



VĚDECKÝ VÝBOR FYTOSANITÁRNÍ A ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

Klasifikace:	Draft	<input type="checkbox"/>	<i>Pro vnitřní potřebu VVF</i>
	Oponovaný draft	<input checked="" type="checkbox"/>	<i>Pro vnitřní potřebu VVF</i>
	Finální dokument	<input type="checkbox"/>	<i>Pro oficiální použití</i>
	Deklasifikovaný dokument	<input type="checkbox"/>	<i>Pro veřejné použití</i>

Název dokumentu:

VALIDAČNÍ STUDIE MYKOTOXINY - DETEKCE, DYNAMIKA A PODMÍNKY KONTAMINACE POTRAVIN A KRMIV

Poznámka:

Vypracoval: RNDr. Jan Nedělník, PhD, VÚPT
Prof Ing. Jana Hajšlová, CSc., VŠCHT
Mgr. Světlana Sýkorová, CSc., VÚRV

Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 PRAHA 6 - Ruzyně
Tel.: +420 233 022 324 , fax.: +420 233 311 591, URL: <http://www.phytopsanitary.org>

1	Úvod	3
2	Cíl	5
3	Současný stav legislativy.....	6
4	Materiál a metody	8
5	Výsledky	17
6	Závěrečný komentář	30

The food and feed quality and safety are really actual topic. Mycotoxins are one of potential chemical contaminants. Results of analysis of some mycotoxins in agricultural commodities and comparison of different analytical methods are summarized.

1 Úvod

Zajištění kvalitních a bezpečných surovin a potravin je nejaktuálnějším trendem současné zemědělské a potravinářské výroby. Naplnění tohoto trendu je závislé na permanentní kontrole a na zajištění optimálních výrobně-technologických podmínek eliminujících případnou akumulaci zdraví škodlivých látek v surovinách pro výrobu potravin či krmiv. Nevyhnutelným fenoménem každého agroekosystému a bohužel také mnohých potravinářských a krmivářských výroby je přítomnost houbových mikroorganismů, které mohou za určitých podmínek produkovat sekundární metabolity, které označujeme souhrnným názvem mykotoxiny. Jsou to látky toxické pro teplokrevné živočichy včetně člověka a je třeba jim věnovat soustavnou pozornost. O jejich významu svědčí také permanentní zájem Evropské komise. V roce 2005 byla vydána nová nařízení související s mykotoxiny, a to direktiva 2005/38/EC ze 6. června 2005 o vzorkování a analytických metodách pro účely oficiální kontroly úrovně fuzariových mykotoxinů v potravinách a směrnice 856/2005 ze stejného data, doplňující směrnici 466/2001 o fuzariových toxinech.

Monitoring realizovaný na konci 90. let a začátku tohoto století v ČR dokumentoval rozsáhlý výskyt fusariových mykotoxinů v cereáliích sklizených v různých agrárních ekosystémech; v některých letech byla jejich přítomnost prokázána až v 95% odebraných vzorků; překročení hodnoty MRL pro DON (2mg/kg) však bylo jen zcela ojedinělé. Faktory ovlivňujícími úroveň kontaminace jsou nejen klimatické podmínky v daném roce, ale ve značné míře je dána i technologií pěstování daných plodin (příprava půdy, předplodina, výživa, ochrana apod. Je třeba zdůraznit, že ošetření fungicidními přípravky ne vždy rezultuje v poklesu hladin diskutovaných mykotoxinů, přesto cílená fungicidní ochrana zůstává základním opatřením. Některé přípravky jako je např. Amistar sice eliminují škodlivého činitele, ale současně jejich aplikace se promítá ve vyšší kontaminaci.

V současné době je sledován jako marker kontaminace cereálií fusariovými mykotoxiny deoxynivalenol (DON) a dále zearalenon. Jak prokázaly některé zahraniční studie a potvrdily předběžné výsledky vyšetření realizovaných na VŠCHT, v mnoha případech je dominujícím trichothecenem nivalenol (NIV) někdy i T-2 toxin a HT-2 toxin. Je zřejmé, že za těchto okolností - tedy pokud je jako jediný analyticky sledovaný reprezentant trichothecenů DON, závažnost kontaminace může být podhodnocena. S přihlédnutím k této skutečnosti i s ohledem na nové poznatky v oblasti toxikologie, se problematika trichothecenů dostala do středu zájmu European Food Safety Authority (EFSA) i dalších mezinárodních komisí (Joint WHO/FAO Expert Committee on Food Additives - JECFA) and the EC's Scientific Committee on Food). V současné době probíhá příprava návrhu hygienických limitů pro další zástupce trichothecenů - NIV, T-2 toxinu (T-2) a HT-2 toxinu (RT-2). Rozšíření spektra regulovaných mykotoxinů vyvolává samozřejmě potřebu iniciace navazujících studií a celkově získání rozsáhlejšího souboru dat. Zohlednit je třeba i nové informace o existenci "maskovaného" DON vázaného v přirozené matici na cukerné zbytky, který není extrahovatelný běžnými analytickými postupy, k jeho uvolnění však dochází působením některých hydrolytických enzymů, což znamená, že i tato forma může být biologicky dostupná a je nutné jí uvažovat při hodnocení dietárního příjmu.

Vzhledem k nebezpečnosti a frekvenci výskytu různých typů mykotoxinů v zemědělských produktech a surovinách je nutné neustále získávat a rozšiřovat spektrum

informací o této skupině kontaminantů a také rozšiřovat a zpřesňovat analytické metody a jejich následné zavádění do praxe. V současnosti je již běžné testování základních druhů potravin a potravinářských surovin na přítomnost a obsah nejrozšířenějších a nejnebezpečnějších mykotoxinů a také v legislativě jsou stanoveny limitní koncentrace těchto látek v jednotlivých matricích (na úrovni české legislativy i na úrovni evropské legislativy - viz výše).

2 Cíl

V roce 2005 byla proto ve spolupráci tří pracovišť realizována pro Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí validační studie s následujícími cíly:

- Zavedení a validace rozhodčí multidetekční metody na principu LC-MS/MS, která umožní exaktní stanovení celého spektra cílových analytů - DON, NIV, IIT -2, T-2 a zearalenonu
- Přípravu alespoň tří homogenních referenčních materiálů (5 - 10 kg) - dvou s vyššími obsahy trichothecenových mykotoxinů s odlišným spektrem jejich zastoupení a jednoho "slepého" vzorku pro validační studie. Pro posouzení správnosti nálezu DON se využije Certifikovaný matriční materiál (CRM)
- Vyšetření referenčních materiálů jak exaktní instrumentální metodou, tak i postupy imunoenzymatickými (ELISA) s cílem posoudit rizika nadhodnocení nálezu druhým z uvedených screeningových postupů v důsledku křížových (nespecifických) interakcí. Posouzení rizika pro interpretaci výsledku v praxi.
- Kritické zhodnocení alternativních analytických postupů na základě statistického zhodnocení dat získaných v rámci pilotní mezilaboratorní studie zahrnující akreditované státní laboratoře zabývající se analýzou mykotoxinů; implementace nového analytického postupu do laboratoří disponujících potřebnou instrumentací (pro studii budou využity výše uvedené referenční materiály).

3 Současný stav legislativy

Vyhlášky a zákony, týkající se vzorkování, správné laboratorní praxe a obsahu kontaminujících látek

3.1.

Sbírka: 611/2004

Datum: 7.12.2004

Částka: 207/2004

VYHLÁŠKA 611

ze dne 24. listopadu 2004,

kteřou se mění vyhláška č. 211/2004 Sb., o metodách zkoušení a způsobu odběru a přípravy kontrolních vzorků

3.2.

Sbírka: 497/2004 Částka: 171/2004

Datum: 22.9.2004

VYHLÁŠKA 497

ze dne 10. září 2004,

kteřou se mění vyhláška Ministerstva zemědělství č. 124/2001 Sb., kteřou se stanoví požadavky na odběr vzorků a principy metod laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů a způsob uchování vzorků.

3.3.

Sbírka: 305/2004

Datum: 18.5.2004

Částka: 100/2004

VYHLÁŠKA 305

ze dne 6. května 2004,

kteřou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách

3.4.

Sbírka: 238/2005

Datum: 17.6.2005

Částka: 88/2005

VYHLÁŠKA 238

ze dne 3. června 2005,

kteřou se mění vyhláška č. 211/2004 Sb., o metodách zkoušení a způsobu odběru a přípravy kontrolních vzorků, ve znění vyhlášky č. 611/2004 Sb.

