UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra analytické chemie

ANALÝZA BIOGENNÍCH AMINŮ V SÝRECH INFRAČERVENOU A RAMANOVOU SPEKTROMETRIÍ

Diplomová práce

Autor práce: Pavla Krajancová
Studijní obor: Chemie životního prostředí

Vedoucí diplomové práce: Ing. David Milde, Ph.D.

Olomouc 2011

Prohlašuji, že předložená práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerou literaturu a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, v práci řádně cituji a jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne . . . . . .

. . . . . .

(podpis)

OBSAH

ÚVOD **1**

I. TEORETICKÁ ČÁST **2**

1. INFRAČERVENÁ SPEKTROMETRIE 3

1.1. Infračervené záření *3*

1.2. Princip infračervené spektrometrie *3*

1.2.1. Vibrace molekul 4

1.2.2. Rotace molekul 5

1.2.3. Vibračně rotační přechody 6

1.3. Instrumentace *7*

1.3.1. Disperzní spektrometry 7

1.3.1.1. Zdroje záření 8

1.3.1.2. Monochromátory 8

1.3.1.3. Detektory 9

1.3.1.4. Infračervené spektrum 10

1.3.2. Nedisperzní spektrometry 10

1.3.3. Spektrometry s Fourierovou transformací 11

1.3.3.1. Zdroje záření 11

1.3.3.2. Interferometr 11

1.3.3.3. Detektory 12

1.3.3.4. Výsledné spektrum 12

1.4. Techniky snímání spekter *12*

1.5. Příklady praktických aplikací *14*

2. RAMANOVA SPEKTROMETRIE 15

2.1. Princip Ramanovy spektrometrie *16*

2.2. Instrumentace *16*

2.2.1. Zdroje záření 17

2.2.2. Monochromátory 17

2.2.3. Detektory 17

2.3. Ramanovo spektrum *18*

2.4. Příklady praktických aplikací *18*

3. BIOGENNÍ AMINY 19

3.1. Struktura a dělení biogenních aminů *19*

3.2. Vznik biogenních aminů *19*

3.3. Význam biogenních aminů *21*

3.4. Výskyt biogenních aminů *22*

3.4.1. Nefermentované potraviny 22

3.4.2. Fermentované potraviny 23

3.5. Reakce a změny *24*

3.6. Biologické účinky biogenních aminů *24*

3.7. Analytické metody stanovení biogenních aminů *25*

3.7.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie 26

3.7.2. Tenkovrstvá chromatografie 26

3.7.3. Plynová chromatografie 27

3.7.4. Kapilární elektroforéza 27

4. SÝRY 28

4.1. Výroba sýra *29*

4.2. Druhy sýrů *29*

4.3. Zrání sýra ... *30*
4.4. Stanovení sýrů infračervenou spektrometrií ... *31*
II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST ... **32**
5. PRACOVNÍ POSTUP A INSTRUMENTACE ... 33
5.1. Chemikálie a materiál ... *33*
5.2. Instrumentace ... *33*
5.2.1. Infračervená a Ramanova spektrometrie ... 33
5.2.2. Lyofilizace ... 34
5.3. Extrakce biogenních aminů ... *34*
5.4. Příprava vzorku pro měření Ramanovým spektrometrem ... *35*
6. VÝSLEDKY A DISKUZE ... 35
6.1. INFRAČERVENÁ SPEKTRA EXTRAKTŮ ... 35
6.1.1. Spektra uzených sýrů ... 37
6.1.2. Spektra neuzených sýrů ... 38
6.2. Souhrnná diskuze ... *40*
6.3. Ramanova spektra sýrů ... *41*
6.3.1. Ramanova spektra uzených sýrů ... 43
6.3.2. Ramanova spektra neuzených sýrů ... 44
6.3.3. Semikvantitativní vyhodnocení ... 46
6.4. Souhrnná diskuze ... *50*
ZÁVĚR ... **51**
POUŽITÁ LITERATURA ... **52**
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ ... **62**
SEZNAM PŘÍLOH ... **64**

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá studiem biogenních aminů v sýrech infračervenou a Ramanovou spektrometrií.

Byla provedena extrakce dvou druhů sýru (uzený a neuzený) ze tří druhů mléka (kravské, kozí, ovčí). Extrakty byly studovány pomocí infračervené spektrometrie metodou úplného zeslabeného odrazu. Absorpční pásy v infračervených spektrech byly přiřazeny funkčním skupinám. V sýrech byly identifikovány hlavní funkční skupiny, mezi nimi NH a NH_2 skupiny, nebylo však touto metodou možné rozlišit, kterým aminolátkám náleží.

Při studiu pomocí Ramanovy spektrometrie byly ze sýrů připraveny tablety čistých sýrů a sýrů s přídavkem tyraminu. Metodou standardního přídavku byla provedena semikvantitativní analýza pro řádové určení koncentrace biogenních aminů v sýrech. Výsledky získané touto metodou (tisíce $mg.kg^{-1}$) byly vyšší než publikované v předchozích studiích.

Jak infračervená, tak Ramanova spektrometrie se po vhodné úpravě vzorku ukázaly, jako přínosné pro kvalitativní analýzu zatímco možnosti kvantitativní analýzy jsou omezené.

Klíčová slova: infračervená spektrometrie, Ramanova spektrometrie, sýry, biogenní aminy

ABSTRACT

This thesis is devoted to study of biogenic amines in cheeses by infrared and Raman spectrometry.

The extraction procedure of two type of cheeses (smoked and non-smoked) made from three different types of milk (cow´s, goat´s, sheep´s) was performed. Extracts were studied by attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectrometry. Absorption bands in infrared spectra were assigned to functional groups. Main functional groups were identified in cheeses, NH and NH_2 groups among them, but it wasn't possible to differentiate which amino compound they belong to.

In study by Raman spectrometry tablet from cheeses and cheeses with tyramine additions were prepared. Semiquantitative analysis was performed by method of standard additions for the determination of concentration of biogenic amines in cheeses estimated by order of magnitude. Results obtained by this method (thousands $mg.kg^{-1}$) were higher than results published in previous studies.

After proper preparation of sample, both infrared and Raman spectrometry showed up as beneficial for qualitative analysis while potential of quantitative analysis is limited.

Keywords: infrared spectrometry, Raman spectrometry, cheeses, biogenic amines

ÚVOD

Biogenní aminy jsou organické, bazické, nízkomolekulární dusíkaté sloučeniny, které obvykle vznikají dekarboxylací volných aminokyselin.[1] Jsou tvořeny a rozkládány mikrobiálním, rostlinným a živočišným metabolismem.

Biogenní aminy se vyskytují v mnoha různých jídlech a nápojích, jejich koncentrace se značně liší v závislosti na druhu potravin, ale také aminu samotného.[1] Vyskytují se v ovoci, zelenině, čokoládě, sýrech, vejci, rybách, mléce, mase, sojových produktech, džusech, vínech, pivu aj.[2,3,4]

Nejběžnějšími aminy jsou: histamin, tyramin, tryptamin, fenylethylamin, putrescin, kadaverin, spermidin a spermin.

Přestože jsou látkami nepostradatelnými, ve vysokých koncentracích mají vasoaktivní a psychoaktivní účinky.[5] Aminy byly také studovány jako karcinogenní prekurzory.[6]

Stanovení biogenních aminů se provádí chromatograficky (TLC, HPLC, GC) nebo elektromigračními technikami (CZE). Jejich analýza je důležitá, jak z hlediska jejich toxicity, tak také možnosti jejich využití jako indikátoru čerstvosti nebo zkažení potravin.[3]

Sýry, jako zdroj bílkovin, tuků, vitamínů a minerálních látek, se konzumují takřka po celém světě.[7] Při zrání sýra je kasein pomalu odbouráván proteolytickými enzymy, což vede ke zvýšení obsahu volných aminokyselin.[4] Během výroby můžeme očekávat přítomnost mnoha druhů mikroorganismů, z nichž některé jsou zodpovědné za produkci biogenních aminů z aminokyselin.[5] Po rybách je sýr druhou potravinou, která je nejčastěji zodpovědná za otravu histaminem.[3]

I. TEORETICKÁ ČÁST

1. Infračervená spektrometrie

Infračervená spektrometrie je optická absorpční metoda, patřící do skupiny nedestruktivních analytických metod, kdy zkoumaný vzorek není analýzou nikterak poškozen, a přesto poskytuje informaci o svém složení.[8]

Principem infračervené spektrometrie je absorpce infračerveného záření molekulami látek, které vyvolává změny vibračních a rotačních podstavů molekul.

Infračervená spektrometrie se stala jednou z nejdůležitějších analytických metod jak pro preparativní, tak analytickou chemii. Je rovnocennou metodou nukleární magnetické rezonanci, hmotnostní spektrometrii, ultrafialové a viditelné spektrometrii a, v závislosti na daném problému, může být užita samostatně nebo ve vhodném spojení s jinou metodou, pro dosažení požadovaného výsledku.[9]

Hlavní cíl infračervené spektrometrické analýzy je stanovení funkčních skupin ve vzorku. Odlišné funkční skupiny absorbují charakteristické frekvence infračerveného záření. Ze zjištění, která část spektra byla absorbována, je pak možné usoudit chemickou strukturu a charakter látky.

Infračervená spektrometrie umožňuje analyzovat jak plyny, kapaliny tak pevné látky.[10]

1.1. Infračervené záření

Infračervené záření je oblast elektromagnetického spektra, který má vlnočet od 13 000 do 10 cm^{-1} nebo vlnovou délku od 0,78 do 1000 μm. Je ohraničen červeným koncem viditelné oblasti při vysokých frekvencích a mikrovlnnou oblastí při nízkých frekvencích. Infračervená oblast je obvykle rozdělena na tři části: blízká (13000 – 4000 cm^{-1}), střední (4000 – 200 cm^{-1}) a vzdálená (200 – 10 cm^{-1}). Nejvíce užívaná oblast infračerveného záření je střední.[10]

1.2. Princip infračervené spektrometrie

Principem infračervené spektrometrie je absorpce infračerveného záření molekulami látek. Záření střední a blízké infračervené oblasti vyvolává vibračně-rotační přechody, kdy se mění současně vibrační i rotační podstav molekuly, působení vzdálené infračervené oblasti vyvolává změnu rotačních stavů molekul, u nichž je potřebná energie malá.

1.2.1. Vibrace molekul

Vibrační pohyb dvouatomové molekuly je možné popsat s použitím vztahů pro harmonický oscilátor, energie vibračního pohybu je pak dána vztahem

$$E_v = h\nu\left(v + \frac{1}{2}\right) , \qquad (1)$$

kde ν je frekvence vibrace a v je vibrační kvantové číslo (nabývá celočíselných hodnot). Pro přirozenou frekvenci harmonického oscilátoru ν platí vztah

$$\nu = \frac{1}{2\pi}\sqrt{\frac{k}{M_r}} , \qquad (2)$$

kde k je silová konstanta vazby a M_r je redukovaná hmotnost vibrujících atomů o hmotnosti m_1 a m_2:

$$M_r = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2} \qquad (3)$$

Frekvence vibrace dvouatomové molekuly závisí na síle poutající atomy, tedy na typu chemické vazby, a na druhu vibrujících atomů, tedy na jejich hmotnosti.

Po dosazení vztahu pro frekvenci do rovnice pro energii vibračního pohybu

$$E_v = \frac{h}{2\pi}\sqrt{\frac{k}{M_r}}\left(v + \frac{1}{2}\right) \qquad (4)$$

Pro vibrační přechody v harmonickém oscilátoru platí výběrové pravidlo $\Delta v = \pm 1$, jsou tedy možné pouze přechody mezi sousedními vibračními hladinami. K přechodu mezi vibračními hladinami dojde, dodáme – li molekule potřebnou energii ve formě elektromagnetického záření s energií rovnou rozdílu energetických hladin, což znamená, že se také frekvence absorbovaného záření musí rovnat frekvenci vibrace molekuly. Nejpravděpodobnějšími přechody se nazývají základní (fundamentální), které odpovídají přechodům mezi základní a prvním excitovaným stavem ($\Delta v = 1 \leftarrow 0$). Jsou-li molekuly excitovány do vyšších vibračních hladin, což nastane při zvýšené teplotě, dochází k přechodům $2 \leftarrow 1$, $3 \leftarrow 2$,..atd., jež nazýváme horké přechody.

Ve skutečnosti se však reálné molekuly chovají jako anharmonický oscilátor. Proto může absorpční spektrum dvouatomové molekuly obsahovat více vibračních pásů, neboť pro přechody mezi sousedními hladinami již nenabývá ΔE stejné hodnoty, nýbrž hodnoty, jež se zmenšují s rostoucí hodnotou vibračního kvantového čísla. Přestává také platit výběrové

pravidlo a ve spektru se objevují také pásy o frekvencích odpovídajících přechodům s $\Delta v>1$, což jsou vyšší harmonické frekvence (overtony).

Vibrace víceatomové molekuly je daleko složitější, když pohyby jednotlivých atomů jsou vzájemně spřažené a navzájem se ovlivňují. Lze ji ale popsat jako součet jednoduchých harmonických pohybů – normálních vibrací, kdy všechny atomy v molekule vibrují se stejnou frekvencí a ve stejné fázi, ale s různými amplitudami. Každá normální vibrace je dána frekvencí, směrem a velikostí výchylky jednotlivých atomů, těžiště soustavy nevibruje. Počet těchto normálních vibrací je dán počtem vibračních stupňů volnosti dané molekuly. Pro N atomovou částici můžeme vypočíst počet vibračních modů ze vztahu 3 N – 5, pro lineární molekuly a 3 N – 6 pro nelineární molekuly.

Vibrace můžeme rozdělit na valenční a deformační. Při valenčních vibracích dochází ke změně délky vazby (může být symetrická a antisymetrická), při deformačních ke změně valenčního úhlu vazby (můžou být nůžková, kolébavá, kroutivá nebo kyvadlová).

Základní podmínkou vzniku absorpčních pásů v IČ spektru je změna dipólového momentu molekuly, neboť vibrační energie vazby se může zvýši absorpcí elektromagnetického záření jen tehdy, pokud se mění při vibraci její dipólový moment. To znamená, že nedochází-li k jeho změně, molekula neabsorbuje infračervené záření a není v IČ spektru pozorovatelná. Dipólový moment molekuly a jeho změny při vibrací souvisejí se symetrií molekuly.

V absorpčním spektru se nacházejí také charakteristické vibrace, což jsou vibrace lokalizované do určité části molekuly, která vibruje relativně nezávisle na zbytku molekuly. O existenci takové skupiny v molekule nám poskytuje informaci pás ve spektru odpovídací této vibraci.[11,12]

1.2.2. Rotace molekul

Rotační přechody lze měřit pouze v plynech. V důsledku interakcí molekul splývají v kapalinách a plynech v kontinuum.

Pro rotační energii rigidní dvouatomové molekuly, která může rotovat jako celek, ale jejíž atomy nemohou konat vibrační pohyb, byl odvozen výraz

$$E_r = -\frac{h^2}{8\pi^2 I} J(J+1)\,, \qquad (5)$$

kde I je moment setrvačnosti molekuly a J je rotační kvantové číslo (které může nabývat hodnot 0, 1, 2, ...).

Zavede-li se za rotační konstantu B, dané vztahem

$$B = \frac{h}{8\pi^2 Ic} \qquad (6)$$

vznikne vztah

$$E_r = BhcJ(J+1) \qquad (7)$$

Rotační energie je kvantována, nabývá jen diskrétních hodnot. Dovolené přechody mezi energetickými hladinami jsou pouze takové, při kterých ΔJ = ±1. Absorbovaná energie, potřebná ke změně rotačního stavu molekuly, je dána vztahem

$$\Delta E_r = E_{r,J+1} - E_{r,J} = 2Bhc\,(J+1) \qquad (8)$$

ΔE_r závisí narozdíl od vibrace také na rotačním kvantovém čísle, hladiny nejsou ekvidistantní. Absorpce IČ záření se projeví ve vzdálené infračervené oblasti, kde získáme ve spektru soubor čar, odpovídajících různým rotačním přechodům. U rotačních přechodů také platí, že aktivní rotace jsou pouze ty, u kterých dochází ke změně dipólového momentu molekuly, tedy u molekul s permanentním dipólovým momentem.

Rotace víceatomových molekul je rozkládána na otáčení kolem tří hlavních os procházejících těžištěm. Molekuly dělíme podle velikosti momentu setrvačnosti při otáčení kolem os na lineární, pro jejichž IČ spektra platí obdobné vztahy jako pro spektra dvouatomových molekul, a molekuly typu symetrického a asymetrického setrvačníku, pro jejichž spektra je nutno odvozené teoretické vztahy korigovat pro reálné molekuly.[9,11]

1.2.3. Vibračně rotační přechody

Při absorpci záření blízké a střední IČ oblasti molekulou dochází současně ke změně vibračního i rotačního stavu molekuly. Energie potřebná ke změně rotačního stavu je velmi malá ve srovnání s energií potřebnou ke změně vibračního. Vibračně rotační energie molekuly je dána vztahem

$$\Delta E_{v+r} = hv\left(v + \frac{1}{2}\right) + BhcJ\,(J+1) \qquad (9)$$

Pokud je molekula v plynném stavu, tedy má možnost rotace, platí při absorpci energie běžná pravidla: Δv= ±1, ΔJ= ±1. Neboť není přechod Δv = -1 u vibračních změn spojen s absorpcí energie, neuvažujeme jej. U vibračně rotačních přechodů má smysl uvažovat i změny ΔJ= -1, neboť konečným výsledkem takového vibračně rotačního přechodu (Δv= +1, ΔJ= -1) je absorpce záření. Existují tedy dva možné typy přechodů: Δv= +1, ΔJ= +1 a Δv= +1, ΔJ= -1.

U lineární víceatomové molekuly závisejí dovolené vibračně rotační přechody také na směru změny dipólového momentu molekuly při vibraci vůči permanetnímu dipólovému momentu molekuly. Probíhá-li změna ve stejném směru jaký má permanentní dipólový moment molekuly, jsou dovolené přechody jako u dvouatomové molekuly a výsledný absorpční pás má také stejný tvar. Mění-li se kolmo, jsou dovoleny i přechody s $\Delta J = 0$ a absorpční pás vznikne úzký. U nelineární víceatomové molekuly mají výsledné obalové křivky vibračně rotačních pásů různé tvary. Závisejí na vzájemném poměru tří momentů setrvačnosti vzhledem ke třem základním osám (molekuly označujeme jako sférický, symetrický a asymetrický setrvačník). Rotační přechody se projevují jako jemná struktura spektra.[11]

1.3. Instrumentace

Rozlišujeme tři typy spektrometrů: nedisperzní, disperzní a spektrometry s Fourierovou transformací.[9]

1.3.1. Disperzní spektrometry

Disperzní infračervené spektrometry jsou konstruovány jako jednopaprskové nebo dvoupaprskové. Mají tři hlavní části: zdroj záření, monochromátor a detektor.[11]

a) Jednopaprskové

U jednopapskových spektrofotometrů záření ze zdroje prochází monochromátorem, kde po nastavení vlnové délky dále pokračuje a prochází nejprve kyvetou obsahující srovnávací vzorek, kde je záření, odrazem od stěn kyvety, eventuelně absorpcí rozpouštědlem nebo ostatními složkami roztoku, poněkud zeslabeno a dopadá na detektor, kde je vzniklý fotoelektrický proud změřen a přiřazuje se mu nulová hodnota absorbance. Poté je kyveta se srovnávacím roztokem nahrazena kyvetou se vzorkem a je změřena jeho absorbance.

Takto jsou eliminovány některé efekty ovlivňující intenzitu procházejícího záření, které však nesouvisí s přítomností analytu v kyvetě. Mohou však vznikat chyby v důsledku časové nestability použitého zdroje záření. Získání spektra je však u tohoto přístroje velmi zdlouhavé, neboť pro získání absorpčního spektra je nutno tento postup opakovat pro jednotlivé vlnové délky záření. Proto jsou vhodné především pro určování koncentrace vzorků prováděné při jedné vlnové délce, popřípadě pro sledování časových změn koncentrace (při dané vlnové délce) při kinetických měřeních.

b) Dvoupaprskové

U dvoupaprskových spektrofotometrů je paprsek vystupující z monochromátoru střídavě směrován rotujícím zrcadlovým segmentem do měrné a do srovnávací kyvety. Poté jsou oba paprsky pomocí zrcadel spojeny do jediného paprsku dopadajícího na detektor. Vzniklý střídavý proud odpovídá poměru toků Φ/ Φ_0. Tento záznam absorpčního spektra trvá obvykle několik minut.[10, 11]

1.3.1.1. Zdroje záření

Zdrojem záření pro infračervenou oblast jsou rozžhavené tyčinky, např. nichromový zdroj, Nernstova tyčinka nebo tzv. Globar, tyto tyčinky jsou žhaveny volně na vzduchu na teplotu 1500 až 2000 °C. Globar je tyčinka z karbidu křemíku a je nejčastěji používaným zdrojem ve střední infračervené oblasti, ale může být také použita pro vzdálenou oblast. Nernstova tyčinka je z keramického materiálu obsahujícího oxidy ZrO_2, Y_2O_3, Er_2O_3. Je vhodná jako zdroj záření ve střední infračervené oblasti. Zářivý výkon těchto zdrojů klesá s rostoucí vlnovou délkou.[9, 11]

1.3.1.2. Monochromátory

Monochromátor je jádro disperzního spektrometru a tvoří základní optickou část přístrojů. Monochromátor je zařízení používané k rozptýlení širokého spektra záření a zajišťuje prostorovou separaci záření o určitém spektrálním intervalu vlnové délky. U kvalitních přístrojů je možné získat spektrální interval tak úzký, že můžeme toto záření považovat za monochromatické.

