

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Testování a optimalizace on-line SPE HPLC podmínek pro
stanovení mykotoxinu patulinu v jablečných nápojích.

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Hradec Králové 15. 5. 2015

Bc. Anežka Holznerová

Srdečně děkuji panu doc. Šatínskému za jeho neskonalou trpělivost, odborné rady, připomínky, čas a jeho velké úsilí, které vynaložil, aby tato práce byla dokončena.

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Literatura a zdroje, z nichž jsem při zpracování práce čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu. Souhlasím, aby práce byla půjčována ke studijním účelům a byla citována dle platných norem.

Dne v Hradci Králové

Podpis.....

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Anežka Holznerová

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

Název diplomové práce: Testování a optimalizace on-line SPE HPLC podmínek pro stanovení mykotoxinu patulinu v jablečných nápojích.

K vývoji metody, kterou by bylo možno detekovat mykotoxin patulin v jablečných nápojích a džusech, bylo využito vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) ve spojení s on-line extrakcí na tuhou fázi (SPE) pomocí techniky přepínání kolon pro úpravu vzorku. Vzorek džusu o objemu 250 μ l byl přímo dávkován do systému. Po nástřiku vzorku došlo k extrakci patulinu z matrice džusu na extrakční předkoloně. Kovová extrakční předkolona o rozměrech 25 x 3 mm, byla naplněna Supel MIP Patulin sorbentem, který je specifickým „molekulárně vtištěným polymerem“ (MIP) určeným pro selektivní extrakci patulinu z jablečné matrice. Jako promývací fáze pro odstranění balastní matrice byl vybrán 1% roztok NaHCO₃, který protékal MIP kolonkou rychlostí 2 ml/min po dobu 2,5 minuty. Po uplynutí této doby došlo k přepnutí ventilu a zbytkové látky matrice zachycené na extrakční předkoloně společně s patulinem byly dále separovány na analytické koloně Kinetex Biphenyl 150 x 4,6 mm (velikost částic 5 μ m). Mobilní fáze o složení 20 % ethylacetátu v acetonitrilu s vodou v poměru 20:80, protékala kolonou rychlostí 1 ml/min při gradientové eluci. Detekce byla provedena UV-VIS detektorem při vlnové délce 276 nm. Celková doba analýzy jednoho vzorku džusu, včetně jeho on-line úpravy, trvala necelých 9 minut. Limit detekce této metody byl 50 μ g/l, což je hodnota odpovídající nejvyššímu povolenému množství patulinu v jablečných džusech dle norem EU.

Klíčová slova: HPLC, MIP, on-line SPE, patulin, mykotoxiny

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Bc. Anežka Holznerová

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

Title of Diploma Thesis: On-line SPE HPLC method optimization for determination of patulin mycotoxin in apple drinks

The issue of food contamination with mycotoxins is a serious problem worldwide. These substances are highly toxic to humans and chronic effects on the human organism in very low doses may cause long-term medical complications. In our work we focused on one of the most common dietary mycotoxins - patulin, which is found in apples and related products (especially apple juices). High performance liquid chromatography (HPLC) coupled with on-line solid phase extraction (SPE) using a column switching technique for sample treatment was developed for determination of mycotoxin patulin in apple drinks and juices. A volume of 250 μ l of juice sample was injected directly into the on-line SPE-HPLC system. After injection of the sample the extraction of patulin from juice matrix was carried out on SPE precolumn. SPE precolumn 25 x 3 mm was filled with Supel MIP Patulin sorbent, which is a specific "molecularly imprinted polymer" (MIP) designated for the selective extraction of patulin from an apple matrix. As the washing solution for removing ballast matrix was selected 1% solution of NaHCO₃, which flowed through MIP precolumn at flow rate 2 ml/min for 2.5 minutes. After this period a valve was switched and the residual ballast matrix, retained on the extraction precolumn, together with patulin were further separated on an analytical column Kinetex Biphenyl 150 x 4.6 mm (particle size 5 μ m). The mobile phase composition of 20 % ethyl acetate in acetonitrile with water in ratio 20:80, flow through the column at 1 ml/min in gradient elution. Detection was performed by UV-VIS detector at a wavelength 276 nm. The total analysis time of one juice sample, including its online pretreatment, was less than 9 minutes. The detection limit of this method was found at level 50 μ g/l, which is the value corresponding to the maximum allowed level of patulin in apple juices according to EU standards.

Obsah

1	Seznam zkratk	8
2	Úvod	9
3	Cíl a zadání práce	10
4	Teoretická část	11
4.1	Patulin	11
4.1.1	Fyzikální a chemické vlastnosti	11
4.1.2	Legislativa a kontrola.....	14
4.2	Metody stanovení patulinu.....	15
4.3	Chromatografie	18
4.4	Vysokoučinná kapalinová chromatografie – High performance liquid chromatography (HPLC)	19
4.4.1	Schéma kapalinového chromatografu.....	20
4.5	On-line SPE HPLC	22
4.5.1	Úprava vzorku.....	22
4.5.2	Schéma přepínání kolon.....	23
4.5.3	Princip on-line SPE chromatografie	24
4.6	Molekulárně vtištěné polymery – Molecularly Imprinted Polymers – MIPs .	25
4.6.1	Využití MIPs	26
4.6.2	Kritické aspekty	27
5	Experimentální část	28
5.1	Materiály a pomůcky	28
5.1.1	Standardy, chemikálie a vzorky	28
5.2	Přístroje a podmínky separace	29
5.3	Příprava roztoků standardů patulinu a hydroxymethylfurfuralu.....	30
5.3.1	Příprava zásobních roztoků.....	30
5.3.2	Příprava pracovních roztoků pro optimalizaci metody.....	30
5.3.3	Příprava pracovních roztoků pro kalibraci.....	30
5.3.4	Příprava roztoků jablečných džusů pro vývoj a validaci metody	31
5.3.5	Příprava mobilních fází pro on-line SPE-HPLC.....	31
6	Vývoj metody	32
6.1	Optimalizace chromatografických podmínek pro separaci patulinu a HMF ..	32
6.2	Výběr analytické kolony	32

6.2.1	Přehled testovaných kolon a podmínek separace	33
6.3	Optimalizace on-line SPE – výběr sorbentu	37
6.4	Volba promývací fáze pro SPE sorbenty	38
6.5	Volba mobilní fáze pro separaci	39
6.6	Optimalizace gradientové eluce při on-line SPE extrakci	43
6.7	Souhrn validovaných podmínek pro HPLC analýzu	49
7	Výsledky.....	50
7.1	Validace analytické metody.....	50
7.1.1	Linearita	50
7.1.2	Opakovatelnost	53
7.1.3	Přesnost.....	54
7.1.4	Výtěžnost	55
8	Závěr	56
9	Použitá literatura	58

1 Seznam zkratek

CAD	Charged Aerosol Detector
DAD	Detektor s diodovým polem – Diode Array Detector
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
FDA	Food and Drugs Administration
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
HMF	Hydroxymethylfurfural
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – High Performance Liquid Chromatography
LLE	Liquid-Liquid Extraction
MIPs	Molekulárně vtištěné polymery - Molecularly Imprinted Polymers
MIT	Technologie molekulárního vtiskování - Molecular Imprinting Technology
MS	Hmotnostní spektrometrie – Mass Spectrometry
NQAD	Nano Quantity Qnalyte Detector
PMTDI	Maximální přijatelný denní příjem – Provisional Maximum Tolerable Daily Intake
PAT	Patulin
RSD	Relativní směrodatná odchylka – Relative Standard Deviation
SPE	Extrakce na tuhou fázi - Solid Phase Extraction
UV-VIS	Ultrafialové-viditelné záření

2 Úvod

Problematika kontaminace potravin mykotoxiny je celosvětově závažný problém. Jsou to látky pro člověka vysoce toxické a jejich chronické působení na lidský organismus i ve velice nízkých dávkách může způsobovat dlouhodobé zdravotní komplikace. Některé z mykotoxinů jsou navíc látky stabilní a perzistentní v životním prostředí, odkud se dále přes zemědělskou (rostlinnou a živočišnou) produkci mohou dostávat do potravního řetězce člověka. Z tohoto hlediska je tedy nutné sledovat, zda nejsou překračovány potravinové limity jednotlivých mykotoxinů a k tomuto účelu vyvíjet citlivé a selektivní analytické techniky pro jejich detekci. V naší práci jsme se zaměřili na jeden z nejčastějších potravních mykotoxinů – patulin, který se vyskytuje v jablcích a s nimi souvisejících produktech (zejména v jablečných džusech).

3 Cíl a zadání práce

Tato diplomová práce je zaměřena na testování a optimalizaci podmínek spojení dvou metod, a to vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s on-line extrakcí tuhou fází (SPE), pro stanovení mykotoxinu patulinu v jablečných nápojích. Jelikož jsou mykotoxiny pro člověka toxické, je nutné sledovat, zda jejich koncentrace v potravinách nepřekračuje dané limity. Z toho důvodu je třeba neustále vyvíjet citlivější a selektivnější metody, kterými by tyto nebezpečné látky mohly být detekovány.

Cílem práce bylo testovat a najít vhodné optimalizované podmínky pro metodu, kterou by bylo možné stanovit patulin v jablečných nápojích. Technikou on-line SPE ve spojení s HPLC bylo dosaženo nejen zkrácení času úpravy vzorku před samotnou analýzou, ale došlo i k zakoncentrování patulinu a částečnému odstranění balastních látek matrice před vlastní separací.

4 Teoretická část

4.1 Patulin

4.1.1 Fyzikální a chemické vlastnosti

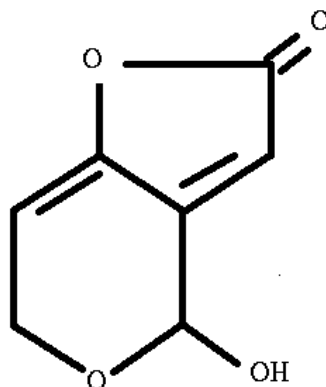
Název IUPAC: 4-Hydroxy-4H-furo[3,2-c]pyran-2(6H)-one

Molekulová hmotnost: 154,12 g/mol

Sumární vzorec: $C_7H_6O_4$

CAS number: 149-29-1

Strukturní vzorec:



Obrázek 1: Strukturní vzorec patulinu (1)

Popis: krystalická látka, bílá (2)

Rozpustnost: - rozpustný ve vodě a v organických rozpouštědlech jako je DMSO, methanol, ethanol, aceton, ethylacetát, chloroform

- nerozpustný v petroleji a benzenu (3).

Bod tání: 105 – 111 °C

Absorpční maximum (vlnová délka): 276 nm

Patulin (PAT) je mykotoxin, který je produkován více než 60 druhy plísní patřících do 30 rodů. Hlavními producenty patulinu jsou plísně *Penicillium expansum*, *Penicillium griseofulvum*, *Aspergillus clavatus* a *Byssochlamys nivea* (4). Tyto druhy plísní napadají různé potraviny včetně ovoce, obilovin a sýrů. Nejběžnějším producentem patulinu v přírodě je *P. expansum*. Patulin je sekundárním metabolitem výše uvedených plísní a kontaminuje plodiny a z nich vyrobené produkty, které byly napadeny těmito plísněmi. Patulin bývá nejčastěji nalezen v jablkách a hruškách s hnědou hnilobou a modrou plísní, jablečných džusech (5) (6), moukách a sladech (7). Patulin se nevyskytuje pouze v plodinách a jejich produktech, ale i v mase, včetně drůbežího, které je kontaminováno po zkrmování obilovin napadených plísní *Aspergillus clavatus* (8).

Vzhledem k výrobním procesům, spotřebním postupům a povaze potravin, patulin vyskytující se v těchto potravinách nepředstavuje bezpečnostní riziko s výjimkou jablečných džusů (9). Z pravidla bývají zahnívajících části většiny ovoce a obilovin odstraněny ještě před spotřebou. V případě potravin jako jsou sýry, které obsahují vysoké množství cysteinu, dochází k inaktivaci patulinu (10). Kontaminace patulinem bývá problémem po sklizni. Růst plísní je silně ovlivňován počasím a právě v období sklizně jsou podmínky pro růst plísní nejpříznivější. Bylo zjištěno, že nejvyšší produkce patulinu je při skladovací teplotě mezi 4 a 25 °C (11). Studie dokazují, že patulin je zničen fermentačními procesy a z tohoto důvodu se nenachází v alkoholických ovocných nápojích nebo ve vinných octech, které jsou produkovány z ovocných šťáv. Zatím co tepelné zpracování způsobí jen minimální zničení patulinu. Z toho vyplývá, že patulin přítomný v jablečné šťávě není rozložen procesem pasterizace (12).

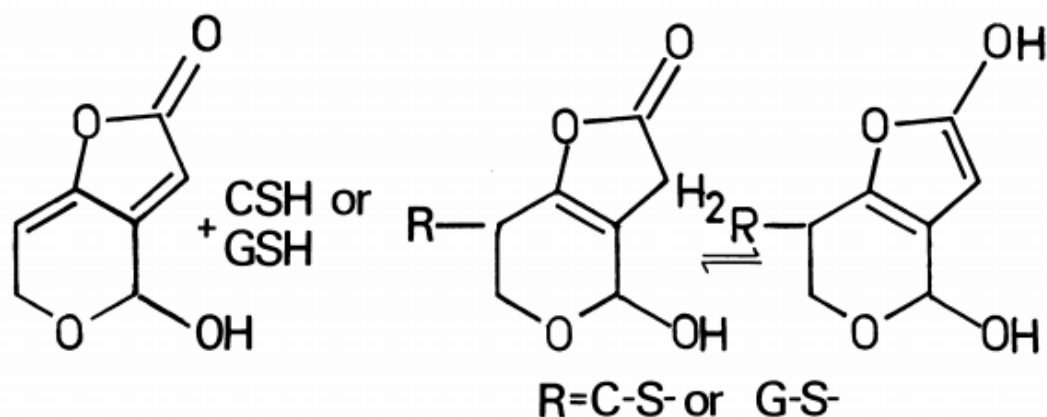
Prvním kdo izoloval patulin z *Penicillium expansum*, *Penicillium griseofulvum* byl Birkinshaw a kol. v roce 1943. Cílem bylo najít nové druhy plísní s antibiotickými účinky. U patulinu tyto antibiotické účinky zjištěny byly (působí na gramnegativní, grampozitivní bakterie a na *Mycobacterium tuberculosis*), ale zároveň je velmi toxický. Byl dokonce testován v klinických studiích, ale zájem o něj ubýval kvůli jeho toxickým účinkům jak na lidský organismus, tak i na zvířata. Působí baktericidně, bakteriostaticky a antifungálně. Vystavení tomuto toxinu může mít imunologické, gastrointestinální a neurologické následky (13) (3). A z tohoto důvodu patří patulin mezi takové mykotoxiny (aflatoxiny, ochratoxin A, zearalenon, fumonisiny,

trichotheceny), jejichž koncentrace v potravinách je přísně hlídána a jeho přípustné hladiny jsou upraveny v mnoha zemích po celém světě. Od roku 2003 platí Evropské nařízení 1425/2003, které stanoví maximální výši 50 µg/l pro ovocné šťávy a odvozené produkty, 25 µg/l u pevných výrobků z jablek a 10 µg/l pro výrobu nápojů a potravin určených pro kojence a malé děti (17). V současné době, americký Úřad pro potraviny a léčiva (FDA), omezuje patulin na maximální koncentraci 50 µg/l (14).

