

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Využití moderních analytických technik pro analýzu mykotoxinů v obilovinách  
Petr Listík

Bakalářská práce  
2019

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Petr Listík**  
Osobní číslo: **C16064**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
Název tématu: **Využití moderních analytických technik pro analýzu mykotoxinů v obilovinách**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na využití moderních analytických technik v analýze mykotoxinů ve vybraných obilovinách. Zaměřte se na úpravu vzorku před analýzou a samotnou analýzu mykotoxinů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie či její spojení s hmotnostní spektrometrií.
2. Poznatky z literatury využijte pro analýzu vybraných trichothecenových mykotoxinů s využitím HPLC/MS/MS.
3. Výsledky prezentované v literatuře a experimentálně zjištěné porovnejte a kriticky zhodnoťte.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucí práce.**

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Konzultant bakalářské práce: **Ing. Kateřina Pravcová**

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **5. února 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 2.7.2019

Listík Petr

Poděkování:

Tímto bych chtěl poděkovat doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. za podporu, odborné rady, pomoc a čas strávený během vypracování této bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Ivetě Brožkové, Ph.D. za poskytnutí vzorků.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením mykotoxinů v obilovinách. Teoretická část zahrnuje charakterizaci jednotlivých mikromycet a jejich sekundárních toxických metabolitů, tzn. mykotoxinů. Práce je zaměřena na tři nejčastěji se vyskytující plísňe rodů *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*. Následně jsou popisovány vybrané mykotoxiny. Experimentální část práce je věnována izolaci trichothecenových mykotoxinů z kontaminovaného ječmene pomocí různých rozpouštědel a následnému stanovení s využitím HPLC/MS techniky. V ječmeni byly prokázány toxiny HT-2 a T-2, přičemž nejlepší extrakční účinnosti bylo dosaženo s využitím vodného roztoku acetonitrilu.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Mykotoxiny, *Fusarium*, trichotheceny, extrakce, HPLC/MS, T-2 toxin, HT-2 toxin

## **TITLE**

Modern analytical techniques in analysis of mycotoxins in cereals

## **ANNOTATION**

This bachelor thesis deals with the determination of mycotoxins in cereals. The theoretical part includes characterization of individual micromycetes and their secondary toxic metabolites, i.e. mycotoxins. The work is focused on the three most common fungi of the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. Subsequently, selected mycotoxins are described. The experimental part of the work is devoted to the isolation of trichothecene mycotoxins from contaminated barley using various solvents followed by HPLC/MS determination. HT-2 and T-2 toxins were detected in barley samples with the best extraction efficiency using aqueous acetonitrile.

## **KEYWORDS**

Mycotoxins, *Fusarium*, trichothecenes, extraction, HPLC/MS, T-2 toxin, HT-2 toxin

# Obsah

Úvod.....	11
1 Teoretická část .....	12
1.1 Mikromycety .....	12
1.2 Mykotoxiny .....	13
1.3 Producenti mykotoxinů .....	16
1.3.1 Rod <i>Aspergillus</i> .....	17
1.3.2 Rod <i>Penicillium</i> .....	19
1.3.3 Rod <i>Fusarium</i> .....	21
1.4 Vybrané mykotoxiny.....	24
1.4.1 Aflatoxiny .....	24
1.4.2 Ochratoxin A.....	26
1.4.3 Patulin .....	27
1.4.4 Trichotheceny .....	28
1.4.5 Fumonisiný .....	35
1.4.6 Zearalenon .....	36
1.5 Úprava vzorku před analýzou .....	38
1.5.1 Odběr vzorku .....	38
1.5.2 Extrakce .....	38
1.5.3 Čištění .....	39
1.6 Metody analýzy.....	41
1.6.1 Imunochemická metoda ELISA.....	41
1.6.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) .....	41
2 Experimentální část.....	44
2.1 Použité přístroje a zařízení .....	44
2.2 Použité chemikálie .....	44
2.3 Použité vzorky.....	45

2.4	Pracovní postup .....	45
2.4.1	Extrakce mykotoxinů .....	45
2.4.2	Separace a podmínky měření .....	45
3	Výsledky a diskuze .....	46
3.1	Identifikace mykotoxinů .....	46
3.2	Účinnost extrakce .....	46
4	Závěr .....	49
5	Použitá literatura .....	50



## Seznam tabulek

Tabulka 1 – Vybrané mykotoxiny, jejich producent, hostitel a místo výskytu [8].....	16
Tabulka 2 - Toxinogenní mikromycety rodu <i>Aspergillus</i> [1, 3].....	18
Tabulka 3 - Toxinogenní mikromycety rodu <i>Penicillium</i> [1].....	20
Tabulka 4 - Toxinogenní mikromycety rodu <i>Fusarium</i> [1] .....	23
Tabulka 5 - Vzorky kontaminovaného ječmene .....	45
Tabulka 6 - Retenční časy, sledované adukty a deklustrační potenciály analyzovaných mykotoxinů [68] .....	46
Tabulka 7 - Naměřené hodnoty HT-2 a T-2 toxinu .....	47

## Seznam ilustrací

Obrázek 1 – <i>Aspergillus flavus</i> [16] .....	17
Obrázek 2 - Stavba a uspořádání konidioforů u jednotlivých podrodů rodu <i>Penicillium</i> [20].	19
Obrázek 3 - <i>Fusarium culmorum</i> [22] .....	22
Obrázek 4 - Chemická struktura aflatoxinů [26] .....	25
Obrázek 5 - Chemická struktura ochratoxinu A [31] .....	26
Obrázek 6 - Chemická struktura patulinu [33] .....	27
Obrázek 7 - Chemická struktura trichothecenového jádra [36] .....	29
Obrázek 8 - Struktura trichothecenů typu A, B, C a D [38] .....	29
Obrázek 9 - Strukturní vzorec HT-2 toxinu a T-2 toxinu [21] .....	31
Obrázek 10 - Strukturní vzorec nivalenolu [21] .....	32
Obrázek 11 - Strukturní vzorec deoxynivalenolu [21] .....	34
Obrázek 12 - Chemická struktura fumonisinu B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub> a B <sub>4</sub> [26] .....	36
Obrázek 13 - Strukturní vzorec zearalenonu [21].....	37
Obrázek 14 - Chromatogram vzorku 80/770 při snímání záporných iontů .....	48
Obrázek 15 - Chromatogram vzorku 80/385 při snímání kladných iontů .....	48

## Seznam zkratek a značek:

AF	Aflatoxiny
OTA	Ochratoxin A
TCT	Trichotheceny
DON	Deoxynivalenon
ZEA	Zearalenon
FUM	Fumonisy
FDA	Americká správa potravin a léčiv
WHO	Světová zdravotnická organizace
FAO	Organizace pro výživu
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
NIV	Nivalenon
T-2	T-2 toxin
HT2	HT2-toxin
DAS	Diacetoxyscirpenol
BEA	Beauvericin
EN	Enniatiny
MON	Moniliformin
FUS C	Fusarin C
FUS X	Fusarenon X
IARC/WHO	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
IAC	Imunoafinitní chromatografie
SPE	Extrakce na pevnou fázi
GPC	Gelová filtrace
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MS	Hmotnostní spektrometrie
W	Deonizovaná voda
ACN	Acetonitril
FA	Kyselina mravenčí
MeOH	Methanol

## Úvod

Mykotoxiny jsou sekundární toxické metabolity vláknitých mikromycetů. Patří do skupiny přírodních toxinů. Ačkoliv je pojem mykotoxiny málo známý, každý se s nimi setkal. Jde o obyčejné plísně, které zasahují do každodenního života. Díky jejich velké morfologické a fyziologické rozmanitosti a adaptabilitě k nejrůznějším podmínkám se vyskytují prakticky všude tam, kde existuje organická hmota. Jsou v půdě, vodě, ovzduší, ale nachází se i v potravinách, krmivech atd. K jejich rozmnožování, šíření a přežívání za nepříznivých podmínek slouží velice odolné spory mikromycet. Zvýšený výskyt plísni může mít na svědomí i chování člověka. Příkladem může být špatné větrání, úklid nebo nesprávné skladování potravin.

Největším problémem jsou již zmíněné mykotoxiny. Jsou produkovány plísněmi, aby obstály v boji o potravu a přežili. Jsou však toxické pro člověka a další živé organismy. Znehodnocují potraviny, krmiva, dřevo a jiné suroviny. Podílí se na chorobách lidí, zvířat i rostlin. Ke kontaminaci obilovin dochází před sklizní, při pěstování, po sklizni, během zpracování, balení, distribuce i skladování hotových výrobků. Tvorbu mykotoxinů ovlivňuje řada faktorů jako je vlhkost, teplota, pH a další. Většina mykotoxinů je chemicky a tepelně stabilní při zpracovávání potravin. Ať už se jedná o pečení, smažení, vaření nebo pasterizaci. Nyní je známo okolo 400 druhů mykotoxinů. Každý rok je kontaminováno více než 25 % celosvětově sklizených plodin. To způsobuje vysoké průmyslové a ekonomické ztráty.

V poslední letech se mykotoxiny dostaly do popředí a roste i zájem vědců. Neustále probíhá výzkum a jsou objevovány nové mykotoxiny a informace. Přesné znalosti mohou poskytnout základ pro snižování počtu mykotoxinů pod hranice, kdy nebudou představovat žádné zdravotní riziko pro lidi i zvířata a tím způsobené další choroby. Řada států a mezinárodních zdravotnických organizací už stanovuje limity a regulační pokyny pro hlavní třídy mykotoxinů. Je důležité neustále zdokonalovat analytické metody, aby došlo k ochraně zdraví spotřebitelů a podpoře zemědělství.

# 1 Teoretická část

## 1.1 Mikromycety

S mikroskopickými houbami se lidé setkávají už od začátku své existence. Jsou rozšířeny prakticky po celém světě [1]. Stáří těchto mikromycet je odhadováno přibližně na 300 milionů let [2]. Novější poznatky však ukázali, že jejich fosilní pozůstatky se datují do období před 460 miliony let. [1]. Plísň už od počátku významně zasahují do života a činností lidí. Staly se nedělitelnou součástí životního a pracovního prostředí člověka. Soužití s nimi zabezpečuje lidstvu zdroje pro výživu. Využívají se k produkci různých druhů potravin (výroba chleba, droždí, mléčných výrobků, sýrů, alkoholických nápojů a jiných fermentovaných potravin), organických látek (vitamíny, enzymy, kyseliny, aj.), ale třeba i antibiotik. Na druhé straně máme i negativní dopady působení hub. Jde hlavně o znehodnocení potravin, krmiv, dřeva a jiných surovin [1-3]. Mohou degradovat i hotové konzervované potravinové produkty. Znehodnocují je po stránce sensorické, ale i po stránce fyziologické [4]. Dále mají podíl na chorobách člověka, zvířat i rostlin. Projevují se formou infekčních onemocnění, otrav a alergií. Patří sem i toxigenní houby se svými sekundárními metabolity – mykotoxiny. Ty způsobují například znehodnocení potravin a představují závažný celosvětový problém [1-3]. Plísň, které produkují toxické metabolity nazýváme toxigenní. Patří sem každá plíseň produkující toxické metabolity pro jakýkoliv jiný organismus. Můžeme sem zařadit producenty antibiotik, které jsou toxické pro bakterie. V užším slova smyslu nazýváme toxigenními plísněmi jen ty, které produkují toxicky nebo fyziologicky účinné látky působící na teplokrevné organismy. Hlavně na člověka a hospodářsky důležitá zvířata [4].

Vláknité mikromycety jsou vícebuněčné nebo jednobuněčné mikroorganismy (kvasinky) řazené do říše hub. Jsou to eukaryotní organismy s heterotrofní výživou. Jde především o saprofytické organismy, které se významně podílejí na koloběhu látek a energie v přírodě. Malá část se přizpůsobila k parazitismu jiných organismů. Díky jejich velké morfoloické a fyziologické rozmanitosti a adaptabilitě k nejrůznějším podmínkám se vyskytují prakticky všude tam, kde existuje organická hmota. Osídlují řadu rozdílných biotopů. Nacházejí se v půdě, vodě, ovzduší, na povrchu živých i odumřelých organismů, ale nachází se i v potravinách a krmivech.

Spory mikromycet jsou jednobuněčné nebo vícebuněčné výtrusy, které slouží k jejich rozmnožování, šíření a přežívání nepříznivých podmínek [1, 2]. Dormance je charakteristickou vlastností půdních hub. Některé mikroskopické houby zůstávají v dormantním, ale životaschopném stavu i několik desítek let. Pokud pro ně nebudou

k dispozici vhodné nutriční podmínky, tak jsou neaktivní. V půdě je mnoho inhibičních látek, které brzdí vyklíčení spor hub. Tento jev se nazývá fungistáze. Pokud do půdy dodáme snadno rozložitelný organický materiál potlačí to fungistázi a spory hub spolu s ostatními rozmnožovacími jednotkami mohou vyklíčit. Mycelia tím obnovují aktivní růst [5].

Výskyt plísní souvisí i s chováním a činností člověka. Je to například nepravidelné větrání a úklid. Dále pak odmrazování, mytí a dezinfekce ledniček a mrazáků. V neposlední řadě hlavně potraviny, které jsou z hlediska zdraví člověka vhodným a velice rizikovým substrátem pro osídlení, růst a rozmnožování toxinogenních mikroskopických hub a následnou produkci mykotoxinů. Příkladem je plesnivý chléb a další zaplísňené potraviny [1, 2].

## 1.2 Mykotoxiny

Název mykotoxiny byl použit poprvé v roce 1955 Forgaczem a Carliem [1]. Slovo je spojeno ze dvou výrazů. Jedním je řecký výraz pro houbu „mykes“ a druhý je z latinského slova „toxicum“, který znamená jed [6].

Mykotoxiny jsou sekundární toxické metabolity vláknitých mikromycetů (houby, plísně). Patří do skupiny významných přírodních toxinů. Jsou to strukturně odlišné komplexní organické sloučeniny nebiłkovinné povahy, které mají nízkou molekulovou hmotnost. Mykotoxiny však nejsou nezbytné pro růst a vývoj vláknitých mikroskopických hub ve srovnání s primárními produkty metabolismu jako jsou aminokyseliny, mastné kyseliny, nukleové kyseliny a proteiny [1]. Podle Turnera je primární metabolismus souhrnem vzájemně souvisejících chemických reakcí, které dodávají organismu energii, biosyntetické meziprodukty a klíčové makromolekuly, jako jsou proteiny nebo DNA. Sekundární metabolismus zahrnuje syntetické procesy, jejichž koncové produkty nemají význam pro ekonomii organismu. Primární metabolismus je v podstatě stejný pro všechny živé organismy, ale sekundární metabolismus se omezuje podle formy života [3].

Produkce mykotoxinů je vysvětlována tím, že slouží jako prostředek vláknitých mikromycetů v boji o potravu a přežití. Jsou toxické pro člověka a pro živé organismy. K vystavení mykotoxinům dochází nezávisle na vůli nebo zájmům člověka [1]. Ke kontaminaci může dojít před sklizní, při pěstování plodiny, po sklizni, během zpracování, balení, distribuce i skladování potravinářských výrobků. Obecně platí, že všechny plodiny a obiloviny, které jsou špatně skladovány a vystaveny vysoké teplotě spolu s dlouhodobou vlhkostí představují riziko pro růst plísní a kontaminaci mykotoxiny [7]. Produkce mykotoxinů na zrnech je silně závislá na faktorech životního prostředí. Klima hraje klíčový faktor výskytu plísní a mykotoxinů. Jejich

přítomnost může ovlivnit i několik faktorů jako je poškození hmyzem nebo biologická dostupnost mikroživin [8]. Za nejvíce náchylnou plodinu se považuje kukuřice. Rýže je naopak nejméně náchylná. Většina mykotoxinů je chemicky a tepelně stabilní během zpracování potravin, včetně vaření, pečení, smažení a pasterizace. Další riziko bezpečnosti potravin představuje kontaminace krmiv, kdy může dojít k přenosu mykotoxinů na produkty živočišného původu (mléko, maso a vejce), což vede k příjmu mykotoxinů u lidí [7]. Velká část mykotoxinů se uvolní do potraviny a zůstane v ní i po odstranění micelární části plísně. Mykotoxiny vyvolávají onemocnění zvané mykotoxikózy. To je rozdíl od mykóz, jelikož ty způsobuje plíseň sama stejně jako alergické onemocnění [4].

V současné době je známo 300-400 mykotoxinů v závislosti na jejich klasifikaci [9]. Jejich počet se i nadále zvyšuje. Z celkového počtu 114 druhů, jenž mají význam v potravinách je 65 druhů toxinogenních a asi 50 z nich je dáváno do souvislosti s mykotoxikózami u lidí a zvířat [10]. Šest z nich se pravidelně nachází v potravinách. Jedná se o aflatoxiny, trichotheceny, zearalenon, fumonisiny, ochratoxiny a patulin [7]. Každým dnem jsou objevovány, popisovány a chemicky charakterizovány další nové mykotoxiny. Některé z nich jsou uvedeny v tabulce 1.

Toxikologický výzkum mykotoxinů nebyl prozatím ukončen, ale i nadále probíhá [1]. Mykotoxiny nemůžeme obecně rozdělit podle jakéhokoli schématu. Po chemické stránce to jsou látky strukturně odlišné. Nemůžeme je dělit, ani podle plísní, které je produkují, protože jeden a ten samý mykotoxin může být produkován různými rody a druhy plísní. Podle toxického a patologického účinku by mohlo být přehlednější, ale ani toto rozdělení není přesné [4]. Většina prací se zabývá výskytem a toxikologií jednoho mykotoxinu. Především aflatoxinů (AF), ochratoxinu A (OTA), zearalenonu (ZEA), fumonisinů (FUM), trichothecenů (TCT) a deoxynivalenolu (DON). Ty se podle nových výzkumů nacházejí v potravině současně. Jde o takzvanou kooperaci nebo současný výskyt mykotoxinů. Pokud jde o vzorky obilovin a výrobky z obilovin, tak mezi 127 kombinacemi mykotoxinů, které jsou popsány v literatuře jsou nejvíce pozorovány AF + FUM, DON + ZEA, AF + OTA a FUM + ZEA [8].

Kontaminace potravin způsobená mykotoxiny je závažný celosvětový problém. Prakticky je to nevyhnutelný a nepředvídatelný problém, protože i tam, kde jsou zavedeny bezpečnostní postupy může dojít ke kontaminaci vzhledem k vysoké odolnosti mykotoxinů. Pro kontrolu výskytu mykotoxinů v různých potravinách a potravinových výrobcích bylo navrženo mnoho strategií. Neexistuje však žádné jednoznačné řešení. Bohužel okolo 25 % celosvětově sklizených plodin je každoročně kontaminováno mykotoxiny, což vede k obrovským zemědělským a průmyslovým ztrátám ve výši miliard dolarů [8, 11]. V mnoha

zemích s nízkým příjmem jsou mykotoxiny přítomné už v základních potravinách. Expozice bývá nepřetržitá a často na vysokých úrovních. Právě v těchto regionech je kontrola mykotoxinů zanedbávána. Souvisí to s neúplnou znalostí mykotoxinů, jejich negativních účinků a rizik. Ve srovnání s programy očkování, zlepšením hygieny a kontrolou malárie může být tento problém vnímán jako nepodstatný. Nejvyšší expozice se vyskytují v komunitách, kde si lidé pěstují a konzumují vlastní potraviny. Tam, kde mykotoxinům byla věnována pozornost šlo spíše o splnění přísných dovozních nařízení o kontaminaci mykotoxiny do bohatších a vyspělejších zemí světa, než o ochranu obyvatelstva v místě produkce [12]. Mnoho národních, mezinárodních veřejných zdravotnických a vládních orgánů věnují pozornost kontaminaci potravin a krmiv mykotoxiny. Například Americká správa potravin a léčiv (FDA), Světová zdravotnická organizace (WHO), Organizace pro výživu (FAO) a Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) tento problém řeší přísnými regulačními pokyny pro hlavní třídy mykotoxinů [7]. V zájmu ochrany lidí a zvířat tyto předpisy stanovili prahové hodnoty v potravinách a krmivech, aby se zajistilo, že nejsou škodlivé [8]. Přes 100 zemí už stanovilo limity pro výskyt mykotoxinů [7]. Přesné znalosti o přeměně mykotoxinů během technologických procesů jsou klíčové a mohou poskytnout základ pro manažery podniků, aby dodržovali legislativní požadavky a snížili riziko kontaminace a negativních dopadů na trh a obchod [13]. Mykotoxiny se však mohou nacházet i v modifikovaných formách. Převážně jako součást obrany rostlin a jejich detoxikačním procesům. Tyto deriváty unikají běžným analytickým metodám a nejsou regulovány legislativou. Nazývají se maskované mykotoxiny a jsou nově vznikajícím problémem. Pokud jde o kontrolované mykotoxiny, jejich limity byly určeny pouze pro expozici jedním mykotoxinem a nezohledňují kombinované účinky. Společný výskyt v obilných zrnech je však dobře známý a lze ho vysvětlit třemi důvody. Prvním důvodem je schopnost většiny mikromycet produkovat několik mykotoxinů současně. Dalším důvodem je možná kontaminace zrna několika houbami současně a v neposlední řadě se potrava pro zvířata obvykle skládá z více zdrojů obilí. Až 48 % ze 7049 analyzovaných vzorků bylo kontaminováno dvěma a více mykotoxiny. To je riziko zejména pro přežvýkavce, kteří mají pestrou stravu a jsou krmeni několika druhy krmiv [8].

Od počátečního objevu mykotoxinů bylo použito několik analytických metod pro jejich stanovení. Nejběžnějšími je kapalínová nebo plynová chromatografie s různými druhy detektorů a imunochemická metoda ELISA. I když bylo dosaženo velikého pokroku, stále existují nevýhody a velké výzvy ve využití těchto analytických metod. Je zapotřebí neustálého zlepšování analýzy mykotoxinů, aby došlo k ochraně zdraví spotřebitelů, podpoře zemědělství a lepšího prosazování norem o mykotoxinech [7].

Tabulka 1 – Vybrané mykotoxiny, jejich producent, hostitel a místo výskytu [8]

mykotoxin	plíseň	napadená potravina	geografický výskyt
AF (B1, B2, G1, G2)	<i>Aspergillus (bombycis, flavus, nomius, ochraceoroseus, parasiticus, parvisclerotigenus, pseudotamarii, rambellii, toxicarius)</i>	Obiloviny a výrobky na bázi obilovin (převážně kukuřice), ořechy, výrobky z ořechů a semena, sušené ovoce, koření, mléko a mléčné výrobky, maso, vejce	Mírné, tropické a subtropické oblasti (jižní Asie a Afrika)
OTA	<i>Aspergillus (alliaceus, auricomus, carbonarius, cretensis, flocculosus, Glaukos, lacticoffeatus, meleus, niger, ochraceus, pseudoelegans, roseoglobulosum, sclerotioniger, sclerotiorum, steynii, sulphureus, westerdijkiae); Penicillium (nordicum, verrucosum)</i>	Obiloviny a výrobky na bázi obilovin (převážně rýže a pšenice), káva a kakaové boby, víno, pivo, sušené ovoce, koření, maso	Od chladných až po tropické oblasti (severní a jižní Amerika, severní a západní Evropa, Afrika a jižní Asie)
TCT (DON, NIV, T-2, HT-2, DAS)	<i>Fusarium (acuminatum, armeniacum, culmorum, crookwellense, equiseti, graminearum, kyushuense, langsethiae, poae, pseudograminearum, sambucinum, scirpi, sporotrichioides, venantum)</i>	Všechny obiloviny a produkty na bázi obilovin	Regiony severního mírného pásma (Evropa, Amerika a Asie)
ZEA	<i>Fusarium (crookwellense, culmorum, equiseti, graminearum, incarnatum, pseudograminearum, semitectum, sporotrichioides, verticillioides)</i>	Všechny obiloviny a produkty na bázi obilovin, banán	Regiony severního mírného pásma (Evropa, Amerika a Asie)
FUM (B1, B2, B3)	<i>Fusarium (anthophilum, Dlamini, fujikuroi, globosum, napiforme, nygamai, oxysporum, polyphialidicum, proliferatum, pseudonygamai, thapsinum, verticillioides)</i>	Kukuřice, proso, čirok, rýže a jejich deriváty	Oblasti s mírným podnebím (Evropa, Afrika)
BEA	<i>Fusarium (acuminatum, armeniacum, anthophilum, avenaceum, beomiforme, Dlamini, equiseti, fujikuroi, globosum, langsethiae, longipes, nygamai, oxysporum, poae, proliferatum, pseudoanthophilum, sambucinum, semitectum, sporotrichioides, subglutinans)</i>	Všechny obiloviny a produkty na bázi obilovin	Mírné podnebí (Evropa)
EN (A, A1, B, B1)	<i>Fusarium (acuminatum, avenaceum, langsethiae, lateritium, poae, proliferatum, sambucinum, sporotrichioides, tricinctum)</i>	Všechny obiloviny a produkty na bázi obilovin	Mírné podnebí (Evropa)
MON	<i>Fusarium (acuminatum, avenaceum, culmorum, equiseti, fujikuroi, napiforme, nygamai, oxysporum, proliferatum, pseudonygamai, sporotrichioides, subglutinans, thapsinum, tricinctum, verticillioides)</i>	Všechny obiloviny a produkty na bázi obilovin	Mírné podnebí (Evropa)

### 1.3 Producenti mykotoxinů

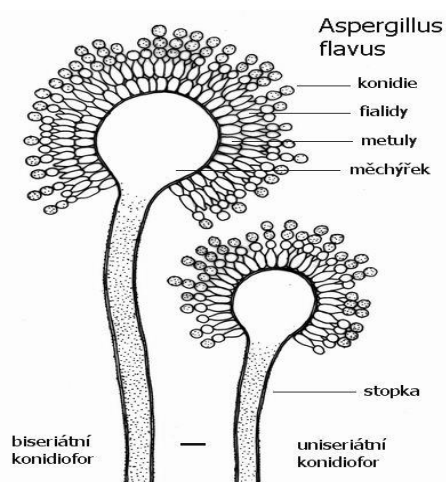
Hlavními producenty mykotoxinů jsou rody *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium* [7, 9]. Rod *Aspergillus* a *Penicillium* často rostou na potravinách a krmivech při skladování a sušení. Naopak rod *Fusarium* většinou infikuje rostoucí plodiny jako je ječmen, pšenice, kukuřice na poli a množí se v rostlině před nebo bezprostředně po sklizni [7, 8].



### 1.3.1 Rod *Aspergillus*

Rod *Aspergillus* zaujímá v historii mykologie a v biotechnologii výjimečné postavení. Je řazen do skupiny Ascomyta a patří k nejrozšířenějším a nejhojněji se vyskytujícím mikromycetám. Mohou se nacházet v půdě, vzduchu, potravinách a v organických zbytcích mnoha dalších zdrojů [14]. Poprvé popsal tento rod botanik Pier Antonio Micheli (1679-1737) v roce 1729. Český název kropidlák vznikl tak, že českým botanikům připomínal průřez rozmnožovacím orgánem kropítka [1]. Název je překladem latinského „aspergō“, což znamená „kropím“ [15]. Je odvozen od plísně *Aspergillus flavus*, jehož schéma je na obrázku 1. Touto plísní byla napadena moučka z podzemnice olejné, která byla hlavní příčinou hromadného uhynutí drůbeže v Anglii v roce 1960 [4].

Je reprezentován velkým počtem fyziologicky rozdílných druhů. Řada z nich disponuje metabolickými vlastnostmi vhodnými pro komerční využití [14]. V současné době je popsáno více než 221 druhů rodu *Aspergillus* [1]. V Japonsku a dalších asijských zemích se kulturní kmeny *Aspergillus oryzae* a *Aspergillus sojae* používají už několik tisíc let používají k výrobě fermentovaných potravin [1, 3]. Zástupci tohoto rodu jsou producenti především organických kyselin, enzymů, cukerných alkoholů a mykotoxinů [14]. Významné jsou například aflatoxinogenní mikromycety produkující aflatoxiny [1]. Dalšími důležitými mykotoxiny jsou aflatrém, kyselina  $\alpha$ -cyklopiazónová, fumitremorgíny, ochratoxin a mnoho dalších [3]. V současnosti je popsáno asi 18 druhů aspergilů patogenních pro člověka. Drtivou většinu (95 %) všech infekcí způsobují pouze tři druhy *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* a *Aspergillus niger*. Vedle infekčních onemocnění se aspergily podílí na mykoalergiích a alergických formách aspergilózy. Další problém představují toxinogenní druhy, které kontaminují mykotoxiny své okolí a podílejí se i na vzniku a rozvoji mykotoxikóz [1].



Obrázek 1 – *Aspergillus flavus* [16]

Nepohlavní rozmnožování je zajištěno hlavicově zakončeným konidioforem, který vyrůstá ze substrátového mycelia nebo ze vzdušných hyf. Na vrcholu se rozšiřuje do měchýřku různých tvarů. Například kulovitého, polokulovitého, elipsoidního nebo palicovitého tvaru. Po celém povrchu nebo částech měchýřku vyrůstají fialidy. Mohou růst v jedné nebo dokonce ve dvou řadách nad sebou. Primární fialidy jsou delší a tlustší a nesou na sobě jednu nebo dvě fialidy sekundární, které jsou občas nazývány metuly. Sekundární fialidy (metuly) jsou kratší a tenčí. Fialidy jsou lahvicovitého tvaru a na vrcholu jsou zúženy v krátký konidiogenní krček. Nově se tvořící mladé konidie jím vypučí v bazipetálních řetězcích. Měchýřek spolu s fialidy a řetězci konidií tvoří konidiální hlavicu typickou pro tento rod [1]. Některé druhy vytvářejí i stádium pohlavní s plodničkami [15]. Vřecka jsou převážně s osmi askosporami vejčitého, oválného nebo kulovitého tvaru [1].

Tento rod je častým původcem kažení potravin, krmiv, ovoce, zeleniny, výrobků z ovoce a zeleniny, tuků a potravin s vysokým obsahem tuku. Vyskytuje se na obilí, mlýnských a pekárenských výrobcích [17]. Aflatoxiny se doporučují sledovat u podzemnice olejné, ořechů, buráků, pistácií, mandlí, v jablečných a broskvových peckách, máku, sezamu a především obilovinách a výrobců z nich. Dále jsou nalézány v sýrech, mléce, koření, fíkách, semenech bavlníku a v mnoha dalších potravinách a krmivech [17, 18]. Mykotoxiny produkované plísněmi rodu *Aspergillus* jsou uvedeny v tabulce 2.

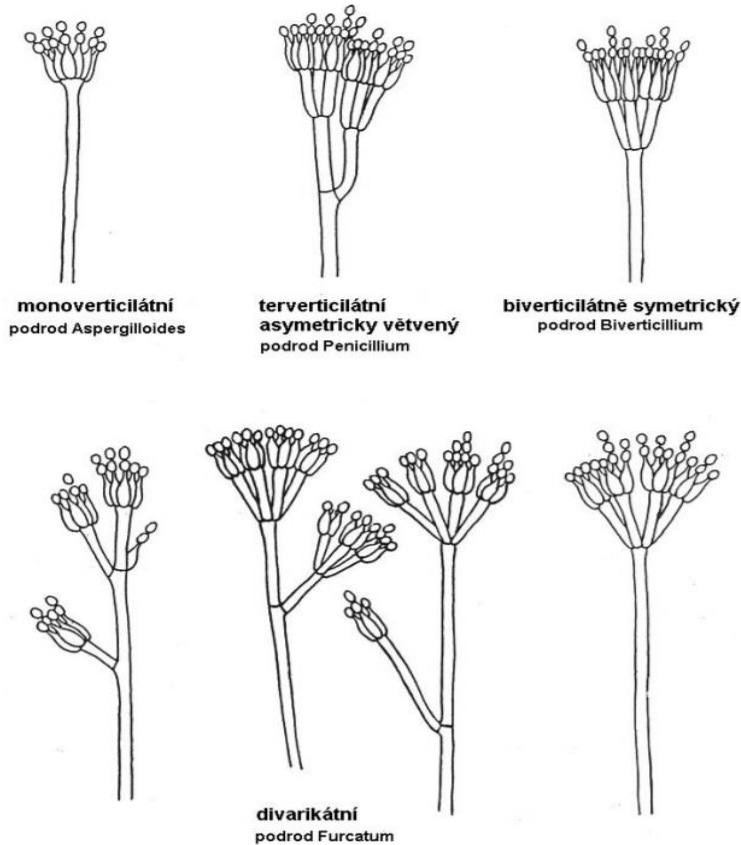
Tabulka 2 - Toxinogenní mikromycety rodu *Aspergillus* [1, 3]

<b>Druh</b>	<b>Produkováný mykotoxin</b>
<i>Emercella nidulans</i>	sterigmatocystin, emestrin
<i>Eurotium amstelodami</i>	neidentifikovatelné toxické metabolity
<i>Eurotium chevalieri</i>	echinulin, neocheinulin
<i>Eurotium rubrum</i>	neidentifikovatelné toxické metabolity
<i>Aspergillus candidus</i>	kys. kojová
<i>Aspergillus clavatus</i>	patulin, tryptoquivalony, cytochalasin E, askladiol
<i>Aspergillus flavus</i>	aflatoxin B1, B2; kys. cyklopiazonová, aflatrém, kys. aspergilová
<i>Aspergillus fumigatus</i>	fumitremorgeny, verukulogen, gliotoxin, kys. helvolová, glyotoxin G
<i>Aspergillus niger</i>	ochratoxin A, malformíny
<i>Aspergillus niveus</i>	citrinin
<i>Aspergillus ochraceus</i>	ochratoxin A, B i C; kys. penicilová, viomeleín
<i>Aspergillus parasiticus</i>	aflatoxin B1, B2, G1, G2
<i>Aspergillus tamaritii</i>	kys. cyklopiazonová, fumiclavin A, kys. kojová
<i>Aspergillus terreus</i>	teritremy, kys. tereová, citreoviridín
<i>Aspergillus ustus</i>	neidentifikovatelné toxické metabolity
<i>Aspergillus versicolor</i>	sterigmatocystin, verzikoloríny
<i>Aspergillus wentii</i>	emodin

### 1.3.2 Rod *Penicillium*

Z latinského slova „penicillus“, což znamená štetec nebo kartáč. Česky štetičkovec nebo plíseň štetičková [15]. Název vznikl tím, že tvar nepohlavní rozmnožovací struktury připomínal našim botanikům štetičky [1]. Jako první použil název *Penicillium* německý mykolog H. F. Link v roce 1809 pro konidiální stádium této houby. Jsou však známá i teleomorfní stádia [15].

Rod *Penicillium* obsahuje přes 225 akceptovaných druhů. Patří k jednomu z nejrozšířenějších vláknitým mikromycetům mírného a teplého klimatu. Jejich spóry jsou prakticky všudypřítomné. Patří k velmi častým kontaminantům potravin, životního a pracovního prostředí člověka [1]. Kolonie mají žlutozelené až modrozelené konidie. Na kontaminovaných potravinách jsou viditelné jako zelené, sametové nebo moučnaté povlaky. Okraje kolonií neobsahují spory, proto jsou viditelné v bílé barvě [19]. Stavba kolonií je podle uspořádání mycelia vlnatá, sametová, funikulózní nebo svazčitá. Každý z podrodů má svojí specifickou stavbu konidioforu, jenž jsou uvedeny na obrázku 2. Podrod *Aspergilloides* má konidiofir monoverciliální. Konidiofir asymetricky větvený terverciliální má podrod *Penicillium*. Dalším podrodem je *Biverticillium* a má biverticiálně symetrický konidiofor. Poslední podrod *Furcatum* má konidiofor divarikační [1].