Monochromátor se skládá z vstupní štěrbiny, dělícího systému, přesněji optiky a disperzního prvku, a výstupní štěrbiny. Pomocí jednoho nebo více parabolických zrcadel se zajišťuje, aby záření procházející vstupní štěrbinou bylo soustředěno na disperzní prvek. Disperzní prvek je zodpovědný za rozdělení záření a bývá to buď hranol, nebo difrakční mřížka.

Hranoly byly pro disperzi používány především ve starších přístrojích. Rozkládaly polychromatické záření podle vlnové délky na základě lomu světla při jeho průchodu hranolem.

V současné době se rozklad infračerveného záření v disperzních spektrometrech provádí nejčastěji pomocí difrakčních mřížek, vyrobených z kovových nebo skleněných

materiálů. Princip rozkladu světla na mřížce spočívá v odrazu nebo ohybu záření a interferenci odražených nebo ohnutých paprsků. Mřížky poskytují mnohem lepší rozlišení než hranol, konstantní po celém rozsahu vlnové délky. Mřížky se liší počtem vrypů na 1 mm podle požadovaného rozsahu (např. 100 vrypů/mm pro rozsah 4000 až 600 cm^{-1} a 25 vrypů/mm pro nižší hodnoty vlnočtů) nebo se také dají využít různé interferenční řády u téže mřížky.[9, 11]

1.3.1.3. Detektory

Detektory záření jsou zařízení, jejichž prací je převádět optický signál (energii záření) na dále použitelný elektrický signál, který je pak možno jednoduše změřit.

Detektory v infračervené spektrometrii musí být velmi citlivé, neboť intenzita spojitého infračerveného záření vysílaného zdroji, které se používají v této oblasti (rozžhavenými tuhými látkami), je poměrně nízká a rychle klesá se zvyšující se vlnovou délkou.

Dříve se detekce prováděla nejčastěji pomocí termočlánků, ve kterých záření dopadalo na spoj dvou různých kovů (Sb + Bi nebo Ag + Pb), kde vznikl potenciálový rozdíl, který se měřil, jejich odezva však byla velmi pomalá a téměř nezávislá na vlnové délce dopadajícího záření a získaný signál byl přímo úměrný jen jeho celkové intenzitě.

Tepelné detektory využívají jevu založenému na změnách materiálu detektoru vlivem teploty. Tepelně produkovaný fotosignál závisí na dopadajícím záření, tedy na vlnové délce. V současné době jsou nejpoužívanější pyroelektrické detektory, založené na změně polarizace feroelektrického materiálu pod Curie bodem. Nejznámějšími pyroelektrickými detektory jsou TGS (triglycinsulfát) a DTGS (deuterovaný triglycinsulfát), jejichž spontánní elektrická polarizace může být měřena jako elektrický signál. Odezva těchto detektorů je velmi rychlá, bez ztráty rozlišení tedy umožňuje tedy rychlou registraci spektra. K tepelným detektorům patří také Golayův a fotoakustický detektor, který se také řadí do podskupiny pneumatických detektorů. Oba detektory jsou principielně založeny na stejném fyzikálním převodu energie záření uvolňované molekulami vzorku po jejich excitaci do vyšších energetických stavů na elektrický signál. Tato energie zvyšuje kinetickou energii molekul plynu, obklopujícího pevný vzorek umístěný v uzavřené měřicí komůrce, a projeví se zvýšením jeho teploty nebo tlaku. K detekci je používán mikrofon a optoakustický signál, který vzniká je zaznamenáván jako

změna elektrického napětí. Je možné jich využít při analýze obtížně měřitelných pevných látek nebo samotných plynů.

Fotoelektrické detektory, zkráceně fotodetektory nebo také polovodičové detektory jsou momentálně nejvíce užívanými detektory pro IČ záření, především pro jejich vyšší citlivost. U těchto detektorů dochází k interakci dopadajícího fotonu s polovodičem. Výsledkem je vznik elektronů a děr – vnitřní fotoelektrický jev. Když foton zasáhne elektron v detektoru, změní ho tak z nevodivého stavu do vodivého. Jejich citlivost značně závisí na vlnové délce a vyžadují chlazení, pro dosažení maximální citlivosti. Do této skupiny patří detektor nazývaný MCT (Mercury – Cadminum – Telluride), jehož citlivost je vysoká a odezva rychlá.[6, 9, 11]

1.3.1.4. Infračervené spektrum

Infračervená spektra jsou obvykle registrována jako závislost transmitance na vlnočtu absorbovaného záření. Při interpretaci spektra sledujeme polohu, tvar, počet a intenzitu absorpčních pásů. Vyhodnocením spektra je možné určit jak přítomnost jednotlivých funkčních skupin v molekule, tak provést identifikaci látky, neboť frekvence vibrací, a tedy také frekvence záření absorbovaného molekulou, je dána druhém atomů. Spektrum je možno rozdělit na oblast skupinových vibrací (charakteristických vibrací) a oblast otisků prstů. Oblast skupinových vibrací leží mezi 4000 – 1500 cm^{-1} a nacházejí se zde vibrace charakteristické pro jednotlivé skupiny atomů. V IČ spektrech různých látek, které obsahují tutéž vibrující skupinu atomů, nacházíme pásy s velmi blízkými hodnotami vlnočtu, neboť při některých vibracích může být pohyb atomů lokalizovaný jen do určité části molekuly (strukturní jednotky, vazby) a atomy takové jednotky pak vibrují ve značné míře nezávisle na zbytku molekuly. Oblast otisků prstů leží mezi 1500 – 600 cm^{-1}. Protože existují vibrace silně zpřažené, delokalizované, jednotlivé pásy, tudíž nelze jednoznačně přiřadit jednotlivým vazbám, avšak jsou charakteristické pro danou molekulu jako celek. Ty náleží do této oblasti, kde tak jako u otisku prstů nenalezneme dvě látky se shodným spektrem.[9, 11]

1.3.2. Nedisperzní spektrometry

Nedisperzní spektrometr má téměř stejnou konstrukci jako disperzní, avšak neobsahuje disperzní prvek. Monochromatičnost zajišťuje již samotná povaha zdrojů

infračerveného záření. Jako zdroje záření jsou používány vysoce monochromatické lasery, plynové nebo pevnolátkové - laserové diody.[8]

1.3.3. Spektrometry s Fourierovou transformací

Nedostatkem disperzních infračervených spektrometrů je především pomalost získávání spektra, malá citlivost (zejména v oblasti pod 200 cm^{-1}), nízký poměr signálu k šumu, nemožnost získat dostatečně velké rozlišení v širokém rozsahu vlnočtů a obtížnost měření propustností pod 1 %.

Spektrometry s Fourierovou transformací (FT) mají tři základní stavební prvky: zdroj záření, interferometr a detektor.[9, 11]

1.3.3.1. Zdroje záření

Jako zdroj záření se v blízké a střední infračervené oblasti používá opět nejčastěji Globar, v blízké infračervené oblasti pak ještě halogenová výbojka a ve vzdálené infračervené oblasti vysokotlaká rtuťová výbojka.[9, 11]

1.3.3.2. Interferometr

Tak, jako je srdcem disperzního spektrometru monochromátor, tak je srdcem spektrofotometru s FT interferometr. Nejznámějším interferometrem je Michelsonův interferometr, který se skládá z pohyblivého zrcadla, pevného zrcadla a děliče paprsků. Paprsek záření ze zdroje přichází na polopropustný dělič paprsků, kde je rozdělen na dvě části. Jednu část paprsku dělič propustí k pohyblivému zrcadlu, druhou odrazí směrem k pevnému zrcadlu. Paprsky, které se od obou zrcadel odrážejí zpět na dělič paprsků, kde se podle polohy pohyblivého zrcadla buď sčítají, nebo vyruší; dochází k interferenci.

Nejdůležitějším prvkem interferometru je bezpochyby dělič paprsků. Většina děličů paprsků je materiál propustný pro infračervené záření potažený vhodným reflexním filmem (KBr, CaF_2). Pro zachování symetrické optické dráhy v obou křídlech interferometru je navíc přidána kompenzační destička vyrobená ze stejného materiálu jako dělič paprsků. Použitím různých materiálů na děliče paprsků můžeme rozlišit použitelnou spektrální oblast, např. pro vzdálenou IČ oblast se používají filmy z polymeru Mylar (polyethylen tereftalát).[9, 11]

1.3.3.3. Detektory

Protože frekvence signálu, dopadajícího na detektor, leží v audiofrekvenční oblasti (10^1 až 10^3 Hz), je nutné použít detektor s velmi rychlou odezvou. Nejčastěji užívanými typy detektorů jsou pyroelektrické DTGS detektory, protože mohou být bez problému použity i při pokojové teplotě, nebo také polovodičový MTC detektor. Používají se také pyroelektrické TGS detektory.[9, 10, 11]

1.3.3.4. Výsledné spektrum

Rekombinovaný paprsek poté prochází vzorkem a ty frekvence, jež nebyly absorbovány, jsou přivedeny na detektor. Intenzita signálu z detektoru, jako funkce změny délky optické dráhy, je nazýván interferogram. Interferogram se převede matematickou operací – Fourierovou transformací – na infračervené spektrum.[9, 11]

1.4. Techniky snímání spekter

Infračervené spektrum je možné získat ze vzorků v mnoha různých skupenstvích, jako je kapalina, pevná látka a plyn. Nicméně mnoho látek nepropouští IČ záření, proto musí být pro získání spektra rozpuštěny nebo zředěny v matrici propustné pro IČ.[10]

Vzorky v plynném stavu jsou měřeny v dlouhých válcích se základnami z materiálu transparentního pro infračervené záření, neboť vzhledem k jejich malé hustotě molekul je nutné použít delší dráhu světelného paprsku v kyvetě. Kyvety také mohou být pod tlakem nebo termostatovány.[9, 11]

Kapalné vzorky se nejčastěji měří v kyvetách ze dvou okének z transparentního materiálu a s otvory pro plnění. Využívá se také technika kapilární vrstvy, kdy je kapka vzorku stlačena mezi dvě destičky z materiálu propustného pro IČ. Těmito materiály nejčastěji bývá KBr, NaCl, CsI, CaF_2, SiO_2, BaF_2, polyethylen, KRS-5, AgCl, AgBr, ZnS, $ZnSe_2$, Ge a Si. Je ovšem důležité zvážit jejich rozpustnost, hygroskopičnost nebo reaktivitu vzhledem k povaze vzorku nebo také rozpouštědla.

Pevné látky můžeme proměřit jako kapalinu, po rozpuštění ve vhodném rozpouštědle ($CHCl_3$, CCl_4), pomocí suspenzní (nujolové) techniky, KBr tabletové techniky nebo odrazovými technikami. Při nujolové technice se připraví suspenze práškového vzorku s emulgačním činidlem, jimž bývá parafínový olej neboli Nujol. Suspenze je následně měřena

mezi dvěma okénky KBr nebo NaCl. Při KBr technice se smíchá práškový vzorek s vysušeným KBr a výsledná směs je slisována do tenké tablety, jež je proměřena.

Vedle standardních transmisních technik měření, kdy záření prochází vzorkem, se stále častěji používají techniky reflexní, neboť umožňují jednodušší předběžné zpracování vzorku. Mezi reflexní techniky patří metoda úplného zeslabeného odrazu, metoda difúzního a metoda zrcadlového odrazu.

Metoda úplného zeslabeného odrazu (ATR attenuated total reflectance) je univerzální, nedestruktivní technika pro získání infračerveného spektra materiálu nebo spektra povrchu materiálu, buď příliš silného, nebo příliš silně absorbujícího k analýze standardní transmisní spektrometrií. Kvalitní spektra tak můžeme získat pro práškové vzorky, pasty, lepidla, pryže, vlákna, silné vrstvy filmů, textilie, papíry, různé povlaky, maziva, krémy a viskózní kapaliny.

Úplný zeslabený odraz nastává, když paprsek záření proniká z prostředí o vyšším indexu lomu do prostředí o nižším indexu lomu a přesáhne-li úhel dopadajícího záření kritický úhel θ_c. Kritický úhel je definován jako

$$\theta_c = sin^{-1}\frac{n_2}{n_1} \quad , \qquad (10)$$

kde n_1 je index lomu vnitřního odrazového elementu a n_2 je index lomu vzorku.

Vzorek je umístěn v těsném kontaktu s ATR krystalem z materiálu s vysokým indexem lomu, infračervený paprsek je orientován na zkosenou hranu krystalu. Při úplném odrazu na rozhraní opticky hustšího prostředí (krystal) s opticky řidším prostředím (vzorek) vzniká zeslabená (evanescentní) absorpční vlna. Hloubka průniku zeslabené vlny je definována vztahem

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1\sqrt{sin^2\Theta - (\frac{n_1}{n_2})}} \quad , \qquad (11)$$

kde λ je vlnová délka dopadajícího záření, θ je úhel dopadu a n_1 a n_2 jsou indexy lomu ATR krystalu a vzorku. Hloubka průniku zeslabené vlny do vzorku je obvykle několik μm a její intenzita je zeslabena vzorkem v oblasti IČ spektra tam, kde vzorek absorbuje, tedy jsou absorbovány ty vlnočty, které odpovídají frekvencím vibrace molekul vzorku.

Výsledné infračervené ATR spektrum se podobá obvyklému IČ spektru, s rozdílem v intenzitách získaných pásů, neboť průnik infračerveného záření do vzorku závisí na vlnové délce záření (dlouhé vlnové délky pronikají hlouběji). Intenzita pásů při kratších vlnových délkách (vyšších vlnočtech) je tedy menší než v transmisním spektru. Tento efekt se

neuplatňuje, je-li vrstva vzorku menší než 2 μm. Získané IČ spektrum pak obsahuje také absorpční pásy použitého krystalu (pozadí), které mohou být odstraněny eliminací pozadí.

ATR krystal bývá vyroben z materiálu propustného pro infračervené záření a s vysokým indexem lomu, nejběžněji užívanými jsou ZnSe, Si, Ge, KRS-5 a diamant. Krystaly jsou také rozlišovány podle tvaru na jednoodrazové a víceodrazové. Víceodrazového krystalu a tedy násobného odrazu se využívá, pokud není po jednom odrazu efekt zeslabení dostatečný.

Difúzní odraz (reflektance) nebo také ve spojení s Fourierovou transformací (DRIFTS Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy) je využíván především pro měření spekter práškových vzorků a pevných látek s nepravidelným povrchem jako je uhlí, papír a látky. Tyto metody také mohou být užity jako alternativa tabletových technik. Jsou citlivé, vyžadují minimální přípravu vzorku a jsou schopné analyzovat téměř neodrazivé materiály, neprůhledné, slabě absorbující s nepravidelnými povrchy či povlaky. IČ záření je zaměřeno na povrch vzorku v nádobce, což má za následek dva typy odrazu: zrcadlový (spekulární) a difúzní. Při zrcadlovém odrazu záření na povrchu pevné látky nedochází k absorpci, zatímco při difúzním odrazu záření proniká do vzorku a poté z něj opět vystupuje. Příslušná optika pak sbírá pouze difúzní záření, jež v sobě nese informaci o absorpci vzorku, a soustřeďuje je na detektor, zatímco zrcadlový odraz potlačuje.

Zrcadlového odrazu se také využívá samostatně. Podstatou této metody je zrcadlový odraz na povrchu vzorku, kdy množství světla závisí na indexu lomu vzorku, úhlu dopadu, kvalitě povrchu a absorpčních vlastnostech. Tato metoda je používána pro měření spekter tenkých filmů na pevných vzorcích a jejich tloušťky, jako jsou vrstvy a nátěry na kovových podložkách, nebo ke studování velkých povrchů jako jsou gumy, polymerní vrstvy, polovodiče či vyleštěná keramika.[9, 10, 11, 12, 13]

1.5. Příklady praktických aplikací

Infračervená spektrometrie se používá ke stanovení řady anorganických i organických látek a také při kontrole čistoty látek. Ve farmaceutickém průmyslu je předložení infračervených spekter, které se měří obvykle difúzním odrazem (DRIFTS), jedním z požadavků při hodnocení léčiv. Použití našla i v medicíně, při diagnostice zhoubných nádorů, pro určování složení ledvinových kamenů nebo pro stanovení sacharidů v krvi. Bylo také zjištěno, že ji lze použít pro identifikaci bakterií, neboť se liší svými infračervenými

spektry. V potravinářském průmyslu, se infračervená spektrometrie stala významnou, rychlou a nedestruktivní metodou pro analýzu a kontrolu kvality potravin. Své místo si našla při analýze masa a masných výrobků (stanovené obsahu tuků), ryb, mléka a mléčných výrobků (stanovení tuků v mléku), obilovin a cereálních výrobků, zeleniny, ovoce, ovocných šťáv (stanovení cukrů), vína, piva, vejce a vaječných produktů.[14, 15]

Rozsáhlého použití dosáhla infračervená spektrometrie v kriminalistice. Především při důkazu a rychlé semikvantitativní analýze drog a zneužívaných léčiv, která lze provést i z několika nalezených zrníček. Nebo také identifikace pachatelů na základě několika vláken u oděvů či úlomků barev na místě autonehody (existují katalogy IČ spekter barev používaných všemi světovými firmami).

Koncentrace ropných látek ve vodě, v půdách a v mořských sedimentech jsou také velmi často určovány pomocí infračervené spektrometrie. Také kontrola stárnutí olejů a kontrola aditiv (např. antioxidantů) je pomocí IČ spektrometrie prováděna. Na základě sledování spektrálních změn olejů je možno provádět diagnostiku motorů v automobilovém průmyslu. V petrochemii byly vypracovány metody pro monitorování průběhu reakce, pomocí sondy ATR zavedené do reaktoru, a prováděna kontrola kvality požadovaného produktu. Při výrobě polovodičů je pomocí reflexních metod určována tloušťka vrstev.

Také byly zkonstruovány infračervené analyzátory, které slouží k identifikaci i stanovení škodlivých látek v životním prostředí (stanovení CO ve výfukových plynech). [11, 14, 15]

2. Ramanova spektrometrie

Infračervená spektrometrie je velmi úzce spjata s Ramanovou spektrometrií, která je taktéž metoda pro pozorování molekulárních vibrací. Oba typy spektrometrií často dávají podobná spektra, ale jsou odlišná natolik, aby mohla poskytovat doplňující informace. Existují konkrétní použití, ve kterých je IČ spektrometrie lepší než Ramanova a naopak.

IČ a Ramanova spektrometrie se liší především svými výběrovými pravidly, kvůli slabšímu rozptylovému efektu má Ramanova spektrometrie nízkou citlivost, avšak je dobře použitelná na vodné roztoky. Také není obecně nutná žádná příprava vzorku (měření opticky transparentních materiálů, zahrnující obaly, okenní skla, krystaly) nebo je o mnoho jednodušší než u IČ spektrometrie, dokáže měřit stejným přístrojem pásy pod 400 cm^{-1} až k pár cm^{-1} (vibrace krystalové mřížky) a je vhodná pro mikroanalýzy.[6, 9]

2.1. Princip Ramanovy spektrometrie

V Ramanově spektrometrii měříme rozptýlené záření vznikající interakcí mezi molekulami vzorku a viditelným, blízkým infračerveným, případně ultrafialovým monochromatickým zářením, kdy současně nastane změna jejich vibračních a rotačních stavů.[11]

Při ozáření vzorku monochromatickým zářením nastávají následující fyzikální jevy:

- Absorpce a fluorescence: jestliže je energie dostatečná k excitaci elektronu, pak je užité záření absorbováno. Excitační energie elektronů může být částečně nebo úplně převedena na teplo, ale také bude opět vyzářena jako dlouhovlnné emisní záření nazývané fluorescence. Ramanův efekt je pak zcela zakryt flourescencí.
- Rayleighův rozptyl: část záření je rozptýlena s původní frekvencí ve všech směrech do prostoru. Dochází tedy k elastické srážce kvant záření s molekulami vzorku, kdy dochází ke změně směru, ale nedochází k výměně energie.
- Ramanův rozptyl: malá část záření je rozptýlena neelasticky s jinou frekvencí. Část energie kvant se předá molekule a opět opustí vzorek rozptýlené s nižší frekvencí, neboť jsou nyní chudší o množství energie předané molekule. Rozdíl energie je spotřebován molekulou na zvýšení vibrační energie. Takto vznikají ve spektru Stokesovy linie, nacházející se u vyšších vlnových délek než je Rayleighova linie.
  Pokud záření zasáhne vibračně excitované molekuly, pak mohou předat jejich vibrační energii dopadajícímu záření. Poté je energeticky obohacené kvantum vyzářeno ze vzorku. Tyto linie se nacházející u nižších vlnových délek než je Rayleighova linie a nazýváme je anti-Stokesovy.[9]

Podmínkou aktivity vibrace v Ramanově spektru je změna polarizovatelnosti molekuly v průběhu vibrace. Polarizovatelnost molekuly je schopnost elektrických nábojů v molekule posouvat se vlivem elektrického pole.[11]

2.2. Instrumentace

Ramanovy spektrometry obsahují zdroj záření, monochromátor a detektor. Rozptýlené záření bývá pozorováno buď ve směru 90 ° nebo 180 ° na směr dopadajícího záření. Kolmé uspořádání se využívá pro speciální případy se slabým signálem (např. pro plyny), přímé uspořádání je jednodušší, protože ohniska laseru a sběrná optika se automaticky shodují.