Chemicky je patulin nenasycený lakton. Patří mezi polyketidové sekundární metabolity a jeho biosyntetická dráha patří mezi nejlépe prozkoumané dráhy sekundárního metabolismu hub. Prvním meziproduktem patulinové dráhy je kyselina 6 – methylsalicylová, která vzniká kondenzací acetylkoenzymu A s třemi malonátovými jednotkami (13).

Studie na zvířatech a pozorování u člověka dokazuje, že patulin má toxické vlastnosti. Akutní toxicita po požití vysoké dávky u zvířat se projevuje křečemi, dušností, plicní kongescí, otoky, ulcerací, hyperémií a gastrointestinální distenzí. U člověka se požití vysokých dávek patulinu projevuje nevolností, zvracením, gastrointestinálními poruchami a poškozením ledvin (11).

Jak již bylo zmíněno, karcinogenní mykotoxin patulin může být inaktivován různými sloučeninami, které obsahují sulfhydryl, např. glutathion a cystein. Tato reakce mezi patulinem a enzymy obsahujícími SH skupiny způsobuje extrémní toxicitu patulinu vůči bakteriím (15).



Obrázek 2: Reakce patulinu se sloučeninami, které obsahují sulfhydryl (15)

4.1.2 Legislativa a kontrola

Výsledky hodnocení expozice ukázaly, že průměrná expozice evropské populace patulinu se nachází hluboko pod hodnotou maximálního přijatelného denního příjmu (PMTDI) 0,4 mg/kg tělesné hmotnosti (16). Tento PMTDI byl stanoven Vědeckým výborem pro potraviny v březnu roku 2000 (17). Ovšem existují specifické skupiny spotřebitelů, jsou jimi zejména děti, které mohou být vystaveny vyšším dávkám patulinu, jelikož u této skupiny se předpokládá vyšší tendence spotřeby jablečných produktů. V zájmu ochrany veřejného zdraví proto bylo nutné stanovit maximální množství patulinu v potravinách, v nichž se běžně vyskytuje. Cílem komise bylo omezit přítomnost patulinu v potravinách na nejnižší rozumně dosažitelnou úroveň (16).

Tuto problematiku řeší nařízení Komise (ES) č. 1425/2003 ze dne 11. srpna 2003, které stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, kterou byly dále stanoveny limity pro maximální limity pro dusičnany, aflatoxiny, ochratoxin A, olovo, kadmium, rtuť, 3-chlor-1,2-propandiol a dioxiny.

Některé členské státy přijaly nebo mají v úmyslu přijmout maximální limity pro patulin v ovocných šťávách, zejména v jablečné šťávě, pevných výrobcích z jablek, například kompotech a jablečné dřeni a ve výrobcích tohoto druhu určených pro kojence a malé děti. Vzhledem k rozdílům mezi členskými státy a k následnému riziku narušení hospodářské soutěže jsou opatření Společenství nezbytná k zajištění jednoty trhu při zachování zásady proporcionality.

Toto nařízení je závazné v celém rozsahu a přímo použitelné ve všech členských státech.

Tabulka 1: Maximální limity pro patulin podle nařízení Komise (ES) č. 1425/2003 (17)

produkty	Maximální limity pro patulin ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Ovocné šťávy a ovocný nektar, zejm. jablečná šťáva používaná jako doplněk jiných nápojů, koncentrovaná ovocná šťáva po obnovení podle pokynů výrobce	50
Lihoviny, cider a jiné kvašené nápoje z jablek nebo nápoje obsahující jablečnou šťávu	25
Jablečná šťáva a tužší výrobky z jablek pro kojence a malé děti, včetně jablečných kompotů a jablečné dřeně, které jsou označené a prodávané jako výrobky určené pro kojence a malé děti, ostatní příkrmy pro malé děti	10

4.2 Metody stanovení patulinu

V současné odborné literatuře zaměřené na stanovení patulinu v potravinách a jablečných nápojích, byla mezi analytickými metodami nejčastěji používaná metoda HPLC s úpravou vzorku pomocí SPE či LLE. Obecně se dá konstatovat, že vývoj metody selektivního stanovení patulinu je poměrně komplikovaná záležitost, jelikož se jedná o malou a polární molekulu.

Možnosti detekce běžně využívají UV-VIS detektor, který bývá v současné době nahrazován hmotnostně spektrometrickým (MS) detektorem.

Úprava vzorku je prováděna off-line, většinou pomocí SPE nebo LLE. Publikované metody se nejčastěji zabývají stanovením patulinu v jablečných džusech a potravinách s obsahem jablečné složky (přesnídávky, marmelády, ovocné šťávy aj.). V následující tabulce bylo shrnuto pouze několik vybraných metod stanovení patulinu v jablečných nápojích.

Tabulka 2: Metody stanovení patulinu

Analyt	Vzorek	Úprava vzorku	Separace	Detekce	Citace
Patulin	Jablečný džus	LLE	UHPLC Kolona Browlee DB AQ C18 (100 x 2,1 mm, 1,9 µm) Izokratická eluce (okyselená voda kyselinou octovou na pH 4 a voda:acetonitril 50:50)	UV-VIS 275 nm	(18)
Patulin	Jablečný džus	SPE (Oasis HLB, cartridge)	HPLC Kolona Biosuite PA-A C18 (250 x 2,1 mm, 3 µm) Gradientová eluce (voda:acetonitril 95:5 a acetonitril) (100:0; 50:50; 0:100)	MS	(11)
Patulin	Jablečný džus	SPE (Oasis HLB, cartridge)	UPLC H-Class Kolona ACQUITY UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm) Gradientová eluce (voda + 0,1% NH ₄ OH a acetonitril + 0,1% NH ₄ OH) (99:1; 10:90; 99:1)	MS	(19)

Analyt	Vzorek	Úprava vzorku	Separace	Detekce	Citace
Patulin	Ovocný džus	LLE	LC-MS Kolona Poroshell EC-C18 (100 x 4,6 mm, 2,7 µm) Izokratická eluce (acetonitril a voda) (40:60)	MS	(20)
Patulin	Jablečný koncentrát	SPE (AccuBoNDII ODS-C18, cartridge) LLE	HPLC Kolona Diamonsil C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) Izokratická eluce (acetonitril a voda) (1:10)	UV-VIS 276 nm	(21)

4.3 Chromatografie

Chromatografie zahrnuje analytické separační metody, které poskytují jak kvalitativní, tak kvantitativní informace o vzorku. Obecným principem chromatografie je separace analyzovaných látek mezi dvěma fázemi, přičemž jedna z fází je pohyblivá – mobilní a druhá nepohyblivá – stacionární. V chromatografii se pohybuje analyzovaná látka spolu s mobilní fází přes stacionární fázi. Molekuly vzorku se na základě rozdílných afinit a interakcí se stacionární fází rozdělují. Molekuly vzorku s vyšší afinitou ke stacionární fází budou systémem procházet pomaleji (na koloně se zadržují) na rozdíl od molekul s nižší afinitou. Takové molekuly procházejí systémem rychleji (na koloně se nezadržují). Z toho vyplývá, že různé sloučeniny od sebe mohou být odseparovány v době, kdy protékají skrz stacionární fázi (22).

Existují různá hlediska dělení chromatografie. Podle charakteru mobilních fází je možné chromatografii rozdělit na plynovou, kde je jako mobilní fáze použit inertní plyn a na kapalinovou chromatografii ve které je mobilní fází kapalina. Další možnosti dělení chromatografie jsou podle:

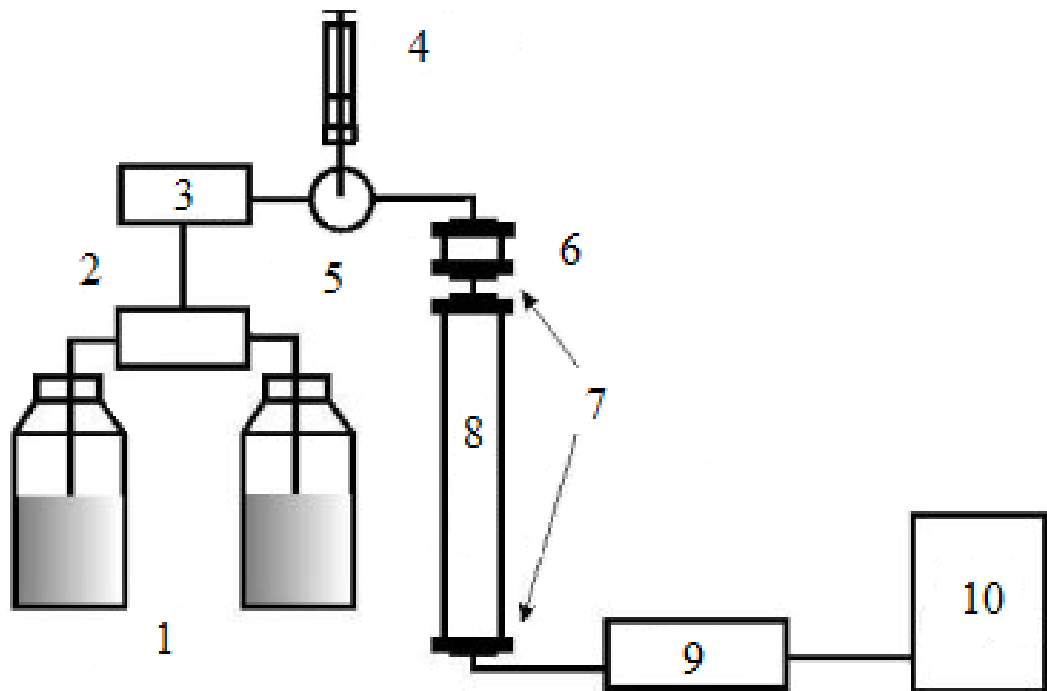
- Způsobu provedení: kolonová (sloupcová), plošná (planární)
- Principu separace: rozdělovací, adsorpční, iontově výměnná, gelová, afinitní
- Pracovního způsobu: eluční (analytická chromatografie), frontální, vytěšňovací
- Účelu: analytická, preparativní (preparační)

4.4 Vysokoučinná kapalinová chromatografie – High performance liquid chromatography (HPLC)

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je běžná metoda používaná k separaci, identifikaci a kvantifikaci různých chemických komponent. HPLC zahrnuje pevnou stacionární fázi, obvykle je obsažena v nerezové koloně, a kapalnou mobilní fázi. Separace složek roztoku vyplývá z rozdílu relativních distribučních poměrů látek mezi oběma fázemi. HPLC je založena na mechanismu adsorpce, rozdílné rozpustnosti, rozdílné velikosti molekul a iontové výměny, v závislosti na typu použité stacionární fáze (23).

Tato metoda má své využití v různých odvětvích jako je například lékařství, forenzní analýza, životní prostředí, výrobní procesy atd. HPLC má řadu výhod v porovnání s jinými technikami. Obecně platné tvrzení je, že HPLC technika je rychlá, automatizovaná a vysoce přesná, což s sebou nese určitá negativa v podobě vyšších nákladů, složitého ovládání a úpravy vzorku (24).

4.4.1 Schéma kapalinového chromatografu



Obrázek 3: Schéma kapalinového chromatografu s předkolonou (25)

- 1) Zásobníky mobilní fáze
- 2) Směšovací komora
- 3) Vysokotlaká bezpulsní pumpa žene mobilní fází systémem.
- 4) Jehla slouží k nasávání daného objemu vzorku.
- 5) Dávkování může být zprostředkováno dávkovací smyčkou nebo automatickým dávkovačem - autosamplerem, kdy je jehlou nasátý vzorek přesně dávkován do proudu mobilní fáze a unášen na kolonu (26).
- 6) Předkolona zajišťuje ochranu analytické kolony před chemickou kontaminací (27).
- 7) Tlumič tlakových pulsů
- 8) Analytická kolona je jednou z nejdůležitějších komponent HPLC systému. Právě tady dochází k separaci jednotlivých složek vzorku. Tyto izolované složky jsou unášeny do detektoru mobilní fáze.

Analytická kolona je tvořena nerezovou nebo skleněnou trubicí o délce 5 – 25 cm a průměru od 2 do 5 mm a je naplněná stacionární fází. Existuje řada typů stacionární fáze:

- Stacionární fáze na bázi silikagelu
- Stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého
- Polymerní stacionární fáze
- Hybridní stacionární fáze
- Stacionární fáze na bázi porézního grafitického karbonu
- Monolitické stacionární fáze
- Stacionární fáze pro HILIC (28)

9) Detektor - hlavními požadavky, které jsou kladeny na HPLC detektor jsou:

- Vysoká citlivost
- Stabilita a reprodukovatelnost odezvy
- Široký lineární dynamický rozsah
- Rychlá odezva
- Minimální objem detekční cely

Typy detektorů (29):

- UV-VIS spektrometrický detektor: principem tohoto typu detekce je měření absorbance při interakci látek s elektromagnetickým zářením. Látky detekovatelné UV-VIS spektrometrickým detektorem absorbují v oblasti od 190-400 nm (UV) a 400-800 nm (VIS). Mezi UV-VIS detektory patří dříve často používaný detektor s fixní vlnovou délkou a dnes používanější detektor s proměnnou vlnovou délkou, skenující UV detektor nebo spektrofotometrický detektor s diodovým polem (DAD).
- Fluorescenční detektor: je využit pro detekci látek se schopností fluorescence, tudíž je vhodným detektorem asi jen pro 10 % organických látek. Vyniká svou citlivostí a selektivitou a nízkým poměrem signálu k šumu.

- Elektrochemické detektory: do této skupiny se řadí detektory například konduktometrické, potenciometrické, amperometrické, coulometrické a detektor polarografický. Společným jmenovatelem těchto detektorů je využití elektrochemických dějů mezi eluentem a elektrodou.
- Refraktometrický detektor: princip detekce je založen na měření rozdílu indexu lomu světla eluentu a analytu; z tohoto důvodu není příliš selektivní a jeho využití v praxi je poměrně omezené.
- Evaporative light scattering detektor (ELSD)
- Charged aerosol detektor (CAD)
- Nano quantity analyte detektor (NQAD)
- Hmotnostně spektrometrické

10) Počítač

4.5 On-line SPE HPLC

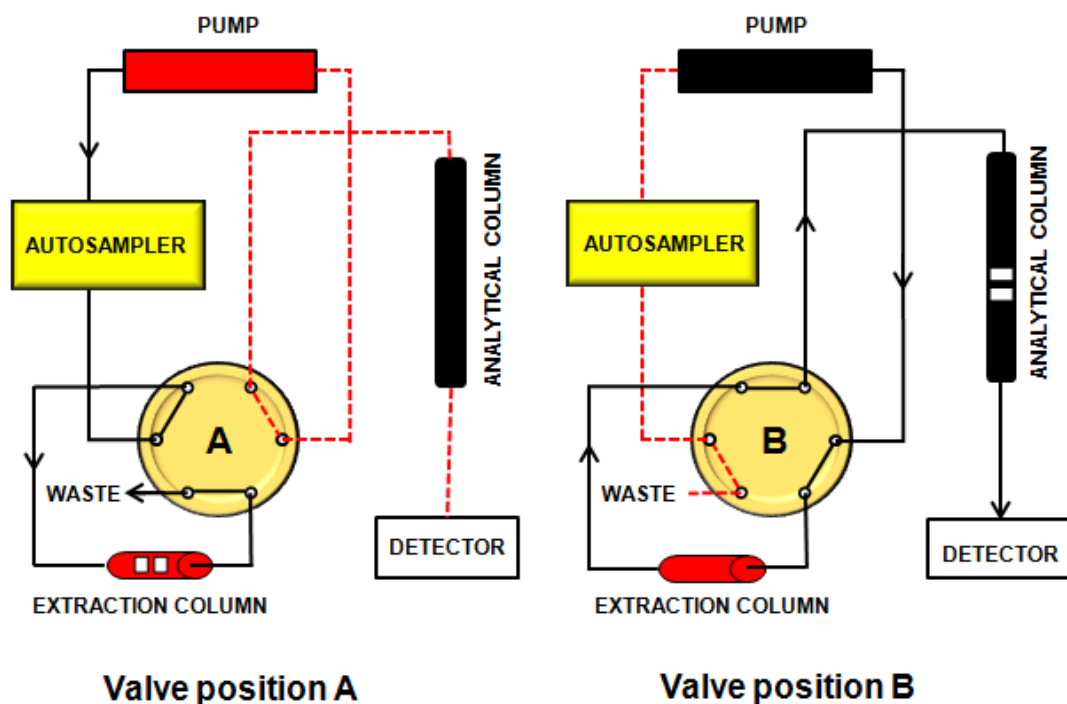
4.5.1 Úprava vzorku

Před samotným stanovením daného analytu je nezbytně nutné provést úpravu vzorku, která zahrnuje izolaci analytu z matrice, jeho zakoncentrování v matrici a přečištění od ostatních balastních látek, které matrice obsahuje. Tímto krokem lze dosáhnout zvýšení selektivity analýzy. Technika, která se využívá při úpravě vzorků, se nazývá extrakce. Extrakce je separační proces, který je založen na různé interakci, adsorbci, rozpustnosti látky v rozdílných rozpouštědlech. Tímto dochází k rozdělení analytu a matrice mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze (30). K úpravě vzorků se nejčastěji používají analytické metody, které využívají extrakci analytů založenou na principu solid-phase extraction (SPE) nebo liquid-liquid extraction (LLE).

LLE – jedna z prvních extrakčních technik. Základem této extrakce je použití dvou nemísitelných kapalin, které umožní distribuci analytu z většinou vodného roztoku vzorku do rozpouštědla nemísitelného s vodou (31).

SPE – nejpoužívanější technika ve všech typech laboratoří. Při použití selektivní techniky extrakce tuhou fází, je vzorek čištěn a zároveň dochází k zakoncentrování analytů. Základem této extrakce je rozdělení vzorku mezi vodnou a tuhou fází na základě distribučního koeficientu (30). V současné době je trendem zjednodušovat a urychlovat úpravu vzorku. Z tohoto důvodu vzniklo spojení on-line SPE s chromatografickými systémy. V tomto případě jde o spojení on-line SPE a HPLC s použitím mechanismu přepínání kolon.

4.5.2 Schéma přepínání kolon



Obrázek 4: Schéma přepínání kolon

Ventil v poloze A: Vzorek je dávkován na extrakční předkolonu (lze dávkovat velmi vysoké objemy). Zde je analyt zachycen na sorbent, je promýván a dochází k jeho zakoncentrování.

Ventil v poloze B: Po přepnutí ventilu jsou zachycené analyty eluovány mobilní fází na analytickou kolonu. Na ní dochází k vlastní separaci. Vzniklý signál je odečítán detektorem (32).

4.5.3 Princip on-line SPE chromatografie

On-line příprava vzorku zahrnuje spojení kolon pomocí přepínacího (vícecestného) ventilu řízeného počítačem (někdy může jít až o několikanásobné spojení).

Existují 3 hlavní přístupy:

1) programování rozpouštědla – v tomto přístupu se nemění ani kolona ani sorbent. Nejprve se pracuje v promývacím módu, kdy je analyt zachycen na extrakční předkoloně a ostatní látky jsou vymyty do odpadu. Následně je zpětným vymytím tento analyt eluován. Po skončení analýzy se musí opět systém ekvilibrovat.

2) přepínání kolon – v tomto přístupu je mobilní fáze stále stejná, avšak mění se kolony. Extrakční předkolona je použita k omezené separaci. Náplň extrakční předklony je zvolena tak, aby se analyt zachytil pouze na krátkou dobu. Po dokončení eluce analytu z extrakční předkolony se přepne tok mobilní fáze tak, aby šel na analytickou kolonu. Na analytické koloně se realizuje vlastní separace.

3) přepínání kolon a programování rozpouštědla – v tomto přístupu analytická kolona pracuje s jinou mobilní fází než extrakční předkolona (33).

Před začátkem celého procesu separace a samotné analýzy musí být autosamplerem nadávkován vzorek. Po nadávkování je vzorek unášen mobilní fází na extrakční předkolonu, kde se analyt zachytává, čistí od matrice a zakoncentrovává. Nežádoucí složky ze směsi jsou vymyty a odtékají do odpadu. Po tomto kroku je vícecestný ventil přepnut do druhé polohy. Látky, které byly zachyceny na sorbentu extrakční předkolony jsou v tomto okamžiku unášeny elučně silnější mobilní fází. Spolu s touto mobilní fází vtéká na analytickou kolonu, kde dochází k vlastní separaci, rozdělení do zón a následně je výsledný signál zachycen detektorem.

4.6 Molekulárně vtištěné polymery – Molecularly Imprinted Polymers – MIPs

Technologie molekulárního vtiskování - Molecular Imprinting Technology (MIT) je nový syntetický přístup jak vytvořit robustní materiály, které rozeznávají molekuly specificky podle jejich struktury. Tyto materiály jsou schopny napodobit přírodní rozpoznávací entity, jako jsou například protilátky a biologické receptory. Klíč k vytvoření syntetických materiálů, které jsou schopny napodobit rozpoznávací procesy v přírodě, pochází z oblasti výzkumu molekulárního vtiskování, které se uskutečnilo v nedávné době. Jedním z hlavních cílů je přijít na způsob tvoření materiálů s rozpoznávací schopností srovnatelnou s přírodním uspořádáním. MIT je považována za všestrannou a slibnou technologii, která by měla být schopná rozpoznat jak molekuly chemické, tak biologické včetně aminokyselin a proteinů (34) (35) (36), nukleotidových derivátů (37), polutantů (38) (39), drog a potravin (40) (41).

MIT je založena na tvorbě komplexu analytu (templátu) s funkčním monomerem. Po procesu polymerace je templát odstraněn z polymeru a následně opouští konkrétní rozpoznávací místo, které je komplementární tvarem, velikostí a chemickou funkcí. Obvykle jsou v polymerní matici přítomny intramolekulární interakce jako například vodíkové vazby, dipól-dipól a iontové interakce mezi molekulami templátu a funkčními skupinami. Tyto funkční skupiny jsou zodpovědné za specifitu rozpoznávacího místa. To znamená, že výsledný polymer rozpozná a selektivně váže pouze molekuly templátu.

Mezi hlavní výhody MIPs patří jejich vysoká selektivita a afinita k cílovým molekulám užitým při imprintačním procesu. Vtištěné polymery, v porovnání s biologickými systémy jako jsou proteiny a nukleové kyseliny, mají vyšší fyzikální robustnost, sílu, rezistenci a lepší schopnost se vyrovnat s teplotou a tlakem. MIPs nereagují s kyselinami, bázemi, ionty kovů a organickými rozpouštědly. K tomu náklady na jejich výrobu jsou nižší a životnost polymerů může být vysoká. Polymery si udrží svou rozpoznávací kapacitu i po několik let, a to i při skladování za pokojové teploty (42).

4.6.1 Využití MIPs

MIPs jsou velmi zajímavým nástrojem, který má využití v různých oblastech, například u separačních procesů, čištění, senzorů a biosenzorů, katalyzátorů a podávání léků.

Molekulárně vtištěná chromatografie je velmi rozsáhle studovanou aplikační oblastí MIPs, protože molekulárně vtištěné polymery jsou vysoce vhodné pro chromatografickou separaci, a to kvůli na míru připravenému sorbentu s předem stanovenou selektivitou. Zvyšující se poptávka po opticky čistých sloučeninách pro chirální separaci zvyšuje uplatnění MIPs. Další důležité uplatnění MIPs je při racemickém rozlišování drog (43) (44). MIPs našly své využití i jako nové selektivní sorbenty při extrakci na pevné fázi (SPE), což umožňuje nejen zakoncentrování a čištění vzorku, ale i selektivní extrakci analytů z komplexních matic.

Nedávno se několika studiím podařilo dokázat, že MIPs mohou sloužit jako syntetické napodobeniny přírodních protilátek a mohou být použity k rozpoznávání složek při analýze imunologických testů. Data získaná při využití MIPs byla úspěšně zkoušena s různými typy detektorů a několik metod dosáhlo úzké integrace snímací platformy s polymerem (45).

Byly vedeny studie, které měly za cíl použít MIPs jako aktivní materiál pro katalýzu některých reakcí. MIPs s katalytickými vlastnostmi mohou být považovány za napodobeniny přírodních enzymů, které lze aplikovat u enzymatických reakcí (46) (47).

Oblastí, která představuje největší výzvy pro MIPs je terapie, především léčebná terapie. Schopnost MIPs vázat bioaktivní molekuly ve specifických podmínkách činí z MIT technologii s obrovským potenciálem při vytváření vhodných lékových forem.

4.6.2 Kritické aspekty

Molekulárně imprintední proces představuje různé výhody, které jsou popsány výše v kapitole 3.5, ale zároveň má tato technologie některé nevýhody.

Vývoj nového MIP systému, vhodného pro konkrétní molekulu templátu, často vyžaduje mnoho práce při jeho syntéze a následně i mnoho testování. Obecně lze říci, že je nutné před nalezením optimálních podmínek provést velké množství pokusů při kterých se mění různé podmínky experimentu. Do vývoje byla nedávno přijata kombinatorní chemie s cílem urychlit optimalizaci MIPs k dosažení kýženého výsledku (48) (49) (50). Kombinatorický přístup rovněž umožňuje najít nejlepší složení MIP prostřednictvím současné syntézy a hodnocení desítek či stovek vtištěných polymerů připravených v malém měřítku (mini-MIPs).

Dalším důležitým kritickým bodem je tvorba MIPs, které jsou kombinovatelné s vodou. Při některých použitích, především v klinice a oblasti životního prostředí (příkladem je mnoho biomolekul, které jsou nerozpustné nebo ztrácí aktivitu v organických rozpouštědlech) je nutné provést vtištění MIPs ve vodném prostředí. Bohužel se navázáním vody do templátu snižuje nebo úplně zruší nekovalentní interakce (elektrostatické interakce, vodíkové vazby a van der Waalsovy síly) mezi templátem a funkčním monomerem. Navzdory tomuto jevu bylo ve vývoji s vodou slučitelných MIPs dosaženo určitých pokroků. Hydrofobní, iontové nebo kovové koordinační interakce se jeví jako velmi slibné, protože zvyšují vazbu templátu a funkčního monomeru i ve vodě. Polymerizovatelné cyklodextriny byly použity jako hydrofóbní část, která je schopna řídit elektrostatické interakce mezi templátem a monomerem při interferencích s vodou (51) nebo minerálními oleji. Cyklodextriny byly přidány po polymerizaci, aby vytvořily hydrofóbní štít, který je schopný ochránit funkční skupiny zodpovědné za molekulární rozpoznávání (52). Existuje několik studií, ve kterých bylo zjištěno, že vtiskávání polymeru do směsi rozpouštědel obsahujících vodu (methanol/voda) má podobné schopnosti jako porogen. Tento přístup je volen v případě, že je templát polární sloučenina nebo není příliš rozpustný v rozpouštědlech, anebo z důvodu použití polárních rozpouštědel, kdy je upřednostňována interakce templátu s monomery (53) (54).

5 Experimentální část

5.1 Materiály a pomůcky

5.1.1 Standardy, chemikálie a vzorky

Patulin, dodavatel Sigma - Aldrich s.r.o. (čistota $\geq 98\%$)

Hydroxymethylfurfural, dodavatel Sigma - Aldrich s.r.o. (čistota $\geq 98\%$)

Acetonitril, CHROMASOLV ® Plus, for HPLC, Sigma - Aldrich s.r.o.

Ethylacetát, CHROMASOLV ® Plus, for HPLC, Sigma - Aldrich s.r.o.

Hydrogenuhlíčan sodný, PENTA (obsah min. 99 %)

Ultračistá voda, čištěná systémem Milli-Q (Millipore)

Vzorky džusu:

Tesco jablečný juice

Hello čerstvá jablečná šťáva

5.2 Přístroje a podmínky separace

Chromatografický systém:

Chromatograf:	Schimadzu 20AD Prominence Liquid Chromatograph
Detektor:	Shimadzu Prominence systém M20A Diode Array Detector
Kolony:	Kinetex Biphenyl 100A, 100 x 4,6 mm, velikost částic 5 µm Kinetex Biphenyl 100A, 150 x 4,6 mm, velikost částic 5 µm Ascentis Express C18 100 x 4,6 mm, velikost částic 5 µm Ascentis Express RP-Amide 100 x 4,6 mm, velikost částic 5 µm YMC triart C18 100 x 2 mm, velikost částic 3 µm
Testované SPE předkolony:	MEPS C18 HS (Thermo Scientific, MEPS Products) Phenomenex Onyx monolithic C18 25 x 4,6 mm Sigma - Aldrich Supel MIP Patulin 20 x 1 mm Sigma - Aldrich Supel MIP Patulin 25 x 3 mm
Dávkování:	50 µl
Detekce:	276 nm
Mobilní fáze:	ethylacetát 20 % v acetonitrilu voda
Průtok:	1,0 ml/min
SPE promývací fáze:	1% roztok NaHCO ₃
Průtok:	0,75 ml/min
Vyhodnocení:	chromatografický software LC Solution

Filtrační zařízení na mobilní fáze:

Millipore, filtr ze skleněných vláken o velikosti pórů 0,45 μm

Analytické váhy:

Sartorius 2004 MP, SRN

5.3 Příprava roztoků standardů patulinu a hydroxymethylfurfuralu

5.3.1 Příprava zásobních roztoků

Navážky 1,00 mg patulinu (PAT) a 5,02 mg hydroxymethylfurfuralu (HMF) byly rozpuštěny v 1 ml metanolu. Takto byl připraven 1 ml roztoku patulinu a 1 ml hydroxymethylfurfuralu k další práci.

5.3.2 Příprava pracovních roztoků pro optimalizaci metody

K přípravě pracovního roztoku byl použit zásobní roztok, který byl zředěn 50krát a to v poměru 1 ml zásobního roztoku patulinu a 1 ml zásobního roztoku hydroxymethylfurfuralu s 50 ml vody. Takto byl připraven směsný pracovní roztok standardů pro optimalizaci metody o koncentraci patulinu 20 mg/l a hydroxymethylfurfuralu 100 mg/l.

