

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra analytické chemie

VÝVOJ ON-LINE SPE-HPLC METODY PRO STANOVENÍ ZEARALENONU VE  
VZORCÍCH PIVA

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:  
Hradec Králové 2017

Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.  
Bc. Barbora Gajdošová

Srdečně děkuji panu doc. Šatínskému za odborné vedení, trpělivost, čas a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnoval. Chtěla bych také poděkovat doktorandce Mgr. Ivoně Lhotské za pomoc při experimentální práci v laboratoři a její cenné rady.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, dne

Bc. Barbora Gajdošová

## Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Barbora Gajdošová

Školitel: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Název diplomové práce: Vývoj on-line SPE-HPLC metody pro stanovení zearalenonu ve vzorcích piva

K vývoji metody pro stanovení mykotoxinu zearalenonu v pivu bylo využito vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s on-line extrakcí na tuhou fázi (SPE) pomocí techniky přepínání kolon pro úpravu vzorku. Byly testovány dva rozdílné sorbenty pro SPE. Vzorek piva o objemu 50  $\mu$ l byl dávkován přímo do systému. Po nástřiku vzorku došlo k extrakci zearalenonu z matrice na extrakční předkoloně Ascentis® Express C18 Guard Cartridge (5 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), která je na bázi reverzní fáze nebo na kolonce (10 x 4,6 mm) naplněné sorbentem Affinimip® SPE Zearalenone, což je specifický molekulárně vtištěný polymer, určený pro selektivní extrakci zearalenonu. Jako promývací fáze pro odstranění balastní matrice byl vybrán pro extrakční předkolonu C18 40% roztok methanolu s 2% vodným roztokem kyseliny octové a pro Affinimip 10% roztok acetonitrilu s 2% vodným roztokem kyseliny octové, tyto promývací roztoky protékaly extrakční kolonkou rychlostí 2 ml/min po dobu 2 minut. Po přepnutí ventilu byly látky dále separovány na chromatografické koloně Kinetex XB-C18 (150 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m). Mobilní fáze o složení acetonitril – voda (35:65), protékala kolonou rychlostí 1 ml/min při gradientové eluci. Fluorimetrická detekce byla nastavena na vlnové délky Ex 270 nm a Em 458 nm. Analýza jednoho vzorku včetně on-line úpravy trvala 13 minut. Limit kvantifikace této metody byl 5  $\mu$ g/l. Zearalenon byl následně analyzován ve 30 vzorcích piv z českého trhu. Naměřené množství mykotoxinu bylo nízké, ve většině případů nedetekovatelné, tudíž i pod nejnižším povoleným limitem pro zearalenon v potravinách.

Klíčová slova: HPLC, MIP, on-line SPE, zearalenon, pivo

## Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Bc. Barbora Gajdošová

Supervisor: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: On-line SPE-HPLC method development for determination of zearalenone in beers

High performance liquid chromatography coupled with on-line solid phase extraction (SPE) using the column switching technique for sample preparation was utilized for the development of the method for the determination of mycotoxin zearalenone in beer. Two different SPE sorbents were tested. A volume of 50  $\mu$ l of beer sample was injected directly into the chromatographic system. After injection, the sample extraction of zearalenone from the matrix was carried out on SPE precolumn Ascentis® Express C18 Guard Cartridge (5 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m), which is based on the reverse phase, or on SPE precolumn (10 x 4.6 mm) filled with Affinimip® SPE Zearalenone sorbent, a specific Molecularly Imprinted Polymer, designed for the selective extraction of zearalenone. 40% methanol – 2% water solution of acetic acid was selected as the washing solution for removing ballast matrix for the C18 extraction column and 10% acetonitrile – 2% water solution of acetic acid for the Affinimip column. These washing solutions were flowed through the extraction column at a flow rate 2 ml/min for 2 minutes. After switching valve, the compounds were further separated on an analytical column Kinetex XB-C18 (150 x 4.6 mm, 5 $\mu$ m). Mobil phase of composition acetonitrile - water (35:65) was passed through the column at 1 ml/min in gradient elution. Wavelengths of fluorimetric detection were set at Ex 270 nm and Em 458 nm. Analysis of one sample including on-line pretreatment was about 13 minutes. Limit of quantification for this method was 5  $\mu$ g/l. Zearalenone was analyzed in 30 samples of Czech beer. The measured amount of mycotoxin was low, in most cases undetectable and under the maximum allowed level for zearalenone according to EU standards.

## Obsah

Seznam zkratk	8
1 Úvod	10
2 Cíl a zadání práce	11
3 Teoretická část	12
3.1 Zearalenon (ZEA)	12
3.2 Legislativa a kontrola	15
3.3 Kontaminace piva	16
3.4 On-line SPE HPLC	18
3.4.1 Úprava vzorku	18
3.5 Molekulárně vtištěné/otištěné polymery (MIP)	20
3.6 Metody stanovení zearalenonu	21
4 Experimentální část	26
4.1 Materiály a pomůcky	26
4.1.1 Standardy, chemikálie a vzorky	26
4.2 Přístroje a podmínky separace	28
4.3 Příprava roztoků standardu zearalenonu	29
4.3.1 Příprava roztoku standardu	29
4.3.2 Příprava zásobních roztoků	29
4.3.3 Příprava pracovních roztoků pro kalibraci	29
4.3.4 Příprava vzorků piva	30
4.3.5 Příprava mobilních fází	30
4.4 Optimalizace chromatografických podmínek	31
4.4.1 Volba mobilní fáze pro isokratickou eluci	31
4.4.2 Parametry detekce	32
4.4.3 Volba promývací fáze	33

4.4.4	Výběr analytické kolony .....	36
4.4.5	Optimalizace gradientové eluce .....	39
4.5	Souhrn optimálních podmínek pro HPLC analýzu .....	42
5	Výsledky .....	43
5.1	Test vhodnosti chromatografického systému .....	43
5.1.1	Účinnost chromatografického systému v gradientové eluci – Peak Capacity P (píková kapacita) .....	44
5.1.2	Faktor symetrie chromatografických píků ( $A_s$ ) .....	44
5.2	Validace analytické metody .....	45
5.2.1	Linearita .....	45
5.2.2	Opakovatelnost .....	48
5.2.3	Přesnost .....	49
5.2.4	Výtěžnost .....	49
5.2.5	Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) .....	50
5.3	Stanovení obsahu zearalenonu ve vzorcích vybraných druhů pív .....	52
6	Závěr a diskuse .....	55
7	Použitá literatura .....	57

## Seznam zkratek

APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization (Chemická ionizace za atmosférického tlaku)
DAD	Diode Array Detector (Detektor s diodovým polem)
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESI	Electrospray Ionization (Ionizace elektrosprejem)
FLD	Fluorescence detektor (Fluorescenční detektor)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography (Vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LLE	Liquid-Liquid Extraction (Extrakce kapalina-kapalina)
LC	Liquid Chromatography (Kapalinová chromatografie)
LOD	Limit of Detection (Limit detekce)
LOQ	Limit of Quantification (Limit kvantifikace)
MIPs	Molecularly Imprinted Polymers (Molekulárně vtištěné polymery)
MIT	Molecularly Imprinting Technology (Technologie molekulárního vtiskování)
MS	Mass Spektrometry (Hmotnostní spektrometrie)
NIP	Non-Imprinted Polymer
ppb	parts per bilion ( $\mu\text{g/l}$ )
ppm	parts per milion ( $\text{mg/l}$ )
ppt	parts per trilion ( $\text{ng/l}$ )
PTFE	Polytetrafluorethylen
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed (Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva)
RIA	Radio-Imunosorbent Assay
RP	Reverse Phase (Reverzní fáze)
RSD	Relative Standard Deviation (Relativní směrodatná odchylka)



SPE	Solid Phase Extraction (Extrakce na tuhou fázi)
SZPI	Státní zemědělská a potravinářská inspekce
TDI	Tolerable Daily Intake (Tolerovatelný denní příjem)
TLC	Thin Layer Chromatography (Tenkovrstvá chromatografie)
UV-VIS	Ultrafialové-viditelné záření
ZAL	Zearalanol
ZAN	Zearalanon
ZEA	Zearalenon
ZOL	Zearalenol

# 1 Úvod

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity produkované vláknitými mikroskopickými houbami. Představují vysoce stabilní toxické nízkomolekulární látky. Za určitých podmínek mohou kontaminovat široké spektrum potravin a mohou tak výrazně přispívat k poškození zdraví lidí a zvířat. Po chronickém alimentárním příjmu nízkých dávek se mohou projevovat zejména hepatotoxické, nefrotoxické, neurotoxické, karcinogenní, cytotoxické, imunotoxické, genotoxické, teratogenní a estrogenní účinky. Akutní otravy nejsou častým jevem, ale alergické reakce se vyskytují celkem běžně, zejména při vdechování spór. Mezi nejsledovanější producenty mykotoxinů patří zejména vláknité houby rodu *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*. Kromě značného snížení technologické kvality pěstovaných cereálií, je závažným problémem přenos mykotoxinů do potravin, případně jejich další uvolňování při technologickém zpracování, např. během sladařsko-pivovarské technologie.

Plísně jsou pravidelnou a běžnou součástí vegetace a plní nezbytnou úlohu v recyklaci živin a rozkladu biologického materiálu. Kontaminují zrniny a krmné plodiny v průběhu celého výrobního procesu, tzn. od sklizně až po skladování a konzervaci. Největší vliv na růst a množení plísní má nepříznivé počasí a nevhodné podmínky ošetřování a skladování. K dalšímu šíření nákazy dochází během rozprášení spór větrem, hmyzem či přístrojovou technikou. Spóry napadají rostlinu během růstu nebo se přenesou do půdy, kde napadají zrna a následně pak celou rostlinu. Největší pozornost při výskytu mykotoxinů v potravinách a krmivech je věnována fusariovým mykotoxinům, které se v našich podmínkách vyskytují nejběžněji. Rod *Fusarium* produkuje zejména trichotheceny, fumonisiny a zearalenon. Na přítomnost mykotoxinů mohou upozornit některé senzorycké změny (zápach, změna barvy, barevné skvrny, ...), ale není to pravidlem. Rostlina se nemusí zdát vůbec houbou napadena, přesto už však může být přítomno podhoubí a zamořenosť mykotoxiny tak může zůstat skryta.

Pivo patří v České republice k velice oblíbeným slabě alkoholickým nápojům vyráběným v pivovaru. Jednou ze základních surovin pro přípravu jsou právě obiloviny, tím pádem i pivo představuje potenciální zdroj rizika pro člověka, z hlediska kontaminace mykotoxiny.

Zabránit výskytu mykotoxinů v potravinách není i přes dodržování zemědělských a technologických postupů zcela možné, proto je velmi důležité sledovat, zda nejsou překračovány potravinové limity jednotlivých mykotoxinů. Z tohoto důvodu se neustále vyvíjejí vhodné citlivé a selektivní analytické metody pro jejich detekci [1, 2].

## **2 Cíl a zadání práce**

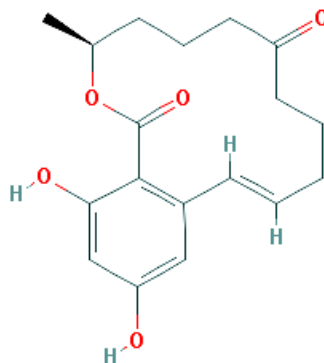
Tato diplomová práce je zaměřená na testování a optimalizaci podmínek vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) spojené s on-line extrakcí na tuhé fázi (SPE) pro analýzu mykotoxinu zearalenonu (ZEA) v pivu, kde se může vyskytovat ve stopovém množství. Jelikož jsou všeobecně mykotoxiny pro člověka škodlivé, je zapotřebí sledovat, zda jejich koncentrace v potravinách nepřekračuje povolené limitní hodnoty, proto se neustále vyvíjejí citlivější a selektivnější metody pro detekci tělu nebezpečných látek.

Cílem diplomové práce bylo testovat a najít vhodné optimalizované podmínky pro on-line SPE metodu, kterou by bylo možné selektivně stanovit zearalenon v matrici piva. Cílem bylo testování dvou odlišných sorbentů na bázi reverzní fáze a na bázi molekulárně vtištěného polymeru. Po optimalizaci on-line SPE-HPLC podmínek byly obě metody validovány a využity pro analýzu zearalenonu ve vzorcích piva.

### 3 Teoretická část

#### 3.1 Zearalenon (ZEA)

Molekulová hmotnost:	318,369 g/mol
Vzorec:	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>
Název IUPAC:	(2E,11S)-15,17-dihydroxy-11-methyl-12-oxabicyclo[12.4.0]octadeca-1(14),2,15,17-tetraene-7,13-dione
Další názvy:	F-2 toxin; toxin, F2



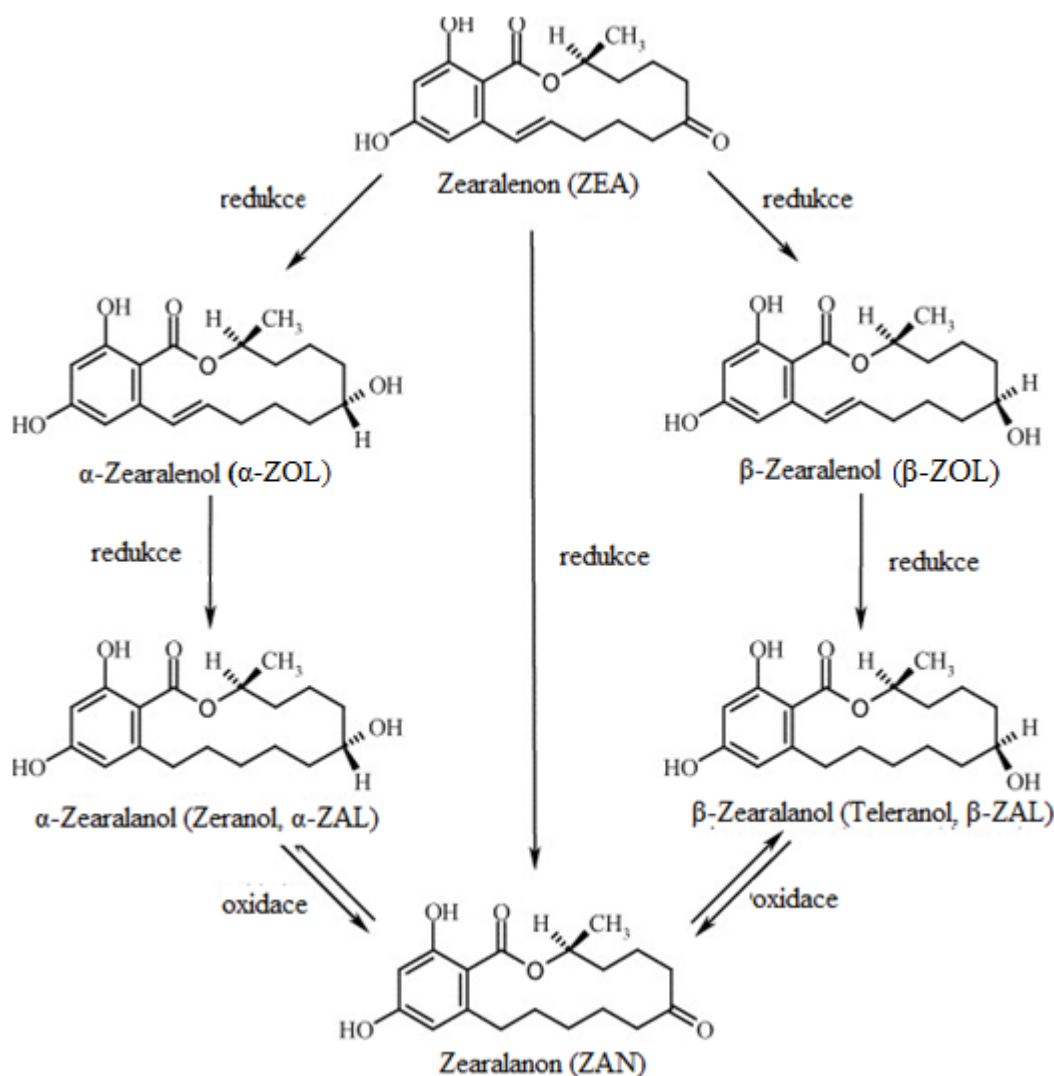
Obr. 1: Molekula zearalenonu [3]

Fyzikální vlastnosti:	bílá krystalická látka nebo bílý prášek bez zápachu
Rozpustnost:	rozpustný v organických rozpouštědlech (éter, ethanol, methanol), v alkalických vodných roztocích. Nerozpustný ve vodě.
Bod tání:	159 – 166°C
Absorpční maximum (vlnové délky):	235, 274, 313 nm (v methanolu) [4, 5]

Zearalenon (ZEA) je lakton kyseliny  $\beta$ -resorcylové produkovaný zejména toxigenními kmeny rodu *Fusarium*. Hlavními producenty zearalenonu jsou *Fusarium graminearum* (neboli *F. roseum*, nepohlavní forma *Gibberella zeae*), *F. culmorum*, *F. moniliforme*, *F. equiseti* atd., což jsou běžné půdní houby v mírném a teplém podnebí. Název zearalenon je kombinací termínů *Gibberella zeae*, laktonu resorcylové kyseliny

(- *ral*), – *ene* (pro přítomnost dvojné vazby mezi C-1' a C-2 uhlíkem) a – *one* pro keton v poloze C-6'. ZEA vzniká jako sekundární metabolit uvedených plísní a napadá hlavně kukuřici, ale na kontaminaci je rovněž náchylná pšenice, ječmen, čirok, žito, proso a rýže. ZEA je vysoce rezistentní k teplotám, proto se může dále vyskytovat ve výrobcích z těchto obilovin, kontaminuje i některé ořechy, chilli koření, banány, kari atd. Při fusariové kontaminaci může docházet i ke společnému výskytu ZEA, trichothecenů a fumonisinů [5, 6, 7, 8].

