

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie



Diplomová práce

Vývoj UHPLC-MS/MS a UHPSFC-MS/MS metod  
pro stanovení vybraných ochratoxinů

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

Hradec Králové, 2022

Kristián Kretek

## **ABSTRAKT**

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

**Katedra analytické chemie**

**Kandidát:** Kristián Kretek

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

**Název diplomové práce:** Vývoj UHPLC-MS/MS a UHPSFC-MS/MS metod pro stanovení vybraných ochratoxinů

Účel této práce spočíval ve vývoji a srovnání UHPLC a UHPSFC analytické metody ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií pro čtyři běžné ochratoxiny. Experimenty byly provedeny na UHPLC systému ACQUITY UPLC a UHPSFC systému ACQUITY UPC<sup>2</sup>, hmotnostní spektrometr XEVO TQ-XS byl totožný.

Na počátku byla provedena optimalizace parametrů iontového zdroje a SRM přechodů. Pro UHPLC byly testovány ve směsi s ACN 3 vodné složky mobilní fáze – kyselina mravenčí, octová a amoniak, při průtoku 0,4 ml/min, gradientové eluci od 2 % do 95 % ACN v 5. minutě, teplotě 40 °C a koloně Acquity UPLC BEH C18. Pro UHPSFC bylo testováno ve směsi s CO<sub>2</sub> celkem 6 organických modifikátorů: MeOH a MeOH s vodou, kyselinou mravenčí, amoniakem a mravenčanem amonným, při průtoku 1,5 ml/min, gradientové eluci od 2 % do 45 % MeOH v 5. minutě, teplotě 40 °C a tlaku 2000 psi. Dále byl proveden screening 13 kolon. Optimalizace hmotnostní detekce byla provedena v SFC testováním 8 přídavných kapalin: MeOH, EtOH a MeOH s přídavkem vody, kyseliny mravenčí, amoniaku a mravenčanu a octanu amonného. Finální podmínky pro UHPLC byly: kolona Acquity UPLC BEH C18 a mobilní fáze v obou módech: ACN + H<sub>2</sub>O + 0,01 % kyselina octová. Finální podmínky pro UHPSFC byly: kolona Acquity UPLC BEH Amide, mobilní fáze CO<sub>2</sub> + MeOH + 10 mM mravenčan amonný + 2 % H<sub>2</sub>O a přídavná kapalina MeOH + 5 % H<sub>2</sub>O v pozitivním módu a CO<sub>2</sub> + MeOH + 10 mM mravenčan amonný a MeOH v negativním módu. Výsledná UHPSFC-MS/MS metoda poskytla výrazně užší kalibrační rozsah a vyšší dolní limit kvantifikace oproti UHPLC-MS/MS.

**Klíčová slova:** ochratoxiny, UHPLC-MS/MS, UHPSFC-MS/MS, vývoj metody, optimalizace

**Poděkování:** Tato práce vznikla za podpory projektu EFSA-CDN, Reg. No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000841.

## **ABSTRACT**

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

**Department of Analytical Chemistry**

**Candidate:** Kristián Kretek

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

**Title of the diploma thesis:** Development of UHPLC-MS/MS and UHPSFC-MS/MS methods for determination of selected ochratoxins

The purpose of this work was development and comparison of UHPLC and UHPSFC analytical methods coupled to tandem mass spectrometry for four common ochratoxins. The experiments were performed using UHPLC system ACQUITY UPLC and UHPSFC system ACQUITY UPC<sup>2</sup>, mass spectrometer XEVO TQ-XS was the same in both cases.

First, optimization of ion source parameters and SRM transitions was done. For UHPLC along with ACN, 3 additives of the water-based component of mobile phase were tested – formic, acetic acid and ammonia, with flow rate 0,4 ml/min, gradient from 2 % to 95 % ACN in 5th minute, temperature 40°C and column Acquity UPLC BEH C18. For UHPSFC 6 organic modifiers along with CO<sub>2</sub> were tested: MeOH and MeOH with addition of water, formic acid, ammonia, and ammonium formate, with flowrate 1,5 ml/min, gradient from 2 % to 45 % MeOH in 5th minute, temperature 40°C and BPR pressure 2000 psi. Screening of 13 columns was also conducted. Optimization of MS detection in SFC was done by testing 8 make-up solvents: MeOH, EtOH, MeOH with addition of water, formic acid, ammonia and ammonium formate and acetate. The final UHPLC conditions were: column Acquity UPLC BEH C18 and mobile phase in both modes: ACN + H<sub>2</sub>O + 0,01 % acetic acid. The final UHPSFC conditions were: column Acquity UPLC BEH Amide, mobile phase CO<sub>2</sub> + MeOH + 10 mM ammonium formate + 2 % H<sub>2</sub>O and make-up solvent MeOH + 5 % H<sub>2</sub>O in positive mode and CO<sub>2</sub> + MeOH + 10 mM ammonium formate and MeOH in negative mode. The final UHPSFC-MS/MS method achieved far narrower calibration range and higher lower limit of quantification compared to UHPLC-MS/MS.

**Keywords:** ochratoxins, UHPLC-MS/MS, UHPSFC-MS/MS, method development, optimization

**Acknowledgement:** This work was supported by the EFSA-CDN project, Reg. No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000841.

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

V Hradci Králové, dne 29.08. 2022

Kristián Kretek

**Poděkování:** Rád bych poděkoval především prof. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za její laskavé vedení, odborné rady a obětovaný čas při vypracování této diplomové práce. Děkuji také zaměstnancům Katedry analytické chemie za pomoc, kterou mi poskytli při praktickém provedení experimentů a rodině za podporu během celého studia.

## OBSAH

<b>ABSTRAKT</b> .....	2
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>Seznam zkratk</b> .....	9
<b>1. Úvod</b> .....	12
<b>2. Cíl a popis zadání práce</b> .....	13
<b>3. Teoretická část</b> .....	14
<b>3.1 Moderní HPLC</b> .....	14
<b>3.2 Superkritická fluidní chromatografie</b> .....	15
3.2.1 Specifika mobilní fáze v SFC.....	15
3.2.2 Rozdíly v SFC instrumentaci oproti HPLC.....	16
<b>3.3 Hmotnostní spektrometrie</b> .....	20
3.3.1 Spojení LC-MS.....	21
3.3.2 Spojení SFC–MS.....	22
<b>3.4 Ochratoxiny</b> .....	23
3.4.1 Úvod.....	23
3.4.2 Biosyntéza ochratoxinů.....	26
3.4.3 Toxikokinetika a toxikodynamika ochratoxinů.....	27
3.4.4 Analytické metody pro stanovení ochratoxinů.....	29
<b>4. Experimentální část</b> .....	33
<b>4.1 Přístrojové vybavení</b> .....	33
<b>4.2 Analytické kolony</b> .....	33
<b>4.3 Chemikálie</b> .....	34
<b>4.4 Standardy ochratoxinů</b> .....	34
<b>4.5 Pracovní postup pro UHPLC–MS</b> .....	34
4.5.1 Příprava roztoků standardů.....	34

4.5.2 Příprava pracovního roztoku standardů.....	34
4.5.3 Příprava mobilní fáze a oplachových kapalin.....	35
<b>4.6 Pracovní postup pro UHPSFC–MS .....</b>	<b>35</b>
4.6.1 Příprava roztoků standardů .....	35
4.6.2 Příprava pracovního roztoku standardů.....	36
4.6.3 Příprava mobilní fáze, přídavné kapaliny a oplachových kapalin .....	36
<b>4.7 Vývoj UHPLC – MS metody.....</b>	<b>38</b>
4.7.1 Výchozí UHPLC podmínky.....	38
4.7.2 Vývoj MS metody.....	39
4.7.3 Optimalizace složení mobilní fáze .....	39
4.7.4 Kalibrační závislost a opakovatelnost měření .....	39
<b>4.8 Vývoj SFC–MS metody.....</b>	<b>40</b>
4.8.1 Výchozí SFC podmínky .....	40
4.8.2 Screening stacionárních fází.....	41
4.8.3 Optimalizace parametrů iontového zdroje .....	41
4.8.4 Optimalizace složení přídavné kapaliny .....	42
4.8.5 Optimalizace složení organického modifikátoru .....	42
4.8.6 Kalibrační závislost .....	42
<b>5. Výsledky a diskuse .....</b>	<b>43</b>
<b>5.1 Vývoj UHPLC–MS metody.....</b>	<b>43</b>
5.1.1 MS sken.....	43
5.1.2 Optimalizace parametrů iontového zdroje.....	47
5.1.3 Sken produktových iontů a optimalizace kolizní energie .....	50
5.1.4 Výsledné SRM přechody.....	55
5.1.5 Optimalizace složení mobilní fáze .....	55
5.1.6 Kalibrační závislost a opakovatelnost UHPLC-MS/MS metody .....	58

<b>5.2 Vývoj UHPSFC–MS metody</b> .....	61
5.2.1 Screening stacionárních fází.....	61
5.2.2 Optimalizace parametrů iontového zdroje.....	67
5.2.3 Optimalizace složení přídavné kapaliny .....	70
5.2.4 Optimalizace složení organického modifikátoru .....	71
5.2.5 Kalibrační závislost v UHPSFC-MS/MS.....	73
<b>5.3 Srovnání UHPLC-MS/MS a UHPSFC-MS/MS metod</b> .....	74
<b>6. Závěr</b> .....	76
<b>7. Seznam použité literatury</b> .....	78



## Seznam zkratek

1-AA	1-aminoantracen
2-EP	2-ethylpyridin
2-PIC	2-pikolyamin
ACN	acetonitril
AcA	kyselina octová
AFB <sub>1</sub>	aflatoxin B <sub>1</sub>
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
AmAc	octan amonný
AmF	mravenčan amonný
ATP	adenosintrifosfát
BEA	beauvericin
BEH	hybridní sorbent zesíťovaný ethylenem
BPR	regulátor zpětného tlaku
CE	kolizní energie
CV	napětí na vstupním kuželu
CSH	hybridní povrchově nabitá částice
DEA	dietylamin
DON	deoxynivalenol
EnA, EnB	enniatin A, B
ESI	ionizace elektrosprejem
EtOH	etanol
FA	kyselina mravenčí
FD	fluorescenční detekce
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IsoP	isopropanol
LC	kapalinová chromatografie
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní detekcí
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny
LLOQ	spodní limit kvantifikace

MeOH	metanol
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MW	molekulová hmotnost
N/A	nedostupné
NDH	nejnižší detekovatelná hladina
OM	organický modifikátor
OP-OTA	ochratoxin A s otevřeným laktonem
OTA	ochratoxin A
OtaA	polyketid syntáza
OtaB	neribozomální protein syntetáza
OtaC	monooxygenáza cytochromu P450
OtaD	halogenáza
OTB	ochratoxin B
OTC	ochratoxin C
OT $\alpha$	ochratoxin alfa
OT $\beta$	ochratoxin beta
PFP	pentafluorofenyl
Q	kvadrupól
QqQ	trojitý kvadrupól
Q-trap	tandemové spojení trojitého kvadrupólu s lineární iontovou pastí
RSD	relativní směrodatná odchylka
SIM	selektivní monitorování iontu
SF	stacionární fáze
SFC	superkritická fluidní chromatografie
SPE	extrakce na tuhou fázi
SRM	monitorování vybrané reakce
TOF	analyzátor doby letu
t <sub>r</sub>	retenční čas
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ULOQ	horní limit kvantifikace

UHPSFC	ultra-vysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie
UV/VIS	ultrafialovo-viditelná oblast
ZEN	zearalenon

## 1. Úvod

Ochratoxiny představují jednu ze skupin mykotoxinů, toxických látek produkovaných plísněmi. Toxický účinek těchto látek je multifaktoriální a vede zejména k poškození ledvin a jater. Látky jsou potenciálně karcinogenní a imunotoxické. Nejvýznamnějším zástupcem je ochratoxin A, jenž je nejběžnější a zároveň se také zdá být nejtoxičtější. Většina ochratoxinů však stále nebyla dostatečně prozkoumána.

Ochratoxin A je běžným kontaminantem potravin na celém světě. V důsledku potřeby splňovat podmínky stanovované autoritami na kvalitu potravin v různých zemích byly vyvinuty metody pro stanovení těchto toxinů. Jen málo metod bylo ale vyvinuto pro analýzu biologických materiálů. Jelikož ale probíhá výzkum vlivu ochratoxinů na lidské zdraví, je potřeba takové metody také vyvíjet a mít k dispozici. Jednotlivé látky skupiny ochratoxinů se v potravinách i v biologických vzorcích vyskytují obvykle ve velice nízkých koncentracích, při kterých ale již mohou být toxické. Proto je potřeba vysoce citlivá detekční technika, která při takovýchto podmínkách zajistí spolehlivé stanovení. Toto splňuje tradiční fluorescenční detektor. Další možností je hmotnostní spektrometrie, která v publikovaných pracích v současnosti převládá. Navíc, kvůli složitosti matrice biologických vzorků je optimální využití chromatografických separačních metod, pro zlepšení kvality dat.

Kapalinová chromatografie v systému reverzních fází s využitím tandemové hmotnostní spektrometrie pro detekci je v současnosti metodou volby při analýze ochratoxinů v biologických vzorcích. Jiné metody byly v databázích zastoupeny již velmi omezeně. Možnou alternativou kapalinové chromatografie je superkritická fluidní chromatografie, která přináší změnu v mechanismu separace a může být přínosná při analýze nejen lipofilních látek.

Tato diplomová práce se zabývá vývojem, optimalizací a srovnáním metod pro analýzu ochratoxinů s využitím kapalinové chromatografie a superkritické fluidní chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

## 2. Cíl a popis zadání práce

Hlavním cílem této práce je vyvinout rychlou a citlivou metodu pro stanovení vybraných ochratoxinů s využitím kapalinové chromatografie a superkritické fluidní chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Dalším cílem je porovnat tyto techniky.

Před experimenty bylo potřeba vyhledat potřebné informace v literatuře, tedy: fyzikálně-chemické vlastnosti analytů, monoizotopické molekulové hmotnosti, schopnosti přijímat nebo poskytovat elektrony a také informace o struktuře a potenciální fragmentaci látek.

V prvních experimentech byla vyvinuta a optimalizována UHPLC-MS/MS metoda při níž byly také získány nejvhodnější SRM přechody jednotlivých sloučenin. V rámci optimalizace chromatografické separace v UHPLC bylo pouze testováno složení mobilní fáze, a to kyselina mravenčí (FA), octová (AcA) a amoniak v koncentracích 0,1 a 0,01 %.

Dalším cílem byl vývoj UHPSFC-MS/MS metody. Nejprve byly optimalizovány parametry MS detekce a to: parametry iontového zdroje a složení přídavné kapaliny, kde bylo testováno celkem 8 možných složení, EtOH, MeOH a MeOH s aditivou kyselinou mravenčí, amoniakem, mravenčanem amonným (AmF) a octanem amonným (AmAc), vždy v koncentraci 10 mM. Testován byl také přídavek vody v MeOH, a to v koncentracích 2 a 5 %. Dále bylo potřeba optimalizovat chromatografickou separaci v SFC. To zahrnovalo provedení screeningu celkem 13 kolon a testování složení organického modifikátoru, kde bylo testováno celkem 6 alternativ, čistý MeOH a MeOH s aditivou kyselina mravenčí, amoniak a mravenčan amonný v koncentracích 10 mM. S aditivou AmF byl také testován přídavek vody v koncentraci 1 a 2 %.

Na závěr bylo záměrem srovnat hotové metody pomocí kalibračních závislostí. Ověření opakovatelnosti nástřiku bylo provedeno pouze v případě UHPLC metody.

### 3. Teoretická část

#### 3.1 Moderní HPLC

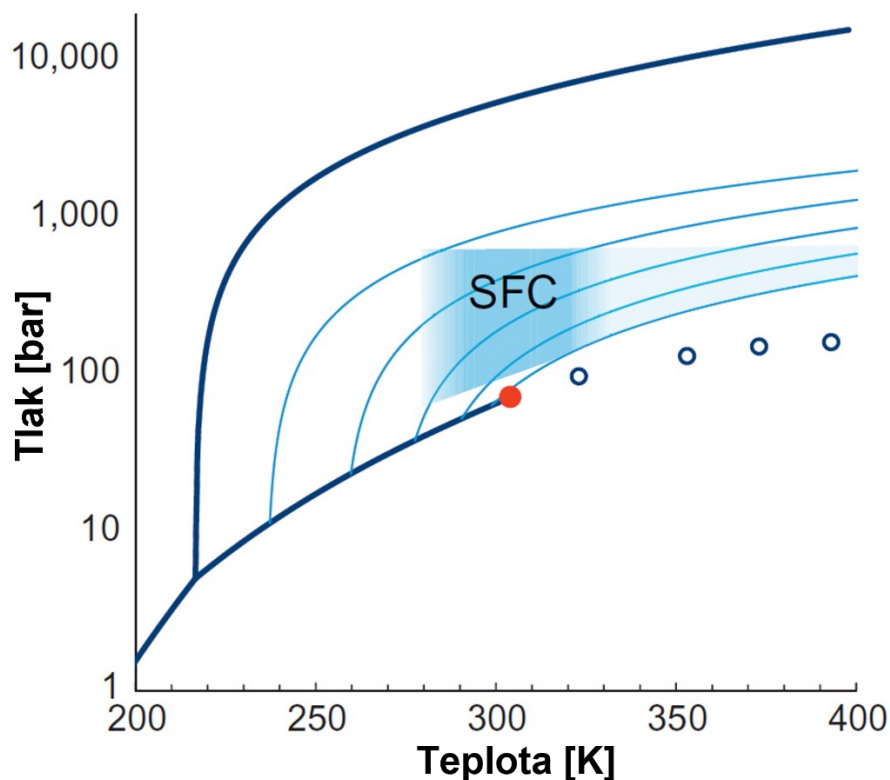
Moderní přístupy k HPLC umožnily zvýšení separační účinnosti, selektivity a urychlení analýz. U ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) je využito částic sorbentu menších než 2  $\mu\text{m}$ . Díky tomu je možné použít kratší kolony s malým průměrem (obvykle 100 x 2,1 mm), což vede ke zkrácení analýz za současného zvýšení separační účinnosti. Výhodou je také výrazné snížení spotřeby mobilní fáze i vzorku. Základním aspektem UHPLC instrumentace je minimalizace mimokolonových prostorů jako jsou: spojovací kapiláry, detekční cely, injekční systémy. V důsledku malých částic sorbentu je totiž UHPLC systém mnohem více náchylný k rozmývání elučních zón. Menší částice kladou na základě Darcyho zákona průtoku mobilní fáze větší odpor. Proto UHPLC vyžaduje oproti HPLC speciální instrumentaci odolnou proti vysokému tlaku. Nutná jsou čerpadla schopna konzistentně a stabilně čerpat při takto vysokých tlacích a detekční systémy schopny sbírat data při rychlých analýzách. Alternativou může být využití částic s pevným jádrem a porézním povrchem (core-shell částic), u nichž k separaci dochází pouze na porézním povrchu o šířce obvykle cca 0,5  $\mu\text{m}$ . Zbytek částice není porézní, což umožní rychlou a účinnou separaci, přičemž nárůst zpětného tlaku je oproti UHPLC výrazně menší. I zde je základním požadavkem na instrumentaci minimalizace příspěvků mimokolonových prostorů [1-3].

## 3.2 Superkritická fluidní chromatografie

Mobilní fázi v superkritické fluidní chromatografii je nadkritická kapalina. Je to speciální stav kapalné látky, ve kterém se nachází, když dojde k překonání kritické teploty a tlaku. Taková tekutina má potom zvláštní vlastnosti nacházející se na pomezí kapaliny a plynu, přičemž spojuje výhodné vlastnosti obou. Oproti běžné kapalině, viskozita nadkritické tekutiny je nižší a difuzivita naopak vyšší, a tak jsou umožněny rychlejší separace s nižším zpětným tlakem v systému. Oproti plynu má nadkritická kapalina však vyšší solvatační sílu a lze ji použít i pro látky netěkavé a termolabilní [4].

### 3.2.1 Specifika mobilní fáze v SFC

V současnosti je jediným prakticky používaným základem mobilní fáze oxid uhličitý. Tento netoxický, nevýbušný plyn má snadno dosažitelné hodnoty kritické teploty i tlaku (31 °C, 7,4 MPa) a je snadno dostupný v dostatečné kvalitě pro SFC analýzu. Jako takový má však nedostačující eluční sílu pro své vysoce lipofilní vlastnosti odpovídající hexanu. Problém byl vyřešen přidáním organického modifikátoru jako druhé složky mobilní fáze. Častým příkladem modifikátoru je metanol. Použit lze také další rozpouštědla běžná pro HPLC jako acetonitril nebo etanol. Použitím organických modifikátorů dochází k výraznému zesílení eluční síly mobilní fáze, a může být dosaženo zkrácení analýz a zlepšení tvaru píků. Organický modifikátor může dále obsahovat aditiva obvykle charakteru kyselin, zásad nebo solí. Dalším možným aditivem je voda, která v nízké koncentraci může vylepšit tvar píků, i podpořit eluci látek. Protože organický modifikátor představuje složku s vyšší eluční silou, při gradientové eluci je zvyšován jeho podíl na úkor oxidu uhličitého. S tím je ovšem spojená také změna kritických hodnot teploty a tlaku pro vzniklou směs, a tak se systém může během analýzy dostat do podkritického stavu. Protože ale přechod mezi vlastnostmi nadkritických a podkritických systémů není nárazový, ale postupný, zachovává si i tak své výhodné vlastnosti [5, 6]. Fázový diagram typické mobilní fáze v SFC je uveden na Obr. 1.

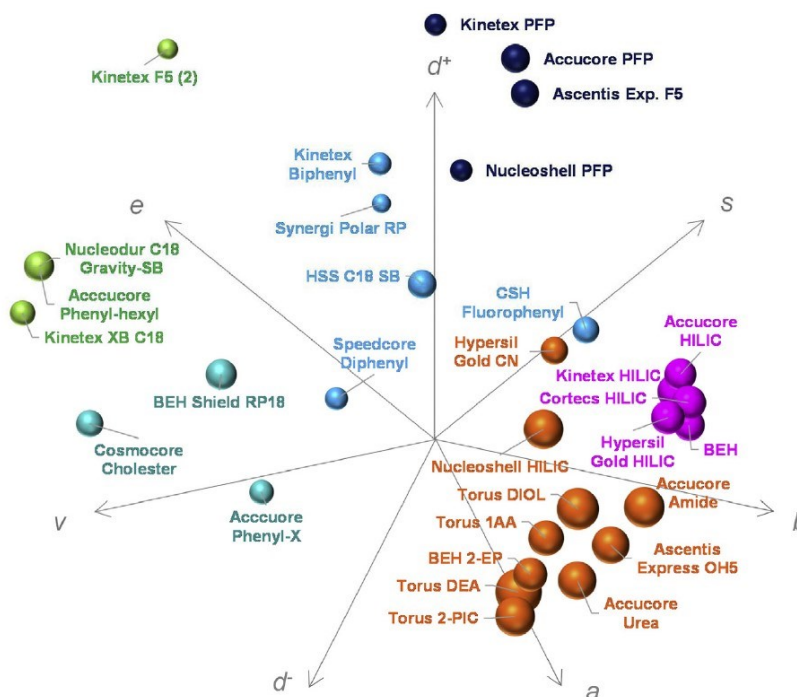


**Obr. 1:** Fázový diagram mobilní fáze na bázi CO<sub>2</sub> využívané v SFC. Tlusté čáry vyjadřují hranice fázového diagramu čistého oxidu uhličitého, světlé čáry ukazují izochory s konstantní hustotou mobilní fáze, červený bod je kritický bod čistého oxidu uhličitého, prázdné kroužky jsou pak kritické body mobilní fáze s přidavkem od 14 do 38 % metanolu, směrem zleva se přidavek metanolu zvyšuje. Upraveno dle [4].

### 3.2.2 Rozdíly v SFC instrumentaci oproti HPLC

V SFC je potřeba regulátor zpětného tlaku (BPR), který přesně reguluje tlak v systému, a zajistí tak opakovatelnost retenčních časů a stabilitu základní linie. Kolony se stacionárními fázemi vyvinutými pro HPLC jsou použitelné i v SFC, i když existují i speciální sorbenty vyvinuté pro SFC (např. 2-ethylpyridin). Výhodou je, že odpadá výběr chromatografického módu, vzhledem k tomu, že charakter mobilní fáze se nemění, mění se pouze fáze stacionární. Lze takto separovat jakékoli látky, které se rozpustí v mobilní fázi na bázi oxidu uhličitého. Oproti HPLC ovšem neexistuje jednoznačný univerzální sorbent a výběr stacionární fáze je proto podstatně složitější. Při výběru sorbentu lze využít paprskový diagram zobrazený na Obr. 2, vyvinutý skupinou Caroline West, zaměřenou na studium a charakterizaci stacionárních fází pro SFC. Tento diagram bere





**Obr. 2:** Paprskový diagram stacionárních fází v SFC. Jednotlivé paprsky reprezentují parametry interakce sorbentu s analyty, přičemž stacionární fáze jsou posouvány ve směru šipky na základě toho, jak moc se projeví daná interakce. Velikost bublin pak udává sílu interakce pro daný sorbent [8].

v potaz sedm základních deskriptorů popisujících interakci analytu s chromatografickým systémem a to: interakce elektronových párů, interakce dipól-dipól, donor nebo akceptor vodíkových vazeb, disperze a koheze a také náboj záporný nebo kladný. Při použití kolon s částicemi menšími než 2 $\mu$ m, je možné hovořit o analogii UHPLC – o ultra-vysokoúčinné superkritické fluidní chromatografii (UHPSFC). Takový systém přináší další zkrácení analýzy a zvýšení separační účinnosti, navíc oproti UHPLC také s nižším zpětným tlakem v systému díky specifikům mobilní fáze. V UHPSFC je ale vhodné použít kolony s vyšším průměrem – obvykle 3,0 mm, z důvodu instrumentace s vyššími mimokolonovými objemy, které zatím neodpovídají standardům užívaným při UHPLC. Vlastnosti kolon testovaných v této práci jsou shrnuty v Tab. 1. Mezi detektory v SFC patří UV/Vis detektor, jehož konstrukce musí zahrnovat detekční celou odolnou vůči tlaku, naopak fluorimetrická detekce je v SFC prozatím problematická. Tak jako u HPLC, i zde je stále více využívána hmotnostní detekce [1,4,7,8].

SFC představuje zajímavou alternativu k HPLC. Moderní SFC systémy jsou dostatečně spolehlivé, citlivé a robustní i pro stanovení nečistot v léčivých přípravcích a jiné stopové analýzy. Tradiční využití pro separaci nepolárních látek typu lipidů či vitamínů rozpustných v tucích už zdaleka není jedinou možností. S přidavkem organických modifikátorů či aditiv se spektrum analyzovatelných látek velmi rozšiřuje. Metoda SFC byla využita pro analýzy přírodních látek, např. obsahových látek léčivých rostlin, environmentálních polutantů a ropných produktů nebo farmaceutik se zaměřením na látky chirální i achirální [9,10].

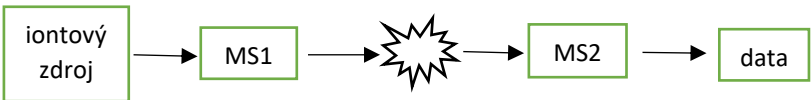
**Tab. 1:** Vlastnosti kolon použitých pro screening v SFC.

