

UNIVERZITA HRADEC KRÁLOVÉ

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

**Přechod mykotoxinu ochratoxinu A (OTA) z matric vybraných  
farmaceutických bylin do přípravků z nich vyrobených**

**Diplomová práce**

Hradec Králové 2020

<b>Autor:</b>	<b>Bc. Eva Znamínková</b>
Studijní program:	Biologie
Studijní obor:	Systematická biologie a ekologie
Vedoucí práce:	doc. RNDr. František Malíř, Ph.D.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: *Přechod mykotoxinu ochratoxinu A (OTA) z matric vybraných farmaceutických bylin do přípravků z nich vyrobených* vypracovala samostatně, a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, z kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové dne: .....

.....

Eva Znamínková

**Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce panu doc. RNDr. Františku Malířovi, Ph.D. za odborné vedení a velmi přínosné konzultace při vypracování této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala panu RNDr. Jakobovi Tomanovi, Ph.D. za cenné rady. Zvláštní poděkování patří mé rodině, která mi svou podporou pomohla k dokončení diplomové práce.

## **Anotace**

ZNAMÍNKOVÁ E., 2020: *Přechod mykotoxinu ochratoxinu A (OTA) z matric vybraných farmaceutických bylin do přípravků z nich vyrobených*. Hradec Králové: Přírodovědecká fakulta Univerzity Hradec Králové, 71s. Diplomová práce

Mykotoxin ochratoxin A se řadí mezi nejzávažnější sekundární toxické metabolity produkované několika druhy vláknitých mikroskopických hub a to zejména druhy rodu *Aspergillus* a *Penicillium*. OTA vykazuje akutní i chronickou toxicitu a tím představuje velké riziko pro lidskou populaci. Na základě mnoha provedených studií OTA prokazatelně vykazuje toxické účinky, jako jsou nefrotoxicita, hepatotoxicita, neurotoxicita, teratogenita, imunotoxicita, genotoxicita a karcinogenita (karcinogen skupiny 2B).

Tento všudypřítomný a přirozeně se vyskytující mykotoxin, kontaminující suroviny, potraviny a krmiva, přispívá ke značným ekonomickým ztrátám na celém světě. OTA se vyskytuje v potravinách živočišného (vejce, ryby, drůbež a mléko), ale především rostlinného původu jako jsou obiloviny, mouka, kakaové boby, kávová zrna, arašídý, sušené ovoce, léčivé rostliny.

Použití fytoterapie má na celém světě dlouhou historii a tvoří důležitou část tradiční medicíny. Vzhledem k celosvětovému rozšíření využívání léčivých bylin a přípravků z nich vyrobených je velice důležité dbát na bezpečnost těchto rostlinných produktů.

Cílem této diplomové práce je stanovení množství ochratoxinu A u různých druhů farmaceuticky významných bylin a dále pak experimentální zjištění množství ochratoxinu A, které přechází do přípravků (odvarů a tinktur) z nich vyrobených, což má význam pro posouzení dietární expozice OTA a realizaci "studie celkového stravování" (TDS). TDS může být doplňkovým nástrojem pro odhad dietární expozice obyvatelstva ochratoxinu A, protože analyzuje obsah ochratoxinu A nejen v bylinných matricích, dostupných na trhu v ČR, ale především v reálných vzorcích odvarů a tinktur z těchto bylin připravených.

## **Klíčová slova**

Ochratoxin A, HPLC, farmaceutické byliny, odvary, tinktury

## **Anotation**

ZNAMÍNKOVÁ E., 2020: *Transfer of mycotoxin ochratoxin A (OTA) from selected raw pharmaceutical herbs into their products*. Hradec Králové: Faculty of Science, University of Hradec Králové, 71p. Diploma thesis

The mycotoxin ochratoxin A is one of the most serious secondary toxic metabolites produced by several species of filamentous microscopic fungi, especially species of the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. OTA shows both acute and chronic toxicity and thus poses a great risk to the human population. Based on many studies performed, OTA has been shown to have toxic effects such as nephrotoxicity, hepatotoxicity, neurotoxicity, teratogenicity, immunotoxicity, genotoxicity and carcinogenicity (carcinogen group 2B).

This ubiquitous and naturally occurring mycotoxin contaminating raw materials, food and feed contributes to significant economic losses worldwide. OTA occurs in food of animal origin (eggs, fish, poultry, and milk), but mainly of plant origin such as cereals, flour, cocoa beans, coffee beans, peanuts, dried fruits, medicinal plants. The use of phytotherapy has a long history around the world and forms an important part of traditional medicine. Due to the worldwide expansion of the use of medicinal herbs and preparations made from them, it is very important to pay attention to the safety of these herbal products.

The aim of this thesis is to determine the amount of ochratoxin A in various types of pharmaceutically important herbs and then experimentally determine the amount of ochratoxin A, which passes into preparations (decoctions and tinctures) made from them, which is important for assessing dietary exposure to OTA and catering "(TDS). TDS can be an additional tool for estimating the dietary exposure of the population to ochratoxin A, because it analyses the content of ochratoxin A not only in herbal matrices available on the market in the Czech Republic, but especially in real samples of decoctions and tinctures prepared from these herbs.

## **Key words**

Ochratoxin A, HPLC, pharmaceutical herbs, decoctions, tinctures

## Obsah

Úvod a cíl práce .....	14
1 Ochratoxiny.....	16
1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti OTA.....	17
1.2 Producenti OTA.....	18
1.2.1 Taxonomie a morfologie rodu <i>Aspergillus</i> .....	20
1.2.2 Taxonomie a morfologie rodu <i>Penicillium</i> .....	21
1.3 Výskyt OTA v potravinách.....	22
1.4 Toxicita OTA .....	22
1.4.1 Akutní a subakutní toxicita .....	24
1.4.2 Chronická toxicita .....	25
1.5 Toxikokinetika OTA .....	25
1.5.1 Absorpce.....	26
1.5.2 Distribuce.....	27
1.5.3 Biotransformace .....	27
1.5.4 Eliminace.....	29
1.6 Regulace OTA v potravinách a krmivech.....	31
2 OTA ve farmaceutických bylinách.....	34
2.1 <i>Astragalus propinquus</i> (Kozinec blanitý).....	35
2.2 <i>Glycyrrhiza glabra</i> (Lékořice lysá) .....	36
2.3 <i>Bacopa Monnieri</i> (Bakopa drobnolistá) .....	37
3 Stanovení OTA ve farmaceutických bylinách metodou HPLC-FLD (Standardní operační postup) .....	38
3.1 Předmět a vymezení působnosti .....	38
3.2 Princip metody .....	39
3.3 Bezpečnost práce.....	39
3.4 Sběr vzorků a jejich skladování.....	39
3.5 Chemikálie a spotřební materiál.....	40
3.5.1 Základní chemikálie .....	40
3.5.2 Roztoky .....	40
3.5.3 Spotřební materiál.....	42
3.5.4 Přístroje a pomocná zařízení.....	42

3.6	Postup úpravy vzorků a schéma extrakce a separace dle Zimmerliho .....	42
3.7	Postup úpravy vzorků a schéma extrakce a separace dle Entwisle 2001 .	44
3.8	Laboratorní nádobí .....	45
3.9	Ověření metody .....	45
3.10	Uvedení měřicího přístroje do chodu a jeho nastavení .....	46
3.11	Analýza .....	46
3.12	Podmínky chromatografického stanovení.....	46
3.13	Potvrzení OTA analýzou metylesteru ochratoxinu A .....	47
4	Stanovení přechodu OTA z kořene <i>Astragalus propinquus</i> do odvarů a tinktur z něj vyrobených.....	47
4.1	Materiál a použité chemikálie.....	47
4.2	Pracovní postup .....	47
4.3	Použité vzorce .....	48
5	Výsledky .....	49
5.1	Stanovení OTA ve farmaceutických bylinách.....	49
5.2	Stanovení procentuálního přechodu OTA do odvarů a tinktur .....	50
5.2.1	Výpočet procentuálního přechodu do odvarů .....	50
5.2.2	Výpočet procentuálního přechodu do tinktur .....	51
	Diskuze .....	52
	Závěr.....	54
	Použitá literatura .....	55
	Přílohy .....	66
	Tabulky.....	66
	Obrázky .....	68
	Výsledky z HPLC .....	70

## Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obr. č. 1	Strukturní vzorec ochratoxinu A (OTA).....	17
Obr. č. 2	Mikrohabitus rodu <i>Aspergillus</i> .....	20
Obr. č. 3	Mikrohabitus rodu <i>Penicillium</i> .....	21
Obr. č. 4	Připravené vzorky odvarů .....	68
Obr. č. 5	Prosávací zařízení.....	68
Obr. č. 6	Kolonky s násadcem naplněným odvarem .....	69
Obr. č. 7	Kolonky s násadce naplněným odvarem .....	69
Tab. č. 1	Druhy rodu <i>Aspergillus</i> produkující OTA v potravinách (Ostrý <i>et al.</i> , 2013) .....	19
Tab. č. 2	Druh rodu <i>Penicillium</i> produkující OTA (Ostrý <i>et al.</i> , 2013).....	19
Tab. č. 3	Taxonomické zařazení rodu <i>Aspergillus</i> (Ostrý & Buchta, 2003 a).....	20
Tab. č. 4	Taxonomické zařazení rodu <i>Penicillium</i> (Ostrý & Buchta, 2003 b) .....	21
Tab. č. 5	Maximální limity OTA v potravinách (Evropská komise, 2006; Evropská komise, 2010) .....	33
Tab. č. 6	Taxonomické zařazení (Kubíček, 2003a).....	35
Tab. č. 7	Taxonomické zařazení (Kubíček, 2003b).....	36
Tab. č. 8	Taxonomické zařazení (ITIS, 2000) .....	37
Tab. č. 9	Ověření metody.....	45
Tab. č. 10	Procentuální přechod OTA do odvarů .....	50
Tab. č. 11	Procentuální přechod OTA do tinktur .....	51
Tab. č. 12	Výsledky screeningu vybraných druhů farmaceutických bylin.....	66
Tab. č. 13	Stanovení OTA u <i>Astragalus propinquus</i> .....	66
Graf č. 3	Standard 4 ng OTA/ml.....	70
Graf č. 1	Slepý vzorek (blank).....	70
Graf č. 2	Standard 0,4 ng/ml .....	70
Graf č. 4	Záznam pozitivního vzorku matrice <i>Astragalus propinquus</i> .....	71
Graf č. 5	Záznam pozitivního vzorku tinktury <i>Astragalus propinquus</i> .....	71
Graf č. 6	Záznam pozitivního vzorku odvaru <i>Astragalus propinquus</i> .....	71



## Terminologický slovník

<b>Adsorpce</b>	Hromadění plynné nebo rozpuštěné látky (adsorbátu) na povrchu jiné látky
<b>Afinita</b>	Schopnost chemických látek slučovat se s jinou látkou nebo částicí
<b>Albumin</b>	Jeden z proteinů krevní plazmy, tvořící 60 % všech plazmatických bílkovin
<b>Bazolaterální membrána</b>	Část plazmatické membrány, která vytváří její bazální a laterální povrchy
<b>Biotransformace</b>	Přeměna chemické struktury látky působením živého organismu
<b>Citrin</b>	Mykotoxin produkováný plísněmi rodu <i>Aspergillus</i> a <i>Penicillium</i>
<b>Distální tubulus</b>	Kanálek (tubulus) v ledvině, část nefronu navazující na Henleovu kličku
<b>Enterohepatální cirkulace</b>	Proces, který označuje oběh určitých látek (žlučových kyselin, bilirubinu, léků či jiných látek, např. OTA) z jater do žluči, následovaný vstupem do tenkého střeva, absorpcí enterocytem a transportem zpět do jater
<b>Erytrocyt</b>	Červená krvinka
<b>Exkrece</b>	Vylučování, vyměšování ven z těla
<b>Fytoterapie</b>	Léčebná metoda využívající léčivé účinky rostlin k léčbě člověka
<b>Genotoxicita</b>	Schopnost látky působit toxicky na genetický materiál
<b>Glomerulární membrána</b>	Membrána glomerulárních kapilár
<b>Hepatotoxicita</b>	Schopnost látky vyvolat poškození jaterní tkáně
<b>Imunosuprese</b>	Stav, kdy imunitní systém není schopen plně reagovat na cizorodé antigeny
<b>Imunotoxicita</b>	Schopnost látky působit toxicky na imunitní systém

<b>in Vitro</b>	„Ve skle“ – tzn. mimo živé tělo, v laboratorním skle – např. zkumavce
<b>Karcinogenita</b>	Schopnost látky vyvolat rakovinu
<b>Lymfocyt</b>	Typ bílé krvinky
<b>Mobilní fáze</b>	Neboli eluent, fáze pohybující se chromatografickým systémem, tato fáze přivádí vzorek do stacionární fáze, kde dochází k jeho separaci
<b>Mykotoxin</b>	Toxin produkováný toxinogenními vláknitými mikroskopickými houbami (plísněmi)
<b>Nefropatie</b>	Obecné označení pro onemocnění ledviny
<b>Nefrotoxicita</b>	Schopnost látky vyvolat poškození tkáně ledvin
<b>Neurotoxicita</b>	Schopnost látky působit toxicky na nervovou soustavu
<b>OTA-DNA adukt</b>	Kovalentní vazba OTA na DNA
<b>Proximální tubulus</b>	Kanálek (tubulus) v ledvině, část nefronu navazující na glomerulus
<b>Redistribuce</b>	Přerozdělení
<b>Renální</b>	Ledvinový, ledvinový
<b>Resorpce</b>	Vstřebání
<b>Retenční čas</b>	Celkový čas, který příslušný analyt stráví v chromatografické koloně při separačním procesu
<b>Retrosternální</b>	Za hrudní kostí- sternem
<b>Screening</b>	Metoda vyhledávání časných forem nemocí nebo odchylek od normy v dané populaci prováděná formou testů

<b>Stacionární fáze</b>	Fáze ukotvená na místě, přes kterou prochází mobilní fáze a také složky vzorku, jde např. o tenkou vrstvu silikagelu (při tenkovrstvé chromatografii)
<b>Standard</b>	Obecně uznávaný vzor umožňující kvalitativní i kvantitativní porovnání
<b>Synergický efekt</b>	Souhlasné působení
<b>Teratogenita</b>	Schopnost látky vyvolat vrozenou vývojovou odchylku vyvíjejícího se plodu
<b>Toxicita</b>	Míra vlivu působení toxické látky na živé organismy
<b>Toxikokinetika</b>	Osud xenobiotika v živém organismu
<b>Vialka</b>	Skleněná lahvička na vzorek, využívá se např. pro kapalinovou i plynovou chromatografii

## Seznam zkratek

<b>ATP</b>	Adenosintrifosfát
<b>BEN</b>	Balkánská Endemická Nefropatie
<b>CYP 450</b>	Cytochrom P450
<b>DNA</b>	Deoxyribonukleová kyselina
<b>ES</b>	Evropské společenství
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization - Organizace pro výživu a zemědělství
<b>FLD</b>	Fluorescenční detektor
<b>GIT</b>	Gastrointestinální trakt
<b>HPLC-FLD</b>	High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection - Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí
<b>IARC</b>	International Agency for Research on Cancer - Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
<b>JECFA</b>	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives – Společný výbor expertů FAO/WHO pro potravinářská aditiva
<b>LD50</b>	Dosis letalis – Letální dávka, tj. dávka, která způsobí úhyn 50 % testovaných jedinců
<b>NADPH</b>	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
<b>OP-OTA</b>	Lactone-Opened Ochratoxin A - Otevřená laktonová forma OTA
<b>OTA</b>	Ochratoxin A
<b>OTB</b>	Ochratoxin B
<b>OTC</b>	Ochratoxin C

<b>OTHQ</b>	Hydrochinonová forma ochratoxinu A
<b>OTQ</b>	Chininová forma ochratoxinu A
<b>OT<math>\alpha</math></b>	Ochratoxin $\alpha$
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline – Fosfátový pufr
<b>Phe</b>	Fenylalanin
<b>PTWI</b>	Provisional Tolerable Weekly Intake - Prozatímní tolerovatelný týdenní přívod
<b>SCF</b>	Scientific Committee on Food – Vědecký výbor pro potraviny
<b>TWI</b>	Tolerable Weekly Intake – tolerovatelný týdenní příjem
<b>WHO</b>	World Health Organization, Světová zdravotnická organizace

## Úvod a cíl práce

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity vláknitých mikroskopických hub. V současné době je známo přes 500 druhů mykotoxinů, které jsou považovány za významné kontaminanty potravin a krmiv. Jedná se o látky, které svými toxickými účinky negativně ovlivňují zdravotní nezávadnost mnoha druhů potravin a v souvislosti s tím také způsobují ekonomické ztráty mnoha zemí na celém světě. Do potravního řetězce vstupují prostřednictvím potravin rostlinného ale i živočišného původu.

Hlavním cílem diplomové práce kromě stanovení obsahu ochratoxinu A (OTA) metodou HPLC-FLD ve farmaceuticky významných bylinách, využívaných zejména v tradiční čínské medicíně a také v tradičním indickém lékařství, tzv. ajurvédské medicíně bylo experimentální zjištění množství mykotoxinu OTA, které přechází do přípravků z těchto bylin (odvarů a tinktur), což má význam pro posouzení dietární expozice OTA.

OTA je přirozeně se vyskytující mykotoxin produkovaný některými vláknitými mikroskopickými houbami druhů *Aspergillus* a *Penicillium*, které se často vyskytují v mnoha potravinářských komoditách, prostřednictvím kterých je lidská populace vystavena nepřetržitému přívodu OTA. Pro lidskou populaci OTA představuje riziko především kvůli toxicitě, protože u něho byly prokázány nefrotoxické, teratogenní, hepatotoxické, neurotoxické, imunotoxické, genotoxické a dokonce také karcinogenní účinky. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny klasifikovala OTA v roce 1993 na základě dostatečných důkazů karcinogenity jako možný lidský karcinogen (skupina 2B). Všechny zmíněné toxické účinky představují veliké riziko pro lidskou populaci, a proto je velice důležité monitorovat výskyt mykotoxinu OTA a kontrolovat jeho množství jak v potravinách rostlinného původu, tak v potravinách živočišného původu a v krmivech. OTA je přírodní kontaminant mnoha druhů potravin, jako jsou například kakaové boby, kávová zrna, mouka, obiloviny, ryby, arašídy, sušené ovoce, víno, vejce drůbeže a mléko. U léčivých rostlin se OTA vyskytuje v různých částech jejich těl (v listech, oddencích, kořenech, kůře a semenech) a jeho produkce je závislá na mnoha faktorech.

