

**Univerzita Hradec Králové**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra Biologie**

**Stanovení mykotoxinu ochratoxinu A ve vzorcích rýže**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor: Lucie Neuchlová

Studijní program: B1501 – Biologie

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

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

Hradec Králové

červen 2015

# **Univerzita Hradec Králové**

Přírodovědecká fakulta

## **Zadání diplomové práce**

Autor: Bc. Lucie Neuchlová

Studijní program: N1501 Biologie

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Název závěrečné práce: Stanovení mykotoxinu ochratoxinu A ve vzorcích rýže

Název závěrečné práce AJ: Determination of the ochratoxin A in samples of rice

### **Cíl, metody, literatura, předpoklady:**

Cílem diplomové práce je analýza OTA ve vzorcích rýže loupané a rýže parboiled a zhodnocení hypotézy, že v rýži parboiled by mohl být výskyt OTA vyšší než v rýži loupané. Analýzy OTA v rýži zahrnují extrakci a vyčištění OTA na imunoafinitních kolonkách a následné imunoanalytické stanovení na ELISA fotometru.

Garantující pracoviště: Katedra biologie, Přírodovědecká fakulta

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

Oponent: doc. MVDr. Vladimír Ostrý, CSc.

Datum zadání práce: 11. 2. 2014

Datum odevzdání práce:

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že diplomovou práci na téma „Stanovení mykotoxinu ochratoxinu A ve vzorcích rýže“ jsem vypracovala samostatně. Veškerou použitou literaturu a seznam informací uvádím v seznamu literatury.

V Hradci Králové dne

Jméno a příjmení

## **PODĚKOVÁNÍ**

Touto cestou bych ráda poděkovala doc. RNDr. Františkovi Malíři, Ph.D., za rady, které mi během psaní diplomové práce vždy s ochotou poskytoval.

**Anotace práce:**

NEUCHLOVÁ, L. *Stanovení mykotoxinu ochratoxinu A ve vzorcích rýže*. Hradec Králové: Přírodovědecká fakulta Univerzity Hradec Králové, 2015. 58 s. Diplomová práce.

Ochratoxin A (OTA) je významný mykotoxin produkováný toxinogenními plísněmi rodu *Aspergillus* a *Penicillium*, které kontaminují potravinové suroviny, potraviny i krmiva. Na lidský organismus působí především nefrotoxicky a dále celou řadou dalších významných nežádoucích - toxických účinků např. hepatotoxicky, reprotoxicky, imunotoxicky, neurotoxicky, teratogenně, genotoxicky a karcinogenně. OTA vykazuje významná zdravotní nebezpečí pro člověka, proto je zapotřebí jeho nebezpečí řídit, tj. minimalizovat jeho dopady na lidské zdraví. Cílem diplomové práce je analyzovat OTA ve vzorcích rýže loupané a rýže parboiled a potvrdit hypotézu, že v rýži parboiled by mohl být výskyt OTA vyšší než v rýži loupané. Rýže parboiled se upravuje hydrotermickou úpravou zrna, při níž se z pluch neloupané rýže působením vysokotlaké páry dostanou dovnitř zrna rozpuštěné vitaminy a minerální látky a předpokládá se, že se děje obdobné i v případě přítomného OTA. Analýzy OTA v rýži zahrnují extrakci a vyčištění OTA na imunoafinitních kolonkách a následné imunoanalytické stanovení na ELISA fotometru.

**Klíčová slova:**

Ochratoxin A, OTA, rýže, stanovení ELISA, HPLC.

**Annotation:**

NEUCHLOVÁ, L. *Determination of mycotoxin ochratoxin A in rice samples*. Hradec Kralove: Faculty of Science, University of Hradec Kralove, 2015. 58 p. Diploma Thesis.

Ochratoxin A (OTA) is a significant mycotoxin produced by toxigenic molds of the genus *Aspergillus* and *Penicillium*, which contaminate food materials, food and feed. It has been shown to be especially nephrotoxic for the human body, the other toxic effects are hepatotoxic, reprotoxic, immunotoxic, neurotoxic, teratogenic, genotoxic and carcinogenic. In the human body then shows a significant health hazards and it is necessary to manage these hazards, i.e. to minimize their impacts on human health. The aim of the thesis is to analyze OTA in samples of husked rice and parboiled rice and to confirm a hypothesis that in the parboiled rice should be the presence of OTA higher, than in husked rice. Parboiled rice is modified by hydrothermal treatment of grain, in which the husks of the paddy rice by high-pressure steam will get into the grain dissolved vitamins and minerals including present OTA. Analysis of OTA in rice include extraction and cleaning of OTA on immunoaffinity boxes and the subsequent immunoassay to ELISA photometer.

**Key words:**

Ochratoxin A, OTA, rice, determination ELISA, HPLC.

## Obsah

1.	Úvod .....	12
2.	Rýže .....	13
	2.1 Leštěná (bílá) rýže .....	14
	2.2 Rýže parboiled.....	15
3.	Ochratoxin A .....	16
	3.1 Producenti OTA .....	16
	3.2 Další formy ochratoxinů.....	17
	3.3 Názvosloví OTA .....	19
	3.4 Chemické a fyzikální vlastnosti .....	20
	3.5 OTA v potravinách.....	20
	3.6 Toxicita OTA .....	22
	3.7 Biotransformace OTA .....	24
	3.8 Maximální limity OTA v rýži a charakterizace nebezpečí .....	25
4.	Metodika – Obecně.....	26
	4.1 Odběr rýže .....	26
	4.2 Analytické metody pro stanovení OTA .....	26
	4.3 Stanovení OTA v rýži .....	30
	4.4. Přístroje a pomocná zařízení .....	32
	4.5 Postup .....	33
5.	Výsledky.....	43
6.	Diskuze .....	45
7.	Závěr.....	50

8.	Seznam literatury .....	51
9.	Seznam obrázků, tabulek a grafů.....	58



## Seznam použitých zkratk

<b>CIN</b>	onemocnění chronická intersticiální nefropatie
<b>EFSA</b>	European Food Safety Authority = Evropský úřad pro bezpečnost potravin
<b>EU SCF</b>	Scientific Committee for Food of European Commission = Vědecký výbor pro potraviny Evropské komise
<b>HPLC</b>	High-performance liquid chromatography = vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<b>IARC/WHO</b>	International Agency for Research on Cancer = Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (Lyon)
<b>JECFA FAO/WHO</b>	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives = Spojený expertní výbor FAO/WHO k potravinářským přídatným látkám
<b>OTA</b>	ochratoxin A
<b>PTWI</b>	prozatímní tolerovatelný týdenní přívod
<b>PTDI</b>	prozatímní tolerovatelný denní přívod
<b>PMTDI</b>	prozatímní maximální tolerovatelný denní přívod
<b>TWI</b>	tolerovatelný týdenní přívod
<b>WHO</b>	World Health Organization, Světová zdravotnická organizace

## Terminologický slovník pojmů

<b>Acetonitril</b>	organická bezbarvá sloučenina (CH <sub>3</sub> CN), využívaná pro přípravu mobilní fáze pro HPLC stanovení; jedná se o nejjednodušší organický nitril
<b>Adukt (OTA - DNA,..)</b>	kovalentní vazba OTA na DNA
<b>Aflatoxin</b>	mykotoxin produkovaný plísněmi rodu <i>Aspergillus</i> , zejména <i>Aspergillus flavus</i> a <i>A. parasiticus</i>
<b>Citrinin</b>	mykotoxin produkovaný plísněmi rodu <i>Aspergillus</i> a <i>Penicillium</i>
<b>Deoxynivalenol, diacetoxyscirpenol, HT-2 toxin, T-2 toxin</b>	toxiny produkovaný plísněmi rodu <i>Fusarium</i> , kontaminující zejména obiloviny
<b>Eluát</b>	vyluhovaná látka (analyt)
<b>Fumonisin</b>	mykotoxin produkovaný plísněmi rodu <i>Fusarium</i>
<b>Hepatocyt</b>	buňka jater
<b>Hydroxyprolin</b>	přírodní aminokyselina, derivát pyrrolu, součást kolagenu
<b>Imunotoxicita</b>	toxicita pro imunitní systém
<b>Lysin</b>	jedna z esenciálních aminokyselin lidského organismu
<b>Mobilní fáze</b>	tzv. eluent, je fáze pohybující se chromatografickým systémem, umožňující odseparování vzorků na jednotlivé analyty
<b>Mykotoxin</b>	toxin produkovaný toxinogenními vláknitými mikroskopickými houbami (plísněmi)
<b>Nefrotoxita</b>	toxicita pro ledviny
<b>Neurotoxita</b>	toxicita pro nervovou soustavu
<b>Patulin</b>	toxin, produkovaný některými druhy plísní- <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> a <i>Byssochlamys</i> , kontaminant ovoce
<b>Plísně</b>	vláknité mikroskopické houby
<b>Reprotoxita</b>	negativní účinky na reprodukci
<b>Serin</b>	alifatická aminokyselina
<b>Slepý vzorek</b>	kontrolní vzorek připravený identickým postupem, jako

	vzorky pro měření (s použitím identických chemikálií), ale bez měřeného analytu (OTA)
<b>Standard</b>	v analytické chemii slouží k posouzení kvality (detekce) či stanovení kvantity
<b>Teratogenita</b>	schopnost látky vyvolat vrozenou vývojovou vadu vyvíjejícího se plodu
<b>Toxikokinetika</b>	osud xenobiotika v živém organismu
<b>Tyrosin</b>	jedna ze základních dvaceti proteinogenních aminokyselin
<b>Vialka</b>	lahvička na vzorky
<b>Zearalenon</b>	mykotoxiny plísňe rodu <i>Fusarium</i> , jedná se o laktony kyseliny $\beta$ -resorcylové, obecně méně toxické než jiné mykotoxiny, působí zejména estrogenně

## 1. ÚVOD

Mykotoxiny představují v současné době závažné zdravotní nebezpečí pro zdraví člověka. Světová Zdravotnická Organizace (WHO) stanovila jako hlavní rizikové kontaminanty potravin a krmiv několik mykotoxinů, kromě ochratoxinu A se sem řadí aflatoxiny B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, fumonisiny B<sub>1</sub> a B<sub>2</sub>, deoxynivalenol, T-2 toxin, HT-2 toxin a zearalenon (WHO, 2002). Ochratoxin A (OTA) patří dle Světové zdravotnické organizace mezi jeden z pěti nejvýznamnějších mykotoxinů produkovaných plísněmi, konkrétně rodu *Aspergillus* a *Penicillium*, což jsou toxinogenní plísně běžně kontaminující potravinové suroviny, potraviny i krmiva. Na lidské zdraví mohou působit nefrotoxicky, hepatoxicky, reprotoxicky, neurotoxicky, teratogenně, genotoxicky a karcinogenně.

Kontaminovány mohou být běžně konzumované potraviny jako je víno, káva, pivo, sušené ovoce, maso, mléčné výrobky, koření, čokoláda, luštěniny, ořechy, arašídy, bavlníková semena, kakaové a kávové boby a v neposlední řadě obiloviny – kukuřice, pšenice, oves, rýže, ječmen, čirok. Obiloviny jako významný zdroj energie jsou běžnou denní součástí stravy z celosvětového hlediska. Dle odhadů mohou být až ve 40 % případů kontaminovány mykotoxiny, kontaminace může být způsobena teplými a vlhkými klimatickými podmínkami v místech pěstování. Teplota a vlhko jsou ideálními podmínkami pro růst kontaminujících plísní, nicméně tyto podmínky mohou nastat i nedodržením skladovacích podmínek. Sledování mykotoxinů v potravinách, lidské moči, krevním séru a mateřském mléce je v ČR zařazeno do systému Monitoringu zdravotního stavu obyvatelstva ve vztahu k životnímu prostředí. Pro minimalizaci negativních účinků mykotoxinů na lidské zdraví jsou stanoveny maximální přípustné limity v potravinách příslušnými normami. Jedná se o nařízení Komise /ES/ č.1881/2006 ES, 105/2010 ES a 594/2012 ES, které stanovují maximální limity OTA v potravinách.

Cílem práce je analyzovat OTA ve vzorcích rýže loupané a rýže parboiled a potvrdit hypotézu, že v rýži parboiled by mohl být výskyt OTA vyšší než v rýži loupané. Analýza OTA v rýži zahrnuje extrakci a vyčištění OTA na imunoafinitních kolonkách a následné imunoanalytické stanovení pomocí ELISA fotometru.

## 2. RÝŽE

Rýže setá (*Oryza sativa*) patří k nejstarším pěstovaným obilovinám na světě. Původ rýže je z oblasti povodí Perlové řeky v Číně, kde byla pěstována již před 8 200 – 13 500 lety. Dnes je rozšířena všude ve světě, zejména v tropických a subtropických oblastech (Valíček a kol., 2002). Největším producentem rýže je nicméně Čína, roční produkce na ploše 30 137 000 ha se pohybuje kolem 20 423,6 milionů tun. Dle odhadů je celková celosvětová roční produkce rýže zhruba 68 501,3 milionů tun (Xianven *et al.*, 2015). Rýže má bezpočet tvarů a barev (v neloupaném stavu) od hnědé přes červenou a fialovou až po černou. Dle údajů v botanice rozlišujeme přes 20 druhů rýže, kulturních forem existuje více než 8000 druhů (Cushman, 2013).

Systematické zařazení rýže dle Mártonfiho, 2007:

Říše: rostliny (*Plantae*)

Oddělení: krytosemenné (*Magnoliophyta*)

Třída: jednoděložné (*Liliopsida*)

Řád: lipnicotvaré (*Poales*)

Čeleď: lipnicovité (*Poaceae*)

Rod: rýže (*Oryza*)

Druh: rýže setá (*Oryza sativa*)

Podle nároků na zavlažování se rozlišuje rýže vodní (bažinná) pěstovaná v nížinách, kde je hodně tepla a světla a rýže suchá (horská) pěstovaná bez zaplavování políček, která se potom vyznačuje méně kvalitními a menšími zrny (EFSA, 2012). Rýže má tři jedlé části – otruby, klíček a endosperm, obdobně jako jiné druhy obilovin. Jedná se o jednoletou plodinu, vysévanou na jaře a sklizeň probíhá zhruba po šesti měsících, tedy v období podzimu (Cushman, 2013). Rýže je velmi dobře stravitelná, obsahuje především škroby (60 – 80 %), poměrně málo bílkovin (gliadinový oryzin), téměř žádný tuk, je hypoalergenní. Loupaná rýže je vhodnou součástí šetřících diet, druhy se slupkou jsou zdrojem nejen škrobů, ale i nerozpustné vlákniny a vitaminů skupiny B a E a některých minerálních látek. Existuje široká škála druhů rýže dle technologické

úpravy. V práci jsou sledovány vzorky rýže leštěné (bílé) a vzorky rýže paraboiled (EFSA, 2012).

## 2.1 Leštěná (bílá) rýže

Leštěná rýže je připravena přesně danými, poměrně složitými postupy. Jako první probíhá mlácení, kdy se zrno zbavuje klasu, zrno se poté dále loupe a tím zbavuje dvou vnějších nestravitelných vrstev plev. Pokud neprobíhají další úpravy, vzniká rýže celozrnná. Pro získání rafinované rýže nicméně následuje několik stupňů bělení. Při prvním bělení se obrousí vrstva epikarpu a mezokarpu i malá část klíčku. Výsledkem je tzv. polorafinovaná rýže. Při druhém bělení dochází k odstranění vrstvy endokarpu a vzniká rafinovaná rýže 3. stupně. Následují ještě 2 další procesy bělení, kdy se rýže zbavuje vrstvy spermodermu a aleuronu, který obsahuje klíček. Výsledným produktem je rafinovaná rýže 1. stupně, která je již velmi chudá na bílkoviny, vlákninu, vitamíny i oligoelementy (stopové prvky). Po procesech bělení je dále rýže upravena kartáčováním, rafinované zrno rýže se tak stává znovu hladkým a pevným. Následným olejováním (zrno se stříká rostlinným olejem nebo častěji vazelinou) se zrno chrání před rozpadem na mouku. Olejování může, ale nemusí, předcházet leštění. Během leštění se zrno stříká tenkou vrstvou glukózy a mastku, aby bylo bělejší a lesklejší a tato vrstva rovněž brání příliš rychlému rozpadu zrna během vaření. Výsledkem je rafinovaná leštěná rýže – tedy produkt s velmi nízkou výživnou hodnotou (Žižka, 2007). Naproti tomu je tato rýže trvanlivější a méně náchylná ke žluknutí (Cushman, 2013).

Rozdělení leštěné rýže podle délky zrna:

- dlouhozrnná (průměrná délka 6 mm, poměr délky a šířky více než 3),
- střednězrnná (průměrná délka 5,2 až 5 mm, poměr délky a šířky méně než 3),
- kulatozrnná (průměrná délka pod 5,2, poměr délky a šířky méně než 2).

## 2.2 Rýže parboiled

Rýže parboiled (někdy označovaná jako vaporizovaná, podle terminologie EU rovněž předpařená) se v poslední době těší stále větší oblibě. Rýže se upravuje patentovaným technologickým postupem, vyvinutým v USA zhruba před padesáti lety.

Jedná se o čtyřfázovou hydrotermickou úpravu zrna, při níž se po namáčení neloupané rýže (paddy) působením vysokotlaké páry „vtlačí“ dovnitř zrna rozpuštěné vitaminy a minerální látky z povrchových vrstev, díky tomu navíc povrch zrna ztvrdne a dochází k přeměně škrobů, takže se rýže při vaření nelepí. Pozitivem je zachování obsahu vitaminů a minerálních látek. Takto opracované zrno se potom zpracovává stejně jako běžné druhy rýže, tzn. loupáním a leštěním, ovšem vitaminy a minerální látky v zrně stále zůstávají. Při vaření absorbuje rýže parboiled více vody, což zlepšuje její výtěžnost. Barva syrové parboiled rýže je žlutá, varem však přechází v zářivě bílou. V úpravě parboiled se prodává i rýže natural. Parboiled rýže je z výživového hlediska hodnotnější. Její energetický obsah je jen nepatrně vyšší, ale obsah vitaminů skupiny B, včetně niacinu a kyseliny listové, je v porovnání s běžnou loupanou rýží údajně téměř dvojnásobný. Pokud jde o množství minerálních látek, expertní studie se shodují, že u sodíku a draslíku jsou hodnoty zhruba stejné jako u běžné rýže. Zatímco hořčík a fosfor vykazuje mírné navýšení, obsah vápníku a železa dosahuje oproti klasické loupané rýži téměř dvojnásobku (EFSA, 2012). Parboiled rýže obsahuje zhruba 80% nutričních hodnot hnědé celozrnné rýže. Tímto způsobem je ošetřováno zhruba 50% světové produkce rýže (Miah *et al.*, 2002).

### 3. OCHRATOXIN A

#### 3.1 Producenti OTA

OTA patří mezi nejvýznamnější toxin ze skupiny mykotoxinů kontaminující širokou škálu potravin, s negativním vlivem na zdraví člověka i zvířat. První izolace proběhla v roce 1965 z kultury *Aspergillus ochraceus* pěstované na sterilní kukuřičné mouce (van der Merwe *et al.*, 1965a).

Mykotoxiny jsou produkovány jako sekundární toxické metabolity toxinogenních plísní. V současné době jsou druhy – *Aspergillus carbonarius*, *Penicillium nordicum*, *P. verrucosum* a *A. ochraceus* považovány jako nejvýznamnější producenty OTA v potravinách. Mezi další producenty patří *Aspergillus westerdijkiae*, *A. steynii*, *A. foetidus*, *A. lacticoffeatus*, *A. niger*, *A. sclerotioniger* a *A. tubingensis* (Ostrý *et al.*, 2013). Při sledování *P. verrucosum* je kromě produkce ochratoxinu A, zároveň často sledována vysoká koncentrace citrininu (Frisvad & Filtenborg, 1989). Rozšíření těchto plísní je klimaticky ovlivněno. *Penicillium verrucosum* roste optimálně při teplotách nižších než 30 °C a při maximální vodní aktivitě 80%, z toho důvodu se nachází zejména v mírných oblastech Severní Evropy a Kanady, výskyt je zaznamenán i ve Středomořských lokalitách s mírným podnebím jako je Itálie, Španělsko, Francie a Portugalsko. *Penicillium verrucosum* je častěji izolováno z míst s chladnějšími podmínkami, při vysoké vlhkosti, proto ke kontaminaci může dojít při nevhodných podmínkách skladování. Dalším uznávaným kontaminantem je *Penicillium nordicum*, ve srovnání s *P. verrucosum* však méně častým (Duarte *et al.*, 2010).

V oblastech mírného klimatu jsou obiloviny vystaveny vyššímu riziku vzniku OTA, protože zrno je často sklíženo s vyšším obsahem vlhkosti. Pokud jsou tedy zrna nedostatečně vysušena, či jsou delší dobu skladována před sušením, pravděpodobnost kontaminace OTA značně stoupá (Uysal *et al.*, 2009).



Zrna rýže obsahují zcela přirozeně vyšší procento vlhkosti, pohybuje se v rozmezí mezi 35 až 50% (Zinedineet *et al.*, 2007). Proto ke kontaminaci spory plísní může dojít již na poli a během sklizně a infikovaná zrna budou obsahovat vysoké hodnoty OTA (Pena *et al.*, 2005). Dle studií druhy rýže jako jsou basmati, hnědá rýže, divoká rýže vykazují vyšší hladiny OTA, a to ze dvou důvodů - vyšší vlhkosti zrn, než u běžné bílé rýže a také z důvodu vyššího obsahu aminokyselin a bílkovin (Gonzales *et al.*, 2006). Obecně obiloviny kontaminované OTA jsou s velkou pravděpodobností kontaminovány dalšími plísňovými metabolity. Následující tabulka znázorňuje optimální růstové podmínky u dvou nejvýznamnějších producentů *Aspergillus ochraceus* a *Penicillium verrucosum*.

**Tab. 1 Optimální růstové podmínky pro *Aspergillus ochraceus* a *Penicillium verrucosum***

<b>Růstové podmínky (Reddy et Bhoola, 2010)</b>	<b><i>A. ochraceus</i></b>	<b><i>P. verrucosum</i></b>
<b>Optimální teplota pro růst plísně</b>	24 - 37 °C	20 °C
<b>Optimální teplota pro produkci OTA</b>	31 °C	20 °C
<b>Optimální pH pro růst</b>	3 - 10	6.0 - 7.0
<b>Minimální vodní aktivita pro produkci OTA</b>	0.8	0.86

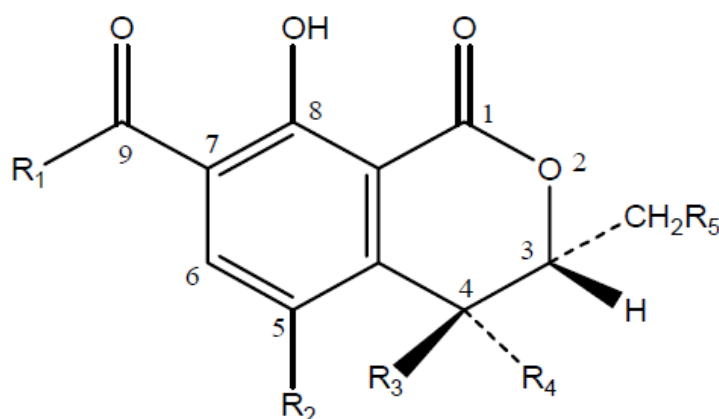
## 3.2 Další formy ochratoxinů

### 3.2.1 Přirozené formy

Kromě OTA se přirozeně vyskytuje ochratoxin B – jedná se o dechlorovaný analog OTA. Dále ochratoxin C – což je ethyl ester OTA, isokumarinový derivát OTA je ochratoxin  $\alpha$  (O $\alpha$ ) a jeho dechlorovaný analog ochratoxin  $\beta$  (O $\beta$ ). Další skupinou jsou hydroxyochratoxiny – např.: 4-R-hydroxyochratoxin A, 4-S-hydroxyochratoxin A a 10-hydroxyochratoxin A. Dále jsou to analogy OTA obsahující tyrosin, lysin či hydroxyprolin (Khouri & Atoui, 2010).

### 3.2.2 Syntetické formy

Mezi nejběžnější syntetické formy patří d-OTA, ethyl amid Ochratoxinu A, či O- methyl Ochratoxinu A. Struktura přírodních i syntetických metabolitů je odvozená dle základního vzorce uvedeného níže (viz obr. 1), v tabulce jsou zaznamenány deriváty (viz tab. 2), které se váží a jsou charakteristické pro daný metabolit (Khouri & Atoui, 2010).



