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

VYUŽITÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE KE STANOVENÍ MARKERŮ OXIDATIVNÍHO STRESU A MYKOTOXINŮ

APPLICATION OF MASS SPECTROMETRY FOR THE DETERMINATION OF OXIDATIVE STRESS MARKERS AND MYCOTOXINS

DIZERTAČNÍ PRÁCE
DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE Ing. MARTINA BOLECHOVÁ
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE doc. Ing. JOSEF ČÁSLAVSKÝ, CSc.
SUPERVISOR

BRNO 2014

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

Zadání dizertační práce

Číslo dizertační práce:	**FCH-DIZ0001/2014**	Akademický rok:	**2014/2015**
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí		
Student(ka):	**Ing. Martina Bolechová**		
Studijní program:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (P2834)		
Studijní obor:	Chemie životního prostředí (2805V003)		
Vedoucí práce	**doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.**		
Konzultanti:			

Název dizertační práce:

Využití hmotnostní spektrometrie ke stanovení markerů oxidativního stresu a mykotoxinů

Zadání dizertační práce:

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na problematiku stanovení markerů oxidativního stresu v biotických vzorcích a stanovení mykotoxinů ve vzorcích rostlinného charakteru.
2. Na základě výsledků rešerše a s přihlédnutím k vybavení laboratoře navrhněte a optimalizujte analytické metody pro stanovení uvedených kontaminantů.
3. Pomocí optimalizovaných metod analyzujte sadu reálných vzorků.
4. Vyhodnoťte získané výsledky a v diskusi je porovnejte s osud publikovanými údaji.

Termín odevzdání dizertační práce: 30.9.2014

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

- -	- -	- -
Ing. Martina Bolechová	doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.	prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
Student(ka)	Vedoucí práce	Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.3.2014

- -
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Prvním tématem předkládané dizertační práce bylo stanovení isoprostanů – markerů oxidativního stresu a dalších látek, které mohou být přítomností oxidativního stresu ovlivňovány. Sledování isoprostanů $iPF_2\alpha$-III, $iPF_2\alpha$-VI, $iPF_2\alpha$-VI, astaxanthinu a polynenasycených mastných kyselin (PUFA), zejména pak kyseliny arachidonové (AA) probíhalo v jikrách lososa obecného (*Salmo salar*). Byly vyvinuty a optimalizovány metody stanovení těchto látek pomocí chromatografických metod ve spojení s konvenční nebo hmotnostně spektrometrickou detekcí. Výsledné metodiky byly použity pro kvantifikaci sledovaných analytů v jikrách *Salmo salar*, lišících se svojí životaschopností a vývojovým stadiem. V nepřeživších jikrách bylo obsaženo větší množství sledovaných isoprostanů a kyseliny arachidonové a zároveň nižší množství astaxanthinu než v kontrolních vzorcích jiker (reprezentujících nezatížené jedince). Také relativní zastoupení PUFA bylo ve vzorcích nepřeživších jiker vyšší než v kontrolních vzorcích. Čerstvě nakladené jikry obsahovaly srovnatelnou hladinu sledovaných isoprostanů s kontrolními vzorky. Pouze isoprostan $iPF_2\alpha$-IV byl obsažen v kontrolních vzorcích pod limit stanovitelnosti, zatímco čerstvě nakladené jikry obsahovaly nízké, avšak kvantifikovatelné množství. Vyšší hladiny PUFA a kyseliny arachidonové ve srovnání s kontrolou byly pozorovány u čerstvě nakladených jiker. Nicméně statisticky významný byl pouze rozdíl v množství astaxanthinu. Rozdílná hladina PUFA a astaxanthinu v jikrách může souviset s jejich biochemickou spotřebou během vývoje. Životaschopnost jiker *Salmo salar* proto mohla být ovlivněna přítomností oxidativního stresu.

Druhá část této práce se zabývá sledováním mykotoxinů v potravinách a krmivech. Mykotoxiny jsou sekundární metabolity produkované plísněni. Jsou to všudypřítomné nežádoucí přírodní kontaminanty, které mohou vážně poškodit zdraví lidí a zvířat. V současné době je známo více než 500 druhů mykotoxinů. Evropskou legislativou je však regulováno pouze velmi malé množství z nich. Evropská komise však žádá Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) o data vedoucí k zavedení regulačních limitů pro další mykotoxiny. V této studii byla vyvinuta multireziduální metoda pro stanovení 17 mykotoxinů v biotických materiálech. Metoda zahrnuje jak mykotoxiny regulované EU, tak i další mykotoxiny v souladu s požadavky EFSA (aflatoxiny, deoxynivalenol, nivalenol, zearalenon, fumonisiny, ochratoxin A, T-2 toxin, HT-2 toxin, enniatiny a beauvericin). Analyty jsou z matrice izolovány pomocí modifikované metody QuEChERS a analyzovány s použitím ultraúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UPLC-MS/MS). Metoda navíc umožňuje ze stejného extraktu stanovit i ergotové alkaloidy (ergokornin, ergosin, ergokryptin, ergokristin a jejich odpovídající epimery).

Vyvinutá metoda byla použita pro monitoring mykotoxinů a ergotových alkaloidů v krmivech a surovinách pro jejich výrobu a v pivovarském ječmeni a sladu z něj připraveném.

KLÍČOVÁ SLOVA

Isoprostany, oxidativní stres, *Salmo salar*, losos, LC-MS, HPLC, astaxanthin, kyselina arachidonová, PUFA, mykotoxiny, námelové alkaloidy, multimetoda, QuEChERS, hmotnostní spektrometrie, krmivo, ekologické zemědělství.

ABSTRACT

The first topic presented in the dissertation thesis is the determination of isoprostanes as markers of oxidative stress and other compounds affected by presence of oxidative stress.

Isoprostanes $iPF_2\alpha$-III, $iPF_2\alpha$-VI, $iPF_2\alpha$-VI, astaxanthin and polyunsaturated fatty acids (PUFA), especially arachidonic acid (AA) were monitored in Atlantic salmon eggs (*Salmo salar*). Methods for the determination of these compounds have been developed and optimized using chromatographic separation coupled to conventional detection or mass spectrometry.

Freshly laid eggs, eyed embryos and non-viable eggs were used to test a general hypothesis that egg viability can be affected by susceptibility to oxidative stress, either through the specific fatty acid concentration and/or the antioxidant capacity of the eggs.

Levels of isoprostanes and arachidonic acid (AA) were significantly higher in non-viable eggs than in control (eyed embryos) as well as relative abundance of PUFA. While no difference of isoprostanes was found between freshly laid and control those from the Atlantic stock except $iPF_2\alpha$-VI which was observed under the LOQ in the control. Higher levels of PUFA and AA in comparison with the control were observed in the freshly laid eggs. However, the only statistically significant difference was observed in the amount of astaxanthin. Different levels of PUFA and astaxanthin may be related to their biochemical consumption during the development of eggs.

This work evaluated potential effect on the viability of eggs *Salmo salar* due to the presence of oxidative stress.

The monitoring of mycotoxins in food and feed was the subject of the second topic. Mycotoxins are secondary metabolites produced by fungi. They are ubiquitous undesirable natural contaminants that are toxic for humans and animals. Today more than 500 mycotoxins has been reckognized. However, only few of them are regulated by the European Union. The European Food Safety Authority (EFSA) was asked by the European Commission to provide a scientific opinion on other mycotoxins for which statutory limits could be developed.

In this study the analytical method allowing fast, reliable and sensitive identification and quantification of 17 mycotoxins in food and feed sample was developed. The method includes both mycotoxins regulated by the EU and selected mycotoxins required by the EFSA (aflatoxins, deoxynivalenol, nivalenol, zearalenone, fumonisin, ochratoxin A, T-2 toxin, HT-2 toxin, enniatins and beauvericin).

Analytes are isolated by the modified QuEChERS method. Ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC–MS/MS) was employed for separation and target mycotoxins quantification. The method also allows determination of ergot alkaloids (ergocornine, ergosine, ergocryptine, ergocristine and their respective epimers).

The developed method was used either for monitoring mycotoxins and ergot alkaloids in feed and raw materials and barley and malt prepared from it. Results of mycotoxins monitoring in various test materials are discussed.

KEYWORDS

Isoprostanes, oxidative stress, *Salmo salar*, salmon, LC-MS, HPLC, arachidonic acid, PUFA, mycotoxins, ergot alkaloids, multimethod, QuEChERS, mass spectrometry, feed, organic farming.

BOLECHOVÁ, M. *Využití hmotnostní spektrometrie ke stanovení markerů oxidativního stresu a mykotoxinů.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 158 s. Vedoucí dizertační práce doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
Podpis studentky

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé dizertační práce doc. Ing. Josefu Čáslavskému, CSc. za odborné vedení dizertační práce, za cenné rady, pomoc, ochotu a vstřícnost. Rovněž bych chtěla také poděkovat prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. za podporu a pomoc během celého studia.

Dále bych ráda poděkovala Dr. Stuartu Gibbsovi za umožnění pobytu v Environmental Research Institute a Dr. Angele Squier za cenné rady při zpracování první části dizertační práce, Dr. Marku Taggertovi a Ing. Petře Doušové za ochotu, díky které bylo možno dokončit první část dizertace a Ing. Daniele Mácové, PhD. za pomoc při vývoji analytického postupu pro sledování isoprostanů.

Další mé poděkování patří vedoucí NRL-RO Ing. Markétě Pospíchalové za umožnění zpracování druhé části dizertace na ÚKZÚZ a Ing. Petře Kosubové, PhD. za neocenitelnou všestrannou pomoc, odborné konzultace a povzbuzování při realizaci exerimentální části měřené pomocí UPLC-MS/MS, Ing. Sylvii Bělákové, PhD. a Ing. Karolíně Benešové, PhD. z Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského za přátelskou spolupráci při zpracování druhé části dizertace a RNDr. Zuzaně Nehybové za vytvoření příjemného pracovního prostředí a motivaci.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za silnou psychickou podporu během celého mého studia.

OBSAH

1. ÚVOD ... 8

2. TEORETICKÁ ČÁST ... 9
2.1 Příprava vzorku k analýze ... 9
2.2 Vybrané chromatografické metody ... 12
2.3 Rozdíl mezi UHPLC a HPLC ... 14
2.4 Spektrofotometrické detektory ... 17
2.5 Hmotnostní spektrometrie ... 18

TÉMA A ... 24

3. TEORETICKÁ ČÁST ... 25
3.1 Oxidativní stres ... 25
3.2 Biologická funkce lipidů ... 25
3.3 Oxidace lipidů ... 26
3.4 Markery oxidativního stresu ... 28
3.5 Metody pro analýzu isoprostanů ... 30
3.6 Antioxidativní ochrana organismu ... 34
3.7 Oxidativní stres a úhyn lososích jiker ... 35

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST ... 36
4.1 Popis experimentu ... 36
4.2 Použité chemikálie ... 37
4.3 Použitá instrumentace pro analýzy ... 37
4.4 Další použitá zařízení ... 38
4.5 Příprava vzorků pro sledování oxidativního stresu v jikrách *Salmo salar* ... 38
4.6 HPLC-PDA analýza astaxanthinu ... 39
4.7 GC-MS analýza mastných kyselin ... 39
4.8 LC-MS/MS analýza isoprostanů ... 40
4.9 Statistické zpracování experimentálních dat ... 40

5. VÝSLEDKY A DISKUZE ... 41
5.1 Optimalizace metod ... 41
5.2 Validace metod pro sledování astaxanthinu, mastných kyselin a isoprostanů ... 46
5.3 Analýza mastných kyselin ... 47
5.4 Analýza astaxanthinu v lososích jikrách ... 51
5.5 Analýza isoprostanů v lososích jikrách ... 51

6. ZÁVĚR ... 54

TÉMA B **55**

7. TEORETICKÁ ČÁST **56**
7.1 Mykotoxiny 56
7.2 Účinek mykotoxinů na zdraví lidí a zvířat 58
7.3 Hodnocení aktuální situace kontaminace potravin a krmiv mykotoxiny 60
7.4 Regulace přítomnosti mykotoxinů Evropskou unií 61
7.5 Charakteristiky vybraných mykotoxinů 62
7.6 Vzorkování pro analýzu mykotoxinů 70
7.7 Extrakce vzorku a přečištění extraktu 71
7.8 Metody finální analýzy mykotoxinů 72
7.9 Multireziduální metoda jako výzva pro analytiky 74
7.10 Matriční efekt 75

8. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST **77**
8.1 Pomůcky a chemikálie 77
8.2 Obecný popis analyzovaných vzorků 77
8.3 Příprava vzorků pro UPLC-MS/MS analýzu 78
8.4 Analýza mykotoxinů metodou UPLC-MS/MS 78
8.5 Statistické zpracování experimentálích dat 79

9. VÝSLEDKY A DISKUZE **80**
9.1 Optimalizace MRM podmínek pro stanovení ergotových alkaloidů 80
9.2 Validace multimetody pro stanovení mykotoxinů 80
9.3 Validace multimetody pro stanovení ergotových alkaloidů 84
9.4 Monitoring mykotoxinů v krmivech a v surovinách pro jejich výrobu 85
9.5 Společný výskyt mykotoxinů 97
9.6 Monitoring aflatoxinů ve vzorcích krmné kukuřice 99
9.7 Mykotoxiny v ekologickém a konvenčním zemědělství 100
9.8 Studium výskytu mykotoxinů v ječmeni a ječném sladu z české produkce 101
9.9 Monitoring ergotových alkaloidů v krmivech a surovinách pro jejich výrobu 108

10. ZÁVĚR **114**

11. ABECEDNÍ SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK **115**

12. POUŽITÁ LITERATURA **118**

13. SEZNAM PŘÍLOH **135**

14. PŘÍLOHY **136**
14.1 Výkonnostní kritéria metody pro současné stanovení 17 mykotoxinů 136
14.2 Životopis 154
14.3 Vědecké aktivity 155
14.4 Publikační činnost 157

1. ÚVOD

Předložená práce se zabývá využitím separačních technik ve spojení s hmotnostně spektrometrickou detekcí pro řešení dvou odlišných témat.

V první části této dizertační práce byla ve spojení se separační technikou použita hmotnostní spektrometrie pro analýzu markerů oxidativního stresu a dalších biologicky významných látek v jikrách lososa obecného (*Salmo salar*). Tato práce byla částečně řešena v Environmental Research Institute, UHI (University of Highlands and Islands) v Thursu (Skotsko, UK) a v Ústředním kontrolním a zkušebním ústavu zemědělském (ÚKZÚZ) v Brně na pracovišti Národní referenční laboratoře Regionálního oddělení (NRL-RO).

Studiem oxidativního stresu se zabývá mnoho vědních oborů, neboť je s ním spojován rozvoj karcinogeneze, poškození nervů nebo vznik kardiovaskulárních onemocnění. U některých živočichů se v přítomnosti oxidativního stresu projevují dokonce i určité specifické reakce, jako jsou například blednutí korálů nebo úhyn raných vývojových stadií lososovitých ryb, označovaný jako syndrom M74.

Studium oxidativního stresu lze v dnešní době provádět několika možnými metodami. Jednou z nich je sledování produktů oxidace kyseliny arachidonové přítomné v buněčných membránách organismů. V důsledku působení oxidativního stresu se procesem lipidní peroxidace této nenasycené mastné kyseliny vytvářejí tzv. isoprostany, které mohou být díky moderním analytickým metodám stanovovány. Přítomností oxidativního stresu jsou ovlivňovány i další látky.

Tato studie se zabývala vývojem a aplikací vhodné metodiky pro sledování markerů oxidativního stresu – isoprostanů, polynenasycených mastných kyselin, zejména pak kyseliny arachidonové a astaxanthinu v biologickém vzorku. Porovnání hladin sledovaných analytů mezi kontrolní a testovanou skupinou lososích jiker mělo odpovědět na otázku, zda jejich životaschopnost mohla být ovlivněna v důsledku přítomnosti oxidativního stresu.

V druhé části dizertační práce byla hmotnostní spektrometrie ve spojení s kapalinovou chromatografií použita pro sledování mykotoxinů. Tato studie byla zpracovávána v ÚKZÚZ v Brně na pracovišti NRL-RO.

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity plísní, které negativně ovlivňují organismus, jedná se o jedny z nejvýznamnějších přírodních kontaminantů potravin a krmiv. Jejich přítomnost je celosvětově sledována jak kontrolními orgány a výzkumnými organizacemi, tak i výrobci potravin a krmiv, protože kontaminované komodity mohou být jejich přítomností znehodnoceny, což způsobuje nezanedbatelné ekonomické ztráty.

V současnosti je popsáno více než 500 druhů mykotoxinů, produkovaných velmi širokým spektrem houbových patogenů. V potravinách a krmivech je však kontrolován a legislativně upravován výskyt jen několika málo z nich. V krmivech reguluje Evropská legislativa množství aflatoxinu B1, fumonisinů, ochratoxinu A, deoxynivalenolu a zearalenonu. Od roku 2013 jsou také legislativně regulovány T-2 a HT-2 toxin. Velká pozornost je věnována také dalším mykotoxinům, neboť získané údaje o jejich výskytu a toxikologickém působení mohou být základem pro nastavení vhodných regulujících limitů, které ochrání spotřebitele a zároveň navíc nepoškodí samotnou obchodovatelnost kontaminovaného materiálu. Evropský úřad pro potravinovou bezpečnost (EFSA) v současné době vyzývá ke sledování např. nivalenolu, enniatinů, beauvericinu a ergotových alkaloidů.

Předkládaná práce představuje levnou, rychlou a dostatečně citlivou metodu pro současnou analýzu legislativně regulovaných i nově sledovaných mykotoxinů v krmivech a ostatních zemědělských komoditách.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Příprava vzorku k analýze

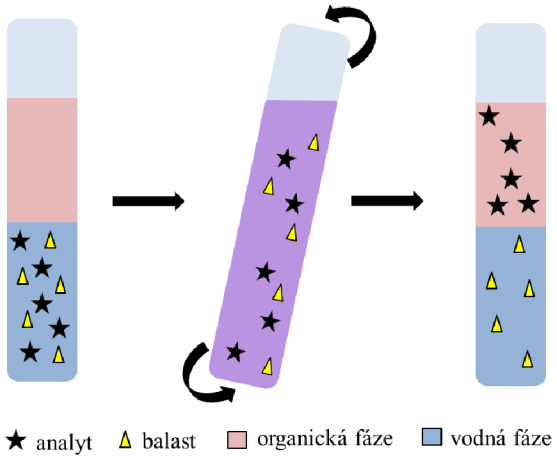
Většinu surových vzorků nelze analyzovat přímo. Vzorky jsou často velmi komplexní materiály a obsahují množství balastních látek nebo interferentů, které mohou značně znesnadňovat analýzu.

Postup zpracování vzorku závisí na charakteru sledovaných analytů, požadovaných limitech na jejich stanovení, legislativních požadavcích, složitosti matrice a použité analytické koncovce (popř. ovlivnění její životnosti). Komplexní matrice, jako jsou například potraviny, krmiva nebo biologické vzorky tkání, se často před chromatografickou analýzou upravují tak, aby byly cílené látky izolovány, přečištěny od nežádoucích koextraktů a v případě nutnosti také zkoncentrovány. Hlavními koextrakty izolovanými z biotických matric jsou různé typy pigmentů (chlorofyly, karotenoidy, anthokyany...), lipidické sloučeniny (triacylglyceroly, fosfolipidy, vosky...), bílkoviny, složky silic, různé pryskyřice a další látky extrahovatelné do organických rozpouštědel, které mohou významně ovlivňovat analýzu [1].

Úprava vzorku pro analýzu je, kromě samotného vzorkování, nejkritičtějším a zároveň časově nejnáročnějším krokem, který zabírá obvykle až 61 % časové náročnosti celého analytického postupu [2]. Techniky úpravy vzorku by měly být proto jednoduché, rychlé, ekonomické, a pokud možno robustní (ve smyslu aplikovatelnosti na různé druhy matric). V poslední době se také klade důraz na to, aby byly metody ekologické, tj. s nízkou spotřebou rozpouštědel, a to navíc takových, která jsou šetrná k životnímu prostředí. Často se lze setkat i s požadavkem na co nejnižší spotřebu vzorku k analýze, avšak za předpokladu zachování jeho reprezantativnosti. Metody pro úpravu vzorku jsou proto předmětem neustálého vývoje a zdokonalování.

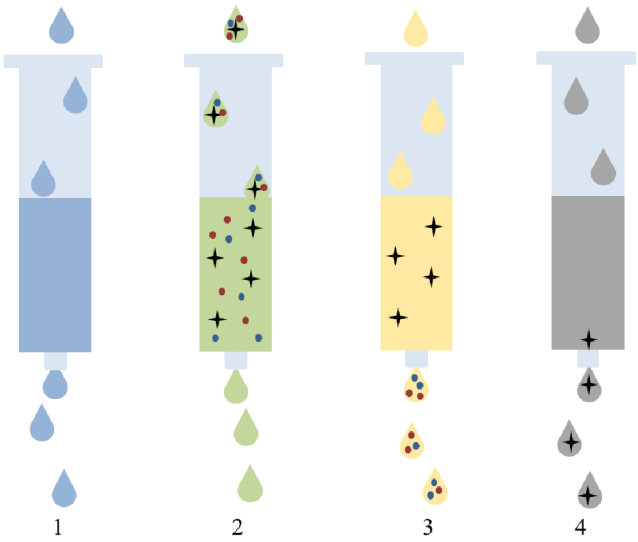
2.1.1 Vybrané příklady přípravy vzorku k chromatografické analýze

Jednou z prvních technik vyvinutých pro úpravu vzorku byla **extrakce z kapaliny do kapaliny** (Obrázek 1), která stále patří mezi nejčastěji používané postupy. V principu se jedná o převedení analytu z vodné fáze do organického rozpouštědla, které musí být s vodou nemísitelné na bázi rozdělovacího koeficientu voda/oktanol.



Obrázek 1: Schematické znázornění ektrakce kapalina – kapalina. Organické rozpouštědlo: hexan.

Tato technika bývá většinou nenáročná jak na provedení, tak na přístrojové vybavení. Komplikovanější, ale v současné době také velmi často používaná, je technika úpravy vzorku **extrakcí na tuhou fázi (SPE)**. Extrakce analytu pomocí SPE probíhá na principu interakce mezi tuhou fází a kapalinou. Podmínkou je, aby měl analyt větší afinitu k tuhé fázi než k matrici vzorku. Princip SPE je schematicky uveden na Obrázku 2.



Obrázek 2: Schematické znázornění průběhu extrakce na tuhou fázi (SPE): Kondicionace kolonky (1), nanášení vzorku (2), promývání vzorku – odstranění matričního balastu (3), eluce analytů (4).

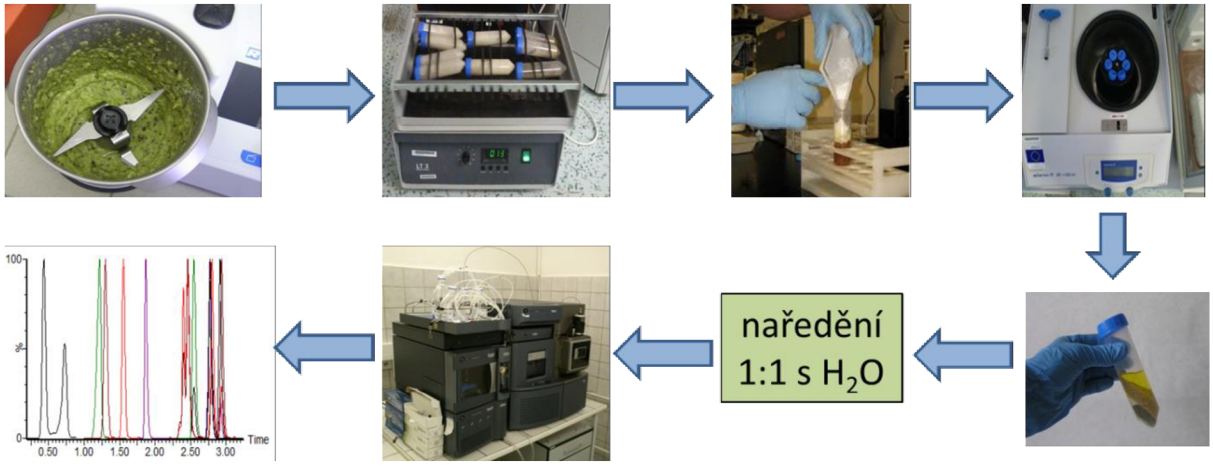
Tato technika je velmi účinná. Její výhodou je vysoká výtěžnost, možnost koncentrace analytů a nízká spotřeba organických rozpouštědel. Existuje několik možností jak při SPE pracovat. Pro funkci se používá působení vnějšího tlaku, podtlaku, nebo využití samotné gravitace. Na trhu se dokonce objevují i automatizované systémy. Náplně kolonek se volí podle účelu analýzy. Jejich výběr je velmi široký, a to od klasických nepolárních C18 a C8, polárních (oxid hlinitý, florisil, …), přes iontově výměnné a polymerní materiály, až po vícemodální sorbenty (obsahují jak nepolární skupinu, tak iontově výměnnou), imunosorbenty nebo molekulárně vtištěné polymery [3].

Extrakty biologických materiálů mohou být navíc upravovány např. **srážením proteinů**. Tímto postupem jsou odstraněny proteiny jak o velké, tak malé molekulové hmotnosti. Tato tzv. precipitace proteinů se provádí například přidáním silných kyselin (HCl, HCOOH, CCl_3COOH, …), přídavkem solí vícemocných iontů ($ZnSO_4$, $CuSO_4$, $BaOH_2$, …), saturací materiálu síranem amonným, atd. Po vysrážení se proteiny obvykle oddělují odstředěním v centrifuze [4].

Uvedené techniky přípravy vzorku byly v dizertaci použity při extrakci markerů oxidativního stresu, astaxanthinu a mastných kyselin ze tkáně lososa obecného (*Salmo salar*).

Citlivost a selektivita instrumentální analytické koncovky se neustálým vývojem přístrojové techniky zdokonaluje, a tak je umožněno sledování několika analytů zároveň i v přítomnosti

dalších matričních koextraktů. Metody, které to umožňují, se nazývají **multireziduální metody**. Jejich účelem je získat komplexní informace o kontaminaci vzorku. Nevhodné přečištění matrice by mohlo zapříčinit nežádoucí ztrátu některých sledovaných analytů. Proto se v takových metodách používají jen jednoduché čistící kroky (např. pomocí aktivního uhlí), nebo žádné, a to v závislosti na tom, jaké fyzikálně-chemické povahy jsou stanovované látky.
Příkladem metody přípravy vzorku, která je vhodná právě pro multireziduální stanovení, je metoda **QuEChERS**. Název této metody je odvozen z anglických slov, které tuto techniku charakterizují: Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged a Safe. Jedním z autorů QuEChERS metody je Michelangelo Anastassiades, který ji původně vyvinul pro skupinové stanovení pesticidů v potravinách a krmivech [5]. Metoda se stala velmi oblíbenou a dočkala se i mnoha modifikací uplatňujících se i při analýzách jiných látek, jako například perfluoroalkylovaných kyselin, mykotoxinů a alkaloidů [6-8]. Ve své podstatě se jedná o velmi jednoduchou, praktickou, časově nenáročnou, levnou a ekologickou metodu přípravy vzorku. Tato metoda zahrnuje extrakci analytů do směsi acetonitrilu s vodou, vysolení analytů do acetonitrilové fáze pomocí přídavku solí (zvýšením iontové síly vodného roztoku), odstranění vodné fáze a stanovení obsahu analytů v acetonitrilové fázi pomocí instrumentálně analytických technik (Obrázek 3). Acetonitrilový extrakt může být přečištěn například pomocí přídavku sorbentů (primární a sekundární aminy, C-18, aktivní uhlí, …). K jistému druhu přečištění dochází již při samotném vysolení analytů do acetonitrilové vrstvy, kdy polárnější látky z matrice zůstávají rozpuštěné ve vodné fázi, a tak lze surový nebo naředěný extrakt analyzovat přímo.
Přes všechny pozitivní aspekty, které multireziduální metody poskytují, se ovšem musí brát v úvahu, že jedním z problémů, vyplývajícím z přítomnosti netěkavých nečistot v nečištěných vzorcích je např. postupný pokles účinnosti chromatografické kolony nebo ovlivnění signálu analytu přítomností matrice [1].



Obrázek 3: Schema extrakce metodou QuEChERS zahrnující kroky: mletí vzorku, extrakce ve směsi acetonitril/voda, přídavek solí, centrifuga, separace vodné fáze od organické, ředění acetonitrilové fáze a finální analýza.

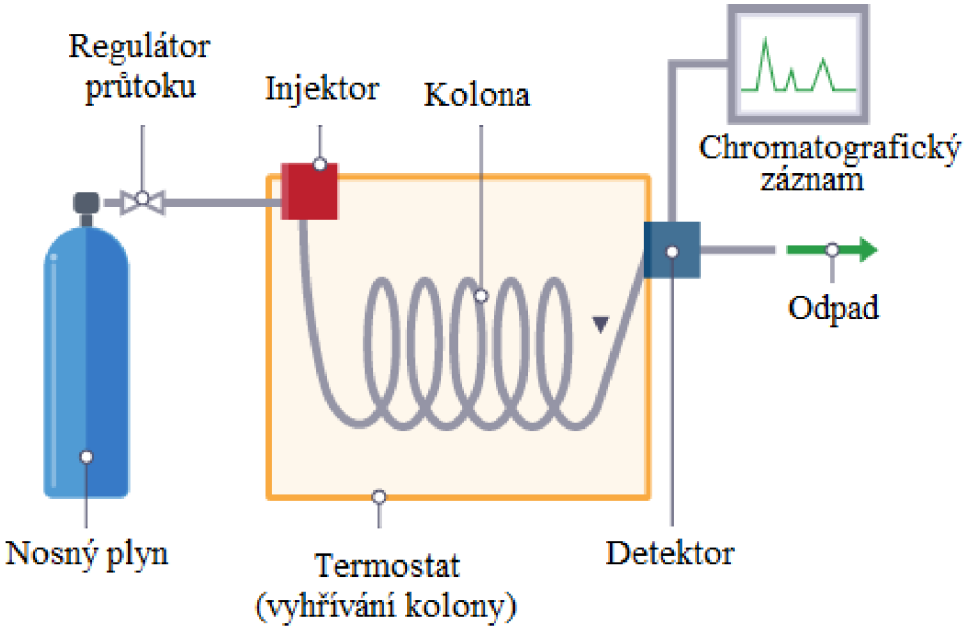
Multireziduální postup nabízí vždy kompromis, který zohledňuje aspekty ekonomické (spotřeba materiálů a chemikálií, časová úspora) a celkovou robustnost stanovení [1]. Modifikovaná QuEChERS metoda byla použita pro analýzu mykotoxinů v krmivech a zemědělských komoditách.

Pro separaci analytů získaných extrakcí vzorku byly v této práci použity chromatografické techniky, které budou blíže diskutovány v následujícím textu.

2.2 Vybrané chromatografické metody

Separační techniky jsou založeny na distribuci složek směsi na základě jejich rozdílných fyzikálně-chemických vlastností. Plynová a kapalinová chromatografie využívá mechanismu rozdělování složek mezi dvě různé nemísitelné fáze; mobilní (pohyblivou) fázi a stacionární (nepohyblivou) fázi. Vzorek je soustavou unášen pohybující se mobilní fází. Dělené složky vzorku v různé míře interagují se stacionární fází (v kapalinové chromatografii také s mobilní fází). Složky, které se poutají ke stacionární fázi více, se pohybují pomaleji a mají větší zádrž, než analyty, které se ke stacionární fázi poutají méně. Tímto mechanismem dochází k rozdělení složek směsi, které dále putují k detektoru, jehož odezva je přímo úměrná množství dané látky. Výsledným záznamem analýzy je chromatogram, na kterém jsou zaznamenány jednotlivé signály jako tzv. píky. Čas, který setrvává analyt v systému, tedy doba od nástřiku po maximum daného píku, se nazývá retenční čas – RT, který je kvalitativní informací. Kvantitativní charakteristikou daného analytu je plocha příslušného píku, případně jeho výška. Při spojení chromatografu s hmotnostním spektrometrem se může navíc získat kvalitativní informace ve formě hmotnostního spektra.

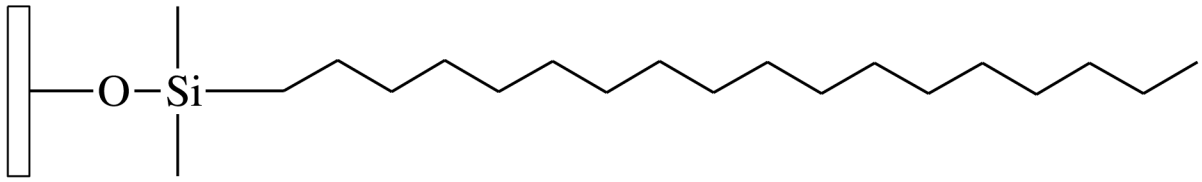
V **plynové chromatografii** (GC) se jako mobilní fáze používá plyn (např. He, Ar, N_2, H_2, atd.). K separaci látek dochází na křemenných kapilárních kolonách pokrytých vrstvou polyimidu, který ji chrání před poškozením. Kapiláry mají různý vnitřní průměr (od 0,1 do 0,53 mm), délku (nejčastěji od 10 do 100 m) a tloušťku filmu stacionární fáze (od 0,1 do 5 µm). Stacionární fáze je obvykle tvořena polydimethylsiloxany (nepolární), polydifenyl-dimethylsiloxany (mírně až středně polární) nebo polyethylenglykolem (polární). Dalšími součástmi plynových chromatografů je zdroj nosného plynu, regulátor průtoku plynu, injektor, termostat, detektor a řídící a vyhodnocovací zařízení. Příklad uspořádání součástí je zobrazen na Obrázku 4.



Obrázek 4: Schéma uspořádání plynového chromatografu (upraveno dle [9]).

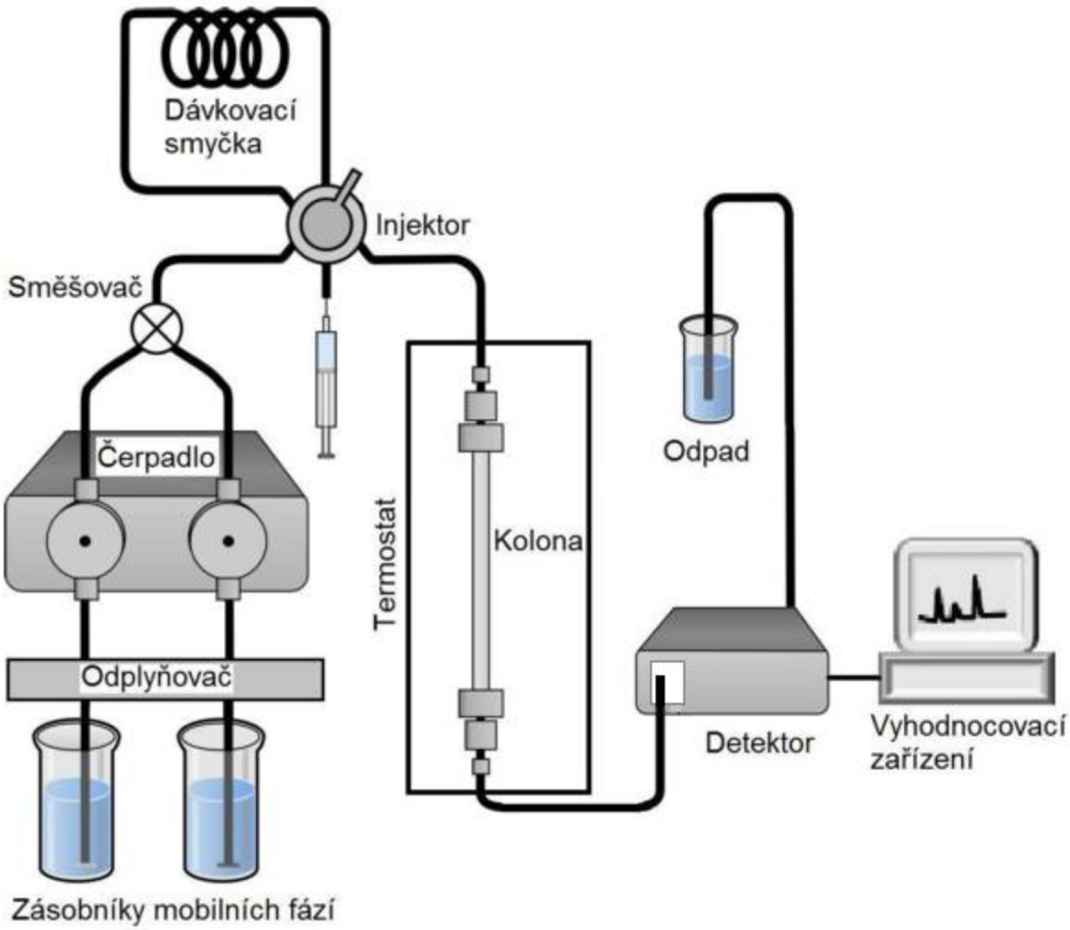
Plynová chromatografie je vhodná pro separaci tepelně stabilních, těkavých nebo polotěkavých nízkomolekulárních sloučenin a plynů. V dizertační práci byla plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) použita pro separaci esterů mastných kyselin obsažených v rybí tkáni.

Pro stanovení isoprostanů, astaxanthinu a mykotoxinů byla v této práci použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).
Touto technikou lze analyzovat ionty, polární i nepolární látky, málo těkavé, tepelně nestabilní a vysokomolekulární sloučeniny.
V kapalinové chromatografii je mobilní fází vždy kapalina, která je v HPLC uspořádání přiváděna do systému pomocí vysokotlakého čerpadla. Podle účelu analýzy se mobilní fáze používají buď polární, nebo nepolární rozpouštědla a jejich směsi. Při dělení směsi analytů v systému se uplatňuje jednak sorpce analytů na stacionární fázi, interakce mobilní fáze se stacionární fází a interakce analytů s mobilní fází. Proto lze, na rozdíl od plynové chromatografie, ovlivňovat separaci látek také složením mobilní fáze.
Stacionární fáze může být buď tuhá látka (adsorpční, iontoměničová, gelová a afinitní chromatografie), nebo kapalina zakotvená na tuhém nosiči (rozdělovací chromatografie) [4].
Stacionární fáze je umístěna v koloně s kovovým pláštěm. Kolony se můžou lišit délkou (nejčastěji v rozmezí od 3 – 30 cm), vnitřním průměrem (nejčastěji mezi 2 až 4,6 mm) a velikostí částic (obvykle 3 – 10 μm). Pokud je zakotvená fáze polárnější než mobilní fáze, hovoříme o chromatografii na **normálních fázích**. Častěji se však používají zakotvené organické kapaliny o nízké polaritě a tehdy hovoříme o chromatografii v systému **obrácených fází**. Toto uspořádání bylo použito i při chromatografických separacích v této dizertační práci. Nejčastěji používanou stacionární fází v systému obrácených fází je povrchově modifikovaný silikagel. Modifikace probíhá chemickým navázáním nepolární fáze s alkylovými řetězci o různé délce (C_2 – C_{30}). Na Obrázku 5 je schematicky znázorněna nejrozšířenější stacionární fáze, kterou je chemicky vázaný alkyl C18 (oktadecylsilikagel).



Obrázek 5: Silikagel povrchově modifikovaný oktadecylem.

Dalšími součástmi kapalinového chromatografu jsou čerpadlo, zásobníky se složkami mobilní fáze, odplyňovač mobilní fáze, dávkovač vzorku, kolona, termostat, detektor a vyhodnocovací zařízení [10]. Schematické znázornění řazení jednotlivých komponent LC systému je zobrazeno na Obrázku 6.



Obrázek 6: Schéma uspořádání kapalinového chromatografu [11].

Při vývoji chromatografické metody se dbá nejen na to, aby byla zachována selektivita a citlivost analýzy. Moderní přístupy navíc vyžadují nízkou finanční náročnost metody a možnost práce v souladu s přístupy tzv. zelené analýzy, jejíž snahou je šetrnost k životnímu prostředí. Z těchto a dalších důvodů je snaha o zkrácení doby analýzy, tedy snaha o co nejrychlejší chromatografické separace a s tím i docílení nižšího množství použitých rozpouštědel. Řešení přináší nové trendy zaváděné v chromatografické analýze jako například vysokoúčinná kapalinová chromatografie za zvýšené teploty, separace pomocí monolitických stacionárních fází nebo povrchově porézních částic, popřípadě zmenšování částic chromatografického sorbentu pod 2 µm, které je často využíváno v UHPLC (ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie).

2.3 Rozdíl mezi UHPLC a HPLC

Mírou účinnosti kolony je počet teoretických pater (bezrozměrná veličina *N*). Čím větší je počet teoretických pater, tím méně je rozšířena zóna analytu, a tím je kolona účinnější. Počet teoretických pater je závislý na délce kolony, retenčním čase, rychlosti průtoku mobilní fáze, velikosti částic náplně kolony, teplotě a viskozitě mobilní fáze. Pro praktické účely lze pro výpočet počtu teoretických pater použít rovnici:

$$N = 5{,}545\left(\frac{t_R}{w_{50}}\right)^2, \tag{1}$$

kde w_{50} je šířka píku v polovině výšky (vyjádřená v jednotkách délky nebo času) a t_R je retenční čas, opět vyjádřený ve stejných jednotkách [4].

Účinnost kolony se vyjadřuje pomocí výškového ekvivalentu teoretického patra H (HETP – Height Equivalent to a Theoretical Plate):

$$H = \frac{L}{N} \tag{2}$$

kde L je délka kolony [4].

Příspěvky jednotlivých procesů k výškovému ekvivalentu teoretického patra (a tedy k rozšiřování zón separovaných látek při průchodu chromatografickým ložem) vyjadřuje van Deemterova teorie (též označovaná jako difuzní nebo dynamická teorie chromatografie [12], která rozlišuje 3 příspěvky: turbulentní difuze, molekulární difuze a odpor vůči převodu hmoty.
Turbulentní difuze (označovaná jako A) je způsobena migrací molekul separovaných látek mezi částečkami náplně, přičemž díky nepravidelnostem mohou být různé molekuly transportovány po různých drahách lišících se délkou. Tento příspěvek je nezávislý na průtokové rychlosti mobilní fáze a je dán vztahem:

$$A = 2\lambda d_p \tag{3}$$

kde λ je geometrický faktor charakterizující kvalitu naplnění kolony a d_p je průměr částeček náplně.
Molekulární difuze (člen B) je migrace molekul z místa o vyšší koncentraci (což je zóna separované látky) do míst o nižší koncentraci. Tento člen je vyjádřen vztahem:

$$B = 2\gamma D_g \tag{4}$$

kde γ je tzv. faktor tortuozity (charakterizuje omezení difuze, která může probíhat jen ve volném směru v kanálcích mezi částečkami náplně), D_g je difuzní koeficient solutu v mobilní fázi. Velikost tohoto příspěvku je přímo úměrná času, po který difuze probíhá, je tedy nepřímo úměrná průtokové rychlosti mobilní fáze.
Odpor vůči převodu hmoty ve stacionární fázi je způsoben difuzí molekul separovaných látek od povrchu dovnitř kapalné stacionární fáze a je charakterizován rovnicí:

$$C_S = \frac{8}{\pi}\frac{k d_f^2}{(1+k)^2} \tag{5}$$

kde k je retenční faktor, d_f je tloušťka filmu stacionární fáze. Příspěvek odporu vůči převodu hmoty v mobilní fázi je vysvětlován parabolickým profilem hydrodynamicky vyvolaného toku mobilní fáze, kdy molekuly ve středu kanálku se pohybují rychleji než molekuly těsně u povrchu částeček. Tento jev popisuje vztah:

$$C_M = \frac{\left(1+6k+11k^2\right)d_p}{24\left(1+k\right)^2} \tag{6}$$

kde d_p je velikost částečny náplně. Odpor vůči převodu hmoty je přímo úměrný průtokové rychlosti mobilní fáze.

Souhrnným vyjádřením těchto příspěvků je van Deemterova rovnice:

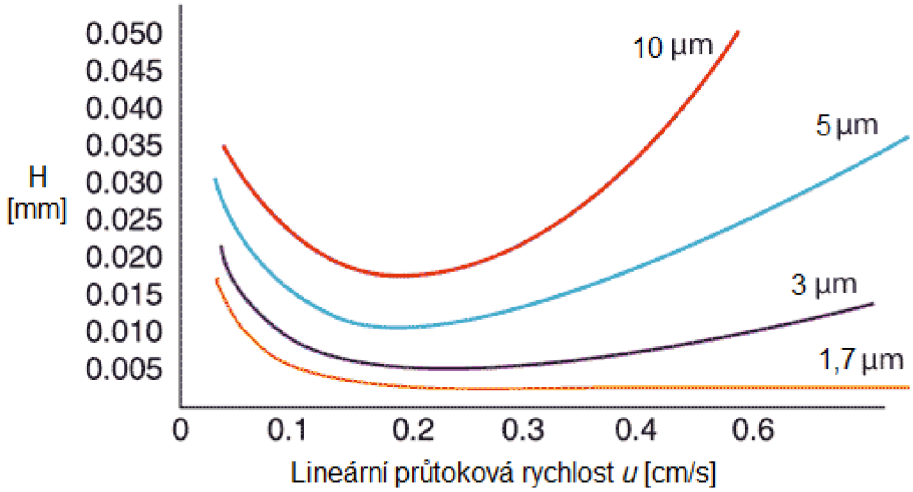
$$\mathrm{H} = \mathrm{A} + \frac{\mathrm{B}}{\mathrm{u}} + \left(\mathrm{C_S} + C_M\right)\cdot \mathrm{u}\,, \tag{7}$$

kde u je lineární rychlost mobilní fáze [cm/s].

Na základě van Deemterovy teorie je minimální výškový ekvivalent teoretického patra kolony závislý na velikosti částic náplně kolony:

$$\mathrm{H_{min}} \approx 1{,}48\,\mathrm{d_p} \tag{8}$$

Na Obrázku 7 jsou znázorněny van Deemterovy křivky pro čtyři různé velikosti běžně používaných částic 10, 5, 3 a 1,7 µm.



Obrázek 7: Van Deemterova křivka pro částice o průměru 10, 5, 3 a 1,7 µm. Minimum křivky odpovídá optimální průtokové rychlosti. Daná kolona tehdy vykazuje největší účinnost a minimálně rozšiřuje zóny analytů [13].

S použitím menších částic stacionární fáze roste účinnost separace (neboli zmenšuje se výška teoretického patra *H*) v důsledku zlepšení převodu hmoty a tím potlačeného rozmývání. S použitím malých částic lze dosáhnout vysoké účinnosti separace i při mnohem vyšších průtokových rychlostech, což umožňuje rychlejší analýzy.

Této skutečnosti bylo využito při vývoji nových chromatografických sorbentů s velikostí částic pod 2 µm. Avšak se snižující se velikostí částic se také výrazně snižuje permeabilita

kolony a tím se zvyšují nároky na vstupní tlak nezbytný pro dosažení potřebného průtoku mobilní záze. Proto vznikla nová generace kapalinové chromatografie – ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) [4]. V UHPLC aplikacích jsou běžně používané tlaky nad 60 MPa, zatímco v HPLC instrumentaci se používají tlaky nižší, zpravidla do 40 MPa. V UHPLC instrumentaci jsou tedy kladeny vysoké nároky na čerpadla. Systém musí zároveň splňovat i další požadavky například na robustní dávkování, rychlé dávkovací cykly, přesné dávkování malých objemů (například 1 µl), co nejmenší zpoždění gradientu, vysokou frekvenci sběru dat, minimální mimokolonové objemy (např. použitím kapilár s menším vnitřním průměrem, kratší dráhy kapilár), vhodné stacionární fáze, které budou mechanicky stabilní i při vysokých tlacích.
Na trhu je již několik UHPLC systémů. Pojem ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie má v odborné literatuře hned několik ekvivalentů a zkratek, jako například UHPLC, U(H)PLC, ultra-HPLC, u-HPLC, nebo ultra-účinná kapalinová chromatografie se zkratkou UPLC, která je momentálně registrovanou značkou firmy WATERS. Ve všech případech se jedná o systémy umožňující práci při vyšších tlacích, než by umožňovala konvenční HPLC [4].
Díky této technologii lze zkrátit analýzy až devětkrát, citlivost zlepšit třikrát a dvakrát lze zlepšit rozlišení. Takové zrychlení se projeví nejen v úspoře energie a času, ale také ve výrazné úspoře organických rozpouštědel, a tedy i v nákladech na jejich bezpečnou likvidaci [14].

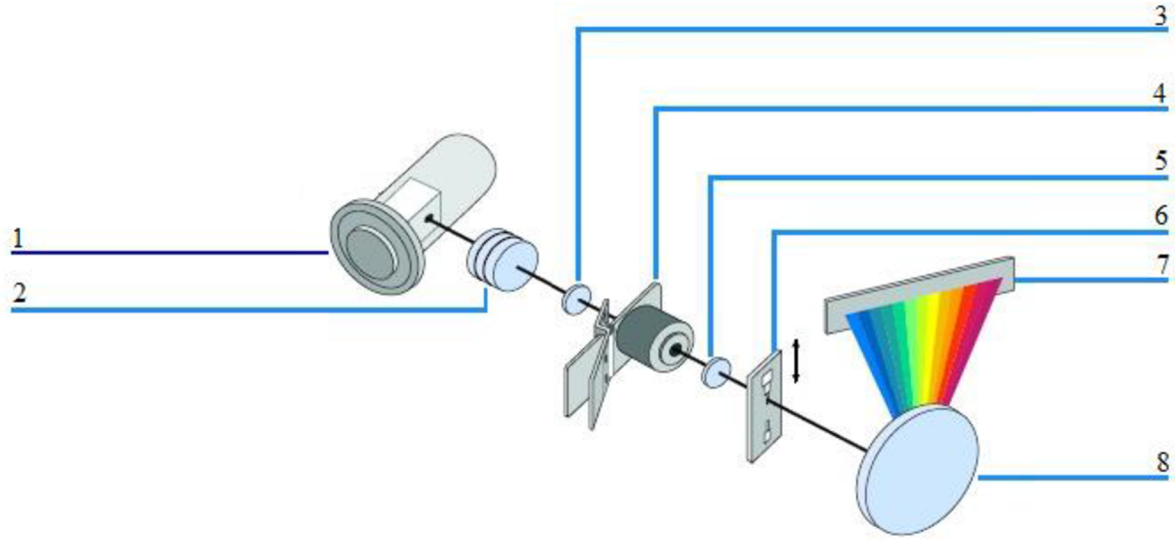
2.4 Spektrofotometrické detektory

Spektrofotometrický detektor měří absorbanci záření v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm. Při absorpci záření v ultrafialové (190 – 400 nm) a viditelné oblasti (400-800 nm) je energie absorbovaných fotonů spotřebována na přechod molekuly ze základního do energeticky bohatšího excitovaného stavu. Látka může absorbovat záření, pokud ve své molekule obsahuje valenční elektrony o dostatečně nízké excitační energii. Skupina s takovými elektrony se označuje jako tzv. **chromofor.** Vhodnými rozpouštědly pro měření spekter látek je například voda, nasycené uhlovodíky, alkoholy, ethery, estery, kyseliny a další látky, které chromoforní skupiny neobsahují.
Kvantitativní vyhodnocení je založeno na Lambert-Beerově zákoně:

$$A = \varepsilon . c . l, \tag{9}$$

kde ε je molární absorpční koeficient, l je tloušťka absorbující vrstvy, c je koncentrace absorbující složky a A je absorbance. Molární absorpční koeficient je konstanta charakteristická pro každou látku. K její změně dochází se změnou koncentrace látek ve vzorku a se změnou délky absorpční vrstvy [4].

V této dizertační práci byl použit **detektor s diodovým polem** (photodiode-array, PDA, DAD), který umožňuje snímat celé spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace. Záření ze zdroje je po průchodu měřící celou detektoru spektrálně rozloženo holografickou mřížkou. Na každou z fotodiod pak dopadá záření o určité vlnové délce, které je zeslabeno absorpcí v cele detektoru. Schéma detektoru s diodovým polem je znázorněno na Obrázku 8.



Obrázek 8: Schéma detektoru s diodovým polem. Deuteriová výbojka (1), čočka (2), clona (4), průtočná cela (4), čočka (5), štěrbina (5), konkávní holografická mřížka (7) a diodové pole (8) (upraveno dle [13]).

Každá fotodioda je spojena s kondenzátorem, který je předem nabitý na určitou hodnotu. Fotoelektrický proud, který vzniká po dopadu záření na diodu, pak vybíjí kondenzátor, přičemž míra vybití je úměrná intenzitě dopadajícího záření. V další fázi se kondenzátory dobíjí a měří se proud, který je k tomu potřebný. Velikost tohoto proudu se ukládá do paměti řídící jednotky. Tato sekvence vybíjení a dobíjení se velmi rychle opakuje (typicky 10× za sekundu) a proto mohou být zaznamenány údaje o absorbanci při každé vlnové délce v každém okamžiku. Spektrální rozlišení je dáno počtem diod v poli, kterých je nejčastěji 1024 [4, 15].

2.5 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je destruktivní strukturně analytická metoda. Touto technikou lze určit hmotnost atomů, molekul a molekulových fragmentů, a to na základě spektrálního záznamu iontů. Tato technika je tedy jednou z metod, umožňující získání informace o struktuře látky.

Hlavními částmi hmotnostního spektrometru (MS) jsou iontový zdroj, který slouží pro převedení molekul na ionty (ionizace), hmotnostní analyzátor pro separaci iontů podle *m/z* (hmotnost/náboj), detektor pro detekci iontů a zesílení signálu, počítač se softwarem pro ovládání systému, sběr a zpracování dat.

Ionty jsou vysoce reaktivní a nesmí docházet k jejich srážkám s jinými molekulami (např. se složkami vzduchu), proto je nesmírně důležité, aby se ionty pohybovaly ve vysoce kvalitním vakuu (např. 10^{-6} Pa). Nedílnou součástí každého hmotnostního spektrometru je tedy i vakuový systém. Kromě těchto částí je hmotnostní spektrometr vybaven také iontovou optikou sloužící k urychlení a fokusaci iontů a zařízením pro zavádění vzorku.

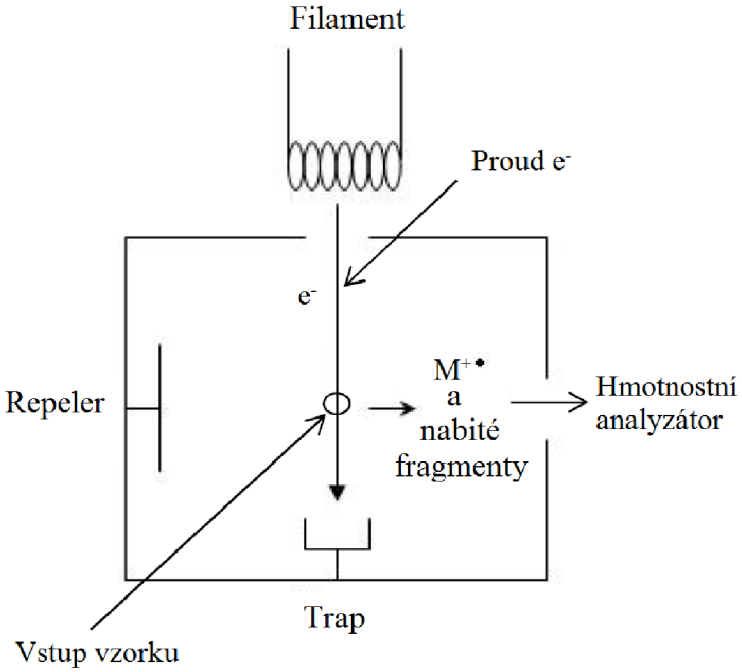
Hmotnostně spektrometrická technika je vysoce variabilní, navíc ji lze uplatnit jak samostatně, tak ve spojení s dalšími separačními metodami, kde slouží jako detektor. Během let byly hmotnostní spektrometry natolik zdokonaleny, že se staly standardními detektory pro

nejrůznější aplikace v environmentálních, potravinových, materiálových, farmakologických, bioanalytických, forenzních a dalších vědách.

V následující části budou podrobněji představovány příklady technik hmotnostně spektrometrické detekce, které byly použity při řešení této dizertační práce.

2.5.1 Ionizační techniky

Pro ionizaci širokého spektra analytů neexistuje univerzální ionizační technika. Proto existuje celá řada technik, jejichž aplikace je ovlivněna především fyzikálně chemickými vlastnostmi stanovovaných látek (např. termální stabilita, polarita, těkavost, molekulová hmotnost).
Základní dělení ionizačních technik je podle množství dodané energie. V případě, že je energetický přebytek dodaný molekule malý, pravděpodobnost fragmentace primárně vzniklého iontu je nízká. Takové techniky se označují jako tzv. **měkké** ionizační techniky. Použitím mnohem vyšší energie při ionizaci, dochází k rozsáhlejší fragmentaci primárně vzniklého iontu. Tato technika se označuje jako tzv. **tvrdá** ionizační technika.
Elektronová ionizace (EI) je zástupcem tvrdých ionizačních technik a je jednou z nejrozšířenějších technik ionizace organických sloučenin (Obrázek 9) [16, 17].

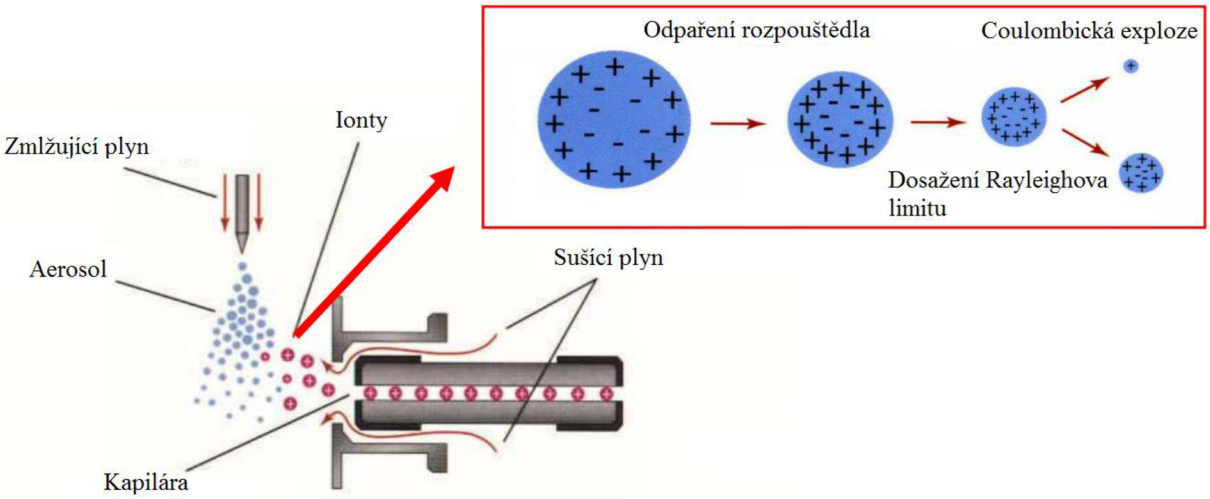


Obrázek 9: Schematické znázornění elektronové ionizace.

Výhodou aplikace elektronové ionizace je existence databází knihoven spekter. Na základě porovnání hmotnostního spektra neznámé látky s knihovnou spekter může být snadno určena její identita. Nejznámějšími databázemi jsou NIST (National Institute of Standards and Technology) a Wiley Registry of Mass Spectral Data, které obsahují přes půl milionu hmotnostních spekter.
Možnost vytváření těchto knihoven spekter je daná tím, že k ionizaci látky dochází vždy stejným mechanismem. Při elektronové ionizaci je molekule proudem elektronů (emitovaných z wolframového nebo rheniového vlákna) dodán velký přebytek vnitřní energie (nejčastěji

70 eV), v důsledku čehož se uvolní valenční elektron, vzniká radikálkation $M^{+\bullet}$ a zároveň dochází k rozsáhlému rozpadu molekuly na menší nabité a nenabité fragmenty.
Elektronovou ionizaci lze aplikovat pouze v případě, je-li stanovovaná látka v plynné fázi. Proto je tento typ ionizace často využíván ve spojení s plynovou chromatografií.

Pro měkké ionizační techniky žádné knihovny spekter neexistují. Vzniklá spektra se totiž mohou výrazně lišit v závislosti na použité ionizační technice, podmínek ionizace a typu přístroje. Nicméně i tato úskalí se v současné době překonávají při vývoji knihoven spekter pro vysokorozlišovací hmotnostní spektrometry (HRMS) ve spojení s kapalinovou chromatografií.
Jednou z nejpoužívanějších měkkých ionizačních technik ve spojení s HPLC je **ionizace elektrosprejem (ESI)**, při které vznikají kladně nabité protonované molekuly $[M+H]^+$ (popř. sodné, draselné nebo amonné adukty) nebo záporně nabité deprotonované molekuly $[M-H]^-$. Touto technikou se ionizují středně polární až iontové látky za atmosférického tlaku. Analyt v rozpouštědle je přiveden kovovou kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí pohybující se mezi 3 – 5 kV. Kapičky na výstupu kapiláry jsou rozprášeny pomocí zmlžujícího plynu a nesou na svém povrchu velké množství nábojů. Odpařováním rozpouštědla dochází ke zvyšování hustoty povrchového náboje. Při dosažení Rayleightova limitu jsou repulzní síly mezi náboji stejné, jako povrchové napětí kapičky, které ji udržuje pohromadě. Při jeho překročení pak dochází k tzv. Coulombické explozi. Tím vzniknou ještě menší kapičky, mezi kterými je distribuován původní náboj. Opakování tohoto procesu vede až k uvolnění iontů [17, 18]. Schematické znázornění ESI je na Obrázku 10.



