VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ
V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# STANOVENÍ VYBRANÝCH MYKOTOXINŮ VE VZORCÍCH ČAJŮ

DETERMINATION OF SELECTED MYCOTOXINS IN TEA

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE Bc. Václav Pustka
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE RNDr. Jaroslav Kuchyňa
SUPERVISOR

BRNO 2020

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

# Zadání diplomové práce

| | | | |
|---|---|---|---|
| Číslo práce: | FCH-DIP1447/2019 | Akademický rok: | 2019/20 |
| Ústav: | Ústav chemie potravin a biotechnologií | | |
| Student: | **Bc. Václav Pustka** | | |
| Studijní program: | Chemie a technologie potravin | | |
| Studijní obor: | Potravinářská chemie a biotechnologie | | |
| Vedoucí práce: | **RNDr. Jaroslav Kuchyňa** | | |

## Název diplomové práce:

Stanovení vybraných mykotoxinů ve vzorcích čajů

## Zadání diplomové práce:

1. Zpracování literární rešerše na téma stanovení mykotoxinů v potravinách
2. Výběr vhodné analytické metody pro stanovení vybraných (aflatoxiny, ochratoxin A)
3. Vývoj vybrané analytické metody HPLC, její validace a vyzkoušení na vzorcích čajů
4. Zpracování a vyhodnocení dat
5. Diskuze získaných výsledků, závěry práce

## Termín odevzdání diplomové práce: 7. 5. 2020:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu.
Toto zadání je součástí diplomové práce.

| | | |
|---|---|---|
| Bc. Václav Pustka | RNDr. Jaroslav Kuchyňa | prof. RNDr. Ivana Márová, CSc. |
| student | vedoucí práce | vedoucí ústavu |

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan

V Brně dne 31. 1. 2020

## ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá vývojem a validací analytické metody využívající vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s fluorescenční detekcí pro simultánní stanovení aflatoxinů a ochratoxinu A v bylinném a ovocném čaji. Teoretická část obsahuje základní přehled skupin mykotoxinů a nejdůležitějších metod, které slouží pro jejich stanovení v potravinách. Větší pozornost je věnována zvláště metodě HPLC a přehledu derivatizačních technik pro zvýšení fluorescenční odezvy aflatoxinů $B_1$ a $G_1$. Praktická část se zabývá optimalizací extrakce a přečištění vzorku, nastavení parametrů instrumentální analýzy a sestavením zařízení pro fotochemickou derivatizaci. Práce se dále věnuje stanovení základních výkonnostních charakteristik pro úspěšnou validaci.



## ABSTRACT

This diploma thesis deals with the development and validation of an analytical method using high performance liquid chromatography method with fluorescence detection for the simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in herbal and fruit tea. The theoretical part describes the most common groups of mycotoxins and the most important methods for their determination in food. The great attention is devoted to HPLC method and the overview of the derivatization techniques for aflatoxins $B_1$ and $G_1$ fluorescence response enhancement. The practical part of this study focuses on the optimization of sample extraction and purification, the settings of the instrumental analysis and the photochemical reactor assembly. The thesis also involves the determination of the basic performance characteristics for the successful method validation.



## KLÍČOVÁ SLOVA

vysokoúčinná kapalinová chromatografie, aflatoxin, ochratoxin A, derivatizace, validace

## KEYWORDS

high performance liquid chromatography, aflatoxin, ochratoxin A, derivatization, validation

PUSTKA, Václav. *Stanovení vybraných mykotoxinů ve vzorcích čajů*. Brno, 2020. Dostupné také z: https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/124073. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce RNDR. Jaroslav Kuchyňa.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

…….

podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych rád poděkoval RNDr. Jaroslavu Kuchyňovi, doc. Ing. Pavlu Divišovi, Ph.D. a celému kolektivu firmy LABTECH za odborné vedení při vypracování této práce. Největší díky však patří mé rodině, která mě po celou dobu studia podporovala, zvláště pak mé ženě Dominice.

# Obsah

**ÚVOD** ..... **7**

**TEORETICKÁ ČÁST** ..... **8**

**1. Mykotoxiny a jejich charakteristika** ..... **8**

**1.1 Stručný přehled mykotoxinů** ..... 8

1.1.1 Aflatoxiny ..... 8

1.1.2 Ochratoxiny ..... 9

1.1.3 Další mykotoxiny ..... 10

**1.2 Mykotoxiny v čajích** ..... 10

**2. Metody analýzy mykotoxinů** ..... **12**

**2.1 Zpracování a úprava vzorku** ..... 12

2.1.1 Extrakce mykotoxinů ze vzorku ..... 12

2.1.2 Možnosti přečištění vzorku ..... 12

**2.2 Chromatografické metody** ..... 13

2.2.1 Typy chromatografických metod ..... 13

2.2.2 Eluční charakteristiky a účinnost chromatografické kolony ..... 14

2.2.3 Vysoce účinná kapalinová chromatografie HPLC ..... 15

2.2.4 Tenkovrstvá chromatografie TLC ..... 15

**2.3 Imunochemické metody** ..... 16

2.3.1 Radioimunoanalýza RIA ..... 16

2.3.2 Enzymová imunoanalýza ELISA ..... 16

**3. Princip HPLC a její využití v analýze mykotoxinů** ..... **19**

**3.1 Kapalinový chromatograf a jeho součásti** ..... 19

3.1.1 Mobilní a stacionární fáze ..... 20

3.1.2 Možnosti detekce ..... 20

**3.2 Způsoby derivatizace** ..... 22

3.2.1 Předkolonová chemická derivatizace ..... 23

3.2.2 Postkolonová chemická derivatizace ..... 23

3.2.3 Postkolonová fotochemická derivatizace ..... 26

**3.3 Simultánní analýza aflatoxinů a ochratoxinu A** ..... 26

**4. Validace analytické metody** ..... **28**

**4.1 Validační parametry** ..... 28

**PRAKTICKÁ ČÁST** ..... **30**

**5. Materiál** ..... **30**

**5.1 Přístroje a zařízení** ..... 30

**5.2 Pomůcky a další vybavení** ..... 31

**5.3 Chemikálie** ... 31
**5.4 Popis použitých vzorových matric** ... 32
**6. Metody** ... **32**
**6.1 Příprava potřebných roztoků** ... 32
6.1.1 Příprava extrakčního rozpouštědla ... 33
6.1.2 Příprava potřebných pufrů ... 33
6.1.3 Příprava směsného standardu ... 33
6.1.4 Příprava mobilní fáze ... 33
**6.2 Příprava vzorků** ... 33
**6.3 Sestavení zařízení pro fotochemickou derivatizaci** ... 34
**6.4 Instrumentální analýza a její parametry** ... 35
**6.5 Stanovení validačních parametrů** ... 36
6.5.1 Stanovení opakovatelnosti ... 36
6.5.2 Stanovení výtěžnosti metody ... 36
6.5.3 Stanovení linearity ... 37
6.5.4 Stanovení meze detekce a meze kvantifikace ... 37
**VÝSLEDKY A DISKUSE** ... **38**
**7. Vývoj a optimalizace metody HPLC** ... **38**
**7.1 Instrumentální analýza** ... 38
7.1.1 Výběr vhodné kolony ... 38
7.1.2 Výběr mobilní fáze a nastavení gradientu ... 39
7.1.3 Derivatizace ... 40
7.1.4 Detekce ... 42
7.1.5 Další podmínky ... 42
**7.2 Optimalizace extrakce a přečištění vzorku** ... 42
**8. Validace metody HPLC** ... **46**
**8.1 Výkonnostní charakteristiky metody** ... 46
8.1.1 Opakovatelnost ... 46
8.1.2 Výtěžnost ... 48
8.1.3 Linearita ... 49
8.1.4 Limit detekce a kvantifikace ... 52
8.1.5 Ověření správnosti metody ... 54
**ZÁVĚR** ... **55**
**SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK** ... **56**
**ZDROJE A POUŽITÁ LITERATURA** ... **58**

# ÚVOD

Plísně jsou díky své nenáročnosti na živiny téměř všudypřítomné. Mimo jiné velmi často napadají potraviny a krmiva hospodářských zvířat, které jsou pro ně ideálním zdrojem výživy a vláhy. Mykotoxiny, jež jsou některými plísněmi produkovány, představují skupinu poměrně stabilních toxických metabolitů a velké riziko pro zdraví spotřebitele. Bývají obsaženy zvláště v řadě rostlinných produktů, nicméně mohou být obsaženy i v živočišných produktech, jako je maso a mléko, pokud je dobytek krmen kontaminovaným krmivem.

Pro zdravotní nezávadnost některých potravin je nutná jejich kontrola v příslušně vybavených laboratořích. Mezi analytickými metodami používanými pro stanovení mykotoxinů jasně dominují metody chromatografické, zvláště pak metoda vysoce účinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí. V poslední době dochází rovněž k velkému rozvoji technik využívající hmotnostní spektrometrii. Nicméně významnou roli hrají také metody imunochemické, jako je metoda ELISA.

Stejně jako jiné potraviny může obsahovat mykotoxiny i čaj, ať už se jedná o čaj pravý (*Camellia sinensis*) nebo o čaj bylinný a ovocný. Stejně tak musí docházet ke kontrole množství těchto škodlivých látek ve finálním výrobku, neboť ke kontaminaci může dojít ve všech fázích zpracování od pěstování po výrobu a skladování. Ačkoliv je v současné době již publikována řada analytických metod, stále je nutné nacházet nové způsoby identifikace a stanovení pro různé matrice a pro různé kombinace těchto kontaminantů potravin.

Tato práce se věnuje vývoji a validaci metody vysoce účinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí pro identifikaci a kvantifikaci množství aflatoxinů a ochratoxinu A, které pro spotřebitele představují nejvyšší riziko ze všech mykotoxinů. Hlavní důraz je kladen na parametry instrumentální analýzy, extrakci a přečištění vzorku a v poslední řadě na stanovení některých výkonnostních charakteristik (validačních parametrů) metody.

# TEORETICKÁ ČÁST

# 1. Mykotoxiny a jejich charakteristika

Mykotoxiny představují významné riziko v oblasti zemědělství a výroby potravin. Jedná se o skupinu jedovatých sekundárních metabolitů, které za daných podmínek produkují mikroskopické vláknité houby označované také jako plísně [1]. Z chemického hlediska jsou to strukturně různorodé nízkomolekulární organické látky nebílkovinné povahy [2]. Většina mykotoxinů vzniká polyketidovou cestou, jiné pak například z kyseliny mevalonové [3], která je významným intermediátem izoprenoidní dráhy [4], nebo aminokyselin. Hlavními producenty jsou rody *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*, které označujeme jako toxinogenní mikroskopické houby [3].

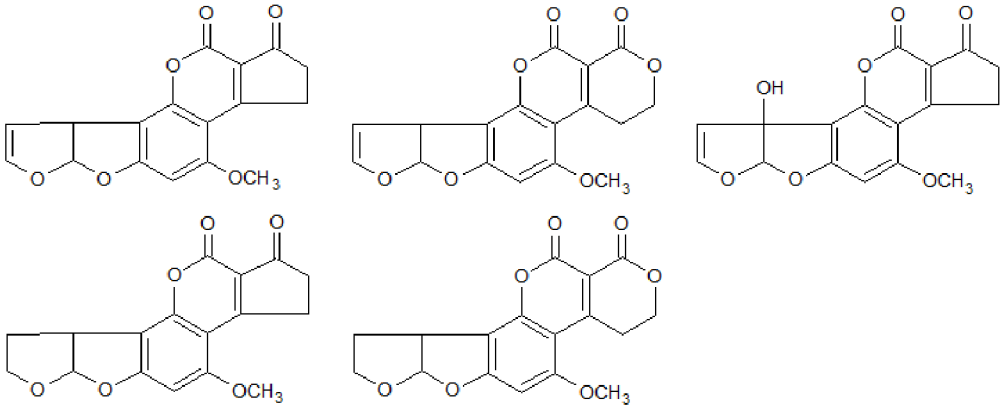
Ke kontaminaci potravin mykotoxiny může docházet jak před sklizní, tak v průběhu skladovaní, zpracování i u konečného spotřebitele. Schopnost hub napadat různé potraviny závisí na její povaze, vlhkosti, teplotě, mechanickém poškození, přítomnosti kyslíku a dalších faktorech [2]. Kontaminovány mohou být taktéž nejrůznější biotechnologické produkty, jako jsou rekombinantní proteiny, enzymy, či potravinářská aditiva (aminokyseliny, vitaminy) [3].

## 1.1 Stručný přehled mykotoxinů

V současné době je známá celá škála nejrůznějších mykotoxinů. Ty jsou na základě svých fyzikálně-chemických vlastností, toxicity i biologického producenta rozděleny do několika skupin. Mezi nejvýznamnější patří aflatoxiny, ochratoxiny a řada fusariových toxinů.

### 1.1.1 Aflatoxiny

Aflatoxiny představují extrémně toxickou skupinu mykotoxinů produkovanou plísněmi rodu *Aspergillus*, zvláště pak druhy *A. flavus* a *A. parasiticus* [3, 5]. Díky svým účinkům patří mezi silné hepatotoxiny, karcinogeny a teratogeny. Na základě fluorescenčního záření, které emitují pomocí budícího zdroje UV záření, jsou aflatoxiny děleny na skupinu B (blue, $AFB_1$, $AFB_2$) a G (green, $AFG_1$, $AFG_2$) [1], přičemž $AFB_1$ je nejrozšířenějším aflatoxinem a nejsilnějším přírodním karcinogenem vůbec [1, 5].

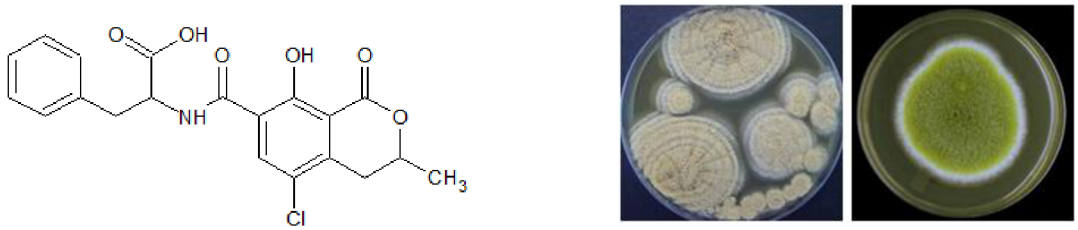



**Obrázek 1.1** – *Zleva doprava nejvýznamnější aflatoxiny $B_1$, $G_1$, $M_1$, $B_2$ a $G_2$* [3]

Skelet aflatoxinů je tvořen kumarinem, bisdihydrofuranovým kruhem a cyklopentanonem v případě skupiny B nebo 5,6-dihydropyran-2-onem u skupiny G (Obrázek 1.1) [1, 3]. Aflatoxiny jsou přeměňovány v játrech na řadu toxických metabolitů [3], z nichž řada (zvláště epoxidy) reaguje s proteiny a DNA [5]. V případě kontaminovaného krmiva $AFB_1$ a $AFB_2$ dochází u dojnic skotu k jejich metabolické přeměně na aflatoxiny třídy M, které mohou být poté obsaženy ve mléku a výrobcích z něj [3].

### 1.1.2 Ochratoxiny

Z plísně druhu *Aspergillus ochraceus* byly izolovány sekundární metabolity známé jako ochratoxiny. Nejvýznamnějším reprezentantem této skupiny je ochratoxin A (OTA), který je odvozen od aminokyseliny fenylalaninu a substituovaného kumarinu s navázaným atomem chlóru (Obrázek 1.2). Vyznačuje se silným nefrotoxickým účinkem. Zároveň je to však i hepatotoxin, imunotoxin, teratogen a karcinogen [1, 3]. Jedním z důvodů jeho toxicity může být schopnost porušit rovnováhu v syntéze proteinů a metabolismu fenylalaninu [5]. Kromě zástupců rodu *Aspergillus* pak produkují ochratoxiny i některé druhy rodu *Penicillium* [1, 3].




**Obrázek 1.2** – *Zleva ochratoxin A* [3], *plíseň Aspergillus ochraceus* [6] *a Aspergillus flavus* [7]

### 1.1.3 Další mykotoxiny

Plíseň paličkovice nachová (*Claviceps purpurea*) napadající obiloviny přeměňuje zrno na tvrdé útvary označované jako námel. V tomto útvaru vzniká skupina metabolitů – mykotoxinů označovaných jako ergotové neboli námelové alkaloidy. Existují dvě strukturně odlišné skupiny těchto alkaloidů, z nichž jedny jsou deriváty kyseliny lysergové, druhé ergolinu. Ergotové alkaloidy se po sklizni a zpracování posléze dostávají do mouky a cereálií. Zároveň jsou tepelně stálé, a proto se nerozkládají například při výrobě pečiva. Po intoxikaci způsobují halucinace i stavy extáze, zároveň však poškozují cévní systém [3].

Fumonisiny jsou poměrně termostabilní mykotoxiny strukturně podobné sfingosinu, které jsou produkovány plísněmi rodu *Fusarium*. Jejich zdrojem je zvláště kontaminovaná kukuřice a výrobky z ní nebo jiné obiloviny [3]. Intoxikace těmito látkami vedou k poškození jater a ledvin, což může vést k úmrtím hospodářských zvířat i člověka. Zároveň jsou tyto toxiny prokázanými karcinogeny [1]. Kromě fumonisinů produkují fusaria chemicky pestrou skupinu mykotoxinů zvanou trichotheceny, které mají celou řadu různých účinků. Typickými zástupci jsou deoxynivalenol či toxin T-2. Kromě těchto dvou skupin mykotoxinů produkují plísně rodu *Fusarium* ještě zearalenon (ZEA), který je dalším významným toxinem, jež se může vyskytovat v potravinách. Tato lipofilní sloučenina, kterou mohou být kontaminovány zvláště obiloviny, vykazuje účinky podobné ženským pohlavním hormonům – estrogenům [3].

Známými mykotoxiny, které rovněž tvoří rody *Aspergillus* a *Penicillium*, jsou patulin a citrinin. Patulin je běžným kontaminantem, který se nachází v ovoci a zelenině. Často může být obsažen v ovocných šťávách a džusech. Ze strukturního hlediska se jedná o lakton dobře rozpustný ve vodě, a proto jednoduše difunduje z místa napadení plísní do celého objemu daného kusu ovoce či zeleniny. Zároveň je jedním z mála mykotoxinů, které mohou být degradovány v průběhu tepelného zpracování potravin. Citrinin, který je odvozen od isochromenu, může být obsažen v napadených obilovinách. Oba zmíněné toxiny mají účinky do jisté míry podobné účinkům aflatoxinů [3].

## 1.2 Mykotoxiny v čajích

Mykotoxiny jsou zvláště nebezpečné i pro jejich vysokou stabilitu při skladování a zpracování. Často je nelze totiž odstranit ani varem za vyšší teploty. Klíčové je tedy zabránit růstu plísní už u výchozích surovin [5]. K tomu přispívají správné způsoby ošetření zemědělských plodin, hygienické zpracování i způsob skladování potravin.

V určitých případech lze uvažovat i o možnostech dekontaminace pomoci fyzikálních, chemických i biologických metod [3].

Jednou z významných komodit, která může být napadena toxinogenními plísněmi, je také čaj. Vlhké a teplé klima subtropických oblastí, kde je čaj běžně produkován, je pro růst vláknitých hub více než vhodné. Proto je obsah mykotoxinů v čajích bedlivě monitorován, zvláště pak množství aflatoxinů a ochratoxinu A, které představují jedny z nejrizikovějších kontaminantů. Jejich obsah se většinou u jednotlivých druhů čaje (bílý, zelený, oolong, černý, Pu-ehr) liší. Tento fakt souvisí s rozdíly ve výrobě například zeleného a černého čaje [8].

Nicméně kontaminovány bývají často také čajové směsi, jejichž základem je ovoce nebo bylinky. Ke kontaminaci sporami a jejich následnému růstu tak může dojít při pěstování, sklizni, zpracování i skladování čaje, ovoce nebo bylin [8]. Z analytického hlediska pak ovocné a bylinné čaje představují poměrně různorodou matrici, ve které je často relativně těžké některé mykotoxiny stanovit.

# 2. Metody analýzy mykotoxinů

## 2.1 Zpracování a úprava vzorku

Klíčovým krokem v každé analýze je odběr vzorků a následná extrakce a purifikace analytů, které jsou v něm obsaženy. Zároveň je tato část analýzy nejnáročnější a zabere nejvíce času. Adekvátní postup je volen zvláště dle vlastností výchozího materiálu a použité analytické techniky [5].

### 2.1.1 Extrakce mykotoxinů ze vzorku

V případě extrakce je důležité, aby byly sledované analyty převedeny ze vzorku do roztoku, ve kterém mohou být po následném přečištění stanoveny [9]. Volba vhodného extrakčního rozpouštědla závisí zvláště na povaze matrice vzorku a vlastnostech sledovaného analytu [5]. V ideálním případě je cílem extrakce převést do použitého solventu veškeré množství daného mykotoxinu a co nejmenší podíl ostatních látek z matrice, čemuž se v praxi můžeme přiblížit díky vhodné volbě jeho složení. Extrakce je většinou prováděna za ultrasonikace, homogenizace či třepání [10].

