

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
**Katedra analytické chemie**

Kontrola obsahu mykotoxinů ve vybraných potravních doplňcích  
Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 11. 5. 2023

Nikola Přívratká

Ráda bych poděkovala panu prof. RNDr. Daliboru Šatínskému, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a pomoc při experimentální práci v laboratoři a při vypracování mé diplomové práce.

## Abstrakt

**Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra analytické chemie**

**Kandidát:** Bc. Nikola Přivratská

**Školitel:** prof. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Kontrola obsahu mykotoxinů ve vybraných potravních doplňcích

Pro vývoj metody ke stanovení mykotoxinu ochratoxinu A (OTA) v potravních doplňcích s obsahem extraktu z ostropestřce mariánského bylo využito spojení vysokoučinné kapalinové chromatografie (HPLC) s on-line extrakcí na tuhou fázi (SPE). Vzorek potravního doplňku extrahovaný do směsi methanol – voda v poměru 1:9 byl dávkován o objemu 50  $\mu$ l na extrakční kolonu Ascentis Express RP-Amide (5 x 2,1 mm, velikost částic 5  $\mu$ m), kde byl promýván od interferujících složek matrice 20% methanolem při průtoku 1 ml/min. Po 1 minutě došlo k přepnutí ventilu a OTA byl eluován z extrakční kolony na analytickou kolonu Ascentis Express Phenyl-Hexyl (100 x 4,6 mm, velikost částic 5  $\mu$ m). Separace probíhala při 40 °C za gradientové eluce s mobilní fází acetonitril/0,5% kyselina octová, která protékala kolonou rychlostí 1 ml/min. Fluorescenční detekce OTA byla provedena při vlnových délkách Ex 355 nm, Em 460 nm. Celková analýza zahrnující on-line úpravu vzorku a separaci trvala 9 minut. Metoda byla validována pro dva typy matrice, přičemž limit kvantifikace pro potravní doplňky ve formě tobolek/tablet byl stanoven na 1  $\mu$ g/l a pro doplňky ve formě kapek na 0,5  $\mu$ g/l.

**Klíčová slova:** HPLC, on-line SPE, ochratoxin A, ostropestřec mariánský

## **Abstract**

**Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Analytical Chemistry**

**Candidate:** Bc. Nikola Přivratská

**Supervisor:** prof. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

**Title of the diploma thesis:** Control of mycotoxin content in food supplements

Due to the growing popularity of nutraceuticals, some concerns about their quality and safety have been expressed. The presented work describes the development of a fast method for mycotoxin ochratoxin A (OTA) determination using high performance liquid chromatography (HPLC) and column switching technique in combination with on-line solid phase extraction (SPE). The method was used for direct determination of OTA in milk thistle-based nutraceuticals. Nutraceuticals were extracted by methanol – water solution in a ratio of 1:9. A volume of 50 µl of the extracted sample was injected on the extraction column Ascentis Express RP-Amide (5 x 2.1 mm, 5 µm particle size). The sample was cleaned from interfering compounds with 20% methanol at a flow rate of 1 ml/min. After a period of 1 minute the valve was switched and mobile phase eluted OTA trapped on the extraction column to the analytical column. Separation was performed by gradient elution on the Ascentis Express Phenyl-Hexyl (100 x 4.6 mm, 5 µm particle size) column using a mobile phase consisting of acetonitrile/0.5% acetic acid at a flow rate of 1 ml/min. OTA was quantified by fluorescence detection at wavelengths Ex 335 nm, Em 460 nm. The total run time including on-line extraction and separation step was 9 min. The method quantification limit was 1 µg/l for food supplements in form of tablets/capsules and 0.5 µg/l for supplements in form of drops.

**Keywords:** HPLC, on-line SPE, ochratoxin A, milk thistle

# Obsah

Použité zkratky.....	9
1 Úvod.....	10
2 Cíl a zadání práce.....	11
3 Teoretická část.....	12
3.1 Mykotoxiny.....	12
3.2 Ochratoxin A.....	12
3.2.1 Toxicita ochratoxinu A .....	13
3.2.2 Legislativa.....	14
3.3 Potravní doplňky .....	16
3.3.1 Kontaminanty potravních doplňků .....	16
3.4 Rostlinné potravní doplňky .....	17
3.4.1 Potravní doplňky z vinné révy.....	17
3.4.2 Potravní doplňky z ginkgo biloby .....	18
3.4.3 Potravní doplňky ze zelené kávy.....	19
3.4.4 Potravní doplňky z ostropestřce mariánského .....	20
3.5 Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	22
3.5.1 Instrumentace v HPLC.....	23
3.5.2 Fluorescenční detekce .....	23
3.6 Úprava vzorků .....	25
3.7 On-line SPE .....	25
3.7.1 Systém přepínání kolon .....	25
3.7.2 Sorbenty SPE kolon .....	27
3.8 Stanovení ochratoxinu A .....	28
4 Experimentální část .....	33

4.1	Použité přístroje a pomůcky .....	33
4.2	Použité chemikálie .....	33
4.3	Použité vzorky .....	34
4.4	Příprava roztoků a vzorků .....	34
4.4.1	Příprava mobilní fáze .....	34
4.4.2	Příprava zásobního extrakčního roztoku .....	34
4.4.3	Příprava zásobního roztoku standardu OTA.....	34
4.4.4	Příprava pracovních roztoků standardu OTA pro kalibraci.....	35
4.4.5	Příprava vzorků potravních doplňků ve formě tablet/tobolek.....	35
4.4.6	Příprava vzorků potravních doplňků ve formě kapek.....	36
4.4.7	Příprava vzorků potravních doplňků pro matricovou kalibraci .....	36
4.4.8	Příprava vzorků potravních doplňků pro výtěžnost a přesnost.....	36
4.5	Parametry měření .....	37
4.6	Optimalizace metody .....	37
4.6.1	Parametry detekce.....	38
4.6.2	Volba mobilní fáze .....	38
4.6.3	Optimalizace gradientové eluce .....	38
4.6.4	Výběr kolony .....	40
4.6.5	Volba promývací fáze.....	43
4.7	Optimální podmínky pro HPLC analýzu.....	48
5	Výsledky.....	50
5.1	Test způsobilosti chromatografického systému (SST) .....	50
5.2	Validace metody.....	51
5.2.1	Linearita .....	51
5.2.2	Opakovatelnost.....	55
5.2.3	Přesnost .....	55

5.2.4	Výtěžnost .....	56
5.2.5	Limit detekce a limit kvantifikace .....	57
5.3	Stanovení ochratoxinu A ve vzorcích potravních doplňků.....	58
6	Závěr a diskuse .....	65
7	Použitá literatura .....	67



## Použité zkratky

DLLE	Disperzní kapalinová mikroextrakce
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FLD	Fluorescenční detekce
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
LLE	Extrakce z kapaliny do kapaliny
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit kvantifikace
MEPS	Mikroextrakce plněným tuhým sorbentem s využitím stříkačky
MIPs	Molekulárně vtištěné polymery
MS	Hmotnostní spektrometrie
OTA	Ochratoxin A
PTFE	Polytetrafluorethylen
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe
RAM	Materiály s omezeným přístupem
RASFF	Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva
SBSE	Sorpční extrakce míchadlem
SPE	Extrakce na tuhou fázi
SPME	Mikroextrakce na tuhou fázi
SZPI	Státní zemědělská a potravinářská inspekce
UV-VIS	Ultrafialové-viditelné záření

## 1 Úvod

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity plísní, které patří mezi hlavní kontaminanty potravin. Vedle ekonomického dopadu představuje kontaminace potravin plísněmi také riziko zdravotní. Za vhodných podmínek produkují toxigenní plísně mykotoxiny, jež mohou mít řadu toxických účinků jako jsou například účinky hepatotoxické, neurotoxické a imunotoxické. Vzhledem k těmto škodlivým účinkům jsou pro vybrané potraviny stanoveny nejvyšší přípustné limity některých mykotoxinů jako jsou aflatoxiny, patulin nebo ochratoxin A (OTA).

Jedním ze zdrojů mykotoxinů mohou být rostlinné potravní doplňky vyrobené z kontaminovaných surovin. Při kontaminaci doplňku stravy mohou pak nad kladnými účinky jeho složek převážit negativní účinky toxinu. Přestože pro potravní doplňky nejsou určeny limity obsahu mykotoxinů, s rostoucím trendem užívání doplňků stravy rostou i nároky na prokázání jejich kvality a bezpečnosti, a proto je potřeba vyvíjet pro jejich kontrolu citlivé a přesné analytické metody.

## **2 Cíl a zadání práce**

Cílem diplomové práce bylo vyvinout, optimalizovat a validovat metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) spojené s on-line extrakcí na tuhou fázi (SPE) pro stanovení OTA.

Úkolem bylo otestovat a vybrat vhodné podmínky on-line úpravy vzorku a následné separace pro analýzu OTA v potravních doplňcích ve formě tablet/tobolek nebo kapek. Pro oba typy matrice byla metoda validována a využita pro analýzu na trhu v ČR dostupných doplňků stravy s obsahem extraktu z ostropestřce mariánského.

## 3 Teoretická část

### 3.1 Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity mikromycet. Tyto nízkomolekulární látky tvoří velmi různorodou skupinu, jejíž nesourodost je dána rozdílnou chemickou strukturou a biosyntetickým původem. Společným znakem mykotoxinů je schopnost zapříčinit onemocnění u člověka a dalších obratlovců již v malých koncentracích.

Klasifikace mykotoxinů je v důsledku různorodosti obtížná a nejednotná. Mohou být uspořádány dle své chemické struktury, biosyntetického původu (polyketidy, námelové alkaloidy, terpeny), toxicity (hepatotoxické, nefrotoxické, neurotoxické, imunotoxické atd.), nebo nejčastěji dle toxigenních mikroskopických vláknitých hub, které je produkují. Mezi významné rody plísní produkující mykotoxiny řadíme rody *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* a *Alternaria*.

V současnosti je známo okolo čtyř set mykotoxinů, z nichž přes třicet je opakovaně studováno jako rizikový toxický nebo disruptivní faktor pro člověka a živočichy. Mezi důležité mykotoxiny související s lidskými a zvířecími nemocemi patří aflatoxiny, citrinin, námelové alkaloidy, fumonisiny, OTA, patulin a zearalenon. Projevy mykotoxikóz u člověka závisí na mnoha faktorech. Kromě druhu a koncentrace toxinu se jedná o dobu expozice, zdravotní stav, pohlaví nebo věk [1] [2].

### 3.2 Ochratoxin A

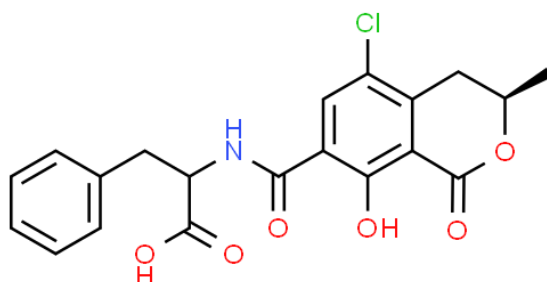
OTA je bílá, slabě kyselá, krystalická látka, která je řazena mezi pentaketidy spojené s fenylalaninem. Vyznačuje se stabilitou v kyselém prostředí a vysokou teplotní stabilitou, kdy ani při 250 °C nedochází ke kompletnímu zničení molekuly [3] [4].

Jedná se o mykotoxin produkovaný plísněmi rodu *Aspergillus* a *Penicillium*, a to především druhy *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius*, *Penicillium verrucosum* a *Penicillium nordicum*. Výskyt těchto mikroskopických vláknitých hub je velmi rozšířený díky širokému spektru podmínek, v nichž jsou schopné růst. Růst plísní ovlivňuje druh substrátu a jeho pH, teplota a také vlhkost vzduchu.

V chladnějších klimatických podmínkách převládají jako producenti ochratoxinů plísně rodu *Penicillium*, v teplejších oblastech naopak převládají producenti rodu *Aspergillus*.

Mykotoxiny jsou významné kontaminanty potravin a krmiv, a proto představují globální zdravotní riziko, mají ale i významný ekonomický dopad. Výskyt mykotoxinů je kromě klimatických podmínek ovlivněn také skladováním, přepravou a následným zpracováním hospodářských produktů. Během zpracování potravin, jako je mletí, pečení, fermentace, pražení nebo smažení, může dojít k chemické úpravě toxinu, nebo k jeho odstranění.

OTA může být nalezen jak v potravinových surovinách, tak ve zpracovaných potravinářských produktech. Nejčastěji jsou OTA kontaminovány obiloviny, kávová zrna, hrozny vinné révy, ořechy, koření, lékořice, fíky a fazole. OTA je v tucích rozpustná a stabilní molekula, což vede k jejímu hromadění v tkáních zvířat, která byla krmena kontaminovaným krmivem. Proto je pro člověka zdravotním rizikem nejen kontaminovaná rostlinná strava, ale i strava živočišného původu [2] [5] [6] [7].



**Obrázek 1:** Strukturní vzorec ochratoxinu A [8]

### 3.2.1 Toxicita ochratoxinu A

Mykotoxikózy jsou nejčastěji důsledkem konzumace kontaminovaných potravin, ale významným zdrojem expozice je také inhalace spor toxigenních hub.

OTA se vstřebává z gastrointestinálního traktu, váže se na proteiny plazmy a krví je distribuován především do ledvin, dále pak do jater, svalů a tukové tkáně. Předpokládá se, že zvýšená kumulace OTA v ledvinách je dána specifickými

transportními proteiny proximálních tubulů, které zvyšují vychytávání tohoto mykotoxinu.

Na buněčné úrovni OTA ovlivňuje například enzymy zapojené do metabolismu fenylalaninu, inhibuje mitochondriální dýchání a stimuluje peroxidaci membránových lipidů. Má nefrotoxický, hepatotoxický, teratogenní a imunotoxický účinek, a Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC, International Agency for Research on Cancer) je zařazen jako karcinogen skupiny 2B, tedy jako pravděpodobně karcinogenní pro člověka [6] [9] [10] [11].

### 3.2.2 Legislativa

Maximální limity OTA (*tabulka č. 1*) a dalších kontaminujících látek v některých potravinách jsou stanoveny Nařízením Komise (EU) č. 2022/1370. Předchozí nařízení, nařízení (ES) č. 1881/2006, bylo změněno v důsledku rozšíření seznamu potravin, u kterých byla zjištěna kontaminace OTA a u kterých byly stanoveny jeho maximální limity. Rozšíření se týká například kakaového prášku, sušených bylinek, některých složek bylinných čajů a sušeného ovoce. V návaznosti na dostupné údaje o výskytu OTA byly zpřísněny limity v pražené a rozpustné kávě, v pekárenských výrobcích a také v sušených hroznech vinné révy. Tolerovaný týdenní příjem OTA ve výši 120 ng/kg tělesné hmotnosti z roku 2006 považuje Nařízení Komise (EU) č. 2022/1370 za neplatný ale neurčuje však novou směrnou hodnotu [12].

**Tabulka 1:** Maximální limity OTA v potravinách [12]

Potravina	Maximální limit OTA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Nezpracované obiloviny	5,0
Všechny produkty získané/zpracované z nezpracovaných obilovin Obiloviny uváděné na trh pro konečného spotřebitele	3,0
Pečivo, svačinky z obilovin a snídaňové cereálie — výrobky neobsahující olejnatá semena, ořechy nebo sušené ovoce	2,0
— výrobky obsahující nejméně 20 % sušených hroznů révy vinné a/nebo sušených fíků	4,0
— ostatní výrobky obsahující olejnatá semena, ořechy a/nebo sušené ovoce	3,0
Nealkoholické sladové nápoje	3,0
Pšeničný lepek neuváděný na trh pro konečného spotřebitele	8,0
Sušené ovoce	8,0

— sušené hrozny révy vinné (korintky, rozinky a sultánky) a sušené fíky — ostatní sušené ovoce	2,0
Datlový sirup	15
Pražená káva — pražená kávová zrna a mletá pražená káva kromě rozpustné kávy — rozpustná káva (instantní káva)	3,0 5,0
Víno (včetně šumivého vína, s výjimkou likérového vína a vína s obsahem alkoholu nejméně 15 % objemových) a ovocné víno	2,0
Aromatizované víno, aromatizované vinné nápoje a aromatizované vinné koktejly	2,0
Hroznová šťáva, rekonstituovaná koncentrovaná hroznová šťáva, hroznový nektar, rekonstituovaný hroznový mošt a rekonstituovaný koncentrovaný hroznový mošt uváděné na trh pro konečného spotřebitele	2,0
Obilné příkrmy a ostatní příkrmy určené pro kojence a malé děti	0,50
Dietní potraviny pro zvláštní lékařské účely určené pro kojence a malé děti	0,50
Koření, včetně sušeného koření, kromě <i>Capsicum</i> spp. <i>Capsicum</i> spp. (sušené plody, celé nebo mleté, včetně chilli, mletého chilli, kayenského pepře a papriky) Směsi koření	15 20 15
Lékořice ( <i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Glycyrrhiza inflata</i> a další druhy) — kořen lékořice, mimo jiné jako složka bylinných čajů — výtažek z lékořice pro použití v potravinářských výrobcích, zejména v nápojích a cukrovinkách — cukrovinky z lékořice obsahující ≥ 97 % výtažku z lékořice v sušině — ostatní cukrovinky z lékořice	20 80 50 10,0
Sušené byliny	10,0
Kořeny zázvoru pro použití v bylinných čajích Kořeny proskurníku lékařského, kořeny pampelišky (smetánky) a květy pomerančovníku pro použití v bylinných čajích nebo v náhražkách kávy	15 20
Slunečnicová semena, dýňová semena, semena melounu (vodního), konopná semena, sójové boby	5,0
Pistácie, které musí být před uvedením na trh pro konečného spotřebitele nebo před použitím jako složka potravin vytříděny nebo jinak fyzikálně ošetřeny Pistácie uváděné na trh pro konečného spotřebitele nebo jako složka potravin	10,0 5,0
Kakaový prášek	3,0

### 3.3 Potravní doplňky

Potravní doplňky jsou potravinové substituenty, jejichž cílem je doplnění běžné stravy. Jedná se o koncentrované zdroje minerálů, vitamínů a dalších látek, kterým je přisouzen fyziologický nebo výživový účinek. Vedle minerálů a vitamínů mohou být složkou potravních doplňků například esenciální mastné kyseliny, vláknina, aminokyseliny nebo bylinné výtažky [13] [14].

Potravním doplňkům nesmí být přisuzována vlastnost prevence nebo léčby onemocnění a také nesmí naznačovat, že by pestrá strava nebyla dostatečná k získání všech živin. Před uvedením nového doplňku stravy na trh musí být informováno Ministerstvo zemědělství a doplněk musí být registrován u státního dozorového orgánu, kterým je Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI). Na rozdíl od léčivých přípravků není u doplňků stravy posuzována jejich účinnost a notifikační povinnost neznamena potvrzení údajů na etiketě výrobku. Na etiketě je povinné uvádět vedle doporučené denní dávky také varování před překročením této dávky, názvy živin, upozornění, že výrobek neslouží jako náhrada pestré a vyvážené stravy a doporučení na jeho uchování mimo dosah dětí [13] [15] [16].

#### 3.3.1 Kontaminanty potravních doplňků

Vzhledem k rostoucímu trendu užívání potravních doplňků je zapotřebí zvýšená kontrola jejich bezpečnosti a kvality. K nepříznivým účinkům na lidské zdraví může vést nejen nadměrné a dlouhodobé užívání, ale i přítomnost různých kontaminantů, jelikož velká část potravních doplňků je založena na přírodních rostlinných extraktech. Mezi významné kontaminanty potravních doplňků patří kovy, toxiny, pesticidy, polychlorované bifenoly a dioxiny [13] [17] [18].

V Evropské unii (EU) jsou doplňky stravy považovány za potraviny a neexistuje pro ně speciální kontrola před uvedením na trh. V rámci EU a Evropského sdružení volného obchodu je možné rychlé sdílení informací ohledně rizika pocházejícího z potravin nebo krmiv pomocí Systému rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF, Rapid Alert system for Food and Feed). Jedna z kategorií RASFF, a to kategorie dietické potraviny, potravinové doplňky a obohacené potraviny, poskytuje hlášení ohledně doplňků stravy [18] [19].



### 3.4 Rostlinné potravní doplňky

Rostlinné potravní doplňky mohou obsahovat mykotoxiny v důsledku kontaminace rostlinných plodin toxigenními houbami. K producentům mykotoxinů napadajícím léčivé byliny a další rostlinné suroviny patří především plísně rodu *Penicillium* a *Aspergillus*.

Ke kontaminaci surovin může dojít již před sklizní, během sklizně s využitím nevhodných zemědělských postupů, nebo během skladování a distribuce za nevyhovujících podmínek, zejména tepla a vlhka. Již vícedenní skladování plodin zvyšuje jejich náchylnost vůči růstu plísní, a tím se zvyšuje riziko produkce mykotoxinů. Obsah mykotoxinů byl prokázán v doplňcích stravy z hroznů vinné révy, z ginkgo biloby, ze zelené kávy a v doplňcích se zeleným čajem nebo s ostropestřcem mariánským.

