

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie



Diplomová práce

**Vývoj metody úpravy vzorku pro stanovení
vybraných ochratoxinů v moči pomocí
UHPLC-MS/MS**

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Konzultant: Ing. Hana Chmelařová, Ph.D.

Hradec Králové, 2023

Bc. Barbora Šejvlová

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Barbora Šejvlová

Školitel: prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Název práce: Vývoj metody úpravy vzorku pro stanovení vybraných ochratoxinů v moči pomocí UHPLC-MS/MS

Cílem práce bylo vyvinout metodu pro stanovení ochratoxinů A, B, C a α v moči s co nejnižším limitem kvantifikace a následně provést validaci této metody, která by byla aplikovatelná v klinické praxi. Pro separaci byla vybrána metoda ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie v systému reverzních fází ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Pro optimalizaci přípravy vzorku bylo provedeno testování metod: mikro-extrakce na tuhou fázi pomocí pipetovacích špiček (μ -SPE-PT), metoda ředění (DAS), extrakce z kapaliny do kapaliny na pevném nosiči (SLE) a jako poslední extrakce z kapaliny do kapaliny vysolováním (SALLE). Byla hodnocena výtěžnost metody, interference matrice a také limit kvantifikace dané metody.

Následně byla provedena validace metody na koloně ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 μ m, 2,1 x 100 mm od firmy Waters, kdy metodou úpravy vzorku byla μ -SPE-PT. Správnost metody se pohybovala v rozmezí od 68 do 122 % pro všechny analyty a přesnost metody u všech analytů měla RSD menší než 20 %. Byl stanoven LLOQ, pro OTA byl stanoven 0,01 ng/ml, pro OTB a OTC 0,02 ng/ml a pro OT α 0,05 ng/ml. ULOQ byl pro všechny analyty 20 ng/ml. Bylo provedeno testování matricových efektů, kdy podmínky byly splněny pouze pro OTA na obou koncentračních hladinách 5 a 20 ng/ml a OTB pouze u 5 ng/ml. Pro OT α byly matricové efekty 70 % na obou hladinách a pro OTC byly naopak v řádech stovek procent.

Klíčová slova: ochratoxiny, moč, příprava vzorku k analýze, UHPLC, μ -SPE-PT, DAS, SLE, SALLE

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Bc. Barbora Šejvlová

Supervisor: prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Title of the diploma thesis: Development of a sample preparation method for the determination of selected ochratoxins in urine by UHPLC-MS/MS

The aim of the work was to develop a method for the determination of ochratoxins A, B, C, and α in urine with the lowest possible quantification limit, and subsequently to carry out the validation of this method, which would be applicable in clinical practice. The method of ultra-high-performance liquid chromatography in a reversed-phase mode in coupled with tandem mass spectrometry was selected for the analyse. Optimization of sample preparation involved: micro-solid phase extraction in pipette tips (μ -SPE-PT), dilute and shoot (DAS), supported liquid extraction (SLE) and finally salting-out assisted liquid-liquid extraction (SALLE). The method recovery, the interference of the matrix and the limit of quantification of the given method were evaluated.

Method validation was carried out on an ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m, 2.1 x 100 mm column from Waters, using μ -SPE-PT as sample preparation technique. Method accuracy ranged from 68 to 122 % for all analytes, and method precision exhibited RSD was less than 20% for all analytes. The LLOQ was determined of 0.01 ng/ml for OTA, 0.02 ng/ml for OTB and OTC, and 0.05 ng/ml for OT α . ULOQ was established for analytes to be 20 ng/ml. Evaluation of matrix effects was performed where the requirements were met only for OTA at both concentration levels of 5 and 20 ng/ml and OTB only at 5 ng/ml. For OT α were the matrix effects only 70% on both levels, and for OTC were in the hundreds of percent.

Key words: ochratoxins, urine, sample preparation, UHPLC, μ -SPE-PT, DAS, SLE, SALLE

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

V Hradci Králové

Bc. Barbora Šejvlová

Poděkování

Ráda bych touto formou poděkovala prof. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D., Ing. Haně Chmelařové Ph.D. a celé katedře za odbornou pomoc. Rady a připomínky, které mi pomohly při zpracování diplomové práce byly velmi cenné. Moje poděkování patří také Kristiánu Kretkovi, kdy jeho diplomová práce byla výchozím pilířem pro tu mou a financím z grantu EFSA-CDN (reg. č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000841). Dále bych chtěla poděkovat mé rodině za jejich trpělivost, pomoc a podporu během celého mého studia.

Obsah

ABSTRAKT	2
ABSTRACT	3
OBSAH	6
SEZNAM ZKRATEK	8
1. ÚVOD.....	10
2. CÍL PRÁCE.....	11
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	12
3.1. ULTRA-VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE VE SPOJENÍ S TANDEMOVOU HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ	12
3.1.1. <i>Ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie</i>	12
3.1.2. <i>Hmotnostní spektrometrie</i>	13
3.1.3. <i>Spojení UHPLC-MS</i>	14
3.2. METODY PRO PŘÍPRAVU VZORKU	15
3.2.1. <i>Metoda ředění (DAS)</i>	15
3.2.2. <i>Extrakce na tuhou fázi (SPE)</i>	15
3.2.3. <i>Extrakce z kapaliny do kapaliny za pomoci pevného nosiče (SLE)</i>	17
3.2.4. <i>Extrakce z kapaliny do kapaliny vysolováním (SALLE)</i>	18
3.3. OCHRATOXINY	18
3.3.1. <i>Fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti vybraných ochratoxinů</i>	20
3.3.2. <i>Biosyntéza a degradace ochratoxinů</i>	21
3.3.3. <i>Přehled metod pro analýzu ochratoxinů v biologickém materiálu</i>	22
3.4. VALIDACE METODY	26
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	29
4.1. PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	29
4.2. CHROMATOGRAFICKÉ KOLONY	29
4.3. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, MATERIÁL A STANDARDNÍ LÁTKY	30
4.4. PŘÍPRAVA ROZTOKŮ PRO UHPLC-MS	31
4.4.1. <i>Příprava zásobních roztoků standardů</i>	31

4.4.2.	<i>Příprava pracovních roztoků standardů</i>	31
4.4.3.	<i>Příprava mobilní fáze a oplachových kapalin</i>	31
4.5.	PARAMETRY MĚŘENÍ UHPLC-MS.....	31
4.6.	OPTIMALIZOVANÉ PODMÍNKY VYBRANÝCH METOD PRO ÚPRAVU VZORKU	33
4.6.1.	<i>Optimalizované podmínky metody SLE</i>	33
4.6.2.	<i>Optimalizované podmínky metody SALLE</i>	34
4.6.3.	<i>Optimalizované podmínky metody μ-SPE-PT</i>	34
4.7.	VALIDACE METODY	34
5.	VÝSLEDKY A DISKUSE	35
5.1.	OPTIMALIZACE METODY SLE	35
5.2.	OPTIMALIZACE METODY SALLE	38
5.3.	OPTIMALIZACE METODY μ -SPE-PT	39
5.4.	POROVNÁNÍ MÓDU IONIZACE	45
5.5.	VLIV STACIONÁRNÍ FÁZE.....	47
5.6.	ZHODNOCENÍ METOD PŘÍPRAVY VZORKU	49
5.7.	VALIDACE METODY	49
6.	ZÁVĚR.....	54
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	56

Seznam zkratk

AcA	kyselina octová
AmF	mravenčan amonný
ACN	acetonitril
CYP450	izoforma cytochromu P450
DAS	metoda ředění a nástřiku
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DCM	dichlormethan
EtAc	ethylacetát
ESI	elektrosprej
FA	kyselina mravenčí
FLD	fluorescenční detektor
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IAC	imunoafinitní kolona
IPA	2-propanol
LC	kapalinová chromatografie
LD _{50%}	dávka toxické látky, která způsobí uhynutí 50 % experimentálních zvířat
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny
LLOQ	dolní mez kvantifikace
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
LOX	lipoxygenáza
MeOH	methanol
MISPE	extrakce na molekulárně vtištěných polymerech

MS	hmotnostní spektrometrie
MTBE	methylerc-butylether
MW	molekulová hmotnost
OTA	ochratoxin A
OTB	ochratoxin B
OTC	ochratoxin C
OT α	ochratoxin alfa
PGSH	prostaglandin syntáza
SALLE	extrakce z kapaliny do kapaliny vysolováním
SLE	extrakce z kapaliny do kapaliny na pevném nosiči
SPE	extrakce na tuhou fázi
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ULOQ	horní mez kvantifikace
μ -SPE-PT	mikro-extrakce na tuhou fázi pomocí pipetovacích špiček

1. Úvod

Ochratoxiny patří mezi skupinu mykotoxinů, které způsobují onemocnění, popřípadě mohou mít za následek smrt lidí i zvířat. Jsou řazeny mezi celosvětově nejvýznamnější toxiny přírodního původu s akutními i chronickými účinky. Vyskytují se především v obilninách, sušeném ovoci či kávě v hlavně severní Evropě a Africe. Ochratoxiny jsou problematické především díky jejich teplotní stabilitě. Pražením se jejich obsah snižuje pouze o 20 % a vaření na ně nemá žádný vliv. Vzhledem k jejich nefrotoxicitě, kdy hlavně OTA způsobuje ledvinové nádory a chromozomální aberace v ledvinách. Z tohoto důvodu se stal OTA hlavním předmětem zkoumání u pacientů s onemocněním ledvin.

Ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií je metodou první volby díky své citlivosti a selektivitě. S ohledem právě na citlivost metody je nutné, aby byl biologický materiál, v našem případě moč, očištěn co nejlépe od balastních látek. Z tohoto důvodu je nezbytně nutné detailně optimalizovat metodu úpravy vzorku.

Optimalizovanou metodou pro úpravu vzorku bude možné detekovat v moči i pouze minimální množství určitých ochratoxinů bez interferencí balastních látek. Díky tomu by mohlo být možné hodnotit vliv množství přijímaných ochratoxinů na vznik onemocnění karcinomu ledvin, či dalších onemocnění s nimi spojených.

Důležitými parametry pro vývoj metody úpravy vzorku je její nenáročnost přípravy a minimalizace použitých objemů rozpouštědel, ale také vzorku. Je nutné validovat metodu, která bude jednoduchá a levná.

2. Cíl Práce

Cílem této práce je vyvinout metodu pro stanovení ochratoxinů A, B, C a α v moči s co nejnižším možným limitem kvantifikace a provést její validaci, aby metoda byla později aplikovatelná v klinické praxi.

Metodou pro stanovení ochratoxinů byla na základě již vydané diplomové práce Kristiána Kretka vybrána UHPLC-MS/MS. Veškeré podmínky byly převzaty, ověřeny a následně využívány po celou dobu testování.

Jako možné metody pro úpravu vzorku byly vybrány: mikro-extrakce na tuhou fázi pomocí pipetovacích špiček (μ -SPE-PT), metoda ředění (DAS), extrakce z kapaliny do kapaliny na pevném nosiči (SLE) a j extrakce z kapaliny do kapaliny vysolováním (SALLE). U jednotlivých metod byla hodnocena změna výtěžnosti při použití daného jako eluční činidla či rozpouštěcí činidla. Byla hodnocena i výtěžnost metody s ohledem na klesající koncentraci obohacení vzorku moči.

Jako parametry optimalizace byly u jednotlivých metod vybrány LLOQ, ULOQ, selektivita, přesnost, správnost metody a matricové efekty. Všechny vzorky moči byly nejdříve po úpravách jednotlivými metodami analyzovány pomocí UHPLC-MS/MS naspikované na 10 ng/ml a následně ověřeny na nižších koncentracích.

Validace byla provedena u metody μ -SPE-PT na koloně se stacionární fází C18, kde se nejdříve změnila kalibrační křivka. Z ní byl určen LLOQ pro jednotlivé ochratoxiny a ULOQ. Dále byly měřeny matricové efekty a hodnotila se správnost a přesnost měření dle EMA.

3. Teoretická část

3.1. Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií

3.1.1. Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

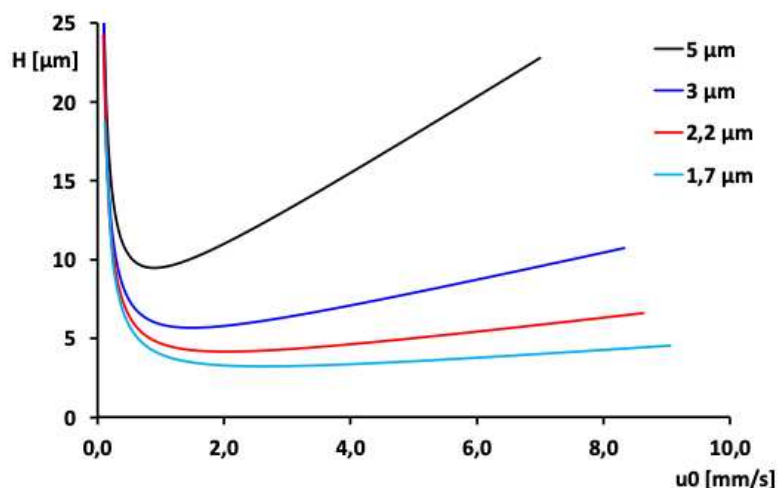
Ultra-vysoko-účinná kapalinová chromatografie je typem moderního přístupu HPLC. U této metody jsou používány kolony s částicemi o průměru menším než 2 μm a díky vysoké účinnosti mohou být kolony oproti vysokoúčinné kapalinové chromatografii kratší. Kolony musí být zapojeny do příslušné UHPLC instrumentace [1].

UHPLC systém musí v první řadě mít minimalizované mimokolonové objemy, aby nedocházelo k rozmývání chromatografických zón. To může být způsobeno velkými mimokolonovými příspěvky systému. Z důvodu vysokého tlaku, díky menším částicím než v přístroji pro HPLC, musí být přístroj schopen zvládnout tlak 100 MPa a více [1].

Stacionární fáze je v UHPLC jedním z klíčových požadavků pro realizaci rychlé a účinné separace. V posledních letech se cílí na vývoj chemicky (široké rozmezí pH) a mechanicky (vyšší tlaky) stabilnějších stacionárních fází. Dalším trendem je vývoj nových chemických modifikací pro získání odlišné selektivity separace. Nejčastěji používaným materiálem pro stacionární fázi je silikagel a hybridní stacionární fáze [1].

Výhodou UHPLC systému je vyšší účinnost separace a zkrácení doby analýzy. Je tomu tak hlavně díky menším částicím, které jsou ve Van Deemterově křivce zodpovědné za člen A (Obr. 1). Křivka je i méně strmá díky členu C, kdy velikost částice je umocněna na druhou. Separační účinnost je zachována i díky nízkému odporu pro převodu hmoty. Další výhodou je také lepší rozlišení píku [1].

Jednou z nevýhod jsou vyšší pořizovací náklady za instrumentaci, ale také problémy s kompatibilitou, u již existujících metod, či přenos metod mezi laboratořemi [1].



Obr. 1: Vliv velikosti částic na lineární rychlost mobilní fáze (u_0) a výškový ekvivalent teoretického patra (H) [1]

3.1.2. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická technika, při které se detekuje iont na základě molekulové hmotnosti ku náboji (m/z) [2].

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří částí: iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor. Iontový zdroj může využívat několika ionizačních technik. Ty jsou děleny na tvrdé a měkké ionizační techniky podle předávané energie. U měkkých ionizačních technik dochází k minimální fragmentaci, jedním ze zástupců je ionizace elektrosprejem (ESI). Mezi tvrdé ionizační techniky je řazena elektronová ionizace (EI). Hmotnostním analyzátozem jsou jednoduchý kvadrupól, trojitý kvadrupól či analyzátor doby letu [3].

Při našem výzkumu byl použit trojitý kvadrupól. Jedná se o tandemové uspořádání tří kvadrupólů. V Tab. 1 je zobrazeno, využití jednotlivých kvadrupólů v závislosti na vybraném skenu. Obecně však lze říct, že první a poslední kvadrupól je využíván jako hmotnostní filtr. Druhý kvadrupól slouží jako kolizní cela, ve které dochází k disociaci vybraných iontů z prvního kvadrupólu. Fragmenty jsou pak analyzovány v posledním kvadrupólu [4]. Trojitý kvadrupól má vysokou citlivost a široký lineární dynamický rozsah [3].

Tab. 1: Typy skenů v hmotnostní spektrometrii [1], [6]

	MS1	fragmentace	MS2	Typ skenu
MS sken	skenuje	-	-	kvalitativní
SIM	fixní m/z	-	-	kvantitativní
sken produktových iontů	fixní m/z	+	skenuje	kvalitativní
SRM	fixní m/z	+	fixní m/z	kvantitativní
sken prekurzorových iontů	skenuje	+	fixní m/z	kvalitativní
sken neutrálních ztrát	skenuje	+	skenuje	kvalitativní (kvantitativní)

SIM – sken vybraného iontu, SRM – sken vybrané reakce

Hmotnostní spektrometr má velký rozsah pro měření molekulových hmotností a vysokou citlivost [2]. Mezi základní parametry při rozlišení typu analyzátoru jsou řazeny: měřený hmotnostní rozsah, rychlost měřeného hmotnostního spektra či pořizovací cena analyzátoru [5].

3.1.3. Spojení UHPLC-MS

Jedním z nejdůležitějších parametrů pro získání reálného záznamu při analýze je důležitá optimální rychlost sběru dat.

Pro správný opakovatelný tvar chromatografického píku Gaussovského tvaru je potřebný dostatečný počet bodů, standardně 12–15. Pokud bude bodů méně dochází k deformaci tvaru píku a snižuje se opakovatelnost plochy píku [6].

Ne všechny analyzátory jsou ideální pro spojení UHPLC-MS, z důvodu nízké akviziční rychlosti. Nejméně vhodnými jsou magnetický sektor, či iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací, z důvodu sběru dat pouze v řádech několika Hz. Naopak ideální je spojení UHPLC s analyzátozem doby letu, který je nejrychlejším analyzátozem. Dalším vhodným je kvadrupólový analyzátor patřící k nové generaci s pozorovacími časy v módu SRM v rozmezí 1–5 ms [1].

Spojení UHPLC-MS je využíváno z důvodu cílené a necílené analýzy v závislosti na použitém typu hmotnostního analyzátoru. [1]. Toto spojení lze využít jak pro polární, tak

nepolární látky. Používá se v bioanalýze při terapeutickém monitorování léčiv a jejich metabolitů, jako jsou imunosupresiva, inhibitory proteáz, či psychofarmaka. Dále se metoda využívá v analýze dědičných metabolických poruch, steroidů, mastných kyselin nebo toxikologii [7].

