

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

Diplomová práce

**Stanovení mykotoxinu citrininu
pomocí on-line SPE HPLC na
molekulárně vtištěných
polymerech**

Vedoucí diplomové práce:

Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Hradec Králové, 2018

Bc. Aneta Kholová

Velice děkuji panu doc. Šatínskému za odborné vedení, trpělivou spolupráci, čas a ochotu, kterou mi věnoval při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Ivoně Lhotské za cenné rady a podporu při experimentální práci v laboratoři.

„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 jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Aneta Kholová

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

Název diplomové práce: Stanovení mykotoxinu citrininu pomocí on-line SPE HPLC na molekulárně vtištěných polymerech

Cílem této práce bylo vytvořit rychlou metodu pro stanovení mykotoxinu citrininu (CIT) za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a techniky přepínání kolon v kombinaci s on-line extrakcí na pevné fázi (SPE) na molekulárně vtištěných polymerech (MIP). Nejvhodnější sorbent pro selektivní extrakci byl vybrán ze šesti nově nasyntetizovaných MIP po vyhodnocení jejich vazebné kapacity a selektivity. Selektivita byla testována porovnáním molekulárně vtištěných a nevtištěných polymerů a schopností polymeru selektivně oddělit citrinin od interferencí z testovaného vzorku. Nejlepším sorbentem MIP (funkční monomer metakrylamidu s porogem acetonitrilem) byla naplněna předkolona (20 × 3 mm) a zapojena do systému přepínání kolon HPLC. Na tento chromatografický systém byly dávkovány tři různé typy matric (extrakt z potravních doplňků, červené fermentované rýže a obilovin). Dávkovaný objem vzorku 50 µl byl na MIP extrakční předkoloně promýván od interferencí methanolem / 0,5% vodným roztokem kyseliny octové v poměru 25:75 (v/v), při průtoku 1 ml/min po dobu jedné minuty. Po přepnutí ventilu byl analyt eluován z kolony MIP na chromatografickou kolonu Kinetex® Biphenyl (100 x 4,6 mm, 5 µm částic) promývanou mobilní fází sestávající z acetonitrilu / 0,5% kyseliny octové, která protékala kolonou rychlostí 1 ml/min za gradientové eluce. Fluorimetrická detekce byla nastavena na vlnové délky Ex 335 nm a Em 500 nm. Celkový čas analýzy vzorku včetně on-line extrakce byl 9,5 minuty. Limit kvantifikace pro tuto metodu byl 5 µg/kg pro matrici obilovin a 25 µg/kg pro matrici červené fermentované rýže a doplňky stravy vyrobené z červené fermentované rýže. CIT byl analyzován celkem v 9 vzorcích, z toho

6 vzorků byly doplňky stravy volně dostupné na českém trhu. Naměřená množství CIT v potravních doplňcích byla nízká, ve většině případů pod limitem detekce nebo limitem kvantifikace, a proto všechny vzorky vyhověly nejvyššímu povolenému limitu pro výskyt CIT v doplňcích stravy.

Klíčová slova: HPLC, MIP, on-line MIP, citrinin, červená fermentovaná rýže

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Bc. Aneta Kholová

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

Title of Diploma Thesis: Determination of mycotoxin citrinin using on-line SPE HPLC on molecularly imprinted polymers

The aim of this work was to develop a fast method for mycotoxin citrinin (CIT) determination using high performance liquid chromatography (HPLC) and column switching technique in combination with on-line solid phase extraction (SPE) based on citrinin-selective molecularly imprinted polymer (MIP). The most suitable sorbent for selective extraction was chosen from six newly synthesized MIP after evaluation of their binding capacity and selectivity. Selectivity was tested by comparing molecularly imprinted and non-imprinted polymers and the ability of the MIP polymer to selectively separate citrinin from interferences of the test sample. The best MIP (functional monomer of metacrylamide with porogen acetonitrile) was filled into pre-column (20 × 3 mm) and connected to HPLC column-switching system. Three different matrices were injected to chromatographic system. 50 µl of the sample was injected onto MIP extraction column and washed out of interferences with methanol / 0.5% water solution of acetic acid in a ratio of 25:75 (v/v) at a flow rate of 1 ml min⁻¹ for 1 minute. After the valve switched, analyte was eluted from the MIP column to a Kinetex® Biphenyl (100 × 4.6 mm, 5 µm particle) chromatographic column by mobile phase consisting of acetonitrile / 0.5% acetic acid, which flowed through the column at a flow rate of 1 ml min⁻¹ for separation by gradient elution. Fluorimetric detection was set at wavelengths Ex 335 nm, Em 500 nm. Total sample analysis time including on-line extraction was 9.5 min. The method limit of quantification was 5 µg kg⁻¹ for cereal matrix and 25 µg kg⁻¹ for red yeast rice and food supplements based on red yeast rice. CIT was analyzed in 9 samples of which 6 samples were food

supplements available on the Czech market. The measured amounts of CIT in food supplements were low. In most cases even below the detection or quantification limit. Therefore, all samples met the maximum limits for CIT in food supplements.

Keywords: HPLC, MIP, on-line MIP, citrinin, red yeast rice

Obsah

Seznam použitých zkratk	10
1. Úvod	12
2. Cíl a zadání práce	13
3. Teoretická část	14
3.1. Mykotoxiny	14
3.2. Citrinin	15
3.2.1. Toxikologie citrininu	17
3.3. Legislativa a kontrola	17
3.4. Úprava vzorku	18
3.5. On-line SPE HPLC	19
3.6. Molekulárně vtištěné/otištěné polymery (MIP)	21
3.7. Využití on-line MISPE HPLC v analýze mykotoxinů	23
3.8. Metody stanovení citrininu	24
4. Experimentální část	30
4.1. Materiál a pomůcky	30
4.1.1. Standardy, chemikálie a vzorky	30
4.1.2. Přístroje a podmínky separace	30
4.2. MIP sorbenty	32
4.2.1. Příprava MIP	32
4.2.2. Výběr MIP sorbentu	33
4.3. Příprava roztoků standardů citrininu	35
4.3.1. Příprava standardu	35
4.3.2. Příprava pracovních roztoků pro kalibraci	35
4.3.3. Příprava pracovního roztoku pro validaci	36
4.4. Příprava vzorků	36
4.5. Příprava mobilních fází	37
4.6. Optimalizace chromatografických podmínek	37
4.6.1. Volba mobilní fáze	37
4.6.2. Optimalizace promývací fáze	38
4.6.3. Optimalizace gradientové eluce	40
4.6.4. Výběr analytické kolony	43
4.6.5. Parametry detekce	45

4.7. Souhrn optimalizovaných podmínek pro HPLC analýzu.....	47
5. Výsledky	50
5.1. Test vhodnosti chromatografického systému	50
5.2. Účinnost chromatografického systému v gradientové eluci.....	50
5.3. Faktor symetrie chromatografických píků	51
5.4. Validace analytické metody.....	51
5.4.1. Linearita	51
5.4.2. Opakovatelnost.....	54
5.4.3. Přesnost	56
5.4.4. Výtěžnost	56
5.4.5. Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ)	57
5.5. Stanovení obsahu citrininu v reálných vzorcích	59
6. Závěr a diskuze.....	61
7. Použitá literatura	63

Seznam zkratek

AFB1	Aflatoxin B1
CIT	Citrinin
DAD	Photodiode-array detector
DLLME	Dispersive liquid-liquid microextraction
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FD	Fluorescenční detektor
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IARC	International Agency of Research on Cancer
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LC	Kapalinová chromatografie
LLE	Liquid-liquid extraction
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit kvantifikace
MEKC	Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
MIP	Molecularly imprinted polymer
MISPE	Molecularly imprinted solid-phase extraction
MS	Hmotnostní spektrometr
NIP	Non-imprinted polymer
NOAEL	No-Observed-Adverse-Effect Level
OTA	Ochratoxin A
PP	Protein precipitation
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe
RASF	Rapid Alert System for Food and Feed
RP	Reverzní fáze

SDLLME	Single drop liquid-liquid microextraction
SPE	Solid phase extraction
TRL	Time-resolved luminiscence
UHPLC	Ultraúčinná kapalinová chromatografie
USE	Ultrazvuková extrakce
UV	Ultrafialové světlo

1. Úvod

Citrinin patří mezi mykotoxiny, které jsou obecně považovány za hlavní kontaminanty potravin. Jedná se o sekundární metabolity mikroskopických hub - plísní. Kontaminují dlouho skladované jídlo a mohou mít velmi závažné, avšak rozdílné toxické účinky jako je nefrotoxicita, hepatotoxicita a cytotoxicita. Tím jsou velmi nebezpečné jak pro lidi, tak pro zvířata. Citrinin nalezneme hlavně v uskladněném obilí, ale může být přítomný i v nahnílém ovoci a zelenině, cereáliích, rýži, ořechách a dalších plesnivých potravinách. Často se nachází společně s ochratoxinem A. Mykotoxiny jsou všeobecně velmi stabilní a perzistentní v životním prostředí, odkud se mohou dostávat přes rostlinnou a živočišnou produkci zpět do potravin.

Pro jejich kontrolu je nutné vyvíjet citlivé, rychlé a přesné analytické metody, avšak zabránit výskytu toxinů v potravinách není možné i přes dodržování veškerých technologických postupů. Z tohoto důvodu je nutné kontrolovat, zda nejsou překračovány normami nařízené limity a hranice.

2. Cíl a zadání práce

Tato diplomová práce si klade za cíl vytvořit citlivou a selektivní metodu pro analýzu citrininu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s on-line extrakcí na pevné fázi (SPE). Cílem práce bylo optimalizovat podmínky extrakce na nově syntetizovaných molekulárně vtištěných polymerech (MIP), výběr stacionární a mobilní fáze pro separaci a vhodných parametrů pro detekci citrininu z různých typů potravin, kde se citrinin může vyskytovat. Metoda byla vyvíjena pro tři druhy potravinových matric: čistá červená fermentovaná rýže, doplňky stravy na snížení cholesterolu vyrobené z červené fermentované rýže a obilniny. V těchto třech matricích se výskyt citrininu očekává nejvíce.

Citrinin bylo třeba nejprve vyextrahovat z pevné matrice do organického rozpouštědla, a pak selektivně stanovit pomocí on-line MIP-SPE-HPLC přímo v jednom kroku, a to vložením extrakční kolonky před samotnou analytickou kolonu v systému přepínání kolon. Tak bylo dosaženo podmínek on-line extrakce, vymytí interferujících látek a následné eluce citrininu na analytickou kolonu a jeho fluorimetrické detekce.

3. Teoretická část

3.1. Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity produkované organismy z říše hub. Chemicky se jedná o nízkomolekulární organické látky. Nejčastějším producentem jsou mikroskopické vláknité houby, neboli plísně. V dnešní době je známo více než 350 druhů toxigenních plísni, které mohou tvořit jeden i více druhů mykotoxinů. Často i naprosto odlišné druhy plísni mohou produkovat chemicky totožnou strukturu toxinu.

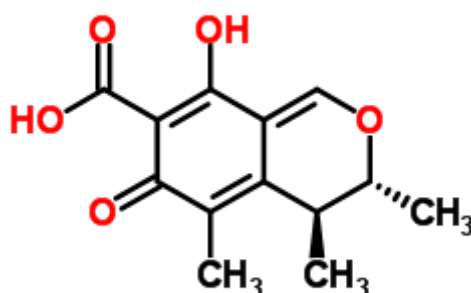
Mykotoxiny patří mezi nejdůležitější kontaminanty přírodního původu, které se staly fenoménem 20. století. Mohou se vyskytovat na různých potravinách, ovoci, krmivech pro zvířata, atd.. Některé druhy mohou být pro živé organismy neškodné, či užitečné a člověk se je naučil využívat pro svůj prospěch, jako jsou například šlechtěné sýry nebo antibiotické účinky rodu *Penicillium*. Jiné druhy mají ovšem rozmanité nežádoucí účinky na organismus. Působení mykotoxinů a jejich škodlivost závisí na jejich typu, době intoxikace i na stavu postiženého. Podle místa expozice mykotoxinu se projevují hepatotoxické, hemoragické, neurotoxické, cytotoxické, nefrotoxické, imunotoxické, teratogenní, genotoxické, karcinogenní a další účinky.

Nejvýznamnějšími producenty mykotoxinů jsou rody *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*. Plísně jsou v dnešním světě naprosto běžná součást okolního prostředí a staly se globálním problémem. Mohou se nacházet v krmivech a potravinách rostlinného původu, což jsou hlavně obiloviny a výrobky z nich. Zabránění této kontaminace není jednoduché. K výskytu mykotoxinů na zemědělských produktech dochází v důsledku nepříznivých teplot a vlhkosti při sklizni, skladování, přepravy a dalším zpracování.

Mezi hlavní skupiny mykotoxinů patří aflatoxiny, ochratoxiny, námelové alkaloidy, citrinin, patulin a toxiny rodu *Fusarium* [1].

3.2. Citrinin

Molekulová hmotnost:	250,25 g/mol
Sumární vzorec:	C ₁₃ H ₁₄ O ₅
Název IUPAC:	(3R,3S)-6-hydroxy-3,4,5-trimethyl-8-oxo-3,4-dihydroisochromene-7-carboxylic acid
Strukturní vzorec:	



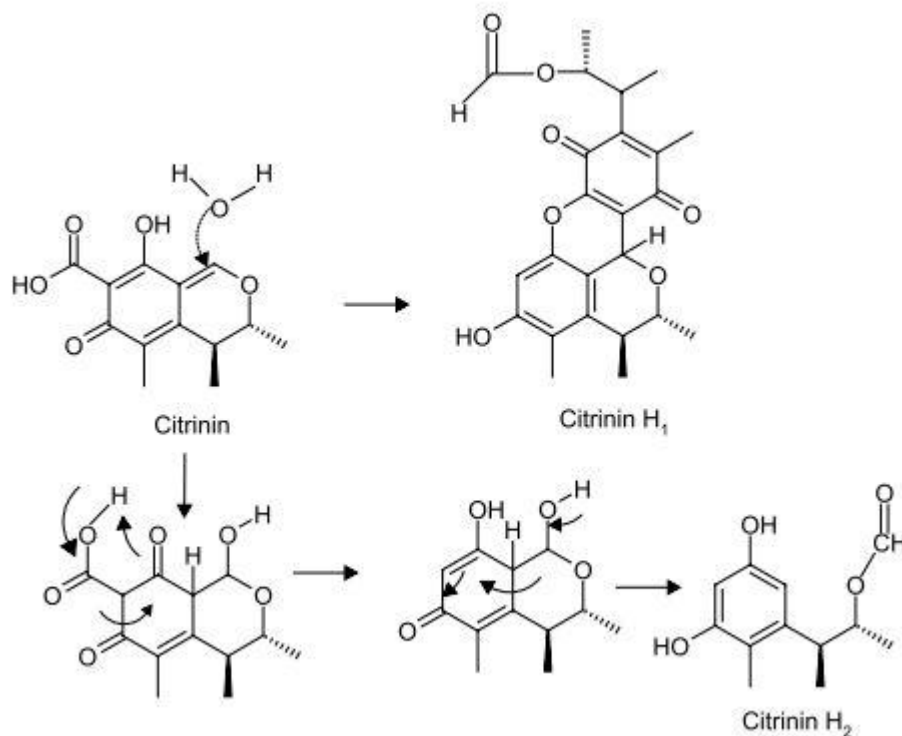
Obr. 1: Molekula citrininu [2]

Citrinin patří mezi mykotoxiny produkované rody plísní *Penicillium*, *Aspergillus* a také *Monascus*. Další ze starších názvů jsou monascidin A, antimycin či citriain. Tyto plísně můžeme nalézt v ovoci a zelenině, v různých druzích cereálií, rýži, pšenici, ječmenu, kukuřici, žitu a dalších obilovinách a výrobcích z nich [3]. Citrinin byl jedním z mnoha mykotoxinů objevených Hetheringtonem a Raistrickem v roce 1931. Byl izolován z kultury *Penicillium citrinum* z rýže, a proto byl spojován s onemocněním žluté rýže v Japonsku a následně pro svou barvu nazýván "yellow rice" toxin [3, 4].

