

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra analytické chemie

**VYUŽITÍ SYSTÉMU PŘEPÍNÁNÍ KOLON V HPLC PRO STANOVENÍ  
VYBRANÝCH MYKOTOXINŮ VE VZORCÍCH PIVA NA ČESKÉM TRHU**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce, konzultant: María Carolina Fernández Ramos, Ph.D,  
Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Hradec Králové, 2014

Ivona Lhotská

Děkuji doc. Šatínskému za milou spolupráci, odborné vedení a směřování mé práce.

Velmi si vážím času, který mi věnoval, jeho rad, připomínek a podpory.

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. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu.

V Hradci Králové, 12. 5. 2014

## Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Ivona Lhotská

Školitel, konzultant: María Carolina Fernández Ramos, Ph.D,

Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Název diplomové práce: Využití systému přepínání kolon v HPLC pro stanovení  
vybraných mykotoxinů ve vzorcích piva na českém trhu

Byla vytvořena nová, rychlá a citlivá metoda vysokoučinné kapalinové chromatografie pro současné stanovení mykotoxinů ochratoxinu A a citrininu v pivu za použití přepínání kolon pro on-line úpřavu vzorku. 100  $\mu$ l piva bylo přímo dávkováno do systému. Izolace analytů z matrice piva proběhla na předkoloně Ascentis Express RP-C18 (5 x 4,6 mm, 2,7  $\mu$ m) promýváním methanolem – 0,5% vodným roztokem kyseliny octové (30:70, v/v) o přutoku 2 ml/min po dobu 2 minut. Po přepnutí ventilu byly látky dále separované na chromatografické koloně Ascentis Express Phenyl-Hexyl (100 x 4,6 mm, 2,7  $\mu$ m) mobilní fází o přutoku 1 ml/min ve složení acetonitril – 0,5% vodný roztok kyseliny octové (45:55, v/v). V čase 3 – 5,5 minuty lineárně narůstá gradient na 75:25. Chromatografická kolona byla temperována na 50°C. Fluorimetrická detekce byla nastavena na vlnové dělky Ex 335 nm, Em 497 nm. Analýza jednoho vzorku včetně on-line úpřavy trvá 6 minut. Limit kvantifikace této metody je 0,01  $\mu$ g/l pro OTA a 0,02  $\mu$ g/l pro CIT. Dané mykotoxiny byly následně analyzovány ve 48 vzorcích piva na českém trhu. Naměřené množství mykotoxinů bylo nízké (pod povoleným limitem), v porovnání s maximálním doporučeným příjmem má pivo jen malý příspěvek na jejich příjmu v potravě.

Klíčová slova: HPLC, přepínání kolon, ochratoxin A, citrinin, pivo

## **Abstract**

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Ivona Lhotská

Supervisor, consultant: María Carolina Fernández Ramos, Ph.D,

Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: Column switching chromatography for mycotoxines  
determination in Czech beer samples

A new fast and sensitive method of high performance liquid chromatography for simultaneous determination of mycotoxins ochratoxin A and citrinin using column-switching system for on-line sample pretreatment was developed. 100 µl of beer was injected directly into the chromatographic system. Isolation of analytes was performed on guard column Ascentis Express RP-C18 (5 x 4.6 mm, 2.7 µm) washing out with methanol – water solution of acetic acid 0.5% (30:70, v/v), at a flow rate 2 ml/min; time of valve switch was set on 2 minutes. The separation was performed on Ascentis Express Phenyl-Hexyl column (100 x 4.6 mm, 2.7 µm) with mobile phase of composition acetonitril – water solution of acetic acid 0.5% at a flow rate 1 ml/min. A gradient was increasing up to 75:25 linearly in time 3 – 5.5 min. The temperature 50°C was set up for column separation. Wavelengths of fluorimetric detection were set at Ex 335 nm, Em 497 nm. Analysis of one sample including on-line pretreatment was less than 6 minutes. Limit of quantification of ochratoxin is 0.01 µg/l and LOQ of citrinin is 0.02 µg/l. The mycotoxins were analyzed in 48 samples of Czech beer. Only a small amount under the limit level was detected. The contribution of beer to the intake of ochratoxin A and citrinin in food is small in comparison with the maximum recommended intake.

Keywords: HPLC, column switching, ochratoxin A, citrinin, beer

## Obsah

1.	Úvod.....	10
2.	Cíl a zadání práce.....	11
3.	Teoretická část.....	12
3.1	Ochratoxin A.....	12
3.2	Citrinin.....	15
3.3	Kontaminace piva.....	17
3.4	Legislativa a kontrola.....	18
3.5	Analytické metody.....	19
3.6	Úprava vzorku pomocí přepínání kolon.....	20
3.7	Testované kolony.....	22
3.8	Metody stanovení ochratoxinu A a citrininu.....	23
4.	Experimentální část.....	29
4.1	Materiály a pomůcky.....	29
4.1.1	Standards, chemikálie a vzorky.....	29
4.1.2	Přístroje a podmínky separace.....	31
4.2	Příprava roztoků standardů ochratoxinu A a citrininu.....	32
4.2.1	Úprava standardů.....	32
4.2.2	Příprava zásobních roztoků.....	32
4.2.3	Příprava pracovního roztoku pro optimalizaci metody.....	32
4.2.4	Příprava pracovních roztoků pro kalibraci.....	32
4.3	Příprava vzorků pív.....	33
4.4	Příprava mobilních fází.....	33
4.5	Optimalizace chromatografických podmínek.....	34
4.5.1	Volba mobilní fáze.....	34
4.5.2	Výběr kolony.....	35
4.5.3	Parametry detekce.....	38
4.5.4	Vliv teploty.....	39
4.5.5	Volba promývací fáze.....	39
4.5.6	Optimalizace gradientové eluce.....	40
5.	Výsledky a diskuze.....	44
5.1	Souhrn optimálních podmínek pro HPLC analýzu.....	44
5.2	Test vhodnosti chromatografického systému.....	45

5.2.1 Účinnost chromatografického systému – zdánlivý počet teoretických pater (N).....	45
5.2.2 Faktor symetrie chromatografických píků ( $A_s$ ).....	46
5.2.3 Rozlišení chromatografických píků ( $R_s$ ) .....	46
5.3 Validace analytické metody .....	48
5.3.1 Linearita .....	48
5.3.2 Opakovatelnost.....	50
5.3.3 Přesnost .....	51
5.3.4 Správnost.....	52
5.3.5 Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) .....	53
5.4 Stanovení obsahu ochratoxinu A a citrininu ve vzorcích vybraných druhů pív.....	56
6. Závěr .....	58
7. Použitá literatura .....	61

## Seznam zkratek

BEN	Balkánská endemická nefropatie
bw	body weight (tělesná hmotnost)
CIT	citrinin
DLLME	dispersive liquid–liquid microextraction
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FAO	Food and Agriculture Organisation of the United Nations
FDA	Food and Drug Administration
FLR	fluorimetrie
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IAC	imunoafinitní kolona
IARC	International Agency of Research on Cancer
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
LIF	laser – induced fluorescence detection
LLE	liquid – liquid extraction
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MEKC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
MFCI	microsphere-based flow cytometric immunoassay
MIP	molecularly imprinted polymer
MOE	margin of exposure
MS	hmotnostní spektrometrie
NOAEL	no-observed-adverse-effect level
OTA	ochratoxin A



pKa	disociační konstanta
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed
RP	reverzní fáze
SIA	sekvenční injekční analýza
SPE	solid phase extraction
TRL	time-resolved luminiscence
TWI	tolerable weekly intake
UPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie
WHO	Světová zdravotnická organizace

## 1. Úvod

Mykotoxiny jsou toxické produkty vláknitých mikroskopických hub. Dnes je identifikováno okolo čtyř set takových látek, přičemž se odhaduje, že zhruba dvacet je v běžné blízkosti člověka ve významnějším množství, aby ho ohrožovaly [8]. Nejsledovanějšími jsou rody *Penicillium*, *Aspergillus* a *Fusarium*. Tyto plísně produkují různé sekundární metabolity, i více druhů a často celé skupiny látek chemicky příbuzného složení. I nepříbuzné houby ale dokážou produkovat stejný mykotoxin. Některé druhy jsou tak neškodné, jiné dokonce žádoucí - například pro své antibiotické účinky nebo šlechtění sýrů. Po toxické stránce mají rozmanité působení, jsou hepatotoxické, nefrotoxické, neurotoxické, karcinogenní, cytotoxické, imunotoxické, genotoxické, teratogenní. Tyto účinky sledujeme zejména při chronickém alimentárním příjmu. K akutním otravám dochází pouze výjimečně, plísně způsobují i různé alergické reakce zejména při vdechování spór.

Plísně jsou bohužel běžnou součástí vegetace. Jejich výskyt zejména na obilninách, které v různé formě tvoří velkou část naší stravy, není nijak ojedinělý a nedá se mu úplně zabránit. Napadají rostliny již během vegetačního období v závislosti na klimatických podmínkách, takže se jejich profil může v jednotlivých letech lišit. K dalšímu šíření nákazy dochází rozprášením spór při sklizni strojovou technikou. Největší vliv na množení plísni však mají špatné skladovací podmínky. Problémem mykotoxinů je, že jsou do hostitele z plísně vypouštěny, i když se pozorovateli rostlina nemusí vůbec zdát houbou napadena, protože není zjevně porostlá typickými barevnými skvrnami. Přesto však už podhoubí může být přítomno a zamořenost mykotoxiny tak může zůstat skryta.

Pivo, využívající jako jednu ze základních surovin právě obilniny, je tím pádem také potenciálním zdrojem rizika pro člověka. Některé mykotoxiny jsou poměrně chemicky a tepelně stabilní, proto se přes řetězec ječmen - slad - pivo dostanou i do konečného produktu. V poslední době je tento problém i medializován, ne vždy však odborně a adekvátně, a proto je třeba odborné posouzení.

I přes dodržování správných zemědělských a technologických postupů není možné zabránit výskytu mykotoxinů v potravinách. I proto je tedy velmi důležitá jejich kontrola: zhodnocení rizika, nastavení limitů a vhodné a citlivé analytické metody umožňující hlídání stanovených hladin.

## 2. Cíl a zadání práce

Tato práce si klade za cíl vytvořit metodu pro současnou analýzu ochratoxinu A a citrininu pomocí vysokoučinné kapalinové chromatografie, najít optimální podmínky co se týče volby kolony, mobilní fáze, teploty. Toto měření musí být dostatečně citlivé a vhodné pro detekci těchto mykotoxinů v přirozené matrici piva, kde se mohou vyskytovat ve stopovém množství.

Je tedy zapotřebí mykotoxiny nejprve extrahovat z piva, a to přímo v jednom kroku vložím extrakční kolony před samotnou analytickou kolonu. Přepínáním kolon je dosaženo podmínek on-line extrakce na pevné fázi, vymytí balastní matrice a následné eluce žádoucích analytů na analytickou kolonu s detekcí pomocí jedné z nejcitlivějších metod – fluorimetrie.

Po optimalizaci podmínek a validaci metody budou přeměřeny vzorky piv na českém trhu, stanoven v nich obsah obou mykotoxinů a porovnán s limity a doporučeními nadnárodních regulačních autorit v oblasti zdraví a potravin.

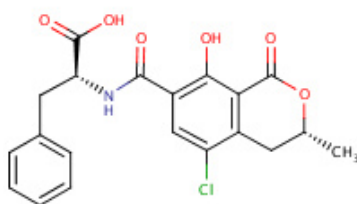
### 3. Teoretická část

#### 3.1 Ochratoxin A

Molekulová hmotnost: 403,81 g/mol

Vzorec:  $C_{20}H_{18}ClNO_6$

Název IUPAC: (2S)-2-[[[(3R)-5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-3,4-dihydroisochromene-7-carbonyl]amino]-3-phenylpropanoic acid



Obr. 1: Molekula ochratoxinu A [21]

Ochratoxin A (OTA) je mykotoxin produkovaný plísněmi rodu *Aspergillus* a *Penicillium*. V izolátu je nejvíce zastoupen mezi ostatními ochratoxiny a vykazuje nejvyšší toxicitu. Vzniká jako sekundární metabolit uvedených plísní a kontaminuje jimi napadené plodiny: obilniny, luštěniny, kávová a kakaová zrna, ovoce, sušené ovoce (rozinky, fíky), dále produkty z nich vyrobené jako mouka, pečivo, pivo a víno. V neposlední řadě také významně ovlivňuje zvířata zkrmuující nakažené zrní, zejména prasata a kuřata. Ochratoxin A bývá nalezen především v ledvinách, játrech a svalch těchto zvířat. Neméně ohrožen je tedy i člověk přijímající ochratoxin A z rostlinných i živočišných zdrojů. Protože je prokázáno, že je ochratoxin A nefrotoxický, potenciální karcinogen a dále je zkoumán pro imunotoxicitu a teratogenitu, upravují nadnárodní autority požadavky na maximální tolerovatelný týdenní příjem člověka vzhledem k jeho tělesné hmotnosti a na maximální povolený obsah ochratoxinu A v některých komoditách.

Poprvé byl ochratoxin A izolován z jihoafrického *Aspergillus ochraceus* van der Merwem v roce 1965. Nejobsáhlejší skupinou vřeckovýtrusných hub produkujících ochratoxin A je sekce *Circumdati* rodu *Aspergillus*. Některé druhy vytváří ochratoxin konstantně, jiné příležitostně, některé jen ve velmi malém množství. Nejvýznamnějšími kontaminanty jsou *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus westerdijkiae* a *Aspergillus steynii*. Dále například *Aspergillus cretensis*, *flocculosus* a další. V tropických oblastech

se více vyskytují formy s tmavými výtrusy odolnější proti slunci sekce *Nigri*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus niger*. Druhým rodem produkujícím ochratoxin je *Penicillium*, který je spíše typický v chladnějších oblastech. V našich podmínkách je častý *Penicillium verrucosum*, vyskytující se běžně na obilovinách, méně *Penicillium nordicum*, který spíše napadá sekundárně sýry a salámy. Zdroj ochratoxinu je tak závislý jednak na geografické oblasti (teplotě, vlhkosti), na podmínkách skladování a také samotné komoditě. Za zdroj ochratoxinu v obilninách může být nejčastěji považován *Aspergillus ochraceus* a *Penicillium verrucosum* [41].

Tab. 1: Druhy plísni sekce *Circumdati* rodu *Aspergillus* produkující ochratoxin podle Frisvada et al. (2004) [19]

Druhy rodu <i>Aspergillus</i> , sekce <i>Circumdati</i>	
Producenti ochratoxinu A	<i>A. steyni</i> , <i>A. flocculosus</i> , <i>A. pseudoelegans</i> , <i>A. westerdijkiae</i> , <i>A. cretensis</i> , <i>A. roseoglobulosus</i> , <i>A. sulphureus</i> , <i>Neopetromyces muricatus</i>
Kmeny produkující vzácněji, pouze ve vhodných podmínkách, ne soustavně	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. sclerotiorum</i>

Ochratoxin A je chlorovaný derivát dihydroisokumarinu, připojený přes karboxyl k fenylalaninu amidovou vazbou. Izolovaný ochratoxin je bílá krystalická látka, která vykazuje modrou nebo zelenou fluorescenci pod ultrafialovým světlem. Jedná se o lipofilní slabě kyselou látku s pKa 4,3 karboxylu fenylalaninu a pKa 7,1 fenolické skupiny isokumarinu. Je značně odolný vůči teplu, a tak těžko odstranitelný i mnohými technologiemi zpracování potravin.

Po příjmu s potravou se absorbuje jako lipofilní, neionizovaný, s kyselými vlastnostmi pravděpodobně už v žaludku a hlavně v jejunu. U přežvýkavců dochází k rozkladu ještě v předžaludcích bakteriálními enzymy, rizikem je tak spíše jen pro živočichy s jednoduchým žaludkem. I když existují teorie, že právě narušení bakteriální mikroflóry může mít nepříznivý vliv také na ruminující živočichy [14].

Ochratoxin je distribuován do tkání krví vysoce vázán na plazmatické bílkoviny zejména albumin. Ukládá se nejvíce v ledvinách, méně v játrech, svalech a tucích.