5.3.3 Příprava pracovních roztoků pro kalibraci

Pracovní roztok standardu patulinu byl vytvořen zředěním zásobního roztoku patulinu (o koncentraci 1000 mg/l) s vodou, a to přidáním 950 μl vody k 50 μl zásobního roztoku patulinu. Tímto vznikl pracovní roztok o koncentraci 50 mg/l (resp. 50 000 $\mu\text{g/l}$), který byl dále ředěn do jednotlivých koncentrací pro kalibrační řadu. Stejným způsobem byly připraveny roztoky pro matricovou kalibraci, kde místo vody byl použit k ředění zásobního a pracovních roztoků standardů vzorek jablečného džusu.

Tabulka 3: Příprava pracovních roztoků ke kalibraci

	c PAT (µg/l)	Objem pracovního roztoku patulinu (µl)	Objem vody/džusu
1.	50	1	999
2.	100	2	998
3.	250	5	995
4.	500	10	990
5.	750	15	985
6.	1000	20	980
7.	2500	50	950
8.	5000	100	900

5.3.4 Příprava roztoků jablečných džusů pro vývoj a validaci metody

Vzorky džusů byly odebrány přímo z obalu, přefiltrovány přes filtr Millipore 0,45 µm do kádinky o objemu 25 ml a z ní dále ředěny či dávkovány do vialek.

Veškeré vzorky, standardy a roztoky standardů byly uchovávány v lednici.

5.3.5 Příprava mobilních fází pro on-line SPE-HPLC

Pro chromatografickou analýzu byly využity všechny tři pumpy tohoto přístroje.

Pumpa A: namíchaná organická složka mobilní fáze: ethylacetát 20 % v acetonitrilu (100 ml ethylacetátu + 400 ml acetonitrilu)

Pumpa B: voda

Pumpa C: připravený roztok promývací fáze 1% NaHCO₃ (10 g NaHCO₃ je rozpuštěn v 1 l superčisté vody a následně vakuově přefiltrován na filtru ze skelných vláken velikosti 0,45 µm)

6 Vývoj metody

6.1 Optimalizace chromatografických podmínek pro separaci patulinu a HMF

V první fázi vývoje metody bylo v rámci diplomové práce nutné optimalizovat separaci patulinu (PAT) od hydroxymethylfurfuralu (HMF). Tento požadavek vychází z předchozích publikovaných prací, kde je zřejmé, že při stanovení patulinu působí HMF jako nejčastěji interferující složka při separaci, jak při chromatografických, tak i elektroforetických stanoveních a to díky strukturální podobnosti a několikanásobně větší koncentraci HMF v matrici jablečných džusů. Z těchto důvodů byla pro optimalizaci separace připravena koncentrace HMF pětikrát vyšší než patulinu.

Při hledání vhodných chromatografických podmínek se především dbalo na schopnost chromatografické kolony co nejlépe separovat HMF a patulin ve směsi standardu. Dalším sledovaným parametrem byla co nejužší šířka píku patulinu, respektive jeho co nejvyšší odezva na detektoru z hlediska citlivosti stanovení. Nejlepší separace bylo dosaženo výběrem vhodné kolony, mobilní fáze a gradientové eluce. Během analýzy byl prováděn nástřik 50 μ l pracovního roztoku vzorku při průtoku kolonou 1 ml/min. Separace na všech kolonách byla prováděna za laboratorní teploty a testované podmínky separací jsou zdokumentovány vloženými chromatogramy.

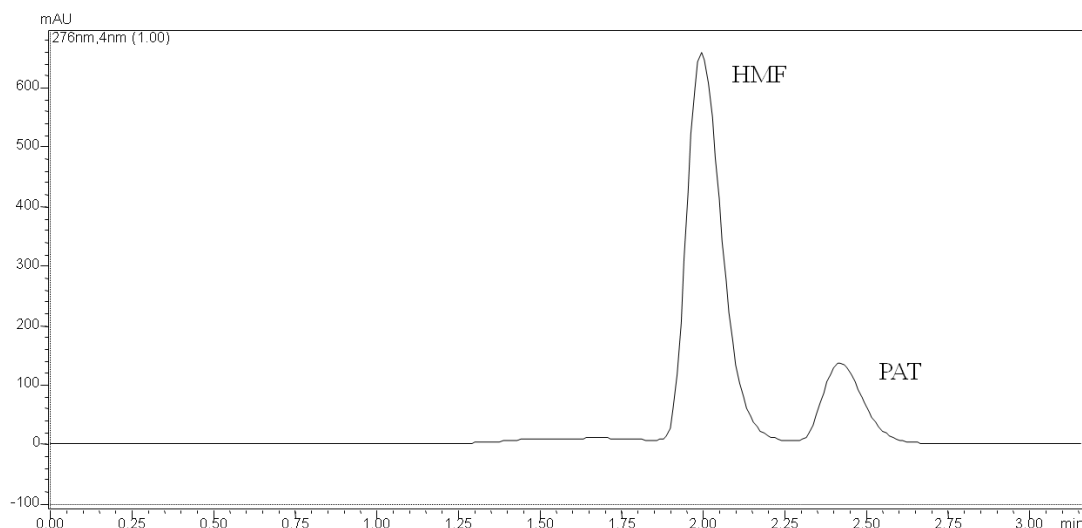
6.2 Výběr analytické kolony

K optimalizaci separace bylo vyzkoušeno několik druhů chromatografických kolon. V závislosti na schopnosti separace hledaných analytů v adekvátním čase bylo pro další on-line SPE-HPLC analýzu možné použít jen čtyři. Z těchto čtyř byla následně vybrána jedna s nejlepšími separačními schopnostmi. Na zvolené kolony byl proveden nástřik 10 a 50 μ l vzorku. Optimalizace probíhala za laboratorní teploty bez on-line SPE kroku.

6.2.1 Přehled testovaných kolon a podmínek separace

Kolona YMC triart 100 x 2 mm, velikost částic 3 μm

Parametry separace: průtok 1,0 ml/min; mobilní fáze acn:voda v poměru 20:80; teplota laboratorní, tlak 8 MPa

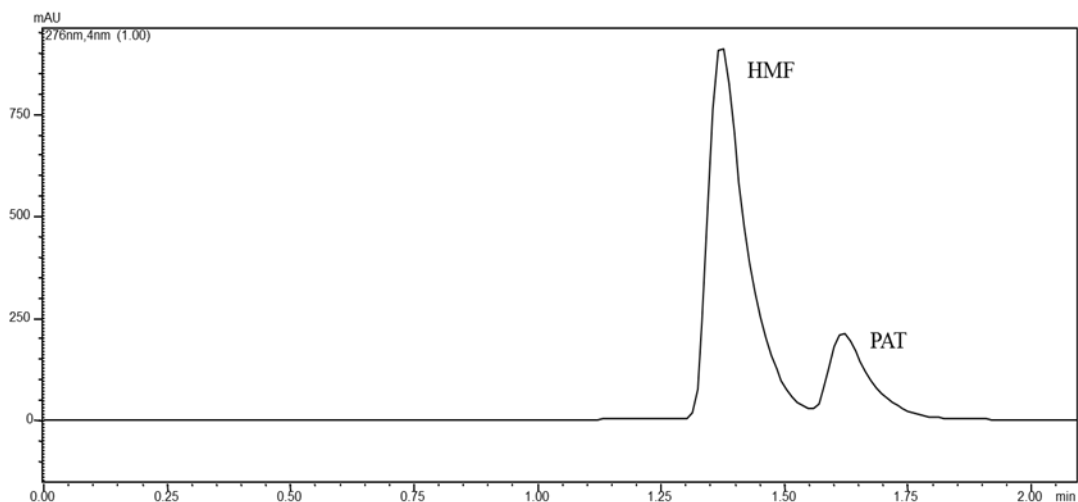


Graf 1: Záznam separace za podmínek mobilní fáze acn:voda v poměru 20:80

Na této koloně bylo testováno složení mobilní fáze, a to v poměru 10:90, 15:85 a 20:80. Nejlepšího výsledku separace bylo dosaženo použitím mobilní fáze o složení acn:voda v poměru 20:80. Látky jsou od sebe dostatečně odseparovány, ale pík patulinu není dostatečně úzký.

Ascentis Express RP-Amide 100 x 4,6 mm, velikost částic 5 μm

Parametry separace: průtok 1,0 ml/min; mobilní fáze acn:voda v poměru 10:90; teplota laboratorní; tlak 5,4 MPa

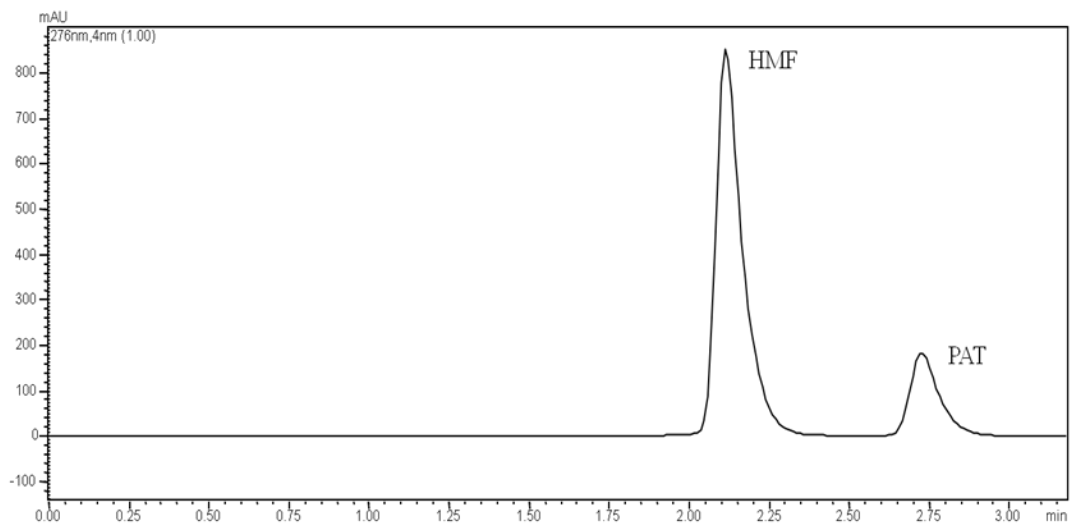


Graf 2: Záznam separace za podmínek mobilní fáze acn:voda v poměru 10:90

V případě této kolony byl také hledán správný poměr mobilní fáze. Nejlepší separace bylo dosaženo při použití mobilní fáze o složení acn:voda v poměru 10:90. Při tomto složení mobilní fáze došlo k úplné separaci píku standardu PAT od píku standardu HMF. Oba píky jsou relativně úzké s vysokou odezvou, avšak částečně chvostují.

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

Parametry separace: průtok 1,0 ml/min; mobilní fáze acn:voda v poměru 10:90; teplota laboratorní; tlak 5,5 MPa

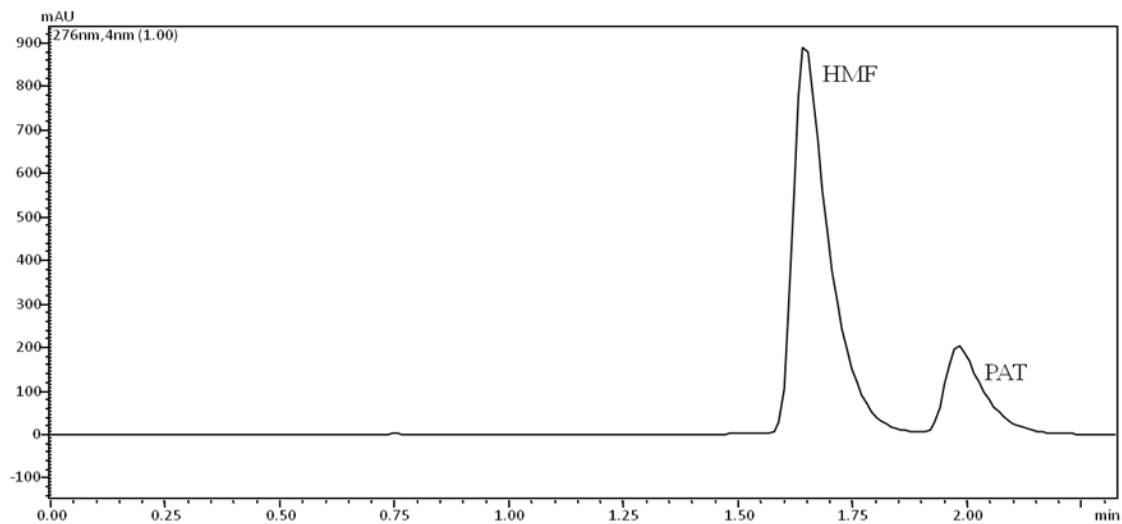


Graf 3: Záznam separace za podmínek mobilní fáze acn:voda v poměru 10:90

Nejlepší volbou pro separaci byla tato kolona Kinetex Biphenyl 100 x 4,6 mm, na které se píky analytů zdají být jak dostatečně vysoké, tak i úzké bez výraznějšího chvostování.

Ascentis Express C18 100 x 4,6 mm, velikost částic 5 μ m

Parametry separace: průtok 1,0 ml/min; mobilní fáze acn:voda v poměru 10:90; teplota laboratorní; tlak 5,5 MPa



Graf 4: Záznam separace za podmínek mobilní fáze acn:voda v poměru 10:90

Na analytické koloně naplněné sorbentem C18 došlo k separaci analytů, ovšem píky částečně chvostují a z toho důvodu byla kolona pro další analýzy vyloučena.

6.3 Optimalizace on-line SPE – výběr sorbentu

Během kroku optimalizace on-line SPE bylo vyzkoušeno několik druhů extrakčních předkOLON a promývacích mobilních fází. Každá z extrakčních předkOLON byla testována, zda její retenční schopnosti budou vhodné pro extrakci hledaných analytů, zejména patulinu. Extrakční předklony byly zapojovány přímo do systému s analytickou kolonou pomocí šesticestného přepínacího ventilu, jehož schéma je uvedeno níže. Nejprve byla do systému zapojena jako extrakční předkolona MEPS C18 obsahující velmi malé množství sorbentu. Na této předkoloně sice docházelo k zadržení analytů, ale s velmi nízkou odezvou pro patulin. Dalším testováním změnou dávkovaných objemů na kolonku bylo zjištěno že patulin se ze sorbentu postupně vymývá již při dávkování menších objemů (nad 50 μ l) a jeho retenci není možné zvýšit ani změnou promývací fáze na čistou vodu. Nízká retence patulinu byla pravděpodobně způsobena malou extrakční kapacitou či malým množstvím sorbentu v předkoloně a tím, že se jedná o poměrně polární molekulu. Z těchto důvodů byla tedy dále vyzkoušena jako SPE kolona klasická monolitní kolona C18, jak krátká tak i delší s větším obsahem sorbentu s reverzní fází. Byla testována monolitní předkolona o rozměrech 10 x 4,6 mm a monolitní kolona 25 x 4,6 mm. Ani u testování těchto extrakčních předkOLON nebylo dosaženo vyhovující retence patulinu při dávkování větších objemů vzorku. Vodná promývací fáze vymývala hledané analyty už při dávkovaném objemu 50 μ l vzorku. Navíc bylo zjištěno, že extrakční kapacita krátké monolitní 10 mm předkolony je paradoxně nižší než u MEPS sorbentu. Z těchto důvodů byl hledán jiný sorbent pro extrakci než je klasická reverzní fáze C18, s důrazem na vyšší retenci a selektivitu při extrakci. Zapojením kolony naplněné Supel MIP Patulin sorbentem došlo k zadržení analytu a na analytické koloně k následnému dělení píků interferujících látek matrice (zejména HMF) a patulinu. Tímto specifickým sorbentem byly naplněny kovové předkolony o dvou různých rozměrech. První kovová předkolona o rozměrech 20 mm délky a 1 mm šířky byla přeplněna z komerční plastové cartridge se 100 mg Supel MIP Patulin SPE sorbentem. Druhá kovová předkolona o délce 25 mm a šířce 3 mm byla rovněž přeplněna z komerční plastové cartridge se 100 mg Supel MIP Patulin sorbentem. Výsledné množství Supel MIP Patulin sorbentu v první, kratší předkoloně, bylo asi 10 mg a ve druhé, delší předkoloně bylo cca 77 mg. Přibližný obsah sorbentu byl zjištěn diferenčním vážením sorbentu zbylého po přeplnění. Pro analýzu byla

zvolena delší předkolona z toho důvodu, že se na ní patulin poměrně dobře zadržoval a bylo možné jej v rámci možností oddělit od balastu matrice. Předklony byly promývány různými roztoky od superčisté vody, přes 0,2 M pufr (kyselina octová + NH₃), 0,1 M pufr (kyselina octová + NH₃), 1% roztokem kyseliny octové a 1% roztokem NaHCO₃. Jako nejvhodnější promývací fáze byl zvolen 1% roztok NaHCO₃, při kterém se analyt na delší předkoloně v celku uspokojivě zadržoval. K vymývání analytu z kolony docházelo až ve 3 minutě promývání, tudíž čas přepnutí ventilu byl zvolen na 2,5 minutu. Dalším optimalizačním krokem byl test se zvyšujícím se zastoupením organické složky v mobilní fázi, dokud nebyly analyty vymyty. Pokusy bylo zjištěno, že nejlepší eluce dosahuje analyt s 20 % ethylacetátu v acetonitrilu a tato koncentrace je tedy stanovena jako hraniční. Při vyšší i nižší koncentraci ethylacetátu dochází ke značnému zhoršení symetrie píku při eluci a následné separaci na analytické koloně.

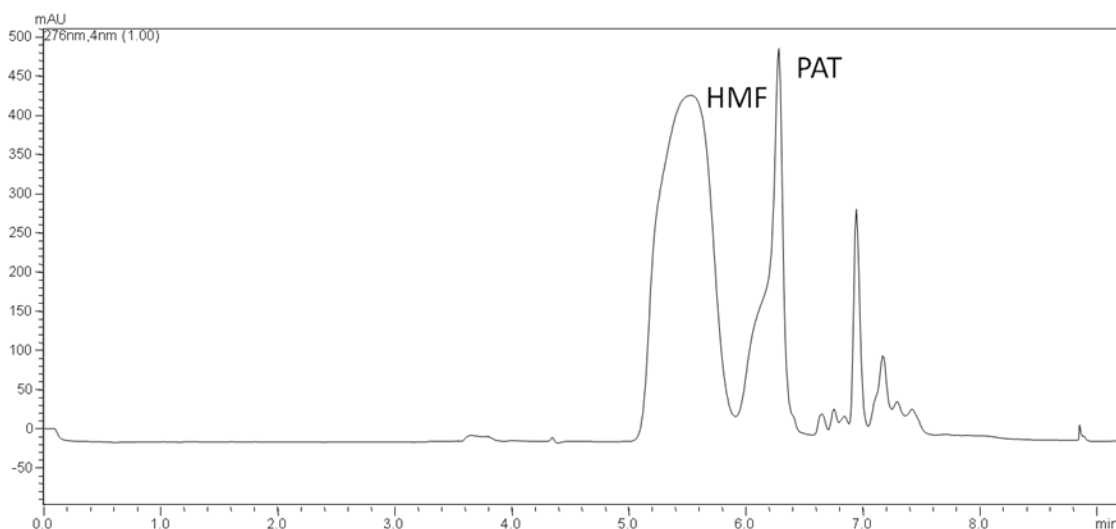
6.4 Volba promývací fáze pro SPE sorbenty

Z počátku byl použit jako promývací roztok methanolu s vodou v různých koncentracích (1%, 2,5%, 5%, 7%). Dále byla testována jak voda, tak roztoky kyseliny octové o pH=2,7 a roztoky pufrů (1% kyselina octová + NH₃, pH=7; 0,2% kyselina octová + NH₃, pH=7). Tyto různé druhy promývací fáze byly zkoušeny zejména pro sorbenty s reverzní fází, tzn. MEPS C18 a monolitické předkolony C18, a také pro extrakční předkolonou Supel MIP současně ve spojení s analytickou kolonou Kinetex Biphenyl 100 x 4,6 mm, která byla použita pro separaci. Jednalo se o poměrně značné množství experimentů a on-line SPE analýz, které vykazovaly pouze negativní výsledky z hlediska retence patulinu či dostatečného odstranění interferujících složek matrice. Vzhledem k rozsahu diplomové práce a negativním výsledkům těchto experimentů, nejsou tyto dále obrázkově dokumentovány. V následujících experimentech bylo zjištěno, že pro analýzu bude nejvhodnější zapojení extrakční předkolony naplněné Supel MIP Patulin sorbentem. Jak bylo zjištěno z návodu na použití, tento sorbent má zvláštní požadavky na „úpravu“. Extrakční předkolona s tímto sorbentem měla být promývána mimo jiné i 1% roztokem NaHCO₃. Použitím 1% roztoku NaHCO₃ došlo k výraznému pokroku v odstranění balastní matrice a v separaci, a to v podobě užších a od sebe lépe odseparovaných píků matrice a analytu.

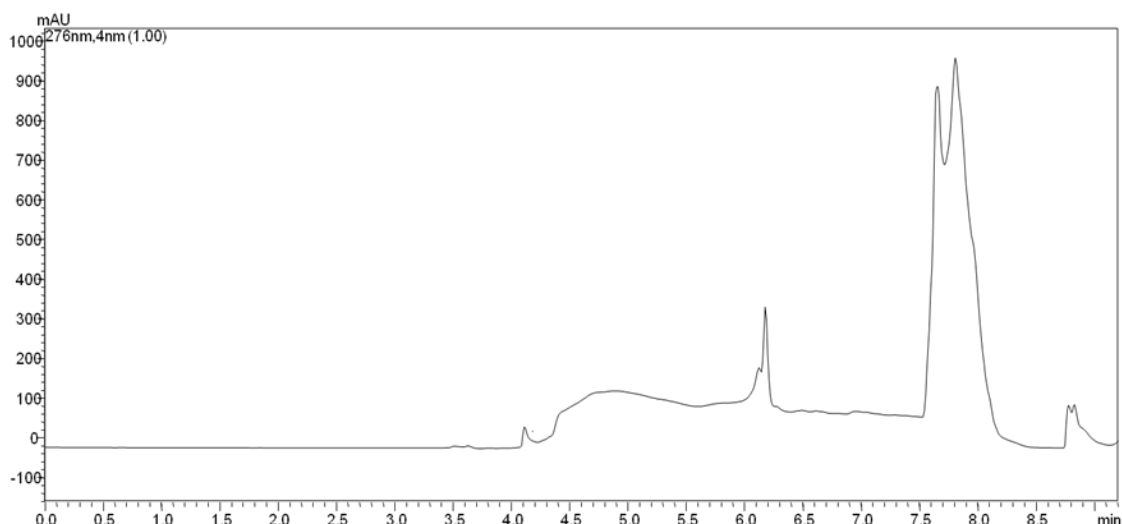
6.5 Volba mobilní fáze pro separaci

Z počátku byla snaha separaci provést za podmínek izokratické eluce, kdy byl testován vhodný poměr organické a vodné mobilní fáze. Tento poměr byl dále využit jako základ gradientové eluce. Gradientovou elucí bylo dosaženo zrychlení analýzy a také byla zvýšena separační účinnost kolony a píky hledaných analytů se staly ostřejšími a lépe separovanými od matrice. Mykotoxin patulin je poměrně hydrofilní látka. Proto je z počátku předkolona promývána mobilní fází s vysokým podílem vodné fáze. Tento podíl v 2,5 minutě klesá ve prospěch organické složky a tím je dosaženo vymytí analytu z extrakční předkolony.

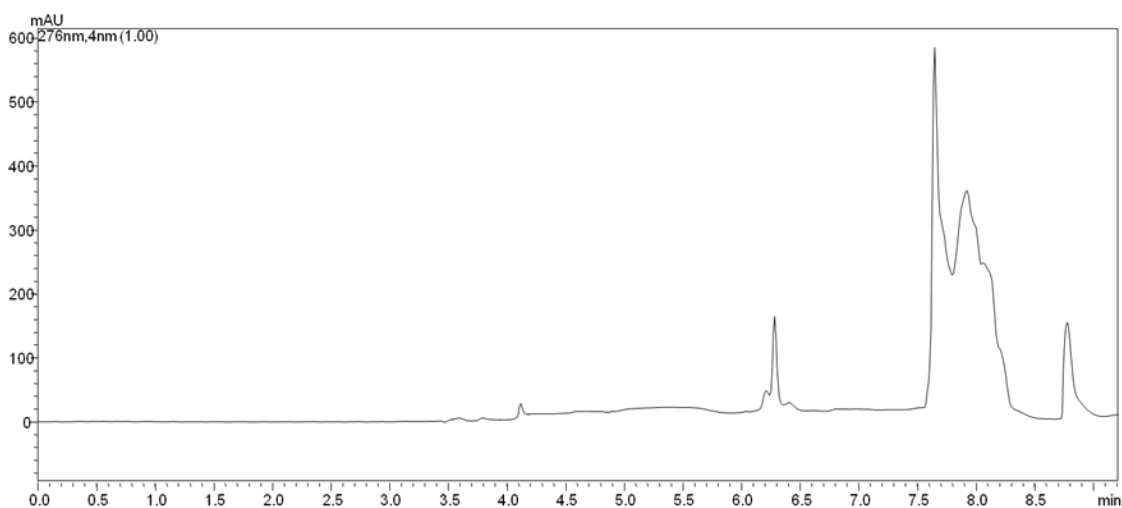
Vodná složka mobilní fáze byla pro separaci patulinu a HMF ponechána v základním stavu bez přidavku pufrů, jelikož experimenty s přidáním kyseliny nebo pufru se ukázaly jako nevhodné pro separaci mykotoxinu od balastních látek viz. graf 6 a graf 7. Na těchto záznamech je vidět, že retenční čas interferujícího píku z matrice džusu se téměř nemění.



Graf 5: Záznam separace standardu HMF a PAT; kolona Kinetex Biphenyl 150 x 4,6 mm, velikost částic 5 μm , předkolona kovová o rozměrech 25 x 3 mm naplněna Supel MIP Patulin sorbentem; mobilní fáze v pumpě A: ethylacetát 20 % v acn a v pumpě B: voda, promývací fáze v pumpě C: 1% NaHCO₃; promývání 2,0 ml/min

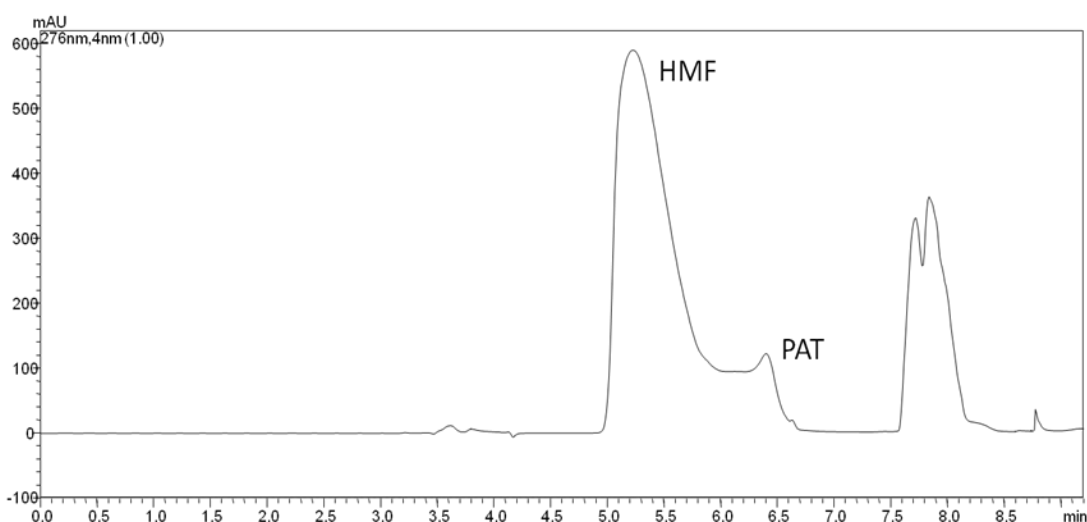


Graf 6: Záznam separace Hello čerstvá jablečná šťáva; kolona Kinetex Biphenyl 150 x 4,6 mm, velikost částic 5 μm , předkolona kovová o rozměrech 25 x 3 mm naplněna Supel MIP Patulin sorbentem; mobilní fáze v pumpě A: ethylacetát 20 % v acn a v pumpě B: kyselina octová pH=2,7; promývací fáze v pumpě C: 1% NaHCO_3 ; promývání 2 ml/min

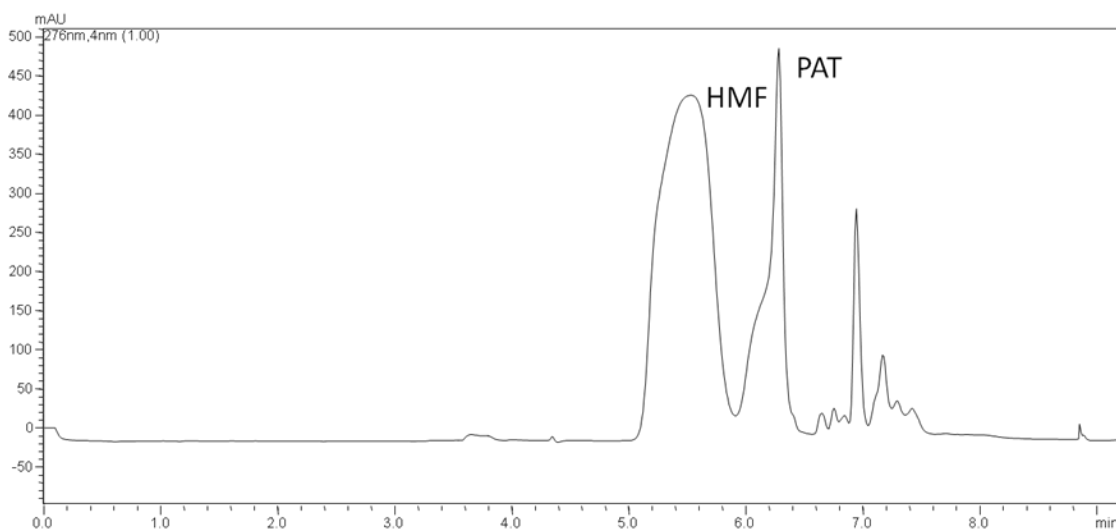


Graf 7: Záznam separace Hello čerstvá jablečná šťáva; kolona Kinetex Biphenyl 150 x 4,6 mm, velikost částic 5 μm , předkolona kovová o rozměrech 25 x 3 mm naplněna Supel MIP Patulin sorbentem; mobilní fáze v pumpě A: ethylacetát 20 % v acn a v pumpě B: pufr: 0,2% kyselina octová + NH_3 pH=7; promývací fáze v pumpě C: 1% NaHCO_3 ; promývání 2 ml/min

