



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLÓGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**ANALÝZA MYKOTOXINŮ Z BIOLOGICKÝCH MATRIC
POMOCÍ BIOMEMBRÁN A KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY**

ANALYSIS OF MYCOTOXINS FROM BIOLOGICAL MATRICES USING BIOMEMBRANES AND CAPILLARY ELECTROPHORESIS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Natália Kubová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Filip Duša, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP 1326/2018
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Natália Kubová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **Mgr. Filip Duša, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název diplomové práce:

Analýza mykotoxinů z biologických matric pomocí biomembrán a kapilární elektroforézy

Zadání diplomové práce:

1. Vytvořit a otestovat metodu pro analýzu amfifilních látek pomocí elektrokinetické chromatografie
2. Optimalizovat tuto metodu pro analýzu mykotoxinů, jmenovitě ochratoxinů, a otestovat různé pseudostacionární fáze
3. Analyzovat pomocí této metody ochratoxin extrahovaný z biologického materiálu, ve kterém se přirozeně vyskytuje

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Natália Kubová
student(ka)

Mgr. Filip Duša, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

V tejto diplomovej práci sú zosumarizované poznatky o mykotoxínoch, konkrétne ochratoxíne A, jeho tolerovateľné množstvá prijímané potravou, detoxifikácia a analytické metódy pre stanovenia mykotoxínov. Súčasťou práce je kapitola o lipozómoch, ktoré boli použité na analýzu ochratoxínu A pomocou lipozomálnej elektrokinetickej kapilárnej elektroforézy.

Praktická časť sa zaoberá analýzou ochratoxínu A z húb *Aspergillus ochraceus* Wilhelm a *Aspergillus melleus* Yukawa kultivovaných na žite ozimnom a optimalizáciou metódy pre analýzu ochratoxínu A na základe lipozómov rôznych zložení. Pomocou kapilárnej elektroforézy nie je ochratoxin A dostatočne separovaný a detekovaný v extrahovanej zmesi, naopak, keď sa použijú roztoky lipozómov, je možné dosiahnuť odlišné migračné správanie a zároveň stabilizáciu ochratoxínu A v roztoku vďaka amfifilným interakciám medzi mykotoxínmi a lipozómami. Preto bola lipozomálna elektrokinetická kapilárna elektroforéza (LECK) metóda využitá pre túto prácu. Najvhodnejšie zloženie lipozómov sa preukázalo zložením molárnych pomerov 25% cholesterol (stabilizácia membrány) / 50% 2-oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycerol 3-phosphocholine (hlavný zwitterionický komponent membrány) / 25% 1,2-diacyl-sn-glycerol-3-phospho-L-serine (dodanie negatívneho náboja).

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Ochratoxín A, lipozómy, kapilárna elektroforéza, žito ozimné, huby, *Aspergillus ochraceus* Wilhelm, *Aspergillus melleus* Yukawa

ABSTRACT

This thesis summarizes knowledge about mycotoxins, with focus to ochratoxin A. It also summarizes its tolerable levels of food intake, detoxification and analytical methods for mycotoxins. The work also includes a chapter describing liposomes that were used for the analysis of ochratoxin A by liposomal electrokinetic capillary electrophoresis (LECK).

The practical part includes the analysis of ochratoxin A from *Aspergillus ochraceus* Wilhelm and *Aspergillus melleus* Yukawa fungi cultivated on a rye and optimization of the method for analysis of ochratoxin A based on liposomes of different compositions. By capillary zone electrophoresis, ochratoxin A is not sufficiently separated and detected in the extracted mixture; conversely, when liposome solutions are used, different migration behavior can be achieved while stabilizing ochratoxin A in solution due to amphiphilic interactions between mycotoxins and liposomes. Therefore, the LEKC method was used for this work. The most suitable liposome composition has been shown to be molar ratios of 25% cholesterol (membrane stabilization) / 50% 2-oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycerol 3-phosphocholine (main zwitterionic lipid) / (25% 1,2-diacyl-sn-glycerol)-3-phospho-L-serine (introduction of negative charge).

KEY WORDS

Ochratoxin A, liposomes, capillary electrophoresis, rye, fungi, *Aspergillus ochraceus* Wilhelm, *Aspergillus melleus* Yukawa

KUBOVÁ, Natália. *Analýza mykotoxinů z biologických matric pomocí biomembrán a kapilární elektroforézy*. Brno : Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. s.58 Vedoucí diplomové práce Mgr. Filip Duša, Ph.D..

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brně a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....

podpis študenta

POĎAKOVANIE

Rada by som týmto poďakovala môjmu vedúcemu diplomovej práce Mgr. Filipovi Dušovi, Ph.D za pomoc, cenné rady a trpezlivosť, za odborné vedenie, venovaný čas a pripomienky pri písaní tejto diplomovej práce, ďalej Ing. Danke Moravcovej, Ph.D a Ing. Marií Horkej, CSc. za poskytnutie štandardov a kolónií húb. Ďalej by som chcela poďakovať svojej rodine a blízkym za podporu počas celého môjho štúdia. Na záver by som chcela poďakovať Ústavu analytickej chémie Akademie vied Českej republiky za možnosť vypracovania tejto diplomovej práce na tomto pracovíšti.

Obsah

Úvod.....	8
1 Teoretická časť	9
1.1 Ochratoxín A.....	9
1.1.1 Plesne rodu Aspergillus a Penicillium	12
1.2 Prevencia OTA.....	14
1.2.1 Obilniny, hrozno, káva, kakao a iné plodiny v teplejších a tropických oblastiach	14
1.2.2 Skladovanie a preprava plodín	15
1.3 Detoxifikácia OTA.....	16
1.3.1 Spracovanie obilnín	16
1.3.2 Fyzikálne a chemické metódy	16
1.3.3 Mikrobiologické metódy.....	17
1.3.4 Potravinárske prísady s ochrannými účinkami proti toxickému pôsobeniu OTA	18
1.4 Analytické metódy stanovenia mykotoxínov	19
1.4.1 Metódy predbežnej úpravy vzoriek	19
1.4.2 Separačné metódy.....	20
1.5 Lipozómy	27
1.5.1 Lipozómy a CE.....	29
2 Cieľ práce	30
3 Experimentálna časť	31
3.1 Prístrojové vybavenie	31
3.2 Chemikálie	32
3.3 Príprava vzoriek	33
3.4 Príprava lipozómov	33

3.5	CZE metóda	34
3.6	LECK metóda	34
4	Výsledky práce a diskusia	36
4.1	Produkcia OTA pomocou inokulovaného žita ozimného	36
4.2	Optimalizácia separačného systému.....	38
4.2.1	Elektroforetické mobility OTA	39
4.3	Kalibračná krivka OTA	44
4.4	Koncentrácie OTA v žite ozimnom	45
4.4.1	Celkové zakoncentrovanie OTA po vysušení	47
5	Záver	50
6	Zoznam použitej literatúry	51
7	Zoznam použitých symbolov	58

Úvod

Mykotoxíny sú jedným z dôležitých faktorov ovplyvňujúcich kvalitu potravín, primárne rastlinného pôvodu. Sekundárne je výskyt týchto mykotoxínov dôležité sledovať aj u hospodárskych zvierat, z dôvodu možnej akumulácie mykotoxínov z kontaminovaného krmiva v živočíšnych tkanivách. Mykotoxíny musia pre spustenie svojho toxického efektu v bunke penetrovať plazmatickou membránou. Takže je možné predpokladať ich vysokú rozpustnosť v fosfolipidovej dvojvrstve. Na tomto predpoklade je založená táto práca, kde je fosfolipidová dvojvrstva rôzneho fosfolipidového zloženia využitá ako separačná fáza pre oddelenie jednotlivých mykotoxínov zo zmesi a následnou detekciou a kvantifikáciou vo vzorkách.

Konkrétne sledovaný bol ochratoxín A v žite ozimnom. OTA je prítomný vo všetkých štádiách potravinového reťazca (obilniny, mäso, ovocie, víno, pivo, káva atď.) Je známy svojimi karcinogénnymi, nefrotoxickými, teratogénnymi, genotoxickými a imunotoxickými vlastnosťami v živočíšnych bunkách. Väčšina mykotoxínov je chemicky stabilná, takže majú tendenciu prežiť skladovanie, spracovanie a dokonca aj pri varení pri pomerne vysokých teplotách, ako sú teploty dosiahnuté počas pečenia chleba alebo výroby raňajkových obilnín.

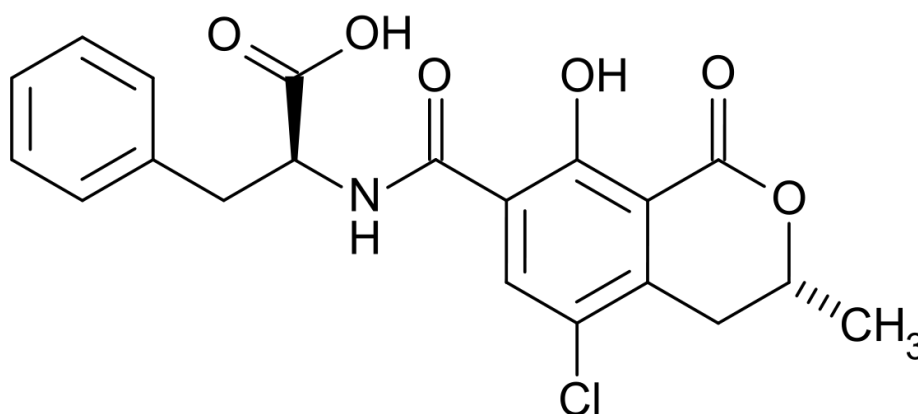
Existuje niekoľko typov analytických metód na analýzu mykotoxínov. V tejto práci bola použitá na analýzu mykotoxínov kapilárna elektroforéza. V súčasnosti je kapilárna elektroforéza jednoduchá a vysokoúčinná metóda, umožňujúca prácu s nanolitrovými objemami vzoriek.

Cieľom tejto práce bolo vytvoriť, otestovať a optimalizovať metódu pre analýzu amfifilných látok pomocou lipozomálnej elektrokinetickej chromatografie, pomocou nej analyzovať mykotoxíny a otestovať rôzne pseudostacionárne fázy.

1 Teoretická časť

1.1 Ochratoxín A

Ochratoxín A (OTA) je toxický metabolit produkovaný hubami rodu *Aspergillus* a *Penicillium*. Keďže môže byť kontaminovaná široká škála potravín, EÚ a ďalšie krajiny stanovili maximálne povolené množstvo ochratoxínu v potravinách. Európsky úrad pre bezpečnosť potravín (EFSA) stanovil tolerovateľný týždenný príjem na 120 ng/kg telesnej hmotnosti. Na základe tohoto stanoviska sa stanovili maximálne limity pre nespracované obilniny, pražené kávové zrná a mletú praženú kávu na 5 ng/kg telesnej hmotnosti. Pre sušené hrozno viniča hroznorodého a rozpustnú kávu 10 ng/kg, pre víno a hroznovú šťavu 2 ng/kg a pre obilné príkrmy a príkrmy určené pre kojencov a malé deti, ako aj diétne potraviny pre zvláštne liečebné účely určené pre kojencov 0,5 ng/kg (NARIADENIE KOMISIE (ES) č. 1881/2006). Reálny týždenný príjem sa u európskeho konzumenta pohybuje v rozmedzí 15–60 ng/kg telesnej hmotnosti. Z toho vyplýva, že maximálne limity sú prekračované len výnimočne (Velíšek a Hajšlová, 2009). Na zníženie možnosti napadnutia plesňou, sú najefektívnejšie stratégie ochrany už pred zberom plodín. OTA je bežne prítomný v obilninách, hrozne, káve, korení, kakae a kvôli svojej termostabilite aj vo svojich derivátoch. OTA v obilninách je produkovaný hlavne *Penicillium verrucosum*, zatiaľ čo OTA na hrozne, káve a kakae je tvorený *Aspergillus carbonarius*.



Obr.1: Vzorec Ochratoxínu A

OTA je známy svojimi karcinogénnymi, nefrotoxickými, teratogénnymi, genotoxickými a imunotoxickými vlastnosťami v živočíšnych bunkách (International Agency for Research on Cancer, 1993). Ľudia sú citlivejší na jeho nefrotoxické účinky. Klasifikovaný je ako skupina 2B (možný karcinogén človeka) Medzinárodnou agentúrou pre výskum rakoviny (1993). Na základe predchádzajúcich štúdií môže byť jeho prítomnosť spojená s chronickou tubulointersticiálnou chorobou obličiek nazývaná balkánska endemická nefropatia (BEN) (Bui-Klimke a Wu, 2014; *Kidney*, 2013; Markovic, Lebedev, Djordjevic, Arambasic, 1976; Chernozemsky, Stoyanov, Petkova-Bocharova, Nicolov, Draganov, Stoichev, Tanchev, Naidenov, Kalcheva, 1977). BEN je chronické progresívne ochorenie s obdobím 6-10 rokov, ktoré vedie k nezvratnému zlyhaniu obličiek. Avšak okrem dlhodobej expozície OTA v endemických oblastiach sa predpokladajú niektoré ďalšie možné príčinné faktory vo vývoji BEN: kyselina aristolochová, intoxikácia ťažkými kovmi, diéta s deficitom selénu a genetická predispozícia (Bui-Klimke, a Wu, 2014; Pavlovic, 2013; Pfohl-Leszkowicz, 2009).

Po absorpcii OTA z gastrointestinálneho traktu sa primárne viaže na albumín s vysokou afinitou, čo vedie k jeho veľmi dlhému polčasu rozpadu (od niekoľkých dní do jedného mesiaca v závislosti od druhu). U zdravých ľudských populácií sa plazmatická koncentrácia OTA pohybuje od niekoľkých stoviek pmol/l do niekoľkých nmol/l, zatiaľ čo v endemických oblastiach môže prekročiť 100 nmol/l (Radic, Fuchs, Peraica, Lucic, 1997; Peraica, Domijan, Fuchs, Lucic, Radic, 1999; Özcelik, Kosar, Soysal, 2001; Lino, Baeta, Henri, Dinis, Pena, Silveira, 2008).

V obehovom systéme je OTA takmer úplne viazaná na albumín. Rozsah väzby albumínu určuje plazmatický polčas OTA, ktorý je najdlhší u ľudí (v porovnaní s inými druhmi) približne jeden mesiac (Hagelberg, Hult, Fuchs, 1989; Studer-Rohr, Schlatter, Dietrich, 2000). Väzba albumínu silne ovplyvňuje toxikokinetiku OTA: u potkanov s deficienciou albumínu bolo vylučovanie toxínov cez obličky 20-70-krát rýchlejšie ako u normálnych potkanov (Kumagai, 1985). Zvýšená rýchlosť eliminácie môže znížiť chronické vystavenie cieľových buniek (hlavne obličkových a pečenných buniek). Keďže albumín je kľúčovým transportným proteínom toxínu v obehovom systéme a vzhľadom na skutočnosť, že asociačná konštanta komplexu OTA-albumín je extrémne vysoká (viac ako 10⁷ l/mol) (Poór, Kunsági-Máté, Bencsik, Petrik, Vladimir-Knežević, Košzegi, 2012; Poór, Kunsági-Máté, Matisz, Li, Czibulya, Peles-Lemli, Košzegi, 2013; Poór, Li, Matisz, Kiss, Kunsági-Máté, Košzegi, 2014; Li, Xu, Luo, Yang, Wang, Huang, 2014).

Okrem BEN niektoré štúdie kladú dôraz na úlohu OTA vo vývoji tuniskej nefropatie (Hassen, Abid-Essafi, Achour, Guezzah, Zakhama, Ellouz, Creppy, Bacha, 2004) nádorov žalúdka a pažeráka v niektorých oblastiach Číny (Cui, Xing, Li, Wu, Wang, Liu, Yan, Zhang, 2010; Liu, Wu, Shen, Cui, Wang, Xing, Yan, Zhan, 2015) a rakoviny semenníkov (Schwartz, 2002).

Keďže za fyziologických podmienok je OTA prítomná ako nabitá molekula, prechádza placentou s najväčšou pravdepodobnosťou aktívnymi mechanizmami transportu. Bohužiaľ, hladiny OTA sú vyššie v placentách a tiež dvojnásobne vyššie v krvi plodu ako u matky (Miraglia, Brera, Corneli, Cava, Montanino, 1996). Predchádzajúce štúdie naznačujú, že väčšina OTA zostáva nezmenená a že pečeň nie je jediným orgánom metabolizujúcim OTA (Heussner a Bingle, 2015). V čreve sa časť OTA hydrolyzuje na ochratoxín α (OTA) pôsobením proteolytických enzýmov a enzýmami bakteriálnej mikroflóry (Pitout, 1969; Doster a Sinnhuber, 1972; Hoehler, Sudekum, Wolfram, Frohlich, Marquardt, 1999; Madhyastha, Marquardt, Frohlich, 1992; Xiao, Marquardt, Li, Vodela, Frohlich, Kemppainen, 1996). Ďalšou možnosťou hydrolyzy OTA je otváranie laktónového kruhu za alkalických podmienok, čo vedie k tvorbe vysoko toxickkej zlúčeniny nazývanej OTA s otvoreným laktónom (Xiao, Marquardt, Li, Vodela, Frohlich, Kemppainen, 1996).