Ve tkáních zůstává déle než v krvi. Reziduum závisí na vaznosti, poločasu a délce příjmu kontaminovaných potravin. Poločas je značně mezidruhově rozdílný, u zdravých lidských dobrovolníků bylo změřeno asi 840 h, tedy až pět týdnů. Ochratoxin podléhá enterohepatální cirkulaci, což také zpomaluje jeho vylučování. Pro látky s podobnou molekulovou hmotností je typické vylučování i žlučí i močí. Hlavním metabolitem napříč živočišnými druhy je ochratoxin alpha vznikající odštěpením fenylalaninu. Všechny metabolity jsou však méně toxické než samotný ochratoxin A [28].

Vzhledem k charakteru nákazy lidí, tedy lehké kontaminaci potravin a spíše dlouhodobému příjmu stopových dávek než akutního předávkování, hovoříme o akutní toxicitě spíše jen experimentálně. U zvířat docházelo k narušení koagulace s následky vnitřního krvácení, hepatální nekróze a nekróze lymfatických uzlin, enteritidám s atrofii střevních klků, s rozdílnou mezidruhovou citlivostí, vyšší u psů a prasat. Případná akutní toxicita byla zaznamenána u vyššího příjmu zemědělců inhalační cestou při manipulaci s plesnivým obilím. Větší význam pro populaci má však chronická toxicita alimentárního příjmu.

U všech testovaných savců byla prokázána nefrotoxicita, hlavním cílem napadení je proximální tubulus, kde ochratoxin A působí cytotoxicky a karcinogenně. U zvířat přijímajících ochratoxin A v potravě byla pozorována karyomegalická léze buněk, která v dlouhodobém horizontu vede k atrofii tubulů, intersticiální fibróze a hyalinizaci tubulů [23]. Prochází placentou, je embryotoxický a teratogenní. Dále byly zjištěny imunosupresivní účinky, vše ale u zvířat a v dávkách mnohem vyšších než nefrotoxických.

Ochratoxin A je kauzální příčinou skandinávských nefropatií prasat. Způsobuje glykosurii, proteinurii a polyurii se ztrátou koncentrační schopnosti ledvin, až jejich selhání. Pro podobnost obou nemocí je spojován také s humánní Balkánskou endemickou nefropatií (BEN), fibrotizující intersticiální nefritidou s familiárním výskytem v endemických zemědělských oblastech jihovýchodní Evropy. U těchto nemocných byly naměřeny vyšší plazmatické hladiny ochratoxinu A, tyto se ale objevily i jinde v Evropě bez podobných následků - hovoří se tedy i o jiných, případně přidružených příčinách například o kyselině aristolochové, virech a dalších nefrotoxických látkách jako kadmium nebo aromatické uhlovodíky vylouhované do pitné vody z hnědého uhlí. Aditivní účinek v patogenezi močových cest má také

citrinin, který se často vyskytuje v obilninách spolu s ochratoxinem, a proto je také tématem této práce.

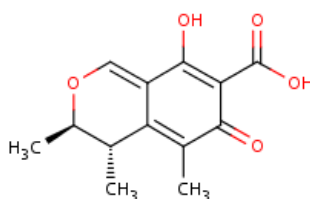
V prvních hodnoceních ještě nebyl dostatek důkazů o karcinogenitě ochratoxinu A, v roce 1993 však byl přehodnocen International Agency for Research on Cancer (IARC) pod záštitou Světové zdravotnické organizace (WHO) a přeřazen do kategorie 2b, tedy možná karcinogenita u lidí. Zpráva o karcinogenech amerického Národního toxikologického programu z roku 2011 jmenuje konkrétně maligní tumory ledvin u samců myši a tumory jater u obou pohlaví po příjmu ochratoxinu A potravou [51]. Data ze studií na lidech jsou nedostatečná pro hodnocení vztahu mezi zvýšenými hodnotami ochratoxinu A v krvi se zvýšenou incidencí tumorů močových cest. Naopak jsou dřívější podezření například u BEN dnes spíše zpochybňována a hledá se jiná příčina. Mechanismus účinků karcinogenity není přesně znám a pravděpodobně působí více cestami, kromě inhibice proteosyntézy kompeticí s fenylalaninem také kovalentními addukty na DNA, oxidativním poškozením, zvýšením intracelulárního pH, inhibicí proteinkinázy.

### 3.2 Citrinin

Molekulová hmotnost: 250,25 g/mol

Vzorec:  $C_{13}H_{14}O_5$

Název IUPAC: (3R,4S)-6-hydroxy-3,4,5-trimethyl-8-oxo-3,4-dihydroisochromene-7-carboxylic acid



Obr. 2: Molekula citrininu [22]

Citrinin, nebo také antimycin, monascidin A, či „yellow rice“ toxin, je další mykotoxin produkovaný plísněmi rodu *Aspergillus* a *Penicillium*, navíc také některými druhy rodu *Monascus*, které se tradičně využívají k fermentaci rýže (red mould rice). Často bývá nalézán spolu právě s ochratoxinem A, jejich nefrotoxický účinek je pak

aditivní. Citrinin sám sice IARC neurčuje jako karcinogen, spadá do kategorie 3 (agent is not classifiable as to its carcinogenicity to humans), není totiž dostatek údajů o jeho účincích. Studie navíc nejsou dostatečně průkazné, aby byla možnost vypočítat průměrný příjem citrininu v populaci, a tak vyčíslit ohrožení a potřebu úředně vymahatelných limitů. Vzhledem k jeho nižší toxicitě oproti ochratoxinu A a menší stabilitě vůči zpracování potravin je mu obecně věnována menší pozornost. Minimálně pro svůj podíl na negativních důsledcích dalších mykotoxinů nebo jiných nefrotoxických látek by však měl být také přeměřován a kontrolován.

Citrinin je polyketid, díky konjugované planární struktuře vykazuje fluorescenci, nejvyšší v neionizované formě při nízkém pH. Je to látka žlutých jehličkovitých krystalků bez zápachu, kyselá, lipofilní, tepelně málo stabilní. Rozkládá se na citrinin H1 a H2, prvně jmenovaný je dokonce více toxický než samotný citrinin. Citrinin byl zkoumán pro své antibiotické vlastnosti, žádné léčivo se z něj však nevyvíjí kvůli hlášené toxicitě při testování u zvířat [22].

Poprvé byl izolován z *Penicillium citrinum* Thom v roce 1931 Hetheringtonem a Raistrickem. Jeho producenti jsou *Aspergillus candidus*, *carneus*, *terreus*, *Penicillium citrinum*, *verrucosum*, *citreonigrum*, *expansum*. Nejvíce je obsažen ve stěně spór, pravděpodobně má vliv na jejich životaschopnost. Kromě obilnin tyto plísně napadají také koření (kmín, koriandr, fenykl, pepř), oříšky, sekundárně sýry, stejně jako ochratoxin i citrinin zůstává v mase a ledvinách prasat [54].

Citrinin je vylučován převážně močí, asi ze 75 %. Experimentální akutní toxicita se projevuje dyspnoí, nekrózou renálního tubulu, akutní myokarditidou, poklesem krevního tlaku. Nebezpečnější je však v praxi citrinin chronickým příjmem alimentární cestou. Výzkumy karcinogenity byly příliš krátké na hodnotné závěry, ani jedna nedosahovala dvou let, nedá se tedy vyloučit ani potvrdit.

Cílový orgán toxicity jsou ledviny, byla pozorována zvýšená morbidita, histopatologické změny, adenomy. Citrinin mění permeabilitu membrány buněk proximálního tubulu, ovlivňuje eflux vápenatých iontů. Dále je tu také riziko reprodukční toxicity, embryotoxicity a teratogenity. Nejsou dostupné podrobnější toxokineticke studie, mechanismus účinku je zřejmě komplexnějšího charakteru, inhibuje RNA a DNA syntézu, narušuje mitochondriální funkce, dává vznik



oxidativním radikálům, inhibuje pomylizaci tubulinu a tvorbu mikrotubulů, aktivuje signální kaspázovou kaskádu s následkem apoptózy buňky.

Při porovnávání účinků ochratoxinu A a citrininu bylo zjištěno, že se jejich působení doplňuje a tím sčítá nefrotoxické působení. Ochratoxin inhibuje syntézu DNA a proteinů již v nižší koncentraci než citrinin, ten je zase účinnější v inhibici mitochondriální respirace a iontového transportu v tubulech [23].

### **3.3 Kontaminace piva**

Ochratoxin A a citrinin se do piva přenáší ze surovin. Výše zmíněné druhy vláknitých hub napadají ječmen a pšenici, a pokud vyprodukují mykotoxiny, budou se přenášet spolu se surovinou i během zpracování. K nákaze dochází často již na poli v závislosti na klimatických podmínkách a kvalitě půdy. Při sklizni jsou spóry rozprášeny na další rostliny a nejrizikovějším obdobím je skladování, kdy mohou obilniny provlhnout a v těsné blízkosti se nákaza šíří. Také nakličování sladu střídavým zavlhnutím a vysoušením musí být kontrolováno, aby se nevyskytla plíseň. Tvorba mykotoxinů nezáleží na vizuální identifikaci houby, může probíhat i skrytě. Ve stopovém množství nemusí být riziková, ale je zapotřebí citlivých analytických metod pro prokázání bezpečnosti přijatelného množství.

Prvním krokem je výroba sladu, což je vlastně naklíčené enzymaticky aktivní zrno. Po naklíčení se zelený slad suší. Světlý slad se dotahuje při nižších teplotách (do 85°C) stejně jako tzv. bílý slad pšeničný, tmavé slady se praží. V pražiči se vyhřívá na karamelizační teplotu, která je pro světlý karamelový slad 120-130°C, polotmavý 160°C a tmavý karamelový slad 180°C. Barvicí slad se praží až při 240°C, po zuhelnatění se rychle zchlazuje a intenzita jeho barvy závisí na délce zahřívání. Tyto tmavé slady se používají pro přípravu tmavých piv, protože mají ale nízkou enzymatickou aktivitu, doplňují se světlým sladem [25]. Teploty využívané při jejich přípravě jsou ale jediné vyšší během vaření piva, při kterých by mohlo docházet k významnějšímu rozkladu jinak značně odolných mykotoxinů.

Dalším krokem, který je považován za možný eliminující faktor, jsou enzymatické procesy během rmutování, kdy se diastatickými enzymy rozkládají složité polysacharidy na jednoduché cukry. Také u fermentace bylo pozorováno snižování

obsahu ochratoxinu [36]. Jinak probíhá příprava piva při relativně nízkých teplotách: vystírání sladu ve vlažné vodě, samo rmutování okolo 75°C, aby nedošlo k předčasné inaktivaci amyláz, chmelení mladiny za varu a nakonec kvašení v chladu. Protože se jedná o relativně malé chemické sloučeniny, není šance je odstranit filtrací.

### 3.4 Legislativa a kontrola

V roce 2006 stanovila European Food Safety Authority (EFSA) tolerovatelný týdenní příjem ochratoxinu A (tolerable weekly intake, TWI) na 120 ng na kilogram tělesné hmotnosti (ng/kg bw). V roce 2010 došlo k přezkoumání, ale hodnota zůstala nezměněna, protože předpokládaný příjem běžné populace je jen 15 až 60 ng/kg bw. V roce 2006 byly dále předloženy v Nařízení komise ES č. 1881/2006 limity pro obsah ochratoxinu A v některých potravinách. Nejnižší hodnoty 2,0 µg/kg jsou stanoveny pro dětskou výživu, nejvyšší u lékořice je stanovena 80 µg/kg.

Pivo omezení nemá, je však nepřímo kontrolováno limity pro ječmen a slad a je navrženo zvážení vhodnosti zavedení limitů obsaženého ochratoxinu A i v pivu. Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives (JECFA) stanovila doporučený TWI přísněji na 100 ng/kg bw.

Tab. 2: Vybrané limity Nařízení komise ES č. 1881/2006 [16]

	Obsah OTA (µg/kg)
Nezpracované obiloviny	5,0
Všechny produkty pocházející z nezpracovaných obilovin (včetně zpracovaných výrobků z obilovin a obilovin určených k přímé lidské spotřebě kromě příkrmů určených pro kojence a malé děti)	3,0
Víno (včetně šumivého vína, s výjimkou likérového vína a vína s obsahem alkoholu nejméně 15 % objemových)	2,0

Pro citrinin prozatím neexistují konkrétní předepsané hodnoty, obecně však pro látky podezřelé z genotoxicity a karcinogenity doporučuje EFSA stanovit míru vystavení dané látce (margin of exposure, MOE) a charakterizovat tak riziko. Pro nedostatek dat ale tato hodnota určit nelze, byl proto tedy alespoň spočítán

maximální denní příjem, který se nepovažuje za rizikový z hlediska nefrotoxicity u lidí (level of no concern for nephrotoxicity). Vychází z hodnot, kdy ještě nebyly pozorovány nežádoucí účinky (no-observed-adverse-effect level, NOAEL), tedy 20 µg/kg bw/den u krys. S určitou korelací kvůli mezidruhovým rozdílům je předpokládán za bezpečný denní příjem pro člověka do 0,2 µg/kg tělesné hmotnosti [14].

V České republice se monitorováním cizorodých látek v potravinách zabývá Státní zemědělská a potravinářská inspekce. V případě nadlimitních nálezů poskytuje hlášení v systému rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF), aby došlo ke stažení z evropského trhu. Ve zprávě z roku 2012 bylo 5 vzorků piva ze 7 pozitivní na ochratoxin A, v nízkých koncentracích 0,01 – 0,09 µg/kg. Citrinin v pivu hodnocen nebyl [48].

Kontrolu piva a jeho surovin poskytuje i na zakázku akreditovaná laboratoř Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Brně. Tento ústav se mimo jiné zabývá právě kontrolou jakosti, kromě testů kvality surovin provádí také různé speciální zkoušky cizorodých látek včetně jednotlivých mykotoxinů (aflatoxiny, ochratoxin A, zearalenon, fumonisiny, cytochalasin E, patulin, sterigmatocystin, deoxynivalenol, deoxynivalenol-3-glukosid, trichoteceny). Jejich analýzu provádí pomocí vnitřních validovaných metod UPLC/FLR a HPLC/MS/MS. Tyto testy mohou být provedeny u ječmene, sladu, mladiny a piva a také chmelu.

### 3.5 Analytické metody

Obě látky vykazují fluorescenci, lze je tedy detekovat i pomocí tenkovrstvé chromatografie. Z hlediska provedení jde však o metodu hůře automatizovatelnou, s méně snadným provedením kvantifikace analytů a vyšším limitem detekce. Pro stopová množství vyskytující se v pivu je tedy nevhodná.

Nejčastěji se pro jejich analýzu využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie, která poskytuje přesné výsledky a s velmi citlivou fluorimetrickou detekcí dosahuje detekčních limitů  $10^{-9}$  –  $10^{-12}$  g/ml [29].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je separační metoda založená na dělení mezi dvěma nemísitelnými fázemi, pevnou stacionární představující sorbent

v koloně a mobilní kapalnou fází unášející vzorek skrz kolonu. V něm obsažené látky postupně interagují s různou afinitou s chemickou strukturou pevné fáze, adsorbují se na ni a zároveň v závislosti na svém rozdělovacím koeficientu jsou extrahovány zpět do mobilní fáze. Takto dochází postupně mnohokrát k vytváření rovnovážných stavů, až se nakonec analyt eluuje z kolony na detektor ve svém charakteristickém retenčním čase při daných podmínkách.

Dnes jsou převážně využívány, a to i v předchozích analýzách těchto mykotoxinů, stacionární reverzní nepolární fáze s chemicky navázanými uhlovodíkovými řetězci, případně s dalšími funkčními skupinami, a k nim mobilní fáze s různým podílem polární složky.

Výhodami kapalinové chromatografie jsou možnost použití minimálních množství vzorku, automatizace, která díky automatickému dávkovači vzorku poskytuje desítky analýz umožňující rutinní použití, separační, kvalitativní i kvantitativní hodnocení.

U samostatných analýz jednotlivých mykotoxinů bývají také využívány elektroforetické metody, imunochemické, detekce pomocí hmotnostní spektrometrie a další. Jedná se však o metody méně univerzální, složitější na provedení a automatizaci nebo více nákladné.