3.2. Metody pro přípravu vzorku

Příprava vzorku je nejnáročnější jak na provedení, tak i časově a je nejvíce náchylná k chybám. Až 30 % chyb vznikne právě v této fázi analýzy. Ideální technika přípravy vzorku by měla být jednoduchá, rychlá, selektivní, účinná, levná, vhodná k automatizaci a kompatibilní s širokou škálou separačních metod. Ve spojení s HPLC se jako extrakční techniky využívají: extrakce na tuhou fázi, extrakce z kapaliny do kapaliny či metoda ředění. Současné trendy v přípravě vzorku směřují k vývoji miniaturizovaných systémů a automatizovaných metod, díky kterým se zvýší jejich přesnost, reprodukovatelnost a hospodárnost [8].

3.2.1. Metoda ředění (DAS)

Metoda ředění (*dilute and shoot*) je jedna z nejjednodušší technik úpravy vzorku v kapalinové chromatografii. Jedná se také o jednu z nejrychlejších metod.

Moč byla ředěna rozpouštědlem z důvodu vysoké koncentrace interferujících látek. Nejčastěji se ředění provádí ultračistou vodou, nebo roztokem mobilní fáze vybrané pro analýzu kapalinovou chromatografií.

Hlavní nevýhodou je absence zakoncentrovací fáze, která zapříčiní snížení citlivosti [9]. Naopak výhodou této metodiky je její jednoduchost a minimální ztráta analytu. Dále dochází i k naředění možných interferujících látek [10].

3.2.2. Extrakce na tuhou fázi (SPE)

Metoda extrakce na tuhou fázi SPE (*solid phase extraction*) využívá tuhého sorbentu. V prvním kroku probíhá kondicionace sorbentu, kdy je na tuhý sorbent aplikováno činidlo pro aktivaci SPE kolony. V tomto kroku se SPE kolonka připraví na interakci se vzorkem. Často se provádí methanolem, vodou, popřípadě pufrům. Jedná se o nezbytný krok pro

reprodukovatelnou sorpcí analytů [11]. Dalším krokem je ekvibrace kolonky, kdy je na kolonku nanášena kapalina podobné povahy (polarity, pH) jako stanovovaný analyt pro zajištění maximální retence analytu. V třetím kroku jsou vybrané analyty navázány na sorbent. Předposledním krokem je promytí kolonky činidlem, které však neeluuje cílový analyt. V posledním kroku se na kolonku aplikuje eluční činidlo, které uvolní požadovaný analyt z SPE kolonky, např. acetonitril [12] (Obr. 2).

Sorbent může být obsažen v samostatné jednorázové kolonce, 96-jamkové destičce, či špičkách pipet (μ -SPE-PT) [13].



Obr. 2: Princip SPE – (1) SPE kolonka, (2) aktivace kolony, (3) kondicionace kolony, (4) nanesení vzorku, (5) promytí a vymytí balastních látek, (6) eluce analytů [1]

Mikro-extrakce na tuhou fázi pomocí pipetovacích špiček (μ -SPE-PT) je typem jednoduché miniaturizace metody SPE. Extrakce probíhá pomocí pístu pipety nebo centrifugací. 1 disk obsahuje zhruba 0,4 mg sorbentu. Běžně se do špičky vrství 3 disky sorbentu, ale může jich být i více, klidně 9. Výhodou této metody je časová nenáročnost a redukce objemu vzorku i rozpouštědel [1]. Na Obr. 3 je zobrazena pipetovací špička, disk, ze kterého je pomocí jehly připravena jedna vrstva sorbentu a speciální jehla pro přípravu SPE sorbentu do špiček pipet. Příprava špičky probíhá zabodnutím jehly do disku a následné přenesení sorbentu do špičky, kdy je důležité, aby sorbent dosedl co nejniž do špičky pipety. Nesmí dojít k průchodu rozpouštědla mimo sorbent.



Obr. 3: Souprava nutná pro přípravu špičky u metody μ -SPE-PT

SPE je snadno automatizovatelná metoda a je možné ji spojit s dalšími analytickými metodami, jako je například LC. Díky své univerzálnosti je využívána pro čištění látek či zakoncentrování stopových množství látek [2].

3.2.3. Extrakce z kapaliny do kapaliny za pomoci pevného nosiče (SLE)

SLE (*supported – liquid extraction*) je typem LLE, kdy je extrakce z kapaliny do kapaliny podpořena inertní křemelinou. Při klasické LLE dochází k přechodu námi stanovované sloučeniny ve vodné fázi do vodou nemísitelného rozpouštědla na základě různého koeficientu rozpustnosti mezi těmito dvěma nemísitelnými rozpouštědly. Tohoto přechodu je umožněno opakovaným protřepáním celé směsi. U SLE místo protřepávání prochází organická fáze křemelinou, za pomoci přístroje, a tím dojde k účinné extrakci [14].

Hlavními výhodami SLE oproti klasické LLE je účinnější extrakce, kdy se netvoří emulze a dále snadná automatizace metody [14].

V prvním kroku je na křemelinu nanesen vzorek moči. Destička se nechá tlakovat dusíkem při námi stanoveném tlaku a po přesně stanovenou dobu. Následně je na křemelinu naneseno elučňivé činidlo, vybrané tak, aby se z křemeliny extrahovaly látky, které je potřeba stanovit a na ní zůstaly látky matricové [15]. SLE platíčko umístěné na přístroji od firmy Waters, který je potřebný k provedení extrakce, je zobrazen na Obr. 4. SLE platíčko se skládá ze 2 částí. Vrchní platíčko obsahuje křemelinu a je do něho aplikován vodný analyt a v dalších krocích

extrakční činidla. Do spodního pláta přechází vyextrahovaný analyt, která prochází křemelinou při tlakování.



Obr. 4: SLE platičko a přístroj Waters potřebný k provedení extrakce

3.2.4. Extrakce z kapaliny do kapaliny vysolováním (SALLE)

SALLE (*salting-out assisted liquid-liquid extraction*) je řazena mezi metody LLE. Je využíváno efektu vysolování k oddělení organického rozpouštědla mísitelného s vodou, jako je acetonitril, z plazmy či moči [16].

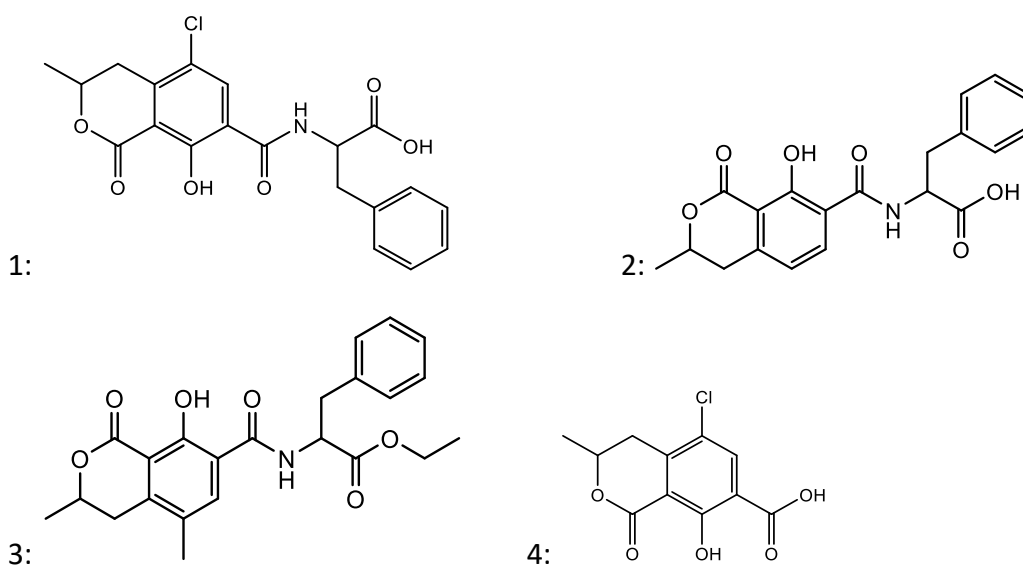
Jedná se o jednu z metod, která je rychlejší a šetrnější k životnímu prostředí [16]. Další výhodou je také jednoduchost metody, která např. oproti SPE, která vyžaduje speciální kolony, nevyžaduje žádné další laboratorní vybavení, což umožní i nižší náklady [17].

3.3. Ochratoxiny

Ochratoxiny jsou řazeny mezi skupinu mykotoxinů produkované mikrohoubami. Mykotoxiny jsou schopny způsobit onemocnění, či ve vážnějších případech smrt u lidí i zvířat. Mohou způsobovat mykózy a mykotoxikózy. Mykotoxiny je těžké rozdělit do kategorií vzhledem k rozdílným chemickým strukturám a biosyntetického původu [18]. Jsou to strukturálně odlišné komplexní sloučeniny a až na výjimky mají molekulovou hmotnost nižší než

700 g/mol. Celosvětově jsou řazeny mezi skupinu nejvýznamnějších toxinů přírodního původu, s akutními, chronickými, ale i pozdními toxickými účinky. Konkrétně ochratoxin A, kterému bude v této práci věnována pozornost, je zařazen mezi silně toxické látky a potenciální karcinogeny, kdy jeho LD_{50%} jsou jednotky mg/kg hmotnosti běžného laboratorního zvířete, např. potkana [19].

Ochratoxiny jsou sekundární metabolity plísní *Aspergillus* a *Penicillium*, které jsou zdraví nebezpečné a kontaminují potravu. Ochratoxiny se vyskytují především v obilninách, sušeném ovoci, či víně hlavně v severní Evropě a Africe [20]. Problémem je hlavně lišící se optimální teplota růstu a vodní aktivita každé plísně, která tyto toxiny produkuje [21]. Vodní aktivitou je myšlena volná voda v materiálu, která není chemicky vázána [22]. Ke kontaminaci dochází v důsledku špatného skladování komodit a neoptimalizovaným zemědělským postupům během sušení [21]. Ochratoxiny jsou tepelně stabilní, pečením a pražením se jejich obsah snižuje maximálně o 20 %, avšak vaření na ně nemá žádný vliv. Chemické struktury vybraných, v této práci studovaných, ochratoxinů jsou znázorněny na Obr. 5 [23]. Dalším, námi nestudovaným, ochratoxinem je metabolit ochratoxinu A, ochratoxin A s otevřeným laktone (OP-OTA), který se vyskytuje u hlodavců, a měl by být toxicitější než původní OTA. Dalším z metabolitů je ochratoxin β vzniklý degradací z OTB [24]. Dle některých studií lze v organismu člověka detekovat i hydroxyochratoxin B, či hydroxyochratoxin A. Na základě dostupných zdrojů bylo zjištěno, že lidé jsou mnohem častěji vystavováni OTA než OTB či OTC [25].



Obr. 5: Struktury vybraných ochratoxinů – (1) ochratoxin A, (2) ochratoxin B, (3) ochratoxin C, (4) ochratoxin alfa [23]

Po provedení mnoha různých, na sobě nezávislých výzkumů nelze říct, který z ochratoxinů je stoprocentně nejtoxičtější. Dle studie provedené u prasat byla v krvi tvorba extracelulárních radikálů na monocytech a granulocytech v pořadí OTA, následně OTC, OTB a jako poslední ochratoxin alfa [26]. V další studii bylo provedeno testování cytotoxicity na buňkách HeLa S3. Jedná se o buňky způsobující rakovinu děložního čípku. LC_{50} byla u OTA 5 μM , u OTC 9 μM , dalším byl OTB 54 μM , OT-alfa 560 μM , dekarboxylovaný OTA 7600 μM a jako poslední ethylamid ochratoxinu A 10100 μM [27].

3.3.1. Fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti vybraných ochratoxinů

Nejčastěji se vyskytujícím je ochratoxin A, který je také nejúčinnějším z této skupiny. OTA má dlouhý poločas rozpadu u lidí a je tak snadno detekovatelný. V mnoha studiích se zabývají otázkou, zda je OTA potenciální hrozbou v případě nefrotoxicity. OTA způsobuje ledvinové nádory, adukty DNA a chromozomální aberace v ledvinách. Může být také embryotoxický a teratogenní [20]. OTA vykazuje významný inhibiční účinek na produkci buněčné energie. Má negativní vliv na tvorbu ATP a spouští mitochondriální dysfunkci, která má letální účinek na celkový buněčný metabolismus. Zastavuje tak produkci důležitých enzymů glukoneogeneze. Infiltrace OTA také narušuje membránový potenciál a blokuje elektronový transportní řetězec [28]. OTA vyvolává vysoký oxidační stres, nadměrnou produkci volných radikálů a indukuje peroxidaci lipidů v přítomnosti nikotinamid adenindinukleotid fosfát reduktázy, díky němuž způsobuje poškození DNA [29].

Dalším zástupcem je ochratoxin B. Jedná se o dechlorovaný ochratoxin A [20]. Má cytotoxické účinky na ledvinové a jaterní buňky in vitro. Pro svůj rychlý metabolismus a vylučování má pouze malé cytotoxické účinky in vivo. Inhibuje buněčnou proliferaci jaterních buněk HepG2, ale postrádá genotoxickou aktivitu ochratoxinu A [30]. Důvodem k nižší toxicitě in vivo může být také nižší afinita k plazmatickým proteinům.

Třetím zástupcem je ochratoxin C, ethylovaný OTA. Na základě mnoha studií lze říct, že OTC může být stejně toxický in vivo a in vitro jako OTA, avšak není zřejmé, zda má stejný způsob účinku [25].

Posledním zástupcem je ochratoxin alfa. Jedná se o netoxický metabolit OTA. Má roli bakteriálního xenobiotického metabolitu, lidského močovinového metabolitu a lidského

xenobiotického metabolitu [31]. Zdá se, že pokud je přítomná pouze isokumarinová část, bez fenylalaninové, jedná se o látku netoxickou.

V Tab. 2 je uveden přehled fyzikálně-chemických vlastností výše vypsanych ochratoxinů. Podle hodnot pKa lze říct, že nejvíce kyselou látkou je OT α , naopak nejméně OTC. Všechny zástupce zmíněné v tabulce kromě OTC tedy může řadit mezi kyseliny. Hodnota LogP vyjadřuje podíl rozpuštěné látky ve dvoufázovém systému oktanol a voda. Všechny námi stanovované látky jsou zhruba uprostřed stupnice, kdy -3 je silně hydrofilní a 10 silně hydrofobní [32]. Hodnoty LogP se v LC využívá při určení vhodné stacionární fáze kolony.

Tab. 2: Fyzikálně-chemické vlastnosti daných ochratoxinů [33], [34]

	MW	pKa	LogP
OTA	403,0823	3,29	4,7
OTB	369,1212	3,4	4,1
OTC	431,1136	7,62	5,4
OT α	256,0139	2,13	3,2

3.3.2. Biosyntéza a degradace ochratoxinů

Biosyntetická cesta OTA není zatím příliš prozkoumána. Fenylalaninová část OTA pochází z šikimátové dráhy a dihydroisokumarinová část z polyketidové dráhy. Druhy plísně *Aspergillus* mohou produkovat současně jak OTA i OTB, avšak množství vyrobeného OTB je často poměrně nižší než OTA. Dále bylo zjištěno, že intermediální metabolit ochratoxin beta může být velmi účinně biotransformován jak na OTA, tak OTB [25].

Biotransformace OTA se účastní enzymy jako prostaglandin syntéza, lipoxygenáza, či izoforma cytochromu P450. Játra nemetabolizují OTA, ale biotransformace probíhá pomocí proteolytických enzymů fáze I a II. Reakce fáze I jsou řízeny enzymy typu CYP450. Enzymovou aktivitou ve střevech se OTA mění na méně toxickou sloučeninu ochratoxin alfa. Důležitou roli hrají také enzymy střevní mikroflóry. Hydrolýzou OTA dochází ke konformačním změnám v laktonovém kruhu. Dechlorace OTA vede ke vzniku OTB, který má menší genotoxický účinek. Enzymy fáze II degradují toxin tvorbou OTA konjugačního komplexu.

Při vylučování močí hrají klíčovou roli lokalizované proteinové receptory. Jen velmi malé množství ochratoxinů je eliminováno glomerulární filtrací z důvodu silné afinity k albuminu. Intracelulární akumulace OTA je způsobena reabsorpcí OTA v tubulech ledvin. Další možností je odstranění toxinů fekální exkrecí, enterohepatální cirkulací, sekrecí tenkého střeva, či vylučování mateřským mlékem [35].

OTA má dlouhý poločas rozpadu v lidské krvi (asi 35 dní), díky své rozsáhlé vazbě na sérové proteiny. Pouze malá část volné frakce podléhá glomerulární filtraci a je vylučována močí. Z tohoto důvodu hladiny OTA v plazmě nebo séru reflektují expozici během delšího období, zatímco hladiny v moči lépe odrážejí příjem OTA v posledních dnech [33].

3.3.3. Přehled metod pro analýzu ochratoxinů v biologickém materiálu

V současnosti jsou ochratoxiny podle dostupných studií analyzovány dvěma možnými metodami, HPLC-MS nebo spojení HPLC s FLD. V posledních několika letech se do popředí více dostává HPLC-MS, hlavně díky snaze o zajištění co nejnižšího možného limitu detekce u stanovovaných analytů.

Před každou HPLC analýzou by měl být každý biologický materiál řádně upraven. Upravení biologického materiálu je nutné zejména z důvodu zamezení zanesení nebo ucpání chromatografického systému, nejčastěji kolony, ale také snížení množství možných interferujících látek. Mezi nejčastější metody úpravy vzorku pro ochratoxiny před samotnou HPLC analýzou patří: LLE, SPE, precipitace proteinů či čištění pomocí imunoafinitních kolon [34], [36]–[43]. V dostupných studiích byla nejčastěji využita LLE, či IAC. Ve většině případů byly tyto metody přípravy vzorku účinné bez rozdílu analyzovaného materiálu, např. plazma, moč, tkáň ledviny. Nutno podotknout, že ve všech zatím vydaných publikacích se autoři vždy zabývali OTA a pouze někteří uvádějí stanovování OT α , popřípadě OTB. Pouze v jediné studii, analýze ochratoxinu v plazmě a moči, bylo uvedeno, že při přípravě vzorku pomocí IAC nebyl na koloně zachován OT α , tudíž ho nebylo možné detekovat. V ostatních publikacích při použití této metody byl testován pouze OTA [34].

Jako stacionární fáze byly vždy použity kolony pro reverzní fáze. Studie z roku 2014 se zaměřila přímo na srovnání 5 kolon při analýze ochratoxinu v rozinkách. Nejnižší limit kvantifikace byl dosažen u kolon s povrchově porézními částicemi, LOQ byl v tomto případě

0,034 µg/kg. V případě této studie nezáviselo na délce kolony, ale důležitým parametrem byla velikost částic. U 5 µm částic byl LOQ 0,076 µg/kg, u 3,5 µm klesla hodnota již na 0,04 µg/kg a nejnižší byla u povrchově porézních částic velikých 2,7 µm [44].