Zearalenon je v organismu absorbován a metabolizován pomocí dvou biotransformačních cest. První z nich je hydroxylace, která je pravděpodobně katalyzována 3 $\alpha$ - a 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenázou, vede k tvorbě estrogeně mnohem silnějším analogům,  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZOL) a  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZOL). Takto vzniklé redukované metabolity jsou následně konjugovány s kyselinou glukuronovou a katalyzovány uridindifosfát-glukuronyl transferázou. Mohou se vyskytovat i další deriváty ZEA např.  $\alpha$ -zearalanol ( $\alpha$ -ZAL),  $\beta$ -zearalanol ( $\beta$ -ZAL) a zearalanon (ZAN). Nicméně jsou pouze omezené důkazy o výskytu těchto metabolitů v potravinách [6, 7, 8, 9].



Obr. 2: Chemická struktura metabolitů zearalenonu, upraveno [10]

Zearalenon není významně akutně toxický, ale ZEA a jeho deriváty vykazují estrogení a anabolické účinky, označují se jako endogenní disruptory (nebo tzv. environmentální hormony). ZEA vyvolává mykotoxikózy u hospodářských zvířat, vyznačující se syndromem hyperestrogenismu u prasat, neplodností u skotu a drůbeže a je zde možný i dopad na lidské zdraví. Prasata (prasnice) jsou k ZEA nejcitlivější, dále např. myši, potkani, opice.

Od roku 1920 bylo vypořádováno, že existuje souvislost mezi konzumací kontaminovaného krmiva a hyperestrogenismem u prasat. Moderní publikace ukazují, že denní dávka pod 1,0 ppm ZEA může vést k syndromu hyperestrogenismu prasat, vyšší dávky mohou pak vést k poruchám koncepce, potratům a hypertrofiím pohlavních orgánů a dalším reprodukčním problémům [11, 12].

Mimoto byla u ZEA prokázána hepatotoxicita, hematotoxicita, imunotoxicita a genotoxicita [7].

### 3.2 Legislativa a kontrola

Roku 2006 byly předloženy v Nařízení komise ES č. 1881/2006 limity pro obsah zearalenonu v některých potravinách. Nejnižší hodnoty 20 µg/kg jsou stanoveny pro dětské příkrmy a výživu, nejvyšší pro kukuřičný rafinovaný olej 400 µg/kg.

Dne 28. září 2007 vyšlo nové Nařízení komise ES č. 1126/2007, kterým se změnilo předchozí nařízení pro některé maximální limity kontaminujících látek v potravinách [13, 14].

V roce 2011 stanovila European Food Safety Authority (EFSA) tolerovatelný denní příjem (TDI) na 0,25 µg na kilogram tělesné hmotnosti. U snídaňových cereálií je podle EFSA možné zvýšení maximálního limitu pro ZEA ze současných 50 µg/kg na 75, 100, 125 či až 150 µg/kg. K překročení TDI by mohlo dojít výjimečně při konzumaci kontaminovaných snídaňových cereálií každý den po dobu dvou až čtyř týdnů [6].

Maximální hodnoty pro ZEA v pivu doposud nebyly konkrétně stanoveny.

Tab. 1: Vybrané limity nařízení komise ES č. 1881/2006 (v závorce uvedená změna z nařízení komise ES č. 1126/2007) [13, 14]

	Maximální limity pro zearalenon (µg/kg)
Nezpracované obiloviny jiné než kukuřičné	100
Nezpracovaná kukuřice, kromě nezpracované kukuřice určené ke zpracování mokřým mletím	200 (350)
Obiloviny určené k přímé lidské spotřebě, obilná mouka, otruby a klíčky ve formě konečného výrobku uváděného na trh pro přímou lidskou spotřebu (kromě potravin uvedených níže)	75
Pečivo (zahrnuje i malé běžné pečivo), sladké pečivo, sušenky, cereální tyčinky a snídaňové cereálie, nezahrnuje kukuřičné tyčinky a snídaňové cereálie z kukuřičného základu	50

Kukuřice určená k přímé lidské spotřebě, cereální tyčinky z kukuřice a kukuřičných snídaňových cereálií	100
Obilné příkrmy (kromě kukuřičných příkrmů) a ostatní příkrmy pro kojence a malé děti	20
Kukuřičné příkrmy pro kojence a malé děti	20

Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI) se každoročně zabývá monitorováním cizorodých látek v potravinách na území České republiky. Pokud se objeví nadlimitní hodnoty cizorodých látek v potravinách a krmivech, pak SZPI podá hlášení v Systému rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF), aby došlo ke stažení z evropského trhu. V předchozích letech bylo na RASFF ohlášeno několik případů překročení limitní hranice pro zearalenon, většinou se jednalo o cereálie a pekařské výrobky. Jako vážné byly zhodnoceny dva případy v roce 2015, kdy se zearalenon vyskytoval v kukuřičné mouce v hodnotě 379,7 µg/kg z Itálie a 1,029 mg/kg ze Srbska [15, 16].

Testováním přítomnosti mykotoxinů a jejich kontrolou v potravinách se zabývá nejen SZPI, ale také Státní veterinární správa v působnosti ministerstva zemědělství a další zdravotní ústavy. Co se týče piva tak do výběru kvalitních a bezpečných surovin zasahuje i Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, který pravidelně monitoruje výskyt cizorodých látek ve sladovnickém ječmeni a chmelu [17].

### 3.3 Kontaminace piva

Ječmen a pšenice spadají pod ekonomicky významné obiloviny, které ve většině případů slouží jako krmivo. Obě dvě suroviny vypěstované v nejlepší kvalitě patří k tradičním surovým materiálům pro výrobu sladu, piva a whisky.

Dalšími surovinami nezbytnými k výrobě piva jsou chmel, voda a pivovarské kvasinky.

Prvním krokem při výrobě piva je výroba sladu, jde o naklíčené a usušené obilné zrna ječmene. Při klíčení dochází ke štěpení polysacharidů pomocí enzymů na jednoduché sacharidy vhodné ke kvašení. Slad se posléze namele na sladový šrot, který



se míchá s vodou. Následuje „rmutování“, které je typické pro česká piva, cílem je uvolnění co nejvíce extrahovatelných látek do roztoku. Během této fáze postupně stoupá teplota až na 70 °C. Tento krok se několikrát opakuje. Dále se scezuje sladina kvůli získání čirého roztoku, který se posléze vaří s chmelem. Při vaření se inaktivují enzymy, dojde tak k zabránění rozkladu dalších sacharidů, dále se vařením mladina sterilizuje a dochází k izomeraci chmelových pryskyřičných kyselin, díky nimž má pivo typickou hořkou chuť. Poslední fází tohoto kroku je ochlazení na 8 až 9°C, přičemž nerozložené bílkoviny koagulují s látkami obsaženými v chmelu a vytváří se tzv. chmelové kaly.

Druhý krok představuje kvašení mladiny, ta se tímto způsobem provzdušní a přidají se k ní kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (kmen odolný vůči chladu). Existují dva druhy pivovarských kvasinek, a to spodní, které pracují v teplotním rozmezí 7 až 15 °C, používají se při výrobě tzv. ležáků nebo svrchní, které pracují při 18 až 22 °C. Během fermentace převážná část cukerných látek zkvasí na ethanol, oxid uhličitý a vedlejší produkty. Pivovarské kvasinky se množí a rozkládají enzymem maltázou polysacharid maltózu na dvě molekuly glukózy.

Jako posledním a nejdelším krokem celého procesu je dokvašování (ležení), které probíhá při nízkých teplotách, pivo se čirí, sytí vznikajícím oxidem uhličitým a dozrává [18].

Plísňe a mykotoxiny se v obilovinách vyskytují běžně, např. právě ječmen je velmi často napadán patogeny rodu *Fusarium*, *Aspergillus* a *Penicillium*. Sekundární metabolity těchto mikroskopických vláknitých hub jsou nebezpečnými přírodními kontaminujícími látkami plodin. Jak již bylo zmíněno výše, zearalenon je chemicky a tepelně stabilní mykotoxin, tudíž dochází k jeho přenosu z kontaminovaných zrn do cereálních výrobků (mouka, chléb, pivo) [19].

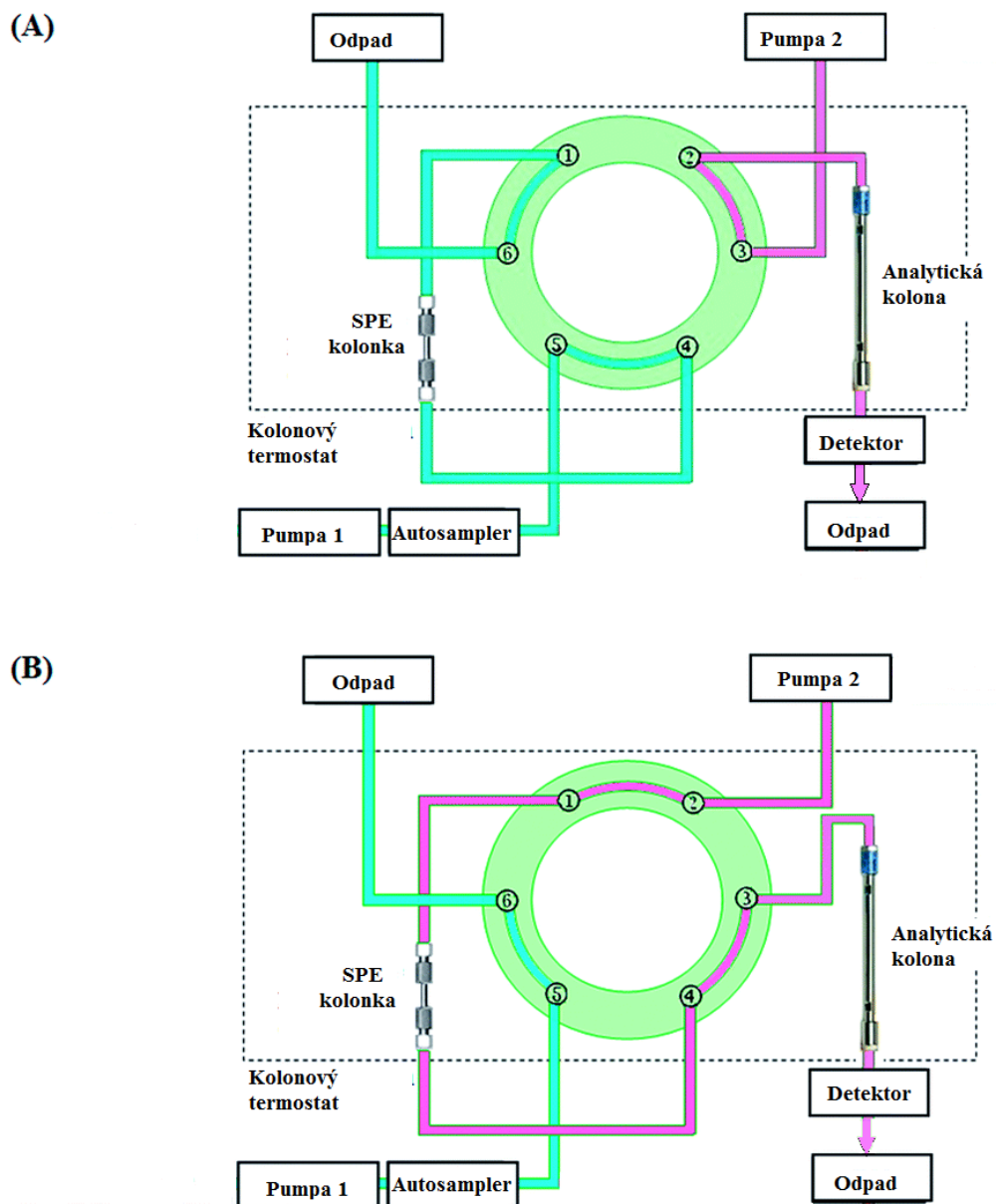
Zvýšená koncentrace zearalenonu ve vzorcích obilovin a krmiv je způsobena spíše důsledkem nesprávného ošetření a uskladnění než primárního vzniku před sklizní na poli. Jedná se zejména o nedostatečné vysušení nebo skladování ve vlhkém prostředí [5]. Ve skladovaném obilí zůstává zearalenon velmi stabilní a v podstatě nezměněn, a to i po rozemletí na mouku či právě po fermentaci. V experimentálních studiích bylo zjištěno, že po upečení chleba z kontaminované mouky zůstává v chlebu více než polovina původního množství ZEA [20].

## 3.4 On-line SPE HPLC

### 3.4.1 Úprava vzorku

Před samotnou analýzou daného vzorku je důležité provést úpravu analytu, která slouží k jeho izolaci, zakoncentrování a přečištění od balastních látek v matrici. Úprava vzorku je většinou kritickým bodem celé analýzy, ale lze takto zvýšit selektivitu analýzy. Nejčastěji se k těmto účelům využívají extrakční techniky, i díky tomu, že velkou většinu z nich lze snadno automatizovat. Moderní on-line extrakční metody umožňují nástřik analytu do chromatografického systému přímo v neupravované formě. Ale i nadále se k úpravě vzorků v laboratořích nejčastěji používají analytické metody využívající extrakci analytů založenou na principu Liquid-Liquid Extraction (LLE) a Solid-Phase Extraction (SPE).

U SPE dochází v jednom kroku současně k zakoncentrování, tak i přečištění extraktu. Další výhodou je např. nízká spotřeba organických rozpouštědel a vysoká selektivita. SPE je založena na rozdělení vzorku mezi pevnou (sorbent) a kapalnou fází. Vzorek však musí mít vyšší afinitu k vhodně zvolenému sorbentu než k matrici vzorku. SPE může být prováděna jak v off-line tak on-line konfiguraci. V tomto případě bylo použito mechanismu přepínání kolon, aby se dosáhlo on-line SPE ve spojení s HPLC (viz obr. 3) [21, 22].



Obr. 3: Schéma přepínání kolon, upraveno [23]

**Ventil v poloze A:** Vzorek je dávkován na SPE kolonku (možno dávkovat vysoké objemy). Zde dochází k zachycení analytu na sorbent, k jeho promývání a zakoncentrování.

