

UNIVERZITA HRADEC KRÁLOVÉ
Přírodovědecká fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2023

Karolína Brandová

Universita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta
Katedra biologie

**Nefrotické mykotoxiny ve farmaceuticky
významných bylinách**

Diplomová práce

Autor

Karolína Brandová

Studijní program

N0588A030001

Studijní obor

Biologie a ekologie, spec.
Experimentální biologie

Vedoucí práce

RNDr. Jakub Toman, Ph.D.

Hradec Králové

2023



Zadání diplomové práce

Autor:	Bc. Karolína Brandová
Studium:	S21BI016NP
Studijní program:	N0588A030001 Biologie a ekologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Název diplomové práce:	Nefrotoxické mykotoxiny ve farmaceuticky významných rostlinách
Název diplomové práce AJ:	Nehrotoxic mycotoxins in pharmaceutical important plants

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Cílem práce je stanovení mykotoxinů citrininu a ochratoxinu A ve vzorcích farmaceuticky významných rostlin. Po zjištění těchto koncentrací budou připraveny modelové nápoje - nálevy a odvary, v podobě, ve které jsou nejčastěji konzumovány. Opět budou změřena množství mykotoxinů a stanoven tak procentuální transfer do běžně konzumovaných nápojů. Díky tomu bude možné odhadnout přívod těchto mykotoxinů do organismu konzumenta, což přispěje k hodnocení "total diet study"

Entwisle AC, Williams AC, Mann PJ, Russell J, Slack PT, Gilbert J. Combined phenyl silane and immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of ochratoxin A in roasted coffee: collaborative study. *J AOAC Int.* 2001 Mar-Apr;84(2):444-50. PMID: 11324609.

Skarkova J, Ostry V, Malir F, Roubal T. Determination of ochratoxin A in food by high performance liquid chromatography. *Anal. Lett.* 2013, vol 45, no 10, s. 1495-1504

Zadávací pracoviště: Katedra biologie,
Přírodovědecká fakulta

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

Datum zadání závěrečné práce: 23.1.2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a v seznamu použité literatury jsem uvedla všechny prameny, z kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové

Brandová Karolína

Poděkování

Ráda bych vyjádřila svou vděčnost vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Jakubu Tomanovi, Ph.D., za jeho obrovskou ochotu, cenné rady a odborný dohled při vedení práce. Chci mu poděkovat za veškerou podporu a čas, který mi věnoval při práci v laboratoři. Také bych chtěla vyjádřit díky Mgr. Darině Pickové Ph.D., která mi mnohokrát pomohla v laboratoři.

Anotace

BRANDOVÁ, K., 2023: *Nefrotoxické mykotoxiny ve farmaceuticky významných bylinách*. Hradec Králové, 2023. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí diplomové práce RNDr. Jakub Toman Ph.D. 76 s.

Cílem diplomové práce je stanovení mykotoxinů ochratoxinu A a citrininu v 60 vzorcích farmaceuticky významných bylin, které jsou běžně dostupné na českém trhu. Tyto byliny jsou převážně určeny pro spotřebitele k tvorbě nálevů a odvarů. Při používání těchto bylin může být spotřebitel exponován toxickým účinkům těchto mykotoxinů, protože oba mají schopnost poškozovat buňky a tkáň ledvin.

Pro samotnou analýzu byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí (HPLC/FLD). Příprava vzorků před analýzou probíhala za pomoci imunoafinitních kolonek.

Klíčová slova

Mykotoxiny, ochratoxin A, citrinin, farmaceuticky významné byliny, HPLC/FLD, nefrotoxicita

Annotation

BRANDOVÁ, K., 2023: *Nephrotoxic mycotoxins in pharmaceutically significant herbs*. Hradec Králové, 2023. Diploma Thesis at Faculty of Science. University of Hradec Králové. Thesis Supervisor RNDr. Jakub Toman Ph.D. 76 s.

The aim of the thesis is to determine the mycotoxins ochratoxin A and citrinin in 60 samples of pharmaceutically significant herbs that are commonly available on the Czech market. These herbs are mainly intended for consumers to make infusions and decoctions. When consuming these herbs, the consumer may be exposed to the toxic effects of these mycotoxins, as both mycotoxins have the ability to damage kidney cells and tissues.

For the analysis itself, a high-performance liquid chromatography method with fluorescence detection (HPLC/FLD) was used. Sample preparation prior to analysis was performed using immunoaffinity columns.

Keywords

Mycotoxins, ochratoxin A, citrinin, pharmaceutically significant herbs, HPLC/FLD, nephrotoxicity.

Obsah

Úvod a cíl práce	1
1 Ochratoxin A.....	3
1.1 Producenti OTA	4
1.2 Fyzikálně chemické vlastnosti OTA.....	5
1.3 Toxicita OTA.....	5
1.3.1 Toxikokinetika.....	6
1.3.2 Nefrotoxicita	6
1.3.3 Karcinogenita	7
1.3.4 Neurotoxicita.....	7
1.3.5 Imunotoxicita	8
1.3.6 Teratogenita.....	8
1.3.7 Genotoxicita	8
1.4 Výskyt OTA v potravinách.....	8
1.4.1 Výskyt OTA v bylinách	9
1.4.2 Legislativní regulace OTA v rámci EU	11
2 Citrinin.....	12
2.1 Producenti CIT	13
2.2 Fyzikálně chemické vlastnosti CIT	14
2.3 Toxicita CIT.....	15
2.3.1 Toxikokinetika.....	16
2.3.2 Nefrotoxicita	16
2.3.3 Karcinogenita	17
2.3.4 Teratogenita.....	17
2.3.5 Imunotoxicita	18
2.3.6 Genotoxicita	18
2.4 Výskyt CIT v potravinách.....	18
2.4.1 Výskyt CIT v bylinách	19
2.4.2 Legislativní regulace CIT v rámci EU	21
3 Praktická část.....	22
3.1 Zkoumaný materiál.....	22
3.2 Princip metody HPLC-FLD	22

3.3	Extrakce a analýza OTA	23
3.3.1	Materiál	23
3.3.2	Přístroje	23
3.3.3	Chemikálie	24
3.3.4	Roztoky.....	24
3.3.5	Programy a software	25
3.3.6	Příprava vzorků a analýza.....	25
3.3.7	Podmínky stanovení pro OTA	26
3.4	Kalibrace	27
3.4.1	Kalibrační křivka	27
3.4.2	Slepý vzorek.....	27
3.5	Validované parametry pro OTA.....	27
3.5.1	Opakovatelnost retenčního času.....	27
3.5.2	Linearita.....	27
3.5.3	Mez detekce a mez stanovitelnosti	28
3.5.4	Opakovatelnost stanovení.....	28
3.5.5	Výtěžnost metody.....	28
3.5.6	Způsob zapisování primárních dat	28
3.6	Výsledky OTA	29
3.7	Extrakce a analýza CIT	30
3.7.1	Materiál	30
3.7.2	Přístroje	30
3.7.3	Chemikálie	30
3.7.4	Roztoky.....	30
3.7.5	Programy a software	30
3.7.6	Příprava vzorků a analýza CIT	31
3.7.7	Podmínky stanovení pro CIT	33
3.8	Kalibrace	33
3.8.1	Kalibrační křivka	33
3.8.2	Slepý vzorek.....	33
3.9	Validované parametry pro CIT.....	33
3.9.1	Opakovatelnost retenčního času.....	33
3.9.2	Linearita.....	33

3.9.3	Mez detekce a mez stanovitelnosti	33
3.9.4	Opakovatelnost stanovení.....	34
3.9.5	Výtěžnost metody.....	34
3.9.6	Způsob zapisování primárních dat	34
3.10	Výsledky CIT	34
4	Diskuze.....	36
	Závěr	39
	Seznam literatury	40
	Přílohy.....	48

Seznam obrázků a tabulek

Obr. 1: Chemická struktura ochratoxinu A (Chemscrech)	3
Obr. 2: Chemická struktura CIT (Chemscrech).....	12
Obr. 3: Filtrace vzorku 47 na filtrační aparatuře	54
Obr. 4: Překapání vzorků kolonkami	55
Obr. 5: Eluce vzorků z kolonek.....	56
Tab. 1: Nejvýznamnější toxinogenní plísně rodu <i>Aspergillus</i> a <i>Penicillium</i> produkující OTA (Ostry <i>et al.</i> 2013)	5
Tab. 2: Celosvětový výskyt OTA v bylinách.....	9
Tab. 3: Legislativní regulace OTA v EU v kořeni a bylinách (European Commission, 2022)	11
Tab. 4: Významní producenti mykotoxinu CIT (EFSA 2012)	14
Tab. 5: Celosvětový výskyt CIT v bylinách.....	20
Tab. 6: Legislativní regulace CIT v EU v potravinách (European Commission, 2019)	21
Tab. 7: Podmínky stanovení OTA.....	27
Tab. 8: Koncentrace OTA ve vzorcích bylin	29
Tab. 9: Podmínky stanovení CIT.....	33
Tab. 10: Koncentrace CIT ve vzorcích bylin.....	35
Tab. 11: Legislativní regulace OTA v EU (European Commission, 2022)	48
Tab. 12: Celkové koncentrace OTA ve vzorcích bylin	50
Tab. 13: Koncentrace CIT v bylinách.....	52
Tab. 14: Zápis o zpracování vzorků bylin (matrice OTA).....	57
Tab. 15: Zápis o zpracování vzorků bylin (matrice CIT).....	59

Seznam zkratek

ATP	Adenosintrifosfát
BEN	Balkánská endemická nefropatie
CIT	Mykotoxin citrinin
CONTAM	Vědecký panel pro kontaminanty (Contaminants in the food chain)
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority)
ES	Evropské společenství
EU	Evropská unie
HPLC/FLD	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí (High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection)
i. p.	Intraperitoneální
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (International Union of Pure and Applied Chemistry)
<i>In vitro</i>	Termín označující práci s organizmy a jejich částmi v umělých podmínkách laboratoře
<i>In vivo</i>	Termín označující vědeckou práci na živém organismu
LC/MS	Kapalinová chromatografie
LD ₅₀	Střední letální dávka - dávka, která způsobí úhyn 50 % testovaných jedinců
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit kvantifikace
OTA	Mykotoxin ochratoxin A
PAT	Mykotoxin patulin
ppb	1 miliardtina z celku (Parts per milion)
ROS	Reaktivní formy kyslíku (Reactive Oxygen Species)
RSD	Relativní směrodatná odchylka (Relative standard deviation)
s.c.	Subkutánní podání
t.m.	Tělesná hmotnost

Terminologický slovník

Absorpce	Pohlčení, či vstřebání
Adenom	Benigní (nezhoubný) nádor
Akumulace	Shromažďování
Antimikrobiální účinky	Schopnost inhibovat nebo zabít mikroorganismy.
Apoptóza	Programovaná buněčná smrt.
Azotémie	Stav, kdy dochází k abnormálně vysoké hladině dusíkatých odpadních látek.
Biosyntéza	Proces tvorby složitějších organických molekul.
Biotransformace	Procesy, kterými se látky přestavují v organismech.
Dehydratace	Stav, kdy dochází k nedostatku vody.
Dysfunkce	Porucha či narušení normální funkce nějakého systému.
Eliminace	Vyloučení či vyřazení
Fertilizace	Biologický proces, při kterém dochází ke spojení spermie a vajíčka, čímž vzniká zygota.
Genotoxicita	Schopnost poškozovat genetický materiál v buňkách.
Glukosurie	Stav, při kterém je glukóza přítomna v moči.
Hematurie	Termín používaný pro popis přítomnosti krve v moči.
Hepatotoxicita	Schopnost poškozovat játra.
Homeostáza	Schopnost organismu udržovat stálé vnitřní prostředí.
Humorální	Regulace tělesných funkcí, která je zprostředkována hormony.
Hypokalémie	Stav, při kterém hladina dusíku v krvi je nižší než normální rozmezí.
Imunosupresivní účinek	Schopnost potlačit nebo oslabit imunitní systém organismu.
Imunotoxicita	Schopnost negativně ovlivňovat imunitní systém.
Intersticiální	Prostor nebo tkáň mezi buněčnými strukturami v těle.
Intraperitoneální	Způsob podání léků přímo do peritoneální dutiny. Peritoneální dutina je prostor uvnitř břišní dutiny.
Karcinogenita	Schopnost způsobovat rakovinové bujení.
Karyomegalie	Termín popisující zvětšení jader buněk.
Kontaminace	Přítomnost nežádoucích nebo nečistých látek.
Limit detekce	Nejnižší množství analytu, které lze danou vyšetřovací metodou prokázat.
Limit kvantifikace	Nejnižší množství analytu, které lze spolehlivě detekovat a kvantifikovat pomocí dané analytické metody.
Lymfopenie	Stav, při kterém je snížen počet lymfocytů v krvi.
Nefropatie	Termín označující různé onemocnění nebo poruchy ledvin.
Nefrotoxicita	Schopnost poškozovat ledvinovou tkáň a vylučovací systém.
Nekróza	Patologický proces, při kterém dochází k nevratnému poškození buněk a tkání vlivem různých faktorů.
Neurotoxicita	Schopnost poškodit nervovou soustavu.

Perorální	Způsob podání léků, kdy se látka užívá ústy.
Subkutánní	Způsob podávání léků, kdy se aplikuje pod kůži do podkoží.
Synergismus	Situace, kdy dvě či více látek působí společně a s výrazně silnějším efektem.
Teratogenita	Schopnost způsobit vývojové vady nebo abnormality plodu během těhotenství.
Toxinogenní	Schopnost produkovat toxin.

Úvod a cíl práce

Mykotoxiny jsou toxiny produkované vláknitými mikroskopickými houbami, běžně nazývanými plísně, které mohou vznikat na různých potravinách a krmivech. Jedná se o sekundární metabolity a tyto látky představují významný zdravotní problém, neboť mohou být přítomny ve stravě lidí i zvířat a mohou mít negativní dopady na jejich zdraví. Mykotoxiny jsou přírodní sloučeniny, které se tvoří v důsledku metabolických aktivit plísní, zejména druhů rodu *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium* (Pandey *et al.* 2023).

Existuje mnoho různých typů mykotoxinů, z nichž každý má specifické účinky a toxický potenciál. Mezi nejznámější patří aflatoxiny, což jsou produkty plísně *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*. Tyto mykotoxiny jsou hepatotoxické a karcinogenní a mohou vést k vážným onemocněním jater, včetně rakoviny jater (Taligoola *et al.* 2011).

Dalším významným typem mykotoxinů jsou fumonisiny, produkty plísně *Fusarium*. Tyto látky mohou být přítomny v kukuřici a produktech z ní a mohou mít negativní vliv na zdraví zvířat i lidí. Fumonisin jsou známé svou hepatotoxickou a neurotoxickou aktivitou a mohou způsobovat problémy s játry a nervovým systémem (Purchase *et al.* 2023). Ochratoxiny jsou mykotoxiny produkované plísněmi rodu *Aspergillus* a *Penicillium*, mohou být přítomny v různých potravinách, včetně obilovin, kávy a vína. Tyto látky jsou nefrotoxické a karcinogenní a mohou vést k poškození ledvin a dalším zdravotním problémům. Dalšími známými mykotoxiny jsou zearalenon, deoxynivalenol (DON) a patulin (PAT). Zearalenon je estrogenemimický mykotoxin, který může mít negativní vliv na reprodukční systém zvířat i lidí. Deoxynivalenol je produktem druhů z rodu *Fusarium* a může způsobit poruchy trávicího systému. PAT je mykotoxin přítomný v ovoci a džusech s možnými toxickými účinky na játra a ledviny (Alshannaq & Yu 2017).

Mykotoxiny mohou být přítomny v potravě v nízkých koncentracích, kde představují nebezpečí při opakovaném a dlouhodobém vystavení. Mohou vyvolávat akutní a chronické zdravotní problémy, jako jsou otravy, karcinogeneze, imunotoxikologie a neurotoxicita. Je proto důležité monitorovat a omezovat přítomnost mykotoxinů v potravinách a krmivech a dodržovat vhodné postupy jejich skladování a zpracování (Ostry *et al.* 2013).

Prevence proti mykotoxinům zahrnuje správnou hygienu během sklizně a skladování plodin, kontrolu teploty a vlhkosti při skladování, odstraňování poškozených a napadených plodin, pravidelné testování potravin a krmiv na přítomnost mykotoxinů. Také je důležité informovat veřejnost o rizicích spojených s mykotoxiny a poskytovat správné vzdělání týkající se správného skladování potravin a jejich bezpečné konzumace.

Vzhledem k jejich širokému rozšíření a potenciálnímu vlivu na lidské zdraví je důležité, aby byla věnována pozornost výskytu a prevenci mykotoxinů. Použití moderních technologií a postupů při kontrole a minimalizaci mykotoxinů je klíčové pro ochranu spotřebitelů a zajištění bezpečnosti potravin.

Je důležité si uvědomit, že mykotoxiny mohou být přítomny v bylinách a bylinných čajích. Byliny jsou často sušeny a skladovány při teplotách a vlhkostech, jež mohou podporovat růst plísní a tvorbu mykotoxinů. Tyto látky mohou být vytvářeny během procesu sušení, skladování nebo již před sklizní (Chen *et al* 2020).

Dále je také důležité, aby výrobci a distributoři bylin a bylinných čajů přijímali opatření k minimalizaci přítomnosti mykotoxinů. To zahrnuje pečlivou kontrolu kvality surovin, správné skladování za optimálních podmínek, pravidelné testování na mykotoxiny a dodržování hygienických postupů během zpracování.

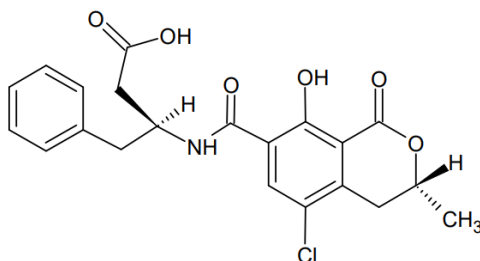
Spotřebitelé by si měli také být vědomi možnosti přítomnosti mykotoxinů v bylinách a bylinných čajích. Je důležité vybírat kvalitní produkty od renomovaných výrobců a dbát na správné skladování a přípravu čajů. V případě podezření na kontaminaci mykotoxiny je vhodné se poradit s odborníkem nebo se vyhnout konzumaci daného produktu.

Celkově je třeba si být vědomý přítomnosti mykotoxinů v různých potravinách včetně bylin a bylinných čajů a dodržovat opatření, která minimalizují riziko jejich výskytu. To je důležité pro zajištění bezpečnosti a ochrany zdraví spotřebitelů.

Cílem této diplomové práce je stanovit citrinin (CIT) a ochratoxin A (OTA) v 60 vzorcích farmaceuticky významných rostlin, které jsou běžně dostupné na českém trhu. Dále budou zjištěné hodnoty porovnány s národními a mezinárodními studii. Dalším vytyčeným cílem je příprava modelových nápojů (nálevů) v podobě, v níž jsou nejčastěji konzumovány. To by mohlo poukázat na možný přívod mykotoxinů do organismu spotřebitele.

1 Ochratoxin A

OTA řadíme do skupiny sekundárních metabolitů mikroskopických vláknitých hub, které jsou produkovány především rody *Aspergillus* a *Penicillium* (Ringot *et al.* 2006; Khoury & Atoui 2010). Biosynteticky se jedná o pentaketid odvozený ze skupiny dihydrokumarinů vázaný na β-fenylalanin. Chemický název je L-fenylalanin-N-[(5chlor-3,4-dihydro-8hydroxy-3-metyl-1-oxo-1H-2-benzopyran-7-yl) karbonyl]-(R)-isokumarin (Obr. 1) (Khoury & Atoui 2010).



Obr. 1: Chemická struktura ochratoxinu A (Chemscrech)

Přirozeně se vyskytují i další ze skupiny ochratoxinů, příkladem může být ochratoxin B (dechlorovaný ochratoxin), ochratoxin C (etylovaný ochratoxin), ochratoxin D (4-hydroxyochratoxin) a další. Avšak ochratoxin A je považován za nejčastější kontaminant potravin ze skupiny ochratoxinů (Khoury & Atoui, 2010; Harčárová *et al.* 2022).

Výskyt OTA souvisí především s nevhodným zacházením s potravinářskými komoditami při jejich pěstování a skladování. OTA byl nalezen v mnoha potravinách a krmivech, jako jsou například obiloviny, luštěniny, olejnatá semena, sušené ovoce a další (Weidenbörner 2018; Daou *et al.* 2023). Riziko rozvoje zdravotních komplikací představují také krmné směsi pro domácí zvířata, a to prostřednictvím kontaminace mykotoxinem. U drůbeže byly po konzumaci kontaminovaného krmiva hojně pozorovány negativní změny na epiteliálních buňkách jícnu a gastrointestinálního traktu, což vedlo ke gastrointestinální dysfunkci, střevní mikrobiální nerovnováze a podvýživě (Khoury & Atoui, 2010).

Dále byla u OTA prokázána nefrotoxicita, hepatotoxicita, teratogenita a imunotoxicita. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) klasifikovala OTA jako možný karcinogen pro člověka, skupina 2B. Avšak uvažuje se o jeho přehodnocení do skupiny 2A jako pravděpodobný karcinogen pro člověka (Ostry *et al.* 2016; Harcarova *et al.* 2022).

1.1 Producenti OTA

Mezi hlavní producenty OTA jsou řazeny především některé druhy z rodů *Aspergillus* a *Penicillium*. Tyto rody kontaminují různé plodiny s různou biomasou v závislosti na klimatických podmínkách. Druhy z rodu *Aspergillus* převládají v tropických a subtropických oblastech, zatímco druhy rodu *Penicillium* jsou častější v mírném pásmu (Wang *et al.* 2016). Prvním nalezeným producentem OTA byl druh *Aspergillus ochraceus* v roce 1965. Nyní je *A. ochraceus* označován jako *A. westerdijkiae*. Produkce OTA u tohoto druhu má tendenci stoupat při optimálních teplotách mezi 25 °C a 30 °C (Khoury & Atoui 2010; Wang *et al.* 2016). *A. westerdijkiae* kontaminuje například cereálie, sóju, mletou červenou papriku, ořechy a další potravinářské komodity (Malir *et al.* 2016).

Většinu druhů z rodu *Aspergillus* produkující OTA řadíme do dvou sekcí: sekce *Circumdati*, kam řadíme například *A. westerdijkiae*, a sekci *Nigri*, kam řadíme například *A. carbonarius* a *A. niger* (Wang *et al.*, 2016). *Aspergillus carbonarius* se vyskytuje převážně v hroznech a produkuje OTA také v produktech z nich (víno, šťáva, sušené plody) a někdy i v kávových zrnech. Sekce *Nigri* obsahuje méně toxické druhy (Khoury & Atoui 2010).

Varga *et al.* (1996) detekovali OTA jako sekundární metabolit u druhů *Aspergillus alliaceus*, *A. sclerotiorum*, *A. sulphueus*, *A. albertensis*, *A. auricomus*, *A. wentii* a *A. carbonarius*. Například *A. alliaceus* je významným kontaminantem fíků v Kalifornii. Rizzo, Eskola a Atroshi (2002) popsali jiné druhy z rodu *Aspergillus*, jako je například *A. fumigatus* a *A. versicolor*. Další studie uvádí ještě druhy *A. niger* (arašídy, hrozny), *A. foetidus* (hrozny), *A. lacticoffeatus*, *A. sclerotioniger*, *A. steynii*, *A. welwitschiae*, a *A. circumdati*, kdy posledních pět druhů bylo izolováno z kávy (Ostry *et al.* 2013; Malir *et al.* 2016; Wang *et al.* 2016). Mezi další uváděné producenty OTA se řadí *A. cretensis*, *A. flocculosus*, *A. pseudoelegans*, *A. roseoglobulosus* a *Neopetromyces muricatus* (Frisvad *et al.* 2004; Khoury & Atoui 2010; Wang *et al.* 2016).

Izolovány a identifikovány byly i druhy z rodu *Penicillium* produkující OTA. Mezi tyto druhy patří *P. verrucosum*, které kontaminuje obvykle obiloviny, *P. nordicum*, které kontaminuje sýry a je hlavním producentem OTA v masných výrobcích. Tito dva producenti jsou hodnoceni jako hlavní, avšak byly popsány i jiné druhy rodu *Penicillium*. Dalšími možnými kontaminanty produkujícími OTA jsou *P. chrysogenum*, *P. viridicatum*, *P. glycyrrhizicola* a *P. polonicum*. Tyto druhy byly schopné produkovat OTA na čerstvé či sušené lékořici. U druhů *P. brevicompaktum*, *P. crustosum*, *P. olsonii* a *P. oxalicum* byly nalezené kontaminace OTA menší než 0,1 ppb (Cabañes *et al.* 2010; Khoury & Atoui 2010; Wang *et al.* 2016).

Tab. 1: Nejvýznamnější toxinogenní plísně rodu *Aspergillus* a *Penicillium* produkující OTA (Ostry *et al.* 2013)

Rod	Sekce	Druh
<i>Aspergillus</i>	<i>Circumdati</i>	<i>A. steynii</i>
		<i>A. westerdijkiae</i>
	<i>Nigri</i>	<i>A. niger</i>
		<i>A. sclerotioniger</i>
		<i>A. lacticoffeatus</i>
		<i>A. foetidus</i>
		<i>A. carbonarius</i>
		<i>A. tubingensis</i>
<i>Penicillium</i>	<i>Verrucosa</i>	<i>P. verrucosum</i>
		<i>P. nordicum</i>

1.2 Fyzikálně chemické vlastnosti OTA

OTA je slabá organická kyselina s molární hmotností 403,8 g/mol. Krystalická struktura se mění od bezbarvé po bílou a tato molekula má intenzivní zelenou fluorescenci pod UV světlem v kyselém prostředí, oproti tomu v alkalickém prostředí má fluorescenci modrou (Khoury & Atoui 2010).

V kyselém a neutrálním pH je OTA rozpustný v polárních organických rozpouštědlech. Příkladem mohou být alkoholy, ketony, chloroform a další. Ve vodě je OTA mírně rozpustný, ale je nerozpustný v petroléterech a nasycených uhlovodících. V alkalických podmínkách je tato molekula rozpustná ve vodném roztoku hydrogenuhličitanu sodného (Khoury & Atoui 2010).

Teplota tání OTA je 90 °C, pokud krystalizuje z benzenu, naopak z xylenu byly získány krystaly s teplotou tání 169 °C. OTA je vysoce stabilní, bylo prokázáno, že má odolnost vůči nízkému pH a vysokým teplotám. Problém nastává ve zmírnění kontaminace potravin. Tuto molekulu není téměř možné odstranit (Khoury & Atoui 2010; Čolović *et al.* 2019). V roce 1982 bylo dokázáno, že OTA za normálních podmínek vaření je pouze částečně degradován (Müller 1982). Molekula OTA vydrží tři hodiny vysokotlaké parní sterilizace za teploty 121 °C a ani při 250 °C není její degradace úplná (Boudra *et al.* 1995; Khoury & Atoui 2010).

1.3 Toxicita OTA

Již v úvodu bylo zmíněno, že OTA spolu s CIT jsou známé nefrotoxické látky. Toxicita OTA je větší než CIT. U savců jsou také známé neurotoxické, imunotoxické, teratogenní a karcinogenní účinky OTA. OTA také narušuje srážení krve a metabolismus glukózy. Toxické účinky OTA zahrnují i inhibici syntézy proteinů, tvorbu reaktivní formy kyslíku (ROS), peroxidaci lipidů, narušení homeostázy vápníku a poškození mitochondriálních oxidačních reakcí (Gupta *et al.* 2018).

Toxické účinky OTA byly rozsáhle studovány na řadě domácích a pokusných zvířatech. Celková toxicita OTA může být ovlivněna u pokusných zvířat například pohlavím, druhem zvířete a způsobem podání. Na základě studií a údajů o akutní toxicitě jsou nejcitlivějšími druhy psi, prasata a kuřata. Naopak méně citlivé jsou krysy a myši (Gupta *et al.* 2018).

Letální dávka OTA, která způsobí úhyn 50 % testovaných subjektů (LD₅₀), je u orálního podání u myši stanovena od 46 do 58 mg/kg tělesné hmotnosti, 20–30 mg/kg u potkana. U čerstvě narozených mláďat 3,9 mg/kg u psa, 1 mg/kg u prasete a 3,3 mg/kg u kuřete. Hodnoty LD₅₀ přes intraperitoneální podání (skrz injekci do břišní dutiny) se uvádí hodnoty od 22 do 40 mg/kg u myši a 20–30 mg/kg u potkana. Podáním intravenózní cestou se uvádějí hodnoty 26–34 mg/kg u myši a 13 mg/kg u potkana (Gupta *et al.* 2018). Po podání sondou jedné dávky 0,17 až 22 mg/kg tělesné hmotnosti bylo u potkanů nejčastěji zjištěno multifokální krvácení a fibrinové tromby v různých orgánech, dále jaterní a lymfoidní nekróza, atrofie klků zejména v lačníku a nefróza (Albassam *et al.* 1987).

1.3.1 Toxikokinetika

Po perorálním podání se OTA vstřebává velmi rychle s biologickou dostupností v rozmezí od 40 % (u kuřat) do 66 % (u prasat), která závisí na velikosti dávky. Během několika hodin dosahuje OTA maximální hladiny v krvi. Hlavní charakteristikou OTA u lidí a mnoha živočišných druhů je, že se ve velkém měřítku váže na albumin a další sérové proteiny pomocí nekovalentní vazby. Tento faktor způsobuje delší dobu eliminace a vylučování. U hlodavců je hlavní cestou vylučování žlučí a stolicí, u jiných živočišných druhů, převážně u opic, převažuje vylučování ledvinami. Stejně tomu je také u člověka. Biotransformace OTA se zdá být nízká. Důležité zjištění ve studiích probíhajících na zvířatech *in vivo* je akumulace OTA v ledvinách, spojená s výraznými rozdíly mezi druhy a pohlavím (EFSA 2006; EFSA 2020).

Kvůli svému dlouhému poločas rozpadu se OTA může akumulovat v tkáních monogastričních hospodářských zvířat, jako jsou prasata, a být tak přítomen v mase a masných výrobcích. U zvířat, která mají více žaludků, je v důsledku účinného rozkladu v bachoru hladina OTA v mléce a požitelných tkáních krav a jiných přežvýkavců nízká. U ryb má OTA krátký poločas rozpadu a velmi nízké hladiny v tkáních (EFSA 2020).

1.3.2 Nefrotoxicita

Hlavním toxickým účinkem OTA je nefrotoxicita. Bylo dokázáno, že OTA vyvolává nefrotoxicitu závislou na dávce a čase u všech testovaných druhů savců s výraznými rozdíly v citlivosti mezi pohlavími. Dlouhodobé podávání OTA způsobuje renální nádory u potkanů a myši, jimž předchází reverzibilní změny ledvin (EFSA 2020).

Epidemiologické výzkumy provedené v Dánsku, Maďarsku, Skandinávii a Polsku ukazují, že OTA hraje důležitou roli u prasečí nefropatie (Elling *et al.* 1985; Khoury & Atoui 2010). Tento mykotoxin je také spojován s lidskou nefropatií, dále také spolu s dalšími mykotoxiny, s lidským smrtelným onemocněním známým jako balkánská endemická nefropatie (BEN). BEN je intersticiální chronické onemocnění postihující jihovýchodní populaci Evropy, kam řadíme Chorvatsko, Bosnu, Bulharsko a Rumunsko (Fuchs & Peraica, 2005; Khoury & Atoui 2010). Charakteristickým znakem na počátku onemocnění BEN je modifikace epiteliálních buněk beze změny velikosti orgánu. Po expozici, která přechází do chronicity, jsou ledviny redukovány. Dále dochází k intersticiální fibróze. V konečném stadiu dochází k poškození renálních funkcí. Mezi další příznaky patří bolest hlavy, bolest bederní oblasti, slabost a anémie (nedostatek železa). Dále jsou důkazy, že byly ovlivněny biochemické procesy v ledvinách, dochází k alkalizaci moči, zvýšení kreatininu a imunoglobulinů M a E (Malir *et al.* 2016).

Ve studii Hassen *et al.* (2004) byl OTA považován za hlavní příčinu karyomegalie tubulárních ledvinových buněk u lidské chronické intersticiální nefropatie postihující populaci v Tunisku. Dalšími příznaky intoxikace OTA mohou být léze na proximálních tubulech, epiteliální buňky mohou být poškozeny a může se ztratit integrita membrány (Malir *et al.* 2016).

1.3.3 Karcinogenita

Mykotoxin OTA má karcinogenní účinky, což znamená, že může způsobovat rakovinové bujení buněk. Aby se předešlo rizikům rakoviny vyplývajících z expozice mykotoxinů, zahájila IARC v Lyonu (Francie) hodnocení karcinogenních rizik pro některé mykotoxiny. Výzkum probíhá na základě epidemiologických údajů a experimentálních studií rakoviny (IARC 2015).

IARC v letech 1976 a 1983 poprvé vyhodnotila karcinogenní riziko OTA pro člověka. V roce 1987 překlasifikovala OTA do skupiny 3, nebyl klasifikován jako karcinogenní pro člověka. V roce 1993 byl opět přeřazen do skupiny 2 B, možný karcinogen pro člověka. Avšak stále probíhají úvahy o jeho reklasifikaci do vyšší skupiny, kde by byl označen jako karcinogen pro člověka, případně do skupiny 2 A jako pravděpodobný karcinogen pro člověka (Malir *et al.* 2016; Ostry *et al.* 2016).

1.3.4 Neurotoxita

Mezi hlavní neurotoxické účinky OTA se řadí oxidativní stres, poškození proteinů a apoptóza buněk. Různé studie prokázaly vliv na laktátdehydrogenázu (oxidoredukční enzym katalyzující přeměnu laktátu na pyruvát), dále také má negativní vliv na funkci mitochondrií. OTA může přímo ovlivňovat dopamin, noradrenalin a 5-hydroxytryptamin, což může vést k motorické poruše mozku a k zhoršení paměti (Nourbakhsh & Tajbakhsh, 2021).

Mechanismy neurotoxicity u mykotoxinu OTA jsou stále málo objasněné a musí probíhat další studie, které by vedly k více důkazům o jeho neurotoxicitě. Vzhledem k potenciální expozici člověka je nutné zajistit adekvátní hodnocení rizik, nezbytné pro lepší pochopení toxikokinetiky a neurotoxicity OTA.

1.3.5 Imunotoxicita

Za určitých podmínek představuje OTA silný imunosupresivní účinek, potlačuje funkci imunitního systému. Imunosuprese byla pozorována u nízkých i vysokých dávkách OTA. Popsány byly nekrózy lymfatických tkání a poruchy humorální i buněčné imunity (Khoury & Atoui 2010). Ze studie Lea *et al.* (1989) vyplývá, že OTA hraje roli v inhibici proliferace periferních T a B lymfocytů a zastavuje produkci interleukinu-2 (IL2) a jeho receptorů.

Výzkum na mnoha druzích zvířat má různé výsledky z hlediska pozorování kostní dřeni a imunitní odpovědi na expozici OTA. Mykotoxin OTA je považován za původce lymfopenie, pozorována byla regrese brzlíku a došlo k potlačení imunitní odpovědi (Petzinger & Weidenbach, 2002).

1.3.6 Teratogenita

U laboratorních zvířat se OTA ukázal jako silný teratogen. OTA může procházet placentou a hromadit se ve fetální tkáni, což způsobuje různé morfologické anomálie. Hlášena byla prenatální dysmorfogeneze u potkanů a myší (Mayura *et al.* 1984), u křečků (Hood *et al.* 1976) a kuřecích embryí (Gilani *et al.* 1978).

Mechanismus teratogeneze nebyl zcela popsán a definován, tudíž vliv na závažnost malformace závisí na různých aspektech, mezi něž může patřit způsob podání či období vývoje plodu (Khoury & Atoui 2010).

1.3.7 Genotoxicita

OTA se hromadí v ledvinách a při chronické expozici dávkám toxickým pro ledviny také indukují nádory ledvin a jater u hlodavců. Výsledky testů genotoxicity jsou nekonzistentní. Celkový důkaz podporuje hypotézu, že poškození DNA je vyvoláno spíše oxidativním stresem než přímou interakcí (EFSA, 2020).

1.4 Výskyt OTA v potravinách

Za hlavní kontaminanty OTA se považují obiloviny, které patří mezi hlavní a nejdůležitější zdroj potravin. Roční celosvětová úroda obilovin přesahuje 2 000 milionů tun a stále roste. Studie Pittet (1998) ukázala, že 25–40 % obilovin v celosvětovém měřítku je kontaminováno mykotoxiny. Ke kontaminaci mykotoxiny může dojít jak na poli, tak během skladování. K těmto kontaminacím převážně dochází v zemích s horkými a vlhkými klimatickými podmínkami, zejména v Africe, jižní Asii a Jižní Americe. Základními potravinami těchto zemí jsou rýže, kukuřice a proso a tyto komodity zejména kontaminují aflatoxiny a ochratoxiny (Nguyen *et al.* 2007; Khoury & Atoui 2010).

Jako druhý hlavní zdroj kontaminace OTA označujeme víno a jeho produkty. Ke kontaminaci dochází skrz různé druhy ochratoxinogenních hub, převážně patřících do rodu *Aspergillus* sekce *Nigri* (*A. carbonarius* a *A. niger*). Významný vliv na množství mykotoxinu má datum sklizně. Dobře zdokumentována je i kontaminace kávových zrn, luštěnin, koření, masa a sýrových produktů (Khoury & Atoui 2010).

OTA byl poprvé nalezen jako přírodní kontaminant v obilovinách v polovině 60. let, kdy byl analyzován v kukuřici v množství od 110 do 150 ng/g (Malir *et al.* 2016). Další studie následovala v roce 1970, kdy Scott *et al.* (1970) našli OTA v obilovinách, fazolích a arašídách. V průběhu let byly na seznam přidávány další potravinářské komodity, které mohou být kontaminovány OTA. Mezi potraviny rostlinného původu se řadí obilné výrobky, olivy, fazole, pivo, víno, káva, kakaové výrobky, rozinky, fíky, lékořice, luštěniny, dýňová semínka a různé typy čajů a bylin (Weidenbörner 2018). Obecná koncentrace OTA v potravinářských komoditách se uvádí v rozmezí od 0,1 do 100 ng/g. V potravinách živočišného původu, jako jsou například vepřové a kuřecí maso, šunka, vepřová krev apod., se hladiny OTA pohybují od 0,1 do 1 ng/g. V krmivech živočišného původu byl OTA nalezen, například ve vepřových ledvinách a játrech, vepřovém mase, kuřecích játrech a vnitřnostech, používaných pro přísady do krmiv pro kočky a psy (Khoury & Atoui 2010).

1.4.1 Výskyt OTA v bylinách

Byliny a bylinné čaje mohou být také kontaminovány mykotoxiny. Studií, které by hodnotily výskyt a stanovovaly koncentrace OTA v bylinách, je velmi málo. Při skladování v domácnosti i během času, než dojde produkt ke spotřebiteli, může nastat sekundární kontaminace, především pokud se bylina či její směs neskládá na suchém a tmném místě. V rámci Evropské unie jsou byliny registrovány buď jako složky potravin, nebo jako drogy, což závisí na členském státu. Z toho důvodu nedochází k jednotné legislativě, jež by regulovala výrobu a komercializaci těchto produktů na trhu. Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) pouze uvádí, že rostlinné produkty musí splňovat aktuální potravinovou legislativu EU. To je dáno nařízením komise (EU) 2022/1370 ze dne 5. srpna 2022, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006.

Co se týče legislativy ohledně rostlinných produktů používaných pro složky léčiv, stanovila European Pharmacopeia maximální limity pouze pro aflatoxin B₁ na 2 g/kg a pro další aflatoxiny B₂, G₁ a G₂ na 4 g/kg (Arroyo-Manzanares *et al.* 2013).