Kritické faktory, ktoré ovplyvňujú rast húb počas poľnohospodárstva, zberu a skladovania komodít OTA je teplota, obsah vody a čas, počas ktorého výrobok zostáva pod hodnotou nepriaznivých podmienok. Ďalšími faktormi sú prítomnosť spór, mechanické faktory (vnútorná časť zeleniny je zraniteľnejšia na hubovú inváziu ako vonkajšia), hmyz (ich metabolizmom zvyšujú vlhkosť a teplotu povrchu zeleniny alebo ovocia a tým ju môžu poškodiť), poškodenie búrkou a dažďom, vlhkosť, dostupnosť minerálnych živín, pH (všeobecne, niektoré formy tolerujú kyslé médiá a sú dokonca schopné okysliť samotné médiá), hladiny kyslíka a oxidu uhličitého, chemické a fyzikálne ošetrovanie a pre niektoré komodity aj rýchlosť sušenia a opätovného namáčania výrobku (Abramson, Sinha, Mills, 1987; Atalla, Hassanein, El-Beih, Youssef, 2003; Chelack, Borsa, Marquardt, Frohlich, 1991; Eskola, 2002; Gimeno, 2000; Magan, Hope, Cairns, Aldred, 2003).

K ďalšej kontaminácii z iných surovín v priemysle môže dôjsť akonáhle je prach nalepený na silách, dopravníkoch, zakrivených potrubíach a na zvyškoch v skladoch (Gimeno, 2000). Konkrétnejšie kritické body v potravinárstve v prípade obilnín sú sušenie, spracovanie a skladovanie (Accensi, Abarca, Cabañes, 2004; Magan, Aldred, 2005), v prípade kávy, kakaa

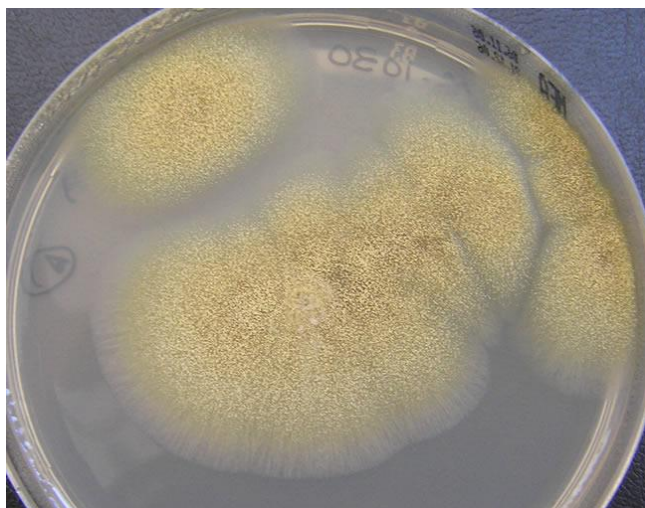
a korenín sú kritické body sušenie, transport a skladovanie (Bucheli, Taniwaki, 2002; Goryacheva, 2006; Magan, Aldred, 2005) zber a preprava v prípade hrozna (Bellí, Ramos, Sanchís, Marín, 2004; Magan, Aldred, 2005). V súčasnosti nie je úplné odstránenie OTA z potravín možné (Komisia Codex Alimentarius, 2003). Ale niektoré metódy na dosiahnutie zníženia OTA sú popísané v ďalších odsekoch v krokoch.

1.1.1 Plesne rodu *Aspergillus* a *Penicillium*

Rod *Aspergillus* bol prvýkrát opísaný v roku 1729 Pierom Antoniom Micheli (Wilson, Mubatanhema, Jurjevic, 2002). Podľa tohto rodu v roku 1877 objavil nemecký botanik a mykológ Karl Adolf Wilhelm druh *Aspergillus ochraceus* a po tomto objave, niektoré ďalšie objavené druhy, ktoré vyzerali podobne ako *Aspergillus ochraceus* boli považované za synonymá tejto huby (Kwon-Chung, Bennett, John, 1992).

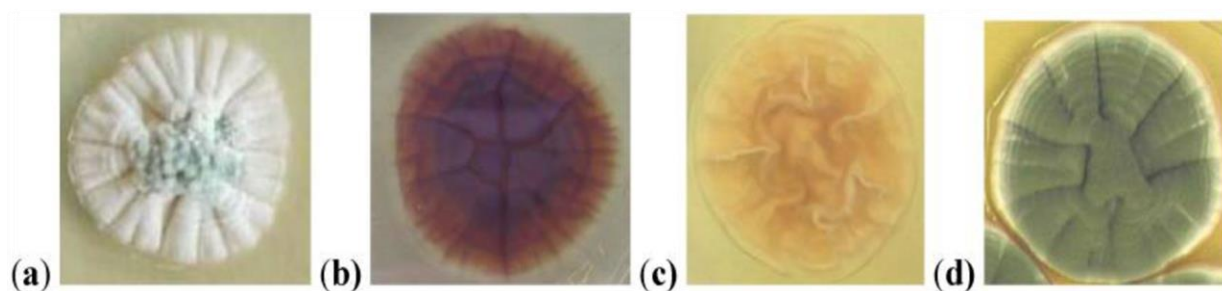
Kolónie *Aspergillus ochraceus* rastú rýchlo a to až 45 až 55 mm za 7 dní. Optimálna teplota pre ich rast je 25 ° C. Na agarovej platni sa vegetatívne mycélium väčšinou ponorí do agaru, zatiaľ čo hlavy konídií sú typicky usporiadané v zónach. Charakteristická farba kolónie je žltá. (Kwon-Chung, Bennett, John, 1992). Niektoré kolónie *Aspergillus ochraceus* tvoria ružovočervenú až fialovú, nepravidelnú, kamienkovú škvrnu až do priemeru 1 mm. Opačný pohľad na Petriho miskú je bledý až hnedastý (Bennet, 2005). Voľným okom sa konidiofóry *Aspergillus ochraceus* javia ako sypká hmota (Kwon-Chung, Bennett, John, 1992). Charakteristická farba konidiofórov je kriedovo žltá až bleďožltohnedá. Výška konidiofórov je až 1500 µm. Konídie sú usporiadané v suchých, vzpriamených reťazcoch, často sa hromadia do dvoch alebo viacerých krátkych stĺpcov. Priemer konídií je okolo 2,5-3,5 µm (Bennet, 2005).

Táto huba sa vyskytuje v širokej škále poľnohospodárskych komodít, ako je kukurica, arašidy, bavlník, ryža, orechy stromové, obilné zrná a ovocie (Wilson a Jurjevic, 2002). Okrem skutočných kolónií húb rastúcich na látkach sa toxíny a metabolity produkované touto hubou našli aj na rôznych iných miestach. Napríklad sa zistilo, že mykotoxín OTA produkovaný touto hubou je prítomný vo vzduchu prenášanom prachu (Skaug, Eduard, Størmer, 2001).



Obr. 2: *Aspergillus ochraceus* na Petriho miske (prevzaté z <https://www.aspergillus.org.uk/content/aspergillus-ochraceus-19>)

Penicillium v porovnaní s *Aspergillus* je rôznorodejší rod, pokiaľ ide o počet druhov a rozsah biotopov (Pitt a Hocking, 2009). V súčasnosti sú *P. verrucosum* a *P. nordicum* jedinými známymi producenti OTA v tomto rode, napriek niektorým správam o produkcii OTA iných druhov (Frisvad a Samson, 2004; Frisvad, Smedsgaard, Larsen, Samson, 2004). *Penicillium casei* a *P. mediolanense* sú synonymá pre *P. verrucosum* a *P. nordicum*, v danom poradí (Frisvad, Smedsgaard, Larsen, Samson, 2004). *Penicillium verrucosum* a *P. nordicum* majú spoločné morfológické charakteristiky, ako sú veľmi podobné priemery kolónií na mnohých kultivačných médiách alebo hrubých častiach. Jedná sa o pomaly rastúce druhy subgénu *Penicillium*. Mnohé druhy klasifikované v tomto subgéne sú morfológicky podobné a identifikácia tradičnými morfológickými technikami je stále ťažká (Pitt a Hocking, 2009). Mnohé z týchto druhov sú veľmi časté a súvisia najmä s uskladnenými potravinami. Druhy produkujúce OTA sú patria do série *Verrucosa* časti *Viridicata* (Frisvad a Samson, 2004).



Obr.3: Kolónie niektorých *Penicillium* spp. na kvasinkovom extrakte po siedmich dňoch inkubácie pri 25 ° C : (a) vzor kolónie *P. verrucosum* alebo *P. nordicum*; b) *P. verrucosum* (reverzne); (c) *P. nordicum* (reverzne); d) *P. viridicatum*

(prevzaté z

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/lw/2.0/html/tileshop_pmc/tileshop_pmc_inline.html?title=Click%20on%20image%20to%20zoom&p=PMC3&id=3153233_toxins-02-01111-g001.jpg)

1.2 Prevencia OTA

Používanie chemických zlúčenín je veľmi atraktívnou stratégiou zabránenia produkcie mykotoxínov (FAO / WHO / UNEP, 1999b). Napríklad v prípade hrozna, bolo zistené, že niektoré fungicídy ako zn. Switch , sú účinné proti kolonizácii húb a produkcii OTA (Varga a Kozakiewicz, 2006). Niektoré fungicídy sa musia používať s opatrnosťou, pretože napríklad karbendazím, má za následok znižovanie fungálnej flóry, ale stimuluje aj produkciu OTA (Medina, Mateo, Valle-Algarra, Mateo a Jiménez, 2007a). Blevé, Grieco, Cozzi, Logrieco a Visconti (2006) demonštrovali in vitro aktivitu epifytových kvasiniek pre *A. carbonarius* a *A. Niger* pri kontrole v hrozne. V prípade výrobkov ovplyvnených *A. carbonarius*, sa zdá byť natamycín účinnou látkou na kontrolu rastu húb a produkciu OTA (Medina, Jiménez, Mateo, Magan, 2007b).

1.2.1 Obilniny, hrozno, káva, kakao a iné plodiny v teplejších a tropických oblastiach

Plodiny v teplejších oblastiach sú výrazne ovplyvnené obdobiami rôznych environmentálnych podmienok. Aby sa zabránilo napadnutiu hubami a prítomnosti OTA, musí byť znížená vlhkosť rastlín. Niektoré z príslušných stratégií napr. zavlažovanie, minerálna výživa a hnojenie rastlín sú vhodné stratégie ochrany pred vznikom OTA (FAO/WHO/UNEP, 1999b). Nové postupy zahŕňajú návrh a výrobu rastlín, ktoré znižujú výskyt plesňových infekcií, obmedzujú rast toxigénnych húb, zabráňujú akumulácii toxínu alebo sú odolné voči pôsobeniu hmyzu. Plodiny v tropických oblastiach sú ovplyvnené prostredím, ktoré stimuluje produkciu húb a to: vysoká teplota, vlhkosť a zrážky (Zinedine, Juan, Idrissi, Manes, 2006). V týchto prípadoch by sa mali dodržiavať všeobecné bezpečnostné pravidlá, ako vyhýbať sa kontaktu pracovných nástrojov so zemou, dôkladne vyčistiť zariadenia, znížiť mechanické škody a kontrolovať hrozbu OTA (FAO, 2006).

1.2.2 Skladovanie a preprava plodín

Skladovanie, či už na farme, vo výrobných priestoroch alebo v obchode s potravinami, je po zbere jednou z najkritickejších fáz pri manipulácii s potravinami. Nevhodné podmienky prostredia, nevhodné balenie alebo rozmrazené potraviny môžu spôsobiť kontamináciu mykotoxínmi počas tohto obdobia (FAO / WHO / UNEP, 1999c). Skladovanie sa musí vykonať za dobre kontrolovaných podmienok, vrátane vhodných odvodňovacích potrubí (FAO / WHO / UNEP, 1990a, Quillien, 2002). Odporúča sa skladovať produkty, ktoré sú úplne vysušené, aby sa udržiavali pri hodnote aktivity vody a_w pod 0,70 a pri teplote pod 20 °C (Bucheli a Taniwaki, 2002; Magan, 2003) alebo, v prípade nevybalených potravín, pod 2-3 °C (Codex Alimentarius Commission, 2003). Káva a kakao sú najviac náchylné na prekonanie hubovej invázie vzhľadom na ich vysokú hygroskopickosť (Magan a Aldred, 2005). Pri úprave plodín po zbere preukázali v prípade vína dobré výsledky proti vzniku OTA fungicídi : Azoxystrobin, Switch alebo Scala v (Varga a Kozakiewicz, 2006). Konzervačné látky ako sorbát draselný alebo propionát vápenatý sú vhodnou prevenciou pred kontamináciou OTA v prípade chleba (Arroyo, Aldred, a Magan, 2005; Marín, 2002). Nová stratégia je použitie antioxidantov ako sú kyselina vanilová alebo kyselina 4-hydroxybenzoová (Palumbo, O'Keeffe, Mahoney, 2007) a esenciálne oleje extrahované z rastliny ako sú materina dúška (*Thymus vulgaris*) alebo *Aframomum*

danielli – rajské zrno (Aroyeun a Adegoke, 2007; Nguefack, Nguikwie, Fotio, Dongmo, Amvam Zollo, Leth, 2007), ktoré by mohli ovplyvniť rast plesní a syntézu OTA.

1.3 Detoxifikácia OTA

Stratégie detoxikácie OTA sú klasifikované v závislosti na type úpravy – fyzikálne, chemické alebo mikrobiologické. Ich cieľom je znížiť alebo eliminovať toxické účinky OTA, modifikácie alebo absorpcie tohto mykotoxínu (FAO / WHO /UNEP, 1999a). Nasledujúce kapitoly popisujú spracovanie obilnín, fyzikálne, chemické a mikrobiologické metódy detoxifikácie OTA.

1.3.1 Spracovanie obilnín

Obilniny sú potraviny, ktoré vo väčšej miere prispievajú k dennému príjmu OTA (Miraglia a Brera, 2002). Počas procesu výroby bieleho chleba, čistením zrna, odstránením frakcií otrúb a vnútorností sa znižuje obsah OTA až do 25% pôvodného obsahu (Scudamore, Banks, MacDonald, 2003). Pokiaľ ide o tepelné spracovanie počas spracovania múky a chleba, nezdá sa, že by ovplyvňovali hladiny OTA (Osborne, 1979; Scott, 1996; Scudamore, Banks, MacDonald, 2003). Napriek tomu, pečenie pečiva znižuje obsah OTA v dôsledku vyšších teplôt a prítomnosti menšieho obsahu vlhkosti (Osborne, 1979). Extrúzia, proces používaný na výrobu raňajkových obilnín a krmiva, znižuje hladiny OTA o 30-40% (Scudamore, Banks a Guy, 2004). Pri výrobe piva boli podstatné straty OTA o 40-89% pozorované počas mletia, pravdepodobne kvôli proteolytickej látkovej degradácii (Baxter, Slaiding, Kelly, 2001 a Krogh, Hald, Gjertsen, Myken, 1974). Pokiaľ ide o fermentáciu, straty OTA sa pohybujú v rozmedzí 2 až 69% (Krogh, Hald, Gjertsen, Myken, 1974; Scott, Kanhere, Lawrence, Daley, Farber, 1995).

1.3.2 Fyzikálne a chemické metódy

Tepelné úpravy úplne neodstránia OTA (Boudra, Le Bars, 1995). Proces zmrazovania (-20 °C) a odmrázovanie (26 °C) , ošetrovanie UV a gama žiarením sú schopné zmierniť produkciu konídí. Napriek tomu len gama žiarenie môže zničiť mykotoxín (Aziz, Moussa, Far, 2004, Deberghes, Deffieux, Gharbi, Betbeder, Boisard, Blanc, Delaby, 1993; Deberghes, Betbeder, Boisard, Blanc, Delaby, Krivobok, Steiman, Seigle-Murandi, Creppy, 1995). Na detoxikáciu OTA chemickými zlúčeninami boli testované mnohé adsorbčné materiály ako sú aktívne uhlie,

cholestyramín, kremičitany hlinité a vápenatohlinité (hlavne zeolity), bentonit, drevné fragmenty alebo kvasinky (Bauer, 1994; Leong, Hocking, Scott, 2006; Péteri, Téren, Vágvölgyi, Varga, 2007; Plank, Bauer, Grünkemeier, Fischer, Gedek, Berner, 1990; Ringot, Lerzy, Chaplain, Bonhoure, Auclair, Larondelle, 2007; Savino, Limosani, García-Moruno, 2007; Varga a Kozakiewicz, 2006). Niektoré z uvedených boli testované in vivo; ich aktivita však nebola taká vysoká, ako sa očakávalo, s výnimkou aktívneho uhlia (Huwig, Freimund, Käppeli, Duler, 2001; Scott, 1996). V tomto prípade jeho použitie bolo zamietnuté kvôli nevyhnutnej retencii živín a otrave zvierat (Gambuti, Strollo, Genovese, Ugliano, Ritieni, Moio, 2005; Huwig, Freimund, Käppeli, Dutler, 2001). Činidlá na odstraňovanie OTA z vína, ako je kazeinát draselný alebo aktívne uhlie, vykazujú pozitívne účinky na detoxifikáciu OTA (zníženie až na 82%), ale tiež poškodili kvalitu vína (Abrunh- Osa, Serra a Venâncio, 2002; Castellari, Versari, Fabiani, Parpinello, Galassi, 2001). V súčasnosti sú najslubnejšími adsorpčnými materiálmi modifikované zeolity, pretože preukázali dobré výsledky v dekontaminácii potravín (Dakovic, Tomašević-Anovic, Rottinghaus, Dondur a Mašič, 2003; Dakovic, 2005; Schall, Simmler-Hübenthal a Süd-Chemie, 2002; Tomašević-Anovic, Dakovič, Rottinghaus, Matijašević, 2003). U obilnín môže byť obsah OTA znížený spracovaním zrna etanolovým roztokom a prerušovanými ultrazvukmi (Lindner, 1992). Alkalický peroxid vodíka, hydroxid sodný a monometyl-amín alebo amónium s liečbou hydroxidom vápenatým sú tiež účinnými metódami proti OTA. Napriek tomu ich aplikácia in vivo nie je možná z dôvodu vysokých hladín OTA nachádzajúcich sa v zvieracích tkanivách (Scott, 1996). Pokiaľ ide o kávu, ošetrovanie etylacetátom, dichlórmetánom a kyselinou mravčou, metylénchloridom je schopné znížiť hladiny OTA (Bortoli a Fabian, 1997; Heilmann, Rehfeldt, Rotzoll, 1999). Výskum, ktorí uskutočnili Amézqueta, González-Peñas, Lizarraga, Murillo-Arbizu a López de Cerain (2008) ukázal, že viac ako 98% OTA prítomných v kakae možno odstrániť alkalickou úpravou. Ďalšou navrhovanou metódou je ozonizácia. Vývoj elektrochemických techník umožnil použitie ozónu pri odstraňovaní OTA až na nezistiteľné hladiny v potravinách, ako sú zrná, orechy alebo zelenina (Denvir, McKenzie, Rogers, Miller, Hitchens, Andrews, 1999; McKenzie, Sarr, Mayura, Bailey, Miller, Rogers, 1997).