Přestože byly mykotoxiny v doplňcích stravy prokázány, mnohokrát jsou detekované hladiny velmi nízké a nepředstavují riziko pro lidské zdraví. Vzhledem k rozsáhlému výskytu toxigenních hub není možné se přítomnosti mykotoxinů zcela vyhnout, ale je důležité dodržovat vhodné podmínky pěstování a skladování surovin a kontrolovat finální produkty z nich vyrobené [17] [18] [20].

#### 3.4.1 Potravní doplňky z vinné révy

Po vylisování hroznů, zejména ve vinařském průmyslu, vzniká vedlejší zbytkový produkt tzv. matolina, která je bohatým zdrojem vlákniny a polyfenolů jako jsou flavonoidy. Právě matoliny a hroznová semena jsou často využívány při výrobě potravních doplňků. Z flavonoidů, které jsou obsaženy především ve slupce a semenech plodů, převládají flavonoly, katechiny a antokyany a jsou známy pro svůj vysoký antioxidační účinek, který je násobně vyšší než u vitamínů C a E. Vedle polyfenolů obsahuje extrakt z hroznových semen také kyseliny  $\alpha$ -linolenovou a  $\gamma$ -linolenovou. Tyto nenasycené mastné kyseliny mají protizánětlivý účinek a podílí se na snížení celkového krevního cholesterolu. Pro své pozitivní účinky mají potravní doplňky z hroznů vinné révy kladný vliv na řadu civilizačních chorob současnosti jako je ateroskleróza, hypertenze a obezita [21] [22] [23].

Nejčastěji je vinná réva napadána plísní *Aspergillus carbonarius*, která je za vhodných podmínek producentem OTA. Při výrobě vína zůstává OTA především ve vedlejších produktech, a to zejména ve slupkách hroznů. OTA byl detekován v řadě

potravních doplňků, které obsahovaly různé procento extraktů z vinné révy, přičemž mezi detekovanými hladinami OTA a obsahem extraktů nebyla zjištěna korelace. Předpokládá se proto, že hladina mykotoxinu je dána rozdílnou kontaminací surovin k výrobě těchto přípravků, jako je matolina, nebo případně kontaminací dalších složek potravního doplňku. Právě kontrola kontaminace matoliny mykotoxiny by mohla sloužit jako parametr kvality surovin pro výrobu potravních doplňků z hroznů vinné révy [24] [25] [26].

### 3.4.2 Potravní doplňky z ginkgo biloby

Jinan dvoulaločný (*Ginkgo biloba*) je dvoudomý strom z čeledi jinanovitých (*Ginkgoaceae*) a jediným žijícím druhem z rodu jinanů. Listy a plody jinanu byly využívány již v tradiční čínské medicíně, a to především pro léčbu astmatu.

V současnosti se pro doplňky stravy a léčivé přípravky využívá extrakt z typických dvoulaločných listů, který podporuje kognitivní funkce mozku a duševní rovnováhu, mikrocirkulaci krve a prokrvení akraálních částí těla, má antioxidační účinky a napomáhá udržet normální hladinu cholesterolu. K léčebným účelům je využíván standardizovaný extrakt, označovaný EGb 761, pro jehož získání byla v 70. letech 20. století vyvinuta metoda německou společností Dr. Willmar Schwabe Pharmaceutical. Tento vysoce koncentrovaný extrakt obsahuje 6 % terpenoidů, 24 % flavonových glykosidů a 5–10 % organických kyselin a je součástí léků pro léčbu kognitivních poruch a lehké demence [27] [28] [29] [30].

Potravní doplňky z ginkgo biloby jsou jedny ze světově nejprodávanějších rostlinných doplňků stravy. Na rozdíl od léčivých přípravků není využíván extrakt standardizovaný a koncentrace látek se v jednotlivých produktech liší. Stejně jako u jiných rostlinných surovin může dojít ke kontaminaci listů ginkgo biloby například pesticidy nebo mykotoxiny. V potravních doplňcích z ginkgo biloby byly detekovány aflatoxiny B1 a B2, které jsou IARC řazeny mezi genotoxické karcinogeny, a T-2 toxin, který je se svými cytotoxickými a genotoxickými účinky nejnebezpečnějším mykotoxinem z trichothecenů. U některých potravních doplňků byla zjištěna přítomnost mykotoxinů a zároveň pesticidů, proto by bylo vhodné v rámci jejich kontroly využít metody pro stanovení více typů kontaminantů [31] [32] [33].

### 3.4.3 Potravní doplňky ze zelené kávy

Kávová zrna jsou semena plodů kávovníku neboli kávových třešní. Mezi významné plodiny patří kávovník arabský (*Coffea arabica*) a kávovník statný (*Coffea canephora*), které jsou pěstované asi v šedesáti zemích v tropických a subtropických oblastech. Kvalitu kávy kromě genetiky rostliny a enviromentálních faktorů ovlivňují zhruba z 60 % procesy, které následují po sklizni plodů. Sušení a loupání plodů, skladování a pražení zrn mají vliv na chemické složení zelených kávových zrn a také na jejich barvu, tvar a velikost. K nejvíce fyzikálně-chemických změnám dochází během pražení, kdy Maillardova reakce ovlivňuje aroma, barvu a chuťový profil kávy [34].

Zelená káva oproti pražené obsahuje více bioaktivních látek jako jsou fenoly a methylxantiny. Antioxidační účinky kávy závisí zejména na obsahu fenolických látek, přičemž klíčovou sloučeninou je kyselina chlorogenová. Zelená kávová zrna obsahují až 14 % kyseliny chlorogenové a její zastoupení je vyšší u kávy robusta v porovnání s arabikou. Kromě kávy je bohatým zdrojem kyseliny chlorogenové například čaj, bobulovité ovoce, citrusy, jablka a broskve. Vedle antioxidačního účinku má tato fenolická látka účinky protizánětlivé, hepatoprotektivní, neuroprotektivní, stimuluje centrální nervovou soustavu a ovlivňuje metabolismus lipidů a glukózy. Kyselina chlorogenová inhibuje absorpci glukózy z tenkého střeva a také snižuje aktivitu enzymu glukóza-6-fosfatázy, a tím ovlivňuje glukoneogenezi a glykogenolýzu. Přestože je známo, že kyselina chlorogenová snižuje hladinu glukózy v krvi a riziko inzulínové rezistence, přesný mechanismus působení není doposud objasněn [34] [35] [36].

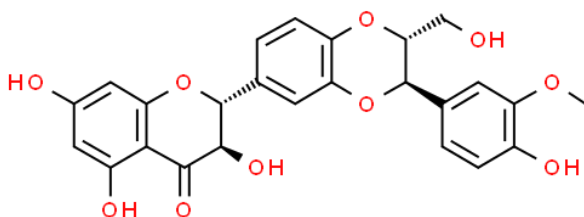
Pro své účinky je extrakt ze zelené kávy s vysokou koncentrací kofeinu a kyseliny chlorogenové používán v řadě potravních doplňků, které podporují hubnutí. S rostoucím počtem lidí trpících nadváhou a obezitou roste i užívání přípravků s extraktem ze zelené kávy, a proto je vhodné kontrolovat jejich kvalitu a bezpečnost. Z procesů, které následují po sklizni kávy, je zásadním krokem ovlivňujícím kvalitu zrn dostatečné sušení, které brání vzniku plísní a kontaminaci kávy mykotoxiny. Nejčastěji identifikovaným mykotoxinem kontaminující zelenou i praženou kávu je OTA, pro nějž jsou stanoveny limity jen v kávě pražené a rozpustné. V potravních doplňcích s extraktem ze zelené kávy byl detekován kromě OTA také ochratoxin B, fumonisin B<sub>1</sub> a kyselina mykofenolová, která má silné imunosupresivní účinky [34] [37].

### 3.4.4 Potravní doplňky z ostropestřce mariánského

Ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*), známý také jako bodlák volčec, je až 1,5 metru vysoká rostlina z čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*) s výraznými ostnatými listeny okolo fialového květenství. Nažky ostropestřce se v Evropě využívaly již v 1. století našeho letopočtu, kdy se věřilo, že zlepšují tok žluči [38].

Potravní doplňky obsahují silymarin, bioaktivní komplex látek z ostropestřce mariánského, a užívají se pro podporu normální funkce jater. Silymarin je obsažen ve všech částech rostliny, ovšem jeho nejvyšší koncentrace se nachází v semenech rostliny, z nichž se extrakt získává nejčastěji. Hlavní aktivní látky extraktu jsou silymarinové flavonolignany, mezi které patří silybin, isosilybin, silidianin a silychristin, a dále pak flavonoidy jako taxifolín, apigenin a kvercetin. Za nejdůležitější bioaktivní látku je považován silybin, který tvoří 50–60 % silymarinu [38] [39].

Přestože je silymarin nejčastěji využíván pro svůj hepatoprotektivní účinek, bylo studiiemi prokázáno mnoho dalších příznivých účinků, a to účinek antimikrobiální, protizánětlivý, regenerativní, protinádorový, kardioprotektivní a neuroprotektivní. Extrakt z ostropestřce se používá zejména při zánětlivých onemocněních jater, virové hepatitidě, toxickém poškození jater a při alkoholové a nealkoholové steatóze. Při jaterních steatózách, které mohou progredovat do závažnějších patologických stavů, dochází k abnormálnímu hromadění lipidů v hepatocytech. Mezi poruchy metabolismu, které vedou ke ztučnění jater, patří také zvýšené vstřebávání volných mastných kyselin, které je inhibováno silybinem, jenž zeslabuje expresi proteinového transportéru mastných kyselin. Silymarin mimo jiné zvyšuje hladinu glutathionu, významného antioxidantu, chráníciho hepatocyty před účinky reaktivních forem kyslíku, a tím snižuje oxidativní stres [38] [39] [40].



**Obrázek 1:** Strukturální vzorec silybinu [41]

Stejně jako u jiných doplňků stravy není pro produkty z ostropestřce mariánského určena referenční hodnota příjmu, a tak je mezi produkty značná variabilita v doporučené denní dávce. Rozdílně jsou také definovány obsahy účinných látek. Většina doplňků stravy využívá ve složení pojmu „extrakt z plodů“, některé definují množství obsaženého silymarinu a výjimečně je uvedena hodnota zastoupení jednotlivých flavonolignanů.

Dalším problémem je potenciální přítomnost kontaminantů, jejichž škodlivé účinky by mohly převážit nad kladnými účinky silymarinu. Kvalita potravních doplňků je dána především kvalitou surovin, z nichž jsou doplňky vyráběny. U ostropestřce mariánského je nejrizikovějším faktorem kontaminace rostlinného materiálu mykotoxiny vlhkost vzduchu, která je v průběhu sklizně žádoucí. Během vlhkého počasí jsou květenství rostlin uzavřená a nedochází tak ke ztrátám nažek, zároveň se tím ale zvyšuje riziko růstu plísní, které za vhodných podmínek mohou být producenty mykotoxinů [42] [43].

Nejčastěji stanovenými mykotoxiny kontaminující potravní doplňky z ostropestřce mariánského jsou sekundární metabolity plísní rodu *Alternaria* a *Fusarium* (tabulka č. 2). Dalšími významnými kontaminanty ostropestřce mariánského jsou plísně rodu *Penicillium* a *Aspergillus* a jejich metabolit kyselina mykofenolová. V testovaných vzorcích byly prokázány i mykotoxiny, jejichž nepříznivé účinky může silymarin zmírňovat, jako deoxynivalenol a zearalenon. Řada detekovaných sekundárních metabolitů plísní má hepatotoxické účinky, které jsou klinicky významné vzhledem k tomu, že tento druh potravního doplňku užívají hlavně osoby s onemocněním jater [44] [45].

Zdravotním rizikem nejsou pouze vysoké koncentrace mykotoxinů, ale také současná kontaminace více druhů mykotoxinů, které mohou mít aditivní nebo synergické účinky. Tyto tzv. „mykotoxinové koktejly“ mohou být toxičtější než vyšší koncentrace jednotlivých mykotoxinů. Zároveň je důležité si uvědomit, že řada lidí užívá více druhů doplňků stravy, které mohou být různě kontaminovány, a že doplňky stravy nejsou jediným zdrojem celkového příjmu mykotoxinů [43] [46].

Vzhledem k tomu, že potravní doplňky tvoří samostatnou skupinu potravin, pro kterou by byly určeny maximální limity koncentrace mykotoxinů, jsou často získané hodnoty v rámci studií porovnány s maximálními limity mykotoxinů pro jiné potraviny.

Například v rámci studie hodnotící kvalitu potravních doplňků je uvedeno, že 92 % testovaných produktů na bázi ostropestřce mariánského obsahovalo násobně vyšší koncentrace T2 a H-2 toxinů, než je maximální limit pro obiloviny určené k přímé lidské spotřebě (200 µg/kg). Tento způsob srovnání je ale pouze teoretický, protože stanové maximální limity berou v úvahu kromě toxicity mykotoxinu také běžně konzumované množství potravin. Vhodnější způsob vyjádření rizika spojeného s konzumací kontaminovaných doplňků stravy je porovnání tolerovaného denního příjmu toxinu, stanoveného Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA, European Food Safety Authority), a vypočítaného reálného příjmu v závislosti na doporučené denní dávce přípravku. Ne pro všechny mykotoxiny jsou ale tolerované denní příjmy EFSA stanoveny [43] [45].

**Tabulka 2:** Nejčastější mykotoxiny kontaminující potravní doplňky z ostropestřce mariánského

Rod	Mykotoxin	Účinek
Alternaria	alternariol monomethylether	genotoxický, hepatoxický, imunotoxický, mutagenní [45]
	alternariol	
	tentoxin	
Fusarium	beauvericin	cytotoxický [45]
	enniatin A	
	enniatin A <sub>1</sub>	
	enniatin B	
	enniatin B <sub>1</sub>	
	deoxynivalenol	cytotoxický, hepatotoxický, neurotoxický, imunotoxický [45]
	HT-2 toxin	
	T2 toxin	
	zearalenon	reprodukční a vývojová toxicita [45]

### 3.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC patří mezi separační chromatografické metody, které jsou založeny na rovnovážné distribuci dělených látek mezi mobilní a stacionární fází. V případě HPLC je

mobilní fází kapalina a stacionární fází je buď kapalina ukotvena na nosiči, nebo pevná látka, která tvoří sorbent v chromatografické koloně.

Pokud mezi těmito nemísitelnými fázemi existuje fázové rozhraní, pak mezi nimi při dělení složek směsi dochází k opakovanému ustalování rovnováhy separovaných látek. Aby došlo k separaci jednotlivých látek, musí se látky lišit svými distribučními konstantami  $K_D$ . Distribuční konstanta je dána poměrem koncentrace složky ve stacionární a koncentrací složky v mobilní fází a čím vyšší je její hodnota, tím delší dobu je látka zadržována ve stacionární fází. Následná eluce složek směsi je uskutečněna buď mobilní fází s konstantním složením, nebo pomocí mobilní fáze, jejíž složení se mění tak, že roste její eluční síla. Isokratická eluce s neměnným složením mobilní fáze je vhodná, pokud mají separované látky podobné fyzikálně-chemické vlastnosti, a tedy i distribuční konstanty  $K_D$ . Gradientovou eluci, při které se složení mobilní fáze mění, je vhodné využít, pokud se jednotlivé složky svými vlastnostmi výrazně liší a isokratická eluce by neúměrně prodlužovala dobu analýzy [47] [48].

### 3.5.1 Instrumentace v HPLC

Mezi základní části kapalinového chromatografu patří zásobníky mobilních fází, odplynovač, směšovač, vysokotlaké čerpadlo, dávkovač vzorku, chromatografická kolona, detektor a počítač s ovládacím programem.

Ze zásobníků mobilních fází odtéká kapalina přes filtry do HPLC systému, kde je odplyněna pomocí vakua, nebo probubláním heliem. Směšovač slouží k mísení složek mobilní fáze dle nastavení programu u gradientové eluce. Stabilní průtok mobilní fáze, která je dále vytlačována přes dávkovací zařízení, zajišťuje vysokotlaké čerpadlo. Pro dávkování vzorků jsou v současnosti využívány především automatické dávkovače. Vzorek je z dávkovací smyčky vymýván mobilní fází a veden do chromatografické kolony v termostatovaném prostoru, která je spojena s detektorem. Detektor zaznamenává jednotlivé separované složky, které jsou graficky zobrazeny jako píky v odlišných retenčních časech pomocí chromatogramu [47] [48] [49].

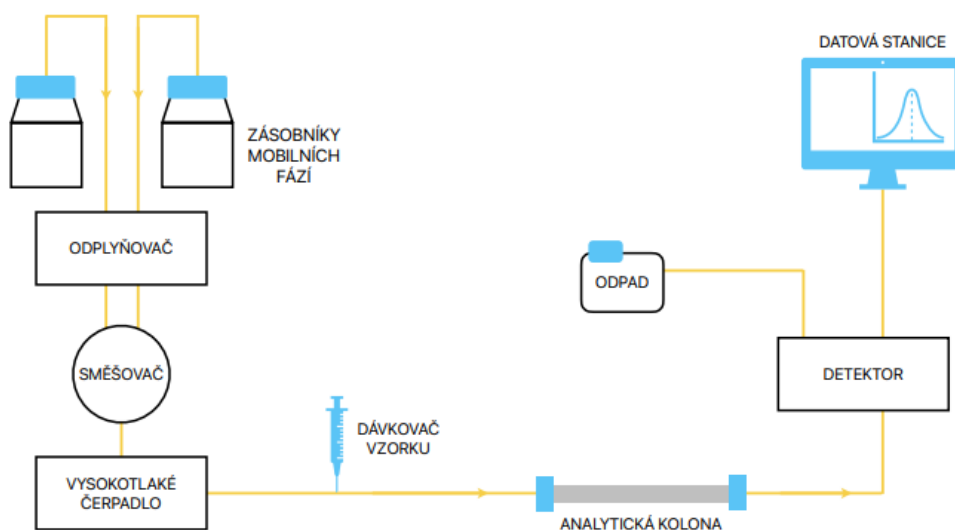
### 3.5.2 Fluorescenční detekce

Chromatografické detektory zaznamenávají chemické nebo fyzikální vlastnosti eluovaného analytu jako elektrický signál. Od detektorů je požadována řada vlastností

jako je například univerzálnost, vysoká citlivost, specifita, linearita nebo nedestruktivnost, přičemž nejobtížnější je dosáhnout kombinace univerzálnosti a vysoké citlivosti. V současné době převládá využití hmotnostní spektrometrie jako pokročilé detekční techniky, dále pak UV-VIS a fluorescenčních detektorů.

Fluorescenční detektor zaznamenává sekundární záření emitované analytem, který nejprve absorboval primární excitační záření a tím přešel do excitovaného stavu. Při fluorescenci se excitovaná molekula látky vrací z excitovaného singletového stavu zpět do základního singletového stavu pomocí emise elektromagnetického záření. Detektory jsou vysoce citlivé a selektivní, ale jejich využití je omezené pro přirozeně fluoreskující látky nebo látky schopné fluoreskovat po derivatizaci. Derivatizační reakce může být v HPLC u původně nefluoreskující látky provedena již před separací nebo až po separaci před vstupem eluátu do detektoru. Nevýhodou derivatizační reakce však často bývá vznik dalších vedlejších fluorescenčních produktů reakce, které komplikují detekci.

Zdrojem excitačního záření absorbovaného analytem v průtokové cele bývá xenonová nebo rtuťová výbojka a excitační vlnová délka je vybrána excitačním monochromátorem. Pokud je látka schopná fluorescence, je možné nastavit požadovanou vlnovou délku emitovaného záření pomocí emisního monochromátoru. Vznikající fluorescenční záření je zachyceno fotonásobičem, který je umístěn kolmo ke zdroji excitačního záření [47] [48] [49].



**Obrázek 3:** Schéma standardního HPLC systému



### 3.6 Úprava vzorků

Pro většinu vzorků je úprava před chromatografickou analýzou nezbytná, abychom získali vzorek reprezentativní, reprodukovatelný, homogenní a vhodný pro nástřik do HPLC systému. Cílem úpravy vzorku je izolování a zakoncentrování analytů, přečištění extraktů a získání vzorku relativně bez interferujících balastních látek. Úprava vzorku má velký vliv na selektivitu, přesnost a správnost analytické metody a zároveň je důležitá pro ochranu HPLC systému, zejména chromatografické kolony.

Na rozdíl od rychlé automatizované chromatografické analýzy je příprava vzorku časově náročná a často prováděna manuálně. Klasické způsoby úpravy vzorků jako je srážení proteinů, extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) nebo SPE jsou víceetapové procesy, při kterých je poměrně vysoká spotřeba rozpouštědel a při manuálním provedení je také možnost chyby lidského faktoru. Na moderní metody pro úpravu vzorků, jakožto klíčového kroku celé analýzy, je kladeno mnoho požadavků, a to snížení časové náročnosti, snížení spotřeby rozpouštědel i samotného vzorku a možnost automatizace [49] [50].