### **3.6 Úprava vzorku pomocí přepínání kolon**

Ke stanovení ochratoxinu A a citrininu z reálného vzorku je potřebujeme nejprve izolovat z matrice, což je nejkritičtější bod. Úprava vzorku je většinou časově nejnáročnější z celé analýzy, náchylná ke ztrátám výtěžnosti, obzvláště při použití klasických off-line extrakčních technik jako je extrakce na pevných fázích (SPE) nebo extrakce kapalina – kapalina (LLE). Matrice piva je relativně nekomplikovaná, vodná, téměř bez bílkovin a nepotřebuje složitých úprav.

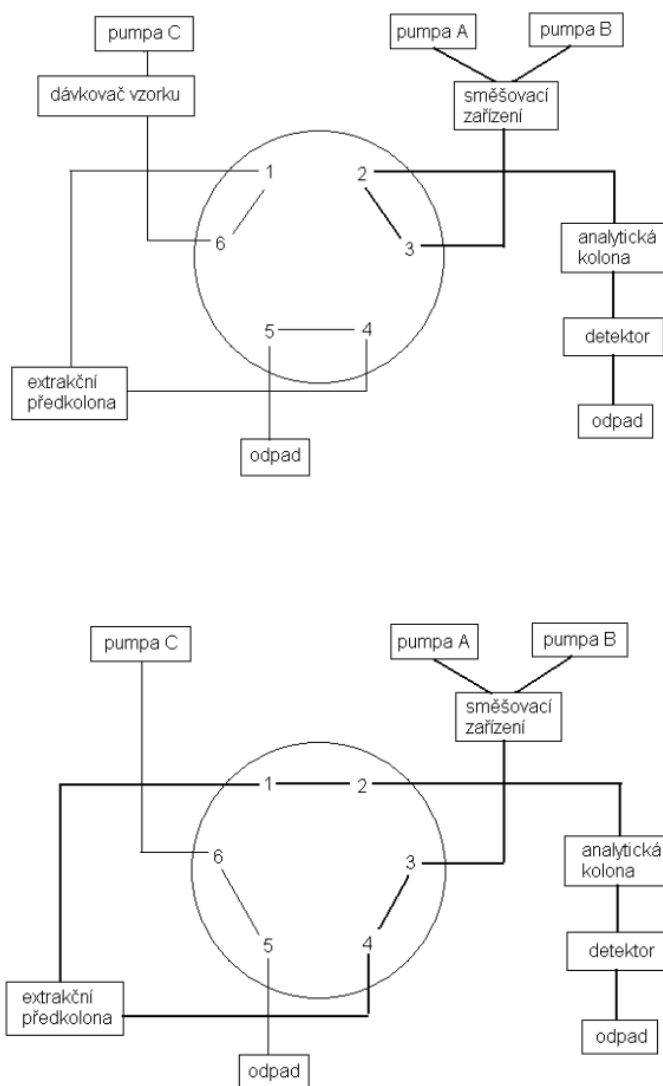
Běžně už se analyzuje ochratoxin A, pro něj se také průmyslově vyrábí extrakční imunoafinitní kolony (např. Ochraprep), obsahující monoklonální protilátku specificky vážící ochratoxin A, takže jsou velmi selektivní a poskytují dobré výsledky [9]. Použití imunoafinitních kolon však v jednom měření nabízí separaci pouze jednoho mykotoxinu. Naším cílem bylo vytvořit metodu univerzálnější a umožnit separaci další

látky. Vhodným řešením je zapojení extrakční předkolony před vlastní analytickou pomocí vícecestného ventilu. V jednom kroku po nástřiku neupraveného vzorku získáme automatizovanou metodu schopnou extrakce i z komplexnější matrice, separace a následného vyhodnocení, ve smyslu on-line zapojení extrakce na pevné fázi do chromatografického systému.

Na první kolonu je vzorek dávkován se slabší mobilní fází, která je více polární a má menší eluční potenciál. Analyzované lipofilní látky zůstanou na koloně zadrženy, vymývá se pouze polární balastní matrice. V druhém kroku následuje přepnutí ventilu a přes extrakční předkolonu začne proudit silnější mobilní fáze, která už eluuje i tyto mykotoxiny a unáší je přímo na analytickou kolonu (viz obrázek 3 znázorňující jednotlivé polohy ventilu). Případným zavedením gradientové eluce je možné dosáhnout ještě rychlejší separace a ostřejších chromatografických píků podobně jako u použití jediné kolony samostatně. Separované látky jsou zaznamenány na detektoru. Na konci analýzy je ventil přepnut do původní polohy a jednotlivé kolony jsou promývány svými počátečními mobilními fázemi a připravovány na další nástřik vzorku.

Co se týče instrumentálních požadavků, je zapotřebí, aby HPLC systém měl alespoň dvě samostatné pumpy na mobilní fáze a vícecestný ventil s možností zapojení alespoň dvou kolon a jejich přepínání. Předkolona by měla mít dostatečnou adsorpční kapacitu pro ideální extrakci, velikost částic náplně je třeba zvolit tak, aby byla kolona méně náchylná k ucpávání. Předkolona bývá často výrazně kratší než analytická kolona, čímž se snižuje doba potřebná na vymývání matrice [45].

Klasická separace na pevných fázích je časově značně náročná, i na obsluhu a spotřebu rozpouštědel. Nejprve je třeba aktivovat SPE kolonku, po nanesení vzorku vymývat matrici, eluovat analyty a teprve potom dávkovat do HPLC systému. Při přepínání kolon dostaneme celý cyklus od hrubého vzorku až po výsledek v jednom automatizovaném celku.



Obr. 3: Jednotlivé polohy ventilu přepínajícího mezi kolonami

### 3.7 Testované kolony

Při optimalizaci metody byly porovnávány náplňové analytické kolony s reverzními fázemi, s částicemi typu fused-core (Ascentis Express firmy Sigma-Aldrich) nebo monolitické (Chromolith firmy Merck). Obojí jsou vyrobeny na bázi silikagelu, takže mají relativně omezenou chemickou stabilitu (dlouhodobější pH jen 3-7) a limitovanou teplotní stabilitu (do 60-70°C) [39].

Povrchově porézní částice (porous shell particles, fused-core) jsou tvořeny 1,7 $\mu$ m neporézním jádrem a slupkou o tloušťce 0,5  $\mu$ m z porézního silikagelu. Výsledkem jsou částice o velikosti 2,7  $\mu$ m, s velikostí pórů 9 nm v množství 75 %

celkového objemu částice. Toto provedení umožňuje pravidelnější distribuci velikosti částic a hustotu naplnění kolony. Snížení axiální a vířivé difuze a odporu proti převodu hmoty zvyšuje kinetiku převodu hmoty. To ve výsledku napomáhá docílit vyšší separační účinnosti bez takového nárůstu zpětného tlaku jako u klasických porézních částic menších než 2  $\mu\text{m}$  s vyšší separační účinností [39]. Jsou to robustní kolony, poměrně rezistentní k ucpávání a poskytující rychlou analýzu. Vyrábí se mnohé varianty reverzních fází, kromě klasických alkylových také polárnější varianty jako pentafluorphenylová nebo phenyl-hexylová [47].

Monolitické kolony jsou tvořeny jedním kusem pevného porézního materiálu naplňujícího kolonu. Vznikají hydrolytickou polymerací, čímž je dosaženo definované struktury o dvou velikostech pórů. Makropóry umožňují snadný průtok mobilní fáze a malé mezopóry zajišťují velký povrch pro separační kapacitu. Oproti částicovým kolonám mají vyšší odolnost vůči matrici vzorku a delší životnost kolony, což je vhodné obzvláště u složitějších bioanalytických vzorků. Jsou totiž také méně náchylné k ucpávání. Na monolitických kolonách je dosaženo nižších tlaků a je tak možné si dovolit vyšší rychlost průtoku. Monolitické kolony jsou prozatím limitované v množství různých chemicky navázaných fází. U endkapovaných stacionárních fází, které nemají volné silanolové skupiny, nedochází k nežádoucím sekundárním interakcím s polárními bazickými sloučeninami [37].

### **3.8 Metody stanovení ochratoxinu A a citrininu**

Nejčastěji jsou tyto mykotoxiny stanovovány pomocí kapalinových chromatografických metod (HPLC, UPLC) s fluorimetrickou detekcí. Na vybavených pracovištích je využívána možnost detekce pomocí hmotnostní spektrometrie. Lze je prokazovat také tenkovrstvou chromatografií s UV detekcí, tato metoda je ale mnohem méně citlivá a stanovení obsahu obtížné. Obecně je snaha používat automatizované metody, kromě HPLC také sekvenční injekční analýzu nebo kapilární elektroforézu. Pro stanovení ochratoxinu A jsou dostupné antigeny pro imunoanalýzy. U ELISY však byla prokázána mírná nepřesnost u velmi nízkých koncentrací oproti HPLC-FLR [10].

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

Analyt	Vzorek	Úprava vzorku	Separace	Detekce	LOD, LOQ	Citace
<b>OTA</b>	Pivo	IAC OchraPrep	<b>HPLC</b> Předkolona Zorbax SB-C18 (12,5 x 4,6 mm, 5 µm), Kolona Zorbax SB-C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) isokratická eluce, acetonitril/okyselená vodná fáze (20 ml kyseliny octové ledové v 1000 ml vody), (50:50)	<b>FLR</b> Ex 333 nm, Em 460 nm	0,75 ng/l, 2,5 ng/l	[9]
<b>OTA</b>		IAC OchraPrep	<b>HPLC</b> Kolona Inertsil (150 x 4,6 mm, 5 µm) s předkolonou (10 x 4 mm, 5 µm) isokratická eluce, acetonitril/voda/kyselina octová (50:49:1)	<b>FLR</b> Ex 333 nm, Em 443 nm	dle matrice, 0,004 – 0,10 µg/kg, 0,01 – 0,30 µg/kg	[49]
<b>OTA</b>	Pivo (ječmen, slad, chmel, mladina)	IAC OchraPrep	<b>UPLC</b> Kolona Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (2,1 x 100 mm, 1,8 µm), gradientová eluce, acn/voda (40:60, 60:40), upraveno H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> na pH 2	<b>FLR</b> Ex 335nm Em 440nm	0,0003 µg/l, 0,001 µg/l	[5]
<b>OTA</b>	Vepřové maso	IAC OchraTest	<b>HPLC</b> Překolona Waters Spherisorb ODS2 (10 x 4,6 mm, 5 µm), Kolona Waters Spherisorb ODS2 (150 x 2,1 mm, 3µm), isokratická eluce acetonitril/voda/kyselina octová (49,5 : 49,5 : 1)	<b>MS</b>	0,06 µg/kg, 0,19 µg/kg	[12]
<b>OTA</b> (aflatoxin B1)	Kořen lékořice, cibule Fritillaria	SPE C18	<b>HPLC</b> Kolona Waters Xbridge <sup>TM</sup> C18 (150 x 2,1 mm, 3,5 µm), gradientová eluce acetonitril/ 5mM ammoniumacetát vodná fáze (20:80, 60:40)	<b>MS/MS</b>	0,024 µg/kg, 0,095 µg/kg	[53]



Analyt	Vzorek	Úprava vzorku	Separace	Detekce	LOD, LOQ	Citace
<b>OTA</b> (celkem 5 mykotoxinů)	Mléko	SPE Oasis HLB cartridge,	<b>UHPLC</b> Kolona UHPLC BEH C18 Waters (50 mm x 2,1 mm, 1,7 μm), gradientová eluce methanol/0,1% vodný roztok amonia (10:90, 90:10)	<b>MS/MS</b>	0,003 μg/kg, 0,009 μg/kg	[24]
<b>OTA</b>	Ořechy a semena	QuEChERS (následná DLLME pro separaci aflatoxinů)	<b>UHPLC</b> Kolona Zorbax Eclipse Plus RRHD (50 x 2,1 mm, 1,8 μm), gradientová eluce, methanol/voda, obě fáze s 0,3 % kyseliny mravenčí a 5mM mravenčanem amonným, (5:95, 90:10)	<b>MS/MS</b>	0,17 μg/kg, 0,57 μg/kg	[3]
<b>CIT</b> (celkem 14 mykotoxinů)					0,52 μg/kg, 1,72 μg/kg	
<b>OTA</b>	Červené víno	IAC OchraStar	<b>HPLC</b> Předkolona Symmetry® C-18 (3,9 x 20 mm, 5 μm), Kolona Waters Symmetry® C-18 (4,6 x 150mm, 5μm), isokratická eluce acetonitril/kyselina mravenčí/voda (49,5 : 49,5 : 1)	<b>FLR</b> Ex 330 nm, Em 460 nm	0,01μg/l, 0,04 μg/l	[50]
		SPE C18			0,09 μg/l, 0,3 μg/l	
<b>OTA</b>	Červené víno	IAC OchraTest	<b>HPLC</b> Kolona Kinetex C18 (4,6 x 100mm, 2,6μm core-shell), isokratická eluce, acetonitril/voda (50:50, okyseleno 1% kyseliny mravenčí)	<b>FLR</b> Ex 333nm, Em 477 nm	0,0025 μg/l, 0,0083 μg/l	[35]
<b>OTA</b>	Červené víno	IAC OchraTest	<b>HPLC</b> Kolona LiChrospher RP-18 Merck (125 x 4,0 mm, 5μm) s předkolonou (4,0 x 4,0 mm, 5μm), isokratická eluce, methanol/voda/kyselina octová (70:30:2)	<b>FLR</b> Ex 336 nm, Em 464 nm	LOD 5 ng/l	[17]
		LLE (chloroform)			<b>ELISA</b>	

Analyt	Vzorek	Úprava vzorku	Separace	Detekce	LOD, LOQ	Citace
<b>OTA</b>	Zázvor	MIP - SPE	<b>UPLC</b> Kolona Waters Acquity UPLC HSS T3 (50 x 2,1 mm, 1,8 µm), isokratická eluce, methanol/0,5% vodný roztok kyseliny octové (65:35)	<b>FLR</b> Ex 333 nm, Em 460 nm	0,09 µg/l, 0,3 µg/l	[6]
<b>OTA</b>	Plazma	LLE (chloroform), poté IAC Ochraprep	<b>HPLC</b> Předkolona Phenomenex C18 (3 x 4,0 mm, 5 µm), Kolona C18 Spherisorb ODS 2 částice 10 µm (300 x 4,6 mm), isokratická eluce, methanol/acetonitril/ 0,005M octan sodný/octová kyselina (300:300:400:14)	<b>FLR</b> Ex 333 nm Em 465 nm	LOQ 0,05 µg/l	[10]
			<b>ELISA</b> (Ridascreen kit)	Fotometricky při 450 nm		
<b>OTA</b>	Pivo	Precipitace proteinů, iontovýměnná/RP SPE	<b>HPLC</b> Kolona Inertsil ODS 3 (2 x 250 mm, 5 µm) s 10mm předkolonou, isokratická eluce, methanol/voda/kyselina octová, (70:30:1,5)	<b>MS/MS</b>	0,4 µg/kg, 0,8 µg/kg	[44]
<b>OTA</b>	Víno	DLLME	<b>Kapilární HPLC</b> Kolona Luna C18 Phenomenex (150 x 0,5 mm, 5 µm), isokratická eluce, vodná fáze (2% kyselina octová, 0,2M SDS)/ methanol (30:70)	<b>LIF</b>	5,5 ng/l, 18,4 ng/l	[2]

Analyt	Vzorek	Úprava vzorku	Separace	Detekce	LOD, LOQ	Citace
OTA	Obilniny, krmivo	QuEChERS	SIA	TSL, terbium	0,7 µg/l, 2,5 µg/l	[33]
				FLR Ex 333 nm Em 457 nm	1,5 µg/l, 5 µg/l	
OTA	Víno	LLE (chloroform), IAC OchraTest	<b>Kapilární elektroforéza</b> Kapilára 48,5 cm, 50 µm, 10 mM borátový pufr, pH 9,3	DAD 380 nm	60 µg/l	[20]
			<b>HPLC</b> Kolona Tracer Extrasil ODS-2 (250 x 4 mm, 5 µm), isokratická eluce, methanol/acetonitril/5mM octan sodný (29:29:42), pH 2,2 (upravené kyselinou fosforečnou)	FLR Ex 225 nm, Em 461 nm	0,07 µg/l	
OTA, CIT (celkem 7 mykotoxinů)	Pivo (africké, kukuřičné)	LLE (acetonitril/4% KCl (9:1), isooktan, chloroform)	TLC detekce, F <sub>254</sub> fluorescenční deska, toluen/ethylacetát/kyselina mravenčí (6:3:1)	UV detekce OTA 366 nm CIT 254 nm	OTA 0,1 µg/ kapku vzorku	[40]
OTA			HPLC stanovení Kolona Lichrospher C18, isokratická eluce, acetonitril/0,1% orthofosforečná kyselina (55:45)	FLR Ex 333 nm, Em 470 nm	1 µg/l,	
OTA	Sýry		HPLC Kolona C18 Inertsil OSD-2 (4,6 x 250 mm, 5µm), isokratická eluce, methanol/voda (70:30) s hydroxidem tetrabutylamonným (1 mM)	TRL, terbium	3 * 10 <sup>-6</sup> M	[52]
CIT					2 * 10 <sup>-6</sup> M	