Citrinin je produkován nejméně dvanácti druhy *Penicillium*. Jak *P. citrinum*, tak také *P. camembertii* - používaný v sýrařském průmyslu, *P. verrucosum* - produkuje také ochratoxin A. Dále je potvrzená produkce některými druhy rodu *Aspergillus* - *A. terreus* a *A. niveum*. Z rodu *Monascus* patří mezi nejvýznamnější druhy *Monascus purpureus* a *Monascus ruber*, které se používají k tvorbě červených pigmentů [3].

Z chemického hlediska se jedná o derivát fenolu, polyketid s konjugovanými vazbami a planární strukturou, díky které vykazuje silnou fluorescenci pod UV zářením (250, 331 nm) jak v roztoku, tak i v pevném skupenství [5, 6]. Tato sloučenina krystalizuje při pH 4,6 jako citronově žlutá látka bez zápachu a při pH 9,9 jako třešňově červená. Látka je lipofilní a tepelně nestabilní. V suchém prostředí má teplotu tání 175 °C, ale v přítomnosti vody je nestabilní a teplota tání se snížila na 140 °C [7]. Citrinin je nerozpustný ve vodě, ovšem velmi dobře rozpustný v polárních organických rozpouštědlech, jako jsou methanol, acetonitril, ethanol a v ředěných roztocích hydroxidu sodného nebo uhličitanu sodného [8].

Struktura je schopna vytvářet chelátové komplexy a může být degradována kyselým nebo alkalickým roztokem a zahříváním. Citrinin se rozkládá při teplotě 175 °C a v bezvodém prostředí se při této teplotě zároveň detoxikuje. V případě, že se v okolí molekuly vyskytuje voda, rozkládá se na sloučeniny citrinin H1 a citrinin H2. Citrinin H1 vzniká reakcí dvou molekul citrininu při teplotě 100 °C. Citrinin H2 vzniká až při teplotě 140 °C. Výsledná struktura je toxickejší, než původní látka [9, 10].



Obr. 2: Schéma rozpadu citrininu [9]

3.2.1. Toxikologie citrininu

Po objevení byl citrinin studován jako antibiotikum, ale pro značné vedlejší toxické účinky bylo od jeho dalšího zkoumání pro farmaceutické využití upuštěno [9]. Mezi hlavní obory studia toxicity citrininu patří akutní toxicita, nefrotoxicita, hepatotoxicita, genotoxicita a karcinogenita. Dále v menší míře i teratogenita a mutagenita.

Nejvýznamnějším cílovým orgánem pro citrinin jsou ledviny. Tam probíhá zároveň i eliminace cizorodé látky a proto je až 75 % citrininu vyloučeno močí. Akutní toxicita se projevuje dušností, snížením krevního tlaku či akutní myokarditidou. Dalšími cílovými orgány jsou játra a kostní dřeň. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) řadí citrinin do třetí skupiny karcinogenů, tedy mezi karcinogeny neklasifikované [11].

Mechanismus účinku toxicity citrininu není ještě zcela objasněn, na rozdíl od ostatních mykotoxinů. V jedné studii bylo potvrzeno, že toxicita citrininu probíhá na buněčné úrovni, kdy je spuštěn obranný mechanismus buňky. Citrinin vyvolává rychlou aktivaci promotorů GRE2 a SOD2 reagujících na stres. Reakce je závislá na dávce a koncentraci látky. Citrinin tedy způsobí expresi antioxidantních kódujících genů a buňka aktivuje obranné dráhy oxidačního stresu a začne produkovat reaktivní formy kyslíku, které následně působí na organismus toxicky a může způsobit až nekrózu epitelu [12].

V jiných studiích byl citrinin zkoumán z odlišného pohledu. Během své přítomnosti v ledvinách narušuje propustnost membrán proximálních tubulů a tím ovlivňuje průchod vápenných iontů v mitochondriích. Tento mechanismus může být příčinou vzniku adenomů, histopatologických změn i nekrózy renálních tubulů. Dále může inhibovat syntézu DNA a RNA v buněčném jádru nebo stimulací uvolňování cytochromu c a aktivací kaspáz indukovat apoptózu buňky [13, 14].

3.3. Legislativa a kontrola

V České republice má na starosti kontrolu přítomnosti mykotoxinů v potravinách Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI), která své vzorky posílá k analýze do Národní referenční laboratoře pro mykotoxiny. Laboratoř se musí

řídít zákony vydanými Evropskou unií, přesněji Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA): č.1881/2006, č.1126/2007, č.105/2010, č. 165/2010, č.219/2014. Pokud se objeví nadlimitní množství mykotoxinu v nějakém vzorku, musí podat laboratoř hlášení do Systému rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF: Rapid Alert System for Food and Feed). Tento systém slouží k ohlášení rizikových potravin za účelem stažení z oběhu a společného evropského trhu [15].

Pro mykotoxiny plně prostudované již existují podrobné limitní koncentrace v různých potravinách a nápojích. Avšak pro citrinin zatím neexistují přesné krajní hodnoty. EFSA má pouze pro látky s genotoxickými a karcinogenními účinky obecné předpisy z roku 2012 o míře vystavení dané látky a charakteristice míry rizika. Pro citrinin jsou ale velmi omezená data, a proto mohl být spočítán pouze orientační maximální denní příjem. Citrinin je nefrotoxický a z 90denní studie na krysách byla zjištěna hladina orientačního maximálního denního příjmu, u kterého ještě nebyly pozorovány žádné nežádoucí účinky (NOAEL), tedy 20 µg/kg tělesné hmotnosti u krys. Po přepočítání na člověka vychází tento limit na 0,2 µg/kg tělesné hmotnosti denně [15, 16].

V roce 2014 došlo k posunu a byly vydány maximální limity pro citrinin v doplňcích stravy na bázi rýže fermentované červenými kvasnicemi *Monascus purpureus* [17].

Tabulka 1: Maximální limit pro citrinin [17]

Citrinin	Maximální limity (µg/kg)
Doplňky stravy na bázi rýže fermentované červenými kvasnicemi <i>Monascus purpureus</i>	2 000

3.4. Úprava vzorku

U téměř každého biologického či potravinového vzorku je třeba před analýzou provést úpravu a selektivní izolaci analytu z matrice. Při úpravě dojde k zakoncentrování, izolaci a přečištění od balastních látek. Tato úprava je nejrizikovější částí celé analýzy vzorku a velice často způsobuje chyby a ztráty analytů. Ovšem tento

krok může velmi zvýšit selektivitu analýzy. K úpravě vzorku se nejčastěji používají různé extrakční metody, u kterých je výhoda, že je lze z velké části automatizovat. Konvenční techniky úpravy vzorku na principu Liquid-Liquid Extraction (LLE), Solid-Phase Extraction (SPE) a Protein Precipitation (PP) jsou stále nejčastěji používané metody v rutinních laboratořích.

PP je tradiční technika pro úpravu vzorků biologických materiálů. Jde o nejrychlejší, nejjednodušší a nejlevnější techniku. Je vhodná pro hydrofilní i pro hydrofobní látky. Principem metody je vysrážení proteinů, které by narušovaly následnou separaci. Ovšem nevýhodami jsou nízká selektivita a častá přítomnost matricových efektů u LC-MS [18].

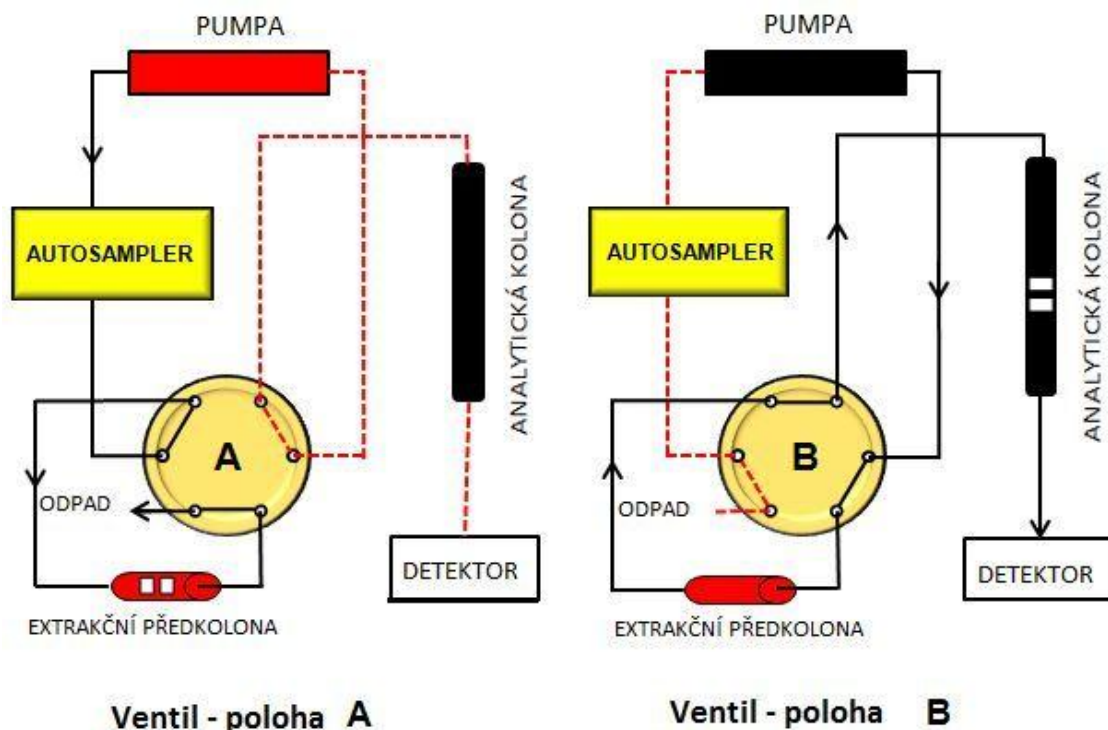
LLE je jedna z prvních popsanych extrakčních metod. Extrakce analytu probíhá z vodného roztoku vzorku do rozpouštědla nemísitelného s vodou. Výhodami jsou sice jednoduchost a nenáročnost na provedení, ale tato technika je velmi časově náročná a s vysokou spotřebou organických rozpouštědel. Ta se však dá pomocí mikroextrakčních postupů značně redukovat až na mikrolitrové objemy jako např. u techniky „single drop liquid-liquid microextraction“ (SDLLME).

SPE extrakce je jedna z nejpoužívanějších technik v analytických laboratořích všech zaměření. Jedná se o univerzální metodu s dobrou výtěžností a nízkou spotřebou organických rozpouštědel. Při prvním kroku dochází současně k zakoncentrování a přečištění extraktu. Selektivita metody závisí na rozdílné afinitě matrice a analytu k použité SPE kolonce. Velkou výhodou této metody je možnost její automatizace. Lze ji provádět jak v off-line, tak i v on-line zapojení.

3.5. On-line SPE HPLC

Techniky on-line extrakčních metod umožňují nástřik neupraveného vzorku přímo na předkolonu chromatografického systému. Tento moderní trend spojení extrakční techniky a chromatografické separace do jednoho kroku je ve výsledku jedna z nejrychlejších a nejpresnějších metod. Díky přímému dávkování na kolonu odpadá riziková manipulace s nebezpečným a toxickým materiálem a riziko ztráty vzorku. Další výhodou je zvýšená produktivita, a proto i nižší náklady připadající na jeden vzorek.

V této práci byla použita technika přepínání kolon k vývoji metody on-line SPE ve spojení s HPLC (viz obr. 3).



Obr. 3: Schéma přepínání kolon [19]

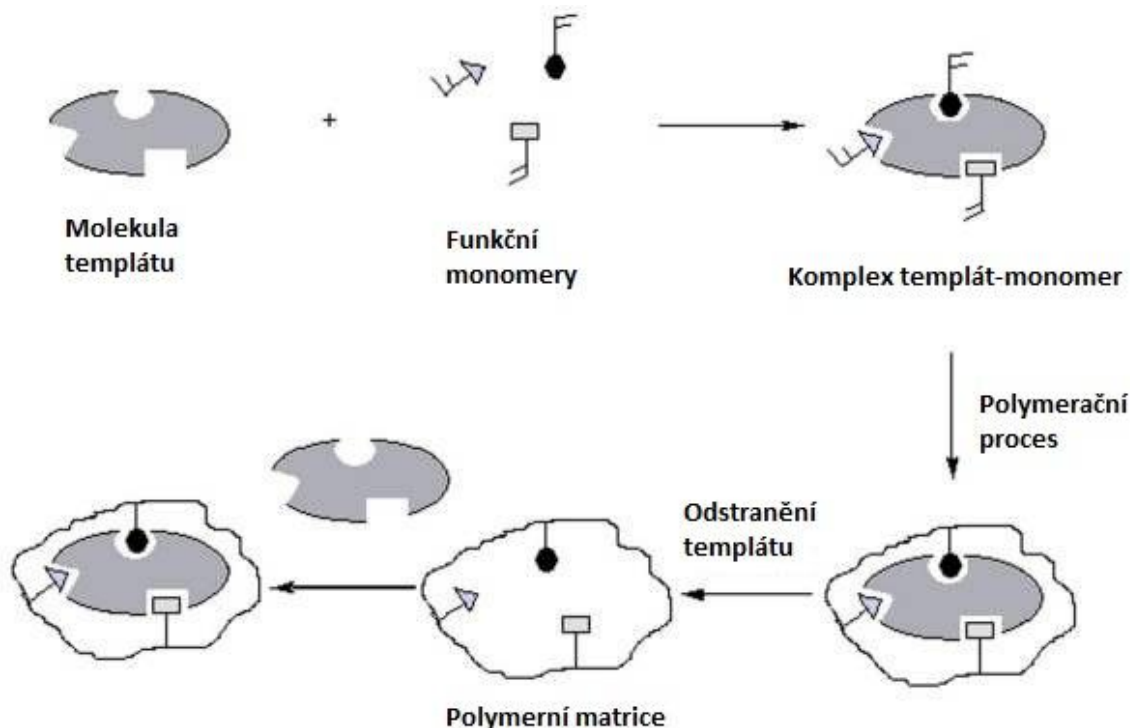
Ventil v poloze A: V první poloze je vzorek dávkován na extrakční předkolonu v on-line SPE zapojení společně s elučně slabou mobilní fází. Analyt se na předkoloně zachytí, zakoncentruje a přečistí od interferujících složek matrice. Výhodou je, že lze dávkovat velké objemy vzorků, až do doby, než bude naplněn objem dávkovací smyčky či sorpční kapacita kolony. Při dávkování mililitrových objemů je pak možné získat značné zakoncentrování analytu v porovnání s klasickým mikrolitrovým dávkováním.

Ventil v poloze B: Po přepnutí ventilu dochází ve druhé poloze k eluování zachyceného analytu pomocí elučně silné mobilní fáze z předkolony na analytickou kolonu. Zde dochází k vlastní separaci a dále je signál zachycen na detektoru.

3.6. Molekulárně vtištěné/otištěné polymery (MIP)

Mezi moderní techniky pro úpravu vzorku před analýzou na bázi SPE patří vysoce selektivní, jednoduchá a robustní metoda molekulárně vtištěných polymerů (MIP), předurčená pro analýzu určité látky nebo skupiny strukturních analogů. MIP jsou stabilní a vhodné k oddělení a analýze komplikovaných vzorků jak chemických, tak biologických, a proto jsou považovány za všestrannou a slibnou moderní technologii. Jejich možné využití je na biologické tekutiny obsahující aminokyseliny, proteiny, nukleotidové kyseliny, dále vzorky životního prostředí, polutantů, drog a potravin [20, 21].

Princip syntézy je založen na nekovalentních vazbách mezi analytem (templátem) nebo látkou strukturně podobnou analytu, dále mezi funkčním monomerem a síťovacím činidlem. Kritickým bodem pro výslednou selektivitu při výrobě polymerů jsou správně zvolené poměry mezi templátem a monomerem. Nekovalentní vazby jsou zodpovědné za vyvázání templátu ze sítě MIP. Po odstranění templátu z polymerní matrice se na vazebná místa selektivně váže jen testovaný analyt, nebo jemu strukturně podobné látky.