Expozice OTA je celosvětovým problémem, o čem svědčí detekce OTA v sérech lidské populace v mnoha zemích. Vzhledem k celosvětovému rozšíření mykotoxinů, které je do značné míry ovlivněno současným celosvětovým obchodem s potravinami a se vzrůstající obavou z možných účinků mykotoxinů je důležité se zaměřit na stanovení limitů pro mykotoxiny v potravinách. V Evropě jsou všechny mykotoxiny limitovány normami a to nařízeními Evropské komise /ES/ č. 1881/2006 ES, 105/2010 ES a 594/2012 ES, která stanovují jeho maximální limity v potravinách.

Léčivé rostliny mají dlouhou historii použití v terapii po celém světě a tvoří důležitou součást tradiční medicíny. V posledních desetiletích došlo k rozšíření fytoterapie i ve vyspělých zemích a díky tomu se bezpečnost rostlinných produktů stala hlavním problémem v oblasti veřejného zdraví a je tedy velmi důležité, aby léčivé byliny a rostlinné produkty byly zahrnuty do příslušné jurisdikce.

# 1 Ochratoxiny

Ochratoxiny jsou sekundární metabolity produkované vláknitými mikroskopickými plísněmi rodů *Penicillium* a *Aspergillus* (Ringot *et. al.*, 2006). Patří mezi jedny z nejdůležitějších skupin mykotoxinů, ve které bylo popsáno mnoho forem ochratoxinů a jejich metabolitů (Malíř *et al.*, 2012). Chemicky jsou ochratoxiny popsány jako slabé organické kyseliny sestávající z dihydroizokumarinové skupiny spojené peptidovou vazbou s 1-fenylalaninem (O'Brien & Dietrich, 2005). Hlavními formami jsou ochratoxin A (OTA), B (OTB, nechlorovaná forma OTA) a C (OTC, ethylester OTA) (Heussner & Bingle, 2015).

Z hlediska počtu studií a jeho četného rozšíření je za nejvýznamnější považován Ochratoxin A (OTA). OTA byl poprvé izolován v roce 1965 jako metabolit produkovaný vláknitou mikroskopickou plísní *Aspergillus ochraceus* při laboratorním screeningu toxinogenních vláknitých hub. Krátce nato byl izolován z komerčního vzorku kukuřice ve Spojených státech jako přirozeně se vyskytující kontaminant a zároveň rozpoznán jako silný nefrotoxin (Bennet & Klich, 2003).

OTA díky významným toxickým účinkům představuje velké riziko pro zdraví lidí a zvířat. Jeho toxicita je srovnatelná s OTC, který se ovšem přirozeně vyskytuje v menším množství. Na rozdíl od OTA další metabolit-OTB neobsahuje chlor v izokumarinové části, proto je mnohem méně toxický ve srovnání s OTA (Van der Merwe *et al.*, 1965).

V laboratorních kulturách je syntetizováno široké spektrum příbuzných sloučenin jako je ochratoxin  $\alpha$  – izokumarinové jádro OTA, jeho dechlorovaný analog známý jako ochratoxin  $\beta$ , methyl a ethylestery a několik analogů aminokyselin (Xiao *et al.*, 1995; Moss, 1996). Ochratoxin  $\alpha$  a  $\beta$  jsou produkty hydrolýzy OTA a OTB a v důsledku chybějící molekuly fenylalaninu nejsou toxické. Zajímavou skupinu tvoří metabolity OTA, které vykazují ještě vyšší toxicitu než samotný OTA. Jedná se o lakton - otevřenou formu (OP-OTA), dále chinonovou a hydrochinonovou formu - OTQ a OTHQ (Wu *et al.*, 2011).



## 1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti OTA

OTA patří z hlediska biosyntézy mezi pentaketidy. Tyto látky můžeme obecně definovat jako deriváty 7-izokumarinu (IARC, 1993).

Strukturně je podobný aminokyselině fenyylalaninu (Phe). Z tohoto důvodu má inhibiční účinek na řadu enzymů, které používají Phe jako substrát, zejména Phe-tRNA syntetázu, což může vést k inhibici syntézy proteinu. Ze stejného důvodu může OTA také stimulovat peroxidaci lipidů (Scott, 1994).

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

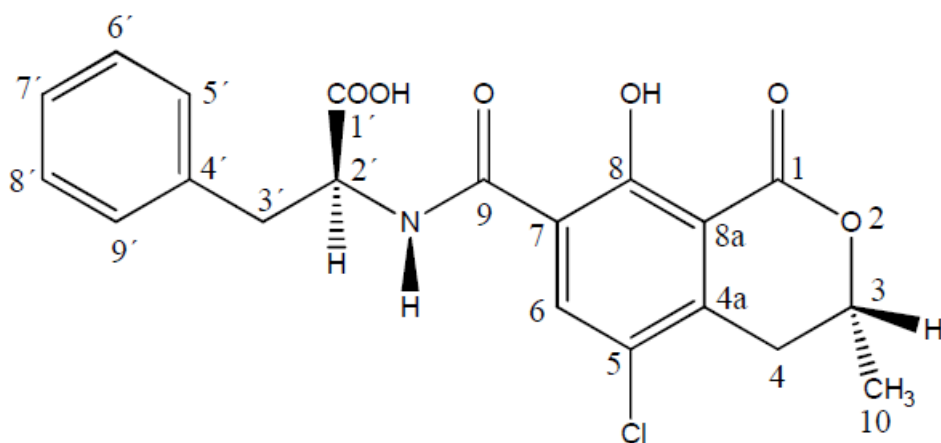
**Název (Chemical Abstracts):** L-Phenylalanine, *N*-[(5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1-*H*-2-benzopyran-7-yl)carbonyl]-, (R)-

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

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

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

**Molekulová hmotnost:** 403,82 daltonů



Obr. č. 1 Strukturální vzorec ochratoxinu A (OTA)

(IARC, 1993)

**Popis:** OTA je bezbarvá krystalická sloučenina, která je opticky aktivní a vykazuje modrou fluorescenci pod UV světlem (Scott, 1994).

**Bod tání:** 169 °C (IARC, 1993).

**Rozpustnost:** Rozpustný v organických rozpouštědlech (chloroformu, etanolu a metanolu) a alkalické vodě (Scott, 1994).

**Stabilita:** OTA je velmi stabilní mykotoxin v různých rozpouštědlech. Při skladování v ethanolu za nízké teploty a chráněn před světlem může být stabilní po dobu nejméně jednoho roku (Neeley & West, 1972). Roztoky OTA v methanolu skladované při -20 ° C jsou stabilní po dobu několika let (Valenta, 1998).

## 1.2 Producenti OTA

K produkci OTA dochází celosvětově a to jak v potravinách rostlinného tak živočišného původu. V subtropických a tropických oblastech dochází k jeho produkci prostřednictvím plísní rodu *Aspergillus* ze sekce *Circumdati* (*Aspergillus ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. steynii*) a *Aspergillus* ze sekce *Nigri* (*Aspergillus carbonarius*, *A. foetidus*, *A. lacticoffeatus*, *A. niger*, *A. sclerotium*, *A. tubingensis*). V mírném a chladném pásmu dochází k jeho produkci druhů rodu *Penicillium* (*P. verrucosum*, *P. nordicum*) (Frisvad *et al.*, 2004; Samson, *et al.*, 2004; Varga & Samson, 2008; Ostrý *et al.*, 2013).

Tři hlavní druhy produkující OTA (*Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius*, *Penicillium verrucosum*) mají zcela odlišné ekologické a fyziologické požadavky a je tedy relativně snadné určit, které druhy jsou odpovědné za tvorbu OTA v určité potravine nebo v dané zeměpisné poloze (Ostrý *et al.*, 2013).

V Evropě a Kanadě je za hlavního producenta OTA u obilovin považován druh *Penicillium verrucosum*. V kávě nebo v hroznech je pak OTA produkován především druhů rodu *Aspergillus* a v mírném chladném pásmu pak především *Penicillium nordicum*, který je považován za hlavní kontaminant masných výrobků a sýrů. Mikroskopické houby zodpovědné za kontaminaci OTA se liší v závislosti na plodině a místě výskytu (Ostrý *et al.*, 2013).

Ve většině případů dochází zároveň k produkci několika toxinů současně, například OTA, OTB nebo OTC. Tento současný výskyt může vést k synergickým toxickým účinkům (Stark, 2005; Ostrý *et al.*, 2013).

Produkcí OTA ovlivňují různé ekologické faktory. Jedná se zejména o klimatické podmínky, zeměpisnou oblast, poškození odrůd a plodin způsobené hmyzem, plísňovou infekcí či nadměrným zavlažováním nebo srážkami. Ošetření plodin pomocí insekticidů a fungicidů může vést ke snížení infekce houbami produkující OTA a následné kontaminace OTA (Ostrý *et al.*, 2013).

**Tab. č. 1 Druhy rodu *Aspergillus* produkující OTA v potravinách (Ostrý *et al.*, 2013)**

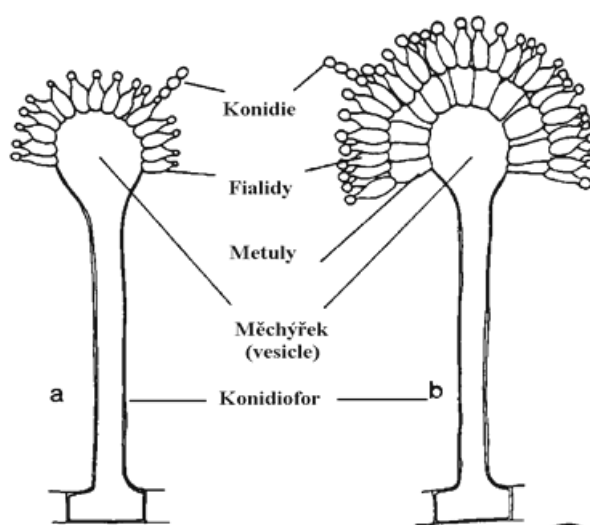
Rod	Sekce	Druh	Potravina
<i>Aspergillus</i>	<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i>	sójové boby, ořechy, červená paprika,  obiloviny, zelená kávová zrna
		<i>A. steynii</i>	kávová zrna
		<i>A. westerdijkiae</i>	kávová zrna
	<i>Nigri</i>	<i>A. carbonarius</i>	hrozny, červená paprika, kávová zrna
		<i>A. foetidus</i>	hrozny
		<i>A. lacticoffeatus</i>	kávová zrna
		<i>A. niger</i>	hrozny, arašídy
		<i>A. sclerotioniger</i>	kávová zrna
		<i>A. tubingensis</i>	hrozny

**Tab. č. 2 Druh rodu *Penicillium* produkující OTA (Ostrý *et al.*, 2013)**

Rod	Podrod	Série	Druh	Potravina
<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Verrucosa</i>	<i>P. verrucosum</i>	obiloviny
			<i>P. nordicum</i>	sušená šunka, salám

## 1.2.1 Taxonomie a morfologie rodu *Aspergillus*

Rod *Aspergillus* neboli kropidlák se řadí do oddělení *Ascomycota*, třídy *Eurotiomycetes* a čeledi *Trichomaceae*. Na mikrohabitu můžeme sledovat charakteristický znak celého rodu a to hlavičkovité zakončení konidioforů (nepohlavní rozmnožovací orgány), které se rozšiřují v tzv. měchýřek. Po obvodu měchýřku jsou umístěny fialidy, které produkují samotné konidie (nepohlavní spory) (Ostrý & Buchta, 2003 a; Varga & Samson, 2008).



Obr. č. 2 Mikrohabitus rodu *Aspergillus*

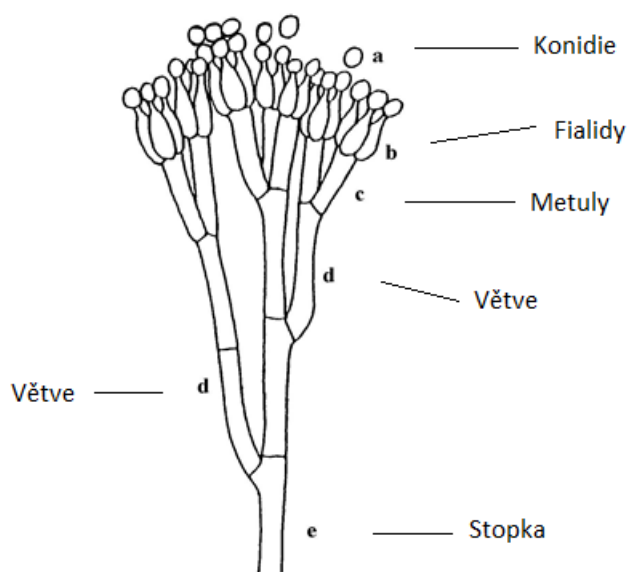
(Ostrý & Buchta, 2003 a)

Tab. č. 3 Taxonomické zařazení rodu *Aspergillus* (Ostrý & Buchta, 2003 a)

Říše	Oddělení	Řád	Čeď	Anamorfní rod
<i>Fungi</i> (houby)	<i>Ascomycota</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Trichomaceae</i>	<i>Aspergillus</i>

## 1.2.2 Taxonomie a morfologie rodu *Penicillium*

Rod *Penicillium* se stejně jako *Aspergillus* řadí do oddělení *Ascomycota* (vřeckovýtrusné houby), třídy *Eurotiomycetes* a čeledi *Trichomaceae*. Tvar nepohlavního rozmnožovacího orgánu připomínající štětičky mu dal český přívlastek štětičkovec a je charakteristickým znakem tohoto rodu. Podle specifické stavby konidioforů se rod *Penicillium* rozděluje na čtyři podrody a to *Aspergilloides*, *Furcatum*, *Penicillium* a *Biverticillium* (Ostrý & Buchta, 2003 b)



Obr. č. 3 Mikrohabitus rodu *Penicillium*

Tab. č. 4 Taxonomické zařazení rodu *Penicillium* (Ostrý & Buchta, 2003 b)

Říše	Oddělení	Řád	Čeleď	Anamorfní rod	Podrod
<i>Fungi</i> (houby)	<i>Ascomycota</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Trichomaceae</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Aspergilloides</i> <i>Penicillium</i> <i>Biverticillium</i> <i>Furcatum</i>

## 1.3 Výskyt OTA v potravinách

Potraviny představují hlavní zdroj expozice OTA u lidí. OTA jako přirozeně se vyskytující kontaminant byl zjištěn u potravin rostlinného i živočišného původu (Ostrý *et al.*, 2013).

OTA byl nalezen u mnoha druhů rostlinných potravin, jako jsou obiloviny, kávová zrna, kakao, čokoláda, koření (např. sušená paprika, chilli, černý pepř, kajenský pepř, muškátový oříšek, koriandr, zázvor, kurkuma), zelenina, sušené ovoce, arašídý, víno, fazole, sójové boby, kukuřice, ořechy, mouka, zelený čaj a některé byliny (Afsah-Hejri *et al.*, 2013).

U potravin živočišného původu dochází ve většině případů k nepřímé kontaminaci prostřednictvím potravního řetězce. Výskyt OTA byl prokázán v syrovém vepřovém mase, u výrobků z vepřové krve nebo drůbežích játrech. K přímé kontaminaci masných výrobků dochází u uzených mas, salámů nebo u sušené šunky (Ostrý *et al.*, 2013).

Ke kontaminaci zemědělských komodit může dojít již při pěstování na poli, během sklizně a zpracování, skladování a následné přepravě. OTA kontaminuje obiloviny, kakao, kávu, koření a sušené ovoce během skladování, zatímco hrozny jsou obvykle kontaminovány na poli. Některé techniky zpracování mohou snížit výskyt populací vláknitých mikroskopických hub na plodinách. K expozici OTA u člověka obvykle dochází konzumací nesprávně skladovaných potravin. OTA lze určit ve tkáních a orgánech lidí a zvířat (včetně mateřského mléka, masa a krve) (Afsah-Hejri *et al.*, 2013).

Je známo, že výskyt OTA v živočišných produktech je mnohonásobně nižší, než je tomu u potravin rostlinných a obecně se nepovažuje za hlavní problém veřejného zdraví (Ostrý *et al.*, 2013).

## 1.4 Toxicita OTA

I když toxické účinky OTA nejsou hlavní náplní této diplomové práce, pro celkový přehled jsou zde uvedeny podrobněji.

Toxikologické hodnocení OTA bylo popisováno již v mnoha studiích a bylo také hlavním předmětem monografie Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC) v roce 1993. IARC v tomto roce klasifikovala OTA na základě dostatečných důkazů karcinogenity v experimentálních studiích na zvířatech a zároveň nedostatečných důkazů u lidí OTA jako možný lidský karcinogen (skupina 2B).

V následujících letech studie IARC prokázaly tendenci ve směru toxicity ke stupni a zároveň prokázaly výskyt synergických účinků různých mykotoxinů (IARC, 1993; Ostrý *et al.*, 2017).

Po objevení spontánních nefropatií u lidí a zvířat bylo provedeno několik experimentálních studií, které prokázaly souvislost toxických účinků OTA se vznikem těchto chorob (Zimmerli & Dick, 1996; Otteneder & Majerus, 2000). Působení OTA jako silného nefrotoxinu je často spojováno se vznikem nádorů močových cest a lidskou Balkánskou endemickou nefropatií (BEN), onemocněním, které v nejhrošším případě může vést až k nevratnému selhání ledvin (Abrunhosa *et al.*, 2010).

OTA vykazuje různé toxické účinky, kromě nefrotoxicity se dále jedná o imunotoxicitu, genotoxicitu, karcinogenitu, mutagenitu, teratogenitu, neurotoxicitu (O'Brien *et al.*, 2001).

Za toxicitu OTA na buněčné úrovni je zodpovědná řada mechanismů. OTA je konkurentem fenylyalanin-tRNA ligázy, čímž inhibuje syntézu proteinů. Jeho biotransformace je komplexní a zahrnuje několik biotransformačních enzymů jako je cytochrom P450, ale i jiné (např. peroxidázy, glutathiontransferázy a lipoxygenázy), které jsou ovlivněny expozicí OTA (Malíř *et al.*, 2013). Jeho toxicita je do jisté míry ovlivněna pohlavím či druhem testovaného organismu (O'Brien *et al.*, 2001).

Mezi další mechanismy působení řadíme tvorbu DNA aduktů, apoptózu, interferenci s cytoskeletem, lipidovou peroxidaci a inhibici mitochondriálního dýchání. Je obecně známo, že OTA brzdí produkci ATP a je schopen redukovat  $Fe^{3+}$  na  $Fe^{2+}$  a oxidovat  $Fe^{2+}$  na  $Fe^{3+}$  což je doprovázeno zvýšenou spotřebou  $O_2$  v přítomnosti CYP 450 nebo NADPH. Tento jev vede k produkci škodlivých aktivních radikálů během metabolismu toxinu v přítomnosti železa ve formě dostupné pro redukci a oxidaci (Malíř *et al.*, 2013).