### 3.7 On-line SPE

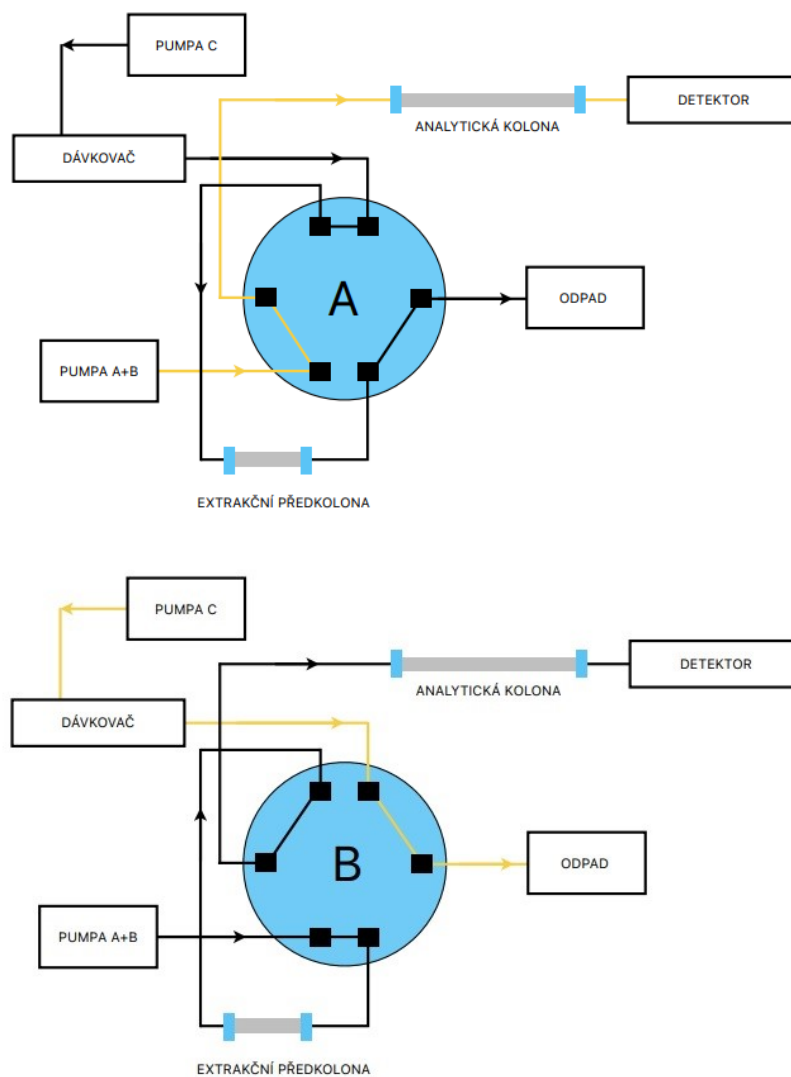
Moderní metody mohou využívat také automatická on-line uspořádání, kde je úprava vzorku přímou součástí HPLC systému. Pro analýzu kapalných vzorků je nejčastěji využíváno on-line spojení SPE s kapalinovou chromatografií. Mezi nejběžnější techniky na principu SPE zapojované do on-line systému patří SPE s využitím kolon a miniaturizované techniky jako mikroextrakce na tuhou fázi (SPME), mikroextrakce plněným tuhým sorbentem s využitím stříkačky (MEPS) a sorpční extrakce míchadlem (SBSE). Zmíněné techniky jsou v současnosti vyvíjené a zdokonalované, a proto jejich využití převládá ve výzkumných laboratořích [51] [52].

#### 3.7.1 Systém přepínání kolon

K zapojení extrakční předkolony do separačního systému se využívá vícecestný selekční ventil. Při dávkování vzorku do systému je ventil v **poloze A** (*obr. 4*), kdy je vzorek unášen mobilní fází na extrakční předkolonu. Zde dochází k extrakci vzorku, retenci požadovaného analytu a jeho zakoncentrování. Zbylé komponenty matrice, které nebyly zachyceny na extrakční předkoloně, jsou vymyty do odpadu.

Následuje přepnutí ventilu do **polohy B**, analyt je eluován silnější mobilní fází na analytickou kolonu a zde dochází k vlastní separaci složek vzorku. K eluci na analytickou kolonu se častěji využívá zpětný tok mobilní fáze, který umožňuje snadnou eluci analytů s vysokou retencí z „čela“ extrakční kolony na kolonu analytickou, což minimalizuje rozmývání jejich píků.

Oproti klasické SPE technice je on-line provedení rychlejší a přesnější, zároveň je minimalizovaná manipulace se vzorkem a jeho ztráty. Výhodou je také opakované využití extrakční předkolony oproti jednorázovým SPE kolonkám a možnost dávkování většího objemu vzorku do chromatografického systému, což umožňuje dosažení vyšší citlivosti stanovení [49] [52].



**Obrázek 4:** Schéma HPLC systému přepínání kolon

### 3.7.2 Sorbenty SPE kolon

Účinnost přečištění vzorku a zakoncentrování analytu je dána především selektivitou sorbentu využívaného při SPE. V on-line SPE systému jsou sorbenty vybírány dle své efektivity, ale také musí být extrakční předkolony kompatibilní s analytickou kolonou, jejíž stacionární fáze by měla poskytovat stejnou nebo větší retenci analytu. Využívané extrakční předkolony by měly být co nejkratší, aby se zabránilo rozmývání elučních zón [53].

Nejčastější délky komerčně dostupný SPE kolon pro on-line systém se pohybují mezi 10 a 20 mm. V propojení SPE a HPLC převládá propojení extrakce a separace na reverzních fázích. Dostupných je mnoho sorbentů extrakčních kolon jako silikagel s vázanými alkyly ( $C_8$ ,  $C_{18}$ ), silikagel s vázanou kyanopropylovou skupinou, polymerní sorbenty, nebo sorbenty na bázi grafitového uhlíku.

Pro svou vyšší selektivitu oproti silikagelovým sorbentům se jako extrakční materiály využívají materiály s omezeným přístupem (RAM) zejména při analýze vzorků z proteinových matric (plazma, sérum, mléko), imunosorbenty a molekulárně vtištěné polymery (MIPs) [52].

RAM jsou porézní sorbenty, které umožňují přímý nástřik biologických vzorků do chromatografického systému. RAM částice na základě fyzikální nebo chemické bariéry zamezují vstupu makromolekulárních látek, většinou proteinů a lipoproteinů. U látek s vysokou molekulovou hmotností, jako matricových proteinů biologických vzorků, dochází pouze k povrchové interakci a jejich adsorpce je minimalizovaná, makromolekuly rychle procházejí kolonou a jsou vyplavovány do odpadu. Malé molekuly vstupují do pórů částic RAM, kde dochází k hydrofobním interakcím [54].

Imunoafinitní SPE se řadí mezi vysoce selektivní extrakční techniky, které umožňují přečištění složitých matric a zakoncentrování analytu. Využívají se sorbenty, na jejichž povrch je navázaná protilátka specificky interagující s analytem. Propojení imunoafinitní SPE a chromatografické metody umožňuje separaci strukturně podobných analytů, u kterých může během extrakce docházet ke křížovým reakcím s protilátkou navázanou na imunosorbentu. Omezením pro využití imunosorbentů je nákladná příprava protilátek, obzvláště pokud se jedná o protilátky monoklonální a jejich horší chemická stabilita zejména v organických rozpouštědlech [50] [52].

Jako „syntetické analogy protilátek“ jsou popisovány MIPs materiály, které interagují s cílovým analytem na principu zámku a klíče. MIPs patří mezi vysoce selektivní extrakční materiály určené pro izolaci cílové látky nebo skupiny látek. Výroba MIPs materiálů zahrnuje vtištění templátu do monomeru a následnou polymeraci, při níž vzniknou dutiny pro selektivní rozpoznání otištěného templátu. Výhodou oproti specifickým protilátkám jsou menší nároky na skladování, široký teplotní rozsah, ve kterém mohou být polymerní materiály využity a také možnost výroby MIPs sorbentů pro širší spektrum látek [55] [56].

V současnosti roste vývoj chromatografických metod využívajících pro on-line úpravu vzorku extrakční kolony plněné nanovláknem. Nanovláknem jsou plněna do cartridge, která je vložena do kovového pláště a zapojena chromatografického systému. Řada metod prokázala stabilitu nanovláken a možnost opakovaného použití extrakčních kolonek. Vedle stability nanovláken je výhodou také jejich velký povrch, který může mít pozitivní vliv na rychlost extrakce a zvýšení extrakční kapacity [57] [58].

### **3.8 Stanovení ochratoxinu A**

Vzhledem k celosvětovému rozšíření mykotoxinů s řadou toxických účinků je kladen důraz na vývoj citlivých, rychlých a jednoduchých analytických metod pro jejich stanovení v různých druzích potravin.

Pro stanovení nízkých koncentrací OTA ve složitějších matricích potravin je klíčovým krokem analýzy úprava vzorku. Dříve využívaná extrakce kapalinou byla povětšinou nahrazena SPE. Pro záchyt OTA se vedle nesespecifických SPE sorbentů, zejména hydrofobních a iontovýměnných, rozšířilo využívání selektivnějších materiálů jako jsou MIPs, imunoafinitní a aptamerové sorbenty.

Nejčastějšími metodami stanovení OTA jsou metody imunochemické a chromatografické. Mezi imunochemické metody patří Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), která poskytuje rychlou analýzu a nevyžaduje složitou instrumentaci. Nevýhodou ELISA a jiných imunochemických metod je riziko zkřížených reakcí u strukturně podobných mykotoxinů. Výrazně převládající instrumentální metodou je HPLC, dále se v menším měřítku využívá také plynová chromatografie a kapilární elektroforéza. Díky přirozené fluorescenci OTA se pro stanovení nejčastěji využívá fluorescenční detektor. Vývoj metod je také zaměřen na možnost analyzování více

mykotoxinů/druhů kontaminantů najednou. Pro taková stanovení je využití fluorescenční detekce omezené a převládá využití HPLC ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS) [59] [60] [61] [62].

Následující *tabulka č. 3* popisuje 10 prací, které se zaměřují na stanovení OTA a dalších mykotoxinů v potravních doplňcích, nebo surovinách, které se k výrobě potravních doplňků využívají.

**Tabulka 3: Možnosti stanovení OTA**

Analyt	Vzorek	Úprava vzorku	Separace	Detekce	LOD, LOQ	Citace
OTA (aflatoxiny, zearalenon, enniatiny, beauvericin)	Rostlinné potravní doplňky (boldovník vonný, ginkgo biloba, ostropestřec mariánský, artyčok, mučenka pletní, přeslička rolní, hloh jednosemenný)	QuEChERS	HPLC Kolona Gemini-NX C18 (150 × 4,6 mm, 5 μm) Gradientová eluce 5 mM mravenčan amonný s 0,1% kyselinou mravenčí ve vodě / v methanolu	MS/MS-IT	-	[18]
OTA	Potravní doplňky a potravinová barviva z vinné révy	SPE (imunoafinitní sorbent)	HPLC Kolona Synergi Hydro-RP (150 × 3 mm, 4 μm) Acetonitril / voda / kyselina octová (99:99:2)	FLD Ex 333 nm Em 460 nm	LOD 0,5 μg/kg LOQ 1,16 μg/kg	[25]
OTA (celkem 57 mykotoxinů)	Rostlinné potravní doplňky (ostropestřec mariánský, jetel luční, lněná semínka, mladý ječmen)	QuEChERS	UHPLC Kolona Acquity UPLC HSS T3 (100 × 2,1 mm, 1,8 μm) Gradientová eluce ESI (+) 5 mM mravenčan amonný s 0,2% kyselinou mravenčí ve vodě / v methanolu ESI (-) 5 mM octan amonný ve vodě/čistý metanol	MS/MS	LOQ 10 μg/kg	[42]

Analyt	Vzorek	Úprava vzorku	Separace	Detekce	LOD, LOQ	Citace
OTA (celkem 15 mykotoxinů)	Ostropestřec mariánský (extrakt/semena)	DLLME (pro některé mykotoxiny QuEChERS)	UHPLC Kolona Zorbax Eclipse Plus HHRD C18 (50 mm × 2,1 mm, 1,8 μm) Gradientová eluce 5 mM mravenčan amonný s 0,3% kyselinou mravenčí ve vodě / v methanolu	MS/MS	LOD 0,59 μg/kg LOQ 1,95 μg/kg	[61]
OTA (aflatoxiny, zearalenon, deoxynivalenol, T-2 a HT-2 toxiny)	Indické léčivé byliny (chebule srdčitá – guduchi, vitánie snodárná – ashwagandha, musli, bazalka posvátná, chřest hroznovitý – shatavari)	SPE (imunoafinitní sorbent)	HPLC Kolona BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 μm) Gradientová eluce Voda / methanol okyselené 0,1% kyselinou octovou	MS/MS	LOQ 0,5 μg/kg	[62]
				FLD Ex 333 nm Em 460 nm	LOQ 20 μg/kg	
OTA	Pivovarnické kvasnice	SPE (imunoafinitní sorbent)	HPLC Kolona YMC Triart C18 (150 × 3,0 mm, 3,0 μm) acetonitril / voda s 1% kyselinou mravenčí (70:30)	FLD Ex 335nm Em 460 nm	LOD 0,01 μg/kg	[63]

Analyt	Vzorek	Úprava vzorku	Separace	Detekce	LOD, LOQ	Citace
OTA	Zelená káva a potravní doplňky s extraktem ze zelené kávy	SPE (imunoafinitní sorbent)	HPLC Předkolona RP-18 (4 × 4 mm, 5 μm), kolona LiChrospher 100 RP-18 (250 × 4 mm, 5 μm), acetonitril / 2% kyselina octová (70:30)	FLD Ex 330 nm Em 460 nm	LOD 0,11 ng/g LOQ 0,36 ng/g	[64]
OTA (celkem 43 mykotoxinů)	Čínské datle – jujube, čínský kaštan	QuEChERS	UHPLC Gradientová eluce 0,1% kyselina mravenčí / acetonitril-methanol-kyselina mravenčí (50%/50%/0,1%)	MS/MS	LOQ 0,1 μg/kg	[65]
OTA (celkem 23 mykotoxinů)	Rostlinné potravní doplňky (maca, třezalka, ginkgo biloba, ředkev černá, česnekový olej, sójové isoflavony)	LLE SPE	HPLC Předkolona Sentry (10 x 2,1 mm, 3,5 μm), kolona Symmetry C18 (150x 2,1 mm, 5 μm) Gradientová eluce Voda-methanol-kyselina octová (95:4:1) / methanol-voda-kyselina mravenčí (97:2:1) s 5 mM octanem amonným	MS/MS	LOD 0,3 ng/g LOQ 1 ng/g	[66]
OTA	Potravní doplňky z třapatky nachové (extrakt z kořene nebo natě)	SPE	HPLC Kolona LiChrospher 100 RP-18 (250 × 4 mm, 5 μm) Acetonitril / 2% kyselina octová (70:30)	FLD Ex 330 nm Em 460 nm	LOD 0,13 ng/g LOQ 0,4 ng/g	[67]



## 4 Experimentální část

### 4.1 Použité přístroje a pomůcky

- chromatograf Shimadzu Prominence LC-20AD
- fluorescenční detektor Shimadzu RF-10AXL

#### Analytické kolony

- ACE 3 C4-300, 150 x 4,6 mm, 3  $\mu$ m
- ACE 3 Phenyl-300, 150 x 4,6 mm, 3  $\mu$ m
- Ascentis Express C18, 100 x 4,6 mm, 2,7  $\mu$ m
- Ascentis Express Phenyl-Hexyl, 100 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m
- Ascentis Express ES-CN, 100 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m
- ASTRA DM, 150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m
- ASTRA C18-HE, 150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m
- Kinetex Biphenyl, 100 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m
- Kinetex Phenyl-Hexyl, 100 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m
- Kinetex PFP, 100 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m
- YMC-Triart, C18, 100 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m
- YMC-Triart C18 ExRS, 100 x 4,6 mm, 3  $\mu$ m

#### Předkolony:

- Ascentis Express RP-Amide, 5 x 2,1 mm, 5  $\mu$ m
- Ascentis Express C18, 5 x 4,6 mm, 2,7  $\mu$ m
- analytické váhy Sartorius 2004 MP
- ultrazvuková digitální lázeň Bandelin Sonorex Digitec
- automatické pipety Transferpette S, Brand

### 4.2 Použité chemikálie

- ochratoxin A, čistota  $\geq 98$  % (Sigma-Aldrich)
- methanol pro HPLC,  $\geq 99,9$  % (Biosolve)
- acetonitril pro HPLC-MS CHROMASOLV<sup>®</sup>,  $\geq 99,9$  % (Honeywell)
- kyselina octová ledová,  $\geq 99,9$  % (VWR Chemicals)
- ultračistá voda, systém Milli-Q (Millipore)

### 4.3 Použité vzorky

- GS Ostropestřec mariánský (Green–Swan Pharmaceuticals CR, a.s.)
- Dr. Max Silymarin Premium (ČESKÁ LÉKÁRNA HOLDING, a.s.)
- Terezia Ostropestřec + Reishi Forte (TEREZIA COMPANY, s.r.o.)
- Farmax Ostropestřec Plus (Neuraxpharm Bohemia, s.r.o.)
- LIVSANE Silymarin&Cholin FORTE (PHOENIX lékárenský velkoobchod, s.r.o.)
- NatureVia Ostropestřec Forte (BIOVIT IMPEX CO. ČR, S.R.O.)
- Lagosa (MAUERMANN-ARZNEIMITTEL FRANZ MAUERMANN OHG, PÖCKI)
- TOPVET Ostropestřec mariánský (Green idea, s.r.o.)
- APOROSA Ostropestřec (VitaObchod, s.r.o.)
- Jamieson Ostropestřec mariánský (BENEPHARMA CZ, spol. s r.o.)
- Hermeopa Ostropestřec (MedinTerra)
- Dr. Popov Ostropestřec mariánský bylinné kapky (Dr. Popov, s.r.o.)
- TOPVET Ostropestřec mariánský extrakt (Green idea, s.r.o.)

### 4.4 Příprava roztoků a vzorků

#### 4.4.1 Příprava mobilní fáze

Organickou složkou mobilní fáze (pumpa A) byl čistý acetonitril čerpaný přímo ze zásobní láhve. Vodná složka (pumpa B) byla tvořena 0,5% vodným roztokem kyseliny octové, který byl připraven okyselením 900 ml ultračisté vody 4,5 ml ledové kyseliny octové. Promývací fází (pumpa C) byl 20% methanol připravený v 900 ml zásobní láhvi smísením 180 ml 100% methanolu a 720 ml ultračisté vody.

#### 4.4.2 Příprava zásobního extrakčního roztoku

Při přípravě zásobního extrakčního roztoku bylo smíšeno 50 ml methanolu a 450 ml ultračisté vody. Tímto byl připraven 10% methanol, který sloužil pro přípravu vzorků potravních doplňků a také pro přípravu pracovních roztoků OTA pro kalibraci.

#### 4.4.3 Příprava zásobního roztoku standardu OTA

Pro přípravu zásobního roztoku OTA bylo naváženo 0,498 mg standardu, který byl rozpuštěn v 1 ml methanolu. Byl tak připraven zásobní roztok o koncentraci

0,498 mg/ml, který byl následně využíván pro přípravu pracovních roztoků standardu pro optimalizaci a validaci metody. Zásobní roztok byl uchováván při -18°C.

#### 4.4.4 Příprava pracovních roztoků standardu OTA pro kalibraci

Ze zásobního roztoku o koncentraci 0,5 mg/ml byl naředěním 10% methanolem připraven roztok o koncentraci 1 mg/l. Z tohoto pracovního roztoku byly připraveny roztoky standardu OTA pro kalibraci o koncentraci v rozmezí 10–100 µg/l. Nižší hladiny kalibračních roztoků OTA byly připraveny z roztoku o koncentraci 100 µg/l. Přípravu pracovních roztoků pro kalibraci popisuje *tabulka č. 4*.

Stejným způsobem byly připraveny roztoky o koncentraci 5 µg/l, 10 µg/l a 15 µg/l pro měření opakovatelnosti.

**Tabulka 4:** Příprava pracovních roztoků OTA pro kalibraci

	Koncentrace OTA µg/l	Objem pracovního roztoku OTA (µl)	Objem 10% MeOH (µl)
		<b>c OTA = 1 mg/l</b>	
1	100	100	900
2	50	50	950
3	25	25	975
4	15	15	985
5	10	10	990
		<b>c OTA = 100 µg/l</b>	
6	5	50	950
7	2	20	980
8	1	10	990
9	0,5	5	995

#### 4.4.5 Příprava vzorků potravních doplňků ve formě tablet/tobolek

Všechny pevné vzorky ve formě tablet byly nejprve rozdrceny v třence pomocí třerky, vzorky ve formě tobolek byly pouze vysypány. Následně byla u každého vzorku potravního doplňku navážena 1/10 hmotnosti tablety/obsahu tobolky a rozpuštěna v 10 ml extrakčního roztoku, tedy v 10% methanolu, v 15 ml centrifugační zkuševce. Poté byly vzorky na 20 minut vloženy do ultrazvukové lázně s destilovanou vodou. Posledním krokem byla filtrace vzorku přes 0,22 µm PTFE filtry.

Příprava vzorků pevných potravních doplňků byla téměř shodná pro vzorky využívané při vývoji metody a při finálním měření pro kontrolu obsahu OTA v doplňcích. Rozdílem bylo pouze množství použitých tablet/tobolek, kdy se pro stanovení obsahu mykotoxinu smísily 3 rozdrcené tablety/tobolky a odvážena byla 1/10 této homogenní směsi.

#### 4.4.6 Příprava vzorků potravních doplňků ve formě kapek

Potravní doplňky ve formě kapek byly připraveny taktéž v centrifugačních zkumavkách ze 2 ml extraktů, ke kterým bylo přidáno 8 ml 10% methanolu. Vzorky byly následně přefiltrovány přes membránový 0,22 µm PTFE filtr.

#### 4.4.7 Příprava vzorků potravních doplňků pro matricovou kalibraci

Pro oba typy matric (pevnou, kapalnou) byly pro matricovou kalibraci připraveny „spike“ vzorky s přidaným obsahem OTA v 8 nebo 9 koncentračních hladinách dle 4.4.5 a 4.4.6, ke kterým byl pipetován pracovní roztok standardu OTA o koncentraci 1 mg/l, nebo 100 mg/l. Přesné objemy jednotlivých složek vzorků zobrazuje *tabulka č. 5*.

**Tabulka 5:** Příprava vzorků potravních doplňků pro kalibraci

	Koncentrace OTA µg/l	Objem pracovního roztoku OTA (µl)	Objem extraktu vzorku potravního doplňku (µl)
		<b>c OTA = 1 mg/l</b>	
1	100	100	900
2	50	50	950
3	25	25	975
4	15	15	985
5	10	10	990
		<b>c OTA = 100 µg/l</b>	
6	5	50	950
7	2	20	980
8	1	10	990
9	0,5	5	995

#### 4.4.8 Příprava vzorků potravních doplňků pro výtěžnost a přesnost

Pro určení výtěžnosti a přesnosti metody byly od každého typu matrice připraveno 6 vzorků s přidavkem pracovního roztoku OTA o koncentraci 1 mg/l. Vzorky byly připraveny dle *tabulky č. 6*. OTA byl vyhodnocován jen na koncentrační hladině

15 µg/l pro snížení spotřeby standardu OTA. Ze stejného důvodu byla snížena navážka tablet a objem kapek.

**Tabulka 6:** Příprava vzorků potravních doplňků pro výtěžnost a přesnost

Typ matrice	Navážka/objem	Objem pracovního roztoku OTA c = 1mg/l (µl)	Objem 10% MeOH (µl)
kapky (Dr. Popov)	1000 µl	75	3925
tablety (NatureVia)	1/20 hmotnosti	75	4925

Vzorky z potravních doplňků ve formě tablet byly následně vloženy na 20 minut do ultrazvukové lázně. Posledním krokem bylo přefiltrování vzorků přes 0,22 µm PTFE filtr.

#### 4.5 Parametry měření

Pro analýzy byl využíván kapalinový chromatograf Shimadzu Prominence LC-20AD se systémem přepínání kolon a fluorescenční detekcí (Shimadzu RF-10AXL, Ex 335 nm, Em 460 nm). Na extrakční předkolonu Ascentis Express RP-Amide (5 x 2,1 mm, 5 µm) bylo dávkováno 50 µl vzorku. Promývací fáze byla tvořena 20% methanolem při průtoku 1 ml/min. Po 1 minutě byl přepnut ventil a vzorek byl zpětným tokem eluován z extrakční předkolony na analytickou kolonu. Separace probíhala při teplotě 40 °C na analytické koloně Ascentis Express Phenyl-Hexyl (100 x 4,6 mm, 5 µm) při gradientové eluci s mobilní fází acetonitril/0,5% kyselina octová. Pro vyhodnocení dat byl využíván chromatografický software LC LabSolutions.

#### 4.6 Optimalizace metody

Cílem optimalizace bylo vyvinutí citlivé metody pro stanovení obsahu OTA v potravních doplňcích, separace analytu od ostatních složek matrice a získání vhodné symetrie píku OTA po extrakci. Mezi optimalizované podmínky patří výběr extrakční předkolony, analytické kolony, výběr vhodné mobilní fáze a průběh gradientové eluce.

#### 4.6.1 Parametry detekce

Na základě excitačního a emisního spektra standardu OTA byly vybrány pro detekci vlnové délky Ex 335 nm a Em 460 nm. Vybrané vlnové délky odpovídají nejčastěji zvoleným vlnovým délkám pro fluorescenční detekci OTA v řadě zveřejněných studií.

#### 4.6.2 Volba mobilní fáze

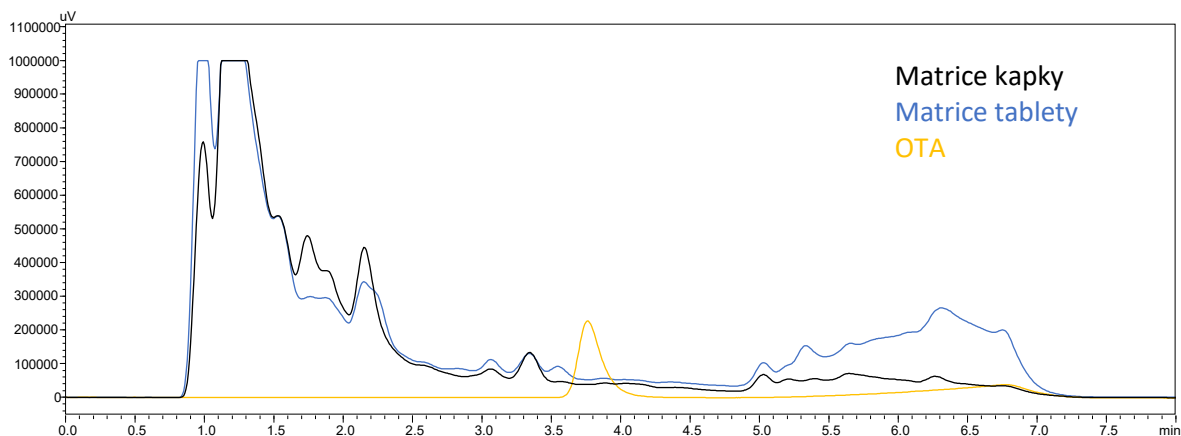
Pro on-line propojení úpravy a separace vzorku bylo vhodné využít gradientovou eluci, kdy při nižších koncentracích organické fáze dojde k vymytí polárnějších složek matrice a silnější mobilní fáze eluuje analyt zakonzentrovaný na extrakční předkoloně. Pro lepší retenci neionizované formy slabě kyselého OTA na analytické koloně byla jako vodná složka mobilní fáze zvolena 0,5% kyselina octová. Jako organická složka mobilní fáze byl zvolen acetonitril.

#### 4.6.3 Optimalizace gradientové eluce

Se všemi 12 kolonami byly testovány dva gradienty o délce 8 minut, které jsou uvedeny v *tabulkách č. 7 a 8*. Cílem optimalizace gradientové eluce bylo dosáhnout separace OTA od složek matrice tobolek a kapek ostropestřce mariánského. Počáteční mísení organické a vodné fáze bylo u obou testovaných gradientů v poměru 45:55. Tento počáteční poměr mobilní fáze byl také nastaven v závěru gradientů pro kondicionaci extrakční kolony, která byla v následném kroku zapojena do on-line systému. Při testování gradientů s celkovým průtokem 1 ml/min byl nástřik vzorků potravních doplňků 10 µl a nástřik standardu OTA o koncentraci 1 mg/l 1 µl.

**Tabulka 7: Podmínky gradientu 1**

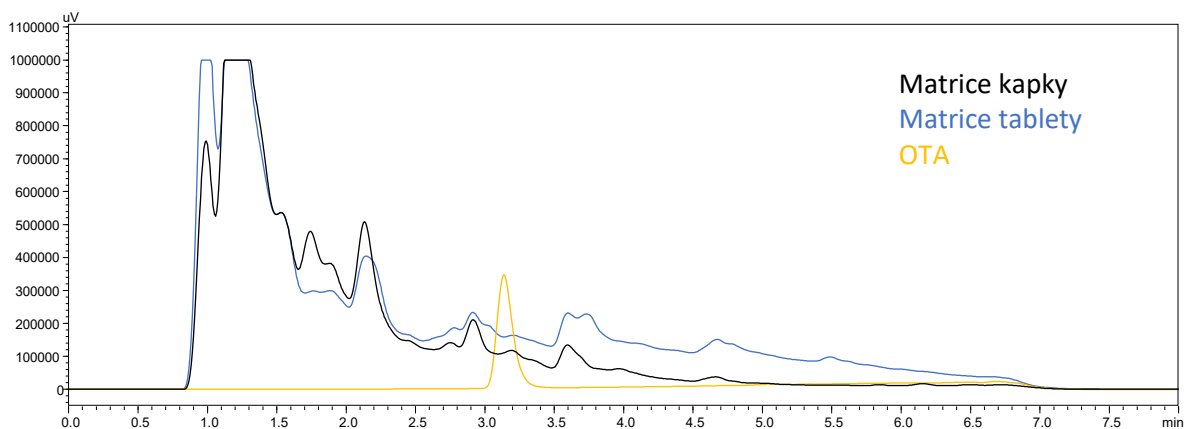
<b>Gradient 1</b>	<b>Složení mobilní fáze (%)</b>	
<b>Čas (min)</b>	<b>Vodná fáze</b>	<b>Organická fáze</b>
0–3,5	55	45
5,5	25	75
6–8	55	45



**Obrázek 5:** Záznam separace OTA na koloně Ascentis Express Phenyl-Hexyl (100 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), gradient 1

**Tabulka 8:** Podmínky gradientu 2

Gradient 2	Složení mobilní fáze (%)	
Čas (min)	Vodná fáze	Organická fáze
0–0,5	55	45
5,5	25	75
6–8	55	45



**Obrázek 6:** Záznam separace OTA na koloně Ascentis Express Phenyl-Hexyl (100 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), gradient 2

Předchozí chromatogramy zobrazují separaci využívající gradient 1 a 2. Při využití gradientu 2, u kterého byl kratší isokratický krok, docházelo u většiny testovaných kolon k eluci OTA v retenčním čase, při kterém eluovaly také interference matrice. Byl proto využit gradient 1, při němž došlo k dostatečnému oddělení OTA od složek matrice.

U zvoleného gradientu bylo následně v on-line SPE spojení testováno přepnutí ventilu v čase 1 minuty, 2 minut a 3 minut. Při prodloužení promývací fáze nedošlo ke zlepšení, a proto bylo přepnutí ventilu nastaveno na 1 minutu pro co nejkratší trvání celé analýzy. Byl otestován také celkový průtok pumpy A a B nastavený na 1,5 ml/min, při kterém ale nedošlo k zúžení píku OTA, a tak byl zachován průtok 1 ml/min. Finální podmínky gradientové eluce zobrazuje *tabulka č. 9*.

**Tabulka 9:** Podmínky gradientu 1 SPE

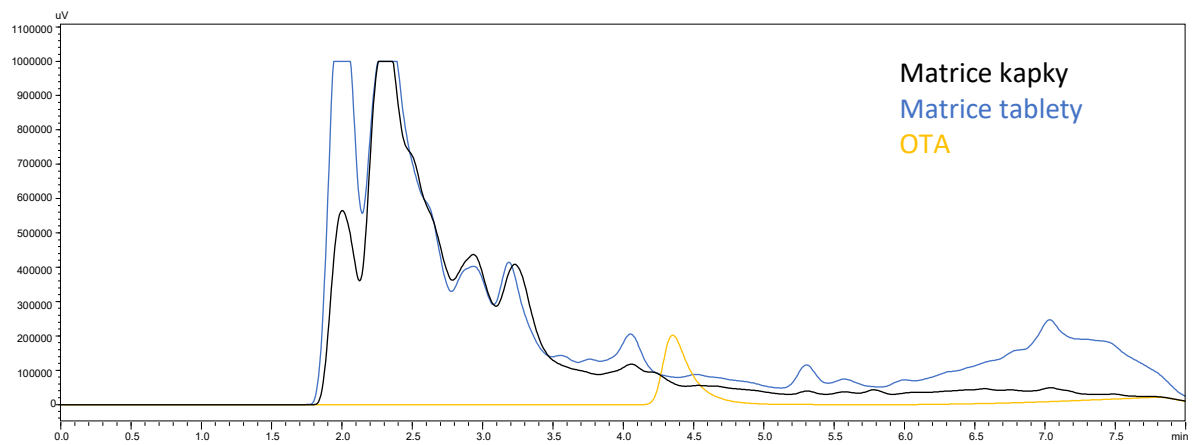
Gradient 1 SPE	Složení mobilní fáze (%)	
Čas (min)	Vodná fáze	Organická fáze
Přepnutí ventilu 1 min		
1–4,5	55	45
6,5	25	75
7–9	55	45

#### 4.6.4 Výběr kolony

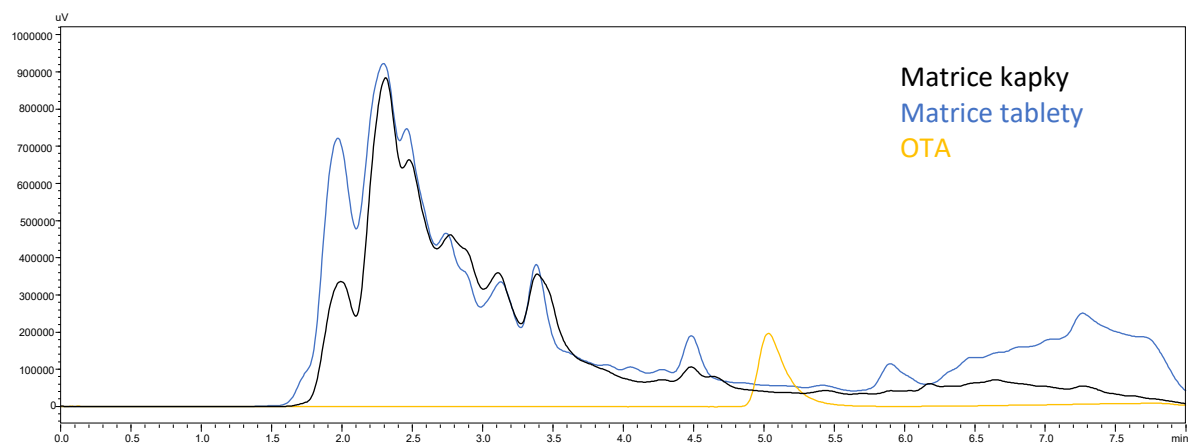
Bylo testováno několik kolon s velikostí částic 2,7  $\mu\text{m}$ , 3  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$ . Cílem bylo vybrat analytickou kolonu, na které dojde k oddělení píku OTA od ostatních interferujících složek matrice. Všechny kolony uvedené v kapitole 4.1 byly otestovány s gradientovou elucí před zapojením do on-line systému. Při výběru kolony byl nástřík standardu OTA o koncentraci 1 mg/l 1  $\mu\text{l}$  a objem nástříku vzorků potravních doplňků 10  $\mu\text{l}$ . Bylo vybráno 5 analytických kolon, u kterých docházelo k nejlepšímu oddělení analytu od interferujících látek matrice vzorku: ACE 3 C4-300 (150 x 4,6 mm, 3  $\mu\text{m}$ ), ACE 3 Phenyl-300 (150 x 4,6 mm, 3  $\mu\text{m}$ ), Ascentis Express Phenyl-Hexyl (100 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), Kinetex Biphenyl (100 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) a Kinetex Phenyl-Hexyl (100 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ). U



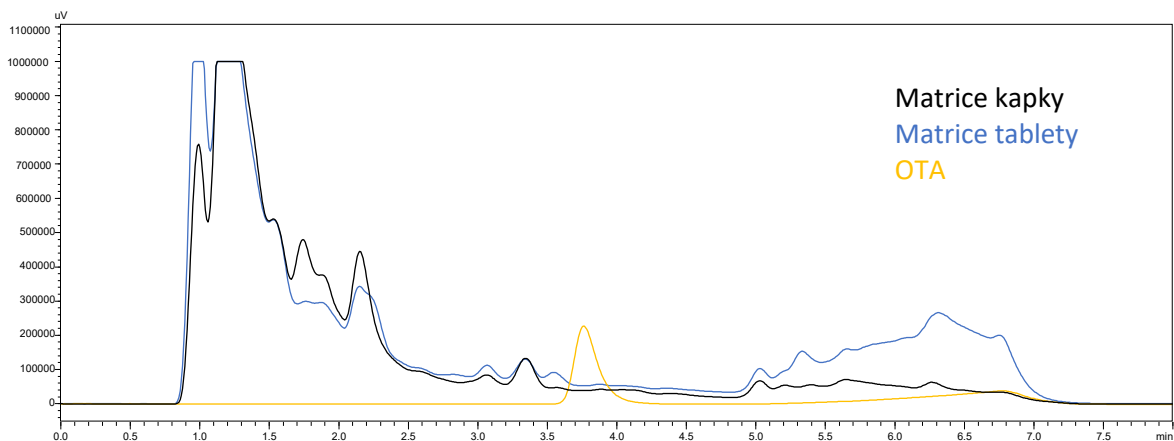
ostatních testovaných kolon interferovaly ve shodný retenční čas složky matrice a standard OTA.



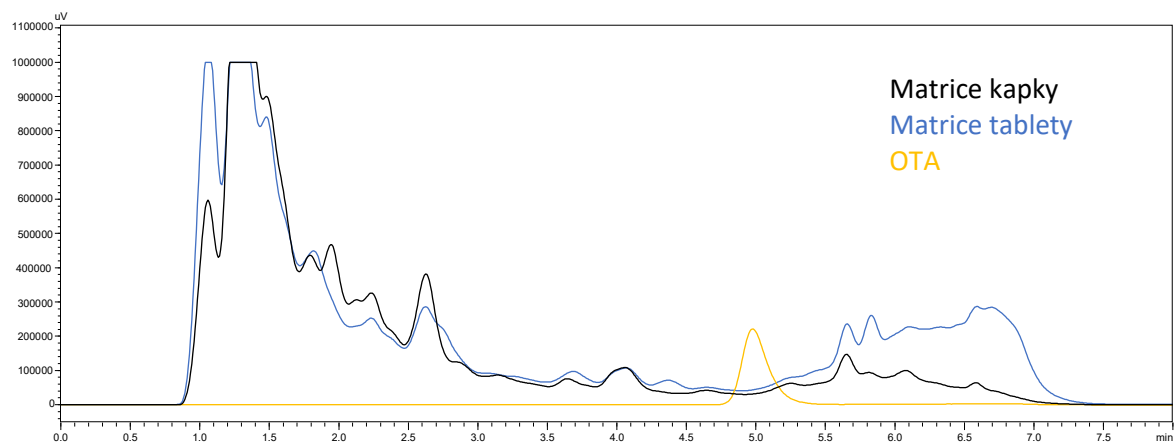
**Obrázek 7:** Záznam separace OTA na koloně ACE 3 C4-300 (150 x 4,6 mm, 3  $\mu$ m), gradient 1



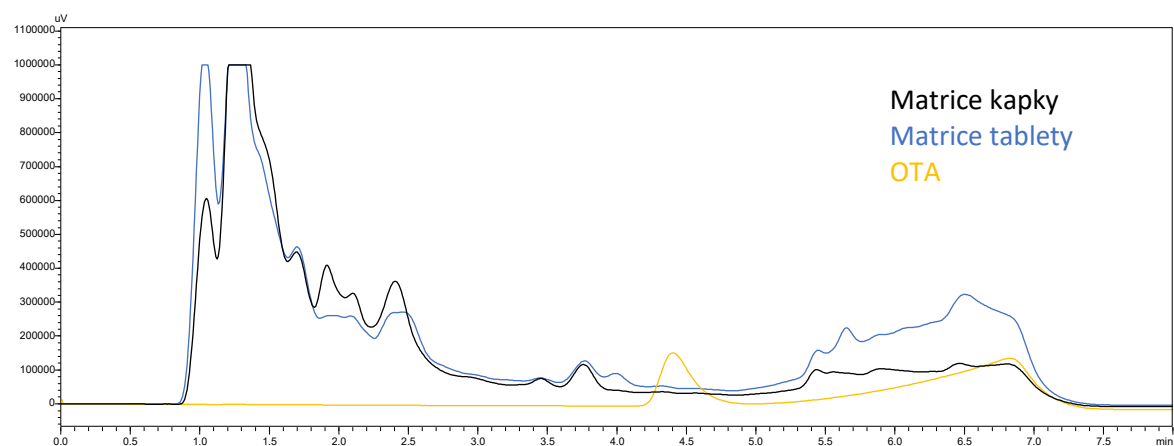
**Obrázek 8:** Záznam separace OTA na koloně ACE 3 Phenyl-300 (150 x 4,6 mm, 3  $\mu$ m), gradient 1



**Obrázek 9:** Záznam separace OTA na koloně Ascentis Express Phenyl-Hexyl (100 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), gradient 1

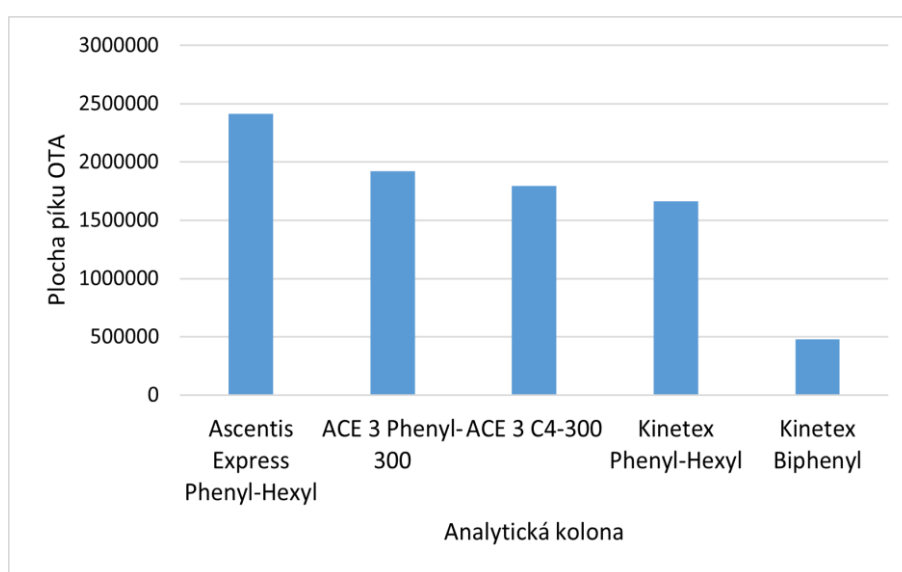


**Obrázek 10:** Záznam separace OTA na koloně Kinetex Biphenyl (100 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), gradient 1



**Obrázek 11:** Záznam separace OTA na koloně Kinetex Phenyl-Hexyl (100 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), gradient 1

Vybrané analytické kolony byly následně zapojeny do on-line SPE systému s vybranou extrakční předkolonou Ascentis Express RP-Amide. Při testování těchto kolon byl objem nástřiku na extrakční předkolonu opět 1 µl standardu OTA o koncentraci 1 mg/l a využívána byla promývací fáze tvořena 5% acetonitrilem. K nejlepšímu přečištění vzorku a zároveň zachytu OTA, jehož pík byl dostatečně úzký a oddělený od složek matrice, docházelo v propojení extrakce na předkoloně Ascentis Express RP-Amide (5 x 2,1 mm, 5 µm) a následné separace na koloně Ascentis Express Phenyl-Hexyl (100 x 4,6 mm, 5 µm). Následující graf (obrázek č. 12) znázorňuje plochu píku OTA po on-line SPE a separaci na testovaných kolonách.



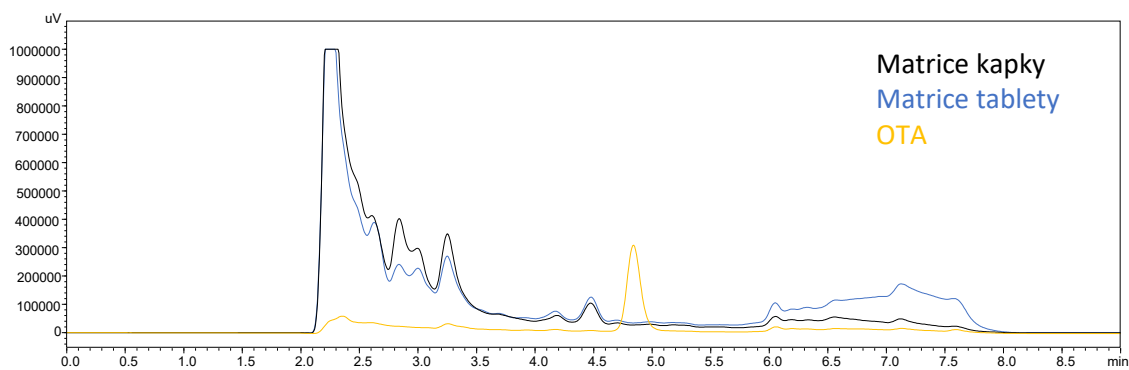
**Obrázek 12:** Retence OTA na různých typech kolon, gradient 1 SPE, promývací fáze 5% acetonitril

#### 4.6.5 Volba promývací fáze

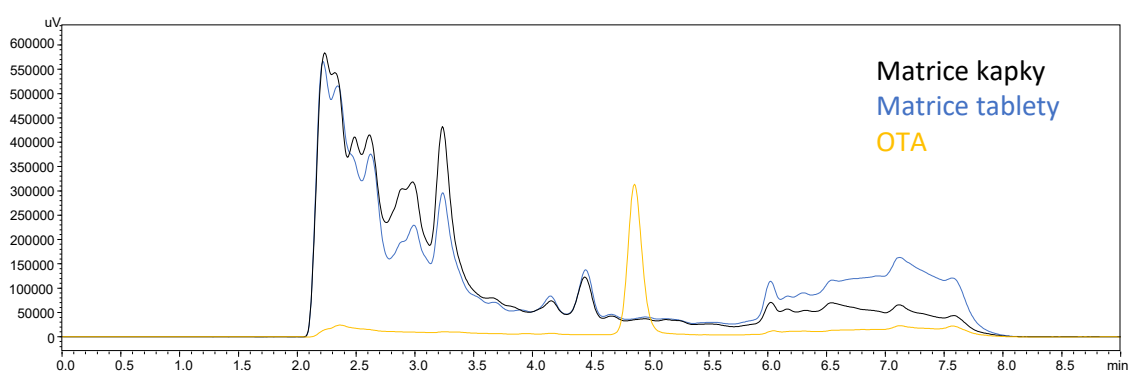
Před optimalizací promývací fáze byla vybrána extrakční předkolona. Testovány byly dvě komerčně dostupné předkolony Ascentis Express RP-Amide (5 x 2,1 mm, 5 µm), Ascentis Express C18 (5 x 4,6 mm, 2,7 µm) a také extrakční kolony, kde byla cartridge o velikosti 10 x 4,6 mm naplněna různými typy nanovláken (poly-ε-kaprolakton, semiaromatický polyamid 6-3-T, polyamid 6/12 s delším alifatickým řetězcem). K nejlepšímu přečištění matrice a zároveň k retenci standardu OTA docházelo na předkoloně Ascentis Express RP-Amide, která byla dále využívána při optimalizaci promývací fáze.

Při optimalizaci promývací fáze byl nástřik standardu OTA o koncentraci 1 mg/l 1  $\mu$ l a objem nástřiku vzorků potravních doplňků 10  $\mu$ l. Jako promývací fáze byly testovány rostoucí koncentrace methanolu, acetonitrilu a jejich rostoucí koncentrace okyselené kyselinou octovou. Při nižších koncentracích methanolu a acetonitrilu nedocházelo k dostatečnému vymytí interferujících látek, při vyšších koncentracích naopak docházelo k vymývání OTA. Srovnatelné promývací účinky měly fáze tvořené 15% acetonitrilem a 20% methanolem, při jejichž použití docházelo k dostatečnému zachytu analytu. Z důvodu lepšího oddělení píku OTA od složek matrice potravního doplňku byl jako výsledná promývací fáze zvolen 20% metanol. Promývací fáze nakonec nebyla okyselená, jelikož při okyselení nedošlo k nárůstu plochy OTA, a tedy ani zlepšení retence analytu. Chromatografické záznamy vybraných analýz při optimalizaci promývací fáze zobrazují následující *obrázky č.13-20*.

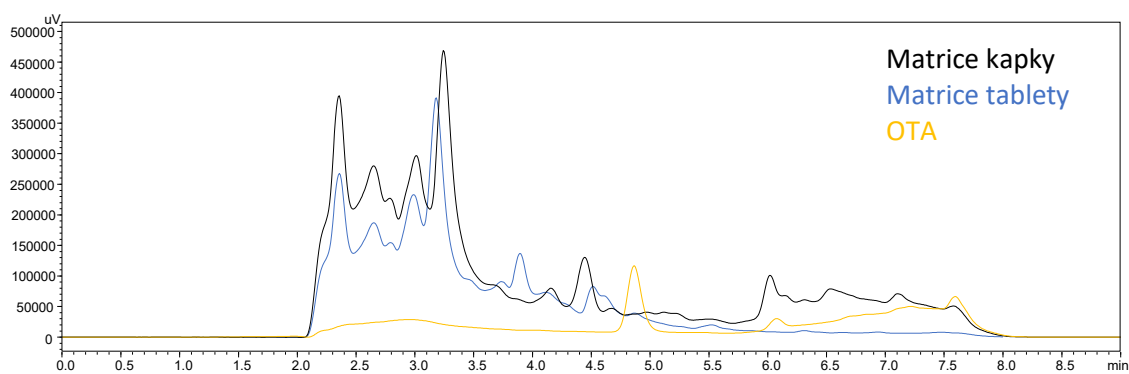
Optimalizována byla také délka promývání a rychlost průtoku promývací fáze. Konkrétně byla testována doba promývání 1 minuta, 2 a 3 minuty. Při prodloužení promývání na 2 minuty nedošlo k žádnému zlepšení, při 3 minutách již docházelo k vymývání OTA. Zachována byla tedy doba promývání 1 min. Následně byla testována rychlost průtoku promývací fáze 1 ml/min, 2ml/min a 3 ml/min. Opět nedošlo ke zlepšení, a proto byla zachována promývací fáze dlouhá 1 minutu při průtoku 1 ml/min.



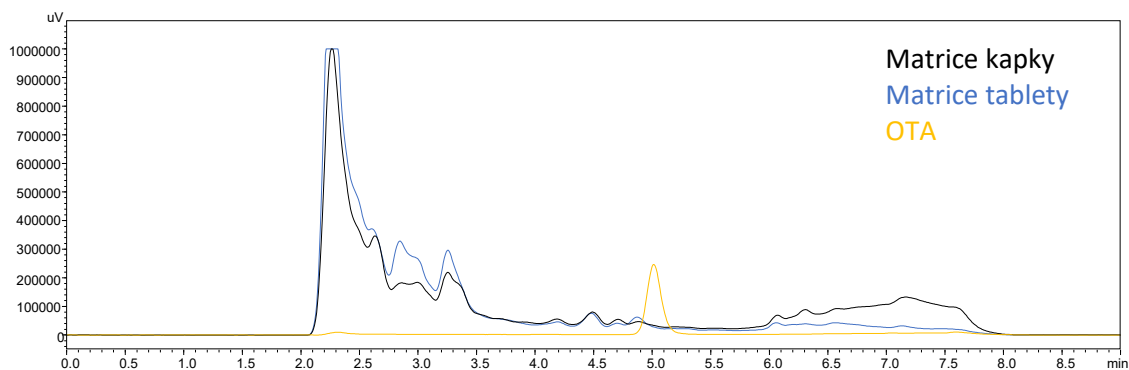
**Obrázek 13:** Záznam separace OTA na koloně Ascentis Express Phenyl-Hexyl (100 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), gradient SPE 1, promývací fáze 5% acetonitril



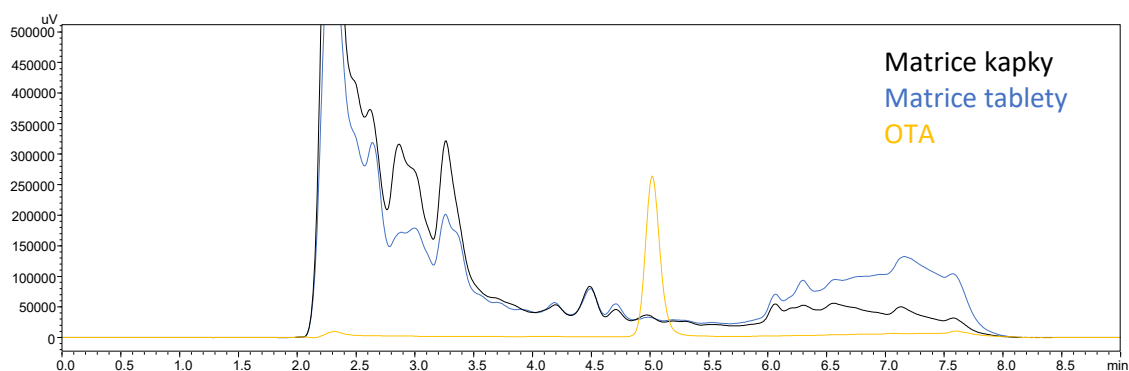
**Obrázek 14:** Záznam separace OTA na koloně Ascentis Express Phenyl-Hexyl (100 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), gradient SPE 1, promývací fáze 15% acetonitril



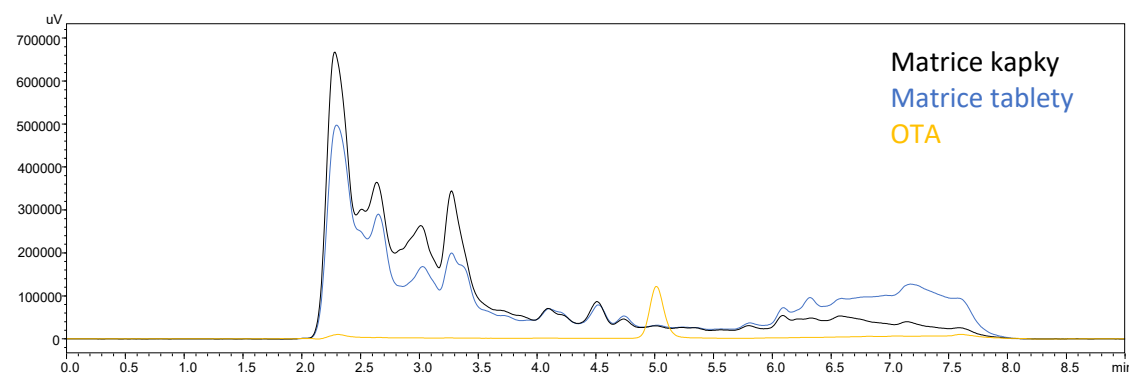
**Obrázek 15:** Záznam separace OTA na koloně Ascentis Express Phenyl-Hexyl (100 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), gradient SPE 1, promývací fáze 20% acetonitril



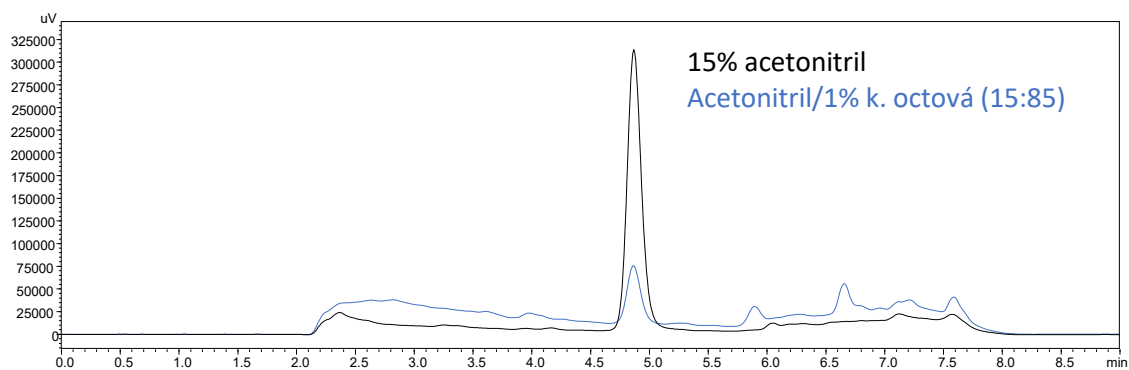
**Obrázek 16:** Záznam separace OTA na koloně Ascentis Express Phenyl-Hexyl (100 x 4,6 mm, 5 μm), gradient SPE 1, promývací fáze 10% methanol



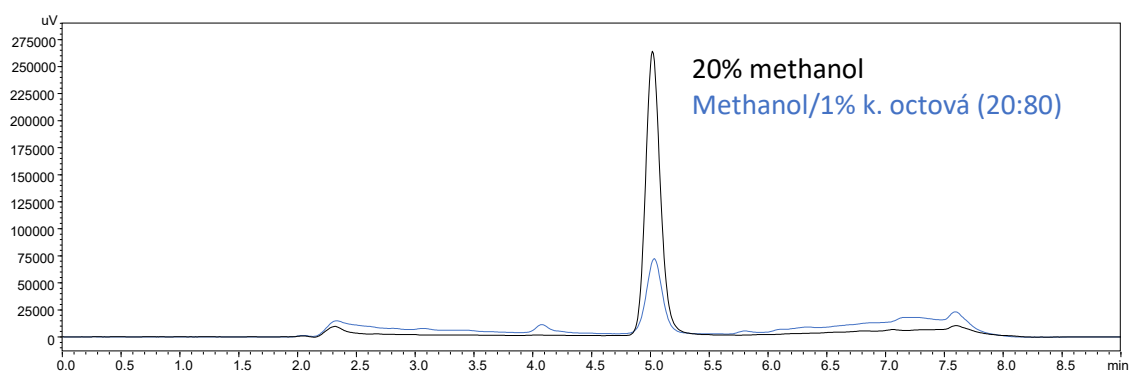
**Obrázek 17:** Záznam separace OTA na koloně Ascentis Express Phenyl-Hexyl (100 x 4,6 mm, 5 μm), gradient SPE 1, promývací fáze 20% methanol



**Obrázek 18:** Záznam separace OTA na koloně Ascentis Express Phenyl-Hexyl (100 x 4,6 mm, 5 μm), gradient SPE 1, promývací fáze 25% methanol



**Obrázek 19:** Porovnání separace OTA při využití 15% acetonitrilu/okyseleného 15% acetonitrilu jako promývací fáze



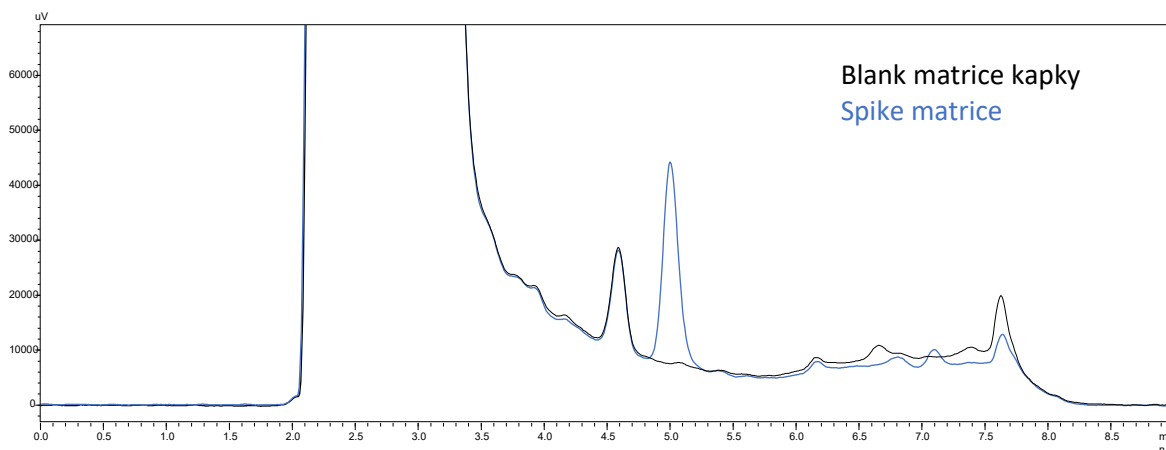
**Obrázek 20:** Porovnání separace OTA při využití 20% methanolu/okyseleného 20% methanolu jako promývací fáze

#### 4.7 Optimální podmínky pro HPLC analýzu

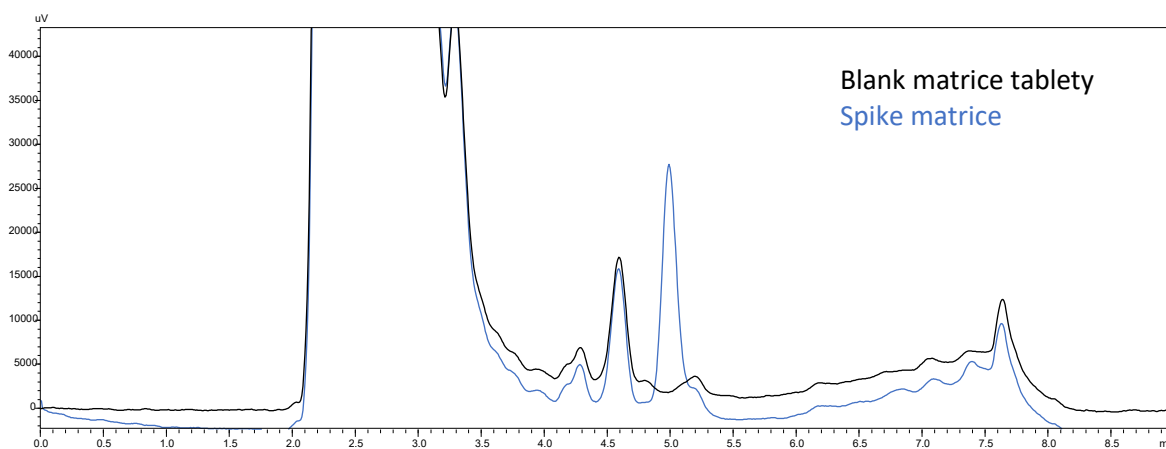
Kolona	Ascentis Express Phenyl-Hexyl, 100 x 4,6 mm, 5 µm
Předkolona	Ascentis Express RP-Amide, 5 x 2,1 mm, 5 µm
Dávkování	50 µl
Detekce	Fluorescenční, Ex 335 nm, Em 460 nm
Mobilní fáze	Acetonitril/0,5 kyselina octová
Typ eluce	Gradientová
Průběh gradientu	1–4,5 min isokratický průběh (45:55), 4,5–6,5 min lineární nárůst gradientu (75:25), 6,5–7 min rychlý pokles gradientu, 7–9 min isokratický průběh při původních podmínkách (45:55)
Průtok	1 ml/min
Promývací fáze	20% methanol
Čas přepnutí ventilu	1 min
Průtok	1 ml/min
Délka analýzy	9 min
Teplota	40 °C



Následující chromatogramy zobrazují separaci blank vzorků obou typů matrice a záznamy separace jejich spike vzorků o koncentraci 5  $\mu\text{g/l}$  OTA za výše popsaných separačních podmínek.



