

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

Bakalářská práce

Mykotoxiny v potravinách – citrinin a možnosti jeho stanovení

(rešeršní práce)

Aneta Kholová

Hradec Králové, 2016

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Podpis

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Daliborovi Šatínskému, Ph.D. za cenné rady a za ochotu a trpělivost při konzultacích, které mi poskytl v průběhu psaní této bakalářské práce.

Obsah

1. Seznam použitých zkratek	7
2. Zadání a cíl práce	8
3. Úvod	9
4. Teoretická část	10
4.1. Mykotoxiny	10
4.1.1. Bezpečnost a kontrola mykotoxinů v potravinách a nápojích	10
4.2. Citrinin	12
4.2.1. Struktura a fyzikální vlastnosti.....	13
4.2.2. Producenti citrininu	13
4.2.3. Mechanismus působení a rozklad.....	14
4.2.4. Toxikologie a účinky na lidské zdraví.....	15
4.2.5. Testy toxicity na zvířatech.....	16
4.2.6. Citrinin v nápojích a potravinách	17
5. Analytická část	19
5.1. Instrumentální metody stanovení mykotoxinů v nápojích a potravinách	19
5.1.1. Trendy v analýze mykotoxinů.....	19
5.2. Analytické metody potenciálně vhodné pro stanovení citrininu	20
5.2.1. Spektrofotometrie	20
5.2.2. Fluorimetrie.....	20
5.2.3. Hmotnostní spektrometrie.....	21
5.2.4. Nukleární magnetická rezonance	21
5.2.5. Elektroforetické metody.....	22
5.2.6. Chromatografické metody.....	23
5.2.7. Imunologické metody (ELISA).....	24
5.3. Možnosti stanovení citrininu	25
5.3.1. Současné stanovení citrininu a ochratoxinu A v sýru pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí časově rozlišenou luminiscencí za použití terbia	25
5.3.2. Rychlé semi-kvantitativní stanovení citrininu v plísňových kulturách izolovaných ze sýrů a sýrových tovarů.....	25
5.3.3. Rychlé stanovení citrininu v kukuřici kapalinovou chromatografií s fluorescencí a enzymovým imunostanovením	26

5.3.4. Společný výskyt ochratoxinu A a citrininu u obilovin z bulharské vesnice s historií balkánské endemické nefropatie (BEN)	26
5.3.5. Jednoduché a citlivé stanovení citrininu v druhu <i>Monascus</i> pomocí GC s hmotnostní spektrometrií	27
5.3.6. Detekce citrininu ve výrobcích obsahujících ochratoxin A novou HPLC metodou	27
5.3.7. Analýza vybraných cereálií na francouzském trhu pro jejich obsah ochratoxinu A, citrininu a fumonisinu B1: Vývoj metody pro souběžnou extrakci ochratoxinu A a citrininu	27
5.3.8. Studie kapilární elektroforézy pro stanovení citrininu v plesnivých potravinách	28
5.3.9. Stanovení citrininu ve vzorcích rýže za použití mikrokapalinového elektrochemického imunosenzoru.....	29
5.3.10. Validovaná RP-HPLC metoda pro stanovení citrininu v Xuezhikang kapslích a dalších fermentovaných výrobcích rodu <i>Monascus</i>	29
5.3.11. Stanovení citrininu v červené ryži pomocí mikrokuliček na základě imunoanalýzy a průtokové cytometrie	30
5.3.12. Přirozený výskyt citrininu v tradičním čínském jídle, léčivých rostlinách a dalších podobných výrobcích.....	30
5.3.13. Přirozený výskyt aflatoxinu B1, ochratoxinu A a citrininu v chorvatských fermentovaných masných výrobcích.....	31
5.3.14. Vývoj amperometrického biosenzoru na bázi peroxidázy pro kvantifikaci citrininu ve vzorcích rýže	31
5.3.15. Současné stanovení lovastatinu a citrininu v doplňcích z červené rýže micelární elektrokinetickou kapilární chromatografií.....	32
5.3.16. Vysoce citlivá imunoanalýza k multiplexní detekci mykotoxinů	32
5.3.17. Souběžná analýza <i>Alternaria</i> toxinů a citrininu v rajčatech: optimalizovaná metoda využívající kapalinovou chromatografii s tandemovým hmotnostním spektrometrem	33
5.3.18. Detekce citrininu za použití fágového zobrazení anti-idiotypové protilátky s jednou doménou pro napodobení antigenu	33
5.3.19. Molekulárně imprintovaný SPR biosenzor pro citlivé stanovení citrininu v červené ryži.....	34
5.3.20. Stanovení citrininu v rýži metodou ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí (UHPLC-FL).....	34
5.3.21. Stanovení citrininu ve výrobcích z červené fermentované rýže pomocí optimalizované extrakční metody s kapalinovou chromatografií a tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS)	35

5.3.22. Vývoj magnetických molekulárně imprintovaných polymerů pro selektivní dělení: Stanovení citrininu ve vzorcích rýže pomocí kapalinové chromatografie s DAD detekcí	35
5.3.23. Studie interakce citrininu s nativními a chemicky pozměněnými cyklodextriny pomocí fluorescenční spektroskopie.....	36
5.3.24. Citlivé stanovení citrininu založené na molekulárně imprintovaném elektrochemickém senzoru	36
5.3.25. Ultrasenzitivní a specifické stanovení citrininu využitím křemíkového senzoru na bázi membrány molekulárně imprintovaných polymerů a trojrozměrných zlatých nanočástic na mezoporézním uhlíku.....	37
5.3.26. Plně automatizovaná metoda využívající přímý nástřik a on-line SPE extrakci v HPLC pro analýzu ochratoxinu A a citrininu v českém pivu.....	37
5.4. Shrnutí komentovaného přehledu metod.....	38
6. Závěr	41
7. Seznam literatury.....	43

1. Seznam použitých zkratek

CE	Kapilární elektroforéza
CEC	Kapilární elektrochromatografie (Capillary Electrochromatography)
DAD	Spektrofotometrický detektor s diodovým polem (Photodiode-array detector)
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FL	Fluorescenční detektor
GC	Plynová chromatografie (Gass Chromatography)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-performance Liquid Chromatography)
LC	Kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
LD ₅₀	Střední smrtelná dávka
LFD	Luminiscenční detekce (Luminiscence Flow Detection)
LLE	Kapalinová extrakce (Liquid-liquid Extraction)
MEKC	Micelární elektrokinetická chromatografie (Micellar electrokinetic chromatography)
MF	Mobilní fáze
MIP	Molekulárně imprintované polymery (Molecularly Imprinted Polymer)
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
RP	Reverzní fáze
SF	Stacionární fáze
SPE	Extrakce na pevné fázi (Solid-Phase Extraction)
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
UHLPC	Rychlá chromatografie (Ultra High-performance Liquid Chromatography)
UV	Ultrafialové světlo
VIS	Viditelné světlo

2. Zadání a cíl práce

Cílem a zadáním této rešeršní práce bylo nalézt a souhrnně uspořádat informace o mykotoxinech, konkrétně citrininu, a shromáždit metody a možnosti, pomocí kterých lze tento toxin stanovit.

3. Úvod

Citrinin je toxická látka přírodního původu řadící se mezi mykotoxiny - sekundární metabolity mikroskopických vláknitých hub. Citrinin je významným kontaminantem potravin a krmiv a pro své nefrotoxické účinky představuje pro živé organizmy vysoké zdravotní riziko. Tento toxin může být přítomen v cereáliích, obilovinách, rýži, ořeších a nahnílém ovoci a zelenině, a tím snižovat kvalitu těchto surovin a výrobků z nich.

Navzdory své zdravotní závadnosti není citrinin ještě zcela prostudovaný mykotoxin a limity pro jeho výskyt v potravinách stále ještě nebyly přesně stanoveny. V dnešní době jsou již známé metody pro jeho extrakci ze vzorků potravin a následného stanovení, ale je otázkou, zda limit určený z hlediska nefrotoxicity je dostatečně nízký pro riziko genotoxicity a kancerogenity.

Rychlé a přesné metody pro stanovení mykotoxinů jsou důležité pro kontrolu potravin a nastavení správných limitů, protože i přes pečlivé dodržování postupů při zpracování a úpravě plodin není možné zcela zamezit výskytu mykotoxinů v potravě.

Analytické metody použité v této práci shrnují starší i moderní trendy pro stanovení citrininu z období let 1996 až 2016. Zdrojem informací byly vědecké články publikované v odborných časopisech a zobrazují tedy vývoj metod používaných v analýze potravin za posledních dvacet let.

4. Teoretická část

4.1. Mykotoxiny

Mykotoxiny se řadí mezi nízkomolekulární organické látky, které vznikají jako sekundárně metabolické produkty řady druhů mikroskopických vláknitých hub, neboli plísni. Pro svou stabilitu za různých podmínek, například za vysokých teplot, jsou označovány za termostabilní, a proto jsou velice nebezpečné pro zvířata, lidi i rostliny.

Mykotoxiny jsou běžnou součástí okolního světa a staly se globálním problémem. Jejich výskyt na krmivech a potravinách rostlinného původu, zejména obilovinách a výrobcích z obilovin není ojedinělý a zamezení jejich výskytu není jednoduché. Rostliny jsou napadeny již v období růstu a následně při sklizni dochází k roznesení spór do vzduchu. Další možnosti intoxikace potravin mohou být nevhodné skladovací podmínky, nesprávná přeprava a špatné zpracování.

V dnešní době máme chemicky potvrzenou existenci více jak čtyř set druhů toxikogenních plísni, ale pouze asi dvacet z nich je pro člověka ohrožujících. Mezi významné producenty mykotoxinů patří plíseň rodu *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*, které vytvářejí jedny z nejtoxičtějších látek. Existuje spousta druhů mikroskopických hub, které mohou vytvářet více jak jeden mykotoxin a z toho důvodu můžeme prakticky každou plíseň považovat za rizikovou pro člověka nebo zvířata. Působení mykotoxinů závisí na jejich typu, na délce působení i na stavu postiženého. Nejčastějšími cílovými orgány jsou buňky jater, ledvin, plic, nervů a mnoha dalších, kde se projevují jejich hepatotoxické, hemoragické, neurotoxické, cytotoxické, nefrotoxické, imunotoxické, teratogenní, genotoxické a karcinogenní účinky.

Ovšem známe i druhy mykotoxinů pro člověka neškodné, dokonce zcela žádoucí jako například mykotoxiny používané na šlechtění sýrů nebo některé s antibiotickými účinky.

4.1.1. Bezpečnost a kontrola mykotoxinů v potravinách a nápojích

Testováním přítomnosti mykotoxinů a jejich kontrolou v celém potravním řetězci se zabývá Národní referenční laboratoř pro mykotoxiny v působnosti Státního zdravotního ústavu. Laboratoř se řídí zákony Evropské unie při Evropském úřadu pro bezpečnost potravin nařízením komise č.1881/2006, č.1126/2007, č.105/2010,

č. 165/2010, č.219/2014, která limity pro mykotoxiny aktualizuje s rostoucí přesností výsledků analytických metod.

Na dodržování limitních hodnot dohlíží Státní zemědělská a potravinářská inspekce. Dozorová činnost kontrolních organizací se však již netýká zdravotní nezávadnosti potravin, které si občan doma uchovává v různých podmínkách po nějakou dobu, dále skladuje nebo sám vypěstuje a právě tam může dojít k významné kontaminaci.

Kontrola výskytu mykotoxinů v potravinách a nápojích je velice důležitá, protože se jedná o potraviny denní spotřeby a příjem případných toxinů může být vysoký. Při překročení limitních množství a následné dlouhodobější konzumaci může dojít k otravě mykotoxiny tzv. mykotoxikóze nebo dalším zdravotním problémům. Přesnost kvantitativní analýzy a schopnost detekce mykotoxinů závisí na přístrojovém vybavení a proto s modernizací a postupným rozvojem v analytických metodách jsou získávány stále přesnější výsledky a detekovány stále menší množství látek ve zkoumaném materiálu.

Druhy mykotoxinů, které jsou plně prostudované mají již stanoveny limitní koncentrace v potravinách a nápojích. Citrinin je ovšem málo prozkoumaný druh a i v dnešní době existuje pouze omezený počet projektů, zabývajících se touto problematikou a kvůli tomu stále v české ani v evropské legislativě nenalezneme přesné hodnoty, které by regulovaly výskyt citrininu v potravinách. (1)

O významu mykotoxinů svědčí i hlášení v systému rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF: Rapid Alert System for Food and Feed). Systém RASFF slouží pro ohlašování rizikových potravin a krmiv za účelem zamezení jejich uvádění do oběhu nebo za účelem jejich stažení ze společného evropského trhu. Kvůli mykotoxinům to je v posledních letech přibližně 50 % surovin a potravin. (2)

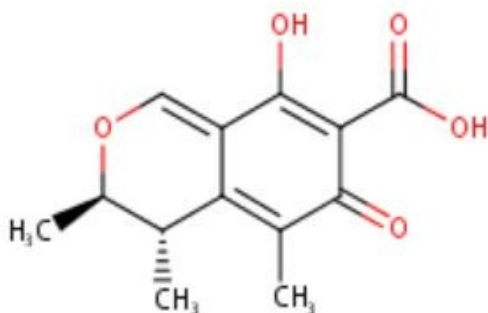
Tabulka 1: Maximální limity koncentrací některých mykotoxinů v jídle (3)

Mykotoxin	Stát	Maximální limit	Jídlo
		($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ nebo $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	
Aflatoxin B1	Belgie	5	Všechno
Aflatoxin B1+G1	Brazílie	30	Všechno
	Belgie	5	Ořechy
Aflatoxin B1+B2+G1+G2	Brazílie	20	Zvířecí krmivo
	Francie	10	Všechno
	USA	20	Všechno
	Belgie	0,05	Mléko
Aflatoxin M1	Francie	0,03	Mléko
	Rusko	0,5	Mléko
	USA	0,5	Mléko
Deoxynivalenol	Rusko	1000	Obiloviny
Ochratoxin A	Dánsko	5	Obiloviny
	Francie	5	Krmivo pro prasata
Zearalone	Francie	200	Obiloviny a rostlinné oleje
	Rusko	1000	Obiloviny a rostlinné oleje
Toxin T2	Rusko	100	Všechno

4.2. Citrinin

Citrinin, též nazývaný monascidin A či antimycin je toxický sekundární produkt houbového metabolismu tvořený rody plísní *Penicillium*, *Aspergillus* a *Monascus*. Tyto plísně můžeme nalézt na jídle, hlavně v cereáliích, výrobcích z obilovin a na některých druzích ovoce. (4) Prvně byl izolován z kultury *Penicillium citrinum* v roce 1931 Hetheringtonem a Raistrickem, kdy se vyskytoval na rýži a byl spojován s onemocněním žluté rýže v Japonsku, odtud někdy také nazývaný "yellow rice" toxin. (1, 5)

Obrázek 1: Strukturální vzorec citrininu



4.2.1. Struktura a fyzikální vlastnosti

Citrinin krystalizuje jako citronově-žlutá látka bez zápachu, lipofilní a tepelně nestabilní tající při teplotě tání okolo 175°C za sucha, ale při přítomnosti vody se teplota sníží na 140°C z důvodu nestability ve vodném prostředí. (1) Je nerozpustný ve vodě, ale velmi dobře rozpustný v ředěných roztocích hydroxidu sodného, uhličitanu sodného nebo octanu sodného, dále v methanolu, acetonitrilu, ethanolu a v mnoha dalších polárních organických rozpouštědlech. (6)

Jedná se o relativně malou molekulu se sumárním vzorcem $C_{13}H_{14}O_5$ a s molární hmotností 250,25 g/mol. (7)

Ze strukturního vzorce zjistíme, že se jedná o ketokarboxylovou kyselinu, která obsahuje konjugovaný planární řetězec a díky tomu je tato látka schopná fluorescence jak v roztoku, tak i v pevném skupenství. (8)

4.2.2. Producenti citrininu

Mezi hlavní producenty citrininu patří rody *Penicillium* a *Aspergillus*. Nejdůležitější je druh *P. citrinum*, který byl označen jako původce houbového onemocnění zvané "yellow rice toxikóza" v Japonsku. Další druhy rodu *Penicillium* produkující citrinin jsou *P. fellutanum*, *P. lividum*, *P. implicatum*, *P. jenenii*, *P. citreoviride*, *P. stecki*, *P. expansum* (běžný kontaminant ovoce), *P. velutinum*, *P. canescens*, *P. notatum*, *P. radicola* (běžný kontaminant cibule, mrkve a brambor), *P. viridicatum*, *P. palitans*, *P. claviforme* a některé druhy *P. camembertii* (používá se k výrobě sýrů). *P. verrucosum* je producentem také mykotoxinu ochratoxinu A. (6)

Z rodu *Aspergillus* jsou nejdůležitější druhy *A. terreus*, *A. candidus* a *A. niveus*. Dále byl citrinin detekován v kulturách plísní *Monascus ruber* a *Monascus purpureus*, používaných v potravinářství k tvorbě červených pigmentů. (4)

4.2.3. Mechanismus působení a rozklad

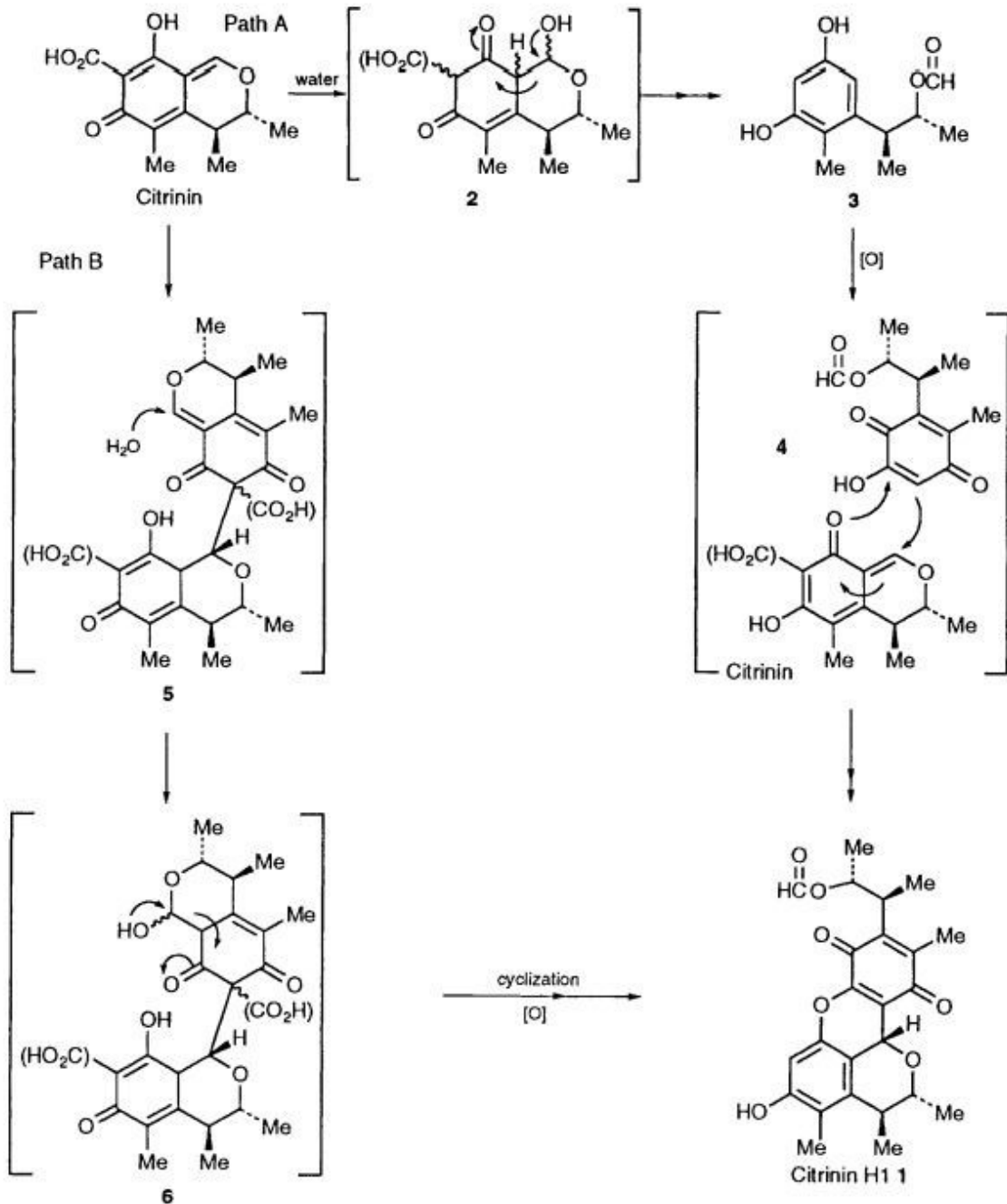
Přesný mechanismus působení není zatím zcela s jistotou popsán, ale i přesto vzniklo několik teorií a výzkumů zabývajících se touto problematikou.

Jeden z výzkumů zjistil, že citrinin působí na buněčné úrovni, když spouští obranný mechanismus buňky. Toxin působí rychle a aktivuje na dávce závislý proces, kde se zapojují stresové promotory GRE2 a SOD2. Přesněji řečeno, spouští expresi antioxidantních kódujících genů a reagující dráhy oxidačního stresu a buňka začne produkovat reaktivní formy kyslíku, které pak na tělo působí toxicky. (9)

Další výzkumy zkoumaly účinky citrininu z jiného hlediska a popsaly, že toxin se akumuluje v mitochondriích jater a ledvin. Dále narušuje tok Ca^{2+} v mitochondriích a transport přes permeabilní membránu, také může inhibovat syntézu DNA a RNA v buňce nebo indukovat apoptózu tak, že stimuluje uvolnění cytochromu c a poté aktivuje multiple kaspázy. (10, 11)

Citrinin se rozkládá při teplotě 175°C, při které se v bezvodém prostředí zároveň i detoxikuje. Pokud se ale citrinin objeví v prostředí obsahující vodu, už při hodnotě 140°C se rozloží na citrinin H1 a na citrinin H2. První jmenovaná struktura je dokonce více toxická, než původní látka. Citrinin H1 vzniká reakcí dvou původních molekul. (12)

Obrázek 2: Reakce vzniku citrininu H1 (12)



4.2.4. Toxikologie a účinky na lidské zdraví

Hlavním cílovým orgánem jsou pro citrinin ledviny, tam probíhá jeho eliminace a proto je ze 75 % vylučován právě močí. Citrinin narušuje propustnost membrány proximálního tubulu a tím ovlivňuje transport vápenných iontů. Tyto účinky mají za následek vznik adenomů, histopatologických změn, nekrózu renálního tubulu a při vysokých dávkách mohou způsobit i smrt.

Další orgány působení jsou játra a kostní dřeň. Akutní toxicita se může projevit dyspnoí, akutní myokarditidou nebo poklesem krevního tlaku.

Další vlivy na lidské zdraví, které zatím nebyly zcela prokázány, ale považují se za velmi pravděpodobné jsou hlavně účinky genotoxické (poškozují genetický materiál), mutagenní (způsobují změnu v genetické informaci a pokud je postižena zárodečná buňka, může být postižen celý jedinec; pokud je poškozena somatická buňka, může dojít ke zhoubnému bujení) a teratogenní (poškozují plod). (1)

Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) zařadila citrinin do třetí skupiny karcinogenů, tedy neklasifikovaný. Do dneška neměl žádný z provedených výzkumů průkazné výsledky, a proto se nedá karcinogenita s jistotou potvrdit.

Při studiích současného výskytu citrininu a ochratoxinu A bylo zjištěno, že se jejich toxické účinky sčítají a doplňují a tím se ještě zvyšuje jejich nefrotoxicita. (13)

Citrinin nemá jen negativní vlastnosti. Byly prokázány antibiotické účinky na grampozitivní bakterie, kterých bylo dříve i hojně využíváno, ale vzhledem k vážné nefrotoxicitě bylo od tohoto využití toxinu upuštěno. (1)

4.2.5. Testy toxicity na zvířatech

Při výzkumu v roce 1977 byly po dobu dvou týdnů dávány dvě různé dávky citrininu (5 mg/kg těl. hm. a 10 mg/kg těl. hm.) injekcí do pobřišnice psům. Nejvyšší dávky byly smrtelné již mezi 7. až 11. dnem. Nižší dávky způsobily zánět pobřišnice. Při histopatologickém vyšetření byly v tělech nalezeny tubulární degenerace, rozpad jader buněk a nekrózy tkání. (14, 15, 16)

Další test podává zprávu o vlivu citrininu, nefrotoxického mykotoxinu, na ledviny. Samci krys typu F344 byli krmeni 0,1% citrininem v potravě po dobu 80 týdnů. První nádor byl objeven v kryse, která zahynula již v 52. týdnu. Po uplynutí 80 týdnů histopatologie zbylých krys objevila adenomy v 35 ze 48 krys, které přežily (72,9%). V kontrolní skupině nebylo nalezeno žádné poškození ledvin. (17)

Během testu, kdy myši dostávaly 6 týdnů injekce ochratoxinu A (5 mg/kg) a citrininu (20 mg/kg) byly studovány hematologické hodnoty: sedimentace erythrocytů, hematokrit v procentech, počet červených krvinek, počet krevních destiček, celkový počet buněk kostní dřeně, počet buněk ve slezině, hmotnost sleziny a koncentrace vápníku v séru. Při aplikaci mykotoxinů došlo k výraznému poklesu počtu krevních destiček a hematokritu. Naopak byla zvýšena sedimentace erythrocytů

a i počet červených krvinek. Hmotnost sleziny a počet buněk ve slezině se během podávání toxinů prudce snížila, stejně jako hodnoty u buněk kostní dřeně. Velké snížení bylo také zaznamenáno v koncentraci vápníku v krevním séru myši. Tento test prokázal negativní vliv na kostní dřeň a následnou krvetvorbu. (18)

Připravený roztok citrininu byl podáván perorálně ve dvou studiích. V prvním případě 7 dnů starým samcům krůt a v druhém případě samcům bílých pekingských kachňat. Koncentrace dávky LD₅₀ byla pro krůty spočítána na 56 mg/kg a u kachňat na 57 mg/kg. Mykotoxin byl nefrotoxický u obou druhů, ale renální léze byly závažnější u krůt s charakteristickou degenerací a nekrózou renálního tubulárního epitelu. Další poškození bylo u krůt nalezeno v játrech, kde nastala nekróza a hyperplazie žlučových cest. Lymfatická nekróza s deplecí se týkala brzlíku a kloakální burzy u kachňat a krůt. Tyto pozdější léze byly nejvýraznějšími histopatologickými změnami u kachňat. (19)

V další studii byl namíchaný a upravený roztok citrininu jednorázově nebo opakovaně podáván králíkům perorální nebo intraperitoneální cestou. 72hodinová LD₅₀ pro intraperitoneální podání byla 50 mg/kg těl. hm. a 134 mg/kg těl. hm. pro perorální podání. Primárním klinickým příznakem po podání jednorázové perorální dávky při koncentraci citrininu 125-150 mg/kg byl tekutý průjem, který se objevil po 8 hodinách po požití. Patologické změny byly obecně omezeny na ledviny, kde nastala degenerace a nekróza proximálních tubulů. U králíků, kterým se podala dávka citrininu 130 mg/kg byly po 8 hodinách pozorovány histopatologické změny na tubulárních epitelových buňkách, u kterých nastala cytoplazmatická vakuolizace. Po týdenní kontrole králíků, kteří dostávali perorálně opakované dávky toxinu (120 mg/kg) denně po dobu sedmi dní byl nalezen regenerovaný renální tubulární epitel doprovázený mírnými nekrózami tubulárních buněk. Králíci požívající opakované a vícenásobné dávky toxinu (33,5 nebo 77 mg/kg) měli ledviny s mírnou degenerací a nekrózou. (20)

4.2.6. Citrinin v nápojích a potravinách

Jedna z prvních komplexních studií na přítomnost citrininu v potravinách byla provedena v roce 1968 v Kanadě. Vzorčky ze zrn spojené s plicními problémy farmářů byly analyzovány a po vytvoření správné screeningové metody byl zjištěn výskyt mykotoxinu citrininu společně s ochratoxinem A. Následovaly další testy v Evropě, Asii a Africe. (21)

Citrinin byl nalezen v řadě obilovin, včetně rýže, pšenice, ječmene, kukuřice, žita a ovsa. Byl objeven v pšeničných moukách a je prokázáno, že může přežít do jisté míry i ve zpracovaných výrobcích z obilovin. Velmi často je hlášen společný výskyt s ochratoxinem A. Vyskytuje se i v některých fermentovaných potravinách, které jsou náchylné na růst plísní na povrchu, jako jsou sýry a fermentované uzeniny. Existují výzkumy, ve kterých bylo zjištěno, že toxin pronikl dva nebo i více centimetrů do potraviny, která měla na povrchu plíseň. V poslední době byl citrinin nalezen také ve vegetariánském zboží, které bylo barveno barvivy odvozenými od druhu hub *Monascus*. Citrinin byl také nalezen v arašídech a plesnivém ovoci. (4)

Jablka se shnilými skvrnami mohou obsahovat citrinin samostatně, nebo se může vyskytovat společně s patulinem. Toto onemocnění ovoce způsobuje druh *P. expansum* a jablko začíná plesnivět v místě poškození. (21) Stejným způsobem se citrinin dostává do dalších druhů ovoce a zeleniny. Nalezen byl například ještě v hrachu, fazolích, hroznovém vínu, hruškách, třešních, černém rybízu, rajčatech a dalších. Ovoce a zelenina se poté zpracovává na nejrůznější produkty a proto můžeme citrinin nalézt i v přesnídávkách, ovocných a zeleninových džusech, moštech a nápojích.

V roce 2001 byla provedena analýza ovocných (jablko, třešeň, černý rybíz a hrozny) a zeleninových (rajčata) džusů ze skladu v Německu pomocí ELISA testu a stopy citrininu (maximum 0,2 µg/l) lze nalézt ve 4 z 55 vzorků. (22)

Ve Španělsku bylo v roce 2009 testováno 84 vzorků aromatických a/nebo léčivých bylin za použití ELISA testu a bylo zjištěno, že 61% vzorků je kontaminováno citrininem (až 355 µg/kg v listech ginkga). V některých vzorcích byl citrinin společně s ochratoxinem A, aflatoxinem B1, zearalenonem, T-2 toxinem a deoxynivalenolem. (23)

Je pravděpodobné, že výskyt citrininu v potravinách není dostatečně popsán, protože není často hledán a také má tendenci se částečně během analýzy degradovat. (4)

5. Analytická část

5.1. Instrumentální metody stanovení mykotoxinů v nápojích a potravinách

V dnešní moderní době je dostupných již mnoho technicky vyspělých přístrojů, metod a postupů, pomocí kterých je laboratoř schopna stanovit přesné složení a kvalitu léčivých přípravků, potravinových doplňků, chemických látek a sloučenin, analyzovat potraviny a nápoje, zda se v nich nenachází nadměrné množství nežádoucích látek, ale také kontrolovat stav ovzduší, vody a půdy. Vývoj těchto přístrojů a metod jde velice rychle kupředu a stále se vyvíjí další nové možnosti využití a vzájemného spojení přístrojů i metod. Je možné zjistit stále menší množství stopových kontaminantů v odebraných vzorcích a mít přesnější výsledky. Díky tomu jsou tyto nové přístupy nezbytnou a běžnou součástí dnešních biologických a chemických laboratoří.

Nástup intenzivního výzkumu na poli mykotoxinů započal rokem 1960, kdy byly ve Velké Británii objeveny aflatoxiny poté, co způsobily úhyn asi 100 000 kusů vánočních krocanů krmených moučkou z brazilské podzemnice olejně. Není pochyb, že ještě dnes jsou některé mykotoxiny příčinou chorob, utrpení a smrti, zejména v tropických a subtropických rozvojových zemích. A není pochyb o tom, že mykotoxiny se musejí v surovinách a potravinách sledovat, a to nejenom z důvodu globalizace potravinového trhu. (2)

5.1.1. Trendy v analýze mykotoxinů

Analytické metody pro stanovení mykotoxinů se neustále vyvíjejí a zlepšují. V dnešní době je kladen nárok na rychlejší a jednodušší metody, které ale stále zůstanou spolehlivé. Dále na vyšší stupeň automatizace, na levnější a multi-reziduální metody, ve kterých můžeme analyzovat i více hledaných analytů současně, protože ve většině z nich se vyskytuje více toxinů najednou.

Budoucností jsou rychlé screeningové metody, které je možno použít přímo v terénu a jsou levné, rychlé a nenáročné. Sem můžeme zařadit TLC, ELISA, LFD a IR-spektroskopie. Další rozvíjející se technikou je stanovení pomocí biosenzorů. Tyto metody jsou velice selektivní, citlivé a mají velmi široké uplatnění. Avšak vzhledem k citlivosti detekce a zvýšené selektivitě pomocí separačního kroku je největším

trendem v analýze širokého spektra mykotoxinů zejména metoda HPLC (UHPLC) v tandemovém spojení s hmotnostní spektrometrií. Zde je zřejmý signifikantní nárůst těchto UHPLC-MS metod ve využití pro multi-mykotoxinové analýzy. (28)

5.2. Analytické metody potenciálně vhodné pro stanovení citrininu

5.2.1. Spektrofotometrie

Spektrofotometrie v ultrafialové nebo viditelné oblasti světla je optická metoda založená na absorpci elektromagnetického záření (200 až 800 nm) při průchodu zředěnými roztoky molekul. Část paprsku procházející kyvetou se vzorkem se absorbuje a měří se rozdíl intenzity tohoto záření. Při absorpci dochází k excitaci valenčních elektronů, které jsou součástí molekulových orbitalů. Proto molekulová absorpční spektra v ultrafialová a viditelné oblasti jsou svou podstatou elektronová spektra.

Tyto metody se nejčastěji používají jako detektory. Jsou založeny na objevu Lambert-Beerova zákona, který říká, že míra absorbance je přímo úměrná koncentraci měřeného roztoku a tloušťce absorbující vrstvy. (25)

5.2.2. Fluorimetrie

Fluorescence je optická metoda používaná v analytické chemii pro schopnost látek přijmout (absorbovat) energii z primárního záření. Elektrony v molekule přejdou do excitovaného stavu a při přechodu zpět do stabilní polohy o nižší energii jsou schopny přebytečnou energii uvolnit sekundárním zářením. Sekundární záření má tedy menší energii, než záření primární a tedy i delší vlnovou délku. Při měření používáme dvě spektra: excitační spektrum, které zobrazuje intenzitu fluorescence v závislosti na vlnové délce primárního záření a emisní spektrum, které zobrazuje intenzitu fluorescence v závislosti na vlnové délce sekundárního záření při konstantních podmínkách primárního záření.

Pouze omezené množství látek je schopno vykazovat fluorescenční aktivitu. Některé látky můžeme derivatizovat pomocí činidel na intenzivně fluoreskující derivát, a proto je tato metoda nejen citlivá, ale i velmi specifická. (25)

5.2.3. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry - MS) je separační technika, která převádí vzorek na ionizovanou plynnou fázi a vzniklé ionty separuje podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje m/z . Ionty bombardují organickou molekulu o vysoké energii za vzniku iontů nebo jejich fragmentů. Následně jsou ionty rozděleny a je zaznamenána jejich četnost a druh.

Přístroj se skládá za tři částí. První je iontový zdroj, kde dochází k převedení neutrálních molekul na nabitě částice. Následuje hmotnostní analyzátor, ve kterém se vzniklé ionty rozdělují v plynné fázi za vysokého vakua podle m/z poměru a poslední částí je detektor, kde probíhá detekce separovaných iontů a určení jejich relativní intenzity.

Tento způsob detekce má vysokou citlivost a přesnost této metody pomáhá získat mnoho specifických údajů o látce. Látku dokážeme nejen identifikovat, ale i zjistit její molekulovou hmotnost a někdy i přesnou strukturu. Dnes můžeme využít i tandemového zapojení, tedy MS/MS pro detekci neznámých látek. První reakce generuje ionty, z nichž se separuje požadovaný iont, ten se podrobí další reakci a z něj vzniklé ionty jsou analyzovány. (25)

5.2.4. Nukleární magnetická rezonance

Nukleární magnetická rezonance je fyzikálně-chemická metoda. Atomová jádra některých prvků mají magnetický moment a ve vnějším magnetickém poli se orientují do poloh, kterým odpovídají určité energetické hladiny. Absorpcí elektromagnetického záření v oblasti krátkých rádiových vln dochází k přechodu jádra na vyšší energetické hladiny. Atomy s nenulovým spinovým kvantovým číslem umístěné v magnetickém poli absorbují a opětovně vyzařují elektromagnetické záření. Zmagnetizovaná atomová jádra převedeme do detekční cívky, na které vznikne napětí, které se měří ve formě doznívající indukce.

V dnešní době můžeme tuto metody využít v medicíně pro zobrazení nejrůznějších částí těla s velmi vysokým rozlišením a pomocí počítače vytvořit dvou- až třírozměrné obrazy struktur lidského těla. Dále se tato metoda používá ve farmacii k analýze léčiv.

5.2.5. Elektroforetické metody

Elektromigrační metody patří mezi separační metody. Fungují na dvou základních elektrokinetických jevech: elektroosmóze a elektroforéze. Mezi roztokem, obsahující elektricky nabitě částice a povrchem, s kterým je roztok ve styku (kapilára), vznikají elektrické dvojvrstvy. Do tohoto rovnovážného prostředí připojíme stejnosměrné elektrické pole, které tuto rovnováhu poruší a vyvolá pohyb. Principem separace složek vzorku je rozdílná rychlost jejich migrace, neboť nabitě částice různých složek se v určitém prostředí liší svou elektroforetickou pohyblivostí.

Nejrozšířenějšími elektromigračními metodami jsou kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis - CE), její podtyp kapilární zónová elektroforéza (Capillary Zone Electrophoresis - CZE), micelární elektrokinetická chromatografie, gelová elektroforéza, isotachoforéza, isoelektrická fokusace a kapilární elektrochromatografie.

Kapilární zónová elektroforéza je separace založená na rozdílech v náboji analytu a provádí se jako volná elektroforéza bez nosiče v tenké kapiláře za konstantního napětí. V této metodě lze separovat kationty i anionty zároveň.

Micelární elektrokinetická chromatografie se používá k separaci neutrálních sloučenin na základě rozdílného rozdělovacího koeficientu mezi vodní fází a micelami a využívá povrchové aktivity micel (tzv. pseudostacionární fáze).

Kapilární gelová elektroforéza používá kapiláry naplněné gelem poskytující molekulově-síťového efektu rozpuštěných látek v prostředí gelu, kde se látky rozdělí podle svých velikostí.

Kapilární isoelektrická fokusace probíhá v kapiláře, kde je vytvořen gradient pH. Tato metoda slouží k separaci amfolytů na základě rozdílů v jejich izoelektrických bodech.

Kapilární elektrochromatografie (CEC) využívá k pohybu mobilní fáze elektroosmotického toku a separace nastává na silikagelu jako stacionární fázi. Separační selektivita v CEC je kombinací HPLC a CE metody.

Izotachoforéza je technika specifická přítomností ostrých zónových rozhraní oddělujících separované zóny jednotlivých složek vzorku, které migrují za sebou stejnou rychlostí. Při jedné separaci můžeme oddělovat buď jenom anionty, nebo jen anionty. (25)

Elektroforéza nachází široké uplatnění ve výzkumu i v praxi mnoha oblastí chemie, biochemie, molekulární biologie, biotechnologie, klinické chemie, zemědělství, v chemickém, farmaceutickém a potravinářském průmyslu.

Modernizací těchto technik je spojování elektroforézy s chromatografií, další vysoce separační metodou. Díky tomu vznikají metody, které jsou pro své vysoké separační schopnosti elektroforézy a vysokou citlivost a specifčnost chromatografie považovány za nejúčinnější a nejperspektivnější analytické separační metody. (26)

5.2.6. Chromatografické metody

Jednou z nejrozšířenějších analytických metod je beze sporu chromatografie, umožňující účinnou separaci látek pro spolehlivou identifikaci a kvantifikaci složek zkoumaného vzorku. Chromatografie se velmi široce uplatňuje ve všech vědeckých odvětvích včetně analýzy potravin. Tato metoda využívá mnohokrát opakované ustanovení rovnováhy mezi dvěma nemísitelnými fázemi.

V chromatografii se vzorek vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární fáze (SF) je nepohyblivá a mobilní fáze (MF) je pohyblivá. Vzorek se umístí na začátek SF a pohybem mobilní fáze je unášen. Složky vzorku interagují se stacionární fází a proto se při pohybu zdržují. Více se zdržují složky, které jsou ve SF vázány silněji, tím se postupně od sebe složky separují a na konec nepohyblivé fáze se dostávají složky méně zadržované.

Nejjednodušší chromatografickou metodou je papírová chromatografie (PC). Základním mechanismem je rozdělovací rovnováha mezi použitou mobilní fází a vodou či jiným rozpouštědlem, které představuje stacionární fází zakotvenou na papíře.

Další jednoduchou metodou je tenkovrstvá chromatografie (TLC). Stacionární fází může být silikagel, oxid hlinitý nebo celulóza ukotvená na podložním materiálu ze skla nebo hliníkové fólie. Mobilní fází jsou většinou polární rozpouštědla, která vzlínají v chromatografické vaně nasycené parami MF a unáší vzorek ze startovací linie. Vzorek je unášen tím rychleji, čím méně je poután na stacionární fází a čím lépe je rozpustný v mobilní fází. Pokud složky nejsou tvořeny barevnými látkami, provede se jejich zviditelnění buď chemickou reakcí pomocí postřiku, nebo pomocí fluorescence. V závislosti na délce dráhy můžeme zjistit i koncentraci vzorku pomocí koncentrační řady.

Tenkovrstvá i papírová chromatografie jsou ekonomicky i přístrojově nenáročné techniky, velmi rychlé a univerzální, a proto se používají pro první orientaci ve složení neznámého vzorku.

Mnohem dokonalejší a nejčastěji používanou metodou k analýze pevných a kapalných netěkavých látek je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC - High performance liquid chromatography), při které dochází k oddělení složek analyzované směsi na koloně naplněné sorbentem. Stacionární fáze je většinou založena na bázi silikagelu, který tvoří mikročástice o velikosti i menší než 5 μm . Dalšími možnostmi jsou SF na bázi oxidu hlinitého, oxidu zirkoničitého nebo monolitické kolony. Mobilní fáze je polární či nepolární kapalina. Při putování vzorku kolonou také dochází k ustanovování rovnováhy na základě různých interakcí.

Nejvíce používaný typ je kapalinová chromatografie na reverzní (obrácené) fázi (RP). Stacionární fáze je tvořena dlouhými nepolárními uhlíkatými řetězci silikagelu (C18 - oktadecylsilikagel) a jako mobilní fáze se používá polární kapalina: voda, methanol, acetonitril a jejich směsi v různých poměrech.

Plynová chromatografie (GC) se od kapalinové liší skupenstvím mobilní fáze, kterou je inertní plyn, nejčastěji helium a dusík. GC se používá pro separaci těkavých vzorků nebo vzorků, které lze lehce převést na plyn. Praktické využití má plynová chromatografie hlavně v analýze potravin, kontrole životního prostředí a farmaceutickém průmyslu.

Po separaci vzorku v kolonách, v HPLC dlouhých 5-30 cm a v GC 1-100 m, je na konec kolony připojen detektor pro konečnou detekci látek ve vzorku. Mezi nejčastější detektory v HPLC patří UV-VIS detektory pro svou univerzálnost a citlivost, DAD, FD a nespécifičtější hmotnostní detektor. (25)

5.2.7. Imunologické metody (ELISA)

ELISA test (enzyme-linked immunosorbent assay) je analytická metoda využívající enzym ke značení antigenu nebo protilátky a tím následně ke značení celého imunokomplexu pomocí vysoce specifické interakce protilátky s antigenem. Navázání enzymu se pak znázorní reakcí se substrátem za vzniku barevného produktu. Výsledná detekce je podle druhu substrátu pro daný enzym fotometrická (např. ELISA), fluorometrická (FEIA) nebo luminometrická (LEIA). Tato technika se používá pro

detekci i kvantifikaci malých množství látek, jako jsou peptidy, protilátky, antigeny, cytokiny, hormony a nádorové markery. (27)

5.3. Možnosti stanovení citrininu

5.3.1. Současné stanovení citrininu a ochratoxinu A v sýru pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí časově rozlišenou luminiscencí za použití terbia

Byla navržena metoda RP-HPLC pro současné stanovení dvou mykotoxinů: citrininu a ochratoxinu A v měkkých sýrech.

Oba mykotoxiny se elují na C18 reverzní fázi za použití isokratické mobilní fáze tvořené směsí methanolu a vody v poměru 7:3 s přídavkem hydroxidu tetrabutylamonného. Tato směs byla okyselená na pH 5,5 kyselinou chlorovodíkovou a byla čerpána rychlostí 0,8 ml/min do chromatografické kolony. Před detekcí byl přidán butanolický roztok s příměsí 5×10^{-3} M terbia, 5×10^{-4} M trioktylfosfin oxidu (TOPO) a $2,5 \times 10^{-2}$ M triethylaminu (TEA). Tento směsný roztok byl čerpán rychlostí 0,2 ml/min a byla prováděna detekce časově rozlišenou luminiscencí (TLR) za využití post-kolonové derivatizace a vzniku chelátů terbia ($\lambda_{\text{ex}} = 331 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 545 \text{ nm}$).

Tato metoda má lineární rozmezí od $3,5 \times 10^{-6}$ až 2×10^{-5} M pro citrinin a od 1×10^{-5} až 5×10^{-5} M pro ochratoxin A. Limit detekce byl pro citrinin 2×10^{-6} M a pro ochratoxin A 3×10^{-6} M. Navrhovaným způsobem lze snadno stanovit ochratoxin A a citrinin v měkkých sýrech s vyšší selektivitou, ve srovnání s přímou fluorescenční detekcí. (29)

5.3.2. Rychlé semi-kvantitativní stanovení citrininu v plísňových kulturách izolovaných ze sýrů a sýrových továren

Pro účely testování produkce citrininu v plísňových kulturách byla vyvinuta nová a rychlá semi-kvantitativní metoda.

Chemická struktura citrininu dává přirozeně slabý fluorofor. Tato fluorescence může být výrazně zesílena okyselením prostředí. Byla stanovena křivka standardní koncentrace kyseliny chlorovodíkové potřebné pro zobrazení žlutého fluorescenčního

signálu pro různé koncentrace citrininu. Dva kmeny rodu *Penicillium* ze Španělské národní sbírky typových kultur byly studovány na produkci citrininu na YES živném médiu při teplotě 25°C po dobu 21 dní. Po celou dobu inkubace bylo médium kontrolováno na přítomnost toxinu a kvantifikace citrininu po přidání HCl. Potvrzení kvantifikace bylo provedeno pomocí RP-HPLC.

Experiment ukázal, že minimální doba inkubace je 5 dní pro průkazný výskyt citrininu v kultivačním médiu. (30)

5.3.3. Rychlé stanovení citrininu v kukuřici kapalinovou chromatografií s fluorescencí a enzymovým imunostanovením

Pro stanovení citrininu v kukuřici byl vyvinut rychlý test s použitím extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE).

Mletá kukuřice byla extrahována pomocí methylenchloridu a 0,5 M kyseliny fosforečné. Extrakt se přidá do nádoby s absorbentem napuštěným roztokem hydrogenuhličitanu sodného. Po odsátí do sucha byl obsah nádoby eluován směsí methanolu a vody a podíly byly odebrány pro kvantifikaci RP-HPLC s fluorescenční detekcí. Při enzymovém imunostanovení byl k extraci použit také roztok uhličitanu sodného.

Výtěžnost při kapalinové chromatografii byla v rozmezí 71,2-86,3 % s odchylkou 4,1-10,6 % a při enzymovém imunostanovení byla výtěžnost v rozmezí 53,2-67,2 % s odchylkou 18,4-51,5 %. Kapalinová extrakce (LLE) měla výhody v nízké spotřebě rozpouštědla, v rychlosti a v možnosti automatizace. (31)

5.3.4. Společný výskyt ochratoxinu A a citrininu u obilovin z bulharské vesnice s historií balkánské endemické nefropatie (BEN)

Vzorky obilovin byly shromážděny v roce 1998 z bulharské vesnice, kde byla nákaza (BEN) zaznamenána a z míst, kde nákaza nalezena nebyla. Odběr vzorků zahrnoval pšenici, kukuřici, ječmen, oves a pšeničné otruby.

Analýza ochratoxinu A a citrininu byla provedena enzymovými imunotesty (EIA) s limitem detekce 0,5 a 5 ng/g. Pozitivní výsledky na mykotoxiny byly potvrzeny pomocí HPLC s fluorescenčním detektorem po extrakci v imunoafinitní koloně.

Největší výskyt toxinů byl nalezen v pšenici, pšeničných otrubách a ovsu. Nejvyšší koncentrace ochratoxinu A byla až 140 ng/g a citrininu 420 ng/g ve vzorcích

z míst, kde byla BEN nákaza zaznamenána. Hladiny citrininu ve vzorcích byly 2 - 200x vyšší než hladiny ochratoxinu A. (32)

5.3.5. Jednoduché a citlivé stanovení citrininu v druhu *Monascus* pomocí GC s hmotnostní spektrometrií

Byla vyvinuta nová metoda pro kvantitativní a kvalitativní stanovení citrininu v druhu *Monascus* pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Druh *Monascus* se přirozeně vyskytuje v červené fermentované rýži, které dává jedinečné zabarvení.

GC separace citrininu ze vzorku bylo dosaženo bez potřeby chemické derivatizace a v chromatogramu může být lehce identifikován, pokud je správně nastavená fragmentace: m/z 220, 205, 177, 105 a 95. Citrinin vykazoval retenční čas 10,89 minuty a vzorek byl porovnáván se standardem. Kvantitativní limit detekce citrininu byl 1 mg/kg. (33)

5.3.6. Detekce citrininu ve výrobcích obsahujících ochratoxin A novou HPLC metodou

Byla vyvinuta a ověřena nová metoda pro stanovení citrininu na základě extrakce na pevné fázi s polyamidovou kolonou a HPLC s fluorescenčním detektorem.

Touto metodou byly získány přesné výsledky s variačním koeficientem nižším než 10 %. Výtěžnost se pohybuje v rozmezí 74-90 %. Detekční limity byly stanoveny na 1 pg/kg pro pšenici, žito, ječmen, kukuřici a oves.

Analýza několika vzorků s ochratoxinem A ukázala, že je přítomen i citrinin ve fazolích, obilovinách, kakaových bobech a rozinkách. Citrinin byl detekován ve 14 vzorcích obsahujících i ochratoxin A v koncentracích 1-8 pg/kg. (34)

5.3.7. Analýza vybraných cereálií na francouzském trhu pro jejich obsah ochratoxinu A, citrininu a fumonisinu B1: Vývoj metody pro souběžnou extrakci ochratoxinu A a citrininu

Plodiny používané pro výrobu snídaňových cereálií mohou být kontaminovány mykotoxiny, které jsou schopny přežít až do konečného produktu. V této práci bylo

testováno čtyřicet pět snídaňových cereálií, které byly nakoupeny ve francouzských supermarketech.

Pomocí nové metody založené na extrakci rozpouštědlem byly současně extrahovány ochratoxin A a citrinin. Výtěžnost byla vyšší jak 80% pro citrinin i ochratoxin A. Fumonisin B1 byl analyzován podle IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) metody a hodnoty výtěžnosti byly v rozmezí 50% až 70% v závislosti na matrici. Ke ztrátám docházelo během kroku čištění na imunoafinitní kolonce. Všechny tři mykotoxiny byly po extrakci separovány na reverzní stacionární fázi HPLC s fluorescenčním detektorem o různých vlnových délkách.

Ochratoxin A byl zjištěn u 69 % vzorků, kde 20 % z nich bylo nad hranicí limitů EU (3 µg/kg). Dvacet procent vzorků obsahovalo citrinin v koncentracích 1,5 - 42 µg/kg a fumonisin B1 byl detekován nejen v kukuřičných cereáliích, ale také ve výrobcích obsahujících oves a rýži v celkových koncentracích 1 - 1110 µg/kg. Některé vzorky byly kontaminovány všemi třemi mykotoxiny zároveň. (35)

5.3.8. Studie kapilární elektroforézy pro stanovení citrininu v plesnivých potravinách

Tato metoda byla navržena pro stanovení citrininu za použití kapilární elektroforézy. Byly zkoumány účinky některých důležitých faktorů na separaci citrininu: koncentrace ethanolu, hodnota pH, hodnota vloženého napětí a čas probíhající analýzy.

Vzorek citrininu byl separován od matrice plesnivého chleba v celkovém času analýzy 9 minut v 10 mmol/l NaH₂PO₃ a 10 mmol/l Na₂B₄O₇ v neutrálním prostředí (pH 7) a jako extrakční činidlo byl použit 10% ethanol. Napětí procházející systémem bylo při spuštění elektroforézy naměřeno 15 kV.

Relativní standardní odchylky byly více než 0,13% pro migrační čas citrininu a 1,6 % pro plochy píku citrininu. Lineární vztah mezi koncentrací a plochou píku vycházel s korelačním koeficientem 0,9969.

Tato jednoduchá a přesná metoda měla výhody v menší spotřebě činidla a ve vysoké separační účinnosti. (36)

5.3.9. Stanovení citrininu ve vzorcích rýže za použití mikrokapalinového elektrochemického imunosenzoru

Vývoj elektrochemického imunosenzoru začleněného do mikrotekuté cely pro kvantifikaci citrininu ve vzorcích rýže byl popsán poprvé právě v této studii.

Citrinin přítomný ve vzorcích rýže byl elektrolyticky upoután na elektrodu ze skelného uhlíku. Ta byla pokovována vrstvičkou ze zlata a modifikována pomocí cysteaminu a tím byla vytvořena monovrstva, která mohla vázat monoklonální myši anti-citrinin IgG protilátky přítomné v roztoku. Pak byl přidán přebytek králičí anti-myši IgG značené křenovou peroxidázou, který reaguje s protilátkou a vzniká imunokomplex s upoutaným citrininem na povrchu elektrody. Křenová peroxidáza za přítomnosti peroxidu vodíku katalyzuje oxidaci katecholu, který je zpátky elektrochemicky redukován na skelné elektrodě s amperometrickým měřením. Měřený proud je úměrný k enzymatické aktivitě a nepřímo úměrný k množství přítomného citrininu ve vzorcích rýže.

Tento imunosenzor pro citrinin ukázal rozsah stanovení mezi 0,5 až 50 ng/ml. Limit detekce byl určen na 0,1 ng/ml, limit kvantifikace na 0,5 ng/ml a variační koeficient byl nižší než 6 %. Elektrochemická detekce může být provedena během dvou minut a celková doba testu se pohybuje okolo 45 minut. Imunosenzor je schopný provést až 80 měření pro různé vzorky s minimální předchozí úpravou. Použitý senzor vykazoval vyšší citlivost a snížení doby analýzy ve srovnání s jinými analytickými metodami, například s chromatografií. Tato metoda byla velmi selektivní a velmi citlivá a imunosenzor se ukázal jako užitečný nástroj ke stanovení citrininu ve vzorcích obilovin. (37)

5.3.10. Validovaná RP-HPLC metoda pro stanovení citrininu v Xuezhikang kapslích a dalších fermentovaných výrobcích rodu *Monascus*

Přítomnost citrininu v Xuezhikang kapslích je sledována díky jejich složení, které obsahuje *Monascus* fermentovanou červenou rýži.

Rychlá a citlivá metoda HPLC s reverzní stacionární fází (RP-HPLC) a s fluorescenční detekcí při $\lambda_{ex} = 331$ nm a $\lambda_{em} = 500$ nm byla vyvinuta pro analýzu citrininu ve fermentovaných výrobcích rodu *Monascus*. Vzorek byl homogenizován, extrahován a poté rozpuštěn v 10 ml směsi toluenu-ethylacetátu-kys. mravenčí. Mobilní

fáze použitá při chromatografii obsahovala okyselenou vodu a acetonitril. Linearita kalibrační křivky byla stanovena v rozsahu koncentrací 0,0107 - 0,537 µg/ml s korelačním koeficientem vyšším než 0,999. Dále byla stanovena mez detekce (LOD) na 0,187 ng/ml a mez kvantifikace (LOQ) na 0,6 ng/ml.

Analýza kapslí a dalších fermentovaných výrobků ukázala, že vzorek neobsahuje detekovatelné množství citrininu a tento test byl potvrzen nezávislou analýzou LC-MS/MS. Tato metoda pak byla použita pro testování 11 vzorků jiných fermentovaných výrobků a v 7 z 11 vzorků bylo nalezeno vyšší množství citrininu v koncentracích 0,10 - 0,594 ng/ml. Tímto testem bylo prokázáno, že tato metoda může být použita pro další testování fermentovaných výrobků rodu *Monascus*.(38)

5.3.11. Stanovení citrininu v červené ryži pomocí mikrokuliček na základě imunoanalýzy a průtokové cytometrie

V praxi tato metoda pomáhala přesně stanovit citrinin v reálném čase ve vzorcích červené rýže.

V této metodě se chemicky modifikované mikrokuličky karboxylovou skupinou konjugují s antigenem: citrinin-ovalbuminem, a poté tento antigen soutěží s citrininem na povrchu mikrokuliček o anti-citrinin protilátku.

Za optimálních podmínek byla hodnota inhibiční koncentrace $IC_{50} = 1,0$ ng/ml a limit detekce dosáhl 0,005 ng/ml. Chyba měření vykazovala nízký variační koeficient v intervalu 5,24 - 8,16 % a průměrná výtěžnost citrininu z uměle kontaminované rýže byla od 89 % do 94 %.

Experimentální data ukázala, že přesnost a citlivost vyvinuté metody pro stanovení citrininu byly uspokojivé. (38)

5.3.12. Přirozený výskyt citrininu v tradičním čínském jídle, léčivých rostlinách a dalších podobných výrobcích

Výzkum, který by sledoval výskyt citrininu v čínské červené rýži a zároveň i v léčivých rostlinách a jiných podobných výrobcích byl proveden v této práci poprvé.

Vzorky byly extrahovány roztokem methanol/voda, a poté přečištěny na imunoafinitní kolonce a kvantifikovány na HPLC s fluorescenční detekcí. Průměrná výtěžnost dosahovala od 73,4 % do 92,5 % podle druhu matrice a variační koeficienty byly 1,4-7,9 %. Limit detekce byl stanoven na 0,8 µg/kg.

Z celkového počtu 109 analyzovaných vzorků ve velké míře konzumovaných potravin byl citrinin detekován u 31 vzorků (28 %) v rozsahu koncentrací od 16,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ do 5253 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Pozitivní vzorky byly ještě potvrzeny kontrolní analýzou na přístroji LC-ESI-MS/MS. (40)

5.3.13. Přirozený výskyt aflatoxinu B1, ochratoxinu A a citrininu v chorvatských fermentovaných masných výrobcích

Jsou-li domácí zvířata vystavena mykotoxinům, mohou být tyto toxiny přeneseny do produkce těchto domácích zvířat: do mléka, vajec a masa. Tato studie byla provedena za účelem zjištění možného výskytu aflatoxinu B1, ochratoxinu A a citrininu v klobásách, polosuchých salámech a za sucha fermentovaných masných výrobcích. Vzorky byly shromážděny namátkově od jednotlivých výrobců na chorvatském trhu.

Aflatoxin B1 a ochratoxin A byly kvantifikovány pomocí ELISA metody, zatímco citrinin za použití metody HPLC s fluorescenční detekcí. Z 90 vzorků byly mykotoxiny nalezeny nejčastěji v za sucha fermentovaných výrobcích a konečné výsledky prokázaly výskyt aflatoxinu B1 v 10 %, ochratoxinu A v 64 % a citrininu v 4 % výrobcích. Koncentrace ve všech pozitivních vzorcích byly nízké. (41)

5.3.14. Vývoj amperometrického biosenzoru na bázi peroxidázy pro kvantifikaci citrininu ve vzorcích rýže

Použití amperometrického biosenzoru současně s křenovou peroxidázou pro stanovení obsahu citrininu ve vzorcích rýže bylo takto navrženo poprvé.

Metoda využívá spojené uhlíkové elektrody naplněné vícecestnými uhlíkovými nanotrubicemi. Ty jsou naplněny minerálním olejem složeným z křenové peroxidázy a ferrocenu, tvořící redoxní materiál. Biosenzor je pokryt dialyzační membránou, která je upevněna ke straně elektrody.

Reprodukovatelnost metody vykazovala 7,0 % odchylku a opakovatelnost byla 3,0 %. Kalibrační křivka byla lineární v rozmezí od 1 do 11,6 nM. Limit detekce byl 0,25 nM a limit kvantifikace byl 0,75 nM. Pro srovnání byl obsah citrininu měřen také fluorimetricky a výsledky elektrochemické a spektrofotometrické metody byly srovnatelné. (42)

5.3.15. Současné stanovení lovastatinu a citrininu v doplňcích z červené rýže micelární elektrokinetickou kapilární chromatografií

Přesná, jednoduchá a rychlá metoda micelární elektrokinetické kapilární chromatografie byla vyvinuta pro současné stanovení lovastatinu, lovastatinu - hydroxykyseliny a citrininu v produktech z červené rýže.

Separace bylo dosaženo v rámci pouhých dvou minut s použitím 20 mM fosfátového pufru při pH 7,0 a 30 mM dodecylsulfátu sodného při napětí 25kV. Zvýšení citlivosti metody pro detekci citrininu bylo dosaženo pomocí rozšíření průsvitu kapiláry.

Výsledky ukázaly, že obsah lovastatinu laktonu a jeho hydroxykyseliny je ve vzorcích velice rozdílný a je potřeba tuto oblast monitorovat. (43)

5.3.16. Vysoce citlivá imunoanalýza k multiplexní detekci mykotoxinů

Nová, citlivá a vysoce výkonná imunoanalýza pro multiplexní testování mykotoxinů byla založená na imobilizovaných syntetických antigenech toxinů navázaných na povrchu tří druhů křemenných mikrokrytalů.

Aflatoxin B1, fumonisin B1 a citrinin, vyskytující se v obilovinách, byly extrahovány a fluorescein isothiokyanát (značená protilátka) byl přidán do centrifugační zkumavky, která obsahovala pozměněné syntetické antigeny na mikrokrystalech křemíku. Fluorescenční signál byl detekován polem fluorescenčního scanneru.

Limit detekce metody byl velmi nízký: 0,5 pg/ml pro aflatoxin B1, 1 pg/ml pro fumonisin B1 a 0,8 pg/ml pro citrinin. Nová metoda poskytovala široký lineární detekční rozsah od 0,001 do 10 ng/ml pro aflatoxin B1 a fumonisin B1 a od 0,001 do 1 ng/ml pro citrinin. Průměrné výtěžnosti vyšly v rozmezí $74,7 \pm 4,0$ % až $127,9 \pm 4,4$ % pro tyto tři mykotoxiny v kukuřici, oříchách a pšenici.

Tato vyvinutá metoda byla použita ke kvantitativnímu stanovení mykotoxinů aflatoxinu B1, fumonisinu B1 a citrininu pro 10 přirozeně kontaminovaných vzorků obilovin a výsledky zjišťovány v souladu s předpisy pro klasický ELISA test. Tento způsob šetří velké množství činidel a urychluje detekční čas. (44)

5.3.17. Souběžná analýza *Alternaria* toxinů a citrininu v rajčatech: optimalizovaná metoda využívající kapalinovou chromatografii s tandemovým hmotnostním spektrometrem

V této studii je popsána nová kvantitativní metoda pro stanovení pěti *Alternaria* toxinů a citrininu v rajčatech a v rajčatové šťávě založená na LC-MS/MS detekci.

Vzorky byly extrahovány v čistém methanolu a následně derivatizovány pomocí 2,4-dinitrofenylhydrazinu pro lepší stanovení tenuazonové kyseliny a ke snížení rozdílů polaritativy zkoumaných sloučenin. Vzorky byly přečištěny na hydrofilních styrenových polymerech při extrakci na pevné fázi (SPE). Chromatografické kolony naplněné různými materiály byly testovány pro separaci toxinů a C18 reverzní fáze vykazovala účinnou separaci všech testovaných analytů.

Validace probíhala na dvou přístrojích LC-MS/MS v jedné laboratoři. Metoda prošla mezinárodními testy s uspokojujivými validačními výsledky a prokázala spolehlivost popsaného postupu. (45)

5.3.18. Detekce citrininu za použití fágového zobrazení anti-idiotypové protilátky s jednou doménou pro napodobení antigenu

Anti-idiotypové protilátky mohou napodobit molekuly antigenů, a proto mohou být alternativou pro konvenční antigeny při imunologických zkouškách.

V této studii byl citrinin vybrán jako cílový analyt a anti-idiotypové protilátky měly sloužit jako náhrada za citrininový haptén. Fágové zobrazení protilátky bylo použito jako signál zesilující nosič v nepřímém kompetitivním fágovém ELISA testu (P-ELISA) pro citlivé stanovení citrininu.

Poloviční inhibiční koncentrace (IC_{50}) v P-ELISA byla 10,9 pg/kg, což je 9x méně, než u konvenčních ELISA testů ($IC_{50} = 102,1$ mg/kg). Výsledky P-ELISA analýzy přirozeně kontaminovaných vzorků byly rovněž v souladu s výsledky získanými pomocí běžného ELISA testu.

U této metody říčí, že navrhovaný P-ELISA test ukazuje potenciální využití fágového zobrazení anti-idiotypové protilátky jako náhradu malých molekul za účelem citlivější detekce analytu (citrininu) při sledování bezpečnosti potravin. (46)

5.3.19. Molekulárně imprintovaný SPR biosenzor pro citlivé stanovení citrininu v červené rýži

Nová a citlivá metoda molekulárně imprintované povrchové plazmonové rezonance (SPR) biosenzoru byla vyvinuta pro selektivní stanovení citrininu v červené rýži.

Pozlacený povrch SPR čipu byl upraven pomocí allyl merkaptanu, a poté byl imprintován citrinin za působení poly(2-hydroxyethyl methakrylát-methakryloyl amidoglutamové kyseliny) (p(HEMA_MAGA)). Na zlatém povrchu modifikovaném allyl merkaptanem se vytvořil povlak. Na nemodifikované a imprintované povrchy byla použita Fourierova transformace infračervené spektroskopie, mikroskopie atomárních sil a měření kontaktních úhlů.

Byl vyhodnocen rozsah linearity: 0,005 - 1,0 ng/ml a limit detekce: 0,0017 ng/ml. Tato metoda SPR biosenzoru byla použita při stanovení citrininu ve vzorcích červené rýže. (47)

5.3.20. Stanovení citrininu v rýži metodou ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí (UHPLC-FL)

Byl vyvinut a validován rychlý, jednoduchý a účinný způsob stanovení citrininu v rýži metodou UHPLC spojený s fluorescenční detekcí. Extrakce citrininu ze vzorků rýže byla provedena smísením vody s acetonitrilem a promytím, aniž by bylo potřeba dalšího přečištění.

Metoda byla validována pro bílou rýži a její použití pro jiné druhy (červené a hnědé rýže) bylo potvrzeno testem výtěžnosti. Za optimálních podmínek byl interval výtěžnosti v rozmezí od 72,5 % do 92,8 % s odchylkou nižší než 7,1 %. Limit detekce byl 1,5 µg/kg a limit kvantifikace byl 5,0 µg/kg. Bylo analyzováno 21 vzorků rýže a ani v jednom z nich nebyla kontaminace vyšší než detekční limit. Tato metoda se ukázala jako velmi jednoduchá a nenáročná. (48)

5.3.21. Stanovení citrininu ve výrobcích z červené fermentované rýže pomocí optimalizované extrakční metody s kapalinovou chromatografií a tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS)

V této studii byly porovnávány metody LC-MS/MS a HPLC s fluorescenční detekcí. Ve vzorcích červené fermentované rýže byl limit detekce 1,0 µg/kg pro LC-MS/MS. Ve srovnání s limitem detekce pro HPLC-FL 250 µg/kg je první použitá metoda mnohem citlivější. I limity kvantifikace pro první metodu 3,0 µg/kg a pro druhou metodu 825 µg/kg jsou velice rozdílné. Byl získán vysoký korelační koeficient ($r=0,999$) a linearita byla v rozsahu od 0,1 až do 100 µg/l pro metodu hmotnostní spektrometrie. Výtěžnosti byly v rozmezí 80,9 % až 106,5 %.

Vyvinutý postup byl aplikován na 12 vzorků komerčních výrobků z červené fermentované rýže a citrinin byl nalezen v 10 z nich v koncentracích od 0,14 do 44,24 mg/kg. Ve srovnání s tradičními kvalitativními i kvantitativními metodami je tato nově vyvinutá metoda LC-MS/MS pro stanovení citrininu mnohem citlivější, přednosti má i v malé spotřebě extrakčního rozpouštědla a v jednoduchém postupu. (49)

5.3.22. Vývoj magnetických molekulárně imprintovaných polymerů pro selektivní dělení: Stanovení citrininu ve vzorcích rýže pomocí kapalinové chromatografie s DAD detekcí

Tato studie se zabývala syntézou nových magnetických molekulárně imprintovaných polymerů (MIP) a jejich aplikací na selektivní extrakci mykotoxinu citrininu ze vzorků potravin.

Tyto polymery byly připraveny Fe₃O₄ nanočásticemi vtištěnými na povrch 2-naftoové kyseliny (2-NA) (templátová molekula) za použití N-3,5-bis(trifluoromethyl)fenyl-N'-4-vinylfenyl močoviny a methakrylamidu jako funkčních monomerů a ethylenglykoldimethakrylátu jako zesilovacího činidla. Tyto polymery byly použity k vytvoření metody extrakce na pevné fázi (m-MISPE) pro selektivní extrakci citrininu ze vzorků rýže před stanovením HPLC s DAD detekcí. Tento způsob zahrnuje i extrakci pomocí ultrazvuku s přidáním roztoku methanol/voda, a následným zakoncentrováním vzorku.

Podmínky extrakce byly optimalizovány a bylo zjištěno, že za optimálních podmínek je výtěžnost 94-98 % s relativní směrodatnou odchylkou menší než 3,4 %. Na

základě výsledků usnadňuje použití metody MIP přesné a účinné stanovení citrininu a může se používat pro selektivní extrakci mykotoxinů ze vzorků rýže. (50)

5.3.23. Studie interakce citrininu s nativními a chemicky pozměněnými cyklodextriny pomocí fluorescenční spektroskopie

V této studii byla zkoumána interakce komplexu citrininu s nativními a chemicky modifikovanými cyklodextriny za použití fluorescenční spektroskopie. Kromě toho byl proveden i molekulární a termodynamický výzkum pro hlubší porozumění chemickým interakcím.

Výsledky ukazují, že methylovaný β -cyklodextrin tvoří s citrininem nejstabilnější komplexy a tyto deriváty vykazují největší nárůst fluorescence oproti původnímu citrininu. Z tohoto výzkumu vyplývá, že některé chemicky modifikované deriváty mají lepší výsledky než nativní deriváty cyklodextrinu a ukazují slibný rozvoj této nové metody pro analýzu potravin. (51)

5.3.24. Citlivé stanovení citrininu založené na molekulárně imprintovaném elektrochemickém senzoru

Tato nová metoda stanovení citrininu je založena na molekulárně imprintovaném voltametričtém senzoru - skelné uhlíkové elektrody.

Skelná uhlíková elektroda je modifikována platinovými nanočásticemi, které jsou zapojené do polyoxomethalátu wolframového ($H_3PW_{12}O_{40}$, POM). Vytvořené povrchy jsou vhodné pro použití rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM), transmisního elektronového mikroskopu (TEM), rentgenové fotoelektronové spektroskopie (XPS) a pro metodu rentgenové difrakce (XRD). Elektropolymerizací 80,0 mM pyrrolu jako monomeru v přítomnosti fosfátového pufru o pH 6,0, který obsahuje 20,0 mM citrininu byla připravena imprintovaná skelná uhlíková elektroda.

Linearita byla vyhodnocena v rozmezí $1,0 \times 10^{-12}$ až $1,0 \times 10^{-10}$ a detekční limit byl určen na $2,0 \times 10^{-13}$ M. Tato metoda byla aplikována na stanovení citrininu ve vzorcích žita, kde byla ověřena stabilita a selektivita voltametričtého senzoru. (52)

5.3.25. Ultrasenzitivní a specifické stanovení citrininu využitím křemíkového senzoru na bázi membrány molekulárně imprintovaných polymerů a trojrozměrných zlatých nanočástic na mezoporézním uhlíku

Měření citrininu je velice obtížné, protože v komerčních potravinách se vyskytuje pouze stopové množství tohoto toxinu.

Nová studie trojrozměrného molekulárně imprintovaného křemenného senzoru pro detekci stopového množství citrininu je založena na elektro-polymeraci o-aminothiofenolu. Ten se naváže na zlaté nanočástice na mezoporézním uhlíku CMK-3 (AuNPs@CMK-3), a tím vznikne upravený funkční povrch zlaté elektrody. Tento povrch působí jako zesilovač signálu, protože zvýší počet míst, kam se může citrinin vázat, a tím i citlivost snímače. Při procesu přípravy snímače křemenných senzorů byl použit transmisní elektronový mikroskop, cyklická voltametrie a elektrochemická impedanční spektroskopie.

Za optimálních podmínek prokázal senzor lineární frekvenční posun na koncentraci citrininu v rozmezí od $6,0 \times 10^{-9}$ až $2,0 \times 10^{-7}$ mol/l s nízkým limitem detekce: $1,8 \times 10^{-9}$ mol/l.

Citlivý senzor vykazoval vynikající selektivní vlastnosti, nízkou interferenci matrice, reprodukovatelnost a dlouhodobou stabilitu. Tato metoda byla úspěšně použita pro analýzu stopového množství citrininu v obilovinách a je vhodná pro další detekci citrininu ve vzorcích potravin. (53)

5.3.26. Plně automatizovaná metoda využívající přímý nástřik a on-line SPE extrakci v HPLC pro analýzu ochratoxinu A a citrininu v českém pivu

Nová rychlá a citlivá metoda je založena na on-line SPE extrakci a na předkoloně s pevným jádrem napojené na HPLC s fluorescenční detekcí. Tato metoda byla vyvinuta pro současnou detekci ochratoxinu A a citrininu ve vzorcích piva.

Přímé vstřikování 100 μ l přefiltrovaného vzorku piva do on-line SPE-HPLC systému umožnilo rychlou a efektivní extrakci vzorku včetně rychlé separace do 6 minut. Zakoncentrování ochratoxinu A a citrinu ze vzorku piva bylo provedeno na RP koloně s C18 řetězcí a s velikostí částic 2,7 μ m. Jako mobilní fáze byla použita směs

methanolu s 0,5% vodným roztokem kyseliny octové o pH 2,8, při rychlosti průtoku 2,0 ml za minutu. Průtokový spínač mezi extrakční kolonou a chromatografickou kolonou byl nastaven na 2 minuty a separace byla provedena na koloně s pevným jádrem s velikostí částic 2,7 μm . Mobilní fází byla směs acetonitrilu s 0,5% vodným roztokem kyseliny octové o pH 2,8. Separace byla provedena pomocí gradientové eluce s rychlostí průtoku 1 ml za minutu a při teplotě 50°C. Fluorescenční excitační a emisní spektra byla nastavena na 335 a 497 nm.

Přesnost metody byla definována průměrnou výtěžností ochratoxinu A a citrininu ze světlého a tmavého piva v rozmezí 98,3-102,1 %. Metoda vykazovala vysokou citlivost z důvodu on-line zakoncentrování. Limit kvantifikace byl stanoven na 10 ng pro ochratoxin A a 20 ng pro citrinin. Zjištěné hodnoty mykotoxinů ve všech vzorcích světlého, tmavého i pšeničného piva byly nižší než limity stanovené Evropskou unií. (54)

5.4. Shrnutí komentovaného přehledu metod

Citrinin je velmi často stanovován souběžně s dalšími mykotoxiny - ochratoxinem A. Nejpoužívanější analytická metoda pro stanovení citrininu je HPLC, různé modifikace ELISA testu a nově také biosenzory, ovšem do popředí se pomalu dostává i LC metoda s tandemově zapojeným hmotnostním spektrometrem. V následující tabulce jsou sepsány souhrnné informace o použitých metodách, detektorech a testovaných matricích související se stanovením citrininu, které byly detailněji uvedeny v rešeršní části práce.

Tabulka 2: Souhrnné informace o dostupných metodách ke stanovení citrininu

Metoda	Analyzovaná látka	Matrice	Detektor	Limit detekce	Zdroj
HPLC	CIT, OTA	Měkké sýry	Luminiscence	2x10 ⁻⁶ M CIT 3x10 ⁻⁶ M OTA	(29)
	CIT	Sýry	FL	-	(30)
	CIT	Kukuřice	FL	-	(31)
	CIT, OTA	Obiloviny kakaové boby, rozinky	FL	1 pg/kg	(34)
	CIT, OTA, FUM	Snídaňové cereálie	FL	-	(35)
	CIT	Fermentované výrobky s <i>Monascus</i>	FL	0,187 ng/ml	(38)
	CIT	Čínské jídlo, červená rýže, léčivé rostliny	FL	0,8 µg/kg	(40)
	Aflatoxin B1, OTA, CIT	Fermentované masné výrobky	FL	-	(41)
	CIT	Rýže	DAD	-	(50)
	CIT, OTA	Pivo	FL	0,006 µg/l CIT	(54)
Biosenzory	CIT	Rýže	-	0,1 ng/ml	(37)
	CIT	Rýže	-	0,25 mol/l	(42)
	CIT	Červená rýže	-	0,0017 ng/ml	(47)
	CIT	Žito	-	2x10 ⁻³ mol/l	(52)
	CIT	Obiloviny	-	1,8x10 ⁻⁹ mol/l	(53)

Metoda	Analyzovaná látka	Matrice	Detektor	Limit detekce	Zdroj
ELISA	CIT, OTA	Obiloviny	-	0,5 - 5 ng/g	(32)
	Aflatoxin B1, CIT, FUM	Obiloviny, kukuřice, ořišky	FL	1pg/ml CIT	(44)
	CIT	Potraviny	-	-	(46)
LC	CIT, <i>Alternaria</i> toxin	Rajčata	MS/MS	-	(45)
	CIT	Červená fermentovaná rýže	MS/MS	3,0 µg/kg	(49)
CE	CIT	Plesnivé potraviny	-	-	(36)
MEKC	Lovastatin, CIT	Výrobky z červené rýže	-	-	(43)
UHPLC	CIT	Rýže - různé druhy	FL	1,5 µg/kg	(48)
GC	CIT	Výrobky s <i>Monascus</i>	MS	1 mg/kg	(33)
Průtoková cytometrie	CIT	Červená rýže	-	0,005ng/ml	(39)

Legenda tabulky:

CIT - citrinin; OTA - ochratoxin A; FUM – fumonisin; - data nebyla nalezena

6. Závěr

Tato bakalářská práce měla za úkol shrnout informace o mykotoxinech, seznámit se s mykotoxinem citrininem, s jeho účinky na lidské zdraví a přehledně sepsat starší i moderní metody, pomocí kterých můžeme tento toxin stanovit v potravinách a nápojích.

V první části této práce jsou sepsány poznatky o mykotoxinech, o bezpečnosti a kontrole mykotoxinů v potravinách a nápojích a důvody, proč je potřeba tyto látky v potravě stanovovat. Dále je tato kapitola zaměřena na konkrétní mykotoxin citrinin, na jeho strukturu, mechanismus účinku a toxicitu pro živé organismy. Do dnešní doby není citrinin zcela prozkoumán, a proto nejsou stanoveny limity, ve kterých se tento toxin může v potravinách vyskytovat. Protože citrinin vykazuje široké spektrum nežádoucích účinků, stanovení definované hraniční koncentrace pro nefrotoxicitu by nemuselo zahrnovat toxickou limitní koncentraci pro genotoxicitu či kancerogenitu.

Ve druhé, analytické části této práce jsou přehledně sepsány a popsány metody, pomocí kterých lze citrinin stanovit, a které se používají v analýze potravin. Vybrané studie analytických metod měly ukázat jejich vývoj pro stanovení citrininu v potravinách a nápojích za posledních dvacet let.

V posledních dvaceti letech došlo ve vývoji metod k několika změnám. První velkou změnou je postupné nahrazování téměř výhradní metody HPLC jinými a přesnějšími metodami. Nejprve byly na vzestupu imunologické metody typu ELISA testu a v posledních 5 letech je moderním trendem využití biosenzorů a modernizace HPLC na UHPLC ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. V elektromigračních metodách došlo v posledních letech k velice přínosnému spojení s chromatografií a toto spojení využívá metoda MEKC.

Další vývoj zaznamenaly metody extrakce a úpravy vzorků před vlastní analýzou, kde došlo k vylepšení mikroextrakcí, byla vyvinuta metoda extrakce citrininu pomocí molekulárně imprintovaných polymerů, a také vylepšeny enzymové extrakce a imunoextrakce.

Citrinin má velmi výraznou schopnost fluorescence, a proto většina metod využívala tohoto principu s dosažením velice nízkých detekčních limitů. Avšak s nástupem hmotnostních spektrometrů se i fluorescenční detekce dostává lehce do pozadí a je nahrazována přesnější a citlivější MS/MS detekcí.

Způsoby stanovení citrininu v potravinách byly za posledních dvacet let velmi zdokonaleny a dnes již neprobíhá pouhá instrumentální separace s následnou detekcí, ale využívají se i různé možnosti dalších úprav: nové typy extrakcí, chemických a enzymových reakcí, předkolonové i postkolonové derivatizace a spoustu dalších, které výsledky urychlí a zpřesní.

Všechny mykotoxiny jsou pro člověka nějakým způsobem toxické a škodlivé, a proto je naprosto nezbytné kontrolovat všechny potraviny a nápoje pro jejich výskyt. Některé z mykotoxinů jsou látky perzistentní a setrvávající v potravním řetězci a životním prostředí, a proto lze pouze omezeně zabránit jejich kontaminaci potravin a nápojů.

7. Seznam literatury

1. FLAJS D., PERAICA M. (2009). **Toxicological properties of citrinin**. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. Záhřeb: Institute for Medical Research and Occupational Health, 60(4), str. 457-464, ISSN 0004-1254.
2. **NRL pro mykotoxiny**. *Zdravotní ústav se sídlem v Ústí nad Labem* [online]. [cit. 2015-12-09]. Dostupné z: <http://www.zuusti.cz/sluzby/hygienicke-laboratore/mykotoxiny/>
3. FLÁVIO HENRIQUE VASCONCELOS DE MEDEIROS, S. J. (2012). **Biological control of mycotoxin-producing molds**. *Ciencia e Agrotecnologia*, Medeimoc, str. 483-497, ISSN 1413-7054.
4. RICHARD LAWLEY, L. C. (2012). **The Food Safety Hazard Guidebook**. Royal Society of Chemistry, str. 213-215, ISBN 1849733813.
5. WEIDENBÖRNER, M. (2013). **Encyclopedia of Food Mycotoxins**. *Springer Science & Business Media*, str. 69-70, ISBN 3662044641.
6. DESHPANDE, S. (2002). **Handbook of Food Toxicology, Food Science and Technology**. *CRC Press*, str. 424, ISBN 0824743903.
7. **Citrinin**. *Abcam, discover more* [online]. [cit. 2016-02-08]. Dostupné z: <http://www.abcam.com/citrinin-ab143476.html>
8. **Citrinin**. *Leathead Food Research* [online]. [cit. 2016-02-08]. Dostupné z: <http://eman.leatherheadfood.com/node/46>
9. AMPARO PASCUAL-AHUIR, E. V.-P. (2014). **Mechanisms of the Food Contaminant Citrinin: Application of a Quantitative Yeast Model**. *Nutrients*, 6(5), str. 2077-2087, ISSN 2072-6643.
10. HAMIYET DÖNMEZ-ALTUNTAS, G. D. (2007). **Effects of mycotoxin citrinin on micronucleus formation in a cytokinesis-block genotoxicity assay in cultured human lymphocytes**. *Journal of Applied Toxicology*, 27(4), str. 337-341, ISSN 1099-1263.
11. YU FENG-YIH, L. Y.-C.-H.-H. (2006). **Citrinin induces apoptosis in HL-60 cells via activation of the mitochondrial pathway**. *Toxicology Letters*, 161(2), str. 143-151, ISSN 1879-3169.
12. ALKA BEN TRIVEDI, M. H. (1993). **Formation of a new toxic compound, citrinin H1, from citrinin on mild heating in water**. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transaction 1*, (18) str. 2167-2171.

13. KLARIC, M. Š. (2012). **Adverse Effects Of Combined Mycotoxins.** *Industrial Hygiene and Toxicology*, 63 (4), str. 519-530, ISSN 0004-1254.
14. KITCHEN D.N., CARLTON W.W., HINSMAN E.J. (1977). **Ochratoxin A and citrinin induced nephrosis in Beagle dogs III.** *Veterinary pathology*, 14(4), str. 392-406, ISSN 0300-9858.
15. KITCHEN D.N., CARLTON W.W., TUIITE J. (1977). **Ochratoxin A and citrinin induced nephrosis in Beagle dogs II.** *Veterinary pathology*, 14(4), str. 261-272, ISSN 0300-9858.
16. KITCHEN D.N., CARLTON W.W., TUIITE J. (1977). **Ochratoxin A and citrinin induced nephrosis in Beagle dogs I.** *Veterinary pathology*, 14(4), str. 154-172, ISSN 0300-9858.
17. ARAI M., HIBINO T. (1983). **Tumorigenicity of citrinin in male F344 rats.** *Cancer Letters*, 17(3), str. 281-287, ISSN 1872-7980.
18. GUPTA M., SASMAL D., BANDYOPADHYAY S., BAGCHI G., CHATTERJEE T., DEY S. (1983). **Hematological changes produced in mice by ochratoxin A a citrinin.** *Toxicology*, 26(1), str. 55-62, ISSN 1879-3185.
19. MEHDI N.A., CARLTON W.W., TUIITE J. (1983) **Acute toxicity of citrinin in turkeys and ducklings.** *Avian Pathology:Journal of the W.V.P.A.*, 12(2), str. 221-233, ISSN 1465-3338.
20. HANIKA C., CARLTON W.W., TUIITE J. (1983) **Citrinin mycotoxicosis in the rabbit.** *Food and Chemical Toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 21(4), str. 487-493, ISSN 1873-6351.
21. EFSA CONTAM Panel. (2012) **Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed.** *EFSA Journal*, 10(3).
22. DIETRICH R., SCHMID A., MÄRTLBAUER E. (2001) **Citrinin in fruit juices.** *Mycotoxin research*, 17(2), str. 156-159, ISSN 1867-1632
23. SANTOS L., MARÍN S., SANCHIS V., RAMOS A. (2009) **Screening of mycotoxin multicontamination in medicinal and aromatic herbs sampled in Spain.** *Journal of the science of food and agriculture*, 89(10), str. 1802-1807, ISSN 1097-0010.
24. ARAI M., HIBINO T. (1983). **Tumorigenicity of citrinin in male F344 rats.** *Cancer Letters*, 17(3), str. 281-287, ISSN 1872-7980.
25. KLOUDA, P. (2003) **Moderní analytické metody.** 2. přepracované vydání. Ostrava, str. 10-100, ISBN 978-80-86369-07-5.

26. PAZOUREK, J. (Červen 2003) **Moderní elektroforetické analytické metody** [online]. Brno [cit. 2016-02-21]. Dostupné z: <https://faf.vfu.cz/pub-files/ustavy/ustav-chemicky-leciv/vyuka-predmetu/analyticka-chemie-ii/separacni-metody---elektroforeza.pdf>, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno.
27. **ELISA – diagnostika protilátek**. *Vyšší odborná škola zdravotnická a Střední zdravotnická škola Hradec Králové: Laboratorní metody* [online]. [cit. 2016-02-29]. Dostupné z: <http://labmet.zshk.cz/vyuka/ELISA-diagnostika-protilatek.aspx>
28. TURNER N.W., BRAMHMBHATT H., SZABO-VEZSE M., POMA A., COKER R., PILETSKY S.A. (2015) **Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009-2014)**. *Analytica Chimica Acta*, 901, str. 12-33, ISSN 0003-2670.
29. VAZQUEZ B.I., FENTE C., FRANCO C., CEPEDA A., PROGNON P., MAHUZIER G. (1996) **Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of ochratoxin A and citrinin in cheese by time-resolved luminiscence using terbium**. *Journal of Chromatography A*, 727(2), str. 185-193, ISSN 0021-9673.
30. VÁZQUEZ B.I., FENTE C., FRANCO C.M., QUINTO E., CEPEDA A., PROGNON P. (1997) **Rapid semi-quantitative fluorimetric determination of citrinin in fungal cultures isolated from cheese and cheese factories**. *Letters in Applied Microbiology*, 24, str. 397-400, ISSN 0266-8254.
31. ABRAMSON D., USLEBER E., MÄRTLBAUER (1999) **Rapid Determination of Citrinin in Corn by Fluorescence Liquid Chromatography and Enzyne Immunoassay**. *Journal of AOAC International* , 82(6), str. 1353, ISSN 1944-7922.
32. VRABCHEVA T., USLEBER E., DIETRICH R., MÄRTLBAUER E. (2000) **Co-occurrence of Ochratoxin A and Citrinin in Cereals from Bulgarian Villages with a History of Balkan Endemic Nephropathy**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, str. 2483-2488, ISSN 1520-5118.
33. SHU P.Y., LIN C.H. (2002) **Simple and sensitive determination of citrinin in Monascus by GC-selected ion monitoring mass spectrometry**. *Analytical sciences*, 18(3), str. 283-287, ISSN 1348-2246.
34. MEISTER U. (2003) **Detection of Citrinin in ochratoxin A - containing Products by a New HPLC Method**. *Mycotoxin Research*, 19(1), str. 27-30, ISSN 1867-1632.
35. MOLINIÉ A., FAUCET V., CASTEGNARO M., PFOHL-LESZKOWCZ A. (2005) **Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B 1 : development of a**

- method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin.** *Food Chemistry*, 92, str. 391-400, ISSN 0308-8146.
36. DU J.-Z., CHEN H.-L., WU J.-M., JIANG Y.-H. (2009) **Study on Capillary Electrophoresis Determination of Citrinin in Mouldy Food.** *Food Science*, 30(6), str. 203-207, ISSN 1002-6630.
 37. ARÉVALO F.J., GRANERO A.M., FERNÁNDES H., RABA J., ZÓN M.A. (2011) **Citrinin determination in rice samples using a micro fluidic elektrochemical immunosensor.** *Talanta*, 83(3), str. 966-973, ISSN 0039-9140.
 38. LI XUE-MEI, SHEN XING-HAI, XUE LAN, DUAN ZHEN-WEN, GUO SHU-REN (2012) **A validated RP-HPLC Method For the Determination of Citrinin in Xuezhikang Capsule and other Monascus-Fermented Products.** *E-Journal of Chemistry*, 9(1), str. 260-266, ISSN 0973-4945.
 39. LI Y., WU H., GUO L., ZHENG Y., GUO Y. (2012) **Microsphere-based flow cytometric immunoassay for the determination of citrinin in red yeast rice.** *Food Chemistry*, 134(4), str. 2540-2545, ISSN 0308-8146.
 40. LI Y., ZHOU Y.-C., YANG M.-H., OU-YANG Z. (2012) **Natural occurrence of citrinin in widely consumed traditional Chinese food red yeast rice, medicinal plants and their related products.** *Food Chemistry*, 132(2), str. 1040-1045, ISSN 0308-8146.
 41. MARKOV K., PLEADIN J., BEVARDI M., VAHČIĆ N., SOKOLIC-MIHALAK D., FRECE J. (2013) **Natural occurrence of aflatoxin B₁, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products.** *Food Control*, 34(2), str. 312-317, ISSN 0956-7135.
 42. ZACHETTI V.G.L., GRANERO A.M., ROBLEDO S.N., ZON M.A., FERNÁNDEZ H. (2013) **Development of an amperometric biosensor based on peroxidases to quantify citrinin in rice samples.** *Bioelectrochemistry*, 91, str. 37-43, ISSN 1567-5394.
 43. NIGOVIC B., SERTIC M., MORNAR A. (2013) **Simultaneous determination of lovastatin and citrinin in red yeast rice supplements by micellar elektrokinetic capillary chromatography.** *Food Chemistry*, 138(1), str. 531-538, ISSN 0308-8146.
 44. GUOZHE DENG, KUN XU, YUE SUN, YU CHEN, ZHENG T., LI J. (2013) **High Sensitive Immunoassay for Multiplex Mycotoxin Detection with Photonic Crystal Microsphere Suspension Array.** *Analytical chemistry*, 85, str. 2833-2840, ISSN 1520-6882.
 45. TÖLGYESI Á., STROKA J., TAMOSIUNAS V., ZWICKEL T. (2015) **Simultaneous analysis of Alternaria toxins and citrinin in tomato: an**

- optimised method using liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(9), str. 1512-1522, ISSN 1944-0057.
46. XU Y., XIONG L., LI Y., XIONG Y., TU Z., FU J., TANG X. (2015) **Citrinin detection using phage-displayed anti-idiotypic single-domain antibody for antigen mimicry.** *Food Chemistry*, 177, str. 97-101, ISSN 0308-8146.
47. ATAR N., EREN T., YOLA M.L. (2015) **A molekular imprinted SPR biosensor for sensitive determinatoin of citrinin in red yeast rice.** *Food Chemistry*, 184, str. 7-11, ISSN 0308-8146.
48. HUERTAS-PEREZ J.F., ARROYO-MANZANARES N., GARCÍA-CAMPANA A.M., GÁMIZ-GRACIA L. (2015) **High-throughput determination of citrinin in rice by ultra-high-performance liquid chromatography and fluorecence detection (UHPLC-FL).** *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 32(8), str. 1352-1357, ISSN 1944-0057.
49. JI X., XU J., WANG X., QI P., WEI W., CHEN X., LI R., ZHOU Y. (2015) **Citrinin Determination in Red Fermented Rice Products by Optimized Extraction Method Coupled to Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS).** *Journal of food science*, 80(6), str. 1438-1444, ISSN 1750-3841.
50. URRACA J.L., HUERTAS-PÉREZ J.F., CAZORLA G.A., GRACIA-MORA J., GARCÍA-CAMPAÑA A.M., MORENO-BONDI M.C. (2016) **Development of magnetic molecularly imprinted polymers for selective extraction: determination of citrinin in rice samples by liquid chromatography with UV diode array detection.** *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408, str. 1-10, ISSN 1618-2650.
51. POÓR M., MATISZ G., KUNSÁGI-MÁTÉ S., DERDÁK D., SZENTE L., LEMLI B. (2016) **Fluorescence spectroscopic investigation of the interaction of cotrinin with native and chemically modified cyclodextrins.** *Journal of Luminiscence*, 172 str. 23-28, ISSN 0022-2313.
52. ATAR N., YOLA M.L., EREN T. (2016) **Sensitive determination of citrinin based on molekular imprinted electrochemical sensor.** *Applied Surface Science*, 362, str. 315-322, ISSN 0169-4332.
53. FANG G., LIU G., YANG Y., WANG S. (2016) **Quartz crystal microbalance sensor based on molecularly imprinted polymer membrane and three-dimensional Au nanoparticles@mesoporous carbon CMK-3 functional composite for ultrasensitive and specific determination of citrinin.** *Sensors and Actuators B: Chemical*, 230, str. 272-280, ISSN 0925-4005.

54. LHOTSKÁ I., ŠATÍNSKÝ D., HAVLÍKOVÁ L., SOLICH P. (2016) **A fully automated and fast method using direct sample injection combined with fused-core column on-line SPE-HPLC for determination of ochratoxin A and citrinin in lager beers.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online], DOI 10.1007/s00216-016-9402-6, ISSN 1618-2642.