

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



VYUŽITÍ HPLC TECHNIKY V ANALÝZE DOPLŇKŮ STRAVY
NA BÁZI ROSTLINNÝCH EXTRAKTŮ
Disertační práce

2019

Mgr. Jakub Fibigr

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji doc. RNDr. Daliborovi Šatínskému, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost a cenné rady v průběhu mého postgraduálního studia.

Práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy (projekty GAUK číslo 181216 a 159415), grantu Specifického vysokoškolského výzkumu SVV 260 412, projektu STARSS (Reg. No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000465) a projektu EFSA-CDN (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000841). Tímto bych chtěl poděkovat za finanční podporu a možnost prezentovat výsledky na zahraničních konferencích.

Děkuji také své manželce, rodině a přátelům za podporu během doktorandského studia.

PROHLÁŠENÍ O PŮVODNOSTI

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne

Jakub Fibigr

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Mgr. Jakub Fibigr

Školitel: doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Název disertační práce:

Využití HPLC techniky v analýze doplňků stravy na bázi rostlinných extraktů

V disertační práci je komplexně popsána problematika doplňků stravy založených na rostlinných extraktech z hlediska obsahu bioaktivních látek, hodnocení čistoty a legislativních požadavků na účinnost a bezpečnost.

Kvalita doplňků stravy na bázi rostlinných extraktů dostupných na trhu v ČR byla prokazována v šesti provedených studiích. Byly vyvinuty a validovány dvě HPLC a čtyři UHPLC metody pro stanovení obsahu bioaktivních látek v doplňcích stravy s obsahem rostlinných extraktů a pomocných látek. V každé práci byly nalezeny takové analytické podmínky, které umožňovaly rychlé a přesné určení obsahu daných bioaktivních látek v doplňcích stravy s ohledem zejména na problematickou separaci některých izomerních látek. Dále byly vyvinuty nebo optimalizovány postupy úpravy vzorků doplňků stravy, které umožňovaly separaci a detekci všech požadovaných bioaktivních látek bez interference matrice a dalších komponent obsažených v analyzovaných doplňcích.

Konvenční přístup k analytickému hodnocení obsahu bioaktivních látek v rostlinných extraktech za využití HPLC instrumentace je zapojení kolon s C18 stacionární fází v kombinaci s dlouhými časy analýz, které jsou nezbytné pro dosažení požadovaných separací jednotlivých látek v extraktech. V provedených studiích byly testovány různé alternativní stacionární fáze a provedeny retenční studie analytů na daných kolonách pro získání co nejlepší selektivity pro dané analyty.

Bylo prokázáno, že kvalita jednotlivých analyzovaných doplňků stravy s obsahem rostlinných extraktů se velmi liší. V některých případech dokonce nebylo nalezeno žádné množství deklarované látky, což je velmi alarmující zjištění, především pro spotřebitele.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Mgr. Jakub Fibigr

Supervisor: doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Title of the Dissertation Thesis:

Application of HPLC technique in analysis of food supplements based on plant extracts

The dissertation thesis deals with complex issues of food supplements based on plant extracts in terms of the content of bioactive substances, purity assessment, and legislative efficacy and safety requirements.

The quality of food supplements available on the market in the Czech Republic was tested in six studies. Two HPLC and four UHPLC methods have been developed and validated to determine the content of bioactive substances in food supplements containing plant extracts and other excipients. In each work, such analytical conditions were found allowing a rapid and accurate determination of the content of the given bioactive substances in food supplements, particularly in the problematic separations of some isomeric substances. Additionally, sample preparation methods for each group of food supplement samples have been developed and optimized to avoid the matrix interferences during the separation and detection of analyzed bioactive substances.

A conventional approach to the analytical determination of the bioactive substances in plant extracts using HPLC instrumentation is to employ the C18 stationary phase in combination with the long analysis times that are necessary to achieve a desired separation of analyzed substances in the extracts. Several alternative stationary phases were tested in the presented studies. Complex retention studies of the analysed compounds were performed on the selected columns to obtain the best selectivity for the analytes.

It has been shown that the quality of the analyzed food supplements containing plant extracts varies greatly. In some cases, no quantity of the declared substance has been found, which is a very alarming finding for consumers.

OBSAH

1	Úvod.....	10
2	Cíle práce.....	12
3	Teoretická část.....	13
3.1	Doplňky stravy založené na rostlinných extraktech	13
3.1.1	Složení a formulace	13
3.1.2	Požadavky a legislativa	15
3.1.3	Kontrola kvality.....	17
3.1.4	Rostlinné extrakty a bioaktivní látky	19
3.1.5	Hodnocení čistoty a bezpečnost rostlinných extraktů	22
3.2	Využití HPLC instrumentace v analýze doplňků stravy na bázi rostlinných extraktů	24
3.2.1	Metody kapalinové chromatografie	24
3.2.2	Úprava vzorku před analýzou	26
3.2.3	Validace nových metod.....	29
3.2.4	Trendy a perspektivy do budoucna	30
4	Komentáře k publikovaným pracím.....	31
4.1	A study of retention characteristics and quality control of nutraceuticals containing resveratrol and polydatin using fused-core column chromatography.....	31
4.2	A new method for rapid determination of indole-3-carbinol and its condensation products in nutraceuticals using core-shell column chromatography method....	34
4.3	A new approach to the rapid separation of isomeric compounds in a Silybum marianum extract using UHPLC core-shell column with F5 stationary phase ...	37
4.4	A UHPLC method for the rapid separation and quantification of phytosterols using tandem UV/Charged aerosol detection – a comparison of both detection techniques	41

4.5	A UHPLC method for the rapid separation and quantification of anthocyanins in acai berry and dry blueberry extracts	45
4.6	A validated UHPLC method for the determination of caffeoylquinic and di-caffeoylquinic acids in green coffee extracts using an RP-Amide fused-core column.....	48
4.7	Current trends in the analysis and quality control of food supplements based on plant extracts	51
5	Závěr	54
6	Seznam použité literatury	56
7	Seznam publikací, abstraktů a řešených projektů	70
7.1	Přehled publikovaných prací.....	70
7.2	Přehled ústních prezentací uvedených v konferenčních sbornících.....	73
7.3	Přehled plakátových sdělení prezentovaných na domácích a mezinárodních konferencích.....	74
7.4	Řešené projekty.....	77
8	Přílohy – publikace zahrnuté v disertační práci.....	78

SEZNAM ZKRATEK

CAD – Corona, detektor nabitého aerosolu

cGMP – současná Správná výrobní praxe

CN – nitril

CQA – chlorogenová kyselina (Caffeoylquinic acid)

ČSN – česká technická norma

DLLME – disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny

dSPE – disperzní extrakce pevnou fází

ED – endokrinní disruptor

EFSA – Evropský úřad pro bezpečnost potravin

ELSD – odpařovací detektor rozptylu světla

ES – prodloužený spojovací řetězec (extended spacer)

EU – Evropská unie

F5 – pentafluorofenyl

FDA – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv

GC – plynová chromatografie

GHP – správná hygienická praxe

GMP – správná výrobní praxe

HACCP – Systém analýzy rizika a stanovení kritických kontrolních bodů

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HRMS – vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie

ICH – Mezinárodní rada pro harmonizaci (International Council for Harmonisation)

ICP-MS – hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

IFS – Standard na bezpečnost potravin v obchodních řetězcích (International Food Standard)

ISO – Mezinárodní organizace pro normalizaci

LLE – extrakce z kapaliny do kapaliny

LLME – mikroextrakce z kapaliny do kapaliny

LOD – limit detekce

LOQ – limit kvantifikace

MIP – molekulárně vtištěný polymer

MISPE – extrakce molekulárně vtištěným polymerem

MS – hmotnostní spektrometrie
MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie
PAH – polycyklické aromatické uhlovodíky
PDA – diodové pole
PDE-5 – fosfodiesteráza typu 5
PNT – potravina nového typu
PTFE – polytetrafluorethylen
QA – jištění jakosti
QC – kontrola jakosti
RP – reverzní fáze
SDME – mikroextrakce do jediné kapky
SLE – extrakce z tuhé fáze do kapalné
SFC – superkritická fluidní chromatografie
SPE – extrakce na tuhou fázi
SZPI – Státní zemědělská a potravinářská inspekce
SZÚ – Státní zdravotní ústav
UHPLC – ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie
UHPSFC – ultravysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie
UV – ultrafialové spektrum
VIS – viditelná část světelného spektra

1 Úvod

Doplňky stravy jsou koncentrované zdroje živin nebo jiných látek, které mají nutriční nebo fyziologický účinek a jejichž účelem je doplnit normální stravu kvůli předpokládaným přínosům pro zdraví. Doplňky stravy jsou uváděny na trh v dávkových formách, například pilulkách, tabletách, kapslích nebo tekuté v odměřených dávkách [1]. Lze je volně koupit v lékárnách, supermarketech, specializovaných prodejnách a prostřednictvím internetu. Celosvětové prodeje doplňků stravy zaznamenávají rychlý růst a zejména ty, které jsou založeny na rostlinných extraktech, patří k nejoblíbenějším, protože jsou považovány za bezpečnější a zdravější než syntetické látky. Panuje také předpoklad, že mají nižší nebo dokonce žádné vedlejší účinky. Tyto rostoucí tržby, které naznačují obrovskou popularitu doplňků stravy, a obecný nedostatek odhodlání prosazovat účinnou legislativu (garance účinnosti a bezpečnosti, dokumentace čistoty a stability použitých látek apod.) dělá trh s doplňky stravy zranitelnější vůči nečestným výrobcům [2]. V Evropské unii jsou doplňky stravy regulovány stejně jako potraviny a současná legislativa je zaměřena pouze na vitamíny a minerály obsažené v doplňcích stravy.

Výrobci ve svých přípravných deklarují obsah určitého množství rostlinného extraktu, ale tato informace neříká nic o obsahu bioaktivních látek. Složení a obsah bioaktivních látek v rostlinách se může lišit v závislosti na klimatu, teplotě, období, půdě a dalších faktorech. Rozpor mezi množstvím použitého extraktu a obsahem účinných látek v jedné dávce může mít podstatný vliv na dávkování a může vést k předávkování konzumenta nebo naopak k neúčinnému přípravku. Ačkoli je nezbytné zajistit bezpečí a neškodnost doplňků stravy, od jejich výrobců se nevyžadují žádná konkrétní posouzení. V EU neexistují žádné kontroly výrobních standardů, které jsou přinejmenším podobné farmaceutické úrovni (GMP). Nejzávažnější problémy spojené s čistotou doplňků stravy se týkají obsahu nedeklarovaných látek, jako jsou inhibitory PDE-5, léčiva určená na hubnutí nebo anabolické steroidy. Ve většině případů jsou tyto látky neoprávněně přidávány do doplňků stravy pro zvýšení předpokládaných účinků. Tato praxe může vést k potenciálně závažným zdravotním následkům [3-5]. Kontaminanty jako pesticidy, mykotoxiny, toxické látky a těžké kovy přítomné v rostlinných extraktech jsou dalším problémem spojeným s čistotou doplňků stravy [6-9].

Ačkoli bioaktivní látky mají nízkou účinnost ve srovnání s farmaceutickými léčivy, existují četné biologické mechanismy, kterými mohou doplňky stravy na bázi rostlinných extraktů ovlivňovat patofyziologické procesy. Na druhé straně správná interpretace dosud provedených klinických studií je zatížena nekonzistentními výsledky, špatně navrženými experimenty nebo výběrem doplňků stravy, které byly zkoumány bez důkladné analýzy před jejich podáváním lidem. Vzhledem k těmto skutečnostem, neexistuje předpoklad, že doplňky stravy na bázi rostlinných extraktů mohou být účinné nebo dokonce obsahovat jakékoliv bioaktivní látky.

Na rozdíl od regulačního rámce EFSA (Evropského úřadu pro bezpečnost potravin) požaduje americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA), aby všechny doplňky stravy vyrobené v USA byly hodnoceny z hlediska totožnosti, čistoty a účinnosti, stejně tak i z pohledu obsahu kontaminantů a zakázaných příměsí [10]. Pro trh v USA je povinné používání správné výrobní praxe (cGMP) v oblasti výroby, balení, označování nebo nakládání s doplňky stravy. Přesto jsou analytici vyzýváni, aby vyvíjeli stále více a více moderních metod schopných poskytnout dostatečné rozlišení, selektivitu a citlivost k detekci požadovaných bioaktivních látek. Důkladná znalost složení a obsahu těchto látek a extraktů s jejich obsahem je nezbytná pro rozumnou konzumaci doplňků stravy a pro zachování důvěry spotřebitelů v bezpečnost a účinnost výrobků obsahujících rostlinné extrakty. Nové moderní ověřené analytické metody pro identifikaci, kvantifikaci a standardizaci bioaktivních látek v rostlinných extraktech jsou předpokladem pro zajištění kontroly kvality a jednotnosti dávkování.

Konvenční přístup k analytickému hodnocení obsahu bioaktivních látek v rostlinných extraktech za využití HPLC instrumentace je zapojení kolon s plně porézními částicemi a s C18 stacionární fází v kombinaci s dlouhými časy analýz, které jsou nezbytné pro dosažení požadovaných separací jednotlivých látek v extraktech, zejména pokud se jedná o izomerní látky. Tyto obtížné separace jsou často dosahovány využitím alternativních metod, jako je superkritická fluidní chromatografie nebo na kolonách s částicemi s pevným jádrem a s využitím alternativních chemicky vázaných stacionárních fází.

2 Cíle práce

Cílem teoretické části disertační práce bylo shrnout současný stav na trhu doplňků stravy založených na rostlinných extraktech, podat výčet možného složení a formulace doplňků stravy, přednést aktuální legislativní předpisy a požadavky na jejich výrobu a upozornit na problematiku jejich kontroly kvality. Dalším z úkolů bylo seznámit čtenáře s bioaktivními látkami, které byly obsaženy v doplňcích stravy, pro které byly vyvíjeny nové analytické metody a které byly analyzovány v experimentální části práce. Posledním záměrem teoretické části bylo shrnout současný stav analytického hodnocení doplňků stravy založených na rostlinných extraktech za využití HPLC instrumentace a uvést trendy těchto analýz.

Cílem publikovaných originálních výzkumných prací bylo vyvinout a validovat nové HPLC a UHPLC metody pro rychlou separaci a stanovení obsahu biologicky aktivních látek v doplňcích stravy založených na rostlinných extraktech za použití moderních stacionárních fází, a to s ohledem na selektivitu k daným analyzovaným látkám. Úkolem bylo využít takových možností úpravy reálných vzorků, uspořádání instrumentace a analytických podmínek, které by umožňovaly separaci a detekci všech požadovaných bioaktivních látek bez interference matrice a dalších komponent obsažených v analyzovaných doplňcích.

Cílem přehledového článku bylo shrnout současné trendy v analýze a kontrole kvality doplňků stravy založených na rostlinných extraktech z pohledu použitých analytických metod, extrakčních postupů při úpravě vzorků, hodnocení čistoty, bezpečnosti a stanovení obsahu biologicky aktivních látek.

3 Teoretická část

3.1 Doplnky stravy založené na rostlinných extraktech

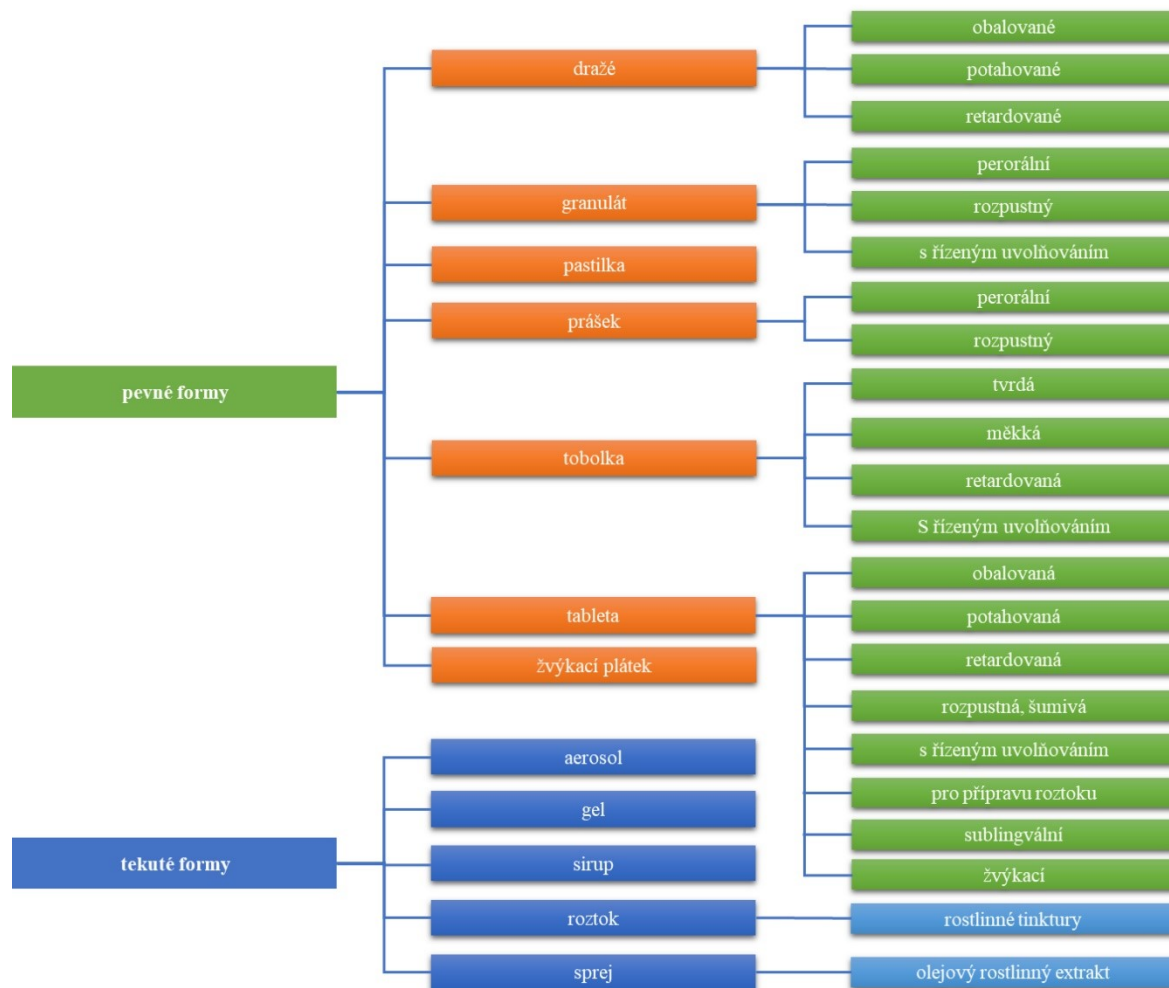
3.1.1 Složení a formulace

Doplnky stravy jsou koncentrované zdroje živin nebo jiných látek, které mají nutriční nebo fyziologický účinek a jejichž účelem je doplnit normální stravu kvůli předpokládaným přínosům pro zdraví [1]. Celá řada látek, jako jsou vitaminy, minerály, amino kyseliny, esenciální mastné kyseliny, vláknina a různé rostlinné a bylinné extrakty, mohou být přítomny v doplňcích stravy. Doplnky stravy nejsou léčivými přípravky a jako takové nemohou vyvolávat farmakologické, imunologické ani metabolické účinky. Proto jejich použití není určeno k léčbě nebo prevenci onemocnění lidí nebo k úpravě fyziologických funkcí [11].

Doplnky stravy se používají upravené do formy tobolek, pastilek, tablet, pilulek a v jiných obdobných formách, dále ve formě sypkých prášků, jako kapalné v ampulích, v lahvičkách s kapátkem a v jiných podobných formách kapalných nebo sypkých výrobků určených k příjmu v malých odměřených množstvích, a takto se uvádějí na trh [12]. Přehled různých formulací doplňků stravy je uveden na Obr. 1. Z výčtu všech možných forem doplňků stravy je patrná blízká podobnost lékovým formám. Legislativa ukládá povinné označení „doplňek stravy“ na obalu přípravku, aby spotřebitel byl jednoznačně upozorněn, že se jedná o potravinu, a ne léčivý přípravek. Stejně tak jsou regulována zdravotní a výživová tvrzení, která mohou být uváděna na obalech doplňků stravy.

V aktuální platné vyhlášce o doplňcích stravy a složení potravin lze nalézt nejvyšší přípustná množství v denní dávce pro rostlinné extrakty a části rostlin použitých v doplňcích stravy, podmínky použití některých dalších látek jiných než rostlinného původu a seznam zakázaných rostlin, částí rostlin a látek [12]. Podmínky přidávání vitaminů, minerálních látek nebo dalších látek do potravin upravuje přímo použitelný předpis Evropské unie o přidávání vitaminů, minerálních látek a dalších látek do potravin [13]. Do potravin nelze přidávat jednotlivě nebo ve směsi omamné nebo psychotropní látky [14], prekursory látek uvedených v kategorii I přímo použitelného předpisu Evropské unie [15], steroidní látky, tj. látky s anabolickými a jinými hormonálními účinky, látky hormonální povahy a další látky, u nichž byl prokázán toxický, genotoxický, teratogenní, halucinogenní, omamný či jiný nepříznivý

účinek na lidský organismus. To mimo jiné znamená, že údaje uvedené na obalu výrobku a deklarovaná množství látek obsažených v doplňku stravy, musí být pravdivé. Produkt by měl mít zachovány všechny jakostní parametry (obsah deklarovaných látek a mikrobiologickou čistotu) minimálně do data expirace přípravku.



