

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Diplomová práce

2018

Martin Šrámek

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

Diplomová práce

Stanovení aflatoxinu M1 v močích české populace

Vypracoval: Martin Šrámek

Vedoucí práce: doc. RNDr. František Malíř Ph.D.

Studijní program: N1501 Biologie

Studijní obor: P-SBN Systematická biologie a ekologie



Zadání diplomové práce

Autor: Martin Šrámek

Studium: S14BI010NP

Studijní program: N1501 Biologie

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Název diplomové práce: Stanovení aflatoxinu M1 v močích české populace

Název diplomové práce AJ: Determination of aflatoxin M1 in urine of the Czech population

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Česká populace je exponována aflatoxinu B1 majoritně prostřednictvím přívodu potravin a potravinových surovin, ale v jaké míře, není přesně známo. U člověka po dietární expozici aflatoxinu B1 dochází k biotransformaci aflatoxinu B1, přibližně v rozsahu 1,2-2,3 % na jeho 4-hydroxylovaný derivát-aflatoxin M1, který přechází do moče nebo do mateřského mléka. Dále je známo, že přívod aflatoxinu M1 mlékem a mléčnými výrobky prostřednictvím potravin české provenience je u naší populace téměř zanedbatelný. Proto po předchozích extrakcích a separacích aflatoxinu M1 na imunoafinitních kolonkách ze vzorků moče a jeho následném stanovení metodou HPLC-FLD bude v rámci pilotní studie monitorována velikost expozice aflatoxinu B1.

Guevara-Gonzales, R.G et al. (2011) Aflatoxins ? Biochemistry and Molecular Biology. Rijeka, Croatia: InTech. Gupta, R.C. Biomarkers in Toxicology. USA, San Diego: Elsevier, 2014.

Garantující pracoviště: Katedra biologie,
Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: doc. RNDr. František Malíř, Ph.D.

Oponent: Vladimír Ostrý

Datum zadání závěrečné práce: 20.1.2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Stanovení aflatoxinu M₁ v močích české populace vypracoval samostatně. Veškeré zdroje, které jsem použil a citoval, jsem uvedl v seznamu použité literatury.

V Hradci Králové dne

Poděkování:

Tímto bych chtěl poděkovat vedoucímu mé diplomové práce panu doc. RNDr. Františku Malířovi, Ph.D. za odborný dohled a poskytování konzultací během vypracování mé diplomové práce.

Dále bych chtěl poděkovat panu Ing. Tomáši Roubalovi a paní Blance Říčařové ze Zdravotního ústavu se sídlem v Ústí nad Labem s pobočkou v Hradci Králové, z oddělení mykotoxinů, kde jsem výzkum prováděl, za odborné vedení při zpracování vzorků a z nich vzešlých dat.

Moje poděkování patří také paní Janě Volfové za pomoc při vyhodnocování dat a jejich uspořádání.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat mojí rodině za neustálou podporu po celou dobu mého studia na Univerzitě Hradec Králové.

Anotace práce:

ŠRÁMEK, M. *Stanovení aflatoxinu M₁ v močích české populace*. Hradec Králové: Přírodovědecká fakulta Univerzity Hradec Králové, 2015. 51 s. Diplomová práce.

Česká populace je exponována aflatoxinu B₁ majoritně prostřednictvím přívodu z potravin a potravinových surovin, ale v jaké míře, není přesně známo. U člověka po dietární expozici aflatoxinu B₁ dochází k biotransformaci aflatoxinu B₁ přibližně v rozsahu 1,2-2,3 % na jeho 4-hydroxylovaný derivát - aflatoxin M₁, který přechází do mateřského mléka nebo do moče. Přívod aflatoxinu M₁ mlékem a mléčnými výrobky je u naší populace považován za méně významný. Na základě uvedených skutečností byla monitorována expozice aflatoxinu B₁ u vybrané české populace stanovením aflatoxinu M₁ v moči metodou HPLC-FLD po předchozí extrakci a separaci aflatoxinu M₁ na imunoafinitních kolonkách.

Klíčová slova:

aflatoxin M₁, moč, česká populace, monitoring, expozice, HPLC-FLD

Anotation:

ŠRÁMEK, M. *Determination of the aflatoxin M₁ in urine of Czech population*. Hradec Králové: Faculty of Science, University of Hradec Králové, 2015. 51 p. Diploma Thesis.

Czech population is exposed to aflatoxin B₁ by majority thought dietary intake from food and food stuffs, but to what extent is not known. In human, after dietary exposure to aflatoxin B₁, is aflatoxin B₁ biotransformed, approximately in the range of 1.2 - 2.3 %, on its 4-hydroxylated derivative - aflatoxin M₁, which passes in to the urine or the breast milk. It is also known that the intake of aflatoxin M₁ by milk and milk products through food and food stuffs of the Czech origin in our population is almost negligible. On the basis of these facts, the exposure of aflatoxin B₁ in the selected Czech population was monitored by HPLC determination of aflatoxin M₁ after the extraction and separation of aflatoxin M₁ on the immunoaffinity columns.

Keywords:

aflatoxin M₁, urine, Czech population, monitoring, exposure, HPLC-FLD

Obsah

Obsah	8
1. ÚVOD	12
2. AFLATOXINY	14
2.1 Chemická charakteristika aflatoxinů	16
2.2 Toxikologické hodnocení	16
2.3 Původci aflatoxinů	17
2.4 Aflatoxin M ₁	20
2.4.1 AFM ₁ fyzikální a chemická charakteristika	21
2.4.1.1 Chemická charakteristika	21
2.4.1.2 Fyzikální charakteristika	21
2.4.2 Biotransformace AFB ₁	22
3. MOČ	22
4. PUFRY	25
4.1 Octanový pufr	25
5. METODIKA	27
5.1 Evidence vzorků	27
5.2 Stanovení pH ve vzorcích moči	27
5.2.1 Materiál, přístroje a použité chemikálie	27
5.2.2 Pracovní postup	28
5.2.2.1 Kalibrace pH metru	28
5.2.2.2 Stanovení pH ve vzorcích moči	28
5.3 Stanovení obsahu AFM ₁ ve vzorcích moči	28
5.3.1 Bezpečnost práce s AFM ₁	28
5.3.2 Materiál, přístroje a použité chemikálie	29
5.3.3 Pracovní postup	29
5.3.3.1 Příprava octanového pufru	29
5.3.3.2 Příprava vzorků pro HPLC stanovení – pracovní postup	30
5.3.4 Přístrojové podmínky při stanovení AFM ₁ metodou HPLC	32
5.3.5 Použité chemikálie	32
5.3.6 Stanovení AFM ₁ ve vzorcích moči metodou HPLC – FLD	32
5.3.6.1 Metoda HPLC	32
5.3.6.2 Validace metody	35

5.3.6.3 HPLC, nastavení přístroje a uvedení do chodu	36
5.3.6.4 Podmínky chromatografického stanovení.....	36
5.3.6.5 Analýza vzorku na HPLC.....	36
5.3.6.6 Derivatizace pro AFM ₁	37
5.3.6.7 Kalibrace	38
5.3.6.8 Výpočet obsahu mykotoxinu ve vzorku.....	38
6. Výsledky	39
6.1 Výsledky měření pH ve vzorcích moči	39
6.2 Výsledky HPLC stanovení obsahu AFM ₁ ve vzorcích moči	40
7. Diskuse	41
8. Závěr	44
9. Použitá literatura.....	45
10. Seznam obrázků, tabulek a grafů	51

Seznam zkratk

AFB ₁	aflatoxin B ₁
AFM ₁	aflatoxin M ₁
CAS	Chemical Abstracts Services
HPLC	High – performance liquid chromatography = vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC - FLD	Kapalinová chromatografie s fluorescenčním detektorem
IARC/WHO	International AgencyforResearch on Cancer = Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (Lyon)
LOQ	Limit of quatification = mez stanovitelnosti
WHO	World Health Organization, Světová zdravotnická organizace

Tabulka 1 Seznam zkratk

Terminologický slovník

acetonitril	nejjednodušší organický nitril se vzorcem CH_3CN , v analytické chemii využíván jako složka mobilní fáze pro HPLC stanovení
adjustace	příprava všeho potřebného pro činnost
aflatoxin	mykotoxin produkováný plísněmi rodu <i>Aspergillus</i> , nejčastěji <i>Aspergillus flavus</i> a <i>A.parasiticus</i>
citrinin	mykotoxin produkováný plísněmi rodu <i>Aspergillus</i> a <i>Penicillium</i>
deoxynivalenol, diacetoxyscirpenol, HT – 2 toxin, T – 2 toxin	toxiny produkované plísněmi rodu <i>Fusarium</i> , vyskytující se především jako kontaminanty obilovin
eluát	vyluhovaná látka (analyt)
fumonisin	mykotoxin produkováný plísněmi rodu <i>Fusarium</i>
hepatocyt	jaterní buňka
mobilní fáze	tzv. eluent
mykotoxin	toxin produkováný toxinogenními vláknitými mikroskopickými houbami (plísněmi)
plísně	vláknité mikroskopické houby
slepý vzorek	kontrolní vzorek připravený identickým způsobem jako měřené vzorky (tzn.: za použití identických chemikálií), ale neobsahující měřená analyt (AFM_1)
standard	v analytické chemii slouží k posouzení kvality (detekce) či stanovení kvantity

vialka	spaciální skleněná lahvička na vzorky
zearalenon	mykotoxin produkováný plísní rodu <i>Fusarium</i> , jedná se o lakton kyseliny β – resorcylové, obecně méně toxický než jiné mykotoxiny, působí zejména estrogenně

Tabulka 2 Terminologický slovník

1.ÚVOD

V současné době globalizace, kdy je evropský, potažmo český, potravinářský trh stále ve větší míře zásobován dovozovými potravinami, vzniká silnější potřeba kontroly jejich zdravotní nezávadnosti. Potraviny mohou být kontaminovány celou řadou látek od chemikálií vyrobených člověkem (umělá hnojiva, pesticidy) až po přirozeně se vyskytující látky biogenního původu, např. mykotoxiny. Právě mykotoxiny představují v současnosti pro člověka závažné zdravotní nebezpečí. Mykotoxiny, významné naturální toxiny, vznikající jako sekundární metabolity toxinogenních vláknitých mikroskopických hub – plísní. Mezi nejvýznamnější mykotoxiny řadí světová zdravotnická organizace (WHO) aflatoxiny, deoxynivalenol, fumonisin B₁ a B₂, HT – 2 toxin, T – 2 toxin, ochratoxiny a zearalenon (WHO, 2002). Ty jsou spolu s dalšími kontaminanty sledovány v České republice v rámci Monitoringu zdravotního stavu obyvatelstva.

Zdrojem kontaminace potravin mykotoxiny respektive toxinogenními plísněmi může být špatné počasí v době zrání nebo sklizně (deštivé období a z toho vyplívající vlhkost obilnin), stres rostlin ze sucha (neboli snížení obranyschopnosti rostliny), zvýšené poškození hmyzem, mechanické poškození při sklizni (jakékoli poškození může při vhodných podmínkách působit jako vstupní brána mikroorganismům), nedostatečné vysušení před uskladněním a v neposlední řadě nevhodné skladovací podmínky. Nevhodné skladovací podmínky jsou největším rizikem, jelikož velká koncentrace uskladněné komodity na jednom místě je ideálním předpokladem pro rychlé šíření. Zachování vhodných podmínek pro růst plísní se ukazuje jako klíčový, protože ani toxinogenní plísně nevytvářejí vždy toxiny, respektive potřebují k tomu vhodné podmínky, tj. vhodnou teplotu a vlhkost. V kombinaci těchto faktorů a špatné kontroly uskladněných zemědělských komodit na výskyt toxinů (laboratorní cestou) může dojít k tomu, že takto zamořené potraviny se dostávají buď přímo k člověku, např. cereálie, mouka, skořápkové plody, ořechy, nebo formou krmiv chovnému dobytku a následně jím produkováných komodit, například v mléce nebo mase, opět do jídelníčku člověka.