Obrázek 10: Schematické znázornění ionizace elektrosprejem.

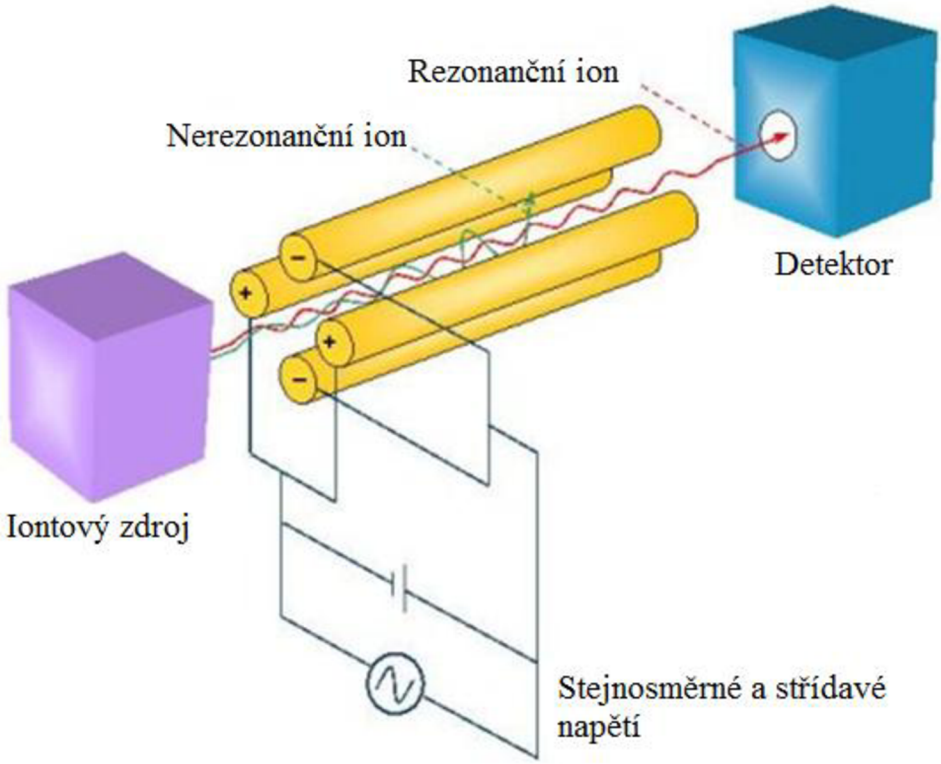
2.5.2 Hmotnostní analyzátory

Hmotnostní analyzátory slouží k rozdělení iontů podle poměru *m/z*. Schopnost separace iontů podle *m/z* je docílena pomocí několika základních fyzikálních principů. K separaci iontů se využívá např. zakřivení dráhy letu iontu v magnetickém nebo elektrickém poli (magnetický nebo elektrostatický analyzátor), oscilace iontů v dvoj- nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí (Q, QqQ, LIT, QIT), různá doba rychlosti letu iontů se stejnou kinetickou energií v oblasti bez pole (TOF), různé absorpce

energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli (ICR) nebo různá frekvence harmonických oscilací (Orbitrap) [4].
Analyzátory jsou charakterizovány následujícími parametry: Hmotnostní rozsah vypovídá o maximální měřitelné hodnotě *m/z*. Schopnost separovat dva sousedící ionty popisuje parametr rozlišení. Podle něj jsou hmotnostní analyzátory děleny na nízkorozlišovací (například jednotkové rozlišení) a vysokorozlišovací (rozlišení na několik desetinných míst). Dalšími parametry jsou správnost hmoty, která charakterizuje míru schopnosti analyzátoru určit správnou hodnotu *m/z*, lineární dynamický rozsah udávající rozsah koncentrací, v nichž je odezva (lineárně) závislá na koncentraci, rychlost záznamu spekter a citlivost.

2.5.2.1 Kvadrupólový analyzátor

Kvadrupólový analyzátor (Q) (Obrázek 11) je nízkorozlišovací hmotnostní analyzátor s hmotnostním rozsahem obvykle do *m/z* 3000 a skenovací rychlostí až do 10 Hz. Tento typ analyzátoru je velice rozšířen a podle Web of Science, ještě nedávno zaujímal 23 % z celkového zastoupení hmotnostních analyzátorů v LC-MS instrumentaci. Jeho oblíbenost v LC-MS, ale i v GC-MS spočívá v konstrukční jednoduchosti a nízkých pořizovacích nákladech.
Skládá se ze čtyř stejných kovových tyčí kruhového průřezu (nebo hyperbolického průřezu pro vyšší rozlišení) o délce 20 – 30 cm. Vždy na dvě protilehlé tyče je přivedeno stejnosměrné kladné napětí a na další dvě protilehlé tyče záporné stejnosměrné napětí. Zároveň je na všechny tyče superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí. Ion přivedený do středu osy kvadrupólu začne oscilovat. V daný časový okamžik pro určitý poměr hodnoty stejnosměrného napětí a amplitudy střídavého napětí jsou oscilace stabilní pouze pro ion s určitým *m/z,* který tak projde kvadrupólem až k detektoru. Všechny ostatní ionty se vybijí o kvadrupólové tyče. Postupnou změnou hodnot stejnosměrného a vysokofrekvenčního napětí jsou na detektor propouštěny všechny ionty v nastaveném rozsahu *m/z* [19]. Díky principu postupného propouštění jednotlivých iontů k detektoru se nazývá tento hmotnostní analyzátor také jako tzv. „kvadrupólový filtr“.
Jednoduchý kvadrupólový analyzátor umožňuje dva typy MS záznamů. **Skenování** v nastaveném rozsahu hmot *m/z* (SCAN) lze využít při screeningových analýzách k identifikaci látek a určení jejich molekulových hmotností. Při spojení LC-MS je signál hmotnostního spektrometru v závislosti na intenzitě zaznamenán jako chromatogram celkového iontového proudu – TIC (total ion current). V každém bodě TIC je zaznamenáno spektrum, které je kvalitativním ukazatelem, protože je charakteristické pro danou sloučeninu. Ze záznamu TIC lze extrahovat chromatogram určitého charakteristického iontu, který slouží k rozlišení koelucí nebo iontů chromatografického pozadí. Takový záznam se nazývá buď rekonstruovaný iontový proud (RIC – reconstructed ion current) nebo **extrahovaný iontový chromatogram** (XIC – extracted ion chromatogram).
Druhým typem MS záznamu je **selektivní záznam vybraného iontu** (SIM – Selected Ion Monitoring). Je-li pro sledování vybráno více iontů, označuje se tento režim jako MID (Multiple Ion Detection). Tyto operační módy jsou díky vysoké citlivosti využívány v cílené a stopové analýze, kdy je známá struktura sledovaných látek.
Režim SCAN je méně citlivý než SIM, protože na proměření každého z iontů je k dispozici menší množství času. Citlivost SCAN se zvyšuje se snižováním skenovacího hmotnostního rozsahu.



Obrázek 11: Schéma kvadrupolového hmotnostního analyzátoru.

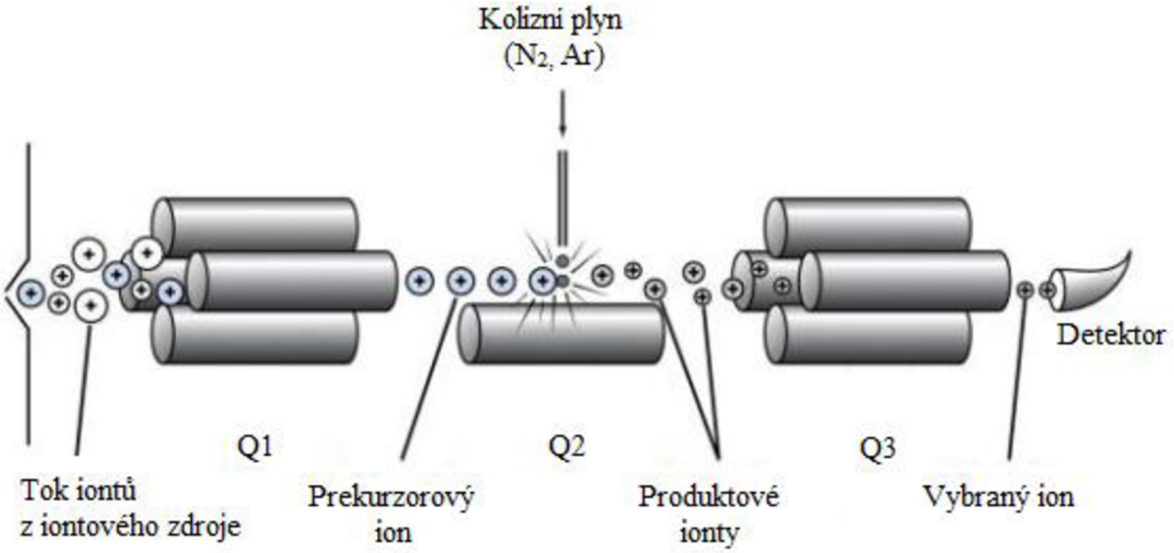
2.5.3 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Tandemová hmotnostní spektrometrie je metoda, která rozšiřuje možnosti klasické hmotnostní spektrometrie, protože se získává další informace o struktuře molekuly. Podle typu hmotnostních analyzátorů může tandemová MS probíhat buď v prostoru (např. trojitý kvadrupól), nebo v čase (např. iontová past). Tandemová MS má uplatnění především při identifikaci a kvantifikaci látek obsažených v komplexních matricích (např. krmivo, potraviny, biologické tkáně) a při objasňování fragmentačních mechanismů [20].
Tandemová MS může být prováděna nejen pomocí téhož typu hmotnostního analyzátoru, ale i zapojením odlišných typů tzv. hybridních analyzátorů. Cílem takového uspořádání je získání nejlepších vlastností z obou druhů analyzátorů (např. Q-TOF).
Předpokladem pro funkci tandemové MS je fragmentace prekurzorů, která může nastat **kolizně indukovanou disociací** (Collision Induced Dissociation, CID) iontu po jeho kolizní excitaci (nejčastěji po srážce s inertním plynem – tzv. kolizní plyn). CID může probíhat již také v iontovém zdroji (in-source CID), avšak bez možnosti výběru iontu prekurzoru.
Pro kvalitativní analýzu a identifikaci jsou obecně vhodnější sférické iontové pasti, neboť umožňují využití mnohostupňové tandemové hmotnostní spektrometrie (MS^n). Pro kvantitativní a rutinní analýzy jsou díky selektivitě a vynikající citlivosti obecně vhodnější trojité kvadrupóly (QqQ).

2.5.3.1 Trojitý kvadrupól

Tandemovou hmotnostní spektrometrii umožňuje například trojitý kvadrupól (QqQ). Jsou to tři kvadrupóly zařazeny v prostoru za sebou. Prostřední kvadrupól (Q_2) slouží jako kolizní cela, do které je zaveden kolizní plyn, který slouží ke kolizně indukované disociaci iontů

vybraných prvním kvadrupólem (Q_1), vzniklé fragmenty jsou analyzovány pomocí třetího kvadrupólu (Q_3). Schematické zobrazení QqQ je uvedeno na Obrázku 12.



Obrázek 12: Zobrazení tandemové hmotnostní spektrometrie MS/MS pomocí QqQ. V Q_1 je vybrán prekurzor, který podléhá CID v Q_2, kde následně probíhá jeho fragmentace. Hmotnostní analýzu následně provádí Q_3 [21].

Trojitý kvadrupól umožňuje měření i dalších typů MS záznamů [4]:

- **Sken produktových iontů** – Q_1 selektivně vybírá prekurzory, které jsou disociovány v Q_2. Q_3 sleduje pouze produktové ionty vzniklé fragmentací. Tento typ záznamu se používá pro objasnění struktury prekurzoru.
- **Sken prekurzorových iontů** – Q_1 skenuje v definovaném hmotnostním rozsahu a Q_3 sleduje vybrané fragmentové ionty (diagnostické ionty). Tento typ záznamu se používá k identifikaci strukturně blízkých látek ve směsi.
- **Sken neutrálních ztrát** – Q_1 i Q_3 skenují s diferencí odpovídající sledované neutrální ztrátě. Tento typ záznamu se také používá k identifikaci strukturně blízkých látek.
- **Sken iontových reakcí** – jestliže je kolizní plyn reaktivní, mohou být indukovány iont-molekulové reakce. Q_1 a Q_3 mohou operovat buďto jako filtry vybraných iontů, nebo můžou skenovat v definovaném rozsahu.
- **Selektivní záznam vybrané reakce** (SRM – Selected Reaction Monitoring) – selektivně vybírá prekurzor iontu, které v Q_2 podléhají CID a následně fragmentují. Q_3 selektivně vybírá produkt. Jestliže je paralelně monitorováno několik nadefinovaných fragmentací, pracuje se v režimu selektivního **záznamu více reakcí** (MRM – Multiple Reaction Monitoring). Tento typ MS záznamu se nejvíce využívá pro cílenou kvantitativní analýzu látek ve složitých matricích.

Téma A

HODNOCENÍ OXIDATIVNÍHO ZATÍŽENÍ LOSOSÍCH JIKER POMOCÍ MODERNÍCH SEPARAČNÍCH TECHNIK

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Oxidativní stres

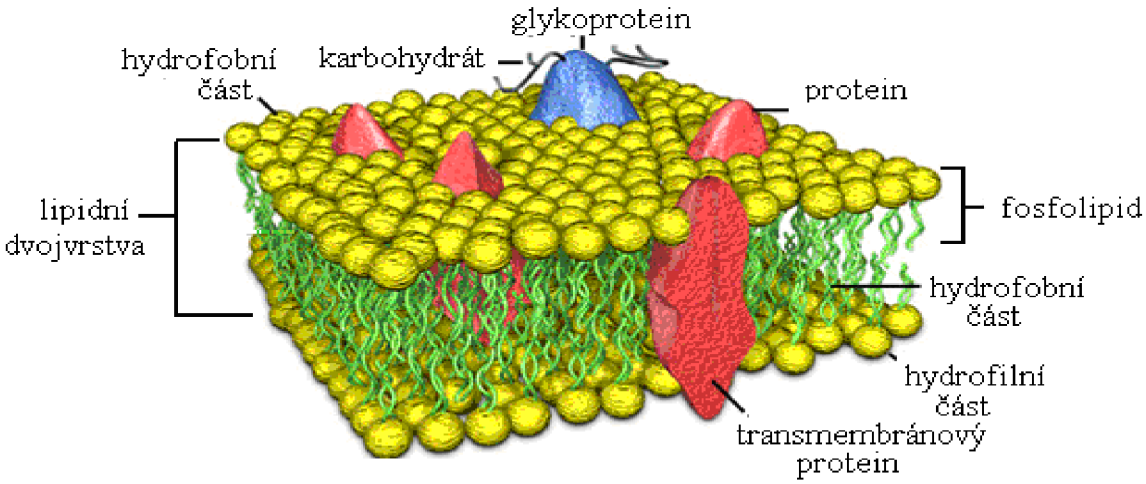
Oxidativní stres je nerovnováha mezi oxidanty a antioxidanty ve prospěch oxidantů. Pod pojmem oxidanty se v této práci budou uvažovat nejen reaktivní kyslíkové formy (např. superoxidový anion $O_2^{-\bullet}$, hydroxylový radikál $OH^{\bullet}$, peroxid vodíku H_2O_2) ale i reaktivní dusíkové formy (např. NO_2, $NO^{\bullet}$, N_2O_3) a jiné volné radikály. Řada oxidantů je v organismech tvořena některými přirozenými procesy, jako je dýchání nebo fagocytóza. Jedná se o tzv. **endogenní** zdroje, které jsou pro organismus přirozené. Avšak množství oxidantů generovaných endogenními zdroji může být zvýšeno podněty zvenčí, a to tzv. **exogenními** zdroji. Mezi takové zdroje se řadí například kouření, průmyslové znečištění životního prostředí (PAHs, PCBs,…) nebo působení pesticidů, těžkých kovů a ultrafialového záření.

Dojde-li ke zvýšení hladiny oxidantů v organismu, může dojít k poškození biologicky důležitých molekul. Oxidanty mohou v organismu atakovat membránové lipidy, proteiny a nukleové kyseliny, čímž dochází k poškození těchto důležitých biomolekul, která mohou být až nevratná [22-24]. Oxidativní stres je spojován se vznikem nádorových, kardiovaskulárních a neurodegenerativních onemocnění nebo s procesem stárnutí [25, 26]. U některých živočišných druhů vyvolávají oxidanty specifické následky, např. blednutí korálů. U lososovitých ryb se projevuje například syndrom M74, jehož důsledkem je úhyn raných vývojových stádií jiker [26, 27].

Hodnocení oxidativního stresu sledováním hladiny oxidantů je složité, neboť se jedná o vysoce reaktivní látky s krátkou životností. Z tohoto důvodu se využívá sledování stabilnějších **sekundárních produktů**, které vznikají právě následkem reakce oxidantů s biomolekulami. Nejčastěji jsou sledovány sekundární produkty polynenasycených mastných kyselin, které jsou součástí lipidové dvojvrstvy v buněčných membránách.

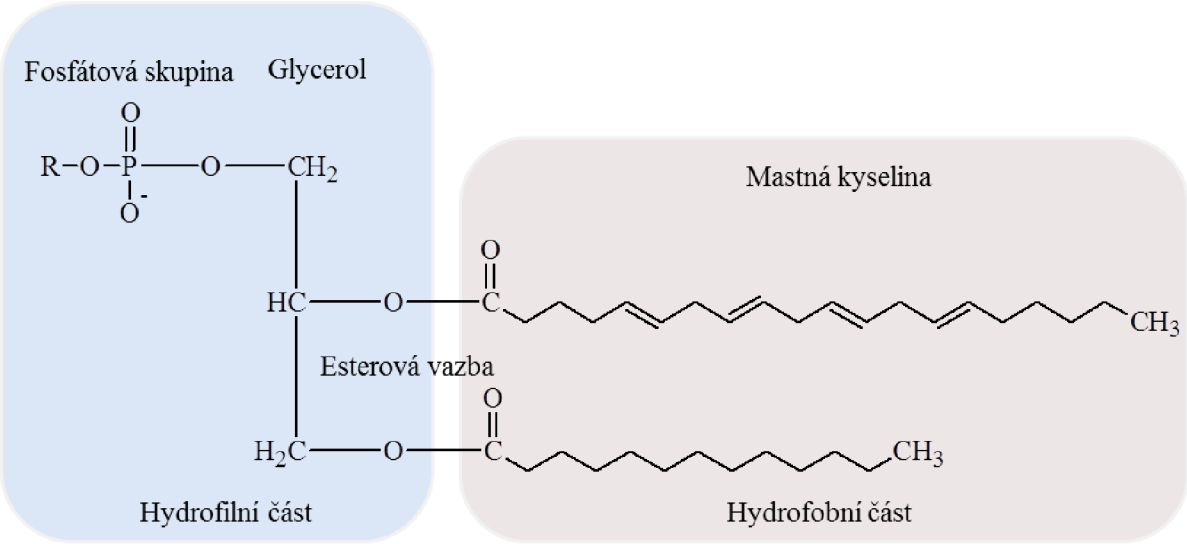
3.2 Biologická funkce lipidů

Lipidy v organismu zastávají několik funkcí. Mezi ty nejdůležitější patří funkce zásobárny energie, stavebních složek buněčných membrán (Obrázek 13) a zajištění izolační a mechanické ochrany.



Obrázek 13: Strukturní komponenty buněčné membrány [28].

Lipidy jsou hlavní součástí fosfolipidové dvojvrstvy buněčné membrány (Obrázek 14). Tvořeny jsou jak nasycenými, tak i polynenasycenými mastnými kyselinami, které obsahují dvě a více dvojných vazeb oddělených methylenovou skupinou.



Obrázek 14: Příklad membránového fosfolipidu.

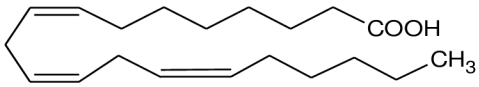
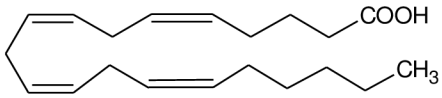
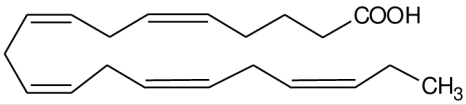
Mastné kyseliny membránových fosfolipidů jsou častým terčem ataku oxidantů. Jejich srážkou s oxidanty vznikají různé sekundární metabolity, jejichž charakter závisí na nasycenosti vazeb dané mastné kyseliny.

3.3 Oxidace lipidů

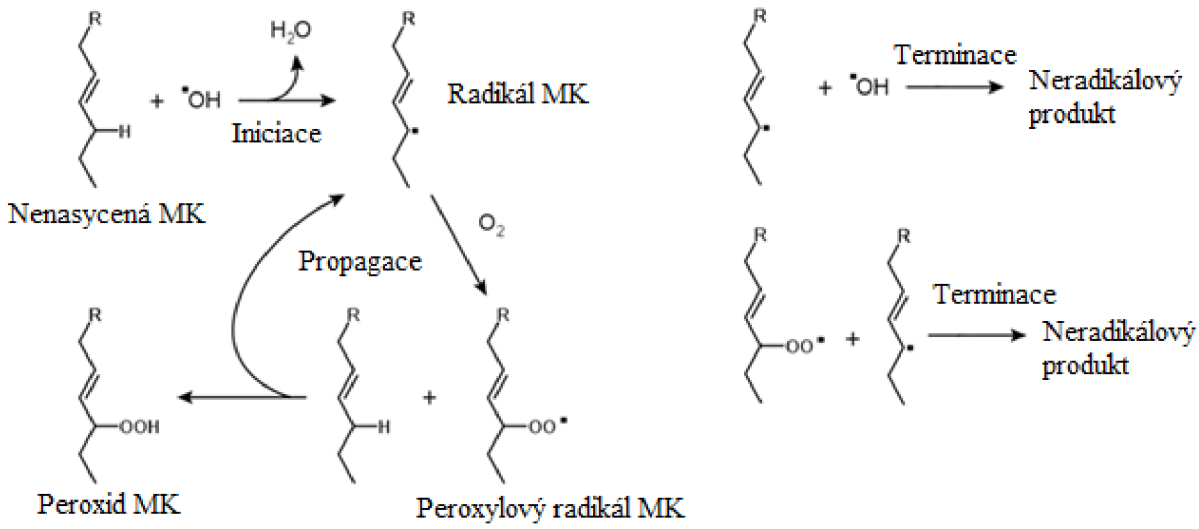
V organismu přirozeně probíhá enzymatická oxidace polynenasycených mastných kyselin, při které se uplatňuje cyklooxygenáza 1 a 2, lipoxygenáza a cytochrom P450. Oxidací esenciálních omega-6 a omega-3 nenasycených mastných kyselin, které ve své struktuře

obsahují 20 uhlíků, vznikají **eikosanoidy**. Mezi eikosanoidy se řadí například prostaglandiny, tromboxany, leukotrieny a další oxidované deriváty. Tyto látky mají hormonální účinky a zprostředkovávají buněčnou signalizaci. Podílejí se na rozvoji zánětu, vzniku horečky, bolesti, kontrole některých dějů rozmnožovacího procesu a ovlivňují procesy srážení krve.
Hlavními prekurzory pro vznik eikosanoidů jsou **kyselina dihomo-γ-linolenová** (kyselina 8c,11c,14c-eikosatrienová, 20:3), **kyselina arachidonová** (kyselina 5c,8c,11c,14c-eikosatetraenová, 20:4) a **EPA** (kyselina 5c,8c,11c,14c,17c-eikosapentaenová, 20:5), jejichž chemické struktury jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1. Chemické struktury vybraných mastných kyselin s 20 uhlíky.

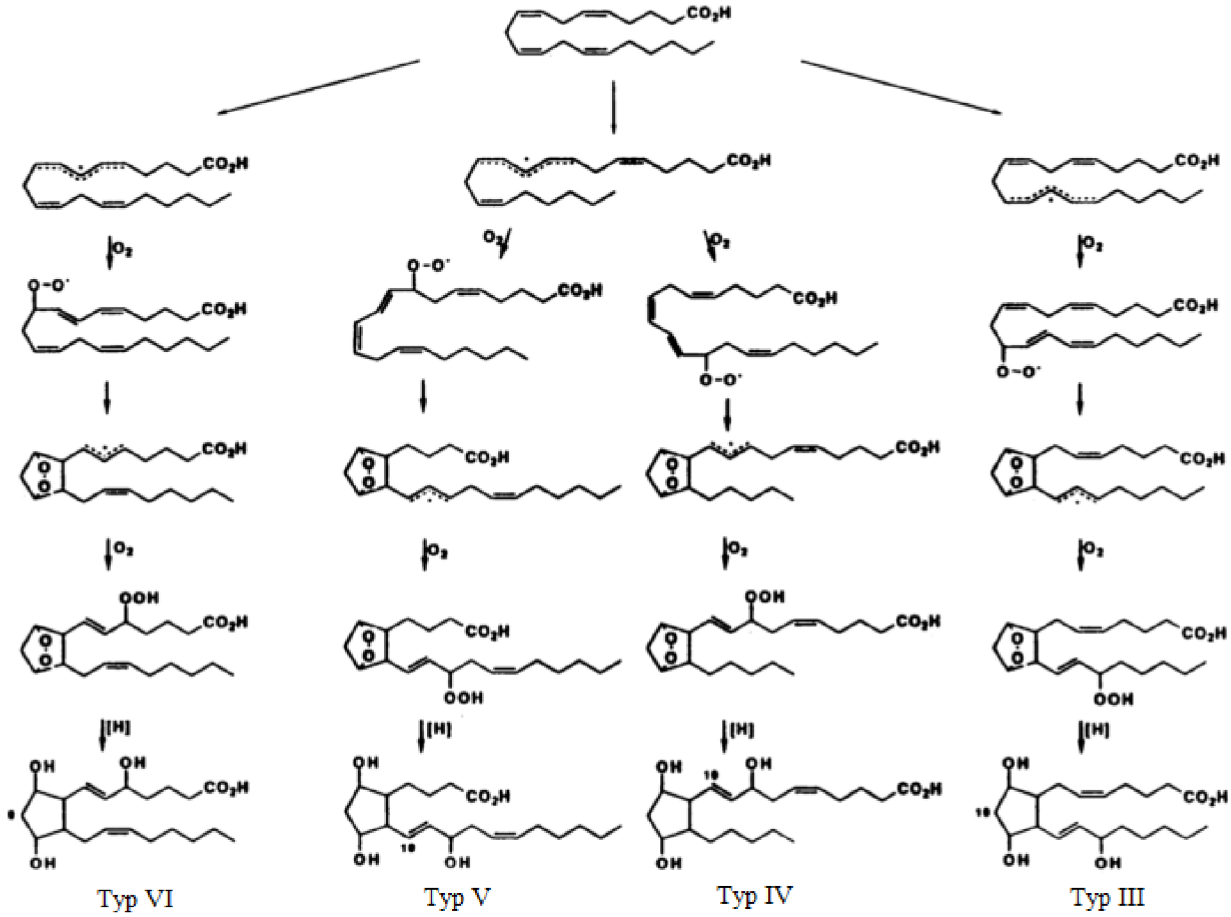
Mastná kyselina	Chemická struktura
Kyselina dihomo-γ-linolenová	
Kyselina arachidonová	
EPA	

Eikosanoidy vzniklé specifickými enzymatickými cestami mají vždy stejnou stereospecificitu a chiralitu každé funkční skupiny. Pouze v tomto uspořádání mohou správně plnit svoji biologickou funkci.
Jinou možností oxidace lipidů je neenzymatická lipidní peroxidace. Oxidanty napadají lipidy a tím dochází k jejich degradativní oxidaci. Proces probíhá mechanismem řetězové reakce se třemi hlavními kroky: iniciace, propagace a terminace (Obrázek 15). Terminace je konečnou fází této řetězové reakce a nastává ve chvíli, kdy je koncentrace radikálů tak vysoká, že je velká pravděpodobnost vzájemné reakce dvou radikálů za vzniku neradikálového produktu [29].



Obrázek 15: Schéma peroxidace lipidů [30].

Kromě jiných sloučenin vznikají lipidní peroxidací také isoprostany. Tyto sloučeniny patří svojí strukturou do skupiny prostanoidů, které vznikají radikálovou oxidací polynenasycených mastných kyselin majících tři a více dvojných vazeb [31-33]. V tomto textu budou takové mastné kyseliny pro přehlednost označované jako PUFA. Radikálovým atakem PUFA vzniká peroxylový radikál, který podléhá intramolekulární cyklické reakci za vzniku endoperoxidu, po jejichž redukci následně vznikají isoprostany [33, 34]. Například z kyseliny arachidonové (AA) vzniká tímto mechanismem 64 regio- a diastereo-izomerních isoprostanových forem čtyř různých typů (Obrázek 16) [35].

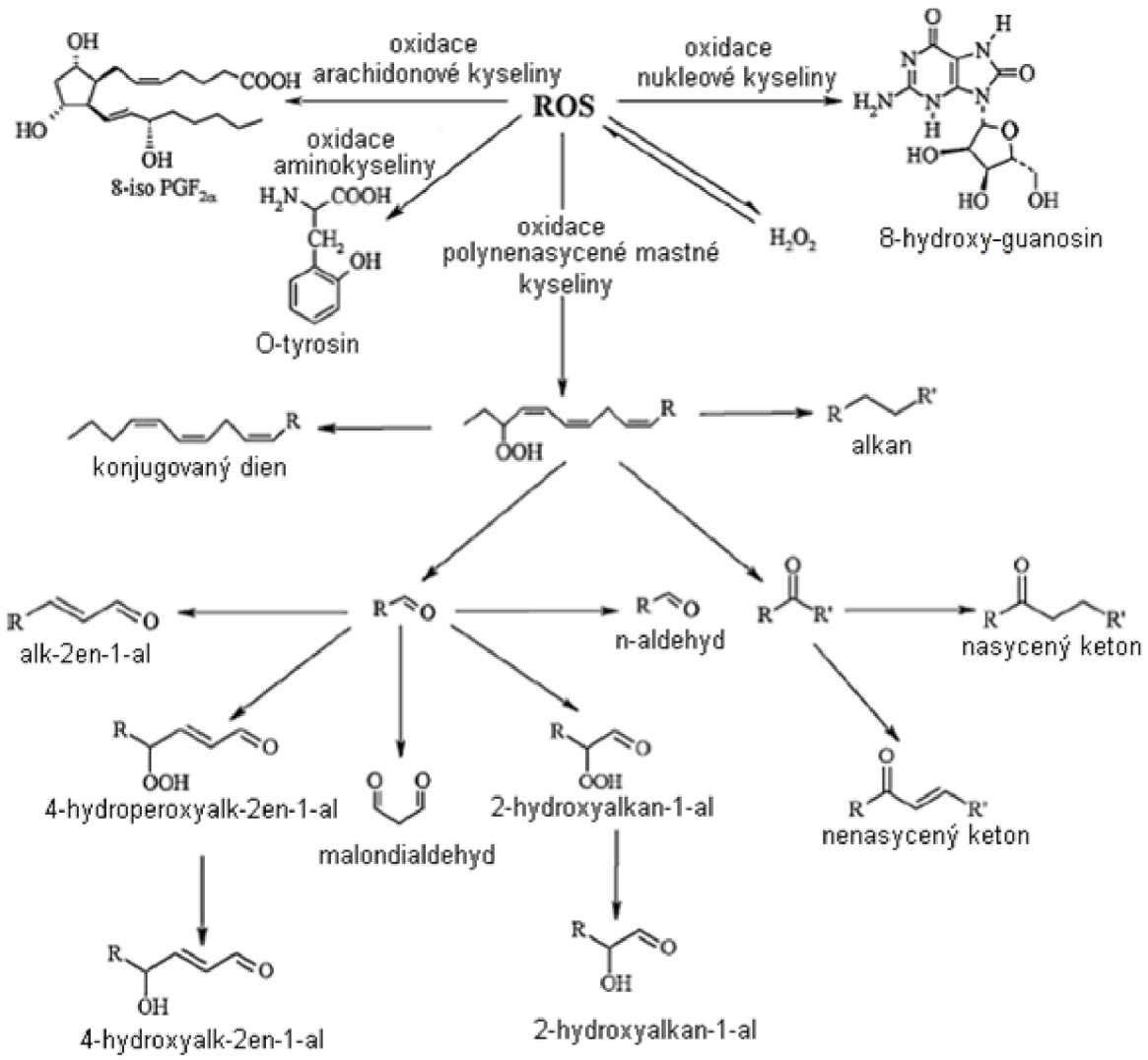


Obrázek 16: Radikálová oxidace kyseliny arachidonové za vzniku čtyř typů isoprostanů [35].

Jestliže je organismus zatížen oxidativním stresem, zvyšuje se hladina isoprostanů a dalších sekundárních produktů lipidní peroxidace.

3.4 Markery oxidativního stresu

Oxidanty jsou vysoce reaktivní molekuly s velmi krátkou životností, a proto je stanovení jejich koncentrace velmi komplikované. I přesto lze však určit úroveň oxidativního stresu v organismu. Pro tento účel se využívá sledování hladiny sekundárních produktů oxidačních reakcí s lipidy, aminokyselinami a nukleovými kyselinami (Obrázek 17).



Obrázek 17: Produkty oxidativního stresu v organismu [36].

Jako tzv. **markery oxidativního stresu** se nejčastěji sledují produkty lipoperoxidace, kam patří nejen **isoprostany**, ale i **malondialdehyd** (MDA) a **4-hydroxy-2-nonenal** (HNE) [36-40]. Protože se jedná o sloučeniny vyskytující se v organismu zcela přirozeně, porovnává se jejich hladina v organismu, kde je podezření na vystavení oxidativnímu stresu, a v organismu, který není oxidativním stresem zatížený. Čím větší je oxidativní stres, tím vyšší je hladina markerů v postiženém organismu.

Isoprostany jsou stabilní produkty neenzymatické oxidace arachidonové kyseliny, a proto jsou významnými biomarkery oxidativního stresu [40]. Jejich hodnoty mohou být sledovány v biologických vzorcích moči [41-45], plasmy [41, 44, 45], dechového kondenzátu [40, 46], nebo tkání (mozek, játra, ...) [41-43, 47].

Za účelem posouzení oxidativního zatížení organismu na základě porovnání hladin isoprostanů v biologickém vzorku bylo nejdříve nutné vyvinout metody vhodné pro jejich analýzu. K tomuto účelu byla využita řada analytických technik, avšak nejvhodnější z nich se stala kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostně spektrometrickou detekcí (LC-MS/MS).

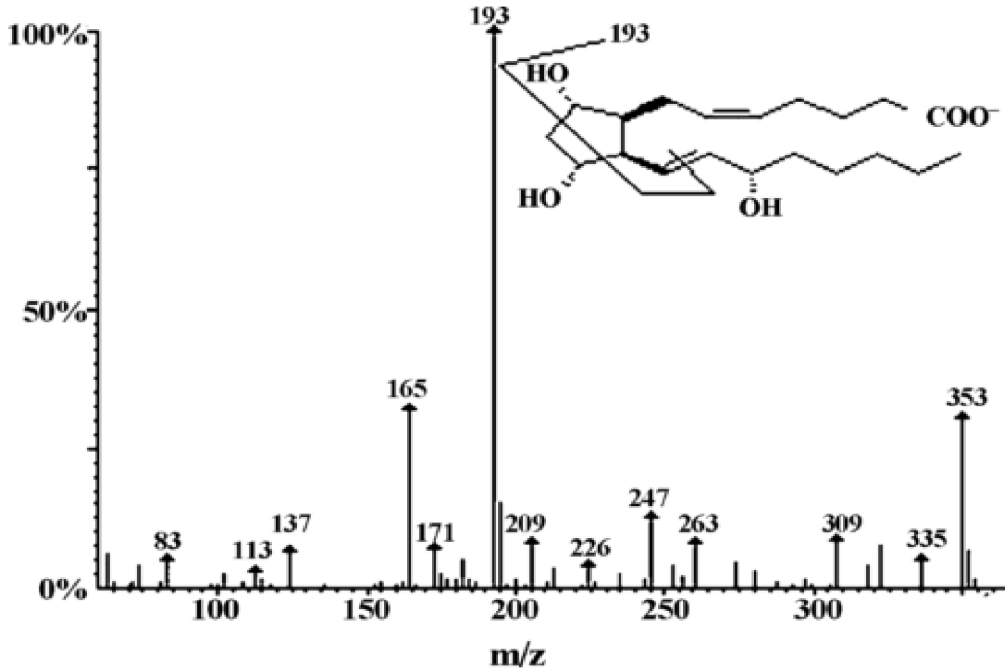
3.5 Metody pro analýzu isoprostanů

Pro analýzu isoprostanů byla publikována řada metod zahrnující kapalinovou chromatografii s fluorescenční nebo UV detekcí, plynovou chromatografii s hmotnostně spektrometrickou detekcí (GC-MS), kapalinovou chromatografii s tandemovou hmotnostně spektrometrickou detekcí (LC-MS/MS), imunochemické metody RIA (radio immunoassay) a EIA (enzyme immunoassay) [42, 48-53].

Benefitem kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostně spektrometrickou detekcí je možnost sledování několika isoprostanů v jedné analýze, zatímco při použití imunochemických metod lze sledovat pouze jednu formu analytu. Navíc je technika LC-MS/MS dostatečně citlivá a selektivní bez nutnosti derivatizace, která je nezbytná při využití plynové chromatografie nebo kapalinové chromatografie s fluorescenční a UV detekcí.

3.5.1 Sledování isoprostanů technikou HPLC-MS/MS

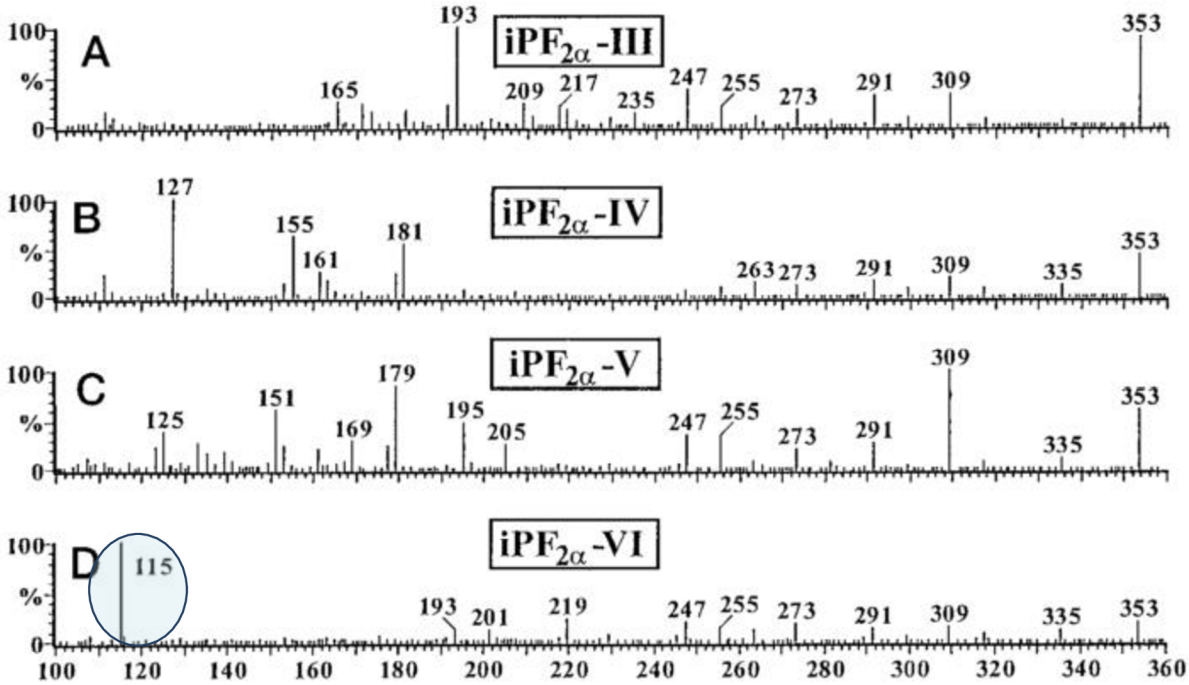
Syslová a kolektiv publikovali metodu pro sledování isoprostanu $iPF_2\alpha$-III v kondenzátu lidského dechu [36]. Pro sledování a následnou kvantifikaci byla použita technika kapalinové chromatografie s ionizací elektrosprejem a tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-ESI-MS/MS). Hmotnostní detektor byl použit v MRM modu (Multiple Reaction Monitoring), který je vysoce selektivní a dostatečně citlivý. K analýze $iPF_2\alpha$-III byla použita ionizace elektrosprejem s detekcí negativních iontů (ESI^-) a sledovaným prekurzorem byl kvasi-molekulární deprotonovaný ion m/z 353. Tento prekurzor byl izolován v prvním kvadrupolu s následnou aplikací CID ve druhém kvadrupolu. Sledovaným produktovým iontem, charakteristickým právě pro tento typ isoprostanu, byl ion m/z 193 (Obrázek 18) [36].



Obrázek 18: ESI^-–MS/MS spektrum $iPF_2\alpha$ -III [36].

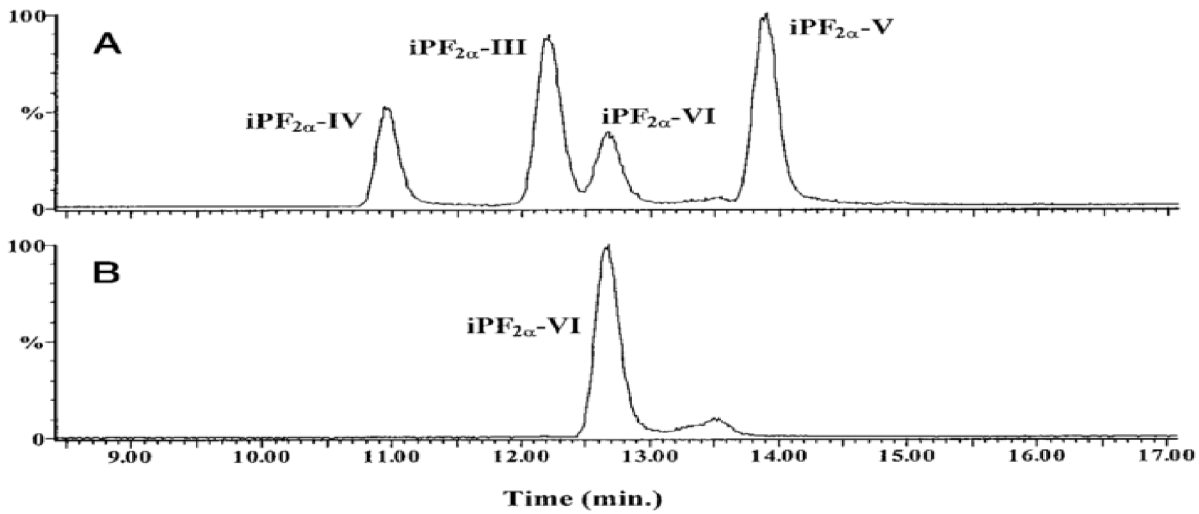
Publikace Lawsona a kol. [53] popisuje sledování isoprostanů $iPF_2\alpha$-III, - IV, -V a -VI. Analýza probíhala pomocí LC-ESI-MS/MS. Prekurzorem pro následnou aplikaci CID byl

karboxylový anion m/z 353, který byl stejný pro všechny čtyři zástupce isoprostanů (Obrázek 19).



Obrázek 19: Produktová hmotnostní spektra čtyř skupin isoprostanů $iPF_2\alpha$ [53] s vyznačeným produktovým iontem m/z 115, který je specifický pro fragmentaci $iPF_2\alpha$-VI**.**

Každá z uvedených skupin isoprostanů obsahuje ve svém produktovém spektru sekundární ionty, které jsou společné pro všechny typy isoprostanů, ale i ionty, které jsou charakteristické pro daný typ isoprostanu. Takovým je například ion m/z 115, který je přítomen v produktovém spektru isoprostanu **$iPF_2\alpha$-VI** a již není přítomen v produktových spektrech zbylých tří typů isoprostanů (Obrázek 20). Díky této specificitě může být **$iPF_2\alpha$-VI** selektován a sledován v přítomnosti dalších skupin isoprostanů, jak je demonstrováno na obrázku z publikace [53] (Obrázek 20).



Obrázek 20: Důkaz specificity LC-MS/MS metody pro $iPF_2\alpha$ – VI. Směs isoprostanů analyzovaná LC-MS/MS monitorující produktové ionty prekurzoru m/z 353. A, Sledování sumy nespecifických produktových iontů m/z 273, 291 a 309; B, Sledování produktového iontu m/z 115, demonstrujícího specificitu pro $iPF_2\alpha$-VI [53].

Li a kol. [44] ve své studii popisují vysokou intenzitu fragmentu m/z 127 pro isoprostan **$iPF_2\alpha$-IV** a zároveň jej uvádějí jako selektivní právě pro tuto skupinu isoprostanů. Ion **m/z 151** je přítomen pouze v produktovém spektru **$iPF_2\alpha$-V**. Proto může být použit k identifikaci této skupiny isoprostanů [44].
Podle uvedených autorů lze tedy identifikovat jednotlivé skupiny isoprostanů na základě přítomnosti produktových iontů, které jsou charakteristické pro danou skupinu isoprostanů. Výčet použitých iontů k identifikaci je uveden v následující Tabulce 2.

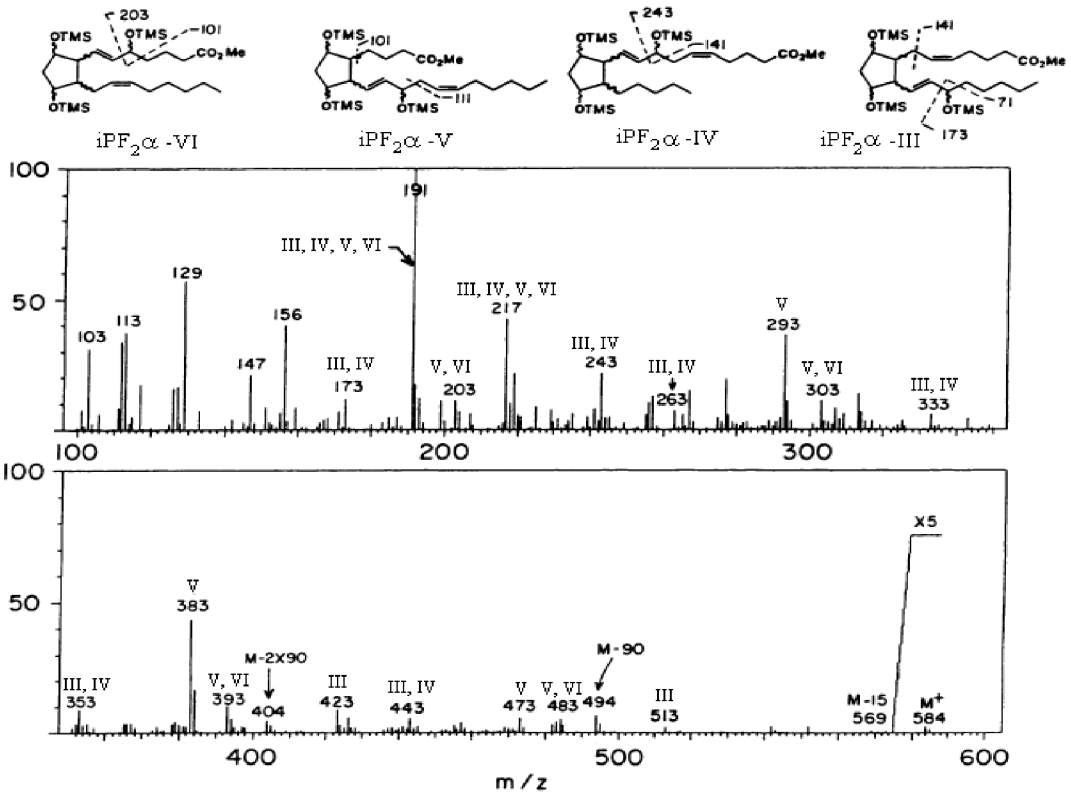
Tabulka 2. Produktové ionty vhodné pro identifikaci isoprostanů $iPF_2\alpha$-III, -IV, -V a -VI, vzniklé po aplikaci CID prekurzoru m/z 353 v MS/MS analýze:

Typ isoprostanu	$iPF_2\alpha$-III	$iPF_2\alpha$-IV	$iPF_2\alpha$-V	$iPF_2\alpha$-VI
m/z	193	127	151	115

Ačkoliv je LC-MS/MS nejpoužívanější analytickou koncovkou pro sledování markerů oxidativního stresu, další možností je využití plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS).

3.5.2 Sledování isoprostanů technikou GC-MS

Morrow a kolektiv ve své publikaci [35] popisují GC-MS analýzu isoprostanů vznikajících *in vivo* v lidském těle. Výsledkem jsou spektra vzniklá elektronovou ionizací (EI) methylesterů a trimethylsilyl-etherů isoprostanů (TMS) analyzovaných v lidské moči (Obrázek 21).



Obrázek 21: MS spektrum methylesterů a TMS derivátů isoprostanů v lidské moči (upraveno dle [35]).

Typickou neutrální ztrátou pro všechny čtyři regioisomery isoprostanů je 90 u, která vzniká fragmentací prekurzorů isoprostanů s následnou ztrátou Me_3SiOH. Běžně pozorovaným základním píkem EI spektra derivátů isoprostanů je m/z 191, který odpovídá iontu Me_3SiO^+=CH-$OSiMe_3$. Dalším iontem, který je společný pro isoprostany, je m/z 217 (Me_3SiO-CH=CH=$^+OSiMe_3$). Tyto pozorované fragmenty jsou tedy nespecifické, a proto nevhodné pro sledování konkrétního typu isoprostanu [35, 41].
Specifikace iontů v EI spektru na Obrázku 21 je uvedena v Tabulce 3. Některé ionty jsou typické pro přítomnost daného regioisomeru isoprostanu a lze je tak selektivně použít k jeho identifikaci.

Tabulka 3. Fragmenty (*m/z*) typické pro regioisomery $iPF_2\alpha$-III, -IV, -V a VI, v Obr. 21 [35].

$iPF_2\alpha$-III	$iPF_2\alpha$ -IV	$iPF_2\alpha$ -V	$iPF_2\alpha$ –VI
513 = M – 71	443 = M – 141	473 = M – 111	483 = M – 101
423 = M – 71 – 90	353 = M – 141 – 90	383 = M – 111 – 90	393 = M – 101 – 90
333 = M – 71 – (2×90)	263 = M – 141 – (2×90)	293 = M – 111 – (2×90)	303 = M – 101 – (2×90)

Plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí tedy má své místo na poli analýzy isoprostanů. Nicméně je třeba si uvědomit, že ačkoliv se jedná o citlivou a selektivní techniku, možnosti analýzy budou vždy limitovány účinností derivatizačního kroku, který je na tomto místě nezbytný pro zvýšení těkavosti analytů.

3.6 Antioxidativní ochrana organismu

Hladina oxidantů v organismu je udržována v přirozených mezích působením antioxidativní ochrany. Dojde-li ke zvýšení hladiny oxidantů na úkor antioxidantů, nastává oxidativní stres. Antioxidanty působí v boji proti oxidativnímu stresu třemi mechanismy: (i) zabraňují tvorbě nadměrného množství oxidantů, (ii) zachycují a odstraňují radikály a (iii) působí reparačním mechanismem na poškozené biomolekuly.

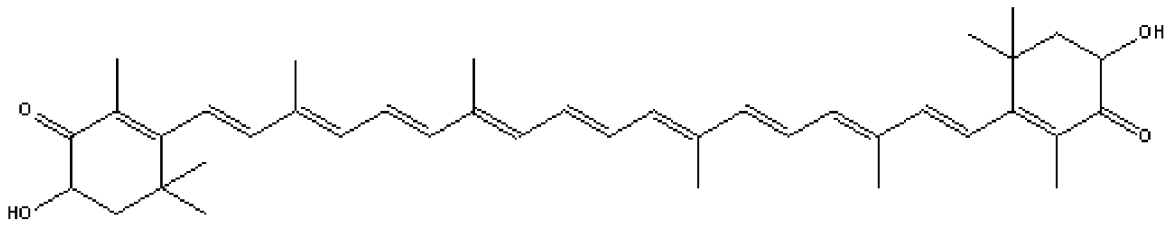
Endogenní antioxidanty se tvoří přímo v organismu a jsou buď enzymové (např. katalasa a superoxid dismutáza), nebo neenzymové, které se dále rozdělují na membránové – lipofilní (např. Koenzym Q10 a β-karoten) a nemembránové – hydrofilní (např. kyselina askorbová, glutathion a bilirubin). **Exogenní antioxidanty** se získávají z potravy. Tato skupina zahrnuje inhibitory vzniku volných radikálů (např. vitamíny, fenolické látky, karotenoidy) a stopové prvky (např. selen a zinek).

Na odstranění radikálů v lipidech se podílí karotenoidy, β-karoten a například vitamin A. Vzhledem k zaměření této práce bude dále diskutována pouze funkce antioxidantu astaxanthinu, který patří do skupiny ketokarotenoidů.

3.6.1 Astaxanthin

Astaxanthin (3,3'-dihydroxy-β-karoten-4,4'-dion) je pigment patřící do skupiny ketokarotenoidů (Obrázek 22). Z chemického hlediska se jedná o oxidovaný derivát β–karotenu, který je zodpovědný za růžovočervené zbarvení peří plameňáků nebo tkání lososů a korýšů [54]. Syntetizovat tento pigment mohou pouze některé druhy řas, bakterií a kvasinek. Ostatní živočichové, u kterých je tento pigment nacházen, jej přijímají výhradně s potravou [54, 55].

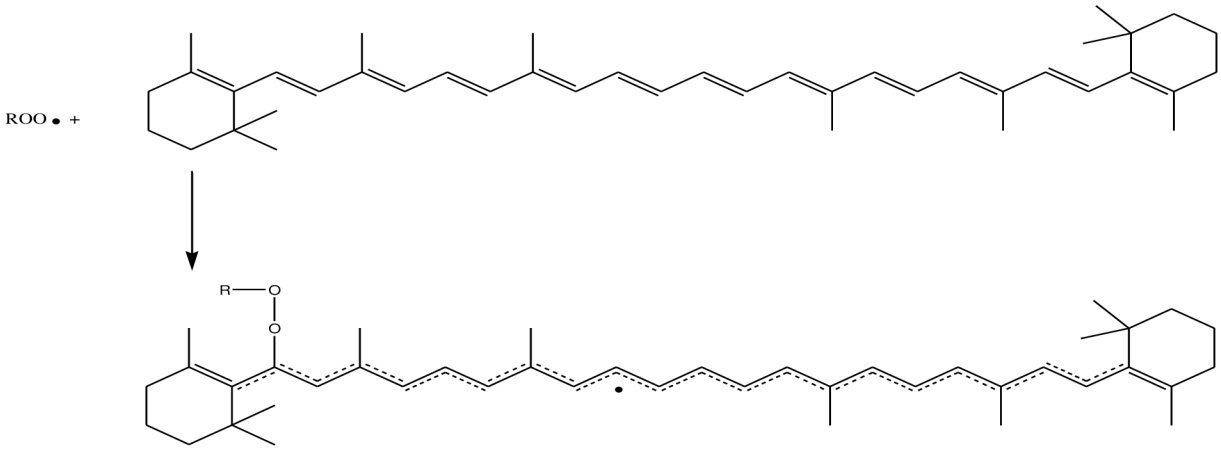
Syntetický nebo přírodní astaxanthin je například uměle přidáván do krmiva na lososích farmách [56-58]. Astaxanthin je sledován z hlediska funkce prekurzoru β-karotenu a antioxidativní schopnosti, která je několikanásobně vyšší než u vitamínu E nebo C [59, 60].



Obrázek 22: Struktura astaxanthinu.

Astaxanthin působí antioxidačně dvěma reakčními mechanismy. Jako zhášeč singletového kyslíku zabraňuje iniciaci oxidace. Zároveň působí i jako lapač radikálů, přičemž zabraňuje vzniku propagačního kroku lipidní autooxidace [61].

Mechanismus záchytu radikálů β-karotenem byl popsán Burtonem a Ingoldem [61]. Radikál je zachycen tím, že se stane součástí systému konjugovaných dvojných vazeb (CDB) (Obrázek 23) a nepárový elektron je následně delokalizován v tomto systému. Tím je zamezeno aktivitě radikálu při řetězové reakci.



Obrázek 23: β-karoten ve funkci lapače radikálů [61]. Radikál se stává součástí systému konjugovaných dvojných vazeb.

Karotenoidy s 9 – 11 CDB mají cca třikrát vyšší antioxidativní aktivitu ve srovnání se systémy obsahujícími 8 a méně dvojných vazeb [62]. Schopnost ochrany karotenoidů *in vivo* je funkcí počtu CDB a vzrůstá s jejich počtem, zároveň je závislá na struktuře řetězce a přítomnosti funkčních skupin [63, 64]. Například karotenoidy obsahující ve své struktuře oxo-skupiny (tak jako astaxanthin) jsou efektivnější antioxidanty a rezistentnější k autokatalytickým radikálovým reakcím než jiné karotenoidy mající stejnou strukturu bez zmiňovaných oxo-skupin [59, 65].

3.7 Oxidativní stres a úhyn lososích jiker

Losos obecný (*Salmo salar*) je dravá tažná ryba, která žije většinu života v moři. Jedná se o nejznámější druh ryby, která v dospělosti podniká migraci z moře do sladkých vod za účelem tření. Ačkoliv se losos obecný přirozeně vyskytuje ve vodách Atlantického oceánu až po oblast Bílého moře, díky vynikajícímu obsahu užitečných živin pro lidské zdraví je chován i na lososích farmách. Tato ryba je zdrojem velmi cenných omega 3 a omega 6 nenasycených mastných kyselin, vitamínu D a antioxidantů.
Syndrom M74, který byl poprvé identifikován v roce 1974 ve Švédsku, způsobuje zvýšenou mortalitu raných vývojových stádií jiker lososa. Příčinou tohoto syndromu je přítomnost oxidativního stresu, který může být vyvolán například působením chlorovaných organických polutantů a jejich metabolitů v přírodním ekosystému [66].
Předkládaná práce se věnuje hodnocení oxidativního zatížení v lososích jikrách *Salmo salar*.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

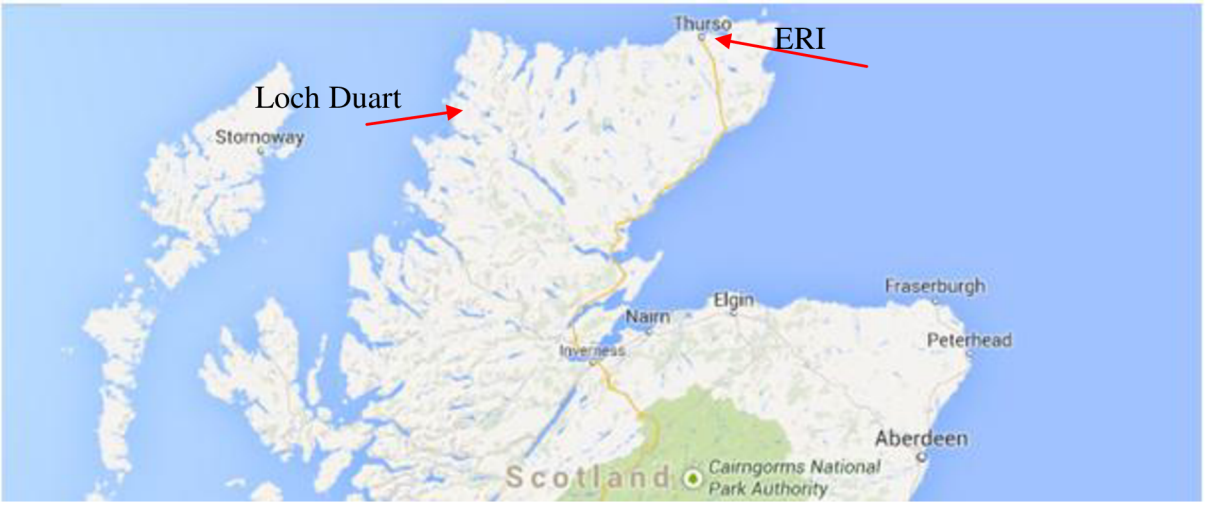
4.1 Popis experimentu

Tato práce se zabývá sledováním hladiny isoprostanů, astaxanthinu a mastných kyselin v jikrách lososa obecného (*Salmo salar*). Studovány byly nepřeživší jikry, čerstvě nakladené jikry a přeživší jikry ve stadiu očních bodů. Stadium očních bodů je nejstarším vývojovým stadiem mezi těmito třemi skupinami jiker. Pojmenování tohoto vývojového stádia je odvozeno ze skutečnosti, že jsou již viditelné oči vyvíjejícího se larválního zárodku ryby nacházejícího se těsně v období před vylíhnutím (Obrázek 24). Právě tyto jikry mohou být vhodné k porovnávání parametrů s dalšími dvěma skupinami jiker, protože nejsou oxidativním stresem zatížené. V textu jsou proto dále označovány jako tzv. **kontrola**.
Relativní množství sledovaných analytů ve vzorcích nepřeživších jiker odpoví na otázku, zda může být životaschopnost těchto jiker přisuzována právě přítomnosti oxidativního stresu. Zatímco čerstvě nakladené jikry mohou vypovídat o možných změnách sledovaných parametrů během vývoje lososa obecného.