Většina mykotoxinů jsou mírně polární sloučeniny dobře rozpustné v organických rozpouštědlech, jako je methanol, aceton, chloroform nebo acetonitril. Ta jsou často používána ve směsi, která navíc obsahuje malé určité množství vody. Například pro extrakci ochratoxinu společně s aflatoxiny pro simultánní analýzu se obvykle používá směs methanolu s vodou [11, 12], popřípadě směs acetonitrilu s vodou [13, 14]. V případě využití imunochemických technik je vhodnější používat směs methanolu s vodou, který má menší negativní efekt na použité protilátky než ostatní uvedená rozpouštědla [15]. Chlorovaná rozpouštědla jsou v poslední době využívána méně často z ekologických důvodů. Pro zlepšení výtěžnosti extrakce je v řadě případů navíc vhodné využití silně nepolárního solventu, jako je například hexan, pro odstranění lipofilních látek [5].

### 2.1.2 Možnosti přečištění vzorku

Extrakty získané ze vzorků zpravidla většinou obsahují velké množství nečistot, a tak nemohou být využity pro přímou chromatografickou analýzu. Výjimkou jsou systémy s hmotnostní detekcí, které vyžadují jen základní přečistění [16, 17] a imunochemické metody, jako je ELISA [5, 17]. Přečištění vzorku probíhá nejčastěji dvěma způsoby – pomocí extrakce na pevné fázi (SPE) nebo pomocí imunoafinitní kolonky (IAC) [5, 16].

SPE probíhá na kolonce, která je naplněná silikagelem nebo jinou vaznou fází (C-18 oktadecylsilan, fenyl, aminopropyl a další). Extrakt ze vzorku v daném rozpouštědle je nanesen na kolonku. Následně protéká pod sníženým tlakem přes sorbent. Zatímco analyty jsou zachyceny, většina nečistot je odstraněna. Poté jsou analyty uvolněny pomocí jiného rozpouštědla [5, 17]. Speciálním typem SPE je využití imunoafinitních kolonek (IAC). IAC využívají specifické interakce protilátek s antigeny. Díky tomu při tomto způsobu přečištění extraktu dochází k minimální ztrátě analytu a maximální eliminaci interferencí. V případě analýzy čajů však může být tato výhoda z důvodu vlivů matrice poněkud upozaděna. IAC jsou přesto nejběžnějšími prostředky pro zachycení mykotoxinů z extraktu, nicméně mají také řadu nevýhod – vyšší cena, křížová reaktivita nebo citlivost vůči organickým rozpouštědlům [10].

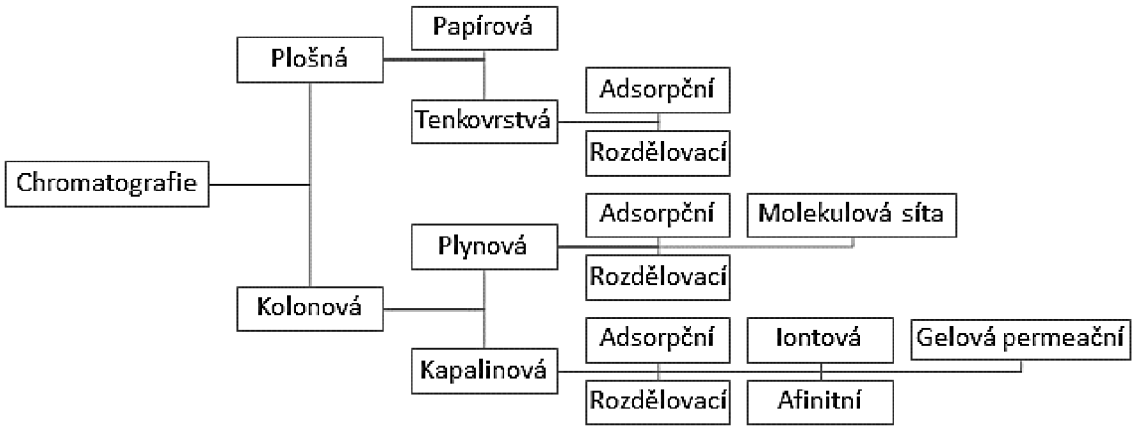
## 2.2 Chromatografické metody

Chromatografie se řadí mezi tzv. separační metody, jejichž princip spočívá v dělení látek na základě jejich rozdílných fyzikálně-chemických vlastností. Separační proces je přitom založen na rozdílné distribuci analyzovaných látek mezi nepohyblivou (stacionární) a pohyblivou (mobilní) fází. Mobilní fáze proudí přes chromatografický systém a unáší analyty přes lože se stacionární fází, kterou je buď pevná látka, nebo kapalina zachycená v inertním nosiči. Při separačním procesu dochází k opakovaným interakcím a ustanovování rovnováhy dělených látek mezi stacionární a mobilní fází [18, 19].

### 2.2.1 Typy chromatografických metod

Podle různých kritérií lze rozlišit několik typů chromatografie, přičemž jednotlivé přístupy se mohou vzájemně kombinovat. Na základě skupenství mobilní fáze je rozlišována kapalinová, plynová a superkritická fluidní chromatografie [15]. Chromatografie může probíhat buď v sloupcovém (kolonovém) nebo plošném uspořádání (na tenké vrstvě) [19]. Dle složení mobilní fáze pak rozeznáváme eluci izokratickou (konstantní složení) a gradientovou (proměnné složení).

V chromatografii se uplatňuje několik separačních principů. Pokud dochází k sorpci látek na stacionární fázi, je chromatografie označována jako absorpční [4, 19]. Lze ji provádět jako chromatografii s normální (NP-HPLC) nebo reverzní fází (RP-HPLC) [18]. Rozdělovací chromatografie je založena na dělení látek mezi dvě vzájemně nemísitelné kapaliny, zatímco iontová chromatografie na elektrostatických silách, které působí mezi nabitými skupinami. Afinitní chromatografie využívá specifických interakcí látek, zvláště pak biomakromolekul. Příkladem mohou být protilátky, které cíleně reagují s antigeny. Posledním principem je dělení látek na základě velikosti, který využívá gelová permeační chromatografie [4, 19]. Pro lepší přehled jsou nejčastěji používaná uspořádání a jejich kombinace jsou uvedeny na obrázku 2.1.




**Obrázek 2.1** – *Přehled možných uspořádání v chromatografii*

### 2.2.2 Eluční charakteristiky a účinnost chromatografické kolony

Kvalitativními ukazateli, které umožňují určit, o jakou sloučeninu se jedná, jsou v chromatografii tzv. retenční parametry. Nejčastěji se používá retenční čas, což je doba od nástřiku vzorku po oblast maxima chromatografického píku [18]. Kvantifikace se pak většinou provádí vyhodnocením plochy chromatografického píku, který představuje odezvu analytu při daném způsobu detekce, a srovnáním (ve většině případů) s externí kalibrační přímkou [19].

Při separaci látek je důležité, aby od sebe látky byly dobře odděleny a zároveň aby separace netrvala příliš dlouhou dobu. Pro hodnocení účinnosti separace u chromatografické kolony (systému) bývá používána veličina označovaná jako počet teoretických pater ($N$) [19]. Zpravidla platí, že čím je hodnota $N$ vyšší, tím je kolona účinnější a separované píky jsou tak ostřejší a méně rozmyté vlivem difúze. Veličina $N$

závisí na délce a velikosti částic kolony, rychlosti toku, teplotě a viskozitě mobilní fáze. Obdobným parametrem je výškový ekvivalent teoretického patra (*H*), který lze získat vydělením délky kolony parametrem *N* [18].

Jak již bylo dříve uvedeno, v ideální případě by měly být píky ostré a jasně oddělené od sebe. Na chromatografickou separaci má však vliv řada dějů, které vedou k rozmývání zóny daného analytu a celkově ovlivňují tvar píku. Tyto děje pak z teoretického hlediska popisuje van Deemterova rovnice, z které vyplývá, že dělení separovaných látek je ovlivněno hned několika typy difúze [18, 19].

### 2.2.3 Vysoce účinná kapalinová chromatografie HPLC

Nejčastěji používanou metodou v analýze organických látek jako jsou mykotoxiny je vysoce účinná kapalinová chromatografie v módu s reverzní fází (RP-HPLC) [15]. Tato technika využívá důmyslný chromatografický systém sestávající z několika komponent. K identifikaci a kvantifikaci látek je využívána řada detektorů [18], přičemž pro analýzu plísňových toxinů bývá nejčastěji využívána UV-VIS, fluorescenční a hmotnostní detekce [15]. Princip HPLC a její využití v analýze mykotoxinů bude probráno detailně v následujících kapitolách.

### 2.2.4 Tenkovrstvá chromatografie TLC

Tenkovrstvou chromatografii (TLC) lze využít zvláště pro rychlý screening většího množství vzorků, je nízkonákladová a poměrně jednoduchá. Nehledě na to, že je TLC v klasickém provedení jednou z nejvíce rozšířených laboratorních metod, od jejího užití v laboratoři pro stanovení mykotoxinů se pomalu upouští [9]. Nicméně modifikovaná verze této metody známá jako vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie (HPTLC) je v některých laboratořích velmi populární [19]. U HPTLC dochází ve srovnání s běžnou TLC k miniaturizaci celého procesu. Dochází k zlepšení dělení díky použití speciálních destiček s rovnoměrnou vrstvou velmi jemného silikagelu s malými póry. Nanášení vzorku je automatizováno a vyvíjení destičky probíhá v komorách nasycených parami mobilní fáze [20]. Vzorek se tak rozdělí na zóny, které obsahují jednotlivé složky [19]. Vysušené destičky jsou poté zpravidla vizualizovány pod UV zářením. Identifikace mykotoxinů probíhá na základě porovnání s retencí standardů, kvantifikace pak na základě intenzity absorpce či fluorescence [9, 19].

## 2.3 Imunochemické metody

Imunochemické metody jsou založeny na specifické interakci protilátky s antigenem. Pro detekci vzniklého komplexu biomakromolekuly s analytem bývá využíváno značení, které může být buď radioaktivní, enzymové nebo může být pro imunoglobuliny použito značení pomocí fluoroforů [21]. Mezi hlavní imunochemické metody patří RIA (radioimmunoassay), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) a imunosenzory, které nacházejí uplatnění hlavně v terénu [15].

### 2.3.1 Radioimunoanalýza RIA

Metoda RIA využívá ke značení antigenů radioaktivní izotopy. Známé množství takto značeného antigenu soutěží o vazbu na dané množství imobilizovaných protilátek s neznámým množstvím antigenu neznačeného. Jedná se tedy o tzv. kompetitivní stanovení, kdy intenzita signálu je nepřímo úměrná množství analytu ve vzorku. V současné době je tato metoda využívána už jen zřídka. Hlavním důvodem je právě radioaktivní záření, které je produkováno radioizotopy používanými ke značení [15].

### 2.3.2 Enzymová imunoanalýza ELISA

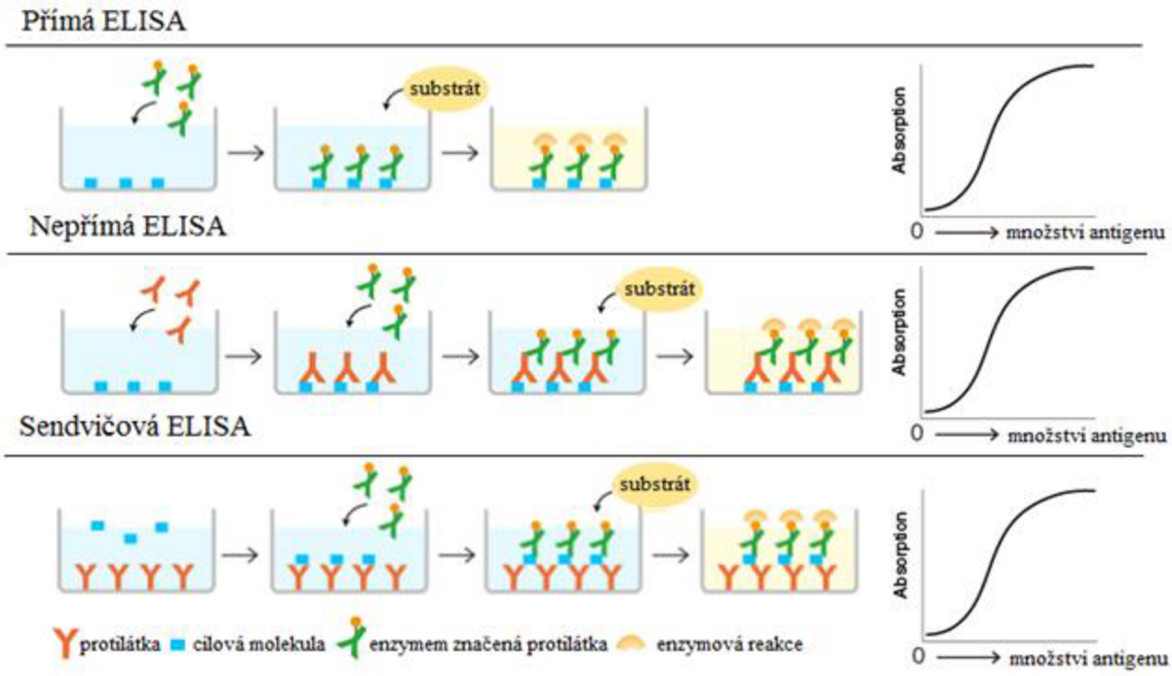
Metoda ELISA byla vynalezena na přelomu 60. a 70. let minulého století [22] a postupně nahradila starší imunochemickou metodu RIA z důvodu její možné škodlivosti vůči lidskému zdraví [15].

V případě metody ELISA je nejčastěji antigen imobilizován na vnitřní stěně jamky na mikrotitrační destičce [21]. Poté dochází k navázání primární protilátky, která je následně detekována pomocí enzymaticky značené sekundární protilátky. Pomocí enzymu je poté přeměňován chromogenní či fluorogenní substrát a následně měřena barevná změna či fluorescence indikující přítomnost daného analytu.

Metodu lze využít jak pro kvalitativní, tak kvantitativní analýzy, přičemž fluorogenní substráty umožňují vyšší citlivost měření [23]. Nespornou výhodou je, že díky vysoké specifitě interakce mezi protilátkou a antigenem můžeme pomocí metody ELISA stanovit analyt ve velmi malé koncentraci s minimálním vlivem interferencí [22].

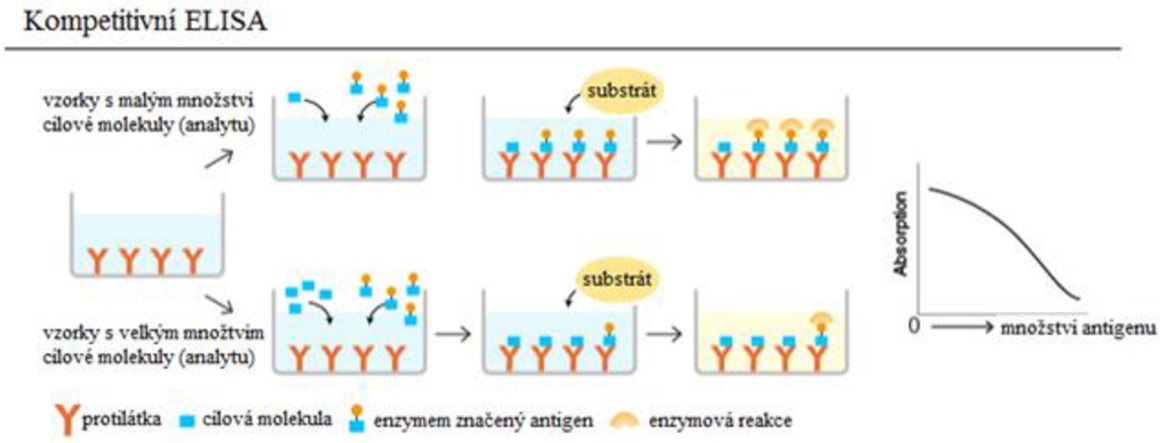
Metoda ELISA existuje ve čtyřech základních typech uspořádání, z nichž každé má své výhody i nevýhody a hodí se pro jiný typ vzorku. Je-li antigen imobilizován pomocí adsorpce na stěně jamky mikrotitrační destičky a poté detekován pomocí protilátky značené enzymem, jedná se o přímé uspořádání. Tento způsob může být využit i opačně, kdy je stanovována protilátka pomocí enzymaticky značeného antigenu.

V případě využití primární protilátky pro vazbu na imobilizovaný antigen a sekundární protilátky určené pro detekci uvedeném výše se jedná o uspořádání nepřímé. Při tzv. sendvičovém uspořádání je nejdříve antigen zachycen ze vzorku pomocí protilátky imobilizované v jamce mikrotitrační destičky. Potom je na antigen navázána další, již značená protilátka, která slouží k detekci (Obrázek 2.2). Ve všech třech případech pak platí, že míra změny zbarvení či fluorescence je úměrná koncentraci analytu [21, 22, 23].




**Obrázek 2.2** – *Nekompetitivní ELISA – přímé, nepřímé i sendvičové uspořádání* [24]

Naopak v případě kompetitivního uspořádání je míra změny nepřímo úměrná koncentraci. Nejdříve je značený antigen totožný s analytem přidán ke vzorku. Následně je směs umístěna do jamky mikrotitrační destičky, která obsahuje známé množství imobilizované protilátky. Značený antigen v roztoku jamky tak soutěží s neznačeným (analytem) o vazbu protilátky, které je nedostatek. Po promytí jamky je následně přidán substrát (Obrázek 2.3). Čím vyšší je pak intenzita měřeného signálu, tím menší je koncentrace stanovované látky [21, 22, 23]. Jednotlivé způsoby mohou být v případě potřeby různě kombinovány.




**Obrázek 2.3** – *Kompetitivní ELISA* [24]

Metoda ELISA má díky své specifitě a senzitivitě v oblasti analýzy mykotoxinů nezastupitelnou roli. V porovnání s chromatografickými metodami, které vyžadují drahou instrumentaci a vyškolený personál, je poměrně jednoduchá, nenákladná, nenáročná na obsluhu a vyžaduje ve většině případů pouze minimální úpravu vzorku. Metoda však není vhodná pro přesná kvantitativní stanovení, a to zvláště v případě komplexní matrice vzorků [5, 9]. Proto je ELISA oblíbenou volbou zvláště pro rychlý screening většího množství vzorků a hrubý odhad koncentrace, která je v případě nutnosti upřesněna pomocí instrumentálních technik, například HPLC [25]. V současné době je dostupná řada komerčních kitů, které jsou vhodné pro stanovení jednotlivých mykotoxinů. Často jsou však využívány soupravy pro analýzu celých skupin chemicky příbuzných mykotoxinů (například aflatoxinů či fumonisinů), které využívají křížovou reaktivitu některých protilátek [26].

Nejčastěji je využíván kompetitivní ELISA formát, který využívá buď značenou primární protilátku, nebo konjugát mykotoxinu s enzymem [5, 15]. Asi nejoblíbenějším enzymem pro značení protilátek nebo standardů je křenová peroxidáza (HRP) [9, 27]. HRP rozkládá peroxid vodíku na vodu a kyslík, přičemž donory elektronů pro tuto reakci jsou organické chromogenní substráty, které po reakci dávají charakteristické zabarvení [28]. Druhým nejčastěji používaným enzymem je alkalická fosfatáza (AP) [15], která je využívána zvláště v případě vysoké peroxidázové aktivity vzorku [28]. Barevné změny jsou po ukončení enzymové reakce vyhodnoceny pomocí spektrofotometrie ve viditelné oblasti v ELISA readeru [22].

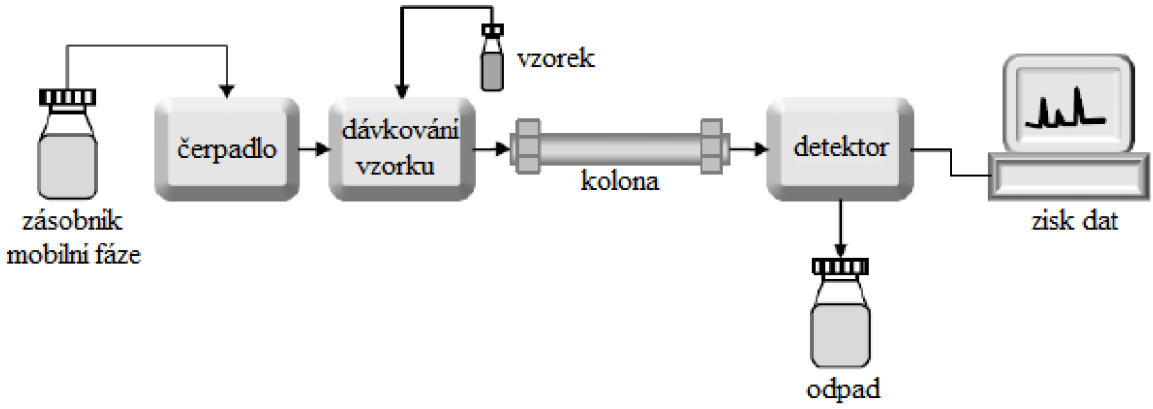
# 3. Princip HPLC a její využití v analýze mykotoxinů

Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) se vyznačuje dobrou spolehlivostí, citlivostí, selektivitou i opakovatelností. Metoda je v současné době už běžně plně automatizována vyjma zpracování a úpravy vzorku [17]. HPLC je oproti plynové chromatografii vhodná i pro stanovení tepelně nestálých a netěkavých látek [19]. Nicméně značným mínusem je nákladná instrumentace a potřeba dobře vyškolené obsluhy přístroje. Navíc mohou některé způsoby detekce vyžadovat u některých mykotoxinů derivatizaci [17].