Analyt	Vzorek	Úprava vzorku	Separace	Detekce	LOD, LOQ	Citace
<b>CIT</b>	Sýry, plísňové kultury sýrů		<b>HPLC</b> Kolona C18 Nucleosil (250 x 4,6 mm, 5 µm), isokratická eluce, tetrabutylamonium (0,57 mM) v methanolu, upraveno na pH 5,5 pomocí 1M HCl, po separaci okyselení	FLR Ex 331 nm Em 500 nm	0,9 * 10 <sup>-7</sup> M, 2 * 10 <sup>-7</sup> M	[18]
<b>CIT</b>	Rýže	Solid-liquid extrakce (acetonitril/4% KCl (9:1), n-heptan, chloroform)	<b>Mikrofluidní elektrochemický imunosensor</b>	elektrochemická	0,1 µg/l, 0,5 µg/l	[1]
<b>CIT</b>	Fermentovaná rýže („Red yeast rice“)	Solid-liquid extrakce (70% ethanol)	<b>MFCI</b> CIT-ovalbumin antigen na karboxylových mikrosférách	FLR	0,005 µg/l, 0,01 µg/l	[32]
<b>CIT</b> (lovastatin)	Fermentovaná rýže („Red yeast rice“)	Solid-liquid extrakce (methanol/voda 80:20)	<b>MEKC</b> Uncoated fused-silica Capillaries, Agilent (32,5 cm, 50 µm)	DAD, UV 216 nm	0,03 ng/l, 0,08 ng/l	[38]

Vysvětlivky: DLLME – dispersive liquid–liquid microextraction, IAC – immunoaffinity column, LIF – laser-induced fluorescence detection, MEKC - micelární elektrokinetická kapilární chromatografie, MFCI – microsphere-based flow cytometric immunoassay, MIP - molecularly imprinted polymer, QuEChERS metoda - Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe, SIA – sekvenční injekční analýza, TRL – time-resolved luminiscence

## 4. Experimentální část

### 4.1 Materiály a pomůcky

#### 4.1.1 Standardy, chemikálie a vzorky

Ochratoxin A, dodavatel Sigma - Aldrich s.r.o., pracovní standard,  $\geq 98 \%$

Citrinin, dodavatel Sigma - Aldrich s.r.o., pracovní standard,  $\geq 98 \%$

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

Methanol, CHROMASOLV<sup>®</sup>, 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 (Millipore)

Vzorky piva (ležáky):

Lobkowicz Premium, Platan 11° (Pivovar Protivín, Pivovary Lobkowicz, a.s.)

Rychtář Premium, (Pivovar Rychtář Hlinsko, Pivovary Lobkowicz, a.s.)

Vévoda 11° (Pivovar Vysoký Chlumeč, Pivovary Lobkowicz, a.s.)

Klášteř 12° (Pivovar Klášteř, Pivovary Lobkowicz, a.s.)

Ježek 11° (Pivovar Jihlava, Pivovary Lobkowicz, a.s.)

Páter (Pivovar Černá Hora, Pivovary Lobkowicz, a.s.)

Kounic (Pivovar Uherský Brod, Pivovary Lobkowicz, a.s.)

Krušovice 12° (Královský pivovar Krušovice, Heineken Česká republika, a.s.)

Břežňák světlý ležák (Pivovar Velké Břežno, Heineken Česká republika, a.s.)

Zlatý bažant (Pivovar Hurbanovo, Heineken Slovensko, a.s.)

Staropramen Ležák, Braník Ležák (Pivovary Staropramen a.s., Praha)

Ostravar Premium (Pivovar Ostravar, Pivovary Staropramen a.s.)

Pilsner Urquell (Pivovar Plzeňský Prazdroj, Plzeňský Prazdroj, a.s.)

Radegast Premium (Pivovar Radegast Nošovice, Plzeňský Prazdroj, a.s.)

Budweiser Budvar, Pardál Echt (Budějovický Budvar, n.p.)

Holba Šerák, Bertold Ležák (Pivovar Holba Hanušovice, a.s., Hanušovice)

Bernard světlý ležák (Rodinný pivovar Bernard, a.s., Humpolec)

Svijanský Máz 11° (Pivovar Svijany, a.s.)

Olivětínský Opat (Pivovar Broumov s.r.o.)

Samson světlý ležák 12° (Pivovar Samson, a.s., České Budějovice)

Bohemia Regent Premium 12° (Pivovar Regent, Třeboň, Bohemia Regent, a.s.)

Valdštejn (Pivovar Nová Paka, a.s.)

Otakar 11° (Měšťanský pivovar v Poličce, a.s.)

Lounský žejdlík 11° (Rodinný minipivovar Domov, Louny)

Chotěboř Prémium (Pivovar Chotěboř s.r.o.)

Poutník světlý ležák 12° (Pivovar Poutník Pelhřimov)

Bakalář (Tradiční pivovar v Rakovníku, a.s.)

Ferdinand (Pivovar Ferdinand s.r.o., Benešov)

Chodovar Zlatý ležák (Rodinný pivovar Chodovar)

Vyškovské pivo (Pivovar Vyškov)

Krakonoš (Pivovar Krakonoš Trutnov)

Skalák (Pivovar Rohozec a.s., Turnov)

Pšeničné nefiltrované ležáky:

Staropramen Nefiltrovaný (Pivovary Staropramen a.s., Praha)

Krušovice Pšeničné (Královský pivovar Krušovice, Heineken Česká republika, a.s.)

Velen (Pivovar Černá Hora, Pivovary Lobkowicz, a.s.)

Světlý kvasnicový pšeničný ležák Herold (Pivovar Herold Březnice a.s.)

Primátor Weizenbier (Pivovar Náchod, Primátor a.s.)

Fénix (Plzeňský Prazdroj a.s.)

Tmavá piva:

Master Tmavý 18° (Pivovar Plzeňský Prazdroj, Plzeňský Prazdroj, a.s.)

Velkopopovický Kozel Černý (Pivovar Velké Popovice, Plzeňský Prazdroj, a.s.)

Krušovice Černé (Královský pivovar Krušovice, Heineken Česká republika, a.s.)

Budweiser Budvar Tmavý ležák (Budějovický Budvar, n.p.)

Pardubický Porter 19° (Pardubický pivovar a.s.)

Samson tmavý ležák 12° (Pivovar Samson, a.s., České Budějovice)

Bernard Černý ležák (Rodinný pivovar Bernard, a.s., Humpolec)

#### 4.1.2 Přístroje a podmínky separace

##### Chromatografický systém:

Chromatograf:	Shimadzu 20AD Prominence Liquid Chromatograph
Detektor:	Shimadzu RF-10AXL Fluorescence Detector
Kolony:	Ascentis® Express F5, 100 x 4,6 mm, 2,7 µm částice, (Sigma Aldrich) Ascentis® Express Phenyl-Hexyl, 100 x 4,6 mm, 2,7 µm částice, (Sigma Aldrich) Ascentis® Express C18, 100 x 4,6 mm, 2,7 µm částice, (Sigma Aldrich) Chromolith® FastGradient RP-18e, 50 x 2 mm, (Merck) Chromolith® HighResolution RP-18e, 50 x 4,6 mm, (Merck)
Předkolona:	Ascentis® Express C18 Guard Cartridge, 5 x 4,6 mm, 5 µm (Sigma Aldrich)
Dávkování:	100 µl
Detekce:	Fluorescenční, Ex 335 nm, Em 497 nm
Mobilní fáze:	Acetonitril – 0,5% vodný roztok kyseliny octové Methanol – 0,5% vodný roztok kyseliny octové Acetonitril - methanol – 0,5% vodný roztok kyseliny octové
Průtok:	1,0 ml/min
Promývací fáze:	Acetonitril – 0,5% vodný roztok kyseliny octové Methanol – 0,5% vodný 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 µm

##### Analytické váhy:

Sartorius 2004 MP, SRN

## **4.2 Příprava roztoků standardů ochratoxinu A a citrininu**

### **4.2.1 Úprava standardů**

Navážky 1,01 mg ochratoxinu A (OTA) a 0,99 mg citrininu (CIT) byly rozpuštěny každá v 1 ml methanolu. Byly tak připraveny 1 ml roztoku ochratoxinu A a 1 ml roztoku citrininu pro další práci.

### **4.2.2 Příprava zásobních roztoků**

Zásobní roztok ochratoxinu A o koncentraci 5 mg/l byl zhotoven odebráním 50  $\mu$ l roztoku standardu připraveného podle 4.2.1. a doplněním 950  $\mu$ l methanolu. Zásobní roztok citrininu vznikl stejným postupem.

### **4.2.3 Příprava pracovního roztoku pro optimalizaci metody**

Smísením po 1  $\mu$ l zásobního roztoku ochratoxinu a 1  $\mu$ l zásobního roztoku citrininu s 998  $\mu$ l methanolu byl nachystán směsný pracovní roztok standardů pro optimalizaci metody o koncentraci 5  $\mu$ g/l každé z látek.

### **4.2.4 Příprava pracovních roztoků pro kalibraci**

Základní směsný roztok pro ředění kalibračních roztoků byl určen na koncentraci 50  $\mu$ l OTA + 100  $\mu$ l CIT/l. Do 25ml baňky bylo napipetováno 250  $\mu$ l zásobního roztoku ochratoxinu A a 500  $\mu$ l zásobního roztoku citrininu a doplněno po rysku promývací mobilní fází, tzn. 30% methanolem okyseleným kyselinou octovou (5 ml na litr mobilní fáze). Pracovní roztoky byly připraveny dalším ředěním tohoto směsného základního roztoku podle tabulky 3. Příslušný objem byl odpipetován do 10ml baňky a doplněn po rysku stejnou mobilní fází.



Tab. 3: Příprava pracovních roztoků pro kalibraci do 10ml baňky

	c OTA (µg/l)	c CIT (µg/l)	objem základního roztoku (µl)
1.	5,0	10,0	1000
2.	2,5	5,0	500
3.	1,25	2,5	250
4.	1,0	2,0	200
5.	0,75	1,5	150
6.	0,5	1,0	100
7.	0,25	0,5	50
8.	0,1	0,2	20
9.	0,05	0,1	10
10.	0,01	0,02	2

#### 4.3 Příprava vzorků pív

Vzorky pív byly odebírány přímo z lahví, do vialky byl nadávkován 1 ml piva.

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

#### 4.4 Příprava mobilních fází

Bylo využíváno všech tří pump tohoto chromatografu.

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

Pumpa B: vodná složka mobilní fáze: 0,5% vodný roztok kyseliny octové

Pumpa C: namíchaná promývací fáze v testovaných poměrech organická/vodná složka, tzn. methanol nebo acetonitril / vodný roztok kyseliny octové (5 ml kyseliny octové na litr mobilní fáze)

## 4.5 Optimalizace chromatografických podmínek

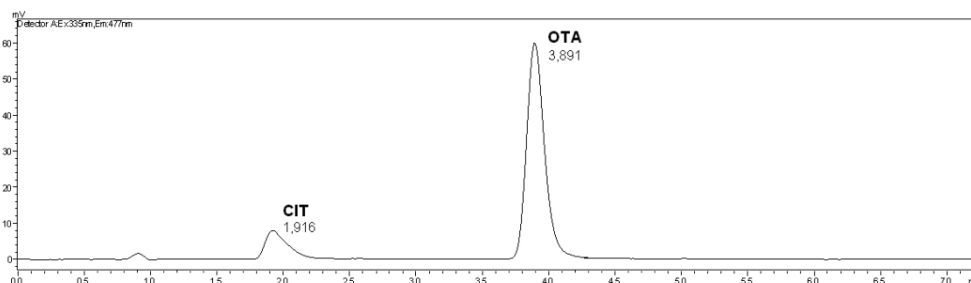
### 4.5.1 Volba mobilní fáze

Nejprve byla snaha separovat látky za isokratických podmínek. Ideální poměr mobilní fáze byl poté využit i pro gradientovou eluci jako počáteční koncentrace. Výhodami gradientové eluce je zrychlení analýzy a dosažení ostřejších píků analytů oddělených od matrice. Oba mykotoxiny jsou poměrně lipofilní, proto je možné při počáteční nižší koncentraci organické fáze nejprve vymýt vodnou matici piva a poté zvýšením gradientu urychlit eluci obou analytů.

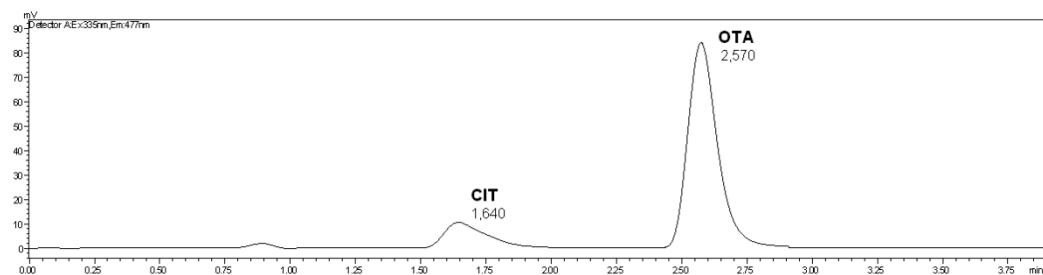
Vodná složka mobilní fáze je slabě okyselená kvůli kyselému charakteru analyzovaných látek. V neionizované formě dochází k jejich vyšší retenci na koloně a lepší separaci od interferencí z matrice. Zvolena byla kyselina octová, která je dobře dostupná, netoxická, organická kyselina.

Volba organického činidla je dána lipofilitou analyzovaných látek. Zkoušeny byly acetonitril, methanol a jejich kombinace. Methanol se ale ukázal jako slabé eluční činidlo pro tyto látky nevhodný, i ve směsi s acetonitrilem nedostatečný. Další pokusy tedy byly zaměřeny na změny poměru acetonitril - 0,5% vodný roztok kyseliny octové. Tato měření probíhala na monolitické koloně High Resolution RP-18e, 50 x 4,6 mm.

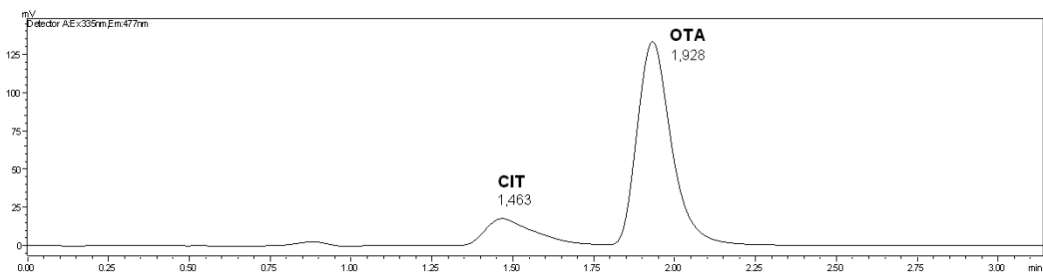
Optimální poměr byl 45:55 (obr. 5). Méně organické složky zbytečně prodlužuje čas analýzy, pík ochratoxinu zaostává za píkem citrininu (obr. 4), naopak při zvýšení podílu acetonitrilu na 50 % nejsou píky dostatečně rozlišené (obr. 6).