Obr. 1 Různé typy formulací doplňků stravy [16]

3.1.2 Požadavky a legislativa

V Evropské unii jsou doplňky stravy dle Nařízení EU č. 178/2002 o potravinovém právu regulovány jako potraviny. Harmonizovaná legislativa upravuje vitaminy a minerály a látky používané jako jejich zdroje, které lze použít při výrobě doplňků stravy. U jiných složek, než jsou vitamíny a minerální látky, stanovila Evropská komise harmonizovaná pravidla na ochranu spotřebitelů před potenciálními zdravotními riziky a vede seznam látek, o nichž je známo nebo se předpokládá, že mají nepříznivé účinky na zdraví a jejichž použití je proto kontrolováno.

V ČR od 1. 1. 2015 je provozovatel potravinářského podniku, který vyrábí nebo uvádí na trh doplněk stravy, povinen před jejich prvním uvedením na trh zaslat Ministerstvu zemědělství český text označení, včetně povinných informací, který bude uveden na obale výrobku. V případě, že jsou splněny všechny legislativní požadavky, může být doplněk stravy uveden na trh v den odeslání oznámení o uvedení doplňku stravy na trh na Ministerstvo zemědělství. Za splnění požadavků právních předpisů, včetně bezpečnosti výrobku a označování odpovídá provozovatel potravinářského podniku uvádějící doplněk stravy na trh. Pro splnění informační povinnosti není nutné přikládat výsledky jakýchkoliv testů či kontrol nezávadnosti a ani v rámci přijetí notifikace nepodléhají doplňky stravy ze strany rezortu Ministerstva zemědělství žádnému schvalovacímu procesu. Doplněk stravy může obsahovat i tzv. „novou složku“. Nová složka stejně jako potravina nového typu je definována nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 258/1997. Nové složky jsou látky, u nichž nebyla doložena historie spotřeby ve významném množství před datem 15. 5. 1997 na území kteréhokoliv členského státu EU. Potraviny nového typu a potraviny, které obsahují novou složku, podléhají před uvedením na trh schvalovacímu procesu [17].

Odborné stanovisko Státního zdravotního ústavu (SZÚ) v podobě vydání certifikátu zdravotní bezpečnosti zahrnuje posouzení složení přípravku z hlediska zdravotní nezávadnosti a platné legislativy (formy vitaminů a minerálních látek, použití rostlinných částí a jejich extraktů z hlediska tradičního používání na území EU, množství účinných složek v doporučené denní dávce a další), posouzení označení přípravku z hlediska platných předpisů včetně doporučených varování pro citlivé skupiny populace a posouzení použitých zdravotních tvrzení. Seznam všech doposud povolených či zamítnutých zdravotních tvrzení lze nalézt na stránkách Evropské komise (EU register of nutrition and health claims).

Certifikát slouží pro prokázání zdravotní bezpečnosti a souladu s evropským a českým potravinovým právem [18].

Ve vyhlášce č. 58/2018 Sb. o doplňcích stravy a složení potravin, lze nalézt, že na obalu doplňku stravy kromě požadavků na označování balených potravin stanovených přímo použitelným předpisem Evropské unie upravujícím označování potravin a požadavků upravených v zákoně, je nezbytné uvést celou řadu dalších údajů a upozornění pro spotřebitele (nevhodnost doplňku stravy pro určité skupiny spotřebitelů, uvádění pouze schválených zdravotních tvrzení, číselný údaj o množství vitaminů, minerálních látek nebo jiných látek s výživovým nebo fyziologickým účinkem vztažený na doporučenou denní dávku a další).

Stejně jako jiné potravinové produkty, doplňky stravy mohou obsahovat různá aditiva, jako jsou sladidla, barviva a potahové látky. Do doplňků stravy prodávaných na území EU lze přidávat pouze specificky schválená aditiva dle Nařízení Evropské komise č. 1333/2008. Dle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 852/2004 o hygieně potravin, jedním z hlavních požadavků pro zajištění zdravotní nezávadnosti potravin je zavedení a dodržování požadavků správné hygienické praxe (Good Hygiene Practice, GHP) a správné výrobní praxe (Good Manufacture Practice, GMP). Tyto principy jsou nezbytným základem pro budování dalších systémů řízení jakosti, zejména postupů založených na principech HACCP. Mezi další standardy kvality potravin patří aplikace norem ČSN P ISO/TS 22002-1:2009 (Programy nezbytných předpokladů pro bezpečnost potravin), ISO 9001:2000 (Systém managementu jakosti) a ISO 22000:2018 (Systém managementu bezpečnosti potravin). Mezi mezinárodně uznávané odborné certifikace výrobců potravin (včetně doplňků stravy) patří BRC (Global Standard for Food Safety) a IFS (International Food Standard). Obě certifikace představují pro prodejce i spotřebitele záruku kvality prodávaných doplňků stravy.

Pro srovnání, americká FDA (Food and Drug Administration) vyžaduje, aby všechny doplňky stravy vyráběné a prodávané v USA byly hodnoceny z hlediska identity, čistoty a potence použitých extraktů. Dále je požadováno stanovení přítomnosti kontaminantů a zakázaných příměsí (adulterantů). Pro americký trh, dodržování současné správné výrobní praxe (cGMP, norma 21 CFR 117) při výrobě, balení, označování nebo držení doplňků stravy je povinné [2].

3.1.3 Kontrola kvality

Nezbytným předpokladem bezpečnosti doplňků stravy na trhu a neklamání spotřebitele je kontrola dodržování výrobních procesů, podnikových i zákonných norem a kontrola obsahu deklarovaných složek a látek zakázaných pro použití v potravinách a v jejich výrobě. Ačkoli doplňky stravy jsou svou formulací velmi podobné léčivým přípravkům, jsou z legislativního pohledu potravinami a tomu také odpovídají požadavky na jejich kontrolu. Pro spotřebitele i prodejce je zcela nemožné rozpoznat jakostní parametry přípravku a musí pouze spoléhat na certifikace výrobce a případnou kontrolu kvality ze strany inspekčních autorit.

Důležitou roli hraje kvalita jednotlivých složek doplňků stravy, a to zejména právě rostlinných extraktů. Výrobce by měl kontrolovat všechny vstupní suroviny včetně primárních obalů a provádět pravidelné audity svých dodavatelů. Zvláštního zřetele by měly být brány rostlinné extrakty pocházející ze zemí mimo EU. Ačkoli nelze u doplňků stravy očekávat kontrolu kvality výrobcem srovnatelnou s léčivými přípravky, přesto je výrobce povinen zajistit, aby to, co deklaruje na obalu přípravku, v něm také bylo, a naopak co deklarováno není, v přípravku přítomno nebylo.

Doplňky stravy na trhu v ČR mohou být dále testovány různými spotřebitelskými organizacemi nebo ze strany Státní zemědělské a potravinářské inspekce (SZPI). Jedním z jejich úkolů je dohled nad dodržováním legislativních požadavků v oblasti doplňků stravy, při jejich výrobě, prodeji i propagování prostřednictvím reklamy. Kontroly SZPI jsou zaměřené především na zkoušky na mikrobiologické požadavky a na obsah cizorodých látek ve smyslu platných právních předpisů (v obou uvedených případech se jedná o prokázání bezpečnosti zkoušené potraviny). Dále se uskutečňují analytické a senzorické rozbory (tedy rozbory jakostních znaků, jejichž parametry jsou závazně stanoveny), hodnotí se také správnost označení a dodržování doby minimální trvanlivosti a použitelnosti výrobků [19].

Nutnost dohledu nad kvalitou doplňků stravy potvrzuje i souhrnná zpráva SZPI za rok 2017. Vzorky doplňků stravy spolu s dalšími potravinami byly hodnoceny z hlediska mikrobiologické čistoty, obsahu limitovaných nebo zakázaných látek a byla provedena kontrola obsahu hlavních složek doplňků stravy deklarovaných na obale. Nadlimitní množství reziduí pesticidů bylo zjištěno u 27 šarží testovaných vzorků potravin včetně doplňků stravy. Obsah polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) byl kontrolován

celkem u 66 šarží potravin, nevyhověla 1 šarže. Byl to doplněk stravy s nadlimitní hodnotou benzo[a]pyrenu a hodnotou suma PAH. Při kontrole obsahu konzervačních látek byla u několika vzorků doplňků stravy stanovena přítomnost konzervační látky, která nebyla vůbec povolena. Další kontrola zaměřená na obsah glukosamin sulfátu, chondroitin sulfátu a metylsulfonylmetanu (MSM) v doplňcích stravy s fyziologickým účinkem na klouby a pojivovou tkáň v množství deklarovaném na obalu produktů prokázala klamání spotřebitele. Z celkového počtu 13 vzorků pouze 5 vzorků zcela vyhovělo uvedené deklaraci na obalu potravin. Naopak zcela nevyhověl výrobek, který v konečném výsledku obsahoval téměř 17× menší množství chondroitin sulfátu, než měl deklarováno na svém obalu. Ostatních 7 vzorků bylo hodnoceno celkově jako nevyhovující, neboť minimálně v jednom ze sledovaných parametrů neodpovídalo skutečné množství chondroprotektiv množství uvedenému na obalu. Cílem kontroly doplňků stravy deklarujících obsah řasy Chlorella bylo prověřit, zda doplňky stravy deklarující na svém obalu pouze řasu Chlorella neobsahují ve skutečnosti i sinici Spirulinu, která je cenově výhodnější než řasa Chlorella. V rámci této kontroly bylo odebráno celkem 15 vzorků doplňků stravy deklarujících na svém obalu ve složení pouze řasu Chlorella. Z celkového počtu 15 vzorků nevyhověly pouze 2 vzorky doplňků stravy, přičemž v jednom případě byl poměr obsahu Chlorella/Spirulina 80/20 % a ve druhém případě 60/40 %.

Mimořádná kontrola vybraných potravin uváděných na trh prostřednictvím internetu byla zaměřena na doplňky stravy, u nichž byly uvedeny informace, které jim přisuzovaly schopnost prevence nebo léčby nemocí kostí a kloubů nebo odkazovaly na takové vlastnosti a dále na výrobky obsahující vybrané nepovolené potraviny a složky nového typu (PNT). V rámci 21 prověřovaných e-shopů bylo zkontrolováno celkem 26 výrobků. V průběhu kontroly bylo u některých výrobků zjištěno, že provozovatel e-shopu neměl na webových stránkách nebo na etiketách výrobků aktuální údaje o jejich složení od výrobce nebo dovozce, tzn., že tyto výrobky ve skutečnosti neobsahovaly nepovolené PNT. Byl potvrzen dlouhodobý problém ukazující, že prostřednictvím internetového prodeje se stále nabízí doplňky stravy, které obsahují nepovolené PNT, a doplňky stravy, při jejichž nabízení jsou používána léčebná tvrzení, případně neschválená zdravotní tvrzení.

V oboru zvláštní výživa a doplňky stravy byl za rok 2017 udělen druhý největší finanční objem zakáz, a to ve výši 3 366 632 Kč [20].

3.1.4 Rostlinné extrakty a bioaktivní látky

Celosvětový prodej doplňků stravy neustále roste a zejména ty, které jsou založeny na rostlinných částech a extraktech, patří mezi nejrozšířenější, protože jsou považovány za bezpečnější a zdravější než syntetické léčivé látky a bez vedlejších účinků [2]. Ačkoli bioaktivní látky mají nízkou účinnost ve srovnání s farmaceutickými léčivy, existují četné biologické mechanismy, kterými mohou doplňky stravy na bázi rostlinných extraktů ovlivňovat patofyziologické procesy. Na druhé straně správné interpretace klinických studií, které byly provedeny, jsou zatíženy nekonzistentními výsledky, špatně navrženými experimenty nebo výběrem doplňků stravy zkoumaných bez analýzy obsahu bioaktivních látek před jejich podáváním lidem. Vzhledem k těmto skutečnostem, neexistuje předpoklad, že doplňky stravy na bázi rostlinných extraktů mohou fyziologicky účinkovat nebo dokonce obsahovat jakékoliv bioaktivní látky.

Výrobci ve svých přípravcích deklarují obsah určitého množství rostlinného extraktu, ale tato informace neříká nic o obsahu bioaktivních látek. Složení a obsah bioaktivních látek v rostlinách se může lišit v závislosti na klimatu, teplotě, období, půdě a dalších faktorech. Rozpor mezi množstvím použitého extraktu a obsahem účinných látek v jedné dávce může mít podstatný vliv na dávkování a může vést k předávkování konzumenta nebo naopak k neúčinnému přípravku. Aby byla zachována důvěra spotřebitelů v bezpečnost a účinnost výrobků obsahujících rostlinné extrakty, jsou zapotřebí nové moderní validované analytické metody pro identifikaci, kvantifikaci a standardizaci bioaktivních látek v rostlinných extraktech, pro kontrolu jakosti a jednotnost dávkování. Jištění kvality doplňků stravy a podrobná znalost obsahu bioaktivních látek v použitých extraktech jsou velmi důležité při stanovení účinnosti a biologické dostupnosti po příjmu těchto látek v klinických studiích. Bez těchto informací mohou být výsledky studií nesprávně interpretovány.

Problémem s biologickou účinností doplňků stravy založených na rostlinných extraktech tkví v jejich biodostupnosti. I přesto, že doplněk obsahuje z analytického hlediska deklarované množství extraktu, nejsou u něj prováděny žádné disoluční testy podobné těm, které jsou nezbytnou součástí registrace léčivých přípravků. Pro výrobce je nezbytné, aby přípravek byl kvalitní z hlediska bezpečnosti, nikoli však účinnosti. Stejně tak není u doplňků stravy sledována stabilita bioaktivních látek. Přípravek může být bezpečný po celou dobu jeho expirace i přesto, že bioaktivní látky mohou být v průběhu degradovány na produkty

bez biologického účinku. Žádná data ani provádění studií z hlediska kompatibility rostlinného extraktu s použitými pomocnými látkami, primárním obalem a vhodnosti konkrétní formulace nejsou vyžadována.

To, že biologická odezva v živém organismu závisí právě na biodostupnosti bioaktivních látek, znamená, že snížená biodostupnost může mít za následek nefunkčnost daného přípravku i přesto, že obsahuje dostatečné množství extraktu s dostatečným množstvím bioaktivních látek, které se však danou cestou podání do lidského těla nevstřebávají. Zde vzniká rozpor mezi studii prováděnými *in vivo* u různých živočichů, kdy „terapeutické hladiny“ je dosaženo podáváním bioaktivních látek přímo do krevního řečiště. Navíc, pouze omezené množství prací se zabývá vstřebáváním různých forem bioaktivních látek z rostlinných extraktů. Například glykosidy bioaktivních látek mohou být absorbovány v tenkém střevu lépe než jejich volné formy [21].

Na trhu v ČR lze nalézt celou škálu různých doplňků stravy s obsahem rostlinných extraktů. K těm neznámějším patří silymarin – extrakt Ostropestřce mariánského s obsahem bioaktivních flavonolignanů, extrakt Ginkgo biloba obsahující flavonové glykosidy a terpenolaktony, borůvkový extrakt s antokyany a spousta dalších. Z průzkumu provedeného společností QuintilesIMS vyplývá, že prodeje doplňků stravy v ČR neustále stoupají. V roce 2016 byl celkový obrat z prodeje 3,92 miliardy korun, což oproti roku 2015 představovalo nárůst o 164 milionů Kč. Tento trend rostoucích prodejů doplňků stravy lze sledovat i v rámci celé EU. Dle dat společnosti Euromonitor International se očekává, že hodnota trhu s doplňky stravy dosáhne v roce 2020 hodnoty 7,9 miliardy € [22].

Tabulka 1 uvádí přehled extraktů, které byly analyzovány v rámci experimentální části této disertační práce, obsah bioaktivních látek, jejich předpokládaný biologický účinek a příklady doplňků stravy, které lze koupit na českém trhu (v lékárnách, supermarketech, specializovaných prodejnách a prostřednictvím internetu).

Tabulka 1 Přehled analyzovaných extraktů s obsahem bioaktivních látek, jejich předpokládaným biologickým účinkem a příklady doplňků stravy na trhu v ČR

Rostlinný extrakt	Bioaktivní látky	Předpokládané biologické účinky	Příklady doplňků stravy dostupných na trhu v ČR
Extrakt z oddenků a kořenů <i>Křídlatky japonské</i>	Resveratrol Polydatin	vychytávání volných radikálů, protizánětlivá, vazorelaxační a protinádorová aktivita, modulace metabolismu lipidů [21]	A1-Resveratrol 800 RX Evelor Resveratrol 50 mg Resveratrol MAX Resveratrol antiaging Indonal Partner for Woman
Extrakt z brukvovité zeleniny	Indol-3-karbinol	protinádorová aktivita u hormonálně dependentních tumorů zahrnující nádor prsu, prostaty, dělohy a tlustého střeva [23,24]	Gynmax GRAV-IN INDOL-IN Indonal man Indonal partner for Woman ProstaIN
Extrakt <i>Ostropestřce mariánského</i> – Silymarin	Taxifolin Silychristin Silydianin Silybin A Silybin B Isosilybin A Isosilybin B	hepatoprotektivní a protinádorová aktivita [25,26]	Ostropestřec forte Silymarin Premium MaxiVita Herbal Detox komplex Ostropestrec Liftea Silybum Herbex
Extrakty rostlinných olejů	β -Sitosterol Brassicasterol Campesterol Ergosterol Fucosterol Stigmasterol Stigmastanol	snížování LDL cholesterolu v lidském těle, protizánětlivé a antioxidační vlastnosti [27]	Cholesterol Lecisterol Vegapure
Extrakt rostliny <i>Serenoa plavivá</i>	Campesterol β -Sitosterol Stigmasterol	pomocná léčba benigní hyperplazie prostaty, protizánětlivé a antiedematózní účinky [28,29]	Prostenal FORTE ProstaMax ProstaIN
Extrakt z bobulí <i>acai</i>	Cyanidin-3-glukosid Cyanidin-3-rutenosid Delphinidin-3-galaktosid Delphinidin-3-glukosid Delphinidin-3-rutenosid	antioxidační, protizánětlivé a anti-karcinogenní vlastnosti [30]	Acai Allnature Acai Detox Acai Exotic Acai Extreme Acai Slim Acai Unios MedPharma Acai berry Vito life Acai berry
Extrakt z plodů borůvek	Cyanidin-3-glukosid Peonidin-3-glukosid	antioxidační a anti-karcinogenní vlastnosti, prevence infekce močových cest [31]	My country extract Green care extract Ostrovidky
Extrakt ze zrn zelené kávy	Chlorogenová kyselina Kryptochlorogenová kyselina Neochlorogenová kyselina Disubstituované deriváty kyseliny chlorogenové	antioxidační a protizánětlivé účinky, snížování rizika kardiovaskulárních chorob a diabetu mellitu typu 2 [32,33]	Kilostop Vito life kyselina chlorogenová Vito life zelená káva Zelená káva bylinný extrakt Zelená káva extra Zelená káva max Zelená káva premium

3.1.5 Hodnocení čistoty a bezpečnost rostlinných extraktů

Při posuzování čistoty rostlinných extraktů obsažených v doplňcích stravy je třeba brát v úvahu několik aspektů. Rostlinné extrakty jsou koncentrované formy rostlinných produktů. Samotná rostlina může být vystavena různým toxickým látkám zapojených do zemědělských procesů, jako jsou pesticidy, mykotoxiny a toxické kovy. Všechny tyto látky se pak mohou nacházet ve finálních formách doplňků stravy. Další problém s čistotou doplňků stravy je přítomnost adulterantů a léčiv, které výrobci úmyslně přidali do svých produktů, aby zvýšili jejich biologický efekt (účinnost). Přítomnost těchto léků představuje vážné zdravotní riziko pro spotřebitele, zejména s ohledem na skutečnost, že přípravky nejsou užívány jen zdravými lidmi, ale většinou nemocnými pacienty, kteří si chtějí zlepšit své zdraví.

Obvyklé postupy extrakce používané pro výrobu extraktů z rostlinného materiálu nemohou zabránit ko-izolaci různých kontaminantů, které mohou být přítomny v surovinách. Nevhodná manipulace, skladování a distribuce léčivých rostlin mohou být zdrojem kontaminace houbami, které mohou produkovat široké spektrum mykotoxinů. Doplňky stravy na bázi rostlinných extraktů kontaminovaných mykotoxiny mohou přispívat k nepříznivým zdravotním problémům, a proto představují zvláštní nebezpečí [34]. Zdravotní riziko existuje i v případě kontaminovaných přípravků, u nichž nebyl překročen daný limit obsahu mykotoxinů, protože spotřebitelé mohou užívat několik doplňků stravy zároveň. V součtu pak již může dojít k překročení stanovených limitů a tím vzniká zdravotní riziko pro spotřebitele.

Mezi další kontaminanty přítomné v rostlinných extraktech patří endokrinní disruptory (ED). Většinou se jedná o syntetické sloučeniny, které interagují s lidským nebo zvířecím endokrinním systémem a narušují jeho funkci. ED v doplňcích stravy na bázi rostlinných extraktů mohou mít odlišný původ, např. prostřednictvím průmyslového znečištění nebo biokumulací v potravinovém řetězci. Mezi perzistentní a biokumulativní sloučeniny patří alkylfenoly (nonylfenol, bisfenoly), polychlorované bifenyly (PCB), dichlorodifenyltrichlorethan (DDT) a dioxiny, které představují vážná rizika v rostlinné a živočišné výrobě. Bylinné přípravky na trhu jsou většinou formulovány jako kapsle obsahující sušený ethanolický extrakt účinných látek [35] nebo sušený obohacený rostlinný materiál. Bohužel běžné postupy při výrobě doplňků stravy na bázi rostlinných extraktů se nevyhnou ko-izolaci potenciálních kontaminantů. Ty mohou být přítomny v surových

rostlinných materiálech a díky jejich podobným fyzikálně-chemickým vlastnostem s extrahovanými biologicky aktivními sloučeninami, jsou také společně extrahovány. V této souvislosti, jejich zakoncentrování ze stopových množství na úrovně překračující povolené limity představuje zdravotní riziko pro spotřebitele. V nedávné době bylo v řadě studií zjištěno, že doplňky stravy mohou obsahovat endokrinní disruptory v podobě estrogenních látek [36-38]. Kvůli velké rozmanitosti doplňků stravy založených na rostlinných extraktech a jejich postavení na pomezí mezi potravinami a farmaceutickými přípravky, maximální stanovená úroveň reziduí pesticidů a dalších ED nejsou stále dobře definovány, zejména v EU. Systematický přehled, který shrnuje problémy kontaminantů, mykotoxinů a záměrných falšování rostlinných doplňků stravy zveřejnil Sanzini a kol. v roce 2011 [39]. Nejzávažnější problémy spojené s čistotou a bezpečností doplňků stravy se týkají nedeklarovaných chemických látek a léčiv, jako jsou inhibitory PDE-5, anorektická a antidiabetická léčiva, které jsou nelegálně přidávány do doplňků stravy pro zvýšení jejich účinků. Jedním zvláštním případem je nalezení vysoké hladiny glukózy, jako adulterantu, v doplňcích stravy obsahujících extrakt rostliny *Stevia rebaudiana*. Toto zjištění může být velmi alarmující pro spotřebitele, kteří se mohou snažit omezit příjem cukru a kteří již trpí diabetickým onemocněním [40].

Kontaminanty obsažené v rostlinných extraktech mohou existovat v surovém stavu rostlinného materiálu, jak již bylo popsáno výše. Tyto toxické sloučeniny obecně zahrnují rostlinné toxiny, sekundární metabolity, pesticidy a těžké kovy. Chronické vystavení vysokým hladinám těchto toxických kovů může způsobit různé nežádoucí účinky na lidské zdraví, včetně kožních alergií, nádorových onemocnění, kardiovaskulárních a neurologických účinků [41].

Tyto výsledky obecně ukazují na nízkou kvalitu výrobních postupů a úmyslné falšování doplňků stravy jejich výrobci. S ohledem na různé skupiny adulterantů, které byly nalezeny, včetně léčiv a toxických látek, metody, které umožňují necílený screening a současné stanovení velkého počtu látek (např. UHPLC-HRMS) jsou nezbytné pro zajištění lepší kontroly jakosti doplňků stravy na bázi rostlinných extraktů a tím i zvýšené zdravotní bezpečnosti pro spotřebitele.

3.2 Využití HPLC instrumentace v analýze doplňků stravy na bázi rostlinných extraktů

3.2.1 Metody kapalinové chromatografie

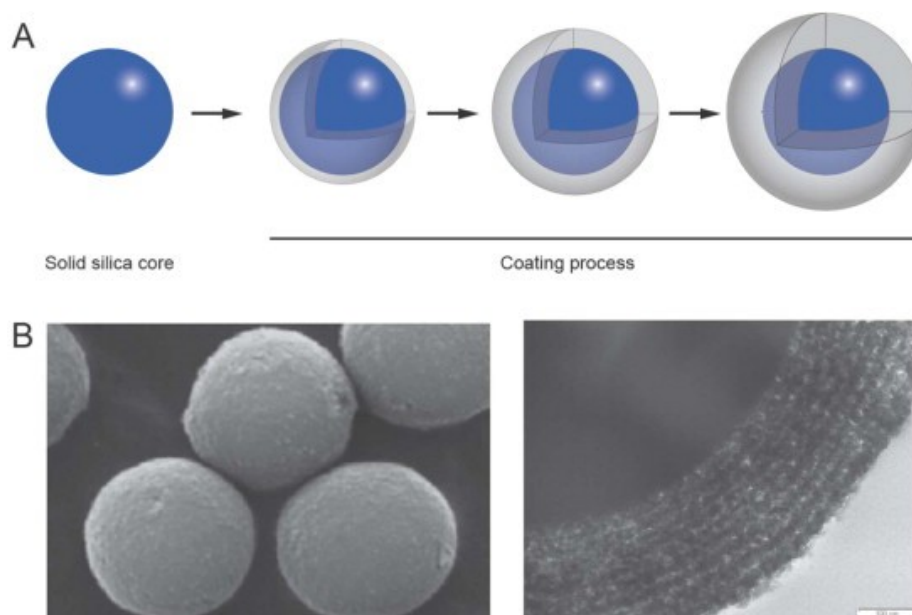
Kapalinová chromatografie v módu reverzní fáze (RP-LC) je nejčastěji používanou metodou pro analýzu bioaktivních látek v doplňcích stravy na bázi rostlinných extraktů a pro testování čistoty rostlinných extraktů obsažených v těchto přípravcích. Analýzy rostlinných extraktů a stanovení bioaktivních látek jsou zpravidla prováděny metodou HPLC spojenou s UV/VIS detektorem nebo pomocí detektoru fotodiodového pole (PDA) [42-52]. Pro dosažení lepší selektivity a citlivosti je alternativně využíván fluorescenční detektor [53,54]. V případě nízké odezvy analytů v UV spektru jsou používány odpařovací detektory, jakým je detektor nabitého aerosolu (CAD, Corona detektor) [55] a detektor rozptylu světla (ELSD) [40,56]. Navzdory univerzální odezvě těchto detektorů na jakýkoli netěkavý nebo polotěkavý analyt bez chromoforu nebo fluoroforu ve své molekule, bez nutnosti derivatizace a poměrně dobré citlivosti, nejsou tyto detektory tak široce používány. Pravděpodobně to je zapříčiněno omezeními jejich lineárního rozsahu a chybějícími spektrálními daty.

Nicméně i PDA detektor má svá omezení co se týká identifikace látek pomocí UV/VIS spektra a zpravidla jsou vyžadovány referenční standardy látek k potvrzení identity pomocí porovnání retenčních časů. Ani to však nemusí být zárukou správné identifikace, zejména u velmi komplexních extraktů obsahujících více strukturně podobných látek. Toto omezení lze vyřešit zapojením MS detekce. Ta je navíc schopna dosáhnout velmi nízkých detekčních limitů. Nejčastěji je v nalezených publikacích využívána měkká ionizační technika vyhřívaného elektrospreje [8,9,54,57,58]. Ale ani univerzální MS detekce není bez určitých limitů. Kvantitativní multikomponentní analýza založená na MS v rostlinných materiálech bývá spojena s nepředvídatelnými matricovými efekty a omezeným počtem drahých izotopově značených interních standardů. Velmi důležitou výzkumnou linií je provádění necílené kvalitativní analýzy adulterantů a kontaminantů pomocí vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie ve spojení s kapalinovou chromatografií (LC-HRMS) [3,4].

V pracích zabývajících se analýzami kovů, jako bioaktivních sloučenin nebo toxických adulterantů v rostlinných extraktech, byla použita hmotnostní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou (ICP-MS). Obsahy toxických (těžkých) kovů se mohou v extraktech

stejných rostlin velmi lišit. Tato variabilita je dána environmentálními a agronomickými podmínkami, pěstováním rostlin v kontaminovaných oblastech, špatnými skladovacími podmínkami a dalšími faktory [41]. Pro stanovení selenu [61] a kobaltu [62] v doplňcích stravy byla použita ICP-MS spojená s HPLC.

Chromatografické systémy (pumpy, detekční systémy), příslušenství (chromatografické kolony) a rozpouštědla neustále zvyšují svoji kvalitu a spolehlivost, proto se v současné době stále více používají alternativní metody separace v analýze rostlinných extraktů a při stanovení bioaktivních látek. Kolony naplněné menšími částicemi a využívající technologii pevného jádra [43,45-47,50-52,55] jsou používány pro zvýšení účinnosti separace a rychlosti eluce s dostatečným rozlišením a citlivostí. Dalším přístupem zvyšujícím rychlost eluce je použití monolitických kolon [42,49]. Pro odlišnou selektivitu se používají alternativní stacionární fáze, jako je kyanopropyl [45], pentafluorfenyl [50-51] a fenylhexyl [55] namísto konvenčních kolon se stacionární fází C18. Tyto alternativní fáze mohou nabídnout lepší selektivitu při analýze složitých rostlinných matric, kratší retenční časy a vyšší účinnost separace (např. C-30 pro separaci karotenoidů, F5 pro separaci antokyanů [51] nebo fenylhexyl stacionární fáze pro separaci fytoosterolů [55]).



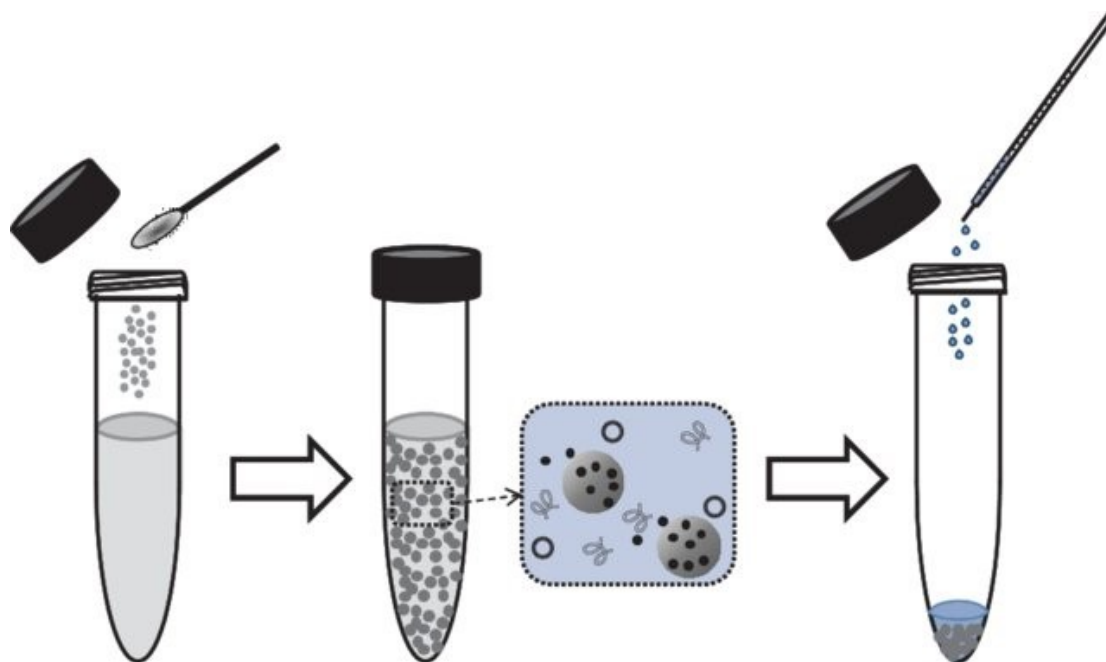
Obr. 2 (A) Proces budování typické částice s pevným jádrem. (B) Fotografie ze skenovacího elektronového mikroskopu zobrazující částice s pevným jádrem o velikosti 2,6 μm (vlevo) a 1,7 μm (vpravo) [63]

3.2.2 Úprava vzorku před analýzou

Techniky úpravy vzorků před analýzou se obvykle volí na základě fyzikálně-chemických vlastností analyzovaných látek, jejich koncentrace v rostlinných extraktech a komplexnosti analyzovaných matric. Při popisu metod úpravy vzorků doplňků stravy je třeba vzít v úvahu, že drtivá většina extraktů je v pevném stavu. Z tohoto pohledu je homogenizace a rozměňování několika dávkových forem (obvykle asi 10) prvním krokem ve všech postupech pro přípravu vzorků. Více jak padesát publikovaných prací za posledních pět let zabývajících se stanovením obsahu bioaktivních látek v doplňcích stravy na bázi rostlinných extraktů nebo testováním čistoty rostlinných extraktů v těchto přípravech uvádí použití ultrazvukem asistované extrakce z pevné fáze do kapalné (SLE). Ta je pak následovaná filtrací, centrifugací nebo oběma metodami jako druhý stupeň extrakce bioaktivních látek, kontaminantů nebo adulerantů z jejich matric. SLE patří mezi snadné a rychlé metody úpravy vzorků. Její oblíbenost v analýze bioaktivních látek je založena na skutečnosti, že extrahované sloučeniny jsou snadno rozpustné v rozpouštědlech používaných k extrakci. Navíc tato rozpouštědla jsou kompatibilní s použitými HPLC metodami, takže není nutný další krok odpařování a rekonstituce. Díky snadné homogenizaci a pulverizaci pevných vzorků poskytujícím rozpouštědlům velký výměnný povrch a krátké difuzní cesty lze dosáhnout rychlé extrakce analytů s požadovanou výtěžností. Pro většinu vzorků je obvykle nezbytná doba ultrazvukování kratší než 30 minut. Po sonifikaci bývá nerozpuštěný materiál obvykle odstraňován filtrací [42-45,49,51,54,57,60] a centrifugací [46,50,56]. Některé práce uvádějí použití vortexování a protřepávání vzorků v extrakčních rozpouštědlech před provedením sonifikace, centrifugace a filtrace pro usnadnění extrakce a dosažení vyššího výtěžku analyzovaných látek. Některé roztoky jsou dále po filtraci nebo odstředování zředěny, než jsou dávkovány do chromatografického systému. Nejčastěji používaným extrakčním rozpouštědlem je čistý methanol, následovaný různými vodnými a okyselenými směsmi methanolu, případně ethanol, acetonitril či další nepolární rozpouštědla zvolená podle povahy extrahovaných látek.

V případě MS, MS/MS a HRMS analýzy vyžadující vysokou čistotu analyzovaných vzorků, se používá několik forem extrakce tuhou fází (SPE). Příkladem je použití disperzní SPE ve studii zaměřené na cílenou analýzu léčiv, rostlinných toxinů a dalších sekundárních metabolitů v bylinných doplňcích stravy UHPLC-HRMS metodou. Analyzované doplňky

stravy byly ve formě měkkých tobolek. Aby se minimalizovala přítomnost nepolárních složek ko-izolovaných z lipofilní matrice v konečném vzorku, bylo provedeno přečištění pomocí dSPE následované filtrací a ředěním [9]. Mezi moderní sorbenty používané v různých formách SPE patří například grafénový oxid [65]. Nedávná práce uvádí použití SPE založené na metodě molekulárně vtištěných polymerů (MISPE) k odstranění matricových efektů u MS. Vhodnost MISPE-UHPLC-MS/MS metody pro analýzu reálných vzorků byla ověřena stanovením lovastatinu v doplňcích stravy s obsahem červené fermentované rýže [66]. MIP poskytují vysokou selektivitu v kroku extrakce, proto jsou výhodné pro úpravu vzorků z komplexních rostlinných matric. Avšak počet dostupných komerčních MIP sorbentů pro extrakci biologicky aktivních sloučenin z rostlinných extraktů je zatím omezený.

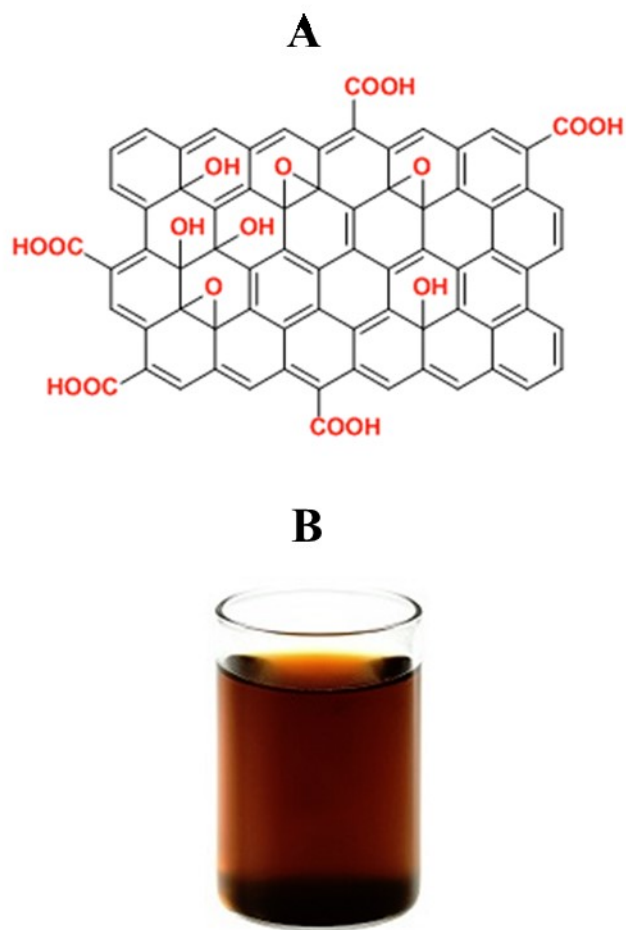


Obr. 3 Příklad provedení disperzní extrakce na tuhou fázi (dSPE) [64]

V neposlední řadě se lze stále setkat s metodou extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) při přípravě vzorků doplňků stravy nebo extrakci bioaktivních látek z rostlinných extraktů. Tato metoda většinou vyžaduje použití patričného vnitřního standardu a ve svém standardním provedení není příliš ekologická s ohledem na používaná rozpouštědla. Proto je konvenční LLE nahrazována novými miniaturizovanými technikami, jako je mikroextrakce

z kapaliny do kapaliny (LLME), disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny (DLLME) nebo mikroextrakce do jediné kapky (SDME).

Metoda LLE byla použita v práci zabývající se stanovením stimulantů, anorektických léků a inhibitorů fosfodiesterázy 5 v doplňcích stravy pomocí LC-HRMS. Postup přípravy vzorku v této studii sestával z rekonstitučního kroku před a po provedení LLE. Směs pentan/ethylether (9:1) byla použita jako akceptorová kapalina pro sloučeniny rozpuštěné v 1M roztoku hydroxidu sodného [4]. Dalším případem, kdy je nezbytné využít LLE v průběhu úpravy vzorku, je analýza rostlinných sterolů a stanolů. Ty se vyskytují v přírodě ve formě esterů, které je nezbytné zmýdelnit pro získání volných forem, které lze separovat a stanovit pomocí HPLC [67].



Obr. 4 Struktura oxidovaného grafénu obsahuje hydroxy, karboxy a epoxy skupiny (A), disperze grafénového oxidu ve vodě (B) [68]

3.2.3 Validace nových metod

Pro zajištění spolehlivých a přesných výsledků analýz musí být publikovaná data opatřena patřičným QA/QC protokolem. V případě validace metod pro analýzu doplňků stravy neexistují jednotné pokyny („guidelines“) pro její provedení a požadovaná kritéria. Autoři jednotlivých studií se odkazují na pokyny FDA pro validaci bioanalytických metod [69], pokyny Mezinárodní rady pro harmonizaci technických požadavků na léčivé přípravky pro humánní použití (ICH) [70] nebo na lékopisná a jiná doporučení [71-73].

I přes tuto nejednotnost, většina prací zabývajících se stanovováním bioaktivních látek v doplňcích stravy a testováním čistoty rostlinných extraktů se shoduje v parametrech validace jako je selektivita, citlivost (LOD / LOQ), linearita, přesnost a preciznost, výtěžnost extrakce, matricové efekty (v případě MS detekce), stabilita vzorků a robustnost navržené metody. Limity pro všechny uvedené parametry jsou přejaty z uvedených pokynů a doporučení. Také bývá uveden test vhodnosti chromatografického systému.

Pro identifikaci bioaktivních látek se často používá srovnání retenčních časů odpovídajícího píku na chromatogramu referenčního standardu a vzorku. Dále při použití PDA detektoru je možné porovnat spektra analyzované látky s referenčním standardem. Vzhledem ke komplexnosti rostlinných extraktů bývá ovšem nutné provést ověření pravosti analyzovaných látek, když daná HPLC metoda sama o sobě nemůže zaručit přesnou shodu analyzované látky v referenčním roztoku a roztoku vzorku, případně detekovat koeluci více látek v jednom chromatografickém píku. Ověření se obvykle provádí pomocí MS, MS/MS a HRMS dat.

3.2.4 Trendy a perspektivy do budoucna

Lze konstatovat, že preferovanou analytickou technikou pro analýzu bioaktivních látek v doplňcích stravy je konvenční HPLC spojená s PDA a UV detektory. Tato skutečnost pramení nejvíce z toho, že tato technika je dobře zavedená ve většině analytických laboratoří, které se zabývají prováděním rutinních analýz různých vzorků, a to nejen doplňků stravy. I přes tento fakt se instrumentace UHPLC začíná prosazovat stále častěji v posledních letech a jako alternativní detekční techniky k UV využívá fluorescenční detekci, univerzální odpařovací detektory (CAD, ELSD) a nejvíce MS detekci. Určitou alternativou k HPLC/UHPLC pro obtížné separace izomerních sloučenin se do budoucna zdá být superkritická fluidní chromatografie (SFC/UHPSFC), která by mohla poskytnout selektivitu, které nelze dosáhnout konvenční kapalinovou chromatografií.

V případě testování čistoty rostlinných extraktů, téměř výlučně je využíváno UHPLC instrumentace spojené s MS, MS/MS a HRMS detekcí. Trend těchto analýz jasně směřuje ke stále častějšímu využití vysokorozlišovací MS pro detekci co možná nejširšího spektra látek, které se mohou vyskytovat v rostlinných extraktech jako kontaminanty nebo adulteranty. V případě analýzy těžkých kovů převládá využití techniky ICP-MS.

Kromě speciálních analýz stopových látek jako jsou mykotoxiny, v úpravě vzorků před analýzou převládá jednoduchá extrakce z pevné fáze do kapalné za pomoci ultrazvuku, po níž následuje filtrace nebo odstředování. Je velice pravděpodobné, že ultrazvukem asistovaná extrakce s ohledem na matrice doplňků stravy a rostlinných extraktů bude i nadále hlavní extrakční technikou úpravy vzorků používanou pro stanovení bioaktivních látek v doplňcích stravy s obsahem rostlinných extraktů a pro testování čistoty těchto extraktů.

4 Komentáře k publikovaným pracím

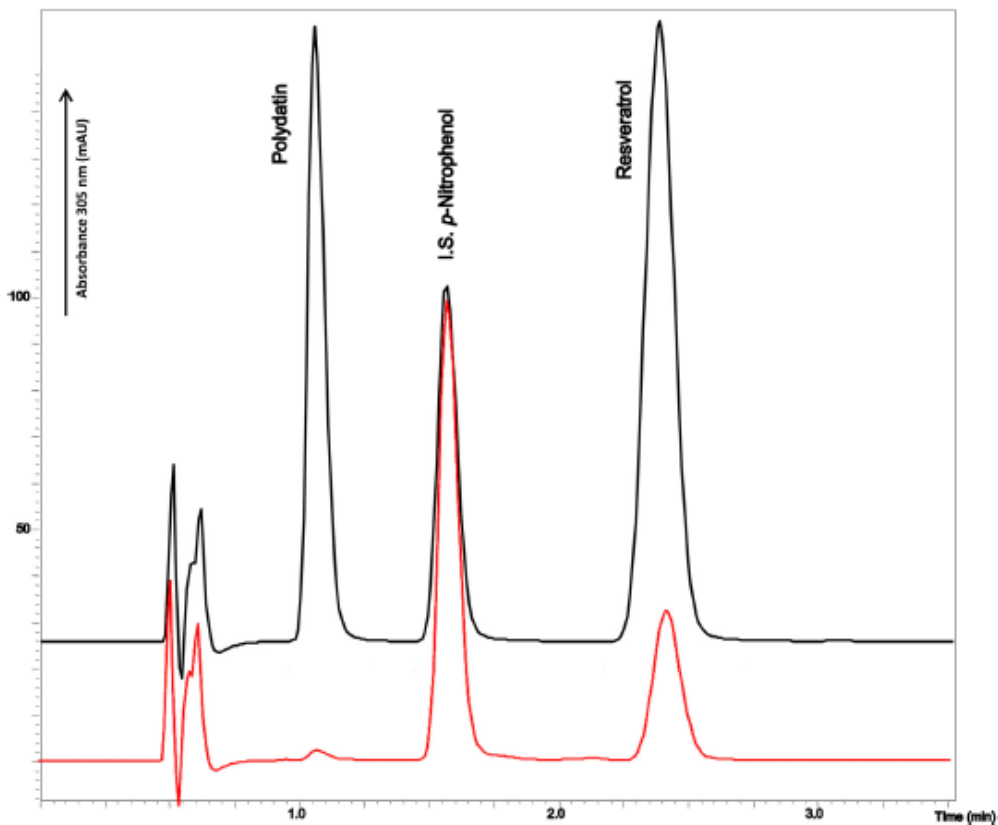
4.1 A study of retention characteristics and quality control of nutraceuticals containing resveratrol and polydatin using fused-core column chromatography

Cílem této práce, která započala již v rámci diplomové práce kandidáta [74], bylo vyvinout rychlou HPLC metodu pro současné stanovení resveratrolu a jeho glykosidu polydatinu v doplňcích stravy s obsahem rostlinných extraktů získaných zejména z oddenků a kořenů *Křídlatky japonské*.

Resveratrol je polyfenolický fytoalexin, který je produkován řadou rostlinných druhů, jako jsou hroznové víno, moruše a právě křídlatka. V přírodě se vyskytuje v *trans*-izomerní formě, která je relativně stabilní. V rostlinných extraktech můžeme také nalézt jeho glykosidickou formu, známou jako polydatin nebo piceid (resveratrol-3-O- β -D-glukosid) [75]. Oddenky a kořeny *Křídlatky japonské* jsou v současné době hlavním zdrojem extraktu obsahujícím přírodní resveratrol a polydatin v doplňcích stravy na celosvětovém trhu [76]. Resveratrol a polydatin vykazují kardioprotektivní účinky, které jsou spojeny s jejich schopností vyvolávat vasorelaxaci, protizánětlivou odezvou a zachytáváním kyslíkových radikálů. Zájem o tyto sloučeniny začal růst po studiích “francouzského paradoxu”, ve kterém byl kardioprotektivní účinek vína přisuzován obsahu látek polyfenolové kompozice. Mezi další přínosy pro lidské zdraví patří protinádorové, antidiabetické, anti-neurodegenerativní a antiobezitní účinky [77].

V rámci vývoje nové RP-HPLC-UV metody pro stanovení obsahu resveratrolu a polydatinu v rostlinných extraktech bylo testováno několik chromatografických kolon s rozdílnou selektivitou (C18, RP-Amide, F5, Phenyl-hexyl, ES-CN). Byl sledován a vyhodnocován efekt objemové frakce acetonitrilu, který byl zvolen pro jeho eluční sílu, na retenční faktor $\log k$ obou analytů na zmíněných typech stacionárních fází. Jako druhá složka mobilní fáze byl použit vodný roztok kyseliny octové o pH 3.0. Optimální podmínky byly nalezeny pro chromatografickou kolonu s povrchově porézními částicemi s nitrilovou stacionární fází a mobilní fází o složení acetonitril/vodný roztok kyseliny octové o pH 3.0 (20:80, v/v). Navíc, rozlišení obou analytů bylo natolik dobré, že umožnilo použití vnitřního

standardu *p*-nitrofenolu, který se eluoval přesně mezi oběma píky, takže nedošlo k prodloužení času analýzy, která byla 3 min (Obr. 5).



Obr. 5 Chromatogram separace resveratrolu, polydatinu a *p*-nitrofenolu v roztoku standardu na fused-core koloně Ascentis Express ES Cyano (100 × 3.0 mm), s velikostí částic 2.7 μm, mobilní fáze acetonitril/vodný roztok kyseliny octové o pH 3 (černá horní linka) a chromatogram z analýzy doplňku stravy Indonal (červená spodní linka)

Metoda úpravy reálných vzorků doplňků stravy před dávkováním do HPLC systému byla optimalizována na základě metod nalezených v literatuře. Přímá extrakce do čistého metanolu za pomoci ultrazvukové lázně prokázala dostatečnou výtěžnost obou analytů. Ta se pohybovala v rozmezí 83–107 % pro všechny testované doplňky stravy. Tento rozptyl byl navíc pravděpodobně způsoben tím, že nebylo možné provést test výtěžnosti přidáním velkého množství roztoku standardu do vzorku (spike) odpovídající alespoň množství obsažené již v samotné matrici. Získat samotnou matrici bez obsahu analyzovaných látek v případě rostlinných extraktů je téměř nemožné. Pro účely testu výtěžnosti musely být použity velmi malé navážky do stejně tak malých objemů ředění, což mohlo ovlivnit výši výtěžku. Optimální podmínky extrakce pro 0.1-0.4 g práškových vzorků zahrnovaly 15 min ultrazvukování ve 25 mL čistého metanolu s přidavkem vnitřního standardu následované filtrací přes 0.45 μm PTFE filtr.

Validace nově vyvinuté metody zahrnovala stanovení parametrů testu způsobilosti chromatografického systému, linearity, citlivosti, selektivity, přesnosti, preciznosti a robustnosti metody. Validace vycházela z doporučených postupů ICH a Evropského lékopisu [70].

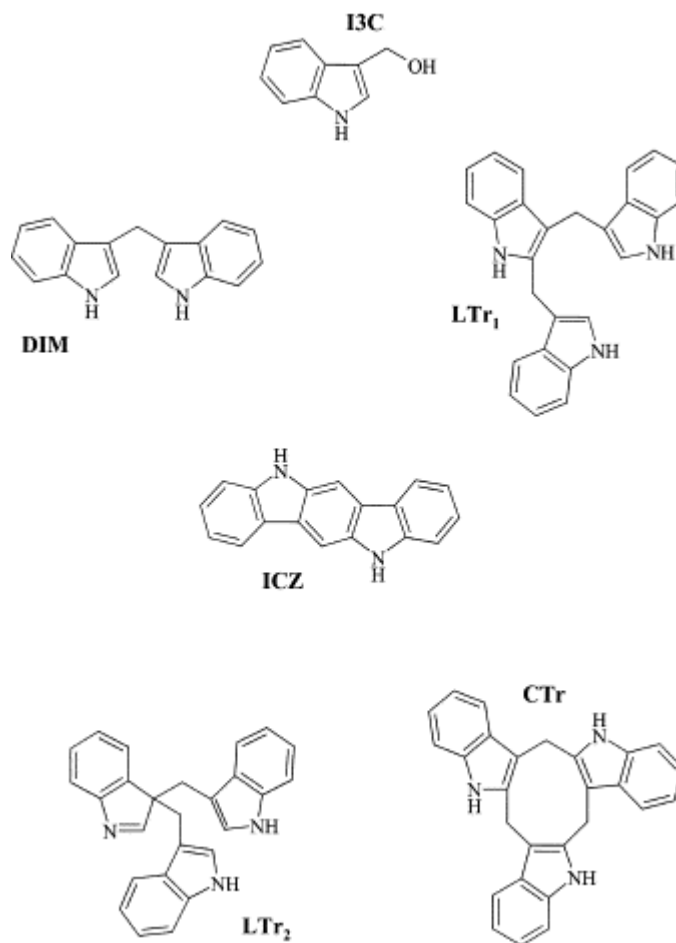
Analýza vybraných doplňků stravy ukázala, že obsah a tím i kvalita jednotlivých přípravků se celkem výrazně liší. Důležitou informací pro spotřebitele také může být absolutní nalezené množství zkoumaných látek v jednotlivých dávkových formách (tabletech nebo kapslích). Výsledky analýzy lze však až na jeden případ považovat za celkem uspokojivé, protože nalezené obsahy resveratrolu byly v souladu s tím, co výrobci deklarovali na obalech jednotlivých přípravků v rámci tolerovatelné odchylky.

4.2 A new method for rapid determination of indole-3-carbinol and its condensation products in nutraceuticals using core-shell column chromatography method

Tato práce se zabývala vývojem HPLC metody pro stanovení obsahu indol-3-karbinolu v doplňcích stravy s obsahem rostlinných extraktů získaných z brukvovité zeleniny. Brukvovitá zelenina je bohatá na obsah indolových glukosinolátů, jejichž enzymatickou degradací vzniká právě indol-3-karbinol. Extrakt tohoto druhu zeleniny propůjčuje doplňkům stravy charakteristický zápach.

V kyselém prostředí podobnému lidskému žaludku dochází ke konverzi indol-3-karbinolu na několik kondenzačních produktů (Obr. 6). Vnitřní nestabilita indol-3-karbinolu v kyselém prostředí vychází z vinylové karbinolaminové části indolového kruhu. Tato jedinečná strukturní vlastnost je základem pro vysokou citlivost indolu-3-karbinolu na dehydrataci a kondenzaci katalyzovanou kyselým prostředím za vzniku komplexní řady oligomerních produktů, včetně 3,3'-diindolymethanu (DIM), indolo[3,2b]karbazolu (ICZ), lineárních trimerů (LTr), cyklického trimeru (CTr) a cyklického tetrameru (CTet) [78]. In vivo hodnocení indol-3-karbinolu a jeho příbuzných látek předpokládá, že DIM je jednou z hlavních bioaktivních látek nesoucí účinky připisované indol-3-karbinolu [79,80]. Mezi ty patří protinádorová aktivita, zejména u hormonálně dependentních tumorů zahrnující nádor prsu, prostaty, dělohy a tlustého střeva. Extrakt s obsahem indol-3-karbinolu navíc vykazuje chemoprotektivní účinky proti estrogen-responsivním druhům nádorů, jako je nádor děložního čípku nebo nádor prsu, jelikož inhibuje ER α receptory [24].

Cílem vývoje nové HPLC metody bylo získat rychlou metodu pro stanovení indol-3-karbinolu v rostlinných extraktech obsažených v kapslích doplňků stravy dostupných na trhu v ČR. Indol-3-karbinol je malá středně polární molekula. Při vývoji chromatografické metody musela být brána v potaz také její nestabilita v kyselém prostředí, proto byla zvolena kolona s nepolární stacionární fází a eluent obsahující pouze čistou vodu a polární organické rozpouštědlo. Acetonitril byl zvolen pro dosažení rychlejší eluce analytu a lepší symetrie píku.



Obr. 6 Struktura indol-3-karbinolu a jeho hlavních kondenzačních produktů. I3C, indole-3-carbinol; DIM, 3,3'-diindolylmethane; LTr, první lineární trimer; ICZ, indol[3,2b]kardazol; LTr, druhý lineární trimer; CTr, cyklický trimer [78]

V prvním kroku byl proveden screening několika chromatografických kolon s různě modifikovanými stacionárními fázemi (C18, F5, Biphenyl a Phenyl-hexyl) za použití mobilních fází s různým poměrem voda/acetonitril. Také byl testován vliv použití povrchově porézních a plně porézních částic v náplních kolon na symetrii píku. Během vývoje metody nebyl prokázán specifický vliv jednotlivých stacionárních fází na eluci analytu, proto byla vybrána kolona zajišťující nejlepší tvar píku a žádnou koeluci interferujících píků z matrice. Tou byla Kinetex XB-C18 kolona s postranními iso-butyl řetězci.

V průběhu vývoje metody a zejména analýzou reálných vzorků se ukázalo, že extrakty neobsahují pouze indol-3-karbinol, ale také jeho kondenzační produkty. První indikací, že se jedná o kondenzační produkty, byla odezva při stejné vlnové délce UV detekce a delší retenční čas. Pomocí MS analýzy bylo prokázáno, že extrakty obsahují kondenzační produkty indol-3-karbinolu, nepodařilo se však přiřadit jednotlivé hmoty píků na

chromatogramu nově vyvinuté HPLC metody (v článku nediskutováno). Kvůli obsahu těchto produktů ve vzorcích doplňků stravy, metoda byla dále optimalizována za použití gradientové eluce. Pro přesnější stanovení indol-3-karbinolu byl použit vnitřní standard. Jako nejvhodnější byl zvolen ethylparaben, jehož nejvyšší odezva byla nejblíže 270 nm čili vlnové délce použité pro detekci indol-3-karbinolu a jeho kondenzačních produktů, a jehož retenční čas neprodlužoval celkovou dobu analýzy, která byla i s ekvilibrací kolony 6.3 min.

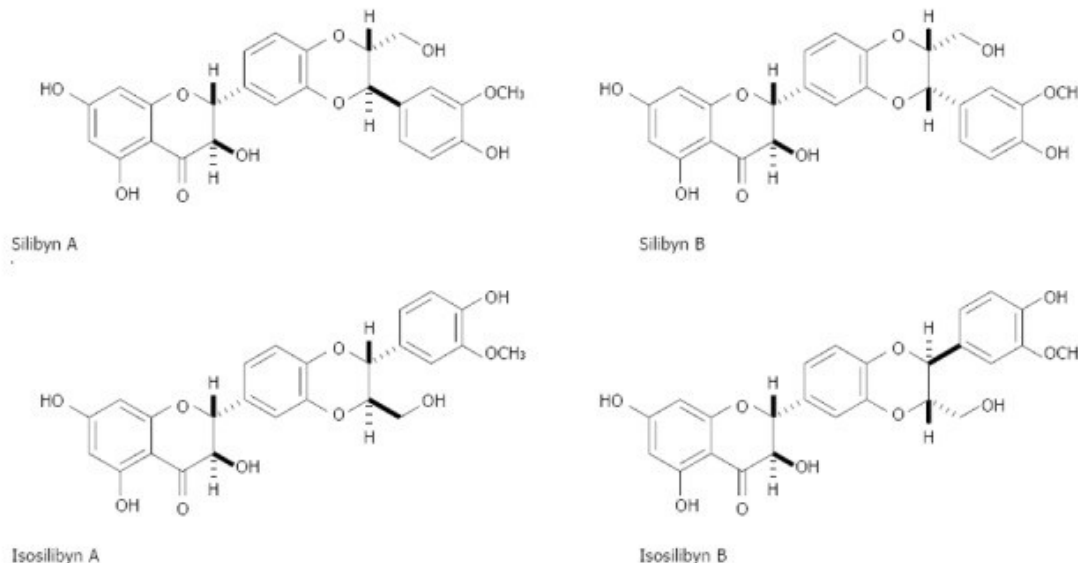
Bylo testováno několik postupů pro extrakci indol-3-karbinolu na základě metod nalezených v literatuře. Bylo zjištěno, že ze dvou analyzovaných přípravků za použití čistého methanolu nebylo extrahováno žádné množství hledaného analytu. Z tohoto důvodu bylo u všech zkoušených přípravků otestováno několik dalších rozpouštědel, jako je acetonitril, ethanol, dimethylsulfoxid a propan-2-ol, zda dojde k lepší extrakci analytu z homogenizované směsi kapslí, avšak přímá extrakce do methanolu pomocí ultrazvukové lázně se ukázala jako dostatečná.

Validace nově vyvinuté metody zahrnovala stanovení parametrů testu způsobilosti chromatografického systému, linearity, citlivosti, selektivity, přesnosti, preciznosti a robustnosti metody. Validace vycházela z doporučených postupů ICH a Evropského lékopisu [70]. Testování stability roztoku indol-3-karbinolu prokázalo, že použití 50°C pro separaci na koloně nemá vliv na výsledné stanovení analytu.

Výsledky analýzy vzorků doplňků stravy ukázaly, že deklarované a nalezené množství indol-3-karbinolu se v jednotlivých preparátech velmi liší. Znepokojující je to, že ve dvou přípravcích nebylo nalezeno žádné množství deklarované látky, byť byl výrobcem deklarován obsah 200 mg a 150 mg indol-3-karbinolu v jedné kapsli. Navíc, tržní cena těchto přípravků nebyla vůbec nízká. V dalších dvou přípravcích bylo nalezeno velké množství kondenzačních produktů a nízké množství indol-3-karbinolu. Výrobce však deklaroval obsah indol-3-karbonilu, nikoli extraktu, tudíž přítomnost degradačních (kondenzačních) produktů poukazuje na špatnou formulaci přípravků nezajišťující správné podmínky pro stabilitu deklarované látky. Obecně lze konstatovat, že kvalita testovaných přípravků byla na velmi nízké úrovni.

4.3 A new approach to the rapid separation of isomeric compounds in a *Silybum marianum* extract using UHPLC core-shell column with F5 stationary phase

V této práci byla vyvinuta a validována nová metoda ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) využívající core-shell kolonu s pentafluorfenylovou stacionární fází pro separaci a kvantifikaci sedmi aktivních složek extraktu *Ostropestřce mariánského*, označovaného též jako silymarin. Ten je známý svou schopností chránit játra před toxickými látkami, léčbou hepatitidy a protinádorovou aktivitou. Nositeli anti-hepatotoxických účinků extraktu je flavonoid taxifolin a směs hlavních bioaktivních flavonolignanů: silychristinu, silydianinu, silybinu A, silybinu B, isosilybinu A a isosilybinu B. Čtyři poslední látky patří do dvou skupin diastereoizomerních flavonolignanů [81,82]. Silymarin je v současné době široce používán v komerčních přípravcích a bylinných čajích.



Obr. 7 Struktury diastereoizomerních párů silybinu a isosilybinu [83]

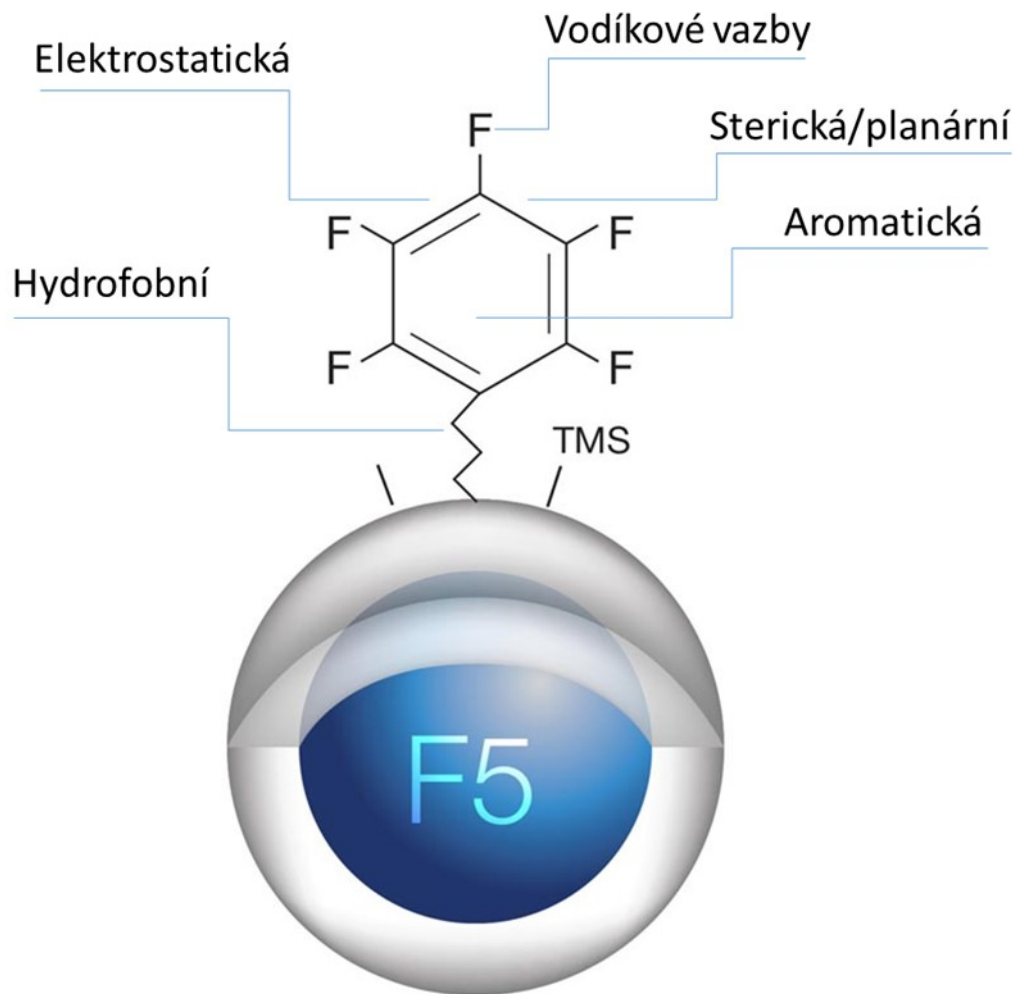
Cílem vývoje a optimalizace nové UHPLC metody bylo získat takové chromatografické podmínky, které by umožňovaly dostatečnou separaci všech stanovovaných látek v přijatelném čase. Zejména obsah dvou diastereoizomerních párů – silybinu A/B a isosilybinu A/B byl předpokladem pro problematickou separaci. Vývoj metody začal původně na konvenčním HPLC systému, v průběhu se ale ukázalo, že tento přístup není dostatečný a že pro dosažení požadované separace je nutné zapojit techniku UHPLC.

Na základě informací nalezených v literatuře, jako počáteční složení mobilní fáze pro vývoj RP-HPLC metody byl stanoven fosfátový pufr o nízkém pH a acetonitril. Bylo testováno několik kolon plněných core-shell částicemi s různě modifikovanými stacionárními fázemi (biphenyl, phenyl-hexyl, RP-amide, F5, C18, C30, ES-CN) za použití roztoku extraktu silymarinu obsahujícím všechny stanovované sloučeniny. Pentafluorofenylová stacionární fáze prokázala nejlepší selektivitu a potenciál pro separaci izomerních látek – silybinu A, B a isosilybinu A, B. Tato stacionární fáze je známá svou kombinací polárních a nepolárních interakcí, mezi které patří vodíkové vazby, hydrofóbní, elektrostatické, aromatické a sterické/planární interakce [84]. Ty dávají možnost dosáhnout účinné separace izomerních látek, které by nebylo možné docílit na konvenčních C18 a C8 reverzních fázích [85,86].

Slepou větví vývoje metody byla snaha o změnu selektivity přidáním β -cyklodextrinu do vodné složky mobilní fáze. Dle dostupných informací v literatuře, sloučeniny silymarinu by měly mít značnou afinitu ke tvorbě inkluzí právě s β -cyklodextrinem, který se používá jako chirální selektor v mobilních fázích [87,88]. Efekt byl však opačný a interakce analytů s β -cyklodextrinem měla za následek horší rozlišení jednotlivých píků na F5 koloně. Naopak na C18 stacionární fázi byla separace s β -cyklodextrinem v mobilní fázi lepší než bez něj, ale stále zcela nedostačující.

Optimalizace metody tedy pokračovala bez dalších aditiv v mobilní fázi za použití Kinetex F5 kolony. Místo acetonitrilu v mobilní fázi byl použit methanol, který je slabším elučním rozpouštědlem na reverzních fázích a navíc u pentafluorofenylové stacionární fáze posiluje aromatické interakce. Ty vznikají tak, že π - π elektrony aromatického kruhu interagují s π - π elektrony analytu, což má za následek vzestup retence analytu na koloně. Acetonitril jako složka mobilní fáze naopak tyto interakce potlačuje. Pouze za využití všech interakcí, které může F5 stacionární fáze poskytovat (Obr. 8), bylo dosaženo separace obou diastereoizomerních párů silybinu a isosilybinu. Gradientová eluce byla optimalizována tak, aby zajistila separaci všech píků a zamezila koeluci píků, zejména u vzorků bylinných čajů. Byť byla pro detekci na PDA detektoru zvolena vlnová délka dávající maximální odezvu pro analyzované sloučeniny (288 nm), matrice vzorků obsahovaly spoustu látek s odezvou při stejné vlnové délce. I přes veškeré ladění gradientového programu, tvar píku silydianinu nebyl ideální, proto byla zvýšena iontová síla fosfátového pufru na 100 mM. Tento krok

zajistil dostatečnou symetrii pro všechny stanovované píky. Za běžných okolností není vhodné takto silný fosfátový pufr pouštět na (U)HPLC systém. V tomto případě byla zajištěna dobrá rozpustnost použitého hydrogenfosforečnanu sodného i v bodě gradientu, kdy se mísil s větším objemem methanolu použitím vyšší teploty (50 °C) v kolonovém prostoru.



Obr. 8 Interakční mechanismy F5 stacionární fáze [89]

Bylo testováno několik postupů pro extrakci stanovovaných látek na základě metod nalezených v literatuře. Přímá extrakce homogenizovaných přípravků za použití ultrazvuku do čistého methanolu se ukázala jako plně dostačující. Pro analýzu bylo použito množství 2 g homogenizované směsi bylinného čaje a 0.5-1.0 g homogenizované směsi doplňku stravy. Homogenizace vzorků byla prováděna v kulovém mlýnu při 30 Hz po dobu 2 minut. Optimální podmínky úpravy vzorku před analýzou zahrnovaly 10 min extrakci

v ultrazvukové lázni do 50 mL čistého methanolu, ředění s ultračistou vodou, centrifugaci a filtraci přes 0.22 PTFE stříkačkový filtr.

Nově vyvinutá metoda byla validována dle ICH doporučení a použita pro stanovení látek obsažených v extraktu sylibinarinu v doplňcích stravy a v bylinných čajích s obsahem usušeného plodu *Ostropestřce mariánského*. Podle Evropského lékopisu, obsah extraktu sylibinarinu je hodnocen jako suma všech analyzovaných flavonolignanů bez flavonoidu taxifolinu. Proto celková množství látek v jednotlivých analyzovaných extraktech a čajích jsou v článku udávána bez nalezeného množství taxifolinu (byť i on je nositelem pozitivních účinků pro lidský organismus). Celkový obsah nalezených účinných látek v jednotlivých extraktech je uváděn jako jejich potence, výrobci totiž nedeklarují obsah flavonolignanů v jedné dávce, ale pouze množství extraktu. Ta pouze u dvou přípravků byla v rozmezí 72.9–77.6 %, u všech ostatních se pohybovala v rozmezí 40.5 % až 55.9 %.

V případě bylinných čajů s obsahem sušeného (a drceného) plodu *Ostropestřce mariánského*, nalezené množství analyzovaných látek, přepočítané na 1 g homogenizované směsi vzorku, bylo až na jeden případ téměř totožné. Čaje dělené do sáčků se pouze výrazně lišily v obsahu množství sušeného a drceného plodu. Na závěr lze ještě dodat, že dle provedené studie, která není uvedena v článku, bylo zjištěno, že extrakce stanovovaných látek do horké vody, případně povaření drceného plodu po dobu 10 min, má za následek v porovnání s extrakcí látek do čistého methanolu 10x nižší výtěžnost aktivních látek sylibinarinu.

4.4 A UHPLC method for the rapid separation and quantification of phytosterols using tandem UV/Charged aerosol detection – a comparison of both detection techniques

V této studii byla vyvinuta, optimalizována a validována nová UHPLC metoda pro stanovení sedmi rostlinných sterolů a stanolů v měkkých tobolkách a tabletách doplňků stravy za využití tandemové detekce UV/CAD. Metoda byla vyvinuta pro separaci a stanovení fytosterolů ergosterolu, brassicasterolu, campesterolu, fucosterolu, stigmasterolu, β -sitosterolu s fytostanolu stigmastanolu. Tyto látky a jejich estery, jsou přírodními steroidy vyskytující se zejména v membránách rostlinných buněk. Většina fytosterolů má 28 nebo 29 uhlíků ve své molekule a obsahuje jednu nebo dvě dvojnou vazby. Tím se liší od fytostanolů, které jsou zcela nasycené a nemají žádnou dvojnou vazbu ve své struktuře. V rostlinných buňkách se rostlinné steroly a stanoly vyskytují jako estery mastných kyselin nebo glykosidy [90,91].

Rostlinnými zdroji bohatými na steroly a stanoly je celá řada ořechů, ovoce a rostlinných olejů. Také některé potraviny jsou obohacovány o fytosteroly, například pomazánky nebo čokolády. V těch najdeme nejčastěji β -sitosterol, campesterol, stigmasterol, brassicasterol a stigmastanol [91,92]. Toto obohacování je prováděno pro schopnost fytosterolů a fytostanolů snižovat LDL cholesterol v lidském těle. Fytosterolům jsou navíc připisovány protektivní účinky u rozvoje některých typů nádorů, protizánětlivé a antioxidační vlastnosti. Fytosteroly (zejména campesterol, β -sitosterol a stigmasterol) obsažené v extraktu rostliny *Serenoa plazivá* (známé též jako Saw palmetto), jsou používány v léčivých přípravcích a doplňcích stravy pro pomocnou léčbu benigní hyperplazie prostaty [91,93,94].

Úkol této práce, vyvinout UHPLC metodu pro rychlou separaci vybraných fytosterolů a fytostanolů, se zdál být nesnadný už od samého počátku. Látky mají velmi podobné struktury a pro svou lipofilní povahu jsou nejčastěji stanovovány pomocí GC instrumentace [92,93,95-98]. Ta však není ideální volbou, protože jí musí předcházet derivatizace stanovovaných analytů, která zvyšuje nároky na přípravu vzorku a může do stanovení vnášet určité chyby. Při zapojení HPLC instrumentace s běžně užívanou UV detekcí může být stanovováno pouze omezené množství fytosterolů a fytostanolů kvůli chybějícím chromoforům v jejich molekulách. Navíc je nutné použít vlnovou délku pod 210 nm, což má

za následek snížení citlivosti a zvýšení rizika potenciálních interferencí. GC a HPLC metody pro stanovení fytoosterolů jsou v obou případech zatíženy dlouhými časy analýz pro dosažení požadovaných separací jednotlivých analytů. V případě MS detekce, u které derivatizaci lze vynechat, se zas projeví problémy spojené se samotnou úpravou vzorku před analýzou. I bez toho bývá kvantifikace látek v rostlinných extraktech za použití MS zatížena nepředvídatelnými matricovými efekty a drahými izotopově značenými vnitřními standardy [99,100]. Úprava reálných vzorků obsahujících fytoosteroly a fytostanoly před samotnou analýzou je celkem náročná a zahrnuje saponifikaci nebo kyselou hydrolyzu esterů. Tyto kroky jsou pak následovány extrakcí z kapaliny do kapaliny (LLE), zakoncentrováním vzorku a výměnou solventu před dávkováním do HPLC systému [94].

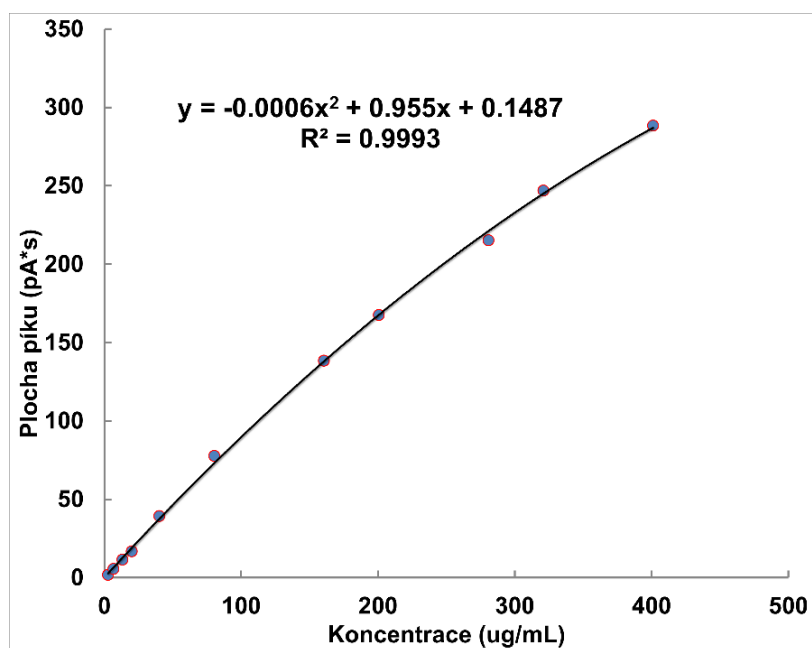
Od začátku vývoje metody byl tandemově za PDA detektor zapojen Corona detektor (CAD). Tato tandemová detekce prokázala, že fytostanoly nejsou detekovatelné v UV spektru ani při vlnových délkách pod 210 nm. Navíc bylo možné porovnat oba typy detekce z hlediska citlivosti. Při výběru mobilní fáze musela být brána v potaz těkavost všech složek a aditiv, podobně jako u MS detekce pro zamezení šumu a interferencí v chromatogramu [99]. Acetonitril (MS grade) a Milli-Q voda byly použity pro gradientovou eluci při testování různých typů kolon a stacionárních fází. Acetonitril byl vybrán jako organická složka mobilní fáze pro rychlejší eluci lipofilních fytoosterolů. Z testovaných fází prokázala nejlepší selektivitu pro analyzované látky phenyl-hexyl stacionární fáze. Core-shell kolona Kinetex Phenyl-hexyl s velikostí částic 1.7 μm byla vybrána pro dosažení co nejlepšího rozlišení a pro další optimalizaci separace. Chromatografické podmínky byly nastaveny tak, aby se našel kompromis mezi rychlou separací s dostatečným rozlišením a udržením zpětného tlaku v systému pod 80 MPa.

Během vývoje metody se ukázalo, že separace campesterolu a campestanolu je nejen obtížná, ale zcela nemožná na všech testovaných stacionárních fázích. Retenční čas obou látek byl vždy stejný i v případě pomalejší gradientové eluce. Bez spektrálních dat nebylo možné určit, která ze dvou látek je v analyzovaných přípravcích. Bylo však prokázáno, že odezva obou standardů dle naměřených kalibračních křivek je na CAD totožná. Proto se daný pík ve vzorcích stanovoval jako suma obou, sterolu i stanolu.

Testování citlivosti obou detektorů u píků viditelných v UV oblasti pod 210 nm prokázalo, že Corona detektor je schopný dosáhnout minimálně třikrát nižšího limitu detekce

než UV detektor s vlnovými délkami pod 210 nm. To je také v souladu s obecně známým faktem, že spousta rozpouštědel absorbuje v této oblasti UV spektra a tím dochází k zvýšení šumu základní linie.

Cílem optimalizace metody pro úpravu vzorků před analýzou spočívající v saponifikaci konjugovaných sterolů a stanolů a extrakci jejich volných forem z analyzovaných doplňků stravy bylo co nejvíce zjednodušit postupy nalezené v literatuře. Jelikož extrakční postupy mohly být testovány pouze na reálných vzorcích, vnitřní standard (1-nonadekanol) byl použit pro sledování výtěžnosti extrakcí. Pro optimalizaci byly vybrány dva reprezentativní vzorky různých formulací doplňků stravy, měkké tobolky a tablety. V literatuře lze nalézt, že nejčastější postup provádění saponifikace fytosterolů spočívá v použití 2M ethanolového roztoku hydroxidu draselného při 80 °C. Poté následuje extrakce z kapaliny do kapaliny volných sterolů [67,92,96,101]. Byla provedena studie vlivu délky saponifikace na výtěžnost volných sterolů a stanolů za použití podmínek nalezených v literatuře. Třepání obou typů vzorků při 80 °C ukázalo přijatelnou výtěžnost v čase 30 minut. Následná extrakce z kapaliny do kapaliny byla provedena smícháním saponifikované směsi s vodným roztokem kyseliny chlorovodíkové a přidáním 10 mL n-hexanu. Ten pak bylo možné přímo dávkovat do UHPLC systému bez nutnosti další výměny solventu nebo ředění.



Obr. 9 Kalibrační křivka β -sitosterolu

Optimalizovaná metoda byla validována dle ICH doporučení. Odezva CAD je lineární pouze v omezeném rozsahu, z toho důvodu byly použity kalibrační křivky kvadratické funkce pro jednotlivé stanovované analyty (Obr. 9). Výsledky analýz jednotlivých doplňků stravy byly v souladu s tím, co výrobci deklarovali na obalech, až na jeden přípravek, ve kterém nebyl nalezen žádný fytosterol ani fytostanol v detekovatelném množství.

4.5 A UHPLC method for the rapid separation and quantification of anthocyanins in acai berry and dry blueberry extracts

V této práci byla vyvinuta, optimalizována a validována nová UHPLC-UV/Vis metoda pro rychlou separaci a stanovení šesti antokyanů v doplňcích stravy s obsahem extraktu z acai a borůvek. Antokyanany patří do skupiny flavonoidů, které jsou zodpovědné za červenou, modrou a fialovou barvu mnoha rostlin, ovoce a zeleniny. Je jim připisováno mnoho prospěšných účinků v lidském organismu, zejména pro jejich antioxidační, protizánětlivé a anti-karcinogenní vlastnosti. V přírodě nalezneme antokyanany jako glykosidy odvozené od antokyanidinů [102]. Většina antokyanů má jako aglykon jeden z šesti antokyanidinů zahrnující cyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin a petunidin [103].

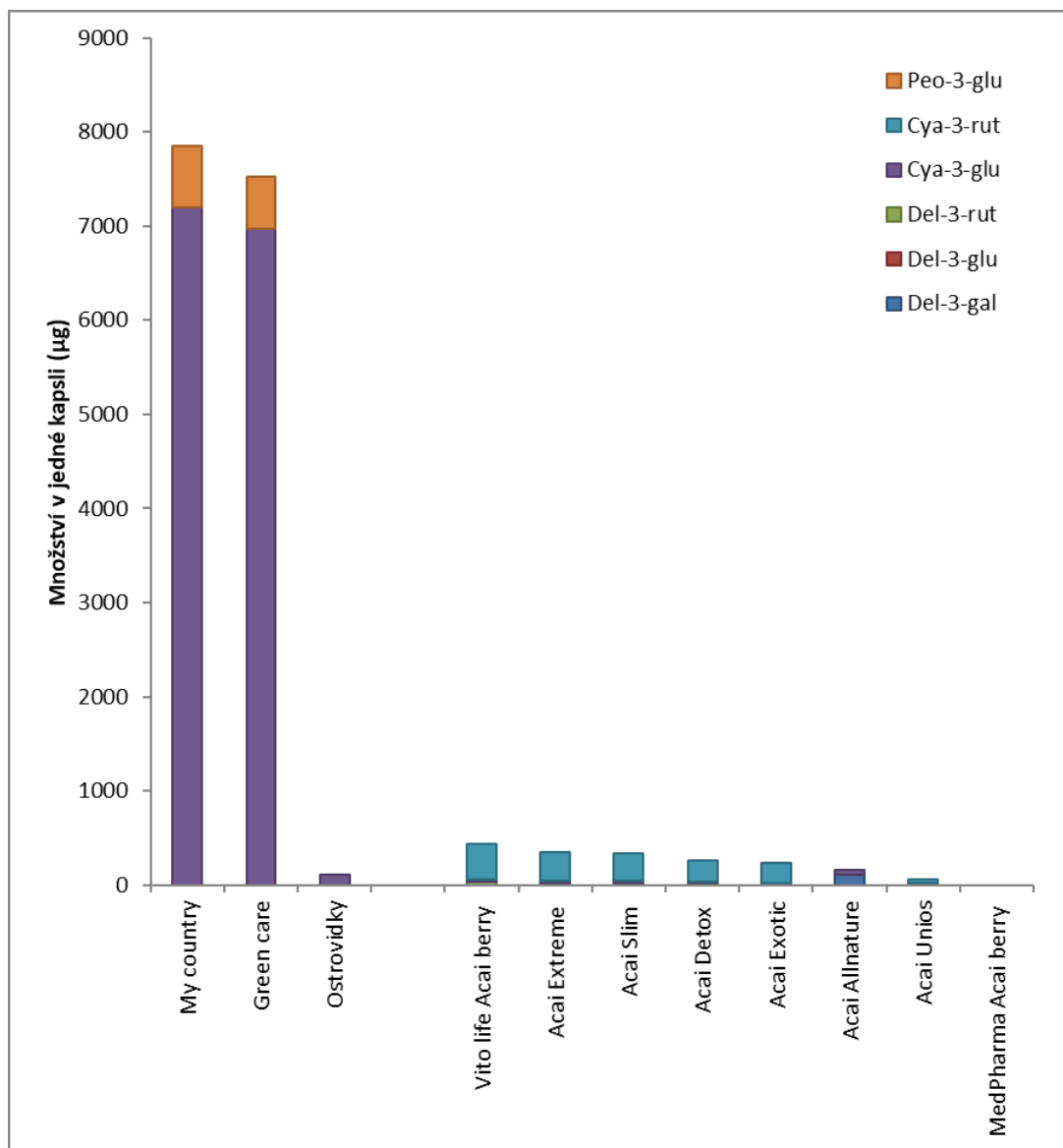
Plody palmy acai jsou po dozrání malé tmavě fialové bobule, které jsou bohaté na antokyanany. V poslední době se tyto plody těšily velké pozornosti a dokonce získaly označení jako „super potravina“. Extrakt bobulí acai lze nyní běžně sehnat jako doplněk stravy [104]. Několik antokyanů, jako například cyanidin-3-glukosid, cyanidin-3-rutinosid, peonidin-3-glukosid a další, byly nalezeny v bobulích acai. Na rozdíl od acai, profil antokyanů v borůvkách je mnohem širší, zahrnuje galaktosidy, glykosidy a arabinosidy pěti aglykonů delphinidinu, cyanidinu, petunidinu, peonidinu a malvidinu. Obsah jednotlivých antokyanů se však liší v závislosti na zeměpisné oblasti, v které byly vyprodukovány [105].

Nejčastěji jsou antokyanany analyzovány za využití konvenčních RP-HPLC metod s C18 stacionární fází a gradientovou elucí. Nedostatečná selektivita a účinnost separace je nahrazována pomalými gradienty a dlouhými časy jednotlivých analýz. Informace nalezené v literatuře a také čerstvě publikované výsledky analýzy antokyanů v borůvkách ukazovaly na to, že fluorovaná stacionární fáze by mohla mít vhodnou selektivitu pro analyzované antokyanany v extraktech acai a borůvek obsažených v doplňcích stravy [106,107]. Již z vývoje metody pro analýzu silymarinu bylo zřejmé, že pentafluorofenylová stacionární fáze může nabídnout několik různých interakčních mechanismů. Dále v reportovaných pracích byl použit acetonitril jako organická složka mobilní fáze a vodný roztok kyseliny mravenčí (2-5 %). V kyselých roztocích o pH 3 a nižším jsou antokyanany ve své flavylium-kationtové formě vyznačujícím se sytě červeným zbarvením a absorpčním maximem při 520 nm.

Pro optimalizaci metody byla zvolena kolona Kinetex F5 (150×2.1 mm) s velikostí částic 1.7 µm. Acetonitril a 5% vodný roztok kyseliny mravenčí byly vybrány pro optimalizaci gradientové eluce. Na základě předběžné analýzy všech dostupných doplňků stravy s obsahem acai a borůvkového extraktu byla metoda optimalizována pro separaci šesti antokyanů (Delphinidin-3-galaktosid, Delphinidin-3-glukosid, Delphinidin-3-rutenosid, Cyanidin-3-glukosid, Cyanidin-3-rutenosid a Peonidin-3-glukosid). Pro ověření, že F5 stacionární fáze poskytuje nejlepší separaci všech analyzovaných antokyanů, byla provedena komparativní studie s dvěma dalšími typy RP stacionárních fází s modifikovaným povrchem částic v kolonách Luna Omega Polar (polární skupiny) a Luna Omega PS (pozitivní náboj). Obě stacionární fáze nabízejí rozšířené možnosti interakce s analyty než konvenční C18 kolony. Jde o kolony s plně porézními částicemi o velikosti 1.6 µm. Pro každou kolonu byl nalezen optimální gradientový program o stejném složení jako pro kolonu Kinetex F5. Obě Luna Omega kolony prokázaly podobnou separační účinnost v porovnání s F5 kolonou. Výsledky jsou ve shodě s předpokladem, že separační účinnost velmi malých částic, jak povrchově porézních tak i plně porézních, je velká. Ačkoli rozlišení a symetrie píků byla na všech kolonách podobná, retenční čas posledního píku byl nejkratší u Kinetex F5 kolony (3 min), která tím byla vybrána pro následnou validaci metody. Doba jedné analýzy i s ekvilibrací kolony nepřesáhla 5 minut.

V rámci vývoje metody byla zkoumána a optimalizována metoda pro úpravu vzorku a extrakci analyzovaných antokyanů. Bylo vycházeno z dat nalezených v literatuře [107,108-110] a na jejich základě bylo testováno několik extrakčních rozpouštědel za použití ultrazvukové lázně. Jako neoptimalnější extrakční solvent byla vybrána směs methanolu a 5% vodného roztoku kyseliny mravenčí v objemovém poměru 25:75. Délka extrakce analytů z matrice na ultrazvukové lázni byla dostačující po dobu 10 minut.

Nově vyvinutá metoda byla validována dle ICH doporučení a použita pro stanovení šesti antokyanů v doplňcích stravy prodávaných na českém trhu. Jak je vidět na Obr. 10, celkové nalezené množství antokyanů ve dvou přípravcích s obsahem borůvkového extraktu bylo mnohonásobně vyšší než v extraktech z acai. V jednom doplňku stravy nebylo nalezeno žádné množství antokyanů nad limitem detekce, ačkoli výrobce deklaroval obsah acai extraktu srovnatelný s ostatními přípravky.



Obr. 10 Porovnání obsahu antokyanů v jednotlivých analyzovaných přípravcích s obsahem borůvkového extraktu (vlevo) a acai extraktu (vpravo)

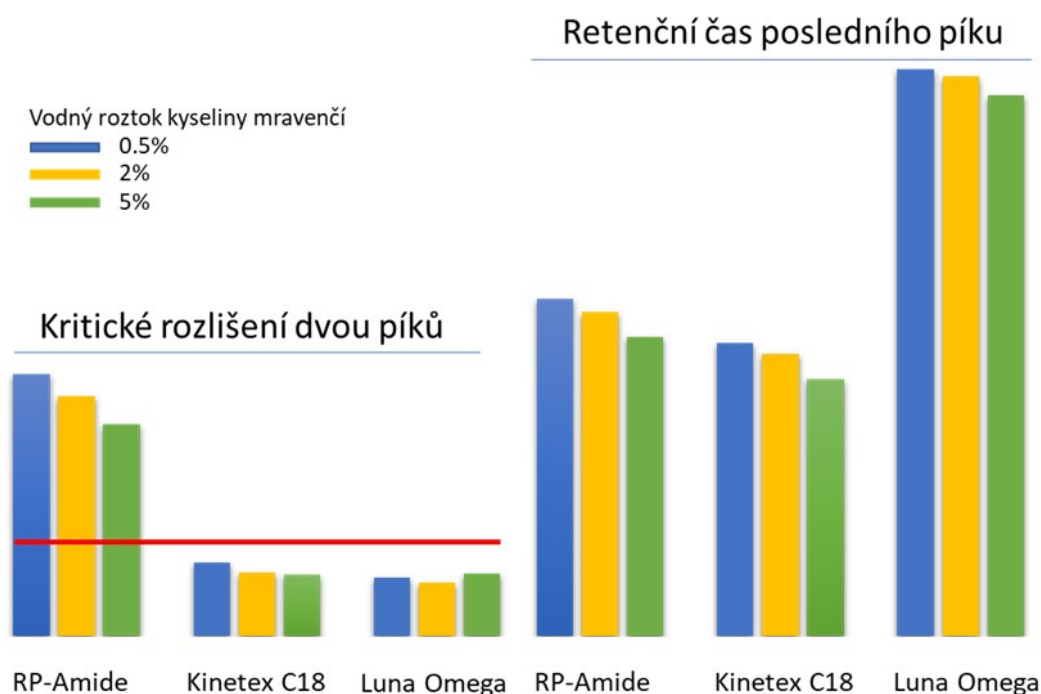
4.6 A validated UHPLC method for the determination of caffeoylquinic and di-caffeoylquinic acids in green coffee extracts using an RP-Amide fused-core column

Tato práce, jejíž experimentální část byla částečně zpracovávána v rámci diplomové práce M. Majorové [111], popisuje vývoj a validaci rychlé UHPLC-UV metody využívající kolonu RP-Amide s vloženou polární skupinou pro separaci a kvantitativní stanovení obsahu 3 isomerů kyseliny chlorogenové (3-CQA, 4-CQA a 5-CQA) a dvou disubstituovaných derivátů kyseliny chlorogenové (1,3-di-CQA a 3,5-di-CQA) v extraktech zelené kávy. Tyto extrakty byly obsaženy v doplňcích stravy ve formě tvrdých kapslí.

Isomery kyseliny chlorogenové jsou fenolické látky, deriváty kyseliny skořicové, s biologickou aktivitou nejvíce spojenou s antioxidačními a protizánětlivými účinky. Dále jsou spojovány se snižováním rizika kardiovaskulárních chorob a diabetu mellitu typu 2 [32,112-114]. Navíc mají schopnost zpomalovat vypouštění glukózy do krevního řečiště po konzumaci jídla [115,116]. Hlavním zdrojem derivátů kyseliny chlorogenové jsou zrna zelené kávy a extrakt z nich [33,117]. Ten se v poslední době těší značné popularitě, zejména pro předpoklad rychlého hubnutí.

Během vývoje UHPLC metody bylo testováno několik parametrů separace zahrnující výběr stacionární fáze, složení mobilní fáze, teplota separace a průtok mobilní fáze. Cílem bylo získat rychlou a selektivní metodu. Nejprve bylo testováno několik různých kolon s povrchově porézními a plně porézními částicemi s různě chemicky modifikovanými stacionárními fázemi. Mobilní fáze složená z vodného roztoku kyseliny mravenčí byla vybrána pro potlačení ionizace karboxylových skupin a fenolických hydroxylů chlorogenových kyselin. Acetonitril byl zvolen jako organická složka mobilní fáze pro rychlejší eluci. Rozlišení píků kyseliny chlorogenové (3-CQA) a kryptochlorogenové (4-CQA) bylo identifikováno jako kritické pro přijatelnou selektivitu stacionárních fází za izokratické eluce o různém složení mobilní fáze (poměr ACN/vodný roztok kyseliny mravenčí). Na základě takto definovaného screeningu byly vybrány 3 kolony (Ascentis Express RP-Amide 100 × 2.1 mm, 2.7 μm; Kinetex C18 100 × 2.1 mm, 2.6 μm; a Luna Omega C18 Polar 150 × 2.1 mm, 1.6 μm) s potenciální požadovanou selektivitou pro retenční studii analyzovaných látek.

Nejprve byl pro každou kolonu optimalizován gradientový program pro dosažení co nejideálnější separace a poté byl sledován efekt obsahu kyseliny mravenčí ve vodné složce mobilní fáze (0.5, 2.0 a 5.0 %) na kritické rozlišení píků kyseliny chlorogenové a kryptochlorogenové (3-CQA a 4-CQA). Z Obr. 11 je patrná unikátní selektivita RP-Amide stacionární fáze. Ta by měla nabízet vyšší selektivitu pro polární látky, obzvláště pro ty, které se chovají jako donor vodíkových vazeb. S rostoucí koncentrací kyseliny mravenčí v mobilní fázi došlo ke zrychlení eluce na této koloně při zachování dostatečného rozlišení všech píků na rozdíl od zbylých dvou testovaných kolon. Pro následnou validaci metody byla tedy vybrána Ascentis Express RP-Amide kolona a gradientová eluce sestávající z acetonitrilu a 5% vodného roztoku kyseliny mravenčí k dosažení co nejrychlejší eluce. Píky kyseliny chlorogenové a kryptochlorogenové se podařilo rozdělit s rozlišením 3.40 v čase kratším než 1.6 min. Celková doba analýzy nepřesáhla 8 minut. Jako ideální teplota kolony pro separaci a zachování stability analytů bylo zvoleno 30 °C. Na základě změřených UV-spekter analyzovaných kyselin byla vybrána vlnová délka 325 nm pro monitoring a kvantitativní analýzu.



Obr. 11 Porovnání kritického rozlišení píku kyseliny chlorogenové a kryptochlorogenové na třech testovaných kolonách za použití různé koncentrace kyseliny mravenčí v mobilní fázi, červená linka zobrazuje minimální požadované rozlišení

Dle literatury, pro extrakci chlorogenových kyselin z různých matric je nejčastěji využíváno 40-80% vodného roztoku methanolu [118-121]. Metoda založená na extrakci z pevné látky do kapaliny za pomoci ultrazvukové lázně byla vybrána jako nejvhodnější k další optimalizaci. Během té bylo zjištěno, že všechny stanovované deriváty kyseliny chlorogenové byly nejlépe extrahovány ze vzorků doplňku stravy za využití směsi methanolu a 5% vodného roztoku kyseliny mravenčí v rozmezí poměrů 50:50 až 25:75. Z pohledu chromatografické separace a symetrie píků se jako optimální složení extrakčního solventu projevil poměr 25:75. To umožnilo přímý nástřik extrakčního rozpouštědla vzorků bez žádných dalších ředění. Optimální čas extrakce na ultrazvukové lázni byl 10 minut. Během extrakce bylo nezbytné kontrolovat, aby se extrakční solvent na ultrazvukové lázni nezahříval kvůli zjištěné tepelné nestabilitě analyzovaných látek.

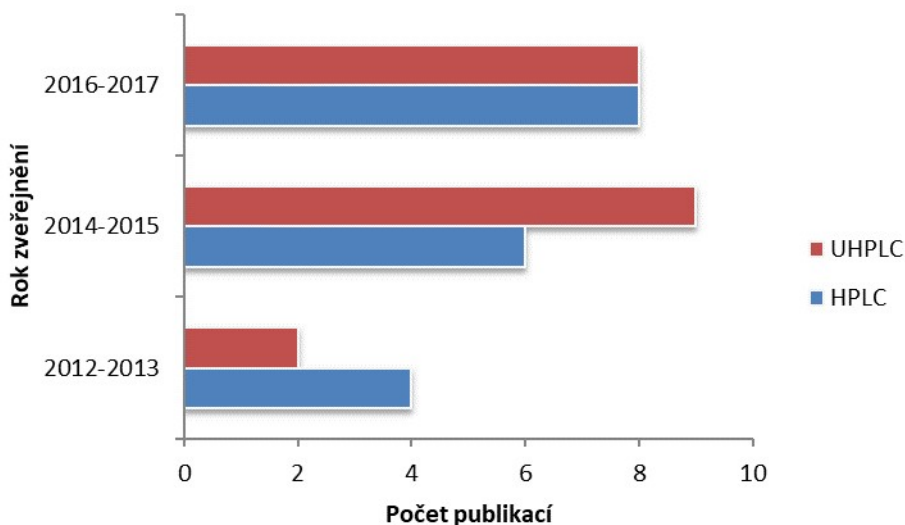
Nově vyvinutá metoda byla validována dle ICH doporučení a použita pro stanovení derivátů kyseliny chlorogenové v doplňcích stravy s obsahem extraktu zelené kávy dostupných na trhu v ČR. Identifikace píků nalezených v analyzovaných vzorcích byla provedena porovnáním retenčních časů s příslušnými referenčními standardy. Navíc pro ověření identity analytů nalezených v jednotlivých extraktech byla provedena analýza na vysokorozlišovacím hmotnostním spektrometru (HRMS) a na základě HRMS a MS/MS dat byla potvrzena přítomnost stanovovaných látek v extraktech. Ve všech přípravcích se nacházela v největším zastoupení kyselina chlorogenová (3-CQA) následovaná kyselinou kryptochlorogenovou (4-CQA) a neochlorogenovou (5-CQA). Disubstituovaná kyselina (3,5-di-CQA) se vyskytovala v přípravcích jako minoritní složka extraktů. 1,3-disubstituovaná kyselina chlorogenová (1,3-di-CQA) nebyla nalezena v žádném přípravku v množství přesahujícím limit detekce. Výsledky ukázaly, že je velký rozdíl v potencích jednotlivých extraktů a tedy, že množství deklarovaného extraktu nesouvisí s obsahem jednotlivých bioaktivních látek.

4.7 Current trends in the analysis and quality control of food supplements based on plant extracts

V této souhrnné práci je předkládán přehled článků zabývajících se analytickým hodnocením obsahu bioaktivních látek obsažených v doplňcích stravy založených na rostlinných extraktech a kontrolou kvality těchto extraktů. Data v přehledu zahrnují publikace v rozmezí let 2012 až 2017.

V úvodu článek shrnuje problematiku doplňků stravy z pohledu legislativních požadavků a současného stavu na trhu. Následuje kapitola shrnující extrakční techniky a metody úpravy vzorků před analýzou. Další kapitola předkládá přehled nejčastěji používaných analytických technik, z nichž nejčastěji užívanou technikou je kapalinová chromatografie. Čtvrtá kapitola se zabývá hodnocením čistoty a bezpečnosti rostlinných extraktů a doplňků stravy, zejména z pohledu přítomnosti mykotoxinů, endokrinních disruptorů, léčiv, nežádoucích příměsí a dalších kontaminantů. Pátá kapitola rozděluje analyzované bioaktivní látky do šesti skupin (terpenoidy, polyfenoly, aromatické kyseliny, glukosinoláty, chlorofyly a aminy) a zabývá se konkrétními technikami použitými pro hodnocení obsahu těchto látek v rostlinných extraktech a doplňcích stravy. Šestá kapitola se zabývá hodnocením použitých metod z hlediska QA/QC protokolu čili, zda metody byly validované a dle jakých postupů.

Lze shrnout, že preferovaná analytická technika pro hodnocení obsahu bioaktivních látek v doplňcích stravy založených na rostlinných extraktech a pro hodnocení čistoty těchto doplňků je kapalinová chromatografie spojená s UV detekcí. Tato technika je stále nejvíce etablovaná ve většině analytických laboratoří, které se zabývají rutinní analýzou různých vzorků, nejen doplňků stravy. Přesto ultravysoko-účinné kapalinové chromatografy (UHPLC) se stávají v poslední době stále častěji využívanější společně se zapojením alternativní detekční techniky jako je fluorescenční detekce [85], detekce nabitého aerosolu (CAD) [55], detekce rozptylu světla využívající odpaření (ELSD) [40,56] a nejvíce hmotnostní detekce (MS) [65,66,122-124].



Obr. 12 Počet publikací využívající techniku vysoko-účinné kapalinové chromatografie (HPLC) a ultravysoko-účinné kapalinové chromatografie (UHPLC) ve sledovaných letech 2012-2017 pro stanovení obsahu bioaktivních látek v doplňcích stravy založených na rostlinných extraktech.

Mezi moderní trend instrumentálních metod pro analýzu bioaktivních látek patří technika superkritické fluidní chromatografie (SFC) [125-127] a její vylepšená forma ultravysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie (UHPSFC) [128]. SFC nabízí selektivitu pro obtížné separace izomerních látek, jejichž separace nelze dosáhnout konvenční kapalinovou chromatografií, zejména v krátkém čase.

V pracích zabývajících se čistotou rostlinných extraktů je situace zcela opačná. UHPLC technika spojená s MS, MS/MS a vysoko-rozlišovací MS (HRMS) [8-9,129-133] detekční technikou je nejčastější užívanou. Několik prací také reportuje zapojení plynové chromatografie spojené s tandemovou MS detekcí (GC-MS/MS) [6,7] a hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) [41,61,62] pro analýzu toxických kovů. Tyto pokročilé instrumentální analytické metody jsou nezbytné pro analýzu komplexních matic, dosažení nízkých limitů detekce cílových látek a pro pokrytí širokého spektra analytů.

Z hlediska metod pro úpravu vzorků před analýzou, extrakce z pevné fáze do kapalné za pomoci ultrazvuku následovaná filtrací nebo centrifugací je stále nejvyužívanější metodou pro stanovení obsahu bioaktivních látek v doplňcích stravy s obsahem rostlinných extraktů, stejně tak pro testování jejich čistoty.

Většina prací citovaných v přehledovém článku uvádí plnou nebo částečnou validaci nově navržených metod podle postupů a směrnic ICH, FDA, evropského a amerického lékopisu. Velká část prací také uvádí využití MS/MS a HRMS dat pro ověření autenticity analyzovaných látek za použití nescifické detekce nebo nejednoznačných UV/Vis spekter získaných z PDA detekce. To podtrhuje fakt, že výsledky analýz rostlinných extraktů v doplňcích stravy nejsou náhodné a že je nezbytné brát je zcela vážně. Zejména ty, které zdůrazňují nízkou kvalitu těchto doplňků. Přítomnost kontaminantů, toxinů, endokrinních disruptorů a nelegálně přidaných léčivých látek se záměrem zvýšit účinnost rostlinných extraktů může mít obzvláště závažné důsledky pro spotřebitele.

Zapojení moderních analytických metod pro zajištění kontroly kvality doplňků stravy založených na rostlinných extraktech je nanejvýš důležité stejně jako potřeba stále více pokročilých technik pro co nejobsáhlejší analýzu čistoty těchto extraktů. Problémem ovšem zůstává úroveň regulatorního rámce a legislativních požadavků. Ta je zcela odlišná v jednotlivých regionech. Světová harmonizace v oblasti regulace a legislativy doplňků stravy je nezbytná pro lepší kvalitu doplňků a standardizaci obsahových látek pro zajištění jednotného dávkování pro spotřebitele.

5 Závěr

V teoretické části byla komplexně popsána problematika doplňků stravy založených na rostlinných extraktech z hlediska složení, formulace, obsahu bioaktivních látek, hodnocení čistoty a legislativních požadavků. Bylo zde vysvětleno, jaké nároky jsou kladeny na výrobce doplňků stravy a proč je nezbytná kontrola kvality těchto přípravků. Dále byl v této části práce shrnut současný stav analytického hodnocení doplňků stravy založených na rostlinných extraktech využívající HPLC instrumentaci a byly uvedeny současné trendy těchto analýz.

Kvalitu doplňků stravy na bázi rostlinných extraktů dostupných na trhu v ČR prokázalo šest provedených studií. Byly vyvinuty a validovány dvě HPLC a čtyři UHPLC metody pro stanovení obsahu bioaktivních látek v doplňcích stravy s obsahem rostlinných extraktů a pomocných látek. Pro každou studii byly nalezeny takové analytické podmínky, které umožňovaly rychlé a přesné určení obsahu daných bioaktivních látek v doplňcích stravy s ohledem zejména na problematickou separaci některých izomerních látek. Dále byly vyvinuty nebo optimalizovány postupy úpravy vzorků doplňků stravy, které umožňovaly separaci a detekci všech požadovaných bioaktivních látek bez interference matrice a dalších komponent obsažených v analyzovaných doplňcích.

Konvenční přístup k analytickému hodnocení obsahu bioaktivních látek v rostlinných extraktech za využití HPLC instrumentace je zapojení kolon s C18 stacionární fází v kombinaci s dlouhými časy analýz, které jsou nezbytné pro dosažení požadovaných separací jednotlivých látek v extraktech. V provedených studiích byly testovány různé alternativní stacionární fáze a provedeny retenční studie analytů na daných kolonách pro získání co nejlepší selektivity pro dané analyty. Lze shrnout, že cíle práce byly v tomto ohledu naplněny.

V první studii, nitrilová stacionární fáze v kombinaci s okyseleným 20% acetonitrilem pomocí kyseliny octové na pH 3 poskytly optimální selektivitu pro separaci a stanovení resveratrolu a polydatinu ve velmi krátkém čase (3 min).

V druhé studii, core-shell kolona s C18 stacionární fází a postranními iso-butylovými řetězci spolu s gradientovou elucí umožnila stanovení indol-3-karbinolu za přítomnosti jeho kondenzačních produktů.

Ve třetí práci, pentafluorophenylová stacionární fáze, která nabízí několik možných interakcí s analyty jako je π - π , disperzní a dipól–dipól interakce, a mobilní fáze sestávající

z metanolu a fosfátového pufru v gradientové eluci zajistila optimální podmínky pro separaci izomerních sloučenin obsažených v silymarinu, extraktu ostropestřce mariánského.

Ve čtvrté studii, core-shell kolona s phenyl-hexyl stacionární fází poskytla vysoce účinnou chromatografickou separaci sedmi rostlinných sterolů a stanolů. V této práci byl navíc využit detektor nabitého aerosolu (CAD, Corona) pro detekci stanolů, které nemají ve své molekule chromofor a tudíž ani neposkytují odezvu na nejčastěji užívaném UV (PDA) detektoru.

V páté práci, dvě kolony s C18 stacionární fází a modifikovaným (nabitým) povrchem částic a jedna kolona s F5 stacionární fází, prokázaly vhodnou selektivitu k separaci šesti antokyanů. Core-shell F5 kolona byla vybrána jako neoptimálnější z hlediska nejkratšího času separace.

V poslední šesté studii, RP-Amide stacionární fáze v kombinaci s mobilní fází sestávající z 5% vodného roztoku kyseliny mravenčí a acetonitrilu umožnila obtížnou separaci chlorogenové a kryptochlorogenové kyseliny ve velmi krátkém čase. Takové separace nebylo možné dosáhnout na žádné jiné testované stacionární fázi v přijatelném čase, což potvrdily i výsledky nalezené v literatuře.

Bylo prokázáno, že kvalita jednotlivých analyzovaných doplňků stravy s obsahem rostlinných extraktů se velmi liší. V některých případech dokonce nebylo nalezeno žádné množství deklarované látky, což je velmi alarmující zjištění, především pro spotřebitele.

Přehledový článek shrnuje současné trendy v analýze a kontrole kvality doplňků stravy založených na rostlinných extraktech z pohledu použitých analytických metod, extrakčních postupů při úpravě vzorků, hodnocení čistoty, bezpečnosti a stanovení obsahu biologicky aktivních látek.

6 Seznam použité literatury

- [1] Směrnice Evropského parlamentu a rady 2002/46/ES, dostupné on-line: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002L0046&from=EN> (cit. 18.09.2018).
- [2] M.M. Phillips, C.A. Rimmer, Functional foods and dietary supplements, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 4323-4324.
- [3] F. Shi, C. Guo, L. Gong, J. Li, P. Dong, J. Zhang, P. Cui, S. Jiang, Y. Zhao, S. Zeng, Application of a high resolution benchtop quadrupole-Orbitrap mass spectrometry for the rapid screening, confirmation and quantification of illegal adulterated phosphodiesterase-5 inhibitors in herbal medicines and dietary supplements, *J. Chromatogr. A* 1344 (2014) 91–98.
- [4] S. Strano-Rossi, S. Odoardi, E. Castrignanò, G. Serpelloni, M. Chiarotti, Liquid chromatography–high resolution mass spectrometry (LC–HRMS) determination of stimulants, anorectic drugs and phosphodiesterase 5 inhibitors (PDE5I) in food supplements, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 106 (2015) 144–152.
- [5] R. Zhang, L. Yin, S. Jin, Detection of illegally added drugs in dietary supplements by near-infrared spectral imaging, *J. Innov. Opt. Heal. Sci.* 7 (2014) 1-7.
- [6] D.G. Hayward, J.W. Wong, F. Shi, K. Zhang, N.S. Lee, A.L. DiBenedetto, M.J. Hengel, Multiresidue Pesticide Analysis of Botanical Dietary Supplements Using Salt-out Acetonitrile Extraction, Solid-Phase Extraction Cleanup Column, and Gas Chromatography–Triple Quadrupole Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 85 (2013) 4686–4693.
- [7] A. Páleníková, G. Martínez-Domínguez, F.J. Arrebola, R. Romero-González, S. Hrouzková, A.G. Frenich, Multifamily determination of pesticide residues in soya-based nutraceutical products by GC/MS–MS, *Food Chem.* 173 (2015) 796–807.
- [8] L. Vaclavik, M. Vaclavikova, T.H. Begley, A.J. Krynitsky, J.I. Rader, Determination of Multiple Mycotoxins in Dietary Supplements Containing Green Coffee Bean Extracts Using Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (UHPLC-MS/MS), *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 4822–4830.
- [9] L. Vaclavik, A.J. Krynitsky, J.I. Rader, Targeted analysis of multiple pharmaceuticals, plant toxins and other secondary metabolites in herbal dietary supplements by ultra-

- high performance liquid chromatography–quadrupole-orbital ion trap mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 810 (2014) 45– 60.
- [10] FDA, Current Good Manufacturing Practice in Manufacturing, Packaging, Labeling, or Holding Operations for Dietary Supplements, Docket no. 1996N-0417 (formerly no. 96N-0417), 34752-34958. 6- 25-21 CFR Part 111, 2007
- [11] European Food Safety Authority: Food supplements, dostupné online z: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/food-supplements> (cit. 18.09.2018).
- [12] Vyhláška č. 58/2018 Sb. o doplňcích stravy a složení potravin
- [13] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1925/2006 ze dne 20. prosince 2006 o přidávání vitaminů a minerálních látek a některých dalších látek do potravin.
- [14] Zákon č. 167/1998 Sb., o návykových látkách a o změně některých dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů.
- [15] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 273/2004 ze dne 11. února 2004 o prekursorech drog.
- [16] MACH, Ivan. *Doplňky stravy: jaké si vybrat při sportu i v každodenním životě*. Praha: Grada, 2012. ISBN 9788024743530.
- [17] *Doplňky stravy: Pravidla pro uvádění na trh*. eAgri 10.11.2016 Dostupné online z: <http://eagri.cz/public/web/mze/potravin/legislativa/doplunky-stravy/> (cit. 23.10.2018).
- [18] *Uvádění doplňků stravy do oběhu*. Státní zdravotní ústav 1.1.2015, Dostupné online z: <http://www.szu.cz/tema/bezpecnost-potravin/doplunky-stravy-1> (cit. 23.10.2018).
- [19] *Kontrolní činnost SZPI*. Státní zemědělská a potravinářská inspekce 18. 10. 2018, Dostupné online z: <http://www.szpi.gov.cz/clanek/kontrolni-cinnost-szpi.aspx> (cit. 23.10.2018).
- [20] *Zpráva o činnosti SZPI za rok 2017*. Státní zemědělská a potravinářská inspekce 19. 04. 2018, Dostupné online z: <http://www.szpi.gov.cz/soubor/zprava-o-cinnosti-szpi-za-rok-2017.aspx> (cit. 23.10.2018).
- [21] L. Frémont, Biological effects of resveratrol, *Life Sciences* 66 (2000) 663-673.
- [22] *Overview of the European Supplement and Novel Foods Market*. Natural products Insider 31.03.2016, Dostupné online z: <https://www.naturalproductsinsider.com/regulatory/overview-european-supplement-and-novel-foods-market> (cit. 25.10.2018).

- [23] B.W. Megna, P.R. Carney, M. Nukaya, P. Geiger, G.D. Kennedy, Indole-3-carbinol induces tumor cell death: function follows form, *J. Surg. Res.* 204 (2016) 47-54.
- [24] J.R. Weng, C.H. Tsai, S.K. Kulp, C.S. Chen, Indole-3-carbinol as a chemopreventive and anti-cancer agent, *Cancer Lett.* 262 (2008) 153–163.
- [25] K.E. Mayer, R.P. Myers, S.S. Lee, Silymarin treatment of viral hepatitis: a systematic review, *J. Vir. Hepat.* 12 (2005) 559–567.
- [26] K. Wellington, B. Jarvis, Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders, *BioDrugs* 15 (2001) 465–489.
- [27] J.A. Weststrate, G.W. Meijer, Plant sterol-enriched margarines and reduction of plasma total- and LDL-cholesterol concentrations in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects, *Eur. J.Clin. Nutr.* 52 (1998) 334–343.
- [28] F.C. Lowe, The Role of *Serenoa repens* in the Clinical Management of Lower Urinary Tract Symptoms Due to Benign Prostatic Hyperplasia, *Euro. Urol. Suppl.* 8 (2009) 894-897.
- [29] F.K. Habib, *Serenoa repens*: The Scientific Basis for the Treatment of Benign Prostatic Hyperplasia, *Euro. Urol. Suppl.* 8 (2009) 887-893.
- [30] K.K. de L. Yamaguchi, L.F.R. Pereira, C.V. Lamarão, E.S. Lima, V.F. da Veiga-Junior, Amazon acai: Chemistry and biological activities, *Food Chem.* 179 (2015) 137-151.
- [31] M. Shi, H. Loftus, A.J. McAinch, X.Q. Su, Blueberry as a source of bioactive compounds for the treatment of obesity, type 2 diabetes and chronic inflammation, *Journal Funct. Foods* 30 (2017) 16-29.
- [32] M.D. Santos, M.C. Almeida, N.P. Lopes, G.E.P. Souza, Evaluation of the antiinflammatory, analgesic and antipyretic activity of the natural polyphenol chlorogenic acid, *Biol. Pharm. Bull.* 29 (2006) 2236–2240.
- [33] R. Upadhyay, L.J.M. Rao, An outlook on chlorogenic acids-occurrence chemistry, technology, and biological activities, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53 (2013) 968–984.
- [34] S. Ashiq, M. Hussain, B. Ahmad, Natural occurrence of mycotoxins in medicinal plants: A review, *Fungal Genet. Biol.* 66 (2014) 1–10.
- [35] Z. Veprikova, M. Zachariasova, Z. Dzuman, A. Zachariasova, M. Fenclova, P. Slavikova, M. Vaclavikova, K. Mastovska, D. Hengst, J. Hajslova, Mycotoxins in

- Plant-Based Dietary Supplements: Hidden Health Risk for Consumers, *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 6633–6643.
- [36] M. Plotan, C.T. Elliott, M.L. Scippo, M. Muller, J.P. Antignac, E. Malone, T.F.H. Bovee, S. Mitchell, L. Connolly, The application of reporter gene assays for the detection of endocrine disruptors in sport supplements, *Anal. Chim. Acta* 700 (2011) 34–40.
- [37] M. Plotan, C.T. Elliott, M. Oplatowska, L. Connolly, Validation and application of reporter gene assays for the determination of estrogenic and androgenic endocrine disruptor activity in sport supplements, *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 3057–3067.
- [38] M. Plotan, C.T. Elliot, C. Frizzell, L. Connolly, Estrogenic endocrine disruptors present in sports supplements. A risk assessment for human health, *Food Chem.* 159 (2014) 157-165.
- [39] E. Sanzini, M. Badea, A. Dos Santos, P. Restani, H. Sievers, Quality control of plant food supplements, *Food. Funct.* 2 (2011) 740-746.
- [40] Y. Wang, B. Avula, W. Tang, M. Wang, M.A. Elsohly, I.A. Khan, Ultra-HPLC method for quality and adulterant assessment of steviol glycosides sweeteners – *Stevia rebaudiana* and stevia products, *Food Addit. Contam. A* 32 (2015) 674–685.
- [41] Filipiak-Szok, M. Kurzawa, E. Sztyk, Determination of toxic metals by ICP-MS in Asiatic and European medicinal plants and dietary supplements, *J. Trace Elem. Med. Bio.* 30 (2015) 54–58.
- [42] I. Brabcová, L. Kovářová, D. Šatínský, L. Havlíková, P. Solich, A fast HPLC method for determination of vitamin E acetate in dietary supplements using monolithic column, *Food Anal. Methods* 6 (2013) 380-385.
- [43] D. Šatínský, K. Jägerová, L. Havlíková, P. Solich, A new and fast HPLC method for determination of rutin, troxerutin, diosmin and hesperidin in food supplements using fused-core column technology, *Food Anal. Methods* 6 (2013) 1353-1360.
- [44] J.M. Omar, H. Yang, S. Li, R.R. Marquardt, P.J.H. Jones, Development of an Improved Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Analyses of trans-/cis-Resveratrol, Quercetin, and Emodin in Commercial Resveratrol Supplements, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 5812–5817.

- [45] J. Fibigr, D. Šatínský, P. Solich, A study of retention characteristics and quality control of nutraceuticals containing resveratrol and polydatin using fused-core column chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 120 (2016) 112-119.
- [46] J. Fibigr, D. Šatínský, L. Havlíková, P. Solich, A new method for rapid determination of indole-3-carbinol and its condensation products in nutraceuticals using core-shell column chromatography method, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 120 (2016) 383–390.
- [47] D. Kremr, D.J. Cocovi-Solberg, P. Bajzerová, K. Ventura, M. Miró, On-line monitoring of in-vitro oral bioaccessibility tests as front-end to liquid chromatography for determination of chlorogenic acid isomers in dietary supplements, *Talanta* 166 (2017) 391-398.
- [48] A. Romani, S. Mulas, D. Heimler, Polyphenols and secoiridoids in raw material (*Olea europaea* L. leaves) and commercial food supplements, *Eur. Food. Res. Technol.* 243 (2017) 429–435.
- [49] S. Magiera, I. Baranowska, A. Lautenszleger, UHPLC–UV method for the determination of flavonoids in dietary supplements and for evaluation of their antioxidant activities, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 102 (2015) 468–475.
- [50] J. Fibigr, D. Šatínský, P. Solich, A new approach to the rapid separation of isomeric compounds in a *Silybum marianum* extract using UHPLC core-shell column with F5 stationary phase, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 134 (2017) 203-213.
- [51] J. Fibigr, D. Šatínský, P. Solich, A UHPLC method for the rapid separation and quantification of anthocyanins in acai berry and dry blueberry extracts, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 143 (2017) 204–213.
- [52] L. Havlíková, D. Šatínský, L. Opletal, P. Solich, A Fast Determination of Chlorophylls in Barley Grass Juice Powder Using HPLC Fused-Core Column Technology and HPTLC, *Food Anal. Methods* 7 (2014) 629-635.
- [53] C. Di Lorenzo, A. Dos Santos, F. Colombo, E. Moro, M. Dell'Agli, P. Restani, Development and validation of HPLC method to measure active amines in plant food supplements containing *Citrus aurantium* L, *Food Control* 46 (2014) 136-142.
- [54] E. Moretón-Lamas, M. Lago-Crespo, M.A. Lage-Yusty, J. López-Hernández, Comparison of methods for analysis of resveratrol in dietary vegetable supplements, *Food Chem.* 224 (2017) 219–223.

- [55] J. Fibigr, D. Šatínský, P. Solich, A UHPLC method for the rapid separation and quantification of phytosterols using tandem UV/Charged aerosol detection – A comparison of both detection techniques, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 140 (2017) 274–280.
- [56] B. Avula, Y.H. Wang, Z. Ali, T.J. Smillie, I.A. Khan, Chemical fingerprint analysis and quantitative determination of steroidal compounds from *Dioscorea villosa*, *Dioscorea* species and dietary supplements using UHPLC-ELSD, *Biomed. Chromatogr.* 28 (2014) 281-294.
- [57] S. Heo, J.Y. Choi, G.J. Yoo, S. Park, S.Y. Baek, Simultaneous analysis of 35 specific antihypertensive adulterants in dietary supplements using LC/MS/MS, *Biomed. Chromatogr.* 31 (2017) e3856.
- [58] B. Guo, M. Wang, Y. Liu, J. Zhou, H. Dai, Z. Huang, L. Shen, Q. Zhang, B. Chen, Wide-Scope Screening of Illegal Adulterants in Dietary and Herbal Supplements via Rapid Polarity-Switching and Multistage Accurate Mass Confirmation Using an LC-IT/TOF Hybrid Instrument, *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 6954–6967.
- [59] E. Sieniawska, T. Baj, R. Sawicki, A. Wanat, K.K. Wojtanowski, G. Ginalska, G. Zgorka, J. Szymanska, LC-QTOF-MS Analysis and Activity Profiles of Popular Antioxidant Dietary Supplements in Terms of Quality Control, *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2017) doi:10.1155/2017/8692516
- [60] J.H. Lee, J.Y. Kim, S. Cho, J.H. Jeong, S. Cho, H.J. Park, S.Y. Baek, Determination of Miroestrol and Isomiroestrol From *Pueraria mirifica* (White Kwao Krua) in Dietary Supplements by LC–MS-MS and LC–Q-Orbitrap/MS, *J. Chromatogr. Sci.* 55 (2017) 214-221.
- [61] Y. Hsieh, S. Jiang, Determination of selenium compounds in food supplements using reversed-phase liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry, *Microchem. J.* 110 (2013) 1–7.
- [62] F. Yang, S. Jiang, A.C. Sahayam, Combined use of HPLC–ICP-MS and microwave-assisted extraction for the determination of cobalt compounds in nutritive supplements, *Food Chem.* 147 (2014) 215–219.

- [63] V. González-Ruiz, A.I. Olives, M.A. Martín, Core-shell particles lead the way to renewing high-performance liquid chromatography, *Trends Anal. Chem.* 64 (2015) 17-28.
- [64] J. A., K. Aguilar-Arteaga, C. Dez, E. Barrado, Recent Advances in the Extraction of Triazines from Water Samples, in: *Herbicides - Advances In Research*, InTech, 2013. doi:10.5772/54962.
- [65] S.S. Hu, W. Cao, J.H. Da, H.B. Dai, J. Cao, L.H. Ye, X.Y. Li, C. Chu, Dispersive Micro Solid-Phase Extraction with Graphene Oxide for the Determination of Phenolic Compounds in Dietary Supplements by Ultra High Performance Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry, *Food Anal. Methods* 8 (2015) 833-840.
- [66] P. Svoboda, D. Sander, K. Plachká, L. Nováková, Development of matrix effect-free MISPE-UHPLC–MS/MS method for determination of lovastatin in Pu-erh tea, oyster mushroom, and red yeast rice, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 140 (2017) 367-376.
- [67] C.T. Srigley, E.A. Haile, Quantification of plant sterols/stanols in foods and dietary supplements containing added phytosterols, *J. Food Compos. Anal.* 40 (2015) 163–176.
- [68] Graphene Oxide, dostupné online z: <https://www.tcichemicals.com/en/li/support-download/tcicemail/application/167-06.html> (cit. 25.11.2018).
- [69] Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry, dostupné online z: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070107.pdf> (cit. 25.11.2018).
- [70] ICH Harmonised Tripartite Guideline Q2(R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005. Dostupné online z: <http://www.ich.org/> (cit. 25.11.2018).
- [71] Validation of analytical procedures. OMCL Network of the Council of Europe, dostupné online z: https://www.edqm.eu/medias/fichiers/validation_of_analytical_procedures_paphomcl_13_82_2r.pdf (cit. 25.11.2018).
- [72] European Pharmacopoeia Online, dostupné online z: <http://online6.edqm.eu/ep905/> (cit. 25.11.2018).

- [73] United States Pharmacopeia (USP) and the National Formulary (NF), dostupné online z: <https://www.uspnf.com/> (cit. 25.11.2018).
- [74] FIBIGR, Jakub. Využití HPLC v analýze nutraceutik s obsahem chlorogenových kyselin. Hradec Králové, 2014. Diplomová práce. Univerzita Karlova.
- [75] C. Wu, J. Yang, F. Wang, X. Wang, Resveratrol: botanical origin, pharmacological activity and applications, *Chin. J. Nat. Med.* 11 (2013) 1–15.
- [76] H. Chen, T. Tuck, X. Ji, X. Zhou, G. Kelly, A. Cuerrier, J. Zhang, Quality assessment of Japanese knotweed (*Fallopia japonica*) grown on Prince Edward Island as a source of resveratrol, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 6383–6392.
- [77] Y. Li, W. Zhu, J. Tao, P. Xin, M. Liu, J. Li, M. Wei, Resveratrol protects cardiomyocytes from oxidative stress through SIRT1 and mitochondrial biogenesis signaling pathways, *Biochem. Bioph. Res. Commun.* 438 (2013) 270–276.
- [78] M.J. Anderton, R. Jukes, J.H. Lamb, M.M. Manson, A. Gescher, W.P. Steward, M.L. Williams, Liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of indole-3-carbinol and its acid condensation products in plasma, *J. Chromatogr. B* 787 (2003) 281–291.
- [79] G.W. Watson, L.M. Beaver, D.E. Williams, R.H. Dashwood, E. Ho, Phytochemicals from cruciferous vegetables, epigenetics, and prostate cancer prevention, *AAPS J.* 15 (2013) 951–961.
- [80] L.M. Beaver, T.W. Yu, E.I. Sokolowski, D.E. Williams, R.H. Dashwood, E. Ho, 3,3'-Diindolylmethane, but not indole-3-carbinol, inhibits histone deacetylase activity in prostate cancer cells, *Toxicol. Appl. Pharm.* 263 (2012) 345–351.
- [81] J.I. Lee, B.H. Hsu, D. Wu, J.S. Barrett, Separation and characterization of silybin, isosilybin, silydianin and silychristin in milk thistle extract by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 57–68.
- [82] T.N. Graf, M.C. Wani, R. Agarwal, D.J. Kroll, N.H. Oberlies, Gram-scale purification of flavonolignan diastereoisomers from *Silybum marianum* (milk thistle) extract in support of preclinical in vivo studies for prostate cancer chemoprevention, *Planta Med.* 73 (2007) 1495–1501.
- [83] N. Vargas-Mendoza, E. Madrigal-Santillán, Á. Morales-González, J. Esquivel-Soto, C. Esquivel-Chirino, M. García-Luna y González-Rubio, J.A. Gayosso-de-Lucio, J. A

- Morales-González, Hepatoprotective effect of silymarin, *World J. Hepatol.* 6 (2014) 144–149.
- [84] Phenomenex adds versatile F5 (Pentafluorophenyl) columns, *Filtr. Sep.* 52(2015) 14.
- [85] Y.F. Wong, A. Makahleh, B. Saad, M.N.M. Ibrahim, A.A. Rahim, N. Brosse, UPLC method for the determination of vitamin E homologues and derivatives in vegetable oils, margarines and supplement capsules using pentafluorophenyl column, *Talanta* 130 (2014) 299–306.
- [86] W. Zhang, Fluorocarbon stationary phases for liquid chromatography applications, *J. Fluor. Chem.* 129 (2008) 910–919.
- [87] A. Ghosh, S. Biswas, T. Ghosh, Preparation and evaluation of silymarin β -cyclodextrin molecular inclusion complexes, *J. Young Pharm.* 3 (2011) 205–210.
- [88] S. Shen, C. Senanayake, W. Tang, N. Haddad, S. Ma, H. Lee, N. Grinberg, J. Wang, N. Yee, Sulfated β -cyclodextrin as chiral mobile phase additive for ultrahigh-Pressure liquid chromatography, in: *LCGC*, 2009, Special Issue April.
- [89] Introducing Kinetex F5, Phenomenex, dostupné online z: <https://www.phenomenex.com/Info/Page/f5#> (cit. 11.10.2018)
- [90] R.A. Moreau, B.D. Whitaker, K.B. Hicks, Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses, *Prog. Lipid Res.* 41 (2002) 457–500.
- [91] T. Bacchetti, S. Masciangelo, V. Bicchiega, E. Bertoli, G. Ferretti, Phytosterols, phytostanols and their esters: from natural to functional foods, *Mediterr. J. Nutr. Metab.* 4 (2011) 165–172.
- [92] S. Duong, N. Strobel, S. Buddhadasa, K. Stockham, M. Auldish, B. Wales, J. Orbell, M. Cran, Rapid measurement of phytosterols in fortified food using gas chromatography with flame ionization detection, *Food Chem.* 211 (2016) 570–576.
- [93] M.J. Lagarda, G. García-Llatas, R. Farré, Analysis of phytosterols in foods, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1486–1496.
- [94] M. Bedner, M.M. Schantz, L.C. Sander, K.E. Sharpless, Development of liquid chromatographic methods for the determination of phytosterols in Standard Reference Materials containing saw palmetto, *J. Chromatogr. A* 1192 (2008) 74–80.