3.5.**Sbírka:** 279/2005**Datum:** 14.7.2005**Částka:** 102/2005**VYHLÁŠKA 279**

ze dne 30. cervna 2005,

kteou se mění vyhláška c. 219/2004 Sb., o zásadách správné laboratorní praxe.**3.6. Postup při intervenčním nákupu obilovin ze sklizně 2005 v členských státech EU**

Společný evropský trh s obilovinami - podmínky intervenčního nákupu se v současné době řídí novelou nařízení komise (ES) č.1068/2005 (novelizuje nařízení komise (ES) č.824/2000). Členským státům EU tato novela ukládá povinné kontrolování limitu kontaminujících látek u obilovin v rámci intervenčního nákupu ze sklizně 2005/2006. Zmíněná povinnost se týká intervenčních agentur členských států EU, tedy i SZJF.

Limity kontaminujících látek vymezené nařízením komise (ES) č.466/2001 byly nově doplněny o fuzariové toxiny DON a zearalenon nařízením komise (ES) č.856/2005 s účinností od 1.7.2006. Pro krmiva jsou limity kontaminantu stanoveny směrnicí 2002/32/ES Evropského parlamentu a rady. Implementace novely nařízení komise (ES) č.1068/2005 znamená, že každý členský stát EU musí mít zpracovanou analýzu rizik, která vyloučí nákup kontaminovaných obilovin nad maximální přípustné limity kontaminujících látek (jedná se o kontaminaci těžkými kovy: Pb, Cd, As, Hg, fusariovými mykotoxiny, aflatoxinem BI). Analýza rizika musí být uplatňována od počátku intervenčního nákupu, tj. od 1.11.2005.

Limity maximálního obsahu fuzariových toxinů v obilovinách podle nařízení komise (ES) č. 466/2001 (včetně novely nařízení č. 856/2005 jsou následující: DON - 1250µg/kg; ZEA -100µg/kg.

Při intervenčním nákupu obilovin je úhrada nákladů za stanovení obsahu jednotlivých kontaminujících látek uložena dodávajícímu, v rámci aktualizace analýzy rizik v příštím hospodářském roce by však SZIF mohl uhradit plošné testování všech dodávek nabízených obilovin na DON pomocí tzv. Quick DON testu (ČR požádala komisi ES o stanovisko k tomuto postupu). Pozitivní nebo sporné případy budou analyzovány přesnějšími metodami (ELISA, HPLC) s úhradou dodavatelem. Analýzy obsahu zearalenonu budou prováděny pouze u vzorků, které vykáží hodnotu obsahu DON blížící se limitu, tj. 1000 - 1250 µg/kg, protože byla prokázána určitá souvislost mezi výskytem DON a ZEA.

(Zdroj: Pokyn k intervenčnímu nákupu, Zemědělec 45/2005, J. Sluková, mluvčí SZIF na podklade údajů Ing.E.Košťálové, SZIF)

4 Materiál a metody

Do validační studie byly zahrnuty vzorky zrna pšenice, kukuřice a kukuřičné siláže. Tyto vzorky byly laboratořemi VŠCHT, VUP a VÚRV analyzovány na obsah deoxynivalenolu (DON), T-2 toxinu (T2) a zearalenonu (ZEA).

Seznam všech testovaných vzorků:

1 pšenice VUP
2 siláž VUP - nekvalitní
3 siláž VUP - standard
4 pšenice 30 - extrakt VURV
5 pšenice64 – extrakt VURV
6 pšenice VURV- spike T2(20 ppb)
7 CRM
8 pšenice VŠCHT 62
9 pšenice VŠCHT 70
10 kukuřice VŠCHT KIS2
11 kukuřice VŠCHT KIS 1
12 kukuřice VŠCHT KIBTBN2
13 pšenice VŠCHT 22
14 pšenice VŠCHT 33
15 pšenice VŠCHT 34
16 pšenice VŠCHT 71

Detailní popis některých vzorků:

Vzorek č.10 - po umělé infekci v polních podmínkách

⇒ Kukuřice Ivanovice2005, Suspence2 (KIS2), Izolinie k transgennímu hybridu - DKC3420

Suspence2

Fusarium graminearum - RICPR 189

Fusarium graminearum - LS 41/02

Fusarium graminearum - LS 273/02

Fusarium poae - LS 1/04

Fusarium poae - LS 26/03

Fusarium sporotrichioides -JR 29/04

Vzorek č.11- po umělé infekci v polních podmínkách

⇒ Kukuřice Ivanovice 2005, Suspence 1 (KIS1), Izolinie k transgennímu hybridu - DKC3420

Suspence1

Fusarium verticillioides - LS 10/04

Fusarium verticillioides- LS 225/02

Fusarium verticillioides- LS 104/03

Fusarium subglutinans - LS 164/02

Fusarium subglutinans - LS 14/04

Fusarium subglutinans - LS 25/03

Fusarium proliferatum -JR 25/04

Fusarium proliferatum-JR 26/04

Vzorek č.12

⇒ BT Kukuřice Ivanovice 2005, Referenční vzorek (KIBTBL2), Transgenní hybrid MON 810 - DKC3421YG

Z kapacitních důvodů nebylo možné, aby všechna zúčastněná pracoviště testovala všechny shromážděné vzorky. Pro potřeby validační studie byly použity metody LC (kapalinová chromatografie) a kompetitivní ELISA metoda.

Laboratoř VŠCHT analyzovala společné vzorky **metodou LC-MS/MS**. Tato metoda je určená pro analýzu trichothecenových mykotoxinů v cereáliích. Byla ověřena pro stanovení 7 trichothecenových mykotoxinů: nivalenolu (NIV), deoxynivalenolu (DON), 15-acetyldeoxynivalenolu (15-ADON), 3-acetyldeoxynivalenolu (3-ADON), T-2 tetraolu (T-2 tetr.), fusarenonu-X (FUS-X), diacetoxyscirpenolu (DAS), HT-2 toxinu (HT-2 tox.) a T-2 toxinu (T-2 tox.) a zearalenon.

Příprava vzorku:

Ze zhomogenizovaného vzorku je odebrána navážka (dále vzorek) 12,5 g (s přesností na 0,1 g) do 250 ml Erlenmeyerovy baňky. Extrakce je prováděna po dobu 1 h na třepače 50 ml extrakční směsí acetonitril-voda (84: 16, v/v). Po ukončení extrakce je extrakt zfiltrován do 50 ml odměrné baňky, koláč na filtru je 2 krát promytý 10 ml extrakční směsí a baňka je doplněna po rysku. Extrakt je přečištěn metodou extrakce na tuhou fázi (SPE) za použití kolony MycoSep™ #226 (před přečištěním je k extraktu přidána kyselina octová - 10 µl/l extraktu). Přečištěný extrakt (frakce 4 ml) se odpaří se na rotační vakuové odparce (teplota vodní lázně 40-50 DC, tlak 220 - 50 mbar) a zbytek směsi rozpouštědel je odfoukán jemným proudem dusíku do sucha. Odparek je převeden do vialky 2 x 500 µl směsí methanol:voda (20:80 v/v). Vzorek je dále přečištěn přes mikrofiltr (0,2 µm) a převeden do vialky s insertem. Poté je analyzován metodou LC-MS/MS (multireziduální stanovení DON spolu s ostatními trichotheceny).

Kapalinová chromatografie (LC)

Stanovení 7 trichothecenových mykotoxinů se provede pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s hmotnostně-spektrometrickým detektorem (MS) na koloně Synergi Hydro RP (150mm x 3mm x 4µm) za uvedených chromatografických podmínek:

Mobilní fáze:

- 10 mM vodný roztok octanu amonného
- methanol

Gradientová eluce : A – 10 mM octan amonný B – methanol

čas (min)	%	Průtok (ml/min)
0	A-80% B20%	0,5
8	A-30% B70%	0,5
15	A-30% B70%	0,5
15,1	A - 80% B20%	0,5
16	A - 80% B20%	0,5
Post time	6 min	0,5

Teplota kolony: 40 °C

Množství nastříkovaného vzorku: 20 J-II (opakovatelnost nástřiku RSD ≤ 2 %)

Pozn.

Opakovatelnost nástřiku byla testována 10 x nástřikem standardního roztoku (doba LC analýzy 22 min. / propíchnuté septum při laboratorní teplotě).