Mobilní fáze jsou v případě HPLC vodné roztoky či jejich směsi s organickými rozpouštědly, které protékají pod vysokým tlakem kolonou obsahující stacionární fázi (sorbent). Po nástřiku vzorku na kolonu jsou jednotlivé analyty odděleny na základě rozdílných interakcí se stacionární i mobilní fází a zaznamenány pomocí detektoru. Retenční čas dané látky závisí nejen na její povaze, ale i na složení stacionární a mobilní fáze [15, 19].

## 3.1 Kapalinový chromatograf a jeho součásti

Kapalinový chromatograf je komplexní zařízení, které se zpravidla skládá z několika součástí – zásobníku mobilní fáze, vysokotlakého čerpadla, systému pro dávkování vzorku, chromatografické kolony, detekčního a vyhodnocovacího zařízení (Obrázek 3.1).




**Obrázek 3.1** – *Schéma kapalinového chromatografu znázorňující nejdůležitější součásti* [29]

### 3.1.1 Mobilní a stacionární fáze

Mobilní fáze je umístěna v zásobní láhvi, odkud je do systému dodávána pomocí vysokotlakého čerpadla. Nutnou operací před vstupem mobilní fáze do chromatografického systému je její odplynění a zbavení se pevných částic. Uvolněné plyny a hrubé nečistoty totiž mohou vážně poškodit kapalinový chromatograf. K odplynění je dnes často používán in-line vakuový degaser, zatímco zanášení systému brání vstupní frity [18].

Pro pohyb mobilní fáze jsou nejčastěji využívána dvoupístová čerpadla. Obsahují dva proti sobě pracující písty, což značně snižuje kolísání tlaku [19]. Případné nedokonalosti v toku jsou upraveny pomocí tlumiče pulzů. Potřebný gradient je připraven ve směšovači. Podle jeho umístění pak rozeznáváme nízkotlaký gradient, je-li umístěn před čerpadlem a vysokotlaký gradient, je-li umístěn za čerpadlem. Dávkování vzorku probíhá dnes běžně pomocí autosampleru [18].

Separace látek probíhá na chromatografické koloně, což je nejčastěji nerezová trubice naplněná sorbentem, která je často ještě chráněna předkolonou [19]. Pro analýzu mykotoxinů bývá nejběžněji využívána reverzní fáze [9, 17]. Stacionární fáze je v tomto případě nepolární, zatímco mobilní fáze je polární. Nejběžnější kolona založená na principu reverzní fáze je kolona C-18. Ta je tvořena silikagelem, na kterém jsou navázány oktadecylové řetězce zajišťující nepolární interakce s analyty [18]. Částice stacionární fáze pak mohou být plně nebo povrchově porézní [19]. Jako mobilní fáze pro separaci mykotoxinů slouží většinou ternární směs voda-acetonitril-methanol [9, 17]. Potřebné teploty pro separaci bývá pak dosaženo pomocí termostatu [19].

### 3.1.2 Možnosti detekce

Po průchodu kolonou jsou oddělené frakce zaznamenány pomocí detektoru [15], kterých v kapalinové chromatografii existuje celá řada. Spektrofotometrické detektory měří absorbanci v ultrafialové a viditelné oblasti spektra. Nejčastěji používané jsou detektory s diodovým polem (DAD), které umožňují proměřit absorpční spektrum dané látky [19]. O něco citlivější jsou detektory fluorescenční (FLD), které snímají záření emitované látkami při jejich deexcitaci po předešlém buzení pomocí světelného zdroje.

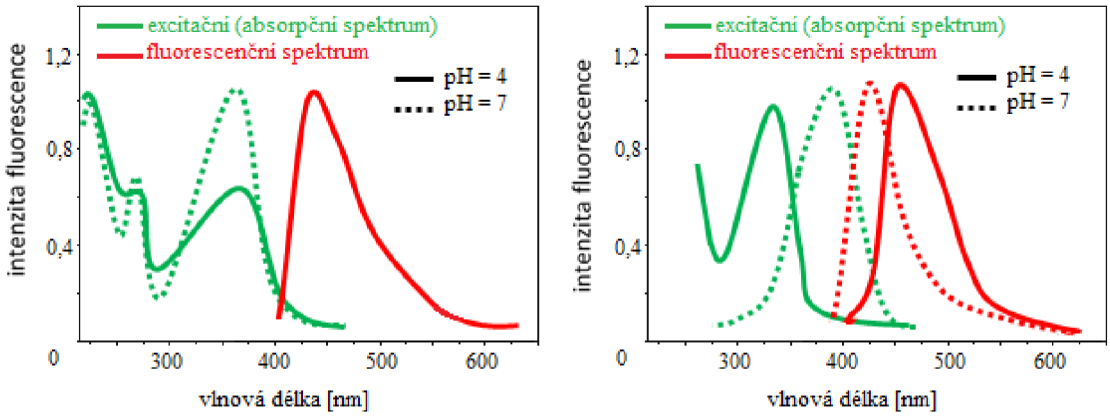
Elektrochemické detektory jsou zase založeny na reakci na rozhraní elektrody a mobilní fáze. Patří mezi ně například detektory ampérometrické či coulometrické. Jejich nevýhodou je, že mohou být využity pro detekci pouze úzké skupiny látek schopné

elektrochemické reakce. Často jsou používány také detektory využívající lom (RID) nebo rozptyl světla (ELSD) či elektrickou vodivost procházejícího roztoku [18, 19].

Řada mykotoxinů, jako jsou například ochratoxin A, citrinin anebo některé aflatoxiny, vykazuje přirozenou fluorescenci [5]. Proto je pro stanovení koncentrace mykotoxinů separovaných na koloně nejčastěji používán fluorescenční detektor v kombinaci s RP-HPLC kvůli nízké citlivosti UV-VIS detektorů používaných v režimu NP-HPLC [30].

Aflatoxiny mají v neutrálním prostředí polárního rozpouštědla tři excitační (absorpční) pásy s maximy přibližně ve 225, 265 a 360 nm. Fluorescence pak dosahuje maxima přibližně v oblasti okolo 450 nm, nicméně vlivem některých rozpouštědel může docházet k červenému (bathochromnímu) posunu. V kyselé oblasti pak dochází k mírné změně absorpčních vlastností, neboť maxima při 225 a 265 nm již nejsou tak výrazná a v případě pásu s maximem 360 nm dochází k hypochromnímu efektu, nicméně fluorescenční maximum v 450 nm je zachováno [31].

V případě ochratoxinu A má hodnota pH jak na excitační, tak fluorescenční spektrum ještě větší vliv, za což vděčí OTA pravděpodobně svým acidobazickým vlastnostem. V neutrální oblasti je maximum pro excitaci přibližně ve 380 nm, pro fluorescenci pak ve 440 nm, zatímco v kyselé pro excitaci ve 330 nm a pro fluorescenci ve 460 nm [32].




**Obrázek 3.2** – *Excitační a emisní spektrum aflatoxinu (vlevo)* [31] *a ochratoxinu A (vpravo)* [32] (upraveno)

Asi nejvíce sofistikovaným a zároveň nejsložitějším způsobem detekce v kapalinové chromatografii je využití hmotnostního spektrometru. Ten na rozdíl

od fluorescenčního detektoru nevyžaduje pro detekci žádnou derivatizaci. Navíc se vyznačuje velmi nízkým limitem kvantifikace a schopností podat strukturní informaci o dané molekule, zvláště v systému tandemové hmotnostní spektrometrie [15, 17]. Díky těmto vlastnostem je hmotnostní detekce vhodná pro simultánní analýzu chemicky odlišných látek, která by se systémy HPLC-DAD a HPLC-FLD nebyla možná [10].

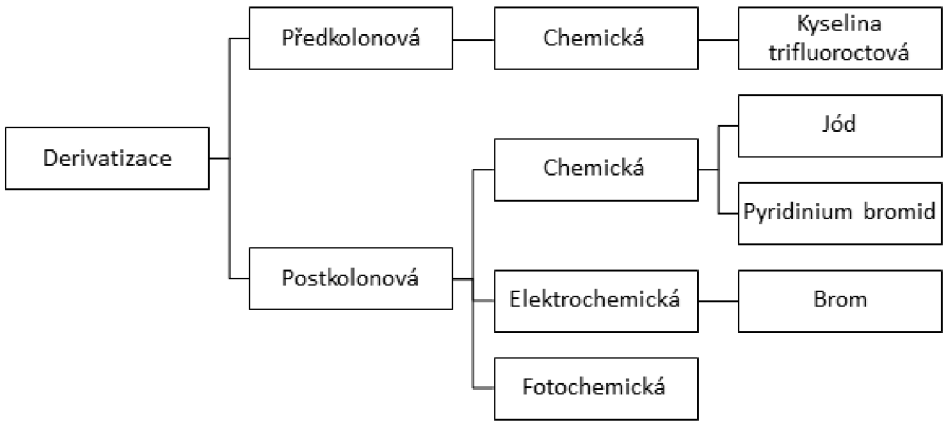
V současné době dochází k rozvoji vysokorozlišovacích systémů (HRMS), které umožňují identifikaci několika typů mykotoxinů najednou včetně jejich metabolitů. Právě metabolity mykotoxinů byly dříve až do příchodu HRMS instrumentace z důvodu nedostatku vhodných technik přehlíženy [17].

Nicméně vybavení pro hmotnostní spektrometrii je v porovnání s ostatními metodami nesmírně nákladné. Pro svůj chod navíc vyžaduje šetrné zacházení a zkušeného operátora [15, 17].

## 3.2 Způsoby derivatizace

Stěžejním krokem chromatografické analýzy je nutnost derivatizace některých mykotoxinů [30]. Jako derivatizace se označují chemické reakce určitého činidla s analytem, které vedou k zlepšení jeho separačních vlastností nebo zvýšení citlivosti použitého způsobu detekce [33]. Toto platí zvláště v případě fluorescenční detekce při stanovení aflatoxinů. Běžně užívané mobilní fáze v systémech HPLC-FLD totiž zhášejí fluorescenci $AFB_1$ a $AFG_1$, a ty tak musí být nejdříve převedeny na sloučeniny, jejichž odezva není zhášena [30].

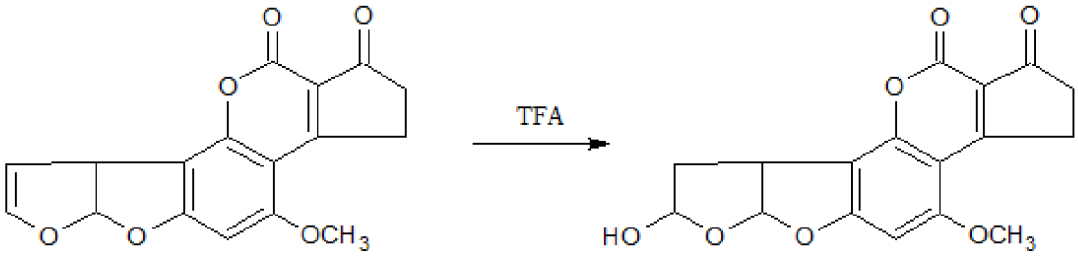
Zatímco v případě metod předkolonové derivatizace je reakční činidlo přidáno do roztoku, který obsahuje analyty, ještě před vstupem na chromatografickou kolonu, v případě postkolonové derivatizace dochází k derivatizační reakci až za kolonou [33].




**Obrázek 3.3** – *Schéma s nejběžněji používanými způsoby derivatizace aflatoxinů*

### 3.2.1 Předkolonová chemická derivatizace

Dvojná vazba dihydrofuranové skupiny může být v kyselém prostředí jednoduše hydratována za vzniku $AFB_{2a}$ a $AFG_{2a}$ (Obrázek 3.4), které ve vodných roztocích vykazují stejnou intenzitu fluorescence jako $AFB_2$ a $AFG_2$. Na základě této reakce byla navržena metoda předkolonové derivatizace vyžívající jako činidlo standardně trifluoroctovou kyselinu (TFA). Ta je společně se vzorkem zahřívána po určitou dobu a až poté je vzorek nastříknut na kolonu. Reakce je zvláště účinná, jsou-li nejdříve ze vzorku odstraněna lipidická rezidua pomocí hexanu. Nevýhodou tohoto způsobu derivatizace je nestabilita $AFB_{2a}$ a $AFG_{2a}$, zvláště je-li v dané mobilní fázi přítomen methanol. Tuto metodu tak nelze doporučit zvláště pro rutinní analýzy s vysokým počtem vzorků využívající autosampler [30].




**Obrázek 3.4** – *Princip derivatizační reakce aflatoxinů $B_1$ a $G_1$ pomocí TFA* [15]

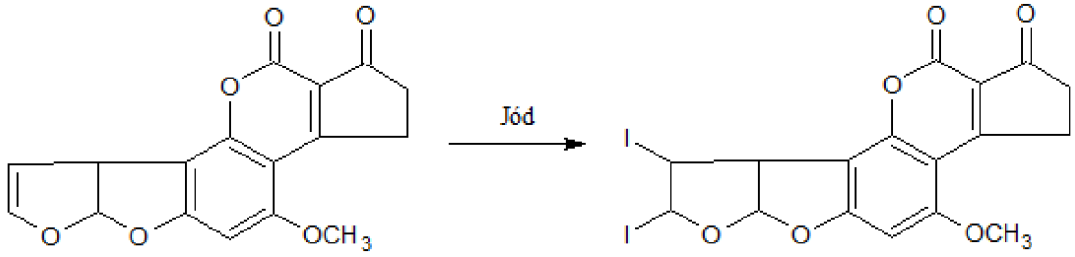
### 3.2.2 Postkolonová chemická derivatizace

Pro on-line analýzu většího množství vzorků je jednoznačně vhodnější postkolonová derivatizace. Jednou z možností je využití jódu, které je také uvedeno v normě ČSN EN ISO 16050 [34], jako derivatizačního činidla. Jeho využití má jednu zásadní výhodu. Na rozdíl od TFA, která má vysoce korozivní účinky a může tak poškodit chromatografický systém [35, 36], je nasycený roztok jodu přidáván pomocí „téčka“ k eluátu vystupujícímu z kolony. Výsledná směs pak prochází přes nerezovou či teflonovou reakční spirálu umístěnou v termostatu (Obrázek 3.7), kde probíhá derivatizační reakce (Obrázek 3.5). Následuje kvantifikace jednotlivých analytů pomocí fluorescenčního detektoru. Citlivost se díky tomuto způsobu derivatizace několikanásobně zvýší [30].

Roztok jódu je nutné připravovat dennodenně čerstvý, navíc musí být zbaven nerozpuštěného zbytku jódu. I přesto však může docházet k zanášení kapilár a celkově většímu opotřebení některých komponent chromatografického systému. Kvůli použití

reakční spirály může pak docházet k rozšiřování píků, ale tento efekt lze částečně eliminovat vhodnou úpravou délky a teploty termostatu [30]. Nicméně dalším problémem tohoto způsobu derivatizace je fakt, že přidáním roztoku reagentu dochází k naředění eluátu. Pro dávkování roztoku obsahujícího činidlo je navíc potřebná další HPLC pumpa, což může být z ekonomického hlediska nákladné [36].

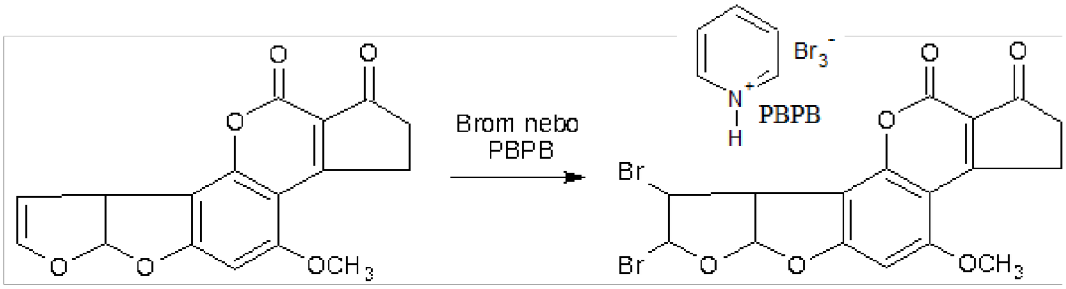
Jednou z možností je i použití malé kolonky naplněné pevným jodem jako derivatizačního reaktoru. Po rozdělení toku před nástřikem vzorku je malá část mobilní fáze vedena reaktorem, kde je nasycena jódem. Následně je opětovně spojena s výstupem z chromatografické kolony a jód tak může reagovat s eluovanými aflatoxiny. Pro toto uspořádání je nutná pouze jedna pumpa, navíc není eluát ředěn roztokem reagentu [37].




**Obrázek 3.5** – *Princip derivatizační reakce aflatoxinů $B_1$ a $G_1$ pomocí jódu* [15]

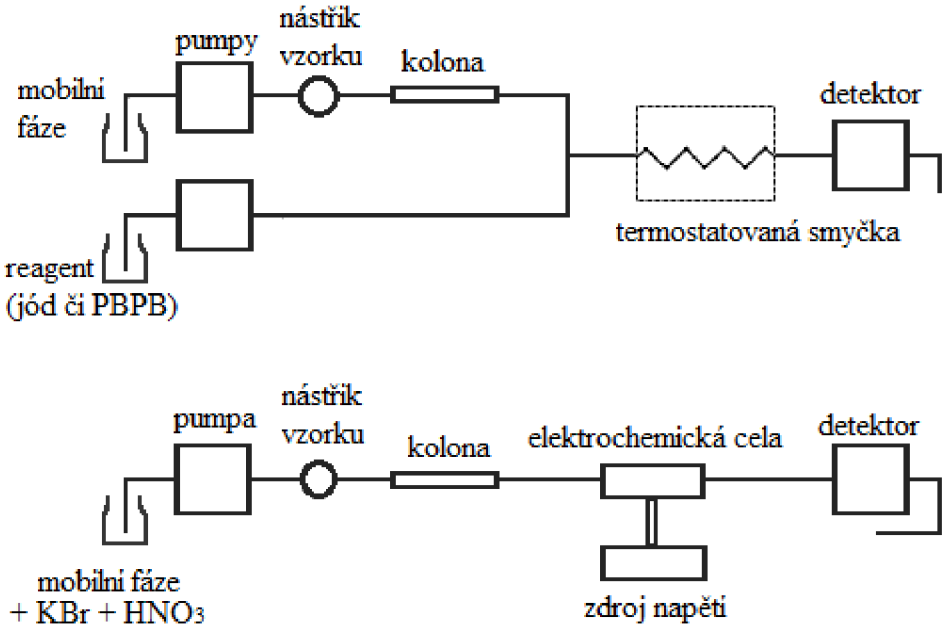
Pro postkolonovou derivatizaci může být rovněž použit brom (Obrázek 3.6). Ten je zároveň reaktivnější než jód, a tak je reakce aflatoxinů s ním rychlejší. Tento způsob derivatizace rovněž popisuje norma ČSN EN 14123 [38]. Kvůli své vysoké reaktivitě však nemůže být brom přidáván k eluátu ve své volné formě. Musí být elektrochemicky generován on-line například z bromidu draselného přidaného do okyselené mobilní fáze [30]. Zařízení pro elektrochemický vývoj bromu a derivatizaci aflatoxinů je dostupné pod obchodním názvem Kobra Cell™ a umisťuje se zpravidla za chromatografickou kolonu (Obrázek 3.7) [39].

Derivatizace pomocí elektrochemicky generovaného bromu má hned několik výhod. Zaprvé je systém levnější, jelikož není nutná žádná další pumpa pro dodávání reagentu. Zároveň je velkou výhodou, že není potřeba připravovat každý den nové roztoky roztoku jodu [30].




**Obrázek 3.6** – *Princip derivatizační reakce aflatoxinů $B_1$ a $G_1$ pomocí bromu* [15]

Pro derivatizaci aflatoxinů bromem může být kromě elektrochemického reaktoru využito také činidlo pyridinium bromid perbromid (PBPB) (Obrázek 3.6). Stejně jako v případě derivatizace jodem je roztok obsahující činidlo přidáván přes „téčko“ k výstupu z kolony, poté následuje reakční smyčka (Obrázek 3.7) [40].