Obr. 4: Schéma molekulárního vtištění [20]

Existují různé způsoby přípravy MIP sorbentů. Některé z těchto polymerizačních metod jsou: objemové, suspenzní, precipitační, in situ či vícestupňové bobtnání [21] (viz tab. 2).

Vzhledem k vysoké selektivitě jsou MIPs využívány v různých oblastech analytické chemie jako jsou senzory, kapilární chromatografie, separace enantiomerů a zejména v přípravě vzorků. V dnešní době se MIP začínají používat do on-line SPE zapojení v chromatografických předkolumnách [21], avšak počet těchto prací je prozatím poměrně malý.

Tabulka 2: Stručné shrnutí metod výroby MIP [21]

Typ polymerizace	Výhody	Nevýhody
Bloková (Bulk)	Jednoduché, bez potřeby speciální instrumentace	Časově náročné kvůli drcení, prosévání a plnění kolon. Nepravidelné tvary a velikosti částic. Nízká účinnost.
Suspenzní (Suspension)	Kulové částice, reprodukovatelnost, rozsáhlé využití	Neslučitelnost s vodou, vyžaduje specifické povrchově aktivní látky
Vícestupňové bobtnání (multi-step swelling)	Monodisperzní kapky s kontrolovaným průměrem. Vynikající částice pro HPLC.	Složité postupy a reakční podmínky, vyžaduje vodnou emulzi
Precipitace (Precipitation)	Vtištěné mikrokuličky, jednotná velikost, vysoké výtěžky.	Spotřeba velkého množství templátu a vysoký ředící faktor
Povrchová (Surface)	Monodisperzní výtěžek, tenká vrstva	Složitý systém, zdlouhavý proces

<i>In situ</i>	Jednokrokové, <i>in situ</i> proces, relativně levná a porézní struktura.	Vyžaduje rozsáhlou optimalizaci pro různé druhy templátu
Sol-gel	Pohodlná a všestranná metoda pro stejně porézní povrchy, vysoká tepelná a chemická stabilita	Obtížné a pomalé navazování

Hodnocení úspěšnosti záchytu analytu na sorbentu MIP se provádí pomocí selektivity, koeficientu selektivity, sorpční kapacity a specifické sorpční kapacity.

Sorpční kapacita se testuje za použití různých rozpouštědel a vyjadřuje jaké maximální množství analytu je schopen sorbent zadržet na 100 mg polymeru. Specifická sorpční kapacita je parametr popisující rozdíl sorpčních kapacit mezi MIP a NIP. Typ rozpouštědla, které je použito při přípravě může ovlivňovat bobtnání polymeru a tím i jeho sorpční kapacitu.

Selektivita MIP se zjišťuje za pomoci strukturně podobných látek. Pokud dojde k záchytu cílového analytu, ale jiná, strukturou podobná látka zachycena nebude, jedná se o velmi selektivní MIP. Koeficient selektivity se spočítá pomocí vzorce:

$$\alpha = \frac{\text{sorpční kapacita MIP}}{\text{sorpční kapacita NIP}} \quad \alpha > 1 \text{ udává selektivitu}$$

3.7. Využití on-line MISPE HPLC v analýze mykotoxinů

Využití on-line zapojení MISPE do HPLC k analyzování mykotoxinů není zatím příliš časté. Jsou vyvinuty komerční MIP sorbenty pro patulin, fumonisin, ochratoxin A, zearalenon a jiné další mykotoxiny. Ovšem žádné z těchto komerčních sorbentů nejsou běžně používány v on-line zapojení. Pouze na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové byla použita tato technika ve studii on-line MISPE pro stanovení patulinu

v jablečných nápojích [19] a on-line MISPE pro stanovení zearalenonu v pivu [22]. Malé rozšíření on-line MISPE-HPLC techniky je pravděpodobně způsobeno složitou optimalizací extrakčního kroku, a také používáním extrakčních činidel nutných pro zachování selektivity MIP, která jsou hůře kompatibilní s HPLC systémem (např. ethylacetát, aceton, uhličitán sodný aj.).

3.8. Metody stanovení citrininu

Vývoj analytických metod pro stanovení mykotoxinů a také i citrininu je předmětem neustálých inovací. Cílem je vyvíjet metody, které jsou rychlé, jednoduché, spolehlivé a vysoce citlivé i pro stopové koncentrace. Důraz je kladen na cenu, automatizaci a na multi-reziduální metody pro stanovení několika analytů najednou, protože v přírodě je většina potravin kontaminována několika toxiny najednou.

Obecně lze metody pro stanovení citrininu rozdělit na imunochemické a chromatografické. Mezi imunochemické metody patří Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) a Radio Immunosorbent Assay (RIA). Chromatografické metody, které se využívají ke stanovení citrininu jsou: tenkovrstvá chromatografie (TLC), plynová chromatografie (GC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a ultra účinná kapalinová chromatografie (UPLC).

Před dvaceti lety byla nejčastější metodou stanovení citrininu metoda HPLC. Avšak od té doby došlo v analýze citrininu k velkému posunu. Tyto metody byly postupně nahrazovány přesnějšími metodami. Nejprve se dostaly na vrchol imunochemické metody jako ELISA, ale nyní i ony ustupují před moderními biosenzory. Mezitím se modernizovala i HPLC na UHPLC a ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií patří nyní k nejcitlivějším metodám. Pro stanovení citrininu zůstává dominantní fluorescenční detektor z důvodu velmi výrazné přirozené fluorescence citrininu. K velkému posunu došlo i ve vývoji elektromigračních metod, kde je velmi přínosné spojení s chromatografií, a toho využívá nová metoda MEKC.

Velkým vývojem prošly i možnosti v nejrizikovější části celé analýzy vzorku - metody extrakce a úpravy vzorků. Došlo k vylepšení imunoextrakcí, enzymových extrakcí a mikroextrakcí, včetně velmi selektivní metody molekulárně vtištěných polymerů.

V následujícím přehledu (tabulka 3) jsou uvedeny některé možnosti stanovení citriniu včetně použité separace a limitů detekce, které byly použity za daných podmínek.

Tabulka 3: Přehled metod stanovení mykotoxinu citrininu

Analyt	Vzorek	Úprava vzorku	Separace	Detekce	LOD, LOQ	Citace
CIT (OTA)	Sýry	-	HPLC Kolona C18 Inertsil OSD-2 (4,6 x 250 mm, 5µm), isokratická eluce, methanol/voda (70:30) s hydroxidem tretrabutylamonným (1 mM)	TRL, terbium	2 * 10 ⁻⁶ M	[23]
CIT	Kukuřice	LLE (dichlormethan a kys. fosforečná, methanol- voda)	RP-HPLC Kolona —LiChrospher RP-18 column (250 × 4 mm Id , 10 µm id.) Isokratická eluce, ACN/voda s 2% kys. mravenčí EIA (SLT 400 AER, Crailsheim, Germany)	FD Ex 333nm Em >405 nm	200 ng/g	[24]
CIT	Výrobky z <i>Monascus</i>	LLE (chloroform)	GC Kolona kapilární (30 m × 0,25 mm i.d.) s částmi z HP- 5MS Nosný plyn: Helium	MS	LOQ: 1 mg/kg	[25]
CIT, OTA	Snídaňové cereálie	LLE	HPLC Kolona C18 spherisorb (3 µm C18, 0,46 · 25 cm) Isokratická eluce Fáze 1: methanol/ACN/acetát sodný (5mM)/kys. octová (300/300/400/28) Fáze 2: H ₃ PO ₄ (0,33 M)/ACN/propan2-ol (600/400/50) Fáze 3: H ₃ PO ₄ (0,33 M)/ACN/propan2-ol (700/300/50)	FD CIT: Ex 331 nm Em 500 nm OTA: Ex 335 nm Em 465 nm	0.5 µg/kg 1.5 µg/kg	[26]

Analyt	Vzorek	Úprava vzorku	Separace	Detekce	LOD, LOQ	Citace
CIT (OTA, AFB₁)	Černé olivy	LLE	HPLC Předkolona a kolona C18 (4 µm C18, 25 × 0,46 cm) H ₃ PO ₄ (0,33 M)/ACN/propanol 2-ol ((700/300/50)	FD Ex 331nm Em 500 nm	0.2 µg/kg 0.5 µg/kg	[27]
CIT	Rýže	LLE (n-hexan, chloroform)	HPLC Kolona C18 spherisorb (3 µm C18, 25 × 0,46 cm) (0,33 M) H ₃ PO ₄ /acetonitril/propan-2-ol (650/400/50)	FD Ex 331nm Em 500 nm	0,11 ng/g 0,35 ng/g	[28]
CIT	Ječmen, žito, pšenice	SPE	HPLC Předkolona MetaGuard Polaris C18 A Kolona Polaris C18 A, 5 µm, (250 x 4,6 mm) Gradientová eluce A: 50% acetonitril, 50% 0,6M kys. ortho fosforečná B: 100% acetonitril	FD Ex 331nm Em 500 nm	0.6-0.9 µg/kg, 1.7- 3.3 µg/kg	[29]
CIT	Rýže	Solid-liquid extrakce (acn/4% KCl (9:1), n-heptan, chloroform)	Mikrofluidní elektrochemický imunosensor	elektrochemická	0,1 µg/l, 0,5 µg/l	[30]
CIT	Doplňky stravy (<i>Monascus</i> - fermentované produkty)	Ultrazvuková extrakce (USE) (toluen-ethylacetát-kys. mravenčí, 7:3:1)	RP-HPLC Kolona Aichrombond-AQ C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 µm) Gradientová eluce ACN/voda (53.5:46.5 ; 100:0 ; 53.5:46.5) okys. H ₃ PO ₄ na pH 2,5	FD Ex 331nm Em 500 nm	0,6 ng/mL, 0,187 ng/mL	[31]

Analyt	Vzorek	Úprava vzorku	Separace	Detekce	LOD, LOQ	Citace
CIT	Fermentovaná rýže („Red yeast rice“)	Solid-liquid extrakce (70% ethanol)	MFCI CIT-ovalbumin antigen na karboxylových mikrosférách	FD	0,005 µg/l, 0,01 µg/l	[32]
CIT (15 dalších mykotoxinů)	Ořechy a semena	QuEChERS (DLLME pro separaci aflatoxinů)	UHPLC 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 mravenčnanem amonným, (5:95, 90:10)	MS/MS	0,52 µg/kg, 1,72 µg/kg	[33]
CIT	Fermentovaná rýže („Red yeast rice“)	Solid-liquid extrakce (methanol/voda 80:20)	MEKC Uncoated fused-silica Capillaries, Agilent (32,5 cm, 50 µm)	DAD, UV 216 nm	0,03 ng/l, 0,08 ng/l	[34]
CIT	Červená fermentovaná rýže	Ultrazvuková extrakce (USE) (toluen-ethylacetát-kys. mravenčí, 7:3:1)	RP-HPLC Kolona C18 ZORBAX Eclipse XDB C18, 5 µm, (250 mm × 4,6 mm) Vodná fáze, ACN/voda s H ₃ PO ₄ pH 2,5 (50:50)	FD Ex 331nm Em 500 nm	-	[35]

Analyt	Vzorek	Úprava vzorku	Separace	Detekce	LOD, LOQ	Citace
CIT	Rajčata, rajčatový džus	SPE Strata-XL, (200 mg, 6 ml, 100 µm)	HPLC Kolona Ascentis Express C-18 (100 × 2,1 mm), 2,7 µm) Gradientová eluce, 10 mM mravenčnan amonný s 0.05% kys. mravenčí ve vodě (pH 3)/čistý methanol (10:90; 100:0; 10:90)	MS/MS	2 µg /kg 5 µg /kg	[36]
CIT	Kukuřice, obilí	MIP-SPE	HPLC Kolona Phenomenex Luna 5 µ C18 100A (250 × 4.60 mm) Acetonitril/voda (50:50) okys. 0,03% trifluoroctová kys.	FD Ex 331nm Em 500 nm	0.01 µg/g 0.03µg/g	[37]
CIT	Hnědá, bílá a červená rýže	QuEChERS	UHPLC Kolona Zorbax Eclipse Plus RRHD (50 × 2,1 mm, 1,8 µm) Gradientová eluce, voda/MeCN + 2% kys. mravenčí	FD Ex 331nm Em 500 nm	1,5 µg/kg, 5,0 µg/kg	[38]

4. Experimentální část

4.1. Materiál a pomůcky

4.1.1. Standardy, chemikálie a vzorky

Citrinin ≥ 98 %, dodavatel Sigma - Aldrich s.r.o., pracovní standard

1-hydroxy-2-naftoová kyselina ≥ 97 %, dodavatel Sigma - Aldrich s.r.o., pracovní standard

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

Methanol, CHROMASOLV®, for HPLC, ≥ 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:

Pšenice (ZD Chmelovice)

Ječmen (ZD Chmelovice)

LipiControl (Brainway inc. s.r.o.)

Červená fermentovaná rýže

MycoCholest (TCM Point s.r.o.)

Cholesten (Advance nutraceutics s.r.o.)

Sibyl - Červená fermentovaná rýže (Imunotop CZ s.r.o.)

Reduchol (Edenpharma)

Arterin (Fine Foods Pharmaceutical n.t.m. s.r.o.)

4.1.2. Přístroje a podmínky separace

Chromatograf: Shimadzu 20AD Prominence Liquid Chromatograph

Detektor: Shimadzu RF-10AXL Fluorescence Detector

MIP kolona: Držák Mercury MS holder, 20 x 3 mm

Kolony:	Ascentis® Express RP-Amide, 100 x 4,6 mm, 5 µm částice, (Sigma Aldrich)
	Kinetex® Biphenyl, 100 x 4,6 mm, 5 µm částice, (Sigma Aldrich)
	Kinetex® XB-C18, 100 x 4,6 mm, 5 µm částice, (Sigma Aldrich)
	Kinetex® PFP, 100 x 4,6 mm, 5 µm částice, (Sigma Aldrich)
	YMC® Triart C18 ExRS, 100 x 4,6, 3 µm částice, (Sigma Aldrich)
Předkolona:	KrudKatcher Ultra in-line filtr, 0.5 µm
Dávkování:	50 µl
Detekce:	Flourescenční, Ex 331 nm, Em 500 nm
Mobilní fáze:	Acetonitril - voda Methanol, methanol/acetonitril - voda Tetrahydrofuran/acetonitril - voda 2-propanol/acetonitril - voda Ethylacetát/acetonitril - voda
Průtok:	1,0 ml/min
Promývací fáze:	Acetonitril - 0,5% roztok kyseliny octové Methanol - 0,5% roztok kyseliny octové
Průtok:	1,0 ml/min
Vyhodnocení:	Chromatografický software LC Solution

Filtrační zařízení na mobilní fáze:

Millipore, filtr ze skleněných vláken o velikosti pórů 0,45 µm a 0,22 µm

Analytické váhy:

Sartorius 2004 MP, SRN

4.2. MIP sorbent

4.2.1. Příprava MIP

Templátovou molekulou byla kvůli ceně a dostupnosti zvolena 1-hydroxy-2-naftoová kyselina, která má strukturu molekuly nejpodobnější s citrininem. Použití standardu citrininu pro přípravu MIP není z ekonomického hlediska kvůli jeho vysoké spotřebě reálné. Testovány byly 3 funkční monomery: MAAM (methakrylamid), MAA (kys. metakrylová), 4-VP (4-vinylpyridin). Iniciátorem reakce byl zvolen AIBN (azobisisobutyronitril) a jako síťovací činidlo EGDMA (ethylenglykol dimethakrylát). MIP byly připraveny v poměru 1:4:16 (templát - monomer - síťovací činidlo). Ke každému MIP byl syntetizován i NIP. Při syntéze NIP nebyl použit templát a tato sloučenina se používá pro test selektivity příslušného MIP. Souhrn v tabulce 4.