**Obrázek 21:** Záznam separace matrice kapek a spike OTA o koncentraci 5  $\mu\text{g/l}$  za optimálních podmínek



**Obrázek 22:** Záznam separace matrice tablet a spike o koncentraci 5  $\mu\text{g/l}$  za optimálních podmínek

## 5 Výsledky

### 5.1 Test způsobilosti chromatografického systému (SST)

Způsobilost chromatografického systému před jeho použitím byla ověřována měřením pracovního roztoku OTA o koncentraci 15 µg/l připraveného dle kapitoly 4.4.4. Pracovní roztok OTA byl měřen ve třech nástřicích o objemu 50 µl, následně byl hodnocen faktor asymetrie píku, jehož doporučená hodnota pro SST je < 2. Faktor asymetrie  $A_s$  je vyjádřen vztahem:

$$A_s = \frac{t}{f}$$

kde  $t$  je šířka sestupné části píku a  $f$  šířka části vzestupné v 5 % výšky píku. Vedle faktoru asymetrie je možné symetrii píku popisovat pomocí faktoru chvostování  $T$  (tailing factor), pro který platí:

$$T = \frac{W_{0,05}}{2f}$$

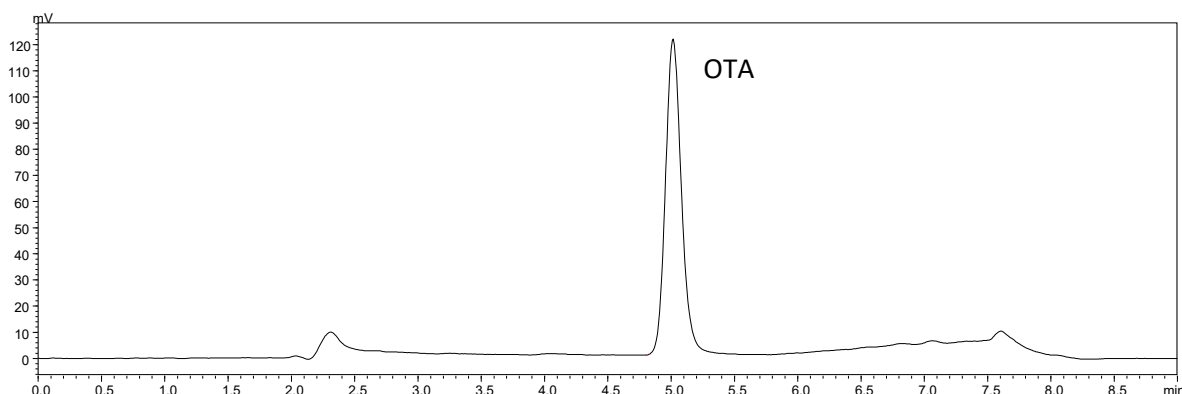
kde  $W_{0,05}$  je šířka píku v 5 % jeho výšky. Faktor chvostování byl automaticky vyhodnocen chromatografickým softwarem LC Solutions a byl využit pro výpočet faktoru symetrie dle vztahu:

$$A_s = 2T - 1$$

Současně byla v rámci SST hodnocena i opakovatelnost nástřiku pro 6 analýz.

**Tabulka 10:** Výsledky testu chromatografického systému

Analyt	$t_R$ (min)	$W_{0,05}$	$T$	$A_s$	Opak. (RSD, %)
OTA	5,010	0,300	1,157	1,314	0,93



**Obrázek 23:** Záznam analýzy OTA o koncentraci 15 µg/l pro SST

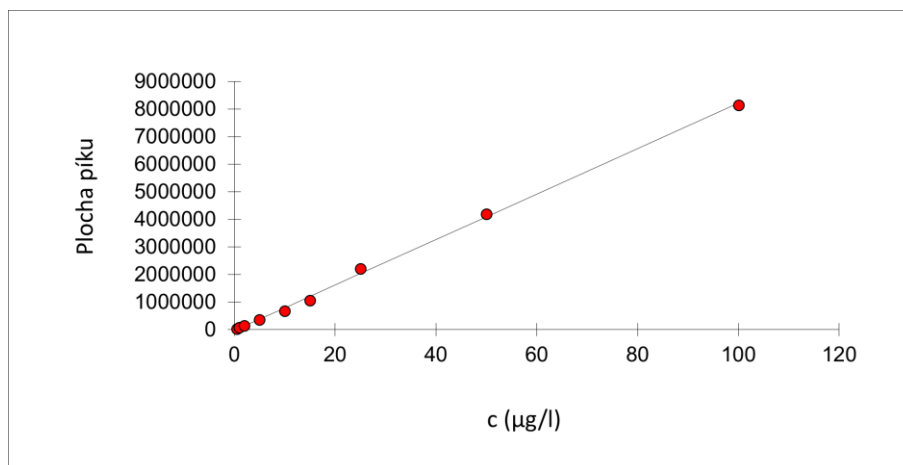
## 5.2 Validace metody

### 5.2.1 Linearita

Pro určení linearity byly připraveny vzorky dle kapitol 4.4.4 a 4.4.7 v 8 nebo 9 koncentračních hladinách v rozmezí 0,5–100 µg/l. U každé koncentrace byly provedeny tři nástřiky a následně byla stanovena průměrná plocha píku z těchto 3 měření. Linearita OTA byla určena pro roztok standardu v 10% methanolu, ve vzorcích matrice tobolek NatureVia Ostropestřec Forte a matrice kapek Dr. Popov Ostropestřec mariánský.

**Tabulka 11:** Průměrné plochy píků OTA v 10% methanolu

Koncentrace OTA (µg/l)	Plocha píku OTA
0,5	27577
1	66962
2	133863
5	358546
10	665044
15	1055618
25	2199555
50	4184039
100	8141768



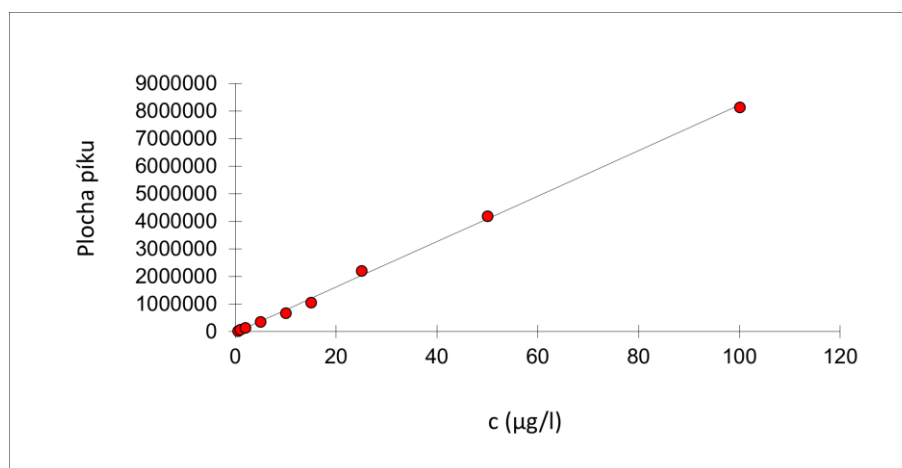
**Obrázek 24:** Graf lineární regrese – OTA v 10% methanolu

**Tabulka 12:** Parametry lineární regrese – OTA v 10% methanolu

Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$				
Počet bodů	n =	9	Odhad chyby	
Směrnice	k =	82431,18	±	1162,652
Abs. člen	q =	-39325,45	±	44996,36
Korelační koef.	r =	0,999304		
Reziduální odch.	s =	108132,9		

**Tabulka 13:** Průměrné plochy píků OTA v matrici tobolek

Koncentrace OTA ( $\mu\text{g/l}$ )	Plocha píku OTA
1	63888
2	152374
5	108131
10	624574
15	856005
25	1705030
50	3376171
100	6251642



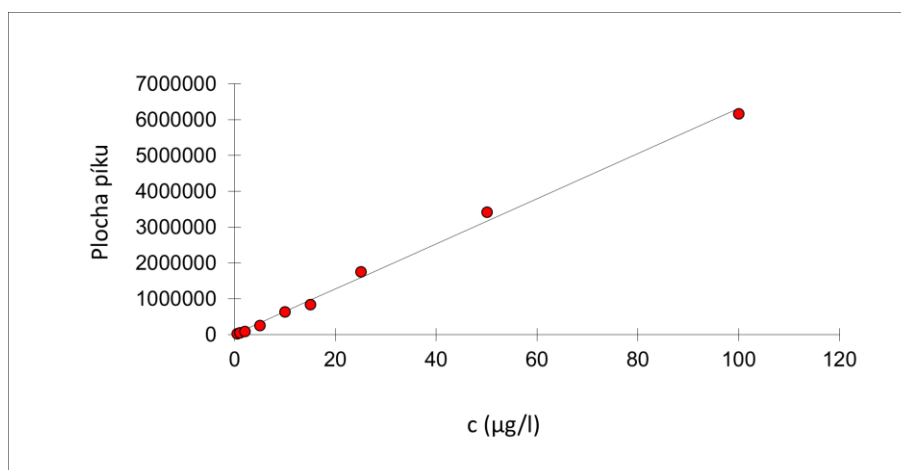
**Obrázek 25:** Graf lineární regrese – OTA v matrici tobolek

**Tabulka 14:** Parametry lineární regrese – OTA v matrici tobolek

Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$				
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby	
Směrnice	k =	63802,08	±	1550,975
Abs. člen	q =	-16627,29	±	63665,59
Korelační koef.	r =	0,998232		
Reziduální odch.	s =	139346,3		

**Tabulka 15:** Průměrné plochy píků OTA v matrici kapek

Koncentrace OTA (µg/l)	Plocha píku OTA
0,5	30061
1	61401
2	91644
5	260230
10	639365
15	846509
25	1759767
50	3428969
100	6169071



**Obrázek 26:** Graf lineární regrese – OTA v matrici kapek

**Tabulka 16:** Parametry lineární regrese – OTA v matrici kapek

Statistické parametry pro regresi : $y = kx + q$				
Počet bodů	n =	9	Odhad chyby	
Směrnice	k =	63027,28	±	1523,396
Abs. člen	q =	16203,24	±	58957,7
Korelační koef.	r =	0,997962		
Reziduální odch.	s =	141684		

## 5.2.2 Opakovatelnost

K ověření opakovatelnosti byly využity pracovní roztoky standardu OTA připravené dle kapitoly 4.4.4. Byly vybrány pracovní roztoky standardu na koncentračních hladinách 5 µg/l, 15 µg/l a 50 µg/l, které byly měřeny v 8 nástřicích o objemu 50 µl. Ze získaných ploch píku OTA byly vypočteny relativní směrodatné odchylky.

**Tabulka 17:** Stanovení opakovatelnosti metody

Nástřík	Plocha píku standardu OTA		
	c OTA = 5 µg/l	c OTA = 15 µg/l	c OTA = 50 µg/l
1	390661	1120030	4236702
2	389722	1105952	4211349
3	397305	1107645	4191882
4	397926	1108520	4189297
5	399553	1101940	4190497
6	393673	1099186	4179691
7	390633	1089853	4161245
8	390976	1085475	4157843
<b>Průměr</b>	393806	1102325	4189813
<b>SD</b>	3656	10264	24000
<b>RSD (%)</b>	0,93	0,93	0,57

## 5.2.3 Přesnost

Pro stanovení přesnosti byly připraveny vzorky dle kapitoly 4.4.8. Využity byly potravní doplňky NatureVia Ostropestřec Forte (tobolky) a Dr. Popov Ostropestřec mariánský (kapky). Od obou typů matrice bylo připraveno 6 vzorků s obsahem OTA, které byly proměřeny ve 3 nástřicích o objemu 50 µl.

**Tabulka 18: Stanovení přesnosti metody**

Číslo vzorku	Průměrné plochy píku OTA	
	NatureVia Ostropestřec Forte tobolky	Dr. Popov Ostropestřec mariánský bylinné kapky
1	924486	919647
2	915234	897791
3	881537	928490
4	922481	978027
5	908292	948324
6	885593	949770
<b>Průměr</b>	906271	937008
<b>SD</b>	16923	25447
<b>RSD (%)</b>	1,87	2,72

#### 5.2.4 Výtěžnost

Hodnoty naměřené pro určení přesnosti byly využity také pro stanovení výtěžnosti metody, kdy byly do poměru dány průměrné plochy píku OTA ve vzorku matrice a průměrné plochy píku OTA o koncentraci 15 µg/l.

**Tabulka 19: Stanovení výtěžnosti metody v tobolkách**

	Koncentrace OTA (µg/l)	Průměr plochy píku OTA	Výtěžnost (%)
Standard OTA	15	979222	
NatureVia Ostropestřec Forte tobolky	15	906271	92,55



**Tabulka 20:** Stanovení výtěžnosti metody v kapkách

	Koncentrace OTA ( $\mu\text{g/l}$ )	Průměr plochy píku OTA	Výtěžnost (%)
Standard OTA	15	995454	
Dr. Popov Ostropestřec mariánský bylinné kapky	15	937008	94,13

### 5.2.5 Limit detekce a limit kvantifikace

Limit kvantifikace (LOQ) odpovídá koncentraci analytu, kterou je možné stanovit s přijatelnou přesností a správností a bývá vyjádřen jako desetinásobek šumu základní linie. LOQ byl stanoven postupným ředěním standardu OTA a vzorků obou typů matric s obsahem OTA a určen jako nejnižší bod kalibračních křivek.

Jako trojnásobek šumu základní linie je vyjádřen limit detekce (LOD), který odpovídá koncentraci analytu, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. LOD pro standard a oba typy matrice byly spočítány z experimentálně zjištěných hodnot LOQ. LOD byl vypočítán pomocí vztahů:

$$LOD = \frac{3h_n}{m}$$

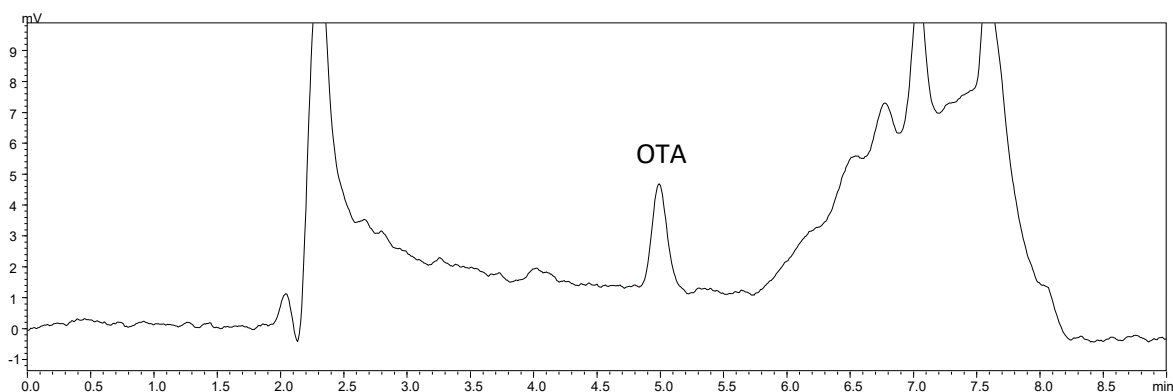
$$LOQ = \frac{10h_n}{m}$$

kde  $h_n$  představuje šum základní linie a  $m$  je směrnice kalibrační křivky. Mezi LOD a LOQ platí:

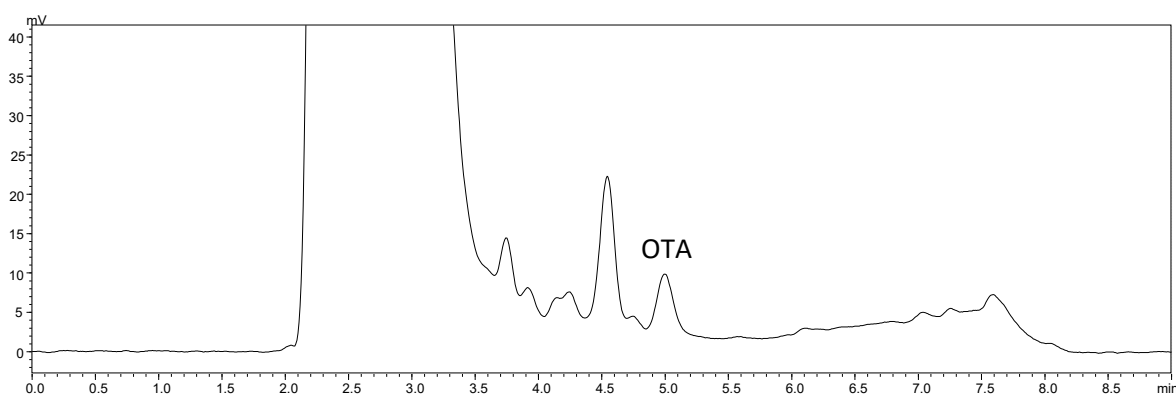
$$LOD = \frac{3LOQ}{10}$$

**Tabulka 21:** Limity detekce a kvantifikace

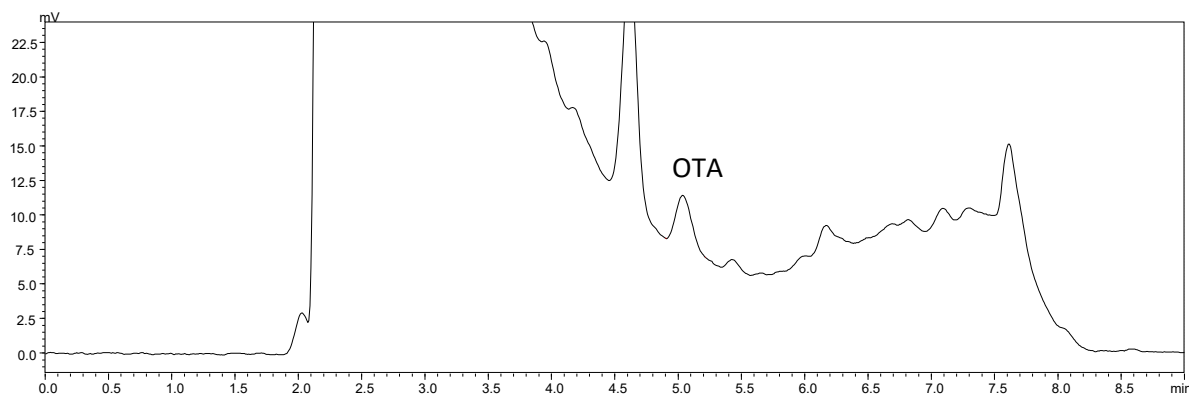
	LOD ( $\mu\text{g/l}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/l}$ )
Standard	0,15	0,5
NatureVia Ostropestřec Forte tobolky	0,3	1
Dr. Popov Ostropestřec mariánský bylinné kapky	0,15	0,5



**Obrázek 27:** Záznam analýzy standardu OTA o koncentraci 0,5 µg/l



**Obrázek 28:** Záznam analýzy OTA o koncentraci 1 µg/l v matrici tobolek



**Obrázek 29:** Záznam analýzy OTA o koncentraci 0,5 µg/l v matric kapek

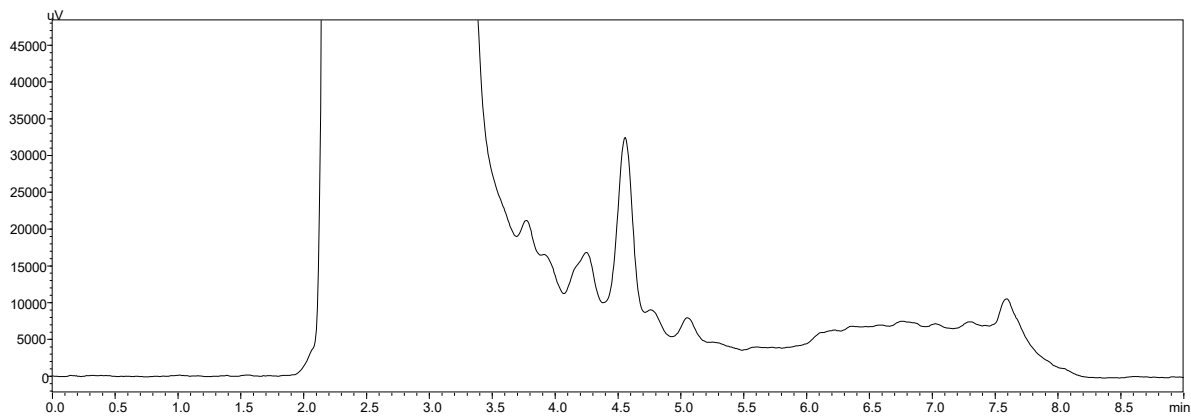
### 5.3 Stanovení ochratoxinu A ve vzorcích potravních doplňků

Pro stanovení OTA ve vzorcích bylo využito celkem 13 potravních doplňků, z nichž 2 byly ve formě kapek a 11 ve formě tablet/tobolek. Jednotlivé vzorky byly připraveny dle kapitoly 4.4.5 a 4.4.6. Od každého potravního doplňku byly připraveny tři vzorky,

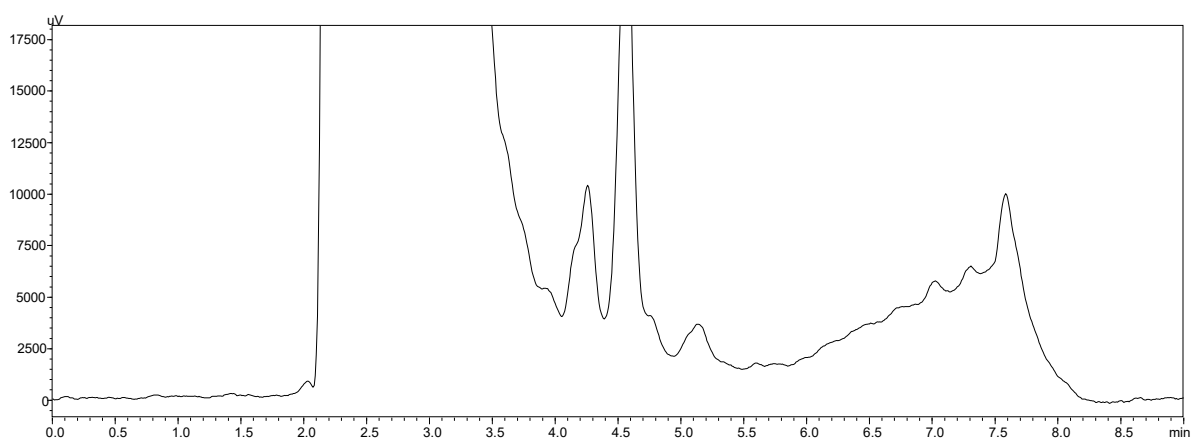
které byly do systému dávkovány o objemu 50 µl a měřeny třikrát. Ze třech měření byla vypočítána průměrná plocha píku, ze které byla vypočtena koncentrace OTA pomocí matricové kalibrační křivky. U všech analyzovaných vzorků byla hodnota OTA pod limitem detekce metody. Chromatografické záznamy těchto analýz zobrazují následující obrázky č. 30–42.