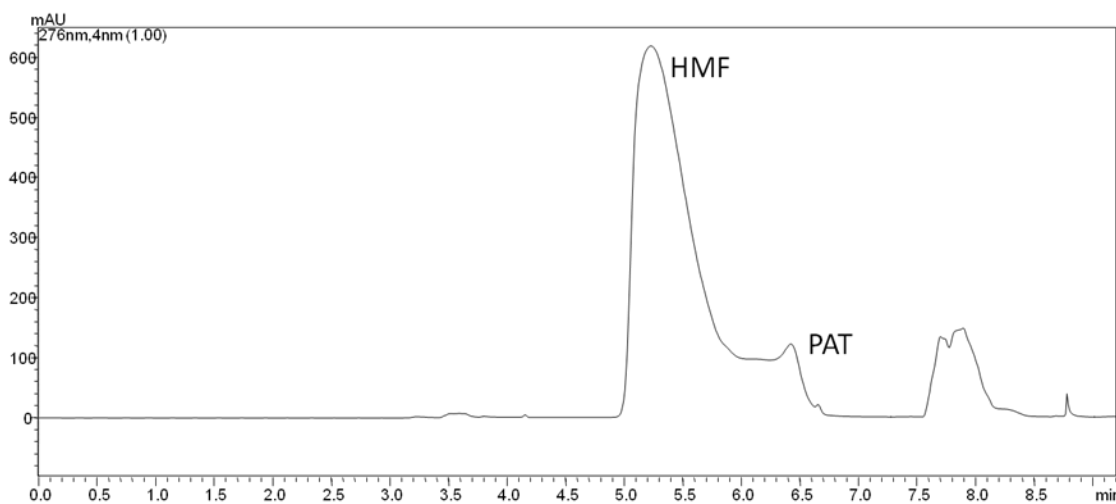
Organická složka mobilní fáze při separaci byla volena na základě hydrofilních vlastností mykotoxinu patulinu a požadavku pro eluci z SPE-MIP sorbentu. Při optimalizaci bylo použito těchto organických rozpouštědel: acetonitril a ethylacetát. Byly provedeny experimenty s různým procentuálním zastoupením ethylacetátu v acetonitrilu, a to od 10% do 30%. Nejvhodnější koncentrací pro analýzu je 20% ethylacetátu v acetonitrilu. Vhodnou kombinací těchto dvou rozpouštědel bylo dosaženo nejlepší eluce z hlediska symetrie a výšky píku patulinu. Další experimenty směřovaly k úpravě poměru ethylacetát:acetonitril – voda během gradientové eluce. Měření bylo prováděno na analytické koloně Kinetex Biphenyl 150 x 4,6 mm.



Graf 8: Záznam separace standardu HMF a PAT; kolona Kinetex Biphenyl 100 x 4,6 mm, velikost částic 5 μ m, předkolona: kovová předkolona o rozměrech 25 x 3 mm naplněna Supel MIP Patulin sorbentem; mobilní fáze v pumpě A: ethylacetát 10 % v acn a v pumpě B: voda, promývací fáze v pumpě C: 1% NaHCO₃; promývání 2 ml/min



Graf 9: Záznam separace standardu HMF a PAT; kolona Kinetex Biphenyl 100 x 4,6 mm, velikost částic 5 μm , předkolona: kovová předkolona o rozměrech 25 x 3 mm naplněna Supel MIP Patulin sorbentem; mobilní fáze v pumpě A: **ethylacetát 20 %** v acn a v pumpě B: voda, promývací fáze v pumpě C: 1% NaHCO₃; promývání 2 ml/min



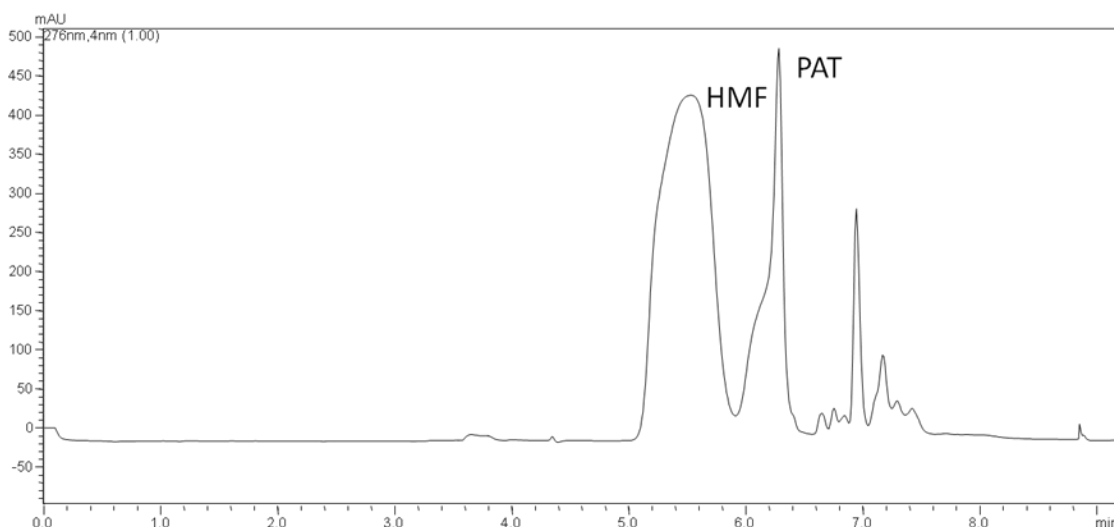
Graf 10: Záznam separace standardu HMF a PAT; kolona Kinetex Biphenyl 100 x 4,6 mm, velikost částic 5 μm , předkolona: kovová předkolona o rozměrech 25 x 3 mm naplněna Supel MIP Patulin sorbentem; mobilní fáze v pumpě A: **ethylacetát 30 %** v acn a v pumpě B: voda, promývací fáze v pumpě C: 1% NaHCO₃; promývání 2 ml/min

6.6 Optimalizace gradientové eluce při on-line SPE extrakci

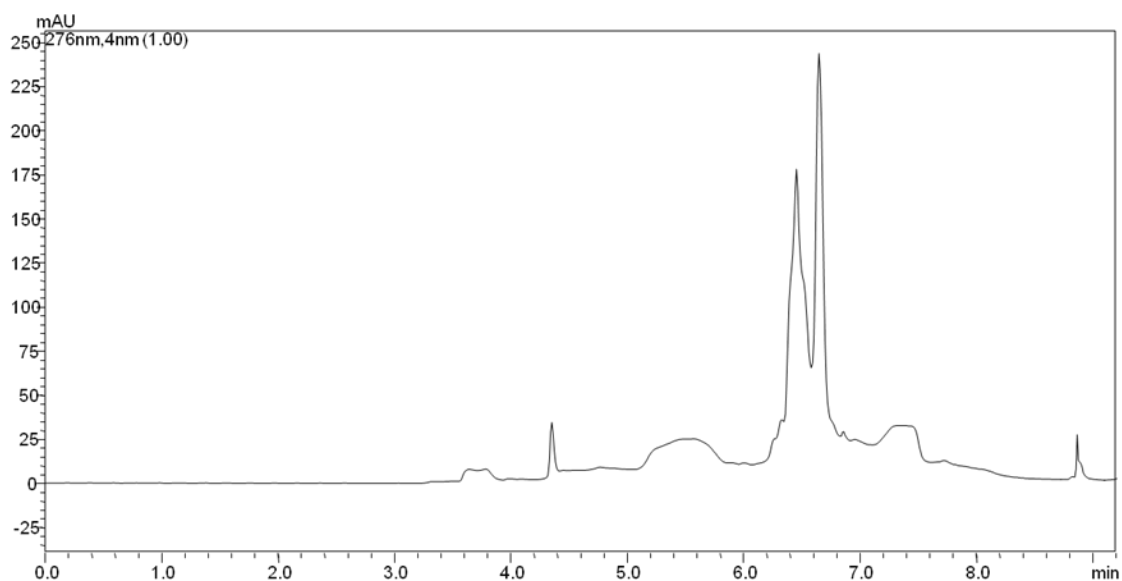
Na počátku testování gradientu bylo nastavení mísení mobilních fází z pumpy A (ethylacetát 20 % v acetonitrilu) a pumpy B (voda) v poměru 20:80. Jako promývací fáze byl použit 1% roztok NaHCO₃. Každý z gradientů byl testován při přepnutí ventilu ve 2,5 minutě po nástřiku vzorku na extrakční kolonu naplněnou Supel MIP Patulin sorbentem. Po několika nástřicích bylo zjevné, že je třeba upravit poměr mísení organické a vodné fáze, jež byl zvolen na počátku. Dalšími zkouškami v úpravě poměrů organické a vodné fáze, bylo dosaženo optimálních podmínek gradientu. Za těchto optimálních podmínek analytickou kolonou Kinetex Biphenyl 100 x 4,6 mm, s velikostí částic 5 µm, protékala mobilní fáze o koncentraci od 5 % organické fáze až po 100% zastoupení této fáze. Nejvhodnějším gradientem pro analýzu byl z cca 30 různých typů gradientů (s různým obsahem a poměrem organické složky na počátku eluce) zvolen gradient 3. Společným jmenovatelem všech zde zmiňovaných gradientů je kromě jiného i poslední změna koncentrací mobilní fáze, kdy oběma kolonami protékala až 99% organická fáze. Důvodem zařazení toho kroku do všech gradientů bylo to, že předkolonu naplněnou Supel MIP Patulin sorbentem bylo nutno před každou další analýzou kondicionovat. V opačném případě pak nedocházelo k požadované extrakci při dalším on-line SPE kroku. To se projevilo nedostatečnou retencí a zhoršenou symetrií píku patulinu. Pro ukázkou jsou níže uvedeny podmínky několika testovaných gradientů společně se záznamy chromatografické separace standardů a srovnání se záznamem blanku jablečného džusu.

Tabulka 4: Popis podmínek gradientu 1

Gradient 1		Složení mobilní fáze	
Čas přepnutí ventilu (2,5min)	Vodná fáze (%)	Organická fáze (%)	
2.51	95	5	
6,51	85	15	
6.61	0	100	
7.60	0	100	
7.70	95	5	
7.70 – 8.70	95	5	



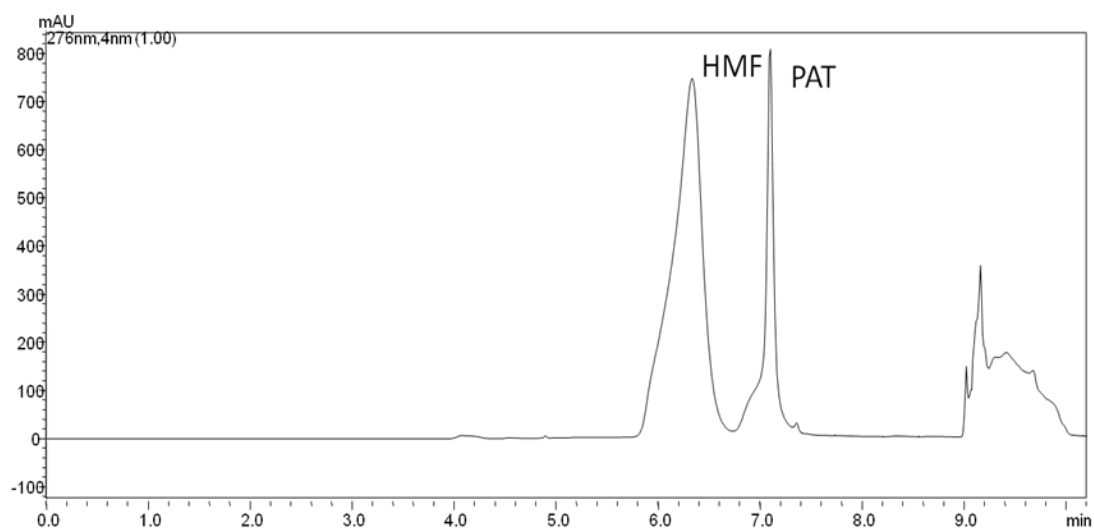
Graf 11: Záznam separace **standardu HMF a PAT**; kolona Kinetex Biphenyl 100 x 4,6 mm, velikost částic 5 μm , předkolona: kovová předkolona o rozměrech 25 x 3 mm naplněna Supel MIP Patulin sorbentem; mobilní fáze v pumpě A: ethylacetát 20 % v acn a v pumpě B: voda, promývací fáze v pumpě C: 1% NaHCO_3 ; promývání 2 ml/min



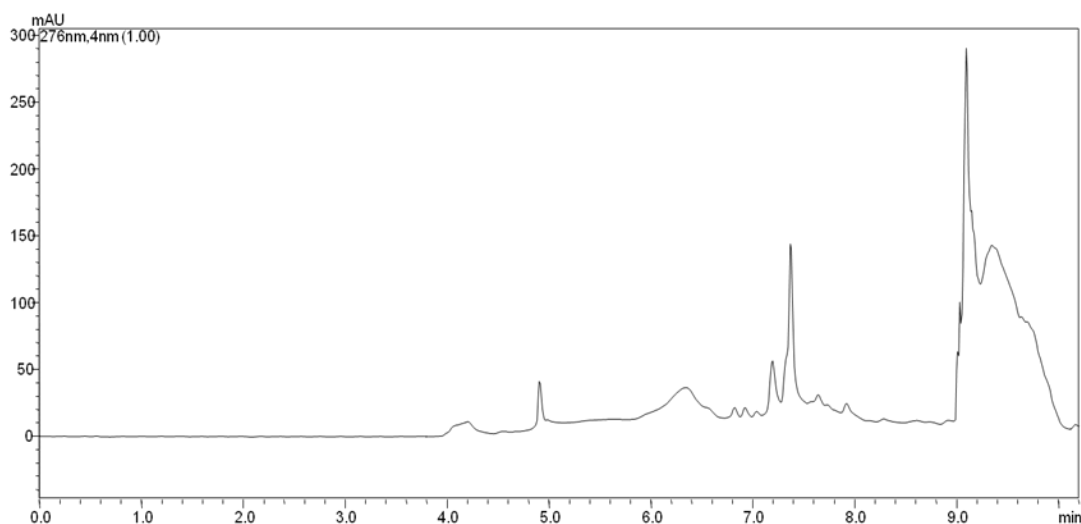
Graf 12: Záznam separace **Hello čerstvá jablečná šťáva**; kolona Kinetex Biphenyl 100 x 4,6 mm, velikost částic 5 μm , předkolona: kovová předkolona o rozměrech 25 x 3 mm naplněna Supel MIP Patulin sorbentem; mobilní fáze v pumpě A: ethylacetát 20 % v acn a v pumpě B: voda, promývací fáze v pumpě C: 1% NaHCO_3 ; promývání 2 ml/min