Obr. 4: Mobilní fáze 40:60 acetonitril - 0,5% vodný roztok kyseliny octové



Obr. 5: Mobilní fáze 45:55 acetonitril - 0,5% vodný roztok kyseliny octové

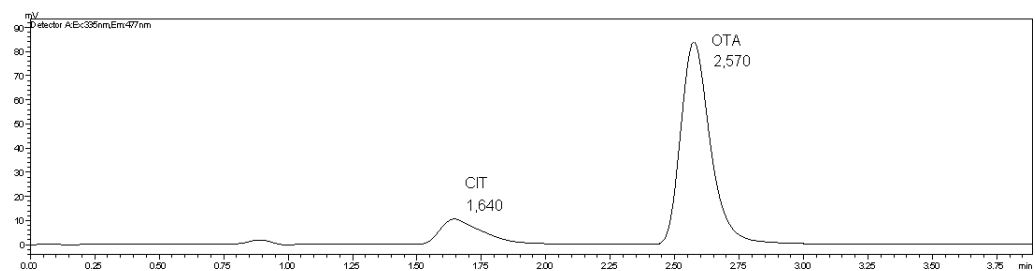


Obr. 6: Mobilní fáze 50:50 acetonitril - 0,5% vodný roztok kyseliny octové

## 4.5.2 Výběr kolony

### Monolitická kolona High Resolution

Parametry: Chromolith® HighResolution RP-18e, 50 x 4,6 mm, monolit, makropóry 15 nm, mezopóry 1,15 µm (Merck)



Obr. 7: Monolitická kolona HighResolution

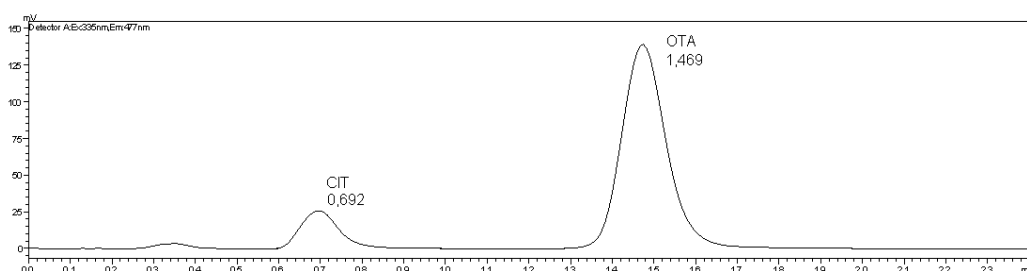
(mobilní fáze 45:55 acetonitril – 0,5% vodný roztok kyseliny octové)

Na této koloně byla hledána ideální mobilní fáze, včetně možnosti použití methanolu samostatně nebo v kombinaci s acetonitrem. Samotný acetonitril byl neúčinnější eluční činidlo, na dalších kolonách se už pracovalo pouze s ním, pro tuto kolonu byl nejlepší poměr 45:55 organická – vodná složka.

Tato kolona by se dala použít pro analýzu ochratoxinu a citrininu, obě látky byly detekovatelné, rozlišení píků bylo vyhovující, navíc při nízkém tlaku na koloně. Nebyla vybrána kvůli chvostování píku citrininu.

### Monolitická kolona C18

Parametry: Chromolith® FastGradient RP-18e, 50 x 2 mm, monolit, makropóry 1,5 µm, mezopóry 13 nm, porosita > 80 % (Merck)



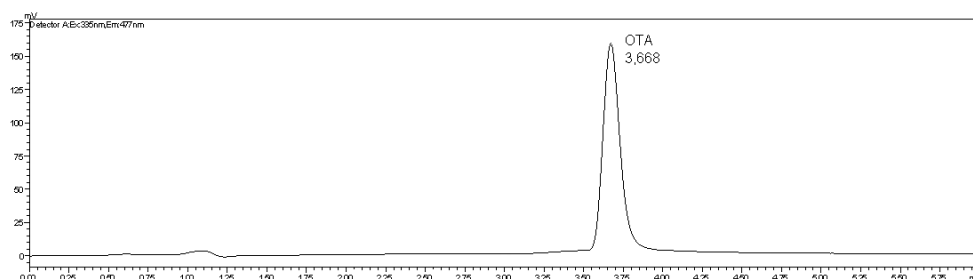
Obr. 8: Monolitická kolona C18

(mobilní fáze 35:65 acetonitril – 0,5% vodný roztok kyseliny octové)

Tato kolona je oproti ostatním testovaným částicovým kolonám kratší a užší, díky menšímu množství sorbentu bylo možno použít mnohem méně organické složky v mobilní fázi, výhodou je také tlak dvakrát nižší než u delší částicové C18 kolony.

### Pentafluorfenylová kolona

Parametry: Ascentis® Express F5, 100 x 4,6 mm, 2,7 µm fused-core částice (Sigma Aldrich)



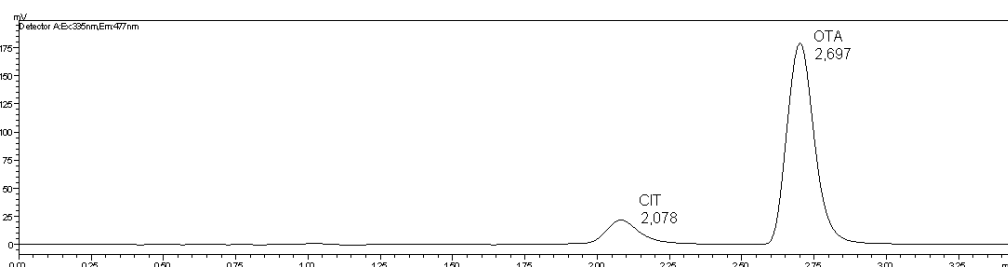
Obr. 9: Pentafluorfenylová kolona

(mobilní fáze 50:50 acetonitril – 0,5% vodný roztok kyseliny octové)

Byla provedena analýza s mobilní fází v poměru acetonitril – vodná okyselená fáze 45:55, 50:50 a 55:45. Na všech záznamech chybí pík citrininu, pravděpodobně se nezachytil na koloně, nebo byl příliš dlouho zadržován. Tato kolona je tedy nevhodná k separaci, natož ke kvantifikaci obou mykotoxinů.

### Kolona C18

Parametry: Ascentis® Express C18, 100 x 4,6 mm, 2,7 µm fused-core částice, (Sigma Aldrich)



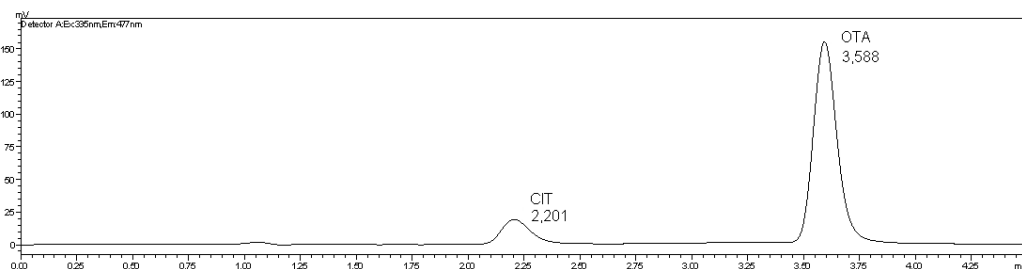
Obr. 10: Kolona C18

(mobilní fáze 55:45 acetonitril – 0,5 % kyselina octová)

I na této koloně byly obě látky separovány, ze zkoušených poměrů mobilních fází nejlépe vycházela 55:45 ve prospěch organické složky. Pík citrininu ale není dostatečně úzký.

### Phenyl-hexylová kolona

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



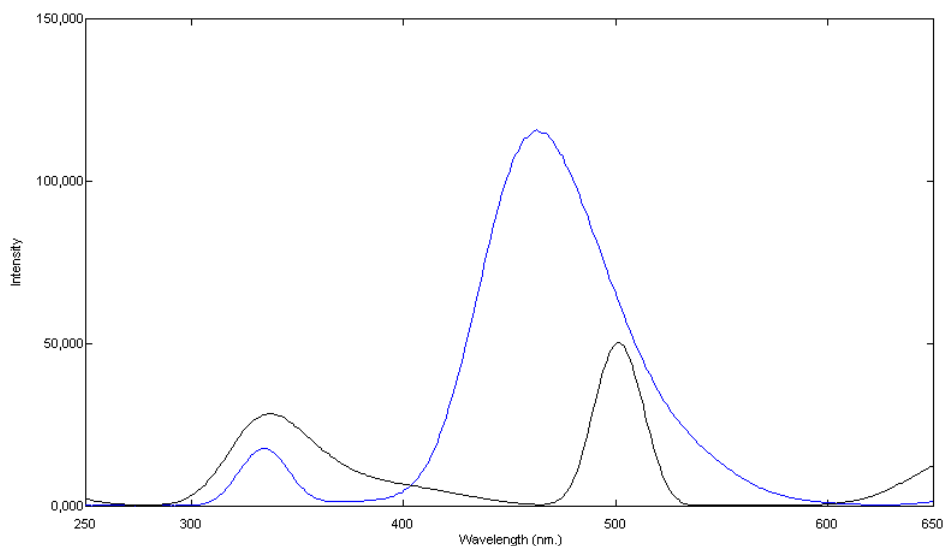
Obr. 11: Phenyl-hexylová kolona

(mobilní fáze 50:50 acetonitril – 0,5 % kyselina octová)

Nakonec byla zvolena z posledních dvou testovaných kolon tato kolona, obě látky se na koloně separují, píky mají dobré rozlišení, výrazně nechvostují, tlak do 15 MPa je vyhovující.

#### 4.5.3 Parametry detekce

Po proměření emisních a excitačních spekter obou standardů byly vybrány hodnoty pro fluorescenční detekci Em 335 nm a Ex 497 nm, na kterých byla odezva obou standardů zároveň co největší. Spektra byla měřena v koncentraci 0,05 mg/l v mobilní fázi 50:50 acetonitril – 0,5% vodný roztok kyseliny octové. Emisní spektrum citrininu je výrazně užší než ochratoxinu A, proto je potřeba nastavit excitační záření podle něj okolo 337 nm, kdy je pro citrinin nejvyšší citlivost, a také volba detekce emisního záření při 497 nm byla učiněna podle hodnot citrininu. Excitační spektra obou látek jsou si blízka. Vzhledem k tomu, že odezvy citrininu jsou zhruba dvakrát slabší než ochratoxinu, při validaci metody bylo využíváno dvojnásobné koncentrace citrininu oproti ochratoxinu, aby jejich hodnoty intenzity byly řádově stejné.



Obr. 12: Emisní spektrum citrininu (černá) a ochratoxinu A (modrá křivka), Ex = 337 nm

#### 4.5.4 Vliv teploty

Vhodná teplota byla vybrána porovnáváním retenčních časů standardů při různých teplotách. Pro měření byla použita kolona Phenyl-hexyl, která se při předchozích měřeních jevila nejvhodnější. Byly srovnávány retenční časy obou píků a sledováno zda dochází k separaci s dostatečným rozlišením obou píků od sebe a píku citriniu od mrtvého objemu. Cílem bylo využít změny teploty k dosažení co nejkratší doby analýzy s dostatečným rozlišením. Dalším sledovaným parametrem byl tlak na koloně. S rostoucí teplotou se dosahovalo kratšího času analýzy a nižšího tlaku. Ze zkoušeného rozmezí 30-60°C je tedy optimální teplota 50°C, vyšší teplota už není vhodná kvůli destrukční zátěži kolony a přílišnému přiblížení píků.

Tab. 4: Srovnání retenčních časů a tlaku na koloně při různých teplotách analýzy

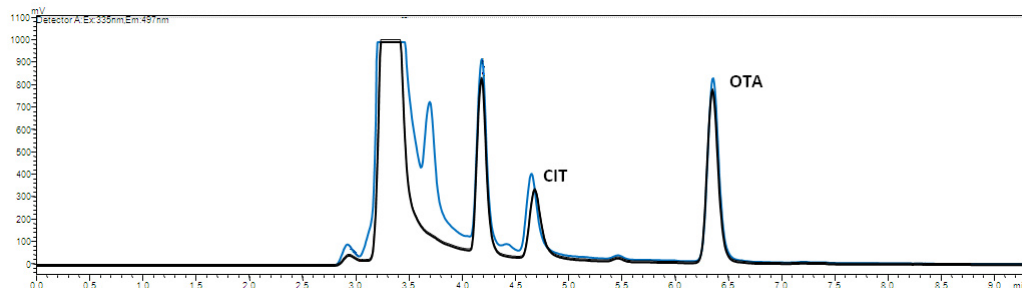
	30°C	40°C	<b>50°C</b>	60°C
t <sub>R</sub> CIT (min)	2,225	2,178	<b>2,129</b>	2,064
t <sub>R</sub> OTA (min)	3,593	3,309	<b>3,057</b>	2,796
tlak (MPa)	14,5	12,9	<b>11,5</b>	10,0

#### 4.5.5 Volba promývací fáze

Přepínáním kolon je dosaženo podmínek extrakce na pevné fázi zapojené do systému on-line. Po nástřiku vzorku předkolonou protéká mobilní fáze se slabším elučním potenciálem, aby byla vymyta balastní matrice. Následuje přepnutí ventilu, kdy je přepojena na předkolonu pumpa se silnější mobilní fází, kterou jsou eluovány i dosud zadržené analyty přímo na vlastní analytickou kolonu. Na ní se látky dále separují touto silnější mobilní fází. Volba slabší promývací fáze je tedy kritický krok z hlediska co nejlepšího odstranění balastní matrice a interferujících píků při současném dostatečném zadržení analyzovaných látek na předkoloně.

Při použití acetonitrilu jako organické složky docházelo ke ztrátám citriniu, maximální koncentrace, která by se dala použít na krátké předkoloně s reverzní fází C-18 (5 x 4,6 mm, 5 µm), byla do 5 % acetonitrilu ve vodné fázi. Vhodnější se proto jevil methanol, pokud možno v co nejvyšší koncentraci, aby se co nejvíce zredukovala balastní matrice při zachování dobrého rozlišení píků

a jejich separace od matrice. Slabší promývací mobilní fáze je kvůli povaze látek také okyselena kyselinou octovou. Výsledná koncentrace byla určena na okyselený 30% methanol (5 ml kyseliny octové na litr mobilní fáze). Obsah methanolu vyšší než 30% způsoboval již vymývání citrininu z extrakční předkolony.



Obr. 13: Promývací fáze okyselený 15% methanol (modrá křivka) a 30% methanol (černá)

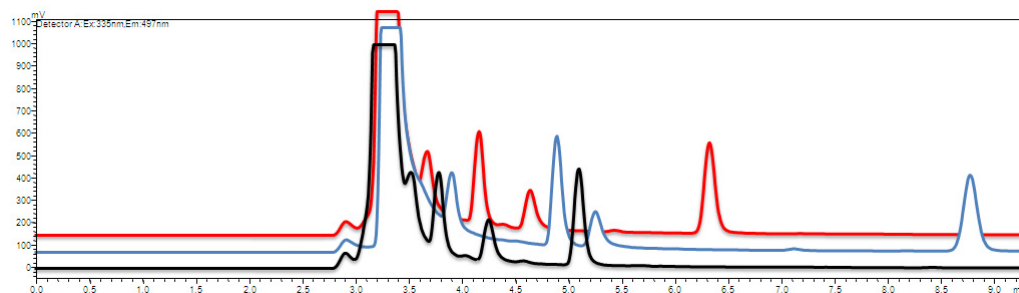
Pro dosažení účinnějšího promývání byl nastaven průtok promývací fáze na 2 ml/min. S delším časem promývání až 5 minut zůstávající balastní pík příliš nezmenšoval odezvu na začátku chromatogramu, byl proto ponechán kratší čas 2 minuty do přepnutí ventilu a začátku separace pro úsporu času analýzy.

Tato optimalizace on-line SPE extrakce probíhala za výše vybraných podmínek na phenyl-hexylové koloně s mobilní fází 45:55 acetonitril – 0,5% vodný roztok kyseliny octové při teplotě 50°C, přičemž byla zapojena přes vícecestný ventil předkolona s reverzní fází C18 a další pumpa se slabší promývací mobilní fází pro on-line úpravu vzorku. Přepínání ventilu bylo nastaveno po 2 minutách po nadávkování vzorku na předkolonu, kdy se ukončí promývání a začne vlastní separace na phenyl-hexylové koloně.

#### 4.5.6 Optimalizace gradientové eluce

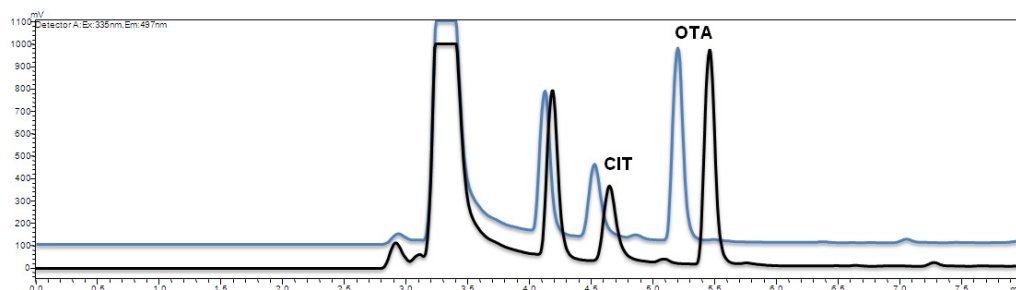
Počáteční koncentrace mobilní fáze byla nastavena na 45:55 acetonitril – 0,5% vodný roztok kyseliny octové. Různé koncentrace acetonitrilu byly srovnávány při isokratické eluci a nástřiku 100 µl vzorku (pivo s přidavkem standardů), pro promytí byl použit 30% okyselený methanol. Vyšší podíl acetonitrilu snižuje rozlišení píku citrininu a píku z balastní matrice, nižší podíl celou analýzu zase zbytečně zpomaluje (obr. 14)





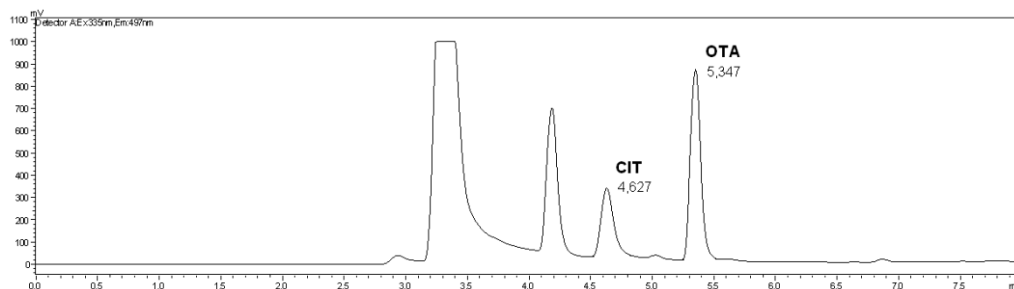
Obr. 14: Srovnání různého poměru organické/vodné složky v mobilní fázi  
 Mobilní fáze acetonitril – 0,5% vodný roztok kyseliny octové v poměru 40:60 (modrá křivka),  
 45:55 (červená křivka), 50:50 (černá křivka).

K přepnutí ventilů dochází opět ve 2. minutě, kde začíná vlastní analýza. Nejprve protéká stálá mobilní fáze o koncentraci 45:55 acetonitril – 0,5% kyselina octová. Další pokusy vedly k určení času, kdy má začít narůstat podíl acetonitrilu v mobilní fázi. Jeho maximální % výše byla odhadem nastavena k růstu do koncentrace 80:20 a testovány byly časy začátku nárůstu gradientu 2,5 minuty a 3 minuty (respektive půl minuty a minuta od přepnutí ventilu). K lepšímu rozlišení píků docházelo při pozdějším nárůstu koncentrace acetonitrilu, tedy ke zvyšování podílu organické fáze až od 3. minuty (obr. 15).



Obr. 15: Srovnání začátku nárůstu gradientu v různém čase  
 Začátek gradientu od 3. minuty (černá) a od 2,5. minuty (modrá křivka)

Následujícím krokem byla optimalizace strmosti nárůstu gradientu, do jaké koncentrace a v jakém časovém intervalu by se měla lineárně zvyšovat organická složka mobilní fáze. Maximální mobilní fáze 80:20 acetonitril – 0,5% vodný roztok kyseliny octové se zdála dostačující, testována byla také konečná koncentrace 90:10.

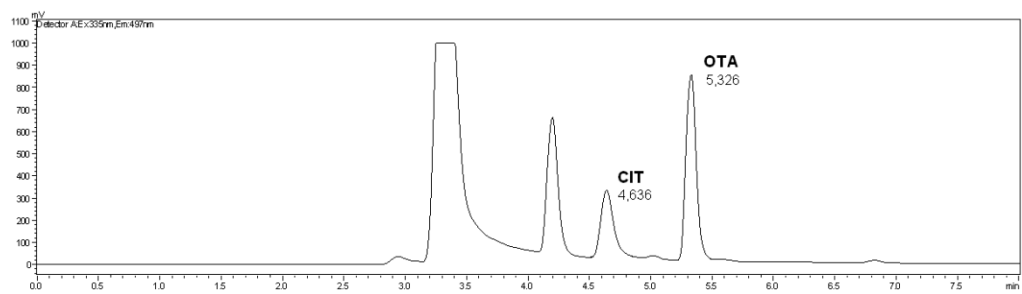


Obr. 16: Nárůst procentuálního podílu acetonitrilu v mobilní fázi ze 45 na 90 %.

Jak je vidět na obrázku 16, z experimentů bylo zjištěno, že v čase 5,5 minuty byly již oba standardy eluovány a průtok v této době na pumpách odpovídal poměru 75:25 acetonitrilu k vodné fázi. Více času a zvyšování podílu acetonitrilu již tedy nebylo nutné. Proto byl výsledný gradient nastaven na konečnou koncentraci 75:25 acetonitril – 0,5% kyselina octová, nárůst gradientu probíhá v čase 3 – 5,5 minut lineárně a v 6. minutě je celá analýza ukončena. Průtok mobilní fáze na analytické koloně byl po celou dobu nastaven na hodnotu 1,0 ml/min. Přehled viz tabulka 5.

Tab. 5: Průběh analýzy, finální podmínky gradientu

	% (acetonitril)	% (0,5% kys. octová)	30% metanol	Komentář
do 2. min	-	-	2 ml/min	nástřik 100 µl vzorku na extrakční kolonu, promývání balastní matrice
2.-3. min	45	55	-	přepnutí ventilů ve 2. minutě, začíná eluce analytů na analytickou kolonu, isokraticky, průtok 1 ml/min
3.-5,5. min	lineární nárůst do 75	lineární pokles na 25	-	lineární nárůst gradientu
5,5.-6,0 min	45	55	-	do 6. min – kondicionace kolony na počáteční podmínky



Obr. 17: Konečný gradient pro validaci  
Procentuální nárůst podílu acetonitrilu 45 -> 75 % v čase 3 - 5,5 minuty.

## 5. Výsledky a diskuze

### 5.1 Souhrn optimálních podmínek pro HPLC analýzu

#### Chromatografický systém:

Chromatograf:	Shimadzu 20AD Prominence Liquid Chromatograph
Detektor:	Shimadzu RF-10AXL Fluorescence Detector
Kolona:	Ascentis® Express Phenyl-Hexyl, 100 x 4,6 mm, 2,7 µm částice, (Sigma Aldrich)
Předkolona:	Ascentis® Express C18 Guard Cartridge, 5 x 4,6 mm, 2,7 µm (Sigma Aldrich)
Dávkování:	100 µl
Detekce:	Fluorescenční, Ex 335 nm, Em 497 nm
Typ eluce:	Gradientová
Mobilní fáze:	Acetonitril – 0,5% vodný roztok kyseliny octové, 45:55 až 75:25
Nárůst gradientu:	2. - 3. min isokraticky, 3. – 5,5. min lineární nárůst gradientu
Průtok:	1,0 ml/min
Promývací fáze:	Methanol – 0,5% vodný roztok kyseliny octové, 30:70
Průtok:	2,0 ml/min
Čas přepnutí ventilu:	2. min
Celkový čas analýzy:	6 min
Teplota:	50°C
Vyhodnocení:	Chromatografický software LC Solution

## 5.2 Test vhodnosti chromatografického systému

Vhodnost chromatografického systému a účinnost chromatografické separace byla prokazována měřením směšného pracovního roztoku standardů pro kalibraci o koncentraci 1 µg/l OTA a 2 µg/l CIT připraveným podle kapitoly 4.2.4. Rovněž byla prokazována pro tyto koncentrace naspikované v matrici piva.

### 5.2.1 Účinnost chromatografického systému – zdánlivý počet teoretických pater (N)

Vhodnost kolony byla ověřena pro analyzované látky samotné i v matrici. Výpočet byl proveden z průměru tří měření podle vzorce:

$$N = 5,54 \cdot \left( \frac{t_R}{w_{0,5}} \right)^2, \text{ kde:}$$

$t_R$  je retenční čas,

$w_{0,5}$  je šířka píku v polovině jeho výšky.

Tab. 6: Účinnost chromatografického systému

<b>analyzovaná látka</b>	<b><math>t_R</math> (min)</b>	<b><math>w_{0,5}</math> (min)</b>	<b>N</b>
ochratoxin A	4,631	0,093	<b>16654</b>
citrinin	5,320	0,112	<b>8343</b>

Tab. 7: Účinnost chromatografického systému v matrici

<b>analyzovaná látka</b>	<b><math>t_R</math> (min)</b>	<b><math>w_{0,5}</math> (min)</b>	<b>N</b>
ochratoxin A	4,617	0,093	<b>16558</b>
citrinin	5,316	0,110	<b>8760</b>

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

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

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

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

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

Tab. 8: Symetrie chromatografických píků

<b>analyzovaná látka</b>	<b><math>t_R</math> (min)</b>	<b><math>w_{0,05}</math> (min)</b>	<b><math>A_s</math></b>
ochratoxin A	4,617	0,191	<b>1,157</b>
citrinin	5,316	0,287	<b>1,414</b>

Tab. 9: Symetrie chromatografických píků v matrici

<b>analyzovaná látka</b>	<b><math>t_R</math> (min)</b>	<b><math>w_{0,05}</math> (min)</b>	<b><math>A_s</math></b>
ochratoxin A	4,631	0,189	<b>1,143</b>
citrinin	5,320	0,260	<b>1,336</b>

Faktor symetrie píku má být v rozmezí 0,8 až 1,5. Pro oba standardy požadavek vyhovuje, i v matrici.

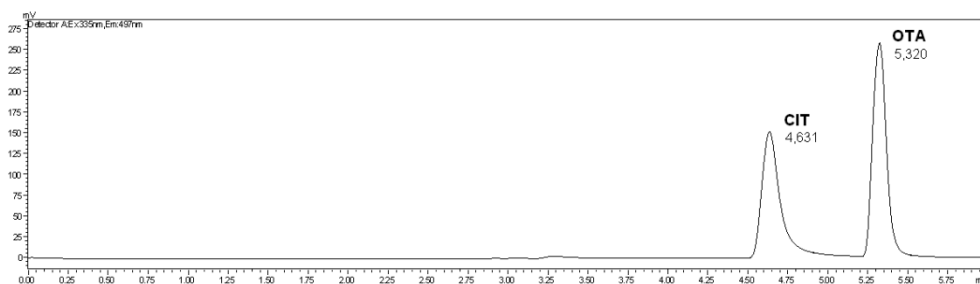
### 5.2.3 Rozlišení chromatografických píků ( $R_s$ )

Rozlišení píků analytů bylo vypočteno z průměru tří měření podle vzorce:

$$R_s = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}, \text{ kde}$$

$t_{R1}$  a  $t_{R2}$  jsou retenční časy látek, kdy  $t_{R2} > t_{R1}$ ;

$w_{h1}$  a  $w_{h2}$  jsou šířky píků v poloviční výšce píků.

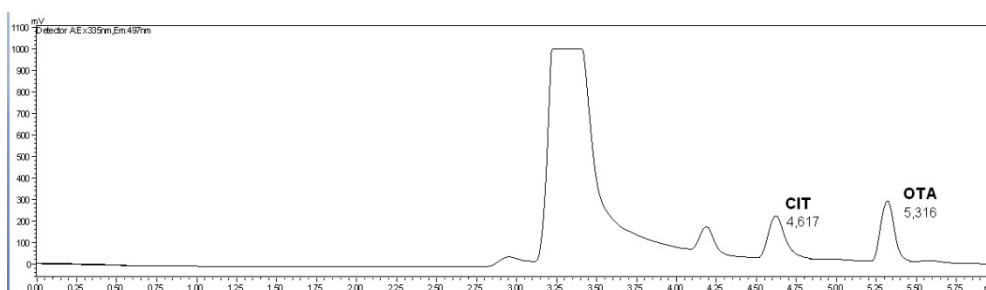


Obr. 18: Separace standardů za optimálních podmínek

Tab. 10: Rozlišení chromatografických píků standardů

analyzované látky	Rs
OTA - CIT	3,745

Rozlišení chromatografických píků bylo experimentálně ověřováno i pro separaci standardů v matrici piva.



Obr. 19: Separace za optimálních podmínek v matrici piva

Tab. 11: Rozlišení chromatografických píků standardů v matrici

analyzované látky	Rs
OTA - CIT	3,854

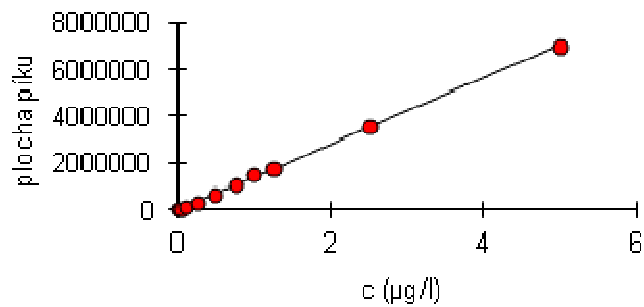
### 5.3 Validace analytické metody

#### 5.3.1 Linearita

Pro určení linearity byla vyhodnocována kalibrační křivka výsledků pracovních roztoků pro kalibraci připravených v koncentracích podle 4.2.4. Každá koncentrace byla proměřena třikrát a pro hodnocení byla použita průměrná hodnota těchto tří měření. Analýza byla prováděna na deseti směsných roztocích, vlastní kalibrace je vyjádřena pro každou látku zvlášť, také v matici piva.

#### Ochratoxin

c (µg/l)	plocha píku
0,01	13341
0,05	66769
0,10	119653
0,25	319878
0,50	673406
0,75	1074918
1,00	1518162
1,25	1797417
2,50	3574453
5,00	6972424



---

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

---

Počet bodů	n = 10	Odhad chyby
Směrnice	k = 1401977	± 11425,65
Abs. člen	q = 13386,25	± 21283,66
Korelační koef.	r = 0,999734	
Reziduální odch.	s = 53201,45	

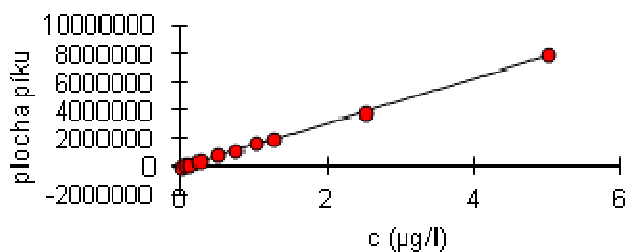
---

Obr. 20: Linearita měření pro ochratoxin A



### Ochratoxin v matrici

c (µg/l)	plocha píku
0,01	15531
0,05	91456
0,10	141230
0,25	384373
0,50	779199
0,75	1147512
1,00	1638684
1,25	1941485
2,50	3791813
5,00	7971228



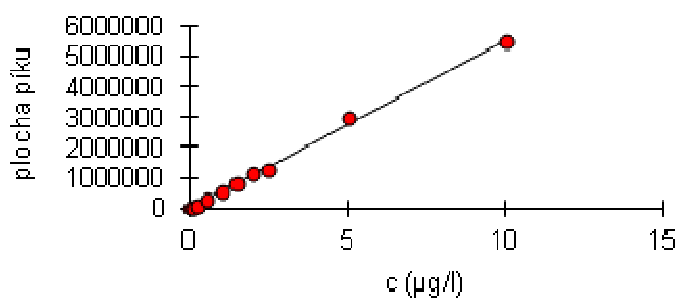
#### Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$

Počet bodů	n = 10	Odhad chyby
Směrnice	k = 1583837	± 14173,88
Abs. člen	q = -16906,6	± 26403,04
Korelační koef.	r = 0,99968	
Reziduální odch.	s = 65998,07	

Obr. 21: Linearita měření pro ochratoxin A v matrici

### Citrinin

c (µg/l)	plocha píku
0,02	9065
0,10	53355
0,20	91545
0,50	256531
1,00	554913
1,50	808918
2,00	1131359
2,50	1284812
5,00	2963856
10,00	5480110



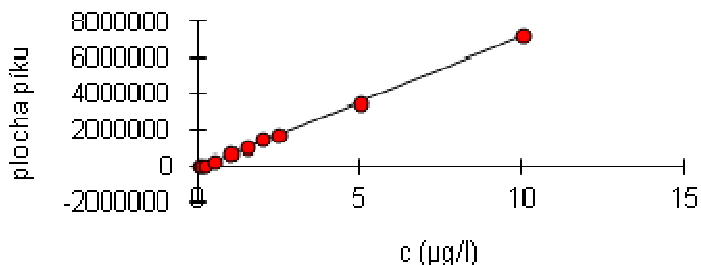
#### Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$

Počet bodů	n = 10	Odhad chyby
Směrnice	k = 555590,4	± 8724,606
Abs. člen	q = -4410,77	± 32504,33
Korelační koef.	r = 0,999015	
Reziduální odch.	s = 81249,06	

Obr. 22: Linearita měření pro citrinin

## Citrinin v matrici

c (µg/l)	plocha píku
0,02	8200
0,10	54192
0,20	80654
0,50	307250
1,00	657800
1,50	1005127
2,00	1437586
2,50	1711656
5,00	3413134
10,00	7197650



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

Počet bodů	n = 10	Odhad chyby
Směrnice	k = 718529,2 ± 6367,612	
Abs. člen	q = -52358,6 ± 23723,13	
Korelační koef.	r = 0,999686	
Reziduální odch.	s = 59299,24	

Obr. 23: Linearita měření pro citrinin v matrici

### **5.3.2 Opakovatelnost**

Pro ověření opakovatelnosti byly směsné pracovní roztoky standardů pro kalibraci tří koncentračních hladin opakovaně dávkovány do systému. Z ploch píků se vyhodnotily relativní směrodatné odchylky jednotlivých látek pro příslušné koncentrace.

Ochratoxin A byl vyhodnocován při koncentracích 5 µg/l, 1 µg/l a 0,05 µg/l, citrinin při koncentracích 10 µg/l, 2 µg/l a 0,1 µg/l.

Tab. 12: Důkaz opakovatelnosti metody

nástřík	ochratoxin			citrinin		
	plocha píku			plocha píku		
	5 µg/l	1 µg/l	0,05 µg/l	10 µg/l	2 µg/l	0,1 µg/l
1	6336121	1521997	66330	4932179	1121755	54045
2	6278274	1517102	66670	4968170	1122133	54456
3	6211150	1508759	64789	4895949	1122066	53828
4	6312680	1506336	65232	4881885	1122494	53658
5	6245884	1507394	65218	4861904	1121714	53739
6	6251120	1509079	65547	4828155	1114561	53717
N	6	6	6	6	6	6
$\bar{x}$	6272538	1511777	65631	4894707	1120787	53907
SD	46097	6292	723	49944	3063	301
<b>RSD (%)</b>	<b>0,73</b>	<b>0,42</b>	<b>1,10</b>	<b>1,02</b>	<b>0,27</b>	<b>0,56</b>

### 5.3.3 Přesnost

Přesnost měření byla vypočítána z průměrů tří nástříků šesti vzorků, které byly připraveny napipetováním po 20 µl základního směsného roztoku (50 µg/l OTA + 100 µg/l CIT) do šesti vialek s 980 µl světlého piva do výsledné koncentrace 1,0 µg/l OTA + 2,0 µg/l CIT. Stejně bylo připraveno šest naspikovaných vzorků tmavého piva, a do výpočtu použit průměr tří nástříků každého vzorku.

Tab. 13: Přesnost v matrici světlého piva

vzorek	průměrná plocha píku CIT	průměrná plocha píku OTA
1	1018191	1449295
2	967020	1427330
3	1027523	1484757
4	1000463	1426412
5	960597	1410261
6	977508	1418456
průměr	991884	1436085
SD	27711	27171
<b>RSD (%)</b>	<b>2,79</b>	<b>1,89</b>

Tab. 14: Přesnost v matrici tmavého piva

Vzorek	průměrná plocha píku CIT	průměrná plocha píku OTA
1	1106175	1457385
2	1113249	1453061
3	1020544	1425265
4	1021867	1450638
5	1143685	1479838
6	1098615	1478076
Průměr	1084023	1457377
SD	51010	20140
<b>RSD (%)</b>	<b>4,71</b>	<b>1,38</b>

Výsledky jsou vyhovující, platí, že RSD < 5%.

### 5.3.4 Správnost

Byla použita metoda standardního přídávku. Výtěžnost byla určena z poměru teoretické vypočítané koncentrace ve vzorku ku známé koncentraci reálně přidaného standardu 1,0 µg/l OTA + 2,0 µg/l CIT. Byly použity hodnoty měřené pro přesnost, šest vzorků světlého piva s přídávkem známé koncentrace a stejně tak šest vzorků tmavého piva, od každého vzorku průměr tří nástřiků. Respektive výsledná plocha pod křivkou každého ze šesti vzorků v matrici pro světlé a pro tmavé pivo získaná z průměru tří nástřiků byla dána do poměru s průměrnou plochou pod křivkou standardů o koncentraci 1,0 µg/l OTA + 2,0 µg/l CIT, které byly měřeny dva vzorky po třech nástřicích.

Tab. 15: Výtěžnost z matrice světlého piva

vzorek	výtěžnost CIT (%)	výtěžnost OTA (%)
1	104,81	99,44
2	99,55	97,94
3	105,77	101,88
4	102,99	97,87
5	98,88	96,77
6	100,62	97,33
<b>průměr</b>	<b>102,10</b>	<b>98,54</b>
SD	2,85	1,86
RSD (%)	2,79	1,89

Tab. 16: Výtěžnost z matrice tmavého piva

vzorek	výtěžnost CIT (%)	výtěžnost OTA (%)
1	103,75	100,66
2	104,41	100,37
3	95,72	98,45
4	95,84	100,20
5	107,27	102,21
6	103,04	102,09
<b>průměr</b>	<b>101,67</b>	<b>100,66</b>
SD	4,78	1,39
RSD (%)	4,71	1,38

Výtěžnost je v rozmezí 95-105% a RSD < 5%.

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

Limit kvantifikace byl stanoven jako odezva desetkrát větší než šum. 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.

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

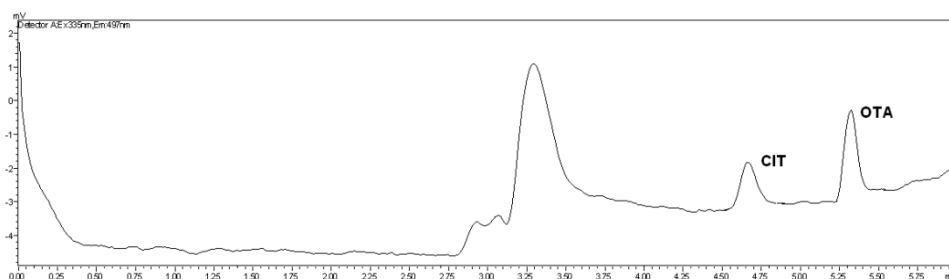
$$LOQ = \frac{10 \cdot h_n}{m} \quad \text{a} \quad LOD = \frac{3 \cdot h_n}{m},$$

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

Mezi nimi pak platí vztah:

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

Obě hodnoty byly ověřeny jak pro čisté standardy, tak v matrici piva. Roztok o koncentraci 0,05 µg/l OTA + 0,1 µg/l CIT byl dále ředěn, výšky píků jednotlivých výstupů byly porovnávány s linií šumu. Při desetinásobném zředění už byly píky na chromatogramu hůře detekovatelné vizuálně oproti šumu. Chromatografický záznam koncentrace rovné limitu kvantifikace, tedy 0,01 µg/l OTA a 0,02 µg/l CIT, ukazuje obr. 24. Tato koncentrace je zároveň stanovena nejnižším bodem kalibračních křivek obou standardů. Metoda je dostatečně citlivá, aby zaznamenala i stopové množství daleko pod (cca 200 krát) regulacemi autorit. Zároveň je tak možno prokázat, že se oba mykotoxiny vyskytují v takto malých koncentracích bez nutnosti obav z chybné kvantifikace výsledku.



Obr. 24: Analýza standardů o koncentraci rovné LOQ  
(OTA v koncentraci 0,01 µg/l a CIT 0,02 µg/l)

Tab. 17: Limit kvantifikace standardů

	koncentrace (µg/l)	1. nástřik (plocha)	2. nástřik (plocha)	3. nástřik (plocha)	průměr LOQ
OTA	<b>0,01</b>	15426	12590	12008	<b>13341</b>
CIT	<b>0,02</b>	11046	8200	7950	<b>9065</b>

Tab. 18: LOD standardů

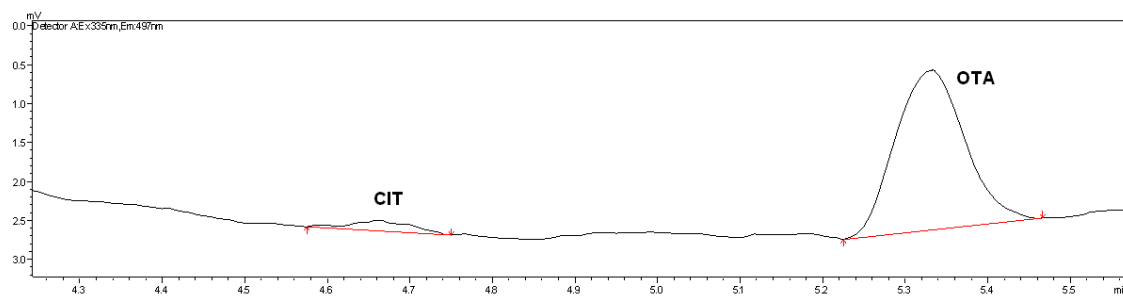
	Teoreticky vypočtená koncentrace LOD (µg/l)
OTA	0,003
CIT	0,006

Tab. 19: LOQ v matrici

	koncentrace ( $\mu\text{g/l}$ )	1. nástřik (plocha)	2. nástřik (plocha)	3. nástřik (plocha)	průměr LOQ
OTA	<b>0,01</b>	15507	15768	15319	<b>15531</b>
CIT	<b>0,02</b>	8644	7897	8059	<b>8200</b>

Tab. 20: LOD v matrici

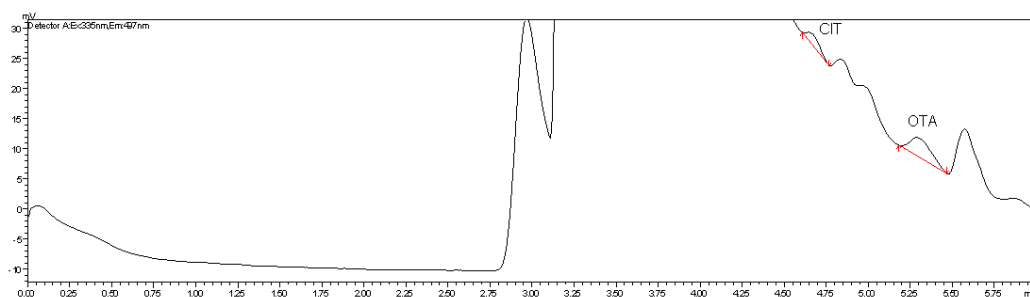
	Teoreticky vypočtená koncentrace LOD ( $\mu\text{g/l}$ )
OTA	0,003
CIT	0,006



Obr. 25: Analýza v matrici vzorku v koncentraci rovné LOD  
(OTA v koncentraci  $0,003 \mu\text{g/l}$  a CIT  $0,006 \mu\text{g/l}$ )

## 5.4 Stanovení obsahu ochratoxinu A a citrininu ve vzorcích vybraných druhů pív

K analýze bylo sesbíráno 48 vzorků pív na českém trhu, z toho 6 pív pšeničných a 7 pív tmavých. Vzorky jednotlivých pív byly odebírány přímo z lahve, 1 ml byl přepipetován do vialky. Nástřik při jednotlivých analýzách byl 100  $\mu$ l. Od každého piva byla provedena dvě měření, z jejich průměrné hodnoty ploch píků byla vypočtena z matricové kalibrační křivky koncentrace. Ochratoxin A byl detekován ve 43 vzorcích, citrinin ve 4 ze 48 proměřovaných pív.



Obr. 26: Chromatogram reálného vzorku: Krušovice světlý ležák.

Tab. 21: Stanovení ochratoxinu A a citrininu v pšeničných pivech

	c OTA ( $\mu$ g/l)	c CIT ( $\mu$ g/l)
Staropramen Nefiltrovaný	0,024	
Krušovice Pšeničné	0,029	0,092
Velen Černá Hora	0,038	
Pšeničný ležák Herold	0,045	
Primátor Weizenbier	0,028	
Fénix	0,048	

Tab. 22: Stanovení ochratoxinu A a citrininu v tmavých pivech

	c OTA ( $\mu$ g/l)	c CIT ( $\mu$ g/l)
Master Tmavý 18°	0,031	
Kozel Černý	0,011	
Krušovice Černé	0,011	
Budvar Tmavý ležák	0,011	
Pardubický Porter 19°	0,102	
Samson tmavý ležák 12°	0,011	
Bernard Černý ležák	0,011	



Tab. 23: Stanovení ochratoxinu A a citrininu ve světlých ležácích

	c OTA (µg/l)	c CIT (µg/l)
Lobkowicz Premium	0,045	
Platan 11°	0,035	
Rychtář Premium	0,091	
Vévoda 11°	0,034	
Kláster 12°	0,025	
Ježek 11°	0,034	
Páter	0,043	
Kounic	0,024	
Krušovice 12°	0,032	0,089
Břežňák světlý ležák	0,054	
Zlatý bažant	0,019	
Staropramen Ležák	0,038	
Braník Ležák	0,033	
Ostravar Premium	0,016	
Pilsner Urquell	0,077	
Radegast Premium	0,024	
Budweiser Budvar	0,060	
Pardál Echt	0,040	
Holba Šerák	0,022	
Bertold Ležák	0,036	
Bernard světlý ležák	0,058	
Svijanský Máz 11°	0,044	
Olivětiný Opat	1,201	
Samson světlý ležák 12°	0,021	
Bohemia Regent Premium	0,028	
Valdštejn	0,047	
Otakar 11°	0,041	
Lounský žejdlík 11°	0,022	
Chotěboř Prémium	0,030	0,126
Poutník světlý ležák 12°	0,024	
Bakalář	0,019	
Ferdinand	0,024	
Chodovar Zlatý ležák	0,028	
Vyškovské pivo	0,046	
Krakonoš	0,030	
Skalák	0,026	0,192

U většiny analyzovaných vzorků byl zjištěn ochratoxin A poměrně těsně nad hladinou kvantifikace metody a v hodnotách 40-200 krát nižších než uvádí povolený limit pro alkoholické nápoje 2 µg/l. Citrinin se vyskytoval ve vzorcích velice zřídka, což koreluje s teorií jeho rozkladu během procesu vaření piva při teplotách blízkých 100°C.

## 6. Závěr

Byla vytvořena metoda pro stanovení mykotoxinů ochratoxinu A a citrininu v pivu. Pro extrakci analytů z matrice byla vložena před samotnou analytickou kolonu kolona extrakční a jejich přepínáním bylo docíleno on-line úpravy vzorku a izolace analytů. Z pěti různých kolon, monolitických i částicových, byla vybrána phenyl-hexylová kolona s porózními částicemi s pevným jádrem technologie fused-core, kompatibilní s C18 předkolonou. Experimentálně byly určeny následující mobilní fáze a podmínky separace. Vlastnosti analyzovaných látek umožnily použití citlivé fluorimetrické detekce.