Tab. 2: Celosvětový výskyt OTA v bylinách

Bylina (lat.)	Část rost. (lat.)	Země	Rozsah [µg/kg]	Reference
<i>Holarrhena antidysenterica</i>	<i>Granum</i>	Indie	80*	Roy & Chourasia, 1990
<i>Ichnocarpus frutescens</i>	<i>Radix</i>	Indie	20*	Roy & Chourasia, 1990
<i>Tribulus terrestris</i>	<i>Fructus</i>	Indie	100*	Roy & Chourasia, 1990

<i>Cassia angustifolia</i>	<i>Folium</i>	Španělsko	3,1–4,2	Santos <i>et al.</i> 2009
<i>Cynara scolymus</i>	<i>Flos</i>	Španělsko	5,0*	Santos <i>et al.</i> 2009
<i>Ginkgo biloba</i>	<i>Folium</i>	Španělsko	0,8–1,1	Santos <i>et al.</i> 2009
<i>Lippia citriodora</i>	<i>Folium</i>	Španělsko	1,5*	Santos <i>et al.</i> 2009
<i>Matricaria chamomilla</i>	<i>Flos</i>	Španělsko	0,8–1,0	Santos <i>et al.</i> 2009
<i>Olea europaea</i>	<i>Folium</i>	Španělsko	1,3*	Santos <i>et al.</i> 2009
<i>Peumus boldus</i>	<i>Folium</i>	Španělsko	1,2–1,6	Santos <i>et al.</i> 2009
<i>Plantago lanceolata</i>	<i>Folium</i>	Španělsko	0,9–1,1	Santos <i>et al.</i> 2009
<i>Rhamnus frangula</i>	<i>Cortex</i>	Španělsko	1,5–4,2	Santos <i>et al.</i> 2009
<i>Rheum officinalis</i>	<i>Herba</i>	Španělsko	2,1–13,9	Santos <i>et al.</i> 2009
<i>Salvia officinalis</i>	<i>Folium</i>	Španělsko	1,1–17,3	Santos <i>et al.</i> 2009
<i>Taraxacum officinale</i>	<i>Herba</i>	Španělsko	10,6*	Santos <i>et al.</i> 2009
<i>Thea sinensis</i>	<i>Folium</i>	Španělsko	3,7–4,9	Santos <i>et al.</i> 2009
<i>Valeriana officinalis</i>	<i>Radix</i>	Španělsko	0,8–1,8	Santos <i>et al.</i> 2009
<i>Verbena officinalis</i>	<i>Herba</i>	Španělsko	1,1*	Santos <i>et al.</i> 2009
<i>Chrysanthemi indicum</i>	<i>Flos</i>	Čína	1,1*	Han <i>et al.</i> 2012
<i>Aloe vera</i>	<i>Herba</i>	Pákistán	90,09–125	Ahmad <i>et al.</i> 2014
<i>Papaver somniferum</i>	<i>Granum</i>	Pákistán	15,8–35,7	Ahmad <i>et al.</i> 2014
<i>Withania coagulans</i>	<i>Folium</i>	Pákistán	10,95*	Ahmad <i>et al.</i> 2014
<i>Codonopsis sp.</i>	<i>Radix</i>	Čína	3,71–515	Chen <i>et al.</i> 2020
<i>Scutellariae sp.</i>	<i>Radix</i>	Čína	1,74–231	Chen <i>et al.</i> 2020

<i>Matricaria chamomilla</i>	-	Libanon	9,8*	El Darra <i>et al.</i> 2019
<i>Salvia officinalis</i>	-	Libanon	4,2*	El Darra <i>et al.</i> 2019

*výsledky jednotlivých měření

1.4.2 Legislativní regulace OTA v rámci EU

OTA je legislativně regulován nařízením komise (ES) č. 1881/2006 ve znění pozdějších předpisů.

V Tab. 2 jsou uvedeny maximální limity OTA v koření a bylinách, které slouží pro regulaci v EU. Maximální limity v ostatních potravinách jsou uvedeny v příloze č. 11.

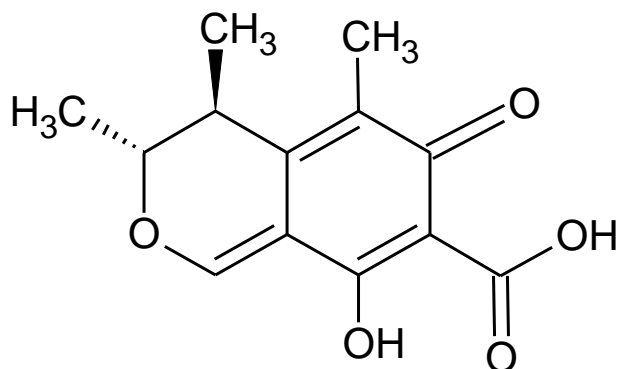
Tab. 3: Legislativní regulace OTA v EU v koření a bylinách (European Commission, 2022)

Potravina	Maximální limity ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Koření včetně sušeného koření, kromě <i>Capsicum</i> spp.	15,0
Koření včetně sušeného koření, kromě <i>Capsicum</i> spp.	20,0
Směsi koření	15,0
Kořen lékořice, mimo jiné jako složka bylinných čajů	20,0
Sušené byliny	10,0
Kořeny zázvoru pro použití v bylinných čajích	15,0
Kořeny proskurníku lékařského, kořeny pampelišky (smetánky) a květy pomerančovníku pro použití v bylinných čajích nebo v náhražkách kávy	20,0

2 Citrinin

Mykotoxin citrinin (CIT) je dalším nefrotoxickým mykotoxinem. CIT je polyketidový mykotoxin, jehož chemický název dle IUPAC je (3R,4S) -4,6 -dihydro -8 -hydroxy -3,4,5 -trimethyl -6 -oxo -3H -2 -benzopyran -7-karboxylová kyselina (Obr. 2) (EFSA 2012). CIT je produkován několika druhy rodů *Aspergillus*, *Penicillium* a *Monascus* (viz Tab. 4). CIT převážně kontaminuje obiloviny, ale detekován byl i v ovoci a v ovocných a zeleninových šťávách, v kořeni a také ve zkažených mléčných výrobcích. CIT se běžně tvoří po sklizni za nevhodných podmínek skladování. Kromě již zmíněných potravinářských komodit se vyskytuje jako nežádoucí kontaminant v angaku, což je červená fermentovaná rýže. Takto zpracovaná rýže je používána v tradiční čínské medicíně (EFSA 2012).

CIT byl poprvé izolován Hetheringtonem a Raistrickem z kultury *Penicillium citrinum* v roce 1931 (Hetherington & Raistrick, 1931). Později byl identifikován z více druhů *Penicillium*, příkladem mohou být *P. expansum* a *P. verrucosum* (Silva *et al.* 2020). V roce 1948 byla popsána chemická struktura CIT a dále v 50. letech byla zkoumána jeho biosyntéza (Whalley *et al.* 1948). První komplexní studie, která se zabývala výskytem CIT ve vzorcích obilí, proběhla v roce 1968 v Kanadě (Scott *et al.* 1972).



Obr. 2: Chemická struktura CIT (Chemscreetch)

Zajímavé jsou antimikrobiální vlastnosti CIT. Bylo experimentálně prokázáno, že CIT vykazuje mírné inhibiční účinky vůči gram pozitivním bakteriím, například proti *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* a *Micrococcus luteus* (Hiroyuki *et al.* 1987). Zóna inhibice antimikrobiální aktivity CIT je mezi 6 až 15 mm, kdy záleží na jeho koncentraci. Dále vykazuje antimikrobiální aktivitu proti *Shigella dysenteriae*, *S. sonnei*, *S. boydii*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* a dalším bakteriím (Mazumder *et al.* 2002). Prokázána byla i cytotoxicita CIT proti *Schizosaccharomyces pombe* (Blasko *et al.* 2013; De Oliveira Filho *et al.* 2017).

I přes své antimikrobiální vlastnosti nemůže být CIT použit v medicíně, jelikož vykazuje silné toxické účinky. Především je důležitá jeho nefrotoxicita, mezi další toxické účinky patří hepatotoxicita, imunotoxicita, karcinogenita, mutagenita, dále má CIT také teratogenní účinky na lidi a zvířata (Zhang *et al.* 2021).

2.1 Producenti CIT

Mykotoxin CIT produkují převážně druhy rodů *Penicillium* a *Monascus*, ale může být produkován i druhy rodu *Aspergillus*. Některé tyto druhy mohou produkovat spolu s citrininem i ochratoxin A či patulin (EFSA 2012).

Po první izolaci z druhu *Penicillium citrinum* v roce 1931 byl CIT později izolován z dalších druhů rodu *Penicillium*, mezi něž patří *P. expansum*, *P. radicola* a *P. verrucosum*. Za určitých podmínek mohou mykotoxin CIT produkovat i určité kmeny *Penicillium camemberti* (EFSA 2012).

Penicillium citrinum je běžně se vyskytující druh vláknité mikroskopické houby, která může kontaminovat všechny druhy potravin a krmiv téměř ve všech klimatických podmínkách na Zemi. Vhodné podmínky pro produkci CIT jsou v rozmezí teplot od 15 do 30 °C, kdy nejvhodnější podmínky jsou při 30 °C. Dalším velmi významným druhem produkujícím CIT je *Penicillium expansum*. Tento druh je známý jako posklizňový patogen ovoce a zeleniny. *Penicillium expansum* produkuje také mykotoxin patulin. *Penicillium verrucosum* je kromě produkce CIT schopný zároveň produkovat OTA (Pitt 2002; Ostry *et al.* 2013). Další producenti mykotoxinu CIT jsou uvedeny v Tab. 4.

CIT produkuje dále také několik druhů rodu *Aspergillus*, například *A. niveus* a *A. oryzae*, které se používají k výrobě saké, miso a sójové omáčky. Dále byla produkce CIT zaznamenána u druhů *A. alabamensis* a *A. carneus* (EFSA 2012).

Rod *Monascus* má téměř tisíciletou historii v rámci svého používání. V Číně se běžně tento rod využívá k výrobě červených a žlutých pigmentů k barvení potravin. Dále se některé druhy z rodu *Monascus* využívají při výrobě a konzervaci potravin (Blanc *et al.* 1995). Z rodu *Monascus* byl CIT poprvé izolován ve studii Blanc *et al.* (1995), tento objev přitáhl další odborníky, kteří dále studovali tuto problematiku. CIT byl izolován z druhů *Monascus ruber* a *Monascus purpureus*, což jsou průmyslově využívané druhy k výrobě již zmíněných pigmentů. Druh *M. purpureus* se využívá k výrobě červené fermentované rýže, která se dále podílí na výrobě doplňků stravy snižujících cholesterol v krvi, tlak a májících i antioxidační účinky (Wang *et al.* 2017).

CIT byl dále popsán i jako produkt *Pythium ultimum* ve studii Endo & Kuroda (1976) a *Clavariopsis aquatica* ve studii Broadbent v roce 1966. Avšak dále nebyl CIT v těchto druzích potvrzen. V roce 1933 byl citrinin nalezen v australské luštěnině *Crotolaria crispata*, avšak není jasné, jestli se nejednalo o sekundární metabolit vláknité mikroskopické houby, která luštěninu mohla kontaminovat (EFSA 2012).

Tab. 4: Významní producenti mykotoxinu CIT (EFSA 2012)

Rod	Druh
<i>Aspergillus</i>	<i>A. alabamensis</i>
	<i>A. carneus</i>
	<i>A. niveus</i>
<i>Monascus</i>	<i>M. aurantiacus</i>
	<i>M. floridanus</i>
	<i>M. lunisporas</i>
	<i>M. pallens</i>
	<i>M. pilosus</i>
	<i>M. purpureus</i>
	<i>M. ruber</i>
	<i>M. sanguineus</i>
<i>Penicillium</i>	<i>P. chrysosporium</i>
	<i>P. citrinum</i>
	<i>P. decaturense</i>
	<i>P. expansum</i>
	<i>P. gorlenkoanum</i>
	<i>P. hetheringtonii</i>
	<i>P. manginii</i>
	<i>P. miczynskii</i>
	<i>P. odoratum</i>
	<i>P. radicum</i>
	<i>P. verrucosum</i>
<i>P. westlingii</i>	

2.2 Fyzikálně chemické vlastnosti CIT

CIT tvoří citronově žluté krystalky s maximální absorpcí ultrafialového záření (UV) při 250 nm a 333 nm. CIT krystalizuje v neuspořádané struktuře s tautomerními formami p-chinonu a o-chinonu v dynamické rovnováze v pevném stavu (Poupko *et al.* 1997). Molekulární hmotnost CIT je 250,25 g/mol. Je málo rozpustný ve vodě, ale rozpustný ve zředěném hydroxidu sodném, uhličitanu sodném nebo octanu sodném. Rozpouští se také v metanolu, acetonitrilu, etanolu a většině dalších polárních organických rozpouštědel (Xu *et al.* 2006). Je schopen tvořit chelátové komplexy a může být degradován v kyselém nebo alkalickém roztoku, či ho lze degradovat zahříváním. Je to chinonmethid se dvěma intramolekulárními vodíkovými vazbami. CIT má konjugovanou planární strukturu, která mu dává jeho přirozenou fluorescenci (Franco *et al.* 1996; De Oliveira Filho *et al.* 2017).

Bylo provedeno několik studií o degradaci citrininu, které odhalily, že k jeho rozkladu dochází při teplotě nad 175 °C za sucha a při teplotě nad 100 °C

v přítomnosti vody. Mezi známé produkty rozkladu patří citrinin H₂, který nevykazuje významnou cytotoxicitu. Druhý známý produkt rozkladu je citrinin H₁, který se skládá ze dvou molekul citrininu a vykazuje zvýšenou cytotoxicitu ve srovnání s mateřskou sloučeninou (Xu *et al.* 2006; De Oliveira Filho *et al.* 2017). Další produkt rozkladu – cytotoxický dimer citrininu, a to dicitrinin A byl popsán v roce 2006 spolu s dalšími produkty degradace monomerů a dimerů (Clark *et al.* 2006).

2.3 Toxicita CIT

CIT představuje vážný problém převážně v tropických a subtropických oblastech, kde kontaminuje potraviny a krmiva. CIT stejně jako OTA má silné nefrotoxické účinky. V mnoha studiích bylo zjištěno, že hlavním orgánem, který je poškozen po vystavení tímto mykotoxinem, jsou ledviny. *In vitro* byla prokázána renální mitochondriální dysfunkce a biosyntéza makromolekul, která nakonec vede k buněčné smrti (Bamias & Boletis, 2008). S kontaminací CIT může souviset tvorba ROS v buňkách a pokles obsahu buněčného adenosintrifosfátu (ATP) (Magro *et al.* 2016). Studie *in vitro* a *in vivo* poskytly jasný důkaz o reprodukční toxicitě CIT, dále také o jeho teratogenních a embryotoxických účincích. Mimo tyto negativní vlastnosti ovlivňuje CIT funkci jater a gastrointestinálního traktu. Spolu s dalšími mykotoxiny včetně OTA se podílí na BEN. Dále CIT může působit synergicky s OTA a spolu mohou utlumit aktivitu syntézy RNA v ledvinové tkáni (Doughari 2015).

V roce 1986 IARC došel k závěru, že existují omezené důkazy o tom, že citrinin může mít karcinogenní účinky u zvířat při experimentálním podání. Avšak nebylo možné posoudit jeho karcinogenitu u lidí. CIT je zařazen do skupiny 3, což znamená, že není možné ho klasifikovat jako karcinogenní látku pro člověka (EFSA 2012). Studie, které posuzovaly karcinogenitu u zvířat *in vitro*, netrvaly dostatečně dlouho, aby s jistotou mohly být vyloučeny karcinogenní účinky CIT. Nelze tedy vyvodit žádný závěr ohledně potenciální karcinogenity citrininu z důvodu nedostatku vhodných dlouhodobých studií, avšak je nutno zmínit, že stále probíhají studie, které se tímto zabývají (Hatanaka *et al.* 1982; Arai & Hibino 1983).

Letální dávka (LD₅₀) u zkoumaných králíků byla stanovena na 20 mg/kg t.m. (tělesné hmotnosti), kdy v průběhu expozice byly pozorovány reakce na CIT, mezi které patřily slzení, nadměrné slinění a mírné histopatologické změny na ledvinách. Podávány byly i dávky od 50 do 75 mg/kg t. m., které potvrdily stejnou citlivost u králíků jako u testovaných morčat. U těch došlo při subkutánním podání (s. c.) CIT v koncentracích 50 až 100 mg/kg t. m. k úhynu, kdy patologie uhynulých zvířat zahrnovala nekrózu renálních tubulů, akutní myokarditidu a nekrózu žaludeční sliznice (Ambrose & DeEds 1946). U potkanů byla pozorována s. c. LD₅₀ při hodnotě 67 mg/kg tělesné váhy (Ambrose & DeEds 1946). Při podání 50 mg/kg t. m. intraperitoneálním podáním (i. p.) byla po 3 hodinách pozorována glukosurie a hematurie, po 48 hodinách byla pozorována nefróza (Jordan *et al.* 1978). V roce 1983 byly u testovaných králíků stanoveny hodnoty LD₅₀ na 50 mg/kg t. m. při i. p.

a při orálním podání byly hodnoty stanoveny na 134 mg/kg t. m. (Hanika *et al.* 1984).

Akutní letální toxicita CIT se pohybovala mezi 20 a 134 mg/kg t. m. v závislosti na druhu a způsobu podání. Orální podání je stanoveno na vyšší dávky než 100 mg/kg t. m. pro letalitu u myší a králíků, což ukazuje na omezenou perorální biologickou dostupnost CIT u těchto živočišných druhů (EFSA 2012).

2.3.1 Toxikokinetika

Posouzení rizika pro CIT není možné zcela určit kvůli nedostatku údajů o toxicitě a toxikokinetice. V toxikologických studiích se využívá prase jako nejvhodnější experimentální zvířecí model pro lidi díky podobnostem gastrointestinálního traktu, jater a ledvin (Swindle *et al.* 2012).

Ze studie Reddy *et al.* (1982) vyplývá, že je CIT eliminován z organismu převážně renální exkrecí. Uvedeno bylo přibližně 75 % i. p. dávky, která byla nalezena v moči po 24 hodinách. Hlavním metabolitem CIT v moči je dihydrocitrinon. Za nefrotoxicitu je však odpovědný CIT jako mateřská sloučenina, nikoli její metabolit.

Studie o toxikokinetice CIT u lidí uvádí poločas eliminace přibližně 9 hodin. Tato studie na lidech však byla provedena pouze u 2 dobrovolníků (Gerding *et al.* 2015). U kuřat byl poločas eliminace CIT významně kratší, a to mezi 2 a 5 hodinami. U prasat se eliminace CIT pohybovala mezi 17 a 26 hodinami (Meerpoel *et al.* 2020).

2.3.2 Nefrotoxicita

CIT je známý pro svou nefrotoxicitu, může stejně jako OTA poškodit ledviny. Mechanismus působení spočívá v inhibici syntézy proteinů, což vede k poškození buněk a jejich smrti. To může dále vést ke snížení funkce ledvin a v horších případech k chronickému selhání ledvin (EFSA 2012).

Nefrotoxické účinky CIT mohou být také ovlivněny interakcí CIT s jinými mykotoxiny, například s OTA. Bylo prokázáno, že společná expozice CIT a OTA je spojena se změnami renálních funkcí nebo s rozvojem renálních patologií (Kumar *et al.* 2007).

Jediná dávka i. p. 50 mg/kg t. m. CIT způsobila nefrózu u potkanů. Koncentrace glukózy v moči a krvi se během 48 hodin zvýšila na maximum (Jordan *et al.* 1978). V další studii, kdy bylo myším podáváno 200 mg/kg t. m. prostřednictvím krmiva, nedošlo ke vzniku renálních tumorů, ale pouze mírných renálních lézí (Kanisawa, 1984). Dávka 80 μ mol/kg CIT významně zvýšila hematokrit a rychlost vylučování bílkovin a glukózy. Naopak snížená rychlost byla zaznamenána u průtoku krve ledvinami a eliminace anorganického fosforu (Peraica & Rašić, 2009).