Součástí mobilní fáze byl vždy acetonitril nebo metanol. V každé studii byla procentuální zastoupení ACN ve směsi při analýze větší než 50 %. Bylo využíváno jak gradientových, tak izokratikých elucí.

Nejčastěji byla využívána detekce pomocí MS a FLD. Tyto metody detekce byly využity jak ve spojení s HPLC, tak UHPLC. U FLD byla vlnová délka excitace při měření nastavena v rozmezí od 274 do 380 nm a emisní vlnová délka od 420 do 465 nm. U MS/MS detekce bývá z pravidla dosaženo nižšího limitu detekce, kdy všechny publikace popisují typ ionizace ESI⁺.

V Tab. 3 je uvedeno shrnutí několika vybraných nejnovějších studií pro srovnání s námi získanými výsledky. Podle všech zatím zjištěných publikací byl nejčastěji testován OTA, nejspíše z důvodu ke své toxicity, dále OT α a pouze v málo studiích OTB. OTC zatím podle zjištěných publikací analyzován nebyl, kdy důvod je neznámý.

Tab. 3: Publikované metody pro analýzu ochratoxinů v biologických materiálech [35], [38]–[41], [45], [46]

technika	materiál	stanovované ochratoxiny	příprava vzorku	stacionární fáze	mobilní fáze	detekce	LOQ (ng/ml)	zdroj
UHPLC	plazma	OTA	centrifugace, precipitace	Zorbax Eclipse Plus C ₈ 150 mm × 3,0 mm, 1,8 μm	ACN:voda:kys. fosforečná 50:50:0.1	FLD 330 a 460 nm	1,48	[37]
UHPLC	mléko	OTA, OTB	SALLE (ACN/2%FA/octan amonný)	Agilent C ₁₈ 100 mm x 2,1 mm, 1,8 μm	voda:ACN	MS/MS	0,0156	[38]
HPLC	plazma	OTA, OTB, OT α	LLE (kys. fosforečná/CHCl ₃)	Nucleodur C ₁₈ Gravity 125 mm x 4,6 mm, 5μm	MeOH: AcA	FLD 274 a 440 nm	0,005	[39]
HPLC	krev	OTA	LLE (voda/ACN/aceton)	Nucleodur C ₁₈ Gravity SB 100 mm x 2 mm, 3 μm	ACN/2%AcA:voda/0,1AcA	MS/MS	0,015	[47]
HPLC	moč	OTA, OT α	LLE, centrifugace, IAC	Nucleosil 100-5 C ₁₈ 125 mm x 3mm, 3μm	2%MeOH/kys. octová :MeOH/isopropanol	FLD 333 a 450 nm	0,05	[34]
UHPLC	moč	OTA	SPE (Oasis HLB 2,1x20 mm)	Nucleodur C ₁₈ Gravity SB 75 mm x 2 mm, 1,8 μm	ACN/voda:0.1%FA/5mM octan amonný	MS/MS	0,012	[41]
HPLC	moč	OTA, OT α	QuEChERS	HSS T-3 100 mm x 2,1 mm, 1,8 μm	MeOH:voda:AcA	MS/MS	0,02	[46]

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie, UHPLC – ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie, SALLE – extrakce z kapaliny do kapaliny vysolováním, IAC – imunoafinitní kolona, LLE – extrakce z kapaliny do kapaliny, SPE – extrakce na tuhou fázi, MISPE – extrakce na molekulárně vtištěných polymerech, ACN – acetonitril, AcA – kyselina octová, FA – kyselina mravenčí, MeOH – methanol, FLD – fluorescenční detektor, OTA – ochratoxin A, OTB – ochratoxin B, OT α - ochratoxin alfa

Tab. 3 - pokračování: Publikované metody pro analýzu ochratoxinů v biologických materiálech [36], [42], [43], [45], [46], [48]

technika	materiál	stanovované ochratoxiny	příprava vzorku	stacionární fáze	mobilní fáze	detekce	LOQ (ng/ml)	zdroj
HPLC	moč	OTA	Chem Elut kolona	LiChrospher RP-18 125 mm x 4 mm, 5 μm	MeOH:voda:AcA 700:300:20	FLD 336 a 464 nm	0,9	[45]
UHPLC	moč	OTA	SPE (Oasis PRiME HLB)	Acquity HSS T3 100 mm x 2,1 mm, 1,8 μm	voda:ACN	MS/MS	0,001	[42]
HPLC	moč	OTA	extrakce, IAC	Nucleosil 100 C ₁₈ 250 mm x 4,6 mm, 5 μm	voda: ACN:AcA 49.5:49.5:1	FLD 333 a 460 nm	0,05	[36]
HPLC	tkáň ledviny	OTA	IAC	Kinetex C ₁₈ core-shell 50 mm x 2,1 mm, 2,6 μm	ACN/AcA:voda/AcA	FLD 333 a 465 nm	0,001	[43]
UHPLC	moč	OTA, OT α	SALLE	Symmetry C18 150 mm x 2,1 mm, 5 μm	voda/0,3% FA/5mM AmF MeOH/0,3% FA/ 5mM AmF	MS/MS	OTA - 0,03 OT α - 0,7	[48]
UHPLC	moč	OTA, OT α	DAS	Symmetry C18 150 mm x 2,1 mm, 5 μm	voda/0,3% FA/5mM AmF MeOH/0,3% FA/ 5mM AmF	MS/MS	OTA - 0,4* OT α - 4*	[48]

*HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie, UHPLC – ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie, SALLE – extrakce z kapaliny do kapaliny vysolováním, IAC – imunoafinitní kolona, LLE – extrakce z kapaliny do kapaliny, SPE – extrakce na tuhou fázi, MISPE – extrakce na molekulárně vtištěných polymerech, ACN – acetonitril, AcA – kyselina octová, MeOH – methanol, AmF – mravenčan amonný FLD – fluorescenční detektor, OTA – ochratoxin A, OTB – ochratoxin B, OT α - ochratoxin alfa, * - hodnota LOD (v článku nebylo uvedeno LOQ)*

3.4. Validace metody

Pro zajištění správnosti zavedeného postupu a spolehlivosti analytických výsledků je nezbytná validace bioanalytické metody podle norem stanovenými regulačními autoritami EMA, či FDA. U chromatografických metod by úplná validace měla zahrnovat následující parametry: selektivita, specificita, matricový efekt, kalibrační křivka (funkce odezvy), rozsah (dolní mez kvantifikace (LLOQ) až horní mez kvantifikace (ULOQ)), správnost, přesnost, přenos analytů, integrita ředění a stabilita [49].

Selektivita metody je vlastnost závislá na koncentraci stanovovaného analytu, složek matrice, popřípadě i nastavení parametrů metody a samotné instrumentální matrice [50]. Slepé vzorky matrice musí být vzaty z 6 různých zdrojů a žádný jiný analyt nesmí mít stejný retenční čas, jako stanovovaná molekula. Odezvy, které lze připsat interferujícím látkám, nesmí být větší než 20 % LLOQ [49].

Specificita metody je vlastnost přesně a správně určit analyt, či více analytů ve směsi, aniž by došlo k interferenci s ostatními složkami. Specifická metoda je oproštěna od vlivu matrice, na rozdíl od selektivity, která vliv ostatních složek připouští [50]. Metoda musí být schopná odlišit strukturně podobné analyty, či izomery. V případě metod založených na LC-MS může hodnocení zahrnovat porovnání molekulové hmotnosti potenciální interferující látky s analytem a chromatografickou separaci příbuzné látky od analytu. Odezvy u slepých vzorků nesmí být větší než 20 % LLOQ [49].

Matricové efekty mají velký vliv při stanovení léčiv a jejich metabolitů za použití LC-MS. Definují se jako změny účinnosti ionizace zapříčiněné přítomností látky, vstupující do iontového zdroje, spolu s analyzovanou látkou. Vznikají jako výsledek soupeření mezi složkami matrice a analytem. Mechanismů, které dávají vzniknout matricovým efektům je mnoho, avšak ne všechny jsou objasněny. Předpokládá se, že hlavní příčina vychází z principu ionizace. Matricový efekt zahrnuje jak potlačení ionizace, tak její zvýšení. Matricové efekty se nedají nijak předvídat [7]. Jsou pozorovány jak u typu ionizace ESI, tak APCI, ale ve větším procentu případů se projevují u ESI. Velké rozdíly jsou pozorovány u jednotlivých technik úpravy vzorku [51]. Při hodnocení matricového efektu se porovnávají plochy píku stanovované látky bez matrice a po přidání extraktu matrice. Rozdíl by neměl být vyšší než 15 %. Pokud vyšší je, může dojít k významnému ovlivnění [52]. Matricové efekty se dají snížit několika způsoby. Lze je

snížit jednoduchým dávkováním menších objemů nebo ředěním vzorků. Další možností je optimalizace přípravy vzorku nebo chromatografických parametrů.

Správnost měření (*method accuracy*) udává těsnost shody mezi aritmetickým průměrem daného počtu opakovaných naměřených hodnot veličin a referenční hodnotou veličiny [1]. Výsledek může být zatížen zanedbatelnou systematickou chybou [53]. Chyba, která v průběhu výsledků zkoušek zůstává konstantní, nebo se mění předvídatelným způsobem se nazývá systematická chyba, kdežto chyba, která se mění nepředvídatelným způsobem se nazývá náhodná chyba výsledku. Rozdíl mezi střední hodnotou a přijatelnou hodnotou se nazývá odchylka (bias) [1]. Ověření správnosti metody by mělo obsahovat minimálně 5 vzorků matricových standardů na minimálně 4 koncentračních hladinách, přičemž by měla být hodnocena vždy alespoň jedna nízká, střední a vysoká koncentrační hladina. Hodnoty správnosti měření by se měly pohybovat v rozmezí 15 % procent, pouze u LLOQ se hodnota může přiblížit k 20 % [49].

Přesnost metody (*method precision*) udává těsnost shody mezi naměřenými hodnotami veličiny získanými opakovaným měřením na stejném nebo na podobných přístrojích za specifikovaných podmínek [1]. Bývá zpravidla vyjádřena číselně mírou nepřesnosti, jako jsou směrodatná odchylka, či rozptyl. Přesnost měření se také používá k definování opakovatelnosti měření, mezilehlé přesnosti měření a reprodukovatelnosti měření. Opakovatelnost měření je dána několika podmínkami, kterými jsou: stejný postup měření, stejný laboratorní pracovník, stejný měřicí systém, stejné pracovní podmínky a místo, opakování měření na stejném, nebo podobném přístroji v krátkém časovém úseku. Mezilehlá přesnost měření se hodnotí v rozšířeném časovém úseku na stejném místě za použití stejného postupu měření. V rámci měření je možné zahrnout novou kalibraci, kalibrátor, změnit obsluhu přístroje, či samotný měřicí systém. Posledním typem je reprodukovatelnost měření, kde je nutné vyzkoušet metodu na různých místech, měřících systémech, či jiném obslužném personálu [53]. Ověření přesnosti musí být provedeno za stejných podmínek, jako ověření správnosti, kdy RSD by měla být pod 15 % [49].

Rozsah metody je měřen pomocí referenčních materiálů či obohacených vzorků na minimálně 6 koncentračních hladinách vždy ve 3 opakováních. Pokud není křivka ideálně lineární je potřeba mít bodů více. Správnost vypočtených koncentrací každého kalibračního standardu by měla být v rozmezí ± 20 % nominální koncentrace na LLOQ a v rozmezí ± 15 % na

všech ostatních úrovních. Výše uvedená kritéria by měla splňovat alespoň 75 % kalibračních standardů [50]. Hodnoty LLOQ a ULOQ by měly být určeny z kalibrační křivky. Jedná se o hodnoty spodního limitu kvantifikace (LLOQ) a koncového limitu kvantifikace (ULOQ) [49].

Ověření stability vzorku se provádí v několika krocích. Je ověřena stabilita stanovovaných analytů v materiálu, při zmražení alespoň na 12 hodin, při -20 °C a -80 °C. Dále skladování při laboratorní teplotě. Každý vzorek by měl být připraven minimálně ve 3 opakováních a následně změřen [49].

Přenos analytů je měření odezvy mezi jednotlivými vzorky v důsledku zůstatku zbytkového analytu v analytickém přístroji z předchozí analýzy. Přenos by měl být posouzen analýzou slepých vzorků po kalibračním standardu na ULOQ. Přenos by neměl být větší než 20 % odezvy analytu při LLOQ [49].

Integrita ředění je posouzení, zda ředění neovlivňuje správnost a přesnost metody. Mělo by být připraveno 5 replikátů, kde je analyt s vyšší koncentrací, než je ULOQ naředěn slepou maticí na koncentraci na kalibrační křivce. Střední správnost by měla být menší než 15 % a přesnost měření by neměla překročit 15 % [49].

4. Experimentální část

4.1. Přístrojové vybavení

HPLC systém: ACQUITY UPLC I-Class PLUS system, Waters, USA

Hmotnostní analyzátor: Xevo TQ-XS trojitý kvadrupól, Waters, Velká Británie

Analytické váhy: Sartorius ME5-OC, Sartorius, Německo

Třepačka: IKA Vortex 3, Sigma-Aldrich, Česká republika

Ultrazvuková lázeň: Sonorex Digitec, Bandelin, Německo

Odstředivka: Mikro 220R, Hettich, Německo

Automatické pipety: Eppendorf Reference 2, Eppendorf, Česká republika

Vakuová odparka: Concentrator Plus, Eppendorf, Česká republika

Tlakovací zařízení pro SLE: Positive Pressure-96 Processor, Waters, USA

Program měření: MassLynx 4.1, Waters, USA

Vyhodnocovací program: TargetLynx XS, Waters, USA

4.2. Chromatografické kolony

1. ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 μm , 2,1 x 50 mm, LOT: 02643525228320, Waters, USA
2. Atlantis Premier BEH C18 AX 1,7 μm , 2,1 x 100 mm, LOT: 01073010815816, Waters, Irsko
3. ACQUITY UPLC HSS T3 1,8 μm , 2,1 x 150 mm, LOT: 02703202018314, Waters, USA
4. ACQUITY UPC CSH PFP 1,7 μm , 3 x 100 mm, LOT: 01043610715615, Waters, USA
5. ACQUITY UPLC BEH PHE 1,7 μm , 2,1 x 100 mm, LOT: 012731259156, Waters, Irsko
6. ACE Excel C18-PFP 1,7 μm , 2,1 x 100 mm, LOT: A210319189, Avantor, USA
7. ACE Excel C18-AR 1,7 μm , 2,1 x 100 mm, LOT: A210316682, Avantor, USA
8. ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 μm , 2,1 x 100 mm, LOT: 0350392941, Waters, Irsko

4.3. Použité chemikálie, materiál a standardní látky

Voda: LC-MS grade, Millipore, destilovaná v přístroji Milli Q RG, Burlington, USA

Acetonitril: Biosolve BV, Valkenswaard, Nizozemsko

Kyselina octová: Lichropur, čistota 100 %, Německo

Methanol: LC-MS optima, Fischer Scientific, čistota 100 %, Loughborough, Velká Británie

Kyselina mravenčí: VWR International S.A.S., čistota >99 %, Velká Británie

Methyl-terc-butyl ether: Sigma-Aldrich, čistota >99,8 %, Německo

Isopropanol: Honeywell, čistota >99,9 %, Německo

Dichlormethan: Sigma-Aldrich, čistota >99,8 %, Německo

Ethylacetát: Lach-Ner s.r.o., čistota 99,91 %, Česká republika

Síran amonný: Penta, čistota 99,5 %, USA

Špičky: Optifit Tips FlexiBulk Tips 200 µl, LOT: 501198685, Sartorius, Finsko
Eppendorf, Česká republika

SPE disky: Empore Octadecyl C18 47 mm Extraction Disks 2215, LOT: 135969, SUPELCO,
USA

SPE Disks HLB 47 mm, LOT: PP17E-1, AttractSPE, Francie

SLE platíčko: Isolute SLE+ 400 µl SLE Plate, LOT:22004156UA, Biotage, Švédsko

Zkumavky: Ratiolab, Německo

Vialky, inserty, víčka: Chromservis, Česká republika

Ochratoxin A: Dr Ehrenstorfer, LOT: 518471Z, Augsburg, Německo, 5 mg, čistota: 99%

Ochratoxin B: Cayman Chem. Comp., LOT: 0597956-2, Ann Arbor, USA, 5 mg, čistota: ≥98%

Ochratoxin C: Cayman Chem. Comp., LOT: 0625727-1,

Ochratoxin α: HPC standards GmbH, LOT: 780762, Borsdorf, Německo, 10 mg, čistota:
99,9%

4.4. Příprava roztoků pro UHPLC-MS

4.4.1. Příprava zásobních roztoků standardů

Navážky standardu v rozmezí od 0,150 - 0,250 mg byly rozpuštěny v odpovídajícím množství acetonitrilu tak, aby výsledná koncentrace byla rovna 1 mg/ml. Následně byly roztoky standardu naředěny vodou na koncentraci 10 µg/ml.

4.4.2. Příprava pracovních roztoků standardů

Zásobní roztok o koncentraci 10 µg/ml byl naředěn vodou na koncentrace 2000 ng/ml a následně ředěn až na koncentraci 0,05 ng/ml.

4.4.3. Příprava mobilní fáze a oplachových kapalin

Organickou složkou mobilní fáze byl čistý acetonitril. Pro přípravu vodné složky mobilní fáze byla odměrná baňka o objemu 500 ml naplněna vodou téměř pod rysku, poté bylo přidáno 50µl kyseliny octové a následně doplněna vodou po rysku. Jako slabá oplachová kyselina byl použit 10% acetonitril. Bylo smícháno 450 ml vody a 50 ml acetonitrilu. Silnou oplachovou kyselinou byl čistý acetonitril. Oplachovou kapalinou pístů čerpadel byl zvolen 10% roztok methanolu, kdy byla smíchána voda o objemu 450 ml s 50 ml methanolu.

4.5. Parametry měření UHPLC-MS

Před každou novou sérií měřených vzorků (nový den) byla kolona ekvilibrována 10 minut. Mezi jednotlivými vzorky to byly vždy 2 minuty (Obr. 6).