1.3.3 Mikrobiologické metódy

Karboxypeptidáza A je enzým schopný ničiť OTA (Deberghes, Betbeder, Boisard, Blanc, Delaby, Krivobok, Steiman, Seigle-Murandi, Creppy, 1995), preto bolo navrhnuté použitie kmeňov *A. Niger* ako zdroje karboxypeptidázy (Varga, Rigó, Téren, 2000). Iné enzýmy, ktoré

možno získať z kmeňov *A. Niger* a ktoré môžu účinne degradovať OTA, sú lipázy (Stander, Bornscheuer, Henke a Steyn, 2000). Karboxypeptidáza prítomná v kvasinke *Phaffia rhodozyma* môže tiež degradovať OTA až na 90% (Péteri, Téren, Vágvölgyi, Varga, 2007). Navyše niektoré baktérie patriace do rodov *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Butyribrio*, *Phenyllobacterium*, *Pleurotus*, *Saccharomyces*, *Bacillus* a *Acinetobacter* (Fuchs, 2008; Varga, Peteri, Tabori, Teren, Vagvolgyi 2005; Varga, Rigó, Téren, 2000) a niektoré huby patriace k *Aspergillus* (*A. Fumigatus*, *A. Niger*, *A. Carbonarius*, *A. Japonicus*, *A. Versicolor*, *A. Wentii* a *A. Ochraceus*), *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Phaffia*, *Penicillium* a *Rhizopus* (*R. Stolonifer* a *R. Oryzae*) (Abrunhosa, Serra, Venâncio, 2002; Péteri, Téren, Vágvölgyi, Varga, 2007; Varga, Peteri, Tabori, Teren, Vagvolgyi, 2005) sú schopné degradovať OTA in vitro až na viac ako 95%. Navyše niektoré z nich vykazujú detoxikačné vlastnosti pri in vivo teste (Fuchs, Sontag, Stidl, Ehrlich, Kundi, Knasmüller, 2008).

1.3.4 Potravinárske prísady s ochrannými účinkami proti toxickému pôsobeniu OTA

Pretože je známe, že OTA spôsobuje poškodenie bunkovej membrány zvýšením peroxidácie lipidov, skúmajú sa ochranné vlastnosti antioxidantných látok. Tieto vlastnosti sú pravdepodobne kvôli schopnosti antioxidantov pôsobiť ako peroxidové aniontové zachytávače, čím chránia bunkovú membránu pred poškodením indukovaným mykotoxínmi (Atroshi, Rizzo, Westermarck, Ali-Vehmas, 2002). In vitro a in vivo štúdie ukazujú, že melatonín (Abdel-Wahhab, Abdel-Galil a El-Lithey, 2005), NAC (Schaaf, 2002), kyselina rosmarinová (Renzulli, Galvano, Piredomenico, Speroni, Guerra, 2004), a-tokoferol, retinol (Baldi, 2004), kyanidín-3-glukopyranozid (Guerra, Galvano, Bonsi, Speroni, Costa, Renzulli, Cervellati, 2005), kyselina askorbová (Grosse, Kosta, Utan, Cervellati, Speroni, Guerra, 2007), kombinované antioxidanty (Atroshi, Biese, Saloniemi, Ali-Vehmas, Saari, Rizzo, Veijalainen, 2000) a metylín (Abdel-Wahhab, Nada, Arbid, 2005), rôzne alkaloidy (Lee, 2007) pôsobia proti niektorým toxickým účinkom OTA. Hundhausen, Bösch-Saadatmandi, Augustin, Blank, Wolfram (2005) poznamenali, že polyfenoly a a-tokoferol nie sú ochranné proti OTA cytotoxickému účinku v pečenej bunkách. Ďalšími látkami, ktoré by mohli znížiť poškodenie spôsobené týmto mykotoxínom, sú roxazyme-G, sezamové semienko, vodný extrakt z artičokov a L-b-fenylalanín (Stoev, Djvinov, Mirtcheva, Pavlov, Mantle, 2002).

1.4 Analytické metódy stanovenia mykotoxínov

Väčšina mykotoxínov je chemicky stabilná, takže majú tendenciu prežiť skladovanie, spracovanie a dokonca aj pri tepelnej úprave a to už pri pomerne vysokých teplotách, ako sú teploty dosiahnuté počas pečenia chleba alebo výroby raňajkových obilnín. Mykotoxíny sú ťažko odstrániteľné, ale najlepšou metódou kontroly je prevencia (Bullerman, Schroeder, Park, 1984). Prítomnosť rozpoznateľnej huby produkujúcej toxíny v skutočnosti neznamena nevyhnutne, že toxín bude taktiež prítomný v potravine, pretože sa na jeho tvorbe podieľa mnoho faktorov. Rovnako neprítomnosť akejkoľvek viditeľnej formy huby nezaručí oslobodenie od toxínov, pretože huba už mohla uhynúť, pričom toxín zostal nedotknutý. Vzhľadom na to, že mykotoxíny nie sú rovnomerne rozdelené v zrne alebo v zmiešaných krmivách, je zrejmé, že odber vzorky krmiva alebo zrn, ktorý poskytne významný výsledok pri analýze mykotoxínov, je obtiažny (Lauren, Jensen, Smith, 2006).

Skutočnosť, že väčšina mykotoxínov je toxická vo veľmi nízkych koncentráciách, vyžaduje citlivé a spoľahlivé metódy ich detekcie. Vzhľadom na rôzne štruktúry týchto zlúčenín nie je možné použiť jednu štandardnú techniku na detekciu všetkých mykotoxínov, pretože každá z nich bude vyžadovať inú metódu. To, čo dobre funguje pre niektoré molekuly, môže byť nevhodné pre iné s podobnými vlastnosťami alebo pre rovnakú molekulu v inom prostredí/matrici. Podobne aj praktické požiadavky na detekciu vysokou citlivosťou a potrebu špecializovaného laboratórneho nastavenia vytvárajú výzvy pre rutinnú analýzu. V závislosti od fyzikálnych a chemických vlastností boli vyvinuté postupy existujúcich analytických techník, ktoré ponúkajú flexibilné a široko založené metódy detekcie zlúčenín. Aplikácia jednoduchších, lacnejších a účinnejších riešení na detekciu mykotoxínov sa čoraz viac vyžaduje vzhľadom na ich vnímanú dôležitosť založenú na ich toxicite a legislatívnych požiadavkách na obmedzenie množstva potravín. Úspešná detekčná metóda by mala byť robustná, citlivá a mala by mať vysoký stupeň flexibility pri širokej škále zlúčenín, ktorá však môže byť veľmi špecifická, ak je to potrebné. Všetky techniky by mali byť reprodukovateľné na vysokej úrovni a získané výsledky musia byť relevantné a ľahko analyzovateľné.

1.4.1 Metódy predbežnej úpravy vzoriek

Väčšina metód používaných na stanovenie mykotoxínov sa musí spoliehať na správne metódy extrakcie a čistenia, okrem prípadov ELISA, ktoré nemusia vyžadovať čistenie (Chu,

Bhatnagar, Lillehoj, 1992). Tieto kroky sú nevyhnutné pre úspešný protokol, pretože sú časovo náročné (príprava vzorky je hlavným časovým faktorom v analýze a trvá približne dve tretiny celkového množstva času) a ovplyvni konečný výber postupu zisťovania. Metóda extrakcie použitá na odstránenie mykotoxínu z biologickej matrice závisí od štruktúry toxínu. Polárne metabolity, ako sú fumonizíny (FUM), vyžadujú prítomnosť vody, podporovanej prítomnosťou organických rozpúšťadiel (Shephard, 1998). Hydrofóbne toxíny, ako je AFT, sa spoliehajú na použitie organických rozpúšťadiel (Holcomb, Wilson, Trucksess, Thompson, 1992). Metóda čistenia použitá v protokole je najdôležitejším krokom, pretože čistota vzorky ovplyvňuje citlivosť výsledkov. Stopové množstvá cieľovej molekuly môžu byť maskované interferujúcimi zlúčeninami, ktoré sa nachádzajú nielen v matrici, ale aj v chemikáliách, materiáloch a rozpúšťadlách použitých v tejto technike.

1.4.1.1 Extrakcia kvapalina – kvapalina

Extrakcia kvapalina-kvapalina (LLE) zahŕňa využitie rozdielnej rozpustnosti toxínu vo vodnej fáze a v nemiešateľnej organickej fáze, aby sa zlúčenina extrahovala do jedného rozpúšťadla, zanechávajúceho zvyšok matrice v druhej. Rozpúšťadlá, ako napríklad hexán a cyklohexán, sa používajú na odstránenie nepolárnych nečistôt, napr. lipidov a cholesterolu. Tento postup je účinný pre niekoľko toxínov a funguje dobre v malých prípravkoch (Bauer a Gareis, 1987). Je to však časovo náročné a závisí to od toho, ktorá matica sa používa a ktoré zlúčeniny boli určené. Nevýhody spočívajú v prípadnej strate vzorky adsorpciou na sklenený materiál.

1.4.2 Separačné metódy

Existuje niekoľko typov chromatografických metód na analýzu mykotoxínov (Shephard, 1998; Valenta, 1998). Preskúvanie Betiny (Betina, 1989), ktoré sa týka obdobia pred rokom 1990, ponúka podrobnú štúdiu o používaní týchto metód. Rovnako ako vo väčšine ostatných príkladov uvedených v tomto prehľade, predbežná úprava vzorky hrá hlavnú úlohu pri analýze. Nasledujúce časti sa zaoberajú rôznymi separačnými metódami, ich výhodami a výzvami pri analýze a detekcii niekoľkých mykotoxínov.

1.4.2.1 Tenkovrstvová chromatografia (TLC)

Tradične najpopulárnejšou metódou používanou na analýzu mykotoxínov je TLC, ktorá ponúka možnosť skenovania veľkého počtu vzoriek. Použitie TLC analýzy pre mykotoxíny je stále populárne pre kvantitatívne aj semikvantitatívne účely. Je to spôsobené vysokou priepustnosťou vzoriek, nízkymi prevádzkovými nákladmi a ľahkou identifikáciou cieľových zlúčenín pomocou UV-VIS spektrálnej analýzy. Rovnako ako pri HPLC, bolo vyvinutých niekoľko metód na získanie najlepších výsledkov pri každej samostatnej triede mykotoxínu a používajú sa jednorozmerné aj dvojrozmerné analýzy (Lin, Zhang, Wang, Chen, 1998). Jednou z hlavných požiadaviek na TLC je však to, že je nevyhnutná príprava vzorky. Typ čistenia závisí od vlastností a typu toxínu. Vrstva silikagélu je jednou z bežných vrstiev používaných pri TLC (Yu a Chu, 1991). Aj keď existujú správy (Frisvad a Thrane, 1987), ktoré vykazujú vyššiu presnosť TLC v porovnaní s viac univerzálnou HPLC pre detekciu OTA, TLC sa bežne nepoužíva v literatúre, pretože HPLC túto techniku nahrádza. Najlepším príkladom je napríklad metóda Dawlatana, Cokera, Naglera, Blundena, (1996), kde bola použitá séria krokov použitého rozpúšťadla na oddelenie OTA od ryže a jej kvantifikácia pomocou fluorescencie. Táto metóda vyžadovala veľké množstvo rozpúšťadiel, intenzívne laboratórne postupy a bola charakterizovaná nedostatkom automatizácie. Bolo však možné ho použiť na rýchle zobrazenie rôznych vzoriek. Nasledujúca časť popisuje niekoľko reprezentatívnych príkladov použitia TLC pri stanovení mykotoxínu.

TLC bola použitá na vyhodnotenie poškodenia plodov orechov *C. Sativa* komerčne predávaných v kanadských obchodoch s potravinami (Overy, Seifert, Savard, Frisvad, 2003). Tri mykotoxigenické huby, ktoré dominovali vo vzorkách, boli *P. Crustosum*, *P. Glabrum* / *spinulosum* a *P. Discolor*. Na stanovenie AFT v rôznych potravinových matriciach sa použila jednorozmerná metóda TLC v kombinácii s čistením založeným na IAC (imunoafinitná chromatografia) (Stroka, Otterdijk, Anklam, 2000). AFT sa kvantifikoval pomocou denzitometrie. Hlásené boli TLC analýzy na detekciu estrónu, estradiolu, dietylstilbestrolu (DES), zearalanolu (zeranol), zearalanónu (ZON) a zearalenolu (ZEL) (Medina a Schwartz, 1992). Ako je zrejmé, z uvedených literárnych zdrojov, bolo dokázané, že TLC sa rutinne používa ako nákladovo efektívna metóda analýzy niekoľkých mykotoxínov podľa vlastného výberu a je schopná používať viacero detekčných systémov s primeraným množstvom presnosti. Zatiaľ čo TLC sa bude ďalej používať, účinná príprava vzorky by mohla ešte viac zvýšiť spektrum mykotoxínov, ktoré je možné pomocou tohto nástroja určiť. Ďalší vývoj

citlivejšieho analytického systému a vylepšená automatizácia, pokiaľ ide o zlepšenie jeho výkonnosti, by mohla v budúcnosti pomôcť TLC. Avšak, ako už bolo uvedené, HPLC v niektorých prípadoch prevládla nad techniku TLC, ale vo väčšine prípadov je použitá v kombinácii s inými technikami.

1.4.2.2 Vysokoučinná kvapalinová chromatografia (HPLC)

Moderná analýza mykotoxínov závisí vo veľkej miere od HPLC a to použitím rôznych adsorbentov v závislosti od fyzikálnej a chemickej štruktúry mykotoxínu. Na predbežnú úpravu vzoriek sa použili analytické kolóny, na prípravu mykotoxínových štandardov sa použili preparačné kolóny (Reinhard a Zimmerli, 1999; Shephard, Sydenham, Thiel, Gelderblom, 1990). V podstate väčšina protokolov použitých na HPLC detekciu mykotoxínov je veľmi podobná. Najbežnejšie detekčné metódy sú UV alebo fluorescenčné detektory, ktoré sa spoliehajú na prítomnosť chromofóru/fluorofóru v molekulách. Množstvo toxínov má už prirodzenú fluorescenciu (napríklad **OTA**, **AFT**, **CIT**) a môže to byť detegované priamo v HPLC-FD (Valenta, 1998). Tieto mykotoxíny, ako sú FUM produkované rodom *Fusarium*, nemajú vhodný chromofór a ich stanovenie si vyžaduje derivatizáciu (EMAN, 2003; Shephard 1998). HPLC je priemyselným štandardom pre detekciu mykotoxínov a pre analýzu OTA existuje už množstvo metód (Valenta 1998). Citlivá metóda FD umožnila odhad OTA v koncentrácii 0,01 ng/ml. V podobnej štúdii bola RP-HPLC (s obrátenou fázou) spojená s FD použitá na analýzu tvorby OTA počas procesu sušenia (Hernández, Moreno, Durán, Guillén, 2006). Výskumníci použili priamu injekciu vzorky hroznového muštu v systéme HPLC-FLD bez predchádzajúceho čistenia. Komplexnosť vzoriek sladkého vína však vyžadovala vyčistenie SPE na kolóne C-18, ktorá umožňuje izoláciu OTA z matrice. Zotavenie bolo vyššie ako 89%. Hodnoty LOD a LOQ zodpovedali 0,22 a 0,77 µg/l. Naše hodnoty pomocou LECK metódy boli približne o tri rády vyššie, kôli horšej citlivosti UV-VIS detektora. Vo väčšine prípadov sa môže OTA viniča kvantifikovať pri koncentráciách nižších ako 0,5 µg/l, čo je blízko hranice Office International de la Vigne et du Vin (Ratola, Martins, Alves, 2004). Obsah etanolu a glukózy nezasahoval do vyčistenia OTA systémom IAC. Hodnota LOD pre OTA bola 0,12 µg/kg. Úroveň OTA bola tiež testovaná v krvných vzorkách dobrovoľníkov v Chorvátsku (Peraica, Domijan, Fuchs, Luci, Radi, 1999). Priemerná koncentrácia OTA stanovená pomocou HPLC bola 0,39 ng/ml plazmy. Pre AFB1 bola zistená prevažná kontaminácia, nasledovaná OTA, zatiaľ čo kontaminácia CIT bola zanedbateľná. Kombinácia metódy HPLC s čistiacim krokom pomocou IAC bola použitá na detekciu OTA v zelených a pražených kakaových

bôboch ako aj vo výrobe kávy (Studer-Rohr, Dietrich, Schlatter, 1995). V zelených kávových zrnách sa zistil OTA vo viac ako 50% analyzovaných vzoriek. Pečenie (250 °C, 150 s) prirodzene kontaminovaných zelených bôbov alebo bôby naočkované *A. Ochraceus* malo za následok len malé zníženie hladiny OTA. Detekčná metóda OTA založená na HPLC v mäsových výrobkoch sušených v suchom stave bola opísaná tak, že neobsahovala žiadny krok čistenia (Toscani, Moseriti, Dossena, Dall'Asta, Simoncini, Virgili, 2007).