OTA je považován za kumulativní toxickou sloučeninu, protože se snadno vstřebává gastrointestinálním traktem (žaludkem a tenkým střevem), ale jeho vylučování žlučovými cestami a močí je obtížné. Orální poločas OTA u lidí je 35,5 dne, u opic 21 dní, u prasat 72–120 hodin, u potkanů 55–120 hodin a u myší 40 hodin. Dlouhé poločasy vylučování pozorované u některých druhů jsou způsobeny silnou vazbou OTA k sérovým proteinům, které omezují jeho přenos z krve do jaterních a ledvinových buněk (Abrunhosa *et al.*, 2010).

Dlouho panovaly neshody ohledně genotoxické aktivity OTA. V roce 1991 bylo objeveno několik DNA aduktů v buňkách sleziny u myši po perorální aplikaci OTA na myši (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1991). Bylo také dokázáno, že buňky cílových orgánů zvířat a také lidské buňky z močových cest reagují na změny DNA mnohem citlivěji (Föllmann *et al.*, 1995; Dörrenhaus & Föllman, 1997).

Teratogenní působení OTA bylo zaznamenáno zejména u hlodavců, u kterých způsobuje vrozené vady. OTA dokáže procházet placentou a být prostřednictvím laktace přenesen na novorozené krysy a myši (Hallen *et al.*, 1998). U plodu je hlavním cílem vyvíjející se centrální nervový systém, proto je OTA považován za neurotoxickou sloučeninu. Kromě toho se v játrech, ledvinách a dalších tkáních potomstva tvoří OTA-DNA adukty (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1993).

Je známo, že OTA ovlivňuje imunitní systém u řady druhů savců. Imunosupresivní účinky, tedy účinky potlačující imunitní systém závisí na řadě faktorů, včetně druhu, pohlaví, typu podání testované látky a také detekční metodě (O'Brien *et al.*, 2001). Imunosuprese byla zjištěna při expozici OTA u prenatalních, postnatalních a dospělých jedinců. Tyto účinky zahrnují sníženou fagocytózu, zvýšenou citlivost k bakteriálním infekcím a opožděnou imunitní odpověď (Stoev *et al.*, 2000). Populace lidských lymfocytů zkoumané *in vitro*, byly nepříznivě ovlivněny expozicí OTA (Lea *et al.*, 1989).

U jednotlivých metabolitů OTA se setkáváme s různou mírou toxicity. Za netoxickou formu je považován OT $\alpha$ , vznikající štěpením peptidové vazby v OTA. Lakton - otevřená forma (OP-OTA), nalezena u hlodavců vykazuje dokonce vyšší toxicitu než samotný OTA. Díky ztrátě chlóru je OTB méně toxický než OTA. Chininové a hydrochinonové (OTQ/OTHQ) formy jsou naopak výrazně toxičtější oproti OTA (Škarková *et al.*, 2013).

Z výše zmíněného vyplývá, že OTA a jeho metabolity způsobují několik toxických účinků současně. Cílovým orgánem u většiny testovaných druhů savců jsou především ledviny, ve kterých dochází ke vzniku lézí, které jsou způsobeny jak akutní, subakutní, či chronickou expozicí. Zvířata mohou vykazovat různou míru citlivosti k OTA v závislosti na genetických faktorech (plemeno, druh), fyziologických faktorech (pohlaví, věk, výživa, jiná onemocnění) a faktorech prostředí (klimatické podmínky) (Harwig *et al.*, 1983).

#### **1.4.1 Akutní a subakutní toxicita**

Jedním ze způsobů měření krátkodobého potenciálu otravy (akutní toxicity) je ukazatel LD50. Tuto veličinu definujeme jako množství zkoumané látky podané testovaným jedincům, která způsobí úhyn 50 % testovaných jedinců do 24 hodin od expozice. Jinými slovy ji lze označit za tzv. smrtelnou dávku pro jednu polovinu testovaných. Ve studiích akutní toxicity se jednotlivé hodnoty velmi liší a to v závislosti na druhu testovaného zvířete a také způsobu podání (orálně, intravenózně nebo intraperitoneálně).



U orálního podání byly zaznamenány hodnoty LD50 od 0,20 mg/kg u psů, 1 mg/kg u prasat až po hodnoty přesahující 30 mg/kg u potkanů. Mezi ostatní faktory ovlivňující akutní toxicitu OTA řadíme například složení stravy a také přítomnost dalších mykotoxinů, které mohou vést k synergickým účinkům těchto látek (Kuiper-Goodman & Scott, 1989; Dirheimer, 1996; Creppy, 1999; Petzinger & Ziegler, 2000; Mantle, 2002; O'Brien & Dietrich, 2005).

Dávky LD50 podané perorálně u všech zkoumaných druhů vyvolaly multifokální krvácení u téměř všech hlavních orgánů a tromby fibrinu ve slezině, játrech, srdci, mozku a ledvinách. U všech zkoumaných druhů byla patrná nefróza v jaterních a lymfoidních tkáních a enteritida s náhodnou zhoubnou atrofií. V jižní Itálii byl nahlášen jediný neoficiální případ pravděpodobné akutní toxicity OTA u člověka, u kterého došlo k přechodnému epigastriálnímu napětí, dýchacím obtížím a retrosternálnímu pálení po práci v sýpce. Biopsie odhalila akutní tubulární nekrózu, a i když nedošlo k vyšetření pacientovy krve na přítomnost OTA, toxin byl stanoven pomocí chromatografie na tenké vrstvě v pšenici ze skladovacího sila (O'Brien & Dietrich, 2005).

#### 1.4.2 Chronická toxicita

Ve vyspělých zemích dochází k chronické expozici OTA mnohem častěji než k expozici akutní. Dlouhodobá expozice vůči nízkým dávkám OTA může vést k mnohem škodlivějším dopadům na organismus, než pokud je jedinec vystaven jednorázově vysoké dávce OTA. Chronická expozice je zodpovědná za nefrotoxicitu a také vede ke vzniku nádorů, jejichž výskyt byl potvrzen u potkanů. Několik studií prokázalo významnou souvislost expozice OTA a některými formami nefropatií. Velmi nízké koncentrace OTA podávané po dobu 14 dní ovlivňují buněčnou hypertrofii v lidském proximálním tubulu. Kromě působení v cílových orgánech (ledvinách, varlatech) dochází k toxickému vlivu OTA na jiné buňky, u kterých se s velkou pravděpodobností mohou projevit stejná poškození. Chronická toxicita OTA se podílí na mechanismu tvorby ledvinových nádorů (Malíř *et al.*, 2013). Ochratoxiny jsou primárně nefrotoxické, ale mohou být také hepatotoxické, imunotoxické, teratogenní a karcinogenní (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007; Malíř *et al.*, 2013).

### 1.5 Toxikokinetika OTA

Sleduje „osud“ OTA v organismu od jeho absorpce až po eliminaci, přičemž je obecně známo, že OTA je kumulativní sloučenina projevující se relativně rychlou absorpcí a pomalou eliminací. OTA je metabolizován několika různými cestami, jako je hydrolýza, hydroxylace, otevírání laktonového kruhu a konjugace, což vede ke vzniku řady metabolitů (Malíř *et al.*, 2013).

Toxikokinetiku OTA ovlivňují různé toxikokinetické (změny koncentrace sloučeniny v organismu v čase) i toxikodynamické pochody (dynamické interakce sloučeniny s biologickými cíli a jejich následné biologické účinky).

Po absorpci z gastrointestinálního traktu se OTA váže na sérové proteiny. Je známo, že značné rozdíly v poločasech séra v různých druzích jsou závislé na afinitě a stupni vazby na proteiny. Reakce adsorbce OTA ze střeva zpět do oběhu v důsledku recyklace žlučových cest napomáhá systémové redistribuci OTA směrem k různým tkáním. Kromě toho dochází k reabsorpci OTA v proximálních a distálních tubulech ledvin. K akumulaci dochází v krvi, játrech a ledvinách. Játra a ledviny jsou také hlavními orgány biotransformace OTA (Ringot *et al.*, 2006).

Metabolismus OTA nebyl podrobně objasněn a v současné době jsou data týkající se biotransformace OTA kontroverzní (Ringot *et al.*, 2006).

### 1.5.1 Absorpce

Ve fyziologických podmínkách dvanáctníku je OTA přítomen ve formě monoanionu ( $\text{OTA}^-$ ) a dianionu ( $\text{OTA}^{2-}$ ). Jedná se o tzv. ionizované formy, které jsou v tucích méně rozpustné. V kyselých podmínkách (v horních částech GIT) nalezneme OTA naopak ve formě neionizované ( $\text{OTA}^0$ ), dobře rozpustné v tucích (Ringot *et al.*, 2006).

K absorpci OTA po perorálním podání dochází zejména pasivně a to z tenkého střeva v jeho neionizované formě rozpustné v tucích. Pasivní absorpce je podporována vysokou afinitou OTA k plazmatickým proteinům (Malíř *et al.*, 2013). Orální biologická dostupnost u experimentálních zvířat je mezi 40 % a 60 % (FAO / WHO, 2001). Maximálních plazmatických koncentrací bylo dosaženo během 24–48 hodin po aplikaci jedné orální dávky 0,5 mg / kg tělesné hmotnosti samcům a samicím potkanů F344 (Zepnik *et al.*, 2003). Koncentrace toxinu a jeho metabolitů je závislá na řadě faktorů včetně dávky, cesty a délky podání a také na druhově specifických faktorech (Studer-Rohr *et al.*, 2000; Ringot *et al.*, 2006).

OTA má velmi vysokou afinitu k plazmatickým proteinům a přibližně 99 % cirkulujícího OTA je vázáno na plazmatické proteiny (hlavně albumin). Pouze malé množství OTA se vyskytuje ve volné formě. Díky svým jedinečným vazebným vlastnostem má OTA dlouhý biologický poločas v séru, u člověka konkrétně 35,5 dne (Studer-Rohr *et al.*, 2000).

Část OTA, která se nachází ve žluči, může být vstřebána střevem. OTA je absorbován přes lidskou střevní sliznici a k transportu dochází přes apikální membránu prostřednictvím pasivní difúze nedisociované formy OTA, zatímco průchod přes bazolaterální membránu je zprostředkován usnadněným nosným systémem (Berger *et al.*, 2003).

Procento absorbovaného OTA se liší mezi druhy: 66 % u prasat, 56 % u potkanů a králíků a 40 % u kuřat (Galtier *et al.*, 1981).

## 1.5.2 Distribuce

Jakmile se OTA dostane do krevního řečiště, více než 99 % je navázáno na sérové proteiny (především albumin), což umožňuje jeho pasivní absorpci v neionizované formě a částečně vysvětluje jeho dlouhý biologický poločas v těle (Dörrenhaus & Föllman, 1997; Hallen *et al.*, 1998). Erytrocyty obsahují pouze nepatrné stopy OTA (Otteneder & Majerus, 2001).

Na základě několika *in vitro* studií byla prozkoumána molekulární podstata interakce mezi OTA a albuminem a na základě těchto dat bylo navrženo, že vazba na albumin zpomaluje eliminaci OTA omezením přenosu z krve do jaterních a ledvinových buněk (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1993). Byla prokázána silná vazba toxinu na protein v krevním séru o molekulové hmotnosti 20 000 DA, na který se OTA váže mnohem specifičtěji než na albumin. Díky snadnému průchodu těchto molekul přes glomerulární membránu, by tato vazba mohla mít rozhodující význam v možné nefrotoxicitě OTA u savců (Škarková *et al.*, 2013). Zdá se, že kromě těchto zmíněných bílkovin se na transportu OTA podílejí i jiné doposud charakterizované krevní proteiny (Harwig *et al.*, 1983).

U zvířat závisí koncentrace toxinu a jeho metabolitů ve tkáních a plazmě na několika faktorech (druhu zvířete, podané dávce, formě OTA, složení potravy, zdravotním stavu). Tyto faktory jsou důležité pro posouzení výskytu toxinových zbytků ve zvířecích tkáních. Je obecně známo, že eliminační poločas OTA je delší v krvi než v tkáních, což pravděpodobně souvisí s vyšší vazebnou afinitou toxinu ke krevním proteinům (Galtier *et al.*, 1981; Creppy, 1999; Petzinger & Ziegler, 2000). K distribuci do tkání u prasat, potkanů, kuřat a koz dochází ve směru ledviny > játra > sval > tuk (FAO/WHO, 2001; Zepnik *et al.*, 2003). Tkáně a tuk mohou sloužit jako rezervoár pro OTA.

U lidí byla zjištěna dvakrát vyšší koncentrace OTA ve fetálním séru oproti mateřskému, z čehož vyplývá, že dochází k aktivnímu přenosu OTA placentou. Mechanismus přenosu OTA přes placentu není zcela prozkoumán (Mally *et al.*, 2005).

## 1.5.3 Biotransformace

U zvířat a lidí dochází k biotransformaci OTA ve střevech, játrech a ledvinách. Existují různé a často protichůdné názory týkající se jeho biotransformace. Jedním z nich je, že vazba na plazmatické bílkoviny, tubulární reabsorpce filtrovaného OTA v ledvinách a jeho pomalá biotransformace na polární a vylučované metabolity může vysvětlit jeho velmi dlouhý biologický poločas u zvířat a lidí.

Kromě toho byla prokázána nedostatečná detekce metabolitu 4-OH-OTA, při použití stejné dávky OTA (0,5 mg/kg tělesné hmotnosti) (Zepnik *et al.*, 2003). Jiní autoři naopak detekovali 4-OH-OTA v množství závislém na dávce. Druhý názor je protichůdný (Pfohl-Leszkowicz & Castegnaro, 2006). Podle těchto autorů se OTA váže na sérový albumin a pravděpodobně 4-OH-OTA (Pfohl-Leszkowicz & Castegnaro, 2006). Autoři naznačují, že nedostatečná detekce 4-OH-OTA ve studii Zepnik *et al.* (2003) byla způsobena srážením proteinů před samotnou analýzou OTA a jeho metabolitů. Jak ve své studii uvádí Castegnaro *et al.* (1998), byly hlášeny vyšší míry vylučování a vyšší výtěžnost, tato studie ovšem aplikovala mnohem vyšší dávky, které mohou narušovat renální spojení nebo vést k vyššímu výtěžku tvorby OT $\alpha$  v důsledku pomalejší nebo neúplné absorpce střeva (Pfohl-Leszkowicz & Castegnaro, 2006).

V těle je OTA metabolizován na hydroxylované deriváty: 4-R-hydroxyochratoxin A, 4-S-hydroxyochratoxin A, 10 OH-OTA, OTB (nechlorovaná forma OTA), OP-OTA (otevřená laktonová forma), OTHQ (chinonová forma), které se nacházejí v krvi nebo moči ve výše uvedených formách nebo jsou konjugovány na glutathion (Zepnik *et al.*, 2001; Dai *et al.*, 2003; Mally *et al.*, 2004; Azpilicueta *et al.*, 2008; Manderville & Pfohl-Leszkowicz, 2008; Pfohl-Leszkowicz, 2009; Jennings-Gee *et al.*, 2010; Hadjeba-Medjdoub *et al.*, 2012; Tozlovanu *et al.*, 2012).

Toxikokinetický profil OTA se velmi liší v závislosti na druhu metabolitu (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007; Wu *et al.*, 2011; Tozlovanu *et al.*, 2012). Míra toxicity a orgánové specifity OTA je závislá na druhu metabolitu vzniklém při biotransformaci OTA a to jak u lidí tak zvířat (JECFA, 2008). Většina metabolitů OTA jako OT $\alpha$  (Stander *et al.*, 2001) a OTB (Petzinger & Ziegler, 2000) jsou považovány za méně toxické než původní sloučenina, přičemž nižší toxicita OTB může částečně vyplývat z rozdílů v toxikokinetice (Mally *et al.*, 2005). Nižší toxicita OTB je také vysvětlována jeho strukturou, ve které, oproti OTA chybí chlor (Mally *et al.*, 2005; Hadjeba-Medjdoub *et al.*, 2012). Naopak některé metabolity, jako například OP-OTA (lakton otevřená forma) jsou stejně toxické jako OTA (Li *et al.*, 2000). Metabolit OP-OTA byl nalezen v lidské krvi i moči (Pfohl-Leszkowicz, 2009).

U OTHQ, který byl také nalezen v krvi a moči byla prokázána vyšší toxicita než u samotného OTA (Faucet-Marquis *et al.*, 2006; Tozlovanu *et al.*, 2006). Není pochyb o tom, že objasnění metabolických cest OTA u zvířat a lidí by bylo velmi užitečné, pokud jde o řešení zdravotních rizik vyplývajících z expozice OTA (Malíř *et al.*, 2013).

## 1.5.4 Eliminace

OTA je kumulativní toxická sloučenina s relativně rychlou absorpcí a pomalou eliminací. U všech druhů hrají fekální i močové exkrece důležitou roli v plazmatické clearanci. Relativní přínos každé vylučovací cesty je ovlivněn cestou podání, dávkou, stupněm vazby na plazmatické proteiny a enterohepatickou cirkulací OTA. Kromě vylučování ledvinami a stolicí, bylo dokázáno, že OTA je vylučován mateřským mlékem (Ringot *et al.*, 2006).

### **Renální exkrece**

OTA a jeho metabolity jsou vylučovány především lidskou močí. K detekci OTA v moči dochází ještě několik dní po jeho požití (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007). Průměrná hodnota eliminace se pohybuje mezi 20 až 80 ng / den a to nezávisle na požití dávce (Castegnaro *et al.*, 2006). Vzhledem k vysoké vazebné afinitě OTA k plazmatickým proteinům je jeho glomerulární filtrace omezená a podléhá spíše tubulární sekreci. Navíc je OTA reabsorbován ve všech nefronových segmentech. Tyto jevy jsou charakterizovány především jako karrimediační transport přes tubulární membrány a jsou prováděny několika transportními proteiny.

Na základě některých studií je OTA v moči považován za lepší ukazatel expozice než hladina OTA v krvi (Gilbert *et al.*, 2001; Pfohl-Leszkowicz & Castegnaro, 2006). Příjem OTA byl popsán jako závislý na koncentraci volného OTA, která je vážně omezena vazbou OTA na sérový albumin (Pfohl-Leszkowicz & Manderville 2007). Množství OTA v moči stejně tak jako v krvi je závislé na jeho příjmu organismem a zůstává i nadále předmětem mnoha studií. Na základě několika dalších výzkumů byla potvrzena přítomnost metabolitů OTA (např. nechlorovaná forma OTB, hydroxylovaný metabolit 4-OH OTA a deriváty chinonu) v lidské moči (Jonsyn-Ellis, 2000; Castegnaro *et al.* 2006, Pfohl-Leszkowicz, 2009).

### **Fekální exkrece**

OTA je spolu se svými metabolity vylučován stolicí. Fekální exkrece je způsobena především biliární exkrecí, která je velmi účinná a s největší pravděpodobností je zapříčiněna molekulovou hmotností OTA (403,8) (Kumagai & Aibara, 1982; Roth *et al.*, 1988).

Je obecně známo, že u molekulových hmotností mezi 350 a 500 se může vyskytnout jak biliární exkrece, tak renální reabsorpce. Kromě toho by neměla být vyloučena sekrece střeva (Kumagai & Aibara, 1982).

Ve studiích, které prováděly experimenty na potkanech, bylo zjištěno, že množství OTA, které může být vyloučeno celým gastrointestinálním traktem je srovnatelné s množstvím vylučovaným žlučí (Suzuki *et al.*, 1997). Bylo také zjištěno, že dominantním místem vylučování OTA je dolní část střeva (Kumagai & Aibara, 1982). Ve střevě dochází k hydrolýze konjugovaných sloučenin OTA prostřednictvím střevní mikroflóry a následné účasti OTA na enterohepatické cirkulaci. Mikrobiální mikroflóra také hydrolyzuje OTA na OT v tlustém střevě. U koz, kterým byla podána jednorázová perorální dávka 0,5 mg / kg OTA, bylo 53 % toxinu vyloučeno stolicí (Nip & CHu, 1979).

### **Exkrece mlékem**

OTA je vylučován také do mateřského mléka, jehož prostřednictvím jsou ohroženy kojené děti. Uvádí se, že množství OTA v mléce je mnohem nižší, než jeho koncentrace v krvi a to až 10 krát (Breitholtz-Emanuelsson *et al.*, 1993). V Itálii byla přítomnost OTA zjištěna u mléka zdravých žen s různou denní stravou v různých zeměpisných oblastech (Micco *et al.*, 1991). Byl zkoumán vztah mezi kontaminací lidského mléka OTA a jeho příjmem z potravy a bylo potvrzeno, že výskyt OTA v lidském mléce byl pravděpodobně spojen s výživovými návyky matky. Nejsilnější asociace byly pozorovány u potravin rostlinného původu a v menší míře u potravin živočišného původu (Skaug *et al.*, 2001). Bylo zjištěno, že v některých zemích (např. Egyptě, Turecku a Sierře Leone) je koncentrace OTA ve srovnání s Evropou více než 100krát vyšší (Kuiper-Goodman *et al.*, 2010).

Navzdory faktu, že koncentrace OTA v mléce ve srovnání s krví je mnohem nižší, představuje kontaminace lidského mateřského mléka potenciálně vážné zdravotní riziko (Kuiper-Goodman *et al.*, 2010).

## 1.6 Regulace OTA v potravinách a krmivech

Se vzrůstající obavou z možných účinků mykotoxinů na zdraví lidí a zvířat se úřady v mnoha zemích rozhodly zavést opatření sloužící ke kontrole a sledování hladiny mykotoxinů. V rozhodujících procesech zaměřených na stanovení limitů pro mykotoxiny hrají roli různé faktory. Patří sem vědecké faktory pro hodnocení rizika (dostupnost toxikologických údajů), znalosti o hladině a distribuci mykotoxinů v komoditách a dále hospodářské faktory, jako jsou obchodní zájmy a otázka zabezpečení potravin. Přes nemalé obtíže byla v posledních letech v mnoha zemích zavedena regulace mykotoxinů a stále se vydávají novější předpisy (FAO/WHO, 2004).

OTA byl hodnocen Společným výborem odborníků FAO / WHO pro potravinářské přídatné látky (JECFA) v roce 1991. Výbor stanovil prozatímní tolerovatelný týdenní příjem (PTWI) na 112 ng / kg tělesné hmotnosti. Tato hodnota byla navržena na základě databáze prasečích nefropatií (WHO, 1991).

Molekula OTA byla však znovu vyhodnocena JECFA v roce 1995 a PTWI byl znovu potvrzen a zaokrouhlen na 100 ng / kg tělesné hmotnosti (FAO, 1996).

Od posledního hodnocení a po provedení několika nových studií zkoumajících účinky OTA, doporučila JECFA na svém 56. zasedání v únoru 2001, aby byly provedeny další studie, které by dopomohly objasnit mechanismus, kterým OTA způsobuje nefrotoxicitu a karcinogenitu (FAO, 2001).

17. září 1998 vydal Vědecký výbor pro potraviny (SCF) stanovisko, ve kterém uvedl, že s ohledem na nejnovější toxikologické studie a údaje o expozici byla zvláštní pozornost věnována také zranitelným skupinám, jako jsou kojenci a děti, a skupinám spotřebitelů, kteří jsou kvůli svým stravovacím návykům vystaveni vyšší hladině OTA než průměrný spotřebitel. Dále navrhl co nejvíce snížit příjem OTA na úroveň mezi 1,2–14 ng / kg tělesné hmotnosti denně (SCF, 1998).

Nařízení Evropské komise (ES) č. 472/2002 ze dne 12. března 2002 (European Commission, 2002) změnilo nařízení (ES) č. 466/2001 (European Commission, 2001), kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách. Nařízení omezuje kontaminaci OTA v nezpracovaných obilovinách, včetně rýže a pohanky, až na 5 µg / kg. U produktů z obilovin však byla kontaminace OTA stanovena na 3 µg / kg. Dále toto nařízení rovněž stanoví kontaminaci suchých hroznů na hranici 10 µg / kg.

Nařízení (ES) č. 683/2004 ze dne 13. dubna 2004 (European Commission, 2004) navíc změnilo nařízení (ES) č. 466/2001, včetně směrnice omezující kontaminaci OTA na 0,5 µg / kg ve všech potravinových přípravcích pro kojence a ve stravě pro zvláštní lékařské účely určené speciálně pro kojence (European Commission, 2001).

Další nařízení (ES) č. 123/2005 klade důraz na určité potravinářské produkty, jako je víno, hroznové šťávy a kávu, které významně přispívají k expozici člověka OTA (European Commission, 2005).

Toto nařízení nezměnilo maximální obsah stanovený dříve u obilovin nebo hroznů. Zahrnuje však novou směrnici omezující kontaminaci OTA u hroznových šťáv a vín (červená, bílá a růžová), kde maximální hodnoty musí být 2 µg / l. Byla přijata další nová směrnice zaměřená na stanovení limitů kontaminace OTA v kávě. Tato směrnice stanovila maximální hladinu pro OTA až 5 µg / kg v kávových zrnech a 10 µg / kg v instantní kávě.

Podle nařízení (ES) č. 466/2001 je naprosto zakázáno míchat neshodné výrobky s výrobky vyhovujícími, aby se snížila úroveň kontaminace OTA. Bylo také zakázáno používat chemické ošetření pro dekontaminaci OTA v produktech určených k lidské spotřebě (European Commission, 2001).

V případě léčivých rostlin má EU oficiální předpisy týkající se limitů OTA povolených pro muškátový oříšek, zázvor, kurkumu, černý a bílý pepř a kořen lékořice a jeho extrakt, přičemž zákonná hranice se pohybuje od 15 µg / kg do 80 µg / kg (Qin *et al.*, 2020), ale těchto limitů je bohužel relativně málo, proto je zapotřebí se tím zabývat mnohem podrobněji.

Cílem všech zmíněných směrnic je minimalizovat přítomnost OTA v různých potravinách s cílem snížit kontaminaci potravinářských výrobků tímto mykotoxinem. Bude to otázka dodržování správných zemědělských postupů nebo dekontaminace konečného produktu.



**Tab. č. 5 Maximální limity OTA v potravinách (Evropská komise, 2006; Evropská komise, 2010)**

	<b>Potraviny</b>	<b>Maximální limity OTA [<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>]</b>
<b>NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2016</b>	Nezpracované obiloviny	5,0
	Všechny produkty pocházející z nezpracovaných obilovin, včetně zpracovaných výrobků z obilovin a obilovin určených k přímé lidské spotřebě (kromě obilných příkrmů, ostatních příkrmů určených pro kojence a malé děti a dietních potravin pro zvláštní léčebné účely, určené speciálně pro kojence)	3,0
	Sušené hrozny révy vinné (korintky, rozinky a sultánky)	10,0
	Pražená kávová zrna a mletá pražená káva kromě rozpustné kávy	5,0
	Rozpustná káva (instantní káva)	10,0
	Víno (včetně šumivého vína, s výjimkou likérového vína a vína s obsahem alkoholu nejméně 15 % objemových) a ovocné víno	2,0
	Aromatizovaná vína, 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 určené pro lidskou spotřebu	2,0
	Obilné příkrmy a ostatní příkrmy určené pro kojence a malé děti	0,50
	Dietní potraviny pro zvláštní léčebné účely, určené speciálně pro kojence	0,50
<b>NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) Č. 105/2010 ze dne 5. února 2010</b>	Koření <i>Capsicum</i> spp. (sušené plody, celé nebo mleté, včetně chilli papriček, mletých chilli papriček, kayenského pepře a papriky) <i>Piper</i> spp. (plody, včetně bílého a černého pepře) <i>Myristica fragrans</i> (muškátový oříšek) <i>Zingiber officinale</i> (zázvor) <i>Curcuma longa</i> (kurkuma) Směsi koření obsahující jeden nebo více výše uvedených druhů koření	15
	Kořen lékořice, složka bylinného čaje	20
	Výtažek z lékořice pro použití v potravinářských výrobcích, zejména v nápojích a cukrovinkách	80

## 2 OTA ve farmaceutických bylinách

Léčivé rostliny mají dlouhou historii použití v terapii po celém světě a tvoří důležitou součást tradiční medicíny, která byla často hlavním zdrojem zdravotní péče v zemích s nízkými nebo středními příjmy. V posledních desetiletích došlo k rozšíření fytoterapie i ve vyspělých zemích, zejména z důvodu, že se jedná o neškodný a přirozený léčebný způsob (Kosalec *et al.*, 2009). Bezpečnost rostlinných produktů se však díky své oblibě a rozšíření globálního trhu stala hlavním problémem v oblasti veřejného zdraví a je tedy velmi důležité, aby léčivé byliny a rostlinné produkty byly zahrnuty do příslušných nařízení (WHO, 2007).

Mnoho kontaminantů se přirozeně vyskytuje v půdě a atmosféře a to především v souvislosti s používáním látek znečišťujících životní prostředí a to jak v minulosti, tak přítomnosti. Následně pak dochází ke kontaminaci léčivých rostlin těmito sloučeninami. Škodlivé látky mohou pocházet z podmínek, ve kterých jsou rostliny pěstovány nebo mohou být kontaminovány po sklizni rostlinného materiálu či ve stádiích výroby finálních produktů. Mezi nejčastější formy kontaminace bylin patří biologická kontaminace (mikroby, mykotoxiny a jiné organismy) a chemická kontaminace (toxické prvky).

Ochratoxiny se vyskytují v různých částech rostlinných těl. Studie léčivých bylin pocházejících z brazilského trhu ukázala, že obsah ochratoxinů je největší v listech, dále oddencích, kořenech, kůře a semenech rostlin. Dominantní plísně produkující toxiny pocházely z rodu *Aspergillus* a *Penicillium*. U většiny rostlin byl zaznamenán výskyt ochratoxinů spolu s jinými druhy mykotoxinů (aflatoxinů a citrinin) (Bugno *et al.*, 2006). Produkce ochratoxinů, ale i jiných mykotoxinů je závislá na mnoha faktorech, jako jsou genetické predispozice rostliny k plísni, druh substrátu, vlhkost, poměr CO<sub>2</sub> a O<sub>2</sub>, přítomnost fungicidů nebo jiných konkurence schopných mikrobiálních druhů. Některé léčivé rostliny obsahují éterické oleje, které se postupně uvolňují do půdního profilu a mohou ovlivňovat chemický potenciál substrátu a tím omezit rozvoj plísni a tvorbu ochratoxinů (Kabelitz & Sievers, 2004).

Hodnocení kvality léčivých rostlin by mělo zahrnovat možnou kontaminaci ochratoxiny. OTA jakožto sekundární nízkomolekulární metabolit může kontaminovat léčivé byliny prostřednictvím některých druhů vláknitých mikroskopických hub, produkujících tento mykotoxin a vyskytujících se na jejich rostlinných tělech. Jedná se zejména o *Penicillium verrucosum* a *Aspergillus ochraceus*, dále pak *A. carbonarius* a *A. niger* (Kosalec *et al.*, 2009).

Dle různých studií bylo zjištěno, že kořeny lékořice podporují kontaminaci plísněmi a následnou produkci OTA. Bresch *et al.* (2000) detekovali OTA u 50 % vzorků kořenů lékořice, zatímco Majerus *et al.* (2000) detekovali OTA ve všech vyšetřovaných vzorcích. Ariño *et al.* (2007) zkoumali kořeny lékořice pomocí kapalinové chromatografie – fluorescenční detekcí, přičemž nejvyšší koncentrace OTA byla zjištěna ve vzorcích ze suchých kořenů lékořice.

Používání léčivých rostlin a přípravků z nich vyrobených se celosvětově rozšiřuje, a proto je velmi důležité kontrolovat bezpečnost rostlinných produktů s ohledem na veřejné zdraví (Kosalec *et al.*, 2009).

Diplomová práce je zaměřena na experimentální zjištění množství mykotoxinu ochratoxinu A, které přechází do přípravků (např. odvarů a tinktur) z farmaceutických bylin. Koncentrace OTA byla analyzována ze vzorků farmaceutických bylin využívaných v tradiční čínské medicíně a v tradičním indickém lékařství, tzv. ajurvédské medicíně. Konkrétně se jednalo o tyto druhy rostlin: *Astragalus propinquus* (Kozinec blanitý), *Glycyrrhiza glabra* (Lékořice lysá) a *Bacopa monnieri* (Bakopa drobnolistá). Na základě výsledků pořízených metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí (HPLC-FLD) jako vysoce pozitivní vyšel ze všech tří zmíněných druhů pouze *Astragalus propinquus*, a proto je největší pozornost věnována právě jemu. U tohoto druhu léčivé rostliny se dále zjišťoval přechodový faktor do výsledného konzumovatelného produktu (odvaru či tinktury).

## 2.1 *Astragalus propinquus* (Kozinec blanitý)

Tab. č. 6 Taxonomické zařazení (Kubíček, 2003a)

<b>Říše</b>	<i>Plantae</i> - rostliny
<b>Oddělení</b>	<i>Magnoliophyta</i> – krytosemenné r.
<b>Třída</b>	<i>Rosopsida</i> – vyšší dvouděložné r.
<b>Řád</b>	<i>Fabales</i> - bobotvaré
<b>Čeleď</b>	<i>Fabaceae</i> - bobovité
<b>Rod</b>	<i>Astragalus</i> - kozinec
<b>Druh</b>	<i>Astragalus propinquus</i> - kozinec blanitý

Kořen *Astragalus propinquus* je základní bylinou tradiční čínské medicíny, ve které je nazývána Huang Qi. Je považována za sladkou, hřejivou bylinu s mnoha léčivými vlastnostmi. Tradičně je využívána při léčbě únavy, obecné slabosti (především u starších osob), nechutenství, náchylnosti k virovým infekcím, necitlivosti, bolesti svalů, diabetes mellitus a rakoviny dělohy, vaječnicků nebo tlustého střeva (Foster, 1998). *Astragalus* je součástí mnoha léčivých tonik tradiční medicíny a často se kombinuje s ženšenem, angelikou, lékořicí a jinými bylinami. Gumová šťáva obsažená v této rostlině se od starověku používá jako zahušťovadlo a emulgátor (Chaturvedula & Prakash, 2013).

## 2.2 *Glycyrrhiza glabra* (Lékořice lysá)

Tab. č. 7 Taxonomické zařazení (Kubíček, 2003b)

<b>Říše</b>	<i>Plantae</i> - rostliny
<b>Oddělení</b>	<i>Magnoliophyta</i> – krytosemenné r.
<b>Třída</b>	<i>Rosopsida</i> – vyšší dvouděložné r.
<b>Řád</b>	<i>Fabales</i> - bobotvaré
<b>Čeleď</b>	<i>Fabaceae</i> - bobovité
<b>Rod</b>	<i>Glycyrrhiza</i> - lékořice
<b>Druh</b>	<i>Glycyrrhiza glabra</i> – lékořice lysá

*Glycyrrhiza glabra* je tradiční léčivá bylina rostoucí v různých částech světa. Je běžně využívána jak v tradiční čínské medicíně, tak v ajurvédě, a to především pro své antibakteriální účinky (obsahuje velké množství flavonoidů), ale i jako aromatická bylina, která maskuje nepříjemnou chuť jiných léků (Biondi *et al.*, 2005). Jedná se o velmi sladkou a uklidňující bylinu, která detoxikuje a chrání játra. Vykazuje silný protizánětlivý účinek, který nachází uplatnění při léčbě artritických stavů, peptických vředů a infekcí hrdla. Mezi další využití této rostliny patří léčba nerovnováhy pohlavních hormonů a menopauzálních symptomů u žen. První zpráva o léčebném použití pochází z Řecka (Fukai *et al.*, 2002a, b).

## 2.3 *Bacopa Monnieri* (Bakopa drobnolistá)

Tab. č. 8 Taxonomické zařazení (ITIS, 2000)

<b>Říše</b>	<i>Plantae</i> - rostliny
<b>Oddělení</b>	<i>Magnoliophyta</i> – krytosemenné r.
<b>Třída</b>	<i>Rosopsida</i> – vyšší dvouděložné r.
<b>Řád</b>	<i>Lamiales</i> - hluchavkotvaré
<b>Čeleď</b>	<i>Plantaginaceae</i> - jitrocelovité
<b>Rod</b>	<i>Bacopa</i> - Bakopa
<b>Druh</b>	<i>Bacopa Monnieri</i> – bakopa drobnolistá

Tato bylina se přirozeně vyskytuje v Indii a má dlouhou historii použití v tradici ajurvédské medicíny, zejména při léčbě poruch způsobených úzkostí a špatnou pamětí. V současné době je prodávána v západních zemích jako doplněk stravy stimulující paměť. Studie ukázaly, že bylina obsahuje mnoho aktivních složek, včetně řady alkaloidů a saponinů, nicméně hlavními složkami jsou steroidní saponiny, Bacosides A a B (Singh & Dhawan 1997). V současné době nejsou publikovány žádné vědecké studie zkoumající blahodárné účinky *Bacopy monnieri* na paměť lidí, existují však studie zkoumající chování potkanů (Roodenrys *et al.*, 2002).

### **3 Stanovení OTA ve farmaceutických bylinách metodou HPLC-FLD (Standardní operační postup)**

Za účelem stanovení přechodu OTA z matric farmaceutických bylin do odvarů a tinktur bylo důležité měření obsahu OTA v jednotlivých vzorcích bylin zakoupených v distribuční síti. Tyto výsledky byly vyhodnoceny a pro další měření byl vybrán *Astragalus propinquus* jako nejvíce kontaminovaný, ze kterého se připravila homogenizovaná směs, u které byl znovu měřen obsah OTA. Z takto připraveného kontaminovaného a homogenizovaného vzorku se dále připravovaly odvary a tinktury za účelem stanovení přenosu OTA do těchto výrobků. Metodika stanovení HPLC je popsána samostatně v dalších kapitolách, z důvodu náročnosti této metody.

#### **3.1 Předmět a vymezení působnosti**

Standardní operační postup popisuje metodu separace (izolace) OTA ze vzorků potravin na imunoafinitních kolonkách. Separace je nezbytnou podmínkou pro jeho kvantitativní stanovení metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC.

Kapalinová chromatografie je fyzikálně – chemická metoda, využívající separaci tedy dělení látek mezi dvěma fázemi, a to fází mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou). Základním principem separace látek kapalinovou chromatografií je různá afinita složek vzorku k mobilní a stacionární fázi (Raška, 2009).

Celý proces začíná nanesením směsi dělených látek na kolonu, čímž se na ní vytvoří eluční pás. Jeho složky jsou následně unášeny mobilní fází kolonou a během toho dochází k jejich interakci se stacionární fází (rozdělováním, adsorpcí apod.) a zpětnému přecházení do mobilní fáze, se kterou můžou rovněž interagovat. Tento proces se mnohonásobně opakuje a při dostatečné odlišnosti distribučních konstant jednotlivých dělených látek dojde po určité době k jejich částečnému nebo úplnému rozdělení do izolovaných pásů. Oddělené látky opouštějí kolonu v různém retenčním (elučním) čase, který závisí na velikosti jejich interakcí se stacionární fází.

Čím jsou tyto interakce silnější, tím je samozřejmě retenční čas větší a daná látka se z kolony vymývá později (Hara *et al.*, 1985).

Mezi hlavní přednosti HPLC patří kvantitativní a zároveň kvalitativní hodnocení separovaných složek, citlivost stanovení, rychlost analýzy, minimální množství použitého vzorku, možnost automatizace. Díky svým přednostem je HPLC používána ve všech moderních lékopisech (Vašíček, 2007).

Spojení metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí FLD má oproti UV-detekci výhodu v tom, že je výrazně citlivější (Dai *et al.*, 2003).

### 3.2 Princip metody

OTA je extrahován ze vzorku farmaceutických bylin systémem kapalina – kapalina a čištěn na vysoce specifické imunoafinitní kolonce Ochrarepp<sup>R</sup>. Kolonka se specificky zadržným obsahem OTA je konečně eluována metanolem. Metanolvý roztok OTA je přímo analyzován metodou HPLC-FLD. OTA se potvrzuje chromatografickou analýzou po rozkladu OTA karboxypeptidázou na ochratoxin  $\alpha$  a fenylalanin.

### 3.3 Bezpečnost práce

Podle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC, WHO) je ochratoxin A řazen do kategorie 2 B (možný karcinogen pro člověka) a to vzhledem k jeho silným toxickým účinkům. Je tedy nutné dbát na bezpečnost práce s touto látkou. Od úpravy vzorků až po samotné HPLC stanovení bylo pracováno v pryžových rukavicích. Pracovní úkony byly prováděny v dobře větrané digestoři nebo laminárním boxu se zapnutým odsáváním vzduchu. K omezení rozlití vzorků byly použity podložky SUPELCO Glass Magnet<sup>TM</sup>Sheet. V laboratořích, ve kterých se provádělo stanovení OTA, byl zabezpečen odtah a filtrace vzduchu. Všechny pracovní povrchy a pomůcky včetně skla byly po skončení práce ihned dekontaminovány v roztoku chlornanu sodného, který je součástí provozního řádu Národní referenční laboratoře pro biomarkery mykotoxinů a mykotoxiny v potravinách.

### 3.4 Sběr vzorků a jejich skladování

V distribuční síti (lékárny, obchody) z 25 různých míst České republiky bylo náhodně vybráno a zakoupeno: 40 vzorků kořene *Astragalus propinquus*, 1 vzorek *Bacopa monnieri* (ve formě sušených listů) a 4 vzorky kořene *Glycyrrhiza glabra*. Vzorky byly zakoupeny v období od roku 2015 do první třetiny roku 2016, z důvodu získání vzorků různých šarží po dobu 15 měsíců. Vzorky se nacházely v různých formách, a to sekané, drcené nebo v prášku.

Původ vzorků byl převážně z Číny, ovšem toto tvrzení jsem nedokázala potvrdit s absolutní jistotou, protože dodavatelé nereagovali na můj dotaz. Podle doporučení výrobce byly všechny vzorky skladovány ve tmě a v suchu a nebyl překročen limit pro jejich skladování.

## **3.5 Chemikálie a spotřební materiál**

### **3.5.1 Základní chemikálie**

Chloroform, pro analýzi, Riedel-de Haen; Hydrouhličitan sodný, pro analýzi, Riedel.de Haen; Metanol gradient grade pro chromatografii, Lichrosolv, MERCK; Acetonitril gradient grade pro chromatografii, Lichrosolv, MERCK; Octan sodný bezvodý, Suprapur, MERCK; Kyselina octová (ledová) pro analýzi, MERCK; Chlorid sodný, Suprapur, MERCK (PENTA-Chrudim); Carboxypeptidase A, SIGMA; Ochratoxin A, SIGMA-ALDRICH; Kyselina ortofosforečná 85% (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), Suprapur, MERCK; Hydrogenfosforečnan dvojsodný (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) x 12 H<sub>2</sub>O, p. a., MERCK; Polyethylenglycol 8'000 pro molekulární biochemii, MicroSelect, FLUKA; Dusík 4,0, GA 224; Technoplyn Linde a. s., Praha; Ultračistá voda ze zařízení Milli Q plus, Millipore

### **3.5.2 Roztoky**

#### Základní roztok ochratoxinu A v metanolu 10 µg/ml

Do lahvičky s obsahem 1 mg (tj. 1000 µg) ochratoxinu A bylo napipetováno 5 ml metanolu, toto množství OTA bylo rozpuštěno. Do uzavíratelné Erlenmayerovy baňky se zábrusem bylo napipetováno 90 ml metanolu, následně bylo přidáno 5 ml roztoku ochratoxinu A v metanolu z originální lahvičky. Tato lahvička po vzorku byla znovu vypláchnuta 5 ml metanolu a metanol byl přidán do Erlenmayerovy baňky. Odměrná baňka se zábrusem byla pečlivě uzavřena, překryta parafilmem a připravený standard byl uložen do mrazničky při -20°C. Doba použitelnosti základního roztoku je 1 rok.

Z takto připraveného základního roztoku byly dále připraveny pracovní roztoky OTA o koncentracích: 40 ng/ml, 4 ng/ml a 0,4 ng/ml. Vše v souladu se standardním operačním postupem (SOP).

#### Pracovní roztok ochratoxinu A 40 ng/ml (40 µg/l)

Bylo odpipetováno 0,1 ml základního roztoku a doplněno metanolem do odměrné baňky o objemu 25 ml po značku. Roztok byl uchován v chladničce, v odměrné baňce s uzávěrem překrytým parafinem. Doba použitelnosti je opět 1 rok.



#### Standardní roztok I. ochratoxinu A 4 ng/ml (4 µg/l)

Bylo odpipetováno 1 ml pracovního roztoku a doplněno metanolem do odměrné baňky o objemu 10 ml po značku. Připravený roztok byl uchován v chladničce a používán maximálně 10 dní.

#### Standardní roztok II. ochratoxinu A 0,4 ng/ml (0,4 µg/l)

Byl odpipetován 1 ml standardního roztoku I a doplněn metanolem do odměrné baňky o objemu 10 ml po značku. Roztok byl uchován v lednici v nádobkách k tomu určených. Doba použitelnosti 3-5 dní.

#### Hydrogenuhlíčitán sodný (NaHCO<sub>3</sub>) 10 (30) g/l

Bylo naváženo 10 (30) g NaHCO<sub>3</sub> a navážka byla rozpuštěna v kádince v menším množství vody. Po rozpuštění byl roztok kvantitativně přelit do 1 l odměrné baňky a doplněn po značku vodou. Roztok byl rozmíchán a uložen do tmavé skleněné lahve.

#### Fosfátový salinický pufr (PBS)

Na váhách bylo naváženo 8 g chloridu sodného (NaCl), 1,2g hydrogenfosforečnanu sodného (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 0,2 g dihydrogenfosforečnanu draselného (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) a 0,2 g chloridu draselného (KCl). Tyto chemikálie byly smíchány a rozpuštěny v 900 ml ultračisté vodě Milli Q plus. Roztok lze uchovávat v chladničce po dobu 1 roku.

#### Fosfátový salinický pufr (PBS s 15% metanolem)

Do 100 ml odměrky bylo napipetováno 15 ml metanolu a po rysku doplněno roztokem PBS.

#### Roztok H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 M

5,7 ml (9,8 g) kyseliny ortofosforečné bylo napipetováno do 100 ml odměrky a doplněno po rysku vodou Milli Q. Roztok lze uchovávat v chladničce po dobu 1 roku.

#### Roztok H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> + NaCl

Do 1000 ml odměrky bylo napipetováno 33,7 ml 85% kyseliny ortofosforečné a přidáno 116,9 g NaCl, doplněno do 1 l vodu Milli Q a několika kapkami 0,5 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Hodnota pH byla upravena na 1,6 (ověřeno pH papírkem). Roztok je stabilní přibližně 6 měsíců.

### 3.5.3 Spotřební materiál

Imunoafinitní kolonky OCHRAREPP<sup>R</sup>, P 14B ke kvantitativnímu stanovení OTA pomocí HPLC, Rhone-Diagnostics Technologies, dodavatel: Jemo Trading s.r.o., Bratislava; papírové filtry Whatman č. 4, MERCK, obj. č. 1004090 nebo 1004 185, nebo filtrační papíry KA2-M, Papírna Pernštejn s.r.o.; Fenylosilanové kolonky Strata Phenyl (55  $\mu$ m, 70 Å), 500 mg/3 ml, dodavatel: Chromservis, Praha

Dále: kádinky různých velikostí, plotýnkový vařič, laboratorní stojan potřebný k filtraci, skleněné nálevky, laboratorní lžička, Erlenmayerovy baňky, odměrné válce, automatické pipety, plastové špičky k pipetám

### 3.5.4 Přístroje a pomocná zařízení

Kapalinový chromatograf s fluorescenční detekcí (HPLC-FLD) – Spectra System (USA), vakuový odplyňovač SCM 400, gradientová pumpa P 2000, Automatický dávkovač Spectra-Physics 3000, Fluorescenční detektor Jasco (model 920 FP), počítač se software CSW 32. Dále laboratorní váhy Navigator , váhy jemné 1. tř. Sartorius R 200 D, mraznička (-20°C), chladničky, kruhová třepačka OS 10 basic (IKA Werke GmbH & CO.KG), zařízení pro řízený průtok imunoafinitní kolonkou - vakuová jednotka BAKER SPE 12 G (BAKER) s prosávací pumpou (SIGMA n. MILLIPORE), zařízení pro odpařování EVATERM, výrobce Ing. V. Hanuš, Brno.

## 3.6 Postup úpravy vzorků a schéma extrakce a separace dle Zimmerliho

Před zahájením separace OTA byly Imunoafinitní kolonky 30 min až 1 h před použitím vyndány z ledničky a temperovány na teplotu laboratoře. Vzhledem k uvažované možné fotolabilitě byla operace prováděna za případného přistínění.

5 g vybraných vzorků bylin (drcených, sekaných nebo v prášku) bylo naváženo do Erlenmayerovy baňky, smícháno s 10 ml pufru ( $H_3PO_4$  + NaCl) a protřepáno na třepačce po dobu 1 minuty.

Navážka byla 4x extrahována přidáním 5 ml chloroformu. Po přidání chloroformu byla výsledná směs vždy po dobu 3 minut intenzivně protřepána. Po každé extrakci byla směs po dobu 15 minut při 6 500 ot.min<sup>-1</sup> centrifugována a spodní odstředěná chloroformová fáze byla odpipetována do stejné polypropylenové centrifugační nádoby.

Chloroformová fáze byla odpařena pod proudem dusíku při teplotě 45 °C na zařízení EVATERM. Rezidium bylo kvantitativně spláchnuto malými dávkami chloroformu (celkový objem chloroformu 5 ml).

Tato chloroformová fáze byla 2x extrahována 5 ml hydrogenuhličitanu sodného (10g/l), protřepána vždy 3 minuty na třepače a zcentrifugována po dobu 5 min při 3 500 ot.min<sup>-1</sup>.

Oba podíly hydrogenuhličitanu sodného (vždy horní vrstva) byly staženy do stejné polypropylenové centrifugační nádoby, ve které byl 1 ml chloroformu a 0,5 ml koncentrované kyseliny mravenčí.

Vodná hydrogenuhličitanová vrstva pak byla postupně 2 x reextrahována 2 ml chloroformu. Při každé extrakci bylo vše protřepáno po dobu 3 min a každý podíl zcentrifugován po dobu 5 min při 3 500 ot.min<sup>-1</sup>.

Spodní chloroformové podíly byly jímány do polypropylenové centrifugační nádoby a odpařeny pod proudem dusíku při teplotě 45°C.

Reziduum bylo rozpuštěno v 5 ml roztoku PBS - metanol 15%. Tímto roztokem byly opláchnuty stěny centrifugační nádoby a dále byla ještě nádobka 3x tímto roztokem vypláchnuta.

Z imunoafinitní kolonky byl vytlačen pufr a byla prosáta po dobu 30 s vzduchem.

Posléze bylo všech 20 ml roztoku PBS – metanol 15% umístěno v nástavci nad adaptérem a roztok byl prosát přes kolonku rychlostí cca 2 ml.min<sup>-1</sup>. Přes kolonku byl opět prosát vzduch po dobu 30 s. Kolonka byla propláchnuta 20 ml vodou Milli Q s následným prosátím vzduchem po dobu 30 až 60 s.

Do nádoby nad adaptérem bylo napipetováno 3 ml okyseleného metanolu a rychlostí 0,5 ml.min<sup>-1</sup> provedena eluce (nebo nižší rychlostí 1 kapka/2 s). Opět byl asi 30 s prosát vzduch.

Vzorek byl jímán do řádně označené vialky a uložen do chladničky.

### 3.7 Postup úpravy vzorků a schéma extrakce a separace dle Entwisle 2001

Imunoafinitní kolonky byly 30 min až 1 h před použitím vyndány z chladničky a temperovány na teplotu laboratoře.

10 g vybraných vzorků bylin (drcených, sekaných nebo v prášku) bylo naváženo do Erlenmayerovy baňky a smícháno se 100 ml směsí metanolu a hydrogenuhličitanu sodného 3%: směs v poměru 50 ml:50ml; v/v a třepáno na třepačce 30 min.

Výsledný roztok byl zfiltrován přes Whatman č. 4 či KA-2M filtrační papír.

Fenylsilanová kolonka byla nejprve prosáta 10 ml směsí metanol/hydrogenuhličitan sodný 3% (v poměru: metanol 20 ml:80 ml hydrogenuhličitan sodný; v/v) a následně ihned 5 ml roztoku 1% hydrogenuhličitanu sodného, pak byl kolonkou krátce prosát vzduch.

20 ml zfiltrovaného roztoku bylo smícháno s 20 ml 3% hydrogenuhličitanu sodného. Těchto 40 ml bylo opatrně prosáto přes fenylsilanovou kolonku.

Po skončení prosávání byl opět prosát krátce vzduch a byla provedena eluce fenylsilanové kolonky 10 ml roztoku - metanol/voda (7 ml metanolu : 93 ml; v/v).

K tomuto eluátu bylo následně přidáno ještě 30 ml PBS (8 g NaCl; 1,2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,2 g KCl; 900 ml H<sub>2</sub>O)

Do prosávacího zařízení byla umístěna imunoafinitní kolonka Ochraprep a byl z ní odstraněn pufr. Kolonka byla prosáta celkem 40 ml roztoku (10 ml eluátu z fenylsilanové kolonky + 30 ml pufru PBS).

Imunoafinitní kolonka byla promyta 20 ml pufru PBS.

Následně byla provedena eluce imunoafinitní kolonky 4 ml čistého metanolu, který byl odpařen pod proudem dusíku na zařízení EVATERM, při teplotě 42 °C a vialka s odparem byla hermeticky uzavřena a uložena do lednice.

Odparek byl rozpuštěn v 0,5 ml metanolu za pomoci ultrazvukové lázně po dobu 10 min a připraven k nástřiku do HPLC (Entwisle et al., 2001).

### 3.8 Laboratorní nádobí

Po skončení analýz se nádobí využívané k analýze OTA řádně dezaktivuje po dobu 24 hodin (vysoce koncentrované roztoky dezaktivujeme 48 hodin) v lázni, která obsahuje 10 l vody, 100 g hydroxidu sodného a 200 ml chlornanu sodného. Po dezaktivaci bylo nádobí opláchnuto horkou vodou se saponátem (10 ml/10 l) a propláchnuto v kyselé lázni, připravené ze 150 ml octa a 10 l destilované vody. Potom bylo nádobí propláchnuto třikrát destilovanou vodou a jedenkrát vodou, získanou z Milli Q a vysušeno v horkovzdušném sterilizátoru při 180°C. Takto dezaktivované nádobí je uloženo do uzavřených skříní pro další použití.

### 3.9 Ověření metody

Metoda stanovení byla v souladu s níže popsaným postupem měření nejprve ověřena. Byly zjištěny tyto parametry:

**Tab. č. 9 Ověření metody**

Parametr	OTA v potravinách $\mu\text{g.kg}^{-1}$ *
Mez detekce	0,12
Mez stanovitelnosti	0,39
Max. stanovitelný obsah	10,0
Nejistota stanovení v %	<20

\* Uvedené hodnoty platí při přípravě vzorku dle použité metody

### **3.10 Uvedení měřicího přístroje do chodu a jeho nastavení**

Příprava kapalinového chromatografu k analýze a práce s ním se řídila návodem výrobce. Před vlastním stanovením musela být chromatografická aparatura uvedena do chodu a alespoň 60 minut pracovala „naprázdno“ pro ustálení podmínek na chromatografické koloně a detektoru. Podmínky stanovení byly nastaveny dle manuálu přístroje. Spráci se začalo až tehdy, jakmile se po nadávkování metanolu při zapnutém fluorescenčním detektoru objevila rovná základní linie.

### **3.11 Analýza**

Odparky rozpuštěné v metanolu, standardy a slepý vzorek (voda Milli Q) byly vsříknuty do kapalinového chromatografu a bylo provedeno stanovení obsahu ochratoxinu A metodou HPLC. S každou sérií analýz byly současně analyzovány standardní roztoky OTA 4 ng.ml<sup>-1</sup>, 0,4 ng.ml<sup>-1</sup>, slepý vzorek a případně také kontrolní materiál, nebo materiál s přídavkem ochratoxinu A. Standardy byly proměňovány vždy na začátku a na konci série vzorků tak, aby počet analýz standardu dosáhl 20 % počtu analyzovaných vzorků. Po skončení analýz byla kolona promyta směsí metanolu s vodou (1:1) – po dobu 20 min. Dále pak 10 min samotnou vodou a nakonec roztokem acetonitrilu a vody (1:1) po dobu cca 60 min. Nakonec byla kolona konzervována směsí metanolu a vody.

### **3.12 Podmínky chromatografického stanovení**

Pro stanovení OTA na HPLC byla připravena mobilní fáze: metanol : acetonitril: 0,005 mol.l<sup>-1</sup> octan sodný : kyselina octová v poměru 300 ml : 300 ml : 400 ml : 14ml (v/v/v/v). Byl nastaven průtok mobilní fáze na 1,5 ml.min<sup>-1</sup>; nástřik: 50 µl. Nastavení FLD: λ Ex (excitace) 333 (340) nm, λ Em (emise) 465 nm, Gain = 1000, (šíře pásma EM: 18). Fluorescenční detektor Jasco FP-920 byl zapnut 15 min. před započítáním práce. Při dodržení těchto podmínek byl eluční čas ochratoxinu A přibližně mezi 7-10 min. při přímém stanovení.

### 3.13 Potvrzení OTA analýzou metylesteru ochratoxinu A

Na zařízení EVATERM se nejprve připraví metylester: 1 ml metanolového extraktu vzorku se odpaří ve vialce do sucha proudem dusíku, který se zavede nad hladinu vzorku. Posléze se přidá 1 ml roztoku  $\text{BF}_3$  v methanolu, vialka se uzavře a protřepe. Vzorky se nechají reagovat ve vialce při teplotě  $60^\circ\text{C}$  po dobu 15 minut. Stejným způsobem jako vzorky se zpracuje i 1 ml standardního roztoku OTA o koncentraci  $4 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Na kapalinovém chromatografu se pracuje za stejných podmínek jako při přímém stanovení ochratoxinu A. Eluční čas esterů ochratoxinu A je kolem 14 minut. Po skončení analýz se kolona promyje a nakonzervuje směsí methanol : voda (1 : 1) – po dobu 20 min., dále 10 min vodou a nakonec roztokem acetonitril : voda (1 : 1) po dobu 60 min. Nakonec se kolona nakonzervuje směsí metanol : voda.

## 4 Stanovení přechodu OTA z kořene *Astragalus propinquus* do odvarů a tinktur z něj vyrobených

Pro stanovení procentuálního přechodu OTA z kořene *Astragalus propinquus* do odvarů bylo připraveno 400 g inertního referenčního materiálu, ve kterém byla koncentrace OTA  $288,9 \text{ ng/g} \pm 12,3$  (SD). Pro přípravu tinktur byl použit směsný vzorek 2 matric s nejvyšší koncentrací OTA ( $1700 \text{ ng/g}$ ,  $1600 \text{ ng/g}$ ). Průměrná koncentrace OTA v takto připraveném směsném vzorku byla  $1650 \text{ ng/g}$ .

### 4.1 Materiál a použité chemikálie

Použitý materiál a chemikálie byly stejné jako v bodě 3.5.

### 4.2 Pracovní postup

Pro zjištění množství OTA, které přechází do přípravků vyrobených z matric *Astragalus propinquus* byl použit stejný postup, který je popsán v bodech 3.6 až 3.13. Za účelem stanovení byly navíc připraveny odvary a tinktury.

## Příprava odvarů

Jedná se zpravidla o vodný výluh drogy získaný varem. Každý odvar byl připraven přidáním 3 g rostlinné části, v našem případě kořenu *Astragalus propinquus* do 300 ml vody. Takto vzniklou směs jsme přivedli k varu a následně vařili po dobu 15 minut na základě doporučení dodavatelů a především lékopisu – doporučeného postupu. Poté byl odvar promíchán a přefiltrován.

## Příprava tinktur

Tinkтуры jsou tekuté přípravky obvykle získávané z usušených rostlinných částí. Každá tinktura byla připravena přidáním 10 g rostlinné části, v našem případě kořenu *Astragalus propinquus* do 100 ml vyluhovadla (obvykle se připravují z jednoho dílu drogy a deseti dílů vyluhovadla, v našem případě lihu). Výchozí droga byla rozmělněna na částice o vhodné velikosti a důkladně promíchána s předepsaným vyluhovadlem a byla ponechána v uzavřené nádobě vhodnou dobu. Zbývá droga se po extrakci oddělila od vyluhovadla.

## 4.3 Použité vzorce

### Vzorec pro výpočet procentuálního přechodu OTA do odvaru a tinktury

$$T_p = \frac{C_f \cdot V}{C_m \cdot \alpha} \cdot 100$$

$T_p$  = procentuální obsah OTA v odvaru/tinktuře

$C_f$  = konečná koncentrace OTA v odvaru/tinktuře (ng/ml)

$V$  = konečné množství odvaru/tinktury (300 ml/100 ml)

$C_m$  = koncentrace OTA v inertním referenčním materiálu (288,9 ng/g, 1650 ng/g)

$\alpha$  = množství použité matrice pro odvar/tinkтуру (3g/10g)



## 5 Výsledky

### 5.1 Stanovení OTA ve farmaceutických bylinách

V tabulce č. 11 jsou uvedena základní screeningová data vybraných druhů bylin, které by mohly obsahovat OTA ve větším množství. Extrakce byla provedena podle metody Entwisle 2001. Jako vysoce pozitivní ze všech testovaných druhů vyšel pouze *Astragalus propinquus* a proto bylo dále otestováno na přítomnost OTA všech 40 vzorků zakoupených matric. U těchto vzorků byla extrakce provedena podle metody Zimmerliho a Dicka (1995), která se ukázala jako vhodnější. Stejná metoda byla použita i pro extrakci OTA z odvarů a tinktur, s výjimkou toho, že v prvním kroku bylo 5 ml odvaru extrahováno přímo chloroformem.

Všechny zakoupené vzorky byly pozitivní na OTA; koncentrace se pohybovala v rozmezí od 28,8 do 1700 ng/g, se střední hodnotou 451,0 ng/g, mediánem 210,0 ng/g a 90. percentilem 1618,0 ng/g. Tyto výsledky dokumentují vysokou koncentraci OTA a frekvenci kontaminace pozorovanou ve vzorcích kořene *Astragalus propinquus* prodávaných v České republice.

U *Astragalus propinquus* se dále stanovoval přechod OTA z matric do výsledného konzumovatelného produktu (odvaru nebo tinktury). Za účelem tohoto stanovení bylo ze 40 zakoupených matric připraveno 400 g inertního referenčního materiálu (přirozeně kontaminovaného a homogenizovaného vzorku *Astragalus propinquus*). Z takto připraveného inertního referenčního materiálu o průměrné koncentraci OTA 288,9 ng / g  $\pm$  12,3 (SD) byly připraveny odvary. Pro přípravu tinktur byl použit směsný vzorek matric o průměrné koncentraci 1650 ng/g. Koncentrace OTA byla měřena pomocí HPLC.

Výsledky jsou z důvodu rozsáhlosti zaznamenány v tabulkách (výsledky screeningu vybraných druhů farmaceutických bylin, stanovení OTA u *Astragalus propinquus*), které je přílohou této práce.

## 5.2 Stanovení procentuálního přechodu OTA do odvarů a tinktur

Na základě uvedených postupů, byly připraveny odvary a tinktury (ze 400 g inertního referenčního materiálu a matrice o koncentraci 1650 ng/g OTA), u kterých byla změřena koncentrace OTA. Tato výsledná hodnota následně sloužila ke zjištění procentuálního přechodu OTA z matic do odvarů nebo tinktur pomocí uvedeného vzorce v kapitole 4.3.

### 5.2.1 Výpočet procentuálního přechodu do odvarů

Průměrný procentuální přechod OTA z *Astragalus propinquus* do odvaru byl vypočten jako 83,4 % ± 8,5 (SD).

**Tab. č. 10 Procentuální přechod OTA do odvarů**

Vzorek číslo	OTA [ng/g]	Median OTA [ng/g]	90% percentil OTA [ng/g]	Přechod OTA $T_p$ [%]	Směrodatná odchylka	Obvyklý příjem OTA [mg/osoba/týden]
1	213,0	240,650	268,170	73,728	8,507	0,021
2	210,0			72,690		0,021
3	246,0			85,151		0,024
4	259,0			89,650		0,025
5	222,0			76,843		0,022
6	267,3			92,523		0,026
7	262,7			90,931		0,026
8	235,3			81,447		0,023
9	217,3			75,216		0,021
10	276,0			95,535		0,027
<b>Průměr. hodnota</b>	<b>240,86</b>	-	-	<b>83,371</b>	-	<b>0,024</b>

Vzorový výpočet, který je platný pro všechna měření a je vytvořen na základě konkrétního měření

$$T_p = \frac{C_f \cdot V}{C_m \cdot \alpha} \cdot 100$$

$$C_f = 213 \text{ ng/ml}$$

$$V = 300 \text{ ml}$$

$$C_m = 288,9 \text{ ng/g}$$

$$\mathbf{T_p = 73,728}$$

$$\alpha = 3 \text{ g}$$

## 5.2.2 Výpočet procentuálního přechodu do tinktur

Průměrný procentuální přechod OTA z *Astragalus propinquus* do tinktury byl vypočten jako 0,328 % ± 0,001 (SD).

Tab. č. 11 Procentuální přechod OTA do tinktur

Vzorek číslo	OTA ng/g	Median OTA [ng/g]	90% percentil OTA [ng/g]	Přechod OTA $T_p$ [%]	Směrodatná odchylka	Obvyklý přívod OTA [mg/osoba/tý den]
1	0,539	0,541	0,543	0,326	0,001	$3,08755 \cdot 10^{-6}$
2	0,544			0,329		$3,11596 \cdot 10^{-6}$
<b>Průměr. hodnota</b>	<b>0,541</b>	-	-	<b>0,328</b>	-	<b><math>3,10649 \cdot 10^{-6}</math></b>

Vzorový výpočet, který je platný pro všechna měření a je vytvořen na základě konkrétního měření

$$T_p = \frac{C_f \cdot V}{C_m \cdot \alpha} \cdot 100$$

$$C_f = 0,539 \text{ ng/ml}$$

$$V = 100 \text{ ml}$$

$$C_m = 1650 \text{ ng/g}$$

$$\mathbf{T_p = 0,326}$$

$$\alpha = 10 \text{ g}$$

## Diskuze

Pro experimentální zjištění množství mykotoxinu ochratoxinu A, které přechází do přípravků (odvarů a tinktur) z farmaceutických bylin byl nejprve proveden základní screening vybraných bylin, s cílem odhalit nejvíce pozitivní vzorky. Ze všech bylin jako nejvíce pozitivní vyšel *Astragalus propinquus* a z tohoto důvodu byl použit pro hlavní experiment, ve kterém se stanovovalo množství OTA, které přechází do odvarů a tinktur. Pro výzkum byly použity dvě metody extrakce a to dle Entwisle *et al.* (2001) a Zimmerli & Dick (1993). Druhá jmenovaná je v Národní referenční laboratoři pro biomarkery mykotoxinů v Hradci Králové běžně používaná, a to především pro svoji spolehlivost, nicméně oproti metodě Entwisle *et al.* (2001) je časově náročnější, a proto je pro screening méně vhodná.

Tradiční čínské léčivé rostliny běžně využívané jako koření, přísady nebo potraviny jsou v Číně široce používané k prevenci a léčbě lidských nemocí (Yang *et al.*, 2010). *Astragalus propinquus* je jedna z nejběžněji používaných bylin v tradiční čínské medicíně k léčbě onemocnění ledvin (Zhang *et al.*, 2014), pokud ovšem neobsahují nežádoucí kontaminanty. Díky svému původu mohou být čínské léčivé rostliny během růstu, sběru, přepravy a zejména skladování kontaminovány různými druhy hub, včetně ochratoxigenních hub. První zprávu o přirozeném výskytu OTA v čínských léčivých bylinách publikuje studie Yang *et al.* (2010) jejíž výsledky ukázaly, že celkem 25 vzorků (23 viditelně plesnivých) z celkového počtu 57 odebraných vzorků čínských léčivých rostlin bylo pozitivních na OTA a to v rozmezí 1,2 - 158,7 ng/g. Ve srovnání s tímto rozsahem byla koncentrace OTA v našich vzorcích výrazně vyšší a to v rozmezí 28,8 - 1700 ng/g. Tyto výsledky dokumentují vysokou koncentraci OTA a frekvenci kontaminace pozorovanou ve vzorcích *Astragalus propinquus* prodávaných v České republice.

Průměrný procentuální přechod OTA z *Astragalus propinquus* do odvarů byl vypočten jako 83,4 % ± 8,5 (SD) a u tinktur 0,162 % ± 0,001 (SD). Z výsledků studie vyplývá, že do odvarů bývá převedeno významné množství OTA, a to podobně, jako je tomu u čajů nebo kávy (Malíř *et al.*, 20014). Naopak z matrice *Astragalus propinquus* do tinktur bývá převedeno pouze nepatrné množství OTA, což přisuzujeme odlišnému postupu při přípravě tinktur, a to především ve vyluhování matrice ve 40% alkoholu.

Světová zdravotnická organizace (World Health Organization, WHO) odhaduje, že více než 100 milionů Evropanů využívá tradiční čínskou medicínu a pětina z nich ji pravidelně používá ke zdravotní péči (WHO, 2013). WHO rovněž vydala pokyny pro hodnocení rostlinných léčivých přípravků, které definovaly základní kritéria pro hodnocení kvality, bezpečnosti a účinnosti rostlinných léčivých přípravků

s cílem pomoci vnitrostátním regulačním orgánům a výrobcům při posuzování podání a dokumentace týkající se těchto přípravků (WHO, 1996).

*Astragalus propinquus* mohou konzumovat jedinci různého staří, ale tradiční bylinkáři nedoporučují pravidelnou konzumaci delší než tři týdny. Množství a rozsah dávek se liší dle pokynů dodavatele a to od 4 do 30 g sušeného *Astragalus propinquus*.

Na základě výsledků, kdy průměrná koncentrace OTA ve vzorcích *Astragalus propinquus* byla 451 ng OTA/g sušeného kořene, v souvislosti s rychlostí přenosu a za předpokladu denní spotřeby 9 g suchého *Astragalus propinquus* prostřednictvím odvarů, lze odhadnout obvyklý týdenní příjem OTA na 0,024 mg / osoba / týden. Za předpokladu, že konzument má hmotnost 60 kg (EFSA, 2006) tento přívod více než třikrát překračuje týdenní tolerovatelný přívod (TWI). Pro nejvyšší úroveň spotřeby a kontaminace by odhadovaný přívod OTA 0,30 mg OTA / osoba / týden překročil TWI více než čtyřicetkrát, což může činit značné problémy v souvislosti s přívodem OTA z jiných zdrojů (potravin rostlinného a živočišného původu) a přispět tak k výrazně vyšší expozici vůči OTA. Za předpokladu denní konzumace 3 ml tinktury je příjem OTA během jednoho týdne zanedbatelný ( $3,10649 \cdot 10^{-6}$  mg /osoba /týden).

## Závěr

OTA jakožto všudypřítomný a přirozeně se vyskytující mykotoxin patří v současnosti mezi nejdiskutovanější mykotoxiny vůbec. Vykazuje mnoho toxických účinků, díky kterým představuje značné riziko pro zdraví lidské populace. Mezi toxické vlastnosti řadíme jeho teratogenitu, imunotoxicitu, hepatotoxicitu, neurotoxicitu, nefrotoxicitu, genotoxicitu a karcinogenitu. V roce 1993 byl Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny klasifikován jako možný karcinogen pro člověka a zařazen do skupiny 2B. Hlavním zdrojem expozice OTA u lidí jsou potraviny. OTA jako přirozeně se vyskytující kontaminant byl zjištěn u potravin rostlinného i živočišného původu.

Ke kontaminaci dochází také u léčivých rostlin a přípravků z nich vyrobených, využívaných například v tradiční čínské a indické tzv. ajurvédské medicíně. Počátky tradiční čínské medicíny nejsou zcela známy, avšak sahají do velmi dávné historie, kdy tato terapie byla často jediným zdrojem zdravotní péče. Díky svým blahodárným účinkům tvoří důležitou součást tradiční medicíny používání léčivých rostlin. Vzhledem k celosvětovému rozšíření fytoterapie je bezpečnost rostlinných produktů značným problémem v oblasti veřejného zdraví a je velice důležité, aby léčivé rostliny a přípravky z nich byly zahrnuty do příslušných regulí.

Hlavním úkolem naší studie bylo experimentální zjištění množství mykotoxinu ochratoxinu A, které přechází do přípravků (odvarů a tinktur) z farmaceuticky významných bylin. Koncentrace OTA byla analyzována ze vzorků léčivých rostlin využívaných v tradiční čínské medicíně a v tradičním indickém lékařství. Na základě výsledků pořízených metodou HPLC-FLD jako vysoce pozitivní vyšel *Astragalus propinquus*, jedna z nejběžněji používaných bylin v čínské medicíně k léčbě ledvin. Dále byl zjištěn procentuální přechod OTA z *Astragalus propinquus* do výsledného produktu (odvaru a tinktury).

Výsledky naší studie mají význam pro posouzení dietární expozice OTA a realizaci „studie celkového stravování“, která může být doplňkovým nástrojem pro odhad dietární expozice obyvatelstva OTA, protože analyzuje obsah OTA nejen v bylinných matricích dostupných na trhu v ČR, ale především v reálných vzorcích odvarů a tinktur.

S ohledem na zdraví lidské populace je velice důležité pokračovat v monitorování OTA u druhu *Astragalus propinquus* a dále se zaměřit na ostatní farmaceuticky významné rostliny a doplňky stravy s cílem zajistit kvalitu a bezpečnost těchto produktů.

## Použitá literatura

- ABRUNHOSA, L., PATERSON, R. R., & VENÂNCIO, A. 2010: Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. *Toxins*, **2**(5), 1078-1099.
- AFSAH-HEJRI, L., JINAP, S., HAJEB, P., RADU, S., & SHAKIBAZADEH, S. 2013: A review on mycotoxins in food and feed: Malaysia case study. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **12**(6), 629-651.
- AZPILICUETA, C. A., ARBELOA, M. I., & DE MAQUIRRIAIN, P. F. J. 2008: Natural and synthetic occurring forms of the ochratoxins. *Food chemistry research developments. New York: Nova Science Publishers*, **116**.
- BENNETT, J. W., & KLICH, M. 2003: Mycotoxins. *Clinical microbiology reviews*, **16**(3), 497-516.
- BERGER, V., GABRIEL, A. F., SERGENT, T., TROUET, A., LARONDELLE, Y., & SCHNEIDER, Y. J. 2003: Interaction of ochratoxin A with human intestinal Caco-2 cells: possible implication of a multidrug resistance-associated protein (MRP2). *Toxicology Letters*, **140**, 465-476.
- BIONDI, D. M., ROCCO, C., & RUBERTO, G. 2005: Dihydrostilbene derivatives from *Glycyrrhiza glabra* leaves. *Journal of natural products*, **68**(7), 1099-1102.
- BREITHOLTZ-EMANUELSSON, A., OLSEN, M., OSKARSSON, A., PALMINGER, I., & HULT, K. 1993. Ochratoxin A in cow's milk and in human milk with corresponding human blood samples. *Journal of AOAC International*, **76**(4), 842-846.
- BUGNO, A., ALMODOVAR, A. A. B., PEREIRA, T. C., PINTO, T. D. J. A., & SABINO, M. 2006: Occurrence of toxigenic fungi in herbal drugs. *Brazilian Journal of Microbiology*, **37**(1), 47-51.
- CASTEGNARO, M., CANADAS, D., VRABCHEVA, T., PETKOVA-BOCHAROVA, T., CHERNOZEMSKY, I. N., & PFOHL-LESZKOWICZ, A. 2006: Balkan endemic nephropathy: role of ochratoxins A through biomarkers. *Molecular nutrition & food research*, **50**(6), 519-529.
- CASTEGNARO, M., MOHR, U., PFOHL-LESZKOWICZ, A., ESTÈVE, J., STEINMANN, J., TILLMANN, T., & BARTSCH, H. 1998: Sex-and strain-specific induction of renal tumors by ochratoxin A in rats correlates with DNA adduction. *International Journal of Cancer*, **77**(1), 70-75.
- CREPPY, E.E. 1999: Human ochratoxicosis. *Journal of Toxicology -Toxin Reviews*, **18**, 277-293.

DAI, J., WRIGHT, M. W., & MANDERVILLE, R. A. 2003: Ochratoxin A forms a carbon-bonded C8-deoxyguanosine nucleoside adduct: implications for C8 reactivity by a phenolic radical. *Journal of the American Chemical Society*, **125**(13), 3716-3717.

DIRHEIMER, G. 1996: Mechanistic approaches to ochratoxin toxicity. *Food Additives and Contaminants*, **13**, 45-48.

DÖRRENHAUS, A. & FÖLLMAN, W. 1997: Effects of ochratoxin A on DNA repair in cultures of rat hepatocytes and porcine urinary bladder epithelial cells. *Archives of Toxicology*, **71**, 709-713.

EL KHOURY, A., & ATOUI, A. 2010: Ochratoxin A: general overview and actual molecular status. *Toxins*, **2**(4), 461-493.

EUROPEAN COMMISSION 2001: Commission Regulation (EC) No 466/2001 of 8 March 2001. *Official Journal of the European Union*, **77**, 1-13.

EUROPEAN COMMISSION 2002: Commission Regulation (EC) No 472/2002 of 12 March 2002. Amending Regulation (EC) No. 466/2001, setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, **50**, 18-20.

EUROPEAN COMMISSION 2004: Commission Regulation (EC) No 2004/683/EC of 13 April. Amending Regulation (EC) No 466/2001, as regards aflatoxins and ochratoxin A in foods for infants and young children. *Official Journal of the European Union*, **106**, 3-5.

EUROPEAN COMMISSION 2005: Commission Regulation (EC) No 123/2005 of 26 January. Amending Regulation (EC) No 466/2001, as regards ochratoxin A. *Official Journal of the European Union*, **25**, 3-5.

EVROPSKÁ KOMISE 2006. *Nařízení komise (ES) 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách* [online]. 2006 [cit. 17. 11. 2020]. Dostupné z: <https://esipa.cz/sbirka/sbsrv.dll/sb?DR=SB&CP=32006R1881>

EVROPSKÁ KOMISE 2010: *Nařízení Komise (EU) č. 105/2010 ze dne 5. února 2010, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, pokud jde o ochratoxin A* [online]. 2010 [cit. 17. 11. 2020]. Dostupné z: <https://esipa.cz/sbirka/sbsrv.dll/sb?DR=SB&CP=32010R0105>

FAO 1996: Biotechnology and food safety. Report of a Joint FAO/WHO consultation. Food and Agricultural Organization. Food and Nutrition.



FAO 2001: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Fifty-sixth meeting. Geneva, Switzerland, pp. 6–15.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organisation/World Health Organisation) 2004: Regional Conference on Food Safety for Asia and Pacific. *Aflatoxin Contamination in Foods and Feeds in the Philippines*. Document 13. Seremban, Malaysia.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organisation/World Health Organisation). 2001: Ochratoxin A. In: Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Prepared by the 56th meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA). *WHO food additives series*, Vol. **47** Geneva, Swit: Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO), World Health Organization (WHO), 281–387.

FAUCET-MARQUIS, V., PONT, F., STØRMER, F. C., RIZK, T., CASTEGNARO, M., & PFOHL-LESZKOWICZ, A. 2006: Evidence of a new dechlorinated ochratoxin A derivative formed in opossum kidney cell cultures after pretreatment by modulators of glutathione pathways: Correlation with DNA-adduct formation. *Molecular nutrition & food research*, **50**(6), 530-542.

FÖLLMANN, W., HILLEBRAND, I. E., CREPPY, E. E., & BOLT, H. M. 1995: Sister chromatid exchange frequency in cultured isolated porcine urinary bladder epithelial cells (PUBEC) treated with ochratoxin A and alpha. *Archives of toxicology*, **69**(4), 280.

FOSTER, S. 1998: Herbs for Health, Sept/Oct, 40-41.

FRISVAD, J. C., FRANK, J. M., HOUBRAKEN, J. A. M. P., KUIJPERS, A. F., & SAMSON, R. A. 2004: New ochratoxin A producing species of *Aspergillus section Circumdati*. *Studies in mycology*, **50**(1), 23-43.

FUKAI, T., MARUMO, A., KAITOU, K., KANDA, T., TERADA, S., & NOMURA, T. 2002a. Anti-Helicobacter pylori flavonoids from licorice extract. *Life sciences*, **71**(12), 1449-1463.

FUKAI, T., MARUMO, A., KAITOU, K., KANDA, T., TERADA, S., & NOMURA, T. 2002b. Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Fitoterapia*, **73**(6), 536-539.

GALTIER, P., ALVINERIE, M., & CHARPENTEAU, J. L. 1981: The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. *Food and cosmetics toxicology*, **19**, 735-738.

GILBERT, J., BRERETON, P., & MACDONALD, S. 2001: Assessment of dietary exposure to ochratoxin A in the UK using a duplicate diet approach and analysis of urine and plasma samples. *Food Additives & Contaminants*, **18**(12), 1088-1093.

- HADJEBA-MEDJDOUB, K., TOZLOVANU, M., PFOHL-LESZKOWICZ, A., FRENETTE, C., PAUGH, R. J., & MANDERVILLE, R. A. 2012: Structure–activity relationships imply different mechanisms of action for Ochratoxin A-mediated cytotoxicity and genotoxicity. *Chemical research in toxicology*, **25**(1), 181-190.
- HALLEN, I.P., JORHEM, L. & OSKARSSON, A. 1998: Placental and lactational transfer of ochratoxin A in rats: a study on the lactational process and effects on offspring. *Archives of Toxicology*, **69**, 596-602.
- HARA, S., TAKEMORI, Y., YAMAGUCHI, M., NAKAMURA, M., & OHKURA, Y. 1985: Determination of  $\alpha$ -keto acids in serum and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **344**, 33-39.
- HARWIG, J., KUIPER-GOODMAN, T. & SCOTT, P. M. 1983: Microbial food toxicants: ochratoxins. In *CRC Handbook of Foodborne Diseases of Biological Origin*. Edited by RECHCIGL, M. J. CRC Press, 193-238.
- HEUSSNER, A. H., & BINGLE, L. E. 2015: Comparative ochratoxin toxicity: A review of the available data. *Toxins*, **7**(10), 4253-4282.
- CHATURVEDULA, V. S. P., & PRAKASH, I. 2013: Flavonoids from *Astragalus propinquus*. *J Chem Pharm Res*, **5**, 261-5.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 1993: Ochratoxin A. In *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*, Vol. **56**. 489-521
- ITIS 2020: *Bacopa monnieri*. Taxonomic Hierarchy. Integrated Taxonomic Information System. [online]. Dostupné z: [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=33038&print\\_version=SCR&source=from\\_print#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=33038&print_version=SCR&source=from_print#null)
- JECFA 2008: Ochratoxin A (addendum). In Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Prepared by the 68th meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives, June 19-28, 2007, Geneva, Switz. *WHO food additive series*, Vol. **59**. Geneva, Switz.: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), World Health Organization (WHO). 169-180, 357-429, 454.
- JENNINGS-GEE, J. E., TOZLOVANU, M., MANDERVILLE, R., MILLER, M. S., PFOHL-LESZKOWICZ, A., & SCHWARTZ, G. G. 2010: Ochratoxin A: In utero exposure in mice induces adducts in testicular DNA. *Toxins*, **2**(6), 1428-1444.

JONSYN-ELLIS, F. E. 2000: Aflatoxins and ochratoxins in urine samples of school children in Mokonde, Southern Sierra Leone. *Journal of nutritional & environmental medicine*, **10**(3), 225-231.

KABELITZ, L., & SIEVERS, H. 2004: Contaminants of medicinal and food herbs with a view to EU regulations. *Innovations Food Technol*, **1**, 25-27.

KLIMEŠ, J. 2008: *Kontrola léčiv I*. 2. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 9788024616131.

KOSALEC, I., CVEK, J., & TOMIĆ, S. 2009: Contaminants of medicinal herbs and herbal products. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, **60**(4), 485-501.

KUBÍČEK, V. 2003a: *Astragalus*. Encyklopedie rostlin [online]. Copyright © 2003 [cit. 08. 11. 2020]. Dostupné z:  
<http://www.kvetena.cz/systematika/Druh.asp?lang=2&abc=Astragalus>

KUBÍČEK, V. 2003b: *Glycyrrhiza glabra*. Encyklopedie rostlin [online]. Copyright © 2003 [cit. 08. 11. 2020]. Dostupné z:  
<http://www.kvetena.cz/systematika/Druh.asp?lang=1&abc=1%E9ko%F8ice>

KUIPER-GOODMAN, T., HILTS, C., BILLIARD, S. M., KIPARISSIS, Y., RICHARD, I. D. K., & HAYWARD, S. 2010: Health risk assessment of ochratoxin A for all age-sex strata in a market economy. *Food Additives and Contaminants*, **27**(2), 212-240.

KUIPER-GOODMAN, T. & SCOTT, P.M. 1989: Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedical and Environmental Sciences*, **2**, 179-248.

KUMAGAI, S., & AIBARA, K. 1982: Intestinal absorption and secretion of ochratoxin A in the rat. *Toxicology and applied pharmacology*, **64**(1), 94-102.

LEA, T., STEIEN, K. & STORMER, F.C. 1989: Mechanism of ochratoxin A-induced immunosuppression. *Mycopathologia*, **107**, 153-161.

LI, S., MARQUARDT, R. R., & FROHLICH, A. A. 2000: Identification of ochratoxins and some of their metabolites in bile and urine of rats. *Food and chemical toxicology*, **38**(2-3), 141-152.

LI, S., MARQUARDT, R.R., FROHLICH, A.A., VITTI, T.G. AND CROW, G. 1997: Pharmacokinetics of ochratoxin A and its metabolites in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **145**, 82.

MAJERUS, P., MAX, M., KLAFFKE, H., & PALAVINSKAS, R. 2000: Ochratoxin A in Süßholz, Lakritze und daraus hergestellten Erzeugnissen. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, **96**(12), 451-454.

- MALIR, F., OSTRY, V., & NOVOTNA, E. 2013: Toxicity of the mycotoxin ochratoxin A in the light of recent data. *Toxin Reviews*, **32**(2), 19-33.
- MALIR, F., OSTRY, V., PFOHL-LESZKOWICZ, A., & ROUBAL, T. 2012: Ochratoxin A exposure biomarkers in the Czech Republic and comparison with foreign countries. *Biomarkers*, **17**(7), 577-589.
- MALIR, F., OSTRY, V., PFOHL-LESZKOWICZ, A., MALIR, J., & TOMAN, J. 2016: Ochratoxin A: 50 years of research. *Toxins*, **8**(7), 191.
- MALIR, F., OSTRY, V., PFOHL-LESZKOWICZ, A., TOMAN, J., BAZIN, I., & ROUBAL, T. 2014: Transfer of ochratoxin A into tea and coffee beverages. *Toxins* **6**: 3438–3453.
- MALLY, A., KEIM-HEUSLER, H., AMBERG, A., KURZ, M., ZEPNIK, H., MANTLE, P., & DEKANT, W. 2005: Biotransformation and nephrotoxicity of ochratoxin B in rats. *Toxicology and applied pharmacology*, **206**(1), 43-53.
- MALLY, A., ZEPNIK, H., WANEK, P., EDER, E., DINGLEY, K., IHMELS, H., & DEKANT, W. 2004: Ochratoxin A: lack of formation of covalent DNA adducts. *Chemical research in toxicology*, **17**(2), 234-242.
- MANDERVILLE, R., & PFOHL-LESZKOWICZ, A. 2008: Bioactivation and DNA adduction as a rationale for ochratoxin A carcinogenesis. *World Mycotoxin Journal*, **1**(3), 357-367.
- MANTLE, P.G. 2002: Risk assessment and the importance of ochratoxins. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **50**, 143-146.
- MATEO, R., MEDINA, Á., MATEO, E. M., MATEO, F., & JIMÉNEZ, M. 2007: An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International journal of food microbiology*, **119**(1-2), 79-83.
- MICCO, C., AMBRUZZI, M. A., MIRAGLIA, M., BRERA, C., ONORI, R., & BENELLI, L. 1991. Contamination of human milk with ochratoxin A. *IARC scientific publications*, **115**, 105-108.
- MOSS, M. O. 1996. Mode of formation of ochratoxin A. *Food additives and contaminants*, **13**, 5-9.
- NEELEY, W.C., & WEST, A.D. 1972: Spectroanalytical parameters of fungal metabolites. III. Ochratoxin A. *Journal AOAC* **55**(6), 1305-1309.
- NIP, W. K., & CHU, F. S. 1979: Fate of ochratoxin A in goats. *Journal of Environmental Science & Health Part B*, **14**(3), 319-333.

- O'BRIEN, E., & DIETRICH, D. R. 2005: Ochratoxin A: the continuing enigma. *Critical reviews in toxicology*, **35**(1), 33-60.
- O'BRIEN, E., HEUSSNER, A. H., & DIETRICH, D. R. 2001: Species-, sex-, and cell type-specific effects of ochratoxin A and B. *Toxicological Sciences*, **63**(2), 256-264.
- OSTRÝ, V., BUCHTA, V., 2003a: Rod *Aspergillus*, in MALÍŘ, F., OSTRÝ, V., *Vláknité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka*. Vyd. 1. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských oborů, s. 105-111. ISBN 80-7013-395-3
- OSTRY, V., MALIR, F., & RUPRICH, J. 2013: Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin. *Toxins*, **5**(9), 1574-1586.
- OSTRY, V., MALIR, F., TOMAN, J., & GROSSE, Y. 2017: Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. *Mycotoxin research*, **33**(1), 65-73.
- OTTENEDER, H., & MAJERUS, P. 2001: Ochratoxin A (OTA) in coffee: nation-wide evaluation of data collected by German Food Control 1995-1999. *Food Additives & Contaminants*, **18**(5), 431-435.
- PETZINGER, E. & ZIEGLER, K. 2000: Ochratoxin A from a toxicological perspective. *Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics*, **23**, 91-98.
- PFOHL-LESZKOWICZ A, MANDERVILLE RA. 2007: Ochratoxin A: an overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Mol Nutr Food Res*, **51**, 61–99.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A. 2009: Ochratoxin A and aristolochic acid involvement in nephropathies and associated urothelial tract tumours. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, **60**(4), 465-482.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A. GROSSE, Y., KANE, A., CREPPY, E.E. & DIRHEIMER, G. 1993: Differential DNA adduct formation and disappearance in three mice tissues after treatment by the mycotoxin, ochratoxin A. *Mutation Research*, **289**, 265-273.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A., & CASTEGNARO, M. 2006: Letter to the editor by Dekant et al. concerning the manuscript "Analysis of some breakfast cereals on the French market for their content of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B-1: Development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin" by Molinie et al., this volume. *Food Chemistry*, **99**(1), 178-181.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A., & MANDERVILLE, R. A. 2007: Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular nutrition & food research*, **51**(1), 61-99.

- PFOHL-LESZKOWICZ, A., CHAKOR, K., CREPPY, E. E., & DIRHEIMER, G. 1991: DNA adduct formation in mice treated with ochratoxin A. *IARC scientific publications*, **115**, 245-253.
- QIN, L., JIANG, J. Y., ZHANG, L., DOU, X. W., OUYANG, Z., WAN, L., & YANG, M. H. 2020: Occurrence and analysis of mycotoxins in domestic Chinese herbal medicines. *Mycology*, 1-21.
- RAŠKA, M. 2009: Analytické hodnocení účinných látek kapalinovou chromatografií II.
- RINGOT, D., CHANGO, A., SCHNEIDER, Y. J., & LARONDELLE, Y. 2006: Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-biological interactions*, **159**(1), 18-46.
- ROODENRYS, S., BOOTH, D., BULZOMI, S., PHIPPS, A., MICALLEF, C., & SMOKER, J. 2002. Chronic effects of Brahmi (*Bacopa monnieri*) on human memory. *Neuropsychopharmacology*, **27**(2), 279-281.
- ROTH, A., CHAKOR, K., ECUÉCREPPY, E., KANE, A., ROSCHENTHALER, R., & DIRHEIMER, G. 1988: Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice. *Toxicology*, **48**(3), 293-308.
- SAMSON, R. A. & PITT, J. I. 2000: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. *Harwood Academic Publishers*, Amsterdam, The Netherlands, pp 1-524
- SAMSON, R. A., HOUBRAKEN, J. A. M. P., KUIJPERS, A. F., FRANK, J. M., & FRISVAD, J. C. 2004: New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus section Nigri*. *Studies in mycology*, **50**(1), 45-56.
- SCF (Scientific Committee on Food) 1998: Opinion on of the Scientific Committee on Food on Ochratoxin A. *EC European Community*, Luxembourg.
- SCOTT, P. M. 1994: *Penicillium* and *Aspergillus* toxins. Mycotoxins in grains: Compounds other than aflatoxin. *Eagan Press. St. Paul, Minnesota. USA*, 261-286.
- SINGH, H. K., & DHAWAN, B. N. 1997: Neuropsychopharmacological effects of the Ayurvedic nootropic *Bacopa monniera* Linn.(Brahmi). *Indian Journal of Pharmacology*, **29**(5), 359.
- SKAUG, M. A., HELLAND, I., SOLVOLL, K., & SAUGSTAD, O. D. 2001: Presence of ochratoxin A in human milk in relation to dietary intake. *Food Additives & Contaminants*, **18**(4), 321-327.

- STANDER, M. A., STEYN, P. S., VAN DER WESTHUIZEN, F. H., & PAYNE, B. E. 2001: A kinetic study into the hydrolysis of the ochratoxins and analogues by carboxypeptidase A. *Chemical research in Toxicology*, **14**(3), 302-304.
- STARK, A. A. 2005: Threat assessment of mycotoxins as weapons: molecular mechanisms of acute toxicity. *Journal of food protection*, **68**(6), 1285-1293.
- STOEV, S.D., GOUNDASHEVA, D., MIRTICHEVA, T. & MANTLE, P.G. 2000: Susceptibility to secondary bacterial infections in growing pigs as an early response to ochratoxicosis. *Experimental and Toxicological Pathology*, **52**, 287-296.
- STUDER-ROHR, I., SCHLATTER, J., & DIETRICH, D. R. 2000: Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. *Archives of toxicology*, **74**(9), 499-510.
- SUZUKI, S., SATOH, T., & YAMAZAKI, M. 1977: The pharmacokinetics of ochratoxin A in rats. *The Japanese Journal of Pharmacology*, **27**(5), 735-744.
- ŠKÁRKOVÁ, J., OSTRÝ, V., MALÍŘ, F., & ROUBAL, T. 2013: Determination of ochratoxin A in food by high performance liquid chromatography. *Analytical Letters*, **46**(10), 1495-1504.
- STUDER-ROHR, I., SCHLATTER, J., & DIETRICH, D. R. 2000: Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. *Archives of toxicology*, **74**(9), 499-510.
- SUZUKI, S., SATOH, T., & YAMAZAKI, M. 1977: The pharmacokinetics of ochratoxin A in rats. *The Japanese Journal of Pharmacology*, **27**(5), 735-744.
- ŠKÁRKOVÁ, J., OSTRÝ, V., MALÍŘ, F., & ROUBAL, T. 2013: Determination of ochratoxin A in food by high performance liquid chromatography. *Analytical Letters*, **46**(10), 1495-1504.
- TOZLOVANU, M., CANADAS, D., PFOHL-LESZKOWICZ, A., FRENETTE, C., PAUGH, R. J., & MANDERVILLE, R. A. 2012: Glutathione conjugates of ochratoxin A as biomarkers of exposure. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, **63**(4), 417-427.
- TOZLOVANU, M., FAUCET-MARQUIS, V., PFOHL-LESZKOWICZ, A., & MANDERVILLE, R. A. 2006: Genotoxicity of the hydroquinone metabolite of ochratoxin A: structure-activity relationships for covalent DNA adduction. *Chemical research in toxicology*, **19**(9), 1241-1247.
- VALENTA, H. 1998: Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. *Journal of Chromatography A*, **815**(1), 75-92.

- VAN DER MERWE, K. J., STEYN, P. S., & FOURIE, L. 1965: 1304. Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxins A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* wilh. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 7083-7088.
- VARGA, J., & SAMSON, R. A. (EDS.). 2008: *Aspergillus in the genomic era*. Wageningen Academic Publishers.
- VARGA, J., KEVEI, E., RINYU, E., TÉREN, J., & KOZAKIEWICZ, Z. 1996: Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Applied and environmental microbiology*, **62**(12), 4461-4464.
- VAŠÍČEK, O. 2007: Využití metod kapalinové chromatografie k separaci oligonukleotidů modifikovaných genotoxickými látkami. *Masarykova univerzita v Brně*.
- WHO 1991: Evaluation of certain food additives and contaminants. Thirty-seventh report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). *WHO technical report series*, **806**, 29–31.
- WHO 2007: Guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. *World Health Organization*.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2013: WHO traditional medicine strategy: 2014-2023. *World Health Organization*.
- WU, Q., DOHNAL, V., HUANG, L., KUCA, K., WANG, X., CHEN, G., & YUAN, Z. 2011: Metabolic pathways of ochratoxin A. *Current drug metabolism*, **12**(1), 1-10.
- XIAO, H., MARQUARDT, R.R., FROHLICH, A.A. AND LING, Y.Z.. 1995: Synthesis and structural elucidation of analogs of ochatoxin A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**, 524-530.
- YANG, L., WANG, L., PAN, J., XIANG, L., YANG, M., & LOGRIECO, A. F. 2010: Determination of ochratoxin A in traditional Chinese medicinal plants by HPLC–FLD. *Food Additives and Contaminants*, **27**(7), 989-997.
- ZEPNIK, H., PÄHLER, A., SCHAUER, U., & DEKANT, W. 2001: Ochratoxin A induced tumor formation: is there a role of reactive ochratoxin A metabolites?. *Toxicological Sciences*, **59**(1), 59-67.
- ZEPNIK, H., VÖLKEL, W., & DEKANT, W. 2003: Toxicokinetics of the mycotoxin ochratoxin A in F 344 rats after oral administration. *Toxicology and applied pharmacology*, **192**(1), 36-44.
- ZHANG, H. W., LIN, Z. X., XU, C., LEUNG, C., & CHAN, L. S. 2014: Astragalus (a traditional Chinese medicine) for treating chronic kidney disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (10).



ZIMMERLI, B., & DICK, R. 1996: Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. *Food additives & contaminants*, **13**(6), 655-668.

# Přílohy

## Tabulky

Tab. č. 12 Výsledky screeningu vybraných druhů farmaceutických bylin

Číslo vzorku UHK	Číslo vzorku ZÚ	Druh vzorku	Charakter vzorku	Separační postup dle:	OTA [ng/g]
1	89430/2015	<i>Glycyrrhiza</i>	matrice	Entwisle 2001	5,65
2	89434/2015	<i>Astragalus</i>	matrice	Entwisle 2001	28,8
3	112462/2015	<i>Astragalus</i>	matrice	Entwisle 2001	165
4	134444/2015	<i>Astragalus</i>	matrice	Entwisle 2001	1110
5	134447/2015	<i>Glycyrrhiza</i>	matrice	Entwisle 2001	11,9
6	134448/2015	<i>Glycyrrhiza</i>	matrice	Entwisle 2001	8
7	134449/2015	<i>Glycyrrhiza</i>	matrice	Zimmerli 1995	3,8
8	22153/2016	<i>Astragalus</i>	matrice	Entwisle 2001	1700
9	22154/2016	<i>Astragalus</i>	matrice	Entwisle 2001	1600
14	94148/2016	<i>Bacopa</i>	matrice	Entwisle 2001	5,49

Tab. č. 13 Stanovení OTA u *Astragalus propinquus*

Číslo vzorku UHK	Druh vzorku	Separační postup dle:	OTA [ng/g]
1	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	28,8
2	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	165,0
3	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	1110,0
4	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	1700,0
5	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	1600,0
6	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	211,0
7	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	188,0
8	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	286,3
9	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	213,2
10	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	37,6
11	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	184,2
12	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	97,3
13	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	234,1
14	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	1253,4
15	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	44,7
16	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	33,4
17	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	256,8
18	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	124,9
19	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	253,5
20	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	713,8
21	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	198,4

<b>Číslo vzorku UHK</b>	<b>Druh vzorku</b>	<b>Separáční postup dle:</b>	<b>OTA [ng/g]</b>
22	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	197,4
23	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	206,7
24	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	36,8
25	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	212,6
26	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	226,7
27	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	156,8
28	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	1655,6
29	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	209,0
30	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	234,5
31	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	65,4
32	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	176,2
33	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	1658,0
34	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	218,1
35	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	1689,6
36	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	56,2
37	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	111,3
38	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	296,8
39	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	82,6
40	<i>Astragalus</i>	Zimmerli 1995	1613,8

## Obrázky



Obr. č. 4 Připravené vzorky odvarů



Obr. č. 5 Prosávací zařízení

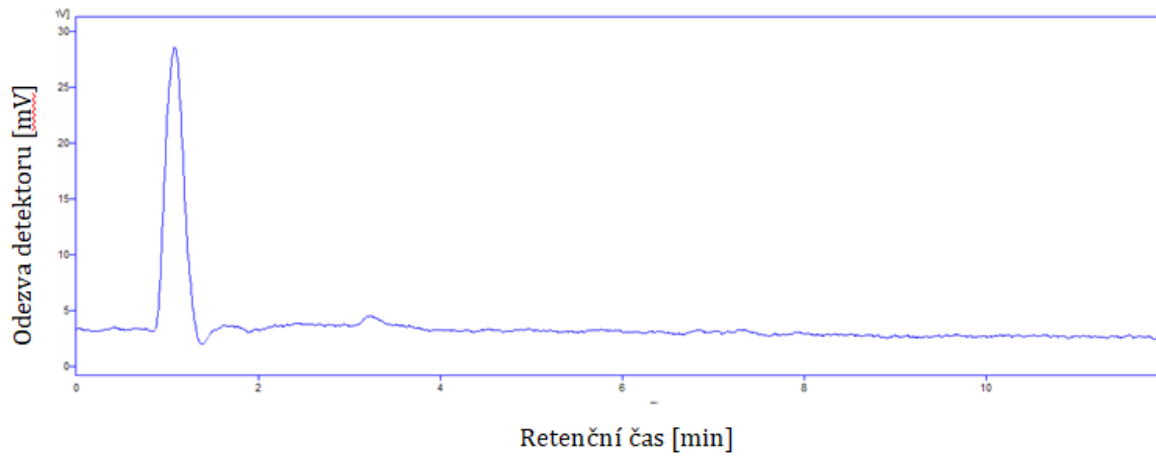


**Obr. č. 6 Kolonky s násadcem naplněným odvarem**

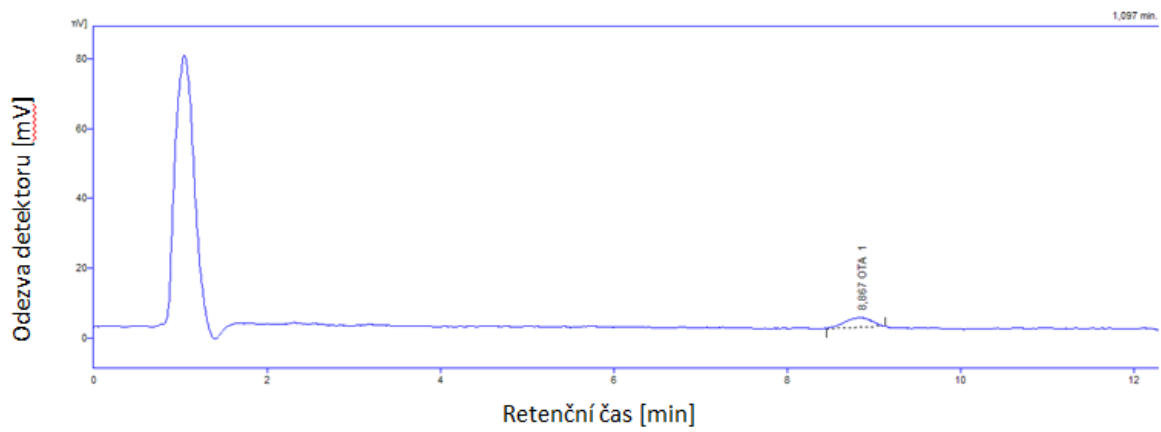


**Obr. č. 7 Kolonky s násadce naplněným odvarem**

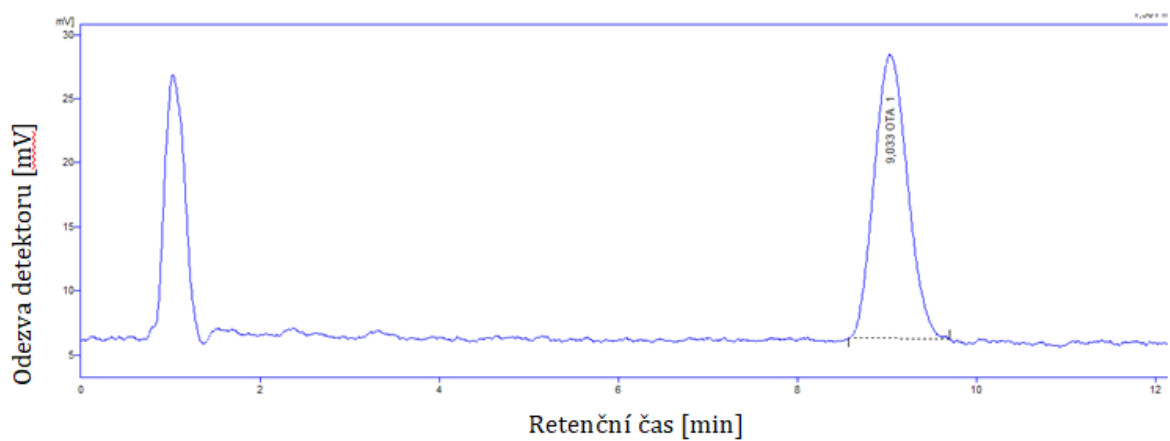
## Výsledky z HPLC



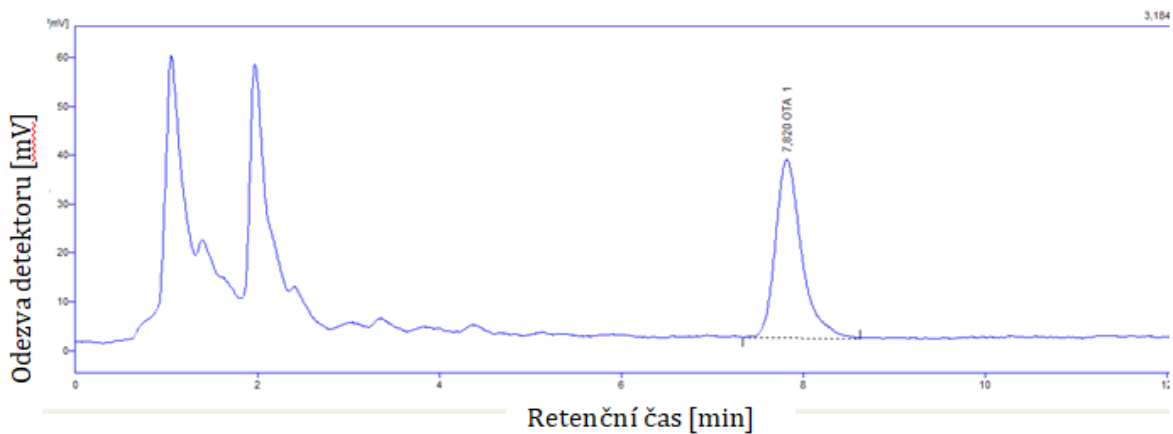
**Graf č. 2 Slepý vzorek (blank)**



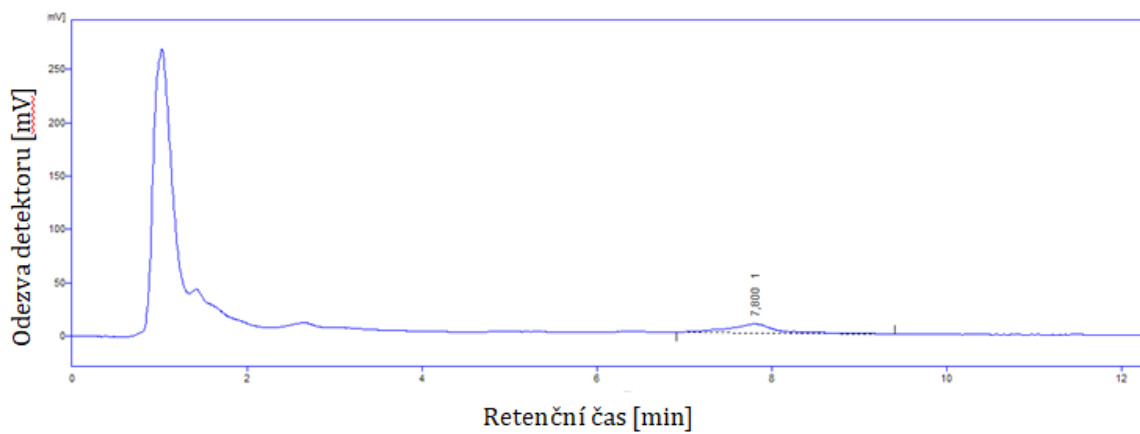
**Graf č. 3 Standard 0,4 ng/ml**



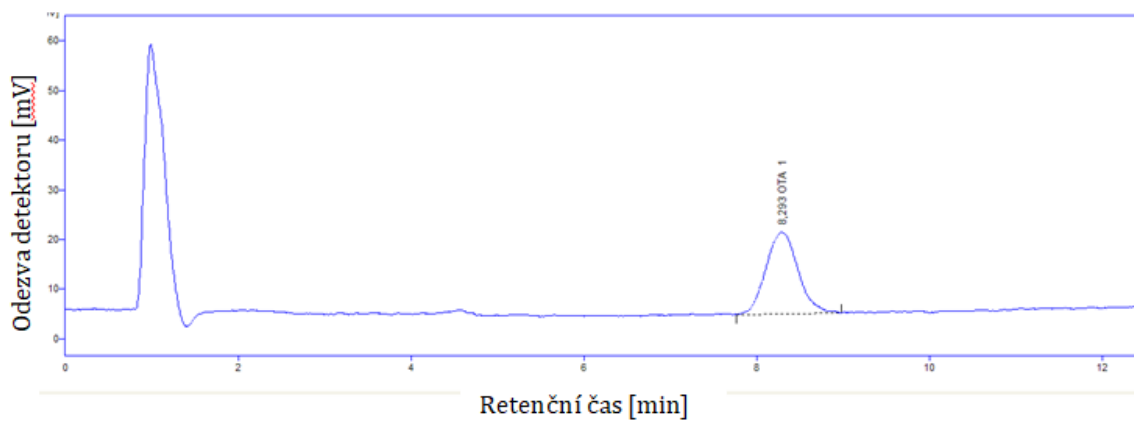
**Graf č. 1 Standard 4 ng OTA/ml**



**Graf č. 4 Záznam pozitivního vzorku matrice Astragalus propinquus**



**Graf č. 5 Záznam pozitivního vzorku tinktury Astragalus propinquus**



**Graf č. 6 Záznam pozitivního vzorku odvaru Astragalus propinquus**