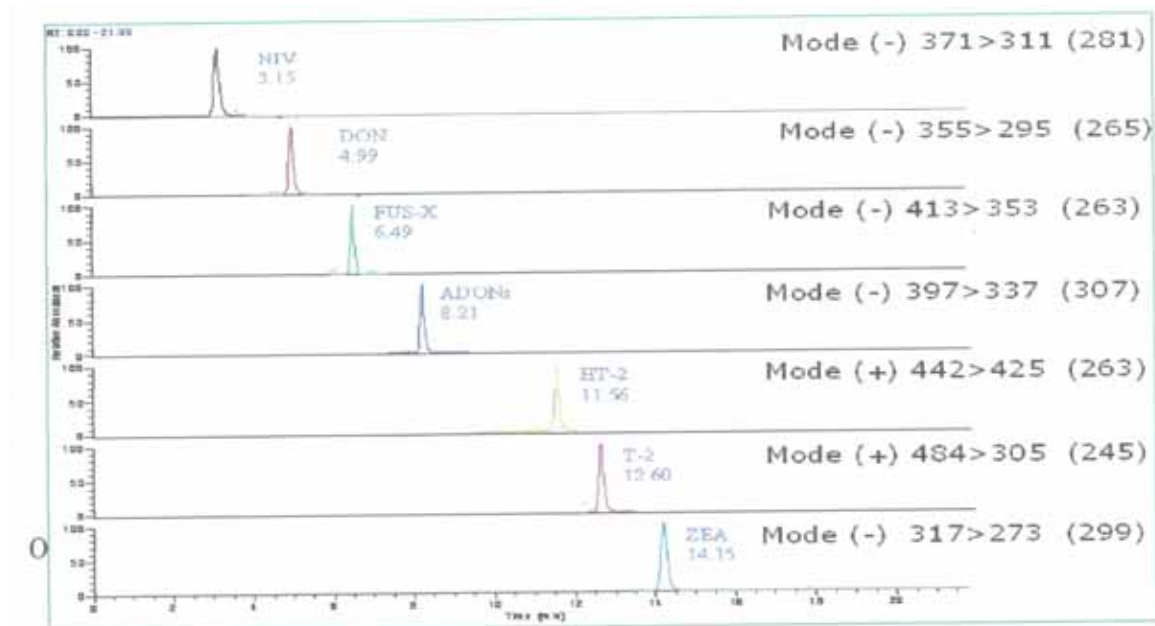
MS detektor: LCQ Deca iontová past

Detektor	Finnigan LCQ Deca - iontová past
Zdroj	APCI
Teplota na kapiláře	150 °C
APCI vypařovací teplota	450 °C
Napětí zdroje	6 kV
Kolizní plyn	helium
Skenování mod	MS/MS
Typ skenu	selected reaction monitoring (SRM)

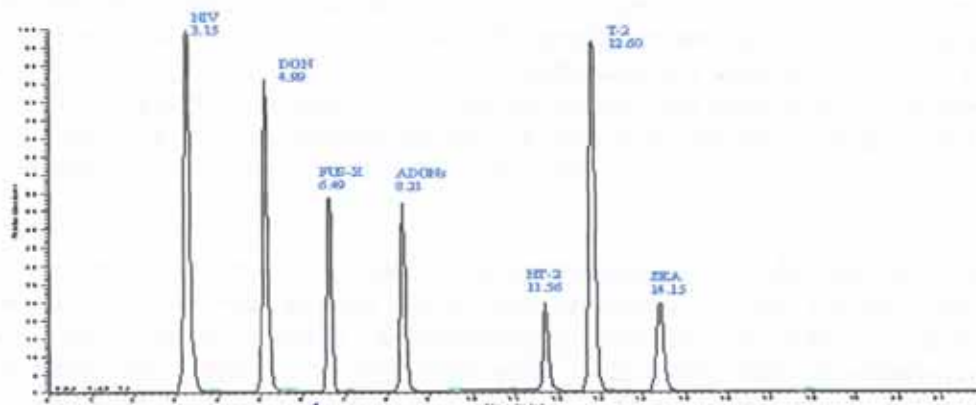
Identifikace a kvantitativní vyhodnocení

Identifikace daných analytů se provádí na základě sledování specifických hmot (miz) jednotlivých analytů a dále specifických přechodů materského iotu na dceřiné a také porovnáním retenčních časů s příslušnými standardy analytu. Konfirmaci je možno provést metodou GC/MS nebo GC/ECD se separací na koloně jiné polarity. Kvantitativní vyhodnocení je založeno na metodě vnějšího standardu porovnáním odezвовých charakteristik analytu s příslušnými standardy pomocí kalibrační závislosti (pomocí softwarového vybavení kapalinového chromatografu).

Mod ionizace a monitorované ionty (miz)



Ukázka chromatogramu LCIMS-MS metody



Kompetitivní ELISA test

Laboratoře VUP a VURV použily pro detekci mykotoxinů komerčně dostupné ELISA soupravy různých výrobců. Pro srovnání byly pracovníky laboratoří vytipovány soupravy s různou citlivostí a drobnými rozdíly v pracovních postupech a v přípravě vzorku k analýzám.

Laboratoř VUP analyzovala vybrané mykotoxiny pomocí souprav s maximální citlivostí (DON, T2 - Rida, ZEA - Neogen), laboratoř VURV testovala vzorky pomocí souprav

pro jednodušší a rychlejší detekci mykotoxinů s nižší citlivostí (testy typu Ridascreen Fast DON, Ridascreen Fast Zearalenon, Ridascreen Fast T-2 toxin, výrobce R-Biopharm, testy typu Fast - Rida). Soupravy obsahují destičku mikrotitracních jamek s navázanou protilátkou, sestavu pěti nebo šesti standardních roztoků o známých koncentracích a další potřebné chemikálie – různé podle typu testu a výrobce.

Analyzovaný mykotoxin obsažený v testovaném vzorku a konjugovaném antigenu soutěží o vazebná místa protilátky, na antigenu je navázaný enzym, který štěpí chromogen za vzniku barevné reakce. Čím víc mykotoxinu vzorek obsahuje, tím více vazebných míst je obsazeno. Naváže se méně konjugovaného antigenu a výsledná barevná reakce je slabší. Intenzita zbarvení je měřena při odpovídajících vlnových délkách (750 nm - ZEA Neogen, zbytek testu - 450 nm), výsledné koncentrace analytů jsou vypočteny na základě srovnání s absorbancí standardních roztoků s využitím příslušného softwaru, např. Ridawin soft.

Příprava vzorků

Vzorky zrna pšenice a kukuřice jsou před analýzami důkladně umlety a homogenizovány. Podobně také kukuřičná siláž je před započítáním analýz důkladně homogenizována a zpracována. Takto zpracovaný vzorek se extrahuje destilovanou vodou nebo 70% roztokem metanol-voda v závislosti na analyzovaném mykotoxinu. Pro detekci DON jsou vzorky extrahovány v destilované vodě v poměru definovaném výrobcem (1:5 nebo 1:20, dle návodu konkrétního testu). Pro detekci T2 a ZEA je jako extrakční činidlo použit 70% metanol (poměr 1:5). Po filtraci je extrakt buď přímo nebo po příslušném zředění připraven k použití v testu. Je nutné, aby všechny testované extrakty měly pH v rozmezí 6 - 8. Tato podmínka je obvykle bez problému splněna u extraktu vzorků, pro které jsou ELISA soupravy výrobcem doporučeny. Materiály, jako je např. kukuřičná siláž, nejsou pro testování na obsah vybraných mykotoxinů výrobcem validovány, je proto nezbytné věnovat testování těchto materiálů zvýšenou pozornost. Hodnota pH vodních extraktů vzorku kukuřičných siláží standardní kvality se obvykle pohybuje mezi 4-5, u methanolových extraktů je to 5-6. U vzorků nekvalitních kukuřičných siláží (sekundární mikrobiologická kontaminace) je zaznamenáváno pH kolem 8. Tyto - pro správné provedení ELISA testu nevhodné- hodnoty pH musí být před analýzami upraveny pomocí roztoku 1N NaOH.

CRM

Pro optimální interpretaci výsledků je spolu s testovanými vzorky zahrnut do testu také certifikovaný referenční materiál (CRM, např. zakoupený od firmy Biopharm Rhone Ltd.). Jedná se o rostlinný materiál s deklarovaným množstvím konkrétního mykotoxinů. CRM materiály jsou k dispozici ve specializovaných laboratořích. Tento je extrahován stejným způsobem jako testované vzorky, popř. v jiném ředícím poměru (podle citlivosti použité metody), extrakt je analyzován spolu s ostatními vzorky. Na základě výsledné hodnoty obsahu mykotoxinů jsou stanoveny výtěžnost testu - v procentech a získané výsledky jsou následně přepočteny na 100% výtěžnosti. Zahnutí CRM do každého testu je nezbytností pro dosažení relevantních výsledků.

Po provedení ELISA testu je změřena intenzita výsledného zbarvení při výrobce doporučené vlnové délce. Taje u DON a T2 450 nm (žlutá barva) a u ZEA 650 nm (modrá až červenofialová). Z absorbance standardních roztoků je vytvořena kalibrační křivka, ze které jsou následně vypočteny hodnoty obsahu analytu v ostatních vzorcích. Pro relevanci výsledků je důležitý také korelační koeficient kalibrační křivky.