Cílem této práce je ověřit si hypotézu, zda je vybraná populace v České republice vystavena aflatoxinu B₁ stanovením aflatoxinu M₁ v moči. Podkladem pro

laboratorní výzkum bylo k dispozici 40 vzorků od anonymních pacientů s onkologickým onemocněním ledvin a močových cest. Zpracování vzorků a jejich následná analýza proběhla na pracovišti analýzy mykotoxinů Zdravotního ústavu v Hradci Králové. Pro extrakci aflatoxinu M₁ byly použity imunoafinitní kolonky AFLAREP® M, následná analýza proběhla metodou HPLC – FLD.

2. AFLATOXINY

Aflatoxiny jsou nejspíše nejvíce známými a vědecky prozkoumanými mykotoxiny na celém světě (Malíř & Ostrý, 2012). Aflatoxiny jsou toxické látky, které byly objeveny v 60. letech 20. století ve spojitosti s epidemií označovanou jako „krůtí X onemocnění“ (Sargeant et al., 1961). K této epidemii došlo v oblasti Londýna a uhynulo při ní 100 000 krůtích kuřat. Příčinou byla krmná moučka Rosseti z podzemnice olejné přidaná do krmiv (Hetcote & Hybert, 1978; Malíř et al., 2003). U ní bylo zjištěno zamoření aflatoxinu. Příznaky provázející otravu byly popsány jako anorexie, stav letargie a slabost křídel. Následná pitva prokázala poškození jaterního parenchymu a proliferaci epitelu žlučovodu. Jelikož nebyl zjištěn bakteriální ani virový původce, bylo onemocnění charakterizováno jako intoxikace. Jako možný zdroj intoxikace byla předpokládána arašídová moučka brazilské provenience, z níž byla následně chromatograficky izolována intenzivně modře a zeleně fluoreskující látka. U ní byl experimentálně prokázán efekt způsobující „krůtí X onemocnění“. Jako původce a zdroj látky byla odhalena vláknitá houba *Aspergillus flavus*, z jejíhož názvu vzniklo označení pro celou skupinu mykotoxinů aflatoxiny (*Aspergillus flavus toxins*). Krátce po té došlo v USA k podobnému onemocnění a to k epidemii hepatomu u pstruhů, způsobené kontaminovaným bavlníkovým olejem přidaným do krmiva (Malíř et al., 2003).

Tyto incidenty, vedoucí k popsání aflatoxinů však nebyly prvními popsány střety s toxickými účinky mykotoxinů. Dá se říci, že různé intoxikace mykotoxiny provázejí lidstvo již od zrodu zemědělství. Již roku 1944 došlo k onemocnění zvanému jako „Mal des Ardents“, při kterém došlo k úmrtí 40 000 obyvatel francouzské Akvitanie a Limoges (Baudrimont, 1995). Viníkem byl vzniklý ergotismus, jehož původcem bylo požití žita kontaminovaného námelem. Ještě starším písemným záznamem proběhnuvší intoxikace mykotoxiny je popsána již v biblickém Starém zákoně (Schoental, 1984).

Aflatoxiny jsou produkovány vláknitými houbami – plísněmi rodu *Aspergillus*, konkrétně třemi druhy – *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* a *A. nomius* (Kurtzman et al., 1987; Reddy et al. 2011). Zatímco *A. flavus* produkuje pouze aflatoxiny skupiny B (B₁ a B₂), *A. parasiticus* AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ (Dorner et al., 1984). Tyto plísně jsou za určitých podmínek schopny napadat téměř každý

organický substrát, především rostliny a rostlinné produkty. Podmínky pro růst jsou velmi důležité, protože toxinogenní plísň jsou schopny produkovat toxiny pouze za optimálních podmínek charakterizovaných zvýšenou vlhkostí (vlhkost vyšší než 14%) a teplotou v rozmezí 25 – 28°C (Suchý & Herzig, 2005). Dalšími podmínkami důležitými pro biosyntézu aflatoxinů jsou pH, přítomnost kyslíku a obsah stopových prvků (Suchý & Herzig, 2005), zejména Zn a Mn (Betina, 1990). Aflatoxiny jsou rozděleny na čtyři přirozené typy a to na AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ (Patočka *et al.*, 2004), z nichž se nejčastěji vyskytuje AFB₁. Označení toxinů vyplývá z jejich chování v UV světle, kdy aflatoxiny ze skupiny B vykazují intenzivní modrou fluorescenci (blue) a skupina G zelenou (green) (Patočka *et al.*, 2004). Aflatoxiny skupiny M (AFM₁, AFM₂) jsou hydroxylované metabolity AFB₁ a B₂. Nacházejí se v mléce savců, jejich krvi a moči jako produkty biotransformace po předchozí expozici AFB₁ a AFB₂ (Groopman, 1994), z čehož vychází označení M, neboli mléčný toxin (milk toxin) (Višňovský *et al.*, 1997). Číselný index znázorňuje pořadí v chromatografickém poli směrem od cíle ke startu.

Konkrétní poměrové podíly výskytu AFB₁, B₂, G₁, G₂ jsou závislé na napadení dané komodity konkrétním druhem z rodu *Aspergillus*. AFB₁ produkovaný druhem *A. flavus* je nejběžněji se vyskytující aflatoxin. Výskyt AFG₁ je vázána na přítomnost aflatoxinu B₁, v jehož nepřítomnosti nebyl detekován. AFB₂ a G₂ se objevují zpravidla v nízkých koncentracích. AFM₁, jakožto metabolický produkt hydroxylace AFB₁, může být zjištěn bez přítomnosti jiných aflatoxinů (IARC, 1993).

Dosavadním výzkumem došlo k celkovému objevu okolo 20 – ti aflatoxinů, kromě již výše zmíněných například: AFB_{2a} známý též pod názvy AFB₁ hemiacetyl nebo aflatoxin W, AFB₃ nebo – parasitikol, AFD₁, AFG_{2a}, AFGM₁, AFM₄, AFP₁, AFQ₁ a AFR₀ – aflatoxikol. Stejně jako AFM jsou AFP₁, AFQ₁ a aflatoxikol metabolické produkty mikrobiálních nebo zvířecích systémů. AFB_{2a}, AFG_{2a} a AFD₁ jsou produkovány spontánně jako odpověď na chemické prostředí (Malíř *et al.*, 2003).

Pro detekci výskytu expozice aflatoxiny lze považovat i zjištění přítomnosti aflatoxinových duktů a to aflatoxinu N7 guaninu v moči, aflatoxinového lysinu v krvi a AFM₁ v moči (Groopman & Kensler, 1999).

2.1 Chemická charakteristika aflatoxinů

Aflatoxiny jsou polycyklické nesaturované vysoce substituované kumariny. Z hlediska způsobu biosyntézy patří mezi dekatetidy. Vycházejí z difuranokumarinového skeletu. Právě spojená dihydrofuranová konfigurace je charakteristická pouze u omezeného počtu sloučenin přírodního původu. U aflatoxinů B je kumarinové jádro spojené s reaktivním bifuranovým systémem pentanonem, naproti tomu u aflatoxinů G je spojeno šestičlenným laktonem (Malíř *et al.*, 2003).

2.2 Toxikologické hodnocení

Aflatoxiny mohou účinkovat na organismus hepatotoxicky, imunotoxicky, genotoxicky, multagenně, karcinogenně a teratogenně. Nejtoxičtější a nejsilnější mutagen je AFB₁, následován je AFG₁, AFB₂ a AFG₂ sestupně. Poukazuje to na úměrnost mezi nasyceností terminálního furanového kruhu a šíří a hloubkou biologické aktivity aflatoxinu. Toxicita, respektive odpověď organismu na ní, je závislá na celé řadě faktorů, mimo jiné na živočišném druhu, pohlaví, věku a způsobu výživy. Toto souvisí s rychlostí a způsobem biotransformace, přítomností hormonů a faktory prostředí. Můžeme vycházet ze všeobecného pravidla, že citlivost vůči aflatoxinům se snižuje věkem a samice bývají méně citlivé než samci (Višňovský *et al.*, 1997).

Projevům toxicity aflatoxinů, akutním i chronickým, dochází především v játrech, v nichž se projevují například steatózou (tukovatění tkáně) nebo proliferací žlučových ductů. Kromě těchto projevů může docházet ke krvácivým nekrózám, mozkovým otokům (Veres, 1986), k poškození ledvin vznikajícími nekrózami tubulů a nadledvin (Višňovský *et al.*, 1997). Při akutní toxicitě dochází ke změnám na tkáni jater, jsou odbarvená a mají zvýšený objem. Současně se objevuje ascites (zvýšené množství volné tekutiny v dutině břišní), poškození jater doprovází žloutenka. Znamky indikující příchod smrti se dají popsat jako melancholie, vrávoravá chůze, nervozita a svalové spasmy. Tento stav většinou vede ke smrti jedince. V případě, kdy jedinec nezemře, dochází k proliferaci nediferencovaných buněk na úrovni žlučových kanálků. Dochází ke glomerulonefritidě ledvin (zánětlivé onemocnění glomerulů), překrvují se plíce. Menší dávky aflatoxinů jsou zodpovědné

za úbytek hmotnosti, ztrátu reprodukční schopnosti a poškození imunitního systému (Malíř *et al.*, 2003).

Mezi projevy biochemického působení aflatoxinů patří inhibice, adenosintrifosfatasy, omezení karbohydrátového a lipidického metabolismu s vyústěním ve snížení hladiny glykogenu v játrech. Dochází k vazbám na DNA a RNA (Malíř *et al.*, 2003).

Odhadovaný NOAEL podle Fischerova statistického testu pro AFB₁ činní 0,75 µg/kg tělesné hmotnosti/den, u aflatoxikolu a AFM₁ se udává odhad mezi 1,25 a < 1,5 µg/kg tělesné hmotnosti/den. Toto je závislé na živočišném druhu, ale také fyzickém stavu jedince. Toxické účinky mohou být zvýšeny například podvýživou. Tento fakt se projevuje především u populací ze třetího světa.

Jako prokázaný karcinogen hodnotí IARC/WHO pouze AFB₁, jehož karcinogenita je pravděpodobně způsobena tvorbou reaktivního epoxidu v poloze 2,3 terminálního furanu a jeho následnou vazbu na nukleovou kyselinu. Aflatoxiny s označením 1 v indexu (B₁, M₁) patří do skupiny genotoxických karcinogenů a jsou nejtoxičtější. Takové to typy aflatoxinů mají bezprahový účinek, tudíž jsou schopné způsobovat tvorbu nádorů bez ohledu na exponovanou dávku. To znamená, že pouze žádná, tzn. nulová expozice, nepředstavuje žádné riziko.

2.3 Původci aflatoxinů

Producenty aflatoxinů jsou především vláknité mikroskopické houby rodu *Aspergillus*, podrodu *Circumdati*, ze sekce *Flavi* (Malíř *et al.*, 2003). Z tohoto rodu se jedná zejména o druhy *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* a *Aspergillus nomius* (Baydar *et al.*, 2007; Jager *et al.*, 2014).

Systematické zařazení rodu *Aspergillus* dle Adla *et al.*, 2012

Říše: *Opisthokonta*

Taxonomická skupina: houby (*Fungi*)

Oddělení: houby vřeckovýtrusé (*Ascomycota*)

Třída: *Pezizomycotina*

Řád: plesnivkotvaré (*Eurotiales*)

Čeleď: plísňovkovité (*Trichocomaceae*)

Rod: kropidlák (*Aspergillus*)

Systematické řazení rodu *Aspergillus* podle Ostrého a Škarkové, 2003

Říše: houby (*Fungy*)

Oddělení: houby vřeckovýtrusé (*Ascomycota*)

Řád: plesnivkotvaré (*Eurotiales*)

Čeleď: plísňovkovité (*Trichocomaceae*)

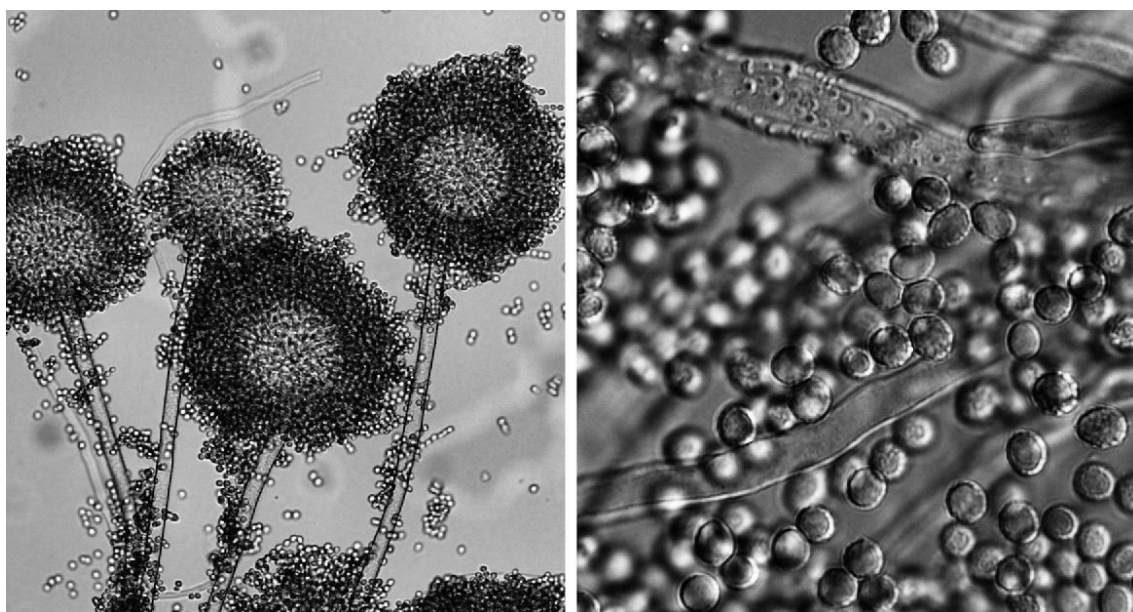
Rod: kropidlák (*Aspergillus*)



Obrázek 1 *Aspergillus parasiticus*



Obrázek 2 *Aspergillus flavus*



Obrázek 3 *Aspergillus nomius*

Mezi další producenty aflatoxinů byly popsány také druhy *Aspergillus argentinicus*, *A. bombycis*, *A. pseudotamarii*, *A. tamarii*, *A. zhaogingensis*. Výsledky správné identifikace uvedených producentů musí být potvrzovány molekulárně biologickými metodami.

Aspergillus flavus tvoří dva morfotypy a to takzvaný L – kmen se sklerociem větším 400 μm s nižší produkcí aflatoxinů nebo atoxigenní a S – kmen s vyšší produkcí aflatoxinů, jehož sklerocium je menší než u L – kmene (Probst *et al.*, 2007). Tvorba toxinů začíná zároveň s tvorbou konidií, největší koncentrace jsou produkovány v lag fázi (Malíř *et al.*, 2003).

Aflatoxinogenní druhy *Aspergillus* jsou všudypřítomné v oblastech s horkým a vlhkým klimatem, a to včetně subsaharské Afriky a nejjižnější Asie (IARC, 1993). V USA a Africe jsou *A. flavus* a *A. parasiticus* hojně rozšířeni, zatímco v nejjižnější části Asie se *A. flavus* vyskytuje výjimečně na rozdíl od ostatních druhů (Pitt *et al.*, 1993). *A. flavus* se nejhojněji vyskytuje mezi 26° a 35° zeměpisné šířky (Council for agricultural Science and Technology, 2003). Do zemí s chladnějším klimatem se aflatoxiny dostávají se zamořenými potravinami, které pocházejí právě ze zemí s vysokým výskytem aflatoxinů, tudíž se dá považovat problematika aflatoxinů za celosvětový problém. Záznamy o výskytu aflatoxinů v potravinách jsou k dispozici převážně ze zemí dovážejících potraviny, ve kterých regulace kontaminace a

nevpouštění na trh kontaminovaných potravin by měla vést k zajištění poměrně nízké expozici aflatoxiny (IARC, 1993).

Aflatoxiny neprodukují všichni zástupci rodu *Aspergillus*. Jen přibližně polovina kmenů tohoto druhu hub je toxinogenních, u kterých však může tvorba dosahovat až množství 10^6 µg/kg (Bennett & Klich, 2003).

2.4 Aflatoxin M₁

První nález tohoto mykotoxinu byl učiněn v roce 1960 v kravském mléce. Jeho strukturní vzorec se podařilo objasnit v roce 1966. Jde o hydroxylovaný metabolit aflatoxinu B₁, jehož má asi 3 - % ní mutagenní potenciál. Je také méně toxický a kancerogenní. V porovnání s AFB₁ byla prokázána nižší schopnost působit jaterní karcinom. K biotransformaci AFB₁ na AFM₁ dochází přibližně v rozsahu 1,2 – 2,2 % (Zhu *et al.*, 1987).

Nálezy tohoto aflatoxinu byly uskutečněny v játrech, ledvinách, krvi, žluči, stolici, moči a v mléce savců (Malíř *et al.*, 2003).

Důvodem lidské expozice AFM₁ je v první řadě konzumace mléka a mléčných výrobků, méně často je člověk exponován AFM₁ po předešlé přímé expozici AFB₁. Z toho vyplývá, že nejrizikovější skupinou jsou děti s vysokou konzumací mléka a to z důvodu jejich nízké hmotnosti, vysoké buněčné aktivity a částečně rozvinuté imunity. Kontaminace mléka velmi často podléhá sezónním trendům. Jeden z důvodů této skutečnosti je, že během letních měsíců bývá přidáváno méně doplňkových krmiv. Jelikož právě doplňková krmiva jsou značným rizikem obsahu AFM₁, bývá během letních měsíců nalezená koncentrace AFM₁ nižší. Jelikož je AFM₁ spojen s proteinovou frakcí mléka, přechází kontaminace i do sýrařských výrobků, a to v koncentracích až 3 -5 krát vyšších oproti mléku (Malíř *et al.*, 2003).

Na rozdíl od AFB₁, B₂, G₁, G₂ se AFM₁ vyskytuje i v nepřítomnosti jiných aflatoxinů.

AM₁ se vyskytuje především v mléce a mléčných výrobcích jako jsou jogurt, máslo, syrovátka, nejrůznější druhy sýrů (Brie, Camembert, Cheddar, Cottage, Eidam, Emmentál, Gouda, Grana Padano, Mozzarella, Parmesan, Romadur, Wensleydale), ale i ve žluté a bílé kukuřici, pistáciových ořeších. V mléce se nachází

jak v pasterizovaném, tak i sterilizovaném, dále jsou známy pozitivní nálezy v sušeném mléce a dokonce i v mléce velbloudím. To dokazuje nemožnost odbourání aflatoxinu M₁ z mléka běžnými způsoby zpracování nebo vaření.

2.4.1 AFM₁ fyzikální a chemická charakteristika

2.4.1.1 Chemická charakteristika

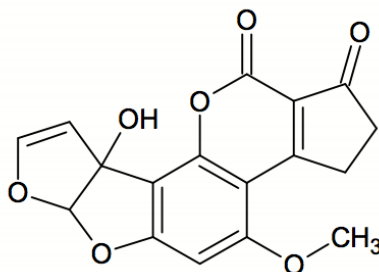
CAS (Chemical Abstracts Services Registry No.): 6795 – 23 – 9

EC Number: 229 – 865 – 4

Název podle Chemical Abstracts: Cyklopenta[c] furo [3',2': 4, 5]furo [2,3 – h][1]benzopyran – 1, 11 – dione , 2 ,3, 6a, 9a – tetrahydro – 9a – hydroxy – 4-methoxy

Synonymum názvu: 4 – hydroxyaflatoxin B₁

Strukturní vzorec:



Obrázek 4 Strukturální vzorec AFM₁

Sumární vzorec: C₁₇H₁₂O₇

Molekulová hmotnost: 328,276 g/mol

2.4.1.2 Fyzikální charakteristika

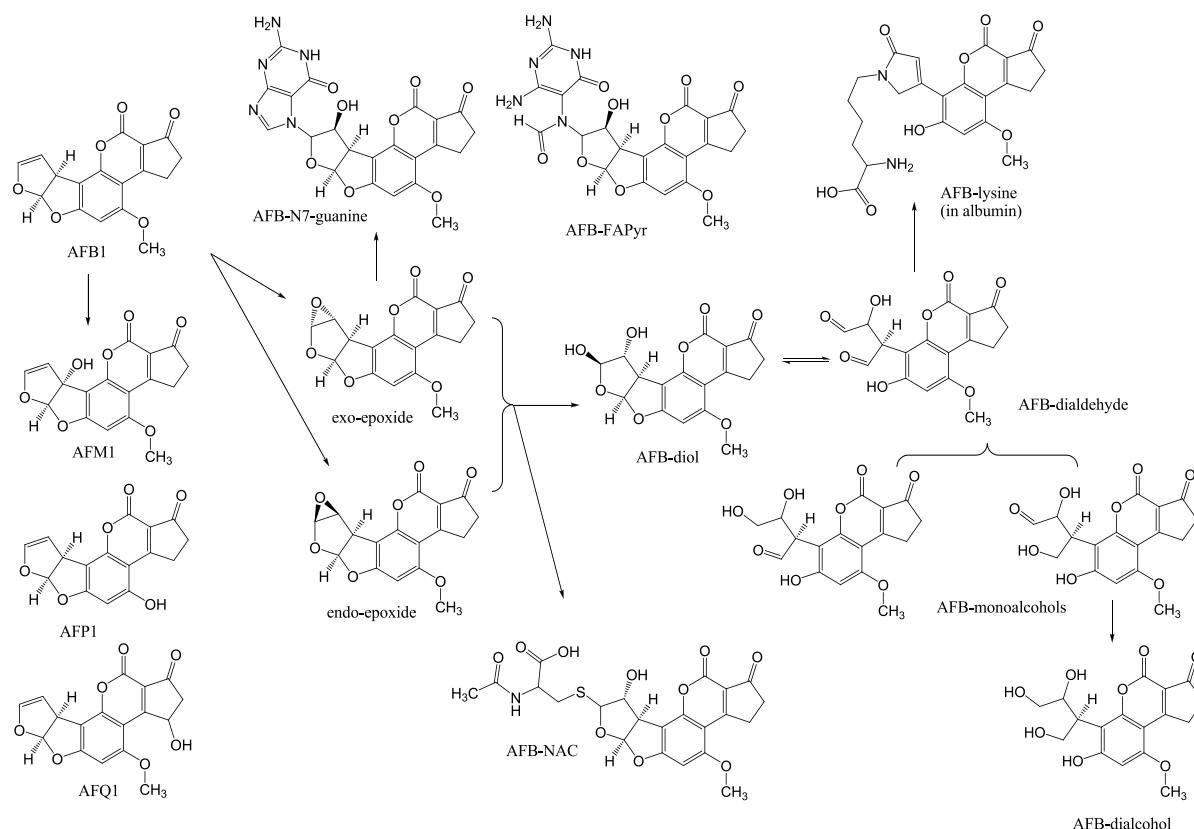
Emituje v UV světle modro – fialovou fluorescenci

Bod tání: 299 °C

Optická otáčivost: $[\alpha]_D - 280^\circ$ ($c = 0,1$ v dimetylformamidu)

Rozpustnost: nerozpustný v hexanu, málo rozpustný v benzenu, rozpustný v methanolu, ethanolu, acetonitrilu, chloroformu, ve směsi methanol : ether (1 : 1)

2.4.2 Biotransformace AFB₁



Obrázek 5 Biotransformace AFB₁

3. MOČ

Moč vzniká jako výsledek zpracování glomerulárního filtrátu v tubulárním aparátu ledvin. Čerstvá moč je kapalina se specifickým lehce aromatickým zápachem se zcela čirým zlatožlutým zabarvením. Charakteristické zlatožluté zabarvení způsobuje barvivo urochrom. Při delším vystavení působení vzduchu se mění její charakteristický zápach na zápach čpavkový způsobený amoniakálním kvašením vyloučené močoviny (Trojan & Langmeier et al., 2003).

Základní vyšetření moče je prováděno za účelem detekce patologických močových projevů jako screening u bezpříznakových osob, nebo jako součást

běžných vstupních vyšetření. Největší výpovědní hodnotu mají vzorky první ranní moče. Nejvhodnější je k rozboru použít střední část proudu a je důležité, aby byl před odběrem zevní genitál pečlivě omyt a osušen. Před odesláním do laboratoře je nutné sesbíranou moč promíchat a změřit její celkový objem. Případně zakonzervovat, jedná-li se o moč sbíranou po delší časový úsek (např. 24 h sběr).

Jedním ze třech základních vyšetření moče je fyzikální. Tím rozumíme senzorické zhodnocení barvy, zákalu, pěny, zápachu a měření pH a hustoty pomocí indikátorového papírku nebo instrumentálně. Za fyziologických okolností je čerstvá moč čirá, světle až sytě žlutá, bez pěny nebo pěna po protřepání rychle mizí. Pěna je trvalejší při proteinurii. Různá zbarvení jsou dána vylučovanými žlučovými barvivými, jejich metabolity a je také ovlivňována některými požitými vitamíny, léky a jinými xenobiotiky. Hustota moči je určována množstvím obsažených rozpuštěných látek a pohybuje se mezi 1001 – 1035 v závislosti na typu diurézy. Při normální diuréze se během jednoho dne vyloučí cca 55 – 70 g pevných látek tvořených asi z 25 g látek anorganických a přibližně 35 g látek organických. Za normálních podmínek, myšleno u zdravého člověka, je reakce moči kyselá, což závisí v první řadě na pH extracelulární tekutiny, ale také na přijímané stravě. Je dokázáno, že konzumace převážně masité stravy snižuje pH moči a vede k acidurii, zatímco strava převážně rostlinná, potažmo bohatá na mléko a výrobky z něj, pH zvyšuje a vede k alkalurii. Stagnaci moče je při některých nemocech cítit amoniak, při ketoacidóze aceton. Hnilobný zápach je cítit např. při hematurii a proteinurii, což je způsobeno uvolňováním sirovodíku z aminokyselin obsahujících – SH skupinu. V dnešní době je však od senzorického hodnocení opouštěno a nahrazování velkosériovým automatizovaným procesem.

Další vyšetřovací metodou je chemické vyšetření moče. Chemické vyšetření lze provést po 4h od odběru. K tomuto vyšetření jsou vyráběny monovalentní nebo polyvalentní indikátorové reagenční proužky. Barevná reakce je způsobena při reakci příslušné součásti moče s jednotlivými zónami impregnovanými činidly. Typický proužek obsahuje zónu pro stanovení pH, hustoty, leukocytů, nitritů, proteinů, glukózy, ketolátek, erytrocytů, bilirubinu a urobilinogenu.

Leukocyturie znamená přítomnost bílých krvinek v moči (více než 5 leukocytů v zorném poli nebo 10000/ml). K příčinám jejího vzniku patří např. infekce močových cest, karcinom prostaty nebo močového měchýře a poranění močové trubice. Pozitivní nálezy nitritů (dusitanů) je především při přítomnosti bakterií (zejména gramnegativních) v moči. Nejcitlivěji detekovaným proteinem je albumin a jeho fyziologické maximální hodnoty jsou mezi 0,15 až 0,2 g/l. Proteinurii můžeme rozdělit na selektivní (vyučován téměř výlučně pouze albumin) a neselektivní (kromě albuminu vylučovány i další typy globulinů). Dle kvantitativního hodnocení a typu proteinurie je možné usuzovat některou formu glomerulárního poškození (Teplan, 2010). Mez detekce pro přítomnost glukózy v moči je okolo 1mmol/l a glykosurie je nejčastějším nálezem vedoucím k odhalení diabetu mellitu. Reakce pro odhalení ketolátek, zejména acetonu a acetoacetátu, jsou pozitivní při ketoacidózách z různých příčin (hladovění, diabetes mellitus 1. typu, prolongované zvracení). Makroskopická hematurie (přítomno 1 a více ml krve/l moči) je často spojena s traumatem, tumory a konkrementy vývodných cest močových. Mikroskopická hematurie je často asymptomatická a je odhalena až při cíleném vyšetření. Bilirubin vzniká degradací hemu a v krvi je vázaný na albumin (nekonjugovaný bilirubin). V játrech je konjugován s kyselinou glukuronovou (konjugovaný). Je vylučován do žluče a následně do střeva. Část bilirubinu se vstřebává ze střeva do krve a proběhává enterohepatální oběh. V moči můžeme nalézt konjugovaný bilirubin, který je rozpustný ve vodě, avšak v moči se normálně téměř nevyskytuje. Jeho přítomnost může značit obstrukční nebo hepatocelulární žloutenku. Urobilinogen je zvýšen při omezení funkce jaterního parenchymu, zvýšeném rozpadu hemoglobinu nebo infekci žlučových cest a enterokolitid.

Posledním standardně prováděným vyšetřením je morfologické, tedy vyšetření močového sedimentu. Pro morfologické vyšetření je nutné moč zpracovat do 1h po odběru. Fázový kontrast využijeme při nálezů erytrocytů. Hodnotíme podle něj jejich velikost a tvar (k deformaci dochází v glomerulech, zatímco hladký povrch budou mít erytrocyty z vývodných močových cest). Aglutinací bílkovinné hmoty vznikají válce, které mohou být podle původu hyalinní, granulované, erytrocytární, leukocytyární nebo epiteliální (z odloupaných epiteliálních buněk). Kromě válců jsou dále často nalézány i krystaly v závislosti na hodnotách pH moči (alkalické pH

například vlivem bakteriální ureázy). Mezi nejfrekventovanější patří kalciumoxalátové, fosfátové a urátové. Kromě nich mezi diagnosticky významné patří i cystinové (při cystinurii) (Schneiderka, 2012).

4. PUFRY

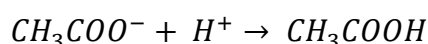
Hlavní význam pufrů spočívá v možnosti přesného nastavení hodnoty pH, v jeho udržování a schopnosti tlumení výkyvů pH způsobené omezeným přídatkem zásady nebo kyseliny. Pufry, jinak řečeno tlumivé roztoky, jsou nejčastěji dvojsložkový systém, čili obsahují roztoky slabých kyselin a jejich solí nebo slabých zásad a jejich solí.

4.1 Octanový pufr

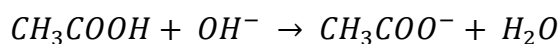
Příklad pufru je pufr složený ze slabé kyseliny a její soli, jedná se o kyselinu octovou a octan sodný - octanový (acetátový) pufr.

Chování pufru po přidavku silné kyseliny nebo silné zásady jde popsat následujícími reakcemi:

Po přidavku H^+ iontů do pufru dochází k reakci s octanovým aniontem za vzniku slabé kyseliny octové. Volné ionty H^+ jsou reakcí převedeny na slabou kyselinu, pH roztoku se tudíž prakticky nemění (Dostál *et al.*, 2009).



Po přidavku OH^- do vzniklého roztoku dojde k reakci se vzniklou kyselinou octovou a pH pufru se opět prakticky nezmění.



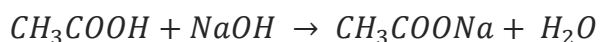
Pomocí Hendersonovy-Hasselbalchovy rovnice lze vypočítat pH pufru:

$$pH = pK_A + \frac{C_B}{dC_A}$$

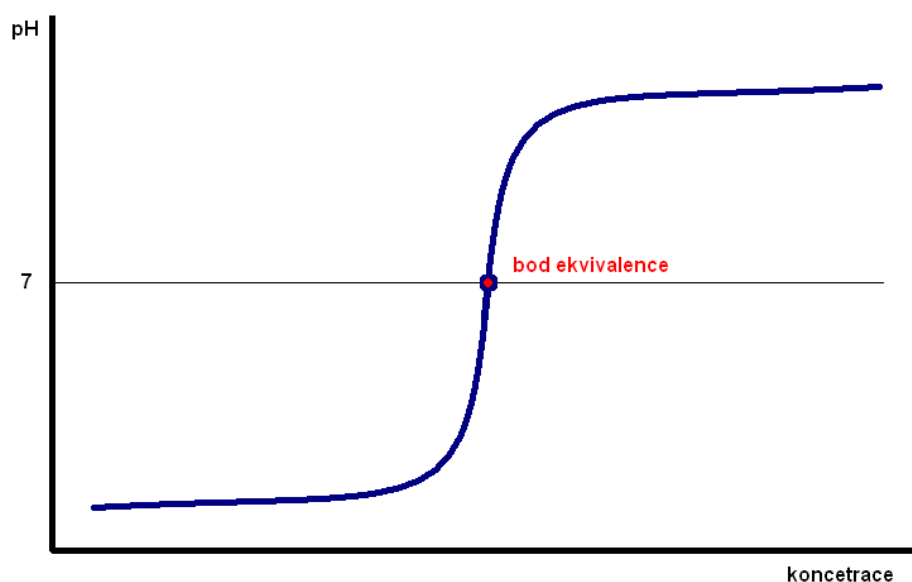
Záporný dekadický logaritmus disociační konstanty slabé kyseliny	pK _A
Látková koncentrace kyselé složky pufru	C _A
Látková koncentrace bazické složky pufru	C _B

Grafickým vyjádřením Hendersonovy-Hasselbalchovy rovnice je titrační křivka slabé kyseliny nebo zásady. Při postupném přidávání zředěných roztoků silné kyseliny nebo zásady (titrace pufru) k roztoku pufru se pH mění pomalu, po překročení hodnoty pH ($\text{pH} = \text{KA} \pm 1$) jsou změny hodnoty pH již značné.

Jako příklad je uvedena titrace kyseliny octové hydroxidem sodným. Titrace kyseliny octové probíhá podle neutralizační rovnice:



Závislost pH na množství přidaného titračního činidla vystihuje titrační křivka. Na začátku titrace je v reakční směsi pouze slabá kyselina octová, v průběhu titrace přibývá octan sodný a roztok je směsí kyseliny octové a octanu sodného v různých poměrech až do bodu ekvivalence, kdy je v reakční soustavě pouze vodný roztok octanu sodného. Za bodem ekvivalence v reakční směsi přibývají hydroxidové anionty a hodnota pH rychle vzrůstá (viz. obr.6). Z obr.6 je vidět, že má titrační křivka tři odlišné fáze. Počáteční a koncová fáze je charakteristická strmým nárůstem hodnoty pH. Ve střední části se hodnota pH mění jen málo v rozmezí přídavného činidla. Tato část křivky je nazývána jako oblast pufru. Roztok v této části obsahuje směs slabé kyseliny a její soli a odolává přídávám silného hydroxidu sodného bez výrazné změny hodnoty pH (Kaš *et et al.*, 2006).



Obrázek 6 Titrací křivka neutralizační rovnice

5. METODIKA

Cílem experimentu bylo pomocí imunoafinitních kolonek separovat aflatoxin M₁ ze vzorků moči a následně potvrdit či vyvrátit, zda je pravděpodobná expozice české populace tomuto aflatoxinu. K analýze bylo vybráno 40 vzorků moči od náhodně vybraných pacientů s onkologickým onemocněním, především s diagnózou nádorů ledvin a vývodných močových cest, např. s Grawitzovým nádorem ledvin. Věkové rozmezí pacientů bylo cca 18 – 65 let. Do studie byli vybráni pouze nemocní s nekomplikovaným průběhem operace, dále bez přítomností metastáz a celkového metabolického rozvratu. Dalším kritériem pro výběr z řad pacientů byla nepřítomnost kardiovaskulárních komplikací. Samotnou analýzu předcházelo několik nezbytných kroků – evidence vzorků, stanovení pH vzorků, stanovení koncentrace kreatinu v moči.

5.1 Evidence vzorků

Vzorkům dodaných do výzkumu bylo přiděleno evidenční šestimístné kódové označení shodné s číslem protokolu. Z důvodu zachování anonymity dárců nebyla uváděna jména. Pro potřeby analýzy probíhající na Zdravotním Ústavu se sídlem v Ústí nad Labem, pobočka Hradec Králové, pracoviště Nezvalova, bylo přiřčeno nové číselné označené podléhající vnitřní evidenci Zdravotního Ústavu. Oba číselné kódy jsou vzájemně propojitelné.

5.2 Stanovení pH ve vzorcích moči

Stanovení hodnoty pH patří vůbec k nejčastějším požadavkům v procesním, laboratorním i terénním měření v běžné praxi. Hodnotu pH nemůžeme měřit přímo, jedná se zpravidla o elektrické měření neelektrické veličiny na elektrochemickém principu. Měřicí řetězec má v takovém případě 2 hlavní články milivoltmetr (pH metr) a pH sondu (s kombinovanou elektrodou) generující napětí v závislosti na pH vzorku, do něhož je ponořena. Použitý pH metr je přesný milivoltmetr, který zobrazuje analogový signál napětí z pH elektrody v mV.

5.2.1 Materiál, přístroje a použité chemikálie

- vzorky moči
- kádinky různého objemu

- pH set 330/1WTW
- laboratorní stojan pro pH metr
- sada pufrů Hamilton Duracal
- ultra čistá voda Milli Q plus.

5.2.2 Pracovní postup

5.2.2.1 Kalibrace pH metru

Při kalibraci pH metru WTW, typ 330/1 – s kombinovanou elektrodou, bylo postupováno podle přiloženého návodu. Po vyjmutí pH metru z transportního obalu a zapojení byla omyta elektroda pH metru ultračistou vodou Milli Q plus a osušena buničitou vatou. Do připravené kádinky byl odlit kalibrační pufr o přibližně očekávaném pH. Před samotnou kalibrací byla elektroda umístěna na laboratorní stojan. Následně byla elektroda spuštěna tak, aby se nedotýkala stěn kádinky, do kalibračního pufru. Dokalibrace proběhla v souladu s přiloženou kalibrační tabulkou.

5.2.2.2 Stanovení pH ve vzorcích moči

Do kádinky se vzorkem moči byla ponořena elektroda pH metru a bylo provedeno měření pH. Tento proces byl u každého vzorku dvakrát opakován kvůli vyšší přesnosti. Naměřené tři hodnoty byly následně zprůměrovány. Po každém měření byla elektroda pH metru omyta ultra čistou vodou Milli Q plus a osušena buničitou vatou. Tento postup byl realizován při každém měření vzorku.

5.3 Stanovení obsahu AFM₁ ve vzorcích moči

5.3.1 Bezpečnost práce s AFM₁

Aflatoxiny jsou vysoce toxické karcinogenní látky. Podle mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC, WHO) náleží AFB₁, B₂, G₁, G₂, M₁ do kategorie 1 – prokázané karcinogeny pro člověka (IARC, 2012). Kromě toho jsou výrazně hepatotoxické. Všechny pracovní povrchy a pomůcky včetně skla jsou po skončení práce ihned dekontaminovány v roztoku chlornanu sodného podle postupu v provozním řádu oddělení (Roubal, 2017).

Vzhledem k riziku vyplývajícimu z potencionální karcinogenity AFM₁ bylo manipulováno se vzorky, počínaje úpravou vzorků až po adjustaci vzorku do vialek

za účelem stanovení HPLC, vždy v pryžových rukavicích. Pracovní úkony byly prováděny v laminárním boxu. Pro manipulaci se vzorky bylo využito novodurové mísy vyložené hliníkovou fólií a filtračním papírem (Malíř, 2010).

5.3.2 Materiál, přístroje a použité chemikálie

- kádinky o různém objemu
- centrifugační patrony
- laboratorní váhy na dvě desetinná místa Navigator
- laboratorní lžička
- odměrné válce
- pipety Gilson s proměnným objemem 1 – 10 ml, 30 – 200 μ l a 100 – 1000 μ l
- Imunoafinitní kolonky AFLAREP® M (R - BIOPHARM)
- odstředivka laboratorní MPW 350 e
- pH metr digitální přenosný pH 330/ set 1 (WTW GmbH. SRN)
- zařízení pro řízený průtok imunoafinitní kolonkou – vakuová jednotka BAKER SPE 12 G (BAKER) s prosávací pumpou (SIGMA n. MILLIPORE)
- zařízení pro odpařování EVATERM (výrobce Ing. V. Hanuš, Brno)
- magnetické míchadlo a magnetický míchač.
- octan sodný CH_3COONa (MERCK)
- kyselina octová CH_3COOH (MERCK)
- methanol CH_3OH (VWR)
- ultračistá voda ze zařízení Milli Q plus
- dusík N_2 kvality 4,0 GA (SIAD TP).

5.3.3 Pracovní postup

5.3.3.1 Příprava octanového pufru

Pro následný experiment je třeba si připravit octanový pufr o pH 5,0.

Octanový pufr byl připraven jako 0,1molární roztok octanu sodného a pro dosažení výsledného pH 5,0 bylo použito kyseliny octové. Nejprve bylo na laboratorních předvážkách naváženo 8,2 g octanu sodného, který byl následně přidán do kádinky s ultračistou vodou Milli Q plus. Do kádinky bylo vloženo magnetické míchadlo a následně byla kádinka umístěna na magnetický míchač. Zapnutý míchač byl nastaven na rychlost míchání 800 ot/min. Proces míchání trval

až do doby, kdy došlo k úplnému rozpuštění krystalků octanu sodného. Po ukončení míchání byla do roztoku spuštěna skleněná kombinovaná elektroda pH metru, tak aby se nedotýkala stěn kádinky. Po zjištění pH roztoku byla po kapkách přidávána koncentrovaná kyselina octová do té doby, než bylo dosaženo požadovaného pH 5,0. Po dosažení pH 5,0 byl obsah kádinky přelit do odměrné baňky o objemu 1 litr a doplněn ultračistou vodou Milli Q plus po rysku.

5.3.3.2 Příprava vzorků pro HPLC stanovení – pracovní postup

Vzorky moči skladované v mrazicím boxu (z důvodu časové náročnosti analýz, zachování kvality vzorků) byly 24 hodin před samotným zpracováním vyjmuty z mrazicího boxu a ponechány při laboratorní teplotě rozmraznout. Takto bylo vždy připraveno 6 – 8 vzorků z důvodu vytížení laboratorního přístroje. Rozmrzlá moč se ponechala vytemperovat při laboratorní teplotě.

Před samotným zpracováním vzorků byly imunoafinitní kolonky vyjmuty z chladničky a ponechány po dobu přípravy vzorků při laboratorní teplotě vytemperovat. Tato doba odpovídala přibližně jedné hodině až hodině a půl, tudíž době doporučené výrobcem.

Vzorky moči byly naváženy na laboratorních předvážkách Navigator do centrifugačních patron (z důvodu nutnosti stejné hmotnosti /objemu, aby při centrifugaci nedošlo k vyjití a tím znehodnocení vzorku). Vážení probíhalo následně: centrifugační patrona bez víčka byla vložena do kádinky a takto položena na váhu, pro přesnost objemu byla vytárována hmotnost centrifugační patrony s kádinkou, následně byl odměřen požadovaný objem vzorku upravený na přibližně shodnou hmotnost s ostatními vzorky. Tato hmotnost se podle objemu vzorku lišila a to v rozmezí mezi 40 a 50 mg (viz. přiložená tabulka). Takto připravené centrifugační patrony se vzorkem byly po čtyřech vkládány do laboratorní odstředivky MPW 350 e. Laboratorní odstředivka byla nastavena na 3500 rpm (otáček) po dobu trvání cyklu 10 – ti minut.

Po ukončení centrifugace byly patrony vyjmuty, odvíčkovány a pomocí pipety Gilson byl odebrán objem 20 ml vzorku. Při odebírání vzorku bylo důležité, aby se nenabral sediment, který byl odstředěn na dně centrifugační patrony. Tudíž byl vzorek odebírán pouze z horní části.

K odpipetovaným 20 ml moči bylo přidáno 20 ml předem připraveného octanového pufru o pH 5,0. Postup přípravy octanového pufru byl popsán výše v textu.

Již vytemperované imunofinitní kolonky byly nainstalovány na uzavíratelné nástavce vakuové jednotky BAKER a vytvořením podtlaku pomocí prosávací pumpy byl z kolonek odstraněn pufr.

Čištění pomocí imunoafinitních kolonek vychází z technologie monoklonálních protilátek. Kolonky obsahují gelovou suspenzi monoklonální protilátky specifické na testovaný toxin. Vzorek je pomalu filtrován skrze imunoafinitní kolonku a sledovaný toxin je zadržen protilátkou uvnitř gelové suspenze.

Na kolonky byly nasazeny adaptéry o objemu 40 ml, do nichž byla následně přelita připravená směs moči a octanového pufru.

Z utěsněné vakuové jednotky byl odstát vzduch, čímž vznikl v prostoru nádoby podtlak. Tato směs byla opatrně po kapkách prosátá přes kolonku. Pomocí částečného otevírání neobsazeného adaptéru byl regulován podtlak v nádobě, aby bylo zachováno kontinuální prokapávání.

Po prosátí celého objemu adaptéru (celého objemu vzorku) bylo do adaptéru aplikováno 40 ml Milli Q plus vody a opět bylo prosáto. Tento proces probíhal u prvních 20–ti ml opět stejnou rychlostí jako u vzorku, zbylých 20 ml o trochu rychleji.

Po prosátí vodou byl vložen do vakuové nádoby nástavec, na němž byly umístěny vialky. Po odejmutí adaptéru byl aflatoxin M₁ eluován 1 ml metanolu. Vialka se vzniklým eluátem byla vložena do duralového bloku zařízení pro odpařování EVATERM a odpařen pod proudem dusíku při teplotě 45 – 50 °C. Vzniklý odparek byl ve vialce neprodyšně uzavřen uzávěrem s teflonovým septem, opatřen štítkem s číslem vzorku a uskladněn v chladničce do doby, než bylo přistoupeno k samotné analýze metodou HPLC – FLD.

Před měřením byl vzorek zředěn 1 ml směsí methanol/voda (50 : 50). Vialka se směsí byla vložena do ultrazvukové lázně po dobu 10 min, čímž došlo k úplnému rozpuštění odparku, a tímto byl vzorek připraven k nástřiku do HPLC.

5.3.4 Přístrojové podmínky při stanovení AFM₁ metodou HPLC

Sestava: Agilent 1100 Series,

Kolona: Kinetex C18, 150 x 4,6 mm, 2,6µm

Detektor: FLD360/440 nm, PMT Gain 10

Mobilní fáze: acetonitril/metanol/voda, 20 : 20 : 60

Průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min

Teplota kolony: 25 °C

Nástřik: 80 µl

5.3.5 Použité chemikálie

- Metanol CH₃OH (gradient grade pro chromatografii)
- Acetonitril C₂H₃N (gradient grade pro chromatografii)
- Ultra čistá voda ze zařízení Milli Q plus
- Standartní roztoky 0,5 pg/ml, 1 pg/ml, 2 pg/ml, 4 pg/ml, 20 pg/ml

5.3.6 Stanovení AFM₁ ve vzorcích moči metodou HPLC – FLD

5.3.6.1 Metoda HPLC

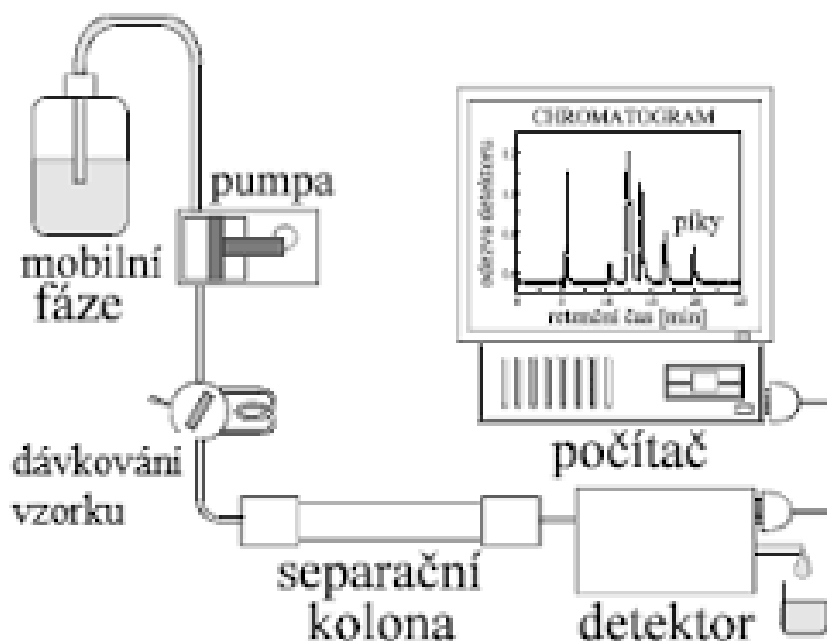
HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (Jaimez *et al.*, 2000) - vysokoúčinná kapalinová chromatografie, někdy také odvozeno od anglického High Pressure Liquid Chromatography - vysokotlaké kapalinové chromatografie, patří v současné době mezi nejčastěji aplikované separační metody díky její vysoké účinnosti, dobré opakovatelnosti a přesnosti. Dalšími přednostmi této metody jsou rychlost analýzy, částečná automatizace a především nízká spotřeba vzorku. Výhodou této metody je schopnost dělit organické, méně těkavé kapaliny a tuhé látky, které jsou rozpustné ve vodě, organických rozpouštědlech nebo v ředěných kyselinách (Bačina, 2014). Tato analýza má široké uplatnění při stanovení biologicky a farmakologicky účinných látek (Snyder *et al.*, 1997).

Princip metody HPLC je založen na rozdílné separaci látek ve směsi mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze a to na mobilní, pohyblivou část, kterou představuje kapalina a na stacionární, nepohyblivou, část, která je ukotvena uvnitř kolony. Stacionární fázi obvykle bývá tuhá látka (nejčastěji silikagel), avšak může jí být i kapalina. Při distribuci jednotlivých složek směsi dochází mezi mobilní a stacionární fází k neustálému ustavování rovnováhy.

Vzorky jsou nadávkovány dávkovacím ventilem do mobilní fáze, která pod tlakem (pumpa) prochází kolonou naplněnou stacionární fází. Kolona je ocelová trubice o délce 10 – 35 cm, vnitřním průměru 3 – 5 mm, vyplněná pevnými malými částicemi, které mají podle druhu kolony určité funkční skupiny (Kvasnicová & Balínová, 2006). Kvalita tohoto sorbentu má rozhodující vliv na účinné rozdělení látek. Konkrétními parametry této kvality jsou velikost, stejnoměrnost, tvar, struktura a porozita částic sorbentu. (Nováková *et al.*, 2013). Následkem využívání kolon s velmi malými částicemi, dochází ke kladení zvýšeného odporu mobilní fází, mobilní fáze, a proto vzniká potřeba zvýšeného tlaku během analýzy. Díky tomu dochází k rychlé a účinné separaci jednotlivých složek směsi. (Klouda, 2003). Vlastnosti vhodně zvoleného sorbentu jsou takové, že způsobuje různou rychlost průchodu různých složek vzorku. Na výstupu z kolony se nachází detektor, ten odesílá signál zachycený z procházející složky na základě například UV detekce, fluorescenční detekce, vodivostní detekce aj.

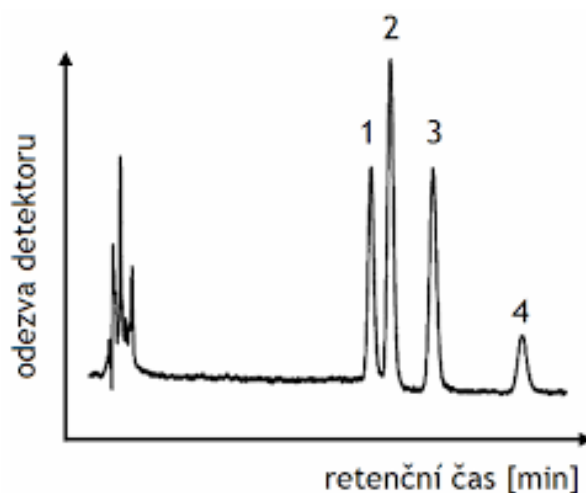
UV detektor funguje na základě měření absorbance eluátu, který protéká mikrokyvetou. Výhodou UV detektoru je jeho citlivost k látkám silně pohlcující UV záření. Dalšími výhodami jsou linearita v závislosti měřené absorbance na koncentraci a nezávislost signálu na průtokové rychlosti eluátu.

Vyšší citlivost detekce, pohybující se v rozmezí 10^{-10} až 10^{-14} g látky, je u fluorescenčního detektoru. Princip metody vychází z toho, že v cele detektoru absorbuje detekovaná látka ultrafialové excitační záření. Část pohlcené energie je emitována v podobě fluorescenčního záření o vyšší vlnové délce (nižší energii) než excitační záření. Toto záření dopadá na fotoelektrický násobič, který poskytuje proud úměrný toku emitovaného fluorescenčního záření a koncentraci detekované látky v cele detektoru. Detektor je spojen se zařízením pro automatický záznam dat, který v příslušném programu vytvoří výstupní chromatogram (Malíř *et al.*, 2003).



Obrázek 7 Schéma HPLC

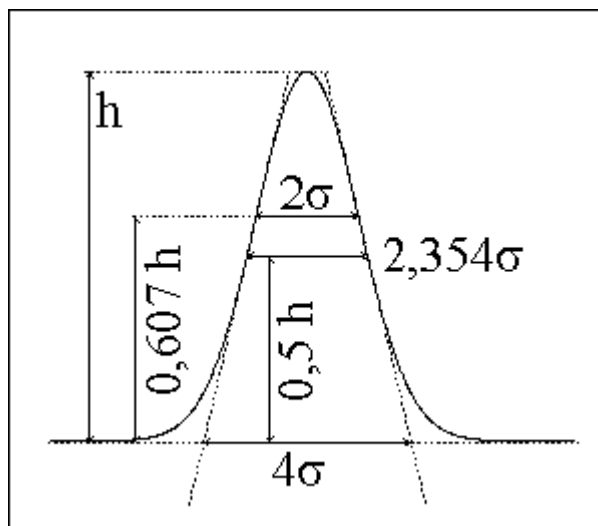
Tato doba od nástřiku analyzované látky po samotný signál detektoru je označována jako retenční čas látky. Objem mobilní fáze potřebný k eluci látky se nazývá eluční nebo retenční objem. Z tohoto důvodu lze eluci popisovat jako časovou nebo objemovou závislost.



Obrázek 8 Retenční čas

Signál detektoru je zaznamenán pomocí zapisovače (chromatografu) formou chromatogramu – znázorňujícího jednotlivé analyty nejčastěji ve formě tzv. chromatografických píků oddělených navzájem základní linií. Jednotlivé vrcholy píků v chromatogramu znázorňují v závislosti na retenčním čase obsah jednotlivých

složek směsi jasně definovaných retenčním časem. Množství (kvantita) analyzované látky obsažené ve vzorku se stanovuje po porovnání se standardy výpočtem ploch, popřípadě výšek jednotlivých křivek píků.



Obrázek 9 Výpočet množství analyzované látky

Pro výpočet plochy píku platí následující vztah:

$$A = 1,064 \cdot h \cdot w_{1/2}$$

Pro lepší a jednoznačnější identifikaci vzorků lze k HPLC připojit hmotnostní spektrometr (MS z anglického Mass Spectrometry). Nejčastěji využívanou konstrukcí je takzvaná kvadrupólová. Princip této metody vychází ze separace molekulových iontů a fragmentu analyzované látky vzniklých ionizací chemických sloučenin v magnetickém poli a měření jejich hmotnosti vzhledem k náboji. Způsoby ionizace jsou různé například ionizace dopadem elektronového paprsku. Působením elektrického a magnetického pole se dráhy vzniklých iontů zakřivují a změnou intenzity elektrického a magnetického pole dochází k rozvinutí hmotnostního spektra. Hmotnostní spektrogram lze získat díky spojitě změně těchto polí. Kvalitativní údaje spektrogramu vyjadřuje poloha čar, jejich výška vyjadřuje kvantitativní údaje. Tato separačně analytická metoda je tedy zároveň kvalitativní i kvantitativní.

5.3.6.2 Validace metody

Pro přesnost měření byla provedena validace metody, z níž vyplynulo:

Mez detekce: 0,11 pg/ml *

Mez stanovitelnosti: 0,37 pg/ml *

Maximální stanovitelný obsah: 10 µg/kg *

Nejistota stanovení: < 20 % **

* Uvedené hodnoty platí při přípravě vzorku výše uvedenou metodou.

** Nejistota stanovení je vyjádřena jako rozšířená nejistota (koeficient rozšíření ≤ 2) s měřeným na certifikovaném referenčním materiálu CRM 284 s koncentrací $c \leq 0,31 \pm 0,06 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ a CRM 285 s koncentrací $c \leq 0,76 \pm 0,05 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Nejistoty stanovení jsou v souladu s EA 4/16. (Roubal, 2017)

5.3.6.3 HPLC, nastavení přístroje a uvedení do chodu

Příprava kapalinového chromatografu k analýze a práce s ním se řídila dle pokynů návodu stanoveného výrobcem. Před samotným započítáním měření byla chromatografická aparatura spuštěna a pracovala nejméně 60 minut „naprázdno“ pro ustálení podmínek na chromatografické koloně a detektoru. Podmínky stanovení byly nastaveny dle manuálu přístroje. S prací se mohlo začít tehdy, když se po nadávkování methanolu při zapnutém fluorescenčním detektoru ukázala rovná základní linie (Malíř, 2010; Roubal, 2017).

5.3.6.4 Podmínky chromatografického stanovení

Pro stanovení AFM₁ na HPLC byla připravena mobilní fáze o složení: acetonitril/methanol/voda v poměru 20 : 20 : 60 (v/v/v). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml/min. Nastavení fluorescenčního detektoru (FLD): λ Ex (excitace) 360 nm, λ Em (emise) 440 nm, Gain = 10 (odezva > 0,2 min (4 s, < standard)). Fluorescenční detektor Hewlett Packard 1100 byl zapnut 15 minut před započítáním samotného měření (Malíř, 2010).

Při dodržení těchto podmínek byl eluční čas AFM₁ přibližně mezi 7,5 – 8,5 min při přímém stanovení.

5.3.6.5 Analýza vzorku na HPLC

Odparky rozpuštěné v metanolu, tj. adjustované vzorky, standardy a slepý vzorek o objemu 80 µl byly nastříknuty do kapalinového chromatografu. Vzorek byl dále unášen odplyněnou mobilní fází (kapalina) do chromatografické kolony. Zde,

na chromatografické koloně, byl analyt rozdělen na jednotlivé složky a tyto jsou pomocí příslušného detektoru (v tomto případě FLD) detekovány a zaznamenány pomocí chromatografu a zapsány do chromatogramu. S každou sérií analýz byly současně analyzovány slepé vzorky a dále standardní roztoky AFM₁ 0,5 ng/ml; 1,0 ng/ml, 2,0 ng/ml a případně také kontrolní materiál nebo materiál s přidavkem aflatoxinu M₁ (Malíř, 2010; Roubal, 2017).

Standards byly proměřovány vždy na začátku a na konci série vzorků tak, aby počet analýz standardů dosáhl 20% počtu analyzovaných vzorků a to v pořadí: slepý vzorek, standard, 0,5 ng/ml; 1,0 ng/ml, 2,0 ng/ml, dále byly změřeny zpracované vzorky moči (Malíř, 2010; Roubal, 2017).

Po skončení analýz byla kolona po dobu 20 minut promyta směsí metanolu a vody v poměru 1:1. Následně byla po dobu 10 minut kolona promývána vodou a po dobu přibližně 70 minut roztokem acetonitrilu a vody v poměru 1:1. Nakonec byla kolona konzervována směsí methanolu a vody (1:1) (Malíř, 2010).

5.3.6.6 Derivatizace pro AFM₁

Vzorek byl vložen do duralového bloku zařízení pro odpařování EVATERM a odpařen pod proudem dusíku, zaváděným nad hladinu vzorku při teplotě 45 - 50°C.

K vysušenému reziduu bylo přidáno 200 µl hexanu a 200 µl kyseliny trifluoroctové. Standardy byly zředěny roztokem mobilní fáze acetonitril/methanol/voda v poměru 20 : 20 : 60 (v/v/v). Následně bylo přidáno 50 µl pracovního standardu do hexanu : TFA roztok.

Roztok byl na 5 – 10 vteřin vložen do ultrazvukové lázně.

Následně byl roztok umístěn na 10 minut do topného bloku a nechán stát při teplotě pohybující se kolem 40 °C.

Po uplynutí 10 minut byl odpařen do sucha pod proudem dusíku při teplotě 50 °C.

Do vialky s reziduem byly přidány 2 ml směsi deionizované vody s acetonitrilem (směs v poměru 75 : 25). Touto směsí bylo za důkladného rozmíchání v ultrazvukové lázni residuum rozpuštěno.

Vzniklý roztok byl přefiltrován přes 0,25µm filtr.

Vzorek byl vstříknut do LC kolony.

5.3.6.7 Kalibrace

Pro ověření linearity a kvantifikace se provádí pokaždé po změření 5 vzorků kalibrace kapalinového chromatografu. Při daných parametrech analýzy byla sestrojena kalibrační křivka vycházející ze závislosti ploch píků na koncentraci AFM₁. Kalibrační křivka byla ověřena (konfirmována). Koncentrační body pro stanovení kalibrační křivky byly stanoveny na objemech 0,5 - 1,0 - 2,0 - 4,0 - 20,0 pg/µl.

5.3.6.8 Výpočet obsahu mykotoxinu ve vzorku

Při výpočtu obsahu mykotoxinu ve vzorku se porovnávají plochy a výšky píků se standardy. Vyhodnocení jsou provedena za pomoci programu HP ChemStation. Koncentrace aflatoxinu M₁ ve vzorku se vyjadřují v µg/kg. Samotný výpočet vychází z hodnoty plochy píku odpovídajícího vzorku, která se vynásobí kalibrační konstantou K (hodnota kalibrační směrnice křivky). Následně se výsledek ještě násobí hodnotou 0,015 (odparek odpovídající 16,7 g vzorku je rozpuštěn v 0,25 ml mobilní fáze) (Roubal, 2017).

$$C[\mu g/kg] = CN \cdot 0,015$$

C koncentrace příslušného aflatoxinu ve vzorku [µg · kg⁻¹]

CN koncentrace příslušného aflatoxinu [pg · µl⁻¹]

Vypočtené výsledky jsou korigovány na výtěžnost dle pokynů konfirmační metody.

6. Výsledky

6.1 Výsledky měření pH ve vzorcích moči

Číslo vzorku	Objem vzorku [ml]	pH
1	530	5,44
2	530	5,83
3	110	6,20
4	560	7,08
5	400	6,53
6	550	6,49
7	525	5,34
8	505	5,62
9	525	7,13
10	390	5,36
11	371	6,50
12	478	5,35
13	423	6,54
14	404	6,46
15	394	6,20
16	355	6,89
17	351	5,85
18	395	5,61
19	387	5,94
20	456	5,76
21	438	5,61
22	447	6,36
23	350	6,41
24	399	5,64
25	440	5,28
26	524	6,12
27	350	6,45
28	384	5,66
29	443	5,43
30	490	6,87
31	258	5,98
32	339	5,35
33	512	5,41
34	362	6,10
35	466	5,30
36	330	5,89
37	290	5,56
38	325	6,99
39	310	5,05
40	478	6,44

Tabulka 3 Výsledky měření pH ve vzorcích moči

Naměřené hodnoty pH u vzorků moči se pohybují v rozmezí pH 5 – 7. Vycházíme – li z faktu, že fyziologické pH moči zdravých jedinců vykazuje hodnoty mezi 5 a 6, případně v maximálním rozmezí 4,5 – 8. Tyto hodnoty jsou závislé kromě zdravotního stavu jedince také na skladbě přijímané potravy, kdy přísun převážně masité stravy vykazuje pH nižší než 5,5, označované jako acidurie, naproti tomu strava převážně laktovegetabilní působí alkalizujícím vlivem. Tento jev může způsobit zvýšení pH moči nad 6,5 a je označován jako alkalurie. pH moči také závisí, jak bylo zmíněno výše, na zdraví jedince. Je zjištěno, že horečnatá onemocnění snižují pH moči tj. moč se stává kyselější a zvýšení hodnot pH je doprovodným jevem při onemocnění močových cest.

6.2 Výsledky HPLC stanovení obsahu AFM₁ ve vzorcích moči

Číslo vzorku	Obsah AFM ₁ [μg · kg ⁻¹]
1	<LOQ
2	<LOQ
3	<LOQ
4	<LOQ
5	<LOQ
6	<LOQ
7	<LOQ
8	<LOQ
9	<LOQ
10	<LOQ
11	<LOQ
12	<LOQ
13	<LOQ
14	<LOQ
15	<LOQ
16	<LOQ
17	<LOQ
18	<LOQ
19	<LOQ
20	<LOQ
21	<LOQ
22	<LOQ
23	<LOQ
24	<LOQ
25	<LOQ
26	<LOQ
27	<LOQ
28	<LOQ
29	<LOQ

30	<LOQ
31	<LOQ
32	<LOQ
33	<LOQ
34	<LOQ
35	<LOQ
36	<LOQ
37	<LOQ
38	<LOQ
39	<LOQ
40	<LOQ

Tabulka 4 Výsledky HPLC stanovení obsahu AFM₁ ve vzorcích moči

Testování 40 vzorků moči prokázalo obsah zjišťovaného AFM₁ ve všech případech pod mezí stanovitelnosti. Mez stanovitelnosti byla při této analýze stanovena jako koncentrace odpovídající obsahu AFM₁ = 0,37 pg/kg. Tyto výsledky potvrdily předpokládanou hypotézu, že populace České republiky pravděpodobně není významně vystavena expozici AFB₁. Minimalizace dietární expozice AFB₁ může svědčit o velmi dobrém a funkčním zabezpečení systému bezpečnosti potravin v rámci ČR, včetně funkčních systémů úřední kontroly, státního zdravotního dozoru a Monitoringu zdravotního stavu obyvatelstva.

7. Diskuse

Využití stanovení AFM₁, přítomného v moči jako biomarkeru expozice člověka na aflatoxiny, bylo provedeno již v rámci několika světových studií.

Studie probíhající v letech 2007 – 2008 v rámci projektu EFCOVAL (European Food Consumption Validation) nashromáždila od dárců (muži a ženy ve věku od 45 do 60 let) celkem 236 vzorků 24 hodinové moči. K separaci AFM₁ bylo použito imunoafinitních kolonek AFLAPREP® M, následné stanovení koncentrací AFM₁ bylo zjišťováno pomocí metody HPLC – FLD. Studie prokázala výskyt AFM₁ u 7,6 % z 236 vzorků a to s průměrnou hodnotou 0,29 pg/ml (Ostrý *et al.*, 2010).

Analýzou vzorků moči 250 lidí probíhající na Taiwanu byly zjištěny koncentrace v rozmezí od 0,003 do 0,108 ng/ml (Hatch *et al.*, 1993).

V brazilské studii z roku 2009 bylo zpracováno 69 vzorků moči od dárců žijících ve městě Piracicaba, stát Sao Paulo. Po pročištění na imunoafinitních kolonkách byly vzorky zpracovány metodou HPLC – FD. Bylo zjištěno, že ze 69 vzorků je u 45 (65 %) koncentrace AFM₁ vyšší než uvedená mez stanovitelnosti, vyjádřená hodnotou $\geq 1,8$ pg/ml. Koncentrace AFM₁ u těchto vzorků, byla zjištěna v rozmezí $1,8 < \text{až} < 39,9$ pg/ml, s průměrnou hodnotou $5,96 (\pm 6,39)$ pg/ml (de Cássia Romero *et al.*, 2009).

Sabran *et al.* (2012) zveřejnili výzkum zjišťující koncentrace AFM₁ v moči obyvatel na území Malajsie. Vzorky byly získány od neakademického personálu univerzity v Putře. Rozboru bylo podrobena 22 vzorků a u všech byl detekován obsah AFM₁ v rozmezí 0,0289 – 0,1547 ng/ml. Průměrná hodnota výsledků byla 0,0421 ng/ml.

Studie ze Sierra Leone v Africe, probíhající před rokem 2002, získala vzorky moči od 134 chlapců a 110 dívek během období sucha a 97 chlapců a 93 dívek během období dešťů. Analýzou vzorků z období sucha bylo zjištěno, že všechny děti, kromě jednoho chlapce, měly pozitivní nález AFM₁. Vzorky z období dešťů došly k podobnému výsledku a to, že kromě čtyř dětí (dvou chlapců a dvou dívek) obsahovaly všechny AFM₁. Celkové koncentrace se pohybovaly v rozmezí od 0,1 do 374 ng/ml (Jonsyn-Ellis, 2000).

Velkým zdrojem studií zabývajících se intoxikací aflatoxiny je jihoamerická Brazílie. Tyto expertizy vycházejí z předpokladu, že hlavními potravinami souvisejícími s kontaminací aflatoxiny jsou kukuřice, arašídny a produkty z nich (Caldas *et al.*, 2002; Gloria *et al.*, 1997; Gloria *et al.*, 2006; Kawashima & Valente-Soares, 2006; Rodrigues-Amaya & Sabino, 2002; Sabino *et al.*, 2000).

Výzkum využívající vylepšené imunoafinitní monoklonální protilátky v kolonkách zjišťoval souvislost mezi vyloučeným aflatoxinem M₁ ve vztahu s denní spotřebou aflatoxinu. Byly použity vzorky od 30 mužů z každé z 69 venkovských oblastí pevninské Číny a z 16 oblastí Tchaj-wanu vždy po 2 vesnicích z oblasti (celkem 170 vesnic). Korelační koeficient vylučování AFM₁ v moči byl srovnáním zjištěn jako 0,50 ($P > 0,001$) napříč všemi 85 oblastmi. Detekovatelné koncentrace AFM₁ obsahovalo 65 % vzorků. S průměrem vylučování 3,1 ng/12 hod. Z toho

vychází, že za předpokladu vylučování 2 – 6 % odpovídá suma vyloučeného AFM₁ velmi nízké denní dávce aflatoxinu, přičemž je možný rozsah 0 – 11 pg/den (Cheng *et al.*, 1997).

Dalšími studiemi zabývajícími se výskytu AFM₁ v lidské moči jsou například práce Campbella *et al.* (1970) hodnotící vzorky z Filipín, práce Niathi *et al.* (1987) ze Zimbabwe, která prokázala u 1228 vzorků moči 4,3% pozitivitu na AFM₁. Metabolity aflatoxinů byly detekovány ve vzorcích moči i v Gambii, Singapuru a Francii (Wild *et al.*, 1987).

Několik epidemiologických studií prokázalo souvislost mezi expozicí aflatoxinů v potravě a zvýšeným výskytem primárního hepatocelulárního karcinomu. Oblastí dietárního příjmu, v níž bylo k dispozici málo informací, bylo vystavení novorozenech dětí aflatoxinů, přijímaným s lidským mateřským mlékem. Výzkum z roku 1987 zabývající se touto problematikou získal jako podkladové materiály vzorky od 54 žen z venkovských oblastí v Zimbabwe. V těchto vzorcích byly metodou ELISA zjištěny v 6 případech pozitivní nálezy (11 %) s hodnotami dosahujícími až 50 - ti pg aflatoxinů/ml. U 42 vzorků mléka získaných od žen ve Francii nebyly zjištěny žádné pozitivní výsledky (Wild *et al.*, 1987).

Výzkum z jižní Afriky (Mwanza & Dutton, 2014), zabývající se srovnáváním výsledků výskytu AFM₁ v mléce mezi zdroji z venkovské samoobživné produkce a komerční mléčnou farmou, zjistil po podrobení analýzám tenkovrstvé chromatografie (TLC), fluorometrie (VF) a vysoko účinné kapalinové chromatografie (HPLC) tyto výsledky: frekvence kontaminace vzorků mléka AFM₁ u venkovské produkce byla 22,8% podle stanovení TLC, 93,9 % stanovením VF a 86 % metodou HPLC. Výsledky u komerční mléčné farmy jako 17,8% (TLC) 96,5% (VF) a 100% (HPLC). Nebyly zjištěny žádné významné rozdíly mezi mlékem venkovských a komerčních farem. Průměrné hodnoty AFM₁ se u obou subjektů pohybovaly v rozmezí 0,15 a 0,17 µg/kg.

8. Závěr

Aflatoxiny patří mezi nejvýznamnější mykotoxiny, a to jak díky své významné toxicitě a karcinogenitě, tak díky jejich výskytu potravinách. Z důvodu svých biologických, tzn. toxických, účinků představují pro člověka značné nebezpečí, které nesmí být opomíjeno. Díky globalizaci potravinového trhu mohou být aflatoxiny velkým rizikem i pro zdraví české populace. Proto je potřebné i nadále pokračovat v monitoringu aflatoxinů v potravinách především u dovozů ze třetích zemí a ve stanovení biomarkerů aflatoxinů v biologickém materiálu (např. v moči a krevním séru).

9. Použitá literatura

BAČINA A., 2014: Vyšší odborná škola zdravotnická a Střední zdravotnická škola Hradec Králové: Laboratorní metody [online]. [cit. 2015-04-13]. Dostupné z: <http://labmet.zshk.cz/vyuka/vyuka.aspx>

BAUDRIMONT, I. *Variation de la nephrotoxicité de l'ochratoxine A sous l'effet de facteurs métaboliques et nonmétaboliques. Thèse pour le Doctorat: Doktorandská.* Bordeaux: Université II. France, 1995. 236 p

BAYDAR, T., ERKEKOGLU, P., SIPAHI, H., SAHIN, G. Aflatoxin B₁, M₁ and ochratoxin A levels in infant formulae and baby foods marketed in Ankara, Turkey. *Journal of food and drug analysis*, 2007, vol. 15, no. 1, p. 89–92.

BENNETT, J. W., KLICH, M. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2003, vol. 16, p. 499–500

BETINA, V. *Mykotoxíny: chémia - boilógia - ekológia*. 1st ed. Bratislava: Alfa, 1990. 284 p. Edícia potravinárskej literatúry. ISBN 80-05-00631-4.

CALDAS, E. D., SILVA, S. C., OLIVIERA, N. O. Aflatoxinas e ocratoxinas a em alimentos e riscos para a saúde humana. *Revista de Saúde Pública*, 2002, vol. 99, p. 195–197.

CAMPBELL, T., CAEDO, J. J., BULATO-JAYME, J., SALAMAT, L., ENGEL, R. Aflatoxin M₁ in human urine. *Nature*, 1970, vol. 227, p. 403–404.

Concil for agricultural Science and Technology. *Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems*. Ames, Iowa: Council for Agricultural Science and Technology, 2003. 199 s. ISBN 1887383220.

DE CÁSSIA ROMERO, A., BARONI FERREIRA, T. R., TADEU DOS SANTOS DIAS, C., CALORI - DOMINQUES, M. A., MICONTTI DA GLORIA, E. Occurrence of AFM₁ in urine samples of a Brazilian population and association with food consumption. *Food Control*, 2010, vol. 21, no. 4, p. 554–558.

DOSTÁL, J.; PAULOVÁ, H.; et al. *Biochemie pro posluchače bakalářských oborů*; Biochemický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita: Brno, 2009.

DORNER, J., COLE, R., DIENER, U. The relationship of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* with reference to production of aflatoxins and cyclopiazonic acid. *Mycopathologia*, 1984, no. 87, p. 12–15.

GLORIA, E. M., FONSECA, H., SOUZA, I. M. Occurrence of mycotoxins in maize delivered to the food industry in Brazil. *Tropical science*, 1997, vol. 37, p. 107–110.

GLORIA, E. M., ROMERO, A. C., CARVALHO, A. P. P., CALORI-DOMINGUES, M. A., GONCALVES, P. V. M. Pertil da contaminaco con aflatoxinas entre embalagens de produtos de amendoim. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 2006, vol. 26/2, p. 660–665.

GROOPMAN, J. *The toxicology of aflatoxins: Human health, veterinary, and agricultural significance*. San Diego, CA: Academic Press, 1994. Molecular dosimetry methods for assessing human aflatoxin exposures, p. 259–280.

GROOPMAN, J., KENSLER, T. The light at the end of tunnel for chemical-specific biomarkers: Daylight or headlights?. *Carcinogenesis*, 1999, vol. 20, p. 1–11.

HATCH, M. C., CHEN, C., LEVIN, B., JI, B. T., YANG HSU, S. W., WANG, L. W., et al. Urinary aflatoxin levels, hepatitis B virus infection an hepatocellular carcinoma in Taiwan. *International Journal of Cancer*, 01 Jan 1993, p. 931–934.

HEATHCOTE, J., HIBBERT, J. *Aflatoxins: chemical and Biological Aspects. Pathological effects*. 1st ed. Amsterdam. Oxford, New York, 1978

IARC Aflatoxin - *Some naturally occurring substances: food items and constituents, hererocyclic aromatic amines and mycotoxins*. 1993th ed. Lyon France: IARC - International Agency for Research on Cancer, 609 p. IARC monographs on the evalution of carcinogenic risk to humans, 56.

IARC, 2012. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: chemical agents and related occupations. A review of human carcinogens. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer **100F**, 224 – 248.

JAIMEZ, J., FENTE, C. A., VAZQUEZ, B. I., FRANCO, C. M., CEPEDA, A., 2000: Application of the as say aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. *Journal of Chromatography A*, **882**, 1 – 10.

JAGER, A. V., TONIN, F. G., SOUTO, P. C. M. C., PRIVATI, R. T., OLIVEIRA, C. A. F. Determination of urinary biomakers for assessment of short - term human exposure to aflatoxins in Sao Paulo, Brazil. *Toxins*, 2014, vol. 6, ISSN 2072 - 6651.

JONSYN-ELLIS, F. Seasonal variation in exposure frequency and concentration levels of aflatoxins and ochratoxins in urine samples of boys and girls. *Mycopathology*, 2000, vol. 152, p. 35–40.

KAŠ, J., KODÍČEK, M., et al. *Laboratorní techniky biochemie*. 1st ed. Praha: VŠCHT, 2006. ISBN 80-7080-586-2.

KAWASHIMA, L. M., VALENTE-SOARES, L. M. Incidencia de fumonisinas B1 aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 2006, vol. 26/3, p. 516–521.

KLOUDA, P., Moderní analytické metody, 2. vydání, Ostrava, 2003, s. 9–26, ISBN 80-86369-07-2

KURTZMAN, C., HORN, B., HESSETLINE, C. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1987, vol. 53, p. 147–158.

KVASNICOVÁ, V. a P. BALÍNOVÁ. LÉKAŘSKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY. *Praktická cvičení z lékařské chemie a biochemie: Chromatografické metody* [online]. 2006 [cit. 2013-05-015]. Dostupné z: http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/praktika/uloha_B2.htm

MALÍŘ, F. CHL ZÚ HK. 2010: *SOP HK 302.05: Stanovení ochratoxinu A (OTA) metodou HPLC – FLD*. 2. vyd. Hradec Králové, 1 – 13.

MALÍŘ, F., OSTRÝ, V. (Eds.): *Vláknité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka*. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, Brno 2003

MALÍŘ, F., OSTRÝ, V. Aflatoxiny - toxické účinky u člověka. *Kontakt*, 2012, vol. 14/1, p. 85–93. ISSN 1212 - 4117.

MWANZA, M., DUTTON, M. Occurrence of aflatoxin M₁ from rural subsistence and commercial farms from selected areas of South Africa. *Food control*, 2014, vol. 39, p. 92–96

NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M. a kol. Moderní HPLC separace v teorii a praxi I, 2013, ISBN 978-80-260-4243-3

NYATHI, C.; MUTIRO, C.; HASLER, J.; CHETSANGA, C. A survey of urinary aflatoxin in Zimbabwe. **1987**, 16, 516–519.

OSTRÝ, V., SKARKOVA, J., KAVRIK, R., RUPRICH, J. An occurrence of ochratoxin A and aflatoxin M₁ biomarkers in human urine. *The 32th mycotoxin workshop in Lyngby*, 2010.

PATOČKA, J. a kol. *Vojenská toxikologie* 1. vyd. Praha: Grada, 2004. 178 s. ISBN 80 - 24 - 0608-3.

PITT, J., HOCKING, A., BHUNDASAMAI, K., MISCAMBLE, B., WHEELER, K., TANBOOK-EK, P. The normal mycoflora of commodities from Thailand. I nuts and oilseeds. *Int.J. Food Microbiol (in press)*, 1993.

PROBST, C., NJAPAU, H., COTTY, P. J. Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: Identification of the casual agent. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, vol. 77, p. 2762.

REDDY, K., FARHANA, N., SALLEH, B. Occurrence of *Aspergillus* spp. and aflatoxin B₁ in Malaysian foods used for human consumption. *Journal of Food Science*, 2011, no. 76, p. T99–T104.

RODRIGUES-AMAYA, D. B., SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: The last decade in review. *Brazilian journal of microbiology*, 2002, vol. 33/1, p. 1–11.

ROUBAL, T. CHL ZÚ HK. 2017: *SOP 302 – Stanovení aflatoxinů B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ metodou HPLC – FLD*. 3. vyd. Hradec Králové, 1 – 14.

SABRAN, M. R., JAMALUDDIN, R., ABDUL MUTALIB, M. S. Screening of aflatoxin M₁, a metabolite of aflatoxin B₁ in human urine samples in Malaysia: A preliminary study. *Food control*, 2012, vol. 28, no. 1, p. 55–58.

SABINO, M., LAMARDO, L. C. A., MILANEZ, T. V., INOMATA, E. I., ZORZETTO, A. P., NAVAS, A. S., et al. Twenty years of aflatoxin contamination in groundnuts a

groundnut products in Sao Paulo State, Brazil. *Official program and abstractbook of the 10th international IUPAC symposium on mycotoxin and phycotoxin*, 2000, p. 151.

SARGEANT, K., O'KELLY, J., CARNAGHAN, R., ALLEROFT, R. The assay of a toxic principle in creatin groundnut meals. *Vet.Rec.*, 1961, vol. 73, p. 1219–1222.

SNYDER, L. R., J. KIRKLAND a J. L. GLAJCH. Practical HPLC method development [online]. 2. vyd. New York: Wiley, 1997, xxvi, 765 p. [cit. 2013-05-10]. ISBN 04-710-0703-X. Dostupné

z: <http://books.google.cz/books?id=EWxvLGgPU6cC&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false>

TROJAN, S., LANGMEIER, M. (ed.). *Lekářská fyziologie*. 4th ed. Praha: GRADA Publishing a.s., 2003. 772 p. ISBN 80-247-0512-5.

VIŠŇOVSKÝ, P., et al. *Farmakologie látek znečišťujících životní prostředí*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1997. 106 s. ISBN 80-7184-407-1.

CHENG, Z., ROOT, M., PAN, W., CHEN, J., CAMPBELL, C. T. Use of an Improved Method for Analysis of Urinary Aflatoxin M1 in a Survey of Mainland China and Taiwan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1997, vol. 6, p. 523–529.

WHO, Health Organization. 2002: Report on Meetings of Expert Committees and Study Groups – Evalution of Certain Mycotoxins. Geneva: World Health Organization.

SUCHÝ, P., HERZIG, I. *Plísně a mykotoxiny, prevence jejich vzniku a dekontaminace v krmivech*. Praha: Vědecký výbor výživy zvířat, 2005.

VERES, K. Mykotoxiny - nový civilizační faktor?. *Vesmír*, 1986, vol. 5, p. 254–256. ISSN 0042-4544.

WILD, Ch. P., PIONNEAU, F. A., MONTESANO, R., MUTIRO, C. F., CHETSANGA, Ch. J. Aflatoxin detected in human breast milk immunoassay. *Int. J. Cancer*, 1987, vol. 40, p. 328–333.

TEPLAN, V. Močové syndromy. *Medicína pro praxi*, 2010, vol. 7/10, p. 391–394.

SCHOENTAL, R. Mycotoxins and the Bible. *Perspect. Biol. Med.*, 1984, vol. 28/1, p. 117–120.

SCHNEIDERKA, P. Močové analýzy. *Ústav patologické fyziologie LFUP a OKB FN Olomouc*, 2012, p. 1–6.

ZHU, J., ZHANG, L., HU, X., XIAO, Y., CHEN, J., XU, Y., et al. Correlation of dietary aflatoxin B₁ levels with excretion of aflatoxin M₁ in human urine. *Cancer Research*, 1987, no. 47, p. 1848–1852.

10. Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obrázek 1 <i>Aspergillus parasiticus</i> , Obrázek 2 <i>Aspergillus flavus</i>	18
Obrázek 3 <i>Aspergillus nomius</i>	19
Obrázek 4 Strukturální vzorec aflatoxinu M1	21
Obrázek 5 Biotransformace alatoxinu B ₁	22
Obrázek 6 Titrační křivka neutralizační rovnice	26
Obrázek 7 Schéma HPLC	34
Obrázek 8 Retenční čas	34
Obrázek 9 Výpočet množství analyzované látky.....	35
Tabulka 1 Seznam zkratk.....	10
Tabulka 2 Terminologický slovník.....	12
Tabulka 3 Výsledky měření pH ve vzorcích moči	39
Tabulka 4 Výsledky HPLC stanovení obsahu AFM1 ve vzorcích moči	41