<b>kolona</b>	<b>Viridis HSS C18 SB</b>	<b>Viridis BEH 2-EP</b>	<b>CORTECS HILIC</b>	<b>Cosmocore Cholester</b>	<b>Torus DEA</b>
ligand	C <sub>18</sub>	2-ethylpyridin	N/A	cholesteryl	diethylamin
velikost a typ částic	1,8 μm	1,7 μm	2,7 μm, povr. porézní	2,6 μm, povr. porézní	1,7 μm
rozměry	3 x 100 mm	3 x 100 mm	3 x 100 mm	3 x 100 mm	3 x 100 mm
tlakový a teplotní limit	415 bar	415 bar	1240 bar, 45 °C	650 bar, 60 °C	415 bar, 60 °C
velikost pórů, měrný povrch	130 Å, 185 m <sup>2</sup> /g	130 Å, 185 m <sup>2</sup> /g	90 Å, 100 m <sup>2</sup> /g	90 Å, 150 m <sup>2</sup> /g	130 Å, 185 m <sup>2</sup> /g
endcapping	ne	ne	N/A	ano	ne
pokrytí uhlíkem	8,5 %	9 %	N/A	N/A	N/A
výrobce, zdroj	Waters, [11]	Waters, [11]	Waters, [11]	Nacalai Tesque, [12]	Waters, [11]
<b>kolona</b>	<b>Acquity UPC<sup>2</sup> CSH Fluoro-Phenyl</b>	<b>Acquity UPC<sup>2</sup> Torus 1-AA</b>	<b>Acquity UPLC BEH Shield RP18</b>	<b>Kinetex Biphenyl</b>	<b>Torus Diol</b>
ligand	pentafluorofenyl	1-aminoanthracen	C <sub>18</sub>	bifenyl	diol
velikost a typ částic	1,7 μm	1,7 μm	1,7 μm	2,6 μm, povr. porézní	1,7 μm
rozměry	3 x 100 mm	3 x 100 mm	3 x 100 mm	3 x 100 mm	3 x 100 mm
limitní tlak, teplota	1240 bar, 60 °C	415 bar, 60 °C	1240 bar, 50 °C	600 bar, 60 °C	415 bar, 60 °C
velikost pórů, měrný povrch	130 Å, 185 m <sup>2</sup> /g	130 Å, 185 m <sup>2</sup> /g	130 Å, 185 m <sup>2</sup> /g	100 Å, 200 m <sup>2</sup> /g	130 Å, 185 m <sup>2</sup> /g
endcapping	ne	ne	ano	N/A	ne
pokrytí uhlíkem	10 %	N/A	17 %	11 %	N/A
výrobce, zdroj	Waters, [11]	Waters, [11]	Waters, [11]	Phenomenex, [13, 14]	Waters, [11]
<b>kolona</b>	<b>Acquity UPC<sup>2</sup> Torus 2-PIC</b>	<b>Viridis BEH</b>	<b>Acquity UPLC BEH Amide</b>	<b>Acquity UPLC BEH Amide</b>	
ligand	2-pikolyllamin	N/A	amid	amid	
velikost a typ částic	1,7 μm	1,7 μm	1,7 μm	1,7 μm	
rozměry	3 x 100 mm	3 x 100 mm	2,1 x 100 mm	3 x 100 mm	
limitní tlak, teplota	415 bar, 60 °C	415 bar	1240 bar, 90 °C	1240 bar, 90 °C	
velikost pórů, měrný povrch	130 Å, 185 m <sup>2</sup> /g	130 Å, 185 m <sup>2</sup> /g	130 Å, 185 m <sup>2</sup> /g	130 Å, 185 m <sup>2</sup> /g	
endcapping	ne	N/A	ne	ne	
pokrytí uhlíkem	N/A	N/A	12 %	12 %	
výrobce, zdroj	Waters, [11]	Waters, [11]	Waters, [11]	Waters, [11]	

### 3.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie představuje analytickou techniku, při níž dochází ke vzniku iontů v plynné fázi a k jejich separaci a následné detekci na základě poměru molekulové hmotnosti k náboji ( $m/z$ ). Každý hmotnostní spektrometr se skládá ze základních tří částí: iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Ionizační techniky lze rozdělit na tvrdé a měkké na základě předávané energie. Při měkkých ionizačních technikách dochází k minimální fragmentaci a k funkci nevyžadují vakuum. Jedním z hlavních zástupců je elektrosprej (ESI). Hmotnostní analyzátor použitý v této práci byl trojitý kvadrupól. Jedná se o tandemové spojení tří kvadrupólů za sebou. Prostřední může být využit jako kolizní cela, kde za přítomnosti kolizního plynu dochází k fragmentaci iontů. Ve zbylých člancích dochází k výběru iontů na základě  $m/z$  a k jejich separaci. Tato konstrukce umožňuje MS/MS experimenty, s výhodou užívané pro identifikaci a zejména kvantifikaci analytu. Typy skenů v hmotnostní spektrometrii jsou shrnuty v Tab. 2. Trojitý kvadrupól má nízké rozlišení, široký lineární rozsah a vysokou citlivost. Časté je spojení hmotnostní spektrometrie jako detekční techniky se separační metodou, např.: kapalinovou, plynovou nebo superkritickou fluidní chromatografií [15-17].

**Tab. 2:** Typy skenů v hmotnostní spektrometrii a jejich základní charakteristiky, vytvořeno podle [1].

				
	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)

### 3.3.1 Spojení LC-MS

Oproti samotnému použití hmotnostní spektrometrie, separace v kapalinovém chromatografu umožní, mimo jiné, oddělení izobarických a izomerních látek (tedy látek o shodné molekulové hmotnosti), omezení interferencí (např. potlačování signálu), zlepšení podmínek pro kvantitativní analýzu a potvrzení identity na základě retenčních časů. Díky rozvoji měkkých ionizačních technik fungujících za atmosférického tlaku je spojení LC s MS již poměrně snadné a rutinní. Nejčastěji využívané jsou elektrosprej (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Nejběžnější hmotnostní analyzátoři představují kvadrupól, iontová past, analyzátor doby letu (TOF) a orbitrap; časté jsou také hybridní analyzátoři. Spojení kapalinové chromatografie s analyzátořem na bázi iontové cyklotronové rezonance je vzhledem k nízké skenovací rychlosti náročné a není běžně využíváno. Zásadním rozdílem LC-MS oproti běžné kapalinové chromatografii je nutnost využití pouze těkavých aditiv do mobilní fáze, například kyseliny mravenčí nebo octové, amoniaku či mravenčanu amonného. Nevhodné je použití iontově párových činidel. Tyto látky charakteru silných kyselin nebo zásad zlepšují retenci při separaci na reverzních fázích, ale extenzivně také kontaminují systém a mohou vést k potlačení signálu při MS detekci. Rozpouštědla používaná při spojení LC-MS musí být těkavá a snadno ionizovatelná. Silně nepolární rozpouštědla typu hexanu, využívaná často při chromatografii na normálních fázích, nemají dostatečnou schopnost přijímat náboj a nejsou proto příliš vhodná. Z tohoto pohledu je snazší spojení hmotnostní spektrometrie s HPLC v systému reverzních fází, s rozpouštědly typu acetonitril nebo metanol a voda. I přes vysokou selektivitu LC-MS je zejména při bioanalýze obvykle nutné před samotnou separací zařadit úpravu vzorku. Jinak by kromě kontaminace systému mohlo dojít k výrazným matricovým efektům, které ovlivňují odezvu iontů v důsledku koeluce s matricí vzorku a narušují tak reprodukovatelnost, správnost, linearitu a přesnost při kvantitativní analýze [1,18].

### 3.3.2 Spojení SFC–MS

I spojení SFC s hmotnostní spektrometrií je v současné době již rutinní a využíváno v mnoha analytických laboratořích. Zásadní rozdíl oproti LC-MS spočívá zejména v charakteru mobilní fáze – při přechodu mobilní fáze z prostředí SFC o vysokém tlaku s BPR do prostředí s atmosférickým tlakem v iontovém zdroji dochází ke změnám vlastností nadkritické kapaliny. Problémem je dekomprese oxidu uhličitého spojená s možností rozdělení fází a snížením obsahu rozpouštědla vedoucím k precipitaci analytu. Tento problém byl vyřešen zavedením přídatného toku kapaliny. Existuje několik konstrukčních řešení, přičemž v současnosti jsou využívány hlavně dva: čerpadlo přídatné kapaliny s děličem toku před BPR a systémy bez děliče toku. První přístup za kolonou přivádí přídatným čerpadlem přídatnou kapalinu a pak část průtoku odvede na hmotnostní detektor, zatímco zbytek pokračuje přes BPR do odpadu. Toto provedení je využíváno společnostmi Waters a Agilent. Při využití celkového toku nedochází k rozdělení a celý průtok mobilní fáze i s přídatnou kapalinou je směřován do iontového zdroje. V důsledku vysokého obsahu oxidu uhličitého způsobujícího ochlazení při dekompresi je zde důležitější zahřívání spojovacích článků SFC a MS. Toto řešení lze nalézt v přístrojích společností Shimadzu a Agilent. Protože přídatná kapalina ovlivní odezvu přístroje pro různé analyty, přináší její složení další proměnnou do vývoje SFC-MS metody, kterou je nutno optimalizovat. Možnosti jsou velmi podobné jako u organického modifikátoru, nejčastěji je využíván metanol nebo etanol, případně s vhodným aditivem [19-21].

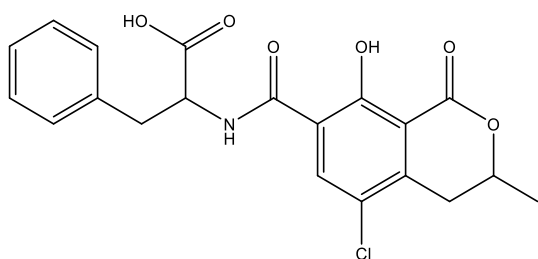
## 3.4 Ochratoxiny

### 3.4.1 Úvod

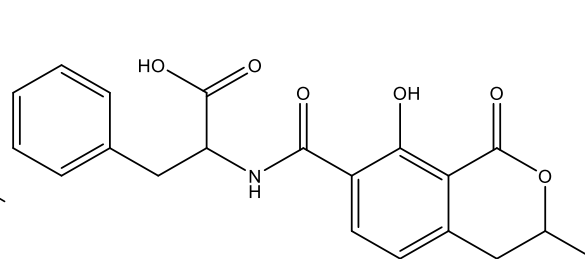
Ochratoxiny představují skupinu běžných mykotoxinů řadících se mezi sekundární metabolity některých druhů rodu *Aspergillus* a *Penicillium*. Svůj název získaly od druhu *Aspergillus ochraceus*, u kterého byl nejvýznamnější člen skupiny, Ochratoxin A (OTA), jako první popsán. Kromě *A. ochraceus* byly ochratoxiny objeveny i u dalších zástupců rodu jako *A. niger*, *A. carbonarius* a řady dalších. Zástupci rodu *Aspergillus* jsou považováni za hlavní zdroj ochratoxinů v oblastech subtropů a tropů. Typicky napadají zemědělské plodiny jako je víno, káva, kakaové boby. U zástupců rodu *Penicillium*, jako je např.: *Penicillium verrucosum* nebo *P. nordicum*, to platí u chladného pásma, zejména u obilnin, *P. nordicum* typicky napadá stravu bohatou na proteiny (maso, sýry) [22-24].

Ochratoxin A je považován za jeden z nejdůležitějších mykotoxinů. Jeho základní struktura je tvořena dihydrokumarinovým základem spojeným amidovou vazbou s L-fenylalaninem. Ostatní ochratoxiny jsou strukturně velmi podobné. Základní zástupci jsou ochratoxin B (OTB, dehalogenovaný derivát OTA), ochratoxin C (OTC, etylester OTA). Ochratoxiny  $\alpha$  a  $\beta$  (OT $\alpha$  a OT $\beta$ ) jsou analoga OTA a OTB, u kterých došlo k rozštěpení amidové vazby. Struktury základních ochratoxinů jsou na Obr. 3. Byla popsána řada dalších metabolitů, ale mnoho z nich bylo připraveno prozatím pouze synteticky [24].

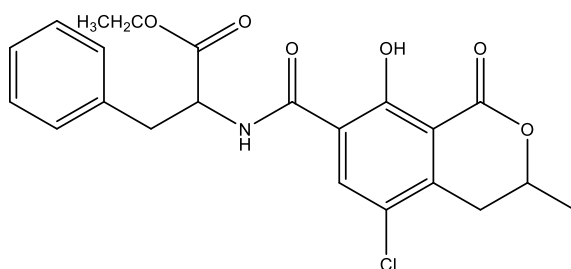
Ochratoxin A



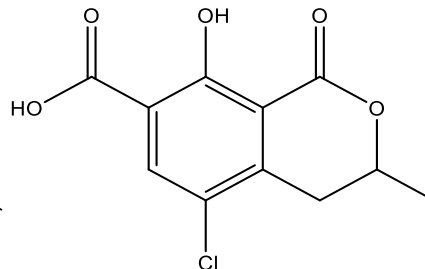
Ochratoxin B



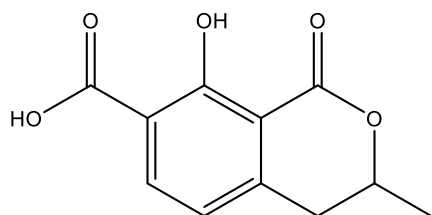
Ochratoxin C



Ochratoxin α



Ochratoxin β



**Obr. 3:** Struktury vybraných ochratoxinů, vytvořeno pomocí ChemDraw.

Základní fyzikálně-chemické vlastnosti vybraných ochratoxinů jsou shrnuty v Tab. 3. Ochratoxiny jsou látky dobře rozpustné v polárních organických rozpouštědlech a ve vodě o alkalickém pH, ale jen slabě rozpustné ve vodě o kyselém nebo neutrálním pH. Ve velmi nepolárních rozpouštědlech (jako jsou nasycené uhlovodíky) se nerozpouští. Důležitou vlastností je silná schopnost fluorescence, čehož se využívá pro detekci. Další charakteristikou, spíše negativního rázu, je vysoká stabilita OTA (a zřejmě i dalších ochratoxinů), a to vůči teplotě, aciditě i radiačnímu záření. OTA se nepodařilo zcela eliminovat ani při sterilizaci v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 3 hod. Při zahřátí při různých úrovních vlhkosti na 200 °C také nedošlo k termálnímu rozkladu. Pouze při zahřátí nad 100 °C v alkalickém prostředí zředěného roztoku NaOH došlo k rozkladu látky i poklesu cytotoxicity. Je očekáváno, že pokud je potravin kontaminována ochratoxiny, je velmi obtížné ji opět dekontaminovat [24-26].



**Tab. 3:** Fyzikálně-chemické vlastnosti vybraných ochratoxinů.

	MW <sup>1</sup>	PK <sub>a</sub> <sup>2</sup>	LogP <sup>1</sup>	počet donorů <sup>2</sup> H <sup>+</sup>	počet akceptorů <sup>2</sup> H <sup>+</sup>	MW <sup>3</sup> [M+H] <sup>+</sup>	MW <sup>3</sup> [M-H] <sup>-</sup>
OTA	403,0823	3,29	4,7	3	7	404,09	402,08
OTB	369,1212	3,4	4,1	3	7	370,13	368,11
OTC	431,1136	7,62	5,4	2	5	432,12	430,11
OTα	256,0139	2,13	3,4	2	7	257,02	255,01
OTβ	222,0528	2,61	2	2	5	223,06	221,05

1: získáno z PubChem [27]

2: získáno ze SciFinder [28]

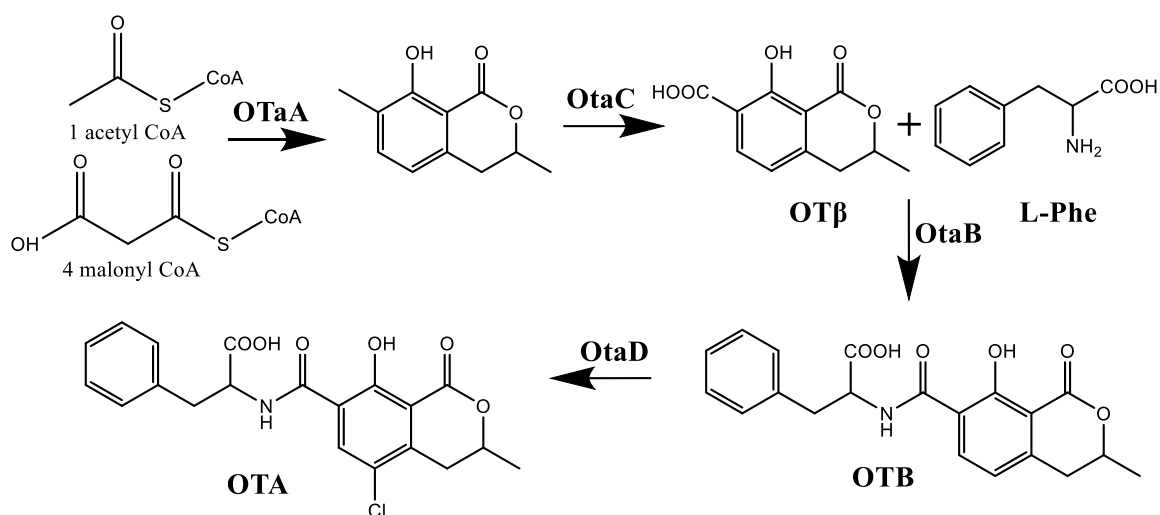
3: vypočítáno pomocí ChemDraw

Nejčastějším způsobem expozice ochratoxinům je požití kontaminované potravin. Zejména OTA je považován za velmi častý kontaminant, a to především obilnin a produktů z nich připravovaných, ale také např. kávy, kakaa, vína, sóji, ořechů, koření nebo piva. V případě pozření krmiva s obsahem ochratoxinů často dochází k akumulaci v různých orgánech a mohou tak být kontaminovány produkty získávané ze zvířat jako je mléko nebo maso. Průměrný příjem OTA byl v EU odhadnut na 15-60 ng/kg tělesné hmotnosti za týden u dospělého člověka. Tolerovatelný týdenní příjem byl nastaven na 120 ng/kg [29, 30].

Ochratoxiny jsou pro člověka velice toxické. Jako nejvíce toxický se stále jeví OTA. Jeho účinek byl prokázán na mnoha úrovních jako je: nefrotoxicita, hepatotoxicita, imunosupresivní účinek, teratogenita. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny jej řadí do kategorie 2b, tedy mezi potenciální karcinogeny. Protože se jedná o běžný mykotoxin, jeho koncentrace v potravinách je regulována Evropskou unií. Týká se to především obilnin, vína, sušených plodů a dalších. Ostatní ochratoxiny jsou také toxické. Jejich toxicita je ale obvykle považována za výrazně slabší. Riziko pro člověka mohou představovat při dlouhodobé expozici, popřípadě ve směsích potencujících toxicitu. Dle současných poznatků lze odhadnout, že toxicita klesá v řadě: OTA > OTC > OTB [31,32].

### 3.4.2 Biosyntéza ochratoxinů

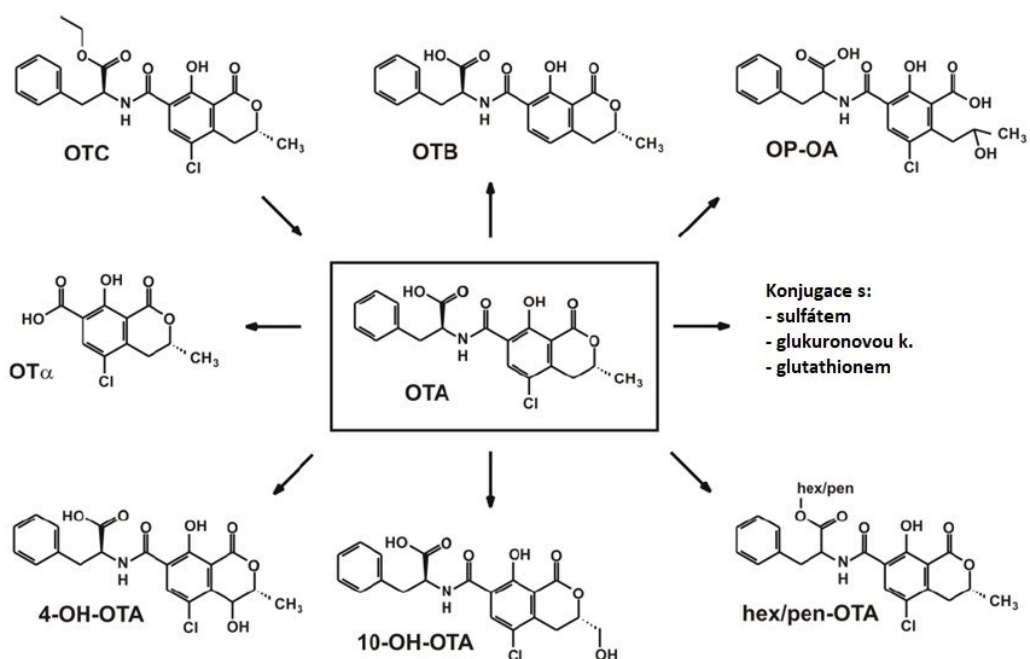
Původní předpoklad byl, že syntéza ochratoxinů začíná skrz polyketidovou cestu od acetyl CoA. V roce 1979 představili Huff a Hamilton model, který vycházel z chemické struktury ochratoxinů. Podle nich byl meziproduktem v syntéze OTA mellein, sekundární metabolit s podobnou strukturou. OTA vzniká biosyntézou dle teorie jako konečný produkt z OT $\beta$ , OT $\alpha$  a OTC. Tato hypotéza byla popřena, když Harris a Mantle experimentálně dokázali, že kolonie *A. ochraceus* pro syntézu OTA mellein nevyužila. Zároveň zpochybnili význam OTC jako meziprojektu, z něhož vzniká OTA. Naopak přišli s návrhem odlišné biosyntetické cesty, vedoucí přes OT $\beta$  a OT $\alpha$  s možnou alternativou přes OT $\beta$  a OTB. S rozvojem molekulární biologie na řadu postupně přišli další vědci a v roce 2018 Wang et al. představili svou vlastní biosyntetickou cestu pro ochratoxiny, která byla potvrzena rozsáhlou studií s využitím genetického základu proteinů účastnících se této cesty. Jejich práce upravila a doplnila předchozí studie. Dle Wang et al. jsou základními prekurzory ochratoxinů acetyl CoA a malonyl CoA, které enzymy polyketid syntáza (OtaA) a monooxygenáza cytochromu P450 (OtaC) přemění na ochratoxin beta, který je následně propojen amidovou vazbou s L-fenylalaninem pomocí neribozomální protein syntetázy (OtaB) na ochratoxin B. Nakonec je OTB halogenizován enzymem halogenáza (OtaD) na chloroderivát ochratoxin A, jako základní produkt biosyntetické cesty. Popsaná biosyntetická cesta je znázorněna na Obr. 4. Na základě posledního výzkumu OTC ani OT $\alpha$  nejsou prekurzory při syntéze OTA. Dle zatím dostupných informací lze očekávat, že se jedná o metabolity OTA, popřípadě příbuzných látek [33-36].



**Obr. 4:** Biosyntetická cesta produkce ochratoxinů, začínající acetyl CoA a malonyl CoA a končící ochratoxinem A, nakresleno v programu Chemdraw podle [35].

### 3.4.3 Toxikokinetika a toxikodynamika ochratoxinů

OTA je rychle absorbován přes gastrointestinální trakt. Díky kyselému charakteru se pasivní difusí vstřebává zejména ze žaludku a také z tenkého střeva. V krevním oběhu se více než 90 % procent váže na krevní bílkoviny, zejména albumin. Biologický poločas OTA se u živočišných druhů velmi liší, u člověka byl zjištěn velice dlouhý biologický poločas až 23,5-35,5 dne. Eliminace je velmi pomalá díky extenzivní vazbě na albumin, reabsorpci v proximálních tubulech a enterohepatální cirkulaci. Ochratoxiny jsou metabolizovány střevní mikroflórou, typické je to zejména u přežvýkavců. Bylo zjištěno, že u řady druhů včetně člověka; OTA prostupuje placentární bariéru a může pronikat také do mateřského mléka. Z hlediska metabolismu se zdá, že ochratoxiny jsou metabolizovány pouze částečně a metabolity OTA mají nižší nebo žádnou toxicitu. [32,37-39]. Základním metabolitem je OTα (OTβ u OTB), který částečně vzniká rozštěpením amidové vazby již v GIT. Oxidací mikrosomálním systémem cytochromů vzniká obvykle 4-hydroxyOTA, málo toxický metabolit. V alkalických podmínkách může vzniknout otevřením laktonového kruhu OTA s otevřeným laktonem (OP-OTA). Vzhledem k vyšší polaritě se zdá být méně toxický, je však potřeba dalších studií k tomu, aby toxicita metabolitů OTA byla dostatečně popsána. V moči, krvi i tkáních zvířat nebo lidí byly objeveny také metabolity druhého stupně metabolismu, tedy konjugáty s glukuronovou kyselinou nebo např. glutationem [38,40-42]. Možné metabolity OTA jsou shrnuty na Obr. 5.



**Obr. 5:** Navržené biotransformační cesty ochratoxinu A. Metabolická transformace u člověka zahrnuje vznik OT $\alpha$  a hydroxylovaných derivátů a také konjugátů s glukuronovou kyselinou. Upraveno dle [38].

Hlavním známým účinkem ochratoxinů je nefrotoxicita. Tento účinek byl zkoumán u zvířat i lidí. Ochratoxiny jsou považovány za možnou příčinu balkánské endemické nefropatie, chronického smrtelného onemocnění postihujícího populaci jihovýchodní Evropy. Karcinogenita OTA u lidí je očekávaná vzhledem k prokázané karcinogenitě u zvířat. Bylo provedeno několik studií na laboratorních myších, kde příjem OTA ve stravě vedl k rozvoji hepatocelulárních a renálních karcinomů. Mechanismů účinku u řady toxických efektů ochratoxinů je více a podílejí se zřejmě společně. Řadí se sem potlačení proteosyntézy, snížení produkce ATP spojené s mitochondriální dysfunkcí. Velmi důležitá je zřejmě indukce oxidačního stresu. Tento účinek je spojen se zvýšenou produkcí kyslíkových a dusíkových radikálů a sníženou obranyschopností buňky vůči nim. Dochází tak k rychlé peroxidaci lipidů a poškození DNA. Karcinogenita může být ale způsobena také, mimo jiné, přímým genotoxickým účinkem způsobeným tvorbou aduktů s DNA, indukci apoptózy nebo ovlivněním mitózy [38,43-45].

### 3.4.4 Analytické metody pro stanovení ochratoxinů

Vzhledem k tomu, že se jedná o známé toxické látky kontaminující potraviny již při nízké koncentraci, je třeba mít k dispozici rychlé, citlivé a robustní metody pro rutinní analýzu. Typickým uplatněním je analýza potravin, a to především se zaměřením na OTA. Pro analýzu ochratoxinů v biologickém materiálu lze nalézt pouze menší množství článků, a to zejména experimentálních studií zaměřených na monitorování expozice populace mykotoxinům. Takové studie obvykle analyzují desítky mykotoxinů současně v jedné nebo dvou separacích, přičemž metodou volby je UHPLC ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Lze také nalézt metody s využitím HPLC s fluorescenční detekcí, použitelnou s výhodou bez derivatizace, díky vlastnostem ochratoxinů. Pro analýzu ochratoxinů s využitím SFC nebyla v databázích nalezena žádná práce [46-59].