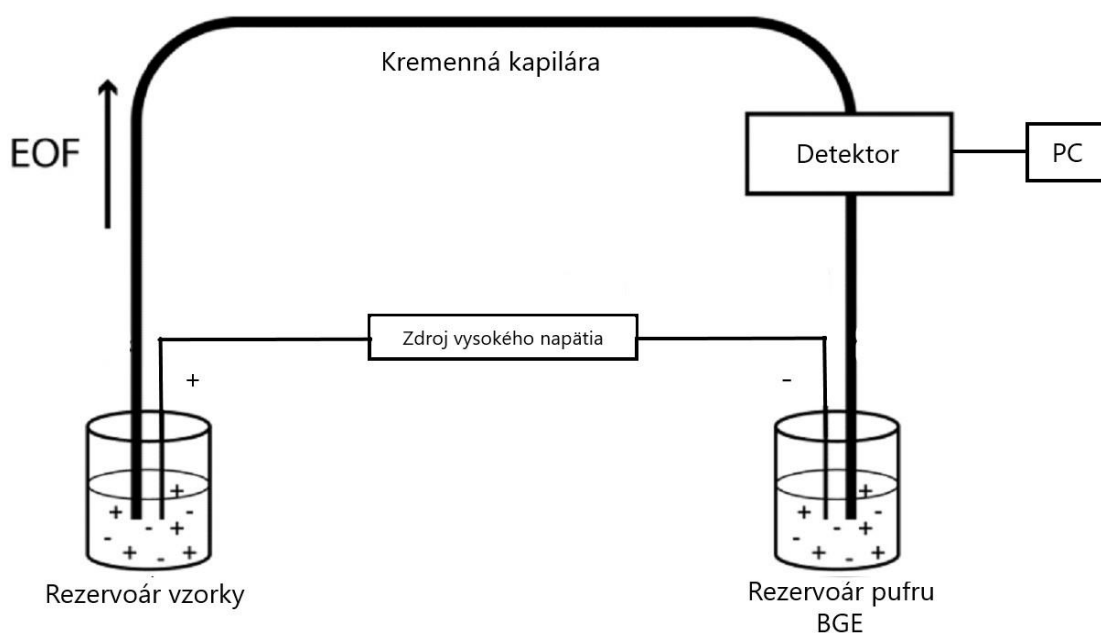
Avšak najpopulárnejšou skupinou bola kombinácia kolóny s obrátenými fázami a kyslej mobilnej fázy obsahujúcej kyselinu ortofosforečnú (Orti, Hill, Liddle, Needham, Vickers, 1986; Lepom, 1986; Dietrich, Usleber, Märtlbauer, Gareis, 1999; Scudamore, Hetmanski, 1992; Scudamore, Hetmanski, Chan, Collins, 1997). LOQ a LOD u vzoriek jablkovej šťavy boli 8,0 µg/l a 3,2 µg/l. Zatiaľ čo táto metóda môže byť použitá na analýzu mykotoxínov, je ťažké dosiahnuť nižšie hranice detekcie a kvantity. Existovalo niekoľko ďalších mykotoxínov, ktoré boli stanovené pomocou metód HPLC (Xu, Jia, Gu, Sung, 2006; Ambrosino, Galvano, Fogliano, Logrieco, Fresa, Ritieni, 2004; Durix, 1999; Gilek a Lindner, 1996; Josephs, Krska, Grasserbauer, Broekaert, 1998). Beauvericin (BEA) v kukurici sa stanovil pomocou SFE kombinovaného s HPLC s diódovým detektorom (DAD) alebo LC-MS (Ambrosino, Galvano, Fogliano, Logrieco, Fresa, Ritien, 2004). Hodnota LOD sa zistila ako nízka ako 2 ng. Hlavnou výhodou použitia HPLC spolu s vysokou kvalitou oddelenia a nízkou hodnotou LOD je možnosť kombinovať viaceré detekčné systémy (fluorescenčné, UV, diódové pole) s touto technológiou, čo umožňuje viacnásobné detekcie zlúčenín z jednej vzorky. Môže sa tiež automatizovať (Hurst, 1998), čo ponúka veľkú výhodu oproti iným technikám, ako je TLC a ELISA.

V súčasnej dobe sa vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) alebo UPLC v kombinácii s hmotnostnou spektroskopiou (MS) alebo MS/MS stala najmodernejšou v multi-mykotoxínovej analýze kvôli jej vysokej selektivite a citlivosti, napriek vysokým nákladom a požiadaviek skúsených zamestnancov (Lattanzio, 2007; Jettanajit a Nhujak, 2016; Soleimany, Jinap, Abas, 2012). Na druhej strane, keď je príprava vzorky a chromatografia dostatočne selektívna, môže byť výhodné spoliehať sa na lacnejšie a presnejšie spektroskopické detekčné techniky ako fluorescenčný detektor (FLD). Použitím systému HPLC-FLD by bolo možné získať hodnoty detekcie limitov (LOD) porovnateľné alebo lepšie ako hodnoty dosiahnuté HPLC-MS-MS. Je však potrebné spomenúť, že metódy využívajúce HPLC-diódové pole (DAD)-FLD sú zvyčajne optimalizované a validované pre jeden analyt alebo chemickú skupinu

analytov (Manoochehri, Asgharinezhad, Safaei, 2015; Li, Wu, Yang, Huang-Fu, 2012; Cao, 2014).

1.4.2.3 Kapilárna elektroforéza (CE)

Individuálna detekcia úzko súvisiacich toxínov vyžaduje okrem vysokej citlivosti sofistikovanú separačnú techniku. Účinná separácia zložiek môže byť založená na pohybe molekuly v elektrickom poli v závislosti na veľkosti náboja a molekulovej hmotnosti analytu. Rýchla separácia sa môže uskutočniť kapilárnou elektroforézou vo vodných pufrovacích roztokoch, s výnimkou potreby organických rozpúšťadiel. (Pena, Alcaraz, Arce, Rios, Valcarel, 2002; Wilkes a Sutherland, 1998).



Obr. 4: Schéma kapilárnej elektroforézy

Kapilárna elektroforéza sa skladá z kapiláry, nádobiek so základným elektrolytom (BGE), nádoby so vzorkou, zdroje vysokého napätia s výstupom na platinovej elektródy a detektora viz Obr.4. Tento detektor je napojený na počítač, ktorý zaznamenáva signál detektora v čase. Najčastejšie sa na meranie používajú kremenné kapiláry s ochrannou vrstvou polyimidu. Dĺžka kapiláry je zvyčajne 20-100 cm, vnútorný priemer 25-100 mikrometrov. Ako BGE slúži spravidla vodný roztok pufru plus prípadné aditíva. Najpoužívanejším typom detektora je UV/Vis absorpčný detektor.

1.4.2.3.1 Elektroforetická mobilita

Elektroforetická mobilita je veličina, ktorá udáva ako rýchlo sa ióny vzorky pohybujú v BGE pod vplyvom aplikovaného napätia. Ión prechádza silou, ktorá sa rovná sume čistého náboja a intenzity elektrického poľa. Tiež je ovplyvnená ťažnou silou, ktorá sa rovná súčinu f , koeficientu trecieho trenia a rýchlosti. To vedie k výrazu pre elektroforetickú mobilitu:

$$\mu_{EP} = \frac{q}{f} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (1)$$

kde f pre sférickú časticu je daná Stokesovým zákonom; η je viskozita rozpúšťadla a r je polomer molekuly alebo častice. Rýchlosť migrácie týchto iónov je daná pomerom náboja k hmotnosti. Skutočná rýchlosť iónov je priamo úmerná E , veľkosti elektrického poľa a dá sa určiť pomocou nasledujúcej rovnice:

$$v = \mu_{EP} E \quad (2)$$

Tento vzťah ukazuje, že väčšie napätie urýchli migráciu iónových druhov (Altria a Kevin, 1995).

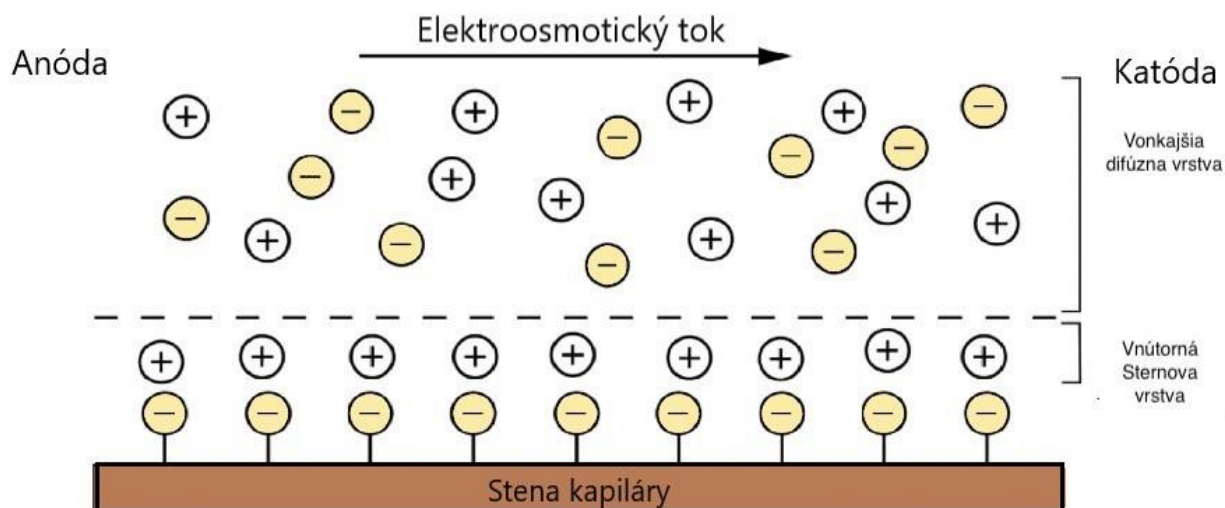
1.4.2.3.2 Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok (EOF) je spôsobený aplikáciou vysokého napätia na kapiláru naplnenú elektrolytom (Altria a Kevin, 1995). Tento tok nastane, keď pufor prechádza kremennou kapilárou s disociovanými silanolovými skupinami ($pK_a \sim 4,6$). Kapilárna stena má potom negatívny náboj, ktorý vytvára elektrickú dvojvrstvu s vodíkovými kationmi, ktoré sú následne priťahované ku katóde. Vnútna katexová vrstva je stacionárna, zatiaľ čo vonkajšia vrstva sa môže voľne pohybovať pozdĺž kapiláry. Použité elektrické pole spôsobuje, že voľné kationy sa pohybujú smerom ku katóde a vytvárajú silný objemový tok. Rýchlosť elektroosmotického toku je riadená nasledujúcou rovnicou:

$$\mu_{EOF} = \frac{\epsilon}{4\pi\eta} E\zeta \quad (3)$$

kde ϵ je dielektrická konštanta roztoku, η je viskozita roztoku, E je intenzita poľa a ζ je zeta potenciál. EOF rastie s veľkým zeta potenciálom, veľkou difúznou vrstvou kationov, ktorá

presúva viac molekúl smerom ku stene kapiláry, a so zvyšujúcim sa pH tlmivého roztoku, takže je viac skupín SiOH ionizovaných (Li, 1992).



Obr. 5 : Elektroosmotický tok (EOF)

1.4.2.4 Ďalšie metódy separácie

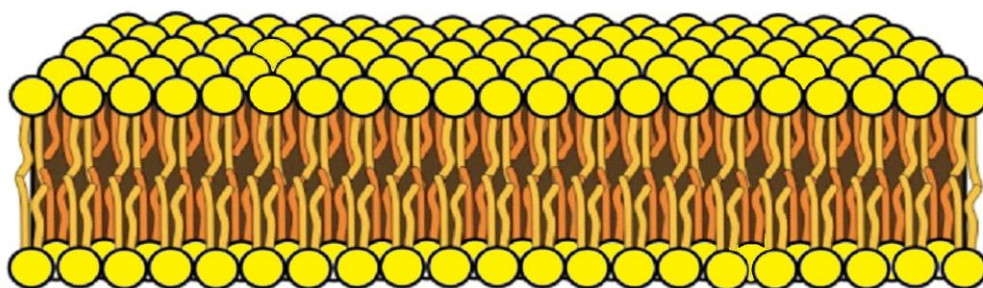
Existujú aj iné separačné techniky, ktoré sú schopné fungovať namiesto chromatografických metód. Medzi nimi je metóda ELISA, ktorá sa nedávno stala veľmi populárnou vzhľadom na jej pomerne nízku cenu a jednoduchú aplikáciu (Morgan, 1989; Goryacheva, Saeger, Eremin, Peteghem, 2007). Komerčne dostupné ELISA súpravy na detekciu mykotoxínov sú zvyčajne založené na kompetitívnom type testu, ktorý používa buď primárnu protilátku špecifickú pre cieľovú molekulu alebo konjugát enzýmu a požadovaný cieľ (Morgan, 1989; Stanker, Merrill, Scotcher, Cheng, 2008; Pestka, Abouzied, Sutikno, 1995).

Vytvorený komplex potom interaguje s chromogénnym substrátom, aby sa získal merateľný výsledok. Môžu byť prenosné, rýchle a sú veľmi špecifické a jednoducho použiteľné. Nevýhoda týchto súprav spočíva v tom, že sú len na jedno použitie, čo môže zvýšiť náklady na hromadné skriningi. Navyše konkurenčná ELISA trpí obmedzeným rozsahom detekcie v dôsledku úzkej citlivosti protilátok, či už mono- alebo polyklonálnych. Vývoj protilátok pre väčšinu mykotoxínov, vzhľadom na ich malú veľkosť, si vyžaduje vývoj nosičovej molekuly

zvyčajne proteínu (napríklad bovinného sérového albumínu) na dosiahnutie imunogenicity. Proces konjugácie môže byť tiež zodpovedný za zníženie selektivity testu.

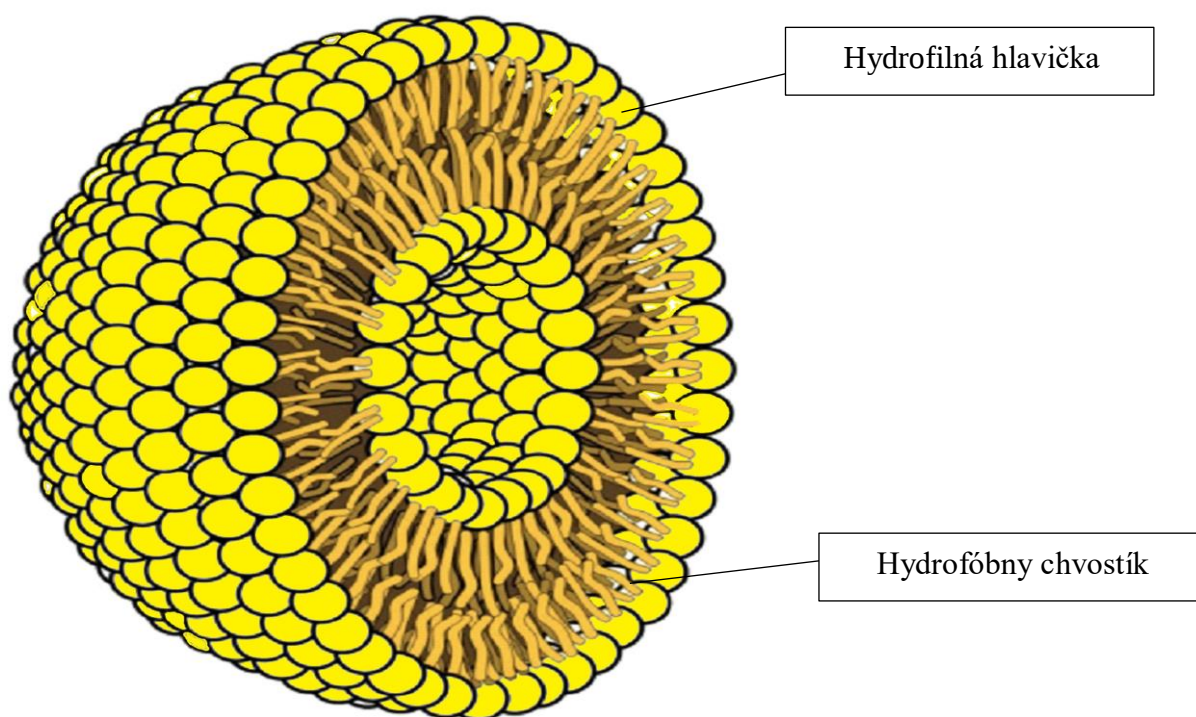
1.5 Lipozómy

Lipozómy majú veľmi podobnú štruktúru ako bunkové plazmatické membrány. Použitie lipozómov ako stacionárnej fázy v kvapalinovej chromatografii (LC) alebo použitie micelárnej elektrokinetickej chromatografii (MEKC), sú dobré dynamické metódy pre štúdium interakcií medzi bunkovými membránami a dôležitými biomolekulami.



