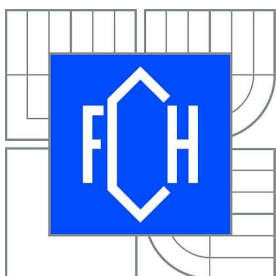


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

SLEDOVÁNÍ OBSAHU VYBRANÝCH TRICHOTHECENOVÝCH MYKOTOXINŮ VE SLADOVNICKÉM JEČMENI

MONITORING OF THE CONTENT OF SELECTED TRICHOTHECENE MYCOTOXINS IN
MALTING
BARLEY

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. LUCIE HRDINOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. SYLVIE BĚLÁKOVÁ

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0364/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Lucie Hrdinová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinařská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Ing. Sylvie Běláková	
Konzultanti:	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.	

Název diplomové práce:

Sledování obsahu vybraných trichothecenových mykotoxinů ve sladovnickém ječmeni

Zadání diplomové práce:

Zpracování literární rešerše zaměřené na:

1. Přehled a charakteristika významných trichothecenových mykotoxinů
2. Mykotoxiny v sladovnickém ječmeni
3. Možnosti stanovení vybraných mykotoxinů v sladovnickém ječmeni

Experimentální část:

1. Optimalizace analýzy vybraných trichothecenových mykotoxinů v obilce ječmene pomocí LC-MS/MS
2. Stanovení vybraných trichothecenových mykotoxinů v odrůdách sladovnického ječmene

Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2010

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Lucie Hrdinová
Student(ka)

Ing. Sylvie Běláková
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá sledováním obsahu trichothecenových mykotoxinů deoxynivalenolu, nivalenolu, T-2 toxinu a HT-2 toxinu ve sladovnickém ječmeni pomocí metody LC-MS/MS.

V teoretické části byla popsána obecná charakteristika mykotoxinů a jejich významný producent, vláknité houby rodu *Fusarium*. Dále byly charakterizovány významné trichothecenové mykotoxiny a obecně mykotoxiny vyskytující se ve sladovnickém ječmeni. V teoretické části diplomové práce byly dále předloženy možnosti stanovení mykotoxinů chromatografickými metodami, zmíněny byly také metody imunochemické.

V experimentální části byla optimalizována analýza trichothecenů typu B pomocí LC/APCI-MS/MS a trichothecenů typu A pomocí LC/ESI-MS/MS. Při analýze 57 vzorků různých odrůd ječmene dosahoval nejvyšších hodnot deoxynivalenol (až 945,2 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), a to v případě odrůdy Sebastian, kde předplodinou byla kukuřice. Nejvyšší hodnoty nivalenolu, T-2 toxinu a HT-2 toxinu (v pořadí 138,4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$; 21,8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ a 68,7 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) byly nalezeny v odrůdě ječmene Prestige, kde předplodinou byla pšenice ozimá.

Následně byla provedena analýza druhého souboru čtyř experimentálních vzorků odrůdy ječmene Sebastian a z něj vyrobeného sladu, kde předplodinou byla kukuřice. V tomto souboru byly tři vzorky uměle infikovány vláknitými houbami rodu *Fusarium*, čtvrtý vzorek nebyl uměle infikován a sloužil jako kontrolní. I v tomto případě dosahoval deoxynivalenol u uměle infikovaných vzorků nejvyšších hodnot.

Diplomová práce byla realizována ve Výzkumném ústavu pivovarském a sladařském a. s. v Brně.

KLÍČOVÁ SLOVA

mykotoxiny, trichotheceny, deoxynivalenol, nivalenol, T-2 toxin, HT-2 toxin, LC-MS/MS, ječmen

ABSTRACT

This master thesis deals with a monitoring of a content of the trichothecene mycotoxins deoxynivalenol, nivalenol, T-2 toxin and HT-2 toxin in malting barley using the LC-MS/MS method.

The theoretical part describes general characteristics of mycotoxins and their significant producer filamentous fungus of *Fusarium* species. Further, important trichothecene mycotoxins and mycotoxins generally which are commonly found in malting barley were also characterized. In the theoretical part of the thesis possibilities for a determination of the mycotoxins by the chromatographic methods were presented too; the immunochemical methods were also mentioned.

In the experimental section an analysis of the B type trichothecenes was optimized by LC/APCI-MS/MS and of the A type trichothecenes by LC/ESI-MS/MS. When analyzing 57 samples of different barley varieties the deoxynivalenol reached the highest values (up to 945,2 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), namely in the case of the Sebastian variety with corn as the fore-crop. The highest values of nivalenol, T-2 toxin and HT-2 toxin (138,4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$; 21,8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ and 68,7 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ respectively) were found in the Prestige variety of barley with winter wheat as the fore-crop.

Subsequently a second set of four experimental samples of the Sebastian variety of barley and malt produced from the variety with corn as the fore-crop were analysed. In this group three samples were artificially infected with the filamentous fungi of *Fusarium* species; the fourth sample was not artificially infected and served as a control sample. Even in the case of the artificially infected samples the deoxynivalenol reached the highest values.

The master thesis was implemented in the Research Institute of Brewing and Malting, Plc. in Brno.

KEYWORDS

mycotoxins, trichothecenes, deoxynivalenol, nivalenol, T-2 toxin, HT-2 toxin, LC-MS/MS, barley

HRDINOVÁ, L. *Sledování obsahu vybraných trichothecenových mykotoxinů ve sladovnickém ječmeni*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 67 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Sylvie Běláková.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Sylvii Bělákové za odborné vedení, konzultace a užitečné rady při řešení této diplomové práce, dále RNDr. Renatě Mikulíkové za umožnění měření a doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za zprostředkování měření diplomové práce. Děkuji také pracovníkům Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského a. s. za ochotu a pomoc při práci v laboratoři.

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Mykotoxiny	10
2.2	Vláknité houby rodu <i>Fusarium</i>	10
2.3	Trichothecenové mykotoxiny.....	10
2.4	Přehled a charakteristika významných trichothecenových mykotoxinů	13
2.4.1	Trichotheceny typu A.....	13
2.4.1.1	<i>T-2 toxin</i> a <i>HT-2 toxin</i> (<i>T-2</i> a <i>HT-2</i>)	13
2.4.1.2	<i>diacetoxyscirpenol</i> (<i>DAS</i>).....	14
2.4.1.3	<i>neosolaniol</i> (<i>NEO</i>).....	14
2.4.2	Trichotheceny typu B	14
2.4.2.1	<i>deoxynivalenol</i> (<i>DON</i>).....	14
2.4.2.2	<i>nivalenol</i> (<i>NIV</i>)	16
2.4.2.3	<i>Fusarenon-X</i> (<i>FUS-X</i>)	16
2.4.2.4	<i>3-acetyldeoxynivalenol</i> (<i>3-ADON</i>) a <i>15-acetyldeoxynivalenol</i> (<i>15-ADON</i>) 16	
2.5	Ječmen.....	17
2.5.1	Sladovnický ječmen	17
2.5.2	Sladování	18
2.5.3	Vybrané odrůdy ječmene jarního	19
2.6	Mykotoxiny v sladovnickém ječmeni	19
2.6.1.1	<i>Aflatoxiny</i>	19
2.6.1.2	<i>Ochratoxin A</i> (<i>OTA</i>)	21
2.6.1.3	<i>Deoxynivalenol</i> (<i>DON</i>).....	21
2.6.1.4	<i>Zearalenon</i> (<i>ZON</i>).....	22
2.6.1.5	<i>Sterigmatocystin</i>	22
2.6.1.6	<i>Alternáριοvé mykotoxiny</i>	23
2.7	Příprava a zpracování vzorků k analýze.....	24
2.7.1	Odběr a zpracování vzorků	24
2.7.2	Extrakce.....	24
2.7.3	Čištění.....	25
2.7.3.1	Extrakce z kapaliny do kapaliny.....	25
2.7.3.2	Imunoafinitní chromatografie (<i>IAC</i>)	25
2.7.3.3	Extrakce na pevné fázi (<i>SPE</i>).....	26
2.7.3.4	Gelová filtrace (<i>GPC</i>)	26
2.8	Možnosti stanovení vybraných mykotoxinů v sladovnickém ječmeni	27
2.8.1	Imunochemické metody (<i>ELISA</i> , <i>RIA</i>)	27
2.8.2	Chromatografické metody.....	27
2.8.2.1	Chromatografie na tenké vrstvě (<i>TLC</i>)	27
2.8.2.2	Vysokoučinná tenkovrstevná chromatografie (<i>HPTLC</i>)	27
2.8.2.3	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (<i>HPLC</i>).....	27
2.8.2.4	Plynová chromatografie (<i>GC</i>).....	28
2.8.3	Hmotnostní spektrometrie (<i>MS</i>).....	29
2.8.3.1	Ionizační techniky.....	29

2.8.3.2	<i>Hmotnostní analyzátory</i>	32
2.8.3.3	<i>Detektory</i>	33
2.8.4	Metoda LC-MS	34
2.8.4.1	<i>Metoda LC-MS/MS</i>	35
2.8.5	Metoda GC-MS	36
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
3.1	Přístrojové vybavení, software a chemikálie	37
3.1.1	Kapalinový chromatograf s hmotnostním detektorem	37
3.1.2	Použité chemikálie	37
3.1.2.1	<i>Rozpouštědla a chemikálie</i>	37
3.1.2.2	<i>Standardy</i>	37
3.2	Optimalizace metody LC-MS/MS	38
3.2.1	Optimalizace metody LC/APCI-MS/MS	38
3.2.1.1	<i>Parametry LC</i>	38
3.2.1.2	<i>Parametry APCI-MS/MS</i>	38
3.2.2	Optimalizace metody LC/ESI-MS/MS	39
3.2.2.1	<i>Parametry LC</i>	39
3.2.2.2	<i>Parametry ESI-MS/MS</i>	40
3.3	Validace metody LC-MS/MS	40
3.3.1	Validace metody LC/APCI-MS/MS	40
3.3.1.1	<i>Opakovatelnost nástřiku</i>	40
3.3.1.2	<i>Správnost (výťažnost) metody</i>	41
3.3.1.3	<i>Mez detekce a mez stanovitelnosti</i>	42
3.3.2	Validace metody LC/ESI-MS/MS	42
3.3.2.1	<i>Opakovatelnost nástřiku</i>	42
3.3.2.2	<i>Správnost (výťažnost) metody</i>	42
3.3.2.3	<i>Mez detekce a mez stanovitelnosti</i>	43
3.4	Kalibrační křivky	43
3.5	Příprava a zpracování vzorků k analýze	45
3.5.1	Příprava mobilní fáze pro analýzu pomocí LC-MS/MS	45
3.5.2	Přepočet koncentrace	46
3.5.3	Soubory sledovaných analytických vzorků	46
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	47
4.1	Validace metody	47
4.1.1.1	<i>Opakovatelnost nástřiku</i>	47
4.1.1.2	<i>Správnost (výťažnost) metody</i>	47
4.1.1.3	<i>Mez detekce a mez stanovitelnosti</i>	48
4.2	Stanovení obsahu vybraných trichothecenů v prvním souboru vzorků	48
4.2.1	Stanovení DON	53
4.2.2	Stanovení NIV	54
4.2.3	Stanovení HT-2	54
4.2.4	Stanovení T-2	55
4.3	Stanovení obsahu vybraných trichothecenů ve druhém souboru vzorků	56
5	ZÁVĚR	58
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	59
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	63

8	SEZNAM PŘÍLOH	65
9	PŘÍLOHA	66

1 ÚVOD

V současné době se klade stále větší důraz na zdravotní nezávadnost potravin, ba dokonce ve světě již vznikají funkční potraviny, které konzumentovi poskytují další profity navíc. Znehodnocení potravin mykotoxiny, sekundárními produkty metabolismu mikroskopických vláknitých hub (vláknitých mikromycetů), se ukázalo jako velmi závažný celosvětový problém.

Dřívější představa, že zdravotní rizika mykotoxinů jsou omezena převážně jen na rozvojové země Afriky a Asie, kde klimatické podmínky pro růst vláknitých mikromycetů a produkci mykotoxinů jsou obzvláště příznivé, se ukázala jako mylná. Současné výzkumy dokumentují, že riziko mykotoxinů existuje na celém světě včetně průmyslově vyspělých států.

Toxikogenní mikromycety a mykotoxiny patří k významným faktorům, které mohou velmi negativně ovlivnit zdraví člověka, a to např. formou infekčního onemocnění, alergiemi nebo otravami [1].

Mykotoxiny se v první řadě vyskytují v zemědělských plodinách, především obilovinách (pšenice, ječmen, žito, oves), rýži, kukuřici, olejnatých semenech (mák, řepka, hořčice, sojové boby, slunečnice) a potažmo potravinářských výrobcích obsahujících tyto suroviny.

V neposlední řadě byl potvrzen vliv na zdravotní stav a produkci hospodářských zvířat (drůbež, prasata a dobytek), jež zkrmovali mykotoxiny kontaminovaná krmiva [2].

V případě této diplomové práce je pozornost zaměřena na obsah trichothecenových mykotoxinů produkovaných mikroskopickými vláknitými houbami rodu *Fusarium* ve sladovnickém ječmeni.

Práce shrnuje výsledky analýzy trichothecenů ve vybraných odrůdách sladovnického ječmene a také souvislost jejich výskytu s pěstovanou předplodinou. Dále předkládá výsledky nalezeného obsahu trichothecenů v uměle infikovaných vzorcích ječmene odrůdy Sebastian a z něj vyrobeného sladu. Vzorky sladovnického ječmene byly uměle infikovány vláknitými houbami rodu *Fusarium*.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity řady druhů mikroskopických vláknitých hub (vláknitých mikromycetů, plísní), jako např. druhů *Fusarium*, *Aspergillus* a *Penicillium*. Patří mezi významné toxiny přírodního původu, jenž mohou kontaminovat široké spektrum potravin a krmiv, a vyvolat různé toxické syndromy nazývané souhrnně mykotoxikózy. Nejstaršími popsány mykotoxikózy jsou ergotismus, alimentární toxická aleukie (ATA) a onemocnění z tzv. červené rýže.

Systematické studium mykotoxinů bylo iniciováno množícími se signály o nebezpečnosti používání plesnivých potravin a krmiv k výživě až v 60. letech minulého století.

Mykotoxiny jsou strukturně odlišné komplexní organické sloučeniny o nízké molekulové hmotnosti (až na výjimky nižší než 700 g.mol^{-1}). Jsou nebiokovinné povahy, toxické pro člověka a živé organismy. Mykotoxiny nejsou nezbytné při rozvoji vláknitých mikromycetů ve srovnání s aminokyselinami, mastnými a nukleovými kyselinami nebo proteiny (proto název sekundární metabolity). V současné době je známo přes 300 mykotoxinů [1, 2].

Zdaleka největší pozornost dnes z hlediska častého výskytu a významného vlivu na zdraví lidí a zvířat zasluhují aflatoxiny, trichotheceny, ochratoxin A, zearalenon, fumonisiny, moniliformin a patulin [3].

2.2 Vláknité houby rodu *Fusarium*

Rod *Fusarium* náleží k významným potencionálně toxikogenním „polním“ mikromycetům [1]. Na rozdíl od ostatních toxikogenních vláknitých hub, u nichž převažují saprofytické druhy, jsou fusaria především parazité.

Nejvýznamnější mykotoxiny produkované vláknitými houbami rodu *Fusarium* jsou diacetoxyscirpenol, deoxynivalenol, fumonisiny, fusarin C, HT-2 toxin, moniliformin, monoacetoxyscirpenol, nivalenol, T-2 toxin a zearalenon. Koncentrace trichothecenů ve fusariemi napadených cereáliích jen zřídka překračuje 1 mg.kg^{-1} [2].

2.3 Trichothecenové mykotoxiny

Skupina trichothecenových mykotoxinů patří mezi nejznámější toxiny produkované převážně vláknitými houbami rodu *Fusarium*. Produkce trichothecenů byla prokázána i u některých kmenů rodu *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Cylindrocarpon*, *Phomopsis*, *Verticimonosporium* a *Stachybotrytis* [4].

Kontaminace organismu trichotheceny má za následek širokou paletu projevů. Může docházet k rozličným syndromům, například ke snížení příjmu nebo totálnímu odmítnutí potravy, k podráždění kůže a k dermálním nekrotickým, zvracení, průjmům a krvácivosti. Trichotheceny jsou popsány i jako imunosupresory a inhibitory syntézy proteinů a DNA. Bez výjimky všechny trichotheceny vykazují pro živočichy větší či menší stupeň toxicity, vykazují i insekticidní efekt. Byla popsána i fytotoxická aktivita. Toxicita je vysvětlována především přítomností epoxyskupiny [5, 6].

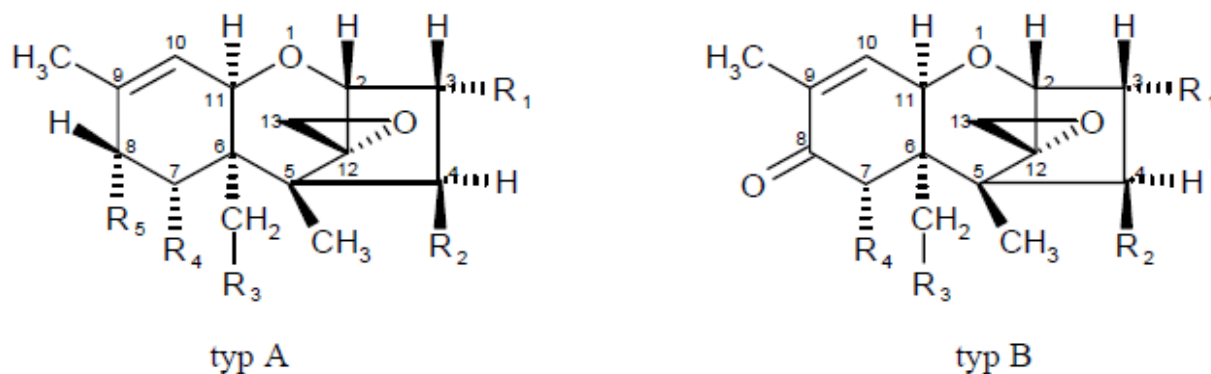
Z hlediska chemické struktury představují trichotheceny pestré skupině sloučenin, vesměs jde o tricyklické seskviterpeny s šestičlenným kruhem, obsahující dvojnou vazbu mezi uhlíky C-9 a C-10 a epoxyskupinu v poloze C-12 a C-13. Podle charakteristických chemických vlastností se rozlišují čtyři podskupiny trichothecenů, a to trichotheceny typu A, B, C a D.

Typ A

Na C-8 není umístěna oxoskupina. Patří sem např. T-2 toxin, HT-2 toxin, monoacetoxyscirpenol, diacetoxyscirpenol, trichodermin.

Typ B

Na C-8 je umístěna oxoskupina. K typu B se řadí nivalenol, deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, jeho isomer 15-acetyldeoxynivalenol a fusarenon-X [2].



Obrázek 1: Strukturní vzorce základního skeletu fusáriových trichothecenů [4].

Tabulka 1: Zkratky a funkční skupiny nejvýznamnějších trichothecenů [4].

Typ	Název mykotoxinu	Zkratka	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
A	Monoacetoxyscirpenol	MAS	OH	OH	OCOCH ₃	H	H
	Diacetoxyscirpenol	DAS	OH	OCOCH ₃	OCOCH ₃	H	H
	T-2 tetraol	T-2 tetr.	OH	OH	OH	H	OH
	T-2 toxin	T-2 tox.	OH	OCOCH ₃	OCOCH ₃	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
	HT-2 toxin	HT-2 tox.	OH	OH	OCOCH ₃	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
	T-2 triol	T-2 triol	OH	OH	OH	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
	Neosolaniol	NEO	OH	OCOCH ₃	OCOCH ₃		OH
B	Nivalenol	NIV	OH	OH	OH	OH	-
	Fusarenon-X	FUS-X	OH	OCOCH ₃	OH	OH	-
	Deoxynivalenol	DON	OH	H	OH	OH	-
	3-acetyl-deoxynivalenol	3-ADON	OCOCH ₃	H	OH	OH	-
	15-acetyl-deoxynivalenol	15-ADON	OH	H	OCOCH ₃	OH	-

Typ C

Obsahuje další epoxy skupinu v poloze C-7 a C-8 nebo C-8 a C-9, např. krotocin.

Typ D

Obsahuje makrocyclický kruh mezi C-4 a C-15, např. verrukariny, roridiny a satratoxiny. Vyznačují se mimořádně vysokou toxicitou Např. akutní toxicita verrukarinu je asi desetkrát vyšší než T-2 toxinu [2].

V současné době je známo více než 170 trichothecenů. Vláknité houby rodu *Fusarium* produkují pouze mykotoxiny skupiny A a B [4]. Největším problémem ve smyslu rizika dietární expozice člověka těmto mykotoxinům je kontaminace cereálií, zvláště pšenice a kukuřice. Výskyt trichothecenů byl však prokázán i u sojových bobů, semen dalších olejnin, banánů a manga a dále v pivu, kam přechází z kontaminovaného ječmene. Fusarií napadené plodiny mohou obsahovat jeden či více trichothecenů. Přenos trichothecenů do masa, mléka či vajec je zanedbatelný [2]. Hlavní zdroje, jenž trichotheceny v potravinách a krmivech kontaminují jsou kukuřice, oves, pšenice a ječmen. V těchto plodinách jsou hojně rozšířeny trichotheceny typu A a B, kdežto trichotheceny typu C a D, ačkoli jsou více toxické, se vyskytují v potravinách a krmivech pouze zřídka [3].

Fyzikálně-chemické vlastnosti trichothecenů jsou velice rozmanité a souvisejí především s přítomností polárních substituentů v jejich molekule. Jedná se o bezbarvé, opticky aktivní, většinou krystalické pevné látky. Jsou termostabilní do teploty 120 °C, středně stabilní při teplotě 180 °C a rozkládají se během 30–40 minutového působení teplot 200–210 °C [4].

Tabulka 2: Některé fyzikálně-chemické vlastnosti vybraných trichothecenů [4].

Trichothecen	Sumární vzorec	Molek. hmot. (g.mol ⁻¹)	Bod tání (°C)	Optická otáč. [α] ²⁰ _D
Monoacetoxyscirpenol	C ₁₇ H ₂₄ O ₆	324	172-173	-
Diacetoxyscirpenol	C ₁₉ H ₂₆ O ₇	366	161-162	-27
T-2 tetraol	C ₁₅ H ₂₂ O ₆	298	-	-
T-2 toxin	C ₂₄ H ₃₄ O ₉	466	151-152	+15
HT-2 toxin	C ₂₂ H ₃₂ O ₈	424	-	-
Neosolaniol	C ₁₉ H ₂₆ O ₈	382	171-172	-
Nivalenol	C ₁₅ H ₂₀ O ₇	312	222-223	+21,54
Fusarenon-X	C ₁₇ H ₂₂ O ₈	354	91-92	+53
Deoxynivalenol	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	296	151-153	+6,35
3-acetyl-deoxynivalenol	C ₁₇ H ₂₂ O ₇	338	135-136	-

- údaj nebyl k dispozici

2.4.1.2 diacetoxyscirpenol (DAS)

Mezi producenty DAS patří *Fusarium sporotrichioides*, *F. graminearum*, *F. poae* a *F. culmorum*. Scirpentriol (SCIRP) vytváří acetylované deriváty monoacetoxyscirpenol (MAS), diacetoxyscirpenol (DAS) a triacetoxyscirpenol (TAS). U scirpentriolu byly prokázány toxické účinky na rostliny, buněčné kultury, mikroorganismy a zvířata, což vyplývá z jeho schopnosti inhibovat syntézu proteinů. Jeho toxicita je obdobná jako u T-2.

Pro zrniny a jejich produkty se kontaminace scirpentriolovými toxiny zdá být méně významná než kontaminace dalšími trichothecenami, jako je např. deoxynivalenol. Brambory však byly v určitých případech silně kontaminovány vysoce toxickým DAS [11]. DAS se vyznačuje významným teratogenním potenciálem [2]. Údaje o TDI nebyly v dostupné literatuře nalezeny [12].

2.4.1.3 neosolaniol (NEO)

Vzhledem ke strukturní podobnosti NEO a ostatních trichothecenů typu A a B se předpokládá podobný mechanismus účinku. Údaje o TDI nebyly v dostupné literatuře nalezeny [12].

2.4.2 Trichothecen typ B

2.4.2.1 deoxynivalenol (DON)

V roce 1973 byl v USA izolován DON z kukuřice napadené mikromycetami *Fusarium graminearum*. Při zkrmování DON kontaminované kukuřice bylo u prasat pozorováno zvracení (vomitus). Na základě toho byl odvozen triviální název tohoto mykotoxinu – vomitoxin [8]. DON byl nalezen v následujících potravinách: obiloviny a výrobky z nich, dětská výživa z obilovin, ječmen a hotové výrobky na bázi ječmene, různé druhy kukuřice, pšenice a výrobky z ní, triticales, rýže, proso, čirok, otruby, žitná mouka a otruby, chleba, špagety, müsli, nudle, pivo, čili prášek, koriandr, zázvor, sojové boby, česnek, brambory. DON je velmi stabilní a jeho koncentrace se nemění ani po technologickém zpracování vstupní suroviny do finálního výrobku. V krmivech se nacházejí poměrně vysoké koncentrace DON, což je způsobeno obsahem lepku a vlhkostí zrní. Přenos DON na skot podáváním kontaminovaného krmiva je možný, ale v mléce jsou nálezy DON extrémně nízké ($< 4 \mu\text{g.l}^{-1}$). Přejít na reziduí DON do masa, mléka nebo vajec je také zanedbatelný.

Při toxikologickém hodnocení byly u zvířat prokázány kožní změny, gastrointestinální onemocnění, hematologické změny, imunosupresivní a teratogenní účinky [1]. DON je z hlediska praktického výskytu trichothecenů považován za hlavní kontaminant potravin. Je indikátorem možné kontaminace dalšími trichothecenovými mykotoxiny. DON se často vyskytuje v obilovinách společně s NIV, DAS a T-2. Jde však naštěstí o jeden z nejméně toxických trichothecenů [1, 2]. DON je dobře rozpustný v acetonitrilu, chloroformu, směsi ethylacetátu a acetonitrilu (4:1), ve směsi chloroformu s methanolem (9:1) a nerozpustný v hexanu a petroletheru. DON je prekursorem 3-acetyldeoxynivalenolu (3-ADON) a 15-acetyldeoxynivalenolu (15-ADON) a spolu s ním jsou někdy detekovány v obilovinách. [8]. Vědecký výbor pro potraviny stanovil v prosinci 1999 pro DON TDI $1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti [10]. Maximální limity DON pro vybrané potraviny jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: Maximální limity vybraných mykotoxinů v potravinách [10].

Potraviny		Maximální limity [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]		
Aflatoxiny		B ₁	Suma B ₁ , B ₂ , G ₁ a G ₂	M ₁
a	Jádra podzemnice olejné, skořápkové plody a zpracované výrobky z nich určené k přímé lidské spotřebě nebo pro použití jako potravinová složka	2,0	4,0	-
b	Sušené ovoce a výrobky z něj zpracované určené k přímé lidské spotřebě nebo pro použití jako potravinová složka	2,0	4,0	
c	Všechny druhy obiloviny a všechny výrobky pocházející z obilovin včetně zpracovaných výrobků z obilovin kromě potravin uvedených viz e, f	2,0	4,0	-
d	Syrové mléko, tepelně ošetřené mléko a mléko pro výrobu mléčných výrobků	-	-	0,50
e	Obilné příkrmy a ostatní příkrmy určené pro kojení a malé děti	0,10	-	-
f	Dietní potraviny pro zvláštní léčebné účely, určené speciálně pro kojení	0,10		0,025
Ochratoxin A				
g	Sušené hrozny révy vinné (korintky, rozinky a sultánky)		10,0	
h	Všechny produkty pocházející z nezpracovaných obilovin, včetně zpracovaných výrobků z obilovin a obilovin určených k přímé lidské spotřebě kromě potravin uvedených viz l, m		3,0	
i	Pražená kávová zrna a mletá pražená káva kromě rozpustné kávy		5,0	
j	Rozpustná káva (instantní káva)		10,0	
k	Víno (včetně šumivého vína, s výjimkou likérového vína a vína s obsahem alkoholu nejméně 15 % objemových)m a ovocné víno		2,0	
l	Obilné příkrmy a ostatní příkrmy určené pro kojení a malé děti		0,50	
m	Dietní potraviny pro zvláštní léčebné účely (9), (10) určené speciálně pro kojení		0,50	
Deoxynivalenol				
n	Nezpracované obiloviny, jiné než pšenice tvrdá, oves a kukuřice		1250	
o	Nezpracovaná pšenice tvrdá a oves		1750	
p	Obiloviny určené k přímé lidské spotřebě, obilná mouka, otruby a klíčky konečného výrobku uváděného na trh pro přímou lidskou spotřebu kromě potravin uvedených viz s		750	
q	Těstoviny (v suchém stavu)		750	
r	Pečivo (včetně malého běžného pečiva), jemné a trvanlivé pečivo, sušenky, svačinky z obilovin a snídaňové cereálie		500	
s	Obilné příkrmy a ostatní příkrmy určené pro kojení a malé děti		200	
Zearalenon				
t	Nezpracované obiloviny, jiné než kukuřice		100	
u	Nezpracovaná kukuřice kromě nezpracované kukuřice určené		350	

	ke zpracování mokrým mletím	
v	Obiloviny určené k přímé lidské spotřebě, obilná mouka, otruby a klíčky ve formě konečného výrobku uváděného na trh pro přímou lidskou spotřebu kromě potravin uvedených viz y, z, z'	75
w	Rafinovaný kukuřičný olej	400
x	Pečivo (včetně malého běžného pečiva), jemné a trvanlivé pečivo, sušenky, svačinky z obilovin a snídaňové cereálie kromě svačinek z kukuřice a kukuřičných snídaňových cereálií	50
y	Kukuřice určená k přímé lidské spotřebě, svačinky z kukuřice a kukuřičné snídaňové cereálie	100
z	Obilné příkrmy (kromě kukuřičných příkrmů) a ostatní příkrmy určené pro kojence a malé děti	20
z'	Kukuřičné příkrmy pro kojence a malé děti	20

2.4.2.2 nivalenol (NIV)

Jde o přirozeně se vyskytující toxin, je produkován toxinným kmenem rodu *Fusarium* (*F. sporotrichioides*), byl poprvé izolován z *F. nivale*. V posledních dvou letech je stále častěji detekován v různých obilovinách [7].

NIV je dobře rozpustný v běžných polárních organických rozpouštědlech jako je acetonitril, methanol a ethyl-acetát, je málo rozpustný ve vodě a chloroformu [13]. IARC (International Agency for Research on Cancer) v r. 1993 došla k závěru, že existují dostatečné důkazy karcinogenních účinků NIV na pokusných zvířatech. U lidí nebyly k dispozici žádné údaje. Celkový závěr byl, že stupeň kancerogenity nebyl určen (skupina 3) [7, 14]. U myši má NIV embryotoxický a ferotoxický účinek, teratogenní účinek nebyl prokázán. NIV vykazuje antivirový a imunotoxický účinek. V závislosti na dávce a expozici může mít účinek imunosupresivní a imunostimulační [12]. NIV je jedním z nejméně akutně toxických trichothecenů, na buněčné úrovni je jeho hlavním toxickým účinkem inhibice proteosyntézy prostřednictvím vazby na ribozom. NIV nevykazuje karcinogenní ani teratogenní účinky [13].

Vědecký výbor pro potraviny stanovil v říjnu 2000 pro NIV prozatímní TDI 0,7 µg.kg⁻¹ tělesné hmotnosti [10].

2.4.2.3 Fusarenon-X (FUS-X)

FUS-X je silným inhibitorem syntézy bílkovin. Antivirová aktivita FUS-X je větší než u NIV a DON, což je zapříčiněno funkční skupinou navázanou na C-4 (aktivita klesá ve směru acetyl>hydroxyl>vodík). Mezi nejzávažnější účinky patří hematotoxicita, porucha imunitního systému, embryo- a fetotoxicita, snížení nárůstu tělesné hmotnosti a snížená spotřeba jídla, zvracení a genotoxicita. Údaje o TDI nebyly v dostupné literatuře nalezeny [12].

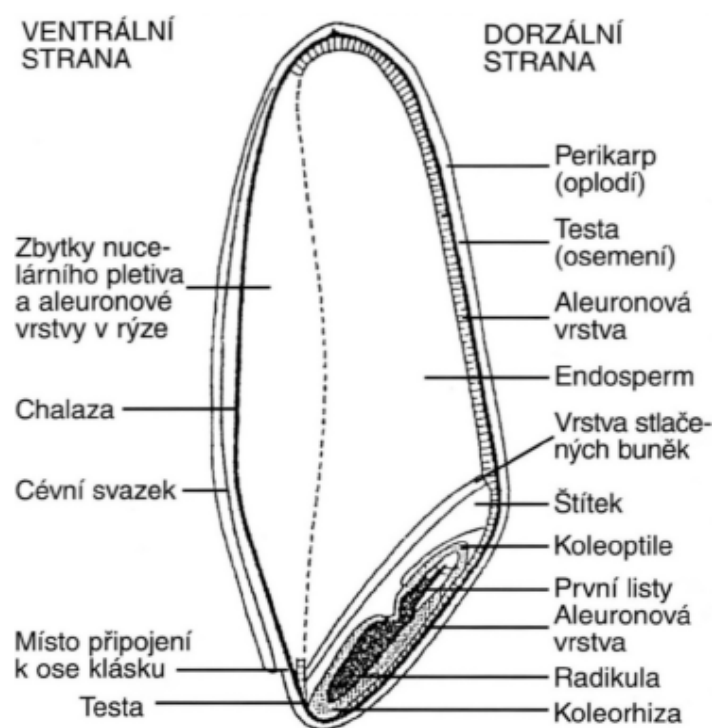
2.4.2.4 3-acetyldeoxynivalenol (3-ADON) a 15-acetyldeoxynivalenol (15-ADON)

Vzhledem ke strukturní podobnosti 3-ADON a 15-ADON s ostatními trichotheceny typu A a B se předpokládá podobný mechanismus účinku. 3-ADON a 15-ADON jsou rozpustné v polárních rozpouštědlech jako je např. methanol, acetonitril a octan ethylnatý, méně rozpustné jsou ve vodě. Údaje o TDI nebyly v dostupné literatuře nalezeny [12, 15].

2.5 Ječmen

Ječmen je pro své mnohostranné hospodářské využití druhou nejrozšířenější zemědělskou plodinou u nás [16]. Pěstování ječmene v České republice se datuje od roku 1227, kdy se používal na výrobu krup, pečení chleba a pouze jako vedlejší surovina při vaření piva. Až ve 40. letech 19. století se začal používat pro kvalitní jarní ječmen termín sladovnický ječmen [17].

Obilka ječmene je tvořena zárodkem, endospermem a obalovými vrstvami. Zárodek obsahuje základ listů, kořínků a stébela. V endospermu se nacházejí zásobní bílkoviny a škrob. Jádru tvoří tenkostěnné škrobové buňky obalené bílkovinami a gumovitými látkami. Vnější část se nazývá aleuronová vrstva a představuje buňky obsahující hlavně bílkoviny a tuky. Ječmen obsahuje 80 až 88 % sušiny, která je tvořena organickými dusíkatými a bezdusíkatými sloučeninami a anorganickými látkami, a 12 až 20 % vody [18, 19].



Obrázek 3: Podélný řez zralou obilkou [17].

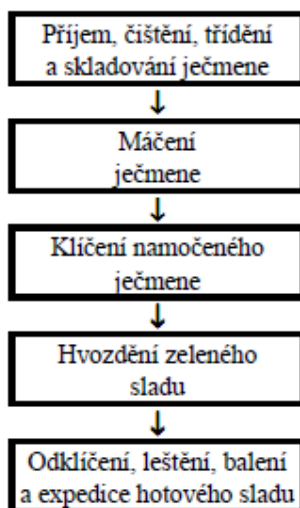
2.5.1 Sladovnický ječmen

Z ječmene se vyrábí slad, který se velmi významně podílí na charakteru pěny, zlatavé barvě a specifické chuti piva. Pro výrobu sladu a sladových výtažků se na našem území pěstují vybrané odrůdy jarního, dvouřadého, nícího ječmene (*Hordeum distichum* var. *nutans*), které patří k nejkvalitnějším odrůdám na světě. Mnohé zahraniční odrůdy mají genetický základ pocházející z našich odrůd, zejména z oblasti Hané [20].

Optimální zpracovatelské vlastnosti ječmene pro výrobu sladu jsou: vlhkost nejvýše 16 %, klíčivost nejméně 90 %, obsah bílkovin maximálně 12,5 % v sušině, co nejvyšší hladina škrobu a řada dalších kritérií [21, 22].

2.5.2 Sladování

Cílem sladování je přeměnit ječmen na slad bohatý na enzymy a extrakt [23]. Proces výroby sladu lze z hlediska jednotlivých výrobních fází rozdělit na několik částí (viz Obrázek 4).



Obrázek 4: Schéma výroby sladu.

Při skladování se čerstvě sklizený a vytríděný ječmen nachází ve stadiu základního klidu, tzv. dormance, a není schopen klíčit. Je to způsobeno přítomností inhibitorů klíčení tzv. dormitů. Teprve po jejich odbourání oxidací dormance zaniká, uvolňuje se činnost stimulatorů (giberelinů) a zrno se stává schopným klíčit. Skladování probíhá v sílech [24]. Vyčištěný a odležený ječmen se máčí v namáčecích náduvnících. Cílem máčení je dodání potřebné vegetační vody z 12-15 % na 42-48 %, která je nutná na zahájení enzymatických reakcí a pro klíčení zrna. Máčení se dnes považuje za nejdůležitější úsek výroby sladu. Po vyprání ječmene, kdy se z ječmene vylouží barevné a hořké látky, kyselina křemičitá a bílkoviny z pluch (látky jsou nežádoucí, neboť zhoršují senzorické vlastnosti piva a podporují tvorbu zákalu v pivu) přichází fáze klíčení.

Cílem sladařského klíčení ječmene je aktivace a tvorba enzymů (největší technologický význam mají amylasy, fosfatasy, cytasy, proteasy) a dosažení požadovaného stupně rozluštění. Dosahuje se toho umělým modelováním optimálních podmínek přirozeného klíčení. Amylasy jsou nejdůležitějšími enzymy ve sladu, s jejich pomocí jsou později odbourávány škroby při rmutování. Obsah amylas je odrůdovou závislostí a je rovněž ovlivněn klimatickými podmínkami ročníku [24]. Během klíčení neprobíhá jen tvorba a zvýšení množství enzymů. Jde o fyziologický proces, při kterém se v zárodečné části zrna vyvíjejí zárodky kořínků, klíčků a listů za využití zásobních látek z endospermu [20]. Současně se mění i vnitřní znaky zrna. Působením enzymů se štěpí rezervní látky a zvyšuje se rozpustnost a luštitelnost. Výsledným produktem klíčení je tzv. zelený slad. Zelený slad má vysoký obsah vody a není na rozdíl od hotového sladu skladovatelný. Poslední fází je hvozďení sladu. Zelený slad je dopraven na tzv. hvozď. V průběhu hvozďení je šetrně odstraněna většina vody dodaná zrnu při máčení a slad je převeden do skladovatelného a stabilního stavu. Dojde k zastavení životních projevů a luštěcích pochodů v zrně. Během hvozďení se vytváří aromatické a barevné látky, charakteristické pro druhy sladu. Tyto látky vznikají při vyšších teplotách interakcemi štěpných produktů polysacharidů a bílkovin, zejména monosacharidů a aminokyselin. Jedná se o řadu chemických změn označovaných jako Maillardovy reakce [25, 26].

Odhvozděný slad se sklápí do košů a dopravuje se do odkličovače, kde se zbavuje kořínků zvaných sladový květ.

2.5.3 Vybrané odrůdy ječmene jarního

Tabulka 4: Vybrané odrůdy ječmene jarního a jejich stručný popis [27].

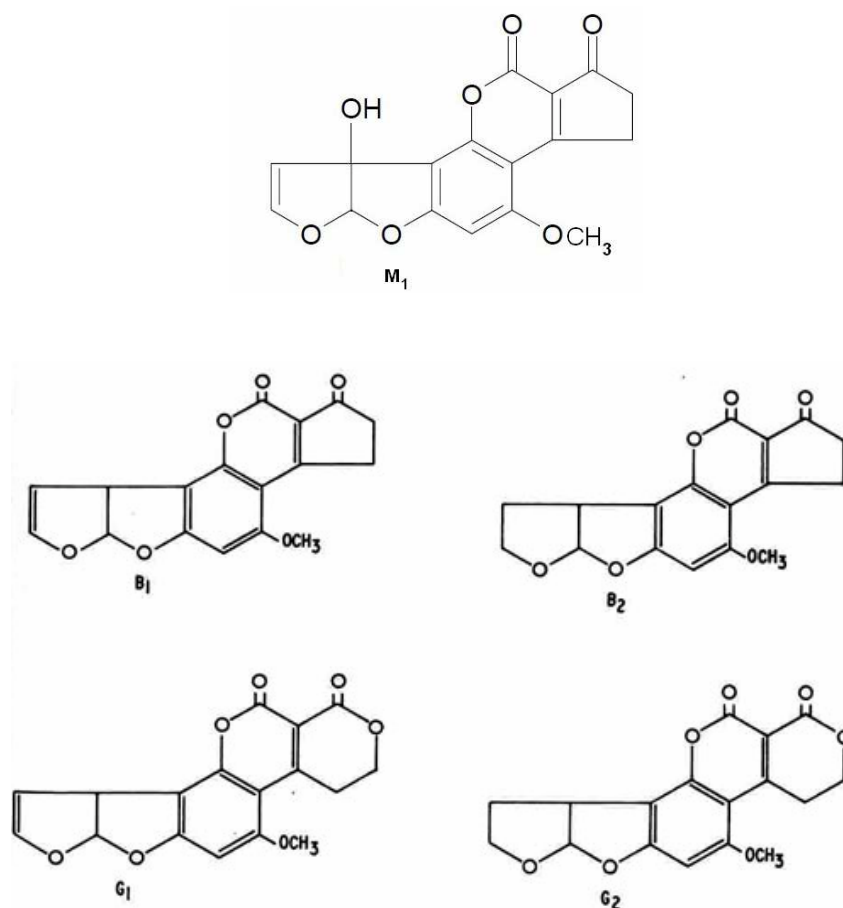
Odrůda	Stručný popis
Aksamit	Polopozdní sladovnická odrůda. Je doporučena Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským pro výrobu Českého piva.
Blaník	Polopozdní sladovnická odrůda. Je doporučena Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským pro výrobu Českého piva.
Bojos	Polopozdní sladovnická odrůda. Je doporučena Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským pro výrobu Českého piva.
Diplom	Polopozdní až pozdní sladovnická odrůda.
Jersey	Polopozdní sladovnická odrůda.
Kangoo	Polopozdní až pozdní sladovnická odrůda s výběrovou sladovnickou jakostí.
Malz	Polopozdní sladovnická odrůda.
Prestige	Poloraná sladovnická odrůda.
Radegast	Polopozdní sladovnická odrůda. Je doporučena Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským pro výrobu Českého piva.
Sebastian	Polopozdní odrůda s výběrovou sladovnickou jakostí.
Xanadu	Středně raná sladovnická odrůda s výběrovou sladovnickou jakostí.

2.6 Mykotoxiny v sladovnickém ječmeni

2.6.1.1 Aflatoxiny

Tabulka 5: Strukturní vzorce a molekulové hmotnosti nejvýznamnějších aflatoxinů [1].

Aflatoxin	Sumární vzorec aflatoxinu	Molekulová hmotnost [g.mol ⁻¹]
B₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312
B₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314
G₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328
G₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330
M₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328



Obrázek 5: Chemické struktury aflatoxinů B₁, B₂, G₁, G₂ a M₁ [28].

Aflatoxiny patří s ohledem na svoji extrémně vysokou toxicitu mezi nejvíce sledované mykotoxiny. Nejvýznamnějšími producenty aflatoxinů jsou dvě blízce příbuzné vláknité houby rodu *Aspergillus*, a to *A. flavus* a *A. parasiticus*. Mezi nejvýznamnější přirozeně se vyskytující aflatoxiny patří aflatoxiny řady B a G (aflatoxin B₁, B₂, G₁ a G₂) a dále aflatoxin M₁[7]. Přítomnost aflatoxinů byla prokázána v plesnivých cereáliích, kávových zrnech a živočišných produktech (šunka, salám, tvrdý sýr) [2]. Aflatoxiny jsou poměrně hydrofilní sloučeniny, a proto není jejich afinita k tukové složce potravinářských surovin vysoká a při výrobě rostlinných olejů se koncentrují ve šrotech. Expozice aflatoxinů může u zvířat i člověka vyvolat řadu akutních i chronických onemocnění. Jako např. tzv. Reyův syndrom, respirační onemocnění, chronickou gastritidu, duševní retardaci dětí a potlačení imunity. Aflatoxiny jsou hepatotoxické, aflatoxin B₁ je považován za nejpotentnější známý přirozený hepatokarcinogen. Mutagenita a karcinogenita aflatoxinů obecně klesá v řadě B₁>G₁>B₂>G₂. Inhibují replikaci a transkripci DNA. U hospodářských zvířat je hlavním problémem především riziko letální akutní intoxikace a za podmínek chronické expozice pak snížená rychlost růstu, náchylnost k infekcím, snížená produkce masa, mléka a vajec

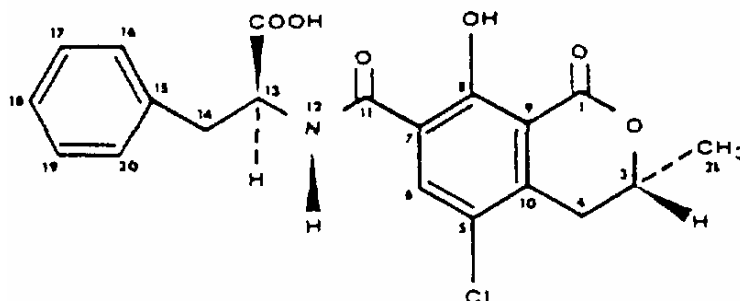
Aflatoxiny jsou rozpustné v běžných organických rozpouštědlech jako je methanol, aceton, acetonitril, chloroform, či toluen [7]. Maximální limity aflatoxinů pro vybrané potraviny jsou uvedeny v Tabulce 3.

2.6.1.2 Ochratoxin A (OTA)

Sumární vzorec: $C_{20}H_{18}O_6ClN$

Molekulová hmotnost: 403 g.mol^{-1}

[1]



Obrázek 6: Chemická struktura ochratoxinu A [29].

Nejvýznamnějšími producenty OTA jsou vláknité houby rodu *Aspergillus ochraceus* a *Penicillium viridicatum*. OTA je obecně nejvýznamnějším reprezentantem ochratoxinů. Za hlavní zdroje OTA v potravinách jsou pokládány cereálie, cereální produkty, vepřové maso, dále káva, pivo, luštěniny, koření a zelený čaj. Toxické účinky jsou přičítány atomu chlóru, kterým je na aromatický kruh substituován. Nejzávažnějším biologickým účinkem zaznamenaným u zvířat exponovaných OTA je nefrotoxicita, hepatotoxicita, genotoxicita, imunotoxicita a karcinogenita. U člověka je expozice OTA spojována s balkánskou endemickou nefropatií a nádory ledvin.

OTA je rozpustný v organických rozpouštědlech (chloroformu, ethanolu a methanolu) [1]. Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) přijal dne 4. dubna 2006 aktualizované vědecké stanovisko týkající se OTA v potravinách a došel k závěru, že tolerovatelný týdenní příjem (TWI) je 120 ng.kg^{-1} tělesné hmotnosti [10]. Maximální limity OTA pro vybrané potraviny jsou uvedeny v Tabulce 3.

2.6.1.3 Deoxynivalenol (DON)

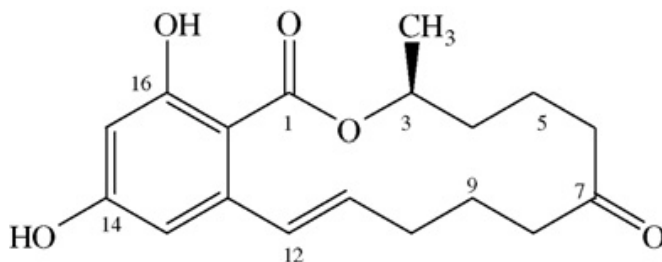
Viz 2.4.2.1.

2.6.1.4 Zearalenon (ZON)

Sumární vzorec: $C_{18}H_{22}O_5$

Molekulová hmotnost: 318 g.mol^{-1}

[1]



Obrázek 7: Chemická struktura zearalenonu [30]

Mezi nejvýznamnějšími producenty ZON se uvádí *Fusarium graminearum* a *F. semitectum*. ZON byl nalezen v následujících potravinách: obiloviny a výrobky z nich, ječmen, slad, pivo, kukuřice, rýže, čirok, proso, boby, ořechy, banány a v některých druzích koření. Jedná se o relativně lipofilní sloučeninu. Obsah ZON často při technologickém zpracování obilovin významně klesá. Akutní toxicita ZON je nízká, nicméně jeho příjem stravou může vyvolat (díky strukturní podobnosti se steroidními hormony estrogeny) hyperestrogenní syndrom. S ohledem na své estrogenní účinky se ZON někdy označuje jako mykoestrogen. Je pokládán za vhodný indikátor přítomnosti dalších fuzáriových mykotoxinů v cereáliích, jako jsou např. trichothecey DON a NIV [1, 7].

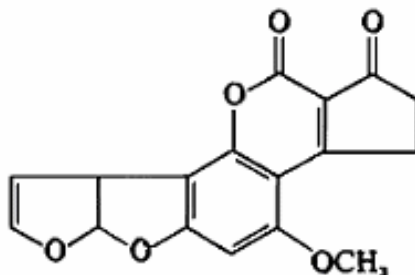
U Zearalenonu byla prokázána hepatotoxicita, hematotoxicita, imunotoxicita a genotoxicita. ZON je prakticky nerozpustný v čisté vodě a tetrachlormethanu a je rozpustný v diethyletheru, chloroformu, dichlormethanu, ethyl-acetátu, alkoholech a vodných alkáliích [30]. Není významně akutně toxický, spolu se svými deriváty však vykazuje významné estrogenní a anabolické účinky [7]. Vědecký výbor pro potraviny stanovil v červnu 2000 pro ZON prozatímní TDI $0,2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti [10]. Maximální limity ZON pro vybrané potraviny jsou uvedeny v Tabulce 3.

2.6.1.5 Sterigmatocystin

Sumární vzorec: $C_{18}H_{12}O_6$

Molekulová hmotnost: 324 g.mol^{-1}

[1]



Obrázek 8: Chemická struktura sterigmatocystinu [32].

Významnými producenty Sterigmatocystinu jsou zejména *Aspergillus versicolor*, *A. flavus* a *A. parasiticus* a *Emericella nidulans*. Sterigmatocystin patří mezi hlavní mykotoxiny pravidelně se vyskytující v obilninách a výrobcích z nich. Přítomnost sterigmatocystinu (spolu s aflatoxiny) byla prokázána v plesnivé pšenici, ječmeni, kukuřici, rýži, sojových bobech a zelené kávě, dále v živočišných produktech (šunka, salám, tvrdý sýr). Sterigmatocystin je meziproductem biosyntézy aflatoxinu B₁. Akutní toxicita sterigmatocystinu je nízká vlivem jeho malé rozpustnosti ve vodě a v žaludečních šťávách a mění se v závislosti na způsobu aplikace, živočišném druhu a dalších faktorech.

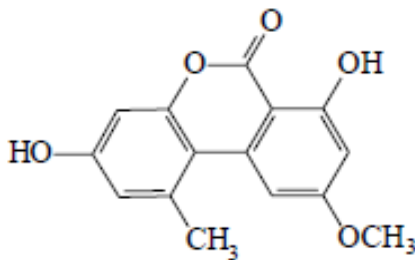
Sterigmatocystin vykazuje hepatotoxický, nefrotoxický, karcinogenní, mutagenní a teratogenní účinek. Přes svoji výraznou karcinogenitu se nezdá být sterigmatocystin významným nebezpečím pro lidské zdraví. Jeho karcinogenní aktivita se rovná 1/10 karcinogenity aflatoxinu B₁. V ČR se přípustné maximální množství v potravinách pohybuje v rozmezí 5–20 µg.kg⁻¹ [1, 2].

2.6.1.6 Alternariové mykotoxiny

Sumární vzorec alternariol monomethyl éteru: C₁₅H₁₂O₅

Molekulová hmotnost: 272 g.mol⁻¹

[1]



Obrázek 9: Chemická struktura alternariol monomethyl etheru [33].

Je známo několik toxikogenních druhů hub rodu *Alternarium*, z nichž nejvýznamnější a nejvíce zkoumaný je druh *A. alternata*. Jako důležité rostlinné patogeny napadají a způsobují zánik mnoha zemědělských plodin (nejčastěji ječmene, pšenice, oves a rajčat) jak na poli, tak i po sklizni. Jestliže v před sklizňovém období nastane suché počasí, jsou zrna často zbarvena houbovou nákazou. Jako posklizňová kontaminace ovoce, zeleniny a obilí se mohou vyskytovat díky přenesení spor z pole, nebo může dojít ke kontaminaci těchto surovin při transportu, zpracování či skladování. Vzhledem k všudypřítomnosti alternariových mykotoxinů se jedná o jedny z nejvýznamnějších plísňových alergenů.

Většina alternariových mykotoxinů vykazuje značnou cytotoxickou aktivitu. Pro savce je za nejvíce toxickou považována tenuazonová kyselina produkovaná rodem *Alternaria* spp. Mutagenní účinek byl pozorován u alternariol monomethyl etheru a altertoxinu I. Chronická toxicita u alternariových mykotoxinů zatím není dostatečně prozkoumána [33]. Expoziční limity (TDI/PTDI) pro alternariové mykotoxiny zatím nebyly na zasedáních EFSA a Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants (JECFA FAO/WHO) v rámci Codex Alimentarius stanoveny [34].

2.7 Příprava a zpracování vzorků k analýze

Analytické stanovení mykotoxinů se skládá z několika na sebe navazujících kroků, z nichž každý rozhoduje o výsledku analýzy [1]. Příprava vzorku k analýze bývá všeobecně považována za jeden z největších zdrojů chyb celého analytického procesu (viz Obrázek 10), jde o časově nejnáročnější a nejpracnější část analýzy [35]



Obrázek 10: Zdroje chyb při analýze [35].

2.7.1 Odběr a zpracování vzorků

Prvním velmi důležitým procesem je odběr a zpracování vzorků. Vzorky potravinových surovin, potravin a krmiv jsou často nehomogenní, kusové a odběry se musí provádět z šarží o značné hmotnosti či počtu jednotek. Důležité je objektivní vzorkování (odběr vzorků) dle příslušné legislativy a dostatečné zhomogenizování zpracovávaných vzorků. Pevné vzorky je nutno dezintegrovat ve vhodném zařízení (např. tříštivém mlýnku, laboratorním mixéru) [1].

2.7.2 Extrakce

Extrakce vzorku organickým rozpouštědlem se provádí nejlépe na laboratorní třepačce v Erlenmayerově baňce, na homogenizátoru, nebo pomocí ultrazvuku. Extrakční rozpouštědlo se volí podle povahy a rozpustnosti příslušného mykotoxinu a s ohledem na extrahovaný materiál a další zpracování extraktu. Extrakce mykotoxinů probíhá za laboratorní teploty a za neutrální nebo kyselé reakce.

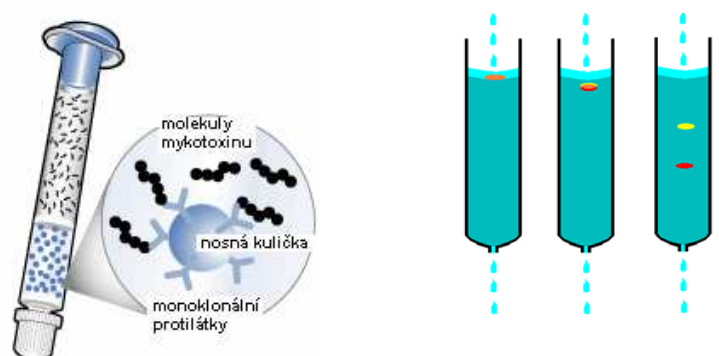
Obecně se k extrakci mykotoxinů nejčastěji používá methanol, octan ethylnatý, chloroform, aceton a acetonitril, popřípadě jejich vodné roztoky. Nejvíce používaným extrakčním médiem pro simultánní co-extrakce trichothecenů typu A a B je 84% acetonitril. Z kyselého prostředí se extrahují do organických rozpouštědel mykotoxiny kyselé povahy. Okyselení vzorku se provádí kyselinou chlorovodíkovou nebo fosforečnou. Po extrakci se suspenze odstředí, u zvláště komplikovaných matric je někdy nezbytné provést po odstředění ještě následnou filtraci [1, 35, 36].

2.7.3 Čištění

2.7.3.1 Extrakce z kapaliny do kapaliny

Je to metoda, která byla používána při čištění extraktů pro stanovení některých mykotoxinů (aflatoxinů, OTA, kys. cyklopiazonové) zejména v 70.–80. letech 20. století. Je založena na různé rozpustnosti látek ve dvou nemísitelných kapalinách.

2.7.3.2 Imunoafinitní chromatografie (IAC)

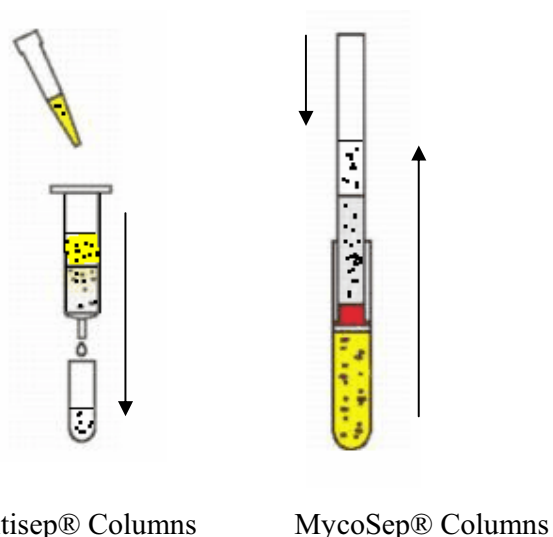


Obrázek 11: Imunoafinitní kolonky [37, 38].

V současné době se nejčastěji používá čištění extraktu mykotoxinů na imunoafinitní kolonce, a to pro svoji vysokou specifitu, menší spotřebu organických rozpouštědel a menší časovou náročnost.

Nejprve se na imunoafinitních kolonkách nechá přefiltrovaný a zředěný extrakt mykotoxinu ve směsi methanolu s vodou pomalu prokapat. V tomto procesu se analyt z kapalné fáze sorbuje na fázi pevnou. Interakce analytu s tuhou fází musí být silnější než s fází kapalnou, ve které je analyt rozpouštěn. Následné eluce analytu se dosáhne promytím kolonky speciálním promývacím pufrem (methanol, okyselený methanol, methanol-acetonitril atd.) [1, 35].

2.7.3.3 Extrakce na pevné fázi (SPE)



Obrázek 12: Příklady extrakcí na pevné fázi na kolonkách Multisep® ROMER a MycoSep® ROMER [39].

Pro mykotoxiny (patulin, sterigmatocystin, trichotheceny, ZON, atd.) se používá také čištění na kolonkách SPE (solid phase extraction) se sorbenty z různých nepolárních, středně polárních a polárních materiálů na bázi modifikovaného silikagelu, polymeru (např. styrendivinybenzenové pryskyřice), nebo křemičitanu hořečnatého [1].

Na Obrázku 12 vpravo je do extraktu vzorku ve zkumavce vtláčována kolonka, tím extrakt stoupá nahoru a filtruje se od nečistot. Jakékoli barviva se v tomto procesu zachytí uvnitř náplně čistící kolonky a přečištěný extrakt se poté odejme. Čistý extrakt se pak suší např. na vakuové rotační odparce a před dalším zpracováním je obnoven podle požadavků analytické koncovky. Komerční trichothecenové EP kolonky jsou vhodné k použití přípravy vzorků řady potravin a krmiv [1, 40].

2.7.3.4 Gelová filtrace (GPC)

Gelová filtrace je metoda separace složek z kapalného média. Princip separace spočívá v tom, že látky s vyšší molekulovou hmotností procházejí kolonou, zatímco menší molekuly přechodně vstupují do pórů gelu a jsou tak zadržovány. Používá se pro separaci velkých molekul (biomolekul) na základě rozdílné molekulové hmotnosti. V oblasti analýzy mykotoxinů se používá především k odstranění lipidických sloučenin a rostlinných pigmentů. V ČR je metoda využívána např. pro stanovení patulinu a ZON [1].

2.8 Možnosti stanovení vybraných mykotoxinů v sladovnickém ječmeni

Mykotoxiny se nejčastěji stanovují imunochemickými a chromatografickými analytickými metodami [1].

2.8.1 Imunochemické metody (ELISA, RIA)

Jedná se o běžnou metodu využívanou pro detekci mykotoxinů, která je založena na imunitní reakci sledované látky s protilátkou. Mykotoxiny zpravidla nevyvolávají imunitní odezvu tvorbou protilátek, ale k tvorbě protilátek dochází až po navázání na vhodný nosič (např. bílkovina). Výhodou metody je poměrně snadné odečítání výsledků např. měřením intenzity zbarvení roztoku fotometrem [15]. ELISA poskytuje rychlý a levný screening, i když při nízkých koncentracích není dostatečně přesná a lze ji aplikovat pouze na omezený rozsah zemědělsko-potravinářských matric [36].

2.8.2 Chromatografické metody

V principu se jedná o migraci v systému dvou fází, z nichž jedna je stacionární a druhá mobilní. Separace se uskutečňuje na základě rozdílného dělení a selektivní retardace složek vzorku v koloně [15].

2.8.2.1 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Jedná se o metodu založenou na vztlínání směsi rozpouštědel v tenké vrstvě sorbentu na povrchu vhodného nosiče. Jednotlivé složky vzorku jsou unášeny po sorbentu různou rychlostí. Jakmile dojde pohyb čela na konec desky, pohyb se zastaví. Jednotlivé složky vzorku lze pozorovat jako barevné skvrny nebo jsou vizualizovány postřikem vhodným chemickým činidlem [15]. Metodu lze použít k orientačnímu, kvantitativnímu nebo semi-kvantitativnímu stanovení mykotoxinů. Je to rychlá, jednoduchá a finančně nenáročná metoda [1, 41]

2.8.2.2 Vysokoúčinná tenkovrstevná chromatografie (HPTLC)

Tato metoda byla vyvinuta na základě klasické TLC metody. Její výhodou oproti klasické TLC je miniaturizace celého zařízení a podstatné snížení množství nanášených látek. Chromatografická deska obsahuje adsorbent (silikagel) nanesený spolu s pojídkem (sádra nebo škrob) na vhodnou podložku (např. sklo). Chromatogram se nejprve eluuje soustavou nebo rozpouštědlem, které snadno vymývá interferující nečistoty a hledaný mykotoxin nechává na startu. Vhodným rozpouštědlem pro vymytí nečistot ze startu chromatogramu je pro mykotoxiny často chloroform, benzen, n-hexan nebo diethylether. Vhodnými vyvíjecími soustavami pro dělení mykotoxinů jsou např. chloroform-aceton, benzen-metanol-kyselina octová a toluen-etylacetát-kyselina mravenčí. Detekce mykotoxinu na chromatogramu se provádí zároveň s kvalitativním a kvantitativním stanovením jeho obsahu v naneseném vzorku. Na start chromatogramu se nanáší kromě vzorků také tříbodová kalibrační stupnice standardů [1].

2.8.2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

U této separační techniky je mobilní fází kapalina, která prostupuje stacionární fází v koloně. Složení mobilní fáze výrazně ovlivňuje separaci (narozdíl od GC) a její optimalizace je velmi důležitá.

Název vysokoúčinná je z toho důvodu, že hnací silou mobilní fáze není jen hydrostatický tlak jako u „běžné“ chromatografie, ale vysoce účinné čerpadlo, které umožňuje vyvinout pracovní tlak až 40 MPa. Vysokotlaká čerpadla (pumpy) umožňují konstantní, regulovatelný a bezpulzní průtok obvykle v rozsahu $0,1\text{--}10\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ [42, 43, 44]. Při samotné analýze je hlavním ukazatelem signál z detektoru, který vytváří chromatogram. Chromatogram je pak grafický záznam odezvy detektoru. Obvykle je úměrný koncentraci eluované látky. Je tvořen řadou píků, v ideálním případě od sebe oddělených a ležících na základní linii. Chromatogram slouží pro následné kvantitativní i kvalitativní vyhodnocení analýzy [43]. Pro identifikaci separovaných složek směsi je důležitý tzv. retenční čas, což je doba, která uplyne od vstupu vzorku do kolony až do záznamu maxima píku na chromatogramu, resp. je to doba, kterou příslušná sloučenina stráví v koloně. Určení retenčního času je tedy důležité pro identifikaci látky. Pro stanovení koncentrace látky je důležitá plocha píku. Pro určení kvantity i kvality se používá příslušných standardů. Standardizace může být externí (standard je analyzován samostatně) nebo interní (standard je přidán k analyzovanému vzorku) [43]. Z hlediska složení mobilní fáze můžeme separační proces (eluci) rozdělit na izokratický (složení mobilní fáze se nemění po celou dobu analýzy) a na gradientový (složení mobilní fáze se v průběhu analýzy mění, koncentrace jedné složky mobilní fáze roste na úkor druhé) [43].

V HPLC se používají kolony z leštěné nerezové oceli, příp. tvrzeného skla, titanu nebo pevného polymeru o délce 10–25 cm a vnitřním průměru 3–4,6 mm. Kolony jsou na koncích opatřeny fritami (póry o velikost 0,5–2 μm). Náplně kolon pro HPLC jsou tvořeny stacionární fází o velikosti částic 1,5–10 μm . Kvalita stacionární fáze (velikost a pravidelný tvar částic, porozita apod.) významně ovlivňuje kvalitu separace. Přípravují se jak z pórovitých anorganických materiálů, tak i z organických polymerů. používají se hlavně materiály na bázi silikagelu [20, 44].

Kapalinová chromatografie umožňuje analyzovat anorganické ionty, přírodní směsi látek, těkavé, málo těkavé i termolabilní organické sloučeniny [43]. Chromatografie na normálních fázích znamená použití polární stacionární fáze (voda vázaná na silikagel) a nepolární fáze mobilní (hexan). Chromatografie na obrácených fázích (RP-HPLC, Reversed-Phase-HPLC) používá stacionární fázi nepolární (uhlovodíky vázané na silikagel) a mobilní fázi polární (voda, alkoholy, acetonitril) [45]. V kapalinové chromatografii se používají detektory jako fotometrický, refraktometrický, fluorescenční, hmotnostní a další [42].

2.8.2.4 Plynová chromatografie (GC)

Plynová chromatografie je metoda separační a současně analytická, umožňující kvalitativní a kvantitativní analýzu plyných vzorků, popř. veškerých těkavých látek (kapaliny či tuhé látky), pokud je lze před separací převést v páry [1]. Vzorek se tedy dává do proudu plynu, kde je ihned odpařen a je dále unášen kolonou. Mobilní fází je nosný plyn. V koloně se složky separují na základě různé schopnosti poutat se na stacionární fázi. Složky opouštějící kolonu indikuje detektor. Signál z detektoru se vyhodnocuje a z časového průběhu intenzity signálu se určí druh a kvantitativní zastoupení složek.

Obecně může být plynová chromatografie použita k separaci plynů, většiny nedisociovatelných kapalin a pevných organických molekul a mnoha organokovových látek. Není použitelná pro separaci makromolekul, organických a anorganických solí.

Plynový chromatograf se skládá ze zdroje nosného plynu, jež tvoří tlaková láhev obsahující vodík, dusík, helium nebo argon, čistícího zařízení zachycující vlhkost a nečistoty v nosném plynu, regulačního systému, dávkovače, který slouží k zavedení vzorku do proudu nosného plynu. Další část tvoří koncentrátor na počátku kolony, jež zachycuje vzorek ze

vzduchu nebo vodného roztoku na adsorbent, samotná kolona, ve které je umístěna stacionární fáze a kde dochází k separaci látek, následuje detektor, vyhodnocovací zařízení, jež zpracovává signál z detektoru, zakresluje chromatografickou křivku (chromatogram) a provádí její vyhodnocení a v neposlední řadě termostát, jež zajišťuje dostatečnou teplotu, dávkovače, kolony a detektoru, nutnou pro udržení vzorku v plynném stavu.

V plynové chromatografii se používají detektory jako tepelně-vodivostní detektor, ionizační detektory, jako je např. plamenový ionizační detektor (FID), fotoionizační detektor (PID), detektor elektronového záchytu (ECD) a hmotnostní spektrometr (MS), jež má nezastupitelný význam [45].

2.8.3 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie je separační technika, která převádí vzorek na ionizovanou plynnou fázi a vzniklé ionty separuje podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje m/z [45]. Jedná se o metodu destrukční, ale vzhledem k velmi malé spotřebě vzorku, která se pohybuje v řádech pg až ng, to nelze považovat za nevýhodu [46].

Hmotnostní spektrometr tvoří tři základní části:

- iontový zdroj (převádí molekuly na nabitě částice, tzv. proces ionizace)
- hmotnostní analyzátor (dělí vzniklé ionty na základě jejich poměru m/z)
- detektor (registruje ionty opouštějící analyzátor a převádí je na elektrický signál)

Další části přístroje jsou tvořeny:

- vakuový systém
- zařízení pro zavádění vzorků (sonda)
- iontová optika
- počítač na ovládání a ladění přístroje, na sběr a ukládání dat [44].

2.8.3.1 Ionizační techniky

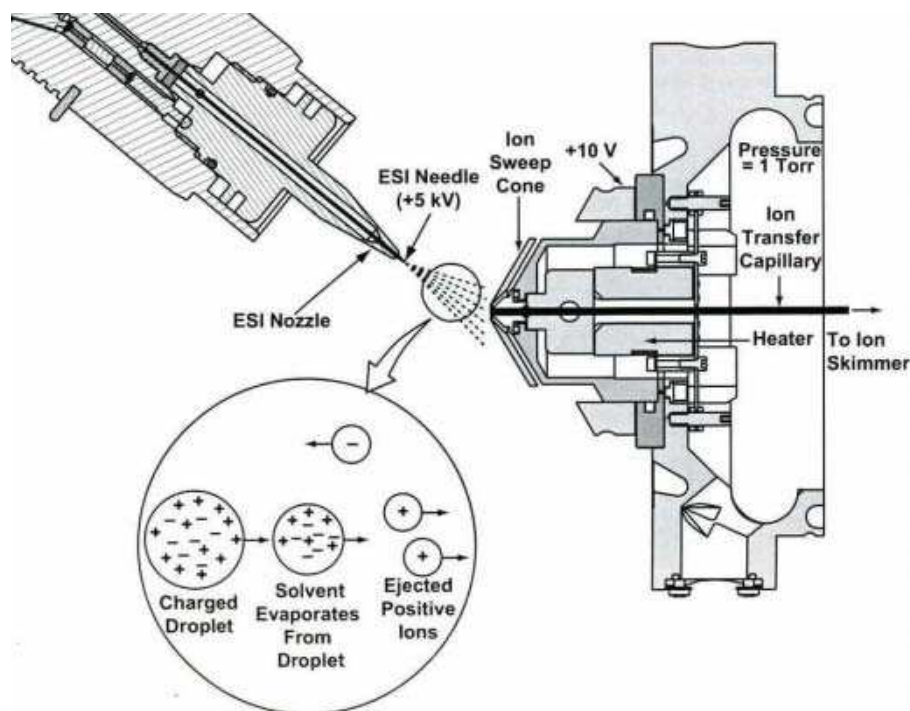
Ionizační techniky hmotnostní spektrometrie se dělí na tzv. tvrdé a měkké. Nejstarší ionizační technikou je ionizace nárazem elektronů, neboli *elektronová ionizace (EI)*, která se řadí k tvrdé typy ionizace. V EI dochází interakcí proudu elektronů s cílenou molekulou k vyrazení elektronu (případně více elektronů) z této molekuly. Vznikají tak jedno nebo vícenásobně nabitě molekulové ionty. Při interakci však dochází k přenosu větší energie než je energie ionizační, což způsobuje fragmentaci molekulového iontu a v případě málo stabilních analytů vznikají výhradně fragmentované ionty, jež neposkytují údaj o skutečné velikosti [18, 44].

Mezi měkké ionizační techniky, neboli techniky v jejichž spektrech pozorujeme (de)protonované molekuly a minimum fragmentů patří:

Chemická ionizace (CI) – V CI se nejprve elektronovou ionizací ionizuje reakční plyn a kombinací elektronové ionizace a iontově molekulárních reakcí vzniká směs iontů reakčního plynu, které se potom účastní přenosu náboje na molekuly studované látky.

Ionizace za atmosférického tlaku (API) – zahrnuje tři ionizační techniky (ESI, APCI, APPI) pracující za atmosférického tlaku, jež znamenaly naprostý průlom v řešení spojení HPLC/MS. Cílem těchto ionizačních technik je, aby se typ a intenzita iontů pozorovaných v hmotnostním spektru co nejvíce blížila skutečné struktuře a koncentraci látek v kapalně fázi [44].

Elektrosprejová ionizace (ESI) – při ionizaci elektrosprejem prochází eluát po výstupu z chromatografické kolony kovovou kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí (3–5 kV). Vznikající kapičky po rozprášení na výstupu z kapiláry za pomoci zmlžujícího plynu nesou na povrchu velké množství nábojů. S odpařujícím se rozpouštědlem hustota elektrického náboje na povrchu kapiček stoupá až do kritického bodu, kdy dochází coulombickou explozí k rozpadu ještě na menší kapičky. Opakování tohoto procesu vede až k uvolnění kvazimolekulárních iontů, (de)protonované molekuly nebo adjuktové ionty [44]. Ionty vzorku prochází hmotnostním spektrometrem a jsou analyzovány. Typická aplikační oblast ESI jsou nejruznější typy biopolymerů, organokovových sloučenin, nekovalentních komplexů a další silně polární až iontové sloučeniny s molekulovými hmotnostmi až do cca 100 tisíc Da v případě proteinů [35, 47].

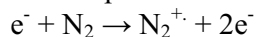


Obrázek 13: Mechanismus ionizace elektrosprejem v pozitivním módu [47].

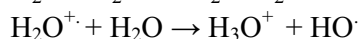
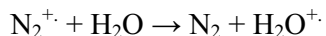
Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) - u APCI je uspořádání iontového zdroje podobné jako u ESI, avšak na kapiláru není vloženo napětí a u jejího konce je navíc umístěna výbojová jehla (elektroda). Na konci kapiláry dochází k rozprášení eluátu pneumatickým zmlžovačem. Vzniklý aerosol je rychle odpařen v krátké zóně vyhřívané na vysokou teplotu (300–600 °C). Vložením napětí na výbojovou jehlu dochází ke vzniku koronárního výboje, jímž jsou nejdříve ionizovány molekuly mobilní fáze, přítomné v plynné fázi ve velkém nadbytku vůči analytu, a vzniklý reakční plyn následně ionizuje molekuly analytu jako u klasické CI. Ionty vzorku prochází hmotnostním spektrometrem a jsou analyzovány [44, 47].

Příklad tvorby typického primárního, sekundárního a aduktového iontu v pozitivním módu:

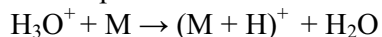
Tvorba primárního iontu:



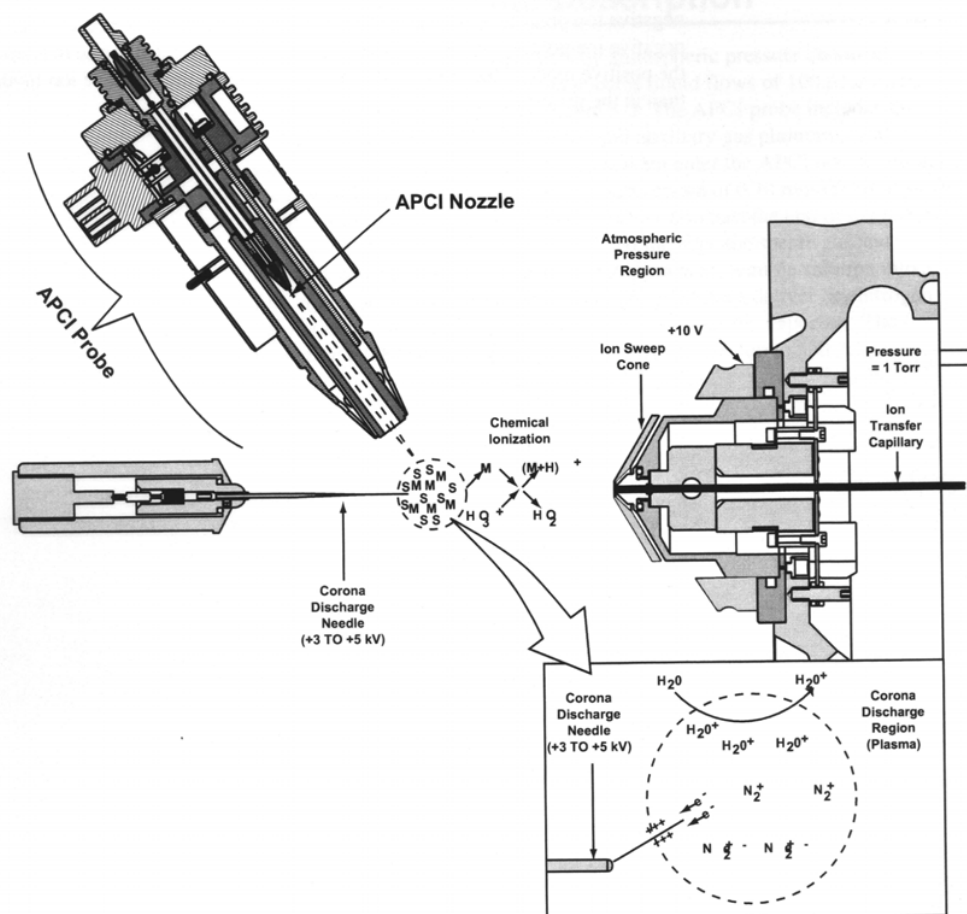
Tvorba sekundárního iontu:



Přenos protonu:



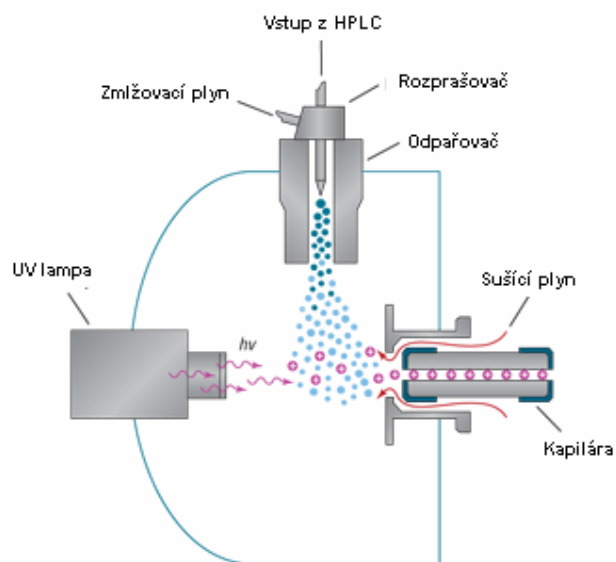
APCI je vhodnější pro látky s nízkou až střední polaritou a molekulovými hmotnostmi přibližně do 1000 – 1200 Da [35, 47].



Obrázek 14: Mechanismus chemické ionizace za atmosferického tlaku (APCI) v pozitivním módu [47].

Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) - technikou APPI jsou ionizovatelné molekuly s konjugovanými dvojnými vazbami, jako jsou např. aromatické sloučeniny. Zdrojem záření je zde kryptonová výbojka s energií fotonů 10 eV. Absorpce fotonu a následné vymrštění elektronu vytváří v APPI z fotoionizované molekuly M radikálový kation M⁺. Tato chemická ionizace vede k relativně složitému mechanismu v kladném a

záporném iontovém módu. Iontově-molekulová reakce může zvýšit citlivost, ale může také zkomplikovat analýzu hmotnostních spekter [46]. Obecně jde o velmi podobnou techniku jako je APCI, ale oproti ní ji lze použít i pro velmi nepolární nebo labilní sloučeniny [44]



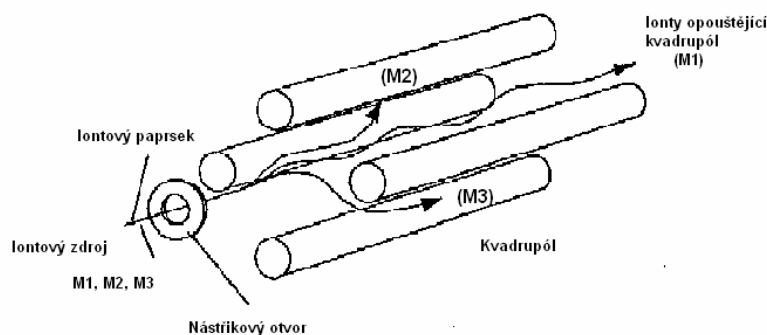
Obrázek 15: Mechanismus fotoionizace za atmosferického tlaku (APPI) [48].

2.8.3.2 Hmotnostní analyzátory

Z iontového zdroje vstupuje směs obsahující ionty různých hmot m nesoucích jeden i více nábojů z a je třeba je před detekcí rozlišit. K rozlišení iontů podle jejich účinných hmot m/z slouží hmotové analyzátory.

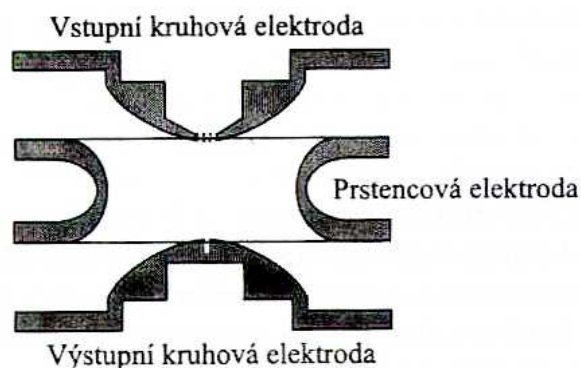
Magnetický analyzátor – v magnetickém poli dochází k zakřivení dráhy letu iontů. Ionty s nižší hodnotou m/z mají větší zakřivení dráhy.

Kvadrupólový analyzátor (Q) bývá součástí hmotnostních spektrometrů vhodných pro spojení s plynovou nebo kapalinovou chromatografií. Separace iontů je dosaženo jejich průchodem mezi čtyřmi kovovými tyčemi, na něž je vloženo stejnosměrné napětí (cca 400 V), vždy u dvou protilehlých tyčí stejného znaménka, a na ně je superponováno střídavé radiofrekvenční napětí (cca 2000 V). K tomu, aby ionty prošly polem, musí se podrobit oscilaci. Stabilita iontů závisí na poměru m/z . Částice s jinou hmotou m/z jsou z elektrického pole vyneseny ven a zadrženy elektrodami [44].



Obrázek 16: Schéma kvadrupólového analyzátoru [48]

Iontová past (IT) uzavírá ionty v ohraničeném prostoru pomocí elektrického pole. Jedná se vlastně o kvadrupól, který je tvořen hyperboloidním prstencem místo jedné dvojice tyčí a dvěma hyperboloidními „víčky“ místo dvojice druhé. Ionty ve vnitřním prostoru iontové pasti jsou nuceny se pohybovat po uzavřených kruhových drahách. Zvyšováním vysokofrekvenčního napětí se jednotlivé iontové druhy podle m/z dostávají na nestabilní trajektorie a opustí iontovou past směrem do detektoru.



Obrázek 17: Schéma iontové pasti [44].

Závislost intenzity iontového proudu na hodnotě m/z pak představuje hmotnostní spektrum [42]. Spektrum organické látky obvykle obsahuje více píků. To je způsobeno dělením molekuly při analýze. Nejintenzivnější pík se nazývá základní, jeho intenzita (výška) se obvykle považuje za 100 %. K tomuto píku se vztahují intenzity ostatních píků spektra [46].

Analýzátor doby letu (TOF)

K analýze dochází v oblasti bez pole, tedy bez elektrického i magnetického pole, které by vymezovalo směr toku iontů do zahnutých křivek či složitých trajektorií. Ionty s menší hodnotou m/z se pohybují rychleji a dostanou se i rychleji na detektor. Tento hmotnostní analyzátor je typicky pulzní. Nejdříve jsou velmi krátkým pulzem ionty urychleny na vstupu do analyzátorové trubice, a poté se přesně měří čas, za který ionty „dolétnou“ k detektoru, podle čehož se určí jejich m/z [44, 49].

2.8.3.3 Detektory

Iontové detektory převádějí proud dopadajících iontů na proud elektronů.

Elektronový násobič – je nejběžnějším detektorem. Ionty dopadající na povrch elektrody, z ní vyrazí e^- . Elektrody zesilují elektronový proud až 10^8 krát. Zesílený proud elektronů je veden do zesilovače a je vyhodnocován.

Fotonásobič – ionty dopadají na fosforovou destičku, čímž uvolní energii ve formě fotonu. Foton je zachycen fotonásobičem. Proud fotonů je zesílen až 10^5 krát

Faradayova klec – dopadající ionty se vybíjí na sběrné elektrodě. Dopad iontu způsobí vyražení elektronu z povrchu. Elektron dopadá na anodu. Vzniklý elektrický proud je zesílen zesilovačem [44, 45].

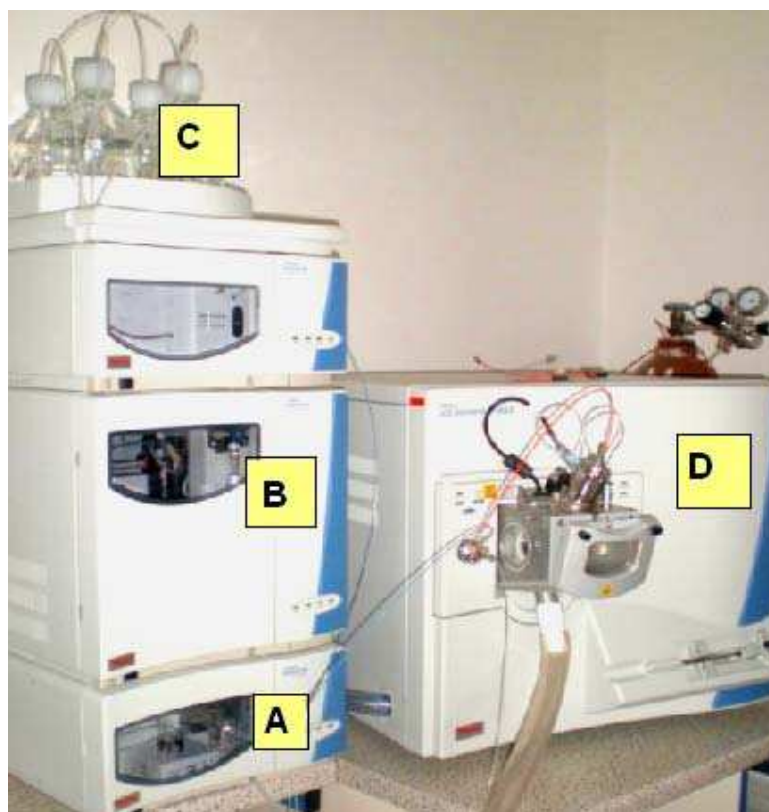
2.8.4 Metoda LC-MS

Propojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií představuje využití moderních separačních metod k přesné identifikaci a strukturní analýze látek [45].

Historický vývoj nebyl zdaleka tak jednoduchý jako u GC-MS. Hlavními problémy spojení HPLC-MS bylo překonání obrovského rozdílu tlaků mezi HPLC a MS (8–10 řádů), neboť kapalinová chromatografie pracuje za vysokého tlaku (MPa) a hmotnostní spektrometrie pracuje za hlubokého vakua, dále převedení analyzovaných látek do plynné fáze a odstranění nadbytku mobilní fáze [44, 46].

Hmotnostní spektrometrie je soběstačná dělicí metoda, ovšem pouze v případě, jedná-li se o jednodušší směsi látek. V případě složitých směsí látek se využívá separační schopnosti právě kapalinové chromatografie.

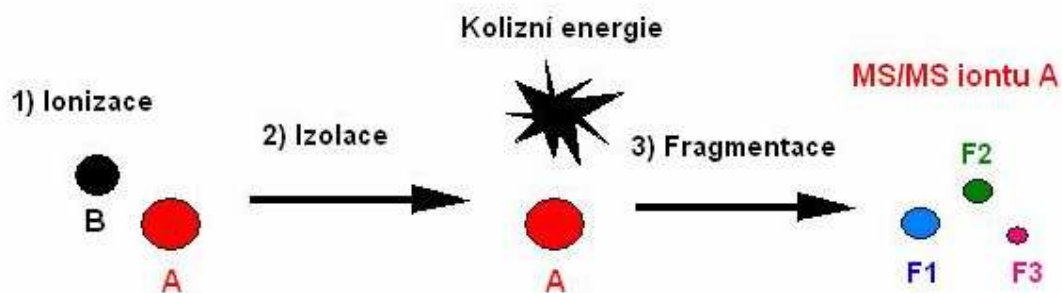
U LC-MS se kapalná mobilní fáze, obsahující analyt, zavádí do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Dochází zde k desolvataci molekul analytu, jejich ionizaci a zavedení do analyzátoru (Právě tato nutnost odstranit velké množství molekul mobilní fáze od molekul analytu byla důvodem, proč se techniky LC-MS začaly prakticky využívat mnohem později, než GC-MS). Typem ionizace u HPLC-MS je ionizace za atmosferického tlaku (API, Atmospheric Pressure Ionization) [44].



Obrázek18: Chromatografický systém: A - gradientová pumpa s degazérem, B - autosampler s kolonovou skříní, C - zásobní lahve, D - hmotnostní spektrometr

2.8.4.1 Metoda LC-MS/MS

Jedná se o spojení kapalinové chromatografie s tzv. tandemovou hmotnostní spektrometrií. V MS/MS uspořádání je vybraný ion podroben kolizní aktivaci (nejčastěji srážkám s inertním plynem – tzv. kolizní plyn), čímž může dojít k rozpadu tohoto iontu na fragmentové ionty a jejich hmotnostní spektrum je změřeno. MS/MS spektrum obsahuje pouze fragmentové ionty vzniklé rozpadem vybraného prekurzoru, neobsahuje žádné nečistoty.



Obrázek 19: Princip MS/MS [48]

2.8.5 Metoda GC-MS

Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie vytvořilo efektivní techniku pro analýzu složitých směsí organických látek. Plynovou chromatografií se separuje vzorek organické látky a separované složky jsou pak v molekulovém separátoru zbaveny nosného plynu a analyzovány hmotnostním spektrometrem. V současnosti se téměř výhradně používá ve spojení s kapilárními kolonami spolu s konvenční elektronovou ionizací (EI) nebo chemickou ionizací (CI). Jako nosný plyn se v GC-MS používá helium, protože lze snadno odčerpat vakuovými pumpami a také se aktivně účastní ionizačního mechanismu. Mezi nejběžnější hmotnostní analyzátory pro GC-MS patří Kvadrupólový analyzátor (Q), Iontová past (IT) a Time-of-Flight (TOF) [44]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístrojové vybavení, software a chemikálie

3.1.1 Kapalinový chromatograf s hmotnostním detektorem

- HPLC systém (Finnigan Surveyor):
 - gradientová pístová pumpa s degaserem Finnigan Surveyor LC Pump Plus, Thermo electron corporation (San Jose, USA)
 - autosampler s kolonovým termostatem Finnigan Surveyor Autosampler Plus, Thermo electron corporation (San Jose, USA)
 - kolona s pevným jádrem Kinetex 2,6 u PFP 100A (100 x 3,00 mm) Phenomenex
- MS systém (Finnigan LCQ Advantage):
 - hmotnostní spektrometr Finnigan LCQ Advantage MAX s turbomolekulární pumpou, Thermo electron corporation (San Jose, USA)

- software: Xcalibur 1.3

3.1.2 Použité chemikálie

3.1.2.1 *Rozpouštědla a chemikálie*

Methanol for gradient elution – Sigma-Aldrich, Německo

Methanol for LC-MS – Sigma-Aldrich

Acetonitril – Sigma-Aldrich for HPLC, Německo

Octan amonný – puriss. p. a. for mass spectrometry, Fluka, Sigma-Aldrich

Destilovaná voda

3.1.2.2 *Standardy*

Deoxynivalenol – Sigma-Aldrich, Německo

Nivalenol – Sigma-Aldrich, Německo

T-2 toxin – Sigma-Aldrich, Německo

HT-2 toxin – Sigma-Aldrich, Německo

3.2 Optimalizace metody LC-MS/MS

3.2.1 Optimalizace metody LC/APCI-MS/MS

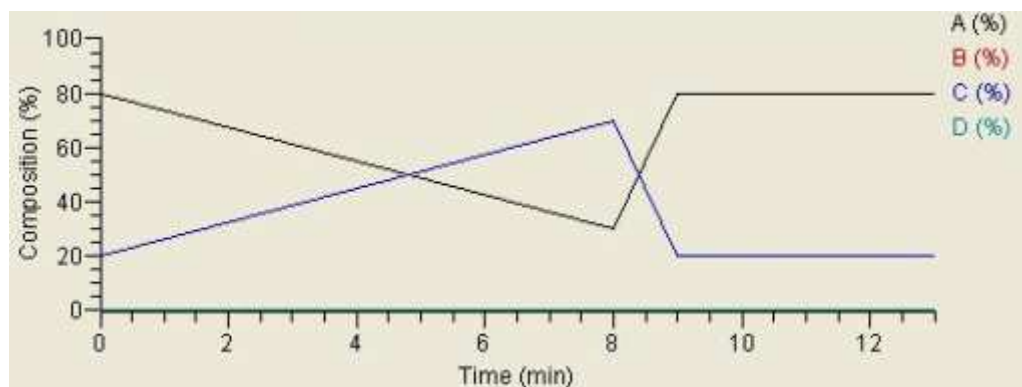
Metoda LC/APCI-MS/MS sloužila k analýze DON a NIV.

3.2.1.1 Parametry LC

mobilní fáze	A	10 mM roztok CH ₃ COONH ₄
	C	MeOH
termostatovaná kolona	45 °C	
nástřik dávkovací smyčky	25 µl	
limitní tlak	5 bar	
maximální tlak	400 bar	
průtok	0,2 ml.min ⁻¹	

Chromatografické separace bylo dosaženo kolonou s pevným jádrem Kinetex 2,6µ PFP 100A (100 x 3 mm) od společnosti Phenomenex.

K eluci trichothecenů typu B DON a NIV byl použit gradientový průtok mobilní fáze:



Obrázek 20 Gradientový průtok mobilní fáze

3.2.1.2 Parametry APCI-MS/MS

	Source Heater Temp (°C):	460.00	Actual	461.90
	Sheath Gas Flow Rate (arb):	50		49.56
	Aux/Sweep Gas Flow Rate (arb):	15		14.02
	Discharge Current (µA):	10.00		9.91
	Discharge Voltage (kV)			1.71
	Capillary Temp (°C):	160.00		160.00
	Capillary Voltage (V):	-18.00		-18.45
	Tube Lens Offset (V):	-10.00		

Tabulka 6: Nastavení hmotnostního detektoru pro analýzu DON a NIV

typ iontového zdroje	APCI
mód iontů	negativní
typ skenování	single-stage full scan
doba analýzy	13 min

Tabulka 7: Parametry detekce MS/MS pro DON a NIV

Analyt	Měřený ion	MS (m/z)	MS/MS (m/z)	
DON	[DON + CH ₃ COO] ⁻	355	265	295
NIV	[NIV + CH ₃ COO] ⁻	371	281	311

3.2.2 Optimalizace metody LC/ESI-MS/MS

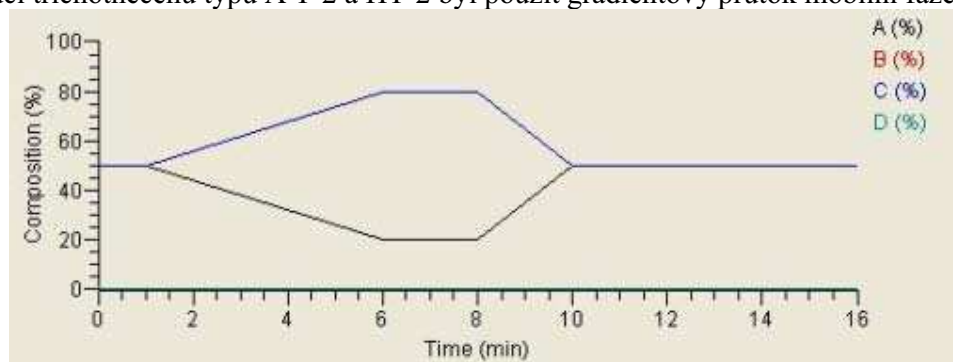
Metoda LC/ESI-MS/MS sloužila k analýze T-2 a HT-2

3.2.2.1 Parametry LC

mobilní fáze	A	10 mM roztok CH ₃ COONH ₄
	C	MeOH
termostatovaná kolona		40 °C
nástřík dávkovací smyčky		25 µl
limitní tlak		5 bar
maximální tlak		400 bar
průtok		0,2 ml.min ⁻¹

Chromatografické separace bylo dosaženo kolonou s pevným jádrem Kinetex 2,6µ PFP 100A (100 x 3 mm) od společnosti Phenomenex.

K eluci trichothecenů typu A T-2 a HT-2 byl použit gradientový průtok mobilní fáze:



Obrázek 20: Gradientový průtok mobilní fáze

3.2.2.2 Parametry ESI-MS/MS



Tabulka 8: Nastavení hmotnostního detektoru pro analýzu T-2 a HT-2

typ iontového zdroje	ESI
mód iontů	pozitivní
typ skenování	single-stage full scan
doba analýzy	17 min

Tabulka 9: Parametry detekce MS/MS pro T-2 a HT-2

Analyt	Měřený ion	MS (m/z)	MS/MS (m/z)		
T-2	[T-2 + Na] ⁺	489	245	387	327
HT-2	[HT-2 + Na] ⁺	447	285	345	-

3.3 Validace metody LC-MS/MS

3.3.1 Validace metody LC/APCI-MS/MS

3.3.1.1 Opakovatelnost nástřiku

Slouží k analýze reálných vzorků. Zásadní vliv na opakovatelnost má stav chromatografické kolony, která může být ovlivněna používáním různých mobilních fází s vysokým obsahem solí nebo s extrémním pH, a také nedostatečná ekvilibrace kolony. Nevhodné zacházení s kolonou způsobí pokles účinnosti kolony, rozdílné hodnoty retenčních časů, nižší rozlišení, dochází k rozmývání píků [15]. V Tabulce 10 a 11 jsou uvedeny hodnoty RSD (relativní směrodatná odchylka) týkající se naměřených hodnot DON a NIV.

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

s...směrodatná odchylka

$\bar{x}$...průměr měření

RSD...relativní směrodatná odchylka

Tabulka 10: Porovnání hodnot retenčních časů (RT) analytů DON a NIV o koncentraci 100,0 ng.ml⁻¹ naměřených na identickém chromatografickém systému za identických podmínek během jednoho dne.

Analyt	RT					průměr RT	RSD [%]
	1	2	3	4	5		
DON	4,32	4,28	4,32	4,32	4,32	4,31	0,4
NIV	2,51	2,51	2,52	2,51	2,51	2,51	0,3

RSD – relativní směrodatná odchylka

Tabulka 11: Porovnání hodnot velikosti ploch pík analytů DON a NIV o koncentraci 100,0 ng.ml⁻¹ naměřených na identickém chromatografickém systému za identických podmínek během jednoho dne.

Analyt	Plocha píku					průměr ploch píků	RSD [%]
	1	2	3	4	5		
DON	180801	186116	195682	168776	184232	183121	4,8
NIV	281707	289934	286543	310974	295748	292981	3,4

RSD – relativní směrodatná odchylka

Z výše uvedených hodnot vyplývá, že výsledky měření vykazují téměř stejné hodnoty, vlastnosti kolony se v průběhu intenzivního měření během jednoho dne téměř nezměnily.

3.3.1.2 Správnost (výtěžnost) metody

Výtěžnost byla stanovena metodou externího přídavku standardu. K měřenému vzorku bylo přidáno určité vypočítané množství roztoku standardu tak, aby obsah trichothecenu tvořil maximálně 1/3 odezvy a standardní přídavek minimálně 2/3.

$$R = \frac{100 \cdot (C_R - C_U)}{C_A} \%$$

C_R – obsah trichothecenu nalezený ve vzorku s externím přídavkem standardu (g.kg⁻¹)

C_U – obsah trichothecenu nalezený ve vzorku (g.kg⁻¹)

C_A – přidané množství standardu do vzorku s přídavkem standardu (g.kg⁻¹)

Tabulka 12: Porovnání obsahu trichothecenu v měřených vzorcích, ke kterým byl přidán externí přídavek standardu DON a NIV o koncentraci 150,0 ng.ml⁻¹.

Analyt	C _R [ng.ml ⁻¹]					C _A [ng.ml ⁻¹]	C _U [ng.ml ⁻¹]	Výtěžnost [%]				
	1	2	3	4	5			1	2	3	4	5
DON	125,5	129,2	131,2	120,9	126,3	150,0	< LOQ	84	86	87	81	84
NIV	117,4	120,9	119,5	125,6	123,3	150,0	< LOQ	78	81	80	84	82

LOQ – mez stanovitelnosti (kvantifikace)

3.3.1.3 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) byla vypočítána grafickou metodou z chromatogramu standardu příslušného analytu, jehož koncentrace se blížila dolní hranici kalibrační závislosti. Trojnásobek hodnoty koncentrace šumu byl mezi detekce, desetinásobek pak mezi stanovitelnosti.

Tabulka 13: Tabulka hodnot LOD a LOQ pro DON a NIV

Analyt	LOD [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]	LOQ [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]
DON	13,4	44,7
NIV	0,7	2,4

3.3.2 Validace metody LC/ESI-MS/MS

3.3.2.1 Opakovatelnost nástřiku

Tabulka 14: Porovnání hodnot retenčních časů (RT) analytů T-2 o koncentraci 50,0 ng.ml⁻¹ a HT-2 o koncentraci 100,0 ng.ml⁻¹ naměřených na identickém chromatografickém systému za identických podmínek během jednoho dne.

Analyt	RT					průměr RT	RSD [%]
	1	2	3	4	5		
T-2	14,01	13,86	13,89	13,85	13,86	13,89	0,4
HT-2	8,22	8,18	8,26	8,21	8,24	8,22	0,3

RSD – relativní směrodatná odchylka

Tabulka 15: Porovnání hodnot velikosti ploch pík analytů T-2 o koncentraci 50,0 ng.ml⁻¹ a HT-2 o koncentraci 100,0 ng.ml⁻¹ naměřených na identickém chromatografickém systému za identických podmínek během jednoho dne.

Analyt	Plocha píku					průměr ploch pík	RSD [%]
	1	2	3	4	5		
T-2	395042	477106	352466	459786	456040	428087	11,0
HT-2	22686	19570	19966	18309	19393	19985	7,3

RSD – relativní směrodatná odchylka

3.3.2.2 Správnost (výťažnost) metody

Tabulka 16: Porovnání obsahu trichothecenů v měřených vzorcích, ke kterým byl přidán externí přídatek standardu T-2 o koncentraci 70,0 ng.ml⁻¹ a standardu HT-2 o koncentraci 120,0 ng.ml⁻¹.

Analyt	C_R [ng.ml ⁻¹]					C_A [ng.ml ⁻¹]	C_U [ng.ml ⁻¹]	Výťažnost [%]				
	1	2	3	4	5			1	2	3	4	5
T-2	61,8	62,0	58,4	59,8	59,4	70,0	< LOQ	88	89	83	85	85
HT-2	101,8	99,7	101,0	97,4	98,7	120,0	< LOQ	85	83	84	81	82

C_R – obsah trichothecenu nalezený ve vzorku s externím přídatkem standardu

C_U – obsah trichothecenu nalezený ve vzorku

C_A – přidané množství standardu do vzorku s přidavkem standardu

LOQ – mez stanovitelnosti (kvantifikace)

3.3.2.3 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) se vypočítala grafickou metodou z chromatogramu standardu příslušného analytu, jehož koncentrace se blížila dolní hranici kalibrační závislosti. Trojnásobek hodnoty koncentrace šumu byl mezi detekce, desetinásobek pak mezi stanovitelnosti.

Tabulka 17: Tabulka hodnot LOD a LOQ pro T-2 a HT-2.

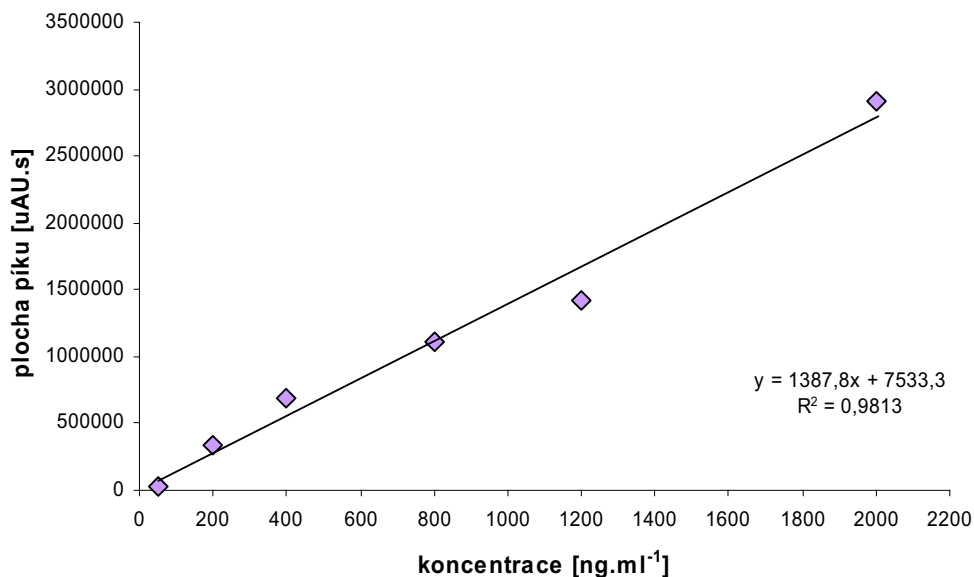
Analyt	LOD [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]	LOQ [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]
T-2	1,5	5,0
HT-2	3,0	10,0

3.4 Kalibrační křivky

Kalibrace byla provedena metodou vnějšího standardu. Standardy běžně skladované v mrazničce byly před použitím ponechány asi 15 minut při laboratorní teplotě a po ustálení jejich teploty s nimi bylo možné pracovat. Nejdříve byl připraven jeden společný zásobní roztok DON a NIV o koncentraci $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$, a to ředěním standardů DON a NIV o přibližné koncentraci $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ do roztoku 50% MeOH.

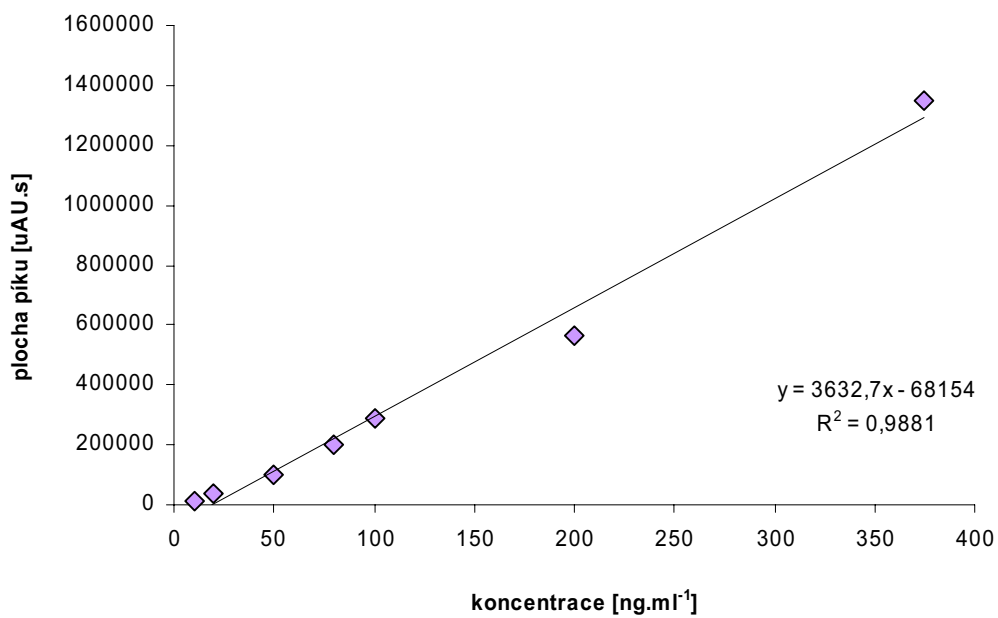
Kalibrační roztoky standardů byly následně připraveny ředěním $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ roztoku na zvolené koncentrace. Koncentrace byly voleny s ohledem na obsah stanovovaných trichothecenů ve vzorcích. Kalibrační křivky byly sestaveny jako závislost plochy příslušných píků na koncentraci jednotlivých standardů.

Pro deoxynivalenol byly zvoleny koncentrace 50, 200, 400, 800, 1200 a 2000 ng.ml^{-1} .



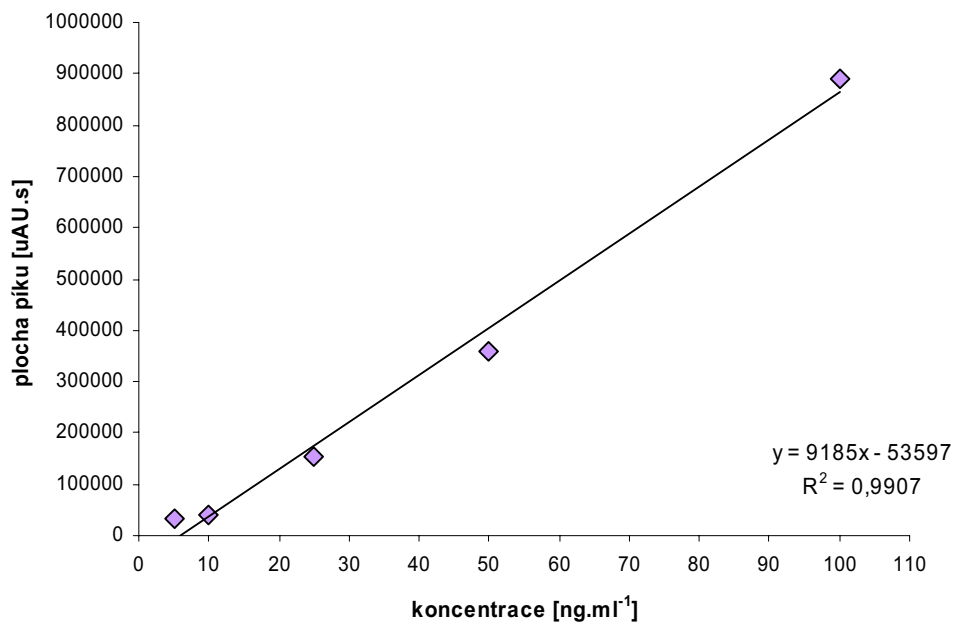
Obrázek 23: Kalibrační křivka deoxynivalenolu

Pro nivalenol byly zvoleny koncentrace 10, 20, 50, 80, 100, 200 a 375 ng.ml⁻¹.



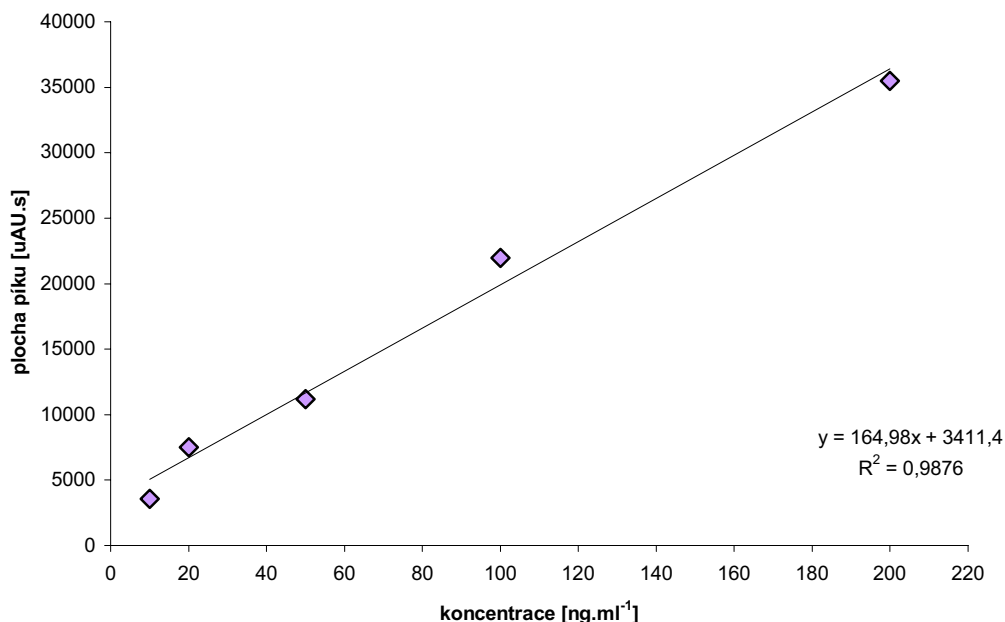
Obrázek 22: Kalibrační křivka nivalenolu

Pro T-2 byly zvoleny koncentrace 5, 10, 25, 50 a 100 ng.ml⁻¹.



Obrázek 24: Kalibrační křivka T-2

Pro HT-2 byly zvoleny koncentrace 10, 20, 50, 100 a 200 ng.ml⁻¹.



Obrázek 25: Kalibrační křivka HT-2

3.5 Příprava a zpracování vzorků k analýze

Vzorky sladovnického ječmene bylo nutno nejprve dezintegrovat na mlýnku. Následně bylo 25 g vzniklé mouky smícháno se 100 ml 84% ACN. Extrakce trichothecenů ze vzorku do rozpouštědla byla provedena pomocí ultrazvuku po dobu 10 minut, poté byla směs centrifugována při 4000 otáčkách 15 minut. Získaný supernatant byl v případě potřeby ještě zfiltrován. 10 ml supernatantu bylo následně protlačeno přes trichothecenovou kolonku EP MYCO SEP 227. Následně byly 2 ml odebraného přečištěného vzorku odpařeny na vakuové rotační odparce při teplotě 45 °C do sucha a poté převedeny do 50% MeOH (1 ml). K promíchání vzorku byl použit ultrazvuk. Nakonec byl vzorek převeden plastovou pasterovou pipetou do vialky a tak připraven k analýze pomocí LC-MS/MS [40].

3.5.1 Příprava mobilní fáze pro analýzu pomocí LC-MS/MS

Příprava mobilní fáze 10mM octanu amonného pro analýzu pomocí LC-MS/MS:

Výpočet navážky octanu amonného:

Mr octan amonný = 77,08 g.mol⁻¹

c = 10 mM

V = 1 l

$m = c \cdot V \cdot M$

$m = 10 \cdot 10^{-3} \cdot 1 \cdot 77,08$

$m = 0,7708 \text{ g CH}_3\text{COONH}_4$

K navážce octanu amonného byl přidán 1 l deionizované vody a promíchání bylo provedeno za použití ultrazvuku. Tento roztok byl z důvodu odstranění možných mechanických nečistot přefiltrován přes nylonový filtr (SUPELCO, Nylon 66 Membranes: 0,45 µm x 47 mm). Přefiltrovaný roztok byl přelit do zásobní nádoby a obohacen 2 % MeOH z důvodu delší trvanlivosti mobilní fáze a zamezení růstu mikroorganismů.

3.5.2 Přepočet koncentrace

Přepočet výsledné koncentrace trichothecenů z $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ vypočtených z kalibrační křivky na $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$:

$$\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} = \text{ng} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \left(\frac{1000}{25} \cdot \frac{100}{10} \cdot \frac{10}{2} \right) / 1000,$$

kde $\frac{1000}{25} \sim 25$ g mouky ječmene odebrané z 1 kg vzorku

$\frac{100}{10} \sim 10$ ml zcentrifugovaného supernatantu odebraného ze 100 ml směsi mouky ječmene s 84% ACN

$\frac{10}{2} \sim 2$ ml odebrané z 10 ml přečištěného supernatantu

$\frac{1}{1000} \sim$ přepočet z ng na µg

3.5.3 Soubory sledovaných analytických vzorků

První soubor

K analýze byl použit soubor skládající se z 57 vzorků ječmene ze sklizně 2008. U jednotlivých vzorků ječmene byla určena odrůda a předplodina. Vzorky pocházely z různých okresů České republiky.

Druhý soubor

Vzorky ječmene odrůdy Sebastian byly vypěstovány na experimentálních pozemcích ZVÚ Kroměříž a MZLU v Žabčicích. Pro analýzu byla použita odrůda ječmene Sebastian ve čtyřech experimentálních variantách – vzorky uměle infikované plísní *Fusarium* a vzorky kontrolní. Umělá infekce ječmene plísní *Fusarium* (mikroinjekcí) a aplikace fungicidů včetně aplikované koncentrace a kombinace prostředků byla prováděna v souladu s normovanými a akreditovanými postupy. Sladování ječmene bylo prováděno na Sladařském ústavu VÚPS v Brně.

Tabulka 18: Experimentální vzorky odrůdy ječmene Sebastian

Číslo vzorku	Sebastian		Infikace	Ošetření	Předplodina
1	ječmen	slad	infikováno	neošetřeno	kukuřice
2	ječmen	slad	infikováno	ošetřeno (fungicid)	kukuřice
3	ječmen	slad	infikováno	ošetřeno (fungicid + adjuvant)	kukuřice
4	ječmen	slad	neinfikováno	neošetřeno	kukuřice

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Validace metody

Byly optimalizovány a validovány metody stanovení vybraných trichothecenů ve sladovnickém ječmeni.

Validována byla metoda LC/APCI-MS/MS pro stanovení DON a NIV a metoda LC/ESI-MS/MS pro stanovení T-2 a HT-2.

4.1.1.1 Opakovatelnost nástřiku

Tabulka 19: Porovnání hodnot relativní směrodatné odchylky (RSD) retenčních časů (RT) analytů DON a NIV, T-2 a HT-2

Analyt	RSD [%]
DON	0,4
NIV	0,3
T-2	0,4
HT-2	0,3

Tabulka 20: Porovnání hodnot relativní směrodatné odchylky (RSD) ploch píků analytů DON a NIV, T-2 a HT-2

Analyt	RSD [%]
DON	4,8
NIV	3,4
T-2	11,0
HT-2	7,3

4.1.1.2 Správnost (výtěžnost) metody

Tabulka 21: Porovnání obsahu trichothecenů v měřených vzorcích, ke kterým byl přidán externí přídatek standardu.

Analyt	Výtěžnost [%]
DON	81 – 87
NIV	78 – 82
T-2	83 – 89
HT-2	81 – 85

4.1.1.3 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Tabulka 22: Tabulka hodnot LOD a LOQ pro trichothecen DON, NIV, T-2 a HT-2.

Analyt	LOD [μg.kg ⁻¹]	LOQ [μg.kg ⁻¹]
DON	13,4	44,7
NIV	0,7	2,4
T-2	1,5	5,0
HT-2	3,0	10,0

4.2 Stanovení obsahu vybraných trichothecenů v prvním souboru vzorků

Trichothecen byly stanoveny nejdříve v prvním souboru, který se skládal z 57 vzorků ječmene různých odrůd.

Tabulka 23: Stanovení vybraných trichothecenů v nejvíce zastoupených vzorcích odrůd sladovnického ječmene

Vzorek č.	DON	NIV	T-2	HT-2	Odrůda	Předplodina
	µg.kg ⁻¹					
1	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	Bojos	cukr
2	57,9	< LOQ	< LOQ	10,5	Bojos	cukr
3	68,6	< LOQ	< LOQ	< LOQ	Bojos	cukr
4	533,9	< LOQ	< LOQ	< LOQ	Bojos	kuk
5	301,7	< LOQ	< LOQ	< LOQ	Bojos	kuk
6	244,4	11,1	< LOQ	< LOQ	Bojos	kuk
7	180,3	< LOQ	< LOQ	< LOQ	Bojos	kuk
8	157,5	11,4	< LOQ	< LOQ	Bojos	kuk
9	157,3	< LOQ	< LOQ	< LOQ	Bojos	kuk
10	155,9	10,0	< LOQ	< LOQ	Bojos	kuk
11	136,7	10,9	< LOQ	< LOQ	Bojos	kuk
12	< LOQ	< LOQ	< LOQ	16,3	Bojos	kuk
13	104,2	< LOQ	< LOQ	< LOQ	Bojos	pšoz
14	< LOQ	11,2	< LOQ	< LOQ	Bojos	pšoz
15	< LOQ	11,1	< LOQ	< LOQ	Bojos	pšoz
16	600,3	< LOQ	< LOQ	16,8	Sebastian	cukr
17	145,8	10,3	< LOQ	< LOQ	Sebastian	cukr
18	137,0	77,0	< LOQ	39,3	Sebastian	cukr
19	945,2	17,9	< LOQ	< LOQ	Sebastian	kuk
20	384,2	21,8	< LOQ	< LOQ	Sebastian	kuk
21	215,4	23,7	< LOQ	< LOQ	Sebastian	kuk
22	195,2	< LOQ	< LOQ	< LOQ	Sebastian	kuk
23	891,4	50,0	< LOQ	< LOQ	Sebastian	pšoz
24	125,5	78,0	< LOQ	< LOQ	Sebastian	pšoz
25	100,4	17,2	< LOQ	< LOQ	Sebastian	pšoz

26	177,5	15,5	< LOQ	< LOQ	Sebastian	pšoz
27	176,6	< LOQ	< LOQ	< LOQ	Malz	cukr
28	< LOQ	14,5	< LOQ	41,3	Malz	cukr
29	737,6	< LOQ	< LOQ	< LOQ	Malz	kuk
30	281,8	< LOQ	< LOQ	< LOQ	Malz	kuk
31	249,2	14,8	< LOQ	21,10	Malz	kuk
32	205,7	< LOQ	< LOQ	< LOQ	Malz	kuk
33	165,8	< LOQ	< LOQ	10,1	Malz	kuk
34	668,4	< LOQ	< LOQ	< LOQ	Malz	pšoz
35	130,7	< LOQ	< LOQ	< LOQ	Malz	pšoz

LOQ – mez stanovitelnosti (kvantifikace)

Tabulka 24: Stanovení vybraných trichotheceů v méně zastoupených vzorcích odrůd sladovnického ječmene

Vzorek č.	DON	NIV	T-2	HT-2	Odrůda	Předplodina
	μg.kg ⁻¹					
36	89,0	< LOQ	< LOQ	12,2	Prestige	cukr
37	800,5	29,4	< LOQ	< LOQ	Prestige	kuk
38	319,8	138,4	21,8	68,7	Prestige	pšoz
39	230,5	< LOQ	< LOQ	< LOQ	Prestige	pšoz
40	122,2	11,4	< LOQ	10,9	Prestige	pšoz
41	344,8	19,5	< LOQ	< LOQ	Diplom	cukr
42	242,4	< LOQ	< LOQ	< LOQ	Diplom	cukr
43	59,8	< LOQ	< LOQ	< LOQ	Diplom	cukr
44	< LOQ	< LOQ	< LOQ	11,9	Diplom	kuk
45	195,9	12,7	< LOQ	< LOQ	Blaník	cukr
46	245,2	< LOQ	< LOQ	< LOQ	Blaník	kuk
47	46,9	10,3	< LOQ	< LOQ	Blaník	kuk
48	48,9	< LOQ	< LOQ	22,0	Blaník	pšoz
49	< LOQ	10,8	< LOQ	< LOQ	Radegast	cukr
50	99,2	61,5	< LOQ	16,8	Radegast	pšoz
51	76,2	12,2	< LOQ	13,7	Radegast	pšoz
52	322,3	< LOQ	< LOQ	< LOQ	Aksamit	kuk
53	50,1	25,2	< LOQ	< LOQ	Aksamit	pšoz
54	< LOQ	26,7	< LOQ	< LOQ	Xanadu	pšoz
55	473,0	10,7	< LOQ	< LOQ	Xanadu	pšoz
56	665,9	< LOQ	< LOQ	< LOQ	Jersey	pšoz
57	172,3	< LOQ	< LOQ	< LOQ	Kangoo	cukr

cukr – cukrová řepa

pšoz – pšenice ozimá

kuk – kukuřice

LOQ – mez stanovitelnosti (kvantifikace)

Tabulka 25: Přehled odrůd a počet vzorků

Odrůda	Počet vzorků	Odrůda	Počet vzorků
Aksamit	2	Prestige	5
Blaník	4	Radegast	3
Bojos	15	Sebastian	11
Diplom	4	Xanadu	2
Jersey	1	Kangoo	1
Malz	9	-	-

Tabulka 26: Pozitivní obsah trichothecenů v 57 sledovaných vzorcích ječmene

Trichothecen	Počet pozitivních vzorků	% pozitivních vzorků
DON	49	86,0
NIV	29	50,9
T-2	1	1,8
HT-2	14	24,6

Tabulka 27: Obsah DON ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) v zrně ječmene podle odrůd

Odrůda	Analyzované vzorky	Pozitivní vzorky	Rozpětí hodnot
Aksamit	2	2	50,1-322,3
Blaník	4	4	46,9-245,2
Bojos	15	11	57,9-533,9
Diplom	4	3	59,8-344,8
Jersey	1	1	665,9
Malz	9	8	130,7-737,6
Prestige	5	5	89,0-800,5
Radegast	3	2	76,2-99,2
Sebastian	11	11	100,4-945,2
Xanadu	2	1	473
Kangoo	1	1	172,3

Tabulka 28: Obsah NIV ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) v zrně ječmene podle odrůd

Odrůda	Analyzované vzorky	Pozitivní vzorky	Rozpětí hodnot
Aksamit	2	1	25,2
Blaník	4	2	10,3-12,7
Bojos	15	6	10,0-11,2
Diplom	4	1	19,5
Jersey	1	0	-
Malz	9	2	14,5-14,8
Prestige	5	3	11,4-138,4
Radegast	3	3	10,8-61,5
Sebastian	11	9	10,3-78,0
Xanadu	2	2	10,7-26,7
Kangoo	1	0	-

Tabulka 29: Obsah HT-2 ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) v zrně ječmene podle odrůd

Odrůda	Analyzované vzorky	Pozitivní vzorky	Rozpětí hodnot
Aksamit	2	0	-
Blaník	4	1	22
Bojos	15	2	10,5-16,3
Diplom	4	1	11,9
Jersey	1	0	-
Malz	9	3	10,1-41,3
Prestige	5	3	10,9-68,7
Radegast	3	2	13,7-16,8
Sebastian	11	2	16,8-39,3
Xanadu	2	0	-
Kangoo	1	0	-

Obsah T-2 byl v 56 vzorcích ječmene z 57 byl pod mezí stanovitelnosti (<LOQ), pouze v případě odrůdy Prestige dosahoval hodnoty 21,8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Tabulka 30: Nejnížší hodnoty vybraných trichotheceů v jednotlivých odrůdách sladovnického ječmene

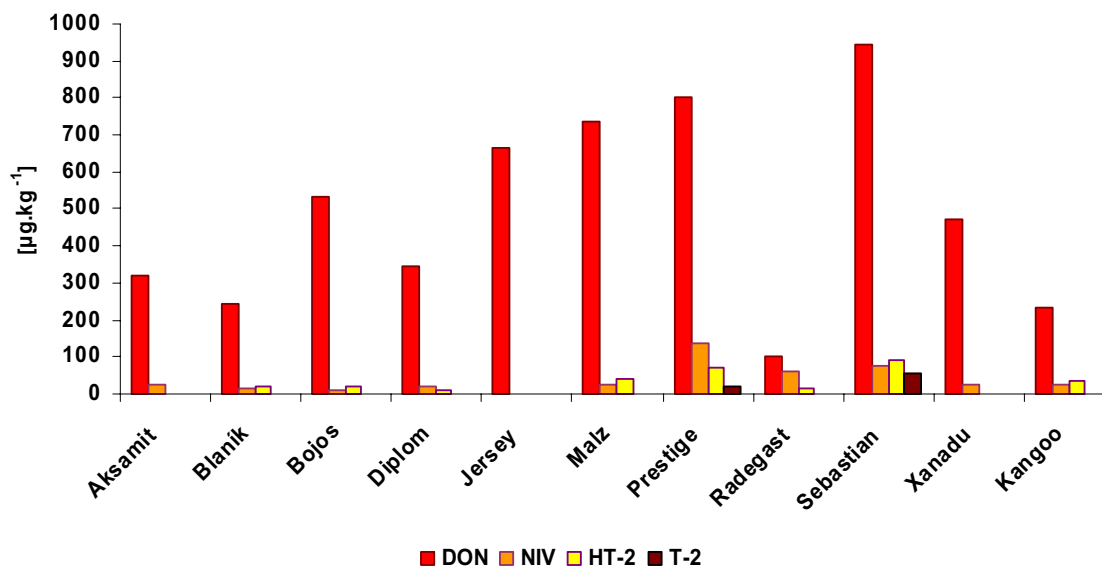
Odrůda	DON [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]	NIV [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]	T-2 [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]	HT-2 [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]
Aksamit	50,1	25,2	< LOQ	< LOQ
Blaník	46,9	10,3	< LOQ	22,0
Bojos	57,9	10,0	< LOQ	10,5
Diplom	59,8	19,5	< LOQ	11,9
Jersey	665,9	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Malz	130,7	10,1	< LOQ	10,1
Prestige	89,0	10,9	21,8	10,9
Radegast	76,2	10,8	< LOQ	13,7
Sebastian	100,4	10,3	< LOQ	16,8
Xanadu	473,0	10,7	< LOQ	< LOQ
Kangoo	172,3	< LOQ	< LOQ	< LOQ

LOQ – mez stanovitelnosti (kvantifikace)

Tabulka 31: Nejvyšší hodnoty vybraných trichothečenů v jednotlivých odrůdách sladovnického ječmene

Odrůda	DON [μg.kg ⁻¹]	NIV [μg.kg ⁻¹]	T-2 [μg.kg ⁻¹]	HT-2 [μg.kg ⁻¹]
Aksamit	322,3	25,2	< LOQ	< LOQ
Blaník	245,2	12,7	< LOQ	22,0
Bojos	533,9	12,5	< LOQ	18,7
Diplom	344,8	19,5	< LOQ	11,9
Jersey	665,9	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Malz	737,6	23,4	< LOQ	41,3
Prestige	800,5	138,4	21,8	68,7
Radegast	99,2	61,5	< LOQ	16,8
Sebastian	945,2	78,0	< LOQ	39,3
Xanadu	473,0	26,7	< LOQ	< LOQ
Kangoo	172,3	< LOQ	< LOQ	< LOQ

LOQ – mez stanovitelnosti (kvantifikace)



Obrázek 26: Nejvyšší hodnoty vybraných trichothečenů v jednotlivých odrůdách sladovnického ječmene

Na základě vyhodnocení nejvyšších hodnot vybraných trichothečenů a množství dat u jednotlivých odrůd byly k dalšímu vyhodnocení vybrány odrůdy Blaník, Bojos, Malz, Prestige a Sebastian.

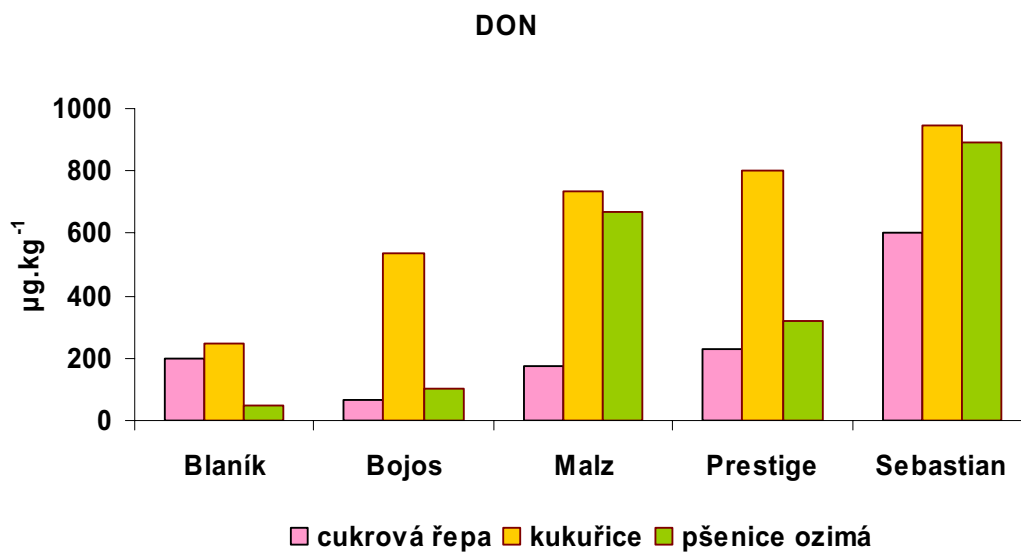
Tabulka 32: Přehled počtu vzorků u vybraných odrůd podle předplodin

Odrůda	počet vzorků	Cukrová řepa	počet vzorků	Kukuřice	počet vzorků	Pšenice ozimá
Blaník		1		2		1
Bojos		3		9		3
Malz		2		5		2
Prestige		1		1		3
Sebastian		3		4		4

4.2.1 Stanovení DON

Tabulka 33: Nejvyšší hodnoty výskytu DON ve vybraných odrůdách sladovnického ječmene v závislosti na předplodině vyjádřený v $\mu\text{g.kg}^{-1}$

Odrůda	cukrová řepa	kukuřice	pšenice ozimá
Blaník	195,9	245,2	48,9
Bojos	68,6	533,9	104,2
Malz	176,6	737,6	668,4
Prestige	230,5	800,5	319,8
Sebastian	600,3	945,2	891,4

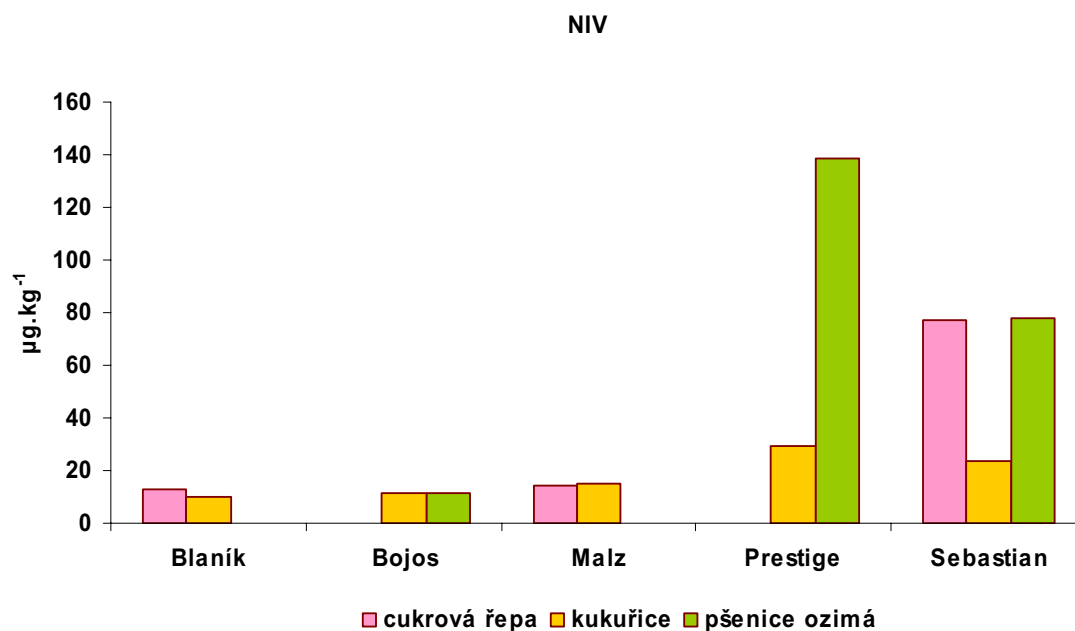


Obrázek 27: Výskyt DON ve vybraných odrůdách sladovnického ječmene v závislosti na předplodině

4.2.2 Stanovení NIV

Tabulka 34: Nejvyšší hodnoty výskytu NIV ve vybraných odrůdách sladovnického ječmene v závislosti na předplodině vyjádřený v $\mu\text{g.kg}^{-1}$

Odrůda	cukrová řepa	kukuřice	pšenice ozimá
Blaník	12,7	10,3	< LOQ
Bojos	< LOQ	11,4	11,2
Malz	14,5	14,8	< LOQ
Prestige	< LOQ	29,4	138,4
Sebastian	77,0	23,7	78,0

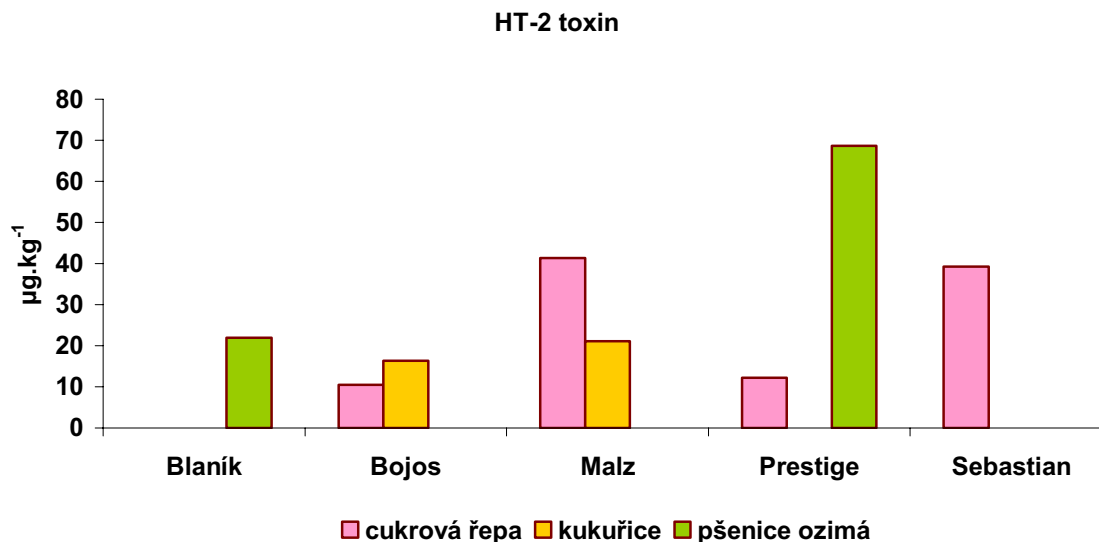


Obrázek 28: Výskyt NIV ve vybraných odrůdách sladovnického ječmene v závislosti na předplodině

4.2.3 Stanovení HT-2

Tabulka 35: Nejvyšší hodnoty výskytu HT-2 ve vybraných odrůdách sladovnického ječmene v závislosti na předplodině vyjádřený v $\mu\text{g.kg}^{-1}$

Odrůda	cukrová řepa	kukuřice	pšenice ozimá
Blaník	< LOQ	< LOQ	22,0
Bojos	10,5	16,3	< LOQ
Malz	41,3	21,1	< LOQ
Prestige	12,2	< LOQ	68,7
Sebastian	39,3	< LOQ	< LOQ



Obrázek 29: Výskyt HT-2 ve vybraných odrůdách sladovnického ječmene v závislosti na předplodině

4.2.4 Stanovení T-2

Výskyt T-2 ve vybraných odrůdách sladovnického ječmene byl pod mezí stanovitelnosti (< LOQ), pouze u odrůdy Prestige v případě předplodiny pšenice ozimé bylo nalezeno 21,8 µg.kg⁻¹.

Obsah trichothecenových mykotoxinů v 57 vzorcích ječmene různých odrůd ze sklizně 2008 se pohyboval v rozmezí 10,0–945,2 µg.kg⁻¹. DON byl v těchto vzorcích obsažen v rozmezí 46,9–945,2 µg.kg⁻¹; NIV v rozmezí 10,0–138,4 µg.kg⁻¹; HT-2 v rozmezí 10,1–68,7 µg.kg⁻¹ (T-2 byl stanoven pouze v případě jednoho vzorku na 21,8 µg.kg⁻¹); viz Tabulka 29 a 30.

Nejvyšší hodnota DON (945,2 µg.kg⁻¹) byla stanovena ve vzorku ječmene odrůdy Sebastian, kde předplodinou byla kukuřice, viz Tabulka 32. Maximální limit DON u nezpracovaných obilnin činí 1250 µg.kg⁻¹, hodnota pozitivního vzorku je tedy pod hodnotou maximálního limitu. Nejvyšší hodnoty NIV, T-2 a HT-2 (v pořadí 138,4 µg.kg⁻¹; 21,8 µg.kg⁻¹ a 68,7 µg.kg⁻¹) byly nalezeny v odrůdě ječmene Prestige, kde předplodinou byla pšenice ozimá, Tabulka 33 a 34.

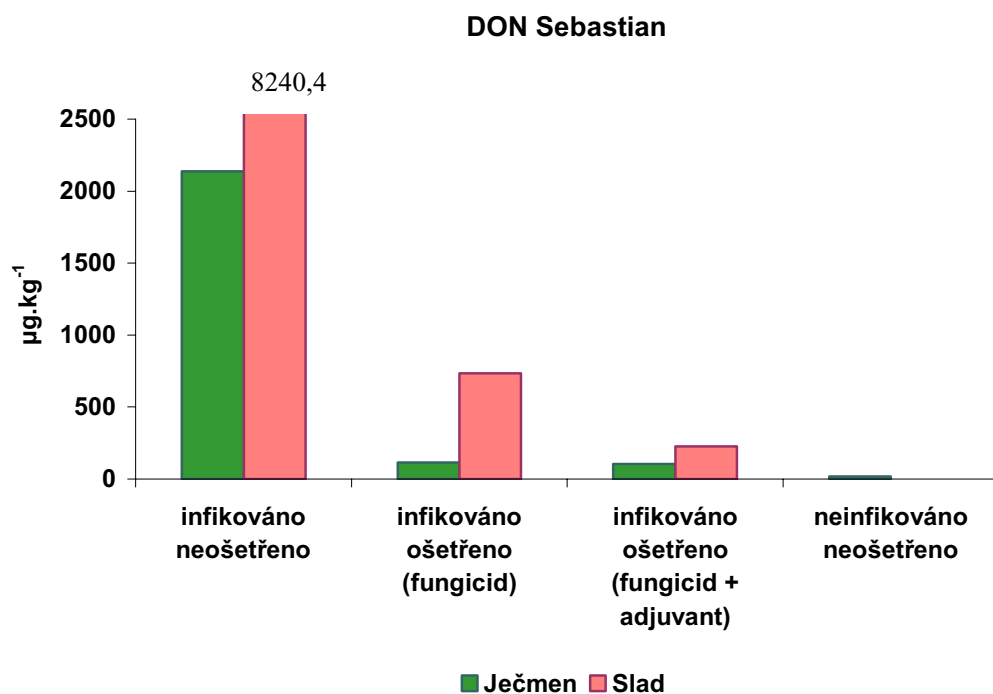
Nejnižší hodnota DON (46,9 µg.kg⁻¹) byla stanovena ve vzorku ječmene odrůdy Blaník, kde předplodinou byla kukuřice. Nejnižší hodnota NIV (10,0 µg.kg⁻¹) byla stanovena ve vzorku ječmene odrůdy Bojos, kde předplodinou byla také kukuřice. Nejnižší a zároveň nejvyšší hodnota T-2 (21,8 µg.kg⁻¹) byla stanovena ve vzorku ječmene odrůdy Prestige, kde předplodinou byla pšenice ozimá a nejnižší hodnota HT-2 (10,1 µg.kg⁻¹) byla stanovena ve vzorku ječmene odrůdy Malz, kde předplodinou byla kukuřice.

4.3 Stanovení obsahu vybraných trichothecenů ve druhém souboru vzorků

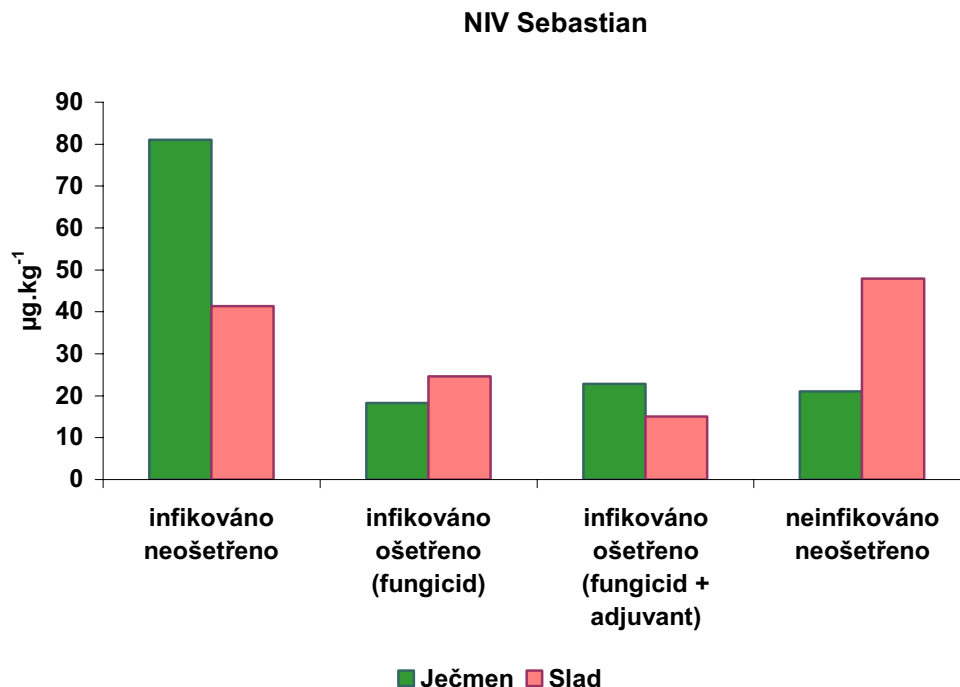
Druhý soubor vzorků byl složen ze čtyř experimentálních vzorků odrůdy ječmene Sebastian a z něj vyrobeného sladu.

Tabulka 36: Obsah DON a NIV ve čtyřech experimentálních vzorcích odrůdy ječmene Sebastian a příslušném sladu

Sebastian		DON [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]		NIV [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]		T-2 HT-2 [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]	
		ječmen	slad	ječmen	slad	ječmen	slad
infikováno	neošetřeno	2138,3	8240,4	81,0	41,4	< LOQ	
	ošetřeno (fungicid)	114,2	733,0	18,3	24,7	< LOQ	
	ošetřeno (fungicid + adjuvant)	103,6	227,9	22,9	15,1	< LOQ	
neinfikováno	neošetřeno	< LOQ	< LOQ	21,1	47,9	< LOQ	



Obrázek 30: Obsah DON v experimentálních vzorcích sladovnického ječmene odrůdy Sebastian a příslušném sladu



Obrázek 31: Obsah NIV v experimentálních vzorcích sladovnického ječmene odrůdy Sebastian a příslušném sladu

Naměřené hodnoty DON a NIV se v uměle infikovaných vzorcích ječmene odrůdy Sebastian (ošetřených i neošetřených) pohybují v rozmezí 15,1–8240,4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

V případě stanovení DON v uměle infikovaném ječmeni odrůdy Sebastian byla zjištěna nejvyšší hodnota u vzorku neošetřeného ječmene (2138,3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) a z něj vyrobeného sladu (8240,4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). Nejnižších hodnot dosahoval DON v uměle infikovaném ječmeni ošetřeném fungicidem a adjuvancí (103,6 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) a z něj vyrobeném sladu (227,9 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). V neinfikovaném a neošetřeném vzorku ječmene byly naměřené hodnoty DON pod mezí stanovitelnosti.

V případě stanovení NIV v uměle infikovaném ječmeni odrůdy Sebastian byla zjištěna nejvyšší hodnota u vzorku ječmene, který nebyl ošetřen (81,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). Kupodivu nejvyšší hodnota NIV ve sladu byla naměřena, narozdíl od DON, v neinfikovaném a neošetřeném vzorku (47,9 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). Nejnižší hodnoty dosahoval NIV v uměle infikovaném vzorku ječmene ošetřeném fungicidem (18,3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) a ve sladu ječmene, který byl ošetřen fungicidem a adjuvancí (15,1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$).

V neinfikovaném a neošetřeném vzorku ječmene byly naměřené hodnoty NIV vyšší než v případě DON.

Obsah T-2 a HT-2 byl ve všech experimentálních variantách odrůdy ječmene Sebastian pod mezí stanovitelnosti (< LOQ).

5 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se věnovala trichothecenovým mykotoxinům obsaženým ve sladovnickém ječmeni. Největší pozornost byla zaměřena na deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV), T-2 toxin (T-2) a HT-2 toxin (HT-2), jež jsou produkovány vláknitými houbami rodu *Fusarium*.

V práci byla shrnuta charakteristika trichothecenových mykotoxinů typu A (T-2, HT-2) a typu B (DON, NIV), a byly rozepsány významné mykotoxiny obsažené ve sladovnickém ječmeni. Současně byly tyto trichothecenové mykotoxiny stanoveny i v souboru několika variant uměle infikovaných vzorků ječmene odrůdy Sebastian a z něj vyrobených sladů. Pro přípravu analytického vzorku byla použita extrakce vodným acetonitrilem a následné přečištění přes SPE kolonku (MYCO SEP 227). Po zakoncentrování na vakuové odparce byly vzorky převedeny do vodného methanolu.

Ke stanovení trichothecenových mykotoxinů (DON, NIV, T-2, HT-2) ve sladovnickém ječmeni a sladu byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (LC-MS/MS). K chromatografické separaci byla použita kolona s pevným jádrem Kinetex 2,6 μ PFP 100A (100 x 3 mm). Byla optimalizována analytická metoda s gradientovou elucí pro trichotheceny typu A a pro trichotheceny typu B.

Jako ionizační technika byla pro trichotheceny typu A použita elektrospojová ionizace (ESI) a pro trichotheceny typu B chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Obě metody byly validovány.

Bylo analyzováno 57 vzorků sladovnického ječmene. Vzorky pocházely přímo od pěstitelů z jednotlivých oblastí ČR. Naměřené hodnoty trichothecenů se u tohoto souboru vzorků sladovnického ječmene pohybovaly v rozmezí 10,0–945,2 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pro zrno ječmene. Hodnoty DON se pohybovaly v rozmezí 46,9–945,2 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, NIV v rozmezí 10,0–138,4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$; HT-2 v rozmezí 10,1–68,7 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, T-2 byl stanoven pouze v případě jednoho vzorku na 21,8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Nejvyšší hodnoty DON byly nalezeny v ječmeni odrůdy Sebastian, kde předplodinou byla kukuřice. Nejvyšší hodnoty NIV, T-2 a HT-2 byly nalezeny v odrůdě ječmene Prestige, kde předplodinou byla pšenice ozimá. Výsledky prokázaly přítomnost trichothecenových mykotoxinů v 56 z 57 analyzovaných vzorků sladovnického ječmene. U žádného z analyzovaných vzorků nebyl překročen maximální limit DON v ječmeni, který podle nařízení Komise Evropských společenství č. 1881/2006 je stanoven ve výši 1 250 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Pro ostatní stanovované mykotoxiny nebyl maximální limit v ječmeni dosud stanoven.

Dále byl analyzován soubor vzorků uměle infikovaného ječmene odrůdy Sebastian a z něj vyrobených sladů. Jednalo se o tři varianty infekce vláknitými houbami rodu *Fusarium* a vzorek kontrolní (bez umělé infekce). Naměřené hodnoty DON a NIV se pohybovaly v rozmezí 15,1–8240,4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pro zrno ječmene i pro slad.

V neinfikovaném a neošetřeném vzorku ječmene byly naměřené hodnoty NIV vyšší než v případě DON. Obsah T-2 a HT-2 byl ve všech experimentálních variantách odrůdy ječmene Sebastian (infikovaných i neinfikovaných) pod mezí stanovitelnosti (< LOQ).

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Malíř, F., Ostrý, V. a kol.: Vlákenné mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka. 1. vyd. Brno: MIKADA, 2003. 349 s. Tirážní znak 57-871-03.
- [2] Velíšek, J.: *Chemie potravin* 3. 2. upr. vyd. Tábor: OASSIS, 2002. 331 s. ISBN 80-86659-03-8.
- [3] Zöllner, P., Mayer-Helm, B.: Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography – atmospheric pressure ionisation mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 2006, vol. 1136, no 2, pp. 123-169.
- [4] Radová, Z., Hajšlová, J.: Mykotoxiny v zemědělské produkci ve vazbě na agrární systém. *Vědecký výbor fytozdravotního a životního prostředí* [online], č.15, 2003, s. 34 [cit. 11. 3. 2010]. Dostupné na: < www.phytoprotection.org/projekty/2003/vvf-13-03.pdf >
- [5] Cole, R. J., Cox, R. H.: *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*. New York: Academic Press, 1981. 152 p.
- [6] Trichothecenové mykotoxiny. [online]. [cit. 15.1. 2010]. Dostupné na: < www.chemicke-listy.cz/docs/full/2002_07_04.pdf >.
- [7] Mykotoxiny. [online]. [cit. 15.1. 2010]. Dostupné na: < <http://www.phytoprotection.org/?link=cs/projekty/2009/> >
- [8] Pestka, J. J.: Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks, *Animal Feed Science and Technology*, 2007, vol. 137, pp. 283-298.
- [9] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: *Meeting Safety evaluation of certain mycotoxins in food*. Food & Agriculture Org., 2001. 701 p. ISBN 9251046646, 9789251046647.
- [10] Nařízení komise (ES) č. 1831/2003, Úřední věstník Evropské unie, 2003. 5 s.
- [11] Herzig, I., Suchý, P., Straková, E.: *Vliv mykotoxinů sterigmatocystinu, moniliforminu, diacetoxyscirpenolu, phomopsinu A a toxinů mikromycet rodu Alternaria na zdraví zvířat a bezpečnost potravin*. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i. Praha, 2008.
- [12] Pronk, M. E. J., Schothorst, R. C., van Egmond, H. P.: *Toxicology and occurrence of nivalenol, fusarenon X, diacetoxyscirpenol, neosolaniol and 3- and 15-acetyldeoxynivalenol: a review of six trichothecenes*. Bilthoven, 2002: RIVM Report 388802024.
- [13] Nivalenol. [online]. 2004 [cit. 26.2. 2010]. Dostupné na: < <http://www.biopure.at/biopure-ex/> >.
- [14] Opinion of the scientific committee on food on fusarium toxins part 4¹: Nivalenol. *Scientific committee on food* [online] 2000 [cit. 25.3. 2010]. Dostupné na: < http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/index_en.html >.

- [15] Jedličková, L.: *Stanovení trichothecenových mykotoxinů v ječmeni a sladu*. Brno, 2007. 94 s. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity na Ústavu chemie. Vedoucí diplomové práce Ing. Dagmar Gajdošová.
- [16] Polák, B., Váňová, M., Onderka, M.: *Základy pěstování a zpracování sladovnického ječmene*. 1. vyd. Praha: Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR, 1998. 4-6 s. ISBN 80-7105-166-7.
- [17] Kosař, K., Procházka, S. a kol.: *Technologie výroby sladu a piva*. 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., 2000. 393 s., ISBN 80-902658-6-3
- [18] Puč, V.: *Stanovení Beta-karotenu v ječmeni metodou HPLC*. Brno, 2007. 80 s. Diplomová práce na Chemické fakultě Vysokého učení technického na Ústavu chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí diplomové práce RNDr. Jarosla Prýma.
- [19] Basařová, G., Čepička, J.: *Sladařství a pivovarství*. 1. vyd. Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury, n. p., 1985. 256 s.
- [20] Čepička J.: Fermentační technologie, kapitola: Sladařství
- [21] Benda, J.: Metodika pěstování jarních obilovin: ječmen jarní, oves, pšenice jarní. Kroměříž: Zemědělský výzkumný ústav, 2001. 143 s. ISBN 8090254543, 9788090254541.
- [22] Basařová G., Hlaváček I.: *České pivo*. Nuga, 1998. 193 s. ISBN 8085903083, 9788085903089.
- [23] Prokeš J.: Pivovarská škola, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský. Dostupné z: < <http://www.pivovarskaskola.cz> >.
- [24] Sladařství. [online]. 2002. [cit. 15.4. 2010]. Dostupné na: < <http://www.vscht.cz/kch/kestazeni/sylaby/sladarstvi.pdf> >.
- [25] Ťopka P., Čejka P.: *Kvasný průmysl*. 1987
- [26] Evans, D. E., Sheehan, M. C., Stewart, D. C.: The impact of malt derived proteins on beer foam quality. Part II: The influence of malt foam-positive proteins and non-starch polysaccharides on beer foam quality. *J. Inst. Brew.*, 1999, vol. 105, 171-177.
- [27] Horáková, V., Dvořáčková, O., Mezlík, T.: *Seznam doporučených odrůd 2009. Přehled odrůd 2009*. 1. vyd. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. Národní odrůdový úřad. 2009. 214 s. ISBN 978-80-7401-016-3.
- [28] Aflatoxins. [online]. [cit. 17.2. 2010]. Dostupné na: < http://www.aflatoxin.info/images/afla_1.jpg >.
- [29] Ochratoxin A. [online]. [cit. 17.2. 2010]. Dostupné na: < <http://www.fao.org/docrep/t1838e/T1838E0M.GIF> >.

- [30] Krska, R., Welzig, E., Boudra, H.: Analysis of Fusarium toxins in feed. *Elsevier*, 2007, pp. 241-264.
- [32] Sterigmatocystin. [online]. [cit. 3.2. 2010].
Dostupné na: < <http://www.micotoxinas.com.br/Sterigmatocystin.gif> >.
- [33] Radová-Sypecká, Z., Hajšlová, J.: Incidence mykotoxinů v cereáliích produkovaných v ČR, vazba na agrotechnická opatření. *VVF* [online], 2003, [cit. 11.3. 2010].
Dostupné na: < <http://www.phytosanitary.org/projekty/2003/vvf-13-03.pdf> >.
- [34] Ostrý, V., Ruprich, J., Malíř, F.: Alternářové mykotoxiny: toxikologické informace a výskyt v potravinách. Vědecký výbor pro potraviny, Státní zdravotní ústav. Brno: 2007. 24 s.
- [35] Helán, V., kolektiv autorů: *Analýza organických látek*. 2. upr. a dopl. vyd. Český Těšín: THETA, 2005. ISBN 80-86380-29-7.
- [36] Lattanzio, V. M. T., Pascale, M., Visconti, A.: Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals. *Trends in Analytical Chemistry*, 2009, vol. 28, no. 6.
- [37] Imunoafinitní kolonky. [online]. 2010 [cit. 20.3. 2010].
Dostupné na: < http://cs.wikipedia.org/wiki/Afinitn%C3%AD_chromatografie >.
- [38] Imunoafinitní kolonky. [online]. [cit. 20.3. 2010].
Dostupné na: < <http://chromservis.cz/item/afla-b-imunoafinitni-kolonky-pro-fluorometr-a-hplc-50-ks?lang=CZ> >.
- [39] Clean up columns. [online]. 2007 [cit. 20.3. 2010].
Dostupné na: < http://www.romerlabs.com/pdts_columns.html#Mycosep >.
- [40] Trichothecene EP Columns - introduction fore use. R-Biopharm RHÔNE LTD, 2005.
- [41] Turnera, N. W., Subrahmanyamb, S., Piletskyb, S. A.: Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 2009, pp. 168-180
- [42] Pertile, E., Čablík, V.: *Instrumentální metody analýzy*. 1. vyd. Ostrava: VŠB - Technická univerzita Ostrava, 2006. 238 s. ISBN 80-248-1049-2.
- [43] Jampílek, J., Opatřilová, R., Liška, I.: Návodů do cvičení z analytické chemie: *Vybrané instrumentální metody*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2007. 74 s. ISBN 978-80-7305-007-8.
- [44] Holčapek, M.: *Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS)*. 1. vyd. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2001. 191 s. ISBN 8071943908, 9788071943907.
- [45] Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. 2. upr. vyd. Ostrava : Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.

- [46] Vřešťál, J.: *Hmotnostní spektrometrie*. 1. vyd. Brno : Vydavatelství MU, 1998. 114 s. ISBN 80-210-1835-6.
- [47] Thermo electron corporation: *FinniganTM Ion Max API Source, Hardware Manual*. Revision A. San Jose: Technical publications, 2003. pp. 2.3-3.3.
- [48] Hmotnostní analyzátory – přednášky. [online]. 2010. [cit. 11.4. 2010]. Dostupné na: < <http://holcapek.upce.cz/teaching.htm> >.
- [49] Herbert, Ch. G., Johnstone, R. A. W.: *Mass spectrometry basics*. CRC Press, 2003. 474 p. ISBN 0849313546, 9780849313547

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3-ADON – 3-acetyldeoxynivalenol
15-ADON – 15-acetyldeoxynivalenol
APCI – Atmospheric Pressure Chemical Ionization
API – Atmospheric Pressure Ionization
APPI – Atmospheric Pressure Photo Ionization
CI – Chemical Ionization
DAS – diacetoxyscirpenol
DON – deoxynivalenol
EI – Electron Ionization
ECD – Electron Capture Detector
EFSA – European Food Safety Authority, Evropský úřad pro bezpečnost potravin
ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ESI – ElectroSpray Ionization
FAO – Food and Agriculture Organization, Organizace pro potraviny a zemědělství při WHO
FID – Flame ionization detector
FUS-X – fusarenon-X
GC – Gas Chromatography
GPC – Gel-Permeation Chromatography
GC-MS – Gas Chromatography-Mass Spectrometry
HPLC – High-Performance Liquid Chromatography
HPTLC – High-Performance Thin-Layer Chromatography
HPLC-MS – High-Performance Liquid Chromatography- Mass Spectrometry
HT-2 – HT-2 toxin
IARC – International Agency for Research on Cancer, Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
IT – Ion Trap
LC – Liquid Chromatography, je zkratkou i pro High-Performance Liquid Chromatography
LC-MS – High-Performance Liquid Chromatography- Mass Spectrometry
LOD – Limit of Detection, limit detekce
LOQ – Limit of Quantification, limit kvantifikace
MeOH – Methanol
MS – Mass Spectrometry
MZLU – Mendelova Zemědělská Lesnická Univerzita
NEO – neosolaniol
NIV – nivalenol
OTA – ochratoxin A
PFP – PentaFluoroPhenyl
PID – PhotoIonization Detector
PTDI – Provisional Tolerable Daily Intake, provizorní tolerovatelný denní přívod
Q – Quadrupole
RSD – Relativní Směrodatná Odchylka
SPE – Solid Phase Extraction
T-2 – T-2 toxin
TDI – Tolerable Daily Intake, tolerovatelný denní přívod
TLC – Thin-Layer Chromatography
TOF – Time-of-Flight
TWI – Tolerant Weekly Intake, tolerovaný týdenní příjem
UV – UltraViolet

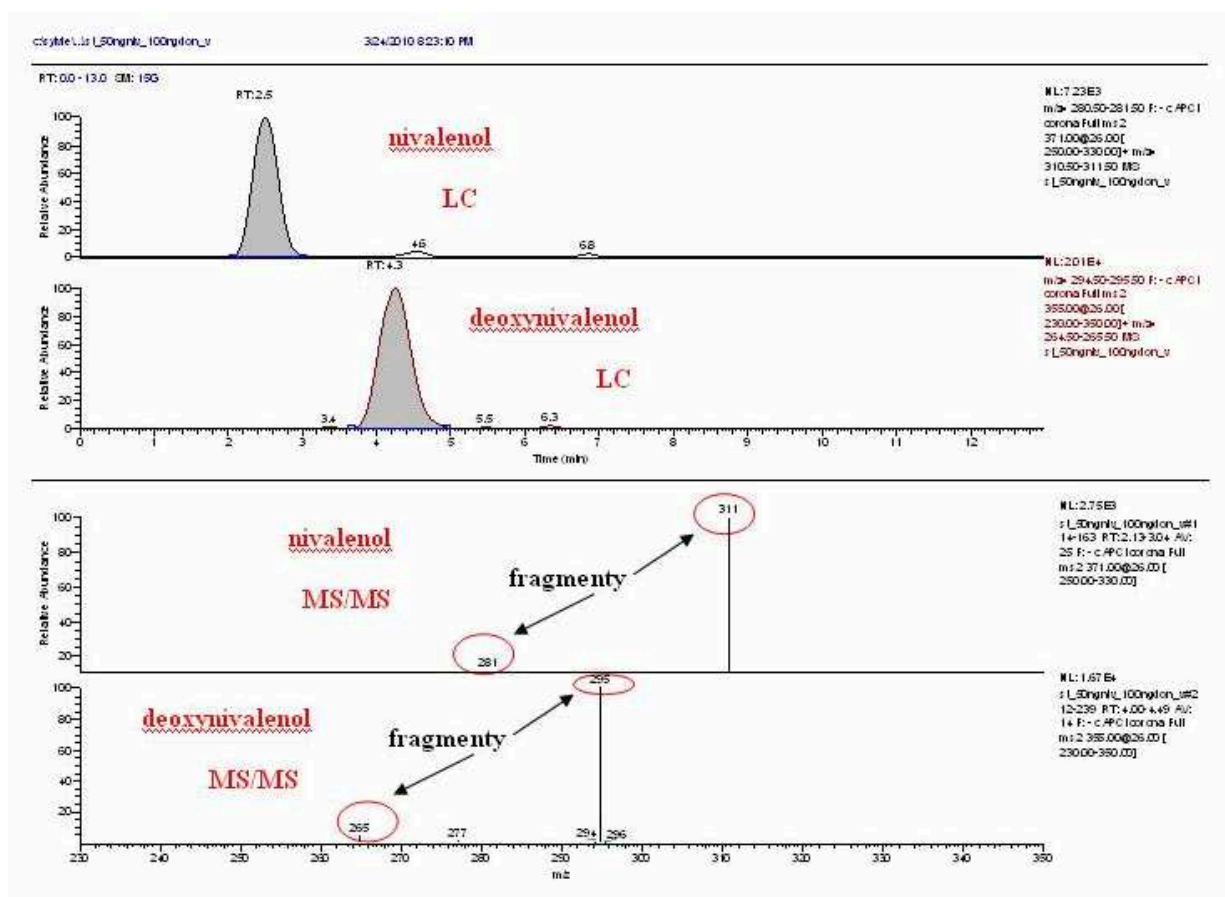
VÚPS – Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s.
WHO – World Health Organisation, Světová zdravotní organizace
ZON – zearalenon
ZVÚ – Zemědělský výzkumný ústav

8 SEZNAM PŘÍLOH

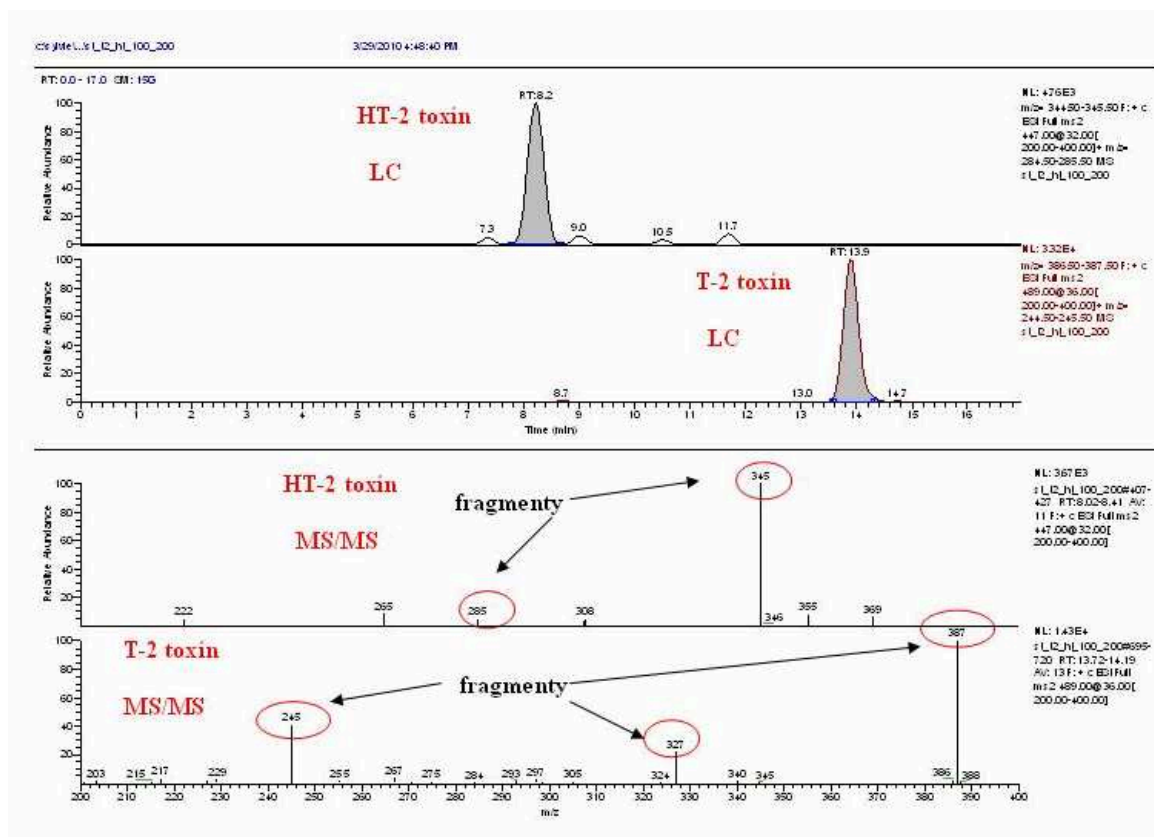
Obrázek 32: Chromatografické píky standardů NIV o koncentraci $50,0 \text{ ng.ml}^{-1}$ a DON o koncentraci $100,0 \text{ ng.ml}^{-1}$ a jejich fragmenty v APCI-MS/MS spektru.

Obrázek 33: Chromatografické píky standardů T-2 o koncentraci $100,0 \text{ ng.ml}^{-1}$ a HT-2 o koncentraci $200,0 \text{ ng.ml}^{-1}$ a jejich fragmenty v ESI-MS/MS spektru.

9 PŘÍLOHA



Obrázek 32: Chromatografické piky standardů NIV o koncentraci $50,0 \text{ ng.ml}^{-1}$ a DON o koncentraci $100,0 \text{ ng.ml}^{-1}$ a jejich fragmenty v APCI-MS/MS spektru.



Obrázek 33: Chromatografické píky standardů T-2 o koncentraci $100,0 \text{ ng.ml}^{-1}$ a HT-2 o koncentraci $200,0 \text{ ng.ml}^{-1}$ a jejich fragmenty v ESI-MS/MS spektru.