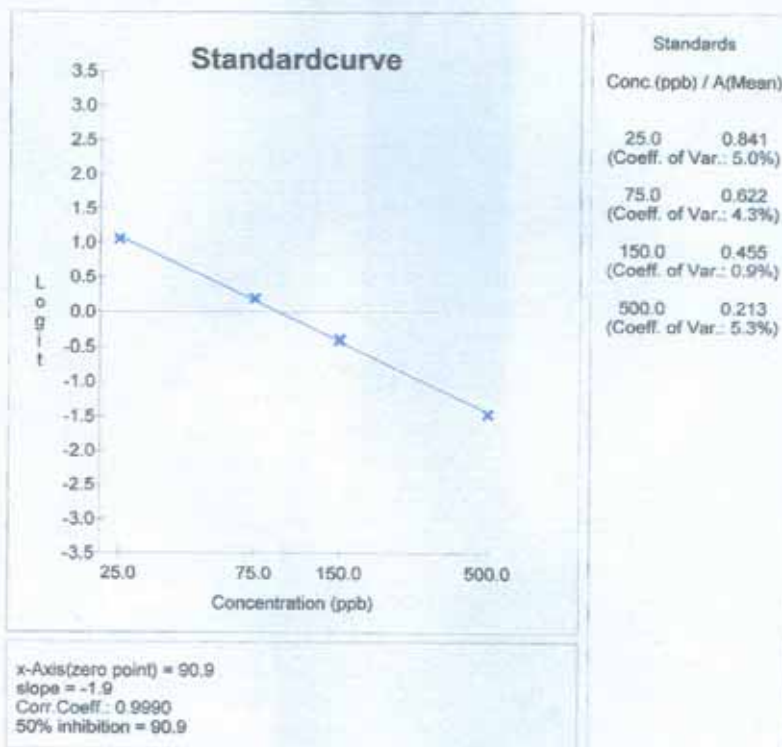
Ukázka záznamu ELISA analýzy

ZEA validace-podrobne
03. Nov. 2005, 16:58:24, Logit/Log, Ser.No:

Plate Values

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.000E	1.150E	1.116E	0.811E	0.870E	0.641E	0.603E	0.458E	0.452E	0.205E	0.221E	0.735E
B	0.665E	0.715E	0.829E	0.826E	0.855E	0.519E	0.515E	0.518E	1.111E	1.043E	1.025E	0.997E
C	0.865E	0.879E	0.276E	0.312E	0.269E	0.004E	0.007E	0.001E	0.191E	0.215E	0.216E	0.423E
D	0.453E	0.470E	0.484E	0.474E	0.563E	1.055E	1.086E	1.031E	0.521E	0.529E	0.469E	1.045E
E	0.000E	0.000E	0.000E	0.000E	0.000E	0.000E	0.351E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
F	0.618E	0.520E	0.519E	0.447E	0.019E	0.667E	0.388E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
G	0.616E	0.443E	0.411E	0.482E	0.015E	0.416E	0.395E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
H	0.484E	0.483E	0.424E	0.454E	0.015E	0.462E	0.361E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

650
nm



ZEA validace-podrobne
03. Nov. 2005, 16:56:24, Logit/Log, Ser.No:

Ser. No.	Concentration ppb	Standards			calculated ppb	Deviation (%)
		Absorbance (Mean)	(CV)	B/B0 (%)		
1	0.0	1.133	2.1	100.0		
2	25.0	0.841	5.0	74.2	25.9	3.7
3	75.0	0.622	4.3	54.9	72.0	4.0
4	150.0	0.455	0.9	40.2	145.9	2.8
5	500.0	0.213	5.3	18.8	515.3	3.1

Ser. No.	ID	Absorbance			calculated ppb	*	=	ppb
		(Mean)	(CV)	(%)				
1	1	0.735	0.0	64.9	43.9	1.0	43.9	
2	1	0.665	0.0	58.7	59.9	1.0	59.9	
3	1	0.715	0.0	63.1	48.1	1.0	48.1	
4	2	0.629	0.0	73.2	27.7	1.0	27.7	
5	2	0.826	0.0	72.9	28.1	1.0	28.1	
6	2	0.855	0.0	75.5	sample < std2	1.0		
7	3	0.519	0.0	45.8	110.9	1.0	110.9	
8	3	0.515	0.0	45.5	112.8	1.0	112.8	
9	3	0.518	0.0	45.7	111.4	1.0	111.4	
10	4	1.111	0.0	98.1	sample < std2	1.0		
11	4	1.043	0.0	92.1	sample < std2	1.0		
12	4	1.025	0.0	90.5	sample < std2	1.0		
13	5	0.997	0.0	88.0	sample < std2	1.0		
14	5	0.865	0.0	76.3	sample < std2	1.0		
15	5	0.879	0.0	77.6	sample < std2	1.0		
16	7	0.276	0.0	24.4	348.4	1.0	348.4	
17	7	0.312	0.0	27.5	286.3	1.0	286.3	
18	7	0.289	0.0	23.7	362.7	1.0	362.7	
19	1b	0.004	0.0	0.4	sample > std5	1.0		

ZEA validace-podrobne
03. Nov. 2005, 16:56:24, Logit/Log, Ser.No:

Ser. No.	ID	Absorbance			Samples		ppb
		(Mean)	(CV)	(%)	calculated ppb	*	
20	10	0.007	0.0	0.6	sample > std5	1.0	
21	10	0.001	0.0	0.1	sample > std5	1.0	
22	11	0.191	0.0	16.9	sample > std5	1.0	
23	11	0.215	0.0	19.0	sample > std5	1.0	
24	11	0.216	0.0	19.1	sample > std5	1.0	
25	12	0.423	0.0	37.3		1.0	168.0
26	12	0.453	0.0	40.0		1.0	147.1
27	12	0.470	0.0	41.5		1.0	136.7
28	13	0.484	0.0	42.7		1.0	128.7
29	15	0.474	0.0	41.8		1.0	134.3
30	13	0.563	0.0	49.7		1.0	92.2
31	14	1.055	0.0	93.1	sample < std2	1.0	
32	14	1.066	0.0	94.1	sample < std2	1.0	
33	14	1.031	0.0	91.0	sample < std2	1.0	
34	15	0.521	0.0	46.0		1.0	110.0
35	15	0.529	0.0	46.7		1.0	106.4
36	15	0.469	0.0	41.4		1.0	137.3
37	6	1.045	0.0	92.2	sample < std2	1.0	

5 Výsledky

Zavedení a validace rozhodčí multidetekční metody na principu LC-MS/MS, která umožní exaktní stanovení celého spektra cílových analytů - DON, NIV, HT-2, T-2 a zearalenonu.

LC-MS/MS METODA

Výtěžnost

spike na hladině 300 μ g/kg

Výtěžnost spočítaná na	NIV	DON	FUS-X	ADONs	HT-2	T-2	ZEA
čisté standardy	62.8	94.2	47.5	85.3	98.9	90.8	49.6
matriční standardy	64.1	89.1	65.1	95.2	90.6	90.5	73.2

Detekční limit

Detekční limit							
analyt	NIV	DON	FUS-X	ADONs	HT-2	T-2	ZEA
μ g/kg	0.5	0.5	1	1	8	0.5	1

Opakovatelnost

Opakovatelnost RSD (%)							
analyt	NIV	DON	FUS-X	ADONs	HT-2	T-2	ZEA
n=5	7.5	8.1	13.2	11.6	7.9	11.7	22.5

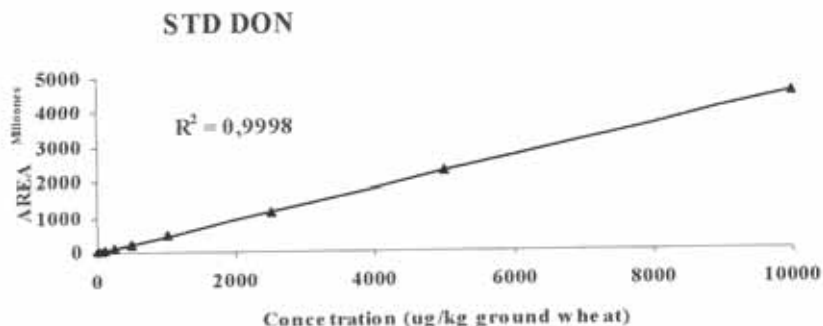
vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka

Linearita

Lineární rozsah 10 - 10 000 μ g/kg obilí (NIV, DON, FUS-X, ADONs, T-2 a ZEA)

Lineární rozsah 25 -10 000 μ g/kg obilí (HT-2)

Korelační koeficient: R= 0.9991-1.0000 (v závislosti na analytu)