**Tabulka 22:** Stanovení OTA v potravních doplňcích

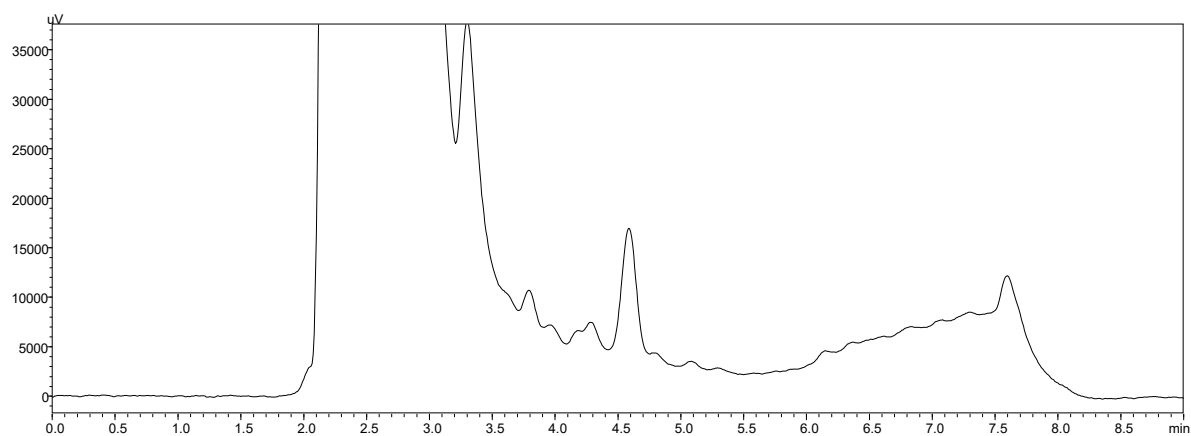
Vzorek	Koncentrace OTA (µg/l)
GS Ostropestřec mariánský	< LOD
Dr. Max Silymarin Premium	< LOD
Terezia Ostropestřec + Reishi Forte	< LOD
Farmax Ostropestřec Plus	< LOD
LIVSANE Silymarin&Cholin FORTE	< LOD
NatureVia Ostropestřec Forte	< LOD
Lagosa	< LOD
TOPVET Ostropestřec mariánský	< LOD
APOROSA Ostropestřec	< LOD
Jamieson Ostropestřec mariánský	< LOD
Hermeopa Ostropestřec	< LOD
Dr. Popov Ostropestřec mariánský bylinné kapky	< LOD
TOPVET Ostropestřec mariánský extrakt	< LOD



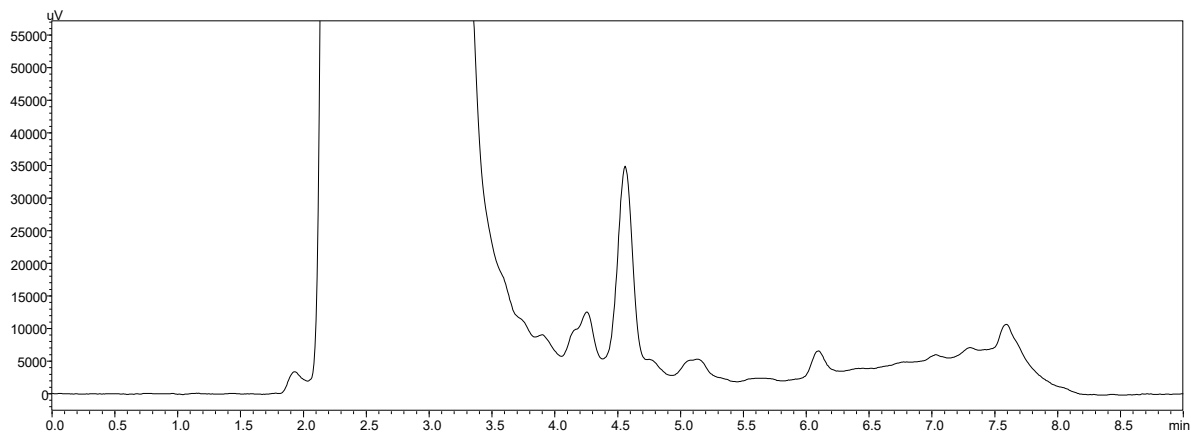
**Obrázek 30:** Záznam analýzy OTA v tabletách GS Ostropestřec mariánský



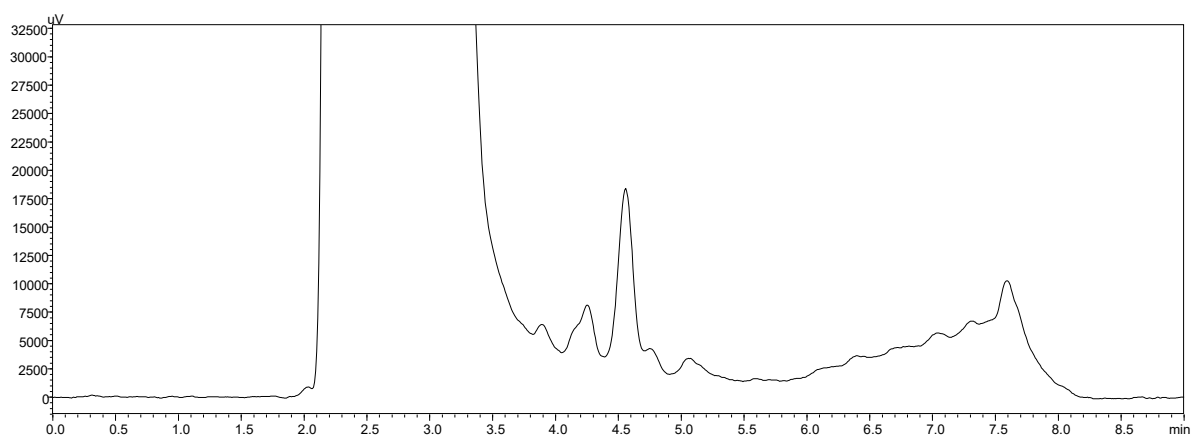
**Obrázek 31:** Záznam analýzy OTA v tobolkách Dr. Max Silymarin Premium



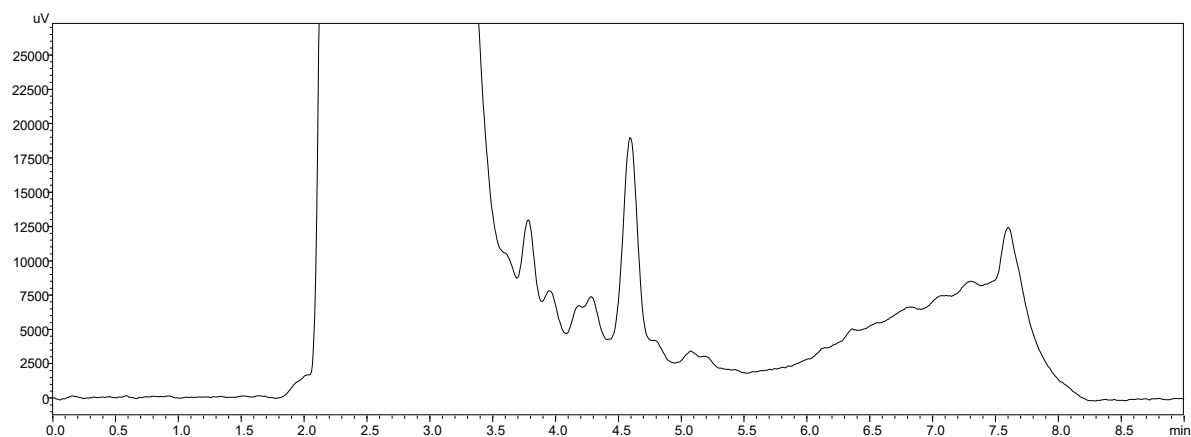
**Obrázek 32:** Záznam analýzy OTA v tobolkách Terezia Ostropestřec + Reishi Forte



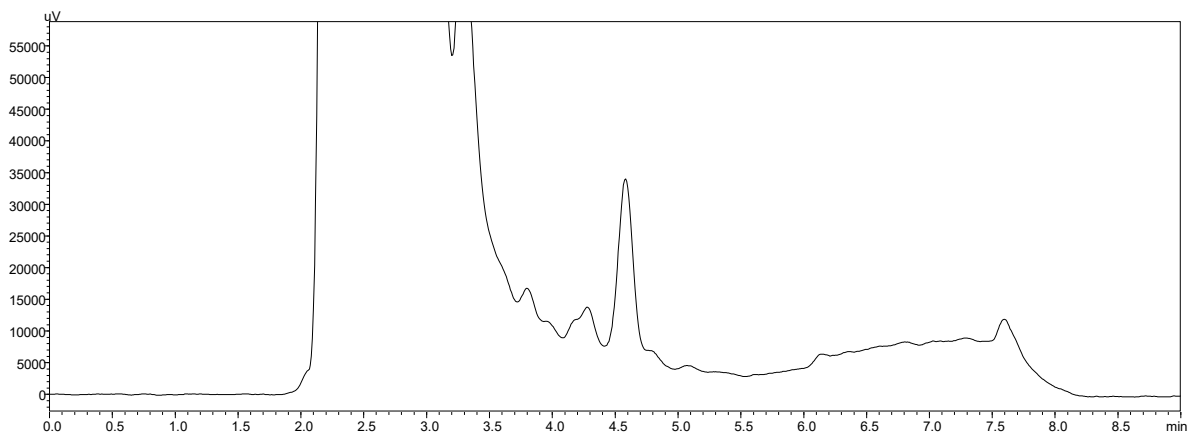
**Obrázek 33:** Záznam analýzy OTA v tobolkách Farmax Ostropestřec Plus



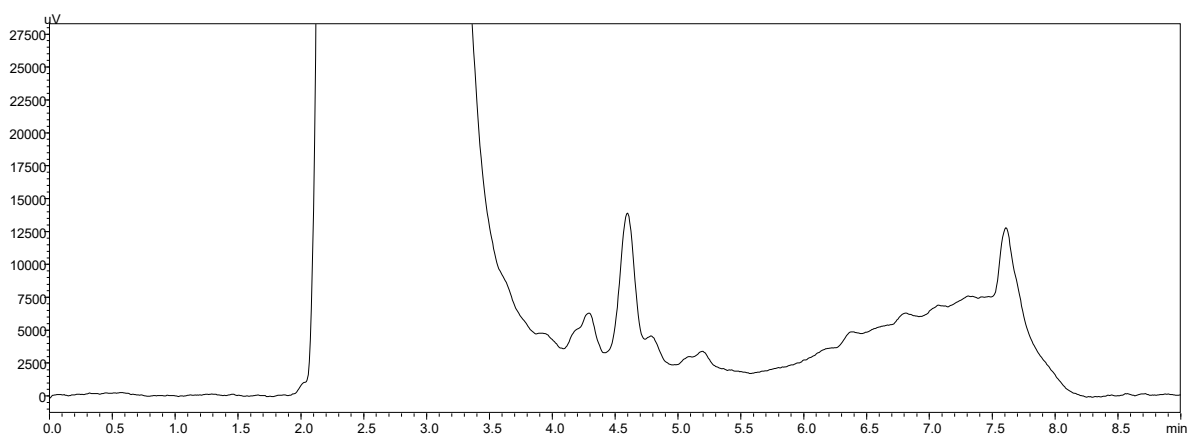
**Obrázek 34:** Záznam analýzy OTA v tobolkách LIVSANE Silymarin&Cholin FORTE



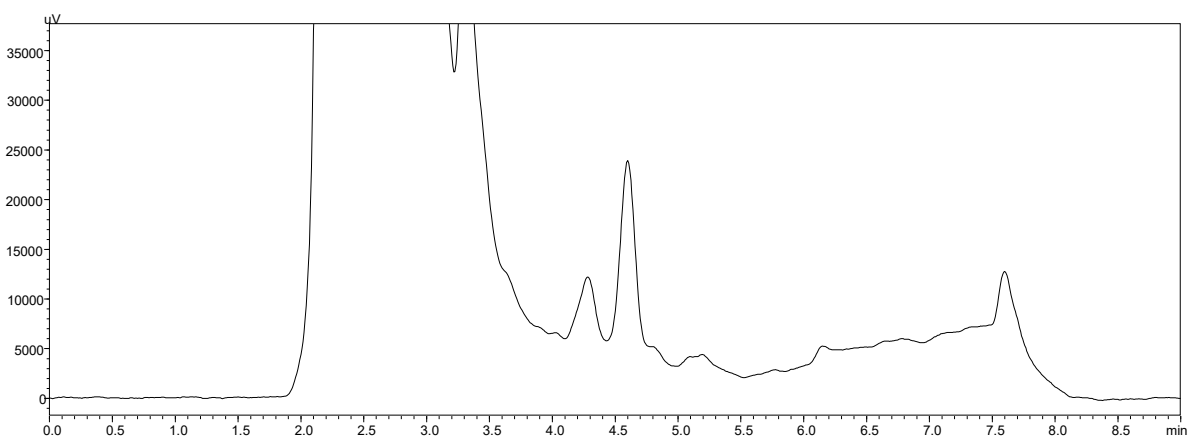
**Obrázek 35:** Záznam analýzy OTA v tobolkách NatureVia Ostropestřec Forte



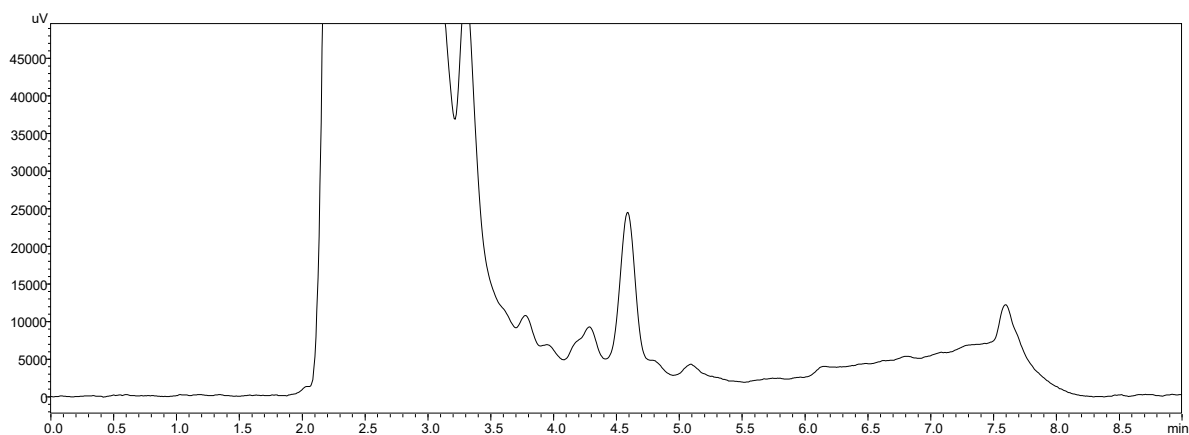
**Obrázek 36:** Záznam analýzy OTA v tabletách Lagosa



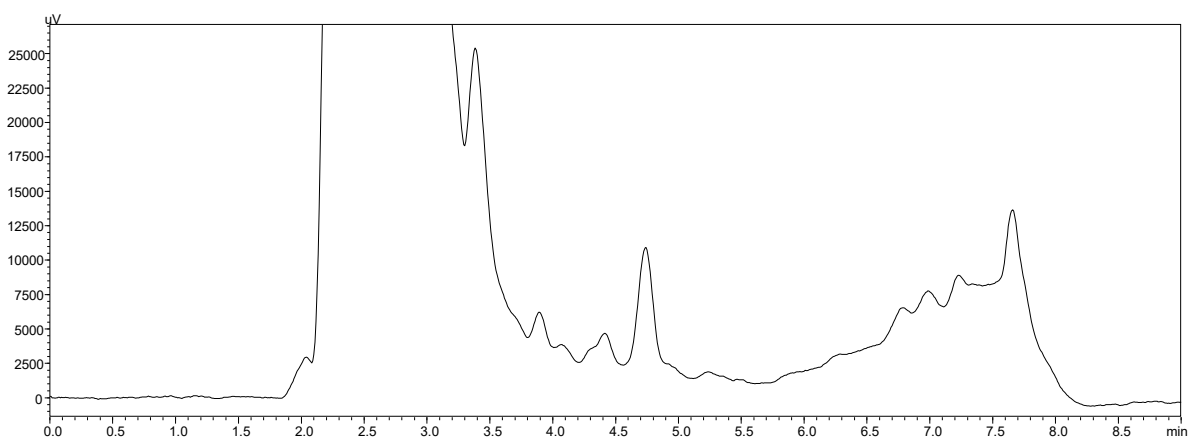
**Obrázek 37:** Záznam analýzy OTA v tobolkách TOPVET Ostropestřec mariánský



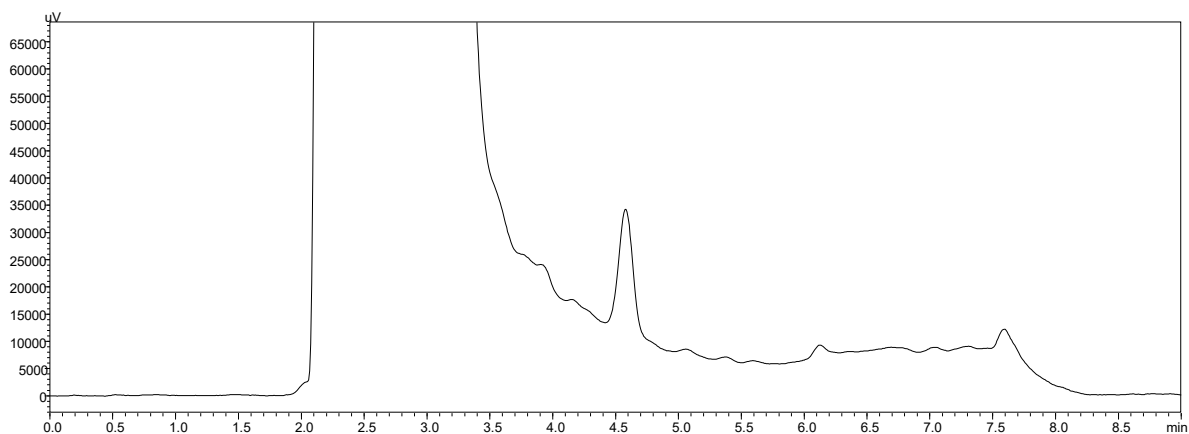
**Obrázek 38:** Záznam analýzy OTA v tabletách APOROSA Ostropestřec



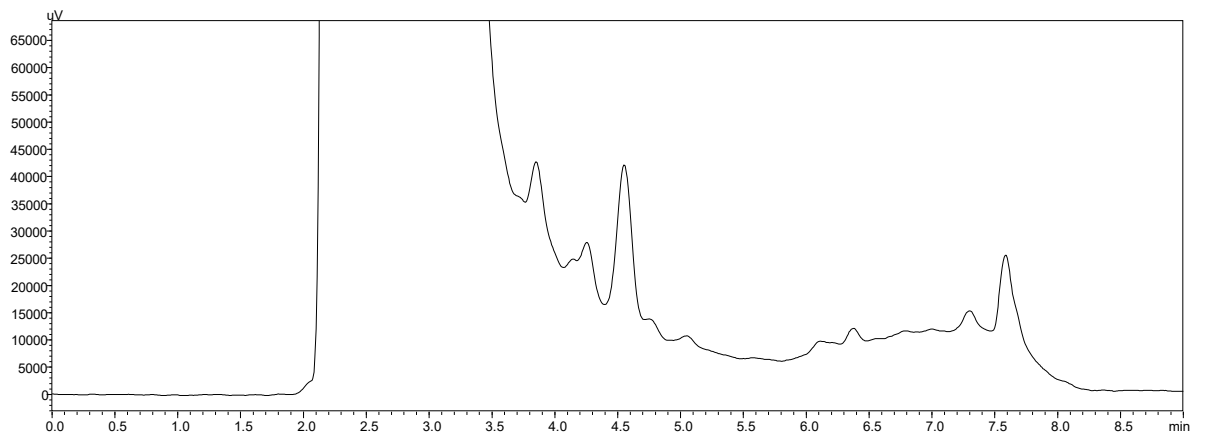
**Obrázek 39:** Záznam analýzy OTA v tabletách Jamieson Ostropestřec mariánský



**Obrázek 40:** Záznam analýzy OTA v tabletách Hermeopa



**Obrázek 41:** Záznam analýzy OTA v kapkách Dr. Popov Ostropestřec mariánský



**Obrázek 42:** Záznam analýzy OTA v kapkách TOPVET Ostropestřec mariánský



## 6 Závěr a diskuse

Cílem této diplomové práce bylo vytvořit a optimalizovat metodu pro stanovení mykotoxinu OTA v doplňcích stravy. Byla vyvinuta HPLC metoda využívající systém přepínání kolon pro on-line spojení SPE úpravy vzorku a následné separace. Součástí optimalizace metody byl výběr extrakční a analytické kolony, volba promývací fáze, optimalizace její délky a rychlosti průtoku, volba mobilní fáze, určení podmínek gradientové eluce a stanovení parametrů citlivé fluorescenční detekce.

