

VÝVOJ METODIKY EXTRAKCE NA TUHÉ FÁZI A HPLC-MS PRO STANOVENÍ DEOXYNIVALENOLU V JEČMENI A SLADU

ALENA JEŽKOVÁ^a, JANA ŽDÁROVÁ KARASOVÁ^b, VLASTIMIL DOHNAL^{a,b,c} a IVANA POLIŠENSKÁ^d

^a Ústav technologie potravin, Agronomická fakulta, MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ^b Katedra toxikologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Třebušská 1575, 500 01 Hradec Králové, ^c Katedra chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem, České mládeže 8, 400 96 Ústí nad Labem, ^d Agrotest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž
dohnal@mendelu.cz

Došlo 4.3.08, přepracováno 17.10.08, přijato 6.11.08.

Klíčová slova: mykotoxin, deoxynivalenol, HPLC-MS, ječmen, slad

Úvod

Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity mikroskopických vláknitých hub, vyvolávající různé toxické syndromy, souhrnně nazývané mykotoxikózy. Mykotoxiny se vyskytují na všech úrovních potravního řetězce¹. Současné výzkumy dokazují, že riziko mykotoxinů existuje na celém světě, včetně průmyslově vyspělých států². Z chemického hlediska se mykotoxiny řadí mezi vysoce stabilní nízkomolekulární organické sloučeniny nebilkovinné povahy³.

Deoxynivalenol (DON) je mykotoxin produkovaný plísněmi rodu *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*), které jsou běžnými patogeny obilnin⁴. DON patří k celosvětově nejrozšířenějším trichothečenům⁵. Z toxikologického hlediska jsou akutní negativní zdravotní účinky deoxynivalenolu charakterizovány zejména střevními potížemi a zvracením². Během výroby piva deoxynivalenol přechází z kontaminovaného ječmene do sladu a následně pak do sladiny. V průběhu dalších kroků zpracování již nedochází k jeho odstranění či degradaci. Částečně se jeho koncentrace v pivu může snížit sorpcí na komponenty buněčné stěny (zejména β -D-glukomanany) pивních kvasinek. Není zcela jisté, jak dalece může konzumace piva obsahujícího mykotoxiny ohrozit lidské zdraví⁶, ale jeho přítomnost, kromě jiných faktorů, může vést ke vzniku nežádoucího jevu zvaného „gushing“, nebo-li přepěňování piva^{7,8}. Tento úkaz je velmi komplexní a může souviset i s produkcí specifických metabolitů plísní, mezi

kteří patří např. relativně malé proteiny zvané hydrofobiny^{9,10}.

Přímé stanovení DON ve vzorcích rostlinného původu bez jejich předchozí úpravy je vzhledem ke složitosti matrice velmi obtížné. Proto jsou pro přípravu vzorku k analýze užívány různé postupy, které mají za úkol vliv této matrice minimalizovat. Nejčastěji používanou metodou je extrakce na tuhou fázi (solid phase extraction, SPE)¹¹. Zde bývá s různou výtěžností aplikována celá řada sorbentů, jako jsou např. aktivní uhlí-alumina, iontově výměnné pryskyřice, silica, Florisil¹², grafitizované saze (GCB), MycoSep kolonky a imunoafinitní kolonky¹³.

K vlastnímu stanovení DON v potravinách se v poslední době používají chromatografické metody, jako je např. plynová chromatografie s detektorem elektronového záchytu (ECD)¹² nebo s hmotnostním detektorem, vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí či superkritická fluidní chromatografie¹⁴. Kromě těchto metod jsou často aplikovány imunologické postupy, např. radioimunologická analýza (RIA) či enzymová imunoanalýza (ELISA)¹⁵.

Cílem práce bylo vyvinutí a zavedení metodiky pro extrakci mykotoxinů z ječmene a sladu a následně i jejich stanovení pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Metodika byla poté využita k hodnocení kontaminace zrna ječmene a z něj vyrobeného sladu a k posouzení vlivu sladování na obsah DON.

Experimentální část

Přístroje

Stanovení obsahu DON ve vzorcích bylo prováděno na kapalinovém chromatografu Agilent HP1100 (Agilent, Palo Alto, USA), sestávajícího z vakuové odplyňovací jednotky (model G1322A), kvartérního čerpadla mobilní fáze (G1311A), automatického dávkovače vzorku (G1313A), UV-VIS detektoru s nastavitelnou vlnovou délkou (G1314A), fluorescenčního detektoru (G1321A) a kvadrupólového hmotnostního detektoru (G1946VL) s ionizační elektrosprejem.

Standard DON byl zakoupen u firmy Sigma-Aldrich, s. r. o. (Praha, ČR). Z něj byl poté rozpuštěním v acetonitrilu připraven zásobní roztok o koncentraci 0,2 mg ml⁻¹. Roztok byl uchováván při teplotě -18 °C. Metoda HPLC-MS stanovení DON byla vyvíjena s roztoky čistého standardu. Ty byly připravovány vždy čerstvé ze zásobního roztoku DON v acetonitrilu o koncentraci 0,2 mg ml⁻¹ ředěním. Veškeré použité chemikálie odpovídaly chromatografické čistotě a byly dodány firmou Sigma-Aldrich, s. r. o.

Vzorky ječmene a sladu

Vzorky ječmene a sladu byly získány od firmy Agrotest fyto, s.r.o (Kroměříž, Česká republika). Jednalo se o vzorky několika odrůd ječmene pěstovaných v různých

oblastech České republiky a po různých předplodinách. Sladování bylo prováděno v laboratoři VÚPS a.s., Sladařského ústavu v Brně. Pro kontrolu byl u všech vzorků obsah DON stanoven nejprve komerčními kity ELISA (RIDASCREEN® FAST DON; výrobce R-Biopharm, Darmstadt, Německo) s limitem detekce (LOD) pro ječmen $12 \mu\text{g kg}^{-1}$, pro slad $62 \mu\text{g kg}^{-1}$ a limitem kvantifikace (LOQ) pro ječmen $42 \mu\text{g kg}^{-1}$ a pro slad $190 \mu\text{g kg}^{-1}$. Výtěžnost metody pro obě matrice odpovídá 110 %.

Příprava vzorku

Navážka 1 g ječmene byla jemně rozemleta a extrahována 10 ml směsí acetonitril (ACN)/voda (84/16, v/v) po dobu 2 min na míchačce (MS2 Minishaker IKA, USA) a vzniklá suspenze byla centrifugována při $10\,000 \text{ ot min}^{-1}$ po dobu 10 min (centrifuga Universal 32 R, Hettich Zentrifugen, Německo). Pevný zbytek byl opět extrahován $2 \times 7 \text{ ml}$ směsí ACN/voda (84/16, v/v), centrifugován, extrakty spojeny a odpařeny do sucha na vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn v 1 ml směsí ACN/voda (84/16), smíchán s 5 ml vody a přefiltrován přes membránový polytetrafluorethylenový filtr (SMI-LabHut Ltd., UK) o velikosti pórů $0,20 \mu\text{m}$. Takto připravený roztok byl přečištěn extrakcí na tuhé fázi (SPE) na vakuovém manifoldu (Supelco, USA). K extrakci byly na základě dat z literatury¹³ vybrány kolonky Envicarb (Supelco, USA). Ty byly předem kondicionovány 10 ml vody a 0,3 ml methanolu. Matrice byla vymyta 3 ml směsí ACN/voda (84/16) a následně byl DON vymyt 2,5 ml methanolu, 5 ml methanolu okyseleného 0,095 ml kyseliny mravenčí a nakonec opět 2,5 ml methanolu. Získaný extrakt byl po odpaření pod mírným proudem dusíku do sucha rozpuštěn v 0,75 ml mobilní fáze (1 mmol l^{-1} kyselina mravenčí/ACN, 90/10, v/v). Takto připravený vzorek byl použit k vlastnímu stanovení na HPLC/MS.

Analýza pomocí HPLC/MS

K separaci byla použita dle cit.¹⁶ chromatografická kolona LUNA C18(2) o rozměrech $250 \times 4,6 \text{ mm}$, plněná částicemi o velikosti $5 \mu\text{m}$ (Phenomenex, USA). Mobilní fáze pro eluci DON měla složení 1 mmol l^{-1} kyselina mravenčí/ACN (90/10, v/v) a průtok 1 ml min^{-1} . Detekce probíhala na MS detektoru v pozitivním módu (DON jako

$[\text{DON} + \text{H}]^+$, $m/z = 297$ a $[\text{DON} + \text{Na}]^+$, $m/z = 319$). Nalezené optimální hodnoty jednotlivých parametrů MS detektoru jsou uvedeny v tabulce I. Čas potřebný k analýze činí 15 min a eluční čas deoxynivalenolu je roven 10,9 min. Proces separace byl prováděn při laboratorní teplotě.

Kalibrace

Kalibrační křivka byla sestavena metodou standardního přídatku. Postup zpracování vzorku pro kalibraci odpovídal postupu použitého pro úpravu reálného vzorku. Před vlastním zpracováním vzorku bylo k navážce obiloviny přidáno požadované množství standardu DON. Více k problematice kalibrace pomocí metody standardního přídatku např. v publikaci¹⁷.

Výsledky a diskuse

Extrakce a čištění vzorku

Při zpracování rostlinné matrice bylo vycházeno z publikovaného postupu¹³. Podle potřeby byly jednotlivé kroky modifikovány na námi použitou instrumentaci. Extrakce DON byla nejprve vyvíjena s čistým standardem a teprve poté aplikována na reálné vzorky. K extrakci byly vybrány SPE kolonky Envicarb od firmy Supelco, LiChrolut EN od firmy Merck s. r. o. (Říčany, ČR) a komerční jednorázová kolonka MycoSep 225 (Romer Labs, Tulln, Rakousko). U všech typů kolonek byla sledována výtěžnost DON a také reprodukovatelnost extrakčního procesu. Dále byl testován i vliv objemu rozpouštědla, ve kterém byl vzorek rozpuštěn před průchodem kolonou, na množství zachyceného DON. Výtěžnost byla sledována pro tři koncentrační hladiny, a to podlimitní ($500 \mu\text{g kg}^{-1}$), limitní ($1250 \mu\text{g kg}^{-1}$) a nadlimitní ($5000 \mu\text{g kg}^{-1}$). Nejvyšší výtěžnost DON v oblasti koncentrací kolem $1250 \mu\text{g kg}^{-1}$ obilniny (maximální povolený limit z Nařízení Komise Evropského společenství č. 1881/2006 (cit.¹⁸)) vykazovaly kolonky Envicarb (84,6 %), zatímco kolonky LiChrolut a MycoSep měly hodnoty výtěžností velmi podobné (65,9 a 64,1 %). Jako nejvhodnější pro další práci byla proto zvolena kombinace kolonky Envicarb a vzorku rozpouštěného v 5 ml vody. K vymytí DON sloužil methanol a methanol okyselený kyselinou mravenčí (0,19 ml/10 ml

Tabulka I
Parametry hmotnostního detektoru

Parametr	Optimální hodnota	Rozmezí sledovaných hodnot
Průtok sušícího plynu, 1 min^{-1}	13	5 až 13
Tlak rozprašovače, kPa (Psig)	345 (50)	138 až 414 (20 až 60)
Napětí na kapiláře elektrospreje, V	4500	1500 až 6000
Teplota, °C	350	150 až 350
Fragmentor, V	125	0 až 400

methanolu). Byl studován vliv objemu elučního činidla na výtěžnost DON. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití 2,5 ml methanolu, 5 ml okyseleného methanolu a nakonec opět 2,5 ml methanolu.

Chromatografické stanovení deoxynivalenolu

Důležitým krokem při vývoji chromatografické separace bylo stanovení nevhodnějšího složení mobilní fáze. Byla použita izokratická eluce při poměru vodné fáze a ACN (90:10). U vodné fáze byl sledován vliv přidavku kyseliny mravenčí o různé koncentraci (0; 0,01; 0,1 a 1 mmol l⁻¹). Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití mobilní fáze s 1 mmol l⁻¹ kyselinou mravenčí. Ta za použitých podmínek metody nejvíce podporovala ionizaci molekuly DON, potřebnou pro její stanovení na hmotnostním detektoru. Citlivost metody byla dále zvýšena opětovnou optimalizací jednotlivých parametrů hmotnostního

detektoru (viz výše).

LOD vyvinuté metody pro stanovení obsahu DON ve vzorcích ječmene (sladu) je roven 25 µg kg⁻¹ = 0,033 µg ml⁻¹ (30 µg kg⁻¹ = 0,040 µg ml⁻¹) a limit kvantifikace 83 µg kg⁻¹ = 0,110 µg ml⁻¹ (100 µg kg⁻¹ = 0,133 µg ml⁻¹). V porovnání s výchozí prací¹⁶, kde sloužil k analýze systém HPLC-UV, se nám LOD s roztokem čistého standardu podařilo snížit téměř desetkrát (LOD HPLC/UV = 0,095 µg DON/ml, LOD HPLC/MS = 0,01 µg DON/ml). Limit detekce publikovaných metod určených k analýze obilovin je následující: ve vzorcích pšenice LOD = 50 µg kg⁻¹ (cit.¹⁹), LOD = 40 µg kg⁻¹ (cit.²⁰), kukuřice LOD = 60 µg kg⁻¹ (cit.¹¹).

Byla provedena validace metody v rámci jednoho dne (10 měření), kdy relativní směrodatná odchylka (RSD) nepřesáhla 6,08 % a v rámci pěti dnů (25 měření) s RSD 6,54 %.

Tabulka II

Srovnání metod ELISA a HPLC-MS při stanovení obsahu deoxynivalenolu ve vzorcích ječmene a sladu (množství DON v µg kg⁻¹)

Odrůda ječmene	Předplodina	ELISA ^{a,b}		HPLC/MS ^{a,b}	
		ječmen	slad	ječmen	slad
Bojos	kukuřice	138	pod LOQ	pod LOQ	pod LOQ
Diplom	cukrovka	pod LOQ	pod LOD	pod LOD	pod LOD
Jersey	pšenice	51	pod LOD	pod LOD	pod LOD
Jersey	kukuřice	pod LOQ	pod LOD	pod LOD	pod LOQ
Jersey	mák	pod LOD	pod LOD	pod LOD	pod LOD
Malz	cukrovka	92	pod LOD	104	pod LOQ
Malz	cukrovka	50	pod LOD	pod LOD	pod LOD
Malz	pšenice ozimá	58	pod LOD	pod LOD	pod LOD
Malz	kukuřice	53	349	pod LOD	112
Prestige	cukrovka	56	pod LOD	103	109
Prestige	cukrovka	pod LOQ	pod LOD	pod LOD	pod LOD
Prestige	pšenice ozimá	55	pod LOD	pod LOD	pod LOD
Prestige	pšenice	pod LOQ	pod LOD	pod LOD	pod LOD
Prestige	ječmen jarní	835	295	641	499
Prestige	slunečnice	42	pod LOD	pod LOQ	127
Prudentia	kukuřice	pod LOQ	pod LOQ	177	231
Sebastian	–	53	193	pod LOD	pod LOQ
Sebastian	cukrovka	63	pod LOQ	pod LOQ	pod LOQ
Sebastian	kukuřice	59	299	pod LOQ	pod LOQ
Tolar	soja	103	pod LOD	pod LOQ	pod LOQ
LOQ ^b		42	190	83	100
LOD ^a		12	62	25	30

^a LOD – limit detekce; ^b LOQ – limit kvantifikace

Výsledky měření

20 vzorků ječmene a z nich vyrobených 20 vzorků sladu bylo analyzováno na obsah DON. Při použití SPE extrakce a HPLC-MS analýzy převyšovalo množství DON LOQ v devíti případech (viz tab. II). Analýzami provedenými pomocí kitů ELISA RIDASCREEN® FAST DON, se podařilo kvantifikovat DON celkem v 18 vzorcích. Při porovnávání výsledků je nutné přihlídnout k faktu, že LOQ byl nižší u vzorků ječmene než u sladu (ELISA 5,2× nižší, HPLC/MS 1,2× nižší), tudíž nebylo možné vyhodnotit velmi nízké koncentrace DON v materiálu po sladování. V případech, kdy se množství DON pohybovalo pod LOQ ve výchozím materiálu, nebylo jeho množství s jedinou výjimkou stanovitelné ani po procesu sladování. Z naměřených hodnot u pozitivních variant je zřejmé, že obsah DON ve sladu někde převýšil jeho obsah v korespondujících vzorcích ječmene, v některých případech byl naopak nižší. Schwarz a spol.²¹ sledovali změny obsahu ergosterolu a DON v průběhu sladování. Hodnoty obsahu DON v zeleném sladu činily 18–114 % hodnoty obsahu DON v původních vzorcích ječmene, u uhvozdného sladu bylo rozpětí těchto hodnot 16–100 %. U kontaminovaného ječmene se může obsah DON zvýšit v průběhu máčení, klíčení a na počátku hvozdní ječmene, kdy jsou nastoleny ideální podmínky pro růst plísní a další produkci mykotoxinů^{4,5,22}. Na straně druhé může dojít k poklesu množství DON a to při máčení zrna, díky odstranění prachu a splavků, a také vyloužením deoxynivalenolu do máčecí vody^{6,10}. Vztahy mezi obsahem DON v ječmeni a ve sladu jsou obecně velmi různorodé a závisí jak na odrůdě ječmene, tak také na technologických podmínkách sladování²³.

Závěr

Cílem práce bylo vyvinutí a zavedení metodiky pro extrakci a stanovení DON v obilovinách dostupnou instrumentací. K SPE extrakci DON z rostlinného materiálu byla vybrána velmi účinná kolonka Envicarb (Supelco). K vlastnímu stanovení byl použit kapalinový chromatograf s hmotnostní detekcí. LOD pro vzorky ječmene (sladu) je roven 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (30 $\mu\text{g kg}^{-1}$) a LOQ 83 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (100 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Doba analýzy odpovídá 15 min, což ji předurčuje jako vhodné řešení pro větší série analýz. Vyvinutá metoda je relativně levná, rychlá a má dostatečnou citlivost, zaručující stanovení nízkých koncentrací DON v obilovinách. Aplikací tohoto postupu jsme získali hodnoty obsahu DON ve vzorcích ječmene a z něj vyprodukovaného sladu. Naměřené výsledky jednoznačně neprokázaly pokles nebo nárůst obsahu DON v procesu sladování. Obsah DON ve všech analyzovaných vzorcích byl pod maximálním povoleným limitem daným legislativou.

Autoři děkují Grantové agentuře Ministerstva obrany České republiky za finanční podporu tohoto projektu (grant č. OPUOFVZ200604).

LITERATURA

1. Žabka M., Jegorov A.: Chem. Listy 96, 607 (2002).
2. Malif F., Ostrý V.: *Vláknité mikromycety (plísně), mykotoxiny a zdraví člověka*. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských oborů, Brno 2003.
3. Suchý P., Herzig I.: <http://www.vuzv.cz/vyziva/studie14.rtf>, staženo 17. 9. 2007.
4. Klem K., Váňová M., Hajšlová J., Lancová K., Sehnalová M.: Plant Soil Environ. 53, 421 (2007).
5. Havlová P., Lancová K., Váňová M., Havel J., Hajšlová J.: J. Agric. Food Chem. 54, 1353 (2006).
6. Wolf-Hall C. E.: Int. J. Food Microbiol. 119, 89 (2007).
7. Linko M., Haikara A., Ritala A., Penttilä M.: J. Biotechnol. 65, 85 (1998).
8. Schwarz P. B., Beattie S., Casper H. H.: J. Inst. Brew. 102, 93 (1996).
9. Sarlin T., Nakari-Setälä T., Linder M., Penttilä M., Haikara A.: J. Inst. Brew. 111, 105 (2005).
10. Laitila A.: *Microbes in the Tailoring of Barley Malt Properties. Academic dissertation in Microbiology*, <http://www.vtt.fi/inf/pdf/publications/2007/P645.pdf>, staženo 20.12.2007.
11. Abramović B., Jajić I., Jurić V., Gaál F. F.: J. Serb. Chem. Soc. 70, 1005 (2005).
12. Radová Z., Holadová K., Hajšlová J.: J. Chromatogr., A 829, 259 (1998).
13. Cavaliere C., D'ascenzo G., Foglia P., Pastorini E., Samperi R., Lagana A.: Food Chem. 92, 559 (2005).
14. Langseth W., Rundberget T.: J. Chromatogr., A 815, 103 (1998).
15. Usleber E., Martlbauer E., Dietrich R., Terplan G.: J. Agric. Food Chem. 39, 2091 (1991).
16. Jedličková L.: *Diplomová práce*. Masarykova univerzita, Brno 2007.
17. Dohnal V., Kaderová I., Ježková A., Skládanka J.: Acta Univ. Agric. et Silv. Mendel. Brun. 15, 9 (2007).
18. *Nařízení Komise č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách*, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:CS:PDF>, staženo 15. 3. 2007.
19. Kotal F., Holadová K., Hajšlová J., Poustka J., Radová Z.: J. Chromatogr., A 830, 219 (1999).
20. Krska R.: J. Chromatogr., A 815, 49 (1998).
21. Schwarz P., Casper H., Beattie S.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 53, 121 (1995).

22. Wolf-Hall C. E., Schwarz P. B., v knize: *Mycotoxins and Food Safety* (DeVries J. W., Trucksess M. W., Jackson L. S., ed.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York 2002.
23. Sypecká Z., Havlová P., Nevrková M.: *Kvasný Průmysl* 49, 146 (2003).

A. Ježková^a, J. Karasová^b, V. Dohnal^{a,b,c}, and I. Polišenská^d (^a *Department of Food Technology, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno*, ^b *Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Hradec Králové*, ^c *Department of Chemistry, Faculty of Science, J.E. Purkyně University, Ústí nad Labem*, ^d *Agrotest Fyto Ltd, Kroměříž*): **Development of Solid-Phase Extraction and HPLC/MS Methods for Deoxynivalenol Determination in Barley and Malt**

A method for the determination of deoxynivalenol (DON) in cereals has been developed and tested. The method is based on solid phase extraction in a column and subsequent separation by HPLC-MS. DON was detected with a MS detector in positive mode. The method is inexpensive, fast and highly sensitive. The method was used for the determination of deoxynivalenol in barley and malt, with the detection limit 25–30 µg kg⁻¹. Changes in the DON content after malting were followed using the method.



SPECIALISTA PRODEJE

Náplň práce:

- Vyhledávání a udržování kontaktů se zákazníky
- Marketing a prodej přiděleného portfolia výrobků
- Marketingové průzkumy, monitoring a vyhodnocování konkurenčních aktivit
- Organizace a vedení marketingových akcí a kampaní
- Udržování a posilování dobrého jména společnosti

Požadavky:

- VŠ vzdělání – chemie, biochemie, případně farmacie
- Angličtina – schopnost plynule hovořit i na odborné úrovni
- Předchozí zkušenost z obchodu a marketingu
- Výborné obchodní a prezentační dovednosti, dobrý mluvený i psaný projev pro komunikaci s představiteli výzkumných ústavů, lékaři, obchodními manažery
- Ochota často cestovat
- Řidičský průkaz B
- Nástup ihned

Co nabízíme:

- Finanční ohodnocení odpovídající dosaženým výsledkům
- Odborné vzdělávání v rámci dynamického a vysoce motivovaného pracovního týmu
- Služební automobil, mobilní telefon
- Zázemí mezinárodní společnosti se sídlem v USA
- 5 týdnů dovolené