**Obrázek 3.7** – *Uspořádání chromatografického systému s postkolonovou derivatizací* [30]

K derivatizaci aflatoxinů je možné využít i α- a β-cyklodektriny [30]. Jedná se o cyklické oligomery tvořené z 6-8 glukózových jednotek, které vznikají enzymatickou degradací škrobu. Uvnitř cyklického řetězce se nachází tzv. kavita, do níž mohou interkalovat jak anorganické, tak organické molekuly včetně aflatoxinů. Některé cyklodextriny a jejich deriváty lze tedy také využít pro derivatizaci za účelem zvýšení intenzity fluorescence [41]. Tato metoda se však pro běžné a rutinní analýzy nepoužívá.

Je totiž nákladná a nenabízí žádné výhody oproti ostatním uvedeným způsobům derivatizace [42].

### 3.2.3 Postkolonová fotochemická derivatizace

Nejunikátnějším způsobem úpravy struktury aflatoxinů pro detekci je nepochybně fotochemická derivatizace. Nejjednodušší běžně používaný fotochemický reaktor (PHRED) obsahuje dlouhou a tenkou PTFE kapiláru opletenou a obtočenou okolo lesklého kousku plechu. Ten je společně s nízkotlakou rtuťovou výbojkou umístěn uvnitř zařízení, přičemž jeden konec kapiláry je napojen na výstup z kolony, druhý na detektor [36].

Vlivem působení UV záření o vlnové délce 254 nm vydávaného výbojkou dochází k adici vody na dvojnou vazbu dihydrofuranového kruhu $AFB_1$ a $AFG_1$. Výsledkem interakce jsou stejně jako v případě derivatizace TFA deriváty označované jako $AFB_{2a}$ a $AFG_{2a}$, jejichž intenzita fluorescence je srovnatelná s $AFB_2$ a $AFG_2$ (Obrázek 3.3) [42].

V porovnání s derivatizací elektrochemicky generovaným bromem je tato metoda stejně účinná pro stanovení aflatoxinů v nejrůznějších matricích [42]. Muscarella a kol. metodu založenou na fotochemické derivatizaci úspěšně validovali a potvrdili, že dosahuje srovnatelných výsledků s ostatními způsoby [25]. Metoda nachází uplatnění i pro simultánní analýzy vícera typů mykotoxinů, jako jsou aflatoxiny, ochratoxin A a zearalenon [43].

## 3.3 Simultánní analýza aflatoxinů a ochratoxinu A

V praxi se často využívá simultánního stanovení několika mykotoxinů najednou pomocí HPLC-FLD. Klíčové je nastavení parametrů extrakce a purifikace, která často využívá imunoafinitní chromatografii. Na trhu je v současné době dostupná řada kolonek od několika různých výrobců, které umožňují zachycení cílové skupiny mykotoxinů. Například firma Vicam nabízí mimo jiné kolonky AflaOchra HPLC pro současnou izolaci aflatoxinu a ochratoxinu, kolonky AOZ HPLC, které navíc umožňují izolaci zearalenonu, kolonky DON-NIV WB pro deoxynivalenol a nivalenol nebo kolonky T-2/HT-2 HPLC pro stejnojmenné toxiny [44]. Dalšími významnými výrobci IAC jsou pak například R-Biopharm Rhône [45] nebo Romer Labs [46].

Nejčastěji sledovanými mykotoxiny v potravinách jsou aflatoxiny a ochratoxin A, neboť představují pro spotřebitele největší riziko. Dosud již bylo vyvinuto a validováno několik metod pro různé matrice, v úvahu však připadají zvláště potraviny rostlinného

původu. Mezi nimi dominují zvláště suché potraviny, jako jsou cereálie nebo koření. Přehled vybraných metod a podmínek analýzy se nachází v tabulce 3.1.

**Tabulka 3.1** – *Přehled analytických metod (HPLC) pro stanovení aflatoxinů vedle ochratoxinu A a dalších mykotoxinů*

| Typ matrice | Analyty | Extrakce | Přečištění | Derivatizace | LOQ [µg/kg] | Ref. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Cereálie, ar. máslo | AFL, OTA | MeCN:W (60:40) | IAC AflaOchra | Postkolonová PBPB | všechny 0,2 | [47] |
| Cereálie | AFL, OTA, ZEA | MeCN:W (60:40) | IAC AOZ | Předkolonová TFA | 0,25; 0,5; 5 | [48] |
| Zázvor, ženšen | AFL, OTA | MeCN:0,5% $NaHCO_3$ (70:30) | IAC AflaOchra | Fotochemická PHRED | - | [49] |
| Cereálie | AFL, OTA, ZEA | MeOH:W (80:20) | IAC AOZ | Fotochemická PHRED | 0,004 – 0,012; 0,05; 0,5 | [43] |
| Kakao, čokoláda | AFL, OTA | MeOH:W (80:20) | IAC AflaOchra | Fotochemická UVE | $B_1$ 0,07; OTA 0,16 | [50] |
| Zázvor | AFL, OTA | MeOH:W (80:20) | IAC AflaOchra | Fotochemická - | 0,1 – 0,6; 0,9 | [11] |
| Koření | AFL, OTA | MeOH:W (80:20) | IAC AflaOchra | Fotochemická PHRED | 0,2 – 0,4; 0,5 | [51] |
| Pšeničné otruby | několik mykotox. | vícestupňová | Myco6in1+ | Fotochemická UVE | 0.38 – 1,08; 1,20 | [52] |

# 4. Validace analytické metody

Validací se rozumí proces, při kterém dochází k získání několika výkonnostních charakteristik dané metody, které slouží k vyhodnocení, zda je tato metoda vhodná pro určené použití. Pro validaci je nutné získat dostatek dat, aby bylo možné prokázat vhodnost jejího užití v praxi [53]. Jedná se o poslední fázi vývoje metody a je nezbytné ji provádět dle soudobých nařízení a předpisů. Dobře provedená validace pak hraje klíčovou roli například při akreditování metody vyvinuté ve zkušební laboratoři dle ČSN EN ISO/IEC 17025 [54].

## 4.1 Validační parametry

Prvním z validačních parametrů je preciznost (dříve přesnost). Ta slouží jako údaj o míře shodnosti mezi vzájemně nezávislými výsledky a nemá tedy vztah k referenční hodnotě. Běžně se vyjadřuje jako směrodatná odchylka jednotlivých výsledků, která popisuje rozptýlení naměřených hodnot okolo průměru. Preciznost výsledků získaných v krátkém časovém intervalu za stejných podmínek označujeme jako opakovatelnost [55]. Mezilehlá preciznost pak vyjadřuje míru shody mezi výsledky v rámci jedné laboratoře (různí lidé, zařízení, čas, …) a reprodukovatelnost zase mezi různými laboratořemi [56].

Správnost určuje těsnost shody mezi naměřenou a přijatou (skutečnou) referenční hodnotou. Tou mohou být například výsledky získané ověřenou metodou, referenční materiály nebo výsledky z referenční laboratoře. Správnost bývá obvykle posuzována pomocí statistických testů na shodnost [55].

Poměr koncentrace analytu k přijaté referenční hodnotě se nazývá výtěžnost a je rovněž významným parametrem při validaci analytické metody. Výtěžnost může být vyjádřena jako zlomek, ale většinou se vyjadřuje jako procenta [55]. Výsledky získané během analýzy jsou korigovány na výtěžnost, aby byla určena přesná hodnota koncentrace analyzované látky v daném vzorku.

Linearita a pracovní rozsah metody udávají, v jakém rozsahu je možné proložit hodnoty dvou závislých proměnných, obvykle odezvy zařízení a koncentrace, lineární závislostí. Ta je obvykle uváděna ve tvaru $y = ax + b$, kde a je směrnice (souvisí s citlivostí) a b je bod na ose y (úsek), kterým přímka prochází [56]. Těsnost této závislosti pak udává tzv. korelační koeficient [55], který nabývá hodnot od -1 do +1. Čím více se jeho hodnota blíží ±1, tím je závislost těsnější.

Mezí detekce (LOD) se rozumí koncentrace, která je statisticky významná od šumu. Jinými slovy je to nejmenší možné množství analytu, které lze ještě rozpoznat. Naopak mezí kvantifikace (LOQ) se rozumí nejnižší možná koncentrace, kterou lze za daných podmínek s danou přesností změřit. Obvykle je pro LOD používán poměr signálu k šumu 3:1 a pro LOQ poměr 10:1 [55].

Schopnost správně určit cílový analyt i v přítomnosti interferujících látek nazýváme selektivita. Ta se zpravidla určuje porovnáním výsledků analýzy vzorků obsahujících pouze standardy se vzorky obsahujícími reálnou matrici [55]. Schopnost vyjadřující stabilitu metody v případě určitých odchylek od daných parametrů této metody se označuje jako robustnost. Většinou se robustnost ověřuje tak, že jsou do daného postupu vnášeny malé změny a je sledován jejích důsledek [56].

# PRAKTICKÁ ČÁST

Cílem této práce byl výběr metody vhodné pro simultánní stanovení aflatoxinů $G_2$, $G_1$, $B_2$, $B_1$ a ochratoxinu A v bylinném a ovocném čaji. Přitom byla zvažována ekonomická a praktická stránka včetně možností laboratoře. Pro analýzu vybraných mykotoxinů byla zvolena metoda vysoce účinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí.

Pro správnou funkci bylo nutné vymyslet nenákladný způsob derivatizace aflatoxinů včetně způsobu extrakce a přečištění vzorku. Pro zhodnocení vhodnosti metody byla metoda validována. K tomu byly použity jako vzorové matrice ovocný a bylinkový čaj, ke kterým bylo přidáno známé množství standardů stanovovaných analytů.

## 5. Materiál

### 5.1 Přístroje a zařízení

Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series vybavený:

- Kvartérním čerpadlem 1100 Quaternary Pump
- Autosamplerem 1100 Autosampler
- Termostatem 1100 Thermostat
- Chromatografickou kolonou
  A) Kinetex C18 150 x 4,6 mm, 5 µm
  B) Kinetex XB-C18 150 x 4,6 mm, 5 µm
- Detektorem 1100 Fluorescence detector
- Softwarem ChemStation, Clarity

UV zařízení pro derivatizaci aflatoxinů $B_1$ a $G_1$ sestávající z:

- Germicidní UV-C lampy 254 nm
- PTFE kapiláry o vnitřní světlosti 0,25 mm a délce 25 m (vnitřní objem 1,2 ml)
- Ventilátoru
- Plechového krytu na elektrozařízení

Třepačka Heidolph Promax 2020

Laboratorní centrifuga Neya 8 s příslušenstvím

Stolní počítač

Kuchyňský mlýnek na kávu

Zařízení na přípravu demineralizované vody

Analytické váhy

pH metr

Chladnička s mrazničkou

## 5.2 Pomůcky a další vybavení

Kónické plastové zkumavky se šroubovacím víčkem 50 ml

Pipety dělené i nedělené 1 – 25 ml

Pipetovací nástavce

Odměrné baňky 5 – 500 ml

Odměrné válce 50 – 2000 ml

Skleněné zkumavky 5 ml

Mikrostříkačky Hamilton 25 – 250 µl

Filtr skládaný, průměr 10 cm

Filtr ze skelného mikrovlákna s velikostí pórů 1,2 µm, průměr 90 mm (Whatman)

Filtrační nálevky

Stojan s držáky

Injekční stříkačky s pístem (10 ml) a bez pístu (25 ml)

Hadička z měkčeného plastu o průměru 5 mm

Pryžová zátka s otvorem pro hadičku

Imunoafinitní kolonky AflaOchra HPLC (Vicam)

Vialky s víčkem pro HPLC

## 5.3 Chemikálie

Demineralizovaná voda

Methanol 99,9% (Sigma-Aldrich)

Acetonitril 99,9% (Sigma-Aldrich)

Hydrogenfosforečnan disodný dihydrát $Na_2HPO_4.2H_2O$ 99% (PENTA)

Dihydrogenfosforečnan sodný $NaH_2PO_4.2H_2O$ 98% (PENTA)

Dihydrogenfosforečnan draselný $KH_2PO_4.2H_2O$ 99% (PENTA)

Chlorid sodný 99,9% a chlorid draselný 98% (PENTA)

Hydrogenuhličitan sodný 99% (PENTA)

Polysorbát 20 (Tween 20, Sigma-Aldrich)

Kyselina octová 99% (PENTA)

Směsný standard aflatoxinů v acetonitrilu – Aflatoxin Mix 4 Solution (Sigma-Aldrich) koncentrace $AFG_2$, $AFB_2$ = 0,5 µg/ml a $AFG_1$, $AFB_1$ = 2 µg/ml

Zásobní standard ochratoxinu A v acetonitrilu – Ochratoxin A Solution (Sigma-Aldrich) koncentrace OTA = 10 µg/ml

### 5.4 Popis použitých vzorových matric

Loyd Jablko a šípky (MOKATE) – ovocný čaj aromatizovaný – složení: jablko, šípky, ibišek, aromata, regulátor kyselosti – kyselina jablečná

Babička Růženka Sedmero bylin (MOKATE) – bylinný čaj směsný – roiboos (*Aspalanthus linearis*), máta peprná list, ostružiník list, plod fenyklu, sporýš lékařský, skořice, lékořice

**Obrázek 5.1** – *Produkty, které sloužily jako testovací matrice pro optimalizaci a validaci metody*

# 6. Metody

### 6.1 Příprava potřebných roztoků

Pro zpracování a analýzu vzorku byly připraveny následující roztoky – extrakční rozpouštědlo, ředící a promývací roztok (pufr), směsný standard aflatoxinů a ochratoxinu A a mobilní fáze.

### 6.1.1 Příprava extrakčního rozpouštědla

Pro extrakci aflatoxinů a ochratoxinu A ze vzorků čajů byl připraven vodný roztok sestávající z 800 ml methanolu a 200 ml 0,5% vodného roztoku hydrogenuhličitanu draselného, který byl připraven rozpuštěním 3 g $NaHCO_3$ ve 200 ml demineralizované vody.

### 6.1.2 Příprava potřebných pufrů

Pro ředění extraktů vzorků před jejich aplikací na imunoafinitní kolonku byl připraven 0,1M fosfátový pufr s 0,5 % Tweenu 20 navážením 10,90 g $Na_2HPO_4.2H_2O$ a 6,06 g $NaH_2PO_4.2H_2O$ do 1000 ml demineralizované vody a přídavkem 5 ml Tweenu 20, přičemž pH bylo upraveno na 7,4.

Pro promývání imunoafinitních kolonek po aplikaci vzorku byl připraven roztok 0,5% Tweenu 20 v PBS (pufrovaný fyziologický roztok) z 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,24 g $KH_2PO_4$, 1,81 g $Na_2HPO_4.2H_2O$, 5 ml Tweenu 20 a 1000 ml demineralizované vody s následnou úpravou pH na 7,4.

### 6.1.3 Příprava směsného standardu

Pro spikovaní a přípravu řady kalibračních roztoků byl připraven směsný zásobní standard smícháním 250 µl Aflatoxin Mix 4 Solution a 250 µl Ochratoxin A Solution a 4,5 ml methanolu. Výsledné koncentrace pak byly 25 ng/ml pro $AFG_2$ a $AFB_2$, 100 ng/ml pro aflatoxiny $AFG_1$ a $AFB_1$ a 500 ng/ml pro ochratoxin A.

### 6.1.4 Příprava mobilní fáze

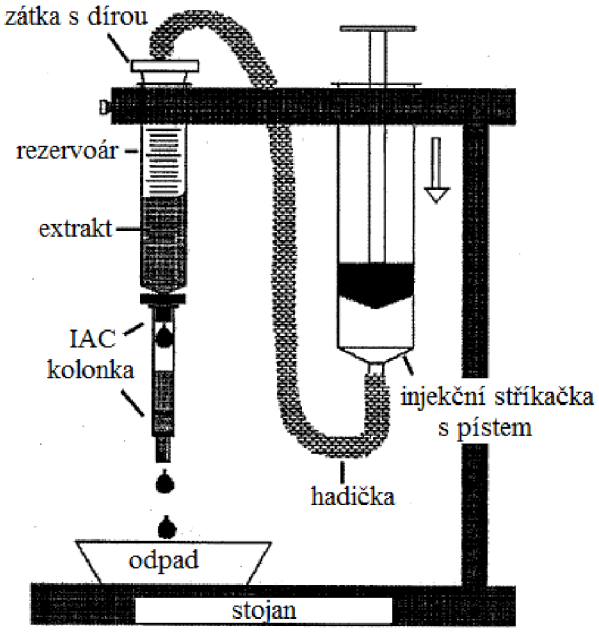
Mobilní fáze A byla připravena z 5 ml kyseliny octové, 50 ml acetonitrilu a 945 ml demineralizované vody. Mobilní fází B byl čistý methanol a mobilní fází C čistý acetonitril.

## 6.2 Příprava vzorků

K 5 g rozemletého vzorku v 50 ml centrifugační zkumavce byl přidán 1 g NaCl a 25 ml extrakčního roztoku. Vzorek byl při 300 RPM/min třepán na horizontální třepačce po dobu 15 min. Po následné centrifugaci při 1600 RCF po dobu 5 minut byl supernatant přefiltrován přes skládaný filtr do kádinky. Šest mililitrů filtrátu bylo pak zředěno 24 ml 0,5% Tweenu 20 v PBS. Takto zředěný extrakt byl opět filtrován přes filtr ze skelného vlákna do 25 ml odměrné baňky.

Injekční stříkačka bez pístu o objemu 25 ml sloužící jako rezervoár byla upevněna pomocí držáku na stojan. Ze spodu byla přes redukci nasazena IAC kolonka AflaOchra HPLC firmy Vicam. Pětadvacet mililitrů filtrátu bylo nadávkováno do rezervoáru a necháno volně prokapat přes kolonku. Poté byla kolonka promyta 5 ml 0,5% Tweenu 20 v PBS a 5 ml demineralizované vody.

Na kolonku byla poté připojena pryžová zátka s hadičkou, na jejímž druhém konci byla nasazena injekční stříkačka. Pomocí stříkačky byla opatrně vytlačena zbylá kapalina v kolonce. Následně bylo na kolonku přidáno 0,75 ml methanolu a ten byl pomocí tlaku prokapán přes kolonku max. rychlostí 1 kapka za sekundu do tmavé vialky. Po jedné minutě bylo přidáno na kolonku opět 0,75 ml methanolu, který byl stejným způsobem prokapán. Nakonec bylo kolonkou ponecháno prokapat ještě 1,5 ml 0,5% kyseliny octové.

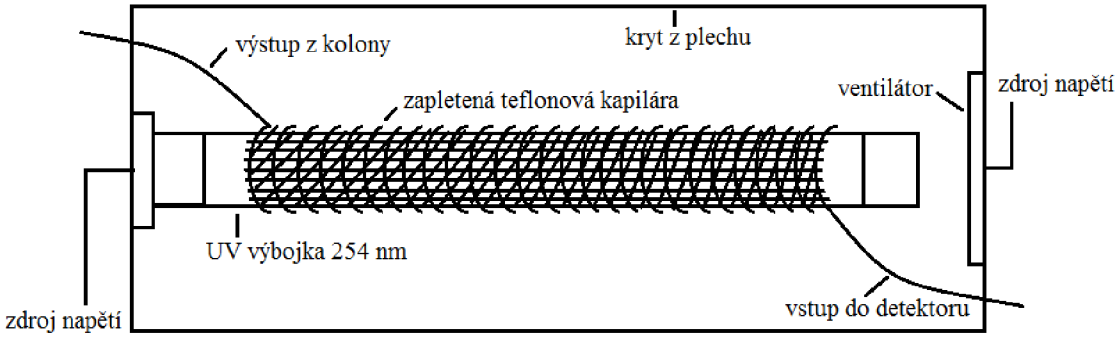



**Obrázek 6.1** – *Doporučený postup při použití IAC kolonek* [57]

## 6.3 Sestavení zařízení pro fotochemickou derivatizaci

Z teflonové kapiláry byla pletením vytvořena trubice okolo UV lampy. UV lampa byla i s opletenou kapilárou uchycena do otvoru vyříznutého do plechového krytu a připojení do elektrické sítě bylo vyvedeno ven. Naproti otvoru pro lampu byl do výřezu v krytu umístěn ventilátor sloužící pro chlazení UV lampy, jehož zapojení do elektrické sítě bylo rovněž vyvedeno ven. Jeden konec PTFE kapiláry byl pomocí fitinků připojen

na výstup z kolony a druhý konec byl připojen na vstup do fluorescenčního detektoru. Nákres zařízení pro fotochemickou derivatizaci je schematicky zobrazen na obrázku 6.2.