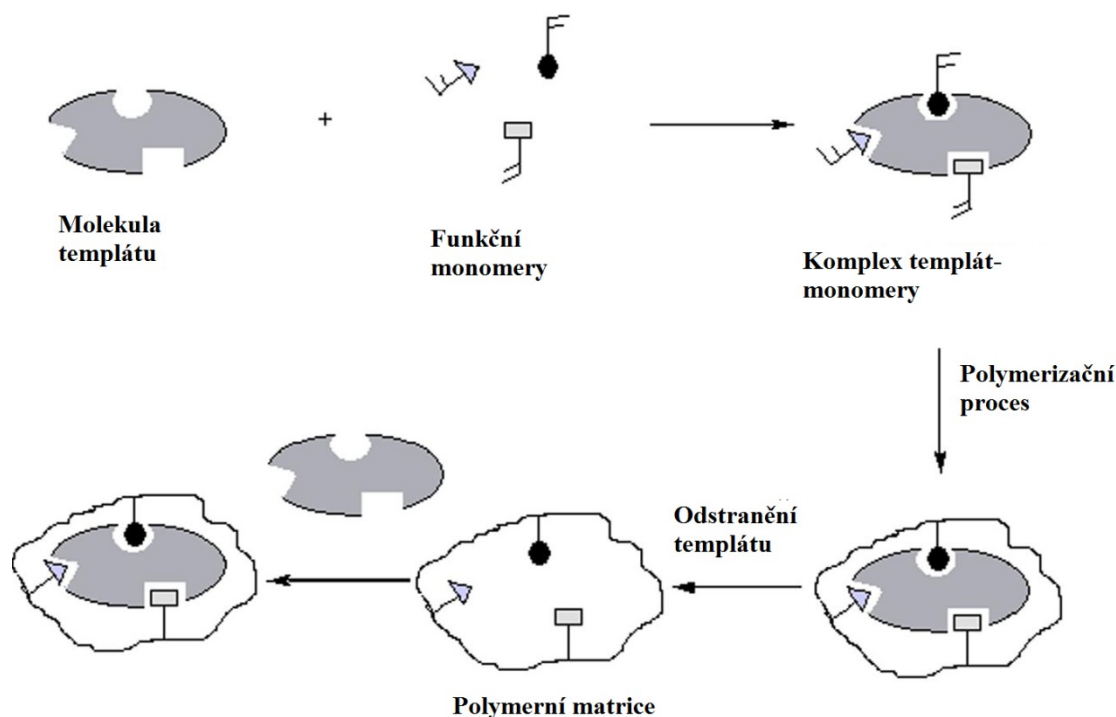
**Ventil v poloze B:** Zachycené analyty jsou po přepnutí ventilu eluovány mobilní fází na analytickou kolonu, kde dochází k vlastní separaci. Signál je dále veden do detektoru.

### 3.5 Molekulárně vtištěné/otištěné polymery (MIP)

K vysoce selektivním SPE sorbentům patří speciálně vyráběné syntetické polymery, MIP, vyráběné technologií molekulárního vtiskování (Molecular Imprinting Technology, MIT). MIP dovedou vybrané analyty, případně jejich strukturální analoga, selektivně a specificky zadržet, podle jejich molekulárního tvaru, velikosti a uspořádání funkčních skupin. Tyto materiály mohou být použity jako ideální materiál v různých aplikačních oblastech, jsou schopny napodobit přírodní rozpoznávací entity, jako např. protilátky a biologické receptory.

V posledních letech se stala konstrukce syntetických materiálů, schopných napodobit procesy rozpoznávání nalezené v přírodě, důležitou a aktivní oblastí výzkumu. MIT je považován za univerzální a výkonnou metodu, která je schopna rozpoznat biologické a chemické molekuly včetně aminokyselina a bílkovin, nukleotidových derivátů, znečišťujících látek, léků a potravin.

MIT je založeno na tvorbě komplexu mezi analytem (templátem) a jedním nebo více funkčních monomerů. Následuje polymerizace a poté je templát z polymeru odstraněn a zůstává po něm stabilní polymer a šablona komplementárního tvaru, velikosti a chemických funkcí (viz obr. 4). Mezi molekulami analytu a funkčními skupinami v polymerní matici obvykle vznikají intramolekulární interakce jako např. vodíkové vazby, dipól-dipól a iontové interakce. Výsledný polymer rozeznává a selektivně váže pouze molekuly templátu [24].



Obr. 4: Schéma molekulárního vtišťování [24]

Extrakce využívající MIPs jako sorbenty mohou být zapojeny jak v off-line, tak on-line uspořádání. Jako v tomto případě při on-line konfiguraci jsou MIPs plněny do speciálních kolonek, které se s chromatografickým systémem spojují vícecestným přepínacím ventilem.

K hlavním výhodám MIPs patří jejich vysoká selektivita a afinita k cílovým molekulám užitým v otiskovacím procesu. Vtištěné polymery jsou ve srovnání s biologickými (proteiny, nukleové kyseliny atd.) daleko inertnější vůči kyselinám, zásadám, iontům kovů a organickým rozpouštědlům. Mohou být používány opakovaně a náklady na výrobu jsou relativně nízké [21, 24].

### 3.6 Metody stanovení zearalenonu

Doposud se zearalenon, jeho metabolity a mykotoxiny obecně stanovují pomocí metod, které lze rozdělit na imunochemické: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) a Radio Immunosorbent Assay (RIA), a chromatografické: tenkovrstvá chromatografie (TLC), plynová chromatografie (GC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Tyto metody jsou velice citlivé a dovedou zachytit analyt už

při extrémně nízké koncentraci (rozmezí ppt až ppb). Nejdostupnější z těchto metod z hlediska finanční a přístrojové náročnosti je TLC ve spojení s UV detekcí, je vhodná pro rychlé kvalitativní stanovení mykotoxinů. V dnešní době se pro zachycení zearalenonu široce používá HPLC spojené s fluorescenčním detektorem (FLD). Nejnovější analýzy byly zaměřeny na kapalinový chromatograf on-line spojený s hmotnostním spektrometrem (LC-MS) nebo tandemovým hmotnostním spektrometrem (LC-MS/MS), tato úprava může zřetelně zredukovat přípravu úpravy vzorku, protože sloučeniny elující současně spolu mohou být odstraněny pomocí MS selektivity a navíc dochází k jednoznačné identifikaci mykotoxinu [25, 26].

V následujícím přehledu jsou uvedeny některé možnosti analýzy včetně použité separace a uváděných limitů detekce za daných podmínek.

Tab. 2: Metody stanovení zearalenonu

Analyt	Země	Vzorek	Úprava vzorku	Separace	Detekce	LOD, LOQ	Citace
ZEA	Francie	Kukuřičné cereálie	MIP (Affinimip <sup>TM</sup> ZON) a NIP (Polyintell), (velikost částic 25 – 45 µm)	<b>HPLC</b> Předkolona Hypersil Gold (10 × 2,1mm) Kolona Hypersil Gold (150 × 2,1 mm) Isokratická eluce, acetonitril/voda (60:40)	<b>FLD</b> Ex 275 nm Em 450 nm		[27]
ZEA	Brazílie	Kukuřičná krupice, popkorn, pufovaná pšenice	LLE	<b>TLC</b> 20 x 20 cm TLC deska (Alugram® SIL G Silica gel 60) Toluen/ethyl-acetát/chloroform/kyselina mravenčí (35:25:25:10; 50:40:10:10) Toluen/acetone (80:20)	<b>UV</b> 366 nm	40 µg/kg 55 µg/kg	[28]
ZEA	Polsko	Pivo	30 min míchání (odplynění)	<b>ELISA</b> Ridascreen Zearalenone (R-Biopharm)	<b>UV/VIS</b> při 450 nm	LOD 0,25 µg/kg	[29]
ZEA	Itálie	Těstoviny z tvrdé a měkké pšenice	QuEChERS extrakce	<b>UHPLC</b> Kolona Accucore aQ C18 (100 x 2,1 mm, velikost částic 2,6 µm) Gradientová eluce, H <sub>2</sub> O v 0,1% kyselině mravenčí a 5nM mravenčanu amonném/methanol v 0,1% kyselině mravenčí a 5nM mravenčanu amonném (40:60, 0:100)	<b>Orbitrap MS</b> ESI ionizace	0,21 µg/kg 0,65 µg/kg	[30]

Analyt	Země	Vzorek	Úprava vzorku	Separace	Detekce	LOD, LOQ	Citace
ZEA $\alpha$ -ZEA $\beta$ -ZEA	Česká republika	Pšenice	LLE Acetonitril/voda azeotropní směs (84:16)	<b>HPLC</b> Kolona LiChroCART 250-4 (250 x 4 mm) se sorbentem LiChrospher 100 RP-C <sub>18</sub> Acetonitril/voda (40:60)	<b>FLD</b> Ex 235 nm Em 440 nm	7,5 $\mu$ g/kg 25 $\mu$ g/kg	[31]
			LLE Methanol/voda (70:70)	<b>ELISA</b> Ridascreen Zearalenon kit	<b>UV-VIS</b>	LOD 1,25 $\mu$ g/kg	
ZEA $\alpha$ -ZEA $\beta$ -ZEA $\alpha$ -ZAL $\beta$ -ZAL	Japonsko	Pivo	SPE Supelclean ENVI-18	<b>LC</b> Kolona Nova-Pak phenyl (150 x 2.0 mm, 4 $\mu$ m), Lineární gradientová eluce methanol/voda/10nM octan amonný	<b>MS/MS</b> ESI ionizace	LOQ 2 ng/g (ppb)	[32]
ZEA	Botswana	Slad, sladěnka, pivo	LLE Chloroform s nasyceným roztokem chloridu sodného a 2% roztokem hydroxidu sodného	<b>TLC</b> Silikagelová deska 0,2 mm Diethyl-ether/cyklohexan (75:25)	<b>UV-VIS</b> při 366 nm, před a po sprejování s 20% AlCl <sub>3</sub> v ethanolu	LOD 20 $\mu$ g/kg	[33]
				<b>HPLC</b> Hypersil MOS (100 x 4.6 mm, 3 $\mu$ m) kolona Isokratická eluce acetonitril/0,1% kyselina fosforová (1:1)	<b>FLD</b> Ex 280 nm Em 465 nm		



Analyt	Země	Vzorek	Úprava vzorku	Separace	Detekce	LOD, LOQ	Citace
ZEA	Rakousko USA	Pivo	MIP	<b>HPLC</b> Kolona 250 x 4,6 mm Methanol/kyselina octová (7:1)	<b>UV, DAD</b>		[34]
ZEA $\alpha$ -ZEA $\beta$ -ZEA $\alpha$ -ZAL $\beta$ -ZAL	Rakousko	Tkáň a moč z hovězího dobytka a prasat	SPE	<b>HPLC</b> Kolona Supersphere® 100 RP-18e kolona, 125 x 3 mm Isokratická eluce acetonitril/methanol/voda (10:45:45) s 15 nM octanem amonným	<b>MS/MS</b> APCI ionizace	0,1 – 0,5 ppb 0,5 – 1 ppb	[35]
ZEA	Česká republika	Pšeničná mouka, slad	SPE Acetonitril/purifikovaná voda (9:1) VICAM ZearalaTest <sup>(TM)</sup> imunoafinitní kolona	<b>HPTLC</b> Silikagelová deska 20 x 10 cm Chloroform/methanol (97:3), chloroform/acetone/2-propanol (85:15:20), Ethyl acetát/n-hexan (1:1), benzen/chloroform/acetone (45:45:15)	<b>FLD</b> Ex 254 nm Em 400 nm	3 µg/kg 10 µg/kg	[36]
ZEA	Česká republika	Pivo	QuEChERS	<b>UPLC</b> Kolona Acquity UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm, 1,7 mm) s Acquity UPLC BEH C18 předkolumnou (5 mm x 2,1 mm, 1,7 mm) Gradientová eluce, 0,1% vodný roztok kyseliny mravenčí/0,1% kyselina mravenčí/1 mM mravenčan amonný v methanolu	<b>MS/MS</b> ESI ionizace	3 µg/kg 10 µg/kg	[19]

## 4 Experimentální část

### 4.1 Materiály a pomůcky

#### 4.1.1 Standardy, chemikálie a vzorky

Zearalenon  $\geq 98\%$ , dodavatel Sigma – Aldrich s. r. o.

Acetonitril, CHROMASOLV<sup>®</sup> Plus, for HPLC,  $\geq 99,9\%$  Sigma – Aldrich s.r.o.

Methanol, CHROMASOLV<sup>®</sup> Plus, for HPLC,  $\geq 99,9\%$  Sigma – Aldrich s.r.o.

Kyselina octová, čistota pro MS, Sigma – Aldrich s. r. o.

Ultračistá voda, čištěná systémem Milli-Q (Milipore)

#### Desetistupňová a jedenáctistupňová piva z ječného sladu:

Bernard jedenáctka ležák (Rodinný pivovar Bernard, a.s., obsah alkoholu: 4,5% obj.)

Bohemia regent 11° (Pivovar Regent Třeboň, obsah alkoholu: 4,6% obj.)

Braník jedenáctka (Pivovary Staropramen, s.r.o., obsah alkoholu: 4,8% obj.)

Břežňák 11 (Pivovar Velké Březno, obsah alkoholu: 4,6% obj.)

Svatý Florian světlý ležák 11° (Rodinný pivovar Svätý Florian Loket, obsah alkoholu: 4,3% obj.)

Gambrinus Excelent 11° (Plzeňský Prazdroj, a.s., Plzeň, obsah alkoholu: 4,7% obj.)

Holba Šerák světlé výčepní pivo (Holba a.s., obsah alkoholu: 4,7% obj.)

Hradecký Votrok 11° (Měšťanský pivovar Havlíčkův Brod, a.s., obsah alkoholu: 4,8% obj.)

Klášter ležák (nepasterovaný, Pivovar Klášter, Pivovary Lobkowicz Group, a.s., obsah alkoholu: 4,6% obj.)

Lobkowicz ležák premium (Pivovary Lobkowicz Group, a.s., obsah alkoholu: 4,7% obj.)

Olivětínský opat světlé výčepní pivo (Pivovar Broumov, obsah alkoholu: 4,2% obj.)

Ostravar Original světlé výčepní pivo (Pivovar Ostravar, Pivovary Staropramen, obsah alkoholu: 4,1% obj.)

Pardál Echt světlý ležák (Budějovický Budvar, n.p., obsah alkoholu: 4,5% obj.)

Pernštejn Vilém 11° (Pivovar Pardubice, a.s., obsah alkoholu: 4,7% obj.)

Pilsner Urquell (Plzeňský Prazdroj, a.s., obsah alkoholu: 4,4% obj.)  
Platan 11° (Pivovar Protivín, Pivovary Lobkowicz, a.s., obsah alkoholu: 4,6% obj.)  
Primátor ležák 11° (Primátor a.s., obsah alkoholu: 4,7% obj.)  
Starobrno Medium nepasterizované (Pivovar Starobrno, obsah alkoholu: 4,7% obj.)  
Staropramen 11° (Pivovary Staropramen, s.r.o., obsah alkoholu: 4,7% obj.)  
Svijanský máz 11° (Pivovar Svijany, a.s., obsah alkoholu: 4,8% obj., čtyřikrát  
chmeleno)  
Velkopopovický Kozel 11° (Pivovar Velké Popovice, obsah alkoholu: 4,6% obj.)  
Zlatopramen 11° (Heineken Česká Republika, a.s., obsah alkoholu: 4,9% obj.)

Dvanáctistupňová piva z ječného sladu:

Bertold ležák (Pivovar Holba, a.s., obsah alkoholu: 5,0% obj.)  
Budweiser Budvar B: originál světlý ležák ( Budějovický Budvar, n.p., obsah alkoholu:  
5,0% obj.)  
Krakonoš 12° (Pivovar Krakonoš, spol. s.r.o., obsah alkoholu: 5,1% obj.)  
Kumburák, Novopacké pivo, ležák (Pivovar Nová Paka, a.s., obsah alkoholu: 5,3% obj.)  
Radegast ryze hořká 12 (Pivovar Radegast Nošovice, Plzeňský Prazdroj, a.s., obsah  
alkoholu: 5,0% obj.)  
Rychtář Premium (Pivovar Rychtář a.s., Pivovary Lobkowicz Group a.s., obsah  
alkoholu: 5,0% obj.)  
Samson světlý ležák 12° (Pivovar Samson, a.s., obsah alkoholu: 5,1% obj.)  
Starobrno Drak extra chmelený ležák (Pivovar Starobrno, obsah alkoholu: 5,3% obj.)

## 4.2 Přístroje a podmínky separace

### Chromatografický systém

Chromatograf:	Shimadzu 20AD Prominence Liquid Chromatograph
Detektor:	Shimadzu RF-10AXL Fluorescence Detector
Kolony:	Kinetex XB-C18 100 x 4,6 mm, částice 5 $\mu$ m (Phenomenex) Kinetex XB-C18 150 x 4,6 mm, částice 5 $\mu$ m (Phenomenex) Kinetex Biphenyl, 100 x 4,6 mm, částice 5 $\mu$ m Kinetex PFP (pentafluorophenyl) 100 x 4,6 mm, částice 5 $\mu$ m Ascentis® Express ES-Cyano, 100 x 4,6 mm, 2.7 $\mu$ m částice (Sigma Aldrich) Ascentis® Express Phenyl-Hexyl, 100 x 4,6 mm, 2.7 $\mu$ m částice (Sigma Aldrich)
Testované SPE	
Předkolony:	Ascentis® Express C18 Guard Cartridge, 5 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m (Sigma Aldrich) Kovová kolonka 10 x 4,6 mm, naplněná sorbentem Affinimip® SPE Zearalenone (Polyintell), částice o velikosti 25 – 80 $\mu$ m, hmotnost sorbentu 82,9 mg
Dávkování:	50 $\mu$ l
Detekce:	Fluorescenční, Ex 270 nm, Em 458 nm
Mobilní fáze:	Acetonitril – voda Methanol – voda
Průtok:	1,0 ml/min
SPE promývací fáze:	Acetonitril- 2% roztok kyseliny octové Methanol – 2% roztok kyseliny octové
Průtok:	2,0 ml/min
Vyhodnocení:	Chromatografický software LC Solution

### Filtrační zařízení na mobilní fáze:

Millipore, filtr ze skleněných vláken o velikosti pórů 0,45  $\mu$ m

### Analytické váhy:

Sartorius 2004 MP, SRN

## **4.3 Příprava roztoků standardu zearalenonu**

### **4.3.1 Příprava roztoku standardu**

Navážka 0,55 mg zearalenonu byla rozpuštěna v 0,5 ml methanolu. Roztok byl dále naředěn desetkrát do 1 ml methanolu. Tento roztok byl používán jako zásobní roztok o koncentraci 110 mg/l a uchováván při -20°C v mrazáku.