Přístroj bývá doplněn polarizátorem a systémem zrcadel, pro maximální ozáření vzorku a zachycení maxima rozptýleného záření, kterému se také říká iluminátor (osvětlovač) vzorku.

Tak jako v infračervené spektrometrii jsou spektrometry v Ramanově spektrometrii disperzní a s Fourierovou transformací.

Vzorek bývá měřen v kyvetách, které mohou být skleněné nebo z nefluoreskujícího křemene. Kyvety mohou být vyhřívané nebo chlazené, někdy je používáno také rotujících kyvet, aby se zabránilo lokálnímu přehřátí a rozkladu vzorku. [9, 11]

2.2.1. Zdroje záření

Ramanova spektrometrie vyžaduje intenzivní monochromatický zdroj záření. Zatímco dříve byly zdrojem monochromatického záření rtuťové výbojky, v současné době se používají prakticky pouze lasery (plynové nebo pevnolátkové), které emitují viditelné, blízké infračervené, případně UV záření. Používají se lasery helium-neonové (He-Ne), argon-kryptonové (Ar-Kr), kryptonové, argonové nebo Nd-YAG (pro spektrometry s FT), lišící se především svým výkonem.[9, 11]

2.2.2. Monochromátory

Jako monochromátory se používají mřížky s vyšší rozlišovací schopností a s nastavitelnou štěrbinou, nejčastěji dvojité nebo trojité pro minimalizování nežádoucího rozptýleného záření. Rayleighovo záření, které je daleko intenzivnější je nutno odstranit filtrem. Ve spektrometrech s Fourierovou transformací je monochromátor opět nahrazen interferometrem.[9, 11]

2.2.3. Detektory

Volba detektoru závisí na druhu použitého laseru. Pokud například použijeme záření z viditelné oblasti spektra, může být jako detektor použit fotonásobič.

V současné době jsou většinou používány vícekanálové detektory, které mohou být konstruovány s takzvanými polychromátory. Pro simultánní detekci celého spektrálního rozmezí nebo jeho vybrané části je se používá diodové pole (diode array) nebo holografická mřížka. Chlazené CCD (charge-coupled devices) detektory, vyvinuté na bázi křemíkového polovodiče, jsou extrémně citlivé pro oblast 330 až 1100 nm.

V Ramanových spektrometrech s FT bývají také užívány polovodičové detektory z germania nebo arsenidu india a galia (InGaAs). [9, 11]

2.3. Ramanovo spektrum

Jak už bylo výše napsáno, podmínkou aktivity vibrace v Ramanově spektru je změna polarizovatelnosti molekuly v průběhu vibrace. Jelikož tuto schopnost mají především nepolární části molekul, neboť se jejich polarizovatelnost při vibraci výrazně mění, projevují se intenzivními pásy v Ramanově spektru zejména vibrace nepolárních vazeb. Zjednodušeně lze říct, že zatímco IČ spektrum poskytuje informace o polárních funkčních skupinách molekul, Ramanovo spektrum poskytuje informace o nepolárních vazbách molekul a skeletu. Pro molekuly se středem symetrie dokonce platí, že vibrace aktivní v Ramanově spektru jsou v infračerveném spektru neaktivní a naopak.

Tvary pásů v Ramanových spektrech jsou obdobné pásům v IČ spektrech.[11]

2.4. Příklady praktických aplikací

Jelikož je voda nevhodným rozpouštědlem pro IČ spektrometrii (kromě ATR techniky) má Ramanova spektrometrie rozsáhlé možnosti analýzy ve vodě rozpustných látek, které může analyzovat bez problému. Přesto však kvantitativní analýzy například metabolitů, jako je glukóza, močovina a mléčná kyselina ve vodném roztoku, jsou stále lépe prováděny infračervenou než Ramanovou spektrometrií. Avšak, Ramanovy spektrometrie se využívá při charakterizaci různých druhů lidských tkání, včetně rakovinou napadených tkání.

Zajímavé užití Ramanovy spektrometrie bylo popsáno pro analýzu automobilových výfukových plynů. Její výhodou je zde možnost analýzy kyslíku, dusíku a vodíku, které nemohou být v IČ spektru viděny kvůli jejich symetrii.

Protože Ramanův rozptylový průřez je poměrně malý, užívá se povrchem zesílený Ramanův rozptyl (SERS Surface Enhanced Raman Scattering). Jsou tak analyzovány látky, které jsou adsorbované k nerovným kovovým povrchům nebo k částicím kovu obsahující stříbro nebo zlato.[9]

3. Biogenní aminy

Aminy jsou bazické nitrosloučeniny odvozené od amoniaku nahrazením jednoho, dvou nebo tří atomů vodíku alkylovou nebo arylovou skupinou. Biogenními aminy (BA) jsou nazývány, pokud vzniknou působením živých organismů.[3, 4]

Vykazují rozdílné biologické účinky a plní v živočišných tkáních a rostlinných pletivech různé funkce.[5]

3.1. Struktura a dělení biogenních aminů

Přehled nejběžnějších biogenních aminů, spolu s jejich prekurzory je uveden v tabulce I. Chemická struktura biogenních aminů může být alifatická (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin) aromatická (tyramin, fenylethylamin); heterocyklická (histamin, tryptamin).[2,3] Lze je také rozdělit na monoaminy (histamin, tyramin, fenylethylamin a tryptamin), diaminy (putrescin a kadaverin) a polyaminy (spermidin a spermin).[2]

Biogenní aminy jsou endogenní, jež jsou produkovány v mnoha různých tkáních (např. adrenalin v dřeni nadledvinek nebo histamin v játrech nebo žírných buňkách) a exogenní, které jsou vstřebávány z potravin ve střevech a vznikají jako důsledek mikrobiální kontaminace a při kvasných procesech.[5, 16]

Tabulka I. Triviální a systematické názvy nejběžnějších biogenních aminů, a jejich prekurzory.[4, 61, 17]

Triviální název	Systematický název	Prekurzor
histamin	2-(1*H*-imidazol-4-yl)ethanamin	histidin
tyramin	4-(2-aminoethyl)fenol	tyrosin
putrescin	butan-1,4-diamin	ornithin
kadaverin	pentan-1,5-diamin	lyzin
fenylethylamin	2-fenylethylamin	fenylalanin
tryptamin	2-(1H-indol-3-yl)ethanamin	tryptofan
spermidin	N-(3-Aminopropyl)butan-1,4-diamin	arginin
spermin	N,N'-bis(3-aminopropyl)butane-1,4-diamin	arginim

3.2. Vznik biogenních aminů

Biogenní aminy vznikají především dekarboxylací aminokyselin, působením enzymů bakteriálního původu, nebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů.[3,4,5] Dekarboxylací aminokyseliny vznikne odpovídající amin odstraněním alfa-karboxyl skupiny.[1,4]

Proteolýza neboli rozklad bílkovin, ať už autolytická nebo bakteriální, hraje významnou roli při uvolňování volných aminokyselin z tkáňových proteinů, které poskytují substrát pro dekarboxylační reakce.[4]

Byly zjištěny dva mechanismy dekarboxylace aminokyselin: reakce závislá na pyridoxal-fosfátu a nezávislá na pyridoxal-fosfátu.

Pyridoxal-fosfát katalyzuje mnoho reakcí aminokyselin. Je vázán v Schiffově bázi vazbou aminoskupiny lysinového zbytku a utváří tak aktivní místo enzymu. Karbonylová skupina pyridoxal-fosfát ochotně reaguje s aminokyselinami, za tvorby meziproduktu – Schiffovy báze, která je poté, za současného odštěpení vody, dekarboxylována za vzniku příslušného aminu a poloviny původního pyridoxal-fosfátu.[4, 5]

Dekarboxylace nekatalyzována pyridoxal-fosfátem vyžaduje pyruvoylový zbytek, který je vázán kovalentní vazbou k amino skupině fenylalaninového zbytku enzymu. Tento aktivní proenzym pyruvyolového zbytku se chová v dekarboxylační reakci podobně jako pyridoxal-fosfát.[4]

Faktory ovlivňující tvorbu aminů v potravinách zahrnuje nejen dostupnost volných aminokyselin a přítomnost mikroorganismů (tabulka II), které mohou dekarboxylovat aminokyseliny, ale také vhodné podmínky pro takové mikroorganismy, pro jejich růst a produkci jejich enzymů.[4] Důležitými podmínkami je pH, koncentrace solí, teplota nebo dostupnost substrátu. [3]

Tabulka II. Izolované bakterie a zjištěné aminy ve vybraných druzích potravin.[4]

Potravina	Izolované bakterie	Zjištěné aminy
sýry	*Lactobacillus buchneri, Lactobacillus 30a, L. bulgaricus, L. plantarum, L. casei, L. acidophilus, L. arabinose, Streptococcus faecium, S. mitis, Bacillus macerans, Propionibacterium* spp.	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, tryptamin, β-fenylethylamin
ryby	*Morganella morganii, Klebsiella pneumonia, Hafnia alvei, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Clostridium perfringenes, Enterobacter aerogenes, Vibro alginolytiens, Bacillus spp., Staphylococcus, xylosus*	histamin, tyramin, kadaverin, putrescin, agmatin, spermin, spermidin
maso a masné produkty	*Pediococcus, Enterobacteriaceae, Lactobacillus, Pseudomonas, Streptococcus, Micrococcus*	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, tryptamin, β-fenylethylamin
fermentovaná zelenina	*Lactobacillus plantarum, Pediococci sp., Leuconostoc mesenteroides*	histamin, kadaverin, putrescin tyramin, tryptamin
fermentované sojové produkty	*Rhizopus oligosporus, Trichosporon beiglli, Lactobacillus plantarum*	histamin, kadaverin, putrescin tyramin, tryptamin

3.3. Význam biogenních aminů

Kromě jejich biologické funkce zdroje dusíku a role prekurzorů pro syntézu hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a proteinů, jsou aminy také důležitou složkou potravinového aroma a potenciálními prekurzory pro tvorbu karcinogenních N-nitroso sloučenin.[3]

Biogenní aminy řazené mezi protoalkaloidy rostlin (hordenin a gramin), jsou stavebními látkami pro biosyntézu fytohormonů ze skupiny auxinů, alkaloidů a dalších sekundárních metabolitů rostlin.[5] V živočišných tkáních mají biogenní aminy funkci tkáňových hormonů (histamin) nebo jsou prekurzory hormonů nadledvinek živočichů (katecholaminy).[5] Bylo dokázáno, že tyramin má prokazatelný antioxidační účinek, který se s koncentrací tyraminu zvyšuje, tento účinek se přisuzuje jeho amino a hydroxy skupinám.[3] Některé druhy aminů jako jsou katecholaminy, indolaminy a histaminy, plní důležité metabolické funkce, zvláště v nervovém systému a při kontrole krevního tlaku. Zvýšení krevního tlaku způsobuje fenylethylamin a tyramin, naproti tomu histamin krevní tlak snižuje. Histamin slouží jako primární mediátor symptomů pozorovaných při alergických reakcích. Aminy putrescin, kadaverin a agmatin zvyšují toxicitu histaminu u lidí, snižováním oxidace histaminu.[3]

Polyaminy (spermidin a spermin) jsou nezbytné složky všech živých buněk, neboť jako vícefunkční kationty, plní řadu významných biologických rolí. [3,5] Nejvýznamnější z nich

je stabilizace buněčných membrán a účast při dělení a růstu buněk, tedy proteosyntéze a biosyntéze nukleových kyselin.[4,5] Polyaminy podílející se na biologických pochodech u živočichů pocházejí ze tří zdrojů: vytvářené v buňkách (endogenní), produkované mikroflórou trávicího traktu a také přijímané potravou. Za důležitý je považován zvýšený příjem potravních polyaminů pro urychlení hojení ran, popálenin, vývoj a obnovu střevní mukózy apod. Naopak by měl být jejich příjem potravou nejnižší u osob s nádorovými onemocněními. V mladých, rychle rostoucích a metabolicky aktivních tkáních, např. v játrech a ledvinách, je obsah polyaminů zvýšený. Téměř obecně platí, že v živočišných produktech je více sperminu než spermidinu, zatímco u produktů rostlinných je tomu naopak.[3, 4, 5]

3.4. Výskyt biogenních aminů

Prakticky všechny potraviny obsahují biogenní aminy jako běžné produkty metabolismu.[5] Celkové množství aminů závisí na povaze potravin a přítomných mikroorganismů.[3]

U potravin v pokročilém stupni kažení a při nevhodném skladování se vyskytují vysoké koncentrace biogenních aminů. Působením kontaminující mikroflóry během skladování vznikají hlavně v rybách a v mase.[5]

Odstranění vzniklých biogenních aminů z potravin je velice obtížné, ale použitím diaminooxidasy můžeme dosáhnout snížení jejich koncentrace, v praxi není tento postup použitelný. V tepelně zpracovaných výrobcích dochází k částečnému snížení obsahu aminů jejich reakcí s redukujícími cukry, resp. s rozkladnými produkty cukrů.[5]

3.4.1. Nefermentované potraviny

Mezi nefermentované potraviny obsahující biogenní aminy patří ryby, maso, mléko, ovoce, zelenina a džusy.[3]

Přítomnost biogenních aminů nad jistou hladinu, je v nefermentovaných potravinách považováno za indikátor nežádoucí mikrobiální aktivity. Lze proto obsah některých z nich využít jako indikátoru čerstvosti. Avšak přítomnost biogenních aminů v potravinách nutně nemusí vzájemně souviset s růstem organismů kažení, protože v potravinách nejsou všechny dekarboxylázy pozitivní. Např. během kažení mas a ryb se hladiny histaminu, putrescinu a kadaverinu obvykle zvyšují, zatímco hladiny sperminu a spermidinu se během tohoto procesu snižují.[3, 5]

Hlavními biogenními aminy v mase a rybách bývají histamin, kadaverin, putrescin a tyramin. Při skladování masa dochází k růstu obsahu biogenních aminů vlivem enzymové aktivity přítomné mikroflóry. Obsah kadaverinu a putrescinu v čerstvém vepřovém mase např. činí do 7 $mg.kg^{-1}$, zatímco ve zkaženém mase 60 $mg.kg^{-1}$ a více. Při vaření dochází pouze k částečnému vyluhování a rozkladu biogenních aminů, má tedy relativně malý vliv na obsah. Vyšší úbytky nastávají při pečení a smažení než při vaření a dušení.

Také v potravinách rostlinného původu se vyskytují biogenní aminy, bývají jejich přirozenou součástí. V ovoci a zelenině bývá hlavním biogenním aminem tyramin a řada dalších se vyskytuje v menším množství, často ve formě konjugátů se skořicovými či mastnými kyselinami. Ve významném množství se v některých rostlinách nacházejí různé deriváty biogenních aminů, běžně se řadící mezi protoalkaloidy.[5]

3.4.2. Fermentované potraviny

Mezi fermentované potraviny obsahující biogenní aminy řadíme potraviny, které prošly procesem fermentace (kvasný proces), jako jsou sýry, mléčné výrobky, fermentovaná zelenina, fermentované masové výrobky, víno, pivo a fermentované rybí výrobky. Biogenní aminy se v nich nacházejí ve vyšším množství, z důvodu nutné přítomnosti mnoha druhů mikroorganismů během fermentace, z nichž některé jsou schopny produkovat biogenní aminy.[3,5] V současnosti by neměly používané startovací kultury vykazovat žádnou dekarboxylační aktivitu aminokyselin, nebo jen velmi nízkou.[5]

Ve většině produktů, obsahujících bakterii mléčného kvašení, je obsaženo značné množství putrescinu, kadaverinu, histaminu a tyraminu.[3]

V mnoha druzích sýru byly nalezeny aminy jako histamin, tyramin, kadaverin, putrescin, tryptamin a fenylethylami. Histamin a tyramin se značně liší v množství vyskytujícím se mezi rozdílnými druhy sýrů, ale i v jejich rámci.[3]

Nárůst obsahu biogenních aminů je patrný zejména u zrajících sýrů, a to hlavně v počátečních fázích fermentace výrobků a je také závislý na druhu přítomných mikroorganismů. Avšak při dodržování správných hygienických zásad a dobré technologii, tedy vyloučením vlivu kontaminující mikroflóry, obsahují i dlouhodobě zrající sýry jen poměrně malá množství biogenních aminů. Vznik biogenních aminů v trvanlivých sýrech vyvolávají mikroorganismy zpracovávané suroviny. Jiná situace nastává u sýrů z

nepasterizovaného mléka (především ovčího a kozího), které se často připravují v malých výrobnách s hygienickými nedostatky i ve vyspělých zemích.[5]

3.5. Reakce a změny

Biogenní aminy jsou reaktivní látky. Kromě enzymových reakcí, vedoucích k derivátům biogenních aminů a dalším sloučeninám, mohou biogenní aminy poskytovat aldehydy, oxidativní deaminací.

Amidy mastných kyselin vznikají dlouhodobým skladováním nebo za zvýšení teploty reakcí biogenních aminů s triacylglyceroly. Příslušné iminy jsou produkty reakcí neenzymového hnědnutí nebo oxidací aminů, např. peroxidem vodíku nebo hydroperoxidy lipidů. Karcinogenní nitrosaminy se mohou tvořit reakcí oxidů dusíku se sekundárními aminy. Aminy fenylethylamin, putrescin, histamin, spermidin a tyramin reagují s bílkovinami za vzniku β-N-substituovaných derivátů diaminopropionové kyseliny. Reakcí tryptaminu s aldehydy vznikají ve vínech a dalších alkoholických nápojích deriváty β-karbolinu.[3, 5]

3.6. Biologické účinky biogenních aminů

Biogenní aminy potravin s výraznějšími nepříznivými účinky na lidské zdraví jsou histamin a tyramin, třetím co do účinnosti je 2-fenylethylamin. Zvýšený obsah diaminů putrescinu a kadaverinu slouží především jako indikátor nedostatků v technologii zpracování a skladování potravin a potravních surovin. Výskyt tryptaminu a agmatinu je vesměs nízký a není spojován a nežádoucím působením na lidské zdraví.

Biogenní aminy (v užším pojetí bez polyaminů spermidinu a sperminu) se ve vysokých koncentracích mohou mít toxikologické účinky a projevovat se jako látky psychoaktivní nebo vasoaktivní. Psychoaktivní aminy působí jako přenašeči v centrálním nervovém systému, vasoaktivní aminy působí přímo nebo nepřímo na vaskulární systém.[4, 5]

Vasoaktivní aminy můžeme podle účinku dělit na:

- vasokontraktibilní aminy (např. tyramin)
- vasodilatační aminy (např. histamin)

Mezi symptomy konzumace vysokých dávek biogenních aminů patří dýchací potíže, zvracení, bušení srdce, pocení, hypotenze (histamin) nebo hypertenze (tyramin) a migrény (fenylethylamin, tyramin).[4]

Toxický účinek biogenních aminů je silně ovlivněn aktivitou enzymů monoaminoxidasa a diaminooxidasa, které je ve střevech odbourávají. Tato aktivita se může různit u jednotlivých jedinců a v závislosti na řadě faktorů, např. na přítomnosti inhibitorů (určitá léčiva, alkohol) nebo potenciátorů. Vysoké koncentrace biogenních aminů již není enzymový systém schopen odstranit.

Většina známých intoxikací jídlem, způsobena biogenními aminy, souvisí s histaminem. Otravy histaminem (histaminóza) ze sýru a ryb a výrobků z nich, jsou jednou z nejčastějších příčin otrav vyvolávaných potravinami (alimentárních intoxikací). Za nebezpečnou pro člověka považujeme koncentraci histaminu vyšší než 500-100 $mg.kg^{-1}$. Zvýšené množství histaminu může vyvolat anafylaktický šok.