Obr. 1 Obecný strukturní vzorec ochratoxinů

Tab. 2 Typy přirozených i syntetických metabolitů OTA

Název	R1	R2	R3	R4	R5
<b>Přírodní formy</b>					
Ochratoxin A	fenylalanin	Cl	H	H	H
Ochratoxin B	fenylalanin	H	H	H	H
Ochratoxin C	ethyl-ester, fenylalanin	Cl	H	H	H
Ochratoxin $\alpha$	OH	Cl	H	H	H
Ochratoxin $\beta$	OH	H	H	H	H
4-R-Hydroxyochratoxin A	fenylalanin	Cl	H	OH	H
4-S-Hydroxyochratoxin A	fenylalanin	Cl	OH	H	H
10-Hydroxyochratoxin A	fenylalanin	Cl	H	H	OH
Tyrosinový analog OTA	tyrosin	Cl	H	H	H
Serinový analog OTA	serin	Cl	H	H	H
Hydroxyprolinový analog OTA	hydroxyprolin	Cl	H	H	H
Lysinový analog OTA	lysin	Cl	H	H	H
<b>Syntetické formy</b>					
d-OTA	d-fenylalanin	Cl	H	H	H
ethyl amid OTA	ethyl amid, fenylalanin	Cl	H	H	H
O-methyl OTA	fenylalanin, OHCH <sub>3</sub> (na C8)	Cl	H	H	H

### 3.3 Názvosloví OTA

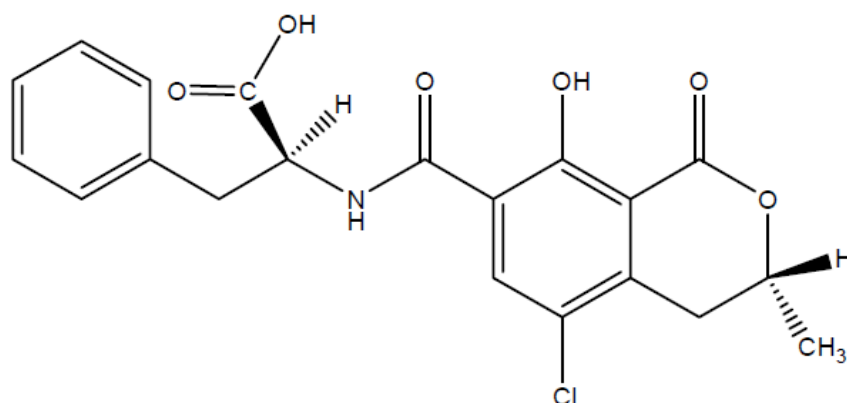
**CAS (Chemical Abstracts Services Registry No.):** 303-47-9

**Název dle Chemical abstracts:** L-Phenylalanine, N-[(5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1-H-2-benzopyran-7-yl)carbonyl]-,(R)-

**Systematický název dle IUPAC:** (N-[[[(3R)-5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-7-isochromanyl] carbonyl]-3-phenyl-L-alanine)

**Synonymum názvu:** (-)-N-[(5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-7-isochromanyl) carbonyl]-3-phenylalanine

**Strukturní vzorec:**



*Obr. 2 Strukturní vzorec OTA*

**Sumární vzorec:** C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>0</sub>O<sub>6</sub>

**Molekulová hmotnost:** 403,8 (IARC, 1993)

### 3.4 Chemické a fyzikální vlastnosti

**Popis:** slabá organická kyselina (Khouri & Atoui, 2010), bezbarvá až bílá krystalická a bez zápachu, krystalky OTA v ultrafialovém světle vyzařují zelené a modré fluorescenční záření v závislosti na přítomnosti kyseliny, či zásady (IARC, 1983; IARC 1993).

**Bod tání:** 169 °C (van der Merwe *et al.*, 1965a, b; Kuiper-Goodman & Scott, 1989; IARC, 1993).

**Optická otáčivost:**  $[\alpha]_{21D} - 46.8$  o ( $c = 2.65 \text{ mmol.l}^{-1}$  v chloroformu) (Pohland *et al.*, 1982; IARC, 1993).

**Rozpustnost:** mírně rozpustný v organických rozpouštědlech (např.: chloroform, etanol, metanol, xylen) (WHO, 1990; IARC, 1993). Naopak ve vodě a nasycených uhlovodících je těžce rozpustný (Khouri & Atoui, 2010).

**Stabilita:** Stabilita OTA je extrémní. Při varu dochází k částečné degradaci (Müller, 1982), nicméně vůči vysokým teplotám i kyselinám vykazuje značnou rezistenci, z kontaminovaných potravin je tedy velmi obtížné tuto molekulu zcela odstranit. Kromě toho může molekula OTA odolat až tří hodinové vysokotlaké sterilizaci párou při 121 °C a odolává i při teplotě 250 °C. Působením gamma záření (až do 7,5 Mrad) v etanolu není OTA degradováno (Khouri & Atoui, 2010). Roztoky ochratoxinu A jsou zcela degradovány působením nadbytku roztoku chlornanu sodného ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) (Castegnaro *et al.*, 1991a; IARC, 1993). Na degradaci se také podílí fluorescenční záření.

### 3.5 OTA v potravinách

Mykotoxiny se tvoří v myceliu plísní, nebo vzácněji v jejich sporách, a většinou rychle penetrují do růstového substrátu, např. do kontaminovaných potravin (Malíř & Ostrý, 2003). Nejčastěji mohou být kontaminovány: víno, káva, pivo, sušené hrozny révy vinné, hroznové šťávy, vepřové maso, drůbež, mléčné výrobky, koření, čokoláda (Clark & Snedeker, 2006), fazole, ořechy, arašídy, bavlníková semena, kakaové a kávové boby, dále také obiloviny – kukuřice, pšenice, oves, rýže, ječmen, čirok

(Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2008). Obiloviny jsou běžnou součástí potravy z celosvětového hlediska, jsou energeticky bohaté díky vysokému obsahu škrobu, dále jsou zdrojem vlákniny, bílkovin i tuků (Dewettinck *et al.*, 2008). Zároveň jsou obiloviny dle výzkumu z 25 - 40% kontaminovány mykotoxiny. Ke kontaminaci dochází často v oblastech s teplými a vlhkými klimatickými podmínkami (zejména Africké země, Jižní Asie, Jižní Amerika). Jedná se zejména o rýži, kukuřici a proso kontaminované aflatoxiny a ochratoxiny. Ke kontaminaci může docházet, jak již bylo zmíněno, během nesprávných podmínek skladování (Nguyen *et al.*, 2007). Úplnému zamezení výskytu však nelze předejít, ani při dodržování správných technologických postupů během růstu, sklizně i skladování plodin. Mykotoxiny mohou kontaminovat potravinový řetězec primárně, při použití kontaminovaných surovin mykotoxiny k výrobě potravin nebo sekundárně, růstem plísní na potravině a následnou produkcí mykotoxinů (Malíř & Ostrý, 2003). Celosvětově jsou obiloviny považovány za významný zdroj kontaminace OTA, až 50% lidského denního příjmu tohoto mykotoxinu pochází právě z konzumace obilovin (Vega *et al.*, 2009). Xianven *et al.*, 2015 zjistili detekovatelné hladiny kontaminace OTA u 18 vzorků rýže z celkových 370, pouze jeden ze vzorků přesáhl limit stanovený Evropskou komisí. Tento vzorek přesáhl hladinu 3 µg/kg. Naproti tomu Li *et al.*, 2014 prokázali kontaminaci u 14,5% sledovaných vzorků rýže, s průměrnou hladinou kontaminace 3,5 µg/kg. Obě tyto studie byly provedeny v Číně. Kontaminace rýže v Tunisku však byla prokázána v daleko vyšších úrovních, hladiny OTA byly průměrně stanoveny na 44 µg/kg rýže (Zaied *et al.*, 2009). V obdobné studii provedené v Pakistánu se průměrná kontaminace rýže pohybovala kolem 12,94 µg/kg (Majeed *et al.*, 2013). Analýza vzorků červené rýže v Malajsii potvrdila přítomnost OTA ve všech analyzovaných vzorcích v rozmezí 0,23-2,48 µg/kg (Samsudin & Abdullah, 2013).

## 3.6 Toxicita OTA

### 3.6.1 Toxicita OTA pro zvířata

Na nefrotoxické OTA působení jsou nejvíce citlivá prasata (onemocnění zv. porcinní mykotoxická nefropatie). Je prokázána korelace mezi nefropatií a extrémními teplotními a vlhkostními klimatickými podmínkami. Vzhledem ke globálnímu oteplování se by se ochratoxin - produkující plísně mohly do budoucna projevovat stále více, zejména druh *Aspergillus niger* (Zhilong *et al.*, 2015). Dále bylo prokázáno, že kromě poškození ledvin OTA způsobuje u zvířat (např. prasat, hlodavců, psů, ptáků a dokonce malých přežvýkavců) poškození žaludku (Krogh *et al.*, 1973). Morfologicky se poškození ledvin se vyznačuje atrofií proximálních tubulů, intersticiální fibrózou, kortikálně sklerotizovanými glomeruly a funkční poruchou tubulární funkce, která se projevuje snížením maximální tubulární exkrece a zvýšením vylučování glukózy. Mimo to se snižuje schopnost produkovat koncentrovanou moč. Tyto účinky byly pozorovány u organismů, jejichž přívod OTA se pohyboval v rozmezí od 200 do 4000 mg/kg krmiva (Stoev *et al.*, 2002). Embryotoxicita, teratogenita a imunotoxicita je způsobena ještě vyššími koncentracemi OTA ve srovnání s koncentracemi, které vyvolávají nefrotoxicitu (Benford *et al.*, 2001).

### 3.6.2 Toxicita OTA u člověka

#### *Nefropatie*

Endemická nefropatie, kdy OTA je pokládán za hlavní příčinné agens onemocnění, pravděpodobně za spolupůsobení dalších neurotoxinů, byl popsán v několika studiích (Stefanovic & Polednakovic, 1991; Vukelic *et al.*, 1992; Walker & Larsen, 2005; Fuchs & Peraica, 2005). Akutní toxicita OTA byla prokázána po inhalační expozici *A. ochraceus* a OTA, kdy během 24 h došlo k akutnímu renálnímu selhání (Di Paolo *et al.*, 1994). U chronického působení OTA je mnohem obtížnější diagnóza, navíc je působení mnohem závažnější a taky nebezpečnější z hlediska možného zdravotního poškození a člověk může být daleko častěji vystaven chronickému působení,

proto je třeba se touto problematikou dále zabývat. Byla prokázána korelace mezi přívodem OTA prostřednictvím kontaminovaných potravin a koncentracemi OTA v krvi sledovaných osob a vyslovena hypotéza o možné souvislosti s rozvojem nefropatií a následně nádorů ledvin (Walker & Larsen, 2005). OTA se velmi pravděpodobně (jako jedno z významných etiologických agens) podílí na onemocnění zvaném Balkánská endemická nefropatie (BEN), což je tubulointersticiální chronické onemocnění postihující obyvatelstvo Balkánu, např. Bulharska a bývalé Jugoslávie. Dále je považován za hlavní příčinu chronické intersticiální nefropatie (CIN) v severní Africe (Wafa 1998, Hassen *et al.*, 2004).

### *Neurotoxicita*

Je prokázáno, že podávání OTA březím krysám vyvolává mnoho malformací v centrálním nervovém systému. Dále může být OTA příčinou vzniku lézí a poškození na mozkové úrovni, OTA se zdá jako vysoce toxická pro nervové buňky a může postihovat i nervové tkáně (Khouri & Atoui, 2010).

### *Teratogenita*

OTA je prokázáný silný teratogen. Snadno prochází placentou a vyvolává různé morfologické anomálie u plodu. Prenatální dysmorfogeneze byla prokázána u krys, myší, křečků a kuřecích embryí. Závažnost malformací závisí na způsobu podání a gestačním období (Khouri & Atoui, 2010).

### *Hepatotoxicita*

U člověka OTA vykazuje neobvyklou toxikokinetiku, s poločasem rozpadu v krvi 840 hodin (35 dní) po perorálním požití. Opožděné vylučování toxinu u člověka může být způsobeno reabsorpcí během enterohepatální cirkulace, reabsorpcí z moče po tubulární sekreci nebo rozsáhlou vazbou na bílkoviny. Játra odstraňují OTA prostřednictvím proteinových nosičů, které váží toxin z hepatocytů a následně vylučují toxin do žluči. Dochází také k příjmu OTA proximálními tubulárními buňkami, které vylučují toxin do moči. Tyto systémy se podílí na eliminační toxikokinetice OTA, a proto mají významný vliv na dobu poločasu rozpadu a délku expozice selektivních orgánů (Petzinger & Weidenbach, 2002).

### *Karcinogeneze*

Nádory ledvin se často vyskytují při denním dietárním příjmu nad 70 ug OTA/kg tělesné hmotnosti za jeden den. U obyvatelstva v endemických oblastech Balkánu exponovaných OTA byly zjištěny OTA-DNA adukty v renální tkáni a nádory (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2007; Phohl-Leszkowicz, 2009).

### *Imunotoxicita*

OTA může negativně ovlivňovat jak humorální, tak buněčnou imunitu. Projevuje se v inhibici B a T lymfocytů (zastavení produkce interleukinu 2 (IL2) a jeho receptorů). Dále blokuje aktivitu NK buněk, stejně jako produkci interferonu. Má se za to, že OTA může být příčinou onemocnění lymfopenie či regrese thymu a obecně potlačuje imunitní odpovědi (Khouri & Atoui, 2010).