### **4.3.2 Příprava zásobních roztoků**

Postupným ředěním zásobního roztoku byl připraven pracovní roztok pro optimalizaci metody o koncentraci 110 µg/l. Nejprve se ze zásobního roztoku připraveného podle 4.3.1 odebralo 50 µl a doplnilo se do 500 µl metanolem, takto vznikl desetinásobně zředěný roztok o koncentraci 11 mg/l. Tento roztok se dále stonásobně naředil tak, že se do vialky napipetovalo 10 µl tohoto roztoku a doplnilo se 990 µl vody. Vzniklý roztok se posléze užíval jako pracovní roztok pro optimalizaci metody.

### **4.3.3 Příprava pracovních roztoků pro kalibraci**

Pracovní roztok zearalenonu byl vytvořen zředěním zásobního roztoku zearalenonu (o koncentraci 110 mg/l) s vodou a to přidáním 990,9 µl vody k 9,1 µl ZEA. Takto vznikl pracovní roztok o koncentraci 1 mg/l, který byl dále ředěn podle tab. 3 do jednotlivých koncentrací pro kalibrační řadu. Stejným způsobem byly připraveny roztoky pro maticovou kalibraci, kde se místo vody použilo k ředění roztoků pivo.

Tab. 3: Příprava pracovních roztoků ke kalibraci

	<b>c ZEA (µg/l)</b>	<b>Objem pracovního roztoku ZEA (µl)</b>	<b>Objem vody/ piva (µl)</b>
1.	200	200	800
2.	150	150	750
3.	100	100	900
4.	75	75	925
5.	50	50	950
6.	20	20	980
7.	10	10	990
8.	5	5	995

#### 4.3.4 Příprava vzorků piva

Vzorky piv byly odebírány přímo z lahví. Do vialky bylo dávkováno po 1 ml piva. Pivo Svatý Florian světlý ležák 11° je nefiltrované pivo a muselo být ještě před nadávkováním do vialky přefiltrováno (stříkačkový filtr 0,45 µm PTFE).

Veškeré vzorky, standardy a roztoky standardů se uchovávaly v lednici.

#### 4.3.5 Příprava mobilních fází

Bylo využíváno všech tří pump na tomto chromatografu.

Pumpa A: organická složka mobilní fáze: čistý acetonitril nebo methanol bez úprav

Pumpa B: vodná složka mobilní fáze: ultračistá voda

Pumpa C: namíchaná promývací fáze v testovaných poměrech organická/vodná složka, tzn. methanol či acetonitril v různém procentuálním zastoupení nebo methanol či acetonitril + 2 % vodný roztok kyseliny octové (20 ml kyseliny octové na 1 litr mobilní fáze)

## 4.4 Optimalizace chromatografických podmínek

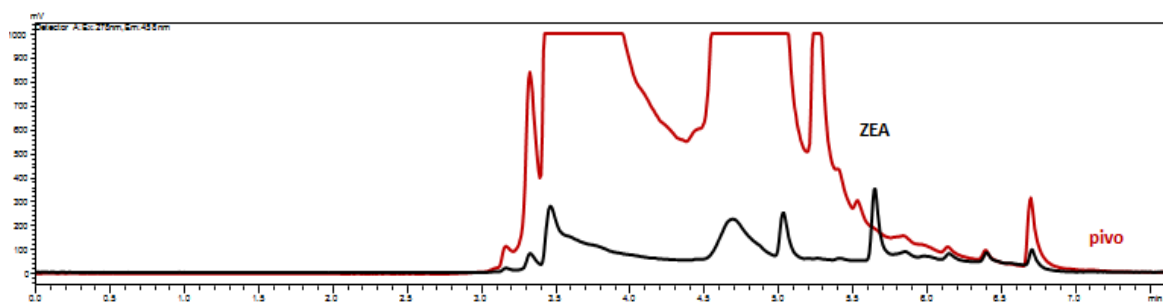
Při hledání vhodných chromatografických podmínek byly testovány takové podmínky separace, aby byla dosažena co nejvyšší výsledná šířka píku zearalenonu, popřípadě aby byla odezva na detektoru z hlediska citlivosti stanovení co nejvyšší. Optimální separace bylo dosaženo výběrem vhodné mobilní fáze, kolony a gradientové eluce. Během analýzy byl prováděn nástřik 50 µl pracovního roztoku vzorku při průtoku kolonou 1 ml/min. Optimalizace probíhala přímo v módu on-line SPE, kde jako sorbent byla použita krátká kolonka s reverzní fází C18 5 x 4,6 mm. Separace na všech kolonách probíhala za teploty 35 °C. Testované podmínky separací jsou zdokumentovány vloženými chromatogramy.

### 4.4.1 Volba mobilní fáze pro isokratickou eluci

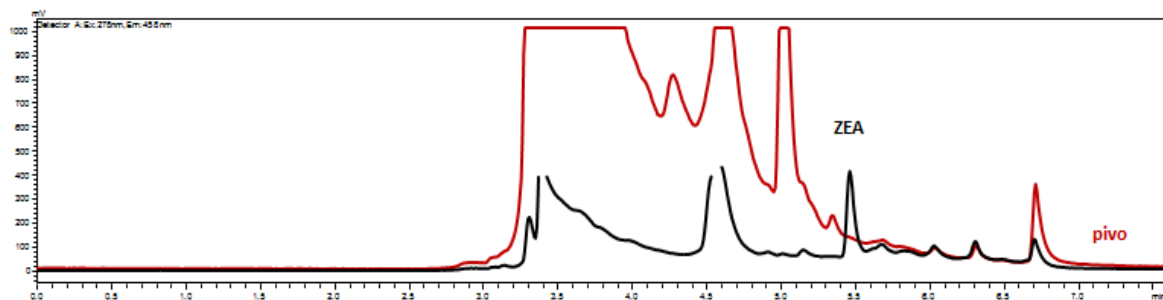
Nejprve byla testována analýza zearalenonu za podmínek isokratické eluce. Po zjištění ideálního poměru mobilních fází byl tento poměr dále využit jako základ pro gradientovou eluci. Použitím gradientové eluce se dosahuje optimálního rozlišení píku zearalenonu od zbytku balastní matrice a přijatelné doby analýzy. Zearalenon je poměrně lipofilní sloučenina, proto je možné při počáteční nižší koncentraci organické fáze nejprve vymýt vodnou matici piva a posléze zvýšením gradientu urychlit eluci analytu s dosažením úzkého píku zearalenonu.

Volba organického činidla byla zvolena na základě lipofilních vlastností analyzované látky. Byly zkoušeny acetonitril a methanol. Methanol se kvůli nedostatečné a pomalé eluci balastní matrice piva ukázal jako nevhodné eluční činidlo při isokratické eluci. Další pokusy byly tedy zaměřeny na změny poměru acetonitril – vodná složka. Tato měření probíhala na core shell koloně Kinetex XB-C18 100 x 4,6 mm, velikost částic 5 µm.

Optimální poměr byl 35:65 acetonitril–voda (obr. 6). Méně organické složky nedostatečně rozlišuje pík Zearalenonu od interference v matici.



Obr. 5: Mobilní fáze 25:75 acetonitril – voda pro separaci na core shell koloně Kinetex XB-C18 100 x 4,6 mm, velikost částic 5  $\mu\text{m}$ .



Obr. 6: Mobilní fáze 35:65 acetonitril – voda pro separaci na core shell koloně Kinetex XB-C18 100 x 4,6 mm, velikost částic 5  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4.2 Parametry detekce

Na základě stávající literatury bylo proměřeno několik emisních a excitačních spekter standardu a z těch byly vybrány hodnoty pro fluorescenční detekci Ex 270 nm a Em 458 nm, při kterých byla odezva standardu co nejvyšší. Spektra byla měřena v koncentraci 1,1 mg/l v mobilní fázi 35:75 acetonitril – voda. Za totožných podmínek se zkoušel nástřík čistého piva.

Tab. 4: Srovnání excitačních vlnových délek standardu při Em 458 nm

Em 458 nm	Excitační vlnová délka				
	278	290	300	270	260
Plocha (area)	961650	463214	40872	1243309	949316
Výška (height)	266645	130212	109311	335985	252927



Tab. 5: Srovnání emisních vlnových délek standardu při Ex 270 nm

Ex 270 nm	Emisní vlnová délka		
	458	470	480
Plocha (area)	1243309	1193351	1026512
Výška (Height)	335985	309411	270377

Z uvedených měření vyplynulo, že jako nejvhodnější vlnové délky pro fluorescenční detekci zearalenonu vzhledem k výšce jeho píku a interferujícím složkám matrice je vhodná excitační vlnová délka 270 nm a emisní vlnová délka 458 nm.

#### 4.4.3 Volba promývací fáze

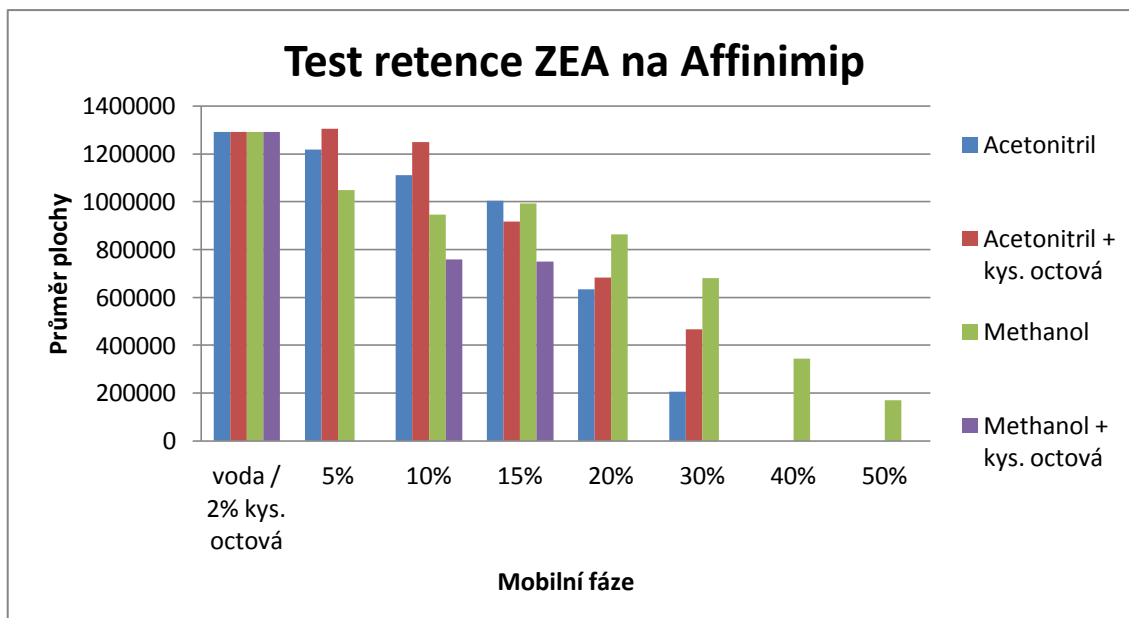
Po nastavení počáteční isokratické eluce na analytické koloně bylo nutné dále optimalizovat krok on-line extrakce na obou testovaných sorbentech. Extrakce na pevné fázi zapojené do systému on-line je dosaženo přepínáním kolon. Mobilní fáze protéká po nástřiku vzorku na předkolonu se slabším elučním potenciálem proto, aby se vymyla balastní matrice. Následuje přepnutí ventilu, čímž se dosáhne připojení na předkolonu pumpy se silnější mobilní fází, kterou je eluován i dosud zadržovaný zearalenon přímo na vlastní analytickou kolonu. Na ní se analyt dále separuje touto silnější mobilní fází. Volba slabší promývací fáze je tedy důležitý krok z důvodu co nejlepšího odstranění balastní matrice a interferujících píků při současném dostatečném zadržení analyzovaných látek na předkoloně.

Zpočátku byl porovnáván promývací roztok acetonitrilu a methanolu smíchané s vodou v různých koncentracích (5%, 10%, 15%, 20%, 30% u methanolu navíc 40% a 50%). Dále byly testovány roztoky acetonitrilu a methanolu o stejné koncentraci avšak okyselené 2% organickou kyselinou octovou na pH 2,50. Kyselina octová byla zvolena, kvůli její snadné dostupnosti, nízké toxicitě a dobré mísitelnosti s organickou složkou mobilní fáze.

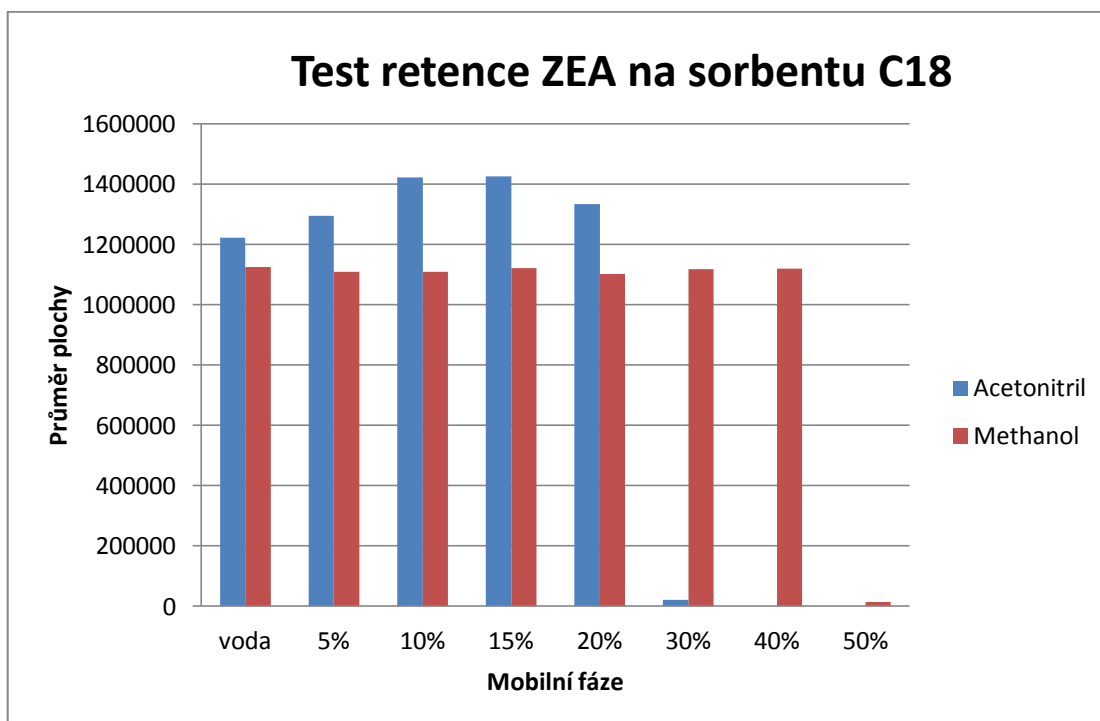
Tyto různé druhy promývací fáze byly zkoušeny pro oba sorbenty, tzn. pro extrakční předkolonu Affinimip a sorbent C18 ve spojení s analytickou kolonou Kinetex XB-C18 100 x 4,6 mm.

V následujících experimentech bylo zjištěno, že pro Affinimip extrakční předkolonu vykazuje nejvhodnější promývací účinky acetonitril v poměrně malé koncentraci (graf č. 1), která přesto zredukovala balastní matici při zachování dobrého rozlišení píku zearalenonu a jeho separace od matrice. Slabší promývací fáze je kvůli povaze testované látky také okyselena kyselinou octovou. Výsledná koncentrace byla určena na okyselený 10% acetonitril kyselinou octovou (20 ml kyseliny octové na litr mobilní fáze). Obsah acetonitrilu vyšší než 10% způsoboval již vymývání zearalenonu z extrakční předkolony.

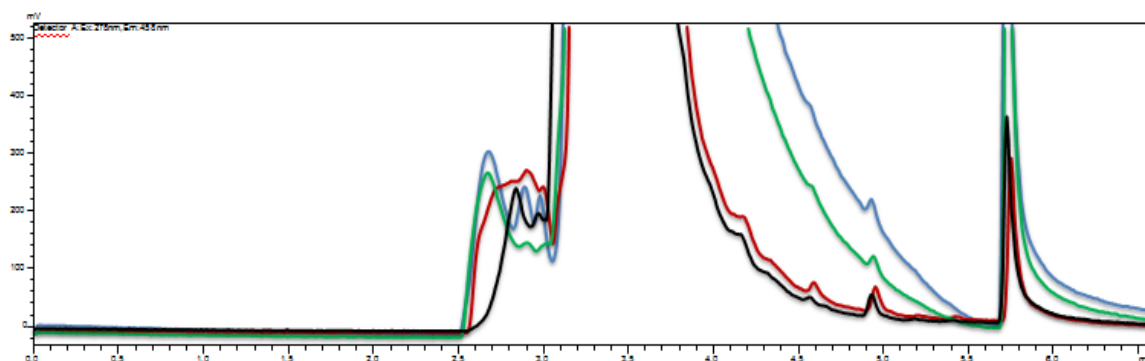
Naopak pro sorbent C18 vykazuje nejvhodnější promývací účinky methanol, pokud možno v co nejvyšší koncentraci, kvůli totožným požadavkům jako u Affinimip (graf č. 2). Výsledná koncentrace byla určena na 40% methanol. Obsah methanolu vyšší než 40% způsoboval již vymývání zearalenonu z extrakční předkolony. Pro separaci reálných vzorků se nakonec i na sorbent C18 použil kyselinou octovou (20 ml kyseliny octové na litr mobilní fáze) okyselený 40% methanol stejně jako u Affinimip předkolony. Okyselení promývací fáze zlepšuje schopnost odstranění balastní matrice. Retence zearalenonu na dvou chemicky odlišných sorbentech s různými promývacími fázemi je znázorněna na níže uvedených grafech.



Graf č. 1: Test retence zearalenonu na Affinimip extrakční předkoloně



Graf č. 2: Test retence zearalenonu na sorbentu C18

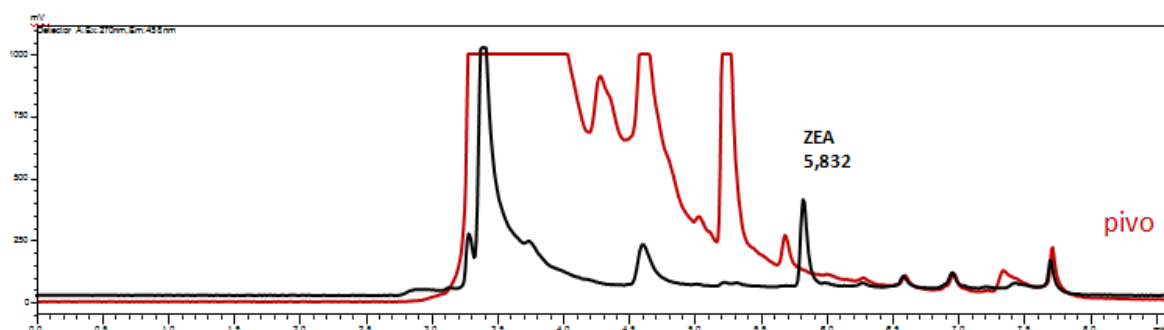


Obr. 7: Vliv kyseliny na promytí Affinimip, 10% acetonitril (modrá křivka), 10% acetonitril + 2% kyseliny octové (červená křivka), 15% Methanol (zelená křivka), 15% Methanol + 2% kyselina octová (černá křivka).

#### 4.4.4 Výběr analytické kolony

Bylo testováno několik druhů chromatografických kolon. K dosažení optimalizace separace píku ZEA od ostatních interferujících složek matrice a co nejnižší odezvy matrice bylo možné použít pouze dvě. Z těchto dvou byla následně vybrána jedna s nejlepšími separačními schopnostmi. Na zvolené kolony byl proveden nástřik 5  $\mu$ l vzorku o koncentraci 1 mg/l a 50  $\mu$ l piva. Optimalizace probíhala za laboratorní teploty.

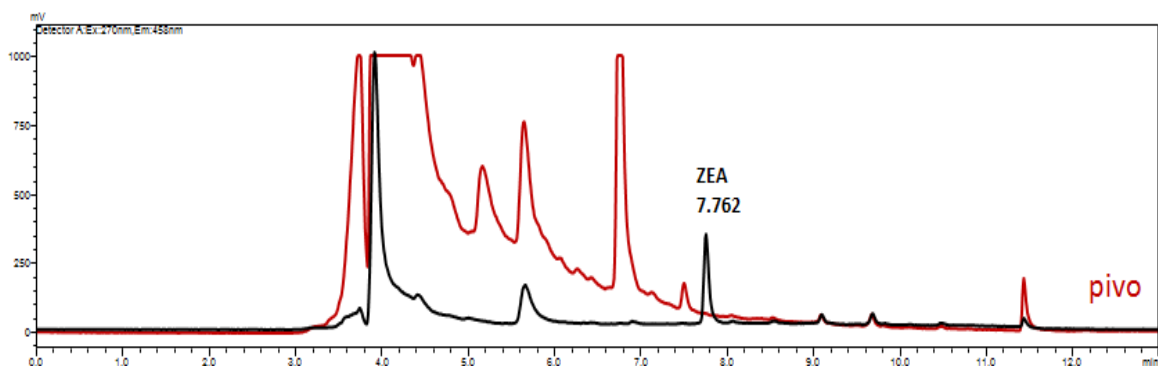
Kinetex XB-C18 100 x 4,6 mm, core-shell silikagel (Phenomenex), velikost částic 5 $\mu$ m



Obr. 8: Záznam ze separace za podmínek mobilní fáze acetonitril - voda v poměru 35:65 na koloně Kinetex XB-C18 100 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m

Na této koloně byla hledána ideální mobilní fáze, včetně možnosti použití methanolu místo acetonitrilu. Samotný acetonitril byl nejúčinnější eluční činidlo, na dalších kolonách se už pracovalo pouze s ním.

Kinetex XB-C18 150 x 4,6 mm, core-shell silikagel (Phenomenex), velikost částic 5 μm

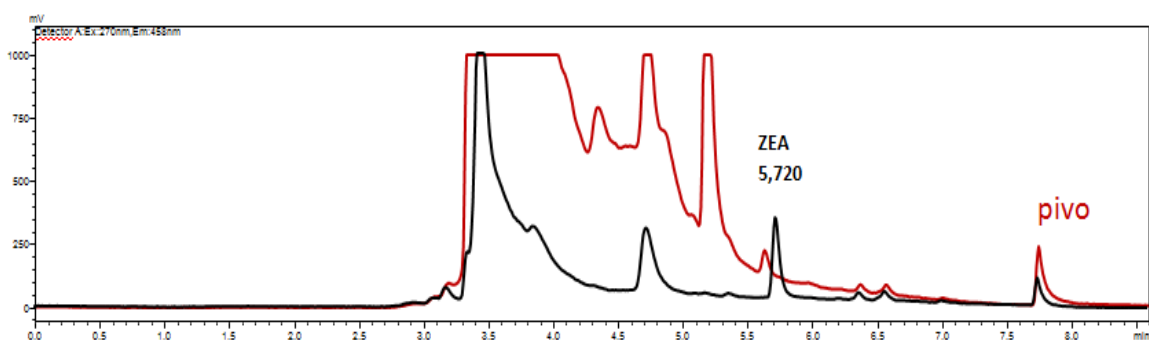


Obr. 9: Záznam ze separace za podmínek mobilní fáze acetonitril - voda v poměru 35:65 na koloně Kinetex XB-C18 150 x 4,6 mm, 5 μm

Nejlepší volbou pro separaci byla tato kolona, která je oproti ostatním kolonám delší. Na této koloně se pík ZEA zdá být dostatečně vysoký i úzký a i odezva matrice piva zde byla nejnižší.

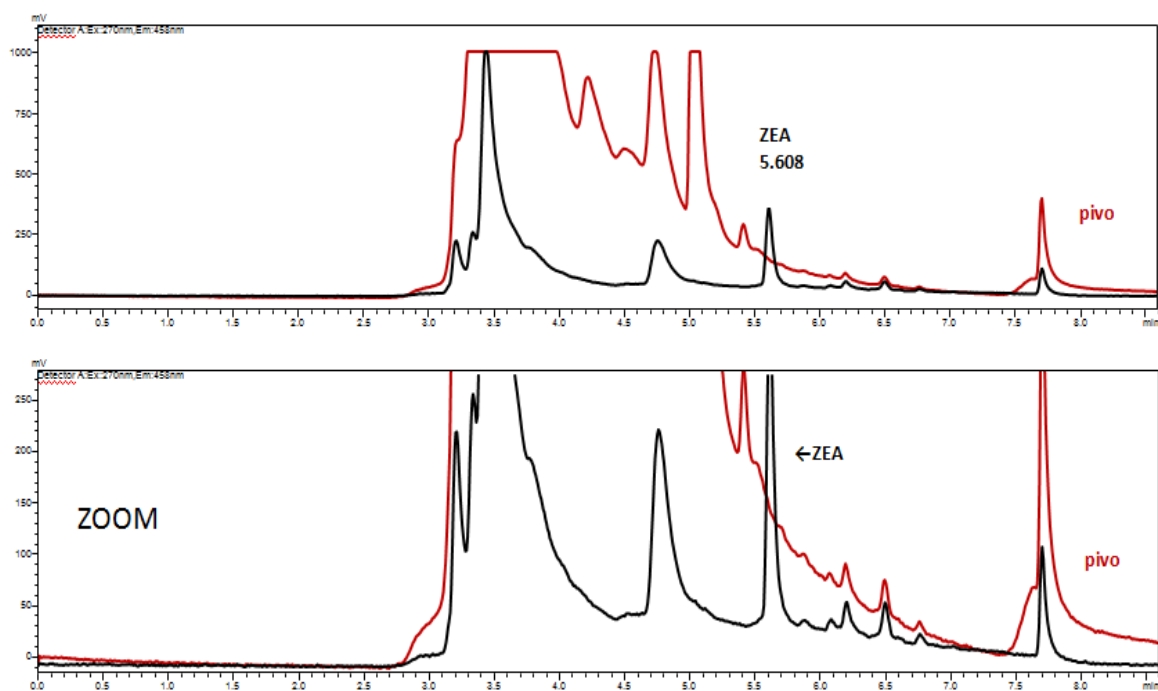
Kolony zmiňované níže se vyhodnotily pro další separaci jako nevhodné, zejména kvůli nedostatečnému vymytí balastních látek v matrici piva, které by znemožňovaly přesné vyhodnocení u reálných vzorků.

Kinetex Biphenyl, 100 x 4,6 mm, velikost částic 5 μm



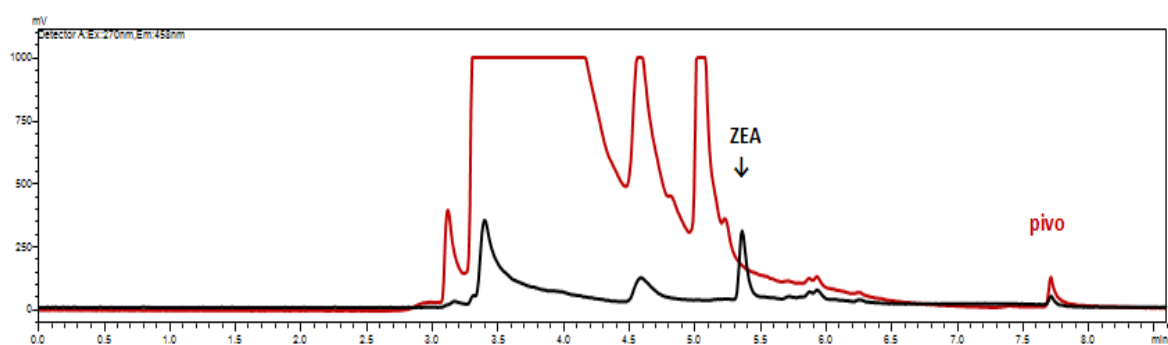
Obr. 10: Záznam separace za podmínek mobilní fáze acetonitril - voda v poměru 35:65 na koloně Kinetex Biphenyl, 100 x 4,6 mm, 5 μm

Kinetex PFP (pentafluorophenyl), 100 x 4,6 mm, velikost částic 5 μm



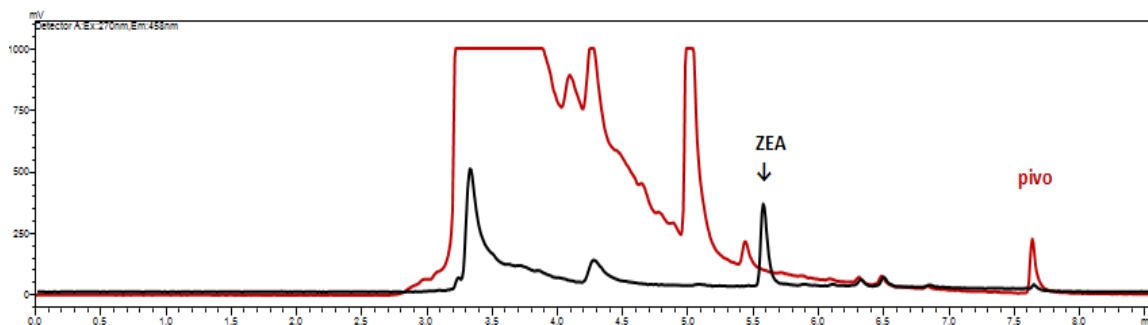
Obr. 11: Záznam separace za podmínek mobilní fáze acetonitril - voda v poměru 35:65 + detail zobrazený na spodním obrázku (Zoom) na koloně Kinetex PFP, 100 x 4,6 mm, 5 μm

Ascentis® Express ES-Cyano, 100 x 4,6 mm, 2,7 μm fused-core částice (Sigma Aldrich)



Obr. 12: Záznam separace za podmínek mobilní fáze acetonitril - voda v poměru 35:65 na koloně Ascentis® Express ES-Cyano, 100 x 4,6 mm, 2,7 μm

Ascentis® Express Phenyl-Hexyl, 100 x 4,6 mm, 2,7 µm fused-core částice (Sigma Aldrich)



Obr. 13: Záznam separace za podmínek mobilní fáze acetonitril - voda v poměru 35:65 na koloně Ascentis® Express Phenyl-Hexyl, 100 x 4,6 mm, 2,7 µm

#### 4.4.5 Optimalizace gradientové eluce

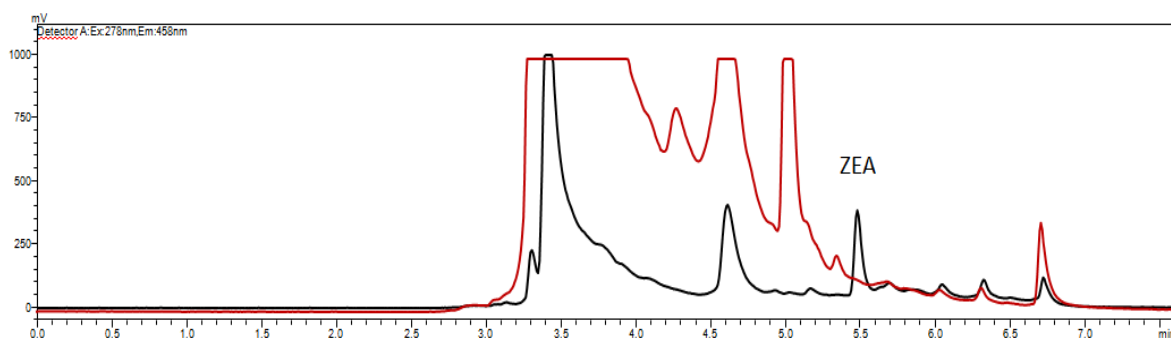
Počáteční testování gradientu bylo nastaveno na mísení mobilních fází z pumpy A (acetonitril) a pumpy B (voda) v poměru 35:65. Různé koncentrace acetonitrilu byly srovnávány při isokratické eluci a nástřiku 5 µl vzorku (čistý standard 1mg/l ve vodě) a 50 µl piva (Svijany), pro promytí byl použit 10% okyselený acetonitril (pumpa C). Nižší podíl acetonitrilu snižuje rozlišení píku zearalenonu a balastní matrice.

Průtok promývací mobilní fáze z pumpy C byl první půl minuty nastavený na 0,5 ml/min, poté byl zvýšen na 1 ml/min až do 2,10 min, kde se opět snížil na 0,5 ml/min. Tento zpomalený průtok při dávkování vzorku na SPE kolonku byl zvolen z důvodů doporučení výrobce Affinimip pro dostatečnou interakci ZEA se sorbentem.

Při vlastní separaci na analytické kolně byl každý z gradientů testován při přepnutí ventilu ve 2 minutě po nástřiku vzorku na extrakční kolonu Affinimip. Počáteční poměr 35:65 se ukázal jako optimální, ale bylo testováno prodloužení délky analýzy pozvolnějším gradientem.

Tab. 6: Popis podmínek gradientu 1

Gradient 1 (konec 7,60 min)	Složení mobilní fáze	
Čas přepnutí ventilu (2 min)	Vodná fáze (%)	Organická fáze (%)
2,00	100	0
2,10 – 3,10	65	35
3,10 – 5,01	0	100
5,01 - 5,50	0	100
5,60 - 7,60	65	35

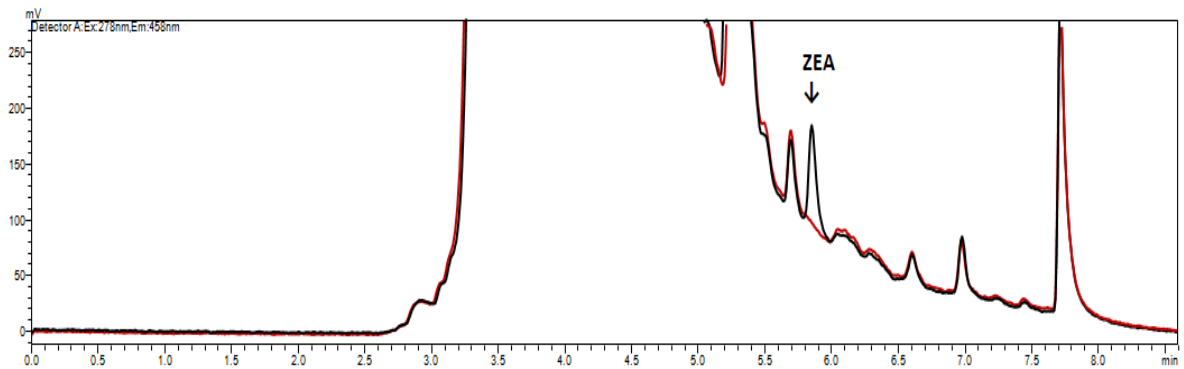


Obr. 14: Záznam separace standardu ZEA (černá křivka) a piva (červená křivka); kolona Kinetex XB-C18 100 x 4,6 mm, velikost částic 5 $\mu$ m, předkolona: kovová předkolona naplněná sorbentem Affinimip® SPE Zearalenone (Polyintell), částice o velikosti 25 – 80  $\mu$ m; mobilní fáze v pumpě A: acetonitril a v pumpě B: voda, promývací fáze v pumpě C: 10% acetonitril s 2% kyselinou octovou promývání 2 ml/min;

Tab. 7: Popis podmínek gradientu 2

Gradient 2 (konec 8,60 min)	Složení mobilní fáze	
Čas přepnutí ventilu (2 min)	Vodná fáze (%)	Organická fáze (%)
2,00	100	0
2,10 – 3,10	65	35
3,10 – 6,01	0	100
6,01 – 6,50	0	100
6,60 – 8,60	65	35

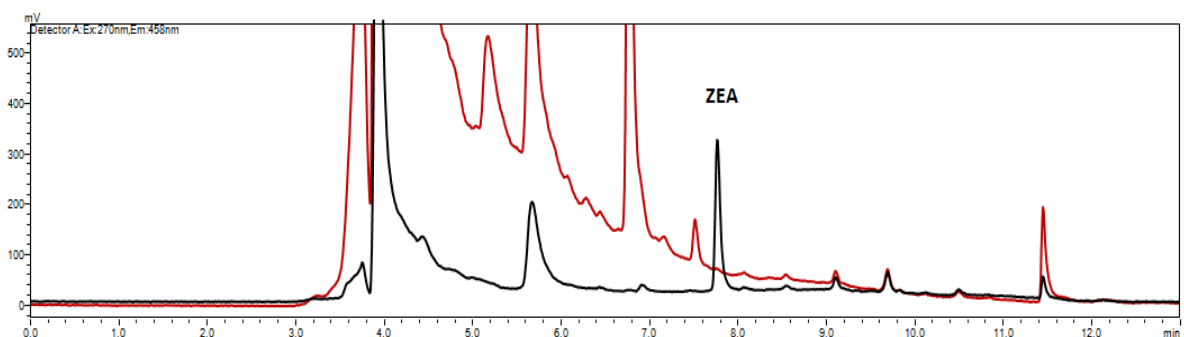




Obr. 15: Záznam separace naspikovaného piva zearalenonem v koncentraci 60 ppb (černá křivka) a piva (červená křivka); kolona Kinetex XB-C18 100 x 4,6 mm, velikost částic 5 $\mu$ m, předkolona: kovová předkolona naplněná sorbentem Affinimip® SPE Zearalenone (Polyintell), částice o velikosti 25 – 80  $\mu$ m; mobilní fáze v pumpě A: acetonitril a v pumpě B: voda, promývací fáze v pumpě C: 10% acetonitril s 2% kyselinou octovou promývání 2 ml/min;

Tab. 8: Popis podmínek gradientu 3

Gradient 3 (konec 13,00 min)	Složení mobilní fáze	
Čas přepnutí ventilu (2 min)	Vodná fáze (%)	Organická fáze (%)
2,00	100	0
2,10 – 3,60	65	35
3,60 – 9,01	0	100
9,01 – 9,75	0	100
10,00 – 13,00	65	35



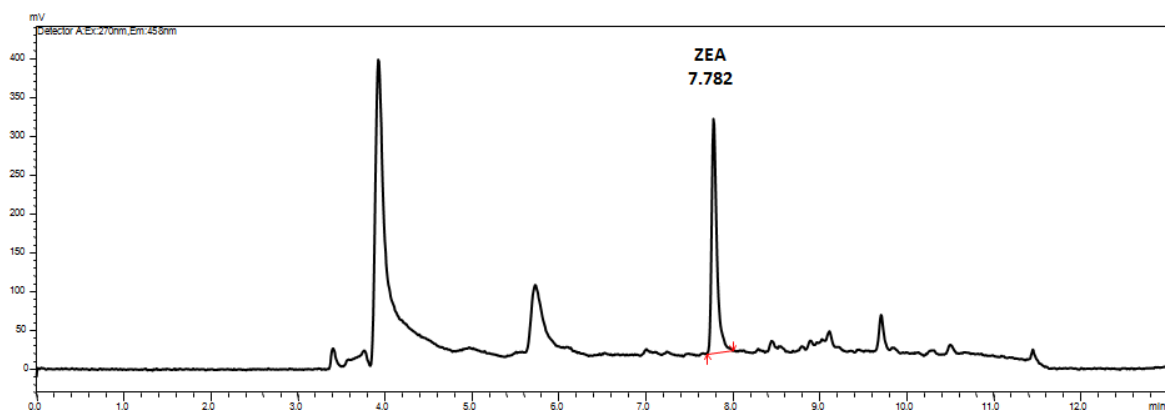
Obr. 16: Záznam separace standardu ZEA (černá křivka) a piva (červená křivka); kolona Kinetex XB-C18 150 x 4,6 mm, velikost částic 5 $\mu$ m, předkolona: kovová předkolona naplněná sorbentem Affinimip® SPE Zearalenone (Polyintell), částice o velikosti 25 – 80  $\mu$ m; mobilní fáze v pumpě A: acetonitril a v pumpě B: voda, promývací fáze v pumpě C: 10% acetonitril s 2% kyselinou octovou promývání 2 ml/min;

Z uvedených záznamů testovaných gradientů je zřejmé, že prodloužení gradientu umožňuje dosažení lepší separace píku ZEA od zbytku balastní matrice a to zejména na delší 150 mm koloně (znázorněno na obr. 16), proto byly takto zvolené podmínky použity pro validaci metody pro on-line SPE na obou sorbentech.

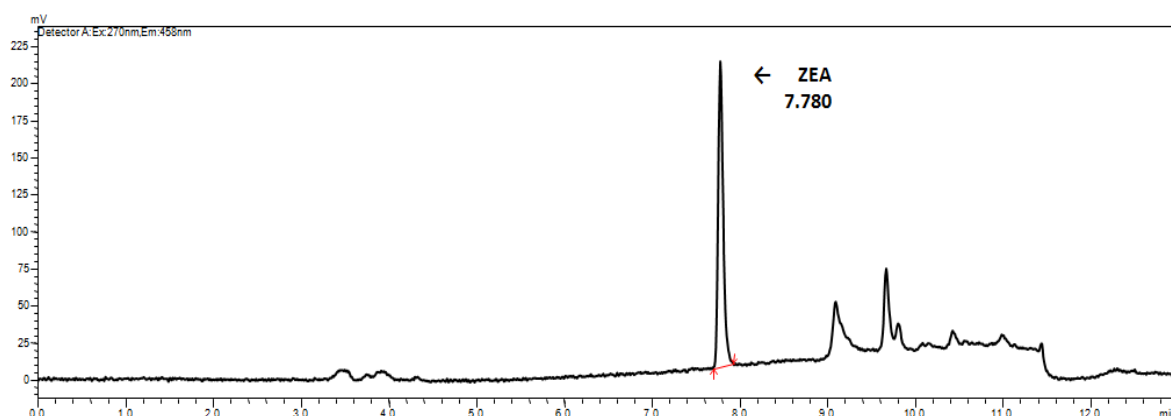
#### 4.5 Souhrn optimálních podmínek pro HPLC analýzu

##### Chromatografický systém

Chromatograf:	Shimadzu 20AD Prominence Liquid Chromatograph
Detektor:	Shimadzu RF-10AXL Fluorescence Detector
Kolona:	Kinetex XB-C18 150 x 4,6 mm, částice 5 $\mu$ m (Phenomenex)
Předkolona:	Ascentis® Express C18 Guard Cartridge, 5 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m (Sigma Aldrich) Kovová cartridge naplněná sorbentem Affinimip® SPE Zearalenone (firma Polyintell), částice o velikosti 25 – 80 $\mu$ m, hmotnost sorbentu 82,9 mg
Dávkování:	50 $\mu$ l
Detekce:	Fluorescenční, Ex 270 nm, Em 458 nm
Typ eluce:	Gradientová, s časem přepnutí ventilu na analytickou kolonu v 2,0 min
Mobilní fáze:	Acetonitril – voda, 35:65 až 100:0
Nárůst gradientu:	2,1 – 3,6 min isokraticky, 3,6 – 9,75 min lineární nárůst gradientu
Průtok:	1,0 ml/min
Promývací fáze:	Acetonitril – 2% vodný roztok kyseliny octové Methanol – 2% vodný roztok kyseliny octové
Průtok:	2,0 ml/min
Čas přepnutí ventilu:	2 min
Celkový čas analýzy:	13 min
Teplota:	Laboratorní
Vyhodnocení:	Chromatografický software LC Solution



Obr. 17: Záznam separace za optimálních podmínek na extrakční koloně Affinimip. Nástřik standardu ZEA o koncentraci 75  $\mu\text{g/l}$ .



Obr. 18: Záznam separace za optimálních podmínek na extrakční koloně C18. Nástřik standardu ZEA o koncentraci 75  $\mu\text{g/l}$ .

## 5 Výsledky

### 5.1 Test vhodnosti chromatografického systému

Vhodnost chromatografického systému a účinnost chromatografické separace byla prokazována měřením pracovního roztoku standardu pro kalibraci o koncentraci 75  $\mu\text{g/l}$  ZEA připraveným podle kapitoly 4.3.3. Tyto parametry se rovněž prokazovaly pro stejnou koncentraci naspikované v matrici piva.

### 5.1.1 Účinnost chromatografického systému v gradientové eluci – Peak Capacity P (píková kapacita)

Při gradientové eluci zůstává šířka píku s časem téměř neměnná a nelze tedy pro hodnocení účinnosti použít rovnici pro zdánlivý počet teoretických pater (N). Píková kapacita P vyjadřuje podíl celkové doby gradientu a průměrné šířky píku v chromatogramu. Výpočet byl proveden podle vzorce:

$$P = 1 + \frac{t_g}{w_b}, \text{ kde:}$$

$t_g$  = doba trvání gradientu

$w_b$  = šířka píku při základně

Tab. 9: Účinnost chrom. systému v gradientové eluci pro extrakční kolonu C18

Analyzovaná látka	$t_r$ (min)	$w_{0,5}$ (min)	$P_c$
Zearalenon	7,780	0,059	33,84

Tab. 10: Účinnost chrom. systému v gradientové eluci pro extrakční kolonu Affinimip

Analyzovaná látka	$t_r$ (min)	$w_{0,5}$ (min)	$P_c$
Zearalenon	7,787	0,059	33,84

### 5.1.2 Faktor symetrie chromatografických píků ( $A_s$ )

Výpočet faktoru symetrie byl proveden z průměru tří měření podle vzorce:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}, \text{ kde:}$$

$w_{0,05}$  = šířka píku ve vzdálenosti 5% výšky píku,

$d$  = vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v 5% jeho výšky

Tab. 11: Symetrie chromatografických píkú pro extrakční kolonu C18

Analyzovaná látka	$t_r$ (min)	$w_{0,05}$ (min)	$A_s$
Zearalenon	7,780	0,143	1,388

Tab. 12: Symetrie chromatografických píkú pro extrakční kolonu Affinimip

Analyzovaná látka	$t_r$ (min)	$w_{0,05}$ (min)	$A_s$
Zearalenon	7,787	0,170	1,597

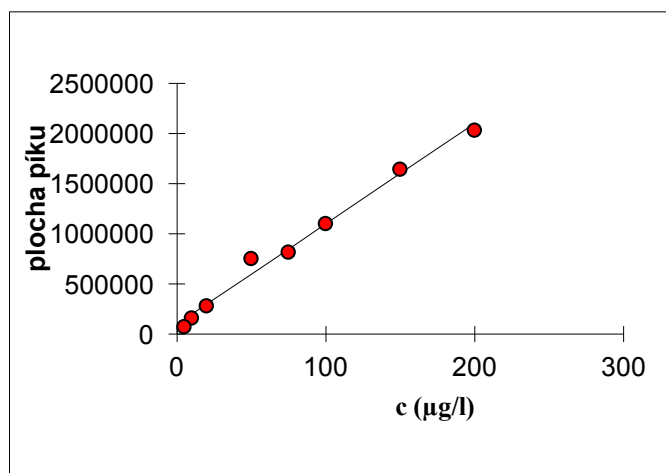
## 5.2 Validace analytické metody

### 5.2.1 Linearita

Pro určení linearity bylo použito 8 pracovních kalibračních roztoků připravených v koncentracích podle kapitoly 4.3.3. Každá koncentrace byla třikrát proměřena. Kalibrační křivka byla sestrojena z výsledné průměrné hodnoty těchto tří měření. Stanovení linearity bylo provedeno jak pro roztoky standardů ve vodě tak v matici piva.

#### Linearita zearalenonu ve vodě pro extrakční předkolonu C18

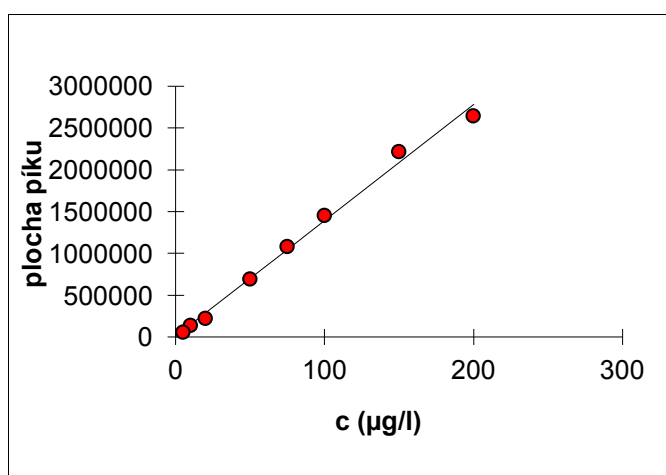
C ( $\mu\text{g/l}$ )	Plocha píku
200	2035686
150	1646862
100	1105394
75	820715
50	756852
20	285082
10	164197
5	77912



<b>Statistické parametry pro regresi : <math>y = k x + q</math></b>		
<b>Počet bodů</b>	n = 8	Odhad chyby
<b>Směrnice</b>	k = 9997	± 430
<b>Abs. Člen</b>	q = 99325	± 43358
<b>Korelační koef.</b>	r = 0,994483	
<b>Reziduální odch.</b>	s = 80120	
<b>Predikce</b>	y = 42000	x = -5,73

Linearita zearalenonu v matrici pro extrakční předkolonu C18

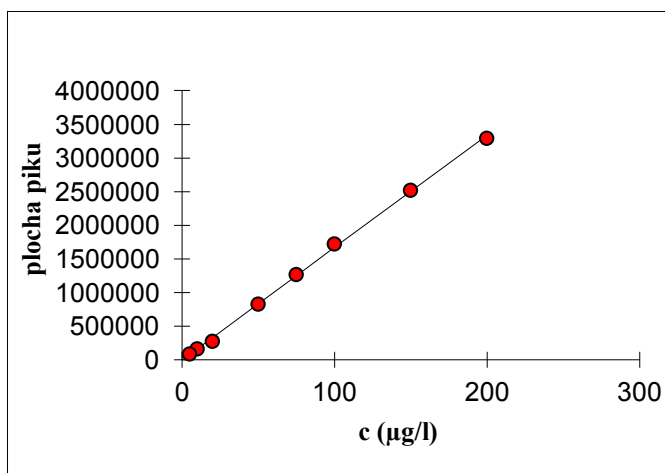
C (μg/l)	Plocha píku
200	2645914
150	2218692
100	1455674
75	1083388
50	695229
20	224639
10	140641
5	59609



<b>Statistické parametry pro regresi : <math>y = k x + q</math></b>		
<b>Počet bodů</b>	n = 8	Odhad chyby
<b>Směrnice</b>	k = 13853	± 463
<b>Abs. Člen</b>	q = 9193	± 46583
<b>Korelační koef.</b>	r = 0,996672	
<b>Reziduální odch.</b>	s = 86079	
<b>Predikce</b>	y = 42000	x = 2,37

Linearita zearalenonu ve vodě pro extrakční předkolonu Affinimip

C (µg/l)	Plocha píku
200	3296119
150	2523508
100	1725218
75	1270449
50	830602
20	277986
10	165500
5	89294

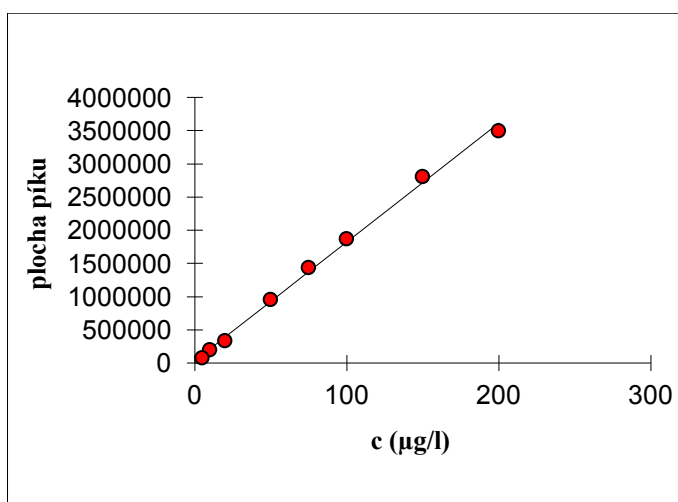


**Statistické parametry pro regresi :  $y = k x + q$**

Počet bodů	n = 8	Odhad chyby
Směrnice	k = 16705	± 206
Abs. Člen	q = -1429	± 20751
Korelační koef.	r = 0,999544	
Reziduální odch.	s = 38346	
Predikce	y = 42000	x = 2,6

Linearita zearalenonu v matrici pro extrakční předkolonu Affinimip

C (µg/l)	Plocha píku
200	3496718
150	2807399
100	1870128
75	1436900
50	955330
20	334476
10	197813
5	77095



Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$		
Počet bodů	n = 8	Odhad chyby
Směrnice	k = 17897	± 403
Abs. Člen	q = 32365	± 40558
Korelační koef.	r = 0,998484	
Reziduální odch.	s = 74947	
Predikce	y = 42000	x = 2,6

### 5.2.2 Opakovatelnost

K ověření opakovatelnosti byly vybrány tři odlišné koncentrace směsných pracovních roztoků standardu, které byly opakovaně dávkovány do systému. Výsledné plochy píků byly použity k výpočtu relativní směrodatné odchylky stanovení zearalenonu o příslušné koncentraci.

Opakovatelnost metody pro stanovení zearalenonu byla vyhodnocována z roztoků standardů o koncentrační hladině 200 µg/l, 100 µg/l a 20 µg/l.

Tab. 13: Stanovení opakovatelnosti metody pro extrakční předkolonu C18 a Affinimip

Nástřik	C18			Affinimip		
	Plocha píku			Plocha píku		
	200 µg/l	100 µg/l	20 µg/l	200 µg/l	100 µg/l	20 µg/l
1	273096	1339066	3051797	3417156	1761114	348340
2	265731	1353880	3027751	3229935	1733803	362836
3	269900	1376624	3054122	3240155	1722339	379994
4	269028	1358690	3007412	3233014	1701982	357942
5	266566	1354393	3005610	3252960	1704621	347803
6	267169	1341749	3023097	3167922	1719955	352634
7	257959	1348597	3010431	3148802	1649526	354647
8	270623	1347166	3003353	3130917	1677807	355926
N	8	8	8	8	8	8
Průměr	267509	1352521	3022947	3227607	1708893	357515
SD	4540	11744	20388	89351	34242	10329
<b>RSD (%)</b>	<b>1,70</b>	<b>0,87</b>	<b>0,67</b>	<b>2,77</b>	<b>2,00</b>	<b>2,89</b>



### 5.2.3 Přesnost

Test přesnosti metody byl vypočítán z průměrů tří nástřiků 7 vzorků piva s přídatkem zearalenonu na jedné koncentrační hladině 50 µg/l.

Tab. 14: Přesnost v matrici piva na extrakční předkoloně C18 a Affinimip

Vzorek	Průměrná plocha píku ZEA – C18	Průměrná plocha píku ZEA – Affinimip
1	691039	927646
2	633628	899842
3	670149	932882
4	672199	885791
5	680447	878412
6	633935	910483
7	740867	934589
Průměr	674609	909949
SD	36637	22829
<b>RSD (%)</b>	<b>5,43</b>	<b>2,51</b>

### 5.2.4 Výtěžnost

Výtěžnost byla určena tak, že byla dána do poměru průměrná hodnota plochy píku roztoku standardu o koncentraci 50 µg/l s průměrnou hodnotou ze 7 vzorků piva, bez nativní přítomnosti mykotoxinu (blank piva), do kterých byl přidán zearalenon o stejné koncentraci. Byly použity hodnoty měřené pro přesnost. Každý vzorek byl do systému dávkován třikrát.

Tab. 15: Stanovení parametru výtěžnosti zearalenonu v matrici piva (n = 7)

	Koncentrace (µg/l)	Průměrná plocha píků	Výtěžnost (%)
C18	50	673846	100,11
	50 + pivo	674609	
Affinimip	50	919456	98,97
	50 + pivo	909949	

### 5.2.5 Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ)

Limit kvantifikace odpovídá koncentrační hladině desetkrát vyšší než je koncentrační hladina šumu. Pro relevantní výpočet koncentrace analytu je tedy možno použít pouze hodnoty rovné nebo vyšší těmto limitním. Jeho určení bylo dosaženo postupným ředěním a experimentálním ověřením hodnot.

Limit detekce byl stanoven pro možnost určit, zda se daný analyt ve vzorku vůbec vyskytuje, tedy pro vyjádření citlivosti metody. Pro limit detekce platí, že hledaný pík v daném retenčním čase musí být významně statisticky odlišný od šumu, abychom mohli mluvit o jeho přítomnosti. Za takový je považován pík třikrát vyšší než šum základní linie. V tomto případě byl dopočten z experimentálně zjištěných hodnot podle vzorců:

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot h_n}{m} \quad \text{a} \quad \text{LOD} = \frac{3 \cdot h_n}{m}$$

kde  $h_n$  = šum na základní linii a  $m$  = směrnice kalibrační křivky

Mezi nimi pak platí vztah:

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot \text{LOD}}{3}$$

Obě hodnoty byly ověřeny jak pro čisté standardy, tak v matrici piva. Roztok o koncentraci 20 µg/l ZEA byl dále ředěn, výšky píků jednotlivých výstupů byly porovnávány s linií šumu. Při desetinásobném zředění už byly píky na chromatogramu vizuálně hůře detekovatelné oproti šumu. Chromatografický záznam koncentrace rovné

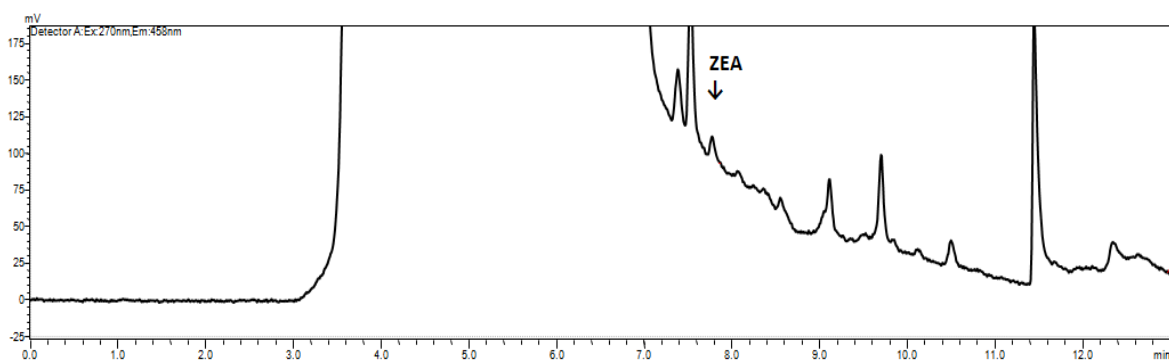
limitu kvantifikace, tedy 5 µg/l ZEA ukazuje obr. 19. Tato koncentrace je zároveň stanovena nejnižším bodem kalibračních křivek obou standardů.

Tab. 16: Limit kvantifikace standardů

	Koncentrace (µg/l)	1. nástřik (plocha)	2. nástřik (plocha)	3. nástřik (plocha)	Průměr LOQ
ZEA	5	95989	78258	93635	89294

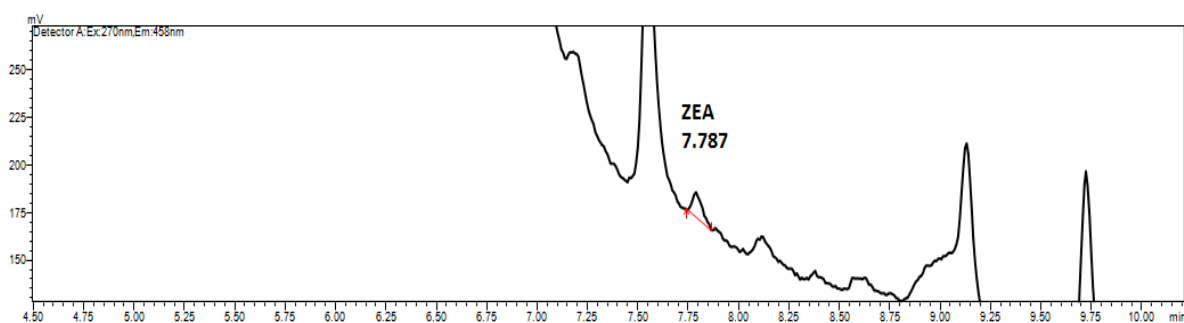
Tab. 17: Limit kvantifikace v matrici piva

	Koncentrace (µg/l)	1. nástřik (plocha)	2. nástřik (plocha)	3. nástřik (plocha)	Průměr LOQ
ZEA	5	75408	76724	79153	77095



Obr. 19: Analýza standardů v matrici piva o koncentraci rovné LOQ (ZEA v koncentraci 5 µg/l)

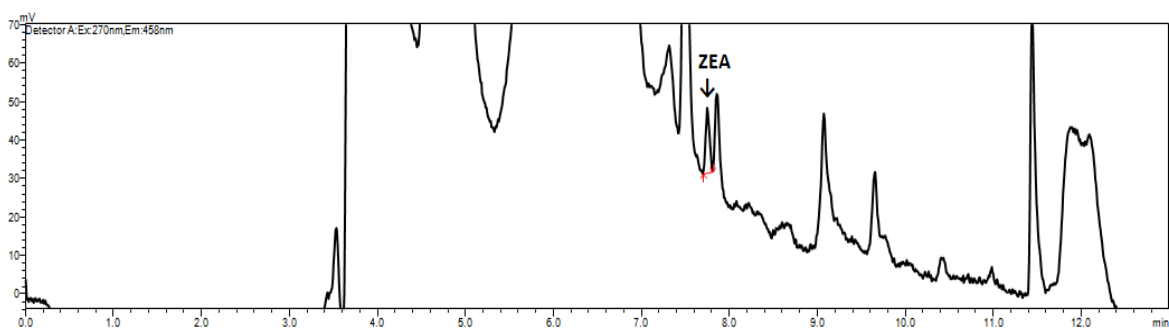
Teoreticky vypočtená koncentrace LOD standardu i v matrici piva pro ZEA odpovídá 1,5 µg/l.



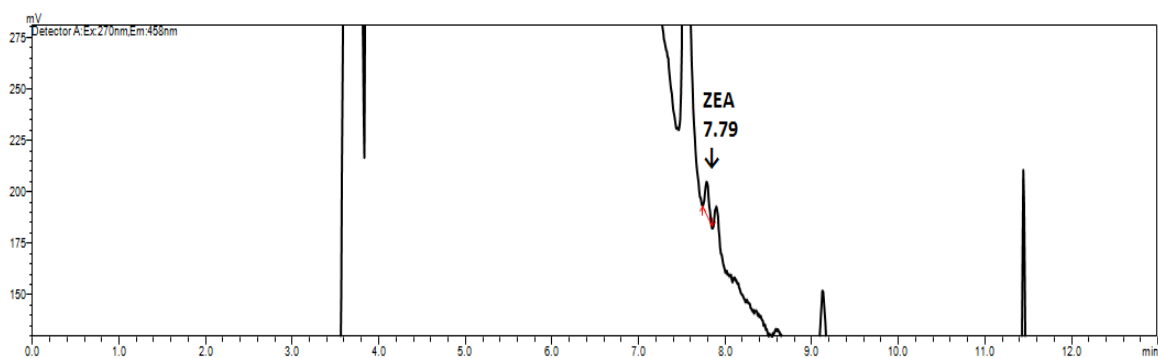
Obr. 20: Analýza vzorku o koncentraci rovné LOD v matrici piva (ZEA v koncentraci 1,5 µg/l)

### 5.3 Stanovení obsahu zearalenonu ve vzorcích vybraných druhů pív

K analýze bylo sesbíráno 30 pív, z toho 8 pív dvanáctistupňových ostatní byla deseti- nebo jedenáctistupňová. Vzorky jednotlivých pív byly odebírány přímo z lahve, 1 ml byl napipetován do vialky. Nástřik při jednotlivých analýzách byl 50  $\mu$ l. Od každého piva byla provedena tři měření, z jejich průměrné hodnoty ploch píků byla vypočtena z matricové kalibrační křivky koncentrace. Při měření na extrakční kolonce C18 byl zearalenon detekován v 8 vzorcích a při měření na extrakční kolonce Affinimip v 15 vzorcích z 30 proměřovaných pív.