Obrázek 2 - Stavba a uspořádání konidioforů u jednotlivých podrodů rodu *Penicillium* [20]

Většina druhů tohoto rodu patří mezi půdní saprofyty. Podílejí se na mineralizaci a kolonizaci rozmanitých organických materiálů. To má velký význam na koloběhu prvků. Nevyznačují se žádnými specifickými nároky na růstové podmínky. Využívají široké spektrum zdrojů uhlíku, včetně pentóz, což není u hub běžné. Ze zdrojů dusíku využívají amonné ionty, aminokyseliny, močovinu, dusitany i dusičnany [14]. Mykotoxiny produkované plísněmi rodu *Penicillium* jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3 - Toxinogenní mikromycety rodu *Penicillium* [1]

<b>Druh rodu <i>Penicillium</i></b>	<b>Produkováný mykotoxin</b>
<i>aethiopicum</i>	griseofulvin, viridicatumtoxin
<i>aurantiogriseum</i>	kys. penicilová, roquefortin C, xanthomegnin, viomellein, verukozidin
<i>brevicompactum</i>	kys. Mykofenolová
<i>camemberti</i>	kys. Cyklopiazonová
<i>citreonigrum</i>	citreo viridin
<i>citrinum</i>	citrinin
<i>commune</i>	kys. cyklopiazonová, kys. cyklopaldová, kys. cyclopolová, cyklopiamin, palitantin, rugolovasiny
<i>crustosum</i>	penitrem A
<i>digitalium</i>	neidentifikovatelné toxické metabolity
<i>expansum</i>	patulin, citrinin
<i>funiculosum</i>	patulin
<i>griseofulvum</i>	patulin, kys. cyklopiazonová, roquefortin C, griseofulvin
<i>hirsutum</i>	roquefortin C, kys. cyklopiazonová
<i>chrysogenum</i>	roquefortin C, kys. cyklopiazonová
<i>islandicum</i>	cyclochloritine, islanditoxin, luteoskyrin, erythrokyrin
<i>italicum</i>	neidentifikovatelné toxické metabolity
<i>janczewskii</i>	griseofulvin, penitrem A
<i>janthinellum</i>	jantitremy, penitremy
<i>nordicum</i>	ochratoxin A
<i>oxalicum</i>	kys. sekalonová
<i>Paxilli</i>	verukulogen, paxillin
<i>purpurogenum</i>	rubratoxiny
<i>raistrickii</i>	griseofulvin
<i>roqueforti</i>	roquefortin C, kys. mykofenolová, patulin, kys. penicilová
<i>rugulosum</i>	Rugulosin
<i>simplicissimum</i>	verukulogen, fumitremorgen B, kys. penicilová, viridicatumtoxin
<i>variabile</i>	rugulosin
<i>verrucosum</i>	ochratoxin A, citrinin
<i>viridicatum</i>	xantomegnin, viomellein, vioxanthin

Některé druhy rodu *Penicillium* napadají měkké ovoce. Zejména citrusy, jablka, hrušky, meruňky, ale třeba i česnek. Svoji činností způsobují velké ekonomické ztráty. Některé druhy se řadí mezi kontaminanty uskladněných obilnin a mohou tvořit mykotoxiny, které mají za následek zdravotní závadnost potravin. U necelých 70 druhů rodu *Penicillium* byla popsána produkce mykotoxinů, které se mohou hromadit i v potravinách vyrobených z napadených surovin. Jde především o obilí, sójové boby, fazole, kávu, kukuřici a rýži [14].

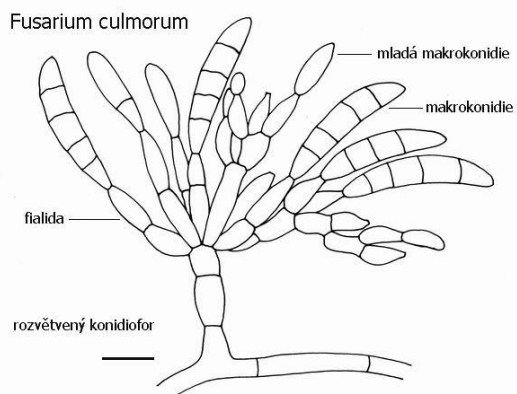
Většina mykotoxinů vykazuje karcinogenní účinky pro různé druhy živočichů. Mezi nejznámější toxiny patří ochratoxin A, citrinin, patulin, kyselina penicilová, kyselina cyklopiazonová a další [14]. Jediným patogenem je druh *Penicillium marneffei*, který u pacientů s AIDS způsobuje systémové infekce [1]. Vedle vzácné patogenity pro člověka mohou některé druhy vyvolat u slabších a citlivějších jedinců alergické reakce [1, 19]. K výrobě antibiotik se využívá hlavně *Penicillium rubens* (penicilin) a *Penicillium griseofulvum* (griseofulvin) [14]. V neposlední řadě se druhy *Penicillium roqueforti* a *Penicillium camemberti* používají na výrobu a zrání některých speciálních druhů plísňových sýrů [1, 14]. *Penicillium nalgiovensis* byl poprvé popsán Laxou roku 1932 na nalžovském sýru, který byl vyráběn v jižních Čechách [1].

### 1.3.3 Rod *Fusarium*

Objev rodu *Fusarium* je spojen s německým botanikem H. F. Linkem. Dalšími průkopníky byli autoři Elias Magnus Fries (1794-1878) a Pier Andrea Saccardo (1845-1920), kteří popsali spoustu dalších druhů [1]. Plísně tohoto rodu jsou značně rozšířeny v přírodě. Především v půdě, ale také v ovzduší i ve vodě [15]. Jako součást půdního ekosystému se podílejí na rozkladu organické hmoty. Řada z nich se přizpůsobila k parazitismu rostlin. Některé mohou být za určitých podmínek patogenní pro živočichy, včetně člověka [1]. Rod *Fusarium* patří k významným toxinogenním „polním“ mikromycetům [1, 21]. Nejčastěji se vyskytují v oblastech Evropy, Asie, Ameriky a Austrálie s mírnými klimatickými podmínkami. Optimální podmínky pro jejich růst jsou teplota 11–23 °C a vlhkost mezi 95–100 % [21].

V oblasti aplikované mykologie (např. potravinářská, lékařská a veterinární mykologie) odborní pracovníci používají k určování toxinogenních a patogenních fuzárií různé identifikační postupy. Tyto postupy jsou na jednotlivých pracovištích většinou historicky zavedeny a identifikace není vždy jednoduchá. Pro určování druhů se pozorují makroskopické znaky na sladidlovém nebo bramboro-glukózovém agaru. Vytváří se dobře vyvinuté vegetativní mycelium a konidiální aparát [1]. Mají bohaté, plstnaté nebo vatovité mycelium [15]. Tvoří se buď jednotlivé konidiofory, na nichž vyrůstají konidie nebo se konidiofory shlukují

do drobných polštářovitých útvarů zvaných sporodochia. V některých případech vyrůstají souvislé konidionosné porosty nazývané pinoty. Jak pinoty, tak sporodochia jsou makroskopicky dobře viditelné, ale k jejich růstu dochází spíše jen na přirozeném substrátu. V kulturách se obvykle nachází pouze volně rozmístěné konidiofory ve vzdušném myceliu. Konidiofory mohou být větvené málo nebo hojněji. Na ose konidioforu se tvoří vstřícně nebo řídce přeslenovitě protáhlé fialidy, které plodí konidie. Nebo se mohou vytvořit nejdříve větévky, které nesou dvě i více konidiogenních buněk – fialid v přeslenu [1]. Pro rod *Fusarium* je charakteristická tvorba dvou typů konidií. Mikrokonidie jsou podstatně menší než makrokonidie. Jsou jednobuněčné, elipsoidní nebo oválné [15]. Na konci konidiogenní buňky mohou tvořit řetězce nebo shluky. Sleduje se charakteristický tvar, velikost a způsob vzniku [1]. Makrokonidie tvoří vždy několik buněk a mají charakteristický rohlíčkovitý nebo srpovitý tvar viditelný na obrázku 3. Od toho je odvozeno i české jméno pro tento druh „srpovnička“, které se ale moc neujalo. Pro určení jednotlivých druhů tohoto rodu je morfologie makrokonidií velice důležitá [15]. Sleduje se počet buněk, velikost, tvar zahnutí, tloušťka buněčné stěny a velikost přepážek [1]. U mnoha druhů se mikrokonidie a makrokonidie vyskytují současně. Některé druhy fuzárií však mohou produkovat pouze mikrokonidie, jiné zas jenom makrokonidie. Některé druhy se vyznačují typickou tvorbou chlamydospor. Vytvářejí se buď na konci mycelárních vláken (terminální chlamydospóry) nebo mezi buňkami vlákna (interkalární chlamydospóry) [15]. U starších kultur dochází i ke vzniku z jednotlivých buněk konidioforu nebo jednotlivých buněk makrokonidií. Některé druhy mohou tvořit blastokonidie, které mohou být přehrádkami rozděleny až na tři septa [1]. Někdy lze u fuzárií pozorovat tvorbu sklerocia, což jsou tuhé kulovité útvary [15]. U mnohých druhů můžeme pozorovat tvorbu perithecia neboli plodničky [1].



Obrázek 3 - *Fusarium culmorum* [22]

Zástupci rodu *Fusarium* uvedeny v tabulce 4 se vyskytují zejména u pšenice, žita, ječmene, ovsa a dalších obilovin a jsou významnými patogeny mnoha zemědělských plodin [1, 21]. Způsobují ekonomické ztráty, které vznikají v důsledku znehodnocení zemědělské produkce, snížené nutriční a technologické kvality zrn.

Tabulka 4 - Toxinogenní mikromycety rodu *Fusarium* [1]

<b>Druh rodu <i>Fusarium</i></b>	<b>Produkováný mykotoxin</b>
<i>acuminatum</i>	T-2 toxin, HT-2 toxin, DAS, MON, chlamydosporol
<i>avenaceum</i>	MON, FUS C, T-2 toxin
<i>culmorum</i>	DON, NIV, ZEA, MON, FUS C, FUS X, 3-acetyl DON, T-2 toxin, calonectrin, sambucinol, butenolid, chlamydosporol, diacetyl-nivalenol, culmorin
<i>equiseti</i>	DAS, ZEA, zearenol-4-sulfát, MON, T-2 toxin, chlamydosporol, butenolid, fusarochromanon, chlamydosporol, equisetin, culmorin
<i>chlamydosporum</i>	T-2 toxin, HT-2 toxin, monoacetoyspirpenol, neosolaniol, iso-neosolaniol, 15-acetylscirpentriol, chlamydosporol
<i>graminearum</i>	DON, 3-acetyl DON, 15-acetyl DON, NIV, DAS, ZEA, FUS C, FUS X, T-2 toxin
<i>moniliforme</i>	FUM, FUS C, FUS A, D, E a F
<i>oxysporium</i>	MON, FUS C, FUS X, T-2 toxin, sambutoxin, fusarenon X, nivalenol, wortmannin
<i>Poae</i>	T-2 toxin, DON, 15-acetyldeoxynivalenol, FUS C, NIV, HT-2 toxin, DAS, nonoacetoxyscirpenol, fusarenon X, butenolide, culmorin
<i>proliferatum</i>	MON, FUM, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, nivalenol, fusarenon X, neosolaninol, cyclonerodiol, sporo 18, equisetin
<i>semitectum</i>	ZEA, T-2 toxin, DAS, nivalenol, fusarenon X, neosolaninol, equisetin
<i>Solani</i>	furanoterpenoidy, ipomeanoly, ipomeanin, a další zatím neznámé toxiny
<i>sporotrichioides</i>	T-2 toxin, HT-2 toxin, DAS, DON, 15-acetyldeoxynivalenol, MON, FUS C, ZEA, neosolaninol
<i>subglutinans</i>	MON, moniliformin, beauvercin, fusaric acid, FUM, chlamydosporol

Zrno obilovin je napadeno během růstu rostlin nebo při skladování v silech. K infekci rostliny dochází především ze zbytků rostlin, které zůstávají na poli z předcházející sklizně nebo z infikované setby. K šíření může dojít i pomocí větru a deště. *Fusarium graminearum* a *Fusarium culmorum* jsou nejčastěji se vyskytující druhy fuzárií, jež jsou původci onemocnění obilovin zvaného *Fusarium head blight*. Důsledkem této nemoci je znehodnocení obilného zrna a možná produkce fusariových mykotoxinů. Napadená zrna jsou malá, svráštělá a jsou typicky bílé až světle růžově zbarveny. K příznakům napadení patří listové nekrózy, které se projevují hnědo-šedými vodnatými skvrnami na listech. Dále pak vadnutí klasů, kde dochází

k prorůstání plísně z místa primární infekce do celého klasu, což má za následek změnu barvy a svraštění. V neposlední řadě hniloby kořenů, které probíhají napadením nesklizené rostliny spíše v zimním období a později je infekce přenášena na zdravé rostliny [21]. Dále fuzárie způsobují vadnutí a padání mladých rostlin na množárnách, ale také tzv. tracheomykózy dospělých rostlin, což se projevuje zežloutnutím a odumíráním rostliny, nakonec i skladištní hniloby uložených plodů [15]. Pro člověka jsou u relativně zdravých jedinců známy a popsány případy mykotických onemocnění. U lidí se sníženou imunitou se mohou tato onemocnění rozvíjet v infekce. Ty velmi často mívají závažný průběh a odolávají léčbě běžně aplikovaných antimykotických léků [1, 15].

## 1.4 Vybrané mykotoxiny

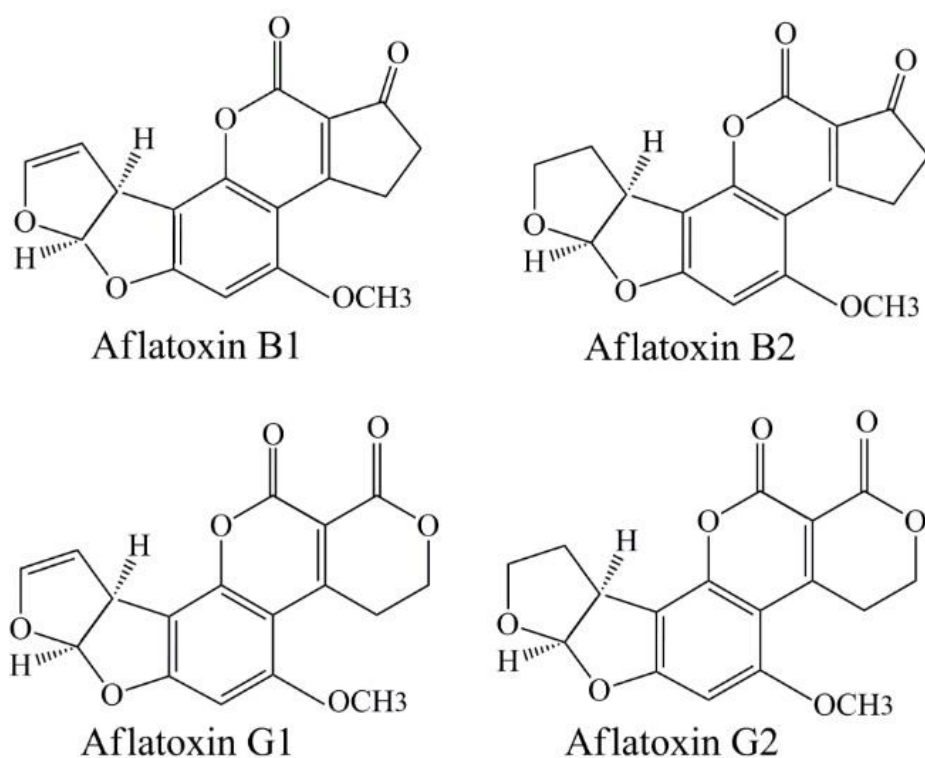
### 1.4.1 Aflatoxiny

Přírodně se vyskytují v prostředí a kontaminují potraviny nebo krmiva [23]. Aflatoxiny byly považovány za produkt plísně *Aspergillus flavus*. Od této plísně je odvozen i jejich název. Později byla jejich produkce objevena i u jiných druhů [24]. Nejběžnějšími producenty jsou tedy *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* a *Aspergillus nomius* [25]. Mohou být syntetizovány ve sporách hub a myceliu nebo vylučovány jako exotoxiny [26]. Za určitých podmínek jsou schopny růst a tvořit aflatoxiny skoro na každém organickém substrátu. Byly objeveny začátkem 60. let v souvislosti s epidemií nazývanou jako krůtí onemocnění X [27]. Žádný z 50 testovaných známých chemických jedů nebyl nalezen, ani virové nebo bakteriální infekce nebyly prokázány. Žádný nový mikroorganismus také nebyl objeven. Veterináři, patologové, mikrobiologové, odborníci na výživu, chemici a vědci všeho druhu nakonec přišli na to, že krmivo obsahovalo kontaminovanou arašídovou mouku původem z Brazílie [28]. V okolí Londýna zahynulo přibližně 100 000 krůtích mláďat [27]. Poté bylo v USA zaznamenáno onemocnění hepatomu u pstruhů vyvolané bavlníkovým olejem kontaminovaným aflatoxiny [1]. První epidemie u lidí byla zaznamenána v roce 1974. Současně ve 150 vesnicích v severozápadní Indii vykazovalo několik set tisíc lidí stejné příznaky otravy, které byly doprovázeny poškozením jater a žloutenkou. Více než 100 lidí zemřelo. Následně byla prokázána souvislost epidemie s konzumací kontaminovaného zrní, které obsahovalo aflatoxin B<sub>1</sub> v průměrné koncentraci 15 mg/kg [27].

Aflatoxiny jsou skupina přibližně dvaceti příbuzných metabolitů hub [29]. Jsou deriváty difuranokumarinového skeletu [28]. V potravinách se nejčastěji vyskytují aflatoxiny B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub>, jejichž struktury jsou zobrazeny na obrázku 4 [29]. Jsou označeny podle barvy



fluorescence v UV oblasti. B<sub>1</sub> a B<sub>2</sub> poskytují modrou fluorescenci. G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub> žlutozelenou fluorescenci. V mléce byly stanoveny v minoritním zastoupení aflatoxiny M<sub>1</sub> a M<sub>2</sub>, což jsou hydroxy deriváty aflatoxinů B<sub>1</sub> a B<sub>2</sub>, které jsou potencionálně karcinogenní pro člověka [24, 26]. Aflatoxin M<sub>1</sub> se tvoří v játrech a vylučuje se do mléka a mléčných žláz, jak u lidí, tak u laktujících zvířat [30]. V kyseljším prostředí pH vznikají z aflatoxinů B<sub>1</sub> a G<sub>1</sub> neenzymatickým působením aflatoxiny B<sub>2A</sub> a G<sub>2A</sub> [24]. Obecně vyvolávají mutagení, karcinogenní a teratogenní účinky [23]. Aflatoxin B<sub>1</sub> je genotoxický karcinogen s akutní toxicitou LD<sub>50</sub> v rozsahu 0,4 – 18 mg/kg v závislosti na použitém pokusném zvířeti [24, 25, 27]. Maximální přípustná hladina celkových aflatoxinů v potravinách byla stanovena na hodnotu menší než 20 ppb. V mléce pak menší než 0,5 ppb [23]. Regulace aflatoxinů byla z počátku omezena analytickými metodami. Dnes můžeme detekovat s přesností na desetiny ng [27]. Nadměrným příjmem může dojít k aflatoxikóze. Při akutní aflatoxikóze dochází především k částečnému poškození jater. V horších případech i k naprostému selhání jejich funkce. Chronická aflatoxikóza je způsobena dlouhodobým příjmem aflatoxinů nejčastěji ze zplísňených potravin. Její diagnóza je složitá a v nejzávažnějších případech dochází ke karcinomu jater [24]. Nejvíce náchylnými potravinami na výskyt aflatoxinů jsou arašídny, ořechy, chilli, koření, ovoce, sója, kukuřice a výrobky z nich [27].

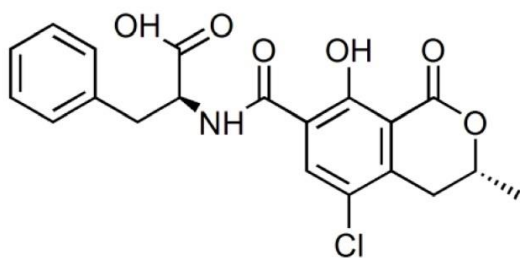


Obrázek 4 - Chemická struktura aflatoxinů [26]

#### 1.4.2 Ochratoxin A

Ochratoxin A byl izolován z *Aspergillus ochraceus* v roce 1965 jihoafrickými badateli. Jako přirozeně se vyskytující kontaminant v kukuřici byl objeven až roku 1969 v USA. Ochratoxin A produkují hlavně rody *Aspergillus* a *Penicillium*. V tropech a subtropích je produkován spíše plísní *Aspergillus*. Ideální teplotou k jeho produkci plísní *Aspergillus ochraceus* je cca 28 °C. Je produkován i v rozmezí 15-37 °C. Při nižších teplotách jsou ho schopny vytvářet plísně *Penicillium*, které to dokážou už od 4 °C [1].

Ochratoxin A je ve skupině ochratoxinů dominantní. Jeho struktura je na obrázku 5. Obecně je můžeme označit jako deriváty 7-izokumarinu vázaného na aminoskupinu  $\alpha$ - $\beta$ -fenylalaninu. Dalšími zástupci jsou například ochratoxin B, ochratoxin C, ochratoxin D, 10-hydroxyochratoxin, ochratoxin  $\alpha$  a další. Ochratoxin B je 16 x méně toxický než ochratoxin A. Ochratoxin C je stejně toxický, ale v potravinách se vyskytuje jen vzácně.



Obrázek 5 - Chemická struktura ochratoxinu A [31]

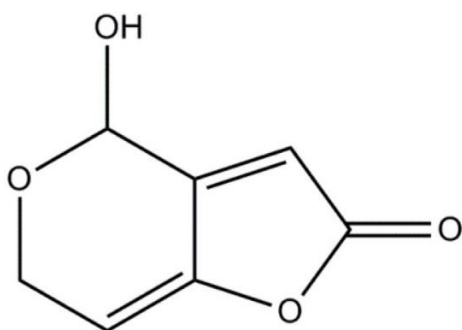
Ochratoxin A se vyskytuje v širokém spektru potravin. Nejvíce je zastoupen v cereáliích, cereálních výrobcích, vepřovém masu, krvi a vnitřnostech (játra, ledviny a výrobky z krve). Dále pak v luštěninách, zeleném čaji, koření, pivu, kávě, vínu, sušeném ovoci a vinném octu [1]. Ochratoxin A je stabilní v kyselém prostředí a dokáže odolávat vysokým teplotám [7]. V roce 1995 byl stanoven provizorní tolerovatelný týdenní přívod na 100 ng/kg tělesné hmotnosti na týden. Později roku 1998 byl stanoven provizorní tolerovatelný denní přívod na 5 ng/kg tělesné hmotnosti na den. Stanovené hodnoty v potravinách dosahovaly koncentrací od setin jednotek  $\mu\text{g}/\text{kg}$  až po tisíce  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , což by při požití potravy kontaminované takovým množstvím mohlo vést ke zdravotním komplikacím [1].

Ochratoxin A je klasifikován ve skupině 2B jako možný lidský karcinogen. Je akutně nefrotoxický a hepatotoxický. Dále způsobuje genotoxicitu, neurotoxicitu, imunotoxicitu, teratogenitu a embryotoxicitu u lidí i zvířat. Ovlivňuje produktivitu hospodářských zvířat. Dochází u nich ke snížené přeměně krmiva a horšímu přírůstku tělesné hmotnosti. Může

se snížit i produkce vajec u nosnic. Je zde podezření, že způsobuje balkánskou endemickou nefropatii, kterou trpí jihovýchodní Evropani. Evropská unie stanovila limity pro ochratoxin A pouze v některých potravinách v rozmezí 5-50 ppb [7].

#### 1.4.3 Patulin

Patulin byl poprvé objeven roku 1941 při výzkumu nových antibiotik. Byl izolován nezávisle na sobě několika autory pod různými názvy jako klavitin, klavacin, expanzin, penicidin, mykoin, leokopin a tercinic. Název patulin byl poprvé použit v roce 1943, kdy byl izolován Anslowem a kol. [1], jako antibioticky aktivní metabolit *Penicillium patulum*. Byl účinný na gram pozitivní i gram negativní bakterie. Ve stejném roce byla objasněna i jeho struktura viditelná na obrázku 6 [1]. Na krátkou dobu byl využíván jako léčebné antibiotikum [32]. Později byly zjištěny i jeho toxické účinky při laboratorních pokusech na zvířatech a proto byl zařazen mezi mykotoxiny [33].



Obrázek 6 - Chemická struktura patulinu [33]

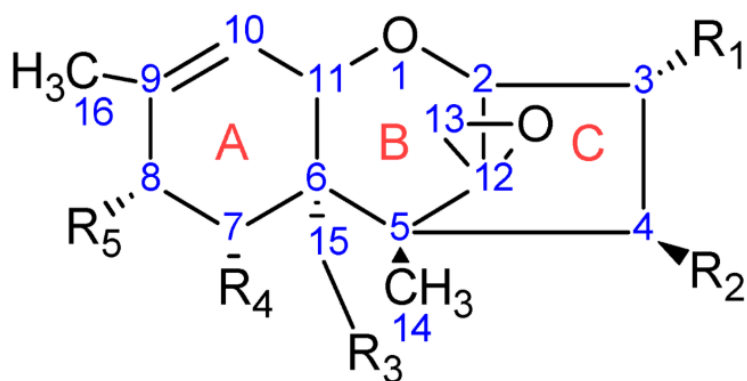
Na jeho produkci se nejvíce podílejí rody *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* a *Byssochlamidys*. Hlavním producentem je *Penicillium expansum*, který působí jako kontaminant jablek a dalšího ovoce. Dalšími významnými jsou *Byssochlamys nivea* a *Aspergillus clavatus* [1]. Celkově ho však produkuje přes 60 druhů hub [33]. Chemicky se řadí mezi nenasycené laktony a jeho biosyntetická dráha je jedna z nejlépe prozkoumaných drah sekundárního metabolismu hub [1]. Ačkoli podrobně známe strukturu meziproductů, jejich funkce je stále nejasná [34]. Optimálními podmínkami pro jeho růst jsou teplota okolo 25 °C a pH v rozmezí 3 - 6,5 [32]. Je toxický pro bakterie, prvoky, houby, rostliny, koryše a obratlovce. Nejčastěji poškozuje gastrointestinální trakt, zejména žaludeční sliznice. Byly u něj dokázány neurotoxické, imunosupresivní a mutagenní účinky [1]. Poškozuje centrální nervovou soustavu, slezinu, játra, žaludek, ledviny a respirační aparát. Při pravidelné a dlouhodobé expozici může

být karcinogenní. Hlavní projevy intoxikace se mohou projevit ztrátou koordinace, paralýzou a degradací neuronů mozkové kůry [32].

Člověk přijímá patulin především z různých potravin vyrobených ze zkaženého ovoce [32]. Jelikož růst plísně a následná produkce patulinu běžně probíhá až po poškození povrchu plodu. Nelze však podcenit výskyt ve zdravém plodu. Vyskytuje se jako kontaminant jablek a výrobků z nich [1]. Nejčastěji v ovocných džusech a jablečných moštích [34]. Také byl objeven v ovoci s přirozenou hnědou hnilobou. Patří mezi ně banány, broskve, meruňky, ananas a spoustu dalších. Přirozený výskyt v obilí prozatím nebyl prokázán. Výskyt patulinu je spíše ukazatelem špatných výrobních postupů a používání plesnivých vstupních surovin. Dostatečnou prevencí intoxikace by mělo být důkladné a pečlivé třídění ovoce [1]. Nicméně ne vždy je hniloba viditelná, proto nebude vyřazení shnilých jablek vždy tak účinné. Může lehce dojít k lisování jablka, které má vnitřní hnilobu. Kvůli kontaminaci ovoce a dalších plodin došlo k použití fungicidů, které snižovali množství a výskyt patulinu, ale jejich použití způsobovalo negativní ohlasy u veřejnosti a ve většině zemí bylo jejich používání nakonec zakázáno [35]. Tolerovatelný denní přívod patulinu byl stanoven na 0,4 ng/kg tělesné hmotnosti na den [1]. Navzdory snahám o snížení patulinu ve všech stádiích procesu výroby jablek je výskyt tohoto mykotoxinu na celém světě stále vysoký [34].

#### 1.4.4 Trichotheceny

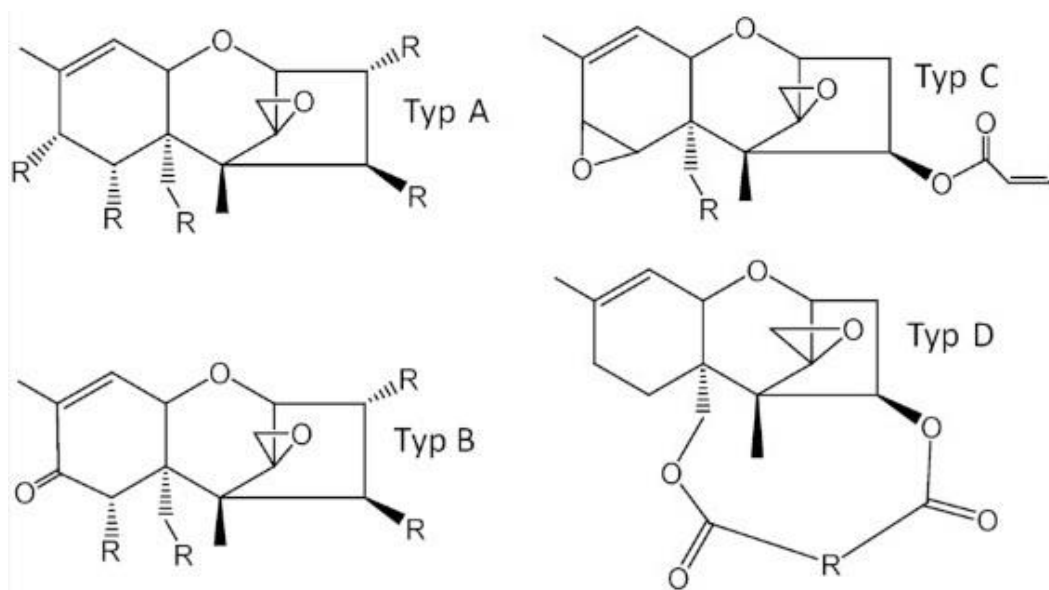
Trichotheceny byly v roce 1932 rozpoznány jako mykotoxiny způsobující alimentární toxickou aleukii (septickou angínu) u lidí na území tehdejšího SSSR [7, 32]. První izolovaný trichothecen byl trichothecin z *Trichothecium roseum*. Nicméně až objev deoxynivalenonu v roce 1980 nastartoval výzkum druhu *Fusarium* a trichothecenů z jiných rodů [36]. Jsou produkovány především plísněmi rodu *Fusarium*. Dalšími producenty jsou rody *Myrothecium*, *Trichothecium*, *Trichoderma*, *Cylindrocarpon*, *Acromonium* (*Cephalosporium*), *Dendrodochium* *Verticimonosporum* a *Stachybotrys* [3, 7]. Trichotheceny jsou nejrozmanitější skupinou mykotoxinů. V současné době je známo více než 150 trichothecenů a jejich derivátů, ale jenom některé z nich byly detekovány jako přírodní kontaminanty obilnin [7]. Jde o více než 80 typů velice si podobných látek [32]. Struktura trichothecenového jádra je zobrazena na obrázku 7.



Obrázek 7 - Chemická struktura trichothecenového jádra [36]

Trichotheceny se odvozují od základního skeletu – trichothekanu [3, 6]. Podle chemické struktury se jedná o tetracyklické seskviterpeny zahrnující šestičlenný cykl s kyslíkem, který obsahuje dvojnou vazbu mezi uhlíky C-9, C-10 a epoxyskupinu v poloze C-12, C-13 [3, 21]. Obecně většinu těchto látek můžeme označovat jako 12, 13-epoxy-9-trichotecény. Můžeme je rozdělit do dvou skupin. Do první patří alkohol deriváty trichothecenů a jejich jednoduché estery. Do druhé skupiny se řadí složitější makrocyclické diestery a triestery [3]. Podle typu, počtu funkčních a substitučních skupin se trichotheceny dělí do čtyř skupin, jejichž struktury jsou na obrázku 8:

- typ A – bez kyslíkové skupiny (oxoskupiny) na C-8
- typ B – na C-8 je oxoskupina
- typ C – další epoxyskupina v poloze C-7, C-8 nebo C-8, C-9
- typ D – makrocyclický kruh mezi C-4 a C-15 se dvěma esterovými vazbami [21, 37]



Obrázek 8 - Struktura trichothecenů typu A, B, C a D [38]

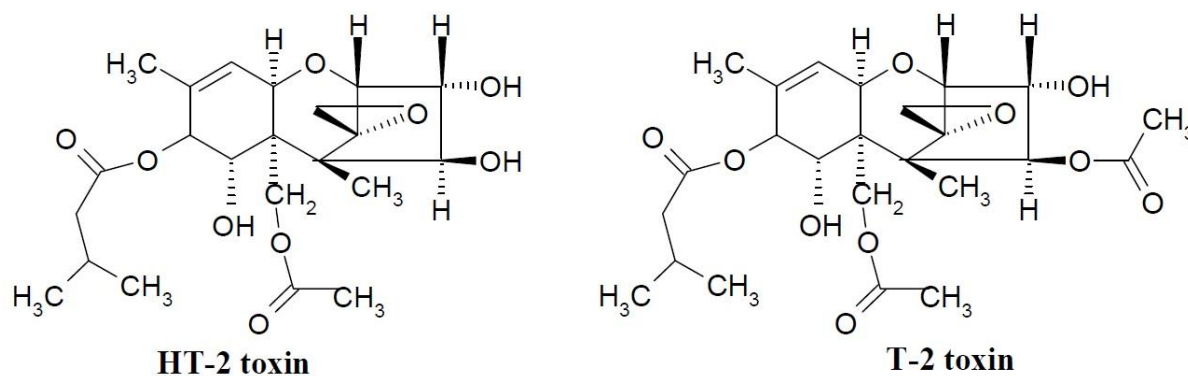
Mezi nejznámější trichotheceeny typu A jsou považovány T-2 toxin a HT-2 toxin, u typu B jde především o deoxynivalenol, nivalenol a fusarenon X [7, 32]. Nejdůležitějšími producenty trichotheceenů jsou plísně *Fusarium graminearum* a *Fusarium culmorum*, které způsobují nemoc nazývanou Fusarium head blight, což je destruktivní onemocnění obilnin s celosvětovým negativním ekonomickým dopadem popisované v kapitole 1.3.3. Nejčastěji se vyskytují v pšenici, žitu, ječmeni, kukuřici a rýži. Dále mohou být přítomny v sójových bobech, bramborách, arašidech, slunečnicových semenech, banánech, ale také v produktech z obilovin jako je chléb, nudle, pivo nebo snídaňové cereálie [7]. Toxičtější trichotheceeny typu C a D se v potravinách a krmivech příliš často nevyskytují [6]. Trichotheceeny jsou pokládány za nejrozšířenější mykotoxiny na světě kvůli jejich celosvětovému rozšíření v obilninách a krmivech. Jak pro lidi, tak pro hospodářská zvířata vykazují vysokou toxicitu, která je vysvětlována přítomností epoxyskupiny [3, 6]. Jsou to látky známé jako inhibitory syntézy proteinů a imunosupresivní látky [32]. K mykotoxikóze trichotheceeny dochází několik hodin po požití kontaminovaných potravin. Jedna z největších epidemií proběhla v devadesátých letech v Severní Americe, kde způsobila ekonomickou ztrátu okolo 3 miliard dolarů [11]. Běžnými příznaky toxicity u zvířat je zpomalený růst, snížená produkce mléka, odmítání krmiv, střevní krvácení a potlačení imunity [7]. U lidí může docházet ke snižování příjmu nebo úplnému odmítnutí potravy, podráždění kůže, zvracení, průjmů a krvácivosti [6]. Trichotheceeny jsou rychle vstřebávány gastrointestinálním traktem a v játrech vznikají epoxidy, které negativně ovlivňují základní buněčné funkce. Mezi ně patří syntéza bílkovin a DNA [32]. Je zajímavé, že bylo pozorováno relativně málo toxigenních účinků na bakteriích ve srovnání s eukaryotickými kmeny. To značí určitý stupeň specifity. V současné době zbývá zjistit, jestli je toxikologická rezistence u prokaryot způsobena rozdíly v buněčném mechanismu, rychlému metabolismu nebo neefektivní membránové translokaci. Některé studie dokonce naznačili, že makrocyclické trichotheceeny se zaměřují na rakovinné buňky a mohou být užitečné jako antileukemika [36].