Z hlediska analyzovaných látek jednoznačně převládá OTA, následován OT $\alpha$ . Okrajově je možné se setkat také s OTB a metabolity OTA – 10-OH-OTA a 2'R-OTA. Pro analýzu OTC a OT $\beta$  v biologickém materiálu nebyl nalezen v databázích žádný článek. Mezi nejčastěji analyzované biologické materiály patří především moč a krevní plazma, dalšími jsou krevní sérum, mateřské mléko (zajímavé pro studium expozice kojenců mykotoxinům) nebo například homogenizované tkáně. Vzhledem ke komplexnosti biologických materiálů je potřeba před samotnou analýzou provést úpravu vzorku. V literatuře jsou využívány nejrůznější metody, jako je extrakce z kapaliny do kapaliny, extrakce na tuhou fázi, deproteinace i moderní metody online úpravy vzorku. Ochratoxiny se v organismu metabolizují pomocí glukuronidace, proto je ve studiích také využíváno enzymatické hydrolýzy glukuronidů [46-59].

V souladu s moderními trendy v současnosti převládá využití UHPLC nad HPLC, zejména díky rychlejší a účinnější separacím. Metody nalezené v literatuře využívaly výhradně stacionární fáze na bázi C18 substituovaného silikagelu, jako univerzální stacionární fáze. Separační podmínky bývají standardní, s využitím gradientové eluce při kombinaci mobilní fáze vodné (s těkavým aditivem obvykle kyselého charakteru) a organické (typicky ACN nebo MeOH). Při fluorescenční detekci bylo možné využít i netěkavá aditiva typu kyseliny fosforečné [46-59].

V pracích zaměřených na studium ochratoxinů nalezených v rešerši byly využity výhradně hmotnostní analyzátory s nízkým rozlišením, konkrétně: trojitý kvadrupól a Q-trap [46-59].

Pro získání článků a odborných studií bylo využito vyhledávání v databázích Science Direct, PubMed, Wiley a ACS. Do vyhledávače bylo postupně zadáváno spojení „ochratoxin/s“ a „mass spectrometry“, „HPLC“, „SFC“ a další vždy spojeno spojovníkem AND. Následně byly články filtrovány na originální studie a manuálně prostudovány pro identifikaci článků zaměřených na biologické materiály. Z výsledku byly nakonec vybrány ty, které byly vydány v posledních cca deseti letech a byly shrnuty v Tab. 4.

**Tab. 4:** Vybrané současné metody pro analýzu ochratoxinů.

technika	analyty	materiál	úprava vzorku	analytická kolona	mobilní fáze	detekce	čas analýzy	rok, zdroj
HPLC	OTA, O <sub>α</sub>	plazma	LLE	Nucleosil 100 C18 (3,0 x 250 mm), 5 μm)	A: AcA 2%/MeOH (66:34) B: MeOH/IsoP (90:10)	FD	45 min	2014 [46]
HPLC	OTA, 2'R OTA	kapka suché krve	extrakce z filtr. papíru	Nucleodur C18 ISIS (2,0 x 150 mm, 5 μm)	A: MeOH + 0,1 FA B: voda + 0,1 FA	MS/MS (Qtrap)	14 min	2015 [47]
HPLC	OTA, 2'R OTA, 10-OH-OTA, O <sub>α</sub> , AFB1, ZEN, celkem 27 látek	kapka suché krve	extrakce z filtr. papíru	NUCLEODUR C18 Gravity SB (2,0 x 100 mm, 3 μm)	A: ACN + 2% AcA B: voda + 0,1% AcA	MS/MS (Qtrap)	11,5 min	2017 [48]
UHPLC	OTA	kryší mozek, plazma	mikrodialýza, deproteinace	Eclipse Plus C8 (3,0 x 150 mm, 1,8 μm)	ACN : voda : H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (50:50:0,1)	FD	10 min	2019 [49]
HPLC	OTA, 2'R OTA, 10-OH-OTA, O <sub>α</sub> , DON, EnB, AFB1, celkem 35 a 27 látek	sérum, moč	LLE/zředění a nástřik	NUCLEODUR® C18 Pyramid (2,0 x 150 mm, 3 μm)	A: ACN + 0,1% FA B: voda + 0,1% FA	MS/MS (Qtrap)	11,5/13 min	2019 [50]
UHPLC	OTA, O <sub>α</sub>	moč, plazma, tkáň skotu	deproteinace	Poroshell EC-C18 (3,0 x 100 mm, 2,7 μm)	A: MeOH + 5 mM AmAc B: voda + 5 mM AmAc	MS/MS (QqQ)	11 min	2019 [51]
UHPLC	OTA, O <sub>α</sub> , DON, ZEN celkem 37 látek	moč	QuEChERS	HSS T-3 (2,1 x 100 mm, 1,8 μm)	A: MeOH : voda : AcA (94:5:1) B: MeOH : voda : AcA (97:2:1)	MS/MS (QqQ)	18 min	2019 [52]
UHPLC	OTA, O <sub>α</sub> , Don, Zen, celkem 26 látek	plazma, moč	deproteinace	Poroshell 120 EC-C <sub>18</sub> (3,0 x 100 mm, 2,7 μm)	A: MeOH + 5 mM AmAc B: voda + 5 mM AmAc	MS/MS (Qtrap)	10 min	2019 [53]

**Tab. 4:** Vybrané současné metody pro analýzu ochratoxinů – pokračování

technika	analyty	materiál	úprava vzorku	analytická kolona	mobilní fáze	detekce	čas analýzy	rok, zdroj
HPLC	OTA, OTB, aflatoxiny, ZEA, celkem 12 látek na nástřík	plazma	Captiva EMR-lipid clean up	Ascentis Express C18 (2,1 x 150 mm), 2.7 μm)	A: voda + 5mM AmF + 0,1% FA B: MeOH : voda 95:5 + 5mM AmF + 0,1 FA	MS/MS (QqQ)	30 min	2019 [54]
UHPLC	OTA, OTB, Ota, fumonisiny, celkem 18 látek	moč	SPE	CORTECS C18 UPLC (2,1 x 100 mm, 1,6 μm)	A: voda + 0,2% AcA B: ACN : MeOH (50:50)	MS/MS (QqQ)	9 min	2020 [55]
UHPLC	OTA	plazma	LLE, enzymatická hydrolýza glukuronidů	Poroshell 120 EC-C18 (2,1 mm x 100 mm, 1,9 μm)	A: MeOH + 5 mM AmAc B: voda + 5 mM AmAc	MS/MS (Qtrap)	9 min	2020 [56]
UHPLC	OTA, Ota, BEA, EnA, EnB, celkem 29 látek	mateřské mléko	SPE	HSS T-3 (2,1 x 100 mm, 1,8 μm)	A: voda + 5mM AmAc + 0,1% AcA B: MeOH	MS/MS (Qtrap)	19 min	2020 [57]
UHPLC	OTA, OTB, aflatoxiny, fumonisin, celkem 8 látek	mateřské mléko	deproteinace	Agilent C-18 (2,1 x 100 mm, 1,8 μm)	A: voda + 10mM AmAc + 0,1% AcA B: ACN	MS/MS (Qtrap)	22 min	2020 [58]
UHPLC	OTA, Ota, AFB1, ZEN, celkem 11 látek	moč	online SPE	Accucore RP-MS (2,1 x 150 mm, 2,6 μm)	A: voda + 0,1% FA B: ACN + 0,1% FA	MS/MS (Qtrap)	13 min	2021 [59]

OTA – ochratoxin A, OTB – ochratoxin B, Ota – ochratoxin alfa, DON – deoxynivalenol, AFB1 – aflatoxin B<sub>1</sub>, ZEN – Zearalenon, BEA – beauvericin, EnA – enniatin A, EnB – enniatin B, LLE – extrakce z kapaliny do kapaliny, SPE – extrakce na tuhou fázi, ACN – acetonitril, AcA – kyselina octová, FA – kyselina mravenčí, MeOH – metanol, AmAc – octan amonný, AmF – mravenčan amonný, IsoP – isopropanol, FD – fluorimetrická detekce, MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie



## **4. Experimentální část**

### **4.1 Přístrojové vybavení**

- hmotnostní spektrometr: Xevo TQ-XS trojitý kvadrupól, Waters, UK
- HPLC systém: ACQUITY UPLC I-Class PLUS system, Waters, USA
- SFC systém: ACQUITY UPC<sup>2</sup>, Waters, USA
- pracovní program: MassLynx 4.1, Waters, USA
- vyhodnocující program: UNIFI, Waters, USA
- analytické váhy: Sartorius ME5-OC, Sartorius, Německo
- třepačka: IKA Vortex 3, Sigma-Aldrich, Česká republika
- automatické pipety: Eppendorf Reference 2, Eppendorf, Česká republika

### **4.2 Analytické kolony**

#### **1. Kolony společnosti Waters, Milford, USA:**

- ACQUITY UPLC BEH C18 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 50 mm, LOT: 0298371531
- Torus Diol 1,7  $\mu\text{m}$ , 3,0 x 100 mm, LOT: 0106390221
- Viridis HSS C18 SB 1,8  $\mu\text{m}$ , 3,0 x 100 mm, LOT: 0108373061
- Viridis BEH 1,7  $\mu\text{m}$ , 3,0 x 100 mm, LOT: 0119372961
- Viridis BEH 2-EP 1,7  $\mu\text{m}$ , 3,0 x 100 mm, LOT: 0114382831
- Acquity UPC<sup>2</sup> Torus 1-AA 1,7  $\mu\text{m}$ , 3,0 x 100 mm, LOT: 0105353441
- Acquity UPC<sup>2</sup> CSH Fluoro-Phenyl 1,7  $\mu\text{m}$ , 3,0 x 100 mm, LOT: 0103331691
- Torus DEA 1,7  $\mu\text{m}$ , 3,0 x 100 mm, LOT: 0105372021
- Acquity UPLC BEH Shield RP18 1,7  $\mu\text{m}$ , 3,0 x 100 mm, LOT: 0172380331
- Acquity UPLC BEH Amide 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm, LOT: 0126332201
- Acquity UPC<sup>2</sup> Torus 2-PIC 1,7  $\mu\text{m}$ , 3,0 x 100 mm, LOT: 0104360431
- CORTECS HILIC 2,7  $\mu\text{m}$ , 3,0 x 100 mm, LOT: 0110372691

## **2. Kolona společnosti Phenomenex, Torrance, USA:**

- Kinetex Biphenyl 2,6 µm, 3,0 x 100 mm, LOT: 5715-0065

## **3. Kolona společnosti Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japonsko:**

- Cosmocore Cholester 2,6 µm, 3,0 x 100 mm, LOT: Y20323

## **4.3 Chemikálie**

- voda LC-MS grade, Millipore, destilovaná v přístroji Milli Q RG, Burlington, USA
- mravenčan amonný, Riedel-de Haën, Seelze, Německo, čistota: 98%
- metanol LC-MS grade: VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Francie
- octan amonný, SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Německo, čistota: ≥99,99%
- amoniak 25%: Merck, Darmstadt, Německo
- kyselina mravenčí: VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Francie

## **4.4 Standardy ochratoxinů**

- OTA: Dr Ehrenstorfer, LOT: 518471Z, Augsburg, Německo, 5 mg, čistota: 99%
- OTB: Cayman Chem. Comp., LOT: 0597956-2, Ann Arbor, USA, 5 mg, čistota: ≥98%
- OTC: Cayman Chem. Comp., LOT: 0531987-2, Ann Arbor, USA, 1 mg, čistota: ≥95%
- OTα: HPC standards GmbH, LOT: 780762, Borsdorf, Německo, 10 mg, čistota: 99,9%

## **4.5 Pracovní postup pro UHPLC–MS**

### **4.5.1 Příprava roztoků standardů**

Navážky standardů v rozsahu 0,100 – 0,300 mg byly rozpuštěny v odpovídajícím množství acetonitrilu na koncentraci 1 mg/ml a naředěny vodou na koncentraci 10 µg/ml.

### **4.5.2 Příprava pracovního roztoku standardů**

Roztoky standardů byly smíseny a dále naředěny vodou na koncentrace 1 µg/ml a 100 ng/ml.

### **4.5.3 Příprava mobilní fáze a oplachových kapalin**

Organickou složkou mobilní fáze byl čistý acetonitril. Vodné složky mobilní fáze byly připraveny následujícím způsobem:

#### **1. 0,1 a 0,01% kyselina mravenčí ve vodě**

Odměrná baňka o objemu 500 ml byla téměř naplněna vodou a do vody se špičkou pipety pod hladinou bylo pipetováno 500  $\mu$ l (0,1% roztok) nebo 50  $\mu$ l (0,01% roztok) kyseliny mravenčí. Poté byla doplněná vodou po rysku.

#### **2. 0,1 a 0,01% kyselina octová ve vodě**

Odměrná baňka o objemu 500 ml byla téměř naplněna vodou a do vody se špičkou pipety pod hladinou bylo pipetováno 500  $\mu$ l (0,1% roztok) nebo 50  $\mu$ l (0,01% roztok) kyseliny octové. Poté byla doplněná vodou po rysku.

#### **3. 0,1 a 0,01% amoniak ve vodě**

Odměrná baňka o objemu 500 ml byla téměř naplněna vodou a do vody se špičkou pipety pod hladinou byly pipetovány 2 ml (0,1% roztok) nebo 200  $\mu$ l (0,01% roztok) 25% amoniaku. Poté byla doplněná vodou po rysku.

Slabou oplachovou kapalinou byl roztok 10% acetonitrilu ve vodě (450 ml vody a 50 ml acetonitrilu) a silnou oplachovou kapalinou byl čistý acetonitril. Jako oplachová kapalina pro písty čerpadla byl použit 10% roztok metanolu ve vodě (450 ml vody a 50 ml metanolu).

Mobilní fáze s aditivou byly používány maximálně 24 hod.

## **4.6 Pracovní postup pro UHPSFC–MS**

### **4.6.1 Příprava roztoků standardů**

Zásobní roztoky standardů připravené dle 4.5.1 byly naředěny acetonitrem na koncentraci 10  $\mu$ g/ml.

#### 4.6.2 Příprava pracovního roztoku standardů

Roztoky standardů byly smíseny a dále naředěny acetonitrilem na koncentrace 1 µg/ml a 100 ng/ml.

#### 4.6.3 Příprava mobilní fáze, přídavné kapaliny a oplachových kapalin

Testované mobilní fáze a přídavné kapaliny jsou uvedeny v Tab. 5 a 6.

**Tab. 5:** Testované mobilní fáze v UHPSFC.

	složka A	složka B
1.	CO <sub>2</sub>	MeOH
2.	CO <sub>2</sub>	MeOH + 10 mM NH <sub>4</sub> OH
3.	CO <sub>2</sub>	MeOH + 10 mM AmF
4.	CO <sub>2</sub>	MeOH + 10 mM AmF + 1% H <sub>2</sub> O
5.	CO <sub>2</sub>	MeOH + 10 mM AmF + 2% H <sub>2</sub> O
6.	CO <sub>2</sub>	MeOH + 10 mM FA

**Tab. 6:** Testované přídavné kapaliny.

	přídavná kapalina
1.	EtOH
2.	MeOH
3.	MeOH + 2% H <sub>2</sub> O
4.	MeOH + 5% H <sub>2</sub> O
5.	MeOH + 10 mM NH <sub>4</sub> OH
6.	MeOH + 10 mM AmF
7.	MeOH + 10 mM AmAc
8.	MeOH + 10 mM FA

Roztoky metanolu s aditivy byly připraveny následujícím způsobem:

##### 1. metanol + 10 mM amoniak

Odměrná baňka o objemu 500 ml byla téměř naplněna metanolem a do metanolu se špičkou pipety pod hladinou bylo pipetováno 377 µl 25% amoniaku. Poté byla doplněná metanolem po rysku.

##### 2. metanol + 10 mM mravenčan amonný

V kádince s metanolem bylo rozpuštěno 315,3 mg mravenčanu amonného. Roztok byl kvantitativně převeden do 500 ml odměrné baňky s metanolem. Baňka byla poté doplněná metanolem po rysku. Přídavek 5 ml (1%) nebo 10 ml (2%) vody byl přidán do kádinky při rozpouštění.

### **3. metanol + 10 mM kyselina mravenčí**

Odměrná baňka o objemu 500 ml byla téměř naplněna metanolem a do metanolu se špičkou pipety pod hladinou bylo pipetováno 189  $\mu$ l kyseliny mravenčí. Poté byla doplněná metanolem po rysku.

### **4. metanol s přídatkem vody**

Odměrná baňka o objemu 500 ml byla téměř naplněna metanolem a do metanolu se špičkou pipety pod hladinou bylo pipetováno 10 ml (2% přídatvek) nebo 25 ml (5% přídatvek) vody. Poté byla doplněná metanolem po rysku.

### **5. metanol + 10 mM octan amonný**

V kádince s metanolem bylo rozpuštěno 385,4 mg octanu amonného. Roztok byl kvantitativně převeden do 500 ml odměrné baňky s metanolem. Poté byla doplněná metanolem po rysku.

Slabá oplachová kapalina, silná oplachová kapalina, oplachová kapalina pístu čerpadla organického modifikátoru i přídatné kapaliny byly 100% metanol.

Mobilní fáze s aditivy byly používány maximálně 24 hod.

## 4.7 Vývoj UHPLC – MS metody

### 4.7.1 Výchozí UHPLC podmínky

Počáteční ekvilibrace kolony trvala 10 min. Průběh gradientové eluce je znázorněn na Obr. 6.

Kolona: ACQUITY UPLC BEH C18 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 50 mm

Teplota kolony: 40 °C

MF: 0,1% HCOOH (A) : ACN (B)

Průtok mob. fáze: 0,4 ml/min

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

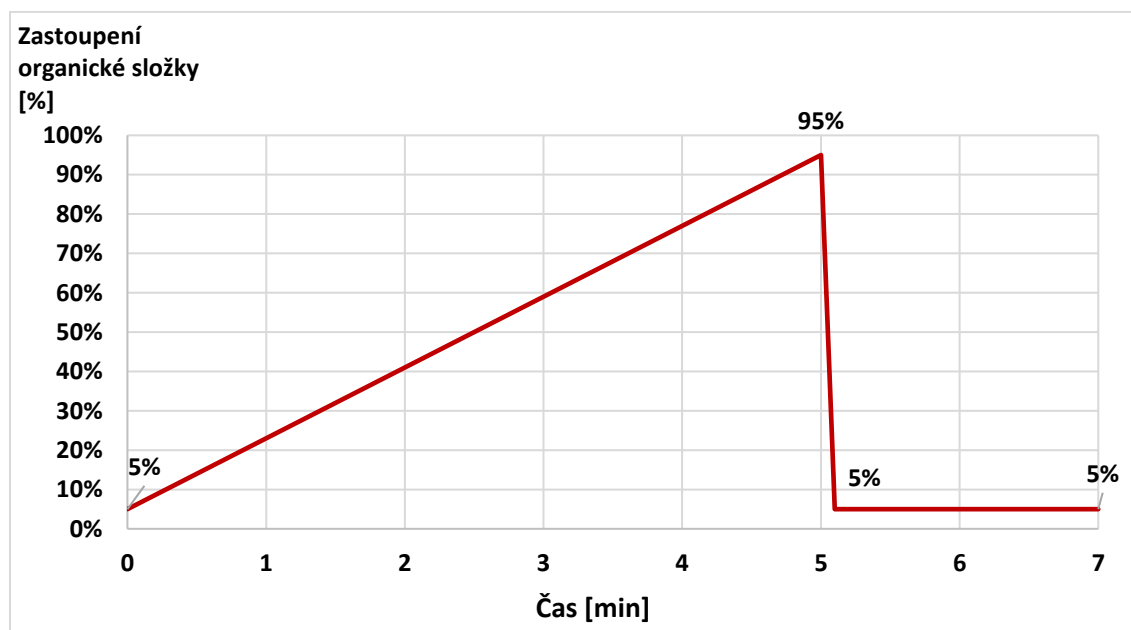
5 min – 5 % A, 95 % B

5,1 min – 95 % A, 5 % B

7 min – 95 % A, 5 % B

Dávkovaný objem: 1  $\mu\text{l}$

Teplota autosampleru: 10 °C



Obr. 6: Průběh gradientové eluce při UHPLC analýze.

#### 4.7.2 Vývoj MS metody

Pro MS sken byl využit roztok směsi ochratoxinů o koncentraci 1 µg/ml, OTC byl v koncentraci 10 µg/ml s nástřikem 10 µl. Měření bylo provedeno v negativním i pozitivním módu ESI. Dále bylo optimalizováno nastavení iontového zdroje v módu SIM, kdy bylo využito stejných roztoků ochratoxinů, nástřik 2 µl. Optimalizovány byly parametry: napětí na kapiláře (v rozmezí 0,5–4,0 kV), napětí na vstupním kuželu (10–55 V), průtok plynu na vstupním kuželu (150–300 L/h), průtok desolvačního plynu (400–1200 L/h) a desolvační teplota (250–500 °C). Kvůli horší dostupnosti a vyšší ceně standardu OTC byla optimalizace parametrů iontového zdroje provedena kompletně pouze pro OTA, OTB a OTα. Pro OTC bylo provedeno pouze testování napětí na vstupním kuželu. Dále byly proměřeny skeny produktových iontů pro jednotlivé látky při třech kolizních energiích – 10, 20 a 30 eV. Využito bylo stejného roztoku s nástřikem 1 µl pro negativní mód, 5 µl pro pozitivní mód a 10 µl v obou případech pro OTC. Následně byla provedena optimalizace kolizní energie pro tři vybrané fragmenty v rozsahu 5–50 eV, dávkované objemy byly 1 µl pro směs látek a 1 µl pro OTC v negativním módu a 3 µl v pozitivním módu. Při testování jednotlivých parametrů byly při každé hodnotě provedeny dva nástřiky a použit byl průměr výsledných hodnot. Opakovatelnost nástřiku byla ověřena výpočtem relativní směrodatné odchylky (RSD).

#### 4.7.3 Optimalizace složení mobilní fáze

Testována byla tři aditiva ve dvou koncentracích 0,1 a 0,01 %: kyselina mravenčí, kyselina octová a amoniak, vše ve vodě. Pro každé aditivum byly provedeny tři nástřiky v obou ionizačních módech. Výsledná hodnota byla získána průměrem. Organická složka byla 100% acetonitril. Nástřik byl 2 µl o koncentraci 10 µg/ml pro OTC a 1 µg/ml pro ostatní ochratoxiny pro pozitivní mód a 1 µl s koncentracemi 1 a 0,1 µg/ml pro negativní mód.

#### 4.7.4 Kalibrační závislost a opakovatelnost měření

Byly měřeny vždy tři nástřiky roztoku se směsí ochratoxinů o postupně rostoucí koncentraci v rozsahu od 0,001 do 1000 ng/ml. V případě negativního módu byla maximální koncentrace ponechána na 100 ng/ml vzhledem k vyšší citlivosti.

Opakovatelnost nástřiku byla ověřena na třech koncentračních hladinách, kdy bylo provedeno vždy 10 nástřiků, koncentrace byly vybrány na základě výsledků kalibrace.

## 4.8 Vývoj SFC–MS metody

### 4.8.1 Výchozí SFC podmínky

Počáteční ekvilibrace kolony trvala 10 min s 40 % organického modifikátoru a 5 min s 2 % organického modifikátoru, jako na počátku gradientu. Průběh gradientové eluce je znázorněn na Obr. 7.

Kolona: Torus Diol 1,7  $\mu$ m, 3,0 x 100 mm

Teplota kolony: 40 °C

MF: CO<sub>2</sub> (A) : MeOH (B)

Průtok mob. fáze: 1,5 ml/min

Gradientová eluce: 0 min – 98 % A, 2 % B

5 min – 55 % A, 45 % B

5,1 min – 98 % A, 2 % B

7 min – 98 % A, 2 % B

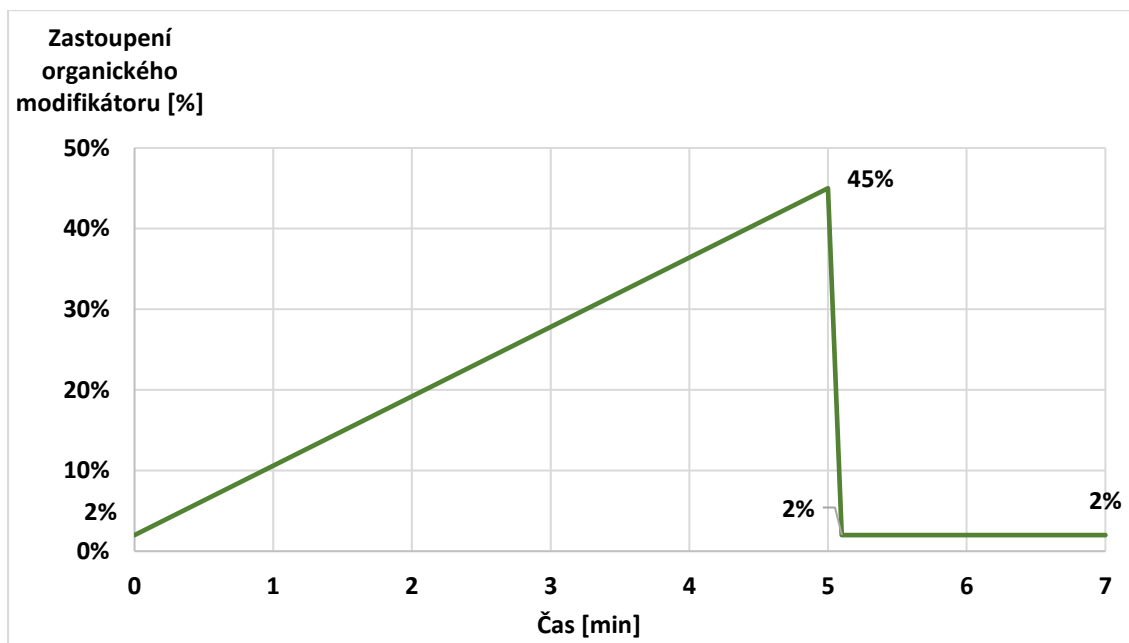
Příd. kapalina: 100% MeOH

Průtok příd. kap.: 0,3 ml/min

Dávkovaný objem: 1  $\mu$ l

Teplota autosampleru: 15 °C





**Obr. 7:** Průběh gradientové eluce při UHPSFC analýze.

#### 4.8.2 Screening stacionárních fází

Bylo otestováno celkem třináct kolon, z toho 10 kolon s plně porézními částicemi o velikosti 1,7 nebo 1,8  $\mu\text{m}$  a 3 kolony s povrchově porézními částicemi o velikosti 2,6 nebo 2,7  $\mu\text{m}$ . Na každé koloně byly vždy testovány organické modifikátory metanol bez aditiva, metanol s 10 mM mravenčanem amonným a metanol s 10 mM amoniakem. Na získaných chromatogramech byla hodnocena zejména separace jednotlivých látek a tvar píků. Dávkovány byly vždy 2  $\mu\text{l}$  směsi ochratoxinů o koncentraci 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , testování bylo provedeno v negativním módu. Při testování kolon Acquity UPLC BEH Shield RP18 a Acquity UPC Torus 1-AA bylo pro vysoký tlak v systému nutno snížit BPR na 1700 psi a gradient na maximum 40 % organického modifikátoru. V případě kolony Acquity UPLC BEH Amide bylo nutné snížit BPR na 1700 psi a průtok mobilní fáze na 1,0 ml/min při zachování gradientu.

#### 4.8.3 Optimalizace parametrů iontového zdroje

Analýzy byly provedeny analogicky jako u UHPLC v 4.7.2. Koncentrace byla 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pro OTC a 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pro ostatní ochratoxiny, nástřik byl 2  $\mu\text{l}$ . Pro měření byla použita kolona Acquity UPLC BEH Amide.

#### **4.8.4 Optimalizace složení přídavné kapaliny**

Screening byl proveden v módu SRM. Testováno bylo celkem osm kapalin, čistý etanol a metanol a metanol s aditivy: s 2 % přídavkem vody, s 5 % přídavkem vody, s 10 mM mravenčanem amonným, s 10 mM octanem amonným, s 10 mM amoniakem, s 10 mM kyselinou mravenčí. Provedeny byly vždy tři nástřiky, z nichž byla výsledná hodnota získána průměrem. Opakovatelnost nástřiku byla ověřena pomocí relativní směrodatné odchylky.