- [95] H.S.M. Ahmida, P. Bertucci, L. Franzò, R. Massoud, C. Cortese, A. Lala, G. Federici, Simultaneous determination of plasmatic phytosterols and cholesterol precursors using gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) with selective ion monitoring (SIM), *J. Chromatogr. B* 842 (2006) 43–47.
- [96] M. Menéndez-Carreño, D. Knol, H. Janssen, Development and validation of methodologies for the quantification of phytosterols and phytosteroloxidation products in cooked and baked food products, *J. Chromatogr. A* 1428 (2016) 316–325.
- [97] L.M. Clement, S.L. Hansen, C.D. Costin, G.L. Perri, Quantitation of sterols and steryl esters in fortified foods and beverages by GC/FID, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 87 (2010) 973–980.
- [98] Y. Liu, G. Yong, Y. Xu, D. Zhu, H. Tong, S. Liu, Simultaneous determination of free and esterified fatty alcohols, phytosterols and solanesol in tobacco leaves by GC, *Chromatographia* 71 (2010) 727–732.
- [99] S. Almeling, D. Ilko, U. Holzgrabe, Charged aerosol detection in pharmaceutical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 69 (2012) 50–63.
- [100] J. Viinamäki, I. Ojanperä, Photodiode array to charged aerosol detector response ratio enables comprehensive quantitative monitoring of basic drugs in blood by ultra-high performance liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta* 865 (2015) 1–7.
- [101] L. Millán, M.C. Sampedro, A. Sanchez, M.A. Goicolea, R.J. Barrio, Determination of phytosterols in oenological matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization and ion-trap mass spectrometry, *J. Food Compos. Anal.* 42 (2015) 171–178.
- [102] W. Yi, C.C. Akoh, J. Fischer, G. Krewer, Absorption of anthocyanins from blueberry extracts by caco-2 human intestinal cell monolayers, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 5651–5658.
- [103] I. Fernandes, F. Marques, V. Freitas, N. Mateus, Antioxidant and antiproliferative properties of methylated metabolites of anthocyanins, *FoodChem.* 141 (2013) 2923–2933.
- [104] A.G. Schauss, X. Wu, R.L. Prior, B. Ou, D. Huang, J. Owns, A. Agarwal, G.S. Jensen, A.N. Hart, E. Shanbrom, Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-

- dried amazonian palm berry, euterpe oleraceae mart. (Acai), *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 8604–8610.
- [105] K.K.L. Yamaguchi, L.F.R. Pereira, C.V. Lamarão, E.S. Lima, V.F. da Veiga-Junior, Amazon acai: chemistry and biological activities: a review, *Food Chem.* 179 (2015) 137–151.
- [106] B. Šmídová, D.Šatínský, K. Dostálová, P. Solich, The pentafluorophenyl stationary phase shows a unique separation efficiency for performing fast chromatography determination of highbush blueberry anthocyanins, *Talanta* 166 (2017) 249–254.
- [107] D.C. Manns, A.K. Mansfield, A core-shell column approach to a comprehensive high-performance liquid chromatography phenolic analysis of *Vitis vinifera* L. and interspecific hybrid grape juices, wines, and other matrices following either solid phase extraction or direct injection, *J. Chromatogr. A* 1251 (2012) 111–121.
- [108] V.V. de Rosso, S. Hillebrand, E.C. Montilla, F.O. Bobbio, P. Winterhalter, A.Z. Mercadante, Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighiaemarginata* DC.) and acai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS, *J. Food Compos. Anal.* 21 (2008) 291–299.
- [109] V. Mulabagal, A.I. Calderón, Liquid chromatography/mass spectrometry based fingerprinting analysis and mass profiling of *Euterpe oleracea* (acai) dietary supplement raw materials, *Food Chem.* 134 (2012) 1156–1164.
- [110] C.M. Willemse, M.A. Stander, A. de Villiers, Hydrophilic interaction chromatographic analysis of anthocyanins, *J. Chromatogr. A* 1319 (2013) 127–140.
- [111] MAJEROVÁ, Michaela. Využití HPLC v analýze nutraceutik s obsahem chlorogenových kyselin. Hradec Králové, 2018. Diplomová práce. Univerzita Karlova.
- [112] T. Ranheim, B. Halvorsen, Coffee consumption and human health: beneficial or detrimental? Mechanisms for effects of coffee consumption on different risk factors for cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus, *Mol. Nutr. Food Res.* 49 (2005) 274–284.
- [113] E. Salazar-Martinez, W.C. Willett, A. Ascherio, J.E. Manson, M.F. Leitzmann, M.J. Stampfer, F.B. Hu, Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus, *Ann. Intern. Med.* 140 (2004) 1–8.

- [114] A.A. Almeida, A. Farah, D.A.M. Silva, E.A. Nunam, M.B.A. Glória, Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 8738–8743.
- [115] G. Haghi, A. Hatami, R. Arshi, Distribution of caffeic acid derivatives in *Gundelia tournefortii* L, *Food Chem.* 124 (2011) 1029–1035.
- [116] T. Bakuradze, N. Boehm, C. Janzowski, R. Lang, T. Hofmann, J.P. Stockis, F.W. Albert, H. Stiebitz, G. Bytof, I. Lantz, M. Baum, G. Eisenbrand, Antioxidant rich coffee reduces DNA damage, elevates glutathione status and contributes to weight control: results from an intervention study, *Mol. Nutr. Food Res.* 55 (2011) 793–797.
- [117] A. Farah, C.M. Donangelo, Phenolic compounds in coffee, *Braz. J. Plant Physiol.* 18 (2006) 23–36.
- [118] A. Farah, M. Monteiro, C.M. Donangelo, S. Lafay, Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans, *J. Nutr.* 138 (2008) 2309–2315.
- [119] J. Wang, D.Q. Lu, X.Q. Ling, J.L. Wang, H.Q. Qiao, P.K. Ouyang, Simultaneous determination of four active components in tobacco wastes by LC, *Chromatographia* 69 (2009) 561–566.
- [120] A. Farah, T. de Paulis, L.C. Trugo, P.R. Martin, Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 1505–1513.
- [121] Y. Chang, A. Ge, X. Yu, X. Jiao, J. Li, J. He, J. Tian, W. Liu, J.T. Azietaku, B. Zhang, X. Gao, Simultaneous determination of four phenolic acids and seven alkaloids in rat plasma after oral administration of traditional Chinese medicinal preparation Jinqi Jiangtang Tablet by LC-ESI-MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 117 (2016) 1–10.
- [122] B. Avula, Y.H. Wang, M. Wang, T.J. Smillie, I.A. Khan, Simultaneous determination of sesquiterpenes and pyrrolizidine alkaloids from the rhizomes of *Petasites hybridus* (L.) G.M. et Sch. and dietary supplements using UPLC-UV and HPLC-TOF-MS methods, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 70 (2012) 53–63.
- [123] K.G. Austin, J. Travis, G. Pace, H.R. Lieberman, Analysis of 1,3 dimethylamylamine concentrations in Geraniaceae, geranium oil and dietary supplements, *Drug Test. Anal.* 6 (2014) 797–804.

- [124] A.B. Cerezo, Á. Leal, M.A. Álvarez-Fernández, R. Hornedo-Ortega, A.M. Troncoso, M.C. García-Parrilla, Quality control and determination of melatonin in food supplements, *J. Food Compos. Anal.* 45 (2016) 80-86.
- [125] M. Ganzera, Supercritical fluid chromatography for the separation of isoflavones, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 107 (2015) 364-369.
- [126] L. Sánchez-Hernández, J.L. Bernal, M.J. del Nozal, L. Toribio, Chiral analysis of aromatic amino acids in food supplements using subcritical fluid chromatography and Chirobiotic T2 column, *J. Supercrit. Fluid.* 107 (2016) 519-525.
- [127] M. Wang, E.J. Carrell, A.G. Chittiboyina, B. Avula, Y.H. Wang, J. Zhao, et al., Concurrent supercritical fluid chromatographic analysis of terpene lactones and ginkgolic acids in Ginkgo biloba extracts and dietary supplements, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 4649-4660.
- [128] B. Li, H. Zhao, J. Liu, W. Liu, S. Fan, G. Wu, et al., Application of ultra-high performance supercritical fluid chromatography for the determination of carotenoids in dietary supplements, *J. Chromatogr. A* 1425 (2015) 287-292.
- [129] A.B. Cerezo, Á. Leal, M.A. Álvarez-Fernández, R. Hornedo-Ortega, A.M. Troncoso, M.C. García-Parrilla, Quality control and determination of melatonin in food supplements, *J. Food Compos. Anal.* 45 (2016) 80-86.
- [130] P. Paíga, M.J.E. Rodrigues, M. Correia, J.S. Amaral, M.B.P.P. Oliveira, C. Delerue-Matos, Analysis of pharmaceutical adulterants in plant food supplements by UHPLC-MS/MS, *Eur. J. Pharm. Sci.* 99 (2017) 219-227.
- [131] E.A. Nantia, D. Moreno-González, A.M. García-Campaña, L. Gámiz-Gracia, High-Throughput Methodology for the Determination of Carbamates in Food Supplements by UHPLC-MS/MS, *Chromatographia.* 80 (2017) 63-70.
- [132] H. Shi, Y. Zhao, J. Sun, L. (L.) Yu, P. Chen, Chemical profiling of glucosinolates in cruciferous vegetables-based dietary supplements using ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem high resolution mass spectrometry, *J. Food Compos. Anal.* 61 (2017) 67-72.
- [133] G. Martínez-Domínguez, R. Romero-González, A.G. Frenich, Determination of toxic substances, pesticides and mycotoxins, in ginkgo biloba nutraceutical products by

liquid chromatography Orbitrap-mass spectrometry, *Microchem. J.* 118 (2015) 124–130.

7 Seznam publikací, abstraktů a řešených projektů

7.1 Přehled publikovaných prací

- A study of retention characteristics and quality control of nutraceuticals containing resveratrol and polydatin using fused-core column chromatography**
Jakub Fibigr, Dalibor Šatínský, Petr Solich
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 120 (2016) 112-119
IF₂₀₁₄ = 2.979, Počet citací: 4 (dle WOS k 30. 11. 2018)
Autorské podíly: Jakub Fibigr – 80 % (příprava experimentů, vývoj metody, optimalizace, validace, sepsání práce)
Dalibor Šatínský – 15 % (návrh experimentů, korekce manuskriptu)
Petr Solich – 5 % (revize manuskriptu)
- A new method for rapid determination of indole-3-carbinol and its condensation products in nutraceuticals using core-shell column chromatography method**
Jakub Fibigr, Dalibor Šatínský, Lucie Havlíková, Petr Solich
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 120 (2016) 383-390
IF₂₀₁₄ = 2.979, Počet citací: 4 (dle WOS k 30. 11. 2018)
Autorské podíly: Jakub Fibigr – 75 % (příprava experimentů, vývoj metody, optimalizace, validace, sepsání práce)
Dalibor Šatínský – 15 % (návrh experimentů, korekce manuskriptu)
Lucie Havlíková – 5 % (MS analýza)
Petr Solich – 5 % (revize manuskriptu)
- A new approach to the rapid separation of isomeric compounds in a Silybum marianum extract using UHPLC core-shell column with F5 stationary phase**
Jakub Fibigr, Dalibor Šatínský, Petr Solich
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 134 (2017) 203-213
IF₂₀₁₅ = 3.169, Počet citací: 10 (dle WOS k 30. 11. 2018)
Autorské podíly: Jakub Fibigr – 80 % (příprava experimentů, vývoj metody, optimalizace, validace, sepsání práce)
Dalibor Šatínský – 15 % (návrh experimentů, korekce manuskriptu)
Petr Solich – 5 % (revize manuskriptu)

4. **A UHPLC method for the rapid separation and quantification of phytosterols using tandem UV/Charged aerosol detection – a comparison of both detection techniques**

Jakub Fibigr, Dalibor Šatínský, Petr Solich

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 140 (2017) 274–280

IF₂₀₁₅ = 3.169, Počet citací: 5 (dle WOS k 30. 11. 2018)

Autorské podíly: Jakub Fibigr – 75 % (příprava experimentů, vývoj metody, optimalizace, validace, sepsání práce)

Dalibor Šatínský – 20 % (návrh experimentů, korekce manuskriptu)

Petr Solich – 5 % (revize manuskriptu)

5. **A UHPLC method for the rapid separation and quantification of anthocyanins in acai berry and dry blueberry extracts**

Jakub Fibigr, Dalibor Šatínský, Petr Solich

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 143 (2017) 204–213

IF₂₀₁₆ = 3.255, Počet citací: 4 (dle WOS k 30. 11. 2018)

Autorské podíly: Jakub Fibigr – 80 % (příprava experimentů, vývoj metody, optimalizace, validace, sepsání práce)

Dalibor Šatínský – 15 % (návrh experimentů, korekce manuskriptu)

Petr Solich – 5 % (revize manuskriptu)

6. **A validated UHPLC method for the determination of caffeoylquinic and di-caffeoylquinic acids in green coffee extracts using an RP-Amide fused-core column**

Jakub Fibigr, Michaela Majorová, Hana Kočová Vlčková, Petr Solich, Dalibor Šatínský

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 151 (2018) 291–300

IF₂₀₁₆ = 3.255, Počet citací: 0 (dle WOS k 30. 11. 2018)

Autorské podíly: Jakub Fibigr – 65 % (příprava experimentů, vývoj metody, optimalizace, sepsání práce)

Michaela Majorová – 10 % (optimalizace a validace metody)

Hana Kočová Vlčková – 5 % (HRMS analýza)

Petr Solich – 5 % (revize manuskriptu)

Dalibor Šatínský – 15 % (návrh experimentů, korekce manuskriptu)

7. **Current trends in the analysis and quality control of food supplements based on plant extracts**

Jakub Fibigr, Dalibor Šatínský, Petr Solich

Analytica Chimica Acta 1036 (2018) 1-15

IF₂₀₁₇ = 5.123, Počet citací: 0 (dle WOS k 30. 11. 2018)

Autorské podíly: Jakub Fibigr – 75 % (analýza publikovaných dat, sepsání práce)

Dalibor Šatínský – 20 % (korekce manuskriptu)

Petr Solich – 5 % (revize manuskriptu)

Souhrn:

Celkový počet citací: 27

Celkový počet citací bez autocitací: 17

h-index: 4

(dle WOS k 30. 11. 2018)

Souhrnný IF: 23.929

7.2 Přehled ústních prezentací uvedených v konferenčních sbornících

1. **J. Fibigr**, D. Šatínský, Quality control of food supplements available on the Czech market using core-shell column chromatography, 6. Postgraduální a 4. Postdoktorandská vědecká konference FAF UK, 9. - 10. 2. 2016, Hradec Králové
2. L. Zelená, L. Hyršová, **J. Fibigr**, P. Pávek, H. Sklenářová, Sequential injection manifold as a tool for automated performance of drug permeation studies, 6. Postgraduální a 4. Postdoktorandská vědecká konference FAF UK, 9. - 10. 2. 2016, Hradec Králové
3. **J. Fibigr**, D. Šatínský, Application of charged aerosol detector in analysis of biologically active substances in food supplements, 7. Postgraduální a 5. Postdoktorandská vědecká konference FAF UK, 7. - 8. 2. 2017, Hradec Králové

7.3 Přehled plakátových sdělení prezentovaných na domácích a mezinárodních konferencích

1. L. Zelená, E. Lopes, **J. Fibigr**, M. Segundo, M. Miró, H. Sklenářová, Automated monitoring of drug permeation studies using Rhodamine 123 as a marker, Flow Analysis 2015, 5. - 10. 7. 2015, Praha, Česká Republika
2. **J. Fibigr**, D. Šatínský, P. Solich, HPLC Method for Determination and Quantification of Indole-3-carbinol in Food Supplements, Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, 2. - 4. 9. 2015, Siófok, Maďarsko
3. **J. Fibigr**, D. Šatínský, P. Solich, HPLC determination of *trans*-resveratrol and polydatin in nutraceuticals, 15th International Nutrition & Diagnostic Conference, 5. - 8. 10. 2015, Praha, Česká Republika
4. **J. Fibigr**, D. Šatínský, P. Solich, HPLC determination of indole-3-carbinol in food supplements, 15th International Nutrition & Diagnostic Conference, 5. - 8. 10. 2015, Praha, Česká Republika
5. **J. Fibigr**, D. Šatínský, P. Solich, UHPLC method development for separation and determination of silymarin compounds, 45. konference Syntéza a analýza léčiv, 22. - 24. 6. 2016, Hradec Králové, Česká Republika
6. **J. Fibigr**, D. Šatínský, P. Solich, UHPLC Method for Determination of Silymarin compounds in Food Supplements, 18th International Symposium On Advances In Extraction Technologies & 22nd International Symposium On Separation Sciences, 3. - 6. 7. 2016, Toruń, Polsko
7. L. Zelená, L. Hyršová, **J. Fibigr**, P. Pávek, H. Sklenářová, Drug permeation studies performed automatically using SIA manifold and Franz diffusion cell as an analytical tool, 18th International Symposium On Advances In Extraction Technologies & 22nd International Symposium On Separation Sciences, 3. - 6. 7. 2016, Toruń, Polsko
7. **J. Fibigr**, I. Lhotská, D. Šatínský, P. Solich, Development of a New UHPLC Method for Separation of Eight Phytosterols using UV/CAD detection, 31st International Symposium on Chromatography, 28. 8. - 1. 9. 2016, Cork, Irsko

8. M. Parmová, L. Chocholoušová Havlíková, D. Šatínský, **J. Fibigr**, J. Chvojka, The Study Of Potential Use Of Nanofiber Polymers As Sorbents For The On-Line Extraction In HPLC, 31st International Symposium on Chromatography, 28. 8. - 1. 9. 2016, Cork, Irsko
9. **J. Fibigr**, I. Lhotská, D. Šatínský, Rapid UHPLC determination of anthocyanins in acai berry and dry blueberry extracts, 45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 18. - 22. 6. 2017, Praha, Česká Republika
10. **J. Fibigr**, D. Šatínský, Sample preparation and UHPLC analysis of anthocyanins in food supplements with acai berry and dry blueberry extracts, 19th International Symposium on Advances in Extraction Technologies, 27. - 30. 6. 2017, Santiago de Compostela, Španělsko
11. L. Zelená, **J. Fibigr**, L. Hyršová, H. Sklenářová, On-line determination of Rhodamine 123 in combination with p-glycoprotein inhibitors using separation in low-pressure SIA system, 19th International Symposium on Advances in Extraction Technologies, 27. - 30. 6. 2017, Santiago de Compostela, Španělsko
12. **J. Fibigr**, M. Majorová, D. Šatínský, UHPLC determination of chlorogenic acids in green coffee extracts, Euroanalysis 2017 (XIXth European Conference in Analytical Chemistry), 28. 8. - 1. 9. 2017, Stockholm, Švédsko
13. **J. Fibigr**, I. Lhotská, D. Šatínský, Application of tandem UV/Charged aerosol detection in analysis of bioactive substances in food supplements, 15th International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Separation Technology, 24. - 26. 1. 2018, Cardiff, Velká Británie
14. **J. Fibigr**, M. Hollá, I. Lhotská, D. Šatínský, A development of HILIC-UHPLC-CAD method for fast separation and determination of steviol glycosides in natural and artificial sweeteners, 24th International Symposium on Separation Sciences (ISSS 2018), 17. – 20. 6. 2018, Jasná, Slovensko

15. I. Lhotská, A. Kholová, **J. Fibigr**, D. Šatínský, New molecularly imprinted polymer as an extraction sorbent for selective on-line SPE-HPLC determination of mycotoxin citrinin in food supplements, 24th International Symposium on Separation Sciences (ISSS 2018), 17. – 20. 6. 2018, Jasná, Slovensko

7.4 Řešené projekty

Vývoj analytických metod pro účinnou separaci izomerních biologicky aktivních látek
(Development of analytical methods for the effective separation of isomeric biologically active compounds)

Grantová agentura Univerzity Karlovy, projekt GA UK č. 181216, hlavní řešitel

On-line monitorování permeačních studií v systému sekvenční injekční analýzy
(Online monitoring of permeation studies in sequential injection analysis)

Grantová agentura Univerzity Karlovy, projekt GA UK č. 159415, spoluřešitel

8 Přílohy – publikace zahrnuté v disertační práci