

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH  
BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4106 Zemědělská specializace

Studijní obor: Biologie a ochrana zájmových organismů

Katedra: Katedra biologických disciplín

Vedoucí katedry: doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph.D.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Obsah biogenních aminů a polyaminů ve volně  
rostoucích jedlých houbách**

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

České Budějovice, duben 2016

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 elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 22. dubna 2016

Podpis:

Děkuji vedoucí své bakalářské práce doc. Ing. Evě Dadákové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky, poskytnuté materiály a vstřícnost při konzultacích, vedoucí k jejímu zdárnému dokončení. Dále děkuji pracovníkům katedry chemie ZF JU, za přípravu vhodných podmínek pro moji práci.

Zároveň děkuji všem ostatním, kteří se podíleli na dokončení této práce.

## SOUHRN

Cílem této bakalářské práce bylo stanovení obsahu osmi biogenních aminů (BA) a polyaminů (PA) metodou kapalinové chromatografie HPLC, konkrétně tryptaminu (TRM), 2 -fenylethylaminu (PEA), kadaverinu (CAD), histaminu (HIM), tyraminu (TYM) putrescinu (PUT), sperminu (SPM) a spermidinu (SPD) ve volně rostoucích jedlých houbách České republiky. Práce byla zaměřena na mezidruhové rozdíly, vliv stáří a části plodnic na obsah BA a PA.

Vzorky pocházejí z oblasti Skalka, přibližně 16 km západně od Českých Budějovic. V osmnácti zkoumaných vzorcích dosahovaly nejvyšší koncentrace SPD a PUT. Změny obsahu BA a PA v plodnicích hříbu dubového (*Boletus reticulatus*, Schaeff) různého stáří se pohybovaly oběma směry. Koncentrace PUT a SPD rostly s věkem plodnice a nejvyšší hodnoty byly naměřeny ve starých plodnicích, zatímco nejvyšší koncentrace PEA a TYM byly zaznamenány u mladých plodnic a postupně klesaly. V jednotlivých částech plodnic hříbu dubového (*Boletus reticulatus*, Schaeff) byly naměřeny nejvyšší hodnoty SPD ve sporotvorné části a PUT v klobouku a třeni. CAD nebyl analýzou vůbec zjištěn, TRM se vyskytl v malém množství u hříbu hnědého (*Boletus badius*, Fr.) a klouzka sličného (*Suillus grevillei*, Klotzsch, Singer), HIM se vyskytl pouze u klouzka kravského (*Suillus bovinus*, Pers., Roussel).

Údajů o obsahu BA a PA ve volně rostoucích jedlých houbách je velmi málo, domnívám se tedy, že by zjištěné údaje mohly pomoci rozšířit údaje v literatuře a nabídnout možnost dalšího zaměření výzkumu biogenních aminů v jedlých houbách.

Klíčová slova: biogenní aminy, polyaminy, volně rostoucí jedlé houby

## **SUMMARY**

The aim of this Bachelor thesis was to determine the content of eight biogenic amines (BA) and polyamines (PA) with liquid chromatography method/HPLC, concretely tryptamine (TRM), 2-phenylethylamine (PEA), cadaverine (CAD), histamine (HIM), tyramine (TYM), putrescine (PUT), spermine (SPM) a spermidine (SPD) in wild-growing edible mushrooms in Czech republic. Thesis was focused on interspecific differences, the influence of age and parts of fruiting bodies on the content of BA and PA.

The samples came from the Skalka area, about 16 km on the west from the České Budějovice. In the eighteen analyzed samples it reached the highest concentration SPD and PUT. Changes to the content of BA and PA in fruiting bodies of *Boletus reticulatus* various ages ranged both directions. Concentration PUT and SPD increased with age of fruiting bodies and the highest values were found in the old fruiting bodies, while the highest concentration of PEA and TYM have been reported in young fruiting bodies and gradually decreased. In each part of the fruiting bodies of *Boletus reticulatus* there was found the highest values of the SPD in spore-forming parts and PUT in a cape and stipe. CAD was not detected by analysis, TRM occurred in a small amount in *Boletus badius* and *Suillus grevillei*, HIM occurred only in *Suillus bovinus*.

Amount of information about the content of BA and PA in wild-growing edible mushrooms is very few. I believe, that the survey data could help extend the data in the literature and offer the possibility of further research focus of biogenic amines in edible mushrooms.

Key words: biogenic amines, polyamines, wild-growing edible mushrooms

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMK	aminokyseliny
BA	biogenní aminy
CAD	kadaverin
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAO	diamoxidáza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
GC	plynová chromatografie
HEP	vnitřní standard aminů
HIM	histamin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEC	iontová chromatografie
MAO	monoaminoxidáza
MAOI	inhibitory monoaminoxidázy
PA	polyaminy
PEA	2-fenylethylamin
PUT	putrescin
RNA	ribonukleová kyselina
SPD	spermidin
SPM	spermin
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
TRM	tryptamin
TYM	tyramin
UPLC	ultra výkonná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialové záření

## Obsah

1	Úvod .....	7
2	Teoretická část .....	8
2.1	Biogenní aminy .....	8
2.1.1	Biologické účinky biogenních aminů .....	9
2.1.2	Potraviny s obsahem BA .....	10
2.1.3	Mikroorganismy produkující BA .....	10
2.2	Polyaminy .....	11
2.2.1	Biologické účinky polyaminů .....	12
2.2.2	Potraviny s obsahem PA .....	13
2.3	BA v houbách .....	13
2.4	Toxikologické účinky biogenních aminů a polyaminů .....	14
2.4.1	Toxicita histaminu .....	14
2.4.2	Toxicita tyraminu .....	15
2.4.3	BA jako karcinogeny .....	16
2.5	Houby .....	16
2.5.1	Jedlé houby .....	16
2.5.2	Hřibovité .....	17
2.5.3	Pečárkovité .....	20
2.6	Analytické metody .....	21
2.6.1	Chromatografie na tenké vrstvě .....	22
2.6.2	Iontová chromatografie .....	22
2.6.3	Plynová chromatografie .....	23
2.6.4	Kapilární zónová elektroforéza .....	23
2.6.5	Kapalinová chromatografie .....	24
2.6.6	Ultra výkonná kapalinová chromatografie .....	24

3	Cíl práce.....	26
4	Experimentální část.....	27
4.1	Použité laboratorní pomůcky, chemikálie, přístroje a zařízení.....	27
4.2	Odběr vzorků.....	28
4.3	Analýza PA a BA metodou HPLC.....	29
4.3.1	Extrakce – tuhé vzorky.....	29
4.3.2	Analytická koncovka.....	30
5	Výsledky a diskuze.....	32
5.1	Obsah BA v druzích .....	32
5.2	Vliv stáří plodnice na obsah BA.....	33
5.3	Závislost výskytu BA na části plodnice .....	35
6	Závěr.....	37
7	Seznam použité literatury .....	38



# 1 Úvod

Biogenní aminy (BA) a polyaminy (PA) jsou látky, které se v lidském těle účastní velkého množství důležitých metabolických procesů. Pro lidské tělo jsou nepostradatelné, ale ve zvýšeném množství mohou mít pro lidský organismus toxické účinky. Vznikají často v potravinách dekarboxylací aminokyselin (AMK), což lze v budoucnu využít ke sledování nekvalitních potravin, čerstvosti potravin nebo špatných výrobních postupů (Ladero et al., 2010).

Aminy se běžně vyskytují v mase a masných výrobcích, alkoholu, fermentovaných výrobcích, sýrech, rybách, ale i v ovoci a zelenině. Množství výzkumů zaměřených na obsah BA a PA v potravinách za poslední roky stoupá, ale stále chybí informace o výskytu aminů v jedlých houbách. Z dostupných informací vyplývá, že nejvyššího obsahu dosahuje putrescin (PUT) a spermidin (SPD). Naopak pod hranicí stanovitelnosti nebo na nízkých úrovních se vyskytují histamin (HIM), tyramin (TYM), tryptamin (TRM) a kadaverin (CAD) (Křížek, Kalač 1997, Dadáková et al., 2009).

Cílem této bakalářské práce bylo sledování osmi aminů – putrescinu (PUT), spermidinu (SPD), sperminu (SPM), 2-fenylethylaminu (PEA), histaminu (HIM), tyraminu (TYM), tryptaminu (TRM) a kadaverinu (CAD) v osmnácti druzích volně rostoucích jedlých hub ČR se zaměřením na mezidruhové rozdíly, vliv stáří a části plodnic na obsah BA a PA. Analýza byla provedena pomocí kapalinové chromatografie s využitím techniky UPLC.

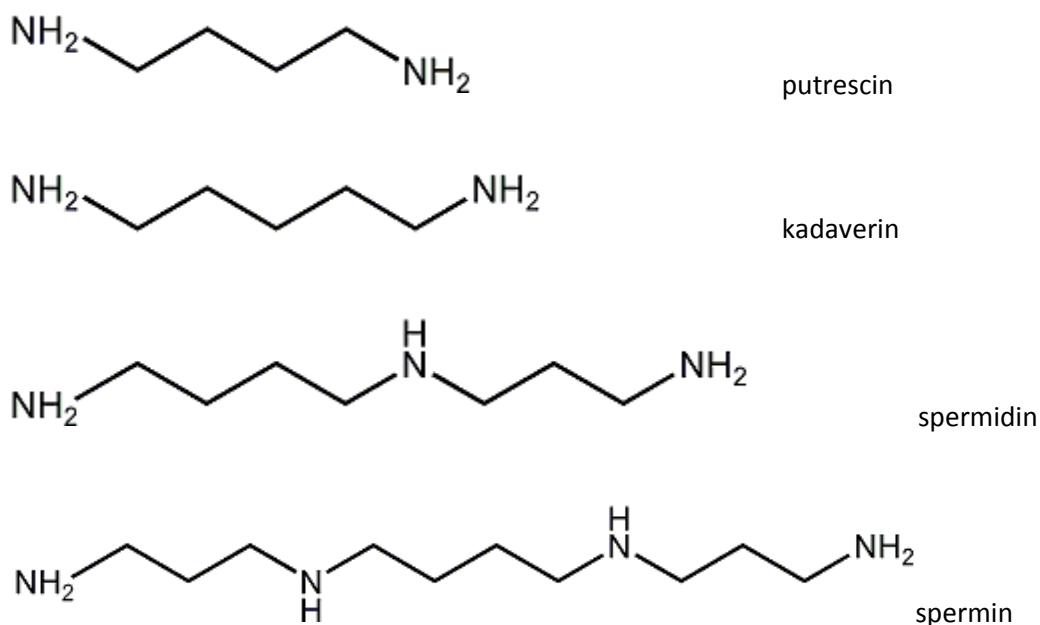
## 2 Teoretická část

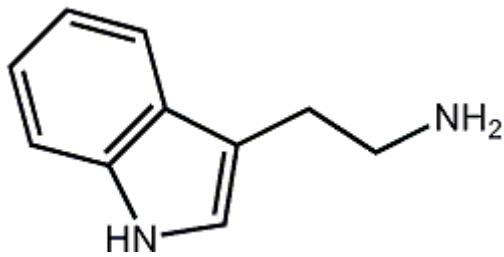
### 2.1 Biogenní aminy

Biogenní aminy (BA) jsou nízkomolekulární organické báze s alifatickou (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin), aromatickou (tyramin, fenylethylalanin) nebo heterocyklickou (histamin, tryptamin) strukturou. Všechny BA se podílejí na biologické aktivitě. Jsou to produkty běžné metabolické aktivity zvířat, rostlin a mikroorganismů. Jejich přítomnost v potravinových výrobcích je z velké části důsledkem přítomnosti mikroorganismů s dekarboxylázovou činností: ty zajišťují odstranění alfa karboxylové skupiny z aminokyseliny, čímž vzniká odpovídající BA. Název BA je přiřazen v závislosti na názvu aminokyseliny, která vedla k jeho vzniku: z histaminu dekarboxylací vzniká histidin, z tryptofanu tryptamin, z fenylalaninu fenylethylamin atd. (Ladero et al., 2010).

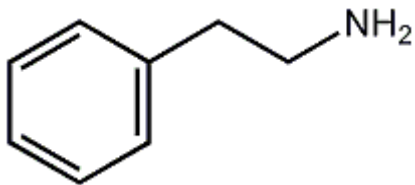
Tradiční skupina výživových BA se rozdělila na dvě podskupiny v průběhu 90. let na základě jejich odlišného způsobu tvorby a biologických rolí. V současné době jsou BA tvořeny převážně bakteriální dekarboxylací volných AMK v nevhodných podmínkách skladování a zpracování biologického materiálu. Polyaminy (PA), které tvoří druhou skupinu, jsou určeny především jako přírodní složky všech živých organismů, s pozitivními i negativními dopady na lidské zdraví za různých podmínek (Dadáková et al., 2009).

Obrázek 1: Strukturální vzorce BA a PA

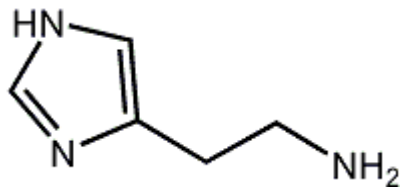




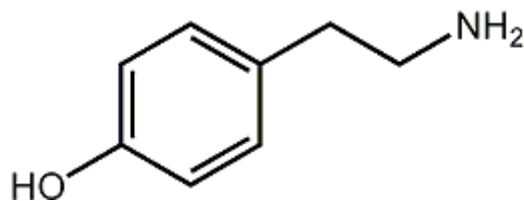
tryptamin



fenylethylamin



histamin



tyramin

### 2.1.1 Biologické účinky biogenních aminů

Biogenní aminy jsou v malé míře pro tělo nepostradatelné, jelikož se podílí na řadě metabolických procesů. Mají zásadní role ve fyziologii a rozvoji eukaryotických buněk, mezi nejaktivnější BA patří histamin a tyramin. Ve větším množství se BA stávají toxickými a působí jako látky vazoaktivní a psychoaktivní.

Mezi vazoaktivní BA patří např. tyramin, jehož zvýšené množství vyvolává periferní vazokonstrikci, zvýšenou srdeční činnost, zrychlené dýchání a zvýšenou hladinu glukózy v krvi. Psychoaktivní BA slouží jako přenašeči v centrální nervové soustavě (McCabe-Sellers et al., 2006).

### **2.1.2 Potraviny s obsahem BA**

Biogenní aminy jsou vytvářeny v různých potravinách a nápojích a to v nezpracovaných i fermentovaných, hlavně aktivitou hnilobných bakterií, ale i některých bakterií mléčného kvašení (Dadáková et al., 2009). Vyskytují se prakticky ve všech potravinách, které obsahují proteiny nebo volné aminokyseliny a podléhají podmínkám, jejichž působení umožňuje mikrobiální a biochemickou aktivitu. Celkové množství různých aminů závisí na povaze potraviny a mikroorganismů. BA jsou přítomny v široké škále potravinářských produktů, včetně rybích, masných a mléčných výrobcích, vínu, pivu, zelenině, ovoci, ořechách a čokoládě (Santos, 1996).

Při přípravě fermentovaných potravin lze očekávat přítomnost velkého množství mikroorganismů, z nichž některé jsou schopné produkovat BA. Většina produktů, ve kterých se vyskytují bakterie mléčného kvašení, obsahují značné množství putrescinu, kadaverinu, histaminu a tyraminu (Santos, 1996).

Mezi potraviny s největším obsahem BA patří víno (Bodmer et al., 1999), pivo (McCabe-Sellers et al., 2006), sýry a kysané zelí (Santos, 1996), ryby a rybí produkty, sójové produkty (Shalaby, 1997).

### **2.1.3 Mikroorganismy produkující BA**

Podstatným faktorem pro tvorbu BA v potravinách je přítomnost mikroorganismů se schopností dekarboxylace AMK. Tato schopnost byla popsána u různých rodů a kmenů bakterií a to jak Gram pozitivní, tak Gram negativní (Kalač, Krausová, 2005). Na tvorbu aminů má do značné míry vliv množství vnitřních a vnějších vlastností potravinové matrice, jako je koncentrace volných AMK, ale také chloridu sodného, glukózy a pH, tak i interakce ve smíšené mikrobiální flóře (Pircher et al., 2007).

**Tabulka 1 Mikroorganismy produkující BA a PA podle Shalaby (1997):**

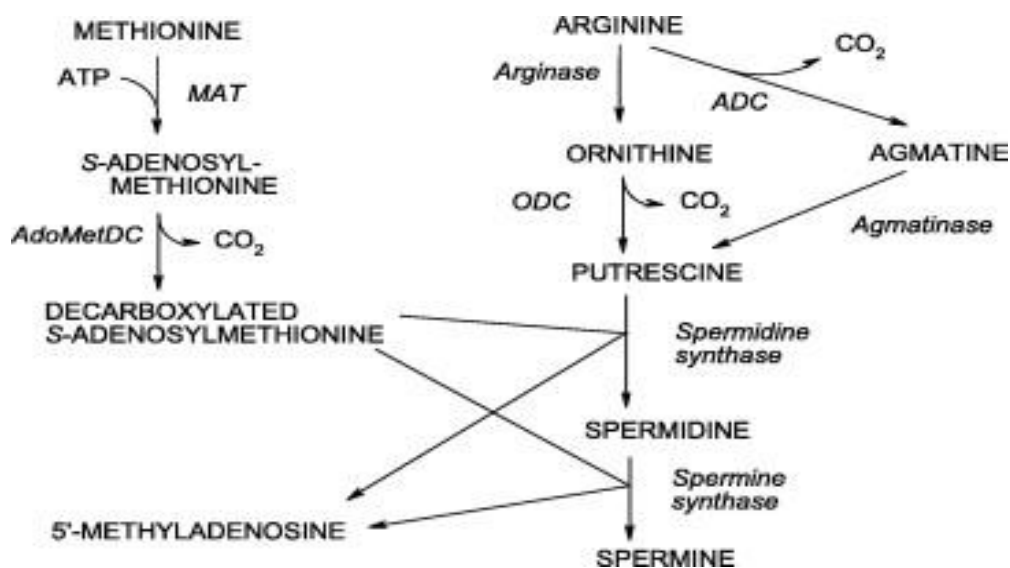
Potravina	Mikroorganismy	Produkovávané aminy
Ryby	<i>Morganella morganii</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Clostridium perfringenes</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Vibro alginolytiens</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i>	Histamin, tyramin, cadaverin, putrescin, agmatin, spermin, spermidin
Sýry	<i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Lactobacillus 30a</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. arabinose</i> , <i>Streptococcus faecium</i> , <i>S. mitis</i> , <i>Bacillus macerans</i> , <i>ropionibacterria</i>	Histamin, cadaverin, putrescin, tyramin, β-enylethylalanin, tryptamin
Maso a masné produkty	<i>Pediococcus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Lactobacillus</i> . <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Micrococcus</i>	Histamin, cadaverin, putrescin, tyramin, β- fenylethylalanin, tryptamin
Fermentovaná zelenina	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococci sp.</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Histamin, cadaverin, putrescin, tyramin, tryptamin
Fermentované sójové produkty	<i>Rhizopus oligosporus</i> , <i>Trichosporon beiglli</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	Histamin, cadaverin, putrescin, tyramin, tryptamin

## 2.2 Polyaminy

Polyaminy (PA) patří ke skupině BA, které se účastní mnoha fyziologických funkcí, zejména v imunitě. Tyto chemické sloučeniny hrají důležitou roli při růstu buněk a proliferaci, pro syntézu proteinů a nukleových kyselin. Také se podílejí na opravě extracelulárního matrixu, buněčné adheze a některých signálních procesů. Bylo prokázáno, že PA deprivace inhibuje buněčnou proliferaci a migraci, může způsobit vadný vývoj embrya, zatímco nadměrné hromadění indukuje apoptózu a transformaci buněk (Moinard et al., 2005).

Tři aminy byly klasifikovány jako biologicky aktivní PA: putrescin (PUT), spermidin (SPD) a spermin (SPM). Putrescin je klasifikován mezi PA kvůli jeho roli jako prekurzor pro fyziologické PA (Dadáková et al., 2009).