Po optimalizaci byla metoda validována pro potravní doplňky ve formě tablet/tobolek a ve formě kapek. Vzorky potravních doplňků byly do systému dávkovány o objemu 50  $\mu$ l. Přečištění vzorku od interferujících látek probíhalo po dobu 1 minuty na předkoloně Ascentis Express RP-Amide (5 x 2,1 mm, 5  $\mu$ m) pomocí promývací fáze tvořené 20% methanolem. Následně došlo k přepnutí ventilu a analyt byl mobilní fází tvořenou acetonitrilem a 0,5% kyselinou octovou eluován na analytickou kolonu. Separace probíhala za režimu gradientové eluce na koloně Ascentis Express Phenyl-Hexyl (100 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) při 40 °C. Analyt byl detekován pomocí fluorescenčního detektoru nastaveného na vlnové délky Ex 335 nm, Em 460 nm.

Při validaci metody byla ověřena linearita OTA v roztoku standardu a v matrici kapek v koncentračním rozmezí 0,5–100  $\mu$ g/l. Ve vzorcích z pevné matrice potravních doplňků byla linearita OTA ověřena v rozmezí 1–100  $\mu$ g/l. Při testování linearity metody bylo dosaženo korelačních koeficientů o hodnotách 0,999 (OTA v 10% methanolu), 0,998 (OTA v matrici kapek) a 0,998 (OTA v matrici tobolek). Opakovatelnost metody byla měřena na třech koncentračních hladinách pracovního roztoku standardu ( 5  $\mu$ g/l, 15  $\mu$ g/l, 50  $\mu$ g/l) a vyjádřena pomocí relativní směrodatné odchylky, která byla u všech koncentrací < 1 %. Přesnost a výtěžnost metody byla určena na jedné koncentrační hladině OTA 15  $\mu$ g/l. Přesnost byla popsána relativní směrodatnou odchylkou s výsledkem 1,87 % pro matrici tobolek a 2,72 % pro matrici kapek. U matrice tobolek byla dosažena výtěžnost metody 92,55 % a u matrice kapek 94,13 %.

Celkem bylo analyzováno 13 vzorků potravních doplňků s obsahem ostropestřce mariánského, které jsou dostupné na českém trhu. Stanovené množství OTA bylo u všech doplňků pod LOD metody. U žádného z potravních doplňků nebyl v okolí retenčního času OTA identifikován žádný výrazný pík, který by odpovídal koncentraci

OTA na hladině 12 µg/l, která odpovídá maximálnímu přípustnému dennímu limitu při běžném dávkování potravních doplňků. Limit z roku 2006 byl stanoven 120 ng/kg OTA za týden. U člověka hmotnosti 70 kg odpovídá tento limit dávce 1,2 mikrogramu/den. To při přepočtu na roztok analyzované tablety odpovídá výše uvedené koncentraci 12 µg/l. Závěrem byly mimo tuto diplomovou práci vzorky předány ke srovnávací MS analýze a negativní výsledky u všech vzorků byly potvrzeny. Lze tedy konstatovat, že předpoklad výskytu OTA v doplňcích s obsahem ostropestřce mariánského, který byl několikrát potvrzen ve dřívějších studiích, nebyl potvrzen v této diplomové práci a potravní doplňky zakoupené začátkem roku 2023 na trhu v ČR nepředstavují bezpečnostní riziko.

## 7 Použitá literatura

- [1] Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical microbiology reviews*, 16(3), 497–516. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>
- [2] Mérillon, J. M., & Ramawat, K. G. (2017). *Fungal Metabolites*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4>
- [3] el Khoury, A., & Atoui, A. (2010). Ochratoxin a: general overview and actual molecular status. *Toxins*, 2(4), 461–493. <https://doi.org/10.3390/toxins2040461>
- [4] McQueen, C. A. (Ed.). (2010). *Comprehensive toxicology*. Elsevier.
- [5] Zapašník, A., Bryła, M., Waškiewicz, A., Ksieniewicz-Woźniak, E., & Podolska, G. (2021). Ochratoxin A and 2'R-Ochratoxin A in Selected Foodstuffs and Dietary Risk Assessment. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(1), 188. <https://doi.org/10.3390/molecules27010188>
- [6] Wang, Y., Wang, L., Liu, F., Wang, Q., Selvaraj, J. N., Xing, F., Zhao, Y., & Liu, Y. (2016). Ochratoxin A Producing Fungi, Biosynthetic Pathway and Regulatory Mechanisms. *Toxins*, 8(3), 83. <https://doi.org/10.3390/toxins8030083>
- [7] <https://bezpecnostpotravin.cz/termin/mykotoxiny/> (dostupné v lednu 2023)
- [8] Ochratoxin A. In: *ChemSpider: Search and share chemistry* [online]. [cit. 2023-05-04]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.8979.html>
- [9] Ringot, D., Chango, A., Schneider, Y. J., & Larondelle, Y. (2006). Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-biological interactions*, 159(1), 18–46. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.10.106>
- [10] Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Acquaviva, R., Barbagallo, I., Bognanno, M., & Galvano, F. (2013). Toxicity of ochratoxin a and its modulation by antioxidants: a review. *Toxins*, 5(10), 1742–1766. <https://doi.org/10.3390/toxins5101742>
- [11] Pfohl-Leszkowicz, A., & Manderville, R. A. (2007). Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular nutrition & food research*, 51(1), 61–99. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600137>
- [12] <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32022R1370&qid=1671387310913&from=EN> (dostupné v únoru 2023)
- [13] <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002L0046&qid=1676301887031&from=CS> (dostupné v únoru 2023)
- [14] <https://bezpecnostpotravin.cz/kategorie/doplanky-stravy/> (dostupné v únoru 2023)

- [15] <https://www.sukl.cz/leciva/jaky-je-rozdil-mezi-doplňky-stravy-a-volne-prodejnymi?highlightWords=dop%C5%88ky+stravy> (dostupné v únoru 2023)
- [16] <https://www.szpi.gov.cz/clanek/vybrane-komodity-doplňky-stravy-povinnosti-provozovatele-potravinarskych-podniku-ppp-pri-uvadeni-doplňku-stravy-na-trh.aspx> (dostupné v únoru 2023)
- [17] Costa, J. G., Vidovic, B., Saraiva, N., do Céu Costa, M., Del Favero, G., Marko, D., Oliveira, N. G., & Fernandes, A. S. (2019). Contaminants: a dark side of food supplements?. *Free radical research*, 53(sup1), 1113–1135. <https://doi.org/10.1080/10715762.2019.1636045>
- [18] Pallarés, N., Berrada, H., Font, G., & Ferrer, E. (2022). Mycotoxins occurrence in medicinal herbs dietary supplements and exposure assessment. *Journal of food science and technology*, 59(7), 2830–2841. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05306-y>
- [19] [https://food.ec.europa.eu/safety/rasff\\_en](https://food.ec.europa.eu/safety/rasff_en) (dostupné v únoru 2023)
- [20] Ashiq, S., Hussain, M., & Ahmad, B. (2014). Natural occurrence of mycotoxins in medicinal plants: a review. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 66, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.02.005>
- [21] Gupta, M., Dey, S., Marbaniang, D., Pal, P., Ray, S., & Mazumder, B. (2020). Grape seed extract: having a potential health benefits. *Journal of food science and technology*, 57(4), 1205–1215. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04113-w>
- [22] Ali, K., Maltese, F., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2010). Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. *Phytochemistry reviews : proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, 9(3), 357–378. <https://doi.org/10.1007/s11101-009-9158-0>
- [23] Kapoor, R., & Huang, Y. S. (2006). Gamma linolenic acid: an antiinflammatory omega-6 fatty acid. *Current pharmaceutical biotechnology*, 7(6), 531–534. <https://doi.org/10.2174/138920106779116874>
- [24] Piemontese L. (2017). Plant Food Supplements with Antioxidant Properties for the Treatment of Chronic and Neurodegenerative Diseases: Benefits or Risks? *Journal of dietary supplements*, 14(4), 478–484. <https://doi.org/10.1080/19390211.2016.1247936>
- [25] Solfrizzo, M., Piemontese, L., Gambacorta, L., Zivoli, R., & Longobardi, F. (2015). Food coloring agents and plant food supplements derived from *Vitis vinifera*: a new source of human exposure to ochratoxin A. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(13), 3609–3614. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00326>
- [26] Ribeiro, E., & Alves, A. (2008). Comparative study of screening methodologies for ochratoxin A detection in winery by-products. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 391(4), 1443–1450. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1861-y>
- [27] Schwab, M. (Ed.). (2017). *Encyclopedia of cancer*. Springer. <https://doi-org.ezproxy.techlib.cz/10.1007/978-3-662-46875-3>

- [28] Mei, N., Guo, X., Ren, Z., Kobayashi, D., Wada, K., & Guo, L. (2017). Review of Ginkgo biloba-induced toxicity, from experimental studies to human case reports. *Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews*, 35(1), 1–28. <https://doi.org/10.1080/10590501.2016.1278298>
- [29] Singh, S. K., Srivastav, S., Castellani, R. J., Plascencia-Villa, G., & Perry, G. (2019). Neuroprotective and Antioxidant Effect of Ginkgo biloba extract against AD and other neurological Disorders. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for experimental neurotherapeutics*, 16(3), 666–674. <https://doi.org/10.1007/s13311-019-00767-8>
- [30] Le Bars, P. L. (2003). Magnitude of effect and special approach to Ginkgo biloba extract EGb 761 in cognitive disorders. *Pharmacopsychiatry*, 36(1), 44–49. <https://doi.org/10.1055/s-2003-40458>
- [31] Martínez-Domínguez, G., Romero-González, R., & Garrido Frenich, A. (2015). Determination of toxic substances, pesticides and mycotoxins, in ginkgo biloba nutraceutical products by liquid chromatography orbitrap-mass spektrometry. *Microchemical Journal*, 118, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2014.09.002>
- [32] Janik, E., Niemcewicz, M., Podogrocki, M., Ceremuga, M., Stela, M., & Bijak, M. (2021). T-2 Toxin-The Most Toxic Trichothecene Mycotoxin: Metabolism, Toxicity, and Decontamination Strategies. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(22), 6868. <https://doi.org/10.3390/molecules26226868>
- [33] Rushing, B. R., & Selim, M. I. (2019). Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 124, 81–100. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.047>
- [34] Toledo Castanheira, D. (Ed.). (2020). *Coffee – Production and Research*. IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.82913>
- [35] Pimpley, V., Patil, S., Srinivasan, K., Desai, N., & Murthy, P. S. (2020). The chemistry of chlorogenic acid from green coffee and its role in attenuation of obesity and diabetes. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 50(10), 969–978. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1786699>
- [36] Upadhyay, R., & Mohan Rao, L. J. (2013). An outlook on chlorogenic acids-occurrence, chemistry, technology, and biological activities. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53(9), 968–984. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.576319>
- [37] Vaclavik, L., Vaclavikova, M., Begley, T. H., Krynitsky, A. J., & Rader, J. I. (2013). Determination of multiple mycotoxins in dietary supplements containing green coffee bean extracts using ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(20), 4822–4830. <https://doi.org/10.1021/jf401139u>

- [38] Wang, X., Zhang, Z., & Wu, S. C. (2020). Health Benefits of *Silybum marianum*: Phytochemistry, Pharmacology, and Applications. *Journal of agricultural and food chemistry*, 68(42), 11644–11664. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04791>
- [39] Tajmohammadi, A., Razavi, B. M., & Hosseinzadeh, H. (2018). *Silybum marianum* (milk thistle) and its main constituent, silymarin, as a potential therapeutic plant in metabolic syndrome: A review. *Phytotherapy research : PTR*, 32(10), 1933–1949. <https://doi.org/10.1002/ptr.6153>
- [40] Gillessen, A., & Schmidt, H. H. (2020). Silymarin as Supportive Treatment in Liver Diseases: A Narrative Review. *Advances in therapy*, 37(4), 1279–1301. <https://doi.org/10.1007/s12325-020-01251-y>
- [41] Silibinin. In: *ChemSpider: Search and share chemistry* [online]. [cit. 2023-05-04]. Dostupné z: [http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.29263.html?rid=63a575bf-24c3-4728-b4be-02dacf0d66ea&page\\_num=0](http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.29263.html?rid=63a575bf-24c3-4728-b4be-02dacf0d66ea&page_num=0)
- [42] Veprikova, Z., Zachariasova, M., Dzuman, Z., Zachariasova, A., Fenclova, M., Slavikova, P., Vaclavikova, M., Mastovska, K., Hengst, D., & Hajslova, J. (2015). Mycotoxins in Plant-Based Dietary Supplements: Hidden Health Risk for Consumers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(29), 6633–6643. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02105>
- [43] Fenclova, M., Novakova, A., Viktorova, J., Jonatova, P., Dzuman, Z., Ruml, T., Kren, V., Hajslova, J., Vitek, L., & Stranska-Zachariasova, M. (2019). Poor chemical and microbiological quality of the commercial milk thistle-based dietary supplements may account for their reported unsatisfactory and non-reproducible clinical outcomes. *Scientific reports*, 9(1), 11118. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47250-0>
- [44] Pickova, D., Ostry, V., Toman, J., & Malir, F. (2020). Presence of Mycotoxins in Milk Thistle (*Silybum marianum*) Food Supplements: A Review. *Toxins*, 12(12), 782. <https://doi.org/10.3390/toxins12120782>
- [45] Bosko, R., Pernica, M., Belakova, S., Bjelkova, M., & Pluhackova, H. (2022). Determination of T-2 and HT-2 Toxins in Seed of Milk Thistle [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.] Using Immunoaffinity Column by UPLC-MS/MS. *Toxins*, 14(4), 258. <https://doi.org/10.3390/toxins14040258>
- [46] Tournas, V. H., Sapp, C., & Trucksess, M. W. (2012). Occurrence of aflatoxins in milk thistle herbal supplements. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 29(6), 994–999. <https://doi.org/10.1080/19440049.2012.664788>
- [47] Nováková, L., Douša, M. a kol. (2013). *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.*
- [48] Dong, M. W. (2019). *HPLC and UHPLC for practicing scientists*. John Wiley & Sons.
- [49] Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2009). *Introduction to modern liquid chromatography*. John Wiley & Sons.

- [50] Nováková, L., Douša, M. a kol. (2013). *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II.*
- [51] Rogeberg, M., Malerod, H., Roberg-Larsen, H., Aass, C., & Wilson, S. R. (2014). On-line solid phase extraction-liquid chromatography, with emphasis on modern bioanalysis and miniaturized systems. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, *87*, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.05.006>
- [52] Pan, J., Zhang, C., Zhang, Z., & Li, G. (2014). Review of online coupling of sample preparation techniques with liquid chromatography. *Analytica chimica acta*, *815*, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.01.017>
- [53] León-González, M. E., & Pérez-Arribas, L. V. (2000). Chemically modified polymeric sorbents for sample preconcentration. *Journal of chromatography. A*, *902*(1), 3–16. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00942-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00942-0)
- [54] Souverain, S., Rudaz, S., & Veuthey, J. L. (2004). Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, *801*(2), 141–156. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.11.043>
- [55] Hashemi, B., Zohrabi, P., & Shamsipur, M. (2018). Recent developments and applications of different sorbents for SPE and SPME from biological samples. *Talanta*, *187*, 337–347. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.05.053>
- [56] BelBruno J. J. (2019). Molecularly Imprinted Polymers. *Chemical reviews*, *119*(1), 94–119. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00171>
- [57] Háková, M., Chocholoušová Havlíková, L., Chvojka, J., Solich, P., & Šatínský, D. (2018). An on-line coupling of nanofibrous extraction with column-switching high performance liquid chromatography - A case study on the determination of bisphenol A in environmental water samples. *Talanta*, *178*, 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.098>
- [58] Chen, L., Bi, Y., Xu, T., Li, X., & Fang, Z. (2022). Composite Nanofibers as Novel Sorbents for On-Line and Off-Line Solid-Phase Extraction in Chromatographic System: A Comparison for Detection of Free Biogenic Monoamines and Their Metabolites in Plasma. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *27*(20), 6971. <https://doi.org/10.3390/molecules27206971>
- [59] Li, X., Ma, W., Ma, Z., Zhang, Q., & Li, H. (2022). Recent progress in determination of ochratoxin a in foods by chromatographic and mass spectrometry methods. *Critical reviews in food science and nutrition*, *62*(20), 5444–5461. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1885340>
- [60] Ha T. H. (2015). Recent Advances for the Detection of Ochratoxin A. *Toxins*, *7*(12), 5276–5300. <https://doi.org/10.3390/toxins7124882>

- [61] Arroyo-Manzanares, N., García-Campaña, A. M., & Gámiz-Gracia, L. (2013). Multiclass mycotoxin analysis in *Silybum marianum* by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a procedure based on QuEChERS and dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of chromatography. A*, 1282, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.072>
- [62] Sarkar, R., Shinde, R., Dhanshetty, M., & Banerjee, K. (2022). Multi-mycotoxin analysis method using liquid chromatography with tandem mass spectrometry and fluorescence detection in Indian medicinal herbs: Development and validation. *Journal of chromatography. A*, 1677, 463310. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463310>
- [63] Gottschalk, C., Biermaier, B., Gross, M., Schwaiger, K., & Gareis, M. (2016). Ochratoxin A in brewer's yeast used as food supplement. *Mycotoxin research*, 32(1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s12550-015-0230-x>
- [64] Twarużek, M., Kosicki, R., Kwiatkowska-Giżyńska, J., Grajewski, J., & Ałtyn, I. (2020). Ochratoxin A and citrinin in green coffee and dietary supplements with green coffee extract. *Toxicon : official journal of the international society on toxinology*, 188, 172–177. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.10.021>
- [65] Zhou, J., Zhang, D. D., Chen, X. H., Guo, Y. B., Jin, M. C., & Zhao, Y. G. (2021). Investigation on the occurrence and contamination of multi-mycotoxin in chestnut and jujube (red date). *Journal of chromatography. A*, 1659, 462486. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462486>
- [66] Diana Di Mavungu, J., Monbaliu, S., Scippo, M. L., Maghuin-Rogister, G., Schneider, Y. J., Larondelle, Y., Callebaut, A., Robbens, J., Van Peteghem, C., & De Saeger, S. (2009). LC-MS/MS multi-analyte method for mycotoxin determination in food supplements. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 26(6), 885–895. <https://doi.org/10.1080/02652030902774649>
- [67] Pilarska, G., Twarużek, M., & Ałtyn, I. (2022). The Presence of Molds and Their Secondary Metabolites in Purple Coneflower-Based Dietary Supplements (*Echinacea purpurea* (L.) Moench). *Toxins*, 14(9), 607. <https://doi.org/10.3390/toxins14090607>