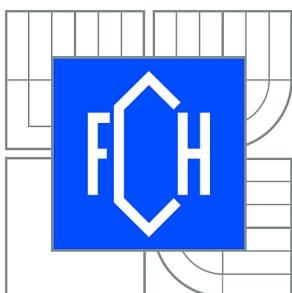




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

METODY EXTRAKCE VYBRANÝCH TOXINŮ Z PEVNÝCH MATRIC A JEJICH NÁSLEDNÉ STANOVENÍ POMOCÍ HPLC/MS

METHODS FOR THE EXTRACTION OF SELECTED TOXINS FROM SOLID MATRICES AND
THEIR SUBSEQUENT DETERMINATION BY HPLC/MS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. DAVID HERMAN

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. JOSEF ČÁSLAVSKÝ, CSc.

BRNO 2014



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0786/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	Bc. David Herman	
Studijní program:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)	
Studijní obor:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Metody extrakce vybraných toxinů z pevných matric a jejich následné stanovení pomocí HPLC/MS

Zadání diplomové práce:

- 1) Provedení literární rešerše zaměřené na metody extrakce vybraných toxinů (saxitoxin, T-2 apod.) z pevných matric, jako např. je půda, rostlinný materiál, potraviny a analytické HPLC/MS metody, využitelné pro kvalitativní a kvantitativní stanovení těchto látek
- 2) Návrh a optimalizace selektivní a citlivé HPLC/MS metody pro stanovení toxinů, určení limitů detekce a limitů kvantifikace
- 3) Výběr vhodných modelových matric, které budou kontaminovány toxiny a postupy kvantitativní extrakce látek z těchto matric (mechanické zpracování vzorků, výběr vhodných rozpouštědel pro extrakci, záchyt na vhodný sorbent). Provedení optimalizace extrakčních postupů tak, aby metoda byla univerzální, jednoduchá, rychlá a poskytovala vysokou výtěžnost
- 4) Praktické ověření extrakce kontaminovaných matric s následnou HPLC/MS analýzu získaných vzorků, optimalizace postupů, určení limitů detekce a limitů kvantifikace, celkové zhodnocení vyvinutých metod a doporučení nejvhodnějšího způsobu, zajišťujícího selektivitu, citlivost a reprodukovatelnost stanovení toxinů pro zvolené druhy matric.

Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2014

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. David Herman
Student(ka)

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Diplomová práce se věnuje aktuálnímu tématu analýzy toxinů a jejich extrakci z hlinitopísčité půdy. Konkrétně se zabývá saxitoxinem, a trichothecenovými mykotoxiny deoxynivalenolem, HT-2 a T-2 toxinem. V teoretické části popisuje výskyt, toxické vlastnosti a působení těchto látek na živý organismus. V dalších kapitolách jsou uvedeny publikované extrakční postupy pro jednotlivé toxiny a analytické metody používané k jejich kvantitativnímu stanovení. V experimentální části byl jako nejlepší navržen optimalizovaný postup přípravy vzorku, založený na extrakci toxinů z půdy směsí 1mM HCOONH₄ v 84% acetonitrilu. Simultánní stanovení toxinů probíhalo na kapalinovém chromatografu za použití CN kolony (3,0 x 150 mm, 3 μm, 100 Å) při využití gradientové eluce. K detekci byl použit hmotnostní spektrometr s vyhřívaným elektrosprejem jako iontovým zdrojem a lineární iontovou pastí jako analyzátozem. Navržená extrakční metoda dosahovala výtěžnosti přes 80 % pro trichothecenové mykotoxiny a 51 % pro saxitoxin.

KLÍČOVÁ SLOVA

trichotheceny, deoxynivalenol, HT-2 toxin, T-2 toxin, saxitoxin, extrakce

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on the analysis of toxins and their extraction from sandy-loamy soil. Particularly, saxitoxin and trichothecene mycotoxins deoxynivalenol, HT-2 and T-2 toxins are in the centre of interest of this work. Their occurrence, toxic properties and influence on living organisms are described in theoretical part of this thesis. In next chapters, currently published extraction methods for individual toxins and analytical approaches for their quantitative evaluation are summarized. In experimental part of this thesis, optimized process of sample pretreatment based on extraction of toxins from soil using 1mM HCOONH₄ in 84% acetonitrile was proposed as the best option. Simultaneous determination of toxins was performed by liquid chromatography on a CN column (3.0 x 150 mm, 3 μm, 100 Å) in gradient elution mode. Mass spectrometer with electrospray as ion source and linear ion trap as analyzer was used as detector. Recovery of designed method was over 80% for trichothecene mycotoxins and 51% for saxitoxin.

KEYWORDS

trichothecenes, deoxynivalenol, HT-2 toxin, T-2 toxin, saxitoxin, extraction

HERMAN, D. *Metody extrakce vybraných toxinů z pevných matric a jejich následné stanovení pomocí HPLC/MS*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 54 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval 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.

Bc. David Herman

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu své diplomové práce doc. Ing. Josefovi Čáslavskému, CSc. za odbornou pomoc, cenné rady a lidský přístup při zpracování této práce. Dále děkuji svému nadřízenému pplk. doc. PharmDr. Danielu Junovi, Ph.D. za umožnění naměření dat do diplomové práce na pracovišti a za čas, který mi věnoval. Děkuji i své rodině, přátelům a kolegům.

Diplomová práce vznikla za finanční podpory veřejné zakázky Ministerstva vnitra VF20122015024 - Nové technologie identifikace a typizace biologických agens a podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy v rámci Dlouhodobého záměru rozvoje organizace 1011 - ZHN.

OBSAH

1.	Úvod	7
2.	Teoretická část	8
2.1	Vybrané toxiny.....	8
2.1.1	Saxitoxin.....	8
2.1.2	Trichothecenové mykotoxiny	9
2.1.2.1	Deoxynivalenol	11
2.1.2.2	T-2 a HT-2 toxin	12
2.2	Extrakce	13
2.2.1	Extrakce saxitoxinu	14
2.2.2	Extrakce trichothecenů	15
2.3	Metody stanovení vybraných toxinů.....	17
2.3.1	Stanovení saxitoxinu.....	17
2.3.2	Stanovení trichothecenů	17
2.4	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	17
2.4.1	HPLC s hmotnostní detekcí.....	19
2.4.1.1	Ionizace elektrosprejem	20
2.4.1.2	Lineární iontová past.....	21
3.	Experimentální část	24
3.1	Chemikálie a standardy toxinů.....	24
3.2	Přístrojové, materiální a softwarové vybavení.....	24
3.3	Příprava roztoků.....	25
3.3.1	Příprava kalibračních roztoků.....	25
3.3.2	Příprava kontaminačního roztoku matrice.....	26
3.4	Matrice	26
3.5	Kontaminace matrice	26
3.6	Zpracování kontaminované půdy.....	27

3.7	Podmínky HPLC–MS metody	27
4.	Výsledky a diskuze	29
4.1	Optimalizace podmínek analýzy	29
4.1.1	Nastavení hmotnostního spektrometru	29
4.1.2	Výběr stacionární fáze	31
4.1.3	Optimalizace teploty na koloně	33
4.1.4	Optimalizace složení mobilní fáze	34
4.1.5	Optimalizace gradientu	35
4.2	Kalibrační závislosti.....	38
4.2.1	DON: kalibrace a limity detekce a stanovitelnosti	38
4.2.2	STX-2HAc: kalibrace a limity detekce a stanovitelnosti.....	38
4.2.3	HT-2 toxin: kalibrace a limity detekce a stanovitelnosti	40
4.2.4	T-2 toxin: kalibrace a limity detekce a stanovitelnosti.....	41
4.2.5	Shrnutí kalibračních parametrů	41
4.3	Optimalizace postupu extrakce toxinů z půdy	42
4.3.1	Optimalizace délky ultrazvukové extrakce.....	42
4.3.2	Optimalizace objemu extrakčního činidla	42
4.3.3	Optimalizace složení extrakčního činidla.....	43
5.	Závěr	45
6.	Seznam literatury	46
7.	Seznam zkratk	54

1. ÚVOD

Životní prostředí je plné toxických látek. Tyto látky mají negativní vliv nejen na živé organismy včetně člověka, ale i na ekonomiku jednotlivých států a celou lidskou společnost. Toxické látky se v přírodě vyskytují přirozeně, nebo je životní prostředí těmito látkami zamořováno v důsledku lidské činnosti, případně zcela záměrně různými mocenskými skupinami k prosazení jejich vlastních cílů a zájmů.

Mezi nejčastější původce přirozených kontaminantů terestrického systému patří rozličné druhy plísní, které jsou přítomny na rostlinách a v půdě na rostlinných zbytcích. Z těchto míst jsou pak šířeny vzdušnými proudy, deštěm a hmyzem, proto je nacházíme i s jejich mykotoxiny na potravinách nebo přímo v potravinách [1]. Hlavní skupinou plísní produkující nebezpečné mykotoxiny je rod *Fusarium*, který se vyskytuje na různých zemědělských plodinách. Tento rod produkuje několik skupin mykotoxinů. Nejvýznamnější skupinou jsou trichotheceny, mezi které patří deoxynivalenol, HT-2 a T-2 toxin, kterými se tato práce podrobněji zabývá [2].

Ve vodním ekosystému patří mezi producenty nebezpečných toxinů mikroorganismy tvořící plankton. K významným toxinům patří saxitoxin, který produkují mořské obrněnky, ale i sladkovodní sinice. Tento toxin se dostává do sedimentu, ale také přímo do potravního řetězce. Otrava tímto toxinem je, zvláště v přímořských státech, celkem běžná [3, 4].

Toxiny, kterými se zabývá tato práce, jsou, díky svým vlastnostem, potenciálně zneužitelné k různým teroristickým nebo diverzním účelům. Proto je důležité vyvíjet analytické metody k jejich detekci a kvantifikaci. Pro analýzu je klíčová příprava vzorku, která má zásadní vliv na kvalitu získaného výsledku.

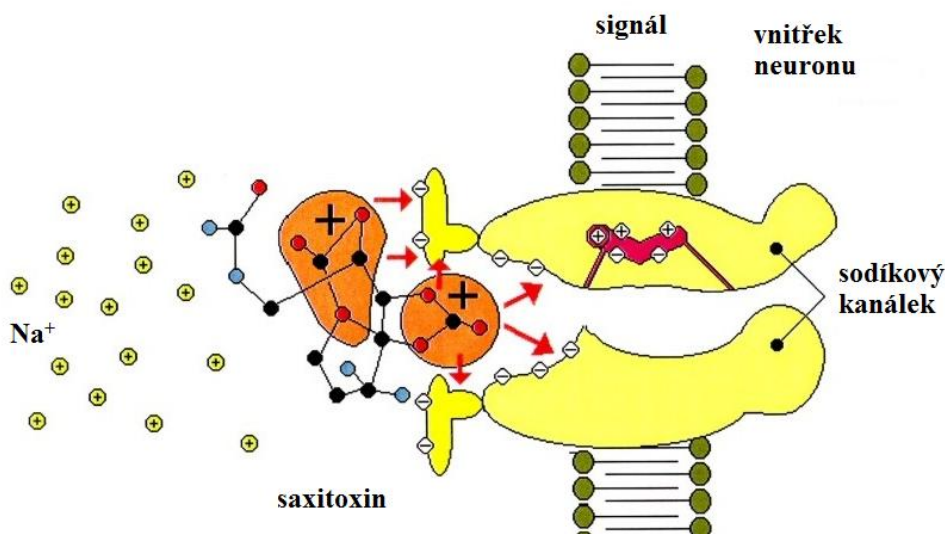
2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Vybrané toxiny

V této diplomové práci jsme se zabývali toxiny, které jsou díky svým vlastnostem potenciálně zneužitelné k teroristickým akcím nebo diverzním účelům. Takové vlastnosti mají tyto vybrané toxiny: saxitoxin (STX), deoxynevivalenol (DON), HT-2 a T-2 toxin.

2.1.1 Saxitoxin

Saxitoxin je neurotoxin produkovaný několika druhy mořských obrněnek (*Gymnodinium* sp., *Pyrodinium* sp.) a sinic (*Anabaena* sp., *Lyngbya* sp., *Aphanizomenon* spp., *Cylindrospermopsis* sp.). Živočichové, kterým tento plankton slouží jako potrava, se stávají sami toxičtí. Jde o tzv. sekundární toxicitu. Jedná se o některé druhy korýšů, měkkýšů (ústřice, slávky, srdcovky) a ryb (čtverzubci). Název toxinu byl odvozen od měkkýše chionky skalní (*Saxidomus giganteus*), u které byl poprvé popsán [5–7].

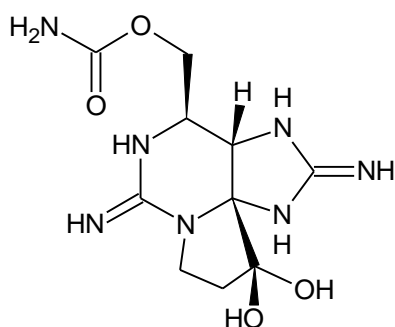


Obr. č. 1: Blokace sodíkového kanálku saxitoxinem [8]

Saxitoxin je jeden z nejúčinnějších přírodních toxinů ($LD_{50} = 0,26$ mg/kg, myš, p. o.). Pro dospělého člověka se odhaduje LD_{50} na 5,7 μ g/kg při perorálním podání. Při injekčním podání je letální dávka asi 10 krát menší. Toxicita saxitoxinu spočívá v jeho schopnosti selektivně blokovat sodíkové kanálky (Obr. č. 1) v buňkách vzrušivých membrán. Již po několika minutách po intoxikaci dochází k znečitlivění rtů, jazyka a konečků prstů. Může se také vyskytovat nevolnost, zvracení a bolest břicha. Při těžkých otravách dochází k znečitlivění končetin, nastává celková svalová slabost a útlum dýchání s následkem smrti.

Úmrtnost při intoxikaci saxitoxinem je velmi vysoká. Prvních 12 hodin po otravě je nejzávažnějších. Proti otravě neexistuje žádné antidotum, léčba se omezuje pouze na podporu dýchání a srdeční činnosti [5–7, 9].

Saxitoxin (Obr. č. 2) patří do skupiny strukturně velice podobných dusíkatých látek, nazývaných paralytic shellfish toxin (PST), které se většinou liší jen v počtu sulfonylových skupin. Látky s jednou sulfonylovou skupinou ve struktuře jsou nazývány B-toxiny nebo gonyautoxiny a se dvěma skupinami C-toxiny. Otrava těmito toxiny je známa jako „paralytic shellfish poisoning“ (PSP) a je častá v přímořských státech [7]. Jelikož jsou tyto toxiny termostabilní, nelze je zničit varem [5].



Obr. č. 2: Strukturní vzorec saxitoxinu [10]

Pro svou vysokou toxicitu (1000 krát vyšší než nervově paralytická látka sarin) a rychlý účinek bylo zkoumáno využití saxitoxinu americkou CIA, která vyvíjela pilulky pro své agenty, aby mohli spáchat sebevraždu v případě prozrazení [5]. Americká armáda skladovala saxitoxin ve svém arzenálu pod označením TZ. Měl být určen ke speciálním úkolům. Uvažovalo se o jeho využití v malorážní munici M1, která by byla vystřelována ve formě šipek. Dále se testovalo potažení nábojů saxitoxinem. Tato látka je uvedena v příloze č. 1 Úmluvy o chemických zbraních, kterou ratifikovala i Česká republika. Seznamy látek z příloh Úmluvy jsou uvedeny ve vyhlášce č. 208/2008 Sb. v platném znění [5, 6].

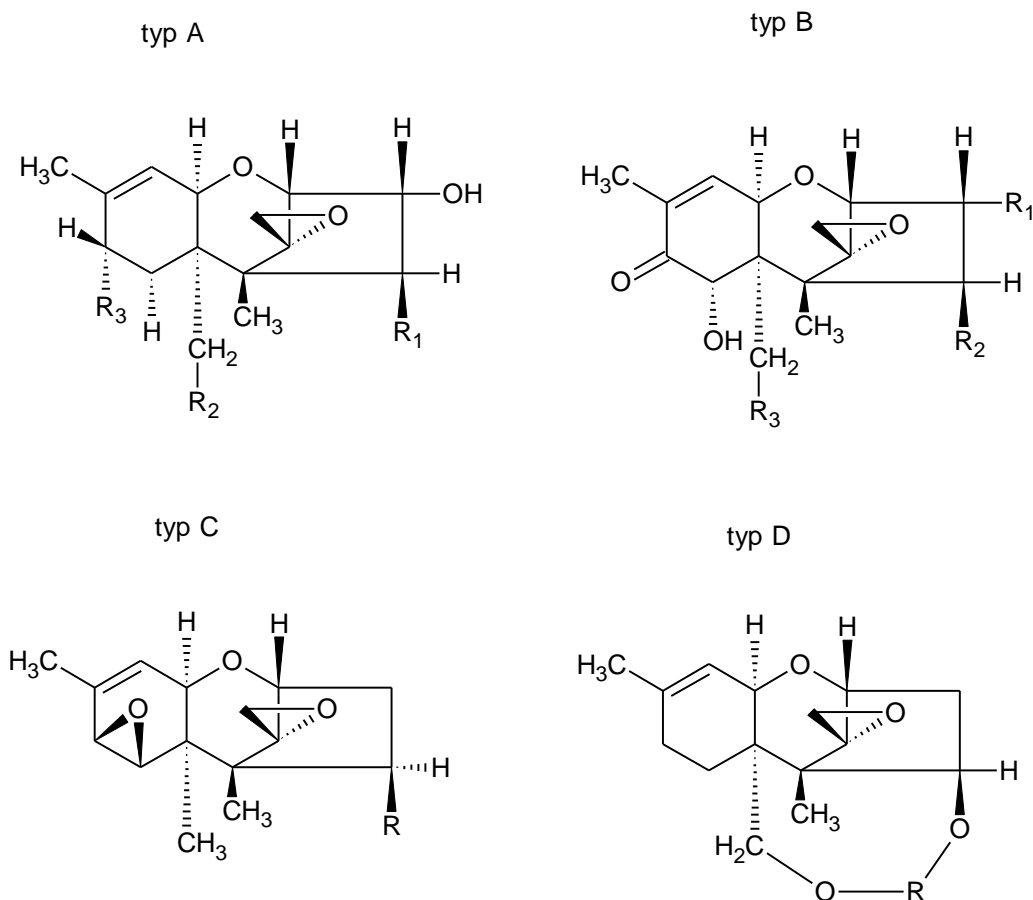
2.1.2 Trichothecenové mykotoxiny

Jedná se o pestrou skupinu sekundárních metabolitů produkovaných houbami rodu *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichothecium*, *Trichoderma*, *Stachybotrys*, *Cephalosporium* a *Verticimonosporium*. Bylo popsáno přes 180 trichothecenů. Z chemického hlediska se jedná o estery seskviterpenových alkoholů. Ve své struktuře mají dvojnou vazbu mezi uhlíky C9-C10 a epoxidovou skupinu na C12-C13 a jsou tedy souhrnně označovány jako 12,13-epoxytrichotheceny [6, 11–13].

Podle jejich typické struktury se rozdělují do čtyř skupin na typ A – D (Obr. č. 3) [14, 15]:

- typ A: na C8 je jiná skupina než ketonická; T-2 a HT-2 toxin, neosolanilol a diacetoxyscirpenol,
- typ B: na C8 je ketonická skupina; deoxynivalenol, nivalenol,
- typ C: ve struktuře mají druhou epoxidickou skupinu mezi C7-C8 nebo C9-C10; krotocin,
- typ D: obsahuje makrocyclický kruh; roridin-A a verrucarín-A.

Hlavním zdrojem kontaminace potravin trichothecenovými mykotoxiny typu A a B jsou obilniny (kukuřice, oves, ječmen a pšenice), které jsou napadeny plísní rodu *Fusarium*. Pro svou velkou chemickou a tepelnou stabilitu se tyto mykotoxiny nacházejí i v produktech vyráběných z napadených obilovin (chléb, mouka) a přecházejí i do živočišných produktů (mléko, maso, vejce) hospodářských zvířat, která jsou krmena kontaminovanou potravou [16]. Typ C a D se v potravinách vyskytují velice ojediněle [15].



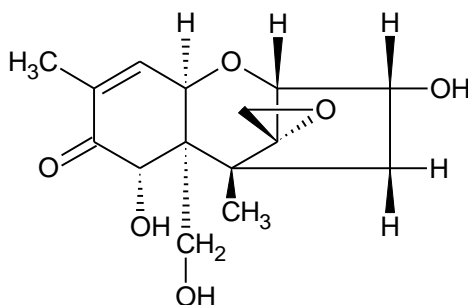
Obr. č. 3: Obecná struktura trichothecenů typu A–D [17]

Trichotheceny typu A mají asi 10 krát vyšší akutní toxicitu než trichotheceny typu B. Účinky u typu B jsou spojeny spíše s chronickou toxicitou. Intoxikace má rozličné příznaky, mezi něž patří iritace kůže, zvracení, průjem, nechutenství, redukce váhy, léze na sliznici gastrointestinálního traktu (GIT), což má za následek rozsáhlé krvácení do GIT [14]. Dochází k poškození jater, ledvin, nervového, oběhového a endokrinního systému. Nastává také inhibice syntézy proteinů a DNA a některé trichotheceny vykazují též imunosupresivní účinky [12, 18].

Neméně důležité jsou negativní efekty na výrobu některých produktů, které způsobuje přítomnost trichothecenů v zemědělských surovinách. Zpomalují růst kvasinek při kynutí těsta na výrobu pečiva a také jsou příčinou inhibice enzymů ve sladu při výrobě piva [16].

2.1.2.1 Deoxynivalenol

Deoxynivalenol je také znám pod triviálním názvem vomitoxin (Obr. č. 4), který byl odvozen od jednoho ze symptomů projevu jeho akutní toxicity – zvracení (vomitus). Jde o nejrozšířenější trichothecenový mykotoxin typu B, který má však nejnižší akutní toxicitu ($LD_{50} = 45 \text{ mg/kg}$, myš, p. o.) ze všech trichothecenů [19, 20]. Významná je spíše jeho chronická toxicita, která se projevuje redukcí váhy, anorexií, odmítáním potravy a poškozením imunitního systému vedoucí ke snížené odolnosti vůči infekcím. Nejvíce citlivé na intoxikaci je prase, u kterého již při dávce 1-2 ppm deoxynivalenolu v potravě dochází k částečnému odmítání potravy. Nejdolnější vůči jeho působení je drůbež a skot [6, 13].



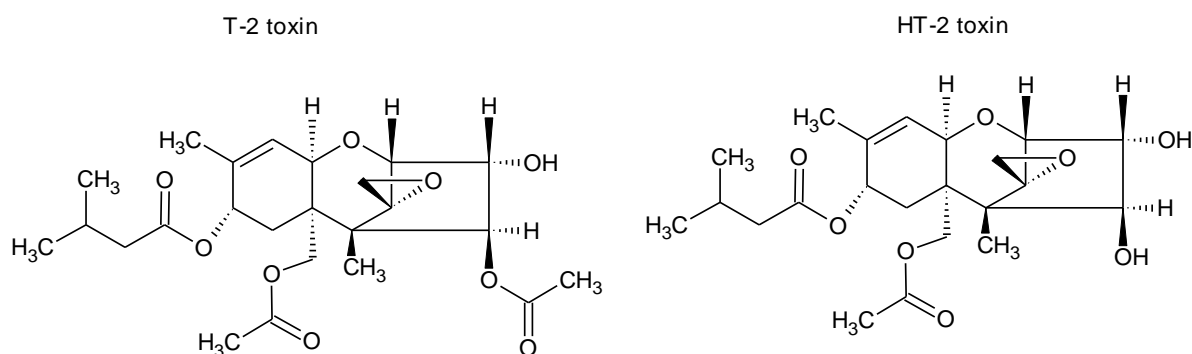
Obr. č. 4: Strukturní vzorec deoxynivalenolu (vomitoxinu) [17]

Je to zatím jediný trichothecenový mykotoxin, pro který byly Evropskou komisí stanoveny nejvyšší přípustné limity v potravinách, a to: $1250 \mu\text{g/kg}$ pro obilniny, $750 \mu\text{g/kg}$ pro mouku a $500 \mu\text{g/kg}$ pro pečivo [2].

Deoxynivalenol je termostabilní, rozkládá se až při teplotách přesahujících 210 °C, a je stálý v mírně kyselém prostředí. Běžně se vyskytuje v pšenici, ječmeni a kukuřici, ale byl detekován i v rýži, sojových bobech, bramborách a slunečnici [1, 10, 11]. Mezi významné producenty patří *Fusarium graminearum* a *Fusarium culmorum* [12].

2.1.2.2 T-2 a HT-2 toxin

T-2 a HT-2 toxiny (Obr. č. 5) jsou zástupci trichothecenů typu A. HT-2 toxin je hlavním metabolitem T-2 toxinu, vzniká odštěpením acetylové skupiny na C4. Z tohoto důvodu se provádí společné stanovení a jejich obsah se uvádí jako suma obou [19]. Vzhledem k jejich vysoké akutní toxicitě (LD₅₀ = 4 mg/kg, myš, p. o. pro T-2 toxin a LD₅₀ = 9 mg/kg, myš, p. o. pro HT-2 toxin) se jedná o jedny z nejjedovatějších trichothecenů [12, 20]. Z těchto důvodů se T-2 toxin dostal do popředí zájmu vojenského výzkumu. Jeho taktické vlastnosti (vyšší toxicita, termostabilita, fotostabilita, různé brány vstupu do organismu) byly shledány jako vyhovující pro bojové využití [21].



Obr. č. 5: Strukturální vzorce T-2 a HT-2 toxinu [17]

Příznaky intoxikace se liší podle brány vstupu toxinů do organismu. Při nadýchání se může objevit svědění a bolest nosu, krvácení, případně vodnatý výtok z nosu, sípání, kašel a potíže s dýcháním. Potřísnění pokožky způsobuje zčervenání, bolestivost, puchýře a nekrózy kůže. Požití toxinů se projevuje nevolností, zvracením, slabostí, vyčerpaností a závratěmi. Ke zmírnění následků otravy se doporučuje podat adsorbenty (aktivní uhlí) a symptomatická léčba. Proti tomuto toxinu není známé žádné antidotum [5, 7].

T-2 toxin je považován za hlavního původce onemocnění zvaného alimentární toxická aleukie. Toto onemocnění vzniká při konzumaci kontaminované potravy. Nejprve dochází k zánětu ústní dutiny, poté jícnu a žaludku, které přechází v gastroenteritidu. Po několika

dnech nastává poškození kostní dřevě a prudké snížení počtu leukocytů, což vede k sepsi a vysoké horečce. Dochází také k podkožnímu krvácení a nekrotám kůže a svalů. Onemocnění má velmi vysokou úmrtnost (až 60%). Rekonvalescence přeživších pacientů trvá několik měsíců [7, 22].

V současné době se Evropská komise zabývá otázkou nejvyšších přípustných limitů v potravinách. Prozatím byl stanoven tolerovaný denní příjem (TDI) pro sumu T-2 a HT-2 toxinu na 100 ng/kg tělesné hmotnosti [23].

Oba toxiny se vyskytují nejčastěji v obilovinách (žito, pšenice, oves, ječmen). K hlavním producentům patří *Fusarium poae*, *F. sporotrichoides*, *F. equiseti* a *F. acuminatum* [19].

2.2 Extrakce

Extrakce je dělicí postup, kdy dochází k rozdělení látek mezi dvě nemísitelné fáze. Toto rozdělení popisuje distribuční koeficient K_D , definovaný jako poměr rovnovážných koncentrací dané látky v obou fázích. Důvodem přechodu sloučeniny mezi fázemi je rozdíl jejích chemických potenciálů v těchto fázích, přičemž transport trvá až do dosažení rovnováhy, kdy se hodnoty chemických potenciálů v obou fázích vyrovnají. Při praktickém použití je velmi často cílem extrakce oddělení analytu od ostatních složek matrice nebo oddělení rušivých látek od analytu. Extrakci můžeme dělit podle skupenství fází, mezi kterými analyt přechází [24–26]:

- Z pevné fáze do kapaliny (SLE, Solid – Liquid Extraction) – požadovaný analyt přechází z pevné fáze do vhodně zvoleného rozpouštědla.
- Z kapaliny do kapaliny (LLE, Liquid – Liquid Extraction) – využívá se různé rozpustnosti analytu ve dvou nemísitelných kapalinách.
- Z kapaliny do plynné fáze (GLE, Gas – Liquid Extraction) – extrakce těkavých látek plynem z kapaliny.
- Z kapaliny na pevnou fázi (SPE, Solid Phase Extraction) – pevná fáze selektivně zachycuje analyt z roztoku.
- Z kapaliny nebo plynu na pevnou fázi (SPME, Solid Phase Microextraction) – jde o modifikaci SPE, kdy dochází k zakoncentrování analytu sorpcí na křemenné vlákno pokryté sběrnou fází.

Využití jednotlivých technik v praxi závisí na typu analytu. Obecně se nejčastěji na extrakci tuhých vzorků využívá tlaková extrakce rozpouštědlem (PSE, ASE) a na extrakci kapalných vzorků se používá extrakce na pevnou fázi (SPE) [27].

2.2.1 Extrakce saxitoxinu

V zatím publikovaných pracích se extrakcí saxitoxinu z hlinitopísčité půdy nikdo nezabýval. Většina prací se zabývá stanovením saxitoxinu v biologickém materiálu, kde používají extrakci zředěnými kyselinami. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) doporučuje pro extrakci 0,1M HCl. K 20 g homogenátu se přidá 20 ml extrakčního činidla a směs se povaří ve vodní lázni po dobu 5 minut [28]. Tento postup také využil Abbot a kol. [4] na Floridě při monitorování obsahu saxitoxinu v rybách z čeledi čtverzubcovitých.

Foss a kol. [29] diskutovali použití kyseliny octové (HAc) místo kyseliny chlorovodíkové při extrakci směsi PST ze sinic. K experimentům používali obě kyseliny o koncentracích 0,1 M, 0,01 M a 0,001 M. Došli k závěru, že při analýze směsi PST je potřebné vyhnout se extrakci 0,1 M HCl z důvodů přeměny některých toxinů na jiné a tudíž dochází ke zkreslení výsledků. Autoři doporučují používat 0,1M kyselinu octovou, protože má dobrou reprodukovatelnost a výtěžnost. Jang a Yotsu-Yamashita [30] používali kyselinu octovou i k extrakci saxitoxinu z ryb čeledi čtverzubcovitých.

Dell'Aversano a kol. [31] ve své práci navrhli novou metodu extrakce. Jako extrakční činidlo používali směs acetonitril (ACN)/voda/kyselina mravenčí (FA) v poměru 80/19,9/0,1. Toto činidlo použili pro vzorky mlžů i planktonu, kdy k 5 g vzorku přidávali 10 ml extrakčního roztoku a pak směs homogenizovali (10 000 ot./min, 5 min), potom následovalo odstředění (7000 ot./min., 10 min).

Sayfritz a kol. [28] tuto metodu modifikovali a využili toho, že pokud je supernatant po odstředění uložen minimálně na 4 h do mrazáku při teplotě -20°C , dojde k rozdělení směsi, kdy vrchní vrstva je kapalná (acetonitril) a spodní vrstva je pevná (zmrzlá voda). Saxitoxin je prakticky nerozpustný v acetonitrilu, proto se koncentruje ve vodné vrstvě. Výhoda použití vysokého obsahu acetonitrilu při extrakci je, že dojde k vysrážení většiny bílkovin ze vzorku. Také experimentovali s jinými organickými rozpouštědly jako je ethylacetát, dichlormethan, tetrahydrofuran a aceton, žádné však nedosahovalo účinnosti acetonitrilu.

Zhuo a kol. [32] modifikovali metodu dle Dell'Aversano, a to použitím kyseliny mravenčí namísto kyseliny octové a zvýšením organického podílu na 90 %. Extrakci prováděli v ultrazvuku po dobu 5 min a po odstředění opět saxitoxin zakoncentrovali vymražením vody ze směsi.

2.2.2 Extrakce trichothecenů

Většina vědeckých týmů se zabývá extrakcí trichothecenových mykotoxinů z potravin. Převážně se jedná o vzorky obilovin a obilných produktů. V současné době je trend vyvíjet metody, kdy se analyzuje současně několik desítek toxinů. K extrakci trichothecenů z obilnin se nejčastěji používá roztok s vysokým obsahem organického podílu. Jako nejvýhodnější se jeví použití acetonitrilu, případně s přidáním kyseliny octové. Jako celkem nevhodná rozpouštědla na extrakci trichothecenů z obilnin se ukazují methanol (MeOH) a ethylacetát (

Tab. č. 1) [33–36]. Naopak Yang a kol. [37] využívali čistý ethylacetát k extrakci HT-2 a T-2 toxinu z různých tkání slepic s výtěžností 68–111 % pro T-2 respektive 60–117 % pro HT-2 toxin v závislosti na druhu tkáně. Ethylacetát také využívali Schothorst a Jekel [38] při extrakci trichothecenů ze vzorků piva.

Stecher a kol. [39] zkoumali využití extrakce kapalina-kapalina (LLE), kdy vzorky pšenice nejprve extrahovali 20% methanolem a poté extrakt vytřepávali do ethylacetátu nebo diethyl etheru. Výsledky výtěžnosti však byly nízké a měly vysokou směrodatnou odchylku.

Ethylacetát používali ve své práci i Mavungu a kol. [40], konkrétně extrakční směs o složení ethylacetát/kyselina mravenčí v poměru 95/5. Tato směs byla použita na vzorky česneku, sóji luštinaté, černé ředkve, třezalky tečkované, jinanu dvoulaločného a maky horské s výtěžností 65–96 % (Tab. č. 2).

Naproti tomu Monbaliu a kol. [41] využívali k extrakci trichothecenů ze sladké papriky směs ethylacetátu s kyselinou mravenčí v poměru 99:1. Výtěžnost extrakce u této směsi byla 76 % pro DON, 89 % pro HT-2 toxin a 103 % pro T-2 toxin.

Nejčastěji využívanou extrakční směsí je acetonitril/voda/kyselina octová v poměru 79/20/1 nebo acetonitril/voda v poměru 84/16. Pomocí těchto směsí se dosahuje vysoké účinnosti extrakce jak z rostlinného materiálu (pšenice, rýže, krmivo pro koně), tak výrobků z nich (mouka, strouhanka, chléb, sušenky) [2, 42–50].

Tab. č. 1: Výtěžnost extrakce při použití různých extrakčních směsí [33, 34]

Extrakční činidlo (složení v %)	Výtěžnost (%)		
	Deoxynivalenol	HT-2 toxin	T-2 toxin
MeOH/H ₂ O (50/50)	83 %	80 %	59 %
MeOH/H ₂ O (75/25)	54 %	71 %	55 %
MeOH (100)	0 %	136 %	71 %
Ethylacetát (100)	0 %	20 %	59 %
ACN (50)	90 %	69 %	53 %
ACN/H ₂ O/HAc (74/25/1)	77 %	76 %	89 %
ACN/H ₂ O (75/25)	114 %	108 %	104 %
ACN/H ₂ O/HAc (79/20/1)	112 %	106 %	107 %
ACN/H ₂ O (80/20)	107 %	102 %	99 %
ACN/H ₂ O (84/16)	106 %	100 %	98 %

Tab. č. 2: Výtěžnost extrakce při použití směsi ethylacetát/kyselina mravenčí [40]

matrice	maka	sója	česnek	ředkev	třezalka	jinan
deoxynivalenol	66 %	71 %	65 %	70 %	67 %	67 %
HT-2 toxin	81 %	92 %	96 %	92 %	87 %	84 %
T-2 toxin	96 %	94 %	91 %	94 %	95 %	93 %

2.3 Metody stanovení vybraných toxinů

Pro stanovení vybraných toxinů bylo publikováno mnoho různých metod. Nejčastěji se využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

2.3.1 Stanovení saxitoxinu

V evropských zemích je oficiální metodou na stanovení PST biotest na myších a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s fluorescenčním detektorem [51]. Pro saxitoxin byla vyvinuta a publikována i imunologická metoda ELISA [4], stanovení pomocí průtokové cytometrie [51], kapilární elektroforézy s elektrochemickou [52] nebo s hmotnostní [53] detekcí a HPLC s hmotnostní detekcí [29, 30, 32, 54, 55].

V HPLC analýzách je nejčastěji používána stacionární fáze silikagel s navázaným oktadecylem (C18) [10, 54–56] a amidová TSK gel Amide 80 [29, 32]. Dále jsou publikovány metody i s jinými stacionárními fázemi např. hydrofilní interakce (HILIC) [31], silikagel s navázaným oktylem (C8) [55] a triakontylem (C30) [30].

2.3.2 Stanovení trichothecenů

Protože trichothecenové mykotoxiny představují velké riziko v potravinách, krmivech i životním prostředí, zabývá se stanovením těchto toxinů celá řada vědeckých týmů. I z tohoto důvodu je publikováno velké množství metod na jejich stanovení. Mezi nejčastěji využívané analytické metody patří kapalinová chromatografie a plynová chromatografie [57–61]. Další publikované metody využívají infračervenou spektrometrii [62], imunologickou metodu ELISA [63, 64] nebo tenkovrstvou chromatografii [64].

Nejčastěji používanou stacionární fází při použití HPLC na stanovení trichothecenů je silikagel s navázaným oktadecylem (C18), ale byly publikovány i metody, při kterých byly použity jiné stacionární fáze např. silikagel s navázaným pentafluorofenylpropylem (PFP) [2]. K detekci jsou používány UV detektor, fluorescenční detektor a hmotnostní detektor [57–61].

V posledních letech se začíná využívat ultraúčinná kapalinová chromatografie (UPLC) a hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HRMS) [61].

2.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC je jedna z neúčinnějších separačních technik, která má široké spektrum použití. Je založena na různé distribuci dělených látek mezi dvě nemísitelné fáze: stacionární a mobilní.

Mobilní fáze je kapalina, která protéká přes stacionární fázi. Tou může být nejčastěji kapalina nanesená na pevné inertní částice nosiče (rozdělovací kapalinová chromatografie) nebo pevná látka – adsorbent (adsorpční kapalinová chromatografie). Stacionární fáze ve formě částic sférického tvaru o malém průměru je umístěna v nerezové koloně. Doba, kterou jednotlivé složky vzorku stráví v mobilní nebo stacionární fázi, je závislá na afinitě analytu ke každé z nich. Proto jejich volbou můžeme ovlivňovat separační proces [26, 65, 66].

V závislosti na polaritě stacionární fáze rozlišujeme kapalinovou chromatografii v systému normálních fází (NP), kde je stacionární fáze polárnější než fáze mobilní; stacionární fázi je např. silikagel, oxid hlinitý, aminopropylsilikagel, mobilní fázi jsou např. alkany, dichlormethan a další, a kapalinovou chromatografii v systému obrácených fází (RP), kde stacionární fáze je méně polární než fáze mobilní; stacionární fázi je nejčastěji alkylovaný silikagel a mobilní fáze jsou většinou binární směsi organických polárních rozpouštědel (např. acetonitril, metanol, tetrahydrofuran) s vodou [65].

Moderní kapalinový chromatograf se skládá ze zásobníků mobilní fáze (1 až 4), vakuového odplyňovače (degaseru), vysokotlakého čerpadla, které zajišťuje čerpání mobilní fáze do systému. Před čerpadlem (nebo součástí čerpadla) je směšovací zařízení, jež umožňuje mísit různé kapaliny z několika zásobníků. Separace může probíhat za stejného složení mobilní fáze (izokratická eluce) nebo se složení může měnit (gradientová eluce). Další součástí HPLC je autosampler, který zajišťuje dávkování vzorku. V současnosti se většinou používá automatický dávkovač s částečně plněnou smyčkou. Kolona bývá umístěna v termostatovaném prostoru, což umožňuje ovlivňovat separaci i teplotou. Na konec systému je zařazen detektor, jehož odezva je přímo úměrná okamžité koncentraci látky v detektorové cele. Nejčastějším a nejpoužívanějším detektorem v HPLC je spektrofotometrický detektor s diodovým polem (DAD) [26, 65, 66].

Mezi další detektory používané ve spojení s HPLC patří fluorescenční detektor, který využívá fluorescence analytu, tedy schopnost emitovat sekundární záření po absorbování excitačního elektromagnetického záření. Emisní záření se měří v kolmém směru na směr vstupujícího excitačního záření. Refraktometrický detektor měří rozdíl mezi indexem lomu čisté mobilní fáze a indexem lomu eluátu. Tento detektor je univerzální, ale méně citlivý. Při měření analytů, které jsou schopné elektrochemické reakce probíhající na fázovém rozhraní elektroda – mobilní fáze, lze využít elektrochemické detektory (amperometrický,

coulometrický). Jako velice výhodné a univerzální se ukazuje spojení HPLC a hmotnostní spektrometrie [26, 65, 66].

K detekci se u HPLC také využívají univerzální detektory na bázi aerosolu. Nejdříve dochází ke zmlžení eluátu na jemné kapky, které jsou unášeny proudem dusíku k vyhřívané části před detekční celou. Zahřátí aerosolu způsobí odpaření rozpouštědla a do detekční cely vstupují již jen částice analytu, kde jsou detekovány různými způsoby. Mezi tyto detektory patří odpařovací detektor rozptylu světla (ELSD), který je založen na rozptylu světla laserového paprsku částicemi analytu. U detektoru nabitého aerosolu (CAD) je přítomna elektroda, na kterou je vloženo vysoké napětí. K této elektrodě je přiváděn dusík, který se na hrotu elektrody nabije kladně. Tento kladný náboj předá molekulám analytu, které proudí do kolektoru za vzniku elektrického proudu. Tento proud je měřen. Nadbytečný kladně nabitý dusík je odstraněn pomocí záporně nabitě iontové pasti, přes kterou lehké molekuly dusíku neprojdou. Detektor NQAD (Nano Quantity Analyte Detector) využívá kondenzace vzniklých částic analytu s přesycenou vodní parou. To vede ke vzniku relativně objemných kapek, které jsou pak detekovány pomocí rozptylu světla laserového paprsku stejně jako u ELSD. Větší velikost kapek má za následek zvýšení citlivosti detektoru [65].

Grafický záznam odezvy detektoru na čas se nazývá chromatogram a je základem pro vyhodnocení analýz z pohledu kvality i kvantity. Kvalitativním ukazatelem je retenční čas t_r , což je doba od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky (vrcholu píku). Kvantitativním ukazatelem je plocha píku A nebo výška píku h [26, 65, 66].

2.4.1 HPLC s hmotnostní detekcí

Výhoda hmotnostního spektrometru (MS) jako detektoru v HPLC je jeho vysoká specifita. Ta umožňuje odhalení koeluční píků, proto můžeme analyzovat složité směsi. Máme také větší jistotu identifikace analytu díky strukturní informaci. V MS nejprve dochází v iontovém zdroji k ionizaci vzorku (převod neutrálních molekul na ionty), poté dojde v analyzátoru k rozdělení vzniklých iontů podle poměru m/z (hmotnost/náboj) a nakonec dochází k detekci iontu a zesílení signálu v detektoru [26, 65, 66].

Mezi nejpoužívanější ionizační techniky využívané ve spojení s HPLC patří ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). Jedná se o tzv. měkké ionizační techniky, při kterých nedochází k významnější fragmentaci, a proto je snazší určení molekulové hmotnosti M_r [26, 65].

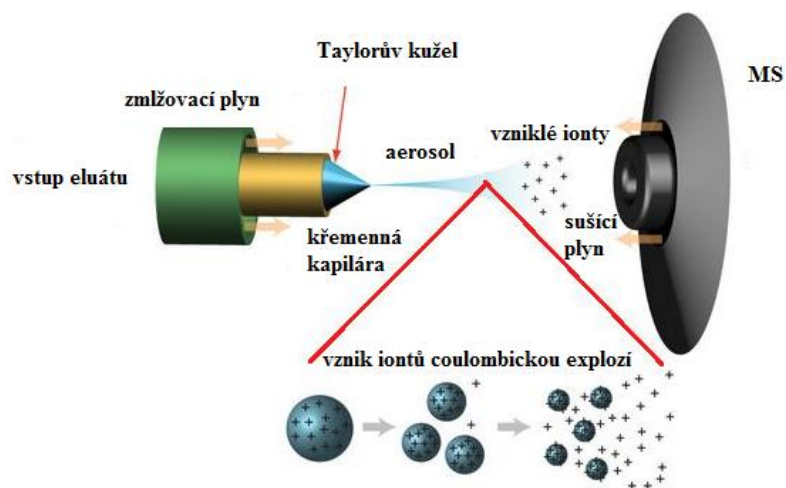
V analyzátoru dochází k rozdělení iontů podle poměru m/z a k jejich urychlení a fokusaci. Hmotnostní analyzátory využívají tyto principy [65]:

- zakřivení dráhy letu v poli (magnetické, elektrické): magnetický separátor,
- různá stabilita oscilací iontů v kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí: kvadrupól, trojitý kvadrupól, iontová past, lineární iontová past,
- odlišná doba letu v oblasti bez pole: analyzátor doby letu,
- rozličná absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli: iontová cyklotronová past,
- rozdělení iontů na základě různé frekvence harmonických oscilací: orbitrap.

2.4.1.1 Ionizace elektrosprejem

Jedná se o nejčastěji používanou ionizační techniku ve spojení s HPLC. Jde o měkkou ionizační techniku za atmosférického tlaku, která v podstatě převádí ionty z kapalně do plynné fáze. Eluát je z chromatografického systému veden do vodivé kapiláry. Díky vloženému napětí mezi kapiláru a vstupní štěrbinu do MS (zpravidla 3 – 5 kV) vzniká tzv. Taylorův kužel (Obr. č. 6), z jehož vrcholu jsou působením intenzivního elektrostatického pole vytrhávány drobné nabitě kapénky. Z důvodu odpařování rozpouštědla, vyvolaného zvýšenou teplotou, dochází ke zmenšování objemu kapiček a tím ke zvyšování hustoty náboje na jejich povrchu, až dojde k překročení Rayleighova limitu a kapička se coulombickou explozí rozpadne na menší, mezi které je rozdělen původní náboj. Proces se opakuje až do vzniku samostatných iontů, které jsou vtahovány do vstupní štěrbině [67, 68].

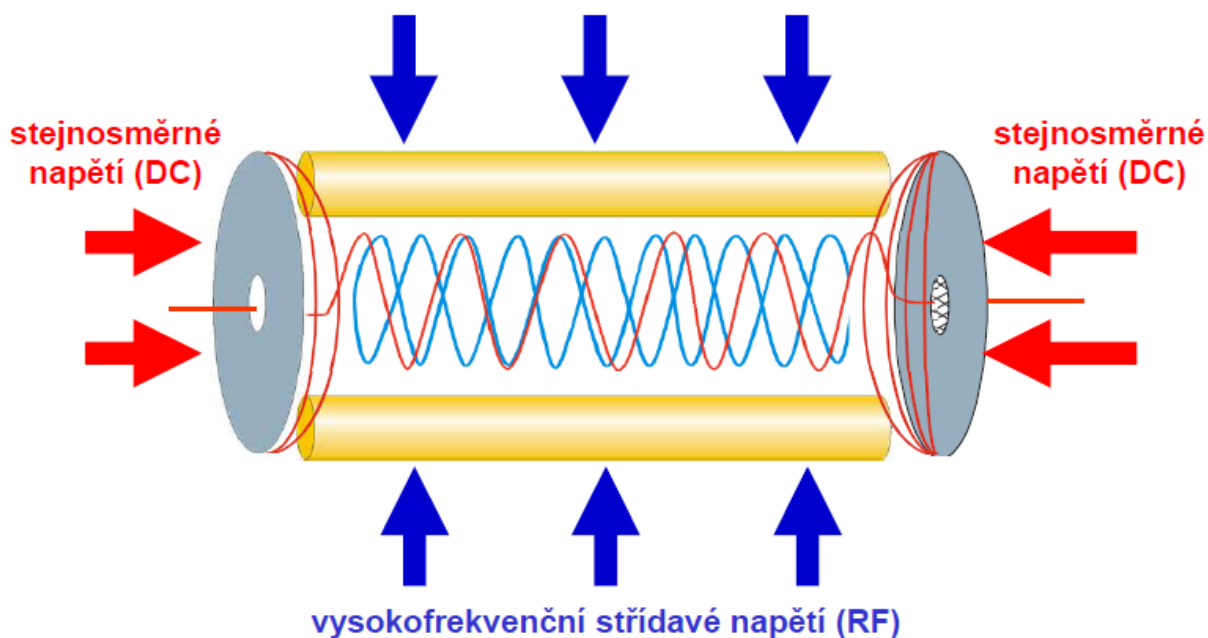
V ESI může u některých typů látek docházet k tvorbě vícenásobně nabitých iontů, což umožňuje analyzovat i ionty s vysokou molekulární hmotností. Proto je tato technika vhodná pro analýzu biomakromolekul (proteiny, peptidy, sacharidy, nukleové kyseliny,...) až do molekulové hmotnosti cca 100 kDa. Při ionizaci elektrosprejem dochází také ke vzniku aduktů iontů, nejčastěji se sodnými a draselnými ionty [67].



Obr. č. 6: Princip elektrospreje [69]

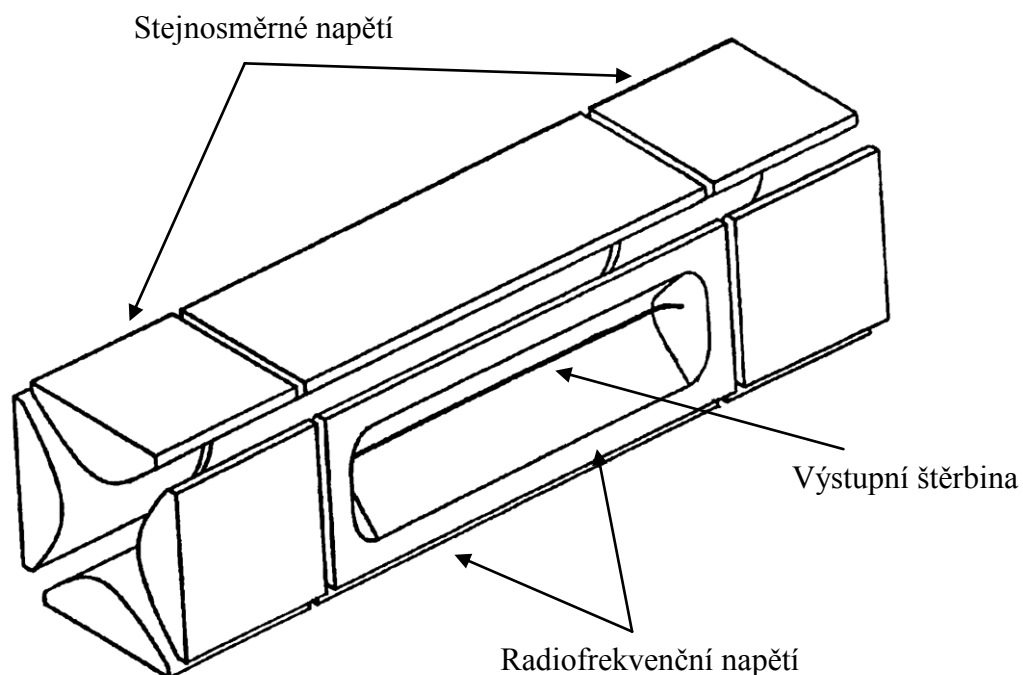
2.4.1.2 Lineární iontová past

Lineární iontová past (Obr. č. 7) je tvořena čtyřmi tyčemi (kvadrupólem), na které je vloženo radiofrekvenční napětí. Vzniklé radiofrekvenční pole uzavírá ionty v pasti v radiálním směru. Kvadrupól je na obou koncích uzavřen elektrodami s vloženým stejnosměrným potenciálem, což umožňuje zachycení iontů v prostoru kvadrupólu v axiálním směru. V tomto uspořádání jsou ionty vypuzovány z pasti v axiálním směru [70].



Obr. č. 7: Lineární iontová past [71]

Radiální vypuzování se používá u segmentovaného kvadrupólu (Obr. č. 8), kdy jsou čtyři hyperbolické tyče rozděleny na tři segmenty o délce 12, 37 a 12 mm. Prostřední segmenty dvou protilehlých tyčí mají uprostřed středního segmentu štěrbinu o velikosti $0,25 \times 30$ mm, kterou jsou radiálně vypuzovány ionty na detektor. Detekční účinnost při tomto uspořádání může být zdvojnásobena, pokud jsou použity dva detektory, které jsou umístěny symetricky u obou protilehlých výstupních štěrbin v prostředním segmentu [70, 72].



Obr. č. 8: Segmentovaný kvadrupól [72]

Lineární iontová past má při porovnání se sférickou iontovou pastí účinnější akumulaci a záchyt iontů (50-70 %), vyšší iontovou kapacitu (až 50krát větší než u sférické iontové pasti) a více operačních režimů. Díky vyšší iontové kapacitě je lineární iontová past méně náchylná k vytvoření prostorového náboje a má lepší dynamický rozsah [70, 71, 73, 74].

Obrovskou výhodou iontové pasti je možnost podrobit vybraný iont další fragmentaci do druhého i vyšších stupňů, tedy realizace MS^n . Teoreticky lze dosáhnout až MS^{10} , prakticky se využívá asi do MS^4 . Tento postup pomáhá určit strukturu neznámé látky [73].

Mezi operační režimy, v kterých dokáže lineární iontová past pracovat, patří [65]:

- Základní sken – měření hmotnostního spektra ve zvoleném rozsahu m/z .
- Selektivní záznam jednoho nebo více iontů (SIM – Selected Ion Monitoring) – měření časové závislosti pro jeden nebo více vybraných iontů.

- Sken produktových iontů – sken, obsahující pouze produktové ionty získané fragmentací selektivně vybraného prekurzorového iontu o zvoleném m/z .
- Sken prekurzorových iontů – sken, který poskytuje spektrum všech prekurzorových iontů, ze kterých mohl vzniknout určitý fragment o zvoleném m/z .
- Sken neutrálních ztrát – monitorování všech prekurzorových iontů, které podléhají vybrané neutrální ztrátě.
- Selektivní záznam jedné (SRM – Selected Reaction Monitoring) nebo více (MRM – Multiple Reaction Monitoring) reakcí – sledování specifické fragmentační reakce vybraného iontu.

Lineární iontová past může být použita samostatně nebo kombinována s jinými analyzátory (kvadrupol, analyzátor doby letu, orbitrap). Iontová past pak do těchto hybridních hmotnostních spektrometrů vnáší možnost realizace spekter MS^n , je tedy využívána k izolaci prekurzoru se zvolenou hodnotou m/z a druhý analyzátor s vyšším rozlišením je pak použit pro přesnější stanovení m/z u produktových iontů [70].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie a standardy toxinů

Všechny chemikálie použité k analýze a extrakci byly zakoupeny v čistotě pro HPLC-MS. Acetonitril, methanol, kyselina octová, octan amonný, kyselina mravenčí a mravenčan amonný byly pořízeny u firmy Sigma Aldrich s.r.o. Deionizovaná voda byla připravena systémem Aqua osmotic 06 (Aqua Osmotic, Česká republika), který upravuje vodivost vody pod $0,07 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ a splňuje tak normu ISO 3696 I. stupně.

K analýzám byly použity standardy těchto toxinů:

- deoxynivalenol (kat. č. 32943-5MG, Sigma Aldrich s.r.o.),
- HT-2 toxin (kat. č. T4138-5MG, Sigma Aldrich s.r.o.),
- T-2 toxin (kat. č. 33947-5MG, Sigma Aldrich s.r.o.),
- diacetát saxitoxinu (kat. č. 6945, Chemos CZ s.r.o.).

3.2 Přístrojové, materiální a softwarové vybavení

- HPLC systém Finnigan Surveyor Plus (Thermo Scientific, USA),
- kolona Luna C18 (2) $3,0 \mu\text{m}$ 100 \AA $3,0 \times 150 \text{ mm}$ (Phenomenex, USA),
- kolona Kinetex $2,6 \mu\text{m}$ PFP 100 \AA $2,1 \times 100 \text{ mm}$ (Phenomenex, USA),
- kolona Luna $3 \mu\text{m}$ CN 100 \AA $3,0 \times 150 \text{ mm}$ (Phenomenex, USA),
- hmotnostní spektrometr LTQ XL (Thermo Scientific, USA),
- třepačka MAXQ 4000 E-class (Thermo Scientific, USA),
- ultrazvuk Sonorex Digital 10P (Bandelin, Německo),
- odstředivka Universal 320R (Hettich, Německo),
- generátor dusíku (Domnick Hunter, USA),
- rotační vakuová odparka VV Micro (Heidolph, Německo),
- analytická váha AB204-S (Mettler Toledo, Německo),
- vortex Labdancer IP 40 (IKA, Německo),
- sušárna Venticell 55 (BMT, Česká republika),
- vakuový systém Laboact (KNF Neuberger, Německo),
- automatické mikropipety s nastavitelným objemem (Brand, Německo),
- vodní lázeň K10 s cirkulátorem DC 10 (Haake, Německo),
- chladnička s teplotou $4 \text{ }^\circ\text{C}$ (Liebher, Německo),

- mrazák s teplotou -80 °C ULTF 320 (Arctiko, Dánsko),
- laboratorní sklo Simax a běžný laboratorní plast,
- software Microsoft Excel 2007,
- software Microsoft Word 2007,
- software Thermo Xcalibur verze 2.1.0.1139,
- software LTQ Tune Plus verze 2.6.0.1061 SP2,
- software ChemDraw Ultra verze 12.0.2.1076,
- citační manažer Zotero verze 4.0.20.2.

3.3 Příprava roztoků

Ze standardů trichothecenů byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 1 mg/ml přidáním 5 ml acetonitrilu do 5 mg standardu. Ze standardu saxitoxinu diacetátu (STX·2HAc) byl připraven zásobní roztok o koncentraci 100 µg/ml přidáním 1 ml 30mM kyseliny octové do 100 µg standardu. Tyto zásobní roztoky byly uchovávány v tmavých skleněných vialkách v mrazáku při teplotě -80 °C.

Ze zásobních roztoků byly připraveny dalším ředěním pracovní roztoky o koncentraci 10 µg/ml. Tyto pracovní roztoky byly uchovávány v tmavých skleněných vialkách v chladničce při teplotě 4 °C.

3.3.1 Příprava kalibračních roztoků

Ze zásobních roztoků byl připraven směsný roztok všech čtyř toxinů o koncentraci 1 µg/ml. Z tohoto roztoku byla připravena sada kalibračních roztoků odpipetováním příslušného objemu (Tab. č. 3) do 1ml odměrné baňky a doplněním po rysku mobilní fázi o počátečním složení. Výsledné koncentrace stanovovaných toxinů byly v rozmezí 0,5–1000 ng/ml.

Tab. č. 3: Příprava kalibračních standardů

označení standardu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
pipetovaný objem (µl)	0,5	1	3	6	12	25	50	100	200	300	400	500	750	1000
výsledná koncentrace (ng/ml)	0,5	1	3	6	12	25	50	100	200	300	400	500	750	1000

3.3.2 Příprava kontaminačního roztoku matrice

Roztok pro kontaminaci matrice byl připraven smícháním pracovních roztoků jednotlivých toxinů o koncentraci 10 µg/ml dle Tab. č. 4. Byl tak získán kontaminační roztok o objemu 1 ml a koncentraci 8 µg/ml pro DON, 1 µg/ml pro STX·2HAc, 0,5 µg/ml pro HT-2 a T-2 toxin. Kontaminační roztok byl vždy připraven čerstvý před vlastním kontaminováním půdy.

Tab. č. 4: Příprava kontaminačního roztoku matrice

toxin	koncentrace pracovního roztoku (µg/ml)	pipetováno (µl)	výsledná koncentrace (µg/ml)
DON	10	800	8,0
STX·2HAc	10	100	1,0
HT-2	10	50	0,5
T-2	10	50	0,5

3.4 Matrice

Jako matrice byla využita hlinitopísčité půda z okolí Hradce Králové – Březhradu (Královehradecký kraj, ČR). Půda byla usušena při 25 °C, rozmělněna a proseta přes síto o velikosti ok 2 mm. Stanovení toxinů v půdě může poskytnout informaci o případném plošném použití těchto látek na daném území v případě válečného konfliktu nebo při ohrožení teroristickými aktivitami.

3.5 Kontaminace matrice

Do Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 0,5 g hlinitopísčité půdy, která byla následně kontaminována 100 µl kontaminačního roztoku. Kontaminovaná půda byla ponechána v sušárně po dobu 24 hodin při teplotě 25 °C, aby došlo k ustálení interakcí mezi matricí a analyty. Výsledný obsah toxinů byl tedy 1600 ng/g půdy pro DON, 200 ng/g půdy pro STX·2HAc a 100 ng/g půdy pro HT-2 a T-2 toxin.

3.6 Zpracování kontaminované půdy

Do Erlenmeyerovy baňky s 0,5 g kontaminované půdy bylo přidáno 40 ml extrakčního činidla. Baňka byla uzavřena zátkou a dotěsněna parafilmem. Následně byla vložena do ultrazvukové lázně o teplotě 50°C na dobu 20 min. Po uplynutí daného času byl roztok z Erlenmeyerovy baňky přelit do centrifugační zkumavky s kónickým dnem o objemu 50 ml. Směs byla odstředěna při $1100 \times g$ po dobu 10 min při teplotě 25 °C.

Po odstředění byl supernatant s pomocí pipety přenesen do baňky s kulatým dnem o objemu 100 ml a následně pomocí rotační vakuové odparky odpařen právě do sucha. Odparek byl rozpuštěn ve 4 ml mobilní fáze o počátečním složení. Pokud se odparek nerozpustil, bylo rozpouštění podpořeno ultrazvukem.

3.7 Podmínky HPLC–MS metody

K separaci toxinů byla použita kolona Luna 3 μm CN 100 Å 3,0 x 150 mm. Metoda je založena na gradientové eluci, kdy je mobilní fáze složena ze dvou složek. Složka A obsahuje 5 mM mravenčan amonný a 0,1 % kyseliny mravenčí v methanolu a složka B je deionizovaná voda. Průběh gradientové eluce je uveden v Tab. č. 5. Celková doba analýzy je 13 minut včetně reekvilibrace kolony. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 500 $\mu\text{l}/\text{min}$. Kolona byla termostatována na teplotu 25 °C a v autosampleru byla teplota udržována na 6 °C. Objem nástřiku byl 25 μl .

Tab. č. 5: Průběh gradientové eluce

čas (min)	složka A (%)	složka B (%)
0	5	95
8	90	10
8,5	5	95
13	5	95

Použitý hmotnostní spektrometr má jako analyzátor lineární iontovou past, která umožňuje vytvářet spektra MS^n . Jako iontový zdroj u hmotnostního detektoru jsme použili HESI-II (vyhříváný elektrosprej), s detekcí kladných iontů. Teplota vyhřívání byla nastavena na 350 °C, průtok zmlžovacího plynu byl 25 prac. jednotek. Napětí na kapiláře bylo 4,5 kV a teplota kapiláry 275 °C. Pozitivní ionty byly detekovány v režimu Multiple Reaction Monitoring.

Hodnoty m/z prekurzorových iontů, kolizní energie a měřené hodnoty m/z produktových iontů jsou uvedeny v Tab. č. 6.

Tab. č. 6: Parametry MRM detekce

toxin	prekurzorový iont (m/z)	kolizní energie CID	produktové ionty (m/z)
deoxynivalenol	297 [M + H] ⁺	17	249; 231
saxitoxin	300 [M + H] ⁺	30	282; 221
HT-2 toxin	447 [M + Na] ⁺	21	345; 285
T-2 toxin	489 [M + Na] ⁺	22	387; 327

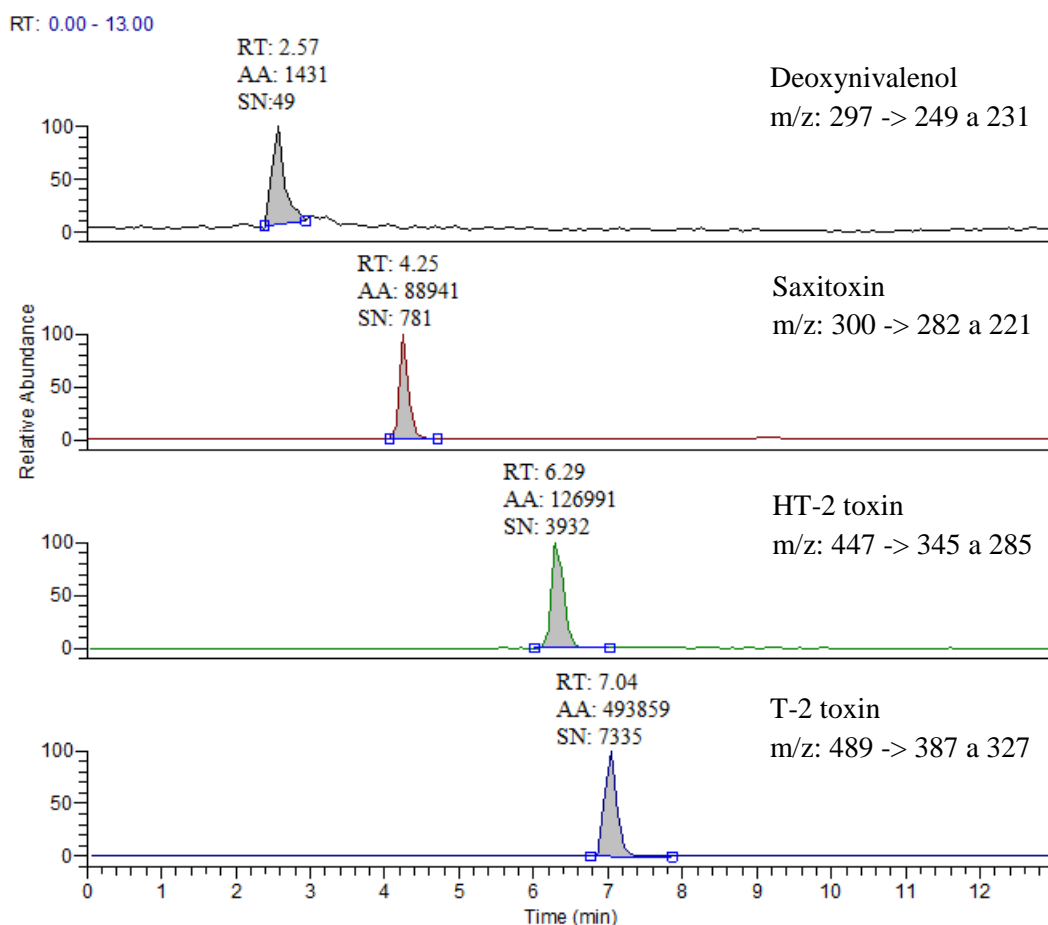
4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Optimalizace podmínek analýzy

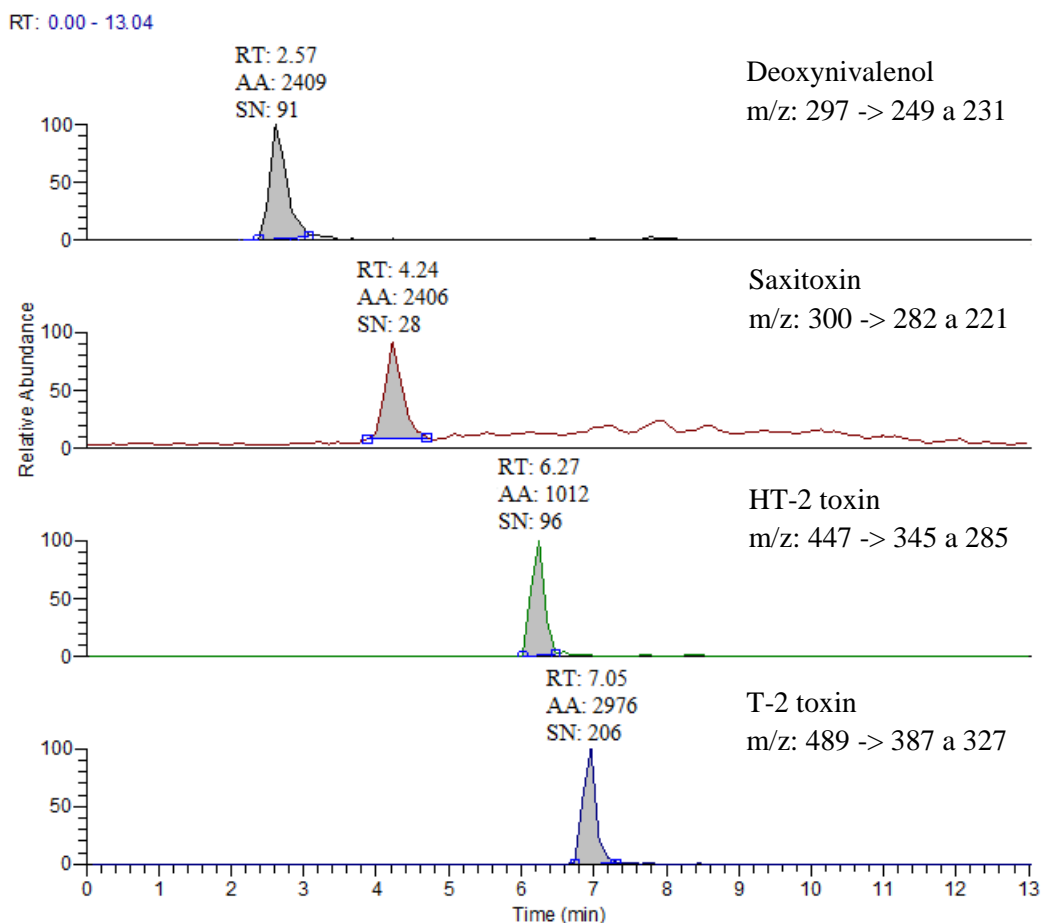
Podmínky analýzy byly optimalizovány při použití směsného roztoku jednotlivých standardů toxinů o koncentraci 100 ng/ml.

4.1.1 Nastavení hmotnostního spektrometru

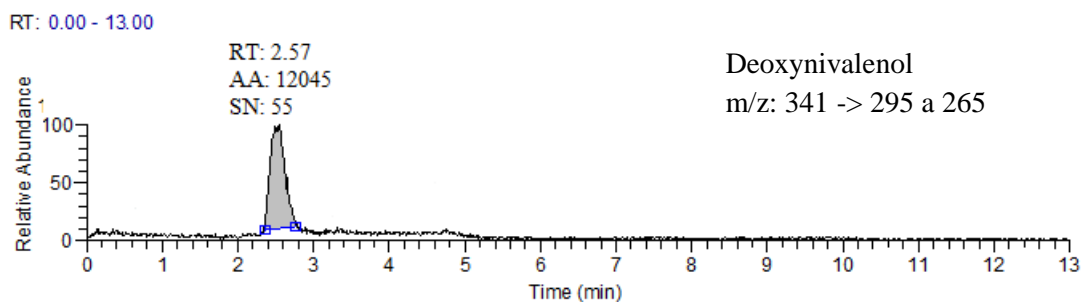
K ionizaci byl využit vyhřívaný elektrosprej HESI-II. Měření probíhalo v pozitivním módu (Obr. č. 9). Při použití APCI (Obr. č. 10) byla lepší odezva detektoru na DON, u ostatních toxinů se odezva detektoru výrazně zhoršila. Zhoršila se také linearita kalibrační závislosti. DON má také lepší odezvu při měření v záporném módu pomocí HESI (Obr. č. 11), ale z důvodu univerzálnosti bylo zvoleno měření v kladném módu pomocí HESI, kdy je odezva detektoru na DON dostačující.



Obr. č. 9: Extrahovaný iontový chromatogram produktových iontů vzniklých fragmentací prekurzorů toxinů o koncentraci 100 ng/ml na koloně Luna CN při použití HESI v kladném módu (RT – retenční čas, AA – plocha píku, SN – poměr signálu a šumu)



Obr. č. 10: Extrahovaný iontový chromatogram produktových iontů vzniklých fragmentací prekurzorů toxinů o koncentraci 100 ng/ml na koloně Luna CN při použití APCI (RT – retenční čas, AA – plocha píku, SN – poměr signálu a šumu)



Obr. č. 11: Extrahovaný iontový chromatogram produktových iontů vzniklých fragmentací aduktu mravenčanového aniontu a prekurzoru deoxynivalenolu o koncentraci 100 ng/ml na koloně Luna CN při použití HESI v záporném módu (RT – retenční čas, AA – plocha píku, SN – poměr signálu a šumu)

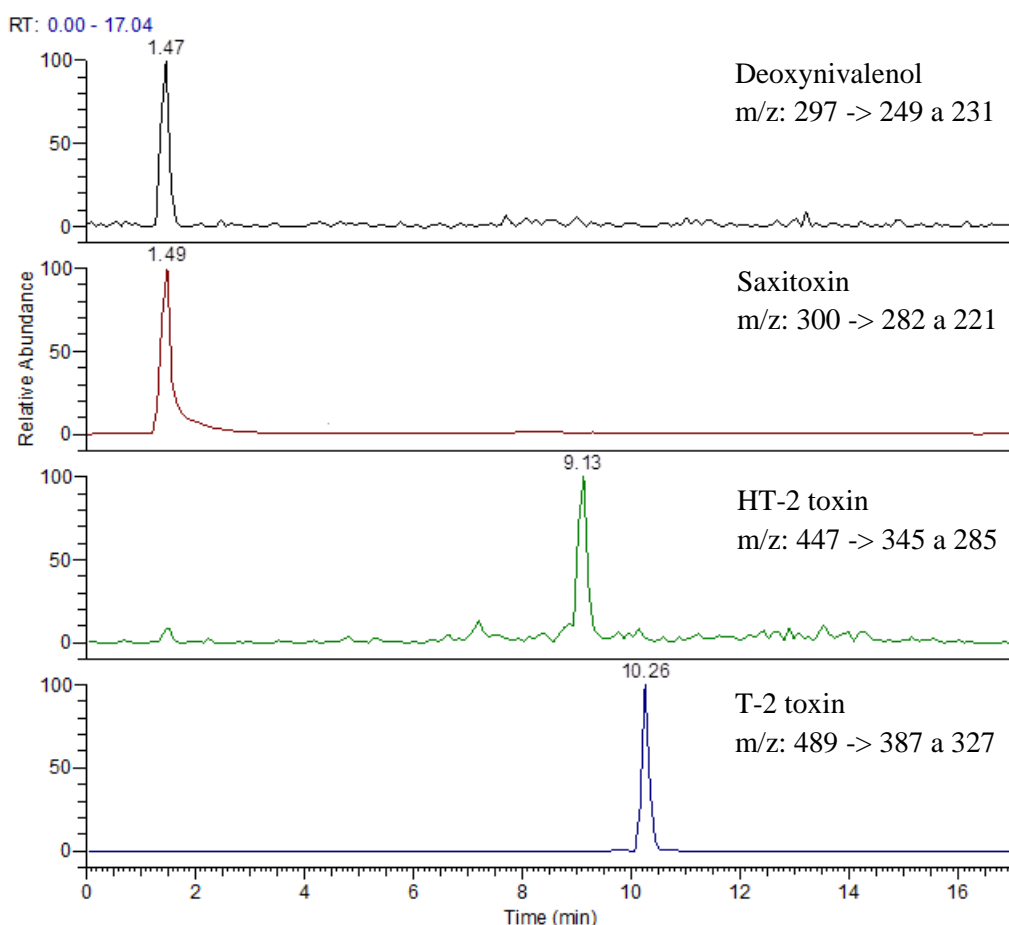
Nastavení detektoru bylo optimalizováno pomocí směsného roztoku při průtoku 500 μ l/min mobilní fáze o složení 50 % A a 50 % B. Bylo využito funkce Tune a jako hlavní

toxin, na který byl detektor nastaven, byl vybrán T-2 toxin, protože je v našich podmínkách nejdostupnější a pro své vlastnosti nebezpečný.

Kolizní energie (CID) pro jednotlivé toxiny byla optimalizována při stejném průtoku a složení mobilní fáze jako nastavení detektoru. Software vyhodnotil jako nejlepší CID pro jednotlivé toxiny takto: 17 pro DON, 30 pro STX, 21 pro HT-2 toxin a 22 pro T-2 toxin.

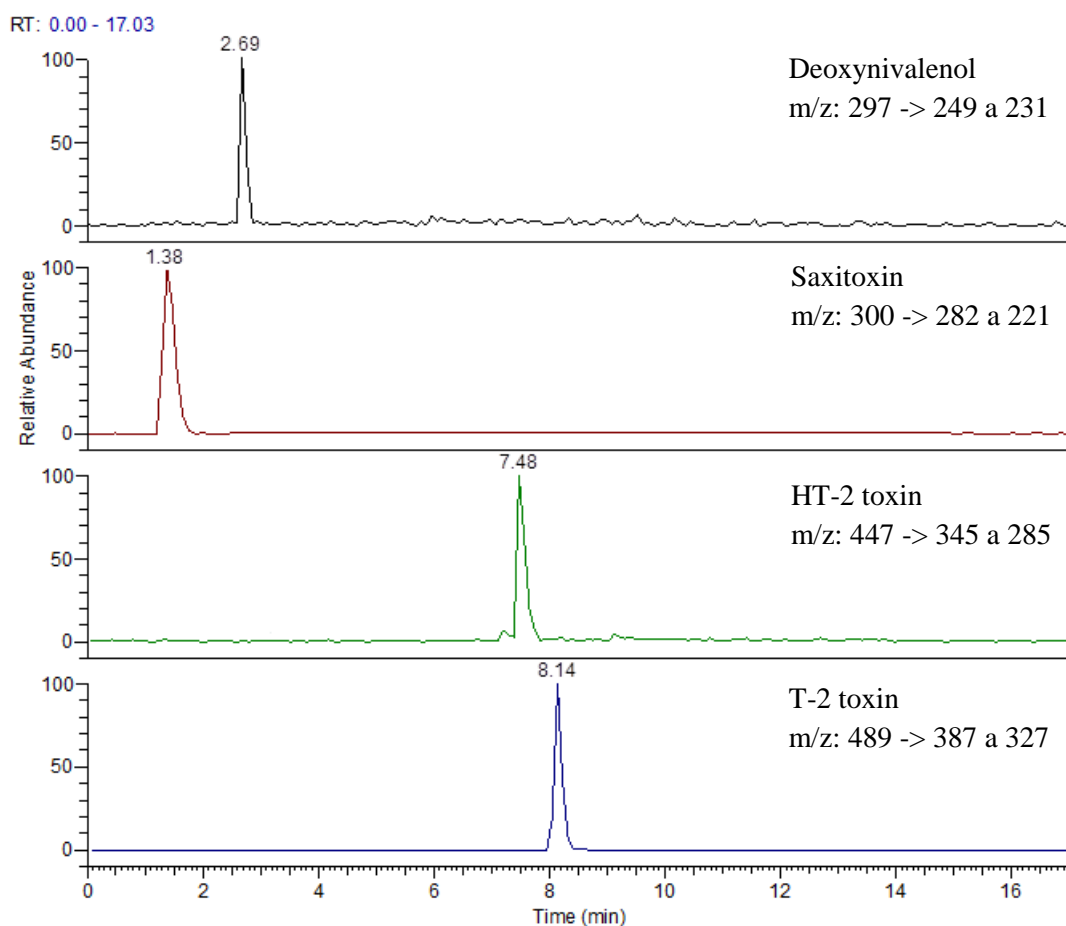
4.1.2 Výběr stacionární fáze

Pro separaci směsi vybraných toxinů byly otestovány tři různé stacionární fáze. První testovanou kolonou byla Luna C18 (2) 3,0 μm 100 Å 3,0 x 150 mm. Jak vyplývá z chromatogramu na Obr. č. 12, na stacionární fázi C18 nedocházelo k uspokojivé separaci směsi toxinů.



Obr. č. 12: Extrahovaný iontový chromatogram produktových iontů vzniklých fragmentací prekurzorů vybraných toxinů o koncentraci 100 ng/ml na koloně Luna C18 (2) při použití HESI v kladném módu

Druhou testovanou kolonou byla Kinetex 2,6 μm PFP 100 \AA 2,1 x 100 mm. Jak je vidět na chromatogramu (Obr. č. 13), tak u této kolony nedocházelo k zadržení STX, ten byl tedy eluován s mrtvým objemem, což je pro separaci nevyhovující.

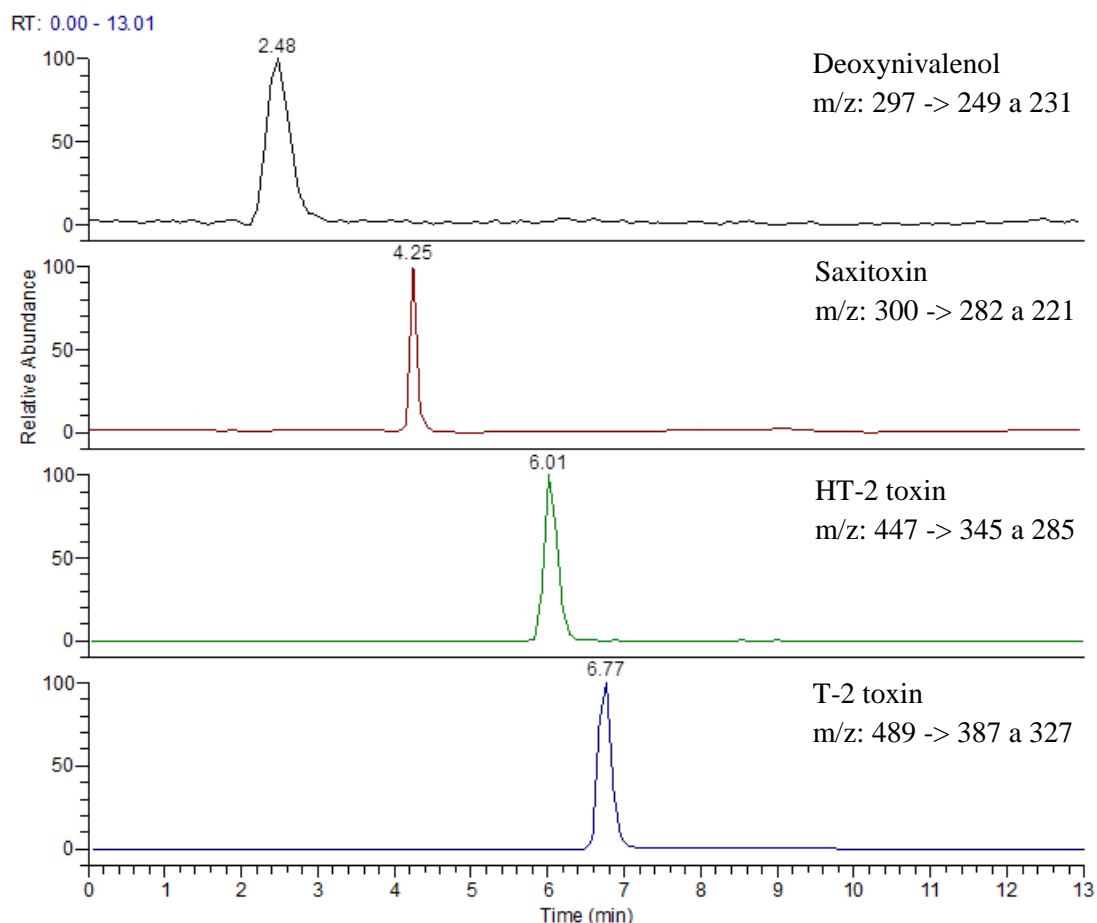


Obr. č. 13: Extrahovaný iontový chromatogram produktových iontů vzniklých fragmentací prekurzorů vybraných toxinů o koncentraci 100 ng/ml na koloně Kinetex PFP při použití HESI v kladném módu

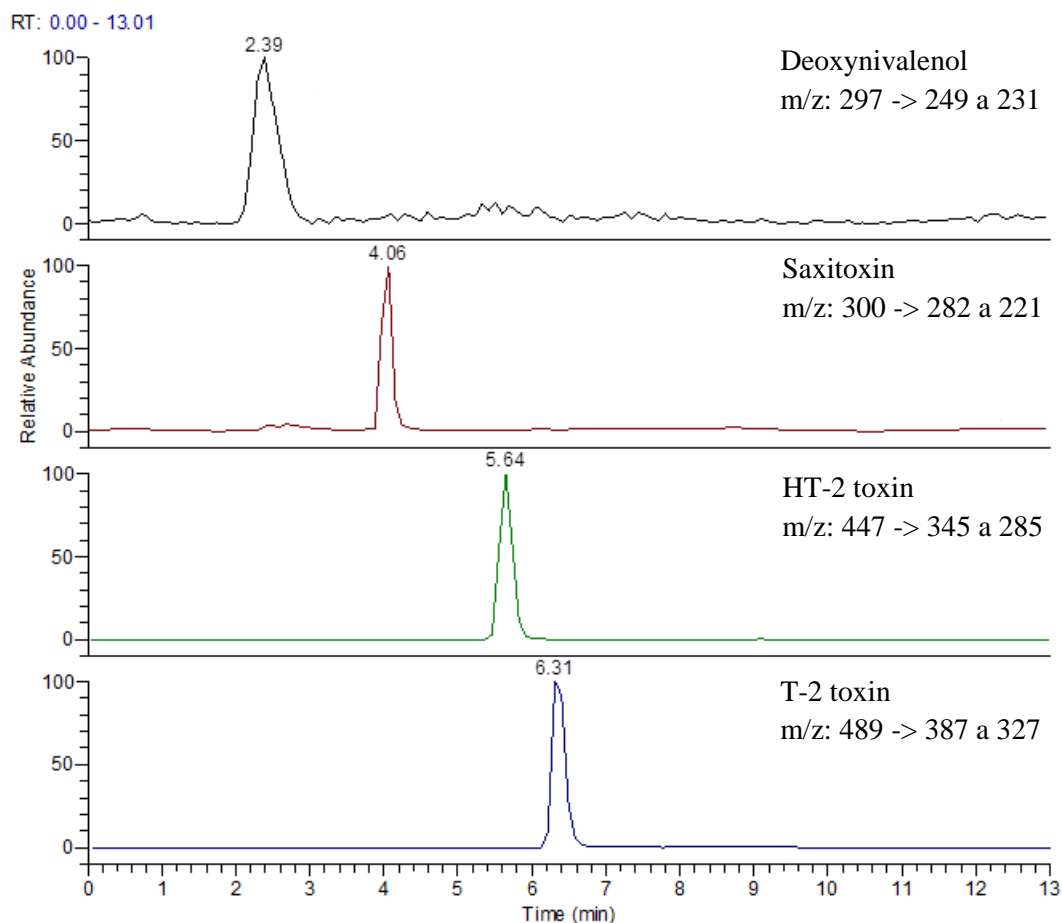
Další testovaná kolona Luna 3 μm CN 100 \AA 3,0 x 150 mm může být použita v režimu normálních i obrácených fází. K této analýze byla použita v režimu reverzních fází a docházelo na ni k dobré separaci všech čtyř toxinů (Obr. č. 9). Proto byla tato kolona vybrána pro analýzu směsi vybraných toxinů.

4.1.3 Optimalizace teploty na koloně

Během optimalizace teploty byly zvoleny teploty 20, 25, 30, 35 a 40 °C. Z výsledků bylo patrné, že dochází k posunům retenčních časů, což je vidět na chromatogramech pro teplotu na koloně 25 °C (Obr. č. 9), teplotu 30 °C (Obr. č. 14) a teplotu 40 °C (Obr. č. 15). Pro další analýzy byla vybrána teplota 25 °C, při které docházelo k dobré separaci bez rozmývání jednotlivých píků a celkový čas metody byl poměrně krátký.



Obr. č. 14: Extrahovaný iontový chromatogram produktových iontů vzniklých fragmentací prekurzorů toxinů o koncentraci 100 ng/ml na koloně Luna CN při použití HESI v kladném módu při teplotě 30 °C



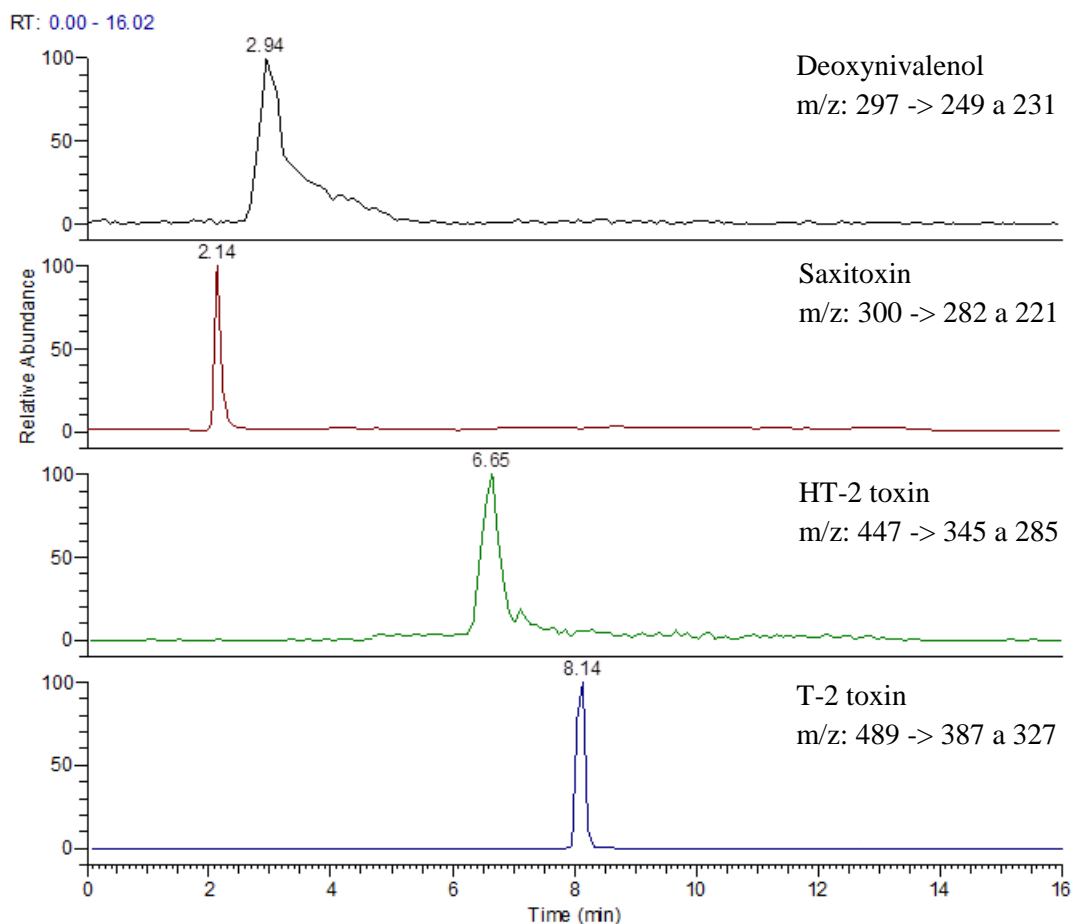
Obr. č. 15: Extrahovaný iontový chromatogram produktových iontů vzniklých fragmentací prekurzorů toxinů o koncentraci 100 ng/ml na koloně Luna CN při použití HESI v kladném módu při teplotě 40 °C

4.1.4 Optimalizace složení mobilní fáze

Jako první byla testována mobilní fáze o složení acetonitril - deionizovaná voda. Ke zlepšení ionizace v elektrospreji byl do směsi dán přídavek kyseliny octové nebo mravenčí a jejich amonných solí. Při použití těchto směsí docházelo k velmi významnému rozmývání píku u DON, což je patrné na chromatogramu (Obr. č. 16). Toto se nepodařilo odstranit ani různým poměrem, případně záměnou přidaných kyselin.

Po neúspěšném použití acetonitrilu byla zkoušena směs methanol - deionizovaná voda. Opět byl testován přídavek kyseliny octové nebo mravenčí a jejich amonných solí. Bylo zjištěno, že počáteční podmínky nesmí obsahovat příliš vysoký obsah kyseliny, protože pak dochází k eluci DON a STX s mrtvým objemem. Na různý obsah amonných solí spíše reagovaly T-2 a HT-2 toxiny změnou svých retenčních časů. Nakonec byla vyhodnocena jako nejlepší směs složená ze dvou roztoků. Jedním byla čistá deionizovaná voda a druhým

roztokem byl methanol s obsahem 0,1 % kyseliny mravenčí a mravenčanu amonného o výsledné koncentraci 5 mM. Výsledný chromatogram je vidět na Obr. č. 9. V této mobilní fázi byla i lepší odezva detektoru než v předchozí acetonitrilové směsi.



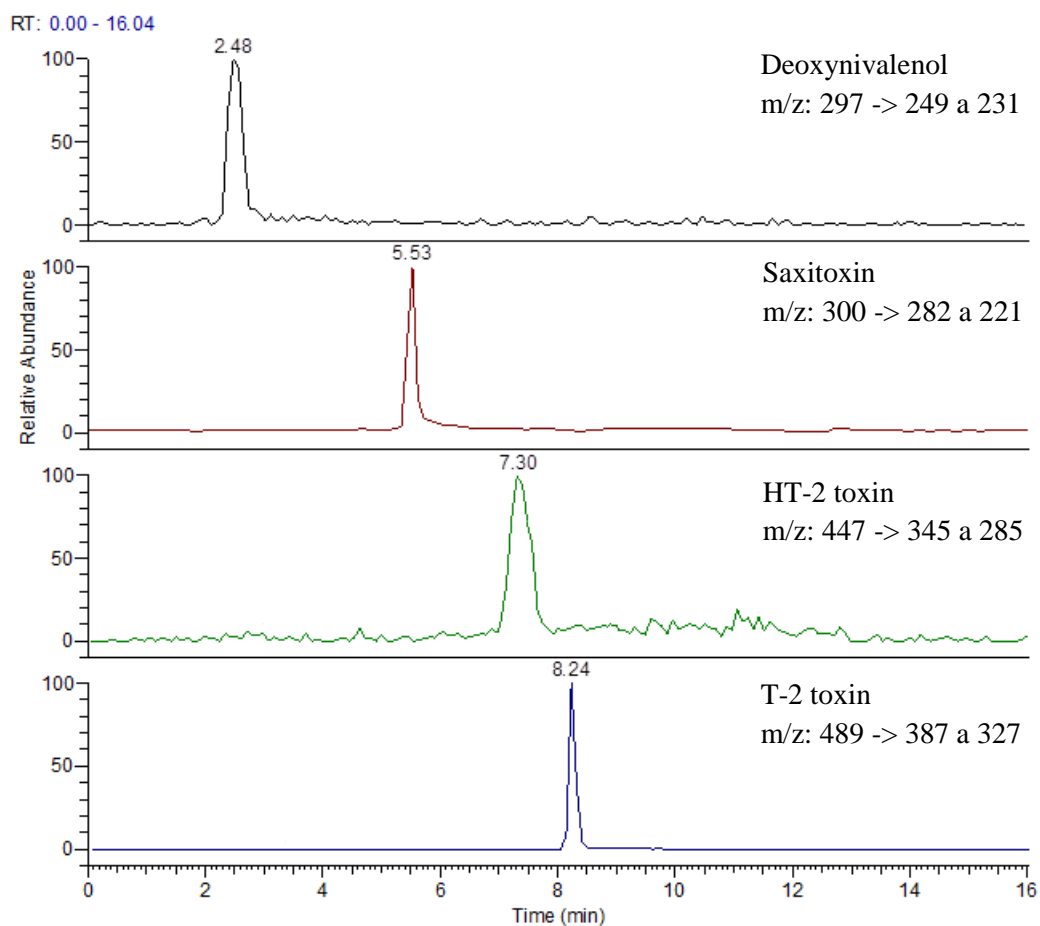
Obr. č. 16: Extrahovaný iontový chromatogram produktových iontů vzniklých fragmentací prekurzorů toxinů o koncentraci 100 ng/ml na koloně Luna CN při použití HESI v kladném módu při použití směsi acetonitril – voda jako mobilní fáze

4.1.5 Optimalizace gradientu

Byly zkoušeny různé průběhy gradientové eluce vybrané mobilní fáze (Obr. č. 17 a Obr. č. 18). Nakonec byl vybrán gradient (Tab. č. 5), kdy docházelo k uspokojivé separaci a celkový čas analýzy včetně reekvilibrace kolony byl 13 minut (Obr. č. 9). Retenční časy jednotlivých toxinů při použití tohoto gradientu jsou v Tab. č. 7.

Tab. č. 7: Retenční časy jednotlivých toxinů

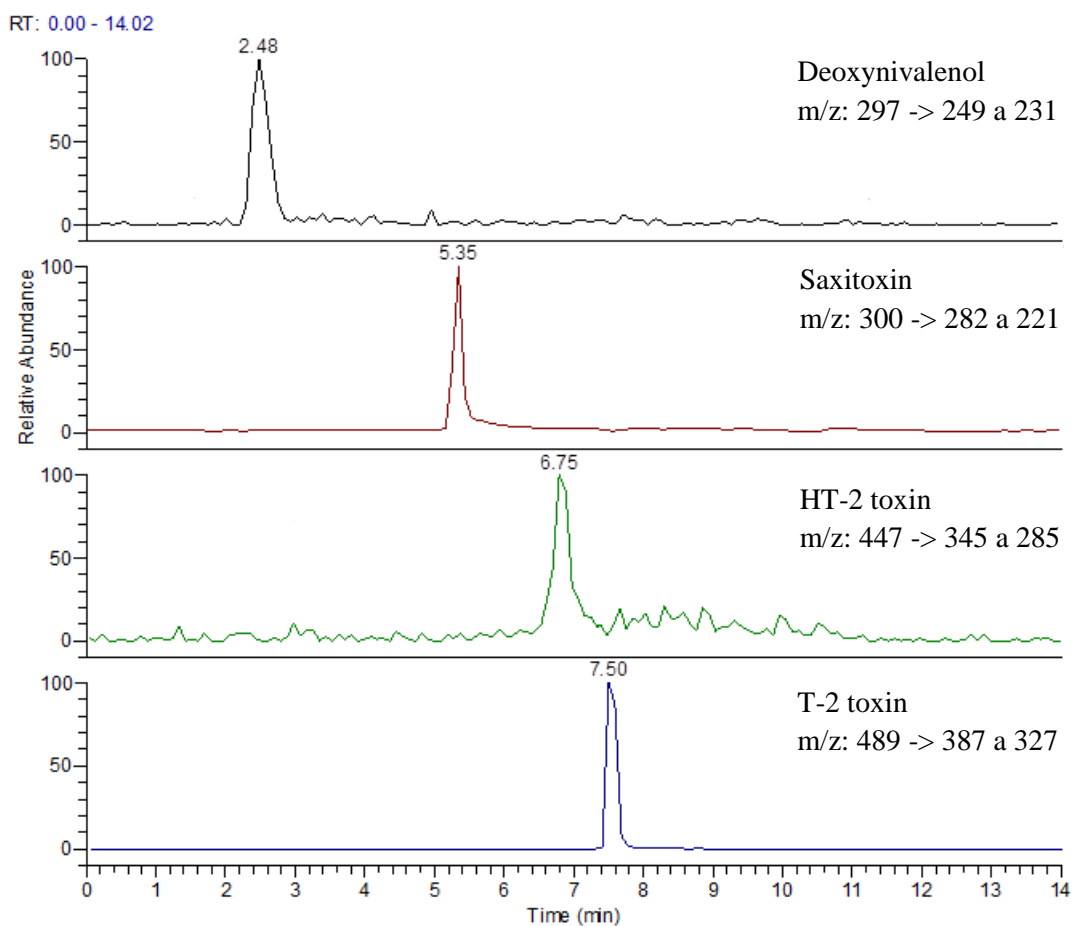
toxin	deoxynivalenol	saxitoxin	HT-2 toxin	T-2 toxin
retenční čas (min)	2,57	4,25	6,29	7,04



Obr. č. 17: Extrahovaný iontový chromatogram produktových iontů vzniklých fragmentací prekurzorů toxinů o koncentraci 100 ng/ml na koloně Luna CN při použití HESI v kladném módu při použití gradientu č. 1 znázorněného v Tab. č. 8

Tab. č. 8: Průběh gradientu č. 1

čas (min)	složka A (%)	složka B (%)
0	5	95
1	5	95
10	90	10
11	5	95
16	5	95



Obr. č. 18: Extrahovaný iontový chromatogram produktových iontů vzniklých fragmentací prekurzorů toxinů o koncentraci 100 ng/ml na koloně Luna CN při použití HESI v kladném módu při použití gradientu č. 2 znázorněného v Tab. č. 9

Tab. č. 9: Průběh gradientu č. 2

čas (min)	složka A (%)	složka B (%)
0	5	95
1	5	95
8	90	10
9	5	95
14	5	95

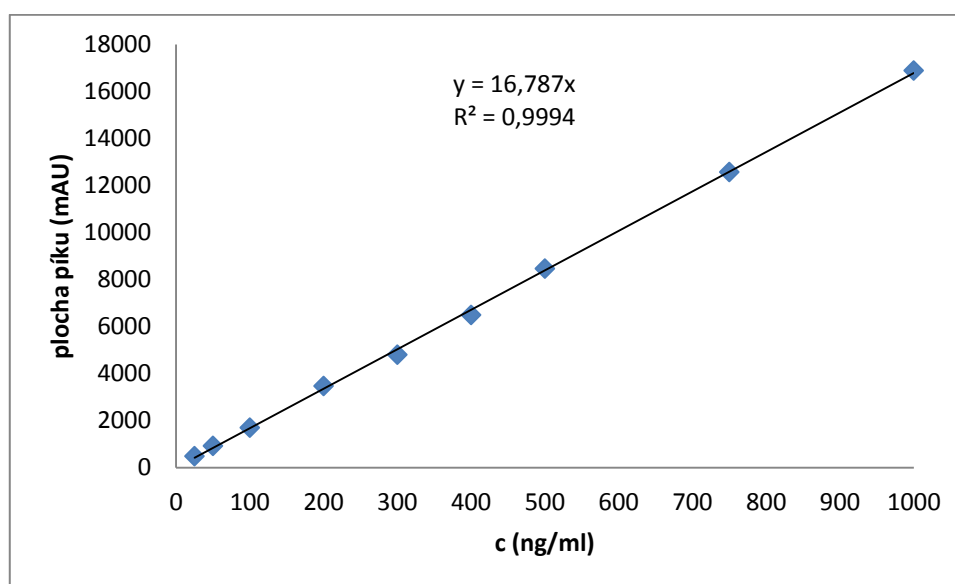
4.2 Kalibrační závislosti

Byly proměřeny směšné kalibrační roztoky o koncentracích 0,5; 1; 3; 6; 12; 25; 100; 200; 300; 400; 500; 750 a 1000 ng/ml od každého toxinu a následně byly sestrojeny pro jednotlivé toxiny kalibrační křivky ze závislosti plochy píku na koncentraci. Grafy byly vytvořeny pomocí programu Microsoft Excel. Dále byly vypočítány hodnoty limitů detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ) z výšky píku analytu a šumu.

4.2.1 DON: kalibrace a limity detekce a stanovitelnosti

U kalibračních roztoků o koncentraci 0,5; 1; 3; 6 a 12 ng/ml nebyl DON detekován nebo nebylo možno ho kvantifikovat, proto byla kalibrační přímka (Graf č. 1) pro DON sestrojena v rozsahu 25–1000 ng/ml. Regresní rovnice pro DON je $y = 16,787x$ s koeficientem determinace $R^2 = 0,9994$.

Dále byly vypočítány hodnoty limitu detekce a limitu stanovitelnosti: LOD = 5,87 ng/ml a LOQ = 19,56 ng/ml.



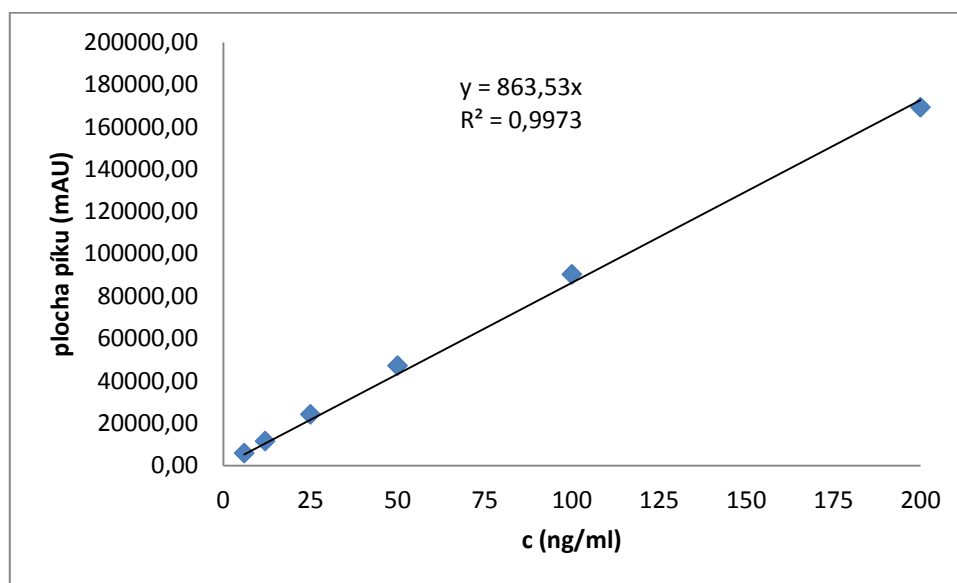
Graf č. 1: Kalibrační přímka pro DON

4.2.2 STX·2HAc: kalibrace a limity detekce a stanovitelnosti

U kalibračních roztoků o koncentraci 0,5; 1 a 3 ng/ml nebyl STX·2HAc detekován nebo nebylo možno ho kvantifikovat a u roztoků o koncentraci 300 ng/ml a vyšší ležela odezva detektoru mimo lineární oblast, proto byla kalibrační přímka (Graf č. 2) pro STX·2HAc

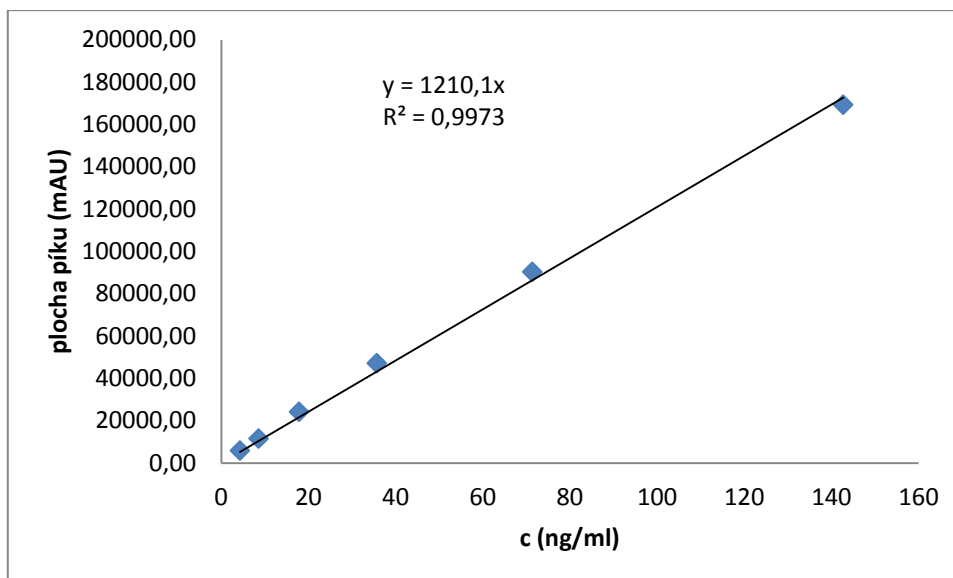
sestrojena v rozsahu 6–200 ng/ml. Regresní rovnice pro STX·2HAc je $y = 863,53x$ s koeficientem determinace $R^2 = 0,9973$.

Dále byly vypočítány hodnoty limitu detekce a limitu stanovitelnosti: LOD = 1,25 ng/ml a LOQ = 4,15 ng/ml.



Graf č. 2: Kalibrační přímka pro STX·2HAc

Pokud bychom přepočítali hmotnost diacetátu saxitoxinu ($M = 419,39$ g/mol) na hmotnost čistého saxitoxinu ($M = 299,29$ g/mol) u všech naměřených a vypočtených hodnot, dostaneme kalibrační přímku (Graf č. 3) v rozsahu 4,28–142,7 ng/ml s regresní rovnicí $y = 1210,1x$ s koeficientem determinace $R^2 = 0,9973$ a limity detekce a stanovitelnosti: LOD = 0,89 ng/ml a LOQ = 2,96 ng/ml.

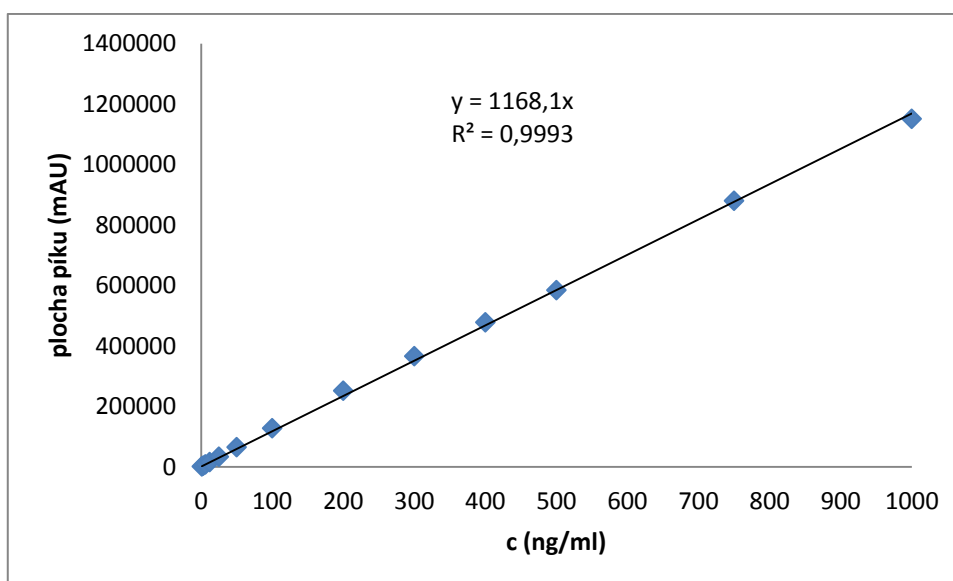


Graf č. 3: Kalibrační přímka pro čistý STX po přepočítání ze STX·2HAc

4.2.3 HT-2 toxin: kalibrace a limity detekce a stanovitelnosti

U kalibračního roztoku o koncentraci 0,5 ng/ml nebylo možné HT-2 kvantifikovat, proto byla kalibrační přímka (Graf č. 4) pro HT-2 toxin sestrojena v rozsahu 1–1000 ng/ml. Regresní rovnice pro T-2 je $y = 1168,1x$ s koeficientem determinace $R^2 = 0,9993$.

Dále byly vypočítány hodnoty limitu detekce a limitu stanovitelnosti: LOD = 0,17 ng/ml a LOQ = 0,58 ng/ml.

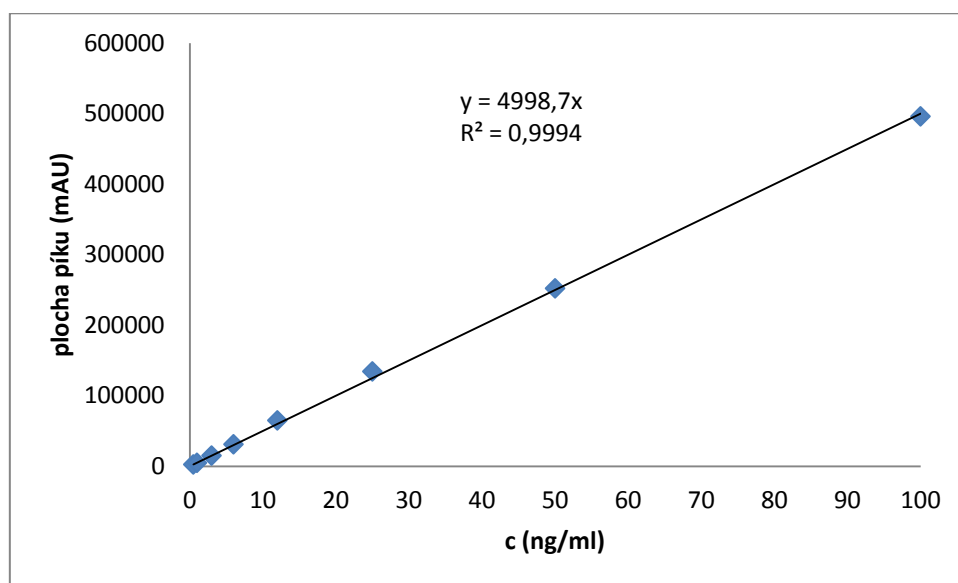


Graf č. 4: Kalibrační přímka pro HT-2

4.2.4 T-2 toxin: kalibrace a limity detekce a stanovitelnosti

U kalibračních roztoků o koncentraci 200 ng/ml a vyšší ležela odezva detektoru mimo lineární oblast, proto byla kalibrační přímka (Graf č. 5) pro T-2 toxin sestrojena v rozsahu 0,5–100 ng/ml. Regresní rovnice pro T-2 je $y = 4998,7x$ s koeficientem determinace $R^2 = 0,9994$.

Dále byly vypočítány hodnoty limitu detekce a limitu stanovitelnosti: LOD = 0,03 ng/ml a LOQ = 0,10 ng/ml.



Graf č. 5: Kalibrační přímka pro T-2

4.2.5 Shrnutí kalibračních parametrů

V Tab. č. 10 jsou přehledně shrnuty rozsahy kalibračních závislostí, jejich rovnice regresí a limity detekce a stanovitelnosti pro jednotlivé toxiny.

Tab. č. 10: Kalibrační parametry pro jednotlivé toxiny

toxin	rozsah kalibrační přímky (ng/ml)	rovnice regrese	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
DON	25–1000	$y = 16,787x$	5,87	19,56
STX·2HAc	6–200	$y = 863,53x$	1,25	4,15
STX	4,28–142,7	$y = 1210,1x$	0,89	2,96
HT-2	1–1000	$y = 1168,1x$	0,17	0,58
T-2	0,5–100	$y = 4998,7x$	0,03	0,10

4.3 Optimalizace postupu extrakce toxinů z půdy

Nejprve byla vyzkoušena extrakce za pomoci horizontální vyhřívané třepačky. Extrakce probíhala za teploty 50 °C při 500 ot./min a po dobu 60 a 90 minut. Mezi časem 60 a 90 minut nebyl výrazný rozdíl ve výtěžnosti extrakce. Pro porovnání byla také testována extrakce v ultrazvukové lázni při teplotě 50 °C o dobu 20 minut. Ta se ukázala účinnější než extrakce na třepačce a též časově méně náročná, proto byla zvolena pro další měření extrakce v ultrazvuku. Teplota 50 °C byla zvolena s ohledem na literaturu, kdy extrakce STX probíhá za vyšších teplot.

Při extrakci na třepačce se také ukázalo jako nevhodné používat plastové nádoby. Docházelo k vylouhování přísad z plastů do extrakčního roztoku a také docházelo k mechanickým oděrům stěn, které způsobovala zrnka písku rotující po stěnách. V extrakčním roztoku tak byly obsaženy i malé kousky plastu. Pro extrakci byly tedy zvoleny skleněné Erlenmeyerovy baňky o objemu 100 ml.

4.3.1 Optimalizace délky ultrazvukové extrakce

Byla porovnáována výtěžnost extrakce při délce 20, 40 a 60 minutách. Ukázalo se, že s delší dobou extrakce výtěžnost spíše mírně klesá (Tab. č. 11). Klesající trend je patrný u všech sledovaných toxinů. Proto byla zvolena doba extrakce 20 min.

Tab. č. 11: Výtěžnost extrakce při různé době extrakce

čas extrakce	20 min	40 min	60 min
DON	84 %	79 %	78 %
STX	51 %	38 %	38 %
HT-2	84 %	76 %	71 %
T-2	96 %	81 %	79 %

4.3.2 Optimalizace objemu extrakčního činidla

Byly testovány různé objemy extrakčního činidla na 0,5 g půdy, a to konkrétně 2, 5 a 40 ml. U malých objemů extrakčního činidla byla výtěžnost extrakce u trichothecenů větší než 65 %. Problém byl se STX, u kterého se výtěžnost pohybovala kolem 7 % při použití 2 ml extrakčního činidla respektive kolem 15 % při použití 5 ml. Proto byl vyzkoušen výrazný nárůst objemu extrakčního činidla a to na 40 ml. Při tomto objemu se podařilo dosáhnout

výtěžnosti extrakce pro STX 51 % a pro trichotheceny přes 90 %. Větší objem již nebyl testován z technických důvodů.

4.3.3 Optimalizace složení extrakčního činidla

Z důvodů rozpustnosti saxitoxinu pouze ve vodě, acetonitrilu a methanolu byly zkoušeny jako extrakční činidla pouze směsi acetonitrilu s vodou a methanolu s vodou, případně byla do směsi přidána kyselina octová nebo mravenčí. Byl také testován přídavek mravenčanu amonného (AF).

Pro extrakci byly na základě literatury vytipovány uvedené směsi rozpouštědel. Dosažená výtěžnost je shrnuta v Tab. č. 12:

- ACN:H₂O v poměru 84:16
- 1mM AF v ACN:H₂O v poměru 84:16
- ACN:H₂O:FA v poměru 89,9:10:0,1 (Obr. č. 19)
- MeOH:H₂O v poměru 20:80
- MeOH:H₂O v poměru 90:10
- MeOH:H₂O:FA v poměru 89,9:10:0,1
- H₂O:FA v poměru 99,9:0,1
- H₂O:HAc v poměru 99,83:0,17 (30 mM)

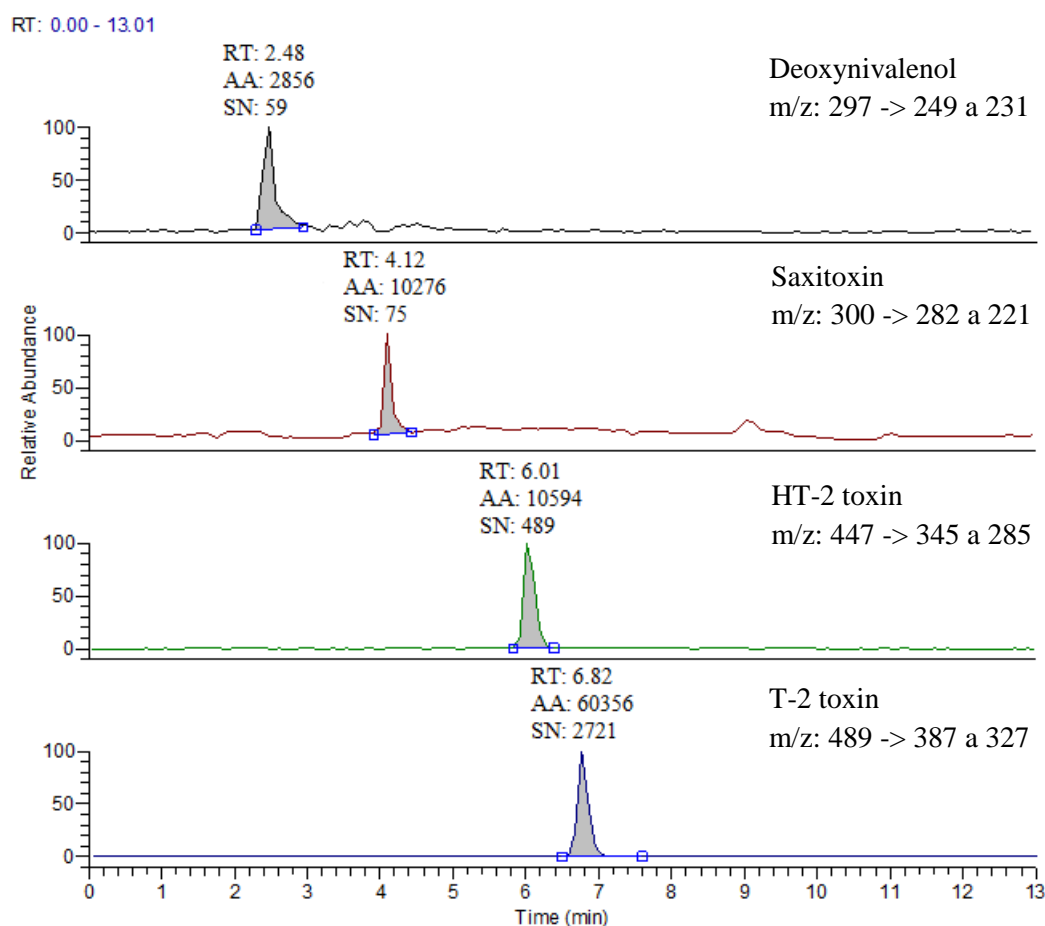
Tab. č. 12: Výtěžnost extrakce při použití různých činidel

	DON	STX	HT-2	T-2
ACN:H ₂ O 84:16	81 %	38 %	71 %	89 %
1mM AF v ACN:H ₂ O 84:16	84 %	51 %	84 %	96 %
ACN:H ₂ O:FA 89,9:10:0,1	77 %	36 %	59 %	84 %
MeOH:H ₂ O 20:80	45 %	< LOQ	26 %	48 %
MeOH:H ₂ O 90:10	< LOQ	< LOQ	65 %	53 %
MeOH:H ₂ O:FA 89,9:10:0,1	< LOQ	28 %	69 %	61 %
H ₂ O:FA 99,9:0,1	< LOQ	< LOQ	31 %	52 %
H ₂ O:HAc 99,83:0,17	< LOQ	< LOQ	30 %	50 %

< LOQ – hodnota je pod limitem stanovitelnosti

Při větším obsahu mravenčanu amonného docházelo k velké deformaci tvaru píku, proto byla testovaná maximální koncentrace mravenčanu 1 mM. Při opakované extrakci a spojení odparků docházelo ke zvýšení výtěžnosti extrakce pro saxitoxin, avšak k výraznému poklesu výtěžnosti pro trichothecenové mykotoxiny.

Z naměřených dat je patrné, že nejvhodnější extrakční roztok je 1mM AF v 84% ACN. Špatná extrahovatelnost STX je pravděpodobně způsobena jeho velmi vysokou afinitou k půdě. Ve své studii Burns a kol. [3] uvádějí, že adsorpce STX na jíly a sedimenty ve vodě je částečně reversibilní. Kontaminované sedimenty tak mohou tvořit rezervoár STX, který se může postupně uvolňovat do vody. To vysvětluje, proč při opakované extrakci čerstvým extrakčním činidlem a spojení odparků lze dosáhnout větší výtěžnosti u STX.



Obr. č. 19: Extrahovaný iontový chromatogram produktových iontů vzniklých fragmentací prekurzorů toxinů na koloně Luna CN po extrakci kontaminované půdy 1mM AF v ACN:H₂O v poměru 84:16

5. ZÁVĚR

Práce se zabývá extrakcí saxitoxinu, deoxynivalenolu, HT-2 a T-2 toxinu z hlinitopísčité půdy a jejich stanovení pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí.

V teoretické části je zpracována rešerše zabývající se těmito toxiny, jejich toxickými účinky na organismus a výskytem v životním prostředí. Dále je rešerše zaměřena na přehled analytických metod k jejich stanovení a na extrakci těchto toxinů z různých rostlinných i živočišných matric.

V rámci experimentální části této práce byla navržena metoda kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí na simultánní stanovení vybraných toxinů. Metoda byla optimalizována s ohledem na nízké meze detekce. Byly sestrojeny kalibrační přímky pro jednotlivé toxiny a vypočítány limity detekce a stanovitelnosti. Metoda je navržena k současnému stanovení všech čtyř toxinů a to v kalibračním rozsahu 25–1000 ng/ml s LOQ = 19,56 ng/ml pro deoxynivalenol, 4,28–142,7 ng/ml s LOQ = 2,96 ng/ml pro saxitoxin, 1–1000 ng/ml s LOQ = 0,58 ng/ml pro HT-2 toxin a 0,5–100 ng/ml s LOQ = 0,10 ng/ml pro T-2 toxin.

Byl také navržen a optimalizován pracovní postup na zpracování vzorku půdy. Jako nejvhodnější se ukázala extrakce ultrazvukem (při 50 °C, 20 min) s následným odstředěním a odpařením supernatantu na vakuové odparce.

Na základě literární rešerše, zabývající se extrakcí vybraných toxinů z rozdílných matric, byly navrženy různé směsi extrakčních činidel. Tyto směsi s ohledem na rozpustnost saxitoxinu byly složeny pouze z vody, acetonitrilu a methanolu. Byly testovány směsi různého složení a případné přídavky dalších látek jako kyseliny octové nebo mravenčí a mravenčanu amonného pro zvýšení výtěžnosti. Z naměřených dat byla vybrána jako nejlepší extrakční směs 1mM mravenčan amonný v 84% acetonitrilu. Při použití této směsi k extrakci bylo dosaženo výtěžnosti 84 % pro deoxynivalenol, 51 % pro saxitoxin, 84 % pro HT-2 toxin a 96 % pro T-2 toxin.

6. SEZNAM LITERATURY

- [1] PITTET, A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds: an update review. *Revue de Medecine Veterinaire (France)* [online]. 1998 [vid. 29. duben 2014]. ISSN 0035-1555. Dostupné z: http://agris.fao.org/agris-search/search.do?request_locale=en&recordID=FR1998004063&query=&sortField=&sortOrder=&agrovocString=&advQuery=¢erString=
- [2] MONACI, Linda, Elisabetta DE ANGELIS a Angelo VISCONTI. Determination of deoxynivalenol, T-2 and HT-2 toxins in a bread model food by liquid chromatography–high resolution-Orbitrap-mass spectrometry equipped with a high-energy collision dissociation cell. *Journal of Chromatography A* [online]. 2011, roč. 1218, č. 48, s. 8646–8654 [vid. 23. březen 2014]. ISSN 0021-9673. Dostupné z: [doi:10.1016/j.chroma.2011.10.008](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.008)
- [3] BURNS, Justina M., Sherwood HALL a John L. FERRY. The adsorption of saxitoxin to clays and sediments in fresh and saline waters. *Water Research* [online]. 2009, roč. 43, č. 7, s. 1899–1904 [vid. 19. duben 2014]. ISSN 0043-1354. Dostupné z: [doi:10.1016/j.watres.2009.02.004](https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.02.004)
- [4] ABBOTT, Jay P., Leanne J. FLEWELLING a Jan H. LANDSBERG. Saxitoxin monitoring in three species of Florida puffer fish. *Harmful Algae* [online]. 2009, roč. 8, č. 2, s. 343–348 [vid. 24. březen 2014]. ISSN 1568-9883. Dostupné z: [doi:10.1016/j.hal.2008.07.005](https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.07.005)
- [5] NOVOTNÝ, Ladislav, Kamil MUSÍLEK, Miroslav POHANKA, Jana ŽDÁROVÁ-KARASOVÁ, Pavel BOŠTÍK, Daniel JUN a Kamil KUČA. *Introduction to chemical and biological warfare agents*. Hradec Kralove [i. e. Čeperka]: L. Novotny, 2011. ISBN 9788026009160.
- [6] HRDINA, Vratislav, Radomír HRDINA, Luděk JAHODÁŘ, Zdeněk MATINEC a Vladimír MĚRKA. *Přírodní toxiny a jedy*. Praha: Galén: Karolinum, 2004. ISBN 8072622560.
- [7] PATOČKA, Jiří. *Vojenská toxikologie*. B.m.: Grada Publishing a.s., 2004. ISBN 9788024706085.
- [8] EQUATOX. *Saxitoxin* [online]. Dostupné z: http://www.equatox.eu/science_of_toxins/saxitoxin/index.html
- [9] Patocka J; Stredav L (April 23, 2002). "Brief Review of Natural Nonprotein Neurotoxins". In Price, Richard. *ASA Newsletter* (Applied Science and Analysis inc.) 02–2 (89): 16–23. ISSN 1057-9419. Dostupné z: <http://www.asanltr.com/newsletter/02-2/articles/Neurotoxins.htm>
- [10] FANG, Xiaoming, Xiang FAN, Yifeng TANG, Jiahua CHEN a Jingci LU. Liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry for determination of saxitoxin and decarbamoylsaxitoxin in shellfish. *Journal of Chromatography A* [online]. 2004, roč. 1036, č. 2, s. 233–237 [vid. 24. březen 2014]. ISSN 0021-9673. Dostupné z: [doi:10.1016/j.chroma.2004.02.075](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.02.075)

- [12] BĚLÁKOVÁ, S. *Mykotoxiny v pivovarských surovinách a v pivu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 64 s. Vedoucí dizertační práce doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc. Dostupné z: <http://dspace.lib.vutbr.cz/xmlui/handle/11012/25107>
- [13] PESTKA, James J. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. *Animal Feed Science and Technology* [online]. 2007, roč. 137, č. 3–4, s. 283–298 [vid. 23. březen 2014]. ISSN 0377-8401. Dostupné z: doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.06.006
- [14] GUTLEB, Arno C., Ellen MORRISON a Albertinka J. MURK. Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. 2002, roč. 11, č. 3–4, s. 309–320 [vid. 22. březen 2014]. ISSN 1382-6689. Dostupné z: doi:10.1016/S1382-6689(02)00020-0
- [15] ZÖLLNER, Peter a Bernhard MAYER-HELM. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2006, roč. 1136, č. 2, s. 123–169 [vid. 22. březen 2014]. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2006.09.055
- [16] CHAMPEIL, A, T DORÉ a J. F FOURBET. *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *Plant Science* [online]. 2004, roč. 166, č. 6, s. 1389–1415 [vid. 23. březen 2014]. ISSN 0168-9452. Dostupné z: doi:10.1016/j.plantsci.2004.02.004
- [17] HAJŠLOVÁ, Jana. *Kontaminace vybraných surovin mykotoxiny* [online]. 2010. Dostupné z: <http://www.phytosanitary.org/projekty/2010/Projekt1.pdf>
- [18] COLE, Richard J. a Richard H. COX. *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*. B.m.: Elsevier, 1981. ISBN 9780323138789.
- [19] HAJŠLOVÁ, Jana. *Mykotoxiny a jejich konjugáty v potravinářských surovinách a krmivech: trendy, rizika dietární expozice, možnosti prognózy osudu při zpracování* [online]. 2008. Dostupné z: <http://www.phytosanitary.org/projekty/2008/Projekt1.pdf>
- [20] RADOVÁ-SYPECKÁ, Zuzana. *Mykotoxiny v zemědělské produkci ve vazbě na agrární systém* [online]. 31. leden 2004. Dostupné z: www.phytosanitary.org/old/projekty/2003/vvf-13-03.pdf
- [21] ŽABKA, Martin a Alexandr JEGOROV. Návrat houby, jež dala vzniknout jménu trichothece. *Chem. Listy*. 2002, roč. 96, s. 607–610.
- [22] MARIN, S., A. J. RAMOS, G. CANO-SANCHO a V. SANCHIS. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2013, roč. 60, s. 218–237 [vid. 30. březen 2014]. ISSN 0278-6915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2013.07.047
- [23] (CONTAM), EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed. *EFSA Journal 2011* [online]. 2011, roč. 9, č. 12 [vid. 29. březen 2014]. Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2481.htm>

- [24] SOBOTNÍKOVÁ, Jana. Instrumentální metody analytické chemie. In: [online]. B.m. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~suchan/Instrumentalni%20metody.pdf>
- [25] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha [i.e. Hradec Králové]; [Klatovy]: Lucie Nováková ; Michal Douša, 2013. ISBN 9788026042433 8026042433 9788026042440 8026042441.
- [26] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. B.m.: Pavel Klouda, 2003. ISBN 9788086369075.
- [27] ČÁSLAVSKÝ, Josef. *Extrakce*. 2014
- [28] SAYFRITZ, S. J., J. A. B. AASEN a T. AUNE. Determination of paralytic shellfish poisoning toxins in Norwegian shellfish by liquid chromatography with fluorescence and tandem mass spectrometry detection. *Toxicon* [online]. 2008, roč. 52, č. 2, s. 330–340 [vid. 19. duben 2014]. ISSN 0041-0101. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxicon.2008.06.001
- [29] FOSS, Amanda J., Edward J. PHILIPS, Mark T. AUBEL a Nancy J. SZABO. Investigation of extraction and analysis techniques for Lyngbya wollei derived Paralytic Shellfish Toxins. *Toxicon* [online]. 2012, roč. 60, č. 6, s. 1148–1158 [vid. 24. březen 2014]. ISSN 0041-0101. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxicon.2012.07.009
- [30] JANG, Junho a Mari YOTSU-YAMASHITA. Distribution of tetrodotoxin, saxitoxin, and their analogs among tissues of the puffer fish Fugu pardalis. *Toxicon* [online]. 2006, roč. 48, č. 8, s. 980–987 [vid. 19. duben 2014]. ISSN 0041-0101. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxicon.2006.07.034
- [31] DELL'AVERSANO, Carmela, Philipp HESS a Michael A. QUILLIAM. Hydrophilic interaction liquid chromatography–mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. *Journal of Chromatography A* [online]. 2005, roč. 1081, č. 2, s. 190–201 [vid. 26. březen 2014]. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2005.05.056
- [32] ZHUO, Liyang, Yuechun YIN, Wusheng FU, Bin QIU, Zhenyu LIN, Yiqiang YANG, Lemin ZHENG, Jianrong LI a Guonan CHEN. Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by HILIC–MS/MS coupled with dispersive solid phase extraction. *Food Chemistry* [online]. 2013, roč. 137, č. 1–4, s. 115–121 [vid. 19. duben 2014]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2012.10.010
- [33] SULYOK, Michael, Franz BERTHILLER, Rudolf KRŠKA a Rainer SCHUHMACHER. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [online]. 2006, roč. 20, č. 18, s. 2649–2659 [vid. 20. duben 2014]. ISSN 1097-0231. Dostupné z: doi:10.1002/rcm.2640
- [34] VISHWANATH, Vinay, Michael SULYOK, Roman LABUDA, Wolfgang BICKER a Rudolf KRŠKA. Simultaneous determination of 186 fungal and bacterial metabolites in indoor matrices by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2009, roč. 395, č. 5, s. 1355–1372 [vid. 20. duben 2014]. ISSN 1618-2642, 1618-2650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-009-2995-2

- [35] VACLAVIK, Lukas, Milena ZACHARIASOVA, Vojtech HRBEK a Jana HAJŠLOVA. Analysis of multiple mycotoxins in cereals under ambient conditions using direct analysis in real time (DART) ionization coupled to high resolution mass spectrometry. *Talanta* [online]. 2010, roč. 82, č. 5, s. 1950–1957 [vid. 20. duben 2014]. ISSN 0039-9140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2010.08.029
- [36] SCHOLLENBERGER, M, U LAUBER, H. Terry JARA, S SUCHY, W DROCHNER a H. -M MÜLLER. Determination of eight trichothecenes by gas chromatography–mass spectrometry after sample clean-up by a two-stage solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* [online]. 1998, roč. 815, č. 1, s. 123–132 [vid. 24. březen 2014]. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(98)00454-3
- [37] YANG, Lingchen, Zhiyong ZHAO, Aibo WU, Yifeng DENG, Zhenlei ZHOU, Jianpeng ZHANG a Jiafa HOU. Determination of trichothecenes A (T-2 toxin, HT-2 toxin, and diacetoxyscirpenol) in the tissues of broilers using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* [online]. 2013, roč. 942–943, s. 88–97 [vid. 24. březen 2014]. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2013.10.034
- [38] SCHOTHORST, R. C. a A. A. JEKEL. Determination of trichothecenes in beer by capillary gas chromatography with flame ionisation detection. *Food Chemistry* [online]. 2003, roč. 82, č. 3, s. 475–479 [vid. 24. březen 2014]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/S0308-8146(03)00117-1
- [39] STECHER, Günther, Kanokwan JARUKAMJORN, Pola ZABORSKI, Rania BAKRY, Christian W. HUCK a Günther K. BONN. Evaluation of extraction methods for the simultaneous analysis of simple and macrocyclic trichothecenes. *Talanta* [online]. 2007, roč. 73, č. 2, s. 251–257 [vid. 20. duben 2014]. ISSN 0039-9140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2007.03.028
- [40] DIANA DI MAVUNGU, Jose, Sofie MONBALIU, Marie-Louise SCIPPO, Guy MAGHUIN-ROGISTER, Yves-Jacques SCHNEIDER, Yvan LARONDELLE, Alfons CALLEBAUT, Johan ROBBENS, Carlos VAN PETEGHEM a Sarah DE SAEGER. LC-MS/MS multi-analyte method for mycotoxin determination in food supplements. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment* [online]. 2009, roč. 26, č. 6, s. 885–895. ISSN 1944-0057. Dostupné z: doi:10.1080/02652030902774649
- [41] MONBALIU, Sofie, Christof VAN POUCKE, Carlos VAN PETEGHEM, Kris VAN POUCKE, Kurt HEUNGENS a Sarah DE SAEGER. Development of a multi-mycotoxin liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for sweet pepper analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [online]. 2009, roč. 23, č. 1, s. 3–11 [vid. 24. duben 2014]. ISSN 1097-0231. Dostupné z: doi:10.1002/rcm.3833
- [42] MOL, Hans G. J., Patricia PLAZA-BOLAÑOS, Paul ZOMER, Theo C. DE RIJK, Alida A. M. STOLKER a Patrick P. J. MULDER. Toward a Generic Extraction Method for Simultaneous Determination of Pesticides, Mycotoxins, Plant Toxins, and Veterinary Drugs in Feed and Food Matrixes. *Analytical Chemistry* [online]. 2008, roč. 80, č. 24, s. 9450–9459 [vid. 20. duben 2014]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac801557f

- [43] SULYOK, Michael, Rudolf KRŠKA a Rainer SCHUHMACHER. Application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method to multi-mycotoxin determination in raw cereals and evaluation of matrix effects. *Food additives and contaminants* [online]. 2007, roč. 24, č. 10, s. 1184–1195. ISSN 0265-203X. Dostupné z: doi:10.1080/02652030701510004
- [44] SPANJER, M C, J M SCHOLTEN, S KASTRUP, U JÖRISSEN, T F SCHATZKI a N TOYOFUKU. Sample comminution for mycotoxin analysis: dry milling or slurry mixing? *Food additives and contaminants* [online]. 2006, roč. 23, č. 1, s. 73–83. ISSN 0265-203X. Dostupné z: doi:10.1080/02652030500260439
- [45] HEREBIAN, Diran, Sebastian ZÜHLKE, Marc LAMSHÖFT a Michael SPITELLER. Multi-mycotoxin analysis in complex biological matrices using LC-ESI/MS: Experimental study using triple stage quadrupole and LTQ-Orbitrap. *Journal of Separation Science* [online]. 2009, roč. 32, č. 7, s. 939–948 [vid. 20. duben 2014]. ISSN 1615-9314. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.200800589
- [46] FRENICH, Antonia Garrido, José Luis Martínez VIDAL, Roberto ROMERO-GONZÁLEZ a María del Mar AGUILERA-LUIZ. Simple and high-throughput method for the multimycotoxin analysis in cereals and related foods by ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* [online]. 2009, roč. 117, č. 4, s. 705–712 [vid. 20. duben 2014]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2009.04.045
- [47] CAPRIOTTI, Anna Laura, Patrizia FOGLIA, Riccardo GUBBIOTTI, Claudia ROCCIA, Roberto SAMPERI a Aldo LAGANÀ. Development and validation of a liquid chromatography/atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometric method for the analysis of mycotoxins subjected to commission regulation (EC) No. 1881/2006 In cereals. *Journal of Chromatography A* [online]. 2010, roč. 1217, č. 39, s. 6044–6051 [vid. 20. duben 2014]. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2010.07.018
- [48] TÖLGYESI, Ádám a Zoltán KUNSÁGI. Quantification of T-2 and HT-2 mycotoxins in cereals by liquid chromatography-multimode ionization-tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal* [online]. 2013, roč. 106, s. 300–306 [vid. 20. duben 2014]. ISSN 0026-265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2012.08.012
- [49] LATTANZIO, Veronica M. T., Michelangelo PASCALE a Angelo VISCONTI. Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2009, roč. 28, č. 6, Applying combinations of chemical analysis and biological effects to environmental and food samples - II, s. 758–768 [vid. 22. duben 2014]. ISSN 0165-9936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2009.04.012
- [50] MENEELY, Julie P., Francesco RICCI, Hans P. VAN EGMOND a Christopher T. ELLIOTT. Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2011, roč. 30, č. 2, BioCop II – Monitoring chemical contaminants in foods, s. 192–203 [vid. 22. duben 2014]. ISSN 0165-9936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2010.06.012
- [51] FRAGA, María, Natalia VILARIÑO, M Carmen LOUZAO, Paula RODRÍGUEZ, Katrina CAMPBELL, Christopher T. ELLIOTT a Luis M. BOTANA. Multidetecion of

- Paralytic, Diarrheic, and Amnesic Shellfish Toxins by an Inhibition Immunoassay Using a Microsphere-Flow Cytometry System. *Analytical Chemistry* [online]. 2013, roč. 85, č. 16, s. 7794–7802 [vid. 25. duben 2014]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac401146m
- [52] ZHANG, Xiaowei a Zhaoxiang ZHANG. Capillary electrophoresis-based immunoassay with electrochemical detection as rapid method for determination of saxitoxin and decarbamoylsaxitoxin in shellfish samples. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2012, roč. 28, č. 1, s. 61–68 [vid. 26. duben 2014]. ISSN 0889-1575. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2012.07.008
- [53] LOCKE, S. J. a P. THIBAUT. Improvement in detection limits for the determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish tissues using capillary electrophoresis/electrospray mass spectrometry and discontinuous buffer systems. *Analytical Chemistry* [online]. 1994, roč. 66, č. 20, s. 3436–3446 [vid. 25. duben 2014]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac00092a022
- [54] DEGRASSE, Stacey, Victor RIVERA, John ROACH, Kevin WHITE, John CALLAHAN, Darcie COUTURE, Karen SIMONE, Tamas PEREDY a Mark POLI. Paralytic shellfish toxins in clinical matrices: Extension of AOAC official method 2005.06 to human urine and serum and application to a 2007 case study in Maine. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* [online]. 2012 [vid. 24. březem 2014]. ISSN 0967-0645. Dostupné z: doi:10.1016/j.dsr2.2012.08.001
- [55] BIRÉ, Ronel, Sophie KRYS, Jean-Marc FRÉMY a Sylviane DRAGACCI. Improved Solid-Phase Extraction Procedure in the Analysis of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2003, roč. 51, č. 22, s. 6386–6390 [vid. 25. duben 2014]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf030342z
- [56] LAWRENCE, J F a B NIEDZWIADK. Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish by using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of AOAC International*. 2001, roč. 84, č. 4, s. 1099–1108. ISSN 1060-3271.
- [57] SHEPHARD, G., F. BERTHILLER, J. DORNER, R. KRŠKA, G. LOMBAERT, B. MALONE, C. MARAGOS, M. SABINO, M. SOLFRIZZO, M. TRUCKSESS, H. VAN EGMOND a T. WHITAKER. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2007-2008. *World Mycotoxin Journal* [online]. 2009, roč. 2, č. 1, s. 3–21 [vid. 24. duben 2014]. Dostupné z: doi:10.3920/WMJ2008.1095
- [58] SHEPHARD, G., F. BERTHILLER, P. BURDASPAL, C. CREWS, M. JONKER, R. KRŠKA, S. MACDONALD, B. MALONE, C. MARAGOS, M. SABINO, M. SOLFRIZZO, H. VAN EGMOND a T. WHITAKER. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2009-2010. *World Mycotoxin Journal* [online]. 2011, roč. 4, č. 1, s. 3–28 [vid. 24. duben 2014]. Dostupné z: doi:10.3920/WMJ2010.1249
- [59] SHEPHARD, G.S., F. BERTHILLER, P.A. BURDASPAL, C. CREWS, M.A. JONKER, R. KRŠKA, V.M.T. LATTANZIO, S. MACDONALD, R.J. MALONE, C. MARAGOS, M. SABINO, M. SOLFRIZZO, H.P. VAN EGMOND a T.B. WHITAKER. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2011-2012. *World*

- Mycotoxin Journal* [online]. 2013, roč. 6, č. 1, s. 3–30 [vid. 24. duben 2014]. Dostupné z: doi:10.3920/WMJ2012.1492
- [60] SHEPHARD, G., F. BERTHILLER, J. DORNER, R. KRŠKA, G. LOMBAERT, B. MALONE, C. MARAGOS, M. SABINO, M. SOLFRIZZO, M. TRUCKSESS, H. VAN EGMOND a T. WHITAKER. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2008-2009. *World Mycotoxin Journal* [online]. 2010, roč. 3, č. 1, s. 3–23 [vid. 24. duben 2014]. Dostupné z: doi:10.3920/WMJ2009.1172
- [61] BERTHILLER, F., P.A. BURDASPAL, C. CREWS, M.H. IHA, R. KRŠKA, V.M.T. LATTANZIO, S. MACDONALD, R.J. MALONE, C. MARAGOS, M. SOLFRIZZO, J. STROKA a T.B. WHITAKER. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2012-2013. *World Mycotoxin Journal* [online]. 2014, roč. 7, č. 1, s. 3–33 [vid. 24. duben 2014]. Dostupné z: doi:10.3920/WMJ2013.1637
- [62] ABRAMOVIĆ, B., I. JAJIĆ, B. ABRAMOVIĆ, J. ČOSIĆ a V. JURIĆ. Detection of deoxynivalenol in wheat by Fourier transform infrared spectroscopy. 2007.
- [63] ZACHARIASOVA, Milena, Jana HAJŠLOVA, Marta KOSTELANSKA, Jan POUŠTKA, Alexandra KRPLOVA, Petr CUHRA a Igor HOCHÉL. Deoxynivalenol and its conjugates in beer: A critical assessment of data obtained by enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2008, roč. 625, č. 1, s. 77–86 [vid. 24. duben 2014]. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2008.07.014
- [64] MOLINELLI, Alexandra, Karina GROSSALBER, Manuela FÜHRER, Sabine BAUMGARTNER, Michael SULYOK a Rudolf KRŠKA. Development of Qualitative and Semiquantitative Immunoassay-Based Rapid Strip Tests for the Detection of T-2 Toxin in Wheat and Oat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2008, roč. 56, č. 8, s. 2589–2594 [vid. 24. duben 2014]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf800393j
- [65] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha [i.e. Hradec Králové]; [Klatovy]: Lucie Nováková ; Michal Douša, 2013. ISBN 9788026042433 8026042433 9788026042440 8026042441.
- [66] SNYDER, Lloyd R, J. J. KIRKLAND a Joseph L. GLAJCH. *Practical HPLC method development*. New York: Wiley, 1997. ISBN 047100703X 9780471007036.
- [67] HOLČAPEK, Michal. Ionizační techniky. In: [online]. B.m. Dostupné z: http://holcapek.upce.cz/teaching/02_IonizacniTechniky.pdf
- [68] ČÁSLAVSKÝ, Josef. Hmotnostní spektrometrie: Ionizační techniky. In: [online]. B.m. 2013. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/elearning/mod/resource/view.php?id=244003>
- [69] LAMOND LABORATORY. *Electrospray ionisation* [online]. 2010. Dostupné z: <http://www.lamondlab.com/MSResource/LCMS/MassSpectrometry/electrosprayIonisation.php>

- [70] DOUGLAS, Donald J., Aaron J. FRANK a Dunmin MAO. Linear ion traps in mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* [online]. 2005, roč. 24, č. 1, s. 1–29 [vid. 5. květen 2014]. ISSN 1098-2787. Dostupné z: doi:10.1002/mas.20004
- [71] HOLČAPEK, Michal. Hmotnostní analyzátory. In: [online]. B.m. Dostupné z: http://holcapek.upce.cz/teaching/03_HmotnostniAnalyzatory.pdf
- [72] SCHWARTZ, Jae C. a Michael W. SENKO. Two-dimensional quadrupole ion trap operated as a mass spectrometer [online]. 6797950. 28. září 2004. [vid. 28. duben 2014]. Dostupné z: <http://www.freepatentsonline.com/6797950.html>
- [73] HERNYCHOVÁ, Lenka. Základy hmotnostní spektrometrie. In: [online]. B.m. Dostupné z: http://www.pmfhk.cz/Prednasky/Hmotnostni_spektrometrie_08.pdf
- [74] SCHWARTZ, Jae C, Michael W SENKO a John E. P SYKA. A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* [online]. 2002, roč. 13, č. 6, s. 659–669 [vid. 10. květen 2014]. ISSN 1044-0305. Dostupné z: doi:10.1016/S1044-0305(02)00384-7

7. SEZNAM ZKRATEK

ACN	acetonitril
AF	mravenčan amonný
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
ASE	zrychlená extrakce rozpouštědlem
DON	deoxynivalenol
ELISA	enzymatická imunoassay
ESI	elektrosprej
FA	kyselina mravenčí
GIT	gastrointestinální trakt
GLE	extrakce plyn – kapalina
HAc	kyselina octová
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
LD ₅₀	smrtná dávka
LLE	extrakce kapalina – kapalina
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie
NP	normální fáze
p. o.	per os (ústy)
PSE	extrakce podporovaná tlakem
PSP	paralytic shellfish poisoning
PST	paralytic shellfish toxin
RP	reverzní fáze
SLE	extrakce pevná fáze – kapalina
SPE	extrakce na pevné fázi
SPME	mikroextrakce na pevné fázi
STX	saxitoxin
STX·2HAc	diacetát saxitoxinu
TDI	tolerovaný denní příjem
UPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie