

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

**Stanovení mykotoxinu ochratoxinu A ve vzorcích vzduchem
sušených šunek metodou HPLC-FLD**

Diplomová práce

Autor: Bc. Lukáš Rejman

Studijní program: N0588A030001

Studijní obor: Biologie a ekologie – experimentální biologie

Vedoucí práce: RNDr. Jakub Toman, Ph.D.



Zadání diplomové práce

Autor: Bc. Lukáš Rejman

Studium: S22BI019NP

Studijní program: N0588A030001 Biologie a ekologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Název diplomové práce: Stanovení mykotoxinu ochratoxinu A ve vzorcích vzduchem sušených šunek metodou HPLC-FLD

Název diplomové práce AJ: Determination of the mycotoxin ochratoxin A in air-dried ham samples by the HPLC-FLD method

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Výzkumná práce bude zaměřena na vzduchem sušené šunky "dry cured ham", tedy tepelně neopracované a nedouzované masné výrobky. Tyto výrobky na svém povrchu velmi často mívají různé druhy vláknitých mikroskopických hub, což není v rozporu se samotným postupem výroby, nicméně lze předpokládat, že mohou být producenty mykotoxinů.

Díky těmto poznatkům bude možné odhadnout přívod tohoto mykotoxinu do organismu konzumenta, což přispěje k hodnocení "total diet study".

Součástí práce bude i úprava a validace současně používané separační metody.

Chen, Y., Chen, J., Zhu, Q., Wan, J. (2022). Ochratoxin A in Dry-Cured Ham: OTA-Producing Fungi, Prevalence, Detection Methods, and Biocontrol Strategies—A Review. *Toxins*. 14(10):693. <https://doi.org/10.3390/toxins14100693>.

Jørgensen, K., & Petersen, A. (2002). Content of ochratoxin A in paired kidney and meat samples from healthy Danish slaughter pigs. *Food Additives and Contaminants*, 19(6), 562–567. <https://doi.org/10.1080/02652030110113807>

Zadávací pracoviště: Katedra biologie,
Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: RNDr. Jakub Toman, Ph.D.

Oponent: doc. RNDr. Vlastimil Dohnal, Ph.D. et Ph.D.

Datum zadání závěrečné práce: 23.1.2020

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedl všechny prameny, z kterých jsem vycházel.

V Hradci Králové dne 10. 5. 2024

.....
vlastnoruční podpis

Lukáš Rejman

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému vedoucímu práce panu RNDr. Jakobovi Tomanovi, Ph.D., za jeho velikou ochotu, odborné vedení a velmi přínosné konzultace během vypracování této diplomové práce. Dále bych rád poděkoval Mgr. Darině Pickové, Ph.D., za její pomoc a laskavost během práce v laboratoři. Zvláštní poděkování patří mojí mamince a mým nejbližším, kteří mi svou podporou pomohli k dokončení diplomové práce.

Anotace

Rejman, L., 2024: *Stanovení mykotoxinu ochratoxinu A ve vzorcích vzduchem sušených šunek metodou HPLC-FLD*. Hradec Králové, 2024. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí diplomové práce RNDr. Jakub Toman, Ph.D., 79 s.

Diplomová práce se zabývá problematikou výskytu ochratoxinu A (OTA) v sušených šunkách zakoupených na českém trhu v roce 2023. Cílem práce bylo zhodnotit koncentraci OTA v sušených šunkách a porovnat zjištěné hodnoty s jinými studii. Celkem bylo analyzováno metodou HPLC-FLD 200 vzorků vzduchem sušených šunek pocházejících z různých zemí EU.

Sušené šunky jsou tradiční potraviny vyráběné po celém světě s velkou oblíbeností, avšak jejich konzumace může představovat potenciální zdravotní riziko pro lidské zdraví v důsledku dietární expozice OTA.

Klíčová slova

OTA, kontaminace, expozice, potraviny, plísně

Annotation

Rejman, L., 2024: *Determination of the mycotoxin ochratoxin A in air-dried ham samples by the HPLC-FLD method*. Hradec Králové, 2024. Diploma thesis at Faculty of Science, University of Hradec Králové. Thesis Supervisor RNDr. Jakub Toman, Ph.D., 79 p.

This thesis investigates the presence of ochratoxin A (OTA) in air dried hams purchased on the Czech market in 2023. The aim was to determine the concentration of OTA in air dried hams and compare those values with other studies. 200 samples of air-dried hams from various countries of the EU were analysed by the HPLC-FLD method.

Dried hams are a traditional and popular groceries manufactured all around the world, however their consumption may pose a potential threat to the human health as a result of the dietary exposition to OTA.

Keywords

OTA, contamination, exposition, food, mold

Obsah

Úvod	
2 Teoretická část.....	1
2.1 Mykotoxiny	1
2.2 Mykotoxiny v potravinách a krmivech	3
2.2.1 Systém zajištění bezpečnosti potravin a krmiv	3
2.2.2 Prevence kontaminace mykotoxiny.....	5
2.3 Ochratoxin A.....	7
2.3.1 Fyzikální a chemické vlastnosti	8
2.3.2 Producenti OTA.....	9
2.3.3 Producenti OTA rodu <i>Aspergillus</i>	10
2.3.4 Producenti OTA rodu <i>Penicillium</i>	11
2.3.5 Výskyt OTA v mase a masných produktech.....	12
2.3.6 Toxicita OTA.....	15
2.3.7 Regulace OTA v potravinách a krmivech.....	17
2.3.8 Analytické metody pro stanovení OTA.....	19
2.4 Sušené šunky	22
2.4.1 Historie	22
2.4.2 Typy vzduchem sušených šunek.....	22
2.4.3 Technologický postup výroby sušených šunek	23
3 Metodika	26
3.1 Přístroje a zařízení	26
3.2 Spotřební materiál.....	27
3.3 Použité chemikálie	28
3.4 Roztoky.....	28
3.4.1 Fosfátový pufr (PBS).....	28
3.4.2 Mobilní fáze	29

3.4.3	60% Acetonitril.....	29
3.4.4	Eluční roztok	29
3.4.5	Zásobní roztok OTA.....	29
3.4.6	Pracovní roztok OTA.....	29
3.5	Použité programy a software	30
3.6	Požadavky na pracovní techniku	30
3.7	Čištění skla – dekontaminace	31
3.8	Princip metody.....	31
4	Pracovní postup.....	33
4.1	Odběr, doprava a skladování vzorků.....	33
4.2	Homogenizace	34
4.3	Úprava vzorků k analýze a extrakci	34
4.4	Podmínky stanovení.....	36
4.5	Kalibrace.....	37
4.5.1	Kalibrační řada.....	37
4.5.2	Slepý vzorek	37
4.6	Validační parametry	37
4.6.1	Retenční čas.....	37
4.6.2	Linearita.....	37
4.6.3	Mez detekce a mez stanovitelnosti.....	38
4.6.4	Opakovatelnost stanovení.....	38
4.6.5	Výtěžnost	38
4.6.6	Způsob dohledání primárních dat	39
5	Výsledky.....	40
6	Diskuze.....	42
	Závěr	

Terminologický slovník

Aditiva	Látky přidávané do výrobků ke zlepšení nebo jiné úpravě jejich vlastností.
Afinita	Vyjadřuje sílu interakce (vzájemného působení) mezi dvěma chemickými látkami.
Analyt	Stanovovaná látka.
Biosyntéza	Tvorba látek živým organismem.
Ergotismus	Onemocnění způsobené ergotovými alkaloidy.
Fungicidy	Prostředky pro ničení parazitických hub a plísní.
Hepatotoxicita	Toxický účinek na játra.
Imunotoxicita	Toxický účinek na imunitní systém.
Karcinogenita	Schopnost vyvolat rakovinné bujení.
Komezál	Mezidruhový vztah, kdy komenzál má výhodu, když je přítomen využívaný druh, kterému ale neškodí.
Konjugace	Spojování s jinou molekulou, čímž se tvoří konjugát.
Mutagenita	Schopnost určité látky způsobovat trvalé, obvykle negativní změny v organismu a jeho potomstvu změnou struktury DNA.
Mykotoxikologie	Obor, který se zabývá studiem mykotoxinů (toxiny produkované plísněmi).
Nefropatie	Obecný termín pro onemocnění ledvin.
Nefrotoxicita	Toxický účinek na ledvinovou tkáň a vylučovací systém.
Purifikace	Proces čištění či vyčištění.
Teratogenita	Schopnost látky poškodit určitým způsobem vývoj plodu.
Toxikokinetika	Studium procesů, kdy tělo nakládá s potencionálně toxickými látkami, zahrnuje porozumění absorpci, distribuci, metabolismu a vylučování těchto látek.
Toxinogenní plísně	Plísně schopné produkovat mykotoxiny.

Seznam zkratek

a_w	Vodní aktivita
ČR	Česká republika
EFSA	(European Food Safety Authority) Evropský úřad pro bezpečnost potravin
ELISA	(Enzyme-linked immuno sorbent assay) Imunocheická metoda
HACCP	(Hazard Analysis and Critical Control Points) Systém kritických bodů
HPLC-FLD	(High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection) Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí
HPLC-MS	(Liquid chromatography - mass spectrometry) Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
IAK	Imunoafinitní kolonka
LD ₅₀	(Lethal dose) Dávka, po níž zahyne 50 % pokusných zvířat
LOD	(Limit of detection) Mez detekce
LOQ	(Limit of quantification) Mez stanovitelnosti
OTA	Ochratoxin A
OTB	Ochratoxin B
OTC	Ochratoxin C
Ot α	Ochratoxin α
PBS	(Phosphate Buffered Saline) Fosfátový pufr
pH	Hodnota udávající na stupnici (0-14) kyselost nebo zásaditost
RASFF	(Rapid Alert System for Food and Feed) Systém rychlého varování pro potravinu a krmiva

Úvod

Mykotoxiny jsou sekundární toxické metabolity produkované vláknitými mikroskopickými houbami, známými jako plísně. Tyto plísně představují důležitou a stále aktuální problematiku v oblasti hygieny potravin a veřejného zdraví. Toxinogenní plísně mohou produkovat sekundární metabolity v zemědělských plodinách, živočišných produktech a hotových potravinách. Dnes je známo více než 400 různých mykotoxinů produkovaných toxigenními plísněmi a jsou neustále objevovány další. Nejznámější zástupci mykotoxinů jsou aflatoxiny, ochratoxiny, zearalenon, deoxynivalenol, HT-2 a T-2 toxiny, fumonisiny, citrinin, patulin a ergotové alkaloidy (Battilani et al., 2016, Tirado et al., 2010, Malíř et al., 2003).

Ochratoxin A (OTA) je mykotoxin produkovaný některými druhy plísní rodu *Aspergillus* a *Penicillium* a je považován za druhý nejvýznamnější mykotoxin. Jeho přítomnost v potravinách, včetně masných výrobků vyvolává obavy ohledně bezpečnosti potravin a zdraví spotřebitelů. I přestože již existují regulace týkající se maximálních hygienických limitů OTA v určitých potravinách, dosud nebyly stanoveny regulační limity pro OTA v mase a masných výrobcích v Evropské unii. Konzumace těchto masných výrobků by tak mohla přispívat k vyššímu příjmu OTA v rámci stravy populace lidí, spolu s dalšími významnými zdroji OTA (Tolosa, 2020, Bhat et al., 2010, Dall'Asta et al., 2010).

V současné době jsou sýry a masné výrobky (zejména šunky) předmětem zvýšené pozornosti v oblasti regulace OTA. Evropská komise zdůraznila nutnost dalšího vědeckého výzkumu týkajícího se přítomnosti OTA v šunkách a stanovení regulačních limitů (EK, 2022).

Cílem této práce je vyhodnocení kontaminace OTA u 200 vzorků na vzduchu sušených šunek, u kterých může docházet ke kontaminaci prostřednictvím přenosu OTA ve svalovině nebo během výrobních procesů. Získané výsledky byly porovnány s výsledky relevantních studií, které se zabývají přirozeným výskytem OTA v šunkách sušených na vzduchu. Stanovení OTA bylo provedeno pomocí HPLC-FLD metody s předúpravou na imunoafinitních kolonkách (IAK).

1 Teoretická část

1.1 Mykotoxiny

Termín mykotoxin je odvozen z řeckého slova *mycos* či *mykes* (=houba) a latinského slova *toxicum* (=jed, otrava). Mikroskopické vláknité houby mohou produkovat mykotoxiny, což jsou sekundární toxické metabolity (Malíř et al., 2003, IARC, 1993). Sekundární metabolity nejsou nezbytné pro běžný růst a reprodukci hub, avšak mohou vyvolávat biochemické, fyziologické a patologické reakce u jiných organismů, včetně obratlovců, rostlin a mikrobů (Haschek & Voss, 2013, Pitt, 2000). Tyto sekundární metabolity jsou nízkomolekulární molekuly ($M_w < 700$), které jsou toxické i při nízkých koncentracích. Biosyntéza mykotoxinů probíhá za určitých mikroklimatických podmínek, které jsou převážně ovlivněny vlhkostí produktu a jeho vodní aktivitou, relativní vlhkostí vzduchu, teplotou, hodnotou pH, složením potravinové matrice, jejím fyzikálním stavem a přítomností plísňových spor (Haschek & Voss, 2013, Sforza et al., 2006).

Mykotoxiny jsou známé svými akutními, chronickými a pozdními toxickými účinky (Pleadin et al., 2019, Murphy et al., 2006). Onemocnění způsobená mykotoxiny se nazývají mykotoxikózy. Nejstarší známou mykotoxikózou u lidí je ergotismus způsobený ergotovými alkaloidy. Ergotové alkaloidy se vyskytují u jednořezných rostlin a napadají důležité kulturní plodiny pro člověka (pšenice, žito, oves, ječmen, kukuřice, rýže aj.). V historii byly ergotové alkaloidy hlavní příčinou nemoci, která je známá jako "oheň svatého Antonína" ("St. Anthony 's Fire"), pojmenovaná podle intenzivního pálení, které postihovalo oběti zejména na končetinách. Existují i záznamy o epidemii mezi Spartány kolem roku 430 př. n. l. a evropské epidemie sahající až do roku 857 n. l. Ergotismus je také spojen s událostmi čarodějnických procesů v Salemu v roce 1600 v Massachusetts (Richard, 2007, Murphy et al., 2006, Pitt, 2000).

Éra moderní mykotoxikologie začala na přelomu 50. a 60. let 20. století, kdy v důsledku zkrmování kontaminovaného krmiva, konkrétně brazilskou arašídovou moukou, ve Velké Británii zahynulo cca 100 000 kusů krůt na tzv. "Krutí X

onemocnění“. Po vypuknutí tohoto onemocnění, které způsobilo velké hospodářské ztráty se začaly objevovat aflatoxiny, které stojí za tímto onemocněním. (Pickova et al., 2021, Richard, 2007).

Mykotoxiny jsou běžným kontaminantem v potravinách a krmivech. Dřívější mylnou představou, že zdravotní rizika mykotoxinů jsou omezena převážně na rozvojové země Afriky a Asie, kde mají toxinogenní plísně vhodné klimatické podmínky pro svůj růst a rozmnožování, vyvracejí již několik let výzkumy z celého světa z průmyslově vyspělých států. Vlivem klimatických změn, především teploty a vlhkosti se v Evropě obecně změnil vzorec výskytu plísní (a jejich sekundárních metabolitů). To může například podporovat častější výskyt kontaminace aflatoxiny, které jsou obvykle spojené s teplejším klimatem. Toxické metabolity mikroskopických vláknitých hub negativně ovlivňují kvalitu potravin a krmiv a mohou být přítomny již v před sklizňové fázi (na úrovni pole) nebo v posklizňové fázi (během transportu, zpracování, skladování, krmení) (Battilani et al., 2016, Tirado et al., 2010, Coffey et al., 2009, Malíř & Ostrý, 2003, Pitt, 2000). I přes to, že jsou desítky let předmětem rozsáhlého výzkumu, zůstává kontaminace mikroskopickými vláknitými houbami stále výzvou. Riziko kontaminace lze částečně redukovat správnými zemědělskými a technologickými postupy, nikdy nelze však kontaminaci zcela zabránit.

Mezi hlavní producenty mykotoxinů patří rody *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Alternaria*, *Byssochlamys* (Pleadin et al., 2019, Pitt, 2000). V souvislosti s potravinami se mezi hlavní producenty mykotoxinů řadí *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*. Rod *Fusarium* je destruktivní patogen na obilninách a dalších komoditách a produkuje fusáriové mykotoxiny před sklizní nebo bezprostředně po sklizni, kdežto *Aspergillus* a *Penicillium* mohou být také rostlinnými patogeny nebo komenzály, ale jsou častěji spojovány s kontaminací potravin během sušení a skladování (např. kontaminace masných výrobků) (Mastanjević et al., 2023, Pitt, 2000). Existují stovky látek, které jsou chemicky charakterizovány a klasifikovány jako mykotoxiny, ale detailně bylo zkoumáno zhruba jen 50 z nich a pro člověka je významných zhruba 20 mykotoxinů. Mezi nejznámější zástupce mykotoxinů patří aflatoxiny, ochratoxiny, zearalenon, deoxynivalenol, HT-2 a T-2 toxiny, fumonisiny, citrinin, patulin a ergotové alkaloidy (CAST, 2003, Pitt, 2000). Lidé a zvířata jsou

mykotoxinům vystaveni orální, inhalační a dermální cestou. Mykotoxiny mají celou řadu škodlivých účinků, které zahrnují karcinogenitu, teratogenitu, mutagenitu, hepatotoxicitu, nefrotoxicitu, imunotoxicitu, neurotoxicitu, zažívací potíže a další (Malíř & Ostrý, 2003).

1.2 Mykotoxiny v potravinách a krmivech

Mikroskopické vláknité houby se nacházejí v potravinách rostlinného i živočišného původu a mohou v nich produkovat mykotoxiny. Jejich toxické metabolity není většinou možné sensoricky odhalit, což umožňuje těmto toxinům běžně pronikat do potravinového řetězce. Tyto toxiny se mohou projevovat v různých fázích potravinářské výroby, počínaje pěstováním a sklizní až po skladování konečných produktů. Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) odhaduje, že asi 25 % světové úrody je kontaminováno a ovlivněno mykotoxiny (Pleadin et al., 2019).

Mykotoxiny se nejčastěji dostávají do lidského těla prostřednictvím přímé konzumace kontaminovaných rostlinných produktů. Nicméně mohou se do organismu dostat i nepřímo prostřednictvím potravin živočišného původu, jako jsou vnitřnosti, maso, mléko nebo vejce, které pocházejí od zvířat, která jsou krmena kontaminovanými krmivy (Cavret & Lecoer, 2006, Gareis & Wolff, 2000). V případě masných výrobků může přítomnost mykotoxinů souviset i s kontaminací aditiv, která jsou používána při výrobě, například paprika, chilli, černý pepř (Vlachou et al., 2022, Picková et al., 2020, Little et al., 2003). Právě proto je velice důležitý monitoring výskytu mykotoxinů v potravním řetězci a provádění kontrolních opatření během celého výrobního procesu k minimalizaci výskytu mykotoxinů.

1.2.1 Systém zajištění bezpečnosti potravin a krmiv

V České republice kontrolu toxinogenních mikroskopických hub a mykotoxinů v celém potravinovém řetězci od primární produkce až po místa prodeje zajišťují v rámci své dozorové činnosti kontrolní organizace spadající pod Ministerstvo zemědělství; Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI), Státní veterinární

správa (SVS), Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ) a organizace spadající pod Ministerstvo zdravotnictví; Orgány ochrany veřejného zdraví (OOVZ).

Systematický výzkum a monitoring toxinogenních mikroskopických hub a mykotoxinů provádí pod vedením Ministerstva zdravotnictví Státní zdravotní ústav (SZÚ) v Praze (Malíř & Ostrý, 2003).

Zajištění bezpečnosti potravin byla jednou z klíčových priorit české vlády po vstupu do Evropské unie. V České republice je obsah mykotoxinů v potravinách regulován stávající legislativou Evropské unie pro aflatoxiny (B₁, B₂, G₁, G₂, M₁), OTA, deoxynivalenol, zearalenon a fumonisiny. Dále se dodržují doporučení pro expozici stanovená Společnou organizací pro výživu a zemědělství (FAO), výborem odborníků Světové zdravotnické organizace (WHO) pro potravinářská aditiva (JECFA) a Vědeckým výborem pro potraviny EU (EK, 2022, Logrieco & Visconti, 2004, Malir et al., 2006).

Rychlý systém varování pro potraviny a krmiva (RASFF) je klíčovým nástrojem evropské integrace, který byl spuštěn v roce 1979. Tento systém umožňuje rychlé a účinné sdílení informací o nebezpečných potravinách a krmivech mezi členy systému a Evropskou komisí. Tyto informace se sdílejí prostřednictvím různých typů oznámení, jako jsou varování, informace, odmítnutí na hranicích a novinky. Ve všech členských státech byla vytvořena kontaktní místa, ze kterých se odesílají informace o zjištění výskytu nebezpečného výrobku Evropské komisi (viz tab. 1). Pro ČR je kontaktní místo SZPI, celý systém je koordinován koordinací skupinou Bezpečnosti potravin, která je v gesci Ministerstva zemědělství (v součinnosti s Ministerstvem zdravotnictví) (EK, 2022, Pinotti et al., 2016).

Tabulka 1: Oznámení přijatá systémem RASFF v ČR v roce 2022

kategorie	produkt	nebezpečí	země původu
varování	bio kakao	aflatoxiny	Ghana
informace	brazilské oříšky	aflatoxiny	Bolívie
varování	melounová semínka	aflatoxiny	Čína
varování	melounová semínka	aflatoxiny	Indie
varování	rozinky	ochratoxin A	Uzbekistán
varování	bio kukuřičné lupínky	aflatoxin B ₁	Německo
varování	brazilské oříšky	aflatoxiny	Bolívie
varování	žitná mouka	ochratoxin A	Česká republika
varování	pistácie	ochratoxin A	Německo

(Informační centrum bezpečnosti potravin, Mze, 2022)

1.2.2 Prevence kontaminace mykotoxiny

Prevence výskytu nežádoucích mykotoxinů v potravinách a krmivech je klíčovým aspektem v zajištění bezpečnosti potravin. Tento proces zahrnuje opatření ke snížení rizika kontaminace surovin, odstraňování kontaminovaného materiálu z potravin a minimalizaci mykotoxinů ve finálním výrobku. Preventivní opatření lze rozdělit do 3 skupin: předsklizňový management, sklizňový management a posklizňový management. Řízení se zásadami dobré zemědělské praxe a správné výrobní praxe při manipulaci, skladování, zpracování a distribuci je zásadní pro co nejúčinnější zabránění kontaminace zemědělských produktů (Pleadin et al., 2019, Kabak et al., 2006).

Zahrnutí kontroly mykotoxinů do systému analýzy rizik a kontrolních bodů (HACCP), které je důležitou součástí celkového postupu k řízení, by mělo zahrnovat strategie pro prevenci, kontrolu a kvalitu od farmy až po vidličku. Začlenění doporučení týkajících se mykotoxinů do HACCP systému umožňuje zemědělským subjektům lépe monitorovat a minimalizovat rizika kontaminace v průběhu celého výrobního procesu (Murphy et al., 2006).

1.2.2.1 Předsklizňový management

Prvním krokem při kontrole kontaminace mykotoxiny je prevence již na úrovni před sklizní. Ačkoli je známo mnoho faktorů, které ovlivňují produkci mykotoxinů na poli, mezi nejdůležitější patří environmetální podmínky (především teplota a vlhkost vzduchu), tyto faktory však nelze zcela kontrolovat zásadami správné praxe. Faktory, které mají klíčový význam pro kontrolu mykotoxinů produkovaných plísněmi na poli jsou střídání plodin, kultivace půdy, zavlažování, prevence proti hmyzu, způsoby obdělávání půdy a způsoby hnojení (Kabak et al., 2006, Pleadin et al., 2019).

Správné naplánování výsadby a sklizně má významný vliv na výskyt chorob (pozdní obiloviny jsou náchylnější ke kontaminaci plísněmi během vlhkého podzimu). Výsadba odolnějších plodin vůči plísním může také významně přispět ke snížení rizika kontaminace mykotoxiny (Pleadin et al., 2019).

Je známo, že fungicidy mají významný vliv na kontrolu kontaminace plísněmi a produkci mykotoxinů, nebo například chemické ošetření proti plísním (kyselina

propionová a octová). Využití biokontroly pomocí netoxigenních kompetitivních mikroorganismů je také velice užitečná technologie, která může snížit kontaminaci mykotoxiny (např. aplikace netoxigenních kmenů *A. flavus*/*A. parasiticus* snižuje kontaminaci zemědělských produktů aflatoxiny) (Moore, 2022, Patharajan et al., 2011, Murphy et al., 2006, Horn et al., 2000).

1.2.2.2 Sklizňový management

Strategie sklizně zahrnují používání funkčního, čistého a suchého sklizňového zařízení a vhodných podmínek pro sklizeň (nízká vlhkost a plná zralost plodiny). Plodiny, jež jsou fyzicky poškozeny, jsou náchylnější k růstu plísní, proto je důležité zabránit těmto poškozením (je vhodné poškozené plodiny odstranit) (Pleadin et al., 2019, Kabak et al., 2006).

1.2.2.3 Posklizňový management

Opatření po sklizni zahrnují sušení, připravení vhodných podmínek pro skladování (teplota, vlhkost) a třídění viditelně kontaminovaných plodin plísněmi a odstraňování nežádoucích materiálů (plevy, prach, úlomky ze zemědělských komodit) (Kabak et al., 2006).

Existuje celá řada způsobů eliminace růstu toxinogenních plísní, například technologie ozařování zrn, pulzní elektrické pole, tepelné zpracování potravin (za vysoké teploty a tlaku), přidání aditiv (hydrogensířičitan sodný), využití mikroorganismů nebo jejich enzymů k degradaci mykotoxinů (bakterie, kvasinky) nebo balení finálních produktů s využitím modifikované atmosféry (např. oxid uhličitý) (Sipos et al., 2021, Karlovsky et al., 2016, Kabak et al., 2006).

1.3 Ochratoxin A

OTA patří mezi nejvýznamnější a nejškodlivější mykotoxiny, které se vyskytují v potravinách a je zodpovědný za řadu zdravotních problémů jak u zvířat, tak i u lidí (Bhat et al., 2010). OTA je běžným kontaminantem v celé řadě rostlinných a živočišných produktů, včetně obilovin, koření, kávy, kakaa, piva, vína, rozinek, luštěnin, jedlých vnitřností, ale i masa a masných výrobků (EFSA, 2020, Bellver Soto et al., 2014, Haighton et al., 2012, Streit et al., 2012, Serra Bonvehí, 2004). OTA byl objeven v Jižní Africe v roce 1965 Van der Merwem et al., kdy izolovali ze sterilní navlhčené kukuřičné mouky OTA a identifikovali ho jako toxický sekundární metabolit *A. ochraceus* (Van der Merwe et al., 1965a; Van Der Merwe et al., 1965b). Od jeho izolace a chemické charakterizace, až po současnost OTA zůstává předmětem intenzivního výzkumu. Studie dokazují, že OTA je nefrotoxický, hepatotoxický, embryotoxický, teratogenní, genotoxický, neurotoxický, imunotoxický a karcinogenní u mnoha živočišných druhů s rozdíly v závislosti na druhu a pohlaví (Malíř et al., 2013, El Khoury & Atoui, 2010). Podle mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC) byl OTA v roce 1993 klasifikován jako možný lidský karcinogen (2B). Častá expozice lidí nebo zvířat OTA může způsobit celou řadu zdravotních problémů. (IARC, 1993).

OTA se jako silný nefrotoxin podílí na některých onemocněních ledvin, a proto je velmi často asociován s Balkánskou endemickou nefropatií (BEN), která byla od 50. let 20. století popsána v omezené oblasti bývalé Jugoslávie, Rumunska a Bulharska. BEN byla považována za důsledek otravy mikroskopickými vláknitými houbami. Toto onemocnění je charakterizováno postupným neinfekčním zánětem tkáně ledvin, které vede až k chronickému selhávání těchto orgánů (Zhao et al., 2017, Malir et al., 2016, Stoev et al., 2010). Nicméně EFSA v předchozích hodnoceních (EFSA, 2006) a JECFA (FAO/WHO 2008, 2001) učinili závěr, že z dostupných epidemiologických studií není možné stanovit etiologickou souvislost mezi OTA a BEN. Předpokládá se, že výskyt BEN souvisí spíše s expozicí jiným toxinům než OTA, např. kyselině aristolochové (EFSA, 2020).

1.3.1 Fyzikální a chemické vlastnosti

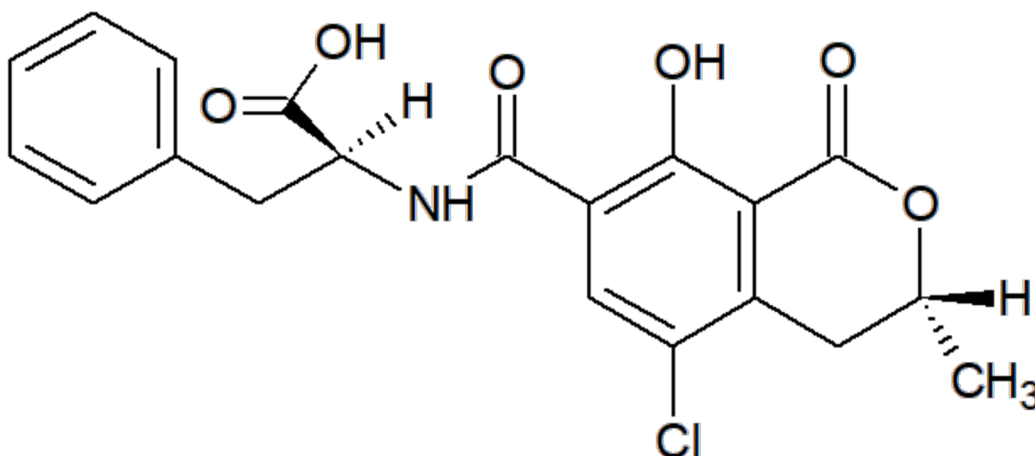
Registrační číslo CAS (Chemical Abstracts Services): No.:303-47-9.

Systematický název dle IUPAC (International Union of Pure and Applied):

(N-[[[(3R)-5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-7-isochromanyl]carbonyl]-3-phenyl-L-alanine).

Sumární (molekulový) vzorec: C₂₀H₁₈O₆ClN

Strukturní (konstituční) vzorec: OTA se skládá z para-chlorfenolového zbytku obsahujícího dihydroiso-kumarinovou skupinu, která je amidem spojena s L-fenylalaninem (El Khoury & Atoui, 2010, IARC, 1983).



Obrázek 1: Strukturní vzorec OTA (Lukáš Rejman, 2024, vytvořeno v ACD/ChemSketch 12.0)

Molekulová hmotnost: 403.82 g/mol (Ringot et al., 2006).

Teplota bodu tání: 169 °C (El Khoury & Atoui, 2010, IARC. 1983).

Popis: OTA je bílá krystalická sloučenina, dobře rozpustná v polárních organických rozpouštědlech, například v chloroformu, methanolu, ethanolu a málo rozpustná ve vodě. Je stabilní vůči tepelným úpravám a podmínkám nízkého pH (El Khoury & Atoui, 2010, Malíř & Ostrý, 2003). Klasické tepelné úpravy potravin, jako je vaření, pečení, smažení a pražení nezpůsobují významný nebo jen částečný pokles hladin OTA (Dahal et al., 2016, Pleadin et al., 2014, Abrunhosa et al., 2010).

Ochratoxiny představují významnou skupinu mykotoxinů, poprvé, jak již bylo zmíněno, izolovaných a popsáných v roce 1965 (Van Der Merwe 1965). Doposud byla identifikovaná řada chemických struktur ochratoxinů a jejich metabolitů u zvířat a rostlin. OTA se skládá z para-chlorfenolové skupiny obsahující dihydroisokumarinovou skupinu, která se peptidickou vazbou váže na L-fenylalanin. Mezi přirozeně vyskytující se formy ochratoxinů patří např. ochratoxin A (který je chlorovaný) a jeho deriváty, dále například ochratoxin B (OTB), což je dechlorovaný derivát OTA, ochratoxin C (OTC) ethylester fenylalaninu, methylester OTA a methyl a ethylester OTB. Dále existují např. hydroxyochratoxiny, např. 4-hydroxyochratoxin A (El Khoury & Atoui, 2010).

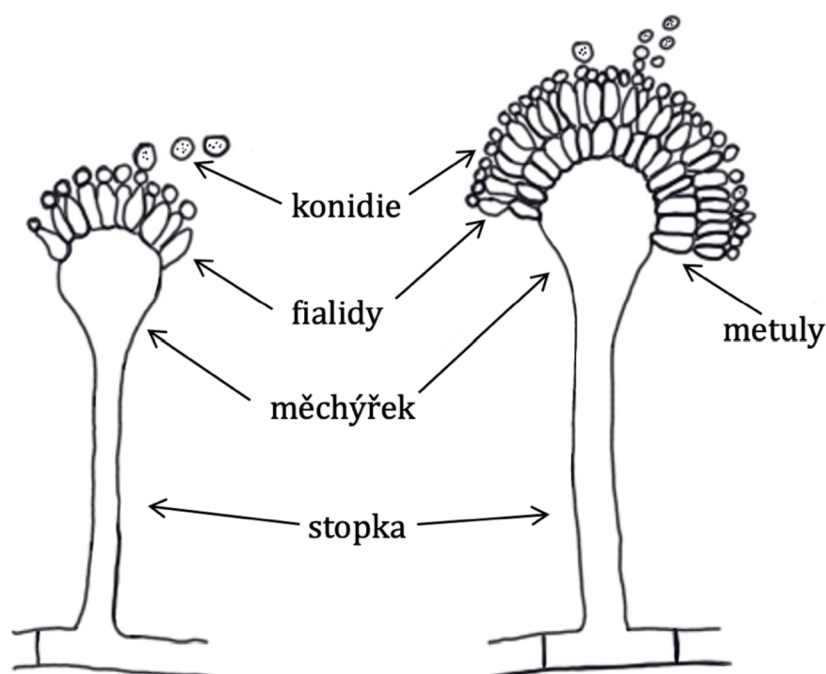
1.3.2 Producenti OTA

OTA produkují především rody *Aspergillus* a *Penicillium*. Tyto mikroskopické vláknité houby kontaminují celou řadu zemědělských komodit, živočišných produktů a zpracovaných potravin (Castella et al., 2002, Abarca et al., 1994). Vyskytují v závislosti na klimatických podmínkách. Druhy rodu *Aspergillus* převažují v oblastech tropického a mírného pásu, zatímco *Penicillium* jsou častější v chladnějších oblastech. Mezi důležité faktory produkce OTA patří teplota, vodní aktivita a složení substrátu. V závislosti na těchto podmínkách mohou druhy rodů *Aspergillus* a *Penicillium* produkovat současně několik mykotoxinů, např. OTA, OTB, a citrinin (Heussner et al., 2006).

1.3.3 Producenti OTA rodu *Aspergillus*

Většina druhů rodu *Aspergillus* produkujících ochratoxin patří do sekce *Circumdati* (*A. steynii*, *A. westerdijkiae*) a sekce *Nigri* (*A. carbonarius*, *A. niger*, *lascticoffeatus*, *A. sclerotioniger*, *A. foetidus* a *A. tubingensis*) (Akbar et al., 2020, Hayat et al., 2012). Dříve byl do sekce *Circumdati* řazen *A. ochraceus*. Novější výzkumy však ukázaly, že na základě molekulárně biologických metod se jedná o druh *Aspergillus westerdijkiae* (Wang et al., 2022, Gil-Serna et al., 2020, Aldred et al., 2008, Frisvad et al., 2004). *A. westerdijkiae* je významným producentem OTA v potravinách. Kromě hlavního producenta *A. westerdijkiae* bylo s produkcí OTA spojeno několik dalších druhů. Například *A. cretensis*, *A. flocculosus*, *A. sulphurous*, *A. albertensis*, *A. auricomus*, a *A. fumigates* (Wang et al., 2016).

V tropických oblastech jsou velmi často izolovány toxinogenní kmeny *A. westerdijkiae* jako kontaminanty potravin. Jak už bylo výše zmíněno, právě druhy rodu *Aspergillus* převažují v teplejších oblastech narozdíl od rodu *Penicillium* (Wang et al., 2016, Frisvad et al. 2004, Samson et al., 2004).

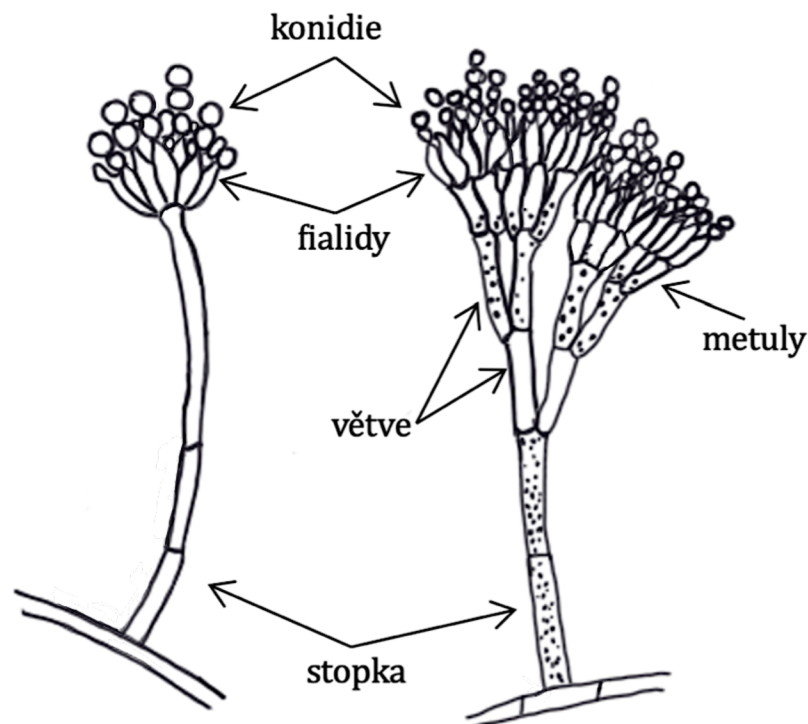


Obrázek 2: Mikrohabitus *Aspergillus* spp. (Lukáš Rejman, 2024, dle Ellis, 2007)

1.3.4 Producenti OTA rodu *Penicillium*

Mezi druhy produkující OTA z rodu *Penicillium* patří *P. verrucosum*, *P. nordicum*, *P. expansum*, *P. chrysogenum*, a *P. polonicum* (Chen et al., 2013, Hayat et al., 2012, Bogs et al., 2006, Larsen et al., 2001). Mezi nejčastější producenty OTA v sušených šunkách, které byly izolovány v několika evropských zemích se řadí *P. verrucosum* a *P. nordicum*. *Penicillium nordicum* obecně kontaminuje potraviny bohaté na sůl a bílkoviny, jako jsou sýry a sušené maso a je považován za důležitého producenta OTA (Stoll et al., 2013). Zatímco *P. verrucosum* obvykle kontaminuje obiloviny rostoucí v chladných a mírných pásmech severní a střední Evropy a v Kanadě, méně často je izolován z masných výrobků (Zadravec et al., 2020, Chen et al., 2013, Pitt, 2002).

Rod *Penicillium* převažuje v chladnějších oblastech, to dokazuje Vipotnik et al. (2017), ve své studii, kdy *P. nordicum* vykazuje nejnižší růstovou schopnost při 30 °C a s klesající teplotou se jeho růstová aktivita zvyšuje. Za mnoha laboratorních podmínek produkuje *P. nordicum* více OTA než *P. verrucosum* (Larsen et al., 2001).



Obrázek 3: Mikrohabitus *Penicillium* spp. (Lukáš Rejman, 2024, dle Abdel-Azeem et al., 2021)

1.3.5 Výskyt OTA v mase a masných produktech

Mikroskopické vláknité houby rodu *Aspergillus* a *Penicillium* představují v potravinářském průmyslu významnou problematiku. Jsou schopny růst i na povrchu suchých masných výrobků, díky své toleranci k nízkému pH a vysoké koncentraci soli. Tato schopnost jim poskytuje jistou ekologickou výhodu, což může vést ke snížení jakosti a bezpečnosti masa a masných produktů (Vipotnik et al., 2017, Pleadin et al., 2015).

OTA se může do masných výrobků dostávat přímou kontaminací, kdy je plísní a potažmo mykotoxiny kontaminován produkt v průběhu kteréhokoliv kroku výroby, nebo nepřímou, kdy dochází k přenosu mykotoxinů při zkrmování kontaminovaného krmiva zvířaty, například u prasat (tzv. "carry-over" efekt) (Tolosa et al., 2021, Völkel et al., 2011, Dall'Asta et al., 2010). Zvířata krmena kontaminovanými krmivy uvádí do pohybu enzymatické a mikrobiální přeměny, které vedou ke vzniku metabolitů. Tyto metabolity jsou pak dále adsorbovány do krevního oběhu a později vyloučeny močí nebo výkaly. Nebezpečné jsou v tomto případě jejich rezidua, která mohou zůstat v jedlých orgánech, jako jsou například ledviny, játra nebo svalovina (Adegbeye et al., 2020). Studie z mnoha zemí odhalily, že vepřové maso a výrobky z něj jsou významným zdrojem chronické dietární expozice ochratoxinu A u lidí, zejména pak výrobky z krve (jelita), orgány určené ke konzumaci, jako jsou ledviny či játra, nebo ze svalů, jako jsou sušené šunky či salámy (Pickova et al., 2022, Battaccone et al., 2010, Dall'Asta et al., 2010). Ačkoliv legislativa EU zatím nestanovuje povolený hygienický limit OTA v mase a masných výrobcích, stanovili si některé státy EU své vlastní limity (viz kapitola 1.3.7 Regulace OTA v potravinách). Problematika přítomnosti OTA v mase a výrobcích z něj je v současné době předmětem vědeckých stanovisek EFSA.

Mezi hospodářskými zvířaty jsou na akumulaci OTA zvláště citlivá prasata (EFSA, 2020, Fink-Gremmels & Van Der Merwe, 2019). Na druhou stranu přežvýkavci mohou pomocí svých symbiotických mikroorganismů hydrolyzovat peptidovou vazbu OTA na fenylalanin a ochratoxin α , který je obecně považován za netoxický (Loh et al., 2020).

Největší koncentrace OTA se v těle prasat obvykle nacházejí v tomto pořadí: krev > ledviny > játra > svaly > tuk. "Carry-over" efekt vzbuzuje velké obavy

v přenosu OTA do masných výrobků. Studie naznačují, že ačkoliv k přenosu OTA do masa dochází, jako hlavní problém se jeví plísně kontaminující povrch během procesu výroby konečného produktu. Ve své studii uvádí Dall'Asta et al. (2010), kdy systematicky sledovali původ OTA v sušených šunkách po dobu 40 dnů, kdy byla prasata krmena subchronickým množstvím OTA v krmné fázi. Přenos OTA ve svalovině při tzv. "carry-over" efektu se jevil jako obecně nižší, než produkce OTA populací plísní na povrchu sušené šunky (Dall'Asta et al., 2010).

Prostory, kde probíhá výroba mohou být významným zdrojem kontaminace plísněmi, vzhledem k příznivým podmínkám pro růst mikroskopických vláknitých hub (např. fáze zrání, kdy je vlhkost a teplota optimální pro jejich růst) (Chen et al., 2022, Parussolo et al., 2019, Dall'Asta et al., 2010).

Tabulka 2: Producenti OTA *Aspergillus* spp. a *Penicillium* spp. v mase a masných produktech

Druh	Potravina	Reference
<i>A. ochraceus</i> *	maso, sušená šunka, slanina, klobásky, sušené masné produkty	Tawakkol & Khafaga, 2007, Iacumin et al., 2011, Rodríguez et al., 2012, Zadavec et al., 2020
<i>A. niger</i>	sušené masné produkty	Zadavec et al., 2020
<i>A. westerdijkiae</i>	masné produkty, sušená šunka	Comi et al., 2014, Vipotnik et al., 2017, Meftah et al., 2018, Parussolo et al., 2019
<i>P. nordicum</i>	fermentované uzeniny, sušené masné výrobky, klobásky, salámy, slanina	Iacumin et al., 2009, Iacumin et al., 2011, Schmidt-Heydt et al., 2011, Ferrara et al., 2016, Iacumin et al., 2017, Meftah et al., 2018
<i>P. verrucosum</i>	klobásky, sušené masné produkty, sušená šunka	Battilani et al., 2007, Iacumin et al., 2011, Zadavec et al., 2020
<i>P. nalgiovense</i>	sušené masné produkty, salámy, fermentované masné výrobky	Castella et al., 2002, Sørensen et al., 2008, Perrone et al., 2015
<i>P. salami</i>	sušené salámy	Perrone et al., 2015
<i>P. solitum</i>	sušené salámy	Perrone et al., 2015

(Vlachou et al., 2022, upraveno L. Rejman)

*Dle posledních zjištění - *A. ochraceus* = *A. westerdijkiae*

1.3.5.1 OTA v sušených šunkách

Sušené šunky představují jednu z nejreprezentativnějších tradičních potravin, které se vyrábějí a konzumují po celém světě. Snížená vodní aktivita, obsah soli, a pH dosažené během zpracování a skladování je obvykle činí bezpečnými, protože společně brání rozvoji patogenních bakterií. Tyto vlastnosti však podporují povrchovou kolonizaci plísněmi. Kromě pozitivního vlivu mykobioty, která se běžně vyskytuje na povrchu během procesu zrání, může docházet k hromadění sekundárních metabolitů (OTA, aflatoxinů) toxinogenních plísní, které mohou mít za následek ohrožení zdraví konzumentů (Mastanjević et al., 2023, Rodrigues et al., 2019).

OTA je nejnebezpečnějším a nejčastěji zjišťovaným mykotoxinem v souvislosti s výrobou tradičních vzduchem sušených šunek (Chen et al., 2022, Tolosa et al., 2021, Berni et al., 2017). Právě proto se v posledních letech věnuje čím dál větší pozornost právě této komoditě. Sušené šunky jsou tradiční potraviny vyráběné po celém světě a vzhledem k jejich velké oblibě představují potenciální riziko pro lidské zdraví (Chen et al., 2022). Proto jejich výroba vyžaduje přísné kontroly kvality, aby byla zajištěna jejich zdravotní nezávadnost.

Za významného producenta OTA v sušených šunkách a dále pak v sušených fermentovaných salámech je považováno *Penicillium nordicum*. *P. nordicum* je psychrotrofní mikroskopická vláknitá houba, pro kterou jsou vhodnější podmínky s nižší teplotou. Proto jsou *Aspergillus spp.* méně častými toxigenními kontaminanty, protože vyžadují vyšší teploty než *Penicillium spp.* Nicméně mnoho studií popisuje výskyt *A. westerdijkiae* v celé řadě masných produktů po celém světě (Iacumin et al., 2020, Parussolo et al., 2019, Vipotnik et al., 2017). Vipotnik et al. (2017), studovali produkci *A. westerdijkiae* s použitím média na bázi sušené šunky. Optimální podmínky pro produkci OTA byly 0,94-0,97 a_w a 20-25 °C. Koncentrace vyprodukovaného OTA za těchto podmínek byla 1943 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Žádný OTA nebyl detekován při 0,85 a_w (Vipotnik et al., 2017).

Ačkoliv neexistuje společná legislativa EU pro maximální hygienické limity OTA v mase a masných výrobcích (např. sušené šunky), některé země EU si stanovili vlastní maximální limity pro tento typ potravin (viz tab. 4).

1.3.6 Toxicita OTA

OTA je považován za nejtoxičtějšího zástupce ze skupiny ochratoxinů, nicméně i ostatní ochratoxiny, nebo jejich metabolity a zejména směsi ochratoxinů mohou představovat vážné nebezpečí pro zdraví lidí a zvířat (Heussner & Bingle, 2015). Bylo prokázáno z mnoha živočišných druhů, že OTA je nefrotoxický, hepatotoxický, embryotoxický, teratogenní, neurotoxický, imunotoxický, genotoxický a karcinogenní (s druhovými i pohlavními rozdíly) (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007, Ringot et al., 2006).

OTA je toxický pro mnoho druhů zvířat, přičemž hlavním cílovým orgánem jsou ledviny. Další toxické účinky zahrnují kardiovaskulární a jaterní abnormality, poruchy koagulačních faktorů, doprovázené krvácením a trombózou ve slezině, játrech, ledvinách a srdci u potkanů, léze trávicího traktu a lymfoidních tkání u křečka, křehkost střev a léze ledvin u kuřat a myelotoxicitu u myši (Mohamed, 2015, Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007, O'Brien & Dietrich, 2005, Müller et al., 1995, Pohland et al., 1992).

1.3.6.1 Toxikokinetika OTA

Pro interpretaci *in vivo* dat z toxikologických zpráv je klíčové porozumění kinetice ochratoxinů (především OTA), včetně absorpce, distribuce, metabolismu a vylučování toxinů (Dixit et al., 2003). OTA je v organismu metabolizován různými cestami, ty zahrnují hydrolýzu, hydroxylaci, otevření laktonu a konjugaci, přičemž vzniká řada různých metabolitů (Wu et al., 2011). Metabolismus OTA zatím není zcela podrobně prozkoumán a současné poznatky o biotransformaci OTA jsou sporné (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007, Castegnaro et al., 2006, Ringot et al., 2006).

OTA je kumulativní toxická sloučenina s relativně rychlou absorpcí a pomalou eliminací (Ringot et al., 2006). Po absorpci z GIT se OTA váže na sérové proteiny (hlavně albumin). Až 99 % cirkulujícího OTA je vázáno na plazmatické proteiny. Právě proto je akumulace OTA v krvi, orgánech (játra a ledviny) a požitelných tkáních živočichů (svalovina) zvýhodněna jeho vysokou afinitou k vazbě na bílkoviny, což přispívá k dlouhému poločasu rozpadu, který se pohybuje v rozmezí

od několika dnů (u hlodavců) až po několik týdnů (u primátů, prasat a lidí), a umožňuje mu tak dosahovat vysokých koncentrací. Díky těmto jedinečným vazebným vlastnostem je poločas v séru u člověka 35,5 dne (Fink-Gremmels & Van Der Merwe, 2019, Duarte et al., 2012, Studer-Rohr et al., 2000). Pouze malé množství OTA se vyskytuje ve volné formě. Je známo, že značné rozdíly v sérových poločasech u různých druhů závisí na specifických faktorech (např. afinitě a stupni vazby na bílkoviny). Játra a ledviny jsou hlavními orgány biotransformace OTA. OTA se po vylučování žlučí vylučuje močí a stolicí (Ringot et al., 2006, Li et al., 2000).

1.3.6.2 Akutní a subakutní toxicita OTA

Akutní toxicita a poločas rozpadu jsou relativně nízké a vyznačují se velkými rozdíly v citlivosti u jednotlivých druhů. Bylo prokázáno, že hodnoty orální LD₅₀ se pohybují v rozmezí přibližně 20 a 46-58 mg/kg tělesné hmotnosti u potkanů a myší, 0,2-1 mg/kg tělesné hmotnosti u prasat, koček, králíků a psů. Byl také pozorován toxičtější účinek při intraperitoneálním podání než při perorálním (Pfohl-Leskowicz & Manderville, 2007, O'Brien & Dietrich, 2005).

Ve studiích akutní toxicity byla zaznamenána buněčná smrt vyvolaná OTA *in vivo* v ledvinových tubulech potkana, v myším embryu a játrech a *in vitro* v různých typech buněk, například v lidských lymfocytech (Assaf et al., 2004, Wei & Sulik, 1993, Albassam et al., 1987).

1.3.6.3 Chronická toxicita OTA

Mnohem větší obavy vzbuzují spíše chronické účinky OTA, které jsou v rozvinutých státech mnohem častější než akutní expozice. Chronická expozice nízkým dávkám OTA by mohla být mnohem škodlivější než akutní expozice vysokým dávkám a je zodpovědná za nefrotoxicitu (Malir et al., 2013, Pfohl-Leskowicz & Manderville, 2007). Dlouhodobá expozice OTA je považována za původce nefropatií u několika druhů hospodářských zvířat, zejména u prasat (O'Brien & Dietrich, 2005).

Nefrotoxicita OTA je důsledkem akutní, subakutní a také chronické expozice, přičemž z hlediska veřejného zdraví je chronická expozice v tomto ohledu

nejvýznamnější (Malir et al., 2013). Nefrotoxický účinek je dobře zdokumentován u savců a ptáků. Studie v Dánsku, Skandinávii, Maďarsku a Polsku prokázaly, že OTA hraje hlavní roli v etiologii prasečí nefropatie. Jak už bylo zmíněno výše, OTA bývá velice často spojován s Balkánskou endemickou nefropatií (BEN). Podílel se také na chronické intersticiální nefropatii (CIN) v Tunisku a dalších severoafrických zemích (Grosso et al., 2003, Pfohl-Leszkowicz et al., 2002, Krogh et al., 1973).

Ačkoliv je OTA primárně nefrotoxický, může působit imunotoxicky, hepatotoxicky, teratogenně (Jennings-Gee et al., 2010). V *in vivo* a *in vitro* studiích byly prokázány genotoxické účinky, nicméně výsledky těchto studií nejsou konzistentní (Klarić et al., 2010). Na základě dostatečných důkazů o karcinogenitě u pokusných zvířat se předpokládá, že je OTA možným humánním karcinogenem (klasifikován jako 2B), nicméně předpověď účinků karcinogenů na člověka z dat získaných na zvířatech je obtížná a představuje značnou výzvu (Mally et al., 2007, Ringot et al., 2006).

1.3.7 Regulace OTA v potravinách a krmivech

Vzhledem ke skutečnosti, že OTA kontaminuje širokou škálu zemědělských komodit a produktů po celém světě, může docházet k překročení limitů expozice člověka a zvířat. Proto je nezbytné, aby se problematika regulace OTA řešila na globální úrovni. Spolupráce mezi mezinárodními organizacemi, vládami a vědeckými institucemi je klíčová pro výměnu informací, výzkum a vytváření mezinárodních standardů (Abrunhosa et al., 2010, Bayman & Baker, 2006).

Evropská komise stanovila v návaznosti na směrnici rady 2002/32/ a s ohledem na doporučení Komise 2006/576 a 2016/1319 orientační hodnoty pro OTA v doplňkových a kompletních krmivech (viz tab. 3).

Na základě různých přístupů byly odhadnuty různé úrovně tolerovaného příjmu pro člověka. Společný výbor expertů FAO/WHO pro potravinářská aditiva (JECFA) odhadl provizorní tolerovaný týdenní příjem (PTWI) OTA na 100 ng/kg tělesné hmotnosti (14,3 ng/kg tělesné hmotnosti/den). Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) stanovil tolerovaný týdenní příjem pro OTA na 120 ng/kg tělesné hmotnosti (17 ng/kg tělesné hmotnosti/den) (EFSA, 2010, FAO/WHO, 2008).

Maximální limity pro OTA v různých potravinách jsou stanoveny v Nařízení komise (EU) 2023/915 (viz přílohy tab. 8) o maximálních limitech některých kontaminujících látek v potravinách a o zrušení nařízení (ES) č. 1881/2006. Nařízení nezahrnuje žádné regulační limity pro OTA v mase a masných výrobcích. V návaznosti na poslední aktualizaci nařízení Komise (EU) 2022/1370, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, pokud jde o maximální limity ochratoxinu A v některých potravinách, vyzvala Evropská komise k dalšímu monitorování přítomnosti OTA u sýrů a šunek (EK, 2023, EK, 2022).

Některé země EU, například Itálie, Dánsko, Polsko, Estonsko, Rumunsko a Slovensko si stanovily vlastní maximální limity pro jedlé vnitřnosti, maso a masné výrobky (viz tab. 4). Další evropské země, ani kontinent Ameriky či Asie nestanovily maximální povolené množství OTA nebo aflatoxinů v masných výrobcích (Tolosa, 2020, Vila-Donat et al., 2018, Pietruszka et al., 2017, Ministero della Sanita 1999) .

Tabulka 3: Orientační hodnoty pro OTA v krmivech

Krmivo	OTA (mg/kg)
Obiloviny a výrobky z obilovin	0,25
Krmné směsi pro:	
Prasata	0,05
Drůbež	0,1
Kočky a psy	0,01

(EFSA, 2023)

Tabulka 4: Národní limity některých zemí EU

Stát	Potravina	Maximální limit (ng/g)
Itálie	vepřové maso, výrobky z vepřového m	1
Dánsko	vepřové ledviny	10
Polsko	živočišné tkáně (ledviny, játra a svaly	5
Estonsko	vepřová játra	10
Rumunsko	vepřové ledviny, játra a maso	5
Slovensko	maso	5

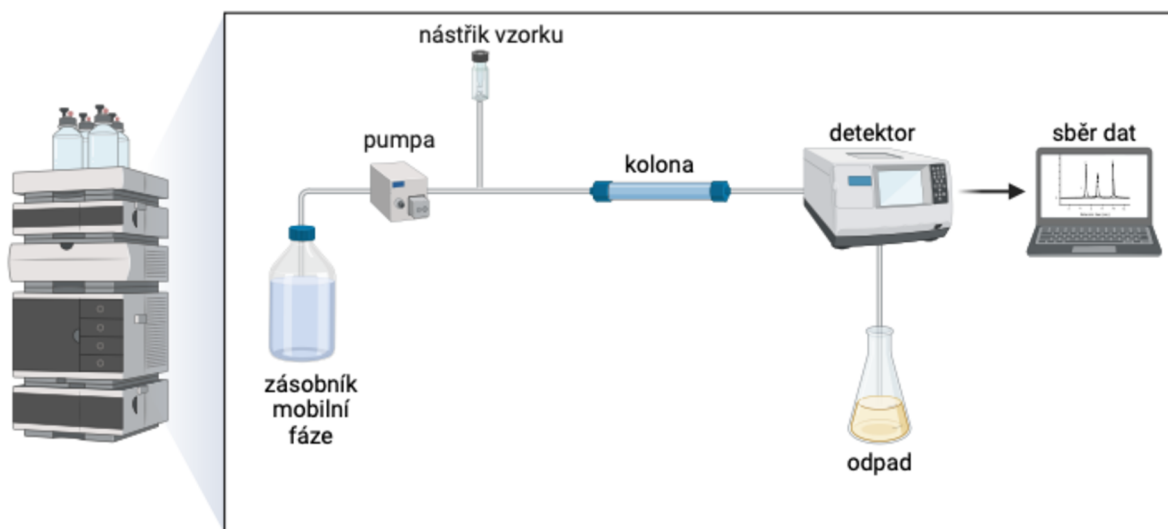
(Tolosa, 2020, Vila-Donat et al., 2018, Pietruszka et al., 2017, Ministero della Sanita, 1999)

1.3.8 Analytické metody pro stanovení OTA

Obecně nejdůležitějšími kroky v každé analýze je odběr vzorků a zpracování vzorku, extrakce a následná purifikace obsažených analytů, separace a detekce. Postup je zvolen dle předem vybrané analytické metody pro stanovení OTA. Mezi tradiční a v současné době nejčastěji používané metody se řadí vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS) a enzymová imunoanalýza (ELISA) (Chen et al., 2022, Malir et al., 2016).

1.3.8.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC byla vyvinuta koncem 60. let 20. století a jedná se o běžnou metodu pro monitorování různých mykotoxinů v potravinách a krmivech (schéma kapalinového chromatografu viz obr. 4) (Chen et al., 2022). Jde o separační metodu, která využívá rozdílné afinity látek v analyzované směsi k pevné (stacionární) a tekuté fázi (mobilní). Pevná fáze je umístěna v koloně a slouží k zachycení látek. Tekutá fáze prochází kolonou pod vysokým tlakem, která obsahuje pevnou nepohyblivou fázi (sorbent). Po nástřiku vzorku na kolonu jsou analyty rozděleny na základě různých interakcí s pevnou a kapalnou fází a jsou identifikovány pomocí detektoru. Využívají se různé typy detektorů, např. fluorescenční detektor (FLD), detektor indexu lomu (RID), hmotnostní spektrometrické detektory (MS), spektrofotometrické detektory (UV/VIS). Adsorpční schopnost různých vzorků v pevné a kapalně fázi, vede k různým retenčním časům a plochám píků, na základě, kterých je možné analyt kvantifikovat (Chen et al., 2022, Vlachou et al., 2022, Wacoo et al., 2014, Van Egmond, 1991, Schweighardt et al., 1980).



Obrázek 4: Schéma kapalinového chromatografu (Lukáš Rejman 2024, vytvořeno v BioRender)

1.3.8.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS)

Jedná se o spojení HPLC v tandemu s hmotnostním spektrometrem (MS). Hmotnostní spektrometrie je separační a současně analytická metoda. Spojení LC-MS umožňuje jednoznačnou identifikaci mykotoxinu. Metodu lze použít ke sledování více mykotoxinů najednou. HPLC-MS se vyznačuje vysokou citlivostí a selektivitou (Rodriguez et al., 2012, Malir et al. 2003).

1.3.8.3 Enzymová imunoanalýza (ELISA)

ELISA je imunoenzymatická reakce, která je založena na vysoce specifické vazebné reakci mezi antigenem (mykotoxinem) a protilátkou, u níž se měří množství navázaných látek pomocí přidání enzymaticky značeného antigenu nebo protilátky, které se specificky vážou s antigenem nebo protilátkou. Specifická vazba antigenu na protilátku vede k vysoké citlivosti a specifičnosti metody ELISA (Chen et al., 2022, Zadavec et al., 2020, Pestka et al., 1981). Imunoenzymatické metody mohou být kompetitivní nebo nekompetitivní (Malir et al., 2003). Pro stanovení mykotoxinů se obvykle používá kompetitivní ELISA, kdy dochází ke kompetitivní reakci mezi

cílovým analytem (mykotoxinem) a enzymem označeným analytem, který je přidán do vzorku. Čím více je cílového analytu ve vzorku, tím méně se naváže enzymem označeného analytu na povrchově vázané protilátky a tím menší je detekovatelný signál (absorbance). Enzymová imunoanalýza je vhodná pro rychlý screening většího množství vzorků (Wacoo et al., 2014, Zheng et al., 2006, Solti et al., 1997).

1.4 Sušené šunky

1.4.1 Historie

Sušená šunka je tradiční potravina, která si získala oblibu po celém světě. Přestože různé země mají své vlastní přístupy k výrobě, existují společné charakteristiky a technologie. Postup výroby se v různých částech světa může lišit v závislosti na místních preferencích, surovinách a výrobních technologiích. Historicky jsou sušené šunky řazeny mezi nejstarší masné výrobky. Mají dlouhou historii sahající do dob starých Řeků. Už v roce 160 př.n.l. byl popsán technologický způsob suchého nasolování kýt s kostí, což se v zásadě podobá postupům používaným v dnešní době. V období císařství starých Římanů byla velká potřeba sušených šunek částečně pokryta dovozem z provincií z Francie, severního Španělska a dnešní Belgie (Toldrá, 2002, Kameník, 2012). Také v Číně existuje starobylá tradice výroby sušených šunek, s nejproslulejším výrobkem šunkou Jinhua (Wang et al., 2021). Sušené šunky se řadí mezi nejdražší masné výrobky. Je kladen vysoký důraz na kvalitu vstupní suroviny a dodržení správného technologického procesu. Tento typ masných výrobků je obecně považován za typický středomořský produkt, i když se vyrábí i mimo jižní Evropu. Středomořské druhy sušené šunky se vyznačují suchým solením a dlouhou dobou zrání (až 24 měsíců). Naopak severoevropské druhy šunky sušené na sucho se vyznačují uzením a následným krátkým zráním. Tradice spojená s exkluzivitou a náročností výroby dodává sušeným šunkám prestiž a výjimečnost na trhu s masnými výrobky (Petrova et al., 2015, Benedini et al., 2012).

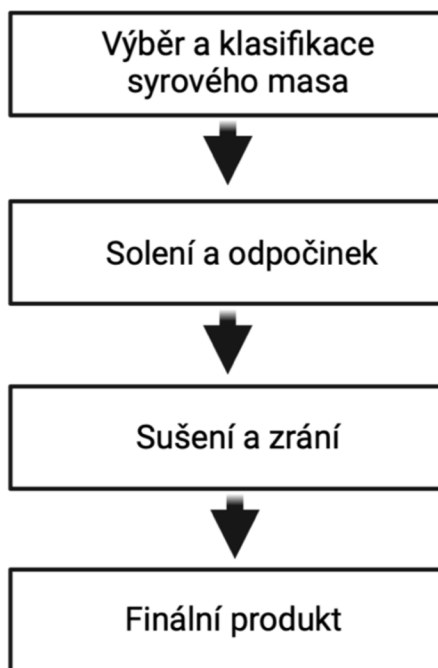
1.4.2 Typy vzduchem sušených šunek

V Evropě patří mezi nejznámější typy vzduchem sušených šunek několik specialit; parmská šunka, známá též jako Prosciutto di Parma, Prosciutto Crudo di Parma nebo pak Prosciutto di San Daniele, Pancetta, originální italská slanina či Coppa sušená krkovice původem ze severní Itálie, reprezentují jedny z nejznámějších italských delikates. Šunky Serrano a Iberico pocházející ze Španělska, jsou rovněž významnými zástupci ze světa vzduchem sušených šunek,

kdy se dlouholetá tradice a kvalita odrážejí v těchto chutných a aromatických masných produktech. Dále pak například šunka Bayonne nebo Noir de Bigorre z Francie (Petrova et al., 2015, Toldrá, 2002). Vzduchem sušené šunky mají své tradiční názvy (viz přílohy tab. 10).

1.4.3 Technologický postup výroby sušených šunek

Pro výrobu sušených šunek je důležité udržovat maso v co nejnižší úrovni mikrobiální kontaminace. Doporučuje se 10^2 - 10^3 /g nebo na cm^2 , hodnota pH by měla být v rozmezí 5,5-5,8 (Toldrá, 2002). Zjednodušené schéma postupu výroby (viz obr. 5). Po výběru a klasifikaci syrového masa lze technologický postup výroby vzduchem sušených šunek rozdělit do tří fází: fáze solení, fáze odpočinku (vyrovnávání koncentrace aditiv – soli), kdy se šunka zbavuje přebytečné vody a konzervuje se a fáze sušení (zrání). Solení a sušení-zrání jsou nejdůležitějšími kroky výroby, při nichž se vytváří především chuť konečného produktu. Délky jednotlivých fází se liší v závislosti na druhu sušené šunky (Petrova et al., 2015, Čandek-Potokar & Škrlep, 2012, Toldrá, 2002).



Obrázek 5: Fáze výroby vzduchem sušených šunek (Lukáš Rejman, 2024, vytvořeno v BioRender)

1.4.3.1 Fáze solení a odpočinku

Prvním krokem při výrobě sušených šunek je fáze solení, případně se přidávají i další aditiva (koření, askorbát). Po porážce jsou čerstvě nařezané a očištěné kýty zasypány solí, kdy je pokryt celý jejich povrch. Rychlost difúze soli do masa je dána koncentrací soli, tloušťkou masa, přítomností bariér v mase (pojivová tkáň) nebo například tím, jestli bylo maso předtím zmrazeno, což urychluje difúzi. Množství soli a doba solení se liší u jednotlivých druhů sušených šunek. Teplota během solení je obecně cca 0-5 °C. Existuje několik typů solení; solení na sucho, solení lákem, injektáž láku do masa (Čandek-Potokar & Škrlep, 2012, Kameník, 2012, Toldrá, 2002).

Po nasolení následuje fáze vyrovnávání, kdy je klíčové dosáhnout rovnoměrného rozložení aditiv v celém kusu masa a poklesu a_w na 0,95 (čím vyšší je hodnota a_w , tím více je prostředí vhodné pro růst bakterií a plísní). Tato část je klíčová pro další kroky výroby, protože je nezbytná pro stabilitu masa z mikrobiologického hlediska (Kameník, 2012). Úplná difúze soli do celého kusu masa trvá obvykle 1-2 měsíce, v závislosti na velikosti kusu masa, pH, přítomnosti intramuskulárního tuku a teplotě komory (Petrova et al., 2015, Laureati et al., 2014, Toldrá, 2002).

1.4.3.2 Fáze sušení a zrání

Tradiční sušení v dřívějších dobách probíhalo bez přísné kontroly teploty a vlhkosti. Sušilo se v místnostech se suchými klimatickými podmínkami, například ve španělských horách, nebo v údolí Parmy či Bayonne. Dnes sušení probíhá v sušících komorách, kde je automaticky počítačem kontrolována teplota, rychlost proudění vzduchu a relativní vlhkost. Aby byla dodržena cirkulace vzduchu, nesmí se jednotlivé kusy šunky dotýkat. Po dosažení a_w 0,95 může být produkt přesunut z chladírenských teplot do prostor, kde se teplota pohybuje okolo 22-24 °C, aby došlo k nastartování enzymatické aktivity, poté je teplota opět snížena na 16-18 °C (Petrova et al., 2015, Kameník, 2012, Toldrá, 2002).

Délka trvání fáze sušení a zrání se liší dle typu sušené šunky. Pro sušené šunky sušené za sucha může fáze sušení a zrání trvat 2-3 měsíce, až 2-3 roky u

nejkvalitnějších variant. Během sušení klesá hmotnost masa, vyvíjí se chuť a aroma a mění se textura produktu. Ztráta vody zvyšuje tuhost a krájitelnost sušené šunky. Postupným sušením klesá hodnota vodní aktivity (pod 0,89 a_w) (Toldrá, 2002).

Prodloužením doby zrání dochází k vyššímu stupni enzymatického rozkladu, což přispívá ke zlepšení chuti a vůně konečného produktu, čímž se zvyšuje celková kvalita vzduchem sušené šunky (Kadlec et al., 2012, Kameník, 2012, Toldrá, 2002).

Nejkvalitnější sušené šunky se prodávají celé s kostí nebo bez kosti. V obchodech se více setkáváme s vykostěnými, na plátky nakrájenými sušenými šunkami, které jsou poté vakuově baleny v ochranné atmosféře a distribuovány do obchodních řetězců (Toldrá, 2002).

2 Metodika

2.1 Přístroje a zařízení

- kapalinový chromatograf v sestavě Agilent 1260 Infinity II + 1260 Infinity II fluorescenční detektor (Agilent, Santa Clara, CA, USA), zakoupen od HPST s.r.o. (Praha, CZ);
- analytická kolona (Kinetex C18, 2,6 μm , 100 Å, 50x2,1 mm) spojená s předkolonou Security GuardTM (Phenomenex C18, 4x2 mm), zakoupena od Chromservis s.r.o. (Praha, CZ);
- automatická pipeta Gilson PIPETMAN (10-100 μl , 100-1000 μl , 1-10 ml), zakoupena od Fisher Scientific, spol. s.r.o. (Pardubice, CZ);
- analytická váha KERN EW1500-2 (KERN & SOHN GmbH, DE), zakoupeno od Fisher Scientific, spol. s.r.o. (Pardubice, CZ);
- centrifuga MPW 351e (MPW MED. instruments, PL) zakoupeno od Unimed Praha s.r.o. (Praha, CZ);
- homogenizátor A: Ultra-Turrax T 50 digital (IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE), zakoupeno od Fisher Scientific, spol. s.r.o. (Pardubice, CZ);
- homogenizátor B: Ultra-Turrax T 10 basic (IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE), zakoupeno od Fisher Scientific, spol. s.r.o. (Pardubice, CZ);
- Reax Multi třepačka (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, DE), zakoupena od Fisher Scientific, spol. s.r.o. (Pardubice, CZ);
- filtrační zařízení s fritou Morton S3, průměr frity 40 mm (KAVALIER GLASS a.s., Praha, CZ);
- zařízení pro řízený průtok imunoafinitní kolonkou (Bakerbond), zakoupeno od VWR (Stříbrná Skalice, CZ);
- výrobek ultračisté vody MicroPure UV (Thermo Scientific, Barnstead, USA) zakoupeno od Fisher Scientific, spol. s.r.o. (Pardubice, CZ);
- ultrazvuková lázeň FB15058 zakoupeno Fisher Scientific, spol. s.r.o. (Pardubice, CZ);
- koncentrátor vzorků Evaterm (Ing. Hanuš, Brno, CZ);

- Vortex 3 (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE), zakoupeno od Fisher Scientific, spol. s.r.o. (Pardubice, CZ);
- horkovzdušná sušárna Heratherm OMH400 (Thermo Fisher Scientific, DE), zakoupeno od Trigon-plus® (Praha, CZ);
- mrazící box;
- chladnička.

2.2 Spotřební materiál

- Ochraprep® imunoafinitní kolonky (R-Biopharm, Glasgow, GB), zakoupeno od Jemo Trading s.r.o. (Bratislava, SK);
- filtrační papíry KA-2M zakoupeny od Papírna Pernštejn s.r.o., (Pernštejn, CZ);
- nylonové injekční filtry (13 mm, 0,22 µm), (Labstore, GB), zakoupeny od HPST s.r.o. (Praha, CZ);
- špičky na pipety (200 µl, 1000 µl, 10 ml);
- kónické plastové zkumavky s uzávěrem (50 ml);
- injekční stříkačka (5 ml);
- vialky (4 ml) a 1,5 ml se septem v kombinaci PTFE a silikonu;
- kuchyňská odměrka;
- plastové prkénko;
- kuchyňský nůž;
- kuchyňská stěrka;
- uzavíratelné plastové krabičky (100 ml).

2.3 Použité chemikálie

- acetonitril (C_2H_3N);
- ultračistá voda (odpor vody $>18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ při $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$);
- methanol (CH_3OH);
- dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$);
- hydrogenfosforečnan disodný (Na_2HPO_4);
- chlorid sodný ($NaCl$);
- standard OTA (*Petromyces albertensis*, $\geq 98\%$, HPLC) (Sigma-Aldrich spol. s r. o. zakoupeno od VWR (Stříbrná Skalice, CZ);
- ledová kyselina octová 100% (CH_3COOH);
- kyselina chlorovodíková 37% (HCl);
- *RBS™ 35 (Carl Roth GmbH + Co. KG) zakoupeno od P-LAB a. s. (Praha, CZ).

Použité chemikálie byly vždy v čistotě HiPerSolf CHROMANORM®.

*RBS™ 35 je víceúčelový alkalický mycí prostředek, který je velmi účinný i při nízkých koncentracích s vysokými smáčecími a emulgačními vlastnostmi. Tento účinný detergent, se využívá k dekontaminaci radioaktivních a odpadních proteinů, lipidů, olejů a vybraných mykotoxinů. Používá se k ručnímu čištění, máčení nebo v ultrazvukové lázni. Je biologicky odbouratelný (Chemical Products R. Borghgraef s. a., 2024).

2.4 Roztoky

2.4.1 Fosfátový pufr (PBS)

Do odměrné baňky o objemu 1000 ml bylo naváženo na analytických váhách následovně: 0,62 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 2,271 g Na_2HPO_4 , a 9 g $NaCl$, poté byla baňka doplněna ultračistou vodou, pH bylo upraveno kyselinou chlorovodíkovou na 7,4.

2.4.2 Mobilní fáze

Mobilní fáze byla složena ze dvou rozpouštědel A a B. Které byly kombinovány v poměru 40:60 (A:B). Rozpouštědlo A: acetonitril:kyselina octová, 99:1, rozpouštědlo B: voda:kyselina octová, 99:1.

2.4.3 60% Acetonitril

Do baňky o objemu 1000 ml bylo odměřeno 600 ml acetonitrilu a následně byla baňka doplněna po rysku ultračistou vodou.

2.4.4 Eluční roztok

Eluční činidlo/roztok pro OTA byl připraven v baňce o objemu 100 ml. Do baňky byl odměřen methanol a kyselina octová v poměru 98:2 (CH₃OH:CH₃COOH, 98:2 v/v).

2.4.5 Zásobní roztok OTA

Původní lahvička standardu obsahovala 1000 µg pevného OTA, aby bylo možné s OTA pracovat, byl rozpuštěn v 5 ml methanolu. Kvantitativně byl roztok OTA převeden do větší baňky o objemu 100 ml, k doplnění byl použit methanol. Takto připravený zásobní roztok o koncentraci 10 µg/ml byl skladován při teplotě -20 ± 0.5 °C. Za těchto podmínek by měl být OTA stabilní 1 rok.

2.4.6 Pracovní roztok OTA

Pracovní standardní roztok byl připraven odpipetováním 100 µl ze zásobního roztoku OTA do 25 ml baňky, k doplnění byl použit methanol, aby se dosáhlo objemu 25 ml. Pracovní standard o koncentraci 40 µg/l byl skladován při -20 ± 0.5 °C. Za těchto podmínek by měl být stabilní 1 rok.

Všechny roztoky byly skladovány při teplotě 4 °C (± 0,5 °C), před použitím vytemperovány na teplotu laboratoře 21 °C (± 0,5 °C). Roztoky byly připravené v ultračisté vodě pomocí přístroje MicroPure UV (Thermo Scientific, Barnstead, USA).

2.5 Použité programy a software

- Microsoft® Excel, verze 2016, licence: předplatné Microsoft 365®, (Microsoft Corporation, Washington, USA).
- Microsoft® Word, verze 2016, licence: předplatné Microsoft 365®, (Microsoft Corporation, Washington, USA).
- Software Agilent OpenLab data (Santa Clara, Ca, USA), zakoupen od společnosti HPTS s.r.o. (Praha, CZ).

2.6 Požadavky na pracovní techniku

Při manipulaci s laboratorními vzorky je nezbytné dodržovat přísná pravidla a postupy s cílem minimalizovat riziko sekundární kontaminace mikroskopickými vláknitými houbami. To zahrnuje používání vhodných obalů pro vzorky a dodržování správných skladovacích podmínek, které eliminují možnost sekundární kontaminace.

Pro zabránění kontaminace mezi jednotlivými vzorky, je nezbytné pravidelně čistit zařízení používaná k homogenizaci (dezinfekce pomocí methanolu a následně oplach destilovanou vodou). Homogenizaci vzorku je vhodné provádět ve speciálních prostorách jako je digestoř, která poskytuje izolované prostředí pro minimalizaci kontaminace (Skřehot, 2020, Škarková, 2011).

Skladování připravených zásobních roztoků a zásobního standardu musí být zajištěno tak, aby nedocházelo k jejich znehodnocení, což by mohlo mít zásadní vliv na výsledek analýzy (Škarková, 2011). Zásobní roztoky chemikálií byly skladovány v chladničce při teplotě 4 °C ($\pm 0,5$), zásobní roztok OTA byl skladován v mrazícím boxu při teplotě 20 (± 0.5 °C).

Manipulace se standardy vyžaduje používání ochranných pomůcek a dodržování specifických pracovních postupů pro bezpečnou práci s toxickými látkami a karcinogeny.

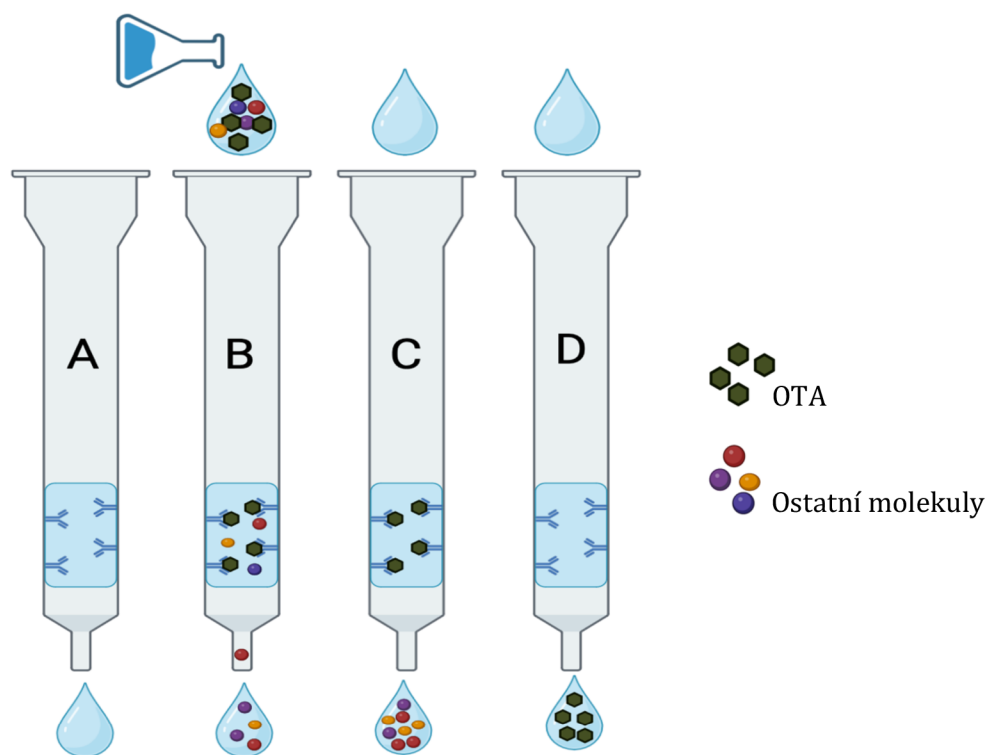
2.7 Čištění skla – dekontaminace

Laboratorní sklo a ostatní pomůcky (nádobí) kontaminované OTA byly dekontaminovány v alkalickém roztoku RBS™ 35. Byl připraven 2% roztok, při teplotě 55 °C, do kterého bylo ponořeno veškeré laboratorní sklo a pomůcky, které byly po extrakci OTA použity. Takto byly v lázni ponořeny po dobu nejméně 30 minut. Po dekontaminaci bylo nádobí ponořeno do horké vody, kde bylo mechanicky opláchnuto. Nakonec bylo nádobí ponořeno a opláchnuto v destilované vodě.

Nádobí bylo sušeno v sušárně při teplotě 70 °C po dobu 45 minut. Poté bylo pečlivě opláchnuto methanolem. Po odpaření methanolu bylo čisté nádobí vráceno do odpovídajících úložných prostor.

2.8 Princip metody

OTA je extrahován ze vzorku sušené šunky pomocí imunoafinitních kolonek (IAK). Jednotlivé IAK obsahují gelovou suspenzi, na kterou jsou vázány monoklonální protilátky. Pokud je OTA ve vzorku přítomen, váže se na tyto protilátky. IAK využívají specifické interakce protilátek a antigenu, díky čemuž při přečištění extraktu pomocí IAK dochází k minimální ztrátě analytu a maximální eliminaci interference. Ostatní látky zachycené v gelu jsou odstraněny mycím roztokem fosfátového pufru (PBS). Po promytí je OTA uvolněn z komplexu antigen-protilátka pomocí elučního činidla – okyseleného methanolu (schéma viz obr. 6). Po eluci z imunoafinitní kolony je OTA dále detekován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí (HPLC-FLD). Pro znázornění chromatografického měření koncentrace OTA ve vzorku (viz přílohy Graf 1).



A-Kondicionace, B-Dávkování vzorku, C-Promytí, D-Eluce

Obrázek 6: Schéma IAK (Lukáš Rejman 2024, vytvořeno v BioRender)

3 Pracovní postup

3.1 Odběr, doprava a skladování vzorků

V roce 2023 bylo zakoupeno celkem 200 vzorků sušených šunek v různých obchodních řetězcích v různých městech České republiky. Všechny vzorky byly různých šarží a pocházely z několika států EU, z Itálie 92 vzorků (46 %), Španělska 65 vzorků (32,5 %), Německa 38 vzorků (19 %), z Francie 3 vzorky (1,5 %) a z České republiky 2 vzorky (1 %). Informace o testovaných vzorcích (viz přílohy tab. 9).

Všechny vzorky byly pečlivě zaevidovány. Informace o každém vzorku obsahovala název produktu, cenu, údaje o výrobcí, datum spotřeby, místo nákupu a šarži. Po dopravení vzorků do laboratoře bylo všech 200 vzorků řádně uskladněno v mrazícím boxu při teplotě $-20 (\pm 0.5 \text{ } ^\circ\text{C})$.



Obrázek 7: Původ zakoupených šunek (Lukáš Rejman, 2024)

3.2 Homogenizace

Prvním krokem v přípravě vzorků k analýze je homogenizace, tj. proces, při kterém se dosáhne stejnoměrného rozptýlení všech složek vzorku, mechanickým rozbitím větších částic na menší a jejich rovnoměrným rozmístěním v celém objemu vzorku. Zamražené vzorky sušených šunek byly vytemperovány na teplotu laboratoře a pokráceny na sterilní podložce. Pomocí homogenizátoru A byl každý vzorek v kuchyňské odměrce důkladně rozmělněn, aby se tak promíchali všechny jeho části. Homogenní směs byla dvakrát po 5 g navážena do kónických plastových zkumavek a označena příslušným číslem a písmenem dle abecedního pořadí (1A, 1B). Zbytek homogenní směsi sloužil jako rezervní vzorek. Rezervní vzorek byl navážen do uzavíratelných plastových krabiček a označen příslušným číslem a písmenem C (1C, 2C atd.), poté byl vzorek umístěn do mrazícího boxu. Průměrná hmotnost rezervního vzorku byla 60 g. Zhomogenizované vzorky ve zkumavkách byly vloženy do igelitových sáčků, vždy v dupletu (1A/1B, 2A/2B atd.) a byly umístěny do mrazícího boxu $-20\text{ °C} (\pm 0.5\text{ °C})$.

3.3 Úprava vzorků k analýze a extrakci

Extrakce a analýza vzorků byla prováděna v 15 sériích. Z toho třináctkrát po 12 vzorcích a dvakrát po 24 vzorcích (pozn. opakování extrakce a analýzy vzorku č. 12', 162' a 163').

Extrakce OTA ze vzorků vzduchem sušených šunek byla provedena modifikovanou metodou OTA_PO_LC_01, SOP: T_78 (Škarková, 2011).

Před dalším zpracováním byly vždy vzorky vytemperovány na laboratorní teplotu $21\text{ °C} (\pm 0,5)$. K separaci se používali zkumavky s označením A. Ke každému naváženému vzorku o hmotnosti 5 g bylo přidáno 20 ml 60% acetonitrilu. Následně byly vzorky homogenizovány pomocí homogenizátoru B po dobu 1 minuty při 11 000 otáčkách za minutu. Mezi každým vzorkem bylo zařízení omyto destilovanou vodou a methanolem. Sada všech 12 vzorků byla protřepána na třepačce po dobu 5 minut při 1400 kmitů/minutu. Po třepání byl ještě každý vzorek centrifugován při

3300 RCF po dobu 5 minut při otáčkách 4500 za minutu. Následně byl vzorek přefiltrován na filtračním zařízení Morton s fritou (S3) s vložkou z filtračního papíru KA-2M. Získaný filtrát by měl být čirý, bez kalu. V případě zákalu, bylo potřeba vzorek znovu přefiltrovat.

Před zahájením prosávání na imunoafinitní kolonce, byly IAK vyjmuty z ledničky a ponechány k temperaci při laboratorní teplotě 21 °C (\pm 0,5 °C). Následně byly instalovány na vakuové prosávací zařízení. Toto zařízení umožnilo regulované protékání pufru kolonou, přičemž hladina nesměla klesnout pod horní úroveň vrstvy gelu. Pufir obsažený v kolonkách prokapal do odpadní vaničky pod IAK.

Získaný filtrát byl promíchán na vortexu. Poté byly pipetou odebrány 4 ml vzorku a nadávkovány do zásobníku nad IAK. Ke vzorku bylo přidáno 44 ml PBS pufru. Směs filtrátu a PBS pufru byla pomalu prokapána přes kolonku. Rychlost prokapávání byla 1 kapka za sekundu. Po prokapání vzorku s PBS pufrem bylo do zásobní nádoby pomocí pipety přidáno ještě 20 ml PBS pufru na promytí IAK. Po prokapání se krátce prosál vzduch, aby se gel v IAK odvodnil.

OTA byl izolován z komplexu antigen-protilátka s využitím eluční směsi methanolu a kyseliny octové (98:2 v/v). K uvolnění OTA z komplexu sloužilo 1,5 ml okyseleného methanolu. Eluční činidlo o objemu 1 ml, bylo pomalu prokapáváno do malé skleněné vialky (o objemu 4 ml), následně byl filtrát znovu umístěn na kolonku a prosáván znovu, tento proces se opakoval celkem čtyřikrát. Na závěr eluce bylo ještě jednou (celkem pětkrát se provádí prokapávání) prosáto 0,5 ml čerstvého elučního činidla, pro maximalizaci zisku analytu. Následovalo krátké prosátí vzduchem, abychom získali veškerou kapalinu z IAK.

Vialka s eluátem byla umístěna do koncentrátoru vzorků, kde došlo k řízenému zkoncentrování vzorku. Vzorek byl zahříván na 45 °C a za současného proudu dusíku odpařován po dobu cca 60 minut. Poté co byl vzorek suchý, byl odparek následně uložen v chladničce při teplotě 4 °C (\pm 0,5 °C) až do provedení analýzy pomocí HPLC-FLD.

Před provedením analýzy HPLC-FLD byl odparek nejprve vytemperován na laboratorní teplotu a poté rozpuštěn na třepačce po dobu 5 minut v 0,5 ml mobilní

fáze. Dále byl vzorek vložen ve vialce do ultrazvukové lázně na dobu 5 minut. Obnovený vzorek byl protlačen pomocí sterilní injekční stříkačky přes membránový filtr do nové čisté 1,5 ml vialky s uzávěrem.

Vzorky ve vialkách byly umístěny do autosampleru HPLC-FLD a přes program v počítači byla spuštěna analýza.

3.4 Podmínky stanovení

Kapalinový chromatograf byl uveden do provozu, aby systémem protekl minimálně desetinásobek objemu analytické kolony, aby došlo k ustálení podmínek na chromatografické koloně a detektoru. Při obsluze HPLC se postupuje dle návodu pro měření na kapalinovém chromatografu Agilent 1260 Infinity II.

Tabulka 5: Podmínky stanovení pro OTA

HPLC zařízení	Agilent 1260 Infinity II
Fluorescenční detektor	1260 Infinity II Fluorescenční detektor
Analytická kolona	Kinetex C18, 2,6 µm, 100 Å, 50 x 2.1 mm, při 30 °C
Předkolona	Guard™ Phenomenex C18, 4 x 2.0 mm, při 30 °C
Software	Agilent OpenLab software CDS 2.5 software
HPLC puppa	Kvarterní pumpa G7104
Mobilní fáze	roztok A: voda : kyselina octová - 99 : 1
	roztok B: acetonitril : kyselina octová - 99:1
	poměr 40 : 60
Objem nástřiku	8 µl
Průtok	0,2 ml/min
Exitace	333 nm
Emise	465 nm
PMT	18
Útlum fluorescence	100 LU

3.5 Kalibrace

3.5.1 Kalibrační řada

Byla provedena šesti bodová kalibrace použitím standardních roztoků připravených z pracovního roztoku OTA, který byl zředěn v mobilní fázi. Roztoky byly vytvořeny v šesti kalibračních úrovních 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 a 4,0 ng/ml. Pro každý den analýzy byla připravena nová kalibrační řada a slepý vzorek (mobilní fáze).

3.5.2 Slepý vzorek

Jako slepý vzorek byla použita mobilní fáze. Slepý vzorek ("blank") se provádí obecně k podchycení chyby v komplexním rámci vzorkování a analytických stanoveních. Slouží ke kontrole čistoty chemikálií a postupu zpracování. Pro každý den analýzy byla připravena nová kalibrační řada a slepý vzorek. Byly použity vždy dva slepé vzorky před kalibrační řadou a jeden po.

3.6 Validační parametry

3.6.1 Retenční čas

Retenční čas OTA v daném chromatografickém systému byl stanoven na $5,52 \pm 0,05$ min. Retenční čas byl určen ze všech měřených vzorků.

3.6.2 Linearita

Linearita je chápána jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, kterými jsou reakce přístroje (analytický signál) a koncentrace analytu. Pro hodnocení linearity se většinou používá korelační koeficient. Tento koeficient R^2 vyjadřuje míru závislosti mezi dvěma proměnnými, nikoliv však nutně lineární vztah. Pro kontrolu kvality dat a hodnocení linearity se může použít dodatečně QC koeficient. Maximální hodnota pro QC koeficient byla stanovena na 3 % (udává se běžně i 5 %) (Van Loco et al., 2002).

Linearita byla ověřena sestrojením šestibodové kalibrační křivky, kdy byl OTA nadávkován v rozsahu 0,1 – 4,0 ng/ml. Při validaci byl QC koeficient = 0,64 % a korelační koeficient $R^2 = 0,9999$. Lze tedy předpokládat, že kalibrační křivka byla lineární.

3.6.3 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce (LOD) odpovídá koncentraci, při které je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu, zatímco mez kvantifikace (LOQ) odpovídá koncentraci, při které je přesnost stanovení taková, že umožňuje kvantitativní vyhodnocení (Armbruster & Pry, 2008, Ebel et al., 1987).

Mez detekce (LOD) byla stanovena na 0,03 ng/g a mez kvantifikace (LOQ) byla 0,10 ng/g. LOD a LOQ bylo vypočteno na základě vzorců dle IUPAC: $LOD = \frac{3 \cdot \sigma}{b}$ a pro $LOQ = \frac{10 \cdot \sigma}{b}$ ("σ" představuje standartní odchylku deseti píků nejnižšího kalibračního bodu 0,1 ng/g, a "b" představuje směrnici kalibrační křivky).

3.6.4 Opakovatelnost stanovení

Relativní směrodatná odchylka (RSD) byla stanovena na 0,21 %. Opakovatelnost stanovení byla vypočítána z výsledků šesti nástřiků každého standardu při koncentračních úrovních 0,1, 0,5 a 2 ng/ml.

3.6.5 Výtěžnost

Výtěžnost metody byla ověřena pomocí spikovaných vzorků. Do vzorků byly přidány standardy v koncentracích 0,5 a 2,0 ng/g před krokem extrakce a po kroku separace na IAK do eluátu. Každá koncentrační úroveň byla měřena ve třech opakováních, celkem bylo tedy analyzováno 6 vzorků s přidaným OTA pro každou koncentraci. Vzorek bez přídavku OTA byl označen jako slepý vzorek.

Průměrná výtěžnost byla stanovena na 72,1 %, což splňuje Nařízení Komise (EU) 2023/2782 (prováděcí nařízení ze dne 14. prosince 2023), kterým se stanoví metody odběru vzorků a analýzy pro kontrolu množství mykotoxinů v potravinách a kterým se ruší nařízení (ES) č. 401/2006 (EK, 2023).

3.6.6 Způsob dohledání primárních dat

Primární data z jednotlivých měření byla získána pomocí softwaru Agilent OpenLab a následně zpracována pomocí Microsoft Excel (verze 16) a Microsoft Word (verze 16). Evidence vzorků byla vedena dle data a čísla vzorku.

4 Výsledky

Z 200 vzorků vzduchem sušených šunek byla v 96 vzorcích zjištěna přítomnost OTA s koncentrací >LOQ (0,1 ng/g). To představuje 48 % z celkového počtu vzorků. Rozmezí koncentrací OTA bylo <LOD – 14,58 ng/g.

Tabulka 6: Výsledné koncentrace OTA ve vzorcích vzduchem sušených šunek

n°	OTA (ng/g)	n°	OTA (ng/g)	n°	OTA (ng/g)	n°	OTA (ng/g)	n°	OTA (ng/g)
1	1,957	41	<LOD	81	<LOQ	121	<LOQ	161	<LOD
2	<LOD	42	0,795	82	<LOD	122	0,694	162	<LOQ
3	0,281	43	<LOQ	83	<LOD	123	13,638	163	0,458
4	<LOQ	44	0,651	84	0,303	124	0,21	164	<LOQ
5	<LOD	45	<LOQ	85	0,295	125	<LOQ	165	0,143
6	0,413	46	<LOQ	86	0,15	126	<LOQ	166	0,979
7	0,759	47	0,176	87	<LOQ	127	<LOQ	167	3,755
8	0,36	48	0,281	88	<LOD	128	<LOQ	168	0,119
9	<LOQ	49	<LOD	89	<LOQ	129	<LOQ	169	0,415
10	0,116	50	<LOQ	90	0,527	130	<LOD	170	0,531
11	<LOQ	51	0,47	91	<LOQ	131	4,04	171	<LOQ
12	<LOQ	52	1,336	92	0,437	132	0,335	172	4,083
13	<LOD	53	0,552	93	0,579	133	6,842	173	<LOQ
14	<LOQ	54	<LOQ	94	0,322	134	0,181	174	<LOQ
15	0,734	55	<LOQ	95	<LOQ	135	0,136	175	0,129
16	<LOQ	56	1,571	96	0,813	136	<LOQ	176	<LOD
17	8,668	57	<LOD	97	<LOQ	137	0,121	177	3,51
18	0,5	58	<LOD	98	0,254	138	1,035	178	<LOQ
19	<LOD	59	0,848	99	<LOQ	139	<LOQ	179	0,702
20	0,151	60	<LOD	100	<LOQ	140	<LOQ	180	0,537
21	<LOD	61	<LOQ	101	8,38	141	0,104	181	2,682
22	0,686	62	<LOQ	102	<LOQ	142	<LOD	182	0,727
23	0,466	63	<LOQ	103	14,585	143	0,803	183	8,082
24	0,812	64	0,315	104	0,877	144	<LOD	184	1,565
25	<LOQ	65	<LOQ	105	0,548	145	<LOQ	185	<LOQ
26	<LOD	66	<LOD	106	0,26	146	<LOQ	186	<LOD
27	0,118	67	<LOQ	107	0,114	147	<LOD	187	<LOQ
28	<LOD	68	<LOD	108	<LOQ	148	6,35	188	3,351
29	0,333	69	0,714	109	<LOQ	149	0,214	189	<LOQ
30	<LOQ	70	<LOD	110	<LOD	150	0,149	190	<LOD
31	<LOD	71	2,481	111	<LOD	151	0,595	191	0,439
32	<LOD	72	<LOQ	112	<LOD	152	<LOQ	192	<LOQ
33	0,119	73	0,756	113	<LOD	153	0,174	193	<LOD
34	0,33	74	<LOQ	114	4,807	154	<LOQ	194	2,724
35	0,409	75	<LOQ	115	0,108	155	0,466	195	<LOQ
36	<LOD	76	<LOQ	116	0,224	156	<LOD	196	0,963
37	<LOD	77	<LOQ	117	1,098	157	0,235	197	0,136
38	<LOD	78	<LOQ	118	3,343	158	<LOQ	198	<LOQ
39	<LOQ	79	3,026	119	0,748	159	0,183	199	<LOQ
40	0,387	80	<LOQ	120	<LOD	160	0,11	200	<LOD

n° = číslo vzorku

hodnoty >LOQ (0,1 ng/g) jsou vyjádřeny číselně

hodnoty <LOD = <LOD (<0,03 ng/g),

hodnoty mezi LOD a LOQ = <LOQ

Tabulka 7: Statistické zpracování dat ve vzorcích sušených šunek

n	n +¹	n +¹ (%)	Aritmetický průměr (ng/g)	Median (ng/g)	90% percentil (ng/g)	Rozsah (ng/g)
200	96	48	0,74 ± 1,94	0,05	1,57	<LOQ - 14,58

n = počet vzorků

n+¹ = vzorky s koncentrací >LOQ

n+¹ (%) = vzorky s koncentrací >LOQ v procentech

Pozn. Pro statistické zpracování byl použit přístup „middle-bound“, takže všechny vzorky s koncentrací <LOQ byly vyhodnoceny jako ½ LOQ (Mihalache & Dall'Asta, 2023).

5 Diskuze

Tato práce byla zaměřena na stanovení OTA ve vzorcích vzduchem sušených šunek, které jsou běžně dostupné v obchodních řetězcích v ČR. Stanovení OTA bylo prováděno pouze v šunkách, které byly vyráběny výše popsánymi postupy, jsou sušeny jen vzduchem a nejsou žádným dalším způsobem kořeněny, případně douzovány ať už teplým či studeným vzduchem, během jejich technologického procesu výroby. Byl zaznamenán značný počet sušených šunek, které byly kontaminovány OTA. Téměř v polovině (48 %) všech vzorků (200) byla zjištěna koncentrace OTA překračující stanovený limit kvantifikace (LOQ = 0,1 ng/g). Kontaminace mezi jednotlivými vzorky vykazovala značnou variabilitu. Rozmezí jednotlivých koncentrací OTA bylo <LOD - 14,58 ng/g.

Existuje celá řada studií, které se zabývají problematikou výskytu OTA v sušených šunkách a jiných masných produktech. Nicméně není příliš mnoho studií, které se zabývají problematikou přirozeně kontaminovaných vzduchem sušených šunek, v její vnitřní vrstvě. V obchodech prodávané sušené šunky obsahují téměř výlučně vnitřní část masa.

Ve studii v Itálii v roce 2002 (Chiavaro et al., 2002) bylo provedeno stanovení OTA v šunkách pomocí HPLC-FD a fluorometrické metody. Bylo testováno celkem 42 vzorků z 11 zpracovatelských podniků. Extrakce OTA byla provedena z libové části masa z 0,5 cm hlubokého řezu. Pro HPLC byl LOD=0,04 ng/g, pro fluorometr LOD = 0,7 ng/g. Testování proběhlo ve dvou etapách, kdy v první etapě bylo testováno 21 vzorků (6 měsíců zrání) a ve druhé etapě 21 vzorků (12 měsíců zrání). Touto metodou bylo detekováno 83 % (35/42) pozitivních vzorků, fluorometrickou metodou 62 % (26/42) pozitivních vzorků. Celkem v 64,2 % (27) analyzovaných vzorcích byla hladina OTA nižší, než je italský národní limit. U 14 vzorků se koncentrace OTA pohybovala v rozmezí 1,0 – 2,0 ng/g. Ve studii byly průměrné hodnoty kontaminace 1,01 a 1,26 ng/g pro HPLC-FLD a fluorometrickou metodu. Při porovnání s touto diplomovou prací jsou průměrné hodnoty vyšší, zde byla průměrná naměřená hodnota koncentrace OTA 0,74 ng/g.

Také Toscani et al. (2007) provedli stanovení OTA ve vzduchem sušených masných výrobcích pomocí HPLC-FLD. Testovali celkem 10 sušených šunek z italského trhu, přičemž pouze 5 vzorků lze porovnávat s touto prací (zbylých 5 prošlo procesem uzení). Byly mezi sebou porovnány vzorky odebrané z vnější i vnitřní vrstvy. LOQ byl stanoven na 0,06 ng/g. LOD byl stanoven na 0,02 ng/g. Ve vnitřních vrstvách byla naměřena koncentrace OTA v rozmezí <LOD-1,52 ng/g (celkem dva vzorky >LOQ). Ve vnějších vrstvách bylo rozmezí koncentrací OTA <LOD-7,28 ng/g (celkem 3 vzorky >LOQ). Průměrná naměřená koncentrace byla 1,96 ng/g. Ačkoliv se jedná o poměrně malou sadu vzorků, je zřejmé, že koncentrace OTA u vnější vrstvy jsou několikanásobně větší než u vnitřní vrstvy, což odpovídá i jiným studiím (Dall'Asta et al., 2010). Porovnání největších naměřených koncentrací OTA ve vnitřní vrstvě lze udělat (1,52 ng/g vs 14,58 ng/g), naměřená hodnota v této diplomové práci je téměř 10x vyšší než v italské studii. Rozdílná koncentrace OTA ve vzorcích může být dána jinou dobou zrání u jednotlivých typů sušených šunek, kdy lze očekávat vyšší koncentrace OTA u déle zrajících typů.

V roce 2010 v další italské studii Dall'Asta et al. (2010) provedli stanovení OTA pomocí HPLC-FLD v čerstvém mase, salámech a sušených šunkách z prasat kterým byla podávána dávka OTA v krmivu a v šunkách z obchodních řetězců, které byly přirozeně kontaminované. Svým rozsahem je práce nejpodobnější této. Oproti předchozím studiím, se zabývala největším počtem vzorků (110 vzorků sušených šunek), které byly zakoupeny na italském trhu. Hlavním cílem práce bylo posouzení způsobů kontaminace, proto se práce velkou částí zabývá stanovením OTA ve vzorcích (masa, salámech a sušených šunkách) od prasat, které byly záměrně krmeny kontaminovaným krmivem na subchronické úrovni. Pro porovnání jsou vhodné pouze výsledky z přirozeně kontaminovaných sušených šunek (110 vzorků). Extrakce byla provedena pomocí IAK Ochraprep® a analýza na HPLC-FLD stejně jako v této práci. Validacionní parametry pro stanovení OTA byly následující; LOQ = 0,3 ng/g a LOD = 0,1 ng/g. V celkem v 84 vzorcích byla ve vnější vrstvě naměřena kontaminace OTA s průměrnou koncentrací OTA 0,98 ng/g. Ve vnitřní vrstvě byla zjištěna přítomnost OTA u 32 vzorků, s průměrnou koncentrací OTA 0,24 ng/g. Maximální naměřená koncentrace OTA ve vnitřní vrstvě byla 4,66 ng/g, ve vnější 12,5 ng/g. I přes to, že průměrná koncentrace OTA ve vzorcích byla pod italským národním limitem, přítomnost vzorků, které vykazovaly vysokou úroveň

kontaminace, poukazuje na velký význam hygienické kontroly v potravinářských podnicích. Nejvyšší naměřenou koncentraci OTA ve vnitřní vrstvě (4,66 ng/g) lze porovnat s hodnotami v této práci, u 3 vzorků byla hodnota obdobná v rozmezí 4,04- 4,8 ng/g (vzorek 114, 131, 172).

V EU je Španělsko jedním z majoritních producentů sušených šunek. Ve studii ze Španělska Rodríguez et al. (2012) testovali metodou HPLC-MS akumulaci OTA v sušené šunce iberijského typu. Vzorky byly odebrány z jejího povrchu a z hloubky 0,5 cm v šestém měsíci zrání (celková doba zrání obvykle 24 měsíců). Bylo analyzováno celkem 20 vzorků s validačními parametry; LOQ = 3 µg/kg, LOD = 1 µg/kg. U celkem 50 % vzorků (z vnějších i vnitřních vrstev) byla naměřena koncentrace >LOD. Průměrná naměřená hodnota u vzorků z vnitřní vrstvy byla téměř 22x vyšší než v této práci, nicméně pro lepší statistické porovnání by byl potřeba větší počet vzorků. Koncentrace OTA naměřené ve vnitřní vrstvě byly v rozmezí 2,0-28,4 µg/kg, maximální naměřená hodnota byla téměř 2x vyšší než v této práci. Je ale potřeba brát v potaz jinou metodu stanovení – HPLC-MS.

Ve studii Pleadin et al. (2015) byl stanovován aflatoxin B₁ a OTA v tradičních masných produktech z trhu a chorvatských domácností. Pro srovnání s touto prací bylo relevantní stanovení koncentrace OTA pouze i istrijských sušených šunek, které byly jako jediné sušené na vzduchu a bez dalších úprav (uzení apod.) Testování zahrnovalo 25 vzorků sušených šunek. Celkem bylo pozitivních 20 % vzorků (5/25) s nejvyšší naměřenou koncentrací 9,42 ng/g. Ze všech prací byla v chorvatské studii průměrná hodnota kontaminace OTA 0,78 ng/g nejpodobnější této práci s průměrnou kontaminací OTA 0,74 ng/g.

V portugalské studii Rodrigues et al. (2019) bylo cílem zjistit kontaminaci u čerstvých a sušených masných výrobků u vepřového, ovčího a kozího masa a určit houby potencionálně zodpovědné za tuto kontaminaci. Pro srovnání s touto prací bylo relevantních celkem 96 vzorků (vepřové kýta 20-25 měsíců zrání - 47 vzorků, vepřová plec 13-15 měsíců zrání - 9 vzorků a vepřová plec 13-15 měsíců zrání - 40 vzorků). Detekce proběhla pomocí HPLC-FLD, modifikovaná metodika dle Chiavaro et al. (2002). Validací parametry byly následující; LOD = 0,3 ng/g, LOQ = 0,9 ng/g. Bylo zjištěno, že 29 % ze vzorků sušených šunek na sucho bylo kontaminováno OTA, z toho 21 % více než 1 ng/g. Je důležité si uvědomit, že počet kontaminovaných

vzorků by byl pravděpodobně mnohem vyšší, kdyby LOQ bylo stejné jako v této diplomové práci (0,1 ng/g), což opět poukazuje na vysokou míru kontaminace sušených šunek OTA.

Z provedené studie vyplývá, že sušené šunky běžně dostupné v obchodních řetězcích v České republice vykazují poměrně vysokou míru kontaminace OTA. Výsledky této práce lze srovnávat s poznatky z jiných studií. Při porovnání s dostupnými daty z Itálie, Španělska, Chorvatska a Portugalska se naměřené koncentrace OTA v této diplomové práci pohybují v rozmezí hodnot zjištěných v jiných studiích. Nicméně v některých případech byly naměřeny i mnohem vyšší koncentrace, což může být dáno typem metody a její citlivostí, dobou zrání u jednotlivých typů sušených šunek nebo typem vzorku (vnější/vnitřní část sušené šunky). Existuje i řada dalších studií, které se zabývají stanovením koncentrace OTA v mase a masných produktech, které byly záměrně inokulovány za účelem zjištění množství OTA. Tyto práce však nelze srovnávat, protože v této práci se jedná pouze o přirozenou kontaminaci.

Ačkoliv zatím v Evropské Unii není stanoven maximální povolený hygienický limit pro maso a masné výrobky, jsou tyto výsledky znepokojující vzhledem k hygieně a bezpečnosti potravin.

Závěr

V této diplomové práci jsou představeny výsledky stanovení OTA ve vzorcích sušených šunek. Byly testovány různé typy sušených šunek pocházející ze zemí EU. Celkem bylo testováno 200 vzorků zakoupených v roce 2023. Stanovení bylo provedeno analytickou metodou HPLC-FLD pouze v přirozeně kontaminovaných sušených šunkách, které jsou vakuově baleny a prodávány v obchodních řetězcích v ČR. Přítomnost OTA byla detekována v 96 vzorcích (48 %) s průměrnou naměřenou koncentrací OTA 0,74 ng/g. Maximální naměřená koncentrace OTA dosahovala až 14,58 ng/g. Při srovnání výsledků s italským národním limitem, který je 1 ng/g, byl tento limit překročen u 24 vzorků, což představuje 12 % všech zkoumaných vzorků. Ještě znepokojivější je fakt, že právě 14 z těchto sušených šunek je italského původu, což je z hlediska hygieny a bezpečnosti potravin alarmující.

Výsledky ukazují, že vzduchem sušené šunky mohou představovat potencionální zdroj OTA v naší stravě. Konzumace těchto masných výrobků může přispívat k vyššímu dietárnímu přívodu OTA spolu s jinými významnými zdroji. Data získaná během studie zdůrazňují naléhavou potřebu zavést regulační limity pro OTA v mase a masných výrobcích v celé Evropské unii. Tyto limity by měly být v souladu s nejnovějšími vědeckými poznatky o rizicích OTA pro lidské zdraví.

V reakci na výzvu Evropské komise k monitorování OTA v sýrech a sušených šunkách, poskytuje tato práce přínosná data, a vzhledem k jejímu rozsahu a zaměření pouze na vzduchem sušené šunky se tato diplomová práce odlišuje od dosavadních studií. V současné době se Evropská komise ve Výboru pro zemědělské kontaminanty zabývá zavedením cíleného monitorovacího programu zaměřeného na šunky a zároveň projednává návrhy na zavedení maximálního limitu OTA v šunkách. Tato studie může posloužit jako základ pro budoucí diskusi o stanovení regulačních limitů pro OTA v mase a výrobcích z masa.

Použitá literatura

Abarca, M. L., Bragulat, M. R., Castellá, G., & Cabañes, F. J. (1994). Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *Niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(7), 2650–2652. <https://doi.org/10.1128/aem.60.7.2650-2652.1994>

Abdel-Azeem, A. M., Yadav, A. N., Yadav, N., & Usmani, Z. (Ed.). (2021). Industrially important fungi for sustainable development. Volume 1, Biodiversity and ecological perspectives. Springer.

Abrunhosa, L., Paterson, R., & Venâncio, A. (2010). Biodegradation of Ochratoxin A for Food and Feed Decontamination. *Toxins*, 2(5), 1078–1099. <https://doi.org/10.3390/toxins2051078>

Adegbeye, M. J., Reddy, P. R. K., Chilaka, C. A., Balogun, O. B., Elghandour, M. M. M. Y., Rivas-Caceres, R. R., & Salem, A. Z. M. (2020). Mycotoxin toxicity and residue in animal products: Prevalence, consumer exposure and reduction strategies – A review. *Toxicon*, 177, 96–108. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.01.007>

Akbar, A., Medina, A., & Magan, N. (2020). Resilience of *Aspergillus westerdijikiae* Strains to Interacting Climate-Related Abiotic Factors: Effects on Growth and Ochratoxin A Production on Coffee-Based Medium and in Stored Coffee. *Microorganisms*, 8(9), 1268. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091268>

Albassam, M. A., Yong, S. I., Bhatnagar, R., Sharma, A. K., & Prior, M. G. (1987). Histopathologic and Electron Microscopic Studies on the Acute Toxicity of Ochratoxin A in Rats. *Veterinary Pathology*, 24(5), 427–435. <https://doi.org/10.1177/030098588702400510>

Aldred, D., Cairns-Fuller, V., & Magan, N. (2008). Environmental factors affect efficacy of some essential oils and resveratrol to control growth and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* and *Aspergillus westerdijikiae* on wheat grain. *Journal of Stored Products Research*, 44(4), 341–346. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2008.03.004>

Armbruster, D. A., & Pry, T. (2008). Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *The Clinical biochemist. Reviews*, 29 Suppl 1(Suppl 1), S49–S52.

Assaf, H., Azouri, H., & Pallardy, M. (2004). Ochratoxin A Induces Apoptosis in Human Lymphocytes through Down Regulation of Bcl-xL. *Toxicological Sciences*, 79(2), 335–344. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh123>

AtlasMedia Ltd. (2024). *Dry-Cured Ham* [Tasteatlas]. <https://www.tasteatlas.com/dry-cured-hams>

Battacone, G., Nudda, A., & Pulina, G. (2010). Effects of Ochratoxin A on Livestock Production. *Toxins*, 2(7), 1796–1824. <https://doi.org/10.3390/toxins2071796>

Battilani, P., Toscano, P., Van der Fels-Klerx, H. J., Moretti, A., Camardo Leggieri, M., Brera, C., Rortais, A., Goumperis, T., & Robinson, T. (2016). Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Scientific Reports*, 6, 24328. <https://doi.org/10.1038/srep24328>

Bayman, P., & Baker, J. L. (2006). Ochratoxins: A global perspective. *Mycopathologia*, 162(3), 215–223. <https://doi.org/10.1007/s11046-006-0055-4>

Bellver Soto, J., Fernández-Franzón, M., Ruiz, M.-J., & Juan-García, A. (2014). Presence of Ochratoxin A (OTA) Mycotoxin in Alcoholic Drinks from Southern European Countries: Wine and Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(31), 7643–7651. <https://doi.org/10.1021/jf501737h>

Benedini, R., Parolari, G., Toscani, T., & Virgili, R. (2012). Sensory and texture properties of Italian typical dry-cured hams as related to maturation time and salt content. *Meat Science*, 90(2), 431–437. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.09.001>

Berni, E., Montagna, I., Restivo, F. M., & Degola, F. (2017). Ochratoxin A Control in Meat Derivatives: Intraspecific Biocompetition between *Penicillium nordicum* Strains. *Journal of Food Quality*, 2017, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/8370106>

Bhat, R., Rai, R. V., & Karim, A. A. (2010). Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(1), 57–81. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00094.x>

Bogs, C., Battilani, P., & Geisen, R. (2006). Development of a molecular detection and differentiation system for ochratoxin A producing *Penicillium* species and its application to analyse the occurrence of *Penicillium nordicum* in cured meats. *International Journal of Food Microbiology*, 107(1), 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.010>

Castegnaro, M., Canadas, D., Vrabcheva, T., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I. N., & Pfohl-Leszkowicz, A. (2006). Balkan endemic nephropathy: Role of ochratoxins A through biomarkers. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50(6), 519–529. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500182>

Castella, G., Ostefeld Larsen, T., Cabanes, J., Schmidt, H., Alboresi, A., Niessen, L., Färber, P., & Geisen, R. (2002). Molecular Characterization of Ochratoxin A Producing Strains of the Genus *Penicillium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(1), 74–83. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00094>

Cavret, S., & Lecoeur, S. (2006). Fusariotoxin transfer in animal. *Food and Chemical Toxicology*, 44(3), 444–453. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.08.021>

Coffey, R., Cummins, E., & Ward, S. (2009). Exposure assessment of mycotoxins in dairy milk. *Food Control*, 20(3), 239–249. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.05.011>

Council for Agricultural Science and Technology (Ed.). (2003). *Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems*. Council for Agricultural Science and Technology.

Čandek-Potokar, M., & Škrlep, M. (2012). Factors in pig production that impact the quality of dry-cured ham: A review. *Animal*, 6(2), 327–338. <https://doi.org/10.1017/S1751731111001625>

Dahal, S., Lee, H. J., Gu, K., & Ryu, D. (2016). Heat Stability of Ochratoxin A in an Aqueous Buffered Model System. *Journal of Food Protection*, 79(10), 1748–1752. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-160>

Dall'Asta, C., Galaverna, G., Bertuzzi, T., Moseriti, A., Pietri, A., Dossena, A., & Marchelli, R. (2010). Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscle, salami and dry-cured ham from pigs fed with contaminated diet. *Food Chemistry*, 120(4), 978–983. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.036>

Dixit, R., Riviere, J., Krishnan, K., & Andersen, M. (2003). Toxicokinetics and Physiologically Based Toxicokinetics in Toxicology and Risk Assessment. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 6(1), 1–40. <https://doi.org/10.1080/10937400306479>

Duarte, S. C., Lino, C. M., & Pena, A. (2012). Food safety implications of ochratoxin A in animal-derived food products. *The Veterinary Journal*, 192(3), 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.11.002>

Ebel, S., Kühnert, H., & Mück, W. (1987). Limits of determination and calibration in HPLC. *Chromatographia*, 23(12), 934–938. <https://doi.org/10.1007/BF02261474>

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Schrenk, D., Bignami, M., Bodin, L., Chipman, J. K., del Mazo, J., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L. (Ron), Leblanc, J., Nielsen, E., Ntzani, E., Sand, S., Schwerdtle, T., Vleminckx, C., Wallace, H., Gropp, J., Antonissen, G., Rychen, G., ... Petersen, A. (2023). Risks for animal health related to the presence of ochratoxin A (OTA) in feed. *EFSA Journal*, 21(11). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8375>

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Schrenk, D., Bodin, L., Chipman, J. K., del Mazo, J., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L. (Ron), Leblanc, J., Nebbia, C. S., Nielsen, E., Ntzani, E., Petersen, A., Sand, S., Schwerdtle, T., Vleminckx, C., Wallace, H., Alexander, J., Dall'Asta, C., ... Bignami, M. (2020). Risk assessment of ochratoxin A in food. *EFSA Journal*, 18(5). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6113>

El Khoury, A., & Atoui, A. (2010). Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. *Toxins*, 2(4), 461–493. <https://doi.org/10.3390/toxins2040461>

Ellis, D., Davis, S., Alexiou, H., Handke, R., Bartley, R. (2007). Descriptions of medical fungi (2nd ed). ISBN 978-0-9598512-6-7

European Food Safety Authority (EFSA). (2006). Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to ochratoxin A in food. *EFSA Journal*, 365. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2006.365>

Evropská komise. (2023). Nařízení Komise (EU) 2023/915 ze dne 25. dubna 2023 o maximálních limitech některých kontaminujících látek v potravinách a o zrušení nařízení (ES) č. 1881/2006. Úřední věstník Evropské unie, L 128, 6-24

Evropská unie. (2022). Nařízení Komise (EU) 2022/1370 ze dne 5. srpna 2022, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, pokud jde o maximální limity ochratoxinu A v některých potravinách . Úřední věstník Evropské unie, L 301/18.

Fink-Gremmels, J., & Van Der Merwe, D. (2019). Mycotoxins in the food chain: Contamination of foods of animal origin. In F. J. M. Smulders, I. M. C. M. Rietjens, & M. Rose (Ed.), *Chemical hazards in foods of animal origin* (s. 241–261). Brill | Wageningen Academic. https://doi.org/10.3920/978-90-8686-877-3_10

Frisvad, J. C., Frank, J. M., Houbraken, J. A. M. P., Kuijpers, A. F. A., & Samson, R. A. (2004). New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology*, (50), 23-43.

Gareis, M., & Wolff, J. (2000). [Relevance of mycotoxin contaminated feed for farm animals and carryover of mycotoxins to food of animal origin]. *Mycoses*, 43 Suppl 1, 79–83.

Gil-Serna, J., Vázquez, C., & Patiño, B. (2020). The Genomic Regions That Contain Ochratoxin A Biosynthetic Genes Widely Differ in *Aspergillus* Section *Circumdati* Species. *Toxins*, 12(12), 754. <https://doi.org/10.3390/toxins12120754>

Grosso, F., Saïd, S., Mabrouk, I., Fremy, J. M., Castegnaro, M., Jemmali, M., & Dragacci, S. (2003). New data on the occurrence of ochratoxin A in human sera from patients affected or not by renal diseases in Tunisia. *Food and Chemical Toxicology*, 41(8), 1133–1140. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(03\)00067-X](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(03)00067-X)

Haighton, L. A., Lynch, B. S., Magnuson, B. A., & Nestmann, E. R. (2012). A reassessment of risk associated with dietary intake of ochratoxin A based on a lifetime exposure model. *Critical Reviews in Toxicology*, 42(2), 147–168. <https://doi.org/10.3109/10408444.2011.636342>

Haschek, W. M., & Voss, K. A. (2013). Mycotoxins. In *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology* (s. 1187–1258). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00039-X>

Hayat, A., Paniel, N., Rhouati, A., Marty, J.-L., & Barthelmebs, L. (2012). Recent advances in ochratoxin A-producing fungi detection based on PCR methods and ochratoxin A analysis in food matrices. *Food Control*, 26(2), 401–415. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.060>

Heussner, A. H., Dietrich, D. R., & O'Brien, E. (2006). In vitro investigation of individual and combined cytotoxic effects of ochratoxin A and other selected mycotoxins on renal cells. *Toxicology in Vitro*, 20(3), 332–341. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.08.003>

Heussner, A., & Bingle, L. (2015). Comparative Ochratoxin Toxicity: A Review of the Available Data. *Toxins*, 7(10), 4253–4282. <https://doi.org/10.3390/toxins7104253>

Horn, B. W., Greene, R. L., & Dorner, J. W. (2000). Inhibition of Aflatoxin B1 Production by *Aspergillus parasiticus* Using Nonafatoxigenic Strains: Role of Vegetative Compatibility. *Biological Control*, 17(2), 147–154. <https://doi.org/10.1006/bcon.1999.0798>

Chemical Products R. Borghgraef s.a. (2024). RBS™ 35, Alkalický čisticí prostředek <https://www.sigmaaldrich.com/US/en/product/sial/83461>

Chen, A. J., Tang, D., Zhou, Y. Q., Sun, B. D., Li, X. J., Wang, L. Z., & Gao, W. W. (2013). Identification of Ochratoxin A Producing Fungi Associated with Fresh and Dry Liquorice. *PLoS ONE*, 8(10), e78285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078285>

Chen, Y., Chen, J., Zhu, Q., & Wan, J. (2022). Ochratoxin A in Dry-Cured Ham: OTA-Producing Fungi, Prevalence, Detection Methods, and Biocontrol Strategies—A Review. *Toxins*, 14(10), 693. <https://doi.org/10.3390/toxins14100693>

Chiavaro, E., Lepiani, A., Colla, F., Bettoni, P., Pari, E., & Spotti, E. (2002). Ochratoxin A determination in ham by immunoaffinity clean-up and a quick fluorometric method. *Food Additives and Contaminants*, 19(6), 575–581. <https://doi.org/10.1080/02652030210123869>

Iacumin, L., Arnoldi, M., & Comi, G. (2020). Effect of a *Debaryomyces hansenii* and *Lactobacillus buchneri* Starter Culture on *Aspergillus westerdijkae* Ochratoxin A Production and Growth during the Manufacture of Short Seasoned Dry-Cured Ham. *Microorganisms*, 8(10), 1623. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101623>

International Agency for Research on Cancer (Ed.). (1983). Some food additives, feed additives and naturally occurring substances: This publication represents the views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans which met in Lyon, 19 - 26 October 1982.

International Agency for Research on Cancer (IARC). (1993). Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins (Vol. 56). World Health Organization. ISBN 978-92-832-1256-0

Jennings-Gee, J. E., Tozlovanu, M., Manderville, R., Miller, M. S., Pfohl-Leskowicz, A., & Schwartz, G. G. (2010). Ochratoxin A: In Utero Exposure in Mice Induces Adducts in Testicular DNA. *Toxins*, 2(6), 1428–1444. <https://doi.org/10.3390/toxins2061428>

Kabak, B., Dobson, A. D. W., & Var, I. (2006). Strategies to Prevent Mycotoxin Contamination of Food and Animal Feed: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(8), 593–619. <https://doi.org/10.1080/10408390500436185>

Kadlec, P., Melzoch, K., Voldřich, M., & technologie, V. škola chemicko-technologická v P. F. potravinářské a biochemické. (2012). Přehled tradičních potravinářských výrob: Technologie potravin. Key Publishing. <https://books.google.cz/books?id=zWyeoAEACAAJ>

Kameník, J. (2012). Hygiena a technologie masa: Trvanlivé masné výrobky (Vyd. 1). Veterinární a farmaceutická univerzita Brno.

Karlovsy, P., Suman, M., Berthiller, F., De Meester, J., Eisenbrand, G., Perrin, I., Oswald, I. P., Speijers, G., Chiodini, A., Recker, T., & Dussort, P. (2016). Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin Research*, 32(4), 179–205. <https://doi.org/10.1007/s12550-016-0257-7>

Klarić, M. Š., Daraboš, D., Rozgaj, R., Kašuba, V., & Pepeljnjak, S. (2010). Beauvericin and ochratoxin A genotoxicity evaluated using the alkaline comet assay: Single and combined genotoxic action. *Archives of Toxicology*, 84(8), 641–650. <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0535-7>

Krogh, P., Hald, B., & Pedersen, E. J. (1973). Occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxic porcine nephropathy. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology and Immunology*, 81B(6), 689–695. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1973.tb02261.x>

Larsen, T. O., Svendsen, A., & Smedsgaard, J. (2001). Biochemical Characterization of Ochratoxin A-Producing Strains of the Genus *Penicillium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3630–3635. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3630-3635.2001>

Laureati, M., Buratti, S., Giovanelli, G., Corazzin, M., Lo Fiego, D. P., & Pagliarini, E. (2014). Characterization and differentiation of Italian Parma, San Daniele and Toscano dry-cured hams: A multi-disciplinary approach. *Meat Science*, 96(1), 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.07.014>

Li, S., Marquardt, R. R., & Frohlich, A. A. (2000). Identification of ochratoxins and some of their metabolites in bile and urine of rats. *Food and Chemical Toxicology*, 38(2–3), 141–152. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00153-2](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00153-2)

Little, C., Omotoye, R., & Mitchell, R. (2003). The microbiological quality of ready-to-eat foods with added spices. *International Journal of Environmental Health Research*, 13(1), 31–42. <https://doi.org/10.1080/0960312021000063331>

Logrieco, A., & Visconti, A. (Ed.). (2004). *An Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2646-1>

Loh, Z. H., Ouwerkerk, D., Klieve, A. V., Hungerford, N. L., & Fletcher, M. T. (2020). Toxin Degradation by Rumen Microorganisms: A Review. *Toxins*, 12(10), 664. <https://doi.org/10.3390/toxins12100664>

Malir, F., Ostry, V., & Novotna, E. (2013). Toxicity of the mycotoxin ochratoxin A in the light of recent data. *Toxin Reviews*, 32(2), 19–33. <https://doi.org/10.3109/15569543.2013.782504>

Malir, F., Ostry, V., Grosse, Y., Roubal, T., Skarkova, J., & Ruprich, J. (2006). Monitoring the mycotoxins in food and their biomarkers in the Czech Republic. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50(6), 513–518. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500175>

Malíř, F., Ostrý V. (2003). Vlákňité mikromycety (plísňě), mykotoxiny a zdraví člověka. Brno: Národní centrum ošetr̄ovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 349 s. ISBN 80-7013-395-3.

Malíř, F., Ostrý, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Malíř, J., & Toman, J. (2016). Ochratoxin A: 50 Years of Research. *Toxins*, 8(7), 191. <https://doi.org/10.3390/toxins8070191>

Mally, A., Hard, G. C., & Dekant, W. (2007). Ochratoxin A as a potential etiologic factor in endemic nephropathy: Lessons from toxicity studies in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 45(11), 2254–2260. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.05.021>

Mastanjević, K., Kovačević, D., Nešić, K., Krstanović, V., & Habschied, K. (2023). Traditional Meat Products—A Mycotoxicological Review. *Life*, 13(11), 2211. <https://doi.org/10.3390/life13112211>

Mihalache, O. A., & Dall'Asta, C. (2023). Left-censored data and where to find them: Current implications in mycotoxin-related risk assessment, legislative and economic impacts. *Trends in Food Science & Technology*, 136, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.04.011>

Ministero della Sanita. (1999). Circolare 9 giugno 1999, n.10. Direttive in materia di controllo ufficiale sui prodotti alimentari: Valori massimi ammissibili di micotossine nelle derrate alimentari di origine nazionale, comunitaria e Paesi terzi. (GU Serie Generale n.135 del 11-06-1999). Gazzetta Ufficiale Della Republic Italiana. http://www.micotossine.it/public/pag_92.pdf

Ministerstvo zemědělství. (2023). Zpráva o činnosti systému RASFF v České republice za rok 2022. [Report]. <https://eagri.cz/zpravy/2023-09-15/zprava-o-cinnosti-systemu-rasff-v-ceske-republice-za-rok-2022>

Mohamed B., A. (Ed.). (2015). *Mammalian Toxicology* (1. vyd.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118683484>

Moore, G. G. (2022). Practical considerations will ensure the continued success of pre-harvest biocontrol using non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* strains. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(15), 4208–4225. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1873731>

Müller, G., Kielstein, P., Köhler, H., Berndt, A., & Rosner, H. (1995). Studies of the influence of ochratoxin A on immune and defence reactions in the mouse model: Untersuchungen zur Beeinflussung von Immun- und Abwehrvorgängen durch Ochratoxin A am Modelltier Maus. *Mycoses*, 38(1-2), 85-91. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1995.tb00013.x>

Murphy, P. A., Hendrich, S., Landgren, C., & Bryant, C. M. (2006). Food Mycotoxins: An Update. *Journal of Food Science*, 71(5). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00052.x>

O'Brien, E., & Dietrich, D. R. (2005). Ochratoxin A: The Continuing Enigma. *Critical Reviews in Toxicology*, 35(1), 33-60. <https://doi.org/10.1080/10408440590905948>

Parussolo, G., Oliveira, M. S., Garcia, M. V., Bernardi, A. O., Lemos, J. G., Stefanello, A., Mallmann, C. A., & Copetti, M. V. (2019). Ochratoxin A production by *Aspergillus westerdijkiae* in Italian-type salami. *Food Microbiology*, 83, 134-140. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.05.007>

Patharajan, S., Reddy, K. R. N., Karthikeyan, V., Spadaro, D., Lore, A., Gullino, M. L., & Garibaldi, A. (2011). Potential of yeast antagonists on in vitro biodegradation of ochratoxin A. *Food Control*, 22(2), 290-296. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.07.024>

Pestka, J. J., Steinert, B. W., & Chu, F. S. (1981). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Ochratoxin A. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(6), 1472-1474. <https://doi.org/10.1128/aem.41.6.1472-1474.1981>

Petrova, I., Aasen, I. M., Rustad, T., & Eikevik, T. M. (2015). Manufacture of dry-cured ham: A review. Part 1. Biochemical changes during the technological process. *European Food Research and Technology*, 241(5), 587-599. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2490-2>

Pfohl-Leszkowicz, A., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I. N., & Castegnaro, M. (2002). Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: A review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*, 19(3), 282-302. <https://doi.org/10.1080/02652030110079815>

Pfohl-Leszkowicz, A., & Manderville, R. A. (2007). Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(1), 61–99. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600137>

Pickova, D., Ostry, V., Malir, J., Toman, J., & Malir, F. (2020). A Review on Mycotoxins and Microfungi in Spices in the Light of the Last Five Years. *Toxins*, 12(12), 789. <https://doi.org/10.3390/toxins12120789>

Pickova, D., Ostry, V., Toman, J., & Malir, F. (2021). Aflatoxins: History, Significant Milestones, Recent Data on Their Toxicity and Ways to Mitigation. *Toxins*, 13(6), 399. <https://doi.org/10.3390/toxins13060399>

Pickova, D., Toman, J., Mikyskova, P., Ostry, V., & Malir, F. (2022). Investigation of ochratoxin a in blood sausages in the Czech Republic: Comparison with data over Europe. *Food Research International*, 157, 111473. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111473>

Pietruszka, K., Piątkowska, M., & Jedziniak, P. (2017). Occurrence of ochratoxin A in animal tissues and feeds in Poland in 2014–2016. *Journal of Veterinary Research*, 61(4), 483–487. <https://doi.org/10.1515/jvetres-2017-0071>

Pinotti, L., Ottoboni, M., Giromini, C., Dell’Orto, V., & Cheli, F. (2016). Mycotoxin Contamination in the EU Feed Supply Chain: A Focus on Cereal Byproducts. *Toxins*, 8(2), 45. <https://doi.org/10.3390/toxins8020045>

Pitt, J. I. (2000). Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin*, 56(1), 184–192. <https://doi.org/10.1258/0007142001902888>

Pitt, J. I. (2002). Biology and Ecology of Toxigenic *Penicillium* Species. In J. W. DeVries, M. W. Trucksess, & L. S. Jackson (Ed.), *Mycotoxins and Food Safety* (Roč. 504, s. 29–41). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0629-4_4

Pleadin, J., Frece, J., & Markov, K. (2019). Mycotoxins in food and feed. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Roč. 89, s. 297–345). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.007>

Pleadin, J., Perši, N., Kovačević, D., Vulić, A., Frece, J., & Markov, K. (2014). Ochratoxin A reduction in meat sausages using processing methods practiced in households. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 7(4), 239–246. <https://doi.org/10.1080/19393210.2014.900119>

Pleadin, J., Staver, M. M., Vahčić, N., Kovačević, D., Milone, S., Saftić, L., & Scortichini, G. (2015). Survey of aflatoxin B 1 and ochratoxin A occurrence in traditional meat products coming from Croatian households and markets. *Food Control*, 52, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.027>

Pohland, A. E., Nesheim, S., & Friedman, L. (1992). Ochratoxin A: A review (Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 64(7), 1029–1046. <https://doi.org/10.1351/pac199264071029>

Richard, J. L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1–2), 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.019>

Rodrigues, P., Silva, D., Costa, P., Abrunhosa, L., Venâncio, A., & Teixeira, A. (2019). Mycobiota and mycotoxins in Portuguese pork, goat and sheep dry-cured hams. *Mycotoxin Research*, 35(4), 405–412. <https://doi.org/10.1007/s12550-019-00374-8>

Rodríguez, A., Rodríguez, M., Martín, A., Delgado, J., & Córdoba, J. J. (2012). Presence of ochratoxin A on the surface of dry-cured Iberian ham after initial fungal growth in the drying stage. *Meat Science*, 92(4), 728–734. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.06.029>

Samson, RA., Houbraeken, JAMP., Kuijpers, AFA., Frank, JM., & Frisvad, JC. (2004). New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, (50), 45-61.

Serra Bonvehí, J. (2004). Occurrence of Ochratoxin A in Cocoa Products and Chocolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6347–6352. <https://doi.org/10.1021/jf040153>

Sforza, S., Dall'Asta, C., & Marchelli, R. (2006). Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 25(1), 54–76. <https://doi.org/10.1002/mas.20052>

Schweighardt, H., Schuh, M., Abdelhamid, A. M., B hm, J., & Leibetseder, J. (1980). Methode zur Ochratoxin-A-Bestimmung in Lebens – und Futtermitteln mittels Hochdruckfl ussigkeitschromatographie (HPLC). *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und – Forschung*, 170(5), 355–359. <https://doi.org/10.1007/BF01042973>

Sipos, P., Peles, F., Brassó, D. L., Béri, B., Pusztahelyi, T., Pócsi, I., & Gyóri, Z. (2021). Physical and Chemical Methods for Reduction in Aflatoxin Content of Feed and Food. *Toxins*, 13(3), 204. <https://doi.org/10.3390/toxins13030204>

Skřehot, P. (2020). Základní požadavky k zajištění bezpečnosti práce při práci s chemickými látkami. Dostupné z: <https://www.bozpprofi.cz/33/zakladni-pozadavky-k-zajisteni-bezpecnosti-prace-pri-praci-s-chemickymi-latkami> uniqueidmRRWSbk196FNf8-jVUh4Egny2sdjJ1sRBZKiWLxjTEPVRyFLS2WAvA/.

Solti, L., Salamon, F., Barna-Vetró, I., Gyöngyösi, Á., Szabó, E., & Wölfling, A. (1997). Ochratoxin A Content of Human Sera Determined by a Sensitive ELISA. *Journal of Analytical Toxicology*, 21(1), 44–48. <https://doi.org/10.1093/jat/21.1.44>

Stoev, S. D., Denev, S., Dutton, M. F., Njobeh, P. B., Mosonik, J. S., Steenkamp, P. A., & Petkov, I. (2010). Complex etiology and pathology of mycotoxic nephropathy in South African pigs. *Mycotoxin Research*, 26(1), 31–46. <https://doi.org/10.1007/s12550-009-0038-7>

Stoll, D., Schmidt-Heydt, M., & Geisen, R. (2013). Differences in the Regulation of Ochratoxin A by the HOG Pathway in *Penicillium* and *Aspergillus* in Response to High Osmolar Environments. *Toxins*, 5(7), 1282–1298. <https://doi.org/10.3390/toxins5071282>

Streit, E., Schatzmayr, G., Tassis, P., Tzika, E., Marin, D., Taranu, I., Tabuc, C., Nicolau, A., Aprodu, I., Puel, O., & Oswald, I. P. (2012). Current Situation of Mycotoxin Contamination and Co-occurrence in Animal Feed—Focus on Europe. *Toxins*, 4(10), 788–809. <https://doi.org/10.3390/toxins4100788>

Studer-Rohr, I., Schlatter, J., & Dietrich, D. R. (2000). Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. *Archives of Toxicology*, 74(9), 499–510. <https://doi.org/10.1007/s002040000157>

Tirado, M. C., Clarke, R., Jaykus, L. A., McQuatters-Gollop, A., & Frank, J. M. (2010). Climate change and food safety: A review. *Food Research International*, 43(7), 1745–1765. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.07.003>

Toldrá, F. (2002). Dry-cured meat products. Food & Nutrition Press.

Tolosa, J., Rodríguez-Carrasco, Y., Ruiz, M. J., & Vila-Donat, P. (2021). Multi-mycotoxin occurrence in feed, metabolism and carry-over to animal-derived food products: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 158, 112661. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112661>

Tolosa, J., Ruiz, M. J., Ferrer, E., & Vila-Donat, P. (2020). Ochratoxin A: Occurrence and carry-over in meat and meat by-products. A Review. *Revue de Toxicologie*, 37(106), 106–110. <https://doi.org/10.1016/j.revttox.2020.02.002>

Toscani, T., Moseriti, A., Dossena, A., Dall'Asta, C., Simoncini, N., & Virgili, R. (2007). Determination of ochratoxin A in dry-cured meat products by a HPLC–FLD quantitative method. *Journal of Chromatography B*, 855(2), 242–248. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.05.010>

Van Der Merwe, K. J., Steyn, P. S., & Fourie, L. (1965b). 1304. Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxins A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* wilh. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 7083. <https://doi.org/10.1039/jr9650007083>

Van der Merwe, K. J., Steyn, P. S., Fourie, L., Scott, D. B., & Theron, J. J. (1965a). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, 205(976), 1112–1113. <https://doi.org/10.1038/2051112a0>

Van Egmond, H. P. (1991). Methods for determining ochratoxin A and other nephrotoxic mycotoxins. IARC Scientific Publications, 115, 57–70.

Van Loco, J., Elskens, M., Croux, C., & Beernaert, H. (2002). Linearity of calibration curves: Use and misuse of the correlation coefficient. *Accreditation and Quality Assurance*, 7(7), 281–285. <https://doi.org/10.1007/s00769-002-0487-6>

Vila-Donat, P., Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2018). A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. *Food and Chemical Toxicology*, 114, 246–259. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.044>

Vipotnik, Z., Rodríguez, A., & Rodrigues, P. (2017). *Aspergillus westerdijikiae* as a major ochratoxin A risk in dry-cured ham based-media. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 244–251. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.031>

Vlachou, M., Pexara, A., Solomakos, N., & Govaris, A. (2022). Ochratoxin A in Slaughtered Pigs and Pork Products. *Toxins*, 14(2), 67. <https://doi.org/10.3390/toxins14020067>

Völkel, I., Schröer-Merker, E., & Czerny, C.-P. (2011). The Carry-Over of Mycotoxins in Products of Animal Origin with Special Regard to Its Implications for the European Food Safety Legislation. *Food and Nutrition Sciences*, 02(08), 852–867. <https://doi.org/10.4236/fns.2011.28117>

Wacoo, A. P., Wendi, D., Vuzi, P. C., & Hawumba, J. F. (2014). Methods for Detection of Aflatoxins in Agricultural Food Crops. *Journal of Applied Chemistry*, 2014, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2014/706291>

Wang, G., Li, Y., Yang, B., Li, E., Wu, W., Si, P., & Xing, F. (2022). Regulates Morphological Development, Ochratoxin A Production, and Fungal Pathogenicity of Food Spoilage Fungus *Aspergillus westerdijikiae* Revealed by an Efficient Gene Targeting System. *Frontiers in Microbiology*, 13, 857726. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.857726>

Wang, Y., Li, F., Chen, J., Sun, Z., Wang, F., Wang, C., & Fu, L. (2021). High-throughput sequencing-based characterization of the predominant microbial community associated with characteristic flavor formation in Jinhua Ham. *Food Microbiology*, 94, 103643. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103643>

Wang, Y., Wang, L., Liu, F., Wang, Q., Selvaraj, J., Xing, F., Zhao, Y., & Liu, Y. (2016). Ochratoxin A Producing Fungi, Biosynthetic Pathway and Regulatory Mechanisms. *Toxins*, 8(3), 83. <https://doi.org/10.3390/toxins8030083>

Wei, X., & Sulik, K. K. (1993). Pathogenesis of craniofacial and body wall malformations induced by ochratoxin A in mice. *American Journal of Medical Genetics*, 47(6), 862–871. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320470613>

Wu, Q., Dohnal, V., Huang, L., Kuca, K., Wang, X., Chen, G., & Yuan, Z. (2011). Metabolic Pathways of Ochratoxin A. *Current Drug Metabolism*, 12(1), 1–10. <https://doi.org/10.2174/138920011794520026>

Zadravec, M., Vahčić, N., Brnić, D., Markov, K., Frece, J., Beck, R., Lešić, T., & Pleadin, J. (2020). A study of surface moulds and mycotoxins in Croatian traditional dry-cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 317, 108459. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108459>

Zhao, T., Shen, X. L., Chen, W., Liao, X., Yang, J., Wang, Y., Zou, Y., & Fang, C. (2017). Advances in research of nephrotoxicity and toxic antagonism of ochratoxin A. *Toxin Reviews*, 36(1), 39–44. <https://doi.org/10.1080/15569543.2016.1243560>

Zheng, M. Z., Richard, J. L., & Binder, J. (2006). A Review of Rapid Methods for the Analysis of Mycotoxins. *Mycopathologia*, 161(5), 261–273. <https://doi.org/10.1007/s11046-006-0215-6>

Seznam obrázků, tabulek a grafu

Obrázek 1: Strukturní vzorec OTA (Lukáš Rejman, 2024, vytvořeno v ACD/ChemSketch 12.0).....	8
Obrázek 2: Mikrohabitus <i>Aspergillus spp.</i> (Lukáš Rejman, 2024, dle Ellis, 2007)....	10
Obrázek 3: Mikrohabitus <i>Penicillium spp.</i> (Lukáš Rejman, 2024, dle Abdel-Azeem et al., 2021).....	11
Obrázek 4: Schéma kapalinového chromatografu (Lukáš Rejman 2024, vytvořeno v BioRender).....	20
Obrázek 5: Fáze výroby vzduchem sušených šunek (Lukáš Rejman, 2024, vytvořeno v BioRender).....	23
Obrázek 6: Schéma IAK (Lukáš Rejman 2024, vytvořeno v BioRender).....	32
Obrázek 7: Původ zakoupených šunek (Lukáš Rejman, 2024).....	33
Obrázek 8: Schéma extrakce a separace před HPLC-FLD analýzou.....	79
Tabulka 1: Oznámení přijatá systémem RASFF v ČR v roce 2022.....	4
Tabulka 2: Producenti OTA <i>Aspergillus spp.</i> a <i>Penicillium spp.</i> v mase a masných produktech.....	13
Tabulka 3: Orientační hodnoty pro OTA v krmivech.....	18
Tabulka 4: Národní limity některých zemí EU.....	18
Tabulka 5: Podmínky stanovení pro OTA.....	36
Tabulka 6: Výsledné koncentrace OTA ve vzorcích vzduchem sušených šunek.....	40
Tabulka 7: Statistické zpracování dat ve vzorcích sušených šunek.....	41
Tabulka 8: Maximální limity OTA v potravinách.....	64
Tabulka 9: Informace o testovaných vzorcích.....	66
Tabulka 10: Tradiční názvy vzduchem sušených šunek v různých státech.....	78
Graf 1: Chromatogram vzorku č. 118.....	78

Přílohy

Tabulka 8: Maximální limity OTA v potravinách

Číslo	Potraviny	Maximální limity OTA (µg/kg)
1.2.1.	Sušené ovoce	
1.2.1.1	Sušené hrozny révy vinné (korintky, rozinky a sultánky) a sušené fíky	8
1.2.1.2	Ostatní sušené ovoce	2
1.2.2.	Datlový sirup	15
1.2.3.	Pistácie, jež mají být před uvedením na trh pro konečného spotřebitele nebo před použitím jako složka potravin vytríděny nebo jinak fyzikálně ošetřeny	10
1.2.4.	Pistácie uváděné na trh pro konečného spotřebitele nebo určené k použití jako složka potravin	5
1.2.5.	Sušené byliny	10
1.2.6.	Kořeny zázvoru (sušené) pro použití v bylinných čajích	15
1.2.7.	Kořeny proskurníku lékařského (sušené), kořeny pampelišky (smetánky) (sušené) a květy pomerančovníku (sušené) pro použití v bylinných čajích nebo náhražkách kávy	20
1.2.8.	Slunečnicová semena, dýňová semena, semena melounu (vodního), konopná semena, sójové boby	5
1.2.9.	Nezpracovaná zrna obilovin	5
1.2.10.	Výrobky pocházející z nezpracovaných zrn obilovin a obiloviny uváděné na trh pro konečného spotřebitele, kromě výrobků uvedených v bodech 1.2.11., 1.2.12., 1.2.13., 1.2.23., 1.2.24.	3
1.2.11.	Pečivo, svačinky z obilovin a sníadaňové cereálie	
1.2.11.1	Výrobky neobsahují olejnatá semena, ořechy nebo sušené ovoce	2
1.2.11.2	Výrobky obsahující nejméně 20 % sušených hroznů révy vinné a/nebo sušených fíků	4
1.2.11.3	Ostatní výrobky obsahují olejnatá semena, ořechy nebo sušené ovoce	3
1.2.12.	Nealkoholické sladové nápoje	3
1.2.13.	Pšeničný lepek neuváděný na trh pro konečného spotřebitele	8

Číslo	Potraviny	Maximální limity OTA (µg/kg)
1.2.14.	Pražená kávová zrna a mletá pražená káva, kromě výrobků 1.2.15	3
1.2.15.	Rozpustná káva (instantní káva)	5
1.2.16.	Kakaový prášek	3
1.2.17.	Sušené koření, kromě produktů uvedených v bodě 1.2.18	15
1.2.18.	<i>Capsacium spp.</i> (sušené plody, celé nebo mleté, včetně chilli, mletého chilli, kajenského pepře a papriky)	20
1.2.19.	Lékořice (<i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Glycyrrhiza inflata</i> a další druhy)	
1.2.19.1	Kořen lékořice (sušený), též jako složka bylinných čajů	20
1.2.19.2	Výtažek z lékořice pro použití v potravinářských výrobcích, zejména v nápojích a cukrovinkách	80
1.2.9.3	Cukrovinky z lékořice obsahující ≥ 97 % výtažku z lékořice v sušině	50
1.2.19.4	Ostatní cukrovinky z lékořice	10
1.2.20.	Víno (7) a ovocné víno	2
1.2.21.	Aromatizované víno, aromatizované vinné nápoje a aromatizované vinné koktejly (8)	2
1.2.22.	Hroznová šťáva, hroznová šťáva z koncentrátu, koncentrovaná hroznová šťáva, hroznový nektar, hroznový mošt a koncentrovaný hroznový mošt uváděné na trh pro konečného spotřebitele	2
1.2.23.	Obilné a ostatní příkrmy pro kojence a malé děti (3)	0,5
1.2.24.	Potraviny pro zvláštní léčebné účely určené pro kojence a malé děti (3)	0,5

(Úřední věstník Evropské unie, 2023)

Tabulka 9: Informace o testovaných vzorcích

Vzorek	Šarže	Datum spotřeby	Město	Hmotnost (g)
1	Lot. Nr:FA2306702	06.06.2023	Hořice	100
2	L:2305700003	17.06.2023	Hořice	150
3	L. 1230792002	18.06.2023	Hořice	90
4	22308626	05.06.2023	Hořice	100
5	L:2302500075	10.05.2023	Hořice	80
6	23000IIQ	20.04.2023	Hořice	80
7	L:2305700003	17.06.2023	Jičín	150
8	Lot. Nr: FA2308102	20.06.2023	Jičín	100
9	22308626	05.06.2023	Jičín	100
10	Lot. Nr: FA2306702	06.06.2023	Nová Paka	100
11	L:2305700003	17.06.2023	Nová Paka	150
12	22308626	05.06.2023	Nová Paka	100
13	23010000062	10.04.2023	Hradec Králové, Brněnská	80
14	L.1430680001	07.06.2023	Hradec Králové, Brněnská	70
15	23000EHH	09.04.2023	Hradec Králové, Brněnská	80
16	24131674	13.06.2023	Hradec Králové, Brněnská	80
17	22308626	05.06.2023	Hradec Králové, Brněnská	100
18	Lot. Nr: FA2307403	13.06.2023	Hradec Králové, Brněnská	100

Vzorek	Šarže	Datum spotřeby	Město	Hmotnost (g)
19	L:2305700003	17.06.2023	Hradec Králové, Brněnská	150
20	170332561	12.06.2023	Hradec Králové, Brněnská	80
21	170332565	12.06.2023	Hradec Králové, Brněnská	80
22	Lot. Nr: FA2308102	20.06.2023	Hradec Králové, Brněnská	100
23	170423403	21.05.2023	Hradec Králové, Brněnská	80
24	23000GXY	07.05.2023	Hradec Králové, Brněnská	80
25	23086000574	10.06.2023	Hradec Králové, Brněnská	90
26	L1430260601	26.04.2023	Hradec Králové, Brněnská	70
27	23110576	05.08.2023	Hradec Králové, Kukleny	70
28		16.06.2023	Hradec Králové, Kukleny	80
29	R01220T	05.05.2023	Hradec Králové, Adalbertinum	70
30	2306500026	20.05.2023	Hradec Králové, Březhrad	90
31	L143081101	20.06.2023	Hradec Králové, Březhrad	70
32	2306000072	30.05.2023	Hradec Králové, Březhrad	80
33	L1430861301	25.06.2023	Hradec Králové, Březhrad	70
34	23000JDS	28.04.2023	Hradec Králové, Slezské	80

Vzorek	Šarže	Datum spotřeby	Město	Hmotnost (g)
35	23000JCT	28.04.2023	Hradec Králové, Akademika B.	80
36	23505563	24.04.2023	Hradec Králové, Akademika B.	100
37	L 02361154	26.05.2023	Hradec Králové, Akademika B.	100
38	170448945	29.06.2023	Hradec Králové, Brněnská	80
39	23086000575	10.06.2023	Hradec Králové, Březhrad	90
40	23000LDB	28.05.2023	Hradec Králové, Brněnská	80
41	2306000072	30.05.2023	Hradec Králové, Brněnská	80
42	L: 1430861201	25.06.2023	Hradec Králové, Brněnská	70
43	L.1430811201	20.06.2023	Hradec Králové, Brněnská	70
44	L. 1430861301	25.06.2023	Jičín	70
45	2307200026	27.05.2023	Jičín	90
46	2306000072	30.05.2023	Jičín	80
47	23000NFE	19.05.2023	Jičín	80
48	23110584	22.05.2023	Jičín	100
49	L. 02361522	09.06.2023	Jičín	100
50	L:2302500075	10.05.2023	Chrudim	80
51	170423403	30.05.2023	Litomyšl	80

Vzorek	Šarže	Datum spotřeby	Město	Hmotnost (g)
52	Lot. Nr: FA2308102	20.06.2023	Litomyšl	100
53	170423403	30.05.2023	Vysoké Mýto	80
54	Lot. Nr: FA2306702	06.06.2023	Vysoké Mýto	100
55	2309000013	14.06.2023	Hradec Králové, Brněnská	90
56		23.06.2023	Hradec Králové, Kukleny	80
57	L: 2307800003	30.06.2023	Jičín	240
58	L: 2307200205	30.06.2023	Jičín	70
59	23410554	10.08.2023	Hradec Králové, Orlice Park	70
60		02.06.2023	Hradec Králové, Orlice Park	80
61		20.07.2023	Hradec Králové, Orlice Park	80
62	23109562	29.07.2023	Hradec Králové, Orlice Park	100
63	L: 1430970701	06.07.2023	Hradec Králové, Brněnská	70
64	170423403	18.06.2023	Hradec Králové, Brněnská	80
65	L: 2307800003	30.06.2023	Hradec Králové, Brněnská	240
66	L: 2307200205	30.06.2023	Hradec Králové, Brněnská	70

Vzorek	Šarže	Datum spotřeby	Město	Hmotnost (g)
67	170379379	27.07.2023	Hradec Králové, Brněnská	90
68	Lot. Nr: FA2311004	19.07.2023	Hradec Králové, Brněnská	100
69	23000NDK	19.05.2023	Hradec Králové, Akademika Bedrny	80
70		09.06.2023	Hradec Králové, Kukleny	80
71	23114597	02.09.2023	Hradec Králové, Kukleny	70
72		04.08.2023	Hradec Králové, Kukleny	80
73	23000PXS	25.06.2023	Hradec Králové, Brněnská	80
74	2311000013	04.07.2023	Hradec Králové, Brněnská	90
75	L: 1431170301	26.07.2023	Hradec Králové, Brněnská	70
76	2307400073	13.06.2023	Hradec Králové, Brněnská	80
77	Lot. Nr: FA2311607	25.07.2023	Hradec Králové, Brněnská	100
78	L: 230001	14.01.2024	Hradec Králové, Brněnská	240
79	23317627	25.09.2023	Hořice	250
80	L: 2303300033	18.05.2023	Hořice	80
81	L300652	06.07.2023	Hořice	90
82		16.06.2023	Hořice	90

Vzorek	Šarže	Datum spotřeby	Město	Hmotnost (g)
83	7631221801	16.07.2023	Hořice	80
84	23000RUS	23.06.2023	Hořice	80
85	23000NFM	24.05.2023	Hořice	80
86	7531012301	26.06.2023	Hradec Králové, Aupark	80
87	L 300760	20.07.2023	Hradec Králové, Aupark	90
88		17.06.2023	Hradec Králové, Aupark	90
89	23117526	22.09.2023	Hradec Králové, Aupark	250
90	L: 1430861301	25.06.2023	Hradec Králové, Brněnská	70
91	L: 1430811101	20.06.2023	Hradec Králové, Brněnská	70
92	170423403	02.07.2023	Hradec Králové, Brněnská	80
93	23000LDB	28.05.2023	Hradec Králové, Březhrad	80
94	23000RUS	23.06.2023	Hradec Králové, Slezské	80
95	L 300982	17.08.2023	Hradec Králové, Slezské	100
96	L. 02414230	15.06.2023	Hradec Králové, Akademika B.	100
97	23213536	12.06.2023	Hradec Králové, Akademika B.	100
98	23000RUS	23.06.2023	Hradec Králové, Akademika B.	80
99	L 300982	18.08.2023	Hradec Králové, Akademika B.	100
100	7531012301	26.06.2023	Hradec Králové	80

Vzorek	Šarže	Datum spotřeby	Město	Hmotnost (g)
101	2305200054	21.06.2023	Hradec Králové	80
102	23000LDB	28.05.2023	Hradec Králové	80
103	Lot. Nr: FA2311607	25.07.2023	Hradec Králové Víta N.	100
104	L. 1231181301	27.07.2023	Hradec Králové Víta N.	90
105	L: 230001	14.01.2023	Hradec Králové Víta N.	240
106	170423403	23.06.2023	Hradec Králové Víta N.	80
107	L: 2307800003	30.06.2023	Hradec Králové Víta N.	70
108	23509545	03.08.2023	Hradec Králové Orlice Park	100
109	23515559	14.09.2023	Hradec Králové Orlice Park	70
110		11.08.2023	Hradec Králové Orlice Park	80
111		02.06.2023	Hradec Králové Orlice Park	80
112	L 300852	01.08.2023	Hradec Králové Aupark	90
113	L: 2305800051	12.06.2023	Hradec Králové Aupark	80
114	66312200	16.07.2023	Hradec Králové Aupark	100
115	L 300982	18.08.2023	Chlumeč	100
116	23000RUS	23.06.2023	Chlumeč	80
117	170423403	02.07.2023	Chlumeč	80
118	Lot. Nr: FA2311607	25.07.2023	Chlumeč	100
119	23000RRA	23.06.2023	Nový Bydžov	80
120	L 300982	18.08.2023	Nový Bydžov	100

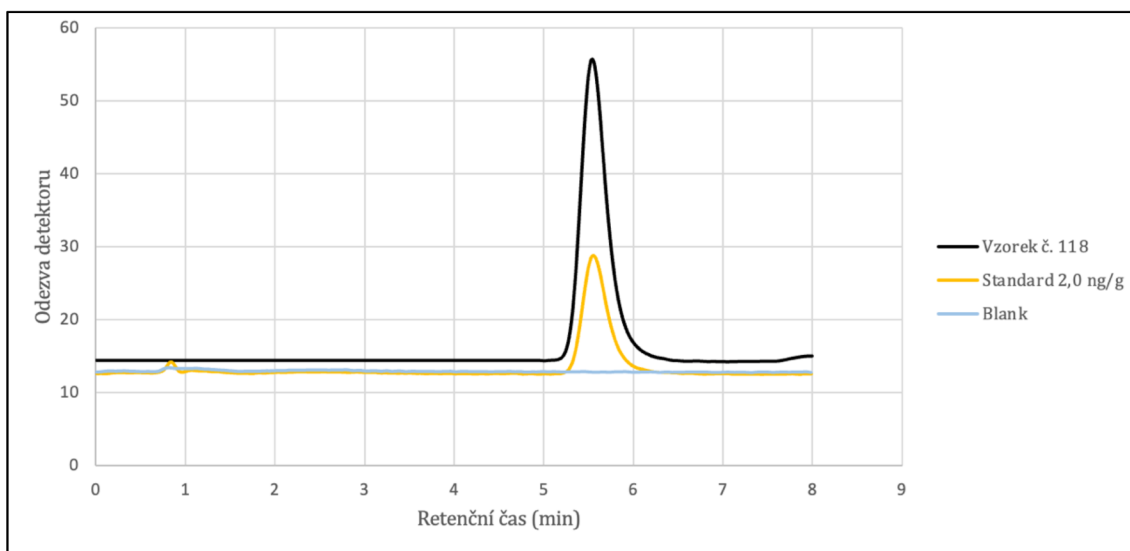
Vzorek	Šarže	Datum spotřeby	Město	Hmotnost (g)
121	Lot. Nr: FA2311004	19.07.2023	Nový Bydžov	100
122	170423403	23.06.2023	Nový Bydžov	80
123	L. 1231181301	27.07.2023	Nový Bydžov	90
124		11.08.2023	Hradec Králové, Kukleny	80
125	23515559	14.09.2023	Hradec Králové, Kukleny	70
126	L 300982	17.08.2023	Hradec Králové, Akademika B.	100
127	7631221901	16.07.2023	Hradec Králové, Eduarda Beneše	80
128	L 301028	23.08.2023	Hradec Králové, Eduarda Beneše	90
129		16.06.2023	Hradec Králové, Eduarda Beneše	90
130	091280423B	27.07.2023	Hradec Králové, Eduarda Beneše	90
131	L: 680174992	24.06.2023	Hradec Králové, Eduarda Beneše	100
132	L: 2305900045	13.06.2023	Hradec Králové, Eduarda Beneše	80
133	66312200	16.07.2023	Hradec Králové, Eduarda Beneše	100
134	L 1431170301	26.07.2023	Hradec Králové, Brněnská	70
135	23117000163	11.07.2023	Hradec Králové, Brněnská	90

Vzorek	Šarže	Datum spotřeby	Město	Hmotnost (g)
136	L. 1431321101	10.08.2023	Hradec Králové, Brněnská	70
137	2310200062	11.07.2023	Hradec Králové, Brněnská	80
138	5608469	19.07.2023	Hradec Králové, Brněnská	80
139		25.08.2023	Hradec Králové, Kukleny	80
140	23111554	12.08.2023	Hradec Králové, Kukleny	100
141	23417579	26.09.2023	Hradec Králové, Kukleny	70
142		16.06.2023	Hradec Králové, Kukleny	80
143	L. 1431321101	10.08.2023	Jičín	70
144	2308800147	27.06.2023	Jičín	80
145	2311000013	04.07.2023	Jičín	90
146	23319552	31.07.2023	Jičín	100
147	L. 02445778	30.07.2023	Jičín	100
148	Lot. Nr: FA2312505	03.08.2023	Jičín	100
149	5620228	30.07.2023	Jičín	80
150	2313000035	24.07.2023	Hradec Králové, Březhrad	90
151	23000QFN	25.06.2023	Hradec Králové, Březhrad	80
152	L. 1431170301	26.07.2023	Hradec Králové, Březhrad	70
153	2308800147	27.06.2023	Hradec Králové, Březhrad	80
154	L. 1431521001	30.08.2023	Hradec Králové, Březhrad	70
155	2313000035	24.07.2023	Hradec Králové, Brněnská	90

Vzorek	Šarže	Datum spotřeby	Město	Hmotnost (g)
156	23000QFN	25.06.2023	Hradec Králové, Brněnská	80
157	L. 1431521001	30.08.2023	Hradec Králové, Brněnská	70
158	L: 1431520901	30.08.2023	Hradec Králové, Brněnská	70
159	2310800061	17.07.2023	Hradec Králové, Brněnská	80
160	Lot. Nr: FA2312505	03.08.2023	Hradec Králové, Brněnská	100
161	L 070623	04.12.2023	Pardubice	100
162	2311600044	24.08.2023	Pardubice	80
163	24152231	14.08.2023	Pardubice	80
164	72740156	01.08.2023	Pardubice	100
165	19R230222	21.08.2023	Pardubice	75
166	23000SVJ	18.07.2023	Pardubice	80
167	L: 2355779070	28.07.2023	Pardubice	100
168	7631221801	16.07.2023	Pardubice	80
169	23518527	05.10.2023	Pardubice	250
170	23000XAR	05.08.2023	Hradec Králové, Brněnská	80
171	Lot. Nr: FA2313203	10.08.2023	Hradec Králové, Brněnská	100
172	170423403	13.08.2023	Hradec Králové, Brněnská	80

Vzorek	Šarže	Datum spotřeby	Město	Hmotnost (g)
173	23515547	14.09.2023	Hradec Králové Orlice Park	100
174	23417579	26.09.2023	Hradec Králové Orlice Park	70
175		08.09.2023	Hradec Králové Orlice Park	80
176		11.08.2023	Hradec Králové Orlice Park	80
177	239146	03.09.2023	Hradec Králové Orlice Park	70
178	Lot. Nr: FA2313801	16.08.2023	Litomyšl	100
179	170423403	19.07.2023	Litomyšl	80
180	L 301131	06.09.2023	Litomyšl	90
181	L: 680177449	29.07.2023	Litomyšl	100
182	24142094	13.07.2023	Litomyšl	80
183	L: 2315700145	03.12.2023	Litomyšl	80
184	66311702	11.07.2023	Litomyšl	100
185	23518527	05.10.2023	Litomyšl	250
186	7631221901	16.07.2023	Česká Třebová	80
187	L 301131	06.09.2023	Česká Třebová	90
188		11.07.2023	Česká Třebová	90
189	091280423B	27.07.2023	Česká Třebová	90
190	L: 2307500044	29.06.2023	Česká Třebová	80
191	23117526	22.09.2023	Česká Třebová	250

Vzorek	Šarže	Datum spotřeby	Město	Hmotnost (g)
192	7631221801	16.07.2023	Hradec Králové	80
193	2312900061	06.09.2023	Hradec Králové	80
194	23000SVJ	18.07.2023	Hradec Králové	80
195	Lot. Nr: FA2313203	10.08.2023	Hradec Králové, Víta Nejedlého	100
196	170423403	13.08.2023	Hradec Králové, Víta Nejedlého	80
197	23216564	17.09.2023	Litomyšl	70
198	2311000013	04.07.2023	Vysoké Mýto	90
199	L. 1430970701	06.07.2023	Vysoké Mýto	70
200	2309600047	05.07.2023	Vysoké Mýto	80



Graf 1: Chromatogram vzorku č. 118, spolu se standardem (2,0 ng/g) a blankem

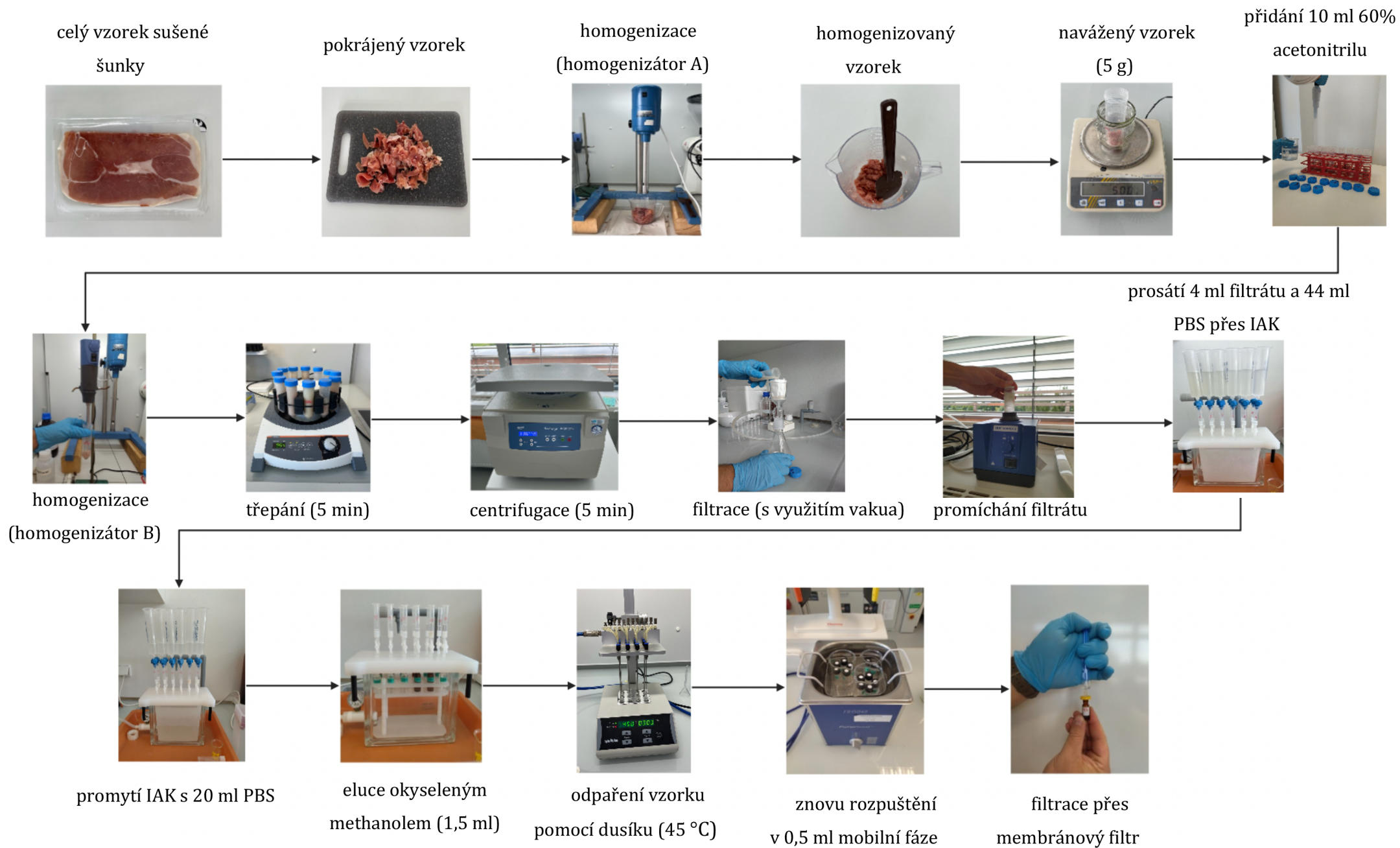
Pozn. Výpočet koncentrace se musel dělit 2, protože se rozpouštěl v 500 μ l mobilní fáze a chromatogram odpovídá tak 2 g vzorku.

Tabulka 10: Tradiční názvy vzduchem sušených šunek v různých státech

Stát	Lokální název
Belgium, Ghent	Ganda Ham
Bulgaria, Elena	Elenski But
China, Jinhua	Jinhua Ham
China, Yunnan	Xuanwei ham
France, Bayonne	Jambon de Bayonne
France, Corsica	Jambon sec de Corse
France, Hautes-Pyrénées	Jambon Noir de Bigorre
France, Pyrénées-Atlantiques	Jambon du Kintoa
Italy	Prosciutto crudo Saint Marcel
Italy	Crudo di Cuneo
Italy, Carpegna	Prosciutto di Carpegna
Italy, Perugia	Prosciutto di Norcia
Italy, Modena	Prosciutto di Modena

Stát	Lokální název
Italy, Parma	Prosciutto di Parma
Italy, San Daniele Del Friuli	Prosciutto di San Daniele
Italy, Veneto	Prosciutto Veneto Berico-Euganeo
Portugal	Presunto
Portugal, Barrancos	Presunto de Barrancos
Portugal, Campo Maior	Presunto de Campo Maior e Elvas
Portugal, Santana da Serra	Presunto de Santana da Serra
Slovenia	Vipavski pršut
Slovenia, Sežana	Kraški pršut
Spain	Jamón Serrano
Spain	Jamón ibérico de cebo
Spain	Jamón ibérico de cebo de campo
Spain, Cáceres	Dehesa de Extremadura
Spain, Galicia	Lacón Gallego
Spain, Jabugo	Jabugo
Spain, Portugal	Jamón ibérico de bellota
Spain, Portugal	Jamón Ibérico
Spain, Portugal	Jamón 100 ibérico de bellota
Spain, Teruel	Jamón de Teruel
Spain, Salamanca	Guijuelo
Spain, Serón	Jamón de Serón
Spain, Travélez	Jamón de Trevélez
Spain, Cordoba	Los Pedroches
United Kingdom, Wales	Carmarthen Ham

(AtlasMedia Ltd., 2024)



Obrázek 8: Schéma extrakce a separace před HPLC-FLD analýzou