Obr. 21: Chromatogram reálného vzorku: Samson světlý ležák 12°, extrakční předkolona C18



Obr. 22: Chromatogram reálného vzorku: Samson světlý ležák 12°, extrakční předkolona Affinimip

Tab. 18: Stanovení zearalenonu v 10° a 11° pivech pro extrakční předkolonu C18 a Affinimip

	<b><u>c ZEA (µg/l) – C 18</u></b>	<b><u>c ZEA (µg/l) – Affinimip</u></b>
Lobkowicz ležák premium	< LOD	< LOD
Pardál Echt ležák	< LOD	<b>≤ LOQ (1,5)</b>
Excelent 11°	< LOD	< LOD
Holba Šerák	< LOD	< LOD
Zlatopramen 11°	< LOD	< LOD
Pilsner Urquell	< LOD	< LOD
Staropramen 11°	< LOD	< LOD
Březňák 11°	< LOD	< LOD
Kozel 11°	< LOD	< LOD
Bernard 11°	<b>&lt; LOQ (1,5)</b>	<b>&lt; LOQ (2,25)</b>
Klášter (nepasterovaný ležák)	< LOD	< LOD
Braník jedenáctka	< LOD	< LOD
Primátor 11°	< LOD	< LOD
Olivětínský opat (výčepní)	< LOD	< LOD
Hradecký Votrok 11°	< LOD	< LOD
Platan 11°	< LOD	< LOD
Ostravar (výčepní)	< LOD	< LOD
Bohemia regent ležák	< LOD	< LOD
Vilém 11°(Perštejn)	< LOD	< LOD
Florián	< LOD	< LOD
Starobrno Medium 11°	< LOD	< LOD
Svijany Máz 11°	< LOD	< LOD

Tab. 19: Stanovení zearalenonu v 12° pivech pro extrakční překolonu C18 a Affinimip

	<b><u>c ZEA (µg/l) – C18</u></b>	<b><u>c ZEA (µg/l) – Affinimip</u></b>
Bertold ležák	< LOD	< LOD
Budweiser Budvar ležák	< LOD	< LOD
Samson světlý ležák 12°	<b>&lt; LOQ (1,8)</b>	<b>&lt; LOQ (2,24)</b>
Kumburák ležák	< LOD	< LOD
Krakonoš 12°	< LOD	< LOD
Radegast 12°	< LOD	< LOD
Rychtář Premium	< LOD	< LOD
Starobrno Drak 12°	< LOD	< LOD

U většiny analyzovaných vzorků byl zjištěn obsah zearalenonu pod hladinou limitu detekce, pouze u dvou, v případě Affinimip u tří piv byla koncentrace ZEA o trochu vyšší než nad touto limitní hladinou. Všechny hodnoty uvedené v tabulkách jsou proto pouze orientační a není možné je pod limitem kvantifikace hodnotit.

## 6 Závěr a diskuse

Byla vytvořena nová metoda pro stanovení mykotoxinu zearalenonu v pivu. Pro zjednodušení a urychlení extrakce analytu z matrice byla zvolena metoda pro úpravu vzorku on-line SPE ve spojení s HPLC. Zvolili jsme dva odlišné sorbenty, jeden na bázi reverzní fáze, druhý na bázi molekulárně vtištěného polymeru. Obě dvě metody byly optimalizovány a validovány. Využitím přepínání kolon mezi extrakční a analytickou bylo dosaženo izolace analytu. Z šesti různých analytických kolon byla vybrána jako nejvhodnější kolona C18 s iso-butylovými postranními řetězci dlouhá 150 mm vyráběná technologií core-shell (částice s pevným jádrem). Experimentálně byla určena vhodná mobilní fáze, její složení a další podmínky separace. Vlastnosti zearalenonu umožnily použít citlivé fluorimetrické detekce.

Promývací fáze pro sorbent C18	Methanol – 2% vodný roztok kyseliny octové (40:60)
Promývací fáze pro Affinimip	Acetonitril – 2% vodný roztok kyseliny octové (10:90)
Délka promývání	2 minuty
Mobilní fáze	Acetonitril – voda
Isokratická eluce	mobilní fáze v poměru 35:65 2 - 3,6 minuta
Gradientová eluce	lineární nárůst na 100:0 3,6 – 9,75 minuta

Po optimalizaci separace byla metoda validována. Linearita zearalenonu byla ověřena v roztoku standardu a v matrici piva v koncentracích 5 až 200 µg/l pro oba SPE sorbenty zvlášť. Výsledkem byla přímka lineární regrese, z níž byl vypočítán korelační koeficient o hodnotě větší než 0,9940. Parametr přesnosti byl měřen na jedné koncentrační hladině 50 µg/l, kritériem tohoto parametru je relativní směrodatná odchylka (RSD), která byla pod 5,5%. Opakovatelnost byla měřena na 3 koncentračních hladinách 20, 100 a 200 µg/l s výsledkem RSD od 0,67 po 2,89 %. Výťažnost se pohybovala mezi 98 a 100%. Limit kvantifikace této metody pro zearalenon je 5 µg/l.

Zearalenon byl stanoven ve 30 vzorcích piv. Nejvyšší množství ZEA bylo nalezeno v pivech Bernard 11° a Samson světlý ležák 12° v obou případech extrakce a navíc u Affinimip ještě v pivu Pardál echt ležák hodnota vyšší než 1,5 µg/l. Tato hodnota je však pod limitem kvantifikace a zůstává pod nejnižším povoleným limitem pro zearalenon v potravinách 20 µg/l.

Závěrem diplomové práce lze konstatovat, že porovnání obou extrakčních sorbentů nebylo tak výrazně rozdílné, jak se očekávalo. Sorbent na bázi molekulárně vtištěného polymeru se neprojevilo značně selektivněji než ten na bázi reverzní fáze, neboť ani z molekulárně vtištěného polymeru se nepovedlo při on-line SPE extrakci beze zbytku odstranit všechny interferující složky z matrice. Navíc po on-line extrakci byl získán chromatogram s menším množstvím interferencí při využití C-18 sorbentu. To je pravděpodobně způsobené větší lipofilitou zearalenonu a tím i možností využití silnější promývací fáze s vyšším obsahem organické složky, která umožňuje lepší přečištění. U Affinimip sorbentu musela být použita slabší eluční fáze a navíc mohlo docházet k nespecifickým interakcím s nosičem templátu. Nebylo ani také možné v on-line provedení striktně dodržet podmínky uváděné producentem MIP, a to zejména vysušení sorbentu před elucí mykotoxinu. Tento krok dle některých zdrojů z literatury může mít také vliv na specifickou funkci sorbentu, zejména při použití nevhodných elučních činidel.



## 7 Použitá literatura

- [1] HAJŠLOVÁ, J. Mykotoxiny. *Vědecký výbor fytoosanitární a životního prostředí* [online]. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., 2009 [cit. 2017-04-28]. Dostupné z: <http://www.phytopsanitary.org/projekty/2009/projekt1.pdf>
- [2] SUCHÝ, P., HERZIG, I. Plísně a mykotoxiny: Prevence jejich vzniku a dekontaminace v krmivech. *Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i.* [online]. Praha: Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i., 2005 [cit. 2017-04-28]. Dostupné z: <https://www.vuzv.cz/sites/File/vybor/Hezig%2C%20Such%C3%BD-Plisne%20a%20mykotoxiny.pdf>
- [3] PubChem, Zearalenone – Compound Summary [online]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281576#section=Top> (20.3.2017)
- [4] Fermentek biotechnology [Online]. Dostupné z: <http://www.fermentek.com/product/zearalenone>. (Citace: 20. 3. 2017)
- [5] MALÍŘ, F., OSTRÝ, V. *Vláknité mikromycety (plísně), mykotoxiny a zdraví člověka*. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2003, 349 s. ISBN 80-7013-395-3.
- [6] Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *EFSA Journal* [online]. 2011, **9**(6), 2197- [cit. 2017-03-21]. DOI: 10.2903/j.efsa.2011.2197. ISSN 18314732. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2011.2197>
- [7] ZINEDINE, A., SORIANO, J. M., MOLTÓ, J. C., MAÑES, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2007, **45**(1), 1-18 [cit. 2017-03-29]. DOI: 10.1016/j.fct.2006.07.030. ISSN 02786915. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691506002432>
- [8] KWAŚNIEWSKA, K., GADZAŁA-KOPCIUCH, R., CENDROWSKI, K. Analytical Procedure for the Determination of Zearalenone in Environmental and Biological Samples. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* [online]. 2015, **45**(2), 119-130 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1080/10408347.2014.896731.

ISSN 1040-8347. Dostupné z:  
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408347.2014.896731>

- [9] FRIZZELL, C. S., UHLIG, C., MILES, O., et al. Biotransformation of zearalenone and zearalenols to their major glucuronide metabolites reduces estrogenic activity. *Toxicology in Vitro* [online]. 2015, **29**(3), 575-581 [cit. 2017-04-07]. DOI: 10.1016/j.tiv.2015.01.006. ISSN 08872333. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233315000077>
- [10] ZÖLLNER, P., MAYER-HELM, B. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2006, **1136**(2), 123-169 [cit. 2017-04-09]. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.09.055. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967306018176>
- [11] BENNETT, J. W., KLICH, M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2003, **16**(3), 497-516 [cit. 2017-04-06]. DOI: 10.1128/CMR.16.3.497-516.2003. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>
- [12] DRÁPAL, J., ETTLEROVÁ, K., HAJŠLOVÁ, J., JECHOVÁ, M., KOZÁKOVÁ, M., MALÍŘ, F., MÜLLEROVÁ, D., OSTRÝ, V., RUPRICH, J., SOSNOVCOVÁ, J., ŠPELINA, V. a WINKLEROVÁ, D. Pravděpodobnostní modelování přívodu zearalenonu z potravin na bázi obilovin. Vědecký výbor pro potraviny. 2007. VVP:INFO/2007/21/deklas/ZEN
- [13] NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách. 2006
- [14] NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 1126/2007 ze dne 28. září 2007, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, pokud jde o fusariové toxiny v kukuřici a ve výrobcích z kukuřice. 2007
- [15] Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF). *Informační centrum bezpečnosti potravin* [online]. Praha: Ministerstvo zemědělství, 2012 [cit. 2017-04-20]. Dostupné z: [http://www.bezpecnostpotravin.cz/stranka/system-rychleho-varovani-pro-potraviny-a-krmiva-\(rasff\).aspx](http://www.bezpecnostpotravin.cz/stranka/system-rychleho-varovani-pro-potraviny-a-krmiva-(rasff).aspx)
- [16] *Rasff Portal* [online]. Europa: European Commission, 2017 [cit. 2017-04-20]. Dostupné z: [http://ec.europa.eu/food/safety/rasff\\_en](http://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en)

- [17] Český svaz pivovarů a sladoven. Mykotoxiny v otázkách a odpovědích [online]. 2013. Dostupné z: <http://www.ceske-pivo.cz/pro-media/vse-o-mykotoxinech>
- [18] PRÁŠILOVÁ, J., KAMENÍČEK, J. Výroba piva: Text pro učitele. In: *Učitel chemie* [online]. Olomouc, 2013 [cit. 2017-04-22]. Dostupné z: [http://ucitelchemie.upol.cz/materialy/vkpch/vyroba\\_piva\\_text\\_pro\\_ucitele.pdf](http://ucitelchemie.upol.cz/materialy/vkpch/vyroba_piva_text_pro_ucitele.pdf)
- [19] BOLECHOVÁ, M., BENEŠOVÁ, K., BĚLÁKOVÁ, S., ČÁSLAVSKÝ, J., POSPÍCHALOVÁ, M., MIKULÍKOVÁ, R. Determination of seventeen mycotoxins in barley and malt in the Czech Republic. *Food Control* [online]. 2015, 47, 108-113 [cit. 2017-04-21]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.06.045. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713514003740>
- [20] DRÁPAL, J., ETTLEROVÁ, K., HAJŠLOVÁ, J., JECHOVÁ, M., KOZÁKOVÁ, M., MALÍŘ, F., MÜLLEROVÁ, D., OSTRÝ, V., RUPRICH, J., SOSNOVCOVÁ, J., ŠPELINA, V. a WINKLEROVÁ, D. Pravděpodobnostní modelování přívodu zearalenonu z potravin na bázi obilovin. Vědecký výbor pro potraviny. 2007. VVP:INFO/2007/21/deklas/ZEN
- [21] SADÍLEK, P. Moderní trendy v úpravě vzorků biologického materiálu k analýze vybraných biologicky aktivních látek. Disertační práce, FAF UK, 2012.
- [22] NOVÁKOVÁ, L. Moderní trendy v přípravě vzorku k analýze s využitím instrumentálních technik. Dostupné na: [http://www.pragolab.cz/files/udalosti/2014-10/01\\_LNovakova.pdf](http://www.pragolab.cz/files/udalosti/2014-10/01_LNovakova.pdf). [online] 3. 10. 2014 [citace: 10. 4. 2017]
- [23] CHENG, C. LIU, L.-C. On-line solid-phase extraction coupled liquid chromatography-ESI-ion trap-mass spectrometry for analysis of abamectin and ivermectin residues in milk. *Analytical Methods* [online]. 2014, 6(5), 1581- [cit. 2017-04-10]. DOI: 10.1039/c3ay41943f. ISSN 1759-9660. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3ay41943f>
- [24] VASAPOLLO, G., Del SOLE, R., MERGOLA, L., LAZZOI, M. R., SCARDINO, A., SCORRANO, S., MELE, G. Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2011, 12(12), 5908-5945 [cit. 2017-04-14]. DOI: 10.3390/ijms12095908. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/12/9/5908/>

- [25] JODLBAUER, J., ZÖLLNER, P., LINDNER, W. Determination of zearalenone and its metabolites in urine and tissue samples of cow and pig by LC-MS/MS. *Mycotoxin Research* [online]. 2000, **16**(S2), 174-178 [cit. 2017-04-17]. DOI: 10.1007/BF02940030. ISSN 0178-7888. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02940030>
- [26] MRKVICOVÁ, M., 2007: Stanovení ochratoxinu A, deoxynivalenolu, zearalenonu, aflatoxinů a fumonisinů metodou HPLC nebo LC/MS/MS v krmivech. In: *Bulletin* 2007. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno. Národní referenční laboratoř. Ročník XI. Č. 1/2007. Brno. s. 12 – 46
- [27] LUCCI, P., DERRIEN, D., ALIX, F., PÉROLIER, C., BAYOUDH, S. Molecularly imprinted polymer solid-phase extraction for detection of zearalenone in cereal sample extracts. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2010, **672**(1-2), 15-19 [cit. 2017-04-12]. DOI: 10.1016/j.aca.2010.03.010. ISSN 00032670. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000326701000293X>
- [28] ALMEIDA-FERREIRA, G. C., et al. Occurrence of zearalenone in wheat-and corn-based products commercialized in the State of Paraná, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2013, 44.2: 371-375.
- [29] KUZDRALIŃSKI, A., SOLARSKA, E., MUSZYŃSKA, M. Deoxynivalenol and zearalenone occurrence in beers analysed by an enzyme-linked immunosorbent assay method. *Food Control* [online]. 2013, **29**(1), 22-24 [cit. 2017-04-14]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.06.003. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713512003234>
- [30] TOLOSA, J., GRAZIANI, G., GASPARI, A., CHIANESE, D., FERRER E., MAÑES, J., RITIENI, A. Multi-Mycotoxin Analysis in Durum Wheat Pasta by liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometry. *Toxins* [online]. 2017, **9**(2), 59- [cit. 2017-04-15]. DOI: 10.3390/toxins9020059. ISSN 2072-6651. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6651/9/2/59>
- [31] RADOVA, Z., et al. Analysis of zearalenone in wheat using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and/or enzyme-linked immunosorbent assay. *Cereal Research Communications*, 2001, 435-442.
- [32] MIZUTANI, K., NAGATOMI, Y., MOCHIZUKI, N. Metabolism of Zearalenone in the Course of Beer Fermentation. *Toxins* [online]. 2011, **3**(12), 134-141 [cit.

- 2017-04-17]. DOI: 10.3390/toxins3020134. ISSN 2072-6651. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6651/3/2/134/>
- [33] NKWE, D. O., TAYLOR, J. E., SIAME, B. A. Fungi, Aflatoxins, Fumonisin B1 and Zearalenone Contaminating Sorghum-based Traditional Malt, Wort and Beer in Botswana. *Mycopathologia* [online]. 2005, **160**(2), 177-186 [cit. 2017-04-17]. DOI: 10.1007/s11046-005-6867-9. ISSN 0301-486x. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11046-005-6867-9> WEISS, R. a B.
- [34] MIZAIKOFF, B. Towards analysis of mykotoxins in beverages with molecularly imprinted polymers for deoxynivalenol and zearalenone. *Mycotoxin Research* [online]. 2002, **18**(S1), 89-93 [cit. 2017-04-17]. DOI: 10.1007/BF02946071. ISSN 0178-7888. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02946071>
- [35] JODLBAUER, J., ZÖLLNER, P., LINDNER, W. Determination of zearalenone and its metabolites in urine and tissue samples of cow and pig by LC-MS/MS. *Mycotoxin Research* [online]. 2000, **16**(S2), 174-178 [cit. 2017-04-17]. DOI: 10.1007/BF02940030. ISSN 0178-7888. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02940030>
- [36] OSTRY, V., SKARKOVA, J. A HPTLC method for the determination of the mycotoxin zearalenone in cereal products. *Mycotoxin Research* [online]. 2003, **19**(1), 64-68 [cit. 2017-04-17]. DOI: 10.1007/BF02940096. ISSN 0178-7888. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02940096>