Promývací fáze: methanol – 0,5% vodný roztok kyseliny octové, 30:70

Délka promývání: 2 minuty

Mobilní fáze: acetonitril – 0,5% vodný roztok kyseliny octové

Isokratická eluce: mobilní fáze v poměru 45:55,  
2. – 3. minuta

Gradientová eluce: lineární nárůst na 75:25,  
3. – 5,5. minuta

Teplota: 50°C

Po optimalizaci separace byla metoda validována. Dobrá chromatografická separace byla prokázána vyhovující symetrií píků, jejich rozlišením, přesností metody s RSD < 5 %, výtěžností mezi 98 - 102 %. Dále byla ověřena linearita pro ochratoxin v koncentracích 0,01 - 5 µg/l, pro citrinin 0,02 - 10 µg/l s korelačním koeficientem větším než 0,9990. Limit kvantifikace této metody je 0,01 µg/l pro OTA a 0,02 µg/l pro CIT.

Byly stanoveny oba mykotoxiny ve 48 vzorcích piv, včetně tmavých a pšeničných. Nejvyšší množství ochratoxinu A bylo nalezeno v pivu Olivětínský Opat, a to 1,201 µg/l. Tato hodnota však stále zůstává pod povoleným limitem 2 µg/l. Nejčastější výskyt se však pohybuje okolo 0,03 µg/l piva (což se shoduje s výsledky Státní zemědělské a potravinářské inspekce, Daška et al., Škarkové et al. a dalších). Podle vědeckého stanoviska EU je doporučen maximální příjem 120 ng/kg tělesné

hmotnosti za týden, což je promítnuto do evropské legislativy. Přísnější kritéria americké FDA a Světové zdravotnické organizace se přiklání pouze k 100 ng/kg bw/týden. I k překročení těchto hodnot by však bylo zapotřebí vypít mnoha piv, jak ilustrují orientační propočty v následujících tabulkách zahrnující výsledky této diplomové práce.

Tab. 24: Výpočet množství piva, které obsahuje limitní množství ochratoxinu A

nejvyšší naměřený obsah OTA	1,2 $\mu\text{g/l}$
tzn. v jednom pivu	0,6 $\mu\text{g OTA}$
limitní příjem podle JECFA	100 $\text{ng/kg bw/týden}$
průměrný 80kg člověk	8 $\mu\text{g/týden}$
to by bylo kontaminovaných piv	13,3 /týden
průměrný obsah OTA	0,03 $\mu\text{g/l}$
tzn. v jednom pivu	0,015 $\mu\text{g OTA}$
to by bylo kontaminovaných piv	533,3 /týden

Citrinin byl zjištěn pouze ve 4 vzorcích, jeho nejvyšší hodnota byla 0,192  $\mu\text{g/l}$ , průměrná se pohybovala okolo 0,125  $\mu\text{g/l}$ . Pro citrinin dosud neexistují legislativní opatření, pouze doporučení pro látku coby podezřelou z karcinogenity. Za bezpečný z hlediska nefrotoxicity je považován denní příjem do 0,2  $\mu\text{g/kg}$  tělesné hmotnosti. Zde jsou obavy ještě menší: aby průměrný 80kg člověk přesáhl tuto hranici, musel by za den vypít přes dvě stě piv.

Tab. 25: Výpočet množství piva, které obsahuje limitní množství citriniu

průměrný obsah CIT	0,125 $\mu\text{g/l}$
tzn. v jednom pivu	0,0625 $\mu\text{g OTA}$
doporučený max. příjem dle EFSA	0,2 $\mu\text{g/kg bw/den}$
průměrný 80kg člověk	16 $\mu\text{g/den}$
to by bylo kontaminovaných piv	256 /den

Riziko konzumace nadlimitního množství ochratoxinu A nebo citrininu z piva je tedy velmi malé. U chronického pití vyššího množství piva jsou nasnadě zdravotní komplikace spíše z nadměrného požívání alkoholu. Pivo ale samozřejmě není jediný ani největší zdroj příjmu ochratoxinu nebo citrininu, za rizikovější je pokládáno i pečivo nebo sníadaňové cereálie. Pro vyjádření určité míry expozice těchto mykotoxinů z piva může být použita statistika roční konzumace piva na obyvatele.

Tab. 26: Průměrný příjem OTA a CIT podle statistické konzumace piva  
v porovnání s danými limity

spotřeba průměrného Čecha [7]	148,6	litrů piva/rok 2012	
tzn. za den	0,8	piv	
průměrný příjem OTA z piva	0,086	µg OTA/týden	
případně ze silně kontaminovaného	3,429	µg OTA/týden	(limit max. 8 µg/týden)
průměrný příjem CIT z piva	0,051	µg CIT/den	(limit max. 0,2 µg/den)

Z výsledků je také patrné, že citrinin zůstává v pivu v mnohem menší míře než ochratoxin, protože je tepelně méně stabilní. V tom případě je ovšem riziko přítomnosti jeho rozkladných produktů včetně toxičtějšího citrininu H1. V budoucnosti by bylo vhodné zaměřit se také na jeho detekci v pivu.

Ochratoxin A se téměř nevyskytuje v tmavých pivech, pravděpodobně díky pražení sladu, kdy by mohl být eliminován k velmi nízkým podílům jako je tomu u kávových zrn. I do tmavých piv se však přidává podíl světlého sladu, který je enzymaticky aktivnější a nabízí tak využitelnější sacharidový základ pro výrobu alkoholu. Pravděpodobně z tohoto důvodu byla tmavá piva s významnějším obsahem ochratoxinu právě Master 18° a Porter 19°, které se připravují z mladiny s vyšším procentuálním obsahem extraktu než klasické 12° ležáky, čehož se docílí vyšším podílem sladu na hektolitr piva, což s sebou přináší také více mykotoxinů.

Byla vyvinuta a validována velmi citlivá metoda vhodná pro současnou analýzu dvou mykotoxinů rovnou z matrice piva bez složitých úprav, vše potřebné je dosaženo automaticky v jednom kroku díky přepínání kolon. Je tak umožněno rutinní jednoduché použití pro kontrolu splňování současných kritérií a zároveň pro získávání údajů pro další posouzení expozice mykotoxinů potravinou.

## 7. Použitá literatura

- [1] ARÉVALO, F. J. et al. Citrinin determination in rice samples using a micro fluidic electrochemical immunosensor. *Talanta*, 2011, vol. 83, No. 3: 966-973.
- [2] ARROYO-MANZANARES, N. et al. Determination of ochratoxin A in wines by capillary liquid chromatography with laser induced fluorescence detection using dispersive liquid-liquid microextraction. *Food Chemistry*, 2012, vol. 135, No. 2: 368-372.
- [3] ARROYO-MANZANARES, N. et al. A new approach in sample treatment combined with UHPLC-MS/MS for the determination of multiclass mycotoxins in edible nuts and seeds. *Talanta*, 2013, vol. 115, No. 15: 61-67.
- [4] AOAC International. Official Method 2001.01. Determination of Ochratoxin A in Wine and Beer. 2012.
- [5] BĚLÁKOVÁ, S. et al. Determination of ochratoxin A in brewing materials and beer by ultra performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Chemistry*, 2011, vol. 126, No. 1: 321-325.
- [6] CAO, J. et al. Molecularly imprinted polymer-based solid phase clean-up for analysis of ochratoxin A in ginger and LC-MS/MS confirmation. *Food Control*, 2013, vol. 33, No. 2: 337-343.
- [7] Český statistický úřad. *Spotřeba alkoholických nápojů a cigaret* [online]. 2013. Dostupné z:  
[http://www.czso.cz/csu/2013edicniplan.nsf/t/21002D461A/\\$File/21391302.pdf](http://www.czso.cz/csu/2013edicniplan.nsf/t/21002D461A/$File/21391302.pdf)  
(10. 4. 2014)
- [8] Český svaz pivovarů a sladoven. *Mykotoxiny v otázkách a odpovědích* [online]. 2013. Dostupné z: [http://www.ceske-pivo.cz/sites/default/files/dokumenty\\_tz/mykotoxiny\\_v\\_otazkach\\_a\\_odpovedich.docx](http://www.ceske-pivo.cz/sites/default/files/dokumenty_tz/mykotoxiny_v_otazkach_a_odpovedich.docx)  
(11. 4. 2014)
- [9] DAŠKO, L. et al. Determination of Ochratoxin A in Beer. *Czech Journal of Food Science*, 2005, vol. 23, No. 2: 69-73.

- [10] DOHNAL, et al. A comparison of ELISA and HPLC methods for determination of ochratoxin A in human blood serum in the Czech Republic. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, vol. 62: 427-431.
- [11] DOUŠA, M. Mez detekce a mez stanovitelnosti. *Hplc.cz* [online]. 2014 Dostupné z: [http://www.hplc.cz/Tip/lod\\_loq.htm](http://www.hplc.cz/Tip/lod_loq.htm) (31. 3. 2014)
- [12] DUARTE, S. C. et al. Novel IAC-LC–ESI-MS2 analytical set-up for ochratoxin A determination in pork. *Food Chemistry*, 2013, vol. 138, No. 2–3: 1055-1061.
- [13] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. Statement on recent scientific information on the toxicity of Ochratoxin A. *EFSA Journal*, 2010, vol. 8, No. 6 : 1626.
- [14] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin. *EFSA Journal*, 2012, vol. 10, No. 3 : 2605.
- [15] EL KHOURY, A., ATOUI, A. Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. *Toxins*, 2010, vol. 2: 461-493.
- [16] ES. Regulation (EC) 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. 2006
- [17] FLAJS, D. et al. ELISA and HPLC analysis of ochratoxin A in red wines of Croatia. *Food Control*, 2009, vol. 20, No. 6: 590-592.
- [18] FRANCO, C. M. et al. Simple and sensitive high-performance liquid chromatography-fluorescence method for the determination of citrinin application to the analysis of fungal cultures and cheese extracts. *Journal of Chromatography A*, 1996, vol. 723, No. 1: 69-75.
- [19] FRISVAD, J. Ch. et al. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology*, 2004, vol. 50: 23-43.
- [20] GONZÁLEZ-PEÑAS, E. et al. Comparison between capillary electrophoresis and HPLC-FL for ochratoxin A quantification in wine. *Food Chemistry*, 2006, vol. 97, No. 2: 349-354.
- [21] Hazardous Substances Data Bank, Ochratoxin A, National Library of Medicine [online], 2014. Dostupné z: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+303-47-9> (18. 3. 2014)

- [22] Hazardous Substances Data Bank, Citrinin, National Library of Medicine [online], 2013. Dostupné z: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+518-75-2> (18. 3. 2014)
- [23] HERINK, J. et al. *Toxické poškození ledvin houbami*. 1. vydání. MAXDORF. Praha, 2007. ISBN 978-80-7345-122-6. Str. 193-205.
- [24] HUANG, L. C. et al. Simultaneous determination of aflatoxin M1, ochratoxin A, zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol in milk by UHPLC–MS/MS. *Food Chemistry*, 2014, vol. 146, No. 1: 242-249.
- [25] CHLÁDEK, L. *Pivovarnictví*. 1. vydání. Grada Publishing. Praha, 2007. ISBN 978-80-247-1616-9. Str. 57 – 81.
- [26] IARC. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 1993, vol. 56: 489.
- [27] IARC. Some Naturally Occurring and Synthetic Food Components, Furocoumarins and Ultraviolet Radiation. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 1986, vol. 40: 67.
- [28] JECFA. Safety evaluation of certain mycotoxins in food: Ochratoxin A. WHO Food Additives Series, No. 47 / FAO Food and Nutrition Paper 74, 2001.
- [29] KLIMEŠ, J. et al. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. 1. vydání. Nucleus HK. Hradec Králové, 2011. ISBN 978-80-87009-29-1. Str. 36-40, 245-254.
- [30] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 1. vydání. Ostrava, 2003. ISBN 978-80-86369-07-5. Str. 6-10, 25-30.
- [31] KUBO, M. Mycotoxins Legislation Worldwide. Leatherhead Food Research [online], 2012. Dostupné z: <http://services.leatherheadfood.com/eman/FactSheet.aspx?ID=79> (3. 4. 2014)
- [32] LI, Y. et al. Microsphere-based flow cytometric immunoassay for the determination of citrinin in red yeast rice. *Food Chemistry*, 2012, vol. 134, No. 4: 2540-2545.

- [33] LLORENT-MARTÍNEZ, E. J. et al. Quantitation of ochratoxin a in cereals and feedstuff using sequential injection analysis with luminescence detection. *Food Control*, 2013, vol. 30, No. 2: 379-385.
- [34] MALÍŘ, F. et al. Toxicity of the mycotoxin ochratoxin A in the light of recent data. *Toxin Reviews*, 2013, vol. 32, No. 2: 19-33.
- [35] MAO, J. et al. Quantification of ochratoxin A in red wines by conventional HPLC–FLD using a column packed with core–shell particles. *Food Control*, 2013, vol. 32, No. 2: 505-511.
- [36] MATEO, R. et al. An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, vol. 119: 79-83.
- [37] Merck Millipore. ChromBook: Your guide to a fascinating world of chromatography. Edukační materiál firmy Merck [online]. Str. 129-187. Dostupné z: <http://www.merckmillipore.cz/showBrochure?id=200803.023>, (10. 4. 2014)
- [38] NIGOVIĆ, B. et al. Simultaneous determination of lovastatin and citrinin in red yeast rice supplements by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Chemistry*, 2013, vol. 138, No. 1: 531-538.
- [39] NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M. et al. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1. vydání. Europrint. Praha, 2013. ISBN 987-80-260-4243-3. Str. 108-111, 234-243.
- [40] ODHAV, B., NAICKER, V. Mycotoxins in South African traditionally brewed burs. *Food Additives and Contaminants*, 2002, vol. 19, No. 1: 55-61.
- [41] OSTRÝ, V. et al. Producers and Important Dietary Sources of Ochratoxin A and Citrinin. *Toxins*, 2013, vol. 5: 1574-1586.
- [42] PubChem, Ochratoxin A - Compound Summary [online]. Dostupné z: [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=442530&loc=ec\\_rcs#itabs-3d](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=442530&loc=ec_rcs#itabs-3d) (2. 4. 2014)
- [43] PubChem, Citrinin - Compound Summary [online]. Dostupné z: [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=54680783&loc=ec\\_rcs](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=54680783&loc=ec_rcs) (2. 4. 2014)
- [44] REINSCH, M. et al. Determination of ochratoxin A in beer by LC–MS/MS ion trap detection. *Food Chemistry*, 2007, vol. 100, No. 1: 312-317.



- [45] SADÍLEK, P. Moderní trendy v úpravě vzorků biologického materiálu k analýze vybraných biologicky aktivních látek. Disertační práce, FAF UK, 2012.
- [46] Scientific comitee on Food. Stanovisko Vědeckého výboru pro potraviny o ochratoxinu A, 1998. Dostupné z: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out14\\_en.html](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out14_en.html) (3. 4. 2014)
- [47] Sigma-Aldrich. Ascentis® Express HPLC Resource Guide [online]. Str. 1-13. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/Brochure/1/t409118.pdf> (1. 4. 2014)
- [48] Státní zemědělská a potravinářská inspekce. Zpráva o výsledcích plánované kontroly cizorodých látek v potravinách v roce 2012. (Vydáno 2013.) Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/ViewFile.aspx?docid=1047745> (12. 4. 2014)
- [49] ŠKARKOVÁ, J. et al. Determination of Ochratoxin A in food by HPLC. *Analytical Letters*, 2013, vol. 46, No. 10: 1495-1504.
- [50] TESSINI, C. et al. Alternatives for sample pre-treatment and HPLC determination of Ochratoxin A in red wine using fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 2010, vol. 660, No. 1–2: 119-126.
- [51] US Department of Health and Human Services. Ochratoxin A. *Report on carcinogens, 12th edition*, 2011. National Toxicology Program. Str. 335-337.
- [52] VAZQUEZ, B. I. et al. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of ochratoxin A and citrinin in cheese by time-resolved luminescence using terbium. *Journal of Chromatography A*, 1996, vol. 727, No. 2: 185-193.
- [53] WANG, L. et al. Simultaneous determination of aflatoxin B1 and ochratoxin A in licorice roots and fritillary bulbs by solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 2013, vol. 138, No. 2–3: 1048-1054.
- [54] WEIDENBÖRNER, M. *Encyclopedia of Food Mycotoxins*. Springer. Berlín, 2001. Str. 69-70.