MIPSE sorbenty byly připraveny pomocí blokové polymerizace. Po 24hodinové polymerizaci v olejové lázni (60 °C) je polymer nadrcen a prosit sítím s velikostí částic < 80 µm. Prosetý prášek byl 24 hodin extrahován v Soxhletově aparatuře směsí kys. octové a methanolu v poměru 1:9. Při této extrakci dojde k odstranění templátu. Před plněním do kolonky byla provedena ještě několikanásobná flotace v acetonu, při které se odstranily velmi malé částice, které mohly ucpávat a tlakovat stroj. Syntéza MIP nebyla součástí této diplomové práce. MIP byly připraveny ve spolupráci s Fakultou chemie a potravinářské technologie STU Bratislava v rámci pgs stáže Mgr. Ivony Lhotské.

Tabulka 4: Rozpis látek použitých k polymerizaci

MIP	Templát	Funkční monomer	Porogen
MIP 1	1-hydroxy-2-naftoová kys.	MAA	Acetonitril
MIP 2	1-hydroxy-2-naftoová kys.	MAA	Aceton
MIP 3	1-hydroxy-2-naftoová kys.	MAAM	Acetonitril
MIP 4	1-hydroxy-2-naftoová kys.	MAAM	Aceton
MIP 5	1-hydroxy-2-naftoová kys.	4-VP	Acetonitril
MIP 6	1-hydroxy-2-naftoová kys.	4-VP	Aceton

4.2.2. Výběr MIP sorbentu

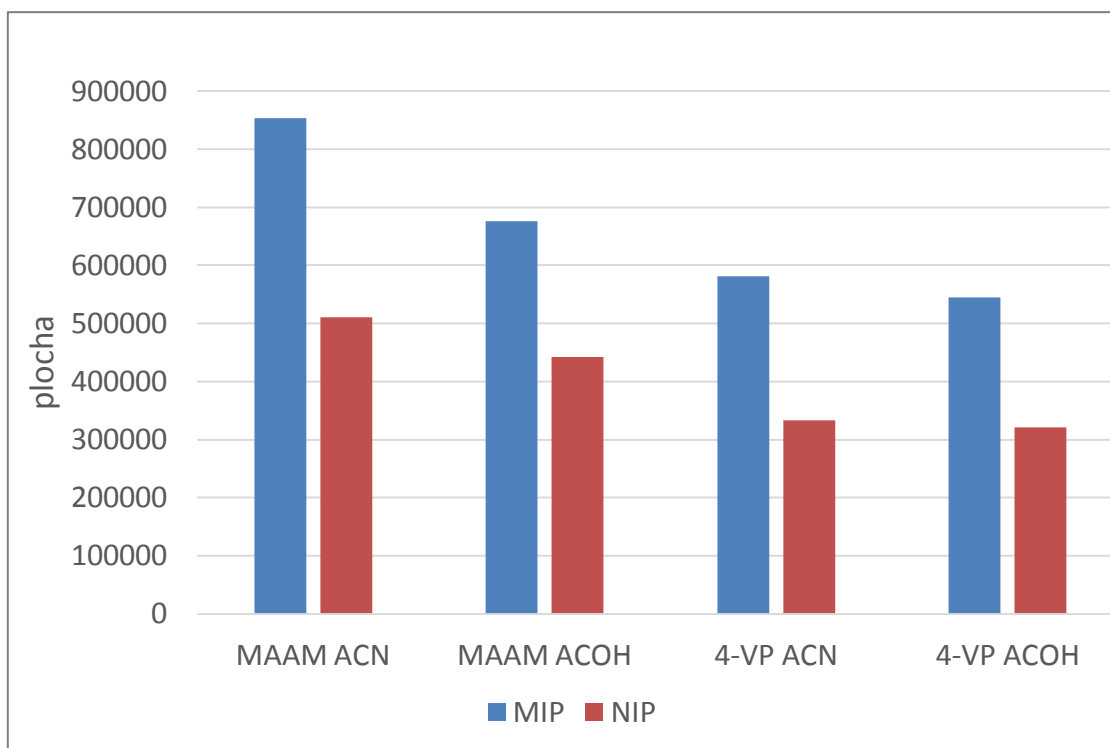
Pro výběr nejvhodnějšího sorbentu k analýze se srovnává selektivita a sorpční kapacita jednotlivých MIP pro porovnání s příslušným NIP. Tyto parametry byly spočítány z měření kalibrační řady standardu.

Po proměření sorpční kapacity ve vzrůstajících koncentracích byly porovnány výsledky pro všechny MIP a NIP. Citrinin se na monomeru 4-vinylpyridinu zadržoval velmi pevně, špatně se vymýval a podobně silně byl zadržován i na NIP. Rozdíl byl u kys. metakrylové, která citrinin zadržovala slabě a velmi podobné výsledky měl i příslušný NIP. Výsledky funkčního monomeru methakrylamidu byly mnohem lepší. MIP s methakrylamidem zadržoval citrinin pevně, ale u NIP tomu tak nebylo. Shrnující porovnání ploch píků všech MIP a NIP v následující tabulce je při koncentraci standardu citrininu 2 mg/l.

Tabulka 5: Porovnání množství zachyceného CIT na MIP a NIP (2 mg/l) vyjádřené jako plochy píku

	MIP (plocha)	NIP (plocha)
MAAM + ACN	853450	511099
MAAM + AcOH	676188	441860
4-VP + ACN	581495	332749
4-VP + AcOH	544294	320728
MAA + ACN	697438	803819
MAA + AcOH	460399	938968

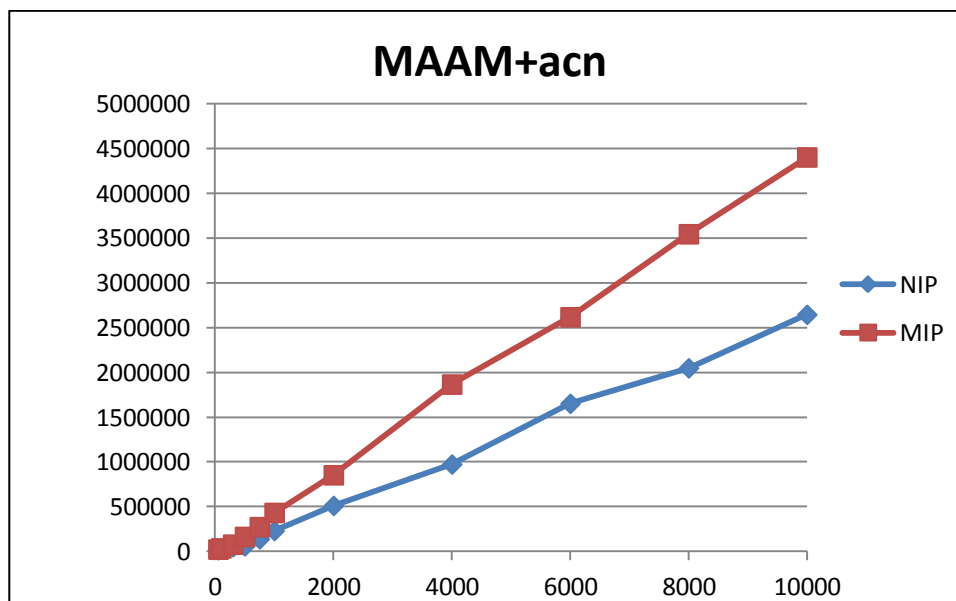
Graf 1: Porovnání retence testovaných MIP a NIP při koncentraci standardu CIT 2 mg/l vyjádřené jako plochy píku



Z přiloženého grafu vyplývá, že pro další analýzy byl vybrán MIP s funkčním monomerem metakrylamidem a poroginem acetonitrilem, kdy byl citrinin na MIP zadržován nejvíce a na MIP dochází i k poměrně selektivnímu zadržování citrininu.

Následující graf zobrazuje kalibrační křivku měření sorpční kapacity pro vybraný polymer. Nejvyšší měřená koncentrace byla 10 mg/l, ovšem ani v této koncentraci nebyla sorpční kapacita MIP překročena. Testování vyšších koncentrací bylo bezpředmětné z důvodu legislativní hranice koncentrace citrininu 2 mg/l v potravinových doplňcích.

Graf 2: Testování sorpční kapacity pro MAAM s ACN



4.3. Příprava roztoků standardu citrininu

4.3.1. Příprava standardu

Navážka 0,503 mg citrininu (CIT) byla rozpuštěna v 1 ml methanolu. Byl tak připraven 1 ml roztoku citrininu o koncentraci 500 mg/l pro další práci.

4.3.2. Příprava pracovních roztoků pro kalibraci

Základní roztoky pro ředění kalibračních řad byly určeny na koncentrace 1 mg/l a 100 mg/l a následující roztoky se ředily z těchto dvou koncentrací. Pro přípravu 1 ml roztoku o koncentraci 100 mg/l bylo napipetováno 200 μ l standardu a 800 μ l 35% methanolu. Pro přípravu druhé koncentrace o objemu 1,5 ml o koncentraci 1 mg/l byly napipetovány 3 μ l standardu a 1497 μ l 35% methanolu.

Pracovní roztoky byly připraveny dalším ředěním těchto směsných základních roztoků podle tabulky 6.

Tabulka 6: Příprava pracovních roztoků ke kalibraci

	c CIT (µg/l)	Objem pracovního roztoku CIT	Objem vody/ vzorku (µl)
1.	5	5 µl (c prac. roztok 1 mg/l)	995
2.	25	25 µl (c prac. roztok 1 mg/l)	975
3.	50	50 µl (c prac. roztok 1 mg/l)	950
4.	100	100 µl (c prac. roztok 1 mg/l)	900
5.	250	250 µl (c prac. roztok 1 mg/l)	750
6.	500	5 µl (c prac. roztok 100 mg/l)	995
7.	1000	10 µl (c prac. roztok 100 mg/l)	990
8.	2000	20 µl (c prac. roztok 100 mg/l)	980
9.	4000	40 µl (c prac. roztok 100 mg/l)	960
10.	8000	80 µl (c prac. roztok 100 mg/l)	920

4.3.3. Příprava pracovního roztoku pro validaci

Zásobní roztok citrininu o koncentraci 5 mg/l byl zhotoven odebráním 10 µl roztoku standardu připraveného podle 4.3.1. a doplněním 990 µl 35% methanolem.

4.4. Příprava vzorků

Všechny pevné vzorky byly nadrceny a poté odváženy navážky po 2,0 g. K navážce bylo přidáno 10 ml 70% methanolu a 30 minut ultrazvukováno. Po ultrazvukové extrakci byly vzorky centrifugovány 6 minut při 3000 rpm. Získaný extrakt byl odebrán a zředěn stejným množstvím vody.

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

4.5. Příprava mobilních fází

Bylo využíváno všech tří pump tohoto chromatografu.

- Pumpa A: organická složka mobilní fáze: čistý originální acetonitril 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)

4.6. Optimalizace chromatografických podmínek

Pro nejlepší chromatografické podmínky je nutno otestovat nejvhodnější podmínky pro separaci v on-line zapojení. Cílem je dosáhnout co nejužších píků citrininu, správného oddělení analytu od matrice bez interferencí a dosáhnout co nejvyšší citlivosti stanovení na detektoru. Mezi faktory, které byly optimalizovány patří: výběr vhodné mobilní fáze, následně analytické kolony a gradientové eluce. Před optimalizací byl HPLC systém zapojen s kolonou Kinetex C18, 100 x 4,6 mm, 5 μ m. Organickou mobilní fází byl 100% acetonitril a vodnou mobilní fází byla čistá voda.

4.6.1. Volba mobilní fáze

Vzhledem k principu extrakce při on-line zapojení nebyla separace citrininu za podmínek isokratické eluce testována (pro eluci z testovaných MIP sorbentů byla nutná vzrůstající koncentrace organické fáze). Byla tedy použita gradientová eluce, kde se využívá změn ideálních poměrů mezi organickou a vodnou fází v čase pro urychlení analýzy a docílení ostřejších píků analyzovaných vzorků. Citrinin je lipofilní látka, proto je možné nejprve při nižších koncentracích organické fáze vymýt balast a polární matici vzorků a poté zvýšením gradientu urychlit eluci analytu.

Byla použita slabě okyselená vodná složka mobilní fáze kvůli lipofilním vlastnostem analyzované látky. V neionizované formě dochází k vyšší retenci na

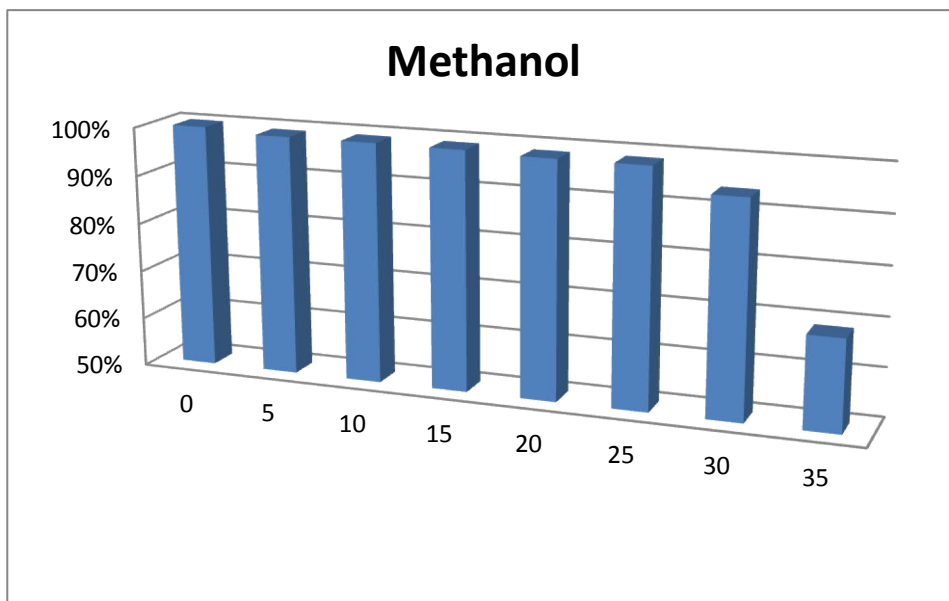
koloně a tím k lepší separaci od interferencí z matrice. Zvolena byla kyselina octová, která je dobře dostupná, organická a netoxická.

Volba organického činidla je dána lipofilitou citrininu. Z důvodu on-line zapojení, kdy je nutné vymývat také extrakční předkolonu, byl základní organickou složkou zvolen acetonitril. Zkoušen byl methanol, tetrahydrofuran, 2-propanol, ethylacetát a jejich směsi s acetonitrem do 20 %. Methanol a další organické sloučeniny se ukázaly jako nedostatečné eluční činidlo nebo v záznamu nebyl velký rozdíl od čistého acetonitrilu, a proto byl dále pro zjednodušení využíván pouze 100% acetonitril.

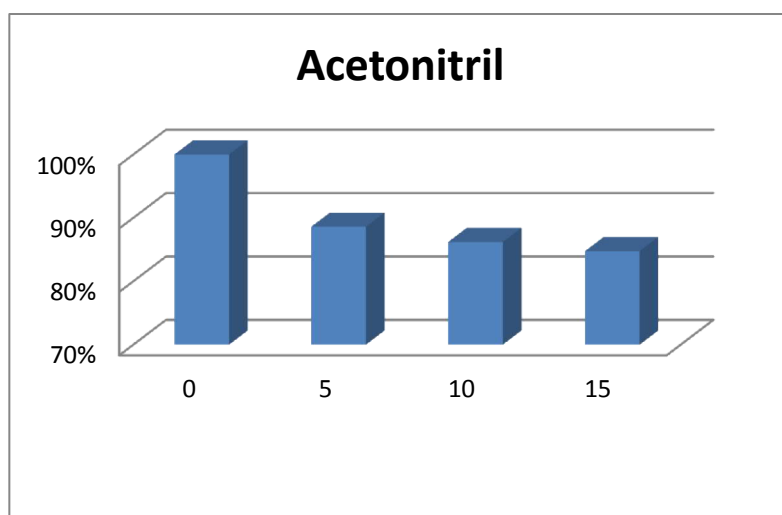
4.6.2. Optimalizace promývací fáze

Po optimalizaci prvotních podmínek separace bylo nutné současně optimalizovat i krok extrakce na pevné fázi zapojené do systému on-line. V první fázi po nástřiku na předkolonu probíhá vymývání balastní matrice. Poté následuje přepnutí ventilu, kdy je k předkoloně zapojena pumpa se silnější mobilní fází a dochází k eluování zakoncentrovaného analytu z předkolony na analytickou kolonu. Teprve na analytické koloně se látky separují pomocí této silnější mobilní fáze.

Testovány byly narůstající koncentrace methanolu a acetonitrilu. Při použití acetonitrilu docházelo už při nízké koncentraci k rychlému vymývání citrininu. Lepší volbou byl methanol, který při vyšších koncentracích vymývá balastní matici a citrinin je stále zadržován na předkoloně. Výsledná koncentrace promývací fáze byla tedy určena na 25% methanol okyselený kyselinou octovou (5 ml na 1 litr mobilní fáze). Promývací fáze s vyšším obsahem methanolu než 25 % způsobovala již vymývání citrininu z extrakční předkolony.



Graf 3: Narůstající koncentrace methanolu zobrazuje procentuální záchyt citrininu na předkoloně



Graf 4: Narůstající koncentrace acetonitrilu zobrazuje procentuální záchyt citrininu na předkoloně

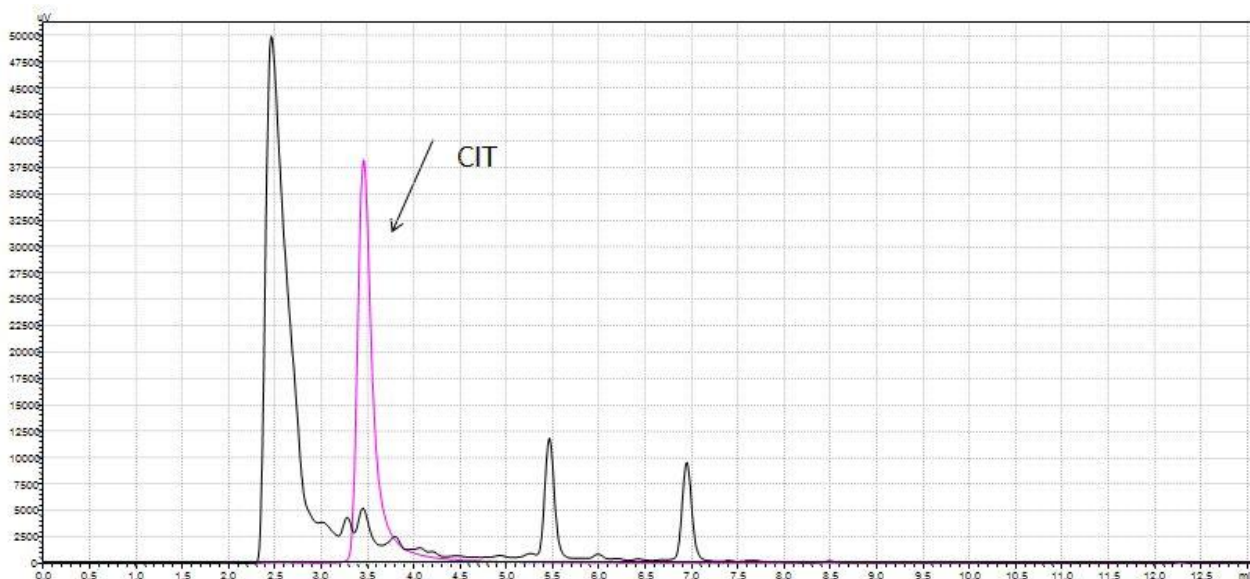
V rámci optimalizace byla testována i doba promývání. První volbou byla doba promývání 1 min. Dále byla testována i 1,5 min a 2 min, ale k žádnému zlepšení nedošlo, a proto doba promývání zůstala zachována na 1 minutě z důvodu co nejkratšího celkového času analýzy.

4.6.3. Optimalizace gradientové eluce

Na začátku testování gradientové eluce bylo nastaveno mísení mobilních fází z pumpy A (acetonitril) a pumpy B (okys. voda) v poměru 50:50. Jako promývací fáze byl použit 25% methanol s kyselinou octovou upravený na hodnotu pH 2,5. Každý z gradientů byl testován při přepnutí ventilu v 1 minutě po nástřiku 50 μ l vzorku matrice na extrakční předkolonu naplněnou MIP sorbentem, který byl vyroben z metakrylamidu a acetonitrilu. Bylo testováno i přepnutí ventilu v čase 1,5 min a ve 2 min, ale nebyl zaznamenán rozdíl, a proto byla ponechána 1 minuta pro kratší čas celé analýzy. Doba počátečního testovaného gradientu byla 12 minut, kdy z poměru 50:50 v první minutě rostl postupně až na poměr 100:0 (acetonitril - 0,5% kyselina octová) v desáté minutě až jedenácté minutě. Tento gradient nám ukázal, jak probíhá eluce matrice z extrakční předkolony. Společnou částí všech testovaných gradientů byla poslední změna koncentrací mobilních fází, kdy oběma kolonami protékala až 100% organická fáze a v poslední minutě se podmínky rychle změnilo do počátečních koncentrací. Tyto kroky byly zařazeny z důvodu kondicionace on-line zapojené extrakční předkolony a ustálení systému před další analýzou. V případě vynechání těchto kroků nedocházelo při dalším nástřiku vzorku k dostatečné extrakci.

Tabulka 7: Popis podmínek gradientu_12 min

Gradient_12 min		Složení mobilní fáze	
Čas přepnutí ventilu (1 min)	Vodná fáze (%)	Organická fáze (%)	
1.00	50	50	
10.00 - 11.00	0	100	
11.06 - 12.00	50	50	

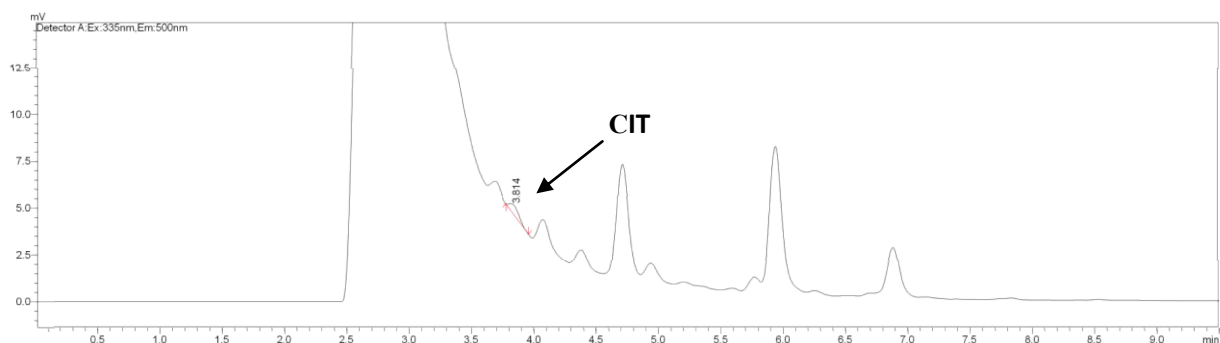


Obr. 5: Záznam separace matrice červené fermentované rýže (černá křivka) a standardu (růžová křivka) na koloně Kinetex XB-C18 100 x 4,6 mm, 5 μ m, gradient_12min

Následujícím krokem byla úprava strmosti nárůstu gradientu, zkrácení metody a zrychlení vymývání balastní matrice vzorku. Následující gradient_2 začínal na poměru fází 30:70 (acetonitril - 0,5% kyselina octová), již ve druhé minutě dosahoval poměru 50:50 a postupně vzrostl na poměr 100:0. Čas metody byl zkrácen z 12 minut na 9,5 minuty.

Tabulka 8: Popis podmínek gradientu_2

Gradient_2	Složení mobilní fáze	
	Vodná fáze (%)	Organická fáze (%)
Čas přepnutí ventilu (1 min)		
1.00	70	30
2.00	50	50
7.00 - 7.50	25	75
7.50 - 8.50	0	100
8.56 - 9.50	70	30

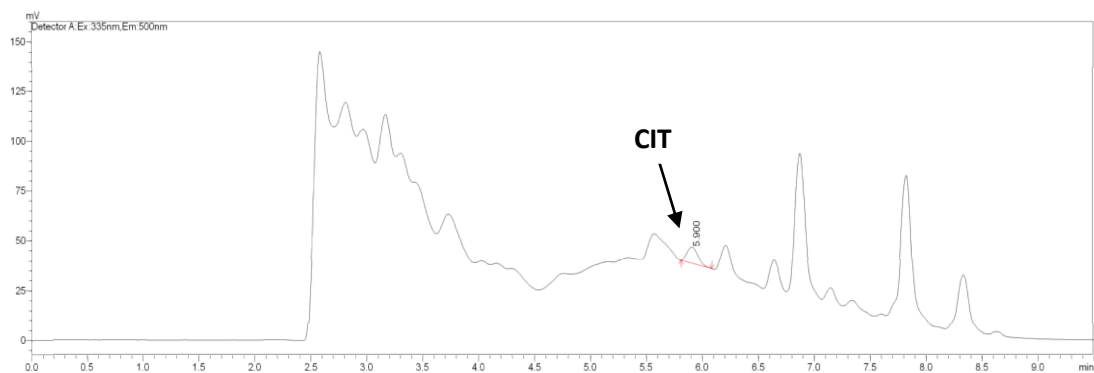


Obr. 6: Záznam separace matrice červené fermentované rýže na koloně Kinetex XB-C18 100 x 4,6 mm, 5 µm, gradient_2

Dalším cílem bylo upravit gradient tak, aby se eluce analytu odsunula na pozdější dobu a tím bylo docíleno jeho oddělení od vymývání balastní matrice.

Tabulka 9: Popis podmínek gradientu_3

Gradient_3		Složení mobilní fáze	
Čas přepnutí ventilu (1 min)	Vodná fáze (%)	Organická fáze (%)	
1.00 - 3.00	70	30	
3.00	70	30	
7.00	25	75	
7.50 - 8.50	0	100	
8.56 - 9.50	70	30	



Obr. 7: Záznam separace matrice červené fermentované rýže na koloně Kinetex XB-C18 100 x 4,6 mm, 5 µm, gradient_3

Jak je zřejmé z předchozího chromatogramu, citrinin byl dostatečně oddělen od matrice vzorku, která je v 6. minutě z velké části vymyta a neruší integraci analytu. Další minoritní interferující složky matrice se eluují v i po retenčním čase citriniu a ani po dalších mnohých experimentech se je nepodařilo úspěšně odstranit. Metoda byla validována za stávajících podmínek s cílem zjistit, zda je možné ji aplikovat v analýze různých matric. Jak v analýze obilí, červené fermentované rýže, tak i doplňků stravy.

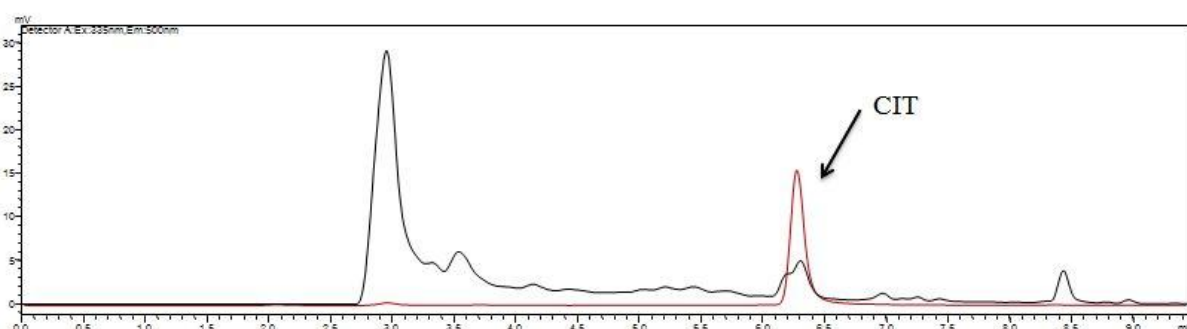
4.6.4. Výběr analytické kolony

Bylo otestováno několik druhů chromatografických kolon pro zvýšení selektivity. Veškerá počáteční měření byla prováděna na koloně Kinetex C18, 100 x 4,6 mm, 5 μ m. Po nástřiku matrice bylo potřeba oddělit interferující složky matrice od píku citriniu. Postupně byly otestovány 4 kolony, na které byl proveden nástřik 50 μ l o koncentraci 1 mg/l. Optimalizace probíhala za laboratorní teploty.

Kinetex® XB-C18, 100 x 4,6 mm, core-shell silikagel (Phenomenex), vel. částic 5 μ m

Na této koloně byla testována optimální mobilní fáze i promývací fáze. Acetonitril byl vybrán jako nejlepší a nejúčinnější eluční činidlo, a proto byl používán při všech následujících měřeních.

Při analýze na C18 koloně interferoval ve stejný retenční čas standard citriniu se složkami matrice.



Obr. 8: Záznam separace na koloně Kinetex XB-C18 100 x 4,6 mm, 5 μ m

YMC® Triart C18 ExRS, 100 x 4,6, 3 µm částice

Tato kolona stejných rozměrů, pouze s menšími částicemi byla zkoušena s cílem více oddělit analyt citriniu od matrice. Ovšem ani s menšími částicemi se to nepodařilo. Chromatogram vypadal velmi podobně.

Dalším pokusem bylo vyzkoušet jiné náplně chromatografických kolon.

Ascentis® Express RP-Amide, 100 x 4,6 mm, 5 µm částice

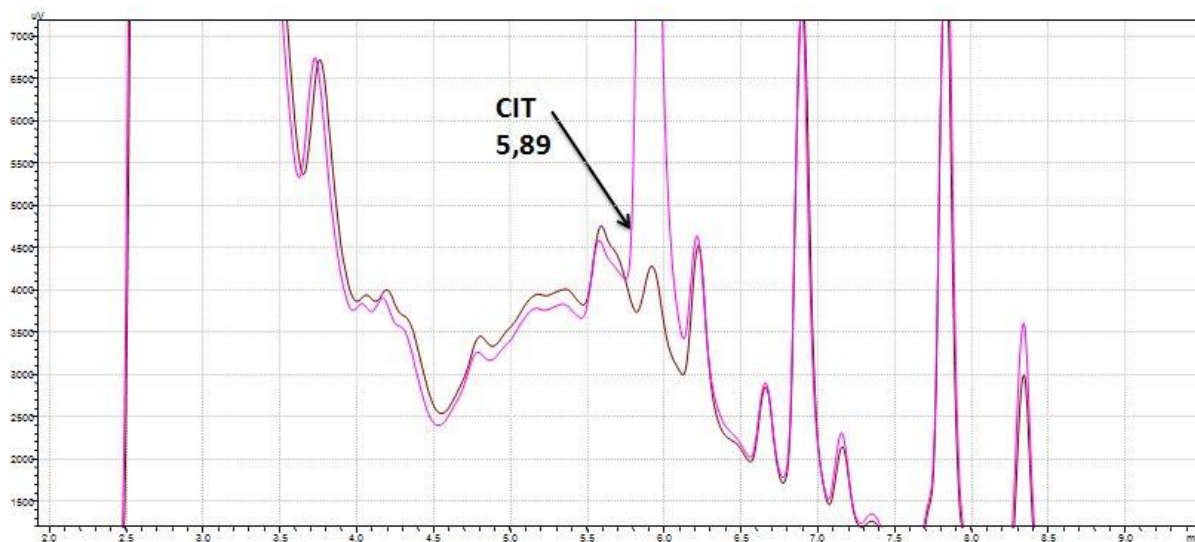
První testovanou kolonou byla kolona s amidovou náplní. Tato kolona se ukázala jako bezpředmětná, když se nepodařilo zobrazit citriniu ani v čistém standardu.