#### **4.8.5 Optimalizace složení organického modifikátoru**

Optimalizace byla provedena pro organický modifikátor metanol čistý a s 5 různými aditivy: 10mM mravenčanem amonným, 10mM mravenčanem amonným s přídavkem 1% H<sub>2</sub>O, 10mM mravenčanem amonným s přídavkem 2 % vody, 10mM kyselinou mravenčí a 10mM amoniakem. Měření bylo provedeno v negativním módu s roztokem o koncentraci 1 µg/ml pro OTA a OTC a 3 µg/ml pro OTB a OTα s nástřikem 2 µl a v pozitivním módu s roztokem o koncentraci 30 µg/ml pro OTA, OTB a OTα a 3 µg/ml pro OTC s nástřikem 3 µl. Provedeny byly vždy tři nástřiky, z nichž byla výsledná hodnota získána průměrem. Opakovatelnost nástřiku byla ověřena pomocí relativní směrodatné odchylky.

#### **4.8.6 Kalibrační závislost**

Kalibrační závislost byla měřena jako v 4.7.4. Maximální koncentrace byla 1000 ng/ml v případě obou ionizačních módů.

## 5. Výsledky a diskuse

### 5.1 Vývoj UHPLC–MS metody

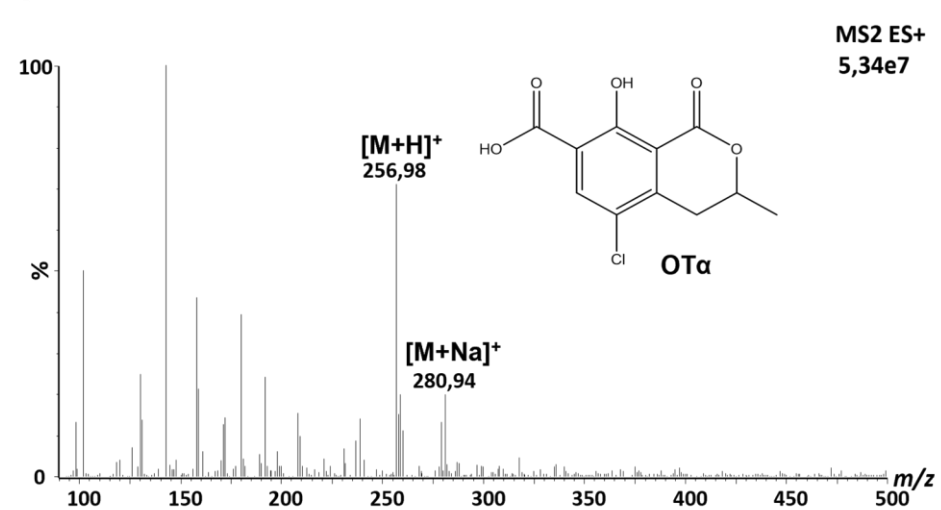
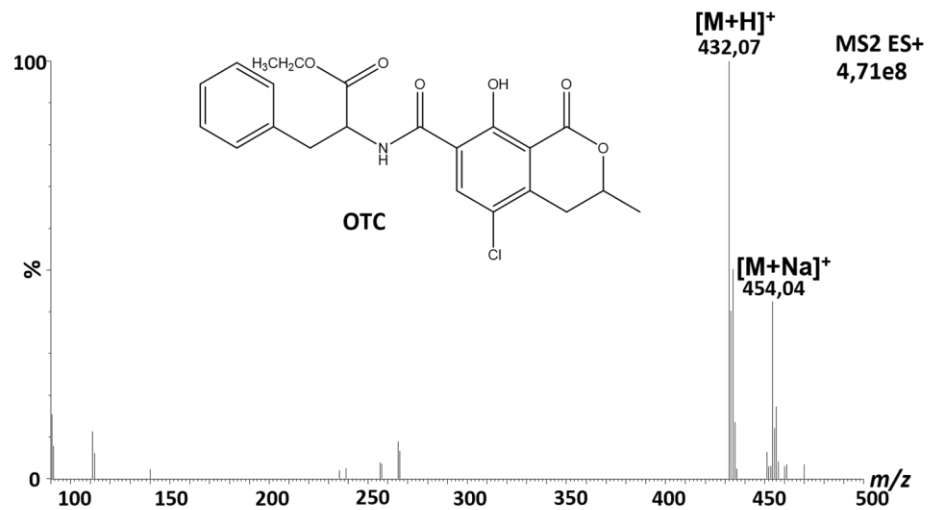
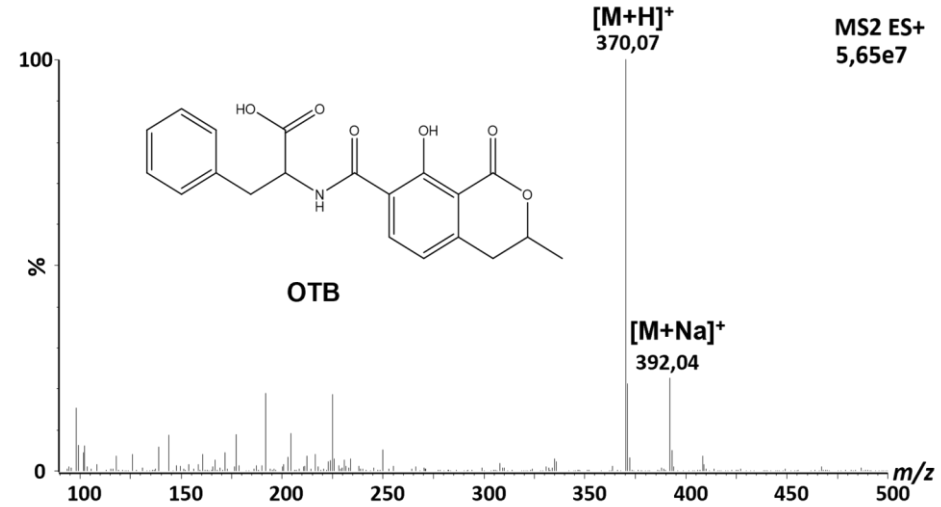
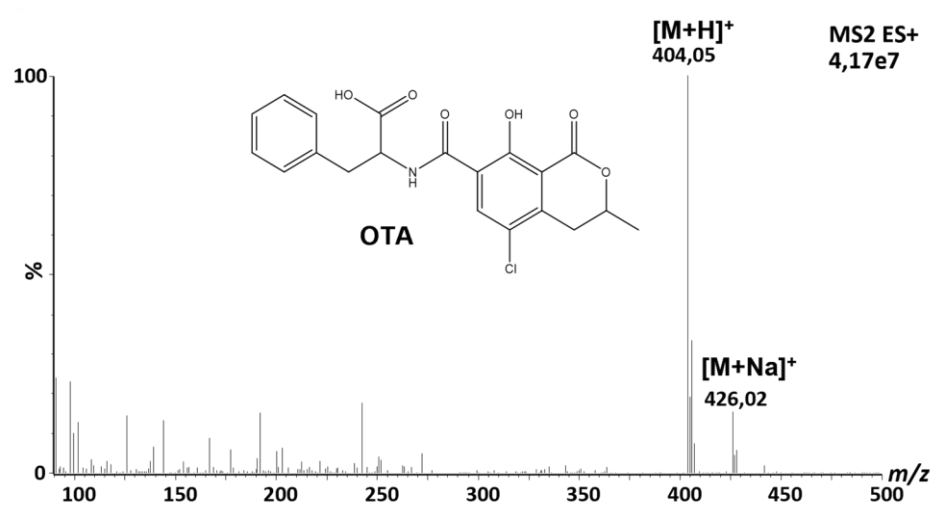
#### 5.1.1 MS sken

Prvním krokem pro vývoj metody bylo provedení MS skenu v rozsahu 90 až 500 Da, tedy pokrývající rozmezí hodnot měřených analytů. Skenování bylo provedeno v pozitivním i negativním módu. Při měření směsi ochratoxinů byly získány jednotlivé hmoty naměřené přístrojem. Získané hodnoty jsou shrnuty v Tab. 7. Nástřikem každé látky jednotlivě byly potvrzeny retenční časy jednotlivých analytů a ověřena čistota standardů. Po ověření byla extrahována spektra jednotlivých látek, ta jsou zobrazena na Obr. 8 a Obr. 9.

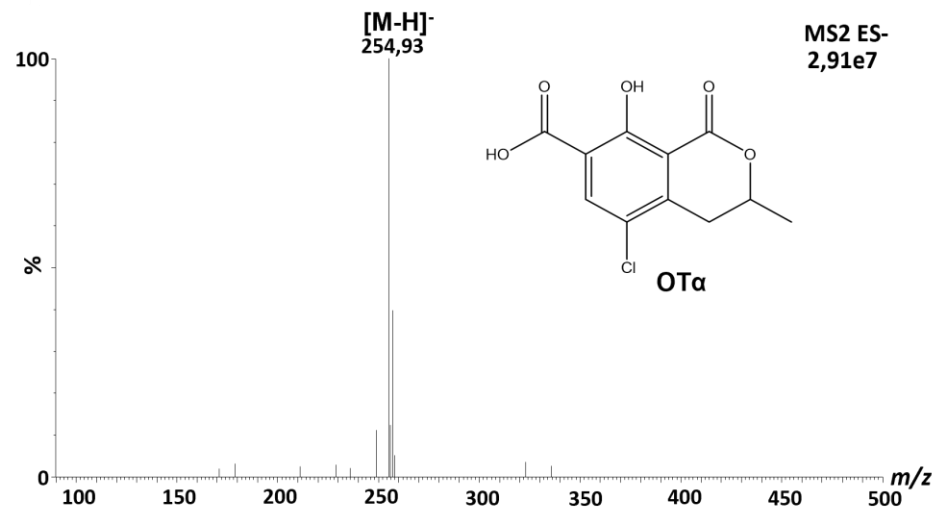
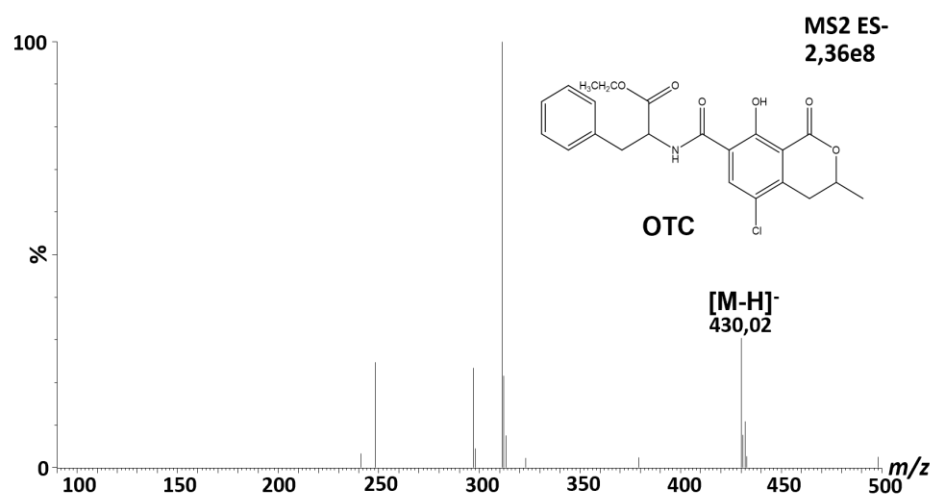
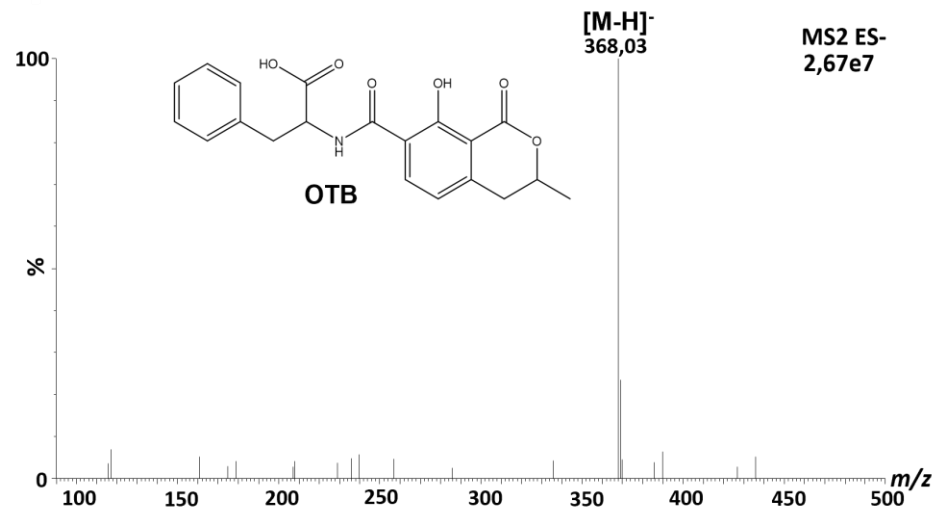
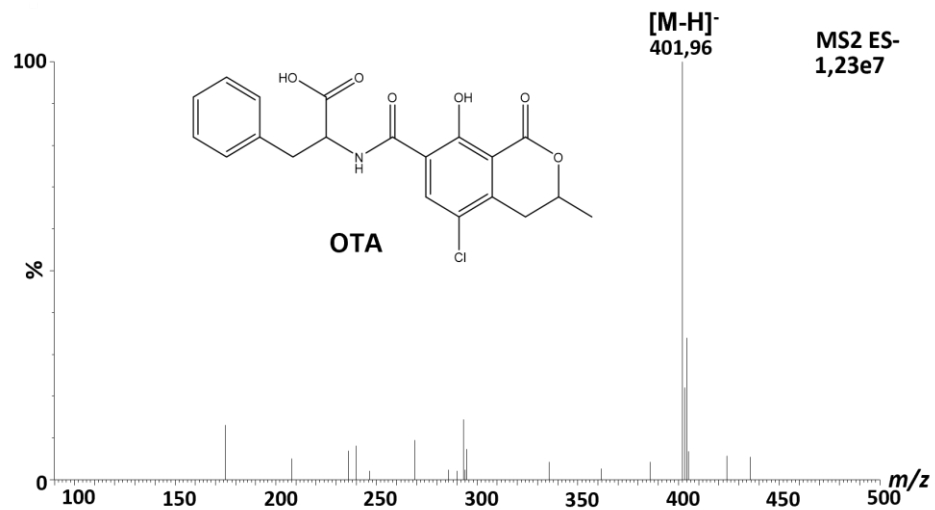
Generické podmínky chromatografické separace byly vybrány na základě LC metod nalezených v literatuře, jednalo se o běžné, univerzální podmínky v UHPLC-MS v systému reverzních fází. Z hlediska ionizace byly přítomny a také převládaly ve všech případech protonované molekuly v záznamu kladných iontů nebo deprotonované molekuly v záznamu záporných iontů, tedy molekulové ionty snadno využitelné pro další analýzu či kvantifikaci. V pozitivním módu byly u všech analytů patrné také adukty se sodíkem. Jejich intenzita byla však nižší oproti molekulovým iontům. Při nástřiku roztoku standardu ochratoxinu C bylo v důsledku nízké odezvy nutno zvýšit koncentraci na 10 µg/ml oproti 1 µg/ml u ostatních ochratoxinů. Příčinou mohla být nižší schopnost ionizace této látky. Standard OTC byl také kontaminovaný OTA, s odezvou pro tento analyt výrazně převyšující odezvu pro OTC. Chromatogramy čistých standardů s extrahovanými iontovými proudy jednotlivých ochratoxinů jsou uvedeny na Obr. 10.

**Tab. 7:** Naměřené hodnoty  $m/z$  v pozitivním a negativním módu pro jednotlivé ochratoxiny a retenční časy získané při generických podmínkách LC separace.

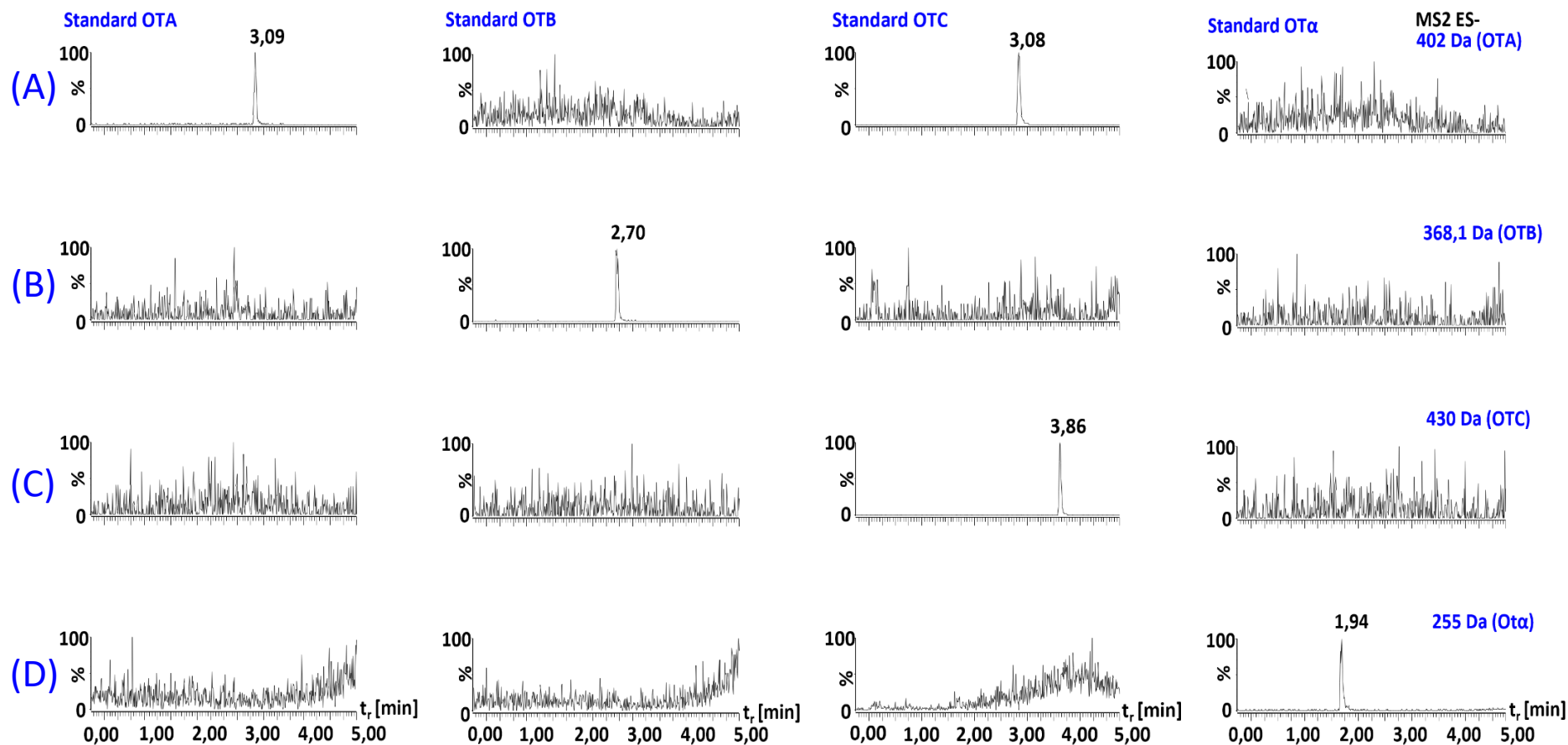
pořadí	analyt	teoretická [M+H] <sup>+</sup>	naměřená [M+H] <sup>+</sup>	teoretická [M-H] <sup>-</sup>	naměřená [M-H] <sup>-</sup>	retenční čas
1.	OTA	404,09	404,04	402,08	401,98	3,07
2.	OTB	370,13	370,08	368,11	368,03	2,71
3.	OTC	432,12	432,05	430,11	430,02	3,87
4.	OT $\alpha$	257,02	256,99	255,01	254,91	1,92



Obr. 8: MS spektra pro jednotlivé ochratoxiny v pozitivním módu s vyznačenými ionty a adukty.



**Obr. 9:** MS spektra pro jednotlivé ochratoxiny v negativním módu s vyznačenými ionty.



**Obr. 10:** Chromatogramy čistých standardů, při každém standardu byly extrahované iontové proudy při molekulových hmotnostech odpovídajících  $[M-H]^-$  jednotlivých ochratoxinů pro ověření čistoty standardů. Řádek A odpovídá proudu pro OTA, B pro OTB, C pro OTC a D pro OT $\alpha$ . Při standardu ochratoxinu C je patrná kontaminace ochratoxinem A.

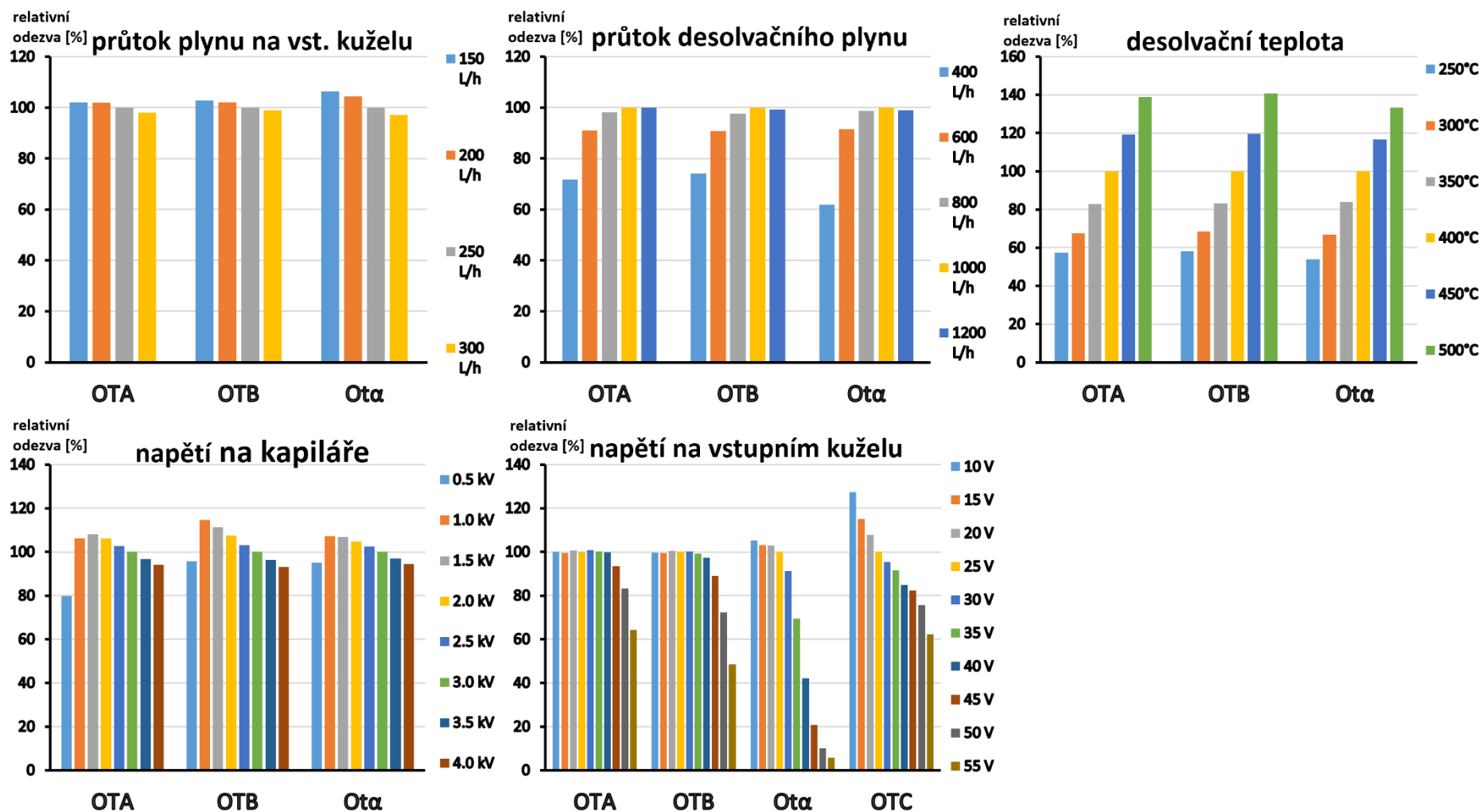
### 5.1.2 Optimalizace parametrů iontového zdroje

Pro optimalizaci bylo využito hodnot  $m/z$  získaných z MS skenu. Měření probíhalo v selektivním módu SIM. Měření všech parametrů bylo provedeno se směsí standardů OTA, OTB a OT $\alpha$ . Standard OTC byl získán později, ale protože látky jsou si značně strukturně podobné, byl pro tento standard optimalizován pouze parametr napětí na vstupním kuželu. Optimalizace byla u všech látek provedena jak v negativním, tak v pozitivním módu, a to ve shodném rozsahu dle Tab. 8.

Jednoznačné výsledky byly získány u desolvační teploty, kdy odezva všech analytů stoupala v přímé řadě a vybrána tak byla nejvyšší optimalizovaná hodnota, tedy 500 °C. Obdobný průběh byl pozorován pro průtok desolvačního plynu, u kterého se ale u posledních dvou hodnot odezva stabilizovala, a tudíž byla použita druhá nejvyšší hodnota 1000 L/h. Vliv průtoku plynu na vstupním kuželu byl slabý a vybrána byla nejnižší hodnota 150 L/h. Optimalizace napětí na kapiláře přinesla mírně odlišné výsledky pro jednotlivé analyty, byl tedy zvolen kompromis, který zachoval co nejvyšší odezvu pro všechny analyty společně. Zvolena byla hodnota 1,5 kV pro oba ionizační módy. Optimální hodnota individuálního parametru napětí na vstupním kuželu byla vybrána pro každý analyt zvlášť. Rozsahy testovaných parametrů a vybrané hodnoty jsou uvedeny v Tab. 8. Grafy znázorňující vliv jednotlivých parametrů v obou módech jsou zobrazeny na Obr. 11 a Obr. 12.