Obrázek 2: Schéma biosyntézy PA (Kalač, Krausová, 2005)



### 2.2.1 Biologické účinky polyaminů

PA jsou všudypřítomné buněčné komponenty s několika intracelulárními cíli včetně NK a membránových složek. Jelikož jsou velmi významné pro růst buněk, vyskytují se vysoké hladiny PA v rychle se dělících buňkách a tkáních, jako jsou nádorové buňky (Kalač, Krausová, 2005). Nejdůležitější funkcí PA, ve které nemohou být nahrazeny jinými dusíkatými sloučeninami, je jejich působení jako druhí poslové (second messenger), čímž zprostředkovávají působení všech známých hormonů a růstových faktorů, hlavně růst buněk, tkání a orgánů (Bardócz, 1995). Nejdůležitějším místem buněčného skladování je cytosol a jádro, kde jsou zapojeny do DNA a RNA transkripce a translace (Larqué et al., 2007). PA pool neboli zásoba se udržuje třemi způsoby: endogenní biosyntézou, výrobou střevními mikroorganismy a příjmem z potravy (Dadáková et al., 2009).

Všechny buňky jsou schopné syntetizovat PA, které mohou být odvozeny i od vnějších zdrojů. PA jsou nezbytné pro udržení vysoké metabolické aktivity normálně fungujícího a imunologického systému střeva. SPM a SPD jsou rovněž zapojeny v rozvoji střevní tkáně (Santos, 1996).

Požadavky na PA jsou vyšší v období růstu u mláďat, ale také v průběhu stárnutí důsledkem snížení aktivity enzymů podílejících se na biosyntéze PA. Orgány s vysokou obměnou buněk, jako slinivka, slezina nebo gastrointestinální trakt byly považované za obzvláště závislé na výživových PA (Kalač, 2006). Výživové PA mohou být požadované při hojení ran a růstu, dozrávání a regeneraci střevní sliznice (Dadáková et al., 2009).

### 2.2.2 Potraviny s obsahem PA

PA se nacházejí nejen v potravinách rostlinného původu (ovoce a zelenina), ale také živočišného původu (maso, ryby, mléko) (Larqué et al., 2007). Nejvyšší obsah PUT se vyskytuje v potravinách rostlinného původu (Moinard et al., 2005), jako je zelenina a ovocné šťávy (Santos, 1996), naopak nízké hladiny PUT jsou typické pro dobře ošetřené potraviny živočišného původu (Kalač, Krausová, 2005). Mléčné výrobky obsahují hlavně PUT a SPD (Moinard et al., 2005).

Maso je bohaté na SPM (Moinard et al., 2005), který zde převládá nad PUT a SPD. Naopak je tomu u potravin rostlinného původu, kde se SPM vyskytuje v menším množství než zbylé dva PA. Zatímco PUT se zvyšuje s bakteriální činností během nevhodného skladování a zpracování potravin živočišného původu, SPD a SPM pocházejí převážně ze surovin (Kalač, Krausová, 2005).

### 2.3 BA v houbách

Ačkoliv výzkum obsahu BA a PA v potravinách probíhá řadu let o obsahu těchto látek v jedlých nebo pěstovaných houbách se ví velice málo.

Dadáková et al., (2009) stanovili obsah osmi biologicky aktivních BA a PA v plodnicích 17 druhů volně rostoucích jedlých hub nasbíraných během tří po sobě jdoucích let. Zatímco HIM a CAD nebyly stanoveny, PUT byl aminem s nejvyšším obsahem někdy přesahující 150 mg/kg<sup>-1</sup> čerstvé hmoty, nejčastěji v družích čeledi Boletaceae. Úroveň TYM a TRM byla nízká, obvykle do 5 mg/kg<sup>-1</sup>, zatímco PEA se vyskytoval od nezjistitelných úrovní až do 38 mg/kg<sup>-1</sup>. Obsah SPD byl vyšší než SPM, obvykle okolo 10 mg/kg<sup>-1</sup> čerstvé hmoty a sporadicky nad 100 mg/kg<sup>-1</sup>.

Kalač, Křížek, (1997) se zabývali obsahem BA ve volně rostoucím hříbu žlutomasém (*Xerocomus chrysenteron*, (Bull.), Šutara), hříbu hnědém (*Boletus badius*, Fr.), klouzku strakoši (*Suillus variegatus*, (Sw.), Kuntze) a kultivované pečárce dvouvýtrusné (*Agaricus bisporus*, (J.E.Lange), Imbach). Obsahy HIM a TYM nebyly detekovány, zatímco koncentrace PUT byla až 1600 mg/kg<sup>-1</sup> a CAD až 165 mg/kg<sup>-1</sup> sušiny.

Bylo zjištěno, že velký vliv na obsah BA v plodnicích hub má počasí. Zatímco houby rostoucí při vysoké vlhkosti mají větší obsah BA způsobený intenzivnější mikrobiální aktivitou, houby rostoucí v suchých obdobích obsahují více sušiny a méně BA (Dadáková et al., 2009).

Vliv stáří plodnice na obsah BA nebyl jednoznačně prokázán, ale byl zjištěn významně vyšší obsah SPD ve sporotvorných částech (Dadáková et al., 2009).

Nejvíce údajů o houbách pochází zejména z Japonska a jsou zaměřeny na druhy používané v japonské kuchyni. Jedná se především o trsnatec lupenitý (*Grifola frondosa*, (Dicks.), Gray), šupinovku nameko (*Pholiota nameko*, T. Itô), korálovec ježatý (*Hericiium erinaceum*, (Bull.), Pers.), žampion brazilský (*Agaricus blazei murill*, Peck), penízovku sametonohou (*Flammulina velutipes*, (Curtis), Singer), houževnatec jedlý (*Lentinus edodes*, (Berk.) Pegler), hlívu máčkovou (*Plerotus eryngii*, (DC.), Quél.) a čirůvku větší (*Tricholoma matsutake*, (S. Ito a S. Imai), Singer) (Nishimura et al., 2005, Nishibori et al., 2005).

Houby jsou považovány za potraviny s vysokým obsahem SPD (Nishibori et al., 2005), oproti tomu SPM byl ve většině případů pod hranicí stanovitelnosti, zatímco PUT a CAD vykazovaly velké kolísání v závislosti na druzích testovaných hub (Nishimura et al., 2005).

## **2.4 Toxikologické účinky biogenních aminů a polyaminů**

Přesto, že jsou BA zapotřebí v mnoha funkcích lidského organismu, spotřeba potravin s vysokým obsahem může mít závažné zdravotní účinky (Santos, 1996). Za normálních okolností během procesu příjmu potravy v lidském střevě je nízké množství BA metabolizováno na fyziologicky méně aktivní produkty. Tento detoxikační systém zahrnuje specifické enzymy, např. diamin oxidázy (DAO). Při příjmu potravin s vysokým obsahem BA není detoxikační systém dostatečně schopný BA odstranit. V případě nedostatečné DAO činnosti způsobené např. genetickou predispozicí, gastrointestinálním onemocněním, inhibicí DAO aktivity v důsledku sekundárních účinků léků nebo alkoholu nemůže dojít k účinnému metabolizování BA. Pokud je detoxikace neefektivní, BA se snadno absorbují a dostanou do krevního oběhu, což vede k toxickým účinkům (Bodmer et al., 1999).

### **2.4.1 Toxicita histaminu**

Histamin je nejjedovatější amin detekovaný v potravinách, jako jsou ryby, sýry, víno a masné výrobky. Toxikologický účinek závisí na koncentraci HIM, přítomnosti



dalších různých aminů, aktivitě aminooxidázy a střevní fyziologii jedince (Santos, 1996). Mezi nejznámější potraviny spojené s otravou HIM patří ryby čeledi makrelovití (Scrombidae) např. makrela a tuňák a také zrající sýry (Shalaby, 1997). Z tohoto důvodu EU stanovila limit HIM v rybách na 200 mg/kg<sup>-1</sup>. Intoxikace se vyznačuje inkubační dobou v rozmezí od několika minut až hodin s příznaky, které jsou obvykle patrné jen na několik hodin (Rauscher et al., 2009).

HIM uplatňuje své toxikologické účinky interakcí s dvěma typy receptorů (H a Hz) na buněčné membrány lidí a jiných savčích druhů, vyvolává dilataci periferních krevních cév, kapilár a tepen, což vede k hypotenzi, návalům a bolesti hlavy (Santos, 1996). Charakteristické kožní projevy jsou vyrážky, kopřivka, lokální zánět a otok. Gastrointestinální zapojení se vyznačuje nevolností, zvracením, průjmem a abdominální křečí. Ve vážných případech došlo k bronchospasmu a dušnosti (Shalaby, 1997).

Požítí potraviny s obsahem histaminu může způsobit syndrom podobný alergii (nesnášenlivost HIM). Kromě perorálně podané dávky má prvořadý význam stav střevních a jaterních regulačních systémů: střevní absorpce HIM je regulována enzymem monoaminoxidázou (MAO) uvolňovaným z enterocytů tenkého střeva do lumen střeva. V důsledku toho mohou vysoké hodnoty trávicího HIM a poruchy nebo snížená aktivita MAO mít za následek vysoký HIM v krvi, což přetíží vnitřní jaterní inaktivační systém (Rauscher et al., 2009).

#### **2.4.2 Toxicita tyraminu**

Tyramin patří mezi vazoaktivní aminy. Jeho význam v potravinách je především kvůli toxikologickým důsledkům. Nejen, že je sám o sobě slabě toxický, ale reaguje s inhibitory monoaminoxidázy (MAOI), léky jejichž kombinace s potravinami obsahujícími TYM může vyvolat hypertenzní krizi. TYM působí hlavně nepřímo tím, že uvolňuje noradrenalin od sympatického nervového systému, který způsobuje zvýšení krevního tlaku, periferní vazokonstrikci a zvýšenou srdeční činnost. Také rozšiřuje zorničky, způsobuje slzení, slinění a zvyšuje hladinu cukru v krvi. Sýr byl zpočátku jídlo spojované se zvýšením krevního tlaku zaznamenaným u pacientů podstupujících léčbu MAOI, proto je zvýšení krevního tlaku po požití potravin s obsahem TYM známo jako „reakce na sýr“. Reakce na sýr může způsobit silné bolesti hlavy, může vyvolat krvácení do mozku nebo srdeční selhání (Shalaby, 1997).

### **2.4.3 BA jako karcinogeny**

Aminy byly zkoumány jako možné mutagenní prekurzory, protože některé aminy mohou vytvářet nitrosoderiváty nebo působit jako prekurzory pro jiné sloučeniny schopné tvořit nitrosaminy. Ty jsou karcinogenní pro různé druhy zvířat a představují potenciaální riziko pro zdraví člověka. PUT a CAD jsou zahřátím převedeny na pyrrolidin a piperidin, z nichž zahřátím vznikají N-nitrosopyrrolidin a N-nitrosopiperidin. Ostatní nitrosovatelné aminy, které tvoří nejznámější karcinogenní N-nitrosaminy jsou sekundární aminy jako agmatin, spermin a spermidin (Shalaby, 1997).

Kvůli účasti na růstu buněk a poliferaci se PA vyskytují v rychle se dělících nádorových buňkách. Léky ovlivňující biosyntézy PA a jejich biologické role mají značný potenciál jako terapeutická činidla, ale nádorové buňky mají schopnost vychytávat extracelulární PA, dietní a produkované gastrointestinálními bakteriemi a kompenzovat účinky terapeutických činidel. PA deprivace kombinující inhibici PA syntézy v nádorových buňkách a snížení hlavních exogenních zdrojů včetně potravin se ukázala jako slibná terapeutická strategie (Kalač, Krausová, 2005).

## **2.5 Houby**

Houby jsou velkou skupinou živých organismů dříve řazených mezi rostliny, od kterých se odlišují zejména absencí chlorofylu. Protože nejsou schopné fotosyntetické asimilace jako zelené rostliny, přijímají organické látky jako zdroj uhlíku a energie. Patří mezi významné rozkladače a parazity, důležité jsou i v některých odvětvích potravinářství a průmyslu. Většina druhů jsou mutualisté, žijí symbioticky s cévnatými rostlinami nebo řasami (Svrček, Vančura, 1987).

### **2.5.1 Jedlé houby**

Jako jedlé houby se označují ty druhy hub, které po dostatečné tepelné úpravě (vaření, smažení, pečení) nevyvolávají žádné zdravotní potíže. Syrové houby by se neměly jíst vůbec, jelikož i malé dávky syrových plodnic některých běžných druhů hub, které po tepelném zpracování sníme bez potíží, vyvolají po požití prudkou nevolnost, například václavky (Svrček, Vančura, 1987).

Praktické použití hub jako potraviny má v českých zemích dlouho tradici, je doloženo kuchyňské využívání našimi předky již koncem minulého tisíciletí. Mezi nejvyužívanější druhy, které se označují jako „staročeské“, patří především různé druhy hřibů (*Boletus*), křemenáče (*Leccinum*), kozáky (*Leccinellum*), špičky (*Marasmius*), pravé ryzce (*Lactarius*), lišky (*Cantharellus*), hlívy (*Pleurotus*) a smrže (*Morchella*). Řada z tradičně sbíraných konzumních hub je v současné době vzácná nebo patří k ohroženým druhům, proto byl vypracován seznam 220 dosud se hojně vyskytujících druhů na území České Republiky (Keizer, 2005).

### 2.5.2 Hřibovité

Houby patřící do této čeledi patří mezi nejhledanější. U houbařů jsou některé druhy velice ceněny obzvláště pro svou velikost, kdy plodnice mohou vážit i kilogram a více. Vyskytují se převážně v humusu v lesích, kde jsou vázány na určité stromy nebo keře, jelikož je u nich vyvinutá silná mykorrhiza. Nejvíce rostou po teplých deštích od léta až do podzimu a jsou rozšířeny kosmopolitně (Cejp, 1958).

#### Hřib smrkový (*Boletus edulis*, Bull.)

Hřib smrkový je nejoblíbenější a nejpopulárnější houba rostoucí na území České republiky a řadí se do skupiny tzv. pravých hřibů. Mykorrhizicky je vázán na smrk, výjimečně se může objevovat v listnatých a smíšených lesích. Roste hojně v podhorských a horských smrčinách, obvykle 2 – 3 týdny po vydatnějších deštích (Svrček, Vančura, 1987).

Kloubouk ( 5 – 20 cm) je v mládí polokulovitý, později lehce sklenutý až plochý, za vlhkého počasí mírně slizký. Barva je nahnědlá až černohnědá. Rourky jsou v mládí bělavé, později žlutavé až žluto-zelenavé. Třeň je v mládí břichatý, později kyjovitý nebo válcovitý, bělavý až světle hnědý, v horní části s nenápadnou bělavou síťkou. V mládí má tvrdou dužinu, později se stává vatovitou (Hagara, 1993).

Obrázek 3: Hřib smrkový (Dadáková, 2014)



Suchohřib hnědý ( *Boletus badius*, Fr.)

Suchohřib hnědý se sbírá jako dobrá jedlá houba, jeho předností je to, že roste až do pozdního podzimu a hlavně, že je zřídka napaden larvami hmyzu. Roste hojně v jehličnatých, zvláště podhorských lesích. Někdy vyrůstá přímo naspodu kmenů nebo ztrouchnivělých pařezích, ale i ze zetlelých smrkových šišek (Svrček, Vančura, 1987).

Klobouk (4 – 15 cm) je polokulovitý až téměř plochý, kaštanově hnědý až černohnědý. Rourky jsou bělavé až nažloutlé, později žluto-zelenavé, které po otláčení zeleno-modrá. Třeň je pevný, jemně vláknitý, obvykle hnědo-červenavý. V mládí má tvrdou a máslovitou dužinu, která později dřevnatí, na řezu v mládí a za vlhka výrazně modrá (Hagara, 1993).

**Obrázek 4: Suchohřib hnědý (Dadáková, 2014)**



Klouzek strakoš (*Suillus variegatus*, (Sw.), Kuntze)

Klouzek strakoš označován také jako Hřib strakoš je houbou borových lesů na kyselém podkladu, zejména pískách. Roste od srpna do října, často v masách. V některých krajích je s oblibou sbírán, především mladé plodnice jsou vydatné a dobré. Většinou je řazen do čeledi hřibovité, ale v některé literatuře se objevuje v čeledi slizákovité (Svrček, Vančura, 1987).

Klobouk (5 – 12 cm) je polokulovitý až polštářovitý, barva žemlově hnědavá až nažloutle olivová. Rourky mají šedožluté až hnědo-olivové ústí. Třeň je hladký, nažloutlý až hnědočervený. Dužina je masitá a šťavnatá, nažloutlá až světle oranžová, na řezu slabě modrá (Hagara, 1993).

Obrázek 5: Klouzek strakoš (Dadáková, 2014)



### 2.5.3 Pečárkovité

Tyto lupenité houby větších rozměrů lze nalézt od května do listopadu, zejména na sušších místech. Patří mezi kulinářsky velmi oblíbené. Vyskytují se zejména v mírném pásmu severní polokoule (Cejp, 1958).

#### Bedla vysoká ( *Lepiota procera*, (Scop.), Singer)

Bedla vysoká je jednou z největších lupenitých hub. Roste obvykle ve skupinách v období vrcholícího léta, zejména na sušších místech smrkových a smíšených lesů. Ke sběru se doporučují plodnice ještě s uzavřeným kloboukem nebo klobouky dospělých plodnic (Svrček, Vančura, 1987).

Klobouk (10 – 25 cm) je v mládí vejčitý a uzavřený, později kuželovitý, nakonec sklenutý až plochý, s tmavým hrbolkem a pokrytý šupinami. Lupeny jsou vysoké, husté a měkké, v mládí zakryté závojem, později se žlutavým až hnědavým zbarvením. Třeň je válcovitý, v mládí vatovitý, poté dutý, po roztrhání závoje se vytváří velký posuvný prsten s roztřepeným okrajem. Dužina v klobouku je vatovitá a měkká, ve třeni tuhá až dřevnatá (Hagara, 1993).

**Obrázek 6: Bedla vysoká (Dadáková, 2014)**



## **2.6 Analytické metody**

BA se v potravinách stanovují ze dvou důvodů: zaprvé kvůli zhodnocení jejich možné toxicity a za druhé kvůli jejich využití ke stanovení jakosti potravin. Pro analýzu BA se využívá několik metod: chromatografie na tenké vrstvě, iontová chromatografie, plynová chromatografie a především vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Dobrých výsledků lze dosáhnout i pomocí kapilární zónové elektroforézy. Jelikož jsou aminy silné organické báze, je velmi užitečné využít tuto funkci k separaci od matrice vzorku. Pro tento účel se jako extrakční činidlo široce využívá kyselina chloristá (Dadáková et al., 2009).

Chromatografie je jednou z nejvýznamnějších analytických a separačních metod. Umožňuje dělení, identifikaci a stanovení velkého počtu organických látek, které

jsou obsažené v nejrůznějších přírodních i technických směsích v širokém koncentračním rozmezí (Šíma, Křížek, 2015).

### **2.6.1 Chromatografie na tenké vrstvě**

TLC (thin layer chromatography) je založena na opakovaném rozdělování chromatografované látky mezi dvě fáze, z nichž jedna je nepohyblivá. Může jít o rozdělování mezi fází pevnou a kapalnou nebo mezi dvě fáze kapalné (Cífková et al., 1965).

Chromatografie na tenké vrstvě se provádí na deskách, na kterých je nanášena tenká vrstva sorbentů. Nejčastěji se používá chromatografie LSC s oxidem hlinitým nebo silikagelem jako sorbentem (Šíma, Křížek, 2015).

(Lapa-Guimarães, Picková, 2004) použili ke stanovení osmi biogenních aminů TLC techniku se systémem rozpouštědel chloroform-diethylether-triethylamin (6:4:1) a následně směsí chloroformu a triethylaminu (6:1). Po oddělení byly aminy kvantifikovány pomocí fluorescenční denzitometrie při 330 nm.

### **2.6.2 Iontová chromatografie**

U iontové chromatografie (IEC) nebo také ionexové chromatografie je stacionární fází ionex a metoda slouží k separaci iontů. Měníče kationtů (katex) nesou záporný náboj a obsahují kyselou funkční skupinu, měniče aniontů (anex) nesou kladný náboj a obsahují bazickou funkční skupinu. Ion obsažený v měniči je vyměněn za ion v mobilní fázi nebo ve vzorku a tak dochází k separaci (Mikeš, 1961).

Analytická kolona se plní měničem iontů s malou kapacitou, což umožňuje použít k separaci mobilní fázi s nízkým obsahem elektrolytů. Supresorová pomocná kolona je plněna měničem kationtů, jako elektrolyt se zde používá hydrogenuhličitanového tlumivého roztoku, který umožní vodivostnímu detektoru detekovat vodivější anionty v separované směsi s poměrně velkou citlivostí. IEC lze použít k analýze kationu, ale převažuje analýza anorganických aniontů, například v dešťové, pitné nebo povrchové vodě (Šíma, Křížek, 2015).

(Favaro et al., 2007) za použití gradientu vodného roztoku kyseliny methansulfonové analyzovali BA v čerstvém a zpracovaném mase, jejichž detekční limity byly nižší (7 – 21 mg/kg) než u jiných chromatografických metod.



### 2.6.3 Plynová chromatografie

GC (Gas chromatography) je metoda neobyčejně citlivá, rychlá a jednoduchá a poskytuje s kvalitativními daty i data kvantitativní, přitom si vystačí s nepatrným množstvím vzorků. Princip dělení spočívá stejně jako u jiných chromatografických metod v rozdělování složek směsi mezi pohyblivou a nepohyblivou bází. Pohyblivou fází tvoří nosný plyn a nepohyblivou tuhý absorbent nebo kapalina, zakotvená fáze nanesená na pevném nosiči (Mikeš, 1961).

Aplikační oblast GC zahrnuje široké spektrum převážně organických látek, zejména těkavé a tepelně stálé látky. GC je zvláště vhodná pro analýzy uhlovodíkových směsí v potravinářském průmyslu, analýzy polutantů životního prostředí, stanovení reziduí polychlorovaných bifenyly, herbicidů a řady dalších zdravotně významných látek (Šíma, Křížek, 2015).

BA se stanovují v odvozených formách, jako je trifluoracetyl, trimethylsilyl, nebo 2,4-dinitrofenyl deriváty. Detektory pro stanovení BA pomocí GC jsou vodivostní, plamenově-ionizační a detektor s elektronovým záchytem (Karovičová, Kohajdová, 2003). V poslední době se standardem mezi detektory stává hmotnostní spektrometr.

### 2.6.4 Kapilární zónová elektroforéza

CZE (Capillary Zone Electrophoresis) neboli zónová kapilární elektroforéza je analytická technika, při které je separace založena na rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli na základě rozdílných nábojů a provádí se jako volná elektroforéza bez nosiče v tenké kapiláře (Klouta, 2003).

Při CZE jsou rezervoáry s tlumivým roztokem propojeny kapilárou vyplněnou rovněž tlumivým roztokem. Běžné kapiláry mají vnitřní průměr 25 až 75  $\mu\text{m}$ . Hlavní výhodou kapilární elektroforézy je možnost využívat pro separaci vysoké napětí až k hodnotám 30 kV, přičemž běžné elektroforéze by při takovémto napětí docházelo k ohřevu tlumivého roztoku. Do značné míry se shoduje s kapalinovou chromatografií či tuto techniku vhodně doplňuje, avšak oproti HPLC je dělicí účinnost CZE podstatně vyšší. Metoda CZE je vhodná především pro oddělení ionogenních látek a nachází uplatnění při separaci organických kyselin, aminokyselin, fenolů, cukrů, léčivých látek a mnoha dalších, zvláště organických látek (Šíma, Křížek, 2015).

Aromatické a heterocyklické aminy nevyžadují před použitím CZE derivatizaci, jelikož absorbují UV světlo, což umožňuje jejich přímou detekci. (Kvasnička, Voldřich, 2006) vyvinuli přímou, citlivou a rychlou kapilární elektroforetickou metodu s vodivostní detekcí pro stanovení BA v potravinářských výrobcích za méně než 15 minut.

Pro elektroforetickou analýzu ostatních aminů je třeba provést derivatizaci. (Kovács et al., 1999) použili k derivatizaci vzorků činidlo AccQ (6-aminoquinolyl-N-hydroxysukcinimidyl-karbamát). Separace PUT, SPM, SPD, HIS, CAD, TYM a TRM byla dosažena během 30 minut s dobrou opakovatelností a linearitou.

### **2.6.5 Kapalinová chromatografie**

Princip HPLC (high-performance liquid chromatography) a podstata separačních dějů se v zásadě neliší od GC. Hlavní rozdíly oproti GC spočívají v minimální kompresibilitě mobilní fáze, malém vlivu teploty na separaci a velmi významné aktivní úloze mobilní fáze. HPLC zahrnuje všechny chromatografické způsoby separace, kdy je mobilní fáze kapalná.

Výhodou HPLC je často šetrnější stanovení zejména organických látek oproti GC, kdy se s látkami pracuje obvykle za zvýšené teploty. Použití HPLC je výhodnější spíše pro hůře těkavé látky tam, kde vznikají problémy s GC. Složky, které běžnými detektory pro HPLC nelze detekovat, se převádějí na snadno detekovatelné deriváty. Tato metoda se dnes široce využívá v průmyslu, zdravotnictví, farmacii a mnoha dalších oborech (Šíma, Křížek, 2015).

Jelikož jsou aminy silné organické báze, je velmi užitečné využít tuto vlastnost k separaci od matrice vzorku. Pro tento účel se jako extrakční činidlo široce využívá kyselina chloristá. Při použití HPLC většinou nelze stanovit BA přímo, proto je třeba aminy nejdříve derivatizovat. Jako derivatizační činidlo se nejčastěji používá dansylchlorid (Dadáková et al., 2009).

### **2.6.6 Ultra výkonná kapalinová chromatografie**

UPLC (ultra-performance liquid chromatography) je nová kategorie kapalinové chromatografie, která si zachovává praktičnost a principy HPLC a zároveň zvyšuje celkové prokládané atributy rychlosti, citlivosti a rozlišení. Při použití částic

s velikostí menší než 2  $\mu\text{m}$  je možné plně využít chromatografické principy k separacím s použitím kratších kolon, nebo vyšší průtoky mobilní fáze pro zvýšení rychlosti s vynikajícím rozlišením a citlivostí (Mayer et al., 2010).

### **3 Cíl práce**

1. Vypracování literární rešerše na téma obsah BA a PA v potravinách.
2. Navržení a provedení experimentů, ve kterých se zkoumá obsah BA a PA v druzích volně rostoucích jedlých hub.
3. Stanovení vlastního obsahu BA a PA ve vzorcích volně rostoucích jedlých hub metodou UPLC.
4. Vyhodnocení získaných výsledků.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Použité laboratorní pomůcky, chemikálie, přístroje a zařízení

Pro analýzu BA a PA byly kromě běžných laboratorních pomůcek, chemikálií a laboratorního skla použity následující přístroje, chemikálie a zařízení. Veškeré použité chemikálie byly analytické čistoty.

#### Chemikálie

Putrescin dihydrochlorid, Fluka, Buchs, Švýcarsko  
Kadaverin dihydrochlorid, Fluka, Buchs, Švýcarsko  
Histamin dihydrochlorid, Fluka, Buchs, Švýcarsko  
Tyramin hydrochlorid, Fluka, Buchs, Švýcarsko  
Tryptamin hydrochlorid, Fluka, Buchs, Švýcarsko  
1,7 – heptandiamin, Fluka, Buchs, Švýcarsko  
Spermidin trihydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo  
Spermin tetrahydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo  
Fenylamin hydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo  
Dansylchlorid, Sigma Aldrich, Německo  
Prolin, Fluka, Buchs, Švýcarsko  
Heptan, Fluka, Buchs, Švýcarsko  
Acetonitril, Merck, Německo  
Uhličitan sodný, Penta, Chrudim, ČR  
Uhličitan draselný, Penta, Chrudim, ČR  
Kyselina chloristá, Acros, Geel, Belgie  
Hydrogenuhličitan sodný, Lach – Ner, Neratovice, ČR

#### Přístroje a zařízení

Třepačka LT2, Kavalier Sázava, ČR  
Odstředivka Sigma 2 – 5, Německo  
Thermovap, Ecom, ČR  
Kapalinový chromatograf (RR – LC), Agilent Technologies, USA  
Filtr ze skelných vláken Z7, Filpap. Štěstí, ČR  
Mlýnek Grandomix GM 200, Retsch, Německo

## 4.2 Odběr vzorků

Pro stanovení obsahu BA a PA byly zvoleny druhy jedlých hub, které rostou běžně v České Republice a jsou pravidelně sbírány.

Odběrové místo – Skalka je soustava kopců s nadmořskou výškou okolo 700 m.n.m, přibližně 16 km západně od Českých Budějovic. Oblast je lesnický využívána a patří k oblíbeným lokalitám pro sběr hub.

Na stanovišti dominuje zhruba padesátiletý porost borovice lesní (*Pinus sylvestris*, L.) s občasným zastoupením habru obecného (*Carpinus betulus*, L.) a buku lesního (*Fagus sylvatica*, L.). Podrost je druhově málo pestrý, převládá brusnice borůvka (*Vaccinium myrtillus*, L.). Průměrná roční teplota je asi 6°C a průměrné roční srážky 560 mm.

Plodnice byly shromážděny ráno v den, kdy nepršelo, během vegetačního období července a srpna 2014. Plodnice poškozené hmyzem a okousané slimáky nebo dalšími zvířaty byly odstraněny. Půda na povrchu nepoškozených těl byla očištěna nožem z ušlechtilé oceli a houby byly umístěny do koše, aby se zabránilo porušení tkáně. Druh houby byl ověřen pomocí atlasu hub (Hagara, 1993). Odebrané plodnice byly roztrženy s ohledem na naplánované experimenty. U každého druhu jedlé houby bylo odebráno vždy tolik plodnic, aby výsledný průměrný vzorek po úpravě vážil alespoň 250 g.

### Mezidruhové rozdíly:

U každého druhu jedlé houby byly pro tento účel odebrány plodnice různého stádia vývoje, při kterých je houba konzumována.

### Vliv stáří plodnice:

Modelovým druhem v tomto experimentu byl hřib dubový. Všechny plodnice daného druhu byly rozděleny na tři věkové kategorie: mladé, střední a staré.

### Vliv části plodnice:

Modelovým druhem toho experimentu byl opět hřib dubový. Byly vybrány tři dostatečně velké plodnice, které byly pečlivě rozděleny na části odpovídající třeni, sporotvorné vrstvě a klobouku.

Všechny pořízené vzorky byly nakrájené na plátky s maximální tloušťkou 5 mm a okamžitě zmrazené na -16°C. Zmrazené vzorky byly do 1 měsíce po odběru lyofilizovány na -60°C při tlaku 0,25 kPa po dobu 24 hodin. Lyofilizovaný materiál byl homogenizován na laboratorním mlýnku a připravený materiál byl uchováván v uzavřené plastové vzorkovnici až do analýzy. Veškerý materiál byl lyofilizován proto, že čerstvé houby jsou neúdržné a rychle podléhají zkáze.

### 4.3 Analýza PA a BA metodou HPLC

#### 4.3.1 Extrakce – tuhé vzorky

Extrakce byla provedena podle publikovaného postupu (Dadáková et al., 2009).

##### Postup extrakce:

Byl navážen 1g lyofilizovaného vzorku hub do 50 ml plastové odstředivací kyvety, následně bylo přidáno 3,5 ml vnitřního standardu HEP (400 ml.l<sup>-1</sup> roztoku heptandiaminu v 0,6M roztoku kyseliny chloristé). Směs byla 30 minut homogenizována při pokojové teplotě na třepačce LT 2, poté byla odstředěna na odstředivce 10 minut při 3500 otáčkách a na závěr byl supernatant přefiltrován přes papírový filtr.

##### Derivatizace:

Byl napipetován 1 ml extraktu hub (v 0,6M roztoku kyseliny chloristé) a následně zneutralizován 1,5 ml uhličitanového extraktu, který se vždy připravuje čerstvý.

Počet vzorků	1	2	4	5	6	8	10
(g) K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,666	1,332	1,998	2,664	3,33	4,664	6,328
(ml) AB	2	4	6	8	10	12	14

##### Příprava roztoku AB:

A: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2,65 g ad 50 ml

B: NaHCO<sub>3</sub> 4,2 g ad 100 ml

pH pufru B bylo nastaveno pomocí pufru A na hodnotu 9,2, poté bylo přidáno 2 ml derivatizačního činidla (dansynchlorid o koncentraci 5 mg/ 1 ml acetonu),

připravuje se vždy čerstvý. Směs byla 20 hodin třepána ve tmě při laboratorní teplotě. Následovalo přidání 200 µm prolinu (0,1 g prolinu/1 ml vody) a extrahování 3 ml heptanu s 2,5 minutovým převrácením. Byl odebrán 1 ml heptanového extraktu, následně odpařen do sucha pod dusíkem a rozpuštěn v 1,5 ml acetonitrilu. Na závěr byl rozpuštěný odparek přefiltrován přes skleněný filtrační papír.

#### 4.3.2 Analytická koncovka

Analýza derivatizovaného vzorku, který obsahuje dansylderiváty přítomných aminů, byla provedena metodou kapalinové chromatografie s využitím UPLC techniky. 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 µm). Koloně bylo 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:

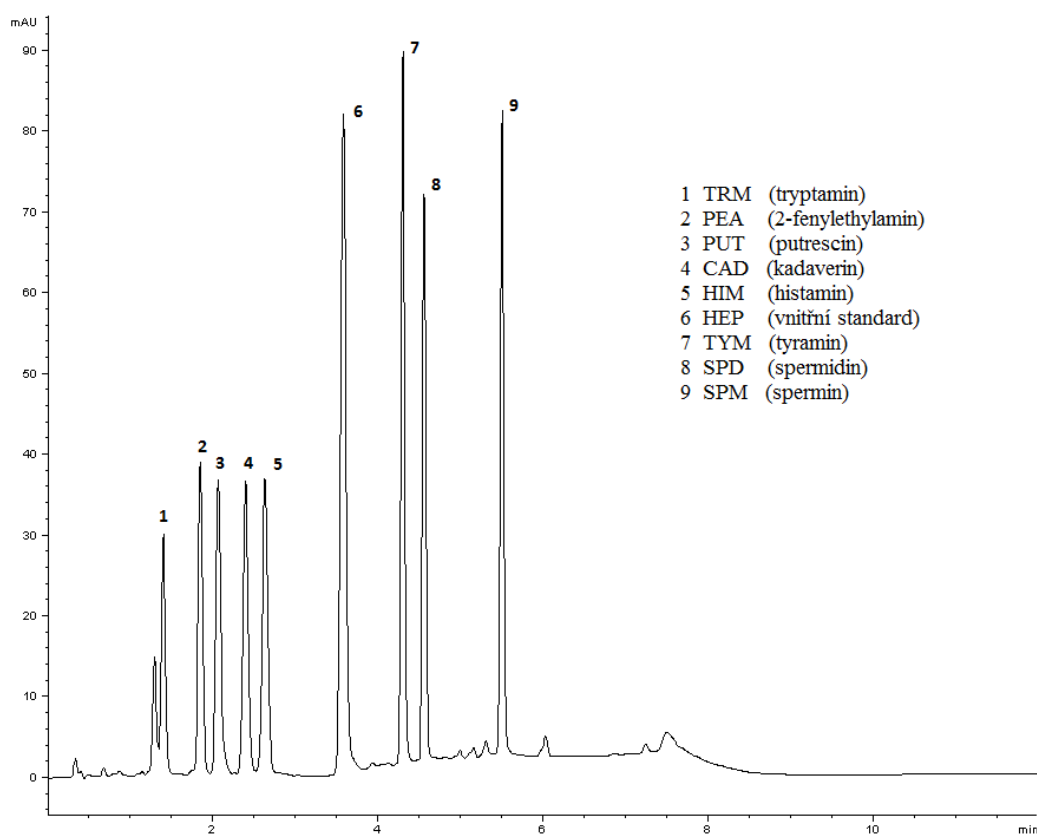
##### Schéma gradientu:

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 1ml/min. Kolona byla termostatována na 25°C, objem nástřiku činil 5 µl a jednotlivé analyty byly detekovány při vlnové délce 225 nm.



**Obrázek 7: záznam standardu aminů**



**Tabulka 2: Meze stanovitelnosti aminů v sušině (mg/kg<sup>-1</sup>)**

LOQ	TRM	PEA	PUT	CAD	HIM	TYM	SPD	SPM
mg/kg	2,9	2,5	2,1	1,9	1,9	3,3	1,2	3,7

## Zpracování dat

Naměřené záznamy byly vyhodnoceny pomocí programu ChemStation3,0 forLCsystems (Agilent Technologies). Obsah BA a PA byl stanoven metodou vnější kalibrace pomocí kalibračních závislostí. Pro výpočet obsahů BA a PA byly použity nástroje programu MS Office Excel.

## 5 Výsledky a diskuze

### 5.1 Obsah BA v druzích

Ze sledovaných aminů byly v osmi vzorcích lupenatých hub naměřeny hodnoty PUT, TYM, SPD a SPM, s občasným výskytem PEA – viz tabulka 3. CAD, TRM a HIM se pohybovaly pod hranicí stanovitelnosti. Nejvyšší obsah byl naměřen u SPD, konkrétně u bedly vysoké a to 1320 mg/kg sušiny, zatímco Dadáková et al., (2009) naměřili obsah SPD 867 mg/kg sušiny. Dalším aminem s vysokým obsahem byl PUT a to 874 mg/kg sušiny u muchomůrky plavé. Nejvyšší hodnota TYM byla 53 mg/kg u bedly vysoké, 192 mg/kg sušiny SPM u čechratky černohnědé.

U 10 vzorků hub s rourkami byly naměřeny hodnoty PEA, PUT, TYM, SPD a SPM, s občasným výskytem TRM a HIM, hodnota CAD se pohybovala pod hranicí stanovitelnosti, viz tabulka 4. Nejvyšší hodnota PEA byla naměřena u šiškovce černého a to 682 mg/kg sušiny, stejně tak nejvyšší obsah TYM – 74,2 mg/kg sušiny. Nejvyšší hodnota PUT byla 2260 mg/kg sušiny u suchohříbu babky. Kalač, Křížek, (1996) naměřili obsah PUT 565 mg/kg sušiny u klouzka strakoše, zatímco hodnoty naměřené v této práci dosahovaly nižších hodnot a to 409 mg/kg sušiny. Obsah SPD byl 4020 mg/kg sušiny u hříbu kováře, Dadáková et al., (2009) naměřili u stejného druhu houby obsah SPD téměř o polovinu méně – 2219 mg/kg sušiny. Nejvyšší naměřená hodnota SPM byla 90,5 mg/kg sušiny u hříbu dubového.

**Tabulka 3: Obsah BA v lupenatých houbách (mg/kg<sup>-1</sup>)**

	<b>PEA</b>	<b>PUT</b>	<b>TYM</b>	<b>SPD</b>	<b>SPM</b>
<b>Muchomůrka růžovka</b>	79,8±1,6	269±4,9	45,3±2,8	995±57,1	23,1±8,5
<b>Muchomůrka plavá</b>	276±1,4	874±5,5	15,9±0,4	868±49,1	*
<b>Ryzec syrovinka</b>	*	27,9±0,3	18,4±12,5	344±0,7	29,6±18,5
<b>Bedla vysoká</b>	*	576±4,5	53±9,9	1320±11,7	19,5±1,8
<b>Čechratka černohnědá</b>	*	696±9,8	LOQ*	209±7,5	192±3,7
<b>Holubinka mandlová</b>	*	30,1±5,3	16,6±0,1	584±20,9	38,5±0,4
<b>Liška obecná</b>	*	55,4±2,2	*	244±0,7	79,8±0,5
<b>Ryzec smrkový</b>	30,4±0,01	45,4±1,8	32,6±1,2	552±5,5	60,9±2,4

\*hodnota je menší než LOQ dané látky

**Tabulka 4: Obsah BA v houbách s rourkami (mg/kg<sup>-1</sup>)**

	TRM	PEA	PUT	HIM	TYM	SPD	SPM
<b>Hřib dubový</b>	*	243±14, 1	1400±89, 7	*	36,2±20 ,2	780±51,3	90,5±4,7
<b>Hřib kovář</b>	*	98,1±3	2080±16, 2	*	23,8±6	4020±16, 7	40,7±19,3
<b>Suchohřib babka</b>	*	704±25, 5	2260±31, 2	*	40,7±1, 4	1460±33, 2	31,8±0,1
<b>Klouzek sličný</b>	98,1±3 ,7	45,6±2, 9	554,6±10, 7	*	30,5±2, 2	272±13,4	38±2,4
<b>Šiškovce černý</b>	*	682±13, 5	935±22,4	*	74,2±3, 9	445±15,9	70,5±7,4
<b>Klouzek strakoš</b>	*	48,7±2	988±21,9	*	13,8±0, 6	409±8,3	71,6±11,8
<b>Hřib borový</b>	*	35,9±1, 4	2190±89, 9	*	13,1±2, 5	1240±67, 8	63,7±2,7
<b>Hřib dutonohý</b>	*	194±3,1	1150±14, 7	*	22,1±0, 9	427±8,2	62,5±2,3
<b>Klouzek kravský</b>	*	LOQ*	642±0,9	3,9±5, 5	12±2	381±6	46,9±7,1
<b>Suchohřib hnědý</b>	95±0,9	187±1,7	1380±58, 7	*	25,8±6, 5	1250±120	44,4±6,8

\*hodnota je menší než LOQ dané látky

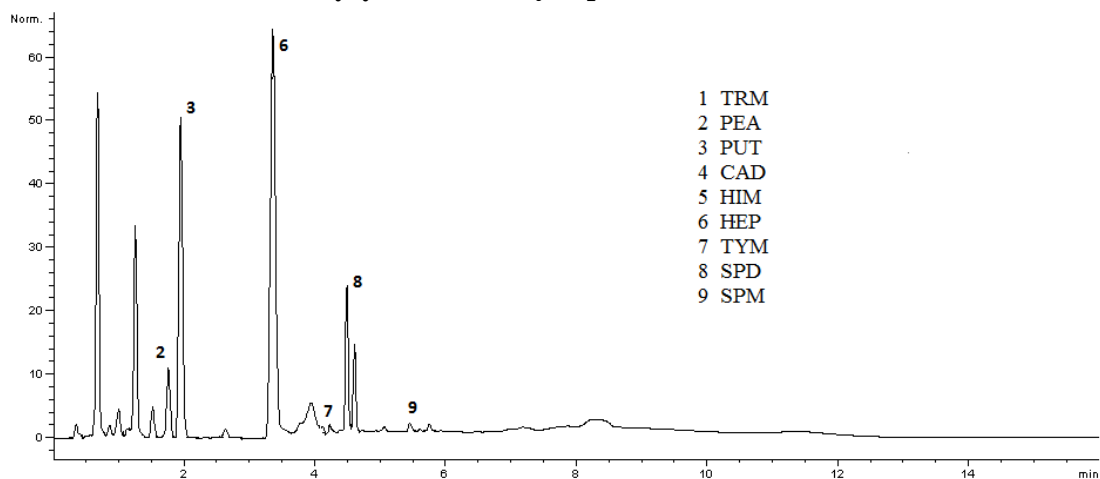
## 5.2 Vliv stáří plodnice na obsah BA

Při analyzování plodnic různého stáří hříbu dubového byly naměřeny nejvyšší hodnoty PUT 1670 mg/kg sušiny, SPD 536 mg/kg sušiny a SPM 67 mg/kg sušiny u nejstarších plodnic, naopak nejvyšší hodnoty PEA 227 mg/kg sušiny a TYM 11,9 mg/kg sušiny byly zaznamenány u plodnic nejmladších, hodnoty TRM, CAD a HIM se pohybovaly pod hranicí stanovitelnosti – viz tabulka 5. V tabulce lze také vidět, že množství BA je prokazatelně ovlivněno stářím plodnice. Na obrázcích č. 8, 9 a 10 vidíme jednotlivé záznamy analýzy vzorků.

**Tabulka 5: Obsah BA v plodnicích různého stáří hříbu dubového (mg/kg<sup>-1</sup>)**

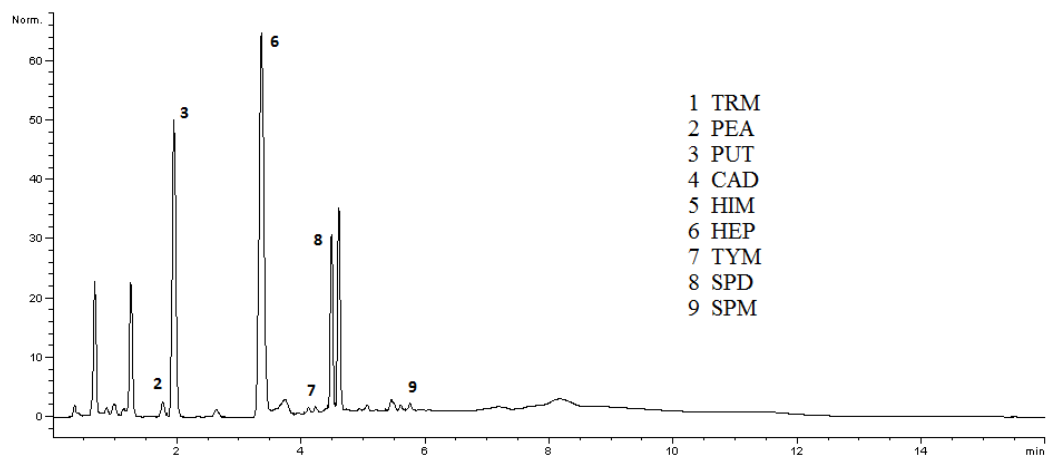
	<b>Mladý</b>	<b>Střední</b>	<b>Starý</b>
<b>PEA</b>	227±1,9	56,8±0,11	57,3±0,2
<b>PUT</b>	1200±1,9	1220±11,3	1670±7,5
<b>TYM</b>	11,9±1	11,3±0,9	10,9±1,3
<b>SPD</b>	414±18,3	520±0,2	536±5,6
<b>SPM</b>	34±4,7	53,6±2,3	67±13,4

**Obrázek 8: Záznam analýzy aminů mladých plodnic**



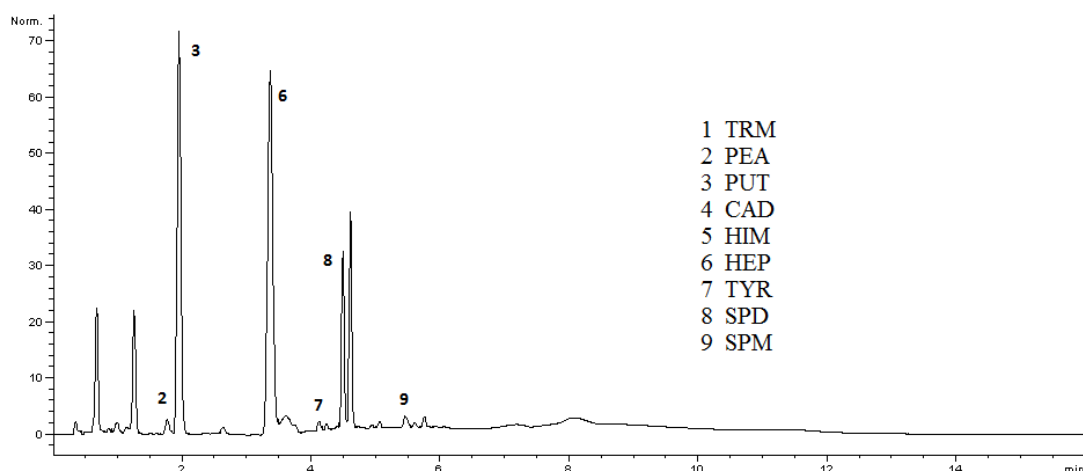
Zkratky viz legenda obrázku č.7.

**Obrázek 9: Záznam analýzy aminů středně starých plodnic**



Zkratky viz legenda obrázku č.7.

**Obrázek 10: Záznam analýzy aminů staré plodnice**



Zkratky viz legenda obrázku č.7.

### 5.3 Závislost výskytu BA na části plodnice

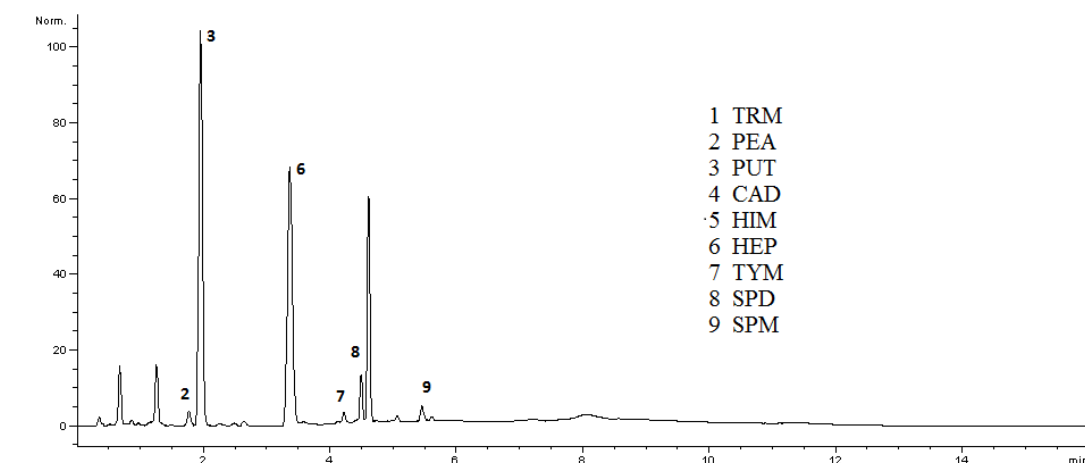
Při analyzování jednotlivých částí plodnic hříbu dubového byly zjištěny velké výkyvy v daných částech houby. Například nejvyšší naměřená hodnota PUT - 2420 mg/kg sušiny byla naměřena v třeni, zatímco v rourkách prokazatelně převládal SPD - 1210 mg/kg sušiny. V klobouku opět převládal PUT – 2050 mg/kg, naopak hodnota SPD dosahovala jen 133 mg/kg sušiny. PEA a TYM dosáhly nejvyšších hodnot v klobouku a to 79,5 mg/kg sušiny a 15 mg/kg sušiny, nejvyšší obsah SPM byl naměřen v rourkách – 103 mg/kg sušiny. Hodnoty TRM, CAD a HIM se pohybovaly pod hranicí stanovitelnosti, viz tabulka 6.

V tabulce lze vidět, že nejvyšší obsah SPD je vázán na sporotvornou část plodnice, k čemuž dospěli i Dadáková et al., (2009) při analýze jiných druhů hub. Na obrázcích č. 11, 12 a 13 můžeme vidět záznamy analýz vzorků jednotlivých částí plodnice.

**Tabulka 6: Obsah BA v jednotlivých částech houby (mg/kg<sup>-1</sup>)**

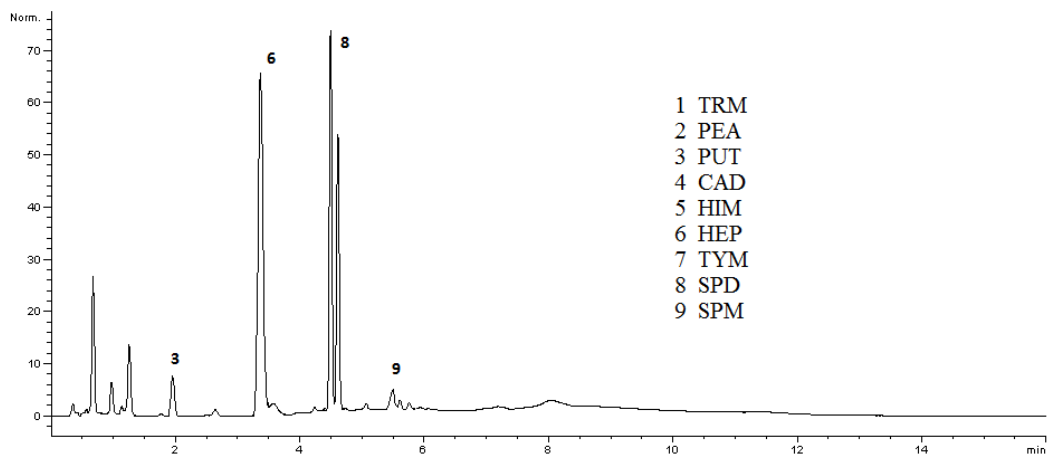
	<b>Třeň</b>	<b>Rourky</b>	<b>Klobouk</b>
<b>PEA</b>	77,3±4,7	*	79,5±0,6
<b>PUT</b>	2420±141	185±4,3	2050±10,9
<b>TRM</b>	13,9±19,6	*	15±1,2
<b>SPD</b>	198±3,9	1210±6,9	133±3,7
<b>SPM</b>	71,3±17	103±2,5	96,9±12,8

**Obrázek 11: záznam analýzy aminů v tření**



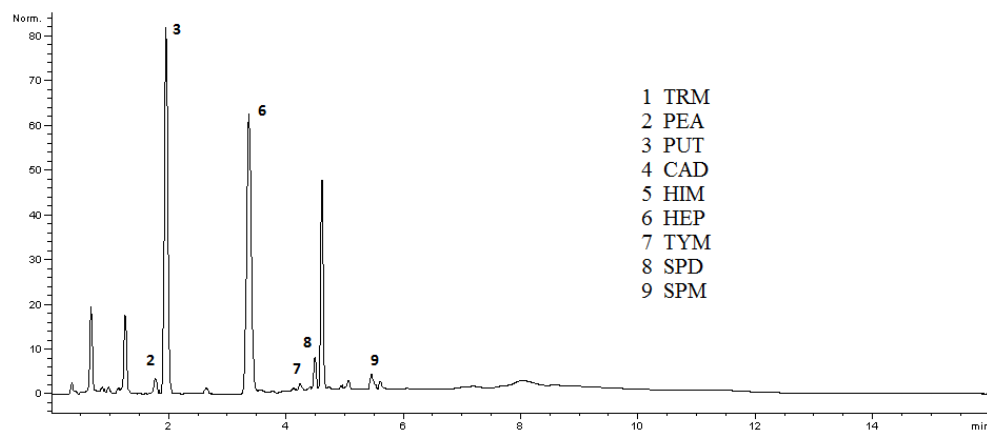
Zkratky viz legenda obrázku č. 7.

**Obrázek 12: záznam analýzy aminů v rourkách**



Zkratky viz legenda obrázku č. 7.

**Obrázek 13: Záznam analýzy aminů v klobouku**



Zkratky viz legenda obrázku č. 7.

## 6 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo stanovení obsahu osmi BA a PA, konkrétně tryptaminu (TRM), 2-fenylethylaminu (PEA), kadaverinu (CAD), histaminu (HIM), tyraminu (TYM), putrescinu (PUT), sperminu (SPM) a spermidinu (SPD) ve volně rostoucích jedlých houbách ČR. Práce byla zaměřena na mezidruhové rozdíly, vliv stáří a části plodnic na obsah BA a PA.

Podle dostupných informací získaných ze studií dosahují nejvyšších obsahů v houbách aminy PUT a SPD, zatímco CAD, HIM, TRM a TYM se v houbách nevyskytují vůbec nebo na velmi nízkých úrovních. Více informací k obsahu BA a PA se v literatuře prozatím nevyskytuje.

Při této práci bylo zkoumáno osmnáct druhů volně rostoucích jedlých hub získaných sběrem z odběrového místa Skalka, přibližně 16 km západně od Českých Budějovic.

Nejvyšší hodnoty naměřené při zkoumání rozdílů mezi druhy byly u SPD – 4020 mg/kg sušiny hříbu kováře a 1320 mg/kg sušiny bedly vysoké, PUT – 2260 mg/kg sušiny suchohříbu babky a 874 mg/kg sušiny muchomůrky plavé. Hodnoty TYM byly 53 mg/kg sušiny bedly vysoké a 74,2 mg/kg sušiny šiškovce černého, u kterého byla naměřena i nejvyšší hodnota PEA – 682 mg/kg sušiny. SPM dosáhl nejvyšších hodnot 192 mg/kg sušiny u čechraty černohnědé a 90,5 mg/kg sušiny u hříbu dubového. Hodnoty CAD, TRM a HIM se pohybovaly pod hranicí stanovitelnosti nebo se objevily jen zřídka.

V různě starých plodnicích modelového druhu hříbu dubového nejvyšších hodnot dosahoval PUT 1670 mg/kg sušiny, SPD 536 mg/kg sušiny a SPM 67 mg/kg sušiny u nejstarších plodnic, oproti tomu nejvyšší hodnoty PEA 227 mg/kg sušiny a TYR 11,9 mg/kg sušiny byly zaznamenány u nejmladších plodnic. TRM, CAD a HIM se pohybovaly pod hranicí stanovitelnosti. Z dat vyplývá, že obsah BA v houbách je ovlivněn jejich stářím.

V jednotlivých částech plodnic hříbu dubového se vyskytovaly nejvyšší hodnoty PUT – 2420 mg/kg sušiny ve třeni, ve sporotvorné části převládal SPD - 1210 mg/kg a v klobouku opět PUT – 2050 mg/kg sušiny. Hodnoty TRM, CAD a HIM se pohybovaly pod hranicí stanovitelnosti.

## 7 Seznam použité literatury

- 1) Bardócz, S. (1995). Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends in Food Science & Technology*, 6(10), 341-346.
- 2) Bodmer, S., Imark, C., & Kneubühl, M. (1999). Biogenic amines in foods: histamine and food processing. *Inflammation research*, 48(6), 296-300.
- 3) Cejp, K. (1958). *Houby II*. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd.
- 4) Cífková, J., Lábner, L., & Schwarz, V. (1965). *Chromatografie na tenké vrstvě*. I. vyd. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd.
- 5) Dadáková, E., Křížek, M., & Pelikánová, T. (2009). Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*, 116(1), 365-370.
- 6) 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(1), 163-171.
- 7) Favaro, G., Pastore, P., Sacconi, 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.
- 8) Hagara, L. (1993). *Atlas hub*. Martin: Neografie.
- 9) Kalač, P., & Krausová, P. (2005). A review of dietary polyamines: formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry*, 90(1), 219-230.
- 10) Kalač, P. (2006). Biologically active polyamines in beef, pork and meat products: a review. *Meat Science*, 73(1), 1-11.



- 11) Kalač, P., & Křížek, M. (1997). Formation of biogenic amines in four edible mushroom species stored under different conditions. *Food Chemistry*, 58(3), 233-236.
- 12) Karovičová, J., & Kohajdová, Z. (2005). Biogenic amines in food. *Chem. Pap.*, 59(1), 70-79.
- 13) Keizer, G. J. (2005). *Houby: encyklopedie* (2. vyd.). Čestlice: Rebo.
- 14) Klouda, P. (2003). *Moderní analytické metody* (2. upr. a dopl. vyd.). Ostrava: Pavel Klouda.
- 15) Kovács, Á., Simon-Sarkadi, L., & Ganzler, K. (1999). Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 836(2), 305-313.
- 16) Křížek, M., Šíma, J. (2015). *Analytická chemie*. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta.
- 17) Kvasnička, F., & Voldřich, M. (2006). Determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis with conductometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1103(1), 145-149.
- 18) Ladero, V., Calles-Enriquez, M., Fernández, M., & Alvarez, M. (2010). Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition & Food Science*, 6(2), 145-156.
- 19) Lapa-Guimarães, 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), 223-232.
- 20) Larqué, E., Sabater-Molina, M., & Zamora, S. (2007). Biological significance of dietary polyamines. *Nutrition*, 23(1), 87-95.

- 21) Mayer, H. K., Fiechter, G., & Fischer, E. (2010). A new ultra-pressure liquid chromatography method for the determination of biogenic amines in cheese. *Journal of Chromatography A*, 1217(19), 3251-3257.
- 22) McCabe-Sellers, B. J., Staggs, C. G., & Bogle, M. L. (2006). Tyramine in foods and monoamine oxidase inhibitor drugs: a crossroad where medicine, nutrition, pharmacy, and food industry converge. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, S58-S65.
- 23) Mikeš, O. (1961). *Příručka laboratorních chromatografických metod*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury.
- 24) Moinard, C., Cynober, L., & de Bandt, J. P. (2005). Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clinical Nutrition*, 24(2), 184-197.
- 25) Nishibori, N., Fujihara, S., & Akatuki, T. (2007). Amounts of polyamines in foods in Japan and intake by Japanese. *Food Chemistry*, 100(2), 491-497.
- 26) Nishimura, K., Shiina, R., Kashiwagi, K., & Igarashi, K. (2006). Decrease in polyamines with aging and their ingestion from food and drink. *Journal of biochemistry*, 139(1), 81-90.
- 27) Pircher, A., Bauer, F., & Paulsen, P. (2007). Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. *European Food Research and Technology*, 226(1-2), 225-231.
- 28) Santos, M. S. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International journal of food microbiology*, 29(2), 213-231.
- 29) Shalaby, A. R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29(7), 675-690.
- 30) Svrček, M., Vančura, B. (1987). *Houby*. Praha: Artia.