#### T-2 toxin a HT-2 toxin

T-2 toxin byl poprvé izolován z kultury *Fusarium sporotrichioides* v roce 1968. Jeho producenty jsou tedy především plísně rodu *Fusarium* [1]. Patří mezi trichotheceeny typu A stejně jako HT-2 toxin, který je jeho hlavním metabolitem [9, 37]. Oba dva patří mezi nejtoxičtější členy trichotheceenů a jejich strukturní vzorce jsou na obrázku 9 [9]. T-2 toxin má vysokou akutní toxicitu a je původcem onemocnění známé jako alimentární toxická aleukie [1, 21]. První zmínka o tomto onemocnění je z doby druhé světové války [37]. Nemoc

se projevila po požití plesnivých zrn v oblastech Ruska. Míra úmrtnosti dosahovala až 80 %. Mezi projevy onemocnění patří zvracení, horečka, záněty trávicího traktu, snížení počtu bílých krvinek a smrt [39]. Druhá zpráva pocházela z Japonska při otravě koní [37]. T-2 toxin byl údajně použit i jako biologická zbraň nazývaná „yellow rain“ v Jihovýchodní Asii [39].

Oba mykotoxiny jsou kontaminanty obilí. Převážně se jedná o oves, žito, pšenici a ječmen. Jejich výskyt je poslední dobou často zaznamenáván ve vysokých koncentracích v ovsu. U této obiloviny nedochází k pozorovatelnému napadení *Fusarii* v průběhu vegetace. Plíseň se rozvíjí latentně a kontaminuje oves mykotoxiny [21]. Optimální teplotou pro výskyt je 8-14 °C [37]. Oba mykotoxiny se v napadených obilovinách nacházejí společně. Je těžké rozdělit jejich účinky vzhledem k rychlému metabolismu T-2 toxinu [37]. Většinou jsou tyto látky stanovovány společně a jejich koncentrace je uváděna v sumě. Laboratoře se často specializují na analýzu jiných, podle nich důležitějších fusariových mykotoxinů. K jejich monitoringu se používá především vysokoúčinná kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií [21].



Obrázek 9 - Strukturální vzorec HT-2 toxinu a T-2 toxinu [21]

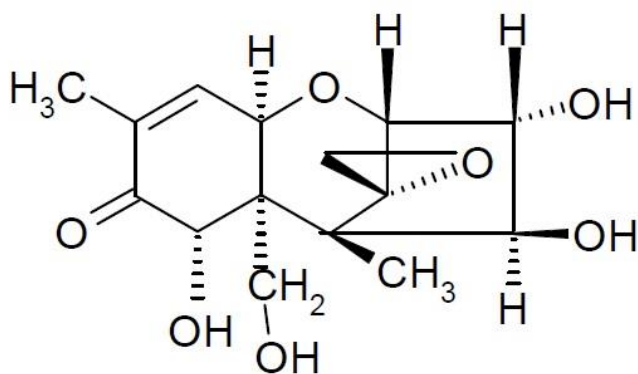
T-2 toxin inhibuje syntézu proteinů, DNA, RNA, mitochondriálních funkcí a dalších procesů. Způsobuje smrt eukaryotické buňky. Má přímý lytický účinek na erythrocyty. Produkty kontaminované tímto mykotoxinem mohou způsobit vážné zdravotní problémy u lidí i zvířat. Může dojít až k usmrcení. Expozice se u zvířat projeví řadou akutních i chronických účinků. Většinou jde o účinky dermatotoxické a emetické. Jsou popsány též účinky imunosupresivní, genotoxické a diskutují se účinky karcinogenní. Dochází k zánětům gastrointestinálního traktu, leukopenii, degradaci kostní dřeně, nevolnosti, zvracení, závratím, zimnici, bolestem břicha, průjmům a potratům. Způsobuje vysokou dermální toxicitu. Rychle penetruje kůži, způsobuje její zarudnutí, puchýře, popáleniny až nekrózu. Má srovnatelné účinky s yperitem. Nebezpečný je

i ve formě aerosolu. Nejčastěji dochází k poškození očí. Při inhalaci jsou postižené dýchací cesty. Představuje hrozby zneužití jako biologické zbraně. T-2 toxin pravděpodobně současně působí s deoxynivalenolem. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC/WHO) řadí toxin do třetí kategorie. To znamená, že zatím není řazen jako karcinogen pro člověka. Navzdory tomu byla u hlodavců zjištěna schopnost iniciovat tvorbu karcinomu v plicích, játrech nebo trávicím traktu. Provizorní tolerovatelný denní příjem pro T-2 toxin byl stanoven na 60 ng/kg tělesné hmotnosti na den [1, 37].

### Nivalenol

Nivalenol je jedním z přirozeně se vyskytujících trichothecenů, který patří do skupiny B. Byl objeven v pšenici a ječmeni při probíhajících průzkumech mezi lety 1976-1985 v Japonsku [37]. Poprvé byla tato látka izolována z kultury *Fusarium nivale* [21]. Jeho strukturní vzorec je zobrazen na obrázku 10. Často se vyskytuje společně s fusarenonem X [37]. Hlavními producenty jsou uváděny *Fusarium poae* a *Fusarium cerealis*. *Fusarium culmorum* a *Fusarium graminearum* jsou však také schopné produkovat nivalenol [21, 37].

Objevuje se především v suchých a parných létech. Nejčastěji se vyskytuje v oblastech Evropy, Austrálie a Asie. Díky vysoké stabilitě dokáže odolávat i vysokým teplotám. Nejčastěji napadá zrna obilovin [37]. Nejčastěji se vyskytuje v pšenici, kukuřici, ovsu, ječmeni a žitu. Také se nachází ve sladu, pivu nebo třeba chlebu [21, 37].



Obrázek 10 - Strukturní vzorec nivalenolu [21]

Nivalenol je silný inhibitor proteinu, RNA a syntézy DNA. Způsobuje nekrózu proliferujících buněk a je extrémně toxický pro tkáně, které se rychle dělí. Při pokusech na myších byly zjištěny embryotoxické a fetotoxické účinky. Je prokázána inhibice produkce imunoglobulinů u myší. Dostupné informace jsou však příliš omezené. Při akutním účinku



dochází k toxicitě kostní dřevě. Chronická toxicita může způsobit leukopenii. U experimentálních zvířat nebyla prokázána karcinogenita nivalenolu. Prozatím nejsou žádné údaje toxicity u lidí [37].

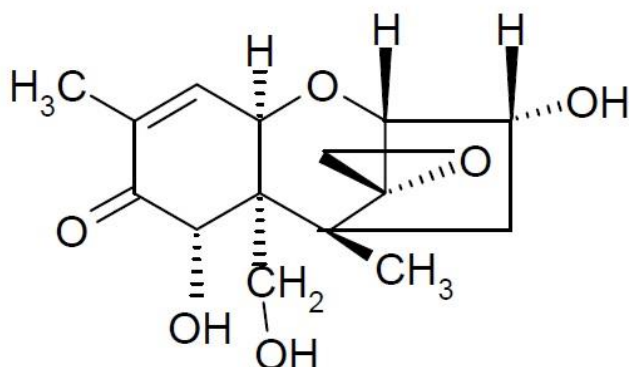
Z důvodu jeho vysoké polaritě je jeho stanovení multidetekčními chromatografickými metodami velice složité. Zatím neexistuje žádná legislativa, která by omezovala jeho nejvyšší povolená množství v potravinách. Řada analytických laboratoří se proto jeho analýzou nezabývá. V poslední době můžeme pozorovat vzrůstající frekvenci jeho výskytu. Tím se dostává i do popředí zájmu odborníků [21].

### Deoxynivalenol

Deoxynivalenol byl objeven v roce 1973 a patří mezi významné zástupce trichothecenů skupiny B [1]. Používá se pro něj i označení vomitoxin [11]. Jeho chemická struktura je zobrazena na obrázku 11. Je produkován zástupci rodu *Fusarium*. Zejména druhy *Fusarium graminearum* a *Fusarium culmorum* [9]. Oba druhy mají jiné optimální podmínky pro růst, což nejspíše ovlivňuje geografické rozložení. Ve vyspělých zemích jsou zrna sušena při vlhkosti menší než 13 %. Tak se zabrání růstu plísní, ale pořád může dojít ke kontaminaci před sklizní. V zemích, kde se vlhkost tolik nekontroluje dochází ke kontaminaci při skladování. V současné době jsou plísně s produkcí deoxynivalenolu závislé především na povětrnostních podmínkách. Dále jsou podporovány nízkou teplotou a vysokou vlhkostí [37].

Deoxynivalenol se vyskuteje prakticky všude na světě, kde se pěstují obiloviny. Je to nejběžnější a nejvíce známý mykotoxin, který kontaminuje potraviny a krmiva z obilovin [1]. V odebraných vzorcích se vyskytuje skoro se 100% jistotou [32]. Bývá používán jako indikátor upozorňující na přítomnost dalších mykotoxinů [21]. Je dokonce považován za nejdůležitější mykotoxin v řadě států. Mezi ně patří Rakousko, Kanada, Itálie, Švédsko, Velká Británie, USA a v oblastech jižní Afriky. Kontaminace může být částečně eliminována dodržováním správné zemědělské praxe a použitím vhodných agrotechnických opatření a prostředků na ochranu rostlin [1]. Přítomnost jde poznat podle načervenalých, bělavých, nápadně lehkých nebo scvrklých zrn [32]. Koncentraci deoxynivalenolu v ječmeni lze snížit během namáčení až o 80-100 %. Při klíčení však jeho obsah opět vzroste a to až o 300 %. To je důvod, proč slad obsahuje více tohoto toxinu než ječmen. Nejvyšší koncentrace jsou obvykle pozorovány u pšenice, ječmene, kukuřice a výrobků z nich. Dále se vyskytuje i v ostatních obilovinách a výrobcích z nich (rýže, proso, čirok, otruby, chléb, špagety, nudle, pivo, koriandr, zázvor, sojové boby, slunečnice, česnek a brambory). V obilovinách se deoxynivalenol často společně vyskytuje s nivalenolem a T-2 toxinem [1]. Podle počítačové simulace v USA se

ukázalo, že roční ztráty na úrodě pšenice a obilí spojené s deoxynivalenolem dosahují 637 milionů dolarů [11].



Obrázek 11 - Strukturální vzorec deoxynivalenolu [21]

DON je považován za vysoce stabilní a dokáže přežít různé způsoby zpracování, jako je mletí, pečení, ohřev a práškování [37]. Degradace byla pozorovaná až při teplotách vyšších než 210 °C [21]. Některá chemická činidla ho dokážou degradovat, ale nepoužívají se, protože nejsou vhodné ke zpracování obilí nebo samy o sobě představují závažné zdravotní rizika. Stabilní je v slabě kyselém prostředí. V zásaditém prostředí se naopak rozkládá [37].

Deoxynivalenol je méně toxický než ostatní trichotheceny. Ve vysokých dávkách však může způsobit smrt podobnou šoku. Je nepravděpodobné, že bychom se s tak vysokými dávkami setkali v potravinách. Mechanismus účinku zahrnuje narušení buněčné struktury, inhibici syntézy proteinu a vyvolání apoptózy. Mechanismus těchto účinků však ještě nebyl plně vysvětlen [37]. Při intoxikaci dojde k poklesu tvorby protilátek a snížení počtu leukocytů [32]. Deoxynivalenol vykazuje imunosupresivní a teratogenní účinky. Záleží také na dávce a délce expozice. Mezi příznaky akutní toxicity patří úzkost, zvýšené slinění, kožní změny, malátnost, průjem, zvracení a anorexie. U chronické toxicity to je úbytek hmotnosti, odmítání potravy a anorexie. Experimentální zvířata jsou citlivá podle následujícího pořadí: prasata > myši > krysy > drůbež > přežvýkavci. To je způsobeno rozdílnou absorpcí, distribucí, metabolismem a eliminací deoxynivalenolu [37].

Nejcitlivější jsou prasata, u kterých dochází ke snížení příjmu a celkovému odmítnutí krmiva, snížení přírůstku a zvracení při koncentraci vyšší než 0,7 mg DON/kg krmiva. Toxické efekty jsou pozorovatelné už od koncentrace 0,25 mg DON/kg krmiva. U přežvýkavců se snižuje užitkovost a příjem krmiva. Drůbež snižuje hmotnost vejce a kvalitu skořápky [32]. Lze předpokládat, že u lidí může vyvolat podobné účinky jako u zvířat [37]. V Kašmíru došlo v roce 1987 k otravě 50 000 osob, které měli gastrointestinální onemocnění nazvané akutní

DON toxikózou. V roce 1980 zase v Indii a Číně k otravě tzv. červenou plísní (red mold poisoning) [1]. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC/WHO) klasifikuje deoxynivalenol ve skupině 3, která není karcinogenní pro člověka [37]. Maximální denní tolerovatelný příjem byl stanoven na 1 µg/kg tělesné hmotnosti na den [1]. Ve většině potravinářských výrobků jsou stanoveny maximální tolerované hladiny od 500 po 1000 µg/kg. Maximální úroveň u surových obilovin povolených Evropskou unií je 1250 µg/kg [11]. V USA a Kanadě je limit 4 mg/kg v krmivu. Pro dojnice je kritická koncentrace 5 mg/kg krmiva. V Česku je stanoven maximální obsah deoxynivalenolu v obilovinách na 2 mg/kg. V mouce je limit stanoven na 1 mg/kg [32]. Analýza metodou ELISA je cenově mnohem dostupnější než GC-MS nebo LC-MS, avšak výhodou technik s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie je, že lze detekovat více trichothecenů a dalších mykotoxinů najednou [36].

### Fusarenon X

Poprvé byl tento mykotoxin izolován v roce 1968, avšak ve výzkumech na něj můžeme narazit jen zřídka. Je produkován různými druhy rody *Fusarium*. Mezi nejčastější patří *Fusarium nivale*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium sporotrichioides* a *Fusarium sambucinum*. Nejčastěji se vyskytuje v teplých subtropických oblastech světa. Kontaminuje česnek, kukuřici, oves a pšenici.

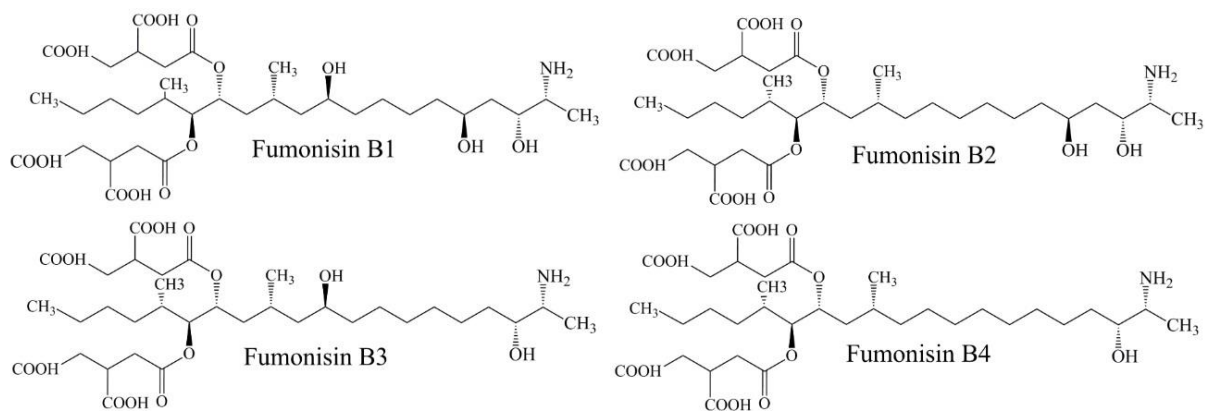
Patří mezi selektivní inhibitory syntézy proteinu a DNA, inhibice syntézy RNA nebyla ovlivněna. Primárně napadá proliferující tkáň s vysokým dělením, nejčastěji slezinu, kostní dřev a střevní sliznici. Na experimentálních zvířatech byly prokázány imunosupresivní, cytotoxické a emetické účinky. Způsobuje průjem, podchlazení a sníženou frekvenci dýchání. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny dospěla k závěru, že u pokusných zvířat nejsou dostatečné důkazy o jeho karcinogenitě, u lidí nejsou k dispozici žádné údaje. Látka byla klasifikována do skupiny 3 [37].

#### 1.4.5 Fumonisin

Fumonisin byly objeveny v roce 1988. Jsou hydrofilní povahy, čímž se liší od ostatních mykotoxinů, které mohou být rozpuštěny v organických rozpouštědlech [7]. Byly izolovány z kukuřice především z plísní *Fusarium verticillioides* a *Fusarium moniliforme* [1, 7]. Při pokusech na koních bylo zjištěno, že způsobují onemocnění nazývané leukoencefalomalacie. Tím se potvrdila souvislost tohoto onemocnění s konzumací plesnivého krmiva. [1] U prasat způsobují plicní edém. V roce 1989 došlo k smrtelné chorobě prasat krmených kukuřicí napadenou plísní *Fusarium verticillioides* v Iowě, Illinois a Gruzii [37].

Pro hospodářská zvířata představují závažné riziko a při vyšší intoxikaci mohou vést ke smrti [21].

V současné době je známo více než 28 fumonisinů, které jsou rozděleny do čtyř skupin (A, B, C a P) [7]. Fumonisy zabraňují biosyntéze sfingolipidů, které se nacházejí ve větším množství v mozku a v nervové tkáni, kde jsou potřebné pro stavbu a fyziologickou činnost buňkové stěny. Nejvýznamnější jsou fumonisy B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> a B<sub>3</sub>, které se běžně vyskytují v přírodě jako kontaminanty potravin a krmiv [1]. V Číně bylo v roce 2014 pozitivních 98 % vzorků kukuřice z provincie Šan-tung [7]. Jsou to vysoce polární, ve vodě rozpustné diestery propan 1,2,3-trikarboxylové kyseliny s pentahydroxydimethyleikosanem, který obsahuje vázanou aminoskupinu. Typy fumonisinů se pak liší typem navázaných funkčních skupin, které jsou zobrazeny na obrázku 12 [21]. Nejčastějším fumonisinem je B<sub>1</sub> a celkově tvoří 70-80 % této skupiny. Je řazen do skupiny 2B jako pravděpodobně karcinogenní [7]. Kromě kukuřice se mohou nacházet i ve fazolích, rýži, kořeni, pivu, nudlích a chlebu. U zvířat způsobují závažné poruchy jater, ledvin a srdce. Výzkumy naznačují spojitost s rakovinou jícnu u člověka. Další účinky na lidské zdraví jsou nejasné. Prozatím je stanoven tolerovatelný denní příjem na 2 µg/kg tělesné hmotnosti na den [37].

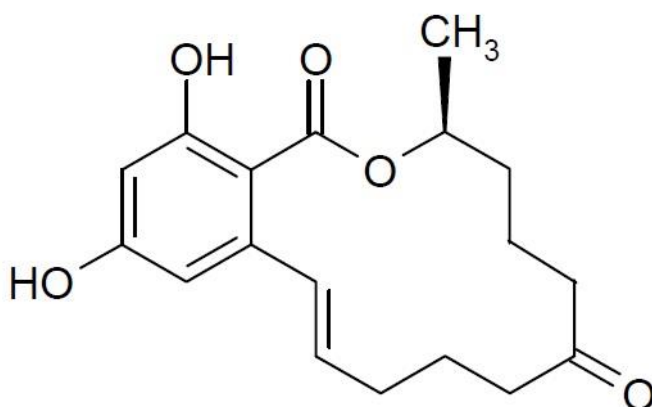


Obrázek 12 - Chemická struktura fumonisinu B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> a B<sub>4</sub> [26]

#### 1.4.6 Zearalenon

Zearalenon byl objeven ve spojitosti s reprodukční poruchou u prasat známou jako vulvovaginitida. Tento zánět byl způsobován zkrmováním plesnivé kukuřice [37]. Mykotoxin byl izolován z kultury *Gibberella zeae* na mleté kukuřici. Nejdříve dostal název F-2 toxin a později byl přejmenován na zearalenon. Jeho chemická struktura byla objasněna v roce 1966 a je zobrazena na obrázku 13 [1].

Hlavními producenty jsou plísně *Fusarium semitectum* a *Fusarium graminearum*, která je schopná produkce zearalenonu v koncentraci až 1900 µg/kg, což odpovídá hmotnosti suchého obilí [1, 7]. Ideální teplotní podmínky pro jeho tvorbu jsou 12-14 °C. Je však prokázána produkce i při teplotách nižších než 10 °C a dokonce i pod 0 °C [1]. Jeho tvorbu podporuje i vysoká vlhkost. Vyskytuje se v mírných oblastech Evropy, Ameriky a Asie [7]. Zearalenon je navíc velmi stabilní sloučenina. Zůstává neměnná při skladování, mletí a dalším zpracování jako fermentaci a vaření potravin. Při vyšších teplotách nedochází k jeho degradaci [37].



Obrázek 13 - Strukturální vzorec zearalenonu [21]

Z chemického hlediska jde o lakton kyseliny β-resorcilové. Existuje i několik jeho derivátů [1]. Strukturálně se podobá přirozeně se vyskytujícím estrogenům a je popsán jako estrogení mykotoxin [7]. Zearalenon a jeho deriváty vytěsňují estradiol z proteinu vázajícího uterin, který nese estrogení odpověď [37]. To má za následek změny a léze v ženském reprodukčním systému. Dále byla u domácích nebo laboratorních zvířat pozorována neplodnost, otok dělohy a vulvy, resorpce embrya a atrofie vaječníku. U skotu je konzumace s vysokým obsahem zearalenonu přímo spojena s neplodností a sníženou produkcí mléka [7]. Není akutně toxický, i při relativně vysoké orální aplikaci u zvířat nezpůsobil smrt [1]. Je klasifikován do skupiny 3 jako pravděpodobně nekarcinogenní pro člověka [7]. Může se však uplatnit jako promotor [1]. U malých dětí a plodů může dojít k intoxikaci, která vede k předčasnému vývoji druhotných pohlavních znaků a zvětšení prsou. Je možné, že snižuje i mužskou plodnost [37].

Nachází se především v cereáliích a cereálních produktech [1]. V USA a Kanadě kontaminuje především kukuřici a pšenici. V evropských zemích se jedná především o pšenici, žito a oves [7]. Dále může kontaminovat ječmen, pivo, slad, cornflakes, popcorn, chléb, rýži,

čirok, ořechy, banány a různé koření. V obilovinách se často vyskytuje v přítomnosti jiného fuzáriového mykotoxinu. Slouží tak jako indikátor výskytu především trichothecenů [1]. Nejčastěji se objevuje společně s deoxynivalenolem [7]. Potraviny na bázi obilovin pro kojence a malé děti mohou obsahovat maximálně 20 µg/kg. Chleba, pečivo a sušenky mohou obsahovat 50 µg/kg. Pro obiloviny určené k přímé lidské spotřebě je to 75 µg/kg. U nezpracované kukuřice to může být až 350 µg/kg. Hodnoty pro krmné směsi se pohybují okolo 2 mg/kg [8].

## 1.5 Úprava vzorku před analýzou

### 1.5.1 Odběr vzorku

Jedním z nejdůležitějších kroků při analýze mykotoxinů je odběr vzorku. Proces vzorkování značně ovlivňuje spolehlivost výsledků celé analýzy. Pokud dojde k chybě při odběru vzorku nebo jeho skladování, tak je prakticky nemožné tuto chybu napravit. Vzorky potravinových surovin, potravin a krmiv jsou ve většině případů nehomogenní. Vzhledem k nerovnoměrnému zastoupení mykotoxinů v obilovinách, potravinách a krmivech je obtížné získat reprezentativní vzorek. Pevné vzorky je nutné rozložit a dezintegrovat ve vhodném zařízení. Odběry vzorků se musí provádět z šarží o značné hmotnosti či počtu jednotek. Velmi důležité je dodržování pravidel vzorkování dle příslušné legislativy a dostatečné zhomogenizování zpracovaných vzorků. Tyto metody odběru vzorků jsou popsány v nařízení Komise (ES) č. 401/2006. Dále existují různé směrnice. Například směrnice o odběru vzorků pro analýzu aflatoxinů nebo pro odběr vzorku a analýzu ochratoxinu A. V rámci států jsou vydávány vyhlášky a různé postupy. To vše vede ke zlepšení odběru vzorků a analýze mykotoxinů v potravinách a krmivech [1, 7, 40-45].

### 1.5.2 Extrakce

K extrakci mykotoxinu z matrice se volí extrakční rozpouštědlo podle povahy, rozpustnosti příslušného mykotoxinu a s ohledem na extrahovaný materiál a další zpracování extraktu. Pro extrakci mykotoxinů ze zrn, obilných potravin a jiných pevných materiálů se využívá extrakce pomocí různých organických rozpouštědel. Vzhledem k charakteru a stálosti mykotoxinů se extrahují za laboratorní teploty v neutrálním nebo kyselém prostředí. Nejčastěji používaná činidla k extrakci mykotoxinů jsou methanol [46], chloroform [47], aceton [47], dichlormethan [47], acetonitril [48], ethylacetát [49], případně jejich směsi s vodou [1, 7, 40-42, 47]. Nejčastěji používané rozpouštědlo pro extrakci mykotoxinů je vodný roztok acetonitrilu [47, 50-55]. U stanovení ZEA se používá směs acetonitrilu

s methanolem [56, 57]. K těmto rozpouštědlům nebo jejich směsím jsou často přidávány modifikátory ve formě kyselin nebo zásad v závislosti na vlastnostech mykotoxinu a matrice vzorku [1, 7, 40, 45]. Kyselé rozpouštědlo může přerušit silné vazby mezi analytem a jinými složkami potravin, jako jsou bílkoviny a cukry, což vede ke zvýšení účinnosti extrakce. Při použití 50-80% vodného roztoku metanolu jako extrakčního činidla bylo dosaženo zlepšení účinnosti extrakce přidávkem NaCl [1]. U vzorků s vysokým obsahem tuků musí být tuk nejprve odstraněn extrakcí nepolárními rozpouštědly jako hexan nebo cyklohexan. Poté následuje extrakce mykotoxinů [1, 7, 40-42, 47].

### 1.5.3 Čištění

Čištění extraktu je časově nejpracnější a nejnáročnější částí při analýze mykotoxinu. Je to důležitý proces pro odstranění interferujících látek, které by mohli překážet při následné detekci mykotoxinů. Čištěním extraktu se zvýší celková správnost a přesnost analýzy. K čištění se používají následující metody [1, 7, 40-42, 47]:

#### Extrakce kapalina-kapalina

Metoda používaná při čištění extraktů některých mykotoxinů, která je založená na různé rozpustnosti látek ve dvou nemísitelných kapalinách. Používala se hlavně pro stanovování aflatoxinů a ochratoxinu A v 70.-80. letech 20. století [1].

#### Imunoafinitní chromatografie (IAC)

Používá se pro čištění extraktu na imunoafinitní kolonce. Tato metoda má vysokou specifitu, menší spotřebu organických rozpouštědel a menší časovou náročnost. Tyto kolonky jsou naplněny aktivovanou pevnou fází vázanou na specifickou protilátku pro daný mykotoxin. Když extrakt prochází kolonkou, tak je mykotoxin specificky navázán na protilátku v kolonce. Následně dochází k promytí kolonky promývacím pufrům pro odstranění všech balastních látek. Poté je mykotoxin eluován eluční směsí, jako je například metanol nebo okyselený metanol. Tato metoda je vhodná pro stanovení aflatoxinů, ochratoxinu A, deoxinivalenolu, fumonisinů a zearalenonu [1, 7, 40-42, 47]. K přečištění fumonisinů může být použita kolonka FumoniStar<sup>TM</sup> [6]. Pro čištění DON, ZON, T-2 a HT-2 může být použita kolonka DZT<sup>®</sup> [6]. Přečištění aflatoxinů je možné na kolonce Aflaprep [58], AflaStar<sup>TM</sup>Fit a AFLAOCHRA HPLC<sup>TM</sup> [6]. Ochratoxiny mohou být přečištěny pomocí kolonek OCHRAPREP<sup>®</sup> [58]. Kolonky Donprep<sup>®</sup> slouží k přečištění DON [6, 58].

### Extrakce na pevnou fázi (SPE)

SPE je metoda založená na adsorpci mykotoxinů ze vzorku na kolonci plněné různou stacionární fází. Poté jsou mykotoxiny eluovány vhodným organickým rozpouštědlem. Sorbenty jsou z různých nepolárních, středně polárních i polárních materiálů na bázi modifikovaného silikagelu, polymeru (styrendivinilbenzen), křemičitanu hořečnatého nebo silné kationtové nebo aniontové iontoměniče (SCX, SAX, C18-AX, C18-CX, CBA). Existuje široká škála komerčně dostupných SPE kolonek [1, 7, 40]. Vhodné pro čištění všech mykotoxinů jsou kolonky MycoSep®, které obsahují směs dřevěného uhlí, iontoměničových pryskyřic a dalších materiálů [40, 50, 52-55, 59, 60]. Pro stanovení DON, ZON, T-2 a HT-2 může být použita kolonka PuriTox MultiToxin [58]. Pro trichotheceny typu A a B je možné použít kolonku Trichothecene EP column [6]. Sorbenty jsou voleny na základě potravinové matrice, chemické povahy mykotoxinu a použitého rozpouštědla. Tato metoda je vhodná především pro stanovení trichothecenů, patulinu, sterigmatocystinu a zearalenonu. Metody SPE a IAC jsou nejčastěji používané pro svou rychlost, účinnost, reprodukovatelnost, bezpečnost a široký rozsah selektivity [1, 7, 40]. IAC kolonky jsou v porovnání s SPE selektivnější a produkují čistší extrakty s minimálním množstvím interferujících složek. Díky své vysoké selektivitě však nejsou vhodné pro analýzu multimykotoxinů, protože často dojde k navázání pouze jednoho cílového mykotoxinu [40].

### Gelová filtrace (GPC)

Je to metoda, která se používá pro separaci složek z kapalného média. Látky s vyšší molekulovou hmotností procházejí kolonou snadněji. Naopak menší molekuly přechodně vstupují do pórů gelu a jsou tak zadržovány. Při analýze mykotoxinů slouží především k odstranění lipidových sloučenin a rostlinných nebo živočišných pigmentů. V Česku se metoda používá pro stanovení patulinu a zearalenonu [1].

### QUECHERS

Pojmenování pochází ze slov quick, easy, cheap, effective, rugged and safe. Je to rychlá extrakční metoda, kdy v jednom kroku dojde k extrakci a vyčištění vzorku. Byla vyvinuta v roce 2003 pro analýzu pesticidů, poté byla upravena pro širokou škálu matric a analytů. Nejčastěji se používá pro analýzu mykotoxinů z obilovin, vedlejších produktů živočišného průmyslu (mléko, vejce), vína, kávy a koření. Tato metoda zahrnuje dvoustupňovou extrakci rozpouštědlem (acetonitril s NaCl a MgSO<sub>4</sub>) a disperzní SPE (silikagel samotný nebo s navázanými C18 skupinami, grafitový prášek) pro čištění. QUECHERS je rychlá, levná a



jednoduchá metoda a ve srovnání s jinými metodami používá minimální množství rozpouštědla [7, 42, 47, 61].

## 1.6 Metody analýzy

### 1.6.1 Imunochemická metoda ELISA

ELISA je rychlý enzymový imunosorbentní test založený na reakci antigenu (mykotoxinu) s protilátkou, u níž se měří množství navázaných látek pomocí přidání enzymem značeného antigenu či protilátky. V nejjednodušším případě soupeří antigen s enzymem značeným antigenem o omezený počet vazebných míst na protilátce. Čím vyšší je koncentrace antigenu, tím nižší je koncentrace enzymem značeného antigenu. Množství enzymem značeného antigenu bude určovat stupeň zbarvení. Výsledkem je barevný produkt, který se ve většině případů měří spektrofotometricky. Koncentrace produktu je úměrná koncentraci antigenu nebo protilátky ve vzorku. Jsou možné i jiné způsoby detekce. Například amperometrické, fluorimetrické nebo použití diferenční pulsní voltametrie. Testy ELISA jsou většinou prováděné na mikrotitračních destičkách, které jsou vhodné pro větší skupiny vzorků. Vhodná je i miniaturizace analýzy a menší spotřeba chemikálií. Hodnota koncentrace analytu se určuje z kalibrační křivky sestavené pomocí standardů. Díky obrovské citlivosti je možné stanovit analyt v množství  $10^{-9}$  až  $10^{-12}$  g. Metoda poskytuje rychlý, specifický a relativně snadný způsob analýzy mykotoxinů. Existuje spousta komerčně dostupných kitů pro detekci a analýzu všech hlavních mykotoxinů. Nicméně metoda má i svoje nevýhody. Souprava detekuje pouze jeden mykotoxin a je určena pouze na jedno použití. Je tedy nevhodná pro analýzu vzorků, které jsou kontaminované dvěma nebo více mykotoxiny. Zjevně takto byly identifikovány mykotoxiny DON, OTA, fumonisiny a aflatoxin B<sub>1</sub> [1, 7, 11, 47, 62-65].

### 1.6.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je v současné době nejrozšířenější metodou pro stanovení jednotlivých mykotoxinů. HPLC je moderní separační technika, která vyniká schopností rozdělit několika složkové směsi s vysokou efektivitou v krátkém čase. Je to soubor metod, založených na různém mechanismu separace, jejichž společným znakem je použití vysokotlakých čerpadel k pohánění kapalné mobilní fáze a účinných kolon, jako nosiče stacionární fáze pro rychlou analýzu. Tato metoda dosahuje vysoké účinnosti a rychlosti především díky kolonám, které jsou plněny náplněmi s velmi jemnými částicemi o velikosti 3-7  $\mu\text{m}$  a vysokých průtoků mobilní fáze. K tomu je potřeba použití vysokotlakých

čerpadel a konstrukce celého přístroje, která odolá tlakům v rozmezí 30-60 MPa. Vzorek je dávkován do mobilní fáze nejčastěji pomocí šesticestného dávkovacího ventilu a dále je vzorek unášen do chromatografické kolony. Na chromatografické koloně dochází k dělení analytů (mykotoxinů). Dochází k opakovanému procesu distribuce vzorku mezi kapalnou mobilní a tuhoun stacionární fází a tak dochází k jejich separaci [1, 7, 11, 43-45, 62]. Během separace dochází k mnoha typům vzájemných interakcí mezi molekulami stacionární a mobilní fáze a mezi molekulami vzorku. Volbou mobilní a stacionární fáze můžeme ovlivnit proces separace a měnit tím eluci separovaných složek. Je potřeba zmínit i ultra-vysokoučinnou kapalinovou chromatografii (UHPLC), která využívá chromatografických kolon plněných částicemi menšími než 2 $\mu$ m a umožňuje tak rychlé separace. Při separacích dochází k vývinu velkého tlaku (až 130 MPa), proto musí být použity speciální přístroje, které jsou odolné vůči takto vysokým tlakům [1, 7, 47, 66, 67].

Při analýze mykotoxinů se v kapalinové chromatografii nejčastěji používá systém s obrácenými fázemi, kde můžeme separovat látky nepolární i polární. U tohoto systému je mobilní fáze polárnější než fáze stacionární. Jako stacionární fáze se používají chemicky vázané nepolární fáze (C4, C8, C18, fenyl, alkylfenyl, nitril) na silikagelu jako nosiči [42, 68-70]. V drtivé většině prací je používána oktadecylsilikagelová stacionární fáze [42, 47, 50, 52, 53, 55]. Mobilní fáze je polární a nejčastěji se jedná o směs vody a organického polárního rozpouštědla, jako metanol, acetonitril, etanol nebo tetrahydrofuran [50, 52, 53, 55]. Pro zlepšení separace nebo lepší tvorbu aduktů a zlepšení citlivosti hmotnostně spektrometrické detekce se často používá kyselina octová nebo mravenčí v kombinaci s octanem či mravenčanem amonným [42].

Je možné použít celou řadu detektorů. Nejčastěji se používá spojení HPLC se spektrofotometrickou, fluorescenční nebo hmotnostně spektrometrickou detekcí. Detektor je spojen se zařízením pro automatické vyhodnocení dat. Závislostí signálu z detektoru na čase získáme chromatogram. Jednotlivé píky odpovídají jednotlivým složkám ve zkoumané směsi. Ke zjištění kvality používáme retenční časy standardů a vzorků. Ke zjištění množství mykotoxinů se využívá plocha píků, v některých případech i výška píků [1, 7, 11, 43-45, 62].

Výhodou je spojení HPLC s hmotnostním spektrometrem (MS), nejčastěji s trojitým kvadrupólem jako analyzátozem, jelikož nám umožňuje vynechat krok přečištění, který bývá materiálově i časově náročný. Vynecháním kroku přečištění a používáním surových extraktů se zvyšují nároky na selektivitu detektoru a zkoumání účinků různorodých matic, které mohou ovlivnit účinnost ionizace. K překonání tohoto problému se používají izotopicky značené vnitřní standardy, které jsou však velmi drahé a nejsou dostupné pro každý analyt [7, 40-42].

Nejčastěji se pro ionizaci používá elektrosprej (ESI) nebo chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a to při záznamu kladných i záporných iontů [7, 40, 42, 50, 52, 53, 55]. Pro některé mykotoxiny je dokonce APCI vhodnější než ESI. U analýzy trichothecenů typu A i B je nutné použít oba režimy snímání iontů, jak kladný, tak záporný [40]. Zvýšit špatnou odezvu trichothecenů bez jakéhokoli čištění vzorku v režimu ESI o přibližně jeden řád je možné přidáním NaCl (100  $\mu$ M) k eluentu. Dojde k vytvoření stabilních aduktů se sodíkovým iontem a zjednodušení spektra [53].

Ionty jsou separovány a identifikovány podle jejich poměru hmotnost/náboj ( $m/z$ ). Výsledkem je hmotnostní spektrum. Z polohy čar v spektru se získají údaje o kvalitě. Z výšek pak získáme údaje o kvantitě mykotoxinu. Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie umožní jednoznačnou identifikaci vzorku. Současně může identifikovat několik mykotoxinů ve vzorku, což z něj činí nejlepší metodu pro stanovování více mykotoxinů v široké škále potravin a krmiv [1, 7, 11, 43-45, 62].

## 2 Experimentální část

### 2.1 Použité přístroje a zařízení

Hmotnostní spektrometr QTRAP 4500

ABSCIEX, USA

Kapalinový chromatograf

- Čerpadla mobilní fáze LC-20AD
- Směšovač mobilní fáze
- Autosampler SIL-20A
- Termostat kolon LCO 102 single

Shimadzu, Kyoto, Japonsko

Shimadzu, Kyoto, Japonsko

Shimadzu, Kyoto, Japonsko

Ecom, Praha

Kolona C18 150 mm x 3,0 mm, 2,7  $\mu$ m

Ascentis Express, Sigma Aldrich, USA

Mlýnek, Retsch GM 200

Fisher Scientific, Pardubice

Analytické váhy

Sartorius, Německo

Homogenizátor Ultra-Turrax T 18

IKA, Německo

Automatické pipety Biohit-Proline

Biohit, Finsko

Překlopná třepačka Reax 2

Heidolph Instruments, Německo

Centrifuga Universal 320

Fisher Scientific, Pardubice

Sušicí vana s přívodem dusíku

Miulab, Čína

Centrifuga 5424

Eppendorf, Německo

### 2.2 Použité chemikálie

Acetonitril (ACN)

Sigma Aldrich, USA

Deonizovaná voda (W)

MILI-Q, Merck Milipore, Německo

Kyselina mravenčí (FA)

TCI Europe, Japan

Ethylacetát

Lach-Ner, s.r.o., ČR

Mravenčan amonný

Sigma Aldrich, USA

## 2.3 Použité vzorky

Vzorky kontaminovaného ječmene, byly poskytnuty Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským v Brně. Suma koncentrace mykotoxinů HT-2 a T-2 ve vzorcích uvedených v tabulce 5 byla stanovena imunochemickou metodou ELISA.

Tabulka 5 - Vzorky kontaminovaného ječmene

Identifikace	označení	$\Sigma$ HT-2; T-2 [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
ječmen	80/385	1455,5
ječmen	80/770	3072,5

## 2.4 Pracovní postup

### 2.4.1 Extrakce mykotoxinů

Vzorky kontaminovaného ječmene šarže 80/770 a 80/385 byly postupně rozemlety v mlýnku a následně homogenizovány. Na analytických vahách bylo přesně naváženo 2,5 g vzorku. K takto připraveným vzorkům bylo postupně přidáváno 10 ml různých rozpouštědel, či jejich směsí. Byly použity 80% acetonitril, 80% acetonitril okyselený 0,1% kyselinou mravenčí, 80% acetonitril okyselený 1% kyselinou mravenčí a ethylacetát. Celkem byly připraveny 4 vzorky z šarže 80/770 a 4 vzorky z šarže 80/385 lišící se extrakčním rozpouštědlem. Vzorky byly třepány na překlopné třepačce při laboratorní teplotě jednu hodinu. Následně byl vzorek centrifugován po dobu 10 minut. 5 ml extrahovaného rozpouštědla bylo odpipetováno a poté vysušeno pod proudem dusíku. Vysušené extrakty byly až do analýzy uchovány v chladničce při teplotě 4 °C. Před analýzou bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  acetonitrilu. Rozpuštěné extrakty byly opět centrifugovány, přefiltrovány přes PTFE stříkačkový filtr a analyzovány pomocí optimalizované HPLC/MS metody.

### 2.4.2 Separace a podmínky měření

Chromatografická separace probíhala na oktadecylsilikagelové koloně Ascentis Express C18 o délce 150 mm, o průměru 3,0 mm a velikosti částic 2,7  $\mu\text{m}$ . Dávkovaný objem je 5  $\mu\text{l}$ .

### **HPLC parametry**

Mobilní fáze se skládala z 0,05 mM  $\text{NH}_4\text{COOH}$  okyseleného 0,1%  $\text{HCOOH}$  a acetonitrilu. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min a teplota kolony byla nastavena na 30 °C.

Separace probíhala za lineární gradientové eluce, při které se koncentrace ACN v průběhu zvyšovala z 15 % na 100 % za 3 minuty.

### MS parametry

Ionizace ESI- a ESI+, napětí na kapiláře – (+) 4500 V, vstupní potenciál - 10 V, deklastrační potenciál (DP) v závislosti na sloučenině dle tabulky 6.

Tabulka 6 - Retenční časy, sledované adukty a deklastrační potenciály analyzovaných mykotoxinů [71]

Mykotoxin	Retenční čas [min]	Adukt	m/z	DP [V]
ESI -				
NIV	1,68	[M+HCOO] <sup>-</sup>	357	-30
DON	2,25	[M+HCOO] <sup>-</sup>	341	-30
HT-2	3,57	[M+HCOO] <sup>-</sup>	469	-60
T-2	4,01	[M+HCOO] <sup>-</sup>	511	-60
ESI +				
DON	2,25	[M+H] <sup>+</sup>	297	70
HT-2	3,57	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	442	70

## 3 Výsledky a diskuze

### 3.1 Identifikace mykotoxinů

Identifikace trichothecenových mykotoxinů byla provedena v extraktech z kontaminovaného ječmene za použití kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Byla zjišťována přítomnost mykotoxinů NIV, DON, HT-2 a T-2. Retenční časy a optimalizovaná metoda byla převzata z předchozí diplomové práce [71]. Ve všech připravených vzorcích byly na základě pozorovaných záznamů vybraných iontů stanoveny toxiny T2 a HT-2. T2 toxin byl pozorován při záznamu kladných iontů a HT-2 toxin při záznamu záporných iontů. Podle výšky píků těchto toxinů byla porovnána účinnosti extrakce s využitím různých rozpouštědel.

### 3.2 Účinnost extrakce

Optimalizovanou metodou byly analyzovány extrakty připravené pomocí čtyř různých rozpouštědel - 80% acetonitril, 80% acetonitril okyselený 0,1% kyselinou mravenčí,

80% acetonitril okyselený 1% kyselinou mravenčí a ethylacetát. Na základě výšek píků jednotlivých toxinů byla porovnána účinnost jednotlivých extrakčních činidel. Naměřené hodnoty při záznamu kladných i záporných iontů jsou uvedeny v tabulce 7.

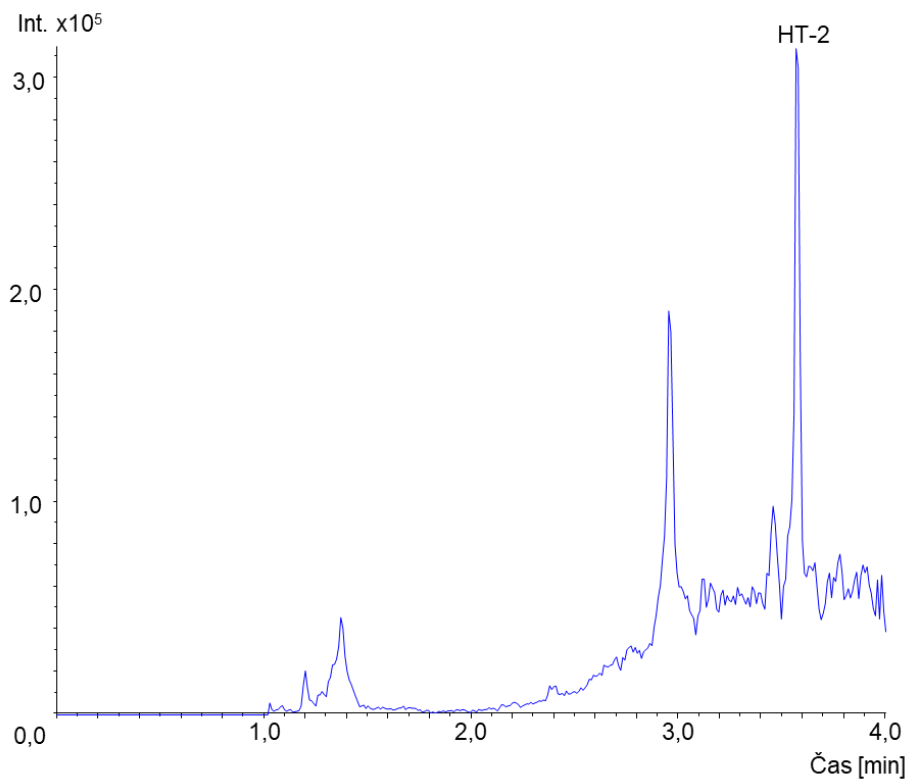
Tabulka 7 - Naměřené hodnoty HT-2 a T-2 toxinu

Vzorek	Rozpouštědlo	HT-2 (ESI-)	T-2 (ESI+)
		Výška píku	Výška píku
80/770-1	80% acetonitril	252 340	566 202
80/770-2	80% acetonitril okyselený 0,1% kyselinou mravenčí	125 980	119 122
80/770-3	80% acetonitril okyselený 1% kyselinou mravenčí	122 040	84 100
80/770-4	ethylacetát	79 690	109 900
80/385-1	80% acetonitril	446 848	237 940
80/385-2	80% acetonitril okyselený 0,1% kyselinou mravenčí	367 070	176 198
80/385-4	ethylacetát	76 900	393 921

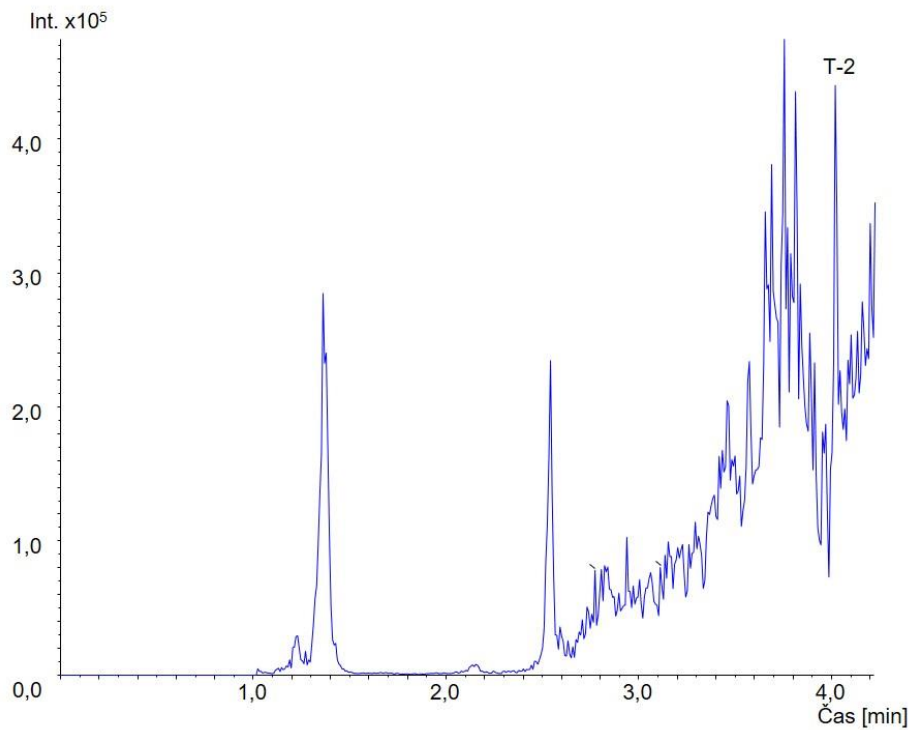
Nejvyšší množství mykotoxinů bylo ze vzorků extrahováno při použití směsi acetonitrilu s vodou bez přídavku kyseliny. U okyselených směsí 80% acetonitrilu byla pozorována podobná účinnost extrakce obou toxinů. Množství kyseliny tedy extrakci těchto mykotoxinů neovlivňuje. Je to zvláštní jev, jelikož okyselením by mělo dojít k lepšímu uvolnění mykotoxinu z matrice, které je způsobené rozrušením vazeb mezi mykotoxiny a jinými složkami vzorku [47]. Nejmenší množství mykotoxinů bylo pozorováno při použití ethylacetátu jako extrakčního činidla.

Na obrázcích 14 a 15 jsou uvedeny ukázky chromatografické separace při záznamu záporných iontů u vzorku 80/770 a kladných iontů u vzorku 80/385. Jak je patrné z obou obrázků vzorky obsahují vysoký počet interferujících látek, které ztěžují identifikaci a kvantifikaci sledovaných toxinů. Tomu by se dalo zabránit přečištěním extraktu např. za použití imunoafinitní kolonky nebo SPE extrakce. Jedná se v celku o rychlé, bezpečné, účinné, reprodukovatelné a vysoce selektivní metody, které jsou vhodné k odstranění všech nežádoucích složek matrice.

Lepších výsledků by se pravděpodobně dalo docílit i zvýšením navážky. To by však vedlo k větší spotřebě chemikálií a větší časové náročnosti přípravy.



Obrázek 14 - Chromatogram vzorku 80/770 při snímání záporných iontů



Obrázek 15 - Chromatogram vzorku 80/385 při snímání kladných iontů



## 4 Závěr

Tato bakalářská práce se zabývá základní charakteristikou a popisem vláknitých mikromycet a jejich sekundárních metabolitů – mykotoxinů. Zaměřuje se především na ty, které se vyskytují v obilovinách. Jde především o plísně rodů *Aspergillus* (plísně převážně skladištní), *Penicillium* (polní i skladištní) a *Fusarium* (plísně především polní). Je nutné si uvědomit, že se přirozeně vyskytují prakticky všude a není možné úplně zabránit jejich výskytu. Kontaminují především obiloviny. Je prokázáno, že každý rok je nakaženo více než 25 % celosvětové produkce. Mohou napadat také, ovoce, zeleninu, ale i potraviny a hotové výrobky. Je nutné zmínit, že mají i pozitivní účinky, jako je například produkce antibiotik, dalších léčiv a využití ve výrobě potravin.

Dále jsou charakterizovány zástupci aflatoxinů a trichothecenů, zearanelenon, fumonisiny, ochratoxiny a patulin, které se pravidelně nachází v obilovinách. Často se vyskytují společně a mohou tak zhoršovat jejich negativní účinky. Obtížnější je pak i jejich správná identifikace. Mykotoxiny mohou způsobovat různá onemocnění. U obilnin se jedná především o nemoc zvanou „Fusarium head blight“. Ke kontaminaci může dojít v celém výrobním procesu, proto je nutné dodržovat určitá preventivní opatření a vytvořit podmínky, které nejsou vhodné pro růst plísní a tvorbu mykotoxinů. Pokud ke kontaminaci dojde, tak je nutné použitím vhodných metod dekontaminovat nebo detoxikovat obiloviny, krmivo nebo potravinu.

Poslední část práce se zabývá experimentálním stanovením trichothecenových mykotoxinů ve dvou vzorcích kontaminovaného ječmene. Pro izolaci byla vybrána čtyři rozpouštědla a byla testována jejich extrakční účinnost. Ve vzorcích byly pomocí HPLC/MS při snímání kladných a záporných iontů detekovány mykotoxiny HT-2 a T-2 a na základě intenzity pozorovaných píků byl jako nejlepší extrakční činidlo vyhodnocen 80% acetonitril.

## 5 Použitá literatura

- [1] MALÍŘ, František a Vladimír OSTRÝ. *Vláknité mikromycety (plísně), mykotoxiny a zdraví člověka*. Vyd. 1. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2003. ISBN 80-7013-395-3.
- [2] OSTRÝ, Vladimír. *Vláknité mikroskopické houby (plísně), mykotoxiny a zdraví člověka*. Praha: Státní zdravotní ústav, 1998. ISBN 80-707-1102-7.
- [3] BETINA, Vladimír. *Mykotoxiny: Chémia - biológia - ekológia*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1990. ISBN 80-05-00631-4.
- [4] POLSTER, Miroslav. *Toxigenní plísně a mykotoxiny v potravinách*. Brno: Ústav pro další vzdělávání středních zdravotnických pracovníků v Brně, 1971.
- [5] KLABAN, Vladimír. *Obecná a environmentální mikrobiologie: fascinující, neuvěřitelný a tajemný svět mikrobů v přírodním prostředí*. 1. vydání. Hradec Králové: Gaudeamus, 2018. ISBN 978-80-7435-673-5.
- [6] BĚLÁKOVÁ, Sylvie. *Mykotoxiny v pivovarských surovinách a v pivu*. Brno, 2013, Disertační práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí. Vedoucí práce Josef Čáslavský.
- [7] ALSHANNAQ, Ahmad a Jae-Hyuk YU. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2017, **14**(6) DOI: 10.3390/ijerph14060632. ISSN 1660-4601.
- [8] SMITH, Marie-Caroline, Stéphanie MADEC, Emmanuel COTON a Nolwenn HYMERY. Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in vitro Combined Toxicological Effects. *Toxins*. 2016, **8**(4), 1-5. DOI: 10.3390/toxins8040094. ISSN 2072-6651.
- [9] STREIT, Elisabeth, Gerd SCHATZMAYR, Panagiotis TASSIS et al. Current Situation of Mycotoxin Contamination and Co-occurrence in Animal Feed—Focus on Europe. *Toxins*. 2012, **4**(10), 788-809. DOI: 10.3390/toxins4100788. ISSN 2072-6651.
- [10] KALHOTKA, Libor. *Vláknité mikromycety. Plísně*. b.r. [cit. 2019-03-10]. Dostupné z: <http://docplayer.cz/1688065-Vlaknite-mikromycety-plisne-ing-libor-kalhotka-ph-d.html>

- [11] BHAT, Rajeev, Ravishankar V. RAI a A.A. KARIM. Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2010, **9**(1), 57-81. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2009.00094.x. ISSN 15414337.
- [12] WILD, C. P. a Y. Y. GONG. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis*. 2010, **31**(1), 71-82. DOI: 10.1093/carcin/bgp264. ISSN 0143-3334.
- [13] PINOTTI, Luciano, Matteo OTTOBONI, Carlotta GIROMINI, Vittorio DELL'ORTO a Federica CHELI. Mycotoxin Contamination in the EU Feed Supply Chain: A Focus on Cereal Byproducts. *Toxins*. 2016, **8**(2). DOI: 10.3390/toxins8020045. ISSN 2072-6651.
- [14] MIESLEROVÁ, Barbora, Michaela SEDLÁŘOVÁ a Aleš LEBEDA. *Houby a houbám podobné organismy v biotechnologiích*. 1. vydání. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2016. ISBN 978-80-244-4983-8.
- [15] KLABAN, Vladimír. *Svět mikrobů: ilustrovaný lexikon mikrobiologie životního prostředí*. 2. rozš. a přeprac. vyd. Hradec Králové: Gaudeamus, 2001. ISBN 80-704-1687-4.
- [16] Aspergillus\_flavus\_nakres. *Informační systém Masarykovy univerzity*. b.r. [cit. 2019-03-30]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps06/mikroorg/web/images/plisne/perokresby/Aspergillus\\_flavus\\_nakres.jpg?lang=en](https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps06/mikroorg/web/images/plisne/perokresby/Aspergillus_flavus_nakres.jpg?lang=en)
- [17] GÖRNER, Fridrich a Ľubomír VALÍK. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodoky sú prenášané požívatinami*. Bratislava: Malé centrum, 2004. ISBN 80-967-0649-7.
- [18] Mykotoxiny, tvorba a pôvodci. *Ústav biochemie a mikrobiologie VŠCHT Praha*. b.r. [cit. 2019-03-30]. Dostupné z: [http://old-biomikro.vscht.cz/vyuka/mzp/2014-03-21\\_Mykotoxiny9.pdf](http://old-biomikro.vscht.cz/vyuka/mzp/2014-03-21_Mykotoxiny9.pdf)
- [19] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [20] KUBÁTOVÁ, . Penicillium. *Přírodovědecká fakulta Univerzita Karlova*. 2006 [cit. 2019-03-31]. Dostupné z: <https://www.natur.cuni.cz/biologie/botanika/veda-a->

vyzkum/atlas-mikroskopickyh-saprotrofnich-hub-ascomycota/3-05-eurotiales-pen-subg-asp.pdf

- [21] HAJŠLOVÁ, Jana, Milena ZACHARIÁŠOVÁ, Alexandra MALACHOVÁ, Marta KOSTELANSKÁ, Vladimír KOCOUREK a Jan POUSTKA. Mykotoxiny a jejich konjugáty v potravinářských surovinách a krmivech: trendy, rizika dietární expozice, možnosti prognózy osudu při zpracování. *Vědecký výbor fytoosanitární a životního prostředí*. b.r. [cit. 2019-04-08]. Dostupné z: <http://www.phyotosanitary.org/projekty/2008/Projekt1.pdf>
- [22] CHUMCHALOVÁ, Jana, Miroslav NĚMEC, Ludmila KOTOUČKOVÁ, Zdena PÁČOVÁ, Dana SAVICKÁ, Alena KUBÁTOVÁ a Petra PATÁKOVÁ. Miniatlasy mikroorganismů: Fusarium culmorum. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze*. b.r. [cit. 2019-04-08]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlasy/fus.htm>
- [23] GUPTA, Ramesh C., Michelle A. LASHER, Ida R. Miller MUKHERJEE, Ajay SRIVASTAVA a Rajiv LALL. Aflatoxins, Ochratoxins, and Citrinin. *Reproductive and Developmental Toxicology*. Elsevier, 2017, , 945-962. DOI: 10.1016/B978-0-12-804239-7.00048-2. ISBN 9780128042397.
- [24] POHANKA, Miroslav. Aflatoxiny. *Toxicology*. Centrum pokročilých studií, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Hradec Králové, b.r. [cit. 2019-04-13]. Dostupné z: <http://www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=177>
- [25] IQBAL, S.Z., M.R. ASI a A. ARİÑO. Aflatoxins ☆. *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier, 2017. DOI: 10.1016/B978-0-12-809633-8.06021-0. ISBN 9780128096338.
- [26] KOSTIĆ, Aleksandar, Danijel MILINČIĆ, Tanja PETROVIĆ, Vesna KRNJAJA, Sladjana STANOJEVIĆ, Miroljub BARAĆ, Živoslav TEŠIĆ a Mirjana PEŠIĆ. Mycotoxins and Mycotoxin Producing Fungi in Pollen: Review. *Toxins*. 2019, **11**(2). DOI: 10.3390/toxins11020064. ISSN 2072-6651.
- [27] KRMENČÍK, Pavel a Jiří KYSILKA. Aflatoxiny. *Biotox*. b.r. [cit. 2019-04-15]. Dostupné z: <http://www.biotox.cz/toxikon/mikromycety/aflattox.php>
- [28] ISMAIEL, Ahmed a Jutta PAPENBROCK. Mycotoxins: Producing Fungi and Mechanisms of Phytotoxicity. *Agriculture*. 2015, **5**(3), 492-537. DOI: 10.3390/agriculture5030492. ISSN 2077-0472.

- [29] COSTA, Jéssica, Rodrigo RODRÍGUEZ, Esther GARCIA-CELA, Angel MEDINA, Naresh MAGAN, Nelson LIMA, Paola BATTILANI a Cledir SANTOS. Overview of Fungi and Mycotoxin Contamination in Capsicum Pepper and in Its Derivatives. *Toxins*. 2019, **11**(1). DOI: 10.3390/toxins11010027. ISSN 2072-6651.
- [30] UDOVICKI, Bozidar, Kris AUDENAERT, Sarah DE SAEGER a Andreja RAJKOVIC. Overview on the Mycotoxins Incidence in Serbia in the Period 2004–2016. *Toxins*. 2018, **10**(7). DOI: 10.3390/toxins10070279. ISSN 2072-6651.
- [31] MADRIGAL-SANTILLÁN, Eduardo, José A. MORALES-GONZÁLEZ, Nancy VARGAS-MENDOZA, Patricia REYES-RAMÍREZ, Sandra CRUZ-JAIME, Teresa SUMAYA-MARTÍNEZ, Ricardo PÉREZ-PASTÉN a Eduardo MADRIGAL-BUJAI DAR. Antigenotoxic Studies of Different Substances to Reduce the DNA Damage Induced by Aflatoxin B1 and Ochratoxin A. *Toxins*. 2010, **2**(4), 738-757. DOI: 10.3390/toxins2040738. ISSN 2072-6651.
- [32] SUCHÝ, Pavel a Ivan HERZIG. PLÍSNĚ A MYKOTOXINY, PREVENCE JEJICH VZNIKU A DEKONTAMINACE V KRMÍVECH. *Výzkumný ústav živočišné výroby*. b.r. [cit. 2019-04-27]. Dostupné z: <https://vuzv.cz/wp-content/uploads/2018/04/Hezig-Such%C3%BD-Plisne-a-mykotoxiny-2005.pdf>
- [33] IOI, J., Ting ZHOU, Rong TSAO a Massimo F. MARCONE. Mitigation of Patulin in Fresh and Processed Foods and Beverages. *Toxins*. 2017, **9**(5). DOI: 10.3390/toxins9050157. ISSN 2072-6651.
- [34] PUEL, Olivier, Pierre GALTIER a Isabelle OSWALD. Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin. *Toxins*. 2010, **2**(4), 613-631. DOI: 10.3390/toxins2040613. ISSN 2072-6651.
- [35] ZHONG, Lei, Jason CAREERE, Zhaoxin LU, Fengxia LU a Ting ZHOU. Patulin in Apples and Apple-Based Food Products: The Burdens and the Mitigation Strategies. *Toxins*. 2018, **10**(11). DOI: 10.3390/toxins10110475. ISSN 2072-6651.
- [36] SHANK, Roxanne A., Nora A. FOROUD, Paul HAZENDONK, François EUDES a Barbara A. BLACKWELL. Current and Future Experimental Strategies for Structural Analysis of Trichothecene Mycotoxins—A Prospectus. *Toxins*. 2011, **3**(12), 1518-1553. DOI: 10.3390/toxins3121518. ISSN 2072-6651.

- [37] YAZAR, Selma a Gülden OMURTAG. Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. *International Journal of Molecular Sciences*. 2008, **9**(11), 2062-2090. DOI: 10.3390/ijms9112062. ISSN 1422-0067.
- [38] MCCORMICK, Susan P., April M. STANLEY, Nicholas A. STOVER a Nancy J. ALEXANDER. Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins*. 2011, **3**(7), 802-814. DOI: 10.3390/toxins3070802. ISSN 2072-6651.
- [39] DĄBROWSKI, Waldemar M. a Zdzisław E. SIKORSKI. *Toxins in food*. 1. vydání. Boca Raton, FL: CRC Press, 2005. ISBN 08-493-1904-8.
- [40] KRŠKA, Rudolf, Patricia SCHUBERT-ULLRICH, Alexandra MOLINELLI, Michael SULYOK, Susan MACDONALD a Colin CREWS. *Mycotoxin analysis: An update*. 2008, **25**(2), 152-163. DOI: 10.1080/02652030701765723. ISSN 1944-0049.
- [41] SFORZA, Stefano, Chiara DALL'ASTA a Rosangela MARCHELLI. Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. 2006, **25**(1), 54-76. DOI: 10.1002/mas.20052. ISSN 0277-7037.
- [42] ZÖLLNER, Peter a Bernhard MAYER-HELM. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2006, **1136**(2), 123-169. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.09.055. ISSN 00219673.
- [43] BERTHILLER, F., C. BRERA, M.H. IHA et al. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2015-2016. *World Mycotoxin Journal*. 2017, **10**(1), 5-29. DOI: 10.3920/WMJ2016.2138. ISSN 1875-0710.
- [44] BERTHILLER, F., B. CRAMER, M.H. IHA et al. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2016-2017. *World Mycotoxin Journal*. 2018, **11**(1), 5-32. DOI: 10.3920/WMJ2017.2250. ISSN 1875-0710.
- [45] TITTEMIER, S.A., B. CRAMER, C. DALL'ASTA et al. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2017-2018. *World Mycotoxin Journal*. 2019, **12**(1), 3-29. DOI: 10.3920/WMJ2018.2398. ISSN 1875-0710.
- [46] JORGENSEN, Kevin a Martin VAHL. Analysis of ochratoxin A in pig kidney and rye flour using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *Food Additives and Contaminants*. 1999, **16**(11), 451-456. DOI: 10.1080/026520399283731. ISSN 0265-203X.

- [47] PERNICA, Marek, Karim C. PIACENTINI, Karolina BENEŠOVÁ, Josef ČÁSLAVSKÝ a Sylvie BĚLÁKOVÁ. Analytical techniques for determination of mycotoxins in barley, malt and beer: A review. *KVASNY PRUMYSL*. 2019, **65**(2), 46-57. DOI: 10.18832/kp2019.65.46. ISSN 2570-8619.
- [48] BLESA, J, J.M SORIANO, J.C MOLTÓ, R MARÍN a J MAÑES. Determination of aflatoxins in peanuts by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2003, **1011**(1-2), 49-54. DOI: 10.1016/S0021-9673(03)01102-6. ISSN 00219673.
- [49] RYCHLIK, Michael a Peter SCHIEBERLE. Quantification of the Mycotoxin Patulin by a Stable Isotope Dilution Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999, **47**(9), 3749-3755. DOI: 10.1021/jf990198a. ISSN 0021-8561.
- [50] RAZZAZI-FAZELI, E, J BÖHM a W LUF. Determination of nivalenol and deoxynivalenol in wheat using liquid chromatography–mass spectrometry with negative ion atmospheric pressure chemical ionisation. *Journal of Chromatography A*. 1999, **854**(1-2), 45-55. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00616-0. ISSN 00219673.
- [51] LAGANÀ, Aldo, Roberta CURINI, Giuseppe D'ASCENZO, Ilaria DE LEVA, Angelo FABERI a Elisabetta PASTORINI. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the identification and determination of trichothecenes in maize. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2003, **17**(10), 1037-1043. DOI: 10.1002/rcm.1019. ISSN 09514198.
- [52] BERGER, Urs, Michael OEHME a Fabian KUHN. Quantitative Determination and Structure Elucidation of Type A- and B-Trichothecenes by HPLC/Ion Trap Multiple Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999, **47**(10), 4240-4245. DOI: 10.1021/jf9904012. ISSN 0021-8561.
- [53] DALL'ASTA, C., S. SFORZA, G. GALAVERNA, A. DOSSENA a R. MARCHELLI. Simultaneous detection of type A and type B trichothecenes in cereals by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry using NaCl as cationization agent. *Journal of Chromatography A*. 2004, **1054**(1-2), 389-395. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.07.081. ISSN 00219673.
- [54] RAZZAZI-FAZELI, E, J BÖHM, K JARUKAMJORN a J ZENTEK. Simultaneous determination of major B-trichothecenes and the de-epoxy-metabolite of deoxynivalenol in pig urine and maize using high-performance liquid chromatography–mass

- spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2003, **796**(1), 21-33. DOI: 10.1016/S1570-0232(03)00604-4. ISSN 15700232.
- [55] RAZZAZI-FAZELI, E, B RABUS, B CECON a J BÖHM. Simultaneous quantification of A-trichothecene mycotoxins in grains using liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2002, **968**(1-2), 129-142. DOI: 10.1016/S0021-9673(02)00957-3. ISSN 00219673.
- [56] URRACA, J.L., M.D. MARAZUELA a M.C. MORENO-BONDI. Analysis for zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol in cereals and swine feed using accelerated solvent extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*. 2004, **524**(1-2), 175-183. DOI: 10.1016/j.aca.2004.03.093. ISSN 00032670.
- [57] PALLARONI, Lea a Christoph VON HOLST. Determination of zearalenone from wheat and corn by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2003, **993**(1-2), 39-45. DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00381-9. ISSN 00219673.
- [58] BENEŠOVÁ, Karolína. Vybrané mykotoxiny v pivovarských surovinách a v pivu. *VÝZKUMNÝ ÚSTAV PIVOVARSKÝ A SLADARŠKÝ*. b.r. [cit. 2019-06-25]. Dostupné z: <http://www.rostlinolekari.cz/sites/default/files/2017-12/Bene%C5%A1ov%C3%A1.pdf>
- [59] KRŠKA, Rudolf. Performance of modern sample preparation techniques in the analysis of Fusarium mycotoxins in cereals. *Journal of Chromatography A*. 1998, **815**(1), 49-57. DOI: 10,1016/S0021-9673(98)00868-1. ISSN 00219673.
- [60] REN, Yiping, Yu ZHANG, Shuangliang SHAO, Zengxuan CAI, Liang FENG, Hongfeng PAN a Zhigang WANG. Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2007, **1143**(1-2), 48-64. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.12.064. ISSN 00219673.
- [61] TAMURA, Masayoshi, Atsuo UYAMA a Naoki MOCHIZUKI. Development of a Multi-mycotoxin Analysis in Beer-based Drinks by a Modified QuEChERS Method and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Sciences*. 2011, **27**(6). DOI: 10.2116/analsci.27.629. ISSN 0910-6340.
- [62] KRALJ CIGIĆ, Irena a Helena PROSEN. An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. *International Journal of*



- Molecular Sciences*. 2009, **10**(1), 62-115. DOI: 10.3390/ijms10010062. ISSN 1422-0067.
- [63] LIPOV, Jan, Ludmila JIRÁKOVÁ a Martin ŠVÉDA. Imunochemické metody. *Seminář z biochemie*. b.r. [cit. 2019-05-19]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/oppa-sem-bio/PDFs/7OPPAst.pdf>
- [64] PAN, Dinorah, Federico BONSIGNORE, Federico RIVAS, Gonzalo PERERA a Lina BETTUCCI. Deoxynivalenol in barley samples from Uruguay. *International Journal of Food Microbiology*. 2007, **114**(2), 149-152. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.08.006. ISSN 01681605.
- [65] TABUC, C., D. MARIN, P. GUERRE, T. SESAN a J. D. BAILLY. Molds and Mycotoxin Content of Cereals in Southeastern Romania. *Journal of Food Protection*. 2009, **72**(3), 662-665. DOI: 10.4315/0362-028X-72.3.662. ISSN 0362-028X.
- [66] Vysokoúčinná kapalinová chromatografie. *Přírodovědecká fakulta Univerzita Karlova*. b.r. [cit. 2019-05-19]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~tesarove/hplc.pdf>
- [67] *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie*. b.r. [cit. 2019-05-19]. Dostupné z: [http://fchi-oppa.vscht.cz/uploads/AK-skripta/Kap\\_1.pdf](http://fchi-oppa.vscht.cz/uploads/AK-skripta/Kap_1.pdf)
- [68] Adsorbenty a chemicky vázané fáze. *HPLC.cz*. b.r. [cit. 2019-06-26]. Dostupné z: [http://www.hplc.cz/Teorie/adsorbent.html#\\_1\\_Polar\\_sorbent](http://www.hplc.cz/Teorie/adsorbent.html#_1_Polar_sorbent)
- [69] COUFAL, Pavel. High Performance Liquid Chromatography, HPLC. *Přírodovědecká fakulta Univerzita Karlova*. b.r. [cit. 2019-06-26]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
- [70] SCHULZOVÁ, Věra. HPLC v analýze potravin a přírodních produktů. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze*. b.r. [cit. 2019-06-26]. Dostupné z: <https://web.vscht.cz/~schulzov/HPLC/1%20HPLC%202019%20teorie.pdf>
- [71] BLANKA, Kyrálová. *Toxinogenní plísňe rodu Fusarium v ječmeni*. Pardubice, 2019. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.