Kinetex® PFP (pentafluorophenyl), 100 x 4,6 mm, 5 µm částice

Na této koloně byla matrice odseparována od citriniu, ovšem gradient, kdy se toto podařilo, byl velmi rychlý a záznamy velmi zasahovaly do vymývajícího se balastu z kolony. Tyto záznamy se obtížně integrovaly a snižovaly procenta výtěžnosti.

Kinetex® Biphenyl, 100 x 4,6 mm, 5 µm částice

Tato kolona byla ve výsledku vybrána jako nejlepší, kdy bylo docíleno odseparování matrice od citriniu a zároveň pík citriniu byl vymýván až v pozdějším čase a nebyl natolik rušen balastní maticí. Na této koloně je pík dostatečně oddělený a plochy píku citriniu při testování výtěžnosti byly porovnatelné se vzorkem čistého standardu.

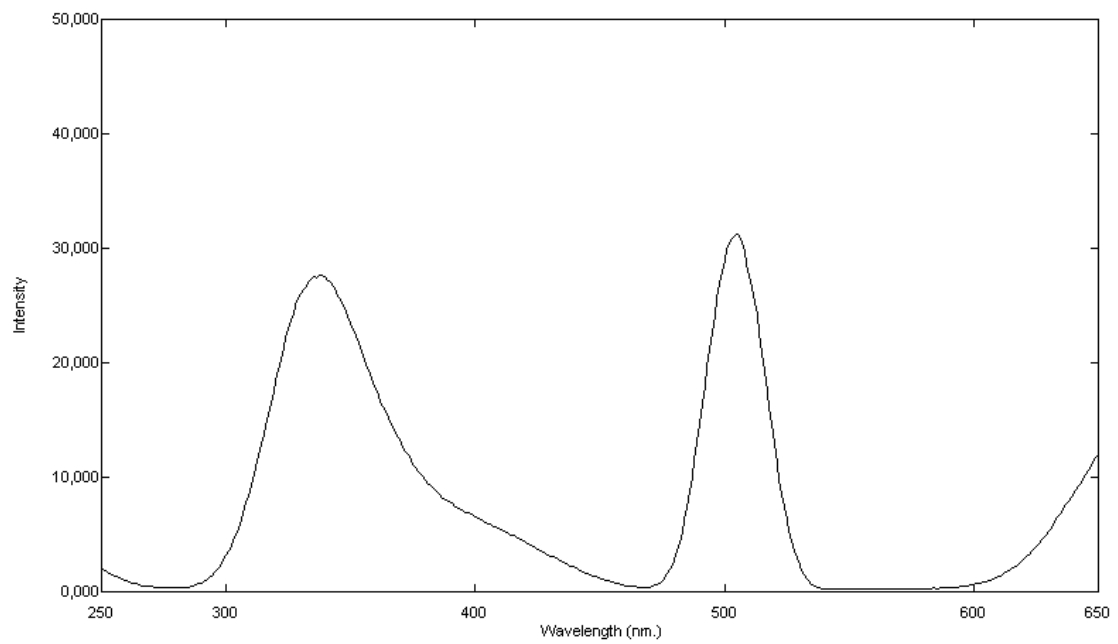


Obr. 9: Záznam separace na koloně Kinetex® Biphenyl, 100 x 4,6 mm, 5 µm částice. Porovnání nástřiku matrice červené fermentované rýže o koncentraci spiku citrininu 100 µg/l (hnědá křivka) a koncentraci spiku citrininu 1000 µg/l (růžová křivka).

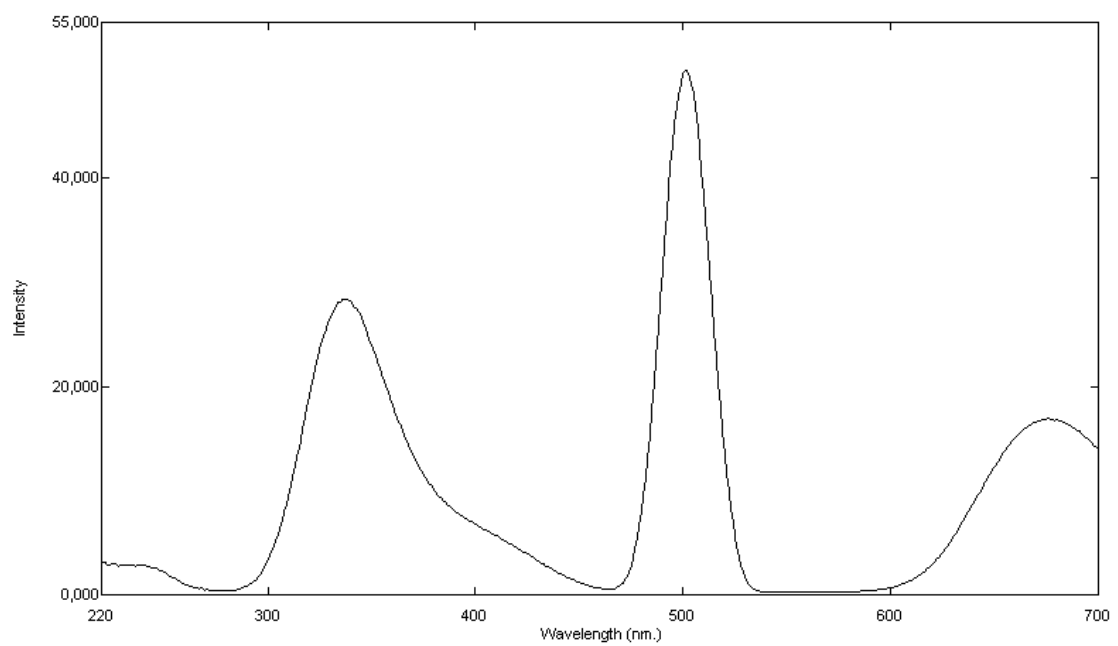
4.6.5. Parametry detekce

Dle literatury a vědeckých článků bylo proměřeno několik emisních a excitačních spekter standardu. Nakonec byly zvoleny pro fluorescenční detekci tyto vlnové délky Em 335 nm a Ex 500 nm, kde byla odezva standardu co nejvyšší, jako ve většině zveřejněných studií.

Obr. 10: Emisní spektrum CIT (Ex 337)



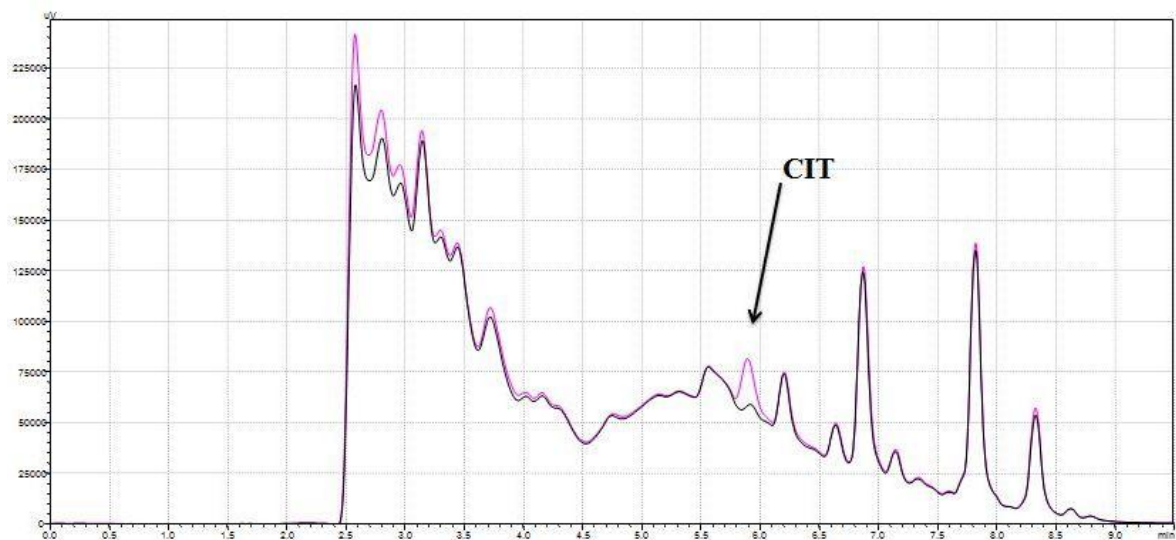
Obr. 11: Excitační spektrum CIT (Em 498)



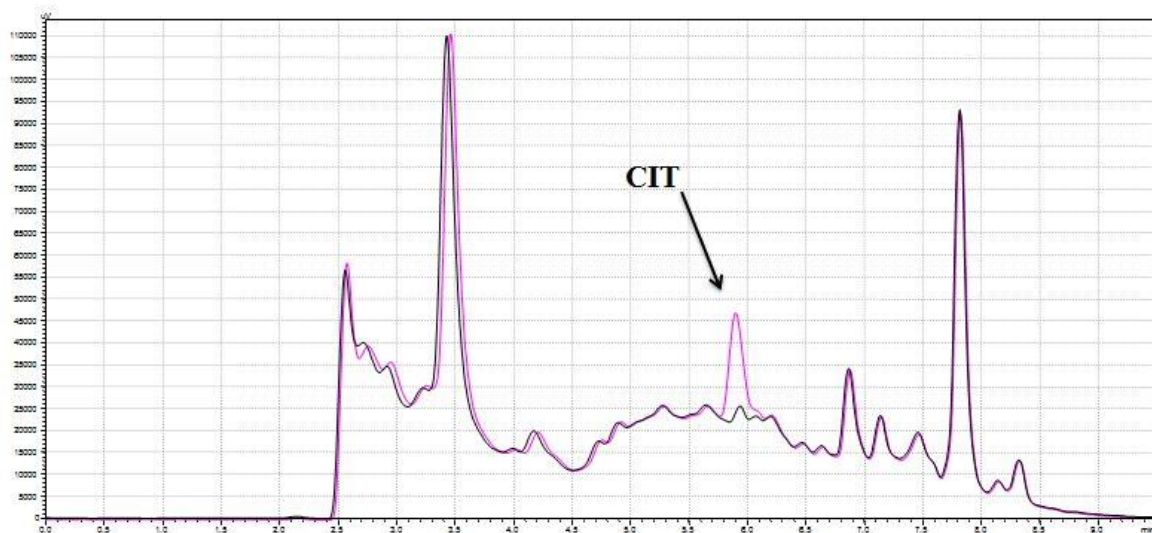
4.7. Souhrn optimálních podmínek pro HPLC analýzu

Chromatograf:	Shimadzu 20AD Prominence Liquid Chromatograph
Detektor:	Shimadzu RF-10AXL Fluorescence Detector
MIP kolona:	Držák Mercury MS holder, 20 x 3 mm
Kolony:	Kinetex® Biphenil, 100 x 4,6 mm, 5 µm částice, (Sigma Aldrich)
Předkolona:	KrudKatcher Ultra in-line filtr, 0.5 µm
Dávkování:	50 µl
Detekce:	Fluorescenční, Ex 335 nm, Em 500 nm
Typ eluce:	Gradientová, s časem přepnutí ventilu na analytickou kolonu v čase 1,0 min
Mobilní fáze:	Acetonitril - 0,5% vodný roztok kyseliny octové
Nárůst gradientu:	1,0 – 3,0 min isokraticky (70:30), 3,0 – 7,5 min lineární nárůst gradientu, 7,5 min - 8,5 min isokraticky (100:0)
Průtok:	1,0 ml/min
Promývací fáze:	25% methanol - 0,5% vodný roztok kyseliny octové
Průtok:	1,0 ml/min
Čas přepnutí ventilu:	1,0 min
Celkový čas analýzy:	9,5 min
Teplota:	Laboratorní
Vyhodnocení:	Chromatografický software LC Solution

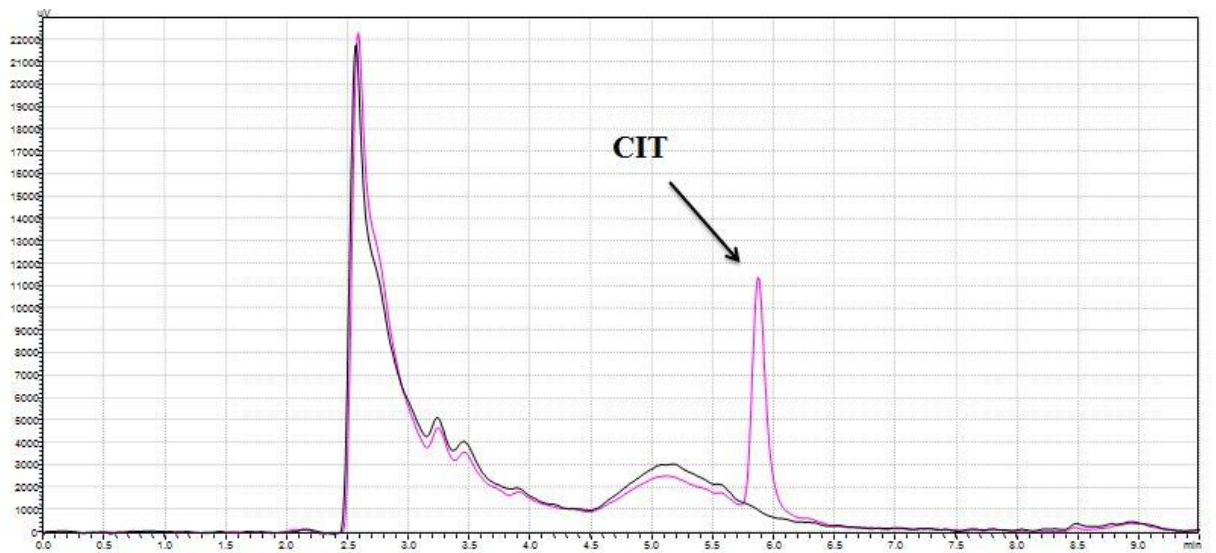
Na chromatogramech níže jsou uvedené záznamy separace standardu citrininu a různých typů matrice za uvedených optimalizovaných podmínek. Metoda byla takto následně validována.



Obr. 12: Záznam separace za optimálních podmínek v on-line zapojení. Porovnání nástřiku matrice červené fermentované rýže blank (černá křivka) a spike o koncentraci 100 µg/l (růžová křivka).



Obr. 13: Záznam separace za optimálních podmínek v on-line zapojení. Porovnání nástřiku matrice LipiControl blank (černá křivka) a spike o koncentraci 100 µg/l (růžová křivka).



Obr. 14: Záznam separace za optimálních podmínek v on-line zapojení. Porovnání nástřiku matrice pšenice blank (černá křivka) a spike o koncentraci 100 µg/l (růžová křivka).

5. Výsledky

5.1. Test vhodnosti chromatografického systému

Vhodnost chromatografického systému a účinnost chromatografické separace byla prokazována měřením pracovního roztoku standardu pro validaci o koncentraci 5000 µg/l CIT připraveným podle kapitoly 4.3.3. Tyto parametry byly také prokazovány v naspikované matici vzorků.

5.2. Účinnost chromatografického systému v gradientové eluci

Při gradientové eluci zůstává šířka píku s časem téměř neměnná a z toho důvodu nelze pro hodnocení účinnosti použít rovnici pro zdánlivý počet teoretických pater (N). Ten nahrazuje Píková kapacita P vyjadřující podíl celkové doby gradientu a průměrné šířky píku v chromatogramu. Hodnota byla vypočítána podle vzorce:

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

t_g doba trvání gradientu

w_b šířka píku při základně

Tabulka 10: Účinnost chromatografického systému v gradientové eluci

Analyzovaná látka	t_r (min)	$w_{0,5}$ (min)	P_c
Citrinin	5,881	0,126	17,865

5.3. Faktor symetrie chromatografických píků

Výpočet faktoru symetrie byl spočítán z průměrů tří měření podle vztahu:

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

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

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

Tabulka 11: Symetrie chromatografických píků

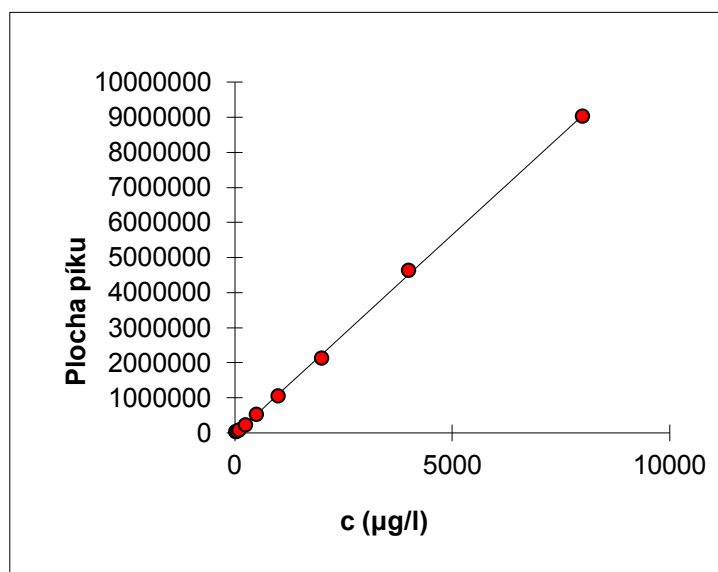
Analyzovaná látka	t_r (min)	$w_{0,05}$ (min)	A_s
Citrinin	5,881	0,352	1,616

5.4. Validace analytické metody

5.4.1. Linearita

Linearita byla určena z výsledků kalibračních křivek pracovních roztoků pro kalibraci připravených podle kapitoly 4.3.2. Bylo změřeno 9 nebo 10 vzrůstajících koncentrací. Každá koncentrace třikrát a pro výpočet byl použit jejich průměr. Analýza byla provedena se vzorky čisté vody standardů i se všemi vzorky matric.

Linearita citrininu v čisté vodě se standardem

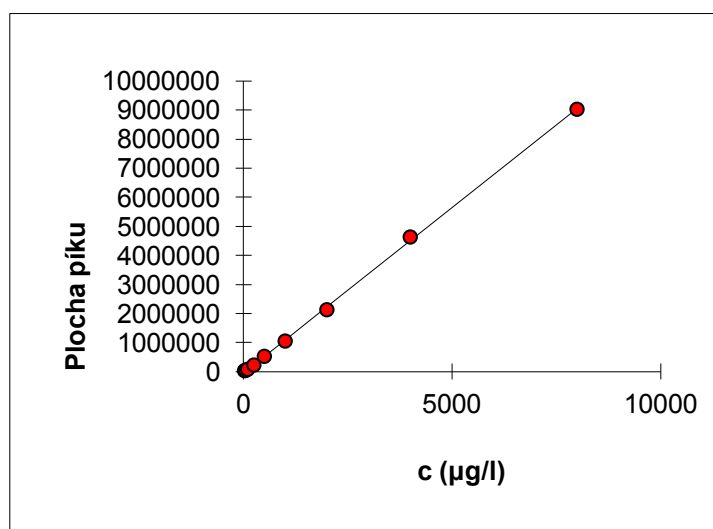


c (µg/l)	Plocha píku
5	3099
25	16367
50	38874
100	83277
250	196799
500	586768
1000	1282684
2000	2214101
4000	4596978
8000	9193149

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

Počet bodů	n =	10	Odhad chyby
Směrnice	k =	1150	± 8,38
Abs. člen	q =	-11906	± 24497
Korelační koef.	r =	0,999788	
Reziduální odch.	s =	64935	

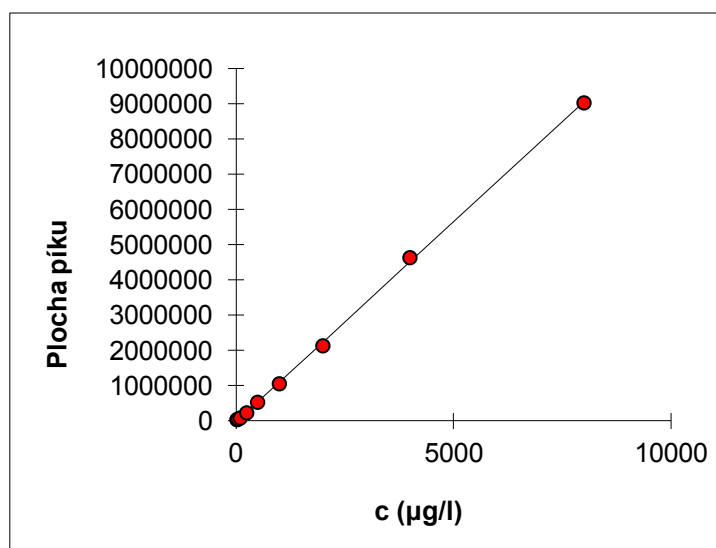
Linearita citrininu v matrici červené fermentované rýže



c (µg/l)	Plocha píku
25	46107
50	56027
100	91954
250	203867
500	524010
1000	1006683
2000	2042708
4000	4261336
8000	8252519

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

Počet bodů	n =	9	Odhad chyby
Směrnice	k =	1037,917	± 7,09
Abs. člen	q =	-4845	± 21854
Korelační koef.	r =	0,999836	
Reziduální odch.	s =	53656	

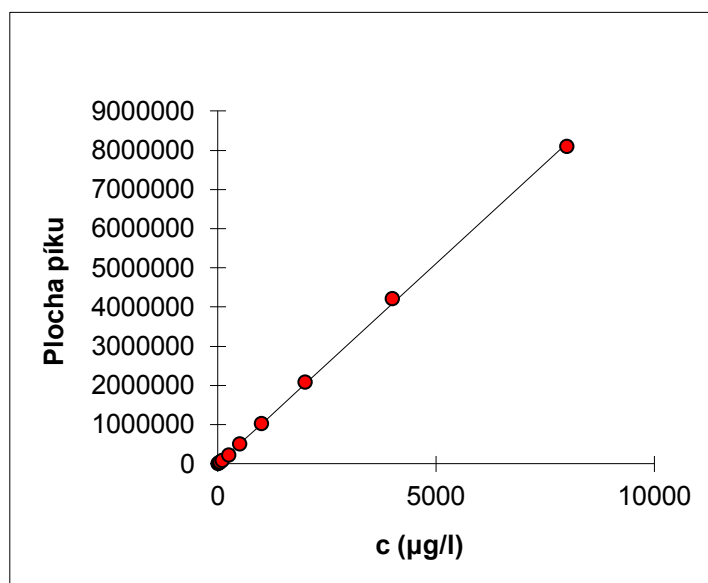
Linearita citrininu v matrici doplňků stravy

c (µg/l)	Plocha píku
25	30782
50	41931
100	77239
250	224513
500	524480
1000	1049715
2000	2127669
4000	4631506
8000	9026916

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

Počet bodů	n =	9	Odhad chyby
Směrnice	k =	1137	± 9,01
Abs. člen	q =	-41898	± 27737
Korelační koef.	r =	0,999781	
Reziduální odch.	s =	68098	

Linearita citrininu v matrici obilovin



c (µg/l)	Plocha píku
5	3099
25	16797
50	38927
100	81002
250	219458
500	503350
1000	1022462
2000	2080343
4000	4210087
8000	8094001

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

Počet bodů	n =	10	Odhad chyby
Směrnice	k =	1020	± 7,20
Abs. člen	q =	1374	± 21018
Korelační koef.	r =	0,999801	
Reziduální odch.	s =	55711	

5.4.2. Opakovatelnost

Opakovatelnost byla ověřena změřením tří různých koncentrací pracovních roztoků standardu a jednotlivých matric s přidavkem standardu taktéž na třech koncentračních hladinách, které byly vždy z jedné vialky opakovaně dávkovány do systému. Zjištěné plochy píků byly použity k výpočtu relativní směrodatné odchylky pro stanovení citrininu. Takto byla zjištěna opakovatelnost stanovení pro čistý standard a standard v matrici. Citrinin byl vyhodnocován při koncentracích 100 µg/l, 1000 µg/l a 4000 µg/l.

Tabulka 12: Stanovení opakovatelnosti pro standard a standardu v matrici červené fermentované rýže

Nástřik	Standard			Červená fermentovaná rýže		
	Plocha píku			Plocha píku		
	100 µg/l	1000 µg/l	4000 µg/l	100 µg/l	1000 µg/l	4000 µg/l
1.	83674	1281062	4595371	91438	1006500	4259838
2.	82757	1286077	4589238	88172	1006459	4238721
3.	83400	1280913	4577761	90707	1007090	4240547
4.	81816	1285342	4597935	91385	1006137	4243963
5.	80837	1297679	4581352	88667	1006076	4244111
6.	82400	1300413	4581972	88863	1006250	4237299
N	6	6	6	6	6	6
Průměr	82480,67	1288581	4587272	89872	1006419	4244080
SD	1048	8424	8206	1469	369	8191
RSD (%)	1,27	0,65	0,18	1,64	0,04	0,19

Tabulka 13: Stanovení opakovatelnosti standardu v matrici LipiControl a v matrici pšenice

Nástřik	LipiControl			Pšenice		
	Plocha píku			Plocha píku		
	100 µg/l	1000 µg/l	4000 µg/l	100 µg/l	1000 µg/l	4000 µg/l
1.	76239	1047899	4637685	80933	1019142	4211914
2.	76581	1048234	4630235	81034	1022865	4205115
3.	77126	1047098	4631728	81174	1019106	4213231
4.	78011	1047860	4635022	80797	1020246	4210299
5.	76170	1048153	4634528	80901	1020066	4207395
6.	76393	1048409	4627136	80366	1018627	4208612
N	6	6	6	6	6	6
Průměr	76753,33	1047942	4632722	80867,5	1020009	4209428
SD	705	462	3783	277	1529	2993
RSD (%)	0,92	0,04	0,08	0,34	0,15	0,07

5.4.3. Přesnost

Pro test přesnosti metody byly provedeny 3 nástřiky z každé skupiny matrice, ve které bylo připraveno 6 navážek vzorků se spikem CIT na jedné koncentrační hladině 2000 µg/l. Z naměřených výsledků byla vypočítána směrodatná odchylka. Tyto vzorky byly připraveny smísením matrice a pracovního roztoku pro validaci, připraveného podle kapitoly 4.3.3.

Tabulka 14: Stanovení parametru přesnosti v různých matricích

Vzorek	Průměr ploch píků		
	Červená ferm. rýže	LipiControl	Pšenice
1	182454	152453	169502
2	188507	147556	163882
3	187531	154602	163456
4	188723	151144	164777
5	180898	157459	168637
6	176366	157243	167270
Průměr	184080	153410	166254
SD	5006,883	3816,49	2564,795
RSD (%)	2,72	2,49	1,54

5.4.4. Výtěžnost

Při počítání výtěžnosti byla dána do poměru průměrná hodnota plochy píku roztoku standardu o koncentraci 200 µg/l (u vzorku dochází ke zředění 10x při extrakci) s průměrnou hodnotou plochy CIT ze vzorků matric. Do každé matrice byl přidán CIT o takové koncentraci, aby poměr zůstal zachován stejný. Ke stanovení výtěžnosti byly použity hodnoty měřené pro výpočet přesnosti. Každý ze vzorků byl dávkován do systému třikrát.

Tabulka 15: Stanovení výtěžnosti citrininu v matricích

	Koncentrace (µg/l)	Průměrná plocha píků	Výtěžnost
Standard	200	202862	
Červená ferm. rýže	200	184080	90,74 %
LipiControl	200	153410	75,62 %
Pšenice	200	166254	81,95 %

5.4.5. Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ)

Limit kvantifikace je stanoven jako odezva desetkrát větší než hladina šumu. Pro správný výpočet koncentrace analytu je možno použít pouze hodnoty rovné nebo vyšší, než tyto hladiny limitní. Jeho určení bylo dosaženo postupným ředěním a experimentálním ověřením hodnot.

Pro určení, zda se daný analyt vůbec ve vzorku vyskytuje, je stanoven limit detekce. Ten vyjadřuje také citlivost metody. Pro LOD platí, že hledaný pík v daném retenčním čase musí být statisticky významně odlišný od šumu, abychom mohli mluvit o jeho přítomnosti. V tomto 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 je směrnice kalibrační křivky.

Mezi LOD a LOQ platí vztah:

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

Obě hodnoty byly spočítány jak pro čisté standardy, tak pro všechny typy matric. Pro každou matici byl určen jiný limit kvantifikace. Pro červenou fermentovanou rýži a doplňky stravy (LipiControl) byla maximální koncentrace, při

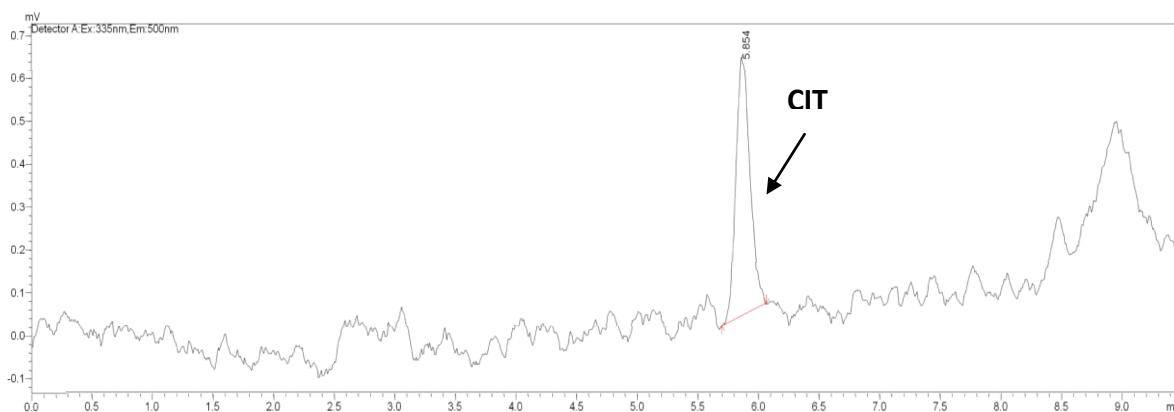
keré se dal pík CIT s jistotou odlišit od šumu, určena na 25 µg/l. Pro standard a obiloviny (pšenice) byl roztok o koncentraci 5 µg/l dvakrát naředěn, ale výsledné píky u matrice obilovin byly na chromatogramu hůře detekovatelné oproti šumu. Tyto koncentrace byly zároveň zvoleny nejnižšími body kalibračních křivek všech matric.