Kolona: ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 µm, 2,1 x 50 mm

Teplota kolony: 40 °C

Mobilní fáze: 0,01% CH₃COOH (A) : ACN (B)

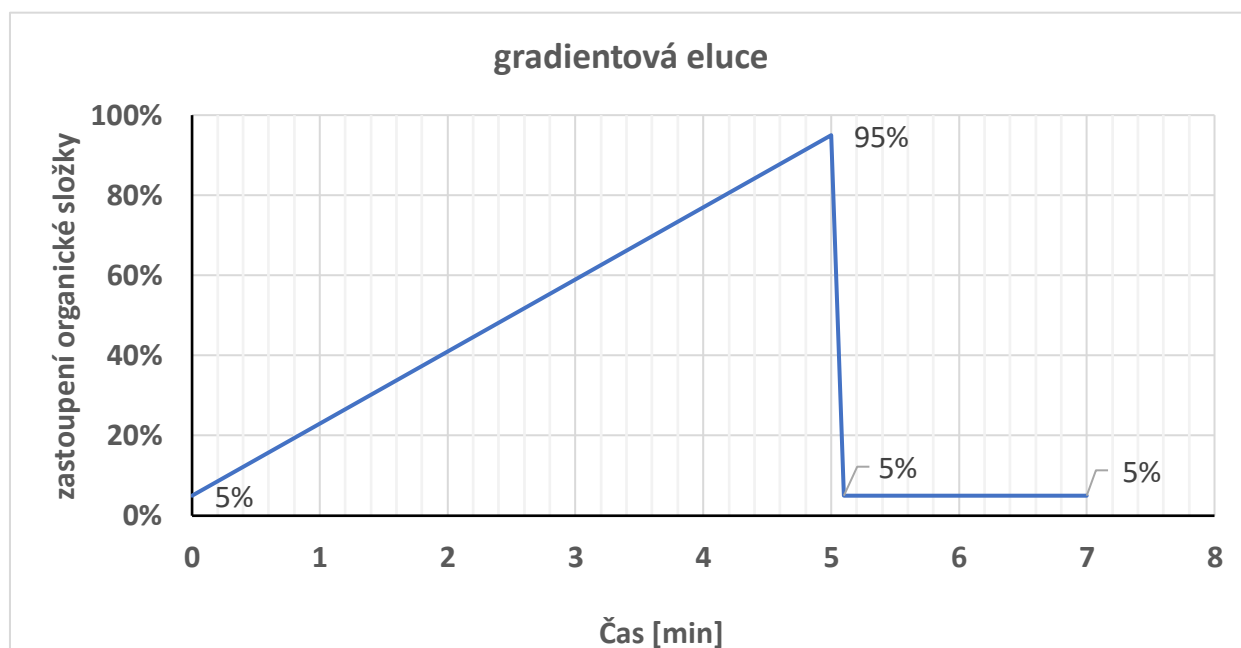
Průtok mob. fáze: 0,4 ml/min

Gradientová eluce: 0 min – 95 % A, 5 % B

5 min – 5 % A, 95 % B

5,1 min – 95 % A, 5 % B

7 min – 95 % A, 5 % B



Obr. 6: Průběh gradientové eluce při UHPLC analýze

Dávkovaný objem: 1 μ l

Teplota automatického dávkovače: 10 °C

Pro měření byl vybrán hmotnostní analyzátor typu trojitý kvadrupól. Nastavení iontového zdroje bylo pro ionizační techniku ESI stejné v pozitivním i negativním módu a je popsáno v Tab. 4.

Tab. 4: Nastavení podmínek iontového zdroje

parametr	hodnota
napětí na kapiláře	1,5 kV
desolvační teplota	500 °C
průtok desolvačního plynu	1000 L/h
průtok plynu na vstupním kuželu	150 L/H

Přechody jednotlivých ochratoxinů byly analyzovány podle podmínek uvedených v Tab. 5 a Tab. 6 za použití ionizační techniky ESI⁺ a ESI⁻.

Tab. 5: Seznam přechodů mateřských iontů ochratoxinů na dceřiné ionty v módu ESI⁺

stanovovaný analyt	prekurzorový iont (<i>m/z</i>)	produktový iont (<i>m/z</i>)	napětí na vstupním kuželu [V]	kolizní energie [eV]
OTA	404	239	25	20
OTB	370	205	25	20
OT-alfa	257	239	20	10
OTC	432	239	15	25

Tab. 6: Seznam přechodů mateřských iontů ochratoxinů na dceřiné ionty v módu ESI⁻

stanovovaný analyt	prekurzorový iont (<i>m/z</i>)	produktový iont (<i>m/z</i>)	napětí na vstupním kuželu [V]	kolizní energie [eV]
OTA	402	358	20	25
OTB	368	324	20	25
OT-alfa	255	167	15	20
OTC	430	249	25	30

4.6. Optimalizované podmínky vybraných metod pro úpravu vzorku

4.6.1. Optimalizované podmínky metody SLE

Moč byla smíchána v poměru 1:1 s 2% FA a 300 µl této směsi bylo naneseno na SLE destičku. Destička byla obsluhována přístrojem Waters za použití tlaku. První a druhé natlakování proběhlo při 3 psi po dobu 100 s. U posledního natlakování byl tlak postupně zvýšen na 10 psi a snižován po dobu 60 sekund. Následně bylo na destičku aplikováno ve dvou opakováních 700 µl extrakční činidlo EtAc. Extrakce probíhala vždy při postupném zvýšení tlaku na 10 psi a postupně byl tlak snížen za dobu 60 sekund.

4.6.2. Optimalizované podmínky metody SALLE

V prvním kroku bylo smícháno 400 µl moči s 400 µl ACN s 2% FA. Následně bylo ke směsi přidáno 800 µl 2M (NH₄)₂SO₄. Celá směs byla centrifugována při 4000 rpm po dobu 15 minut a teplotě 20°C. Po centrifugaci byla odebrána acetonitrilová část do další zkumavky a do původní bylo přidáno dalších 400 µl ACN. Směs byla podruhé centrifugována při stejných podmínkách. Oddělená acetonitrilová část byla přidána k té první a vzorek byl nastříknut do stroje.

4.6.3. Optimalizované podmínky metody µ-SPE-PT

Před samotnou analýzou vzorku je nutné si připravit špičky. Do každé 200 µl pipetovací špičky je aplikováno 6 vrstev sorbentu C18. V prvním kroku analýzy byly špičky kondicionovány pomocí MeOH 5 minut při 20°C a 5000 rpm a následně při stejných podmínkách vodou. Teplota a otáčky zůstaly po celou dobu úpravy vzorku stejné. Dále bylo do špičky nanášeno ve směsi 200 µl moči okyselené 100% FA na 3% FA. Po tomto nanášení byly špičky centrifugovány 15 minut. Třetím krokem byla aplikace 2x po sobě 100 µl 0,1% FA, kdy stáčení probíhalo po dobu 10 minut. Posledním krokem byla eluce 50 µl ACN při centrifugaci během 5 minut.

4.7. Validace metody

Vzorky pro validaci byly zpracovány metodou µ-SPE-PT. Byla provedena validace podle směrnic EMA z roku 2022 [49]. Při validaci byla měřena správnost, přesnost, rozsah a matricové efekty. V rámci rozsahu byly stanoveny LLOQ a ULOQ pro každý analyt.

Rozsah byl hodnocen ze dvou nezávislých měření matricových kalibračních křivek v rozmezí koncentrací 0,005 – 100 ng/ml. Z kalibrační křivky byly stanoveny LLOQ a ULOQ.

Správnost a přesnost byla měřena na několika koncentračních hladinách, konkrétně 0,05 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,2 ng/ml, 5 ng/ml a 20 ng/ml.

Matricové efekty byly vyhodnoceny na koncentračních hladinách 5 ng/ml a 20 ng/ml.

5. Výsledky a diskuse

Podmínky pro UHPLC-MS/MS byly převzaty z diplomové práce Kristiána Kretka [54]. Tyto podmínky byly ověřeny a změřeny kalibrační křivky standardů.

Z dostupných publikací zatím stanovovaných ochratoxinů byly vybrány pro úpravu vzorku metody DAS, SALLE a μ -SPE-PT. Metoda DAS byla s ohledem na chybějící zakoncentrovací fázi a vyšším hodnotám LLOQ po testování vyhodnocena jako nevhodná. Dalším problémem u této metody byla nedostačující eliminace interferencí. Na základě literární rešerše byly testovány metody na principu LLE, které byly dosud nejvíce využívány. Jednalo se o metodu SALLE a SLE. Metoda μ -SPE-PT byla vybrána na základě možnosti zakoncentrování analytu, a tudíž analýze ochratoxinů s co nejnižším LLOQ.

Matricovým vzorek v našem případě byla směsná moč od 10 různých zdravých lidí. Moč byla na začátku experimentu smíchána, rozdělena do menších zkumavek a uchovávána při -80°C v mrazáku. Před každou analýzou bylo rozmrazeno jen potřebné množství moči při pokojové teplotě.

5.1. Optimalizace metody SLE

Tento postup byla testován jako nový, jelikož nebyl zmíněn v žádné literatuře. Výchozí podmínky tedy byly podle příbalové knihy k destičkám SLE [15]

Obohacená moč byla smíchána v poměru 1:1 s příslušnou ředící směsí, v závislosti na pKa analytu, a 300 μl této směsi bylo nanášeno na SLE destičku. Destička byla obsluhována přístrojem Waters, kdy první a druhé natlakování proběhlo při 3 psi po dobu 100 s. U posledního natlakování byl tlak postupně zvyšován na 10 psi a snižován po dobu 60 sekund. Následně bylo na destičku aplikováno ve dvou opakováních 700 μl extrakčního činidla. Při extrakci byl tlak postupně zvyšován na 10 psi a snižován po dobu 60 sekund. Celé testování bylo provedeno podle parametrů v kapitole 4.5.

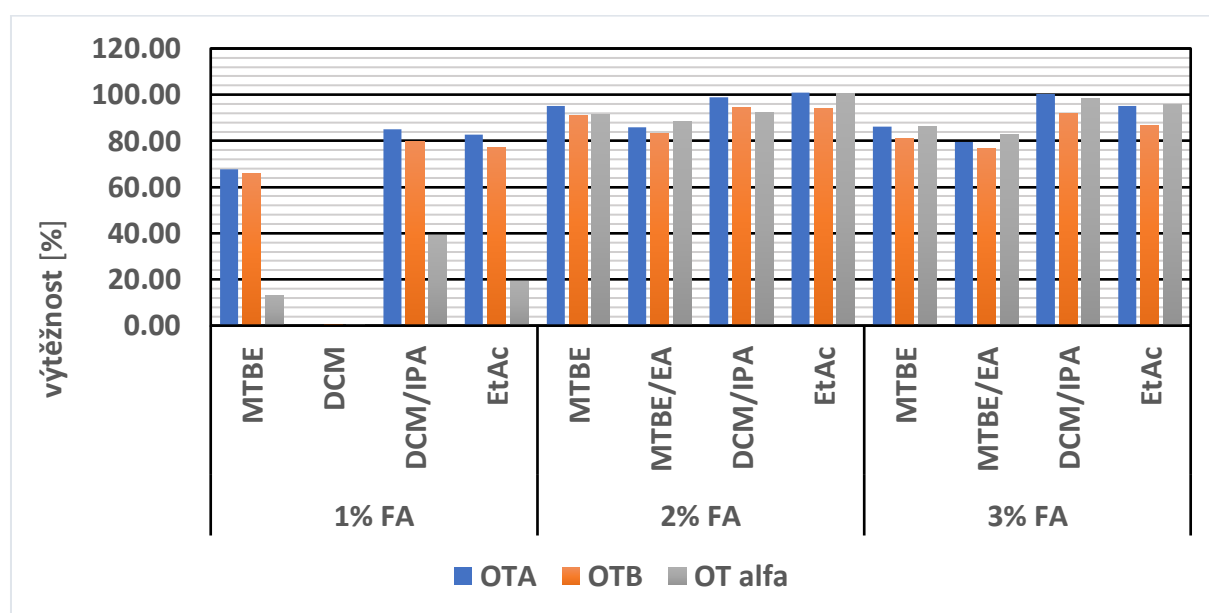
Na základě pKa stanovovaných látek, bylo v případě ředících roztoků testována 0,1% FA, 1% FA, 2% FA, 3% FA a HCl. Po testování těchto roztoků bylo vyhodnoceno, že 0,1 % FA a HCl jsou pro tuto analýzu zcela nepoužitelné. Výtěžnost jednotlivých ochratoxinů za použití

těchto roztoků nebyla ani 5 %, proto již dále nebudou diskutovány. Vhodným ředícím roztokem s ohledem na výtěžnost při extrakci byly vyhodnoceny 1% FA, 2% FA a 3% FA.

Jako extrakční činidla byla podle fyzikálně chemických vlastností stanovovaných analytů pro testování vybrána: methylterc-butylether, ethylacetát, dichlormethan a dichlormethan naředěný s 2-isopropanolem v poměru 95:5. Následně byl vyzkoušen ještě MTBE/EtAc v poměru 80:20 z důvodu využití této směsi při jiné analýze, díky které bylo docíleno vyšší výtěžnosti extrakce.

Při optimalizaci extrakčních činidel bylo zjištěno, že nejméně vhodným je DCM, naopak ideálním činidlem by mohl být ethylacetát.

Graf výtěžnosti v závislosti na použitých ředících roztocích a elučních činidlech při optimalizaci je zobrazen na Obr. 7.

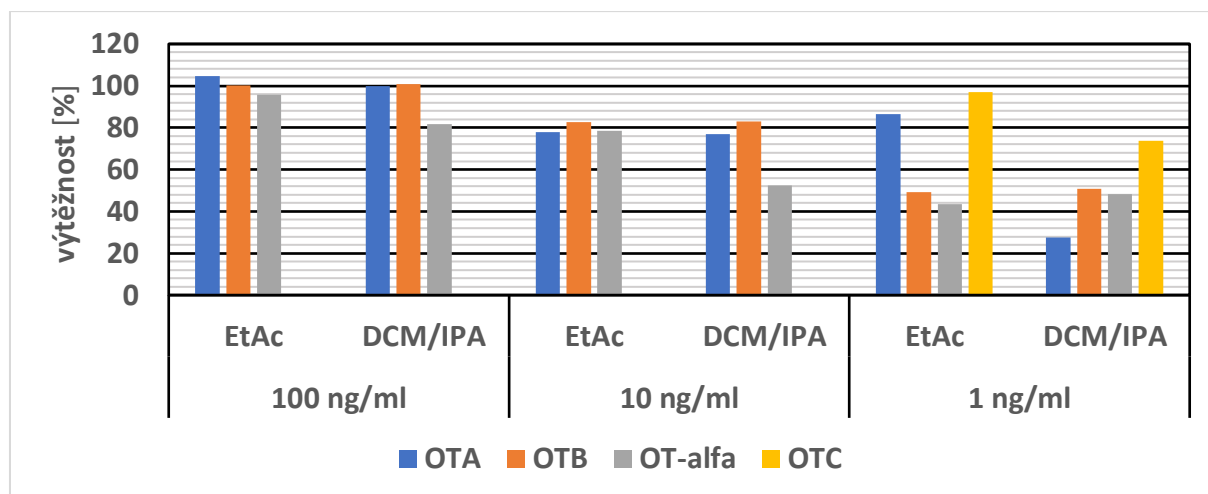


Obr. 7: Srovnání ředících a elučních činidel při analýze moči obohacené na koncentraci 100 ng/ml

Nejlépeším ředícím roztokem s ohledem na výtěžnost extrakce u všech námí stanovovaných analytů je 2% FA a nejvhodnějšími elučními činidly EtAc a DCM/IPA. Proto další hodnocení bylo provedeno vždy při eluci těmito dvěma činidly.

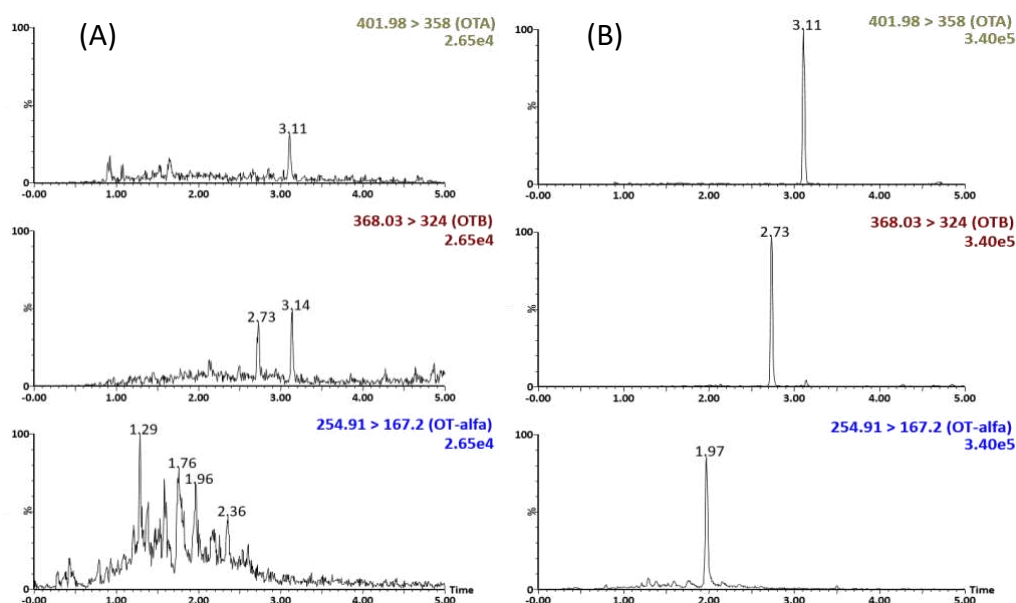
Dalším krokem optimalizace bylo ověření, že výtěžnost této metody bude dobrá i u obohacení nižší než 100 ng/ml, na které probíhalo určení nejvhodnějšího ředícího roztoku a

elučního činidla. Jak je ukázáno na Obr. 8, výtěžnost metody při nižší koncentraci obohacení klesala.



Obr. 8: Srovnání výtěžností SLE z moči při obohacení ochratoxiny na koncentracích 100 ng/ml, 10ng/ml a 1 ng/ml za použití extrakčních činidel EtAc a DCM/IPA

Srovnání chromatogramů pro jednotlivé přechody daných ochratoxinů u moči obohacené na koncentraci 10 ng/ml a matricové moči zobrazuje Obr. 9. Z chromatogramů čisté moči je zřejmé, že hlavně u ochratoxinu alfa je v moči přítomno stále mnoho dalších interferujících látek, které zamezují co nejnižšímu možnému limitu kvantifikace a snižují selektivitu metody.