Obrázek 24: Vývojová stadia jiker lososa obecného.

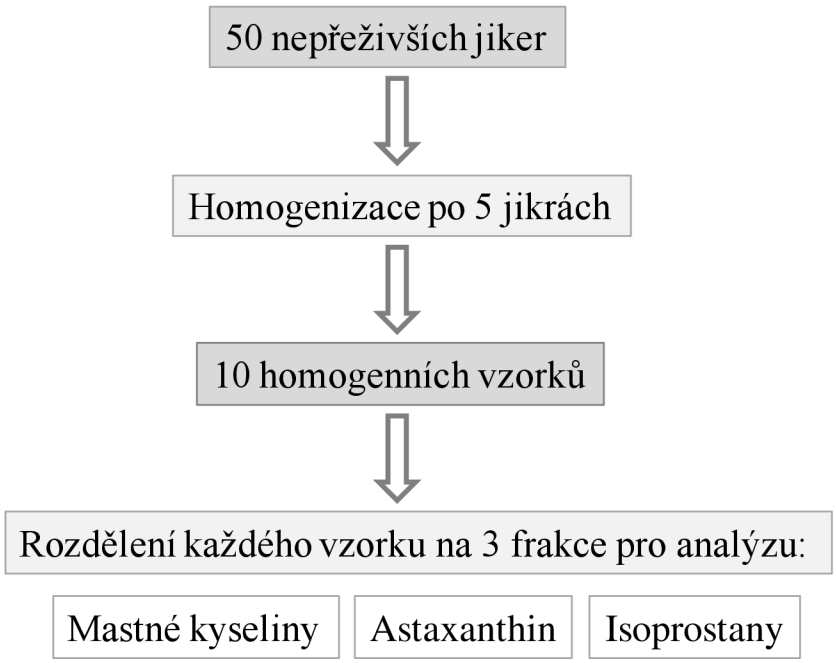
4.1.1 Popis vzorků pro experiment

Pro experimentální účely a validaci stanovení sledovaných parametrů byla použita rybí svalovina (*Salmo salar*). Vyvinuté metody byly poté použity pro sledování oxidativního stresu v lososích jikrách, které byly poskytnuty lososí farmou Loch Duart ve Skotsku (Obrázek 25).



Obrázek 25: Mapa Skotska s vyznačením přibližné polohy zdroje lososích jiker (Loch Duart) a Environmental Research Institute (ERI).

K dispozici byly tři skupiny jiker ve složení: nepřeživší jikry, čerstvě nakladené jikry a jikry ve stadiu očních bodů – kontrola. Každá skupina čítala 50 jedinců.
Množství tkáně z jedné samotné jikry bylo nedostačující pro analýzu všech požadovaných parametrů, a proto se vždy pracovalo se homogenizovanou podskupinou každé ze tří skupin jiker. Z každé skupiny bylo tedy vyčleněno 10 vzorků po pěti jikrách, které byly homogenizovány v třecí misce pod tekutým dusíkem. Tímto postupem vznikly tři skupiny jiker po 10 vzorcích lišících se stadiem vývoje a životaschopností. Každý homogenizovaný vzorek byl analyzován zvlášť na přítomnost mastných kyselin, astaxanthinu a isoprostanů (Obrázek 26).



Obrázek 26: Schéma přípravy vzorku nepřeživších jiker, které je analogické pro čerstvě nakladené jikry a kontrolní vzorky.

4.2 Použité chemikálie

V této práci byly použity standardy isoprostanů: 8-isoprostan ($iPF_2\alpha$-III) > 99%; $iPF_2\alpha$-VI > 95%; $iPF_2\alpha$-IV > 98% a kyseliny arachidonové C20:4, ≥ 98%, které byly pořízené z Cayman Chemicals (USA), a astaxanthinu, který byl pořízen z DHI LAB (Hørsholm, Denmark). Dále byla použita rozpouštědla (CH_3CN, CH_3OH) o čistotě pro HPLC analýzu (Rathburn Chemicals Ltd., UK) a rozpouštědla o čistotě pro LC-MS analýzu (Sigma Aldrich, USA) a další běžně dostupné chemikálie o čistotě p. a.: NaOH, HCl, 14% BF_3 v methanolu, KOH, bulythydroxytoluen (BHT), HCOOH, aceton, methanol a ethanol.

4.3 Použitá instrumentace pro analýzy

Použitá instrumentace pro analýzu isoprostanů, mastných kyselin a astaxanthinu je uvedena v Tabulce 4.

Tabulka 4. Použitá instrumentace pro analýzy.

Technika	Název	Specifikace detektoru	Výrobce	Ovládací software
HPLC	Ultimate 3000	-	Dionex, Německo	Chromeleon® verze 6.8.
UV-VIS	Photodiode Array Detector (PDA) - 996	detektor s fotodiodovým polem	Waters, USA	Chromeleon® verze 6.8.
GC	Agilent 6890 N	-	HP Agilent Technologies	ChemStation G2070AA
MS	MSD quadrupole mass spectrometer	jednoduchý kvadrupólový filtr	HP Agilent Technologies	ChemStation G2070AA
HPLC	Waters 2695	-	Waters, USA	MassLynx™
MS	Quatro Micro ™API	ESI-QqQ	Waters, USA	MassLynx™

4.4 Další použitá zařízení

Pro extrakci kapalinou byla použita třepačka KS 260 (IKA, Německo) a ultrazvuková lázeň (Grant Instruments MXB, Velká Británie). Pro extrakci tuhou fází byl použit SPE Vacuum Manifold SPE-MAN12 (Charlton Scientific Ltd., Velká Británie). Odstředění probíhalo pomocí centrifugy CL30R (Thermo Scientific, Velká Británie).

4.5 Příprava vzorků pro sledování oxidativního stresu v jikrách *Salmo salar*

4.5.1 Extrakce astaxanthinu ze tkáně *Salmo salar*

Extrakce astaxanthinu z lososí tkáně byla provedena podle modifikované metody publikované ve studii Hongxia Li [67]. Přibližně 0,03 g homogenizované tkáně bylo v centrifugační zkumavce smícháno s 5 ml acetonu. Astaxanthin byl ze vzorku extrahován pomocí ultrazvuku po dobu 15 min. Extrakt byl poté odstředěn při 3500 otáčkách/min po dobu 5 minut. Poté byl supernatant oddělen. Ke zbytku tkáně byl přidán další podíl 5 ml acetonu a postup extrakce a odstředění byl opakován. Oba extrakty byly spojeny a při laboratorní teplotě odpařeny do sucha pod proudem dusíku. Odparek obsahující astaxanthin byl poté rozpuštěn v 0,5 ml acetonu a přefiltrován přes nylonový membránový filtr s velikostí pórů 0,45 µm do vialky. Takto připravený vzorek byl analyzován metodou HPLC-PDA.

4.5.2 Extrakce mastných kyselin ze tkáně *Salmo salar*

Vzorek tkáně pro analýzu mastných kyselin byl připravován podle metody, kterou publikoval M. Sasser [68]. Přibližně 0,03 g homogenizovaného vzorku bylo zmýdelněno 1 ml roztoku 4 M NaOH v 50% MeOH. Směs ve zkumavce byla ve vroucí vodní lázni ohřívána po dobu 30 minut, během této doby byly zkumavky po 5 minutách ručně protřepávány. Po ochlazení na laboratorní teplotu byly do zkumavky přidány 2 ml roztoku 6 M HCl v 50% MeOH. Směs ve zkumavce byla dále ohřívána při 80 °C po dobu 10 minut. Tímto způsobem došlo k methylaci karboxylové skupiny mastných kyselin a uvolněné mastné kyseliny tím byly esterifikovány kysele katalyzovanou reakcí. Po ochlazení v ledové tříšti byly vzniklé

methylestery mastných kyselin extrahovány do 1 ml hexanu. Poté byla spodní vodná vrstva odsáta. Směs mastných kyselin byla přečištěna přídavkem 2 ml 1,2% roztoku NaCl ve vodě. Směs byla ručně velmi jemně protřepávána. Podíl vrchní organické fáze byl převeden do vialky a takto připraven pro GC/MS analýzu.

4.5.3 Extrakce isoprostanů ze svaloviny *Salmo salar*

4.5.3.1 Hydrolýza tkáně

Vázané isoprostany byly z fosfolipidové dvojvrstvy buněčných membrán uvolněny alkalickou hydolýzou. Tkáň lososa (0,35 ± 0,001 g) byla hydrolyzována 1 ml 1 M KOH po dobu 50 minut při 40 ± 2 °C s přídavkem 20 µl butylhydroxytoluenu (BHT, 1 nmol/ml), který zde plnil funkci antioxidantu. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl přidán 1 ml 1 M HCl a 2 ml 100 mM kyseliny mravenčí pro úpravu pH a vysrážení proteinů. Následovala centrifugace po dobu 10 min při 2400 g.

4.5.3.2 Extrakce tuhou fází

Z 3,5 ml supernatantu po centrifugaci byly isoprostany izolovány extrakcí tuhou fází. Pro tento účel byly použity kolonky Strata-X 33 µm s obrácenou fází na polymerním sorbentu (Phenomenex, USA) obsahující 200 mg sorbentu.
Kolonky byly kondicionovány 2 ml MeOH a následně promyty 2 ml vody. Po nanesení vzorku byly kolonky promyty 2 ml vody a 2 ml směsi MeOH:voda (20:80; v/v). Isoprostany byly eluovány 3 ml methanolu, objem extraktu byl pod proudem dusíku snížen na 0,2 ml. Po filtraci přes membránový filtr s velikostí pórů 0,45 µm byl vzorek připraven pro následnou LC-MS/MS analýzu.

4.6 HPLC-PDA analýza astaxanthinu

Astaxathin byl analyzován vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s UV-VIS detekcí. Separace probíhala na koloně Phenomenex Synergi MAX-RP 80A (250 mm × 4,6 mm, velikost částic 4 µm). Mobilní fáze byla složena z 0,1 M octanu amonného (eluční složka A) a methanolu (eluční složka B). Gradientová eluce byla nastavena následovně. Počáteční složení mobilní fáze se stávalo z 95 % eluční složky B. Toto složení bylo konstantní po dobu 5 min. Podíl eluční složky B se poté zvyšoval na 100 %, a to do 12,5 minuty. V 13,5. min následoval návrat do počátečních podmínek, které byly konstantně drženy do 17. min. Průtok mobilní fáze byl 0,8 ml/min a objem nástřiku činil 20 µl. Vlnová délka pro detekci a kvantifikaci astaxanthinu byla 474 nm.

4.7 GC-MS analýza mastných kyselin

Analýza mastných kyselin byla prováděna pomocí plynového chromatografu s kvadrupólovým hmotnostním analyzátorem. Vzorky byly separovány na koloně HP-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm). Nosným plynem bylo helium s průtokem 1 ml/min (konstantní průtok). Teplota nástřiku byla 250 °C, dávkování vzorku bylo bezděličové s jednominutovým intervalem uzavření ventilu děliče. Množství dávkovaného vzorku bylo 1 µl.
Teplotní program byl následující: Počáteční teplota kolony byla 90 °C po dobu 1 min, poté se zvýšila gradientem 20 °C/min na 280 °C, finální izoterma byla 2 min. Byla použita

elektronová ionizace (EI) při 70 eV. Teplota iontového zdroje byla 280°C. Rozsah skenování byl od 50 do 550 u, frekvence záznamu spekter byla 5 spekter/s.

4.8 LC-MS/MS analýza isoprostanů

Chromatografická separace probíhala pomocí ultraúčinného kapalinového chromatografu ve spojení s hmotnostním spektrometrem typu trojitého kvadrupólového filtru (UPLC-MS/MS, XEVO TQ-MS). Vzorky byly separovány na koloně ACQUITY UPLC BEH C18, 50 mm × 2,1 mm ×1,7 µm (Waters, USA). Mobilní fáze sestávala z 0,1% kyseliny octové ve vodě (eluční složka A) a 0,1% kyseliny octové v methanolu. Složení mobilní fáze bylo během eluce programově měněno s následujícím gradientem: Počáteční složení mobilní fáze 10 % složky B, po 4,5 min 99,5 % složky B, isokraticky do 7. minuty, v 7,1 minutě návrat na počáteční podmínky, stabilizace do 10 minuty. Objem nástřiku byl 2,5 µl, teplota kolony 40 °C, teplota autosampleru byla nastavena na 15 °C. Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml/min. Ionizace analytů probíhala v ESI zdroji s detekcí negativních iontů. Napětí na kapiláře bylo nastaveno na hodnotu -3,7 kV. Průtok sušícího plynu (N_2) byl 650 l/h o teplotě 500 °C a zmlžovacího plynu 50 l/h. Teplota zdroje byla nastavena na 150 °C. Kolizním plynem byl argon o průtoku 0,15 ml/min. Pro každý analyt byl sledován jeden MRM přechod, který byl specifický pro daný typ isoprostanu. Naměřená data byla dále zpracována programem MassLynx V4.1.

4.9 Statistické zpracování experimentálních dat

Ke statistické analýze experimentálních výsledků byl použit program Excel verze 2010 (Microsoft, USA). Statistická významnost hladin analyzovaných parametrů mezi zkoumanými skupinami jiker byla hodnocena Studentovým t-testem na hladině významnosti 0,05.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Optimalizace metod

Z dostupných literárních zdrojů byly vybrány metodiky pro stanovení vybraných markerů popisujících oxidativní zatížení v organismu. Tyto metodiky byly postupně upravovány tak, aby vyhovovaly aktuálním laboratorním podmínkám. Pro vývoj a následnou validaci analytických postupů byla použita rybí svalovina lososa obecného.

5.1.1 Optimalizace metody pro stanovení astaxanthinu v lososí tkáni

Metoda pro analýzu astaxanthinu vycházela z několika studií [67, 69]. Pro extrakci astaxanthinu z lososí tkáně byl použit aceton. Experimentálně byl ověřen počet potřebných extrakčních kroků k uvolnění maximálního množství astaxanthinu ze tkáně do rozpouštědla. Výsledný extrakční postup byl prováděn ve dvou krocích. Astaxanthin byl stanoven kapalinovou chromatografií s konvenční spektrofotometrickou detekcí. Nejvhodnější vlnová délka aplikovaného záření byla testována v rozmezí od 470 do 495 nm, protože karotenoidy vykazují v tomto pásmu nejlepší absorbanci [70]. Astaxanthin vykazoval absorpční maximum při vlnové délce 474 nm. Tato vlnová délka byla následně použita pro detekci a kvantifikaci astaxanthinu v lososích jikrách. Pro separaci byla zpočátku použita isokratická eluce při 95 % organické složky v mobilní fázi, avšak pro dokonalé vymytí všech složek vzorku z kolony byla nakonec využita gradientová eluce do 100 % organické složky.

5.1.2 Optimalizace metody pro stanovení mastných kyselin v lososí tkáni

Mastné kyseliny lze stanovit plynovou chromatografií ve formě jejich esterů, které jsou dostatečně těkavé na to, aby mohly být takto analyzovány. Testovány byly dvě různé metody esterifikace. První postup vycházel ze studie, kterou publikoval Alvarez [71], kde se pro esterifikaci karboxylové skupiny využívala Lewisova kyselina, a to 14% fluorid boritý v methanolu. Druhý postup byl založen na kysele katalyzované esterifikaci mastných kyselin protickou kyselinou, a to kyselinou chlorovodíkovou v methanolu [68]. U obou metod byla nalzena srovnatelná účinnost esterifikace mastných kyselin obsažených v lososí tkáni. Při rozhodování, kterou z metod využít bylo tedy přihlíženo k finančním a ekologickým ukazatelům, a proto byl pro výslednou přípravu methylesterů mastných kyselin použit postup esterifikace methanolem katalyzovaný kyselinou chlorovodíkovou.
Příprava vzorku pro analýzu mastných kyselin probíhala tedy podle M. Sassera s výjimkou extrakce methylesterů mastných kyselin, pro kterou byl ve výsledném postupu použit hexan.

5.1.3 Optimalizace metody pro stanovení isoprostanů v lososí tkáni

Přístrojové vybavení laboratoře umožňovalo stanovení isoprostanů jak pomocí plynové, tak kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí. Plynová chromatografie však vyžadovala esterifikaci karboxylové skupiny pomocí diazomethanu. Tato látka byla vyráběna v laboratoři ve speciální aparatuře umožňující rozklad N-nitroso-N-methyl-p-toluensulfonamidu. Výsledná analýza pomocí plynové chromatografie ve spojení s jednoduchým kvadrupólem nebyla dostatečně citlivá pro sledování isoprostanů v lososí tkáni. Diazomethan je navíc velmi toxický a výbušný plyn a jeho příprava byla časově náročná. Z tohoto důvodu byly dále optimalizovány podmínky kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

K optimalizaci stanovení pomocí UPLC-MS/MS byly použity jednotlivé standardy isoprostanů o koncentraci 100 ng/ml a jejich směs o koncentraci 1 ng/ml. V rámci vývoje metodiky pro sledování isoprostanů v lososích jikrách byly optimalizovány následující parametry: (i) příprava vzorků, (ii) MRM přechody pro sledování vybraných isoprostanů a (iii) chromatografická separace.

5.1.3.1 Příprava vzorku tkáně obsahující produkty oxidativní degradace mastných kyselin

K optimalizaci postupu izolace isoprostanů ze tkáně byly použity 3 g lososí svaloviny. Po důkladné homogenizaci byla tkáň ponechána v 0,3% roztoku H_2O_2 přes noc za nepřístupu světla. Tímto postupem došlo k oxidaci mastných kyselin a tvorbě jejich oxidačních produktů včetně isoprostanů, které mohly být ze tkáně dále izolovány a stanoveny metodou LC-MS/MS. Použitá koncentrace H_2O_2 a doba expozice byla předtím testována tak, aby nebyla pro tkáň viditelně destruktivní.

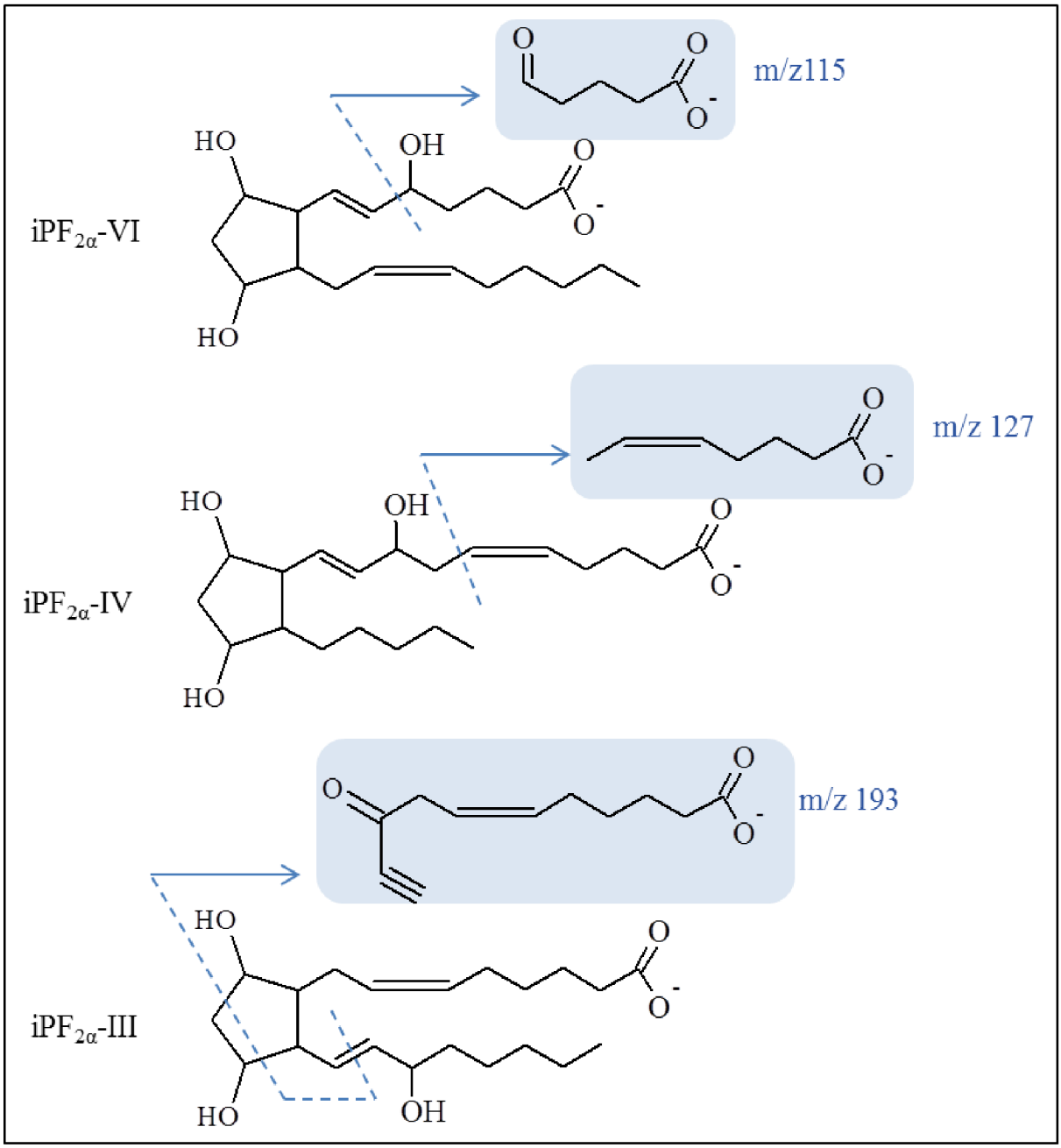
5.1.3.2 Optimalizace podmínek pro extrakci isoprostanů

Vázané isoprostany, stejně tak jako mastné kyseliny, byly nejdříve uvolněny alkalickou hydrolýzou, neboť bylo zapotřebí získat informaci o celkovém množství isoprostanů (volných a vázaných). Metoda pro hydrolýzu a následnou extrakci cílených analytů vycházela ze studií T. Sicilia, H. Li a M. Masoody [43, 44, 47] a byla optimalizována pro podmínky naší laboratoře. Studie se lišily teplotou při hydrolýze a dobou trvání hydrolýzy (30 – 60 min), a proto byly tyto parametry optimalizovány. Doba hydrolýzy ani teplota neměly významný vliv na množství izolovaných isoprostanů, a proto následující experimenty probíhaly za průměrných podmínek tj. při cca 40 °C po dobu 50 min.

Vzhledem k obecně nízkým hodnotám koncentrace isoprostanů v biologické tkáni je zapotřebí extrakt zakoncentrovat a přečistit pro odstranění potenciálních interferentů. Pro tento účel lze použít extrakci na tuhé fázi (SPE). Během optimalizace byly porovnávány dvě SPE kolonky lišící se použitou stacionární fází. S první kolonkou, která obsahovala reverzní fázi C-18 (Waters) bylo dosaženo výtěžnosti mezi 77,0 – 89,7 % a s druhou kolonkou, která obsahovala polymerní reverzní fázi (Phenomenex), bylo dosaženo výtěžnosti mezi 98,9 – 99,9 %. Vzorky byly dále přečišťovány pomocí kolonky obsahující polymerní stacionární fázi.

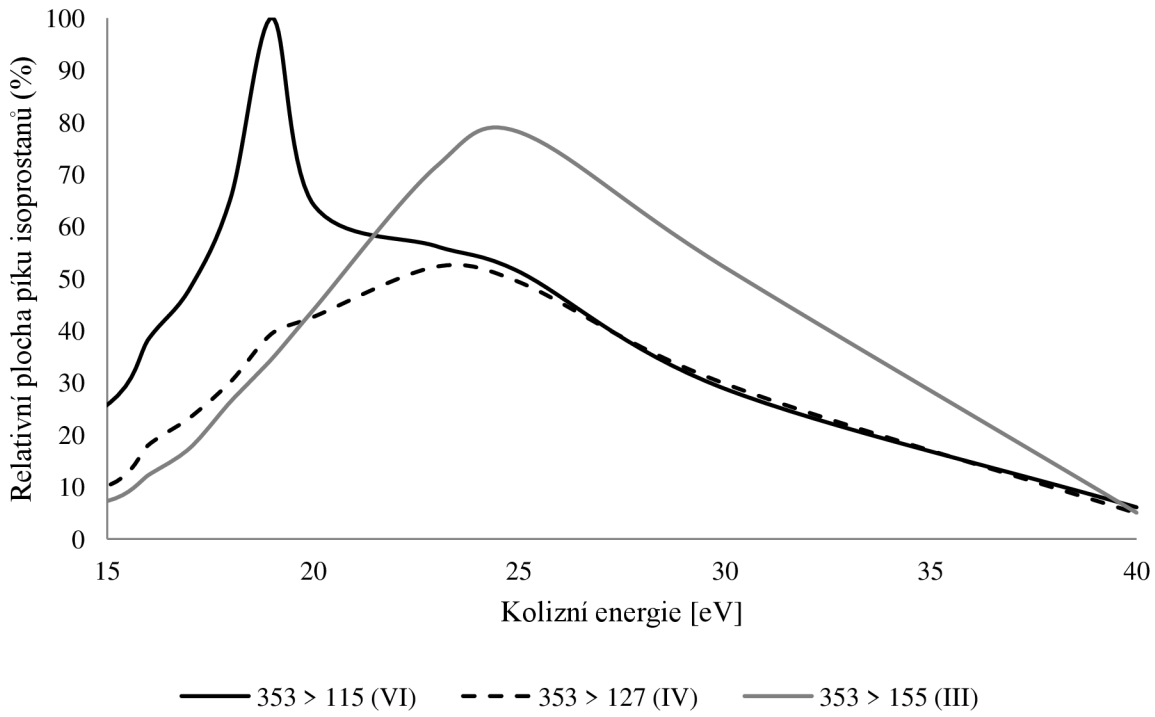
5.1.3.3 Optimalizace LC-MS parametrů

Pro sledování a následnou kvantifikaci analytů pomocí systému UPLC-MS/MS byla použita ionizace elektrosprejem se sledováním negativních iontů. Prekursorem pro následnou aplikaci kolizně indukované disociace byl kvazimolekulární deprotonovaný ion m/z 353, který byl společný pro všechny tři typy sledovaných analytů. Každá skupina isoprostanů obsahovala ve svém produktovém spektru sekundární ionty, které byly společné pro všechny typy isoprostanů, ale i ionty, které byly charakteristické pro jeden daný typ isoprostanu (Obrázek 27).



Obrázek 27: Sledované fragmenty po aplikaci kolizně indukované disociace prekurzoru m/z 353 pro kvantifikaci daného typu isoprostanu [72].

Pro sledování isoprostanů byly vybrány selektivní sekundární ionty pro aplikaci MRM modu tandemové hmotnostně spektrometrické detekce a byly optimalizovány podmínky jejich kolizně indukované disociace. Závislost plochy píku isoprostanů na aplikované kolizní energii je znázorněna na Obrázku 28.



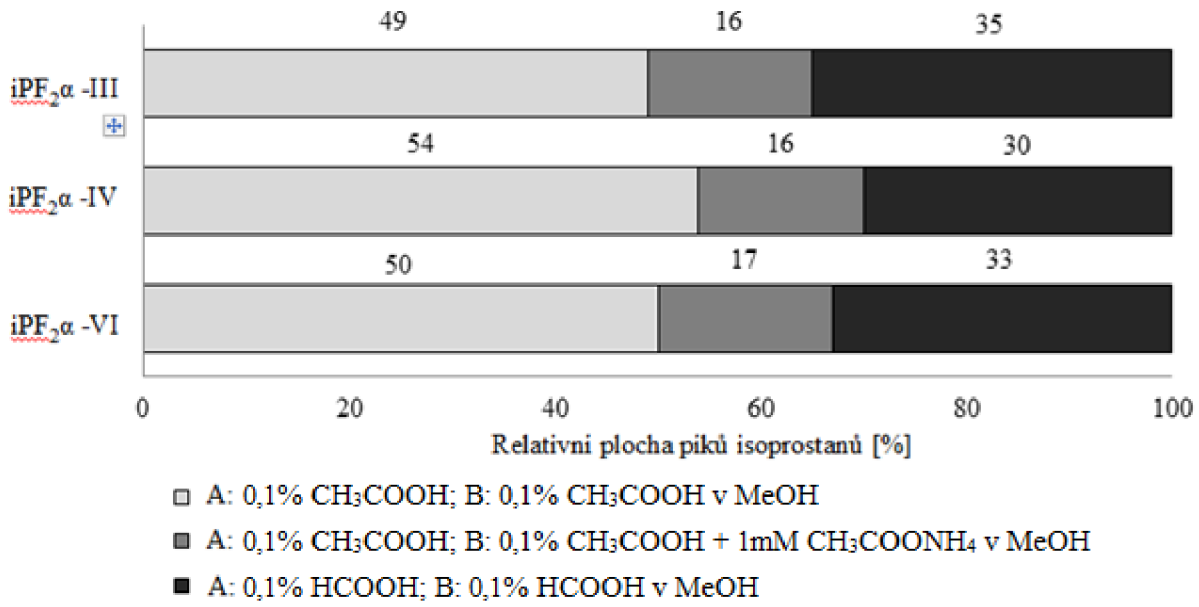
Obrázek 28: Vliv hodnoty kolizní energie na relativní plochu píku isoprostanů.

Pro následná měření byly použity hodnoty kolizních energií, které odpovídaly maximu křivky na Obrázku 28. MRM podmínky jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5. Nastavení MS detektoru pro aplikaci MRM módu.

	MRM reakce[m/z → m/z]	Napětí na vstupní čočce[V]	Kolizní energie[eV]
iPF_2 α -III	353 →193	40	25
iPF_2 α -IV	353 →127	40	23
iPF_2 α -VI	353 →115	40	19

Součástí dalších optimalizací bylo testování vlivu složení mobilní fáze na odezvu analytů. Předpokládaný pozitivní vliv mobilní fáze obsahující kyselinu octovou na intenzitu iontů sledovaných v negativním modu byl ověřen srovnáním s mobilními fázemi obsahujícími kyselinu mravenčí a octan amonný. Plochy píků každého analytu zvlášť byly pro srovnání normalizovány a graficky porovnány (Obrázek 29).



Obrázek 29: Vliv složení mobilní fáze na odezvu isoprostanů.

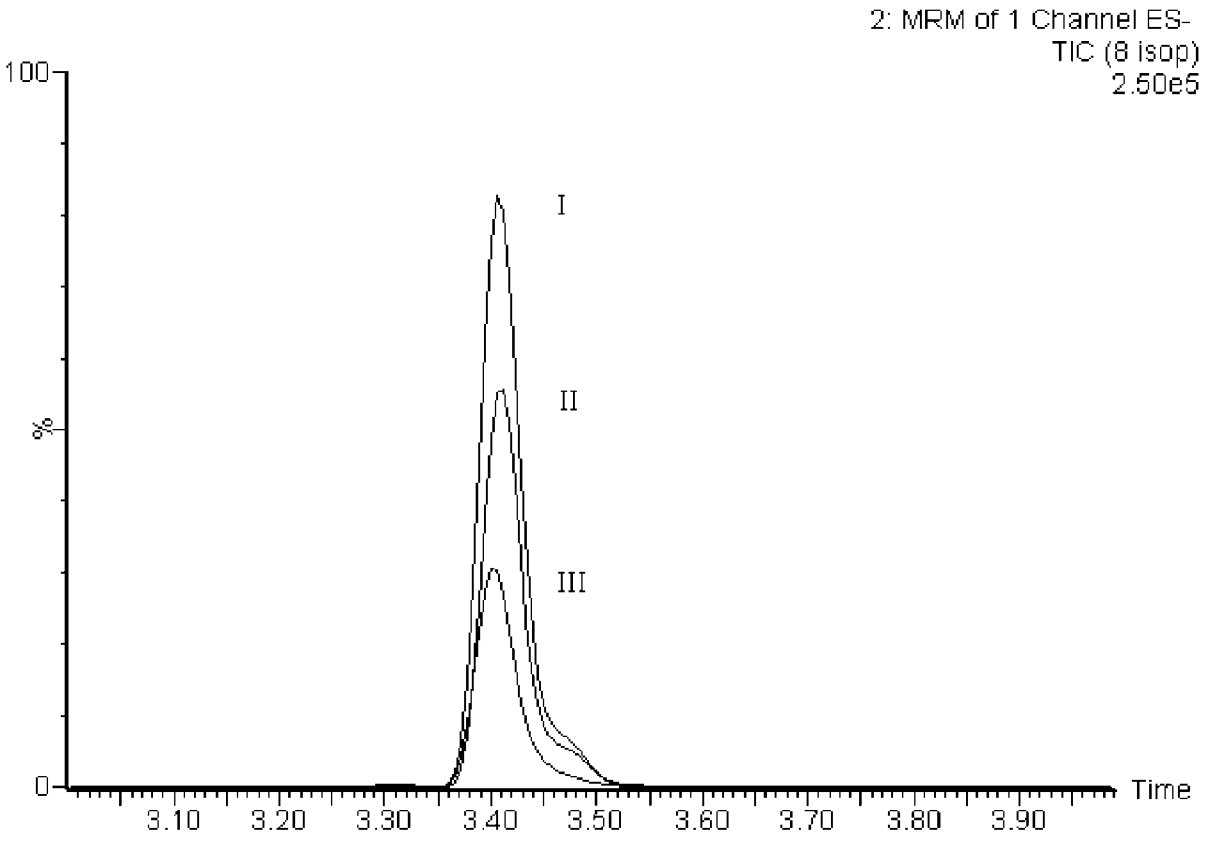
Ze srovnání lze usoudit, že použitá mobilní fáze měla velmi podobný efekt na každý ze tří analytů. Plocha píků isoprostanů je téměř dvojnásobně větší při použití mobilní fáze obsahující pouze kyselinu octovou, ve srovnání s plochou píků, získanou při aplikaci mobilní fáze obsahující pouze kyselinu mravenčí. Použití octanu amonného pro modifikaci mobilní fáze zde mělo významný vliv na snížení intenzity píků sledovaných analytů. V souvislosti s tímto experimentem byl při každé použité mobilní fázi určován i limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ), které byly určeny jako trojnásobek resp. desetinásobek poměru odezvy vůči šumu nulové linie. Výsledné hodnoty LOD a LOQ jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6. Vliv použité mobilní fáze na limity detekce a kvantifikace UPLC-MS/MS metody.

Isoprostan	$iPF_2\alpha$ -III			$iPF_2\alpha$ -IV			$iPF_2\alpha$ -VI		
Mobilní fáze	I	II	III	I	II	III	I	II	III
LOD [ng/ml]	0,013	0,089	0,060	0,039	0,114	0,051	0,021	0,080	0,051
LOQ [ng/ml]	0,042	0,297	0,201	0,129	0,381	0,171	0,069	0,265	0,171

Poznámka: Složení mobilních fází: I, A: 0,1% CH_3COOH, B: 0,1% CH_3COOH v MeOH; II, A: 0,1% CH_3COOH, B: 0,1% CH_3COOH a 1mM CH_3COONH_4 v MeOH; III, A: 0,1% HCOOH, B: 0,1% HCOOH v MeOH

Nejnižšího limitu kvantifikace bylo dosaženo chromatografií s mobilní fází obsahující pouze kyselinu octovou (I). Testované mobilní fáze neměly výrazný vliv na tvar píku. Na Obrázku 30 je uvedena ukázka ovlivnění chromatogramu $iPF_2\alpha$ -III použitou mobilní fází.



Obrázek 30: Chromatogram iPF$_2\alpha$-III s použitou mobilní fází I, A: 0,1% CH_3COOH a B: 0,1% CH_3COOH + 1 mM CH_3COONH_4; II, A: 0,1% HCOOH a B: 0,1% HCOOH v MeOH; III, A: 0,1% CH_3COOH a B: 0,1% CH_3COOH v MeOH.

Pro následující chromatografické experimenty na UPLC-MS/MS byla použita mobilní fáze tvořená složkou A (0,1% CH_3COOH ve vodě) a B (0,1% CH_3COOH v methanolu).

5.2 Validace metod pro sledování astaxanthinu, mastných kyselin a isoprostanů

K posouzení a dokumentaci kvality analytického postupu pro sledování astaxanthinu, mastných kyselin a isoprostanů v lososí tkáni, byla stanovena kriteria metody jako opakovatelnost, linearita, mez detekce (LOD) a mez kvantifikace (LOQ).
Citlivost metody je dána mezí detekce a mezí stanovitelnosti, které můžou být získány několika způsoby. LOQ a LOD byly v této práci vypočítány z poměru signálu k šumu. Opakovatelnost metody byla stanovena pomocí obohacených vzorků lososí tkáně v šesti opakováních. Důkladně homogenizovaná tkáň byla zpracovávána a analyzována podle výše popsaných postupů.

5.2.1 Validace stanovení mastných kyselin

Vhodnost metody pro stanovení mastných kyselin v lososí tkáni byla vzhledem k dostupnosti standardů experimentálně ověřena pomocí standardu kyseliny arachidonové.
Mez detekce (LOD) odpovídala koncentraci 250 µg/g a mez stanovitelnosti 760 µg/g (LOQ). Linearita byla hodnocena v rozsahu od 760 do 5000 µg/g, kde hodnota korelačního

koeficientu odpovídala R = 0,9993. Linearita byla tímto prokázána v celém dynamickém rozsahu kalibrační křivky. Opakovatelnost byla hodnocena pomocí RSD, jejíž výsledná hodnota činila ±8,7 %. Metoda je tedy vhodná pro stanovení mastných kyselin ve tkáni lososa.

5.2.2 Validace stanovení astaxanthinu

Mez detekce (LOD) odpovídala koncentraci 1 µg/g a mez stanovitelnosti 2,5 µg/g (LOQ). Linearita byla prokázána v koncentračním rozsahu 2,5 – 25 µg/g. Korelační koeficient R = 0,9996. Opakovatelnost, vyjádřená pomocí RSD, činila v tomto experimentu ± 6,5 %.
Validací byla prokázána vhodnost metody pro stanovení astaxanthinu ve tkáni lososa obecného.

5.2.3 Validace stanovení isoprostanů

Pro tři sledované typy isoprostanů byla sestrojena kalibrační závislost koncentrace na ploše píku. Získané kalibrační body v rozmezí od 1 do 1000 ng/ml (odpovídalo 0,66 a 666 ng/g) byly zpracovány metodou lineární regrese s koeficientem determinace R nejméně 0,999 pro všechny tři typy isoprostanů. Tímto byla prokázána linearita v daném koncentračním rozsahu. Další validované parametry jsou shrnuty v Tabulce 7.

Tabulka 7. Pracovní charakteristiky UPLC-MS/MS metody pro stanovení isoprostanů.

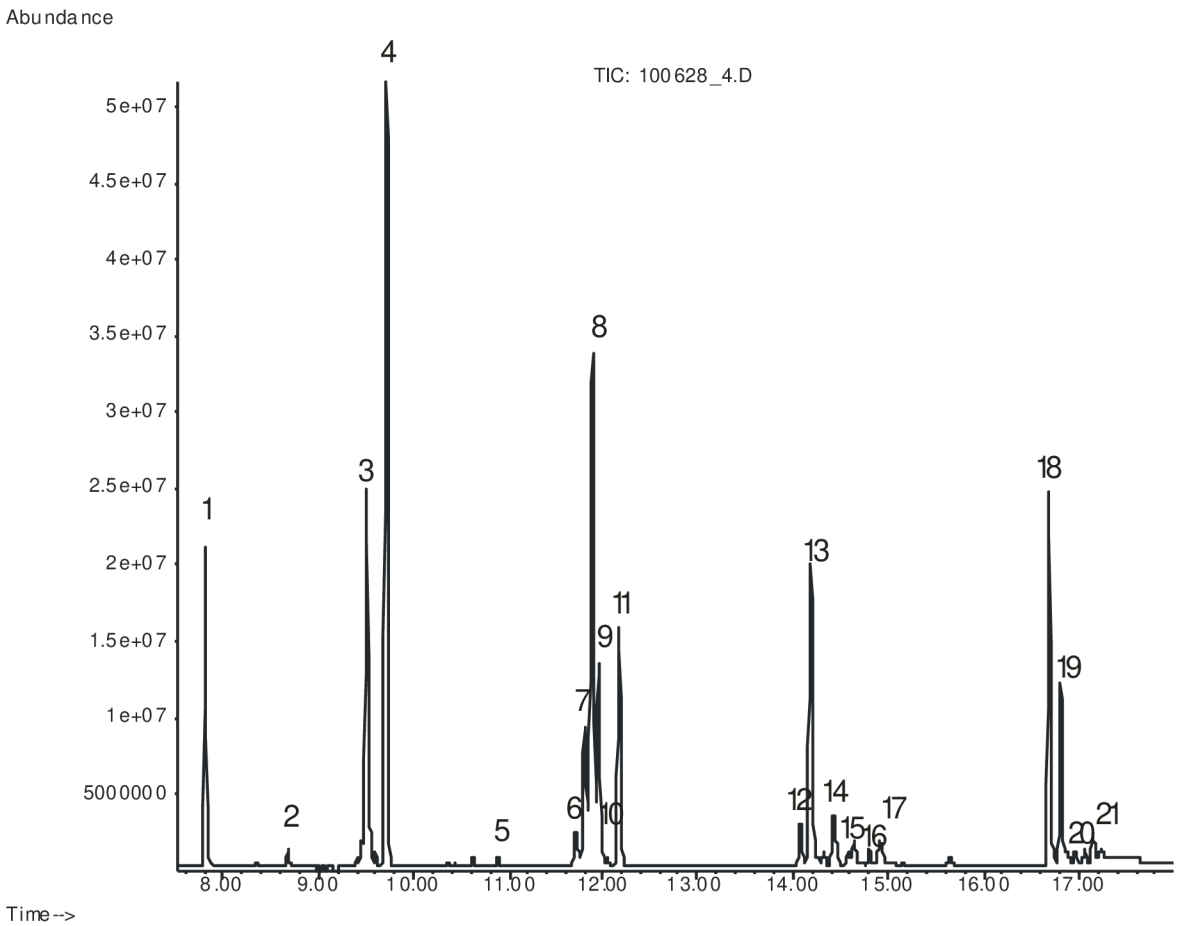
	RT (min)	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	R	RSD (n = 6)
$iPF_2\alpha$ -III	3,41	0,009	0,028	0,9993	14,6
$iPF_2\alpha$ -IV	3,31	0,026	0,085	0,9992	9,9
$iPF_2\alpha$ -VI	3,47	0,014	0,045	0,9997	14,7

Validací byla prokázána vhodnost metody pro stanovení isoprostanů v lososí tkáni.

5.3 Analýza mastných kyselin

Přítomnost oxidativního zatížení v organismu je často spojována se zvýšenou hladinou některých polynenasycených mastných kyselin, kterými jsou například kyselina dokosahexaenová a arachidonová [66, 73, 74]. Kyselina arachidonová je prekurzorem isoprostanů, které slouží jako markery oxidativního stresu. Proto se tato práce zaměřovala na srovnání množství kyseliny arachidonové mezi jednotlivými vzorky jiker. Díky možnostem, které poskytuje moderní analytická technika GC-MS, bylo možno zároveň sledovat celkový profil relativního zastoupení mastných kyselin ve sledovaných vzorcích jiker.

Složení mastných kyselin v lososích jikrách bylo velmi podobné tomu, jaké uvádí ve své studii Brown S. B. a kol. [75].
Na Obrázku 31 je uveden chromatogram se záznamem 21 mastných kyselin, které byly v různém poměru přítomny ve všech vzorcích lososích jiker. Přehled těchto mastných kyselin včetně triviálních názvů je uveden v Tabulce 8.



Obrázek 31: Chromatografický záznam celkového iontového proudu (TIC) mastných kyselin v lososích jikrách (čerstvě nakladené jikry). Názvy označených píků mastných kyselin jsou uvedeny v Tabulce 8.

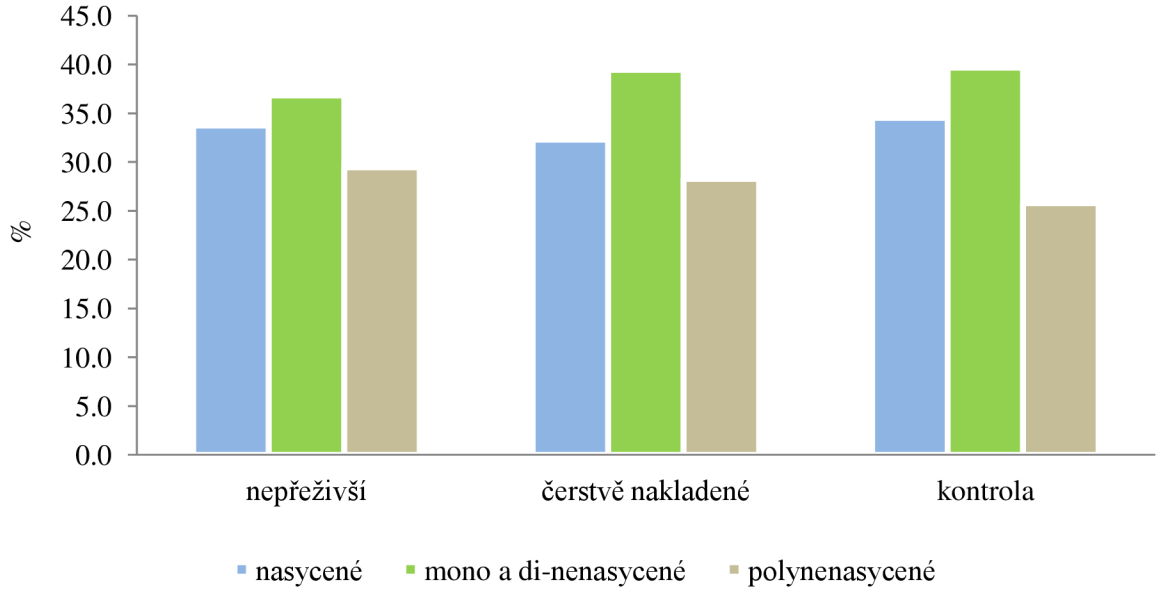
Tabulka 8. Přehled mastných kyselin přítomných ve vzorcích jiker lososa obecného. Mastné kyseliny jsou barevně odděleny podle nasycenosti vazeb (modrá: nasycené, zelená: mono a di-nenasycené a šedá: polynenasycené).

Pík	RT	Chemický vzorec	Chemický název kyseliny	Triviální název
1	7,82	14:0	Tetradekanová	Myristová
2	8,69	15:0	Pentadekanová	Pentadekanová
4	9,72	16:0	Hexadekanová	Palmitová
5	10,89	17:0	Heptadekanová	Margarová
11	12,19	18:0	Oktadekanová	Stearová
3	9,51	16:1(n-7)	9-hexadecenová	Palmitoolejová
7	11,72	17:1(n-7)	10-heptadecenová	-
9	11,88	18:1(n-9)	9-oktadecenová	Elaidová
6	11,59	18:1(n-7)	11-oktadecenová	Vakcenová
15	14,66	20:1(n-9)	11-eikosenová	-
10	12,01	18:2(n-4)	11,14-oktadekadienová	-
8	11,80	18:2(n-6)	9,12-oktadekadienová	Linolelaidová

Tabulka 8 (pokračování). Přehled mastných kyselin přítomných ve vzorcích jiker lososa obecného. Mastné kyseliny jsou barevně odděleny podle nasycenosti vazeb (modrá: nasycené, zelená: mono a di-nenasycené a šedá: polynenasycené).

Pík	RT	Chemický vzorec	Chemický název kyseliny	Triviální název
12	14,20	20:4(n-6)	5,11,14,17-eikosatetraenová	Arachidonová (AA)
14	14,44	20:4(n-6)	(Z)5,11,14,17-eikosatetraenová	Arachidonová (AA)
13	14,22	20:5(n-3)	5,8,11,14,17-eikosapentaenová	Timnodová (EPA)
16	14,82	20:5(n-3)	5,8,11,14,17-eikosapentaenová	Timnodová (EPA)
17	14,93	20:5(n-3)	5,8,11,14,17-eikosapentaenová	Timnodová (EPA)
19	16,82	20:5(n-3)	5,8,11,14,17-eikosapentaenová	Timnodová (EPA)
18	16,69	22:6(n-3)	4,7,10,13,16,19-dokosahexaenová	Dokosahexaenová (DHA)
20	17,07	22:6(n-3)	4,7,10,13,16,19- dokosahexaenová	Dokosahexaenová (DHA)
21	17,16	22:6(n-3)	4,7,10,13,16,19- dokosahexaenová	Dokosahexaenová (DHA)

V jikrách byly obsaženy nasycené i nenasycené mastné kyseliny. Proto byly sestaveny profily mastných kyselin podle nasycenosti vazeb (Obrázek 32). Pro vyjádření zastoupení mastných kyselin byla použita vnitřní normalizace. Profily mastných kyselin se mezi vzorky jiker výrazně neliší. Vždy dominují mono- a di- nenasycené mastné kyseliny, poté nasycené mastné kyseliny a nejmenší relativní zastoupení zaujímají mastné kyseliny obsahující tři a více dvojných vazeb.



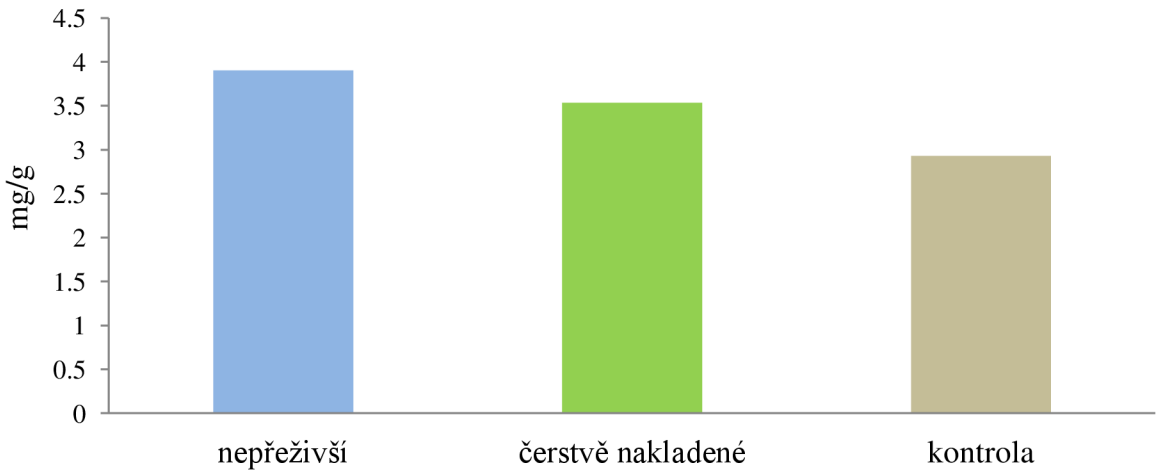
Obrázek 32: Relativní zastoupení nasycených, mono- nebo di-nenasycených a polynenasycených mastných kyselin ve vzorcích lososích jiker.

Isoprostany vznikají lipidní peroxidací polynenasycených mastných kyselin obsahujících alespoň tři dvojné vazby (PUFA). Náchylnost lososích jiker k tvorbě isoprostanů mohla být proto hodnocena podle množství těchto mastných kyselin v jednotlivých vzorcích jiker. Z tohoto důvodu bylo provedeno porovnání mezi jednotlivými skupinami jiker z pohledu relativního množství PUFA v jednotlivých skupinách vzorků.

Ve srovnání s kontrolou bylo větší množství PUFA obsaženo v nepřeživších jikrách (Obrázek 32). Nepřeživší jikry tedy mohly být považovány za náchylnější ke tvorbě isoprostanů ve srovnání s kontrolou.
Čerstvě nakladené jikry obsahovaly větší množství PUFA než kontrolní vzorky. Ta mohla být způsobena buď přítomností oxidativního stresu u čerstvě nakladených jiker, nebo postupným snižováním PUFA díky biologické přeměně těchto látek během vývoje lososích jedinců.

5.3.1 Analýza kyseliny arachidonové

Kyselina arachidonová patří mezi PUFA a je prekurzorem dále sledovaných F_2-isoprostanů. Její zvýšené množství v organismu se dává do souvislosti s přítomností oxidativního stresu. Absolutní množství kyseliny arachidonové bylo porovnáváno mezi vzorky testovaných jiker.
EI hmotnostní spektrum kyseliny arachidonové obsahovalo několik významných iontů. Základním píkem EI hmotnostního spektra kyseliny arachidonové byl ion m/z 79. Extrahovaný iontový chromatogram m/z 79 byl proto vybrán pro kvantitativní stanovení kyseliny arachidonové ve vzorcích jiker. Ke konfirmaci kyseliny arachidonové sloužil RT a vybrané ionty z hmotnostního spektra m/z 287 a m/z 316.
Množství kyseliny arachidonové se v jikrách pohybovalo v rozmezí od 7,2 do 16,3 mg/g. Nálezy jsou srovnatelné se studií Browna a kol., kde jikry lososa obecného obsahovaly kyselinu arachidonovou v přibližném množství 6 mg/g [75].
Průměrná množství kyseliny arachidonové jsou uvedena na Obrázku 33. Její největší množství bylo obsaženo v nepřeživších jikrách (3,9 ± 0,8 mg/g) (n = 10) a poté v čerstvě nakladených jikrách, které obsahovaly 3,5 ± 0,1 mg/g (n = 10). Nejmenší množství kyseliny arachidonové bylo obsaženo v kontrolních vzorcích (2,9 ± 0,2 mg/g) (n = 10).



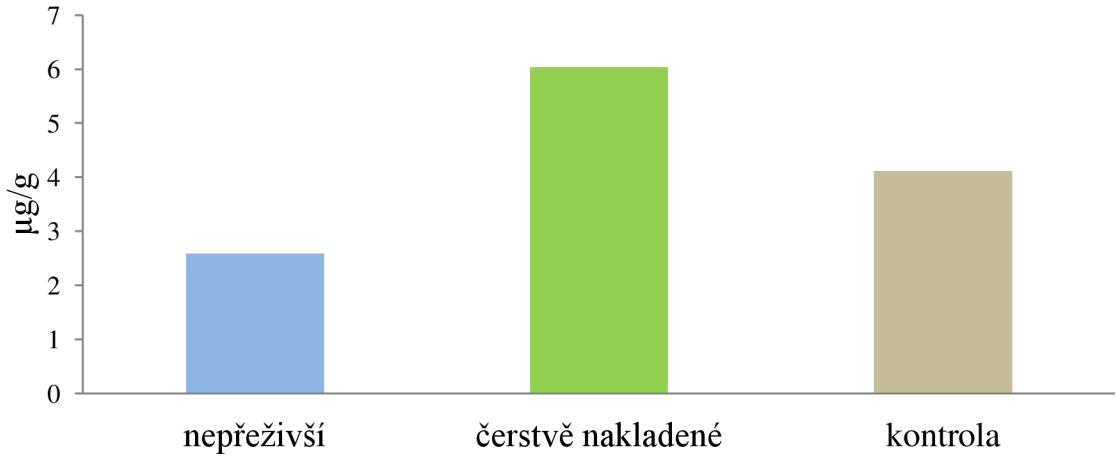
Obrázek 33: Průměrná množství kyseliny arachidonové v lososích jikrách.

Mezi kontrolními vzorky a nepřeživšími vzorky jiker byly pozorovány sice malé, avšak statisticky významné rozdíly (p = 0,04), zatímco mezi kontrolními vzorky a čerstvě nakladenými vzorky nebyl rozdíl statisticky potvrzen (p = 0,42). Množství kyseliny arachidonové kopíruje nálezy v relativním zastoupení PUFA ve vzorcích jiker, a proto lze opět konstatovat, že kontrolní jikry mohou být méně náchylné ke tvorbě F_2-isoprostanů než

nepřeživší jikry. Rozdíl mezi kontrolou a čerstvě nakladenými jikrami může být způsoben faktory diskutovanými již v předchozí části věnované PUFA.

5.4 Analýza astaxanthinu v lososích jikrách

Vyvinutá metoda pro stanovení astaxanthinu byla použita pro hodnocení oxidativního stresu v kontrolních, čerstvě nakladených a nepřeživších jikrách.
Již bílá barva nepřeživších jiker vizuálně naznačovala nižší hladinu karotenoidů oproti zbylým dvěma analyzovaným skupinám, což bylo následně potvrzeno i analýzou. Největší koncentrace astaxanthinu byly nalezeny ve vzorcích čerstvě nakladených jiker, a to 6,0 ± 2,6 µg/g (n = 10). Menší hladina astaxanthinu byla nalezena ve vzorcích nepřeživších jiker, a to 2,6 ± 1,0 µg/g (n = 10). V kontrole bylo obsaženo 4,11 ± 1,1µg/g (n = 10) astaxanthinu. Množství astaxanthinu v lososích jikrách je znázorněno na Obrázku 34. Nalezená množství astaxanthinu byla v souladu s nálezy tohoto karotenoidu v lososích jikrách, které jsou udávány v rozmezí 0 – 14,7 µg/g [76].

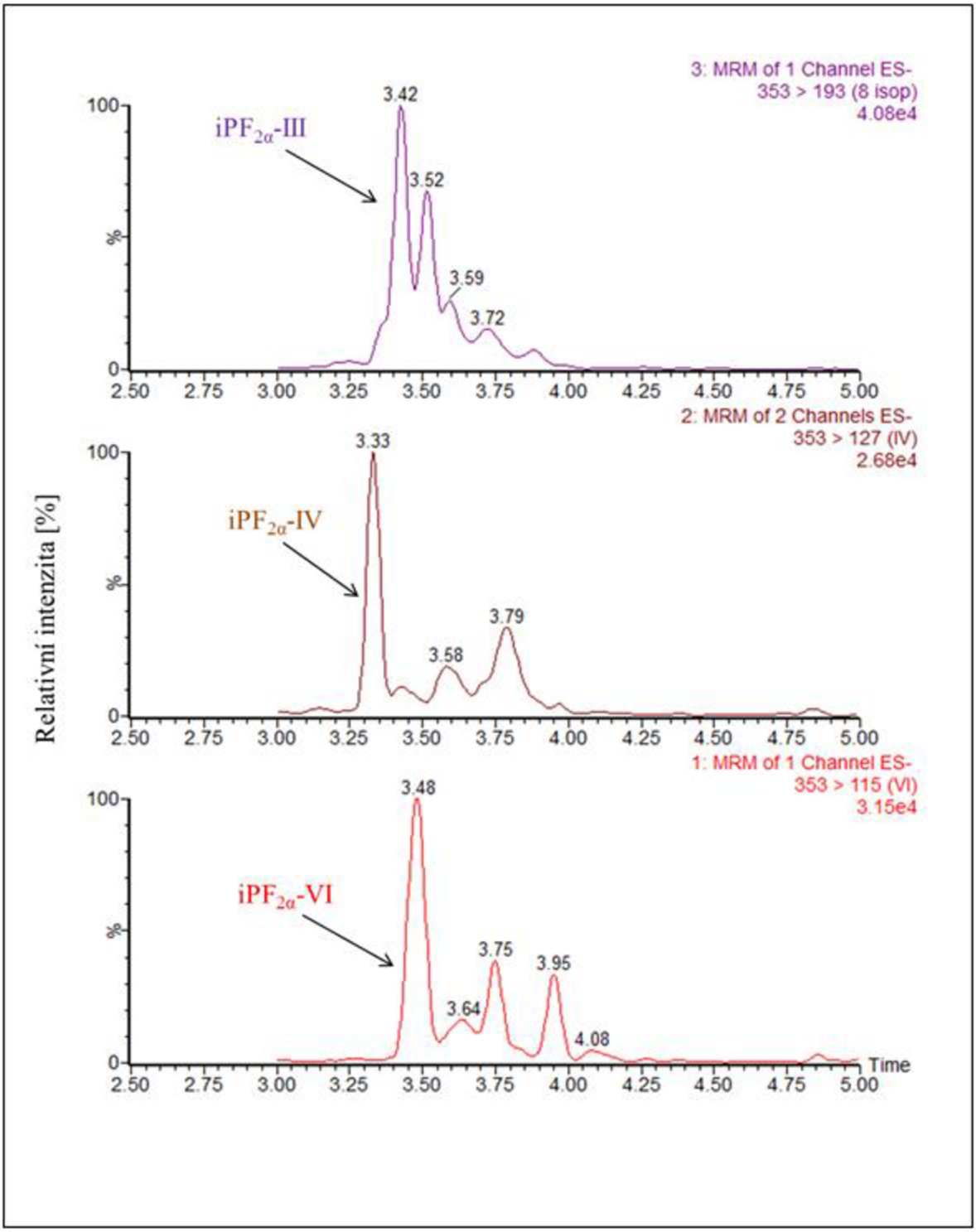


Obrázek 34: Hladina astaxanthinu ve vzorcích lososích jiker.

Statisticky významné rozdíly byly pozorovány mezi kontrolními vzorky a nepřeživšími jikrami (p = 0,002) a mezi kontrolními vzorky a čerstvě nakladenými jikrami (p = 0,004).
Nízká hladina astaxanthinu ve srovnání s kontrolními vzorky by mohla být vysvětlena právě přítomností oxidativního stresu. Snížená hladina mezi kontrolními vzorky a čerstvě nakladenými jikrami může opět naznačovat postupnou spotřebu tohoto ketokarotenoidu během vývoje jikry. Astaxanthin je rybou přijímán pouze prostřednictvím potravy a jeho množství v jikrách je dáno přítomností astaxanthinu v těle samice. Během vývoje jikry může být tedy tento pigment spotřebováván antioxidativní ochranou organismu. O snížení množství astaxanthinu během vývoje ryby hovoří například i následující publikace [77].

5.5 Analýza isoprostanů v lososích jikrách

Vyvinutá analytická metoda pro analýzu isoprostanů byla použita pro hodnocení oxidativního stresu v jikrách lososa obecného. V této studii byly srovnávány hladiny markerů oxidativního stresu, a to $iPF_2\alpha$-III, $iPF_2\alpha$-IV a $iPF_2\alpha$-VI mezi přeživšími jikrami (kontrola), nepřeživšími jikrami a čerstvě nakladenými jikrami. Na Obrázku 35 je znázorněn příklad fragmetogramu isoprostanů získaných extrakcí vzorku čerstvě nakladených jiker.



Obrázek 35: Fragmentogram isoprostanů; vzorek čerstvě nakladených jiker *Salmo salar* s vyznačenými vyhodnocovanými píky.

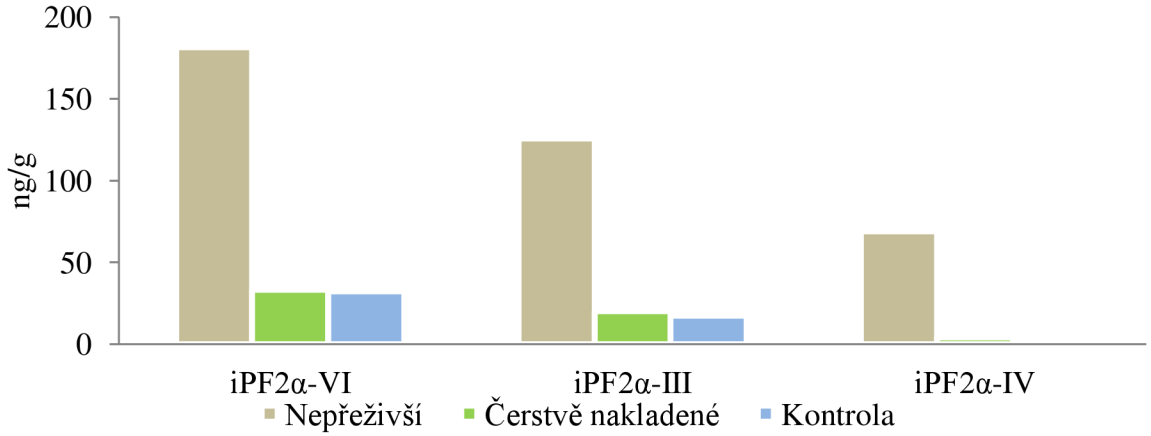
Nalezená množství isoprostanů byla porovnatelná s množstvím těchto markerů obsažených v živočišné tkáni vodních organismů na základě srovnání se studií prováděné na sasankách koňských [78].

Všechny sledované analyty byly v různém množství obsaženy ve všech testovaných vzorcích jiker s výjimkou $iPF_2\alpha$-IV, jehož množství v kontrolních vzorcích se nacházelo pod limitem kvantifikace použité metody (viz Tabulka 9).

Tabulka 9. Průměrná množství isoprostanů typu III, IV a VI v kontrolních, čerstvě nakladených a nepřeživších vzorcích jiker lososa obecného.

	Průměr ± SD; (n = 10)		
	$iPF_2\alpha$-VI	$iPF_2\alpha$-III	$iPF_2\alpha$-IV
Kontrola	33,2 ± 12,9	17,4 ± 5,6	< LOQ
Nakladené jikry	32,2 ± 12,3	20,2 ± 7,5	4,1 ± 3,6
Nepřeživší jikry	181,5 ± 37,8	125,7 ± 23,1	69,0 ± 19,0

Nejvyšší množství všech sledovaných typů isoprostanů bylo nalezeno ve vzorcích nepřeživších jiker, které převyšovalo nálezy v ostatních dvou skupinách, a to více než pětkrát (Obrázek 36).



Obrázek 36: Množství isoprostanů ve vzorcích kontrolních, čerstvě nakladených a nepřeživších jiker. Hodnoty odpovídají průměrnému množství obsaženému v deseti vzorcích z každé testované skupiny.

V množství isoprostanů mezi kontrolou a nepřeživšími jikrami byly nalezeny signifikantní rozdíly, zatímco mezi kontrolními vzorky a vzorky čerstvě nakladených jiker nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly. Statistické porovnání mezi testovanými skupinami jiker je uvedeno v Tabulce 10.

Tabulka 10. Statistické porovnání množství isoprostanů v testovaných vzorcích jiker.

Isoprostan	Srovnávané vzorky		Hodnota *p*
$iPF_2\alpha$-VI	Kontrola	Čerstvě nakladené	0,8710
	Kontrola	Nepřeživší	0,0001
$iPF_2\alpha$-III	Kontrola	Čerstvě nakladené	0,2353
	Kontrola	Nepřeživší	0,0001
$iPF_2\alpha$-IV	Kontrola	Čerstvě nakladené	–[a]
	Kontrola	Nepřeživší	–[a]

a… Množství $iPF_2\alpha$-IV v kontrolních vzorcích se nacházelo pod LOQ.

Podíl jednotlivých typů isoprostanů klesal ve všech vzorcích v řadě: VI > III > IV. Tento trend byl také popsán ve studii Ormezzana a kol. [79], která navíc uvádí, že isoprostany typu VI a III jsou produkovány *in vivo* v podobném množství, zatímco typ V a IV jsou produkovány v nižším množství.

6. ZÁVĚR

Tato studie se zabývala vývojem a optimalizací metod pro stanovení isoprostanů – markerů oxidativního stresu a dalších látek, které mohou být přítomností oxidativního stresu ovlivňovány.

Analyty byly ze tkáně izolovány vhodnou extrakční technikou a stanoveny pomocí chromatografických metod ve spojení s konvenční spektrofotometrickou (VIS) nebo hmotnostně spektrometrickou detekcí. Vyvinuté metody byly použity pro sledování isoprostanů $iPF_2\alpha$-III, $iPF_2\alpha$-VI, $iPF_2\alpha$-VI, astaxanthinu a polynenasycených mastných kyselin (PUFA), zejména pak kyseliny arachidonové, v jikrách lososa obecného (*Salm salar*), které se lišily svojí životaschopností a vývojovým stadiem.

V nepřeživších jikrách bylo obsaženo větší množství sledovaných isoprostanů a arachidonové kyseliny a zároveň nižší množství astaxanthinu než v kontrolních vzorcích jiker (reprezentujících nezatížené jedince). Také relativní zastoupení PUFA bylo ve vzorcích nepřeživších jiker vyšší než v kontrolních vzorcích.

Výsledky této studie podporují hypotézu, že životaschopnost jiker *Salmo salar* mohla být ovlivněna v důsledku přítomnosti oxidativního stresu.

Čerstvě nakladené jikry obsahovaly srovnatelnou hladinu sledovaných isoprostanů s kontrolními vzorky. Pouze $iPF_2\alpha$-IV byl obsažen v kontrolních vzorcích pod LOQ, zatímco čerstvě nakladené jikry obsahovaly nízké, avšak kvantifikovatelné množství. Vyšší hladiny PUFA a kyseliny arachidonové ve srovnání s kontrolou, byly pozorovány u čerstvě nakladených jiker. Nicméně statisticky významný byl pouze rozdíl v množství astaxanthinu. Úbytek množství PUFA a astaxanthinu může souviset s jejich biochemickou spotřebou během vývoje jiker.

Postup pro izolaci a kvantifikaci isoprostanů je validovaný v matrici tkáně lososa obecného (*Salmo salar*). Důležitým krokem celého postupu je uvolnění vázaných forem isoprostanů pomocí hydrolýzy, který lze aplikovat i na další tkáňové vzorky. Z tohoto důvodu lze konstatovat, že vyvinutá metoda je obecně vhodná pro sledování markerů oxidativního stresu i v jiných biologických tkáních.

Téma B

VYUŽITÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE KE STANOVENÍ MYKOTOXINŮ

7. TEORETICKÁ ČÁST

7.1 Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou sekundární toxické metabolity vláknitých mikromycetů (plísní). Sekundárními metabolity se označují proto, aby se odlišily od látek, které jsou daným organismem také metabolizovány, ale na rozdíl od sekundárních metabolitů jsou nezbytné pro jeho správnou funkci. Těmito tzv. primárními metabolity jsou například aminokyseliny, nukleové kyseliny a proteiny, které jsou esenciální pro daný organismus. Sekundární metabolity pak mají funkci především obrannou a ochrannou. Plísně jsou téměř všudypřítomné a jejich přítomnost může značně ovlivnit kvalitu potravin a krmiv.

Název „mykotoxin“ je kombinací řeckého názvu pro houby „mykes“ a latinského názvu pro jed „toxicum“. Bylo objeveno již více než 500 mykotoxinů lišících se strukturou a fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Z hlediska bezpečnosti potravin a krmiv jsou významné pouze některé z nich. Nejčastěji se vyskytujícími mykotoxiny, které způsobují nežádoucí účinky na organismus člověka a zvířat, jsou aflatoxiny, ochratoxiny, fumonisiny, trichotheceny, zearalenon a patulin. Za účelem zavedení maximálních přípustných limitů v potravinách a krmivech vydala Evropská instituce EFSA dokument, ve kterém navíc vybízí ke sledování enniatinů a ergotových alkaloidů v zemědělských surovinách a jejich osudu v rámci celého potravního řetězce a technologického zpracování [80, 81].

Zájem je tedy o studium celé řady mykotoxinů, které se liší nejen svojí chemickou strukturou, ale i svým původem. Různé mykotoxiny jsou produkované různými plísněmi a jejich klasifikace je proto poměrně nesnadná a záleží na konkrétním hledisku, podle kterého mohou být mykotoxiny tříděny. Klasifikaci lze provádět například na základě původu daného mykotoxinu, tedy jaký druh houby jej produkuje (fusariové mykotoxiny), dále mohou být děleny podle chemické struktury (trichotheceny A a B a enniatiny), nebo mohou být děleny například podle biologické aktivity (hepatotoxiny, nefrotoxiny, neurotoxiny, mutageny, karcinogeny, …). V Tabulce 11 [82] je přehled nejběžnějších mykotoxinů s jejich původci a nejčastějším výskytem v příslušné komoditě.

Tabulka 11. Přehled nejběžnějších mykotoxinů s jejich původci a typickým výskytem.

Mykotoxin		Původce	Výskyt
Trichotheceny typu A	T-2 toxin, HT-2 toxin, diacetoxyscirpenol, neosolaniol, verrucarol	*Fusarium sporotrichioides, F. poae, F. culmorum, F. equiseti, F. graminearum, F. moniliforme, Cephalosporium sp., Myrothecium sp., Trichoderma sp., Trichothecium sp., Phomopsis sp., Stachybotrys sp., Verticimonosporium sp.*	obiloviny, obilné potraviny
Trichotheceny typu B	nivalenol, deoxynivalenol, 3-acetyl DON, 15-acetyl DON, fusarenon-X	*Fusarium graminearum, F. sporotrichioides, F. Culmorum, F. cerealis, F. lunulosporum*	obiloviny, obilné potraviny
Zearalenon		*Fusarium graminearum, F. sporotrichioides, F. culmorum, F. equiseti, F. crookwellense*	ječmen, oves, pšenice, rýže, čirok, sezam, sójové boby, obilné potraviny

Tabulka 11 (pokračování). Přehled nejběžnějších mykotoxinů s jejich původci a typickým výskytem.

Mykotoxin		Původce	Výskyt
Fumonisiny	Fumonisiny A1, A2, B1, B2, B3, C1, C2, C3, P1, P2, P3	*Fusarium verticilliodies, F. proliferatum, F. anthophilum, F. moniliforme, F. dlamini, F. napiforme, F. nygamai, Alternaria alternata*	kukuřice, kukuřičné potraviny, čirok, chřest, rýže
Ochratoxiny	ochratoxiny A, B, C	*Aspergillus ochraceus, A. niger, A. melleus, A. alutaceus, A. alliaceus, A. albertensis, A. citricus, Neopetromyces muricatus, Penicillium viridicatum, P. verrucosum, P. cyclopium, P. carbonarius*	obiloviny, sušené ovoce, rozinky, víno, káva, oves, žito, koření
Ergotové alkaloidy	ergokornin, ergokristin, ergokryptin, ergosin	*Claviceps purpurea, C. africanana, C. fusiformis, C. paspali, Neotyphodium coenophialum*	pšenice, rýže, žito, olivy, čirok, tabák, jablka, pepř, slunečnicová semínka, semena řepky olejné, pekanové ořechy, rajčata, mandarinky
Enniatiny	Enniatin A, A1, B, B1	*Fusarium avenaceum, F. orthoceras, některá Alternaria, Halosarpheia, Verticillium sp.*	pšenice, kukuřičná zrna, ječmen, oves, rýže
Patulin		*Aspergillus clavatus, A. longivesica, A. terreus, P. expansum, Penicillium griseofulvum, Byssochlamys sp.*	jablka, jablečné džusy, třešně, obilná zrna, grepy, hrušky, borůvky
Beauvericin		*F. bulbicola, F. denticulatum, F. lactis, F. phillophilum, F. pseudocircinatum, F. succisae*	pšenice, kukuřičná zrna, ječmen, oves, rýže
Fusaroproliferin		*Fusarium prolifaratum, F. concentricum, F. antophilum, F. begoniae, F. succisae, F. bulbicola, F. circinatum, F. udum, F. sublutinans*	pšenice, kukuřičná zrna, ječmen, oves, rýže
Aflatoxiny	Aflatoxin B1, G1, B2 a G2	*Aspergillus flavus, A. nomius, A. parasiticus, A. arachidicola, Emericella astellata, E. venezuelensis, E. olivicola*	kukuřice, rýže, pšenice, koření, mandle, olejniny, sušené ovoce, sýr
	Aflatoxin M1 a M2	metabolity aflatoxinu B1 a B2	mléko, vejce, maso

Houby ze stejného rodu mohou produkovat různé mykotoxiny a zároveň může být jeden typ mykotoxinu produkován houbami z různých rodů. Významné toxinogenní vláknité mikromycety jsou z rodu *Aspergillus, Fusarium, Penicillium* a *Alternaria*. Houby jsou natolik početné oddělení, že jejich detailní prozkoumání mohlo být provedeno zatím jen pro určitou část, a proto se nevylučuje přítomnost dalších druhů hub a mykotoxinů.

7.2 Účinek mykotoxinů na zdraví lidí a zvířat

V určitém množství může přítomnost mykotoxinů v potravinách ovlivnit zdraví lidí i zvířat. Způsobený efekt je různý a jeho závažnost záleží na množství a variabilitě faktorů, kterými jsou například množství přijímané látky, doba trvání expozice, mechanismus účinku, druh mykotoxinu, přítomnost více druhů mykotoxinů, pohlaví, metabolismus, obranné mechanismy, fyziologický stav a další faktory [83].

Onemocnění, která nastanou v důsledku příjmu mykotoxinů, jsou označována jako tzv. **mykotoxikózy**. Do těl zvířat se mykotoxiny dostávají s krmivem, které je kontaminované plísněmi. U lidí dochází k expozici buď prostřednictvím konzumace plesnivých potravin, nebo konzumací kontaminovaných živočišných produktů (mléko, maso, vejce), které obsahují mykotoxiny, jež se dostaly do těl zvířat s plesnivým krmivem. Mykotoxiny jsou zodpovědné za množství významných onemocnění u lidí a zvířat. Některá onemocnění vedla dokonce až k epidemiím, neboť se díky neznalosti nemohla odstranit příčina, kterou byla právě plísní kontaminovaná potravina. Nejznámější mykotoxikóza je ergotismus. První případy jsou datovány od roku 1750. Toto onemocnění je způsobeno příjmem potraviny kontaminované ergotovými (námelovými) alkaloidy, které jsou produkovány plísní paličkovicí nachovou (*Claviceps purpurea*). Ergotismus je díky příznakům onemocnění dokonce spojován s některými čarodějnickými procesy. Nejlépe je toto dokumentováno u tzv. Salemského čarodějnického procesu ze sklonku 17. století (USA, Massachussetts) [84]. Mykotoxiny mohou u zvířat a člověka vyvolat řadu nežádoucích onemocnění, která mají **akutní**, **chronický** nebo obojí průběh, a to v závislosti na druhu toxinu a na dávce. **Akutní primární mykotoxikózy** jsou vyvolány příjmem vysokých dávek, při kterých dochází k patologickým změnám na játrech (degenerace, nekrózy, cirhóza), ledvinách a dalších orgánech. Dále dochází k poškození oběhového systému a centrální nervové soustavy. Vznikají i kožní onemocnění a dochází k hormonálním změnám vedoucím až k neplodnosti [85]. **Chronický průběh** je vyvolán dlouhodobým příjmem nízkých dávek. Projevuje se teratogenními, mutagenními a karcinogenními účinky, poškozením centra krvetvorby (krvácení, snížená srážlivost, změny v kostní dřeni), oslabením imunitního systému (zvýšená náchylnost k infekčním chorobám) a snížením užitkovosti zvířat. Navíc se mykotoxiny mohou hromadit a vylučovat v metabolicky a toxikologicky aktivnějších formách a tím o to víc mohou ohrožovat zdraví organismu [85]. V následující Tabulce 12 je výčet některých mykotoxinů a jejich působení na zdraví organismu.

Tabulka 12. Zástupci mykotoxinů a jejich účinky na zdraví.

Mykotoxin	Toxický účinek na zdraví
Aflatoxiny	Účinek na játra (hepatotoxicita, hepatokarcinogenita), karcinogenita a teratogenita, hemoragie (ledviny, střeva), imunosuprese.
Ochratoxiny	Nefrotoxicita, karcinogenita, imunosuprese.
Fumonisiny	Plicní edém, nefro- a hepatotoxicita, imunosuprese.
Trichotheceny	Poruchy zažívání (zvracení, průjem), redukce hmotnosti, hemoragie (žaludek, srdce, plíce, střeva, močový měchýř), vznik ústních lézí, dermatitida, neplodnost, degenerace kostní dřeně, zpomalený růst, imunosuprese
Zearalenon	estrogenní účinky, otok vulvy, výhřez pochvy, zvětšení dělohy, atrofie varlat, atrofie vaječníků, neplodnost, potrat.
Ergotové alkaloidy	Gangréna, křeče, halucinace.
Patulin	Mutagenita, genotoxicita, karcinogenita.

Mezinárodní organizace pro výzkum rakoviny (IARC) provedla hodnocení a klasifikaci mykotoxinů z hlediska jejich možné karcinogenity. V následující Tabulce 13 jsou uvedeny mykotoxiny a jejich zařazení do příslušné skupiny podle IARC.

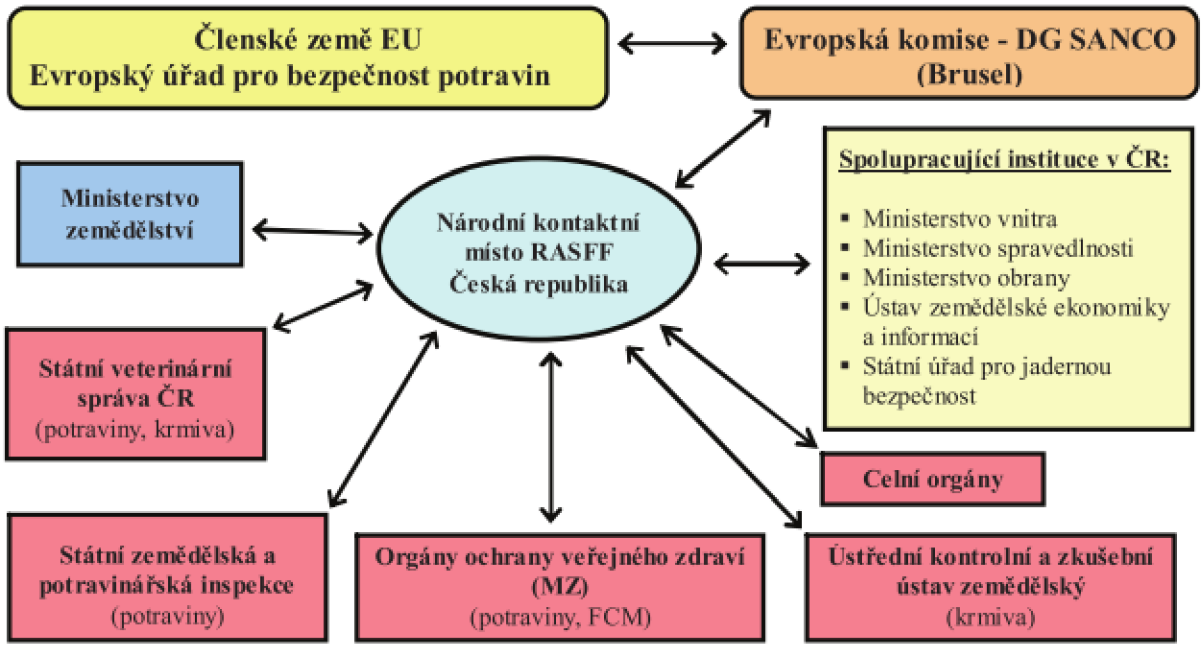
Tabulka 13. Zařazení mykotoxinů do kategorií karcinogenů podle IARC [86].

Mykotoxin	Kategorie karcinogenů podle IARC	
Aflatoxin B1 Aflatoxin B2 Aflatoxin G1 Aflatoxin G2	1	Prokázaný karcinogen pro člověka
Aflatoxin M1 Fumonisiny Ochratoxin A	2B	Podezřelý karcinogen pro člověka
Nivalenol T-2, HT-2 toxin Zearalenon Deoxynivalenol	3	Neklasifikovaný jako karcinogenní pro člověka

Z pohledu nebezpečnosti mykotoxinů na zdraví lidí a zvířat je nezbytné, aby se pravidelně kontroloval obsah mykotoxinů v potravinách a krmivech. Jen tak se může včas zabránit jejich požití a předejít tak zdravotním komplikacím.

7.3 Hodnocení aktuální situace kontaminace potravin a krmiv mykotoxiny

Bezpečnost potravin a krmiv je v popředí zájmu veřejnosti a způsob jejího zabezpečení v Evropské unii dosahuje ve světovém měřítku velmi vysoké úrovně. Největší podíl na této skutečnosti má dobře propracovaná legislativa, jejíž součástí je i Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 178/2002 [87] a Nařízení Komise (EU) č. 16/2011 [88]. Tento systém slouží k oznamování přímého nebo nepřímého rizika pro lidské zdraví pocházejícího z potravin nebo krmiv a je označován zkratkou RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed). RASFF umožňuje rychlé a účinné sdílení informací o nebezpečích mezi členy systému, které tvoří Evropská komise, 27 členských států EU a EFTA (Island, Lichtenštejnsko a Norsko), a Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA).
Českým národním kontaktním místem (NKM) v RASFF je Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI). NKM soustřeďuje informace ze všech dozorových orgánů nad potravinami a krmivy v ČR. Dojde-li ke zjištění výskytu nebezpečného výrobku některým z dozorových orgánů v ČR, odesílá NKM do Evropské komise informace získané od jednotlivých účastníků národního systému. Česká republika je pak zpětně informována o kontrolních zjištěních v členských státech EU. Schéma fungování RASFF v ČR je znázorněno na následujícím Obrázku 37 [89].



Obrázek 37: Schéma fungování RASFF v České republice.

SZPI ze své funkce NKM uveřejňuje přehled oznámení, která v rámci RASFF přijala nebo odeslala. Tento přehled se v průběhu roku aktuálně doplňuje o nová oznámení. O činnosti systému RASFF je za příslušný rok zpracována zpráva, která je dostupná veřejnosti prostřednictvím internetu.
Každý rok je přijato nebo odesláno určité množství oznámení týkajících se přítomnosti nežádoucích látek v krmivech nebo potravinách. Na množství oznámení v ČR týkajících se přítomnosti mykotoxinů se za uplynulé období nejvíce podílela kontaminace aflatoxiny.

7.4 Regulace přítomnosti mykotoxinů Evropskou unií

Předpokladem pro krmiva a potraviny je jejich bezpečnost a zdravotní nezávadnost. Proto existují právní předpisy obsahující skupinu pravidel, která mají zajistit dosažení tohoto cíle. Tato pravidla se vztahují na produkci krmiv a potravin a na jejich uvádění na trh. V České republice, stejně jako v ostatních členských státech Evropské unie, platí národní právní předpisy (především zákony, vyhlášky, nařízení vlády) a právní předpisy EU, přičemž Evropská (harmonizovaná) legislativa je nadřazena národní legislativě. Zajištění bezpečnosti potravin a krmiv z hlediska obsahu mykotoxinů probíhá pomocí limitů stanovených EU. Proces tvorby limitů je však nesmírně komplexní, neboť do něj promlouvá mnoho různých faktorů. Hodnotí se jak samotná toxicita, která může být pro různá zvířata a lidi odlišná, výskyt mykotoxinu, možnosti vzorkování a schopnost danou látku analyzovat. V neposlední řadě musí být limity nastaveny také podle možností prvovýrobců, zpracovatelů a výrobců. A to všechno tak, aby byl materiál stále ještě obchodovatelný.
V současné době evropská legislativa udává několik druhů limitů pro mykotoxiny. Jsou jimi:
Maximální hodnoty (Maximum levels) – krmiva a potraviny, které jsou dány na trh, musí splňovat daný limit. Jedná se o bezpečné hladiny. Krmiva a potraviny, které nesplňují maximální hodnoty, nesmí být na trh dány.
Směrné hodnoty (Guidance levels) – krmiva a potraviny, které jsou dány na trh, by měly směrné hodnoty splňovat. Stanovené hodnoty jsou vodítko pro přijmutí nebo odmítnutí šarže. Při jejich stanovení byla vzata v úvahu toxicita pro člověka a vnímavost jednotlivých živočišných druhů.
Orientační hodnoty (Indicative levels) – tyto hodnoty nejsou bezpečné hodnoty. Jsou to orientační úrovně pro daný mykotoxin, při jejichž překročení by měla být provedena šetření a další měření, a to zcela jistě při opakovaných zjištěních.

Základní pravidla k právním předpisům týkajících se krmiv a potravin jsou stanovena v nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002 [87]. Předpisy stanovující maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách jsou stanovena v Nařízení komise (ES) č. 1126/2007 [90], přičemž je kladen zvláštní důraz na dětskou a kojeneckou výživu.
Legislativa o nežádoucích látkách v krmivech je upravována právními předpisy týkajícími se pouze krmiv. Na rozdíl od potravin chybí v těchto předpisech limity pro maximálně přípustné koncentrace jednotlivých mykotoxinů v krmivech. Pouze Aflatoxin B1 je jediný mykotoxin, který je regulován maximální hodnotou, a to na základě směrnice evropského parlamentu a rady 2002/32/ES [91]. Ostatní mykotoxiny jsou regulovány pouze směrnými nebo orientačními hodnotami [92-94]. Přehled limitů pro deoxynivalenol, zearalenon, ochratoxinu A, fumonisiny, T-2 toxin, HT-2 toxin a aflatoxiny je uveden v Tabulce 14.

Tabulka 14. Limity pro mykotoxiny v krmivech [92].

Mykotoxin	Produkty určené ke zkrmování	Směrné hodnoty mg/kg (ppm)
Deoxynivalenol	obiloviny, produkty z obilovin, vedlejší produkty z kukuřice, doplňková a kompletní krmiva	0,9 – 12
Zearalenon	obiloviny, produkty z obilovin, vedlejší produkty z kukuřice, doplňková a kompletní krmiva	0,1 – 3
Ochratoxin A	obiloviny, produkty z obilovin, vedlejší produkty z kukuřice, doplňková a kompletní krmiva	0,05 – 0,25
Fumonisin B1 + B2	kukuřice, produkty z kukuřice, doplňková a kompletní krmiva	5 – 60
Aflatoxin B1[a]	všechny krmné suroviny, kompletní krmiva, doplňková krmiva	0,005 – 0,02
T-2 a HT-2 toxin[b]	výrobky z obilovin pro krmiva a krmné směsi	250 – 2000 (pro kočky do 50)

a… maximální povolený obsah dle [91]
b... orientační hodnoty dle [93, 94]

Koncentrace mykotoxinů v krmivech jsou zřídkakdy tak vysoké, aby se u zvířat projevila akutní mykotoxikóza [95]. Nicméně i když jsou zaznamenány její projevy, je velmi obtížné stanovit souvislost mezi zdravotními problémy zvířete a obsahem mykotoxinů v krmivech. Příznaky jsou velmi podobné příznakům dalších nemocí, popřípadě jsou některé symptomy mykotoxikóz sekundární, tzn., že vznikly v důsledku nemoci vzniklé potlačením imunity, vyvolaným mykotoxiny.
Podobně jako je obtížné stanovení mykotoxikóz, je obtížné stanovit bezpečné hladiny mykotoxinů v krmivech. Důvodem je nedostatečný výzkum a rozdílná citlivost živočichů vůči různým mykotoxinům. Svoji roli může také hrát nepřesný odběr vzorků a analýza krmiv a skutečnost, že existuje množství potenciálních mykotoxinů a existence interakcí mezi mykotoxiny a stresovými faktory [95].

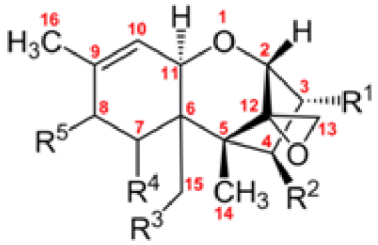
V následující kapitole jsou shrnuty vlastnosti jednotlivých skupin mykotoxinů studovaných v rámci této dizertační práce.

7.5 Charakteristiky vybraných mykotoxinů

7.5.1 Trichotheceny

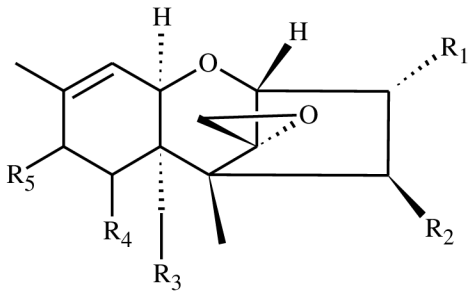
Trichotheceny jsou nejpočetnější skupinou mykotoxinů produkovanou vláknitými houbami rodu *Fusarium*. Produkce trichothecenů byla prokázána i u některých kmenů rodu *Myrothecium, Trichoderma, Trichothecium, Cylinrocarpon, Phomopsis, Verticimonosporium a Tachybotrytys* [96]. V současnosti bylo identifikováno a popsáno přes 170 trichothecenových mykotoxinů. Z chemického hlediska se jedná o tricyklické seskviterpeny charakterizované dvojnou vazbou mezi uhlíky č. 9 a 10 a jedním epoxy kruhem

mezi uhlíky č. 12 a 13 (Obrázek38). Souhrnně se tedy označují jako 12, 13-epoxytrichotheceny.



Obrázek 38: Obecná struktura trichothecenů.

Trichotheceny jsou děleny do skupin A – D, a to podle charakteristických strukturních rozdílů [97] a přítomnosti funkčních skupin. Typ A obsahuje na uhlíku C-8 jinou funkční skupinu než ketonickou (HT-2 a T-2 toxiny, diacetoxyscirpenol, neosolaniol, verrucarol). Typ B obsahuje na uhlíku C-8 karbonylovou skupinu – deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV) a fusarenon-X. Typ C obsahuje kromě epoxyskupiny v poloze C-12, C-13 další epoxyskupinu v poloze C-7 a C-8 nebo C-8 a C-9. Typ D má makrocyklický kruhový systémem mezi C-4 a C-15, který je spojený esterovými vazbami. Z uvedených typů jsou nejvýznamnější zástupci ze skupiny A a B, jejichž strukturní vzorce základního skeletu jsou na následujícím Obrázku 39.



Obrázek 39: Strukturní vzorec základního skeletu trichothecenů. Funkční skupiny jednotlivých trichothecenů jsou popsány v Tabulce 15.

Tabulka 15. Funkční skupiny nejvýznamnějších trichothecenů (viz Obrázek 39).

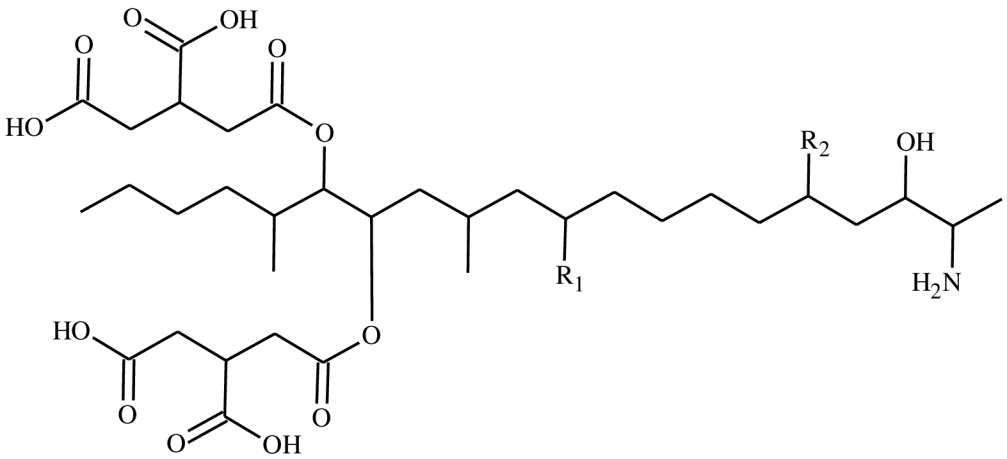
Typ	Mykotoxin	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
	Monoacetoxiscirpenol	OH	OH	$OCOCH_3$	H	H
	Diacetoxiscirpenol	OH	$OCOCH_3$	$OCOCH_3$	H	H
	T-2 tetraol	OH	OH	OH	H	OH
A	T-2 toxin	OH	$OCOCH_3$	$OCOCH_3$	H	$OCOCH_2CH(CH_3)_2$
	HT-2 toxin	OH	OH	$OCOCH_3$	H	$OCOCH_2CH(CH_3)_2$
	T-2 triol	OH	OH	OH	H	$OCOCH_2CH(CH_3)_2$
	Neosolaniol	OH	$OCOCH_3$	$OCOCH_3$	H	OH
	Nivalenol	OH	OH	OH	OH	=O
	Fusarenon-X	OH	$OCOCH_3$	OH	OH	=O
B	Deoxynivalenol	OH	H	OH	OH	=O
	3-Acetyl-deoxynivalenol	$OCOCH_3$	H	OH	OH	=O
	15-Acetyl-deoxynivalenol	OH	H	$OCOCH_3$	OH	=O

Trichotheceny typu A vykazují vyšší akutní toxicitu než trichotheceny typu B, jejichž účinky jsou spojeny spíše s toxicitou chronickou [81]. Nejnižší akutní toxicitu ve srovnání s ostatními trichotheceny vykazuje deoxynivalenol. Naopak nejvíce toxický trichothecen je T-2 toxin,

který způsobuje apoptózu buňky [97, 98]. Mezi nejčastěji kontaminované plodiny patří pšenice, ječmen a kukuřice [98].

7.5.2 Fumonisiny

Z chemického hlediska lze strukturu fumonisinů charakterizovat jako složitou alifatickou sloučeninu (Obrázek 40). Jedná se o diestery propan-1,2,3-trikarboxylové kyseliny a 2-acetylamino nebo 2-amino-12,16-dimetyl-3,5,10,14,15-penta-hydroxy eikosan nebo jejich C-10 deoxy-analogy.
Dosud bylo izolováno 7 fumonisinů: A1, A2, B1, B2, B3, B4, C1. Nejvýznamnější z nich je fumonisin B1.



Obrázek 40: Chemická struktura některých typů fumonisinů. Funkční skupiny FB1, FB2 a FB3 jsou uvedeny v Tabulce 16.

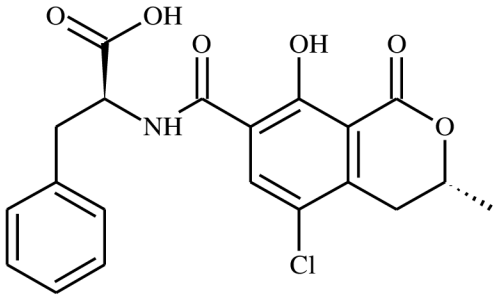
Tabulka 16. Funkční skupiny fuminosinů FB1, FB2 a FB3 korespondující s Obrázkem 40.

Fumonisin	R_1	R_2
Fumonisin B1	OH	OH
Fumonisin B2	H	OH
Fumonisin B3	OH	H

Fumonisiny jsou mykotoxiny, které se vyskytují po celém světě. Jsou produkovány houbami především z rodu *Fusarium*. Podle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC) jsou klasifikovány jako možné karcinogeny pro člověka a jsou spojovány s karcinomem jícnu u lidí [95].
Nejčastěji je kontaminována kukuřice a výrobky z ní, přičemž nejčastěji se vyskytují fumonisin B1 a fumonisin B2 (FB1 a FB2). Za maximální přípustnou hranici tohoto toxinu v krmivu lze pokládat koncentraci 5 mg/kg krmiva [85].

7.5.3 Ochratoxiny

Nejvýznamnějším mykotoxinem z této skupiny je ochratoxin A (OTA), který je produkován především plísněmi z rodu *Penicillinum* a *Aspergillus*. Ochratoxiny jsou z pohledu chemické struktury izokumarinové deriváty, které jsou spojené s fenylalaninem (Obrázek 41).

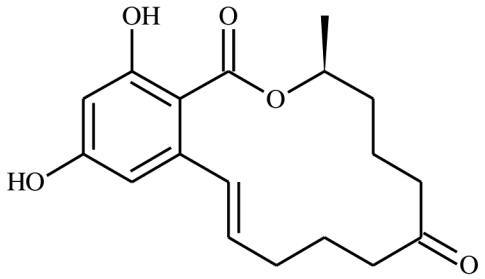


Obrázek 41: Chemická struktura ochratoxinu A.

Díky své struktuře jeho hlavní toxický vliv spočívá v inhibici syntézy proteinu. Ochratoxin A je také silný teratogen, poškozující játra a ledviny, kde způsobuje nefrotoxikózu, působí imunosupresivně, způsobuje snížení přírůstků hmotnosti [95]. Nejčastěji se vyskytuje na obilovinách (ječmen, kukuřice, žito, pšenice, oves, rýže), méně pak na sójových bobech, fazoli a podzemnici olejné.

7.5.4 Zearalenon

Zearalenony jsou laktony kyseliny β-resorcyklické a jejich typickými producenty jsou plísně rodu *Fusarium*. V současné době je izolováno 15 derivátů základní struktury zearalenonu (Obrázek 42).

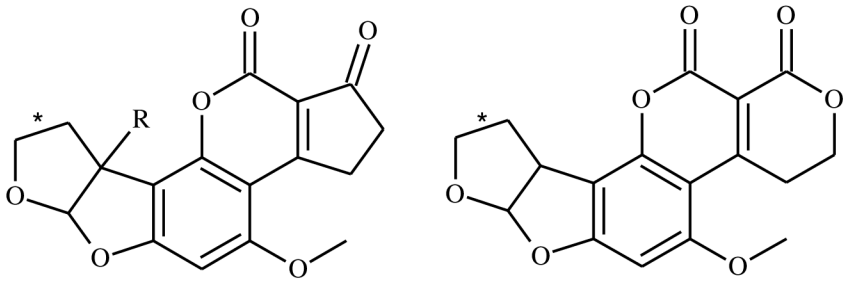


Obrázek 42: Chemická struktura zearalenonu (ZON).

Zearalenony jsou méně toxické než některé jiné mykotoxiny, jejich efekt je estrogenní a nejcitlivější jsou vůči němu prasata. Způsobuje tzv. hyperestrogenitu za vzniku symptomů „feminizace“. Pro člověka se odhaduje bezpečný příjem ve výši do 0,05 µg/kg tělesné hmotnosti [85]. Nejčastěji se vyskytuje v obilninách, kukuřici, čiroku, senu, siláži. Dokonce se velmi často vyskytuje v krmivech živočišného původu.

7.5.5 Aflatoxiny

Jejich struktura je odvozena od difuranokumarinového skeletu. Aflatoxiny jsou produkovány toxinogenními kmeny plísně *Aspergillus*. Postupně byly identifikovány 4 přirozené typy aflatoxinů: AFB1, AFB2, AFG1 a AFG2 (Obrázek 43). Nejčastěji se vyskytuje AFB1, který je nejúčinnějším známým hepatokarcinogenem [85]. Aflatoxiny jsou prokazovány u různých druhů zrnin, sóji, hrachu, bobu, prosa a ořechů.



Aflatoxiny B a M Aflatoxiny G

Obrázek 43: Chemická struktura aflatoxinů. Funkční skupiny aflatoxinů jsou uvedeny v Tabulce 17.

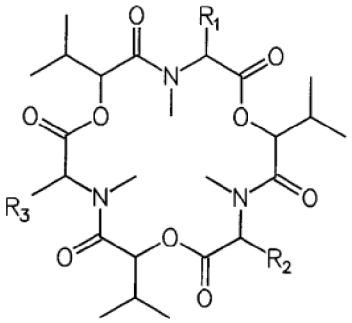
Tabulka 17. Funkční skupiny aflatoxinů korespondující s Obrázkem 43.

Aflatoxin	R	Typ vazby*
Aflatoxin B1(AFB1)	H	dvojná
Aflatoxin B2 (AFB2)	H	jednoduchá
Aflatoxin M1 (AFM1)	OH	dvojná
Aflatoxin M2 (AFM2)	OH	jednoduchá
Aflatoxin G1 (AFG1)	-	dvojná
Aflatoxin G2 (AFG2)	-	jednoduchá

Distribuce metabolitů do různých míst těla zvířat může být příčinou nebezpečných reziduí v potravinách. V organismu dojnic jsou aflatoxiny zčásti metabolizovány na chemicky jiné formy, označované jako AFM1, AFM2, které pak přecházejí do mléka, masa a orgánů [85]. AFM1 je monohydroxylovaný metabolit AFB1 (Obrázek 43), je metabolizován enzymovým systémem cytochromu P450 v játrech a je dále vylučován do mléka dojících hospodářských zvířat které konzumovaly krmivo kontaminované AFB1 [99, 100]. Toxicita aflatoxinu M1 je menší než jeho prekurzoru, ale stále vykazuje cytotoxické, genotoxické a karcinogenní účinky [101]. Z tohoto důvodu IARC WHO přehodnotila jeho skupinu klasifikace karcinogenity a na základě nových informací ji změnila ze skupiny 2 do skupiny 1 [102]. AFM1 je stále přítomen i ve vyrobených mléčných produktech a jeho obsah je navíc relativně stejný i během zpracování a skladování mléčných výrobků. Tento toxin nelze ani inaktivovat např. pomocí pasterizace nebo zpracování při velmi vysoké teplotě (ultra-high temperature, UHT) [103]. Některé země mají nastavené legislativní limity pro obsah AFM1 v mléce a ostatních mléčných produktech. V Evropské unii je maximální povolený obsah této látky do 0,05 µg/kg mléka [104].

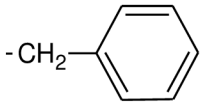
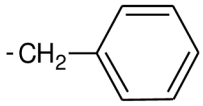
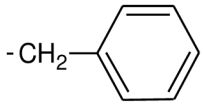
7.5.6 Enniatiny a beauvericin

Enniatiny a beauvericiny jsou produkovány především rodem *F. avenaceum*. V přírodě se vyskytují ve formě cyklických depsipeptidů (Obrázek 44) [105]. Funkční skupiny jednotlivých druhů jsou vyznačeny v Tabulce 18.



Obrázek 44: Chemická struktura cyklického hexadepsipeptidu. Funkční jednotlivých mykotoxinů jsou uvedeny v Tabulce 18.

Tabulka 18. Funkční skupiny enniatinů a beauvericinu korespondující s Obrázkem 44.

Název mykotoxinu	R_1	R_2	R_3
Enniatin A (ENA)	$-CH(CH_3)CH_2CH_3$	$-CH(CH_3)CH_2CH_3$	$-CH(CH_3)CH_2CH_3$
Enniatin A1 (ENA1)	$-CH(CH_3)CH_2CH_3$	$-CH(CH_3)CH_2CH_3$	$-CH(CH_3)_2$
Enniatin B (ENB)	$-CH(CH_3)_2$	$-CH(CH_3)_2$	$-CH(CH_3)_2$
Enniatin B1 (ENB1)	$-CH(CH_3)CH_2CH_3$	$-CH(CH_3)_2$	$-CH(CH_3)_2$
Beauvericin (BEA)			

Je známo okolo osmi druhů enniatinů z nichž jsou nejvýznamnější enniatin A, A1, B a B1. Enniatiny vykazují antibiotickou a ionoforní aktivitou. Zatím nejsou známy případy mykotoxikóz spojené s těmito druhy mykotoxinů. Prokázané jsou jejich jiné toxické účinky, které jsou pravděpodobně spjaty právě s jejich ionoforní aktivitou. Ta má za následek ovlivnění transmembránového pohybu kationtů, což způsobí osmotickou nerovnováhu v buňkách [105]. Beauvericin je mimo jiné i prokázaný velmi silný insekticid [106]. Enniatiny a beauvericin se nejčastěji vyskytují v obilných zrnech, chlebu, siláži, sladu, pšenici, kukuřici, ječmenu a ovsu.

7.5.7 Ergotové (námelové) alkaloidy

Alkaloidy jsou přírodní látky produkované některými organismy z řad živočichů, hub, řas a bakterií. Tyto látky sice nejsou nezbytné pro životaschopnost organismu, tak jako například aminokyseliny, ale především pomáhají k přežití. Ergotové alkaloidy jsou známé také pod názvem námelové alkaloidy. Jsou to sekundární metabolity produkované některými druhy hub z rodu *Claviceps*. Tyto alkaloidy jsou v menší míře produkovány i celou řadou dalších hub, např. rodu *Balansia*, *Sphacelia*, *Penicillinum*, *Acremanium* a *Aspergillus* [107].

V Evropě je nejrozšířenějším druhem houby produkující ergotové alkaloidy paličkovice nachová (*Claviceps purpurea*) [108], která infikuje více než 400 druhů rostlin. Tato houba parazituje jak na obilninách, které jsou ekonomicky významnými plodinami (žito, pšenice, ječmen, tritikále a oves), tak na travách [109]. Její výskyt je hojnější při vlhkém počasí. Mycelium má formu sklerocia (Obrázek 45), které obsahuje směs různých EAs. Obsah a složení směsi alkaloidů ve sklerociu se liší podle zralosti sklerocia, hostitelské plodiny,

zeměpisné polohy a převládajícího podnebí [110, 111]. Odborná literatura udává, že celkový obsah alkaloidů ve sklerociích se pohybuje v rozmezí od 0,01% až 1 % (w/w) [110, 112, 113].

Obrázek 45: Různé velikosti a tvary sklerocií houby *Claviceps purpurea* vyrůstající na žitě (A) a na pšenici (B).

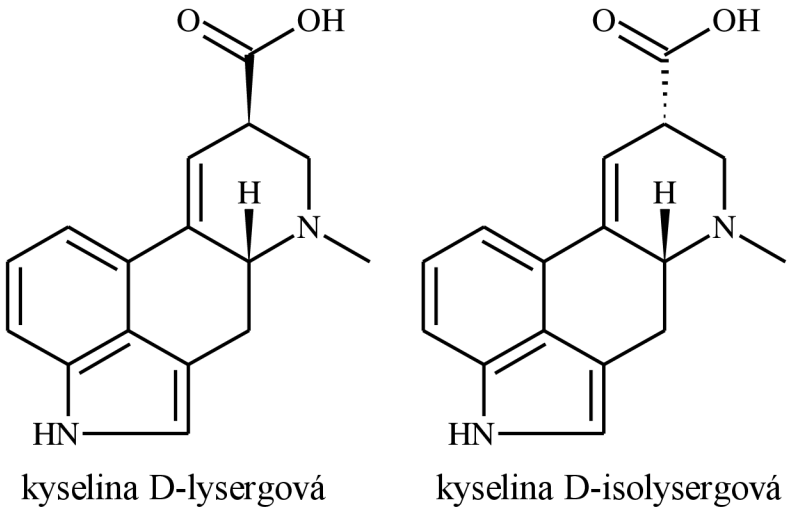
Za příhodných podmínek (na jaře) ze sklerocií vyrůstají hlavičková stroma (Obrázek 46), kde se vytvářejí spory, které infikují rostliny v období květenství. Ze semeníku se po infekci stává sklerocium a vývojový cyklus houby se opakuje.

Obrázek 46: Stroma houby *Claviceps purpurea* vyrůstající ze sklerocie.

Sklerocia jsou sklízená zároveň s obilím, a proto může dojít ke kontaminaci výsledných obilných produktů, potravin a krmiv. Speciální čistící a mlecí postupy umožňují odstranění až 82 % sklerocií [114]. Tyto postupy jsou však nákladné a jejich účinnost se mezi druhy obilnin liší. Důležitá je proto prevence ve formě pěstitelských a šlechtitelských opatření.

Zavádějí se vhodné osevní postupy v kombinaci s hlubokým zapravením sklerocií do půdy pluhem, které znesnadní růst stromat. Pro výsev se používá pouze nekontaminované a kvalitní osivo.
Ergotové alkaloidy jsou toxické pro lidi i pro zvířata. Nemoc z otravy námelem (tzv. ergotismus) může mít dvě odlišné formy. První z nich je gangrenózní forma, která se projevuje pálivou bolestí, zúžením cév vedoucích do končetin, nekrózou, gangrénou až odumíráním končetin. Tato forma je běžnější u hospodářských zvířat. Jinak je též známá jako tzv. „oheň sv. Antonína“. Druhá forma se nazývá konvulzivní (křečovitá) a projevuje se nervovou dysfunkcí. Dochází k parestézii, která se šíří do celých končetin a může být doprovázena křečemi svalů, bludy a halucinacemi. V dnešní době je ergotismus u lidí značně eliminován, avšak stále se objevuje několik případů projevů ergotismu u hospodářských zvířat [115].

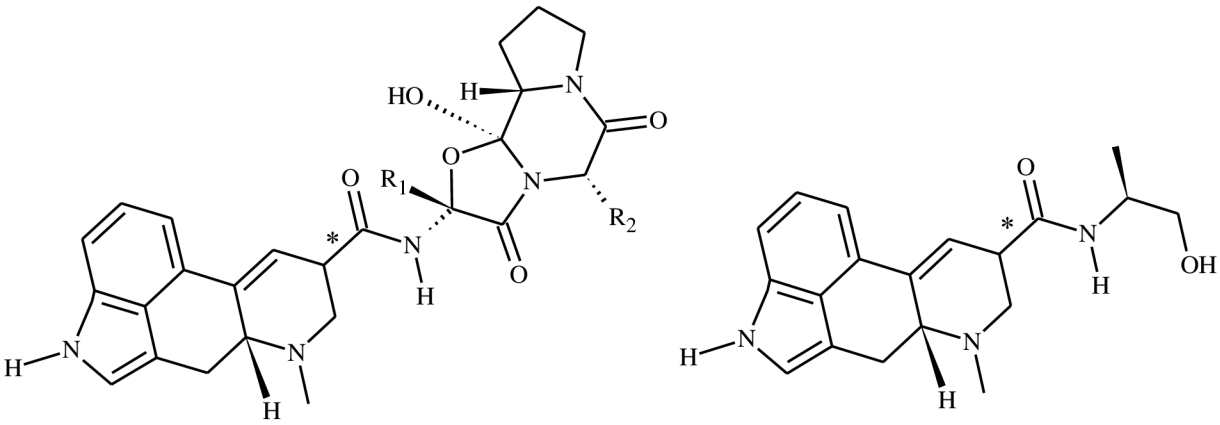
Z hub rodu *Claviceps* bylo izolováno více než 70 různých ergotových alkaloidů, které se rozdělují do několika skupin (např. klavinové alkaloidy, ergopeptiny). V této práci budou diskutovány pouze sloučeniny ze skupiny derivátů kyseliny lysergové (Obrázek 47).



Obrázek 47: Strukturní vzorce kyseliny D-lysergové a D-isolysergové.

Deriváty kyseliny D-lysergové jsou označeny příponou –in a jsou levotočivé. Navíc vykazují vysokou farmakologickou aktivitu a jsou fyziologicky účinnější než deriváty kyseliny D-isolysergové. Její deriváty jsou pravotočivé a vykazují jen slabé farmakologické účinky. V názvosloví končí příponou –inin [116, 117].

Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA) bylo doporučeno sledování šesti nejvýznamnějších zástupců, kteří byli vybráni na základě nejčastějšího výskytu a fyziologické aktivity [118]. Kromě ergometrinu, ergotaminu, ergosinu, ergokristinu, ergokryptinu, ergokorninu se jedná také o jejich epimery (ergo- ininy) (Obrázek 48), které jsou sice považovány za biologicky neaktivní, avšak za určitých podmínek se mohou transformovat na svůj biologicky aktivní epimer.



Ergotové alkaloidy (*stereo vazba) Ergometrin (* stereo vazba)

Obrázek 48: Chemická struktura ergotových alkaloidů a ergometrinu. Funkční skupiny EAs jsou uvedeny v Tabulce 19.

Tabulka 19. Funkční skupiny ergotových alkaloidů korespondující s Obrázkem 48.

Ergotový (námelový) alkaloid	R_1	R_2
Ergokornin	$CH(CH_3)_2$	$CH(CH_3)_2$
Ergokristin	$CH(CH_3)_2$	$CH_2C_6H_5$
Ergokryptin	$CH(CH_3)_2$	$CH_2CH(CH_3)_2$
Ergosin	CH_3	$CH_2CH(CH_3)_2$
Ergotamin	CH_3	$CH_2C_6H_5$

7.6 Vzorkování pro analýzu mykotoxinů

Vyšetření přítomnosti kontaminantů musí mít co nejvyšší vypovídací schopnost. Pozornost je tedy věnována nejen samotné analýze, ale především i přípravě vzorku a jeho odběru pro zajištění dostatečně reprezentativního vzorku. Právě odběr vzorků pro sledování mykotoxinů je nejkřehčím článkem v postupu jejich analýzy. Chybné vzorkování materiálu a odběr poměrné části z celkového odebraného vzorku tvoří dle mnohých autorů okolo 90 % celkové chyby mykotoxinové analytiky [119]. Na vině je totiž nízká koncentrace těchto látek v dané komoditě a jejich nerovnoměrné heterogenní rozložení. Mikroskopické vláknité houby (plísně), které mykotoxiny produkují, se běžně vyskytují v izolovaných místech, tzv. **ohniscích** či **ložiscích** [120, 121].

V souvislosti se zajištěním co nejvyššího stupně reprezentativnosti laboratorního vzorku byla vypracována pravidla konkretizovaná Vyhláškou Ministerstva zemědělství 211/2004 Sb. a jejími přílohami [122]. Metody odběru vzorku a metody analýzy pro úřední kontroly množství mykotoxinů v potravinách jsou dány Nařízením 401/2006/ES [123]. Tento dokument zahrnuje i opatření v případě heterogenní distribuce mykotoxinů ve vzorkovaném materiálu [120].

Obecně platí, že homogenita vzorku pro testování v laboratoři může být zvýšena použitím vyšší navážky. Proto se ve většině standardních operačních postupů pro analýzu mykotoxinů uvažuje navážka až 25 g vzorku. V případě nízké navážky (cca 1 – 2,5 g) je zapotřebí klást důraz na homogenizaci vzorku například mletím na velmi jemné částice s následným promísením.

7.7 Extrakce vzorku a přečištění extraktu

Extrakce je čistící a dělící operace, při které přechází složka ze směsi látek v kapalné či tuhé fázi do jiné kapalné fáze – rozpouštědla. Ve většině analytických metod pro stanovení mykotoxinů v biotických matricích je matrice extrahována rozpouštědlem, které je nejčastěji organické, nebo směsí organického rozpouštědla s vodou. Pro tyto účely se využívají organická rozpouštědla methanol, acetonitril, ethylacetát a jejich vzájemné kombinace.

K uvolnění mykotoxinů z matrice se využívá třepání, míchání, vyluhování, sonikace, superkritické fluidní extrakce, extrakce za zvýšeného tlaku (PSE) [124-126]. Vzhledem ke složitosti matrice (potraviny, krmiva) je vysoce pravděpodobné, že extrakt bude obsahovat množství matricových komponent, kterými jsou například lipidy, proteiny, cukry a pigmenty, které mohou následně interferovat s hledanými analyty. Při aplikaci MS analýzy způsobují matriční koextrakty pokles nebo nárůst signálu analytu – tzv. matriční efekt. Proto je vhodné zavést po extrakci tzv. čistící krok neboli clean-up, aby se vzorek zbavil nežádoucích komponent, které by mohly ovlivňovat stanovení analytů. Tento krok má významný vliv na konečnou kvalitu analytických výstupů a zároveň se může předejít zanášení nečistot do systému instrumentace a prodloužit tak životnost jeho komponent. Spolu s extrakcí se jedná o nejnáročnější a nejpracnější část v celkovém postupu stanovení analytů.

Zařazení čistícího kroku v procesu úpravy vzorku se s používáním LC-MS přístrojů mění a díky jejich citlivosti a vysoké selektivitě není v mnoha aplikacích nezbytné [127]. Zároveň je velmi nepravděpodobné nalézt takový čistící krok, který by byl vhodný pro všechny sledované analyty, a právě na tuto skutečnost naráží multireziduální metody.

Pro přečištění extraktů se velmi často používají imunoafinitní kolonky (IAC). Mechanismus přečištění na imunoafinitních kolonkách je vysoce selektivní a získaný extrakt je velmi čistý, a proto lze stanovit i opravdu nízké koncentrace analytu. Při aplikaci imunoafinitního přečištění dochází k reverzibilní specifické interakci mezi protilátkami v kolonce a mykotoxinem v extraktu. Promytím kolonky speciálním promývacím pufrem se eluují interferující látky, které nejsou specificky vázány. Analyt je poté z kolony eluován vhodným elučním činidlem. Komerčně dostupné jsou např. imunoafinitní kolonky pro aflatoxiny, fumonisiny, ochratoxiny, deoxynivalenol, T-2 toxin a zearalenon. Na kolonkách mohou být v důsledku tzv. křížové reaktivity dokonce zachyceny i tzv. maskované formy mykotoxinů [121]. Tato problematika je podrobně řešena v publikaci od Malachové a kol. [128]. Navzdory specificitě a relativní jednoduchosti přečištění extraktu pomocí této techniky se jedná o finančně dosti náročnou variantu, pomocí které lze navíc stanovit pouze jeden analyt nebo menší skupinku analytů (VICAM – Myco 6 in 1), popřípadě maskované formy daného analytu.

Další variantou, jak zbavit surový extrakt nežádoucích nečistot, je extrakce na tuhou fázi (SPE). Tato technika není ve srovnání s imunoafonitními kolonkami tolik specifická a umožňuje stanovení skupiny mykotoxinů, například trichotheceny typu A a B, aflatoxiny se zearalenonem, ergotové alkaloidy a další [129].

Počínaje zaváděním metod pro multireziduální stanovení kontaminantů bylo zapotřebí nalézt vhodný extrakční postup, kterým by bylo možno uvolnit analyty z matrice i přes jejich odlišnou fyzikálně-chemickou povahu. Příkladem takové jednoduché a robustní metody je aplikace extrakční a čistící metody zvané QuEChERS. Nicméně prozatímní používání čistících technik (PSA, silikagel, aktivní uhlí,...) není vhodné pro některé mykotoxiny (například fumonisiny, zearalenon,...) z důvodu nekvantitativní extrakce [7, 121, 125, 130].

Nejméně nákladnou a časově nenáročnou možností je pouhé naředění extraktu, označovaného v anglické literatuře jako tzv. „dilute and shoot“. Pro účely mykotoxinové analýzy byla prezentována například Spanjerem a kol. [131]. Jestliže se bude hodnotit množství analytů, které lze tímto způsobem stanovit, je tato metoda velmi efektivní. Nicméně je zapotřebí brát v úvahu matriční efekty a potřebu vysoké selektivity instrumentální analytické koncovky.

7.8 Metody finální analýzy mykotoxinů

Po extrakci vzorků pro analýzu mykotoxinů v biotických matricích následuje konečná fáze, a to použití instrumentálně analytické koncovky. Ta by měla být nejen přesná, ale i dostatečně citlivá a selektivní. Rutinně používané metody analýzy mykotoxinů jsou založeny na využití plynové chromatografie nebo vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Pro sledování přírodních kontaminantů se široce uplatňují systémy kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí. Díky této technice je možno zavádět tzv. multimetody pro současné sledování i několika různých analytů v jedné analýze.
Pro screening mykotoxinů jsou vhodné například imunochemické techniky, imunosensory a biosensory.

7.8.1 Plynová chromatografie

Pro účely stanovení mykotoxinů v potravinách a krmivech může být použita plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí. V minulosti bylo publikováno použití této instrumentální koncovky pro analýzy trichothecenů A a B, patulinu a zearalenonu [132-134].
Mykotoxiny jsou malé molekuly, které jsou netěkavé. Proto je nezbytné provedení derivatizace ještě před analýzou plynovou chromatografií, aby se docílilo zvýšení těkavosti analytů. Pro účely analýzy trichothecenových mykotoxinů plynovou chromatografií jsou vhodné trimethylsilyl (TMS), trifluoracetyl (TFA) [135] nebo heptafluorobutyl (HFB) deriváty. TMS deriváty jsou poměrně stabilní a lze je sledovat pomocí širokého spektra detektorů v plynové chromatografii. HFB deriváty poskytují intenzivní odezvu na detektorech elektronového záchytu (ECD) a hmotnostních spektrometrech (MS). Nejméně stabilní jsou pak trifluoacetylestery [135].
Hmotnostní spektrometr je pro svoji vypovídací schopnost jedním z nejpoužívanějších detektorů ve spojení s plynovou chromatografií. Toto spojení vykazuje vysokou selektivitu a detekovatelnost analytů. Pro multireziduální stanovení mykotoxinů však není tato technika nejvhodnější, neboť se často potýká s problémy týkajícími se nelinearity kalibračních křivek, změny odezvy, přenosu analytů, velkých matričních efektů nebo prezence paměťového efektu z předchozí analýzy a výjimkou nejsou ani vysoké odchylky v opakovatelnosti a reprodukovatelnosti [136, 137].
Z tohoto důvodu a také kvůli nutnosti derivatizace byla mykotoxinová analytika směřována k využití spíše HPLC technik s hmotnostně spektrometrickou detekcí.

7.8.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Pro účely sledování mykotoxinů v potravinách a krmivech má tato technika nejširší uplatnění. Právě díky její citlivosti a nízkým limitů detekce byly vyvinuty metody pro širokou škálu mykotoxinů. V konvenčním uspořádání se HPLC spojuje s UV-VIS nebo fluorescenčními detektory (FLD).

V některých případech je nezbytné zařadit do procesu analýzy derivatizaci před kolonou nebo za ní, k zajištění dostatečné citlivosti detekce. Aflatoxiny se například upravují elektrochemickou bromací v tzv. „KOBRA“ celách. Tento krok zajistí dostatečnou citlivost na fluorescenčních detektorech [138, 139].
Derivatizaci vyžadují také trichotheceny typu A, které postrádají UV chromofory, a proto nemohou být stanoveny pomocí konvenčních detektorů. Různé derivatizační techniky jsou diskutovány v mnoha studiích [140-143]. Jak je patrné, i v případě použití HPLC pro separaci analytů se nelze v mnoha případech vyhnout derivatizačnímu kroku, který je nutno provést nikoliv pro vyřešení problémů souvisejících se separací, jak je tomu v případě plynové chromatografie, ale pro zlepšení mezí detekce. Díky tomu se ovšem několikanásobně zvyšuje nejen čas analýzy, ale i její cena. Tento problém řeší využití hmotnostně spektrometrické detekce, která již derivatizaci nevyžaduje.

7.8.3 HPLC ve spojení s hmotnostně spektrometrickou detekcí

Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) nebo tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) je v současnosti nejpoužívanějším nástrojem pro detekci mykotoxinů. Tato technika je dostatečně robustní, citlivá, flexibilní a použitelná pro široké spektrum analytů, jejichž identifikace probíhá na základě molekulové hmotnosti a následná informace o struktuře může být získána díky specifickým fragmentačním reakcím [144]. Při použití LC-MS lze pracovat v širokém kalibračním rozsahu s velmi dobrou přesností a opakovatelností.
Ve srovnání s GC-MS je spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem technicky náročnější. Z HPLC jsou analyzované látky neseny v proudu kapaliny za atmosférického tlaku, zatímco hmotnostní spektrometr pracuje za hlubokého vakua [145].
Pro spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií byla vyvinuta řada technik. V současnosti se k tomuto účelu nejvíce používají ionizační techniky za atmosférického tlaku (API). Nejdůležitějšími zástupci této skupiny jsou ionizace elektrosprejem (ESI) [7, 121, 125, 126, 131, 146-149], chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) [82] a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) [150], které byly také použity v publikovaných metodách pro stanovení mykotoxinů.

7.8.4 Bioanalytické metody pro stanovení mykotoxinů

Bioanalytické metody mají také své nezastupitelné místo při stanovování mykotoxinů. Proto zde budou diskutovány vybrané metody pro analýzu mykotoxinů v potravinách a krmivech, které jsou využitelné v rámci screeningové strategie, nebo jako samostatné analytické postupy pro nezpracované a surové komodity. Pro dané účely mohou být bionalytické metody výhodnější než stávající, často velmi nákladné instrumentální postupy. Nejběžnější je uspořádání na mikrotitračních destičkách, které se široce uplatňuje při rutinních analýzách. Jedná se o jednoduchou a rychlou metodu bez potřeby čištění. Množství analytu je stanoveno pomocí jednoduchého spektrofotometru, fluorimetru nebo vizuálně a porovnává se vždy se standardem. Existují i další formy bioanalytického stanovení, například biosensory, SPR (povrchová plasmová rezonance) imunosensory a proužkové testy. Mnoho laboratoří využívá rutinně ELISA metodu (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), jejíž princip je na bázi vzniku vazby mezi antigenem a protilátkou [151]. ELISA kity jsou k dispozici pro měření

např. celkového obsahu aflatoxinů, deoxynivalenolu, celkového obsahu fumonisinů, ochratoxinu A, T-2 toxinu a zearalenonu.
Jinou bioanalytickou technikou jsou tzv. biosensory, které také mohou sloužit k monitorování přítomnosti a detekci kontaminujících látek, např. pesticidů, průmyslových chemikálií nebo přírodních toxinů. Zatímco pro detekci nízkomolekulárních chemických kontaminantů je nutná extrakce upravených vzorků s následnou chromatografií, tedy procesy trvající v řádu hodin až dní, biosenzory umožňují detekci těchto kontaminantů v reálném čase. Biosenzory umožňují ve spojení s SPR sledování několika mykotoxinů souběžně, jak prezentoval například Bram van der Gaag a kol. [152], kdy byl analyzován aflatoxin B1, zearalenon, ochratoxin A, fumonisin B1 a deoxynivalenol. Zde ovšem bylo nutné vzorek nejdříve připravit extrakcí s čistícím krokem přes Mycosep 224. Pomocí SPR imunosenzoru lze detekovat malé molekuly s nízkým LOD, a to dokonce v tak komplexních matricích, jakou jsou potraviny nebo krmiva.

7.9 Multireziduální metoda jako výzva pro analytiky

Skutečnost, že se některé kontaminanty mohou vyskytovat společně a že stejné vzorky jsou často analyzovány několikrát pro různé účely, byla impulsem pro vývoj multireziduálních metod schopných detekovat větší množství chemicky různorodých látek současně. Tímto přístupem se dosáhne vyšší průchodnosti vzorků laboratoří (časová úspora), stejně tak i finanční úspory [153]. Vzhledem k variabilitě chemických struktur a jejich fyzikálně-chemických vlastností je vývoj metody schopné pojmout široké spektrum analytů nesmírně náročný [137]. Dokonce i ve skupině trichothecenů jsou mykotoxiny vykazující široký rozsah polarit od nepolárního T-2 toxinu po hydroxylovaný nivalenol. Za předpokladu, že se dosáhne nalezení vhodného extrakčního rozpouštědla pro potřeby dané sledované skupiny mykotoxinů, nemusí tato metoda vyhovovat dalším mykotoxinům následně přidaným ke sledovaným analytům. Zároveň je velmi nepravděpodobné, že se nalezne metoda pro přečištění extraktu tak, aby nedošlo ke ztrátám některých sledovaných analytů. V konečné fázi je nezbytné, aby i příslušná analytická koncovka byla schopna detekovat analyty na tak nízkých hladinách, které vyhovují předpisům pro maximální přípustné limity těchto kontaminantů v potravinách nebo krmivech. Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí je jistým řešením tohoto problému [137]. Kromě techniky LC-MS/MS byla též publikována metoda pro stanovení 182 mykotoxinů HPLC-UV detekcí. Tato metoda je ovšem vhodná spíše pro kvalitativní analýzu mykotoxinů produkovaných plísňovými kulturami, a to zejména díky vysokým limitům detekce [154].
LC-MS techniky pro stanovení mykotoxinů v potravinách a krmivech se objevily v posledních dvaceti letech. Díky širokému rozsahu těchto přírodních kontaminantů potravin a krmiv a díky různorodým možnostem využití LC-MS/MS techniky byla publikována již řada metod pro jejich sledování.

Multimetody zaměřené na sledování mykotoxinů sledují takové spektrum analytů, jejichž hodnoty jsou legislativně regulovány v příslušných komoditách (AFs, ZON, FBs, OTA, DON, T-2, HT-2), nebo se jejich regulace plánuje, případně jsou sledovány na základě požadavků EU (ENs, BEA, NIV, EAs). Metabolizované a konjugované formy mykotoxinů zatím nejsou častou součástí multimetod, především z důvodu slabé dostupnosti standardů a převedení vázaného mykotoxinu do rozpustné formy [155]. I přesto však existuje několik publikací na toto téma [128].

S vývojem na poli hmotnostní spektrometrie se zavádí i využití přímé analýzy v reálném čase (DART). Václavík a kol., studovali potenciál DART techniky ve spojení s vysokorozlišovacím analyzátorem Orbitrap při analýze mykotoxinů v QuEChERS extraktu. Z celkového počtu 24 mykotoxinů bylo DART technikou ionizováno 11 z nich. I přes nižší ionizační kapacitu pro sledované mykotoxiny je tato metoda v porovnání s LC-MS technikou, rychlejší a flexibilnější [156].

7.10 Matriční efekt

Při LC-MS analýzách vzorku, který obsahuje matriční komponenty, může docházet k tzv. **matričnímu efektu (ME)**. Ten způsobuje změnu ionizační účinnosti (odezvy analytu) právě v důsledku přítomnosti matričních koextraktů, která se projeví zvýšením nebo snížením signálu analytu. Vznik tohoto efektu se předpokládá v ionizačním zdroji, a proto se vyskytuje více či méně u všech ionizačních technik. Tento problém je nejzávažnější ve spojení LC-MS při aplikaci technik ionizace za atmosférického tlaku, zejména pak pro elektrosprej, který je nejvíce používanou měkkou ionizační technikou ve spojení s kapalinovou chromatografií. Matricový efekt může být přítomen v LC-MS analýze, dokonce i když je použita pro kvantifikaci analytů tandemová hmotnostní spektrometrie, a to právě proto, že tento fenomén nastává ještě před dosažením hmotnostního detektoru.

Přítomnost matričního efektu lze studovat dvěma hlavními experimenty. V prvním případě se jedná o **postkolonovou infuzní metodu**. Extrakt matrice neobsahující sledované látky je nadávkován na chromatografickou kolonu. Ve stejném čase je proud analytu infuzně vnášen do systému, kde je směšován s eluátem z kolony a přiváděn do iontového zdroje. Stejný experiment je proveden s dávkováním čistého rozpouštědla na kolonu. Následně se porovnávají intenzity odezvy analytů v jednom a druhém případě. Tento způsob sledování matričního efektu byl aplikován v několika studiích [157-159], dosud však nebyl publikován ve studiích týkajících se mykotoxinové analytiky.

Autoři spíše preferují druhý způsob, tj. **postextrakční metodu**, založenou na procentuálním vyjádření zvýšení nebo snížení signálu (Signal Suppression or Enhancement – SSE). SSE je vypočítán jako poměr směrnice kalibrační křivky v matrici a směrnice kalibrační křivky v čistém rozpouštědle. V případě 100 % výsledku SSE není matriční efekt pozorován. Nad 100 % SSE hovoříme o pozitivním matričním efektu (zvýšení signálu analytu) a pod 100 % SSE hovoříme o negativním matričním efektu (snížení signálu analytu). V případě provedení tohoto experimentu je nezbytné, aby matriční efekt nebyl závislý na koncentraci analytu a byl proveden v lineárním rozsahu kalibrační křivky.

Důležité je mít na paměti, že matriční efekt může být nejen rozdílný pro různé analyty ve stejných matricích, ale i různý pro stejné analyty v různých matricích. Například signál aflatoxinů v pšenici se příliš neliší od signálu v rozpouštědle, zatímco v extraktu kukuřice můžeme sledovat rapidní pokles signálu o 17 až 68 % [160]. Matriční efekt je velmi variabilní a závisí na analytu, matrici a chromatografické separaci analytu od matricových komponent.

Matriční efekt může být zeslaben dávkováním vzorku obsahujícího menší množství matričních komponent, čehož může být dosaženo selektivnější extrakcí nebo zavedením čistícího kroku. V případě multimetod se dosud nepodařilo najít takový čistící krok, kterým by se neodstranily i některé sledované analyty. Z tohoto důvodu se přistupuje k redukci matričního efektu např. naředěním extraktu, přičemž by mělo být v povědomí, že dochází nejen k naředění matričních komponent, ale i samotných cílových analytů. Proto je třeba sledovat limit detekce.

Pozitivní matriční efekt může nastat v důsledku toho, že některé matriční komponenty poskytují stejný fragment m/z jako sledovaný analyt. Pravděpodobnost pozorování takového typu matričního efektu se snižuje s rostoucím rozlišením hmotnostního spektrometru.
I přes existenci matričního efektu u měkkých ionizačních technik by měla být na paměti skutečnost, že některá zvýšení signálu nevznikají pouze v důsledku matričního efektu, ale může jít o změnu odezvy vinou kontaminace mezičlenu [161].

7.10.1 Kontrola matričního efektu

Matriční efekt může být kontrolován několika možnými způsoby. Jedním z nich je aplikace interního standardu, který navíc zlepšuje přesnost výsledku analýzy. Nejvhodnější interní standardy v mykotoxinové analýze jsou izotopově značené analogy nativních mykotoxinů. Aplikace těchto látek koriguje nejen matriční efekt, ale zlepšuje metodu, zejména pak přesnost, opakovatelnost a linearitu kalibrační křivky. Pro tyto účely mohou být použity standardy deuterované, ale i značené uhlíkem ^{13}C. V případě, že jsou přidány před extrakcí, postihují navíc i výtěžnost metody [127, 141]. Proto, aby mohl být matriční efekt korigován pomocí vnitřního standardu, je nutností, aby daný izotop odpovídal retenci příslušného nativního analogu. Jen tak může vnitřní standard postihnout změny v ionizační účinnosti. Proto se přistupuje spíše k používání ^{13}C značených standardů, neboť deuterované mohou mít rozdílnou retenci od nativních analogů. Jestliže je používán relativní poměr značeného a nativního strukturního analogu, hovoříme o tzv. izotopovém ředění.
Tato technika kontroly matričního efektu není příliš rozšířená, neboť nabídka ^{13}C izotopově značených standardů mykotoxinů je omezená a jejich cena je značně vysoká.
Jinou – levnější variantou pro korekci matričního efektu je kalibrace v matrici. Jednoduše jde o vytvoření kalibrační řady analytů nikoliv v rozpouštědle, ale ve vyextrahované matrici, která je totožná (nebo alespoň co nejvíce podobná) matrici vzorku [147].
Poslední jmenovanou metodou je metoda standardního přídavku. V případě korekce matričního efektu lze přídavek dodat těsně před nástřikem. Bude-li zapotřebí korigovat navíc výtěžnost, musí se přídavek provést již před extrakcí.
Všechny metody mají své pro a proti. V případě ^{13}C značených standardů se jedná o velmi univerzální metodu a za předpokladu správně nastavených parametrů MS detekce lze dosáhnout opravdu spolehlivých výsledků. Tato metoda je vhodná nejen pro jednosložkové matrice, ale i pro komplexní materiály. Nejčastěji jde o kontrolu kompletních nebo doplňkových krmiv, kdy se ve skutečnosti jedná o různorodou směs obsahující přírodní materiály, doplňkové látky, ale i minerální složku. Pro takovou matrici je složité nalézt blank vhodný pro přípravu kalibrace v matrici. Pro účely analýzy mykotoxinů ve složitých směsích lze upotřebit také metodou standardního přídavku. Kalibrace v matrici je vhodná zejména pro jednoduché a jednosložkové matrice. Nicméně s rostoucím počtem cílených analytů klesá počet možných vzorků, vhodných pro účely blankové matrice.

8. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Běžně sledované mykotoxiny (DON, ZON, OTA, AFs, T-2, HT-2, FBs) jsou často analyzovány pomocí screeningových ELISA testů, které jsou cenově dostupné, případně se využívají přesnější a citlivější analytické metody založené na kapalinové chromatografii s konvenční detekcí (fluorescenční, UV) nebo hmotnostní detekcí. Tyto metody mohou být použity pro sledování několika mykotoxinů v jednom vzorku. S ohledem na dostupnost moderních a vysoce citlivých hmotnostních spektrometrů je současným trendem minimální nebo žádné přečištění vzorku. Kromě snížení nákladů je další výhodou multimetod také nízká spotřeba rozpouštědel, která jsou toxická pro životní prostředí [7, 162, 163].

Cílem této práce bylo tedy vyvinout a validovat metodu založenou na UPLC-MS/MS pro simultánní stanovení 17 mykotoxinů (aflatoxiny B1, B2, G1, G2, fumonisiny B1 a B2, ochratoxin A, deoxynivalenol, nivalenol, zearalenon, T-2 a HT-2 toxin, a „nové“ mykotoxiny beauvericin a enniatiny A, A1, B, B1). Kromě toho lze ze stejného extraktu za stejných měřících podmínek sledovat také ergotové alkaloidy (ergokristin, ergosin, ergokornin, ergokryptin a jejich odpovídající epimery). Tyto alkaloidy však nejsou součástí uvedené multimetody, protože by v důsledku koeluce několika analytů hrozilo snížení citlivosti metody a ztráty potřebného počtu bodů na chromatografický pík. Proto jsou ergotové alkaloidy měřeny v separátní metodě (spolu s pyrrolizidinovými alkaloidy, které nejsou součástí této dizertační práce), lišící se pouze MRM podmínkami v nastavení hmotnostního spektrometru.

8.1 Pomůcky a chemikálie

Standardy mykotoxinů (pevné nebo kapalné) byly pořízeny od různých dodavatelů. Deoxynivalenol (DON), Ochratoxin A (OTA), HT-2 toxin (HT-2), zearalenon (ZON), aflatoxiny B1, B2, G1 a G2 (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2) a izotopově značené standardy AFB1-$^{13}C_{17}$, FB1-$^{13}C_{34}$, DON-$^{13}C_{34}$, OTA-$^{13}C_{20}$, a T-2-$^{13}C_{24}$ byly pořízeny od firmy Sigma-Aldrich, Fluka (Steinheim, Německo). Nivalenol (NIV), T-2 toxin (T-2) a fumonisin B1 a B2 (FB1 a FB2) byly pořízeny od firmy Biopure (Vídeň, Rakousko). Enniatiny A, A1, B a B1 (ENA, ENA1, ENB a ENB1) a beauvericin (BEA) byly pořízeny od firmy Enzo Life Science (New York, USA). Ergotové alkaloidy ergokrystin, ergokornin, ergosin, ergokryptin, ergokrystinin, ergokorninin, ergosinin, ergokryptinin byly pořízeny od firmy Romer labs (Tulln, Rakousko). Pevné standardy byly připraveny rozpuštěním ve vhodném organickém rozpouštědle. Roztoky standardů byly před použitím uchovávány při -18 °C bez přístupu světla.

Analytická, HPLC a MS rozpouštědla (acetonitril, methanol, kyselina mravenčí, mravenčan amonný, $MgSO_4$ a NaCl) byly pořízeny od firmy Sigma-Aldrich, Fluka (Steinheim, Německo) a Lach-Ner (Česká republika). Ultračistá voda byla připravena pomocí zařízení Milli-Q systém (Millipore Corporation, USA). Jako referenční materiál sloužila kukuřice kontaminovaná mykotoxiny s deklarovanou hodnotou analytů, která byla obdržena při účasti v mezilaboratorní porovnávací zkoušce pro testování multimetod ke stanovení mykotoxinů pomocí LC-MS IRM MoniQA FOOD-CT-2006-036337.

8.2 Obecný popis analyzovaných vzorků

Tato práce je dělena do několika částí, a to podle původu vzorku a sledované kontaminace mykotoxiny nebo alkaloidy.

V rámci monitoringu mykotoxinů při úřední kontrole orgánem státní správy ÚKZÚZ bylo v letech 2012 a 2013 odebráno 133 vzorků z české zemědělské produkce. První část této práce tedy popisuje obecnou kontaminaci těchto vzorků krmiv a surovin pro jejich výrobu.
Část těchto vzorků byla vyprodukována v souladu s ekologickými principy zemědělství. Výskyt mykotoxinů v závislosti na způsobu pěstování je diskutován v samostatné kapitole této práce. Další část vzorků byla odebrána v rámci programu RASFF z důvodu monitoringu aflatoxinu B1 v kukuřičné matrici.
Vyvinutá metoda pro sledování 17 mykotoxinů byla použita také pro monitoring mykotoxinů v pivovarském ječmeni a sladu z něj připraveném (celkem 52 vzorků ze sklizně z roku 2012).
Na základě požadavků EFSA probíhá také monitoring přítomnosti ergotových alkaloidů. Metoda pro jejich sledování byla vyvinuta až koncem roku 2013. Proto byly na přítomnost EAs analyzovány vzorky odebrané úřední kontrolou v druhé polovině roku 2013 a v první polovině roku 2014. Ačkoliv se část vzorků sledovaných na přítomnost EAs překrývá s částí vzorků pro monitoring mykotoxinů (neboť je použita stejná technika přípravy a ze stejného extraktu mohou být analyzovány jak mykotoxiny, tak EAs), v této práci je jejich hodnocení kontaminace pro přehlednost diskutována zvlášť.

8.3 Příprava vzorků pro UPLC-MS/MS analýzu

Vzorky byly připravovány modifikovanou metodou QuEChERS. 10 ml 0,1% HCOOH a 10 ml acetonitrilu bylo přidáno k homogennímu vzorku (2 g). Směs byla protřepávána 20 minut při 250 kmitech/min pomocí horizontální laboratorní třepačky KAVALIER LT 3 (Praha, Česká republika). Poté byla ke vzorkům přidána směs solí 4 g $MgSO_4$ a 1 g NaCl. Směs byla intenzivně ručně protřepávána 1 minutu a poté odstředěna při 5000 otáčkách/min po dobu 5 min. 0,5 ml acetonitrilové fáze bylo smícháno s 0,5 ml ultračisté vody. Před analýzou byly vzorky filtrovány přes membránové nylonové filtry s velikostí pórů 0,2 µm.

8.4 Analýza mykotoxinů metodou UPLC-MS/MS

Pro identifikaci a kvantifikaci sledovaných mykotoxinů byl použit UPLC Acquity systém (Waters) spojený s hmotnostním spektrometrem typu trojitého kvadrupólu s ionizací za atmosférického tlaku XEVO TQ MS (Waters). Separace analytů probíhala pomocí kolony Acquity UPLC BEH C18 (50 mm × 2,1 mm × 1,7 µm), která byla opatřena předkolonou Acquity UPLC BEH C18 guard column (5 mm × 2,1 mm × 1,7 µm) při 40 °C. Složky vzorku byly postupně z kolony vymývány gradientovou elucí. Mobilní fáze sestávala ze složky A (voda s 0,1 % kyseliny mravenčí) a složky B (methanol s 0,1 % kyseliny mravenčí a 1 mM mravenčanem amonným). Počáteční složení mobilní fáze sestávalo z 10 % složky B a v čase 0,3 min vzrostlo toto množství na 20 %. Další gradient složky B následoval do 4,5 min na 99,5 %. Poté následovala izokratická eluce po dobu 3,5 minut, pak následoval návrat na počáteční podmínky. Celkový čas analýzy i s kondicionací kolony byl 10 min. Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml/min a objem nástřiku činil 2,5 µl.
Nastavení hmotnostního spektrometru bylo následující: pro ionizaci byl použit elektrosprej s detekcí pozitivních iontů. Napětí na kapiláře bylo nastaveno na 3 kV. Průtok sušícího plynu (N_2) byl 700 l/h, teplota 450 °C, průtok zmlžovacího plynu byl 15 l/h. Teplota zdroje byla nastavena na 150 °C. Kolizním plynem byl argon o průtoku 0,15 ml/min. Pro každý analyt byly sledovány dva MRM přechody (jeden kvantifikační, druhý konfirmační). Prekurzory

a produktové ionty pro každý analyt jsou uvedeny v Tabulce 20. Naměřená data byla dále zpracována programem MassLynx V4.1.
Ergotové alkaloidy nebyly součástí multimetody pro ostatní mykotoxiny a byly měřeny zvlášť v jiné metodě spolu s pyrrolizidinovými alkaloidy (tyto analyty však nejsou zahrnuty v této dizertační práci). Způsob extrakce a nastavení UPLC-MS/MS systému jsou však identické s multimetodou pro stanovení mykotoxinů, liší se pouze MRM podmínky (Tabulka 21).

Tabulka 20. MS/MS parametry pro mykotoxiny nastavené na přístroji XEVO TQ MS (Waters), hmotnostní spektrometr typu trojitého kvadrupólového filtru.

	RT (min)	Prekurzor (m/z)	Napětí na čočce (V)	Produktový ion 1 (m/z)	Kolizní energie (eV)	Produktový ion 2 (m/z)	Kolizní energie (eV)
NIV	0,84	313	26	125	12	177	13
DON	1,10	297	20	203	20	231	20
AFG2	2,07	331	45	245	40	313	33
AFG1	2,21	329	45	243	37	311	30
AFB2	2,33	315	45	259	40	287	35
AFB1	2,46	313	45	213	40	241	40
HT-2	3,02	442	16	215	13	263	13
FB1	3,15	722	45	334	40	352	40
T-2	3,29	484	20	185	12	215	12
ZON	3,48	319	20	185	20	187	20
OTA	3,54	404	25	221	25	239	25
FB2	3,62	706	50	318	55	336	50
ENB	4,35	640	50	196	25	214	25
BEA	4,44	784	50	244	25	262	25
ENB1	4,45	654	50	196	30	214	30
ENA1	4,54	669	50	210	27	228	27
ENA	4,62	683	50	210	27	228	27

Tabulka 21. MS/MS parametry pro ergotové alkaloidy nastavené na přístroji XEVO TQ MS (Waters), hmotnostní spektrometr typu trojitého kvadrupólového filtru.

Ergotový alkaloid	RT (min)	Prekurzor (m/z)	Napětí na čočce (V)	Produktový ion 1 (m/z)	Kolizní energie (eV)	Produktový ion 2 (m/z)	Kolizní energie (eV)
E-kornin	2,49	562	38	223	35	268	27
E-korninin	2,71	562	38	223	37	278	30
E-sin	2,71	576	21	268	25	208	25
E-sinin	2,85	576	38	223	35	305	27
E-kryptin	2,35	548	38	223	33	208	35
E-kryptinin	2,40	548	20	223	28	208	30
E-kristin	2,74	610	23	208	25	268	35
E-kristinin	2,88	610	35	223	35	305	29

8.5 Statistické zpracování experimentálních dat

Ke statistické analýze experimentálních výsledků byl použit program Excel verze 2010 (Microsoft, USA). Statistická významnost hladin analyzovaných parametrů mezi zkoumanými skupinami jiker byla hodnocena Studentovým t-testem na hladině významnosti 0,05.

9. VÝSLEDKY A DISKUZE

9.1 Optimalizace MRM podmínek pro stanovení ergotových alkaloidů

Parametry pro stanovení ergotových alkaloidů pomocí hmotnostní spektrometrie se mohou z důvodu použité instrumentální techniky lišit. Například ve studii Mavungu a kol. [115] se pro fragmentaci –ininových epimerů EAs místo protonovaného molekulového iontu prekurzoru používá klastr s odštěpenou vodou, tedy $[M-18+H]^+$. Tento přístup může být přínosný například ve chvíli, jestliže jsou MS podmínky stanovení nastaveny tak, že je molekulový ion fragmentován již v samotném ESI zdroji (např. je příliš vysoká teplota zdroje MS). V této práci byly testovány oba přístupy, avšak v daném instrumentálním nastavení byly pro aplikaci CID vždy vybrány protonované molekulové ionty, protože vykazovaly mnohem lepší meze detekce.

Vzhledem k výběru stejných prekurzorů a v mnoha případech i produktových iontů obou epimerů byl kladen důraz na chromatografickou separaci. Chromatografické podmínky, převzaté z multimetody pro měření mykotoxinů, však byly dostatečně účinné na oddělení obou izomerních forem.

9.2 Validace multimetody pro stanovení mykotoxinů

Během validace byla ověřena přesnost, správnost, selektivita, nejistota, linearita, meze stanovitelnosti a meze detekce metody pro stanovení mykotoxinů a ergotových alkaloidů.

Přesnost (opakovatelnost) charakterizuje rozptýlení validované vlastnosti kolem střední hodnoty zapříčiněné působením náhodných chyb. Statistickou mírou přesnosti je směrodatná odchylka (s), resp. relativní směrodatná odchylka (RSD) v procentech. Data pro vyhodnocení opakovatelnosti byla naměřena za podmínek měření opakovatelnosti, tj. v jedné laboratoři, stejným pracovníkem, na stejném přístroji a v co nejkratším čase. Přesnost metody pro stanovení vybraných mykotoxinů byla stanovena opakovanou analýzou (6 opakování) obohacených vzorků kukuřice, pšenice, kompletní krmné směsi a siláže na 3 hladinách v rozmezí 1 – 8000 μg/kg v závislosti na druhu matrice a analytu. Pro všechny parametry byla splněna validační kriteria podle požadavků uvedených v příslušné legislativě [123, 164, 165].

Správnost charakterizuje shodnost výsledků měřené validované vlastnosti s akceptovatelnou nebo deklarovanou referenční nebo vzrůstající hodnotou. Správnost byla ověřena metodou standardního přídavku do vzorků krmiv, které neobsahují validované parametry. Výtěžnosti metody byly vypočteny z průměrného výsledku měření. Výtěžnost mykotoxinů se pohybovala v rozmezí 60 – 130 %. Pouze NIV vykazoval nižší výtěžnost, a proto musí být jeho výsledek vhodně korigován.

Správnost metody byla ověřena také pomocí interního referenčního materiálu s deklarovaným obsahem mykotoxinů. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 22. Správnost metody byla také ověřena pomocí stejného referenčního materiálu při použití izotopově značených analogů mykotoxinů (data nejsou zahrnuta v tabulce). Ve všech případech byly stanovené hodnoty v souladu s deklarovaným množstvím jednotlivých mykotoxinů.

Tabulka 22. Verifikace UPLC-MS/MS metody pro simultánní stanovení mykotoxinů.

Mykotoxin	Deklarovaná hodnota (µg/kg)	Nejnižší tolerovaná hodnota (µg/kg)	Nejvyšší tolerovaná hodnota (µg/kg)	Stanovená hodnota (µg/kg)
DON	567,2	369,6	764,9	360,9
AFG2	1,0	0,6	1,4	1,1
AFG1	8,7	4,9	12,5	10,5
AFB2	0,5	0,3	0,7	< 2,5
AFB1	4,8	2,7	6,9	6,7
HT-2	184,7	108,5	260,9	239,8
FB1	2085,0	1487,5	2682,2	1814,5
T-2	N.D.	N.D.	N.D.	< 5,0
ZON	273,0	166,8	379,2	300,6
OTA	6,7	3,8	9,6	4,2
FB2	726,0	482,3	969,7	850,9

Mez stanovitelnosti (LOQ) je úroveň, nad kterou lze věrohodně provést kvantitativní stanovení analytů. LOQ bylo stanoveno na základě Dokumentu SANCO/12495/2011. Tato úroveň odpovídá nejnižší validované hladině a označuje se jako tzv. reportovací limit (RL). Požadavky na tuto hladinu se mezi jednotlivými mykotoxiny výrazně liší. Zatímco metoda pro stanovení AFB1 v krmivech by měla umožňovat jeho kvantitativní stanovení minimálně na hladině 5 µg/kg (vyplývá z maximálního povoleného obsahu daného legislativou), tak pro DON by byla vyhovující např. hladina 900 µg/kg (vyplývá ze směrné hodnoty pro obsah dle platné legislativy). Všechny analyty splňovaly požadavky na mez stanovitelnosti.

Selektivita je schopnost metody selektivně změřit validovanou vlastnost, tzn. že vliv potenciálních interferentů je nevýznamný. V hmotnostní spektrometrii je mírou selektivity hmotnostní spektrum, které je charakteristické pro každou jednotlivou látku. V případě kvantitativní analýzy s využitím trojitého kvadrupólu se pro každý analyt sledují dva specifické MS/MS přechody. Selektivita detekce je splněna v případě, že poměr intenzity zastoupení produktových iontů zůstává zachován u standardu i reálných vzorků. V případě MS detekcí jsou dále pozorovány matricové efekty, tj. ovlivnění signálu analytu přítomností matrice při ionizaci. Matriční efekt byl počítán dle následující rovnice: ME = směrnice kalibrační křivky v matrici/směrnice kalibrační křivky v rozpouštědle *100. U všech analytů byl prokázán větší či menší vliv matrice na potlačení nebo zesílení signálu analytu. Z tohoto důvodu je zapotřebí kvantifikovat mykotoxiny pomocí kalibrace v matrici, izotopovým ředěním popřípadě standardním přídavkem.

Nejistoty odpovídají směrodatné odchylce z vícenásobného měření matrice obohacené na různých hladinách. Požadavek na maximální rozšířenou nejistotu (tj. nejistotu vynásobenou faktorem pokrytí 2) byl splněn u všech parametrů.

Linearita byla pro analyty počítána ze závislosti plochy píku standardu na jeho koncentraci. Pro její hodnocení byl použit korelační koeficient *R*, který měří stupeň korelace. Hodnoty *R* byly pro všechny mykotoxiny v daném rozsahu vždy větší než 0,995.

Jednotlivé pracovní charakteristiky každého parametru v dané matrici jsou uvedeny v tabulkách v Příloze 14.1. Jejich součástí jsou také i tzv. požadovaná výkonnostní kriteria metody vyplývající z příslušných nařízení a směrnic EU.

Pro přehlednost a praktičnost byly pracovní charakteristiky metody pro kukuřici, pšenici a krmné směsi shrnuty do skupiny tzv. obilniny. Výslednou pracovní charakteristikou metody pro obilniny se stala vždy nejpřísnější charakteristika získaná validací jednotlivých matric. Další pracovní charakteristiky byly získány testováním siláže, jakožto zástupce pícnin (Tabulka 23). Zjednodušený přehled vybraných pracovních charakteristik pro jednotlivé skupiny materiálů (obilniny a pícniny) je uveden v Tabulce 23.

Tabulka 23. Zjednodušený přehled vybraných pracovních charakteristik metody pro stanovení mykotoxinů v materiálech s obsahem obilnin a v pícninách.

Mykotoxin	Parametry	Obiloviny	Pícniny
Nivalenol	LOQ [ppb]	80	160
	Rozmezí [ppb]	80 – 100	160 – 320
	Nejistota [%]	50	50
	Rozmezí [ppb]	> 100	> 320
	Nejistota [%]	30	30
Deoxynivalenol	LOQ [ppb]	50	50
	Rozmezí [ppb]	50 – 100	50 – 100
	Nejistota [%]	50	50
	Rozmezí [ppb]	> 100	> 100
	Nejistota [%]	30	30
Aflatoxin G2	LOQ [ppb]	2,5	5
	Rozmezí [ppb]	2,5 – 10	5 – 10
	Nejistota [%]	50	50
	Rozmezí [ppb]	> 10	> 10
	Nejistota [%]	30	30
Aflatoxin G1	LOQ [ppb]	2,5	10
	Rozmezí [ppb]	2,5 – 10	10 – 20
	Nejistota [%]	50	50
	Rozmezí [ppb]	> 10	> 20
	Nejistota [%]	30	30
Aflatoxin B2	LOQ [ppb]	1	2
	Rozmezí [ppb]	1 – 5	2 – 10
	Nejistota [%]	50	50
	Rozmezí [ppb]	> 5	> 10
	Nejistota [%]	30	30
Aflatoxin B1	LOQ [ppb]	1	2,5
	Rozmezí [ppb]	1 – 5	2,5 – 10
	Nejistota [%]	50	50
	Rozmezí [ppb]	> 5	> 10
	Nejistota [%]	30	30
HT-2 toxin	LOQ [ppb]	5	10
	Rozmezí [ppb]	5 – 10	10 – 20
	Nejistota [%]	65	65
	Rozmezí [ppb]	> 10	> 20
	Nejistota [%]	50	50

Tabulka 23 (pokračování). Zjednodušený přehled vybraných pracovních charakteristik metody pro stanovení mykotoxinů v materiálech s obsahem obilnin a v pícninách.

Mykotoxin	Parametry	Obiloviny	Pícniny
	LOQ [ppb]	10	20
	Rozmezí [ppb]	10 – 20	20 – 40
Fumonisin B1	Nejistota [%]	50	50
	Rozmezí [ppb]	> 20	> 40
	Nejistota [%]	40	40
	LOQ [ppb]	5	5
	Rozmezí [ppb]	5 – 20	5 – 20
T-2 toxin	Nejistota [%]	50	50
	Rozmezí [ppb]	> 20	> 20
	Nejistota [%]	30	30
	LOQ [ppb]	20	20
	Rozmezí [ppb]	20 – 40	20 – 40
Zearalenon	Nejistota [%]	50	50
	Rozmezí [ppb]	> 40	> 40
	Nejistota [%]	30	30
	LOQ [ppb]	5	5
	Rozmezí [ppb]	5 – 10	5 – 10
Ochratoxin A	Nejistota [%]	40	40
	Rozmezí [ppb]	> 10	> 10
	Nejistota [%]	30	30
	LOQ [ppb]	20	20
	Rozmezí [ppb]	20 – 40	20 – 40
Fumonisin B2	Nejistota [%]	50	50
	Rozmezí [ppb]	> 40	> 40
	Nejistota [%]	30	30
	LOQ [ppb]	5	5
	Rozmezí [ppb]	5 – 40	5 – 40
Enniatin B	Nejistota [%]	50	50
	Rozmezí [ppb]	> 40	> 40
	Nejistota [%]	25	25
	LOQ [ppb]	5	5
	Rozmezí [ppb]	5 – 40	5 – 40
Beauvericin	Nejistota [%]	50	50
	Rozmezí [ppb]	> 40	> 40
	Nejistota [%]	25	25
	LOQ [ppb]	5	5
	Rozmezí [ppb]	5 – 40	5 – 40
Enniatin B1	Nejistota [%]	50	50
	Rozmezí [ppb]	> 40	> 40
	Nejistota [%]	25	25

Tabulka 23 (pokračování). Zjednodušený přehled vybraných pracovních charakteristik metody pro stanovení mykotoxinů v materiálech s obsahem obilnin a v pícninách.

Mykotoxin	Parametry	Obiloviny	Pícniny
Enniatin A1	LOQ [ppb]	5	5
	Rozmezí [ppb]	5 – 40	5 – 40
	Nejistota [%]	50	50
	Rozmezí [ppb]	> 40	> 40
	Nejistota [%]	25	25
Enniatin A	LOQ [ppb]	5	5
	Rozmezí [ppb]	5 – 40	5 – 40
	Nejistota [%]	50	50
	Rozmezí [ppb]	> 40	> 40
	Nejistota [%]	25	25

Pícniny obecně poskytují mnohem bohatší extrakty v porovnání s obilninami. Množství koextraktů může významně ovlivnit pracovní charakteristiky metody, jak se projevilo i během této validace. Např. NIV, některé AFs, FB1, T-2 vykazují vyšší mez stanovitelnosti v pícninách než v obilninách (viz Tabulky v Příloze 14.1). Ve většině případů byly také stanovené nejistoty mnohem vyšší u pícnin než u obilných matric. I přes to jsou však pracovní charakteristiky stále v souladu s požadovanými pracovními kritérii.
Kontrola extrakčního procesu může být sledována pomocí přídavku tzv. systémového strandardu Aflatoxinu M1 (AFM1) před extrakcí.

9.3 Validace multimetody pro stanovení ergotových alkaloidů

Pro validaci stanovení ergokorninu, ergokryptinu, ergosinu, ergokristinu a jejich epimerů byly použity dvě relevantní matrice, vojtěška a ječmen, které byly obohaceny na dvou koncentračních hladinách (5 a 100 µg/kg). Obohacení blankových matric bylo provedeno v šesti opakováních pro každou matrici zvlášť. V rámci validace byla hodnocena mez stanovitelnosti (LOQ), správnost, přesnost, selektivita, nejistota a linearita. Pro všechny testované analyty byla splněna validační kritéria podle Rozhodnutí komise 2002/657/ES [165] a Dokumentu SANCO/12495/2011 [166]. Mez stanovitelnosti (LOQ), je vyjádřena jako tzv. reportovací limit, který byl pro všechny parametry 5 µg/kg, a to v obou validovaných matricích. Ostatní validační data jsou uvedena v Tabulkách 24 a 25.

Tabulka 24. Hodnoty *R* pro EAs v rozpouštědle a v extraktech ječmene a vojtěšky.

	Rozpouštědlo (ACN:H_2O, 1:1; v/v)	Ječmen	Vojtěška
Ergokornin	0,99959	0,99905	0,999963
Ergokorninin	0,99999	0,99908	0,998622
Ergokryptin	0,99998	0,99999	0,998867
Ergokryptinin	0,99994	0,99971	0,998287
Ergosin	0,99996	0,99972	0,995018
Ergosinin	0,99945	0,99661	0,998402
Ergokrystin	0,99982	0,99980	0,997649
Ergokrystinin	0,99982	0,99804	0,999884

Tabulka 25. Výtěžnost a přesnost metody pro vzorky v testovaných matricích obohacených na dvou validačních hladinách.

	Výtěžnost (RSD) (%); n = 6			
	Ječmen		Vojtěška	
	5 µg/kg	100 µg/kg	5 µg/kg	100 µg/kg
Ergokornin	88 (21,1)	86 (1,0)	90 (22,1)	99 (1,3)
Ergokorninin	106 (6,2)	92 (0,7)	82 (23,6)	95 (2,2)
Ergokryptin	88 (21,1)	86 (3,4)	90 (19,7)	100 (2,4)
Ergokryptinin	87 (13,3)	89 (2,5)	97 (9,2)	99 (2,8)
Ergosin	92 (11,5)	98 (1,5)	102 (6,5)	96 (1,6)
Ergosinin	82 (19,6)	90 (1,8)	74 (16,8)	84 (1,5)
Ergokrystin	81 (25,0)	89 (2,4)	77 (24,9)	87 (3,5)
Ergokrystinin	89 (11,5)	84 (1,1)	83 (12,4)	95 (0,7)

Výtěžnosti metody byly vypočteny z průměrného výsledku 6 měření. Výtěžnost EAs se pohybovala v ječmeni na hladině RL mezi 81 – 106 % a ve vojtěškové matrici mezi 74 - 102 %. Na hladině 100 µg/kg byla výtěžnost EAs v ječmeni mezi 84 – 98 % a ve vojtěškové matrici v rozmezí 87 – 100 %.

Ječmenná matrice vykazovala především pozitivní ME, zatímco vojtěšková matrice působila spíše potlačení signálu analytů (Tabulka 26). Z tohoto důvodu je zapotřebí kvantifikovat testované EAs pomocí kalibrace v matrici nebo standardním přídavkem před nástřikem, který je aplikován alespoň před nástřikem.

Tabulka 26. Porovnání matricových efektů v různých matricích při LC-MS/MS detekci (%).

	Ječmen	Vojtěška
Ergokornin	92	70
Ergokorninin	134	119
Ergokryptin	99	54
Ergokryptinin	108	77
Ergosin	101	71
Ergosinin	96	62
Ergokrystin	131	58
Ergokrystinin	136	71

Minimální požadovaná kritéria pro nejistotu vyplývající z Rozhodnutí komise 2002/657/ES jsou pro hladinu 5 µg/kg 36 % a pro 100 µg/kg 23 %. Požadavek na nejistotu byl splněn u všech testovaných parametrů.

Korelační koeficient (*R*) byl pro všechny EAs v daném rozsahu vždy větší než 0,995 (Tabulka 24), a proto byla prokázána linearita v kalibračním rozsahu (5 – 500 µg/kg) pro všechny testované parametry.

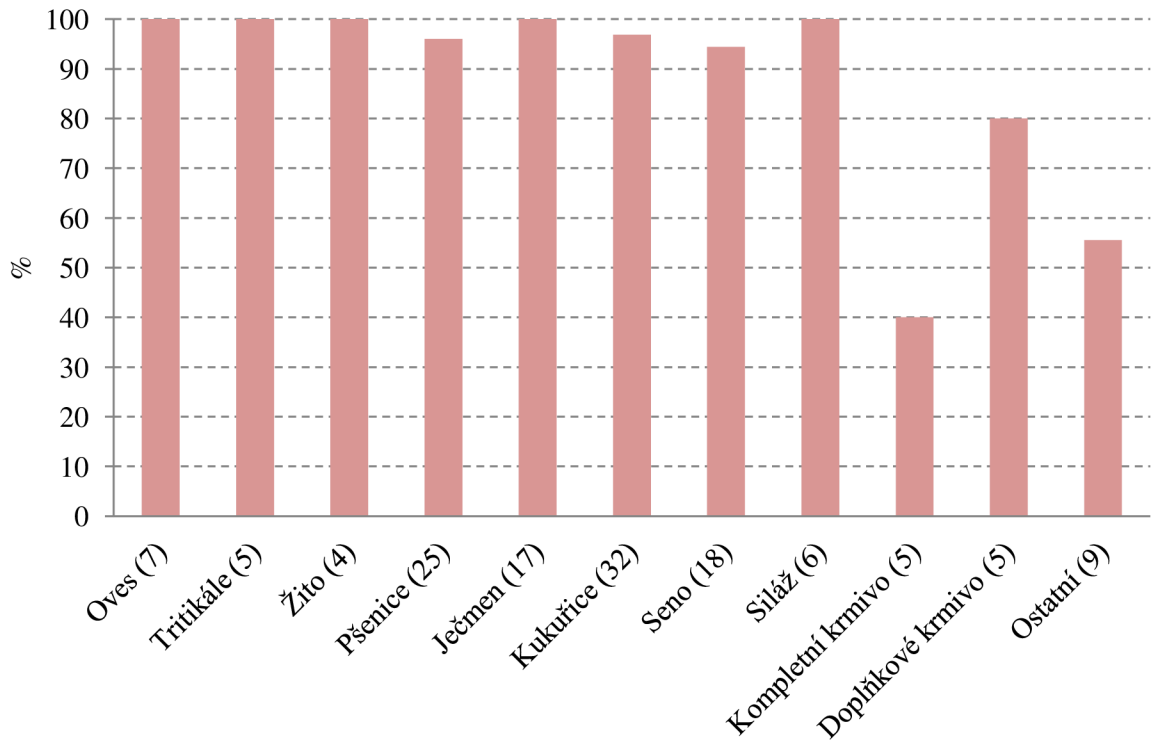
9.4 Monitoring mykotoxinů v krmivech a v surovinách pro jejich výrobu

Výskyt mykotoxinů v krmivech má nepříznivý účinek nejen na zdraví samotných zvířat. Mykotoxiny v krmivech mohou představovat současně také reálné riziko pro člověka, protože

dochází k jejich transportu nebo k transportu jejich metabolitů z krmiv do produktů živočišné výroby (maso, mléko, vejce).
V rámci studie, zabývající se monitoringem kontaminace krmných surovin a kompletních krmných směsí, bylo na přítomnost DON, NIV, HT-2, T-2, ZON, AFs, ENs, FBs, OTA a BEA testováno 133 vzorků krmiv.

V této studii bylo sledováno široké spektrum materiálů určených jak k přímému zkrmování, tak pro výrobu kompletních krmiv (např. premix). Na přítomnost 17 vybraných mykotoxinů byly testovány následující materiály rozdělené do několika kategorií; jednalo se o obilniny (oves, tritikále, žito, pšenice, ječmen, kukuřice), pícniny (seno, vojtěška, byliny, fermentovaná krmiva – siláže), krmivo (kompletní krmné směsi a doplňkové krmné směsi). Kromě jmenovaných kategorií byla vytvořena navíc kategorie tzv. ostatních materiálů, která zahrnuje komodity zastoupené v počtu 1 nebo 2 vzorků. Do této kategorie spadal hrách, pseudoobilnina pohanka, bob koňský, sója, sladový květ a premix, což je materiál pro výrobu doplňkových krmných směsí s obsahem vitamínů, stopových prvků a dalších registrovaných aditivních látek.

Kontaminace vzorků mykotoxiny byla poměrně vysoká. Devět testovaných komodit z 11 bylo kontaminováno alespoň jedním mykotoxinem ve více než 80 % testovaných vzorků (Obrázek 48). Relativně méně kontaminovaná byla kompletní krmiva a ostatní materiál, která obsahovala alespoň jeden mykotoxin v méně než 60 % vzorků (Obrázek 49). Celkové shrnutí kontaminace krmiv mykotoxiny je uvedeno v Tabulkách 27 – 30.



Obrázek 49: Procentuální zastoupení vzorků kontaminovaných nejméně jedním sledovaným mykotoxinem v množství nad mezí stanovitelnosti. Celkové množství testovaných vzorků v jednotlivých komoditách je uvedeno v závorce.

Tabulka 27. Množství mykotoxinů (µg/kg) v obilniách.

Materiál/mykotoxin	ZON	FB1	FB2	OTA	DON	T-2	HT-2	BEA	ENA	ENA1	ENB	ENB1	NIV
Oves (7 vzorků)													
N°pozitivních vzorků	1	0	0	0	2	3	2	4	3	4	5	4	4
Průměr/Množství[a]	22	-	-	-	79	17	51	262	16	46	331	116	302
Minimum	-	-	-	-	73	15	38	6	14	10	13	18	80
Maximum	-	-	-	-	85	19	65	777	18	101	1154	321	705
LOQ	20	10	20	5	50	5	5	5	5	5	5	5	80
Tritikále (5 vzorků)													
N°pozitivních vzorků	1	0	0	0	3	0	0	2	3	4	5	5	0
Průměr/Množství[a]	42	-	-	-	1000	-	-	18	15	78	1723	376	-
Minimum	-	-	-	-	626	-	-	14	9	8	21	5	-
Maximum	-	-	-	-	1267	-	-	23	21	201	5420	1118	-
LOQ	20	10	20	5	50	5	5	5	5	5	5	5	80
Žito (4 vzorky)													
N°pozitivních vzorků	0	0	0	0	1	0	0	2	2	4	4	4	0
Průměr/Množství[a]	-	-	-	-	495	-	-	12	10	54	642	205	-
Minimum	-	-	-	-	-	-	-	8,3	8,3	7,8	193	49	-
Maximum	-	-	-	-	-	-	-	15	11	94	1605	361	-
LOQ	20	10	20	5	50	5	5	5	5	5	5	5	80
Pšenice (25 vzorků)													
N°pozitivních vzorků	0	0	0	1	13	1	2	10	7	12	23	18	2
Průměr/Množství[a]	-	-	-	86	207	5,4	8,5	29	22	100	560	227	183
Minimum	-	-	-	-	52	-	5,7	5,5	6,6	10	6,3	6,2	177
Maximum	-	-	-	-	582	-	11	108	74	619	4987	1811	190
LOQ	20	10	20	5	50	5	5	5	5	5	5	5	80

Tabulka 27 (pokračování). Množství mykotoxinů (µg/kg) v obilniách.

Materiál/mykotoxin	ZON	FB1	FB2	OTA	DON	T-2	HT-2	BEA	ENA	ENA1	ENB	ENB1	NIV
Ječmen (17 vzorků)													
N°pozitivních vzorků	1	0	0	0	10	2	5	7	4	13	17	16	0
Průměr/Množství[a]	341	-	-	-	679	16	15	23	17	51	736	202	-
Minimum	-	-	-	-	50	14	3,9	6,6	6,2	4,5	17	5,0	-
Maximum	-	-	-	-	3901	17	38	54	24	197	4859	1138	-
LOQ	20	10	20	5	50	5	5	5	5	5	5	5	80
Kukuřice (32 vzorků)													
N°pozitivních vzorků	14	22	10	2	29	6	10	21	6	6	18	8	0
Průměr	68	266	124	8	963	9	16	71	14	17	43	23	-
Minimum	23	11	22	7,0	80	7,1	5,2	6,0	5,1	7,1	5,6	6,0	-
Maximum	131	1381	446	9,0	3931	15	51	320	34	45	160	92	-
LOQ	20	10	20	5	50	5	5	5	5	5	5	5	80

Tabulka 28. Množství mykotoxinů (µg/kg) v pícninách.

Materiál/mykotoxin	ZON	FB1	FB2	OTA	DON	T-2	HT-2	BEA	ENA	ENA1	ENB	ENB1	NIV
Seno (18 vzorků)													
N°pozitivních vzorků	3	0	0	0	0	4	4	11	6	14	15	8	2
Průměr	118	-	-	-	-	88	80	56	19	32	92	90	241
Minimum	24	-	-	-	-	5,5	6,8	5,6	6,2	5,1	6,2	5,5	124
Maximum	291	-	-	-	-	241	209	247	52	186	681	518	358
LOQ	20	20	20	5	50	5	10	5	5	5	5	5	160

Tabulka 28 (pokračování). Množství mykotoxinů (µg/kg) v pícninách.

Materiál/mykotoxin	ZON	FB1	FB2	OTA	DON	T-2	HT-2	BEA	ENA	ENA1	ENB	ENB1	NIV
Siláž (6 vzorků)													
N°pozitivních vzorků	0	3	1	0	5	0	2	5	0	0	6	4	1
Průměr/Množství[a]	-	36	42	-	295	-	15	18	-	-	34	9,4	466
Minimum	-	31	-	-	74	-	14	8,2	-	-	7,3	6,3	-
Maximum	-	41	-	-	457	-	16	34	-	-	50	12	-
LOQ	20	20	20	5	50	5	10	5	5	5	5	5	160

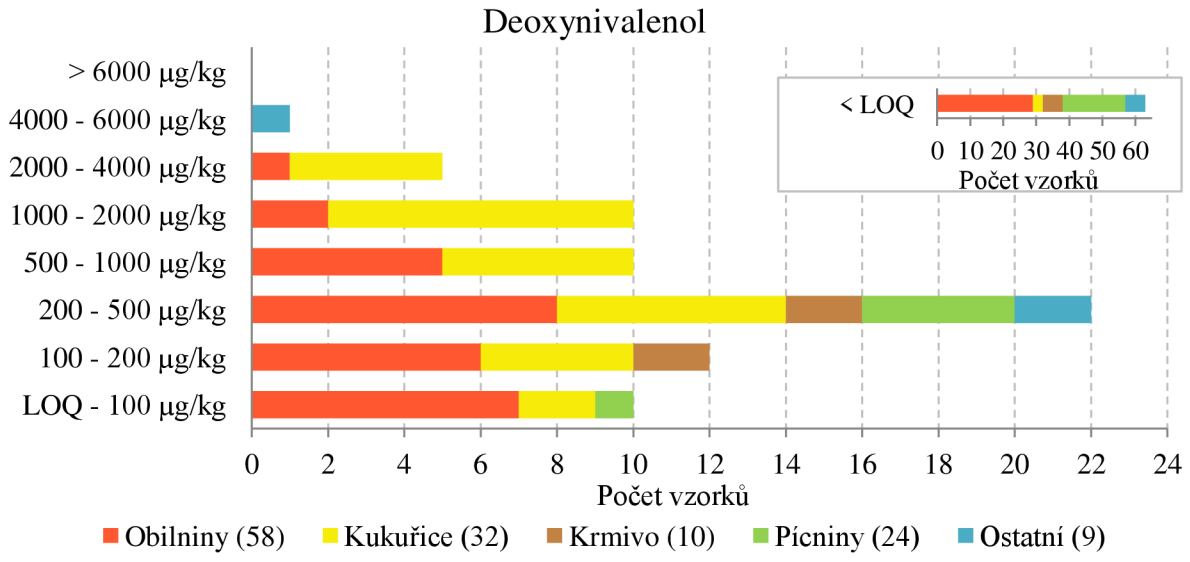
Tabulka 29. Množství mykotoxinů (µg/kg) v krmivech.

Materiál/mykotoxin	ZON	FB1	FB2	OTA	DON	T-2	HT-2	BEA	ENA	ENA1	ENB	ENB1	NIV
Kompletní krmná směs (5)													
N°pozitivních vzorků	1	0	0	0	2	0	0	1	1	1	2	2	0
Průměr/Množství[a]	34	-	-	-	176	-	-	18	6,8	29	177	39	-
Minimum	-	-	-	-	107	-	-	-	-	-	141	7,7	-
Maximum	-	-	-	-	245	-	-	-	-	-	212	69	-
LOQ	20	10	20	5	50	5	5	5	5	5	5	5	80
Doplňková krmná směs (5)													
N°pozitivních vzorků	0	0	0	1	2	1	1	2	1	2	4	3	1
Průměr/Množství[a]	-	-	-	7,0	274	9,0	5,9	26	33	125	262	87	300
Minimum	-	-	-	-	110	-	-	23	-	37	14	75	-
Maximum	-	-	-	-	437	-	-	29	-	214	463	93	-
LOQ	20	10	20	5	50	5	5	5	5	5	5	5	80

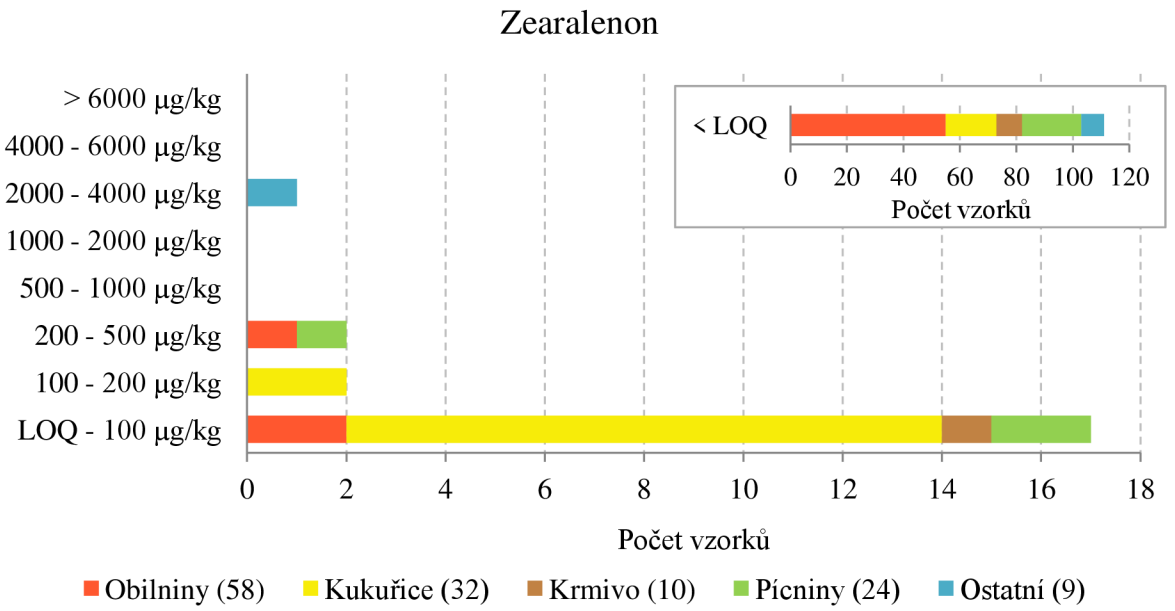
Tabulka 30. Množství mykotoxinů (µg/kg) v ostatních materiálech.

Materiál/mykotoxin	ZON	FB1	FB2	OTA	DON	T-2	HT-2	BEA	ENA	ENA1	ENB	ENB1	NIV
Sója (2 vzorky)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hrách	-	-	-	-	-	-	-	20	-	8,6	37	14	-
Pohanka	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bob koňský	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Topinambur	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sladový květ	-	-	-	-	207	-	43	-	-	-	-	-	-
Prach z výroby krmiv	-	-	-	-	228	-	16	81	-	36	315	113	137
Premix	3131	199	65	-	5643	-	-	37	-	-	-	-	-
LOQ	20	10	20	5	50	5	5	5	5	5	5	5	80

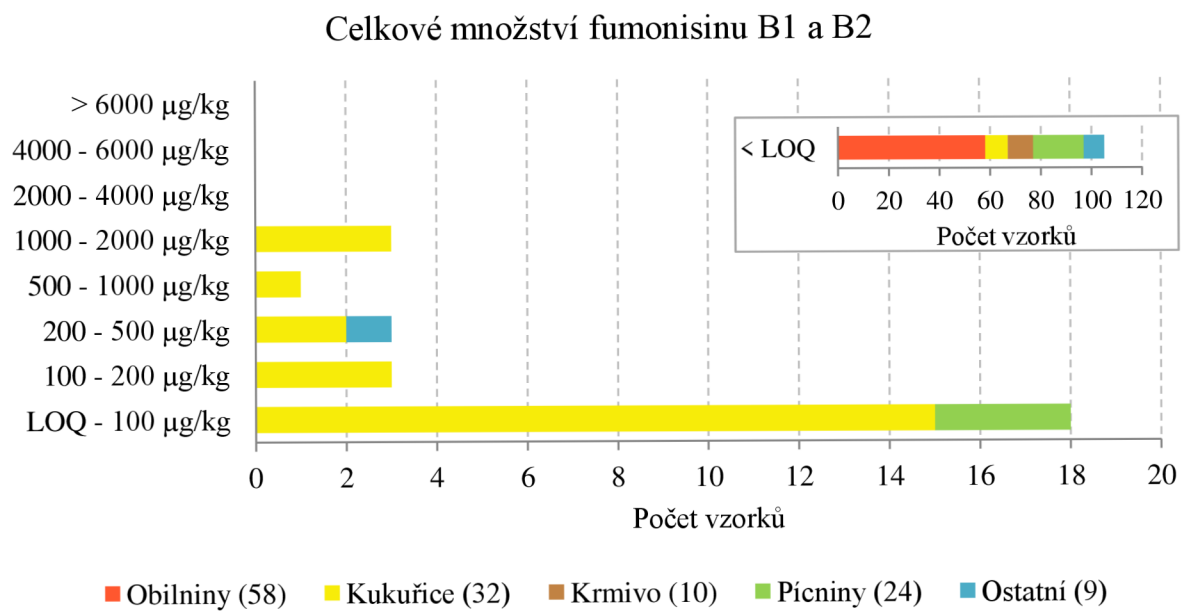
Pro mykotoxiny DON, ZON, celkové množství FB1 a FB2, OTA a ZON, jejichž množství v krmných materiálech je legislativně regulováno EU, byly sestaveny histogramy. Tyto grafy zobrazují počet vzorků jednotlivých kategorií krmných materiálů, obsahujících mykotoxiny ve vymezeném množstevním rozsahu (viz Obrázky 50-54). Kromě zmíněných mykotoxinů byl histogram sestrojen také pro celkové množství T-2 a HT-2 toxinu, neboť od března roku 2013 jsou také pro tento parametr stanoveny orientační hodnoty [93]. Pro Aflatoxin B1 nebyl histogram sestrojen, protože byl obsažen pouze v jednom vzorku. Kukuřice byla pro názornost specifické kontaminace fumonisiny vyjmuta z obilnin a tvoří zde samostatnou kategorii.



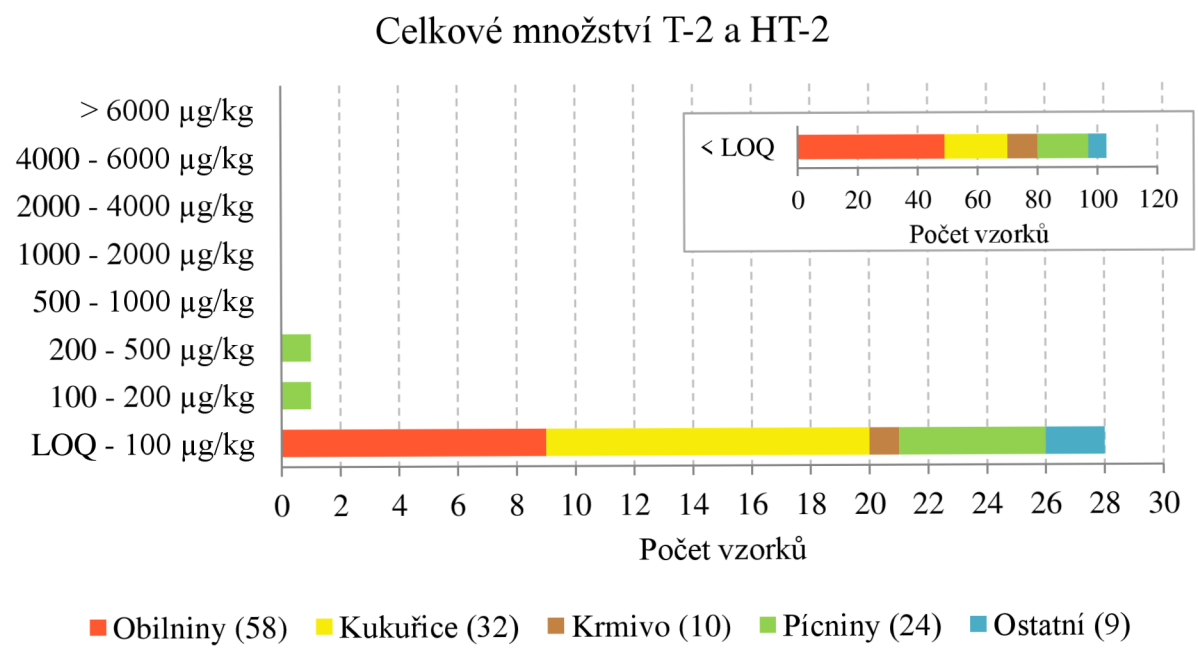
Obrázek 50: Histogram zobrazující počet vzorků jednotlivých kategorií krmných materiálů obsahující DON ve vymezeném množstevním rozsahu. Celkový počet sledovaných vzorků je uveden v závorce.



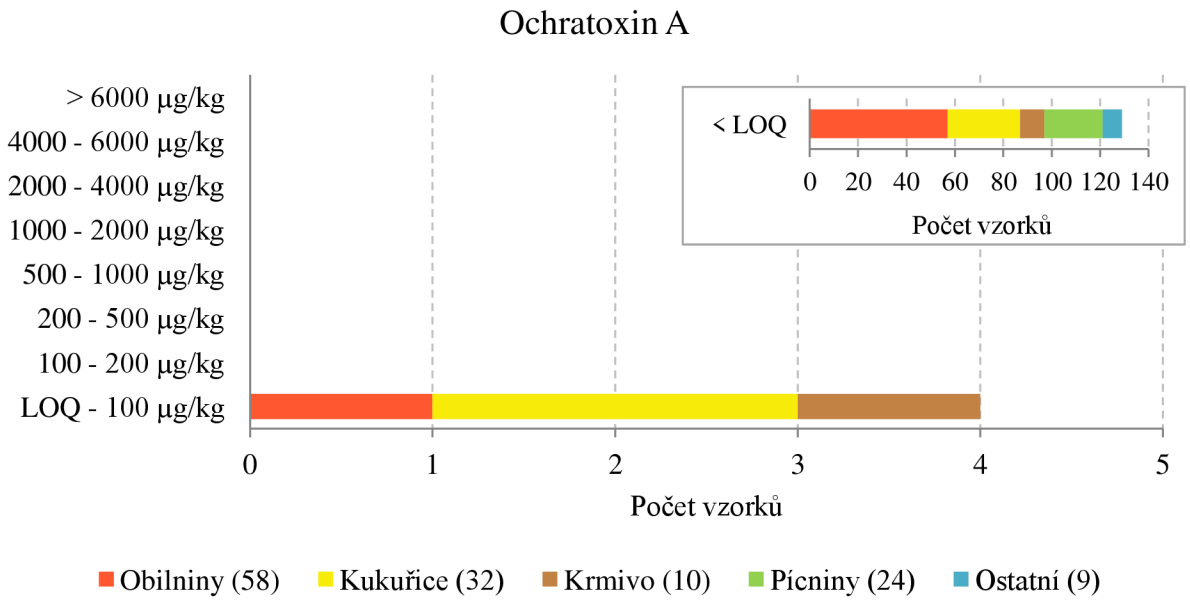
Obrázek 51: Histogram zobrazující počet vzorků jednotlivých kategorií krmných materiálů obsahující ZON ve vymezeném množstevním rozsahu. Celkový počet sledovaných vzorků je uveden v závorce.



Obrázek 52: Histogram zobrazující počet vzorků jednotlivých kategorií krmných materiálů obsahující celkové množství FB1 a FB2 ve vymezeném množstevním rozsahu. Celkový počet sledovaných vzorků je uveden v závorce.



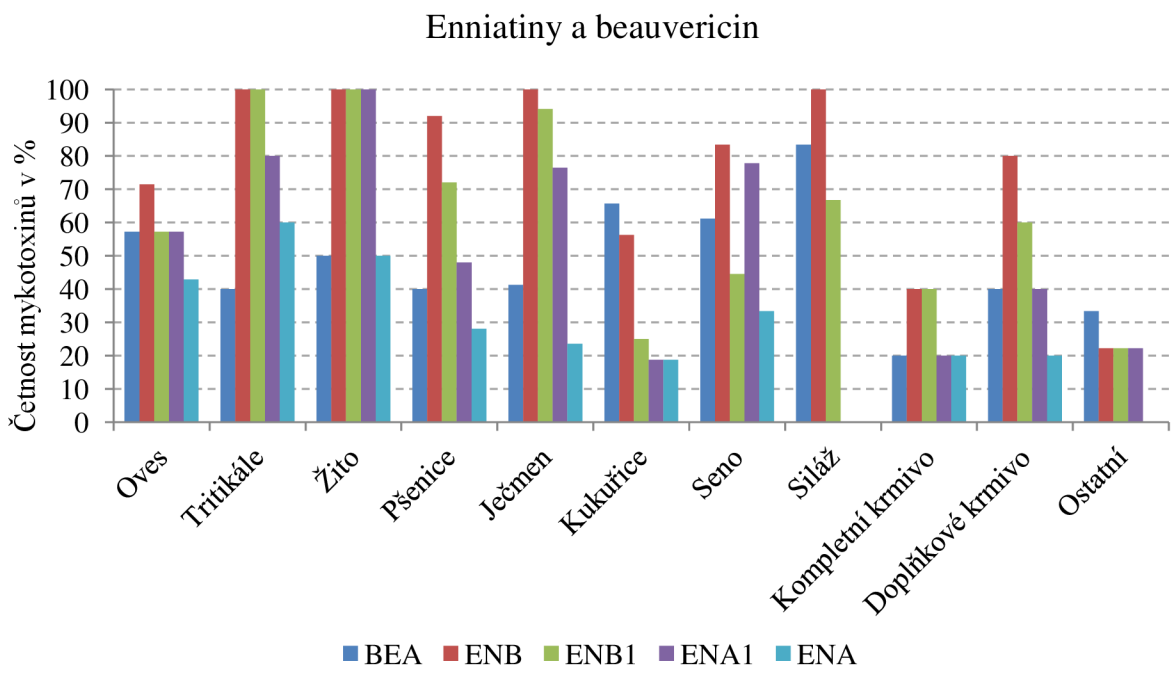
Obrázek 53: Histogram zobrazující počet vzorků jednotlivých kategorií krmných materiálů obsahující celkové množství T-2 a HT-2 ve vymezeném množstevním rozsahu. Celkový počet sledovaných vzorků je uveden v závorce.



Obrázek 54: Histogram zobrazující počet vzorků jednotlivých kategorií krmných materiálů obsahující OTA ve vymezeném množstevním rozsahu. Celkový počet sledovaných vzorků je uveden v závorce.

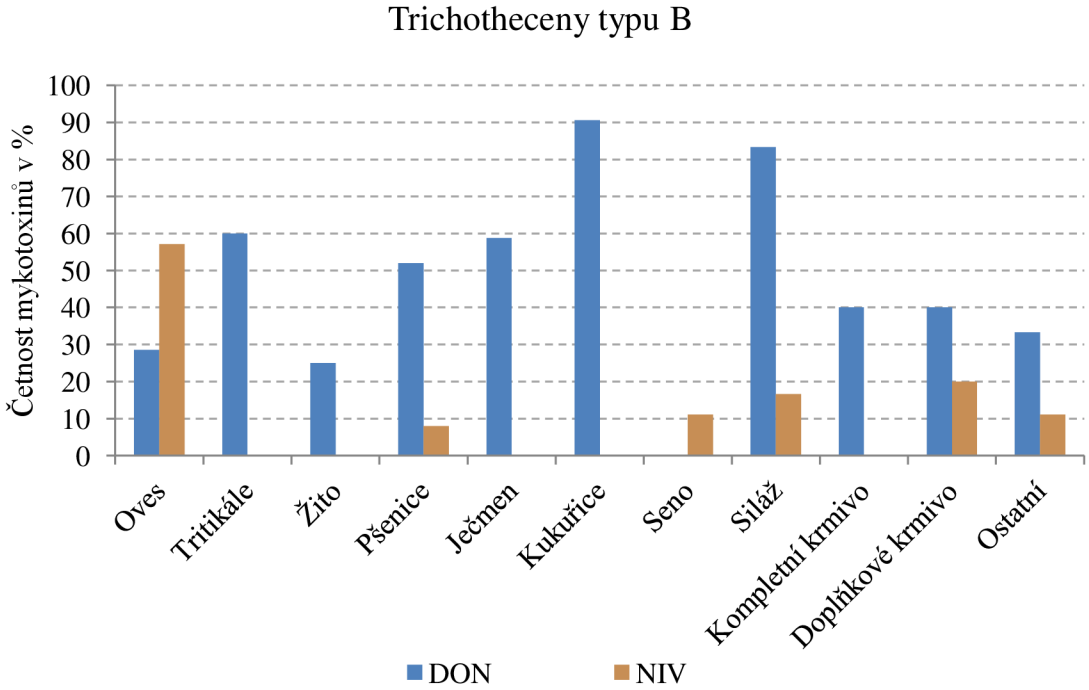
Legislativně upravované mykotoxiny se ve většině vzorků nejčastěji nacházely ve velmi nízkém množství, a to do 100 µg/kg nebo pod mezí stanovitelnosti (viz Obrázky 50-54). Tyto nálezy byly porovnatelné se studií Zachariášové a kol. [167]. Výjimkou byl DON, který byl v testovaném souboru vzorků identifikován ve větším množství, a to mezi 200 – 500 µg/kg (Obrázek 50).
Několik vzorků bylo kontaminováno významným množstvím mykotoxinů, avšak nalezená množství v žádném z případů nepřesahovala legislativní limity pro danou komoditu.

Testované vzorky krmiv a suroviny pro jejich výrobu byly nejčastěji kontaminovány enniatiny B, B1, A a A1, BEA a trichothecenem DON. Ennitainy přitom vykazovaly typickou distribuci (B > B1 > A1 > A), o které se zmiňuje například studie J. L. Sørensena [168]. Tato distribuce byla charakteristická jak pro množství, tak pro četnost těchto „nových“ a zatím jen krátce sledovaných mykotoxinů.
ENB byl nalezen ve více než 90 % všech vzorků obilnin s výjimkou ovsa (71 %) a kukuřice (60 %). Kontaminovány byly také všechny vzorky siláží a 80 % doplňkového krmiva. Nejméně často byl tento mykotoxin obsažen v kompletním krmivu (40 %) a ostatním materiálu (22 %). Enniatiny byly také často doprovázeny přítomností beauvericinu, který se společně s ENB vyskytoval v 82 % nálezů. Četnost pozitivního výskytu enniatinů a BEA je shrnuta na Obrázku 55.



Obrázek 55: Četnost enniatinů a beauvericinu v testovaných vzorcích krmiv.

Ze skupiny trichothecenů typu B; DON kontaminoval všechny zkoušené skupiny vzorků krmiv a materiálů pro jejich výrobu s výjimkou sena. Výskyt NIV byl v testovaných vzorcích obecně méně častý a v menším množství než bylo v případě mykotoxinu DON. Avšak v některých materiálech, jako například v ovsu a seně byl jeho výskyt častější. Přítomnost NIV tedy nebyla vázána na přítomnost DON, neboť pouze ve 4 % pozitivních nálezů DON, byl také přítomen NIV. Četnost výskytu sledovaných trichothecenů typu B je zobrazena na Obrázku 56.



Obrázek 56: Četnost trichothecenů typu B, deoxinivalenolu a nivalenolu v testovaných vzorcích krmiv.

Dále byla monitorována přítomnost T-2 a HT-2 toxinu. Nejčastější výskyt těchto trichothecenů typu A byl pozorován ve vzorcích ovsa, které bylo těmito mykotoxiny kontaminováno z více než 40 %. Méně často byly kontaminovány vzorky pícnin, avšak ve větším průměrném množství (viz Tabulka 28). Ve všech testovaných skupinách krmiv byl přítomen alespoň jeden ze sledovaných trichothecenů skupiny A s výjimkou tritikále, žita a kompletních krmiv.
ZON byl přítomen v ovsu, tritikále, ječmeni, seně, kompletním krmivu, ostatním materiálu a v kukuřici, kde byla jeho přítomnost nejpočetnější (40 %), nikoliv však největší z hlediska jeho množství v této komoditě (viz Obrázek 51). ZON nebyl přítomen ve vzorcích žita, pšenice, siláží a v doplňkové krmné směsi.
Tak jako ve studii Zachariášové a kol. [167], i v této studii kontaminovaly fumonisiny nejčastěji a v největším množství kukuřici. Z 35 testovaných vzorků kukuřic obsahovalo 24 vzorků (69 %) právě tento typ mykotoxinů. Fumonisiny také kontaminovaly jeden vzorek siláže a v nízké koncentraci byly obsaženy také ve vzorku premixu.
OTA byl ve významném množství (86 µg/kg) přítomen v jednom vzorku pšenice. Kontaminována byla také kukuřice a doplňkové krmné směsi, avšak v množství pod 10 µg/kg.
Aflatoxiny nebyly nalezeny v žádném z testovaných vzorků s výjimkou vzorku hrachu, který obsahoval 1,4 µg/kg AFB1 a stopové množství (pod LOQ) AFB2.

9.4.1 Výskyt mykotoxinů v obilninách určených ke krmení zvířat

Všechny obilniny, kromě kukuřice, byly nejvíce kontaminovány ENB, jehož průměrné množství z pozitivních nálezů činilo 331 µg/kg ovsa, 1723 µg/kg tritikále, 642 µg/kg žita, 560 µg/kg pšenice a 736 µg/kg ječmene. Maximální nalezená množství tohoto mykotoxinu se nacházela v tritikále, pšenici a ječmeni mezi 4859 – 5420 µg/kg, v žitě 1605 µg/kg a v ovsu 1154 µg/kg. Ostatní enniatiny a beauvericin byly nacházeny v menším průměrném množství. Nejvyšší nalezená množství těchto mykotoxinů nebyla překonána v žádné z ostatních testovaných kategorií krmiv. Z legislativně upravovaných mykotoxinů byl ve vzorcích obilnin nejvíce obsažen DON. Ve vzorcích kukuřic se tento mykotoxin nacházel v průměrném množství 963 µg/kg, a byl nejčastěji a v největším množství nacházeným mykotoxinem této matrice. Podobné průměrné množství bylo obsaženo také v tritikále. Ostatní obilniny byly kontaminovány DON v menším množství. Průměrné nálezy DON se v pšenici, ječmeni a žitě vyskytovaly mezi 207 – 679 µg/kg. Nízká množství byla nacházena také v ovsu, a to do 85 µg/kg. Ve vzorku tritikále překračovalo množství DON dokonce i 1000 µg/kg a téměř 4000 µg/kg bylo nalezeno ve vzorku ječmene a kukuřice. NIV se vyskytoval pouze ve vzorcích ovsa v průměrném množství 302 µg/kg a ve vzorcích pšenice v průměrném množství 183 µg/kg. V pšenici, ječmeni a kukuřici byly nacházeny trichotheceny typu A (T-2 a HT-2) v průměrném množství do 16 µg/kg. Větší výskyt těchto mykotoxinů byl pozorován ve vzorcích ovsa, kde byla průměrná koncentrace HT-2 toxinu 51 µg/kg. Pouze jeden vzorek pšenice obsahoval větší, avšak legislativně nevýznamné množství OTA (86 µg/kg), neboť překročení směrné hodnoty pro daný produkt ke krmení je až v případě obsahu většího než je 250 µg/kg. Nalezené množství OTA bylo zároveň největším nalezeným obsahem tohoto mykotoxinu ve všech testovaných kategoriích produktů určených ke zkrmování. Dva vzorky kukuřice obsahovaly OTA v průměrném množství 8,0 µg/kg. Zearalenonem byl kontaminován vždy jeden vzorek ovsa (22 µg/kg), tritikále (42 µg/kg) a ječmene (341 µg/kg),

který byl kontaminován největším množstvím ze všech testovaných obilnin. 14 vzorků kukuřic obsahovalo ZON v průměrném množství 68 µg/kg. Fumonisiny B1 a B2 kontaminovaly pouze vzorky kukuřic, a to v průměrném množství 266 µg/kg FB1 a 124 µg/kg FB2. Ve vzorku kukuřice byl nalezen zároveň nejvyšší obsah těchto dvou mykotoxinů (1381 µg/kg FB1 a 446 µg/kg FB2) v porovnání s nálezy v ostatních kategoriích krmiv.
Kukuřice byla obilninou s nejpočetnějším nálezem sledovaného spektra mykotoxinů. Pravděpodobně z důvodu, že je tato obilnina zvláště náchylná k infekci mykotoxinogenními houbami, a to především z rodu *Fusarium* [169].
Naproti tomu žito byla obilnina s obsahem nejužšího spektra sledovaných mykotoxinů, protože kromě nejčastěji se nacházejících enniatinů a BEA, byl pouze jediný vzorek kontaminován jiným mykotoxinem (DON).

9.4.2 Výskyt mykotoxinů v pícninách určených ke krmení zvířat

Další testovanou kategorií byly pícniny. Do této kategorie spadá seno a fermentovaná krmiva (senáže a siláže). Silážování je způsob konzervace pícnin. V důsledku anaerobního fermentačního procesu je krmivo zakonzervováno díky vzniklé velmi nízké hladině pH, která je obvykle až 4. Takové prostředí je velmi nevhodné pro většinu organismů způsobujících kazivost. Jestliže je však přítomen kyslík, hladina pH se zvýší a díky tomu může dojít k rozrůstání houbového patogenu a kontaminaci krmiva mykotoxiny. Proto je nezbytné dodržování správné zemědělské praxe během takové konzervace krmiv.

Ennitainy a BEA byly nejčastějším kontaminantem sena i siláží, avšak jejich nálezy se v jednotlivých komoditách lišily. Jejich množství v seně se často pohybovalo ve stovkách µg/kg, zatímco siláž obsahovala jejich množství v řádech desítek µg/kg. Tato matrice však byla na rozdíl od sena kontaminována DON, jehož průměrné množství bylo 295 µg/kg. V obou matricích byl alespoň jeden vzorek kontaminován NIV v množství ve stovkách µg/kg. V obou materiálech byl pozitivní záchyt alespoň jednoho ze sledovaných trichothecenů typu A, přičemž siláž byla kontaminována výrazně méně než seno, které obsahovalo T-2 a HT-2 toxin v průměrném množství okolo 80 µg/kg. Ve vzorku sena bylo zároveň zachyceno největší množství HT-2 toxinu (209 µg/kg) ze všech testovaných kategorií krmiv, ZON byl nalezen ve vzorcích sena v průměrném množství 118 µg/kg a fumonisiny kontaminovaly zejména vzorky kukuřičných siláží, a to v množství lehce převyšující meze stanovitelnosti, která byla pro tuto matrici 20 µg/kg.

9.4.3 Výskyt mykotoxinů v kompletních a doplňkových krmných směsí

ENB byl opět nejčastěji kontaminující mykotoxin kompletních a doplňkových krmných směsí, který se nacházel průměrně ve stovkách µg/kg. Ostatní enniatiny a beauvericin byly nacházeny v menším množství. Testované materiály také obsahovaly trichotheceny typu B, DON se vyskytoval ve dvou vzorcích kompletních a doplňkových krmiv v průměrném množství okolo 200 µg/kg. NIV kontaminoval pouze jeden vzorek doplňkové krmné směsi. T-2 a HT-2 toxin byly obsaženy v nízkém množství (do 10 µg/kg) pouze v jednom vzorku doplňkové krmné směsi. Nízké množství OTA, které mírně převyšovalo mez stanovitelnosti, bylo nalezeno ve vzorku doplňkové krmné směsi. Nízké množství ZON bylo obsaženo

ve vzorku kompletní krmné směsi. Žádný z testovaných vzorků krmiv neobsahoval fumonisiny.

9.4.4 Výskyt mykotoxinů v ostatním materiálu určeném ke krmení zvířat

Ostatní zkoušené materiály vykazovaly běžné až nízké hodnoty kontaminace mykotoxiny s výjimkou vzorku premixu. Tento vzorek obsahoval nadstandardně vysoká množství DON (5643 µg/kg) a ZON (3131µg/kg). Množství ZON desetinásobně převyšovalo množství, než je u tohoto mykotoxinu běžně nacházeno. Nicméně ani zde nebyly překročeny hygienické limity stanovené platnou legislativou podle Doporučení komise 2006/576/EC, protože premix není určen pro přímou konzumaci, ale pouze k obohacení kompletní krmné směsi. Premix obsahuje minerály, vitamíny a aditiva, která jsou legislativně schválena Registrem doplňkových látek, platném v EU. Jeho samotné složení může být různé a je sestaveno podle aktuálních potřeb odběratele a účelu zkrmování. V závislosti na přidaném množství premixu kontaminovaného ZON do kompletního krmiva tedy vzrůstá riziko překročení hygienického limitu pro daný typ krmné směsi. Bude-li tento premix použit do kompletního krmiva například pro selata, nesmí jeho množství přesahovat více než 3,2 %, aby nedošlo k porušení hygienických limitů pro ZON v takovém typu krmiva.
Tento premix obsahoval také nejvyšší nalezené množství DON. I v tomto případě by premix nesměl tvořit více než 16 % krmiva, aby nebyly překročeny hygienické limity pro DON v krmivu pro prasata, pro která je tento limit nejnižší.
Jediný pozitivní nález aflatoxinu B1 byl ve vzorku hrachu (1,4 µg/kg), který byl jinak kontaminován pouze nízkým množstvím ennitainů a BEA.
Oproti těmto nestandardním nálezům pohanka, oba vzorky sóji, bob koňský a topinambur byly prosté sledovaných mykotoxinů.

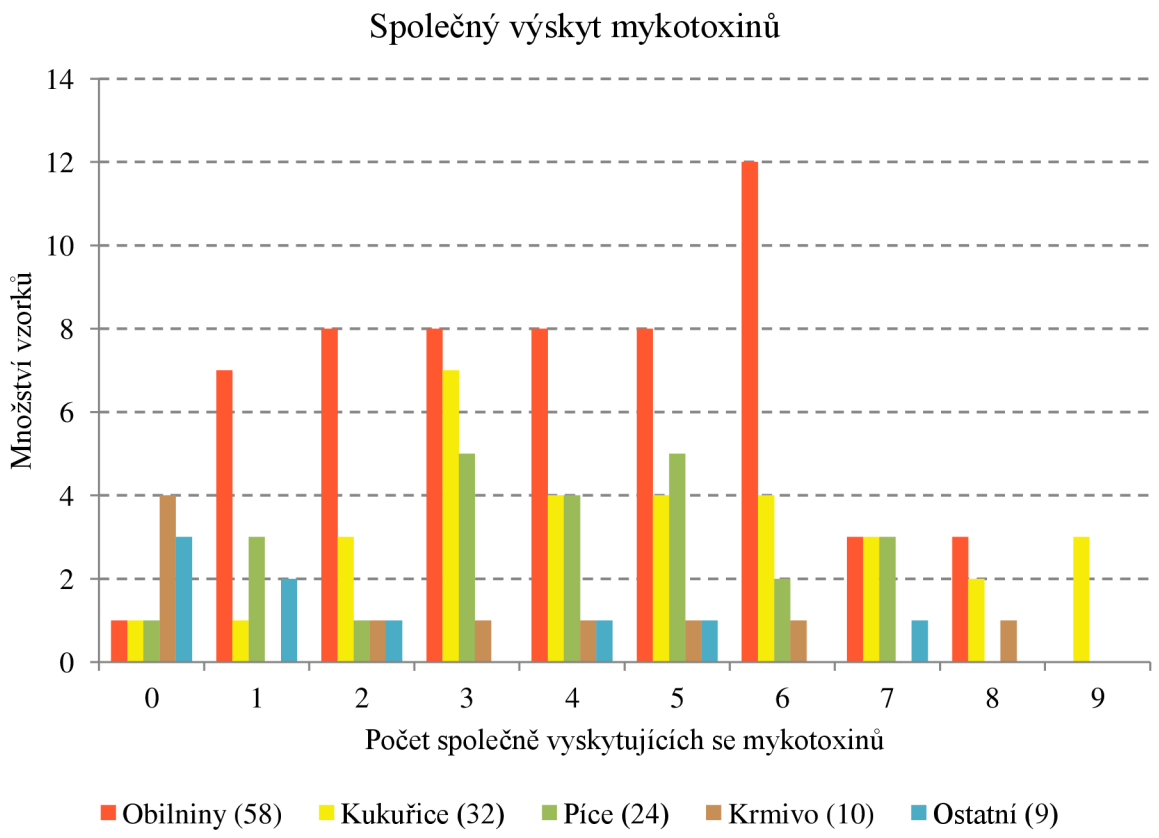
Množství pozitivních nálezů sledovaných mykotoxinů v testovaných vzorcích krmiv a produktů určených pro jejich výrobu bylo vysoké. Často se však jednalo o nálezy pohybující se v blízkosti meze stanovitelnosti, které byly díky citlivému přístrojovému vybavení pro většinu analytů velmi nízké.
Výskyt plísní a jejich toxických metabolitů závisí na mnoha faktorech. Ke kontaminaci plodin může docházet již na poli v procesu jejich pěstování. Velký vliv mají dané klimatické podmínky, druh předplodiny a ošetřování, dále pak jejich úprava a skladování. U fermentovaných krmiv je riziko růstu vláknitých mikromycetů navíc zvýšené použitím nesprávné konzervační technologie.

9.5 Společný výskyt mykotoxinů

Na základě několika studií je známo, že houbové patogeny jsou schopné produkovat více než jeden mykotoxin [170-172]. Krmné suroviny mohou být navíc infikovány zároveň i více druhy hub. Proto studium výskytu jednoho mykotoxinu poskytne pouze malé množství informací o riziku spojeném s konzumací daného krmiva. Z toho důvodu je mnohem užitečnější komplexní informace o výskytu širšího spektra mykotoxinů. Navíc jsou v literatuře popsány aditivní nebo dokonce synergické toxické účinky kombinací některých mykotoxinů, jak je tomu například při současném působení OTA s FB1 a kyselinou penicilinovou [173] nebo AFB1 v kombinaci s FBs, trichotheceny, OTA nebo CIT [167]. Předkládaná studie umožňovala sledování spektra 17 mykotoxinů, avšak některé, jako

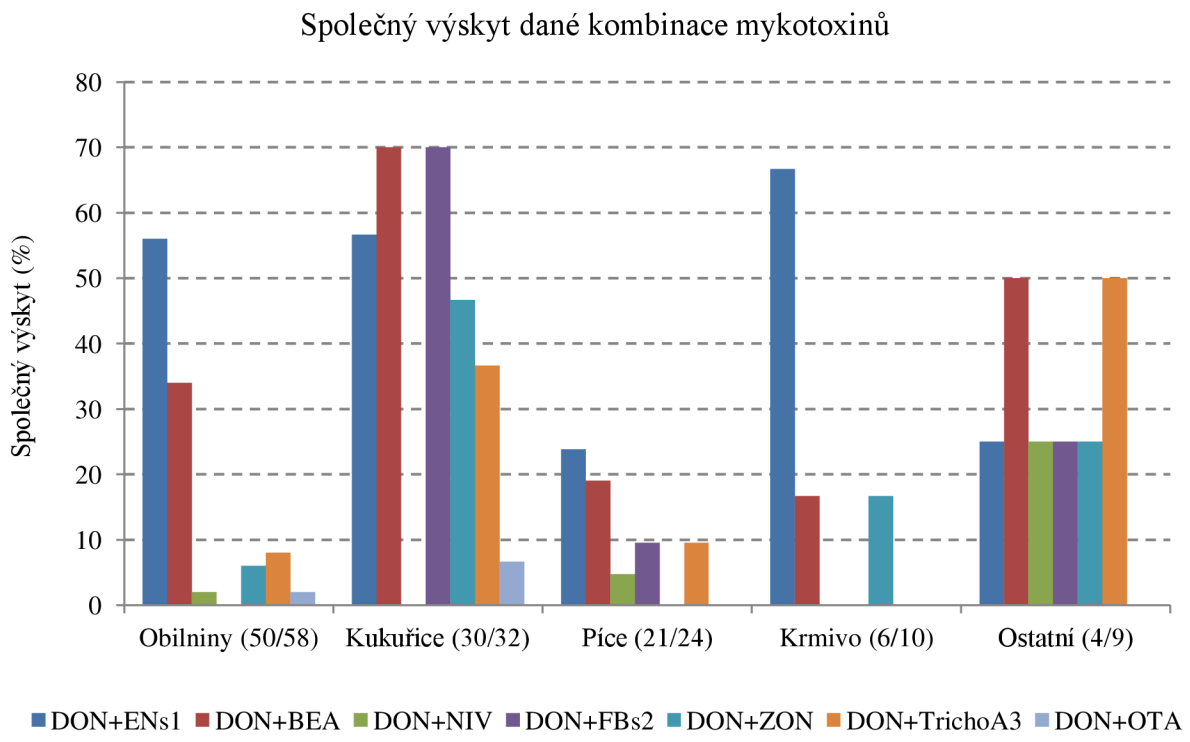
například aflatoxiny, se nevyskytovaly v žádném vzorku kromě jednoho, který byl navíc kontaminován enniatiny a BEA. Diskutovány budou tedy nálezy kombinací ostatních mykotoxinů.

Dva a více mykotoxinů společně bylo obsaženo v 83 % vzorků. Z toho nejčastěji bylo identifikováno pohromadě 3 – 6 mykotoxinů. Nejvíce bylo společně nalezeno 9 mykotoxinů, které kontaminovaly 3 vzorky kukuřic. Celkové shrnutí společného výskytu mykotoxinů v jednotlivých kategoriích krmiv je zobrazeno na Obrázku 57.



Obrázek 57: Společný výskyt mykotoxinů v jednotlivých kategoriích; v závorce je uveden celkový počet testovaných vzorků z jednotlivých kategorií.

V souvislosti s krmivy se o deoxynivalenolu často hovoří, jako o tzv. markeru upozorňujícím na přítomnost i dalších mykotoxinů [174]. Proto byly sestaveny četnosti výskytu kombinací ostatních mykotoxinů s tímto trichothecenem typu B (Obrázek 58). Vzhledem k tomu, že enniatiny a BEA byly nejčastěji nalézanými mykotoxiny, tak největší podíl na četnosti společného výskytu mykotoxinů měla kombinace DON + enniatiny a DON + BEA, které byly identifikovány ve většině testovaných kategorií krmiv a produktů pro jejich výrobu. Díky četné přítomnosti fumonisinů v kukuřici byla také často přítomna kombinace DON + fumonisiny. Ve významném množství se ještě vyskytovala kombinace mykotoxinů DON + ZON a DON + T-2 nebo HT-2, a to především v kukuřici a v ostatním testovaném materiálu. Kombinace mykotoxinů DON + NIV, u které je experimentálně prokázán synergický toxický účinek [175, 176] se vyskytovala pouze ve třech vzorcích zahrnujících oves, siláž a prach z výroby krmiv (který však neslouží ke zkrmování).



Obrázek 58: Procentuální zobrazení společného výskytu dané kombinace mykotoxinů v jednotlivých kategoriích; v závorce je uvedeno množství vzorků s obsahem dvou a více mykotoxinů z celkového množství testovaných vzorků. Poznámky k popiskům: 1-alespoň jeden z enniatinů, 2-alespoň jeden z fumonisinů, 3-alespoň jeden z T-2 nebo HT-2 toxinů.

Synergické toxické účinky jsou také prokázány při společném působení ZON + FB1 [176]. Tato kombinace byla nejčastěji pozorována v 31 % vzorků kukuřic a ve vzorku premixu. Další kombinace mykotoxinů, pro které jsou popsány synergické toxické účinky jako například pro NIV+T-2 a NIV+ZON [176], byly nacházeny pouze ojediněle, a to ve vzorcích ovsa.

9.6 Monitoring aflatoxinů ve vzorcích krmné kukuřice

Testované vzorky kukuřic v této práci byly ÚKZÚZ odebrány v rámci monitoringu aflatoxinů v této komoditě jakožto reakce na notifikaci systému včasného varování pro potraviny a krmiva (RASFF), neboť v roce 2013 byla v Německu zachycena významná množství (od 1,9 – 158,5 µg/kg) AFB1 ve vzorcích kukuřic s původem v Rumunsku a Srbsku. Přímé ohrožení spotřebitele nastalo, když byl také prokázán mnohočetný nález mykotoxinu aflatoxinu M1 v srbském mléce [177], několikanásobně převyšující maximální povolený obsah 0,05 µg/kg.

Vzorky kukuřic testovaných v této studii pocházely z České republiky. Riziko kontaminace mléka nebezpečným AFM1 bylo velmi nízké, protože jeho prekurzor AFB1 nebyl obsažen v žádném testovaném vzorku kukuřice. Plísně rodu *Aspergillus*, které tyto nebezpečné mykotoxiny produkují, se převážně vyskytují v teplém a vlhkém podnebí. Proto byly pravděpodobně nálezy aflatoxinů v českých kukuřicích negativní.

9.7 Mykotoxiny v ekologickém a konvenčním zemědělství

Zájem o ekologicky pěstované produkty potravin se neustále zvyšuje. Ať již z důvodu získání dotací nebo díky poptávce se vytvářejí stále nové produkční oblasti bez pesticidů. Jen od roku 2006 do roku 2012 vzrostla v ČR výměra půdy určené pro ekologické hospodaření téměř dvakrát a tato plocha stále narůstá. V souvislosti s ekologickým zemědělstvím však vzniká otázka, zda potraviny, které jsou získávány tímto způsobem, jsou bezpečné. Studií, které porovnávají kvalitu produktů z ekologického, a konvenčního zemědělství bylo zatím publikováno poměrně málo a stává se, že se jejich závěry často liší [178-181].
V naší studii pocházely analyzované vzorky krmiv a surovin pro jejich výrobu také z konvenční a ekologické zemědělské produkce. Jednalo se však o množství různorodých vzorků z různých odběrných míst z celé ČR, a proto je v následující části pouze informativně porovnán výskyt mykotoxinů v těchto vzorcích v závislosti na způsobu pěstování.

71 analyzovaných vzorků pocházelo z komodit pěstovaných konvenčním způsobem a 62 vzorků z komodit pěstovaných v souladu s principy ekologického zemědělství. Celkem bylo mykotoxiny kontaminováno 123 vzorků, z nichž 63 pocházelo z konvenčního zemědělství a 60 z produktů ekologického zemědělství. Větší množství kontaminovaných vzorků mykotoxiny bylo pozorováno u produktů z ekologického zemědělství (95 %) než u produktů z konvenčního zemědělství (89 %). Stejný závěr byl například pozorován ve studii zabývající se kontaminací ovsa [179].

Statistická analýza neprokázala vliv způsobu pěstování surovin na množství většiny mykotoxinů. Významný rozdíl byl pozorován pouze pro kontaminaci fumonisiny B1 a B2, které se mnohem častěji a ve vyšších koncentracích vyskytovaly v konvenčně pěstovaných produktech. Veškeré ekologické produkty byly prosté těchto mykotoxinů nebo obsahovaly jejich množství pod limitem kvantifikace dané metody. Tato skutečnost je pravděpodobně dána tím, že fumonisiny kontaminovaly převážně kukuřici, neboť na všech 26 vzorků s pozitivním obsahem FB1 připadalo 22 vzorků kukuřic. Ekologicky pěstovaná kukuřice byla zastoupena pouze jedním vzorkem, zatímco 31 vzorků kukuřic bylo pěstováno konvenčním způsobem. Statisticky významnější množství ($p < 0{,}01$) u konvenčně pěstovaných komodit bylo pozorováno také pro DON, avšak i to lze vysvětlit stejným způsobem, jako v případě fumonisinů. Kontaminace komodit DON a fumonisiny je shrnuta v Tabulce 31.

Tabulka 31. Množství DON, FB1 a FB2 v produktech ekologického a konvenčního zemědělství z roku 2012 – 2013.

Mykotoxin	Způsob pěstování	Počet pozitivních vzorků (%)	Rozsah kontaminace (µg/kg)	Průměr (µg/kg)	Hodnota *p*
DON	Konvenční	50 (70)	50 – 5643	560	0,003
	Ekologické	21 (33)	52 – 2708	156	
FB1	Konvenční	26 (37)	11 – 1381	87	–
	Ekologické	0 (0)	0	0	
FB2	Konvenční	12 (17)	22 – 446	19	–
	Ekologické	0 (0)	0	0	

Statisticky významné rozdíly v množství nebo v zastoupení jednotlivých mykotoxinů se nepotvrdily dokonce i při posuzování kontaminace v rámci stejných komodit. Porovnání bylo provedeno pouze pro pšenici a ječmen, které byly zastoupeny dostatečným počtem vzorků pro provedení statistického porovnání.

Posuzování kvality a určování jakostních rozdílů bioproduktů a produktů z konvenčního zemědělství je velmi složité a je potřeba k němu přistupovat komplexně. Výsledky výzkumů jsou často nejednoznačné a není tak možné striktně určit, zda je kvalitnější daný bioprodukt či produkt z konvenčního zemědělství [182].

9.8 Studium výskytu mykotoxinů v ječmeni a ječném sladu z české produkce

V této části práce byla vyvinutá metoda pro simultánní stanovení 17 mykotoxinů využita v rámci spolupráce s VÚPS v Brně pro sledování mykotoxinů ve vzorcích ječmene jarního a ječného sladu. Analyzovány byly 3 série (celkem 52) vzorků ze sklizně 2011. První série obsahovala 22 vzorků sladovnického ječmene (odrůdy Bojos, Xanadu, Blaník, Radegast, Malz a Wintmalt) z různých lokalit v České republice, ve kterých byl screeningovou metodou ELISA nalezen mykotoxin DON (n = 22) v množství nad 250 µg/kg. Druhá série zahrnovala 6 vzorků ječmene a byla na DON negativní (tj. obsah DON byl menší než 250 µg/kg) a byla použita jako kontrolní (n = 6). Třetí série vzorků obsahovala celkem 24 vzorků, a to 12 vzorků ječmene (4 sladovnické odrůdy – Malz, Bojos, Sebastian a Xanadu) ze 3 lokalit v ČR a 12 vzorků sladu, který byl z těchto vzorků vyroben (n = 24). Slady byly připraveny v mikrosladovně Sladařského ústavu v Brně. Kvantifikace mykotoxinů, byla provedena s využitím matricové kalibrace.
Metoda vyhovovala pro stanovení mykotoxinů v potravinářském ječmeni, protože LOQ byly nižší a v případě OTA rovné MAL (maximum allowable limit) daném nařízením Evropské unie [183] pro některé mykotoxiny.

9.8.1 Stanovení DON pomocí ELISA metody

ELISA (z angl, Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) je metoda založená na specifické reakci mezi protilátkou a antigenem. Komerčně dostupné AgraQuant® DON Test kity byly použity pro stanovení obsahu DON ve vzorcích ječmene. Měření probíhalo na VÚPS v Brně,

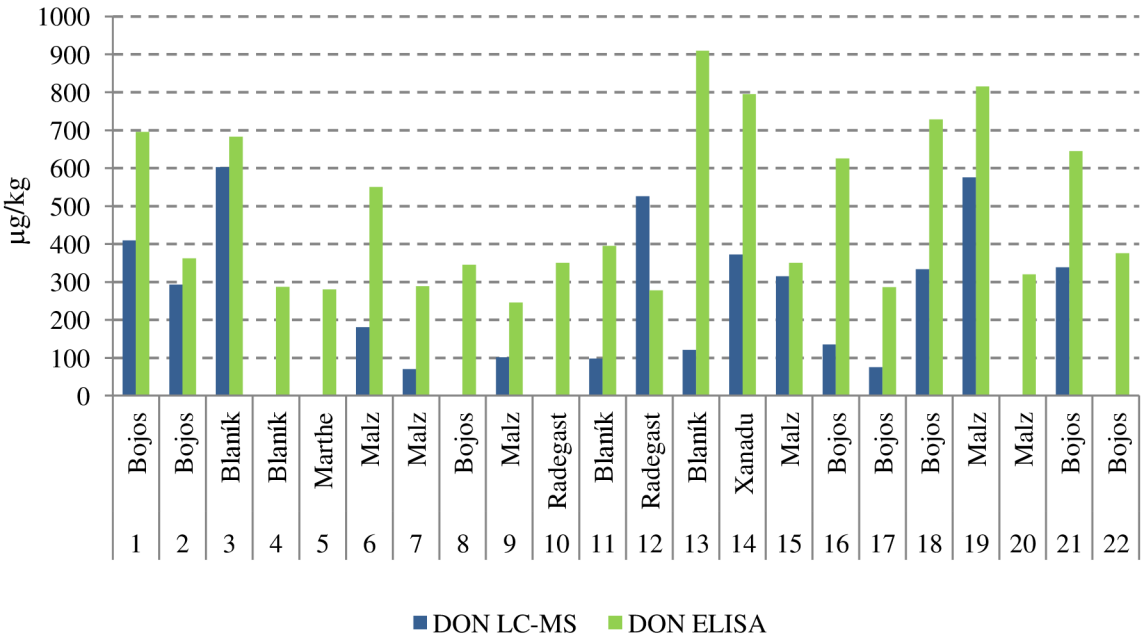
kde byla tato metoda validována pro ječmen a slad. Příprava vzorku a vyhodnocení byla v souladu s instrukcemi dle výrobce. LOD byl 200 µg/kg a LOQ byl 250 µg/kg.

9.8.2 Přítomnost mykotoxinů v ječmeni a sladu

V žádném ze zkoumaných 52 vzorků ječmene a sladu nebyl přítomen ani jeden ze sledovaných aflatoxinů a OTA, FB1 se vyskytl v jediném vzorku ječmene z první série, kde byl předpoklad kontaminace dalšími mykotoxiny, v množství na hranici LOQ (méně než 20 µg/kg). Jako negativní vzorky byly brány vzorky s obsahem mykotoxinů nižším než LOD, pro výpočet průměru byly jako pozitivní brány vzorky, kde se vyskytoval mykotoxin v množství vyšším, než byl LOQ. Pokud byl mykotoxin detekován, ale nebyl kvantifikován, je to uvedeno vždy ve vysvětlivkách v příslušné tabulce.

9.8.3 Srovnání obsahu DON detekovaného pomocí ELISA a UPLC-MS/MS

Ačkoliv jsou ELISA kity široce používané díky jejich snadné přípravě a nízkým nákladům, jejich nevýhodou můžou být zkřížené reakce a falešně pozitivní nebo nadhodnocené výsledky. Kity jsou vyvinuty pro stanovení DON a jeho konjugovaných forem, jako například 3-acetyl-DON, 15-acetyl-DON, de-epoxy-DON (DON-1) a deoxynivalenol-3-glukosid (D3G). Kromě zkřížené reakce s konjugovanou formou D3G může být výsledek ELISA stanovení ovlivněn zkříženou reakcí antigenu s dalšími matričními koextrakty [184]. V této studii nebylo sledováno množství D3G ani jiné konjugované formy DON. Avšak, UPLC-MS/MS metodou byl detekován vyšší obsah DON pouze v jednom vzorku ječmene. Výsledky jsou zobrazeny na Obrázku 59.

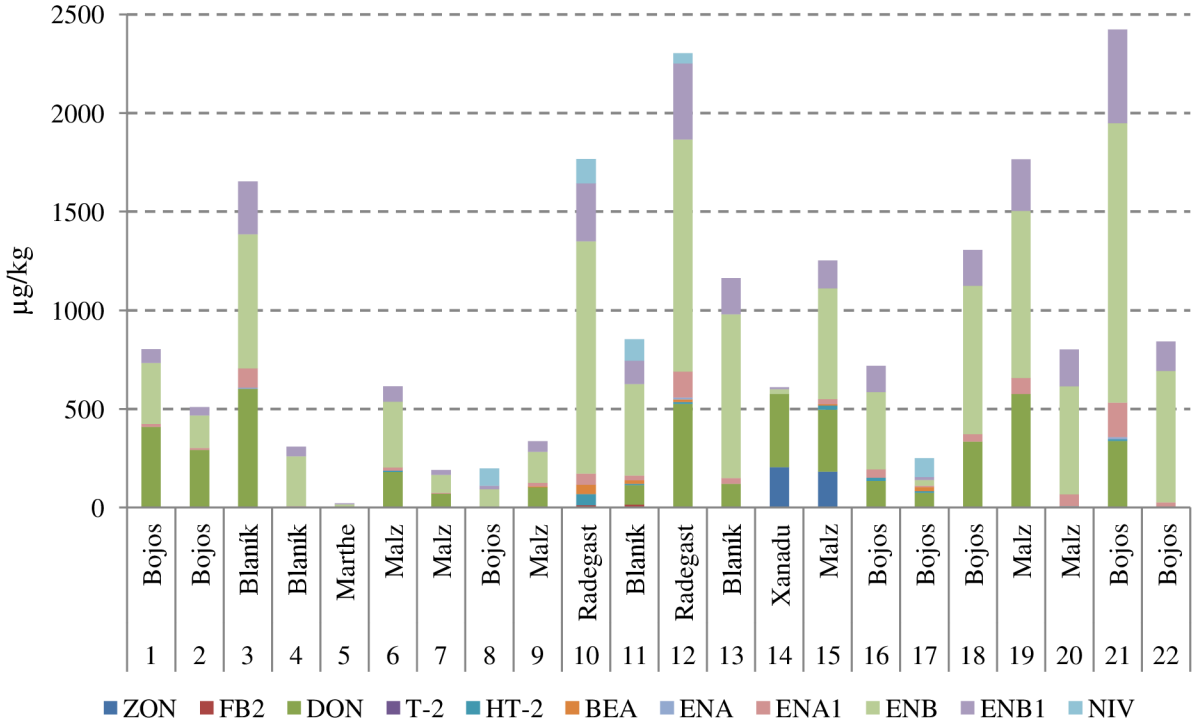


Obrázek 59: Srovnání obsahu DON stanoveného pomocí ELISA a UPLC-MS/MS metodou.

Vzorky z první série byly vybrány na základě pozitivního obsahu trichothecenu deoxynivalenolu, který je často považován za tzv. marker mykotoxinové kontaminace, což bylo potvrzeno také i v této studii. Rozsah kontaminace vzorků DONem je zobrazen na Obrázku 60. Nejvyšší obsah DON činil v této sérii 602,2 µg/kg. Toto nalezené množství

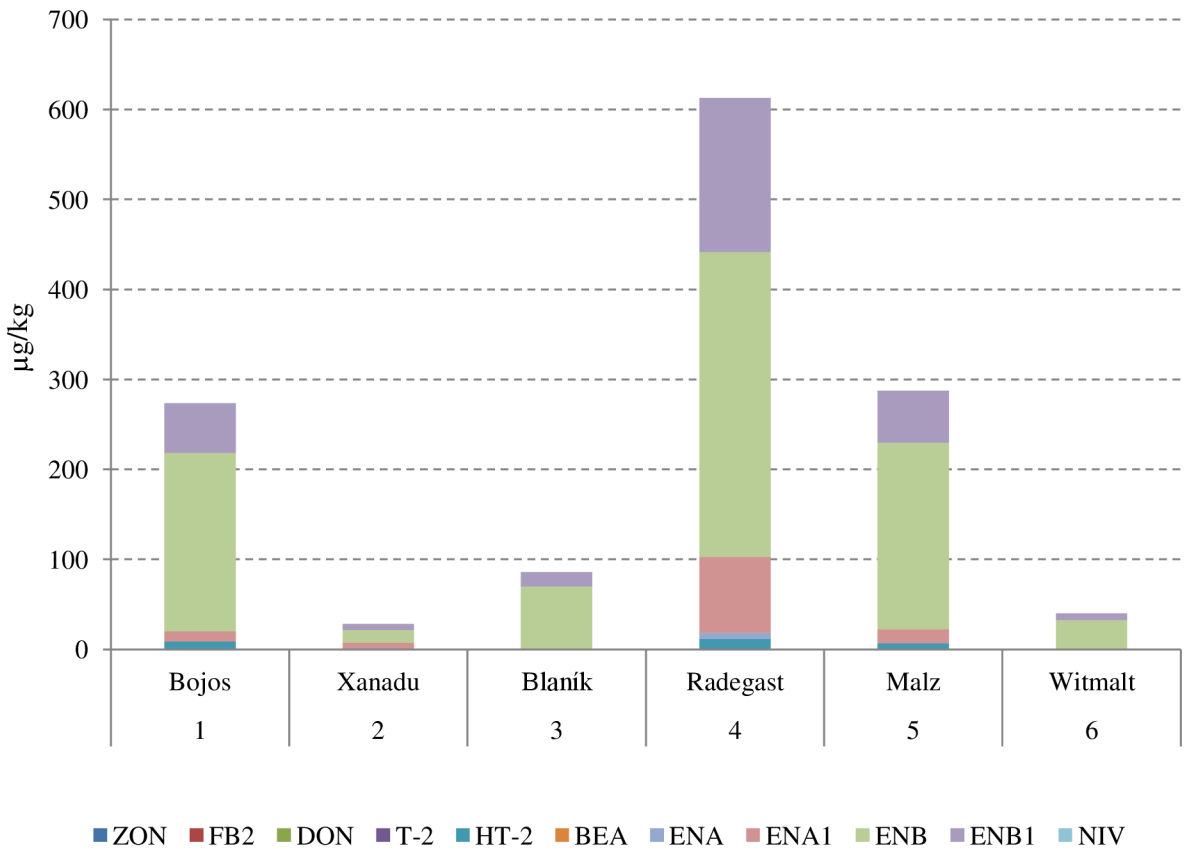
odpovídá zhruba polovině nejvyššího povoleného obsahu 1250 µg/kg v této matrici [183] a je v souladu s běžnými nálezy tohoto trichothecenu v dané matrici [185]. Obsah ostatních sledovaných mykotoxinů je také v souladu s odbornou literaturou. Kontaminace ZON a FB2 byla zanedbatelná. Pouze dva vzorky byly kontaminovány těmito mykotoxiny. Množství NIV, ZON, T-2 a HT-2 jsou v souladu s výsledky studií ječmenu a cereálií prováděných v České republice a okolních zemích [185-189]. Dosud je však studováno jen omezené množství mykotoxinů.

BEA a ENs byly přítomny zřídka a pouze v malém množství (max 47,9 a 11,7 µg/kg). Všechny testované vzorky obsahovaly ENB, B1 a ENA1, a to v mnohem větších koncentracích. Největší nalezené množství odpovídalo nálezu ENB (cca 1000 µg/kg), což je v souladu s dalšími studiemi výskytu tohoto mykotoxinu v ječmeni [190, 191]. Mnohem vyšší koncentrace enniatinů jsou nalézány v oblasti středozemního regionu s vyššími teplotami. Například v roce 2011, Queslati a kol. [192] publikovali nálezy průměrné koncentrace ENB v ječmeni, které bylo až 31 mg/kg.



Obrázek 60: Spektrum mykotoxinů v DON-pozitivních vzorcích ječmene.

Druhá série DON-negativních vzorků byla kontaminována mnohem méně ve srovnání s první sérií (Obrázek 61). BEA byl přítomen pouze ve stopovém množství a ENA byl přítomen pouze v jednom vzorku v množství těsně nad LOQ (6,72 µg/kg). Ostatní enniatiny byly nacházeny v množství 3 – 4 × nižším než v první sérii. Také ostatní analyzované mykotoxiny byly nacházeny ve velmi malém množství nebo v množství pod mezí stanovitelnosti. Výsledky z obou sérií vzorků jsou sumarizovány v Tabulce 32.



Obrázek 61: Spektrum mykotoxinů v DON-negativních vzorcích ječmene.

Tabulka 32. Výskyt mykotoxinů v DON-pozitivních a DON-negativních vzorcích ječmene.

Série (počet vzorků)	Mykotoxiny	N pozitivních vzorků nad LOD (% pozitivních)	Průměr (vzorky pozitivní nad LOQ)	Rozsah kontaminace (vzorky pozitivní nad LOQ)	Medián
DON-pozitivní ječmen (22)	NIV	8 (36)[a]	93	52 - 123	0
	DON	19 (86)[b]	284	70 - 602	128
	ZON	2 (9)	193	181 - 204	0
	FB1	1 (5)	Stopy (< 20)		0
	FB2	2 (9)	13	11 - 16	0
	ENB	22 (100)	499	16 - 1416	427
	BEA	22 (100)[c]	18	5,1 - 48	0
	ENB1	22 (100)	143	5,1 - 476	126
	ENA1	22 (100)[d]	46	5,6 - 174	26
	ENA	22 (100)[e]	10	6,0 - 12	0
	HT-2	10 (46)	15	6,0 - 57	0
	T-2	8 (36)[f]	24	15 - 31	0

Tabulka 32 (pokračování). Výskyt mykotoxinů v DON-pozitivních a DON-negativních vzorcích ječmene.

Série (počet vzorků)	Mykotoxiny	N pozitivních vzorků nad LOD (% pozitivních)	Průměr (vzorky pozitivní nad LOQ)	Rozsah kontaminace (vzorky pozitivní nad LOQ)	Medián
DON - negativní ječmen (6)	NIV	1 (17)	Stopy (< 80)		0
	DON	1 (17)	Stopy (< 50)		0
	FB2	1 (17)	Stopy (< 20)		0
	ENB	6 (100)	143	15 - 338	134
	BEA	6 (100)	Stopy (< 5)		0
	ENB1	6 (100)	53	6,5 - 172	36
	ENA1	6 (100)[g]	29	5 - 85	7,6
	ENA	6 (100)[h]	6,7	6,72	0
	HT-2	4 (67)	9,1	6,9-12	3,5
	T-2	2 (33)	Stopy (< 5)		0

a, 5 vzorků bylo pozitivních nad LOQ, 3 pod LOQ (< 80 µg/kg)
b, 16 vzorků bylo pozitivních nad LOQ, 3 pod LOQ (< 50 µg/kg)
c, 6 vzorků bylo pozitivních nad LOQ, 16 pod LOQ (< 5 µg/kg)
d, 19 vzorků bylo pozitivních nad LOQ, 3 pod LOQ (< 5 µg/kg)
e, 3 vzorky bylo pozitivních nad LOQ, 19 pod LOQ (< 5 µg/kg)
f, 5 vzorků bylo pozitivních nad LOQ, 3 pod LOQ (< 5 µg/kg)
g, 4 vzorky bylo pozitivních nad LOQ, 16 pod LOQ (< 5 µg/kg)
h, 1 vzorek byl pozitivních nad LOQ, 5 pod LOQ (< 5 µg/kg)

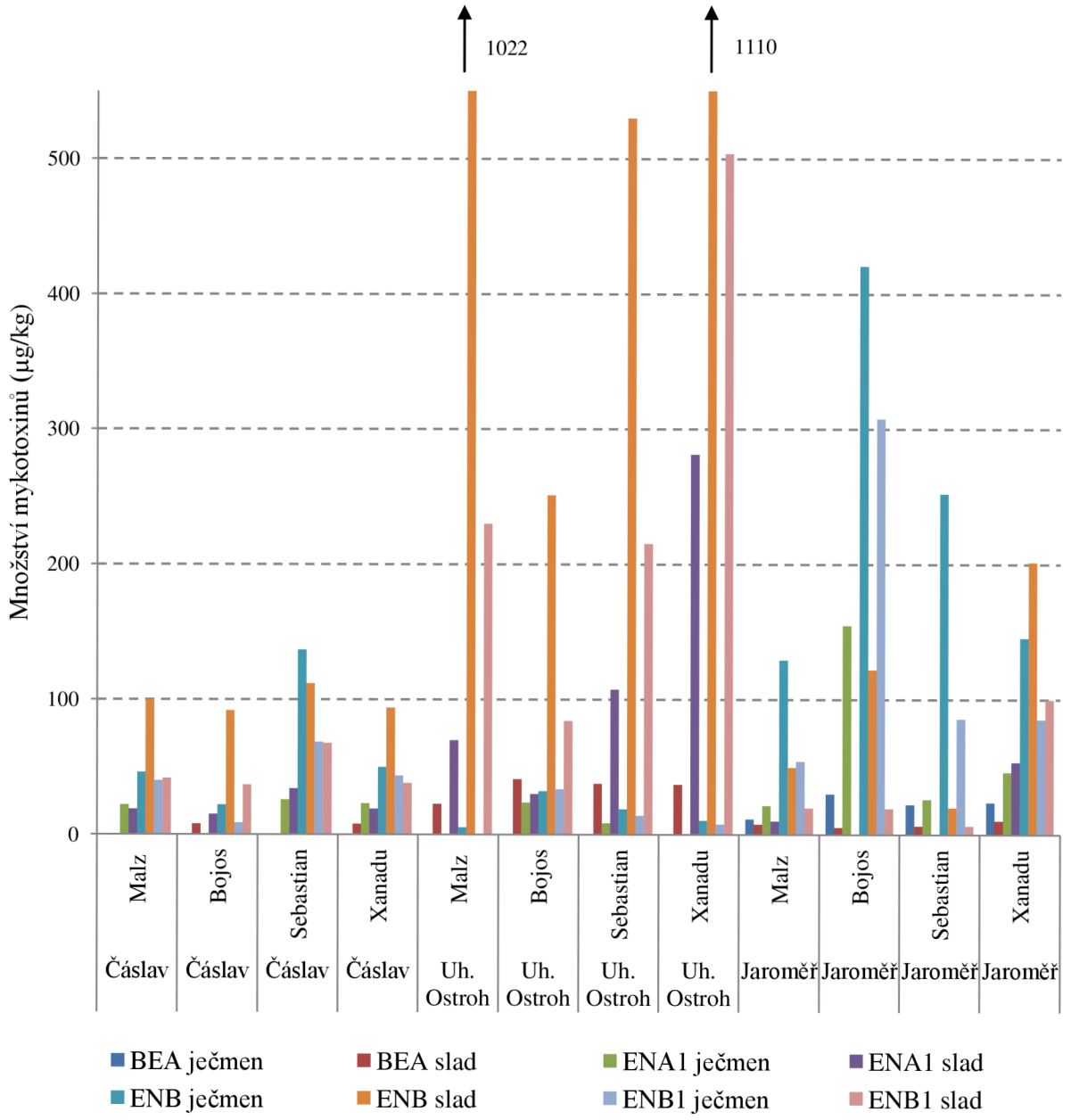
9.8.4 Přestup mykotoxinů z ječmene do sladu

Osud mykotoxinů během sladování a vaření byl studován již dříve (např. [193]), nicméně byly dosud publikovány pouze dvě studie zabývající se přestupem eniatinů a beauvericinu z ječmene do sladu a piva [191, 194].

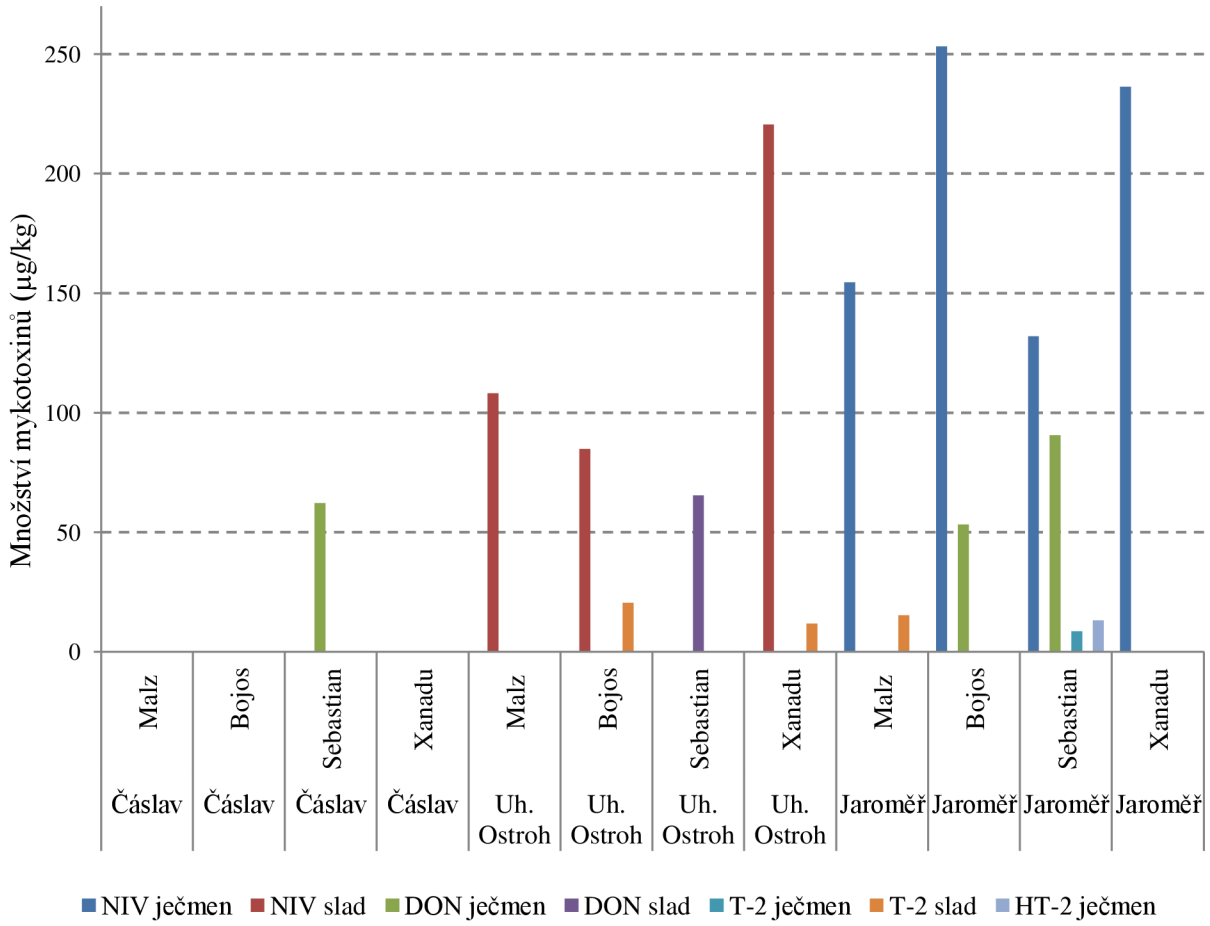
V předkládané studii byl analyzován pouze ječmen a slad z něho vyrobený. Slad byl před analýzou skladován při laboratorní teplotě v klimatizované místnosti.

Na základě výsledů z výše uvedených studií bylo předpokládáno, že množství enniatinů a beauvericinu ve sladu bude stejné jako v ječmeni, ze kterého byl slad připraven, nebo budou hodnoty spíše nižší. Tento předpoklad byl však splněn pouze v některých případech.

Ječmen použitý pro sladování byl obecně málo kontaminovaný mykotoxiny. Na Obrázku 62 jsou znázorněna množství enniatinů a BEA a na Obrázku 63 jsou znázorněna množství DON, NIV, T-2 a HT-2 toxinu v ječmeni a sladu.



Obrázek 62: Množství enniatinů a BEA ve vzorcích různých druhů ječmene a sladu z rozdílných lokalit.



Obrázek 63: Množství DON, NIV, T-2 a HT-2 ve vzorcích různých druhů ječmene a sladu z rozdílných lokalit.

Množství ENA se až na výjimky nacházelo pod LOQ. Kontaminován byl pouze ječmen druhu Bojos z Jaroměřic nad Rokytnou (9,4 µg/kg) a dva vzorky sladu z Uherského Ostrohu (9,6 a 25 µg/kg) (nejsou zahrnuty v obrázku).

Již několikrát bylo dokázáno, že je výskyt mykotoxinů proměnlivý, protože závisí na mnoha faktorech, jako například na místě pěstování plodiny, klimatických podmínkách, odrůdě a roku pěstování. Tato studie ukazuje významné rozdíly mezi jednotlivými lokalitami. Obecně největší kontaminace byla pozorována ve sladu z lokality Uherský Ostroh.

Méně kontaminovaný byl ječmen z lokality Čáslav. ENA1 byl obsažen v nízké koncentraci 34 µg/kg, ENB 112 µg/kg, ENB1 68 µg/kg a jejich množství bylo srovnatelné v připraveném sladu, BEA byl pouze v nízkém množství (do 8 µg/kg) obsažen ve dvou vzorcích sladu, přičemž v ječmeni byl obsažen pod LOQ. Co se týče ostatních mykotoxinů, pouze DON byl přítomen v kvantifikovatelném množství lehce nad LOQ 62 µg/kg a to v odrůdě Sebastian.

Množství mykotoxinů ve vzorcích z Jaroměřic nad Rokytnou bylo také poměrně nízké. Největší množství mykotoxinů bylo obsaženo v odrůdě Bojos, kde byl obsažen ENB v množství 421 µg/kg, ENB1 v množství 308 µg/kg a ENA1 v množství 154 µg/kg. Přitom množství ENB1 a ENA1 nebylo překonáno v žádném dalším testovaném vzorku ječmene

nebo sladu. Obsah ENB, B1 a A1 ve sladu byl nižší než v původním ječmeni s výjimkou odrůdy Xanadu, BEA byl stanoven pouze v nízkých koncentracích (do 30 µg/kg) ve všech testovaných vzorcích ječmene a ještě nižší množství byla obsažena v připraveném sladu. Ve všech vzorcích ječmene byl obsažen také NIV a dva vzorky obsahovaly DON. Dva vzorky ječmene a jeden vzorek sladu obsahovaly nízká množství T-2 a HT-2 toxinu (Obrázek 63).
Ječmen z lokality Uherský Ostroh byl nejméně kontaminován mykotoxiny. Dva vzorky ječmene obsahovaly NIV pod LOQ (< 80 µg/kg), BEA, T-2 a HT-2 byly také obsaženy pod LOQ (< 5 µg/kg) a enniatiny do 34 µg/kg (ENB1 v odrůdě Bojos). Po procesu sladování ovšem množství některých mykotoxinů vzrostlo o sto až tisíc procent ve všech čtyřech vzorcích. BEA byl zastoupen ve všech vzorcích sladu v množství do 42 µg/kg, ENA1 do 281 µg/kg, ENB do 1110 µg/kg a ENB1 do 504 µg/kg, NIV byl nalezen v množství do 220 µg/kg a DON v množství 65 µg/kg v odrůdě Sebastian. Odrůda Bojos a Xanadu byly kontaminovány HT-2 toxinem v množství 20 a 12 µg/kg Obrázek 63.
Obsažená množství enniatinů a BEA ve vzorcích ječmene byla ve srovnání s jinými studiemi [191, 194] nižší. Nicméně houby rodu *Fusarium* se řadí mezi tzv. polní plísně (tj. jsou přítomny v zrnu již před sklizní obilovin) a ve vhodných podmínkách mohou růst a produkovat mykotoxiny také během skladování [195, 196]. Navíc spory vláknitých mikromycetů mohou být přítomny téměř kdekoliv, jako například v půdě, kde ke kontaktu plísně s obilovinou může dojít i během sklízení. Druh předplodiny má také významný podíl na kontaminaci houbovými patogeny. Během sladování může množství mykotoxinů klesat, avšak jejich množství může narůstat i během další manipulace. Je například popsáno, že i stres vyvolaný nevhodnými podmínkami pro plíseň může vyvolat zvýšenou produkci některých mykotoxinů, nebo může docházet k jejich uvolňování z vázaných forem [186].

9.9 Monitoring ergotových alkaloidů v krmivech a surovinách pro jejich výrobu

Vybrané vzorky, odebrané v rámci kontroly krmiv na ÚKZÚZ, byly testované na přítomnost ergotových alkaloidů (EAs). Celkem bylo vybráno 133 vzorků. Pro účely monitoringu EAs bylo sledováno 7 vzorků doplňkové krmné směsi (DKS), 9 vzorků kompletní krmné směsi (KKS), 19 vzorků píce (seno, siláž), 11 vzorků ovsa, 5 vzorků tritikále, 17 vzorků ječmene, 23 vzorků pšenice, 21 vzorků kukuřice, 2 vzorky žita, 2 vzorky směsného šrotu ovsa a ječmene (šrot oves + ječmen) a ostatní materiál (lupina, rýže, řepka, čaj, vojtěška, slunečnicový šrot, hrách, sladový květ, topinambur, koňský bob, prach z výroby krmiv a pohanka).
Alkaloidy byly kvantifikovány pomocí kalibrace v matrici nebo standardním přídavkem před nástřikem.

9.9.1 Hodnocení závažnosti obsaženého množství EAs v testovaných materiálech

Evropská unie doposud nestanovila maximální přípustná množství EAs, a to jak v potravinách, tak v krmivech. Evropskou legislativou je stanoveno maximální přípustné množství námelu v krmivech obsahujících nemleté obiloviny (1 g/kg) [91]. V různých druzích námelu se vyskytuje až 30 druhů alkaloidů, jejichž celkový obsah činí 0,025 – 0,4 %, výjimečně až 1 % (v závislosti na druhu obiloviny nebo lokalitě), přičemž ve střední Evropě je v námelu obsaženo průměrné množství EAs 800 µg/kg [197].
Pouze pro dokumentaci závažnosti nalezeného množství EAs v testovaných vzorcích krmiv a surovin pro jejich výrobu bylo vypočítáno teoretické maximální povolené množství EAs

na kg materiálu. Toto množství odpovídá cca 800 µg/kg krmiva a vztahuje se na celkovou sumu 12 EAs uvedených v doporučení komise 2012/154/EU [198].
V předkládané studii je monitorováno pouze 8 z těchto alkaloidů, a proto by mělo být vypočítané teoretické maximální množství kritičtější. Nicméně pro účely porovnání závažnosti výskytu EAs v krmivech je tato hodnota dostačující.
Pro celkové množství EAs existuje také tolerovaný denní příjem (TDI) stanovený EFSA [199], který odpovídá 0,6 µg/kg t. hm. a den Množství EAs ve vzorcích bude tedy také srovnáváno s touto hodnotou.

9.9.2 Výskyt ergotových alkaloidů v krmivech a surovinách pro jejich výrobu

Houby rodu *Claviceps p.* nečastěji parazitují na obilí a trávě, proto byla kontaminace EAs u těchto materiálu předpokládána a následným testováním na přítomnost EAs také potvrzena. EAs byly obsaženy pouze ve vzorcích obilí s výjimkou kukuřice a v píci. Další nálezy byly identifikovány ve vzorcích kompletních a doplňkových krmných směsí, které jsou ovšem z větší části vyrobeny právě z obilí. Výskyt EAs v těchto matricích je shrnut v Tabulkách 33-35. V případě kontaminace pouze jednoho zástupce z dané kategorie, je v tabulce uvedeno nalezené množství v µg/kg.
V ostatních monitorovaných materiálech by se EAs tedy neměly vyskytovat. Avšak z důvodu možné kontaminace námelem, při nesprávné zemědělské manipulaci, byly do této studie tyto materiály také zahrnuty. Žádný z těchto vzorků však neobsahoval sledované EAs.

Tabulka 33. Množství ergotových alkaloidů (µg/kg) ve vzorcích obilí.

Materiál/mykotoxin	E-kornin	E-korninin	E-sin	E-sinin	E-kryptinin	E-kryptin	E-krystin	E-krystinin
Oves (11)								
N pozitivních vzorků	3	2	2	3	2	3	3	3
Průměr	7,1	21	22	8,5	28	7,0	8,0	16
Minimum	348	114	69	189	178	717	176	66
Maximum	141	67	45	80	103	271	68	49
Tritikále (5)								
N pozitivních vzorků	1	1	0	0	1	1	1	1
Množství	226	51	-	-	8,3	49	78	395
Ječmen (17)								
N pozitivních vzorků	3	0	0	1	1	2	1	2
Průměr/Množství[a]	5,2	-	-	16	5,9	14	17	11
Minimum	7,7	-	-	-	-	21	-	13
Maximum	6,1	-	-	-	-	17	-	12
Pšenice (23)								
N pozitivních vzorků	4	2	1	4	1	4	3	0
Průměr/Množství[a]	7,7	5,3	232	5,5	3,0	13	6,7	-
Minimum	46	50	-	19	-	216	35	-
Maximum	23	28	-	15	-	71	24	-

Tabulka 33 (pokračování). Množství ergotových alkaloidů (µg/kg) ve vzorcích obilí.

Materiál/mykotoxin	E-kornin	E-korninin	E-sin	E-sinin	E-kryptinin	E-kryptin	E-krystin	E-krystinin
Žito (2)								
N pozitivních vzorků	1	1	0	2	1	0	1	0
Průměr/Množství[a]	40	12	-	5,1	5,3	-	7,3	-
Minimum	-	-	-	8,0	-	-	-	-
Maximum	-	-	-	6,5	-	-	-	-
Šrot (oves a ječmen) (2)								
N pozitivních vzorků	1	1	1	1	1	1	1	1
Množství	191	35	64	341	43	250	12	103

a, Pokud je pozitivní pouze jeden vzorek, je udáváno nalezené množství v µg/kg

Tabulka 34. Množství ergotových alkaloidů (µg/kg) ve vzorcích píce.

Materiál/mykotoxin	E-kornin	E-korninin	E-sin	E-sinin	E-kryptinin	E-kryptin	E-krystin	E-krystinin
Píce (20)								
N pozitivních vzorků	1	1	1	1	1	1	1	1
Množství	74	168	90	40	184	74	11	23

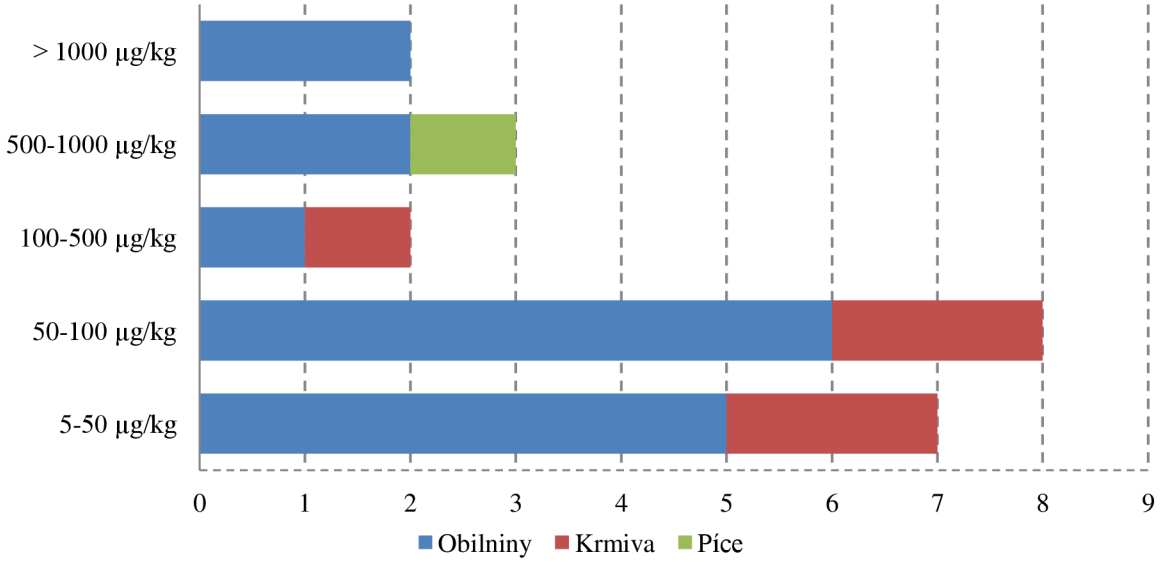
Tabulka 35. Množství ergotových alkaloidů (µg/kg) ve vzorcích krmiv.

Materiál/mykotoxin	E-kornin	E-korninin	E-sin	E-sinin	E-kryptinin	E-kryptin	E-krystin	E-krystinin
Doplňkové krmivo (7)								
N pozitivních vzorků	3	2	2	3	3	3	0	0
Průměr	6,7	5	8	5,1	5	16	-	-
Minimum	20	10	12	35	13	39	-	-
Maximum	14	8	10	20	9	25	-	-
Kompletní krmivo (9)								
N pozitivních vzorků	1	1	1	1	1	1	0	0
Množství	17	5,0	10	30	8,1	39	-	-

Výskyt EAs v obilí byl poměrně častý, neboť více než 1/4 vzorků byla kontaminována alespoň jedním EAs (přesně 27 %). Dva a více EAs pak bylo přítomno v 88 % pozitivních nálezů. Ze vzorků obilných matric, které byly zastoupeny více než dvěma vzorky, byl nejčastěji kontaminován oves, EAs obsahovaly 4 vzorky z 11 (36 %) o celkové koncentraci v rozmezí 16 – 1855 µg/kg. Přitom oves obsahoval vůbec největší nalezené celkové množství EAs napříč všemi testovanými vzorky. Dále byly EAs kontaminovány oba vzorky žita a 1 vzorek obilného šrotu.

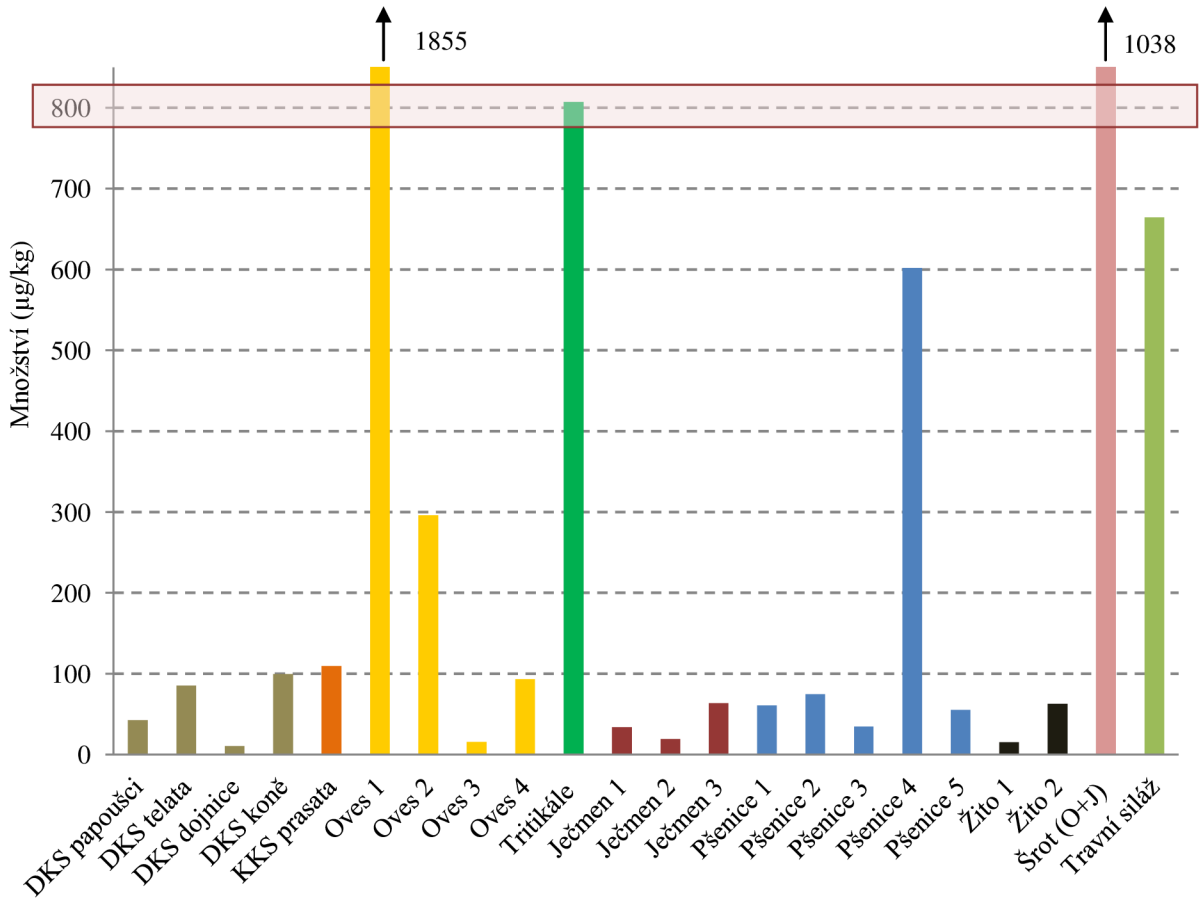
Zatímco ve studii Mavungu a kol. [115] byl pozorován nejvyšší nález celkové koncentrace EAs (v jejich případě se jednalo o 12 EAs) v kompletní krmné směsi (1145 µg/kg) [115], v naší studii byly EAs obsaženy pouze ve vzorku kompletní krmné směsi pro prasata, a to v celkovém množství 110 µg/kg. Ostatních 8 vzorků KS bylo prostých sledovaných EAs.

Mnohem častěji byly EAs nacházeny ve vzorcích doplňkových krmných směsí. Kontaminovány byly celkem 4 vzorky ze 7 (57 %), avšak celkové množství EAs ve vzorku nepřesáhlo 100 µg/kg.
Stejně jako ve studii Mavungu a kol. [115] byl i v naší studii kontaminován pouze jeden vzorek travní siláže. Celkový obsah nalezených EAs byl v našem vzorku o něco vyšší (664 µg/kg) než ve zmiňované studii (430 µg/kg), která navíc sledovala obsah dalších 4 EAs (ergometrin, ergotamin a jejich epimery).
Obecně lze shrnout, že většina matric s pozitivním nálezem EAs obsahovala jejich celkové množství pod 100 µg/kg (Obrázek 64). Jeden vzorek krmné směsi pro prasata a jeden vzorek ovsa obsahoval celkové množství EAs mezi 100 a 500 µg/kg. 4 vzorky obilí (oves, tritikále, pšenice i šrot (směs ovsa a ječmenu) a travní siláž obsahovaly celkové množství EAs nad 500 µg/kg. Shrnutí kontaminace testovaných materiálů podle vymezených hladin nálezu celkového množství EAs je uvedeno na Obrázku 64.



Obrázek 64: Počet vzorků z jednotlivých testovaných skupin (obilniny, krmiva, píce) s celkovým obsahem EAs v rámci vymezených hladin.

V testovaných vzorcích se nejčastěji vyskytoval ergokornin, který kontaminoval 14 % vzorků, a ergokryptin, který byl obsažen ve 12 %, avšak v největším průměrném množství ze všech EAs (108 µg/kg). Průměry byly počítány pouze pro pozitivní vzorky, kde se vyskytoval EA v množství nad mezí stanovitelnosti (5 µg/kg).
Podle odstavce 9.9.1 bylo vypočítáno teoretické maximální povolené množství EAs na kg materiálu, které dle výpočtu činí 800 µg/kg. Takové množství EAs bylo obsaženo pouze ve 3 testovaných vzorcích, které patřily do skupiny obilnin. Vzorky ovsa, tritikále a šrotu obsahovaly 1855, 807 a 1038 µg/kg (Obrázek 65).

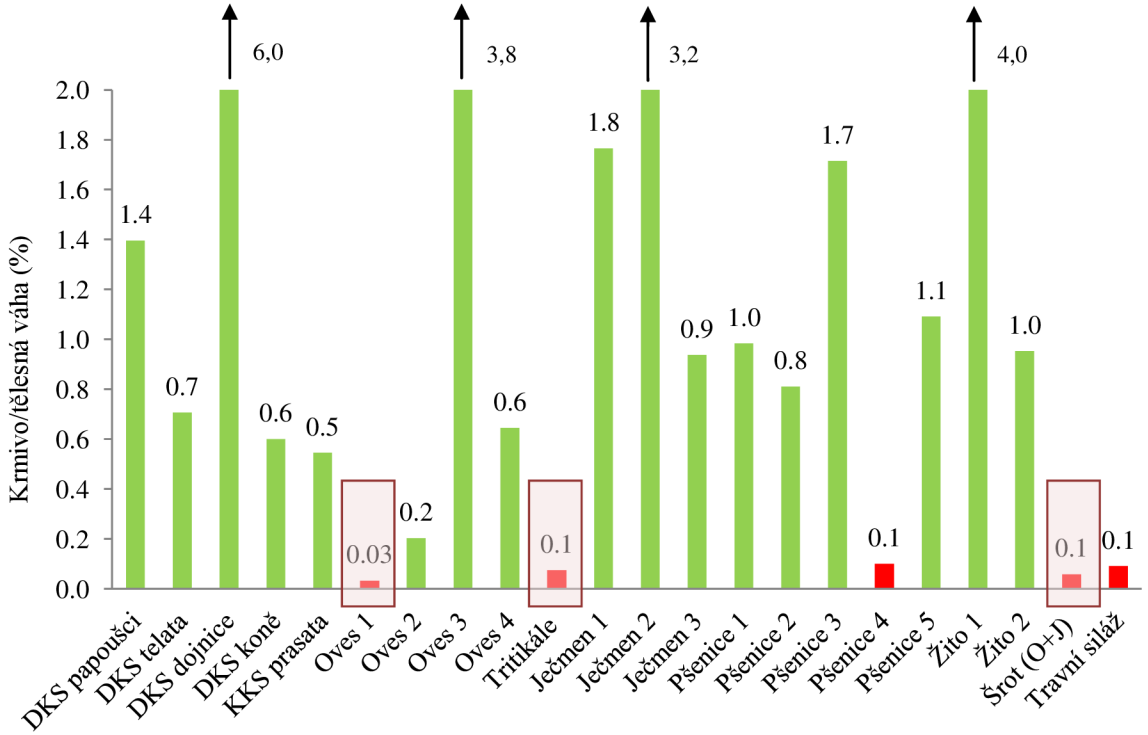


Obrázek 65: Celkové množství sledovaných EAs v krmivech. Obdélník vyznačuje krmiva s obsahem EAs převyšujícím 800 µg/kg (tj. převyšující možný teoretický maximální povolený limit).

Pro pozitivní vzorky bylo také dle odstavce 9.9.1 vypočítáno jejich množství, které by muselo být požito, aby byla dosažena TDI podle EFSA (0,6 µg/kg t. hm. a den). Vzhledem k variabilitě tělesné hmotnosti jsou tato množství vypočítána jako procentuální zastoupení materiálu vůči tělesné hmotnosti (Obrázek 66). 4 vzorky (3 obilné, 1 travní siláž) jsou v obrázku vyznačeny červeně, protože se TDI dosáhne jejich konzumací již v množství 0,1 % vůči tělesné váze.

Navíc při konzumaci vzorku ovsa, který obsahuje nejvyšší celkově nalezené množství EAs (1855 µg/kg), dojde k dosažení TDI již při konzumaci 0,03 % vůči tělesné váze (tj. např. 30 g materiálu/100 t. hm. a den) (Obrázek 66).

Vzorky, které obsahují navíc celkové množství EAs nad 800 µg/kg, jsou v Obrázku 66 ohraničeny rámečkem. Tyto vzorky by mohly být tedy potenciálně vážně nebezpečné. Jmenovitě se jedná o oves, tritikále a šrot (oves a ječmen).



Obrázek 66: Množství krmiva v % k tělesné hmotnosti, při kterém se po konzumaci dosáhne TDI (0,6 µg/kg t. hm. a den) EAs stanovené podle EFSA. Červeně vyznačená jsou krmiva s hodnotou pod 0,1 % (tj. např. 100 g/100 t. hm. a den). V rámečku jsou uvedena krmiva s celkovým obsahem EAs převyšujícím 800 µg/kg (tj. převyšující možný teoretický maximální povolený limit).

Ačkoliv mohou být nálezy EAs v některých případech alarmující, je nutné si uvědomit, že se z velké části jednalo vždy o materiál, který slouží teprve pro přípravu krmných směsí, a proto může následným zpracováním dojít k „naředění“ obsahu EAs. Ovšem z praxe existuje také několik výjimek. Jako příklad může sloužit kůň v zátěžovém tréninku (o tělesné hmotnosti 500 kg), který je schopen zkrmit až 5 kg čistého ovsa za den (informace přímo od zkušeného chovatele). V případě, že by takový kůň požil oves s obsahem EAs 1855 µg/kg, TDI EAs by byl překročen více než 30 krát. Proto je nezbytné monitorovat přítomnost EAs v krmivech a surovinách pro jejich výrobu, aby se zamezilo možnému zdravotnímu riziku.
Tato studie popisuje aktuální situaci výskytu EAs v českých krmivech a v surovinách pro jejich výrobu. Reálné nálezy EAs poukazují, že jejich výskyt není jen ojedinělý a lze se setkat dokonce i s významnými nálezy, které mohou být i potenciálně nebezpečné.

10. ZÁVĚR

Druhá část dizertační práce se věnovala vývoji metody pro současné stanovení mykotoxinů v potravinách a krmivech.

Validována byla metoda pro simultánní stanovení mykotoxinů zahrnující jak legislativně upravované mykotoxiny, tak mykotoxiny, jejichž sledování doporučuje EFSA. Simultánní stanovení mykotoxinů a ergotových alkaloidů z jednoho extraktu bylo prováděno modifikovanou extrakční technikou založenou na nepufrované QuEChERS metodě. Mykotoxiny byly detekovány a kvantifikovány pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostně spektrometrickou detekcí. Postup pro stanovení mykotoxinů je rychlý, snadný a jednoduchý. Navíc se vyznačuje nízkou spotřebou rozpouštědel, a proto je také ohleduplný k životnímu prostředí. Použitá metoda byla během validací shledána dostatečně robustní a lze ji tedy snadno rozšířit o nové analyty a aplikovat na širokou škálu matric. Metoda je charakterizována nízkými mezemi stanovitelnosti, vysokou selektivitou, správností a přesností.

Metoda pro simultánní stanovení 17 mykotoxinů byla použita pro monitoring mykotoxinů v krmivech a krmných surovinách. Analyzováno bylo 133 vzorků odebraných v rámci kontroly krmiv státním orgánem ÚKZÚZ. Spektrum nalezených mykotoxinů bylo poměrně bohaté. V krmivech se vyskytovaly jak legislativně upravované, tak i nové mykotoxiny, které se dokonce vyskytovaly nejčastěji a v největších koncentracích. Nejvíce kontaminovaná byla kukuřice a kukuřičná siláž, která oproti ostatním vzorkům často obsahovala navíc i fumonisiny.

Sledování aflatoxinů v 32 vzorcích kukuřic, které probíhalo v rámci RASFF, v žádném případě nepotvrdilo přítomnost některého z těchto nebezpečných karcinogenů.

Navzdory tomu, že v žádném případě nebyly překročeny legislativně stanovené limity pro přítomnost mykotoxinů, by mělo být bráno v úvahu případné riziko vyplývající z toxického působení mykotoxinů při jejich společném výskytu.

Část analyzovaných vzorků pocházela z konvenčního hospodaření a část vzorků byla vyprodukována v souladu s ekologickými principy. Konvenční produkty byly mykotoxiny kontaminovány méně, avšak vliv na přítomnost mykotoxinů podle způsobu pěstování nebyl zcela jednoznačný.

Vyvinutá metoda pro sledování 17 mykotoxinů byla dále použita pro monitorování 52 vzorků ječmene jarního a ječného sladu ze sklizně z roku 2012. Byla potvrzena závislost výskytu mykotoxinů na lokalitě, klimatických podmínkách, odrůdě a zejména na roku pěstování. Z 12 vzorků ječmene různé odrůdy a z různých lokalit byl připraven slad. Obsah mykotoxinů ve vyrobeném sladu byl menší nebo téměř shodný ve srovnání s ječmenem, ze kterého byl slad vyroben. Pouze jedna lokalita vykazovala rapidní navýšení některých mykotoxinů (enniatinů) po sladování všech čtyř druhů ječmene. Možným vysvětlením může být, že byl ječmen infikován houbovým patogenem již na poli a během sladovacího procesu se zvýšila produkce mykotoxinů. Avšak takový závěr nelze zobecnit a je nutné pokračovat v dalším výzkumu.

Metoda pro sledování 8 ergotových alkaloidů byla použita při monitoringu vzorků krmiv. Kontaminace těmito látkami byla pozorována pouze v jednom vzorku píce, v krmivech a ve vzorcích obilí, které bylo kontaminováno z více než ¼ alespoň jedním ergotovým alkaloidem. Některé vzorky by mohly při požití dokonce způsobovat zdravotní potíže, neboť obsahovaly významná množství sledovaných alkaloidů. Výskyt nebezpečného množství ergotových alkaloidů v krmivech není tedy jen problémem středověké minulosti, ale i dnes je třeba brát v úvahu riziko vyplývající z výskytu těchto látek v krmivech a surovinách pro jejich výrobu.

11. ABECEDNÍ SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	kyselina arachidonová
AFB1	aflatoxin B1
AFB2	aflatoxin B2
AFG1	aflatoxin G1
AFG2	aflatoxin G2
AFM1	aflatoxin M1
AFM2	aflatoxin M2
AFs	aflatoxiny
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
API	ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
Beauv	beauvericin
CDB	systém konjugovaných dvojných vazeb
CID	kolizně indukovaná disociace
CIT	citrinin
ČR	Česká republika
DAD	Diode Array detector
DART	přímá analýza v reálném čase
DG SANCO	The Health and Consumer Protection Directorate General of the European Commission
DHA	kyselina dokosahexaenová
DKS	doplňkové krmivo
DON	deoxynivalenol
EA	ergotový alkaloid
EAs	ergotové alkaloidy
ECD	detektor elektronového záchytu
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
EFTA	Evropské sdružení volného obchodu
EI	elektronová ionizace
EIA	Enzyme ImmunoAssay
E-kornin	ergokornin
E-korninin	ergokorninin
E-kristin	ergokristin
E-kristinin	ergokristinin
E-kryptin	ergokryptin
E-kryptinin	ergokryptinin
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
ENA	enniatin A
ENA1	enniatin A1
ENB	enniatin B
ENB1	enniatin B1
ENs	enniatiny
EPA	kyselina eikosapentaenová
ES	Evropské společenství
ESI	ionizace elektrosprejem

ESI⁻ elektrosprej s detekcí negativních iontů
E-sin ergosin
E-sinin ergosinin
EU Evropská unie
FB1 fumonisin B1
FB2 fumonisin B2
FLD fluorescenční detektor
GC plynová chromatografie
GC-MS plynová chromatografie s hmotnosně spektrometrickou detekcí
HETP Heigh Equivalent to a Theoretical Plate
HFB heptafluorbutyl
HNE 4-hydroxy-2-nonenal
HPLC vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-UV vysokoúčinná kapalinová chromatografie se spektrofotometrickou detekcí
HRMS High Resolution Mass Spectrometry
HT-2 HT-2 toxin
IAC imunoafinitní chromatografie
IARC mezinárodní organizace pro výzkum rakoviny
KKS kompletní krmivo
LC-ESI-MS/MS kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostně spektrometrickou detekcí s elektrosprejovou ionizací
LC-MS kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí
LC-MS/MS kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostně spektrometrickou detekcí
LIT lineární iontová past (Linear Ion Trap)
LOD limit detekce (mez citlivosti)
LOQ limit kvantifikace (mez stanovitelnosti)
MDA malondialdehyd
ME matriční efekt
MRM Multiple Reaction Monitoring (sledování několika fragmentací)
MS hmotnostní spektrometrie/spektrometr
MS/MS tandemová hmotnostní spektrometrie
MS^n vícestupňová tandemová hmotnostní spektrometrie
NIST The National Institute of Standards and Technology
NIV nivalenol
NKM národní kontaktní místo
NRL-RO Národní referenční laboratoř – Regionální oddělení
ODS Oktadecilsilikagel
OS oxidativní stres
OTA ochratoxin A
PAHs polycyklické aromatické uhlovodíky
PCBs polychlorované bifenily
PDA detektor s diodovým polem (Photodiode Array detector)
PSA primární a sekundární aminy
PSE extrakce za zvýšeného tlaku
PUFA nenasycené mastné kyseliny (v této práci takové, které obsahují více než dvě dvojné vazby)

Q	kvadrupólový analyzátor
QIT	kvadrupólová iontová past (Quadrupole Ion Trap)
QqQ	analyzátor s trojitým kvadrupólem
QuEChERS	rychlá metoda izolace analytů z matrice (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe)
RASFF	systém rychlého varování pro potraviny a krmiva
RIC	Reconstructed Ion Chromatogram
ROS	reaktivní kyslíkové formy
SPE	extrakce na tuhou fázi
SPR	povrchová plasmová rezonance
SRM	Selected Reaction Monitoring
SSE	Signal Supression or Enhancement
SZPI	Státní zemědělská a potravinářská inspekce
T-2	T-2 toxin
TDI	tolerovaná denní dávka
TFA	trifluoracetyl
TIC	Total Ion Current
TMS	trimethylsilyl
TOF	analyzátor doby letu
U(H)PLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie
UHI	University of the Highlands and Islands
UHT	Ultra High Temperature
ÚKZÚZ	Ústřední, kontrolní a zkušební ústav zemědělský
UV	spektrometrie v ultrafialové oblasti spektra
VIS	spektrofotometrie ve viditelné oblasti
VÚPS	Výzkumný ústav pivovarský a sladařský
XIC	Extracted Ion Chromatogram
ZON	zearalenon

12. POUŽITÁ LITERATURA

1 HAJŠLOVÁ J, KOCOUREK V, POUSTKA J, CUHRA P: Příprava vzorku pro stanovení reziduí pesticidů v potravinách. *Chemické listy*. 1998;92: 777-783.

2 MAJORS RE: Sample Prep Perspectives: Trends in Sample Preparation. *LCGC*. 2002;20(12): 1098 - 1113.

3 MITRA S, BRUKH R: *Sample Preparation: An Analytical Perspective, in Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, edited by L. W. A. SONS. 1st ed. Hoboken, NJ, USA; 2003. 488 p. ISBN: 978-0-471-32845-2.

4 NOVÁKOVÁ L, DOUŠA M: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1. vyd. Praha: Lucie Nováková, Michal Douša; 2013. 299 s. ISBN 978-80-260-4243-3.

5 ANASTASSIADES M, LEHOTAY SJ, STAJNBAHER D, SCHENCK FJ: Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC international*. 2003;86(2): 412-431.

6 LANKOVA D, LACINA O, PULKRABOVA J, HAJSLOVA J: The determination of perfluoroalkyl substances, brominated flame retardants and their metabolites in human breast milk and infant formula. *Talanta*. 2013;117(0): 318-325.

7 ZACHARIASOVA M, LACINA O, MALACHOVA A, KOSTELANSKA M, POUSTKA J, GODULA M, HAJSLOVA J: Novel approaches in analysis of Fusarium mycotoxins in cereals employing ultra performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. *Analytica chimica acta*. 2010;662(1): 51-61.

8 MOL HG, VAN DAM RC, ZOMER P, MULDER PP: Screening of plant toxins in food, feed and botanicals using full-scan high-resolution (Orbitrap) mass spectrometry. *Food additives and contaminants Part A, chemistry, analysis, control, exposure and risk assessment*. 2011;2(10): 1405-1423.

9 Schéma GC. [Online]. Citováno 12. 08. 2014. Dostupné z: < http://www.bbc.co.uk/schools/gcsebitesize/science/triple_ocr_21c/further_chemistry/chromatography/revision/5/>.

10 ŠTULÍK K, ŠEVČÍK J, PACÁKOVÁ V, JELÍNEK I, COUFAL P, BOSÁKOVÁ Z: *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum; 2005. 266 s. ISBN-10: 80-246-0852-9

11 KANTOŠOVÁ K: *Stanovení vybraných perfluoroalkylovaných sloučenin v komplexních matricích*. Brno, 2014. 76 s. Diplomová práce na Ústavu chemie a technologie ochrany životního prostředí Vysokého učení technického v Brně. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.

12 VAN DEEMTER JJ, ZUIDERWEG F J, KLINKENBERG A: Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. *Chem. Engng Sci*. 5 271–289, 1956.

13 LAKE R: *How do small particle size columns increase sample throughput?* [Online]. Citováno: 26.9.2014. Dostupné z: <http://www.restek.com/Technical-Resources/Technical-Library/Pharmaceutical/pharm_A016>.

14 OLŠOVSKÁ J, JURKOVÁ M: Nové trendy v kapalinové chromatografii a jejich využití v analýze piva a pivovarských surovin. *Kvasný průmysl*. 2012;58(6): 166-170.

15 HAJNOS-WAKSMUNDZKA M, SHERMA J: *High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis*: CRC Press; 2010. 995 p. ISBN 9781420092608

16 PETERKOPS R: Theory of ionization of atoms by electron impact. Boulder, Colorado Associated University Press, 1977. 263 p. ISBN-10: 0870811053

17 DE HOFFMANN E: Mass Spectrometry; *KIRK-OTHMER Encyclopedia of Chemical Technology*. John Wiley & Sons, 2000. 880 p. ISBN: 978-0-471-48508-7

18 MORA JFDL, VAN BERKEL GJ, ENKE CG, COLE RB, MARTINEZ-SANCHEZ M, FENN JB: Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 2000;35(8): 939-952.

19 MARCH RE, HUGHES RJ, TODD JFJ: *Quadrupole storage mass spectrometry* 1. vyd edn. Hoboken: John Wiley & Sons; 1989. ISBN 0-471-85794-7.

20 GROSS J: Chhabil Dass: Fundamentals of contemporary mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2007;389(3): 675-676.

21 HARRIS DC: *Quantitative Chemistry Analysis*. 7th edition. W.H Freeman and Company; 2011. 899 p. ISBN-10: 0716728818

22 CHOUDHARY M, JETLEY UK, ABASH KHAN M, ZUTSHI S, FATMA T: Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium Spirulina platensis-S5. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2007;66(2): 204-209.

23 TOYOKUNI S: Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int.* 1999;49(2): 91-102.

24 ZIMMERMAN JJ: Redox/radical repertoire rapport: pathophysiology and therapeutics. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1998;42(1): 1-3.

25 HALLIWELL B, GROOTVELD M: The measurement of free radical reactions in humans: Some thoughts for future experimentation. *FEBS Letters*. 1987;213(1): 9-14.

26 RICE-EVANS C, BURDON R: Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Progress in Lipid Research*. 1993;32(1): 71-110.

27 LESSER MP: Oxidative stress causes coral bleaching during exposure to elevated temperatures. *Coral Reefs*. 1997;16(3): 187-192.

28 DAVIDSON MW: Plasma membrane. Florida State University, 2004. [Online]. Citováno: 27.9.2014. Dostupné z: < http://micro.magnet.fsu.edu/cells/plasmamembrane/plasmamembrane.html, 2012>

29 BAILEY JM: Prostaglandins, Leukotrienes and Other Eicosanoids. From Biogenesis to Clinical Application. Edited by F. Marks and G. Furstenberger. Wiley-VCH: Weinheim. 1999. *Journal of the American Chemical Society*. 2001;123: 3621-2. 388 pp. ISBN 3-527-29360-4. Journal of the chemical Society, 2001, 123(15):3621-3622.

30 Schema lipidní peroxidace. [Online]. Citováno 2.7.2011. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/lipid_peroxidation, 02.07.2010>.

31 VOET D, VOET JG: *Biochemistry.* 2 ed. New York: Wiley and Sons; 1995. 1392 p. ISBN 978-0471586517.

32 MONTUSCHI P, BARNES PJ, ROBERTS LJ, 2nd: Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *Faseb j*. 2004;18(15): 1791-800.

33 YIN H, PORTER NA, MORROW JD: Separation and identification of F2-isoprostane regioisomers and diastereomers by novel liquid chromatographic/mass spectrometric methods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005;827(1): 157-164.

34 HALLIWELL B, CHIRICO S: Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*. 1993;57: 715-724; discussion 724-725.

35 MORROW JD, HILL KE, BURK RF, NAMMOUR TM, BADR KF, ROBERTS LJ, 2nd: A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(23): 9383-9387.

36 SYSLOVÁ K, KAČER P, KUZMA M, KLUSÁČKOVÁ P, FENCLOVÁ Z, LEBEDOVÁ J, PELCLOVÁ D: Determination of 8-iso-prostaglandin F2α in exhaled breath condensate using combination of immunoseparation and LC–ESI-MS/MS. *Journal of Chromatography B*. 2008;867(1): 8-14.

37 SUN X, NAIR J, BARTSCH H: A modified immuno-enriched 32P-postlabeling method for analyzing the malondialdehyde-deoxyguanosine adduct, 3-(2-deoxy-beta-D-erythro-pentofuranosyl)- pyrimido[1,2-alpha]purin-10(3H)one in human tissue samples. *Chem Res Toxicol*. 2004;17(2): 268-172.

38 DEL RIO D, STEWART AJ, PELLEGRINI N: A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2005;15(4): 316-328.

39 STALIKAS CD, KONIDARI CN: Analysis of malondialdehyde in biological matrices by capillary gas chromatography with electron-capture detection and mass spectrometry. *Anal Biochem*. 2001;290(1): 108-115.

40 HEGEDÜS A, ERDEI S, JANDA T, TÓTH E, HORVÁTH G, DUDITS D: Transgenic tobacco plants overproducing alfalfa aldose/aldehyde reductase show

higher tolerance to low temperature and cadmium stress. *Plant Science.* 2004;166(5): 1329-1333.

41 CHIABRANDO C, VALAGUSSA A, RIVALTA C, DURAND T, GUY A, ZUCCATO E, VILLA P, ROSSI JC, FANELLI R: Identification and measurement of endogenous beta-oxidation metabolites of 8-epi-Prostaglandin F2alpha. *J Biol Chem*. 1999;274(3): 1313-1319.

42 GAO L, ZACKERT WE, HASFORD JJ, DANEKIS ME, MILNE GL, REMMERT C, REESE J, YIN H, TAI HH, DEY SK, PORTER NA, MORROW JD: Formation of prostaglandins E2 and D2 via the isoprostane pathway: a mechanism for the generation of bioactive prostaglandins independent of cyclooxygenase. *J Biol Chem*. 2003;278(31): 28479-28489.

43 SICILIA T, MALLY A, SCHAUER U, PÄHLER A, VÖLKEL W: LC–MS/MS methods for the detection of isoprostanes (iPF2α-III and 8,12-iso-iPF2α-VI) as biomarkers of CCl4-induced oxidative damage to hepatic tissue. *Journal of Chromatography B*. 2008;861(1): 48-55.

44 LI H, LAWSON JA, REILLY M, ADIYAMAN M, HWANG S-W, ROKACH J, FITZGERALD GA: Quantitative high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis of the four classes of F2-isoprostanes in human urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(232): 13381-13386.

45 SIRCAR D, SUBBAIAH PV: Isoprostane measurement in plasma and urine by liquid chromatography-mass spectrometry with one-step sample preparation. *Clin Chem*. 2007;53(2): 251-258.

46 MONTUSCHI P, RAGAZZONI E, VALENTE S, CORBO G, MONDINO C, CIAPPI G, CIABATTONI G: Validation of 8-isoprostane and prostaglandin E(2) measurements in exhaled breath condensate. *Inflamm Res*. 2003;52(12): 502-507.

47 MASOODI M, NICOLAOU A: Lipidomic analysis of twenty-seven prostanoids and isoprostanes by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2006;20(20): 3023-3029.

48 CHANG CT, PATEL P, KANG N, LAWSON JA, SONG WL, POWELL WS, FITZGERALD GA, ROKACH J: Eicosapentaenoic-acid-derived isoprostanes: synthesis and discovery of two major isoprostanes. *Bioorg Med Chem Let*t. 2008;18(20): 5523-5527.

49 WANG Z, CIABATTONI G, CREMINON C, LAWSON J, FITZGERALD GA, PATRONO C, MACLOUF J: Immunological characterization of urinary 8-epi-prostaglandin F2 alpha excretion in man. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995;275(1): 94-100.

50 TSIKAS D: Application of gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry to assess in vivo synthesis of prostaglandins, thromboxane, leukotrienes, isoprostanes and related compounds in humans. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1998;717(1-2): 201-245.

51 KOROTCHENKO OD, ALEKSEEV SM, EVSTIGNEEVA RP, KARPOVA GV, ISAI SV: HPLC-fluorometric analysis of prostaglandins from marine organisms. *Chemistry of Natural Compounds*. 1999;35(6): 612-615.

52 NOUROOZ-ZADEH J: Key issues in F2-isoprostane analysis. *Biochem Soc Trans.* 2008;36(Pt5): 1060-105.

53 LAWSON JA, LI H, ROKACH J, ADIYAMAN M, HWANG S-W, KHANAPURE SP, FITZGERALD GA: Identification of Two Major F2 Isoprostanes, 8,12-Iso- and 5-epi-8,12-Iso-isoprostane F2α-VI, in Human Urine. *Journal of Biological Chemistry.* 1998;273(45): 29295-29301.

54 PÉREZ-GÁLVEZ A, NEGRO-BALMASEDA JJ, MÍNGUEZ-MOSQUERA MI, CASCAJO-ALMENARA MV, GARRIDO-FERNÁNDEZ J: Astaxanthin from crayfish (Procambarus clarkii) as a pigmentary ingredient in the feed of laying hens. *Grasas y aceites*. 2008;59(2): 139-145.

55 GOODWIN TW: *The biochemistry of the carotenoids: Plants. Animals*: Chapman and Hall; 1980. ISBN 9780412216909.

56 BENEMANN J: Microalgae aquaculture feeds. *Journal of Applied Phycology*. 1992;4(3): 233-245.

57 HATLEN B, AAS GH, JØRGENSEN EH, STOREBAKKEN T, GOSWAMI UC: Pigmentation of 1, 2 and 3 year old Arctic charr (Salvelinus alpinus) fed two different dietary astaxanthin concentrations. *Aquaculture.* 1995;138(1-4): 303-312.

58 TORRISSEN OJ: Strategies for salmonid pigmentation. *Journal of Applied Ichthyology.* 1995;11(3-4): 276-281.

59 PALOZZA P, KRINSKY NI: Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: an overview. *Methods Enzymol*. 1992;213: 403-20.

60 KOBAYASHI M, KAKIZONO T, NISHIO N, NAGAI S, KURIMURA Y, TSUJI Y: Antioxidant role of astaxanthin in the green alga Haematococcus pluvialis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1997;48(3): 351-356.

61 BURTON GW, INGOLD KU: Beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. Science. 1984;224(4649): 569-573.

62 GRADELET S, ASTORG P, LE BON A-M, BERGÈS R, SUSCHETET M: Modulation of aflatoxin B1 carcinogenicity, genotoxicity and metabolism in rat liver by dietary carotenoids: evidence for a protective effect of CYP1A inducers. *Cancer Letters.* 1997;114(1-2): 221-223.

63 BERMOND P: Biological Effects of Food Antioxidants; In BJF. HUDSON. *Food Antioxidants.* Elsevier Applied Food Science Series, Springer Netherlands, 1990: p. 193-251.

64 HIRAYAMA O, NAKAMURA K, HAMADA S, KOBAYASI Y: Singlet oxygen quenching ability of naturally occurring carotenoids. *Lipids.* 1994;29(2): 149-150.

65 TERAO J: Antioxidant activity of beta-carotene-related carotenoids in solution. *Lipids.* 1989;24(7): 659-661.

66 PICKOVA J, DUTTA PC, PETTERSSON A, FRØYLAND L, KIESSLING A: Eggs of Baltic salmon displaying M74, yolk sac mortality syndrome have elevated levels of cholesterol oxides and the fatty acid 22:6 n-3. *Aquaculture.* 2003;227(1-4): 63-75.

67 LI H, TYNDALE ST, HEATH DD, LETCHER RJ: Determination of carotenoids and all-trans-retinol in fish eggs by liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B.* 2005;816(1-2): 49-56.

68 SASSER M: Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids.; in MIDI, (ed) *Technical note 101. 1990.*

69 RAZAVI SH, BLANCHARD F, MARC I: UV-HPLC / APCI-MS Method for Separation and Identification of the Carotenoids Produced by Sporobolomyces ruberrimus H110. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering.* 2006;25(2): 1-10.

70 SCOTT KJ: Detection and Measurement of Carotenoids by UV/VIS Spectrophotometry; *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc., 2001.

71 ALVAREZ JG, STOREY BT: Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*. 1995;42(3): 334-346.

72 WAUGH RJ, MORROW JD, ROBERTS LJ, 2nd, Murphy RC: Identification and relative quantitation of F2-isoprostane regioisomers formed in vivo in the rat. *Free Radic Biol Med*. 1997;23(6): 943-954.

73 PICKOVA J, KIESSLING A, PETTERSSON A, DUTTA PC: Comparison of fatty acid composition and astaxanthin content in healthy and by M74 affected salmon eggs from three Swedish river stocks. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology.* 1998;120(2): 265-271.

74 VUORI KA, NIKINMAA M: M74 syndrome in Baltic salmon and the possible role of oxidative stresses in its development: present knowledge and perspectives for future studies. *Ambio.* 2007;36(2): 168-172.

75 BROWN SB, ARTS MT, BROWN LR, BROWN M, MOORE K, VILLELLA M, FITZSIMONS JD, HONEYFIELD DC, TILLITT DE, ZAJICEK JL, WOLGAMOOD M, HNATH JG: Can Diet-Dependent Factors Help Explain Fish-to-Fish Variation in Thiamine-Dependent Early Mortality Syndrome? *Journal of Aquatic Animal Health*. 2005;17(1): 36-47.

76 CHRISTIANSEN R, TORRISSEN OJ: Effects of dietary astaxanthin supplementation on fertilization and egg survival in Atlantic salmon (Salmo salar L.). *Aquaculture*. 1997;153(1-2): 51-62.

77 GLOVER M, MORTON R, A, ROSEN D, G.: Astaxanthin, cholesterol and lipins in developing salmon eggs. *Biochemical Journal.* 1952;50(3): 425–429.

78 MÁCOVÁ D: *Využití separačních technik ve spojení s hmotnostní spektrometrií pro stanovení environmentálně významných látek*. PhD. Thesis. Brno: VUT, FCH, 2012, 165 p.

79 ORMEZZANO O, CRACOWSKI JL, MALLION JM, POIRIER O, BESSARD J, BRIANCON S, FRANCOIS P, BAGUET JP: F2-Isoprostane level is associated with the angiotensin II type 1 receptor -153A/G gene polymorphism. *Free Radic Biol Med.* 2005;38(5): 583-588.

80 VERSTRAETE F: EU food safety legislation with focus on contaminants: Challenges for food research, in Food Research in Support to Science – Base Regulations: Challenges for Producers and Customers. 2009, 21. - 22. duben. Praha.

81 HAJŠLOVÁ J, MALACHOVÁ A, ZACHARIÁŠOVÁ M, KOSTELANSKÁ M, KOCOUREK V: *Kontaminace vybraných surovin mykotoxiny*. [Online]. Citováno 27.9.2014. Dostupné z: <http://www.phytosanitary.org/projekty/2010/Projekt1.pdf., Výzkumný ústav rostlinné výroby>.

82 HAJSLOVA J, ZACHARIASOVA M, CAJKA T: Analysis of multiple mycotoxins in food. *Methods Mol Biol.* 2011;747: 233-58.

83 PERAICA M, RADIC B, LUCIC A, PAVLOVIC M: Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull World Health Organ.* 1999;77(9): 754-766.

84 MALÍŘ F, OSTRÝ V: *Vláknité mikromicety (plísně), mykotoxiny a zdraví člověka*. Brno/Hradec králové: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů; 2003. 348 s. ISBN 80-7013-395-3

85 SUCHÝ P, HERZIG I: *Plísně a mykotoxiny* - Prevence jejich vzniku a dekontaminace v krmivech. Brno, Vědecký výbor výživy zvířat – studie, 2005: p. 22.

86 Mycotoxins Factsheet. 2011. [Online]. Citováno dne 11.3.2012. Dostupné z: < http://irmm.jrc.ec.europa.eu/EURLs/eurl_mycotoxins/Documents/JRC%2060040_Mycotoxin%20factsheet_3rd%20edition.pdf>.

87 EU: Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 178/2002, kterým se stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva, zřizuje se Evropský úřad pro bezpečnost potravin a stanoví se postupy týkající se bezpečnosti potravin.

88 EU: Nařízení Komise (EU) č. 16/2011 ze dne 10. ledna 2011, kterým se stanoví prováděcí opatření k systému včasné výměny informací pro potraviny a krmiva.

89 RASFF: *Zpráva o činnosti systému rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF) v České republice za rok 2010*. [Online]. Citováno dne: 11.3.2012. Dostupné z <http://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/publikace/RASFF_2010_final.pdf>.

90 EU: Nařízení komise (ES) č. 1126/2007 ze dne 28. září 2007, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, pokud jde o fusariové toxiny v kukuřici a ve výrobcích z kukuřice.

91 EU: EU (B). Směrnice evropského parlamentu a rady 2002/32/ES ze dne 7. května 2002 o nežádoucích látkách v krmivech.

92 EU: Doporučení komise ze dne 17. Srpna 2006 o přítomnosti deoxynivalenolu, zearalenonu, ochratoxinu A, T-2 a a HT-2 a fumonisinů v produktech určených ke krmení zvířat.

93 EU: Doporučení Komise ze dne 27. března 2013 ohledně přítomnosti toxinů T-2 a HT-2 v obilovinách a výrobcích z obilovin.

94 EU: Doporučení Komise ze dne 4. listopadu 2013 , kterým se mění doporučení 2006/576/ES, pokud jde o toxiny T-2 a HT-2 v krmných směsích pro kočky.

95 SCHNEIDEROVÁ P: *Bezpečnost krmiv a zdraví zvířat – mykotoxiny*. ÚZPI, 2008: p. 45.

96 RADOVÁ Z, HAJŠLOVÁ J: *Mykotoxiny v zemědělské produkci ve vazbě na agrární systém*. Vědecký výbor fytosanitárního a životního prostředí. [Online]. Citov8no dne 11.3.20030. Dostupné z: <www.phytosanitary.org/projekty/2003/vvf-13-03.pdf>.

97 GUTLEB AC, MORRISON E, MURK AJ: Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by Fusarium strains: a review. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2002;11(3-4): 309-320.

98 HE J, ZHOU T, YOUNG JC, BOLAND GJ, SCOTT PM: Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 2010;21(2): 67-76.

99 GÜRBAY A, AYDIN S, GIRGIN G, ENGIN A B, SAHIN G: Assessment of aflatoxin M?1? levels in milk in Ankara, Turkey. *Food control.* 2006;17(1): 1-4.

100 KESKIN Y, BASKAYA R, KARSLI S, YURDUN T, OZYARAL O: Detection of aflatoxin M1 in human breast milk and raw cow's milk in Istanbul, Turkey. *J Food Prot.* 2009;72(4): 885-889.

101 FALLAH AA, RAHNAMA M, JAFARI T, SAEI-DEHKORDI SS: Seasonal variation of aflatoxin M1 contamination in industrial and traditional Iranian dairy products. *Food Control*. 2011;22(10): 1653-1656.

102 IARC.: International Agency for Research in Cancer. Aflatoxins. In IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans. IARC, Lyon, France: World Health Organisation., 2002.

103 FALLAH AA: Assessment of aflatoxin M1 contamination in pasteurized and UHT milk marketed in central part of Iran. *Food and Chemical Toxicology*. 2010;48(3): 988-991.

104 EU: Nařízení komise č. 2174/2003 ze dne 12. prosince 2003, kterým se mění nařízení (ES) č. 466/2001, pokud jde o aflatoxiny. 2003.

105 BEHM C, DEGEN GH, FOLLMANN W: The Fusarium toxin enniatin B exerts no genotoxic activity, but pronounced cytotoxicity in vitro. *Mol Nutr Food Res*. 2009;53(4): 423-430.

106 EFSA: *Request for a EFSA opinion for the scientific opinion on the risks to human and animal*. [Online]. Citováno dne 11.3.2012. Dostupné z: < http://registerofquestions.efsa.europa.eu/raw-war/mandateLoader?mandate=M-2010-0305>.

107 CORDELL G, A.: *The Alkaloids: Chemistry and Biology*. Academic press, 1997. 590 p. ISBN 0-12-469550-7

108 KOMAROVA EL, TOLKACHEV ON: The Chemistry of Peptide Ergot Alkaloids. Part 1. Classification and Chemistry of Ergot Peptides. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2001;35(9): 504-513.

109 NAUDE TW, BOTHA CJ, VORSTER JH, ROUX C, VAN DER LINDE EJ, VAN DER WALT SI, ROTTINGHAUS GE, VAN JAARSVELD L, LAWRENCE AN: Claviceps cyperi, a new cause of severe ergotism in dairy cattle consuming maize silage and teff hay contaminated with ergotised Cyperus esculentus (nut sedge) on the Highveld of South Africa. *Onderstepoort J Vet Res*. 2005;72(1): 23-37.

110 LOMBAERT G: Liquid Chromatographic Method for the Determination of Ergot Alkaloids in Cereal Grains; in Trucksess M, Pohland A, (eds) Mycotoxin Protocols. *Methods in Molecular Biology*™, Humana Press, 2001, vol. 157, p. 215-24.

111 STORM ID, RASMUSSEN PH, STROBEL BW, HANSEN HC: Ergot alkaloids in rye flour determined by solid-phase cation-exchange and high-pressure liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2008;25(3): 338-346.

112 BURK G, HOBEL W, RICHT A: Ergot alkaloids in cereal products: results from the Bavarian Health and Food Safety Authority. *Mol Nutr Food Res.* 2006;50(4-5): 437-442.

113 LAUBER U, SCHNAUFER R, GREDZIAK M, KIESSWETTER Y: Analysis of rye grains and rye meals for ergot alkaloids. *Mycotoxin Research.* 2005;21(4): 258-262.

114 KRSKA R, CREWS C: Significance, chemistry and determination of ergot alkaloids: a review. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2008;25(6): 722-731.

115 DIANA DI MAVUNGU J, MALYSHEVA SV, SANDERS M, LARIONOVA D, ROBBENS J, DUBRUEL P, VAN PETEGHEM C, DE SAEGER S: Development and validation of a new LC–MS/MS method for the simultaneous determination of six major ergot alkaloids and their corresponding epimers. Application to some food and feed commodities. *Food Chemistry.* 2012;135(1): 292-303.

116 ŘEHÁČEK Z, SAJDL P: *Ergot alkaloids. Chemistry, Biological Effects,Biotechnology.* Praha: Academia; 1990. ISBN 80-200-0283-9.

117 SAJDL P: Biosyntéza námelových alkaloidů a její regulace. Praha, Mikrobiologický ústav ČSAV, 1989: p. 69.

118 KRSKA R, STUBBINGS G, MACARTHUR R, CREWS C: Simultaneous determination of six major ergot alkaloids and their epimers in cereals and foodstuffs by LC-MS-MS. *Anal Bioanal Chem.* 2008;391(2): 563-576.

119 SÝKOLOVÁ S, NEDĚLNÍK J: *Mykotoxiny – stav výskytu v zemědělských surovinách a krmivech v ČR a v Evropě.* Vědecký výbor fytosanitárního a životního prostředí. , 2003. [Online]. Citováno dne: 15.3.2012. Dostupné z: < http://www.phytosanitary.org/projekty/2003/vvf-15-03.pdf>.

120 STEJSKAL V, FRAŇKOVÁ M: Sborník ze semináře: Metody odběru a analýzy vzorků, komodit, potravin a půdy. Praha, Ministerstvo zemědelství České republiky, 2009: p. 94.

121 RASMUSSEN RR, STORM IM, RASMUSSEN PH, SMEDSGAARD J, NIELSEN KF: Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* 2010;397(2): 765-776.

122 Ministerstvo zemědělství: Vyhláška č. 211 ze dne 15. dubna 2004 o metodách zkoušení a způsobu odběru a přípravy kontrolních vzorků ve znění vyhlášky č. 611 ze dne 24. listopadu 2004, ve znění vyhlášky č. 238 ze dne 3. června 2005 a ve znění vyhlášky č. 459 ze dne 4. listopadu 2005.

123 EU: Nařízení komise (ES) č. 401/2006 ze dne 23. února 2006, kterým se stanoví metody odběru vzorků a metody analýzy pro úřední kontrolu množství mykotoxinů v potravinách. 2006.

124 HAJŠLOVÁ J, ZACHARIÁŠOVÁ M, MALACHOVÁ A, KOSTELANSKÁ M, KOCOUREK V: *Mykotoxiny*. 2009. [Online]. Citováno dne: 11.3.2012. Dostupné z: < http://www.phytosanitary.org/projekty/2009/Projekt1.pdf>.

125 DESMARCHELIER A, OBERSON JM, TELLA P, GREMAUD E, SEEFELDER W, MOTTIER P: Development and comparison of two multiresidue methods for the analysis of 17 mycotoxins in cereals by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2010;58(13): 7510-7519.

126 KOKKONEN M, JESTOI M: A Multi-compound LC-MS/MS Method for the Screening of Mycotoxins in Grains. *Food Analytical Methods*. 2009;2(2): 128-140.

127 MALIK AK, BLASCO C, PICO Y: Liquid chromatography-mass spectrometry in food safety. *J Chromatogr A*. 2010;1217(25): 4018-4040.

128 MALACHOVÁ A, KOSTELANSKÁ M, ZACHARIÁŠOVÁ M, KOHOUTKOVÁ J, HAJŠLOVÁ J: New approach in analysis of Fusarium mycotoxins and their masked form: Immunoaffinity column clean-up. *Chemické listy.* 2008;102: 700-702.

129 Romer Labs. [Online]. Citováno dne: 11.3.2012. Dostupné z: < http://www.romerlabs.com/en/products/columns.html>.

130 TREBSTEIN A, LAUBER U, HUMPF H-U: ANALYSIS OF FUSARIUM TOXINS VIA HPLC-MS/MS MULTIMETHODS: matrix effects and strategies for compensation. *Mycotoxin Research*. 2009;25(4): 201-13.

131 SPANJER MC, RENSEN PM, SCHOLTEN JM: LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2008;25(4): 472-489.

132 CUNHA SC, FERNANDES JO: Development and validation of a method based on a QuEChERS procedure and heart-cutting GC-MS for determination of five mycotoxins in cereal products. *J Sep Sci.* 2010;33(4-5): 600-609.

133 SCHOLLENBERGER M, LAUBER U, JARA HT, SUCHY S, DROCHNER W, MULLER HM: Determination of eight trichothecenes by gas chromatography-mass spectrometry after sample clean-up by a two-stage solid-phase extraction. *J Chromatogr A*. 1998;815(1): 123-132.

134 TANAKA T, YONEDA A, INOUE S, SUGIURA Y, UENO Y: Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2000;882(1-2): 23-8.

135 WREFORD BJ, SHAW KJ: Analysis of deoxynivalenol as its trifluoroacetyl ester by gas chromatography-electron ionization mass spectrometry. *Food Addit Contam*. 1988;5(2): 141-147.

136 PASCALE MN: Detection method for mycotoxins in cereal grains and cereal products. *Matica Srpska Proceedings for Natural Sciences.* 2009;117: 15-25.

137 PITTET A: Modern methods and trends in mycotoxin analysis. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*. 2005;96: 424-444.

138 STROKA J, ANKLAM E, JORISSEN U, GILBERT J: Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination

of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder: collaborative study. *J AOAC Int*. 2000;83(2): 320-340.

139 KOK WT, BRINKMAN UAT, FREI RW: On-line electrochemical reagent production for detection in liquid chromatography and continuous flow systems. *Analytica Chimica Acta.* 1984;162(0): 19-32.

140 VISCONTI A, LATTANZIO VM, PASCALE M, HAIDUKOWSKI M: Analysis of T-2 and HT-2 toxins in cereal grains by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr A*. 2005;1075(1-2): 151-158.

141 PASCALE M, HAIDUKOWSKI M, VISCONTI A: Determination of T-2 toxin in cereal grains by liquid chromatography with fluorescence detection after immunoaffinity column clean-up and derivatization with 1-anthroylnitrile. *Journal of Chromatography A.* 2003;989(2): 257-264.

142 GILBERT J: Recent advances in analytical methods for mycotoxins. *Food Addit Contam.* 1993;10(1): 37-48.

143 MEISTER U: Analysis of T-2 and HT-2 toxins in oats and other cereals by means of HPLC with fluorescence detection. *Mycotoxin Res.* 2008;24(1): 31-39.

144 BOYD RK, BASIC C, BETHEM RA: *Trace Quantitative Analysis by Mass Spectrometry*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.; 2008. 748 p. ISBN: 978-0-470-05771-1

145 HOLČAPEK M, JANDERA P: Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). *Chemické listy.* 1998;92: 278-286.

146 LATTANZIO VM, GATTA SD, SUMAN M, VISCONTI A: Development and in-house validation of a robust and sensitive solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, ochratoxin A, deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxins in cereal-based foods. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2011;25(13): 1869-1880.

147 SULYOK M, KRSKA R, SCHUHMACHER R: A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Anal Bioanal Chem.* 2007;389(5): 1505-1523.

148 DIANA DI MAVUNGU J, MONBALIU S, SCIPPO ML, MAGHUIN-ROGISTER G, SCHNEIDER YJ, LARONDELLE Y, CALLEBAUT A, ROBBENS J, VAN PETEGHEM C, DE SAEGER S: LC-MS/MS multi-analyte method for mycotoxin determination in food supplements. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2009;26(6): 885-895.

149 EDIAGE EN, DI MAVUNGU JD, MONBALIU S, VAN PETEGHEM C, DE SAEGER S: A validated multianalyte LC-MS/MS method for quantification of 25

mycotoxins in cassava flour, peanut cake and maize samples. *J Agric Food Chem.* 2011;59(10): 5173-5180.

150 TANAKA H, SUGITA-KONISHI Y, TAKINO M, TANAKA T, TORIBA A, HAYAKAWA K: A Survey of the Occurrence of Fusarium Mycotoxins in Biscuits in Japan by Using LC/MS. *Journal of Health Science.* 2010;56(2): 188-194.

151 STEJSKAL V, HAJŠLOVÁ J, KOCOUREK V: *Bioanalytické metody pro hodnocení bezpečnosti zemědělských surovin a produktů.* [Online]. Citováno dne: 12.3. 2012. Dostupné z: < http://www.phytosanitary.org/projekty/2008/Projekt2.pdf>.

152 VAN DER GAAG B, SPATH S, DIETRICH H, STIGTER E, BOONZAAIJER G, VAN OSENBRUGGEN T, KOOPAL K: Biosensors and multiple mycotoxin analysis. *Food Control.* 2003;14(4): 251-254.

153 MOL HG, PLAZA-BOLANOS P, ZOMER P, DE RIJK TC, STOLKER AA, MULDER PP: Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrixes. *Anal Chem.* 2008;80(24): 9450-9459.

154 FRISVAD JC, THRANE U: Standardized high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone retention indices and UV-VIS spectra (diode array detection). *J Chromatogr.* 1987;404(1): 195-214.

155 BERTHILLER F, SCHUHMACHER R, ADAM G, KRSKA R: Formation, determination and significance of masked and other conjugated mycotoxins. *Anal Bioanal Chem.* 2009;395(5): 1243-1252.

156 VACLAVIK L, ZACHARIASOVA M, HRBEK V, HAJSLOVA J: Analysis of multiple mycotoxins in cereals under ambient conditions using direct analysis in real time (DART) ionization coupled to high resolution mass spectrometry. *Talanta.* 2010;82(5): 1950-1957.

157 VAN HOOF N, COURTHEYN D, ANTIGNAC JP, VAN DE WIELE M, POELMANS S, NOPPE H, DE BRABANDER H: Multi-residue liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis of beta-agonists in urine using molecular imprinted polymers. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2005;19(19): 2801-2808.

158 LIANG HR, TAKAGAKI T, FOLTZ RL, BENNETT P: Quantitative determination of endogenous sorbitol and fructose in human nerve tissues by atmospheric-pressure chemical ionization liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2005;19(16): 2284-2294.

159 KING R, BONFIGLIO R, FERNANDEZ-METZLER C, MILLER-STEIN C, OLAH T: Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2000;11(11): 942-950.

160 SULYOK M, BERTHILLER F, KRSKA R, SCHUHMACHER R: Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the

determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2006;20(18): 2649-2659.

161 KLOTZEL M, GUTSCHE B, LAUBER U, HUMPF HU: Determination of 12 type A and B trichothecenes in cereals by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 2005;53(23): 8904-8910.

162 MALACHOVA A, DZUMAN Z, VEPRIKOVA Z, VACLAVIKOVA M, ZACHARIASOVA M, HAJSLOVA J: Deoxynivalenol, deoxynivalenol-3-glucoside, and enniatins: the major mycotoxins found in cereal-based products on the Czech market. *J Agric Food Chem.* 2011;59(24): 12990-12997.

163 RUBERT J, DZUMAN Z, VACLAVIKOVA M, ZACHARIASOVA M, SOLER C, HAJSLOVA J: Analysis of mycotoxins in barley using ultra high liquid chromatography high resolution mass spectrometry: comparison of efficiency and efficacy of different extraction procedures. *Talanta.* 2012;99: 712-719.

164 EU: Směrnice Komise 2005/38/ES ze dne 6. června 2005, kterou se stanoví metody odběru vzorků a metody analýzy pro úřední kontrolu množství fusariových toxinů v potravinách.

165 EU: Rozhodnutí Komise 2002/657/ES ze dne 12. srpna 2002, kterým se provádí směrnice Rady 96/23/ES, pokud jde o provádění analytických metod a interpretaci výsledků.

166 EURL: Document N° SANCO/12495/2011. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. 2011.

167 ZACHARIASOVA M, DZUMAN Z, VEPRIKOVA Z, HAJKOVA K, JIRU M, VACLAVIKOVA M, ZACHARIASOVA A, POSPICHALOVA M, FLORIAN M, HAJSLOVA J: Occurrence of multiple mycotoxins in European feedingstuffs, assessment of dietary intake by farm animals. *Animal Feed Science and Technology*. 2014;193(0): 124-140.

168 SORENSEN JL, NIELSEN KF, RASMUSSEN PH, THRANE U: Development of a LC-MS/MS method for the analysis of enniatins and beauvericin in whole fresh and ensiled maize. *J Agric Food Chem*. 2008;56(21): 10439-10443.

169 JOUANY JP: Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 2007;137(3-4): 342-362.

170 SWEENEY MJ, DOBSON AD: Mycotoxin production by Aspergillus, Fusarium and Penicillium species. *Int J Food Microbiol*. 1998;43(3): 141-158.

171 BOTTALICO A: Fusarium diseases of cereals: species coplex and related mycotoxin profiles, in europe. *Journal of Plant Pathology.* 1998;80: 85–103.

172 ATALLA MM, HASSANEIN NM, EL-BEIH AA, YOUSSEF YA: Mycotoxin production in wheat grains by different Aspergilli in relation to different relative humidities and storage periods. *Nahrung.* 2003;47(1): 6-10.

173 STOEV SD, DUTTON MF, NJOBEH PB, MOSONIK JS, STEENKAMP PA: Mycotoxic nephropathy in Bulgarian pigs and chickens: complex aetiology and similarity to Balkan endemic nephropathy. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2010;27(1): 72-88.

174 SOBROVA P, ADAM V, VASATKOVA A, BEKLOVA M, ZEMAN L, KIZEK R: Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdisciplinary Toxicology*. 2010;3(3): 94-99.

175 MADHYASTHA MS, MARQUARDT RR, ABRAMSON D: Structure-activity relationships and interactions among trichothecene mycotoxins as assessed by yeast bioassay. *Toxicon.* 1994;32(9): 1147-1152.

176 TAJIMA O, SCHOEN ED, FERON VJ, GROTEN JP: Statistically designed experiments in a tiered approach to screen mixtures of Fusarium mycotoxins for possible interactions. *Food and Chemical Toxicology.* 2002;40(5): 685-695.

177 KOS J, LEVIĆ J, ĐURAGIĆ O, KOKIĆ B, MILADINOVIĆ I: Occurrence and estimation of aflatoxin M1 exposure in milk in Serbia. *Food Control*. 2014;38(0): 41-46.

178 BŁAJET-KOSICKA A, TWARUŻEK M, KOSICKI R, SIBIOROWSKA E, GRAJEWSKI J: Co-occurrence and evaluation of mycotoxins in organic and conventional rye grain and products. *Food Control*. 2014;38(0): 61-66.

179 KUZDRALIŃSKI A, SOLARSKA E, MAZURKIEWICZ J: Mycotoxin content of organic and conventional oats from southeastern Poland. *Food Control.* 2013;33(1): 68-72.

180 EDWARDS SG: Fusarium mycotoxin content of UK organic and conventional wheat. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2009;26(4): 496-506.

181 BERNHOFT A, CLASEN PE, KRISTOFFERSEN AB, TORP M: Less Fusarium infestation and mycotoxin contamination in organic than in conventional cereals. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2010;27(6): 842-852.

182 HAJŠLOVÁ J, TOMANIOVÁ M, SCHULZOVÁ V, HUBERT J, STEJSKAL V, NEDĚLNÍK J: *Kritické zhodnocení environmenální zátěže agrárního ekosystému ČR z hlediska produkce bezpečných bioplodin*. 2007. [Online]. Citováno dne> 21.8.2014. Dostupné z: <http://www.phytosanitary.org/projekty/2007/VVF_01_2007.pdf>.

183 EU: Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. 2006.

184 ZACHARIASOVA M, HAJSLOVA J, KOSTELANSKA M, POUSTKA J, KRPLOVA A, CUHRA P, HOCHEL I: 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. *Anal Chim Acta*. 2008;625(1): 77-86.

185 BĚLÁKOVÁ S, BENEŠOVÁ K, ČÁSLAVSKÝ J, SVOBODA Z, MIKULÍKOVÁ R: The occurrence of the selected fusarium mycotoxins in Czech malting barley. *Food Control*. 2014;37(0): 93-8.

186 MALACHOVÁ A, HAJŠLOVÁ J, EHRENBEREGEROVÁ J, KOSTELANSKÁ M, ZACHARIÁŠOVÁ M, URBANOVÁ J, CERKAL R, ŠAFRÁNKOVÁ I, MARKOVÁ J, VACULOVÁ K, HRSTKOVÁ P: Fusarium mycotoxins in spring barley and their transfer into malt. *Kvasny prumysl*, 2010: p. 131– 426.

187 MANKEVIČIENĖ A, BUTKUTĖ B, GAURILČIKIENĖ I, DABKEVIČIUS Z, SUPRONIENĖ S: Risk assessment of Fusarium mycotoxins in Lithuanian small cereal grains. *Food Control.* 2011;22(6): 970-976.

188 ŠKRBIĆ B, MALACHOVA A, ŽIVANČEV J, VEPRIKOVA Z, HAJŠLOVÁ J: Fusarium mycotoxins in wheat samples harvested in Serbia: A preliminary survey. *Food Control.* 2011;22(8): 1261-1267.

189 IBÁÑEZ-VEA M, LIZARRAGA E, GONZÁLEZ-PEÑAS E, LÓPEZ DE CERAIN A: Co-occurrence of type-A and type-B trichothecenes in barley from a northern region of Spain. *Food Control.* 2012;25(1): 81-8.

190 UHLIG S, TORP M, HEIER BT: Beauvericin and enniatins A, A1, B and B1 in Norwegian grain: a survey. *Food Chemistry.* 2006;94(2): 193-201.

191 VACLAVIKOVA M, MALACHOVA A, VEPRIKOVA Z, DZUMAN Z, ZACHARIASOVA M, HAJSLOVA J: 'Emerging' mycotoxins in cereals processing chains: changes of enniatins during beer and bread making. *Food Chem.* 2013;136(2): 750-757.

192 OUESLATI S, MECA G, MLIKI A, GHORBEL A, MAÑES J: Determination of Fusarium mycotoxins enniatins, beauvericin and fusaproliferin in cereals and derived products from Tunisia. *Food Control*. 2011;22(8): 1373-1377.

193 SCOTT PM: Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. *J AOAC Int*. 1996;79(4): 875-882.

194 HU L, GASTL M, LINKMEYER A, HESS M, RYCHLIK M: Fate of enniatins and beauvericin during the malting and brewing process determined by stable isotope dilution assays. *LWT - Food Science and Technology*. 2014;56(2): 469-477.

195 VAUGHAN A, O'SULLIVAN T, VAN SINDEREN D: Enhancing the Microbiological Stability of Malt and Beer — A Review. *Journal of the Institute of Brewing*. 2005;111(4): 355-371.

196 FAKHRUNNISA H, M. H., GHAFFAR A: Seed-borne mycoflora of wheat, soghum and barley. *Pakistan Journal of Botany.* 2006;38: 185–92.

197 MULDER PPJ, VAN RAAMSONK LWD, VAN EGMOND HJ, VOOGT J, VAN BRAKEL MW, VAN DER HORST GM, DE JONG J: Dutch survey ergot alkaloids

and sclerotia in animal feed; National Monitoring Plan Animal Feeds. Netherlands, RIKILT - Institute of food safety, 2012.

198 EU: Doporučení komise ze dne 15. března 2012 o monitorování přítomnosti námelových alkaloidů v krmivech a potravinách, 2012/154/ES. 2012.

199 EFSA: Scientific Opinion on Ergot alkaloids in food and feed. 2012: p. 158.

13. SEZNAM PŘÍLOH

13.1 Výkonnostní kritéria metody pro současné stanovení 17 mykotoxinů

13.2 Životopis

13.3 Vědecké aktivity

13.4 Publikační činnost

14. PŘÍLOHY

14.1 Výkonnostní kritéria metody pro současné stanovení 17 mykotoxinů

Tabulka 36. Validační parametry metody pro nivalenol.

NIVALENOL		Kukuřice	Pšenice	KKS	Siláž	Požadovaná výkonnostní kritéria metody
RT [min]		0,84	0,84	0,84	0,84	x
Lineární kalibrační rozsah [ppb]		80 - 4000	80 - 4000	80 - 4000	160 - 8000	x
R^2		0,999	0,999	0,998	0,999	x
R		1,000	0,999	0,999	1,000	x
ME [%]		104	105	82	75	x
	hladina 1 [ppb]	80	80	80	160	80; 160 [a]
Správnost [%]		59	50	76	60	80 - 110
Opakovatelnost [%]		11	2	13	16	80 / ≤ 23; 160/ ≤ 21
Nejistota [%]		22	4	26	32	x
	hladina 2 [ppb]	160	160	160	320	160; 320 [a]
Správnost [%]		65	51	61	54	80 - 110
Opakovatelnost [%]		6	8	12	14	160 / ≤ 21; 320 / ≤ 19
Nejistota [%]		12	16	25	27	x
	hladina 3 [ppb]	2000	800	800	1600	800; 1600; 2000 [a]
Správnost [%]		52	50	60	51	80 - 110
Opakovatelnost [%]		3	8	8	5	800 / ≤ 17; 1600 / ≤ 15; 2000 / ≤ 14
Nejistota [%]		6	15	16	11	x

[a]… Rozhodnutí komise 200/657/ES.

R… korelační koeficient

ME… matriční efekt

Aby bylo možné zařadit tento analyt do skupinového stanovení mykotoxinů v krmivech, tak aby byly zajištěny požadavky na výtěžnost metody, stanovený výsledek musí být korigován na výtěžnost.

Tabulka 37. Validační parametry metody pro deoxynivalenol.

DEOXYNIVALENOL		Kukuřice	Pšenice	KKS	Siláž	Požadovaná výkonnostní kritéria metody
Retenční čas [min]		1,10	1,10	1,10	1,10	x
Lineární kalibrační rozsah [ppb]		50 - 2500	40 - 2500	40 - 2500	50 - 2500	x
R^2		0,999	0,999	0,998	0,999	x
R		1,000	1,000	0,999	1,000	x
ME [%]		83	78	44	54	x
ME ^{13}C [%]		101	100	98	99	x
	hladina 1 [ppb]	50	50	50	50	50 [a]
Správnost [%]		93	75	93	103	60 - 110
Opakovatelnost [%]		10	5	25	5	≤ 20
Nejistota [%]		20	10	50	10	X
	hladina 2 [ppb]	100	100	100	100	> 100 - ≤ 500 [a]
Správnost [%]		91	78	89	89	60 - 110
Opakovatelnost [%]		9	8	9	7	≤ 20
Nejistota [%]		18	16	18	14	X
	hladina 3 [ppb]	2000	500	500	500	> 100 - ≤ 500; >500 [a]
Správnost [%]		88	85	90	84	500 / 70 - 120; 2000 / 70 - 120
Opakovatelnost [%]		2	4	7	3	≤ 20
Nejistota [%]		4	7	13	6	x

[a]… Rozhodnutí komise 200/657/ES.

R… korelační koeficient

ME… matriční efekt

ME ^{13}C … matriční efekt korigovaný pomocí vnitřních izotopově značených analogů

Požadované výkonnostní kritérium pro výtěžnost (správnost) deoxynivalenolu pro hladinu 50 µg/kg není stanoveno v Nařízení komise (ES) č. 401/2006 ze dne 23. února 2006. Toto nařízení má požadavky na danou vlastnost až od 100 µg/kg. Tyto požadavky jsou také aplikovány na hladinu 50 µg/kg. Výtěžnost deoxynivalenolu je vyhovující.

Tabulka 38. Validační parametry metody pro aflatoxin G2.

AFLATOXIN G2	Kukuřice	Pšenice	KKS	Siláž	Požadovaná výkonnostní kritéria metody
Retenční čas [min]	2,07	2,07	2,07	2,07	x
Lineární kalibrační rozsah [ppb]	2,5 - 125	2 - 125	2 - 125	5 - 250	x
R^2	0,998	0,996	0,995	0,997	x
R	0,999	0,998	0,998	0,999	x
ME [%]	159	134	154	115	x
hladina 1 [ppb]	2,5	2,5	2,5	5	1 - 10 [a]
Správnost [%]	92	103	109	101	70 - 110
Opakovatelnost [%]	14	7	14	11	2.5 / ≤ 39; 5 / ≤ 36
Nejistota [%]	28	15	28	23	x
hladina 2 [ppb]	5	5	5	10	1 - 10 [a]
Správnost [%]	94	103	105	100	70 - 110
Opakovatelnost [%]	8	8	12	7	5 / ≤ 36; 10 / ≤ 32
Nejistota [%]	16	15	24	15	x
hladina 3 [ppb]	50	25	25	50	>10 [a]
Správnost [%]	100	98	100	95	80 - 110
Opakovatelnost [%]	3	5	5	3	50 / ≤ 25; 25 / ≤ 28
Nejistota [%]	6	10	10	6	x

[a]… Nařízení komise (ES) č. 401/2006 ze dne 23. února 2006.

R… korelační koeficient

ME… matriční efekt

Tabulka 39. Validační parametry metody pro aflatoxin G1.

AFLATOXIN G1		Kukuřice	Pšenice	KKS	Siláž	Požadovaná výkonnostní kritéria metody
Retenční čas [min]		2,21	2,21	2,21	2,21	x
Lineární kalibrační rozsah [ppb]		2,5 - 125	2 - 125	2 - 125	10 - 500	x
R^2		0,996	0,999	0,998	0,997	x
R		0,998	0,999	0,999	0,999	x
ME [%]		116	120	104	78	x
	hladina 1 [ppb]	2,5	2,5	2,5	10	1 - 10 [a]
Správnost [%]		97	95	96	88	70 - 110
Opakovatelnost [%]		11	14	25	15	2,5 / ≤ 39; 10 / ≤ 32
Nejistota [%]		23	28	49	29	x
	hladina 2 [ppb]	5	5	5	20	1 - 10 , >10 [a]
Správnost [%]		100	92	97	96	5 / 70 - 110; 20 /80 - 120
Opakovatelnost [%]		4	12	12	6	5 / ≤ 36; 20 / ≤ 29
Nejistota [%]		9	24	23	11	x
	hladina 3 [ppb]	50	25	25	100	>10 [a]
Správnost [%]		106	98	104	89	80 - 110
Opakovatelnost [%]		4	4	5	4	25 / ≤ 28; 50 / ≤ 25; 100 / ≤ 23
Nejistota [%]		8	9	10	8	x

[a]… Nařízení komise (ES) č. 401/2006 ze dne 23. února 2006.

R… korelační koeficient

ME… matriční efekt

Tabulka 40. Validační parametry metody pro aflatoxin B2.

AFLATOXIN B2		Kukuřice	Pšenice	KKS	Siláž	Požadovaná výkonnostní kritéria metody
Retenční čas [min]		2,33	2,33	2,33	2,33	x
Lineární kalibrační rozsah [ppb]		1 - 50	1 - 50	1 - 50	2 - 100	x
R^2		0,998	0,998	0,999	0,996	x
R		0,999	0,999	0,999	0,998	x
ME [%]		74	101	69	39	x
	hladina 1 [ppb]	1	1	1	2	1 - 10 [a]
Správnost [%]		104	86	88	94	70 - 110
Opakovatelnost [%]		10	13	20	14	1 / ≤ 45; 2 / ≤ 42
Nejistota [%]		21	26	39	27	x
	hladina 2 [ppb]	2	2	2	4	1 - 10 [a]
Správnost [%]		104	97	90	94	70 - 110
Opakovatelnost [%]		6	12	10	13	2 / ≤ 42; 4 / ≤ 37
Nejistota [%]		11	24	19	26	x
	hladina 3 [ppb]	50	10	10	20	>10 [a]
Správnost [%]		102	99	92	91	80 - 110
Opakovatelnost [%]		2	4	10	7	25 / ≤ 28; 50 / ≤ 25; 100 / ≤ 23
Nejistota [%]		4	8	19	13	x

[a]… Nařízení komise (ES) č. 401/2006 ze dne 23. února 2006.

R… korelační koeficient

ME… matriční efekt

Tabulka 41. Validační parametry metody pro aflatoxin B1.

AFLATOXIN B1		Kukuřice	Pšenice	KKS	Siláž	Požadovaná výkonnostní kritéria metody
Retenční čas [min]		2,46	2,46	2,46	2,46	x
Lineární kalibrační rozsah [ppb]		1 - 50	1 - 50	1 - 50	2,5 - 125	x
R^2		1,000	0,998	0,998	0,999	x
R		1,000	0,999	0,999	1,000	x
ME [%]		57	105	67	33	x
ME ^{13}C [%]		95	88	82	83	x
	hladina 1 [ppb]	1	1	1	2.5	1 - 10 [a]
Správnost [%]		81	79	92	92	70 - 110
Opakovatelnost [%]		19	12	14	10	1 / ≤ 45; 2.5 / ≤ 39
Nejistota [%]		38	24	28	19	x
	hladina 2 [ppb]	2	2	2	5	1 - 10 [a]
Správnost [%]		93	93	92	94	70 - 110
Opakovatelnost [%]		6	4	6	5	2 / ≤ 42; 5 / ≤ 36
Nejistota [%]		11	8	12	10	x
	hladina 3 [ppb]	40	10	10	25	>10 [a]
Správnost [%]		100	101	92	88	80 - 110
Opakovatelnost [%]		1	2	5	4	25 / ≤ 28; 50 / ≤ 25; 100 / ≤ 23
Nejistota [%]		2	5	9	9	x

[a]… Nařízení komise (ES) č. 401/2006 ze dne 23. února 2006.

R… korelační koeficient

ME… matriční efekt

ME ^{13}C … matriční efekt korigovaný pomocí vnitřních izotopově značených analogů

Tabulka 42. Validační parametry metody pro HT-2 toxin.

HT-2 TOXIN		Kukuřice	Pšenice	KKS	Siláž	Požadovaná výkonnostní kritéria metody
Retenční čas [min]		3,02	3,02	3,02	3,02	x
Lineární kalibrační rozsah [ppb]		5 - 250	4 - 250	4 - 250	10 – 500	x
R^2		0,999	0,995	0,996	0,998	x
R		0,999	0,997	0,998	0,999	x
ME [%]		363	259	369	385	x
	hladina 1 [ppb]	5	5	5	10	5; 10 [a]
Správnost [%]		98	105	130	102	60 - 130
Opakovatelnost [%]		10	28	31	12	≤ 40
Nejistota [%]		20	56	62	24	x
	hladina 2 [ppb]	10	10	10	20	10; 20 [a]
Správnost [%]		87	99	106	98	60 - 130
Opakovatelnost [%]		11	13	16	10	≤ 40
Nejistota [%]		22	27	31	19	x
	hladina 3 [ppb]	200	50	50	100	100 - 200 [a]
Správnost [%]		105	99	100	92	60 - 130
Opakovatelnost [%]		3	12	10	4	≤ 40
Nejistota [%]		6	23	20	7	x

[b] … Nařízení komise (ES) č. 401/2006 ze dne 23. února 2006.

R … korelační koeficient

ME … matriční efekt

Požadované výkonnostní kritérium pro výtěžnost (správnost) HT-2 toxinu pro hladiny 5 – 20 µg/kg není stanoveno v Nařízení komise (ES) č. 401/2006 ze dne 23. února 2006. Toto nařízení má požadavky na danou vlastnost až od 100 µg/kg. Tyto požadavky jsou aplikovány také na hladiny 5, 10 a 20 µg/kg. Výkonnostní kritéria jsou vyhovující.

Tabulka 43. Validační parametry metody pro fumonisin B1.

FUMONISIN B1		Kukuřice	Pšenice	KKS	Siláž	Požadovaná výkonnostní kritéria metody
Retenční čas [min]		3,15	3,15	3,15	3,15	x
Lineární kalibrační rozsah [ppb]		10 - 250	10 - 200	10 - 500	20 - 1000	x
R^2		0,996	0,995	0,997	0,995	x
R		0,998	0,997	0,999	0,997	x
ME [%]		150	148	163	141	x
ME ^{13}C [%]		102	94	99	107	x
	hladina 1 [ppb]	5	10	10	20	≤ 500 [a]
Správnost [%]		58	94	119	74	60 - 120
Opakovatelnost [%]		59	17	6	15	≤ 30
Nejistota [%]		118	34	12	31	x
	hladina 2 [ppb]	10	20	20	40	≤ 500 [a]
Správnost [%]		65	106	79	82	60 - 120
Opakovatelnost [%]		24	13	15	5	≤ 30
Nejistota [%]		48	26	30	11	x
	hladina 3 [ppb]	20	50	100	200	≤ 500 [a]
Správnost [%]		85	75	62	79	60 - 120
Opakovatelnost [%]		11	14	4	1	≤ 30
Nejistota [%]		22	29	8	2	x

[a]… Nařízení komise (ES) č. 401/2006 ze dne 23. února 2006.

R… korelační koeficient

ME… matriční efekt

ME ^{13}C … matriční efekt korigovaný pomocí vnitřních izotopově značených analogů

Výkonnostní kritérium správnosti a opakovatelnosti fumonisinu B1 v kukuřičné matrici pro hladinu 5 µg/kg nevyhovuje požadavkům daným Nařízením komise (ES) č. 401/2006 ze dne 23. února 2006. Požadavek na správnost a přesnost (opakovatelnost) byl splněn až na hladině 10 µg/kg. Proto bude tato hladina reportovacím limitem pro fumonisin B1 v kukuřičné matrici. Všechna kritéria jsou tímto vyhovující.

Tabulka 44. Validační parametry metody pro T-2 toxin.

T-2 TOXIN		Kukuřice	Pšenice	KKS	Siláž	Požadovaná výkonnostní kritéria metody
Retenční čas [min]		3,29	3,29	3,29	3,29	x
Lineární kalibrační rozsah [ppb]		5 - 250	4 - 150	5 - 250	5 – 250	x
R^2		0,999	0,996	0,998	0,998	x
R		1,000	0,998	0,999	0,999	x
ME [%]		180	191	175	118	x
ME ^{13}C [%]		96	93	111	109	x
	hladina 1 [ppb]	5	5	5	5	5 [a]
Správnost [%]		95	90	87	91	70 - 110
Opakovatelnost [%]		13	14	19	20	≤ 36
Nejistota [%]		25	27	37	40	X
	hladina 2 [ppb]	10	10	10	10	10 [a]
Správnost [%]		105	94	103	101	80 - 110
Opakovatelnost [%]		13	9	12	13	≤ 32
Nejistota [%]		26	18	24	27	X
	hladina 3 [ppb]	200	50	50	50	50 - 250 [b]
Správnost [%]		104	92	103	104	60 - 130
Opakovatelnost [%]		2	5	4	7	≤ 40
Nejistota [%]		4	9	8	14	x

[a]… Rozhodnutí komise 200/657/ES.

[b]… Nařízení komise (ES) č. 401/2006 ze dne 23. února 2006.

R… korelační koeficient

ME… matriční efekt

ME ^{13}C … matriční efekt korigovaný pomocí vnitřních izotopově značených analogů

Požadované výkonnostní kritérium pro výtěžnost (správnost) T-2 toxinu pro hladiny 5 a 10 µg/kg, není stanoveno v Nařízení komise (ES) č. 401/2006 ze dne 23. února 2006. Toto nařízení má požadavky na danou vlastnost až od 50 µg/kg. Tyto požadavky jsou také aplikovány na hladiny 5 a 10 µg/kg. Výkonnostní kritéria jsou vyhovující.

Tabulka 45. Validační parametry metody pro zearalenon.

ZEARALENON		Kukuřice	Pšenice	KKS	Siláž	Požadovaná výkonnostní kritéria metody
Retenční čas [min]		3,48	3,48	3,48	3,48	x
Lineární kalibrační rozsah [ppb]		10 - 250	10 - 150	10 - 250	10 - 1000	x
R^2		0,995	0,995	0,996	0,997	x
R		0,997	0,998	0,998	0,999	x
ME [%]		212	341	293	170	x
	hladina 1 [ppb]	5	5	20	20	≤ 50 [a]
Správnost [%]		65	82	106	86	60 - 120
Opakovatelnost [%]		111	44	14	20	≤ 40
Nejistota [%]		222	88	28	40	X
	hladina 2 [ppb]	10	10	40	40	≤ 50 [a]
Správnost [%]		84	86	104	78	60 - 120
Opakovatelnost [%]		21	15	10	20	≤ 40
Nejistota [%]		41	30	20	40	X
	hladina 3 [ppb]	200	50	200	200	>50 [a]
Správnost [%]		99	102	98	100	70 - 120
Opakovatelnost [%]		3	7	6	6	≤ 25
Nejistota [%]		6	15	12	13	x

[a]… Nařízení komise (ES) č. 401/2006 ze dne 23. února 2006.

R… korelační koeficient

ME… matriční efekt

Výkonnostní kritérium správnosti a opakovatelnosti zearalenonu v kukuřičné a pšeničné matrici pro hladinu 5 µg/kg nevyhovují požadavkům daným Nařízením komise (ES) č. 401/2006 ze dne 23. února 2006. Požadavek na správnost a přesnost (opakovatelnost) byl splněn až na hladině 10 µg/kg. Proto bude tato hladina reportovacím limitem pro zearalenon v kukuřičné a pšeničné matrici. Všechna kritéria jsou vyhovující.

Tabulka 46. Validační parametry metody pro ochratoxin A.

OCHRATOXIN A		Kukuřice	Pšenice	KKS	Siláž	Požadovaná výkonnostní kritéria metody
Retenční čas [min]		3,54	3,54	3,54	3,54	x
Lineární kalibrační rozsah [ppb]		2,5 - 125	4 - 150	5 - 250	5 – 500	x
R^2		0,999	0,997	0,999	0,999	x
R		0,999	0,999	0,999	1,000	x
ME [%]		114	131	219	83	x
ME ^{13}C [%]		104	100	109	98	x
	hladina 1 [ppb]	2,5	5	5	5	1 - 10 [a]
Správnost [%]		98	110	107	74	70 - 110
Opakovatelnost [%]		8	1	7	7	≤ 20
Nejistota [%]		16	1	14	13	X
	hladina 2 [ppb]	5	10	10	10	1 - 10 [a]
Správnost [%]		89	110	102	79	70 - 110
Opakovatelnost [%]		11	3	5	11	≤ 20
Nejistota [%]		22	7	10	21	X
	hladina 3 [ppb]	50	50	50	50	50 [a]
Správnost [%]		110	95	92	89	70 - 110
Opakovatelnost [%]		2	2	2	3	≤ 20
Nejistota [%]		4	4	4	6	x

[a]… Nařízení komise (ES) č. 401/2006 ze dne 23. února 2006.

R… korelační koeficient

ME… matriční efekt

ME ^{13}C … matriční efekt korigovaný pomocí vnitřních izotopově značených analogů.

Požadované výkonnostní kritérium pro výtěžnost (správnost) ochratoxinu A pro hladinu 50 µg/kg, není stanoveno v Nařízení komise (ES) č. 401/2006 ze dne 23. února 2006. Toto nařízení má požadavky na danou vlastnost od 1 do 10 µg/kg. Tyto požadavky jsou také aplikovány na hladinu 50 µg/kg. Výkonnostní kritéria jsou vyhovující.

Tabulka 47. Validační parametry metody pro fumonisin B2.

FUMONISIN B2		Kukuřice	Pšenice	KKS	Siláž	Požadovaná výkonnostní kritéria metody
Retenční čas [min]		3,62	3,62	3,62	3,62	x
Lineární kalibrační rozsah [ppb]		10 - 250	10 - 200	10 - 500	20 - 1000	x
R^2		0,997	0,999	0,996	0,996	x
R		0,998	0,999	0,998	0,998	x
ME [%]		189	192	209	276	x
	hladina 1 [ppb]	10	5	10	20	≤ 500 [a]
Správnost [%]		65	124	150	79	60 - 120
Opakovatelnost [%]		24	38	9	11	≤ 30
Nejistota [%]		48	76	18	22	X
	hladina 2 [ppb]	20	20	20	40	≤ 500 [a]
Správnost [%]		102	96	107	70	60 - 120
Opakovatelnost [%]		2	10	11	10	≤ 30
Nejistota [%]		4	20	22	20	X
	hladina 3 [ppb]	40	50	100	200	≤ 500 [a]
Správnost [%]		111	119	81	70	60 - 120
Opakovatelnost [%]		4	7	9	4	≤ 30
Nejistota [%]		8	14	18	7	x

[a]… Nařízení komise (ES) č. 401/2006 ze dne 23. února 2006.

R… korelační koeficient

ME… matriční efekt

Výkonnostní kritéria správnosti a opakovatelnosti fumonisinu B2 v pšeničné matrici pro hladinu 5 µg/kg a v kompletní krmné směsi pro hladinu 10 µg/kg nevyhovují požadavkům daným Nařízením komise (ES) č. 401/2006 ze dne 23. února 2006. Požadavek na správnost a přesnost (opakovatelnost) byl v pšeničné matrici a v kompletní krmné směsi splněn až na hladině 20 µg/kg. Proto bude tato hladina reportovacím limitem pro fumonisin B2. Všechna kritéria jsou tímto vyhovující.

Tabulka 48. Validační parametry metody pro enniatin B.

ENNIATIN B		Kukuřice	Pšenice	KKS	Siláž	Požadovaná výkonnostní kritéria metody
Retenční čas [min]		4,35	4,35	4,35	4,35	x
Lineární kalibrační rozsah [ppb]		5 - 500	5 - 500	5 - 500	5 - 500	x
R^2		1,000	0,999	0,996	1,000	x
R		1,000	1,000	0,998	1,000	x
ME [%]		87	79	107	60	x
	hladina 1 [ppb]	5	5	5	5	5 [a]
Správnost [%]		103	96	86	70	70 - 110
Opakovatelnost [%]		2	12	9	12	≤ 36
Nejistota [%]		4	25	19	24	X
	hladina 2 [ppb]	10	10	10	10	10 [a]
Správnost [%]		102	101	86	81	80 - 110
Opakovatelnost [%]		2	14	7	6	≤ 32
Nejistota [%]		3	27	14	11	X
	hladina 3 [ppb]	40	50	50	50	40; 50 [a]
Správnost [%]		105	114	88	108	80 - 110
Opakovatelnost [%]		3	7	2	2	40 / ≤ 26; 50 / ≤ 25
Nejistota [%]		6	13	3	3	x

[a]… Rozhodnutí komise 200/657/ES)

R… korelační koeficient

ME… matriční efekt

Tabulka 49. Validační parametry metody pro beauvericin.

BEAUVERICIN		Kukuřice	Pšenice	KKS	Siláž	Požadovaná výkonnostní kritéria metody
Retenční čas [min]		4,44	4,44	4,44	4,44	x
Lineární kalibrační rozsah [ppb]		5 - 500	5 - 500	5 - 500	5 - 500	x
R^2		1,000	0,999	0,998	1,000	x
R		1,000	1,000	0,999	1,000	x
ME [%]		127	147	95	144	x
	hladina 1 [ppb]	5	5	5	5	5 [a]
Správnost [%]		108	100	106	88	70 - 110
Opakovatelnost [%]		13	2	3	5	≤ 36
Nejistota [%]		27	4	6	10	X
	hladina 2 [ppb]	10	10	10	10	10 [a]
Správnost [%]		99	97	88	86	80 - 110
Opakovatelnost [%]		3	3	5	5	≤ 32
Nejistota [%]		5	7	10	9	X
	hladina 3 [ppb]	40	50	50	50	40; 50 [a]
Správnost [%]		101	98	93	87	80 - 110
Opakovatelnost [%]		1	2	2	4	40 / ≤ 26; 50 / ≤ 25
Nejistota [%]		2	4	4	8	x

[a]… Rozhodnutí komise 200/657/ES.

R… korelační koeficient

ME… matriční efekt

Tabulka 50. Validační parametry metody pro enniatin B1.

ENNIATIN B1		Kukuřice	Pšenice	KKS	Siláž	Požadovaná výkonnostní kritéria metody
Retenční čas [min]		4,45	4,45	4,45	4,45	x
Lineární kalibrační rozsah [ppb]		5 - 500	5 - 500	5 - 500	5 - 500	x
R^2		1,000	0,999	0,997	0,999	x
R		1,000	1,000	0,999	1,000	x
ME [%]		87	78	111	71	x
	hladina 1 [ppb]	5	5	5	5	5 [a]
Správnost [%]		101	107	93	84	70 - 110
Opakovatelnost [%]		4	10	18	5	≤ 36
Nejistota [%]		8	19	37	10	X
	hladina 2 [ppb]	10	10	10	10	10 [a]
Správnost [%]		100	99	79	85	80 - 110
Opakovatelnost [%]		3	6	5	5	≤ 32
Nejistota [%]		6	12	10	9	X
	hladina 3 [ppb]	40	50	50	50	40; 50 [a]
Správnost [%]		106	105	97	91	80 - 110
Opakovatelnost [%]		3	5	2	2	40 / ≤ 26; 50 / ≤ 25
Nejistota [%]		6	9	3	3	x

[a]… Rozhodnutí komise 200/657/ES.

R… korelační koeficient.

ME… matriční efekt.

Tabulka 51. Validační parametry metody pro enniatin A1.

ENNIATIN A1		Kukuřice	Pšenice	KKS	Siláž	Požadovaná výkonnostní kritéria metody
Retenční čas [min]		4,54	4,54	4,54	4,54	x
Lineární kalibrační rozsah [ppb]		5 - 500	5 - 500	5 - 500	5 - 500	x
R^2		1,000	1,000	0,995	0,999	x
R		1,000	1,000	0,998	1,000	x
ME [%]		130	149	127	149	x
	hladina 1 [ppb]	5	5	5	5	5 [a]
Správnost [%]		106	96	84	96	70 - 110
Opakovatelnost [%]		2	7	5	6	≤ 36
Nejistota [%]		5	13	10	11	X
	hladina 2 [ppb]	10	10	10	10	10 [a]
Správnost [%]		100	95	93	86	80 - 110
Opakovatelnost [%]		2	4	3	4	≤ 32
Nejistota [%]		4	7	6	8	X
	hladina 3 [ppb]	40	50	50	50	40; 50 [a]
Správnost [%]		103	99	98	90	80 - 110
Opakovatelnost [%]		1	3	2	2	40 / ≤ 26; 50 / ≤ 25
Nejistota [%]		2	5	5	4	x

[a]… Rozhodnutí komise 200/657/ES

R… korelační koeficient

ME… matriční efekt

Tabulka 52. Validační parametry metody pro enniatin A.

ENNIATIN A		Kukuřice	Pšenice	KKS	Siláž	Požadovaná výkonnostní kritéria metody
Retenční čas [min]		4,62	4,62	4,62	4,62	x
Lineární kalibrační rozsah [ppb]		5 - 500	5 - 500	5 - 500	5 - 500	x
R^2		1,000	0,999	0,995	1,000	x
R		1,000	0,999	0,997	1,000	x
ME [%]		88	79	108	77	x
	hladina 1 [ppb]	5	5	5	5	5 [a]
Správnost [%]		100	94	106	93	70 - 110
Opakovatelnost [%]		2	4	3	6	≤ 36
Nejistota [%]		4	7	6	12	X
	hladina 2 [ppb]	10	10	10	10	10 [a]
Správnost [%]		100	96	95	87	80 - 110
Opakovatelnost [%]		3	4	4	4	≤ 32
Nejistota [%]		6	7	8	8	X
	hladina 3 [ppb]	40	50	50	50	40; 50 [a]
Správnost [%]		105	99	97	88	80 - 110
Opakovatelnost [%]		3	2	2	1	40 / ≤ 26; 50 / ≤ 25
Nejistota [%]		6	5	3	3	x

[a]… Rozhodnutí komise 200/657/ES

R… korelační koeficient

ME… matriční efekt

Tabulka 53. Validační parametry metody pro aflatoxin M1.

AFLATOXIN M1		Kukuřice	Pšenice	KKS	Siláž	Požadovaná výkonnostní kritéria metody
Retenční čas [min]		2,10	2,10	2,10	2,10	x
ME [%]		216	230	216	244	x
	hladina [ppb]	10	10	10	20	1 - 10, >10 [a]
Správnost [%]		99	94	91	82	10 / 70 - 110, 20 / 80 -110
Opakovatelnost [%]		9	9	6	13	10 / ≤ 32; 20 / ≤ 29
Nejistota [%]		18	18	12	26	x

[a]… Nařízení komise (ES) č. 401/2006.

AFM1 může sloužit jako tzv. systémový standard pro kontrolu extrakčního procesu během přípravy vzorku pro skupinové stanovení mykotoxinů.

14.2 Životopis

Martina Bolechová

Brno 656 06, E-mail: xcbolechova@fch.vutbr.cz

Pracovní zkušenosti:

2011 – dosud **Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský**, Národní referenční laboratoř – Regionální oddělení Brno

- Přírodovědní analytik – diagnostik
- LC-MS specialista

Zahraniční stáže

02/2010 – 07/2010 **Environmental Research Institute, Skotsko**, North Highland College, University of the Highland and Islands

- Pracovně-studijní stáž v rámci mobilitního programu SOCRATES ERASMUS

09/2008 – 01/2009 **University of Ljubljana, Slovinsko**, Faculty of Biotechnology a Faculty of Environmental Chemistry

- Studijní stáž v rámci mobilitního programu SOCRATES ERASMUS

Vzdělání

2009 – dosud **Vysoké učení technické v Brně**, Fakulta chemická, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí – doktorský studijní program

2007 – 2009 **Vysoké učení technické v Brně**, Fakulta chemická, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí – magisterský studijní program
Diplomová práce: *Využití separačních metod s hmotnostní detekcí pro studium degradačních produktů nových polymerních materiálů*

2004 – 2007 **Vysoké učení technické v Brně**, Fakulta chemická, Chemie a chemické technologie – bakalářský studijní program
Bakalářská práce: *Možnosti využití hmotnostní spektrometrie při analýze modifikovaných kopolymerů kyseliny mléčné a glykolové*

2000 – 2004 **Střední průmyslová škola chemická**
Obor: Aplikovaná chemie – Analytická chemie

14.3 Vědecké aktivity

Projekty

2014

- Interní projekt VÚ 10.01/2014 – řešitel
  „Převedení metod pro sledování mykotoxinů a melaminu v krmivech z LC-MS (IT) na jiný LC-MS systém“
- Interní projekt VÚ10.03/2014 – spoluřešitel
  „Zavedení metody pro stanovení polárních pesticidů pomocí LC-MS“ ˝
- Interní projekt VÚ 10.02/2014 – řešitel
  „Ověření homogenity vzorku pro sledování mykotoxinů“

2013

- Interní projekt VÚ 10.09/2013 – řešitel
  „Stanovení ergotových alkaloidů“

2012

- Interní projekt VÚ 40.05/2012 – řešitel
  „Stanovení vitamínu D3 v krmivech pomocí LC-MS“
- Interní projekt VÚ 40.02/2012 – řešitel
  „Stanovení pyrrolizidinových alkaloidů metodou LC-MS“
- *Validační studie – řešitel*
  „Determination of pyrrolizidine alkaloids in honey and plan material“

2011

- Grantový projekt G4 2145 (FRVŠ) – řešitel
  „Zavedení testů ekotoxicity pro testování “musk“ sloučenin“
- Interní projekt VÚ K9/2011 – řešitel
  „Skupinové stanovení vybraných mykotoxinů metodou LC-MS“

2010

- Grantový projekt G4 1710 (FRVŠ) – spoluřešitel
  „Stanovení reziduí pesticidů a mykotoxinů v biotických matricích pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí“

Prezentace výsledků na konferencích

2014

- XLIV. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, Skalský Dvůr (26. - 28. 5. 2014)
  - forma prezentace – přednáška: *„Stanovení alkaloidů v krmivech metodou UPLC-MS/MS“*
  - forma prezentace – poster: *„Analýza vitamínu D v krmivech metodou UPLC-MS/MS“*
- 36th Mycotoxin Workshop 2014, Göttingen (16. - 18. 6. 2014)
  - forma prezentace – poster: „Stanovení přírodních toxinů v krmivech metodou UPLC-MS/MS“
- 37. Pivovarsko-sladařský seminář, Plzeň (31. - 8. 6. 2014)
  - forma prezentace – přednáška (spoluautor): „Studium vybraných „emerging“ mykotoxinů v ječmeni a ve sladu“

- Nové analytické postupy pro zemědělskou praxi, Brno (12. 6. 2014)
  - forma prezentace – přednáška (spoluautor): „Kontrola a stanovení vybraných přírodních toxinů v krmivech“

2013

- Studentská konference Chemie je život, FCH VUT v Brně (6. 12. 2013)
  - forma prezentace – přednáška (AJ): *„Determination of Selected Naturally Occurring Alkaloids in Feed by UPLC-MS/MS“* – Přednáška byla **oceněna 2. místem** v soutěži ve své kategorii
- 6th International Symposium on RAFA, Praha (5. - 8. 11. 2013)
  - forma prezentace – poster: *„Occurence of mycotoxins in animal feed from organic farming production“*
  - forma prezentace – poster: *„Determination of naturally-occuring alkaloids im feed by UPLC-MS/MS“*
  - forma prezentace – poster: *„Analysis of Vitamin D in feed by UPLC-MS/MS“*
- 8th Conference, RME 2013, Food, feed, water analysis innovations and breakthroughs, Nizozemí (21. - 23. 1. 2013)
  - forma prezentace – poster: *„Multiresidue mycotoxin analysis of conventional and organic agriculture commodities by UPLC-MS/MS“*
  - forma prezentace – poster: *„Determination of pyrrolizidine alkaloids in feed by UPLC-MS/MS“*

2012

- Metody laboratorního zkoušení krmiv, ÚKZÚZ, Brno (30. 4. 2012)
  - forma prezentace – přednáška: *„Stanovení vitamínu D3 v krmivech“*
  - forma prezentace – přednáška: *„Multimetoda pro stanovení mykotoxinů v krmivech pomocí UPLC-MS/MS“*
- 34. Mycotoxin workshop, Braunschweig, Německo (14. - 16. 5. 2012)
  - forma prezentace – poster: *„Multimycotoxin method for feed analysis by UPLC-MS/MS“*

2011

- 6th International Symposium on RAFA, Praha (5. - 8. 11. 2011)
  - forma prezentace – poster: *„Co-occurence of mycotoxins in feeds produced in the Czech Republic“*
- 5th Meeting on Chemistry and life, FCH VUT v Brně (14. - 16. 9. 2011)
  - forma prezentace – poster: *„Isoprostanes as markers of oxidative stress“*
  - forma prezentace – poster: *„Oxidative stress assessment of salmon eggs“*

14.4 Publikační činnost

2015

- **BOLECHOVÁ, M.**; ČÁSLAVSKÝ, J.; POSPÍCHALOVÁ, M.; KOSUBOVÁ, P. UPLC-MS/MS method for determination of selected pyrrolizidine alkaloids in feed. *FOOD CHEMISTRY,* 2015, s. 265-270. ISSN: 0308- 8146.
- **BOLECHOVÁ, M.**; BENEŠOVÁ, K.; BĚLÁKOVÁ, S.; ČÁSLAVSKÝ, J.; POSPÍCHALOVÁ, M.; MIKULÍKOVÁ, R. Determination of seventeen mycotoxins in barley and malt in the Czech Republic. FOOD CONTROL, 2015, s. 108-113. ISSN: 0956-7135.

2014

- **BOLECHOVÁ, M.**; KOSUBOVÁ, P.; ČÁSLAVSKÝ, J. *Stanovení alkaloidů v krmivech metodou UPLC-MS/MS.* XLIV. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin: 2014. **Sborník dosud nevydán.**
- **BOLECHOVÁ, M.**; ČÁSLAVSKÝ, J.; MÁCOVÁ, D.; VÁVROVÁ, M.; TAGGART, M. *Metoda pro analýzu isoprostanů ve tkáni lososa.* Chemické listy, XY, s. X-Y. ISSN: 0009-2770. **Přijato k tisku**

2013

- **BOLECHOVÁ, M**. Krmiva obohatí rovněž vitamín D. *Agrární noviny,* 2013, s. 36-36. ISSN: 1211- 3816.
- **BOLECHOVÁ, M.**; KOSUBOVÁ, P.; ČÁSLAVSKÝ,J. *Determination of Selected Naturally Occurring Alkaloids in Feed by UPLC-MS/MS.* Studentská odborná konference Chemie je život. Sborník příspěvků. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. s. 236-241. ISBN: 978-80-214-4823- 0.
- MÁCOVÁ, D.; ČÁSLAVSKÝ, J.; **BOLECHOVÁ, M**.; VÁVROVÁ, M. Identification of photo- degradation products of polyurethane foam with enhanced biodegradability. *Fresenius Environmental Bulletin,* 2013, roč. 22, č. 8a, s. 2362-2370. ISSN: 1018- 4619.
- **BOLECHOVÁ, M.**; KOSUBOVÁ, P.; MRKVICOVÁ, M. *Determination of pyrrolizidine alkaloids in feed by UPLC-MS/MS.* Bilthoven the Netherlands: Bastiaanse Communication, RME, 2013. s. 106 - 106.
- **BOLECHOVÁ, M.**; KOSUBOVÁ, P.; ČÁSLAVSKÝ, J.; POSPÍCHALOVÁ, M. *Multiresidue mycotoxin analysis of conventional and organic agriculture commodities by UPLC-MS/MS.* Bilthoven the Netherlands: Bastiaanse Communication, RME, 2013. s. 105 - 105.
- **BOLECHOVÁ, M.**; **KOSUBOVÁ, P.; POSPÍCHALOVÁ, M.** *Determination of naturally-occuring alkaloids in feed by UPLC-MS/MS. 6th International Symposium on recent advances in food analysis.* Institute of Chemical Technology, Prague: ICT Prague Press, 2013. s. 338-338. ISBN: 978 80 7080 861 0.
- **BOLECHOVÁ, M.**; **KOSUBOVÁ, P.; POSPÍCHALOVÁ, M**. *Occurence of mycotoxins in animal feed from organic farming production. 6th International Symposium on recent advances in food analysis.* Institute of Chemical Technology, Prague: ICT Prague Press, 2013. s. 330-330. ISBN: 978 80 7080 861 0.
- **BOLECHOVÁ, M.**; KOSUBOVÁ, P.; NEHYBOVÁ, Z.; MRKVICOVÁ, M. *Analysis of Vitamin D in feed by UPLC-MS/ MS. 6th International Symposium on*

recent advances in food analysis. Institute of Chemical Technology, Prague: ICT Prague Press, 2013. s. 215-215. ISBN: 978 80 7080 861 0.

2012

- **BOLECHOVÁ, M**. *Zavádění multireziduální metody pro stanovení mykotoxinů v krmivech.* Brno: ÚKZÚZ, 2012.
- **BOLECHOVÁ, M**. *Stanovení vitamínu D3 v krmivech.* Brno: ÚKZÚZ, 2012.
- **BOLECHOVÁ, M**.; KOSUBOVÁ, P.; POSPÍCHALOVÁ, M. *Multimycotoxin method for feed analysis by UPLC-MS/ MS.* Braunschweig, Germany: 34. Mycotoxin workshop, 2012. s. 43-43.

2011

- POSPÍCHALOVÁ, M.; ZBÍRAL, J.; FLORIÁN, M.; **BOLECHOVÁ, M**. *Co-occurence of mycotoxins in feeds produced in the Czech Republic*. 5th International Symposium on *recent advances in food analysis*. Institute of Chemical Technology, Prague: ICT Prague Press, 2011. s 271 ISBN: 978 80 7080 795 8.
- **BOLECHOVÁ, M.**; ČÁSLAVSKÝ, J.; VÁVROVÁ, M. *Isoprostanes as markers of oxidative stress.* Chemické listy. 2011. s 959 ISSN: 0009- 2770.
- **BOLECHOVÁ, M.**; SQUIER, A; ČÁSLAVSKÝ, J.; KENNETH, B.; VÁVROVÁ, M. *Oxidative stress assessment of salmon eggs.* Chemické listy. 2011. s. 959. ISSN: 0009- 2770.
- **BOLECHOVÁ, M.**; KOSUBOVÁ, P.; POSPÍCHALOVÁ, M. *Multimycotoxin method for feed analysis by UPLC-MS/ MS.* Braunschweig, Germany: 34. Mycotoxin workshop, 2012. s. 43-43.

2009

- ČÁSLAVSKÝ, J.; MÁCOVÁ, D.; **BOLECHOVÁ, M**.; VÁVROVÁ, M.; VOJTOVÁ, L.; VESELÝ, M. Produkty degradace polyurethanových pěn jako potenciální kontaminanty životního prostředí. In *XVIII. vědecké sympózium s mezinárodní účastí "Situace v ekologicky zatížených regionech Slovenska a střední Evropy". Zborník (Proceedings).* 1. Košice: Slovenská banícka spoločnosť ZSVTS, 2009. s. 97-100. ISBN: 978-80-970034-1- 8.