Nejvyšší povolené množství je v řadě zemí předepsáno pouze u histaminu a tyraminu, neboť znalosti o toxicitě ostatních biogenních aminů nejsou dostatečné. Z důvodu mnoha faktorů, které je nutné při hodnocení toxického účinku zvažovat (množství spotřebované potraviny, přítomnost jiných toxických látek apod.) je velice obtížné stanovit hranici toxicity biogenních aminů.[3, 5]

3.7. Analytické metody stanovení biogenních aminů

Jsou dva důvody pro stanovení aminů v potravinách, prvním je jejich potencionální toxicita a druhým důvodem je možnost užití biogenních aminů jako ukazatelů kvality potravin.[2] Bylo publikováno mnoho různých metod pro izolaci a odhad aminů, ale neexistuje jediná kvantitativní analytická metoda pro stanovení biogenních aminů ve všech potravinách.[4]

Současnými metodami analýzy biogenních aminů jsou tenkovrstvá chromatografie (TLC), plynová chromatografie (GC), kapilární elektroforéza (CE) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).[2] HPLC pracující v systému reverzních fází (RP-HPLC) je v praxi nejpoužívanější metodou.[18]

Nejběžnějšími problémy, se kterými se setkáváme při analýze biogenních aminů v potravinách je složitá matrice vzorku, přítomnost potenciálních interferentních sloučenin a výskyt několika biogenních aminů současně ve stejném alikvotním podílu. Pro extrakci biogenních aminů je nejčastěji používaná kyselina chloristá (v různých koncentracích), trichloroctová, chlorovodíková (0,1M) a organická rozpouštědla (methanol, aceton, acetonitril – $HClO_4$ a dichlormethen – $HClO_4$).[19] Kromě extrakce kapalinou se využívá také extrakce na pevné fázi.[4,20] Vzorky se většinou homogenizují v mixérech nebo homogenizérech,

centrifugují a filtrují. Kvůli detekci nebo také nízké koncentraci biogenních aminů je většinou potřeba vzorky derivatizovat na deriváty vysoce absorbující nebo fluoreskující.[21]

Uplatnění zde nachází také enzymatické metody, které byly vyvinuté pro stanovení mikroorganismů produkujících biogenní aminy a jsou specifické pro bakterie produkující histamin. Většina z těchto metod je založena na produkci peroxidu vodíku, působením enzymu oxidázy na histamin. Enzymatické testy jsou obecně založeny na následné aktivitě dvou enzymů: diamin oxidáze (DAO) a avidin peroxidáze.[22, 23, 24]

3.7.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

V současnosti je HPLC díky své všestrannosti, přesnosti, citlivosti, účinnosti a reprodukovatelnosti jednou z nejčastěji používaných technik.

Při analýze biogenních aminů HPLC se nejčastěji používá systém reverzních fází, s derivatizací dansyl chloridem nebo o-ftalaldehydem, detekován UV nebo fluorimetrickým detektorem.

Dalšími možnými činidly pro derivatizaci jsou např. dabsyl chlorid, 4-chloro-7-nitrobenzofurazan, 1,2-naftochinon-4-sulfonát, benzoyl chlorid nebo fluorescein. Používá se také N-acetylcystein nebo 2-merkaptoethanol, jejich deriváty však nejsou moc stabilní. Derivatizace bývá předkolonová (sýry, ryby) nebo postkolonová (sýry, víno, kyselé zelí), a v případě použití konduktometrického detektoru není derivatizace nutná. Detekce bývá ještě prováděna spektrofotometrickým, konduktometrickým, ampérometrickým nebo také DAD detektorem.

V analýze biogenních aminů HPLC se také využívá gradientové eluce, ion-párové HPLC a stále běžnější bývá spojení HPLC a MS. [4, 17, 20, 22, 25, 26, 27, 28, 29]

3.7.2. Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie má mnoho výhod, jako je jednoduchost, všestrannost nebo použitelnost na velké množství vzorků v minimálním čase.

Extrakty jsou naneseny a rozseparovány na vrstvě celulózy nebo silikagelu, kterým jsou pokryty skleněné nebo hliníkové destičky, převážně vícenásobnou vyvíjecí technikou. Poté jsou BA derivatizovány nejčastěji dansylchloridem a kvantifikovány densitometrem při 330 nebo 254 nm. Pro tenkovrstvou chromatografii byly zkoumány odlišné systémy rozpouštědel, které by byly méně škodlivé a zlepšovaly separaci větších skupin biogenních

aminů. Jako třeba systém rozpouštědel chloroform – ether – triethylamin (6:4:1) a dále chloroform – triethylamin (6:1).[2, 4, 22, 30, 31]

3.7.3. Plynová chromatografie

Plynová chromatografie se pro analýzu biogenních aminů používá nejčastěji ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS), může být také kombinovaná s ion-párovou extrakcí. Derivatizuje se bromidem pentafluorobenzylu, anhydridem kyseliny heptafluoromáselné, pentafluorobenzaldehydem nebo trifluoroacetyl acetonem.

Byla vyvinuta metoda pro rychlé stanovení histaminu v rybách a rybích produktech, kdy odpadá krok derivatizace. Vzorek byl jednoduše extrahován alkalickým metanolem a poté nastříknut na kolonu. [2, 32-36]

3.7.4. Kapilární elektroforéza

Mezi elektromigračními metodami, využívanými pro analýzu biogenních aminů, převažuje kapilární zónová elektroforéza. Také zde je většinou nutná derivatizace, i když byla vyvinuta i metoda bez přečišťování vzorku a derivatizace.[29]

Při srovnání kapilární elektroforézy s HPLC podaly obě metody uspokojivé výsledky co do citlivosti, detekčního limitu, reprodukovatelnosti a přesnosti, ovšem CE je rychlejší a nevyžaduje složitou předběžnou úpravu vzorku.[37] CE s derivatizací naftalen-2,3-dikarboxyaldehydem (NDA) a fluorescenční detekcí byla použita pro současné stanovení histaminu a histidinu, pro svou rychlost a citlivost.[38]

Mezi nejčastější způsob detekce patří laserem indukovaná fluorescence, dále se využívá např. pulzní ampérometrické detekce (PAD), detekce diodovým polem (DAD diode-array detection) nebo UV detekce.[39-41] Jako derivatizační činidlo kromě výše zmíněného NDA byl použit 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol, o-ftalaldehyd (OPA) nebo fenylizotiokyanát (FITC). [42-48]

Ačkoli je preferovaná postkapilární (post-capillary) derivatizace, která probíhá až po separaci a vymigrování vzorků z kapiláry, využívá se i derivatizace před analýzou, tzv. předkapilární (pre-capillary) a také přímo na koloně (on-capillary).[21]

Kromě výše zmíněných metod byla ještě použita také micelární elektrokinetická kapilární chromatografie, která spojuje chromatografický a elektroforetický separační mechanismus.[21, 49-53]

4. Sýry

Sýr je obecné pojmenování pro skupinu fermentovaných produktů na bázi mléka, vyráběných ve velké škále chutí a druhů po celém světě.[54]

V západním světě se setkáváme se sýry, které jsou vyrobeny především ze tří druhů mléka: kravského, kozího a ovčího, ale v menší míře také buvolího. V jiných částech světa se využívá ještě mléko dalších zvířat, jako jsou osli, koně, jaci, sobi, velbloudi, zebu nebo dromedáři. Každý z těchto sýru se odlišuje od ostatních specifickou chutí. Kravské mléko obsahuje méně bílkovin a tuku než mléko ovčí. Kozí mléko, díky přítomnosti zvláštních mastných kyselin, tvoří v sýru svěží, ostrou chuť. [7, 55]

Sýry mohou být vyrobeny z nepasterizovaného nebo pasterizovaného mléka. Pasterizace snižuje rizika epidemiologických onemocnění, zajišťuje standardní kvalitu, avšak chuť je méně výrazná, neboť v ošetřeném mléce se zároveň s eliminací většiny škodlivých mikroorganismů ničí také mléčné bakterie a přirozená mikroflóra, která způsobuje typickou chuť a rozmanitost krajových specialit. Dnes platí v rámci Evropské unie hygienická a zpracovatelská nařízení, která vyplynula z případů onemocnění listeriózou z nepasterizovaného mléka.[55]

Ačkoli se procento složek v mléku liší druh od druhu, ale také zvíře od zvířete, neboť kvalita mléka a obsah všech složek závisí na prostředí, ve kterém se zvíře, jež mléko produkuje, chová. Mléko obsahuje vodu, tuky (tukové globule), mléčné bílkoviny (zejména kasein), mléčný cukr laktózu, minerální látky (vápník, hořčík, fosfor), spolu s malým množstvím pigmentů, enzymů, vitamínů (vitamínů B-komplexu rozpustných ve vodě, dále A, C, D, E a K rozpustných v tucích), stopových prvků (zinek, jod, železo) a bakterií. Sýry navíc z výroby obsahují také syřidlo, mléčnou kulturu a sůl. Někdy se přidávají ještě bakteriální a plísňové kultury.

Sýry mají prokazatelný antibakteriální účinek, jenž je způsoben přítomností celé skupiny látek, včetně těkavých, které jsou zodpovědné za výrazné sýrové aroma. Konzumací sýrů zvyšujeme svou odolnost a obohacujeme svoji střevní mikroflóru. Přesto mohou být sýry pro některé lidi nebezpečné, mají totiž (zvláště ty starší, dlouhozrající) vyšší hladinu histaminu, zodpovědného za alergické reakce.[7, 55, 56]

4.1. Výroba sýra

Hlavním krokem při výrobě sýra je srážení kaseinu. To se provádí buď tzv. syřidlem nebo okyselením.

Syřidlo štěpí vazbu přesně mezi dvěma aminokyselinami v molekule kappa – kaseinu, čímž se z něj odštípne rozpustná část, jež zmizí v roztoku. Nerozpustná část zůstává na povrchu, ale na stabilizaci micely už nestačí, neboť méně přitahuje vodu. Shluknutím jednotlivých micel vzniká sraženina. Teplotou lze tento proces ovlivnit. Mléko se tedy lehce zahřívá ne teplotu sýření (kolem 30 °C) nebo se pasterizuje (15 – 40 sekund se zahřívá na teplotu 72 – 74 °C) a poté se ochladí na teplotu sýření (15 – 40 °C). Nejlépe se srážení provádí působením enzymu zvaného chymosin, který se vyskytuje v žaludku mláďat, jelikož je ale přírodních syřidel nedostatek, sráží se sýry alternativními látkami, které se získávají z plísní nebo rostlin (např. ze šťávy z artyčoku - enzymy proteinázy). V posledních letech je také dostupný chymosin získaný pomocí genového inženýrství.

Druhou možností srážení mléka je jeho okyselením. Jelikož jsou micely od sebe odpuzovány zápornými náboji nacházejícími se na povrchu, při okyselení (např. přidáním octa nebo kyseliny vinné) tyto náboje zmizí a do roztoku se uvolňuje vápník. Výsledkem je sraženina. Sražení se opět může urychlit zahřátím.

Výroba sýra vyžaduje přesný technologický postup, jeho kvalita a chuť je velmi zásadně ovlivněna dávkou enzymu, dobou štěpení či teplotou.[55, 56]

4.2. Druhy sýrů

Tak jako existují nejrůznější druhy sýra, tak je i několik druhů jejich dělení. Dělí se podle typu mléka, tvrdosti, obsahu tuku, délky zrání, vzhledu nebo způsobu srážení.

Podle typu mléka se dělí sýry na sýry z kravského, ovčího a kozího mléka, nebo také lze rozlišovat sýry s pasterizovaného nebo nepasterizovaného mléka.

Konzistenci sýru určuje voda a tuk. Dělení podle typu mléka plyne z poměru mezi vodou a sušinou. Sýr, který obsahuje méně vody je sušší a tedy i tvrdší. Přebytečná voda se někdy odstraňuje solením. Vliv má také obsah syřidla, čím tvrdší sýr chceme vyrobit, tím více syřidla přidáme. Také teplota při srážení tvrdších sýrů bývá často vyšší (30 – 40 °C).

- Čerstvé sýry mají vysoký obsah vody a nedávají se zrát. Při jejich výrobě se používá jen malý přídavek syřidla a zákysová kultura. Řadíme k nim třeba tvaroh, lučinu, fromage frais, gervais nebo cottage.

- Měkké sýry procházejí krátkým zráním. Patří sem brie, camembert nebo brynza.
- Polotvrdé sýry jsou hutné, ale pružná struktury, lze je snadno krájet a zrají déle. Mezi takové sýry patří eidam, gouda, čedar či ementál.
- Tvrdé sýry dlouho zrají, mají nízký obsah vody a obsah tuku až 50 %. Krájí se obtížně, aniž by se nerozdrobily. Je to například parmezán a nebo pecorino.
- Tavené sýry se vyrábějí z jednoho nebo více druhů přírodních sýrů, které se rozemelou a zahřejí na teplotu 85 – 120 °C. Ke směsi se přidávají další látky jako máslo, tvaroh, rostlinný tuk apod. Přídavkem tzv. tavící soli, což jsou soli kyseliny fosforečné nebo citronové, se zabraňuje vysrážení bílkovin nebo oddělení tuků, tak že se upraví kyselost hmoty.[7, 55, 57]

Dělení dle obsahu tuku v sušině se také různí, ale obecně můžeme rozdělit sýry na vysokotučné, plnotučné, polotučné, nízkotučné a odtučněné.[58]

Dělením podle délky zrání pak můžeme sýry označit přívlastky, v závislosti na délce jeho zrání, např. jako mladý, uleželý, extra uleželý nebo přestárlý.

U dělení podle vzhledu se posuzuje jak vzhled kůry, tak i vzhled celého sýra od povrchu po vnitřek. Toto dělení je používáno ve Francii a sýry pak můžeme zařadit např. mezi sýry zrající pod mazem, sýry s plísní na povrchu nebo sýry s plísní v těstě.[7]

Podle způsobu srážení, kdy je zásadním kritériem způsob získání sraženiny na výrobu sýra, rozdělujeme sýry na kyselé a sladké. Pokud se mléko sráží kyselinou mléčnou, jež je produktem bakterií mléčného kvašení, jedná se o sýry kyselé. Při výrobě sladkých sýrů se mléko sráží syřidlem a získá se tak sýřenina.[58]

Jsou také sýry, které nespadají do žádné z výše popsaných kategorií, jako třeba mozzarella, kozí sýry nebo syrovátkové sýry (ricotta, serac).[7]

4.3. Zrání sýra

U některých druhů sýrů bývá následným procesem jejich zrání. Čerstvé sýry nezrají, ihned po odkapání se balí. Výjimkou jsou čerstvé kozí sýry, které procházejí krátkým obdobím zrání, jež trvá až dva týdny. Některé sýry, jako zrající pod mazovou kulturou nebo lisované sýry mohou zrát až tři měsíce a velmi velké lisované sýry dokonce vyzrávají déle než rok.

Na procesu zrání se podílejí mikroorganismy (kvasinky, bakterie a plísně) přeměňující laktózu na kyselinu mléčnou. Bílkoviny kaseinu se štěpí na aminokyseliny a kyselina mléčná, citronová i aminokyseliny se dále přeměňují na jednoduché těkavé látky. Štěpením tuků vznikají nejvýraznější aromatické sloučeniny. Uvolňují se z nich mastné kyseliny a vytvářejí až stovky jednoduchých těkavých látek, zejména ketonů a aldehydů. Při tomto procesu se uvolňuje oxid uhličitý, ten který nemůže unikat se hromadí v sýru a tak vznikají oka (Ementál).[55, 56]

4.4. Stanovení sýrů infračervenou spektrometrií

Využití infračervené spektrometrie a jejich technik při analýze sýrů je stále častěji předmětem zkoumání. Již dávno se nejedná pouze o prostou analýzu sýru,[59] ale byla již použita ke kontrole kvality, pravosti, [60] geografického původu [61] či předpovědi barvy sýru. [62] Dále byly pomocí IČ spektrometrie studovány [63] a rozlišovány mikroorganismy přítomné při zrání sýru, [64] a monitorovány jejich populace [65] a příspěvek při zrání (proteolytická aktivita).[65] Během zrání sýru byla touto metodou zkoumána stálost luteinu,[67] stanovovány vybrané volné aminokyseliny,[68] peptidy v sýrech s odlišnou dobou zrání [69] a pozorován rozdíl mezi plnotučným a odtučněným sýrem.[70] Také byla s její pomocí charakterizována stádia zrání [71] a sledována struktura bílkovin a interakční změny během skladování.[72] Díky své rychlosti měření a časově nenáročné přípravě vzorku, vzhledem k ostatním metodám, byla použita IČ spektrometrie k rychlému stanovení složení,[73] odhadu zralosti a senzorických vlastností,[74] předpovědi složení a kvality aroma,[75] analýze sýřeniny,[76] kontrole kvality během zpracování[77] a zhodnocení chemických parametrů (obsah tuku, sušiny, laktózy, vlhkosti, kyseliny mléčné, různých forem dusíku, organického fosforu a vázaného vápníku).[78-83]

II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5. Pracovní postup a instrumentace

5.1. Chemikálie a materiál

K analýze bylo použito šest různých druhů sýru, jež jsou popsány v tabulce III a IV. Pro volbu vhodného pH byl použit uzený plátková eidam (Miltra).

Tabulka III. Použité neuzené sýry a jejich specifikace.

druh mléka	země původu	označení
kravské	Itálie	Pecorino prato sardo stagionato
kozí	Itálie	Montasio in quarti
ovčí	Itálie	Caprottino Fresco

Tabulka IV. Použité uzené sýry a jejich specifikace.

druh mléka	země původu	označení
kravské	Španělsko	uzený sýr přírodní
kozí	Španělsko	uzený sýr kozí
ovčí	Holandsko	Manchego DOP

Použitý standard tyraminu (99 %) pro Ramanovu spektrometrii byl pořízen ze Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo). Použitou chemikálií k extrakci byl diethylether (p.a.) pořízený z firmy Penta (Praha, ČR) a NH_4OH (25 %, p.a.) z firmy Lachema (Neratovice, ČR). Dále byla použita deionizovaná voda (Millipore Direct – Q UV).

5.2. Instrumentace

5.2.1. Infračervená a Ramanova spektrometrie

Měření IČ spektrometrií bylo provedeno na FT-IR spektrometru Nicolet 6700 firmy Thermo Scientific s ATR nástavcem, se zdrojem záření EverGlo, detektorem DTGS KBr a KBr deličem paprsků. Spektra byla zaznamenávána ve střední oblasti IČ záření 4000 – 650 cm^{-1}, s rozlišením 4 cm^{-1} při 64 skenech.

Měření Ramanovou spektrometrií bylo provedeno na Nicolet NXR FT-Raman modulu, s laserem Nd:YAG, jako zdrojem záření (při síle laseru 1W, apertuře 150), detektorem InGaAs a CaF_2 deličem paprsků. Spektra byla zaznamenávána v oblasti 2500 – 400 cm^{-1}, s rozlišením 8 cm^{-1} při 128 skenech.

5.2.2. Lyofilizace

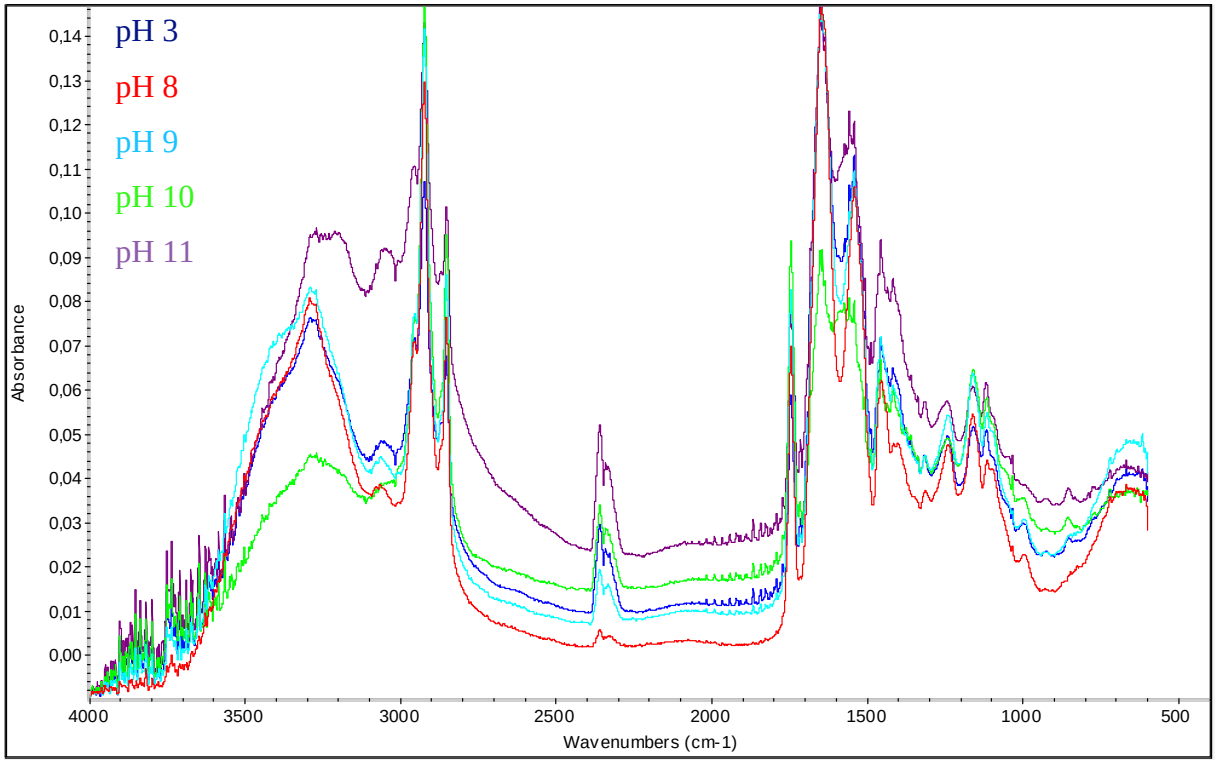
Lyofilizace byla provedena pomocí přístroje Alpha 1 – 2 LD plus firmy Christ. Celková doba sušení byla přibližně 20 hodin. Hlavní sušení probíhalo při teplotě - 42 °C a tlaku 0,097 mbar, konečné dosušování pak při teplotě - 66 °C a tlaku 0,0049 mbar.

5.3. Extrakce biogenních aminů

Pro extrakci bylo vždy naváženo 5 g přes noc lyofilizovaného sýru. Pro srovnání byla provedena také jedna extrakce čerstvého sýru. Navážka sýru byla smíchána s 20 ml destilované vody s přídavkem NH_4OH pro úpravu na pH 8. Toto pH bylo zvoleno po sérii extrakcí uzeného eidamu do diethyletheru při pH 3, 8, 9, 10 a 11 (obrázek 1). Při pH 8 bylo nejlepší rozlišení a nejvyšší intenzita píků.

Směs sýru a vody o pH 8 byla dána na 15 minut do ultrazvukové lázně a poté dekantována do děličky, kde k ní bylo přidáno 10 ml diethyletheru. Tato směs byla třepána po dobu 10 minut a poté ponechána v klidu. Po rozdělení vrstev byla horní vrstva nakápnuta na ATR krystal IČ spektrometru a po zaschnutí zaznamenána spektra.

Obrázek 1. Spektrum extrakce uzeného eidamu při pH 3, 8, 9, 10 a 11



5.4. Příprava vzorku pro měření Ramanovým spektrometrem

Lyofilizované sýry byly rozetřeny v třecí misce s tloučkem. Byl navážen vždy 1 g sýru a 5, 10 a 15 mg standardu tyraminu. Směs sýru a tyraminu byla zhomogenizována v třecí misce s tloučkem. Tablety čistých sýrů a sýrů s přídavkem 0,5 %, 1 % a 1,5 % tyraminu byly připraveny a změřeny Ramanovou spektrometrií třikrát.

6. Výsledky a diskuze

6.1. Infračervená spektra extraktů

Nebyl pozorován žádný výrazný rozdíl mezi spektry uzených (obrázek 2, 3 a 4) a neuzených sýrů (obrázek 5, 6, 7 a 8), druhů sýru podle mléka použitého k jeho výrobě či mezi jednotlivými sýry. Taktéž při porovnání spekter kravského neuzeného sýru, kdy byl pro srovnání extrahován jak sýr čerstvý (obrázek 6), tak i lyofilizovaný (obrázek 5), nebyl shledán výrazný rozdíl.

Nejvýraznější pásy ve všech spektrech sýrů se nacházejí kolem 3300 cm^{-1} a odpovídají valenčním vibracím OH skupin vody a valenčním vibracím NH skupin sekundárních aminů, amidů, polypeptidů a aminokyselin. Další dva intenzivní pásy leží poblíž 2922 cm^{-1} a 2852 cm^{-1}, doplněné pásem o malé intenzitě při 2954 cm^{-1}, jedná se o valenční symetrické a symetrické vibrace skupin CH_2 a CH_3, a spolu s intenzivním pásem při 1744 cm^{-1}, náležícím valenčním vibracím C=O skupin, přísluší lipidům.

Přítomnost laktózy potvrzují pásy vyskytující se ve spektrech okolo 1080 cm^{-1} a 1030 cm^{-1}. Absorpční pás okolo 1115 cm^{-1} je připisován valenčním vibracím skupin C-OH a C-O laktózy a monosacharidů.

Pro deformační vibrace NH skupin primárních aminů a NH_2 skupin amidů je charakteristický pás při 1650 cm^{-1} a také pás okolo 1640 cm^{-1}. Absorpční pás poblíž 1540 cm^{-1} vzniká díky deformačním vibracím NH skupin aminů a amidů. [8, 71, 73, 84, 85]

Tabulka V. Přehled absorpčních pásů (cm $^{-1}$) v infračervených spektrech sýrů a jejich přiřazení. [8, 71, 73, 84, 85]

Přiřazení adsorpčních pásů	**uzené sýry**			**neuzené sýry**		
	kravský	**kozí**	**ovčí**	**kravský**	**kozí**	**ovčí**
ν (OH), ν (NH)	3281	3290	3279	3289	3272	3356
ν_{as} (CH_2)	2955	2953	2954	2954	2955	2954
ν_{as} (CH_3)	2922	2922	2922	2922	2923	2922
ν_s (CH_3)	2852	2853	2853	2852	2853	2853
ν (C=O)	1744	1744	1743	1744	1743	1743
δ (NH_2), δ (NH)	1652	1652	1652	1652	1652	1652
δ (NH_2), δ (NH)	1636	1637	1647	1647	1635	1635
δ (NH)	1541	1541	1541	1541	1540	1540
δ (CH_3)	1456	1456	1457	1457	1457	1457
ν_s (COC)	1153	1154	1158	1157	1157	1160
ν (C-OH), ν (C-O),	1111	1111	1114	1118	1118	1116

pozn.: ν...valenční vibrace

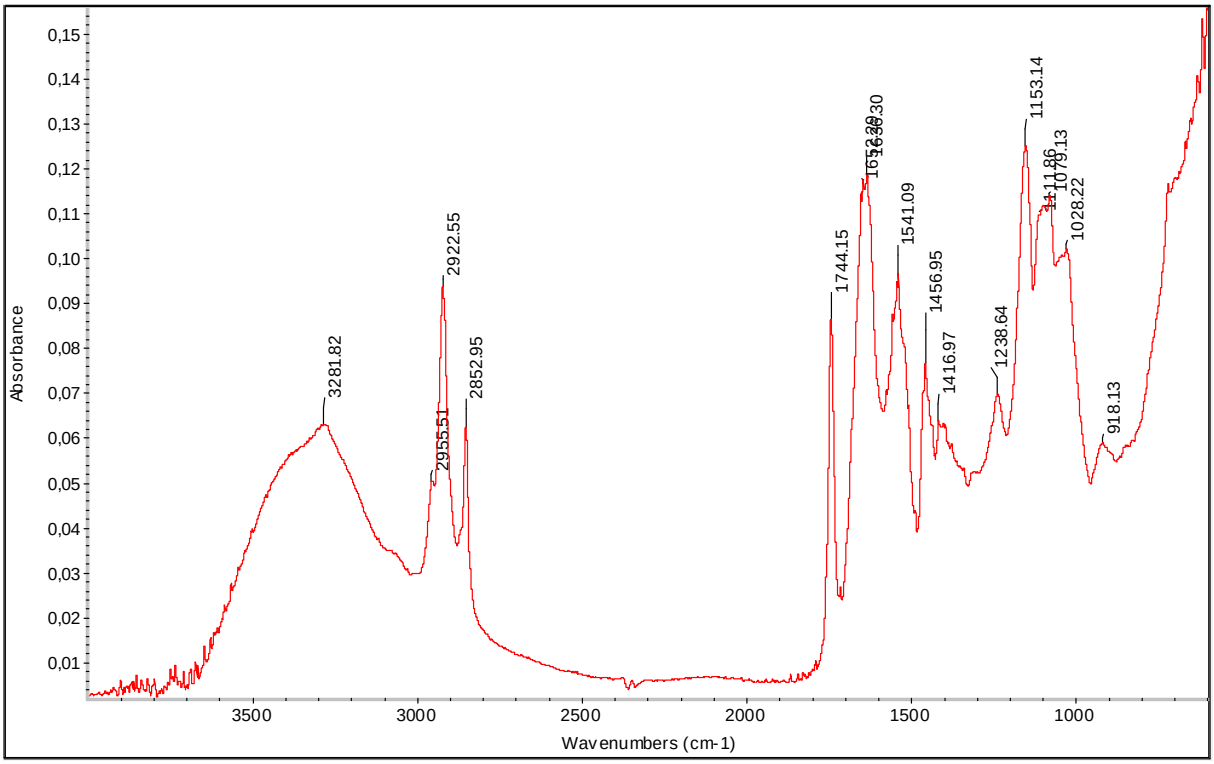
δ...deformační vibrace

as...asymetrická

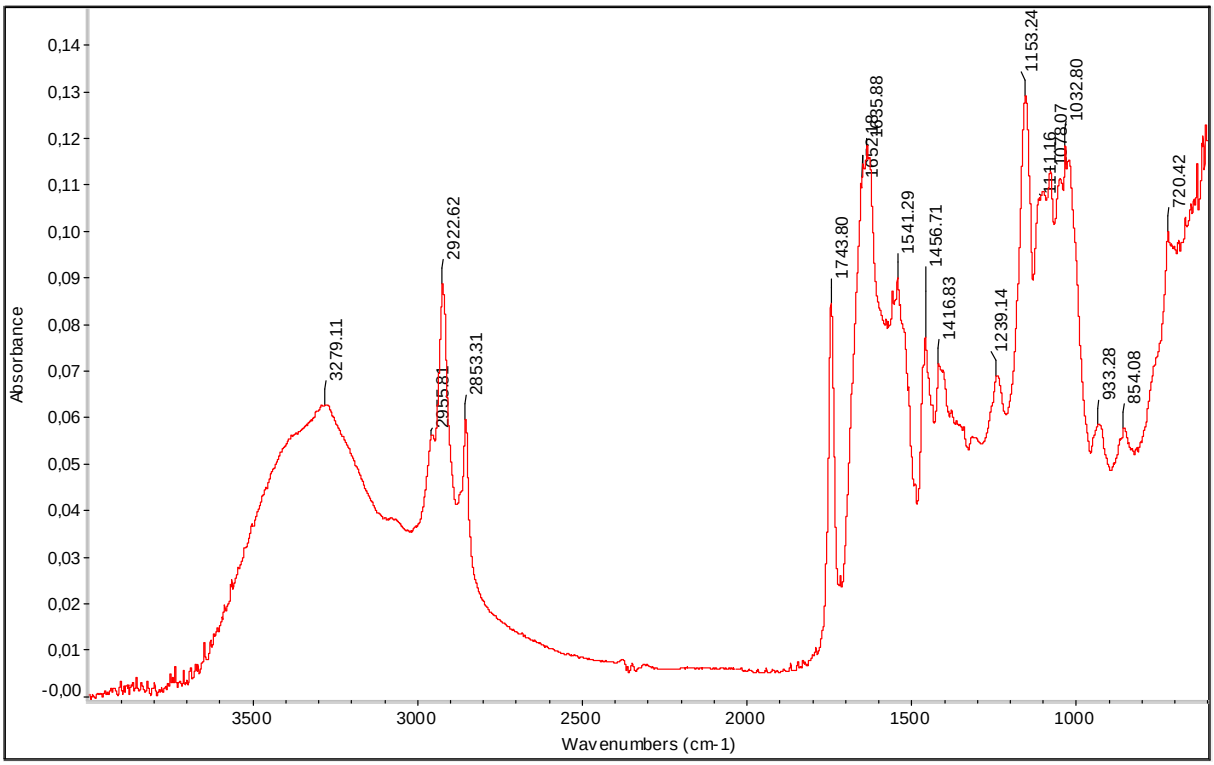
s...symetrická

6.1.1. Spektra uzených sýrů

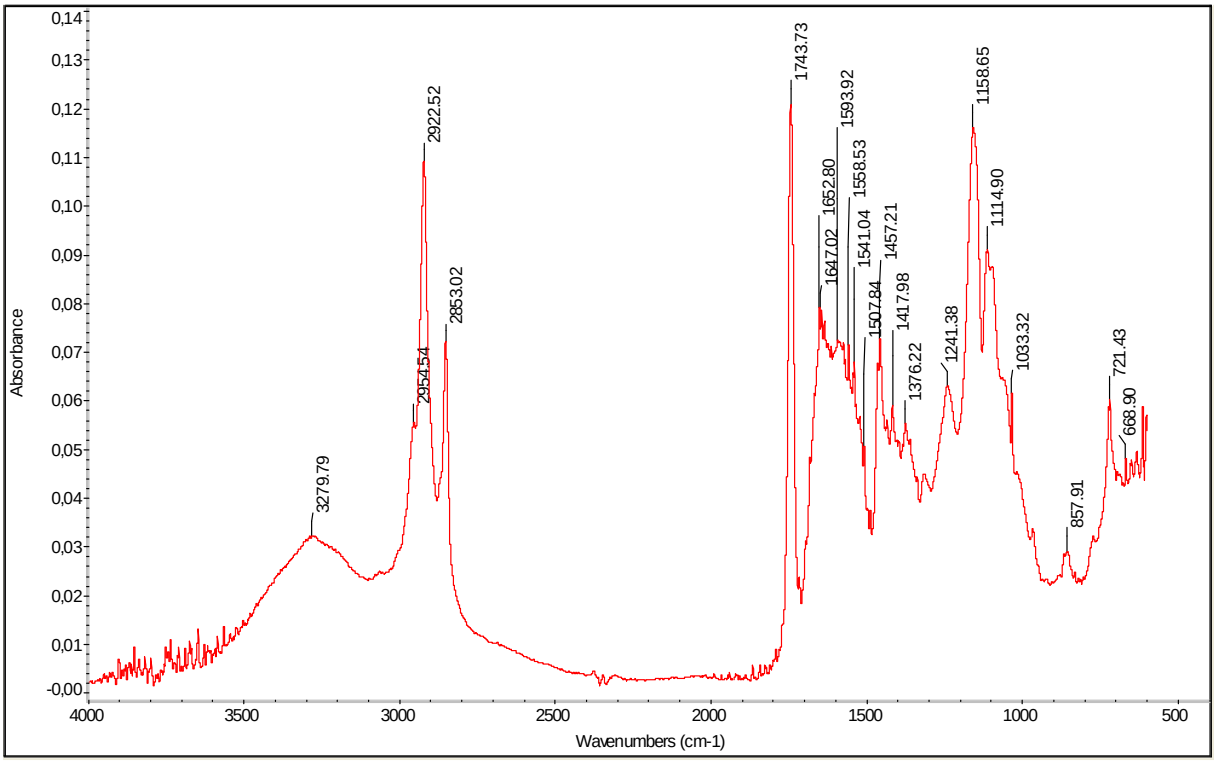
Obrázek 2. Spektrum uzeného kravského lyofilizovaného sýru po extrakci při pH 8



Obrázek 3. Spektrum uzeného kozího lyofilizovaného sýru po extrakci při pH 8

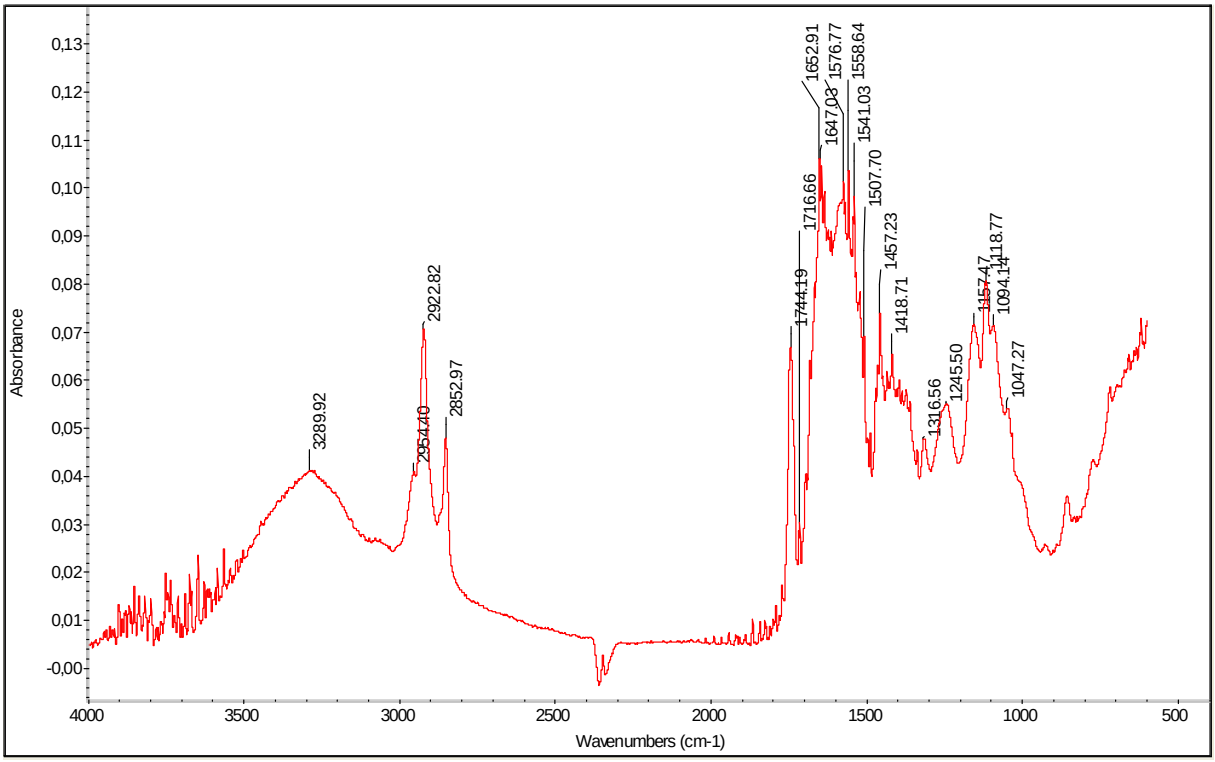


Obrázek 4. Spektrum uzeného ovčího lyofilizovaného sýru po extrakci při pH 8

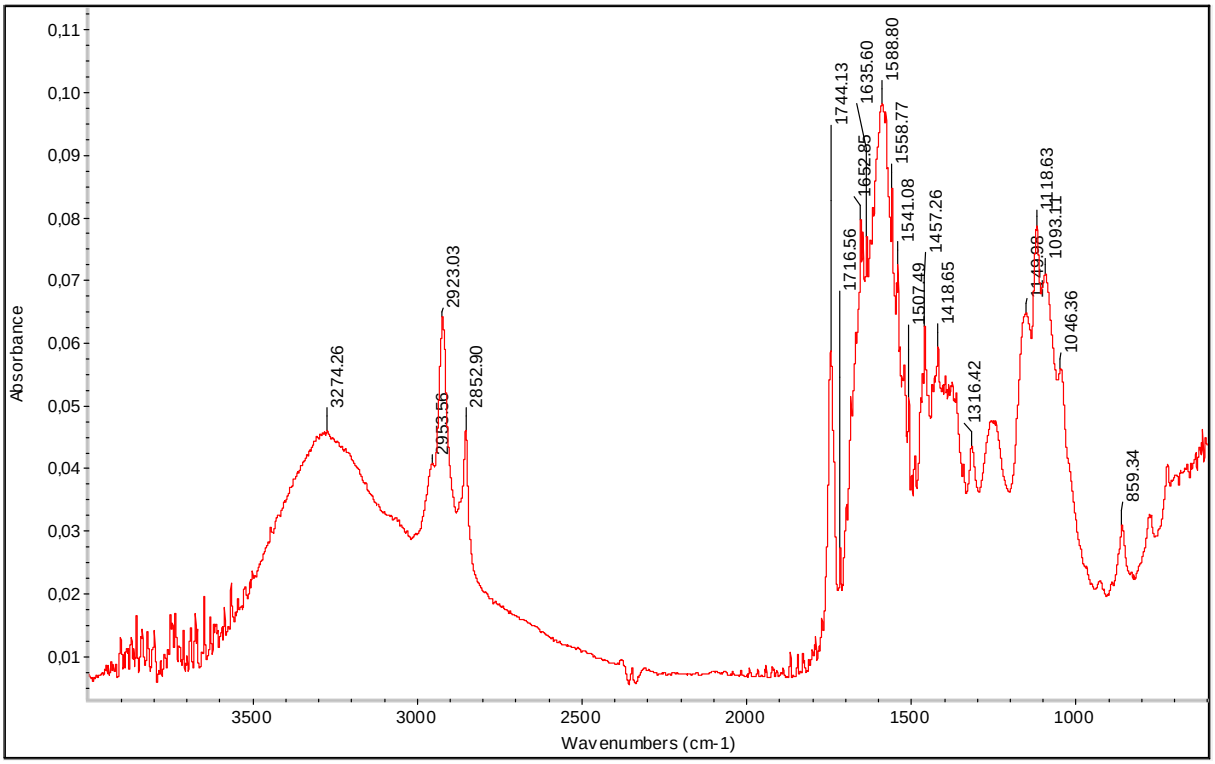


6.1.2. Spektra neuzených sýrů

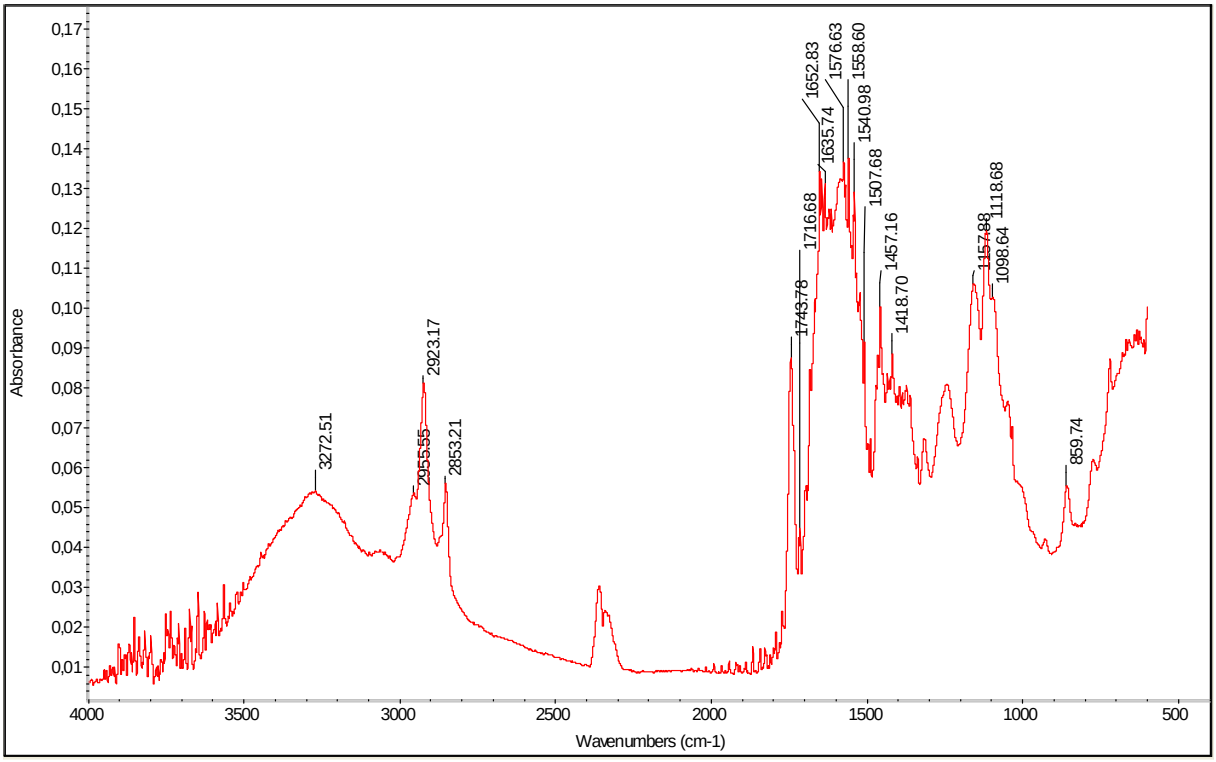
Obrázek 5. Spektrum neuzeného kravského lyofilizovaného sýru po extrakci při pH 8



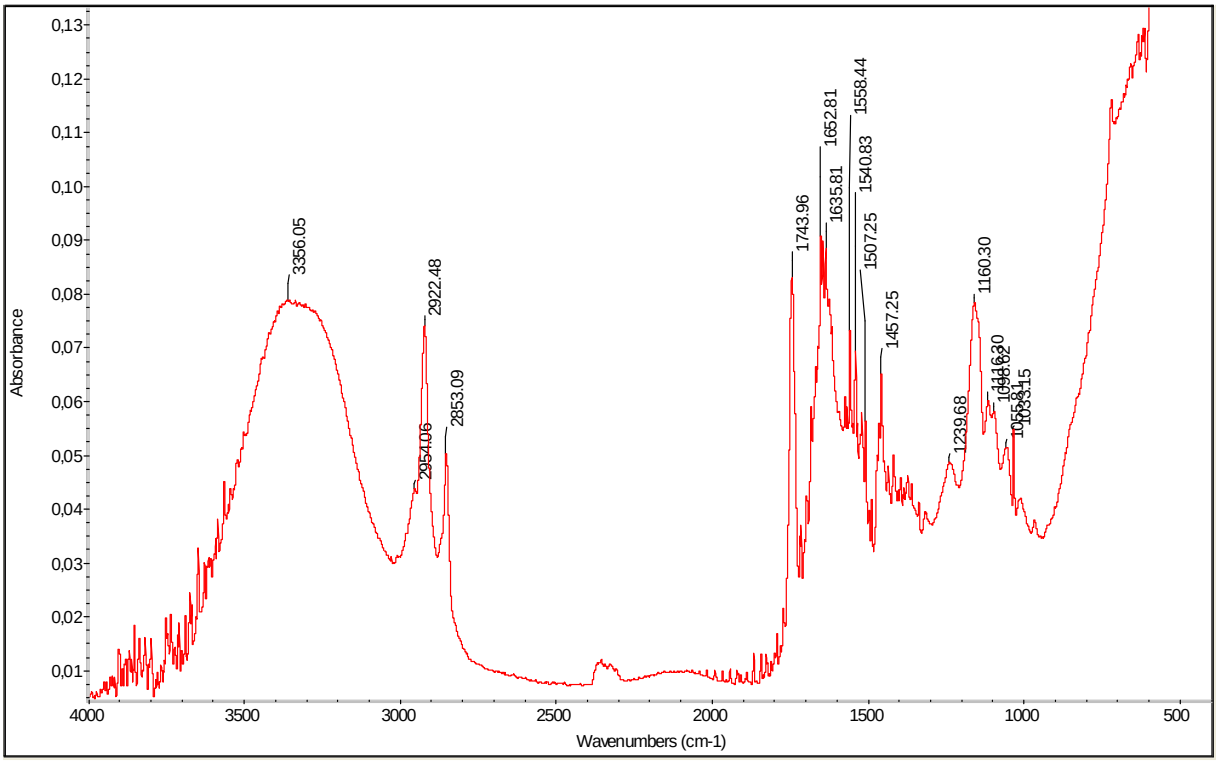
Obrázek 6. Spektrum neuzeného kravského čerstvého sýru po extrakci při pH 8



Obrázek 7. Spektrum neuzeného kozího lyofilizovaného sýru po extrakci při pH 8



Obrázek 8. Spektrum neuzeného ovčího lyofilizovaného sýru po extrakci při pH 8



6.2. Souhrnná diskuze

Extrakce rozpouštědlem o pH 8 odstranila interferujících sloučeniny a umožnila detekci hlavních sloučenin v sýrech. Slabě zásadité prostředí se ukázalo pro extrakci nejvhodnějším, což se odlišuje od publikovaných extrakčních postupů, které byly provedeny kyselým extrakčním činidlem.

Spektra ukázala celkové chemické složení extraktu sýru. Z absorpčních pásů bylo možné vyčíst přítomnost kyselin, esterů, alkoholů, peptidů a sacharidů. Avšak ze spekter nebylo možné odlišit sýr uzený a neuzený či jeho druhy. Spektra sýrů se shodovala se spektry v publikovaných článcích.[75, 73, 85, 86]

Nevýhodou extrakčního postupu byla nemožnost kvantifikace pomocí metody standardních přídavků, z důvodu velmi malé rozpustnosti tyraminu ve vodě. Také samotná metoda ATR se nejevila pro kvantifikaci vhodná, neboť i při dávkování stejného objemu vzorku nebyla vždy zaručena totožná tloušťka vzniklého filmu na krystalu. Intenzita pásů ve spektru se tedy lišila od celkové koncentrace chemických funkčních skupin ve vzorku.

Hlavní předností infračervené spektrometrie je její schopnost rychlého snímání spektra vzorku a nepříliš časově náročná úprava vzorku před měřením.

Přestože bylo možné infračervenou spektrometrií identifikovat absorpční pásy NH a NH_2 skupin nebylo možné jednoznačně identifikovat, zda patří biogenním aminům.

6.3. Ramanova spektra sýrů

V Ramanových spektrech tablet čistých sýrů se kvůli nižší intenzitě a horšímu poměru signál/šum obtížněji identifikovaly funkční skupiny. Ani v Ramanových spektrech nebyly zpozorovány žádné výrazné rozdíly mezi uzenými (obrázek 9, 10 a 11) a neuzenými sýry (obrázek 12, 13 a 14) či mezi jejich druhy.

Ve všech spektrech sýrů se nachází nejvýraznější pás při 1444 cm^{-1}, který odpovídá deformačním vibracím CH_2 skupin. Kolem 1659 cm^{-1} leží další intenzivní pás, jež spolu s pásem poblíž 1615 cm^{-1} přísluší deformačním vibracím skupiny NH_2 aminů a amidů. Přítomnost C-N skupin alifatických aminů dokazuje především výrazný pík při 1080 cm^{-1} a také jeho dva méně znatelné sousedící píky 1125 a 1004 cm^{-1}. Výrazný triplet pásů 1340, 1304 a 1270 cm^{-1} vzniká díky deformačním vibracím skupin CH_2, CH a CH_3. Deformační vibrace OH skupin mohou být překryty nebo být součástí tripletu či píku při 1444 cm^{-1}.[6, 8, 87]

Tabulka VI. Přehled absorpčních pásů (cm $^{-1}$) v Ramanových spektrech sýrů a jejich přiřazení. [6,8,87]

Přiřazení adsorpčních pásů	**uzené sýry**			**neuzené sýry**		
	kravský	**kozí**	**ovčí**	**kravský**	**kozí**	**ovčí**
ν (C=O)	1749	1743	1748	1746	1743	1750
δ (NH_2)	1657	1656	1658	1656	1661	1656
	1620	1619	1618	1615	1610	1617
δ (CH_2)	1443	1443	1444	1444	1445	1443
δ (CH)	1340	1340	-	1334	1344	-
δ (CH_3)	1304	1305	1304	1303	1305	1303
δ (CH)	1264	1278	1271	1272	1268	1275
ν (C-N)	1124	1127	1123	1124	1123	1124
ν (C-N)	1085	1080	1080	1084	1078	1082
ν (C-N)	1005	1003	1004	1004	1004	1004
ν_{sym} (COC)	881	877	880	878	875	873
	854	853	857	854	857	856

pozn.: ν...valenční vibrace

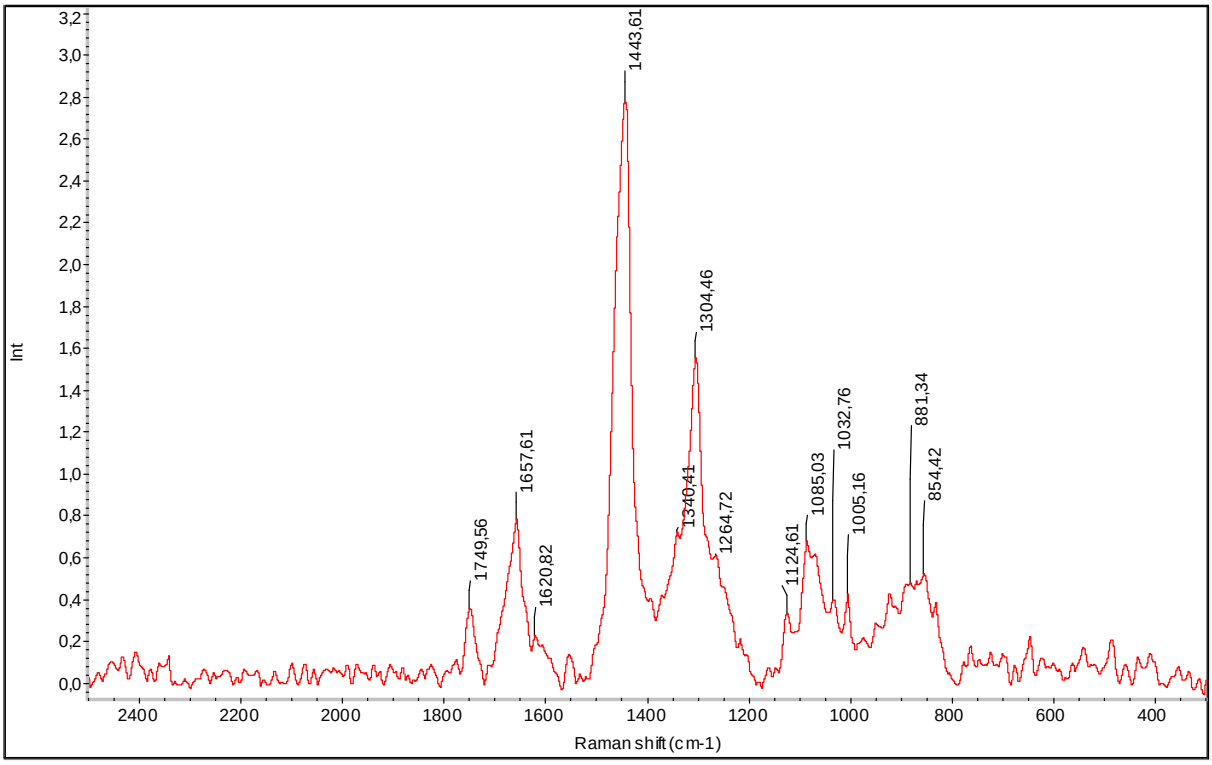
δ...deformační vibrace

as...asymetrická

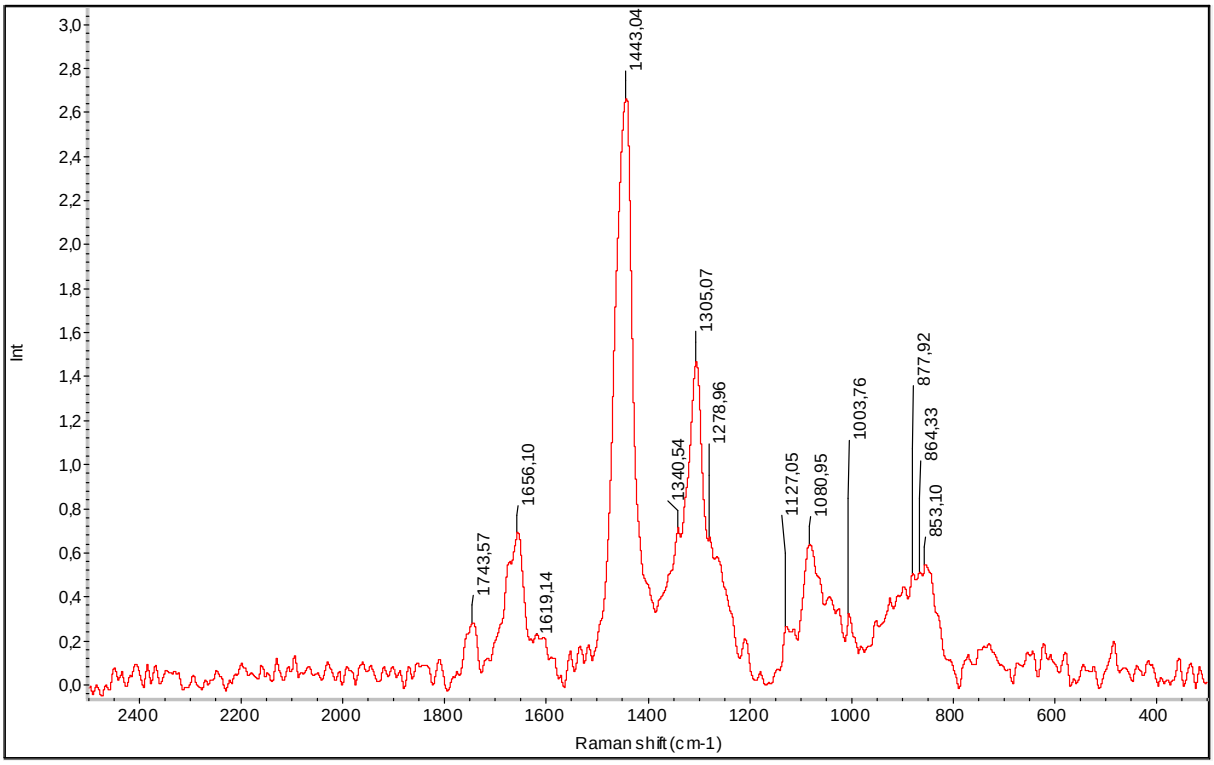
s...symetrická

6.3.1. Ramanova spektra uzených sýrů

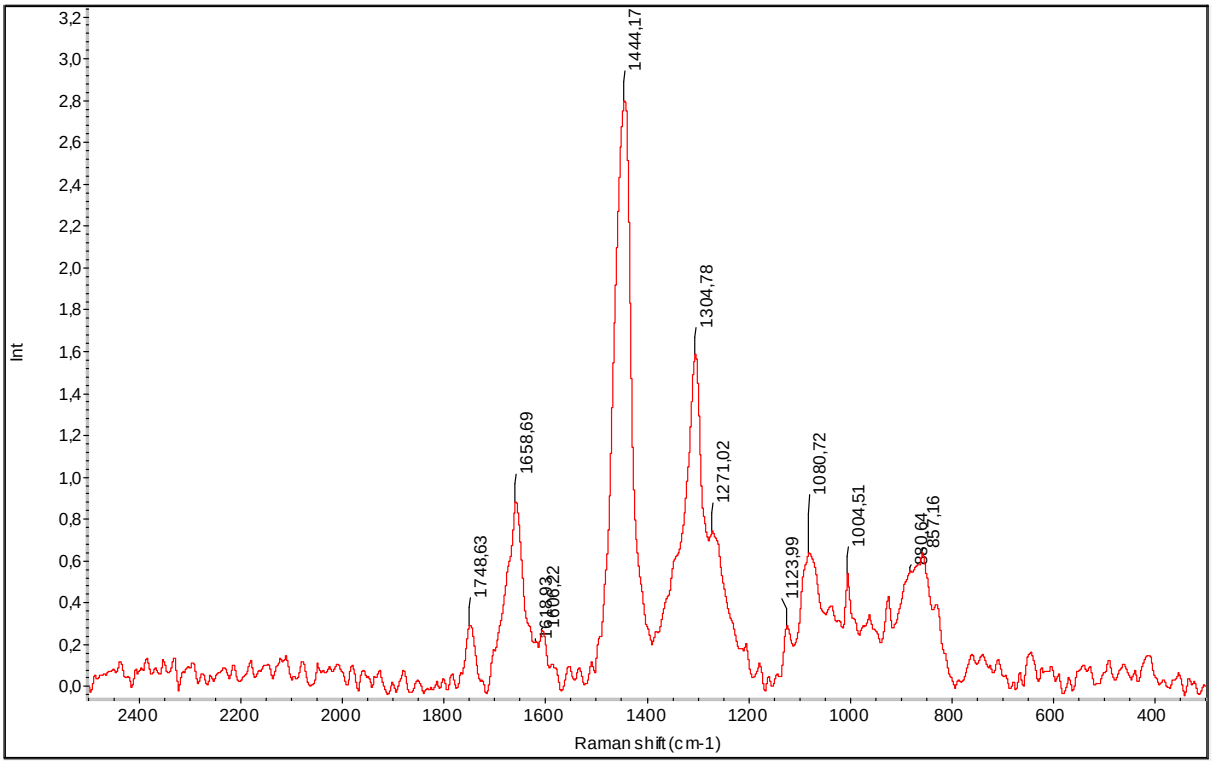
Obrázek 9. Spektrum uzeného kravského lyofilizovaného sýru



Obrázek 10. Spektrum uzeného kozího lyofilizovaného sýru

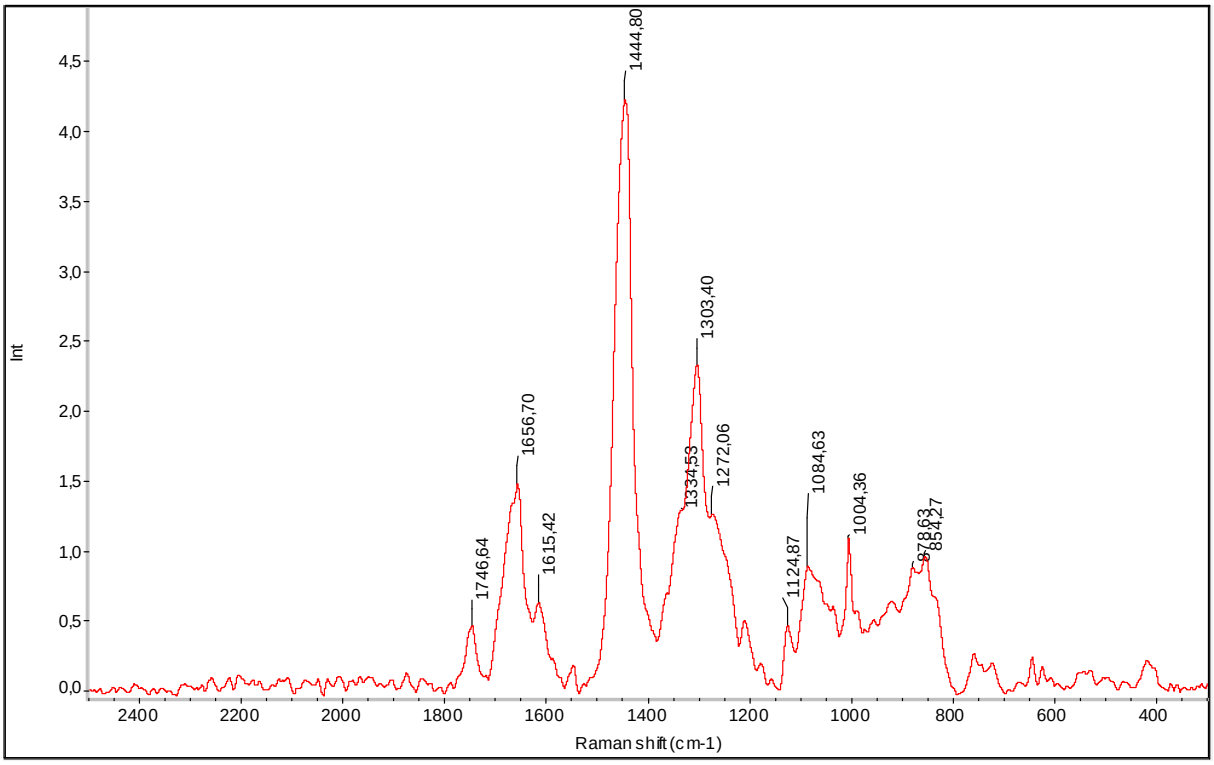


Obrázek 11. Spektrum uzeného ovčího lyofilizovaného sýru

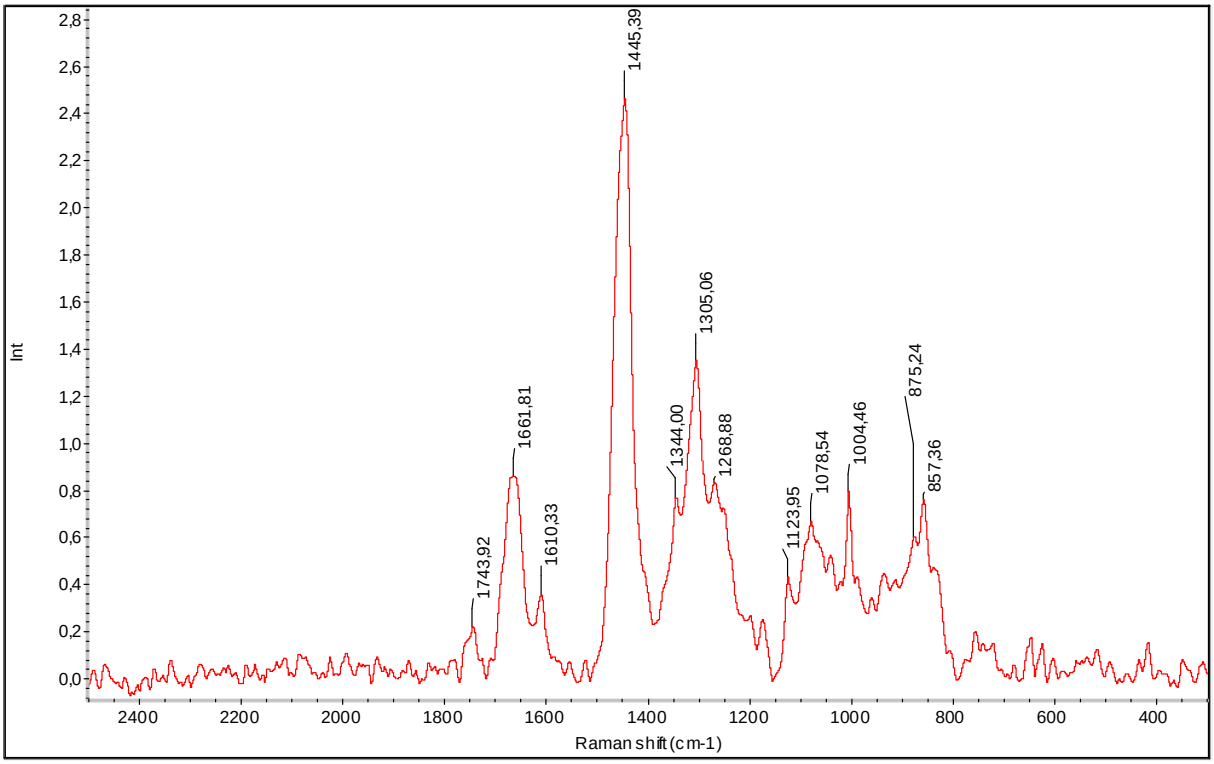


6.3.2. Ramanova spektra neuzených sýrů

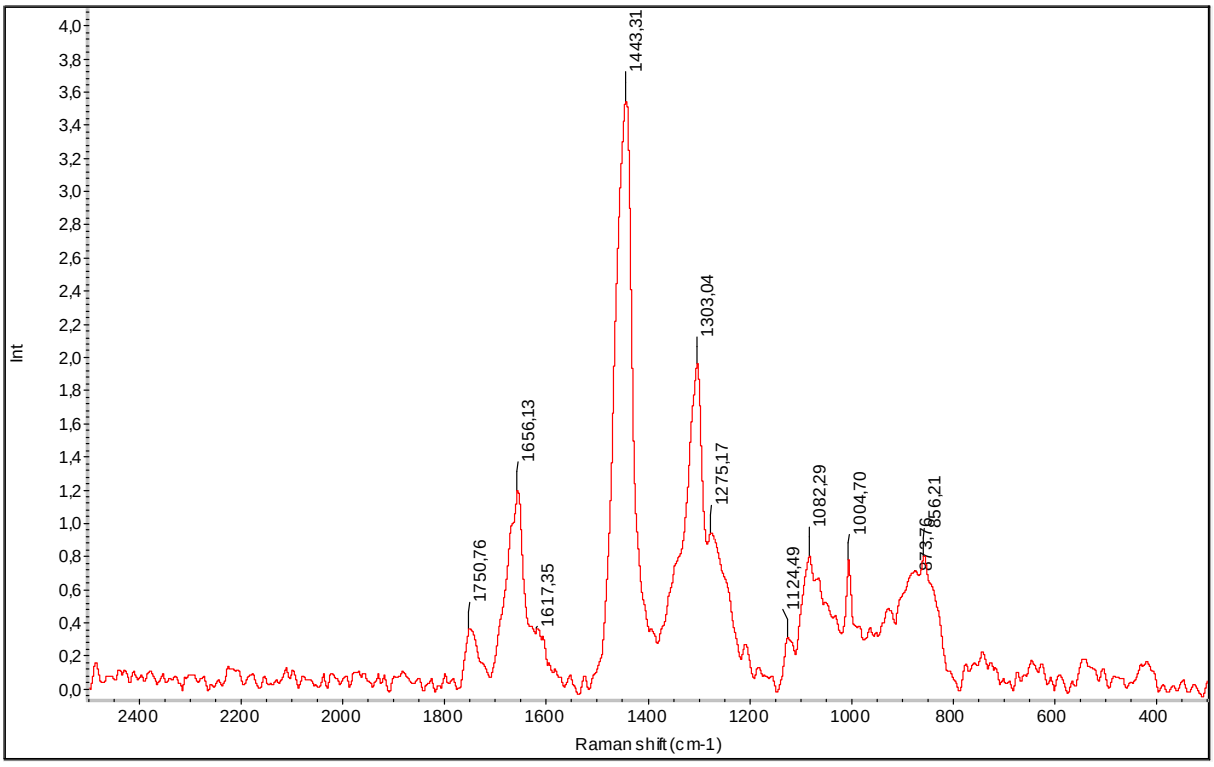
Obrázek 12. Spektrum neuzeného kravského lyofilizovaného sýru



Obrázek 13. Spektrum neuzeného kozího lyofilizovaného sýru



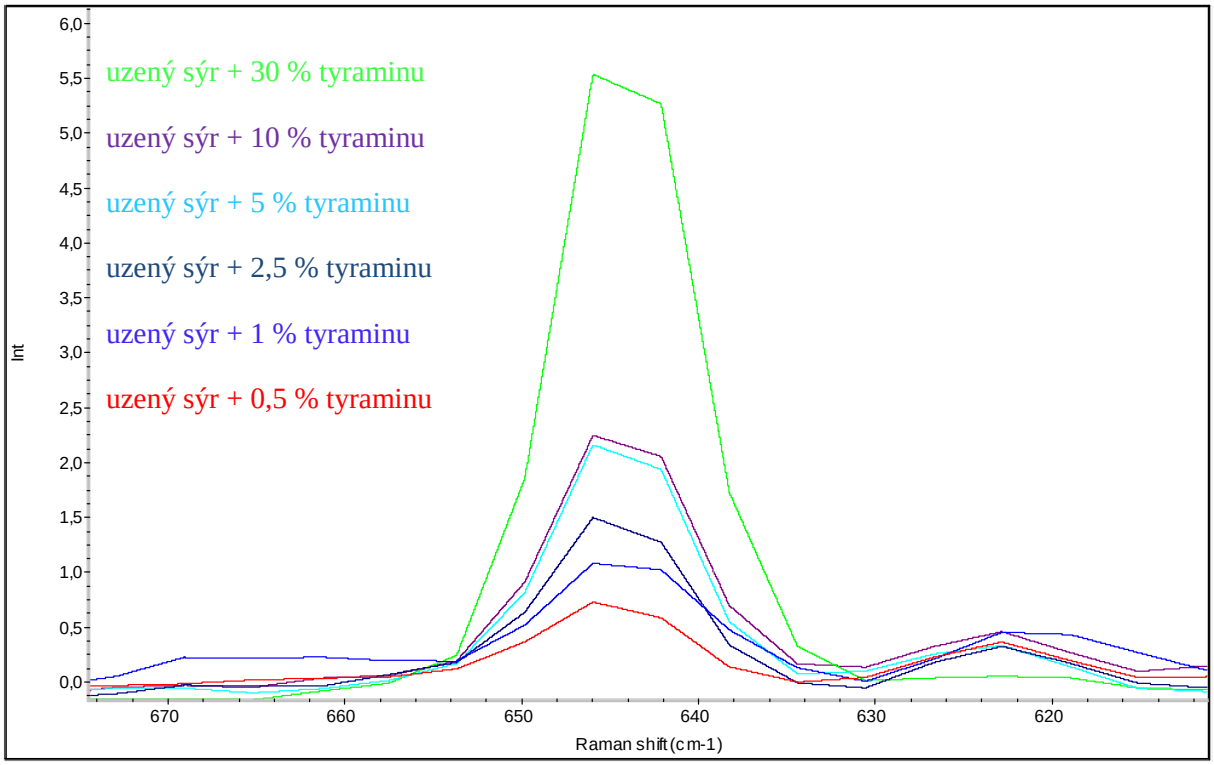
Obrázek 14. Spektrum neuzeného ovčího lyofilizovaného sýru



6.3.3. Semikvantitativní vyhodnocení

Na základě měření čistého tyraminu (příloha P1) a uzeného eidamu s přídavkem tyraminu 0,5; 1; 2,5; 5; 10 a 30 % (příloha P2) byl pro odečítání k semikvantitativnímu vyhodnocení zvolen pík v oblasti 646 cm^{-1} (obrázek 9). Jeho výška a plocha narůstala s rostoucí koncentrací přidaného tyraminu.

Obrázek 9. Pík v oblasti 646 cm^{-1} spektra uzeného eidamu s přídavkem tyraminu



Plochy píků byly odečteny pomocí programu TQ Analyst. U ploch píku si můžeme všimnout vzrůstající tendence s rostoucí koncentrací tyraminu (tabulka VI a VII).

Tabulka VI. Hodnoty plochy absorpčního pásu (při 646 cm-1)ve spektrech neuzených sýrů

druh sýru	přídavek tyraminu	plocha pásu	oblast odečítání [cm^{-1}]
kravský	0,5 %	1,81142	653 - 638
		1,99700	653 - 638
		1,74906	657 - 638
	1 %	2,12141	653 - 630
		2,58905	653 - 634
		2,67945	653 - 630
	1,5 %	3,69191	661 - 634
		3,23062	661 - 630
		2,84811	657 - 626
kozí	0,5 %	1,20093	653 - 638
		1,74390	653 - 634
		1,36800	653 - 634
	1 %	2,75497	653 - 634
		2,89728	655 - 634
		2,60267	653 - 634
	1,5 %	3,25860	657 - 634
		3,80326	657 - 630
		3,70057	661 - 634
ovčí	0,5 %	1,48280	653 - 638
		1,39525	653 - 630
		1,13047	653 - 634
	1 %	2,65026	653 - 634
		2,79392	653 - 630
		2,25995	661 - 634
	1,5 %	3,17053	661 - 634
		3,53532	665 - 634
		2,87882	665 - 634

Tabulka VII. Hodnoty plochy absorpčního pásu (při 646 cm-1)ve spektrech uzených sýrů

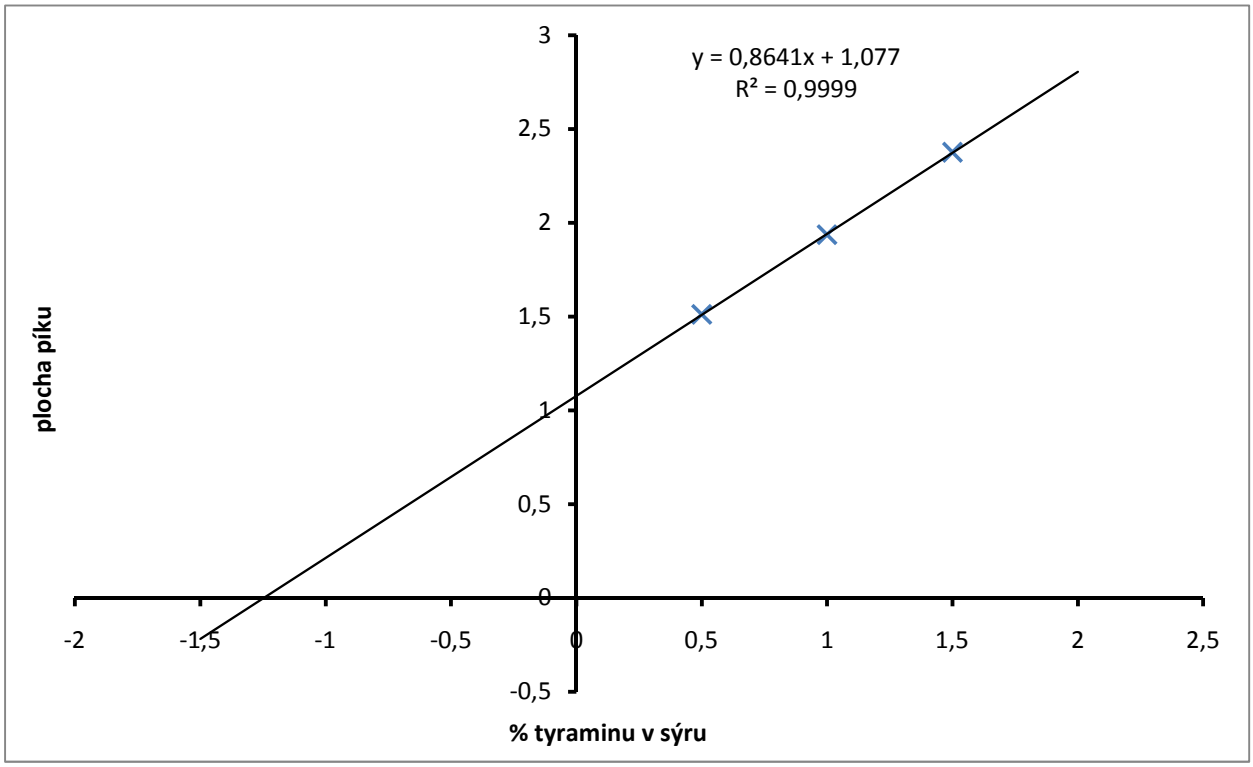
druh sýru	přídavek tyraminu	plocha pásu	oblast odečítání [cm^{-1}]
kravský	0,5 %	1,29803	649 - 630
		1,51136	653 - 638
		1,15813	657 - 634
	1 %	1,71779	669 - 638
		1,93652	653 - 634
		2,01285	653 - 630
	1,5 %	2,71781	665 - 638
		2,37542	657 - 611
		2,87931	669 - 634
kozí	0,5 %	1,64792	653 - 634
		1,10198	653 - 638
		2,65163	653 - 634
	1 %	2,41924	653 - 630
		2,27039	653 - 634
		2,76089	653 - 630
	1,5 %	6,09359	661 - 630
		4,38588	653 - 622
		5,54868	661 - 634
ovčí	0,5 %	1,38980	653 - 638
		1,64344	653 - 638
		1,39200	657 - 634
	1 %	1,92567	657 - 630
		2,08859	661 - 638
		1,99527	653 - 638
	1,5 %	2,28067	653 - 634
		2,88491	653 - 634
		3,26847	653 - 630

Pomocí metody standardního přídavku byl vypočítán v programu MS Excel obsah biogenních aminů v původních sýrech v procentech a následně přepočítán na miligramy aminů na gram sýru (obrázek 10). Výsledné hodnoty obsahu byly u jednotlivých měření zprůměrovány a vypočtena směrodatná odchylka (tabulka VIII).

Tabulka VIII. Obsahy biogenních aminů v sýrech

neuzený sýr	obsah BA [mg.g^{-1}]	uzený sýr	obsah BA [mg.g^{-1}]
kravský	3,52	kravský	15,77
	11,12		12,46
	12,07		7,53
průměr	8,91 ± 3,83	průměr	11,92 ± 3,39
kozí	1,69	kozí	2,38
	3,67		2,12
	0,96		2,61
průměr	2,101 ± 1,14	průměr	2,37 ± 0,20
ovčí	4,43	ovčí	10,94
	2,03		7,77
	1,95		1,82
průměr	2,80 ± 1,15	průměr	6,84 ± 3,78

Obrázek 10. Kalibrační graf pro metodu standardního přídavku uzeného kravského sýru



6.4. Souhrnná diskuze

Kvůli nižší intenzitě a horšímu poměru signál/šum v Ramanových spektrech nebyla možná identifikace všech pásů, avšak absorpční pásy hlavních funkčních skupin byly zřetelné, jejich identifikace se shodovala se spektry infračervených skupin. Ramanova spektra také prokázala přítomnost NH_2 skupin amidů a aminů, a proti infračerveným spektrům také skupin C-N.

Výsledné hodnoty biogenních aminů obsažených v uzených sýrech byly zjištěny vyšší než v sýrech neuzených. Nejvyšší obsah biogenních aminů byl zjištěn v kravském sýru, jak uzeném, tak neuzeném. Naopak nejnižší u sýru kozího. Hodnoty se v rámci jednoho druhu sýru bohužel lišily, a to především u sýru kravského a ovčího, což mohlo být způsobeno nedokonalou homogenizací vzorku s tyraminem, z důvodu složité matrice sýru.

Celkové množství biogenních aminů v sýru se pohybovala v rozmezí 2 101 až 11 920 $mg.kg^{-1}$. Hodnoty celkového množství biogenních aminů obsažených v sýrech, stanovovaných metodou HPLC, se převážně pohybovaly v řádech desítek či stovek $mg.kg^{-1}$, a obsah jednotlivých aminů také v řádech jednotek, v závislosti na druhu aminu. [18, 25, 88]

Ve studii Standarové a kol. dosahovaly nejvyšší naměřené hodnoty celkových BA 2 540 $mg.kg^{-1}$ ve tvarůžcích, 2 490 $mg.kg^{-1}$ v brynze a ostatních měkkých zrajících sýrech. [88]

Fyziologickou reakci na biogenní aminy může způsobit již obsah desítek $mg.kg^{-1}$, jako např. 2-fenylethylamin při množství 30 $mg.kg^{-1}$ může vyvolat migrénu. Limity pro vybrané BA v rybách, sýrech, pivu a vínu obsahovala česká legislativa do roku 2004, avšak dnes je v ČR platný pouze hygienický limit pro histamin v rybách a výrobcích z ryb uváděný ve vyhlášce Ministerstva zdravotnictví č.305/2004 Sb., který činí 100 $mg.kg^{-1}$. [88, 89]

ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na úvodní studii biogenních aminů pomocí metod vibrační spektrometrie.

Byla provedena extrakce dvou typů sýru (uzený a neuzený) ze tří různých druhů mléka (kravské, kozí, ovčí) při pH 8. Extrakty byly charakterizovány pomocí infračervené spektrometrie metodou ATR a byly identifikovány pásy základních funkčních skupin.

Infračervená spektrometrie prokázala přítomnost NH a NH_2 skupin v sýrech, avšak touto metodou nelze rozlišit, zda náleží biogenním aminů, amidům či aminokyselinám. ATR metodou nebylo možné provést kvantifikaci, z důvodu rozdílné tloušťky vzniklého filmu vzorku dávkovaného na krystal a také nízké rozpustnosti tyraminu.

Ramanovou spektrometrií byla pořízena spektra tablet samotných sýrů a spektra tablet sýrů s přídavkem standardu tyraminu 0,5; 1 a 1,5 %. V Ramanových spektrech bylo možné rozpoznat základní funkční skupiny, které se shodovaly se skupinami identifikovanými infračervenou spektrometrií. Také zde byly nalezeny pásy skupin NH_2 a navíc C-N skupin, které mohou náležet biogenním aminům.

Z Ramanových spekter byly odečteny plochy píku, rostoucího se zvyšující se koncentrací tyraminu. Semikvantitativní analýza, pro řádové stanovení obsahu biogenních aminů v jednotlivých původních sýrech, byla provedena metodou standardních přídavků. Výsledné hodnoty celkového množství biogenních aminů byly vyšší než hodnoty získané analýzou pomocí metody HPLC již publikovaných studií, což může být způsobeno nedostatečnou homogenitou tablety a neschopností Ramanovy spektrometrie odlišit biogenní aminy od ostatních aminosloučenin.

Infračervená a Ramanova spektrometrie se prokázaly jako rychlé metody pro identifikaci hlavních funkčních skupin v sýrech a semikvantitativní analýzu, avšak nevhodné pro přesnou specifikaci a kvantifikaci biogenních aminů.