Obr. 9: Porovnání čisté moči po úpravě SLE (A) a moči obohacené na koncentraci 10 ng/ml (B)

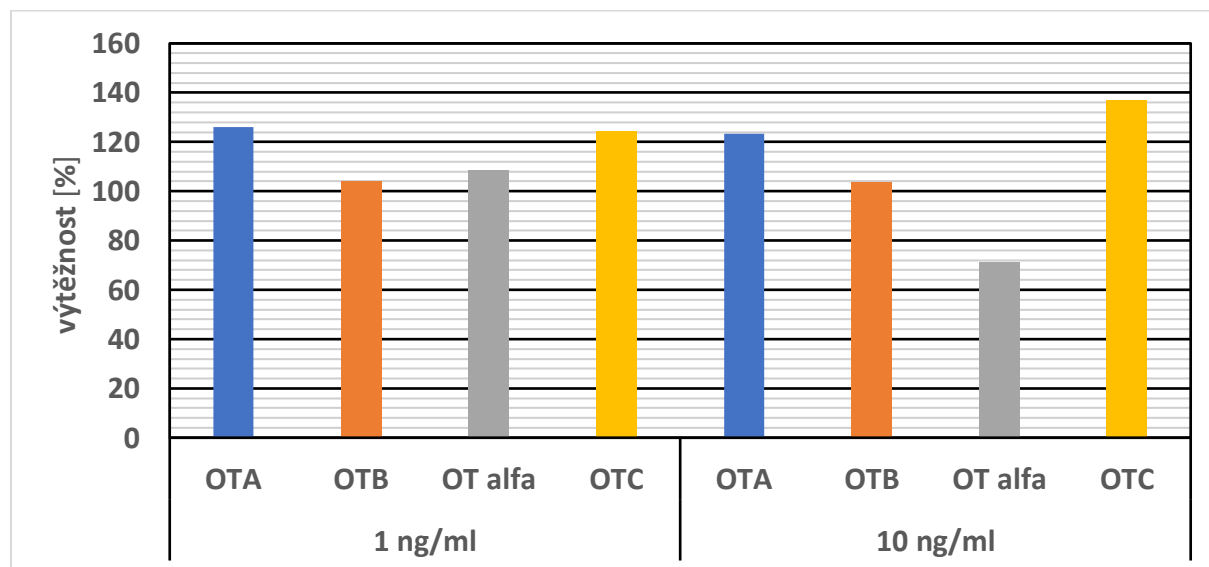
5.2. Optimalizace metody SALLE

Metoda SALLE byla vybrána na základě publikace Song et. al, ze které byly použity také výchozí podmínky [48].

V prvním kroku bylo smícháno 400 μl obohacené moči s 400 μl ACN s 2% FA. Následně bylo ke směsi přidáno 800 μl 2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Celá směs byla centrifugována při 4000 rpm po dobu 15 minut a teplotě 20°C. Po centrifugaci byla odebrána acetonitrilová část do další zkumavky a do původní bylo přidáno dalších 400 μl ACN. Směs byla podruhé centrifugována při stejných podmínkách. Následně byly oba acetonitrilové extrakty spojeny a odpařeny při různých teplotních stupních pro srovnání. Vzorky byly odpařeny při 30°C, 60°C a část z nich byla nastříknuta do stroje bez odpaření. Vzorky odpařené v odparce při 30°C a 60°C byly následně rozpuštěny ve 400 μl 50% MeOH. Všechny vzorky byly měřeny podle podmínek popsaných v kapitole 4.5.

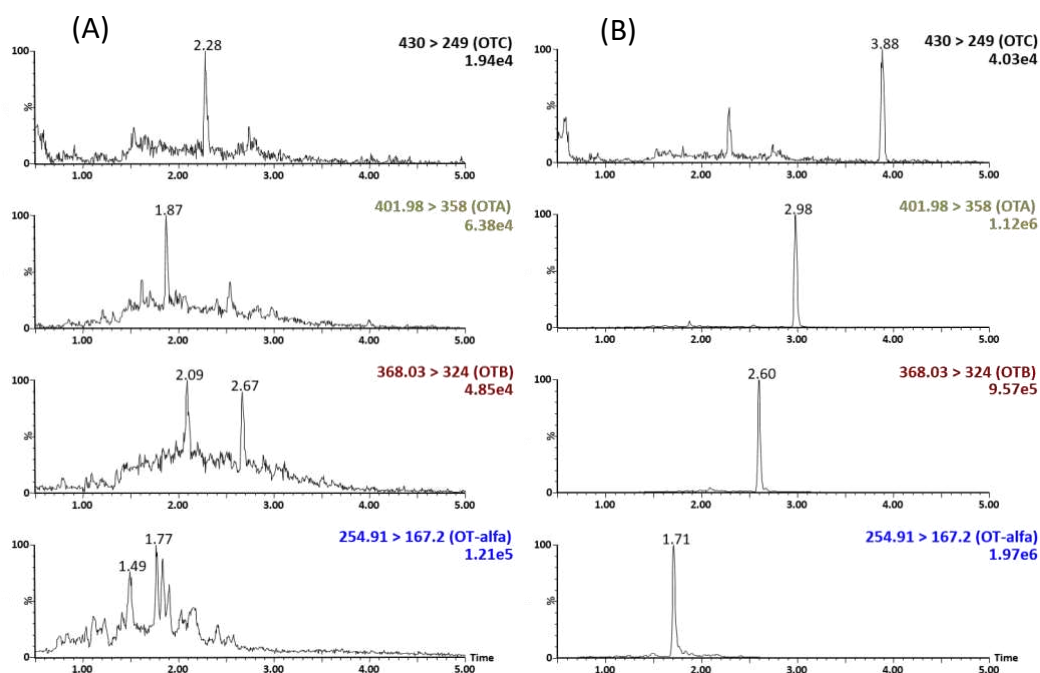
Vzorky, které byly odpařované v odparce a následně nadávkovány do stroje neměly v detektoru žádnou odezvu, z námi neznámého důvodu, a proto pro další analýzu byl využit postup bez odpaření.

Obr. 10 ukazuje srovnání výtěžností při obohacení moči na koncentrační hladinu 1 ng/ml a 10 ng/ml s při optimalizovaných podmínkách popsaných v kapitole 4.5.



Obr. 10: Srovnání výtěžností jednotlivých ochratoxinů na koncentrační hladině 1 ng/ml a 10 ng/ml do moči

Na Obr. 11 je zobrazeno porovnání chromatogramů matrice moči upravené metodou SALLE a moči upravené touto metodou při obohacení na koncentrační hladinu 10 ng/ml. Z chromatogramu 11A lze vyčíst, že i v případě této metody není moč dostatečně očištěna od balastních látek hlavně u OT α , kdy na chromatogramu je stále mnoho píků v okolí námi stanovovaného analytu. Látka přítomná v blízkosti OT α tak brání správné kvantifikaci.



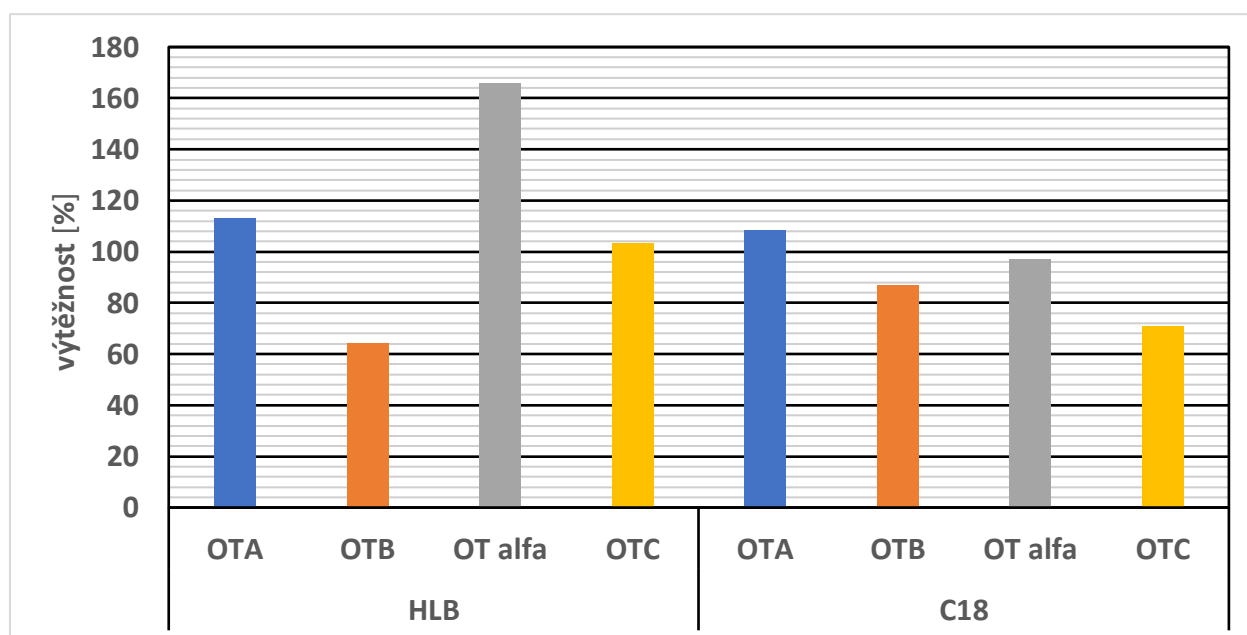
Obr. 11: Porovnání čisté moči po úpravě SALLE (A) a moči obohacené na koncentraci 10 ng/ml upravené stejnou metodou (B)

5.3. Optimalizace metody μ -SPE-PT

Metoda μ -SPE-PT byla vyzkoušena na základě dvou jiných publikací [41], [42].

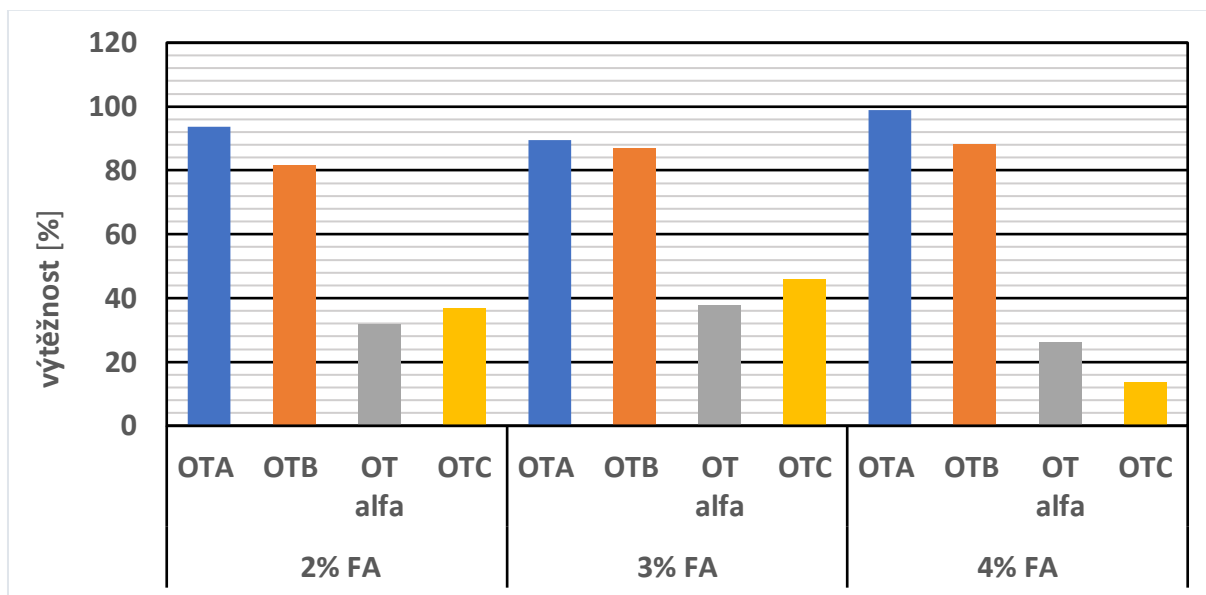
Špičky byly kondicionovány 5 minut při 20°C a 5000 rpm pomocí MeOH a následně při stejných podmínkách vodou. Teplota a otáčky zůstaly po celou dobu úpravy vzorku stejné. Dále bylo do špičky nanášeno ve směsi 100 μ l moči a 100 μ l 2% FA. Po tomto nanášení byly špičky centrifugovány 15 minut. Třetím krokem byla aplikace 2x po sobě 100 μ l 0,1% FA, kdy stáčení probíhalo po dobu 10 minut. Posledním krokem byla vícenásobná eluce 50 μ l ACN, centrifugace probíhala vždy 5 minut. Během prvních měření byla moč eluována 3x ACN na základě již publikovaného článku [42]. Vše bylo měřeno při parametrech metody sepsaných v kapitole 4.5.

Při prvním kroku optimalizace byly vybrány kolony se sorbentem C18 a sorbentem HLB. HLB sorbent byl vybrán na základě dosud vydaných publikací a C18 s ohledem na využití C18 reverzní stacionární na koloně. Špičky byly ručně připraveny, kdy za pomoci byla aplikována postupně vrstva z disk do 200 μ l špičky. Byly připraveny špičky s 3 vrstvami C18 pro jednu sérii měření a 3 vrstvami HLB pro druhou polovinu vzorku. Při analýze bylo zjištěno, že typy sorbentu byly vybrány jako vhodné, jelikož stanovované analyty zůstaly na kolonce až do kroku eluce. Během nanášecího a promývacího kroku sorbentem procházeli pouze látky balastní. Vhodnějšími špičkami se jeví C18 kolony, které mají u všech analytů výtěžnost v rozmezí 70 až 110 % (Obr. 12).



Obr. 12: Srovnání výtěžností jednotlivých ochratoxinů při použití SPE špiček na koncentrační hladině ochratoxinů v moči 1 ng/ml

V kroku nanášení byla testována výtěžnost při okyselení moči vodným roztokem 1%, 2% a 3% FA v poměru 1:1 (Obr. 13).



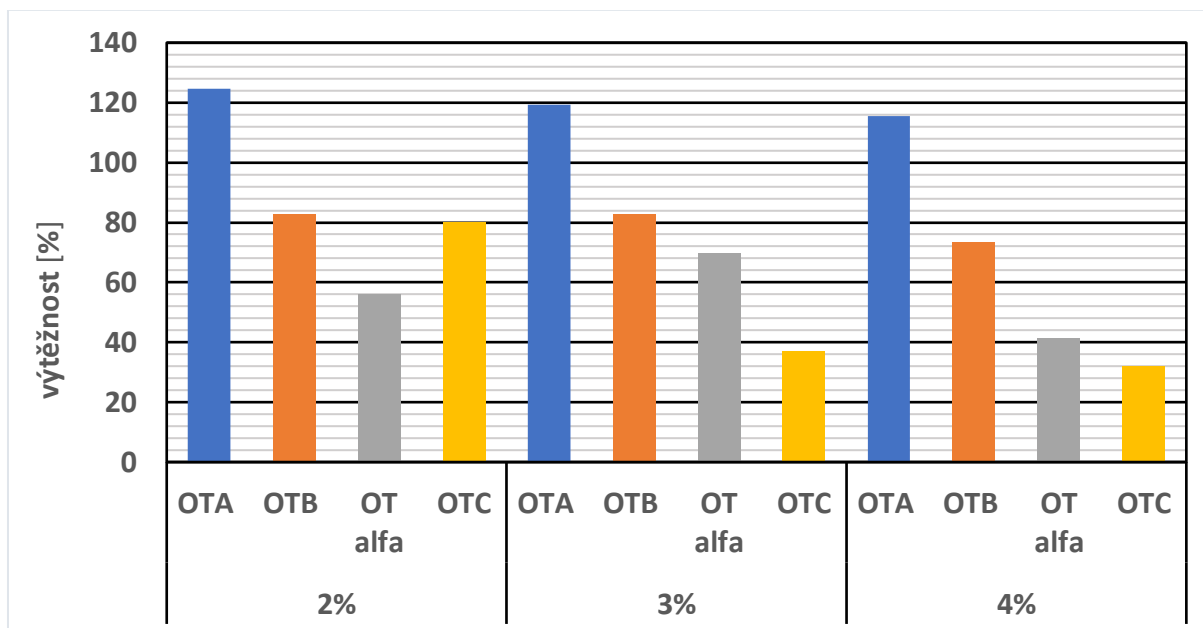
Obr. 13: Srovnání vlivu použití vodného roztoku FA v kroku nanášení v poměru 1:1 (FA:moč) na výtěžnost při obohacení na koncentrační hladinu 0,5 ng/ml při použití kolon C18

Při testování výtěžnosti jednotlivých frakcí při eluci ACN bylo zjištěno, že více než 98 % celkového množství všech studovaných ochratoxinů se eluuje hned v první frakci, a proto byl upraven vícekrokový postup na eluci pouze 1x ACN (Tab. 7).

Tab. 7: Srovnání výtěžností jednotlivých kroků eluce za použití ACN

eluce č.	výtěžnost OTA [%]	výtěžnost OTB [%]	výtěžnost OT α [%]	výtěžnost OTC [%]
1	99,39	99,36	98,61	98,95
2	0,53	0,51	1,19	0,74
3	0,07	0,13	0,20	0,31

V dalším experimentu bylo provedeno okyselení moči 100% FA na 2%, 3% a 4% FA v moči a byla sledována výtěžnost po celém procesu (Obr. 14). Toto testování bylo provedeno hlavně z důvodu zvýšení zakoncentrovací fáze, kdy původně došlo k zakoncentrování 2x, nyní by mohlo být možné zakoncentrování 4x.

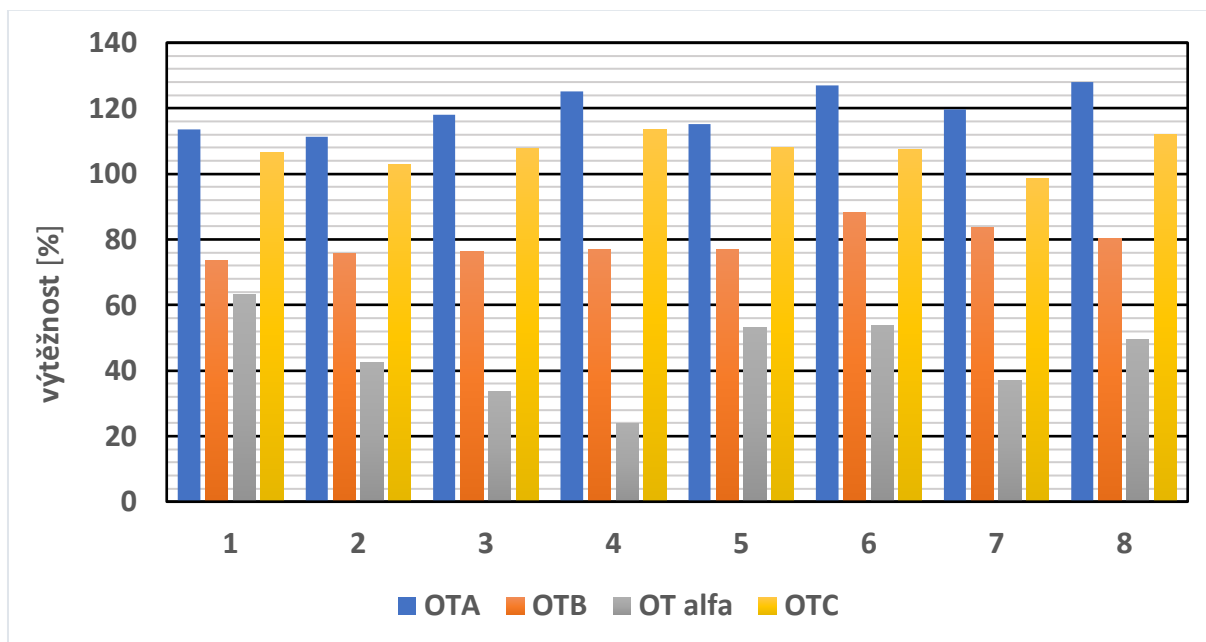


Obr. 14: Srovnání výtěžnosti na koncentrační hladině 0,5 ng/ml po přímém oxyselení moči v kroku nanášení různými koncentracemi FA za použití kolonky C18

Bylo také provedeno měření vlivu nanášeného objemu, kdy bylo do špiček aplikováno 200 μ l, 300 μ l, 400 μ l a 500 μ l moči vždy v poměru 1:1 s 2% a 3% FA, avšak výtěžnost metody u jednotlivých ochratoxinů kromě OTA klesala, proto data nejsou prezentována.

Při testování vlivu počtu vrstev sorbentu bylo zjištěno, že aplikace více vrstev sorbentu, v našem případě 6 stejných místo 3, zvýšila výtěžnost hlavně u OT α a OTC. Pro následující měření bylo tedy použito špiček s 6 sorbenty C18.

Při vyhodnocení výtěžností v předchozích měření byl problém s vyššími pozadími a interferenci látek u OTB a OT- α , proto bylo provedeno promytí kolonky i jinými rozpouštědly, než vodná 0,1% FA, kdy byla vybrána: 5% MeOH, 10% MeOH, voda, 5% MeOH s 0,1% FA a 10% MeOH s 0,1% FA. Díky mnohonásobnému promytí, které může odstranit mnoho interferencí byla testována i kombinace těchto rozpouštědel a v každém kroku bylo aplikováno jiné. V případě tohoto testování bylo zjištěno, že mezi promývacími roztoky není výrazný rozdíl v pozadí na chromatogramech. Jsou však rozdílné hlavně výtěžnosti při použití daného činidla. Nejvhodnějšími se jeví promytí 2x 0,1% FA, 2x 5% MeOH s 0,1% FA a kombinace 1x 0,1% FA s 1x voda a jako poslední 1x voda a 1x 10%MeOH s 0,1% FA. Naopak u ostatních rozpouštědel a jejich kombinací nebyla výtěžnost u OT- α ani 50 % (Obr. 15).

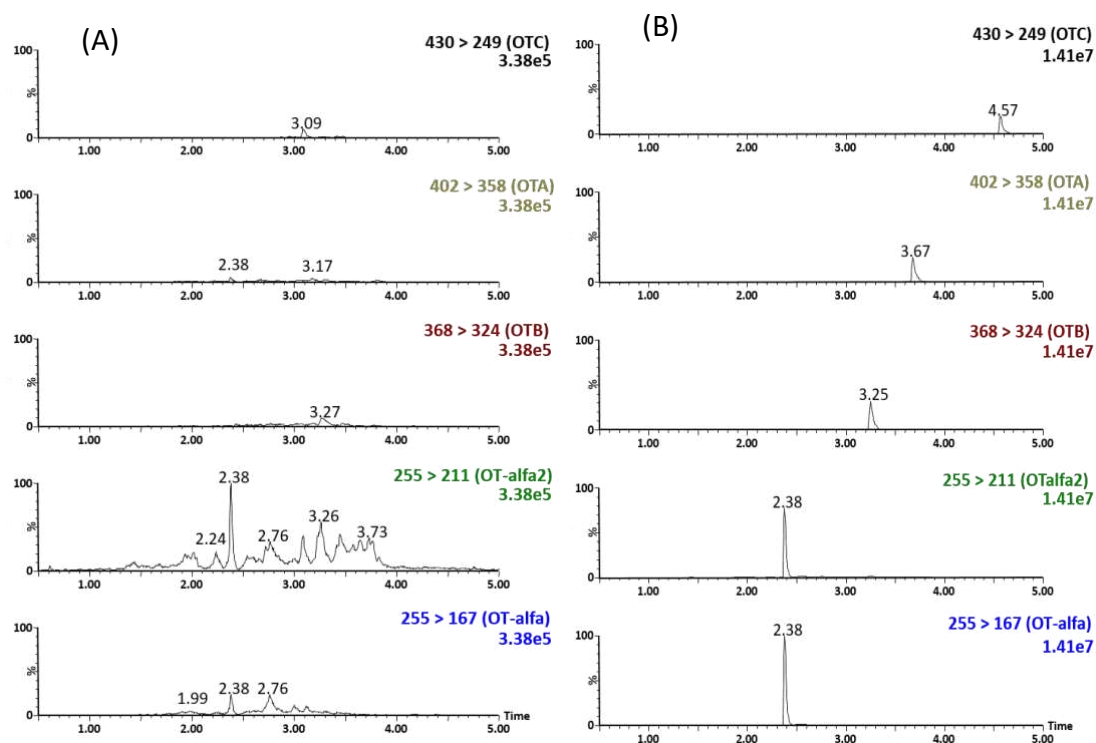


Obr. 15: Výtěžnost analýzy při různých kombinacích promývacích roztoků sepsaných v tabulce při použití obohacené moči na 2 ng/ml, na 3% FA aplikované na 6 vrstev C18 sorbentu

Číslo v grafu	Promývací krok 1	Promývací krok 2
1	0,1% FA	0,1% FA
2	voda	voda
3	5% MeOH	5%MeOH
4	10% MeOH	10% MeOH
5	5% MeOH + 0,1% FA	5% MeOH + 0,1% FA
6	0,1% FA	voda
7	5% MeOH	voda
8	voda	10% MeOH + 0,1% FA

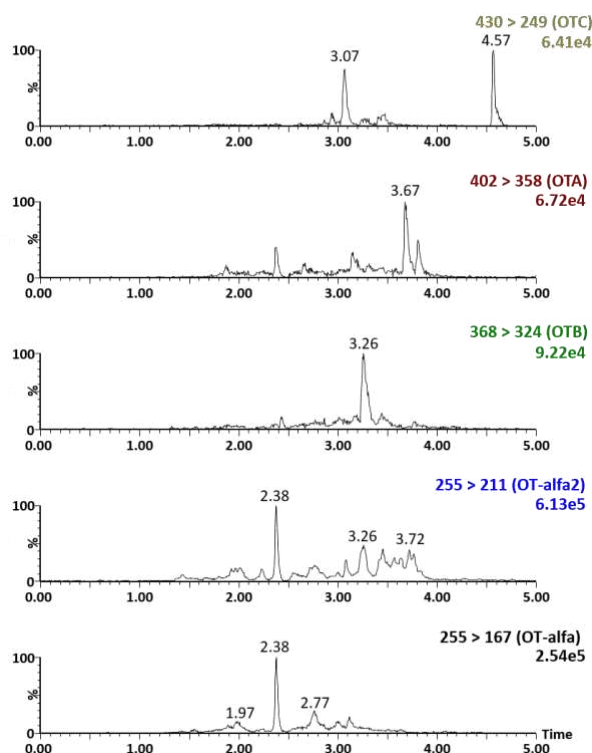
Obr. 16 zobrazuje chromatogramy přečištěné moči a moči obohacené na 10 ng/ml. V tomto porovnání je zobrazen i druhý přechod pro ochratoxin alfa (255>211), u kterého nejsou výsledky uváděny z důvodu vyšších matricových efektů. Přečištění moči je v případě

všech analytů kormě OT α v pořádku. U OT α by mohl vzniknou u obohacení na nižší koncentrace problém, jelikož je stále v moči přítomna interferující látka.



Obr. 16: Porovnání čisté moči po úpravě SPE (A) a moči obohacené na koncentraci 10 ng/ml upravené stejnou metodou (B)

Z chromatogramů Obr. 17 je zřejmé, že detekce všech analytů je možná již při koncentraci ochratoxinů v moči 0,1 ng/ml.



Obr. 17: Chromatogramy přechodů jednotlivých ochratoxinů při obohacení moči na koncentrační hladinu 0,1 ng/ml kdy retenční časy analytů jsou uvedeny v tabulce

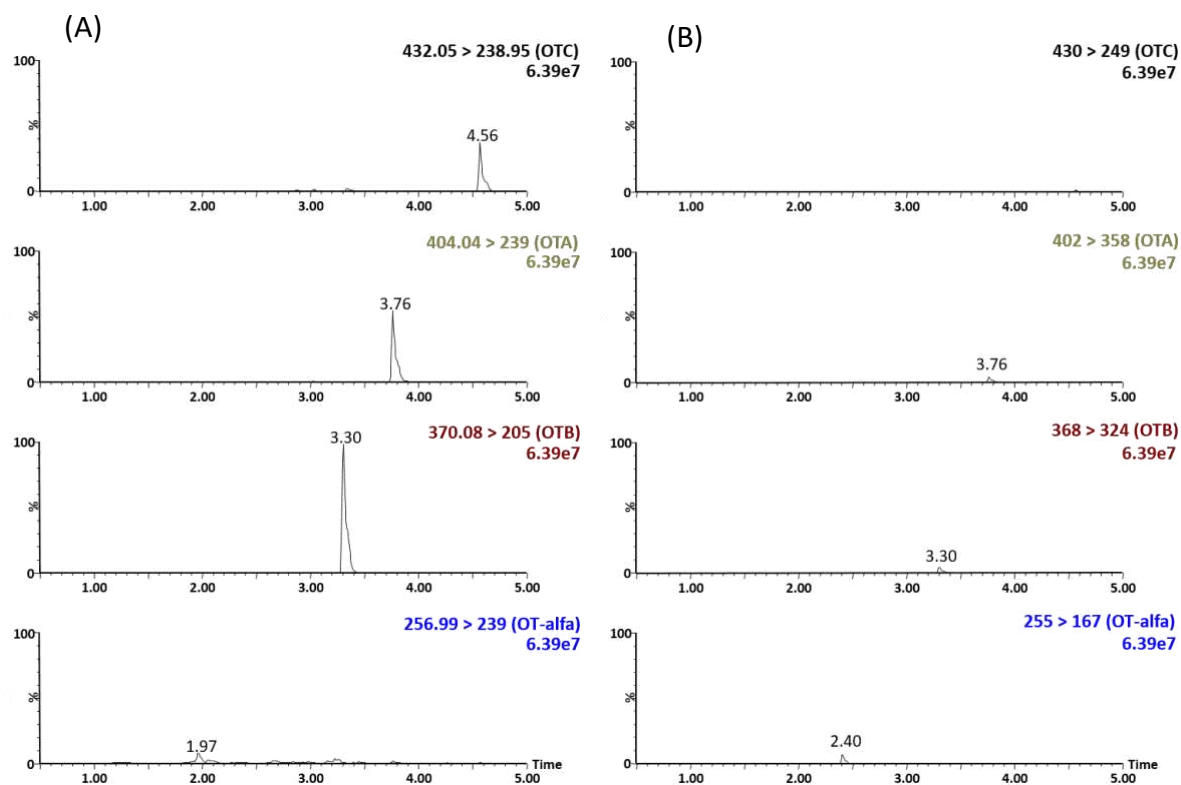
	OTA (min)	OTB (min)	OT α (min)	OTC (min)
Retenční čas	3,67	3,26	2,38	4,57

5.4. Porovnání módu ionizace

Z důvodu nižší odezvy u OTC byly pro ověření standardy měřeny nejen v negativním módu, který byl vybrán v diplomové práci Kristiána Kretka, ale i pozitivním módu a stanoveny limity LOD a LOQ. Vzhledem k vyšším matricovým efektům a horším LOD a LOQ při testování standardů, nebyla již detekce pomocí ESI⁺ využita. Tabulku srovnání jednotlivých LOD a LOQ při dávkování standardů je uvedeno v Tab. 8. Porovnání chromatogramů všech přechodů je uvedeno na Obr. 18. Z obrázků je zřejmé, že intenzita odezvy je u všech analytů vyšší u ESI⁺. U ESI⁻ došlo k lepšímu rozlišení píků a kvantifikaci na nižších koncentračních hladinách, proto byl i přes rozpor s dosud vybranými publikacemi vybrán jako vhodnější. Další výhodou u ESI⁻ bylo také menší chvostování píku u všech vybraných analytů.

Tab. 8: Srovnání LOD a LOQ jednotlivých ochratoxinů u standardů za použití ionizační techniky ESI

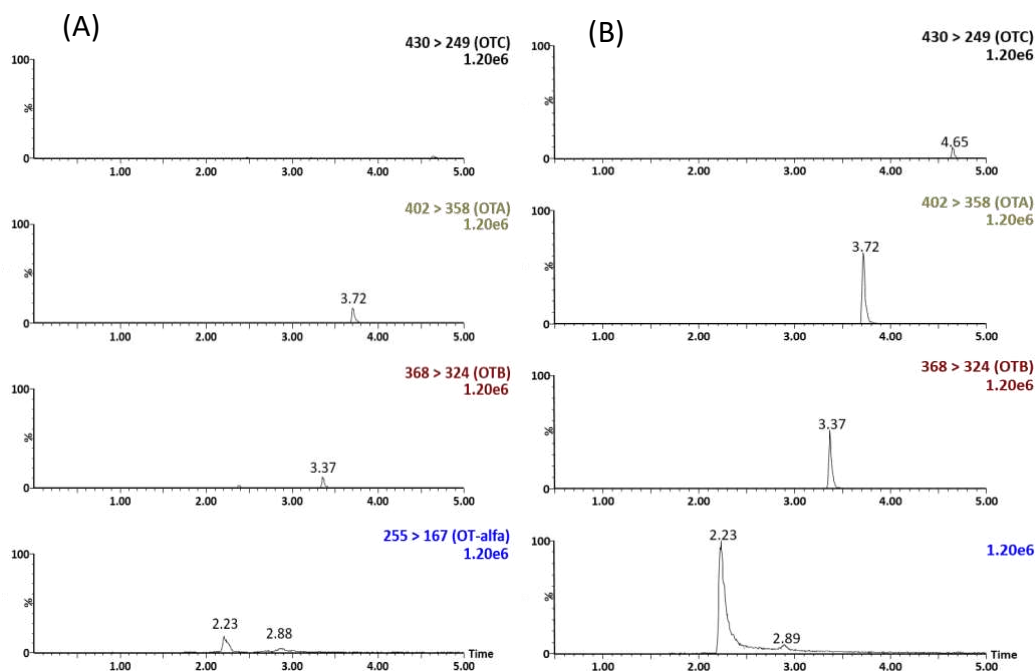
	LOD (pg/ml)		LOQ (pg/ml)	
	ESI ⁺	ESI ⁻	ESI ⁺	ESI ⁻
OTA	20	20	100	50
OTB	10	20	50	50
OT-alfa	200	100	1000	500
OTC	500	200	2000	500



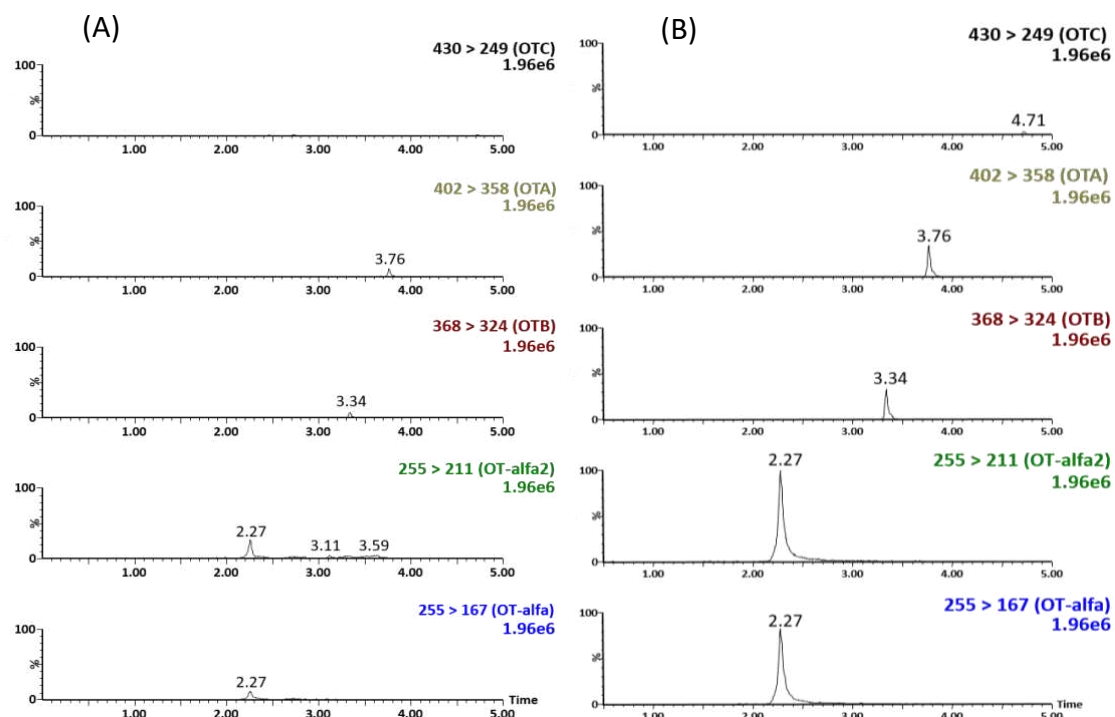
Obr. 18: Porovnání přechodů všech ochratoxinů při úpravě matrice metodou SPE obohacené na 10 ng/ml, ESI⁺ (A) a ESI⁻ (B)