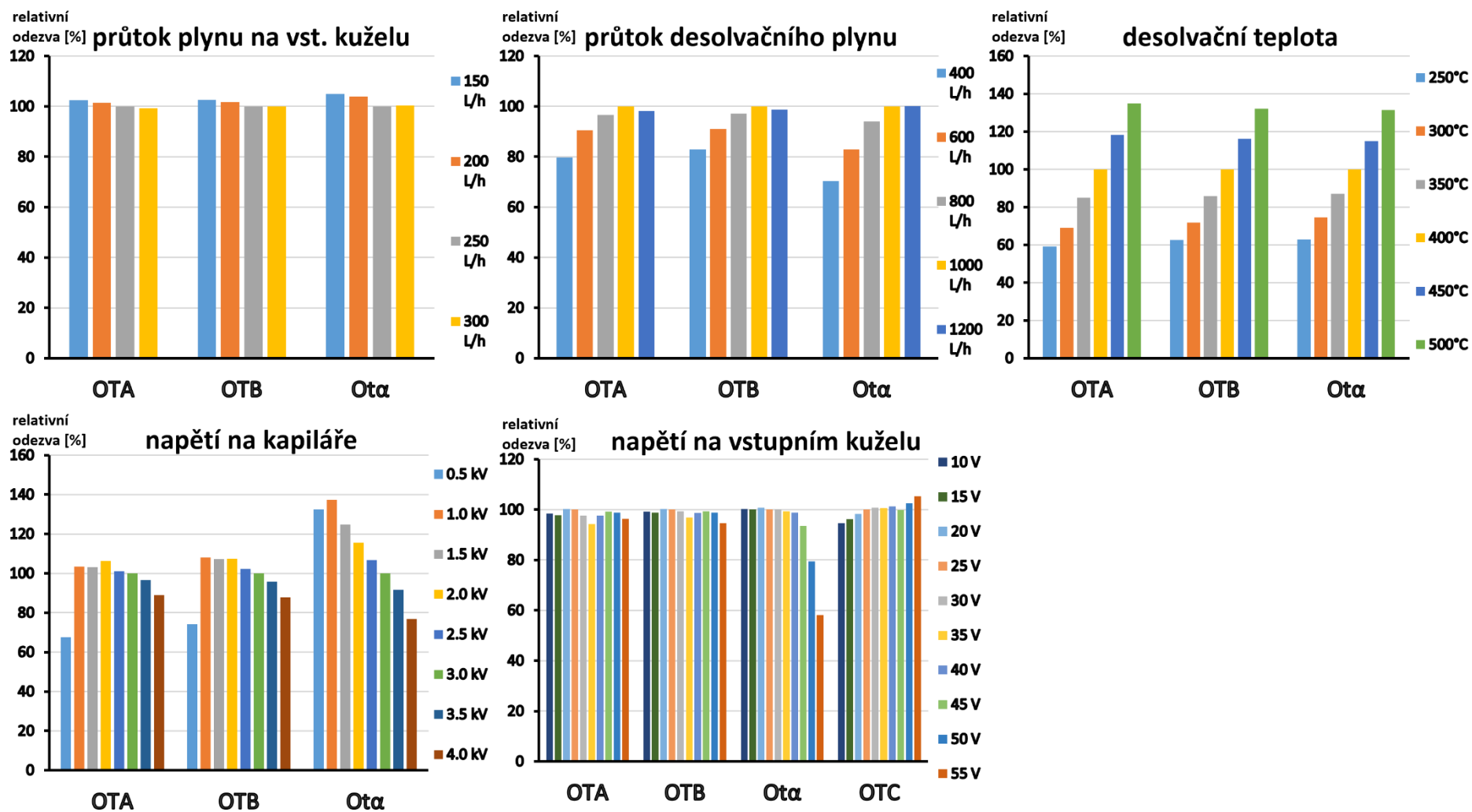
**Tab. 8:** Rozsah testovaných parametrů při optimalizaci nastavení iontového zdroje a vybrané finální hodnoty.

mód	parametr	rozsah	finální hodnota
+	napětí na vst. kuželu:	10–55 V	25 V (OTA, OTB), 15 V (OTC), 20 V (OT $\alpha$ )
	napětí na kapiláře:	0,5–4,0 kV	1,5 kV
	desolvační teplota:	250–500 °C	500 °C
	průtok desolvačního plynu:	400–1200 L/h	1000 L/h
	průtok plynu na vst. kuželu:	150–300 L/h	150 L/h
-	napětí na vst. kuželu:	10–55 V	25 V (OTA, OTB), 30 V (OTC), 20 V (OT $\alpha$ )
	napětí na kapiláře:	0,5–4,0 kV	1,5 kV
	desolvační teplota:	250–500 °C	500 °C
	průtok desolvačního plynu:	400–1200 L/h	1000 L/h
	průtok plynu na vst. kuželu:	150–300 L/h	150 L/h



**Obr. 11:** Relativní odezva analytů při změně parametrů optimalizovaných v pozitivním módu při UHPLC podmínkách. Hodnoty byly vztaženy na odezvu při průtoku plynu na vstupním kuželu 250 L/h, průtoku desolvačního plynu 1000 L/h, desolvační teplotě 400 °C, napětí na kapiláře 3,0 kV a napětí na vstupním kuželu 25 V.





**Ob. 12:** Relativní odezva analytů při změně parametrů optimalizovaných v negativním módu při UHPLC podmínkách. Hodnoty byly vztaženy na odezvu při průtoku plynu na vstupním kuželu 250 L/h, průtoku desolvačního plynu 1000 L/h, desolvační teplotě 400 °C, napětí na kapiláře 3,0 kV a napětí na vstupním kuželu 25 V.

### 5.1.3 Sken produktových iontů a optimalizace kolizní energie

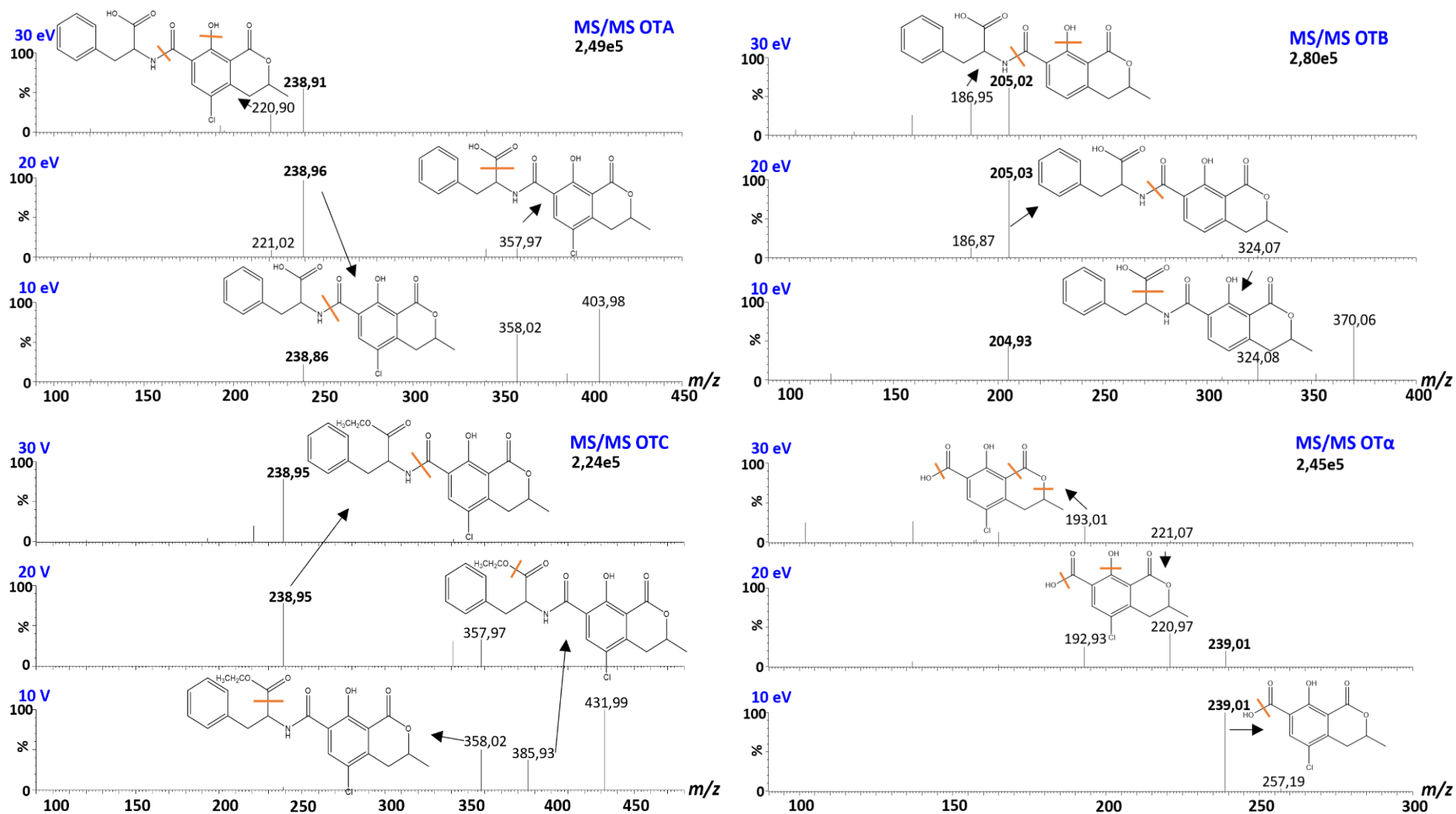
Cílem tohoto experimentu bylo získat informace o fragmentaci látek a o poměrném zastoupení jednotlivých fragmentů. Skenování bylo provedeno při třech různých hodnotách kolizní energie, 10, 20 a 30 eV. Spektra produktových iontů jsou uvedena na Obr. 13 a Obr. 14. Po porovnání intenzit jednotlivých fragmentů byly následně vybrány tři fragmenty s nejvyšší odezvou. Při srovnatelné odezvě byla přednost udělena fragmentu o vyšší molekulové hmotnosti. Následné experimenty pro optimalizaci už byly provedeny v SRM pro tři jednotlivé přechody pro každou látku, dle Tab. 9 a Tab. 10. Do grafů na Obr. 15 a Obr. 16 byly zadány plochy jednotlivých píků v absolutních hodnotách, aby bylo možné srovnávat v rámci měnící se kolizní energie i v rámci jednotlivých přechodů. Výsledkem byl jeden přechod pro každou látku se svojí hodnotou kolizní energie, při které poskytoval nejvyšší odpověď přístroje ze všech.

**Tab. 9:** Shrnutí jednotlivých fragmentů využitých pro optimalizaci SRM přechodů a kolizní energie v pozitivním ionizačním módu.

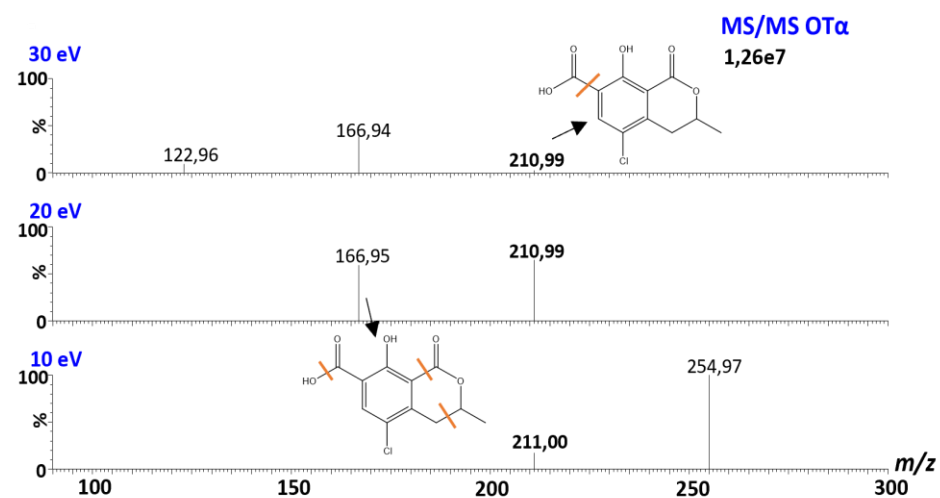
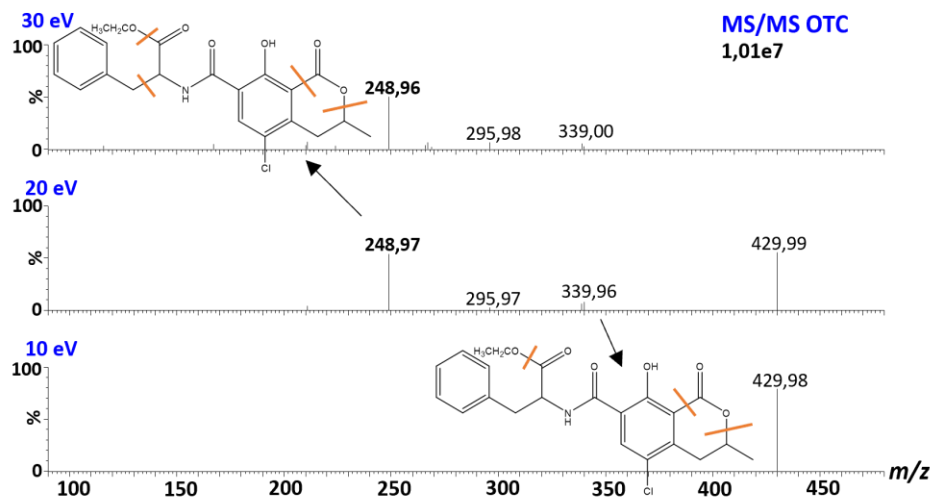
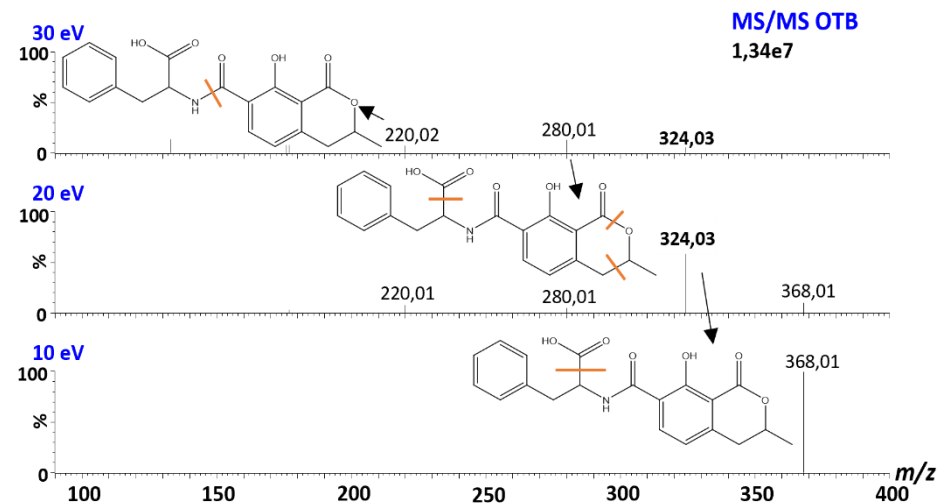
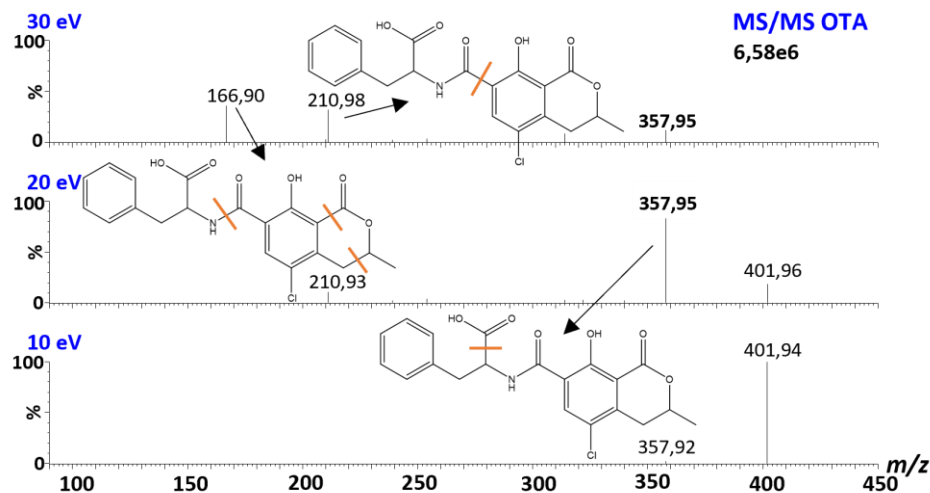
pořadí	analyt	naměřená [M+H] <sup>+</sup>	fragment 1	fragment 2	fragment 3	napětí na vst. kuželu [V]
1.	OTA	404,04	358,0	239,0	221,0	25
2.	OTB	370,08	205,0	324,1	187,0	25
3.	OTC	432,05	238,95	357,99	285,96	15
4.	OT $\alpha$	256,99	239,0	221,0	193,0	20

**Tab. 10:** Shrnutí jednotlivých fragmentů využitých pro optimalizaci SRM přechodů a kolizní energie v negativním ionizačním módu.

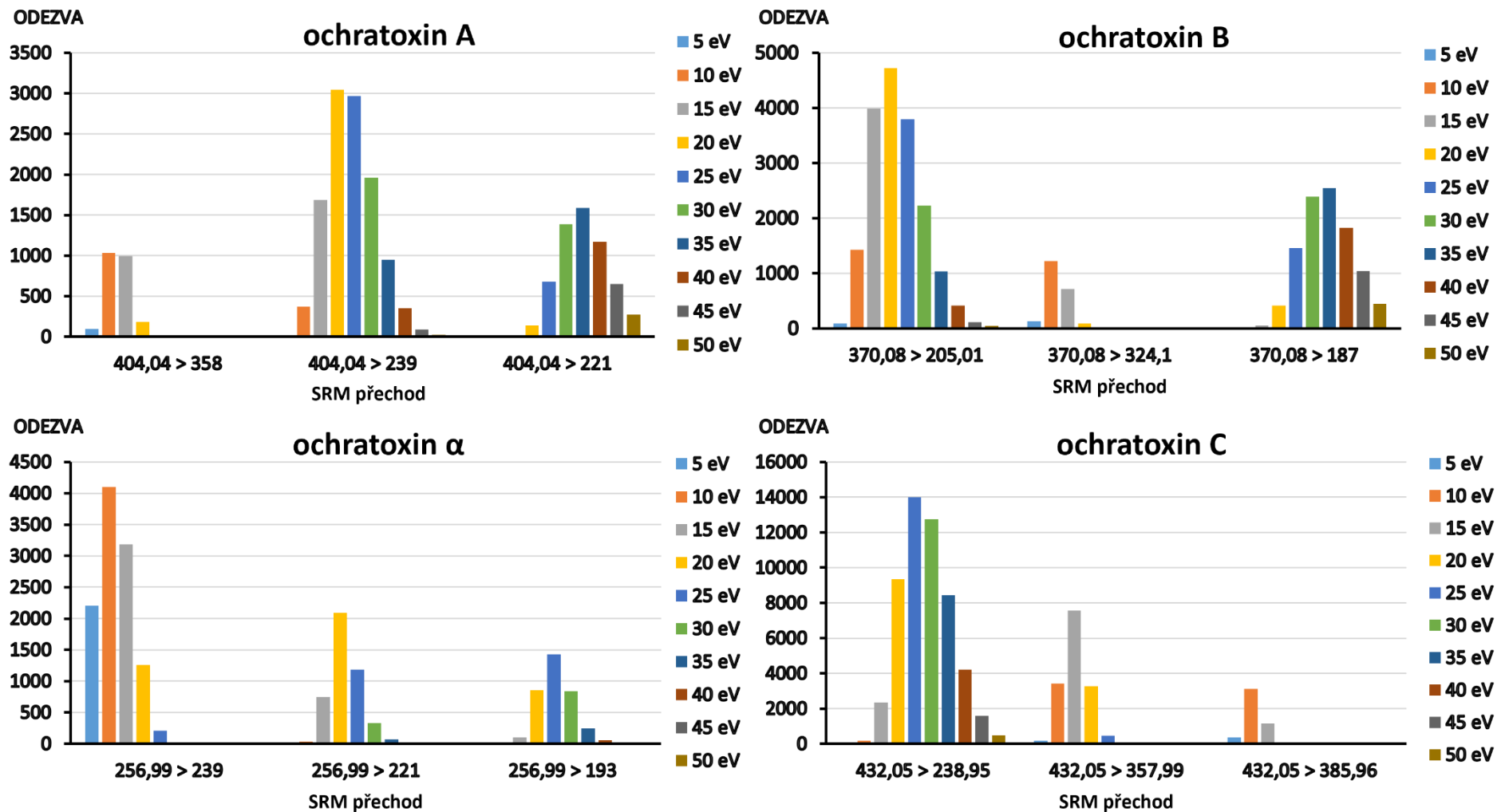
pořadí	analyt	naměřená [M+H] <sup>+</sup>	fragment 1	fragment 2	fragment 3	napětí na vst. kuželu [V]
1.	OTA	401,98	358,0	211,0	166,9	25
2.	OTB	368,03	324,0	280,0	220,0	25
3.	OTC	430,02	248,97	339,95	295,98	30
4.	OT $\alpha$	254,91	211,0	166,9	122,9	20



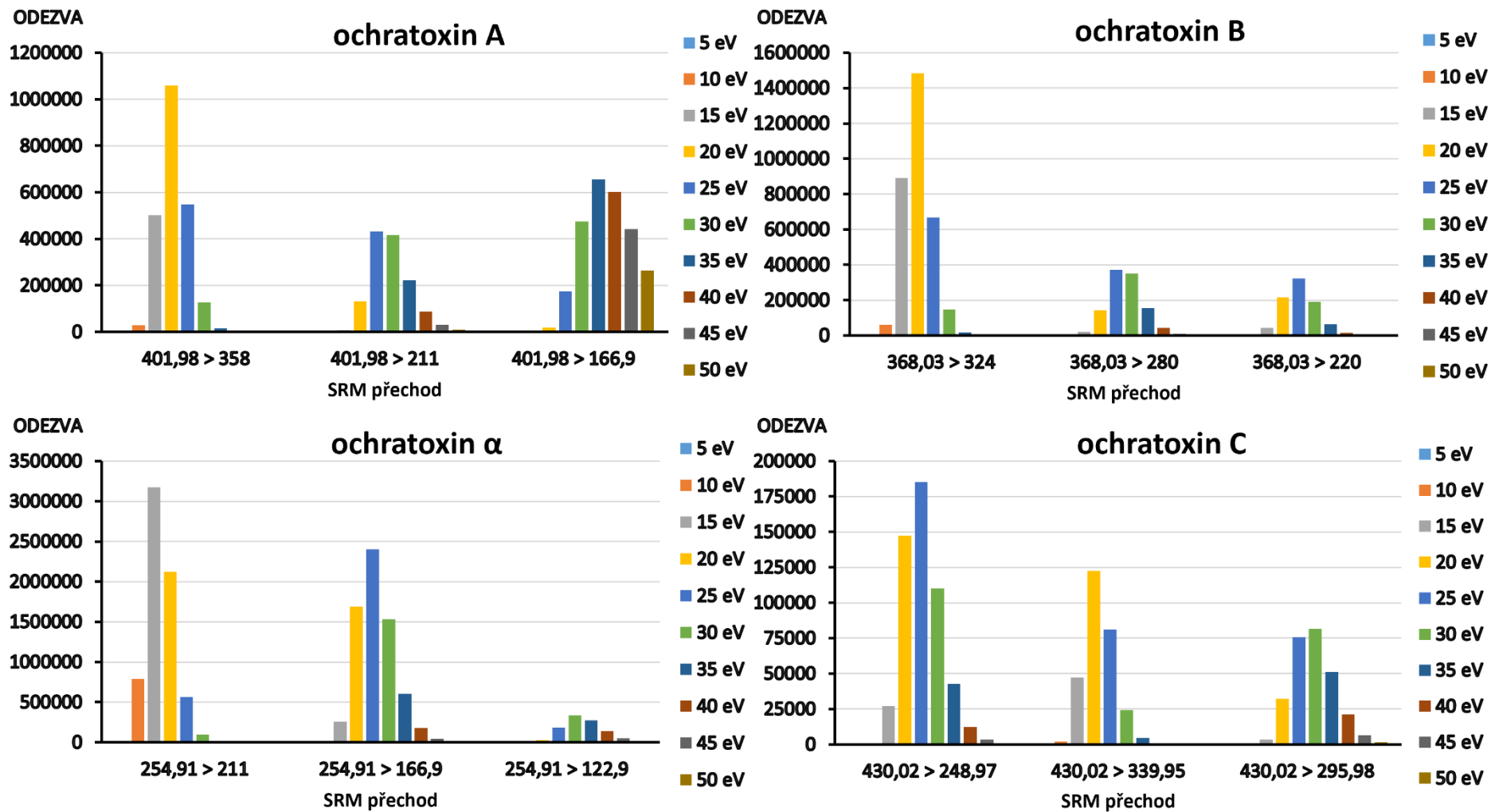
**Obř. 13:** Spektra produktů ionů pro jednotlivé látky při třech různých hodnotách kolizní energie v pozitivním módu. Fragmentace je naznačena červenou čárou. Fragmety byly identifikovány s pomocí vyhodnocovacího programu UNIFI a [60].



**Obr. 14:** Spektra produktových iontů pro jednotlivé látky při třech různých hodnotách kolizní energie v negativním módu. Fragmentace je naznačena červenou čarou. Fragmenty byly identifikovány s pomocí vyhodnocovacího programu UNIFI a [61].



**Obr. 15:** Srovnání absolutních hodnot průměrné plochy píků reprezentující tři různé přechody pro každý analyt při různých kolizních energiích, v pozitivním ionizačním módu. Z grafu byl vybrán jeden konkrétní SRM přechod při konkrétní ionizační energii s nejvyšší plochou pro každou látku.



**Obr. 16:** Srovnání absolutních hodnot průměrné plochy píků reprezentující tři různé přechody pro každý analyt při různých kolizních energiích, v negativním ionizačním módu. Z grafu byl vybrán jeden konkrétní SRM přechod při konkrétní ionizační energii s nejvyšší plochou pro každou látku.

### 5.1.4 Výsledné SRM přechody

Finální SRM přechody s kolizní energií a napětím na vstupním kuželu jsou uvedeny v Tab. 11 a Tab. 12.

**Tab. 11:** SRM přechody jednotlivých ochratoxinů v pozitivním módu.

pořadí	analyt	naměřená [M+H] <sup>+</sup>	vybraný fragment	kolizní energie [eV]	napětí na vst. kuželu [V]
1.	OTA	404,04	239,0	20	25
2.	OTB	370,08	205,01	20	25
3.	OTC	432,05	238,95	25	15
4.	OT $\alpha$	256,99	239,0	10	20

**Tab. 12:** SRM přechody jednotlivých ochratoxinů v negativním módu.

pořadí	analyt	naměřená [M-H] <sup>-</sup>	vybraný fragment	kolizní energie [eV]	napětí na vst. kuželu [V]
1.	OTA	401,98	358,0	25	20
2.	OTB	368,03	324,0	25	20
3.	OTC	430,02	248,97	30	25
4.	OT $\alpha$	254,91	211,0	20	15

### 5.1.5 Optimalizace složení mobilní fáze

Vývoj chromatografické metody byl omezen na optimalizaci aditiv mobilní fáze, protože již při generických podmínkách došlo k dostatečné separaci látek a píky byly úzké a relativně symetrické. Cílem bylo tedy pouze zvýšit MS odezvu. Testována byla aditiva z nejčastěji využívaných v hmotnostní spektrometrii, a to: kyselina mravenčí, octová a amoniak na dvou koncentračních hladinách, přidána do vodné složky mobilní fáze. Organickou složkou byl acetonitril, který poskytl vhodnou selektivitu separace a je silným elučním činidlem. Díky nízké viskozitě navíc umožnil vyšší separační účinnost a

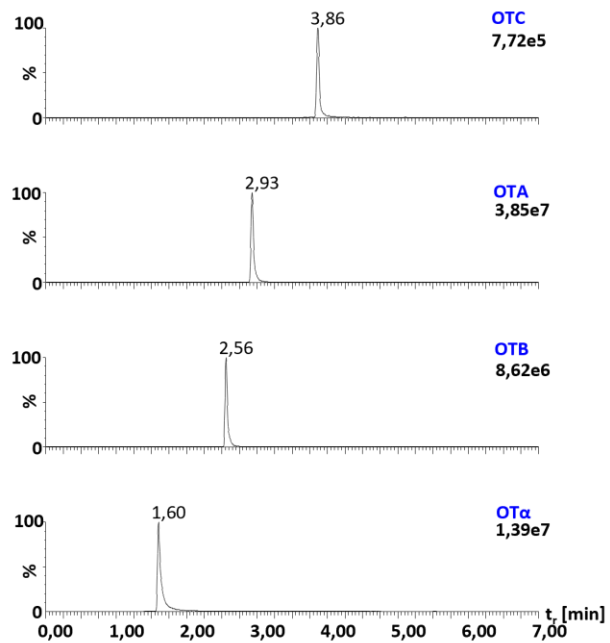
užší píky dle van Deemterovy teorie. Měření bylo provedeno v pozitivním i negativním módu. Jednotlivé módy byly měřeny zvlášť v rámci jednoho dne pro zachování porovnatelnosti odezvy, vzhledem k nižší robustnosti hmotnostní spektrometrie, ve srovnání např. s UV/Vis detekcí. Experimenty probíhaly v módu SRM.

Změna aditiva mobilní fáze se ukázala jako komplikovaná, zejména z kyselého na bazické a naopak. Klasická ekvilibrace kolony trvající 10 minut při výměně aditiva nestačila a bylo nutné ji rozšířit na alespoň 15 minut. V opačném případě docházelo k nižší opakovatelnosti odezvy, která byla monitorována s využitím relativní směrodatné odchylky z tří měření. Při hodnotách převyšujících 10 % byla měření opakována.

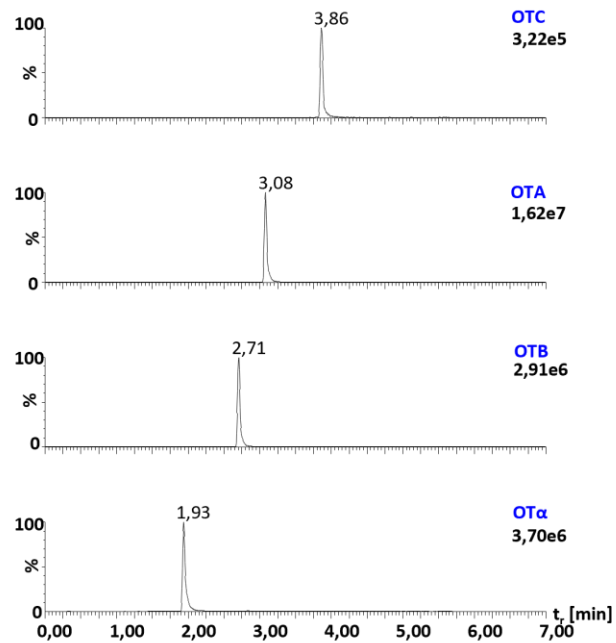
V průběhu měření došlo, v případě mobilní fáze s amoniakem, ke ztrátě selektivity separace. OTA a OTB byly eluovány dříve než původně první  $OT\alpha$ . Příčinou byla pravděpodobně ionizace kyselých analytů v bazickém prostředí. Při využití mobilní fáze s kyselinou octovou oproti kyselině mravenčí pořadí látek zůstalo zachováno, došlo pouze k mírnému posunu retenčních časů jednotlivých látek směrem k chromatografickému počátku. Stejně malé rozdíly byly patrné na chromatogramu v případě změny koncentrace aditiva, což platilo pro všechna tři aditiva. Chromatogramy při použití různých aditiv jsou srovnány na Obr. 17. Zásadní rozdíl mezi plochami píků v jednotlivých módech se projevil při použití amoniaku. Zatímco v pozitivním módu došlo k zesílení odezvy jednotlivých analytů s výjimkou  $OT\alpha$ , kde zůstala stejná, v negativním módu došlo k výraznému poklesu odezvy oproti původní kyselině mravenčí. U všech aditiv v obou módech obecně platila výhoda méně koncentrované mobilní fáze (0,01 %) oproti koncentrovanější (0,1 %). Grafy závislosti relativní odezvy na použitém aditivu jsou znázorněny na Obr. 18 a Obr. 19. V obou módech došlo k získání nejvyšší odezvy při využití kyseliny octové v koncentraci 0,01 % jako aditiva ve vodné složce mobilní fáze.



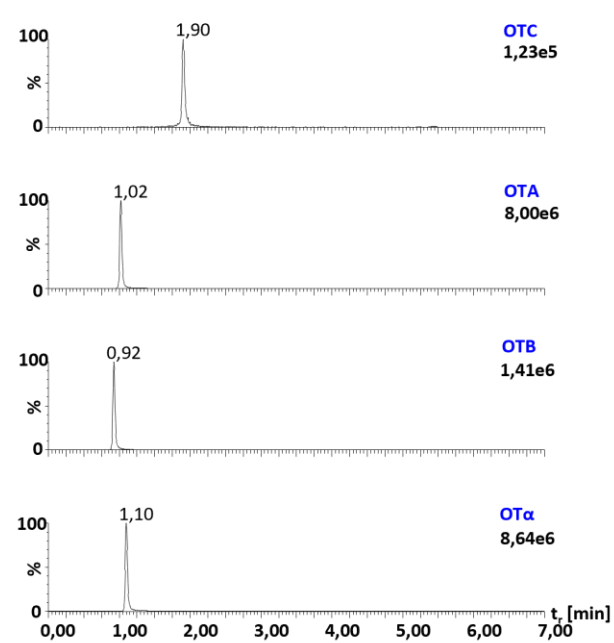
AcA 0,01%



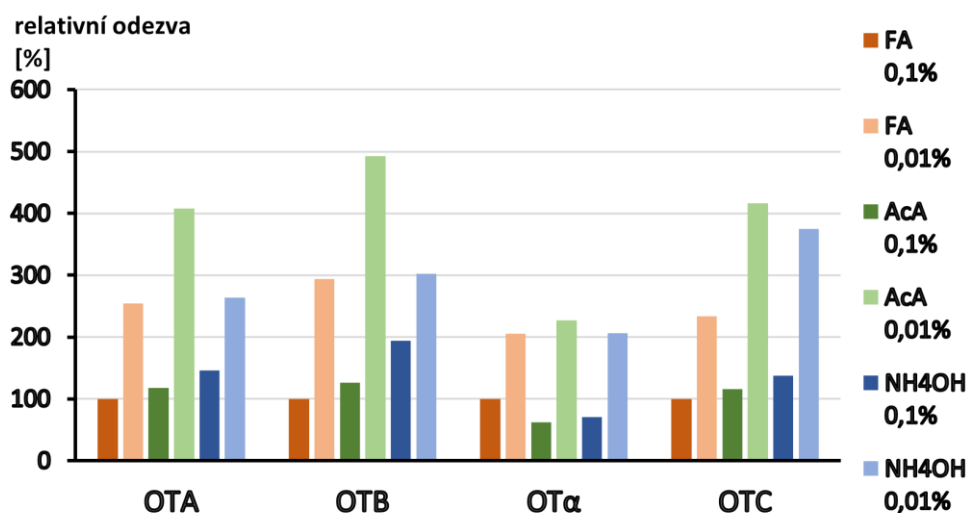
FA 0,1%



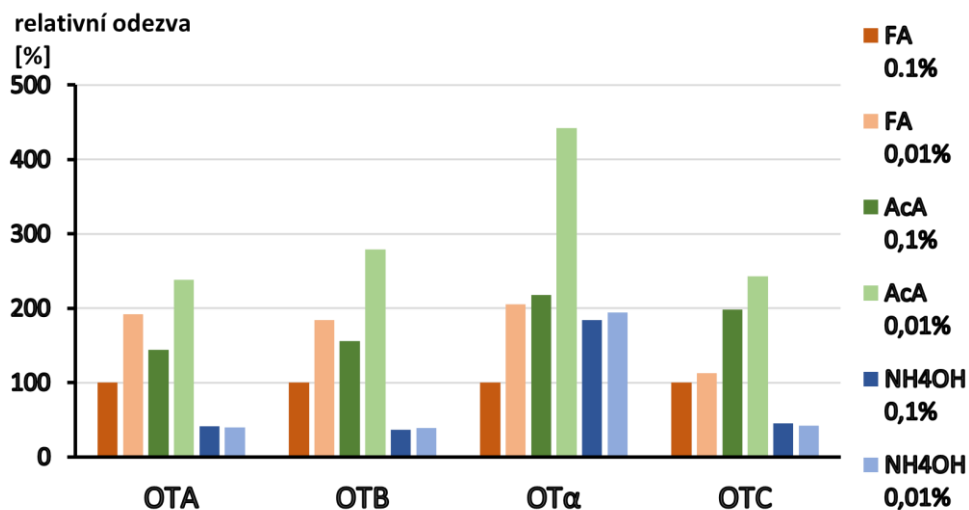
NH<sub>4</sub>OH 0,1%



**Ob. 17:** Chromatografická separace ochratoxinů s přidavkem jednotlivých aditiv při UHPLC podmínkách. Píky jsou úzké s mírnou úrovní chvostování. Při použití amoniaku došlo ke ztrátě selektivity separace. Pro ukázkou byla při každém aditivu vybrána koncentrace s lepšími výsledky.



**Obr. 18:** Vliv aditiv mobilní fáze na relativní odezvu látek v pozitivním módu při UHPLC podmínkách, vztaženo na odezvu při FA 0,1%.



**Obr. 19:** Vliv aditiv mobilní fáze na relativní odezvu látek v negativním módu při UHPLC podmínkách, vztaženo na odezvu při FA 0,1%.

### 5.1.6 Kalibrační závislost a opakovatelnost UHPLC-MS/MS metody

Kalibrační závislost byla měřena v rozsahu 0,001 ng/ml až 1000 ng/ml v pozitivním módu a 0,001 ng/ml až 100 ng/ml v negativním módu vzhledem k vyšší odezvě v negativním módu u předchozích měření. V rámci obou módů byl za poslední nástřik nejvyšší koncentrace zařazen slepý vzorek pro výpočet procentuální hodnoty přenosu analytů. Pro výslednou kalibraci bylo vyzkoušeno několik typů kalibračních závislostí. Jako optimální byla zvolena vážená kalibrace (1/x) pro OTA v negativním módu, v ostatních případech byla zvolena nevážená kalibrace s funkcí přirozeného logaritmu ln.

U všech tři analytů byl získán nižší limit kvantifikace v negativním ionizačním módu a to 0,05 ng/ml pro OTA, 0,02 ng/ml pro OTB a 0,1 ng/ml pro OT $\alpha$ . V pozitivním módu byly spodní limity kvantifikace 1 ng/ml pro OTA 0,5 ng/ml pro OTB a 2 ng/ml pro OT $\alpha$ . Korelační koeficient kalibračních křivek byl ve všech případech vyšší než 0,999. Nejvyšší hodnota přenosu byla 0,22 % v případě OTB v pozitivním módu. V Tab. 13 a Tab. 14 jsou uvedeny parametry kalibračních závislostí v jednotlivých módech.

Na základě výsledků kalibrační závislosti byly pro každý mód vybrány 3 koncentrační hladiny v oblasti nízké, střední a vysoké koncentrace v kalibračním rozmezí a to: 2, 20 a 200 ng/ml pro pozitivní mód a 0,5, 5 a 50 ng/ml pro negativní mód a při každé koncentraci byla měřena opakovatelnost nástřiku. RSD ploch píků byly nejvyšší pro nejnižší koncentrace, jak se dalo očekávat, vzhledem k nižším absolutním hodnotám samotných ploch. Nejvyšší hodnota byla 4,35 %. Požadavek Evropské lékové agentury na validaci bioanalytických metod je maximálně 15 %, což ale zahrnuje i metodu úpravy vzorku [62]. Výsledky měření opakovatelnosti jsou uvedeny v Tab. 15.

**Tab. 13:** Parametry kalibrační křivky pro jednotlivé ochratoxiny v pozitivním módu v UHPLC podmínkách.

pozitivní mód						
analyt	LLOQ [ng/ml]	ULOQ [ng/ml]	funkce	rovnice přímky	korelační koeficient	přenos [%]
OTA	1	500	ln	1,04068x+6,6569	0,99975	0,08
OTB	0,5	500	ln	1,04537x+7,2923	0,99988	0,22
OT $\alpha$	2	1000	ln	1,0505x+6,1895	0,99983	0,10

**Tab. 14:** Parametry kalibrační křivky pro jednotlivé ochratoxiny v negativním módu v UHPLC podmínkách.

negativní mód						
analyt	LLOQ [ng/ml]	ULOQ [ng/ml]	funkce	rovnice přímky	korelační koeficient	přenos [%]
OTA	0,05	100	Váha 1/x	8775,42x+99,5181	0,99986	0,14
OTB	0,02	100	ln	0,989529x+9,4505	0,99991	0,16
OT $\alpha$	0,1	100	ln	0,998933x+9,2333	0,99984	0,07

**Tab. 15:** Výsledky měření opakovatelnosti nástřiku pro jednotlivé analyty a koncentrační hladiny v obou módech.

ionizační mód	koncentrační hladina [ng/ml]	analyt	RSD t <sub>r</sub> [%]	RSD odezvy [%]
pozitivní	2	OTA	0,00	2,52
		OTB	0,20	2,80
		OT $\alpha$	0,18	4,35
	20	OTA	0,00	3,07
		OTB	0,16	1,33
		OT $\alpha$	0,24	2,73
	200	OTA	0,00	0,94
		OTB	0,18	1,31
		OT $\alpha$	0,27	1,15
negativní	0,5	OTA	0,00	1,67
		OTB	0,00	1,20
		OT $\alpha$	0,24	2,50
	5	OTA	0,00	0,91
		OTB	0,00	0,69
		OT $\alpha$	0,29	0,90
	50	OTA	0,00	0,67
		OTB	0,00	0,98
		OT $\alpha$	0,27	0,68

## 5.2 Vývoj UHPSFC–MS metody

Protože byl použit stejný hmotnostní spektrometr, mohly být podmínky optimalizace SRM přechodů převzaty z vyvinuté UHPLC-MS/MS metody. Provedena byla pouze optimalizace parametrů iontového zdroje, kvůli odlišným vlastnostem mobilní fáze.

### 5.2.1 Screening stacionárních fází

Protože v SFC není k dispozici univerzální stacionární fáze jako v případě HPLC na reverzních fázích, byl proveden screening stacionárních fází. Testováno bylo celkem 13 kolon. Na každé bylo provedeno testování se třemi různými organickými modifikátory. Podmínky analýzy odpovídaly generickým podmínkám s využitím SRM přechodů z LC metody. Screening byl proveden v negativním módu kvůli vyšší citlivosti.

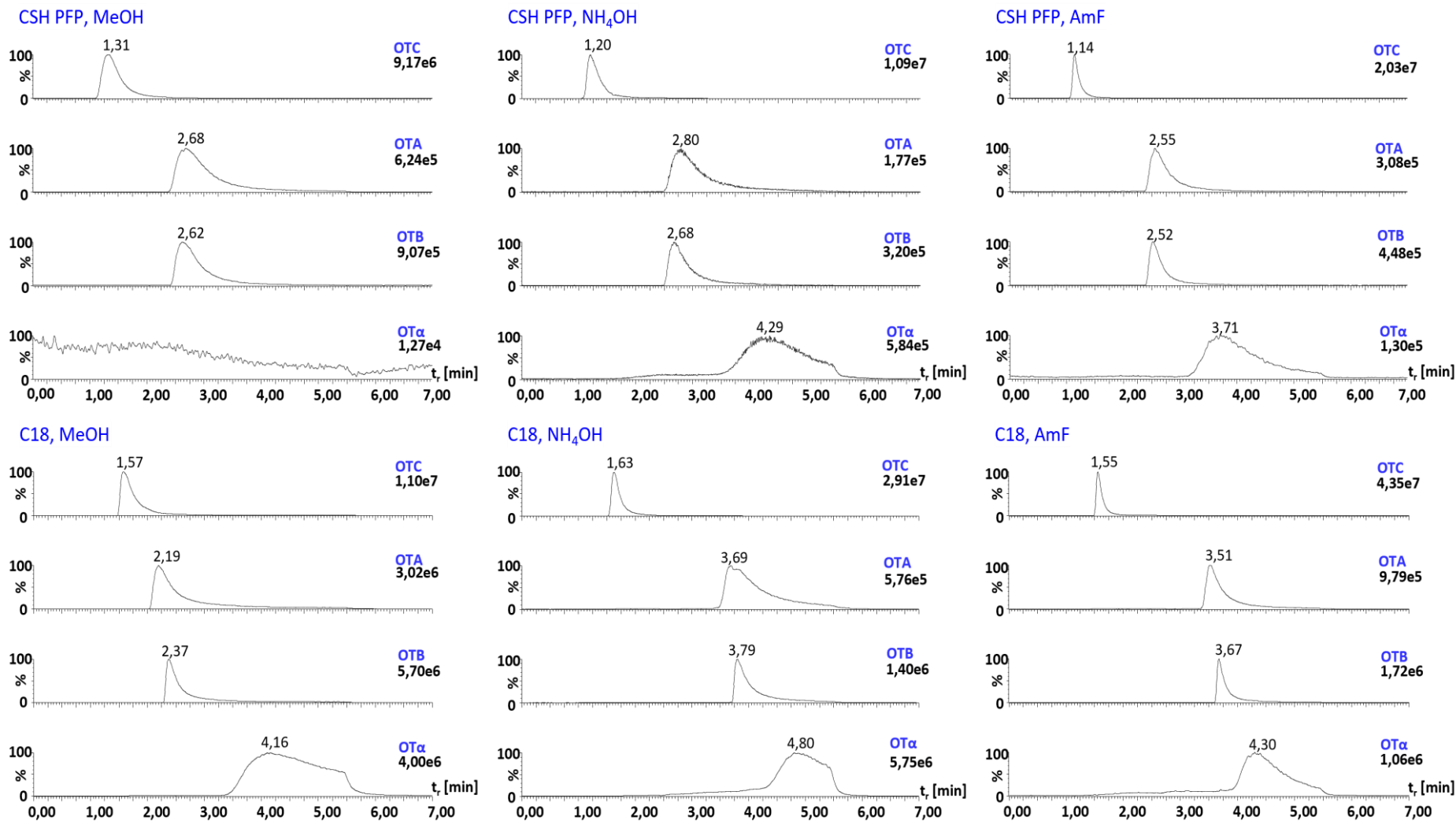
Na základě selektivity separace a tvaru píků výsledných chromatogramů byly kolony rozděleny do tří skupin, které jsou shrnuty v Tab. 16. Do skupiny jedna byly zařazeny kolony s nejhoršími tvary píků a separací látek, do skupiny dvě pak kolony s nedostatečnou separací kritického páru OTA a OTB. Tyto dvě látky jsou strukturně velmi podobné a často u nich docházelo ke koeluci. Tři kolony s nejlepšími vlastnostmi pro analýzu ochratoxinů v rámci screeningu byly zařazeny do skupiny tři. Z jednotlivých skupin byl vybrán jeden nebo dva příklady chromatogramů.

Skupina číslo jedna zahrnovala největší počet kolon ze všech skupin, tedy osm a to: Viridis HSS C18, Viridis BEH 2-EP, Cosmocore Cholester, CORTECS HILIC, Acquity UPC<sup>2</sup> CSH Fluoro-Phenyl, Acquity UPLC BEH Shield RP18, Acquity UPC<sup>2</sup> Torus 1-AA a Torus DEA.

První skupina se vyznačovala nejproblematičtější separací, docházelo zde k výraznému zadržování látek na koloně a píky byly velmi rozmyté. Nástřiky často nebyly opakovatelné. Nejvíce to bylo patrné u ochratoxinu alfa. Separace kritického páru ochratoxinu A a ochratoxinu B v tomto případě nebyla sledovatelná, protože píky byly příliš rozmyté a docházelo k přenosům. Výjimku tvořila kolona Torus DEA v případě použití 10 mM AmF jako aditiva. Chromatogramy pro kolony Acquity UPC<sup>2</sup> CSH Fluoro-Phenyl a Viridis HSS C18 ze skupiny jedna jsou uvedeny na Obr. 20.

**Tab. 16:** Shrnutí výsledků separace analytů na jednotlivých kolonách s rozdělením kolon do 3 skupin.

skupina	kolony	separace kritického páru OTA a OTB			tvary píků												
		MeOH	10 mM AmF	10 mM NH <sub>4</sub> OH	MeOH				10 mM AmF				10 mM NH <sub>4</sub> OH				
					OTA	OTB	OTC	OT $\alpha$	OTA	OTB	OTC	OT $\alpha$	OTA	OTB	OTC	OT $\alpha$	
1	Viridis HSS C18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
	Viridis BEH 2-EP		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Acquity UPC <sup>2</sup> Torus 1-AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Acquity UPC <sup>2</sup> CSH Fluoro-Phenyl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	Torus DEA	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
	Acquity UPLC BEH Shield RP18	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
	CORTECS HILIC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
	Cosmocore Cholester	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
2	Torus Diol	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	Kinetex Biphenyl	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
3	Viridis BEH	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	
	Acquity UPLC BEH Amide	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Acquity UPC <sup>2</sup> Torus 2-PIC	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-



**Obr. 20:** Chromatogramy separace látek s jednotlivými organickými modifikátory pro kolony Acquity UPC<sup>2</sup> CSH Fluoro-Phenyl a Viridis HSS C18 ze skupiny 1.

Druhá skupina zahrnovala pouze dvě kolony a to: Torus Diol a Kinetex Biphenyl. Charakteristikou této skupiny byly píky užšího a symetričtějšího tvaru oproti skupině jedna, problémem nicméně byla koeluce ochratoxinu A a B. Typické to bylo zejména pro první jmenovanou kolonu, která byla testována hned jako první. Píky byly na této koloně velmi úzké a symetrické, zejména pak při použití AmF jako aditiva organického modifikátoru. Navíc byly všechny látky eluovány již před koncem gradientu, což bylo výhodné oproti kolonám ze skupiny tři. Při využití čistého metanolu došlo k rozmytí píku ochratoxinu  $\alpha$ , tak jako u předchozích kolon. Chromatogram při použití kolony Torus Diol je uveden na Obr. 21. Kolona Kinetex Biphenyl přinesla další posun eluce látek směrem k nižším retenčním časům. Problémem byla opět špatná separace kritického páru a také asymetrický pík  $OT\alpha$  u všech aditiv organického modifikátoru.

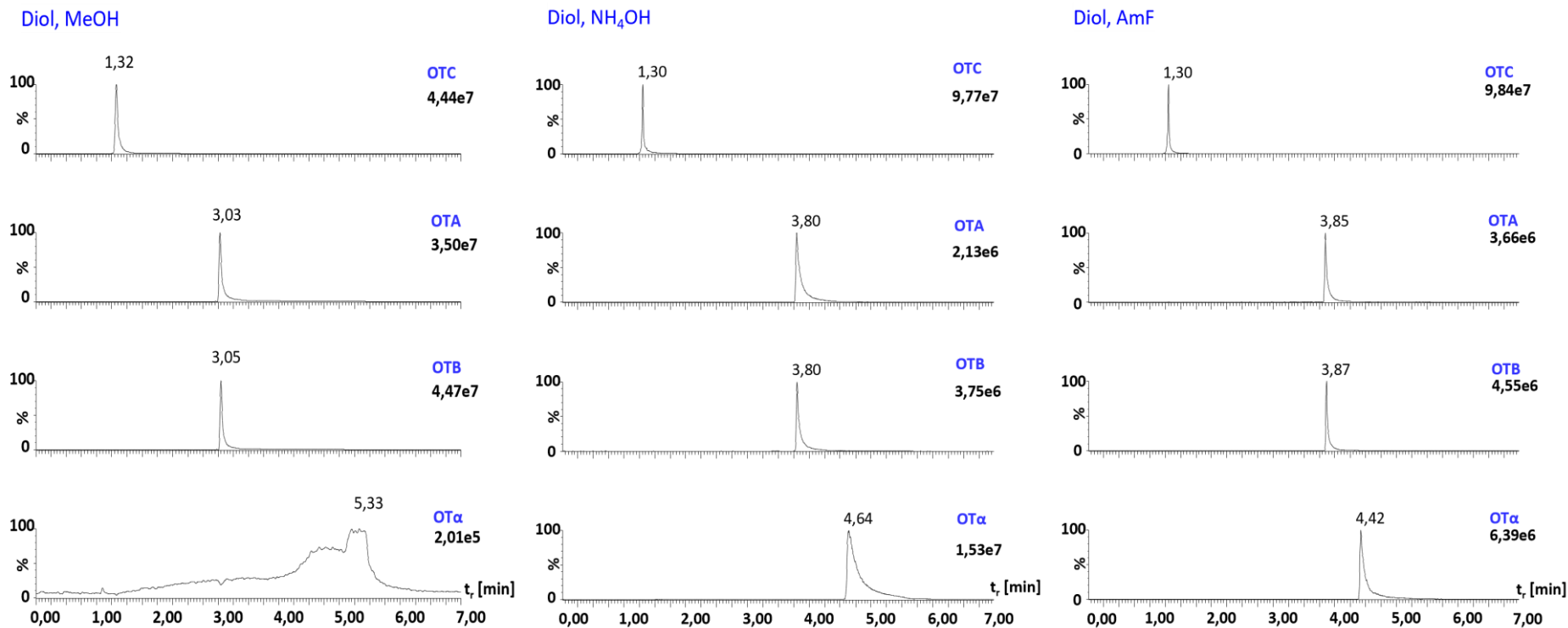
Do skupiny číslo 3 byly zahrnuty tři kolony: Viridis BEH, Acquity UPC<sup>2</sup> Torus 2-PIC a Acquity UPLC BEH Amide. Zde byla dosažena dostatečná separace kritického páru OTA a OTB. Problémem byl opět tvar píku především u  $OT\alpha$  a do jisté míry také OTA.

Kolona Viridis BEH poskytla dostatečnou separaci páru OTA a OTB a tvary píků byly úzké a symetrické, zejména při použití AmF, s opětovnou výjimkou  $OT\alpha$ . Navíc, při použití tohoto modifikátoru docházelo ke koeluci OTB a  $OT\alpha$ .

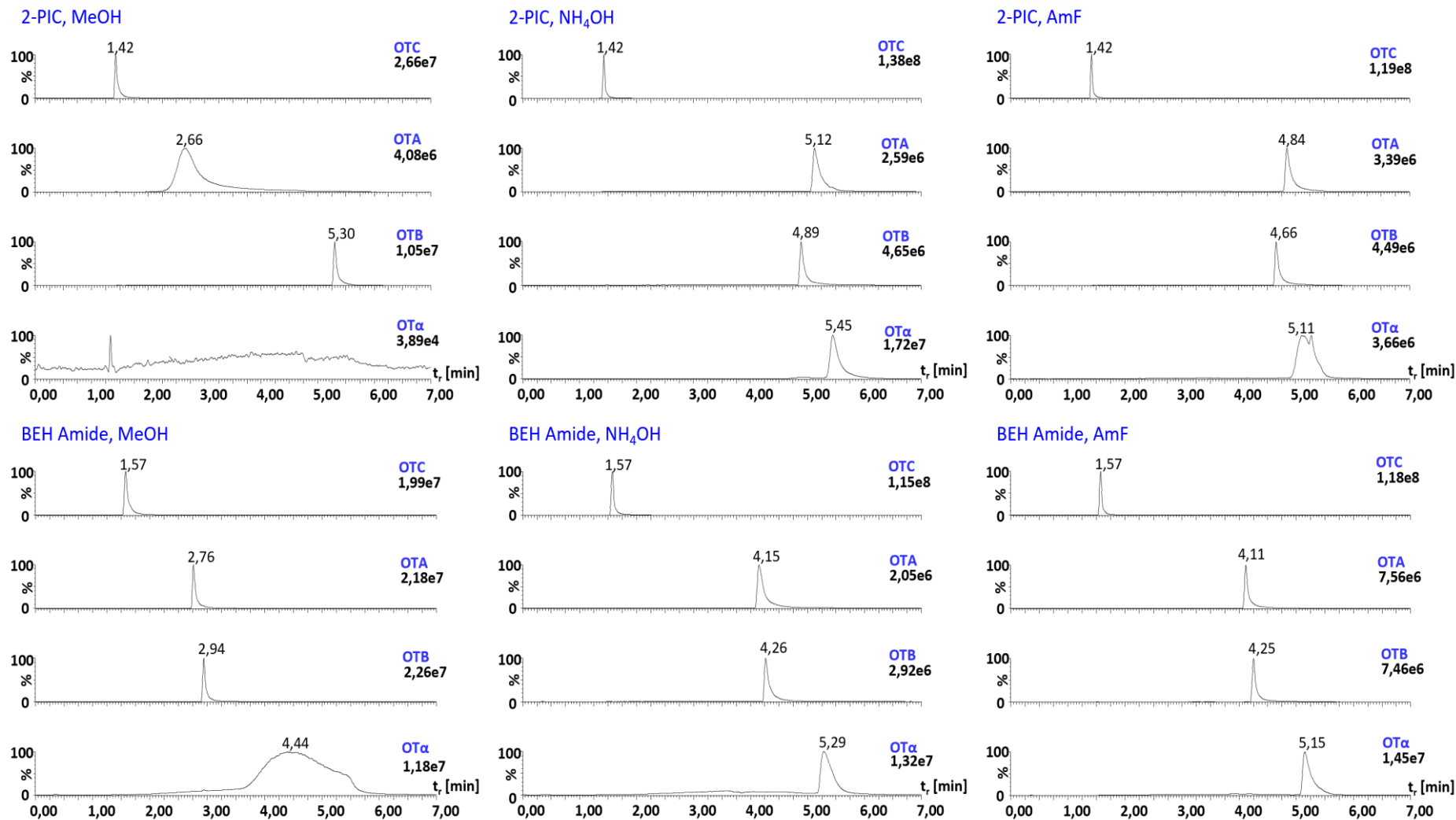
U kolony Acquity UPC<sup>2</sup> Torus 2-PIC nejlepší výsledky poskytovalo aditivum  $NH_4OH$ . Problémem byla zejména pozdní eluce  $OT\alpha$  a OTB při použití tohoto aditiva; zejména u prvního jmenovaného ochratoxinu pak nebyly tvary píků při dvou nástřicích po sobě opakovatelné. Pravděpodobně zde docházelo k nedostatečnému vymytí látky z kolony. Tento problém byl patrný při použití všech aditiv.