POUŽITÁ LITERATURA

1 Bodmer S., Imark C., Hneubuhl M.: Biogenic amines in foods: Histamine and food processing. *Inflammation Research, 48,* 296-300 (1999)

2 Onal A.: A review: Current analytical methods for determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry, 103,* 1475-1486 (2007)

3 Santos M.H.S.: Biogenic amines: their importance in foods. *Journal of Food Microbiology, 29,* 213-231 (1996)

4 Shalaby A. R.: Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International, 29 (7),* 675-690 (1997)

5 Velíšek J., Hajšlová J.: *Chemie potravin II, 3.vydání.* OSSIS, Tábor 2009

6 Pradyot P.: *Dean's Analytical Chemistry Handbook.* McGraw-Hill, New York 2002

7 http://www.vemeno.com/cheesy_obchod_se_syry/clanek/cz/724/homepage/ staženo 4.1.2011

8 *www.vscht.cz/anl/lach1/7_IC.pdf* staženo: 26.10.2010

9 Gunzler H.U., Gremlinch H.: *IR Spectroscopy: An Introduction.* Wiley-VCH, Weinheim 2002

10 Frank S.: *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry.* Prentice Hall, New Jersey 1997

11 Němcová I., Čermáková L., Rychlovský P.: *Spektrometrické analytické metody I.* Karolinum, Praha 2004

12 Taraba B.: *Chemická struktura pevné fáze.* Ostravská univerzita, Ostrava 1995

13 www.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/ftir.pdf staženo 26.10.2010

14 Ozaki O., McClure W.F., Christy W.A.: *Near-Infrared Spectroscopy in Food Science & Technology.* John Wiley & Sons, New Jersey 2007

15 Sun D.W.: *Infrared Spectroscopy For Food Quality Analysis And Control.* Academic Press, New York 2009

16 http://en.wikipedia.org/wiki/Biogenic_amine staženo dne: 8.1.2011

17 Juneja V.K., Sofos J.N.: Pathogens and toxins in foods: challenges and interventions, ASM, Washington 2010

18 Smělá D., Pechová P., Komprda T., Klejdus B., Kubáň V.: Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chemické listy, 98,* 432-437 (2004)

19 Moret S., Conte L. C.: High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods An analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. *Journal of Chromatography A, 729,* 363-369 (1996)

20 Pena-Gallego A., Hernández-Orte P., Cacho J., Ferreira V.: Biogenic amine determination in wines using solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A, 1216,* 3398-3401 (2009)

21 Oguri S.: Electromigration methods for amino acids, biogenic amines and aromatic amines. *Journal of Chromatography B, 747,* 1-19 (2000)

22 Marcobal A., Rivas B., Munoz R.: Methods for Detection of Bacteria Producing Biogenic Amines on Foods: A Survey. *Journal of Consumer Protection and Food Safety, 1216,* 3398-3401 (2006)

23 Draisci R., Volpe G., Lucentini L., Cecilia A., Federico R., Palleschi G.: Determination of biogenic amines with an electrochemical biosensor and its application to salted anchovies. *Food chemistry, 62,* 225-232 (1998)

24 Lange J., Wittmann C.: Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry, 372,* 276-283 (2002)

25 Mazzucco E., Gosetti F., Bobba M., Marengo E., Robotti E., Gennaro M. C.: High-Performance Liquid Chromatography – Ultraviolet Detection Method for Simultaneous Determination of Typical Biogenic Amines and Precursor Amino Acids. Applications in Food Chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58,* 127-134 (2010)

26 Castillo M. A., Castells R. C.: Procedure for Determination of Biogenic Amines by Derivatization with Dabsyl Chloride and Reversed Phase Liquid Chromatography. *Chromatographia, 54,* 711-716 (2001)

27 Lavizzari T., Veciana-Nogués M. T., Bover-Cid S., Mariné-Font A., Vidal-Carou M. C.: Improved method for the determination of biogenic amines and polyamines in vegetable products by ion-pair high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A, 1129,* 67-72 (2006)

28 Pinho O., Ferreira I.M.P.L.V.O., Mendes E., Oliviera B.M., Ferreira M.: Effect of temperature on evolution of free amino acid and biogenic amine contents during storage of Azeitao cheese. *Food Chemistry, 75,* 287-291 (2001)

29 Kvasnicka F., Voldrich M.: Determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis with conductometric detection. *Journal of Chromatography A, 1003,* 145-149 (2006)

30 Lapa-Guimaraes J., Pickova J.: New solvent system for thinlayer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid. *Journal of Chromatography A, 1045,* 223-232 (2004)

31 Shalaby A.R.: Simple, rapid and valid thin layer chromatographic method for determining biogenic amines in foods. *Food Chemistry, 65,* 117-121 (1999)

32 Fernandes J.O., Ferreira M.A.: Combine ion-pair extraction and gas chromatography-mass spectrometry for the simultaneous determination of diamines, polyamines and aromatic amines in Port wine and grape juice. *Journal of Chromatography A, 886,* 183-195 (2000)

33 Hwang B.S., Wang J.T., Choong Y.M.: A rapid gas chromatographic method for determination of histamine in fish and fish products. *Food Chemistry, 82,* 329-334 (2003)

34 Fernandes J.O., Judas I.C., Oliveira M.B., Ferreira I.M.P.L.V, Ferreira M.A.: A GC-MS Method for Histamine and other Biogenic Amines in Beer. *Chromatographia, 53,* 327-331 (2001)

35 Ngim K.K., Ebeler S.E., Lew M.E., Crosby D.G., Wong J.W.: Optimized Procedures for Analyzing Primary Alkalamines in Wines by Pentafluorobenzalddehyde Derivatization and GC – MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48,* 3311-3316 (2000)

36 Awan M.A., Fleet I., Thomas C.L.P.: Determination of biogenic diamines with a vaporisation derivatisation approach using solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry, 111,* 462-468 (2008)

37 Lange J., Thomas K., Wittmann C.: Comparison of a capillary electrophoresis method with high-performance liquid chromatography for determination of biogenic amines in various food samples. *Journal of Chromatography B:Analytical Technology Biomedical Life Science, 779,* 229-239 (2002)

38 Zhang L.Y., Sun M.X.: Determination of histamine and histidin by capillary zone electrophoresis with pre-column naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A, 1040,* 133-140 (2004)

39 Sun X., Yang X., Wang E.: Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis with pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography A, 1005,* 182-195 (2003)

40 Lista A.G., Arce L., Ríos A., Valcárcel, M.: Analysis os solid samples by capillary electrophoresis using a gas extraction sampling device in a flow system. *Analytica Chimica Acta, 435,* 315-322 (2001)

41 Arce R.E., Vural N., Yilmas S., Vural Y.H.: Direct determination of biogenic amines in wine by integrating continuous flow clean-up and capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Journal of Chromatography A, 803,* 249-260 (2004)

42 Zhang L.Y., Tang X.C., Sun M.X.: Simultaneous determination of histamine and polyamines by capillary zone electrophoresis with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B, 820*, 211-219 (2005)

43 Ruiz-Jiménez J., Luque de Castro M.D.: Pervaporation as interface between solid samples and capillary electrophoresis: Determination of biogenic amines food. *Journal of Chromatography A, 1110*, 245-253 (2006)

44 Cortacero-Ramírez S., Arráez-Román D., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A.: Determination of biogenic amines in beer and brewing-process samples by capillary electrophoresis coupled to laser-induced fluorescence detection. *Food Chemistry, 100*, 383-389 (2007)

45 Kovacs A., Simon-Sarkadi L., Ganzler K.: Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A, 836*, 517-530 (1999)

46 Male K.B., Luong J.H.T.: Derivatization, stabilization and detection of biogenic amines by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A, 926*, 309-317 (2001)

47 Liu X., Yang L.X., Lu Y.T.: Determination of biogenic amines by 3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldehyde and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A, 998*, 213-219 (2003)

48 Arce L., Rios A., Valcárcel M.: Selective and rapid detection of biogenic amines by capillary zone electrophoresis. *Chromatographia, 46*, 170-176 (1997)

49 Nouadje G., Siméon N., Dedieu F., Nertz M., Puig Ph., Couderc F.: Determination of twenty eight biogenic amines and amino acids during wine aging by micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A, 765,* 337-343 (1997)

50 Kalac P., Savel J., Krizek M., Pelikánová T., Prokopová M.: Biogenic amines formation in bottled beer. *Food Chemistry, 79,* 431-434 (2002)

51 Liu Y.M., Cheng J.-K.: Separation of biogenic amines by micellar electrokinetic chromatography with on-line chemiluminescence detection. *Journal of Chromatography A, 1003,* 211-216 (2003)

52 Su S.C., Chou S.S., Chang P.C., Hwang D.F.: Determination of biogenic amines in fish implicated in food poisoning by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Science Applocations, 749,* 163-169 (2000)

53 Krizek M., Pelikanova T.: Determination of seven biogenic amines in foods by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A, 815,* 243-250 (1998)

54 Fox P.F.: *Cheese – Chemistry, Physics and Microbiology, volume 1.* Chapman & Hall, New York 1993

55 Mikeš V.: *Proč se klepou řízky – chemie v kuchyni.* Dokořán, Praha 2008

56 Harbutt, J.: *Cheese.* Willow Creek Press, USA 1999

57 http://cs.wikipedia.org/wiki/S%C3%BDr staženo 3.2.2011

58 www.madeta.cz/assets/files/Skola_**syr**u/3.**rozdeleni_syr**u.pdf staženo 15.3.2011

59 Frank J.F., Birth G.S.: Application of near infrared reflectance spectroscopy to cheese analysis. *Journal of Dairy Science, 65,* 1110-1116 (1982)

60 Voodcock, T., Fagan, C.C., O´Donnell, C.P., Downey, G.: Application of near and mid-infrared spectroscopy to determine cheese quality and authenticity. *Food Bioprocess Technol, 1,* 117-129 (2008)

61 Pillonel L., Luginbuhl W., Picque D., Schaller E., Tabacchi R., Bosset J.O.: Analytical methods for the determination of the geographic origin of Emmental cheese mid- and near-infrared spectroscopy. *European Food Reseaech and Technology, 216,* 174-178 (2003)

62 Pillonel L., Dufour D., Schaller E., Bosset J.O., De Baerdemaeker J., Karoui R.: Prediction of colour of European Emmental cheeses by using near infrared spectroscopy a feasibility study. *European Food Reseaech and Technology, 226,* 63-69 (2007)

63 Lefier D., Lamprel, H., Mazerolles G.: Evolution of Lactococcus strains during ripening in Brie cheese using Fourier transform infrared spectroscopy. *Dairy Science and Technology, 80,* 247-254 (2000)

64 Weinrichter B., Luginbuhl W., Rohm H., Jimeno J.: Differentiation of facultatively heterofermentative lactobacilli from plants, milk, and hard type cheeses by SDS-PAGE, RAPD, FTIR, energy source utilization and autolysis type. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, 34,* 556-566 (2001)

65 Oberreuter H., Brodbeck A., Stetten S., Goerges S., Scherer S.: Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy is a promising tool for monitoring the population dynamics of microorganisms in food stuff. *European Food Reseaech and Technology, 216,* 434-439 (2003)

66 Vannini L., Baldi D., Lanciotti R.: Use of Fourier transform infrared spectroscopy to evaluate the proteolytic activity of Yarrowia lipolytica and its contribution to cheese ripening. *International Journal of Food Microbiology, 69,* 113-123 (2001)

67 Jones S.T., Aryana K.J., Losso J.N.: Storage stability of lutein during ripening of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science, 88,* 1661-1670 (2005)

68 Skeie S., Feten G., Trygve A., Ostlie H., Isaksson T.: The use of near infrared spectroscopy to predict selected free amino acids during cheese ripening. *International Dairy Journal, 16,* 236-242 (2006)

69 González-Martín I., Hernández-Hierro J.M., Vivar-Quintana A., Revilla I., González-Pérez C.: The application of near infrared spectroscopy technology and a remote reflectance fibre-optic probe for the determination of peptides in cheeses with different ripening times. *Food Chemistry, 114, 1564-1569 (2009)*

70 Lamprell H., Mazerolles G., Kodjo A., Chamba J.F., Noel Y., Beuvier E.: Discrimination of Staphylococcus aureus strains from different species of Staphylococcus using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *International Journal of Food Microbiology*, *108,* 125-129 (2006)

71 Martín-del-Campo S.T., Picque D., Cosío-Ramírez R., Corrieu G.: Middle infrared spectroscopy characterization of ripening stages of Camembert-type cheeses. *International Dairy Journal, 17,* 835-845 (2007)

72 Mazerolles G., Devaux M.F., Duboz G., Duployer M.H., Riou N.M., Dufour E.: Infrared and fluorescence spectroscopy for monitoring protein structure and interaction changes during cheese ripening. *Dairy Science and Technology, 81,* 509-527 (2001)

73 Rodriguez-Saona L.E., Koca N., Harper W.J., Alvarez V.B.: Rapid determination of Swiss cheese composition by Fourier transform infraredattenuated total reflectance spectroscopy. *Journal of Dairy Science, 89,* 1407-1412 (2006)

74 Downey G., Sheehan E., Delahunty C., O´Callaghan D., Guinee T., Howard V.: Prediction of maturity and sensory attributes of Cheddar cheese using near-infrared spectroscopy. *International Dairy Journal, 15,* 701-709 (2005)

75 Subramanian A., Harper W.J., Rodriguez-Saona L.E.: Rapid Prediction of Composition and Flavor Quality of Cheddar Cheese Using ATR-FTIR Spectroscopy. *Journal of Food Science, 74,* C292-C297 (2009)

76 Lee S.J., Jeon I.J., Harbers L.H.: Near-infrared reflectance spectroscopy for rapid analysis of curds during cheddar cheese making. *Journal of Food Science, 62,* 53-56 (1997)

77 Adamopoulos K.G., Goula A.M., Petropakis H.J.: Quality control during processing of feta cheese - NIR application. *Journal of Food Composition and Analysis, 14,* 431-440 (2001)

78 Upreti P., Metzger L.E.: Utilization of Fourier transform infrared spectroscopy for measurement of organic phosphorus and bound calcium in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science, 89,* 1926-1937 (2006)

79 Wittrup Ch., Norgaard L.: Rapid near infrared spectroscopic screening of chemical parameters in semi-hard cheese using chemometrics. *Journal of Dairy Science, 81,* 1803-1809 (1998)

80 Martín-del-Campo S.T., Picque D., Cosío-Ramírez R., Corrieu G.: Evaluation of chemical parameters in soft mold-ripened cheese during ripening by mid-infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science, 90,* 3018-3027 (2006)

81 Karoui R., Mouazen A.M., Dufour É., Pillonel L., Picque D., Bosset J.O., Baerdemaeker J.: Mid-infrared spectrometry A tool for the determination of chemical parameters in Emmental cheeses produced during winter. *Dairy Science and Technology, 86,* 83-97 (2006)

82 Cattaneo T.M.P., Giardina C., Sinelli N., Riva M., Giangiacomo R.: Application of FT-NIR and FT-IR spectroscopy to study the shelf-life of Crescenza cheese. *International Dairy Journal, 15,* 693-700 (2005)

83 Karoui R., Mouazen A.M., Dufour É., Pillonel L., Schaller E., Baerdemaeker J., Bosset J.O.: Chemical characterisation of European Emmental cheeses by near infrared spectroscopy using chemometric tools. *International Dairy Journal, 16,* 1211-1217 (2006)

84 Meyers R.A.: *Encyclopedia* of *Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation.* John Wiley & Sons, England 2011

85 Fagan C.C., Everard C., O´Donnell C.P., Downey G., Sheehan E.M., Delahunty C.M., O´Callaghan D.J., Howard V.: Prediction of processed cheese instrumental texture and meltability by mid-infrared spectroscopy coupled with chemometric tools. *Journal of Food Engineering, 80,* 1068-1077 (2007)

86 Fagan C.C., Everard C., O´Donnell C.P., Downey G., Sheehan E.M., Delahunty C.M., O´Callaghan D.J.: Evaluating mid-infrared spectroscopy as a new technique for predicting sensory texture attributes of processed cheese. *Journal of Dairy Science, 90,* 1122-1132 (2007)

87 Socrates G.: *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*: *Tables and Charts.* John Wiley & Sons, England 2001

88 Standarová E., Borkovcová I, Vorlová L: Obsah biogenních aminů v sýrech z české obchodní sítě. *Veterinářství, 58,* 735-739 (2008)

89 Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č.305/2004 Sb., kterou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství potravinách. *Sbírka zákonů 2004*. *částka 100 (2004)*

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

Φ	tok záření prošlého kyvetou s měřeným roztokem
Φ_0	tok záření prošlého kyvetou s čistým rozpouštědlem
ATR	Metoda úplného zeslabeného odrazu (Attenuated total reflectance)
BA	Biogenní aminy (Biogenic amines)
CCD	Nábojově vázané prvky (Charge-coupled devices)
CE	Kapilární elektroforéza (Capillary electrophoresis)
CZE	Kapilární zónová elektroforéza (Capillary zone electrophoresis)
DAD	Detekce diodovým polem (Diode-array detection)
DAO	Diamin oxidáza
DRIFTS	Metoda difúzního odrazu ve spojení s Fourierovou transformací (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy)
DTGS	deuterovaný triglycinsulfát
FITC	fenylizotiokyanát
FT	Fourierova transformace (Fourier transform)
GC	Plynová chromatografie (Gas chromatography)
GC-MS	Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (Gas chromatography – Mass spectrometry)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-performance liquid chromatography)
IČ	Infračervená/é
NDA	Naftalen-2,3-dikarboxyaldehyd
OPA	o-ftalaldehyd

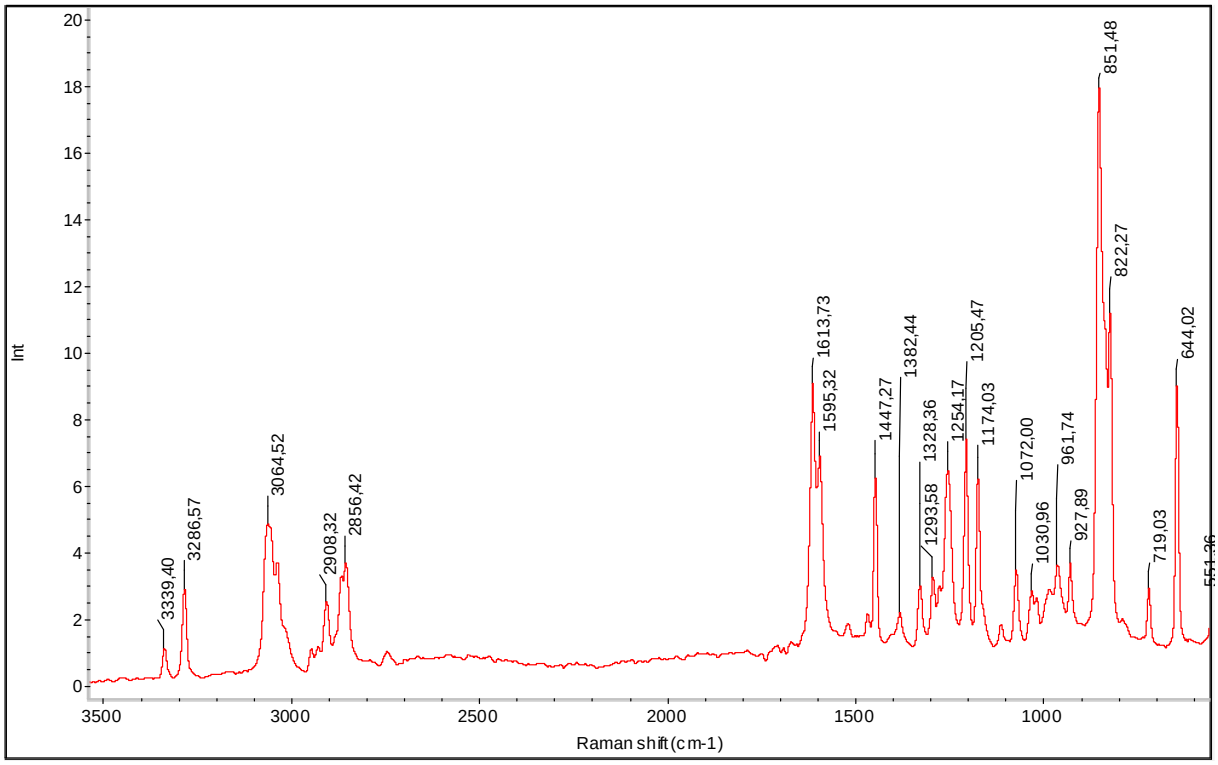
PAD	Pulzní ampérometrická detekce
RP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie pracující v systému reverzních fází (Reversed-phase high-performance liquid chromatography)
SERS	Povrchem zesílený Ramanův rozptyl (Surface Enhanced Raman Scattering)
TGS	triglycinsulfát
TLC	Tenkovrstvá chromatografie (Thin layer chromatography)
UV	Ultrafialový/á

SEZNAM PŘÍLOH

P1 Ramanovo spektrum tyraminu

P2 Ramanovo spektrum uzeného eidamu s přídavkem tyraminu 0,5; 1; 2,5; 5; 10 a 30 %

PŘÍLOHA P1: Ramanovo spektrum tyraminu



PŘÍLOHA P2: Ramanovo spektrum uzeného eidamu s přídavkem tyraminu 0,5; 1; 2,5; 5; 10 a 30 %