Obr. 6: Lipidová dvojvrstva (prevzaté a upravené z <https://www.upjs.sk/public/media/4354/Biofyzika10.pdf>)

Lipozómy sú samo-zostavené vezikuly bežne pozostávajúce z fosfolipidových dvojvrstiev, ktoré majú amfifilný charakter. Fosfolipidová dvojvrstva obsahuje zapuzdrenie hydrofóbných zlúčenín v dvojvrstvovej membráne alebo hydrofilných molekúl vo vnútornej dutine (Corradini, Mancinia, Bello, 2004). Okrem toho, v závislosti na zložení, veľkosti a povrchových charakteristikách fosfolipidov, môžu lipozómy interagovať s molekulami a bunkovými povrchmi v okolitom roztoku (Ahmed, Farah, Kellaway, 1985). Tieto vlastnosti umožňujú širokospektrálne používanie lipozómov ako modelov biologických membrán, ako aj nosičov liečiv a iných činidiel terapeutickkej, diagnostickej a kozmetickej hodnoty (Forssen a Willis, 1998). Použitie fosfolipidového povlaku ako stacionárnej fázy v kvapalinovej chromatografii vedie k štúdiu interakcií rozpustenej membrány a v menšej miere k dosiahnutiu niekoľkých separácií rozpustenej látky (Gomez-Hens a Fernandez-Romero, 2005).



Obr. 7: Zloženie lipozómu (prevzaté a upravené z <https://www.upjs.sk/public/media/4354/Biofyzika10.pdf>)

Je známe, že polomer alebo zakrivenie lipozómov signifikantne ovplyvňuje fyzikálno-chemické vlastnosti lipidových dvojvrstiev. Napríklad malé unilamelárne vezikuly (SUV) vychádzajúce z veľkých zakrivených kmeňov vykazujú širší gélový až kvapalný kryštalický fázový prechod (Sheetz a Chan, 1972) a silnejšie interakcie s peptidmi v porovnaní s lipozómami väčších priemerov (Matsuzaki, Takaishi, Fujita, Miyajima, 1991; Beschiaschvili a Seelig, 1992). Vo farmaceutických aplikáciách sú enkapsulácia lieku a správanie *in vivo* vysoko závislé od veľkosti vezikúl (Nagayasu, Uchiyama, Nishida, Yamagiwa, Kawai, Kiwada, 1996; Uchiyama, Nagayasu, Yamagiwa, Nishida, Harashima, Kiwada, 1995).

Veľkostná distribúcia lipozómov je bežne určovaná metódou dynamického rozptylu svetla (DLS) a elektrónovou mikroskopiou. Tieto techniky sú však časovo náročné, a preto nie sú vhodné pre systémy, v ktorých sa veľkosť častíc rýchlo mení. Dobrými príkladmi sú agregácia, fúzia a mobilizácia lipozómov indukovaných peptidmi a inými činidlami, napr. polyetylén glykol. Lipozómy nie sú opticky homogénne častice. Zistilo sa, že celkový objem lipozómov je recipročne úmerný zákalu pri 450 nm (Bangham, Gier, Greville, 1967).

1.5.1 Lipozómy a CE

Kapilárna elektroforéza vyžaduje veľmi malé množstvo lipozómov a vzoriek, čo je obzvlášť výhodné pri použití vzácnych typov/zložení membrán. CE je vhodná a flexibilná pri používaní rôznych režimov; CE má schopnosť využívať lipozómy nielen ako stacionárnu fázu, ale tiež ako pseudo-stacionárnu fázu jednoduchým spôsobom bez potreby ich imobilizácie, ktorá by mohla zničiť ich biologickú natívnu štruktúru. V poslednom čase sa zistilo, že lipozómy majú rôzne aplikácie v CE, vrátane ich použitia ako povlaky kapilár (Cunliffe, Baryla, Lucy, 2002; Manetto, Bellini, Deyl, 2003; Ornskov, Ullsten, Soderberg, Markides, Folestad, 2002; Hautala, Linden, Wiedmer, Ryhaen, Saily, Kinnunen, Riekkola, 2003) alebo pseudostacionárnej fázy (Wiedmer, Burns, Agbodjan, Khaledi, 2002; Burns a Khaledi, 2002) na dosiahnutie separácie rozpustenej látky alebo na skúmanie interakcií rozpustenej membrány. Hjerten, Zhang, Zhang, Hjerten, Lundahl boli prvými, ktorí používali lipozómy v CE na štúdium ich interakcií s modelovými liekmi a dvomi oktapeptidmi (Zhang, Hjerten, Lundahl, 1995). Interakcie a transport malých molekúl cez bunkové membrány boli simulované a študované pomocou techník CE (Breyer, Howard, Raje, Allison, Apkarian, Brown, Strasters, 2003; Manetto, Bellini, Deyl, 2003; Mohamed, 2000).

Ako pseudo-stacionárne fázy pre elektrokinetickú chromatografiu (EKC) sa používajú rôzne iónové nosiče, ako sú MEKC (Terabe, 1989), vysokomolekulové micely (Ozaki, Terabe, Ichihara, 1994; Wang a Warner, 1994), mikroemulzné EKC (MEEKC) (Watarai, 1991,) a dendriméry (Tanaka, Fukutome, Hosoya, Kimata, Araki, 1995). Z týchto techník sa najčastejšie využíva micelárna EKC (MEKC), ktorá používa roztoky micel iónových povrchovo aktívnych látok, ako je dodecylsulfát sodný (SDS). Táto metóda umožňuje rozlíšenie rozpustených látok na základe ako elektroforetických tak aj chromatografických procesov, čo umožňuje oddelenie dokonca elektricky neutrálnych zlúčenín. Použitelnosť MEKC sa však často obmedzuje na zlúčeniny s nízkou molekulovou hmotnosťou, ktorých hydrofobicita nie je extrémne vysoká (Terabe, Miyashita, Shibata, Barnhart, Alexander, Patterson, Karger, Hosoya Tanaka, 1990).

2 Cieľ práce

Cieľom tejto práce bolo vytvoriť a otestovať metódu pre analýzu amfifilných látok pomocou elektrokinetickej chromatografie, optimalizovať túto metódu pre analýzu mykotoxínov, konkrétne ochratoxínu a otestovať rôzne zloženie pseudostacionárnej fázy. Následne analyzovať pomocou tejto metódy ochratoxín extrahovaný z biologického materiálu, v ktorom sa tento prirodzene vyskytuje. Pre prípravu ochratoxínu boli použité kultúry plesní rastúcich za kontrolovaných podmienok na žite ozimnom.

3 Experimentálna časť

3.1 Prístrojové vybavenie

- CE systém Agilent Technologies : Model 7100, USA, viz Obr.8
 - DAD detection (diode array detection) detekcia pri vlnových dĺžkach 200 nm, 238 nm a 350 nm, rýchlosť zaznamenávania 4 Hz; plné spektrum (200 – 600 nm) snímanie rýchlostí 0,5 Hz
 - software : 3D CE Chemstation



Obr.8: Kapilárna elektroforéza 7100 CE od Agilent Technologies

- kremenné separačné kapiláry s polyimidovým povlakom (50 μm I.D./375 μm O.D., 32,5/24 cm celková dĺžka (l_{tot})/efektívna dĺžka (l_{eff})) Polymicro technologies, USA
- analytické váhy KERN AEJ, Nemecko
- ultrazvukový kúpeľ SONOREX DIGITAL 10P, BANDELIN, Nemecko
- pH meter – XS PC8, Taliansko
- centrifúga Eppendorf – mini Spin plus, Nemecko

3.2 Chemikálie

Pre prípravu lipozómov

- cholesterol – p.a., *Sigma-Aldrich*, Steinheim, Nemecko
- 2-oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycerol 3-phosphocholine (POPC) - 99% (TLC) p.a., *Sigma-Aldrich*, Steinheim, Nemecko
- 1,2-diacyl-sn-glycerol-3-phospho-L-serine – (POPS) p.a., *Sigma-Aldrich*, Steinheim, Nemecko

Pre prípravu pufrov

- fosforečnan trisodný dodekahydrát p.a. – *Penta*, Praha, Česká republika
- hydrogen fosforečnan disodný dodekahydrát – *Penta*, Praha, Česká republika
- dihydrogen fosforečnan sodný dodekahydrát – *Penta*, Praha, Česká republika

Ďalšie chemikálie

- hydroxid sodný – *Mach chemikálie s.r.o.*, Slezská Ostrava, Česká republika
- methanol HPLC gradient grade – *J.T.Baker*
- chlorofom – p.a., *Sigma-Aldrich*, Steinheim, Nemecko

Mikroorganizmy

- *Aspergillus ochraceus* Wilhelm - CCM F-269 (Česká zbierka mikroorganizmov), Masarykova univerzita, Česká republika
- *Aspergillus melleus* Yukawa - CCM 8002, Masarykova univerzita, Česká republika
- zásobný roztok (100 µg/ml) štandardu OTA - *Romer Labs Deutschland GmbH*, Nemecko

Vzorky

- žito ozimné, *Bio Harmonie*, Staré mesto, Česká republika
- ovsené vločky, *Zdraví z přírody*, Veľká Británie
- otruby, *Zdraví z přírody*, Veľká Británie

3.3 Príprava vzoriek

Huby boli kultivované na 10 ml kultivačnom Sabouraud agarovom médiu a následne izolované zo žita ozimného. 25 g žita ozimného bolo pridaných do 25 ml vriacej vody, na ktoré boli po vychladnutí zámerne očkované mikroorganizmy *Aspergillus ochraceus* Wilhelm a *Aspergillus melleus* Yukawa (Česká zbierka mikroorganizmov označenia F-269 a 8002) v Erlenmeyerových bankách vypláchnutých vriacou vodou. Kultivácia prebiehala pri týchto podmienkach: teplota 30 °C, voľný prístup vzduchu, 20 dní. Kultúry boli inkubované bez miešania počas 20 dní. 50 ml kultivačného média SAB sa trikrát extrahovalo so 100 ml chloroformu. 25 g húb obsiahnutých ražného zrna sa zhromaždilo v maltách a pridalo sa 25 ml chloroformu s 1% HCL. Trením sa vytvorila hladká zmes a následne sa prefiltrovala cez dvojité vrstvy filtračného papiera. Získalo sa približne 15 ml filtrátu. Filtrát sa trikrát extrahoval 30 ml chloroformu s 1% HC1. Chloroform sa ďalej odparil vo vákuu a výsledný film sa rozpustil v 20 ml metanole. Metanolický extrakt sa ďalej rozdelil na polovicu a odparil sa pod miernym prúdom vzduchu do sucha. Na konečné rozpustenie sa použilo 1 ml vody alebo metanolu. Takto pripravené roztoky boli následne použité pre prípravu vzoriek pro LEKC.

3.4 Príprava lipozómov

Pre prípravu lipozómov sa používali tieto lipidy: 1-palmitoyl-2-oleoylglycero-3-fosfocholín, 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-fosfo-L-serín, a cholesterol zo zásobného roztoku, rozpusteného v chloroforme o koncentracii 20 mM. Napipetovalo sa odpovedajúce množstvo zásobných roztokov lipidov na prípravu 1 ml 4mM roztoku lipozómu. Chloroform bol najprv vysušený jemným prúdom stlačeného vzduchu a následne sa lipidový film dal cez noc do vákua (pre úplné odstránenie chloroformu). Pridal sa 1 ml pufru 10 mM fosforečnanu sodného o pH6. Hodnota pH zásobného roztoku pufru bola upravená pomocou HCl 1 M. Nasledovalo 60 min zahriatie na 60 °C za stáleho miešania, čím vznikli multilamelárne lipozómy. Na vyčistenie roztoku lipozómov sa použil ultrazvuk pri kontrolovanej teplote pod 35 °C. Takto vznikli

unilamellárne lipozomy ktoré sa prefiltrovali cez 0,4µm filter PVDF (polyvinyldéndifluridová membrána) pre úplné odstránenie prachových a iných častíc. Takto vzniknutý zásobný roztok pre LECK o koncentracii 4 mmol.dm⁻³ fosfolipidov sa pred samotnou analýzou ďalej riedil pufrom na výslednú koncentráciu 0,15 mmol.dm⁻³.

Jednotlivé testované lipozomálne systémy boli pripravené v týchto molárnych pomeroch: 25% cholesterol + 25% POPS + 50% POPC, 50% cholesterol + 25% POPS + 25% POPC, 25% POPS + 75% POPC.

3.5 CZE metóda

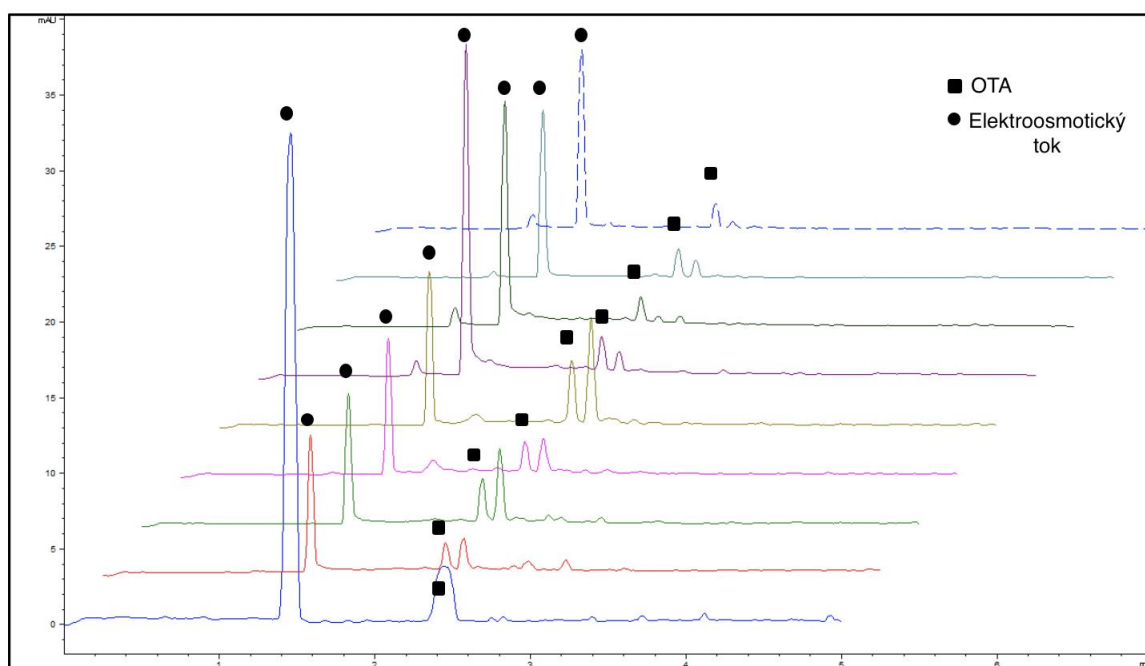
Na kapilárnu zónovú elektroforézu (CZE) sa použili pufrý pH 3, pH 6, pH 11 bez lipozomov. Ďalšie podmienky sú rovnaké ako pri LECK metóde popísane v kap. 3.6. Pomocou CZE nebol ochratoxín separovaný od iných látok v extrakte a pík OTA bol nestabilný. Keď sa použijú roztoky lipozomov, je možné dosiahnuť odlišné migračné správanie vďaka rôznym interakciám medzi mykotoxínmi a lipozómami. Preto bola LECK metóda zvolená pre túto prácu.

3.6 LECK metóda

Pomocou lipozomálnej elektrokinetickej kapilárnej elektroforézy boli analyzované mykotoxíny extrahované z kultúr húb *Aspergillus ochraceus* Wilhelm a *Aspergillus melleus* Yukawa. Negatívne nabité lipozomové disperzie s rôznymi zwitterionickými/negatívne nabitými lipidmi boli aplikované na stanovenie retenčných faktorov (k) mykotoxínov. Lipozomové disperzie pozostávali z týchto molárnych pomerov: 25% cholesterol + 25% POPS + 50% POPC, 50% cholesterol + 25% POPS + 25% POPC, 25% POPS + 75% POPC. Separácie mykotoxínov boli vykonávané v BGE, riedeného fosfolipidmi a pufrom 10 mM fosforečnanu sodného, pH6 na výslednú koncentráciu 0,15 mmol.dm⁻³.

Pri obidvoch metódach sa použila kapilára potiahnutá polyakrylamidom, celkovej dĺžky 32,5 cm, efektívnej dĺžky 24 cm pri napätí 20 kV. Konštantná teplota kapiláry bola udržiavaná na 20 °C. Dávkovalo sa hydrodynamicky pri tlaku 50 mbar po dobu 10 s. Pohyblivosť lipozomov bola stanovená s použitím antracénu ako markera mobility pseudostacionárnej fázy.

Výstupom analýzy bol elektroforegram.



Obr.9 : Elektroforegram ochratoxínu pomocou LECK

4 Výsledky práce a diskusia

4.1 Produkcia OTA pomocou inokulovaného žita ozimného

Na kultiváciu húb použitých pre inokuláciu bolo použitých 10 ml agarového Sabouraud média, ktoré pri laboratórnej teplote vydržali až mesiac v dobrej kondícii a rast húb trval o niečo dlhšie ako rast na žite ozimnom. Do 25 g žita ozimného bolo pridaných do 25 ml vriacej vody, na ktoré boli po vychladnutí zámerne očkované mikroorganizmy *Aspergillus ochraceus* Wilhelm a *Aspergillus melleus* Yukawa v Erlenmeyerových bankách vypláchnutých vriacou vodou. Kultivácia prebiehala pri týchto podmienkach: teplota 30 °C a voľný prístup vzduchu. Kultúry boli inkubované bez miešania počas 20 dní.

Takisto sa použilo 25 g ovsených vločiek a otrúb pri rovnakých podmienkach ako pri žite ozimnom. Čisté kultúry boli nahradené mikroorganizmami spôsobujúcimi kvasenie, čo viedlo k potlačeniu rastu inokulovaných plesní. Prvá generácia bola neúspešná z viacerých dôvodov, napríklad nedostatočná sterilizácia, výber rastlinných substrátov, nedostatočný prístup vzduchu, preto sa analyzovali vzorky z druhej kultivácie, kde bol už rovnomernejší a lepší rast.

Pri raste húb na žite ozimnom sú patrne malé morfológické rozdiely. Z literatúry je možné vyčítať, že kolónie *Aspergillus ochraceus* Wilhelm rastú o niečo rýchlejšie a to až 45 až 55 mm za 7 dní ako kolónie *Aspergillus melleus* Yukawa (Kwon-Chung, Bennett, John E. 1992). Kolónie *Aspergillus melleus* Yukawa sú svetlejšie a vyššie ako kolónie *Aspergillus ochraceus* Wilhelm, ktoré sú tmavšie a intenzívnejšie. Napriek sporeniu a inokulácii začala časť semien klíčiť, čo znamená, že plesň nebola schopná rýchlo zničiť semená a to potvrdilo pomalý rast. Počas našej kultivácie vzorky 8002 na žite ozimnom narástla horná chlpatá sivo-biela vrstva konídií huby *Aspergillus melleus* Yukawa a vytvorila sa medzera medzi semenami žita. Spodná vrstva zrn nevytvárala chlpatú vyššiu vrstvu, ale mala tmavo sivo-zelené sfarbenie. Vzorky 8002 boli po filtrácii intenzívnejšie sfarbené do žltá ako vzorky F-269, koncentrácie vzorky 8002 boli väčšie, čo znamená, že táto huba *Aspergillus melleus* Yukawa produkuje viac OTA.



Obr.10 : Kultivácia huby *Aspergillus melleus* Yukawa, fotené v deň zberu a extrakcie



Obr.11 : Kultivácia huby *Aspergillus ochraceus* Wilhelm, fotené v deň zberu a extrakcie

4.2 Optimalizácia separačného systému

Separácie mykotoxínov boli vykonávané v BGE, pozostávajúceho z fosforečnanu sodného o iónovej sile 10 mM a pH 3, pH 6 a pH 11. Najprv sa skúmal účinok pH tlmivých roztokov použitých v BGE na OTA a lipozómy. BGE pH 3 mal nízky EOF, OTA bol málo disociovaný a dôsledkom toho bola pomalá analýza. BGE pH 11 mal naopak vysoký EOF ale nestabilný pík OTA a nestabilné lipozómy a tým pádom vysoký šum. Najlepšie podmienky pre separáciu OTA sa získali pri pH 6 a toto pH bolo použité v ďalších analýzach.

Tento BGE bol použitý aj v kombinácií s 4mM lipozómami týchto molárnych zlození : 25% cholesterol + 25% POPS + 50% POPC, 50% cholesterol + 25% POPS + 25% POPC, 25% POPS + 75% POPC. Vzorky boli riedené 10x s puframi pH 3, 6, 11 na celkový objem 100 μ l. tiomočovina bola riedená 100x zo zásobného roztoku 5 mg/ml na výslednú koncentráciu 0,05 mg/ml tiomočoviny. Z dôvodu nestability píku OTA bola ďalšia séria vzoriek riedená rovnako ale s pridaním lipozómov vyššie uvedených molárnych zlození a kombinácií. Takto nariadené vzorky boli použité pre všetky analýzy uvedené ďalej.

Postupným testovaním sa rovnako dospelo k ďalej uvedeným podmienkam analýzy. Dávkovalo sa hydrodynamicky pri tlaku 50 mbar po dobu 10s. Pred každou analýzou bolo nastavené premývanie kapiláry destilovanou vodou a hydroxidom sodným 10min. Kremenná kapilára bola potiahnutá polyimidom, celkovej dĺžky 32,5 cm, efektívnej dĺžky 24 cm. Analýza prebiehala pri separačnom napätí 20 kV. Dĺžka analýzy bola nastavená na max 7 min. UV spektrá štandardov OTA a vzoriek boli DAD detektorom s maximom pri absorbancii 335 nm. Pre optimalizáciu metódy boli použité extrakty OTA z kultivácie z dôvodu vysokej ceny a malého dostupného množstva štandardu OTA, preto bol štandard použitý až pri optimalizovaných systémoch.

4.2.1 Elektroforetické mobility OTA

Vzorky	V MeOH	V H ₂ O
8002	I.	I.
	II.	II.
F269	I.	I.
	II.	II.

Tabuľka 1: Popis vzoriek I. a II. sady rozpustených v metanole alebo vo vode

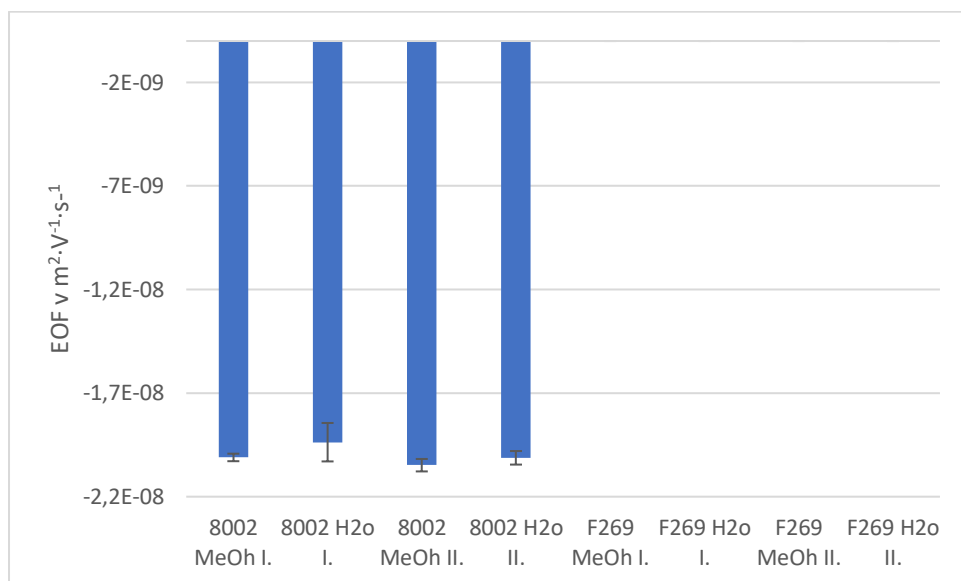
I. a II. vždy udávajú sadu kultivácii.

Retenčné faktory k sa vypočítali z účinných elektroforetických pohybov analytov v podmienkach LEKC a CZE a z účinných elektroforetických pohybov lipozómov, ktoré určila CZE.

$$k = \frac{(\mu_r - \mu_0)}{(\mu_{lipo} - \mu_r)} \quad (4)$$

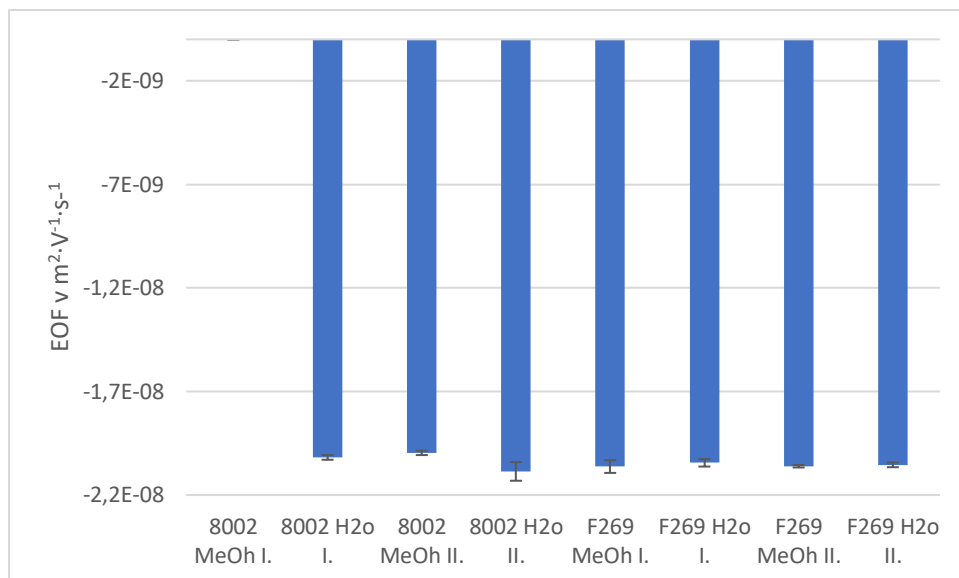
kde μ_r je elektroforetická mobilita OTA v lipozómoch, μ_0 je elektroforetická mobilita OTA v pufri a μ_{lipo} je elektroforetická mobilita lipozómov.

4.2.1.1 Elektroforetické mobility OTA v lipozómoch zloženia 25%POPS + 75%POPC



Graf 1 : Elektroforetické mobility OTA zistené metódou LECK

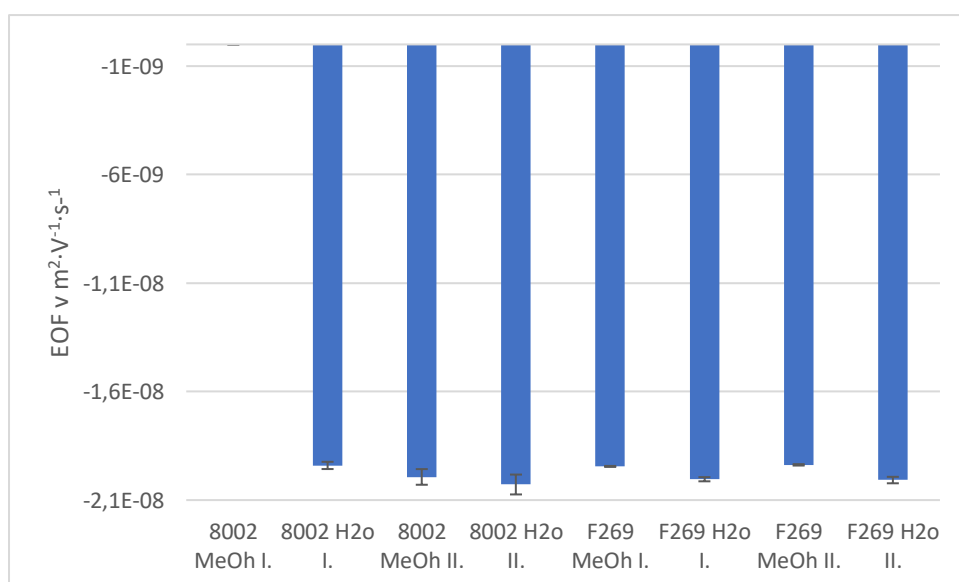
Na grafe č.1 sú znázornené elektroforetické mobility OTA v lipozómoch molárneho zloženia 25% POPS a 75% POPC metódou LECK. Pri vzorke F-269 neboli detekované žiadne píky, preto tento systém lipozómov nebol vhodný na optimalizáciu metódy analýzy OTA. Retenčný faktor tohto systému je 0,169, čiže OTA sa do lipozómov rozpúšťal pomerne málo. SD u všetkých týchto systémov sú pomerne vysoké a kolísajú v závislosti na vzorke.



Graf 2 : Elektroforetické mobility OTA stabilizovaného lipozómami v BGE bez lipozómov

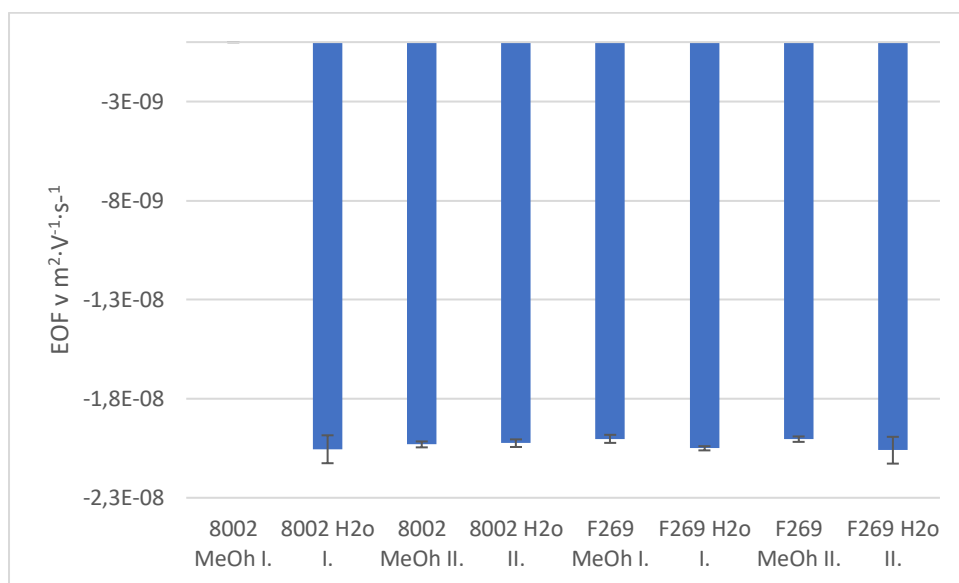
Na grafe č. 2 sú znázornené elektroforetické mobility OTA rozpusteným v v BGE bez lipozómov. Pri prvej vzorke 8002 rozpustenej v pufrí a v metanole nebol detekovaný žiadny pík, čo signalizovalo nestabilitu systému. Ďalej sa s týmito lipozómami nepracovalo.

4.2.1.2 Elektroforetické mobility OTA v lipozómoch zloženia 50%cholesterol + 25%POPS + 25%POPC



Graf 3 : Elektroforetické mobility OTA zistené metódou LECK

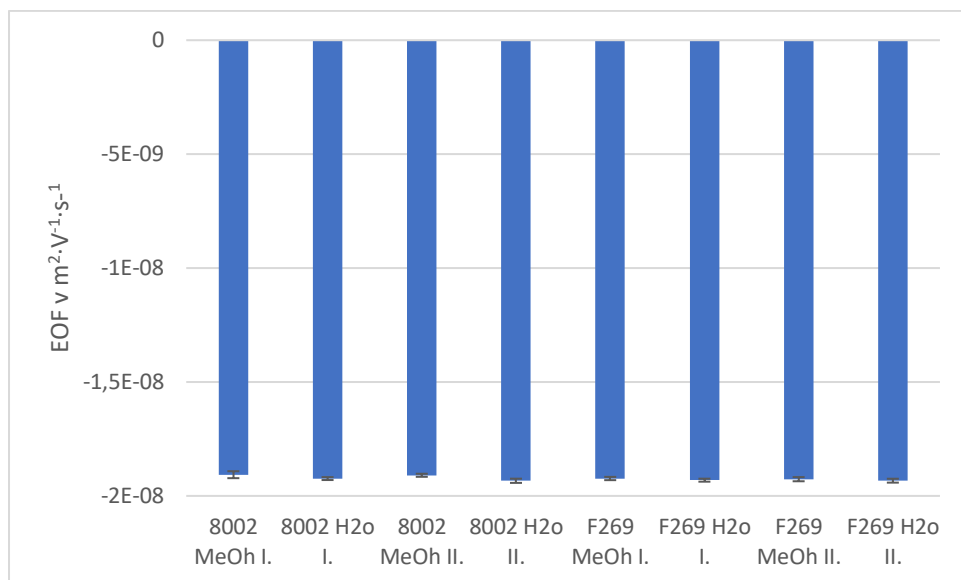
Na grafe č. 3 sú znázornené elektroforetické mobility OTA v lipozómoch molárneho zloženia 50% cholesterol + 25% POPS a 25% POPC metódou LECK. Pri prvej vzorke 8002 rozpustenej v lipozómoch a v metanole neboli detekované žiadne píky, preto tento systém lipozómov takisto nebol vhodný na optimalizáciu metódy analýzy OTA. Retenčný faktor tohto systému je 0,186, je vyšší než predchádzajúci systém, ale stále to signalizuje nízku mieru interakcie.



Graf 4 : Elektroforetické mobility OTA stabilizovaného lipozómami v BGE bez lipozómov

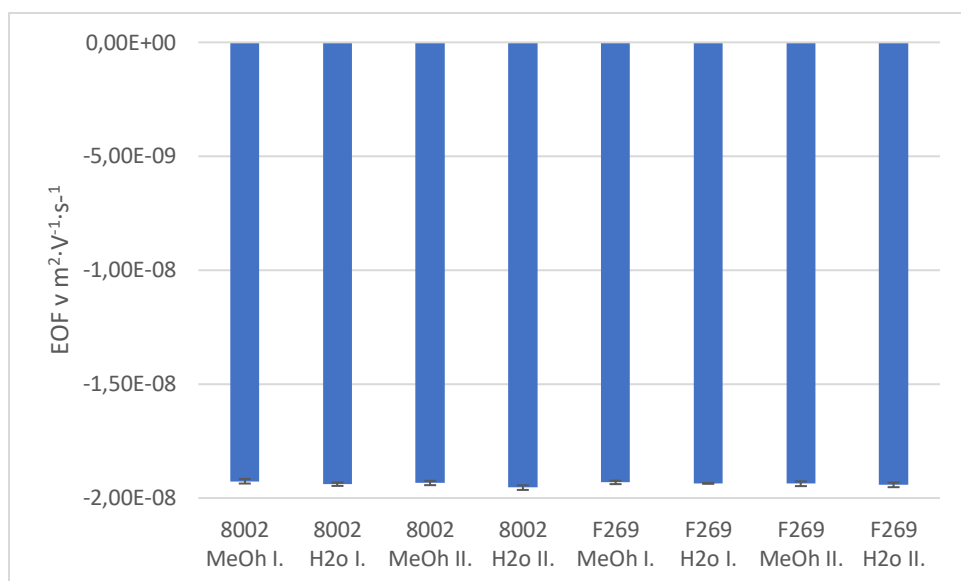
Na grafe č. 4 sú znázornené elektroforetické mobility OTA v pufri bez lipozómov. Pri prvej vzorke 8002 rozpustenej v metanole neboli detekované žiadne píky, preto tento systém lipozómov nebol vhodný na optimalizáciu metódy analýzy OTA.

4.2.1.3 Elektroforetické mobility OTA v lipozómoch zloženia 25% cholesterol + 25%POPS + 50%POPC



Graf 5 : Elektroforetické mobility OTA zistené metódou LECK

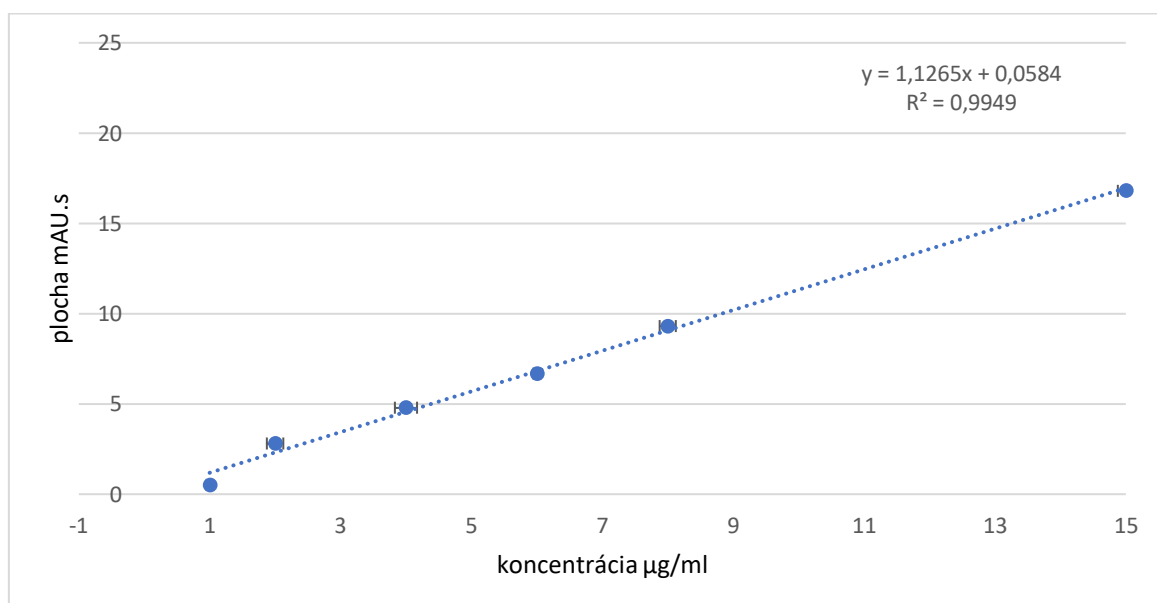
Na grafe č. 5 sú znázornené elektroforetické mobility OTA v lipozómoch molárneho zloženia 25% cholesterol + 25% POPS a 50% POPC metódou LECK. Tento systém lipozómov sa preukázal ako najúčinnnejší na separáciu OTA. Malé odchylky hodnôt elektroforetických mobilit naznačujú stálosť systému a preto tieto lipozómy boli určené na analýzu OTA. Retenčný faktor bol ovplyvnený zložením lipozómov a jeho hodnota je 0,375, čo je najvyššia hodnota k spomedzi lipozomálnych systémov a signalizuje to najvyššiu mieru interakcie OTA – lipozómy, čo je predpoklad pre účinnú separáciu v LECK. SD boli ďaleko nižšie ako u predchádzajúcich dvoch systémov.



Graf 6 : Elektroforetické mobility OTA stabilizovaného lipozómami v BGE bez lipozómov

Na grafe č. 6 sú znázornené elektroforetické mobility OTA v pufri bez lipozómov. Pri všetkých vzorkách boli zaznamenané píky a môžeme z toho vyvodiť, že dané zloženie lipozómov funguje dobre aj ako stabilizátor vzoriek pre kapilárnu zónovú elektroforézu.

4.3 Kalibračná krivka OTA



Obr.12 : Kalibračná závislosť plochy píku na koncentrácii OTA

Rovnica lineárnej regresie : $y = 1,1265x + 0,0584$

Koeficient determinácie rovnice lineárnej regresie kalibračnej závislosti: $R^2 = 0,9949$

Výpočet koncentrácie OTA z uvedenej rovnice lineárnej regresie kalibračnej závislosti:

$$c = \frac{(y - 0,0584)}{1,1265} \quad ; \text{ kde } y \text{ je plocha píku}$$

Limity detekcie a kvantifikácie boli vypočítané zo smerníc kalibračných priamok podľa kritérií $3 \times S/N$ (signál/šum) pre LOD a $10 \times S/N$ pre LOQ. Limit detekcie pre OTA bol $0,577 \mu\text{g/ml}$ limit stanoviteľnosti bol $1,22 \mu\text{g/ml}$ čo je v poriadku lebo naše vzorky sú nad $3 \mu\text{g/ml}$.

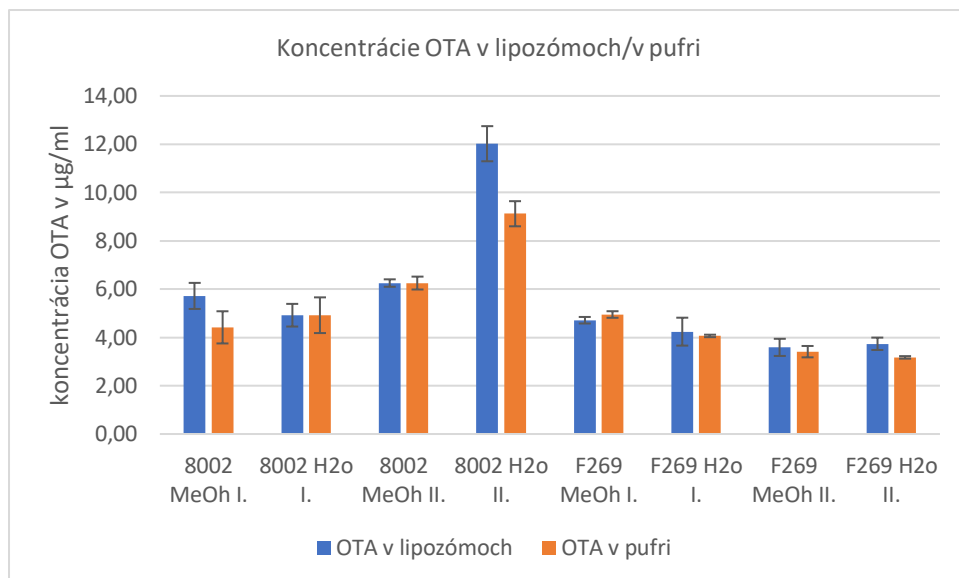
Kalibračná krivka je zostrojená iba z metódy LECK, pretože v pufri neboli stabilné a opakovateľne merateľné plochy pík.

4.4 Koncentrácie OTA v žite ozimnom

Výpočet koncentrácie OTA z kalibračnej závislosti vid'. kapitola 4.3 .

Vzorky	Koncentrácia OTA v lipozómoch, v $\mu\text{g/ml}$	Koncentrácia OTA v pufri, v $\mu\text{g/ml}$
8002 MeOh I.	5,72	4,42
8002 MeOh II.	6,25	6,25
8002 H2o I.	4,92	4,92
8002 H2o II.	12,02	9,12
F269 MeOh I.	4,71	4,95
F269 MeOh II.	3,59	3,41
F269 H2o I.	4,24	4,06
F269 H2o II.	3,74	3,17

Tabuľka 2 : Koncentrácie OTA v žite ozimnom zistené kapilárnou elektroforézou s BGE osahujúcim lipozómy (LEKC) / bez lipozómov (CZE); lipozómy boli použité ako stabilizátor vzorky OTA v oboch prípadoch



Graf 7 : Koncentrácie OTA jednotlivých vzoriek rozpustených v lipozómoch / v pufri

Na grafe č. 7 sú znázornené rozdiely v koncentráciách OTA rozpusteného v lipozómoch alebo rozpusteného v pufri so znázornenými smerodatnými odchýlkami. Z grafu je zrejmé, že v pufri je menej OTA ako v lipozómoch, pretože lipozómy udržia lepšie OTA v roztoku. V lipozómoch sa OTA stále rozpúšťal, narozdiel od pufru, kde to bolo náročnejšie. Na základe výsledkov sme zistili, že lipozómy sú výhodnejšie systémy na detekciu a separáciu OTA (LEKC metóda) ako BGE bez lipozómov (CZE metóda) s lipozómami použitými iba pre rozpustenie dávkovanej vzorky. V lipozómoch sme priemerne detekovali o 6,4% viac OTA ako v pufri a priemerná SD bola o 1,2 % vyššia. Počas našej štúdie sme zistili, že vzorka 8002, čiže huba *Aspergillus melleus* Yukawa produkovala priemerne o 50 % viac OTA ako vzorka F-269, huba *Aspergillus ochraceus* Wilhelm.

Na grafe č. 7 sú znázornené koncentrácie OTA v jednotlivých vzorkách metódou LECK so smerodatnými odchýlkami. Nie je možné jednoznačne určiť kde sa OTA lepšie rozpúšťal a separoval, či vo vode alebo v metanole. Narozdiel metódy LECK, keď bol OTA rozpustený iba v pufri, vo vzorke 8002 boli detekované vyššie koncentrácie OTA keď bol OTA rozpustený vo vode, naopak pri vzorke F-269 boli detekované vyššie množstvá OTA rozpusteného v metanole.

4.4.1 Celková koncentrácia v žitnom zrne

25 g húb obsiahnutých ražného zrna sa zhromaždilo v maltách a pridalo sa 25 ml chloroformu s 1% HCL. Trením sa vytvorila hladká zmes a následne sa prefiltrovala cez dvojité vrstvy filtračného papiera. Získalo sa približne 10-15 ml filtrátu. Filtrát sa trikrát extrahoval 30 ml chloroformu s 1% HC1. Chloroform sa ďalej odparil vo vákuu a výsledný film sa rozpustil v 20 ml metanolu. Metanolickej extrakt sa ďalej rozdelil na polovicu a odparil sa pod miernym prúdom vzduchu do sucha. Na konečné rozpustenie sa použilo 1 ml vody alebo metanolu. Na celkové zakonzentrovanie OTA sa sčítali výsledné koncentrácie OTA zo vzoriek rozpustených v H₂O a MeOH.

Výpočet:

Vysušený extrakt bol rozpustený v 1 ml H₂O a v 1 ml metanole.

10 µl extraktu vo vzorke = 100 µl vzorky

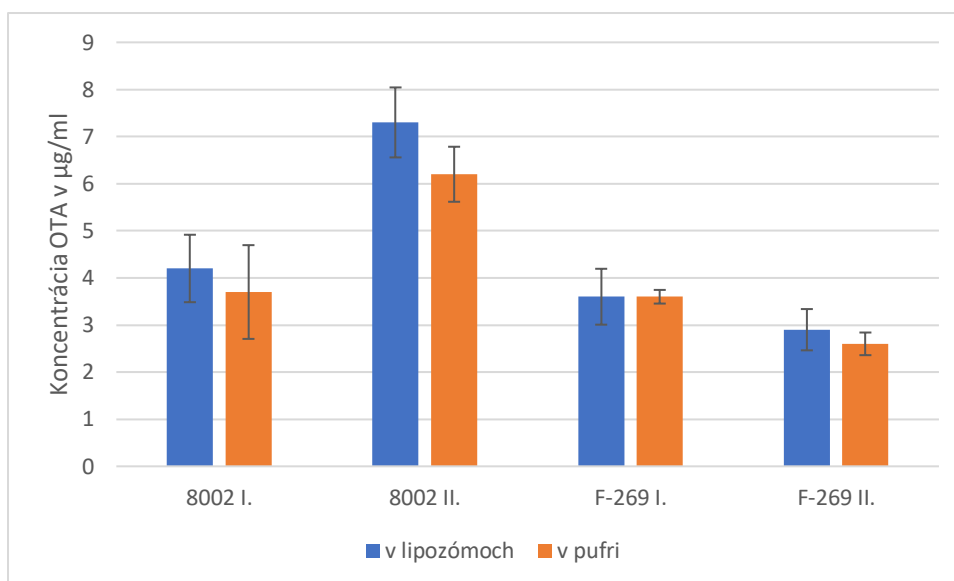
Napr. : Vzorka 8002 v lipozómoch, I. v MeOH + I. v H₂O

$$c = \frac{57,2 \mu g + 49,2 \mu g}{25 g} = \frac{106,1 \cdot 10^{-6} g}{25 g} = 4,2 \cdot 10^{-6} g/g \text{ žita ozimného}$$

$$c = 4,2 \mu g \text{ OTA} / 1 g \text{ žita}$$

Vzorky	Koncentrácia OTA v lipozómoch v µg/g	Koncentrácia OTA v pufri v µg/g
8002 I.	4,2	3,7
8002 II.	7,3	6,2
F-269 I.	3,6	3,6
F-269 II.	2,9	2,6

Tabuľka 3: Celkové koncentrácie OTA v lipozómoch / v pufri I. a II. sady vzoriek



Graf 8 : Rozdielne koncentrácie extraktu OTA analyzovaných v lipozómoch / v pufri

Na grafe č.8 sú znázornené rozdiely v koncentráciách extraktu OTA rozpusteného vždy v lipozómoch analyzovaného v BGE s lipozómami a v BGE bez lipozómov / v pufri. CZE analýzy boli veľmi nestabilné a lipozómy boli nutné minimálne ako stabilizátor OTA vo vzorke. Z grafu je zrejmé, že v pufri bolo menej OTA ako v lipozómoch, pretože lipozómy stabilizujú OTA v roztoku. Lipozómy molárneho zloženia 25% cholesterol + 25% POPS a 50% POPC preukázali najlepšiu stabilitu a najvyšší retenčný faktor v rámci testovaných zložení membrány preto sú vhodné pri analýze OTA LECK metódou.

Pomocou metódy HPLC boli sledované koncentrácie OTA rôznymi vedcami ako napr. Araguás, González-Peñas a López de Cerain (2005) zo Španielska zistili v ich štúdiu, že 19 z 21 vzoriek obilnín bolo zistených kontaminovaných OTA so strednou hladinou 0,265 µg/kg. V ďalšej štúdiu Roscoe, Lombaert a Huzel (2008) hlásili prítomnosť OTA u 53 zo 156 (35%) vzoriek cereálnych raňajok do 1,4 µg/kg. Villa a Markaki (2009) uviedli prítomnosť OTA u 33 z 55 (60%) raňajkových cereálií v priemernej hladine 0,18 µg/kg. Vo Francúzsku Molinié, Faucet, Castegnaro a Pfohl-Leszkowicz (2005) zistili OTA v 31 zo 45 vzoriek obilnín do 8,8 µg/kg. Rozdiely v obsahu OTA v zrnách obilnín môžu byť spôsobené odlišným zrnom, ktoré sa používa v rôznych pomeroch v chleboch alebo raňajkových cereáliách. Vo všeobecnosti sa však predpokladá, že chlieb vyrobený z kukurice je častejšie kontaminovaný ako pšeničný chlieb (Duarte, Bento, Pena, Lino, Delerue-Matos, Oliveira, 2010). V našich umelo kultivovaných médiách sú výťažky OTA približne 1000 krát vyššie ako hodnoty týchto výsledkov.

Použitie LECK metódy má oproti HPLC výhodu použitia stále čerstvej pseudostacionárnej fázy ktorej zloženie je laditeľné s rôznym zložením zmesi mykotoxínov s možnosťou dávkovania malých objemov, takisto aj dávkovanie nižších objemov vzoriek. HPLC metóda má lepšiu citlivosť ale zavedenie fluorescenčnej detekcie počas LECK analýzy umožní zvýšenie citlivosti o niekoľko rádov. To by malo byť dostatočné, keďže na dosiahnutie detekcie limitu OTA povoleného v potravinách bude pre prezentovanú LEKC metódu potrebné aspoň o dva rády vyššiu citlivosť.

5 Záver

Ochratoxín A (OTA) je toxický metabolit produkovaný hubami *Aspergillus* a *Penicillium* a je známy svojimi karcinogénnymi, nefrotoxickými, teratogénnymi, genotoxickými a imunotoxickými vlastnosťami v živočíšnych bunkách. Ľudia sú citlivejší na jeho nefrotoxické účinky. Je klasifikovaný ako skupina 2B - možný karcinogén človeka, preto je dôležité sledovať jeho množstvo v potravinách.

Ciele tejto práce boli okrem spracovania poznatkov teórie o mykotoxínoch hlavne vytvorenie a testovanie metódy pre analýzu amfifilných látok pomocou elektrokinetickej chromatografie a optimalizácia tejto metódy pre analýzu ochratoxínu A. Ďalším cieľom bolo testovať rôzne zloženie pseudostacionárnej fázy, konkrétne lipozómov. Následne analyzovať pomocou tejto metódy ochratoxín extrahovaný z biologického materiálu, v ktorom sa prirodzene ochratoxín vyskytuje. Pre prípravu ochratoxínu boli použité kultúry plesní rastúcich za kontrolovaných podmienok na žite ozimnom.

Ako najúčinnnejšie a najstabilnejšie lipozómy na separáciu ochratoxínu A metódou LECK boli preukázané lipozómy molárnych zložení 25% cholesterol + 25% POPS + 50% POPC. Testované boli aj lipozómy molárnych pomerov 25% POPS + 75% POPC a 50% cholesterol + 25% POPS + 25% POPC, avšak vykazovali horšie parametre separácie a opakovateľnosti meraní.

Lipozomálna elektrokinetická kapilárna elektroforéza patrí medzi novšie metódy a tento spôsob analýzy ochratoxínu A predtým nebol testovaný. Oproti HPLC metóde má nevýhody aj výhody. Nevýhodou je horšia citlivosť. Výhodou LECK metódy je použitie stále čerstvej pseudostacionárnej fázy, ktorej zloženie je laditeľné a ďalej taktiež s možnosťou dávkovania veľmi nízkych objemov.

6 Zoznam použitej literatúry

Ahmed, A.M.S.; Farah, F.H.I.; Kellaway.W.; The thermodynamics of partitioning of phenothiazines between phosphate buffer and the lipid phases of cyclohexane, *n*-octanol and dmPC liposomes *Pharm. Res.* 2: 119–24 , 1985

Altria, Kevin D., Capillary Electrophoresis Guidebook : Principles, Operation and Applications. New York: Humana P, 1995

Amézqueta, S. A kol., A review: *Ochratoxin Adecontamination*, Food control, 2008

Bennet, J.W. *Mycology Series*. New Orleans, Louisiana: Tulane University. pp. 294–295, 2005

Breyer, E.D.; Howard, S.; Raje, N.; Allison, S.; Apkarian, R.; Brown, W.V. and Strasters, J.K. , Study of lipid and apolipoprotein binding interactions using vesicle affinity capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 75: 5160–69 (2003),

Bui-Klimke, T.; Wu, F. Evaluating weight of evidence in the mystery of balkan endemic nephropathy. *Risk Anal.*, 2014, 34, 1688–1705

Burns, S.T. and Khaledi, M.G. , Rapid determination of liposome- water partition coefficients ($K_w - l$) using liposome electrokinetic chromatography (LEKC). *J. Pharm. Sci.* 91: 1601–12 (2002)

Burns, S.T.; Agbodjan, A.A.; Khaledi, M.G., Characterization of solvation properties of lipid bilayer membranes in liposome elec- trokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A* 973: 167–76 (2002)

Cao, J., Zhou, S., Kong, W., Ma, X., Yang, M., Wan, L., Yang, S.; Simultaneous determination of aflatoxins B(1), B(2), G(1), G(2) in Fructus Bruceae by high-performance liquid chromatography with online postcol- umn photochemical derivatization; Journal of Separation Science, 2014; 37(19): 2771–2778.

Corradini, D.; Mancinia, G.; Bello, C., Use of liposomes as a dis- persed pseudo-stationary phase in capillary electrophoresis of basic proteins. *J. Chromatogr. A* 1051: 103–10, 2004

- Cui, J.; Xing, L.; Li, Z.; Wu, S.; Wang, J.; Liu, J.; Wang, J.; Yan, X.; Zhang, X. Ochratoxin A induces G(2) phase arrest in human gastric epithelium GES-1 cells *in vitro*. *Toxicol. Lett.*, 2010, 193, 152–158
- Cunliffe, J.M.; Baryl, N.E.; Lucy, C.A. , Phospholipid bilayer coatings for the separation of proteins in capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 74: 776–83, 2002
- Doster, R.C.; Sinnhuber, R.O. Comparative rate of hydrolysis of Ochratoxin A and B *in vitro*. *Food Cosmet. Toxicol.* ,1972, 10, 389–394
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) / WHO (World Health Organization) / UNEP (United Nations Environment Programme), 1999b
- Forssen, E. and Willis, M.; Ligand-targeted liposomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 29: 249–71, 1998
- Frisvad J.C., Samson R.A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Stud. Mycol.* 2004;49:1–173
- Frisvad J.C., Smedsgaard J., Larsen T.O., Samson R.A. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Stud. Mycol.* 2004;49:201–241
- G. Beschiaschvili, J. Seelig, *Biochemistry* 31 (1992) 10044^ 10053)
- Gomez-Hens, A. and Fernandez-Romero, J.M. , The role of liposomes in analytical processes. *Trends Anal. Chem.* 24: 9–19, 2005
- Goryacheva, Y.; Saeger, S. De; Eremin, S.A.; Peteghem, C. Van, *Food Addit. Contam* (2007)
- Hagelberg, S.; Hult, K.; Fuchs, R. Toxicokinetics of Ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *J. Appl. Toxicol.*, 1989, 9, 91–96
- Hassen, W.; Abid-Essafi, S.; Achour, A.; Guezzah, N.; Zakhama, A.; Ellouz, F.; Creppy, E.E.; Bacha, H. Karyomegaly of tubular kidney cells in human chronic interstitial nephropathy in Tunisia: Respective role of Ochratoxin A and possible genetic predisposition. *Hum. Exp. Toxicol.*, 2004, 23, 339–346
- Hautala, J.T.; Linden, M.V.; Wiedmer, S.K.; Ryhaen, S.J.; Saily, M.J.; Kinnunen, P.K.J.; Riekkola, M.L., Simple coating of capillaries with anionic liposomes in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 1004: 81–90 , 2003

- Heussner, A.H.; Bingle, L.E. Comparative Ochratoxin toxicity: A review of the available data. *Toxins*, 2015, 7, 4253–4282
- Hoehler, D.; Sudekum, K.H.; Wolfram, S.; Frohlich, A.A.; Marquardt, R.R. Metabolism and excretion of Ochratoxin A fed to sheep. *J. Anim. Sci.*, 1999, 77, 1217–1223
- Chernozemsky, I.N.; Stoyanov, I.S.; Petkova-Bocharova, T.K.; Nicolov, I.G.; Draganov, I.V.; Stoichev, I.I.; Tanchev, Y.; Naidenov, D.; Kalcheva, N.D. Geographic correlation between the occurrence of endemic nephropathy and urinary tract tumour sinvratza district, Bulgaria *Int.J.Cancer* ,1977,19,1–11
- Christensen, Martha (1982). "The *Aspergillus ochraceus* Group: Two New Species from Western Soils and a Synoptic Key". *Mycologia*. 74 (2): 210–225
- Igbal, S.,Z. a kol., A review: *Assessment of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in breakfast cereals*, Elsevier, 2014
- International Agency for Research on Cancer, 1993
- Jettanajit, A., Nhujak, T.; Determination of mycotoxins in brown rice using QuEChERS sample preparation and UHPLC–MS-MS; *Journal of Chromatographic Science*, 2016; 54(5): 720–729
- Komisia Codex Alimentarius, 2003
- Kumagai, S. Ochratoxin A: Plasma concentration and excretion into bile and urine in albumin-deficient rats. *Food Chem. Toxicol.* ,1985, 23, 941–943
- Kwon-Chung, K.J.; Bennett, John E. (1992). *Medical mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger. ISBN 978-0812114638
- Lattanzio, V.M., Solfrizzo, M., Powers, S., Visconti, A.; Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and Fusarium toxins in maize by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after multitoxin immunoaffinity cleanup; *Rapid communications in mass spectrometry*, 2007; 21(20): 3253–3261
- Li, C., Wu, Y.-L., Yang, T., Huang-Fu, W.-G.; Rapid determination of fumonisins B1 and B2 in corn by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with ultrasonic extraction; *Journal of Chromatographic Science*, 2012; 50(1): 57–63.

Li, Sam. Capillary Electrophoresis: Principles, Practice, and Applications. Journal of Chromatography Library; Elsevier Science Publishers: The Netherlands, 1992; Vol 52

Li, Y.; Czibulya, Z.; Poór, M.; Lecomte, S.; Kiss, L.; Harte, E.; Ko'zsegi, T.; Kunsági-Máté, S. Thermodynamic study of the effects of ethanol on the interaction of Ochratoxin A with human serum albumin. *J. Lumin.*, 2014, 148, 18–25

Lino, C.M.; Baeta, M.L.; Henri, M.; Dinis, A.M.P.; Pena, A.S.; Silveira, M.I.N. Levels of Ochratoxin A in serum from urban and rural Portuguese populations and estimation of exposure degree. *Food Chem. Toxicol.*, 2008, 46, 879–885

Liu, J.; Wu, S.; Shen, H.; Cui, J.; Wang, Y.; Xing, L.; Wang, J.; Yan, X.; Zhang, X. Ochratoxin A induces DNA damage and G2 phase arrest in human esophageal epithelium Het-1A cells *in vitro*. *J. Toxicol. Sci.*, 2015, 40, 657–665

M.R.A. Morgan, Tetrahedron 45 (1989) 2237

Madhyastha, M.S.; Marquardt, R.R.; Frohlich, A.A. Hydrolysis of Ochratoxin A by the microbial activity of digesta in the gastrointestinal tract. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 1992, 23, 468–472

Manetto, G.; Bellini, M.S. and Z. Deyl, Z., Application of capillaries with minimized electroosmotic flow to the electrokinetic study of acidic drug–b-oleoyl-g-palmitoyl-L-aphosphatidyl choline lipo- some interactions. *J. Chromatogr. A* 990: 205–14 (2003)

Manetto, G.; Bellini, M. S.; Deyl, Z., Application of capillaries with minimized electroosmotic flow to the electrokinetic study of acidic drug–b-oleoyl-g-palmitoyl-L-aphosphatidyl choline liposome interactions. *J. Chromatogr. A* 990: 205–14, 2003

Manoochehri, M., Asgharinezhad, A.A., Safaei, M.; Determination of aflatoxins in rice samples by ultrasound-assisted matrix solid-phase dispersion; *Journal of Chromatographic Science*, 2015; 53(1): 189–195

Markovic, B.; Lebedev, S.; Djordjevic, M.; Arambasic, M. Endemic urinary tract cancer in Bulgaria, Yugoslavia and Romania: Etiology and pathogenesis. *Med. Biol. Environ.*, 1976, 1–2

Matsuzaki, K. a kol., *Colloid Polym. Sci.* 269 (1991) 604–611.

Miraglia, M.; Brera, C.; Corneli, S.; Cava, E.; Montanino, G.; Miraglia, E. Occurrence of Ochratoxin A (OTA) in Maternal Serum, Placenta and Funiculum. In Proceedings of the IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins—Developments in Chemistry, Toxicology and Food Safety, Rome, Italy, 27–31 May 1996

Mohamed, N.A.L.; Kuroda, Y.; Shibukawa, A.; Nakagawa, T.; Gizawy, S.E.; Askal, H.F. and Kommos, M.E.E., Binding analysis of nil- vadipine to plasma lipoproteins by capillary electrophoresis-frontal analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21: 1037–43 (1999).

Mohamed, N.A.L.; Kuroda, Y.; Shibukawa, A.; Nakagawa, T.; Gizawy, S.E.; Askal, H.F. and Kommos, M.E.E., Enantioselective binding analysis of verapamil to plasma lipoproteins by capillary electrophoresis–frontal analysis. *J. Chromatogr.A* 875: 447–53 (2000)

Moslem, MA; Mashraqi, A; Abd-Elsalam, KA; Bahkali, AH; Elnagaer, MA (Nov 23, 2010). "Molecular detection of ochratoxigenic *Aspergillus* species isolated from coffee beans in Saudi Arabia". *Genetics and Molecular Research*.

Nagayasu, A. a kol., *Biochim. Biophys. Acta* 1278,(1996)

Nakamura, H., a kol., A review: *Liposome electrokinetic chromatography as a novel tool for the separation of hydrophobic compounds* , Analytical sciences , 1996

NARIADENIE KOMISIE (ES) č. 1881/2006

Ornskov, E.; Ullsten, S.; Soderberg, L., Markides, K.E; Folestad, S., Method for immobilization of liposomes in capillary electrophoresis by electrostatic interaction with derivatized agarose. *Electrophoresis* 23: 3381–84 , 2002

Özcelik, N.; Kosar, A.; Soysal, D. Ochratoxin A in human serum samples collected in Isparta-Turkey from healthy individuals and individuals suffering from different urinary disorders. *Toxicol. Lett.*, 2001, 121, 9–13

Pavlovic', N.M. Balkan endemic nephropathy - Current status and future perspectives. *Clin. Kidney J.* ,2013, 6, 257–265

Pena, R.; Alcaraz, M.C.; Arce, L.; Rios, A.; Valcarel, M., *J. Chromatogr. A* 967 (2002) 303. a FUM Wilkes, J.G.; Sutherland, J.B., *J. Chromatogr. B* 717 (1998) 135

- Peraica, M.; Domijan, A.M.; Fuchs, R.; Lucic, A.; Radic, B. The occurrence of Ochratoxin A in blood in general population of Croatia. *Toxicol. Lett.*, 1999, *110*, 105–112
- Pestka, J.J.; Abouzied, M.N.; Sutikno, M., *Food Technol.* 49 (1995) 120
- Pfohl-Leszkowicz, A. Ochratoxin A and aristolochic acid involvement in nephropathies and associated urothelial tract tumours. *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, 2009, *60*, 465–483
- Pitout, M.J. The hydrolysis of Ochratoxin A by some proteolytic enzymes. *Biochem. Pharmacol.*, 1969, *18*, 485–491
- Pitt J.I., Hocking A.D. *Fungi and Food Spoilage*. 3rd. Springer; Dordrecht, The Netherlands: 2009
- Poór, M.; Kunsági-Máté, S.; Bencsik, T.; Petrik, J.; Vladimir-Knežević, S.; Ko'šzegi, T. Flavonoid aglycones can compete with Ochratoxin A for human serum albumin: A new possible mode of action. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2012, *51*, 279–283
- Poór, M.; Kunsági-Máté, S.; Czibulya, Z.; Li, Y.; Peles-Lemli, B.; Petrik, J.; Vladimir-Knežević, S.; Ko'šzegi, T. Fluorescence spectroscopic investigation of competitive interactions between Ochratoxin A and 13 drug molecules for binding to human serum albumin. *Luminescence*, 2013, *28*, 726–733
- Poór, M.; Li, Y.; Matisz, G.; Kiss, L.; Kunsági-Máté, S.; Ko'šzegi, T. Quantitation of species differences in albumin-ligand interactions for bovine, human and rat serum albumins using fluorescence spectroscopy: A test case with some Sudlow's site I ligands. *J. Lumin.* 2014, *145*, 767–773
- Radic, B.; Fuchs, R.; Peraica, M.; Lucic, A. Ochratoxin A in human sera in the area with endemic nephropathy in Croatia. *Toxicol. Lett.*, 1997, *91*, 105–109
- Sheetz, M.P. a Chan, S.I. , *Biochemistry* 11 (1972) 4573–4581
- Schwartz, G.G. Hypothesis: Does Ochratoxin A cause testicular cancer *Cancer Causes Control*, 2002, *13*, 91–100
- Skaug, MA; Eduard, W; Størmer, FC (2001). "Ochratoxin A in airborne dust and fungal conidia". *Mycopathologia*. 151 (2): 93–8.

Soleimany, F., Jinap, S., Abas, F.; Determination of mycotoxins in cereals by liquid chromatography tandem mass spectrometry; *Food Chemistry*, 2012; 130(4): 1055–1060.

Stanker, L.H. ; Merrill, P.; Scotcher, M.C.; Cheng, L.W., *J. Immunol. Methods* 336 (2008)

Studer-Rohr, I.; Schlatter, J.; Dietrich, D.R. Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of Ochratoxin A plasma levels in human. *Arch. Toxicol.*, 2000, 74, 499–510

Turner, N., W. A. Kol., A review: *Analytical methods for determination of mycotoxins*, *Analytica Chimica Acta* , 2008

Velíšek, J. a Hajšlová, J., *Chemie potravin, Rozš. a přepřac.* 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6

Wiedmer, S. K.; Jussila, M.S.; Holopainen, J.M.; Alakoskela, J.M.; Kinnunen, P.K.J. and Riekkola, M.L. , Cholesterol-containing phosphatidylcholine liposomes: Characterization and use as dispersed phase in electrokinetic capillary chromatography. *J. Sep. Sci.* 25: 427–37 (2002)

Wiedmer, S.K.; Hautala, J.; Holopainen, J.M.; Kinnunen, P.J.K and Riekkola, M.L., Study on liposomes by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 22: 1305–13, 2001

Wiedmer, S.K.; Holopainen, J.M.; Mustakangas, P.; Kinnunen, P.K.J.; Riekkola, M. L., Liposome as carriers in electrokinetic capillary chromatography. *Electrophoresis* 21: 3191–98, 2000

Wilson, DM; Mubatanhema, W; Jurjevic, Z (2002). *Biology and ecology of mycotoxigenic Aspergillus species as related to economic and health concerns*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 504. pp. 3–17, ISBN 978-1-4613-5166-5. PMID 11922097.

Wilson, DM; Mubatanhema, W; Jurjevic, Z (2002). *Biology and ecology of mycotoxigenic Aspergillus species as related to economic and health concerns*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 504. pp. 3–17.

Xiao, H.; Madhyastha, S.; Marquardt, R.R.; Li, S.; Vodela, J.K.; Frohlich, A.A.; Kemppainen, W. Toxicity of OTA, its opened lactone form and several of its analogs: Structure-activity relationships. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1996, 137, 182–192

Zhang, Y.X.; Zhang, R.; Hjerten, S. and Lundahl, P. , Liposome capillary electrophoresis for analysis of interactions between lipid bilayers and solutes. *Electrophoresis* 16: 1519–23 (1995)

7 Zoznam použitých symbolov

μ	micro, 10^{-6}
BGE	základný elektrolyt
CE	kapilárna elektroforéza
CZE	kapilárna zónová elektroforéza
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
LECK	lipozomálna elektroforetická kapilárna elektroforéza
LOD	limit detekcie
LOQ	limit kvantifikácie
OTA	ochratoxín A
TLC	tenkovrstvová chromatografia
V	volt, základná jednotka napätia v sústave SI