

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**MOŽNOSTI STANOVENÍ MYKOTOXINŮ
V POTRAVINÁCH**

KATEŘINA KOHOUTOVÁ

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2021

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Daliboru Šatínskému, PhD. za jeho trpělivost, cenné rady, informace a připomínky, které mi poskytl v průběhu psaní této práce.

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

OBSAH

1. Použité zkratky	6
2. Úvod	8
3. Zadání – cíl práce	9
4. Teoretická část	10
4.1 Mykotoxiny	10
4.1.1 Mykotoxiny v potravinách	11
4.1.2 Bezpečnost a kontrola mykotoxinů v potravinách	13
4.2 Ochratoxin A	14
4.2.1 Struktura a fyzikální vlastnosti	14
4.2.2 Producenti	15
4.2.3 Biosyntéza	15
4.2.4 Mechanismus působení a rozklad	16
4.2.5 Toxikologické hodnocení	17
4.2.6 Výskyt v potravinách a nápojích	20
5. Analytická část	22
5.1 Analýza mykotoxinů	22
5.2 Příprava vzorku pro analýzu	22
5.2.1 Odběr vzorku	23
5.2.2 Extrakce	23
5.2.3 Přečištění extraktu	24
5.3 Metody potenciálně vhodné pro stanovení ochratoxinu A	26
5.3.1 Optické metody	26
5.3.2 Fluorescenční analýza	28
5.3.3 Hmotnostní spektrometrie (Mass spectrometry – MS)	28
5.3.4 Chromatografické metody	29
5.3.5 Elektromigrační separační metody	33
5.3.6 Imunochemické metody	34
5.4 Možnosti stanovení ochratoxinu A	35
5.4.1 Stanovení ochratoxinu A ve vzorcích pšenice a kukuřice metodou využívající sorpční extrakci na míchací tyčince ve spojení s kapalinovou chromatografií s fluorescenční detekcí	35
5.4.2 Stanovení ochratoxinu A ve vzorcích rýže metodou fluorescenční polarizační imunoanalýzy	36
5.4.3 Plně automatizovaná a rychlá metoda využívající on-line SPE extrakci v kombinaci s HPLC detekcí ke stanovení citrininu a ochratoxinu A v českém pivu	36
5.4.4 Analýza přítomnosti aflatoxinu B1, ochratoxinu A a citrininu ve fermentovaných masných produktech chorvatského původu	37
5.4.5 Vývoj oligosorbentu pro stanovení ochratoxinu A ve vzorcích piva	37
5.4.6 Detekce ochratoxinu A a citrininu nově navrženou HPLC technikou	38
5.4.7 Studium obsahu ochratoxinu A v jihomoravských a zahraničních vínech metodou UPLC s fluorescenční detekcí	38
5.4.8 Detekce ochratoxinu A, fumonisinu B1 a citrininu pro jejich možnou kontaminaci francouzských cereálií: vývoj metody pro simultánní extrakci citrininu a ochratoxinu A	39

5.4.9	Vývoj elektrochemické metody pro detekci ochratoxinu A založené na aptameru a izotermální amplifikaci	39
5.4.10	Elektrochemická metoda využívající magnetické nanočástice pro stanovení ochratoxinu A v červených hroznech <i>Vitis vinifera</i>	40
5.4.11	Detekce ochratoxinu A pomocí fluorescenční chromatografické imunoanalýzy využívající kvantové tečky	40
5.4.12	Rychlý gelový test pro neinstrumentální detekci ochratoxinu A v pivu	41
5.4.13	Dvouprůtokový imunochromatografický test pro rychlou kvantitativní detekci ochratoxinu A a zearalenonu v kukuřici, pšenici a vzorcích krmiva	41
5.4.14	Stanovení ochratoxinu A v cereáliích imunoultrafiltrací a HPLC ve spojení s fluorescenční detekcí po postkolonové derivatizaci v elektrochemickém článku.....	42
5.4.15	Simultánní stanovení stopového množství aflatoxinu B1 a ochratoxinu A pomocí mikročipové kapilární elektroforézy na bázi aptameru ve vzorcích potravin	42
5.4.16	Stanovení ochratoxinu A časově rozdělenou fluorescenční imunoanalýzou založenou na polyklonálních protilátkách	43
5.4.17	Vývoj metody využívající nový biosenzor k detekci ochratoxinu A v červeném víně	44
5.4.18	Detekce ochratoxinu A v jablkách kontaminovaných <i>Aspergillus ochraceus</i> metodou využívající mikrofluidní kompetitivní imunosenzor a magnetické nanočástice .	44
5.4.19	Metoda stanovení ochratoxinu A využívající molekulární signalizátory a real-time PCR	45
5.4.20	Stanovení ochratoxinu A a ochratoxinu B v archivních Tokajských vínech využívající on-line SPE v kombinaci s HPLC-FD	45
6.	Závěr	47
7.	Seznam obrázků	49
8.	Seznam tabulek	49
9.	Použitá literatura	50

1. POUŽITÉ ZKRATKY

BEN	Balkánská endemická nefropatie
CEC	Kapilární elektrochromatografie
CGE	Kapilární gelová elektroforéza
CIEF	Kapilární izoelektrická fokusace
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
DICGA	Kompetitivní imunochromatografický test s dvěma průtoky
EIA	Enzyoimunoanalýza
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FD	Fluorescenční detekce
FPIA	Fluorescenční polarizační imunoanalýza
GC	Plynová chromatografie
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
HPTLC	Vysokoučinná tenkovrstvá chromatografie
LAMP	Smyčkou zprostředkovaná izotermální amplifikace
LC	Kapalinová chromatografie
LLE	Extrakce z kapaliny do kapaliny
MCE-LIF	Kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescenční detekcí
MECC	Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
MF	Mobilní fáze
MS	Hmotnostní spektrometrie
QDs-ICA	Fluorescenční chromatografická imunoanalýza využívající kvantových teček
QCM-D	Křemenné mikrováhy s měřením disipace

SBME	Sorpční extrakce na míchací tyčince
SF	Stacionární fáze
SPE	Extrakce na tuhou fázi
SWV	Voltametrie čtvercových vln
TLC	Tenkvrstvá chromatografie
TRFIA	Časově rozdělená fluorescenční imunoanalýza
UPLC	Ultraúčinná kapalinová chromatografie

2. Úvod

Ochratoxin A je toxická látka, která se řadí mezi mykotoxiny – sekundární produkty metabolismu mikroskopických vláknitých hub. Kontaminuje potraviny a krmiva a představuje tak zdravotní riziko pro člověka a hospodářská zvířata. Nejčastěji kontaminovanými produkty jsou cereálie a cereální produkty, dále jej můžeme najít také v kávě, pivu, vínu, luštěninách, koření, zeleném čaji, sušeném ovoci a zvířecích produktech, kam se může dostat skrze trávicí trakt těchto živočichů. Mezi toxické účinky tohoto mykotoxinu se řadí zejména nefrotoxicita, dále pak imunotoxicita, mutagenita, teratogenita, karcinogenita a neurotoxicita.

Kontaminace potravin mykotoxiny představuje celosvětový problém, a i přes to, že jsou dodržovány vhodné doporučené zemědělské a technologické postupy a opatření je nemožné jí zcela zamezit. Pro ochranu zdraví spotřebitelů je proto důležité, aby byly zavedeny rychlé, dostatečně citlivé a spolehlivé metody pro stanovení a kvantifikaci těchto látek v potravinách.

Ve své práci jsem se pokusila shrnout důležité informace o ochratoxinu A, popsány jsou jeho fyzikální a chemické vlastnosti, struktura, biosyntéza, mechanismus působení, toxicita, dále také zdravotní rizika, která jsou spojená s konzumací potravin, které kontaminoval a zejména analytické metody a možnosti detekce, které se jeví jako vhodné k jeho stanovení.

3. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Zadáním a cílem této bakalářské práce bylo vyhledat a přehledně uspořádat informace o mykotoxinech, konkrétně o ochratoxinu A, a popsat některé vybrané metody a možnosti, pomocí kterých je možné tento mykotoxin stanovit.

4. TEORETICKÁ ČÁST

4.1 Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou nízkomolekulární látky nebílkovinné povahy, které vznikají jako sekundární produkty metabolismu některých druhů mikroskopických vláknitých hub neboli plísní. V současné době je potvrzena existence více než čtyř set druhů mykotoxinů a neustále jsou objevovány a chemicky charakterizovány další nové druhy. Nejznámější mykotoxiny jsou produkovány rody *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium* (1, 2).

Různé kmeny stejného druhu mohou produkovat více než jeden typ mykotoxinu. Typickým příkladem je druh *Aspergillus flavus*: většina jeho toxinogenních kmenů produkuje aflatoxiny, ale některé kmeny jsou schopny produkovat i jiné typy toxinů jako je např. aflatrém nebo kyselina α -cyklopiazónová. Všechny kmeny toxinogenního druhu ovšem nemusí být producenty mykotoxinů (2).

Zatímco všechny mykotoxiny jsou produkty metabolismu hub, ne všechny toxické látky, které houby produkují, nazýváme mykotoxiny. Důležitou roli v tomto rozdělení hraje koncentrace metabolitu a také oblast, na kterou cílí svůj toxický účinek. Mykotoxiny obecně působí toxicky na člověka a zvířata již v nízkých koncentracích. Ostatní nízkomolekulární látky produkované houbami, jako je např. ethanol, které mají toxický účinek jen ve vysokých koncentracích, nejsou považovány za mykotoxiny. Mezi mykotoxiny se neřadí ani houbové jedy, přestože jsou to produkty metabolismu hub a mohou způsobovat onemocnění nebo smrt člověka a zvířat. Hlavní rozdíl mezi mykotoxiny a houbovými jedy je ten, že mykotoxiny jsou produkovány mikroskopickými houbami a houbové jedy produkují houby makroskopické.

Díky jejich různorodé chemické struktuře, rozličné biosyntéze a mechanismu působení je velmi těžké vytvořit jednotný systém, podle kterého by bylo možné jednotlivé mykotoxiny klasifikovat. Jednou z možností kategorizace je rozdělení mykotoxinů podle jejich účinku na jednotlivé orgány. Rozlišujeme mykotoxiny hepatotoxické, nefrotoxické, neurotoxické, imunotoxické atd. Dále můžeme mykotoxiny rozdělovat z cytologického hlediska na mykotoxiny teratogenní,

mutagenní, karcinogenní nebo toxiny schopné vyvolat alergickou reakci. Organičtí chemikové je rozdělují podle jejich chemické struktury, biochemikové podle jejich biosyntézy a mykologové podle houby, kterou jsou produkovány. Nutno podotknout, že ani jeden z výše zmiňovaných způsobů klasifikace není dostačující (1).

Důvod proč vláknité houby produkují mykotoxiny nebyl doposud jednoznačně vysvětlen, během let bylo ovšem vytvořeno hned několik teorií, které se o to pokoušejí. První hypotéza tvrdí, že mykotoxiny vznikají jako odpadní produkty metabolismu. Následně byla ale vyvrácena zjištěním, že toxiny jsou houbami produkovány jen v určité, poměrně krátké fázi. Nikoliv po celou dobu růstu. Další teorie byla založena na domněnce, že organismus toxiny využívá k potlačení růstu nebo k usmrcení konkurenčních druhů, což podporoval fakt, že některé houby vylučováním fyto toxinů usmrcují rostlinné buňky a využívají mrtvá rostlinná pletiva, která enzymaticky natráví. Poslední, třetí teorie tvrdí, že toxiny regulují vlastní metabolické děje a mají vliv na morfogenezi a diferenciaci.

Dosud neexistuje všeobecně uznávaná teorie, která by vysvětlovala význam produkce mykotoxinů houbami. Mají totiž tak moc různorodou chemickou strukturu a rozmanitý mechanismus účinku na buňku, že je obtížné dávat je do souvislosti s jedním posláním (3).

4.1.1 Mykotoxiny v potravinách

Mykotoxiny ohrožují zdraví člověka prostřednictvím potravin, které kontaminují. Jejich působením dochází k rozkladu potravin a snižování jejich biologické hodnoty.

Kontaminace potravin mykotoxiny představuje celosvětový problém. Dochází k ní přirozeně, není možné ji předvídat, odstranit nebo jí zamezit, a to i v případě dodržování vhodných doporučených zemědělských a technologických postupů, které by měly vést ke snížení výskytu toxinogenních hub a produkce mykotoxinů během vegetativního růstu plodin, sklizně a skladování. Je také obtížné je odstranit během přípravy pokrmů, protože jsou velmi tepelně a chemicky odolné. Další nebezpečí představuje možnost kontaminace živočišných produktů rezidui mykotoxinů v důsledku přívodu kontaminovaného krmiva do organismu hospodářských zvířat. Tímto způsobem se mykotoxiny mohou rozšířit do potravního řetězce.

Potraviny jsou pro vláknité mikroskopické houby vhodným živným substrátem. Po jejich kontaminaci spórami mikromycetů dochází k nárůstu mycelia a k aktivaci enzymatického aparátu. Posléze dochází ke kažení a rozkladu potravin (4, 5).

Růst hub a produkce toxinů může probíhat na plodinách ještě na poli, během jejich uskladnění, nebo v obou případech. Produkci mykotoxinů v těchto komoditách můžeme zabránit prevencí růstu jejich producentů. Prevence nebo inhibice růstu toxinogenních hub během uskladnění je většinou zajištěna úpravou vnitřních prostor. Hlídá se vlhkost, teplota a plynná atmosféra. Hladina vlhkosti se řeší sušením plodin ještě před uskladněním. Použitím hermeticky uzavíratelných kontejnerů s vysokou hladinou oxidu uhličitého a nízkou hladinou kyslíku můžeme regulovat plynnou atmosféru. Existuje i možnost použití chemické inhibice růstu hub. Nejčastěji jsou využívány organické kyseliny, zejména kyselina propionová, samotná nebo v kombinaci s kyselinou mravenčí (2, 5).

Většina studií zabývajících se osudem mykotoxinů se soustředí na degradaci koncentrace parentních mykotoxinů v nezpracované plodině a finálním produktu. Tento přístup je vhodné použít při procesech zpracování potravin, při kterých dochází k redistribuci koncentrace mykotoxinu mezi dvě frakce (např. prosévání). V případě, že při zpracování potravin používáme tepelnou energii (např. během pečení nebo pražení), musíme počítat s faktem, že během procesu může dojít k reakci mykotoxinu s jinými chemickými látkami, enzymy nebo komponentami matrice. Mohou poté vznikat degradační produkty, které mají odlišné toxikokinetické a toxikodynamické vlastnosti než parentní mykotoxin. Detailní znalosti o chování a osudu mykotoxinů v potravinách a také během jejich zpracování jsou nezbytné pro posouzení zdravotní nezávadnosti potravin.

Zpracování potravin je důležitým nástrojem pro snížení koncentrace mykotoxinu. Přestože existuje mnoho studií zabývajících se degradací koncentrace mykotoxinů během zpracování potravin, informací o degradačních produktech, které vznikají, máme jen velmi málo. Zpracování potravin může vést ke vzniku kovalentních aduktů mezi parentním mykotoxinem a komponentami matrice, jako jsou např. proteiny nebo škrob. Tento jev byl pozorován u ochratoxinu A při pražení kávy a je na něj podezření u fumonisinů během růstu kukuřičných produktů. Strukturní modifikace

parentního mykotoxinu během zpracování potravin zahrnují izomerizaci, dekarboxylaci, přeskupení a reakce s jinými malými molekulami (6).

4.1.2 Bezpečnost a kontrola mykotoxinů v potravinách

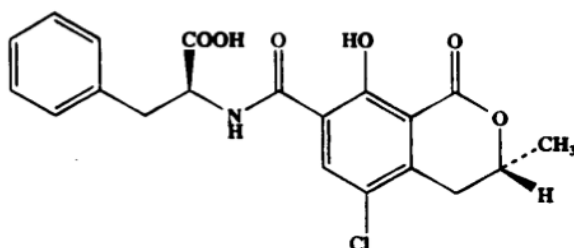
Tvorba hygienických limitů a regulace mykotoxinů ve snaze ochránit konzumenty před zdravotními problémy, které těmito látkami mohou být způsobeny, byla iniciována v 60. letech minulého století spolu s objevem a detailním popisem aflatoxinů. Rozšiřující se informace o nebezpečnosti mykotoxinů vedly v mnoha zemích ke stanovení prvních limitů, často navíc stanovovaných ad hoc. Cílem EU v této oblasti je harmonizovat legislativu. Vedle „evropských“ norem existují normy národní, které vznikly na základě různých faktorů (aktuální toxikologická data, znalosti o výskytu jednotlivých mykotoxinů v různých komoditách, vědecké poznání, úroveň analytických metod), které jsou specifické pro každou zemi. Velikost rizika spojená s konzumací mykotoxinů a s ní spojené maximální přípustné limity jsou stanovovány podle výsledků nejnovějších studií a toxikologických dat. Příkladem může být identifikace toxické sloučeniny, metabolických procesů, které provázejí konzumaci, a také z akutní a chronické toxicity. Všechny tyto informace je potřeba dát do souvislosti s různými skupinami konzumentů-spotřebitelů. Proto je speciální pozornost věnována dětské výživě. Vývoj analytických metod a jejich validace je také velmi důležitá. Je potřeba, aby byly reprodukovatelné a osvojitelné v síti laboratoří napříč zeměmi.

Vzhledem k nebezpečnosti a problematické likvidovatelnosti mykotoxinů je nezbytné monitorovat jejich množství v různých zemědělských produktech. Před vstupem ČR do Evropské unie byly některé limity pro mykotoxiny deklarovány ve vyhlášce 298/1997 Sb (7). Testováním mykotoxinů a jejich přítomností v biologickém materiálu se zabývá Národní referenční laboratoř pro mykotoxiny, která působí pod Státním zdravotním ústavem. Řídí se zákony Evropské unie při Evropském úřadu pro bezpečnost potravin nařízením komise č.1881/2006, č. 1126/2007, č. 105/2010, č. 165/2010, č. 219/2014, která aktualizuje limity pro mykotoxiny s rostoucí přesností analytických metod. Státní zemědělská a potravinářská inspekce dohlíží na dodržování limitních hodnot (8). Na studium toxinogenních vláknitých mikroskopických hub je zaměřeno Národní referenční

centrum pro mikroskopické houby a jejich mykotoxiny v potravinových řetězcích. Zavádí a validuje příslušné analytické metody a v neposlední řadě posuzuje nové hygienické limity pro mykotoxiny v potravinách (9).

4.2 Ochratoxin A

Ochratoxiny jsou skupinou toxických sekundárních metabolitů vláknitých mikroskopických hub z rodu *Aspergillus* a *Penicillium*. Ochratoxin A je nejvíce dominantním a nejstudovanějším zástupcem této skupiny a vyznačuje se nejvyšší toxicitou. V globálním měřítku kontaminuje zemědělské plodiny a následně také potraviny a nápoje a díky tomu způsobuje mnohé zdravotní potíže člověku i zvířatům. Bylo prokázáno, že působí nefrotoxicky a je spojován se smrtelným onemocněním ledvin, Balkánskou endemickou nefropatií (BEN) (10). Poprvé ho izolovali van de Merve at al., kteří extrahovali ochratoxiny A a B a jejich methyl- a ethylestery z plesnivého kukuřičného šrotu směsí chloroform-methanol (2, 3).



Obrázek 1: Strukturální vzorec ochratoxinu A

4.2.1 Struktura a fyzikální vlastnosti

Struktura ochratoxinu A byla poprvé objasněna v roce 1965: jedná se o derivát dihydroisokumarinu, který je spojený pomocí peptidové vazby s aminokyselinou L-β-fenylalaninem (viz Obrázek 1). Vedle ochratoxinu A existují ještě např. ochratoxin B (analog ochratoxinu A, kterému chybí atom chlóru), ochratoxin C (ochratoxin A ethylester), ochratoxin D (4-hydroxyochratoxin), 10-hydroxyochratoxin a ochratoxin α (3, 4).

Sumární vzorec ochratoxinu A je $C_{20}H_{18}ClNO_6$. Jedná se o slabou organickou kyselinu s hodnotou pK_a 7,1 a molekulovou hmotností 403,8 g/mol. Je to bezbarvá až bílá krystalická látka bez zápachu, která krystalizuje z benzenu jako solvát s teplotou tání 90 °C. Rekrystalizací z xylenu jeho teplota tání stoupne na 171 °C. Při neutrálním

a kyselém pH je dobře rozpustný v polárních rozpouštědlech (alkoholy, ketony, chloroform) a málo rozpustný ve vodě. V zásaditém prostředí se rozpouští ve vodném uhličitanu sodném a zásaditých rozpouštědlech. Je to také opticky aktivní látka, která pod UV zářením v kyselém médiu vykazuje zelenou fluorescenci a v zásaditých podmínkách vykazuje fluorescenci modrou (2, 11, 12, 13).

Jedná se o chemicky velmi stabilní sloučeninu. Je odolný vůči vysokým teplotám a kyselému prostředí. Proto je velmi těžké jej kompletně odstranit z potravin a nápojů, které kontaminoval (12).

4.2.2 Producenti

Hlavními producenty ochratoxinu A jsou rody *Aspergillus* a *Penicillium*. Frekvence výskytu různých druhů hub, které jsou schopny produkovat ochratoxin A, se liší podle zeměpisné oblasti a komodit, které kontaminují.

Rod *Penicillium* je zodpovědný za produkci ochratoxinu A především v chladnějších oblastech jako je Kanada, východní a severozápadní Evropa a některé části jižní Afriky. Nejznámějším zástupcem spojovaným s produkcí ochratoxinu A je *P. verrucosum*. Jako další lze uvést *P. commune*, *P. palitans*, *P. variabile*, *P. expansum* nebo *P. verruculosum*. Mikromycety z tohoto rodu jsou schopny produkovat ochratoxin A již od teploty 4 °C do teploty 30 °C při 22 % relativní vlhkosti.

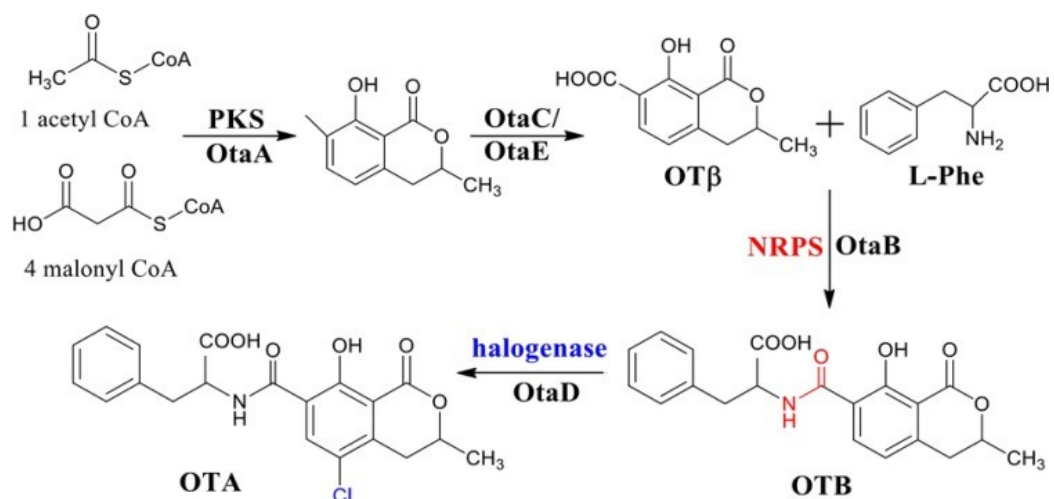
V subtropických a tropických oblastech je ochratoxin A produkován vláknitými houbami z rodu *Aspergillus*. Optimální teplota pro jeho produkci plísní *A. ochraceus* se pohybuje okolo 28 °C, i když může být tímto druhem produkován v teplotním rozsahu 15-37 °C. Mezi další plísně z rodu *Aspergillus*, které produkují ochratoxin A, řadíme *A. alliaceus*, *A. melleus*, *A. niger*, *A. glaucus* a *A. elegans* (4, 14).

4.2.3 Biosyntéza

Ochratoxin A je hybridní molekula, která vzniká spojením pentaketidu dihydroisokumarinu s aminokyselinou L- β -fenylalaninem.

Prvním krokem biosyntézy je zformování isokumarinu z acetyl-CoA a malonyl-CoA, a to za působení enzymu polyketid-syntázy. Následně dojde k oxidaci

této molekuly na ochratoxin β . Působení neribozomální peptidové syntetázy poté katalyzuje vznik peptidové vazby mezi ochratoxinem β a L- β -fenylalaninem a vzniká tak další meziprodukt, ochratoxin B. Posledním krokem je halogenace, při které dojde k připojení atomu chlóru. Obrázek 2 popisuje průběh biosyntézy (15).



Obrázek 2: Reakce biosyntézy ochratoxinu A (15)

4.2.4 Mechanismus působení a rozklad

Po vstřebání v trávicím ústrojí dojde k navázání ochratoxinu A na sérový albumin a distribuci do jater, ledvin a tukové tkáně.

Ochratoxin A zasahuje do všech tří hlavních oblastí primárního metabolismu a také do transportních elektronových systémů mitochondrií.

V metabolismu sacharidů způsobuje pokles glukoneogeneze v tubulárních buňkách tím, že inhibuje enzym fosfoenolpyruvát karboxykinázu, který zajišťuje přeměnu fosfoenolpyruvátu na pyruvát.

Inhibuje syntézu proteinů v organismu tím, že zasahuje do tvorby aminokyseliny fenylalaninu. Způsobuje kompetitivní inhibici fenylalaninhydroxylázy a dalších enzymů, které jsou potřebné ke vzniku fenylalaninu. Zároveň způsobuje nekompetitivní inhibici fenylalanyl-tRNA syntetázy.

Jedním z dominantních mechanismů působení ochratoxinu A je to, že způsobuje zablokování respirace v mitochondriích. Tento děj vede k modifikaci intracelulárního vápníku. Mitochondriální výdej vápníku je snížen, zatímco intracytosolické množství je

zvýšeno. Díky inhibici respirace dojde k redukci množství ATP v tubulárních buňkách, což dále vede k poškození ledvin.

Další oblastí působení ochratoxinu A je látková výměna lipidů. Dochází k jejich peroxidaci a stimulaci tvorby malondialdehydu. Po peroxidaci dojde k uvolnění reaktivních metabolitů kyslíku, které jsou agresivní vůči DNA a způsobují ruptury podjednotek z jednoduchých provazců.

Vztahy mezi těmito procesy nejsou ještě zcela vysvětleny. Je však zjištěno, že důležitou roli hraje snížení hladiny buněčného glutathionu a zvýšení tvorby 8-oxoguaninu. Je také prokázáno, že toxické působení ochratoxinu A způsobuje snížení hodnoty α -tokoferolu v plasmě a několikanásobné zvýšení hemoxygenázy-1, což je enzym regulující oxidační stres, a to především v ledvinách.

Ochratoxin A je metabolizován na R- a S-izomery nebo na 4- a 10-hydroxyochratoxin, a to především v játrech. Reakce jsou katalyzovány cytochromem P450. Jeho oxidativní biotransformace probíhá jen v malém množství a pravděpodobně nevede ke vzniku reaktivních metabolitů schopných navázat se na DNA.

Z proximálního tubulu je transportován systémem renálních organických aniontů, a to jak skrze membránu kartáčového lemu buňky, tak bazolaterální membránu. Renální a tubulární reabsorpce a sekrece hrají důležitou roli v modulaci nefrotoxicity toxinu a mohou usnadňovat reziduální perzistenci ochratoxinu A v ledvinách. Zároveň ale přispívají k odstranění mykotoxinu z organismu (3).

4.2.5 Toxikologické hodnocení

Mezi hlavní toxické účinky ochratoxinu A řadíme nefrotoxicitu, imunotoxicitu, mutagenitu, karcinogenitu, teratogenitu a neurotoxicitu.

Akutní i chronická toxicita tohoto mykotoxinu je v zásadě odvozena od jeho schopnosti inhibovat proteosyntézu na základě kompetice s fenylalaninem v reakcích, které jsou katalyzované enzymem fenylalanyl-tRNA syntetázou (4).

4.2.5.1 Akutní toxicita

Hodnota LD₅₀ je velmi variabilní. Je závislá na živočišném druhu, pohlaví a způsobu podání a kolísá od 0,2 mg/kg tělesné hmotnosti u psa (pohlaví nespecifikováno) do 30,3 mg/kg tělesné hmotnosti u samice potkana (samice jsou citlivější na perorální podání). Vyšší toxicitu zaznamenáváme u intraperitoneálního podání ochratoxinu A (4).

Nefrotoxicita

Cílovým orgánem účinku tohoto mykotoxinu jsou ledviny. Je potenciálně nefrotoxickeý pro všechny druhy, které byly vybrány pro modelové testování, výjimkou byli jen dospělí přežvýkavci. Bylo prokázáno, že hraje významnou roli v etiologii nefropatie prasat. Toto onemocnění se podařilo experimentálně vyvolat u prasete podáváním stravy kontaminované ochratoxinem A (v koncentracích 4000, 1000 a 200 mg/kg). Choroba se projevuje až trojnásobným zvětšením ledvin, fibrotickými změnami a atrofií kůry ledvin a poškozením proximálních tubulů. Modelově se akutním a chronickým podáváním ochratoxinu A podařilo nefropatii navodit také u potkanů a kuřat.

Bylo provedeno mnoho experimentálních prací zabývajících se nefrotoxicitou ochratoxinu A *in vitro* a také *in vivo*, ze kterých vyplývá, že způsobuje narušení intracelulárních metabolických procesů s následnou apoptózou renálních buněk, renální hemodynamiky a také významně narušuje funkce proximálního tubulu (a to i v subchronických dávkách), dále vede ke snížení glomerulární filtrace a tubulární resorpce a ovlivňuje všechny části nefronu a ledviny *in toto* (4).

4.2.5.2 Pozdní toxické účinky

Mutagenita

V SOS chromotestu za použití indikátorového kmene *Escherichia coli* PQ37 indukoval ochratoxin A SOS reparaci DNA. K reparaci došlo v nepřítomnosti exogenního metabolického systému, kdežto působení metabolické aktivace mutagenitu snižovalo. Výsledky tohoto testu potvrdily, že ochratoxin A je přímým mutagenem a je částečně detoxikován působením metabolické přeměny. Genotoxické účinky tohoto mykotoxinu jsou s největší pravděpodobností zprostředkovány přítomností atomu chlóru v jeho

molekule (ochratoxin B, který chlór neobsahuje má pouze cytotoxické účinky). Mutagenitu, která nebyla detekována v klasickém Amesově testu, se podařilo prokázat i u bakteriálních indikátorových kmenů *Salmonella typhimurium* v modifikovaném experimentu, kdy ochratoxin A po metabolické aktivaci pomocí primárních hepatocytů potkana vykazoval jednoznačnou mutagenní odpověď u kmenů TA1535, TA1538 a TA100. Mutagenitu přímo na úrovni DNA potvrdila indukce jednořetězcových zlomů. Při cytogenetickém vyšetření působení ochratoxinu A *in vitro* byla pozorována zvýšená výměna sesterských chromatid v lidských periferních lymfocytech. Bylo také opakovaně prokázáno, že ochratoxin A je schopen vázat se kovalentní vazbou na DNA a vytvářet tak adukty. Jejich vznik naznačuje, že je expozice ochratoxinu A velmi pravděpodobná v iniciaci karcinogeneze (4).

Karcinogenita

Důkazy o karcinogenních účincích ochratoxinu A nejsou zatím dostatečné, i když je výskyt nádorů v populaci s vysokou expozicí či u pacientů s BEN karcinogenitou ochratoxinu A naznačil. Také jeho mutagenní účinky tuto možnost podporují vzhledem k prokázané souvislosti mutagenní aktivity s iniciací nádorového procesu. Výsledky experimentů provedených na myších a potkanech podávají vcelku přesvědčivé údaje o karcinogenitě ochratoxinu A, z toho důvodu je mykotoxin zařazen do kategorie 2B, tj. mezi látky s možným karcinogenním působením (4, 10).

Teratogenita

Během experimentálních testů na zvířatech byla prokázána schopnost ochratoxinu A indukovat embryotoxicitu a hrubé strukturální malformace. Účinek závisel na stáří embrya a na podané dávce. K pozorovatelným změnám došlo konkrétně např. u křečků již po jedné intraperitoneální aplikaci ochratoxinu A v dávce 2,5-20 mg/kg tělesné hmotnosti mezi 7.-10. dnem březosti samice. 8. a 9. den byly vzhledem k malformacím nejkritičtější. Mortalita fetu byla významně zvýšena 7., 8., a 9. den v souvislosti s podáním nejvyšší dávky (20 mg/kg tělesné hmotnosti). Mechanismus teratogenního působení ochratoxinu A nebyl doposud jednoznačně vysvětlen, ale předpokladem je, že působí přímo na embryonální vývoj.

Dále bylo prokázáno, že po podání ochratoxinu A březí samici potkana prochází placentou a kumuluje se ve tkáních fetu. U člověka to s největší pravděpodobností probíhá stejně. Ochratoxin A i přes svou molekulovou hmotnost prochází transplacentární bariérou (4).

Imunosupresivní účinky

V in vitro podmínkách má ochratoxin A schopnost inhibovat proliferaci periferních T a B lymfocytů, potlačit tvorbu interferonu a narušit tvorbu interleukinu 2. Při testech na experimentálních zvířatech u nich tento mykotoxin vyvolal lymfopenii, regresi thymu a potlačil imunitní odpověď. Imunitní systém prasat je citlivý na dávky ochratoxinu A nižší než 1 mg/kg tělesné hmotnosti v podmínkách běžného standardního chovu. Dávky v množství 2,5 mg/kg krmiva poté u těchto zvířat snižují fagocytární aktivitu makrofágů a tvorbu interleukinu 2.

Tato poškození imunitního systému podporují hypotézu o souvislosti expozice ochratoxinu A s karcinogenními účinky. Údaje o imunotoxických účincích mykotoxinu v lidském organismu nejsou dosud k dispozici, i když je možné je předpokládat (4).

4.2.6 Výskyt v potravinách a nápojích

Ochratoxin A, stejně jako ostatní ochratoxiny, kontaminuje širokou škálu komodit jak rostlinného, tak živočišného původu. Ke kontaminaci může dojít na poli během zrání plodiny, během sklizně, skladování nebo při přepravě, a to v případě, že jsou poskytnuty příznivé podmínky pro růst mykotoxinu, zvláště pokud nedošlo ke kompletnímu vysušení plodiny. Mykotoxin může být přítomen v potravině i v případě, že plíseň není viditelná (14).

Ochratoxin A detekujeme hlavně v cereáliích a cereálních produktech. Na základě výsledků hodnocení, provedených Evropskou komisí bylo zjištěno, že tato skupina komodit je nejčastějším zdrojem expozice ochratoxinu A, což představuje 50 % celkové dietární expozice ochratoxinu A v evropských zemích. (14) Dále jej můžeme najít také v kávě, pivu, víně, luštěninách, koření, zeleném čaji, vepřovém mase, krvi a vnitřnostech (ledviny, játra a výrobky z krve). Obecně se jedná o maso nepřežvýkavých zvířat, která byla vystavena působení ochratoxinu A skrze kontaminované krmivo. Přežvýkavci, jako jsou krávy nebo ovce, jsou rezistentní vůči

efektu ochratoxinu A, a to z důvodu, že dochází k jeho hydrolyze na netoxické metabolity symbiotickými prvky v jejich žaludku. Mezi další zdroje patří i sušené ovoce, jako např. rozinky nebo fíky (4, 14).

V roce 2000 Majerus aj. analyzovali 281 vzorků vín (rosé a červené) z celkem 22 zemí světa. Ukázalo se, že 40 % bylo kontaminováno. Přítomnost ochratoxinu A byla ve vínech sledována v závislosti na proliferaci vláknitých mikromycetů *Aspergillus* a *Penicillium* v Německu, Švýcarsku, Španělsku, Japonsku, Itálii a Francii. Skupina kolem Viscontiho v roce 1999 odstartovala studii 15 evropských laboratoří s cílem validace metody pro stanovení ochratoxinu A ve vínech. Bylo testováno 38 vzorků červených vín, 9 vzorků bílých vín a 8 vzorků rosé. Ve většině vzorků byl detekován ochratoxin A v rozsahu 0,01-7,6 µg/l, z toho nejvýznamnější kontaminace byly zjištěny u červených vín. 15,8 % červených vín bylo kontaminováno v rozsahu buď 1,01-2,00 µg/l a nebo > 2,00 µg/l, u 63,2 % červených vín byla zjištěna kontaminace v rozsahu 0,21-0,1 µg/l. Obsah ochratoxinu A v červených, bílých a rosé vínech pocházejících z významných vinařských oblastí byl sledován i ve Francii. V závislosti na oblasti se koncentrace mykotoxinu pohybovaly v rozsahu < 0,01 - > 1,0 µg/l.

Stanovené hodnoty ochratoxinu A v potravinách obvykle dosahovaly koncentrací od setiny jednotky µg/kg (µg/l) až tisíce µg/kg. V roce 1995 stanovila Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants (JECFA) provizorní tolerovaný týdenní přívod 100 µg/kg tělesné hmotnosti a v roce 1998 Scientific Committee of European Commission (EU SCF) stanovila provizorní tolerovaný denní příjem pro ochratoxinu A 5 ng/kg tělesné hmotnosti (4).

5. ANALYTICKÁ ČÁST

5.1 Analýza mykotoxinů

Analytické metody využívané pro detekci mykotoxinů v potravinách se stále zlepšují a vyvíjejí. V současti je důraz kladen na to, aby analýza byla jednoduchá a rychlá, ale zároveň aby poskytovala spolehlivá a přesná data. Neustále je usilováno o zvýšení citlivosti, selektivity, přesnosti a také robustnosti analytických metod. Dále také o vyšší stupeň automatizace, o méně nákladné a multi-reziduální metody, při kterých by bylo možné analyzovat více analytů najednou (16, 17).

V důsledku rozdílných chemických a fyzikálních vlastností jednotlivých mykotoxinů jsou potřeba specifické postupy extrakce, přečišťování a analýzy. Většina používaných metod cílí na detekci jednoho konkrétního mykotoxinu, případně skupiny mykotoxinů podobných vlastností. V současné době jsou k analýze mykotoxinů nejvíce využívány metody chromatografické a imunochemické. Z chromatografických metod se jedná zejména o plynovou chromatografii (GC) a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) ve spojení s hmotnostní nebo fluorescenční detekcí. Z imunochemických metod se pak jedná zejména o ELISA testy, které jsou využívány hlavně pro rychlý screening. Začaly se také objevovat techniky využívající biosenzory (18).

5.2 Příprava vzorku pro analýzu

Analytické stanovení mykotoxinů je složeno z několika kroků, které na sebe navzájem navazují a mají rozhodující vliv na výsledek analýzy.

Existuje několik málo analytických metod, které jsou schopné detekovat mykotoxin přímo z odebraného materiálu bez nutnosti předchozí úpravy vzorku, příkladem mohou být optické metody založené na infračervené spektroskopii (18). Na druhou stranu většina chromatografických metod preanalytickou úpravu vzorku vyžaduje. Stejně tak některé imunologické metody a také určité metody využívající biosenzory. Úprava vzorku sice prodlužuje celkovou dobu analýzy, ale zvyšuje citlivost

a robustnost použité metody, a navíc také umožňuje zakoncentrování stopových množství mykotoxinů z původní potravní matrice (16).

5.2.1 Odběr vzorku

Odběr vzorku hraje klíčovou roli při identifikaci a stanovení mykotoxinu v biologickém materiálu. Odběry je potřeba provádět z šarží o značené hmotnosti nebo počtu jednotek, protože mykotoxiny jsou v mnoha případech ve vzorcích nehomogenně distribuovány. Homogenní distribuci můžeme očekávat u výrobků vyrobených z primárně kontaminovaných surovin s tím, že během jejich zpracování proběhla homogenizace a současně i devitalizace flóry. V ostatních případech je odběr vzorku velmi komplikovanou záležitostí, která rozhodujícím způsobem ovlivňuje výsledek analýzy. Je velmi důležité dbát na objektivní odběr vzorku dle příslušné legislativy a dostatečně zpracované vzorky zhomogenizovat (4, 18).

Vzorky v pevné stavu se dezintegrují ve vhodně zvoleném zařízení (např. tříštitivý mlýnek nebo laboratorní mixér). Dezintegrace a homogenizace vzorků zvířecí nebo lidské tkáně se provádí ve speciálním zařízení za použití tantalových či wolframových kuliček poté, co byly vzorky zmrazeny tekutým dusíkem.

V ČR platí vyhláška MZe ČR č. 339/2001 Sb. o metodách zkoušení a způsobu odběru a přípravy kontrolních vzorků za účelem zjišťování jakosti a zdravotní nezávadnosti potravin nebo surovin určených k jejich výrobě a také vyhláška MZ ČR č. 107/2001 Sb. o hygienických požadavcích na stravovací služby a o zásadách osobní a provozní hygieny při činnostech epidemiologicky závažných. V zemích Evropské Unie platí směrnice EK 98/53/EC odběr vzorků pro analýzu aflatoxinů, směrnice EK 2002/26/EC odběr vzorků pro analýzu ochratoxinu A (4).

5.2.2 Extrakce

Extrakce se provádí do organického rozpouštědla. Ideálně na laboratorní třepačce v Erlenmayerově baňce se zábrusem, která je uzavřená zátkou ze skla zajištěnou tak, aby se neuvolnila, nebo v homogenizátoru. Při výběru rozpouštědla je potřeba brát v potaz povahu příslušného mykotoxinu a jeho rozpustnost, dále také materiál, ze kterého je mykotoxin extrahován a následnou manipulaci

s extraktem. Extrakce mykotoxinů se provádí za laboratorní teploty a neutrálního či kyselého pH.

Nejčastěji se při extrakci mykotoxinů používá methanol, chloroform, acetonitril, aceton, octan ethylnatý, případně jejich vodné roztoky. V případě použití 50-80 % vodného roztoku methanolu je možné přidat do vodné fáze NaCl a tím podstatně zvýšit účinnost extrakce. Mykotoxiny kyselé povahy (např. ochratoxin A, citrinin, zearalenon) se extrahují do organických rozpouštědel z kyselého prostředí. Pro okyselení vzorku se používá kyselina fosforečná nebo chlorovodíková.

Po extrakci se získaná suspenze přefiltruje přes filtr (papírový nebo se skleněnými vlákny), případně se odstředí. V případě zvláště komplikovaných matric je někdy potřeba vzorek nejprve odstředit, a následně ještě přefiltrovat (4).

5.2.3 Přečištění extraktu

Ze všech kroků analytického stanovení mykotoxinů patří přečištění extraktu mezi časově nejnáročnější a nejpracnější.

5.2.3.1 Extrakce z kapaliny do kapaliny (Liquid-liquid extraction – LLE)

Jedná se o separační metodu, jejímž principem je přenos analytu z jedné kapalné fáze do druhé kapalné fáze. Tyto kapaliny nesmí být vzájemně mísitelné. Principem je převod stanovované složky z roztoku, který analyzujeme (obvykle polární vodná fáze) do druhé fáze, která je nepolární (organické rozpouštědlo). V nepolární fázi je pak možné izolovanou složku přímo stanovit např. spektrofotometricky (extrakčně spektrofotometrické stanovení). Do organického rozpouštědla mohou přitom přejít pouze elektroneutrální částice. Extrakčně spektrofotometrické stanovení, při kterém dojde k extrakci a zároveň zakoncentrování vzorku, je výhodné pro svou jednoduchost, zvýšenou citlivost a selektivitu (19).

Nejjednodušší způsob extrakce je vytřepávání v dělicí nálevce. Je možné zvýšit efektivitu zvětšením objemu organického rozpouštědla nebo opakovanými extrakcemi menšími objemy organického rozpouštědla (19). Cílem je získat co nejvíce dané složky v co nejméně krocích a spotřebovat co nejmenší množství rozpouštědla. Volíme

tedy to, o kterém víme, že v něm bude stanovovaný analyt mnohem více rozpustný než v rozpouštědle, ze kterého se ho extrahujeme (20).

Tato metoda byla používána při čištění extraktů některých mykotoxinů (aflatoxinů, kys. cyklopiazonové, ochratoxinu A) hlavně v 70. – 80. letech minulého století (4).

5.2.3.2 Extrakce na pevnou fázi (Solid Phase Extraction – SPE)

Tato metoda extrakce využívá toho, že molekuly vzorku v důsledku svých chemických vlastností interagují se sorbentem a ulpívají na jeho povrchu. Proto je možné ji nazvat také chemická filtrace.

Mezi výhody použití SPE patří především dobrá selektivita a úspora organických rozpouštědel. Jedná se o univerzální metodu, kterou je možné automatizovat a propojit s jinými instrumentálními metodami. Je možné ji využít při čištění látek, výměně rozpouštědel, derivatizaci nebo v případě, že je potřeba zakoncentrovat stopová množství látek (20).

Kolonky SPE obsahují sorbenty z rozličných materiálů. Může se jednat o materiály nepolární na bázi modifikovaného silikagelu (např. s navázanými C18 řetězci), polymery (např. styrendivinybenzenové pryskyřice, která vykazuje až desetinásobné zvýšení kapacity sorbentu ve srovnání s předchozí skupinou), křemičitan hořečný (florisil), ale i materiály středně polární nebo polární.

Postup klasické SPE techniky: nejprve dojde k odpaření extraktu mykotoxinu na vakuové odparce. V dalším kroku je obnoven v malém množství rozpouštědla. Poté, co dojde k zasáknutí obnoveného extraktu do náplně kolonky, je chromatografický sloupec promýván doporučenými elučními soustavami, nejčastěji dvěma. První eluční směs nebo rozpouštědlo zajistí vymytí interferujících a balastních látek, nejčastěji lipidů/proteinů, a mykotoxin zůstává na zadržen na sorbentu kolonky. Druhá eluční směs slouží k vymytí mykotoxinu z lože sorbentu. Pod proudem dusíku je pak eluát odpařen do sucha a před dalším zpracováním obnoven podle požadavků následně použité analytické metody (4).

5.2.3.3 Imunoafinitní chromatografie

Další možností je čištění extraktu mykotoxinů na imunoafinitní kolonce. Výhodou této metody je její vysoká specifita, malá spotřeba organických rozpouštědel a menší časová náročnost. Používá se nejčastěji při stanovení např. aflatoxinů B, G, M1, ochratoxinu A, deoxynivalenolu, fumonisinu B1 nebo zearalenonu.

Extrakt mykotoxinu se přefiltruje a zředí ve směsi methanolu s vodou a následně se nechá pomalu prokapat imunoafinitní kolonkou. Během toho proběhne reverzní specifické spojení mykotoxinu z extraktu s protilátkami na kolonce. Poté se kolonka promyje speciálním promývacím pufrem, čímž jsou odstraněny koextrační látky a mykotoxin je eluován použitím eluční směsi (methanol, methanol-acetonitril, okyselený methanol atd.) (4).

5.2.3.4 Gelová filtrace

Při gelové filtraci jsou látky separovány na základě své molekulové hmotnosti. Během separace dochází k uplívání látek s menší molekulovou hmotností v pórech gelu, zatímco látky, které mají molekulovou hmotnost vyšší procházejí kolonou. V analýze mykotoxinů se tato metoda využívá třeba v případě, že je potřeba odstranit živočišné nebo rostlinné pigmenty či lipidické sloučeniny. Na území naší republiky se gelová filtrace používá např. při analýze mykotoxinů zearalenonu a patulinu (4).

5.3 Metody potenciálně vhodné pro stanovení ochratoxinu A

5.3.1 Optické metody

Optické metody jsou fyzikální metody, při kterých vzorek buď interaguje s elektromagnetickým zářením, nebo elektromagnetické záření vyzařuje. Metody využívané při identifikaci a stanovování mykotoxinů se řadí do skupiny spektrální absorpční optické metody, které jsou založené na výměně energie mezi látkou a zářením, konkrétně sledují pohlcování záření roztokem. Výstupem, který se hodnotí je spektrum vyjadřující závislost intenzity záření, které prošlo vzorkem, na vlnové délce (20).

5.3.1.1 Ultrafialová a viditelná spektrometrie

Ultrafialová a viditelná spektrometrie jsou metody založené na absorpci viditelného a ultrafialového záření (200-800 nm) zředěnými roztoky analytu. Během absorpce přechází valenční elektrony ze základních orbitalů na orbitály excitované. Současně dochází i ke změnám ve vibračních a rotačních stavech molekul. Tyto metody fungují na principu Lambert-Beerova zákona, podle kterého je absorbance závislá na tloušťce absorbující vrstvy a koncentraci látky, která absorbuje elektromagnetické záření.

Přístroje sloužící k měření absorpčních spekter se nazývají spektrofotometry a skládají se z několika základních součástí: zdroj elektromagnetického záření, filtr či monochromátor, kyveta obsahující vzorek, detektor a měrné zařízení. Jako zdroj viditelného světla se nejčastěji používá žárovka s wolframovým vláknem, zdrojem ultrafialového záření bývá deuteriová výbojka nebo vodíková lampa. Část záření, které prochází kyvetou, je absorbována vzorkem. Záření, které prošlo skrz vzorek, dopadá na detektor, který předá signál měrnému zařízení. Identifikace sloučenin je založena na platnosti Lambertova-Beerova zákona. Měření se provádí při vlnové délce maxima absorpčního pásu, kdy je nejméně ovlivněno nepřesně nastavenou vlnovou délkou a zároveň je nejcitlivější. Výsledkem je elektronové absorpční spektrum, které udává závislost absorbance na vlnové délce (19, 20).

5.3.1.2 Infračervená spektrometrie

Infračervená spektroskopie je metoda založená na tom, že molekuly látek absorbují infračervené záření. Toto záření má větší vlnovou délku a nižší energii než záření viditelné a ultrafialové a pokrývá elektromagnetické spektrum v rozsahu od 0,78 do 1000 μm . Energie způsobuje změny vibračních a rotačních stavů molekul, ale nestačí již na změny stavů elektronových. Místo označení vlnová délka se u této metody používá pojem vlnočty. Nejvýznamnější je pro tuto metodu oblast 4000-670 cm^{-1} .

Výsledkem analýzy infračervenou spektroskopií je pásové spektrum, na kterém je vyobrazena závislost transmitance nebo absorbance na vlnočtu záření, které látka absorbovala. Pásky ve spektru charakterizují jednotlivé vibrační přechody. Záření

ze zdroje je střídavě pouštěno přes kyvetu se vzorkem a přes srovnávací prostředí. V monochromátoru se vymezuje vlnočť záření, které je měřeno detektorem. Následně vyhodnocovací zařízení zpracuje signál z detektoru do podoby záznamu spektra. Spektrum vzorku se porovná s knihovnou spekter v paměti počítače. Podle vlnočťů se jednotlivé pásy přiřazují vibračním funkčním skupin (20).

Infračervená spektrometrie je metoda vhodná pro rychlý screening a kvantifikaci mykotoxinů v obilovinách. Její výhodou je nenáročnost provedení, rychlost a také to, že není potřeba vzorek před analýzou upravovat. Zároveň je ale limitována distribucí mykotoxinu ve vzorku, protože je možné analyzovat pouze mykotoxiny, které jsou v biologickém materiálu rozptýleny homogenně a ve vyšších koncentracích (5).

5.3.2 Fluorescenční analýza

Fluorescenční analýza metoda založená na absorpci ultrafialového záření molekulami látek a následné emisi tohoto záření. Během toho jsou elektrony excitovány ze základního stavu do stavu excitovaného. Vlivem kolizí s okolními molekulami ztrácí molekula v excitovaném stavu energii a přechází na nejnižší vibrační hladinu. Během přechodu zpět do stabilní polohy jsou elektrony v molekule schopny přebytečnou energii uvolnit v podobě sekundárního záření, které se vyznačuje nižší energií a delší vlnovou délkou než záření primární. Ve fluorescenční analýze vyhodnocujeme dvě spektra: excitační a emisní. Excitační spektrum udává závislost intenzity fluorescence na vlnové délce primárního záření, emisní spektrum popisuje závislost intenzity fluorescence na vlnové délce sekundárního záření.

Fluorescenční aktivitu vykazuje pouze omezené množství látek. Obecně lze říci, že se jedná o větší molekuly tvořící rigidní planární struktury s konjugovanými dvojnými vazbami. Některé látky je možné derivatizovat pomocí činidel za vzniku fluoreskujícího derivátu (20).

5.3.3 Hmotnostní spektrometrie (Mass spectrometry – MS)

Hmotnostní spektrometrie je citlivá a selektivní metoda, během které dochází k převedení molekul na ionty. Ty jsou následně rozlišeny na základě poměru hmotnosti a náboje m/z a jejich četnost a druh se zaznamená. Metoda podává informaci

o molekulové hmotnosti, elementárním složení a zastoupení jednotlivých izotopů. Hmotnostní spektrometr se skládá z těchto částí: iontový zdroj, dále hmotnostní analyzátor a detektor.

Vzorek v plynném stavu je přiveden do iontového zdroje, kde je bombardován proudem rychle letících částic za vzniku iontů nebo iontových fragmentů. V hmotnostním analyzátoru dojde k rozdělení iontů za vysokého vakua (10^{-4} – 10^{-8} Pa) v plynné fázi podle poměru m/z . V detektoru probíhá detekce a určení relativní intenzity jednotlivých iontů.

Výsledkem je hmotnostní spektrum, které ukazuje, jak je relativní intenzita iontového proudu závislá na podílu m/z . Relativní intenzita 100 % je přiřazena vždy nejintenzivnějšímu píku spektra a intenzity ostatních píků se dopočítají.

Existuje i možnost tandemového zapojení hmotnostních spektrometrů (MS/MS). V první reakci jsou pak generovány ionty, ze kterých je následně separován iont, který je podroben další reakci. Ionty získané během těchto reakcí jsou následně analyzovány.

Hmotnostní spektrometr se často využívá jako detektor v plynové chromatografii. V molekulovém separátoru jsou jednotlivé separované složky analyzovány poté, co byly zbaveny nosného plynu (20).

5.3.4 Chromatografické metody

Chromatografie se řadí mezi velmi rozšířené analytické separační metody. Je díky ní možné separovat, identifikovat a stanovovat jak organické, tak anorganické látky. Uplatňuje se ve většině vědeckých odvětvích včetně analýzy potravin. Separace probíhá na základě opakovaného ustalování rovnováhy mezi analyzovanými molekulami a dvěma fázemi, které jsou vzájemně nemísitelné.

Separace probíhá tak, že se analyzovaný vzorek vnáší mezi dvě fáze, které se vzájemně nemísí. Těmi jsou stacionární a mobilní fáze. Mobilní fáze (MF) je pohyblivá, kdežto fáze stacionární (SF) je nepohyblivá. Analyzovaná látka je umístěna na začátek stacionární fáze a následně je unášena pomocí mobilní fáze chromatografickou soustavou. Na základě vzájemných interakcí složek vzorku se SF dochází k zadržování těchto složek při pohybu soustavou. Více jsou zadržovány složky,

které stacionární fáze váže silnější vazbou. Tímto způsobem jsou od sebe jednotlivé složky analytu postupně separovány a na konec SF se dostávají rychleji složky, které jsou zadržovány méně (20).

5.3.4.1 Tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography – TLC)

Tenkovrstvá chromatografie se řadí mezi planární techniky kapalinové chromatografie. SF, která je nejčastěji tvořena silikagelem nebo oxidem hlinitým, je uspořádána plošně jako součást tenké vrstvy. Tou bývá podložka ze skla, polyesteru nebo hliníku. Na start v blízkosti jednoho z konců plochy se nanese vzorek. Touto stranou se podložka s tenkou vrstvou po vyschnutí rozpouštědla ponoří do mobilní fáze. Celý systém je umístěn v prostoru, který je nasycen parami mobilní fáze. Působením kapilárních sil začne MF fáze vzlínat přes start tenkou vrstvou a unáší s sebou složky analytu. Rychlost separace jednotlivých složek je závislá na síle vazby k SF a rozpustnosti v MF. Takto je analyzovaná látka separována do zón. Každá zóna obsahuje jednotlivé složky vzorku. Před tím, než MF dosáhne konce plochy se vyvíjení ukončí a označí se čelo. V případě, že separované složky netvoří barevné látky je možné je pomocí chemické reakce ve formě postřiku vhodným činidlem zviditelnit. Případně je možné je pozorovat pod ultrafialovou lampou, kdy využíváme schopnosti fluorescence (20).

Metoda tenkovrstvé chromatografie je rychlá, jednoduchá a finančně nenáročná. V analýze mykotoxinů se používá hlavně jako orientační metoda pro kvalitativní, resp. semikvantitativní screeningová stanovení (4).

5.3.4.2 Vysokoučinná tenkovrstvá chromatografie (High Performance Thin Layer Chromatography – HPTLC)

Tato metoda je moderní modifikací tenkovrstvé chromatografie. Její výhoda spočívá v miniaturizaci celého zařízení, snížení množství nanášených látek a také možnosti zpracovávat více vzorků současně. Analýza probíhá na chromatografické desce, tvořené nejčastěji silikagelovým adsorbentem naneseným spolu s pojidlem (škrob či sádra) na vhodně zvolené podložce (hliníková nebo plastová folie, sklo). Před stanovením některých mykotoxinů je potřeba impregnovat vrstvu adsorbentu komplexotvorným činidlem (kyselina šťavelová nebo EDTA), protože by mohly tvořit

komplexy s kationty obsaženými v pojivu adsorbentu a poté by nebylo možné je dobře vyhodnotit.

Pro efektivnější dělení jsou používány různé modifikace. Mezi nejjednodušší patří eluce ve více soustavách. Chromatogram je nejprve eluován soustavou nebo rozpouštědlem, které vymyje interferující látky a mykotoxin ponechá na startu. Mezi vhodná rozpouštědla pro vymytí nečistot patří benzen, n-hexan, chloroform, případně diethylether. Vhodnými vyvíjecími soustavami, které se používají při dělení mykotoxinů, mohou být např. benzen-methanol-kyselina octová, chloroform-aceton nebo toluen-ethylacetát-kyselina mravenčí. Konkrétně pro ochratoxin A se jedná o soustavu benzen-methanol-kyselina octová.

Při detekci mykotoxinu se provádí zároveň jeho kvantitativní a kvalitativní stanovení v daném vzorku. Spolu se vzorkem se na start chromatogramu nanáší také v tripletkách třibodová kalibrační stupnice standardů (4).

5.3.4.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography – HPLC)

V HPLC tvoří mobilní fázi kapalina. Chromatografický proces je založen na vzájemné interakci mezi molekulami vzorku a molekulami mobilní a stacionární fáze. Volba MF a náplň kolony, tj. kvalita sorbentu, velikost částic, tvar, porozita i struktura, mají rozhodující vliv na separaci složek vzorku. Vysoké účinnosti je dosahováno použitím kolon naplněných jemnými částicemi a vysokými průtokovými rychlostmi MF. Pro dosažení potřebné rychlosti mobilní fáze jsou potřeba vysokotlaká čerpadla, a tudíž i taková konstrukce přístroje, která bude odolávat tlakům až do 30-60 MPa.

Nejvíce je v HPLC využíváný systém reverzních fází. Stacionární fáze jsou nepolární fáze chemicky vázané na silikagelu jako nosiči. MF je naopak silně polární. Většinou je to směs vody a polárního organického rozpouštědla, např. acetonitrilu nebo methanolu. Při separaci ochratoxinu A se jako mobilní fáze nejčastěji používá směs methanol, zředěná kyselina octová a voda. Při izokratické eluci je MF vedena ze zásobníku přes odplyňovač do vysokotlakého čerpadla, případně při použití gradientové eluce je MF přiváděna ze zásobníků a mísí se podle programu

ve směšovači a teprve potom putuje do vysokotlakého čerpadla. Dále je vedena přes dávkovací zařízení do kolony, která je přímo spojena s detektorem. Detektor je spojen se zařízením, které na základě přijatého signálu dává tzv. chromatogram, který charakterizuje danou směs složek. Při identifikaci mykotoxinů se využívá retenčních časů.

Existuje také možnost spojení HPLC s hmotnostní detekcí pomocí hmotnostního spektrometru, nejčastěji se jedná o kvadrupól (4, 19, 20).

5.3.4.4 Plynová chromatografie (Gas Chromatography – GC)

V plynové chromatografii zajišťuje transport vzorku kolonou proud plynu, do kterého je vzorek dávkován. Aby vzorek mohl být unášen plynem, je potřeba, aby se rychle přeměnil na plyn, proto se tato metoda využívá při analýze plyných vzorků, popř. těkavých látek, které lze snadno převést v páry. Separace látek probíhá v soustavě plyn-pevná látka nebo plyn-kapalina. Mobilní fáze je vždy v plynném skupenství (tzv. nosný plyn) a SF je umístěna v chromatografické koloně. Jako MF se volí inertní plyn, nejčastěji vodík, dusík, helium nebo argon, který je uzavřený v tlakové lahvi. Kolony v tomto typu chromatografie rozlišujeme náplňové a kapilární. Jako náplňové kolony slouží trubice, které vyplňuje sorbent nebo nosiče pokryté kapalnou fází. Vyrábí se ze skla nebo oceli a vyznačují se vyšší kapacitou než kolony kapilární. V adsorpční chromatografii se jako náplň adsorbentů používá nejčastěji silikagel, grafitizované saze nebo oxid hlinitý. U kapilárních kolon využíváme jako nosič stacionární fáze jejich vnitřní stěnu. Nejčastěji jsou zhotoveny z taveného křemene.

Separace probíhá tak, že do proudu nosného plynu se nadávkuje vzorek, který interaguje s náplní kolony. Při separaci látek s podobnými fyzikálními vlastnostmi je možné analýzu provádět při konstantní teplotě. Pokud analyzujeme látky, které se od sebe svými fyzikálními vlastnostmi výrazně liší, je potřeba využít techniky teplotního a tlakového gradientu, který zrychluje analýzu a zároveň zvyšuje účinnost separace. Signál detektoru, který je umístěn na výstupu z kolony, je přímo úměrný okamžité koncentraci stanovovaného analytu. Velkou výhodou je, že plynový chromatograf je možné spojit s hmotnostní detekcí, kdy je pomocí GC vzorek

předseparován a následně podroben separaci a analýze v hmotnostním spektrometru (MS), což vede k jednoznačné identifikaci vzorku (GC/MS) (4, 20).

5.3.5 Elektromigrační separační metody

Tyto metody fungují na principu dvou elektrokinetických jevů – elektroforézy a elektroosmózy. Využívají toho, že mezi roztokem obsahujícím nabitě částice a povrchem, který je s roztokem v kontaktu (stěny kapiláry), se vytváří elektrické dvojvrstvy. Časem dochází k rovnoměrnému rozdělení nábojů. Na toto prostředí se připojí stejnosměrné elektrické pole, které způsobí, že dojde k porušení rovnováhy a vyvolá pohyb nábojů. Jednotlivé složky vzorku se v různých prostředích liší elektroforetickou pohyblivostí nabitých částic, což způsobuje, že migrují rozdílnou rychlostí. Tímto způsobem dojde k separaci jednotlivých složek vzorku.

V analýze mykotoxinů se využívá zejména kapilární elektroforéza. Je tvořena kapilárou, která je naplněna roztokem základního elektrolytu, který vede proud. Oba konce kapiláry jsou spolu s elektrodami, mezi které je vloženo vysoké napětí, ponořeny do roztoku elektrolytu (20). Její výhodou je, že se spotřebuje jen malý objem rozpouštědel a pufrů, což ale snižuje citlivost metody, protože lze testovat pouze malé objemy vzorků. Citlivost se dá zvýšit použitím vhodného detektoru, v případě analýzy mykotoxinů se jedná nejčastěji o detektor s laserem indukovanou fluorescencí (5).

5.3.5.1 Kapilární zónová elektroforéza (Capillary Zone Electrophoresis – CZE)

Kapilární zónová elektroforéza je metoda, při které dochází k separaci iontů ve volném roztoku. V závislosti na pH základního elektrolytu rozpuštěné látky disociují a ionty disociovaných složek jsou pak separovány na základě rozdílných poměrů náboje ku hmotnosti. Rychlost toku určuje zdánlivá pohyblivost iontů. Rychleji se pohybují menší molekuly s větším nábojem. Metoda umožňuje detekovat kationty i anionty v rámci jedné analýzy (20).

5.3.5.2 Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (Micelar Electrokinetic Capillary Chromatography - MECC)

Micelární elektrokinetická chromatografie je metoda, pomocí které je možné separovat neutrální sloučeniny. Základní elektrolyt obsahuje povrchově aktivní látky ve vysoké koncentraci. Ve chvíli, kdy dojde k překročení mezní koncentrace (tzv. kritická micelární koncentrace), začnou molekuly povrchově aktivních látek agregovat a vznikají micely. Micely jsou uspořádány tak, že hydrofilní hlavičky směřují vně a hydrofobní řetězce tvoří jádro, které může rozpouštět složky vzorku. Toto nepolární jádro vytváří tzv. pseudostacionární fázi. Během analýzy se složky vzorku rozdělí mezi pseudostacionární fázi a pufr, který slouží jako mobilní fáze. Separace probíhá na základě jejich rozdílné retence obdobně jako v HPLC (20).

5.3.5.3 Kapilární elektrochromatografie (Capillary ElectroChromatography – CEC)

Kapilární elektrochromatografie je kombinací kapilární elektroforézy a HPLC. Kapiláry plněné mikročásticemi stacionární fáze slouží jako kolony. Posun mobilní fáze zajišťuje stejnosměrné napětí a vyvolání elektroosmotického toku. Separace látek probíhá na koloně na stejných principech jako v HPLC. Touto metodou je možné separovat nabitě i neutrální látky rozličné chemické povahy (20).

5.3.6 Imunochemické metody

Enzymoimunoanalýza (EIA) je skupina imunochemických metod, které se vyznačují tím, že používají enzym ke značení antigenu, případně protilátky a tím dojde k označení imunokomplexu, který při reakci vznikl. Navázání enzymu se znázorní reakcí se substrátem, jejímž výsledkem je vznik barevného produktu, který se následně detekuje. Detekce závisí na druhu substrátu, může být fotometrická (ELISA), fluorimetrická (FEIA) nebo luminometrická (LEIA). Tyto metody jsou vhodné, pokud je potřeba kvantifikovat malá množství protilátek, antigenů, případně dalších látek (hormony, cytokiny, nádorové markery apod.) (21).

Při analýze mykotoxinů jsou nejčastěji používanou metodou ELISA testy (enzyme-linked immunosorbent assay). Principem metody je kompetitivní interakce protilátky

s mykotoxinem (antigenem). U protilátky se následně měří, jaké množství látek se na ni navázalo a to tak, že se přidá enzymem značený antigen nebo protilátka. Tato technika poskytuje rychlou a specifickou analýzu, která je relativně jednoduchá na provedení a nevyžaduje složitou instrumentaci. Na trhu je již mnoho komerčně dostupných souprav na stanovení většiny běžně analyzovaných mykotoxinů. Nevýhodou této metody je to, že se mohou vyskytnout tzv. zkřížené reakce při stanovování podobných mykotoxinů. Z toho důvodu se soupravy používají jednorázově a při detekci pouze jednoho mykotoxinu, což zvyšuje finanční náročnost této techniky. Díky ELISA metodě jsme schopni rozdělit vzorky do dvou skupin podle toho, jestli analýza potvrdila nebo nepotvrdila přítomnost mykotoxinu. Vzorky, ve kterých byl nález mykotoxinu pozitivní, jsou následně dále analyzovány použitím některé z již uvedených instrumentálních metod (5, 16).

5.4 Možnosti stanovení ochratoxinu A

5.4.1 Stanovení ochratoxinu A ve vzorcích pšenice a kukuřice metodou využívající sorpční extrakci na míchací tyčince ve spojení s kapalinovou chromatografií s fluorescenční detekcí

Pro kvantifikaci ochratoxinu A ve vzorcích pšenice a kukuřice byla vyvinuta metoda sorpční extrakce na míchací tyčince (SBME), následovaná kapalinovou chromatografií s fluorescenční detekcí (HPLC-FD).

Mletá jádra kukuřice a pšenice byla extrahována ve směsi acetonitril-voda-kyselina octová. Protože pšeničná a kukuřičná jádra jsou bohatá na tuk, který by mohl snížit extrakční kapacitu SBME sorbentu, bylo potřeba pomocí cyklohexanu tuk z extraktu odstranit. Následovala extrakce pomocí SBME zařízení, které se skládalo z C18 SPME vlákna uzavřeného v polypropylenové mikrozkušavce z dutých vláken. Po extrakci byl ochratoxin A ze sorbentu desorbován pomocí methanolu. Chromatografická separace probíhala při 25 °C na C18 koloně (50 x 4,6 mm) s velikostí částic 2,6 µm. Eluenty obsahující 7mM kyselinu octovou byly acetonitril-voda a methanol. Průtoková rychlost byla 1 ml/min.

Za optimalizovaných extrakčních podmínek byla mez detekce 0,9 µg/kg a 2,5 µg/kg s přesností 3,4 % a 5 % v rozsahu koncentrací od 1 do 100 µg/kg v pšeničné a kukuřičné mouce (22).

5.4.2 Stanovení ochratoxinu A ve vzorcích rýže metodou fluorescenční polarizační imunoanalýzy

Metoda fluorescenční polarizační analýzy (FPIA) byla využita ke stanovení ochratoxinu A ve vzorcích rýže. Jedná se o rychlou a velmi citlivou metodu, jejíž výhodou je, že nevyžaduje preanalytickou úpravu vzorku.

Principem metody je to, že nativní mykotoxiny ve vzorku a mykotoxin značený indikátorem soutěží o vazebná místa na monoklonální protilátce. Množství indikátoru je nepřímo úměrné množství volného mykotoxinu ve vzorku, takže koncentrace analytu nepřímo koreluje s hodnotami polarizace. Jako indikátor byl zvolen ochratoxin A-amino-methyl fluorescein.

Deset vzorků rýže bylo kontaminováno v rozmezí 0,98-14,6 ng/ml. Tato sada vzorků byla analyzována pomocí FPIA i pomocí HPLC, která sloužila jako referenční metoda. Data z těchto dvou metod vykazovala dobrou úroveň korelace, což vypovídá o praktické použitelnosti vyvinuté metody. Detekční rozsah metody se pohyboval v rozmezí 0,03-0,78 ng/ml, výtěžnost byla 70-110 % s relativní směrodatnou odchylkou menší než 20 % (23).

5.4.3 Plně automatizovaná a rychlá metoda využívající on-line SPE extrakci v kombinaci s HPLC detekcí ke stanovení citrininu a ochratoxinu A v českém pivu

Pro stanovení citrininu a ochratoxinu A ve vzorcích piva byla vyvinuta citlivá analytická metoda. Jedná se o on-line SPE extrakci na překoloně s pevným jádrem v kombinaci s HPLC ve spojení s fluorescenčním detektorem.

Vzorek (100 µl piva, které bylo přefiltrováno) byl přímo nadávkován do on-line SPE-HPLC systému. Extrakce vzorku byla efektivní a rychlá, trvala méně než 6 minut. Vzorky byly zakoncentrovány na RP kolonce (5 x 4,6 mm) s C18 sorbentem. Velikost částic sorbentu byla 2,7 µm. Mobilní fáze použitá během analýzy byla směs 0,5 %

vodného roztoku kyseliny octové s methanolem o pH 2,8. Průtoková rychlost byla nastavena na 2,0 ml/min. Přepnutí ventilu mezi kolonou chromatografickou a kolonou extrakční bylo nastaveno na dvě minuty. Na koloně s pevným jádrem probíhala separace. U této kolony byla velikost částí 2,7 μm . Separace probíhala při gradientové eluci, kdy rychlost průtoku byla 1 ml/min a teplota 50 °C. Jako mobilní fáze byla zvolena směs 0,5 % vodného roztoku kyseliny octové s acetonitrilem.

Výtěžnost při použití této metody se pohybovala v rozmezí 98,3-102,1 %. Hodnoty limitu kvantifikace byly 10 ng/l pro ochratoxin a 20 ng/l pro citrinin (24).

5.4.4 Analýza přítomnosti aflatoxinu B1, ochratoxinu A a citrininu ve fermentovaných masných produktech chorvatského původu

V případě, že jsou domácí zvířata vystavena působení mykotoxinů např. formou kontaminovaného krmiva, se může stát, že tyto toxiny přecházejí dále do živočišné výroby z těchto zvířat (maso, mléko, vejce). Tato studie se snažila detekovat přítomnost citrininu, aflatoxinu B1 a ochratoxinu A v polosuchých salámech, za sucha fermentovaných masných výrobků a klobásách, které byly náhodně vybrány v rámci prověřování chorvatského trhu.

Citrinin byl kvantifikován metodou HPLC-FD, zatímco ochratoxin A a aflatoxin B1 byly analyzovány pomocí ELISA testu. Z 90 testovaných vzorků byla nejčastější kontaminace mykotoxiny zjištěna u za sucha fermentovaných masných výrobků. Konečné výsledky analýzy ukázaly, že ochratoxin A byl detekován v 64,44 %, aflatoxin B1 v 10 % a citrinin ve 4,44 % testovaných výrobků. Maximální koncentrace ochratoxinu A ve vzorcích uzenin činily 7,83 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Obecně, ačkoli byl ochratoxin A detekován v každém typu produktu, jeho koncentrace byly velmi nízké (25).

5.4.5 Vývoj oligosorbentu pro stanovení ochratoxinu A ve vzorcích piva

Byla vyvinuta metoda, která je schopna detekovat ochratoxin A již v nízkých koncentracích. Tato technika využívá komerčních imunoafinitních kolon k zakoncentrování vzorku s následnou detekcí mykotoxinu pomocí HPLC ve spojení s fluorescenčním detektorem.

Alternativní možností je nahradit protilátky DNA aptamery. DNA aptamer s vysokou afinitou a specifitou pro ochratoxin A byl imobilizován (koncentrace DNA 0,2 mg/ml) na agarózu aktivovanou bromkyanem. Následně byl použit jako sorbent v SPE koloně. Tento oligosorbent byl optimalizován pro selektivní extrakci ochratoxinu A ze vzorků piva. Po imobilizaci aptamerů na pevném nosiči byla provedena extrakce. Pivo bylo odplyněno, zředěno a nanášeno na oligosorbent. Toxin byl eluován z oligosorbentu a kvantifikován pomocí HPLC-FD.

Průměrná výtěžnost u této metody byla 96 %. Aptamerové extrakční kolony mohly být použity znovu více než třikrát bez ztráty extrakční účinnosti. Metoda umožnila rychlou a spolehlivou analýzu vzorků piva s odhadovanou mezí detekce 0,2 ng/ml z objemu vzorku 200 µl (26).

5.4.6 Detekce ochratoxinu A a citrininu nově navrženou HPLC technikou

Jedná se o nově navrženou metodu založenou na SPE extrakci, která využívá polyamidovou kolonu a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii ve spojení s fluorescenční detekcí.

Použitím této metody bylo dosaženo přesných výsledků s variačním koeficientem, který byl nižší než 10 %, výtěžkem v rozmezí od 74 do 90 % a limity detekce pro ječmen, žito, kukuřici a oves 1 µg/kg.

Ochratoxin A byl detekován také v kakaových skořápkách a sušených hroznech (27).

5.4.7 Studium obsahu ochratoxinu A v jihomoravských a zahraničních vínech metodou UPLC s fluorescenční detekcí

V letech 2009-2010 bylo na kontaminaci ochratoxinem A testováno 72 vzorků vína jihomoravského a zahraničního původu. Byla použita rychlá analytická metoda využívající imunoafinitní kolonu k přečištění extraktu a ultraúčinnou kapalinovou chromatografii (UPLC) s fluorescenční detekcí ke kvantifikaci ochratoxinu A ve vzorku.

Hodnoty limitu detekce a limitu kvantifikace byly 0,3 a 1,0 ng/l. Ochratoxin A byl detekován v 11 % jihomoravských vín a zjištěná koncentrace se pohybovala mezi 1,2 a 71,2 ng/l. U zahraničních vín se koncentrace pohybovala v rozmezí od 1,6

do 227,0 ng/l. Naměřené hodnoty ve všech analyzovaných vzorcích nepřevyšovaly maximální povolený limit stanovený Evropskou unií – 2,0 µg/kg (28).

5.4.8 Detekce ochratoxinu A, fumonisinu B1 a citrininu pro jejich možnou kontaminaci francouzských cereálií: vývoj metody pro simultánní extrakci citrininu a ochratoxinu A

Snídaňové cereální produkty mohou být kontaminovány mykotoxiny jako důsledek předchozí kontaminace zemědělských plodin. Ve francouzských supermarketech bylo náhodně vybráno čtyřicet pět snídaňových produktů a testováno na přítomnost vybraných mykotoxinů.

Během analýzy byly citrinin a ochratoxin A simultánně extrahovány rozpouštědlem. U obou byla výtěžnost vyšší než 80 %. Fumonisin byl analyzován podle IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) metod. Výsledná výtěžnost se pohybovala v rozmezí od 50 do 70 %, výtěžnost závisela na analyzované matrici. Ztráty byly zaznamenány v průběhu imunoafinitního přečišťování. Po přečištění následovala separace vybraných mykotoxinů na HPLC-FD zapojené v módu reverzních fází. Fluorescenční detektor byl nastaven na různé vlnové délky.

Ochratoxin byl detekován v 69 % testovaných vzorků, z nichž 20 % bylo nad limitem stanoveným Evropskou Unií. Dvacet procent vzorků bylo kontaminováno citrininem v koncentračním rozsahu 1,5-42 µg/kg. Během analýzy bylo zjištěno, že fumonisin B1 kontaminoval nejen cereální produkty, ale byl detekován také v produktech, které obsahovaly ovesné vločky nebo rýži, a to v koncentracích 1,0-1110 µg/kg. U některých vzorků byla zaznamenána kontaminace fumonisinem B1, citrininem i ochratoxinem A současně (29).

5.4.9 Vývoj elektrochemické metody pro detekci ochratoxinu A založené na aptameru a izotermální amplifikaci

Tato studie poprvé zavedla přesný a účinný detekční systém, který využívá integraci smyčkou zprostředkované izotermální amplifikace (LAMP), aptamerů a elektrochemických metod pro citlivou detekci ochratoxinu A.

Aptamery byly navrženy jako vnější primer, který má spustit LAMP reakci. Následně byly produkty této reakce kombinovány s redoxně aktivní molekulou methylenové modři a analyzovány metodou diferenční pulzní voltametrie. V průběhu reakce byla methylenová modř vkládána do zdvojených oblastí LAMP amplikonů. V důsledku toho došlo ke snížení volné koncentrace methylenové modři. Celkový proud reakční směsi s amplifikací klesal v důsledku pomalé difúze komplexu methylenová modř-amplifikovaná DNA na povrchu elektrody. Výška píku proudu souvisela se vstupním množstvím aptamerů, což představovalo připravený prostředek k detekci koncentrace ochratoxinu A.

Tato metoda poskytla dobrý lineární vztah v rozmezí 0,001-50 nM s detekčním limitem 0,3 pM pro ochratoxin A (30).

5.4.10 Elektrochemická metoda využívající magnetické nanočástice pro stanovení ochratoxinu A v červených hroznech *Vitis vinifera*

Tato studie popisuje vývoj elektrochemické metody, která využívá techniku voltametrie čtvercových vln (SWV) v kombinaci s modifikovanými magnetickými nanočásticemi. Jedná se o rychlou a citlivou metodu detekce a kvantifikace ochratoxinu A ve vinných hroznech (Cabernet Sauvignon, Malbec a Syrah) po sklizni.

Hrozny byly naočkovány *Aspergillus ochraceus*, aby bylo možné izolovat ochratoxin A z uměle infikovaných vzorků. Následně byl ochratoxin A detekován pomocí SWV. Naměřené hodnoty proudu byly přímo úměrné koncentraci ochratoxinu A ve vzorcích. Stejně vzorky byly proměřeny také metodou ELISA.

Meze detekce vypočítané pro elektrochemickou detekci a ELISA testy byly 0,02 a 1,9 µg/kg a variační koeficient přesnosti byl nižší než 5,5 % (31).

5.4.11 Detekce ochratoxinu A pomocí fluorescenční chromatografické imunoanalýzy využívající kvantové tečky

Byla vyvinuta rychlá, jednoduchá a citlivá metoda detekce ochratoxinu A v kukuřici založená na fluorescenční chromatografické imunoanalýze s využitím kvantových teček (QDs-ICA).

Konjugáty anti-ochratoxin A monoklonální protilátky značené CdSe/ZnS-QDs byly navrženy jako fluorescenční sonda. Součástí QDs-ICA byla testovací linie (T line) a kontrolní linie (C line), které byly dávkovány optimálními koncentracemi ochratoxin A-ovulbumin (OTA-OVA) a stafylokokového proteinu A (SPA).

Za optimálních podmínek vykazoval QDs-ICA vynikající specifitu a dostatečnou přesnost a správnost. Pro kvalitativní detekci byla mezní hodnota pro linii T pro vizuální detekci 2,5 ng/ml. Hodnota LD50 QDs-ICA byla 0,91 ng/ml, limit detekce byl 0,07 µg/ml a detekční rozsah se pohyboval v rozmezí 0,05-10 ng/ml (32).

5.4.12 Rychlý gelový test pro neinstrumentální detekci ochratoxinu A v pivu

Pro neinstrumentální detekci ochratoxinu A ve vzorcích piva byl optimalizován rychlý a snadno použitelný imunotest.

Nejprve dojde k zakoncentrování imunoafinitní vrstvy uvnitř kolony. Následně se na stejné vrstvě provede detekce pomocí kompetitivního ELISA testu. Nejnižší mezní hodnota při vizuální kontrole byla 0,2 µg/l. Byl proveden screening 37 přirozeně kontaminovaných vzorků a nebyly získány žádné falešně negativní výsledky.

Popsaná metoda nabízí jednoduchý, rychlý a finančně nenáročný screeningový nástroj, který přispívá k lepší ochraně zdraví spotřebitelů (33).

5.4.13 Dvouprůtokový imunochromatografický test pro rychlou kvantitativní detekci ochratoxinu A a zearalenonu v kukuřici, pšenici a vzorcích krmiva

Pro simultánní kvantifikaci ochratoxinu A a zearalenonu v kukuřici, pšenici a krmivu byl vyvinut jednokrokový kompetitivní imunochromatografický test s dvěma průtoky (DICGA).

Přirozeně kontaminované vzorky kukuřice, pšenice a krmiva byly analyzovány pomocí DICGA metody a kapalinové chromatografie s tandemově zapojenými hmotnostními spektrometry (LC-MS/MS). Korelace mezi těmito dvěma metodami byla vyhodnocena pomocí regresní analýzy.

Limit detekce ochratoxinu A byl 0,32 ng/ml s rozsahem detekce 0,53-12,16 ng/ml. Hodnoty výtěžnosti ve vybraných vzorcích se pohybovaly v rozmezí 77,3-106,3 % a variačním koeficientem nižším než 15 %. DICGA ukázala velký potenciál pro jednoduchou, rychlou, citlivou a finančně dostupnou kvantitativní metodu detekce ochratoxinu A a zearalenonu (34).

5.4.14 Stanovení ochratoxinu A v cereáliích imunoultrafiltrací a HPLC ve spojení s fluorescenční detekcí po postkolonové derivatizaci v elektrochemickém článku

Tato studie představuje novou metodu přečištění vzorku založenou na imunoultrafiltraci pro analýzu ochratoxinu A v cereáliích.

Ochratoxin A byl extrahován směsí acetonitril-voda a extrakt byl následně přefiltrován v ultrafiltračním zařízení. Po promytí fosfátovým pufrem byl ochratoxin A eluován směsí methanol-kyselina octová. Následně byla provedena detekce metodou HPLC-FD ve spojení s elektrochemickým článkem. Elektrochemický článek měl zamezit matricovým efektům tím, že způsobil oxidaci matricových sloučenin.

Metoda byla validována opakovanou analýzou ječných a žitných klasů a certifikovaného pšeničného referenčního materiálu. Výtěžnost a standardní odchylky nabývaly hodnot 71 ± 9 % pro pšenici, 77 ± 12 % pro ječmen a 77 ± 8 % pro vzorky žita. Detekční limit byl 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a limit kvantifikace 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Analýza referenčního materiálu poskytla výsledky, které se nacházely v rozmezí stanoveném výrobcem (35).

5.4.15 Simultánní stanovení stopového množství aflatoxinu B1 a ochratoxinu A pomocí mikročipové kapilární elektroforézy na bázi aptameru ve vzorcích potravin

Byla vyvinuta mikročipová kapilární elektroforéza na bázi aptameru spojená s detekční metodou laserem indukované fluorescence (MCE-LIF) pro rychlé stanovení aflatoxinu B1 a ochratoxinu A.

Aptamery specifické pro tyto dva mykotoxiny byly nejprve hybridizovány s jejich aptamerovými komplementárními oligonukleotidy. Dvouvláknová DNA, která přišla do kontaktu s prostředím obsahujícím mykotoxiny, se odvíjela do samostatného

komplexu aptamer-mykotoxiny a aptamer komplementárního samostatného vlákna. Pomocí MCE metody mohou být separovány různé typy oligonukleotidů a detekovány pomocí fluorescenčního barviva SYBR gold.

Za optimálních podmínek bylo dosaženo analýzy konjugátu aptamer-mykotoxin během 3 minut. Limit detekce stanovený pro aflatoxin B1 byl 0,026 ng/ml a pro ochratoxin A 0,021 ng/ml. Studie specifity ukázala, že jiné často stanovované mykotoxiny nevykazují křížové reakce s těmito dvěma aptamery, což prokazuje dobrou selektivitu této metody. Bylo prokázáno, že se jedná o snadnou, rychlou a dostatečně specifickou metodu pro simultánní stanovení aflatoxinu B1 a ochratoxinu A ve vzorcích potravin (36).

5.4.16 Stanovení ochratoxinu A časově rozdělenou fluorescenční imunoanalýzou založenou na polyklonálních protilátkách

Byla zavedena rychlá, vysoce selektivní a citlivá metoda pro stanovení ochratoxinu A. Jedná se o nepřímou kompetitivní časově rozdělenou fluorescenční imunoanalýzu (TRFIA) založenou na polyklonálních protilátkách.

Analýza byla provedena na destičce s 96 jamkami, které obsahovaly specifické polyklonální protilátky proti stanovovaným mykotoxinům. Na mikrotitrační destičku byl nanesen konjugát ochratoxin A-hovězí sérový albumin, který byl následně inkubován se standardním toxinem (vzorkem) a protilátkami proti ochratoxinu A. Vzorky byly zároveň stanoveny pomocí systému autoDELFI1235, aby bylo možné posoudit, zda je navrhovaná metoda vhodná pro detekci ochratoxinu A.

Limit detekce ochratoxinu A byl 0,02 µg/l. Hodnoty stanovení se pohybovaly v rozmezí od 0,02 do 400 µg/l. Průměrné výtěžnosti ze vzorků, které byly obohaceny 1-200 µg ochratoxinu A na kilogram byly 95,8 %. Jako referenční metoda byly použity ELISA testy a korelační koeficient mezi těmito dvěma metodami byl 0,912. Výsledky ukázaly, že metoda TRFIA je vhodná pro kvantifikaci ochratoxinu A v obilovinách (37).

5.4.17 Vývoj metody využívající nový biosenzor k detekci ochratoxinu A v červeném víně

Byl vyvinut nový biosenzor založený na použití křemíkových krystalických mikrovah rozšířených o možnost měření disipace (QCM-D) a specifických protilátek pro rychlou a citlivou detekci ochratoxinu A v červeném víně.

Kombinace nepřímého kompetitivního imunotestu s QCM-D poskytuje zařízení, které je schopné současně zaznamenávat změny frekvence a disipace, což poskytuje podrobné informace o látce, která je v kontaktu s povrchem senzoru. V této studii bylo amplifikace QCM-D dosaženo použitím sekundárních protilátek konjugovaných s nanočásticemi zlata.

Bylo dosaženo lineárního rozsahu stanovení 0,2-40 ng/ml s výborným limitem detekce 0,16 ng/ml, což je o řád méně než limit detekce specifikovaný legislativou Evropskou Unií. Kromě toho byl matricový efekt (způsobený výskytem polyfenolů ve víně) a související nespecifické interakce s povrchem senzoru zcela eliminovány předběžnou úpravou vína přidáním 3 % polyvinylpyrrolidonu (38).

5.4.18 Detekce ochratoxinu A v jablkách kontaminovaných *Aspergillus ochraceus* metodou využívající mikrofluidní kompetitivní imunosenzor a magnetické nanočástice

Tato práce se zabývala vývojem, charakterizací a aplikací metody imunoanalýzy založené na nanočásticích zlata jako platformy pro imobilizaci bioaktivních materiálů inkorporovaných do mikrofluidního systému k zajištění rychlé a citlivé kvantifikace ochratoxinu A v jablkách kontaminovaných druhem *Aspergillus ochraceus*.

Navrhovaný senzor má velký potenciál pro automatizaci. Detekce ochratoxinu A byla založena na kompetitivní nepřímé imunoanalýze využívající monoklonálních protilátek proti ochratoxinu A imobilizovaných na 3-aminopropylem modifikovaných magnetických nanočásticích.

Celková doba analýzy činila 16 minut s limitem detekce 0,05 µg/kg. Kromě toho byly korelační koeficienty v rámci testů a odchylky mezi nimi nižší než 6,5 %. Tato metoda může být velmi slibným analytickým nástrojem pro stanovení ochratoxinu A ve zjevně zdravých plodech po sklizni a pro její použití v zemědělském průmyslu (39).

5.4.19 Metoda stanovení ochratoxinu A využívající molekulární signalizátory a real-time PCR

Byl vyvinut jednoduchý a levný způsob analýzy ochratoxinu A ve víně. DNA aptamer byl použit jako rozpoznávací sonda ve formě molekulárního signalizátoru s fluorochromem na jednom konci a zhášedčem fluorescence na druhém konci. Takto připravený aptamer byl schopný zaujmout konformaci vhodnou pro navázání ochratoxinu A, což způsobilo nárůst intenzity fluorescence v důsledku větší vzdálenosti mezi fluorochromem a zhášedčem fluorescence. K zachycení signálu bylo použito zařízení real-time PCR.

Za optimálních podmínek je možné provést analýzu během jedné hodiny. Navrhovaný systém navíc vykazoval dobrou selektivitu pro ochratoxin A vůči jiným mykotoxinům (ochratoxin B a aflatoxin M1). Lineární rozsah stanovení se pohyboval v rozmezí 0,2-2000 μM s limitem detekce 13 nM a korelačními koeficienty $r^2 = 0,9952$ a $r^2 = 0,9904$ (40).

5.4.20 Stanovení ochratoxinu A a ochratoxinu B v archivních Tokajských vínech využívající on-line SPE v kombinaci s HPLC-FD

Byla vyvinuta analytická metoda pro stanovení ochratoxinu A a ochratoxinu B v Tokajských archivních vínech založená na on-line SPE ve spojení s HPLC-FD využívající přepínání kolon pro rychlou a citlivou kontrolu kontaminace mykotoxiny.

Metoda byla validována s výtěžností v rozmezí 91,6-99,1 % s relativní směrodatnou odchylkou nižší než 2 %. Limit kvantifikace byl 0,1 $\mu\text{g/l}$ pro ochratoxin A a 0,2 $\mu\text{g/l}$ pro ochratoxin B. Celková doba analýzy byla 6 minut. Ve studii byl proveden rozsáhlý průzkum 59 vzorků Tokajských vín z let 1959-2017. Ochratoxin A byl detekován pouze v malém množství vzorků a jeho koncentrace nepřekročila přípustný limit stanovený Evropskou unií (2 $\mu\text{g/l}$), což svědčí o dobré kvalitě pěstování a skladování Tokajského vína (41).

Tabulka 1: Souhrnné informace o dostupných metodách ke stanovení ochratoxinu A

Metoda	Analyzovaná látka	Matrice	Detektor	Limit detekce	Zdroj
HPLC	OTA	Pšenice, kukuřice	FD	0,9 µg/kg	(22)
	OTA, CIT	Pivo	FD	10 ng/l OTA	(24)
	OTA	Pivo	FD	0,2 ng/ml	(26)
	OTA, CIT	Ječmen, žito, kukuřice, oves	FD	1 µg/kg	(27)
	OTA, CIT, FUM	Snídaňové cereálie	FD	-	(29)
	OTA, CIT, aflatoxin B1	Fermentované masné produkty	FD	-	(25)
	OTA	Cereálie	FD	0,4 µg/kg	(35)
	OTA, OTB	Tokajská vína	FD	-	(41)
FPIA	OTA	Rýže	-	-	(23)
UPLC	OTA	Víno	FD	0,3 ng/l	(28)
Elektrochemické metody	OTA	Červené hrozny	SWV	0,02 µg/kg	(31)
	OTA		-	0,3 pM	(30)
QDs-ICA	OTA	Kukuřice	-	0,07 µg/ml	(32)
ELISA	OTA	Pivo	-	0,2 µg/l	(33)
DICGA	OTA, zearalenon	Kukuřice, pšenice, krmivo	-	0,32 ng/ml	(34)
MCE	OTA, aflatoxin B1	Vzorky potravin	LIF	0,021 ng/ml	(36)
TRFIA	OTA	Obiloviny	-	0,02 µg/l	(37)
Biosenzor	OTA	Červené víno		0,16 ng/ml	(38)
	OTA	Jablka	-	0,05 µg/kg	(39)
Molekulární signalizátor	OTA	Víno	-	13 nM	(40)

Legenda tabulky:

OTA – ochratoxin A, CIT – citrinin, FUM – fumonisin, - data nebylo možné dohledat

6. ZÁVĚR

Cílem této rešeršní práce bylo zpracovat dostupná data o ochratoxinu A a shrnout informace o současně používaných metodách, jimiž je možné tento mykotoxin stanovit v různých potravinách nebo zemědělských produktech.

První, teoretická část práce měla shrnout základní informace o mykotoxinech, o jejich kontrole a bezpečnosti v potravinách a nápojích a důvody, proč je důležité je v potravinách kontrolovat. Následně se kapitola věnuje ochratoxinu A. Stručně je popsána jeho struktura, fyzikální a chemické vlastnosti, biosyntéza a také toxické účinky, kterými působí na živé organismy. Popsán je také jeho výskyt v potravinách a limity stanovené Evropskou unií.

Dále následuje analytická část této práce, kde je nejprve věnován prostor přípravě vzorku pro analýzu, kam se řadí tématika odběru vzorku, extrakce vzorku, a nakonec přečištění získaného extraktu. Déle jsou přehledně sepsány analytické metody, pomocí kterých je možné ochratoxin A v potravinách stanovit.

Z důvodů kontroly potravin a včasné eliminace rizika ohrožení zdraví konzumentů je potřeba, aby metody pro stanovení mykotoxinů v potravinách byly co nejvíce citlivé, selektivní a spolehlivé, ale zároveň dostatečně rychlé, levné a jednoduché na obsluhu. Postupně dochází k nahrazování původně velmi používaných HPLC metod, novými a progresivnějšími technikami. V posledních letech jsou stále více na vzestupu imunologické metody typu ELISA testů. Do popředí se také dostává trend využívající biosenzory a aptamery, a také moderní modifikace HPLC na UHPLC, která je spojena s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Hojně využívány jsou také elektromigrační metody, a to zejména ve spojení s metodami chromatografickými.

Co se ochratoxinu A týče, soustředí se studie také na zdokonalení metod extrakce a úpravy vzorku před analýzou. Často je využívána metoda extrakce, případně mikroextrakce na tuhou fázi a metoda imunoafinitní chromatografie.

Mnohé metody využívají toho, že ochratoxin A má schopnost nativní fluorescence, tudíž je mnoho způsobů stanovení založeno na spojení kapalinové chromatografie s fluorescenčním detektorem. Postupně jsou ovšem stále více při

analýze mykotoxinů využívány hmotnostní detektory a metoda HPLC-FD je pomalu upozaďována a nahrazována citlivější MS/MS detekcí.

Konzumace potravin kontaminovaných mykotoxiny ohrožuje zdraví člověka i hospodářských zvířat, proto je nezbytné kontrolovat výskyt a množství těchto toxických látek v potravinách a nápojích.

7. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Strukturální vzorec ochratoxinu A.....	14
Obrázek 2: Reakce biosyntézy ochratoxinu A (15)	16

8. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Souhrnné informace o dostupných metodách ke stanovení ochratoxinu A	46
--	----

9. POUŽITÁ LITERATURA

1. BENNETT, J. W., KLICH., M. *Mycotoxins*. Clinical Microbiology Reviews [online]. 2003, 16(3), 497-516 [cit. 2021-04-09]. ISSN 0893-8512. doi:10.1128/CMR.16.3.497-516.2003. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12857779/>
2. BETINA, V. *Mykotoxíny: Chémia - biológia - ekológia*. Bratislava: Alfa, 1990. ISBN 80-05-00631-4.
3. HERINK, J., RYCHLÍK, I., PELCLOVÁ, D. *Toxické poškození ledvin houbami: patogeneze, klinika, léčba*. Praha: Maxdorf, 2007. Jessenius. ISBN 978-80-7345-122-6.
4. MALÍŘ, F., OSTRÝ, V. *Vláknité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka*. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2003. ISBN 80-7013-395-3.
5. ALSHANNAQ, A., YU, J. *Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food*. International Journal of Environmental Research and Public Health [online]. 2017, 14(6) [cit. 2021-04-09]. ISSN 1660-4601. doi:10.3390/ijerph14060632. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28608841/>
6. STADLER, D., BERTHILLER, F., SUMAN, M., SCHUHMACHER, R., KRŠKA, R. *Novel analytical methods to study the fate of mycotoxins during thermal food processing*. Analytical and Bioanalytical Chemistry [online]. 2020, 412(1), 9-16 [cit. 2021-04-09]. ISSN 1618-2642. doi:10.1007/s00216-019-02101-9. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-019-02101-9>
7. NEDĚLNÍK, J. *Aktuální stav mykotoxinové kontaminace potravin a produktů rostlinného původu v Evropě v letech 2003-2004 a komparace hygienických limitů*. Vědecký výbor fytoosanitární a životního prostředí [online]. 2004 [cit. 2021-04-09]. Dostupné z: <http://www.phytosanitary.org/projekty/2004/vvf-01-04.pdf>

8. KHOLOVÁ, A. *Mykotoxiny v potravinách - citrinin a možnosti jeho stanovení*. Hradec Králové, 2016. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Katedra analytické chemie.
9. *Národní referenční centrum pro mikroskopické houby a jejich toxiny v potravinových řetězcích (NRC)* Státní zdravotní ústav [online]. 2007 [cit. 2021-03-28]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/narodni-referencni-centrum-pro-mikroskopicke-houby-a-jejich>
10. MONDANI, L., PALUMBO, R., TSITSIGIANNIS, D., PERDIKIS, D., MAZZONI, E., BATTILANI, P. *Pest Management and Ochratoxin A Contamination in Grapes: A Review*. *Toxins* [online]. 2020, 12(5) [cit. 2021-04-09]. ISSN 2072-6651. doi:10.3390/toxins12050303. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7290310/>
11. REDDY, L., BHOOLA, K. *Ochratoxins—Food Contaminants: Impact on Human Health*. *Toxins* [online]. 2010, 2(4), 771-779 [cit. 2021-04-09]. ISSN 2072-6651. doi:10.3390/toxins2040771. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22069609/>
12. EL KHOURY, A., ATOUI, A. *Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status*. *Toxins* [online]. 2010, 2(4), 461-493 [cit. 2021-04-09]. ISSN 2072-6651. doi:10.3390/toxins2040461. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22069596/>
13. *PubChem Compound Summary for CID 442530, Ochratoxin A*. National Center for Biotechnology Information. PubChem [online]. 2021 [cit. 2021-04-09]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ochratoxin-A>
14. CENTRE FOR FOOD SAFETY. *Ochratoxin A in Food*. Food and Environmental Hygiene Department [online]. 2006 [cit. 2021-04-09]. Dostupné z: https://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme_rafs/files/cfs_news_ras_23_och.pdf
15. WANG, Y., WANG, L., WU, F., LIU, F., WANG, Q., ZHANG, X., SELVARAJ, J. N., ZHAO, Y., XING, F., YIN, W. B., LIU, Y. *A Consensus Ochratoxin A Biosynthetic Pathway: Insights from the Genome Sequence of Aspergillus ochraceus and a Comparative*

- Genomic Analysis*. Applied and Environmental Microbiology [online]. 2018, 84(19), e01009-18 [cit. 2021-04-09]. ISSN 0099-2240. doi:10.1128/AEM.01009-18. Dostupné z: <https://aem.asm.org/content/aem/84/19/e01009-18.full.pdf>
16. TURNER, N. W., BRAMHMBHATT, H., SZABO-VEZSE, M., POMA, A., COKER, R., PILETSKY, S. A. *Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009–2014)*. Analytica Chimica Acta [online]. 2015, 901, 12-33 [cit. 2021-04-09]. ISSN 0003-2670. doi:10.1016/j.aca.2015.10.013. Dostupné z: <http://awarticles.s3.amazonaws.com/Turner2015.pdf>
17. SONGSERMSAKUL, P., RAZZAZI-FAZELI, E. *An Review of Recent Trends in Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for Determination of Mycotoxins*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies [online]. 2010, 31(11-12), 1641-1686 [cit. 2021-04-09]. ISSN 1082-6076. doi:10.1080/10826070802126395. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2662450/>
18. KRŠKA, R., SCHUBERT-ULLRICH, P., MOLINELLI, A., SULYOK, M., MACDONALD, S., CREWS, C. *Mycotoxin analysis: An update*. Food Additives & Contaminants: Part A [online]. 2008, 25(2), 152-163 [cit. 2021-04-09]. ISSN 1944-0049. doi:10.1080/02652030701765723. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18286405/>
19. KARLÍČEK, R. *Analytická chemie pro farmaceuty*. 4., nezměn. vyd. Praha: Karolinum, 2013. ISBN 978-80-246-2202-6.
20. KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Třetí, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko, 2016. ISBN 978-80-86369-22-8.
21. BAČINA, A., BUDAYOVÁ, E., VOKATÁ, S. *ELISA – diagnostika protilátek*. Vyšší odborná škola zdravotnická a Střední zdravotnická škola Hradec Králové: Laboratorní metody [online]. [cit. 2021-02-29]. Dostupné z: <http://labmet.zshk.cz/vyuka/ELISA-diagnostika-protilatek.aspx>
22. AL-HADITHI, N., KÖSSLER, P., KARLOVSKY, P. *Determination of Ochratoxin A in Wheat and Maize by Solid Bar Microextraction with Liquid Chromatography and Fluorescence Detection*. Toxins[online]. 2015, 7(8), 3000-3011 [cit. 2021-04-18].

- ISSN 2072-6651. doi:10.3390/toxins7083000. Dostupné z:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26251923/>
23. HUANG, X., TANG, X., JALLOW, A., et al. *Development of an Ultrasensitive and Rapid Fluorescence Polarization Immunoassay for Ochratoxin A in Rice*. *Toxins* [online]. 2020, 12(11) [cit. 2021-04-18]. ISSN 2072-6651. doi:10.3390/toxins12110682. Dostupné z:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33138019/>
24. LHOTSKÁ, I., ŠATÍNSKÝ, D., HAVLÍKOVÁ, L., SOLICH, P. *A fully automated and fast method using direct sample injection combined with fused-core column on-line SPE–HPLC for determination of ochratoxin A and citrinin in lager beers*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*[online]. 2016, 408(12), 3319-3329 [cit. 2021-04-18]. ISSN 1618-2642. doi:10.1007/s00216-016-9402-6. Dostupné z:
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00216-016-9402-6#citeas>
25. MARKOV, K., PLEADIN, J., BEVARDI, M., VAHČIĆ, N., SOKOLIĆ-MIHALAK, D., FRECE, J. *Natural occurrence of aflatoxin B1, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products*. *Food Control* [online]. 2013, 34(2), 312-317 [cit. 2021-04-19]. ISSN 09567135. doi:10.1016/j.foodcont.2013.05.002. Dostupné z:
<https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-9c0ccb94-ba55-344b-afcb-a9786b042793>
26. RHOUATI, A., PANIEL, N., MERAIHI, Z., MARTY, J. *Development of an oligosorbent for detection of ochratoxin A*. *Food Control* [online]. 2011, 22(11), 1790-1796 [cit. 2021-04-19]. ISSN 09567135. doi:10.1016/j.foodcont.2011.04.021. Dostupné z:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713511001605#!>
27. MEISTER, U. *Detection of citrinin in ochratoxin A-containing products by a new HPLC method*. *Mycotoxin Research* [online]. 2003, 19(1), 27-30 [cit. 2021-04-19]. ISSN 0178-7888. doi:10.1007/BF02940087. Dostupné z:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23604663/>
28. MIKULÍKOVÁ, R., BĚLÁKOVÁ, S., BENEŠOVÁ, K., SVOBODA, Z. *Study of ochratoxin A content in South Moravian and foreign wines by the UPLC method with fluorescence detection*. *Food Chemistry* [online]. 2012, 133(1), 55-59 [cit. 2021-04-

- 20]. ISSN 03088146. doi:10.1016/j.foodchem.2011.12.061. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S030881461101853X>
29. MOLINIÉ, A., FAUCET, V., CASTEGNARO, M., PFOHL-LESZKOWICZ, A. *Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B1: development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin*. Food Chemistry[online]. 2005, 92(3), 391-400 [cit. 2021-04-20]. ISSN 03088146. doi:10.1016/j.foodchem.2004.06.035. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/223029784> Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of Ochratoxin A citrinin and fumonisin B1 Development of a method for simultaneous extraction of Ochratoxin A and citrinin
30. XIE, S., CHAI, Y., YUAN, Y., BAI, L., YUAN, R. *Development of an electrochemical method for Ochratoxin A detection based on aptamer and loop-mediated isothermal amplification*. Biosensors and Bioelectronics [online]. 2014, 55, 324-329 [cit. 2021-04-21]. ISSN 09565663. doi:10.1016/j.bios.2013.11.009. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956566313007872>
31. FERNÁNDEZ-BALDO, M. A., BERTOLINO, F. A., MESSINA, G. A., SANZ, M. I., RABA, J. *Modified magnetic nanoparticles in an electrochemical method for the ochratoxin A determination in Vitis vinifera red grapes tissues*. Talanta [online]. 2010, 83(2), 651-657 [cit. 2021-4-25]. ISSN 00399140. doi:10.1016/j.talanta.2010.10.018. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0039914010007939>
32. ZHOU, J., YANG, Q., LIANG, C., CHEN, Y., ZHANG, X., LIU, Z., WANG, A. *Detection of ochratoxin A by quantum dots-based fluorescent immunochromatographic assay*. Analytical and Bioanalytical Chemistry [online]. 2021, 413(1), 183-192 [cit. 2021-4-25]. ISSN 1618-2642. doi:10.1007/s00216-020-02990-1. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-020-02990-1#citeas>
33. GORYACHEVA, I. Y., BASOVA, E. Y., VA N PETEGHEM, C., EREMIN, S. A., PUSSEMIER, L., MOTTE, J.-C., DE SAEGER, S. *Novel gel-based rapid test for non-instrumental detection of ochratoxin A in beer*. Analytical and Bioanalytical Chemistry [online]. 2008, 390(2), 723-727 [cit. 2021-4-25]. ISSN 1618-2642. doi:10.1007/s00216-007-

- 1713-1. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-007-1713-1#citeas>
34. ZHANG, X., HE, K., Yun FANG, Y., et al. *Dual flow immunochromatographic assay for rapid and simultaneous quantitative detection of ochratoxin A and zearalenone in corn, wheat, and feed samples*. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B [online]. 2018, 19(11), 871-883 [cit. 2021-4-26]. ISSN 1673-1581. doi:10.1631/jzus.B1800085. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1631/jzus.B1800085#citeas>
35. REITER, E. V., CICHNA-MARKL, M., CHUNG, D. H., SHIM, W. B., ZENTEK, J., RAZZAZI-FAZELI, E. *Determination of ochratoxin A in grains by immuno-ultrafiltration and HPLC-fluorescence detection after postcolumn derivatisation in an electrochemical cell*. Analytical and Bioanalytical Chemistry [online]. 2011, 400(8), 2615-2622 [cit. 2021-4-26]. ISSN 1618-2642. doi:10.1007/s00216-011-4942-2. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21461614/>
36. XIAO, M. W., BAI, X. L., LIU, Y. M., YANG, L., LIAO, X.. *Simultaneous determination of trace Aflatoxin B1 and Ochratoxin A by aptamer-based microchip capillary electrophoresis in food samples*. Journal of Chromatography A [online]. 2018, 1569, 222-228 [cit. 2021-4-26]. ISSN 00219673. doi:10.1016/j.chroma.2018.07.051. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30037541/>
37. HUANG, B., TAO, W., SHI, J., TANG, L., JIN, J. *Determination of ochratoxin A by polyclonal antibodies based sensitive time-resolved fluoroimmunoassay*. Archives of Toxicology [online]. 2006, 80(8), 481-485 [cit. 2021-4-28]. ISSN 0340-5761. doi:10.1007/s00204-006-0112-2. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16688427/>
38. KARCZMARCZYK, A., HAUPT, K., FELLER, K.H. *Development of a QCM-D biosensor for Ochratoxin A detection in red wine*. Talanta [online]. 2017, 166, 193-197 [cit. 2021-4-28]. ISSN 00399140. doi:10.1016/j.talanta.2017.01.054. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28213222/>
39. FERNÁNDEZ-BALDO, M. A., BERTOLINO, F. A., FERNÁNDEZ, G., MESSINA, G. A., SANZ, M. I., RABA, J. *Determination of Ochratoxin A in apples contaminated with*

- Aspergillus ochraceus* by using a microfluidic competitive immunosensor with magnetic nanoparticles. *The Analyst* [online]. 2011, 136(13) [cit. 2021-4-28]. ISSN 0003-2654. doi:10.1039/c1an15148g. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21611646/>
40. SANZANI, S., REVERBERI, M., FANELLI, C., IPPOLITO, A. *Detection of Ochratoxin a Using Molecular Beacons and Real-Time PCR Thermal Cyclers*. *Toxins* [online]. 2015, 7(3), 812-820 [cit. 2021-4-29]. ISSN 2072-6651. doi:10.3390/toxins7030812. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25760080/>
41. KHOLOVÁ, A., LHOTSKÁ, I., UHROVÁ, A., ŠPÁNIK, I., MACHYŇÁKOVÁ, A., SOLICH, P., ŠVEC, F., ŠATÍNSKÝ, D. *Determination of Ochratoxin A and Ochratoxin B in Archived Tokaj Wines (Vintage 1959–2017) Using On-Line Solid Phase Extraction Coupled to Liquid Chromatography*. *Toxins* [online]. 2020, 12(12) [cit. 2021-4-29]. ISSN 2072-6651. doi:10.3390/toxins12120739. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33255273/>