Ve studii Arai & Hibino (1983) byl potkanům podáván CIT po dobu 80 týdnů. Postupně byly pozorovány zvětšené ledviny s jemným zrnitým povrchem. Histopatologicky vykazovaly ledviny od prvního vyšetření výraznou dilataci proximálních stočených tubulů a intersticiální fibrózu v důsledku intersticiální nefritidy a také fokální hyperplazii renálních tubulů. Počínaje 40. týdnem vykazovali

potkání fokální hyperplazii tubulárního epitelu a malých adenomů. Masivní benigní adenomy se objevily po 60 týdnech v ledvinách (Arai & Hibino 1983).

Perorální dávka 120 mg/kg t. m. u králíků způsobila azotémii a metabolickou acidózu s hemokonztrací a hypokalémií během 4 až 12 hodin (Hanika *et al.* 1984). U králíků, kteří zvládli tyto koncentrace, byly dále podávány dávky 80 mg/kg a 100 mg/kg a byla pozorována zvýšená hladina kreatininu v moči. U mláďat králíků bylo prostřednictvím potravy podáváno 15 mg/kg CIT a byly pozorovány léze na výstelce proximálních stočených tubulů (Kumar *et al.* 2007).

2.3.3 Karcinogenita

Poznatky o potenciálních karcinogenních účincích CIT v biologických systémech jsou stále velmi nejasné. V 80týdenní studii z roku 1984 byl popsán vznik renálních adenomů u hlodavců (Kanisawa, 1984). Avšak přesto nebyly v této studii hlášeny žádné renální karcinomy ani jiné nádory. Na druhé straně Arai & Hibino (1983) zjistili počátek tvorby nádorů v ledvinách samců krysa po 80 týdnech expozice CIT.

Stále však nelze vyvodit žádný závěr ohledně potenciální karcinogenity citrulinu z důvodu nedostatku vhodných dlouhodobých studií.

2.3.4 Teratogenita

Studie *in vitro* a *in vivo* poskytly důkazy reprodukční toxicity, teratogenních a embryotoxických účinků CIT. Studie *in vivo* také poskytly jasné důkazy o vlivu toxicity na matku, včetně nefrotoxicity.

Studie Singh *et al.* (2008) potvrdila, že CIT indukuje teratogenitu u hlodavců. Avšak daná dávka vyvolala mateřskou toxicitu a rozsah expozice potomstva nebylo možné v této studii určit. Údaje o skutečné expozici navíc zůstávají neurčitě, protože všechny matky vykazovaly snížený příjem krmiva na různých úrovních. Asi 10 % všech plodů bylo retardováno s neúplnou osifikací lebky.

V další studii byla zkoumána kuřecí embrya, kdy bylo 1–10 µg CIT injikováno do inkubovaných vajec. Nejvýraznější změny byly pozorovány třetí den po expozici. Embrya vykazovala morfologické změny, mezi které patřily exencefalie, mikrooftalmie a rozštěp zobáku (Vesela *et al.* 1983).

Poměrně nedávné studie *in vitro* z roku 2007, kde pracovali s myšími embryonálními buňkami, ošetřili blastocysty CIT, které dále vykazovaly apoptózu a významně sníženou míru implantace (Chan & Shiao 2007). V dalších *in vitro* experimentech Chan (2008) pozoroval významné snížení rychlosti dozrávání oocytů, fertilizace a embryonálního vývoje.

Na reprodukčních orgánech samců proběhla studie v roce 2010, kdy myší samci dostávali i. p. dávky v rozsahu od 0,0625 do 6,25 mg/kg t. m. po dobu 7 dnů. Hodnoceny byly hmotnosti reprodukčních orgánů, kvalita spermatu, koncentrace testosteronu v séru a plodnost léčených myší. CIT ve všech dávkách významně zvýšil relativní hmotnost orgánů varlat, nadvarlat, semenného váčku a předkožky. Snížil se počet spermií a zvýšil se počet abnormálních spermií. Histologické vyšetření

odhalilo zvětšený průměr tubulu semeníku varlat. Dále se snížily koncentrace testosteronu u samců (Qingqing *et al.* 2012).

2.3.5 Imunotoxicita

Carlton *et al.* v roce 1974 zjistil v průzkumu na psech plemena beagle nesourodé změny v počtu leukocytů, tyto změny však mohly být spojené s dehydratací zvířat. U myší, kterým byla podávána i. p. 20 mg/kg t. m., bylo zjištěno celkové snížení počtu buněk kostní dřeni (Gupta *et al.* 1983). U křečků způsobil CIT mírnou nekrózu rozptýlených jednotlivých lymfocytů ve slezině a střevní submukóze (Jordan *et al.* 1978).

Jednotlivé perorální dávky CIT (50, 70 a 80 mg/kg t. m.) způsobily u krůt nekrózu lymfocytů v brzlíku a kloakální burze (Mehdi *et al.* 1983). U brzlíku se mírná až výrazná nekróza lymfocytů vyskytovala většinou v kortexu. Stejná distribuce lézí byla pozorována u 7denních kachňat léčených perorálně jedinou dávkou (30, 40 a 50 mg/kg t. m.) CIT a tato studie potvrdila cytotoxicitu citrininu vůči lymfocytům ve slezině *in vitro* (Mehdi *et al.* 1983).

2.3.6 Genotoxicita

Dostupné literární prameny ukazují, že CIT není mutagenní v konvenčních bakteriálních testech ani s metabolickou aktivací frakce S9 z jater či ledvin potkana a ani u člověka. V jedné studii však byla mutagenita CIT pozorována pomocí Amesova testu, kdy byly jako aktivační systémy použity potkaní hepatocyty. V buňkách *in vitro* CIT neindukoval jednovláčkové zlomy DNA ani oxidační poškození, ale způsobil aneuploidii a chromozomální aberace. V *in vivo* studiích na myších se projevoval CIT indukci chromozomálních abnormalit a hypoploidii v kostní dřeni (Jeswal 1996).

2.4 Výskyt CIT v potravinách

CIT byl izolován především v potravinách rostlinného původu. Kontaminuje především různé druhy obilovin, mezi něž patří kukuřice, pšenice, žito, rýže, ječmen, oves a další. Dále může kontaminovat výrobky z obilovin. Vyskytuje se v ovoci a ovocných šťávách (Dietrich *et al.* 1999), v jablkách, v olivách (olivové produkty), také kontaminuje rozinky (Meister 2003). Další studie kontrolovaly ořechy (mandle, arašíd, lískové ořechy, pistácie), olejnatá semena, například byl izolován ze slunečnicových semínek (Subrahmanyam & Rao 1974; Saxena & Mehrota 1990). Studie zabývající se kořením také potvrdily jeho výskyt v kurkumě, koriandru, fenyklu, černém pepři, kardamomu a v kmínu (Saxena & Mehrota 1990). Sýry mohou být také kontaminovány CIT (Bailly *et al.* 2002; Kamle *et al.* 2022). U obilovin je pravděpodobnější kontaminace, pokud nedojde k řádnému vysušení zrna, kde je vyšší vlhkost nad 16 %, je větší pravděpodobnost kontaminace. Optimální teplotní růst CIT se udává okolo 30 °C (Kamle *et al.* 2022).

CIT je během zpracování potravin nestabilní. Nízké hladiny CIT ve zpracovaných potravinách mohou vyplývat ze skutečnosti, že CIT je citlivý na teplo a během tepelné úpravy se rozkládá za vzniku dalších komplexních sloučenin, jako jsou CIT H₁ a CIT H₂, jejichž cytotoxicita je ve srovnání s původní mateřskou sloučeninou CIT vyšší u H₁ a nižší u H₂ (Malir *et al.* 2013).

V nařízení Komise (ES) č. 1881/2006 byla stanovena řada maximálních tolerancí vůči kontaminujícím látkám i látkám přirozeným pro rostliny v potravinářských komoditách. Stanovené maximální limity pro CIT jsou uvedeny v podkapitole 2.4.2.

2.4.1 Výskyt CIT v bylinách

Stejně jako pro OTA neexistuje ani pro CIT žádná legislativa, která by regulovala limity CIT v bylinách. Množství studií, které by se zabíraly touto problematikou, je opět málo, avšak i přesto se v některých studiích můžeme setkat s vysokými hladinami CIT ve farmaceuticky významných rostlinách.

Tab. 5: Celosvětový výskyt CIT v bylinách

Bylina (lat.)	Část rostliny (lat.)	Země	Rozsah koncentrace [µg/kg]	Reference
<i>Holarrhena antidysenterica</i>	<i>Granum</i>	Indie	80*	Roy & Chourasia 1990
<i>Arctium sp.</i>	<i>Radix</i>	Španělsko	25,8*	Santos <i>et al.</i> 2009
<i>Cynara scolymus</i>	<i>Flos</i>	Španělsko	29,8*	Santos <i>et al.</i> 2009
<i>Ginkgo biloba</i>	<i>Folium</i>	Španělsko	298,7– 354,8	Santos <i>et al.</i> 2009
<i>Lippia citriodora</i>	<i>Folium</i>	Španělsko	29,6–79,1	Santos <i>et al.</i> 2009
<i>Mentha sp.</i>	<i>Folium</i>	Španělsko	41,0–43,3	Santos <i>et al.</i> 2009
<i>Peumus boldus</i>	<i>Folium</i>	Španělsko	15,7–62,7	Santos <i>et al.</i> 2009
<i>Rhamnus frangula</i>	<i>Cortex</i>	Španělsko	26,7–38,4	Santos <i>et al.</i> 2009
<i>Taraxacum officinale</i>	<i>Herba</i>	Španělsko	21,6–96,0	Santos <i>et al.</i> 2009
<i>Thea sinensis</i>	<i>Folium</i>	Španělsko	18,0–22,3	Santos <i>et al.</i> 2009
<i>Verbena officinalis</i>	<i>Herba</i>	Španělsko	31,2*	Santos <i>et al.</i> 2009
<i>Acorus calamus</i>	<i>Rhizoma</i>	Indie	1208*	Koul & Sumbali 2010
<i>Bergenia ciliata</i>	<i>Rhizoma</i>	Indie	40–1220	Koul & Sumbali 2010
<i>Pueraria tuberosa</i>	<i>Radix</i>	Indie	10–230	Koul & Sumbali 2010
<i>Zingiber officinale</i>	<i>Rhizoma</i>	Indie	10–1120	Koul & Sumbali 2010
<i>Angelicae sinensis</i>	<i>Radix</i>	Čína	5,1*	Han <i>et al.</i> 2012
<i>Iridis tectori</i>	<i>Rhizoma</i>	Čína	0,8*	Han <i>et al.</i> 2012
<i>Rumicis japonici</i>	<i>Radix</i>	Čína	0,3*	Han <i>et al.</i> 2012
<i>Astragalus sp.</i>	<i>Radix</i>	Čína	0,8*	Han <i>et al.</i> 2012
<i>Ephedrae sp.</i>	<i>Herba</i>	Čína	8,5*	Han <i>et al.</i> 2012
<i>Codonopsis pilosula</i>	<i>Radix</i>	Čína	0,41–19	Chen <i>et al.</i> 2020
<i>Scutellaria baicalensis</i>	<i>Radix</i>	Čína	0,46–53	Chen <i>et al.</i> 2020
<i>Tremella fuciformis</i>	<i>Fruktus</i>	Čína	0,77–37	Chen <i>et al.</i> 2020

*výsledky jednotlivých měření

2.4.2 Legislativní regulace CIT v rámci EU

Maximální limity pro mykotoxin CIT jsou stanoveny pouze pro doplňky stravy na bázi červené fermentované rýže. Regulace je zajištěna nařízením Komise (EU) 2019/1901 ze dne 7. listopadu 2019, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, pokud jde o maximální limity citrininu v doplňcích stravy na bázi rýže fermentované červenými kvasnicemi *Monascus purpureus*.

Tab. 6: Legislativní regulace CIT v EU v potravinách (European Commission, 2019)

Potravina	Maximální limity $\mu\text{g}/\text{kg}$
Doplňky stravy na bázi rýže fermentované červenými kvasnicemi <i>Monascus purpureus</i>	100

3 Praktická část

3.1 Zkoumaný materiál

Farmaceuticky významné byliny mají dlouhou historii, rostlinné suroviny jsou široce používány v doplňcích a léčivech. Během pěstování, zpracování, skladování, distribuce a prodeje mohou být byliny stejně jako mnoho jiných zemědělských produktů kontaminovány různými mikroorganismy. Přísné zavádění správné zemědělské a správné výrobní praxe je nejlepším způsobem, jak minimalizovat riziko vnější kontaminace (Gajewska *et al.* 2022).

Různé mikroorganismy včetně nejen saprofytických mikrobů, ale i patogenních bakterií a toxigenních hub se mohou vyskytovat v bylinách ve vysokém počtu. Jejich přítomnost snižuje jejich kvalitu a zvyšuje obavy o veřejné zdraví. Patogenní plísňe kontaminují potravinářské komodity po celém světě a představují globální bezpečnostní riziko pro spotřebitele. Jejich výskyt a množství v bylinách se liší v závislosti na zeměpisné poloze a povětrnostních podmínkách. Zejména klima s tropickým teplem, vysokou vlhkostí vzduchu a dešťovými srážkami predisponuje k růstu hub a syntéze mykotoxinů. Dalším důležitým problémem je, zda má výrobní systém vliv na plísňovou infekci rostlinné suroviny a akumulaci mykotoxinů. V ekologické produkci jsou syntetická hnojiva a vstupy jako fungicidy, pesticidy a insekticidy zakázány. To vyvolává otázku, zda jsou ekologicky pěstované byliny a jiné potravinářské komodity více či méně náchylné ke kontaminaci plísněmi a syntéze mykotoxinů (Gajewska *et al.* 2022).

Pro stanovení koncentrace citrininu a ochratoxinu A byly použity vzorky 60 farmaceuticky významných bylin, které jsou běžně dostupné v obchodech. Před analýzou byly vzorky skladovány v původním balení v laboratorní teplotě v suchu a ve tmě. Pro stanovení koncentrace těchto dvou mykotoxinů byla použita metoda HPLC/FLD.

3.2 Princip metody HPLC-FLD

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, zkráceně HPLC – z originálu High Performance Liquid Chromatography, je velmi často používaná separační metoda, jejíž výhody spočívají v její vysoké účinnosti (výtěžnosti) a citlivosti, dobré opakovatelnosti a robustnosti (Xu *et al.* 2006).

Princip separace analytů je založen na dvou nemísitelných fázích: stacionární a mobilní. Obecným principem této metody je pohyb mobilní fáze přes stacionární, na níž je uložen analyt, jenž může být zdržován na stacionární fázi, a dochází k separaci jeho složek. Stacionární fázi mohou být např. silikagel, oxid hlinitý. Pro mobilní fázi se používají organická rozpouštědla, případně jejich směsi a voda (Skarkova 2011).

Ve vysokoúčinném kapalinovém chromatografu jsou vzorky odebírány dávkovacím ventilem do mobilní fáze, která nese složky vzorku na kolonu, kde dochází k separaci analytů dle fyzikálně-chemických vlastností. Když projde analyt separační kolonou, jsou detekovány v mobilní fázi v průtokové cele detektoru. Při

průchodu detektorem se složky rozpoznávají a kvantifikují na základě fluorescenčních vlastností (Skarkova 2011).

Výsledkem detekce je grafický záznam, takzvaný chromatogram, na němž se hodnotí plocha nebo výška píku. Dále se provádí odečet výsledků z kalibrační křivky.

Tato metoda se často používá v lékařství a farmaceutickém průmyslu pro analýzu léčiv, metabolitů a dalších organických sloučenin, protože mnoho z nich má fluorescenční vlastnosti, a lze je tedy spolehlivě identifikovat a kvantifikovat (EFSA 2012).

3.3 Extrakce a analýza OTA

3.3.1 Materiál

- Filtrační papíry KA-2M, papírny Pernštejn spol. s r.o. (Pernštejn, Česká republika);
- Injekční stříkačka (5 ml);
- Laboratorní sklo;
- Membránové filtry LUT Syringe Filters Nylon, 13 mm, 0,22 μm , pk/100, HPST s.r.o. (Praha, Česká republika), Labstore (Inverness, Highland, Spojené království);
- Imunoafinitní kolonky, Ochraprep®, Jemo Trading s.r.o., Bratislava, R-Biopharm (Darmstadt, Německo);
- Plastové centrifugační nádoby se šroubovacím uzávěrem (50 ml);
- Plastové nádoby se šroubovacím uzávěrem (100 ml);
- Špičky na pipety (200 μl , 1000 μl a 10 ml);
- Vialky (1,5; 4 ml).

3.3.2 Přístroje

- Analytická váha KERN EW1500-2, KERN & SOHN GmbH (Balingen, Německo), Fisher Scientific, spol. s r.o. (Pardubice, Česká republika).
- Automatická pipeta Gilson PIPETMAN, 100–1000 μl , Fisher Scientific, spol. s r.o. (Pardubice, Česká republika).
- Automatická pipeta Gilson PIPETMAN, 10–100 μl , Fisher Scientific, spol. s r.o. (Pardubice, Česká republika).
- Automatická pipeta Gilson PIPETMAN, 10–100 μl , Fisher Scientific, spol. s r.o. (Pardubice, Česká republika).
- Automatická pipeta Gilson PIPETMAN, 1–10 ml, Fisher Scientific, spol. s r.o. (Pardubice, Česká republika).
- Filtrační zařízení Morton fritta S3, průměr frity 40 mm, KAVALIERRGLASS, a. s., (Praha 5, Česká republika).
- Mlýn MAHLKÖNIG, Hemro Manufacturing Germany GmbH (Hamburg, Německo).
- Horkovzdušná sušárna.

- Chladnička.
- Kapalinový chromatograf v sestavě Agilent 1260 Infinity II spojený s 1260 Infinity II fluorescenčním detektorem, Agilent (Santa Clara, CA, USA), HPST s.r.o. (Praha, Česká republika).
- Mrazicí box.
- Třepačka, Reax Multi, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, Německo), Fisher Scientific, spol. s r.o. (Pardubice, Česká republika).
- Ultrazvuková lázeň FB15048, Fisher Scientific, spol. s r.o. (Pardubice, Česká republika).
- Zařízení pro odpařování pod dusíkem (tj. koncentrátor vzorků) EVATERM, Ing. V. Hanuš, (Brno, Česká republika).
- Zařízení pro řízený průtok imunoafinitní kolonkou Bakerbond, VWR (Stříbrná Skalice, Česká republika).

3.3.3 Chemikálie

Uvedené chemikálie byly používány v čistotě alespoň p. a. a pro potřeby HPLC se používají rozpouštědla v čistotě HPLC nebo LC-MS Gradient Great. Všechny chemikálie byly zakoupeny od společnosti VWR s. r. o (Stříbrná Skalice, Česká republika)

- Acetonitril (C_2H_3N);
- Metanol (CH_3OH);
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$);
- Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$);
- Hydrogenfosforečnan sodný (Na_2HPO_4);
- Chlorid sodný ($NaCl$);
- Kyselina chlorovodíková (HCl);
- Ledová kyselina octová (CH_3COOH);
- RBS-35, P-LAB a.s. (Praha, Česká republika);
- Standard OTA (*Petromyces albertensis*, $\geq 98\%$, HPLC);
- Ultračistá voda (dále voda) ze zařízení MicroPure UV-UF, $>18,2 M\Omega \cdot cm$ při 21 °C. (Fisher Scientific spol. s r.o. (Pardubice, Česká republika), Thermo Scientific (Pardubice, Česká republika).

3.3.4 Roztoky

- PBS pufr (0.62 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ + 5.73 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ + 9 g $NaCl$ do 1000 ml H_2O);
- Mobilní fáze: A (acetonitril: kys. octová; 99:1): B (kys. octová: voda; 99:1) v poměru 40 : 60;
- A : B v poměru 40 : 60;
- Okyselený metanol (metanol : kyselina octová v poměru 98 : 2);
- Pracovní roztok standardu 40 ng/ml

3.3.5 Programy a software

- Microsoft® Excel®, verze 2016, součást sady Microsoft 365®, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA.
- Microsoft® Word®, verze 2016, součást sady Microsoft 365®, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA.
- Software Agilent OpenLab data. (Santa Clara, CA, USA), HPST s.r.o. (Praha, Česká republika).

3.3.6 Příprava vzorků a analýza

Homogenizace vzorků

Vzorky byly skladovány ve tmě a v suchu a před homogenizací byly uchovány v jejich původním balení. V první fázi byly jednotlivé vzorky 60 bylin homogenizovány pomocí automatického mlýnu. Pro každou testovanou bylinu byla až 3 balení (min. 100 g) díky tomu, že se jedná o maloobchodní balení určená pro spotřebu uživateli v domácnosti. Konkrétní balení byla smíchána dohromady a vysypána na filtrační papír připravený v digestoři. Na filtrační papír byl nakreslen kříž, který měl symbolizovat 4 čtvrtiny filtračního papíru.

Před dalším krokem byla směs promíchána, tak aby se spojila balení konkrétní byliny dohromady. Již vzniklá směs se rovnoměrně umístila na střed a odebíral se z každé čtvrtiny vzorek, po odebrání se opět směs zamíchala a zarovнала na střed filtračního papíru. Proces se opakoval, dokud nebylo odebráno potřebné množství. Tomuto procesu se říká kvartace a běžně se využívá k získání reprezentativního vzorku ze sypké směsi.

V digestoři byla připravena váha s plastovou uzavíratelnou nádobou se šroubovacím víčkem. Do této nádoby byl při každém odebrání vzorku při kvartaci plastovou lžičkou vzorek navážen a kvartace probíhala, dokud nebylo naváženo 20 g vzorku. Nádoba byla označena číslem vzorku, dále zde bylo uvedeno datum homogenizace a navážené množství. Takto připravený vzorek byl dále vsypán do továrního mlýnku a byl namlet najemno. Vzorek byl opět vsypán do označené nádoby a pevně uzavřen, aby nedošlo k jeho znehodnocení, a byl uložen opět ve tmě a v suchu. Při následné homogenizaci dalšího vzorku byl prostor v digestoři uklizen, muselo dojít k výměně plastové lžičky a filtračního papíru z důvodu zabránit nežádoucí vzájemné kontaminaci mezi vzorky. Mlýnek byl před každým dalším použitím vyčištěn, aby se zabránilo mísení vzorku.

Příprava vzorků před analýzou

Před začátkem přípravy byly vyndány všechny roztoky z chladničky ven, tak aby došlo k vytemperování na laboratorní teplotu, stejně tomu tak bylo u imunoafinitních kolon. Do plastové zkumavky s kónickým dnem bylo odváženo 5 g vzorku, ke kterému bylo přidáno 20 ml roztoku 60% acetonitrilu. Pokud byl vzorek moc savý, muselo být přidáno celkem 40 ml. Vzorky byly vloženy do třepačky přímo v těchto nádobách a třepaly se po dobu pěti minut.

Vzorek byl dále filtrován pomocí filtrační aparatury, která byla připravena během třepání. Za pomoci vakua byl vzorek přefiltrován do Erlenmeyerovy baňky, z níž byl filtrát přelit do skleněné nádoby, aby se lépe odebíralo dané množství pomocí pipety. Pokud byl filtrát zakalen, byla provedena filtrace ještě jednou. Během filtrace bylo připraveno vakuové prosávací zařízení pro prosátí filtrátu kolonkou. Každá kolonka byla označena číslem podle vzorku. Z imunoafinitní kolonky byl vykapán pufr těsně nad filtr, tak aby nedošlo k jeho vyschnutí. Do zásobníku, který byl připojen na kolonku shora, byly napipetovány 4 ml filtrátu, které byly dále ředěny 44 ml PBS. Zředěný roztok byl dále velmi pomalu prokapán do odpadní nádoby. Regulace průtoku byla řízena pomocí vytvoření podtlaku. Po překapání celého objemu byly kolonky odvodněny prudkým a krátkým prosátím vzduchu.

Pro eluci bylo použito 1,5 ml okyseleného metanolu. Nejprve byl napipetován 1 ml, který byl překapán skrz kolonku do připravené a označené vialky. Extrakt ve vialce byl opět přelit do kolonky a byl překapán, tento proces se opakoval 4×. Při 5. opakování bylo napipetováno posledních 0,5 ml okyseleného metanolu do kolonky a opět byl překapán do vialky, kde bylo celkem tedy 1,5 ml eluátu. Po posledním překapání byla kolonka prosáta vzduchem do sucha.

Vialky byly přeneseny a vloženy do koncentrátoru vzorků EVATERM, kde došlo k odpaření obsahu pod proudem dusíku do sucha při teplotě 40 °C. Před uložením odparku byly vialky pořádně zkontrolovány, jestli se odpařil všechen eluát. Odparek byl uložen do chladničky při teplotě 4 °C, dokud nedošlo k jeho analýze.

Analýza vzorků OTA

Před zpracováním na HPLC/FLD byl odparek vzorku vzat z chladničky a byl vytemperován na laboratorní teplotu. Následně byl vzorek rozpuštěn v mobilní fázi (A : B), kdy byla použita třepačka, a dále byly vzorky dány do ultrazvukové vodní lázně. V neposlední řadě byl vzorek přefiltrován pomocí injekční stříkačky a membránového filtru do čisté a označené vialky se šroubovacím uzávěrem.

Takto připravené extrakty byly vloženy na HPLC/FLD s automatickým dávkovačem, který se nazývá autosampler.

3.3.7 Podmínky stanovení pro OTA

Pro správnou obsluhu kapalinového chromatografu je nutné dodržovat pokyny výrobce. Před zahájením analýzy musí být chromatografická aparatura spuštěna po takovou dobu, kdy kolonou proteče mobilní fáze o desetinásobku objemu kolony, aby došlo k ustálení podmínek v chromatografické koloně a detektoru, což se nazývá ekvilibrace. Podmínky pro HPLC/FLD jsou uvedeny v tab. 7.

Tab. 7: Podmínky stanovení OTA

Analytická kolona	Kinetex C18, 2.6 μm , 100 \AA , 50 \times 2,1 mm
Předkolona	Guard TM Phenomenex C18, 4 \times 2,0 mm
HPLC pumpa	Kvartérní pumpa G7104
Fluorescenční detektor	FLD G1364F: Excitační vlnová délka: 333 nm, emisní vlnová délka: 465 nm, zisk PMT 18, fluorescence attenuation 100 LU.
Mobilní fáze	A (acetonitril: kyselina octová 99 : 1) : B (voda : kyselina octová 99 : 1) 40 : 60
Průtok	0,2 ml/min.
Teplota kolony	30°C
Systém kontroly dat	Agilent OpenLab data
Dávkovač	Dávkovač G7129C.
Objem nástřiku	8 μl

3.4 Kalibrace

3.4.1 Kalibrační křivka

Pro sestavení šestibodové kalibrační řady byly použity koncentrace OTA 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 ng/ml v mobilní fázi a byly připraveny každý den při začátku práce z pracovního standardu OTA.

3.4.2 Slepý vzorek

Slepý vzorek neboli blank je vzorek, který se používá jako kontrola experimentu nebo analýzy, jenž slouží k určení nežádoucího faktoru (nesprávná kalibrace přístroje, nevhodný způsob manipulace s materiálem a další).

3.5 Validované parametry pro OTA

3.5.1 Opakovatelnost retenčního času

Retenční čas OTA v daném chromatografickém systému byl stanoven na $5,5 \pm 0,35$ min.

3.5.2 Linearita

V kontextu analýzy dat je linearita vztah mezi dvěma proměnnými, kde se jedna proměnná mění v závislosti na změně druhé proměnné v přímé úměře. Při validaci analytických metod se lineární vztah obvykle testuje pomocí srovnání experimentálních dat s lineární regresní křivkou, která by měla být získána při postupné změně vstupu o stejnou velikost. Pokud data vykazují lineární vztah, může být použita lineární křivka pro stanovení neznámé koncentrace vzorku. Při validaci metody se obvykle testuje lineární vztah a stanovuje se lineární rozsah kalibrační

křivky, aby bylo zajištěno, že výsledky jsou přesné a spolehlivé (Van Loco *et al.* 2002).

Pro hodnocení linearity se běžně využívá korelační koeficient. Nicméně korelační koeficient R^2 spíše měří stupeň korelace, než linearitu, protože to závisí na rozložení bodů na přímce. Pokud je korelační koeficient velmi blízký jednému bodu, může dojít k zakřivení přímky. Existují tedy jiné testy, které jsou vhodnější pro posouzení linearity (Van Loco *et al.*, 2002).

Byl tedy ještě použit QC koeficient, který spíše určuje linearitu. „QC koeficient se používá v kombinaci s korelačním koeficientem a linearita se obecně považuje za prokázanou, když $R^2 > 0,99$ a $QC < 5 \%$ “ (Van Loco *et al.* 2002).

Při validaci OTA byl korelační koeficient $R^2 = 0,999 \%$ a $QC = 2,478 \%$, kdy stanovený maximální QC koeficient byl 3% (běžně se udává 5%). Lze předpokládat, že kalibrační křivka byla tedy lineární.

3.5.3 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Metodou dle IUPAC byla mez detekce neboli LOD (Limit of detection) stanovena na $0,03 \text{ ng/g}$ a mez stanovitelnosti neboli LOQ (Limit of quantification) byla stanovena na $0,1 \text{ ng/g}$. Dle IUPAC se LOD rovná $\frac{3 * \sigma}{m}$ a LOQ se rovná $\frac{10 * \sigma}{m}$, kde σ = směrodatná odchylka při desetinásobném měření nejnižšího standardu a m = směrnice kalibrační přímky.

3.5.4 Opakovatelnost stanovení

Relativní směrodatná odchylka (RSD) měření byla stanovena na $2,29 \%$.

3.5.5 Výtěžnost metody

Výtěžnost metody byla stanovena pomocí spikovaných vzorků o koncentraci 4 ng/g ve třech opakováních. Spikované byly vzorky, u kterých nebyla v předchozí analýze zjištěna žádná koncentrace OTA. Pro výpočet byl použit vzorec $RE (\%) = \frac{A}{B} \times 100$, kdy A = obohacený vzorek matrice, extrahovaný poté, B = extrahovaný vzorek obohacený matricí (Matuszewski *et al.*, 2003). Výtěžnost metody byla stanovena na $88,3 \%$.

3.5.6 Způsob zapisování primárních dat

Data byla získána pomocí softwaru Agilent OpenLab a následně zpracována v Microsoft Excel verze 2016.

3.6 Výsledky OTA

Z 60 vzorků testovaných na OTA bylo pozitivních 24 vzorků (nad LOQ > 0,1 ng/g). Minimální koncentrace, která byla zaznamenána, je 0,13 ng/g u natě maralu (*Maral leuzea*) a nejvyšší u natě vlaštovičnicku většího (*Chelidonium majus*) 826,6 ng/g.

Tab. 8: Koncentrace OTA ve vzorcích bylin

Číslo vzorku	Český název	Latinský název	Koncentrace [ng/g]
9	Devětsil lékařský	<i>Petasides hybridus radix</i>	2,06
10	Divizna velkokvětá	<i>Verbascum densiflorum flos</i>	0,14
13	Eukalyptus	<i>Eucalypti folium</i>	0,23
14	Jinan dvouláložný	<i>Ginkgo biloba folium</i>	2,05
18	Chmel otáčivý	<i>Strobilus lupuli</i>	1,25
24	Kontryhel žlutozelený	<i>Alchemilla xanthochlora herba</i>	8,72
30	Lopuch větší	<i>Artium lappa radix</i>	52,86
31	Ostružník maliník	<i>Rubi idaei folium</i>	0,33
32	Maral (Parcha saflorová)	<i>Maral leuzea herba</i>	0,13
35	Mařinka (Svízel vonný)	<i>Galium odoratum herba</i>	0,39
37	Mochna nátržník	<i>Potentilla erecta radix</i>	2,89
40	Ostropěstřec mariánský	<i>Silybum marianum fructus</i>	12,73
41	Ostružník křovitý	<i>Rubi fruticosi folium</i>	0,18
42	Pampeliška lékařská	<i>Taraxaci officinalis radix</i>	1,93
45	Pohanka obecná	<i>Fagopyrum saggitatum herba</i>	1,05
47	Prvosěnka jarní	<i>Primula veris flos</i>	649,08
48	Pupava bezlodyžná	<i>Carlina acaulis radix</i>	2,05
50	Řebříček obecný	<i>Achillea millefolium flos</i>	0,17
51	Řepík lékařský	<i>Agrimonia eupatoria herba</i>	1,31
53	Sléz maurský	<i>Malva sylvestris flos</i>	0,81
54	Světlík lékařský	<i>Euphrasia officinalis folium</i>	0,15
55	Svízel syřišťový	<i>Galium verum herba</i>	0,54
58	Vlaštovičník větší	<i>Chelidonium majus herba</i>	826,62
60	Zeměžluč menší	<i>Centaurium minus herba</i>	2,16

3.7 Extrakce a analýza CIT

3.7.1 Materiál

- Imunoafinitní kolonky, EASI-EXTRACT® CITRININ, Jemo Trading s.r.o., Bratislava, R-Biopharm (Darmstadt, Německo)

Další použitý materiál viz. podkapitola 3.3.1.

3.7.2 Přístroje

Využité přístroje viz. podkapitola 3.3.2.

3.7.3 Chemikálie

Uvedené chemikálie byly používány v čistotě alespoň p. a. a pro potřeby HPLC se používají rozpouštědla v čistotě HPLC nebo LC-MS Gradient Great. Všechny chemikálie byly zakoupeny od společnosti VWR s.r.o. (Stříbrná Skalice, Česká republika)

- Kys. fosforečná;
- Acetonitril;
- Hydroxid sodný;
- Kys. octová;
- Metanol (CH₃OH);
- Tween 20;
- RBS-35, P-LAB a.s. (Praha, Česká republika);
- Standard CIT.

Ultračistá voda (dále voda) ze zařízení MicroPure UV-UF, >18,2 MΩ·cm při 21 °C (Fisher Scientific spol. s r.o. – Pardubice, Česká republika), Thermo Scientific (Praha, Česká republika).

3.7.4 Roztoky

- PBS pufr (1,16 g NaHPO₄ + 0,2 KH₂PO₄ + 0,2 KCl + 8 g NaCl do 1000 ml H₂O);
- Mobilní fáze: 10 mM kys. fosforečná (pH 2,5) + acetonitril (50 : 50 v/v);
- 75% metanol (metanol + voda);
- 0,1% Tween v 10 mM kys. fosforečné (0,5 ml Tween 20 + 500 ml H₃PO₄; pH 7,4);
- Kalibrační řada (75 µl pracovního roztoku CIT standardu + 75 µl vody + 1350 µl metanol:voda ; 50 : 50);
- 10 mM kys. fosforečná (1,368 ml H₃PO₄ + voda; doplněné do 2 l; pH 2,5);
- Standard CIT (zásobní: 5000 µl/250 ml metanol = 20 µl/ml; pracovní: 1 ml zásobního roztoku + 124 ml metanolu = 125 ml → 160 µg/ml).

3.7.5 Programy a software

- Microsoft® Excel®, verze 2016, součást sady Microsoft 365®, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA.
- Microsoft® Word®, verze 2016, součást sady Microsoft 365®, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA.
- Software Agilent OpenLab data (Santa Clara, CA, USA), HPST s.r.o. (Praha, Česká republika).

3.7.6 Příprava vzorků a analýza CIT

Homogenizace

Homogenizace proběhla stejně jako u postupu při analýze OTA.

Příprava vzorků před analýzou

Opět byly před začátkem přípravy vyndané všechny roztoky z chladničky ven, aby se vytemperovaly na laboratorní teplotu, stejně je tomu tak u imunoafinitních kolonek. Do plastové zkumavky s kónickým dnem bylo odváženo 5 g vzorku, ke kterému bylo přidáno 25 ml roztoku 75% metanolu. Vzorky byly vloženy přímo v těchto nádobách do třepačky po dobu 15 minut.

Vzorek byl dále filtrován pomocí filtrační aparatury. Filtrace proběhla obdobně jako u přípravy vzorků pro analýzu OTA, tedy za pomoci vakua byl vzorek přefiltrován do Erlenmeyerovy baňky, z níž byl filtrát přelit do skleněné nádoby, aby se lépe odebíralo dané množství pomocí pipety. Pokud byl filtrát zakalen, byla provedena filtrace ještě jednou. Během filtrace bylo připraveno vakuové prosávací zařízení pro prosátí filtrátu kolonkou. Každá kolonka byla označena číslem vzorku. Z imunoafinitní kolonky byl vykapán pufr těsně nad filtr, aby nedošlo k jeho vyschnutí. Do zásobníku, který byl připojen na kolonku shora, bylo napipetováno 5 ml filtrátu, který byl zředěn 20 ml PBS. Zředěný roztok byl dále nechán velmi pomalu prokapat do odpadní nádoby. Regulace průtoku byla řízena pomocí vytvořeného podtlaku. Po překapání celého objemu byly kolonky odvodněny prudkým a krátkým prosátím vzduchu.

Pro promytí kolonek bylo použito 10 ml 0,1% Tweenu, dále bylo přidáno 10 ml 10mM kyseliny fosforečné (pH 7,4). Každý roztok byl zvlášť prokapán přes kolonky.

Pro eluci byl použit 100% metanol v množství 1 ml, který byl prokapán do připravených a označených vialek. Dále byl použit 1 ml vody, který byl opět prokapán do stejných vialek a kolonky byly odvodněny prudkým prosátím vzduchu.

Vialky byly přeneseny a vloženy do koncentrátoru vzorků EVATERM, kde došlo k odpaření obsahu pod proudem dusíku do sucha při teplotě 40 °C. Před uložením odparek byly vialky pořádně zkontrolovány, jestli se odpařil veškerý eluát. Odparek byl uložen do chladničky při teplotě 4 °C, dokud nedošlo k jeho analýze.

Analýza vzorků CIT

V souladu se standardním postupem bylo provedeno stanovení obsahu CIT ve vzorcích farmaceuticky významných bylin.

Před zpracováním na HPLC/FLD byl odparek vzorku vyjmut z chladničky a nechal se temperovat na laboratorní teplotu ($21 \pm 0,5$). Následně byl vzorek rozpuštěn v 1 ml patřičné mobilní fáze a umístěn na třepačku po dobu 5 minut, dále byly vzorky vloženy do ultrazvukové vodní lázně. V neposlední řadě byl vzorek přefiltrován pomocí injekční stříkačky a membránového filtru do čisté a označené vialky se šroubovacím uzávěrem. Takto připravené extrakty byly vloženy do autosempleru HPLC/FLD.

3.7.7 Podmínky stanovení pro CIT

Tab. 9: Podmínky stanovení CIT

Analytická kolona	ARION® Plus, C18, 3,0 µm, 150 mm, I.D. 4,6 mm
HPLC pumpa	Kvartérní pumpa G7104
Fluorescenční detektor	FLD G1364F: Excitační vlnová délka: 330 nm, emisní vlnová délka: 500 nm, zisk PMT 18, fluorescence attenuation 100 LU.
Mobilní fáze	10 mM kys. fosforečná (pH 2,5) : Acetonitril (50 : 50 v/v)
Průtok	1,0 ml/min.
Teplota kolony	40 °C
Systém kontroly dat	Agilent OpenLab data
Dávkovač	Dávkovač G7129C.
Objem nástřiku	100 µl

3.8 Kalibrace

3.8.1 Kalibrační křivka

Pro sestavení šestibodové kalibrační řady byly použity koncentrace CIT 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 ng/ml v mobilní fázi a byly připraveny každý den při začátku práce z pracovního standardu CIT.

3.8.2 Slepý vzorek

Slepý vzorek neboli blank je vzorek, který se používá jako kontrola experimentu nebo analýzy, jenž zajišťuje správnost měření. Zde byl použit 50% methanol.

3.9 Validované parametry pro CIT

3.9.1 Opakovatelnost retenčního času

Retenční čas OTA v daném chromatografickém systému byl stanoven na $5,48 \pm 0,08$ min.

3.9.2 Linearita

Při validaci CIT byl korelační koeficient $R^2 = 0,999$ % a QC = 1,497 %, kdy stanovený maximální QC koeficient byl 3 % (běžně se udává 5 %). Lze předpokládat, že kalibrační křivka byla tedy lineární.

3.9.3 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Podle metody IUPAC byla mez detekce neboli LOD (Limit of detection) stanovena na 0,08 ng/g a mez stanovitelnosti neboli LOQ (Limit of quantification) byla stanovena na 0,25 ng/g. Dle metody IUPAC se LOD rovná $\frac{3 * \sigma}{m}$ a LOQ se rovná $\frac{10 * \sigma}{m}$, kde

σ = směrodatná odchylka při desetinásobném měření nejnižšího standardu
a m = směrnice kalibrační přímky.

3.9.4 Opakovatelnost stanovení

Relativní směrodatná odchylka (RSD) měření byla stanovena na 1,22 %.

3.9.5 Výtěžnost metody

Výtěžnost metody byla stanovena pomocí spikovaných vzorků o koncentraci 4 ng/g ve třech opakováních. Spikované byly vzorky, u kterých nebyla v předchozí analýze zjištěna minimální koncentrace CIT (bedrník). Pro výpočet byl použit vzorec RE (%) = $\frac{A}{B} \times 100$, kdy A = obohacený vzorek matrice extrahovaný poté, B = extrahovaný vzorek obohacený matricí (Matuszewski *et al.* 2003). Výtěžnost metody byla stanovena na 89,5 %.

3.9.6 Způsob zapisování primárních dat

Data byla získána pomocí softwaru Agilent OpenLab a následně zpracována v Microsoft Excel verze 2016.

3.10 Výsledky CIT

Z 60 vzorků testovaných na CIT bylo pozitivních 17 vzorků (nad LOQ > 0,25 ng/g). Minimální pozitivní koncentrace, která byla zaznamenána je 0,255 ng/g u natě mateřídoušky obecné (*Thymus serpyllum*) a nejvyšší u prvosenky jarní (*Primula veris*) 472,79 ng/g.

Tab. 10: Koncentrace CIT ve vzorcích bylin

Číslo vzorku	Český název	Latinský název	Koncentrace [ng/g]
1	Andělíka čínská (Děhel čínský)	<i>Angelica sinensis radix</i>	0,62
4	Borůvka (brusnice borůvka)	<i>Vaccinium myrtillus herba</i>	1,68
5	Brusinka (brusnice brusinka)	<i>Vaccinium vitis-idaea folium</i>	0,39
9	Devětsil lékařský	<i>Petasides hybridus radix</i>	0,35
10	Divizna velkokvětá	<i>Verbascum densiflorum flos</i>	0,3
16	Hluchavka bílá	<i>Lamium album herba</i>	0,54
19	Jablečník obecný	<i>Marrubium vulgare herba</i>	4,69
32	Maral (Parcha saflorová)	<i>Maral leuzea herba</i>	0,26
34	Mateřídouška obecná	<i>Thymus serpyllum herba</i>	0,26
42	Pampeliška lékařská	<i>Taraxaci officinalis radix</i>	0,4
43	Pelyněk pravý	<i>Artemisia absinthium herba</i>	0,28
46	Proskurník	<i>Althaeae folium cons.</i>	0,3
47	Prvosenka jarní	<i>Primula veris flos</i>	472,79
56	Šípek (Růže šípková)	<i>Cynosbati fruscus (Rosa canina)</i>	0,56
58	Vlaštovičník větší	<i>Chelidonium majus herba</i>	69,68
59	Yzop lékařský	<i>Hyssopi officinalis herba</i>	3,09
60	Zeměžluč menší	<i>Centaurium minus herba</i>	0,44

4 Diskuze

V současnosti je stále málo studií, které by se zabývaly mykotoxiny ve farmaceuticky významných bylinách. Porovnání výsledků z jiných studií a výsledků z této diplomové práce je velmi omezeno. Avšak cílem této práce byla mimo jiné také analýza dalších bylin, které nejsou často, nebo ještě vůbec nebyly analyzovány na mykotoxiny. Mnoho studií se také věnuje spíše analýze toxigenních hub než jejich sekundárními metabolity, což vede pouze k dohadům, zda dané vzorky byly kontaminovány mykotoxiny.

Příkladem studie, která se zabývala výskytem mykotoxinů v bylinách, je studie z Japonska, ve které bylo analyzováno 49 vzorků bylin ve formě prášku na výskyt aflatoxinů (AFL) a OTA, avšak v žádném vzorku nebyl OTA detekován (Hitokoto *et al.* 1978).

V roce 1990 proběhla studie, která se zabývala výskytem mykotoxinů ve farmaceuticky významných bylinách. Výsledky vyšetření vzorků bylin ukázalo velké množství producentů mykotoxinů, mezi které patřily *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus* nebo *Penicillium citrinum*. Izoláty byly dále testovány na přítomnost mykotoxinů, kdy izolováno bylo deset vzorků z různých bylin. Nejčastěji se vyskytujícím mykotoxin byl aflatoxin B₁ (AFL B₁), a to v poměrně vysokých koncentracích (170–670 mg/kg). Jednou z rostlin, které byla testována, je řebříček obecný (*Achillea millefolium*) (Roy & Chourasia, 1990). Mezi vzorky testovaných bylin patřily *Glycyrrhiza glabra* (lékořice lysá), která se používá jako expektorans, nebo diuretikum, *Holarrhena antidysenterica*. Jeho koncentrace byla 50 µg/kg. Dále byl zjištěn v *Holarrhena antidysenterica*, také v *Strychnos nux-vomica*. Tyto byliny obsahovaly koncentrace OTA od 50 do 100 µg/kg a CIT v koncentracích 80 µg/kg (Roy & Chourasia, 1990). Avšak ani jedna z uvedených bylin nebyla analyzována v této diplomové práci.

Ve studii z roku 1998 bylo zkoumáno 11 vzorků bylin, mezi něž byl zařazen například list proskurníku lékařského (*Althaea officinalis*), list meduňky lékařské (*Melissa officinalis*), nať řebříčku obecného (*Achillea millefolium*), avšak ani u jednoho vzorku nebyl OTA ani CIT detekován (Halt 1998). V porovnání s výsledky z této práce, kdy vzorek listu proskurníku obsahoval CIT v koncentraci 0,296 µg/kg a OTA nebyl detekován, nať meduňky neobsahovala CIT ani OTA, v květu řebříčku byl OTA nalezen v koncentraci 0,166 µg/kg, zatímco CIT nebyl detekován.

Ve studii Santos *et al.* (2009) proběhla analýza 84 vzorků farmaceuticky významných nebo aromatických bylin pomocí analytické metody ELISA. Vzorky byly zakoupeny v maloobchodech ve Španělsku. Studie probíhala na více mykotoxinech. Všechny vzorky byly kontaminovány.

Kontaminace OTA byla prokázána u *Salvia officinalis* (šalvěj lékařská) od 1,1 do 17,3 µg/kg, dále byly také kontaminovány listy černého čaje (*Thea sinensis*), nať rebarbory (*Rheum officinalis*), listy máty peprné (*Mentha piperita*), listy jinanu (*Ginkgo biloba*) a listy boldovníku (*Peumus boldus*). Nejvyšší koncentrace OTA byly u šalvěje 17,3 µg/kg. LOD v této studii bylo stanoveno u OTA na 0,025 a u CIT na 16,5 µg/kg (Santos *et al.* 2009).

Porovnat výsledky ze studie Santos *et al.* (2009) a z této diplomové práce lze u několik analyzovaných bylin. Prvním společným druhem rostliny, který byl analyzován, je list eukalyptu (*Eucalypti sp.*), avšak žádné koncentrace OTA ani CIT nebyly zaznamenány. Oproti tomu v této diplomové práci byla u OTA naměřena koncentrace 2,1 µg/kg, avšak u CIT byly koncentrace zanedbatelné. Ve vzorku listů jinanu dvoulaločného (*Ginkgo biloba*) se vyskytly koncentrace CIT od 298,7 do 354,8 µg/kg, kdy kontaminace byla spolu s OTA, AFL B₁, zearalenonem (ZEN), T-2 toxinem a deoxynivalenolem (DON). Koncentrace OTA se pohybovaly od 0,8–1,1 µg/kg. V porovnání s našimi výsledky byly koncentrace CIT zanedbatelné a výsledky OTA u nás byly vyšší a pohybovaly se okolo 2,1 µg/kg. Další bylinou byl bedrník obecný (*Pimpinella saxifraga*), kdy v této studii nebyly koncentrace OTA ani CIT zaznamenány, také v naší analýze byly koncentrace zanedbatelné. Ve vzorku jitrocele kopinatého (*Plantago lanceolata*) se pohybovaly koncentrace OTA i CIT pod LOD. V naší studii nebyl CIT ani OTA zaznamenán. OTA ani CIT nebyly detekovány ani ve vzorku květu bezu černého (*Sambucus nigra*), stejné zjištění bylo u našeho vzorku. Vysoké koncentrace CIT byly u natě pampelišky lékařské (*Taraxacum officinale*) 21,6–96,0 µg/kg, v porovnání s našimi výsledky z kořene byla tato hodnota podstatně vyšší. CIT ve vzorku kořene *T. officinale* byl v koncentraci 0,4 µg/kg. Oproti tomu hodnoty OTA se v této studii pohybovaly od LOD pod 10,6 µg/kg a v naší práci byly hodnoty OTA 1,9 µg/kg. Vliv na kontaminaci mykotoxinem a jeho výsledné koncentrace může mít i studie různé části rostliny. Analýza vzorků květu lípy malolisté (*Tilia cordata*) neprokázala přítomnost těchto dvou mykotoxinů. Avšak naše analýza u vzorku květu lípy obecné (*Tilia vulgaris*) objevila koncentrace CIT 0,2 µg/kg a OTA okolo 0,1 µg/kg. Dále se studie analyzovala na nať kopřivy dvoudomé (*Urtica dioica*), avšak ve vzorku nebyl CIT ani OTA přítomen, zatímco v naší studii byl CIT detekován pod LOD a OTA v zanedbatelných koncentracích. Ve vzorku kořene kozlíku lékařského (*Valeriana officinalis*) byly koncentrace CIT 25,5 µg/kg a OTA od 0,8 do 1,8 µg/kg. Oproti tomu v našem vzorku CIT nebyl zaznamenán a OTA byl v hodnotách pod LOD. Dále lze porovnat vzorky semen ostropestřce mariánského, kdy se jeho koncentrace v této španělské studii pohybovaly pod LOD pro CIT i OTA. Oproti tomu v této diplomové práci byly koncentrace CIT zanedbatelné, ale OTA byl analyzován v 12,7 µg/kg. Ve vzorcích meduňky lékařské (*Melissa officinalis*) nebyly detekovány tyto dva mykotoxiny ani v jedné z těchto studií (Santos *et al.* 2009).

Dále byly zkoumány oddenky a kořeny bylin v Číně. Bylo zkoumáno 23 vzorků a 4 z nich byly kontaminovány CIT v koncentracích od 0,3 do 5,1 µg/kg. Kontaminace byla spolu s AFB₁, AFB₂, AFM₁ a dalšími mykotoxiny. Nejvyšší koncentrace CIT

5,1 µg/kg byla analyzována ze vzorku anděliky čínské (*Angelica sinensis*), v porovnání s výsledky z této práce jsou koncentrace nižší, 0,6 µg/kg (Han *et al.* 2012).

Ve studii Martínez-Dominquez *et al.* (2015) byly identifikovány a kvantifikovány toxické látky včetně mykotoxinů. Studie proběhla na jinanu dvoulaločném, a to pomocí metody LC/MS, avšak mykotoxiny CIT ani OTA nebyly ve vzorcích nalezeny.

Ve studii Veprikova *et al.* (2015) bylo zkoumáno 28 vzorků doplňků stravy na bázi bylin (např. zelený ječmen, goji, magnólie, kopřiva a další), dále 32 doplňků stravy na bázi ostropestřce mariánského, určených k léčbě a prevenci onemocnění jater, a 9 vzorků bylin určených ke snížení menopauzálních účinků (Veprikova *et al.*, 2015). Porovnání výsledků ale není možné, jelikož nebyly zkoumané samotné matrice bylin, ale výrobky na jejich bázi.

Studie Chen *et al.* (2019) z Číny, která se zabývala výskytem mykotoxinů ve farmaceuticky významných bylinách, objevila poměrně vysoké koncentrace OTA, avšak ani jedna studovaná bylina se neshodovala s bylinami zkoumanými v této diplomové práci (Chen *et al.* 2019).

Ve studii Pallarés *et al.* (2022) proběhl výzkum na 85 vzorcích bylin ve formě kapsulí. Kontrolováno bylo několik mykotoxinů včetně OTA pomocí analytické metody LC-MS/MS-IT (kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotností spektrometrií se záchytem iontů). Ani v jednom vzorku nebyl OTA potvrzen.

Závěr

V této diplomové práci bylo analyzováno 60 vzorků různých farmaceuticky významných bylin, které si může konzument běžně koupit v obchodu s potravinami. Analyzovány byly dva mykotoxiny – ochratoxin A a citrinin. Analýza vzorků proběhla pomocí metody HPLC/FLD, kdy výtěžnost u OTA byla 88,3 % a u CIT 89,5 %.

Diplomová práce je rozdělena do čtyř částí, kdy v prvních dvou je rozebírána teorie o OTA a CIT. Podkapitoly se zabývají chemickými a fyzikálními vlastnostmi těchto dvou mykotoxinů, jejich producenty, toxickými vlastnostmi a výskytem v potravinách se zaměřením na kontaminaci farmaceuticky významných bylin. Mezi hlavní producenty byly u OTA uvedeny rody *Aspergillus* a *Penicillium*. CIT produkují převážně druhy z rodů *Penicillium* a *Monascus*. Studie obou mykotoxinů dokazuje jejich nefrotoxicitu a spoluúčast na onemocnění BEN.

V druhé polovině práce jsou zhodnoceny výsledky praktické části, kde jsou uvedeny výsledky z analýzy obou mykotoxinů. Z 60 vzorků bylo na OTA (nad LOD) 24 pozitivních a na CIT bylo pozitivních 17 vzorků. Hodnoty OTA se pohybovaly od 0,13 do 826,6 ng/g a koncentrace CIT od 0,26 do 472,79 ng/g. Největší hodnoty u obou mykotoxinů byly detekovány u vzorků natě prvosenky jarní a vlašovičnicku většního. Dále byly výsledky z této diplomové práce porovnávány z výsledky analýz z jiných studií, které se také zabývaly touto problematikou. Studií, jež by se zabývaly stanovením OTA a CIT v farmaceuticky významných rostlinách je velmi málo, přestože v nich byly analyzovány vysoké koncentrace obou těchto mykotoxinů. Výsledky nelze přímo porovnávat nejen kvůli počtu studií, ale protože byly často analyzovány různé druhy rostlin, včetně bylinných směsí nebo kapslí. Mnoho studií se také věnuje spíše analýze toxigenních hub než jejich sekundárním metabolitům.

Druhým cílem po zjištění koncentrací v matricích rostlin byla příprava nálevů těchto rostlin, avšak výsledky byly nehodnotitelné. Nejsou proto uváděny žádné závěry z těchto analýz.

Rostliny klasifikované jako farmaceuticky významné by měly být pečlivě skladovány a kontrolovány na přítomnost mykotoxinů, aby byli chráněni spotřebitelé, kteří tyto produkty používají ke zlepšení svého zdraví. Kvalita a bezpečnost rostlinných produktů také úzce souvisí s dodržováním zásad správné zemědělské praxe v každé fázi výroby.

Míra intoxikace je závislá na množství přívodu byliny konzumentem. Doporučené množství závisí na konkrétním druhu byliny, proto by měly být limity zvažovány individuálně. Avšak průměrná spotřeba bylin a výrobků z nich je nízká, proto denní přívod mykotoxinů bude rovněž velmi nízký, a to i s ohledem na nestabilitu mykotoxinů při vyšších teplotách. Důvěra spotřebitelů v produkty však vyžaduje absenci toxinů, jimž se lze vyhnout. Jejich přítomnost v rostlinných produktech by měla být využita jako podnět ke zlepšení kvality a bezpečnosti potravin provedením dalších studií o přítomnosti mykotoxinů v těchto produktech.

Seznam literatury

AHMAD, B., ASHIQ, S., HUSSAIN, A., BASHIR, S. & HUSSAIN, M. Evaluation of mycotoxins, mycobiota, and toxigenic fungi in selected medicinal plants of Khyber Pakhtunkhwa. *Pakistan. Fungal Biology*. 2014; **118**(9-10): 776–784.

AMBROSE, A.M. & DEEDS, F. Acute and subacute toxicity of pure citrinin. *Experimental Biology and Medicine*. 1946; **59**(2): 289-91

ALBASSAM, M.A., YONG, S.I., BHATNAGAR, R., SHARMA, A.K. & PRIOR, M.G. Histopathologic and electron microscopic studies on the acute toxicity of ochratoxin A in rats. *Veterinary Pathology*. 1987; **424**: 427–435.

ALSHANNAQ, A. & YU, J. H. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *Int J Environ Res Public Health*. 2017; **14**: 632.

ARAI, M. & HIBINO, T. Tumorigenicity of citrinin in male F344 rats. *Cancer Letters*. 1983; **17**: 281-287.

ARROYO-MANZANARES, N., GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. & GÁMIZ-GRACIA, L. Multiclass mycotoxin analysis in *Silybum marianum* by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a procedure based on QuEChERS and dispersive liquid–liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*. 2013; **1282**: 11–19.

BAILLY, J.D., QUERIN, A., LE BARS-BAILLY, S., BENARD, G. & GUERRE, P. Citrinin production and stability in cheese. *J. Food Prot.* 2002; **65**: 1317–1321.

BETINA, V. Mykotoxíny: Chémia - Biológia - Ekológia. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1990.

BLANC, P. J., LORET, M. O., & GOMA, G. Production of citrinin by various species of *Monascus*. *Biotechnology Letters*. 1995; **17**(3): 291–294.

BLASKO, A., MIKE, N., GROF, P., GAZDAG, Z., CZIBULYA, Z., NAGY, L., KUNSAGI-MATE, S. & PESTI, M. Citrinin-induced fluidization of the plasma membrane of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; **59**: 636–642

BOUDRA, H., LE BARS, P. & LE BARS, J. Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; **61**: 1156–1158.

CABAÑES, F.J., BRAGULAT, M.R. & CASTELLÁ, G. Ochratoxin A Producing Species in the Genus *Penicillium*. *Toxins (Basel)*. 2010; **2**(5): 1111–1120.

CARTWRIGHT, N., ROBERTSON, A. & WHALLEY, W. A Synthesis of Citrinin. *Nature* **163**, 94–95 (1949).

ČOLOVIĆ, R., PUVAČA, N., CHELI, F., AVANTAGGIATO, G., GRECO, D. *et al.* Decontamination of Mycotoxin-Contaminated Feedstuffs and Compound Feed. *Toxins*. 2019; **11**(11): 617.

DAOU, R., HOTEIT, M., BOOKARI, K., JOUBRANE, K., KHABBAZ L. R. *et al.* Public Health Risk Associated with the Co-occurrence of Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Spices, Herbs, and Nuts in Lebanon. *Frontiers in Public Health*. 2023; **10**: 1072727.

DE OLIVEIRA FILHO, J. W. G., ISLAM, M. T., ALI, E. S., UDDIN, S. J., SANTOS, J. V. DE O. *et al.* A comprehensive review on biological properties of citrinin. *Food and Chemical Toxicology*. 2017; **110**: 130–141.

DIETRICH, R., USLEBER, E., MÄRTLBAUER, E. & GAREIS, M. Nachweis des nephrotoxischen Mykotoxins Citrinin in Lebensmitteln und mit *Monascus* spp. hergestellten Lebensmittelfarbstoffen. *Archiv für Lebensmittelhygiene*. 1999; **50**: 17–21

DOUGHARI, J.H. The Occurrence, Properties and Significance of Citrinin Mycotoxin. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*. 2015; **6**(11).

EL DARRA, N., GAMBACORTA, L. & SOLFRIZZO, M. Multimycotoxins occurrence in spices and herbs commercialized in Lebanon. *Food Control*. 2019; **95**: 63–70.

EL KHOURY, A., & ATOUI, A. Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. *Toxins*. 2010; **2**(4): 461–493.

ELLING, F., NELSEN, J.P., LILLEHOJ, E.B., THOMASSEN, M.S., STORMER, F.C. Ochratoxin A induced porcine nephropathy: Enzyme and ultrastructural changes after short-term exposure. *Toxicon*. 1985; **23**: 247–254.

ENDO, A. & KURODA, M. Citrinin, an inhibitor of cholesterol synthesis. *The Journal of Antibiotics*. 1976; **29**(8): 841-843.

ENTWISLE, A.C., WILLIAMS, A.C., MANN, P.J., RUSSELL, J., SLACK, P.T. & GILBERT, J. Combined phenyl silane and immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of ochratoxin A in roasted coffee: collaborative study. *J AOAC Int*. 2001; **84**(2): 444-50.

European Commission (EC). European Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, 2006. Off. J. Eur. Union 2006, 364, 5–24.

European Commission (EC). European Commission Regulation (EC) No. 2022/1370 of 5 August 2022 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of ochratoxin A in certain foodstuffs.

European Commission (EC). European Commission Regulation (EC) No. 2019/1901 of 7 November 2019 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of citrinin in food supplements based on rice fermented with the red yeast *Monascus purpureus*.

FRANCO, C.M., FENTE, C.A., VAZQUEZ, B., CEPEDA, A. & LALLAOUI, L. Simple and sensitive endemic nephropathy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996; **48**: 2483-2488.

FRISVAD, J.C., FRANK, J.M., HOUBRAKEN, J.A.M.P., KUIJPERS, A.F.A. & SAMSON, R.A. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Stud. Mycol.* 2004; **50**: 23–43.

FUCHS, R. & PERAICA, M. Ochratoxin A in human kidney diseases. *Food Addit. Contam.* 2005; **22**: 53–57.

GERDING, J., ALI, N., SCHWARTZBORD, J., CRAMER, B., BROWN, D.L., DEGEN, G.H. & HUMPF, H.U. A comparative study of the human urinary mycotoxin excretion patterns in Bangladesh, Germany and Haiti using a rapid and sensitive LC–MS/MS approach. *Mycotoxin Research.* 2015; **31**: 127–136.

GILANI, S.H., BANCROFT, J. & REILY, M. Teratogenicity of ochratoxin A in chick embryos. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1978; **46**: 543–546.

GUPTA, M., SASMAL, D., BANDYOPADHYAY, S., BAGCHI, G., CHATTERJEE, T. & DEY, S. Hematological changes produced in mice by ochratoxin A and citrinin. *Toxicology.* 1983; **26**: 55–62.

GUPTA, R. C., LASHER, M. A., MUKHERJEE, I. R. M., SRIVASTAVA, A. & LALL, R. Aflatoxins, Ochratoxins, and Citrinin. *Reproductive and Developmental Toxicology.* 2017; 945–962.

GUPTA, R. C., SRIVASTAVA, A. & LALL, R. Ochratoxins and Citrinin. *Veterinary Toxicology.* 2018; 1019–1027.

HALT, M. Moulds and mycotoxins in herb tea and medicinal plants. *European Journal of Epidemiology.* 1998; **14**(3): 269–274.

HAN, Z., REN, Y., ZHU, J., CAI, Z., CHEN, Y., LUAN, L., & WU, Y. Multianalysis of 35 Mycotoxins in Traditional Chinese Medicines by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Coupled with Accelerated Solvent Extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2012; **60**(33): 8233–8247.

HANIKA, C., CARLTON, W.W., BOON, G.D. & TUIITE, J. Citrinin mycotoxicosis in the rabbit: clinicopathological alterations. *Food Chem Toxicol.* 1984; **22**: 999–1008.

HARCAROVA, M., NAD, P. & ZIGO, F. Ochratoxin Incidence in Poultry Feed Mixtures. *Asian Journal of Agriculture and Food Sciences.* 2022; **10**(6).

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

HATANAKA, J., DOKE, N., HARADA, T., AIKAWA, T. & ENOMOTO, M. Usefulness and rapidity of screening for the toxicity and carcinogenicity of chemicals in medaka, *Oryzias latipes*. *The Japanese Journal of Experimental Medicine.* 1982; **52**: 243–253.

HETHERINGTON, A. C. & RAISTRICK, H. Studies in biochemistry of microorganism XI. On the production and chemical constitution of a new yellow

colouring matter, citrinin, produced from glucose by *Penicillium citrinum* Thom. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B—Biological Sciences*. 1931; **220**: 269–297.

HIROYUKI, H., KENSUKE, H. & KOZO, S. Mechanism of antifungal action of citrinin. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1987; **5**: 1373-1378.

HITOKOTO, H., MOROZUMI, S., WAUKE, T., SAKAI, S. & KURATA, H. Fungal kontamination and mycotoxin detection of powdered herbal drugs. *Appl. Environ. Microbiol.* 1978; **36**(2): 252-256.

HOOD, R.D., NAUGHTON, M.J. & HAYES, A.W. Prenatal effects of ochratoxin A in hamsters. *Teratology*. 1976; **13**: 11–14.

CHAN, W.H. Effects of citrinin on maturation of mouse oocytes, fertilization, and fetal development in vitro and in vivo. *Toxicology Letters*. 2008; **180**: 28-32.

CHAN, W.H. & SHIAO, N.H. Effect of citrinin on mouse embryonic development in vitro and in vivo. *Reproductive Toxicology*. 2007; **24**: 120-125.

CHEN, L. GUO, W., ZHENG Y., ZHOU, J., LIU, T. *et al.* Occurrence and Characterization of Fungi and Mycotoxins in Contaminated Medicinal Herbs. *Toxins*. 2020; **12**(1): 30.

CHEN, L., GUO, W., ZHENG, Y., ZHOU, J., LIU, T. *et al.* Occurrence and Characterization of Fungi and Mycotoxins in Contaminated Medicinal Herbs. *Toxins (Basel)*. 2020;**12**(1):30.

IARC (2015) Preamble to the IARC Monographs (amended January 2006). Available online: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Preamble/>. Accessed 25 October 2016.

IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Naturally Occuring Substances: Food Items and Costituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins; IARC: Lyon, France, 1993; Volume 56, pp. 489–524.

International Agency for Research of Cancer (IARC). Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Vol. 40. Lyon: IARC; 1986. p. 67-82.

JESWAL, P. Citrinin-induced chromosomal abnormalities in the bone marrow cells of *Mus musculus*. *Cytobios*. 1996; **86**: 29-33.

JORDAN, W.H., CARLTON, W.W. & SANSING, G.A. Citrinin mycotoxicosis in the rat. II. Clinicopathological observations. *Food Cosmet Toxicol*. 1978; **16**: 441-447.

KAMLE, M., MAHATO, D.K., GUPTA, A., PANDHI, S., SHARMA, N. *et al.* Citrinin Mycotoxin Contamination in Food and Feed: Impact onAgriculture, Human Health, andDetection and Management Strategies. *Toxins*. 2022; **14**: 85.

KANISAWA M. Synergistic effect of citrinin on hepatorenal carcinogenesis of ochratoxin A in mice. *Dev Food Sci* 1984; **7**: 245-54.

KOUL, A. & SUMBALI, G. Contamination of medicinally important dried rhizomes and root tubers with fungi and their toxins. *Indian Phytopath.* 2010; **63**(1): 55-58.

KUMAR, M., DWIVEDI, P., SHARMA, A.K., SINGH, N.D. & PATIL, R.D. Ochratoxin A and citrinin nephrotoxicity in New Zealand White rabbits: and ultrastructural assessment. *Mycopathologia.* 2007; **163**: 21-30.

LEA, T., STEIEN. K. & STORMER. C. Mechanism of ochratoxin A induced immunosuppression. *Mycopathologia.* 1989; **107**: 153-159.

MARTÍNEZ-DOMÍNGUEZ, G., ROMERO-GONZÁLEZ, R. & GARRIDO FRENICH, A. Determination of toxic substances, pesticides and mycotoxins, in ginkgo biloba nutraceutical products by liquid chromatography Orbitrap-mass spectrometry. *Microchemical Journal.* 2015; **118**: 124-130.

MATUSZEWSKI, B.K., CONSTANZER, M.L., CHAVEZ-ENGET, C.M. *et al.* Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* 2003; **75**(13):3019-3030.

MAYURA, K., PARKER, R., BERNDT, W.O. & PHILIPS, T.D. Ochratoxin A-induced teratogenesis in rats: Partial protection by phenylalanine. *Appl. Environ. Microbiol.* 1984; **48**: 1186-1188.

MAZUMDER, P.M., MAZUMDER, R., MAZUMDER, A. & SASMAL, D.S. Antimicrobial activity of the mycotoxin citrinin obtained from the fungus *Penicillium citrinum*. *Ancient Science of Life.* 2002; **XXI**: 191-197.

MEERPOEL, C., VIDAL, A., DI MAVUNGU, J.D. *et al.* Development and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of citrinin and ochratoxin A in a variety of feed and foodstuffs. *J. Chromatogr. A.* 2018; **1580**: 100-109.

MEERPOEL, C., VIDAL, A., HUYBRECHTS, B., TANGNI, E. K., DE SAEGER, S., CROUBELS, S., & DEVREESE, M. Comprehensive toxicokinetic analysis reveals major interspecies differences in absorption, distribution and elimination of citrinin in pigs and broiler chickens. *Food and Chemical Toxicology.* 2020; 111365.

MEHDI, N.A., CARLTON, W.W. & TUIE, J. Acute toxicity of citrinin in turkeys and ducklings. *Avian Pathology.* 1983; **12**: 221-233.

MEISTER, U. Detection of citrinin in ochratoxin A-containing products by a new HPLC method. *Mycotoxin Research.* 2003; **19**(1), 27-30.

MÜLLER, H.M. Decontamination of mycotoxins. I. Physical process. *Übersicht. Tierernähr.* 1982; **10**: 95-122.

NGUYEN, M.T., TOZLOVANU, M., TRAN, T.L. & PFOHL-LESZKOWICZ, A. Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. *Food Chem.* 2007; **105**: 42-47.

NOURBAKHS, F. & TAJBAKHS, E. Neurotoxicity mechanism of Ochratoxin A. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*. 2021; **13**(2): 34-45.

OSTRY, V., MALIR F., & NOVOTNA, E. Toxicity of the mycotoxin ochratoxin A in the light of recent data. *Toxin Reviews*. 2013; **32**(2), 19-33.

OSTRY, V., MALIR, F., PFOHL-LESZKOWICZ, A., MALIR, J., & TOMAN, J. Ochratoxin A: 50 Years of Research. *Toxins*. 2016; **8**(7), 191.

OSTRY, V., MALIR, F., TOMAN, J. & GROSSE, Y. Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. *Mycotoxin Research*. 2016; **33**(1): 65–73.

PALLARÉS, N., BERRADA, H., FONT, G. & FERRER, E. Mycotoxins occurrence in medicinal herbs dietary supplements and exposure assessment. *J Food Sci Technol*. 2022; **59**(7): 2830-2841.

PANDEY et al. Fungal mycotoxins in food commodities: present status and future concerns. *Frontiers in Sustainable Food System*. 2023.

PERAICA, M. & RAŠIĆ, D. Toxicological Properties of Citrinin. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 2009; **60**(4): 457-464.

PETZINGER, E. & WEIDENBACH, A. Mycotoxins in the food chain: The role of ochratoxins. *Livest. Prod. Sci*. 2002; **76**: 245–250.

PITT, J. I. Biology and Ecology of Toxigenic Penicillium Species. *Mycotoxins and Food Safety*. 2002; 29–41.

PITTET, A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds an updated review. *Rev. Med. Vet*. 1998; **149**: 479–492.

POUPKO R, LUZ Z & DESTRO R. Carbon-13 NMR of citrinin in the solid state and in solutions. *Journal of Physical Chemistry A*. 1997; **101**(28): 5097-5102.

PURCHASE, J., DONATO, R., SACCO, C. *et al*. The association of food ingredients in breakfast cereal products and fumonisins production: risks identification and predictions. *Mycotoxin research*. 2023.

QINGQING, H., LINBO, Y., YUNQIAN, G. & SHUQIANG, L. Toxic effects of citrinin on the male reproductive system in mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2012; **64**(5): 465-469.

REDDY, B.N., NUSRATH, M., KUMARI, C.K. & NAHDI, S. Mycotoxin contamination in some food commodities from tribal areas of Medak District, Andhra Pradesh. *Indian Phytopathol*. 1982; **36**: 683–686

RINGOT, D., CHANGO, A., SCHNEIDER, Y. J. & LARONDELLE, Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions*. 2006; **159**(1): 18–46.

RIZZO, A., ESKOLA, M. & ATROSHI, F. Ochratoxin A in Cereals, Foodstuffs and Human Plasma. *Europ. J. Plant Pathol.* 2002; **108**, 631–637.

ROY, A. K., & CHOURASIA, H. K. Mycoflora, mycotoxin producibility and mycotoxins in traditional herbal drugs from India. *Journal of General and Applied Microbiology.* 1990; **36**(5): 295–302.

SANTOS, L., MARÍN, S., SANCHIS, V., & RAMOS, A. J. Screening of mycotoxin multicontamination in medicinal and aromatic herbs sampled in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2009; **89**(10): 1802–1807.

SAXENA, J. & MEHROTA, B. S. The occurrence of mycotoxins in some dry fruits retail marketed in Nainital district of India. *Acta Alimentaria.* 1990; **19**: 221–224.

SCOTT, P.M., VAN WALBEEK, W., KENNEDY, B. & ANYETI, D. Mycotoxins (ochratoxin A, citrinin, and sterigmatocystin) and toxigenic fungi in grains and other agricultural products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1972; **20**: 1103–1109.

SHINOHARA, Y., ARAI, M., HIRAO, K., SUGIHARA, S., NAKANISHI, K. *et al.* Combination effect of citrinin and other chemicals on rat kidney tumourigenesis. *Gann.* 1997; **67**: 147–155.

SILVA, L. J. G., PEREIRA, A. M. P. T., PENA, A., & LINO, C. M. Citrinin in Foods and Supplements: A Review of Occurrence and Analytical Methodologies. *Foods.* 2020; **10**(1): 14.

SINGH, N.D., SHARMA, A.K., DWIVEDI, P., PATIL, R.D. & KUMAR, M. Experimentally induced citrinin and endosulfan toxicity in pregnant Wistar rats: histopathological alterations in liver and kidneys of fetuses. *Journal of Applied Toxicology.* 2008; **28**: 901–907.

SKARKOVA, J., OSTRY, V. & MALIR, F., Roubal T. Determination of ochratoxin A in food by high performance liquid chromatography. *Anal. Lett.* 2013; **45**(10): 1495–1504.

SUBRAHMANYAM, P., & RAO, A. S. Occurrence of aflatoxins and citrinin in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) at harvest in relation to pod condition and kernel moisture content. *Current Science.* 1974; **43**: 707–710.

SWINDLE, M.M., MAKIN, A., HERRON, A.J., CLUBB, F.J. & FRAZIER, K.S. Swine as models in biomedical research and toxicology testing. *Vet. Pathol.* 2012; **49**(2): 344–356.

TALIGoola, H. K., ISMAIL, M. A. & CHEBON, S. K. Mycobiota and aflatoxins associated with imported rice grains stored in Uganda. *Czech Mycol.* 2011; **63**(1): 93–107.

VAN LOCO, M. ELSKENS, Ch. CROUX, H. BEERNAERT, 2002: Linearity of calibration curves: use and misuse of the correlation coefficient. *Accredit. Qual. Assur.* 7281- 285. DOI:10.1007/S00769-002-0487-6.

VARGA, J., KEVEI, E., RINYU, E., TÉREN, J. & KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996; **62**: 4461–4464.

VEPRIKOVA, Z., ZACHARIASOVA, M., DZUMAN, Z., ZACHARIASOVA, A., FENCLOVA, M. *et al.* Mycotoxins in Plant-Based Dietary Supplements: Hidden Health Risk for Consumers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2015; **63**(29): 6633–6643.

WANG, H., ZHANG, S., LIN, T. & ZHENG, D.. Introduction and Safety Evaluation of Citrinin in Foods. *Journal of Food and Nutrition Sciences.* 2017; **5**(5): 179-183

WANG, Y., WANG, L., LIU, F., WANG, Q., SELVARAJ, J. *et al.* Ochratoxin A Producing Fungi, Biosynthetic Pathway and Regulatory Mechanisms. *Toxins.* 2016; **8**(3), 83.

XU, B., JIA, X., GU, L. & SUNG, C. Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. *Food Control.* 2006; **17**(4): 271–285.

ZHANG, H., AHIMA, J., YANG, Q., ZHAO, L., ZHANG, X., & ZHENG, X. A review on citrinin: Its occurrence, risk implications, analytical techniques, biosynthesis, physiochemical properties and control. *Food Research International.* 2021; **141**: 110075.

Přílohy

Tab. 11: Legislativní regulace OTA v EU (European Commission, 2022)

Potravina	Maximální limity (µg/kg)	
Neopracované obiloviny	5,0	
Všechny produkty získané/zpracované z nezpracovaných obilovin	3,0	
Obiloviny uváděné na trh pro konečného spotřebitele		
Pečivo, svačinky z obilovin	Výrobky obsahující nejméně 20 % sušených hroznů révy vinné a/nebo sušených fíků	2,0
a sníadaňové cereálie ¹	výrobky neobsahující olejnatá semena, ořechy nebo sušené ovoce ¹	4,0
	Ostatní výrobky obsahující olejnatá semena, ořechy a/nebo sušené ovoce	3,0
Nealkoholické sladové nápoje ²		3,0
Pšeničný lepek neuváděný na trh pro konečného spotřebitele ³		8,0
Sušené hrozny révy vinné (korintky, rozinky a sultánky) a sušené fíky		8,0
Ostatní sušené ovoce		2,0
Datlový sirup		15,0
Pražená kávová zrna a mletá pražená káva kromě rozpustné kávy		3,0
Rozpustná káva (instantní káva)		5,0
Víno (včetně šumivého vína, s výjimkou likérového vína a vína s obsahem alkoholu nejméně 15 % objemových) a ovocné víno		2,0
Aromatizované víno, aromatizované vinné nápoje a aromatizované vinné koktejly		2,0
Hroznová šťáva, rekonstituovaná koncentrovaná hroznová šťáva, hroznový nektar, rekonstituovaný hroznový mošt a rekonstituovaný koncentrovaný hroznový mošt uváděné na trh pro konečného spotřebitele		2,0
Obilné příkrmy a ostatní příkrmy určené pro kojence a malé děti ⁴		0,50

Potravina	Maximální limity (µg/kg)
Dietní potraviny pro zvláštní lékařské účely určené pro kojence a malé děti ⁵	0,50
Koření včetně sušeného koření, kromě <i>Capsicum</i> spp.	15,0
Koření včetně sušeného koření, kromě <i>Capsicum</i> spp.	20,0
Směsi koření	15,0
Kořen lékořice, mimo jiné jako složka bylinných čajů	20,0
Výtažek z lékořice (⁴²) pro použití v potravinářských výrobcích, zejména v nápojích a cukrovinkách	80,0
Cukrovinky z lékořice obsahující ≥ 97 % výtažku z lékořice v sušině	50,0
Ostatní cukrovinky z lékořice	10,0
Sušené byliny	10,0
Kořeny zázvoru pro použití v bylinných čajích	15,0
Kořeny proskurníku lékařského, kořeny pampelišky (smetánky) a květy pomerančovníku pro použití v bylinných čajích nebo v náhražkách kávy	20,0
Slunečnicová semena, dýňová semena, semena melounu (vodního), konopná semena, sójové boby	5,0
Pistácie, které musí být před uvedením na trh pro konečného spotřebitele nebo před použitím jako složka potravin vytríděny nebo jinak fyzikálně ošetřeny	10,0
Pistácie uváděné na trh pro konečného spotřebitele nebo jako složka potravin	5,0
Kakaový prášek	3,0

Tab. 12: Celkové koncentrace OTA ve vzorcích bylin

Číslo vzorku	Český název	Latinský název	Koncentrace [ng/g]
1	Andělíka čínská	<i>Angelica sinensis radix</i>	< LOD
2	Bedrník obecný	<i>Pimpinella saxifraga radix</i>	< LOD
3	Benedikt čubet	<i>Cardui benedicti herba</i>	< LOD
4	Borůvka (brusnice borůvka)	<i>Vaccinium myrtillus herba</i>	< LOD
5	Brusinka (brusnice brusinka)	<i>Vaccinium vitis-idaea folium</i>	< LOD
6	Brutnák lékařský	<i>Borago officinalis herba</i>	< LOD
7	Čekanka obecná	<i>Cichorium intybus herba</i>	< LOD
8	Černý rybíz (Bez černý)	<i>Sambucus nigra flos</i>	< LOD
9	Devětsil lékařský	<i>Petasides hybridus radix</i>	2,06
10	Divizna velkokvětá	<i>Verbascum densiflorum flos</i>	0,14
11	Echinacea (Třapatka nachová)	<i>Echinacea purpurea radix</i>	< LOD
12	Echinacea (Třapatka nachová)	<i>Echinacea purpurea flos</i>	< LOD
13	Eukalyptus	<i>Eucalypti folium</i>	0,23
14	Jinan dvoulaločný	<i>Ginkgo biloba folium</i>	2,05
15	Hloh obecný	<i>Crataegus oxyacantha fructus</i>	0,03
16	Hluchavka bílá	<i>Lamium album herba</i>	< LOD
17	Hořec žlutý	<i>Gentiana lutea radix</i>	< LOD
18	Chmel otáčivý	<i>Strobilus lupuli</i>	1,25
19	Jablečník obecný	<i>Marrubium vulgare herba</i>	< LOD
20	Jahodník obecný	<i>Fragaria vesca folium</i>	< LOD
21	Jitrocel kopinatý	<i>Plantago lanceolata folium</i>	< LOD
22	Komonice lékařská	<i>Melilotus officinalis herba</i>	< LOD
23	Kopřiva dvoudomá	<i>Urtica dioica herba</i>	< LOD
24	Kontryhel žlutozelený	<i>Alchemilla xanthochlora herba</i>	8,72
25	Kostival lékařský	<i>Symphytum officinale radix</i>	< LOD
26	Kozlík lékařský	<i>Valeriana officinalis radix</i>	0,04
27	Levandule lékařská	<i>Lavandula angustifolia flos</i>	< LOD
28	Lípa obecná	<i>Tiliae vulgaris flos</i>	0,05
29	Lnice květel	<i>Linariae herba cins.</i>	< LOD
30	Lopuch větší	<i>Artium lappa radix</i>	52,86
31	Ostružník maliník	<i>Rubi idaei folium</i>	0,33
32	Maral (Parcha saflorová)	<i>Maral leuzea herba</i>	0,13

Číslo vzorku	Český název	Latinský název	Koncentrace [ng/g]
33	Meduňka lékařská	<i>Melissa officinalis herba</i>	< LOD
34	Mateřídouška obecná	<i>Thymus serpyllum herba</i>	< LOD
35	Mařinka (Svízel vonný)	<i>Galium odoratum herba</i>	0,39
36	Měsíček lékařský	<i>Calendulae sine calice flos</i>	0,05
37	Mochna nátržník	<i>Potentilla erecta radix</i>	2,89
38	Mochna stříbrná	<i>Potentilla argentea herba</i>	< LOD
39	Ořešák královský	<i>Junglandis regia folium</i>	< LOD
40	Ostropěstřec mariánský	<i>Silybum marianum fructus</i>	12,73
41	Ostružník křovitý	<i>Rubi fruticosi folium</i>	0,18
42	Pampeliška lékařská	<i>Taraxaci officinalis radix</i>	1,93
43	Pelyněk pravý	<i>Artemisia absinthium herba</i>	< LOD
44	Plicník lékařský	<i>Pulmonaris officinalis folium</i>	< LOD
45	Pohanka obecná	<i>Fagopyrum saggitatum herba</i>	1,05
46	Proskurník	<i>Althaeae folium cons.</i>	< LOD
47	Prvosenka jarní	<i>Primula veris flos</i>	649,08
48	Pupava bezlodyžná	<i>Carlina acaulis radix</i>	2,05
49	Pýr plazivý	<i>Graminis rhizoma radix</i>	< LOD
50	Řebříček obecný	<i>Achillea millefolium flos</i>	0,17
51	Řepík lékařský	<i>Agrimonia eupatoria herba</i>	1,31
52	Sedmikráska chudobka	<i>Bellis perennis flos</i>	< LOD
53	Sléz maurský	<i>Malva sylvestris flos</i>	0,81
54	Světlík lékařský	<i>Euphrasia officinalis folium</i>	0,15
55	Svízel syřišťovitý	<i>Galium verum herba</i>	0,54
56	Šípek (Růže šípková)	<i>Cynosbati fruscus (Rosa canina)</i>	0,08
57	Tužebník jilmový	<i>Filipendula ulmaria herba</i>	< LOD
58	Vlaštovičník větší	<i>Chelidonium majus herba</i>	826,62
59	Yzop lékařský	<i>Hyssopi officinalis herba</i>	0,08
60	Zeměžluč menší	<i>Centaurium minus herba</i>	2,16

Tab. 13: Koncentrace CIT v bylinách

Číslo vzorku	Český název	Latinský název	Koncentrace [ng/g]
1	Andělka čínská (Děhel čínský)	<i>Angelica sinensis radix</i>	0,62
2	Bedrník obecný	<i>Pimpinella saxifraga radix</i>	< LOD
3	Benedikt čubet	<i>Cardui benedicti herba</i>	< LOD
4	Borůvka (brusnice borůvka)	<i>Vaccinium myrtillus herba</i>	1,68
5	Brusinka (brusnice brusinka)	<i>Vaccinium vitis-idaea folium</i>	0,39
6	Brutnák lékařský	<i>Borago officinalis herba</i>	< LOD
7	Čekanka obecná	<i>Cichorium intybus herba</i>	< LOD
8	Černý rybíz (Bez černý)	<i>Sambucus nigra flos</i>	< LOD
9	Devětsil lékařský	<i>Petasides hybridus radix</i>	0,35
10	Divizna velkokvětá	<i>Verbascum densiflorum flos</i>	0,3
11	Echinacea (Třapatka nachová)	<i>Echinacea purpurea radix</i>	< LOD
12	Echinacea (Třapatka nachová)	<i>Echinacea purpurea flos</i>	< LOD
13	Eukalyptus	<i>Eucalypti folium</i>	< LOD
14	Gingko (Jinan dvoulaločný)	<i>Ginkgo biloba folium</i>	< LOD
15	Hloh obecný	<i>Crataegus oxyacantha fructus</i>	0,13
16	Hluchavka bílá	<i>Lamium album herba</i>	0,54
17	Hořec žlutý	<i>Gentiana lutea radix</i>	< LOD
18	Chmel otáčivý	<i>Strobilus lupuli</i>	< LOD
19	Jablečník obecný	<i>Marrubium vulgare herba</i>	4,69
20	Jahodník obecný	<i>Fragaria vesca folium</i>	0,14
21	Jitrocel kopinatý	<i>Plantago lanceolata folium</i>	< LOD
22	Komonice lékařská	<i>Melilotus officinalis herba</i>	< LOD
23	Kopřiva dvoudomá	<i>Urtica dioica herba</i>	0,09
24	Kontryhel žlutozelený	<i>Alchemilla xanthochlora herba</i>	0,22
25	Kostival lékařský	<i>Symphytum officinale radix</i>	0,23
26	Kozlík lékařský	<i>Valeriana officinalis radix</i>	< LOD
27	Levandule lékařská	<i>Lavandula angustifolia flos</i>	< LOD
28	Lípa obecná	<i>Tiliae vulgaris flos</i>	0,15
29	Lnice květel	<i>Linariae herba cins.</i>	< LOD
30	Lopuch větší	<i>Artium lappa radix</i>	< LOD

Číslo vzorku	Český název	Latinský název	Koncentrace [ng/g]
31	Maliník (Ostružník maliník)	<i>Rubi idaei folium</i>	< LOD
32	Maral (Parcha saflorová)	<i>Maral leuzea herba</i>	0,26
33	Meduňka lékařská	<i>Melissa officinalis herba</i>	< LOD
34	Mateřídouška obecná	<i>Thymus serpyllum herba</i>	0,26
35	Mařinka (Svízel vonný)	<i>Galium odoratum herba</i>	< LOD
36	Měsíček lékařský	<i>Calendulae sine calice flos</i>	< LOD
37	Mochna nátržník	<i>Potentilla erecta radix</i>	< LOD
38	Mochna stříbrná	<i>Potentilla argentea herba</i>	< LOD
39	Ořešák královský	<i>Junglandis regia folium</i>	< LOD
40	Ostropestřec mariánský	<i>Silybum marianum fructus</i>	< LOD
41	Ostružník křovitý	<i>Rubi fruticosi folium</i>	< LOD
42	Pampeliška lékařská	<i>Taraxaci officinalis radix</i>	0,4
43	Pelyněk pravý	<i>Artemisia absinthium herba</i>	0,28
44	Plicník lékařský	<i>Pulmonaris officinalis folium</i>	< LOD
45	Pohanka obecná	<i>Fagopyrum saggitatum herba</i>	0,12
46	Proskurník	<i>Althaeae folium cons.</i>	0,3
47	Prvosenka jarní	<i>Primula veris flos</i>	472,79
48	Pupava bezlodyžná	<i>Carlina acaulis radix</i>	< LOD
49	Pýr plazivý	<i>Graminis rhizoma radix</i>	0,24
50	Řebříček obecný	<i>Achillea millefolium flos</i>	< LOD
51	Řepík lékařský	<i>Agrimonia eupatoria herba</i>	< LOD
52	Sedmikráska chudobka	<i>Bellis perennis flos</i>	< LOD
53	Sléz maurský	<i>Malva sylvestris flos</i>	< LOD
54	Světlík lékařský	<i>Euphrasia officinalis folium</i>	< LOD
55	Svízel syřišťovitý	<i>Galium verum herba</i>	0,11
56	Šípek (Růže šípková)	<i>Cynosbati fruscus (Rosa canina)</i>	0,56
57	Tužebník jilmový	<i>Filipendula ulmaria herba</i>	< LOD
58	Vlaštovičník větší	<i>Chelidonium majus herba</i>	69,68
59	Yzop lékařský	<i>Hyssopi officinalis herba</i>	3,09
60	Zeměžluč menší	<i>Centaurium minus herba</i>	0,44



Obr. 3: Filtrace vzorku 47 na filtrační aparatuře



Obr. 4: Překapání vzorků kolonkami



Obr. 5: Eluce vzorků z kolonek

Pracovní deník

Tab. 14: Zápis o zpracování vzorků bylin (matrice OTA)

Číslo vzorku	Popis vzorku	Navážka [g]	Objem eluátu [ml]	Separáční postup	Požadovaná analýza	Datum	Separaci provedl
1	Andělíka čínská (Děhel čínský)	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	6. 6.	Brandová
2	Bedrník obecný	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	6. 6.	Brandová
3	Benedikt čubet	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	6. 6.	Brandová
4	Borůvka (brusnice borůvka)	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	6. 6.	Brandová
5	Brusinka (brusnice brusinka)	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	6. 6.	Brandová
6	Brutnák lékařský	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	6. 6.	Brandová
7	Čekanka obecná	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	6. 6.	Brandová
8	Černý rybíz (Bez černý)	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	6. 6.	Brandová
9	Devětsil lékařský	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	6. 6.	Brandová
10	Divizna velkokvětá	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	6. 6.	Brandová
11	Echinacea (Třapatka nachová)	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	6. 6.	Brandová
12	Echinacea (Třapatka nachová)	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	6. 6.	Brandová
13	Eukalyptus	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	14. 6.	Brandová
14	Gingko (Jinan dvoulaločný)	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	14. 6.	Brandová
15	Hloh obecný	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	-	Brandová
16	Hluchavka bílá	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	14. 6.	Brandová
17	Hořec žlutý	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	14. 6.	Brandová
18	Chmel otáčivý	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	14. 6.	Brandová
19	Jablečnick obecný	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	14. 6.	Brandová
20	Jahodník obecný	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	14. 6.	Brandová
21	Jitrocel kopinatý	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	14. 6.	Brandová
22	Komonice lékařská	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	14. 6.	Brandová
23	Kopřiva dvoudomá	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	14. 6.	Brandová
24	Kontryhel žlutozelený	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	14. 6.	Brandová
25	Kostival lékařský	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	14. 6.	Brandová
26	Kozlík lékařský	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	15. 6.	Brandová
27	Levandule lékařská	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	15. 6.	Brandová
28	Lípa obecná	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	15. 6.	Brandová
29	Lnice	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	15. 6.	Brandová
30	Lopuch větší	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	15. 6.	Brandová

Číslo vzorku	Popis vzorku	Navážka [g]	Objem eluátu [ml]	Separáční postup	Požadovaná analýza	Datum	Separaci provedl
31	Maliník	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	15. 6.	Brandová
32	Maral (Parcha saflorová)	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	15. 6.	Brandová
33	Meduňka l�kařsk�	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	15. 6.	Brandová
34	Mateřidouška obecn�	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	15. 6.	Brandová
35	Mařinka (Svízel vonn�)	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	15. 6.	Brandová
36	M�s�ček l�kařsk�	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	15. 6.	Brandová
37	Mochna n�trzn�k	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	15. 6.	Brandová
38	Mochna stříbrná	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	16. 6.	Brandová
39	Ořeř�k kr�lovsk�	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	16. 6.	Brandová
40	Ostropestřec mari�nsk�	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	16. 6.	Brandová
41	Ostružník křovit�	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	16. 6.	Brandová
42	Pampeliška l�kařsk�	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	16. 6.	Brandová
43	Pelyn�k prav�	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	16. 6.	Brandová
44	Plicník l�kařsk�	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	16. 6.	Brandová
45	Pohanka obecn�	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	16. 6.	Brandová
46	Proskurník	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	16. 6.	Brandová
47	Prvosenka jarn�	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	16. 6.	Brandová
48	Pupava bezlodyzn�	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	16. 6.	Brandová
49	P�r plaziv�	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	16. 6.	Brandová
50	Řebříček obecn�	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	17. 6.	Brandová
51	Řep�k l�kařsk�	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	17. 6.	Brandová
52	Sedmikráska chudobka	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	17. 6.	Brandová
53	Sl�z maursk�	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	17. 6.	Brandová
54	Sv�tl�k l�kařsk�	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	17. 6.	Brandová
55	Svízel syř�střovit�	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	17. 6.	Brandová
56	Š�pek (R�že šípková)	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	17. 6.	Brandová
57	Tužebník jilmov�	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	17. 6.	Brandová
58	Vlaštovičník v�tř�	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	17. 6.	Brandová
59	Yzop l�kařsk�	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	17. 6.	Brandová
60	Zeměžluč menř�	5	1	OTA_PO_LC_01	HPLC	17. 6.	Brandová

Tab. 15: Zázpis o zpracování vzorků bylin (matrice CIT)

Číslo vzorku	Popis vzorku	Navážka [g]	Objem eluátu [ml]	Separační postup	Požadovaná analýza	Datum	Separaci provedl
1	Andělíka čínská (Děhel čínský)	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	4. 7.	Brandová
2	Bedrník obecný	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	-	Brandová
3	Benedikt čubet	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	4. 7.	Brandová
4	Borůvka (brusnice borůvka)	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	4. 7.	Brandová
5	Brusinka (brusnice brusinka)	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	4. 7.	Brandová
6	Brutnák lékařský	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	4. 7.	Brandová
7	Čekanka obecná	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	4. 7.	Brandová
8	Černý rybíz (Bez černý)	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	4. 7.	Brandová
9	Devětsil lékařský	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	4. 7.	Brandová
10	Divizna velkokvětá	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	4. 7.	Brandová
11	Echinacea (Třapatka nachová)	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	4. 7.	Brandová
12	Echinacea (Třapatka nachová)	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	4. 7.	Brandová
13	Eukalyptus	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	4. 7.	Brandová
14	Gingko (Jinan dvoulaločný)	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	5. 7.	Brandová
15	Hloh obecný	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	5. 7.	Brandová
16	Hluchavka bílá	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	5. 7.	Brandová
17	Hořec žlutý	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	5. 7.	Brandová
18	Chmel otáčivý	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	5. 7.	Brandová

Číslo vzorku	Popis vzorku	Navážka [g]	Objem eluátu [ml]	Separací postup	Požadovaná analýza	Datum	Separaci provedl
19	Jablečník obecný	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	5. 7.	Brandová
20	Jahodník obecný	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	5. 7.	Brandová
21	Jitrocel kopinatý	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	5. 7.	Brandová
22	Komonice lékařská	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	5. 7.	Brandová
23	Kopřiva dvoudomá	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	5. 7.	Brandová
24	Kontryhel žlutozelený	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	5. 7.	Brandová
25	Kostival lékařský	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	5. 7.	Brandová
26	Kozlík lékařský	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	5. 7.	Brandová
27	Levandule lékařská	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	5. 7.	Brandová
28	Lípa obecná	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	5. 7.	Brandová
29	Lnice	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	5. 7.	Brandová
30	Lopuch větší	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	5. 7.	Brandová
31	Maliník	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	5. 7.	Brandová
32	Maral (Parcha saflorová)	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	5. 7.	Brandová
33	Meduňka lékařská	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	5. 7.	Brandová
34	Mateřídouška obecná	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	5. 7.	Brandová
35	Mařinka (Svízel vonný)	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	5. 7.	Brandová
36	Měsíček lékařský	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	5. 7.	Brandová

Číslo vzorku	Popis vzorku	Navážka [g]	Objem eluátu [ml]	Separací postup	Požadovaná analýza	Datum	Separaci provedl
37	Mochna nátržník	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	5. 7.	Brandová
38	Mochna stříbrná	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	6. 7.	Brandová
39	Ořešák královský	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	6. 7.	Brandová
40	Ostropestřec mariánský	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	6. 7.	Brandová
41	Ostružník křovitý	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	6. 7.	Brandová
42	Pampeliška lékařská	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	6. 7.	Brandová
43	Pelyněk pravý	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	6. 7.	Brandová
44	Plicník lékařský	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	6. 7.	Brandová
45	Pohanka obecná	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	6. 7.	Brandová
46	Proskurník	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	6. 7.	Brandová
47	Prvosenka jarní	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	6. 7.	Brandová
48	Pupava bezlodyžná	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	6. 7.	Brandová
49	Pýr plazivý	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	6. 7.	Brandová
50	Řebříček obecný	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	6. 7.	Brandová
51	Řepík lékařský	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	6. 7.	Brandová
52	Sedmikráska chudobka	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	6. 7.	Brandová
53	Sléz maurský	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	6. 7.	Brandová
54	Světlík lékařský	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	6. 7.	Brandová

Číslo vzorku	Popis vzorku	Navážka [g]	Objem eluátu [ml]	Separáčn� postup	Pořadovaná analýza	Datum	Separaci provedl
55	Svízel syřiřtřovitý	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	6. 7.	Brandová
56	ř�pek (Růže ř�pkov)	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	6. 7.	Brandová
57	Tuřebn�k jilmov	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	6. 7.	Brandová
58	Vlařtoviĉn�k větř�	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	6. 7.	Brandová
59	Yzop l�kařsk	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	6. 7.	Brandová
60	Zeměřluĉ menř�	5	2	EASY-EXTRACT® CITRININ	HPLC-FLD	6. 7.	Brandová