## 3.7 Biotransformace OTA

Při expozici OTA se v organismu molekuly váží na plazmatické proteiny a metabolizují se na hydroxylované deriváty. Vzniká metabolit 4-hydroxyochratoxin, který se vyznačuje podobnými cytotoxickými a imunosupresivními účinky jako OTA. V organismu může být OTA štěpen na fenylalanin a chlorovaný dihydroizokumarinový základ ochratoxin  $\alpha$  (OT $\alpha$ ), který se vyznačuje genotoxickými účinky. OT $\alpha$  je vylučován v exkretech – moči i mléce zvířat exponovaných OTA. V játrech je OTA přeměňován na glukurono- a sulfo- konjugáty a dochází také ke konjugaci s glutathionem. Tato cesta, považovaná obecně za detoxikační, může nicméně vést k tvorbě elektrofilních sloučenin s genotoxickou schopností (Malíř & Ostrý, 2003).



### 3.8 Maximální limity OTA v rýži a charakterizace nebezpečí

#### *Maximální limity OTA*

S cílem minimalizovat negativní dopady mykotoxinů, konkrétně ochratoxinu A, na lidské zdraví jsou zavedeny toxikologické standardy a maximální hygienické limity, která tyto dopady eliminují. Při stanovení hygienických limitů na mykotoxiny hraje roli několik faktorů, mezi které patří hodnocení rizik na základě toxikologických údajů, údaje o spotřebě potravin, znalost o výši a distribuci mykotoxinů v komoditách a dostupné citlivé analytické metody.

Obsahy ochratoxinu A jsou v rámci EU (ES) limitovány Nařízením Komise /ES/ č. 1881/2006 ES, 105/2010 ES a 594/2012 ES, která stanovují jeho maximální limity v potravinách. Nařízením Komise ES č. 1881/2006 byl stanoven maximální limit OTA v rýži ve výši 3 µg/kg.

#### *Charakterizace nebezpečí OTA*

Problematikou charakterizace nebezpečí OTA v potravinách se proto zabývaly Scientific Committee on Food (SCF) (European Commission, 1998), Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) (EFSA, 2006) a konečně také Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) (JECFA, 2008) (Ostrý & Škarková et al., 2014).

#### *Prahový toxický účinek OTA (treshold)*

a) Např. SCF stanovil v roce 1998 „tolerable daily intake“ (TDI) = 5 ng/kg t. hm/den.

b) EFSA v roce 2006 stanovil tolerovatelný týdenní přívod (TWI - tolerable weekly intake) = 120 ng/kg t. hm/týden. Experti EFSA ve svém stanovisku připouštěli nedostatečný průkaz OTA-DNA aduktů a TWI proto stanovili na základě nejnižší hodnoty toxické dávky pro nefrotoxicitu u prasat (LOAEL /„lowest observed adverse effect level“/ = 8 µg/kg t. hm/den) Použili faktor nejistoty 450 na základě dat extrapolovaných ze zvířat na člověka, jakož i mezidruhovou specifitu. TWI je vztažen

na nefrotoxicitu a nezohledňuje karcinogenitu, proto řada odborníků považuje uvedený bezpečnostní faktor navržený EFSA za nepřiměřený (viz. např. následující informace).

#### *Bezprahový toxický účinek OTA (non-treshold)*

Charakterizací nebezpečí OTA v potravinách z hlediska karcinogenity OTA se zabývali v organizaci Health Canada. Byl stanoven „negligible cancer risk intake-zanedbatelný přívod z hlediska rakoviny“ (NCRI) na úrovni 4 ng /kg t. hm./den (Kuiper-Goodman *et al.*, 2010).

## **4. METODIKA – OBECNĚ**

### 4.1 Odběr rýže

Byl připraven rozpis a časový harmonogram odběru a svozu vzorků rýže ve čtyřech odběrových termínech v roce 2014 na 12 odběrových místech v ČR. Podle zpracovaného rozpisu a časového harmonogramu byl pracovníky řešitelského týmu zabezpečen nákup vzorků rýže v obchodní síti v ČR, jejich svoz a uchování v laboratořích aplikované toxikologie na SZÚ v Brně a dále pak parboiled rýže – v Národní referenční laboratoři pro biomarkery mykotoxinů ve Zdravotním ústavu Ústí nad Labem, regionálním pracovišti Hradec Králové. Celkem bylo v roce 2014 ve čtyřech odběrových místech odebráno náhodným odběrem 60 vzorků rýže.

### 4.2 Analytické metody pro stanovení OTA

Metody pro stanovení mykotoxinů jsou chromatografické (Krska *et al.*, 2001) a enzymové imunisorpční analýzy (Heber *et al.*, 2001). Mezi chromatografické metody patří TLC, HPTLC, HPLC, GC (Jaimez *et al.*, 2000). Principem chromatografických metod je dělení složek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je mobilní a druhá stacionární.

#### 4.2.1 Metoda HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)

HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) (Jaimez *et al.*, 2000) je založena na separaci složek z kapalného média. Separace probíhá při průchodu kolonou s pevným sorbentem. Rozpuštěná zkoumaná látka se vpraví pomocí injekčního ventilu do nosného média (rozpuštědla). Roztok je pod vysokým tlakem protlačován přes kolonu. Vhodně zvolený sorbent má takové vlastnosti, že některé složky procházejí kolonou rychleji, jiné pomaleji. Na výstupu z kolony je příslušný detektor, který registruje některou veličinu (např. UV detektor, dále fluorescenční a vodivostní aj.). Výsledkem signálu z detektoru v závislosti na čase je tzv. chromatogram - časové spektrum charakterizující danou směs složek. Jednotlivé vrcholy chromatogramu odpovídají jednotlivým složkám ve zkoumané směsi. Plocha, případně výška jednotlivých křivek "píků" při porovnání se standardy poskytuje údaj o množství (kvantitě) takto analyzovaného vzorku. HPLC lze spojit s tzv. hmotnostní detekcí pomocí hmotnostního spektrometru (MS), nejčastěji kvadrupolové konstrukce. Hmotnostní spektrometrie je separační a současně analytická metoda. Její podstatou je separace molekulových iontů a fragmentů analyzované látky, které vznikly ionizací molekul v magnetickém poli. Dráhy vzniklých iontů se zakřivují v elektrickém a magnetickém poli. Změnou intenzity elektrického a magnetického pole lze dosáhnout rozvinutí hmotnostního spektra. Spojitou změnou těchto polí získáme hmotnostní spektrogram. Z polohy čar ve spektrogramu získáme údaj o kvalitě, z jejich výšek pak údaje o kvantitě mykotoxinu. Spojení GC-MS nám umožní jednoznačnou identifikaci vzorku – mykotoxinu.

HPLC využívá krátké, úzké ocelové kolony rovnoměrně naplněné jemnými pravidelnými částicemi sorbentu, což umožňuje dosažení vysokého rozlišení a zkrácení doby analýzy. HPLC kolona má značný odpor a vyžaduje použití čerpadla.

Nejprve se analyzovaný vzorek nastříkne buď pomocí injekční stříkačky do dávkovače Rheodyne (může se použít automatický dávkovač). Odplyněnou mobilní fází (kapalina) je unášen do chromatografické kolony. Na chromatografické koloně dochází k dělení analytů (v našem případě mykotoxinů), které jsou následně detekovány pomocí některého z HPLC detektorů, např. UV/VIS, FLD, atd., pro mykotoxiny je ale většinou výhodnější FLD.

UV detektor sleduje absorpenci eluátu protékajícího mikrokyvetou. Jeho výhodou je citlivost k látkám, silně absorbujícím UV záření a linearita závislosti měřené absorbance na koncentraci a nezávislost signálu na průtokové rychlosti eluátu. Ještě citlivější je fluorescenční detektor, kde se mez detekce pohybuje v rozmezí  $10^{-10}$  až  $10^{-14}$  g látky, která vykazuje fluorescenci. Detekovaná látka v cele detektoru absorbuje ultrafialové budící (excitační) záření, jehož pohlcená energie se zčásti vyzáří (emituje) ve formě fluorescenčního záření o nižší energii (vyšší vlnové délce), než má excitační záření. Emitované záření dopadá na fotoelektrický násobič, který poskytuje proud úměrný toku emitovaného fluorescenčního záření a koncentraci detekované látky v cele detektoru, který je spojen se zařízením pro automatický záznam dat a pro vyhodnocování chromatogramů (Malíř *et al.*, 2003).

Výpočet obsahu mykotoxinu ve vzorku se provádí porovnáním plochy a výšky píků se standardy. Přístroje jsou řízeny počítačem, který umožňuje přímou komunikaci pracovníka s přístrojem. HPLC je v současnosti nejrozšířenější metodou pro stanovení jednotlivých mykotoxinů (Malíř *et al.*, 2003).

#### 4.2.2 Imunochemická metoda stanovení – ELISA

Imunoenzymatická reakce (ELISA) je založena na reakci antigenu (mykotoxinu) s protilátkou, u níž se měří množství navázaných látek pomocí přidání enzymem značeného antigenu či protilátky. Měření se provádí spektrofotometricky (závislost absorbance na koncentraci) (Malíř *et al.*, 2003).

Imunoenzymatické metody dělíme na kompetitivní nebo nekompetitivní.

- Kompetitivní:



Většinou se měří množství komplexu značeného antigenu s protilátkou  $\text{Ag}^*\text{AB}$ , možné je i měřit množství nenavázaného značeného antigenu.

- Nekompetitivní:



Ve většině případů se měří množství navázané značené protilátky (komplex  $\text{ABAgAB}^*$ ) za účelem dosažení co nejvyšší citlivosti.

Metoda ELISA se velmi často používá v kombinaci s imunoafinitní chromatografií. Imunochemické metody slouží pro screeningové stanovení vybraných mykotoxinů v potravinách a zemědělských komoditách a jsou využívány pro detekci aduktů mykotoxinů s DNA nebo proteiny.

## 4.3 Stanovení OTA v rýži

### 4.3.1 Bezpečnost práce s OTA

OTA je jedním z mykotoxinů s toxinogenními účinky. Podle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC, WHO) náleží do kategorie 2 B (možný karcinogen pro člověka). Od úpravy vzorků až po ELISA či HPLC stanovení je nutno pracovat v pryžových rukavicích, pracovní úkony provádět v dobře větrané digestoři, laminárním boxu. Všechny manipulace se provádějí v novodurové míse, vyložené hliníkovou folií a filtračním papírem. K omezení rozlití vzorků jsou využívány podložky SUPELCO Glass Magnet<sup>TM</sup>Sheet. Všechny pracovní povrchy a pomůcky včetně skla jsou po skončení práce ihned dekontaminovány v roztoku chlornanu sodného, který je součástí provozního řádu laboratoře (Malíř, 2010).

### 4.3.2 Chemikálie a spotřební materiál

#### ***Základní chemikálie***

Metanol gradient grade pro chromatografii, Lichrosolv, MERCK, obj. č. 106007.

Acetonitril gradient grade pro chromatografii, Lichrosolv, MERCK, obj. č. 100030.

Octan sodný bezvodý, Suprapur, MERCK, obj. č. 6264.

Kyselina octová (ledová) pro analýsi, MERCK, obj. č. 63.

Chlorid sodný, Suprapur, MERCK, obj. č. 6406.

Ochratoxin A, ALDRICH, obj. č. 85,628-2.

Dusík 4,0, GA 224, Technoplyn Linde a.s., Praha.

Ultračistá voda ze zařízení Milli Q plus, Millipore.

## ***Roztoky***

Pufír k ředění odpadku vzorku pro ELISA stanovení: PBS pufír pH 7,4 (0.62 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  + 5.73 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  + 9g NaCl do 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}$ )

Standardní roztok ochratoxinu A pro HPLC stanovení - 4  $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ : (I)

1 ml pracovního roztoku (40  $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) se doplní metanolem do odměrné baňky o objemu 10 ml po značku. Roztok se uchovává v chladničce a používá maximálně 10 dnů.

Standardní roztok ochratoxinu A 0,4  $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ : (II)

1 ml standardního roztoku (I) se doplní metanolem do odměrné baňky o objemu 10 ml po značku. Roztok se uchovává v chladničce. Doba použitelnosti 3 dny.

## ***Spotřební materiál***

- ELISA souprava- RIDASCREEN<sup>®</sup> Ochatoxin A 30/15 (Art. Nr.: R1311)
- Imunoafinitní kolonky OCHRAPREP<sup>R</sup>, P 14B, Rhone - Diagnostics Technologies, Jemo-Trading, Bratislava nebo alikvotní od jiného výrobce a dodavatele, např. Vicam, dodavatel Chromservis, Praha.
- Papírové filtry Whatman č. 4, MERCK, obj. č. 1 004 090 nebo 1 004 185.
- Membránové filtry Millipore 0, 45  $\mu\text{m}$  dodavatel Chromservis, Praha,
- Mikroreakční vialky 2 a 5 ml (LABICOM),
- Pipety Gilson s proměnným objemem 30-200  $\mu\text{l}$  a 100-1000  $\mu\text{l}$ ,

#### 4.4. Přístroje a pomocná zařízení

- Promývačka BioTek ELx50
- ELISA BioTek Epoch
- HPLC- Vysokoučinný kapalinový chromatograf Spectra System, složený z vakuového odplyňovače SCM 400, gradientové pumpy P 2000, automatického dávkovače Spectra-Physics 3000, dále fluorescenčního detektoru Jasco, model 920 FP a konečně počítače se softwarem CSW 32.
- Váhy jemné 1. tř., Sartorius R 200 D, výrobce SARTORIUS AG, SRN, dodavatel SARTALEX v. d., Ústí nad Labem.
- Analytická kolona kovová, délky 300 mm, vnějšího průměru 8 mm, vnitřního průměru 4,6 mm, s náplní SPHERISORB ODS 2, 10  $\mu\text{m}$ , obj. č. 1720, Bischoff Chromatography.
- Předkolona Phenomenex 3 x 4 mm s náplní C18.
- Zařízení pro úpravu ultračisté vody Milli Q plus, Millipore.
- Homogenizátor Polytron PT 3000, Kinematika
- Mlýnek vibrační Testchem-S, PLR, dodavatel ANMAT Trading, Ostrava Zábřeh
- Zařízení pro řízený průtok imunoafinitní kolonkou, vakuová jednotka BAKER SPE 12 G s prosávací pumpou MILLIPORE, BAKER, Velká Británie.
- Zařízení pro odpařování EVATERM (koncentrátor LAB-EVA, LABICOM, CR)



## 4.5 Postup

### 4.5.1 Homogenizace a extrakce a příprava vzorků rýže k vlastní analýze

#### *Homogenizace*

Vzorky rýže byly nejprve zhomogenizovány po dobu 2 min na homogenizátoru Polytron PT 3000, či 3 min na vibračním mlýnku Testchem-S.

#### *Extrakce*

Bylo naváženo 10 g takto zhomogenizovaného vzorku rýže, ke kterému byla přidána směs 40 ml acetonitril:voda (60:40 v/v) za důkladného protřepání na Vortexu po dobu 90 s a následně byl vzorek zfiltrován.

Filtrát by zředěn PBS pufrům – a to tak, že ke 4 ml filtrátu (což odpovídá 1 g vzorku) bylo přidáno 44 ml PBS pufru pH 7,4.

#### *Separace OTA na imunoafinitní kolonce*

##### *Princip*

Imunoafinitní kolonky obsahují suspenzi gelu, na kterém jsou navázány monoklonální protilátky. Na tyto protilátky se naváže příslušný antigen, kterým je zde OTA, pokud je ve vzorku přítomen. Ostatní tzv. balastní látky, které se mechanicky zachytily v gelu, jsou odstraněny z kolonky mycím roztokem. Použitím okyseleného metanolu jako elučního činidla se OTA uvolní z komplexu antigen-protilátka. S imunoafinitními kolonkami bylo pracováno v souladu s firemním doporučením Ochraprep® (R-Biopharm AG-IAC, Darmstadt, Germany).

#### *Interference*

Při stanovení OTA se mohou rušivě projevit látky vykazující fluorescenci při stejných vlnových délkách, u ELISA fotometrického stanovení se jedná o vlnovou délku 450 nm. V návodu ELISA soupravy RIDASCREEN® OTA 30/15 je uvedena skřížená reaktivita: OTA =100 %, ochratoxin C = 44 %, ochratoxin B=14 %, ochratoxin  $\alpha$ . = < 0,1 %), která však při použití imunoafinitních kolonek, kdy je specificky zachycen a uvolněn pouze OTA, odpadá.

### *Vlastní separační postup*

Potřebný počet imunoafinitních kolonek OCHRAPREP byl vyndán z chladničky a ponechán po dobu 30 min až 1 hod při teplotě laboratoře - s cílem temperace kolonek.

Do prosávacího zařízení Bakerbond byla umístěna takto kondicionovaná imunoafinitní kolonka a byl z ní pomalým prosátím odstraněn pufr. Do PE nádoby nad adaptérem nad touto imunoafinitní kolonkou byl umístěn celý ředěný filtrát (viz b. extrakce) o objemu 48 ml, který byl opatrně prosát kolonkou rychlostí cca 1 ml/min. Potom byl kolonkou asi po dobu 15 s prosát vzduch. Následně byla kolonka promyta 2 x 10 ml PBS pufru. Pak byl kolonkou opět prosát vzduch. Nakonec byla kolonka extrahována eluční směsí = 4 ml metanol:kys. octová (98:2 v/v). Metanol byl odpařen do sucha pod proudem dusíku a odparek byl těsně před vlastním stanovením rozpuštěn v 500 µl směsi metanol: kys. octová (98:2v/v). V případě, že vzorek nebyl bezprostředně analyzován na HPLC či ELISA, byl odparek uložen v mrazícím boxu a obnoven těsně před vlastním stanovením (Malíř, 2010).

#### 4.5.2 Analytická koncovka

##### *ELISA*

Pro ELISA stanovení byl následně odparek rozpuštěn v 0,5 ml pufru (hydrogenuhličitanu sodného o pH 8,1).

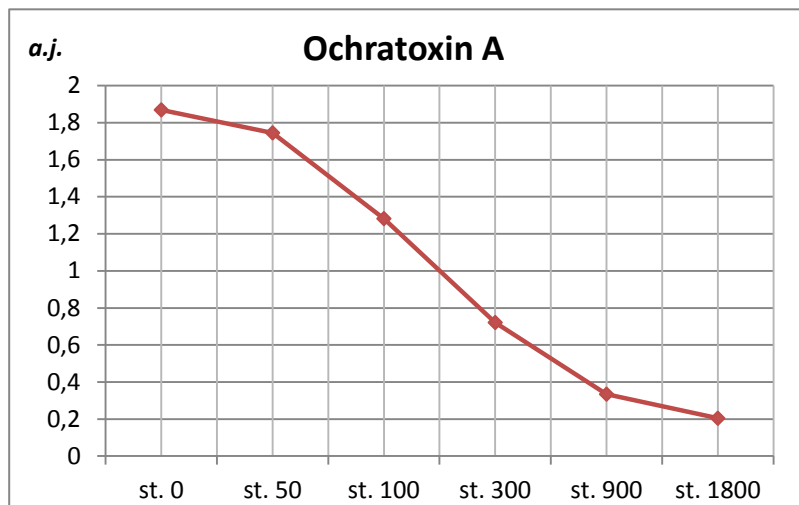
##### *Kvantitativní stanovení OTA ve vzorcích rýže – ELISA test*

Stanovení ochratoxinu A.

*Parametry validace metody:* detekční limit po předseparacích OTA na imunoafinitní kolonce pro obilí a krmiva = ca. 50 ppt (= ng/kg)

**Tab. 3** *Koncentrace standardů* (znázornění v grafu)

<b>Koncentrace standardů (ppt)</b>	<b>absorbance (a.j.)</b>
st. 0	1,869
st. 50	1,745
st. 100	1,282
st. 300	0,721
st. 900	0,334
st. 1800	0,204



#### *Příprava konjugátu*

Enzymový konjugát v lahvičce s červeným víčkem byl naředěn do zkumavky nebo malé lahvičky v poměru 1+10 (1:11) zředěným pufrům. Množství konjugátu bylo odhadnuto podle předpokládaného množství vzorků. Např. dávka pro 4 proužky – stripy (pro 4x8 stanovení) byla v množství 200 µl konjugátu a 2,00 ml pufru. Bylo možné naředěný konjugát připravit do vaničky a následně bylo možné využít i osmi kanálovou pipetu pro rychlou manipulaci.

#### *Pipetování vzorků a standardů*

Požadovaný počet stripů byl umístěn do rámečku. Pro každý vzorek a standard je nutná jedna zředovací jamka. Do každé jamky bylo napipetováno 50 µl vzorku nebo standardu. Standardů v ELISA testu bylo celkem 6, o koncentracích: 0, 50, 100, 300, 900, 1800 ppt. Vzorky byly dávkovány do jednotlivých jamek v doubletu (dvojmo). Protože byly očekávány možné vyšší koncentrace ochratoxinu A ve vzorcích rýže, byly proto tyto vzorky příslušným způsobem (uvedeným v *tab. 4*) naředěny.

**Tab. 4 Schématické znázornění pipetovaných standardů a vybraných vzorků**

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>A</b>	st. 0	6	38	03 (10x)
<b>B</b>	st. 50	8	40	03 (15x)
<b>C</b>	st. 100	10	42	61 (5x)
<b>D</b>	st. 300	12	44	61 (10x)
<b>E</b>	st. 900	14	02 (5x)	61 (15x)
<b>F</b>	st. 1800	32	02 (10x)	sl. vzorek
<b>G</b>	2	34	02 (15x)	sl. vzorek
<b>H</b>	4	36	03 (5x)	sl. vzorek

*Pozn. k ředění:*

100 µl vzorku přidáním: 400 µl NaHCO<sub>3</sub> (5x)

900 µl NaHCO<sub>3</sub> (10x)

1400 µl NaHCO<sub>3</sub> (15x)

#### *Pipetování konjugátu a inkubace*

Do jednotlivých jamek bylo pipetováno 50 µl připraveného konjugátu. Stripy v rámečku byly jemně promíchány krouživým pohybem a následně byly inkubovány po dobu 30 min na temném místě při laboratorní teplotě.

#### *Příprava promývacího pufru*

Pak byl připraven promývací pufr PBS-Tween do promývacího zařízení-promývačky. Celý sáček z testovací sady byl rozpuštěn v jednom litru destilované vody a přelit do PE lahve u promývačky. Doba použitelnosti roztoku je 4 – 6 týdnů při teplotě 2 – 8 °C. Zkušební stripy (proužky) byly promyty celkem 3x zkušebním promývacím roztokem- z důvodu pročištění jehlových trysek.

#### *Promývací proces*

Po 30 minutách byly stripy vyjmuty z uložení v temnu a několikrát vyklepány na připravené ubrousky - s cílem vysušení jamek. Odstranila se tak zbývající kapalina. Následně byly tyto stripy vloženy do promývačky (*viz obr. 3*) a 3x promyty. Poté byly opět vyklepány do buničité vaty s cílem odstranění zbylých kapek.



***Obr. 3 Promývačka BioTek ELx50***

*Chromogen substrát*

Do jednotlivých jamek bylo napipetováno 100  $\mu$ l chromogen substrátu (hnědá lahvička) a opatrně ručně promícháno krouživým pohybem na rovné ploše. Následně byly stripy (proužky) inkubovány po dobu 15 minut - opět v temnu.

*STOP substrát*

Po uplynutí 15 minut bylo opatrně přidáno 100  $\mu$ l STOP substrátu (žluté víčko lahvičky) do každé jamky, díky kterému dojde ke změně barvy.

*Měření pomocí ELISA test*

Absorbance (v a.j. = absorbančních jednotkách) byla měřena při vlnové délce 450 nm (viz. obr. 4), nejdéle do 30 minut od přidání STOP substrátu.



*Obr. 4. Spektrometr ELISA BioTek Epoch*

Výsledky získané měřením OTA na ELISA fotometru byly confirmovány na HPLC-FLD.

#### 4.5.3 Stanovení obsahu OTA ve vzorku metodou HPLC

Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s fluorescenční detekcí je akreditovaná ověřená metoda pro detekci a kvantifikaci OTA v rýži (ČSN EN ISO / IEC 17025). Validace metody byla provedena dle protokolu schváleného AOAC, se zásadami pro výpočet stanovitelnosti metody ICH (International Conference of Harmonization), obecných zásad pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. Tato metoda byla akreditována Českým institutem pro akreditaci (ČSN EN ISO / IEC 17025).

##### *Validace HPLC metody*

Metoda stanovení byla v souladu s níže popsaným postupem měření nejprve zvalidována.

Byly zjištěny: mez detekce: 0,1 µg/kg \*; mez stanovitelnosti: 0,3 µg/kg\*; max. stanovitelný obsah: 10 µg/kg\*; nejistota stanovení < 20 % \*\*; \* Uvedené hodnoty platí při přípravě vzorku dle použité metody; \*\* Nejistota stanovení je vyjádřena jako rozšířená nejistota (koeficient rozšíření = 2) změřením na certifikovaném referenčním materiálu (European reference materials- konkrétně ERM-BC211).

##### *HPLC, nastavení přístroje a uvedení do chodu*

Příprava kapalinového chromatografu (*viz. obr. 5 a 6*) k analýze a práce se řídila dle pokynů návodu stanoveného výrobcem. Před samotným započítáním měření byla chromatografická aparatura spuštěna a pracovala nejméně 60 min „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 metanolu při zapnutém fluorescenčním detektoru ukázala rovná základní linie (Malíř, 2010).

##### *Podmínky chromatografického stanovení*

Pro stanovení OTA na HPLC byla připravena mobilní fáze o složení: metanol: acetonitril: 0,005 mol/l octan sodný:kyselina octová v poměru 300 ml:300 ml:400 ml:14 ml (v/v/v/v). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1,5 ml/min.

Nastavení fluorescenčního detektoru:  $\lambda$  Ex (excitace) 333 (340) nm,  $\lambda$  Em (emise) 465 nm, Gain = 1000, (šíře pásma EM: 18). Fluorescenční detektor Jasco FP-920 byl zapnut 15 min. před započítáním samotného měření (Malíř, 2010).

Při dodržení těchto podmínek byl eluční čas ochratoxinu A přibližně mezi 7-9 min při přímém stanovení (Malíř, 2010).

#### *Analýza vzorků na HPLC*

Odparky rozpuštěné v metanolu, tj. adjustované vzorky, standardy a slepý vzorek o objemu 50  $\mu$ l byly nastříknuty do kapalinového chromatografu a bylo provedeno stanovení obsahu ochratoxinu A metodou HPLC. S každou sérií analýz byly současně analyzovány slepý vzorek a dále standardní roztoky OTA 0,4 ng/ml, 4 ng/ml a případně také kontrolní materiál, nebo materiál s přidavkem OTA (Malíř, 2010).

Standardy 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 0,4 ng/ml, standard 4 ng/ml, dále byly změřeny vzorky zpracované rýže (Malíř, 2010).

Po skončení analýz byla kolona promyta směsí metanolu a vody (1:1) - po dobu 20 min. Dále byla kolona promývána 10 min vodou a roztokem acetonitrilu a vody (1:1) po dobu přibližně 70 min. Nakonec byla kolona konzervována směsí metanolu a vody (1:1) (Malíř, 2010).





**Obr. 5 HPLC s příslušenstvím (J. Toman ©)**



**Obr. 6 Prosávací zařízení (J. Toman ©)**

## *Kalibrace*

### Kalibrační křivka

Pro ověření linearity při daných parametrech analýzy byla sestrojena kalibrační křivka, tj. závislost ploch píků na koncentraci ochratoxinu A a byla ověřena-konfirmována. Koncentrační body pro sestavení kalibrační křivky: 0,125, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 ng/ml ( $\mu\text{g/l}$ ).

### *Výpočet*

Pomocí programu CSW 32.

## 5. VÝSLEDKY

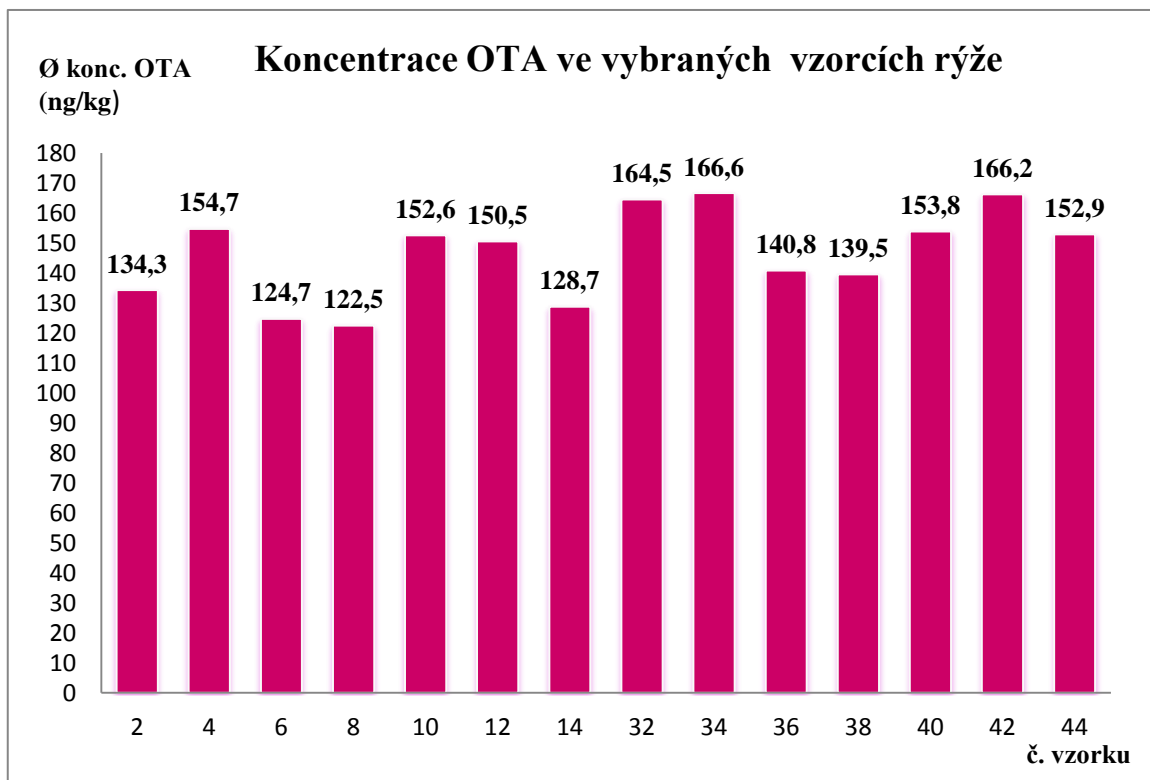
Výsledné měření (viz tab. 4) koncentrací OTA (ppt = ng/kg) v rýži bylo provedeno v tripletu, tj. celkem třikrát.

**Tab. 4 Koncentrace ochratoxinu A v rýži zjištěné na fotometru ELISA**

Vzorky	n	n+	Aritm. Průměr (g/kg)	Medián (μg/kg)	Perc.90% (μg/kg)	Min (μg/kg)	Max (μg/kg)
	(%)	(%)					
rýže	60	58	0,15	0,15	0,17	0,05	0,17
	(100)	(96,7)					

n, počet vzorků; n+, počet pozitivních vzorků ( $\geq 50$  ng/kg); %, pozitivních vzorků

**Graf 1. Grafické znázornění náhodně vybraných průměrných koncentrací OTA v rýži**



V grafu (*viz graf 1*) jsou zaznamenány koncentrace OTA ve 14 náhodně vybraných testovaných vzorcích rýže. Koncentrace OTA všech vzorků rýže změřené na ELISA fotometru se pohybovaly v rozmezí 0,05 - 0,17  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $\text{ng}/\text{g}$ ), což je v souladu s HPLC stanovením, kde byly všechny koncentrace nižší než mez stanovitelnosti, tj.  $< 0,3 \mu\text{g}/\text{kg}$ . Žádný z měřených vzorků rýže neobsahoval vyšší koncentraci OTA, než je maximální povolený limit – a to  $3 \mu\text{g}/\text{kg}$  ( $\text{ng}/\text{g}$ ). Vzorky, u kterých koncentrace OTA byly vyšší než povolený limit ve výši  $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ , nebyly vzorky zakoupené rýže, ale jednalo se o kontrolní referenční materiál.

## 6. DISKUZE

V letech 2004-2005 se bylo předmětem studie celkem 209 vzorků různých skupin běžně konzumovaných potravin v Tunisu. Byly zjišťovány kontaminanty - aflatoxiny, OTA pomocí testu ELISA. Výsledky ukázaly, že majoritním kontaminantem je OTA s průměrnou koncentrací  $3,5 \pm 5,3$  ng/g a to v 59,8% zkoumaných vzorků. Zajímavé je ale, že rýže patřila mezi nejméně kontaminované potraviny (Ghalia *et al.*, 2008).

Juan *et al.* v roce 2008 ve své studii zaměřené na měření ochratoxinu A v rýži a sušených plodech zjistili koncentrace OTA v rozmezí od  $0,02 \pm 0,01$  až  $32,4 \pm 2,10$  ng/g, přičemž by hladina neměla přesahovat hodnotu 0,02 ng/g. Výsledky této první studie v Maroku ukázaly, že 15% z celkového počtu vzorků rýže překročily limity stanovené předpisy EU. Další výzkum byl zaměřen na stanovení ochratoxinu A v rýži pomocí HPLC po předchozím předčištění na imunoafinitní kolonce. Limit detekce byl opět dle normy EU 0,2 ng/g. Ze 182 analyzovaných vzorků rýže bylo kontaminováno 6% a to v rozmezí 0,2 - 4,8 ng/g, průměrná kontaminace všech analyzovaných vzorků byla 1,6 ng/g (Feizy *et al.*, 2011). S využitím stejné metodiky proběhlo testování 42 vzorků ve Španělsku, LOD byl stanoven na 0,05 pg/kg. OTA bylo zjištěno v šesti vzorcích při koncentracích v rozmezí 0,09 až 3,52 µg/kg (Pena *et al.*, 2005). Obdobně studie vzorků rýže z hlavních obchodních řetězců Teheránu a Íránu přinesly pozitivní nálezy OTA pro 69 vzorků ze 100. Limit byl stanoven na 0,03 až 0,1 mg/kg, přičemž rozsahy OTA byly  $1,37 \pm 5,72$  až  $0,15 - 46,79$  mg/kg. Většina kontaminovaných vzorků nepřesahovala limity pro obiloviny dle Iránské normy (ISIRI). Vzhledem k poměrně vysokým hodnotám OTA v některých vzorcích a zároveň i vzhledem k možné spotřebě jiných potravin kontaminovaných OTA však může být příjem této toxické látky vyšší, než je její prozatímní tolerovatelný denní stanovený limit FAO/WHO (Hadian *et al.*, 2008). V korejské studii zaměřené na analýzy mykotoxinů byl jako nejčastější kontaminující mykotoxin stanoven OTA. Jeho hladina v některých vzorcích přesáhla přípustnou mezní hodnotu limitu v EU ve výši 3 ng/g (Je Won *et al.*, 2005). Ve Švédsku byly studovány vzorky rýže odebrané na maloobchodním trhu s cílem zjistit obsah mykotoxinů a to konkrétně v rýži basmati a dlouhozrnné rýži. U vzorků byl na HPLC analyzován obsah OTA a další mykotoxiny. Výsledky prokázaly pouze aflatoxiny, které jsou časté kontaminanty dovozové rýže

(Frelund *et al.*, 2009). Kanadská studie analyzující mykotoxiny v rýži přinesla výsledky pro vzorky odebrané v roce 2007, kdy celkem 100 vzorků vykazovalo koncentrace OTA 0,05 ng/g. Ve čtyřech vzorcích byla zjištěna hodnota 0,2 ng/g, jednalo se o hnědou rýži a sushi rýži. Druhý odběr vzorků byl zrealizován v roce 2008, kdy bylo odebráno celkem 99 vzorků rýže, pouze jeden vzorek vykazoval vyšší koncentraci OTA a to 0,49 ng/g. Celkově výsledky této studie prokázaly vyšší hodnoty OTA v hnědé rýži (Bansal *et al.*, 2011). Ze 100 vzorků zkoumaných ve východním Turecku byly zjištěny prokazatelné koncentrace OTA u 38 vzorků. Tři z těchto vzorků mírně přesáhly přípustné limity (3,02 µg/kg), jednalo se o vzorky odebírané při vysoké relativní vlhkosti, tedy za vhodných podmínek pro výskyt producentů tohoto mykotoxinu (Buyukunal *et al.*, 2010).

V Brazílii byla provedena analýza celkem 230 vzorků rýže a rýžových produktů pro stanovení společného výskytu mykotoxinů. Vzorky byly analyzovány v letech 2007-2009. OTA byl prokázán u 40 % vzorků, 55 % vzorků nepřesáhlo hladinu OTA nad 0,11 pg/kg. 28% vzorků bylo kontaminováno od 0,20 - 0,24 µg/kg. Zajímavé však je, že nejvyšší úroveň kontaminace byla prokázána ve výrobcích z rýže, a to zejména produktech získaných z rýžových slupek a rýžových otrub (Almeida *et al.*, 2012). Margo *et al.*, 2006 prokázali vyšší zastoupení plísňových kontaminantů u neloupané a hnědé rýže než u rýže bílé a dlouhozrné, které prochází úpravami před jejich uvedením na trh. Objevují se i studie zkoumající optimální podmínky pro růst plísní a přítomnost mykotoxinů. Cílem jedné takovéto studie bylo zjistit vliv teploty pro růst plísní a přítomnost OTA a citrininu (CIT) u různých obilovin (pšenice, tritikale, žito, ječmen, kukuřice, rýže). Připravené zvlhčené substráty byly naočkovány *P. verrucosum* a skladovány v autoklávu při teplotě 10 °C, 20 °C a 30 °C po dobu 40 dní. Růst plísní byl pozorován u všech obilovin při všech teplotách. Maximální úrovně růstu plísní byly zhodnoceny při 30 °C a to v rozmezí 401 - 3280 mg/kg obilovin. Mezi testovanými obilovinami, byl nejvyšší obsah plísní při každé teplotě zjištěn u rýže. Nejvyšší akumulace OTA a CIT byla zjištěna ve vzorcích skladovaných při teplotách 20 °C a 30 °C, optimální podmínky pro produkci obou mykotoxinů jsou za teploty 20 °C. Maximální zjištěná koncentrace OTA ( $31,9 \pm 4,3 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ ) a CIT ( $74,8 \pm 5,7 \text{pg}/\text{kg}$ ) byla stanovena v rýži. Při teplotě 10 °C k produkci mykotoxinů nedochází. Optimální

podmínky pro růst plísní tedy nejsou shodné s optimálními podmínkami pro produkci mykotoxinů (Wawrzyniaka & Waśkiewicz, 2014).

Pro plísně *Penicillium verrucosum* a *Penicillium nordicum* se hodnotily podmínky pro produkci OTA - médium, pH, teploty, mikrobiální živiny, inkubační doby a stopové prvky. Jako nejproduktivnější médium pro střední a maximální množství OTA pro oba druhy bylo stanoveno Czapek Yeast Extract agar. Optimální pro růst mycelia i produkci OTA je pH v rozmezí 5,5 - 5,6, teplota 25 - 30 °C a kvasničný extrakt (1%). Ideální inkubační doba je 12 až 15 dní a to jak pro *P. verrucosum* i pro *P. nordicum*. Přítomné stopové prvky  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  silně ovlivňují produkci OTA, naopak  $Cu^{2+}$  a  $Fe^{3+}$  snižují produkci OTA o 30-40%, což bylo potvrzeno analýzami na HPLC (Koteswara Rao *et al.*, 2013).

Bansal *et al.* ve studii z roku 2011 publikovali výsledky z měření mykotoxinů v rýži. Vzorky byly odebrány v letech 2007 a 2008. Průměrná koncentrace OTA zjištěná ve vzorcích odebraných v prvním roce byla 0,05 ng/g. Pouze ve čtyřech vzorcích byly detekovány koncentrace OTA vyšší a to 0,2 ng/g, tři z těchto vzorků byly odebrány v USA a jeden byl z Indie. Vzorky odebrané v dalším roce koncentrací 0,05 ng/g v průměru nepřesahovaly, s výjimkou jednoho vzorku rýže odebraného z Thajska. Jednalo se o koncentraci 0,47 ng/g.

Koncentrace mykotoxinů byly zjištěny v rýži u celkem 80 vzorků dovážených do Indie a Pákistánu v období od ledna 2011 do srpna 2012. Byly zjištěny koncentrace ochratoxinu A 0,96 ng/g. K měření bylo využito HPLC s předčištěním na imunoafinitních kolonkách (Mosayebi & Mirzaee, 2014).

V jedné z nejnovějších studií bylo testováno celkem 370 vzorků rýže získané ze šesti provincií v Číně s cílem stanovení obsahu aflatoxinů a OTA. Kontaminace OTA byla zjištěna pouze u nižšího procenta vzorků - 4,9% (18/370). Průměrná hodnota OTA u těchto vzorků činila 0,85 mg/kg. Úroveň OTA byly nad limit EU překročeny pouze u jednoho ze vzorků, nicméně vytvoření souvislého monitorovacího programu pro prevenci a řízení těchto kontaminantů je považováno za vhodné (Xianwen *et al.*, 2015).

Hyun & Dojin, 2015 zjistili přítomnost OTA v hlavních obilovinách, které se užívají pro výrobu cereálií. Celkem 489 vzorků kukuřičných, rýžových, obilných a ovesných cereálií byly pravidelně odebírány a sledovány po 2 roky (z maloobchodů USA). 205 vzorků (42%) bylo kontaminováno OTA v rozmezí 0,10 až 9,30 ng/g. Úrovně OTA byly povětšinou pod limitem nařízení Komise EU (3 ng/g), ale vyskytly se i výjimky. Konkrétně rýžové cereálie byly kontaminovány v 15% případech (10/66).

Ve studii z roku 2011 se autoři zabývali průnikem mykotoxinů při úpravě na tzv. parboiled rýži. Vzorky byly odebrány z brazilského trhu v průběhu roku ve čtyřech obdobích – v únoru, květnu, srpnu a listopadu. OTA byl zaznamenán u 12,5 % vzorků, z toho koncentrace u 9 % vzorků překročila legislativní limit. Bylo zjištěno několik poznatků. Nejvíce vzorků kontaminovaných OTA bylo prokázáno ve vzorcích odebraných v květnu, což lze vysvětlit pravděpodobněji kontaminací plísněmi během sklizně. Nejvyšší relativní vlhkost prostředí, která dosahuje kolem 80%, je v období od srpna do listopadu, s čímž souvisí také zvýšená vlhkost rýžových zrn. Vlhkost rýže potom závisí také na kvalitě obalů, které by měly bránit změnám ve vlhkosti výsledného produktu. Úprava na rýži parboiled navyšuje množství minerálních látek a proteinů zhruba o 30% ve srovnání s bílou rýží (Dors *et al.*, 2009). Dalším poznatkem je velmi nízký obsah fenolických sloučenin u vzorků kontaminovaných OTA, což se vysvětluje tím, že zrna rýže s nižším obsahem těchto sloučenin, jsou náchylnější ke kontaminaci plísněmi. Zrna rýže kontaminovaná plísněmi tedy obsahují vyšší množství minerálních látek, proteinů a vitaminů, a zároveň nízké procento fenolických sloučenin. Následně může docházet k průniku produkovaných mykotoxinů v procesu předpaření (Dors *et al.*, 2011).

Sledování mykotoxinů v potravinách je zařazeno v systému monitorování zdravotního stavu obyvatelstva České republiky. Jako významné se považují především pozdní toxické účinky po příjmu nízkých jednorázových nebo opakovaných koncentrací mykotoxinů v potravinách. Koncentrace OTA byla měřena ELISA fotometrem, po předchozí extrakci vzorků na imunoafinitních kolonkách. Díky regulacím současných legislativních norem, které stanovují maximální limity OTA v rýži a dalších potravinách, u nichž hrozí kontaminace mykotoxiny, jsou možná rizika pro



obyvatelstvo eliminována. Pro zdraví populace v současné době rýže nepředstavuje významné závažné riziko, nicméně je potřebné obsah OTA v rýži nadále sledovat.

## 7. ZÁVĚR

OTA patří mezi zemědělsky a také toxikologicky nejvýznamnější mykotoxiny. V posledních letech se stal předmětem, jak mnoha toxikologických studií, tak studií, zaměřených na hledání jeho nových expozičních zdrojů.

Díky nežádoucím toxickým účinkům je nutné řídit riziko OTA a minimalizovat jeho dopady na lidské zdraví. V některých zahraničních studiích, zaměřených na stanovení OTA v rýži, byly zjištěny relativně vysoké koncentrace OTA, které by se mohly projevit v lidském organismu toxicky, což bylo důvodem realizace této studie v ČR, protože zde tyto komplexní údaje chybějí.

Zvláštní pozornost byla věnována zjištění koncentrací OTA také v parboiled rýži, po předchozím vyčištění na imunoafinitních kolonkách a následném fotometrickém ELISA stanovení. Konfirmace získaných vybraných výsledků byla provedena na HPLC s FLD detekcí. Fotometricky zjištěné koncentrace OTA v rýži byly na HPLC – FLD nalezeny pod mezí stanovitelnosti ( $< 0,30 \mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Hypotézu, že se při úpravě tzv. parboiled rýže se do ní dostávají kromě vitaminů a látek s benefičním účinkem na organismus člověka, také např. různé toxiny, např. OTA, tyto výsledky nepotvrdily.

Na základě zde zjištěných prezentovaných výsledků lze uzavřít, že pro zdraví populace v ČR rýže alespoň zatím nepředstavuje z hlediska mykotoxinu ochratoxinu A významné zdravotní riziko. Výsledky korelují se studií kanadských autorů (Bansal *et al.*, 2011).

I přes zjištění relativně velmi nízkých koncentrací OTA v rýži, však bude, především z důvodu globalizace potravinového trhu, potřeba alespoň intermitentně obsah ochratoxinu A a případně dalších mykotoxinů v rýži v ČR sledovat.

## 8. SEZNAM LITERATURY

ALMEIDAA, M. I., ALMEIDAA, N. G., CARVALHOA, K. L., GONGALVES, G. A. A., SILVAA, C. N., SANTOSA, E. A, GARCIAA J. C., VARGAS, E. A. 2012: Co-occurrence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2, ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol, and citreoviridin in rice in Brazil. *Food Additives & Contaminants: Part A*, **4**, 694-703.

BANSAL, J., PANAZOPOULOS, P., TAM, J., CAVLOVIC, P., KWONG, K., TURCOTTE, A. - M., LAU, B. P. -Y. SCOTT, P. M. 2011: Surveys of rice sold in Canada for aflatoxins, ochratoxin A and fumonisins. *Food Additives and Contaminants*, **28**, 767-774.

BENFORD, D., BOYLE, B., DEKANT, W., FUCHS, R., GAYLOR, D.W., HARD, G., MCGREGOR, D.B., PITT, J.I., PLESTINA, R., SHEPHARD, G., SOLFORIZZO, M., VERGER, P.J.P; WALKER, R. 2001: Ochratoxin A. *Joint Expert Committee on Food Additives*, **47**, 1–172.

BUYUKUNAL, S., K., KAHRAMAN, T., CIFTCIOGLU, G., R. 2010: Occurrence of AF, AFB1 OTA in Rice Commercialized in Eastern Turkey. *Polish Journal of Environmental Studies*, **19**, 907-912.

CASTEGNARO, M., BAREK, J., FRÉMY, J. M., LAFONTAINE, M., MIRAGLIA, M., SANSONE, E.B., TELLING, G.M. (eds). 1991a: Laboratory Decontamination and Destruction of Carcinogens in Laboratory Wastes: Some mycotoxins, *International Agency for Research on Cancer*, **113**, 9-16.

CLARK, H. A., SNEDEKER, S. M., 2006: Ochratoxin A: Its cancer risk and potential for exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health B*, **9**, 265-296.

CREPPY, E. E., CASTEGNARO, M., GROSSE, Y., MERIAUX, J., MANIER, C., MONCHARMONT, P., WALLER, C. 1993: Etude De L'ochratoxicose Humaine Dans Trois Regions de France. Alsace, Aquitaine et Region Rhone-Alpes. In *Human Ochratoxicosis and Its Pathologies*; Creppy, E.E., Castegnaro, M., Dirheimer, G., Eds.; John Libbey Eurotext: Montrouge, France, 147–158.

CUSHMAN, M. Types of Rice. In: *Whole grains council* [online]. 2013 [cit. 2014-10-20]. Dostupné z: <http://wholegrainscouncil.org/whole-grains-101/types-of-rice>

ČSN EN ISO/IEC 17 025:2005 *Posuzování shody – Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří v akreditačním systému České republiky*.

DEWETTINCK, K., VAN BOCKSTAELE, F., KUHNE, B., VAN DE WALLE, D., COURTENS, T.M., GELLYNCK, X. 2008: Nutritional value of bread: influence of processing, food interaction and consumer perception. *Journal of Cereal Science*, **48**, 243-257.

DI PAOLO, G., GUARNIERI, A., GAROSI, G. 1994: Inhaled mycotoxins lead to acute renal failure. *Nephrology Dialysis Transplantation*, **9**, 116–200.

DORS, G. C., BIERHALS, V. S., BADIALE-FURLONG, E. 2011: Parboiled rice: chemical composition and the occurrence of mycotoxins. *Food Science and Technology*, **31**, 172-177.

DORS, G. C.; PINTO, L. A. A.; BADIALE-FURLONG, E. 2009: Migration of mycotoxins into rice starchy endosperm during the parboiling process. *Food Science and Technology*, **42**, 433-437.

DUARTE, S.C., PENA, A., LINO, C.M. 2010: A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. *Food Microbiology*, **27**, 187-198.

EFSA. Rýže a její druhy. *Informační centrum Ministerstva zemědělství* [online]. 2012 [cit. 2014-10-20]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92335.aspx>

FEIZY, J., BEHESHTI, H. R., FAKOOR JANATI S. S., KHOSHBAKHT FAHIMA, N. 2011: Survey of ochratoxin A in rice from Iran using affinity column cleanup and HPLC with fluorescence detection. *Food Additives & Contaminants: Part B: Surveillance.*, **1**, 67-70.

FRELUND, E., THIMB, A. M., GILUND, A., BROSTEDTB, S., NYBERGB, M., OLSENA, M. 2009: Moulds and mycotoxins in rice from the Swedish retail market. *Food Additives & Contaminants: Part A*, **4**, 52-533.

FRISVALD, J.C. & FILTENBORG, O. 1989: Terverticilate penicilia: chemotaxonomy and mycotoxin production. *Mycologia*, **81**, 837-861.

FUCHS, R., PERAICA, M. 2005: Ochratoxin A in human kidney diseases. *Food Additives and Contaminants*, **22**, 53–57.

GHALIA, R., HMAISSIA-KHLIFAA, K., GHORBEL, H., MAAROUFIB, K., HEDILIA, A. 2008: Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in tunisian foods. *Food Control*, **9**, 921-924.

GONZALEZ, L., JUAN, C., SORIANO, J.M., MOLTÓ, J.C., MANES, J., 2006. Occurrence and daily intake of ochratoxin A of organic and non-organic rice and rice products. *International Journal of Food Microbiology*, **107**, 223-227.

HADIAN, Z., YAZDANPANA, H., AZIZI, M. H., SEYED AHMADAN, F., KOUSHKI, M. R., HOSSEINI PANJAKI, S. M., MORTEZAEI, G.H.R., SHOJAEI ALIBADIL, F., KHOSHGOZARAN, S. 2009: Occurrence of ochratoxin A in rice sold in chain stores in Tehran. *Journal of nutrition sciences & food technology.*, **2**, 53-59.

HASSEN, W., ABID-ESSAFI, S., ACHOUR, A., GUEZZAH, N., ZAKHAMA, A., ELLOUZ, F., CREPPY, E.E., BACHA, H. 2004: Karyomegaly of tubular kidney cells in human chronic interstitial nephropathy in Tunisia: Respective role of Ochratoxin A and possible genetic predisposition. *Human & Experimental Toxicology*, **23**, 339–346.

HEBER, D., LEMBERTAS, A., LU, Q., BOWERMAN, S., GO, V. 2001: An analysis of nine proprietary Chinese red yeast rice dietary supplements: implications of variability in chemical profile and contents. *The Journal of Alternative & Complementary Medicine*, **7**, 133-139.

HYUN, J. L., DOJIN, R. 2015: Significance of Ochratoxin A in Breakfast Cereals from the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* Article ASAP DOI: 10.1021/jf505674v

IARC (International Agency for Research on Cancer). 1983: *IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: Some Food Additives, Feed Additives and Naturally Occurring Substances*, **31**, 191-206.

IARC (International Agency for Research on Cancer). 1993: Ochratoxin A. *In IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*, **56**, 489-521.

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

JUAN, C., ZINEDINE, A., IDRISSE, L. MANES, J. 2008: Ochratoxin A in rice on the Moroccan retail market. *International Journal of Food Microbiology*, **1-2**, 83-85.

KHOURI, A., ATOUI, A. 2010: Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. *Toxins*, **2**, 461-493.

- KOTESWARA, R. V., RAMANA, M. V., GIRISHAM, S., REDDY, S. M. 2013: Culture Media and Factors Influencing Ochratoxin A Production by Two Species of *Penicillium* Isolated from Poultry Feeds. *National Academy Science Letters*, **1**, 101-110.
- KROGH, P., ELLING, F., FRIIS, C., HALD, B., LARSEN, A. E., LILLEHØJ, E. B., MADSEN, A., MORTENSEN, H. P., RASMUSSEN, F., RAVNSKOV, U. 1979: Porcine nephropathy induced by long-term ingestion of ochratoxin A. *Veterinary Pathology*, **40**, 466–475.
- KRSKA, R., BAUMGARTNER, S., JOSEPHS, R. 2001: The state of the art in the analysis of type A and B trichothecene mycotoxins in cereals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **371**, 285-299.
- KUIPER-GOODMAN, T., SCOTT, P. M. 1989: Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedical and Environmental Sciences*, **2**, 179-248.
- MAJEED, S., IQBAL, M., ASI, M. R., IQBAL, S. Z. 2013: Aflatoxins and ochratoxin A contamination in rice, corn and corn products from Punjab, Pakistan. *Journal of Cereal Science*, **58**, 446-450.
- 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 ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, Brno 2003.
- MALÍŘ, F., OSTRÝ, V., ŠKARKOVÁ, J. 2003: Analytické techniky stanovení mykotoxinů in MALÍŘ, F., OSTRÝ, V. *Vláknité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka*. **1.** vyd. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotních oborů, 259-271.
- MARGO, A., CARVALHO, M. O., BASTOS, M.S.M., CAROLINO, M., ADLER, C.S., TIMLICK, B., MEXIA, A. 2006: *Mycoflora of stored rice in Portugal*. *9th International Working Conference on Stored Product Protection*. 128-134
- MÁRTONFI, P. 2007: *Systematika cievnatých rastlín*. Košice: Vydavateľstvo Univerzity P. J. Šafárika, **3**, 220.
- MIAH, M. A., HAQUE, K. A., DOUGLASS, M. P, CLARKE B. 2002: Parboiling of rice. Part II: Effect of hot soaking time on the degree of starch gelatinization. *International Journal of Food Science & Technology*, **5**, 539-545.

MOSAYEBI, M., MIRZAEI, H. 2014: Determination of Mycotoxin Contamination and Heavy Metals in Edible Rice Imported to Golestan Province. *Iranian Journal of Health and Environment*, **4**, 503-514.

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách. Official Journal of the European Union, 2004, L 364/5 - L 364/24.

OSTRÝ, V., MALÍŘ, F., RUPRICH, J., 2013: Producers and Important Dietary Sources of Ochratoxin A and Citrinin. *Toxins*, **5**, 1574-1586.

OSTRÝ, V., & ŠKARKOVÁ, *et al.* 2014: Ochratoxin A – hodnocení zdravotního rizika pro vybrané populační skupiny v ČR. *Závěrečná zpráva o řešení programového projektu podpořeného Interní grantovou agenturou Ministerstva zdravotnictví ČR. doba řešení 2011 – 2013, reg. č. NT/12051 – 3/2011, Státní zdravotní ústav. 3-4, 11-12, 17-18.*

PENA, A., CEREJO, F., LINO, C., SILVERIA, I., 2005: Determination of ochratoxin A in Portuguese rice samples by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **382**, 1288-1293.

PETZINGER, E., WEIDENBACH, A. 2002: Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. *Livestock Production Science*, **76**, 245–250.

PFOHL-Leszkowicz, A., 2009: Ochratoxin A and aristolochic acid involvement in nephropathies and associated urothelial tract tumours. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, **60**, 465 –483.

PFOHL-LESZKOWICZ, A., MOLINIÉ, A. TOZLOVANU, M., MANDERVILLE, R.A. 2008: Combined Toxic Effects of Ochratoxin A and Citrinin, In Vivo and In Vitro. *Food Contaminants*, 56-79.

PFOHL- LESZKOWICZ, A., TOZLOVANU, M., MANDERVILLE, R., PERAICA, M.; CASTEGNARO, M., STEFANOVIC, V. 2007: New molecular and field evidences for the implication of mycotoxins but not aristolochic acid in Human Nephropathy and Urinary tract tumor. *Molecular Nutrition & Food Research.*, **51**,131–146.

POHLAND, A.E., SCHULLER, P.L., STEYN, P.S, VAN EGMOND, H.P. 1982: Physicochemical data for some selected mycotoxins, *Pure and Applied Chemistry*, **54**, 2219-228.

REDDY L., BHOOLA K. 2010: OCHRATOXINS-FOOD CONTAMINANTS: IMPACT ON HUMAN Health. *Toxins*, **2**, 771-779.

SAMSUDIN, N. I. P., ABDULLAH, N. 2013: A preliminary survey on the occurrence of mycotoxigenic fungi and mycotoxins contaminating red rice at consumer level in Selangor, Malaysia. *Mycotoxin Research*, **29**, 89-96.

STEFANOVIC, V., POLENAKOVIC, M.H. 1991: Balkan nephropathy. *American Journal of Nephrology*, **11**, 1-11.

STOEV, S. D., PASKALEV, M., MACDONALD, S., MANTLE, P. G. 2002: Experimental 1 year ochratoxin A toxicosis in pigs. *Experimental and Toxicologic Pathology*, **53**, 481-487.

TOMAN, J. 2014. *Stanovení mykotoxinu ochratoxinu A v kávě*. Diplomová práce. Univerzita Hradec Králové, Přírodovědecká fakulta, 1-88.

UYSAL, Ü. D., ÖNCÜ, E. M., BERIKTEN, D., YILMAZ, N., TUNCEL, N. B., KIVANC, M., TUNCEL, M., 2009: Time and temperature dependent microbiological and mycotoxin (ochratoxin-A) levels in boza. *International Journal of Food Microbiology*, **130**, 43-48.

VALÍČEK, P. 2002: *Užitkové rostliny tropů a subtropů*. Praha: Academia, **2**, 486.

VAN DER MERVE, K. J., STEYN, P. S., FOURIE, L., DE SCOTT, B. & THERON, J. J. 1965a : Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraeus*. *Willh. Nature*, **205**, 1112-1113.

VAN DER MERVE, K. J., STEYN, P. S., FOURIE, L. 1965 b: Mycotoxins. Part II, The constitution of ochratoxins A, Band C metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Journal of the Chemical Society*, 7083-7088.

VAN EGMOND, H.P.; SCHOTHORST, R.C.; JONKER, M.A. 2007: Regulations relating to mycotoxins in food: Perspectives in a global and European context. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **389**, 147-157.

VEGA, M., MUÑOZ, K., SEPÚLVEDA, C., ARANDA, M., CAMPOS, V., VILLEGAS, R., VILLARROEL, O. 2009: Solidphase extraction and HPLC determination of ochratoxin A in cereals products on Chilean market. *Food Control*, **20**, 631-634.

VUKELIC, M., SOSTARIC, B., BELICZA, M. 1992: Pathomorphology of Balkan endemic nephropathy. *Food and Chemical Toxicology*, **30**, 193-200.



Wafa, E.W., YAHYA, R.S., SOBH, M.A., ERAKY I., EL-BAZ, M., EL-GAYAR H.A., BETBEDER A.M., CREPPY E.E. 1998: Human ochratoxycosis and nephropathy in Egypt: a preliminary study. *Human & Experimental Toxicology*, **17**, 124–129.

WALKER, R., LARSEN, J.C. 2005: Ochratoxin A: previous risk assessments and issues arising. *Food Additives and Contaminants*, 6–9.

WAWRYZYNIAKA, J., WASKIEWICZB, A. 2014: Ochratoxin A and citrinin production by *Penicillium verrucosum* on cereal solid substrates. *Food Additives & Contaminants: Part A*, **1**, 139-148.

WHO. 1990: Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot (Environmental Health Criteria 105), Geneva.

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

XIANWEN, L., RUICEN, L., CHUNQIANG, R., HE, Z., CHENGLAN, L. 2015: Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in rice samples from six provinces in China. *Food Control*, **50**, 401–404.

ZAIED, C., ABID, S., ZORGUI, L., BOUAZIZ, C., CHOUCANE, S., JOMAA, M., BACHA, H. 2009: Natural occurrence of ochratoxin A in Tunisian cereals. *Food Control*, **20**, 218-222.

ZHILONG, L., KUNLUN, H., YUNBO, L. 2015: Ochratoxin A and ochratoxin – producing fungi on cereal grain in China: a review. *Food Additives and Contaminants: Part A*, **32**, 1-10.

ZINEDINE, A., SORIANO, J.M., JUAN, C., MOJEMMI, B., MOLTÓ, J.C., BOUCLOUZE, A., CHERRAH, Y., IDRISSE, L., EL AOUAD, R., MANES, J., 2007: Incidence of ochratoxin A in rice and dried fruits from Rabat and Salé area, Morocco. *Food Additives and Contaminants*, **24**, 285-291.

ŽIŽKA, R. Celozrná rýže. *Prameny zdraví* [online]. 2007 [cit. 2014-10-20]. Dostupné z: <http://www.magazinzdravi.cz/celozrna-ryze>

## 9. SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

<i>Obr. 1</i> Obecný strukturní vzorec ochratoxinů	18
<i>Obr. 2</i> Strukturní vzorec OTA	19
<i>Obr. 3</i> Promývačka BioTek ELx50	37
<i>Obr. 4</i> Spektrometr ELISA BioTek Epoch	38
<i>Obr. 5</i> HPLC s příslušenstvím (J. Toman ©)	41
<i>Obr. 6</i> Prosávací zařízení (J. Toman ©)	41
<i>Tab. 1</i> Optimální růstové podmínky pro <i>Aspergillus ochraceus</i> a <i>Penicillium verrucosum</i>	17
<i>Tab. 2</i> Typy přirozených i syntetických metabolitů OTA	18
<i>Tab. 3</i> Koncentrace standardů (znázornění v grafu)	35
<i>Tab. 4</i> Koncentrace ochratoxinu A v rýži zjištěné na fotometru ELISA	43
<i>Graf 1.</i> Grafické znázornění náhodně vybraných průměrných koncentrací OTA v rýži	43