Tabulka 5: Popis podmínek gradientu 2

Gradient 2	Složení mobilní fáze	
	Vodná fáze (%)	Organická fáze (%)
Čas přepnutí ventilu (2,5min)		
2.51	95	5
5.51	80	20
7.51	80	20
7.60	0	100
8.60	0	100
8.70	95	5



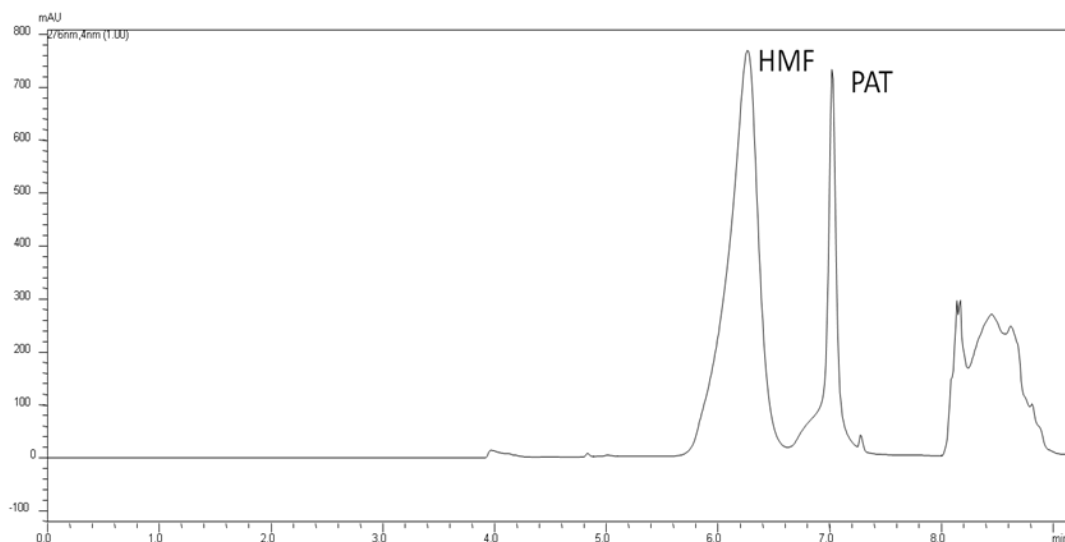
Graf 13: Záznam separace **standardu HMF a PAT**; kolona Kinetex Biphenyl 150 x 4,6 mm, velikost částic 5 μm , předkolona kovová o rozměrech 25 x 3 mm naplněna Supel MIP Patulin sorbentem; mobilní fáze v pumpě A: ethylacetát 20 % v acn a v pumpě B: voda, promývací fáze v pumpě C: 1% NaHCO_3 ; promývání 2 ml/min



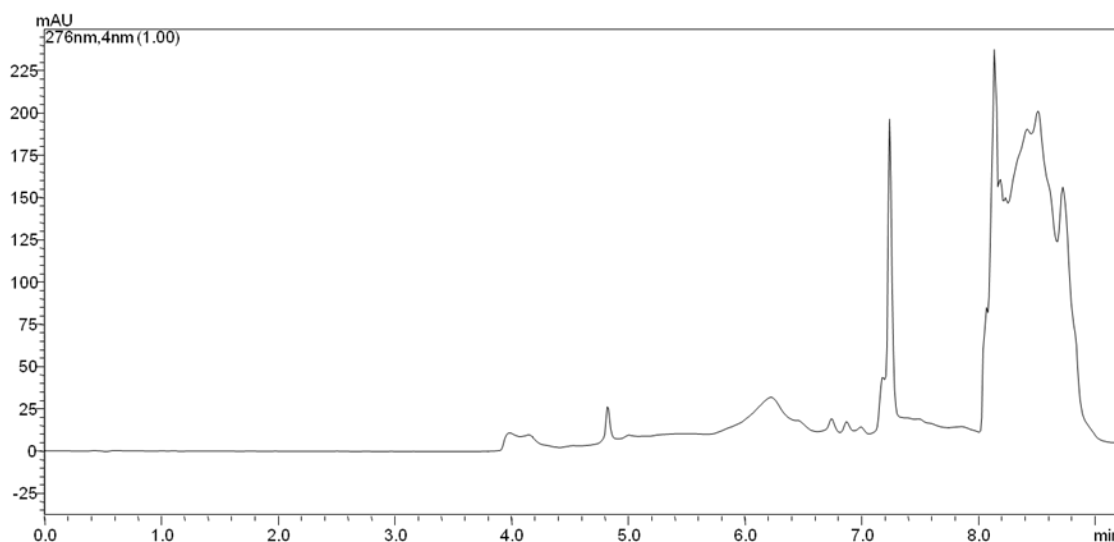
Graf 14: Záznam separace **Hello čerstvá jablečná šťáva**; kolona Kinetex Biphenyl 150 x 4,6 mm, velikost částic 5 μm , předkolona kovová o rozměrech 25 x 3 mm naplněna Supel MIP Patulin sorbentem; mobilní fáze v pumpě A: ethylacetát 20 % v acn a v pumpě B: voda, promývací fáze v pumpě C: 1%NaHCO₃; promývání 2 ml/min

Tabulka 6: Popis podmínek gradientu 3

Gradient 3	Složení mobilní fáze	
	Vodná fáze (%)	Organická fáze (%)
Čas přepnutí ventilu (2,5min)		
2.51	95	5
4.51	85	15
6.51	85	15
6.60	0	100
7.60	0	100
7.70	95	5
7.70 – 8.70	95	5



Graf 15: Záznam separace **standardu HMF a PAT**; kolona Kinetex Biphenyl 150 x 4,6 mm, velikost částic 5 μm , předkolona kovová o rozměrech 25 x 3 mm naplněna Supel MIP Patulin sorbentem; mobilní fáze v pumpě A: ethylacetát 20 % v acn a v pumpě B: voda, promývací fáze v pumpě C: 1% NaHCO_3 ; promývání 2 ml/min



Graf 16: Záznam separace **Hello čerstvá jablečná šťáva**; kolona Kinetex Biphenyl 150 x 4,6 mm, velikost částic 5 μm , předkolona kovová o rozměrech 25 x 3 mm naplněna Supel MIP Patulin sorbentem; mobilní fáze v pumpě A: ethylacetát 20 % v acn a v pumpě B: voda, promývací fáze v pumpě C: 1% NaHCO_3 ; promývání 2 ml/min

Jak je zřejmé z předchozích dvou chromatogramů analyzovaných standardů a matrice džusu za podmínek gradientu 3, lze konstatovat, že pík patulinu je dostatečně odseparován od hlavního interferujícího píku matrice, který je eluován těsně za retenčním časem patulinu. Další minoritní interferující složky matrice elující v retenčním čase patulinu se ani po dalších mnohých experimentech nepodařilo úspěšně odstranit. Metoda tedy byla validována za současných stávajících podmínek s cílem ověřit, zda je možné ji aplikovat na analýzu reálných vzorků jablečných džusů pro stanovení kontaminujícího patulinu.

6.7 Souhrn validovaných podmínek pro HPLC analýzu

Chromatografický systém:

Chromatograf:	Schimadzu 20AD Prominence Liquid Chromatograph
Detektor:	Shimadzu Prominence systém M20A Diode Array Detector
Kolona:	Kinetex Biphenyl 150 x 4,6 mm, velikost částic 5 μm
Předkolona:	Sigma - Aldrich Supel MIP patulin 25 x 3 mm
Dávkování:	250 μl
Detekce:	276 nm
Typ eluce:	gradientová, s časem přepnutí ventilu na analytickou kolonu v 2,5. minutě
Mobilní fáze:	ethylacetát 20 % v acetonitrilu Voda
Průtok:	1,0 ml/min
Promývací fáze:	1% roztok NaHCO_3
Průtok:	2 ml/min
Čas přepnutí ventilu:	2,5 min
Celkový čas analýzy:	8,70 min
Teplota:	laboratorní
Vyhodnocení:	Chromatografický software LC Solution

7 Výsledky

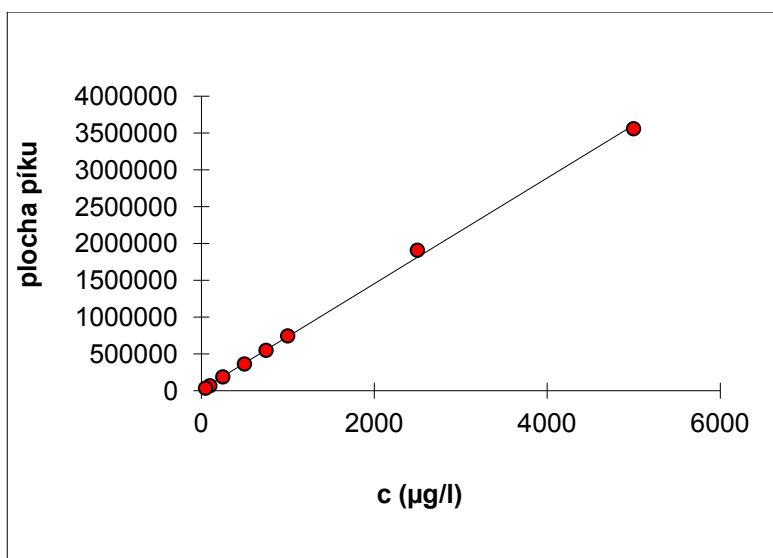
7.1 Validace analytické metody

7.1.1 Linearita

Pro stanovení linearity bylo použito osm pracovních kalibračních roztoků o různé koncentraci, které byly připraveny dle podkapitoly 4.3.3. Každý z kalibračních roztoků byl měřen třikrát. Z výsledné průměrné hodnoty těchto tří měření každé koncentrace byla sestrojena kalibrační křivka, která je důležitá při hodnocení linearity. Stanovení linearity bylo provedeno jak pro roztoky standardů ve vodě tak v matrici jablečného džusu.

Linearita patulinu ve vodě

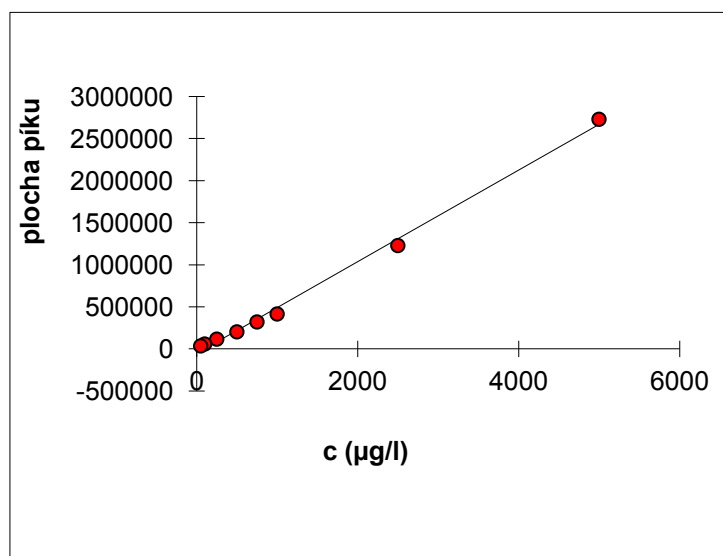
c (µg/l)	plocha píku
5000	3558286
2500	1908319
1000	744709
750	548908
500	363764
250	188328
100	68104
50	35264



Statistické parametry pro regresi: $y = k x + q$		
Počet bodů	n =8	Odhad chyby
Směrnice	k =718	± 10
Abs. člen	q =15932	± 20832
Korelační koef.	r =0,9993	
Reziduální odch.	s =46072	
Predikce	y =42000	x =36

Linearita patulinu v matrici džusu

c (µg/l)	plocha píku
5000	2729419
2500	1228683
1000	415634
750	321027
500	203427
250	116572
100	58558
50	36297



Statistické parametry pro regresi: $y = k x + q$		
Počet bodů	$n = 8$	Odhad chyby
Směrnice	$k = 544$	± 14
Abs. člen	$q = -52101$	± 29381
Korelační koef.	$r = 0,9978$	
Reziduální odch.	$s = 64979$	
Predikce	$y = 42000$	$x = 172$

7.1.2 Opakovatelnost

Pro zkoušku opakovatelnosti byly vybrány 3 odlišné koncentrace pracovních roztoků standardu, které byly následně 7 opakovaně dávkovány do systému. Výsledné plochy píků byly využity k výpočtu relativní směrodatné odchylky stanovení patulinu o příslušných koncentracích.

Opakovatelnost metody pro stanovení patulinu byla vyhodnocována z roztoků standardů na koncentrační hladině 5000 µg/l, 500 µg/l a 50 µg/l

Tabulka 7: Opakovatelnost stanovení patulinu

nástřík	patulin		
	plocha píku		
	5000 µg/l	500 µg/l	50 µg/l
1	3161817	349928	37528
2	3250898	353247	35857
3	3211864	345002	43220
4	3267324	350930	41204
5	3184727	340341	43622
6	3271165	344440	33176
7	3215049	344991	43152
N	6	6	6
Průměr	3223263	346982	39679
SD	41749	4509	4163
RSD (%)	1,3	1,3	10,5

7.1.3 Přesnost

V testu přesnosti metody byly provedeny 2 nástřiky každého ze 7 vzorků džusů s přidavkem patulinu na třech koncentračních hladinách. Z naměřených ploch píků byla následně vypočítána průměrná plocha píku pro každou koncentraci a určeny RSD stanovení. Tyto vzorky byly připraveny smísením pracovního roztoku patulinu připraveného dle podkapitoly 4.3.2 příprava pracovních roztoků a džusu dle požadované koncentrace viz tabulka 1.

Parametr přesnosti byl hodnocen na třech koncentračních hladinách 5000, 500 a 50 $\mu\text{g/l}$.

Tabulka 8: Příprava vzorků k měření přesnosti

Přesnost			
	Pracovní roztok (μl)	džus (μl)	Koncentrace ($\mu\text{g/l}$)
1.	5	4995	50
2.	50	4950	500
3.	500	4500	5000

Tabulka 9: Přesnost metody stanovení patulinu v jablečných džusech

vzorek	Průměrná plocha píku PAT (5 $\mu\text{g/l}$)	Průměrná plocha píku PAT (500 $\mu\text{g/l}$)	Průměrná plocha píku PAT (5000 $\mu\text{g/l}$)
1	51409	218117	2526387
2	53549	237908	2714740
3	51825	244184	2760059
4	49532	233709	2599793
5	48442	234777	2763201
6	47183	233652	2668649
7	38245	242065	2686422
Průměr	48597	234916	2674179
SD	5048	8478	86122
RSD (%)	10,4	3,6	3,2

7.1.4 Výtěžnost

Výtěžnost byla stanovena tak, že průměrné hodnoty ploch píků roztoku standardu, které byly použity u testu opakovatelnosti, byly dány do poměru s průměrnými hodnotami ploch píků vzorku džusu do kterého byl přidán patulin tak, aby koncentrace zůstaly zachovány. Ke stanovení výtěžnosti byly vybrány tři vzorky o třech různých koncentracích. Každý ze vzorků byl dávkován do systému dvakrát.