5.5. Vliv stacionární fáze

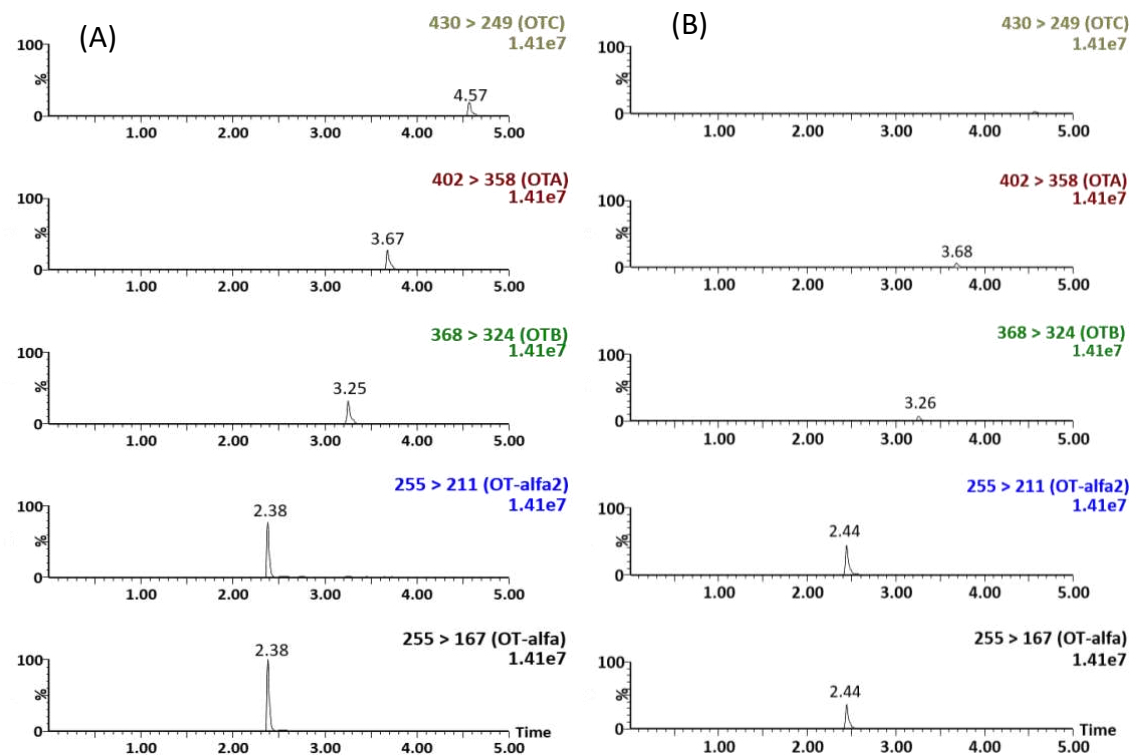
V důsledku interference, kterým se nebylo i přes optimalizaci metody pro úpravu vzorku vyhnout, bylo provedeno i testování různých chromatografických kolon. Kolony Atlantis Premier BEH C18, ACQUITY UPLC HSS T3, ACQUITY UPC CSH PFP a ACQUITY UPLC BEH PHE nebyly pro analýzu vhodné. U kolony Atlantis Premier BEH C18 a ACQUITY UPC CSH PFP nebyly i přes opakované analýzy detekovány žádné píky. U kolony UPLC HSS T3 došlo k výraznému chvostování píků. ACQUITY UPLC BEH PHE by byla vhodnou kolonou při detekci ochratoxinů v čisté vodě. Při analýze biologického materiálu bylo přítomno v moči stále vysoké množství balastních látek a byla zhoršena jak identifikace, tak kvantifikace stanovovaných látek. Vhodnou se jevila být kolona ACE Excel C18-PFP a ACE Excel C18-AR, kdy se podařilo rozlišit OT- α od jiné látky nacházející se blízko retenčního času analytu. Problém však byl u ostatních zkoumaných analytů, kdy došlo k chvostování píků (Obr. 19, Obr. 20). V obou případech došlo potlačení signálu u moči i přes přítomnost zakoncentrovací fáze. Po testování kolony BEH-C18 o délce 100 mm, na rozdíl od prvních měření, kdy byla délka pouze 50mm, byly kolona vyhodnocena jako nejlepší pro validaci této metody (Obr. 21). Pouze u této kolony došlo díky zakoncentrovací fázi při úpravě moči ke zesílení signálů analytů.



Obr. 19: Porovnání pozadí matrice (A) a standardu obohacené na koncentrační hladinu 10 ng/ml (B) na koloně ACE C18-PFP



Obr. 20: Porovnání pozadí matrice obohacené na koncentrační hladinu 10 ng/ml (A) a standardu o stejné koncentraci (B) na koloně ACE C18-AR



Obr. 21: Porovnání pozadí matrice obohacené na koncentrační hladině 10 ng/ml (A) a standardu o stejné koncentraci (B) na koloně BEH-C18

5.6. Zhodnocení metod přípravy vzorku

Metoda DAS a SALLE se může jevit jako vhodné metody, avšak kvůli chybějící zakoncentrovací fázi, není možné detekovat nižší koncentrace. Z tohoto důvodu bylo od další optimalizace obou metod ustoupeno.

Na základě získaných výsledků by metoda SLE nemohla být při obohacení na 1 ng/ml z důvodu nereprodukovatelnosti použita (Obr. 8). Další nevýhodou této metody je přítomnost balastních látek u OT α i po očištění moči touto metodou.

S ohledem na všechny tyto výsledky byla jako metoda pro validaci vybrána metoda μ -SPE-PT. Interference dalších látek v blízkosti retenčního času stanovovaných analytů je u této metody ve srovnání s ostatními metodami nižší, a díky zakoncentrování analytů je docíleno detekce nižších koncentrací stanovovaných analytů.

Při porovnání námi získaných výsledků a publikací již vydaných lze říct, že data se příliš neshodují. Hlavní rozdíl je již v nastavení parametrů hmotnostního spektrometru. Zatímco dříve publikované práce uvádějí využití ESI⁺, v našem případě bylo využívána detekce pomocí ESI⁻. Při srovnání možných limitů kvantifikace s dosud publikovanými pracemi došlo v našem případě ke zhoršení, kdy nebylo možné se dostat na tak nízké koncentrační hladiny i při použití stejné metody z publikace. Oproti zatím publikovaným pracem však byla poprvé vyvinuta možná metoda pro stanovení OTC. Celkově tedy byla vytvořena metoda na komplexní analýzu několika ochratoxinů zároveň.

5.7. Validace metody

V rámci validace metody byla nejdříve změřena matricová kalibrační křivka na vzorku směsné moči. Měření bylo provedeno v ESI⁻. Pro jednotlivé analyty byl stanoven rozsah. Limit kvantifikace je spolu s rovnicí matricové kalibrační křivky a linearitou uveden v Tab. 9. ULOQ byl s ohledem na zachování linearitu rovnice matricové kalibrační křivky stanoven pro všechny látky stejně, tedy 20 ng/ml.

Tab. 9: Rovnice matricových kalibračních křivek, linearita a LLOQ jednotlivých ochratoxinů

	Rovnice matricové kalibrační křivky	Linearita (R^2)	LLOQ (ng/ml)
OTA	16923,7x-7,3338	0,998658	0,01
OTB	15457,9x+1015,37	0,999124	0,02
OT α	20019x+1548,34	0,99597	0,05
OTC	6670,93x-48,9581	0,996726	0,02

Správnost a přesnost byla hodnocena na 4 koncentračních hladinách. Přesnost metody byla vyhodnocena pomocí % RSD a správnost pomocí výtěžnosti v %. Výtěžnost se pohybovala v rozmezí od 68 do 122 % pro všechny analyty. RSD metody u všech analytů byla menší než 20 % (Tab. 10). V rámci validačních parametrů podle EMA splní hranici ± 15 % pro správnost metody uvedenou v procentech všechny analyty, kromě OT α . Přesnost metody byla splněna pro všechny koncentrační hladiny a stanovované analyty.

Tab. 10: Správnost a přesnost metody pro stanovované analyty na 4 koncentračních hladinách

	koncentrace (ng/ml)	OTA	OTB	OT α	OTC
Správnost metody (%)	0,1	98,9	108,2	75,5	121,5
	0,2	104,3	108,0	81,5	120,1
	5	99,8	89,2	67,7	88,3
	20	105,0	96,4	72	99,1
Přesnost metody (%)	0,1	6,5	10,0	17,4	11,1
	0,2	5,2	5,5	11,5	6,6
	5	10,8	13,3	13,7	13,5
	20	5,2	5,7	12,6	6,3

červeně označená čísla – nesplňují podmínky validace

Pro hodnocení matricových efektů byla využita metoda post extrakčního přidavku. Moč byla upravena metodou μ -SPE-PT a následně obohacena na koncentrace 5 ng/ml a 20 ng/ml. Moč byla připravena ve 4 replikátech a plochy píků byly porovnány s odezvami

standardních roztoků, kdy hodnoty musí být $\pm 15\%$ (Tab. 11). Matricové efekty byly splněny pouze pro OTA na obou koncentračních hladinách a u OTB pouze na koncentraci 5 ng/ml. Pro OT α a OTC bude třeba dále optimalizovat metodu, ať už v kroku přípravy vzorku, tak nastavení parametrů UHPLC-MS/MS. Z důvodu nevyhovujících výsledků pro validaci u některých ochratoxinů bylo měření po přípravě nových matricových vzorků opakováno (Tab. 12). Jak je vidět z opakované přípravy, je právě tento krok jedním z nejdůležitějších z důvodu zanesení chyby. OTA měla při obou výsledcích podobné hodnoty. OTB by při opakovaném měření splnil validační parametry i na koncentrační hladině 20 ng/ml. Při opakovaném měření byly výsledky pro OT α a OTC více v souladu s parametry validace, avšak stále ne všechny k validaci vhodné. U OT α došlo ke zvýšení matricových efektů z 50% na 70%. U byly při opakovaném měření matricové efekty okolo 400 %, kdežto při prvním měření byly na nižší koncentrační hladině lehce pod 2000 % a na vyšší 460 %.

Tab. 11: Hodnocení matricových efektů na 2 koncentračních hladinách

	Koncentrace (ng/ml)	OTA	OTB	OT α	OTC
Matricové efekty (%)	5	101,7	84,6	55,3	1929,5
	20	88,2	75,9	51,6	466,6

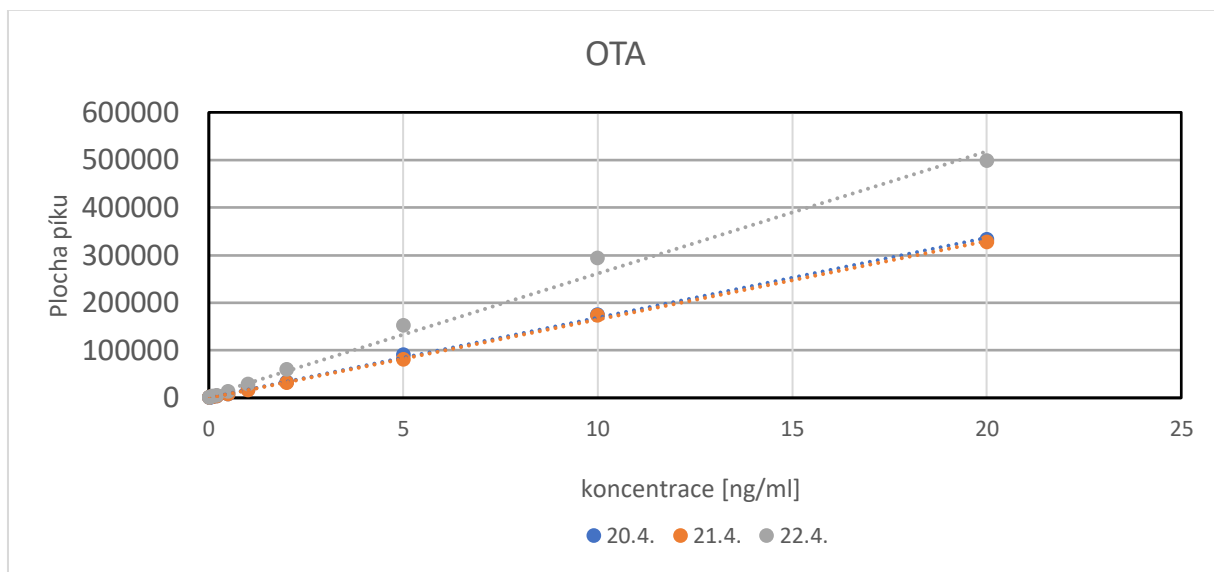
červeně označená čísla – nesplňují podmínky validace

Tab. 12: Opakované hodnocení matricových efektů na 2 koncentračních hladinách.

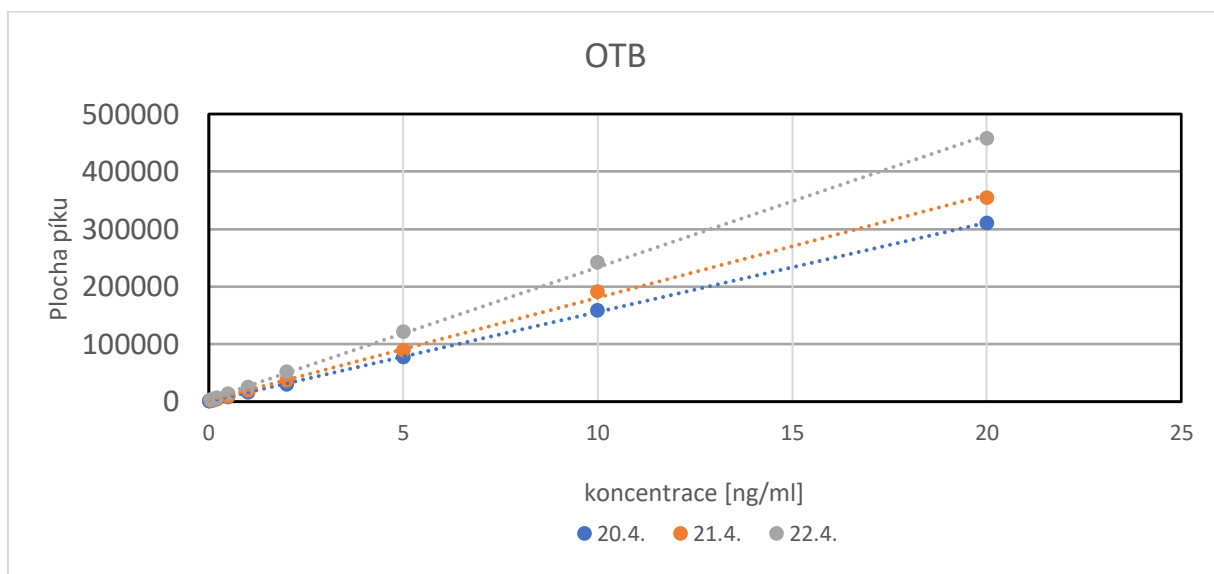
	Koncentrace (ng/ml)	OTA	OTB	OT α	OTC
Matricové efekty (%)	5	95,3	90,3	66,9	418,5
	20	96,9	92,3	71,8	356,5

červeně označená čísla – nesplňují podmínky validace

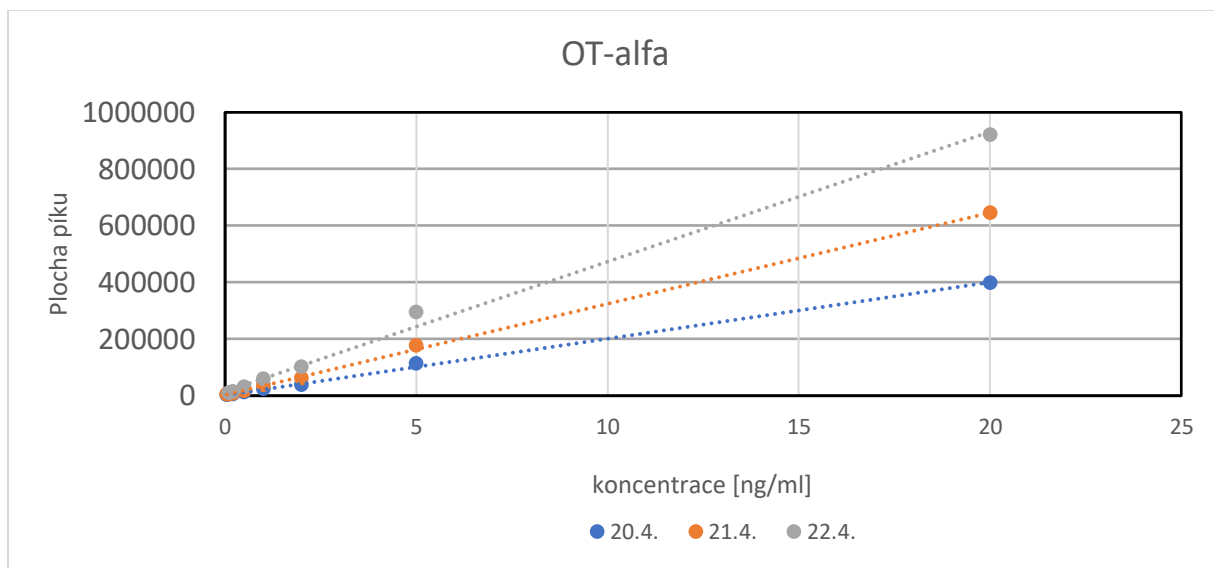
V rámci validace byla změřena také jednou připravená matricová kalibrační křivka v několika po sobě jdoucích dnech. Kalibrační přímky pro jednotlivé ochratoxiny byly zaneseny do grafu a zobrazeny na následujících obrázcích, Obr. 22, Obr. 23, Obr. 24, Obr. 25. Rovnice matricových kalibračních přímek v několika po sobě jdoucích jsou zaneseny v Tab. 13. Z předpisů kalibračních křivek lze vyčíst, že při měření vzorku po delší době dochází ke změnám v odezvách na detektoru, proto je vhodné připravené vzorky ihned změřit, aby nedocházelo k zanesení chyby z důvodu špatné stability vzorku.