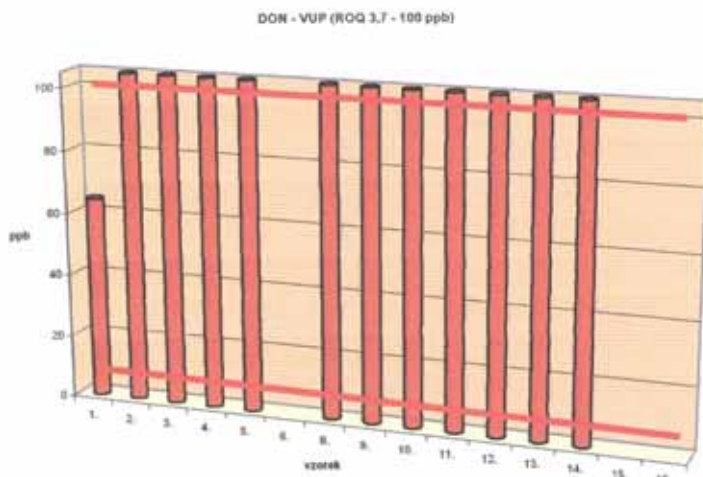
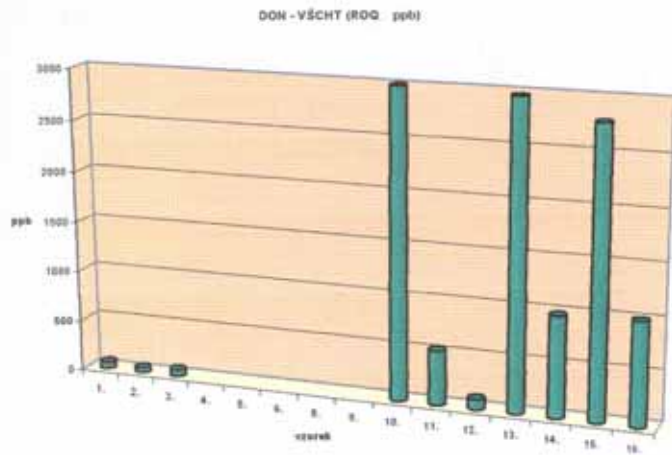
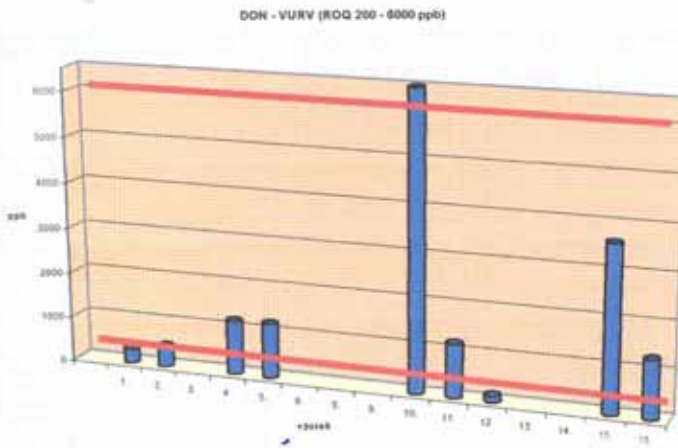
Vyšetření referenčních materiálů jak exaktní instrumentální metodou, tak i postupy imunoenzymatickými (EL/SA) s cílem posoudit rizika nadhodnocení nálezu druhým z uvedených screeningových postupů v důsledku křížových (nespecifických) interakcí. Posouzení rizika pro interpretaci výsledku v praxi.

DON / ppb

Přepočet na 100% výtěžnost

vzorek	VURV -ELISA (fast soupravy)	VUP - ELISA (maximální citlivost)	VŠCHT - LC
1 pšenice VUP	325	64,3	65,7
2 siláž VUP- nekvalitní	457	170,5	43,3
3 siláž VUP- standard	1150	>LOQ (přes 100)	64,2
4 pšenice 30- extrakt VURV	1190	>LOQ (přes 100)	*
5 pšenice	1210	>LOQ (pres 100)	*
6 pšenice VURV- spike T2 (20 ppb)	*	*	*
7 CRM (2600; 2000; 700)	2240; 2050; 780	70/36,9	*
8 pšenice VSCHT 62	*	>LOQ (pres 100)	*
9 pšenice VSCHT 70	*	>LOQ (pres 100)	*
10 kukuřice VSCHT KIS2	99990	>LOQ (pres 100)	41606,1
11 kukuřice VSCHT KIS1	1190	>LOQ (pres 100)	531,5
12 kukuřice VSCHT KIBTBN2	<LOQ (pod 200)	>LOQ (pres 100)	102,8
13 pšenice VSCHT 22	*	>LOQ (pres 100)	2970,1
14 pšenice VSCHT 33	*	>LOQ (pres 100)	980,9
15 pšenice VSCHT 34	3620	*	2783,8
16 pšenice VSCHT 71	1280	*	1003,2
rozsah kvantifikace	200 - 6000 ppb	3,7 -100 ppb	5-10000

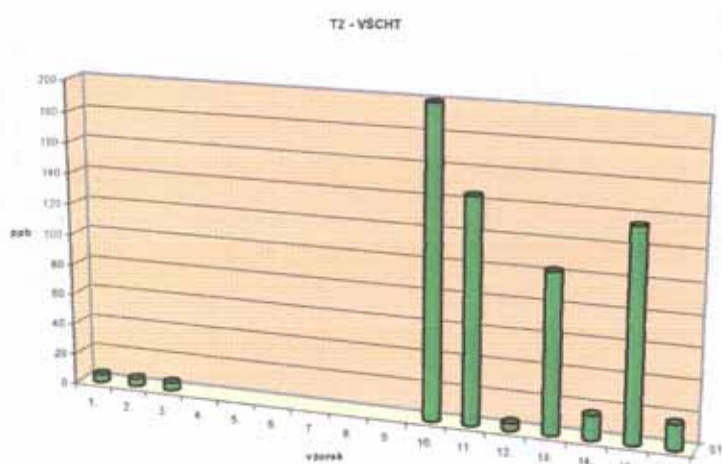
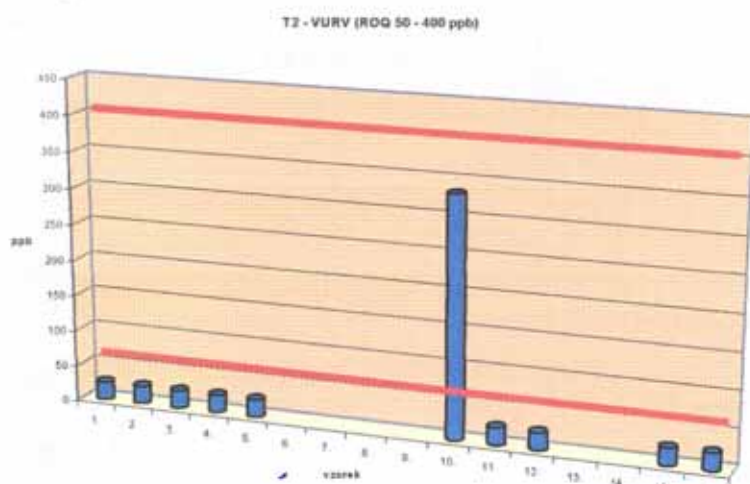
Pozn.: VUP - byl k dispozici stejný CRM jako byl použit laboratoří VURV, vzhledem k citlivosti metody bylo nutno ředit, což mohlo způsobit znepresnění tohoto konkrétního výsledku.



T2 / ppb

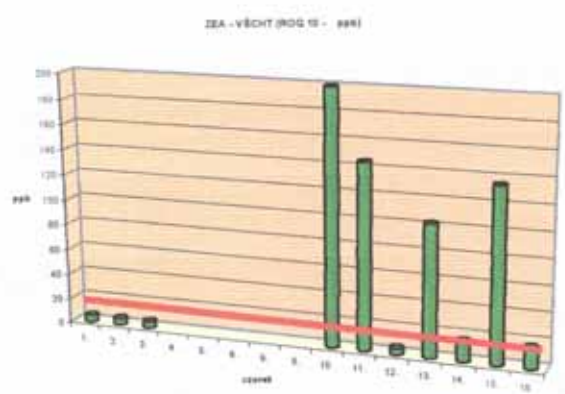
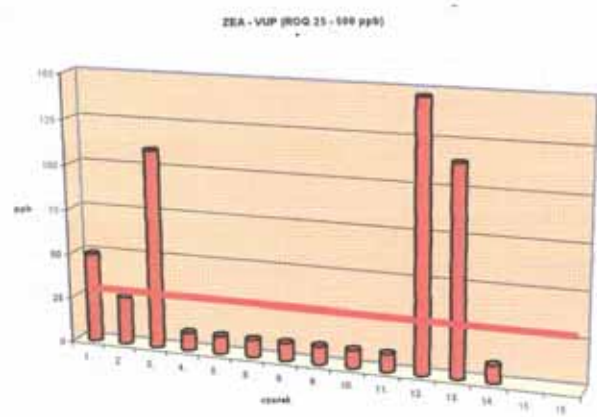
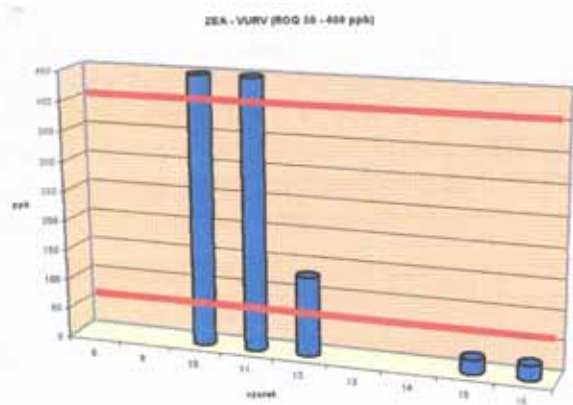
Pozn.: Nebyl k dispozici CRM pro ELISA stanovení, všechny výsledky jsou pouze orientační

vzorek	VURV -ELISA (fast soupravy)	VŠCHT - LC
1 pšenice VUP	<LOQ (pod 50)	7,9
2 siláž VUP- nekvalitní	<LOQ (pod 50)	8,7
3 siláž VUP- standard	<LOQ (pod 50)	7,8
4 pšenice 30- extrakt VURV	<LOQ (pod 50)	*
5 pšenice	<LOQ (pod 50)	*
6 pšenice VURV- spike T2 (20 ppb)	75,6 (4 x konc.)	*
7 CRM (2600; 2000; 700)	*	*
8 pšenice VSCHT 62	*	*
9 pšenice VSCHT 70	*	*
10 kukuřice VSCHT KIS2	352	< 0,5
11 kukuřice VSCHT KIS1	<LOQ (pod 50)	215,1
12 kukuřice VSCHT KIBTBN2	<LOQ (pod 200)	< 0,5
13 pšenice VSCHT 22	*	1,4
14 pšenice VSCHT 33	*	< 0,5
15 pšenice VSCHT 34	<LOQ (pod 50)	1,8
16 pšenice VSCHT 71	<LOQ (pod 50)	< 0,5
rozsah kvantifikace	50 - 400 ppb	5-10000



ZEA/ ppb

vzorek	VURV -ELISA (fast soupravy)	VUP - ELISA (maximální citlivost)	VŠCHT - LC
1 pšenice VUP	80,3	49,46	3,9
2 siláž VUP- nekvalitní	<LOQ (pod 50ppb)	26,06	3,1
3 siláž VUP- standard	123,4	110,03	3,1
4 pšenice 30- extrakt VURV	<LOQ (pod 50ppb)	<LOQ (pod 25ppb)	*
5 pšenice	<LOQ (pod 50ppb)	<LOQ (pod 25ppb)	*
6 pšenice VURV- spike T2 (20 ppb)	-	<LOQ (pod 25ppb)	*
7 CRM 648 ppb	472,4	324/329,4	*
8 pšenice VSCHT 62	*	<LOQ (pod 25 ppb)	*
9 pšenice VSCHT 70	*	<LOQ (pod 25 ppb)	*
10 kukuřice VSCHT KIS2	>4000	<LOQ (pod 25 ppb)	28070,7
11 kukuřice VSCHT KIS1	>400	<LOQ (pod 25 ppb)	145,5
12 kukuřice VSCHT KIBTBN2	132,5	147,2	3,2
13 pšenice VSCHT 22	*	114,75	102,7
14 pšenice VSCHT 33	*	<LOQ (od 25 ppb)	16,1
15 pšenice VSCHT 34	<LOQ (pod 50ppb)	*	135,4
16 pšenice VSCHT 71	<LOQ (pod 50ppb)	*	16,6
rozsah kvantifikace	50 - 400 ppb	25 - 500 ppb	5-10000



Odběr vzorku a extrakce

Jelikož odběr vzorku a jeho příprava pro analýzu je pravděpodobně jedním z faktorů nejvíce ovlivňujících výslednou hodnotu, byl do série testů zařazen také následující pokus: Vzorky 1-5 byly pracovníky laboratoří VUP a VURV extrahovány, připravené extrakty byly ve stejný den oběma laboratořemi analyzovány (použitím ELISA s různou citlivostí). Cílem tohoto testu bylo vyhodnotit rozdíl mezi analýzami stejných extraktu pomocí rozdílných metod a také vliv odběru a přípravu vzorku na výslednou hodnotu.

PRACOVISTĚ	DON ppb		T2 ppb		ZEA ppb	
	VUP	VURV	VUP	VURV	VUP	VURV
1. pšenice EXTRAKCE VUP	64,3	325	0,376	<LOQ	46,46	80,3
1. pšenice EXTRAKCE VURV	*	<LOQ	*	<LOQ	*	<LOQ
2. siláž nekvalitní EXTRAKCE VUP	170,5	457	0,468	<LOQ	26,06	<LOQ
2. siláž nekvalitní EXTRAKCE VURV	*	<LOQ	*	<LOQ	*	<LOQ
3. siláž standard EXTRAKCE VUP	>100	1550	0,398	<LOQ	110,03	123,4
3. siláž standard EXTRAKCE VURV	*	350	*	<LOQ	*	<LOQ
4. pšenice EXTRAKCE VURV	<LOQ	1190	0,444	<LOQ	<LOQ	<LOQ
5. pšenice EXTRAKCE VURV	<LOQ	1210	0,482	<LOQ	<LOQ	<LOQ
ROQ	3,7 - 100	200- 6000	0,01- 1,6	50 - 400	25 - 500	50 - 400

pH extraktu

Dalším dílčím testem bylo srovnání extraktu před a po úpravě pH. Extrakt vzorku č. 3 (kukuřičná siláž standardní kvality) měl pH 3,83, po výrobcem předepsané úpravě pomocí roztoku NaOH na odpovídající hodnotu pH 6,4 byly obě varianty extraktu otestovány.

PRACOVISTE	DON ppb		T2 ppb		ZEA ppb	
	VUP	VURV	VUP	VURV	VUP	VURV
EXTRAKT S NEVYHOVUJÍCÍM pH	134,48	1550	0,439	<LOQ	156,01	538,5
EXTRAKT PO UPRAVE pH	<LOQ	-	0,398	<LOQ	108,7	123,4
ROQ	3,7 - 100	200- 6000	0,01- 1,6	50 - 400	25 - 500	50 - 400

Měření absorbance

Jelikož je pro vyhodnocení výsledku v případě zearalenonu výrobcem předepsaný filtr 650 nm, který obvykle nebývá součástí standardní výbavy vyhodnocovací techniky, bylo v laboratoři VUP provedeno srovnání výsledných hodnot konkrétního testu získaných měření absorbance při různých vlnových délkách (630 a 650 nm).

Tabulka: srovnání výsledků získaných měření absorbance při různých vlnových délkách, přepočteno na 100% výtěžnosti.

vzorek	630 nm	650 nm
1 pšenice VUP	49,4	51,2
2 siláž VUP - nekvalitní	25,6	26,9
3 siláž VUP - standard	106,1	113,8
4 pšenice 30 - extrakt VURV	<25	< 25
5 pšenice 64 - extrakt VURV	<25	< 25
6 pšenice VURV- spikeT2 (20 ppb)	< 25	< 25
7 CRM 324 ppb	314,9	329,4
10 kukuřice VŠCHT KIS2	>500	>500
11 kukuřice VŠCHT KIS 1	>500	>500
12 kukuřice VŠCHT KIBTBN2	146,5	159,4
13 pšenice VŠCHT 22	112,6	118,7
14 pšenice VŠCHT 33	<25	< 25
15 pšenice VŠCHT 34	112,6	119,2
výtěžnost	97,2%	101,7%

Z výše uvedené tabulky je patrné, že měření absorbance při 630 a 650 nm nezpůsobí zásadní rozdíly či nepřesnosti výsledku. Relace mezi získanými koncentracemi jsou zachovány, závěrem tohoto srovnání je tedy názor, že je v nutných případech možné filtry do určité míry zaměnit.

Reprodukovatelnost ELISA testu

Jedním z argumentů používaných některými autory proti používání ELISA testu pro stanovení mykotoxinů je, dle jejich názoru, nízká reprodukovatelnost výsledků. Proto byly v laboratoři VUP extrakty některých vzorků analyzovány na koncentraci ZEA soupravami různých šarží. Z údajů uvedených v následující tabulce vyplývá vysoká korelace mezi výsledky získanými použitím souprav s různým číslem šarže.

Tabulka: srovnání výsledku získaných použitím souprav různých šarží, ROQ 25 - 500ppb.

vzorek	šarže 1	šarže 2
1 pšenice VUP	51,2	52,5
2 siláž VUP - nekvalitní	26,9	< 25
3 siláž VUP - standard	113,8	108,6
4 pšenice 30 - extrakt VURV	<25	< 25
5 pšenice 64 - extrakt VURV	<25	*
6 pšenice VURV- spikeT2 (20 ppb)	< 25	< 25
7 CRM 324 ppb	329,4	342
8 pšenice VŠCHT 62	< 25	< 25
9 pšenice VURV 70	< 25	< 25
10 kukuřice VŠCHT KIS2	>500	>500
11 kukuřice VŠCHT KIS 1	>500	462,3
12 kukuřice VŠCHT KIBTBN2	159,4	127,2
13 pšenice VŠCHT 22	118,7	129,6
14 pšenice VŠCHT 33	<25	< 25
15 pšenice VŠCHT 34	119,2	144,5
výtěžnost	101,7%	105,5%

Homogenita vzorku č.16

Ve VÚRV byla provedena zkouška homogenity vzorku č.16 (VŠCHT C.71) pomocí 5 navážek po 5 g pro stanovení DON, získané výsledky jsou uvedeny v tabulce:

navážka 5 g	DON (ppb) 100%
1	1370
2	1460
3	1520
4	1590
5	1470

72,5 průměr

1480 směrodatná odchylka (tj. 4,89 %)

Detailní výsledky analýz (VŠCHT)

Vzorek č. 10	NIV	DON	FUS-X	ADONs	HT-2	T-2	ZEA
ref. mat.	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg
KIS2a	274,0	41308,3	40,2	4985,3	1148,5	197,3	23426,4
KIS2b	273,0	40914,7	40,0	3890,3	1449,2	231,0	36179,6
KIS2c	260,0	41500,9	41,5	4251,1	1250,0	221,1	28549,4
KIS2d	278,0	42700,2	37,4	4564,5	1390,0	210,8	24127,5
Průměr	271,3	41606,0	39,8	4422,8	1309,4	215,1	28070,7
Smodch	7,8	769,2	1,7	465,3	136,0	14,4	5862,4
RSD	2,9	1,8	4,3	10,5	10,4	6,7	20,9
LOD	0,5	0,5	1,0	1,0	8,0	0,5	1,0
LOQ	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

Vzorek č. 11	NIV	DON	FUS-X	ADONs	HT-2	T-2	ZEA
ref. mat.	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg
KIS2a	141,1	544,1	42,2	25,2	pod LOD	pod LOD	150,3
KIS2b	149,3	511,4	44,0	19,3	pod LOD	pod LOD	143,6
KIS2c	147,0	570,0	37,8	20,7	pod LOD	pod LOD	125,0
KIS2d	151,0	500,6	32,4	20,6	pod LOD	pod LOD	163,0
Průměr	147,1	31,5	39,1	21,5			145,5
Smodch	4,3	31,6	5,2	2,6			15,8
RSD	2,9	5,9	13,2	12,0			10,9
LOD	0,5	0,5	1,0	1,0	8,0	0,5	1,0
LOQ	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

Vzorek č. 12	NIV	DON	FUS-X	ADONs	HT-2	T-2	ZEA
ref. mat.	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg
KIBTBL2a	pod LOD	104,15	40,90	pod LOD	pod LOD	pod LOD	pod LOQ
KIBTBL2b	pod LOD	103,71	45,01	pod LOD	pod LOD	pod LOD	pod LOQ
KIBTBL2c	pod LOD	100,68	43,61	pod LOD	pod LOD	pod LOD	pod LOQ
KIBTBL2d	pod LOD	102,85	42,01	pod LOD	pod LOD	pod LOD	pod LOQ
Průměr	pod LOD	102,8	42,9	pod LOD	pod LOD	pod LOD	pod LOQ
Smodch		1,5	1,8				
RSD		1,5	4,2				
LOD	0,5	0,5	1,0	1,0	8,0	0,5	1,0
LOQ	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

Vzorek č. 13	NIV	DON	FUS-X	ADONs	HT-2	T-2	ZEA
ref. mat.	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg
RM22a	pod LOQ	2980,2	42,5	89,1	21,3	pod LOQ	101,9
RM22b	pod LOQ	3162,5	38,0	96,5	22,9	pod LOQ	83,2
RM22c	pod LOQ	2767,5	37,2	82,2	20,1	pod LOQ	123,1
Průměr	pod LOQ	2970,1	39,2	89,3	21,4	pod LOQ	102,7
Smodch		197,7	2,9	7,1	1,4		20,0
RSD		6,7	7,3	8,0	6,6		19,4
LOD	0,5	0,5	1,0	1,0	8,0	0,5	1,0
LOQ	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

Vzorek č. 15	NIV	DON	FUS-X	ADONs	HT-2	T-2	ZEA
ref. mat.	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg
RM34a	pod LOQ	2800	36,2	82,3	21,3	pod LOQ	135,4
RM34b	pod LOQ	2836,8	39,5	80,8	24,3	pod LOQ	126,5
RM34c	pod LOQ	2714,6	38,0	74,2	23,3	pod LOQ	144,3
Průměr	pod LOQ	2783,8	37,9	79,1	23,0	pod LOQ	135,4
Smodch		62,7	1,7	4,3	1,5		8,9
RSD		2,3	4,4	5,4	6,6		6,6
LOD	0,5	0,5	1,0	1,0	8,0	0,5	1,0
LOQ	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

Vzorek č. 14	NIV	DON	FUS-X	ADONs	HT-2	T-2	ZEA
ref. mat.	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg
RMP33a	33,2	971,2	42,0	14,6	12,4	pod LOD	18,2
RMP33b	36,2	958,0	36,0	13,5	13,1	pod LOD	14,0
RMP33c	39,2	1013,4	38,0	12,8	11,9	pod LOD	16,2
Průměr	36,2	980,9	38,7	13,6	12,5	pod LOD	16,1
Smodch	3,0	28,9	3,1	0,9	0,6		2,1
RSD	8,2	3,0	7,9	6,6	4,8		13,0
LOD	0,5	0,5	1,0	1,0	8,0	0,5	1,0
LOQ	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

Vzorek č. 16	NIV	DON	FUS-X	ADONs	HT-2	T-2	ZEA
ref. mat.	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg
RMP71a	99,2	999,6	39,4	11,2	12,8	pod LOD	16,5
RmP71b	90,3	967,0	42,1	12,8	13,7	pod LOD	16,0
RMP71c	107,7	1043,0	38,9	13,5	14,3	pod LOD	17,4
Průměr	99,1	1003,2	40,1	12,5	13,6	pod LOD	16,6
Smodch	8,7	38,1	1,7	1,2	0,8	0,0	0,7
RSD	8,8	3,8	4,3	9,4	5,6	0,0	4,1
LOD	0,5	0,5	1,0	1,0	8,0	0,5	1,0
LOQ	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

Vzorek č. 1	NIV	DON	FUS-X	ADONs	HT-2	T-2	ZEA
ref. mat.	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg
VUP1A	19,0	65,0	86,2	48,7	55,1	pod LOQ	pod LOQ
VUP1B	17,6	67,2	93,2	42,9	56,3	pod LOQ	pod LOQ
VUP1C	17,1	64,8	93,1	45,9	57,3	pod LOQ	pod LOQ
Průměr	17,9	65,7	90,8	45,8	56,2	pod LOQ	pod LOQ
Smodch	1,0	1,4	4,0	2,9	1,1		
RSD	5,5	2,1	4,4	6,3	2,0		
LOD	0,5	0,5	1,0	1,0	8,0	0,5	1,0
LOQ	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

Vzorek č. 2	NIV	DON	FUS-X	ADONs	HT-2	T-2	ZEA
ref. mat.	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg
VUP2A	25,2	43,0	86,0	50,3	61,3	pod LOQ	pod LOQ
VUP2B	23,7	45,1	97,4	47,5	57,8	pod LOQ	pod LOQ
VUP2C	21,2	41,9	99,4	46,1	69,6	pod LOQ	pod LOQ
Průměr	23,4	43,3	94,3	48,0	62,9	pod LOQ	pod LOQ
Smodch	2,6	1,6	7,3	2,1	6,1		
RSD	8,6	3,7	7,7	4,5	9,6		
LOD	0,5	0,5	1,0	1,0	8,0	0,5	1,0
LOQ	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

Vzorek č. 3	NIV	DON	FUS-X	ADONs	HT-2	T-2	ZEA
ref. mat.	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg
VUP3A	23,0	67,0	86,2	47,5	62,3	pod LOQ	pod LOQ
VUP3B	20,7	63,6	93,4	44,0	64,5	pod LOQ	pod LOQ
VUP3C	21,1	62,0	97,7	43,6	59,2	pod LOQ	pod LOQ
Průměr	21,6	64,2	92,4	45,0	62,0	pod LOQ	pod LOQ
Smodch	1,2	2,6	5,8	2,1	2,7		
RSD	5,6	4,0	6,3	4,8	4,3		
LOD	0,5	0,5	1,0	1,0	8,0	0,5	1,0
LOQ	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

6 Závěrečný komentář

V průběhu řešení validační studie bylo získáno velké množství dat, jejichž vyhodnocení a zobecnění je velmi obtížné. Výsledky všech tří zúčastněných laboratoří jsou u některých analytů a v některých maticích značně odlišné, což mohlo být zapříčiněno několika faktory.

Prakticky zásadním zdrojem chyb a nepřesností může být odběr vzorků pro analýzy a jejich následná úprava a homogenizace. I když vzorkování pro účely této studie probíhalo dle standardních postupů a ve smyslu směrnice EK, materiály, jako např. kukuřičná siláž, se vyznačují velmi různorodým složením a velikostí částic a použitím dostupného laboratorního vybavení nelze určitou nehomogenitu vyloučit. Analyzovaný materiál nebyl tedy zcela identický (a možná to ani není možné při jeho charakteru - jednotlivá zrna - dosti velké částice a jejich nehomogenní distribuce ve vzorku). I při velmi pečlivé homogenizaci menších částic šrotu po umletí vzorku a důkladném promíchávání nelze určitou nehomogenitu vyloučit - ale měla by být co nejnižší. Nadto je pro celý testování z připraveného vzorku odebíráno relativně velmi malé množství. Odběr vzorku a jeho následná homogenizace pro vlastní analytiku je proto jedním z klíčových momentů stanovení obsahu mykotoxinů. I když vzorkování pro účely této studie probíhalo dle standardního postupu a ve smyslu směrnice EK, mohla být nehomogenita matic jedním z důvodů rozdílných výsledků.

Dalším problematickým momentem se zdá být ředění vzorků. Při vyšších obsazích sledovaných mykotoxinů je nutné ředění původního extraktu před vlastním stanovením, aby bylo možné obsah analytu kvantifikovat (v závislosti na kvantifikačním rozsahu testu). Tomuto problému je možné předejít výběrem metody s odpovídající citlivostí (v případech určitých předpokládaných záchytů). Problém několikanásobného ředění je třeba zohlednit také v případě CRM.

Již samotný fakt, že jde o srovnání rozdílných metod, jakými chromatografie a imunoenzymologie bezpochyby jsou, přináší některé složité otázky. Každá z metod zahrnuje určité faktory, které mohou ovlivnit dosažené výsledky (křížové reakce, citlivost konkrétní metody, postup přípravy vzorku apod.).

Mnoho faktorů ovlivňujících přesnost výsledku je ale také v rámci ELISA stanovení. Laboratoře VUP a VURV pracovaly s ELISA soupravami rozdílných citlivostí – soupravy typu FAST a soupravy s maximální citlivostí. I z tohoto důvodu jsou výsledkem v některých případech rozdílné hodnoty nebo hodnoty mimo kvantifikační rozsah stanovení.

U ELISA stanovení je obvyklé použít pro vyhodnocení výsledku CRM – certifikovaný referenční materiál. Jedná se o materiál se známým a potvrzeným obsahem konkrétního mykotoxinů. Vzorek CRM projde testem s analyzovanými vzorky, na základě rozdílu deklarované a výsledné hodnoty je vypočtena procentuální výtěžnost testu. Pomocí této hodnoty jsou přepočteny výsledky analyzovaných vzorků.

Kontrolou mohou být pouze CRM (certifikovaný referenční materiál), avšak komerčně dle současných znalostí autorů studie nejsou k dispozici CRM např. s vyššími obsahy DON (nejvýše 2 600 ppb), CRM pro ZEA je pouze jeden a CRM pro T-2 není k dispozici vůbec. I v případě CRM je ale několik faktorů, které mohou způsobit chybu či nepřesnosti. Problematický je již deklarovaný obsah analytu. V dostupných CRM je deklarovaný obsah v

relativně vysokých rozpětích ± 25 %. Pro některé mykotoxiny není CRM k dispozici, pro ostatní mykotoxiny je v různých obdobích možné získat CRM s různou koncentrací. Koncentrace mykotoxinů v CRM často mimo kvantifikační rozsah použité metody (a z toho vyplývající nutnost ředění) jsou dalším omezujícím faktorem.

Proto by jedním z budoucích cílů měl být vývoj tuzemských maximálně homogenních CRM. Autoři si ale uvědomují, že příprava CRM je velmi náročná jak po stránce přístrojového vybavení (homogenizace), tak i jeho následné validace radou akreditovaných laboratoří. Proto druhou variantou vedle vývoje tuzemských CRM je doporučení stávajícím výrobcům, aby s měnící se legislativou (změna hygienických limitů) připravili CRM odpovídající koncentrace a navíc připravili CRM dosud na trhu nedostupná (T-2 toxin apod.).

U stanovení deoxynivalenolu bylo dosaženo relativně vysoké shody mezi všemi laboratořemi. Ve vzorcích především pšenice po přirozené infekci nebyly záchyty DON vysoké a pohybovaly se do 0,5ppm, u vzorků kukuřice po umělé infekci byl obsah DON vysoký a přesahoval hygienické limity. Absence číselných hodnot u laboratoře VUP byla dána použitím soupravy s vysokou citlivostí. Pokud jsou hodnoceny vzorky s obsahy DON do cca 6000 ppb, jsou soupravy RIDASCREEN FAST DON vhodné a podle zkušeností poskytují reálné výsledky (ověřování pomocí CRM a účast v kruhových testech FAPAS). Jedná-li se o vzorky s vysoce nadlimitními obsahy DON a je nutno používat ředící faktory 5 - 20 (30 000 - 120 000), může docházet při použití souprav RIDASCREEN FAST DON k určitému nadhodnocení výsledku jednak ředěním a jednak možnými křížovými reakcemi. Materiály s takovou kontaminací však prakticky nepřicházejí v úvahu při hodnocení surovin pro potravinářské zpracování, jedná se pouze o vzorky z cílených velmi masivních infekcí jednotlivých porovnávaných genotypů při řešení výzkumných projektů s cílem vyvinout odolné materiály. Jsou-li všechny vzorky hodnoceny stále stejnou metodou, je chyba stanovení u všech položek souboru stejná a rozdíly v obsahu DON odrážejí skutečné rozdíly mezi položkami. V mnoha případech navzájem korelují výsledky stanovení obsahu DON a kvantitativního obsahu DNA patogena. Používání souprav FAST Ize u DONu pokládat za vhodné, i jeho hodnoty v CRM jsou jim přizpůsobeny. Hodnoty obsahu DON v komerčně dostupných CRM cca 700, 2000 a 2600 ppb jsou voleny v rozsahu pod a nad hygienickým limitem, takže mohou sloužit pro kontrolu správnosti stanovení a zjištění hodnoty výtěžnosti metody. Stanovení výtěžnosti pomocí CRM, který je nutno nejméně 10x ředit v případě souprav s vysokou citlivostí, je nutné považovat pouze za orientační.

V případě T-2 toxinu nebyl k dispozici CRM. Opět korelují mezi oběma použitými metodami záchyty T-2 ve vysokých a nízkých obsazích.

U zearalenonu dobře korelují výsledky dosažené na obou pracovištích používajících ELISA soupravy (VUP, VURV). U metody LC bylo dosaženo u některých vzorků nižších hodnot.

U T-2 a ZEA mykotoxinů je zřejmé, že je třeba dále pokračovat v optimalizaci analytických metod včetně chromatografických technik a že je třeba pokračovat ve shromažďování dalších údajů z monitoringu a při zjišťovaných velmi nízkých obsazích je nutné používání souprav ELISA s vyšší citlivostí, než mají soupravy FAST.

Jedním z argumentů používaných některými autory proti používání ELISA testu pro stanovení mykotoxinů je, dle jejich názoru, nízká reprodukovatelnost výsledku. Proto byly v laboratoři VUP extrakty některých vzorků analyzovány na koncentraci ZEA soupravami různých šarží. Z výsledku uvedených ve studii vyplývá vysoká korelace mezi výsledky získanými použitím souprav s různým číslem šarže.

Dalším z výsledku validační studie je ověření smutečnosti, že pro získání relevantních výsledku lze v krajním případě měřit absorbance vzorku při vlnových délkách ne příliš odlišných od vlnových délek doporučených výrobcí. V modelovém experimentu byl obsah zearalenonu měřen nejen při doporučené vlnové délce, ale i při vlnové délce odlišné o 20 nm

nebyly zaznamenány zásadní rozdíly či nepřesnosti výsledku. Relace mezi získanými koncentracemi zůstaly zachovány.

Finálním shrnutím výsledku validační studie je to, že po odstranění problému při odběru a úpravě vzorku a nejasností ohledně CRM je ELISA test plně vhodný pro mykotoxikologická stanovení. Je vhodné zvolit metodu s vyhovující citlivostí a ROQ. Při správném provedení ELISA analýz je jedním z důležitých ukazatelů svědčících o věrohodnosti výsledku hodnota korelačního koeficientu křivky standardu. V případě analýz uvedených ve validační studii se tato hodnota pohybovala na úrovni 0,98 - 0,99.

Srovnávané analytické metody jsou pro stanovení mykotoxinů využitelné, ale při volbě metody musí analytik vzít v úvahu mnoho faktorů. Především původ analyzovaného vzorku (přirozená infekce, sekundární infekce při skladování, po umělých infekcích apod.) s předpokládanou úrovní kontaminace mykotoxiny a dle toho volil citlivost metody. Volba vhodné metody i její citlivosti je důležitá i vzhledem k předpokládanému využití analyzované matrice (např. potravinářská pšenice). Samostatnou studii vyžaduje validace odběru vzorku jednotlivých matric. Ukazuje se opakovaně, že vzorkování je jedním ze základních zdrojů chyb.