

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B 4131 Zemědělství  
Studijní obor: Zemědělská biotechnologie  
Katedra aplikované chemie  
Vedoucí katedry: prof. Ing. Martin Křížek, CSc.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**OBSAH BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ  
VE SKOPOVÉM MASE**

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Eva Dadáková, Ph.D  
Konzultant bakalářské práce: prof. Ing. Pavel Kalač, CSc.

Autor: Lucie Tothová

České Budějovice, duben 2010

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 10. dubna 2010

Podpis:

Práce byla vypracována na katedře aplikované chemie Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích s finanční podporou výzkumného záměru MSM 6007665806 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR.

Děkuji své školitelce Ing. Evě Dadákové, Ph.D za trpělivost při vedení bakalářské práce a cenné připomínky k jejímu zdárnému dokončení, velký dík patří také konzultantovi prof. Ing. Pavlu Kalači CSc. za přečtení celé práce a neocenitelné rady k úpravám.

Mé dík patří také paní Ing. Miluši Kozlové za pomoc s překladem článků. Dále děkuji celé rodině a přátelům za podporu v průběhu celého studia.

## SOUHRN

Cílem této bakalářské práce bylo zjištění obsahu biologicky účinných biogenních aminů a polyaminů ve skopovém a jehněčím masu.

Česká republika není příliš velkým konzumentem skopového a jehněčího masa. Nejvíce se ho konzumuje v období Velikonoc, zatímco v anglosaských zemích je vyhledávaným druhem. Spotřeba skopového masa ve světě je zhruba 2 kg/os./ rok, zatímco v ČR pouze 0,4 kg/os./ rok. Maso jatečných zvířat je bohaté na biogenní aminy a polyaminy, především na spermin (SPM) a spermidin (SPD). Jejich obsah již byl stanoven u masa a drobů skotu, prasat a kuřat. Údaje o obsahu polyaminů SPM a SPD ve skopovém i jehněčím masu dosud v literatuře chybějí, údaje o obsahu biogenních aminů jsou velmi kusé.

Za použití metody kapalinové chromatografie v uspořádání UPLC byly stanovovány aminy: putrescin (PUT), kadaverin (CAD), tyramin (TYR), fenylethylamin (PEA), histamin (HIM), tryptamin (TRM), SPD a SPM, které mají výrazné biologické účinky. Analyzováno bylo maso skopové (19 vzorků z hřbetu, 17 vzorků z kýty) a jehněčí (20 vzorků z hřbetu, 20 vzorků z kýty).

Vzorky pocházely od drobných chovatelů, zvířata byla hybridy několika plemen. Všechny byly analyzovány 24 hod po porážce. Nejvyšší průměrný obsah byl zjištěn ve skopové kýtě, a to SPM 32,53 mg/kg, SPD 5,91 mg/kg a PUT 2,45 mg/kg. Druhý nejvyšší průměrný obsah měla jehněčí kýta - SPM 17,25 mg/kg, SPD 4,22 mg/kg a PUT 2,04 mg/kg. Následoval skopový hřbet s obsahem SPM 17,22 mg/kg, SPD 3,99 mg/kg, PUT 2,38 mg/kg a jako u jediného ze čtyř typů masa byl ve stopovém množství zjištěn i TYR. Nejnižší obsah aminů byl zjištěn v jehněčím hřbetu, kde SPM dosáhl průměrné hodnoty 16,54 mg/kg, SPD 5,08 mg/kg a PUT 2,11 mg/kg. Histamin se vyskytoval jen ve stopových množstvích, aminy TRM, PEA a CAD nebyly u žádných vzorků zjištěny.

Zjištěné hodnoty jsou srovnatelné s publikovanými údaji pro maso hovězí a vepřové.

***Klíčová slova:*** skopové maso, jehněčí maso, biogenní aminy, polyaminy, UPLC

## SUMMARY

The aim of the bachelor thesis was to determine content of biologically active biogenic amines and polyamines in mutton and lamb meat.

There are not too many consumers of mutton in the Czech Republic. This kind of meat is consumed mostly during Easter, while in Anglo-Saxon countries it has been a sought-after food resource. World's mutton yearly consumption has been about 2 kg per capita. In the Czech Republic it is only 0.4 kg. Meat of slaughter animals is rich in biogenic amines and polyamines, especially in spermine (SPM) and spermidine (SPD). Their contents in beef, pork and chicken meat have been determined previously. Literature data on mutton and lamb has been lacking for polyamines and information on biogenic amines has been very scarce.

Liquid chromatography method in UPLC arrangement was used for the determination of putrescine (PUT), cadaverine (CAD), tyramine (TYR), phenylethylamine (PEA), histamine (HIM), tryptamine (TRM), SPD and SPM, the amines with considerable biological effects. Mutton and lamb loin (19 and 20, respectively) and leg (17 and 20, respectively) were analysed 24 hours after slaughter

The samples originated from various minor breeders and they were hybrids of several breeds. The highest mean content was determined in mutton leg (32.53, 5.91 and 2.45 mg kg<sup>-1</sup> of SPM, SPD and PUT, respectively), followed by lamb leg (17.25, 4.22 and 2.04 mg kg<sup>-1</sup> of SPM, SPD and PUT, respectively). The respective mean contents in mutton loin were 17.22, 3.99 and 2.38 mg kg<sup>-1</sup> and those in lamb loin 16.54, 5.08 and 2.11 mg per kg. Lamb loin was the only meat with detected TYR. Histamine was present only at trace levels, amines TRM, PEA and CAD were not detected in any samples.

The determined contents are comparable with published data for beef and pork.

**Key words:** mutton, lamb, biogenic amines, polyamines, UPLC

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AdoMetDC	adenosylmethionedekarboxyláza
AGM	agmatin
Arg	arginin
AMK	aminokyseliny
ARG	arginin
BA	biogenní aminy
CAD	kadaverin
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAO	diaminoxydáza
EOT	elektroosmotický tok
GC	plynová chromatografie
HIM	histamin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEC	iontová chromatografie
LOD	detekční limit
MF	mobilní fáze
Met	metionin
MO	mikroorganismy
NK	nukleové kyseliny
ODC	ornithindekarboxyláza
Ort	ornithin
PA	polyaminy
PEA	fenylethylamin
PUT	putrescin
SF	stacionární fáze
SPD	spermidin
SPM	spermin
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TYM	tyramin
TRM	tryptamin

# Obsah

1	Úvod.....	9
2	Literární přehled.....	10
2.1	Aminy.....	10
2.1.1	Fyzikální vlastnosti aminů.....	10
2.2	Biogenní aminy a polyaminy.....	10
2.2.1	Biogenní aminy.....	10
2.2.1.1	Vlastnosti a dělení BA.....	12
2.2.1.2	Vznik BA.....	12
2.2.1.3	Potraviny s obsahem BA.....	13
2.2.1.4	Biologické účinky BA.....	16
2.2.1.5	Stanovování toxicity BA.....	16
2.2.2	Co jsou polyaminy, kde se vyskytují a jejich význam.....	17
2.2.3	Vznik polyaminů a jejich katabolismus.....	20
2.2.4	Zvyšující se obsah polyaminů a potraviny s jejich výskytem.....	21
2.3	Ovce.....	22
2.3.1	Původ ovcí.....	22
2.3.1.1	Dělení ovcí podle původu:.....	23
2.3.2	Plodnost.....	23
2.3.2.1	Faktory ovlivňující reprodukci:.....	23
2.3.3	Masná užitkovost.....	24
2.3.3.1	Organoleptické vlastnosti masa:.....	25
2.3.3.2	Faktory určující kvalitu masa:.....	25
2.3.3.3	Jatečná hodnota.....	25
2.3.3.4	Plemena ovcí s masnou užitkovostí.....	27
2.4	Analytické metody.....	28
2.4.1	Chromatografické metody.....	28
2.4.1.1	Historie chromatografie.....	28
2.4.1.2	Dělení chromatografie podle tvaru separačního prostoru.....	28
2.4.2	Princip vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).....	29
2.4.2.1	Čerpadla pro HPLC.....	29
2.4.2.2	Dávkování vzorků.....	29

2.4.2.3	Kolony pro HPLC.....	30
2.4.2.4	Detektory HPLC.....	30
2.4.2.5	Kapalinová chromatografie a BA.....	30
2.4.2.6	Využití metody HPLC pro analýzu BA a PA.....	31
2.4.3	Ultra výkonná kapalinová chromatografie (UPLC).....	32
2.4.3.1	Využití metody UPLC pro stanovení BA a PA.....	32
2.4.4	Iontová chromatografie a BA.....	33
2.4.5	Plynová chromatografie a BA.....	33
2.4.6	Elektromigrační metody.....	33
2.4.6.1	Kapilární zónová elektroforéza (CZE).....	33
2.4.6.2	Kapilární elektroforéza (CZE).....	33
2.4.6.3	Elektroforéza BA a PA.....	34
2.4.6.4	Využití metody CZE pro stanovení BA a PA.....	34
3	Cíl práce.....	36
4	Experimentální část.....	37
4.1	Použité chemikálie, přístroje a zařízení.....	37
4.2	Odběr vzorků.....	38
4.3	Analytické postupy.....	38
4.3.1	Analýza BA a PA metodou HPLC.....	38
4.4	Výsledky a diskuse.....	41
5	Závěr.....	45
6	Seznam literatury.....	47



# 1 Úvod

Biogenní aminy (BA) mají významné biologické vlastnosti a v nízkých koncentracích se vyskytují téměř v každé potravíně. Vznikají nejčastěji dekarboxylací příslušné aminokyseliny (AMK) za působení mikrobiálního enzymu, biosyntézou v rostlinných a živočišných tkáních či fermentací (HALASZ ET AL., 1994).

Polyaminy (PA) jsou sloučeniny, které se vyskytují přirozeně ve všech živých buňkách organismů od mikroorganismů až po savce. V porovnání s BA mají specifické biologické funkce. Účastní se při léčbě zranění, růstu a pomáhají při obnově buněk střevní sliznice, účastní se také dělení buněk a fyziologické apoptóze (DELOYER, PEULEN A DANDRIFOSSE, 2005). Vznikají biosyntézou AMK nebo se odvozují *de novo* syntézou (KOZOVÁ ET AL., 2008).

V potravinách jako je maso, masné výrobky a drůbež se v syrovém stavu nejvíce vyskytuje spermin. Cílem bakalářské práce bylo sledování obsahu aminů tedy sperminu, spermidinu, putrescinu, kadaverinu, tryptaminu, fenylethylaminu, histaminu, tyraminu a určení jejich obsahu ve skopovém a jehněčím masu. Vzorby byly poskytnuty od drobných chovatelů do 24 hod od porážky. Skopové maso bylo odebíráno od tří beranů a šestnácti ovcí, jehněčí maso od dvaceti jehňat obojího pohlaví. Jejich stanovení se provádělo pomocí kapalinové chromatografie na principu UPLC.

## **2 Literární přehled**

### **2.1 Aminy**

#### **2.1.1 Fyzikální vlastnosti aminů**

Vazba C – N u aminů je polární, ale méně polární než vazba C – O v alkoholech (dusík 3,0 v porovnání s kyslíkem 3,5 je méně elektronegativní) (SVOBODA ET AL., 2005). Čím je rozdíl elektronegativit větší, tím je vazba polárnější, čím je nižší, tím má vazba výrazněji kovalentní charakter (MAREČEK A HONZA, 2004).

Dipól – dipólové interakce jsou v aminech větší než v uhlovodících, ale zároveň menší než v alkoholech, proto je vodíková vazba u primárních a sekundárních aminů slabší než u alkoholů.

V důsledku vodíkových můstků je ovlivněn i bod varu: nejvyšší mají primární aminy (jelikož mají 2 atomy vodíku, které mohou tvořit vodíkové můstky) a nejnižší bod varu mají terciální aminy, které již vodíkové můstky tvořit nemohou. Zároveň aminy, které obsahují méně než 7 atomů uhlíku C, jsou rozpustné ve vodě (SVOBODA ET AL., 2005).

### **2.2 Biogenní aminy a polyaminy**

#### **2.2.1 Biogenní aminy**

Biogenní aminy (BA) jako putrescin (PUT), kadaverin (CAD), spermidin (SPD), spermin (SPM), tryptamin (TRM), fenylethylamin (PEA), histamin (HIM) a tyramin (TYM) patří mezi nízkomolekulární bazické alifatické, aromatické nebo heterocyklické organické sloučeniny, které jsou nežádoucími produkty rozkladu bílkovin (MIAZAKI A YANG, 1958).

**Obr. 1: strukturní vzorce a systematické názvy BA a PA**

**putrescin**



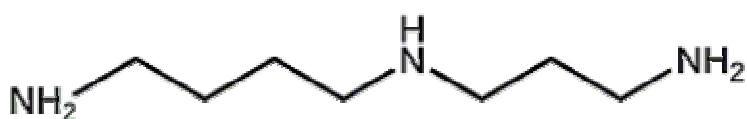
1,4-diaminobutan

**kadaverin**



1,5-diaminopentan

**spermidin**



*N*-(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutan

**spermin**



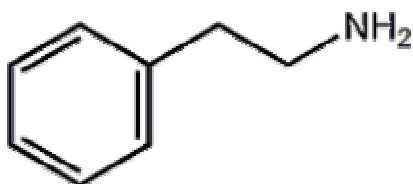
*N,N'*-bis-(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutan

**tryptamin**



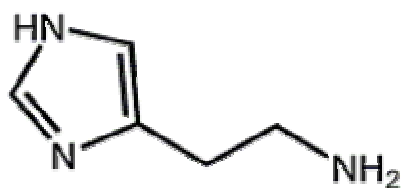
2-(1H-indol-3-yl)ethanamin

**fenylethylamin**



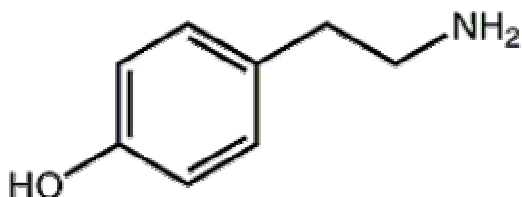
2-fenylethylamin

**histamin**



2-(4-imidazolyl)ethylamin

**tyramin**



4-(2-aminoethyl)fenol

### 2.2.1.1 Vlastnosti a dělení BA

Tradiční skupina výživových BA byla v devadesátých letech 19.století rozdělena na dvě podskupiny na základě odlišného způsobu tvorby a také podle jejich biologické role. Dělí se na monoaminy: HIM, TYM, PEA, TRM, diaminy: PUT, CAD, triaminy: AGM a další podskupinou jsou polyaminy (PA), které se nacházejí jako složky všech živých organismů, jak s pozitivním, tak i negativním účinkem na zdraví člověka za určitých podmínek (DADÁKOVÁ ET AL., (2009).

Některé BA mají samy o sobě významné biologické vlastnosti, jsou např. tkáňovými hormony (HIM), protoalkaloidy (hordenin, gramin) a stavebními látkami, účastníci se biosyntézy dalších hormonů živočichů (PEA), fytohormonů neboli auxinů, alkaloidů a jiných sekundárních metabolitů rostlin (VELÍŠEK, 1999).

### 2.2.1.2 Vznik BA

BA vznikají dekarboxylací aminokyseliny (AMK) potraviny za působení mikrobiálního enzymu. Z histidinu vzniká dekarboxylací jako produkt HIM, z lysinu CAD, dekarboxylací argininu (Arg) vzniká agmatin a dále PUT atd. Ovšem v některých potravinách se BA vyskytují přirozeně, vznikají biosyntézou v rostlinných a živočišných buňkách. Vykonávají v organismu člověka důležité funkce. Slouží jako prekurzory některých hormonů, nukleových kyselin (NK) a

proteinů. Ovšem velké množství těchto aminů, může být pro lidské tělo toxické. Jelikož se vytvářejí v různých potravinách a nápojích, jak kvašených (fermentovaných) tak nekvašených (nefermentovaných) mají na jejich tvorbu vliv svou činností bakterie hnilobné a také bakterie mléčného kvašení, tak vznikají i při fermentaci (HALASZ ET AL., 1994; KŘÍŽEK ET AL., 2004).

### **2.2.1.3 Potraviny s obsahem BA**

BA jsou obsaženy prakticky skoro ve všech potravinách jako běžné produkty metabolismu. Nacházejí se v různých potravinách ať už sýrech, alkoholu jako je např. víno či pivo, kyselém zelí (fermentované výrobky), kde vznikají činností mikroorganismů (MO) či v mastných výrobcích a rybách. Množství a druh aminu ovlivňuje u potravin: složení, teplota skladování, zrání a balení (HALASZ ET AL., 1994; VELÍŠEK, 1999).

**Tab. 1: BA, jejich prekurzory, produkty transformace a biologický význam podle VELÍŠKA (1999):**

BA	Původní AMK	Další produkty AMK a transformace aminu	Biologický význam
HIM	histidin		Lokální tkáňový hormon, vliv na krevní tlak, sekreci žaludeční šťávy, účast při anafylaktickém šoku a alergických reakcích.
CAD	lysin		Stabilizace makromolekul (NK), subcelulárních struktur (ribozomy), stimulace diferenciac buněk, rostlinný hormon.
PUT	arginin <i>via</i> ornithin nebo citrullin	N-methylputrescin SPD, SPM	Stabilizace makromolekul (NK). Subcelulárních struktur (ribozomy), stimulace diferenciac buněk, rostlinný hormon.
AGM	arginin	PUT, N-methylputrescin, SPD, SPM	Stabilizace makromolekul (NK). Subcelulárních struktur (ribozomy), stimulace diferenciac buněk, rostlinný hormon.
PEA	fenylalanin	TYM, dopamin, adrenalin, noradrenalin	Prekurzor TYM.
TYM	tyrosin	dopamin, adrenalin, noradrenalin, synefrin, hordenin	Prekurzor dopaminu, lokální tkáňový hormon, vliv na krevní tlak a koncentrace hladkého svalstva.
TRM	tryptofan	Serotonin, melatonin	Lokální tkáňové a rostlinné hormony (katecholaminy), vliv na krevní tlak, peristaltiku střev, psychické fce.

**Tab. 2: Mikroorganismy produkující BA podle VELÍŠKA (1999):**

Potravina	Mikroorganismy	Produkované aminy
ryby	<i>Morganella morganii</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Proteus krabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Enterobacter</i> <i>aerogenes</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Staphylococcus</i> <i>xylosus</i>	HIM, TYM, CAD, PUT AGM, SPM, SPD
sýry	<i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L.</i> <i>plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L.</i> <i>arabinose</i> , <i>Streptococcus faecium</i> , <i>S. mitis</i> , <i>Bacillus macerans</i> , <i>Propionibacterium</i> sp.	HIM, CAD, PUT, TYM, TRM
Maso a masné výrobky	<i>Pediococcus</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., čeled' <i>Enterobacteriaceae</i>	HIM, CAD, PUT, TYM, PEA, TRM
Fermentovaná zelenina	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i> , <i>Pediococcus</i> sp.	HIM, CAD, PUT, TYM, PEA, TRM
Fermentované produkty ze sóji	<i>Rhizopus oligosporus</i> , <i>Trichosporon beiglii</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	HIM, CAD, PUT, TYM, TRM

Živočišné materiály jako maso, ryby a sýry bývají obvykle hlavními zdroji BA např. HIM, CAD, PUT a TYM. Při skladování dochází za působení enzymové aktivity přítomné mikroflóry ke zvyšování obsahu BA. Obsah některých z nich slouží jako indikátor čerstvosti masa. Např. čerstvé jatečné maso vepřové obsahuje do 7 mg.kg<sup>-1</sup> CAD a PUT, zatímco zkažené maso 60 mg.kg<sup>-1</sup> a více. Vaření má relativně malý vliv na obsah BA, pouze se částečně rozkládají. Na vzniku BA v trvanlivých salámech se mohou podílet MO použité ve startovacích kulturách, ale i MO ze zpracované suroviny. Při skladování ryb kolem teploty 0 °C a nižších je vznik BA zanedbatelný, ovšem při teplotách vyšších je přítomen HIM v tkáních makrelovitých ryb (*Scombridae*), kam patří třeba makrela, která může obsahovat až 300mg.kg<sup>-1</sup> a tuňák dokonce 800 mg.kg<sup>-1</sup> (VELÍŠEK, 1999).

V rostlinných materiálech jako ovoce a zelenina, kde bývá nejčastěji obsažen TYM, se další BA vyskytují pouze v menším množství. Často se nacházejí konjugáty BA se skořicovými kyselinami či mastnými kyselinami. V listech špenátu je obsažen volný HIM v množství kolem 200 – 400 mg.kg<sup>-1</sup>. V banánech se vyskytuje jako hlavní BA TYM. Klíčící ječmen (hlavně v kořeni) obsahuje derivát TYM hordenin. U kaktusů druhu *Lophophora williamsii* je od TYM odvozený protoalkaloid meskalin, který má halucinogenní účinky (byly využívány Aztéky při náboženských obřadech). Citrusové plody *Citrus reticulata* (americké plody podobné mandarinkám) obsahující synefrit (VELÍŠEK, 1999).

#### **2.2.1.4 Biologické účinky BA**

BA jsou látky nezbytné pro organismus, za vysokých koncentrací se však projevují jako látky:

- Psychoaktivní
- Vasoaktivní

Psychoaktivní aminy jsou přenašeči v CNS, vasoaktivní aminy působí na vaskulární systém ať už přímo, či nepřímo. Vasoaktivní aminy se dělí podle účinku:

- Vasokontraktibilní (např. TYM)
- Vasodilatační aminy (např. HIM)

Konzumace má toxické účinky (VELÍŠEK, 1999).

#### **2.2.1.5 Stanovování toxicity BA**

BA se v potravinách stanovují z důvodů možného výskytu jedovatých látek a z důvodu označování kvality potravin. Toxicita aminů silně závisí na individuální schopnosti detoxikace (SHALABY, 1996). Nízké množství BA během metabolismu v lidském střevě způsobí, že potravina se méně aktivně rozkládá. Do tohoto detoxikačního systému spadají enzymy jako je např. diaminoxydáza (DAO). Když se však tráví velké množství BA, detoxikační systém není schopen je účinně eliminovat. Genetické předpoklady, jako jsou nemoci zažívacího traktu nebo inhibice DAO aktivity, mohou způsobit, díky lékům či alkoholu, potlačení detoxikace aminů (KŘÍŽEK ET AL., 2002). Mezi nejtoxičtější BA patří HIM, který se v těle vyskytne po konzumaci ryb z rodu *Scombridae*, a TYM. Otravy způsobené BA jsou hlášeny



pravidelně z celého světa (CHEN ET AL., 2008). HIM má inkubační dobu v minutách po požití a mezi příznaky patří bolest hlavy, otok obličeje a pocení, vyrážka a svědění, zvracení, nevolnost, průjem a bušení srdce (BECKER ET AL., 2001). TYM může způsobit nebezpečnou intoxikaci, pojmenovanou jako *cheese relaction* neboli hypertentní krize, která je doprovázená silnou bolestí hlavy a může vést až k nitrolebečnímu krvácení, neuronovému poškození či dokonce selhání srdce a plic (JOOSTEN, 1988). Některé BA, jako jsou PUT, CAD, TRM a AGM dokonce zvyšují toxicitu HIM a TYM. Výbornou prevencí před tvorbou BA je tedy skladování při odpovídajících teplotách nebo balení v modifikované atmosféře (HALASZ ET AL., 1994).

BA a PA mohou být nitrósovány nebo mohou fungovat jako prekurzory sloučenin, z nichž mohou vznikat karcinogenní N-nitrosaminy. Za karcinogenní se považují nitrosaminy, které obsahují sekundární aminoskupiny, jakými jsou SPD, SPM a AGM (SHALABY, 1996).

### **2.2.2 Co jsou polyaminy, kde se vyskytují a jejich význam**

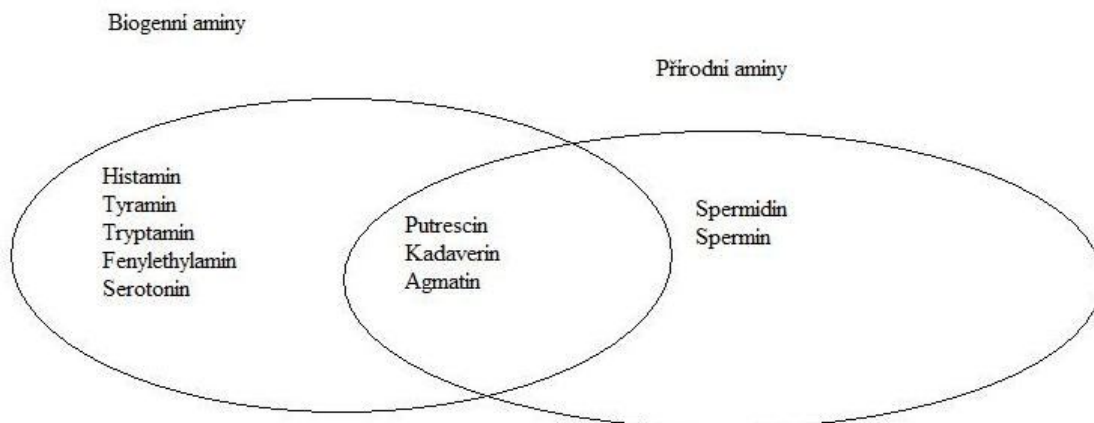
Mezi nejběžnější a nejznámější výživové polyaminy (PA) patří: putrescin (PUT) (1,4-diaminobutan), spermidin (SPD) (N-(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutan) a spermin (SPM) (N,N'-bis-(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutan).

Nacházejí se od mikroorganismů přes buňky živých organismů až po savce a vykonávají řadu fyziologických funkcí (KALACĀ A KRAUSOVÁ, 2005).

Pro svůj velký biologický význam se začaly od devadesátých let 20. století vyřazovat ze skupiny biogenních aminů, a to z důvodu jejich odlišné úlohy v eukaryotické buňce, a tvoří skupinu polykationických, kterým se jinak říká fyziologické polyaminy:

- Putrescin i přesto, že je strukturou diamin, stojí na pomezí BA a PA a řadí se do obou skupin, je spíše zařazován do skupiny PA z důvodu jeho funkce jako prekursor obou biologicky aktivních „pravých“ polyaminů, spermidinu (SPD) a sperminu (SPM) (PUT → SPD → SPM) (KOZOVÁ ET AL., 2009).

**Obr. 2: Rozdělení přírodních aminů**



Putrescin a spermidin patří mezi přirozené polykationty. Za fyziologických podmínek tvoří na amino skupinách 2,3 nebo 4 kladné náboje. Ty jsou schopné za vzájemného působení se zápornými strukturami buněčného povrchu zajistit řadu specifických funkcí v metabolismu. V buňce jsou navázány na makromolekuly nukleových kyselin (DNA a RNA) elektrostatickou a kovalentní vazbou (KALÁČ A KRAUSOVÁ, 2005):

- Především SPD a SPM jsou důležité při léčbě zranění a při růstu, dozrávání a obnově buněk střevní sliznice, především v období vývoje savců a dospívání – způsob organismu přizpůsobit se novému prostředí (DELOYER, PEULEN A DANDRIFOSSE, 2005; PEULEN A DANDRIFOSSE, 2004)
- Účastní se při fyziologické apoptóze (= geneticky programovaná buněčná smrt), která je např. regulací homeostaze orgánů či embryonálního vývoje (GUGLIUCCI, 2005).
- Účastní se množení a dělení buněk, což má velký podíl na růstu nádorů – tkáň zhoubného nádoru obsahuje rychle se dělící buňky a PA urychlují jeho rozvoj (BACHRACH, 2004; THOMAS A THOMAS, 2003; WEISS ET. AL, 2002).
- Při malém množství PA může dojít k objevení citlivosti na výživové alergeny, pravděpodobnost alergie může být až 80 %, kdy je zvýšená propustnost střevní sliznice pro makromolekuly a nedostatečně vyvinutý

imunitní systém střeva - pozorováno u kojených krys i u dětí (DANDRIFOSSE ET AL., 2000).

- PA putrescin a kadaverin jsou používány i v některých kosmetických přípravcích podporujících růst vlasů a chrání pokožku před škodlivým UV zářením – působí jako antioxidanty (BARDÓCZ ET AL., 1995).
- V dnešní době se studuje souvislost zvýšeného obsahu PA v nervové tkáni u Alzheimerovy choroby, ale také vliv PA na zánětlivá onemocnění trávicího traktu jako je např. ulcerózní kolitida nebo Crohnova choroba (HYND, SCOTT A DODD, 2004; WEISS ET AL., 2004).
- PA mají také afinitu k některým receptorům CNS, které blokuje ethanol při závislosti člověka na alkoholu (FONT ET AL., 2005).
- Každý orgán v těle požaduje PA a potřeba závisí na fyziologickém a patologickém stavu jedince (MOINARD, CYNOBER A DE BANDT, 2005).

Dle BAGNONIHO A TASSONNIHO (2001) se PA rozdělují dle formy, ve které se v buňkách vyskytují na:

1. Volné
2. Vázané

*Volné polyaminy* ovlivňují úroveň schopnosti růstu buněčného obsahu PA.

*Vázané polyaminy* regulují buněčný obsah volných PA.

Vázané bývají PA kovalentně k molekule např. rostlinných fenolů či membránových fosfolipidů. Vázané PA se dají uvolnit hydrolýzou silnou kyselinou (KALAČ A KRAUSOVÁ, 2005).

KALAČ A KRAUSOVÁ (2005) říkají, že další možné rozdělení vázaných PA je na:

- 1) Rozpustné
- 2) Nerozpustné

To se provádí pomocí kyseliny chloristé, která vyluhuje rostlinou matrici, připravovanou k izolaci PA během analytických procedur.

### 2.2.3 Vznik polyaminů a jejich katabolismus

Polyaminy: PUT, SPD a SPM vznikají z metioninu (Met) a argininu (Arg) biosyntézou nebo se odvozují *de novo* syntézou, tak absorpcí z mimobuněčných zdrojů (KOZOVÁ ET AL., 2008).

Zdroje PA podle KALAČE (2006):

- 1) Biosyntéza, kde vzniká arginin (Arg) přes ornitin (Ort) s ornitinovou dekarboxylázou (EC 4.1.1.17), která začíná tvorbu putrescinu (PUT)
- 2) syntéza a uvolnění za pomoci gastrointestinální bakteriální flóry
- 3) přímo z přijímané potravy

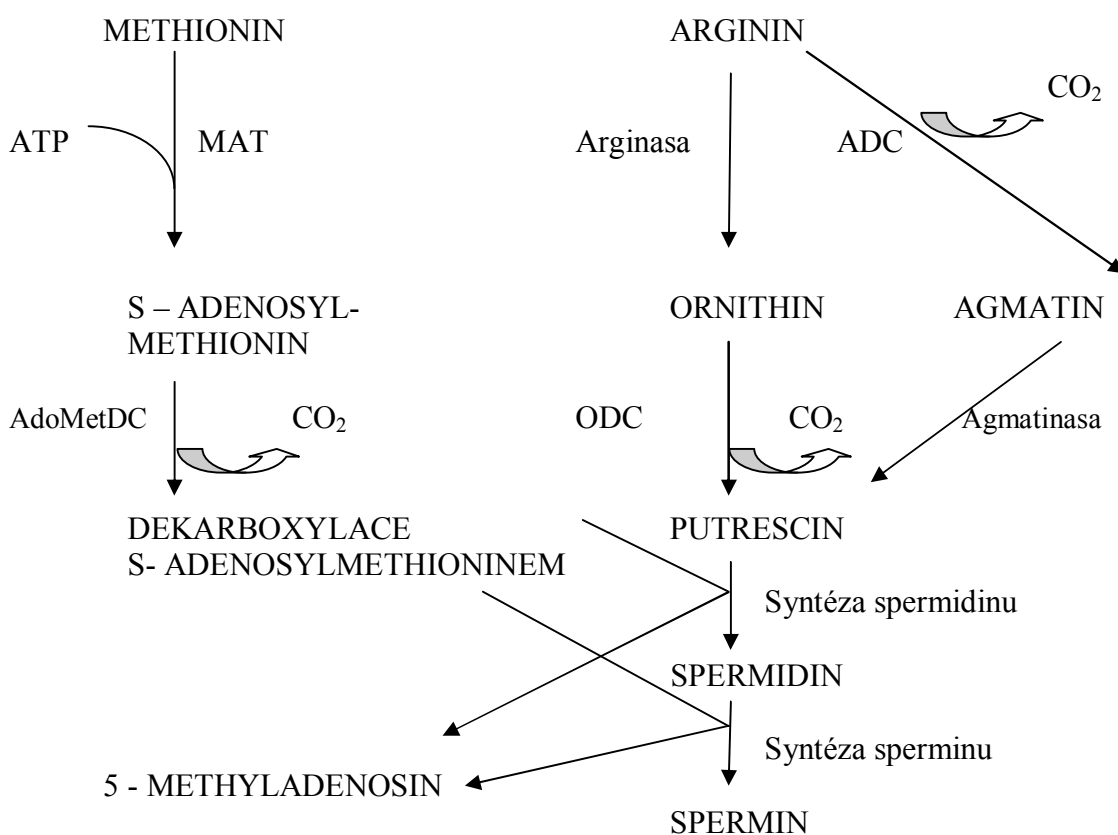
*Biosyntéza:* je v savčích buňkách velmi usměřována enzymy ornithindekarboxylázou (ODC) a S-adenosylmethionidekarboxylázou (AdoMetDC). Hlavní roli při tvorbě putrescinu v buňkách savců má ornithindekarboxyláza. Přeměnu putrescinu (PUT) na vyšší polyaminy (PA) provádí metionin (Met) poskytnutím aminopropylové skupiny.

Syntéza probíhá za účasti enzymů aminopropyltransferových, spermidinové a spermiové syntáze. U zdravých buněk je kontrolována hladina polyaminů katabolickými a biosyntetickými enzymy (KALAČ A KRAUSOVÁ, 2005).

Nedokonalá kontrola syntézy může být příčinou například zvyšující se hladiny polyaminů v nádorových buňkách ve srovnání se zdravými (KALAČ A KRAUSOVÁ, 2005). U starších lidí s omezenou biosyntetickou schopností je problém tvořit PA biosyntézou (KRAUSOVÁ ET AL., 2007).

Vyšší rostliny, mikroorganismy (MO) a houby dokáží syntetizovat PUT i nepřímo účinkem ornithindekarboxylázy (ADC) přes AGM (HILLARY A PEGG, 2003).

**Schéma 1.: Schéma biosyntézy polyaminů (KALAČ A KRAUSOVÁ, 2005)**



#### 2.2.4 Zvyšující se obsah polyaminů a potraviny s jejich výskytem

Polyaminy jsou v malých dávkách přirozenou složkou potravy. Požadavek na PA je vyšší v období růstu mladých lidí a také během dospívání, kvůli snižování aktivity enzymů podílejících se na polyaminových biosyntézách (KALAČ, 2006).

Vysoká hladina PA je v mladých aktivních tkáních a orgánech. K velkému snížení polyaminů (SPD tak i SPM) ve svalovině, ale i v orgánech dochází během stárnutí (KRAUSOVÁ ET AL., 2007).

Nejvyšší obsah mezi PA má běžně PUT, který je spojen s působením některých bakterií a to převážně rodů *Enterobacterium* a *Clostridium* (KALAČ A KRAUSOVÁ, 2005).

Vyšší obsah SPM ve srovnání s SPD je zaznamenán u potravin živočišného původu – hlavně u masa.

Opačný poměr je typický pro potraviny rostlinného původu.

Zatímco PUT se tvoří za nevhodných skladovacích podmínek potravin pomocí velkého množství bakterií, SPD a SPM v potravinách pocházejí předně ze syrových potravin. (KRAUSOVÁ ET AL., 2008)

**Tab. 3.:Potraviny s obsahem SPD,SPM a PUT podle KALAČE A KRAUSOVÉ (2005):**

Potraviny s obsahem	
↑SPD nad 30mg/kg	Luštěniny, zejména sojové boby, hrušky, květák, brokolice, chleba, obilniny a mnoho dalších
↑SPM 20 – 60mg/kg	Maso, drůbež a masné výrobky, nejvíce játra, červené maso teplokrevných zvířat
↓SPM	ryby
↑PUT nad 40mg/kg	Pomeranče, mandarinky, pomerančová šťáva, grapefruitová šťáva, kysané zelí, kečup, kvašené sojové výrobky, mražený hrášek
↓ PUT	Rybí omáčky, tresčí jikry, konzervované krabí maso
↑ PA	Sýry, především zrající
↓ PA	Kravske mléko, jogurt, mateřské mléko, slepičí vejce

↑ ... vysoký obsah

↓ ... nízký obsah

## 2.3 Ovce

### 2.3.1 Původ ovcí

Ovce, ještě spolu s kozami, patří mezi nejstarší domestikovaná hospodářská zvířata. Na našem území jsou chovány již od 9. století. Ovčí produkty poskytovaly zdroj především potravy, oděvů a na úplném začátku byly ovce používány jako obětní zvíře, což dosud trvá i v dnešní době v Saudské Arábii. Ovčáctví u nás dosáhlo největšího rozmachu v 19. století v období „zlatého rouna“, kdy zde bylo přes 2 milióny kusů ovcí. Ovšem v roce 1920 došlo ke značnému snížení na 217 tisíc ks a v roce 1935 dokonce na pouhých 40 tisíc ks (VEJČÍK, 2007).

Chov ovcí měl velký význam při hledání nových progresivních šlechtitelských postupů, chovy ovcí zvyšovaly úrodnost půdy a položily základy textilní výroby (HORÁK, 1985).

K výraznému zvýšení stavu ovcí došlo v roce 2004, kdy bylo v ČR chováno již 115 852 kusů. Zvýšení ovlivnilo zejména:

- Austrálie a Nový Zéland nakupují levně vysoce kvalitní vlnu
- Stát podporuje nákup plemenných ovcí s masnou užitkovostí
- Dotace na chovy ovcí (VEJČÍK, 2007):

#### **2.3.1.1 Dělení ovcí podle původu:**

- 1) Muflon evropský – jediná divoce žijí ovce, dnes hojně žije na Sardinii a Korsice
- 2) Muflon asijský – především v Malé Asii, větší než muflon evropský
- 3) Ovce kruhorohá neboli arkal - ovce stepí, od ní odvozena nejpočetnější skupina dlouhoocasých ovcí
- 4) Argal – nejmohutnější vysokohorská a středoasijská ovce, krátkoocasá (BŘEZINOVÁ ET AL., 1952)

#### **2.3.2 Plodnost**

Reprodukce patří k hlavním užitkovým vlastnostem u hospodářských zvířat. Reprodukce přímo ovlivňuje masnou a mléčnou produkci, ale i produkci kůže a nepřímo produkci vlny (ŘÍHA ET AL., 2001).

Plodností se všeobecně rozumí schopnost zvířat produkovat pohlavní buňky schopné oplození a je základem k rozšiřování a udržení populace zvířat (VEJČÍK, 2007).

##### **2.3.2.1 Faktory ovlivňující reprodukci:**

Reprodukce je ovlivněna řadou biologických faktorů, mezi nejdůležitější patří podle HORÁKA (1984) tyto:

- *Pohlavní dospělost:* Je dána plemennou příslušností, pohlavím, zdravím, ošíváním i ustájením. Pohlavní dospělost nastává celkem brzy a to u beránek ve věku 3 – 6 měsíců a u jehnic o trochu později, v 5 – 10 měsíců. VEJČÍK (2007) udává pohlavní dospělost u jehnic už ve věku 4 – 7 měsíců. V té době by mělo dojít k oddělení beránek od matek a jehnic.

- *Chovatelská dospělost*: má větší význam, než věk, který se liší u plemen. Velký význam má tedy kondice a živá hmotnost zvířete. Živá hmotnost v době zapuštění má být dle VEJČÍKA (2007) 65 – 75% naproti tomu hmotnost živých zvířat podle HORÁKA (1984) má být 40 – 60%.
- *Pohlavní cyklus*: u ovcí je polyedrický a trvá 16 – 18 dnů. Ale udává se rozpětí 14 – 21 dnů. Říje trvá 1 – 2 dny (16 – 48 hodin), ale u plodných ovcí říje trvá déle, nástup ovulace je na konci říje. Délka gravidity se udává 150 ± 7 dní. Plodná plemena mají délku gravidity 142 – 145 dnů.
- *Počet ovulovaných vajíček*: 1 - 4
- *Vlastní porod*: trvá 1 – 2 hodiny
- *Normální doba odchodu z lůžka*: do 6 hodin po porodu
- *Zapouštění ovcí*: vhodnost inseminace je v druhé polovině říje, výběr provádí ovčák 2x denně pomocí berana prubře, plemenní berani by se měli před začátkem připouštěcího období ostříhat.
- *Počet jedinců ve vrhu*: bývá příznivé 4 – 6 jehňat.

### 2.3.3 Masná užitkovost

Masem v širším smyslu rozumíme všechny požitelné části těla jatečně opracovaných zvířat. V užším slova smyslu svalové buňky, tedy hladké nebo pruhované vlákna s cévami, šlachami, blánami, tukem a kostmi. Ovčí maso má specifickou chuť i vůni, je lehce stravitelné a obsahuje velké množství živin. Má vysoký obsah bílkovin, které jsou bohaté na esenciální aminokyseliny (např. methionin, histidin, arginin, fenylalanin, ...), vitamíny B, minerální látky. Ovčí maso má příznivou skladbou nenasycených mastných kyselin (olejová, linolová, ...). Kvalita tuku se zvyšuje se zvyšováním obsahu nenasycených mastných kyselin. A zároveň zvyšováním obsahu nenasycených mastných kyselin v potravinách při jejich příjmu klesá v krvi hladina cholesterolu, čehož může být využito při dietách nebo speciálních jídelnících (GAJDOŠÍK A POLÁCH, 1984).

Ovčí maso se dělí na skopové, které je z dospělých jedinců a na maso jehněčí, které pochází z mladých kusů zvířat, a to do 1 roku věku. Na kvalitu ovčího masa má vliv stejně jako u ostatních hospodářských zvířat: věk, výživa, plemeno, pohlaví,



ranost, zdravotní stav, klimatické podmínky, ošetřování, ustájení, ale i kuchyňská úprava. Nej kvalitnější maso je ze zvířat ve věku 4 – 6 měsíců (VEJČÍK, 2007).

### 2.3.3.1 Organoleptické vlastnosti masa:

- Jehněčí maso - bývá šedočervené barvy, dobré chuti, šťavnaté, křehké a bez skopové vůně.
- Maso skopců do 1 roku – červená barva převažuje, svalová vlákna jsou pevnější než u masa jehněčího, maso má typické skopové aroma.
- S narůstajícím věkem je aroma silnější a jeho specifické vlastnosti jsou důvodem malé oblíbenosti tohoto masa, jehněčí maso tyto vlastnosti nemá (VEJČÍK, 2007).

### 2.3.3.2 Faktory určující kvalitu masa:

- *Barva* – postupný růst je charakterizovaný růstem červených myofibrilů, to odpovídá pozorování, že koncentrace mioglobulinu se zvyšuje pomalu a v dospělosti rychleji, maso se stává červenějším a tmavším, ztráta barvy čerstvého masa závisí na pH a teplotě uskladnění
- *Intramuskulární tuk* – jinak známý jako mramorování, není u ovcí významný, ale u skotu ano, u skotu způsobuje křehkost masa
- *Křehkost* – tuhost a křehkost závisí hlavně na stáří zvířete, ale také na druhu pojivové tkáně
- *Chuť a vůně* – je u masa ovcí velmi specifická, většina výzkumů o chuti masa byla zaměřována převážně na tuk než libové maso; kontroly se z tohoto důvodu zaměřují na tukové složení a metabolismus (ŘÍHA ET AL., 2001).

### 2.3.3.3 Jatečná hodnota

*Pojmem jatečná hodnota* se chápe jako hmotnost jatečného trupu, vyjádřená v % živé hmotnosti (ŘÍHA ET AL., 2001),

*Výtěžnost* je poměr hmotnosti jatečně opracovaného těla váženého k čisté nákupní hmotnosti (VEJČÍK, 2007).

Nejznámější systém na rozdělování do jatečných tříd je systém SEUROP. V systému jsou hodnoceny jatečné trupy podle zmasilosti a ztučnění. Je 6 tříd zmasilosti a 5 tříd protučnělosti. Jatečným trupem se rozumí tělo zabitého zvířete, po stažení z kůže, vykrvení, vyvrhnutí, bez hlavy a končetin, bez ocasu, bez mléčné žlázy, pohlavních orgánů, vnitřností, pouze ledviny a ledvinový lůj zůstávají v těle (VEJČÍK, 2007).

Zařazení jatečných ovcí do 3 skupin (VEJČÍK, 2007):

- H – jehňata do 13 kg hmotnost jatečného trupu
- J – jehňata do 1 roku
- O – ovce ostatní

*Třídy zmasilosti* (VEJČÍK, 2007): hodnotí se záď, hřbet a bedra, plecka

- S – extra
- E – výborná
- U – velmi dobrá
- R – dobrá
- O – průměrná
- P – slabá

*Třídy protučnělosti*:

- Označují se číslicemi 1 – 5, určuje se míra povrchového ztučnění trupu a protučnění v hrudní dutině jatečných zvířat (VEJČÍK, 2007).

Dělení opracovaného těla ovcí podle HORÁKA (1985):

- 1) krk s kostmi
- 2) šrůtka s kostmi
- 3) hřbet s kostmi
- 4) bok s kostmi
- 5) svíčková
- 6) plece s kostmi

## 7) kýta

Podle kvality se opracované části zařazují do 4 jakostních skupin (GAJDOŠÍK A POLÁCH, 1984) :

- I. Třída – hřbet, kýta
- II. Třída – plec, zákrčí
- III. Třída – šrůtka, bok
- IV. Třída – krk

V ČR je nejvyšší poptávka po skopovém masu v období Velikonoc, zatímco například ve Spojených arabských emirátech je vyhledávaným a běžným typem masa. Ve světě připadá na obyvatele zhruba 2 kg jehněčího masa na osobu za rok, zatímco ČR je slabým konzumentem a spotřeba je kolem 400g/osoba/rok, a to právě v již zmíněném období Velikonoc.

### 2.3.3.4 Plemena ovcí s masnou užitkovostí

Užitkovost u ovcí bývá většinou kombinovaná jako i u jiných druhů hospodářských zvířat. Ovce se chovají pro maso, mléko, vlnu, kůži, lanolin, ale využívají se z nich i střeva, droby, lůj, předžaludky, rohy, kosti a jiné.

Plemena s masnou užitkovostí v odchodu by měla mít plodnost 140 % a přírůstky jehňat v odchovu by měly být minimálně 300g/den.

Popis masných plemen: Berrichone du Cher a Charollais podle GAJDOŠÍKA A POLÁCHA (1984):

*Berrichon du Cher*: Je původem francouzské plemeno, polojemnovlné, vzniklo přísnou selekcí a křížením plemene berrichone a leicester. Je malého až středně velkého tělesného rámce. Obě pohlaví jsou bezrohá, mají široká čela a jsou celá bílá. Hmotnost bahnic je 70 – 110 kg a beranů 110 – 125 kg. Plodnost 140 – 150 %.

*Charollais*: Pochází z Francie a též se řadí do polojemnovlného plemene. Plemeno je bezrohé a má narůžovělé zabarvení kůže na obličejí a uších. Vlna je bílá sortimentu A – B. Plodnost je v rozmezí 140 – 160%. Hmotnost bahnic kolísá v rozmezí 70 – 80 kg a beranů 110 – 140 kg.

## 2.4 Analytické metody

### 2.4.1 Chromatografické metody

#### 2.4.1.1 Historie chromatografie

Objev chromatografie sahá do 90. let 19. století a je spojován se jménem ruského botanika M. Cvětá, který použil skleněnou kolonu naplněnou uhlíčitánem vápenatým pro dělení a izolaci barviv z rostlinných extraktů. Název metody vznikl spojením dvou řeckých slov „chroma“ (barva) a „grafein“ (psát). Metoda byla mnoho let zapomenuta a znovu objevena v roce 1914 Martinem a Syngem, kteří získali za rozvoj této metody v roce 1952 Nobelovu cenu (DRBAL A KŘÍŽEK, 1999).

#### 2.4.1.2 Dělení chromatografie podle tvaru separačního prostoru

**Tab. 4: Dělení chromatografie**

Hlavní typ chromatografie	MF	SF	Typ chromatografie	Zkratka	Použití
Plynová chromatografie (GC)	plyn	kapalina	Plynová rozdělovací chromatografie	GLC	Toxikologie, potravinářství
		pevná látka	Plynová adsorpční chromatografie	GSC	farmacie, aj.
Kapalinová chromatografie (LC)	kapalina	kapalina	Kapalinová rozdělovací chromatografie	LLC	Toxikologie, potravinářství
			Papírová chromatografie	PC	farmacie, aj.
			Kapalinová adsorpční chromatografie	LSC	
		Pevná látka	Iontová chromatografie	IEC	Úprava vody
			Tenkovrstvá chromatografie	TLC	Potravinářství, toxikologie, farmacie, aj.

## 2.4.2 Princip vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC = High Performance Liquid Chromatography) je pokročilá, instrumentálně náročná technika kapalinové chromatografie. Mobilní fáze (MF) musí být aplikována v přetlaku jednotek až desítek MPa a je vedena ze zásobníku MF přes vysokotlaké čerpadlo. Z čerpadla je vedena MF přes tlumič pulzů čerpadla do kolony. Dávkování vzorku obvykle zajišťuje dávkovací šesticečný ventil. Separační kolona v HPLC bývá většinou vyrobena z nerez, oceli či speciální skleněné trubice o vnitřním průměru 2 – 20 mm a délce nejčastěji 10 – 20cm a musí odolat vysokému tlaku MF. Kolony jsou naplněné SF. V případě HPLC to bývá oxid křemičitý různě chemicky modifikovaný. K detekci se využívá instrumentálních metod např. fotometrie v UV, fluorometrie, hmotnostní spektrofotometrie či elektrochemické metody (DRBAL A KRÍŽEK, 1999).

### 2.4.2.1 Čerpadla pro HPLC

MF má tlaky od 1 do 60 MPa, v průtocích od 0,1 do 10 ml.min<sup>-1</sup>. Dříve se využívaly lineární dávkovače, kde byl problém v dávkování za náročných tlakových podmínek. Jednalo se o válcovou komoru s objemem 0,2 – 0,5 l, ve které fungoval píst na principu injekční stříkačky. Výhodou bylo vyloučení pulzace MF, zatímco nevýhodou představovala omezená kapacita rezervoáru a přerušování pro opětovné plnění (DRBAL A KRÍŽEK, 1999).

Nyní je využíváno kontinuálně pracující pulzující čerpadlo pístové či membránové. Při každém pohybu pístu dojde k vytlačení malého objemu MF do systému. Pulzace se tlumí pomocí dalšího čerpadla pracujícího v opačné fázi či tlumiče pulzů. Nejnovější čerpadla mají elektronicky řízený zpětnovazební systém, reziduální tlakové pulzace rovnou řídí otáčky motoru (DRBAL A KRÍŽEK, 1999).

### 2.4.2.2 Dávkování vzorků

Dávkování je možné podobně jako u GC mikrostříkačkou přes těsnění ze silikonové gumy (tzv. septum). Z důvodu vysokých provozních tlaků v koloně je tento způsob využíván jen velice málo. Dalším způsobem, také málo využívaným, je nástřik mikrostříkačkou pomocí tzv. „stop flow“ ventilu, kde dojde ke krátkému rozpojení čerpadla s kolonou a opětovnému spojení po nástřiku. Dnes se dává

největší přednost nástřiku vzorku s použitím tzv. šesticestného kohoutu s dávkovací smyčkou. Ta se naplní vzorkem o konstantním objemu, následně se přepne kohout a eluent protéká smyčkou a unáší vzorek do kolony (DRBAL A KŘÍŽEK, 1999).

### **2.4.2.3 Kolony pro HPLC**

Využívány jsou rovné kolony v délce 10 – 100 cm a o vnitřním průměru 0,2 - 2 cm. Při složitější separaci směsi vzorku se řadí kolony za sebe. Pro přírodní látky obsahující velké množství balastních látek, které mohou vyvolat poškození či znehodnocení kolony, se před vlastní kolonou zařazuje ochranná předkolonka. Je levnější než samotná kolona, její výměnou chráníme separační kolonu. Velikost zrn sorbentu pro plnění je 3 – 50  $\mu\text{m}$  (DRBAL A KŘÍŽEK, 1999).

### **2.4.2.4 Detektory HPLC**

HPLC k detekci využívá nejčastěji průtokový fotometrický či fluorometrický detektor. Eluát protéká měrnou celou malého objemu s velkou optickou délkou nejčastěji  $V = 5 - 10 \mu\text{m}$ ,  $l = 10 \text{ mm}$ . Vlnová délka odpovídá maximální absorpci analyzované látky. Moderní přístroje mají detektory s možností libovolně nastavit vlnovou délku či tzv. diode array detektorem, který změří v daném okamžiku celé UV/VIS spektrum složky. Tato informace je důležitý kvantitativní údaj o sledované složce. Málo využívaný bývá např. refraktometrický detektor, který registruje změny indexu lomu eluátu. Ale je vhodný při dělení např. cukrů (DRBAL A KŘÍŽEK, 1999).

### **2.4.2.5 Kapalinová chromatografie a BA**

Chromatografie je důležitá metoda pro stanovení BA v potravinách. První postupy se soustředily hlavně na stanovení důležitých toxických BA, zejména HIM a TYM. Pro stanovení byla navržena tenkovrstvá chromatografie (TLC), chromatografie iontových výměn (IEC), chromatografie plynová (GC) a velmi významná je kapalinová chromatografie (HPLC). Dobré výsledky též poskytne i kapilární zónová elektroforéza (CZE) (LAPA – GUIAMARAES A PICKOVA, 2004).

Před vlastní analýzou se aminy extrahují ze vzorku do roztoku. Pro tento účel se často využívá kyselina chloristá (MORETOM A CONTOM, 1996).

Mnohé aminy nemají dostatečnou absorpci a tak se nedají stanovovat přímo. Je třeba je před analýzou derivatizovat. Jako nejběžnější činidlo pro derivatizaci aminů se používá dansyl chlorid. TLC dansyl derivátů aminů se stále využívá pro svou rychlost a jednoduchost při screeningu u více vzorků zároveň. TLC metoda je velmi využívána v potravinářském průmyslu (SBALILA, VASUNDHARA A KUUDAVALLY, 2001).

Detekční limit (LOD) je 5-10 ng při fluorescenční densitometrii (LAPA – GUIAMARAES A PICKOVA, 2004).

Pro derivatizace se používají i jiná činidla. VANDENABEELE ET AL. použil 2-chlorethylnitrosourea, ale i přesto je nejčastěji používaný pravděpodobně dansyl chlorid (VANDENABEELE ET AL., 1998; HERNANDEZ-BORGEZ ET AL., 2007; PROETOS ET AL., 2008; SOUFLEROS ET AL., 2007).

#### **2.4.2.6 Využití metody HPLC pro analýzu BA a PA**

- Stanovení přirozeného obsahu PA v čerstvém hovězím a vepřovém mase, krátce po porážce, dřív než bude skladované, zpracované nebo kuchyňsky upravované. Zde byl zjištěn vysoký obsah SPM, zatímco obsah PUT a SPD se zdá, že má menší význam z pohledu výživy. Zvýšený obsah SPM se může předpokládat u masa mladých a rychle rostoucích zvířat. Žádný ze současně stanovovaných BA HIM, TYM, TRM a CAD nebyly přítomny v analyzovaných vzorcích. Což naznačuje bezvýznamnou aktivitu bakterií schopných dekarboxylace odpovídajících AMK během sledovaného počátečního skladování čerstvého masa (KALAČ A KRAUSOVÁ, 2005).
- Stanovení PA v čerstvém a zpracovaném hovězím a vepřovém mase, kdy bylo zjištěno, že obvykle obsah PUT, SPD a SPM v čerstvém mase je <2, <5 a 20 – 40 mg/kg. Současné informace o změnách PA během skladování se shodují s tvorbou PUT za pomoci bakteriální činnosti. Zpracování masa se pravděpodobně nepodílí na změnách obsahu SPD a SPM (KALAČ, 2005).
- Dále byly stanovovány PA v nefermentovaných masových výrobcích, salámech a klobásách a sušených fermentovaných masných výrobcích (KALAČ, 2005).

- Stanovení obsahu biologicky aktivních PA v játrech hovězího dobytka, prasat a kuřat po porážce, kdy byly studovány biogenní aminy HIM, TYM, TRM, CAD, které nebyly přítomny v analyzovaných vzorcích jater v zaznamenaném množství. Játra všech jatečných zvířat patří ale mezi potraviny s vysokým obsahem SPD a SPM. Ovšem podobně jako u jiných potravin se obsah PA velmi lišil. Z tohoto důvodu je to ztížení pro využití výsledků pro kontrolovanou lidskou výživu (KRAUSOVÁ ET AL., 2006).
- Stanovení biologicky aktivních PA ve vepřových ledvinách a slezině, po porážce a změny během skladování v chladárně a během kuchyňské úpravy, které byly následně po analýze zařazeny mezi potraviny s vysokým obsahem PA (KOZOVÁ ET AL., 2008).

### 2.4.3 Ultra výkonná kapalinová chromatografie (UPLC)

Od roku 2004 byla navržena nová generace chromatografických kolon, které vydrží vysoký tlak (až do 1000 barů). Tento systém byl obchodně označen UPLC (NGUYEN ET AL., 2007). UPLC využívá malé částice (<2 μm) v krátkých kolonách (5 cm). Toto uspořádání může výrazně zkrátit dobu analýzy bez snížení účinnosti. Při porovnání s HPLC metodou, UPLC metoda vykazuje mnoho výhod, jako je zkrácení doby, menší spotřeba rozpouštědel při zachování vysoké rozlišovací schopnosti (LIU ET AL., 2007)

#### 2.4.3.1 Využití metody UPLC pro stanovení BA a PA

- Moderní metoda UPLC byla využita ke stanovení obsahu BA a PA v některých druzích evropských hub (divoce rostoucí jedlé houby), kdy extrahované aminy z hub (*Boletus edulis*, *Xerocomus badius*, *X. chrysenteron* a *Suillus variegatus*) byly derivatizovány dansyl chloridem. Byl stanovován obsah PUT, CAD, HIM a TYM. PUT a SPD byly aminy, které se vyskytovaly v nejvyšších úrovních v plodnicích divoce rostoucích hub hned po sběru, zatímco obsah dalších BA a SPM byl výrazně nižší. Nejvyšší obsah SPD se vyskytoval v částech tvořících spory. Houby se řadí mezi potraviny s největším zaznamenaným obsahem SPD (DADÁKOVÁ, PELIKÁNOVÁ A KALAČ, 2009).



#### **2.4.4 Iontová chromatografie a BA**

IEC je obzvláště vhodná pro komplexní matrice. Výluhy v kyselině chloristé byly vstříkovány bez dalších úprav do sloupce výměny kationtů a vyluhovány roztokem kyseliny metansulfonové. LOD byl vyšší v porovnání s ostatními chromatografickými metodami a to 7 – 12 mg/ kg (FAVARO ET. AL, 2007).

#### **2.4.5 Plynová chromatografie a BA**

Není moc často využívanou metodou při stanovování aminů. Slouží například ke stanovení obsahu BA v pivu a víně (PAIK, CHOI A KIM, 2006).

#### **2.4.6 Elektromigrační metody**

Elektroforéza je elektromigrační separační analytická metoda, kde principem metody je pohyb vzorku v elektrickém poli. Dělení je založené na rozdílné pohyblivosti částic v elektrickém poli. Pohyblivost závisí na: velikosti náboje, velikosti a tvaru molekul, podmínkách prostředí (pH), kde dělení probíhá a na síle elektrického pole. Elektromigrační metody pracují výhradně v kapalně fázi (DRBAL A KRÍŽEK, 1999).

Máme několik druhů elektroforéz: zónová elektroforéza (ZE), izotachoforéza, izoelektrická fokusace a elektrochromatografie.

##### **2.4.6.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)**

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) již 100let je založena na principu klasické elektroforézy. Je to vysoce moderní a perspektivní analytická technika. Označuje se také jako vysokoúčinná kapilární elektroforéza (HPCE). Jedná se o jednu z nejdokonalejších metod k dělení v současně době, dokonce lepší než HPLC či GC (DRBAL A KRÍŽEK, 1999). Předností kapilární elektroforézy je vysoká rozlišovací schopnost, malá spotřeba rozpouštědel a krátká doba analýzy.

##### **2.4.6.2 Kapilární elektroforéza (CZE)**

U kapilární elektroforézy dochází k dělení směsi analyzovaných látek ve velmi tenké křemenné kapiláře s vnitřním průměrem 50-100  $\mu\text{m}$ . Pracovní stejnosměrné napětí (desítky kV) vytváří stejnosměrné elektrické pole, ve kterém se

pohybují složky směsi. Detektorem CZE je fotometrická detekce jako u HPLC (DRBAL A KRÍŽEK, 1999).

Vzorek se vstříkuje do kapiláry na anodovém konci v objemu 1 – 10 nl, to je výhoda oproti chromatografickým metodám (1000x nižší množství). Kapilára je ponořena do tlumivého roztoku. V kapiláře vzniká vlivem vloženého vysokého napětí elektro-osmotický tok, který žene ionty směrem k detektoru. Během toho dochází k jejich dělení. Na kvalitu dělení má vliv: délka kapiláry, rychlost elektro-osmotického toku (EOT), pohyblivost separovaných iontů, pro které je důležité pH a teplota roztoku, při níž dělení probíhá. Kapilára se obaluje vrstvou polymeru (např. polyakrylamid), který zvyšuje mechanickou odolnost kapiláry (DRBAL A KRÍŽEK, 1999).

#### **2.4.6.3 Elektroforéza BA a PA**

Aromatické a heterocyklické BA mohou být stanovovány pomocí kapilární zónové elektroforézy (CZE) bez derivatizace díky přirozené absorpci UV světla. Analýzy HIM jsou rychlé (doba migrace mezi 4 – 9 min. HIM v rybách byl stanoven ve fosfátovém pufru o pH 2,5 (ROSSANO ET. AL, 2006). U rajčat a rajčatového protlaku byl použit citrátový pufr o pH 2,5 (BOLYGO ET. AL, 2000).

Obecně musí být aminy před analýzou CZE derivatizovány. Pro vzorky potravin byl navržen 6-aminoquionyl-N-hydroxysuccinimidyl karbonát. Sedm BA nejběžněji se vyskytujících v potravinách – PUT, CAD, SPD, SPM, HIM, TYM a TRM, byly analyzovány za 25 minut (KOVACÍ, SIMON – SAKARDI a GANZLER, 1999). Stejná skupina aminů byla analyzována za 15 – 35 minut za použití velmi jednoduché derivatizace benzoylchloridem (KRÍŽEK A PELIKÁNOVÁ, 1998). Derivatizace 4-fluor-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazolem a fluorescenční detekce splní požadavky pro velmi citlivé stanovení aminů v rostlinných tkáních (ZHANG, TANG A SUN, 2005).

#### **2.4.6.4 Využití metody CZE pro stanovení BA a PA**

- Aminy byly stanovovány v lahvovém pivu (KALAČ ET AL., 2002).
- Aplikace bakterií mléčného kvašení startovacích kultur snižuje úroveň BA v kyselém zelí (ŠPIČKA ET AL., 2002).

- Stanovení obsahu PA ve zpracovaném mase, vepřových játrech a ledvinách, dušeném hrášku, grepfruitu, ale i v zeleném pepři a sóje (KALAČ ET AL., 2005).
- Stanovení BA a PA v mnoha potravinách jako např. v sýru, vínu, pivu či kyselém zelí byly stanovovány CZE KŘÍŽKEM A PELIKÁNOVOU (1998).

### **3 Cíl práce**

- 1) Vypracování literární rešerše na téma BA A PA ve skopovém mase jatečných zvířat, účincích těchto látek a analytických metodách pro stanovení jejich obsahu, nejznámějšími metodami HPLC A CZE.
- 2) Zacházení a práce se živočišnými vzorky, které slouží pro analýzu, postupy sloužící pro analýzu sledovaných nejdůležitějších BA a PA analytickou metodou HPLC.
- 3) Stanovení obsahu BA a PA ve vzorcích skopového a jehněčího masa získaných pro řešení VZ MSM.
- 4) Vyhodnocení získaných výsledků.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Použité chemikálie, přístroje a zařízení

Pro analýzu polyaminů byly kromě běžných laboratorních pomůcek, laboratorního skla a chemikálií, používány následující chemikálie, přístroje a zařízení. Všechny používané chemikálie byly analytické čistoty (p.a.)

#### Chemikálie

1,7-diaminoheptan, Sigma Aldrich, Německo,

Acetonitril pro HPLC (gradient grade), Merck, Německo,

Dansylchlorid, Sigma Aldrich, Německo,

Heptan, Fluka, Buchs, Švýcarsko,

Histamin dihydrochlorid, Sigma Alrich, Německo,

Hydrogenuhlíčitán sodný, Lachema, Neratovice, ČR,

Kadaverin dihydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo,

Kyselina chloristá, Acros Organic, New Jersey, USA,

Prolin, Fluka, Buchs, Švýcarsko,

Putrescin dihydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo,

Spermidin trihydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo,

Spermin tetrahydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo,

Tryptamin hydrochlorid, Sigma Aldrich Německo,

Uhlíčitán draselný, Lachema, Neratovice, ČR,

Uhlíčitán sodný, Lachema, Neratovice, ČR.

#### Přístroje a zařízení

Analytické váhy, B 204, Metter Toledo, Švýcarsko,

Kapalinový chromatogram (RRLC) Agilent Technologies, USA

Mixér, Moulinex, Francie,

Odstředivka Sigma 2 – 5, Německo

Ponorný mixér, Bosch, Německo,

## 4.2 Odběr vzorků

Analyzovány byly vzorky jehněčího a skopového masa. Všechna zvířata pocházela od drobných chovatelů a představovala hybridy několika plemen. Trup poraženého zvířete byl na jatkách rychle zchlazen na 3- 4°C a uchováván v chladírně. Kosterní svalovina jatečních zvířat byla odebírána do 24 hodin po porážce. Odebírány byly následující části: hřbet (*Musculus longissimus lumborum et thoracis*) a kýta (*Musculus gluteus*). Vzorky masa byly z jatek transportovány v chlazené přepravce do laboratoře a bezprostředně zpracovány. Každý vzorek vážil 200 – 250g.

Jehněčí maso bylo získáno z 20 jehňat obojího pohlaví. U všech zvířat byl analyzován vzorek kýty a hřbetu. Průměrná jateční hmotnost byla  $12,6 \pm 2,7$  kg, průměrný věk byl  $5,9 \pm 1,1$  měsíců.

Skopové maso pocházelo z 3 beranů a 16 ovcí. Bylo odebráno 19 vzorků skopového hřbetu a 17 vzorků skopové kýty. U některých zvířat vzorek nebyl odebrán pro velké množství zjevného tuku, který znesnadňuje analýzu. Průměrná jateční hmotnost byla  $32,3 \pm 11,4$  kg, průměrný věk byl  $70,9 \pm 31,0$  měsíců.

## 4.3 Analytické postupy

Biogenní aminy a polyaminy byly stanovány metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

### 4.3.1 Analýza BA a PA metodou HPLC

#### Extrakce

Extrakty byly do doby analýzy skladovány v chladničce při teplotě  $4 \pm 1$  °C. Běžná doba skladování byla kratší než jeden měsíc, ojediněle až 2 měsíce.

#### Postup extrakce:

- 1) Navážili jsme  $40 \pm 1$  g vzorku masa a přelili přibližně 100 ml 0,6 M kyseliny chloristé,

- 2) Směs jsme homogenizovali cca 3 min kuchyňským ručním tyčovým mixérem (Bosch, 600 W) a odstředili (Sigma 2-5, průměr rotoru 272 mm) při 3500 otáček / minutu po dobu 10 minut,
- 3) Supernatant jsme přefiltrovali přes skládaný filtrační papír (pro kvalitativní analýzu, nekrepovaný nehlazený) a celkový objem filtrátu doplnili do 140 – 150 ml roztokem 0,6 M kyseliny chloristé.

### Derivatizace

Extrakty byly derivatizovány a analyzovány podle publikovaného postupu (DADÁKOVÁ ET AL., 2009).

#### Postup derivatizace:

- 1) Odpipetovali jsme 1 ml extraktu vzorku 0,6 M kyseliny chloristé,
- 2) Přidali jsme 100  $\mu$ l vnitřního standardu, kterým byl roztok 1,7-heptandiaminu v 0,6 M kyseliny chloristé o koncentraci 400  $\text{mg.l}^{-1}$ ,
- 3) Následně jsme roztok neutralizovali 1,5 ml uhličitanového roztoku, který musí být vždy před analýzou čerstvý,

**Tab. 5: Příprava uhličitanového neutralizačního roztoku**

Počet vzorků	1	2	4	5	6	8	10
(g) $\text{K}_2\text{CO}_3$	0,666	1,332	1,998	2,664	3,33	4,664	5,328
(ml) roztoku AB	2	4	6	8	10	14	16

Příprava roztoku AB, který nemusí být pokaždé čerstvě připravován:

Roztok A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2,65 g ad 50 ml

Roztok B:  $\text{NaHCO}_3$  4,2g ad 100ml

- 4) Přidali jsme 2 ml derivatizačního činidla (roztok 5 mg dansylchloridu na 1 ml acetonu); tento roztok musí být také před každou derivatizací čerstvě připraven.
- 5) Po přidání roztoku dansylchloridu se vzorek nechal třepat 20 hodin ve tmě při laboratorní teplotě.

- 6) Poté jsme dávkovali 200  $\mu$ l roztoku L-prolinu (0,1 g v 1 ml vody) a po zreagování nadbytečného činidla se ještě třepal 1 hodinu ve tmě.
- 7) Přidali jsme 3 ml heptanu, do kterého jsme vzniklé deriváty polyaminů a biogenních aminů extrahovali, a extrahovali jsme 2,5 minuty.
- 8) Po odebrání 1 ml supernatantu se vzorek odpařil do sucha pod dusíkem za laboratorní teploty.

Odparek se rozpustil v 1,5 ml roztoku acetonitrilu a byl přefiltrován přes skleněný filtr (velikost pórů 1,7 $\mu$ m) do odměrné vialky.

### **Analytická koncovka**

Analýza derivatizovaného vzorku, který obsahuje dansylderiváty přítomných aminů, byla provedena metodou kapalinové chromatografie s využitím techniky UPLC. Provedení odpovídalo publikované metodě (DADÁKOVÁ ET AL., 2009).

K analýze byl používán kapalinový chromatograf vybavený binární pumou, zařízením na odplynění mobilních fází, autosamplerem, termostatem kolon a diode-array detektorem. Separace analytů probíhala v chromatografické koloně (Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18, 50 mm x 4,6 mm ID, s velikostí částic sorbentu 1,8  $\mu$ m). Koloně byl předřazeno filtrační zařízení pro ochranu kolony (tzv. in-line filter). Vlastní chromatografická separace byla uskutečněna s použitím mobilních fází A (100% acetonitril) a B (50% acetonitril) a gradientové eluce podle následujícího programu:

0-2 min	A 40%, B 60%
2-3 min	A 40-80%, B 60-20%
3-4 min	A 80-90%, B 20-10%
4-6 min	A 90-95%, B 10-5%
6-7 min	A 95-40%, B 5-60%
7-12 min	A 40%, B 60%

Rychlost průtoku mobilní fáze byla během celé analýzy konstantní a činila 1 ml/min. Kolona byla termostatována na 25°C, objem nástřiku činil 5  $\mu$ l a jednotlivé analyty byly detekovány při vlnové délce 225 nm.



## Statistické vyhodnocení

Pro statistické vyhodnocení výsledků analýz byl použit program Microsoft Excel. Obsah polyaminů v mase byl charakterizován aritmetickým průměrem, měrodatnou odchylkou ( $S_x$ ), mediánem a rozpětím.

### 4.4 Výsledky a diskuse

Aminy byly stanovovány ve skopové kýtě, skopovém hřbetu, jehněčí kýtě a jehněčím hřbetu. Obsah aminů je udán v tabulkách č. 6 – 9.

**Tab. 6: Obsah aminu ve skopové kýtě**

Skopová kýta (označení)	Aminy mg/kg	TRM	PEA	PUT	CAD	HIM	TYR	SPD	SPM
SK 01		0	0	2,07	0	1,25	0	9,02	38,12
SK 02		0	0	1,92	0	0,54	0	9,46	41,61
SK 03		0	0	2,75	0	0,57	0	14,56	48,87
SK 04		0	0	2,86	0	0,79	0	10,59	54,07
SK 05		0	0	2,06	0	0,61	0	4,56	42,73
SK 06		0	0	2,65	0	0,72	0	10,99	53,09
SK 07		0	0	2,12	0	0,94	0	3,17	49,79
SK 08		0	0	3,02	0	0,71	0	3,45	16,88
SK 09		0	0	2,89	0	0,94	0	4,08	28,69
SK 10		0	0	2,75	0	0,85	0	6,76	26,91
SK 11		0	0	3,39	0	0,61	0	4,24	31,50
SK 12		0	0	2,73	0	0,65	0	3,19	22,33
SK 13		0	0	1,96	0	0,48	0	1,65	16,05
SK 14		0	0	2,23	0	0,72	0	7,37	16,54
SK 15		0	0	1,79	0	0,93	0	3,02	25,02
SK 16		0	0	2,16	0	0,39	0	1,29	17,38
SK 17		0	0	2,36	0	0,96	0	2,99	23,43
<b>Průměr</b>				<b>2,45</b>		<b>0,74</b>		<b>5,91</b>	<b>32,53</b>
<b>Odchylka</b>				<b>0,44</b>		<b>0,21</b>		<b>3,70</b>	<b>13,20</b>
<b>Medián</b>				<b>2,36</b>		<b>0,72</b>		<b>4,24</b>	<b>28,69</b>
<b>Rozpětí</b>				<b>1,79-</b> <b>3,39</b>		<b>0,48-</b> <b>1,25</b>		<b>1,29-</b> <b>14,56</b>	<b>16,05-</b> <b>54,07</b>

Z tabulky č. 6 vyplývá, že nejvyšší obsah aminů ve skopové kýtě byl zjištěn u aminu SPM a to nejvíce u vzorku SK 04, kde byl obsah 54, 07 mg/kg. Průměrný obsah

SPM je ve skopové kýtě 32,53. Druhý nejvíce zastoupený amin byl SPD, který už byl v průměru pouze 5,91 mg/kg. Třetím aminem byl PUT s 2,45 mg/kg a nejmenší množství měl HIM 0,74 mg/kg. Aminy TRM, PEA, CAD a TYR nebyly ve vzorcích přítomny ani v minimálním množství.

**Tab. 7: Obsah aminů ve skopovém hřbetu**

Skopový hřbet (označení)	Aminy mg/kg	TRM	PEA	PUT	CAD	HIM	TYR	SPD	SPM
SH 01		0	0	1,91	0	0	0	3,83	17,73
SH 02		0	0	2,25	0	0	0	2,81	15,30
SH 03		0	0	2,77	0	0	0	7,82	19,33
SH 04		0	0	2,00	0	0	0	5,00	17,65
SH 05		0	0	2,16	0	0	0	3,39	16,25
SH 06		0	0	2,06	0	0	0	3,59	18,92
SH 07		0	0	1,97	0	0	0	2,27	19,65
SH 08		0	0	1,26	0	0	0	2,95	11,19
SH 09		0	0	3,27	0	0	0	4,41	17,95
SH 10		0	0	2,78	0	0	0	3,45	15,04
SH 11		0	0	2,14	0	0	0	5,24	16,43
SH 12		0	0	3,60	0	0	0	4,45	20,93
SH 13		0	0	1,83	0	0	0	4,26	18,30
SH 14		0	0	2,61	0	0	0	4,89	21,08
SH 15		0	0	2,69	0	0	0	2,87	19,83
SH 16		0	0	2,05	0	0	0	6,81	15,18
SH 17		0	0	2,16	0	0	0	1,98	18,42
SH 18		0	0	2,96	0	0	6,23	1,30	13,02
SH 19		0	0	2,83	0	0	4,23	4,52	14,99
<b>Průměr</b>				<b>2,38</b>			<b>0,56</b>	<b>3,99</b>	<b>17,22</b>
<b>Odchylka</b>				<b>0,55</b>			<b>1,65</b>	<b>1,55</b>	<b>2,57</b>
<b>Medián</b>				<b>2,16</b>			<b>0</b>	<b>3,83</b>	<b>17,65</b>
<b>Rozpětí</b>				<b>1,26-</b>			<b>4,23-</b>	<b>1,30-</b>	<b>11,19-</b>
				<b>3,60</b>			<b>6,23</b>	<b>7,82</b>	<b>21,08</b>

Z tabulky č. 7 vyplývá, že ve skopovém hřbetu byl nejvyšší obsah SPM stejně jako ve skopové kýtě. Vzorek SH 14 měl nejvyšší obsah SPM a to 21,08 mg/kg. Průměrný obsah SPM ve skopovém hřbetě byl 17,22 mg/kg. Druhým nejvíce zastoupeným aminem byl opět SPD s průměrným obsahem 3,99 mg/kg. PUT měl

průměrný obsah 2,38 mg/kg. Na rozdíl od skopové kýty byl v hřbetu zjištěn obsah TYR, ale pouze u vzorků SH 18 a SH 19, kdežto HIM nebyl zastoupen ani v malém množství. Průměrný obsah TYR byl 0,56 mg/kg. TRM, PEA, CAD a HIM nebyly ve vzorcích skopového hřbetu zjištěny.

**Tab. 8: Obsah aminů v jehněčí kýtě**

Jehněčí kýta (označení)	Aminy mg/kg	TRM	PEA	PUT	CAD	HIM	TYR	SPD	SPM
JK 01		0	0	2,33	0	0,90	0	2,16	18,75
JK 02		0	0	1,85	0	0,62	0	3,67	16,53
JK 03		0	0	1,92	0	0,71	0	2,19	17,09
JK 04		0	0	1,96	0	0,88	0	2,72	18,41
JK 05		0	0	1,79	0	0,54	0	2,64	15,09
JK 06		0	0	2,06	0	0,61	0	4,67	17,26
JK 07		0	0	2,37	0	0,49	0	3,78	19,72
JK 08		0	0	1,79	0	0,43	0	3,21	17,55
JK 09		0	0	2,58	0	0,85	0	5,26	20,07
JK 10		0	0	2,61	0	0,65	0	2,33	18,05
JK 11		0	0	1,98	0	0,44	0	5,88	16,05
JK 12		0	0	1,81	0	0,35	0	3,77	15,74
JK 13		0	0	2,55	0	0,47	0	4,96	19,04
JK 14		0	0	2,39	0	0,49	0	3,12	18,23
JK 15		0	0	2,32	0	0,59	0	3,49	19,36
JK 16		0	0	1,84	0	0,69	0	5,42	13,46
JK 17		0	0	2,04	0	0,55	0	4,79	12,91
JK 18		0	0	2,08	0	0,48	0	5,87	13,59
JK 19		0	0	1,47	0	0,47	0	7,62	18,14
JK 20		0	0	1,07	0	0,49	0	6,73	19,84
<b>Průměr</b>				<b>2,04</b>		<b>0,59</b>		<b>4,22</b>	<b>17,25</b>
<b>Odchylka</b>				<b>0,39</b>		<b>0,16</b>		<b>1,57</b>	<b>2,18</b>
<b>Medián</b>				<b>2,01</b>		<b>0,55</b>		<b>3,78</b>	<b>17,80</b>
<b>Rozpětí</b>				<b>1,07-</b>		<b>0,35-</b>		<b>2,16-</b>	<b>12,91-</b>
				<b>2,61</b>		<b>0,90</b>		<b>7,62</b>	<b>20,07</b>

Z tabulky č. 8 vyplývá, že jehněčí kýta měla obsah SPM, SPD, PUT a HIM. Největší obsah byl opět u SPM, kdy průměr byl 17,25 mg/kg což je velmi podobné jako u skopové kýty. Následující amin byl SPD a na třetím místě PUT. Nejnižší obsah měl

HIM, kde průměr byl 0,59 mg/kg. TRM, PEA, CAD a TYM nebyly v jehněčí kýtě zjištěny ani v minimálním množství.

**Tab. 9: Obsah aminů v jehněčím hřbetu**

Jehněčí hřbet (označení)	Aminy mg/kg	TRM	PEA	PUT	CAD	HIM	TYR	SPD	SPM
JH 01		0	0	2,22	0	1,06	0	4,96	16,84
JH 02		0	0	2,27	0	0,95	0	5,46	17,16
JH 03		0	0	1,80	0	0,74	0	3,66	15,46
JH 04		0	0	2,19	0	0,69	0	3,72	14,82
JH 05		0	0	1,83	0	0,67	0	4,30	14,04
JH 06		0	0	2,19	0	0,62	0	5,47	13,30
JH 07		0	0	2,37	0	0,79	0	5,01	15,76
JH 08		0	0	1,98	0	0,58	0	4,23	15,30
JH 09		0	0	2,07	0	0,83	0	5,58	15,58
JH 10		0	0	2,36	0	0,65	0	5,16	18,49
JH 11		0	0	2,10	0	0,54	0	5,75	15,07
JH 12		0	0	1,98	0	0,87	0	5,23	18,74
JH 13		0	0	2,33	0	0,59	0	3,74	17,15
JH 14		0	0	2,90	0	0,70	0	4,27	22,88
JH 15		0	0	2,98	0	0,78	0	4,74	19,43
JH 16		0	0	1,69	0	0,63	0	5,52	12,16
JH 17		0	0	1,95	0	0,50	0	5,42	13,40
JH 18		0	0	2,16	0	0,49	0	6,09	11,76
JH 19		0	0	1,58	0	0,61	0	7,14	21,09
JH 20		0	0	1,25	0	0,47	0	6,04	22,44
<b>Průměr</b>				<b>2,11</b>		<b>0,69</b>		<b>5,08</b>	<b>16,54</b>
<b>Odchylka</b>				<b>0,40</b>		<b>0,15</b>		<b>0,89</b>	<b>3,17</b>
<b>Medián</b>				<b>2,13</b>		<b>0,66</b>		<b>5,20</b>	<b>15,67</b>
<b>Rozpětí</b>				<b>1,25-</b>		<b>0,47-</b>		<b>3,66-</b>	<b>11,76-</b>
				<b>2,98</b>		<b>1,06</b>		<b>7,14</b>	<b>22,88</b>

Tabulka č. 9 ukazuje, že nejvyšší obsah byl opět obsah SPM, který byl v průměru 16,54 mg/kg. Ve vzorcích jehněčího hřbetu byl SPD v průměru 5,08 mg/kg, PUT 2,11 mg/kg a HIM 0,69 mg/kg, který byl podobný obsahu ve skopovém hřbetu. TRM, PEA, CAD a TYM nebyly zjištěny ve 20 vzorcích jehněčího hřbetu.

## 5 Závěr

Cílem bakalářské práce bylo stanovení obsahu biogenních aminů a polyaminů ve skopovém a jehněčím masu, a to v kýtě a na hřbetu.

Jehněčí a skopové maso nepatří v České republice mezi maso s největší spotřebou. Zato v zemích anglosaských je velmi oblíbeným a vyhledávaným zdrojem potravy. Rovněž v tradičním židovském jídelníčku má skopové maso své důležité postavení a spolu s telecím masem je velmi vyhledávané. Velká konzumace je také v Indii či Saudské Arábii. Ovčí maso má specifickou chuť i vůni, je lehce stravitelné a obsahuje velké množství živin. Má vysoký obsah bílkovin, které jsou bohaté na esenciální aminokyseliny, vitamíny B, minerální látky.

Polyaminy PUT, SPD a SPM jsou nezbytné pro růst a dělení buněk, takže jsou důležité při léčbě zranění a účastní se růstu a obnově střevní sliznice. Z druhé strany je jejich příjem potravou nežádoucí u jedinců se zjištěnými nádory. Jejich obsah již byl stanoven v masu drůbeže, skotu a prasat. Pro skopové a jehněčí maso však zatím v literatuře údaje chybějí.

Jen minimální informace jsou dostupné pro biogenní aminy v obou druzích masa. Tyto látky vznikají činností některých bakterií z aminokyselin uvolněných z bílkovin v nevhodně skladovaném masu. Jejich vznik je nežádoucí, protože mají řadu nepříznivých zdravotních účinků.

K analýze jsme použili kapalinovou chromatografii na principu uspořádání UPLC a stanovovali jsme aminy: TRM, PEA, PUT, CAD, HIM, TYR, SPD a SPM. Analyzovány byly vzorky jehněčího a skopového masa z hřbetu a kýty 24 hodiny po porážce na jatkách v Týně n/Vlt. Zvířata pocházela od drobných chovatelů a jednalo se o hybridy několika plemen.

- Nejvyšší průměrný obsah polyaminů byl zjištěn ve skopové kýtě (n=17), a to: 32,53 mg/kg SPM s rozpětím 15,1 - 54,1 mg/kg; 5,91 mg/kg SPD s rozpětím 1,3 – 14,6 mg/kg, 2,45 mg/kg PUT o rozpětí 1,8 – 3,4 mg/kg. Histamin se vyskytoval jen ve stopových množstvích. Aminy TRM, PEA, CAD a TYR nebyly ve vzorcích zjištěny,
- po skopové kýtě následovala s nejvyšším průměrným obsahem polyaminů jehněčí kýta (n=20 ): 17,25 mg/kg SPM (rozpětí 12,9 – 20,1 mg/kg); 4,22 mg/kg SPD (rozpětí 2,2 – 7,6 mg/kg) a 2,04 mg/kg PUT (rozpětí 1,17 – 2,6

mg/kg). Histamin byl opět detekován jen ve stopových množstvích. Aminy TRM, PEA, CAD a TYR nebyly ve vzorcích přítomny,

- následoval skopový hřbet (n = 19): 17,22 mg/kg SPM (rozpětí 11,2 – 21,1 mg/kg); 3,99 mg/kg SPD (rozpětí 1,3 – 7,8 mg/kg) a 2,38 mg/kg PUT (rozpětí 1,3 – 3,6 mg/kg). Ve dvou vzorcích byl zjištěn tyramin s obsahem 4,2 a 6,2 mg/kg. TRM, PEA, CAD a HIM nebyly detekovány.
- nejnižší průměrný obsah polyaminů byl v jehněčím hřbetu (n = 20), kde SPM dosáhl hodnoty pouze 16,54 mg/kg s rozpětím 11,8 – 22,9 mg/kg, SPD 5,08 mg/kg (rozpětí 3,7 – 7,1 mg/kg) a PUT 2,11 mg/kg (rozpětí 1,3 – 3,0 mg/kg). Histamin byl detekován opět jen ve stopových množstvích, aminy TRM, PEA, CAD nebyly zjištěny ani ve vzorcích jehněčího hřbetu.

Z výsledků vyplývá, že nejvyšší obsah polyaminů je v kýtě. Vyšší obsah byl zjištěn u kýty skopové než u jehněčí. Hřbet má méně aminů než kýta a opět vyšší obsah byl u hřbetu skopového než v jehněčího. Výsledky potvrdily, že ovčí maso 24 hodiny po porážce obsahuje nejvíce SPM, následně SPD a malý obsah PUT. Tyto výsledky jsou srovnatelné s údaji literatury pro hovězí a vepřové maso a řadí skopové i jehněčí maso mezi poměrně bohaté zdroje potravních polyaminů.

Biogenní aminy s nežádoucími zdravotními účinky se v obou druzích masa 24 hodiny po porážce nevyskytovaly vůbec, nebo jen ve stopových množstvích.

## 6 Seznam literatury

1. Bagni, N., & Tassoni, A. (2001). Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plant. *Amino Acids*, 20, 301-317.
2. Bachrach, U. (2004). Polyamines and cancer: Minireview article. *Amino Acids*, 26, 307-309.
3. Bardócz, S., Duguid, T. J., Brown, D. S., Grant, G., Pusztai, A., Ralph, A. (1995). The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. *British Journal of Nutrition*, 73, 819-828.
4. Becker, K., Southwick, K., Reardon, J., Berg, R., & MacCormack, J. N. (2001). Histamine poisoning associated with eating tuna burgers. *Journal of the American Medical Association*, 285 (10), 1327-1330.
5. Bolygo, E., Cooper, P. A., Jesstop, K. M., & Moffatt, F. (2000). Determination of histamine in tomatoes by capillary electrophoresis. *Journal of AOAC International*, 83(1), 89-94.
6. Březinová, L., Bureš, J., Hrabal, F., Klečka, J.(1952). Chov velkého zvířectva. *Státní pedagogické nakladatelství*, Praha, 1952, 487 s.
7. Dadáková, E., Křížek, M., Pelikánová, T.(2009). Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 116 (1), 365-370.
8. Dadáková, E., Pelikánová, T., Kalač, P. (2009). Content of biogenic amines and polyamines in some species of European wild-growing edible mushrooms. *European Food Research and Technology*, 230, 163-171.

9. Dandrifosse, G., Peulen, O., El Khefif, N., Deloyer, P., Dandrifosse, A.C., Grandfils, C. (2000). Are milk polyamines preventive agents against food allergy? *Proceedings of the Nutrition Society*, 59, 81-86.
10. Deloyer, P., Peulen, O., & Dandrifosse, G. (2001). Dietary polyamines and non-neoplastic growth and disease. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 13, 1027-1032.
11. Drbal, K., Křížek, M. (1999). Analytická chemie. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta*, 1999, 186 s.
12. Favaro, G., Pastore, P., Saccani, G., & Cavalli, S. (2007). Determination of biogenic amines in fresh and processed meat by ion chromatography and integrated pulsed amperometric detection on Au electrode. *Food Chemistry*, 105(4), 1652-1658.
13. Font, M., Sanmartín, C., García, H., Contreras, S., Paeile, C., Bilbeny, N. (2005). A new polyamine derivative, a structural analogue of spermine, with in vivo activity as an inhibitor of ethanol appetite. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 13, 4375-4382.
14. Gajdošík M., Polách A. (1984). Chov oviec. *Príroda, Bratislava v spolupráci so SZN Praha*, 1984, 360 s.
15. Gugliucci, A. (2005). Alternative antiglycation mechanisms: are spermine and fructosamine-3-kinase part of a carbonyl damage control pathway? *Medical Hypotheses*, 64, 770-777.
16. Halasz, A., Barath, A., Simon-Sarkadi, L., & Holzapfel, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in foods. *Trends in Food Science and Technology*, 5(2), 42-49.



17. Hernandez-Borges, J., D'Orazio, G., Aturki, Z., & Fanali, S. (2007). Nano-liquid chromatography analysis of dansylated biogenic amines in wines. *Journal of Chromatography A*, 1147(2), 192-199.
18. Hillary, R. A., Pegg, A. E. (2003). Decarboxylases involved in polyamine biosynthesis and their inactivation by nitric oxide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1647, 161-166.
19. Horák, F. (1985). Možnosti rozvoje velkochovů ovčí. *Ministerstvo zemědělství a výživy ČSR ve Státním zemědělském nakladatelství v Praze*, 1985, 176 s.
20. Hynd, M. R., Scott, H. L., Dodd, P. R. (2004). Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimers disease. *Neurochemistry International*, 45, 583-595.
21. Chen, H. C., Kung, H. F., Chen, W. C., Lin, W. F., Hwang, D. F., Lee, Y. C., et al. (2008). Determination of histamine and histamine-forming bacteria in tuna dumpling implicated in a food-borne poisoning. *Food Chemistry*, 106(2), 612-618.
22. Joosten, H. M. L. J. (1988). The biogenic amine contents of Dutch cheese and their toxicological significance. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 42(1), 25-42.
23. Kalač, P. (2006). Biologically active polyamines in beef, pork and meat products: A review. *Meat Science*, 73, 1-11.
24. Kalač, P., Krausová, P. (2005). A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry*, 90, 219-230.
25. Kalač, P., Křížek, M., Pelikánová, T., Langová, M., Veškrna O. (2005). Contents of polyamines in selected foods. *Food Chemistry*, 90, 561-564.

26. Kalač, P., Šavel, J., Křížek, M., Pelikánová, T., Prokopová, M. (2002). Biogenic amine formation in bottled beer. *Food Chemistry*, 79, 431-434.
27. Kovacs, A., Simon-Sakardi, L., & Ganzler, K. (1999). Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 836(2), 305-313.
28. Kozová, M., Kalač, P., Pelikánová, T. (2008). Biologically active polyamines in pig kidneys and spleen: Content after slaughter and changes during cold storage and cooking. *Meat Science*, 79, 326-331.
29. Kozová, M., Kalač, P., Pelikánová, T. (2009). Changes in the content of biologically active polyamines during beef loin storage and cooking. *Meat Science*, 81, 607-611.
30. Krausová, P., Kalač, P., Křížek, M., Pelikánová, T. (2006a). Content of biologically active polyamines in livers of cattle, pigs and chickens after animal slaughter. *Meat Science*, 73, 640-644.
31. Krausová, P., Kalač, P., Křížek, M., Pelikánová, T. (2008). Changes in the content of biologically active polyamines during pork loin storage and culinary treatments. *European Food Research and Technology*, 226, 1007-1012.
32. Krausová, P., Kalač, P., Křížek, M., Pelikánová, T. (2007). Changes in the content of biologically active polyamines during storage and cooking of pig liver. *Meat Science*, 77, 269-274.
33. Křížek, M., & Pelikánová, T. (1998). Determination of seven biogenic amines in foods by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A*, 815(2), 243-250.

34. Křížek, M., Pavlíček, T., Vácha, F. (2002). Formation of selected biogenic amines in carp meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(9), 1088- 1093.
35. Křížek, M., Pelikánová, T. (1998). Determination of seven biogenic amines in foods by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A*, 815, 243-250.
36. Křížek, M., Vácha, F., Vorlová, L., Lukášová, J., Cupáková, S., (2004). Biogenic amines in vacuum-packed and non-vacuum-packed flesh of carp (*Cyprinus carpio*) stored at different temperatures. *Food Chemistry*, 88(2), 185 – 191.
37. Lapa-Guimaraes, J., Pickova, J. (2004). New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid. *Journal of Chromatography A*, 1045(1-2), 223-232.
38. Liu, M., Li, Y. G., Chou, G. X., Cheng, X. M., Zhang, M., Wang, Z. T. (2007). Extraction and ultra-performance liquid chromatography of hydrophilic and lipophilic bioactive components in a Chinese herb *Radix Salviae miltiorrhiza*. *Journal of Chromatography A*, 1157(1-2), 51-55.
39. Mareček, A., Honza, J. (2004). *Chemie pro čtyřletá gymnázia 1.díl. Olomouc*, 2004, 240 s.
40. Miyazaki, J. H., Yang, S. F. (1987). The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 69(2), 366-370.
41. Moinard, C., Cynober, L., de Bandt, J.-P. (2005). Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clinical Nutrition*, 24, 184-197.
42. Moret, S., Conte, L. S. (1996). High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic in foods – An analysis of different methods of sample

- preparation in relation to food characteristics. *Journal of Chromatography A*, 729(1-2), 363-369.
43. Nguyen, D. T. T., Guillardme, D., Heinisch, S., Barrioulet, M. P., Rocca, J. L., Rudaz, S., et al. (2007). High throughput liquid chromatography with sub-2  $\mu\text{m}$  particles at high pressure and high temperature. *Journal of Chromatography A*, 1167(1), 76-84.
44. Paik, M. J., Choi, Y. M., & Kim, K. R. (2006). Simultaneous profiling analysis of alkylphenols and amines by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 560(1-2), 218-226.
45. Proestos, C., Loukatos, P., & Komaitis, M. (2008). Determination of biogenic amines in wines by HPLC with pre-column dansylation and fluorometric detection. *Food Chemistry*, 106(3), 1218-1224.
46. Rossano, R., Mastrangelo, L., Ungaro, N., & Riccio, P. (2006). Influence of storage temperature, freezing time on histamine level in the European anchovy *Engraulis encrasicolus* (L., 1758): A study by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 830(1), 161-164.
47. Santos, W. C., Souza, M. R., Cerqueira, M., & Gloria, M. B. A. (2003). Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 degrees C. *Food Chemistry*, 81(4), 595-606.
48. Shakila, R. J., Vasundhara, T. S., Kumudavally, K. V. (2001). A comparison of the TLC-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products. *Food Chemistry*, 75(2), 255-259.
49. Shalaby, A. R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29(7), 675-690.

50. Soufleros, E. H., Bouloumpasi, E., Zotou, A., Loukou, Z. (2007). Determination of biogenic amines in Greek wines by HPLC and ultraviolet detection after dansylation and examination of factors affecting their presence and concentration. *Food Chemistry*, 101(2), 704-716.
51. Svoboda, J., Liška, F., Stibor, I., Kvičala, J., Dvořák, D. (2005). Organická chemie I. *VŠCHT v Praze*, 2005, 310 s.
52. Špička, J., Kalač, P., Bover-Cid, S., Křížek, M. (2002). Application of lactic acid bacteria starter cultures for decreasing the biogenic amine levels in sauerkraut. *European Food Research and Technology*, 215, 509-514.
53. Thomas, T., Thomas, T. J. (2003). Polyamine metabolism and cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 7, 113-126.
54. Václav, J., Říha, J., Golda, J., Majzlík, I. (2001). Šlechtění ovcí. *Asociace chovatelů masných plemen v Rapotíně ve spolupráci s Výzkumným ústavem pro chov skotu v Rapotíně a Českou zemědělskou univerzitou v Praze*, 2001, 152 s.
55. Vandenaabeele, O., Garrelly, L., Ghelfenstein, M., Commeyras, A., Mion, L. (1998). Use of 2-chloroethylnitrosourea, a new type of pre-column derivatizing agent for the measurement of biogenic amines, by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*, 795(2), 239-250.
56. Vejčík, A. (2007). Teorie a praxe v chovu ovcí (Odborná monografie). *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta*, 2007, 72 s.
57. Velíšek, J. (1999). Chemie potravin 3.díl. *OSSIS Tábor*, 1999, 331 s.
58. Weiss, T. S., Bernthard G., Buschauer, A., Thasler, W.E., Dolnager, D., Zirngibl, H., Jauch, K.W. (2002). Polyamine levels of human colorectal

adenocarcinomas are correlated with tumor stage and grade. *International Journal of Colorectal Disease*, 17, 381-387.

59. Weiss, T. S., Herfarth, H., Obermeier, F. et al. (2004). Intracellular polyamine levels of intestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 10, 529-535.

60. Zhang, L. Y., Tang, X. C., & Sun, M. X. (2005). Simultaneous determination of histamine and polyamines by capillary zone electrophoresis with 4-fluor-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B – Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 820(2), 211-219.