

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

Detekce mykotoxinů pomocí ELISA testu

Diplomová práce

Autor: Veronika, Dvořáková

Studijní program: N1501 – Biologie

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Vedoucí práce: Ing. Vladimír Dvořák, Ph.D.

Hradec Králové

květen 2015

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Zadání diplomové práce

Autor: **Bc. Veronika Dvořáková**

Studijní program: N1501 Biologie

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Název závěrečné práce: Detekce mykotoxinů pomocí ELISA testu

Název práce v AJ: Using of ELISA test for detection of mycotoxins

Cíl a metody práce:

Cílem práce je na základě literární rešerše popsat metody měření mykotoxinů pomocí ELISA testu a zdokumentovat možné využitelné testovací sady. Dalším cílem práce je ověřit možnosti využití přístroje pro další metody měření. V praktické části bude zhotovena metodika pro použití přístroje ELISA, která bude následně ověřena při vlastním měření mykotoxinů ve studovaných vzorcích různého původu.

Garantující pracoviště: Katedra biologie, Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: Ing. Vladimír Dvořák, Ph.D.

Oponent: doc. RNDr. František Malíř, Ph.D.

Datum zadání práce: 20. 11. 2013

Datum odevzdání závěrečné práce:

Prohlášení:

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

V Hradci Králové dne

Jméno a příjmení

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala Ing. Vladimíru Dvořákovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a trpělivost při řešení mé diplomové práce. Dále děkuji Ing. Tomáši Roubalovi ze Zdravotního ústavu Ústí nad Labem s pobočkou v Hradci Králové za odborné rady a zkušenosti, které jsem získala při práci v laboratoři.

Anotace:

DVOŘÁKOVÁ, V. *Detekce mykotoxinů pomocí ELISA testu*. Hradec Králové: Přírodovědecká fakulta Univerzity Hradec Králové, 2015. 64 s. Diplomová práce.

Cílem práce je na základě literární rešerše popsat metody měření mykotoxinů pomocí ELISA testu a zdokumentovat možné využitelné testovací sady. Dalším cílem práce je ověřit možnosti využití přístroje pro další metody měření. V praktické části bude zhotovena metodika pro použití přístroje ELISA, která bude následně ověřena při vlastním měření mykotoxinů ve studovaných vzorcích různého původu.

Klíčová slova

mykotoxiny, ELISA test, ochratoxin A, testovací sady

Annotation:

DVOŘÁKOVÁ, V. *Using of ELISA test for detection of mycotoxins*. Hradec Králové: Faculty of Science, University of Hradec Kralove, 2015. 64 p. Diploma Thesis.

The aim is to describe the methods of mycotoxin's measurements with using of ELISA test based on the literary research and to document an applicable assay kits. Another aim is to verify possibilities of using the device for further measurement procedures. The process for use of ELISA device will be determined in the practical part, which will be subsequently verified by mycotoxin's measurements in the examined samples of various origins.

Key words

mycotoxins, ELISA test, ochratoxin A, assay kits

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Literární přehled	11
2.1	Analýza mykotoxinů	11
2.1.1	Odběr a příprava vzorku	11
2.1.2	Analýza.....	11
2.2	ELISA test.....	12
2.2.1	Přímá ELISA.....	13
2.2.2	Nepřímá ELISA.....	13
2.2.3	Kompetitivní ELISA.....	13
2.2.4	Nekompetitivní ELISA	14
2.3	Princip kompetitivní metody ELISA.....	14
2.4	Základní části ELISA testu a přístrojové vybavení.....	15
2.5	Využití přístroje ELISA pro další metody měření.....	16
2.6	Další metody.....	18
2.6.1	Chromatografie na tenké vrstvě (TLC).....	19
2.6.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	19
2.6.3	Plynová chromatografie (GC).....	19
2.6.4	EIA testy (enzymoimunoanalýza).....	20
2.6.5	Imunoafinitní chromatografie	20
2.6.6	Radioimunoanalýza (RIA).....	21
2.6.7	PCR (polymerázová řetězová reakce).....	21
2.7	Mykotoxiny.....	21
2.8	Ochratoxin A.....	25
2.8.1	Druhy plísní produkující ochratoxin A.....	26
2.9	Léčivé rostliny, koření	27

2.10	Lékořice.....	29
2.10.1	Nařízení komise EU č.105/2010.....	31
3	Metodika.....	33
3.1	Stanovení ochratoxinu pomocí sady RIDASCREEN.....	33
3.1.1	Příprava vzorku lékořice.....	34
3.2	Metodika práce s testovací sadou	35
3.3	Metodika práce s automatickou promývačkou stripů	39
4	Výsledky.....	44
5	Diskuze	48
6	Závěr.....	52
7	Seznam Literatury.....	54
8	Seznam obrázků, tabulek a grafu.....	62
9	Přílohy.....	63

1 Úvod

V našem životním prostředí se setkáváme s různými patogenními plísněmi, jejichž sekundární produkty tzv. mykotoxiny, mohou mít závažný vliv na zdraví člověka. Způsobují mykózy a alergie, zasahují různé orgány a orgánové soustavy. Diplomová práce je zaměřena na detekci mykotoxinů. Je důležité se tímto tématem zabývat, protože produkty plísní se dostávají do potravin a krmiv během zpracování a skladování a setkat se s nimi může každý člověk či hospodářské zvíře. Významné je stanovení maximálního limitu denního přívodu mykotoxinů, které je v některých zemích stále nedostatečné.

Tato práce je zaměřena na detekci a měření mykotoxinu ochratoxinu A, který je produkován plísněmi rodu *Aspergillus* a *Penicillium*. Na lidský organismus může mít nefrotoxické, hepatotoxické, karcinogenní, imunosupresivní nebo teratogenní účinky, které jsou velmi závažné.

Teoretická část práce se především zabývá měřením mykotoxinů s využitím ELISA testu. Poměrně podrobně je popsán průběh analýzy mykotoxinů, jehož základem je správný odběr a příprava vzorku. Dále je prezentován princip měření pomocí ELISA přístroje a vysvětlen základ, týkající se ELISA testování. Nedílnou součástí je ověření dalších možností, jak by přístroj ELISA mohl být využit pro jiná měření. V teoretické části jsou také stručně uvedeny další metody, které se v praxi používají a slouží ke stanovení mykotoxinů. Tato kapitola obsahuje nejznámější chromatografické a imunochemické metody. V práci jsou shrnuty poznatky o mykotoxinu ochratoxinu A a jeho působení na lidský organismus. Vzhledem k tomu, že v praktické části bude analyzován ochratoxin A ve vzorcích lékořice, následující kapitola se proto zabývá dosavadními výzkumy a měřeními této suroviny, případně po zpracování, potraviny. Teoretická část se také zabývá některými kontaminacemi léčivých rostlin a koření mykotoxiny. Tyto produkty jsou využívány jako potraviny, léčiva a dále i v kosmetice. Byliny slouží pro přípravu výluhů (nálevů a odvarů), které jsou konzumovány ve formě bylinných čajů.

V praktické části je pomocí ELISA testu měřen ochratoxin A ze vzorků lékořice, která se vyskytuje a používá v potravinářství, především v cukrovinkách anebo v čajových směsích. Teprve v nedávné době byly stanoveny maximální limity pro tuto potravinu, proto je důležité se lékořicí a výrobků z ní zabývat a provádět její analýzu.

Součástí praktické části je vypracování metodiky použití přístroje ELISA a také postup práce s testovací sadou. Tato část zahrnuje přípravu vzorků lékořice, stanovení ochratoxinu pomocí testovací sady RIDASCREEN, postup práce a možnosti nastavení automatické promývačky stripů a měřicího přístroje fotometru EPOCH. Další kapitola se zabývá výsledky vlastního měření ochratoxinu A ve vzorcích a získané výsledky jsou v diskuzi porovnány s výsledky jiných laboratoří, které byly publikovány v literatuře.

Díky mojí čtrnáctidenní stáži v Národní referenční laboratoři pro biomarkery mykotoxinů při Zdravotním ústavu Ústí nad Labem, na regionálním pracovišti v Hradci Králové byly získány velmi cenné zkušenosti, týkající se přípravy vzorků mykotoxinů pro následné stanovení vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií, které byly zúročeny v praktické části zde předložené diplomové práce.

2 Literární přehled

Vláknité mikroskopické houby mohou produkovat sekundární metabolity tzv. mykotoxiny, které často představují zdravotní nebezpečí. Prostřednictvím moderních analytických metod se provádí jejich detekce v dobře vybavené laboratoři (Patočka, 2004). Analytické stanovení mykotoxinů využívá jejich fyzikální, chemické a biologické vlastnosti (Šimůnek, 2004). Analýza se skládá z několika navazujících kroků, z nichž každý rozhoduje o správném výsledku (Malíř *et al.*, 2003).

2.1 Analýza mykotoxinů

Stanovování mykotoxinů ve vzorku se skládá ze tří hlavních částí, kterými je odběr vzorku, příprava vzorku a vlastní analýza.

2.1.1 Odběr a příprava vzorku

Prvním nejdůležitějším krokem je oddělení a získání reprezentativního vzorku z celkového objemu. Vzorky mykotoxinů jsou většinou součástí nějakého substrátu, proto bývají heterogenní. Pro získání homogenního vzorku je nutné jej obvykle protřepat na třepačce, promíchat nebo využít mixér a následně extrahovat (Carlile *et al.*, 2001). Nejdříve je odebrán materiál z jednotlivých míst jedné výrobní šarže, následuje kombinování a homogenizace vzorků s cílem získat souhrnný vzorek a z něj je pak použit laboratorní vzorek pro analytické vyhodnocení (Barkai-Golan & Paster, 2011). Shibamoto (2012) uvádí, že při měření aflatoxinu v burských oříšcích, dochází z 92,7 % k chybě při odběru vzorku, ze 7,2% během přípravy vzorku a pouze 0,1 % při analýze vzorku.

2.1.2 Analýza

Většina analytických metod zahrnuje 3 kroky: extrakci, purifikaci (separaci) a kvantifikaci. Mykotoxiny jsou snadno extrahovány do směsi vody a organických rozpouštědel, kterými je nejčastěji chloroform, metanol, acetonitril a aceton (DeVries *et al.*, 2002). Nollet & Toldrá (2011) ve své publikaci uvádí, že pro extrakci ochratoxinu A se používá směs zředěné kyseliny a organických látek.

Pro extrakci organickým rozpouštědlem je vhodné použít laboratorní třepačku a umístit vzorek do Erlenmeyerovy baňky, která se uzavírá skleněnou zátkou. Také je možné využít homogenizátor např. Polytron. Mykotoxiny se vyznačují svou stálostí, proto se extrakce provádí za pokojové teploty a reakce jsou buď neutrální, nebo kyselé (Malíř *et al.*, 2003).

Důležitým krokem při analýze mykotoxinů je čištění extraktu. Pro čištění ochratoxinu A, aflatoxinu, fumonisinu, deoxynivalenolu a zearalenonu je vhodné použít imunoafinitní kolonky. Mezi výhody patří rychlost a specifita, nevýhodou je však jejich cenová náročnost, nejsou vhodné na všechny typy mykotoxinů a někdy je potřeba předčištění před použitím kolonek (Fratamico *et al.*, 2005). Pomocí vakuové odparky dochází k odpaření extraktu mykotoxinu. Po přidání rozpouštědla se ponechá vzorek procházet přes kolonku a následně je promýván obvykle dvěma elučními činidly. Druhá eluční směs umožňuje vymytí mykotoxinu z kolonky. Následuje odpaření eluátu pod proudem dusíku a další postup měření pokračuje podle analytické koncovky (Malíř *et al.*, 2003).

Cole (2012) píše, že po přečištění a jednom či více kroků purifikace, následuje vlastní analýza mykotoxinů pomocí různých metod, které zahrnují chromatografii na tenké vrstvě (TLC), vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) a plynovou chromatografii (GC).

Po ukončení analýzy je nutné dekontaminovat používané nádobí a okolní povrchy. Během analýzy je vhodné vkládat použité nádobí do 5 % roztoku chlornanu sodného (NaClO), který patří mezi silná oxidační činidla (Nollet, 2000).

2.2 ELISA test

ELISA je aplikována v různých odvětvích biologie jako významná diagnostická technika (Walker & Rapley, 2008). ELISA test se využívá v základním výzkumu či v klinické praxi, detekuje a kvantifikuje antigeny, protilátky. Dále slouží ke zjišťování struktury antigenu v tělních tekutinách a tkáňových extraktech (Lukáš *et al.*, 1997).

Principem imunochemické metody ELISA je interakce antigenu a specifických protilátek, při které se tvoří imunokomplex antigen-protilátka. Pro stanovení se využívá značení enzymu na jednom z reaktantů (Habuřtová *et al.*, 2011). Během této vazby vzniká produkt enzymatické reakce, který je detekován (Stejskal *et al.*, 2008).

Emon (2006) dělí enzyimoimunologickou metodu (ELISA) na přímou a nepřímou.

2.2.1 Přímá ELISA

Při využití přímé metody ELISA je do jamky umístěn antigen, který je adsorbován na pevnou fázi. Následuje krok promytí a poté jsou přidány protilátky, které se enzymaticky značí. Ty reagují a vážou se na antigen. Následuje inkubace a promývání, dále je přidán substrát/chromofor (S). Po barevné změně, kdy dochází ke katalyzované reakci, je přidán stop roztok, který umožní zastavení reakce a vyvolá další barevné změny. Na závěr dochází k detekci při dané vlnové délce spektrofotometricky (Habuřtová *et al.*, 2011).

2.2.2 Nepřímá ELISA

Nepřímá ELISA je používána pro kvalitativní či kvantitativní testování protilátek. Počátečním krokem je pokrytí jamek antigenem, do kterých je umístěna testovaná látka a ponechána inkubaci. Pokud byla protilátka navázána na imobilizovaný antigen, jejich přítomnost je detekována po dodání sekundárních protilátek, které jsou enzymaticky značeny. Po přidání substrátu dochází k reakci, která je spojována s barevnou změnou na základě koncentrace protilátky přítomné v testovaném vzorku (Elgert, 2009).

ELISA metodu lze dále rozdělit na kompetitivní a nekompetitivní. Oba formáty lze použít jako přímou či nepřímou metodu (Stejskal *et al.*, 2008).

2.2.3 Kompetitivní ELISA

Při kompetitivní ELISE je využívána jedna protilátka, která je omezena svým množstvím. Dochází ke kompetici o vazebná místa této protilátky mezi značeným antigenem, kterého je mírný nadbytek a neznačeným antigenem, jenž je v analyzovaném vzorku (Habuřtová *et al.*, 2011). U kompetitivní metody je měřeno

množství navázaného značeného antigenu s protilátkou, lze ale také měřit množství nenavázaného značeného antigenu (Malíř *et al.*, 2003).

2.2.4 Nekompetitivní ELISA

Nekompetitivní ELISA využívá primární protilátku, která je v přebytku. K reakci dochází pouze u jednoho antigenu, kterým je analyzovaná látka. Kvantifikace vazby protilátky-antigenu probíhá díky sekundární protilátce, která může být konjugována enzymem (Habuřtová *et al.*, 2011). Nekompetitivní metodu lze také označit jako sendvičovou (Stejskal *et al.*, 2008).

2.3 Princip kompetitivní metody ELISA

Měření mykotoxinů pomocí ELISA metody je na základě reakce antigenu (mykotoxinu) a protilátky (AgraQuant, 2008). Po přidání enzymem značené protilátky či antigenu je stanovena hodnota podle množství navázaných látek. Kvantitativní zhodnocení je měřeno spektrofotometricky (Malíř *et al.*, 2003).

Principem kompetitivní metody ELISA je soutěžení o vazebné místo protilátky mezi volným ochratoxinem ve vzorku či kontrolními standardy a ochratoxinem s navázaným enzymem (tzv. konjugát), který je v soupravě. Veškerý nenavázaný konjugát je odstraněn při promývání. Poté se do jamek přidává chemická látka (tzv. substrát), která reaguje s enzymem a vzniká modré zbarvení (RIDASCREEN, 2014). Intenzita zbarvení je nepřímo úměrná koncentraci volného ochratoxinu ve vzorku či standardu. Po přidání stop roztoku se zbarvení mění z modré na žlutou. Měření absorbance probíhá fotometricky pomocí ELISA readeru při vlnové délce 450 nm (AgraQuant, 2008). Větší intenzita zbarvení je tedy u negativního vzorku, má tudíž i větší absorbanci. Pro zjištění koncentrace vzorku je nezbytné proměřit kalibrační závislost, která se získá změřením absorbance standardních roztoků (Stejskal *et al.*, 2008). Dále se vytvoří standardní křivka intenzity zbarvení standardů, do které se zanesou zbarvení vzorků. Díky softwaru je pak vyhodnocena koncentrace ochratoxinu v měřených vzorcích (Svobodová, 2013). Pro provedení ELISA metody se často využívá také imunoafinitní chromatografie (Malíř *et al.*, 2003).

2.4 Základní části ELISA testu a přístrojové vybavení

Pro správné pochopení principu kompetitivní metody ELISA je důležité se podrobněji seznámit se základními částmi testu, s přístrojovým vybavením a souvisejícími procesy.

ELISA reader

ELISA reader je fotometr pro stanovení koncentrace mykotoxinu. Jedná se o spektrofotometr, jenž dokáže odečítat absorbanci v reakčních jamkách. Součástí přístroje jsou filtry, pomocí kterých je možné volit vlnovou délku. U toho systému to bývá v rozmezí mezi 405 a 570 nm (Žákovská, 2012).

Automatická promývačka

Automatická promývačka je programovatelné přístrojové vybavení, které se uplatní při promývání mikrostripů. V tomto procesu dochází k plnění a vyprazdňování jamek pufovacím roztokem. Slouží k separaci navázaných (zreagovaných) a nenávaných látek, jedná se tak o klíčovou část úspěšného použití ELISA testu (Crowther, 2000).

Adsorpce je proces, při kterém se rozpuštěné látky v kapalině drží na pevném povrchu na základě přitažlivých sil, buď se jedná o slabé, fyzikální síly nebo silnější chemické vazby (Daintith, 2008). V praxi je **pevnou fází** upravený polystyren, který může být ve formě mikrotitračních destiček, kuliček, hřebenů a pruhů (Žákovská, 2012). Obvykle je však tvořena mikrotitrační destičkou s jamkami (8x12), která je komerčně dostupná. Jedná se o specializované vybavení, jehož výhodou je snadná a rychlá manipulace zahrnující využití multikanálové pipety (Crowther, 2000).

Antigen

Antigen je makromolekulární látka, kterou imunitní systém vyhodnotí jako látku cizí. Pokud se antigen dostane do organismu, dojde k navození imunitní odpovědi a je stimulována tvorba protilátek (Zajoncová, 2013). Antigeny jsou polymery přirozeného nebo umělého původu. Z chemického hlediska zahrnují proteiny, polypeptidy, polysacharidy a nukleoproteiny. Na povrchu antigenu se nachází

epitopy, které jsou tvořeny skupinou atomů. Na tyto části antigenu se specificky váže protilátka (Janatková, 2014).

Protilátka

Jedná se o molekulu, která se váže na antigen a dokáže tím spustit obrannou reakci organismu. Protilátky jsou děleny na polyklonální, monoklonální a rekombinantní. Polyklonální protilátky jsou namířeny proti více epitopům antigenu, monoklonální proti jednomu epitopu určitého antigenu a rekombinantní kombinují oba předchozí typy (Cwиковá, 2014).

Plazmatické buňky, které vznikají z B-lymfocytů, jsou stimulovány antigenem a tvoří tak protilátky. Zahrnují heterogenní skupinu glykoproteinů živočišného původu (Janatková, 2014).

Konjugát

Konjugátem je specifická protilátka s navázaným enzymem. Ten reaguje se substrátem a dochází tak v přítomnosti chromogenu k barevné reakci (Žáková, 2012). V případě stanovení sekundárních produktů plísň je to mykotoxin, na kterém je navázaný enzym a je součástí testovací sady (Svobodová, 2013).

Substrát

Jedná se o chemickou sloučeninu, s kterou enzym specificky reaguje za vzniku barevného produktu (Crowther, 2000). Ten je pak měřen spektrofotometricky a platí, že koncentrace produktu je úměrná koncentraci protilátky či antigenu v analyzovaném vzorku (Kodíček, 2004). Komerčně dostupné jsou rozmanité substráty, jejichž ideální vlastností by měla být stabilita, snadné použití, neměl by být toxický a měl by být kompatibilní s široce dostupnými přístroji (Shan, 2011).

2.5 Využití přístroje ELISA pro další metody měření

Využití ELISA metody je všestranné, uplatňuje se v odvětví lékařství, zubního lékařství, imunologii, molekulární mikrobiologii, genetiky a v biotechnologiích. Detekovat lze okolní prostředí, dále rostlinné a živočišné produkty, které slouží jako potraviny či krmiva (Walker & Rapley, 2008).

Pomocí enzymové imunoanalýzy RIDASCREEN jsou měřeny mykotoxiny aflatoxin, ochratoxin A, zearalenon, deoxynivalenol, T - 2 toxin a fumonisin. Tato sada se vyznačuje vysokou citlivostí, specifiitou, patří mezi rychlé a spolehlivé metody. Další testovací sadou je RIDAQUICK, jedná se o rychlé testy, které slouží k semikvantitativnímu a kvantitativnímu vyhodnocení. Aflacard jsou kartičkové testy, které umožňují kvantitativní měření mykotoxinů v potravinách a krmivech. Výhodou je, že nevyžaduje drahé vybavení a lze testovat široké spektrum vzorků (JEMO TRADING, 2014). Další testovací sada, která se v praxi využívá pro stanovení ochratoxinu A, se nazývá AgraQuant Ochratoxin Assay. Slouží ke kvantitativnímu měření ochratoxinu A i B a využívá se pro stanovení v obilí, cereáliích, ořích, kaka, pivu, sójových bobech, vín, kávě, krmivech a dalších potravinách (AgraQuant, 2008).

Testovací sadu Veratox je možné využít pro stanovení alergenů v potravinách (jako například mandle, vejce, lískové ořechy, hořčice, burské ořechy, sója a mléko), pro detekci mykotoxinů stejných jako u testovací sady RIDASCREEN. Dále je možné pomocí této metody identifikovat rezidua uvnitř těla různých druhů ryb a mořských plodů. Detekovanou látkou je v tomto případě histamin (NEOGEN, 2014). Limit detekce testu AgraQuant na ochratoxin A je 1,9 ppb, u testu RIDASCREEN je tato hodnota 1,25 ppb. Testovací sada RIDASCREEN se tedy vyznačuje vyšší citlivostí při stanovení ochratoxinu A (RIDASCREEN, 2014).

K antigenům, které je možné detekovat ELISA testem, patří například růstový hormon v moči, TSH (thyreotropní hormon) v krevním séru a plasmě, chromogranin A v plasmě a také celá řada nádorových markerů (Lukáš *et al.*, 1997).

Megdal (2009) uvádí, že ELISA se stala převládající metodou pro kvantifikaci hodnoty inzulínu v plazmě. Na rozdíl od RIA metody je přesnější, používá se menší vzorek krve a nevyžaduje licenci pro nakládání s radioaktivními látkami.

ELISA se používá k identifikaci virových, bakteriálních, parazitických a houbových infekcí. Například je to virové onemocnění hepatitidy B a C, bakteriální infekce anthrax, parazitické infekce zastupuje *Giardia* a *Strongyloides*. Ve většině případů dochází k testování protilátek proti patogenu v séru. ELISA je také používána k identifikaci proteinu sporozoitů. Jedná se o infekční fázi parazita vyvolávajícího

malárii, který se do těla hostitele dostane po bodnutí komárem (Walker & Rapley, 2008). Kumar (2012) uvádí další využití jednoduché a univerzální ELISA metody, která je schopná detekovat protilátky a antigeny různých mikroorganismů. Zahrnuje bakterie mykoplasmy, chlamydie, *Haemophilus influenzae*, *Borrelia burgdorferi*, viry *Herpes simplex*, zarděnky, respirační syncytiální virus a parazity například *Entamoeba histolytica*. Elgert (2009) píše, že nepřímá ELISA metoda se využívá například při stanovování protilátek proti viru lidské imunodeficiency (HIV), který způsobuje nemoc AIDS.

Například při stanovování hepatitidy B je povrchový antigen označen a následně detekován použitím mikrotitrační destičky (pevné fáze), na které se nachází neoznačené antisérum reagující s antigenem (Blaney & Howard, 2008).

Kleiböhmer (2001) ve své publikaci uvádí, že metoda ELISA je nejvíce používanou imunochemickou analýzou pro detekci reziduí pesticidů. Imunochemické metody je tedy možné využít v klinické chemii.

2.6 Další metody

Většina mykotoxinů je toxická již při nízké koncentraci a vyžaduje dostatečně citlivou a spolehlivou metodu pro kvantitativní detekci. Důležitým a rozhodujícím krokem je odběr vzorků, dále pak vlastní analýza. Technika by měla být jednoduchá k použití, rychlá a přenosná (Khalesi, 2010).

Pro analýzu ochratoxinu A se nejčastěji používají metody chromatografické a imunochemické. Metody chromatografické jsou založeny na separačních technikách. Principem je dělení složek, které se nachází mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je mobilní, druhá stacionární. Imunochemické reakce jsou založeny na reakci antigenu a protilátky (Malíř *et al.*, 2003).

Mezi metody chromatografické se řadí například chromatografie na tenké vrstvě (TLC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a plynová chromatografie (GC), mezi metody imunochemické (ELISA), (RIA) a další (Zhang *et al.*, 2011).

2.6.1 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Během této metody dochází k separaci složek z kapalného média, které jsou unášeny spolu s rozpouštědlem v tenké vrstvě sorbentu. Používá se separační destička, na jejíž okraj se nanáší analyzovaná látka a následně je umístěna do rozpouštědla. Po použití daného činidla je na destičce možné sledovat proužky, které odpovídají analyzovaným složkám (Malíř *et al.*, 2003). Jedná se o poměrně populární metodu, která je schopna vyhodnotit velké množství vzorků a je ekonomicky nenáročná. Nejběžněji se používá vrstva silikagelu (Turner *et al.*, 2008). Bylo zjištěno, že metoda TLC není dostatečně přesná pro testování potravin a krmiv (Zhang *et al.*, 2011). Chromatografie na tenké vrstvě je jednoduchou, levnou a rychlou metodou, kdy je možné analyzovat více vzorků. TLC je vhodnou metodou pro stanovování ochratoxinu A a aflatoxinu. Pro některé mykotoxiny však metoda vykazuje nižší citlivost a horší přesnost. Ke kvantitativnímu stanovení je nutné použít densitometr (Leslie *et al.*, 2008).

2.6.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Kapalinová chromatografie (LC) patří k separačním technikám, kde je analyzovaný vzorek oddělen na základě distribuce mezi mobilní fází (proudící kapalina) a stacionární fází tj. sorbentem, který je součástí kolony. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je moderní formou LC. Využívá kolonu menších rozměrů, přes kterou je mobilní fáze pumpována pod vysokým tlakem (Dong, 2006). Pomocí injekčního ventilu je rozpuštěná analyzovaná látka vstříknuta do nosného média a prochází kolonou, kde se nachází sorbent, který umožňuje průchod některých složek pomaleji a jiných rychleji. Na konci kolony je umístěn detektor, který měří různé veličiny např. optickou absorbanci (Malíř *et al.*, 2003). Signál detektoru je odeslán na připojený počítač, kde je možné vidět klesající a stoupající průběh detekce. Tato data jsou využita přímo ke kvantitativnímu měření analytů anebo ke standardní kalibraci přístroje (McMaster, 2007). Nollet et Toldrá (2011) uvádí, že HPLC je nejvíce využívanou technikou pro detekci ochratoxinu A.

2.6.3 Plynová chromatografie (GC)

Jedná se o analytickou a separační metodu, jejíž separace je prováděna na základě plynu a kapaliny (GLC) nebo plynu a tuhé látky (GSC). Mobilní fází je vždy plyn a

stacionární fázi může být pevná látka (sorbent) nebo kapalina, která je umístěna v chromatografické koloně (Malíř *et al.*, 2003).

Plynová chromatografie spojuje separační metodu na kapilární koloně a využití speciálních detektorů. Nevýhodou této metody je, že analyzovány mohou být pouze tepelně stabilní a těkavé vzorky. Tento problém lze však částečně vyřešit využitím derivatizace (Cigic & Prosen, 2009).

Výhodou plynové chromatografie je souběžné analyzování více vzorků najednou, dobrá citlivost, vyžaduje však drahé vybavení a specializovanou odbornost pracovníků (Leslie *et al.*, 2008).

2.6.4 EIA testy (enzymoimunoanalýza)

Jedná se o analytické metody, u kterých díky imunochemické reakci a enzymatické detekci lze stanovit ve vzorku koncentraci protilátky nebo antigenu. Podle substrátu vstupujícího do reakce probíhá detekce spektrofotometricky, nefelometricky, fluorometricky a luminometricky. Speciálním druhem EIA metody je právě ELISA metoda (Bartůňková & Paulík, 2011). Rozlišují se dva formáty EIA metody – homogenní a heterogenní (Shan, 2011).

2.6.5 Imunoafinitní chromatografie

Principem je použití chromatografické kolony, která slouží jako stacionární fáze. V ní jsou umístěny imobilizované protilátky, na které se pak navazují antigeny. Vzorek prochází chromatografickou kolonou, antigeny se navážou a další látky vzorku jsou vyloučeny z kolony. Dále je použito eluční činidlo, které rozrušuje vazby a dochází k eluci stanovovaného vzorku z kolony (Stejskal *et al.*, 2008). Malíř *et al.* (2003) ve své publikaci uvádí postup čištění extraktu. Po procesu extrakce je přefiltrovaný extrakt ve směsi s metanolem a vodou (metanol 10-30 % podíl) zředěn vodou a je ponechán pomalému prokapávání kolonkou. Dochází k navázání látek a kolonka je promyta vodou nebo speciálními promývacím roztokem. Eluce navázaného mykotoxinu z kolonky probíhá pomocí elučního činidla, kterým může být metanol, okyselený metanol, směs metanolu a acetonitrilu atd.

Imunoafinitní chromatografie se často používá jako součást HPLC metody. Výhodou tohoto postupu je vysoká selektivita interakcí protilátek s dalšími molekulami (Brown & Grushka, 2003).

2.6.6 Radioimunoanalýza (RIA)

Metoda RIA byla popularizována v 60. letech Bersonem a Yalowem. Stala se nejpoužívanější metodou díky své vysoké citlivosti, dokáže detekovat 10^{-12} g. Většina klasických imunologických reakcí do té doby nedokázala měřit tak malé množství protilátky či antigenu (Elgert, 2009). Principem této imunochemické metody je značení protilátek radioaktivními izotopy. Většinou se používají tyto radioizotopy (^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S a ^{125}I). Nejvhodnější jsou však radioizotopy ^3H a ^{14}C z důvodu jejich dlouhého poločasu rozpadu. Zároveň vykazují nižší úroveň beta záření (Stejskal *et al.*, 2008). Metoda RIA vyžaduje zvláštní opatření během analýzy, protože se pracuje s radioaktivními látkami. Problém může také nastat při nakládání s radioaktivními odpady. Další nevýhodou sady RIA je její krátká životnost, obvykle může být po otevření používána pouze několik dní (Fathimunisa & Begum, 2014).

2.6.7 PCR (polymerázová řetězová reakce)

Mykologické určení je často náročné i pro zkušeného odborníka, proto se v poslední době využívají metody založené na polymerázové řetězové reakci (Matušinsky *et al.*, 2013). Pomocí této reakce lze detekovat a kvantitativně analyzovat mykotoxiny toxigenních hub. Molekula DNA nebo fragmenty DNA cílového organismu mohou být amplifikovány a detekovány pomocí gelové elektroforézy (Bridge, 1998). Real-time PCR (R-T PCR) měří kvantitativně produkty amplifikace v reálném čase. Může být použita k identifikaci a kvantifikaci například plísně rodu *Fusarium*, která se vyskytuje na obilí a jejích derivátů (Leslie & Logrieco, 2014).

2.7 Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou toxické produkty sekundárního metabolitu některých druhů hub (Turner, 2008). Patří mezi významné přírodní toxiny, které degradují potraviny. Způsobují řadu onemocnění a mykotoxikóz jak u člověka, tak i u hospodářských

zvířat. Mezi ně patří například ergotismus, alimentární toxická aleukie, aflatoxikóza, balkánská nefropatie a další (Ostrý, 1998). Mykotoxiny mohou napadat různé orgány: játra, ledviny, nervový systém, svaly, kůži, dýchací orgány, trávicí trakt, pohlavní orgány atd. Zdravotní riziko v souvislosti s mykotoxiny se liší a závisí především na geografické oblasti a ekonomickém statusu populace. Oblasti, ve kterých je vyšší průměrná roční teplota a vyšší relativní vlhkost vzduchu, jsou příznivější pro růst plísní (Halt, 1998).

Je odhadováno, že dochází ke kontaminaci nyní až 38% celkové světové produkce obilnin mykotoxiny. Důvodem mohou být nedostatečné zkušenosti pro pěstování a následnou sklizeň, neúplné dosušení plodin, nevhodné balení produktů či nevyhovující skladovací a transportní podmínky. Problémem je obtížné odstranění mykotoxinů během technologických úprav. Nejvhodnější je tedy preventivní opatření, které by zabránilo kontaminaci plodin. Vhodným prostředkem je aplikace fungicidů, využívání odolných odrůd, sklizení v optimální zralosti a skladování při nižších teplotách a menší vlhkosti (Modrá *et al.*, 2014).

Nejznámější mykotoxiny zahrnují aflatoxiny, ochratoxin, zearalenon, fumonisin, patulin, citrinin, dále také sterigmatocystin, kyselinu penicilovou, deoxynivalenol, T-2 toxin a další trichotheceny (Rai & Varma, 2009).

Aflatoxiny

Aflatoxiny jsou sekundárními metabolity, které produkují vláknité houby rodu *Aspergillus*, především *A. flavus* a *A. parasiticus*. Mezi čtyři přirozeně se vyskytující aflatoxiny patří aflatoxin B₁, B₂, G₁ a G₂, z nichž nejběžnějším a nejtoxičtějším je aflatoxin B₁. Byly potvrzeny karcinogenní, mutagenní a imunosupresivní účinky aflatoxinů (Romagnoli, 2006). Vyskytují se v různých potravinách například v kukuřici, burských oříšcích, rýži, pšenici a mléčných produktech (Abou-Donia, 2015).

Fumonisin

Plíseň *Fusarium*, která produkuje fumonisiny, napadá obvykle kukuřici a jiné obiloviny. Její mykotoxiny jsou neurotoxické a genotoxické (Magan & Olsen, 2004). Mezi nejběžnější fumonisiny patří FB₁, FB₂ a FB₃, přičemž FB₁ způsobuje koňskou

leukoencefalomalácii. Jedná se o otravu plesnivou kukuřicí. U prasat jsou tyto mykotoxiny příčinou plicního edému, u potkanů vykazují nefrotoxické účinky a způsobují rakovinu jater (AgraQuant, 2008).

Patulin

Patulin je metabolitem, který je produkován různými druhy hub, zahrnující rody *Penicillium*, *Aspergillus* a *Paecilomyces*. Kontaminuje ovoce, jako jsou hrušky, jablka, broskve, meruňky, hroznové víno a olivy, dále také výrobky z něj například džusy, kompoty a marmelády. Patulin vykazuje genotoxické, cytotoxické, imunotoxické a neurotoxické účinky (Barkai-Golan & Paster, 2011). Tento mykotoxin je stabilní v kyselém prostředí při hodnotě pH 2 a méně. Je tedy nestabilní v alkalickém prostředí a pomalu se rozkládá ve směsi destilované vody s metanolem (Deshpande, 2002).

Citrinin

Citrinin je produkován plísní *Aspergillus ochraceus* a *Penicillium citrinum* a dalšími příbuznými druhy. Může se nacházet v rýži, ječmenu, kukuřici a jablkách (Barkai-Golan & Paster, 2011). Plíseň *Penicillium citrinum* byla prohlášena za jednu z příčin vzniku onemocnění žluté rýže v Japonsku. Podobně jako ochratoxin A je citrinin potenciálním nefrotoxinem. Onemocnění ledvin a prasečí nefropatie je spojována s požitím kontaminovaného krmiva hospodářskými zvířaty (Deshpande, 2002).

Zearalenon

Zearalenon je produkován plísněmi rodu *Fusarium* a *Gibberella* a vyskytuje se v obilovinách (Dobiáš *et al.*, 2003). Může kontaminovat pšenici, ječmen, kukuřici, rýži, oves, čirok a některé luštěniny. Vysoká hodnota mykotoxinu byla stanovena při analýze banánů pěstovaných v Indii. Vyskytoval se také v produktech, které byly z obilnin zpracovány. Bylo zjištěno, že zearalenon má hormonální vliv na reprodukční systém prasat a ovcí (Lawley *et al.*, 2012). Votava *et al.* (2003) píše, že tento mykotoxin vykazuje antibakteriální a mutagenní účinky.

Trichotheceny

Trichotheceny jsou produkovány rodem *Fusarium*, *Trichoderma*, *Stachybotrys* a dalšími. Nachází se v mouce, ovsu, ječmenu, rýži a kukuřici a mají vliv na imunitní odpověď (Barkai-Golan & Paster, 2011). Jeden z nejznámějších mykotoxinů je T-2 toxin. Trichotheceny mají mutagenní, karcinogenní a genotoxické účinky a mohou inhibovat syntézu bílkovin. Mezi značně toxické mykotoxiny pro zvířata patří T-2 toxin, nivalenol, deoxynivalenol a fusarenon-X. Z gastrointestinálního traktu jsou vstřebávány a koncentrace rychle narůstá v ledvinách, játrech, žluči a střevech (Patočka, 2004).

Sterigmatocystin

Sterigmatocystin je dermatoxinem, který produkuje hlavně *Aspergillus nidulans* a *Aspergillus versicolor*. Tyto plísně jsou přítomny v půdě a zemědělských plodinách (Barkai-Golan & Paster, 2011). Vyskytují se na zaplísňených obilovinách, kukuřici, v burských oříšcích, koření, sýru a zelených kávových zrnech. Jedná se o potenciální karcinogen, mutagen a teratogen u zvířat a lidí, hlavním cílovým orgánem, které mykotoxin zasahuje, jsou játra. Chemicky je sterigmatocystin podobný aflatoxinům, tudíž bude mít podobné vlastnosti z hlediska stability v potravinách (Lawley *et al.*, 2012).

Plísně mohou napadat kulturní plodiny během jejich růstu, sklizni, skladování nebo při závěrečném zpracování. Většina sekundárních metabolitů je chemicky stabilní i po převaření poměrně vysokými teplotami. Pokud se na substrátu vyskytuje plíseň, není pravidlem, že zde budou vždy produkovány i mykotoxiny. Jelikož jsou mykotoxiny poměrně stabilní, mohou být v potravíně přítomné, i když se houba již na potravíně nevyskytuje (Fernández-Cruz *et al.*, 2010). Z důvodu obtížného odstraňování mykotoxinů ze substrátu je nejvhodnější prevence jejich vzniku a vytvoření takových podmínek, při kterých nedochází k jejich formaci (Turner *et al.*, 2008).

Byly prokázány antagonistické a synergické vztahy u mykotoxinů. Příkladem takového společného působení je synergický vztah ochratoxinu A a citrininu, kdy dochází k významnému zvýšení karcinogenity ochratoxinu A. U řady mykotoxinů bylo zhodnoceno bezpečí a byly tak stanoveny maximální limity přívodu

v potravinách a krmivech. Jsou zjišťována rizika pro populaci a jednotlivce expozice (Ostrý, 1998).

Kontaminace potravin mykotoxiny může kromě zdravotních problémů způsobovat i ekonomické ztráty např. pro země, které dané potraviny exportují (Fernández-Cruz *et al.*, 2010).

2.8 Ochratoxin A

Sekundární metabolit ochratoxin A je produkován plísněmi *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius* a *Aspergillus niger* (Ariño & Herera, 2006). V chladnějších oblastech jsou ochratoxiny produkovány především plísní rodu *Penicillium*, v teplejších a tropických částech světa jsou zastoupeny různými druhy plísně *Aspergillus*. Sekundárními metabolity rodu *Aspergillus* bývá ochratoxin A a ochratoxin B, zatímco *Penicillium* většinou produkuje pouze ochratoxin A (Liu, 2009).

Poprvé byl izolován v roce 1965 z plísně *Aspergillus ochraceus*. Molekula OTA, která je chemicky tvořena derivátem fenylalanin-dihydroizokumarinu, je velmi stabilní jak ke změně teploty, tak k hydrolýze (Fernández-Cruz, 2010). V kyselém nebo neutrálním prostředí je rozpustná v polárních organických rozpouštědlech (Nollet & Toldrá, 2008). Jedná se tedy o termostabilní mykotoxin, který lze zničit až po několika minutách při teplotě vyšší než 250°C. Nedochází k jeho zničení při běžných úpravách pokrmů (Modrá *et al.*, 2014).

Ochratoxin A vykazuje nefrotoxické, hepatotoxické, imunosupresivní a teratogenní účinky (Votava, 2003). Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny byl v roce 1993 OTA vyhodnocen jako potenciální karcinogen (Quintela, 2012). Podle IARC (International Agency for research on Cancer) byl klasifikován do skupiny 2B, tj. „potenciálně karcinogenní pro člověka“ (Creppy, 2002). Vědecký výbor pro potraviny uvádí, že je vhodné co nejvíce redukovat expozici OTA, proto byl stanoven tolerovatelný denní příjem (TDI) na 5 ng/kg za den (SCF, EU, 1998). Ledviny jsou hlavním cílovým orgánem, u kterého vykazuje toxické působení a je také spojován s výskytem nádorů močových cest. S největší pravděpodobností způsobuje onemocnění nazvané balkánská endemická nefropatie. U pacientů

způsobuje karcinomy ledvin a horních cest močových. Mezi symptomy patří bolest hlavy, nechutenství, žloutenka, urémie a anémie. Výskyt tohoto onemocnění byl popsán v 50. letech 20. století na území Chorvatska, Bosny a Hercegoviny, Srbska, Rumunska a Bulharska (Modrá *et al.*, 2014).

Ochratoxin A inhibuje proteosyntézu (Miliotis & Bier, 2003). Jeho působení má za následek poškození mitochondrií, způsobuje oxidační poškození a peroxidaci lipidů. OTA může mít vliv na apoptózu některých buněk. Poločas vyloučení u lidské populace byl stanoven asi na 35 dní. Vzhledem k tomu, že se ochratoxin A vylučuje do mateřského mléka, může být nebezpečný i pro kojence (Modrá *et al.*, 2014).

Ochratoxin A se nejčastěji vyskytuje v obilninách, dále se může nacházet v kávě, koření, sušeném ovoci, mase, pivu a vínu. OTA byl také objeven v lidských a živočišných tekutinách. Při příjmu kontaminovaných krmiv se dostává do oběhového systému, jater a dalších tkání zvířat. Při konzumaci masa z těchto zvířat může mykotoxin přijmout i člověk a OTA tak projde potravním řetězcem (Turner, 2008).

2.8.1 Druhy plísň produkující ochratoxin A

Penicillium verrucosum je pomalu rostoucím druhem s neobvykle nízkou optimální teplotou růstu (okolo 20°C). Vyskytuje se v rozmezí teplot 0 - 31°C. Nejčastěji tato plíseň roste na obilninách v chladnějším mírném klimatu. Ochratoxin A, který tato plíseň produkuje, je nejvíce přítomen na chlebu a výrobcích z mouky a v mase zvířat, pro které jsou obilniny hlavní složkou potravy (DeVries, 2002).

Aspergillus ochraceus, jehož optimální teplota růstu je 25°C, vytváří okrové (světle žluté) až hnědé kolonie. Tato plíseň je zodpovědná za produkci ochratoxinu v kávě a uskladněném obilí (Motarjemi *et al.*, 2013). Dále se vyskytuje v zelených kávových bobech, olejninách a luštěninách. Sekundární metabolity plísně *Aspergillus ochraceus* je ochratoxin A, v menší míře produkuje ochratoxin B a C a také kyselinu penicilovou.

Aspergillus carbonarius produkuje ochratoxin A v hroznovém víně a z něho vyrobených produktech, ke kterým patří víno, džus z vinných hroznů, vinný ocet a sušené hrozny. Optimální teplota pro produkci mykotoxinů je v rozmezí 15-20°C a

je nižší než optimální teplota růstu (Blackburn, 2006). Tento druh je snadno od ostatních odlišitelný díky velkým, ostnitým konidiím (Liu, 2009).

Aspergillus niger je nejběžnější plísní, která je izolována z oříšků (zahrnující burské oříšky, pekanové ořechy, pistácie, lískové oříšky, kokosové ořechy, vlašské ořechy). Obilniny a olejniný jsou také častým substrátem pro růst této houby. *Aspergillus niger* patří mezi xerofilní druhy s optimem teploty 35-37°C (Blackburn, 2006). Tato plíseň vytváří charakteristické, tmavě hnědé až černé kolonie (Liu, 2009).

Analýzy biologických materiálů jsou velmi důležité. Ochratoxin se do organismu může dostat různými cestami, mezi ně patří příjem potravinami, inhalace a kožní kontakt. Hlavní metodou zjištění přítomnosti OTA v organismu je detekce z krve. Pokud je mykotoxin přítomen v krevním séru či plasmě, indikuje expozici OTA, která vznikla jeho přívodem především prostřednictvím potravin (Dohnal *et al.*, 2013).

Pfohl-Leszkowicz and Manderville (2007) uvádí, že hodnota LD₅₀ pro ochratoxin A je stanovena od 0,2 do 58,3 mg/kg na testovaných zvířatech.

2.9 Léčivé rostliny, koření

Léčivé rostliny a koření jsou stěžejními produkty, které lidstvo denně využívá jako aromatické přísady v potravinách, nápojích, léčivech a také tvoří ingredience v parfémch a kosmetice. Díky léčivým, antioxidačním, antimikrobiálním či nutričním vlastnostem mají různá koření široké spektrum využití (Peter, 2006).

Byliny jsou používány pro své účinky při onemocněních, obtížích nebo k jejich prevenci již od dávných dob. Některé však nesplňují požadavky na kvalitu, bezpečnost a účinnost (Ashiq *et al.*, 2014). Tradiční medicína je v Číně využívána již více než pět tisíc let. Podle výzkumu se až 89% lidí z vyspělých států spoléhá na medicínu s využitím přírodních produktů (Shaw, 1998). Velké procento lidí tedy konzumuje léčivé rostliny a bylinné čaje každý den nebo téměř každý den. Byliny v bylinných směsích mohou být kontaminovány plísněmi a jejich sekundárními metabolity a představují tak zdravotní nebezpečí. Bylo objeveno přes

220 toxických plísní, které produkují okolo 300 metabolitů a 60 z nich patří mezi mykotoxiny.

Při analýze bylin a bylinných čajů nejčastěji převládal druh *Penicillium* (54,58 %) a *Aspergillus* (19,80 %), následován druhem *Cladosporium*, *Alternaria*, *Mucor*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Absidia* a *Trichoderma* (Halt, 1998).

Po rostlinných produktech a sušeném ovoci (rozinky, fíky) je v obchodech vysoká poptávka. Během používaných technologií a skladovacích podmínek však může vzniknout ideální prostředí pro růst plísní a vznik mykotoxinů (Trucksess & Scott, 2007).

Závažným problémem je kontaminace potravin, krmiv a bylin, které se používají v medicíně, ochratoxinem A. Může být ovlivněno zdraví spotřebitele, protože tento mykotoxin je rozpustný ve vodě a během vaření a máčení se může dostávat do odvarů. OTA přítomný v suchém kořeni lékořice je přenesen do čajového výluhu. V případě kávy se OTA přítomný v pražených kávových bobech dostává po zalití vodou do tohoto horkého nápoje. Nicméně je zatím nedostatek informací o přechodu OTA z čerstvých bylin použitých v medicíně po zalití vroucí vodou (Shim *et al.*, 2014).

Léčivé rostliny jsou konzumovány celé nebo pouze jejich části, také se z nich vyrábí jejich extrakty (Trucksess & Scott, 2007). Koření je získáváno umletím usušených rostlin, jsou používány rostlinné části – semena, kůra, kořen (obr. 1). Během pěstování a sušení na slunci může dojít ke kontaminaci plísněmi. Jejich růst a produkce mykotoxinů je závislá na vnitřních a vnějších faktorech a fyzickém poškození. Mezi vnitřní faktory patří obsah vlhkosti, pH, redoxní potenciál, obsah živin v substrátu, inhibitory a osmotický tlak. Vnějšími faktory jsou přírodní podmínky jako například teplota, relativní vlhkost a přítomnost plynu v životním prostředí (Peter, 2006).

Mezi mykotoxiny, které se vyskytují v koření, patří aflatoxiny, ochratoxin A, zearalenon, fumonisiny a trichotheceny. Bylo zjištěno, že koření zahrnující chilli, fenykl, kmín, koriandr, černý pepř, kardamom a kurkumu, byly kontaminovány aflatoxiny (Sinha, 1996).

Některá koření a byliny jako například skořice, hřebíček, popřípadě oregano a hořčice dokážou inhibovat růst mycelií a produkci mykotoxinů. Naopak sezamová semínka, zázvor a rozmarýn přispívají k výskytu aflatoxinů (Motarjemi, 2013). Přítomnost aflatoxinů byla prokázána během testování různých druhů paprik rodu *Capsicum*, které se využívají jako koření. Dále byla potvrzena v česneku, který je lidmi využíván pro své antibakteriální, antifungální, antioxidační účinky, snižuje krevní tlak, hladinu cholesterolu a zlepšuje cirkulaci krve. Aflatoxiny byly také nalezeny v kořenu zázvoru, který je hojně využíván při zažívacích obtížích (Trucksess & Scott, 2007).



Obr. 1: Koření a kontaminace mykotoxiny

2.10 Lékořice

Lékořice lysá (*Glycyrrhiza glabra*) je botanicky zařazená do řádu *Fabales* (bobotvaré), čeled' *Fabaceae* (bobovité), podčeled' *Faboideae*, tribus *Galegeae*, rod *Glycyrrhiza*. Používá se ve farmaceutickém průmyslu jako ingredience v bylinných čajích, patří mezi expektorans a zvyšuje krevní tlak (Herrera, 2009). V tradiční čínské medicíně je lékořice nejdůležitější bylinou (obr. 2), slouží jako antipyretikum a antitusikum k léčbě kašle, faryngitidy, bronchitidy a bronchiálního astmatu. Kromě toho je lékořice běžným doplňkem stravy (Chen *et al.*, 2013).

V potravinářství je lékořice poměrně běžně využívána pro svůj kořen a extrakt, který je získán při rozdrcení a následné extrakci kořene s vodou. Extrakt je filtrován a koncentrovaný se používá k výrobě pevných válečků či lékořicového

prášku. Lékořicový extrakt se také prodává v kapalně formě 12-15 % (Ariño & Herrera, 2006).

Chen *et al.* (2013) popisuje izolaci plísně ze vzorku lékořice. Celý lékořicový kořen je nakrájen pomocí sterilního nástroje na menší části, které budou použity pro izolaci. Do 10 g vzorku je přidáno 90 ml destilované vody, směs se promíchá a dále je na třepačce protřepávána po dobu 30 minut. Dalším krokem je vytvoření série 10 ředění do konečné koncentrace 10^{-3} . Vzorek o objemu 1 ml z každého ředění je umístěn na agar obsahující chloramfenikol a následně mohou být kolonie počítány a vytvořeny průměry. Všechny kolonie v Petriho miskách se inkubují při teplotě 25°C po dobu 7-10 dní a poté se skladují při teplotě 4°C pro pozdější izolaci a determinaci kolonií.



Obr. 2: Lékořice lysá (*Glycyrrhiza glabra*)

Lékořicový extrakt ze sušeného kořene *Glycyrrhiza glabra* se hojně využívá ve farmakologii v různých zemích. Obsahuje glycyrrhizin, který je používán jako sladidlo či příchuť v potravinách. Předchozí studie potvrdily potenciální antioxidační vlastnosti (Malekinejad, 2009). Trucksess & Scott (2007) uvádí, že glycyrrhizin je padesátkrát sladší než sacharóza. V lékořici používané v čínské medicíně (*G. uralensis*) se nachází ještě větší koncentrace této látky. Lékořice je také populární ingrediencí v cukrovinkách (obr. 4) a dalších potravinách jako například ve žvýkačkách (Ariño & Herrera, 2006). Do čajových směsí je v menším množství přidávána lékořice nebo třeba zázvor. V těchto potravinách byl nalezen ochratoxin A a aflatoxiny, pro které jsou komisí EU stanoveny maximální limity.

Při překročení těchto hodnot mohou být bylinné čaje potenciálním problémem. Toxické plísně mohou růst na povrchu čaje. Pro prevenci mikrobiálního růstu byl stanoven maximální limit vlhkosti 10 % při uskladnění a přepravě (Motarjemi *et al.*, 2013).



Obr: 3: Kořen lékořice a výrobky

2.10.1 Nařízení komise EU č.105/2010

Podle Nařízení komise (EU) č.105/2010 jsou stanoveny maximální limity ochratoxinu A v koření a lékořici. Toto Nařízení komise se odvolává na tolerovatelný týdenní přívod ve výši 120 ng/kg tělesné hmotnosti, což znamená tolerovatelný denní přívod (TDI) ve výši 17,1 ng/kg/t.hm./den, stanovený vědeckým výborem EFSA (Evropský úřad pro bezpečnost potravin v r. 2006). Bohužel se tento přívod vztahuje pouze na nefrotoxicitu ochratoxinu A, nikoliv na karcinogenitu a mnohými odborníky je v současnosti pokládán za nedostatečný.

Bylo dokázáno, že v některých státech, kteří dováží koření do EU, nedochází ke kontrolám přítomnosti ochratoxinu A. Několikrát bylo potvrzeno vysoké množství ochratoxinu A v koření a lékořici. Pro lékořici byl stanoven maximální limit 20 ng/g u kořene lékořice a složky bylinného čaje. U výtažku z lékořice, který se použije v potravinářských nápojích a cukrovinkách je dán limit 80 ng/g (viz tabulka č. 1). Hodnota je vztažena na nezředěný výtažek. Přibližně ze tří až čtyř kilogramů kořene rostliny se získává jeden kilogram výtažku (Barroso, 2010). Poprvé byl ochratoxin A v lékořici oznámen v Německu (Bresch *et al.*, 2000) a (Majerus *et al.* 2000), ti detekovali vysoké procento pozitivních vzorků.

Současnými autory je prokázána přítomnost ochratoxinu A v lékořici a jejích produktech (Herrera *et al.*, 2009).

Tab. č. 1- Stanovení maximálního limitu OTA v některých kontaminujících látkách

Koření <i>Capsicum spp.</i> (celé či mleté sušené plody, chilli papričky, kayenský pepř) <i>Piper spp.</i> (plody bílého a černého pepře) <i>Myristica fragrans</i> (muškátový oříšek) <i>Zingiber officinale</i> (zázvor) <i>Curcuma longa</i> (kurkuma) Směsi koření obsahující jeden či více z uvedených druhů koření	30 ng/g (od 1. 7. 2010 do 30. 6. 2012) 15 ng/g (od 1. 7. 2012)
Lékořice (nejčastěji <i>Glycyrrhiza glabra</i>, <i>Glycyrrhiza inflata</i>)	
Kořen lékořice, složka bylinného čaje	20 ng/g
Výtažek z lékořice pro použití v potravinářských výrobcích, zejména v nápojích a cukrovinkách	80 ng/g

3 Metodika

K analýze byla použita přímá kompetitivní ELISA metoda, kterou lze kvantitativně měřit množství ochratoxinu A ve vzorku. Stanovení proběhlo pomocí testovací sady RIDASCREEN, která zjišťuje ochratoxin A v obilninách, krmivech, pivu a séru prasat (RIDASCREEN, 2014). Ochratoxin je produkován převážně houbami *Aspergillus ochraceus* a *Penicillium verrucosum*, které se vyskytují v různých potravinách např. v rozinkách, ječmenu, sójových produktech a kávě (AgraQuant, 2008).

3.1 Stanovení ochratoxinu pomocí sady RIDASCREEN

Materiál, přístrojové vybavení a pomůcky:

ELISA BioTek EPOCH, promývačka BioTek ELx50, centrifuga, vybavení pro odpařování rozpouštědel, třepačka, mlýnek, Erlenmeyerova baňka, imunoafinitní kolonky pro přečištění ochratoxinu A, vakuová pumpa, vakuový manifold, odměrný válec, filtrační papír, nálevka, pipety, polypropylenové nádobky, plastové stříkačky, vialky, mikropipety s rozmezím stupnice 20-200 µl a 200 – 1000 µl, analytické váhy s přesností 0,01 mg, kapátka

Chemikálie:

Solný fosfátový pufr PBS ($\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{NaCl}$), chloroform (CHCl_3), kyselina mravenčí (HCOOH), hydrogenuhličitan sodný (NaHCO_3)

Součástí kitu:

96 jamek pokrytých protilátkou proti ochratoxinu A (12 stripů po 8 jamkách) v držáku, 6 vialek o objemu 1,3 ml každého standardu (0, 50, 100, 300, 900, 1800 ppt), 1 láhev o objemu 0,7 ml konjugátu (ochratoxin s navázaným enzymem) – lahvička s červeným víčkem, 1 láhev o objemu 10 ml roztoku substrátu, obsahuje tetrametylbenzidin (látko měnící svou barvu po reakci s enzymem) – hnědě označená lahvička, 1 láhev o objemu 14 ml Stop roztoku – žlutě označená lahvička,

zřed'ovací pufr konjugátu o objemu 7 ml – bíle označená lahvička, promývací pufr (sůl) pro přípravu 10 mM fosfátového pufru, 0,05 % roztok, hodnota pH 7,4

Roztok standardů obsahuje ochratoxin A v různých koncentracích. Aby nedošlo ke kontaktu roztoku a kůže, používají se při práci ochranné rukavice. Skleněné nádoby a použité pomůcky jsou dekontaminovány pomocí 10 % chlornanu sodného přes noc. Dojde tak k úpravě pH roztoku, ve kterém je obsažena kyselina chlorovodíková na hodnotu 7. Stop roztok obsahuje 1 N kyselinu sírovou (H_2SO_4).

Testovací sada je skladována při teplotě 2-8°C. Nepoužité jamky se umísťují zpět do originálního obalu, musí být řádně uzavřeny a skladovány při teplotě 2-8°C. Nesmí dojít k expozici přímým světlem, protože ochratoxin A je citlivý na sluneční záření.

3.1.1 Příprava vzorku lékořice

Příprava vzorku lékořice probíhala podle návodu Zimmerli & Dick (1995). Do Erlenmeyerovy baňky je umístěna navážka 5 g ze vzorku lékořice. K ní se přidává 10 ml pufru H_3PO_4 a NaCl. Po dobu 1 minuty je směs třepána na třepačce (Vortex). Dalším krokem je extrakce pomocí chloroformu (CHCl_3), který je přidáván celkem 4x po 5 ml a po každé je nutné zkumavku po dobu 3 minut protřepat. Zkumavky se umístí do centrifugy, jejíž rychlost je 6500 otáček za minutu, na dobu 15 minut. Velmi zásadním krokem je správné odpipetování spodní chloroformové fáze do polypropylenové nádoby, které bude celkem 20 ml z každé zkumavky. Chloroformová fáze je nakonec odpařena pod proudem dusíku při teplotě 45°C. Reziduum ve zkumavce se spláchne menšími dávkami chloroformu o celkovém objemu 5 ml. Následně je chloroformová fáze dvakrát extrahována 5 ml hydrogenuhličitanem sodným (NaHCO_3). Směs je protřepávána po dobu 3 minut na třepačce (Vortex), poté je umístěna do centrifugy na 5 minut při 3500 otáčkách za minutu. Podíl NaHCO_3 , který se nachází v horní vrstvě, je stáhnut do polypropylenové nádoby, ve které je odpipetováno 1 ml chloroformu a 0,5 ml kyseliny mravenčí (HCOOH). Vodná uhličitanová vrstva je reextrahována celkem 2x 2 ml chloroformu. Dále se dají vzorky třepat na Vortex na 3 minuty, centrifugace probíhá 5 minut při 3500 otáčkách za minutu. Spodní vrstva je

odebrána do centrifugační nádoby a je odpařena pod proudem dusíku při teplotě 45°C.

Dále probíhá přečištění na imunoafinitní kolonce. Do kádinky se pipetují 4 ml filtrátu, přidává se 44 ml PBS a prefiltruje se přes filtr z mikrovlákn. Podle návodu, který uvádí výrobce, se připraví kolonka a připevní se na kohout vakuového manifoldu. Na druhý konec kolonky se umístí plastová stříkačka, do které se lije naředěný extrakt. Ten protéká pomalu přes kolonku, až do chvíle kdy prochází vzduch. Pomocí vakuové pumpy je možné zlepšit průchodnost extraktu. Dále podle výrobce dochází k propláchnutí kolonky (Zimmerli & Dick, 1995).

Dalším krokem je příprava roztoku vzorku. Kolonka je vyjmuta a umístí se nad vialku, ve které je metanol. Do ní se eluuje ochratoxin A, který je rozředěn 1,5 ml vody. Poté je směs promísena. Je možné vzorek ještě přefiltrovat před vlastní analýzou (Zbírál, 2011).

3.2 Metodika práce s testovací sadou

Ke stanovení byla použita sada RIDACREEN, díky které lze získat přesnou koncentraci ochratoxinu v jednotkách ng/g. Postup práce zahrnuje přípravu enzymového konjugátu, pipetování vzorků a standardů, pipetování konjugátu, inkubace, přípravu promývacího pufru, který je využit ve fázi promývání. Dalšími kroky je pipetování chromogen substrátu a STOP substrátu a nakonec je použit ELISA reader pro vyhodnocení koncentrace (RIDASCREEN, 2014).

1. Příprava konjugátu

Červeně označená lahvička obsahuje enzymový konjugát, který se naředí do zkumavky v poměru (1:11) zředěným pufrem. Použije se takové množství pufru, kolik se předpokládá, že bude měřeno vzorků. Například pro stanovení 4 stripů (4 stripy x 8 jamek) je potřeba 200 µl konjugátu a 2 ml pufru. Pokud bude pro práci použita osmi kanálová pipeta, je možné připravit konjugát do vaničky.

2. Pipetování vzorků a standardů

Do držáku se umístí požadovaný počet stripů. Pro každý vzorek a standard je potřeba jedna zředovací jamka, do které je odpipetováno 50 µl vzorku nebo standardu. Pro každý vzorek se používá nová pipetovací špička, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků. Roztok v jamkách se promíchá tak, že je celkem 3x nasán a vypuštěn obsah jamek. Standardy jsou umístěny v 6 lahvičkách o koncentracích 50, 100, 300, 900, 1800 ng/kg (ppt). Dávkování každého vzorku je do dvou stripů. Na závěr se zapíše pozice standardů a testovacích vzorků v mikrotitrační destičce (viz. tabulka č. 2).

Tab. č. 2: Znázornění standardů a vzorků na mikrotitrační destičce

	1	2	3	4
A	st. 0	C	68	28 (15x)
B	st. 50	D	78	48 (5x)
C	st. 100	E	88	48 (10x)
D	st. 300	F	98	48 (15x)
E	st. 900	směsný vzorek	108	08 (10x)
F	st. 1800	61	118	08 (20x)
G	A	18	28 (5x)	08 (30x)
H	B	58	28 (10x)	slepý vzorek

3. Pipetování konjugátu a inkubace

Předem připravený konjugát je pipetován do stripů o objemu 5 µl. Po přidání do všech jamek se obsah promíchá krouživým pohybem na podložce. Rámeček se stripů se umístí do temného místa a je inkubován po dobu 30 minut při pokojové teplotě.

4. Příprava promývacího pufru

Pro fázi promývání je nutné připravit promývací pufr PBS-Tween, který je součástí testovací sady a je umístěn v sáčku. Pufr se nechá rozpustit v jednom litru destilované vody a následně se přelije do nádoby u promývačky. Je možné ho uchovávat při teplotě 2-8°C v chladničce po maximální dobu 4-6 týdnů.

Před zahájením promývání vzorků a standardů je důležité spustit promývací program a 3x promýt pouze zkušební stripy.

5. Fáze promývání

Na pracovní plochu je umístěn filtrační papír nebo buničitá vata. Po uplynulých 30 minutách jsou inkubované stripy rychlým pohybem vyprázdněny. Nechají se obrácené dnem vzhůru na filtračním papíře, aby došlo k řádnému vysušení. Stripy se umístí do automatické promývačky stripů ELx50™ a 3x je spuštěn program promývání. Po ukončení je znovu vyprázdněna zbývající kapalina do filtračního papíru nebo vaty.

6. Pipetování chromogen substrátu

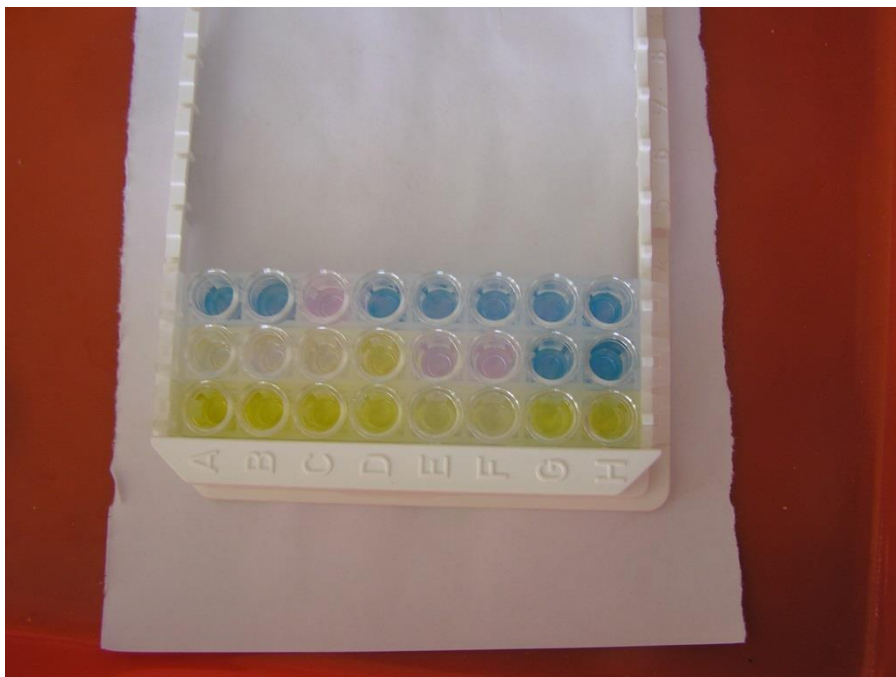
Do stripů se pipetuje chromogen substrát o objemu 100 μ l z hnědě označené lahvičky. Krouživým pohybem je opatrně promíchán na pracovní ploše a umístěn opět do temného místa při pokojové teplotě 20-25°C, inkubace probíhá po dobu 15 minut.



Obr. 4: Pipetování STOP roztoku

7. Pipetování STOP substrátu

Po skončení inkubace je pipetováno do každé jamky 100 μ l STOP substrátu (obr. 4), který je v žlutě označené lahvičce. Během tohoto procesu dochází k barevným změnám (viz obr. 5). Zbarvení se mění z modré na žlutou.



Obr. 5: Barevné změny po přidání STOP roztoku

8. Měření pomocí ELISA readeru

Pro vyhodnocení se používá přístroj ELISA reader. Jedná se o fotometr, kde se měří absorbance při vlnové délce 450 nm. Je možné měřit vzorky až do 30 minut po přidání STOP substrátu. Fotometr je propojen s počítačem, kde jsou zaznamenány výsledky měření.

Fotometr EPOCH

Přístroj Fotometr EPOCH (obr. 6) dokáže na základě pohlcení světla různých vlnových délek stanovit koncentraci látky ve vzorku. Dokáže měřit v rozmezí vlnových délek 200-999 nm a je schopen detekovat 6 – 384 jamek. Průběh testu je velmi rychlý a snadný. Součástí vybavení je Software Gen5™ Microplate Data Analysis (BioTek, 2015).

Fotometr slouží k vyhodnocení koncentrace v tomto případě ochratoxinu při vlnové délce 450 nm. Koncentrace je měřena v jednotkách ppt ($\text{pg/g} = \text{ng/kg}$) nebo ppb (ng/g). Průběh křivky standardu potvrzuje, zda došlo ke správnému měření (RIDASCREEN, 2014). Pokud vzorek obsahuje vyšší hodnotu než standard s největší koncentrací ($>1800 \text{ ng/kg}$; tj. $> 1,8 \text{ ng/g}$), pak musí dojít ke zředění. Dojde k opakované analýze za účelem získání přesného výsledku. Zředovací faktor musí být zahrnut do závěrečného výpočtu (AgraQuant, 2008). Limit detekce u obilnin a krmiv při dodržení návodu setu činí $1,25 \text{ ng/g}$ (ppb).



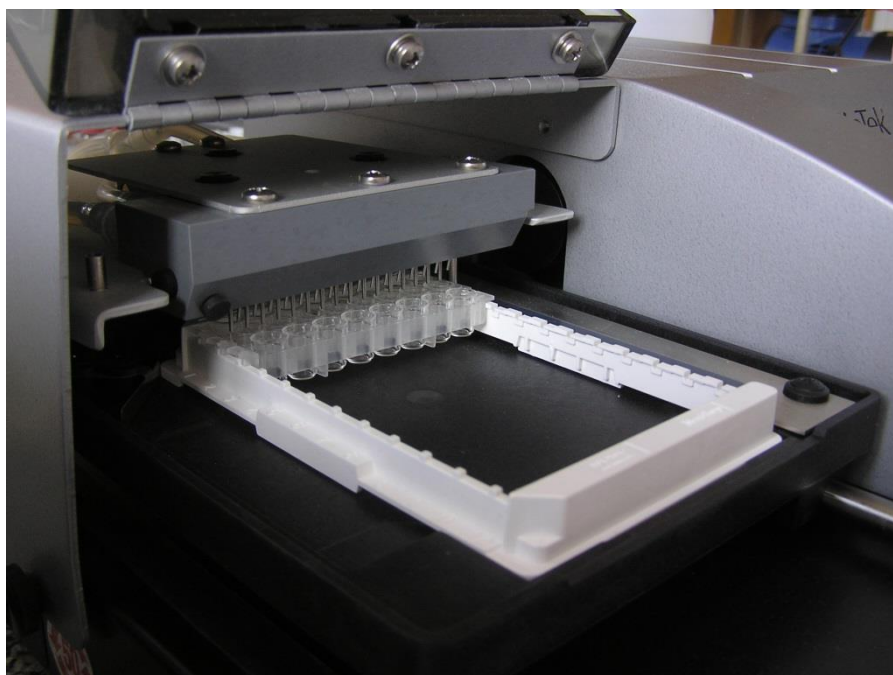
Obr. 6: Fotometr EPOCH

3.3 Metodika práce s automatickou promývačkou stripů

Ve fázi promývání byla použita automatická promývačka stripů ELx50TM (viz obr. 7) a postup práce byl proveden podle uživatelské příručky, která byla dodána k přístroji.

Využití ELx50 je široké, uplatní se například při ELISA testu, fluorescenci, chemiluminiscenci a RIA. Díky různým typům promývání lze přístroj použít při intenzivním promývání během ELISA testů či pozvolnější promývání buněčných kultur. Součástí promývačky je nástavec, který je složen z 8 kanálků. Kapacita použití pro tento nástavec je 8-jamkový strip a 96-jamková destička.

Po zapnutí promývačky dochází k auto-testu přístroje. Následně se zadává jméno programu, který je uložen a pak je možné program spustit.



Obr. 7: Automatická promývačka stripů ELx50™

Metoda promývání

Při promývání se označí jménem promývací program, dále je nutné zadat typ destičky 96 (při použití 8-jamkového stripu či 96-jamkové destičky), zvolí se metoda promývání, typ plnění a odsátí a poté může být program uložen. Při zvolení metody promývacího programu se vybírá počet cyklů promytí, způsob promytí, zda bude promývací pufr protřepán či ponechán, dobu ponechání pufru v jamce než bude odsán (0-600 s) a jestli bude promícháván pufr v jamce (0-600 s). Je možné nastavit intenzitu třepání na stupnici 1-5, kde 1 je nejnižší třepání. Další možností je promytí plnicích kanálků po jejich namočení a zvolení objemu roztoku, který k tomu bude použit 1-200 ml. Dalším krokem je zvolení rychlosti pumpování plnicí kapaliny v rozmezí 1-9, hodnota 1 je nejpomalejší rychlost. Nakonec se program uloží do systému.

Plnění

Během programování plnění promývacího programu se zvolí objem, který bude rozdělen do jamek během cyklu, rychlost plnění z kanálků do jamek v rozmezí 1-9, výšku plnění mezi koncem nasávacích kanálků a povrchem nosiče destičky, v intervalu 12-180, kde 12 je nejmenší vzdáleností od povrchu. Lze upravit plnění, horizontální pozici plnění, tj. pozice kanálků a středu jamek v rozmezí -24 až 24 v případě 8-kanálového nástavce. Záporné hodnoty znamenají plnění od předního okraje jamek směrem dozadu, kladné hodnoty v opačném postupu. Je možné zvolit promytí dna, díky kterému dojde ke zvýšení jednoho cyklu z celkového počtu. Určuje se objem promývacího roztoku a rychlost promývání. Dále se zvolí objem pufru použitého k propláchnutí plnicích kanálků (1-200 ml). Opět je program uložen.

Odsátí

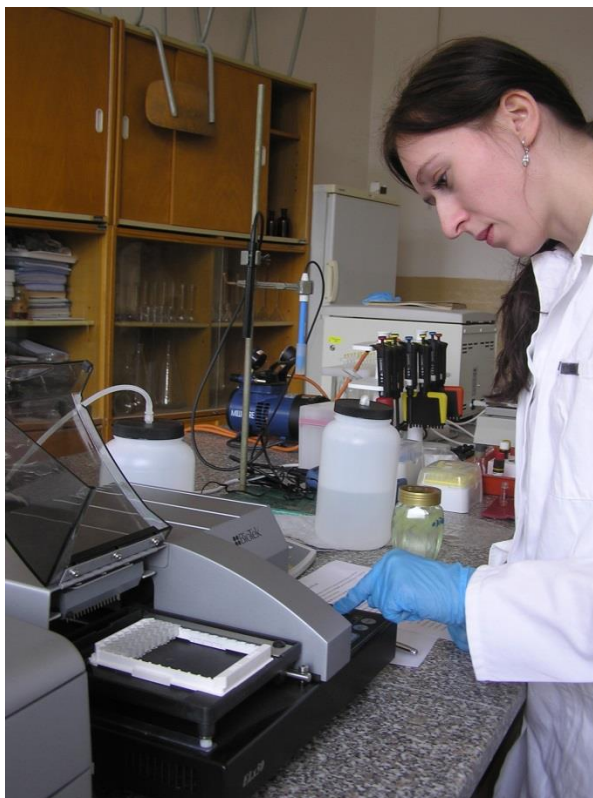
Během programování lze nastavit výšku odsátí, která značí výšku mezi koncem odsávacích kanálků a povrchem nosiče destičky. Rozmezí je 12-180, kde 12 udává nejmenší vzdálenost. Doporučením je nastavit výšku odsávacích kanálků, tak aby byly co nejblíže k jamce a odsávaly tak přebytečnou kapalinu. Dále lze nastavit horizontální pozici odsátí a rychlost odsátí. Zpoždění odsátí začíná, když kanálky dosáhnou odsávací výšky a končí při dalším pohybu, rozmezí hodnot je 0-5000 ms. Pokud se využívá křížového odsátí, zpoždění probíhá až při tomto procesu. Křížové odsátí zahrnuje dva procesy. Nejdříve dochází k odsátí jamek při horizontální pozici, druhé odsátí je v křížové horizontální pozici. Díky tomuto kroku je snížen zbytkový objem vzorku z obvodu jamek.

Namáčení

Program namáčení napomáhá nenavázanému materiálu difundovat do promývacího pufru. Začíná při rozdělení promývacího pufru do jamek. Nelze ho spustit samostatně, používá se jako součást spojovacího programu.

Spojovací programy

Pomocí spojovacích programů mohou být kroky promytí, naplnění, odsátí, plnění a namáčení propojeny a automaticky spuštěny. Celkem je možné naprogramovat až 10 programů (viz obr. 8).



Obr. 8: Ovládání automatické promývačky

Údržba

Pravidelně se provádí preventivní údržba. Zaručí tak funkčnost přístroje a prodlouží jeho životnost. Také minimalizuje ucpávání ventilků a kanálků, ke kterému dochází během krystalizace solných roztoků. Měla by být dodržována denní, měsíční údržba, údržba přes noc, dlouhodobá údržba a dekontaminace. Pravidelně se spouští testy, které ověří funkčnost přístroje. Testování instalačních předpokladů se provádí po instalaci přístroje. Během testů se kontroluje funkčnost systému, přesnost dávkování a zbytkový objem.

Při denní údržbě se zpočátku proplachuje promývačka daným roztokem např. roztokem pufru. Zabrání se tak ucpávání kanálků při promývání. Pokud je

během dne přístroj používán nepravidelně, spustí se funkce AutoPrime. Tento program pracuje automaticky v pravidelných intervalech. Pokud není zapnut, je nezbytné během dne použít program RINSE_AND_SOAK. Při údržbě přes noc či víkend se doporučuje spustit program OVERNIGHT_LOOP, díky kterému dochází k vypláchnutí všech promývacích roztoků z přístroje, promývání a namáčení kanálků. Během měsíční údržby se proplachují láhve deionizovanou vodou, vyčistí se a desinfikují nástavce a kanálky.

Pokud je potřeba přístroj dlouhodobě uskladnit, provádí se propláchnutí a namočení nástavce a hadiček. Systém je propláchnut a je z něj odstraněna veškerá kapalina. Během práce může dojít k nahromadění a kontaminaci přístroje plísněmi. K dekontaminaci se využívá těchto látek: 0,5 % chlornan sodný nebo 70 % izopropylalkohol, 10 % NaOCl, destilovaná nebo deionizovaná voda. K ochranným pomůckám patří laboratorní plášť, ochranné brýle a rukavice, rouška a pytel na biologický odpad.

Na všechna místa na povrchu přístroje je aplikován 0,5 % roztok chlornanu sodného. Po odstranění krytu a nosiče destiček se povrch uvnitř promývačky otře a pro dekontaminaci přístroje se zapne program DEKONTAMINATE.

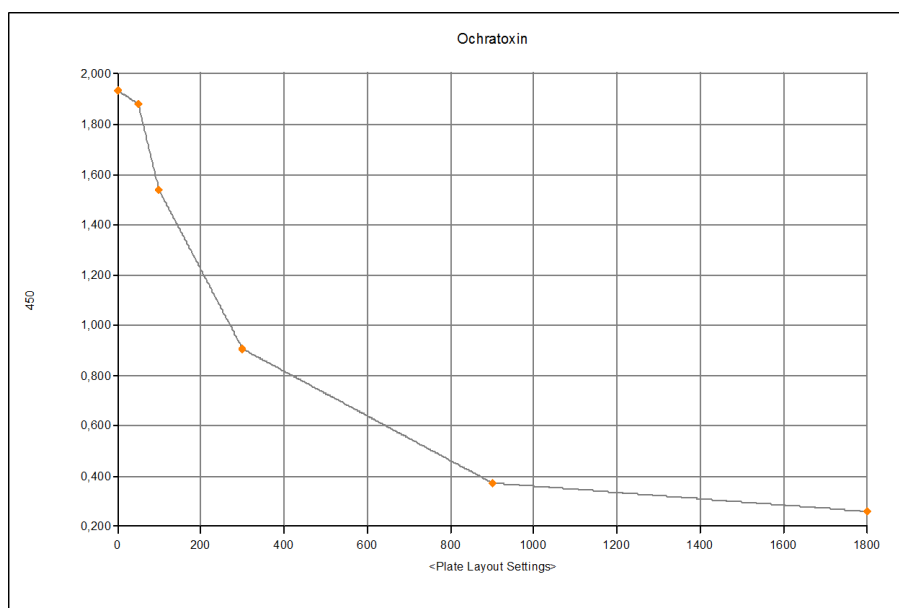
4 Výsledky

Měření standardních vzorků slouží ke kalibraci přístroje ELISA. Ke stanovení ochratoxinu A byly použity standardní látky o koncentraci (0, 50, 100, 300, 900, 1800 ppt) z testovací sady. Po změření jejich absorbance je získána kalibrační závislost, kterou ukazuje tabulka č. 3. V logaritmickém měřítku jsou na jedné ose vyneseny hodnoty absorbance a na druhé ose hodnoty koncentrace a tím je získána kalibrační křivka (viz graf č. 1).

Tab. č. 3: Koncentrace standardů a jejich absorbance

koncentrace standardů (ng/kg)	hodnota absorbance
St. 0	1,937
St. 50	1,881
St. 100	1,539
St. 300	0,908
St. 900	0,374
St. 1800	0,261

Měření standardní látky pomocí ELISA při vlnové délce 450 nm



Graf č. 1: Výsledky měření standardů ochratoxinu A

Pro analýzu byly použity směsné vzorky mletého kořene lékořice A-F, dále vzorky lékořice č. 61, 18, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 118. Také byl testován jeden slepý vzorek. Limit detekce je stanoven na 1,25 ppb (ng/g). V našem případě, kdy byly využity vzorky po separacích na imunoafinitních kolonkách a po HPLC stanovení a následném odpaření vzorků však detekční limit OTA činil přibližně 50 ng/kg (tj. 0,05 ng/g). Celkem bylo měření opakováno čtyřikrát a z hodnot jednotlivých měření byly vytvořeny průměry, s kterými bylo nadále pracováno (viz tabulka č. 4). Zastoupení pozitivních vzorků bylo 100 %. Pomocí ELISA přístroje byly získány hodnoty absorbance (viz tabulka č. 6) a koncentrace vzorků, byl vypočítán aritmetický průměr, medián, rozsah, směrodatná odchylka a variační koeficient (viz tabulka č. 5).

V národní referenční laboratoři byly pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie naměřeny vysoké hodnoty koncentrace OTA nad 1800 ng/kg u vzorků lékořice č. 28, 48, 08. Proto byly vzorky před použitím ELISA testu nejprve zředěny a poté byla také změřena absorbance a koncentrace vzorků (viz tabulka č. 7). Vzorek 28 a 48 byl zředěn 5x, 10x a 15x tím způsobem, že k 100 µl vzorku bylo přidáno 400 µl, 900 µl a 1400 µl NaHCO₃. U vzorku č. 08 došlo ke zředění 10x, 20x a 30x tak, že k 100 µl vzorku bylo pipetováno 900 µl, 1900 µl a 2900 µl NaHCO₃.

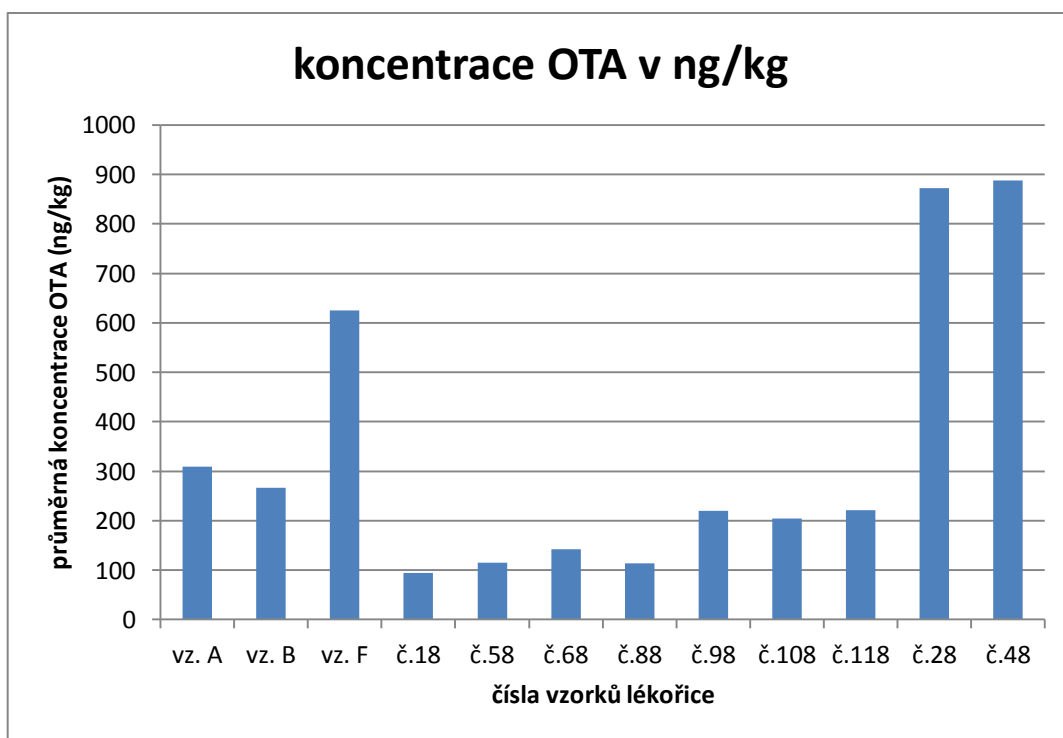
Tab. č. 4: Koncentrace OTA v lékořici zjištěné pomocí ELISA fotometru po předchozím vyčištění na imunoafinitních kolonkách

Vzorky	n	n+	Aritm. průměr (ng/g)	Medián (ng/g)	Perc. 90% (ng/g)	Min. (ng/g)	Max. (ng/g)
lékořice	24	24	2,47	0,22	17,2	0,09	28,07

n (počet vzorků), n+ (počet pozitivních vzorků; ≥ 50 ppt (0,05 ng/g) = LD=limit detekce)

Graf (viz graf č. 2) znázorňuje koncentrace ochratoxinu A v náhodně vybraných vzorcích, které se nacházejí v rozmezí 0,09 – 28,07 ng/g. K výpočtu byly použity

i naředené vzorky, které byly vynásobeny za účelem získání definitivních hodnot. Maximální limit OTA v kořeni lékořice je stanoven Nařízením Komise ES č. 1881/2006 na hodnotu 20 ng/g. Tento povolený limit byl překročen u vzorku č. 08, jehož koncentrace byla 28,07 ng/g.



Graf č. 2: Stanovení průměrné koncentrace v náhodně vybraných vzorcích lékořice

(Vysvětl.: Z důvodu optimalizace výsledků při statistickém zpracování byly vyloučeny odlehlé hodnoty měření. V tomto případě se jednalo o vzorky: č. 28, 48 a 08.)

U směsného vzorků mletého kořene lékořice C, D, E a u vzorku lékořice č. 61 a 78 byla naměřena hodnota vyšší než 1800 ppt, tj. 1,8 ng/g. Vzhledem k finanční náročnosti této metody nebylo možné měření zopakovat pro přesné stanovení. Tato hodnota však ukazuje vysoké koncentrace ochratoxinu A v analyzovaných vzorcích lékořice.

Tab. č. 5 - Stanovení ochratoxinu A ve vzorcích lékořice – koncentrace (ng/kg)

měření	koncentrace (ppt)
1	309,3
2	266,9
3	625,4
4	94,4
5	115,4
6	142,7
7	113,3
8	219,8
9	203,8
10	221,5
aritmetický průměr	231,3
medián	211,8
rozsah	94, 3; 625,4
směrodatná odchylka	155,5
90 % percentil	340,9

5 Diskuze

S využitím testovací sady RIDASCREEN byly analyzovány vzorky lékořice a směsné vzorky mletého kořene lékořice. Pro stanovení koncentrace byl použit přístroj ELISA BioTek EPOCH, který měří na základě pohlcení světla různých vlnových délek. Dále byla pro práci použita promývačka BioTek ELx50, která je nezbytnou součástí přístrojového vybavení a umožňuje intenzivní promývání během ELISA testů.

V národní referenční laboratoři mi bylo umožněno naučit se přípravu vzorku pro stanovení ochratoxinu A. Metoda probíhala podle návodu Zimmerli & Dick (1995), kterou v laboratoři běžně využívají. Pro úpravu vzorků se používají imunoafinitní kolonky a analytickou koncovkou je zde vysokoúčinná kapalinová chromatografie, pomocí které byly změřeny vzorky lékořice. Stejně vzorky odpařené po HPLC stanovení pak byly analyzovány pomocí ELISA metody. Navíc díky využití imunoafinitní chromatografie před HPLC stanovením a po následném odpaření zbytku vzorku se tím podařilo odstranit tzv. zkříženou reaktivitu (cross-reactivity), která se uvádí při striktním dodržení návodu při běžném použití ELISA setu, kdy vedle 100 % reaktivity OTA ruší navíc ochratoxin C ze 44 %, ochratoxin B ze 14 % a ochratoxin α $\leq 0,1$ %, což v konečném důsledku vedlo ke zcitlivění metody stanovení a získání detekčního limitu ve výši 50 ppt, tj. 0,05 ng/g.

Maximální limit obsahu OTA v kořenu lékořice a ve složce bylinného čaje je stanoven na hodnotu 20 ng/g. U lékořice, jejíž výtažek je součástí cukrovinek a potravinářských nápojů je dán maximální limit 80 ng/g.

Celkově měření každého vzorku proběhlo čtyřikrát a z hodnot byly vytvořeny průměry, které se využily pro další statistické zhodnocení. Díky fotometru ELISA byly změřeny hodnoty absorbance při vlnové délce 450 nm a koncentrace v ng/kg. Z celkového počtu 24 vzorků se koncentrace ochratoxinu A pohybovala v rozmezí od 0,09 ng/g až do 28,07 ng/g (ppb). Průměrná hodnota byla stanovena na 2,47 ng/g a medián je 0,22 ng/g. Vzhledem k tomu že v národní referenční laboratoři byly pomocí HPLC stanoveny vysoké hodnoty koncentrace OTA některých vzorků, pro měření pomocí ELISA testu byly tyto vzorky zředěny.

Vzorek č. 28 a č. 48 byl zředěn 5x, 10x a 15x, vzorek č. 08 byl zředěn 10x, 20x a 30x. Právě u těchto vzorků byly naměřeny nejvyšší koncentrace OTA, u vzorku č. 28 je koncentrace 0,87 ng/g, u vzorku č. 48 je to 0,88 ng/g. U vzorku č. 08 byla naměřena koncentrace dokonce 28,07 ng/g.

U pěti vzorků byla pomocí spektrofotometru naměřena koncentrace vyšší než 1,8 ng/g (1 800 ppt). Aby bylo možné stanovit přesnou hodnotu, bylo by nutné vzorky zředit a znovu provést měření. Vzhledem k finanční náročnosti této metody však již nebylo možné analytické stanovení zopakovat a získat tak přesné koncentrace těchto vzorků. Proto byly tyto hodnoty z celkového průměru vyřazeny. Je tedy jasné, že by průměrná koncentrace při započítání těchto hodnot byla mnohem vyšší. Ovšem i tyto naměřené hodnoty jsou důležitým ukazatelem, že ve vzorcích lékořice byla vysoká koncentrace ochratoxinu A.

Bylo zjištěno, že každý měřený vzorek lékořice obsahoval ochratoxin A. Pomocí ELISA metody byla stanovena koncentrace OTA v lékořici v rozmezí 0,09 – 28,07 ng/g. Pokud jsou výsledky srovnány s výzkumy odborných článků, některé námi naměřené hodnoty se jim přibližují.

Jedním z největších dovozců lékořice je Čína. Díky statistickým údajům z roku 2011 bylo zjištěno, že 3300 tun této rostliny bylo odtud exportováno do Japonska, Korey, Německa, Spojených států a dalších zemí. Planě rostoucí druhy lékořice (*G. uralensis*, *G. inflata* and *G. glabra*) jsou hlavně distribuovány do vyprahlých pouští a travnatých oblastí Gansu, Ningxia, Xinjiang a Vnitřního Mongolska na severozápadu Číny, nejvíce využívanou varietou je *G. uralensis* (Chen *et al.*, 2013).

V Německu byla provedena analýza 83 vzorků kořene lékořice a produktů s obsahem lékořice využívaných v potravinářském a lékařském odvětví. Byly zjištěny vysoké koncentrace ochratoxinu A v hodnotách od 0,3 ng/g do 64,3 ng/g, (medián 4,5 ng/g), u dětských čajů bylo množství nižší (0,1-0,4 ng/g). Hodnoty OTA v léčivech závisí na obsahu lékořice, pohybovaly se v rozmezí 2,6-50,3 ng/g (Majerus *et al.*, 2000).

Ve Španělsku bylo analyzováno 30 vzorků kořene lékořice, cukrovinek s obsahem lékořice, lékořicových bloků a extraktů kapalinovou chromatografií. Všechny

produkty obsahovaly OTA, u sušeného kořene byl průměr 63,6 ng/g, u čerstvého kořene 9,2 ng/g a v cukrovinkách byla průměrná hodnota 3,8 ng/g (Ariño *et al.*, 2007).

Chen *et al.* (2013) testovali v lékořici přítomnost ochratoxinu A a aflatoxinu B1 ve 3 různých regionech Číny. Bylo zjištěno, že se ve vzorcích vyskytuje 9 rodů plísní zahrnujících 22 druhů. Byly izolovány 2 nové druhy plísně rodu *Penicillium* (*Penicillium glycyrrhizicola* sp. nov. a *Penicillium xingjiangense* sp. nov.). Pomocí kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrofotometrie bylo analyzováno 5 druhů, které byly schopny syntetizovat ochratoxin A (*Penicillium chrysogenum*, *P. glycyrrhizicola*, *P. polonicum*, *Aspergillus ochraceus* a *A. westerdijkiae*) o koncentraci v rozmezí 13,0 – 39,1 ng/g.

Ariño, Herrera *et al.* (2006) uvádějí výsledky analýzy ochratoxinu v lékořici. Nejvyšší zjištěné hodnoty dosahují koncentrace OTA ve výši 252,8 ng/g. Sušený kořen lékořice obsahoval v průměru 63,6 ng/g a v čerstvém kořenu lékořice bylo naměřeno v průměru 9,2 ng/g. V cukrovinkách s obsahem lékořice byla stanovena hodnota OTA 3,8 ng/g.

V Německu byly získány vzorky kořene lékořice a sladkostí s obsahem lékořice z různých obchodů a lékáren. Pomocí LC/MS-MS (kapalinové chromatografie – hmotnostní spektrofotometrie a kapalinové chromatografie a tandemové hmotnostní spektrofotometrie), rozsah koncentrací ochratoxinu A se pohyboval v rozsahu od 0,3 do 216 ng/g (Bresch *et al.*, 2000).

Arrino *et al.* (2007) uvádí, že z lékořice a jejích dalších produktů přejde 5 % OTA do čaje při přípravě formou odvaru a 1 % při vyluhování. Studie, kterou provedl Shim *et al.* (2014), zjistila vyšší hodnoty při získávání odvaru z lékořice a to okolo 12 – 61 %. Pro konzumenty, kteří si připravují z kontaminovaných bylin ochratoxinem A čaje, je tento přenos potenciálním nebezpečím. Jelikož asijské země mají vyšší spotřebu čajů připravených z léčivých rostlin, je nutné, aby existoval bezpečný management z hlediska kontaminace OTA., tj. minimalizace zdravotních dopadů pro člověka.

Leslie & Logrieco (2014) ve své publikaci uvádí, že po 40-160 minutách při použití suchého tepla o teplotě 100°C nebyl ochratoxin A v obilninách degradován. Pokud

se však použije k degradaci vlhké teplo, je obsah mykotoxinu snížen více než o 50 % po dvou hodinách. Během pečení chleba je tedy ochratoxin A stabilní. U lékořice však nedošlo k redukci ochratoxinu A při teplotě 150°C po dobu 60 minut, což znamená relativně vysoké riziko z hlediska možného přívodu OTA do lidského organismu.

6 Závěr

Ochratoxin A (OTA) byl Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny zařazen jako potenciální karcinogen, sk. 2B. Dokonce se začínají objevovat názory o jeho možném přeřazení do skupiny 2A, pravděpodobný či dokonce do skupiny 1, prokázaný karcinogen. Tento mykotoxin se navíc vyznačuje především významnými nefrotoxickými, dále také hepatotoxickými, imunosupresivními a teratogenními účinky a představuje tak významné zdravotní nebezpečí. Důležité je proto stanovení maximálního limitu jeho přívodu v potravinách a znalost zkonsumovaného množství potravin u jednotlivce.

Lékořice je běžně používanou rostlinou v různých odvětvích, například ve farmaceutickém průmyslu, kosmetice, v potravinářství a také jsou z ní připravovány čajové směsi. Tato bylina má významné farmakologické účinky, slouží jako expektorans, antipyretikum, navíc díky obsahu glycirrhizinu zvyšuje krevní tlak. V ES je maximální limit obsahu ochratoxinu A v kořeni lékořice stanoven na 20 ng/g. Koncentrace OTA ve výtažku z lékořice nesmí překročit 80 ng/g. Ten se používá při přípravě nápojů a cukrovinek.

Pomocí ELISA metody bylo analyzováno 24 vzorků lékořice, přičemž ve všech měřeních byla potvrzena přítomnost ochratoxinu A. Ve vzorcích byly zjištěny pozitivní koncentrace OTA. V Národní referenční laboratoři pro metabolity mykotoxinů a mykotoxiny v potravinách při Zdravotním ústavu Ústí nad Labem, regionální pracoviště Hradec Králové byly vzorky analyzovány také pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Díky absolvování čtrnáctidenní stáže v této laboratoři jsem získala cenné zkušenosti při přípravě mykotoxinů, týkající se jejich extrakcí ze vzorků a vyčištění na imunoafinitních kolonkách a stanovení HPLC metodou.

Vzhledem k tomu, že i v této práci byly potvrzeny pozitivní nálezy ochratoxinu A v lékořici, je důležité se stanovením OTA pomocí moderních laboratorních metod v této surovině, případně již upravené potravině, neustále zabývat, protože na základě globalizace potravinového trhu jsou k nám dováženy suroviny a

potraviny z celého světa, což se týká i dovážené lékořice, mnohdy vysoce kontaminované.

7 Seznam Literatury

- ABOU-DONIA, M. *Mammalian Toxicology*. United Kingdom. John Wiley & Sons, 2015. 720 s. ISBN: 978-1-119-94041-8.
- AgraQuant Ochratoxin Assay 2/40. Singapore. Romer Labs, 2008. 4s.
- ASHIQ, S. Natural Occurrence of Mycotoxins in Food and Feed: Pakistan Perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **14**, 159-175.
- ARIÑO, A., HERRERA, M., ESTOPAÑAN, G., & JUAN, T. 2006: High levels of ochratoxin A in licorice and derived products. *International Journal of Food Microbiology*, **114**, 366-369.
- BARKAI-GOLAN, R., & PASTER, N. *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*. Washington. Academic Press, 2011. 408 s. ISBN-13: 000-0123741262.
- BARROSO, J. M., 2010. Commission Regulation (EU) No 105/2010 [online]. Access to European Union law. [cit. 2015-02-08]. Dostupné z WWW: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32010R0105>>.
- BARTUŇKOVÁ, J., & PAULÍK, M. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2. vyd. Praha. Grada, 2011. 172 s. ISBN: 978-80-247-3533-7.
- BIOTEK, 2015. Epoch Microplate Spectrophotometer [online]. BioTek. [cit. 2015-04-08]. Dostupné z WWW: <http://www.biotek.com/products/microplate_detection/epoch_microplate_spectrophotometer.html>.
- BLACKBURN, C. W. *Food Spoilage Microorganisms*. Cambridge. Woodhead Publishing, 2006. 736 s. ISBN-13: 9781855739666.
- BLANEY, K. D., & HOWARD, P. R. *Basic & Applied Concepts of Blood Banking and Transfusion Practices*. 3. vyd. St. Louis. Elsevier Health Sciences, 2008. 400 s. ISBN-13: 978-0323086639.
- BRESCH, H., URBANEK, M., & NUSSER, M., 2000: Ochratoxin A in food containing liquorice. *Nahrung*, **44**, 276–278.

- BRIDGE, P. D. *Applications of PCR in Mycology*. Tucson. CABI, 1998. 257 s. ISBN-13: 978-0851992334 .
- BROWN, P. R., & GRUSHKA, E. *Advances in Chromatography*. New York. CRC Press, 2003. 448 s. ISBN: 0-8247-0950-0.
- CARLILE, M. J., WATKINSON, S. C., & GOODAY, G. W. *The Fungi*. London. Academic Press, 2001. 588 s. ISBN: 978-0-12-738445-0.
- CHEN, A. J., TANG, D., ZHOU, Y. Q., SUN, B. D., LI, X. J., WANG, L. Z., & GAO, W. W. 2013: Identification of Ochratoxin A Producing Fungi Associated with Fresh and Dry Liquorice. *PloS ONE*, **8**, e78285.
- CIGIC, I. K., & PROSEN, H. 2009: An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. *International Journal of Molecular Sciences*, **10**, 62-115.
- COLE, J. L. *Modern Methods in the Analysis and Structural Elucidation of Mycotoxins*. London. Academic Press, 2012. 486 s. ISBN: 978-0-12-179515-3.
- CREPPY, E. E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, **127**, 19-28.
- CROWTHER, J. R. *The ELISA Guidebook*. Totowa. Humana Press, 2000. 436 s. ISBN: 978-0-89603-950-6.
- CWIKOVÁ, O. 2014. Imunochemické metody [online]. Speciální mikrobiologie [cit. 2015-04-03]. Dostupné z WWW: <http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=2613>.
- DAINTITH, J. *Oxford Dictionary of Chemistry*. Oxford. Oxford University Press, 2008. 592 s. ISBN-13: 978-0199204632.
- DESHPANDE, S. S. *Handbook of Food Toxicology*. New York. CRC Press, 2002. 920 s. ISBN 0-8247-0760-5.
- DEVRIES, J. W., TRUCKSESS, M. W., & JACKSON, L. S. *Mycotoxins and Food Safety*. New York. Springer, 2002. 295 s. ISBN 0-306-46780-1.

DOBIÁŠ, L. *Obecná a speciální mikrobiologie*. 1. vyd. Ostrava. Multex soft, 2003. 218 s.

DOHNAL, V., DVOŘÁK, V., MALÍŘ, F., OSTRÝ, V., & ROUBAL, T. 2013: A comparison of ELISA and HPLC methods for determination of ochratoxin A in human blood serum in the Czech Republic. *Food and Chemical Toxicology*, **62**, 427-431.

DONG, M. W. *Modern HPLC for Practicing Scientists*. Hoboken. John Wiley & Sons, 2006. 320 s. ISBN: 978-0-471-72789-7.

ELGERT, K. D. *Immunology: Understanding The Immune System*. 2.vyd. Hoboken. John Wiley & Sons, 2009. 726 s. ISBN: 978-0-470-08157-0.

EMON, J. M. *Immunoassay and Other Bioanalytical Techniques*. New York. CRC Press, 2006. 536 s. ISBN 978-0-8493-3942-4.

FATHIMUNISA, B. *Immunology*. Delhi. PHI Learning Pvt. Ltd., 2014. 604 s. ISBN: 978-81-203-4983-4.

FERNÁNDEZ-CRUZ, M. L., MANSILLA, M. L., & TADEO, J. L. 2010: Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. *Journal of Advanced Research*, **1**, 113-122.

FRATAMICO, P. M., BHUNIA, A. K., & SMITH, J. L. *Foodborne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology*. Wymondham. Caister Academic Press, 2005. 453 s. ISBN: 978-1-904455-00-4.

HABUŠTOVÁ, O., SEHNAL, F., SVOBODOVÁ, Z., & HUSSEIN, H. M. *Optimalizace metodiky ELISA pro stanovení obsahu Cry3Bb1 toxinu v různých částech kukuřice pomocí komerčního kitu*. České Budějovice. Biologické Centrum AV ČR, 2011. 27 s. ISBN: 978-80-86668-11-6.

HALT, M. 1998: Moulds and mycotoxins in herb tea and medicinal plants. *European Journal of Epidemiology*, **14**, 269-274.

HERRERA, M., HERRERA, A., & ARIÑO, A. 2009: Estimation of dietary intake of ochratoxin A from liquorice confectionery. *Food and Chemical Toxicology*, **47**, 2002-2006.

JANATKOVÁ, I. 2014. Imunochemické metody [online]. Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky. [cit. 2015-04-05]. Dostupné z WWW:

<<http://che1.lf1.cuni.cz/html/imuno.pdf>>.

JEMO TRADING, 2014. Analýza mykotoxínů v potravinách a krmivách [online].

JEMO TRADING. [cit. 2015-02-05]. Dostupné z WWW:< <http://www.profood.sk/>>.

KLEIBÖHMER, W. *Environmental Analysis*. Amsterdam. Elsevier, 2001. 324 s. ISBN: 0-444-50021-9.

KODÍČEK, M. 2004. Biochemické pojmy [online]. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. [cit. 2015-02-15]. Dostupné z WWW:

<http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/ebook.obsah.htm>.

KHALESİ, M., SHEİHH-ZEİNOİDİN, & M. TABRİZCHİ, M. 2010: Determination of ochratoxin A in licorice root using inverse ion mobility spectrometry. *Talanta*, **83**, 988-993.

KUMAR, S. *Textbook of Microbiology*. New Delhi. Jaypee Brothers Medical Publisher, 2012. 784 s. ISBN: 978-93-5025510-0.

LAWLEY, R., CURTIS, L., & DAVIS, J. *The Food Safety Hazard Guidebook*. Cambridge. RSC Publishing, 2012. ISBN: 978-1-84973-381-6.

LESLIE, J. F., BANDYOPADHYAY, R., & VISCONTI, A. *Mycotoxins: Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural Trade*. Cambridge. CABI, 2008. 476 s. SBN-13: 978-1845930820.

LESLIE, J. F., & LOGRIECO, A. *Mycotoxin Reduction in Grain Chains*. Oxford. Wiley-Blackwell, 2014. 376 s. ISBN: 978-0-8138-2083-5.

LIU, D. *Molecular detection of foodborne pathogens*. Boca Raton. CRC Press, 2009. 905 s. ISBN-13: 978-1420076431.

LUKÁŠ, Z., DRÁBEROVÁ, E., FEIT, J., & VOJTĚŠEK, B. *Imunohistochemické metody v biologii a v bioptické diagnostice*. Brno. Masarykova univerzita, 1997. 170 s. ISBN 80-210-0620-X.

- MAGAN, N. & OLSEN, M. *Mycotoxins in food: Detection and control*. Abington. Woodhead Publishing, 2004. 471 s. ISBN: 1-85573-733-7.
- MAJERUS, P., MAX, M., KLAFFKE, H., & PLAVINSKAS, R. 2000: Ochratoxin A in Süssholz, Lakritze und daraus hergestellten Erzeugnissen. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. **96**, 451–454.
- MALEKINEJAD, H., FARSHID, A. A., & MIRZAKHANI, N. 2009: Liquorice plant extract reduces ochratoxin A-induced nephrotoxicity in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, **63**, 125-130.
- MALÍŘ, F., OSTRÝ, V. a kol. *Mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka*. Brno. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů (NCO NZO), 2003. 349 s. ISBN: 80-7013-395-3.
- MATUŠINSKY, P., VÁŇOVÁ, M., POLIŠENSKÁ, I., SPITZEROVÁ, D., JANEČEK, M., & SMUTNÝ, V., 2013: Nepřímá opatření k omezení výskytu klasových fuzarióz u obilovin. *Obilnářské listy*, **21**, 62-64.
- MCMMASTER, M. *HPLC: A Practical User's Guide*. Hoboken, John Wiley & Sons, 2007. 256 s. ISBN: 0-471-75401-3.
- MILIOTIS, M. D., & BIER, J. W. *International Handbook of Foodborne Pathogens*. New York. CRC Press, 2003. 688 s. ISBN: 978-0-8247-0685-2.
- MEGDAL, P. A. *Molecular Strategies for Human Nutrition: Screening for Wild-caught Salmon by Fatty Acid Measurements and Effects of Foods on Insulin Levels in Post-prandial Fingertick Blood Samples*. Ann Arbor. ProQuest, 2009. 112 s. ISBN: 1-109-19654-7.
- MODRÁ, H., SVOBODOVÁ, Z., ŠIROKÁ, Z., & BLAHOVÁ, J. *Toxikologie potravin – vybrané kapitoly*. Brno. Veterinární a farmaceutická fakulta Brno, 2014. 87 s. ISBN: 978-80-7305-751-0.
- MOTARJEMI, Y., MOY, G., & TODD, E. *Encyclopedia of Food Safety*. London. Academic Press, 2013. 2304 s. ISBN: 978-0-12-378613-5.

NEOGEN, 2014. Food safety mycotoxins [online]. NEOGEN Food Safety. [cit. 2015-01-20]. Dostupné z WWW:

<http://www.neogen.com/FoodSafety/FS_NT_Index.html >.

NOLLET, L. M. L. *Food Analysis by HPLC*. 2. vyd. New York. CRC Press, 2000. 1068 s. ISBN: 0-8247-8460-X.

NOLLET, L. M. L., & TOLDRÁ, F. *Handbook of Processed Meats and Poultry Analysis*. Boca Raton. CRC Press, 2008. 760 s. ISBN: 978-1-4200-4531-4.

NOLLET, L. M. L., & TOLDRÁ, F. *Safety Analysis of Foods of Animal Origin*. Boca Raton. CRC Press, 2011. 1002 s. ISBN-13: 978-1439848173.

OSTRÝ, V. *Vláknité mikroskopické houby (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka*. Praha. Státní zdravotní ústav, 1998. 20 s. ISBN: 80-7071-102-7.

PATOČKA, J. *Vojenská toxikologie*. Praha. Publishing, 2004. 178 s. ISBN: 80-247-0608-3.

PETER, K. V. *Handbook of Herbs and Spices*. Cambridge. Woodhead Publishing, 2006. 568 s. ISBN: 978-0-85709-040-9.

PFOHL-LESZKOWICZ, A., & MANDERVILLE, R. A., 2007: Ochratoxin A: an overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, **51**, 61–99.

QUINTELA, S. VILLARÁN, C., LÓPEZ DE ARMENTIA, I., & ELEJALDE, E. 2012: Ochratoxin A removal in wine: A review. *Food Control*, **30**, 439-445.

RAI, M., & VARMA, A. *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*. London. Springer, 2009. 405 s. ISBN: 978-3-642-00725-5.

RIDASCREEN Ochratoxin A 30/15. *Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of ochratoxin A*. Darmstadt. R. Biopharm AG, 2014. 18 s.

ROMAGNOLI, B., MENNA, V., GRUPPIONI, N. & BERGAMINI, C. 2006: Aflatoxins in spices, aromatic herbs, herb-teas and medicinal plants marketed in Italy. *Food Control*, **18**, 697-701.

SCF (Scientific Committee on Food). 1998: Opinion of the Scientific Committee on Food on ochratoxin A (expressed on 17 September 1998). Directorate – Scientific Opinions. European Commission, Brussels, Belgium.

SHAN, G. *Immunoassays in Agricultural Biotechnology*. Hoboken. John Wiley & Sons, 2011. 368 s. ISBN: 978-0-470-28952-5.

SHAW, D. 1998: Risks or remedies? Safety aspects of herbal remedies in the UK. *Journal of the Royal Society of Medicine*, **91**, 294–296.

SHIBAMOTO, T., & BJELDANES, L. F. *Introduction to Food Toxicology*. San Diego. Academic Press, 2012. 213s. ISBN: 978-0-08-092577-6.

SHIM, W. HA, K., KIM, M., KIM, J., & CHUNG, D. 2014: Evaluation of the Transfer Rate of Ochratoxin A to Decoctions of Herbal Medicines. *Food Science and Biotechnology*, **23**, 2103-2108.

SINHA, K. K. *Mycotoxin Induced Physiological Responses in Crop Plants*. New Delhi. M.D. Publications Pvt. Ltd., 1996. 124 s. ISBN: 81-7533-016-3.

STEJSKAL, V., & HAJŠLOVÁ, J. *Bioanalytické metody pro hodnocení bezpečnosti zemědělských surovin a produktů*. Praha. Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí, 2008. 52 s.

SVOBODOVÁ, Z. 2013. Kvantitativní stanovení ochratoxinu metodou ELISA [online]. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. [cit. 2015-03-19]. Dostupné z WWW:

<<http://cit.vfu.cz/toxpotr/soubory/Cviceni%202013/cv5MykotoxinyELISAochratoxin.pdf>>.

ŠIMŮNEK, J. 2004. Plísňe a mykotoxiny [online]. Lékařská fakulta Masarykovy univerzity. [cit. 2015-03-25]. Dostupné z WWW:

<http://www.med.muni.cz/dokumenty/pdf/plisne_a_mykotoxiny.pdf>.

TRUCKSESS, M. W., & SCOTT, P. M. 2007: Mycotoxins in botanicals and dried fruits: A review. *Food Additives and Contaminants*, **25**, 181-192.

TURNER, N. W., SUBRAHMANYAM, S., & PILETSKY, S. A. 2008: Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, **632**, 168-180.

Uživatelská příručka ELx50 Automatická promývačka stripů. Praha. DYNEX, 2014. 63 s.

VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno. Neptun, 2003. 495 s. ISBN: 80-902896-6-5.

WALKER, J. M., & RAPLEY, R. *Molecular Biomethods Handbook*. Hatfield. Humana Press, 2008. 1124 s. ISBN: 978-1-60327-370-1.

ZAJONCOVÁ, L. 2013. Imunochemické metody [online]. Univerzita Palackého v Olomouci. [cit. 2015-04-10]. Dostupné z WWW:

<http://biochemie.upol.cz/doc/skripta/kbc/Imunochemicke_metody.pdf>.

ZBÍRAL, J. 2011. Stanovení obsahu mykotoxinů metodou HPLC – ochratoxin A [online]. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. [cit. 2015-03-12].

Dostupné z WWW:

<http://eagri.cz/public/web/file/246935/_10562.1 Stanoveni obsahu mykotoxinu_HPLC_OTA.pdf>.

ZHANG, A., MA, Y., FENG, L., WANG, Y., CHENGHUA, H., WANG, X., & ZHANG, H. 2011: Development of a sensitive competitive indirect ELISA method for determination of ochratoxin A levels in cereals originating from Nanjing, China. *Food Control*, **22**, 1723-1728.

ZIMMERLI, B., & DICK, R. 1995: Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup" methodology and Swiss data. *Journal of Chromatography*, **666**, 85-99.

ŽÁKOVSKÁ, A. 2012. Imunohistochemické metody [online]. Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity. [cit. 2015-04-10]. Dostupné z WWW:

<www.sci.muni.cz/ofiz/wp-content/uploads/2012/10/ELISA1.ppt>.

8 Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obr. 1: Koření a kontaminace mykotoxiny (cit. 12. 3. 2015). Dostupné na WWW:
<http://www.globalgrinders.com/blog/top-tips-for-buying-storing-and-using-whole-spices/>

Obr. 2: Lékořice lysá (Glycyrrhiza glabra) (cit. 2. 3. 2015). Dostupné na WWW:
<http://www.uniprot.org/taxonomy/49827>

Obr. 3: Kořen lékořice a výrobky (cit. 12. 3. 2015) Dostupné z WWW:
<http://www.bag.admin.ch/themen/drogen/00041/00618/13196/13208/?lang=d>

Obr. 4: Pipetování STOP roztoku (foto V. Dvořák, 4. 2. 2015)

Obr. 5: Barevné změny po přidání STOP roztoku (foto V. Dvořák, 4. 2. 2015)

Obr. 9: Fotometr EPOCH (foto V. Dvořák, 4. 2. 2015)

Obr. 7: Automatická promývačka stripů ELx50TM (foto V. Dvořák, 4. 2. 2015)

Obr. 8: Ovládání automatické promývačky (foto V. Dvořák, 4. 2. 2015)

Tab. č. 1- Stanovení maximálního limitu OTA v některých kontaminujících látkách

Tab. č. 2: Znázornění standardů a vzorků na mikrotitrační destičce

Tab. č. 3: Koncentrace standardů a jejich absorbance

Tab. č. 4: Koncentrace OTA v lékořici zjištěné pomocí ELISA fotometru po předchozím vyčištění na imunoafinitních kolonkách

Tab. č. 5 - Stanovení ochratoxinu A ve vzorcích lékořice – koncentrace (ng/kg)

Tab. č. 6 – Stanovení ochratoxinu A ve vzorcích lékořice při absorbanci (450 nm)

Tab. č. 7 - Stanovení OTA v naředěných vzorcích lékořice při absorbanci (450 nm)

Graf č. 1: Výsledky měření standardů ochratoxinu A

Graf č. 2: Stanovení průměrné koncentrace v náhodně vybraných vzorcích lékořice

9 Přílohy

Tab. č. 6 – Stanovení ochratoxinu A ve vzorcích lékořice při absorbanci (450 nm)

měření	absorbance (a.j.)
1	1,0
2	1,0
3	0,6
4	1,6
5	1,4
6	0,1
7	1,1
8	1,2
9	1,1
10	1,8
aritmetický průměr	0,8
medián	1,0
rozsah	0,1; 1,8
směrodatná odchylka	0,6
variační koeficient	0,7

Tab. č. 7 - Stanovení OTA v naředěných vzorcích lékořice při absorbanci (450 nm)

měření	absorbance (a.j.)
1	1,6
2	1,6
3	1,7
4	1,6
5	1,8
6	1,7
7	0,1
8	0,2
9	0,3
10	1,7
aritmetický průměr	1,2
medián	1,6
rozsah	0,1; 1,8
směrodatná odchylka	0,7
variační koeficient	0,5