Tabulka 16: Limit kvantifikace standardu a matric

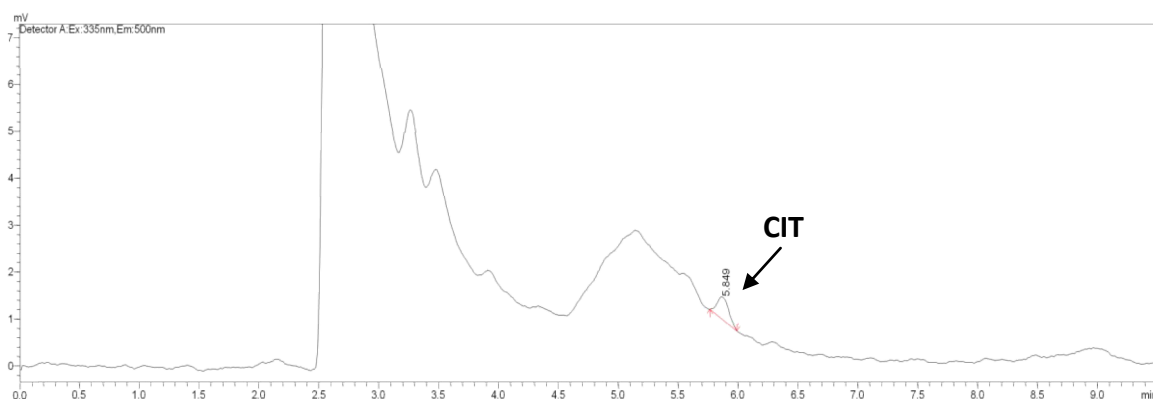
	Koncentrace (µg/l)	1. nástřik (plocha)	2. nástřik (plocha)	3. nástřik (plocha)	Průměr LOQ
Standard	2	6328	4887	5019	5411
Červená ferm. rýže	25	54621	42376	41325	46107
LipiControl	25	34121	29333	28892	30782
Pšenice	5	3105	3030	3164	3100

Tabulka 17: Limit detekce pro standard a matrice

	Teoreticky vypočtená koncentrace LOD (µg/l)
Standard	0,6
Červená ferm. rýže	7,5
LipiControl	7,5
Pšenice	1,5



Obr. 15: Chromatografický záznam analýzy standardu o koncentraci rovné LOQ (2 µg/l)



Obr. 16: Chromatografický záznam analýzy citrininu v matrici pšenice o koncentraci rovné LOQ (5 µg/l)

5.5. Stanovení obsahu citrininu v reálných vzorcích

Chromatografická analýza byla validována pro tři různé matrice. Pro vlastní stanovení reálných vzorků bylo celkem použito 6 přípravků doplňků stravy volně prodejných na českém trhu, 2 zástupci obilovin a jedna čistá fermentovaná rýže dovezená z Číny. Jednotlivé vzorky byly pro analýzu připraveny podle kapitoly 4.4. a poté do systému dávkovány v jednotlivých nástřicích po 50 µl. Od každého vzorku byly provedeny minimálně tři měření, z jejichž průměrné hodnoty ploch byla vypočtena pomocí kalibrační křivky výsledná koncentrace CIT.

Tabulka 18: Výsledky stanovení průměrné hodnoty CIT v reálných vzorcích

VZOREK	Stanovená konc. CIT (µg/kg)
LipiControl	550,5
Arterin	< LOD
Cholesten	< LOD
MycoCholest	< LOD
Reduchol	1105,8
Sibyl	< LOD
Pšenice	< LOD
Ječmen	< LOQ
Červená ferm. rýže	5292,2

U většiny vzorků byla hodnota citrininu pod limitem detekce, v jednom případě pod hranicí limitu kvantifikace. U dvou doplňků stravy byl nalezen citrinin v dostatečném množství pro výpočet výsledné kontaminace. Přesto byly koncentrace ve vzorcích 2x až 4x nižší než uvádí jediný schválený limit pro výskyt citrininu v doplňcích stravy (2000 µg/kg). Čistá fermentovaná rýže nemá v evropské legislativě stanoveny limity pro kontaminaci tímto mykotoxinem, navzdory tomu, že není problém tuto surovinu do EU, případně do České republiky, dovézt. Obecně se však na trhu v ČR tyto výrobky moc nevyskytují. Kdyby byl použit tento limit na náš vzorek čisté fermentované rýže, limit by byl překročen téměř 3x. Jedná se však o logickou a reálnou hodnotu, jelikož výrobky z červené fermentované rýže jsou nejvíce ohroženy kontaminací mykotoxinem citrininem [17, 31, 32] a testovaný vzorek měl prošlou lhůtu trvanlivosti.

6. Závěr a diskuze

Cílem této diplomové práce bylo urychlit celkový čas úpravy vzorků pomocí on-line zapojení MIP extrakce do HPLC a poté vytvořit a optimalizovat metodu pro stanovení citrininu ve třech různých maticích. Zástupcem doplňků stravy pro optimalizaci metody byl zvolen přípravek LipiControl, jako zástupce obilovin byla použita pšenice a třetí maticí byla čistá červená fermentovaná rýže. Technikou přepínání kolon a vložením extrakční MIP předkolony do HPLC systému bylo docíleno promytí vzorku a selektivní extrakce hledaného analytu. V on-line spojení bylo testováno několik MIP a NIP sorbentů, z nichž byl vybrán MIP který vykazoval největší selektivitu a retenci citrininu (MIP s funkčním monomermem metakrylamidem a porogem acetonitrilem). Z testovaných chromatografických kolon byla poté vybrána pro separaci kolona s biphenylovou stacionární fází dlouhá 100 mm a s velikostí částic 5 μm . Experimentálně byly zjištěny ideální podmínky pro separaci a také složení mobilní fáze. Fyzikální vlastnosti citrininu umožnily použít citlivou fluorimetrickou detekci. Parametry vyvinuté metody jsou následující:

Promývací fáze:	methanol - 0,5% vodný roztok kyseliny octové, 25:75
Délka promývání:	1 minuta
Extrakční kolona:	Držák Mercury MS holder, 20 x 3 mm naplněna MIP sorbentem MAAM + ACN
Chromatografická kolona:	Kinetex® Biphenil, 100 x 4,6 mm, 5 μm částice, (Sigma Aldrich)
Mobilní fáze:	acetonitril - 0,5% vodný roztok kyseliny octové
Gradientová eluce:	1,0 – 3,0 min isokraticky (70:30), 3,0 – 7,5 min lineární nárůst gradientu, 7,5 min - 8,5 min isokraticky (100:0)

Po optimalizaci celé separace byla metoda validována. Vyhovující podmínky chromatografické separace byly prokázány požadovanými validačními parametry. Linearita pro citrinin byla zjištěna z kalibrační křivky v koncentracích 5 - 8000 $\mu\text{g/l}$ s korelačním koeficientem větším než 0,9997. Přesnost i opakovatelnost byla vypočtena s relativní směrodatnou odchylkou < 3 %,

výtěžnost se pohybuje v rozmezí 75 - 91 %. Limit kvantifikace této metody byl 25 µg/l pro červenou fermentovanou rýži a doplňky stravy, 5 µg/l pro obiloviny a 2 µg/l pro čistý standard.

Citrinin byl celkem stanoven v 9 různých vzorcích. Nejvyšší koncentrace - 5292,2 µg/kg byla nalezena v čisté červené fermentované rýži a koncentrace 1105,8 µg/kg byla zjištěna v doplňcích stravy s názvem Reduchol. Čistá červená fermentovaná rýže nemá v evropské legislativě stanovenou žádnou horní hranici. Kdybychom použili jediné legislativně dané množství pro výskyt citrininu v doplňcích stravy - 2000 µg/kg, které Reduchol stále ještě splňuje, rýže by tento limit téměř 3x překračovala.

Závěrem lze konstatovat, že byla vyvinuta nová a validovaná metoda pro separaci citrininu přímo z extraktů neupravené matrice. Metoda je originální, protože do této doby nebyla v dostupné literatuře publikována technika MISPE v on-line zapojení pro stanovení citrininu z potravních vzorků. Nabízí se tak využití této metody pro rychlou analýzu a následnou kontrolu dodržování limitních legislativních hranic pro výskyt citrininu v doplňcích stravy. Metoda je validována pro použití pouze v doplňcích stravy, ale po ověření selektivity a výtěžnosti by mohla být využita i v dalších potravinách a zvířecích krmivech.

7. Použitá literatura

- [1] Mykotoxiny. *Bezpečnost potravin* [online]. [cit. 2017-10-25]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76672.aspx>
- [2] (-)-citrinin. In: *ChemSpider: Search and share chemistry* [online]. [cit. 2017-10-25]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10222475.html>
- [3] RICHARD LAWLEY, L. C. (2012). The Food Safety Hazard Guidebook. *Royal Society of Chemistry*, str. 213-215, ISBN 1849733813.
- [4] WEIDENBÖRNER, M. (2013). Encyclopedia of Food Mycotoxins. *Springer Science & Business Media*, str. 69-70, ISBN 3662044641.
- [5] RICHARD, John L. "Guide to Mycotoxins - featuring Mycotoxin Risk Management in Animal Production". In: *Romer Labs: What is Citrinin?* [online]. 2015. [cit. 2017-10-25]. Dostupné z: <https://www.romerlabs.com/en/knowledge-center/knowledge-library/articles/news/what-is-citrinin/>
- [6] O'NEIL a J. MARYADELE. (2006) The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 15. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, ISBN 9781849736701.
- [7] FLAJS D., PERAICA M. (2009). Toxicological properties of citrinin. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. Záhřeb: Institute for Medical Research and Occupational Health, 60(4), str. 457-464, ISSN 0004-1254.
- [8] DESHPANDE S. (2002). Handbook of Food Toxicology, Food Science and Technology. *CRC Press*, str. 424, ISBN 0824743903.
- [9] XU B.-J., JIA X.-G., GU LI-J., SUNG CH.-K. (2006) Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. *Food Control*. Elsevier, 17(4), 271-285. ISSN 0956-7135.
- [10] ALKA BEN TRIVEDI M. H. (1993). Formation of a new toxic compound, citrinin H1, from citrinin on mild heating in water. *Journal of the Chemical Society*, Perkin Transaction 1, (18) str. 2167-2171.

- [11] KHOLOVÁ, Aneta. (2016) *Mykotoxiny v potravinách – citrinin a možnosti jeho stanovení*. Hradec Králové. Bakalářská práce. UK v Praze, Farmaceutická fakulta v HK. Vedoucí práce: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.
- [12] AMPARO PASCUAL-AHUIR, E. V.-P. (2014). Mechanisms of the Food Contaminant Citrinin: Application of a Quantitative Yeast Model. *Nutrients*, 6(5), str. 2077-2087, ISSN 2072-6643.
- [13] YU FENG-YIH, L. Y.-C.-H.-H. (2006). Citrinin induces apoptosis in HL-60 cells via activation of the mitochondrial pathway. *Toxicology Letters*, 161(2), str. 143-151, ISSN 1879-3169.
- [14] CHAN, W.-H. (2007). Citrinin induces apoptosis via a mitochondria-dependent pathway and inhibition of survival signals in embryonic stem cells, and causes developmental injury in blastocysts. *Biochemical Journal*, 404 (2), str. 317–326, <http://doi.org/10.1042/BJ20061875>.
- [15] Citrinin - mykotoxin v potravinách a krmivech. *Informační centrum bezpečnosti potravin Ministerstva zemědělství* [online]. 2012 [cit. 2017-11-10]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/citrinin-mykotoxin-v-potravinach-a-krmivech.aspx>
- [16] 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, (10) 3, str. 2605.
- [17] NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 212/2014 ze dne 6. března 2014, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, pokud jde o maximální limity kontaminující látky citrininu v doplňcích stravy na bázi rýže fermentované červenými kvasnicemi *Monascus purpureus*. 2014
- [18] NOVÁKOVÁ, L. Moderní trendy v přípravě vzorku k analýze s využitím instrumentálních technik. Dostupné na: http://www.pragolab.cz/files/udalosti/2014-10/01_LNovakova.pdf. [online] 3. 10. 2014 [citace: 9. 12. 2017]
- [19] HOLZNEROVÁ, Anežka. (2015) *Testování a optimalizace on - line SPE HPLC podmínek pro stanovení mykotoxinu patulinu v jablečných nápojích*.

Hradec Králové. Diplomová práce. UK v Praze, Farmaceutická fakulta v HK.
Vedoucí práce: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

- [20] VASAPOLLO, G., SOLE, R. D., MERGOLA, L., LAZZOI, M. R., SCARDINO, A., SCORRANO, S., & MELE, G. (2011). Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(9), str. 5908–5945. <http://doi.org/10.3390/ijms12095908>
- [21] M. MOEIN MOHAMMAD, ABDEL-REHIM MOHAMED. (2015) Molecularly imprinted polymers for on-line extraction techniques. *Bioanalysis*. 7(17), 2145–2153, ISSN 1757-6180.
- [22] GAJDOŠOVÁ, Barbora. (2017) *Vývoj on-line spe-hplc metody pro stanovení zearalenonu ve vzorcích piva*. Hradec Králové. Diplomová práce. UK v Praze, Farmaceutická fakulta v HK. Vedoucí práce: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.
- [23] VAZQUEZ, B. I. et al. (1996). Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of ochratoxin A and citrinin in cheese by time-resolved luminescence using terbium. *Journal of Chromatography A*, (727) 2, str. 185-193.
- [24] ABRAMSON D., USLEBER E., MÄRTLBAUER (1999) Rapid Determination of Citrinin in Corn by Fluorescence Liquid Chromatography and Enzyne Immunoassay. *Journal of AOAC International*, 82(6), str. 1353, ISSN 1944-7922.
- [25] SHU P. Y., LIN C. H. (2002) Simple and sensitive determination of citrinin in *Monascus* by GC-selected ion monitoring mass spectrometry. *Analytical sciences*, 18(3), str. 283-287, ISSN 1348-2246.
- [26] MOLINIÉ A., FAUCET V., CASTEGNARO M., PFOHL-LESZKOWCZ A. (2005) Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B 1: development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin. *Food Chemistry*, 92, str. 391-400, ISSN 0308-8146.

- [27] EL ADLOUNI, C., TOZLOVANU, M., NAMAN, F., FAID, PFOHL-LESZKOWICZ, A. (2006), Preliminary data on the presence of mycotoxins (ochratoxin A, citrinin and aflatoxin B1) in black table olives “Greek style” of Moroccan origin. *Mol. Nutr. Food Res.*, 50, str. 507–512. doi:10.1002/mnfr.200600055.
- [28] TOZLOVANU M., M. T. NGUYEN, T. L. TRAN, A. PFOHL-LESZKOWICZ (2007). Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. *Food Chemistry*, (105), str. 42-47.
- [29] HARTL A. & STENZEL W.R. (2007). Development of a method for the determination of the citrinin in barley, rye and wheat by solid phase extraction on aminopropyl columns and HPLC-FLD. *Mycotox Res*, (23) 127, ISSN: 0178-7888, <https://doi.org/10.1007/BF02951508>.
- [30] ARÉVALO, F. J. et al. (2011). Citrinin determination in rice samples using a micro fluidic electrochemical immunosensor. *Talanta*, vol. (83) 3, str. 966-973.
- [31] LI XUE-MEI, SHEN XING-HAI, XUE LAN, DUAN ZHEN-WEN, GUO SHU-REN (2012) A validated RP-HPLC Method For the Determination of Citrinin in Xuezhikang Capsule and other Monascus-Fermented Products. *E-Journal of Chemistry*, 9(1), str. 260-266, ISSN 0973-4945.
- [32] LI Y., WU H., GUO L., ZHENG Y., GUO Y. (2012) Microsphere-based flow cytometric immunoassay for the determination of citrinin in red yeast rice. *Food Chemistry*, 134(4), str. 2540-2545, ISSN 0308-8146.
- [33] ARROYO-MANZANARES, N. et al. (2013). A new approach in sample treatment combined with UHPLC-MS/MS for the determination of multiclass mycotoxins in edible nuts and seeds. *Talanta*, (115) 15, str. 61-67.
- [34] NIGOVIC B., SERTIC M., MORNAR A. (2013) Simultaneous determination of lovastatin and citrinin in red yeast rice supplements by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Chemistry*, 138(1), str. 531-538, ISSN 0308-8146.
- [35] W. WANGA, QI CHEN, X. ZHANG, H. ZHAN, Q. HUANG, D. LI, J. YAO (2014) Comparison of extraction methods for analysis of citrinin in red fermented rice. *Food Chemistry*, 157, str. 408–412, ISSN: 0308-8146.

- [36] TÖLGYESI Á., STROKA J., TAMOSIUNAS V., ZWICKEL T. (2015) Simultaneous analysis of *Alternaria* toxins and citrinin in tomato: an optimised method using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(9), str. 1512-1522, ISSN 1944-0057.
- [37] APPELL M., M. A. JACKSON, L. C. WANG, W. B. BOSMA (2015). Determination of Citrinin Using Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction Purification, HPLC Separation, and Fluorescence Detection. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 28, 1815 – 1819, ISSN: 1082-6076.
- [38] HUERTAS-PEREZ J.F., ARROYO-MANZANARES N., GARCÍA-CAMPANA A.M., GÁMIZ-GRACIA L. (2015) High-throughput determination of citrinin in rice by ultra-high-performance liquid chromatography and fluorescence detection (UHPLC-FL). *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 32(8), str. 1352-1357, ISSN 1944-0057.