Patulin v matrici džusu

Tabulka 10: Stanovení parametru výtěžnosti patulinu v matrici džusu

Koncentrace ($\mu\text{g/l}$)	Průměrná plocha píků	Výtěžnost (%)
50	39679	122
50 + džus	48597	
500	346982	68
500 + džus	234916	
5000	3223263	83
5000 + džus	2674179	

Výtěžnost u vzorku o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ přesáhla hranici 100 %. Tento jev byl způsoben interferující látkou z matrice a nízkou odezvou patulinu na této nízké koncentraci. I přes veškeré vynaložené úsilí se tato nežádoucí interference nepodařila odstranit. Na vyšších koncentračních hladinách byla stanovena hodnota výtěžnosti on-line SPE extrakce 68 a 83%, což je také nevyhovující pro použití metody. Tyto hodnoty mohou být vysvětleny částečnou vazbou patulinu na matrici džusu, anebo předčasným vymýváním patulinu z MIP sorbentu v prostředí matrice džusu.

8 Závěr

Hlavním cílem této diplomové práce bylo najít optimální podmínky pro analýzu mykotoxinu patulinu v jablečných nápojích. Během práce byly tyto optimální podmínky nalezeny a metoda validována. Pro zjednodušení a urychlení extrakce analytu z matrice, a tím i vlastní analytické části, byla zvolena metoda pro úpravu vzorku on-line SPE ve spojení s HPLC. Využitím přepínání kolon mezi extrakční a analytickou kolonou bylo dosaženo izolace analytu. Prvním krokem, ve vývoji vlastní analytické metody stanovení patulinu, bylo najít vhodnou analytickou kolonu. Z pěti různých analytických kolon byla vybrána jako nejvhodnější analytická kolona se stacionární fází modifikovanou bifenylovou skupinou. Experimentálně bylo zjištěno, že nejlepší možné separace lze dosáhnout zapojením MIP předkolony před bifenylovou kolonou. Dalšími experimenty byla určena vhodná mobilní fáze, její složení a ostatní podmínky separace. K detekci byl použit univerzální UV-VIS detektor.

V daném koncentračním rozmezí (50 – 5000 $\mu\text{g/l}$) byla testována linearita patulinu v roztoku standardů a v matrici džusu. Výsledkem byla přímka lineární regrese, z níž byl vypočítán korelační koeficient o hodnotě 0,9993 a 0,9978.

Parametr přesnosti byl měřen na třech koncentračních hladinách patulinu, a to 5000 $\mu\text{g/l}$, 500 $\mu\text{g/l}$ a 50 $\mu\text{g/l}$. Kritériem přesnosti je relativní směrodatná odchylka (RSD), která se pohybovala v rozmezí 3,2 – 10,4 %. Další z měřených parametrů byla opakovatelnost. Opět byla měřena na třech vybraných koncentračních hladinách s výsledkem RSD od 1,3 – 10,5 %.

Jako poslední parametr byla měřena výtěžnost, jejíž hodnoty pro dané koncentrace se pohybovaly mezi 68 – 122 %. Výtěžnosti 122 % bylo dosaženo u nejnižší koncentrace patulinu (50 $\mu\text{g/l}$). Důvodem je interference matrice, kterou již nebylo možné odstranit. Limity detekce a kvantifikace vyvinuté metody nebyly hodnoceny taktéž z důvodů přítomnosti interferujících píků v oblasti retenčního času patulinu.

Byla vyvinuta metoda, kterou lze stanovit obsah patulinu v jablečných nápojích až k hodnotám 50 $\mu\text{g/l}$, což je maximální povolený limit pro patulin v jablečných nápojích.

Nevyhovujícím je však parametr výtěžnosti. Bylo dosaženo hodnoty 122 %, což je způsobeno interferující složkou matrice, kterou se nepodařilo odstranit.

Závěrem diplomové práce lze konstatovat, že použitím SPE MIP sorbentu pro extrakci patulinu z jablečného džusu se značně zvýšila selektivita extrakčního procesu. Avšak i přes „molekulárně vtištěný“ materiál sorbentu, není možné při on-line SPE extrakci odstranit beze zbytku všechny interferující složky z matrice. Pravděpodobným důvodem mohou být neselektivní interakce složek matrice s polymerem templátu a jejich vazba na sorbent během extrakce. Dalším důvodem může být nedodržení podmínek, které jsou přesně specifikovány při off-line MIP-SPE extrakci, tzn. přesný postup promývacích a elučních kroků, který není možno provést on-line v HPLC systému. Studium literatury je možné zjistit, že prací zabývajících se spojením on-line SPE-MIP HPLC je poměrně málo, což svědčí o náročnosti vývoje těchto metod.

9 Použitá literatura

1. **Šimůnek J.** www.med.muni.cz. Dostupné na:
http://www.med.muni.cz/prelek/MYKOTW/mpr_idx.htm. [Online] únor 2003. [Citace: 9. 4. 2015]
2. Fermentek biotechnology Dostupné na: <http://www.fermentek.co.il/patulin.htm>.
[Online] 5. 4. 2012. [Citace: 25. 3. 2015]
3. **Betina V.:** Mykotoxíny-chémia-biológia-ekológia. vydavateľství ALFA, Bratislava, ISBN: 8005006314
4. **Kvasničková A.:** Patulin v ovocných šťávách. Agronavigátor. Dostupné na:
<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=158&ch=13&typ=1&val=103487>
[Online] 16. 8. 2010 [Citace 10. 3. 2015]
5. **Harwig et al.:** Occurrence of patulin and patulin-producing strains of *Penicillium expansum* in natural rot of apples in Canada. *Can. Inst. Food Technol. J.* vol. 6 No. 22; 1973
6. **Brain P. W. et al.:** Production of patulin in apple fruits by *Penicillium expansum*. *Nature (London)* 178; strany: 263 - 264; 1956
7. **Ukai T. et al.:** Studies on the poisonous substance from a strain of *Penicillium* (Hori-Yamamoto strain), II. Culture method of Hori-Yamamoto strain and chemical structure of its poisonous substance. *Proc. Phar. Soc. Jpn.* vol. 74: strany: 450; 1954
8. **Krmenčík J.:** Patulin. Dostupné na:
<http://www.biotox.cz/toxikon/mikromycety/patulin.php>. www.biotox.cz. [Online] 2007
[Citace 10. 3. 2015]
9. **Fritz W., Engst, R.:** Survey of Selected Mycotoxins in Food. *J. Environ. Sci. Health B* vol. 16 No. 2; strany: 193-210; 1981
10. **Ciegler et. al.:** Mycotoxins in human and animal health. *Pathotox Publ.* strany: 609-623; 1977

11. **Brandon E.F.A, Baars A.J. et al.:** Risk assessment of patulin intake from apple containing products by young children. Dostupné na:
https://www.nvwa.nl/txmpub/files/?p_file_id=2200971. [Online] [Citace: 25. 3. 2015]
12. Patulin in apple juice, apple juice concentrates and apple juice products. Dostupné na: <http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/NaturalToxins/ucm212520.htm> . <http://www.fda.gov/default.htm>. [Online] 18. 11. 2014
[Citace: 25. 3. 2015]
13. **Malíř F., Ostrý V., Bárta I., Buchta V., Dvořáčková I., Paříková J., Severa J., Škarková J.:** Vlákňité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka, Národní centrum ošetrovatelských a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, strany 28 – 58, 92, 105 – 112, 143, 148 – 156, 161 – 216, 259 – 330; 2003
14. **Puel O., Galtier P., Oswald P.I.:** Biosynthesis and Toxicological Effect of Patulin. Dostupné na: www.mdpi.com/journal/toxins. Toxin 2010, vol. 2. No.4
[Online] 5. 5. 2010 [Citace: 25. 3. 2015]
15. **Reiss. J.** Dostupné na: http://www.aaccnet.org/publications/cc/backissues/1976/Documents/chem53_150.pdf. [Online] 10. 6. 1975. [Citace: 25. 3. 2015]
16. Commission acts to limit levels of the mycotoxin "patulin" in apple products. www.ec.europa.eu.
http://ec.europa.eu/dgs/health_consumer/library/press/press309_en.pdf. Midday express [Online] 12. 8. 2003 [Citace: 10. 4. 2015]
17. Nařízení Komise. Dostupné na:
<http://www.eurlex.cz/dokument.aspx?celex=32003R1425>. [Online] [Citace: 10. 4. 2015]
18. **Prabhu P.:** Analysis of the mycotoxin patulin in apple juice using the flexar FX-15 UHPLC-UV. Dostupné na:
http://www.perkinelmer.com/pdfs/downloads/app_flexarapplejuice.pdf. [Online] PerkinElmer, Inc. [Citace: 5. 5. 2015] CT 06484 USA.

19. **Tyler B., Brady E., Burgess J. A.:** Selective analysis of patulin in apple juice using the aquity UHPLC H-clay with the acquity QDa detector. Dostupné na: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004788en.pdf>. Libraly number: PSTR134821741 [Online] [Citace: 5. 5. 2015]
20. **Lee T. P., Sakai R., Manaf N. A., Rodhi A. M., Saad B.:** High performance liquid chromatography method for the determination of patulin and 5-hydroxymethylfurfural in fruit juices marketed in Malaysia. Food Control, 15. 9. 2013, lev. 38, strany: 142 - 149
21. **Li J., Wu R., Hu Q., Wang J.:** Solid phase extraction and HPLC determination of patulin in apple kuice concentrate. Food Control, Sv. 18, stránky 530-534; 30. 12. 2005
22. **Kupiec T.:** Quality-control analytical methods: High-performance liquid chromatography. Dostupné na: <http://arlok.com/articles/High-Performance%20Liquid%20Chromatography.pdf>. [Online] 4. 5. 2004. [Citace: 25. 3. 2015]
23. Method of Analysis: 1. Physical and Physicochemical Methods: 1.14 Chromatography: 1.14.4 High-performance liquid chromatography. Dostupné na: <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/> [Online] [Citace: 26. 3. 2015]
24. **Smith C.:** Disadvanteges and advantages of an HPLC. Dostupné na: http://www.ehow.com/list_5911530_disadvantages-advantages-hplc.html. [Online] 9 23, 2014. [Cited: 3 26, 2015.]
25. **Kos G., Krska R.:** Separation and detection techniques for the determination of mycotoxins. Dostupné na: <http://services.leatherheadfood.com/eman/FactSheet.aspx?ID=62>. European mycotoxins awereness network [Online] [Citace: 24. 3 2015.]
26. old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/. [Online] [Citace: 27. 3 2015.]
27. **Adam J.:** Předkolony a filtry - ochrana analytických kolon Dostupné na: <http://www.labicom.cz/administrace/ckfinder/userfiles/files/6-P%C5%99edkolony,filtry-LABICOM.pdf>. [Online] [Citace: 27. 3 2015.]

28. **Naibrťová L.:** Využití systému přepínání kolon v HPLC pro zakoncentrování a stanovení insekticidů z vodné matrice. [Diplomová práce, UK v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové] Hradec Králové 2014.
29. **Nováková L.:** HPLC - teorie nová. Dostupné na:
<https://intranet.faf.cuni.cz/getmedia/1720276f-aa53-48b2-9e5e-f9b8c5206864/HPLC-teorie-nova.aspx?disposition=attachment> [Online] [Citace:] 28. 3.2015
30. **Králová, R.:** Stanovení léčiv v pitných vodách. [Diplomová práce, VUT v Brně]. Brno 2014. FCH-DIP0790/2013, stránky 24-27.
31. **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. [Online] 3. 10. 2014. [Citace: 3. 4. 2015]
32. **Cvačka, J.:** Instrumentace pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. Dostupné na: <http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc2.pdf>. [Online] 10. 11. 2010 [Citace: 16. 4. 2015]
33. Příprava vzorku k analýze: Dostupné na:
<http://analyt.wz.cz/Priprava/1.%20Priprava%20vzorku.pdf> [Online] [Citace: 7. 4 2015.]
34. **Bossi A. et al.:** Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: The state of the art. s.l.: Biosens.Bioelectron, 2007. strany: 1131-1137
35. **Morelli I. et al.:** Molecularly imprinted submicronpheres for applications in a novel model biosensor-film. Sens. Actuators B, 2010. strany: 394-401. Sv. 150
36. **Scorrano S. et al.:** Synthesis of molecularly imprinted polymers for amino acid derivatives by using different functional monomers. 2011, strany: 1735-1743
37. **Longo L., Vasapollo G.:** Molecularly imprinted polymers as nucleotide receptors. *Mini-Rev. Org. Chem.* 2008, strany: 163-170
38. **Pichon V., Chapuis-Hugon F.:** Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants - A review. *Anal. Chim. Acta.* 2008, strany: 48-61

39. **Tamayo F.G., Casillas J.L., Martin-Esteban A.:** Clean up of phenylurea herbicides in plant sample extracts using molecular imprinted polymers. *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, strany: 1234-1240
40. **Puoci F. et al.:** Molecularly imprinted solid phase extraction for the selective HPLC determination of α -tocopherol in bay leaves. *Anal. Chim. Acta.* 2007, strany: 164-170
41. **Baggiani C., Anfossi L., Giovannoli C.:** Solid phase extraction of food contaminants using molecular imprinted polymers. *Anal. Chim. Acta.* 2007, strany: 29-39
42. **Vasapollo G. et al.:** Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective. *International Journal of Molecular Sciences.* 2011, strany: 5908-5945
43. **Haginaka J.:** Monodispersed, molecularly imprinted polymers as affinity-based chromatography media. *J. Chromatogr. B.* 2008, strany: 3-13
44. **Haniga J., Sanbe H., Takehira H.:** Uniform-sized molecularly imprinted polymers for (s)-ibuprofen retention properties in aqueous mobile phase. *J. Chromatogr. A.* 1999, strany: 117-125
45. **Piletsky S.A., Turner N.W., Laitenberger P.:** Molecularly imprinted polymers in clinical diagnostics-future potential and existing problems. *Med. Eng. Phys.* 2006, strany: 971-977
46. **Li W., Li S.:** Molecular imprinting: A versatile tool for separation, sensors and catalysis. *Adv. Polym. Sci.* 2007, strany: 191-210
47. **Wulff G.:** Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers. *Chem. Rev.* 2002, strany: 1-27
48. **Lanza M. et al.:** Surface plasmon resonance sensor for domoic acid based on grafted imprinted polymer. *Biosens. Bioelectron.* 2004, strany: 145-152
49. **Martin-Esteban A., Tadeo J.L.:** Selective molecularly imprinted polymer obtained from a combinatorial library for the extraction of bisphenol A. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2006, strany: 747-751

50. **Dirion B. et al.:** Water-compatible molecularly imprinted polymers obtained via high-throughput synthesis and experimental design. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, strany: 15101-15109
51. **Piletsky S.A, Andersson H.S., Nicholls I.A.:** Combined hydrophobic and electrostatic interaction-based recognition in molecular imprinted polymers. *Macromolecules.* 1999, strany: 633-636
52. **Piletska E.V. et al.:** Adaptation of the molecular imprinted polymers towards polar environment. *Anal. Chim. Acta.* 2005, strany: 47-51
53. **Scorrano S., Longo L., Vasapollo G.:** Molecularly imprinted polymer for solid-phase extraction of 1-methyladenosine from human urine. *Anal. Chim. Acta.* 2010 strany: 167-171
54. **Sun H.-W., Qiao F.-X.:** Recognition mechanism of water-compatible molecularly imprinted solid-phase extraction and determination of nine quinolones in urine by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2008, strany: 1-9