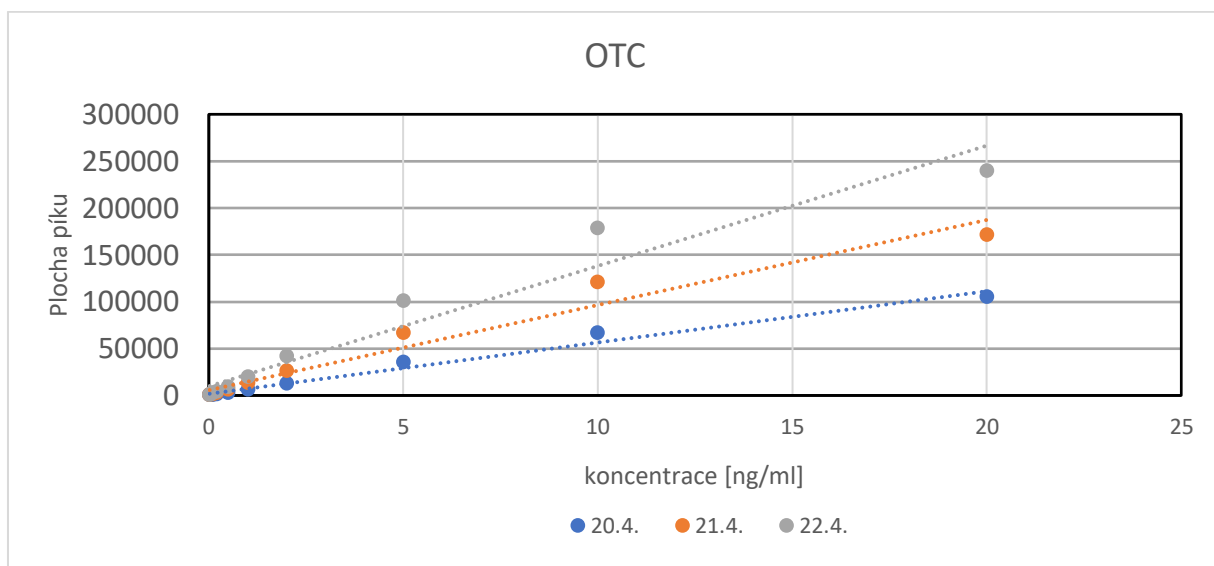
Obr. 22: Porovnání matricových kalibračních křivek OTA změřených ve třech po sobě jdoucích dnech



Obr. 23: Porovnání matricových kalibračních křivek OTB změřených ve třech po sobě jdoucích dnech



Obr. 24: Porovnání matricových kalibračních křivek OT-alfa změřených ve třech po sobě jdoucích dnech



Obr. 25: Porovnání matricových kalibračních křivek OTC změřených ve třech po sobě jdoucích dnech

Tab. 13: Srovnání rovnic matricové kalibrační křivky v několika po sobě jdoucích dnech

	20.4.	21.4.	22.4.
OTA	$16923,7x-7,3338$	$16438x-10,7181$	$27012,6x+50,8583$
OTB	$15457,9x+1015,37$	$17961,1x+1724,44$	$23328,8x+2452,71$
OT-alfa	$20019x+1548,34$	$32438,6x+1893,03$	$48319x+4550,17$
OTC	$6670,93-48,9581$	$12541,6x+165,775$	$18824,6x+191,064$

6. Závěr

Byla vyvinuta metoda UHPLC-MS/MS pro stanovení ochratoxinů A, B, C a α v moči. Pro úpravu vzorku byla validována metoda μ -SPE-PT s využitím UHPLC-MS/MS na koloně ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 μ m, 2,1 x 100 mm od firmy Waters.

Metody DAS a SALLE nebyly vhodné z důvodu chybějící zakoncentrovací fáze n, i když výtěžnost těchto metod je více než 80 %. Dalším problémem je i přítomnost mnoha balastních látek, které pomocí těchto metod nelze odstranit.

Metoda SLE je vhodná pro stanovení ochratoxinů, ale pouze při zastoupení ve větší koncentraci ve vzorku, nad 10 ng/ml. S ohledem na přítomnost vysokého množství balastních látek i po přečištění moči je námi vyvinutá metoda pro OT α nevhodná. V případě stanovení pouze OTA by byla metoda jistě vhodnou a při stanovení OTB vzhledem k nižší výtěžnosti spíše ne. Pro OTC nejsou dostupná data, z důvodu pozdějšího dodání čisté látky.

S ohledem na všechny tyto výsledky byla jako metoda pro validaci vybrána metoda μ -SPE-PT. Interference dalších látek v blízkosti retenčního času stanovovaných analytů je u této metody ve srovnání s ostatními metodami nižší, a díky 4násobnému zakoncentrování analytů je docíleno detekce nižších koncentrací stanovovaných analytů.

Při srovnání dosažených limitů kvantifikace došlo ke zhoršení. LLOQ pro OTA byl stanoven na koncentraci 0,01 ng/ml, pro OTB a OTC byl 0,02 ng/ml a pro OT α 0,05 ng/ml. ULOQ byl pro všechny analyty stanoven na 20 ng/ml. Tímto vyvinutým postupem úpravy vzorku nebylo možné se dostat na tak nízké koncentrační hladiny, jako v zatím třech publikovaných pracích z celkových dvanácti. Hodnoty vyjadřující správnost a přesnost metody byly splněny pro všechny analyty kromě OT α , kdy nebyla splněna správnost metody. U OTA a OTB byly hodnoty pro matricové efekty splněné. U OTA byly matricové efekty 95 % na obou koncentračních hladinách a u OTB 90 % na obou koncentračních hladinách. Pro další výzkum by bylo nutné se zaměřit na matricové efekty u OT α a OTC, jelikož v rámci této práce se je nepodařilo validovat, z důvodu přetrvávajících interferencí i při několikanásobné optimalizaci postupu extrakce. U OT α byly matricové efekty 70% a pro OTC okolo 400% pro obě koncentrační hladiny.

Celkově tedy byla vyvinuta metoda pro stanovení OTA a OTB v moči. Metodou přípravy vzorku byla validována metoda μ -SPE-PT, po které následovala analýza pomocí UHPLC-MS/MS. I když parametry jako správnost a přesnost měření byly pro OT α a OTC validovány, je potřeba se v dalším výzkumu zabývat metodou přípravy vzorku a nastavení podmínek UHPLC-MS/MS pro splnění parametru matricových efektů. Možnou změnou při úpravě vzorku by mohla být kombinace typů sorbentů HLB a C18 při aplikaci do SPE špičky, či eluce nižším množstvím ACN pro zajištění zvýšení zakoncentrovací fáze.

7. Seznam použité literatury

- [1] L. Nováková, M. Douša, a P. Česla, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*, 2. vydání. Brno: Česká chromatografická škola, 2021.
- [2] P. Klouda, *Moderní analytické metody : učebnice základů instrumentálních analytických metod*, 1. Ostrava, 2016.
- [3] J. H. Gross, *Mass Spectrometry*. Cham: Springer International Publishing, 2017. doi: 10.1007/978-3-319-54398-7.
- [4] E. de Hoffmann a V. Stroobant, „Mass Spectrometry Principles and Applications“.
- [5] Matematicko-fyzikální fakulta Univerzity Karlovy, „Hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů“, Viděno: 12. květen 2023. [Online]. Dostupné z: https://www.google.com/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=0CAIQw7AJahcKEwjYqr7FkPD-AhUAAAAAHQAAAAQAw&url=https%3A%2F%2Fphysics.mff.cuni.cz%2Fkfpp%2Fskrip%2Fevf075%2Fsims_p8.doc&psig=AOvVaw1j58s0oelZOkv6kpFiAbGM&ust=1683992896480286
- [6] R. E. Ardrey, *Liquid chromatography-mass spectrometry : an introduction*. J. Wiley, 2003.
- [7] Klapková E, Uřinová R, a Průša R, „Vliv matricových efektů při vývoji a validaci metod pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií“, 2011.
- [8] H. Kataoka, „Column-Switching Sample Preparation“, in *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, J. Pawliszyn, Ed., Oxford: Academic Press, 2012, s. 649–676. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00058-2>.
- [9] V. Viette, M. Fathi, S. Rudaz, D. Hochstrasser, a J.-L. Veuthey, „Current role of liquid chromatography coupled to mass spectrometry in clinical toxicology screening methods“, roč. 49, č. 7, s. 1091–1103, 2011, doi: doi:10.1515/CCLM.2011.182.
- [10] B. Greer, O. Chevallier, B. Quinn, L. M. Botana, a C. T. Elliott, „Redefining dilute and shoot: The evolution of the technique and its application in the analysis of foods and biological matrices by liquid chromatography mass spectrometry“, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, roč. 141, s. 116284, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116284>.

- [11] T. Horák *et al.*, „Využití SPE a SPME při analýze piva“, 2006.
- [12] A. Vaghela, A. Patel, A. Patel, A. Vyas, a N. Patel, „Sample Preparation In Bioanalysis: A Review“, *INTERNATIONAL JOURNAL OF SCIENTIFIC & TECHNOLOGY RESEARCH*, roč. 5, s. 5, 2016, [Online]. Dostupné z: www.ijstr.org
- [13] Y. Saito, „John R. Dean: Extraction techniques in analytical sciences“, *Anal Bioanal Chem*, roč. 398, č. 5, s. 1851–1852, 2010, doi: 10.1007/s00216-010-4119-4.
- [14] R. Majors, „Supported Liquid Extraction: The Best-Kept Secret in Sample Preparation“, *LC GC Eur*, roč. 25, s. 430–435, srp. 2012.
- [15] „ISOLUTE[®] SLE+ User Guide Supported Liquid Extraction ISOLUTE[®] SLE+ User Guide ISOLUTE[®] SLE+ User Guide“, 2016.
- [16] Y. Q. Tang a N. Weng, „Salting-out assisted liquid–liquid extraction for bioanalysis“, *Bioanalysis*, roč. 5, č. 12, s. 1583–1598, čer. 2013, doi: 10.4155/bio.13.117.
- [17] A. A. Alshishani, B. Saad, N. F. Semail, S. M. Salhimi, a M. K. M. Talib, „Salting-out assisted liquid-liquid extraction method coupled to gas chromatography for the simultaneous determination of thujones and pulegone in beverages“, *Int J Food Prop*, roč. 20, č. sup3, s. S2776–S2785, 2017, doi: 10.1080/10942912.2017.1373665.
- [18] J. W. Bennett a M. Klich, „Mycotoxins“, *Clinical Microbiology Reviews*, roč. 16, č. 3, s. 497–516, 1. červenec 2003. doi: 10.1128/CMR.16.3.497-516.2003.
- [19] F. Malíř, V. Ostrý, a kolektiv autorů, *Vláknité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka*. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2003.
- [20] L. Reddy a K. Bhoola, „Ochratoxins-food contaminants: Impact on human health“, *Toxins*, roč. 2, č. 4, s. 771–779, duben 2010. doi: 10.3390/toxins2040771.
- [21] T. R. Bui-Klimke a F. Wu, „Ochratoxin A and Human Health Risk: A Review of the Evidence“, *Crit Rev Food Sci Nutr*, roč. 55, č. 13, s. 1860–1869, lis. 2015, doi: 10.1080/10408398.2012.724480.
- [22] P. B. Tompsett a H. W. Pritchard, „The effect of chilling and moisture status on the germination, desiccation tolerance and longevity of *Aesculus hippocastanum* L. seed“, *Ann Bot*, roč. 82, č. 2, s. 249–261, 1998, doi: 10.1006/anbo.1998.0676.
- [23] PerkinElmer, „ChemDraw “. 2023. Viděno: 30. březen 2023. [Online]. Dostupné z: <https://chemdrawdirect.perkinelmer.cloud/js/sample/index.html>

- [24] Q. Wu *et al.*, „Metabolic Pathways of Ochratoxin A", *Curr Drug Metab*, roč. 12, s. 1–10, led. 2011, doi: 10.2174/138920011794520026.
- [25] A. H. Heussner a L. E. H. Bingle, „Comparative Ochratoxin Toxicity: A Review of the Available Data", *Toxins (Basel)*, roč. 7, č. 10, s. 4253–4282, 2015, doi: 10.3390/toxins7104253.
- [26] G. Müller *et al.*, „Ochratoxin A and some of its derivatives modulate radical formation of porcine blood monocytes and granulocytes", *Toxicology*, roč. 199, č. 2, s. 251–259, 2004, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.01.040>.
- [27] H. Xiao *et al.*, „Toxicity of Ochratoxin A, Its Opened Lactone Form and Several of Its Analogs: Structure–Activity Relationships", *Toxicol Appl Pharmacol*, roč. 137, č. 2, s. 182–192, 1996, doi: <https://doi.org/10.1006/taap.1996.0071>.
- [28] I. Klopčič a M. S. Dolenc, „Chemicals and Drugs Forming Reactive Quinone and Quinone Imine Metabolites", *Chemical Research in Toxicology*, roč. 32, č. 1. American Chemical Society, s. 1–34, 22. leden 2019. doi: 10.1021/acs.chemrestox.8b00213.
- [29] H. S. Shin, H. J. Lee, M. C. Pyo, D. Ryu, a K.-W. Lee, „Ochratoxin a-induced hepatotoxicity through phase i and phase ii reactions regulated by ahr in liver cells", *Toxins (Basel)*, roč. 11, č. 7, 2019, doi: 10.3390/toxins11070377.
- [30] Národní centrum pro biotechnologické informace, „Ochratoxin B", *PubChem Compound Summary pro CID 20966*, 2022. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ochratoxin-B> (viděno 26. listopad 2022).
- [31] Národní centrum pro biotechnologické informace, „Alfa-ochratoxin", *PubChem Compound Summary pro CID 107911*, 2022. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/alpha-Ochratoxin> (viděno 26. listopad 2022).
- [32] A. Finizio, M. Vighi, a D. Sandroni, „Determination of n-octanol/water partition coefficient (Kow) of pesticide critical review and comparison of methods", *Chemosphere*, roč. 34, č. 1, s. 131–161, 1997, doi: [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(96\)00355-4](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(96)00355-4).

- [33] N. Ali, K. Muñoz, a G. H. Degen, „Ochratoxin A and its metabolites in urines of German adults—An assessment of variables in biomarker analysis", *Toxicol Lett*, roč. 275, s. 19–26, čer. 2017, doi: 10.1016/j.toxlet.2017.04.013.
- [34] K. Muñoz, M. Blaszkewicz, a G. H. Degen, „Simultaneous analysis of ochratoxin A and its major metabolite ochratoxin alpha in plasma and urine for an advanced biomonitoring of the mycotoxin", *Journal of Chromatography B*, roč. 878, č. 27, s. 2623–2629, 2010, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.11.044>.
- [35] W.-C. Liu *et al.*, „Ochratoxin A as an alarming health threat for livestock and human: A review on molecular interactions, mechanism of toxicity, detection, detoxification, and dietary prophylaxis", *Toxicon*, roč. 213, s. 59–75, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.04.012>.
- [36] A. M. P. Dinis, C. M. Lino, a A. S. Pena, „Ochratoxin A in nephropathic patients from two cities of central zone in Portugal", *J Pharm Biomed Anal*, roč. 44, č. 2, s. 553–557, 2007, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.12.001>.
- [37] E. M. Öncü Kaya, O. T. Korkmaz, D. Yeniceli Uğur, E. Şener, A. N. Tunçel, a M. Tunçel, „Determination of Ochratoxin-A in the brain microdialysates and plasma of awake, freely moving rats using ultra high performance liquid chromatography fluorescence detection method", *Journal of Chromatography B*, roč. 1125, s. 121700, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.06.027>.
- [38] R. Mehta, S. A. Shetty, M. F. Young, P. B. Ryan, a K. Rangiah, „Quantification of aflatoxin and ochratoxin contamination in animal milk using UHPLC-MS/SRM method: a small-scale study", *J Food Sci Technol*, roč. 58, č. 9, s. 3453–3464, zář. 2021, doi: 10.1007/s13197-021-04986-w.
- [39] H. Boudra a D. P. Morgavi, „Development and validation of a HPLC method for the quantitation of ochratoxins in plasma and raw milk", *Journal of Chromatography B*, roč. 843, č. 2, s. 295–301, 2006, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.06.018>.
- [40] B. Osteresch, S. Viegas, B. Cramer, a H.-U. Humpf, „Multi-mycotoxin analysis using dried blood spots and dried serum spots", *Anal Bioanal Chem*, roč. 409, č. 13, s. 3369–3382, 2017, doi: 10.1007/s00216-017-0279-9.

- [41] J. Schmidt *et al.*, „Determination of Urinary Mycotoxin Biomarkers Using a Sensitive Online Solid Phase Extraction-UHPLC-MS/MS Method", *Toxins (Basel)*, roč. 13, č. 6, 2021, doi: 10.3390/toxins13060418.
- [42] B. Šarkanj *et al.*, „Ultra-sensitive, stable isotope assisted quantification of multiple urinary mycotoxin exposure biomarkers", *Anal Chim Acta*, roč. 1019, s. 84–92, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.02.036>.
- [43] F. Malir *et al.*, „Investigation of ochratoxin A biomarkers in biological materials obtained from patients suffering from renal cell carcinoma", *Food and Chemical Toxicology*, roč. 158, s. 112669, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112669>.
- [44] Y. Sultan, N. Magan, a A. Medina, „Comparison of five different C18 HPLC analytical columns for the analysis of ochratoxin A in different matrices", *Journal of Chromatography B*, roč. 971, s. 89–93, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.09.016>.
- [45] A.-M. Domijan, M. Peraica, M. Miletić-Medved, A. Lucić, a R. Fuchs, „Two different clean-up procedures for liquid chromatographic determination of ochratoxin A in urine", *Journal of Chromatography B*, roč. 798, č. 2, s. 317–321, 2003, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.10.003>.
- [46] C. Martins *et al.*, „Exposure assessment of Portuguese population to multiple mycotoxins: The human biomonitoring approach", *Int J Hyg Environ Health*, roč. 222, č. 6, s. 913–925, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.06.010>.
- [47] B. Osteresch, S. Viegas, B. Cramer, a H.-U. Humpf, „Multi-mycotoxin analysis using dried blood spots and dried serum spots", *Anal Bioanal Chem*, roč. 409, č. 13, s. 3369–3382, 2017, doi: 10.1007/s00216-017-0279-9.
- [48] S. Song, E. N. Ediage, A. Wu, a S. De Saeger, „Development and application of salting-out assisted liquid/liquid extraction for multi-mycotoxin biomarkers analysis in pig urine with high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry", *J Chromatogr A*, roč. 1292, s. 111–120, 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.10.071>.
- [49] „Committee for Medicinal Products for Human Use ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis Step5", 2022. [Online]. Dostupné z: www.ema.europa.eu/contact

- [50] A. Krejčová, *Zabepečení jakosti výsledků analýz v chemické laboratoři*. Pardubice: Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, 2010.
- [51] R. Dams, M. A. Huestis, W. E. Lambert, a C. M. Murphy, „Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid“, *J Am Soc Mass Spectrom*, roč. 14, č. 11, s. 1290–1294, 2003, doi: [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(03\)00574-9](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(03)00574-9).
- [52] H. Brozmanová, „Laboratorní metody v terapeutickém monitorování léků“, *KLINICKÁ FARMAKOLOGIE A FARMACIE*, roč. 34, č. 2, s. 62, 2020.
- [53] SEKK s.r.o., „Metrologická terminologie ve zdravotnické a analytické laboratoři“, 2023. <http://www.sekk.cz/terminologie/index.php> (viděno 19. únor 2023).
- [54] K. Kretek, „Vývoj UHPLC-MS/MS a UHPSFC-MS/MS metod pro stanovení vybraných ochratoxinů“. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlova v Hradci Králové , Hradec Králové, 2022.