**Obrázek 6.2** – *Schéma zařízení pro postkolonovou fotochemickou derivatizaci*

## 6.4 Instrumentální analýza a její parametry

Přečištěné vzorky obsahující přidaný standard aflatoxinů a ochratoxinu byly změřeny pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí. Pro analýzu byla použita kolona Kinetex C18 150 x 4,6 mm, 5 µm, jejíž termostat byl nastaven na teplotu 40 °C. Gradient mobilní fáze byl nastaven podle tabulky 5.1 a průtok byl nastaven na 1 ml/min. Fluorescenční detektor byl nastaven dle tabulky 5.2. Vzorky byly nastřikovány pomocí autosampleru z vialek s teflonovým septem, přičemž nástřik byl 40 µl.

**Tabulka 6.1** – *Nastavení gradientu mobilní fáze*

| Čas [min] | A [obj. %] | B [obj. %] | C [obj. %] |
|---|---|---|---|
| 0 | 65 | 30 | 5 |
| 15 | 50 | 0 | 50 |
| 20 | 50 | 0 | 50 |
| 25 | 65 | 30 | 5 |
| 30 | 65 | 30 | 5 |

A: 0,5% kyselina octová a 5% acetonitril ve vodě, B: metanol, C: acetonitril

**Tabulka 6.2** – *Nastavení fluorescenčního detektoru*

| Čas [min] | Excitační λ [nm] | Emisní λ [nm] | PMT - Gain |
|---|---|---|---|
| 0 | 364 | 455 | 14 |
| 15 | 330 | 455 | 14 |

## 6.5 Stanovení validačních parametrů

### 6.5.1 Stanovení opakovatelnosti

Opakovatelnost byla získána opakovaným měřením spikované matrice vzorku. Z vybrané matrice byla vytvořena šestkrát navážka po 5,0 g. Ke každé replice vzorku byl přidán směsný standard mykotoxinů tak, aby výsledná koncentrace ve vybrané matrici byla 0,5 µg/kg pro aflatoxiny $G_2$ a $B_2$, 2,0 µg/kg pro aflatoxiny $B_1$ a $G_1$ a 10 µg/kg pro ochratoxin A. Po následné analýze těchto replik byl ze získaných hodnot vypočten aritmetický průměr $\bar{x}$ (1),

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^{n} x_i \qquad (1)$$

směrodatná odchylka $s$ (2),

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2} \qquad (2)$$

a relativní směrodatná odchylka $s_r$ (3),

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \qquad (3)$$

kde $n$ je počet opakování a $x_i$ jednotlivé výsledky.

### 6.5.2 Stanovení výtěžnosti metody

Pro stanovení výtěžnosti metody byly použity data získaná dle postupu uvedeného v kapitole 5.9.1. Hodnoty výtěžnosti byly vypočteny pro jednotlivé matrice dle vztahu (4),

$$R_e = \frac{n_{II}}{n_I} \cdot 100 \qquad (4)$$

kde $R_e$ je výtěžnost vyjádřená v procentech, $n_{II}$ je naměřená hodnota a $n_I$ je přijatá referenční hodnota.

### 6.5.3 Stanovení linearity

Lineární závislost byla ověřena sestrojením kalibrační křivky s rozsahem 0,5 – 200 pg pro aflatoxiny $G_2$ a $B_2$, 2 – 400 pg pro aflatoxiny $G_1$ a $B_1$ a 10 – 4000 pg pro ochratoxin A. Ředěním směsného standardu směsí methanol a 0,5% kyselina octová 50:50 dle tabulky číslo 6.3 bylo připraveno šest kalibračních standardů, jejichž opakovaným měřením (6x) byly sestaveny kalibrační přímky pro jednotlivé analyty vynesením průměrné plochy píků proti jejich koncentraci. Kalibrační bod 1 byl připraven ředěním 10 µl bodu číslo 2 do 990 µl ředícího roztoku. Nástřik byl 20 µl.

Kalibrační přímka byla poté vyjádřena ve tvaru (5),

$$y = a + bx \qquad (5)$$

kde $y$ je koncentrace, $a$ úsek, $b$ směrnice a $x$ koncentrace analytu.

**Tabulka 6.3** – *Příprava kalibračních roztoků*

| Kalibrační bod | Řeď. zás. standard [µl] | Ředící roztok [µl] |
|---|---|---|
| 1 | - | - |
| 2 | 10 | 990 |
| 3 | 40 | 960 |
| 4 | 100 | 900 |
| 5 | 200 | 800 |
| 6 | 400 | 600 |

### 6.5.4 Stanovení meze detekce a meze kvantifikace

Pro výpočet mezí detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) byl integrován šum základní linie chromatogramu spikované matrice. Následně bylo z chromatogramu odečteno maximální kolísání základní linie. Ze získaných dat byly následně vypočteny koncentrační limity detekce $x_D$ a kvantifikace $x_Q$ pomocí vztahu (6) a (7) v µg/kg,

$$x_D = \frac{3h_{max}}{b} . k . \frac{100}{R_e} \qquad (6)$$

$$x_Q = \frac{10h_{max}}{b} . k . \frac{100}{R_e} \qquad (7)$$

kde $h_{max}$ je maximální kolísání základní linie vyjádřené jako plocha, $k$ je přepočetní koeficient zahrnující úpravu vzorku a přepočet jednotek a $R_e$ je výtěžnost.

# VÝSLEDKY A DISKUSE

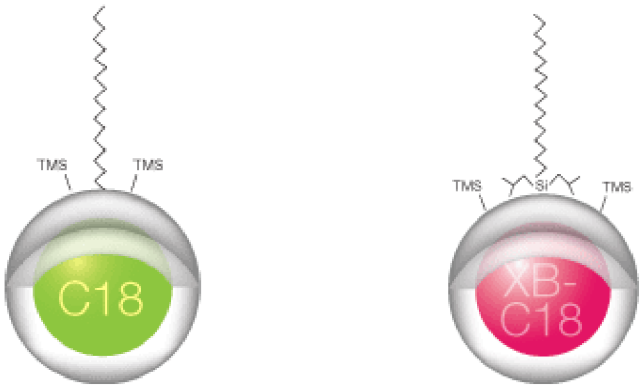
## 7. Vývoj a optimalizace metody HPLC

Vývoj metody spočíval zvláště ve výběru vhodného způsobu derivatizace, kdy byla zvažována účinnost, ekonomická dostupnost i jednoduchost při využití v praxi při použití daného způsobu derivatizace. Následně byla provedena optimalizace mobilní fáze. Nejtěžší fází byla optimalizace extrakce a přečištění vzorků.

### 7.1 Instrumentální analýza

#### 7.1.1 Výběr vhodné kolony

Pro analýzu mykotoxinů byly vyzkoušeny dvě kolony výrobce Phenomenex – Kinetex C18 a 150 x 4,6 mm, 5 µm a Kinetex XB-C18 150 x 4,6 mm, 5 µm. Jedná se o kolony využívající technologii CORE-SHELL. Stacionární fáze je složena z částic s pevným jádrem a porézním povrchem, a proto se oproti běžným kolonám s celoporézními částicemi vyznačují vyšší účinností [58]. V našem případě se ukázalo, že použití této technologie je zvláště výhodné. Kapilára derivatizačního zařízení totiž vytváří určitý mrtvý objem a i přes to, že je navrženo správně, dochází k mírnému rozšiřování píků, což užití kolony s povrchově porézními částicemi do určité míry vyvažuje.




**Obrázek 7.1** – *Stacionární fáze kolon Kinetex C18 a XB-C18*

Kolony Kinetex C18 a XB-C18 mají tzv. TMS-endacapping, což v praxi znamená, že zbylé volné silanolové skupiny silikagelu po připojení oktadecylových řetězců jsou deaktivovanány reakcí s trimethylsilylchloridem. Cílem této modifikace je potlačit nespecifické polární interakce některých analytů se stacionární fází a zabránit tak tailingu jejich píků. Endcapping rovněž zvyšuje odolnost kolony za méně šetrných

podmínek [59], například při užití kyselých mobilních fází při analýze aflatoxinů a ochratoxinu A.

Výrobce kolon Kinetex C18 a XB-C18, firma Phenomenex, deklaruje u kolony XB-C18 nižší retenci pro bazické látky a vyšší retenci pro látky kyselé při použití okyselené mobilní fáze než v případě kolony C18 [60]. Z toho důvodu byla metoda testována na obou kolonách s předpokládaným snížením retenčního času ochratoxinu A při použití kolony C18, což by mohlo vést ke zkrácení analýzy. Nicméně při porovnání obou chromatogramů byl pozorován minimální rozdíl mezi těmito kolonami a teoreticky je možné pro danou metodu použít obě.

### 7.1.2 Výběr mobilní fáze a nastavení gradientu

Ochratoxin A je slabá kyselina s $pK_{a1} = 4$ a $pK_{a2} = 7$ [61]. Díky acidobazickým vlastnostem ochratoxinu A lze tak volit mezi dvěma elučními módy. V naší analýze byla použita okyselená mobilní fáze (např. 0,1 – 0,5% kyselina mravenčí, octová, či fosforečná), kdy nastává eluce v pořadí $AFG_2$, $AFG_1$, $AFB_2$, $AFB_1$ a OTA, neboť u ochratoxinu A tak nedochází k disociaci kyselých vodíků karboxylové a fenolické skupiny. OTA má tedy v případě použití reverzní fáze v kombinaci s kyselou mobilní fází vyšší retenci než aflatoxiny [11, 43, 51].

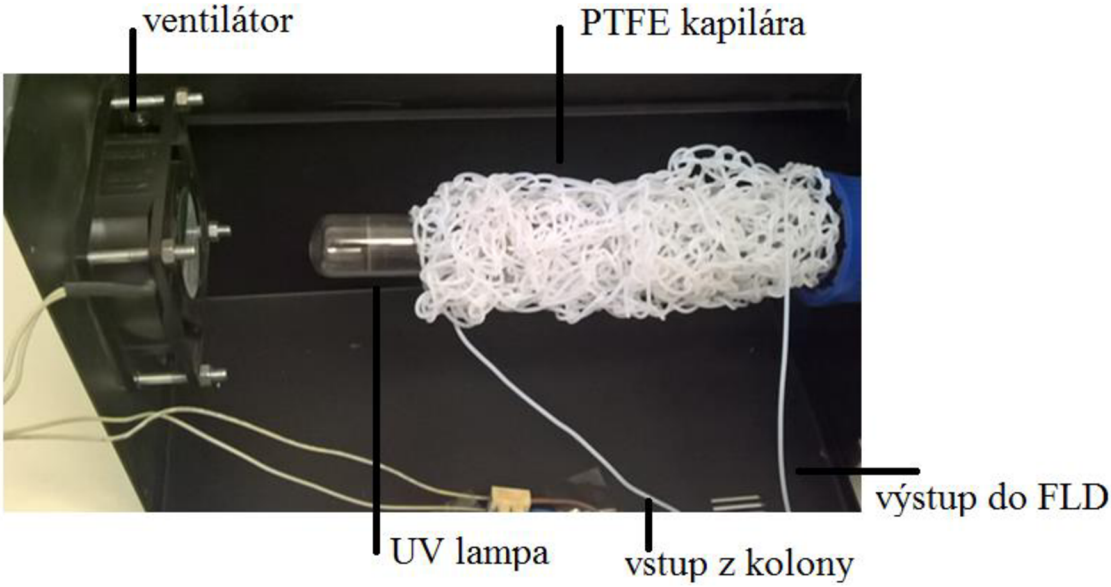
Nicméně Irakli a kol. použili opačného principu, kdy se kyselina do mobilní fáze nepřidává. Kyselé skupiny ochratoxinu A tak v neutrálním roztoku disociují a záporný náboj způsobí, že v systému s reverzní fází dochází v tomto případě k eluci ochratoxinu A před aflatoxiny – tedy v pořadí OTA, $AFG_2$, $AFG_1$, $AFB_2$ a $AFB_1$ [52]. Výhodou tohoto způsobu je možné zkrácení doby chromatografické analýzy. Bohužel při vyšším množství interferencí s nízkou retencí z čajových směsí, které se někdy dostanou až do finálního extraktu, může dojít k překryvu těchto píků se signálem OTA. Nakonec bylo tedy rozhodnuto dát přednost prvnímu přístupu.

Celkově se podařilo gradient poměrně dobře nastavit a jednotlivé analyty byly od sebe dostatečně odděleny do 20 minut. Celková délka analýzy pak byla 30 minut. Retenční časy $AFG_2$, $AFG_1$, $AFB_2$, $AFB_1$ a OTA byly 6,17 min, 6,89 min, 7,56 min, 8,38 min a 16,98 min.

### 7.1.3 Derivatizace

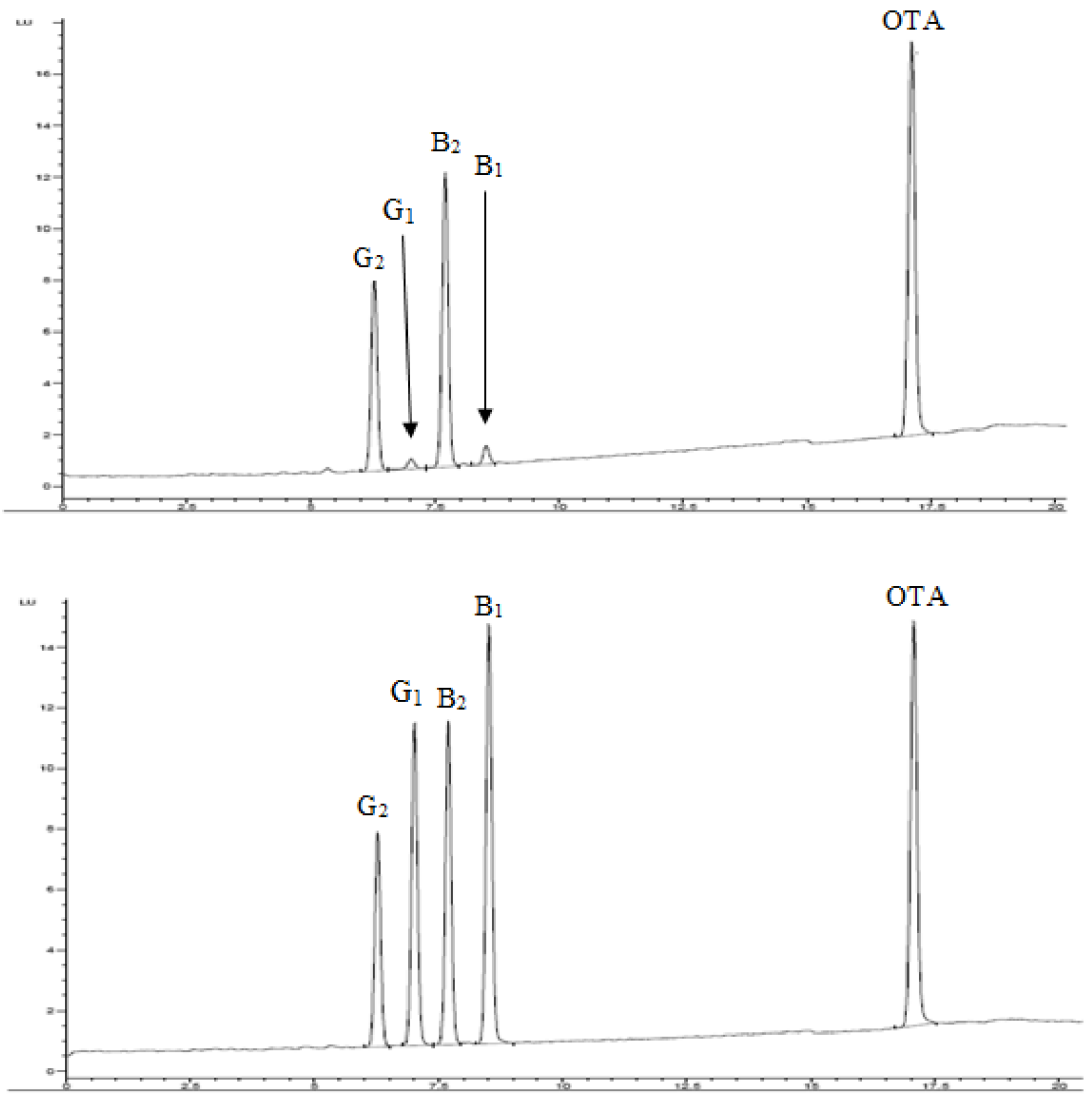
Pro zvýšení fluorescenční odezvy aflatoxinů $B_1$ a $G_1$ byla zvolena možnost fotochemické derivatizace. Tento postup má několik výhod – není nutno denně připravovat roztoky, které obsahují zdraví škodlivé reagencie a není ani potřeba další speciální vybavení (pumpy či elektrochemické cely) [36]. Na rozdíl od chemické předkolonové derivatizace ji lze provádět on-line a nedochází při ní k ředění eluátu roztokem s činidlem jako v případě chemické postkolonové derivatizace. K rozmývání jednotlivých zón analytu dochází tedy pouze vlivem difúze v kapiláře [62], což vede k vyššímu rozlišení. Zařízení pro tento způsob derivatizace je navíc z hlediska konstrukce poměrně jednoduché, a tak jej není nutné pořizovat komerční výrobek, ale lze si jej sestavit přímo v laboratoři.

Pro potlačení nežádoucí difúze je nutné, aby kapilára, kterou protéká eluát z kolony byla vhodně dlouhá a byla spletena, nikoli pouze obtočená okolo UV lampy. V rovné kapiláře totiž kapalina proudí laminárně a má tzv. parabolický proudový profil. V podélném směru pak dochází k axiální disperzi, kdy částice jedné látky putují kapilárou různou rychlostí. Tento difúzní tok má významný vliv na rozmytí píků separovaných látek. Vlivem opletení však dochází v jednotlivých záhybech k míchání, což má za následek potlačení laminárního proudění [63].




**Obrázek 7.2** – *Zařízení pro fotochemickou derivatizaci aflatoxinů $B_1$ a $G_1$*

V našem případě se podařilo dosáhnout kýženého výsledku – zvýšení intenzity fluorescence u aflatoxinů $B_1$ a $G_1$ při zachování požadovaného rozlišení chromatografických píků jednotlivých analytů. Na obrázku 7.3 jsou srovnány chromatogramy bez derivatizace a po derivatizaci.




**Obrázek 7.3** – *Porovnání dvou chromatogramů standardů aflatoxinů a ochratoxinu A stejné koncentrace před a po derivatizaci pomocí UV záření*

### 7.1.4 Detekce

Fluorescenční detekce je běžně používaná při stanovení mykotoxinů. Jedná se o poměrně citlivý způsob detekce umožňující stopové analýzy. Excitační a emisní vlnová délka byla zvolena na základě znalosti příslušných spekter a předchozích publikovaných metod [51].

### 7.1.5 Další podmínky

Teplota termostatu byla stejně jako v dostupné literatuře [43, 51, 52] nastavena na 40 $^{o}$C. Při nižší teplotě docházelo k růstu tlaku, stejně tak k horšímu rozlišení píků stanovovaných látek. Dle dřívějších poznatků byl nastaven průtok mobilní fáze na 1 ml/min.

Dalším důležitým parametrem, který bylo potřeba nastavit, byl objem nástřiku vzorku. U stopových analýz, kde je mnohdy nutné jít na limity detekce a kvantifikace pod 1 ppb (např. 1 µg/kg), je pro snížení těchto limitů na požadovanou mez často dosaženo zvýšením nástřiku vzorku. V případě analýzy mykotoxinů jsou do systému dávkovány velké objemy vzorku až do 100 µl [51, 64]. V našem případě však nebylo možné s dostupným vybavením a za daných podmínek dávkovat tak velké objemy, a tak byly postupně dávkovány objemy 20, 40 a 80 µl. V našem případě bylo možné dávkovat až 40 µl bez negativních vlivů na separaci, nicméně při 80 µl již docházelo ke zhoršení rozlišení a symetrie píků.

## 7.2 Optimalizace extrakce a přečištění vzorku

Vůbec nejobtížnější části vývoje metody byla optimalizace extrakce a přečištění vzorku. Všechny parametry musely být nastaveny tak, aby bylo dosaženo akceptovatelných hodnot výtěžnosti, jež jsou uvedeny v Nařízení komise (ES) č. 401/2006 [65], a to u všech stanovovaných parametrů. Prvním krokem při analýze, který bylo nutné doladit, byla extrakce směsí rozpouštědel. U bylinného i ovocného čaje byly testovány různá extrakční rozpouštědla dle dřívějších doporučení. Nejvíce se jako extrakční rozpouštědlo osvědčila směs 80% methanolu s vodou, která je zároveň nejběžněji používanou pro extrakci zmiňovaných mykotoxinů z různých matric [8]. Pro redukci acidity některých vzorků (zvláště ovocný čaj) se stejně jako v případě Trucksess a kol. [49] osvědčil přídavek uhličitanu sodného do extrakčního roztoku, který ji částečně redukoval.

K extrakci byly rovněž použity směsi acetonitrilu s vodou. Nicméně použití směsi 60% acetonitrilu s vodou k lepším výsledkům na rozdíl od dřívějších studií [13, 47, 48] nevedlo. U aflatoxinu $B_1$ a ochratoxinu A byly pozorovány podobné hodnoty výtěžnosti, jako při použití 80% methanolu, avšak znatelně horší výtěžnost pro aflatoxiny $G_2$, $B_2$ a $G_1$. Podobných výsledků dosáhli i Rahmani a kol. [43]. Přehled použitých rozpouštědel a hodnoty výtěžnosti jsou uvedeny v tabulce 7.1.

**Tabulka 7.1** – *Hodnoty výtěžnosti získané při použití různých rozpouštědel*

| | Použité extrakční rozpouštědlo | | | |
|---|---|---|---|---|
| | MeOH:W | MeOH:0,5%$NaHCO_3$ | MeCN:W | MeCN:W |
| Poměr | 60:40 | 80:20 | 60:20 | 80:20 |
| $AFG_2$ | 54,95 % | 54,58 % | 9,42 % | 5,73 % |
| $AFG_1$ | 56,38 % | 72,76 % | 64,78 % | 45,88 % |
| $AFB_2$ | 62,57 % | 71,59 % | 61,45 % | 51,24 % |
| $AFB_1$ | 58,78 % | 70,20 % | 78,71 % | 69,19 % |
| OTA | 71,08 % | 78,46 % | 79,33 % | 45,24 % |

Důležitým krokem úpravy vzorku před imunoafinitním přečištěním je jeho ředění vodou. Organická rozpouštědla použitá pro extrakci totiž denaturují přítomné protilátky a fungují tak zároveň jako eluent. Nicméně při přechodu z organické fáze do vodné fáze během ředění dochází ke srážení některých ve vodě nerozpustných složek z roztoku a vytváří se okem viditelný zákal. Látkami, které jsou takto vyloučeny z roztoku, mohou být i cílové analyty, což se stalo v našem případě ochratoxinu A, jehož výtěžnost byla v případě ovocných čajů téměř nulová. Nicméně po úpravě pH zředěného extraktu pomocí roztoku hydroxidu na hodnotu 7,5 došlo k výraznému zlepšení výtěžnosti. Proto byl pro ředění extraktu vzorků čajů použit stejně jako v podobné studii [49] 0,1M fosfátový pufr, jehož pufrační kapacita je přibližně v rozmezí pH od 6 do 7,5 [66].

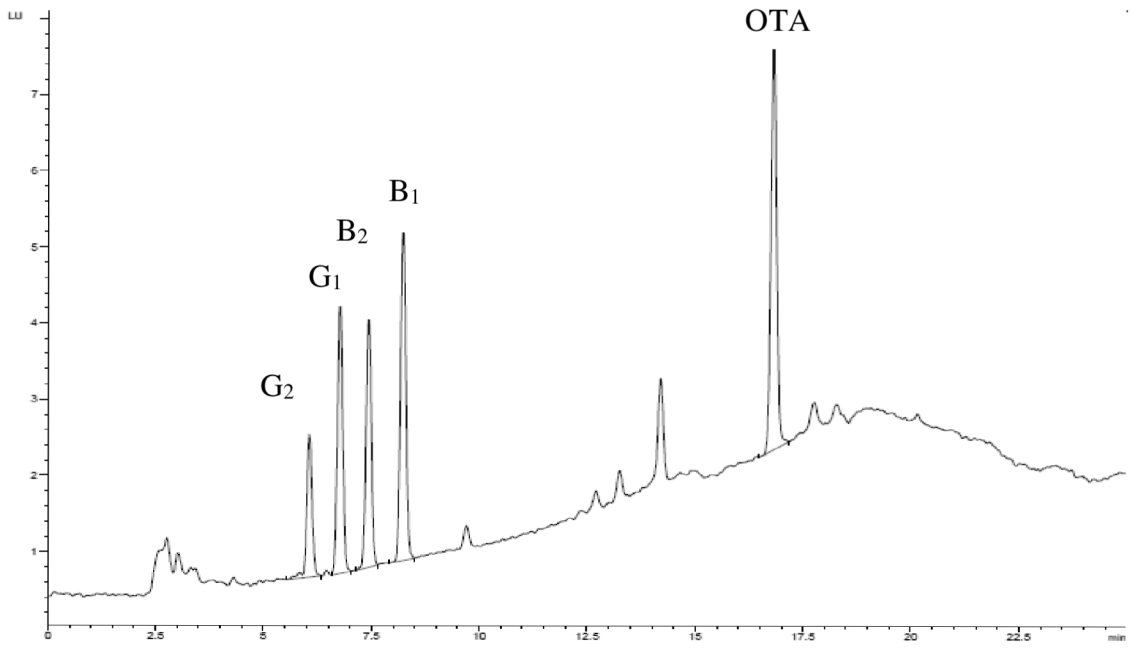
Nízkou výtěžnost OTA v případě některých vzorků lze přisoudit pravděpodobně jeho acidobazickým vlastnostem, neboť se jedná o kyselinu s $pK_{a1} = 4$ (karboxylová skupina) a $pK_{a2} = 7$ (fenolová skupina) [61]. Při nízkém pH, které je u extraktu ovocného čaje dáno obsahem přirozeně se vyskytujících nebo přidaných kyselin (acidulantů), nejsou kyselé skupiny OTA disociovány a molekula je z hlediska náboje neutrální, což může vést k jeho zhoršené rozpustnosti ve vodných roztocích. To se nezměnilo ani

po ředění vodou, které mělo na výslednou hodnotu pH malý vliv [8]. Navíc může nízké pH extraktu rovněž zhoršovat vazbu protilátky v imunoafinitní kolonce na cílový toxin [67], neboť pracovní rozsah většiny těchto bílkovin je ve fyziologickém rozmezí pH [21]. Přidáním vhodného pufru k extraktu však lze extrémní hodnoty pH vyrovnat.

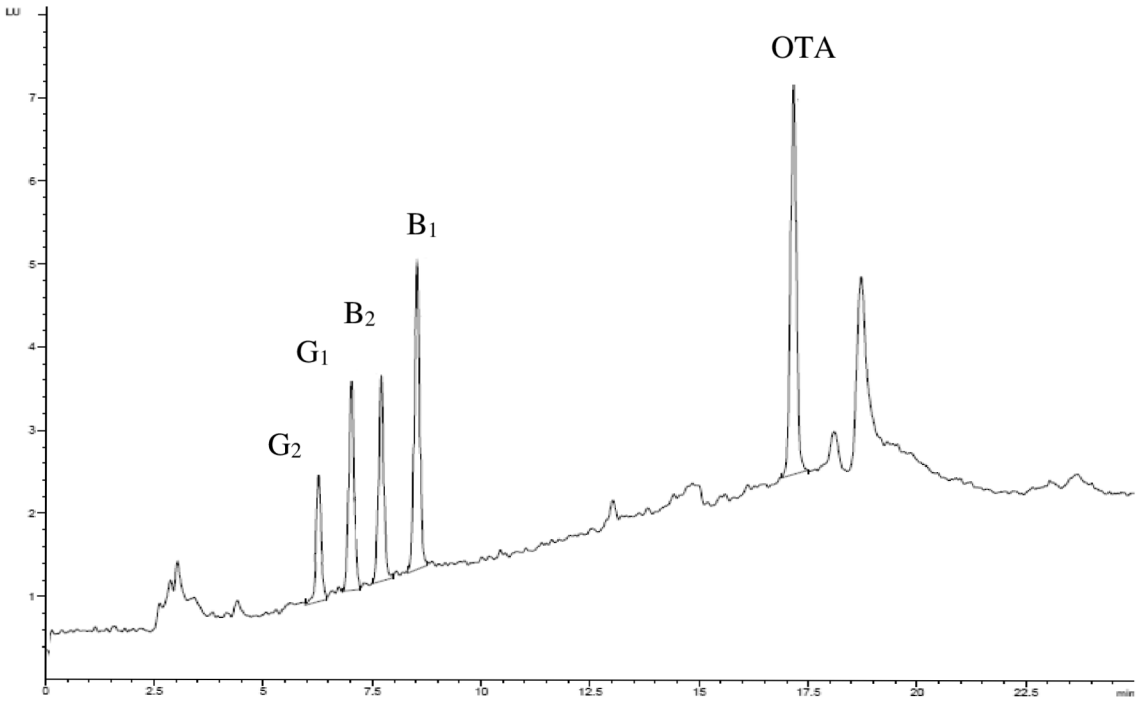
V průběhu experimentů byla ve srovnání s ostatními analyty pozorována nižší výtěžnost v případě $AFG_2$. Ačkoliv nemůžeme úplně vyloučit vliv matrice, způsobu extrakce, nebo obojí, nižší výtěžnost u $AFG_2$ může být způsobena i sníženou afinitou protilátky k tomuto analytu, která může za určitých podmínek nastat [68]. Může k tomu přispívat i vyšší náchylnost $AFG_2$ k chemickým změnám, jelikož G izomery mají oproti jednomu laktonovému kruhu izomerů B kruhy dva [69]. Nižší výtěžnosti obou zmíněných toxinů mohou být ovlivněny i tím, že pro spikovaní vzorků byl použit směsný standard, ve kterém jsou oproti $AFG_2$ a $AFB_2$ obsaženy v nižší koncentraci, přičemž koncentrační úroveň může mít na výslednou hodnotu výtěžnosti vliv [65]. Nicméně v případě $AFG_1$ výrazně nižší hodnota výtěžnosti pozorována nebyla.

Ovocné a bylinné čaje většinou představují směsi, které obsahují několik různých komponent. Díky tomu se jedná o komplexní matrici obsahující řadu zvláště fenolických látek [3], které mohou ovlivňovat průběh extrakce a ovlivňovat tak výtěžnost, ale i analýzu pomocí kapalinové chromatografie. Nicméně i přes velké množství látek, jež by potenciálně mohly ve vzorku působit jako nežádoucí interference a bránit tak efektivní analýze, se jich do finálního extraktu díky užití specifických imunoafinitních kolonek dostalo poměrně málo, jak můžeme vidět na obrázcích 7.4 a 7.5. K tomu přispěl i přídavek neionogenního detergentu Tween 20 do promývacího roztoku pro kolonky. Při použití jeho 0,5% roztoku v PBS byl jak okem, tak na výsledném chromatogramu pozorovatelný zřetelný vliv na odstranění nežádoucích interferencí, například většiny rostlinných barviv.

Na rozdíl od doporučení firmy Vicam [57] se pro eluci (desorpci) aflatoxinů a ochratoxinu A z kolonky osvědčilo použít dva podíly methanolu o objemu 750 µl, které byly na kolonku dávkovány s minutovým rozestupem a ponechány pomalu prokapat a následně bylo přes kolonku ještě prokapáno 1,5 ml 0,5% kyseliny octové, což mělo pozitivní vliv na výtěžnost všech analytů.




**Obrázek 7.4** – *Chromatogram spikovaného vzorku ovocného čaje*




**Obrázek 7.5** – *Chromatogram spikovaného vzorku bylinného čaje*

# 8. Validace metody HPLC

Požadavky na výkonnostní charakteristiky analytických metod pro stanovení různých mykotoxinů jsou uvedeny v Nařízení komise (ES) č. 401/2006 ze dne 23. února 2006, kterým se stanoví metody odběru vzorků a metody analýzy pro úřední kontrolu množství mykotoxinů v potravinách. Cílem toho nařízení je zajistit, aby laboratoře pověřené kontrolou používaly metody se srovnatelnou účinností [65]. V Nařízení komise (ES) č. 1881/2006 jsou pak uvedeny nejvyšší přípustné limity pro tyto kontaminanty v potravinách [70]. Výsledky získané v průběhu validace metody v této diplomové práci byly porovnány s těmito nařízeními.

## 8.1 Výkonnostní charakteristiky metody

### 8.1.1 Opakovatelnost

Dle Nařízení komise (ES) č. 401/2006 (dále jen „nařízení“) ze dne musí být akceptační kritérium, které slouží pro posouzení opakovatelnosti při stanovení aflatoxinů, stanoveno výpočtem jako násobek kritéria pro posouzení reprodukovatelnosti (8),

$$RSD_r = 0{,}66 \,.\, RSD_R \qquad (8)$$

kde $RSD_r$ je směrodatná odchylka získaná za podmínek pro opakovatelnost a $RSD_R$ je směrodatná odchylka získaná za podmínek reprodukovatelnosti, která se získá z tzv. Horwitzovy rovnice (9),

$$RSD_R = 2^{(1-0{,}5\log C)} \qquad (9)$$

kde $C$ je hmotnostní poměr množství analytu k množství matrice (např. 1 = 100 g/100 g atd.) [65]. Akceptační kritéria vypočtená dle nařízení jsou uvedena v tabulce 8.1.

**Tabulka 8.1** – *Nejvyšší přípustné hodnoty $RSD_r$ pro jednotlivé aflatoxiny.*

| | $c$ [μg/kg] | $C$ | $RSD_R$ [%] | $RSD_r$ [%] |
|---|---|---|---|---|
| $AFG_2$ | 0,5 | $0{,}5 \times 10^{-10}$ | ≤ 50,23 | ≤ 33,15 |
| $AFG_1$ | 2,0 | $2{,}0 \times 10^{-9}$ | ≤ 40,77 | ≤ 26,91 |
| $AFB_2$ | 0,5 | $0{,}5 \times 10^{-10}$ | ≤ 50,23 | ≤ 33,15 |
| $AFB_1$ | 2,0 | $2{,}0 \times 10^{-9}$ | ≤ 40,77 | ≤ 26,91 |

V nařízení jsou dále uvedena akceptační kritéria pro opakovatelnost při stanovení obsahu ochratoxinu A. Na koncentrační úrovni do 1 µg/kg by hodnota $RSD_r$ měla být ≤ 40 %, zatímco na úrovni od 1 µg/kg do 10 µg/kg ≤ 20 % [65].

Relativní směrodatná odchylka získaná měřením spikovaného vzorku bylinného čaje pomocí směsného standardu za podmínek opakovatelnosti byla 9,97 % pro aflatoxin $G_2$, 4,61 % pro aflatoxin $G_1$, 9,58 % pro aflatoxin $B_2$, 8,25 % pro aflatoxin $B_1$ a 6.26 % pro ochratoxin A.

**Tabulka 8.2** – *Opakovatelnost stanovená pro bylinné čaje*

| | Naměřená koncentrace [µg/kg] | | | | | | | $SD_r$ | $RSD_r$ [%] | Kritérium [%] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | Průměr | | | |
| $AFG_2$ | 0,28 | 0,29 | 0,23 | 0,31 | 0,25 | 0,28 | 0,27 | 0,03 | 9,97 | ≤ 33,15 |
| $AFG_1$ | 1,44 | 1,50 | 1,37 | 1,39 | 1,48 | 1,54 | 1,46 | 0,07 | 4,61 | ≤ 26,91 |
| $AFB_2$ | 0,31 | 0,34 | 0,38 | 0,34 | 0,40 | 0,38 | 0,36 | 0,03 | 9,58 | ≤ 33,15 |
| $AFB_1$ | 1,30 | 1,35 | 1,41 | 1,31 | 1,44 | 1,61 | 1,40 | 0,12 | 8,25 | ≤ 26,91 |
| OTA | 7,75 | 8,58 | 7,07 | 8,00 | 7,95 | 7,71 | 7,85 | 0,49 | 6,26 | ≤ 20 |

V případě ovocného čaje byly získány $RSD_r$ 10,10 % pro aflatoxin $G_2$, 6,86 % pro aflatoxin $G_1$, 5,93 % pro aflatoxin $B_2$, 6,38 % pro aflatoxin $B_1$ a 7,59 % pro ochratoxin A. Lze tedy říct, že uvedené hodnoty v obou případech splňují nejen dané akceptační kritérium, a tak vyhovují požadavkům na výkonnostní charakteristiky analytických metod, jež jsou uvedeny v nařízení, ale rovněž garantují poměrně dobrou preciznost za podmínek opakovatelnosti.

**Tabulka 8.3** – *Opakovatelnost stanovená pro ovocné čaje*

| | Naměřená koncentrace [µg/kg] | | | | | | | $SD_r$ | $RSD_r$ [%] | Kritérium [%] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | Průměr | | | |
| $AFG_2$ | 0,28 | 0,33 | 0,30 | 0,29 | 0,32 | 0,25 | 0,29 | 0,03 | 10,10 | ≤ 33,15 |
| $AFG_1$ | 1,38 | 1,57 | 1,48 | 1,66 | 1,40 | 1,51 | 1,50 | 0,10 | 6,86 | ≤ 26,91 |
| $AFB_2$ | 0,36 | 0,37 | 0,34 | 0,38 | 0,34 | 0,32 | 0,35 | 0,02 | 5,93 | ≤ 33,15 |
| $AFB_1$ | 1,44 | 1,48 | 1,38 | 1,65 | 1,49 | 1,43 | 1,48 | 0,09 | 6,38 | ≤ 26,91 |
| OTA | 8,01 | 9,03 | 9,17 | 8,46 | 7,82 | 7,67 | 8,36 | 0,63 | 7,59 | ≤ 20 |

### 8.1.2 Výtěžnost

Výtěžnost pro aflatoxiny by se dle příslušného nařízení EU měla pohybovat v rozmezí 50 – 120 % při koncentraci do 1 µg/kg, 70 – 110 % pro koncentrace v rozmezí od 1 do 10 µg/kg a 80 – 110 % pro koncentrace nad 10 µg/kg. V případě ochratoxinu A by pak výtěžnost měla být v rozmezí 50 – 120 % pro koncentrace do 1 µg/kg a 70 – 110 % pro koncentrační úroveň od 1 do 10 µg/kg [65]. Výtěžnosti získané pro bylinné čaje byly 54,58 % pro $AFG_2$ a 70,20 – 78,46 % pro $AFG_1$, $AFB_2$, $AFB_1$ a OTA.

**Tabulka 8.4** – *Výtěžnost stanovená pro bylinné čaje*

| | Průměrná nam. hodnota [µg/kg] | Přijatá ref. hodnota [µg/kg] | Výtěžnost [%] | Kritérium [%] |
|---|---|---|---|---|
| $AFG_2$ | 0,27 | 0,5 | 54,58 | 50 – 120 |
| $AFG_1$ | 1,46 | 2,0 | 72,76 | 70 – 110 |
| $AFB_2$ | 0,36 | 0,5 | 71,59 | 50 – 120 |
| $AFB_1$ | 1,40 | 2,0 | 70,20 | 70 – 110 |
| OTA | 7,85 | 10 | 78,46 | 70 – 110 |

Výtěžnosti získané pro ovocné čaje byly 58,91 % pro $AFG_2$ a 69,99 – 83,60 % pro $AFG_1$, $AFB_2$, $AFB_1$ a OTA. Lze tedy říct, že v obou případech získaná data splňují požadavky kladené na výkonnostní charakteristiky analytických metod dané evropskou legislativou. Možné příčiny nižší hodnoty výtěžnosti pro $AFG_2$ jsou diskutovány již v kapitole 7.2.

**Tabulka 8.5** – *Výtěžnost stanovená pro ovocné čaje*

| | Průměrná nam. hodnota [µg/kg] | Přijatá ref. hodnota [µg/kg] | Výtěžnost [%] | Kritérium [%] |
|---|---|---|---|---|
| $AFG_2$ | 0,29 | 0,5 | 58,91 | 50 – 120 |
| $AFG_1$ | 1,50 | 2,0 | 74,98 | 70 – 110 |
| $AFB_2$ | 0,35 | 0,5 | 69,99 | 50 – 120 |
| $AFB_1$ | 1,48 | 2,0 | 73,95 | 70 – 110 |
| OTA | 8,36 | 10 | 83,60 | 70 – 110 |

### 8.1.3 Linearita

Linearita byla ověřena sestrojením šestibodové kalibrační křivky, kde na osu *y* byla vynesena odezva analytu vyjádřená jako plocha píku a na osu *x* pak exaktní množství analytu v nástřiku v pikogramech. Tento postup je vhodné využít z důvodu možné budoucí změny objemu nástřiku vzorku.

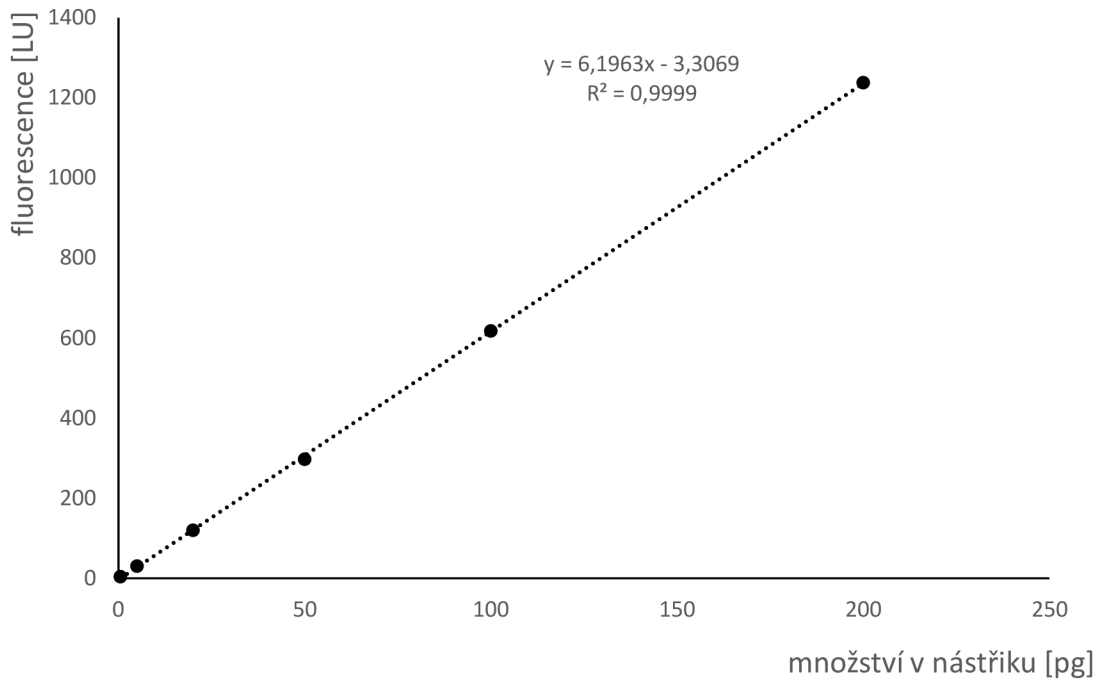
Linearita metody byla ověřena v rozsahu 0,5 – 200 pg pro $AFG_2$ a $AFB_2$, 2 – 400 pg pro $AFG_1$ a $AFB_1$ a 10 – 4000 pg pro OTA. V případě všech kalibrací byl koeficient determinace ($R^2$) roven 0,999 demonstrující dobrou korelaci odezvy detektoru s množstvím analytu. Parametry kalibračních závislostí jsou shrnuty v tabulce 8.7.

**Tabulka 8.6** – *Data pro externí kalibrační přímku*

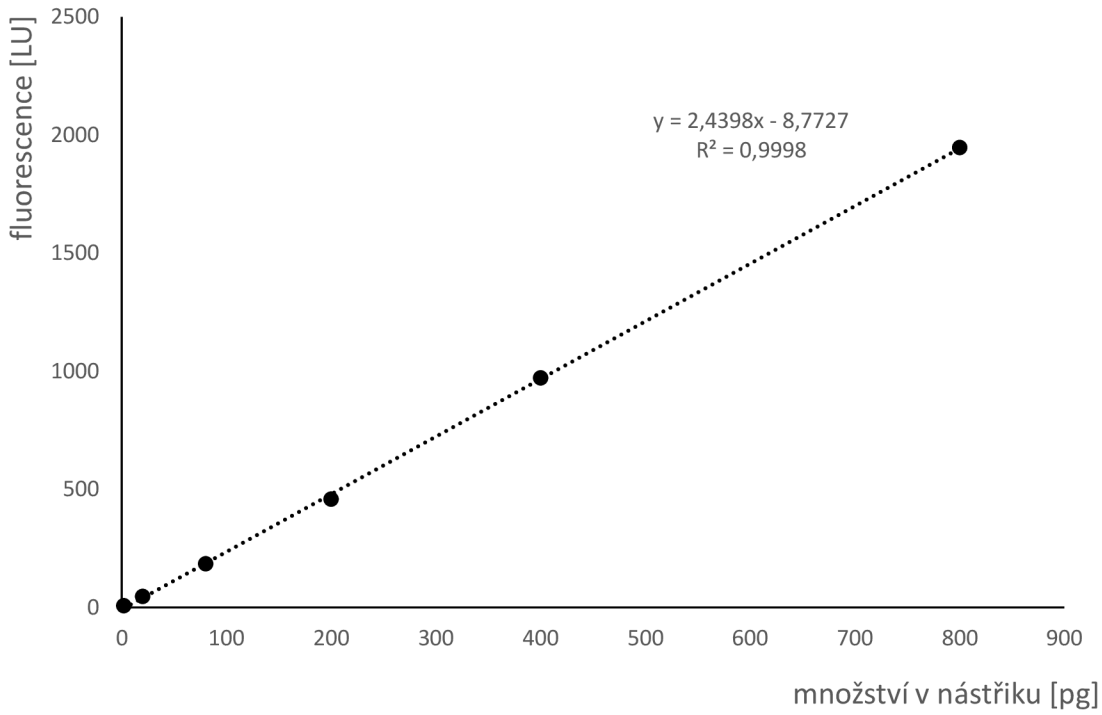
| *m* [pg] | *A* [LU] $AFG_2$ | *A* [LU] $AFB_2$ | *m* [pg] | *A* [LU] $AFG_1$ | *A* [LU] $AFB_1$ | *m* [pg] | *A* [LU] OTA |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0,5 | 4,09 | 6,35 | 2 | 6,13 | 8,25 | 10 | 7,78 |
| 5 | 30,43 | 46,49 | 20 | 46,67 | 61,14 | 100 | 64,39 |
| 20 | 119,62 | 182,86 | 80 | 184,14 | 240,17 | 400 | 254,61 |
| 50 | 297,60 | 455,52 | 200 | 457,36 | 607,43 | 1000 | 639,73 |
| 100 | 617,51 | 962,33 | 400 | 971,00 | 1286,15 | 2000 | 1373,26 |
| 200 | 1237,59 | 1905,25 | 800 | 1946,62 | 2549,49 | 4000 | 2643,12 |
| Poznámka – *m* – exaktní množství (hmotnost) látky v nástřiku, *A* – průměrná plocha chromatografického píku. | | | | | | | |

**Tabulka 8.7** – *Parametry kalibračních závislostí (shrnutí)*

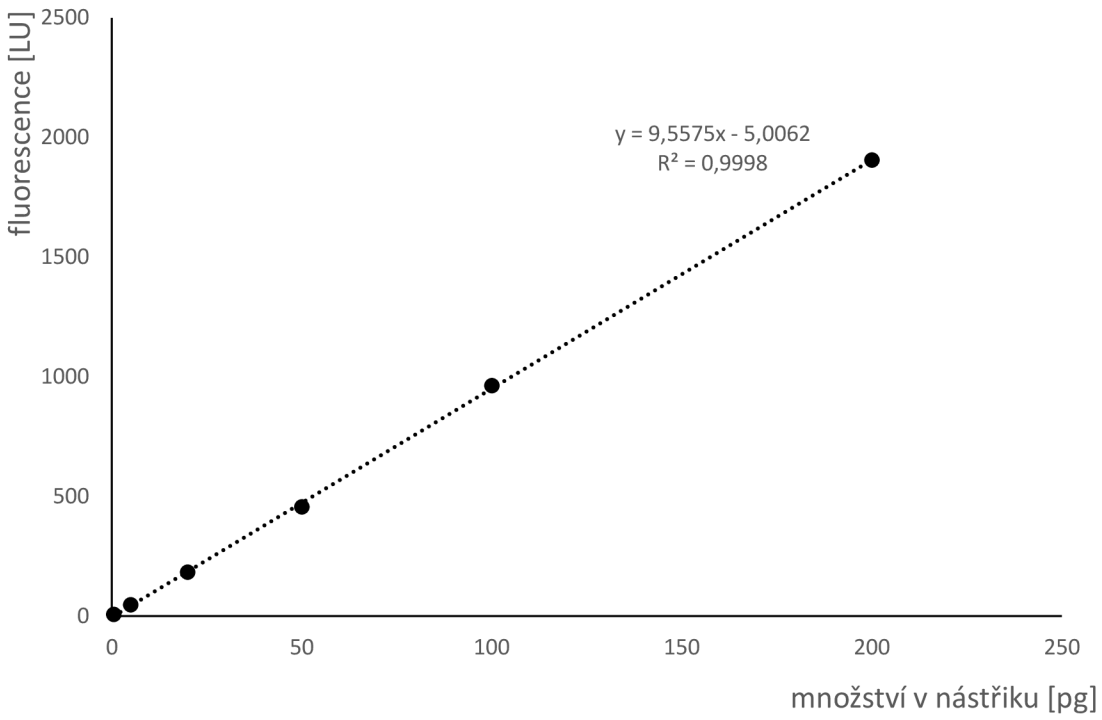
| | Hmotnostní rozpětí [pg] | Směrnice *b* | Intercept *a* | Korelační determinace $R^2$ |
|---|---|---|---|---|
| $AFG_2$ | 0,5 – 200 | 6,20 | -3,31 | 0,999 |
| $AFG_1$ | 2,0 – 800 | 2,44 | -8,77 | 0,999 |
| $AFB_2$ | 0,5 – 200 | 9,56 | -5,01 | 0,999 |
| $AFB_1$ | 2,0 – 800 | 3,20 | -8,79 | 0,999 |
| OTA | 10 – 4000 | 0,67 | -2,22 | 0,999 |



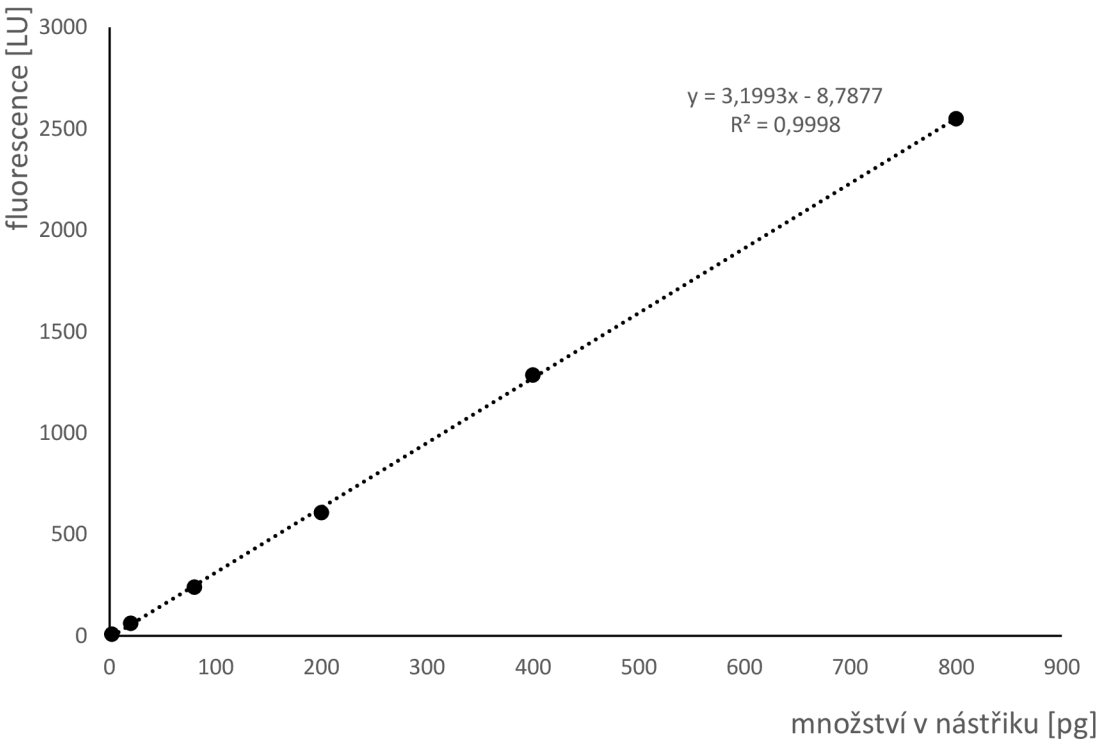

**Obrázek 8.1** – *Kalibrační přímka pro aflatoxin $G_2$*



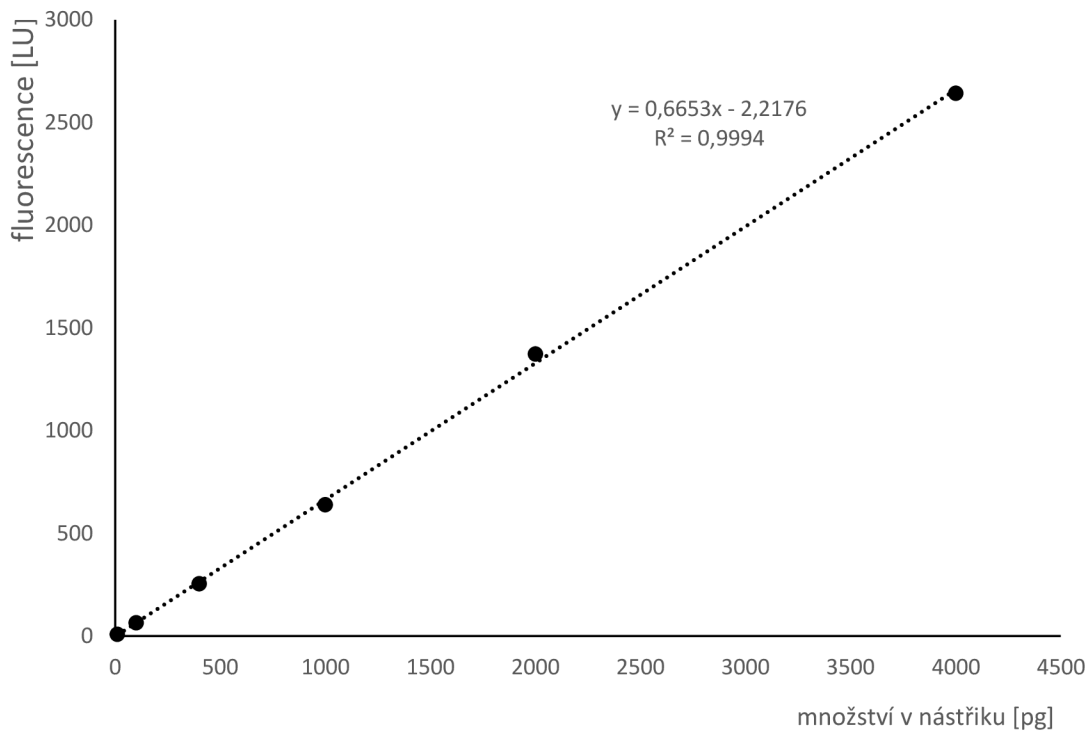

**Obrázek 8.2** – *Kalibrační přímka pro aflatoxin $G_1$*




**Obrázek 8.3** – *Kalibrační přímka pro aflatoxin $B_2$*




**Obrázek 8.4** – *Kalibrační přímka pro aflatoxin $B_1$*




**Obrázek 8.5** – *Kalibrační přímka pro ochratoxin A*

### 8.1.4 Limit detekce a kvantifikace

Ačkoliv minimální požadavky na LOD a LOQ nejsou v Nařízení komise (ES) č. 401/2006 uvedeny, lze je odvodit z nařízení Nařízení komise (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, které stanovuje maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách. Bohužel v tomto zařízení nejsou uvedeny limity pro bylinkové ani ovocné čaje, a tak bylo v našem případě rozhodnuto vzít do úvahy nejnižší stanovené limity.

Nejpřísnější limity jsou stanoveny pro obiloviny, skořápkové plody nebo sušené ovoce a představují nejvyšší přípustný limit pro $AFB_1$ 2,0 µg/kg a pro sumu $AFB_1$, $AFB_2$, $AFG_1$ a $AFG_2$ 4,0 µg/kg. Nicméně u některých potravin určených jako výživa pro kojence jsou tyto limity ještě přísnější, kdy je maximální povolené množství $AFB_1$ 0,10 µg/kg [70]. Výpočet pro přepočetní koeficient byl proveden dle tabulky 8.8.

**Tabulka 8.8** – *Výpočet pro přepočetní koeficient k*

| | Nástřik | Objem po IAC | Objem pro IAC | Ředění | Objem extraktu | Množství vzorku |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Data | 40 µl | 3 ml | 25 ml | 5 × | 25 ml | 5 g |
| Výpočet | $k$ = 25/1000*3/25*5*25/5 = 0,075 | | | | | |

Cílem při vývoji a validaci analytické metody je dostat se pod tyto legislativní limity. Pro bylinný čaj byly pro aflatoxiny LOD v rozmezí 0,02 µg/kg a 0,07 µg/kg a LOQ v rozmezí 0,06 µg/kg a 0,22 µg/kg, zatímco pro ochratoxin A byly LOD a LOQ 0,22 µg/kg a 0,75 µg/kg.

**Tabulka 8.9** – *LOD a LOQ stanovený pro bylinné čaje*

| | $h_{max}$ | $b$ | $k$ | $R_e$ [%] | $x_D$ [µg/kg] | $x_Q$ [µg/kg] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $AFG_2$ | 0,53 | 6,20 | 0,075 | 54,58 | 0,04 | 0,12 |
| $AFG_1$ | 0,53 | 2,44 | 0,075 | 72,76 | 0,07 | 0,22 |
| $AFB_2$ | 0,53 | 9,56 | 0,075 | 71,59 | 0,02 | 0,06 |
| $AFB_1$ | 0,53 | 3,20 | 0,075 | 70,20 | 0,05 | 0,18 |
| OTA | 0,53 | 0,67 | 0,075 | 78,46 | 0,22 | 0,75 |

Poznámka – $h_{max}$ – maximální kolísaní základní linie vyjádřené jako plocha píku,
$b$ – směrnice kalibrační přímky,
$k$ – koeficient zahrnující úpravu vzorku a přepočet jednotek,
$R_e$ – výtěžnost,
$x_D$ – koncentrace odpovídající limitu detekce,
$x_Q$ – koncentrace odpovídající limitu kvantifikace.

Podobně jako v případě bylinného čaje byly stanoveny vyhovující limity detekce a kvantifikace v případě ovocného čaje. LOD pro aflatoxiny se pohybovaly v rozmezí od 0,02 do 0,07 µg/kg, LOD pro ochratoxin A byl 0,22 µg/kg. LOQ pro aflatoxiny pak byly v rozmezí od 0,06 do 0,23 µg/kg a LOQ pro ochratoxin A byl 0,74 µg/kg. Bylo tedy dosaženo podobných výsledků jako v případě ovocného čaje.

**Tabulka 8.10** – *LOD a LOQ stanovený pro ovocné čaje*

| | $h_{max}$ | $b$ | $k$ | $R_e$ [%] | $x_D$ [µg/kg] | $x_Q$ [µg/kg] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $AFG_2$ | 0,56 | 6,20 | 0,075 | 58,91 | 0,03 | 0,11 |
| $AFG_1$ | 0,56 | 2,44 | 0,075 | 74,98 | 0,07 | 0,23 |
| $AFB_2$ | 0,56 | 9,56 | 0,075 | 69,99 | 0,02 | 0,06 |
| $AFB_1$ | 0,56 | 3,20 | 0,075 | 73,95 | 0,05 | 0,18 |
| OTA | 0,56 | 0,67 | 0,075 | 83,60 | 0,22 | 0,74 |

Poznámka – $h_{max}$ – maximální kolísaní základní linie vyjádřené jako plocha píku,
$b$ – směrnice kalibrační přímky,
$k$ – koeficient zahrnující úpravu vzorku a přepočet jednotek,
$R_e$ – výtěžnost,
$x_D$ – koncentrace odpovídající limitu detekce,
$x_Q$ – koncentrace odpovídající limitu kvantifikace.

Metodu však nelze použít pro kontrolu kojenecké výživy, neboť nebylo dosaženo potřebných limitů detekce a kvantifikace. Nicméně při vhodné úpravě množství vzorku, případně množství ředěného extraktu aplikovaného na imunoafinitní kolonku a další optimalizaci lze uvažovat i o tomto využití.

### 8.1.5 Ověření správnosti metody

Správnost metody nebylo možné ověřit z důvodu nedostupnosti vhodných certifikovaných referenčních materiálů či mezilaboratorního porovnání.

# ZÁVĚR

Tato diplomová práce se věnuje vývoji a validaci analytické metody vysoce účinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí pro stanovení aflatoxinů a ochratoxinu A v bylinném a ovocném čaji. V rámci praktické části byla optimalizována fáze extrakce a přečištění vzorku včetně volby podmínek instrumentální analýzy a derivatizace.

Jako vzorové matrice byly vybrány směsný bylinný a ovocný čaj. Pro extrakci spikovaných vzorků těchto čajů se nejvíce osvědčila směs methanolu a 0,5% vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného. Před aplikací na imunoafinitní kolonku byly vzorky ředěny fosfátovým pufrem, který snížil procentuální obsah organického rozpouštědla a vyrovnával kyselé pH některých vzorků. Pro přečištění vzorků byly použity imunoafinitní kolonky obsahující specifické protilátky proti zmiňovaným analytům.

Vzorky byly analyzovány pomocí kapalinové chromatografie. Pro separaci byla zvolena nepolární kolona Kinetex C18 a použita okyselená mobilní fáze umožňující eluci ochratoxinu A až za všemi čtyřmi aflatoxiny. Pro zvýšení odezvy aflatoxinů $B_1$ a $G_1$ zvolena technika fotochemické derivatizace, jelikož se jedná o ekonomicky nejvýhodnější způsob derivatizace, jehož praktické provedení je poměrně jednoduché a nevyžaduje žádné speciální vybavení ani chemikálie.

Poslední fází při vývoji metody byla její validace. Opakovatelnost byla stanovena ze šesti spikovaných replik vzorků čajů. Pro bylinný čaj byla směrodatná odchylka $RSD_r$ v rozmezí 4,61 – 9,97 % a pro ovocný čaj v rozmezí 5,93 – 10,10 %. Výtěžnost $R_e$ se u všech analytů pohybovala v rozmezí 54,58 – 78,46 % pro bylinný čaj a 58,91 – 83,60 % pro čaj ovocný. Linearita byla ověřena sestrojením kalibrační přímky s rozsahem 0,5 – 200 pg pro $AFB_2$, $AFG_2$, 2 – 800 pg pro $AFB_1$, $AFG_1$ a 10 – 4000 pg pro OTA. Limit detekce byl v obou případech v rozmezí 0,02 – 0,07 µg/kg pro aflatoxiny a 0,22 µg/kg pro ochratoxin A. Limit kvantifikace pak byl v rozmezí 0,06 – 0,23 µg/kg pro aflatoxiny a 0,75 µg/kg pro ochratoxin A.

Metoda splňuje požadavky na výkonnostní charakteristiky analytických metod dané evropskou legislativou, a tak lze považovat její validaci za úspěšnou. Metoda byla úspěšně akreditována dle normy ČSN EN ISO/IEC 17025. Volba matrice i dalších analytů (mykotoxinů) v rámci analýzy potravin a krmiv na rostlinné bázi je dle této akreditace flexibilní, a tak lze do budoucna po úpravě některých parametrů a validaci uvažovat užití metody pro kontrolu dalších komodit, jako je černý nebo zelený čaj.

# SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

$AFB_1$ ($B_1$) – aflatoxin $B_1$

$AFB_2$ ($B_2$) – aflatoxin $B_2$

$AFB_{2a}$ – derivát aflatoxinu $B_1$

$AFG_1$ ($G_1$) – aflatoxin $G_1$

$AFG_2$ ($G_2$) – aflatoxin $G_2$

$AFG_{2a}$ – derivát aflatoxinu $G_1$

AP – alkaline phosphatase – alkalická fosfatáza

DAD – diode array detector – detektor s diodovým polem

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay – enzymová imunoanalýza

ELSD – evaporative light scattering detector – odpařovací detektor rozptylu světla

FLD – fluorescence detector – fluorescenční detektor

HPLC – high-performance liquid chromatography – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPTLC – high-performance thin layer chromatography – vysokoúčinná kapalinová tenkovrstvá chromatografie

HRMS – high-resolution mass spectrometry – vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie

HRP – horseradish peroxidase – křenová peroxidáza

NP – normálně fázová

IAC – immunoaffinity column – imunoafinitní kolonka

OTA – ochratoxin A

PBPB – pyridinium bromid perbromid

PBS – phosphate buffered saline – pufrovaný fyziologický roztok

RIA – radioimmunoassay – radioimunoanalýza

RID – refractive index detector – refraktometrický detektor

RP – reverse phase – reverzně fázová

SPE – solid phase extraction – extrakce na pevné fázi

TFA – trifluoracetic acid – trifluoroctová kyselina

TLC – thin layer chromatography – tenkovrstvá chromatografie

ZEA – zearalenon

# ZDROJE A POUŽITÁ LITERATURA


[1] BENNETT, J. W. a M. KLICH. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. 2003, **16**(3), 497-516. DOI: 10.1128/CMR.16.3.497-516.2003. ISSN 0893-8512.

[2] OSTRÝ, Vladimír a Veronika KÝROVÁ. Toxinogenní vláknité mikroskopické houby a mykotoxiny v potravinách. *Živa*. 2017, **164**(5), 134-135.

[3] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. Mykotoxiny. *Chemie potravin II: Kontaminující látky*. Rozšířené a přepracované 3. vydání. Tábor: OSSIS, 2009, 204 - 307. ISBN 978-80-86659-16-9.

[4] KODÍČEK, Milan. *Biochemické pojmy - výkladový slovník*. Druhé vydání. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2007. ISBN 978-80-7080-669-2.

[5] TURNER, Nicholas W., Sreenath SUBRAHMANYAM a Sergey A. PILETSKY. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2009, **632**(2), 168-180. DOI: 10.1016/j.aca.2008.11.010. ISSN 00032670.

[6] *Aspergillus ochraceus*. *Aspergillus & Aspergillosis Website* [online]. [cit. 2020-05-15]. Dostupné z: https://www.aspergillus.org.uk/content/aspergillus-ochraceus-15

[7] *Aspergillus flavus*. *Fun With Microbiology* [online]. [cit. 2020-05-15]. Dostupné z: http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2012/02/aspergillus-flavus.html

[8] SEDOVA, Irina, Mariya KISELEVA a Victor TUTELYAN. Mycotoxins in Tea: Occurrence, Methods of Determination and Risk Evaluation. *Toxins*. 2018, **10**(11). DOI: 10.3390/toxins10110444. ISSN 2072-6651.

[9] BAKIRDERE, Sezgin, Selin BORA, E. BAKIRDERE, Fırat AYDIN, Yasin ARSLAN, O. KOMESLI, Işıl AYDIN a Emrah YILDIRIM. Aflatoxin species: their health effects and determination methods in different foodstuffs. *Open Chemistry*. 2012, **10**(3). DOI: 10.2478/s11532-012-0009-2. ISSN 2391-5420.

[10] ZHANG, Lei, Xiao-Wen DOU, Cheng ZHANG, Antonio LOGRIECO a Mei-Hua YANG. A Review of Current Methods for Analysis of Mycotoxins in Herbal Medicines. *Toxins*. 2018, **10**(2). DOI: 10.3390/toxins10020065. ISSN 2072-6651.

[11] WEN, Jing, Weijun KONG, Jian WANG a Meihua YANG. Simultaneous determination of four aflatoxins and ochratoxin A in ginger and related products by HPLC with fluorescence detection after immunoaffinity column clean-up and postcolumn photochemical derivatization. *Journal of Separation Science*. 2013, **36**(23), 3709-3716. DOI: 10.1002/jssc.201300885. ISSN 16159306.

[12] DHANSHETTY, Manisha a Kaushik BANERJEE. Simultaneous Direct Analysis of Aflatoxins and Ochratoxin A in Cereals and Their Processed Products by Ultra-High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Journal of AOAC International*. 2019, **102**(6), 1666-1672. DOI: 10.5740/jaoacint.19-0048. ISSN 1060-3271.

[13] GARCIA-VILLANOVA, Rafael J., Carlos CORDÓN, Ana M. GONZÁLEZ PARAMÁS, P. APARICIO a M. Eugenia GARCIA ROSALES. Simultaneous Immunoaffinity Column Cleanup and HPLC Analysis of Aflatoxins and Ochratoxin A in Spanish Bee Pollen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, **52**(24), 7235-7239. DOI: 10.1021/jf048882z. ISSN 0021-8561.

[14] IBÁÑEZ-VEA, María, Laura Ana CORCUERA, Rebeca REMIRO, María Teresa MURILLO-ARBIZU, Elena GONZÁLEZ-PEÑAS a Elena LIZARRAGA. Validation of a UHPLC-FLD method for the simultaneous quantification of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in barley. *Food Chemistry*. 2011, **127**(1), 351-358. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.12.157. ISSN 03088146.

[15] WACOO, Alex P., Deborah WENDIRO, Peter C. VUZI a Joseph F. HAWUMBA. Methods for Detection of Aflatoxins in Agricultural Food Crops. *Journal of Applied Chemistry*. 2014, 2014, 1-15. DOI: 10.1155/2014/706291. ISSN 2356-7171.

[16] SHEPHARD, Gordon S. Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009, **395**(5), 1215-1224. DOI: 10.1007/s00216-009-2857-y. ISSN 1618-2642.

[17] YAO, H., Z. HRUSKA a J. Diana DI MAVUNGU. Developments in detection and determination of aflatoxins. *World Mycotoxin Journal*. 2015, **8**(2), 181-191. DOI: 10.3920/WMJ2014.1797. ISSN 1875-0710.

[18] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-802-6042-433.

[19] HOLZBECHER, Záviš a Jaroslav CHURÁČEK. *Analytická chemie*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1987.

[20] Vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie [online]. [cit. 2020-02-16]. Dostupné z: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS3/hypertext/AJAOI.htm

[21] KRÁLOVÁ, Blanka. *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 978-80-7080-449-0.

[22] AYDIN, Suleyman. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*. 2015, **72**, 4-15. DOI: 10.1016/j.peptides.2015.04.012. ISSN 01969781.

[23] GAN, Stephanie D. a Kruti R. PATEL. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013, **133**(9), 1-3. DOI: 10.1038/jid.2013.287. ISSN 0022202X.

[24] The principle and method of ELISA. *MBL Life Science* [online]. [cit. 2020-04-19]. Dostupné z: http://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/elisa.html

[25] MUSCARELLA, Marilena, Marco IAMMARINO, Donatella NARDIELLO, Sonia LO MAGRO, Carmen PALERMO, Diego CENTONZE a Domenico PALERMO. Validation of a confirmatory analytical method for the determination of aflatoxins $B_1$, $B_2$, $G_1$ and $G_2$ in foods and feed materials by HPLC with on-line photochemical derivatization and fluorescence detection. *Food Additives and Contaminants*. 2009, **26**(10), 1402-1410. DOI: 10.1080/02652030903107906. ISSN 1944-0049.

[26] GORYACHEVA, I. Y., S. De SAEGER, S. A. EREMIN a C. Van PETEGHEM. Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection: Evolution from single to multiple analyte screening. *Food Additives and Contaminants*. 2007, **24**(10), 1169-1183. DOI: 10.1080/02652030701557179. ISSN 0265-203X.

[27] KOLOSOVA, Anna Yu, Won-Bo SHIM, Zheng-You YANG, Sergei A. EREMIN a Duck-Hwa CHUNG. Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin $B_1$. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2006, **384**(1), 286-294. DOI: 10.1007/s00216-005-0103-9. ISSN 1618-2642.

[28] KHATKHATAY, M. Ikram, Meena DESAI, Zheng-You YANG, Sergei A. EREMIN a Duck-Hwa CHUNG. A Comparison of Performances of Four Enzymes Used in Elisa with Special Reference to β-Lactamase. *Journal of Immunoassay*. 1999, **20**(3), 151-183. DOI: 10.1080/01971529909349349. ISSN 0197-1522.

[29] CZAPLICKI, Sylwester. Chromatography in Bioactivity Analysis of compounds. *Column Chromatography*. InTech, 2013, 2013-04-10. DOI: 10.5772/55620. ISBN 978-953-51-1074-3.

[30] KOK, W. Th. Derivatization reactions for the determination of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1994, **659**(1-2), 127-137. DOI: 10.1016/0378-4347(94)00152-9. ISSN 03784347.

[31] RASCH, Claudia, Maike BÖTTCHER a Michael KUMKE. Determination of aflatoxin B1 in alcoholic beverages: comparison of one- and two-photon-induced fluorescence. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010, **397**(1), 87-92. DOI: 10.1007/s00216-010-3530-1. ISSN 1618-2642.

[32] STEINBRÜCK, Dörte, Claudia RASCH a Michael U. KUMKE. Photophysics of Ochratoxin A in Aqueous Solution: comparison of one- and two-photon-induced fluorescence. *Zeitschrift für Naturforschung B*. 2008, **63**(11), 1321-1326. DOI: 10.1515/znb-2008-1111. ISSN 1865-7117.

[33] Derivatizační techniky v HPLC. *HPLC.CZ* [online]. [cit. 2020-04-19]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Tip/derivatizace.htm

[34] ČSN EN ISO 16050 (560006). *Potraviny - Stanovení aflatoxinu $B_1$ a celkového obsahu aflatoxinů $B_1$, $B_2$, $G_1$ a $G_2$ v obilovinách, ořeších a výrobcích z nich - Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie*. 2013.

[35] BEAVER, Rodney W. Determination of aflatoxins in corn and peanuts using high performance liquid chromatography. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 1989, **18**(3), 315-318. DOI: 10.1007/BF01062354. ISSN 0090-4341.

[36] JOSHUA, Henry. Determination of aflatoxins by reversed-phase high-performance liquid chromatography with post-column in-line photochemical derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*. 1993, **654**(2), 247-254. DOI: 10.1016/0021-9673(93)83367-2. ISSN 00219673.

[37] JANSEN, H., R. JANSEN, U. A. Th. BRINKMAN a R. W. FREI. Fluorescence enhancement for aflatoxins in HPLC by post-column split-flow iodine addition from a solid-phase iodine reservoir. *Chromatographia*. 1987, **24**(1), 555-559. DOI: 10.1007/BF02688544. ISSN 0009-5893.

[38] ČSN EN 14123 (560069). *Potraviny - Stanovení aflatoxinu $B_1$ a sumy aflatoxinů $B_1$, $B_2$, $G_1$ a $G_2$ v lískových oříšcích, arašídech, pistáciích, fících a práškové paprice - Metoda HPLC s postkolonovou derivatizací a s přečištěním na imunoafinitní kolonce*. 2013.

[39] KOBRA® CELL Instruction Manual. *R-Biopharm AG* [online]. [cit. 2020-04-19]. Dostupné z: https://food.r-biopharm.com/wp-content/uploads/sites/2/2017/06/KOBRA-CELL-K01V19.pdf

[40] GARNER, R. Colin, Matthew M. WHATTAM, Patrick J.L. TAYLOR a Martin W. STOW. Analysis of United Kingdom purchased spices for aflatoxins using an immunoaffinity column clean-up procedure followed by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1993, **648**(2), 485-490. DOI: 10.1016/0021-9673(93)80433-9. ISSN 00219673.

[41] CEPEDA, A., C. M. FRANCO, C. A. FENTE, B. I. VÁZQUEZ, J. L. RODRÍGUEZ, P. PROGNON a G. MAHUZIER. Postcolumn excitation of aflatoxins using cyclodextrins in liquid chromatography for food analysis. *Journal of Chromatography A*. 1996, **721**(1), 69-74. DOI: 10.1016/0021-9673(95)00566-8. ISSN 00219673.

[42] PAPADOPOULOU-BOURAOUI, Andri, Joerg STROKA a Elke ANKLAM. Comparison of Two Post-Column Derivatization Systems, Ultraviolet Irradiation and Electrochemical Determination, for the Liquid Chromatographic Determination of Aflatoxins in Food. *Journal of AOAC International*. 2002, **85**(2), 411–416. DOI: 10.1093/jaoac/85.2.411. ISSN - .

[43] RAHMANI, A., S. JINAP, A. KHATIB a C. P. TAN. Simultaneous Determination of Aflatoxins, Ochratoxin A, and Zearalenone in Cereals Using a Validated RP-HPLC Method and PHRED Derivatization System. *Journal of AOAC International*. 2013, **36**(5), 600-617. DOI: 10.1080/10826076.2012.670182. ISSN 1082-6076.

[44] Vicam Product Guide 2019. *Vicam* [online]. [cit. 2020-04-19]. Dostupné z: http://vicam.com/pdf/Product-Guide-2019.pdf

[45] Mycotoxin analysis – rapid and reliable. R-Biopharm AG [online]. [cit. 2020-04-19]. Dostupné z: https://food.r-biopharm.com/analytes/mycotoxins/

[46] Sample Cleanup Columns for Mycotoxins. *Romer Labs* [online]. [cit. 2020-04-19]. Dostupné z: https://www.romerlabs.com/en/products/cleanup-columns/

[47] CHAN, D., S. J. MACDONALD, V. BOUGHTFLOWER a P. BRERETON. Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in food using a fully automated immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography–fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*. 2004, **1059**(1-2), 13-16. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.09.096. ISSN 00219673.

[48] GÖBEL, Roswitha a Klaus LUSKY. Simultaneous Determination of Aflatoxins, Ochratoxin A, and Zearalenone in Grains by New Immunoaffinity Column/Liquid Chromatography. *Journal of AOAC International*. 2004, **87**(2), 411-416. DOI: 10.1093/jaoac/87.2.411. ISSN 1060-3271.

[49] TRUCKSESS, Mary W., Carol M. WEAVER, Carolyn J. OLES, Frederick S. FRY a Gregory O. NOONAN. Determination of Aflatoxins $B_1$, $B_2$, $G_1$, and $G_2$ and Ochratoxin A in Ginseng and Ginger by Multitoxin Immunoaffinity Column Cleanup and Liquid Chromatographic Quantitation: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*. 2008, **91**(3), 511-523. DOI: - .

[50] TURCOTTE, Anne-Marie, Peter M. SCOTT a Brett TAGUE. Analysis of cocoa products for ochratoxin A and aflatoxins. *Mycotoxin Research*. 2013, **29**(3), 193-201. DOI: 10.1007/s12550-013-0167-x. ISSN 0178-7888.

[51] WAN AINIZA, W. M., S. JINAP a M. SANNY. Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in single and mixed spices. *Food Control*. 2015, **50**, 913-918. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.10.051. ISSN 09567135.

[52] IRAKLI, Maria N., Adriana SKENDI a Maria D. PAPAGEORGIOU. HPLC-DAD-FLD Method for Simultaneous Determination of Mycotoxins in Wheat Bran. *Journal of Chromatographic Science*. 2017, **55**(7), 690-696. DOI: 10.1093/chromsci/bmx022. ISSN 0021-9665.

[53] Definice: Konfirmace - Kvalifikace - Validace. *HPLC.CZ* [online]. [cit. 2020-04-19]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Validace/definice.html

[54] ČSN EN ISO/IEC 17025 (015253). *Všeobecné požadavky na kompetenci zkušebních a kalibračních laboratoří*. 2018.

[55] Validační program pro statistické zpracování analytických dat. *HPLC.CZ* [online]. [cit. 2020-04-19]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Validace/program_validace.htm#_ftn2

[56] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.

[57] AflaOchra HPLC Instruction Manual. *Vicam* [online]. [cit. 2020-04-20]. Dostupné z: https://vicam.worldsecuresystems.com/Default.aspx?PageID=4898897

[58] Core-Shell Science. *Phenomenex* [online]. [cit. 2020-04-19]. Dostupné z: https://www.phenomenex.com/Kinetex/CoreShellTechnology

[59] What is Endcapping? *Silicycle Inc.* [online]. [cit. 2020-04-19]. Dostupné z: https://www.silicycle.com/faq/what-is-endcapping

[60] MCGINLEY Michael, Lawrence LOO, Jeff LAYNE, Terrell MATHEWS, Ismail RUSTAMOV, Emmet WELCH, Mike CHITTY a Tivadar FARKAS. Complementary Selectivities of Kinetex® Core-Shell Phases: C18, XB-C18, C8 and PFP. *Phenomenex* [online]. [cit. 2020-04-19]. Dostupné z: https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/60a3dd7a-40ec-498b-a461-7b0aaae5c97c.pdf

[61] MALIR, Frantisek, Vladimir OSTRY, Annie PFOHL-LESZKOWICZ, Jan MALIR a Jakub TOMAN. Ochratoxin A: 50 Years of Research. *Toxins*. 2016, **8**(7). DOI: 10.3390/toxins8070191. ISSN 2072-6651.

[62] Fotochemické derivatizační reakce. *HPLC.CZ* [online]. [cit. 2020-04-19]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Tip/photochem_reactor.htm

[63] Teorie toku mobilní fáze postkolonovým reaktorem. *HPLC.CZ* [online]. [cit. 2020-04-20]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Tip/pcrs_extra_column_band.htm

[64] POURETEDAL, Zohreh a Mansooreh MAZAHERI. Aflatoxins in black tea in Iran. *Food Additives and Contaminants: Part B*. 2013, **6**(2), 127-129. DOI: 10.1080/19393210.2013.764551. ISSN 1939-3210.

[65] Nařízení komise (ES) č. 401/2006, kterým se stanoví metody odběru vzorků a metody analýzy pro úřední kontrolu množství mykotoxinů v potravinách, 2006.

[66] Phosphate Buffer (pH 5.8 to 7.4) Preparation and Recipe. *AAT Bioquest* [online]. [cit. 2020-05-18]. Dostupné z: https://www.aatbio.com/resources/buffer-preparations-and-recipes/phosphate-buffer-ph-5-8-to-7-4

[67] VISWANATH, Prema, Divyashree Kallendahalli NANJEGOWDA, Hemalatha GOVINDEGOWDA, Akshatha MALEBENNUR DATTATREYA a Vinutha SIDDAPPA. Aflatoxin Determination in Black Tea (Camellia sinensis) - Status and Development of a Protocol. *Journal of Food Safety*. 2012, **32**(1), 13-21. DOI: 10.1111/j.1745-4565.2011.00339.x. ISSN 01496085.

[68] PRADO, Guilherme, Aline F. ALTOÉ, Tatiana C. B. GOMES, et al. Occurrence of aflatoxin $B_1$ in natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2012, **43**(4), 1428-1435. DOI: 10.1590/S1517-83822012000400026. ISSN 1517-8382.

[69] DIAZ, Gonzalo J, Sandra M CEPEDA a Perry A MARTOS. Stability of Aflatoxins in Solution. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 2012, **95**(4), 1084-1088. DOI: 10.5740/jaoacint.11-017. ISSN 1060-3271.

[70] Nařízení komise (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, 2006.