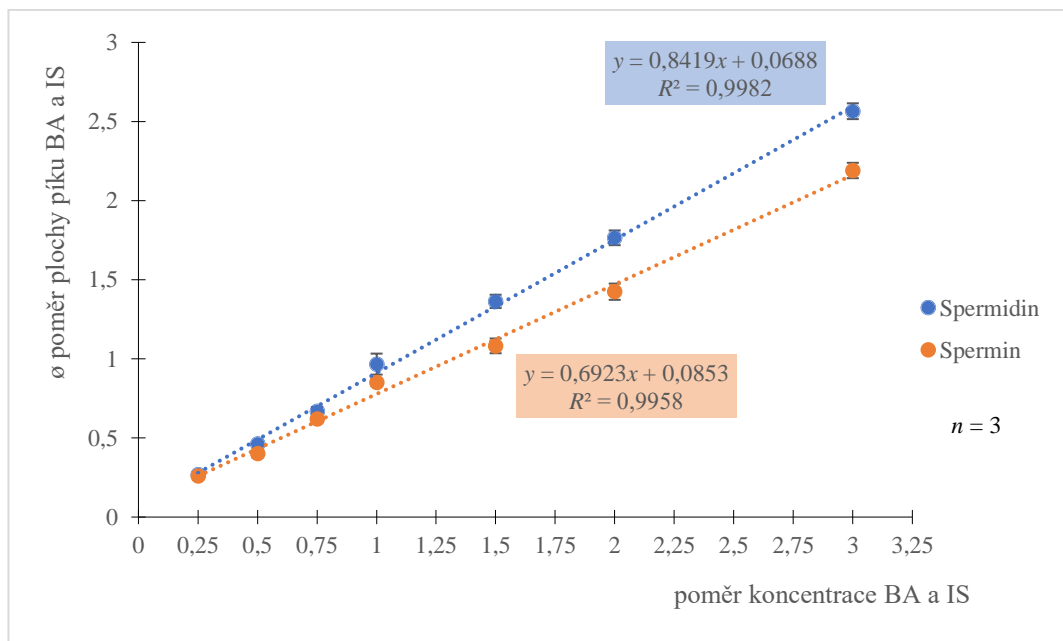
Obrázek I - 6: Píky molekulových iontů dansylderivátů biogenních aminů (kalibrační bod 2,00 mg/l)

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

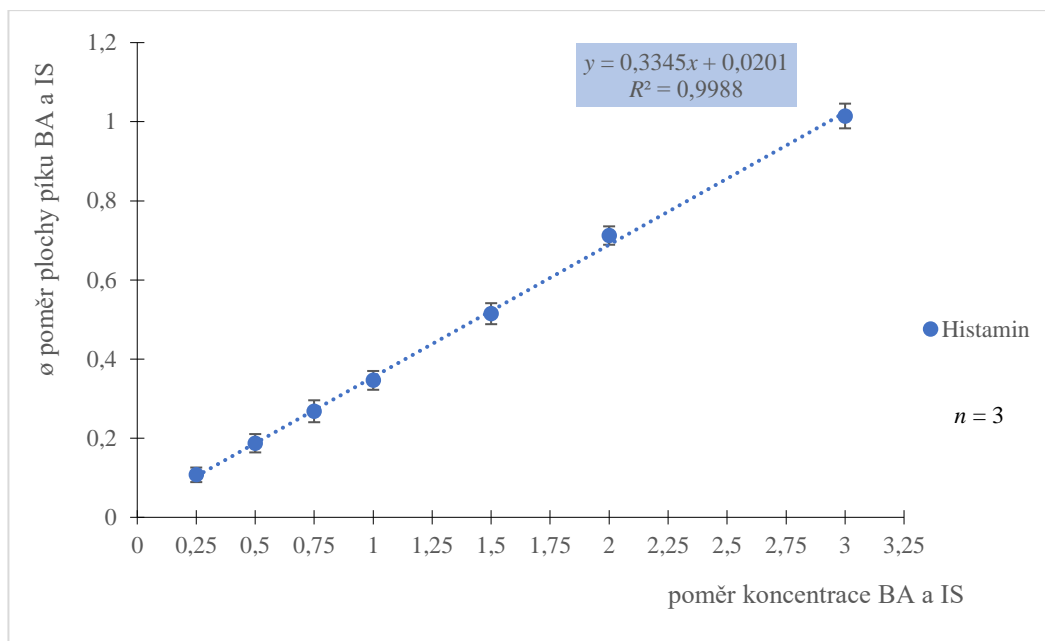
Příloha II: Grafy kalibračních závislostí HPLC-DAD



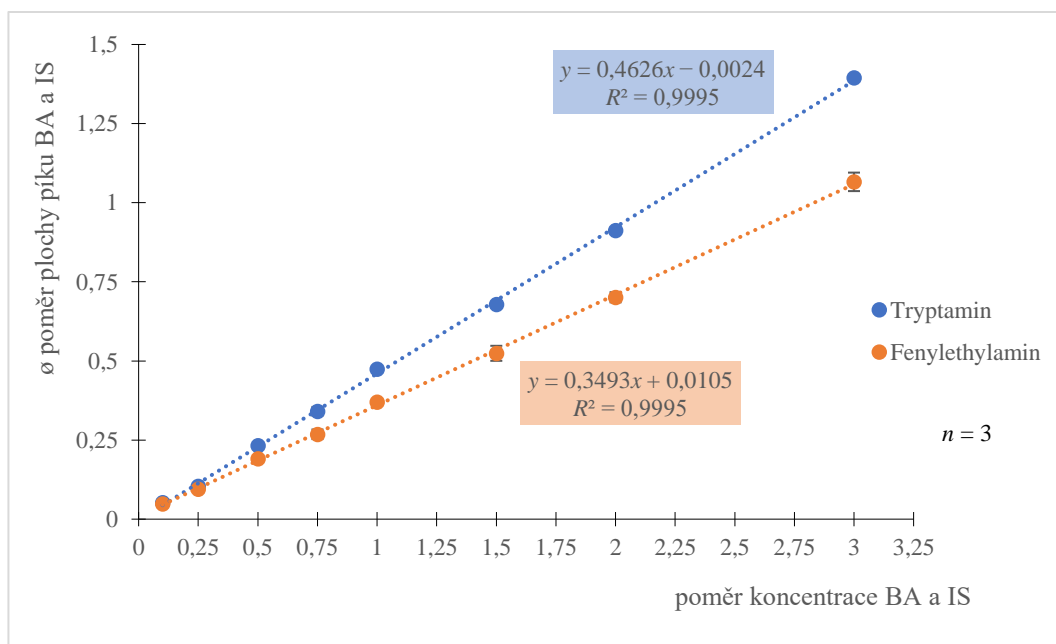
Obrázek II - 1: Kalibrační závislost putrescinu a kadaverinu



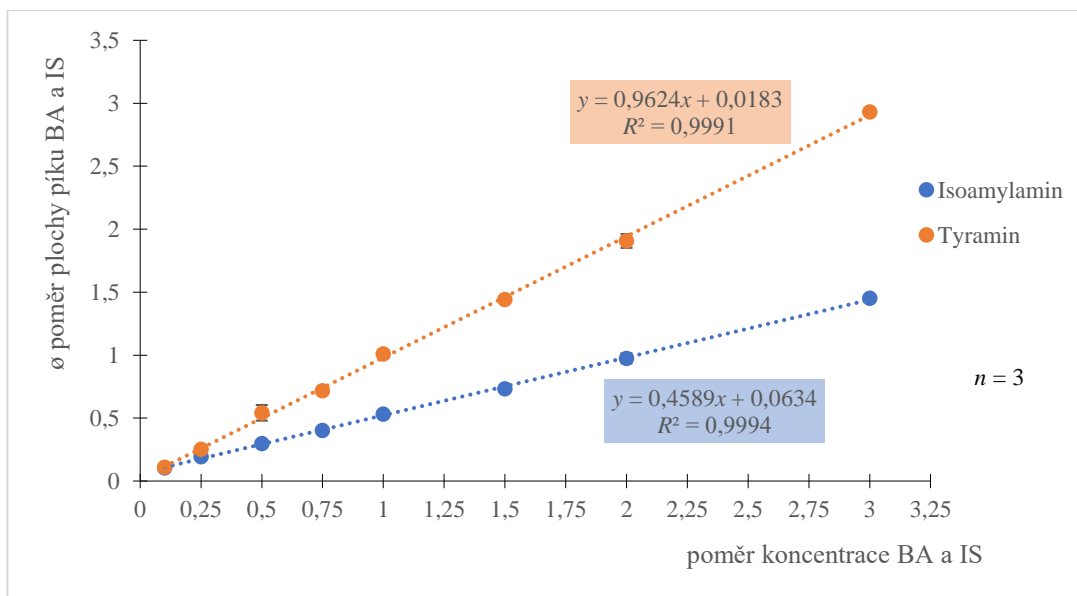
Obrázek II - 2: Kalibrační závislost spermidinu a sperminu



Obrázek II - 3: Kalibrační závislost histaminu

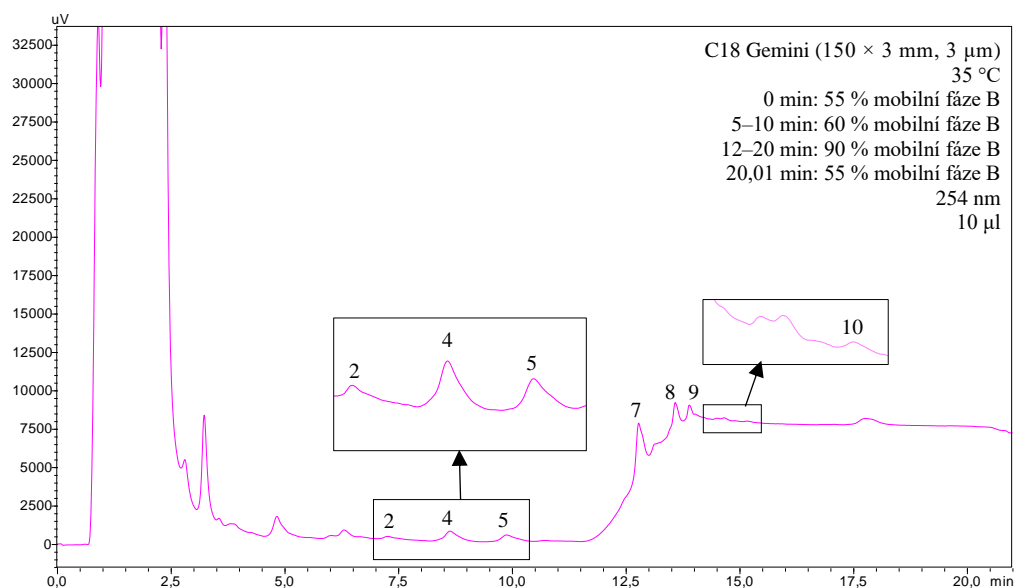


Obrázek II - 4: Kalibrační závislost tryptaminu a fenylethylaminu



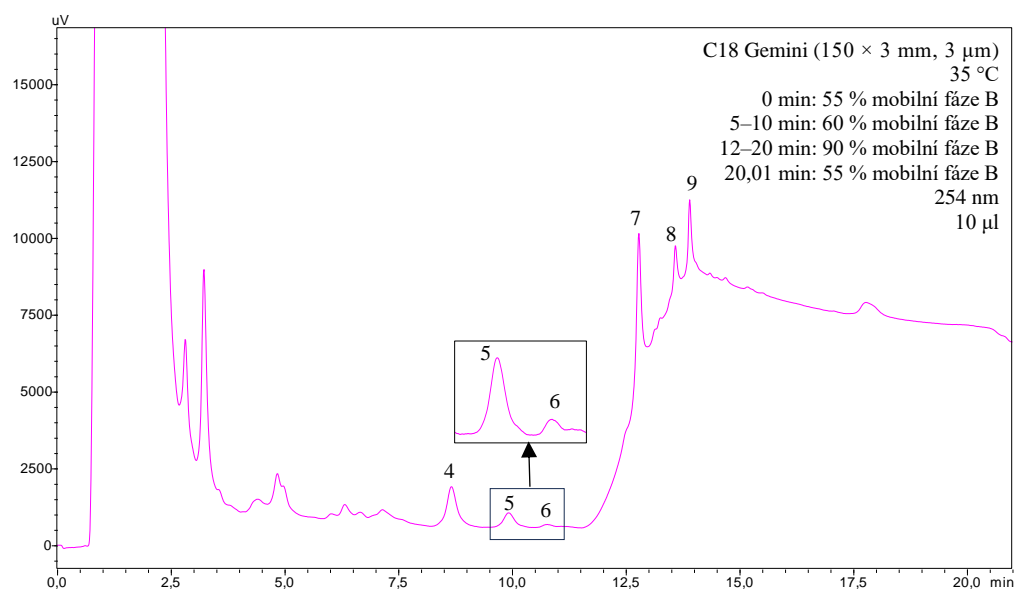
Obrázek II - 5: Kalibrační závislost isoamylaminu a tyraminu

Příloha III: Ukázkové chromatogramy jednotlivých kategorií kimchi po 24hod fermentaci



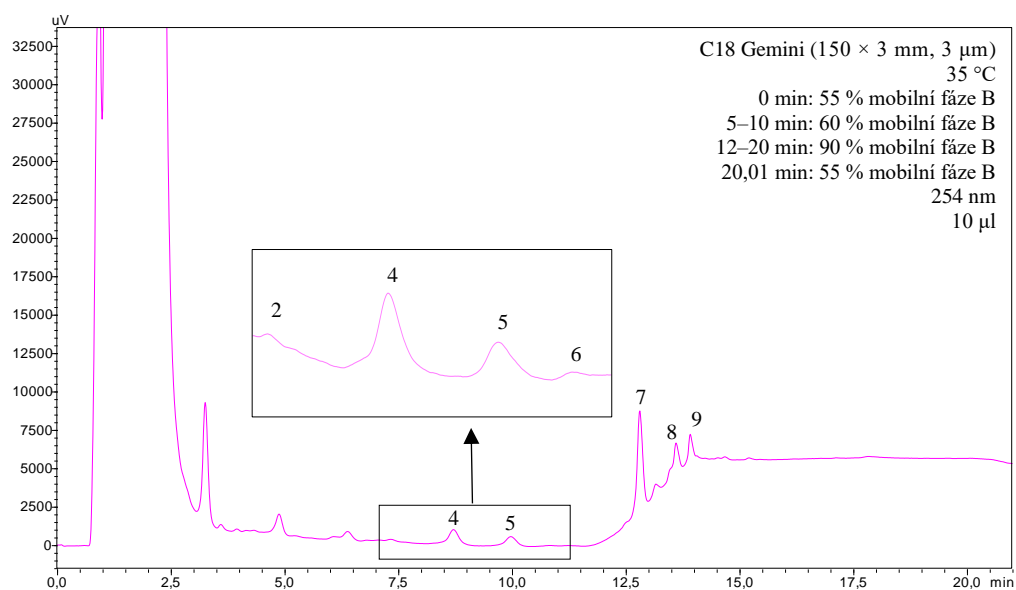
Obrázek III - 1: Ukázkový chromatogram vzorku přirozeně fermentovaného kimchi po 24hod fermentaci

2 – fenylethylamin, 4 – putrescin, 5 – kadaverin,
7 – vnitřní standard (1,7-diaminoheptan), 8 – tyramin, 9 – spermidin, 10 – spermin



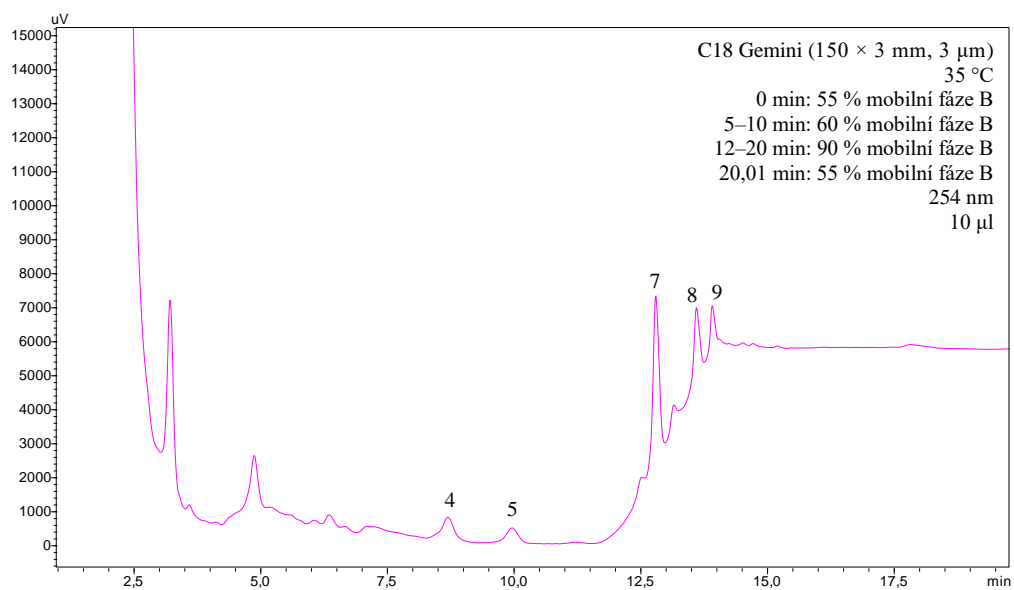
Obrázek III - 2: Ukázkový chromatogram vzorku kimchi s kulturou *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* po 24hod fermentaci

4 – putrescin, 5 – kadaverin, 6 – histamin,
7 – vnitřní standard (1,7-diaminoheptan), 8 – tyramin, 9 – spermidin



Obrázek III - 3: Ukázkový chromatogram vzorku kimchi s kulturou *Lactobacillus acidophilus* po 24hod fermentaci

2 – fenylethylamin, 4 – putrescin, 5 – kadaverin, 6 – histamin,
7 – vnitřní standard (1,7-diaminoheptan), 8 – tyramin, 9 – spermidin



Obrázek III - 4: Ukázkový chromatogram vzorku kimchi s kulturou *Bacillus cereus* po 24hod fermentaci

4 – putrescin, 5 – kadaverin,
7 – vnitřní standard (1,7-diaminoheptan), 8 – tyramin, 9 – spermidin