Další kolonou ze skupiny 3 byla kolona Acquity UPLC BEH Amide. Na této koloně byla umožněna dostatečná separace všech analytů včetně kritického páru OTA a OTB a tvary píků byly relativně úzké a symetrické. Problémem byla pouze pozdní eluce  $OT\alpha$ , jehož retenční čas se nacházel až za koncem gradientu. Tvar píku se tak vyznačoval chvostováním. Chromatogramy separace látek na kolonách Acquity UPC Torus 2-PIC a Acquity UPLC BEH Amide jsou uvedeny na Obr. 22.





**Obr. 21:** Chromatogramy separace látek s jednotlivými organickými modifikátory pro kolonu Torus Diol ze skupiny 2.



**Ob. 22:** Chromatogramy separace látek s jednotlivými organickými modifikátory pro kolony Acquity UPC<sup>2</sup> Torus 2-PIC a Acquity UPLC BEH Amide ze skupiny 3.

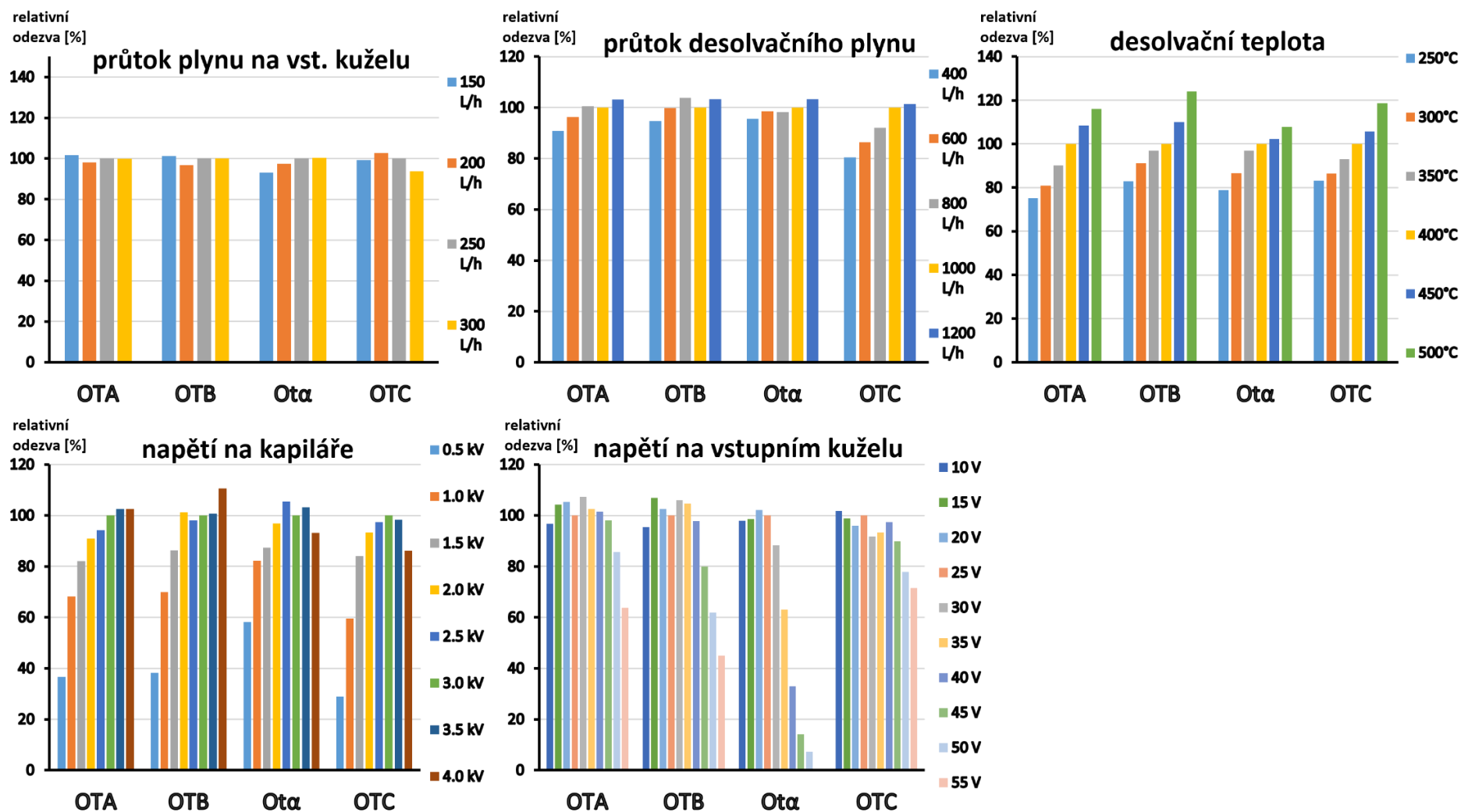
## 5.2.2 Optimalizace parametrů iontového zdroje

Experimenty byly provedeny ekvivalentním způsobem k experimentům provedeným při vývoji LC metody. Využita byla kolona Acquity UPLC BEH Amide, která poskytovala nejlepší výsledky ve srovnání kolon. Organickým modifikátorem byl 10 mM mravenčan amonný v metanolu.

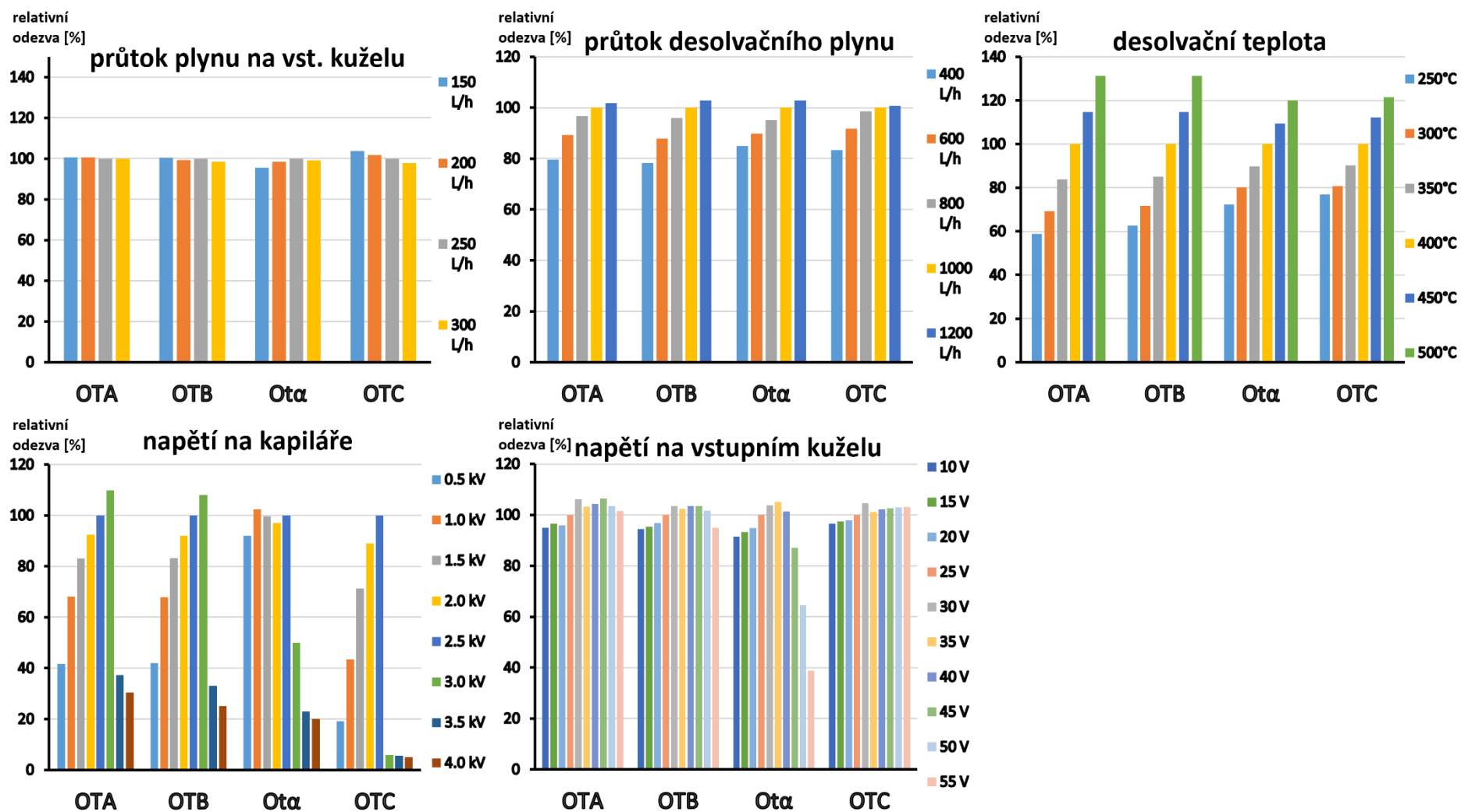
Výsledky pro parametry desolvační teplota, průtok desolvačního plynu a průtok plynu na vstupním kuželu vykazovaly obdobné trendy jako u LC: odezva se u desolvační teploty a u průtoku desolvačního plynu se zvyšující se hodnotou proměnné průběžně zvyšovala, zvoleny byly nejvyšší hodnoty tedy 500 °C pro teplotu a tentokrát 1200 L/h pro průtok plynu. Průtok plynu na vstupním kuželu měl i zde minimální vliv na odezvu analytů a zvolena byla i zde nejnižší hodnota 150 L/h. Při změně napětí na vstupním kuželu byla odezva v pozitivním módu nižší při vyšších hodnotách, zatímco v negativním módu zůstávala stabilní. Dalo by se tedy říci, že chování v jednotlivých módech bylo ve srovnání s kapalinovou chromatografií analogické. Zvolena byla tentokrát jednotná hodnota pro všechny analyty a to 30 V v pozitivním módu a 20 V v negativním módu. Poslední parametr napětí na kapiláře přinesl oproti LC již výraznější změny, průběh závislosti odezvy na parametru měl spíše rostoucí charakter. Pro vyšší opakovatelnost byla zvolena kompromisní hodnota 2,0 kV v obou módech. Rozsahy testovaných parametrů a vybrané hodnoty jsou uvedeny v Tab. 17. Grafy znázorňující vliv jednotlivých parametrů v jednotlivých módech jsou znázorněny na Obr. 23 a Obr. 24.

**Tab. 17:** Rozsah testovaných parametrů při optimalizaci nastavení iontového zdroje a vybrané finální hodnoty v UHPSFC-MS/MS.

mód	parametr	rozsah	finální hodnota
+	napětí na vst. kuželu:	10–55 V	30 V
	napětí na kapiláře:	0,5–4,0 kV	2,0 kV
	desolvační teplota:	250–500 °C	500 °C
	průtok desolvačního plynu:	400–1200 L/h	1200 L/h
	průtok plynu na vst. kuželu:	150–300 L/h	150 L/h
-	napětí na vst. kuželu:	10–55 V	20 V
	napětí na kapiláře:	0,5–4,0 kV	2,0 kV
	desolvační teplota:	250–500 °C	500 °C
	průtok desolvačního plynu:	400–1200 L/h	1200 L/h
	průtok plynu na vst. kuželu:	150–300 L/h	150 L/h



**Obr. 23:** Grafy znázorňující relativní odezvu analytů při změně parametrů optimalizovaných v pozitivním módu při UHPSFC podmínkách. Hodnoty byly vztaženy na odezvu při průtoku plynu na vstupním kuželu 250 L/h, průtoku desolvačního plynu 1000 L/h, desolvační teplotě 400 °C, napětí na kapiláře 3,0 kV a napětí na vstupním kuželu 25 V.

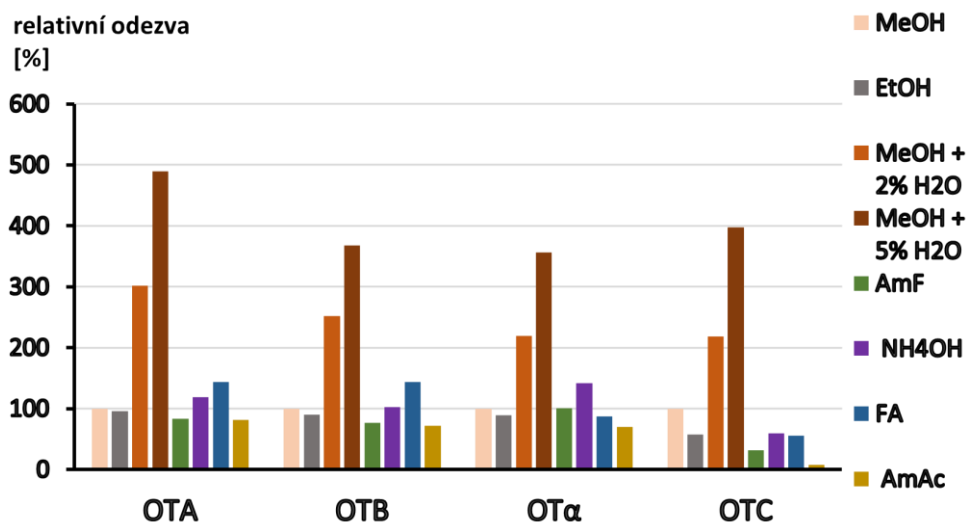


**Obr. 24:** Grafy znázorňující relativní odezvu analytů při změně parametrů optimalizovaných v negativním módu při UHPSFC podmínkách. Hodnoty byly vztaženy na odezvu při průtoku plynu na vstupním kuželu 250 L/h, průtoku desolvačního plynu 1000 L/h, desolvační teplotě 400 °C, napětí na kapiláře 3,0 kV a napětí na vstupním kuželu 25 V.

### 5.2.3 Optimalizace složení přídavné kapaliny

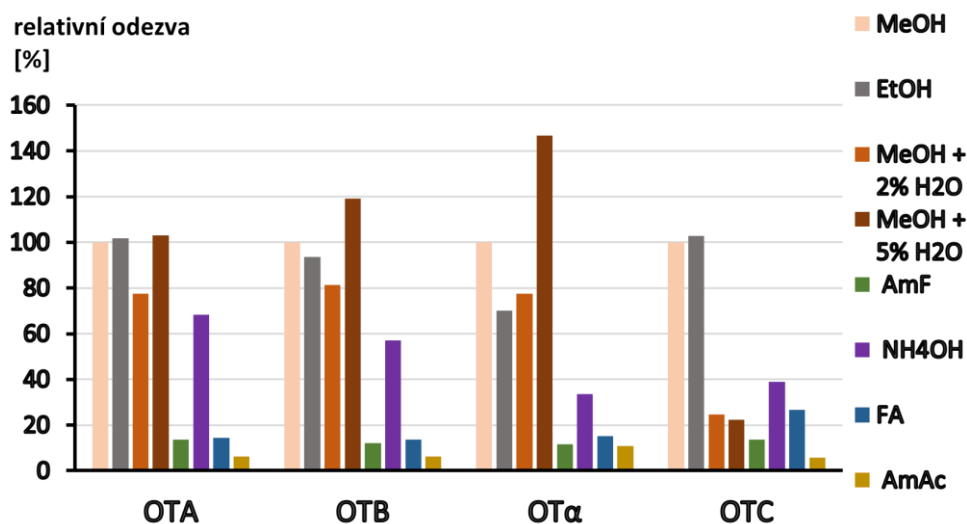
Složení přídavné kapaliny již neovlivní proces separace analytů ani tvar píků. Vliv tohoto parametru působí na proces ionizace v iontovém zdroji a ovlivňuje tak odezvu, a tedy citlivost hmotnostní detekce jednotlivých látek. Optimalizace byla provedena s využitím celkem osmi různých kapalin, a to sedmi kapalin s metanolem, čistým nebo s aditivou kyselého a bazického charakteru, osmou kapalinou byl pak čistý etanol. Vyzkoušen byl také přídavek vody v čistém metanolu. Samozřejmostí byla kompatibilita všech aditiv s MS systémem. Měření bylo provedeno zvláště pro pozitivní i negativní mód, a to vždy v rámci jednoho dne pro maximalizaci srovnatelnosti odpovědí přístroje pro jednotlivá aditiva.

V pozitivním módu byly výsledky jednoznačné: se zvyšujícím se přídavkem vody docházelo k výraznému zvyšování odezvy všech analytů bez výjimky. U ostatních kapalin nedošlo k výrazné změně s výjimkou OTC, kde odezva ochratoxinu C výrazně klesala u všech kapalin oproti metanolu. Jako optimální přídavná kapalina byl zvolen metanol s přídavkem 5 % vody. Vliv aditiv na odezvu v pozitivním módu je zobrazen na Obr. 25.



**Obr. 25:** Vliv přídavné kapaliny na relativní odezvu látek v pozitivním módu, vztaženo na odezvu při použití MeOH.

V negativním módu se s přidavkem 5 % vody odezva rovněž zvýšila v případě OTA, OTB a OT $\alpha$ , nicméně došlo k výraznému poklesu v případě OTC. S výjimkou etanolu byl u všech ostatních kapalin patrný výrazný pokles odezvy u všech analytů oproti čistému metanolu. Jako optimální přídavná kapalina byl zvolen 100% metanol. Vliv aditiv na odezvu v negativním módu je zobrazen na Obr. 26.



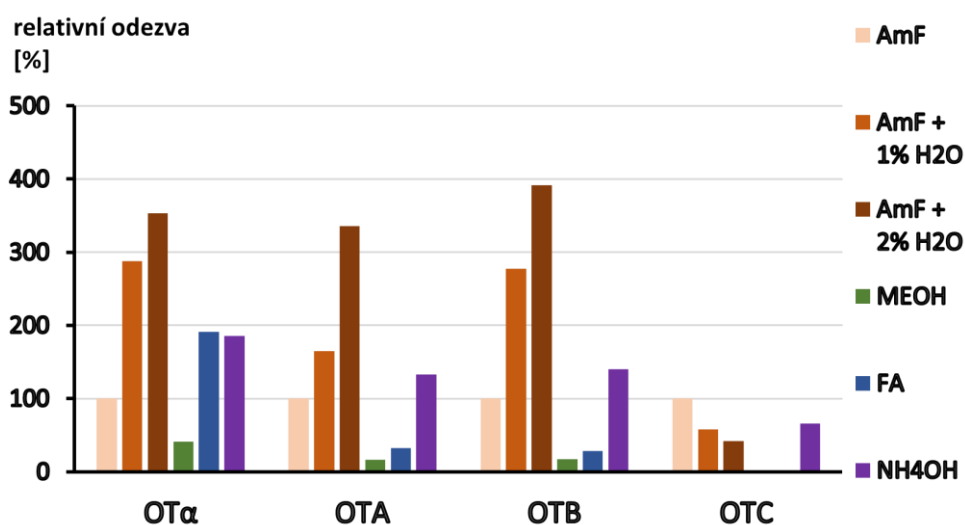
**Obr. 26:** Vliv přídavné kapaliny na relativní odezvu látek v negativním módu, vztaženo na odezvu při použití MeOH.

#### 5.2.4 Optimalizace složení organického modifikátoru

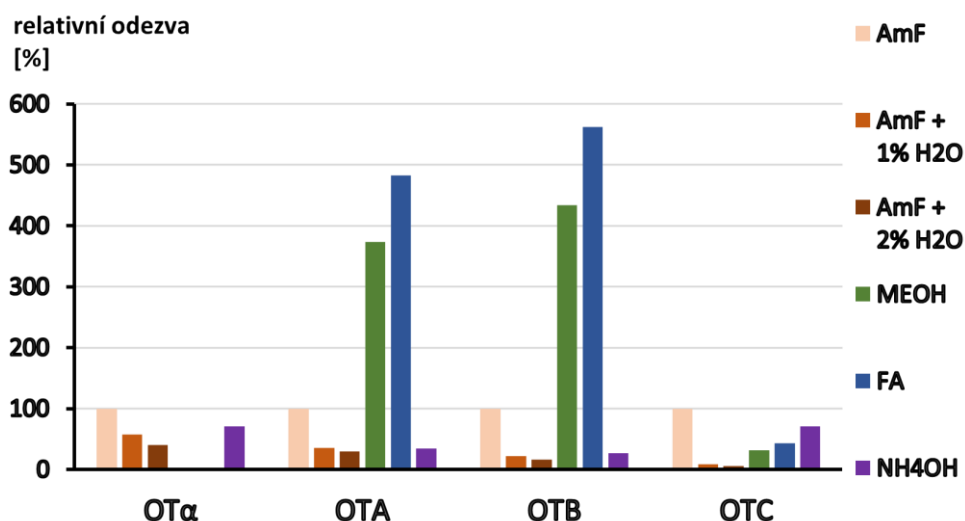
Experimenty probíhaly analogicky k testování složení mobilní fáze v případě LC. Testováno bylo celkem šest organických modifikátorů, základem všech byl metanol, přičemž aditiva byla vybírána ze skupiny kyselin, zásad a solí kompatibilních s hmotnostním spektrometrem. Při využití aditiva mravenčanu amonného, které se v předchozích měřeních jeví jako slibné, byl navíc testován přídavek vody, a to v koncentraci 1 a 2 %. Testování bylo provedeno v pozitivním i negativním módu, vždy v rámci jednoho dne. Jako přídavné kapaliny byly využity kapaliny vybrané podle 5.2.3.

Na rozdíl od LC, se separace látek a tvar píků ukázaly jako problematické. Při použití modifikátorů čistého metanolu a 10 mM kyseliny mravenčí v metanolu došlo k výraznému rozmytí píku ochratoxinu alfa. Proto byla tato aditiva z grafu pro OT $\alpha$  vyřazena. I zde byl problém s nedostatečnou opakovatelností, což vyžadovalo dostatečně dlouhou ekvilibraci kolony.

Jako optimální aditivum organického modifikátoru pro pozitivní mód byl zvolen 10 mM AmF s 2 % přídavkem vody. Alternativou by byl čistý AmF, kvůli lepší odezvě pro OTC, nicméně nebyl zvolen, protože přídavek vody zlepšil separaci kritického páru OTA a OTB. V rámci negativního módu poskytovalo velmi zajímavé výsledky aditivum 10 mM FA, a to zejména pro OTA a OTB. Bohužel toto aditivum nemohlo být použito kvůli zmíněným problémům s OT $\alpha$ . Jako optimální byl zvolen 10 mM AmF bez přídavku vody. Vliv aditiv na relativní odezvu v pozitivním módu je znázorněn na Obr. 27 a v negativním módu na Obr. 28.



**Obr. 27:** Vliv aditiv organického modifikátoru na relativní odezvu látek v pozitivním módu, vztaheno na odezvu při použití AmF.



**Obr. 28:** Vliv aditiv organického modifikátoru na relativní odezvu látek v negativním módu, vztaheno na odezvu při použití AmF.



Výsledky v pozitivním módu ukázaly postupné zvyšování odezvy se zvyšujícím se přidavkem vody. Při dalším vývoji metody by bylo možné dále otestovat přidavky vody s jinými aditivami než jen AmF, a pokusit se vyřešit problém s rozmýváním píku OT $\alpha$ .

### 5.2.5 Kalibrační závislost v UHPSFC-MS/MS

Kalibrační závislost byla měřena ve stejném rozsahu jako při LC metodě, tedy od 0,001 do 1000 ng/ml v obou módech. Zároveň byl určen přenos analytů do slepého vzorku, který následoval po nástřiku maximální koncentrace. Kvůli vysokému přenosu vzorku a také nízké citlivosti metody nebyla stanovena rovnice kalibrační křivky. Byla určena pouze nejnižší detekovatelná hladina (NDH), což byla koncentrace, při níž došlo k alespoň dvojnásobnému nárůstu odezvy oproti předchozí koncentraci nebo slepému vzorku. Menší nárůst odezvy signalizoval pouze přenosy analytu z předchozích nástřiků. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 18.

Jak je patrné z tabulky, výsledný přenos byl velice vysoký, v řádech desítek procent. Z toho důvodu byla nejnižší detekovatelná hladina snížena, protože již v rámci slepého vzorku byly patrné píky analytů a při nízkých koncentracích tak výrazně interferovaly s detekcí. Kvantitativní hodnocení tak bylo zcela znemožněno. Protože metoda poskytovala nedostatečné výsledky pro stanovení ochratoxinů na nízkých koncentračních hladinách, měření opakovatelnosti nebylo provedeno.

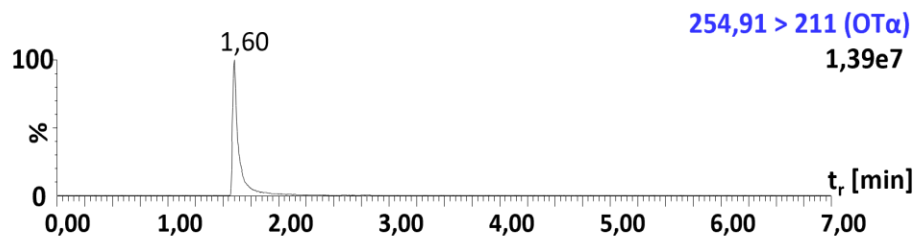
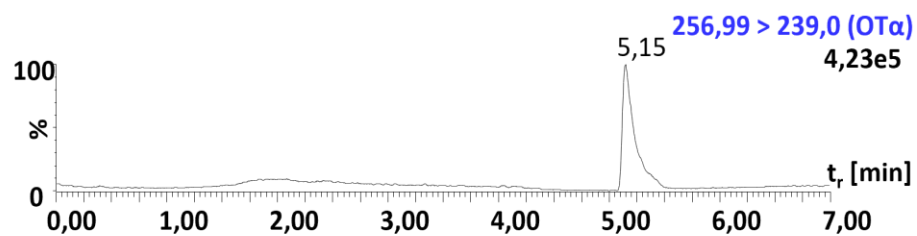
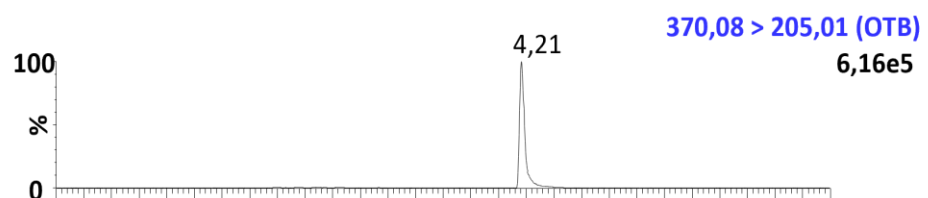
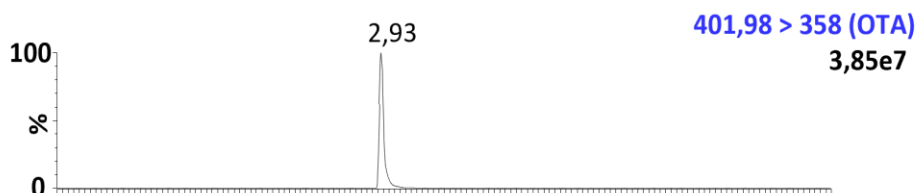
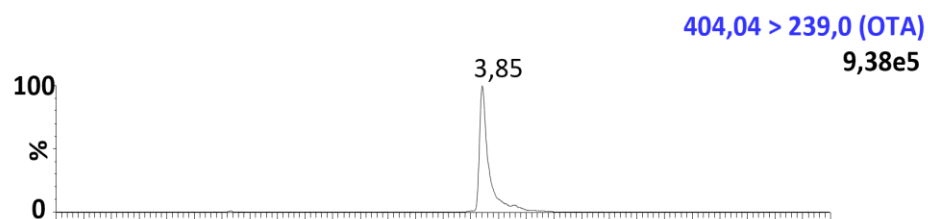
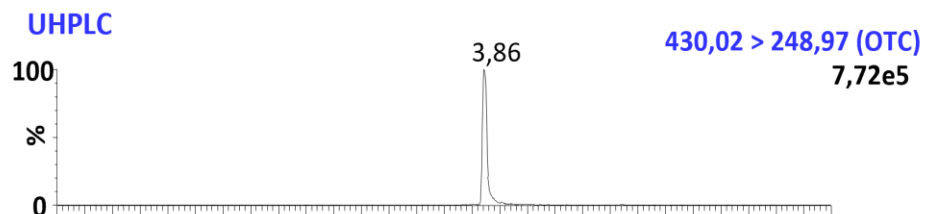
**Tab. 18:** Shrnutí výsledků z kalibrace ochratoxinů v UHPSFC-MS/MS metodě.

analyt	negativní mód		pozitivní mód	
	NDH [ng/ml]	přenos [%]	NDH [ng/ml]	přenos [%]
OTA	100	11,21	200	11,77
OTB	500	20,95	200	22,97
OT $\alpha$	1000	16,67	1000	31,03

### 5.3 Srovnání UHPLC-MS/MS a UHPSFC-MS/MS metod

Ve finální UHPLC metodě byly píky úzké, ale vyznačovaly se mírným chvostováním, střední hodnoty faktoru symetrie píků jednotlivých látek byly v rozsahu 1,6–2,4. Všechny analyty byly eluovány v rámci gradientu. Separace byla dosažena snadno již při generických podmínkách a vývoj metody byl proto relativně jednoduchý. Naproti tomu dosažená separace při UHPSFC metodě nebyla ideální ani po provedené optimalizaci. Píky byly oproti UHPLC širší a úroveň chvostování byla vyšší, s faktory symetrie píků v rozsahu 2,2–3,1. Separace kritického páru OTA a OTB byla dosažena pouze částečně s hodnotou rozlišení 0,6 v negativním módu a 1,8 v pozitivním módu. Rozdíl v selektivě separace byl způsoben odlišným organickým modifikátorem s nejvyšší odezvou v jednotlivých módech. Látky byly eluovány poměrně pozdě, zejména problematický OT $\alpha$  až za koncem gradientu. Optimalizace chromatografické metody byla také mnohem náročnější. Vzhledem k tomu, že v literatuře nebyla nalezena žádná publikace, která by se separací ochratoxinů v SFC zabývala, výběr podmínek byl ztížen. Srovnání výsledné chromatografické separace v obou metodách je ukázáno na Obr. 29.

Při srovnání kalibračních závislostí bylo v UHPLC-MS/MS metodě dosaženo citlivé detekce se spodními limity kvantifikace 0,02–0,1 ng/ml. Tyto hodnoty řádově odpovídají limitům získaným v literatuře z Tab. 4. V UHPSFC metodě bylo kvantifikační rozmezí mnohem užší a stanoveny byly nejnižší detekovatelné hladiny 100–1000 ng/ml. Zajímavé chování vykazoval OTC, který při vývoji UHPSFC metody poskytoval výrazně vyšší odezvu vzhledem k ostatním ochratoxinům. Bohužel, kvůli nevyhovující kvalitě standardu, nebyl vývoj ani jedné metody pro tuto látku dokončen. Vzhledem k potřebě citlivého stanovení ochratoxinů v biologickém materiálu je tedy vyvinutá UHPSFC metoda v současné podobě pro další výzkum nepoužitelná. Pro další využití by bylo potřeba UHPSFC metodu dále optimalizovat a pokusit se zvýšit citlivost detekce, popřípadě dále zlepšit tvar píků.



**Obr. 29:** Srovnání výsledných chromatogramů s SRM přechody v negativním módu při UHPLC-MS/MS metodě a v pozitivním módu při UHPSFC-MS/MS metodě, pro UHPSFC byl pro srovnání zvolen mód s vyšším rozlišením kritického páru OTA a OTB.

## 6. Závěr

V rámci této diplomové práce byly nejprve měřeny MS skeny standardů vybraných ochratoxinů a získány hodnoty  $m/z$  jednotlivých iontů. Následně byla v metodě SIM provedena optimalizace parametrů iontového zdroje v pozitivním i negativním módu. Skenováním produktových iontů pro každý analyt byla získána fragmentační spektra, z nichž byly vybrány fragmenty použité dále pro optimalizaci parametru kolizní energie. Získaná data byla využita pro získání SRM přechodu pro každý analyt v obou ionizačních módech.

Optimalizace UHPLC chromatografické separace byla snadná a přímočará díky informacím z literatury a použití univerzální stacionární fáze C18. Provedeno bylo pouze testování složení mobilní fáze. Testována byla aditiva vodné složky mobilní fáze, a to AcA, FA a  $\text{NH}_4\text{OH}$  v koncentracích 0,1 a 0,01 %. Nejlepším aditivem byla kyselina octová o koncentraci 0,01 %, a to v obou módech.

Při vývoji UHPSFC–MS/MS metody byla nejdříve provedena optimalizace chromatografické separace testováním 13 kolon s různými typy částic i ligandů. Optimální separace bylo dosaženo na koloně Acquity UPLC BEH Amide. Na této koloně byla provedena optimalizace parametrů iontového zdroje ve shodném rozsahu jako v případě LC metody. Dále bylo optimalizováno složení přídatné kapaliny. Testováno bylo celkem osm kapalin a to: EtOH, MeOH, MeOH + 2 a 5 %  $\text{H}_2\text{O}$  a MeOH s aditivy: 10 mM FA, 10 mM AmF, 10 mM AmAc a 10 mM  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Jako nejvýhodnější se ukázal 100% MeOH v negativním módu a MeOH s 5% přídavkem vody v pozitivním módu. Testování organických modifikátorů bylo provedeno v rozsahu 6 kapalin: MeOH a MeOH s aditivem 10 mM  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 10 mM FA, 10 mM AmF čistým a s přídavkem 1 a 2 % vody. Jako optimální byl zvolen přídavek 10 mM AmF v negativním módu a 10 mM AmF + 2 %  $\text{H}_2\text{O}$  v pozitivním módu.

Vyvinuté metody byly využity pro určení kalibrační závislosti. V UHPLC-MS/MS metodě bylo získáno kalibrační rozmezí 0,05–100 ng/ml pro OTA, 0,02–100 ng/ml pro OTB a 0,1–100 ng/ml pro OT $\alpha$  v negativním módu a 1–500 ng/ml pro OTA, 0,5–500 ng/ml pro OTB a 2–1000 ng/ml pro OT $\alpha$  v pozitivním módu. Spodní limit kvantifikace byl tedy u všech analytů nižší v negativním módu, horní limit kvantifikace naopak vyšší v pozitivním

módu. Pro UHPLC-MS/MS metodu byla stanovena opakovatelnost, kdy nejvyšší naměřená RSD byla 4,35 %. V UHPSFC-MS/MS metodě bylo docíleno úzkého kalibračního rozpětí a byly pouze určeny nejnižší detekovatelné hladiny pro OTA, OTB a OT $\alpha$ : 100, 500 a 1000 ng/ml v negativním módu a 200, 200 a 1000 ng/ml v pozitivním módu. Tyto velice vysoké hodnoty znamenají nemožnost využití vyvinuté UHPSFC metody pro další výzkum v této podobě. Ve srovnání metod pro analýzu ochratoxinů lepší výsledky poskytla UHPLC metoda.

Při dalším výzkumu v oblasti UHPSFC by bylo potřeba dále vylepšit chromatografickou separaci látek, a především zvýšit citlivost detekce. Dalším krokem bude vývoj a optimalizace metody úpravy vzorku, pro umožnění analýzy konkrétních vzorků biologického materiálu. Pokud by se podařilo získat kvalitní standardy ochratoxinu C, popřípadě dalších ochratoxinů či jejich metabolitů, mohla by analýza těchto látek přinést další rozměr do vývoje metody.

## 7. Seznam použité literatury

- [1] NOVÁKOVÁ, Lucie, Michal DOUŠA a Petr ČESLA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 2021. ISBN 978-80-270-8559-0.
- [2] FEKETE, Szabolcs, Isabelle KOHLER, Serge RUDAZ a Davy GUILLARME. Importance of instrumentation for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2014, **87**, 105-119 [cit. 2022-08-05]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2013.03.012
- [3] NOVÁKOVÁ, Lucie, Dagmar SOLICHOVÁ a Petr SOLICH. Advantages of ultra performance liquid chromatography over high-performance liquid chromatography: Comparison of different analytical approaches during analysis of diclofenac gel. *Journal of Separation Science* [online]. 2006, **29**(16), 2433-2443 [cit. 2022-08-05]. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.200600147
- [4] C.F., Poole. *Supercritical fluid chromatography* [online]. Amsterdam: Elsevier, 2017 [cit. 2022-04-10]. ISBN 9780128092071.
- [5] MILLER, Larry M., J. David PINKSTON a Larry T. TAYLOR. *Modern Supercritical Fluid Chromatography* [online]. Wiley, 2019 [cit. 2022-04-09]. ISBN 9781118948392. Dostupné z: doi:10.1002/9781119626022
- [6] DESFONTAINE, Vincent, Davy GUILLARME, Eric FRANCOTTE a Lucie NOVÁKOVÁ. Supercritical fluid chromatography in pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2015, 113, 56-71 [cit. 2022-03-28]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2015.03.007
- [7] NOVÁKOVÁ, Lucie, Alexandre GRAND-GUILLAUME PERRENOUD, Isabelle FRANCOIS, Caroline WEST, Eric LESELLIER a Davy GUILLARME. Modern analytical supercritical fluid chromatography using columns packed with sub-2µm particles: A tutorial. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2014, 824, 18-35 [cit. 2022-03-28]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2014.03.034

- [8] WEST, Caroline, Elise LEMASSON, Sophie BERTIN, Philippe HENNIG a Eric LESELLIER. An improved classification of stationary phases for ultra-high performance supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2016, 1440, 212-228 [cit. 2022-03-28]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2016.02.052
- [9] WEST, Caroline. Current trends in supercritical fluid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2018, 410(25), 6441-6457 [cit. 2022-03-28]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-018-1267-4
- [10] D'ATRI, Valentina, Szabolcs FEKETE, Adrian CLARKE, Jean-Luc VEUTHEY a Davy GUILLARME. Recent Advances in Chromatography for Pharmaceutical Analysis. *Analytical Chemistry* [online]. 2019, 91(1), 210-239 [cit. 2022-03-28]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.8b05026
- [11] *Chromatography Columns and Supplies Catalog* [online]. Waters, 2019 [cit. 2022-03-28]. Dostupné z: [https://mz-at.de/fileadmin/user\\_upload/Brochures/waters-cat19-01\\_en.pdf](https://mz-at.de/fileadmin/user_upload/Brochures/waters-cat19-01_en.pdf)
- [12] *Cosmocore, Core Shell Particle for UHPLC resolution* [online]. NACALAI TESQUE [cit. 2022-03-28]. Dostupné z: [https://www.nacalai.co.jp/global/download/pdf/COSMOCORE\\_Series.pdf](https://www.nacalai.co.jp/global/download/pdf/COSMOCORE_Series.pdf)
- [13] *Kinetex Reversed Phase, Biphenyl* [online]. Phenomenex [cit. 2022-03-28]. Dostupné z: <https://www.phenomenex.com/Kinetex/KinetexOrderNow/biphenyl>
- [14] *Kinetex HPLC/UHPLC Columns Tips for Care and Use* [online]. Phenomenex [cit. 2022-03-28]. Dostupné z: <https://www.phenomenex.com/Info/WebDocumentServe/kinetex-hplc-uhplc-columns-tips-for-care-and-use.pdf>
- [15] GROSS, Jürgen H. *Mass Spectrometry* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017 [cit. 2022-03-28]. ISBN 978-3-319-54397-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-54398-7

- [16] DE HOFFMANN, Edmond a Vincent STROOBANT. *Mass spectrometry: principles and applications*. 3rd ed. Chichester: John Wiley, c2007. ISBN 978-0-470-03310-4.
- [17] LEE, Mike S. a Mingshe ZHU, ed. *Mass Spectrometry in Drug Metabolism and Disposition* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2011 [cit. 2022-04-09]. ISBN 9780470929278. Dostupné z: doi:10.1002/9780470929278
- [18] FANALI, Salvatore. *Liquid chromatography: fundamentals and instrumentation*. Waltham: Elsevier, c2013. ISBN 978-0-12-415807-8.
- [19] TARAFDER, Abhijit. Designs and methods for interfacing SFC with MS. *Journal of Chromatography B* [online]. 2018, 1091, 1-13 [cit. 2022-03-28]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2018.05.003
- [20] CHEN, Liuxi, Brian DEAN a Xiaorong LIANG. A technical overview of supercritical fluid chromatography-mass spectrometry (SFC-MS) and its recent applications in pharmaceutical research and development. *Drug Discovery Today: Technologies* [online]. 2021, 40, 69-75 [cit. 2022-03-28]. ISSN 17406749. Dostupné z: doi:10.1016/j.ddtec.2021.10.002
- [21] PILAŘOVÁ, Veronika, Kateřina PLACHKÁ, Maria A. KHALIKOVA, Frantisek SVEC a Lucie NOVÁKOVÁ. Recent developments in supercritical fluid chromatography – mass spectrometry: Is it a viable option for analysis of complex samples?. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2019, 112, 212-225 [cit. 2022-03-28]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2018.12.023
- [22] VAN DER MERWE, K. J., P. S. STEYN, L. FOURIE, DE B. SCOTT a J. J. THERON. Ochratoxin A, a Toxic Metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* [online]. 1965, 205(4976), 1112-1113 [cit. 2022-04-07]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/2051112a0
- [23] HAYAT, Akhtar, Nathalie PANIEL, Amina RHOUATI, Jean-Louis MARTY a Lise BARTHELMEBS. Recent advances in ochratoxin A-producing fungi detection based on PCR methods and ochratoxin A analysis in food matrices. *Food*



- Control* [online]. 2012, 26(2), 401-415 [cit. 2022-04-07]. ISSN 09567135.  
Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2012.01.060
- [24] EL KHOURY, André a Ali ATOUI. Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. *Toxins* [online]. 2010, 2(4), 461-493 [cit. 2022-04-07]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins2040461
- [25] POÓR, Miklós, Sándor KUNSÁGI-MÁTÉ, Zsuzsanna CZIBULYA, Yin LI, Beáta PELES-LEMLI, József PETRIK, Sanda VLADIMIR-KNEŽEVIĆ a Tamás KŐSZEGI. Fluorescence spectroscopic investigation of competitive interactions between ochratoxin A and 13 drug molecules for binding to human serum albumin. *Luminescence* [online]. 2013, 28(5), 726-733 [cit. 2022-04-07]. ISSN 15227235. Dostupné z: doi:10.1002/bio.2423
- [26] TRIVEDI, Alka B., Etsushiro DOI a Naofumi KITABATAKE. Detoxification of Ochratoxin A on Heating under Acidic and Alkaline Conditions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [online]. 2014, 56(5), 741-745 [cit. 2022-04-07]. ISSN 0916-8451. Dostupné z: doi:10.1271/bbb.56.741
- [27] *PubChem* [online]. National Center for Biotechnology Information [cit. 2022-04-18]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
- [28] *SciFinder* [online]. American Chemical Society [cit. 2022-04-18]. Dostupné z: <https://scifinder.cas.org>
- [29] Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to ochratoxin A in food. *EFSA Journal* [online]. 2006, 4(6) [cit. 2022-04-07]. ISSN 18314732. Dostupné z: doi:10.2903/j.efsa.2006.365
- [30] GUPTA, Ramesh C., Ajay SRIVASTAVA a Rajiv LALL. Ochratoxins and Citrinin. *Veterinary Toxicology* [online]. Elsevier, 2018, 2018, s. 1019-1027 [cit. 2022-04-09]. ISBN 9780128114100. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-811410-0.00072-6
- [31] Commission, E. Commission regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 december 2006 Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Off. J. Eur. Union L 2006, I364, 4–5.

- [32] HEUSSNER, Alexandra a Lewis BINGLE. Comparative Ochratoxin Toxicity: A Review of the Available Data. *Toxins* [online]. 2015, 7(10), 4253-4282 [cit. 2022-04-07]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins7104253
- [33] HUFF, WILLIAM E. a PAT B. HAMILTON. Mycotoxins – Their Biosynthesis in Fungi: Ochratoxins – Metabolites of Combined Pathways. *Journal of Food Protection* [online]. 1979, 42(10), 815-820 [cit. 2022-04-09]. ISSN 0362-028X. Dostupné z: doi:10.4315/0362-028X-42.10.815
- [34] HARRIS, Jonathan P a Peter G MANTLE. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry* [online]. 2001, 58(5), 709-716 [cit. 2022-04-09]. ISSN 00319422. Dostupné z: doi:10.1016/S0031-9422(01)00316-8
- [35] WANG, Yan, Liuqing WANG, Fan WU, et al. A Consensus Ochratoxin A Biosynthetic Pathway: Insights from the Genome Sequence of *Aspergillus ochraceus* and a Comparative Genomic Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2018, 84(19), e01009-18 [cit. 2022-04-09]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.01009-18
- [36] WANG, Yan, Liuqing WANG, Fei LIU, Qi WANG, Jonathan SELVARAJ, Fuguo XING, Yueju ZHAO a Yang LIU. Ochratoxin A Producing Fungi, Biosynthetic Pathway and Regulatory Mechanisms. *Toxins* [online]. 2016, 8(3) [cit. 2022-04-09]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins8030083
- [37] RINGOT, Diana, Abalo CHANGO, Yves-Jacques SCHNEIDER a Yvan LARONDELLE. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2006, 159(1), 18-46 [cit. 2022-04-07]. ISSN 00092797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2005.10.106
- [38] KÓSZEGI, Tamás a Miklós POÓR. Ochratoxin A: Molecular Interactions, Mechanisms of Toxicity and Prevention at the Molecular Level. *Toxins* [online]. 2016, 8(4) [cit. 2022-04-09]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins8040111
- [39] GUPTA, Ramesh C. a Angela ALIBERTI. *Biomarkers in Toxicology* [online]. 2014. USA: Elsevier [cit. 2022-04-09]. ISBN 978-0-12-404630-6.

- [40] STØRMER, F C, O STØREN, C E HANSEN, J I PEDERSEN a A J AASEN. Formation of (4R)- and (4S)-4-hydroxyochratoxin A and 10-hydroxyochratoxin A from Ochratoxin A by rabbit liver microsomes. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1983, 45(4), 1183-1187 [cit. 2022-04-09]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/aem.45.4.1183-1187.1983
- [41] XIAO, Hao, Srinivasa MADHYASTHA, Ronald R. MARQUARDT, Suzhen LI, Jayantha K. VODELA, A.A. FROHLICH a Barbara W. KEMPPAINEN. Toxicity of Ochratoxin A, Its Opened Lactone Form and Several of Its Analogs: Structure–Activity Relationships. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 1996, 137(2), 182-192 [cit. 2022-04-09]. ISSN 0041008X. Dostupné z: doi:10.1006/taap.1996.0071
- [42] TAO, Yanfei, Shuyu XIE, Fanfan XU, et al. Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2018, **112**, 320-331 [cit. 2022-04-09]. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2018.01.002
- [43] PFOHL-LESZKOWICZ, Annie a Richard A. MANDERVILLE. An Update on Direct Genotoxicity as a Molecular Mechanism of Ochratoxin A Carcinogenicity. *Chemical Research in Toxicology* [online]. 2012, 25(2), 252-262 [cit. 2022-04-09]. ISSN 0893-228X. Dostupné z: doi:10.1021/tx200430f
- [44] BUI-KLIMKE, Travis a Felicia WU. Evaluating Weight of Evidence in the Mystery of Balkan Endemic Nephropathy. *Risk Analysis* [online]. 2014, 34(9), 1688-1705 [cit. 2022-04-09]. ISSN 02724332. Dostupné z: doi:10.1111/risa.12239
- [45] PFOHL-LESZKOWICZ, Annie a Richard A. MANDERVILLE. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition & Food Research* [online]. 2007, 51(1), 61-99 [cit. 2022-04-09]. ISSN 16134125. Dostupné z: doi:10.1002/mnfr.200600137
- [46] ALI, Nurshad, Meinolf BLASZKEWICZ, M. MANIRUJJAMAN, et al. Biomonitoring of ochratoxin A in blood plasma and exposure assessment of adult students in Bangladesh. *Molecular Nutrition & Food Research* [online]. 2014, 58(11), 2219-2225 [cit. 2022-04-09]. ISSN 16134125. Dostupné z: doi:10.1002/mnfr.201400403

- [47] CRAMER, Benedikt, Bernd OSTERESCH, Katherine A. MUÑOZ, Hartmut HILLMANN, Walter SIBROWSKI a Hans-Ulrich HUMPF. Biomonitoring using dried blood spots: Detection of ochratoxin A and its degradation product 2'R-ochratoxin A in blood from coffee drinkers\*. *Molecular Nutrition & Food Research* [online]. 2015, 59(9), 1837-1843 [cit. 2022-04-09]. ISSN 1613-4125. Dostupné z: doi:10.1002/mnfr.201500220
- [48] OSTERESCH, Bernd, Susana VIEGAS, Benedikt CRAMER a Hans-Ulrich HUMPF. Multi-mycotoxin analysis using dried blood spots and dried serum spots. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2017, 409(13), 3369-3382 [cit. 2022-04-09]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-017-0279-9
- [49] ÖNCÜ KAYA, Elif Mine, Orhan Tansel KORKMAZ, Duygu YENICELI UĞUR, Erol ŞENER, A. Neşe TUNÇEL a Muzaffer 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* [online]. 2019, 1125 [cit. 2022-04-09]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2019.06.027
- [50] WARENSJÖ LEMMING, Eva, Andrea MONTANO MONTES, Jessica SCHMIDT, Benedikt CRAMER, Hans-Ulrich HUMPF, Lotta MORAEUS a Monica OLSEN. Mycotoxins in blood and urine of Swedish adolescents—possible associations to food intake and other background characteristics. *Mycotoxin Research* [online]. 2020, 36(2), 193-206 [cit. 2022-04-09]. ISSN 0178-7888. Dostupné z: doi:10.1007/s12550-019-00381-9
- [51] ZHANG, Zhiqi, Zhichen FAN, Dongxia NIE, Zhihui ZHAO a Zheng HAN. Analysis of the Carry-Over of Ochratoxin A from Feed to Milk, Blood, Urine, and Different Tissues of Dairy Cows Based on the Establishment of a Reliable LC-MS/MS Method. *Molecules* [online]. 2019, 24(15) [cit. 2022-04-09]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24152823
- [52] MARTINS, C., A. VIDAL, M. DE BOEVRE, et al. Exposure assessment of Portuguese population to multiple mycotoxins: The human biomonitoring approach. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* [online].

- 2019, 222(6), 913-925 [cit. 2022-04-09]. ISSN 14384639. Dostupné z:  
doi:10.1016/j.ijheh.2019.06.010
- [53] FAN, Kai, Juanjuan XU, Keqiu JIANG, et al. Determination of multiple mycotoxins in paired plasma and urine samples to assess human exposure in Nanjing, China. *Environmental Pollution* [online]. 2019, 248, 865-873 [cit. 2022-04-09]. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2019.02.091
- [54] ARCE-LÓPEZ, Beatriz, Elena LIZARRAGA, Myra FLORES-FLORES, Ángel IRIGOYEN a Elena GONZÁLEZ-PEÑAS. Development and validation of a methodology based on Captiva EMR-lipid clean-up and LC-MS/MS analysis for the simultaneous determination of mycotoxins in human plasma. *Talanta* [online]. 2020, 206 [cit. 2022-04-09]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2019.120193
- [55] LIU, Zhezhe, Xiaoxue ZHAO, Libiao WU, Shuang ZHOU, Zhiyong GONG, Yunfeng ZHAO a Yongning WU. Development of a Sensitive and Reliable UHPLC-MS/MS Method for the Determination of Multiple Urinary Biomarkers of Mycotoxin Exposure. *Toxins* [online]. 2020, 12(3) [cit. 2022-04-09]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins12030193
- [56] FAN, Kai, Xi CHENG, Wenbo GUO, et al. Ochratoxin A in human blood plasma samples from apparently healthy volunteers in Nanjing, China. *Mycotoxin Research* [online]. 2020, 36(3), 269-276 [cit. 2022-04-09]. ISSN 0178-7888. Dostupné z: doi:10.1007/s12550-020-00387-8
- [57] BRAUN, Dominik, Eva SCHERNHAMMER, Doris MARKO a Benedikt WARTH. Longitudinal assessment of mycotoxin co-exposures in exclusively breastfed infants. *Environment International* [online]. 2020, 142 [cit. 2022-04-09]. ISSN 01604120. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2020.105845
- [58] MEHTA, Rukshan V., Anthony J. WENNDT, Amy Webb GIRARD, et al. Risk of dietary and breastmilk exposure to mycotoxins among lactating women and infants 2–4 months in northern India. *Maternal & Child Nutrition* [online]. 2021, 17(2) [cit. 2022-04-09]. ISSN 1740-8695. Dostupné z: doi:10.1111/mcn.13100

- [59] NDAW, Sophie, Daniele JARGOT, Guillaume ANTOINE, Flavien DENIS, Sandrine MELIN a Alain ROBERT. Investigating Multi-Mycotoxin Exposure in Occupational Settings: A Biomonitoring and Airborne Measurement Approach. *Toxins* [online]. 2021, 13(1) [cit. 2022-04-09]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins13010054
- [60] LAU, B. P.-Y., P. M. SCOTT, D. A. LEWIS a S. R. KANHERE. Quantitative determination of ochratoxin A by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* [online]. John Wiley & Sons, 2000, 35, 23–32 [cit. 2022-04-18]. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1096-9888(200001)35:1<23::AID-JMS903>3.0.CO;2-B
- [61] HAN, Zheng, Yunliang ZHENG, Lianjun LUAN, Yiping REN a Yongjiang WU. Analysis of ochratoxin A and ochratoxin B in traditional Chinese medicines by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using [<sup>13</sup>C<sub>20</sub>]-ochratoxin A as an internal standard. *Journal of Chromatography A* [online]. 2010, 1217(26), 4365-4374 [cit. 2022-04-18]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2010.04.052
- [62] *Guideline on bioanalytical method validation* [online]. European Medicines Agency, 2015 [cit. 2022-04-18]. Dostupné z: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf)