



VĚDECKÝ VÝBOR FYTOSANITÁRNÍ A ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

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

Název dokumentu:

Mykotoxiny

Poznámka:

Zpracoval:

Prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc.

ve spolupráci s Ing. Milenou Zachariášovou, Ing. Alexandrou Malachovou, Ing. Martou Kostelanskou a Doc. Ing. Vladimírem Kocourkem CSc.

**Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 PRAHA 6 -
Ruzyně**

Tel.: +420 233 022 324 , fax.: +420 233 311 591, URL: <http://www.phytopsanitary.org>

Souhrn

Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity produkované širokou škálou mikroskopických vláknitých hub napadajících drobnozrnné cereálie a kukuřici. Jedná se především o rody *Alternarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*. Vláknité houby rodu *Fusarium* (většinou *F. culmorum* a *F. graminearum*) jsou nejběžnějšími producenty trichothecenů, fumonisinů a zearalenonu, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* a *A. nomius* produkují zejména aflatoxiny a ochratoxin A je nejčastěji produkován vláknitými houbami rodu *Aspergillus* a *Penicillium*. Dalším významným polním pathogenem je takzvaný námel (*Claviceps purpurea*), který zodpovídá za výskyt takzvaných námelových (ergotových) alkaloidů. Kromě značného snížení technologické kvality pěstovaných cereálií, závažným problémem v potravinářství je hlavně přenos mykotoxinů do potravin, případně další uvolňování jejich tzv. „maskovaných“ forem, ke kterému běžně dochází při technologickém zpracování, zejména během sladařsko-pivovarské technologie.

Předkládaná studie komplexně shrnuje aktuální problematiku mykotoxinů a poskytuje podrobný přehled týkající se jejich výskytu v potravinách a krmivech, přičemž největší pozornost je věnována fusariovým mykotoxinům, které se v našich podmínkách vyskytují nejběžněji. Je zde poskytnut přehled moderních multidetekčních metod využívaných pro stanovení volných i konjugovaných mykotoxinů, které jsou založené především na kapalinové chromatografii s hmotnostně spektrometrickou detekcí (LC-MS). Přílohou rozsáhlé rešerše je řada případových studií, jež poskytují přehled výsledků nejnovějšího výzkumu realizovaného na Ústavu chemie a analýzy potravin Vysoké školy chemicko technologické v Praze. Tyto studie se týkají (i) dynamiky volných a vázaných trichothecenových mykotoxinů v průběhu vaření piva, (ii) hladin kontaminace mykotoxiny v cereálních výrobcích dostupných na evropském trhu se zvláštním zaměřením na dětskou a kojeneckou výživu a biopotraviny (iii) hygienicko-toxikologické kvality krmiv.

Summary

Mycotoxins are the toxic secondary metabolites produced by wide scope of microscopic filamentary fungi affecting small grains cereals and maize. Those are first of all *Alternarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium* genera. Filamentary fungi genus *Fusarium* (mostly *F. culmorum* a *F. graminearum*) are most frequent producers of trichothecenes, fumonisins and zearalenone, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. nomius* produce aflatoxins and ochratoxin A is mostly produced by filamentary fungi *Aspergillus* and *Penicillium* genera. Additionally, further significant pathogen is ergot (*Claviceps purpurea*), which is responsible for ergot alkaloids occurrence. In addition to decreasing of technological quality of grown cereals, a serious problem of food safety is the carry-over of mycotoxins to processed foods, eventually further releasing of their “masked” forms, which is relatively common, especially in case of the malting and brewing industry.

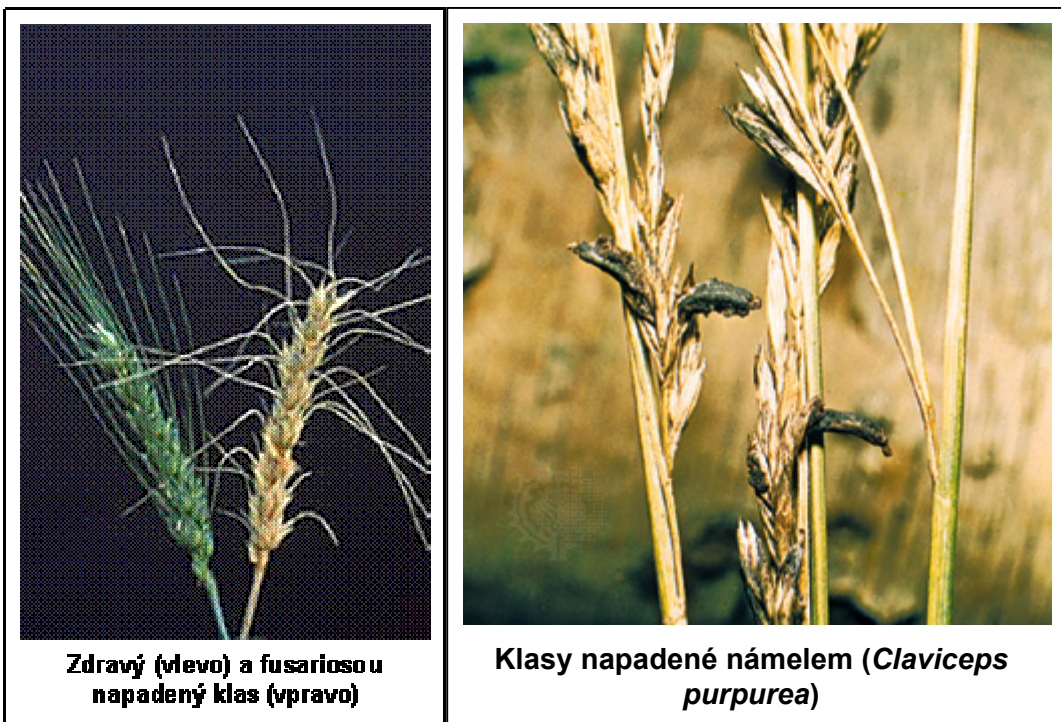
This study summarizes the actual problematic of mycotoxins and provide the detail review concerning the mycotoxins occurrence in food and feed, whereas the most attention is paid for *Fusarium* mycotoxins, which are most common in our geographic area. There is summarized the overview of modern multianalyte methods employed for determination of free and conjugated mycotoxins based first of all on the liquid chromatography coupled with mass spectrometric detection (LC-MS). The attachment of the review is several case studies providing overview of the latest research realized on the Department of Food Chemistry and Analysis of the Institute of Chemical Technology in Prague. Those studies concerning with (i) dynamic of free and conjugated trichothecene mycotoxins during the brewing technology, (ii) mycotoxins contamination levels in cereal products available on the European market with focusing on baby food and BIO products (iii) hygiene-toxicological quality of feed.

1.	ÚVOD.....	5
2.	SKUPINY MYKOTOXINŮ A JEJICH PRODUCENTI.....	6
2.1	TRICHOTHECENY.....	6
2.2	FUMONISINY.....	9
2.3	ZEARALENONY.....	10
2.4	OCHRATOXIN.....	11
2.5	AFLATOXINY.....	12
2.6	ALTERNARIA.....	14
2.7	NÁMELOVÉ ALKALOIDY.....	15
2.8	MONILIFORMIN.....	16
2.9	FUSAROVÁ KYSELINA.....	17
2.10	CITRININ.....	17
2.11	PATULIN.....	18
2.12	STERIGMATOCYSTIN.....	19
2.13	MASKOVANÉ MYKOTOXINY.....	19
3.	MYKOTOXINY V POTRAVINÁCH.....	21
3.1	VÝSKYT MYKOTOXINŮ V PIVECH Z OBCHODNÍ SÍTĚ.....	22
3.2	VÝSKYT MYKOTOXINŮ V PRODUKTECH PEKÁRENSKÉ TECHNOLOGIE.....	23
4.	MYKOTOXINY V KRMIVECH.....	24
4.1	MYKOTOXINY V SILÁŽI.....	27
4.2	DEKONTAMINACE MYKOTOXINŮ V KRMIVECH.....	29
5.	ANALYTICKÉ METODY.....	31
5.1	VZORKOVÁNÍ.....	31
5.2	EXTRAKCE A PŘEČIŠTĚNÍ VZORKU.....	33
5.3	IDENTIFIKACE A KVANTIFIKACE.....	35
6.	LEGISLATIVA.....	41
7.	PŘÍLOHY.....	45
	<i>Případová studie 1.....</i>	<i>45</i>
	<i>Případová studie 2.....</i>	<i>56</i>
	<i>Případová studie 3.....</i>	<i>65</i>
	<i>Případová studie 4.....</i>	<i>71</i>
	<i>Případová studie 5.....</i>	<i>73</i>
8.	ZÁVĚR.....	75
9.	LITERATURA.....	76

1. Úvod

Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity produkované širokou škálou mikroskopických vláknitých hub napadajících drobnozrnné cereálie a kukuřici, přičemž nejrozšířenějšími rody těchto vláknitých hub jsou *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*. Spory těchto hub se běžně nacházejí v půdě, infikují zrno a prostřednictvím mízního systému pak celou rostlinu, čímž dochází ke znehodnocování pěstovaných plodin a ke snižování objemu zemědělské produkce. Tyto mikromycety se vyskytují prakticky ve všech klimatických pásech, kde podmínky dovolí pěstování kulturních plodin. Vláknité houby rodu *Fusarium*, většinou *F. culmorum* a *F. graminearum*, jsou nejběžnějšími producenty trichothecenů a zearalenonu. *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* a *A. nomius* produkují zejména aflatoxiny, zatímco ochratoxin A je nejčastěji produkován houbami rodu *Aspergillus* a *Penicillium*. Dalším významným polním patogenem je takzvaný námel způsobený vláknitou houbou *Claviceps purpurea*, který postihuje cereálie, včetně sladovnického ječmene. Pomineme-li značné snížení technologické kvality produkovaných cereálií vlivem těchto fungálních patogenů a jejich sekundárních metabolitů, přenos mykotoxinů do potravin, případně jejich dalšímu uvolňování z jejich „maskovaných“ forem, ke kterému běžně dochází během technologického zpracování (zejména sladařsko-pivovarské technologii) znamená v potravinářství závažný problém a vysoké zdravotní riziko pro exponovanou populaci.

S rostoucí osvětou oblasti výživy a jejího vlivu na lidské zdraví roste zájem o kvalitní potraviny, a to zejména z hlediska jejich zdravotní nezávadnosti. K zajištění hygienicko-toxikologické nezávadnosti potravin živočišného původu je však nezbytné dbát i na složení a kvalitu podávaných krmiv a tím udržovat chovná zvířata v dobré zdravotní kondici, což bylo v minulosti často opomíjeno. Také u krmiv totiž dochází ke kontaminaci přírodními toxiny a řadou dalších nežádoucích látek. Je důležité klást značný důraz na složení krmiv vzhledem k případnému transferu kontaminantů do masa a mléka, nemluvě o celkové „pohodě“ („welfare“) hospodářských zvířat vyžadované novou evropskou legislativou.



Zdravý (vlevo) a fusariosou napadený klas (vpravo)

Klasy napadené námelem (*Claviceps purpurea*)

2. Skupiny mykotoxinů a jejich producenti

2.1 Trichotheceny

Nejvýznamnějšími producenty trichothecenů jsou jednotlivé druhy plísní *Fusarium* (*Fusarium poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*). Produkce těchto mykotoxinů byla prokázána i u některých kmenů rodu *Myrothecium*. Nejčastěji je jejich kontaminace sledována u cereálií, zvláště pak pšenice a kukuřice. Výskyt trichothecenů byl prokázán i u sójových bobů, banánů, manga a dále v pivu, kam přechází z kontaminovaného ječmene. Z hlediska chemické struktury představují trichotheceny pestrou skupinu sloučenin. Podle charakteristických vlastností a počtu funkčních a substitučních skupin se rozlišují čtyři základní skupiny trichothecenů (1,2,3):

- *typ A* (pozice C-8 bez oxoskupiny): T-2, HT-2 toxin, neosolaniol (NEO), diacetoxyscirpenol (DAS)

- *typ B* (na C-8 oxoskupina): nivalenol (NIV), deoxynivalenol (DON), 3-acetyldeoxynivalenol (3-ADON), 15-acetyldeoxynivalenol (15-ADON), fusarenon-X (FUS-X)
- *typ C* (v poloze C-7 a C-8 nebo C-8 a C-9 další epoxyskupina)
- *typ D* (mezi C-4 a C-12 makrocyclický kruh)

Celkem se jedná se o skupinu více než 180 typů s charakteristickým trichothecenovým jádrem (sesquiterpenoidní strukturou). Všechny trichotheceny mají v poloze 9,10 dvojnou vazbu a v poloze 12,13 epoxy skupinu. Trichotheceny jsou méně stabilní v silně alkalickém prostředí a jsou známé jako inhibitory proteosyntézy a imunosupresivní látky. U člověka byla popsána alimentární toxická aleukie „septická angína“. Trichotheceny jsou rychle resorbovány z gastrointestinálního traktu a v játrech se metabolizují na epoxidy, které negativně ovlivňují základní funkce, jako je syntéza bílkovin a DNA, a tím negativně ovlivňují replikaci buněk (4).

Deoxynivalenol (DON)

Producenty DON jsou toxinogenní kmeny rodu *Fusarium*. V roce 1973 byl v USA izolován DON z kukuřice napadené mikromycetami *Fusarium graminearum*. Při zkrmování DON kontaminované kukuřice bylo u prasat pozorováno zvracení (vomitus). Na základě tohoto byl odvozen triviální název tohoto mykotoxinu – *vomitoxin*.

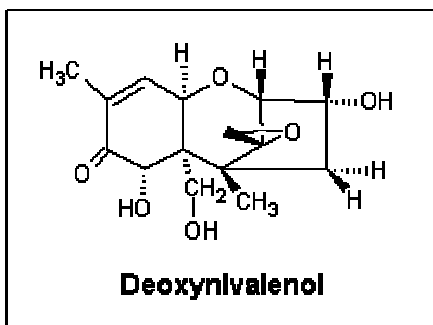
Z chemického hlediska patří DON mezi významné zástupce mykotoxinů trichothecenové skupiny typu B. Je dobře rozpustný v acetonitrilu, chloroformu, směsi ethylacetátu a acetonitrilu (4:1), ve směsi chloroformu s methanolem (9:1) a nerozpustný v hexanu a petroletheru.

Z fusariových mykotoxinů je nejčastěji nalézaným mykotoxinem v krmivech, je však považován za nejméně toxický pro živočichy. Polygastrři jsou méně citliví na DON než monogastrři, protože v batoru se DON konvertuje na méně toxickou formu deepoxy-deoxynivalenol (DOM-1) (4).

V poslední době vyvstává důležitá otázka týkající se relativní toxicity 3-acetyldeoxynivalenolu (3-ADON) a 15-acetyldeoxynivalenolu (15-ADON), jejichž prekursorem je právě DON a spolu s ním jsou někdy detekovány v obilovinách.

Toxické účinky DON jsou spojovány s gastroenteritidami, intestinálními hemorhagiemi a úhynem. Cílovým působením toxického účinku jsou enterocyty, kde inhibuje syntézu proteinů a vyvolává apoptózy.

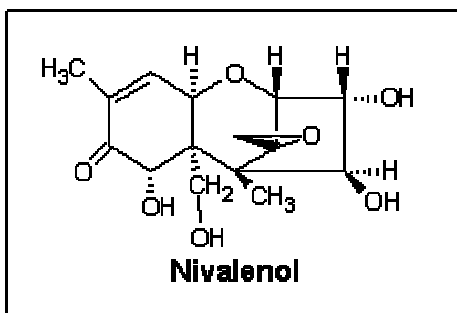
Nejčastěji se vyskytuje v obilovinách (kukuřice, proso, pšenice, ječmen) (1,2,3).



Nivalenol

Přírodně vyskytující se toxin, který je řazen mezi významné zástupce trichothecenů typu B. NIV je produkován toxinnogenním kmenem rodu *Fusarium* (*F. sporotrichioides*).

NIV je chemicky charakterizován jako 3a,4b,7a,15-tetrahydroxy-12,13-epoxytrichotec-9-en-8-one (Obr.2). Je dobře rozpustný v polárních organických rozpouštědlech (methanol, ethylacetát). V posledních dvou letech je stále častěji detekován v různých obilovinách. Dosud pro NIV nejsou stanoveny hygienické limity (1,2,3).



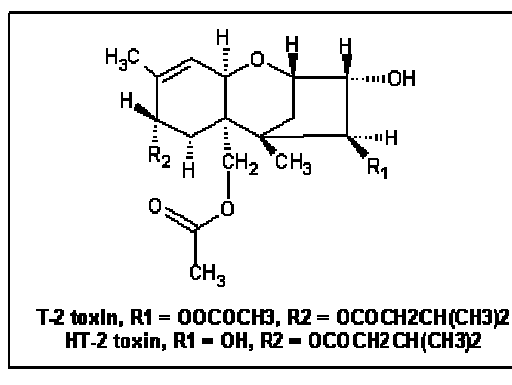
T-2 a HT-2 toxin

T-2 toxin byl izolován v roce 1968 z kultury *Fusarium sporotrichioides* Sherb. Je považován za jednoho z pravděpodobných původců mykotoxikózy – alimentární toxické aleukie (ATA). Producenti T-2 toxinu jsou toxinogenní kmeny rodu *Fusarium*. Patří mezi významné zástupce mykotoxinů trichothecenové skupiny A (**Obr.3**). Je dobře rozpustný v acetonitrilu, chloroformu, směsi ethylacetátu s acetonitrilem (4:1), ve směsi chloroformu s methanolem (9:1) a nerozpustný v hexanu a petroletheru (1,3,8).

T-2 a HT-2 inhibují syntézu proteinů a funkci mitochondrií, způsobují imunosupresi a cytotoxicitu u živočichů a buněčných kultur. Na základě prováděných experimentů se zvířaty se T-2 považuje za potenciální karcinogen a mutagenní sloučeninu (4).

V obilovinách se běžně vyskytují T-2 a HT-2 současně, jelikož jeden přechází v druhý. HT-2 je deacetylovaná forma T-2 toxinu. T-2 a HT-2 se nejčastěji vyskytují v ječmeni a ovsu. Studie T-2 ukazují, že nachází-li se T-2 ve vysokých koncentracích v krmivech podávaným skotu, může se spolu se svými metabolity vylučovat v malém množství do mléka (4).

V současnosti jsou T-2 a HT-2 předmětem zájmu Evropské unie a v nejbližší době budou pro tyto mykotoxiny zavedeny maximální limity.



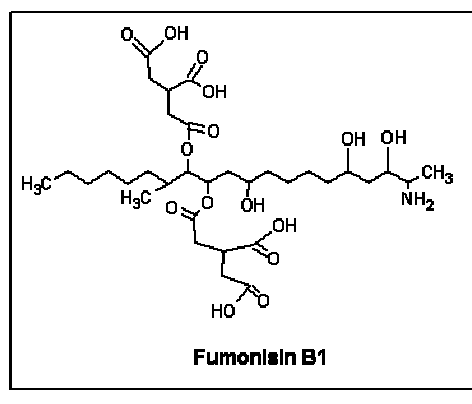
2.2 Fumonisin

Tato skupina mykotoxinů byla objevena koncem 80. let 20.století v Jihoafrické republice. Producenti fumonisinů jsou toxinogenní kmeny rodu *Fusarium*. Nacházejí se především v kukuřici a v příslušných produktech používaných jako krmivo (siláž), také byly

nalezeny v rýži a prosu. V současné době je známa celá řada fumonisinů (fumonisin A₁ , A₂ , B₁ , B₂ , B₃ , B₄), z nichž nejvýznamnější jsou fumonisin B₁ (FB₁) a B₂ (FB₂). FB₁ a FB₂ jsou jako jediné legislativně ošetřeny (1,2,3).

Fumonisin je možno chemicky charakterizovat jako složité alifatické sloučeniny. Jde o velmi polární diestery propan-1,2,3-trikarboxylové kyseliny s pentahydroxydimethyleikosanem. Jsou relativně značně termostabilní. Účinně je lze z povrchu kukuřice odstranit omytím, zejména v alkalických roztocích. Jsou rozpustné ve vodě, více rozpustné ve směsi acetonitrilu s vodou, dobře rozpustné v methanolu a nerozpustné v nepolárních rozpouštědlech.

FB₁ je převládajícím fumonisinem detekovaný v potravinách. Vykazuje odlišné toxické účinky u člověka a zvířat. Je mu přičítána rakovina jícnu, hepatotoxicita a nefrotoxicita. Fumonisin vyvolávají u hospodářských zvířat řadu onemocnění. U koní jde o mykotoxikosu zvanou ELEM (z angl. equine leukoencephalomalasia), u prasat vyvolává edem plic PPE (z angl. Porcine Pulmonary Edema). Byly prokázány důkazy jejich hepatotoxicity a nefrotoxicity (4).



2.3 Zearalenony

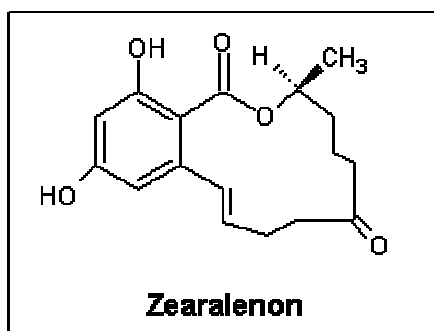
Producenty zearalenonu jsou zejména toxigenní kmeny rodu *Fusarium*. Mezi nejvýznamnějšími se uvádí *Fusarium graminearum* a *F.semitectum*. Zearalenon (ZON) je chemicky charakterizován jako lakton kyseliny β-resorcylové. V organismu je biotransformován na estrogeně mnohem aktivnější α-zearalenol (α-ZEA) a β-zearalenol (β-ZEA). Tyto vzniklé metabolity mohou následně konjugovat s glukuronovou kyselinou. Dále se mohou vyskytovat další deriváty ZON jako jsou α-zearalanol (α-ZAL), β-zearalanol (β-

ZAL) a zearalanon (ZAN), dále pak např. 7 α -zearalanol, 7 β -zearalanol, 11-hydroxyzearalenon, 14-hydroxyzearalenon, 4-acetylzearalenon, 5-formylzearalenon (6).

V posledních letech je diskutován vliv konjugátu zearalenonu, zearalenon-4- β -D-glukopyranosidu na zdraví hospodářských zvířat a člověka. Zearalenon-4- β -D-glukopyranosid se vyskytuje také v obilovinách a hovoříme o něm jako o tzv. „maskovaném“ mykotoxinu (viz. kapitola 2.13).

U ZON byla prokázána hepatotoxicita, hematotoxicita, imunotoxicita a genotoxicita. Není významně akutně toxický, spolu se svými deriváty však vykazuje významné estrogení a anabolické účinky. U monogastrických zvířat vykazuje estrogení aktivitu, velmi citlivá jsou především prasata (prasnice). Zdravotní komplikace se mohou dostavit již při koncentraci 1 mg/kg krmiva. Pro člověka může být zdrojem ZON mléko, do kterého se ZON vylučuje asi 0,01 % přijaté denní dávky. Odhaduje se, že pro člověka je bezpečný příjem ZON ve výši 0,05 μ g/kg živé hmotnosti. Vzhledem k průměrným koncentracím ZON v krmivech nepředstavuje přechod tohoto mykotoxinu a jeho metabolitů do tkání a mléka polygastrů a prasat významné zdravotní riziko pro člověka po konzumaci masa a mléka. Přesný mechanismus toxicity ZON nebyl prozatím kompletně prostudován (4).

Jedná se o to relativně lipofilní sloučeninu, která se vyskytuje v různých obilovinách, hlavně v kukuřici. V menším rozsahu se také vyskytuje u ječmene, pšenici, čiroku, prosu a rýže (1,2,3).



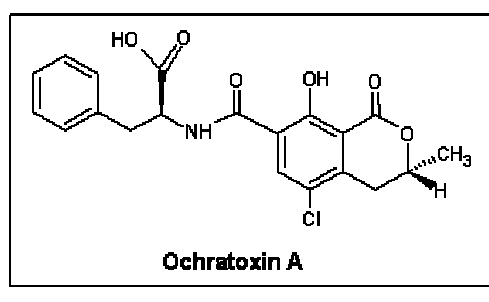
2.4 Ochratoxin

Při produkci ochratoxinů se uplatňují především vláknité houby *Aspergillus ochraceus* (v tropických a subtropických oblastech) a *Penicillium viridicatum* (v chladných oblastech), který produkuje nejtoxičtější mykotoxin této skupiny, ochratoxin A (OTA), který

je nejvýznamnější zástupcem této skupiny. Ve své molekule obsahuje fenylalanin se substituovaným (3R)-3,4-dihydromethylisokumarinem. Toxické účinky jsou přisuzovány atomu chlóru, kterým je aromatický kruh substituován. Přirozeně se vyskytuje v cereáliích a cereálních produktech, v zelených kávových bobech a hojně v silážích. Jde o termostabilní toxin, tudíž není destruován při tepelné úpravě krmiv a potravin (1,2,3,4).

Vedle rostlinných produktů lze nalézt OTA též v orgánech hospodářských zvířat. Stopové koncentrace OTA byly prokázány v mase. Určitou výhodou z hlediska bezpečnosti potravin je, že se jen nepatrně kumuluje v živočišných tkáních, takže potraviny živočišného původu nepředstavují pro člověka vážné zdravotní riziko.

Nejzávažnějším biologickým účinkem zaznamenaným u zvířat exponovaných OTA je nefrotoxicita, genotoxicita a karcinogenita. U člověka je expozice OTA spojována s balkánskou endemickou neuropatií a nádory ledvin. Při prováděném průzkumu byl zjištěn častý výskyt OTA v krevní plasmě u 50 % testované populace (4).



2.5 Aflatoxiny

Aflatoxiny byly identifikovány jako první ze všech mykotoxinů poté, co v roce 1960 ve Velké Británii zemřelo přes 100 000 krocanů po požití infikovaného krmiva. V současné době jsou nejlépe prozkoumanou skupinou mykotoxinů. Jedná se o metabolity plísní *Aspergillus flavus* a *A. parasiticus*, jejichž spóry jsou celosvětově rozšířeny ve vzduchu a v půdě. Produkce toxinů vyžaduje vlhkost nad 12 %, optimálně nad 14 % a teplotu mezi 12 °C a 37 °C, optimum je 28 °C². Díky požadavku na vyšší teplotu a vlhkost jsou aflatoxiny v našich klimatických podmínkách málo rozšířeny, avšak mohou být importovány s kontaminovanými potravinami a surovinami z tropických a subtropických oblastí, kde jsou ideální podmínky pro jejich produkci.

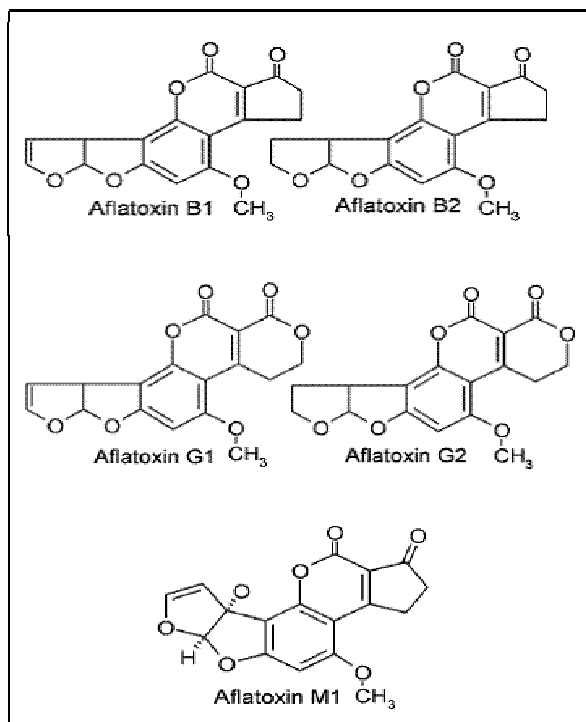
Mezi nejběžněji kontaminované potraviny se řadí obiloviny jako kukuřice, rýže či pšenice, olejnatá semena zahrnující arašídny, soju, slunečnici a bavlnu, koření (chilli, pepř, koriandr, zázvor) a ořechy (kokos, mandle, pistácie, vlašské ořechy). Také mléko může být kontaminováno aflatoxiny, které do něj přechází z krmiva dojníc (1,2,3).

Celkem bylo identifikováno 18 druhů aflatoxinů, z nichž nejznámější jsou aflatoxin B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) a G₂ (AFG₂). AFB₁ a AFB₂ jsou produkovány převážně *A. flavus*, zatímco *A. parasiticus* produkuje všechny čtyři typy. Ostatní aflatoxiny, mezi něž patří např. AFB_{2A}, AFG_{2A}, AFM₁ a aflatoxikol, se vyskytují jen minoritně.

Aflatoxiny se řadí mezi deriváty difuranokumarinů. Podle chemické struktury je můžeme rozdělit na skupinu difurokumarocyklopentenonů (AFB₁, AFB₂, AFM₁, AFM₂) a difurokumarolaktonů (AFG₁, AFG₂).

Aflatoxiny jsou rozpustné v běžných organických rozpouštědlech jako methanol, aceton, acetonitril, chloroform či toluen. Vyznačují se silnou schopností fluoreskovat v UV světle při vlnové délce 265 nm. Podle barvy, jakou vysílají, dostaly i svá označení – AFB₁ a B₂ fluoreskují modře (z angl. blue), zatímco AFG₁ a G₂ fluoreskují zeleně (z angl. green).

V přítomnosti minerálních kyselin dochází k adici vody na dvojnou vazbu furanového kruhu za vzniku AFB_{2A} a AFG_{2A}, které jsou minoritně produkovány i v přírodě. Reakci se zásadami se hydrolyzuje lakton, avšak tato reakce je za nižších teplot vratná. Při zahřívání jsou aflatoxiny velmi odolné, není-li v mediu přítomná voda. Tehdy dochází k otevření laktonového kruhu a destrukci molekuly. Redukcí vzniká z aflatoxinů B₁ a G₁ aflatoxiny B₂ a G₂ (1,2,3).



2.6 Alternaria

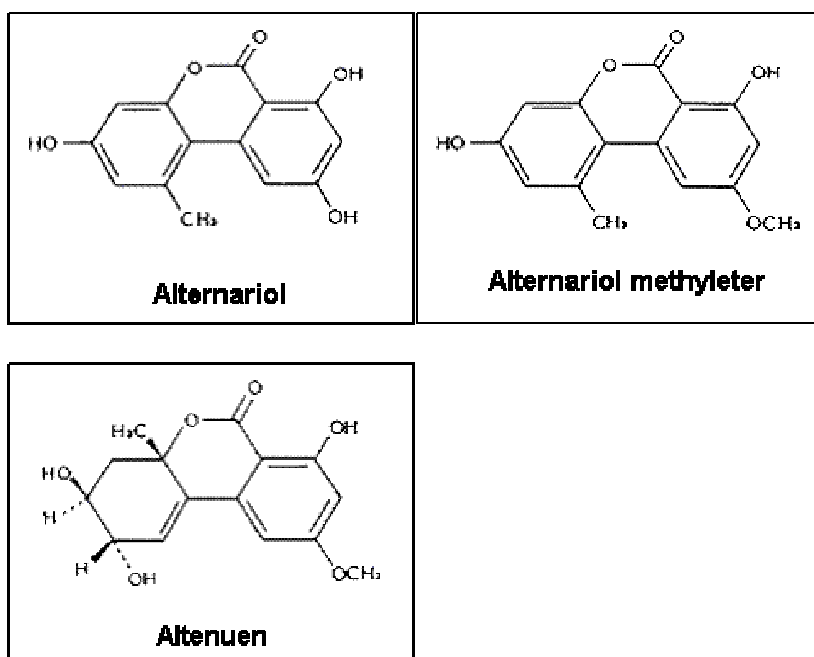
Rod *Alternaria* je běžný kontaminant, který vegetuje na široké škále plodin a způsobuje jejich plesnivění během růstu i po sklizni. Vzhledem k tomu, že *Alternaria spp.* může růst i při chladírenských teplotách, bývá často příčinou kažení potravin během skladování. Nejvýznamnější druh je *Alternaria alternata*, která za určitých podmínek může produkovat celou řadu sekundárních metabolitů. Mezi nejzávažnější a nejčastěji se vyskytující toxiny patří tenuazoniková kyselina (TEA), alternariolmethylether (AME), alternariol (AOH), řidčeji pak altenuene a altertoxin I.

Alternariové toxiny, které svou rozmanitostí a odlišnými vlastnostmi připomínají fusariové mykotoxiny, se vyskytují především v cereáliích, semenech slunečnice a řepky, olivách a mnoha druzích ovoce (citrusy, borůvky, jablka) a zeleniny (zelená paprika, rajčata). Významný je obsah AOH a AME v jablkách a výrobcích z nich, naopak v rajčatech je nejvíce zastoupena TEA. Vysoký obsah těchto toxinů je spojen s viditelným napadením dané plodiny plísní. Alternariové toxiny byly nalezeny i v zamořeném stavebním materiálu.

Toxiny produkované *A. alternata* jsou rozdílné chemické povahy. TEA je jednosytná kyselina s hodnotou $pK_a = 3,5$. Během zahřívání či reakcí s alkáliemi ztrácí

optickou aktivitu a tvoří se isotenuazonová kyselina, což vede ke krystalizaci této viskózní kapaliny. Je rozpustná v methanolu nebo chloroformu a s kovovými ionty (Ca, Fe, Mg, Cu, Ni) tvoří komplexy⁹.

AOH a AME jsou dibenzopyrozinové deriváty rozpustné ve většině organických rozpouštědel. Jejich struktura je znázorněna na **Obrázku 5**, kdy v případě AME je na C5 navázána methoxy skupina místo hydroxy. Altenuen (ALT) patří také mezi dibenzopyrozinové deriváty a od AME se liší pouze postavením jedné methylové a jedné hydroxy skupiny (1,2,3,4).

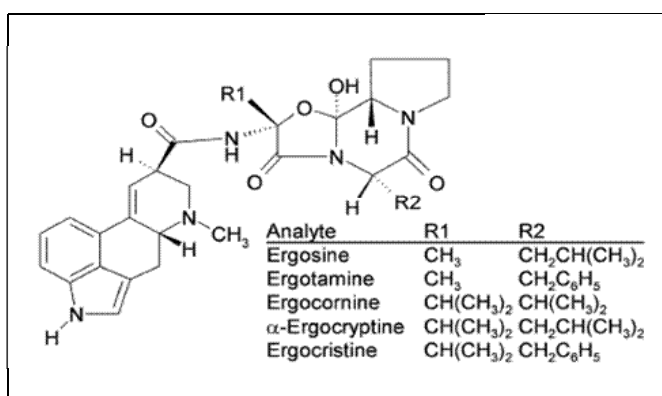


2.7 Námelové alkaloidy

Další poměrně rozšířenou skupinou mykotoxinů jsou námelové (ergotové) alkaloidy produkované plísní paličkovice nachová (*Claviceps purpurea*), která parazituje na obilovinách, zvláště na žitě, ale také na některých trávách a plevelech.

Na infikovaných květenstvích se objevují charakteristické černé útvary ostruhovitého tvaru (námel), které obsahují řadu alkaloidů. Zastoupení jednotlivých alkaloidů se liší podle druhu námele, lokality jeho pěstování a druhu trávy. Nejběžnější jsou alkaloidy ergotamino-

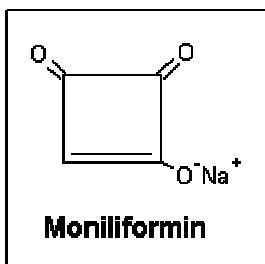
ergotoxinové skupiny (nerozpustné ve vodě), které jsou právě zodpovědné za ergotismus (otravu námelem). Druhou skupinou alkaloidů jsou amidy kyseliny lysergové (ve vodě rozpustné), s nejdůležitějšími zástupci erginem (amidem kyseliny d-lysergové) a ergobasinem. Riziko onemocnění člověka ergotizmem po konzumaci cereálních potravin je v našich podmínkách, při dodržování zásad správné zemědělské praxe (osivo je chemicky ošetřeno, speciální agrotechnika ap.) a na základě současných poznatků, minimální. Může k němu však dojít při hrubém porušení správné zemědělské a technologické praxe během pěstování a zpracování obilovin. Z hlediska možné expozice jsou pak více ohrožena hospodářská zvířata, např. v hospodářstvích s nedostatečnou krmivovou základnou, kde jsou zkrmovány zbytky po čištění zrna, nebo při pastvě, kdy jsou traviny kontaminovány námelem. Přechod námelových alkaloidů do mléka monogastrů (tedy i člověka) je prokázán. Dalším potenciálním zdrojem nákazy pro člověka by mohly být výrobky na bázi žita, dovážené z oblastí, kde zemědělství a jeho kontrola není na nejlepší úrovni (1,2,3,4).



2.8 Moniliformin

Moniliformin je chemicky charakterizován jako 3 hydroxycyklobut-3-en-1,2,-dion. Vyskytuje se převážně v podobě sodné soli. Poprvé byl izolován ze substrátů napadených mikromycety *Fusarium moniliformis*. Nejčastěji se tento mykotoxin nalézá v kukuřici.

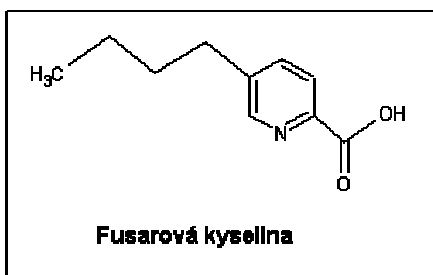
Moniliformin je fyto toxický pro pšenici, kukuřici a rostliny tabáku. Velmi citlivá na incidenci tohoto mykotoxinu je drůbež, zejména kuřata a kachňata. Toxikologické hodnocení tohoto mykotoxinu není uzavřeno a hygienické limity nebyly doposud stanoveny (1,2,3,4).



2.9 Fusarová kyselina

Kyselinu fusarovou syntetizují mikromycety rodu *Fusarium* z aminokyseliny tryptofanu. Fusarová kyselina je sice známá řadu let, ale až dosud nebyla považována za příliš nebezpečného původce fusariových mykotoxikóz. Její toxicita je poměrně nízká. Fusarová kyselina však u řady živočichů mění průběh neurochemických procesů v mozku.

Bylo zjištěno, že všechny kmeny fusariových mikromycet produkují určité množství této kyseliny. Na základě tohoto faktu bylo navrženo, aby byla kyselina fusarová použita jako indikátor kontaminace krmiv fusariovými mykotoxiny. U polygastrů její přítomnost zvyšuje toxicitu ostatních mykotoxinů (např. DON). Fusarová kyselina se často vyskytuje v obilovinách (1,2,3,4).

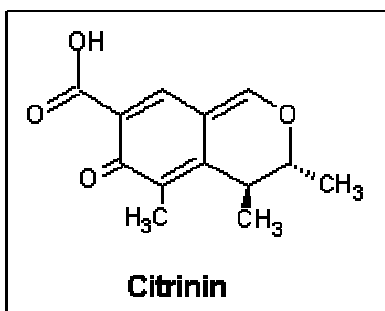


2.10 Citrinin

Citrinin je sekundární metabolit mikromycet rodu *Aspergillus* a *Penicillium*, zejména *P. citrinum* a *P. verrucosum*. Představuje hlavní kontaminaci tzv. červené rýže a obilovin.

Jedná se o derivát isochromenu, který se může vyskytovat ve dvou tautomerních formách. Chinoidní forma je běžně přítomna v neutrálním prostředí. V alkalickém prostředí se vyskytuje tautomerní fenol.

Citrinin byl poprvé objeven na počátku 30. let 20. století, kdy byl nejprve charakterizován jako antimikrobiální antibiotikum, teprve později mu byla prokázána jeho silná nefrotoxicita a interference s metabolickými procesy v játrech. Dle *International Agency for Research on Cancer* (IARC) je klasifikován jako silný karcinogen (1,2,3,4).

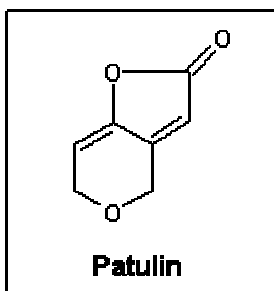


2.11 Patulin

Paulin (PAT) je produkován mikromycety rodu *Penicillium*, nejvýznamnějšími jsou *P. patulinum* a *P. expansum*. PAT se vyskytuje převážně v jablkách, ale jeho přítomnost byla prokázána i v hroznech a pomerančích. Zdrojem PAT však mohou být i jiné potraviny, např. zelenina, cereálie i sýr. Jeho přítomnost byla prokázána i v mase, kde se koncentruje po zkrmování obilovin kontaminovaných *Aspergillus clavatus*.

PAT je v potravinách spíše indikátor špatných výrobních postupů, jako např. používání "plesnivých" vstupních surovin, než bezprostřední vážné ohrožení zdraví člověka či zvířete, nelze však ani v případě PAT opomenout chronickou toxicitu. Je středně toxický, způsobuje poškození žaludeční sliznice (hemoragie, edémy).

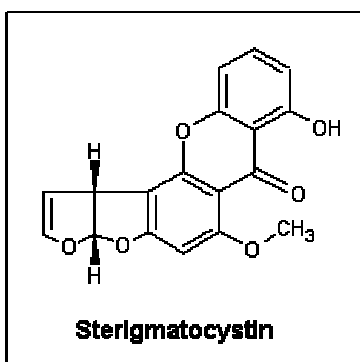
Chemickou strukturou se PAT řadí mezi mykotoxiny laktonového typu, jde o opticky inaktivní 4-hydroxy-4*H*-furo[3,2-*c*]pyran-2(6*H*)on. Je velmi dobře rozpustný ve vodě, alkoholech, acetonu, benzenu, chloroformu, ethylacetátu, částečně rozpustný v ethyletheru a benzenu a nerozpustný v petroletheru. Mechanismus degradace dosud nebyl dosud uspokojivě objasněn (1,2,3,4).



2.12 Sterigmatocystin

Nejvýznamnějším producentem sterigmatocystinu bývají mikromycety rodu *Aspergillus*, převážně *A. versicolor*, *A. flavus* a *A. parasiticus*. Vyskytuje se především v „plesnivých“ obilovinách, kávových zrnech a živočišných produktech (např. šunka, salám i sýr).

Sterigmatocystin lze chemicky charakterizovat jako xanthen-7-on. Obsahuje bisdihydroxfurofuranový kruh. Sterigmatocystin je pro zvířata a lidi akutně silně toxický a dle IARC byl klasifikován jako potenciální lidský karcinogen (skupina B) (1,2,3,4).



2.13 Maskované mykotoxiny

Výzkumy posledních let poukázaly na další závažné riziko v oblasti fusariových mykotoxinů. Kromě volných forem mykotoxinů zde totiž existují také jejich formy vázané. Většinou se jedná o konjugáty se sacharidy, jež stejně jako u jiných xenobiotik, vznikají v průběhu detoxifikačního procesu rostlin. Rostliny napadené toxinogenními vláknitými houbami mají totiž své přirozené obranné mechanismy vedoucí k eliminaci neblahých

účinků mykotoxinů. V rostlinných orgánech (semena, kořeny, listy), pletivech a organelách (vakuoly, chloroplasty) dochází k reakcím (oxidace, redukce, hydrolýza, methylace, glukosidace), při kterých jsou toxiny s aktivními funkčními skupinami přeměněny za pomoci enzymů na deriváty nebo konjugáty, jejichž škodlivost pro rostliny je pak minimální a proto mohou být ukládány ve vakuolách (7).

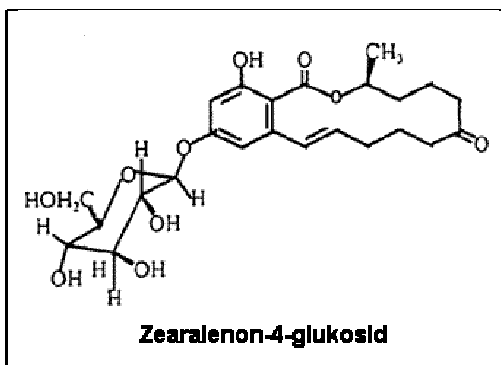
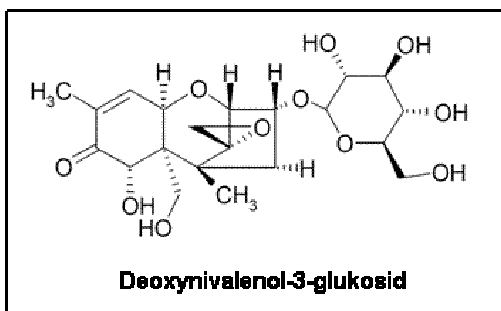
Tyto mykotoxinové konjugáty jsou často označovány také jako „maskované“, protože díky svým odlišným fyzikálně-chemickým vlastnostem, jako je jejich vyšší polarita a tím horší extrahovatelnost běžnými rozpouštědly, ztráty při přečišťování a komerční nedostupnost standardů, donedávna unikaly běžné analytické detekci.

První nepřímé důkazy existence těchto sloučenin sahají až do poloviny 80-tých let 20. století, kdy při sledování dynamiky mykotoxinů v pšenici cíleně infikované fusarií byl nejprve prokázán nárůst, a následně výrazný pokles obsahu DON, který byl pravděpodobně způsobený právě přeměnou původního DON na jeho metabolity (8).

Dalším podmětem vedoucím k výzkumu těchto látek bylo, že během klinických pozorování zvířat neodpovídala vysoká intenzita symptomů typických pro mykotoxikózy relativně nízkému obsahu mykotoxinů stanovenému v příslušných krmivech (9). Nejznámějším a doposud nejprobádanějším konjugátem trichothecenů je deoxynivalenol-3-glukosid (3- β -D-glukopyranosyl-4-deoxynivalenol, DON-3-Glc, který se v pšenici vyskytuje v koncentracích odpovídajících až 30 % koncentrace „volného“ DON. Přítomnost DON-3-Glc a případně dalších forem maskovaných mykotoxinů byla laboratoří Ústavu chemie a analýzy potravin VŠCHT na vysokých hladinách prokázána v mnoha produktech na bázi cereálií, zejména ve sladu a pivu (10,11,12).

Údaje o biologické dostupnosti a toxicitě DON-3-Glc zatím nejsou zcela k dispozici, ale dosavadní výzkum naznačuje, že enzymy určitých bakteriálních kmenů vyskytujících se ve střevech savců jsou schopné štěpit DON-3-Glc za uvolnění mateřského DON.

Prvním metabolitem zearalenonu izolovaným v roce 1988 byl zearalenon-4- β -D-glukopyranosid (7). DON-3-Glc byl poprvé izolován roku 1992 ze suspenzní kultury *Zea mays* (18).



Dle studie Berthillera z roku 2005 odpovídá poměr DON-3-Glc/DON v cíleně infikovaných obilovinách asi 1/3 v případě přirozené infekce byl tento poměr kontaminace zrn asi 1/5 (14). Další studie uskutečněná na Ústavu chemie a analýzy potravin VŠCHT přináší informaci o poměru DON-3-glc/DON v sladech, který je přibližně 1/5 až 1/1 (10). Srovnatelné nebo i vyšší hladiny tohoto maskovaného mykotoxinu vzhledem k DON byly zaznamenány i v pivu (včetně meziproductů sladařsko-pivovarských technologií) oproti koncentraci v původním ječmeni (11,12).

3. Mykotoxiny v potravinách

Jak již bylo řečeno v úvodu, v posledních letech se zřetelně zvyšuje zájem spotřebitelů o kvalitní zemědělské produkty. I přes to, že projevovaná snaha o pěstování kvalitních zemědělských surovin v souladu se zásadami dobré zemědělské praxe je značná, přítomnost mykotoxinů v cereáliích úplně eliminovat nelze. Během technologického zpracování cereálií pak koncentrace mykotoxinů vzhledem k původním cereáliím klesá (díky „zředění“ původní suroviny během výroby potravin), avšak k významnější degradaci

vzhledem k jejich tepelné a chemické stabilitě nedochází. Přítomnost určitých hladin mykotoxinů v cereálních produktech dostupných v obchodní síti je tedy běžná. Následující kapitoly poskytují stručnou rešerši o incidenci a hladinách mykotoxinů ve vybraných komoditách.

3.1 Výskyt mykotoxinů v pivech z obchodní sítě

Výzkumy provedené v horizontu posledních deseti let ukazují na incidenci převážně trichothecenových mykotoxinů v pivu, a to převážně deoxynivalenolu (DONu). Během posledních tří let byl však laboratoří Ústavu chemie a analýzy potravin na VŠCHT Praha prokázán také vysoký obsah „maskované“ formy tohoto mykotoxinu, deoxynivalenol-3-glukosidu (DON-3-Glc), v pivu a sladu (10). Obě tyto formy jsou zřejmě uvolňovány činností enzymů během sladařsko-pivoarské technologie z vazeb na polysacharidy škrobu či buněčných stěn. Na základě tohoto zjištění byl proveden rozsáhlý monitoring obsahu mykotoxinů v pivech dostupných ve světové obchodní síti (11). Široké spektrum různých pivovarských značek zde bylo reprezentováno celkem 176 vzorky. Z těchto vzorků bylo 64 % pozitivních na přítomnost DON (rozmezí koncentrací 1,0-35,9 µg/l) a 86 % obsahovalo alespoň jeden konjugát DON a to DON-3-Glc (rozmezí koncentrací 1,2-37,0 µg/l) nebo 3-ADON a 15-ADON, které jsou detekovány jako suma ADON (rozmezí koncentrací 1,0-25,0 µg/l). Žádné další fusariové mykotoxiny v těchto vzorcích piv nalezeny nebyly. Jelikož nebyly dostupné podrobné informace o původu surovin jednotlivých vzorků piv (například koncentrace mykotoxinů v původních ječmenech/sladech a detailní postup jednotlivých výrob piv), není možné vyvodit platné závěry týkající se dynamiky mykotoxinů během technologií. Dá se však říci, že obsah DON a jeho konjugátů roste s obsahem alkoholu v pivu.

Toto zjištění v podstatě potvrdilo trend potvrzený během evropského screeningového průzkumu (15). Nutno však zdůraznit, že piva s vyšším podílem alkoholu jsou zároveň i „silná“ piva (12°) obsahující větší podíl sladinového extraktu než piva 10° nebo nealkoholická. Nižší obsah DON a jeho konjugátů v nealkoholických pivech může také souviset s faktem, že tato piva jsou vyráběna odlišnou technologií (speciální kmeny kvasinek, přídatné látky, podmínky jednotlivých kroků výroby).

3.2 Výskyt mykotoxinů v produktech pekárenské technologie

Vliv pekařské technologie na konečný obsah fusariových mykotoxinů v pečivu je po léta předmětem zájmu mnoha studií. Monitoring je zaměřen především na studium DON, NIV a ZON, v menší míře je pozornost věnována také 3- a 15-ADON. Fus-X a HT-2 a T-2 toxinu (16). Přehled kontaminace pečiva fusariotoxinem DON ve vybraných zemích je uveden v **Tabulce I**. Dosud publikované výsledky prací se zabývají vlivem nastavení hlavních technologických parametrů (způsob fermentace, doba a teplota zrání, kynutí a pečení, druh a množství použitých aditiv atd.) na mykotoxikologickou kvalitu finálních výrobků. Scott a kol. (1991) prokázal značnou stabilitu těchto látek v průběhu pečení (20). Relativní stabilitu DON během pečení potvrzují také studie Boyacioglu a kol. (1993), která zaznamenala během pečení bez použití pekárenských aditiv pokles DON pouze o 7 % (21), a Tanaka a kol. (1986), kdy byly po 30 min pečení na 170 °C zjištěny jen zanedbatelné změny v hladinách sledovaného DON v pečivu (22). Stejně tak Abbas a kol. (1985) ve své studii uvádí, že během pečení k destrukci přítomného DON nedochází (23).

Zcela otevřenou otázkou zůstávají konjugované formy mykotoxinů a degradační produkty DON a ostatních sledovaných fusariotoxinů v průběhu pekařské technologie. Greenhalgh a kol. (1984) identifikoval v pečeném chlebu isomer DON, tzv. iso-DON, v množství, které odpovídá 3-13 % DON původně přítomného v mouce (24). Přítomnost iso-DON, v rozmezí 10-26 % DON původně přítomného v mouce, a dalších minoritních degradačních produktů v pečeném chlebu uvádí také studie Boyacioglu a kol. (1993) (21). Studie Young a kol. (1984) přisuzuje dramatický nárůst DON v kynutém pečivu pravděpodobnému uvolnění tohoto mykotoxinů z jeho neznámých prekurzorů, mezi které lze počítat i konjugované formy těchto látek (25).

Tabulka I: Přehled výskytu DON v pečivu (16,17).

Země původu	Druh pečiva	DON [mg/kg]	Incidence [%]	Studie
Argentina	*	0,2 - 2,8	92,8	Pacin a kol.(1997)
Itálie	chléb	0,007 - 0,27	79,2	Cirillo a kol. (2003)
Kanada	*	0,009 - 4,06	43,0	Scott (1997)
Německo	pšeničný chléb	průměrně 0,125	90,0	Schollenberger a kol. (2003)
	*	průměrně 0,092	*	Schollenberger a kol. (1999)
	žitný chléb	15 - 142	0,8	Schollenberger a kol. (2005)
	pšeničný chléb	15 - 382	1,0	

USA	*	1,6 - 5,4	*	Abouziéd a kol. (1991)
Velká Británie	chléb	průměrně 0,058	95,0	FSA (2003)

* neuvedeno

Studium hladin DON v meziproduktech pekařské technologie (těsto, vykynuté těsto a pečený výrobek) bylo cílem práce Neira et al. (1997). Během tohoto experimentu byl zaznamenán pokles mezi vyhněným těstem a těstem po vykynutí o 21,6 % a vykynutým těstem a upečeným výrobkem o 28,9 %. Celkový pokles obsahu DON v průběhu pečení byl stanoven na 44,3 % (minimální a maximální úbytek 16,8 a 96,6 %). Dále byl potvrzen trend snížení kontaminace DON s prodlužující se dobou pečení. Pozitivní vztah mezi počáteční hladinou DON a jeho úbytkem byl zaznamenán během kynutí, což je v rozporu s výsledky studie Scott a kol. (1992) (20,26).

Nárůst celkového množství DON ve vyhněném těstě v porovnání s původní moukou o 21-40 % byl zjištěn ve studii Lancová a kol. (v tisku) zabývající se osudem trichothecenů během pekárenského procesu. Následně byl zaznamenán výrazný pokles DON o 38-46 % oproti původnímu množství v procesu kynutí a v závěrečné fázi kynutí byly stanoveny relativně vysoké hladiny DON v rozsahu 132-145 % ve srovnání se surovinou. Během pečení (210 °C, 14 min) nebylo výrazné snížení DON pozorováno, poklesy hladin činily maximálně 6 %. Kolísající obsah fusariotoxinu DON je v této práci vysvětlován jeho možným uvolněním z konjugovaných forem, např. z deoxynivalenol-3-glukosidu, které je pravděpodobně následováno chemickými přeměnami ve sloučeniny, které nebylo možné detekovat použitou analytickou metodou (33).

4. Mykotoxiny v krmivech

Krmiva mohou být napadena nejen epifytickými rody mikromycet jako jsou *Fusarium*, *Penicillium* a *Aspergillus*, které napadají obiloviny a silážové směsi, ale také endofytickými druhy *Neothyphodium* a *Epichloë* převážně kolonizujícími traviny a pícniny chladnějších regionů všech kontinentů. Tyto mikromycety produkují celé spektrum sekundárních metabolitů, jejichž toxický vliv pak závisí na typu a množství těchto toxinů v krmivu, zdraví hospodářských zvířat, fyziologické dispozici daného organismu (věk,

pohlaví) a na způsobu chovu („farm management“). Symptomy pozorované po expozici kontaminovaným krmivem se souhrnně označují jako onemocnění zvaná mykotoxikózy. Vedle akutních intoxikací (nižší příjem potravy, imunosuprese, ztráta reprodukční schopnosti, úhyn) způsobených vysokými hladinami mykotoxinů v krmivech, také nízké hladiny toxinů působí negativně na zdraví zvířat a jsou příčinou nejenom významných ekonomických ztrát způsobených malými hmotnostními přírůstky chovaného dobytka, ale také nižší produkce kvalitních surovin živočišného původu (27). Rezidua mykotoxinů a jejich metabolitů mohou být přítomná v surovinách živočišného původu, jako jsou mléko, maso a vejce. Ačkoliv je případný přenos reziduí mykotoxinů do živočišných produktů je stále předmětem výzkumu, současné znalosti v této oblasti předpokládají možné zdravotní riziko u malých dětí při přenosu vysoce toxického aflatoxinu B1 do mléka dojníc jako jeho metabolitu Aflatoxinu M1. Dále je pozorován přenos ochratoxinu A do masa a následně masných výrobků déle chovaných prasat.

Toxikologické hodnocení působení mykotoxinů je stále předmětem výzkumu. V současné době jsou známa pouze experimentální data toxického působení na cílové orgány zvířat pro nejvýznamnější skupiny mykotoxinů jako aflatoxiny, trichotheceny, ergotové alkaloidy, fumonisiny a zearalenone (28). Dostupné studie však nereflktují všechny aspekty požadované pro kvantifikaci hodnocení rizika z důvodu nedostatku informací o mykotoxinové kontaminaci krmiv. Navíc, ve většině případů, jsou hospodářská zvířata krmena kromě komerčních směsných krmiv také krmivy produkovaných přímo na farmě, která nejsou běžně testována na obsah mykotoxinů.

Jak již bylo uvedeno výše, krmiva bývají kontaminována celou řadou mykotoxinů, jejichž působení na organismus může je - z důvodu rozmanitosti jejich chemické struktury - velice různorodé. Proto je problematické zhodnotit jejich kombinované působení na organismus a experimentální data shrnující kombinované toxické působení těchto látek jsou limitována. Z dostupných studií je však zřejmé, že působení jednotlivých mykotoxinů při kombinované expozici může mít antagonistické, aditivní a synergické účinky na exponovaný organismus. Synergické působení bylo zjištěno v případě fusarové kyseliny, kdy byl v její přítomnosti pozorován zvýšený toxický efekt fumonisinů u kuřat a diacetoxyscirpenolu (DAS) a deoxynivalenolu (DON) u prasat (29). Ve většině analytických laboratoří není fusarová kyselina rutinně stanovována z důvodu její nízké akutní toxicity (27). Na druhé

straně, cyklopiazoniová kyselina svými subtraktivními efekty zabraňuje peroxidaci membránových lipidů vyvolané působením paulinu (29).

Vedle „volných“ mykotoxinů se mohou v krmivech vyskytovat tzv. „maskované“ (konfugované) mykotoxiny. První zmínky o maskovaných mykotoxinech se objevily již v polovině 80. let 20. století, kdy byly pozorovány mykotoxikózy zvířat, při kterých klinický stav zvířat neodpovídal množství mykotoxinů stanovenému ve zkrmovaném krmivu. Neočekávaně vysoká toxicita použitého krmiva byla pravděpodobně způsobena konjugovanými formami mykotoxinů. Maskované formy mykotoxinů pravděpodobně vznikají při detoxikačních procesech obilovin (14), což prokázaly i následně uskutečněné studie zabývající se transformacemi mykotoxinů v rostlinách. Do dnešní doby byly identifikovány rostlinné metabolity DON, zearalenonu (ZON) a ochratoxinu A (7). Detoxikační reakce chrání rostliny před toxickými látkami z okolního prostředí, ale také před sloučeninami, které rostliny tvoří samy, a zahrnují především tzv. transformace (deepoxidace, deacetylace a isomerace) a konjugace. Během těchto reakcí jsou reaktivní funkční skupiny redukovány či maskovány tak, aby se toxicita nově vzniklého produktu snížila či úplně eliminovala (7). Při konjugacích jsou volné mykotoxiny vázány na více polární látky, např. na glukosu, sulfát či glutathion a vzniklé konjugáty jsou následně ukládány do buněčných vakuol (14). Detoxifikace probíhající v zemědělských plodinách však nemusí nutně vést ke snížení rizika pro konzumenty. Biologická dostupnost a toxicita těchto látek není doposud známa. Potencionální nebezpečí maskovaných mykotoxinů spočívá v jejich hydrolýze při průchodu trávicím traktem savců, při kterém může dojít k uvolnění původního, více toxického mykotoxinu. Při pokusech na prasatech krmených krmivem kontaminovaným zearalenon-4- β -D-glukopyranosidem byly zaznamenány příznaky odpovídající intoxikaci organismu volným ZON (14).

Maskované mykotoxiny unikaly až donedávna rutinnímu stanovení hned ze dvou důvodů: i) jsou polárnější než původní volné formy mykotoxinů a proto nebyly extrahovatelné spolu s ostatními rutinně stanovovanými toxiny použitím běžných směsí rozpouštědel, ii) nebylo možné je detekovat běžnými analytickými přístupy, které byly převážně zaměřené na cílený screening iii) nebyly komerčně dostupné analytické standardy těchto látek. V současné době je již možné díky dostupnosti standardu zavádět maskovaný mykotoxin odvozený od DON deoxynivalenol-3- β -D-glucopyranoside (DON-3-Glc) do multidetekčních analytických metod a tak modifikovat a optimalizovat přípravu vzorků, aby

bylo dosaženo dobrých výtěžností. Vedle DON-3-Glc již bylo identifikováno mnoho dalších maskovaných mykotoxinů, například zearalenon-4-glukosid (ZON-4-Glc) detekovaný v cereálních výrobcích (30).

V Evropské Unii jsou ustanoveny maximální limity vybraných mykotoxinů Nařízením komise (ES) č. 1126/2007 ze dne 28. září 2007, které upravuje nařízení (ES) č. 1881/2006 (31,32). Toto nařízení stanovuje pouze maximální limity pro deoxynivalenol, zearalenon a fumonisiny, aflatoxiny, patulin, ochratoxin A a aflatoxiny v μg na 1kg příslušné potraviny. Z toho důvodů řada kontrolních laboratoří sleduje pouze tyto legislativně ošetřené mykotoxiny, kdežto k potenciálním zdravotním rizikům mohou přispívat také další mykotoxiny včetně jejich maskovaných forem, které nejsou v legislativě zahrnuty.

Výsledky monitoringu mykotoxinů ve vzorcích cereálií získaných z různých regionů v celé Evropě ukazují, že 63 % z nich bylo kontaminováno trichotheceny typu B, 22 % zearalenonem, 7 % trichotheceny typu A, 13 % ochratoxinem A, ve 26 % vzorků byly detekovány vysoce toxické aflatoxiny a v 38 % fusariové mykotoxiny fumonisiny. Nejfrekventovanějšími kontaminanty tedy byly trichotheceny typu B, kdy průměrná hladina souboru byla $625 \mu\text{g}/\text{kg}$ a nejvyšší detekovaná hladina $24\,019 \mu\text{g}/\text{kg}$ byla zjištěna ve vzorcích kukuřice. Výsledky této studie indikují nezbytnost provádění pravidelné kontroly mykotoxinové kontaminace z důvodu zhodnocení rizika, které by mohlo představovat kontaminované krmivo pro hospodářská zvířata a potažmo pro člověka. Jednou ze strategií využívaných ke snížení rizika mykotoxinové intoxikace je přidávání aditivních látek pro dekontaminaci mykotoxinů do krmiv. Tyto aditivní látky deaktivují toxiny na základě adsorpčních či enzymatických degradací přímo v zažívacím traktu zvířat (27).

4.1 Mykotoxiny v siláži

Siláž je způsob konzervace krmiva, stejně jako například sušení sena. Silážování uchovává krmivo ve šťavnatém stavu. Konzervace probíhá působením mléčného kvašení cukrů obsažených v píce. Celý proces musí probíhat bez přístupu vzduchu. Vlastní siláž zachovává, jak obsah živin, tak vitamínů použitého materiálu. Výsledná kvalita siláže je obvykle přímo úměrná kvalitě substrátu (druhu píce, silážní zralosti, obsahu sušiny a stupni zpracování). Jako silážování se označuje kvasný proces při obsahu sušiny max. do 45-50 %. Cílem je co nejdříve vytvořit dostatečné množství kyseliny mléčné, čímž dosáhneme

kyselosti hmoty pH asi 4 a také zamezíme vzniku nežádoucích hnilobných procesů. Při vlastním silážování se bílkoviny štěpí na jednodušší látky, obdobně se glycidy rozkládají na jednodušší cukry a to fruktózu a glukózu. Základním konzervačním činitelem ke kyselina mléčná. Při nedodržení procedury však dochází ke vzniku kyseliny máselné, octové nebo mravenčí. V takovém případě výsledná siláž nepříjemně páchne a je nepoužitelná. Siláže se využívají hlavně jako základní objemové krmivo pro dobytek a může se zkrmovat celoročně (35,36).

Silážovány jsou převážně traviny, seno a kukuřice, souhrnně nazývané píce. Nejčastěji používanou surovinou pro výrobu siláže je kukuřice. Přítomnost mykotoxinů může být připsán infekci kukuřice přímo na poli nebo během uskladnění siláže (35). Tato případná infekce redukuje nutriční hodnotu kukuřice a může představovat zdravotní riziko pro zvířata a následně pro člověka (35).

Screening potenciálně toxigenních mikromycet izolovaných ze zralé siláže ukázal, že *Fusaria* (*Fusarium culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. solani* a *F. verticillioides*) byla schopna produkce mykotoxinů na živném agaru (35).

Píce přicházejí přirozeně do kontaktu s mykotoxiny před, během a po sklizni, ale také během transportu a uskladnění. Podle podmínek, za kterých byly pícniny sklizeny, můžeme vymezit tři ekologické typy mikromycet (29):

- polní (předsklizňová perioda)
- meziproductové (během sklizně)
- skladovací (uskladnění pro sklizni)

Ve vlhké trávě a senu se často vyskytuje velmi početné toxinogenní mikromycety rodu *Aspergillus* a *Penicillium*, stejně jako *Fusarium* (29).

Nejběžněji se vyskytujícími mykotoxiny v siláži jsou DON, ZON, FB₁, OTA, citrinin a PAT. PAT je převážně produkován v travních silážích. OTA a citrinin mohou být tvořeny v kukuřičných silážích a suchých pící (29).

Majoritním patogenem travních, kukuřičných siláží nebo siláží cukrové řepy v Evropě je *Penicillium roqueforti*, nicméně toxiny produkované tímto kmenem mají nízkou stabilitu při silážování. Kdežto v důsledku kontaminace již na poli, mohou mikromycety rodu *Fusarium* přežít v silážích a produkovat fusariové mykotoxiny (29).

Spektrum přítomnosti druhů mikromycet v silážích vyrobených silážováním kukuřice, čiroku a travin se mění s dobou uskladnění. Po uplynutí dvou až tří měsíců po

uskladnění siláže můžeme ještě detekovat mikromycety rodu *Penicillium*, *Fusarium* a *Aspergillus*. PAT se objevuje v silážích ještě po šesti měsících uskladnění (29).

Cílem odhalení mykotoxinů je (35):

- prozkoumat mikroflóru zralé kukuřičné siláže (11 měsíců stará)
- rozvinout metody pro stanovení mykotoxinů
- porovnávat koncentrace stanovovaných mykotoxinů v kukuřičné siláži ve dvou stupních (nahore a na dně silážní jámy)

4.2 Dekontaminace mykotoxinů v krmivech

Na dekontaminaci lze pohlížet jako na proces řešící již vzniklé situace, kdy jsou v krmivu mykotoxiny přítomny. Mykotoxinová kontaminace obilovin, olejnin a dalších plodin je celosvětově diskutovanou problematikou a popsanou v mnoha studiích (37). Vzhledem k tomu, že v současnosti neexistují stoprocentní metody prevence vzniku mykotoxinů v krmivech, je nutné vzít v úvahu dekontaminační metody.

Neexistují univerzální dekontaminační metody z důvodu obrovské škály mykotoxinů a s jejich různorodou chemickou strukturou, vysokou stabilitou vůči řadě fyzikálních, chemických i biologických faktorů. K dekontaminaci krmiv jsou proto využívány různé metody (37):

- *fyzikálně-chemické* (vodný roztok chloridu vápenatého, kombinace tepla a tlaku)
- *adsorpční efekt minerálních jílu*
- *degradace mykotoxinů za použití enzymů* (esterázy a epoxidáza)

Trichothece v živočišném organismu procházejí různými variantami metabolických reakcí. Například acetylované mykotoxiny rychle přecházejí na deacetylovanou formu (např. T-2 na HT-2, FUS-X na DON, 3-ADON na DON). Deacetylační reakce jsou katalyzované specifickými esterase a velice rychlé. De-epoxidace trichothece probíhá inkubací mykotoxinů se střevní mikroflórou nebo s mikroorganismy v bachoru krav. Metabolismus de-epoxidace může být také detekován v plazmě a moči ovcí a krav, ale pouze v malé míře. Redukce epoxidového kruhu je pravděpodobně uskutečněna anaerobními mikroorganismy zažívacího traktu (38).

Podle Nařízení 1881/2006/ES se potraviny obsahující mykotoxiny nesmí záměrně detoxikovat chemickým ošetřením.

5. Analytické metody

V současné době existuje řada analytických metod, téměř výhradně založených na kapalinové chromatografii s hmotnostně-spektrometrickou detekcí, které jsou schopné spolehlivé identifikace a kvantifikace mykotoxinů.

Moderním trendem jsou multidetekční metody (39,40,41), které jsou schopné stanovit desítky analytů během jednoho nástřiku (Sulyok et al. publikoval současné stanovení 87 mykotoxinů (39), Hans Mol et al. stanovil mykotoxiny, pesticidy a veterinární léčiva během jedné analýzy (40), Lacina et al. publikoval multidetekční metodu pro stanovení mykotoxinů a pesticidů (41)). Výhodou multidetekčních metod bývá většinou jednoduchá a rychlá příprava vzorku. Extrakt je většinou pouze naředěn a analyzován bez přečištění, protože z důvodu široké diverzity chemických vlastností cílových analytů je velmi obtížné najít vhodný čistící sorbent. Nevýhodou s tím spojenou je tedy velké množství ko-extraktů, které mohou interferovat s ionty analytů a snižovat tak citlivost metody.

Další variantou jsou metody zaměřené na jeden analyt nebo skupinu chemicky podobných analytů, u kterých je možno maximálně přizpůsobit analytický postup přípravy vzorku konkrétnímu analytu (42,43,44,45).

Stanovení mykotoxinů lze obecně rozdělit na několik na sebe navazujících kroků:

- odběr a úprava vzorku (vzorkování)
- extrakce
- přečištění
- identifikace a kvantifikace

5.1 Vzorkování

Prvním a velmi důležitým krokem analytického postupu je odběr (vzorkování) a příprava vzorku, z důvodu nehomogenní distribuce mykotoxinů v analyzované matrici. Vzorky potravinových surovin, potravin a krmiv jsou velmi často nehomogenní, kusové a odběry se musí provádět z šarží o značné hmotnosti či počtu jednotek. Jen v omezeném počtu případů jsou mykotoxiny v potravinách distribuovány homogenně, což je dáno především povahou jejich vzniku. Homogenní výskyt lze předpokládat pouze u výrobků, které byly vyrobeny

z primárně kontaminovaných surovin a při zpracování došlo k homogenizaci. Na základě výše jmenovaných skutečností je klíčovým bodem stanovení mykotoxinů proces vzorkování, kterým získáme reprezentativní vzorek, tj. vlastnostmi shodný s celkem. Vzorkovací krok specifikuje, jak vzorek bude vybrán nebo v jakém množství a jaká bude velikost vzorku použitého k analýze.

Odběr vzorku můžeme rozdělit na tři části:

strategie vzorkování, což je základní rozvaha o způsobu odběru vzorku

plán vzorkování, který zahrnuje plánovanou metodu volby a odběr vzorku

postup vzorkování, jež určí konkrétní provedení, které vychází z instrukcí vztahujících se k použití plánu vzorkování

Vzorkování je obvykle vícestupňový proces, který začíná odběrem primárního vzorku a pokračující jeho postupným zmenšováním až na sub-vzorek (laboratorní vzorek), který vstupuje do analytické laboratoře. Zde se z něho připraví analytický vzorek. Tento vzorek je pak kvantifikován používanými schválenými procedurami.

Odběr vzorku, jeho další zmenšování a skladování musí probíhat způsobem, který neovlivní žádnou relevantní vlastnost vzorkovaného objektu.

Při vzorkování dochází k řadě chyb způsobených vzorkovacími zařízeními (např. vzorkovací zařízení není schopno zachytit částice určité velikosti, hustoty nebo dochází ke ztrátám vlivem setrvačnosti, vlivem elektrostatického napětí, atd.) (46).

V analytické praxi se odběr vzorku (vzorkování) provádí podle technických norem (českých ČSN, evropských EN a mezinárodních ISO) vypracovaných pro daný materiál - jednotlivé druhy potravin, zemědělských produktů, surovin, průmyslových výrobků, atd. (46).

- Vyhláška Ministerstva zemědělství ČR č.211/2004 Sb. o metodách zkoušení a způsobu odběru a přípravy kontrolních vzorků za účelem zjišťování jakosti a zdravotní nezávadnosti potravin nebo surovin určených k jejich výrobě
- Vyhláška Ministerstva zdravotnictví ČR č.137/2004 Sb. o hygienických požadavcích na stravovací služby osobní a provozní hygieny při činnostech epidemiologicky závažných.
- Nařízení Komise 401/2006/ES, kterým se stanoví metody odběru vzorků a metody analýzy pro úřední kontrolu množství mykotoxinů v potravinách.

5.2 Extrakce a přečištění vzorku

Extrakce je dělicí operace, při které přechází složka ze směsi látek v kapalně či tuhé fázi do jiné kapalně fáze - rozpouštědla. Způsob extrakce závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech stanovovaného mykotoxinu, matrici, způsobu extrakce a rozpouštědla. Extrakční rozpouštědlo volí podle povahy, rozpustnosti příslušného mykotoxinu a s ohledem na extrahovaný materiál a další zpracování extraktu. Čištění extraktu patří k nejpracnější a časově nejnáročnější částí postupu analytického stanovení mykotoxinů.

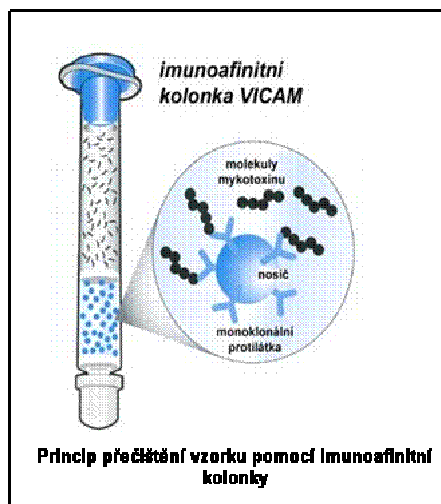
K uvolnění mykotoxinů z matrice se využívá třepání, míchání, vyluhování, sonikace, superkritické fluidní extrakce (SPE) nebo extrakce za zvýšeného tlaku (PLE). Nejčastěji používaná extrakční rozpouštědla jsou směs acetonitrilu s vodou (dnes nejpoužívanější), směs methanolu s vodou nebo směs ethylacetátu a acetonitrilem s vodou.

Po extrakci následuje přečištění vzorku (tzv. clean-up) , které slouží k odstranění interferujících látek (barviva atd.). V některých případech tento krok analytického postupu může být vynechán (47,48,49).

Dnes hojně využívané přečišťovací metody extraktu můžeme dle jejich principu rozdělit do následujících bodů:

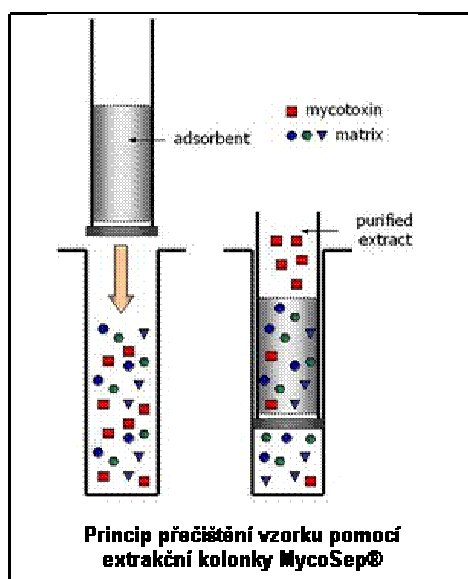
- i. ***Imunoafinitní chromatografie (IAC)*** – v současné době nejvíce používaná metoda pro svoji vysokou specifiku, menší spotřebu organických rozpouštědel a menší časovou náročnost. Pro stanovení deoxynivalenolu a zearalenonu jsou komerčně dostupné imunoafinitní kolony dodávané s komerčními názvy RIDA, VICAM.

Princip metody spočívá v tom, že přefiltrovaný a zředěný extrakt mykotoxinu ve směsi methanolu s vodou se nechá pomalu prokapat imunoafinitní kolonou. V této fázi dojde k reverznímu specifickému spojení mezi protilátkami v kolonce a mykotoxinem v extraktu. Po promytí kolonky speciálním promývacím pufrem je mykotoxin v procesu desorpce z kolony eluován eluční směsí (methanol, okyselený methanol, atd.).



- ii. **Extrakce na pevnou fázi (SPE)** – často používaná pro přečištění vzorku při stanovení mykotoxinů, například zearalenon. Sorbent je z různých nepolárních, středně polárních a polárních materiálů na bázi modifikovaného silikagelu (např. s navázanými C18 řetězci), polymeru nebo křemičitanu hořečnatého (florisil).

Princip této metody spočívá v zachycení mykotoxinu na sorbentu a uvolnění nečistot a nebo naopak. Obrázek níže zobrazuje princip přečištění vzorku pomocí extrakční kolonky MycoSep®, kdy se na sorbetu zachytí nečistoty (barviva, matrice, atd.).



- iii. **Gelovou filtrací (GPC)** – metoda separace složek z kapalného média. Princip separace spočívá v tom, že látky s vyšší molekulovou hmotností procházejí kolonou, zatímco menší molekuly přechodně vstupují do pórů gelu a jsou tak zadržovány. Používá se pro separaci velkých molekul na základě rozdílné molekulové hmotnosti. V oblasti analýzy mykotoxinů se používá především k odstranění lipidických sloučenin a rostlinných nebo živočišných pigmentů (47,48,49).

5.3 Identifikace a kvantifikace

Analytickou koncovku můžeme definovat jako krok analytického postupu sloužící ke stanovení fusariových mykotoxinů na místě jejich výskytu. Metody stanovení fusariových mykotoxinů můžeme rozdělit do dvou hlavních kategorií (50):

- i. Kvalitativní metody či „semiscreeningové“ metody
- ii. Kvantitativní metody

Kromě již zavedených chromatografických technik (**Tabulka II**) a imunochemických metod, dochází v současnosti k rozvoji dalších instrumentálních technik pro stanovení mykotoxinů. Jako velmi nadějně se ukazují metody kapilární elektroforézy a elektrochromatografie a dále technologie biosensorů, sloužící zejména k rychlému screeningovému stanovení specifických mykotoxinů (47,48,49,50).

Tabulka II: Příklady analytických metod pro stanovení fusariových mykotoxinů (51,52).

Mykotoxin	Matrice	Separční metoda	Detekce
<i>ZON</i>	Kukuřice, pšenice, pivo, moč	HPLC	MS, MS/MS
<i>DON</i>	Kukuřice, pšenice	HPLC	MS, MS/MS, UV
<i>DON</i>	Kukuřice, pšenice	GC (po derivatizaci)	ECD, MS
<i>DOM-1</i>		GC (po deprivatizaci)	ECD
<i>Trichotheceny typ A</i>	Cereálie	HPLC	MS, MS/MS
<i>T-2, HT-2</i>	Cereálie	GC (po derivatizaci)	MS, ECD
<i>T-2, HT-2</i>	Cereálie	HPLC	MS/MS
<i>Trichotheceny typ B</i>	Kukuřice, moč	HPLC	MS, MS/MS
<i>Fumonisin</i>	Kukuřice, krmivo, zelenina	HPLC	MS, MS/MS
<i>FB₁, FB₂</i>	Kukuřice, krmivo, zelenina	HPLC (po deprivatizaci)	FLC

Kvalitativní metody

Ke zjištění, zda analyzovaný vzorek obsahuje mykotoxiny, slouží kvalitativní metody. Nedávají nám ale přesnou informaci, v jakém množství se mykotoxin vyskytuje. Dále mohou sloužit pro zaměření na další analytické postupy.

V analýze se k běžnému screeningu mykotoxinů většinou využívají imunochemické metody nebo chromatografie na tenké vrstvě (TLC). Mezi imunochemické metody jsou řazeny imunoenzymatické reakce (ELISA) a radioimunometody (RIA). Imunochemické metody podléhají řadě inovací a tudíž se v současnosti používají i pro kvantitativní analýzu (47,48,49).

Kvantitativní metody

K přesnému určení množství analytu ve vzorku slouží kvantitativní metody, k nimž patří především chromatografické metody. Jsou to metody určené pro úřední kontrolu potravin. Chromatografickými metodami můžeme separovat obrovské množství analytů.

Jedná se o separační techniku, která využívá dělení složek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je mobilní (pohyblivá) a druhá stacionární (nepohyblivá).

S chromatografickými metodami je velmi často spojován hmotnostní detektor, který není závislý na chemických charakteristikách jako UV-absorbance nebo fluorescence. V **Tabulkách III až VI** je uveden souhrn analytických metod pro stanovení fusariových mykotoxinů využívající techniku LC-MS včetně přípravy vzorku, chromatografických a hmotnostních parametrů.

U použití LC-MS techniky nalézáme však jedno negativum, a tím jsou tzv. matriční efekty, které mohou omezit možnosti analýzy pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostním detektorem (LC-MS). Máme-li však k dispozici vnitřní standardy, mnohdy můžeme úspěšně tyto efekty eliminovat. Další přijatelnou strategií k eliminaci matričních efektů je použití odpovídajících matričních standardů.

Poslední vývojový stupeň LC-MS/MS instrumentace za použití ionizace elektrosprejem dovolí analyzovat mykotoxiny bez předchozího přečištění surového rostlinného extraktu (47,48,49,50).

Tabulka III: LC-MS metody pro analýzu trichothecenových mykotoxinů (53).

Mykotoxin	Matrice	Příprava vzorku	Kapalinová chromatografie		Hmotnostní spektrometrie	
			Kolona	Mobilní fáze/přísady	Ionizace	Skenovací režim
<i>DON, T-2 toxin</i>	krmivo, kukuřičné jídlo, oves	SFE s CO ₂ +5%MeOH, odlučňování pomocí extrakce 1/1 s hexanem	RP-18	Isokratická eluce: vodný roztok 3mM NH ₄ OAc/ MeOH/ ACN-50: 45: 5	ESI+trojitý kvadrupól	Úplný sken, SIM, SRM
<i>DON</i>	pšenice	Extrakce s ACN/H ₂ O (84:16), přečištění pomocí kolonky MycoSep 227 a 216	RP-18	Isokratická eluce: H ₂ O/ACN/MeOH (92:9:9)	APCI – jednoduchý kvadrupól	Úplný sken, SIM
<i>T-2 a HT-2 toxin</i>	oves, ječmen, pšenice, kukuřice	Extrakce s ACN/ H ₂ O (84:16), přečištění pomocí kolonky MycoSep 227 a 216	RP-18	Gradientová eluce: H ₂ O/ACN oba s 1 mM NH ₄ OAc	APCI+ jednoduchý kvadrupól	Úplný sken, SIM
<i>DON</i>	pšenice, obilí	Extrakce s ACN/ H ₂ O (84:16), filtrace a ředění vodou	RP-18	Gradientová eluce: H ₂ O/MeOH+0,3%AcOH	ESI - iontová past	Úplný sken, SIM
<i>DON, T-2 a HT-2 toxin</i>	cereálie	Extrakce s ACN/ H ₂ O (80:20), přečištění na kolonce MycoSep 225	RP-18	Isokratická eluce: H ₂ O//MeOH (65:35) s 0,1 mM NaCl	ESI ± jednoduchý kvadrupól	Úplný sken, SIM
<i>DON, T-2 a HT-2 toxin</i>	slad	Extrakce s ACN/ H ₂ O (84:16)	RP-18	Gradientová eluce: H ₂ O//MeOH/ACN s NH ₄ OAc	ESI ± trojitý kvadrupól	SRM

MeOH – methanol, ACN – acetonitril, NH₄ OAc – octan amonný

Tabulka IV: LC-MS metody pro analýzu ochratoxinu A (OTA) (53).

Mykotoxin	Matrice	Příprava vzorku	Kapalinová chromatografie		Hmotnostní spektrometrie	
			Kolona	Mobilní fáze/přísady	Ionizace	Skenovací režim
OTA	pivo	Extrakce kapalina/kapalina s toluenem, SPE se silikagelovou kolonkou	RP-18	Gradientová eluce: 0,05% TFA v H ₂ O//MeOH	ESI + trojitý kvadrupól	SRM
OTA	Pšeničná mouka, kafe, koření,	Extrakce kapalina/kapalina s toluenem, SPE nebo extrakce s roztokem Na ₂ CO ₃	RP-18	Gradientová eluce: 0,05% TFA v H ₂ O//MeOH	ESI + iontová past	Úplný sken, SRM
OTA	Cereálie součástí potravin a krmiv	Extrakce kapalina/kapalina s toluenem, SPE nebo extrakce s roztokem Na ₂ CO ₃	RP-18	Gradientová eluce: H ₂ O//MeOH	ESI – trojitý kvadrupól	SRM
OTA	Rýže, ječmen	Extrakce s MeOH/vodný roztok 3% NaHCO ₃	RP-18	Isokratická eluce: H ₂ O//MeOH/ACN (1:1:1)	ESI + trojitý kvadrupól	SRM

MeOH – methanol, ACN – acetonitril, NH₄ OAc – octan amonný

Tabulka V: LC-MS metody pro analýzu zearalenonu (ZON) (53).

Mykotoxin	Matrice	Příprava vzorku	Kapalinová chromatografie		Hmotnostní spektrometrie	
			Kolona	Mobilní fáze/přísady	Ionizace	Skenovací režim
ZON	kukuřice	Extrakce s ACN/ H ₂ O (75:25), IAC nebo přečištění na kolonce Mycosep 224	RP-18	Isokratická eluce: H ₂ O/ACN (60:40)	APCI+(-) jednoduchý kvadrupól	SIM
ZON	Kukuřice, oves, pšenice	Extrakce s ACN/ H ₂ O (75:25) + KCl, SPE a IAC	RP-18	Isokratická eluce: H ₂ O/MeOH (25:75) s 15 mM NH ₄ OAc	APCI- trojitý kvadrupól	SRM
ZON	pivo	SPE s kolonou RP-18	RP-8	Isokratická eluce: H ₂ O/MeOH (35:65) s 15 mM NH ₄ OAc	APCI- trojitý kvadrupól	SRM
ZON	pšenice	mikrovlákná podpora extrakce s MeOH/ACN (1:1)	RP-8	Isokratická eluce: H ₂ O/MeOH každý s 0,2% AcOH (45:55)	ESI- iontová past	SIM

MeOH – methanol, ACN – acetonitril, NH₄ OAc – octan amonný, AcOH – octová kyselina

Tabulka VI: LC-MS metody pro analýzu fumonisinů (53).

Mykotoxin	Matrice	Příprava vzorku	Kapalinová chromatografie		Hmotnostní spektrometrie	
			Kolona	Mobilní fáze/přísady	Ionizace	Skenovací režim
<i>fumonisin</i>	pšenice	Extrakce s ACN/ H ₂ O (50:50), SPE s iontoměničovou kolonou	RP- 18	Gradientová eluce: H ₂ O//MeOH každý s 0,01% AcOH	ESI+ iontová past	Úplný sken, SIM
<i>fumonisin</i>	Pšeničné produkty	Extrakce s ACN/MeOH/ H ₂ O (25:25:50), SPE s kolonou RP-18	RP- 18	Gradientová eluce: H ₂ O//MeOH každý s 0,05% TFA	ESI+ trojitý kvadrupól	Úplný sken, SIM
<i>fumonisin</i>	kukuřice	Extrakce s MeOH/ H ₂ O (70:30), SPE s iontoměničovou kolonou	RP- 18	Gradientová eluce: H ₂ O//MeOH každý s 1% AcOH	ESI+ iontová past	SIM
<i>fumonisin</i>	Kukuřice, rýže	Extrakce s MeOH/ H ₂ O (75:25), SPE s iontoměničovou kolonou	RP- 18	Gradientová eluce: H ₂ O//MeOH každý s 1% HCOOH	ESI+ iontová past	Úplný sken
<i>fumonisin</i>	Kultury hub v rýži	Extrakce s ACN/ H ₂ O (75:25)	RP- 18	Gradientová eluce: H ₂ O//MeOH každý s 1% HCOOH	ESI+ iontová past	Úplný sken, SRM

MeOH – methanol, ACN – acetonitril, NH₄ OAc – octan amonný, AcOH – octová kyselina

6. Legislativa

Legislativní regulace obsahu mykotoxinů v potravinách a krmivech je v současné době prováděna na úrovni nařízení ES. Maximální limity by měly být stanoveny na úrovni, které je možno dosáhnout při dodržování správných zemědělských a výrobních postupů a při zohlednění rizika souvisejícího s konzumací potravin.

V současnosti je obsah fusariových mykotoxinů v potravinách upraven nařízením komise (ES) č.1126/2007 ze dne 28.září 2007, kterým se mění nařízení (ES) č.1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách (**Tabulka VII až XII**). V **Tabulce XIII** jsou uvedeny přípustné denní dávky (TDI) vybraných mykotoxinů (31,32).

Pro T-2 a HT-2 toxiny, fumonisiny, nivalenol a deoxynivalenol-3-glukosid v současné době nejsou stanoveny maximální limity.

Na základě Doporučení č. 576/2006/EK o přítomnosti deoxynivalenolu, zearalenonu, ochratoxinu A, T-2 a HT-2 a fumonisinů v produktech určených ke krmení zvířat by měly členské státy s přispěním provozovatelů krmivářských podniků posílit monitorování přítomnosti deoxynivalenolu, zearalenonu, ochratoxinu A a fumonisinu B1 + B2, T-2 a HT-2 toxinu v obilovinách a výrobcích z obilovin určených ke krmení zvířat a v krmných směsích. Pro tyto účely jsou pak v příloze uváděny tzv. směrné hodnoty uvedených mykotoxinů v krmivech.

K prevenci a snižování fusariových toxinů v obilovinách a výrobcích z obilovin přijala EK další významné Doporučení č. 583/2006/EK. V uváděných zásadách jsou popsány faktory, které podporují infekci, růst a tvorbu toxinů v obilovinách na úrovni prvovýroby, a metody jejich kontroly. Opatření v době výsevu, před sklizní a po sklizni u každé jednotlivé plodiny závisí na převládajících klimatických podmínkách, přičemž je nutno zohlednit výrobní praxi v daném regionu. Proto by všichni, kdo jsou zapojeni do dodavatelského řetězce, měli pravidelně provádět vlastní posuzování rizika, a tak rozhodovat o rozsahu opatření, která je třeba přijmout pro prevenci nebo minimalizaci kontaminace fusariovými toxiny.

Deoxynivalenol

Tabulka VII: Maximální limity

Potravina	Maximální limit (µg/kg)
Nezpracované obiloviny, jiné než pšenice tvrdá, oves a kukuřice	1250
Nezpracovaná pšenice tvrdá a oves	1750
Obiloviny určené k přímé lidské spotřebě, obilná mouka (včetně kukuřičné mouky, kukuřičné krupičky a kukuřičné krupice, otruby ve formě konečného výrobku uváděného na trh pro přímou lidskou spotřebu a klíčky	750
Těstoviny (v suchém stavu)	750
Pečivo (včetně malého běžného pečiva), jemné a trvanlivé pečivo, sušenky, svačinky z obilovin a snídaňové cereálie	750
Nezpracovaná kukuřice	1750
Obilné příkrmy a ostatní příkrmy určené pro kojence a malé děti	200

Zearalenon

Tabulka VIII: Maximální limity

Potravina	Maximální limit (µg/kg)
Nezpracované obiloviny jiné než kukuřice	100
Nezpracovaná kukuřice	200
Obiloviny určené k přímé lidské spotřebě, obilná mouka (včetně kukuřičné mouky, kukuřičné krupičky a kukuřičné krupice, otruby ve formě konečného výrobku uváděného na trh pro přímou lidskou spotřebu a klíčky	75
Pečivo (včetně malého běžného pečiva), jemné a trvanlivé pečivo, sušenky, svačinky z obilovin a snídaňové cereálie kromě svačinek z kukuřice a kukuřičných snídaňových cereálií	50
Svačinky z kukuřice a kukuřičné snídaňové cereálie	50
Obilné příkrmy (kromě kukuřičných příkrmů) a ostatní příkrmy určené pro kojence a malé děti	20
Kukuřičné příkrmy pro kojence a malé děti	20
Kukuřice určená k přímé lidské spotřebě, kukuřičná mouka, kukuřičná krupička,	200

kukuřičná krupice, kukuřičné klíčky a rafinovaný kukuřičný tuk	
--	--

Fumonisy

Tabulka II: Maximální limity

Potravina	Maximální limit (µg/kg)
<i>Fumonisy</i>	<i>Suma B₁a B₂</i>
Nezpracovaná kukuřice	4000
Kukuřice určená pro přímou spotřebu	1000
Snídaňové cereálie a svačinky na bázi kukuřice	800
Kukuřičné příkrmy a ostatní příkrmy určené pro kojence a malé děti	200

Ochratoxin A

Tabulka II: Maximální limity

Potravina	Maximální limit (µg/kg)
Nezpracované obiloviny	5,0
Všechny produkty pocházející z nezpracovaných obilovin, včetně zpracovaných výrobků z obilovin a obilovin určených k přímé lidské spotřebě	3,0
Sušené hrozny révy vinné(korintky, rozinky a sultánky)	10,0
Pražená kávová zrna a mletá pražená káva kromě rozpustné kávy	5,0
Rozpustná káva (instanční káva)	10,0
Víno(včetně šumivého vína s výjimkou likérového vína a vína s obsahem alkoholu nejméně 15% obj) a ovocné víno	2,0
Aromatizovaná vína, aromatizované vinné nápoje a aromatizované vinné koktejly	2,0
Hroznová šťáva, rekonstituovaná koncentrovaná hroznová šťáva, hroznový nektar, rekonstituovaný hroznový mošt a rekonstituovaný koncentrovaný hroznový mošt určené pro lidskou spotřebu	2,0
Obilné příkrmy a ostatní příkrmy určené pro kojence a malé děti	0,50
Dietní potraviny pro zvláštní léčebné účely určené speciálně pro kojence	0,50
Zelená káva, sušené ovoce jiné než sušené hrozny révy vinné, pivo, kakao a kakaové	-

výrobky, likérová vína, masné výrobky, koření a lékořice	
--	--

Patulin

Tabulka III: Maximální limity

Potravina	Maximální limit (µg/kg)
Ovocné šťávy, rekonstituované koncentrované ovocné šťávy a ovocné nektary	50
Lihoviny, jablečné víno a jiné fermentované nápoje získané z jablek nebo obsahujících jablečnou šťávu	25
Jablečná šťáva a pevné výrobky z jablek, včetně jablečného kompotu a jablečného pyré, pro kojence a malé děti, takto označené a prodávané	10,0

T-2 a HT-2

Tabulka IV: Maximální limity

Potravina	Maximální limit (ng/kg) Suma T-2 a HT-2
Cereálie	*
Oves	*

* Maximální limity doposud oficiálně nestanoveny. Podrobnosti ohledně připravované legislativy jsou uvedeny v Kapitole 7, Případová studie č. 2.

Tabulka XIII: Příпустné denní dávky (Nařízení komise (EC) 856/2005) (34).

Mykotoxin	TDI (µg/kg)
<i>DON</i>	1
<i>NIV</i>	0,7
<i>T-2 a HT-2 toxiny</i>	0,06
<i>Fumonisin B₁, B₂, B₃</i>	2

7. Přílohy

Případová studie 1

Stanovení deoxynivalenolu a jeho konjugovaných forem ve vzorcích piva české i zahraniční produkce

Pivo patří mezi nejkonzumovanější alkoholické nápoje na světě. Je vyráběno z ječných i dalších obilných sladů, které mohou obsahovat mykotoxiny. Tyto látky jsou tepelně stabilní a v průběhu technologického zpracování surovin na hotové potraviny nejsou degradovány. Proto jsou často detekovatelné i v potravinářských výrobcích a takto mohou významně ovlivňovat lidské zdraví. V poslední době se výzkum v oblasti mykotoxinů zaměřuje na jejich konjugované formy, které mohou významně přispívat k celkové kontaminaci potravin, jedná se např. o deoxynivalenol-3-glukosid (D3G).

Cílem předkládané studie bylo posoudit mykotoxikologickou kvalitu piv domácí i zahraniční produkce z roku 2008. Celkově bylo vyšetřeno 97 vzorků komerčních lahvových piv. Všechna piva byla testována na obsahy fusariových mykotoxinů, jmenovitě DON, jeho dvou glykosilované formy (D3G) a acetylované formy (ADONs). Soubor vzorků piv různých obchodních značek obsahoval piva světlá i tmavá s různým obsahem alkoholu. Přehled vzorků a detekované hladiny mykotoxinů je uveden v **tabulkách XIV a XV**. Celkově bylo analyzováno 59 vzorků českých piv, 15 německých, 5 rakouských, 8 dánských a 10 kanadských, z toho bylo 84 piv světlých a 13 piv tmavých.

Tab XIV: Přehled tuzemských vzorků piv a detekované hladiny analytů.

číslo vzorku	druh piva	% alkoholu	DON (µg/l)	D3G (µg/l)	ADONs (µg/l)
CZ-1	tmavý ležák	5,5	9,7	11,0	< 3
CZ-2	světlý ležák	5,0	7,4	4,1	9,0
CZ-3	světlý ležák	5,0	< 1	15,5	< 3
CZ-4	světlý ležák	5,0	8,7	6,0	< 3
CZ-5	světlé	4,1	1,5	8,6	< 3
CZ-6	světlý ležák	4,0	18,5	28,5	5,0
CZ-7	světlý ležák	4,4	12,9	8,8	11,5
CZ-8	světlý ležák	4,4	30,4	40,9	< 3

CZ-9	světlé výčepní	3,8	14,2	16,3	< 3
CZ-10	černé výčepní	3,8	< 1	18,4	< 3
CZ-11	světlé výčepní	4,0	16,8	17,7	< 3
CZ-12	světlý ležák	4,6	15,8	23,2	< 3
CZ-13	světlý ležák	4,8	10,1	25,3	< 3
CZ-14	světlý ležák	5,0	< 1	10,3	< 3
CZ-15	světlé	max. 0,49	14,7	19,2	< 3
CZ-16	světlé výčepní	4,0	< 1	< 1	< 3
CZ-17	světlé výčepní	4,0	6,4	11,6	< 3
CZ-18	světlé výčepní	4,0	< 1	< 1	< 3
CZ-19	světlé	5,0	31,4	14,3	5,8
CZ-20	světlý ležák	7,5	4,4	10,9	< 3
CZ-21	světlý ležák	7,5	< 1	2,0	4,0
CZ-22	světlý ležák	5,0	5,8	3,6	< 3
CZ-23	světlý ležák	5,0	12,4	16,0	< 3
CZ-24	tmavý ležák	4,8	< 1	< 1	< 3
CZ-25	světlé	max 0,5	5,4	15,2	< 3
CZ-26	světlé	9,0	28,1	14,6	8,3
CZ-27	tmavý ležák	4,4	62,9	68,8	27,8
CZ-28	tmavý ležák	4,4	12,8	5,6	< 3
CZ-29	tmavý ležák	4,4	7	12	6,0
CZ-30	polotmavý ležák	4,8	34,1	55,3	< 3
CZ-31	polotmavý ležák	5,1	13,0	24,3	< 3
CZ-32	výčepní světlé	4,0	4,0	4,1	< 3
CZ-33	světlé výčepní	4,0	8,6	12,3	< 3
CZ-34	výčepní světlé	4,0	10	< 1	< 3
CZ-35	tmavý ležák	4,8	19,8	25,7	< 3
CZ-36	tmavý ležák	4,8	6	5	< 3
CZ-37	světlý ležák	5,0	4,2	3,3	6,1
CZ-38	světlý ležák	5,0	7,8	15,4	< 3
CZ-39	světlý ležák	5,0	7	5	5,0
CZ-40	světlé výčepní	3,8	21,0	37,3	< 3
CZ-41	světlé	max 0,5	22,0	17,7	< 3
CZ-42	světlé výčepní	4,0	11,9	27,4	< 3
CZ-43	světlý ležák	5,0	16,3	32,5	< 3
CZ-44	světlý ležák	5,0	14	18	< 3
CZ-45	světlé	7,6	6,7	19,5	< 3
CZ-46	světlý ležák	5,0	13	27	8,0
CZ-47	tmavý ležák	4,7	19,5	34,9	< 3
CZ-48		4,9	< 1	< 1	< 3
CZ-49		max0,5	< 1	< 1	4,0
CZ-50		4,9	< 1	4,4	6,0
CZ-51		3,9	6,2	4,8	< 3
CZ-52	světlé	4,9	7,1	5,3	< 3
CZ-53	tmavé	5,2	< 1	3,9	< 3
CZ-54	tmavé	5,2	16	26	24,0
CZ-55		5,0	7,6	5,9	8,7
CZ-56		5,0	22,1	5,8	< 3
CZ-57		5,0	< 1	3,7	7,6
CZ-58	světlé výčepní	4,5	14,7	13,9	4,0
CZ-59	světlý ležák	5,1	8,3	6,6	6,2

* výsledky jsou přepočítány na výtěžnost

Tab. XV: Přehled zahraničních vzorků piv a detekované hladiny analytů.

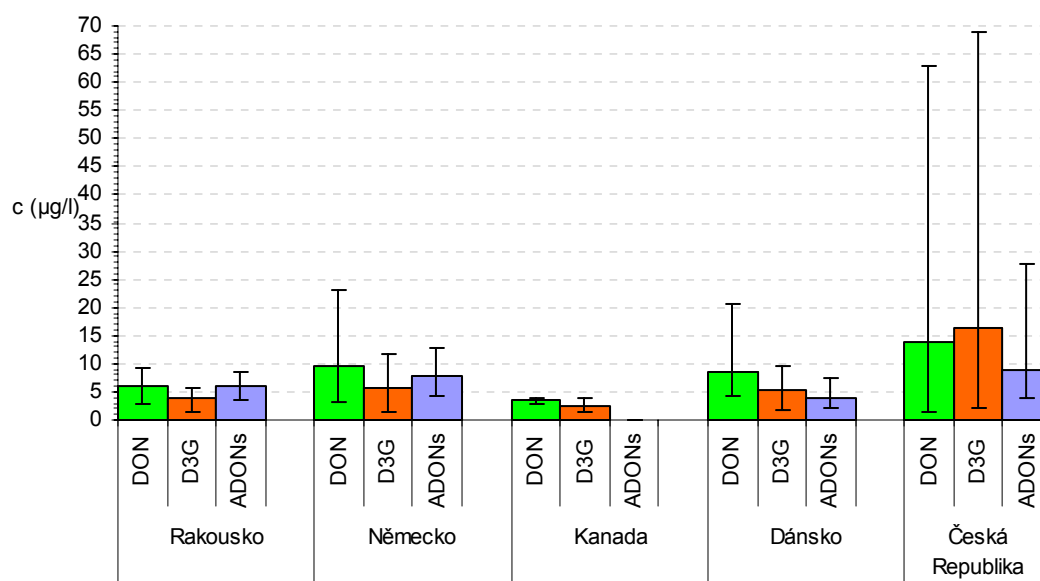
číslo vzorku	země původu	% alkoholu	DON (µg/l)	D3G (µg/l)	ADONs (µg/l)
Z-1	Rakousko	5,0	2,7	1,5	< 3
Z-2	Rakousko	5,3	9,0	4,2	< 3
Z-3	Rakousko	5,2	6,1	4,0	3,5
Z-4	Rakousko	4,6	< 1	4,7	< 3
Z-5	Rakousko	5,7	6,4	5,8	8,6
Z-6	Německo	4,9	3,1	4,6	4,7
Z-7	Německo	5,4	23,1	9,3	< 3
Z-8	Německo	5,3	3,3	3,5	< 3
Z-9	Německo	4,9	5,0	6,1	6,2
Z-10	Německo	4,9	7,5	6,3	10,9
Z-11	Německo	5,2	15,9	11,7	10,0
Z-12	Německo	0,0	3,7	3,1	10,7
Z-13	Německo	4,9	< 1	< 1	5,6
Z-14	Německo	4,9	< 1	2,0	7,1
Z-15	Německo	0,0	< 1	< 1	< 3
Z-16	Německo	5,0	5,2	4,0	4,3
Z-17	Německo	7,0	16,2	11,6	12,7
Z-18	Německo	4,9	9,8	5,2	6,3
Z-19	Německo	4,8	< 1	1,5	11,2
Z-20	Německo	5,3	6,5	5,7	6,2
Z-21	Kanada	5,0	< 1	1,6	< 3
Z-22	Kanada	5,0	< 1	3,8	< 3
Z-23	Kanada	4,0	2,8	2,8	< 3
Z-24	Kanada	5,0	< 1	2,6	< 3
Z-25	Kanada	5,0	3,6	2,9	< 3
Z-26	Kanada	5,0	3,9	1,5	< 3
Z-27	Kanada	5,0	< 1	< 1	< 3
Z-28	Kanada	5,0	< 1	2,4	< 3
Z-29	Kanada	5,2	< 1	< 1	< 3
Z-30	Kanada	5,0	< 1	< 1	< 3
Z-31	Dánsko	4,6	13,3	1,8	< 3
Z-32	Dánsko	4,6	6,0	4,6	3,6
Z-33	Dánsko	5,8	8,5	8,5	< 3
Z-34	Dánsko	4,6	6,0	5,4	7,5
Z-35	Dánsko	4,6	4,6	9,4	< 3
Z-36	Dánsko	5,2	6,4	< 1	< 3
Z-37	Dánsko	5,6	20,4	3,9	< 3
Z-38	Dánsko	5,2	4,0	2,5	< 3

* výsledky jsou přepočítány na výtěžnost

Fusariotoxin DON byl detekován v 67 % vzorků všech piv a jeho průměrná hladina byla 12 µg/l. Glykosylovaný D3G byl nalezen v 81 % vzorků s průměrnou kontaminací 13,6 µg/l a ADONs obsahovalo 51 % vzorků s kontaminací 6,1 µg/l. Pro přehlednější vyjádření a diskusi výsledků byl celý soubor rozdělen na několik skupin, ve kterých bude

dále porovnáván vliv obsahu alkoholu, neječných technologických přísad, země původu piva a jednotlivých pivovarů na hladiny fusariotoxinu DON i jeho dvou metabolitů.

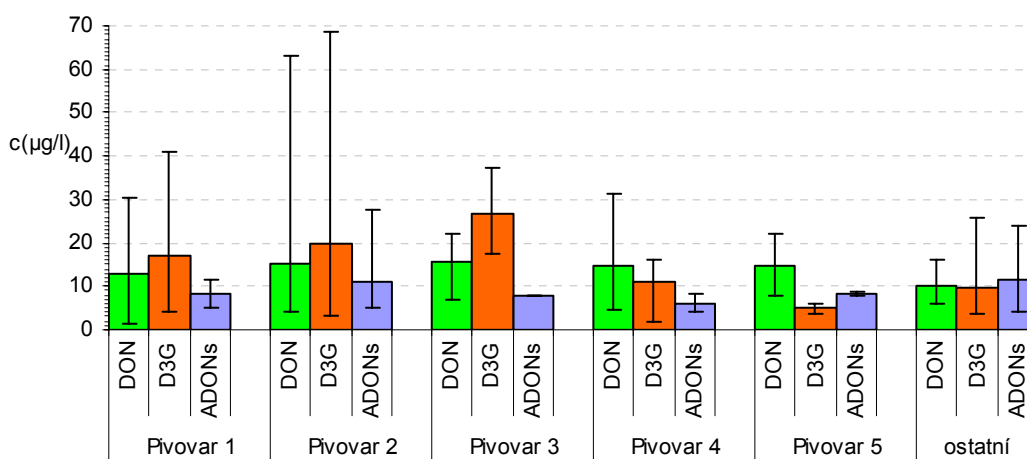
V první části diskuse bude kontaminace piva srovnána na základě jejich země původu. Souhrnný ilustrační graf je uveden na **Obr. 1**. Z výsledků je zřejmé, že největší obsah zkoumaných mykotoxinů byl nalezen v českých pivech. Tento fakt by sice mohl být způsoben vysokým počtem českých vzorků ve srovnání s množstvím piva zakoupených v zahraničí, ale výsledky jsou shodné a potvrzují rozsáhlou studii Rupricha (54). Mykotoxinem DON bylo kontaminováno 68 % vzorků zahraničních piva, průměrný obsah byl stanoven na 7,8 µg/l, konjugát D3G byl detekován v 87 % případů s průměrnou kontaminací 4,6 µg/l a acetylované ADONs byly nalezeny v necelé polovině vzorků (47 %, průměrný obsah 6,9 µg/l). Nejkontaminovanější pivo pocházelo z Německa (16,2 µg/l DON; 11,6 µg/l D3G; 12,7 µg/l ADONs), naopak u tří kanadských a jednoho německého piva nebyl detekován ani jeden ze sledovaných mykotoxinů. Velmi nízké hladiny fusariotoxinů, průměrně do 5 µg/l, byly naměřeny v kanadských pivech, kde dokonce ani v jednom vzorku nebyly stanoveny acetylované ADONs.



Obr. 1: Hladiny mykotoxinů DON, D3G a ADONs v pivech, řazeno podle země původu.

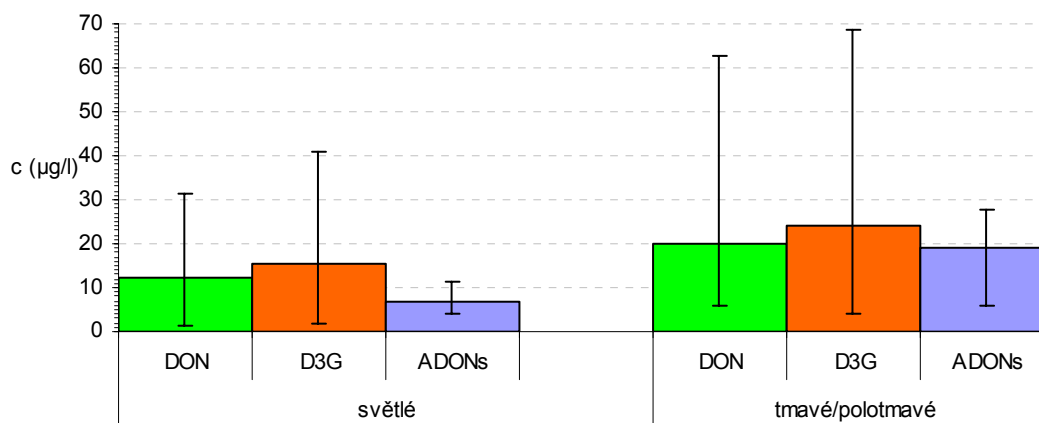
V pivech domácí české produkce byl DON nalezen v 80 % případů, D3G v 90 % vzorků a ADONs pouze u 27 % piv. Jejich průměrné obsahy byly postupně stanoveny na 14,0; 16,5 a 8,9 µg/l.

Česká piva byla dále srovnána podle jednotlivých výrobců, tedy původních pivovarů. Průměrné výsledky jsou shrnuty na **Obr. 2**. Jediný pivovar, ve kterém byl DON i jeho dva metabolity stanoveny nad limitem detekce ve 100 % vzorků, byl pivovar 3. Průměrně byl také v tomto pivovaru stanoven nejvyšší obsah D3G, a to 28,6 µg/l. Je zřejmé, že průměrné obsahy DON byly téměř u všech pivovarů srovnatelné a pohybovaly se kolem 15 µg/l. Obsahy D3G kolísaly od 5 do 30 µg/l, a ADONs byly stanoveny průměrně na 8 µg/l.



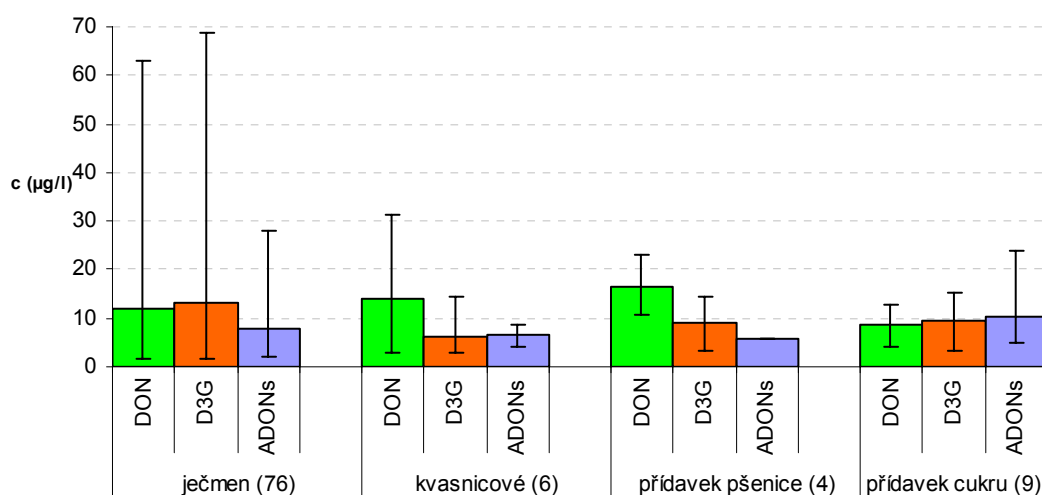
Obr. 2: Srovnání obsahu DON, D3G a ADONs v pivech, řazeno podle výrobce.

Pro další porovnání výsledků byl celý soubor piv rozdělen na světlé a tmavé piva. Průměrné hodnoty DON, D3G i ADONs v těchto dvou kategoriích jsou znázorněny na **Obr. 3**. Celkově bylo analyzováno 84 piv světlých a 13 piv tmavých. V případě světlého typu piva byl DON u 87 % vzorků detekován nad limitem detekce, D3G u 92 % vzorků a ADONs u 38 %. Co se týká polotmavých až tmavých piv DON byl detekován v 75 % vzorků, D3G v 94 % a ADONs v 23 % vzorků piv. Při vzájemném srovnání byly vyšší obsahy mykotoxinů stanoveny ve tmavých pivech, hladiny DON, D3G a ADONs byly v těchto vzorcích o 62; 57 a 192 % vyšší, než v pivech světlých.



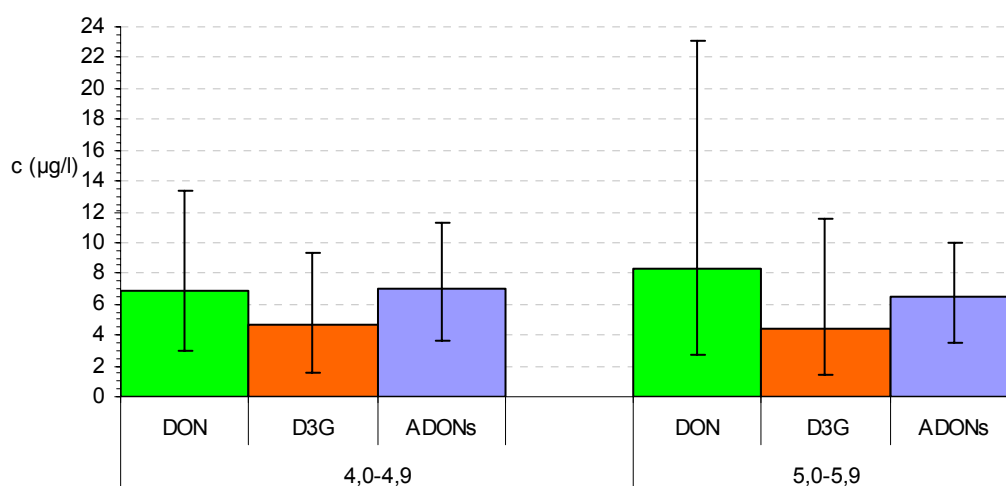
Obr. 3: Srovnání obsahu DON, D3G a ADONs podle typu piva (světlé, tmavé / polotmavé).

V další části výsledků byla piva rozdělena podle typů obilných sladů a dalších technologických přísad, která byla použita v rámci výroby piva. Celkově bylo analyzováno 76 piv vyrobených pouze z ječných sladů, 6 piv s přísadou kvasnic, 4 pšeničná piva (slad směs ječmene a pšenice) a 9 surogovaných piv karamel, maltózovým sirupem nebo sacharózou. Výsledky jsou uvedeny na **Obr. 4**. Z grafů je patrné, že nejvyšší obsahy volného fusariotoxinu DON i jeho „maskované“ glykosylované formy D3G byly stanoveny ve vzorcích piv vyrobených pouze z ječných sladů (max. obsah D3G – 13,2 µg/l) a ze sladů pšeničných (max. obsah DON – 16,6 µg/l). Průměrné hodnoty všech mykotoxinů byly srovnatelné a nebyly zaznamenány žádné významné rozdíly v hladinách kontaminace v závislosti na surovinách použitých pro vaření piva.



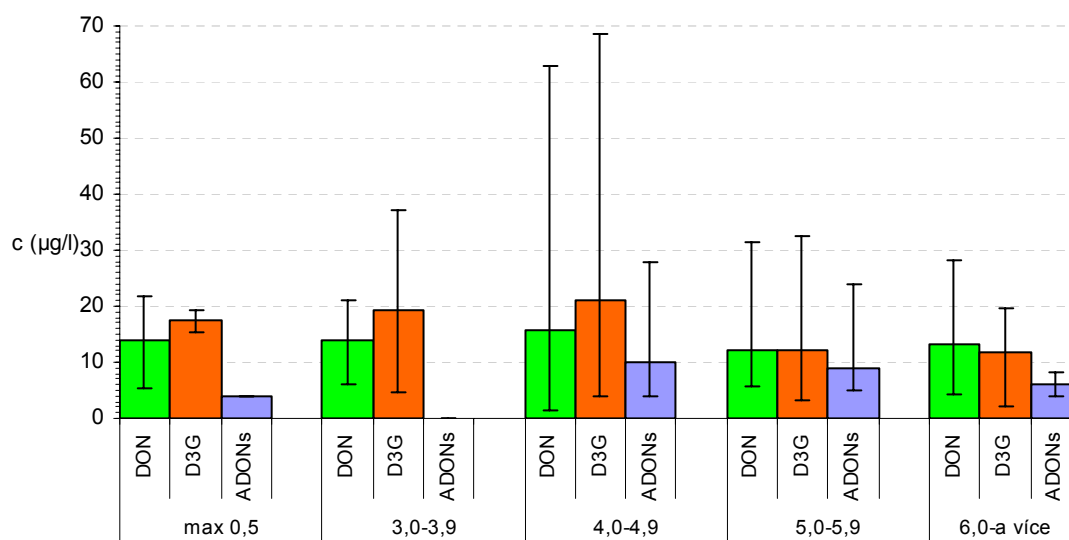
Obr. 4: Vliv rozdílné technologie vaření piva na hladiny mykotoxinů.

Poslední způsob, jak byly vzorky piv rozděleny a diskutovány je podle obsahu alkoholu. Vzorky byly rozděleny na zahraniční a české piva (viz **obr. 5 a 6**) a dále podle objemových procent alkoholu na několik skupin. První **obr. 5** znázorňuje obsah DON, D3G a ADONs v pivech zahraniční produkce seřazených podle obsahu alkoholu. Většina ze zahraničních piv obsahovala alkohol v rozmezí 4,0-5,9 % obj., a proto jsou výsledky znázorněny pouze pro tyto vzorky (pouze dva vzorky německých piv byly nealkoholické a jejich kontaminace byla nízká, jeden vzorek byl s obsahem alkoholu 7 obj. % - právě tento vzorek obsahoval nejvíce mykotoxinů ze všech zahraničních piv, viz výše). Z grafického znázornění je patrné, že hladiny mykotoxinů jsou v obou skupinách srovnatelné a nelze tedy podle obsahu alkoholu usuzovat na míru kontaminace piva mykotoxiny.



Obr. 5: Srovnání obsahu DON, D3G a ADONs v pivech zahraniční produkce podle obsahu alkoholu (% obj.).

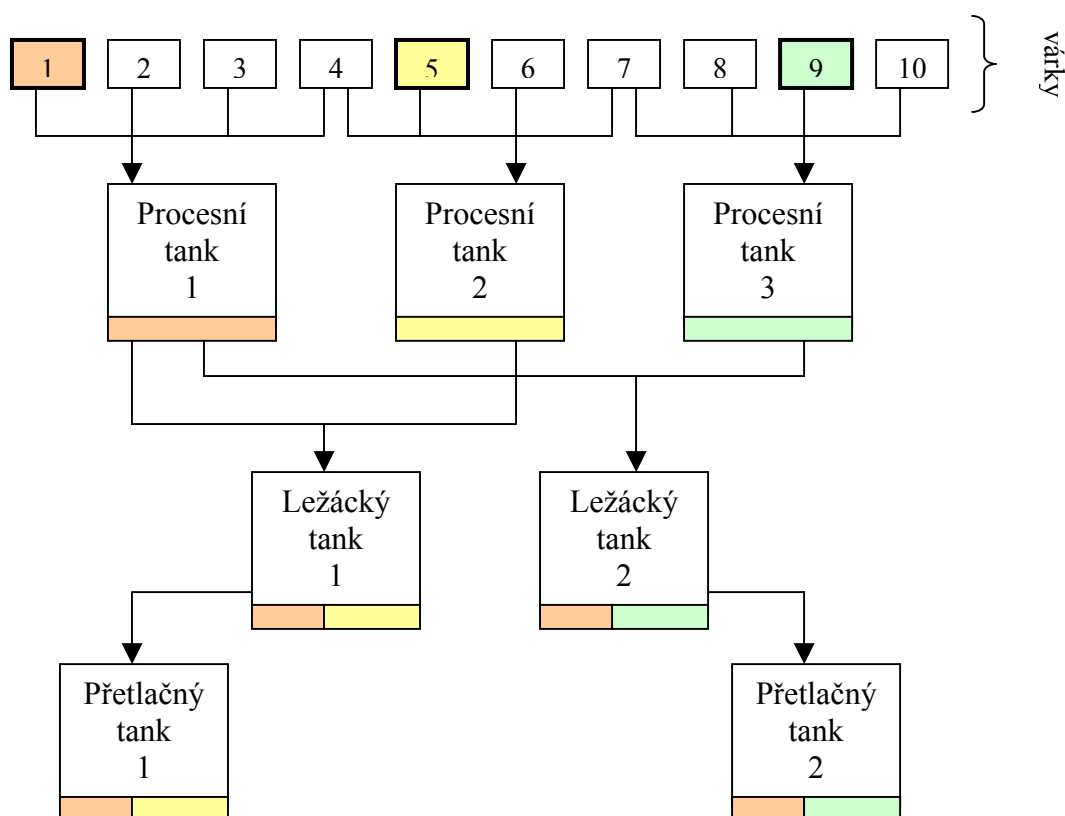
V případě českých piv, kdy bylo k analýzám použito vyšší množství vzorků, byla možnost rozdělit piva do více skupin s různým obsahem alkoholu (viz. **Obr. 6**). Ovšem ani v tomto případě nelze určit trend závislosti obsahu mykotoxinů na obsahu alkoholu v pivech. Obsahy DON i jeho konjugovaných forem různě kolísali, obsah DON se pohyboval v rozmezí 10 – 15 µg/l, průměrné obsahy D3G byly, ve většině případů, o 26 % vyšší než obsahy volného DON.



Obr. 6: Srovnání obsahu DON, D3G a ADONs v pivech tuzemské produkce podle obsahu alkoholu (% obj.).

Analýza vzorků technologického procesu vaření piva typu ležák

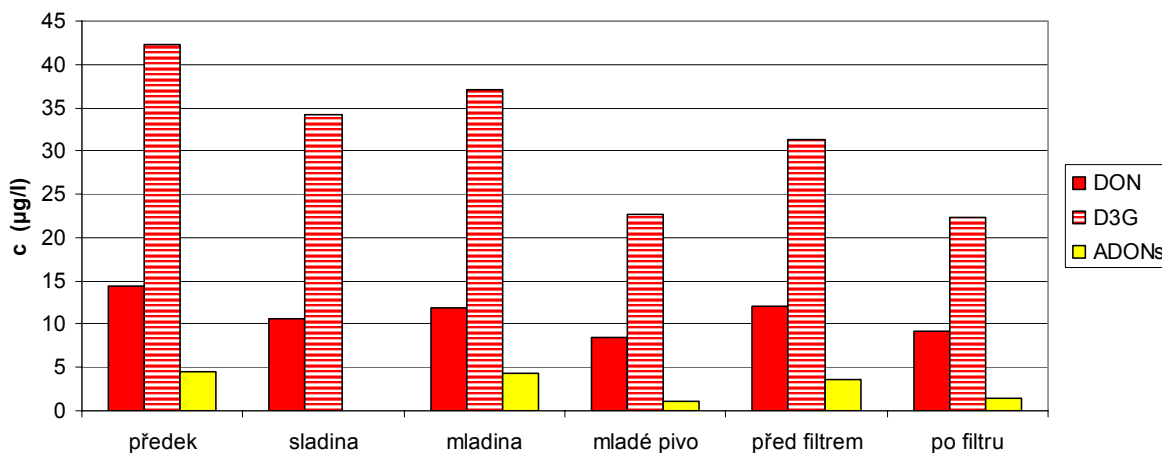
V dále uvedené části studií zaměřených na osud fusariových mykotoxinů v průběhu pivovarských technologií, které byly provedeny na Ústavu chemie a analýzy potravin VŠCHT v Praze, byla pozornost věnována koncentračním změnám mykotoxinů v rámci celé technologie. Vzorky jednotlivých technologických kroků vaření klasického ležáku byly získány z nejmenovaného českého pivovaru. U analyzovaného druhu piva byly sledovány tři výrobní várky, u kterých došlo během dalších technologických kroků se smíšením, celý technologický postup je schematicky znázorněn na **Obr. 7**. Z každé várky byl odebrán vzorek předku (předek představuje prvních cca 70 hl sladiny oddělené od mláta), sladiny, mladiny a mláta. Dále byly odebrány vzorky mladého piva, piva před filtrací a pasterací a piva po filtraci a pasteraci.



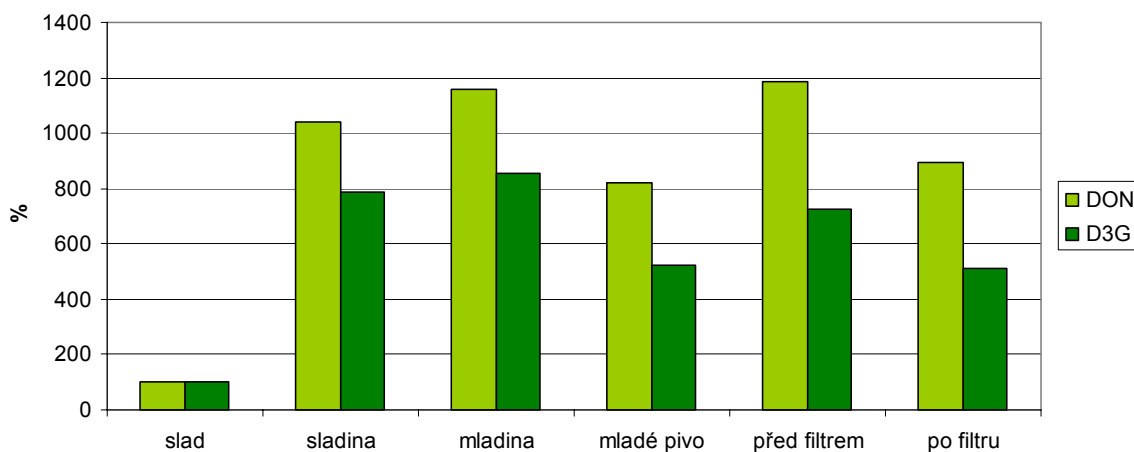
Obr. 7: Schéma odběru vzorků během technologie vaření ležáku.

DON a DON-3-Glc byly detekovány ve všech vzorcích odebraných v průběhu výroby ležáku, s výjimkou mláta. Průměrná hodnota byla 10,8 $\mu\text{g/l}$ pro DON a 30,6 $\mu\text{g/l}$ pro DON-3-Glc. ADONs byly detekovány pouze v 11 případech z 23, přičemž stejně jako DON a DON-3-Glc nebyly nalezeny v žádném ze vzorků mláta. Průměrná hodnota v pozitivních vzorcích

byla 2,9 $\mu\text{g/l}$ (**Obr. 8**). Uvedené průměrné hodnoty jsou mírně nadhodnoceny vysokým obsahem mykotoxinů ve vzorcích předku. Největší nárůst DON byl pozorován v pivu před filtrací a pasterací (na 1200 %), nejmenší množství bylo v mladém pivu (820 %). DON-3-Glc byl nejvíce přítomen v mladině (860 %), nejméně ve zfiltrovaném pivu (520 %). Nárůst DON v analyzovaných vzorcích byl vždy vyšší, než nárůst DON-3-Glc, DON-3-Glc byl ale přítomen v mnohem větších koncentracích (**Obr. 9**).



Obr. 8: Změny koncentrací mykotoxinů během výroby ležáku.



Obr. 9: Nárůst obsahu mykotoxinů během výroby ležáku (100 % = obsah mykotoxinů ve sladu).

Z výsledků uvedených v této kapitole je zřejmé, že v průběhu technologického vaření piva nedochází k degradaci mykotoxinů, které se do procesu vaření dostávají z kontaminovaného ječmene. Pro příklad byly analyzovány komerční i technologické vzorky tuzemské i zahraniční produkce a bylo prokázáno, že mykotoxinů jsou detekovatelné až v 80

% vzorků piv. Kromě samotného mykotoxinu DON, se na významných hladinách vyskytují ve vzorcích i jeho konjugované nebo-li maskované formy, tedy glukosylovaný D3G a acetylované ADONs.

Případová studie 2

Stanovení trichothecenů typu A se zaměřením na HT-2 a T-2 toxiny v ovsu a ovesných výrobcích.

V rámci ochrany veřejného zdraví je nezbytně nutné udržovat množství kontaminujících látek na toxikologicky přijatelné úrovni. V roce 2001 byl proto pracovní skupinou Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants (JECFA FAO/WHO) v rámci Codex Alimentarius a Scientific Committee for Food of European Commission (EU SCF) v rámci zemí EU stanoven expoziční limit T-2 a HT-2 toxinů na 60 ng/kg tělesné hmotnosti/den (60). V České republice jsou stanoveny limity pro obsah některých mykotoxinů v potravinách a surovinách pro jejich výrobu Nařízením komise (ES) č. 1881/2006. Maximální hodnoty pro obsah součtu T-2 a HT-2 toxinu však zatím nejsou pevně stanoveny, aktuální diskutované hodnoty pro nezpracované obiloviny jsou 100 µg/kg, pro nezpracovaný oves 500 µg/kg, pro ovesné výrobky 200 µg/kg a pro dětskou výživu 50 µg/kg. Z odhadu příjmu těchto toxinů v potravě, který je uveden ve Stanovisku Vědeckého výboru pro potraviny vyplývá, že přítomnost T-2 a HT-2 toxinu může představovat ohrožení pro veřejné zdraví. Vědecký výbor pro potraviny stanovil kombinovanou tolerovanou denní dávku (t-TDI) pro T-2 a HT-2 toxin na 0,06µg na kg tělesné hmotnosti (61).

T-2 a HT-2 toxiny v ovsu

Onemocnění FHB u obilovin jako pšenice nebo ječmen indikují zřetelné fuzariózy klasů. Z nových vědeckých poznatků však vyplývá, že u ova nemusí být napadení fusarií v průběhu vegetace vůbec viditelné, ale patogeny *Fusarium spp.* v příznivých klimatických podmínkách oves zcela běžně napadají a kontaminují jej svými toxickými produkty (62). Vědecké práce poukazují na to, že T-2 a HT-2 toxiny se mohou v ovsu vyskytovat v relativně vysokých koncentracích, které mohou být pro časté konzumenty této obiloviny přímou hrozbou (57). Jelikož je oves považován za nutričně nejvyváženější obilovinu a jeho spotřeba například v letech 2005/2006 v Evropské unii činila 7,6 miliónů tun (63), je potřeba věnovat pozornost vývoji přesných analytických metod s nízkými detekčními limity, shromáždit větší množství údajů o výskytu a provést další výzkumy zaměřené na faktory podílející se na

přítomnosti T-2 a HT-2 toxinu v obilovinách a výrobcích z obilovin, zejména v ovsu a výrobcích z ovsa. V **tabulce XVI** je uveden výskyt T-2 a HT-2 toxinu v cereáliích v různých zemích světa. Z tabulky je zřejmé, že tyto toxiny se nejen v ovesných matricích vyskytují ve velmi různých koncentracích.

Tab. XVI: Výskyt T2 a HT2 toxinu v cereáliích v různých zemích světa (63-71).

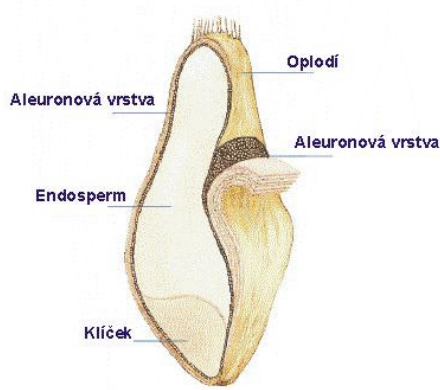
Země původu	Druh cereálie	T-2 toxin [mg/kg]	HT-2 toxin [mg/kg]	Studie
Brazílie	pšenice	0,04 a 0,8	-	Furlong a kol., 1995
Česká republika	ječmen pšenice	0,0059-0,0077 0,0057-0,0082	0,013-0,0772 0,0127-0,0183	Hajšlová a kol., 2007
Finsko	oves	suma T-2 + HT-2 max 1,369		Hietaniemi, 2006
Kanada	ječmen, pšenice	0,116-0,31	0,12-0,44	Stratton a kol., 1993
Německo	oves a ovesné vločky	0,0017-0,034	0,0052-0,051	Gottschalk a kol., 2007
	oves, kojenecká výživa, müsli, snídaňové cereálie	0,004-0,0138	0,0194-0,0331	Trebstein a kol., 2008
	oves a ovesné produkty	suma T-2 + HT-2 0,003-0,174		Mister, 2008
	chléb, pečivo, nudle, snídaňové cereálie, dětská výživa, rýže	0,004-0,039	0,012-0,051	Schollenberger a kol., 2000
Německo	oves a ovesné produkty	0,0032-0,055	<0,002-0,122	Majerus a kol., 2008
Norsko	ovesné vločky a krupky	suma T-2 + HT-2 max 0,054		Clasen, 2003
	oves	0,025-0,38	0,083-0,88	Langseth a kol., 1999
Polsko	pšenice	0,02-2,4	0,01-0,37	Grabarkiewicz-Szczesna, 1996
Slovensko	krmiva pro drůbež	0,001-0,13	0,002-0,173	Labuda a kol., 2005
Švédsko	oves	0,044-0,049	0,038-0,075	Widestrand a kol., 2003
Velká Británie	ovesné vločky	suma T-2 + HT-2 max 0,137		Morning, 2007
	ovesné krmivo pro koně	suma T-2 + HT-2 max 29,7		BOMBA, 2007
		suma T-2 + HT-2 max 4,54		Morning, 2007

Oves setý

Mezi největší pěstitele ovsa patří Rusko, Kanada, USA, Polsko, Německo, Finsko, Švédsko, Austrálie a Ukrajina. V České republice se oves pěstoval na největší ploše v letech 1980-1991. Dnes už v ČR tak velká produkce není, nicméně oves se opět dostává do popředí zájmu konzumentů. Největší podíl ovsa se využívá jako krmivo. V potravinářství se oves nejčastěji zpracovává na ovesné vločky, jejichž spotřeba má v posledních letech stoupající tendenci. Velmi oblíbené jsou také ovesné snídaně v podobě kaší, müsli a müsli tyčinek. Méně často se z ovsa vyrábí ovesná mouka a ovesná rýže (72,73).

Skladba zrna je znázorněna na **Obr. 12**. Vnější vrstvy zrna neboli oplodí mají za úkol chránit zrna před mechanickým poškozením a vlivy počasí, proto jsou tvořeny především celulózou a nerozpustnými látkami. Pod vnější vrstvou je osemení, ve kterém se nacházejí barviva. Při technologickém zpracování se tyto vrstvy odstraňují a tvoří otruby. Na rozhraní obalových vrstev a endospermu se nachází aleuronová vrstva, která má vysoký obsah bílkovin (až 30 %) a minerálních látek. Při vymletí aleuronové vrstvy se tak zvyšuje obsah popela a mírně i obsah bílkovin v mouce. Vnitřní část obilky se nazývá endosperm. V endospermu jsou uloženy zásobní látky zrna, které jsou tvořeny především škrobem, bílkovinami, mastnými kyselinami a dusíkatými látkami.

Klíček neboli zárodek tvoří nejmenší část zrna. Jsou v něm uloženy základy pro tvorbu kořínků, stébla a listů. Klíček obsahuje bílkoviny a většinu tuku, který se v zrna nachází (70).



Obr. 12: Stavba obilného zrna

Oves je také významným zdrojem vlákniny ať už rozpustné nebo nerozpustné. V obilce ovsa se průměrně nachází 12 % vody, 54,5 % škrobu, 11,7 % bílkovin, 6,0 % tuku, 10,8 % celulózy a 3,0 % popelovin (73).

Oves obsahuje mnohem více bílkovin než ostatní obiloviny. Tyto bílkoviny mají téměř ideální aminokyselinové složení s vysokým obsahem esenciálních aminokyselin a jsou lehce stravitelné. Dále obsahuje mezi obilovinami nejvíce tuku, který je tvořen převážně nenasycenými mastnými kyselinami. Nejvíce tuku je uloženo v klíčku. Oves je také výborným zdrojem rozpustné vlákniny, která je tvořena β -glukany. Ty jsou spolu s dalšími látkami v organismu odpovědné za snižování hladiny LDL-cholesterolu, který má negativní vliv na lidské zdraví (74).

Technologie zpracování ovsa

Z asi 70 druhů ovsa se v České republice pěstuje oves setý *Avena sativa* a oves nahý *Avena nuda*. Oves nahý se představuje asi jednu desetinu produkce ovsa, nicméně jeho technologické vlastnosti (vyšší objemová hmotnost a hmotnost tisíce zrn) zajišťují vyšší výtěžnost ovesných vloček. Oves se pěstuje hlavně jako krmivo pro hospodářská zvířata a jen 10 % se využívá pro potravinářské účely. Průměrná roční spotřeba ovesných produktů na jednoho člověka se u nás odhaduje asi na 2,5-3 kg (70).

Jakostní znaky potravinářského ovsa

Oves, který slouží k potravinářským účelům musí splňovat určité kvalitativní znaky. Především musí být zdravý a mikrobiologicky nezávadný s dobře vyvinutými plnými zrny světlé barvy. Další doporučené a závazné znaky jakosti jsou uvedeny v **tabulce XVII**.

Tab. XVII: Tabulka jakostních znaků potravinářského ovsa (72).

Doporučené hodnoty	oves pluchatý oves nahý	
Vlhkost (%)	13	12
Objemová hmotnost (g/l)	550	680
Podíl zrna nad sítem, 1,8x22 mm (%)	90	80
Příměsi (%)	6,0	3,0
Nečistoty (%)	0,0	0,0
Závazné hodnoty		
Chuť	---	typická, bez nahořklé
Příměsi: zrna neodstranitelná (%)	max. 1,0	max. 1,0
zrna porušená (%)	max. 1,0	max. 1,0
zrna zdvojená (%)	max. 2,0	---

Mlýnské výrobky z ovsa

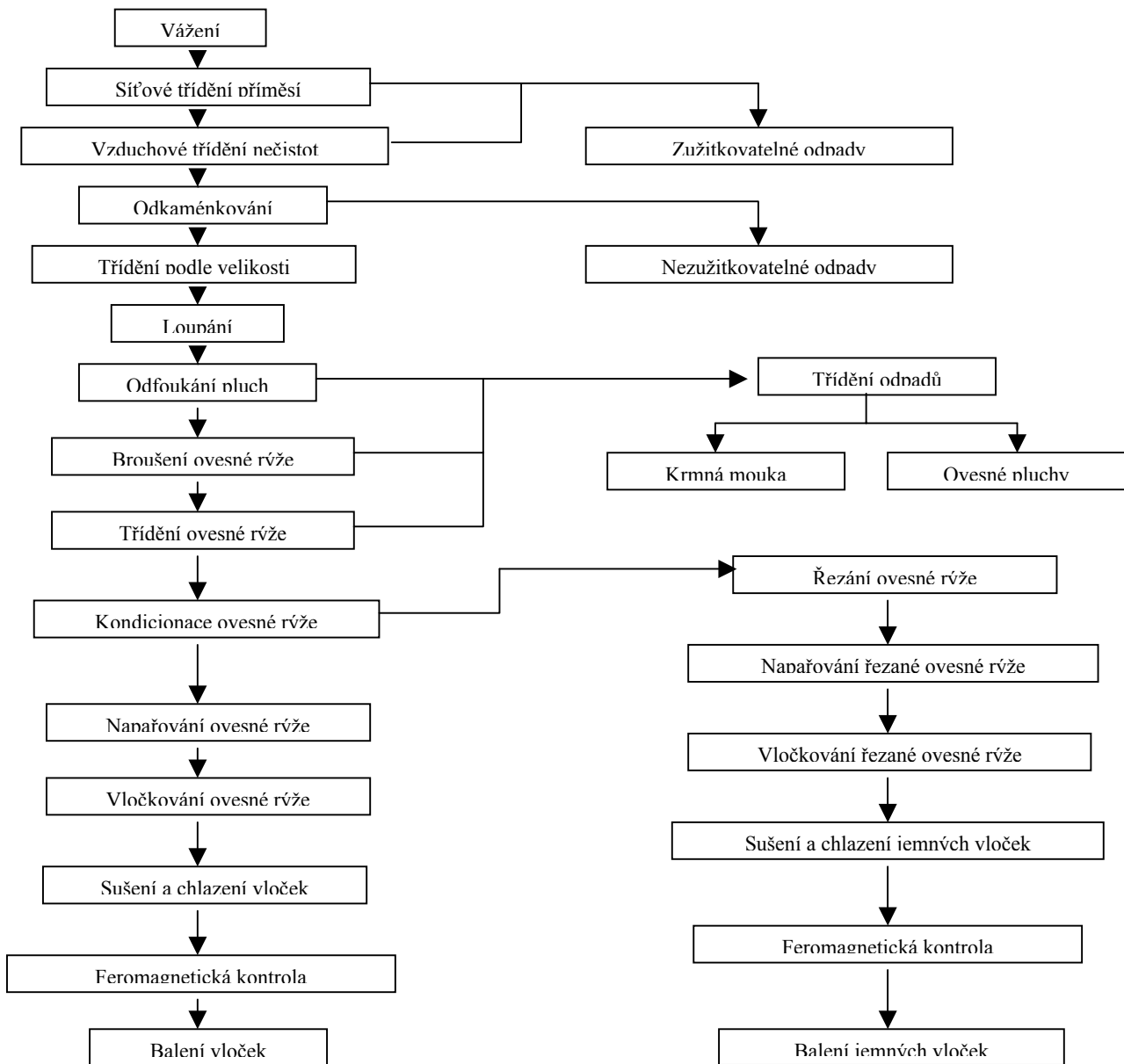
Sortiment mlýnských výrobků zahrnuje tři hlavní produkty:

- Ovesné vločky – vločky o tloušťce 0,5-0,7 mm, které se vyrábí mačkáním důkladně napařené obroušené ovesné rýže; používají se k výrobě cereálních směsí – müsli, pečiva nebo k přípravě ovesné kaše
- Jemné ovesné vločky – vyrábí se z příčně řezané ovesné rýže, jsou drobnější a slabší, takže mají kratší dobu varu
- Ovesná mouka – vyrábí se mletím ovesných vloček po jejich tepelném opracování; používá se k výrobě ovesných kaší, směsí mouk a instantních polévek

Technologie výroby ovesných vloček

Blokové schéma výroby ovesných vloček je uvedeno na **Obr. 13**. Oves musí být před technologickým zpracováním důkladně zbaven všech nežádoucích nečistot a příměsí. Poté se ovesná zrna dělí na sítích podle velikosti na dvě až tři frakce. Tyto frakce se samostatně zbavují slupek na loupacích strojích. Zde se oves optimálně zbavuje pluch tak, že vzniká minimální množství zlomků ovesné rýže (obílek zbavených pluch) a ovesné mouky. Další pracovní operace zahrnuje roztřídění ovesné rýže a nevyzloupaných zrn. Následuje broušení ovesné rýže, kdy se zrna zbavují vousku a kondicionace, při které se snižuje vlhkost o 3-5 %. Enzymový systém lipidů je nutno inaktivovat, což se provádí hydrotermickým ošetřením, kdy se ovesná rýže zahřívá při vlhkosti 18-22 % na teplotu 90-95 °C.

Hydrotermické ošetření má zásadní vliv na chuť, trvanlivost a dobu potřebnou k vaření ovesných vloček. Ihned po napařování vstupuje upravená ovesná rýže do vločkovacích válcových stolicí, kde získává finální podobu vloček. Poté je nutno ovesné vločky ochladit a vysušit a před balením provést kontrolu feromagnetických nečistot (72).



Obr. 13: Blokové schéma výroby ovesných vloček

Monitoring fusariových mykotoxinů v ovesných potravinách

Oves je díky svým nutričním vlastnostem velmi oblíbenou snídaňovou cereálií. Cílem této studie bylo také posoudit kontaminaci cereálních produktů na bázi ovesa, které jsou dostupné v maloobchodní síti v České republice. Jako vzorky byly zakoupeny ovesné vločky, oves, müsli a také dětské ovesné kaše. Právě ovesné kaše mohou představovat zvýšené zdravotní riziko, neboť dětský organismus je obecně citlivější vůči toxinům, které se v těchto výrobcích mohou vyskytovat a je tedy nutné obsah mykotoxinů v produktech určených pro dětskou výživu přísně monitorovat. Seznam vzorků a jejich popis je uveden v **tabulce XVIII**. Výsledky tohoto zkoumání jsou shrnuty v **tabulce IX** a v grafu na **Obr. 14**.

Tab. XVIII: Komerční vzorky zakoupené v maloobchodní síti

Vzorek	Název
KV1	Bio müsli
KV2	Ovesné vločky
KV3	Müsli sypané červené ovoce
KV4	Křupavé müsli s jahodami
KV5	Express natural ovesná kaše
KV6	Ovesná kaše s meruňkami
KV7	Müsli pražené
KV8	Kaše na dobrou noc bio
KV9	Dobrá kaše
KV10	Vitalis
KV11	Miss Fit
KV12	Zapékané křupavé müsli
KV13	Müsli zapékané ovocné
KV14	Krusli s jogurtem brusinkové
KV15	Bio ovesné vločky
KV16	Bio oves bezpluchý
KV17	Ovesné vločky jemné

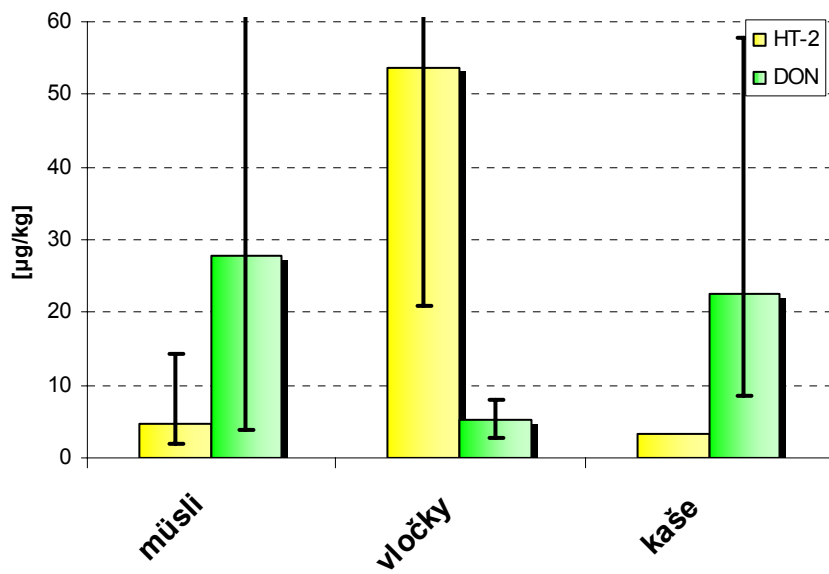
K analýze vzorků byla použita metoda LC-MS/MS s použitím extrakce ACN:H₂O (84:16, v/v) s přečištěním přes MycoSep 226 (viz 3.2.2.2.1), data byla vyhodnocena pomocí matriční kalibrační řady.

Prakticky jediné dva mykotoxiny, které byly v celém souboru vzorků detekovány byly HT-2 toxin a DON. T-2 toxin byl v některých vzorcích detekován, ale ležel pod hladinou kvantifikace (obsahy menší než 1 µg/kg). HT-2 toxin byl detekován v 65 % vzorků, průměrná hodnota 13 µg/kg, DON byl pozitivní v 88 % vzorků a jeho průměrná hladina činila 89 µg/kg. Nejvyšší koncentrace HT-2 byla nalezena ve vzorku KV17 (vločky) a to 110 µg/kg. Nejvyšší koncentrace DON 100 µg/kg byla ve vzorku KV10 (müsli).

Tab IX: Obsah fusariových mykotoxinů v komerčních vzorcích

Vzorek [µg/kg]	T-2	HT-2	NIV	DON	D3G	ADONs	Fus-X	ZEA
KV1	<1	14,4	<10	3,9	<10	<10	<3	<3
KV2	<1	20,9	<10	4,9	<10	<10	<3	<3
KV3	<1	12,8	<10	5,0	<10	<10	<3	<3
KV4	<1	3,4	<10	6,2	<10	<10	<3	<3
KV5	<1	<1	<10	8,6	<10	<10	<3	<3
KV6	<1	<1	<10	14,6	<10	<10	<3	<3
KV7	<1	1,9	<10	9,8	<10	<10	<3	<3
KV8	<1	<1	<10	57,8	<10	<10	<3	<3
KV9	<1	8,5	<10	9,2	<10	<10	<3	<3
KV10	<1	<1	<10	99,6	<10	<10	<3	<3
KV11	<1	<1	<10	47,7	<10	<10	<3	<3
KV12	<1	2,8	<10	14,6	<10	<10	<3	<3
KV13	<1	3,4	<10	<LOQ	<10	<10	<3	<3
KV14	<1	<1	<10	60,9	<10	<10	<3	<3
KV15	<1	30,5	<10	2,8	<10	<10	<3	<3
KV16	<1	11,4	<10	<LOQ	<10	<10	<3	<3
KV17	<1	109,6	<10	7,9	<10	<10	<3	<3

V grafu na **Obr. 14** je srovnání obsahu HT-2 toxinu a deoxynivalenolu v jednotlivých skupinách výrobků. Obecně müsli vzorky obsahovaly vyšší množství DON. Průměrná koncentrace HT-2 v müsli výrobcích byla 5 µg/kg a DON 28 µg/kg. Ve vločkách převažoval naopak obsah HT-2 toxinu. Jeho průměrná koncentrace byla 54 µg/kg a průměrná koncentrace DON byla 5 µg/kg. V ovesných kaších bylo opět větší množství DON a to průměrně 23 µg/kg a 3,2 µg/kg HT-2. Legislativa pro sumu T-2 a HT-2 toxinu dosud není platná, ale navrhovaný limit pro zpracovaný oves je 200 µg/kg. Maximální limit pro obsah DON ve zpracovaném ovsu je také 200 µg/kg. Z výsledků je zřejmé, že všechny zakoupené vzorky by legislativě vyhověly, neboť koncentrace T-2, HT-2 a DON byly nižší než 200 µg/kg.



Obr. 14: Průměrný obsah mykotoxinů v jednotlivých typech ovesných výrobků.

Případová studie 3

Porovnání kontaminace fumonisiny v kukuřičných BIO a konvenčních výrobcích zakoupených v české obchodní síti.

Vliv zpracování na obsah fumonisinů

Fumonisinu přecházejí z kontaminované suroviny do konečných produktů potravinářského průmyslu. Z procesů probíhajících při zpracování kukuřice má na obsah fumonisinů vliv zejména suché mletí, resp. rozdělení na mlynářské frakce, vymývání vodou nebo mokré mletí, teplota a alkalická hydrolyza (nixtamalizace).

Z vědeckých údajů vyplývá, že při suchém mletí mají mlynářské frakce s menšími částicemi vyšší hladinu fumonisinů, než mlynářské frakce s většími částicemi, ačkoliv pocházejí ze stejné šarže nezpracované kukuřice. Tento fakt byl zohledněn i při stanovování hygienických limitů platných v EU.

Mokré mletí je hlavním technologickým postupem při výrobě kukuřičného škrobu. V podstatě jde o mletí a promývání vodou zároveň. Z kukuřičného škrobu se dále vyrábí kukuřičný sirup a z kvašením etanol. Vedlejšími produkty mokrého mletí jsou krmiva pro zvířata s vysokým obsahem vlákniny. V kukuřičném škrobu, sirupu ani etanolu se fumonisinu nevyskytují, neboť jsou během zpracování vymyty vodou. Vyšší hladiny fumonisinů se mohou vyskytovat ve výše zmíněných vedlejších produktech, což je nutné zohlednit při dalším použití tohoto materiálu jako krmiva (80,81).

Máčení celé kukuřice má na snížení obsahu fumonisinů jen nepatrný vliv.

Fumonisinu jsou poměrně termostabilní a tak teploty a doby záhřevu používané při komerčním zpracování kukuřice nejsou schopny významně snížit jejich hladinu. Při pečení kukuřičného pečiva nebo konzervování kukuřice se obsah fumonisinů snižuje jen nepatrně, stejně tak extruze nemá větší vliv na snížení hladiny fumonisinů (80).

Delší smažení polenty, nebo autoklávování kukuřičné mouky sice může snížit hladinu fumonisinů až o 80% a to bez konverze na hydrolyzované fumonisinu, ale tyto procesy nejsou při úpravě kukuřice běžné (81).

Nixtamalizace je metoda zpracování kukuřice, pro niž je typické vaření a máčení kukuřičných zrn v roztoku hydroxidu vápenatého a případně následné sušení a mletí. Jedná se o tradiční metodu pocházející z Jižní Ameriky a produktem je tzv. kukuřičná masa. Z té se

pečením vyrábějí tortilly a pečením a smažením tzv. tortilla chipsy (81). Při tomto procesu dochází díky vyššímu pH k odštěpení jedné nebo dvou molekul propantrikarboxylové kyseliny z původní molekuly fumonisinu B1, čímž vzniká částečně nebo plně hydrolyzovaná forma fumonisinu B1 (PHFB1 resp. HFB1). Dochází také k vylouhování fumonisinu do máčecí lázně a zřejmě i degradaci fumonisinu B1, neboť suma koncentrací FB1, PHFB1 a HFB1 ve výsledných produktech a odpadech je nižší než v původní surovině. Přibližně 34 % fumonisinů zůstává v kukuřičné mase a 45 % je přítomno v máčecím roztoku, 21 % fumonisinů tedy musí být přeměněno na další produkty, nebo zcela degradováno. Další procesy při výrobě tortill a tortilla chipsů nejsou z hlediska změn obsahu fumonisinů tak významné. Při pečení a smažení dochází pouze ke snížení obsahu vody a tím ke zvýšení koncentrace fumonisinů v konečném produktu (81).

Zkvašováním, např. při výrobě piva, se fumonisinů neodstraní, avšak při výrobě kukuřičné pálenky do konečného produktu nepřecházejí, neboť jsou odstraněny při destilaci (81).

Monitoring fumonisinů ve výrobcích z české obchodní sítě

V letech 2006, 2007 a 2008 bylo v české obchodní síti nakoupeno celkem 112 potravin (a krmiv) na bázi kukuřice. Počty vyšetřovaných vzorků jednotlivých kategorií spolu s počty BIO výrobků jsou uvedeny v **Tab. XX**. Vzorky byly analyzovány po jednoduché extrakci směsí acetonitril/voda metodou kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostně-spektrometrickou detekcí. Stanovovány byly tři nejhlavnější analyty ze skupiny fumonisinů, a to FB1, FB2 a FB3. Výsledky stanovení jsou uvedeny v **Tab. XXI**.

Tab. XX: Souhrn vyšetřovaných vzorků

	Celkem vyšetřených vzorků	Z toho BIO výrobků
Extrudované výrobky	8	0
Corn flakes	10	1
Snídaňové cereálie	7	2
Konzervovaná kukuřice	2	0
Pop corn	2	1
Dětská výživa	2	0
Nachos a tortilly	19	1
Škrob	3	1
Mouka	7	4
Polenta	15	7
Kukuřičná strouhanka	1	0
Speciální potraviny pro celiaky	6	0
Kukuřičný slad	1	0
Pivo	6	0
Ostatní*	19	19
Krmiva pro křečky a morčata	4	0

*pšenice, grahamová moučka, ječmen, rýže, pohanka, kuskus.

Tab. XXI: Výsledky kontaminace fumonisiny B1, B2 a B3 ve vyšetřovaných výrobcích.

	FB1		FB2		FB3	
	Rozsah kontaminace (µg/kg)	Průměr/median (µg/kg)	Rozsah kontaminace (µg/kg)	Průměr/median (µg/kg)	Rozsah kontaminace (µg/kg)	Průměr/median (µg/kg)
Extrudované výrobky	20-108.8	56.4/43.4	0-23	14.5/16	0-14	6.5/8.2
Corn flakes	0-13.6	2.4/0	0-10.8	1.1/0	0	0/0
Snídaňové cereálie	0-46	6.6/0	0-22.5	3.2/0	0-8.5	1.2/0
Konzervovaná kukuřice	<3	0/0	<3	0/0	<3	0/0
Pop corn	<3	0/0	<3	0/0	<3	0/0
Dětská výživa	<3	0/0	<3	0/0	<3	0/0
Nachos a tortilly*	0-1398.1	385.3/173	0-356.7	112.3/88.6	0-188.2	57.2/51
Škrob	<3	0/0	0	0/0	<3	0/0
Mouka	0-450	230/233	0-150	75.5/47	0-85.2	33.7/25
Polenta**	13.3-1338	409.3/276	0-439	131.5/59	0-134	43.7/33
Kukuřičná strouhanka	74	74/74	37.4	38.4/38.4	21.1	21.1/21.1
Speciální potraviny pro celiaky	<3	0/0	<3	0/0	<3	0/0
Kukuřičný slad	358	358/358	123	123/123	21	21/21
Pivo	<3	0/0	<3	0/0	<3	0/0
Ostatní	0-522	32.7/0	0-474.8	37/0	0-69	7.5/0
Krmiva pro křečky a morčata	0-449	114.8/5.1	0-98.7	24.7/0	0-55.2	13.8/0

* 5 vzorků překročilo legislativní limit 800 µg/kg (pro sumu FB1 a FB2)

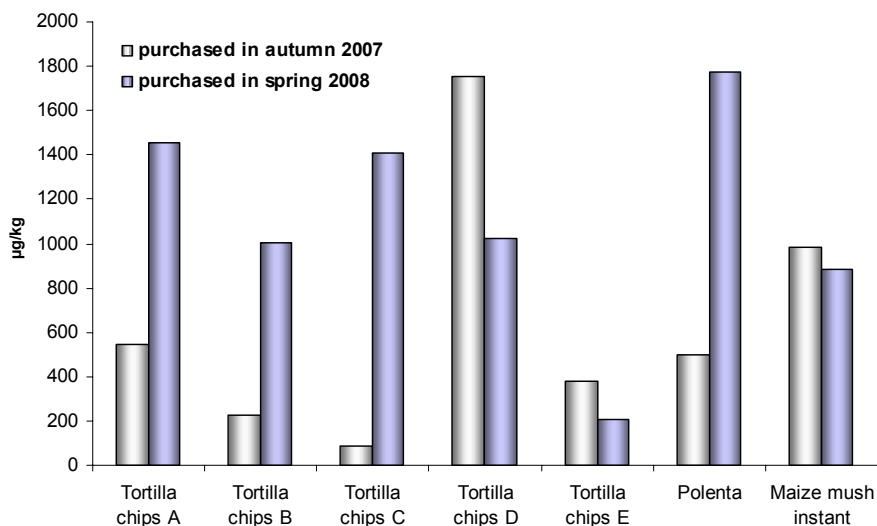
** 2 vzorků překročilo legislativní limit 1000 µg/kg (pro sumu FB1 a FB2)

Obecně lze říci, že nejvyšší koncentrace ve vyšetřovaných kukuřičných výrobcích vykazoval fumonisin B1. Další fumonisinů se vyskytovali v poměru FB1:FB2:FB3 - 9:3:1.

Přítomnost fumonisinů byla potvrzena v 50% z vyšetřovaných vzorků. Žádné, nebo velmi nízké hladiny byly nalezeny v konzervované kukuřici, popcornu, corn-flacích, dětské výživě, kukuřičném škrobu, výrobcích pro celiaky a pivu (podobné výsledky byly publikovány ve studiích (80,82,83,84)). Nízkou incidencí i relativně nízké hladiny fumonisinů vykazovaly i ostatní cereálie, jako pšenice, grahamová moučka, ječmen, rýže, pohanka a kuskus pocházející z organického zemědělství. Extrudované kukuřičné výrobky vykazovaly poměrně vysoký výskyt fumonisinů, avšak jejich hladiny zdaleka nedosahovaly hranice povoleného maximálního limitu v potravinách (nařízení komise EC 1126/2007(32)). Na druhou stranu, k výrobkům s vysokou incidencí a zároveň s vysokými hladinami kontaminace fumonisinů patřily kukuřičné mouky a polenty, a také nachos a tortilly, z nichž některé (2 vzorky polenty a 5 vzorků kukuřičných nachos a tortill) dokonce překročily povolený maximální limit (EC 1126/2007, (32)).

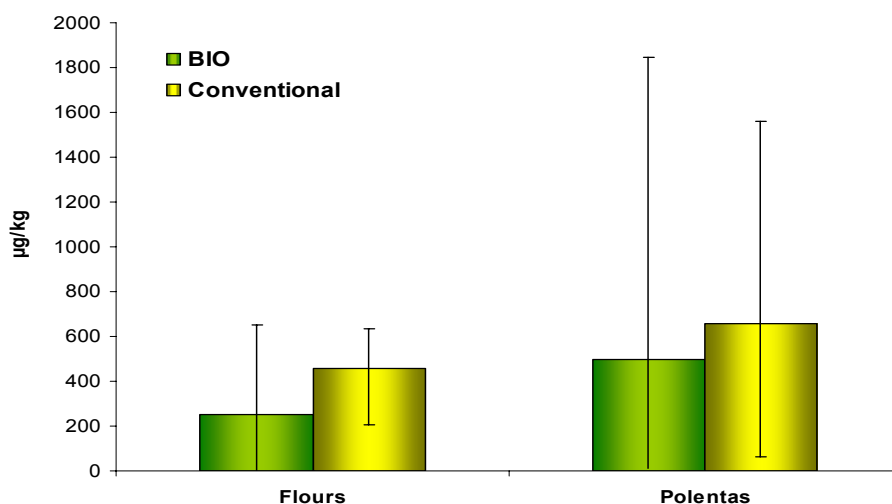
Nachos a tortilly patří ke skupině potravin vyráběných speciálními technologiemi využívajícími alkalické vaření (nixtamalizaci). Surová kukuřice je máčena a pak vařena v koncentrovaném roztoku hydroxidu vápenatého, což přispívá ke zlepšení technologických vlastností zpracovávaného materiálu. Ačkoliv existuje řada studií dokumentující pokles FB1 během této technologie (Sydenham et al., 1995 reportoval 95% redukci FB1 (85), Voss et al., 2001 dokumentoval redukci FB1 od 40 do 80% (86), Dombink-Kutzman et al., 2000 popsal 81.5 % redukci FB1 (87)), hladiny fumonisinů ve většině vyšetřovaných nachos a tortill dostupných na českém trhu byly relativně vysoké (<10-1923 µg/kg). Příčina tohoto zjištění může být ve špatné mykotoxikologické kvalitě výchozí kukuřice, která bývá importována z jižních států teplých klimatických podmínek, kde je vysoká kontaminace fumonisinů velmi běžná (78,88,89).

Důležitost kvality vstupní suroviny je znázorněna i na **Obr. 15**, kdy byly porovnávány různé šarže téže potraviny. Je vidět, že hladiny kontaminace se pro stejný výrobek velmi liší v závislosti na dané šarži. Vzhledem k tomu, že je velmi obtížné doložit se původu vstupní kukuřice použité pro výrobu potraviny (údaje na obalu výrobku jej neuvádí), je velmi těžké tento trend předem odhadnout.



Obr. 15: Porovnání obsahu fumonisinů v různých šaržích výrobků.

Co se týká porovnání konvenční a BIO produkce, relevantní srovnání vzhledem k zastoupení počtu vzorků bylo možné provést pouze pro dvě skupiny potravin, a to kukuřičné mouky a kukuřičné polenty (viz **Obr. 16**). (pro mouky – 4 vzorky z BIO produkce, 3 vzorky z konvenční produkce; pro polenty – 7 vzorků z BIO produkce a 8 vzorků z konvenční produkce). Z **Obr. 16** vyplývá, že průměrné hodnoty kontaminace fumonisin jsou nižší u výrobků z BIO produkce, avšak vzhledem k vysokým rozptylům mezi maximální a minimální hodnotou není toto tvrzení statisticky průkazné.



Obr. 16: Porovnání obsahu fumonisinů v BIO a konvenčních moukách a polentách.

Případová studie 4

Fusariové mykotoxiny a jejich konjugované formy v siláži a senáži

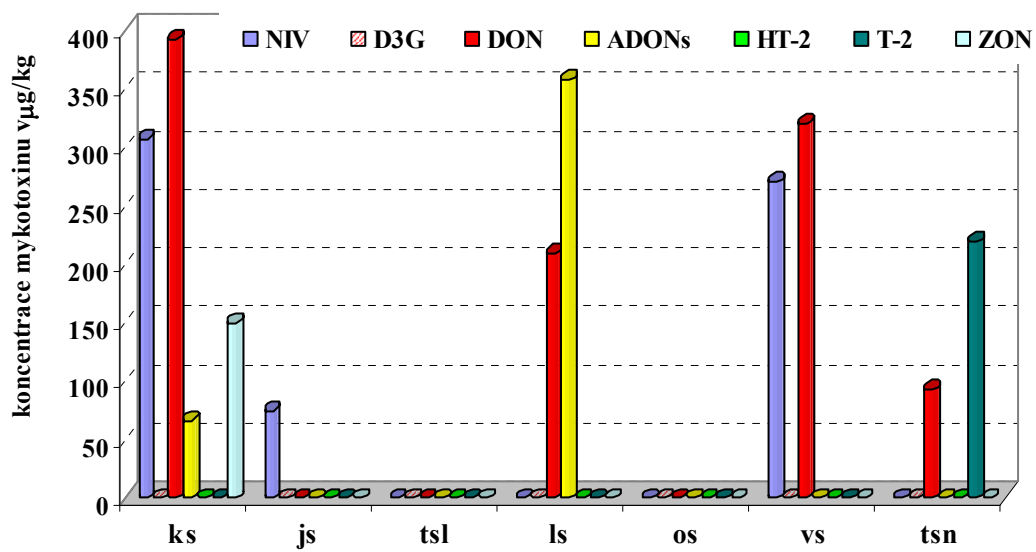
Cílem této studie bylo monitorovat výskyt nejfrekventovanějších fusariových mykotoxinů, a to nejen volných, ale i jejich vázaných forem v siláži a senáži. Na Ústavu chemie a analýzy potravin byla tato studie provedena již v jiných fermentovaných produktech (potravinách) – v pečivu a pivu. Celkem 23 vzorků siláží a senáží bylo dodáno Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským v Brně a analyzováno na Ústavu chemie a analýzy potravin. Podstatná část vyšetřovaných vzorků byla tvořena kukuřičnou siláží (17 vzorků), dále jetelotravní (1 vzorek), luskoobilnou siláží (1 vzorek). Obsahy mykotoxinů byly analyzovány také u 2 vzorků ovesné a 1 vzorku vojtěškotravní senáže.

Přítomnost trichothecenu typu B - DON byla prokázána v šesti vzorcích. Nejvyšší hladiny DON byly detekovány ve vzorcích kukuřičné siláže (průměrná koncentrace 392 µg/kg). Dále ve vojtěškotravní senáži (320 µg/kg), luskoobilné siláži (209 µg/kg) a travní senáži (93 µg/kg).

NIV byl detekován ve čtyřech případech. Nejvyšší obsah NIV byl prokázán opět ve vzorcích kukuřičné siláže (průměrný obsah 307 µg/kg). Vojtěškotravní senáž byla zjištěna koncentrace NIV 271 µg/kg. Přítomnost NIV byla dále prokázána na nižších hladinách u jetelotravní siláže (75 µg/kg).

Suma 3- a 15-ADON byla detekována v luskoobilné siláži (358 µg/kg) a také u dvou vzorků kukuřičné siláže (99 a 66 µg/kg).

Na hladině 219 µg/kg byl přítomen ve vzorku travní senáže trichothecen typu A - T-2 toxin. Incidence dalších toxinů z řady trichothecenů HT-2 a maskovaného D3G nebyla potvrzena v žádném vzorku. Naopak mykotoxin s estrogenními účinky ZON, který je považován za významný kontaminant kukuřice byl detekován ve čtyřech vzorcích kukuřičné siláže. Průměrné hladiny sledovaných mykotoxinů shrnuje **Obr. 17**.



ks – kukuřičná siláž, js – jetelotravní siláž, tsl – travní siláž, ls – luskoobilná siláž, os – ovesná senáž, vs – vojtěškotravní senáž, tsn – travní senáž

Obr. 17: Průměrné hladiny sledovaných mykotoxinů ve vzorcích siláže a senáže.

Případová studie 5

Změny hladin fusariových mykotoxinů v průběhu silážování

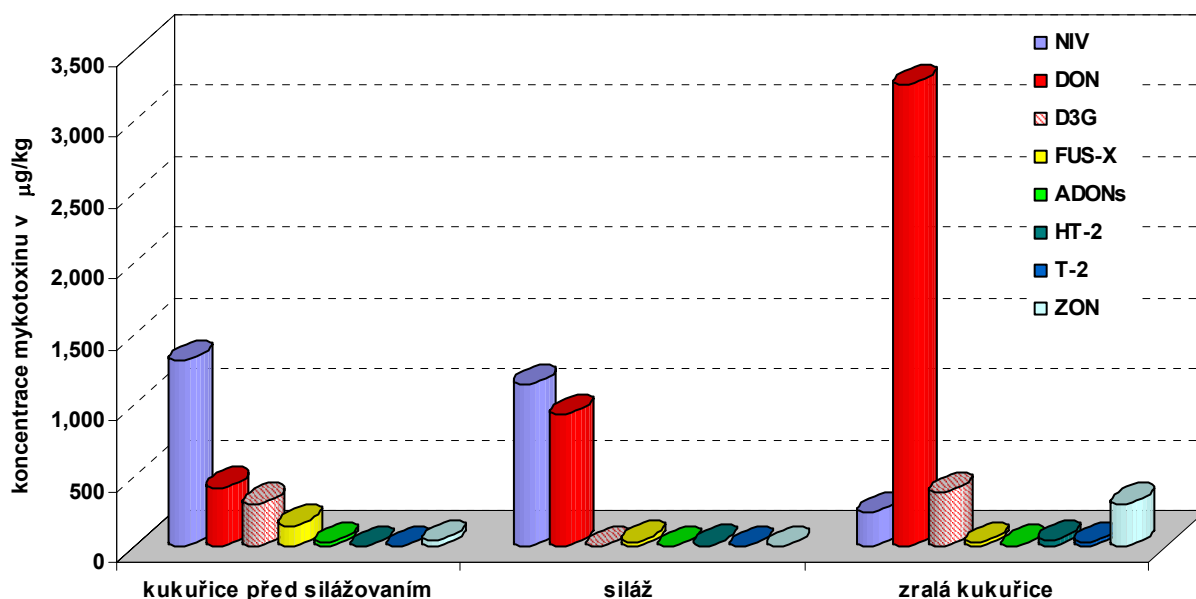
Ve spolupráci s Výzkumným ústavem rostlinné výroby, v.v.i Ruzyně (VÚRV) byla provedena pilotní studie, kdy na uměle inokulované Bt-kukuřici byl sledován osud fusariových mykotoxinů během silážování. Pro umělou infekci silážní kukuřice v Ivanovicích na Hané byly vybrány kmeny druhů *Fusarium graminearum*, *F. subglutinans* a *F. sporotrichioides* a byla připravena suspenze spor ve sterilní vodě. Do dozrávajících palic a rostlin kukuřice byly ocelovými kartáči simulovány otvory po zavíječi kukuřičném a zádovým rozprašovačem aplikována připravená suspenze spor. Kukuřičná řezanka byla dána do silážní jámy. Poté bylo odebráno 5 infikovaných vzorků kukuřičné řezanky mléčné zralosti z různých odběrových míst v silážní jámě ještě před silážováním. Po proběhnutí fermentačního procesu mléčného kvašení bylo odebráno 5 vzorků siláže opět z různých odběrových míst silážní jámy. Část pěstované kukuřice byla ponechána na poli až do úplné zralosti a po sklizni bylo opět odebráno 5 vzorků zralé kukuřice.

Všechny vzorky odebrané ve výše zmíněném experimentu byly na Ústavu chemie a analýzy potravin analyzovány na obsah nejfrekventovanějších fusariových mykotoxinů pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

Ve výchozí surovině kukuřičné řezance byl detekován na nejvyšší hladině NIV (průměrná hodnota 1 315 µg/kg), dále byly na vyšších hladinách zastoupeny DON (průměrná hladina 415 µg/kg) a jeho maskovaná forma D3G (302 µg/kg). FUS-X byl detekován na hladině 148 µg/kg, mykoestrogen ZON 45 µg/kg a suma ADON 28 µg/kg. Trichoheceny typu A HT-2 a T-2 nebyly v kukuřičné řezance detekovány.

Po proběhnutí silážního procesu klesla hladina NIV o 13 %. Tento malý rozdíl mezi hladinami NIV detekovanými v kukuřičné řezance a siláži může být přičítán nejistotě vzorkování a analytického stanovení. Koncentrace DON po silážování stoupla o 123 % a naopak maskovaný mykotoxin D3G nebyl v siláži detekován. Tento vysoký nárůst DON a naopak pokles D3G může být způsoben hydrolýzou glykosidické vazby u D3G působením mléčných bakterií a tím vzniku DON. Hladina FUS-X poklesla během silážování o 82 %. Ostatní mykotoxiny nebyly v siláži detekovány.

Během zrání kukuřice na poli dochází pravděpodobně k další produkci mykotoxinů oproti sklizení kukuřice již v době mléčné zralosti. Hladina DON ve zralé kukuřice vzrostla o 685 % oproti kukuřici mléčné zralosti, kdežto u D3G došlo k navýšení o 26 %. Mnohonásobné navýšení DON v období mezi mléčnou zralostí a úplnou zralostí kukuřice je způsobeno pravděpodobně dalším rozvojem fusarií a následnou produkcí DON. Je známo, že k napadení palic fusarií dochází nejvíce v období metání a k největší produkci mykotoxinů až v období během plnění a dozrávání palic (90). K výraznému navýšení (až 11 násobnému) došlo v průběhu dozrávání kukuřice také v případě ZON. Trichotheceny typu A HT-2 a T-2, které nebyly v kukuřici sklizené v době mléčné zralosti detekovány, byly ve zralé kukuřici detekovány na nízkých hladinách (40 a 27 $\mu\text{g}/\text{kg}$). U NIV a jeho acetylovaného derivátu FUS-X došlo při dozrávání kukuřice ke snížení, což může být přičítáno jejich navázání do maskovaných forem při detoxifikačních reakcích rostlinného metabolismu. Maskovaná forma NIV nivalenol-3-glucosid byl v této kukuřici identifikován pomocí vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie typu Time of Flight (TOF MS) (91). **Obr. 18** shrnuje průměrné hladiny sledovaných mykotoxinů v kukuřičné řezance, siláži a zralé kukuřici.



Obr. 18: Průměrné hladiny sledovaných analytů v průběhu silážování.

8. Závěr

Kontaminace cereálií a cereálních potravin mykotoxiny je celosvětově velmi aktuálním tématem. Vedle výběru preferentních odrůd pěstovaných plodin s ohledem na dispozice k růstu daných druhů mikroskopických vláknitých hub je v zemědělství kladen důraz na praktikování dobré zemědělské praxe, jejímž cílem je mimo jiné minimalizovat riziko pocházející z výskytu těchto vláknitých hub a jimi produkovaných mykotoxinů. Výsledky nejnovějšího výzkumu týkajícího se mykotoxikologické kvality potravin a krmiv byly dokumentovány v případových studiích, které tvoří přílohu této studie. Byl zde zhodnocen výskyt mykotoxinů a hladiny jejich kontaminace v pivech dostupných na českém trhu (více než 85 % incidence mykotoxinu DON) a dynamika volných a vázaných trichothecenových mykotoxinů v průběhu vaření piva (bilanční nárůst DON a jeho konjugované formy D3G, který je připisován uvolňování DON i jeho maskované formy vlivem enzymatických procesů v průběhu technologie). Dále byla zhodnocena incidence mykotoxinů v cereálních výrobcích na českém trhu. Celkově se dá shrnout, že nejfrekventovanějším mykotoxinovým kontaminantem ovesných výrobků je DON a HT-2 toxin, zatímco v cereáliích na bázi kukuřice dominuje incidence fumonisinů, a to hlavně B1 a B2. Z celkového počtu 127 vyšetřovaných cereálií a cereálních výrobků však pouze necelých 6 % překročilo maximální limit povolený nařízením 1126/2007/ES.

Je však nutno zdůraznit, že problematika mykotoxinů není jen záležitostí cereálií a cereálních potravin. V souvislosti se vzrůstající poptávkou po zdravých a kvalitních potravinách živočišného původu začala být pozornost soustředěna také na nutriční složení a hygienicko-toxikologickou nezávadnost krmiv, která je obzvláště důležitá z hlediska transferu metabolitů mykotoxinů do živočišných produktů. Efektivní a rychlou kontrolu těchto potravin a krmiv umožňují moderní citlivé multidetekční metody, na jejichž vývoj a optimalizaci je oprávněně kladen stále větší důraz. Tato studie by měla sloužit všem pracovníkům státních dozorcích orgánů i průmyslového zpracování potravin a krmiv, jichž se problematika bezpečnosti potravin a krmiv dotýká, a kteří mají možnost ji ovlivnit.

9. Literatura

- 1 WIEDENBORNER M.: Encyklopedia of Food Mycotoxins, Springer-Verlag, **2001**.
- 2 KAMIMURA H.: Mykotoxins and Phytotoxins 1988, Elsevier, Amsterdam, **1989**.
- 3 PLACENTA C.M., et al. A review of worldwide contamination of cereals grains and animal feed with Fusarium mycotoxins, *Animal Feed Science and Technology*, **1999**, 78, 21-37.
- 4 PESTKA JAMES J. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks, *Animal Feed Science and Technology*, **2007**, 137, 283-298.
- 5 SORENSEN L.K. Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, **2005**, 820, 183-196.
- 6 ZIDENEDINE A., et al. Review on toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone, *Chemical Toxicology*, **2007**, 45, 1-18.
- 7 ENGELHARDT, et al. Metabolism of mycotoxins in plants. *Advances in food sciences*, **1999**, 21 (3-4), 71-78.
- 8 MILLER, J. Deoxynivalenol, acetyl deoxynivalenol, and zearalenone formation by Canadian isolates of *Fusarium graminearum* on solid substrates.. *Appl Environ Microbiol.*, **1983**, 46 (3), 625-629.
- 9 GAREIS, M. Maskierte mykotoxine. *Tierernaehrer*, **1994**, 22, 104-113.
- 10 LANCOVÁ, K., et al. Transfer of Fusarium mycotoxins and masked deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer. *Food additives and contaminants*, **2008**, 25 (6), 732-744.
- 11 KOSTELANSKÁ, M., et al. Occurrence of deoxynivalenol and its major conjugate, deoxynivalenol-3-glycoside, in beer and some brewing intermediates. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2009**, 57, 3187-3194.
- 12 ZACHARIÁŠOVÁ, M., et al. Deoxynivalenol and its conjugates in beer: A critical assessment of data obtained by enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, **2008**, 625 (1), 77-86.
- 13 BERTHILLER, F., et al. : Synthesis of deoxynivalenol-glucosides and their characterization using a Qtrap LC-MS/MS. In (ed.). *26th mycotoxin workshop*. Giessen, Germany, May 19-21, **2003**.
- 14 BERTHILLER, F., et al. Masked mycotoxins: Determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2005**, (53), 3421-3425.

- 15** PAPADOPOULOU-BOURAOUI, A., et al. Screening survey of deoxynivalenol in beer from the European market by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Food Addit. Contam.*, **2004**, *21*, 607-617.
- 16** SCHOLLENBERGER M., et al. Trichothecene toxins in different groups of conventional and organic bread of the German market, *Journal of food composition and analysis*, **2005**, *18*, 69-78.
- 17** MURPHY P.A., et al. Food mycotoxins: An update, *Journal of food science*, **2006**, *71* (5), 51-65.
- 18** KAMIMURA H., et al. Applied and Environmental Mikrobiology, **1986**, *9*, 515-519.
- 19** SCHOLLENBERGER M., et al. [A survey of Fusarium toxins in cereal-based foods marketed in an area of southwest Germany](#), *Mycopathologia*, **1999**, *147* (1), 49-57.
- 20** SCOTT P.M. Mycotoxins, 104th annual international meeting of the association of official analytical chemists, SEP 10-13, 1990 NEW ORLEANS, LA, *Journal of AOAC*, 1991, *74* (1), 120-128.
- 21** BOYACIOGLU D., et al. Additives affect deoxynivalenol (vomitoxin) flour during breadbaking, *Journal of Food Science*, **1993**, *58*, 416-418.
- 22** TANAKA T., et al. Residues of *Fusarium* mycotoxins, nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone, in wheat and processed food after milling and baking, **1986**, *27* (6), 653-655.
- 23** ABBAS H.K., et al. Effect of cleaning, milling and baking on deoxynivalenol in wheat, *Applied and environmental microbiology*, **1985**, *50*, 482-486.
- 24** GREENHALGH R., et al, Synthesis, characterization and occurrence in bread and cereal products of an isomer of 4-deoxynivalenole (vomitoxin), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1984**, *32* (6), 1414-1420.
- 25** YOUNG J.C., FULCHER R.G. Mycotoxins in grains – cause, consequences, and cures, *Cereal Foods World*, **1984**, *29* (11), 725-728.
- 26** NEIRA M.S., et al. The effects of bakery processing on natural deoxynivalenol contamination, *International journal of food microbiology*, **1997**, *37*, 21-25.
- 27** BARUG D., et al. The mycotoxin factbook, food and feed topics, Wageningen Academic Publishers, ISBN-10: 90-8686-006-0, ISBN-13: 978-90-8686-006-7, **2004**
- 28** D'MELLO, J.P.F. AND MACDONALD, A.M.C. Mycotoxins, *Animal Feed Science and Technology*, **1997**, *69*, 155-166.
- 29** YIANNIKOURIS, A, JOUANY, J. Mycotoxins in feed and their fate in animals: a review, *Animal Research*, **2002**, *51*, 81-99.

- 30** VENDI O. ET AL., Simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, and their major masked metabolites in cereal based food by LC-MS/MS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, DOI 10.1007/s00216-009-2873-y, **2009**
- 31** NAŘÍZENÍ KOMISE (EC) č. 1881/2006 z 19. prosince 2006: Maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách – dostupné na <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ>
- 32** NAŘÍZENÍ KOMISE (EC) č. 1126/2007 ze dne 28. září 2007 kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, pokud jde o fusariové toxiny v kukuřici a ve výrobcích z kukuřice – dostupné na <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:255:0014:0017:CS:PDF>
- 33** LANCOVA K. et al. The fate of trichothecene mycotoxins during the processing milling and baking, *Food Additives and Contaminants*, **2008**, 25 (5), 650-659.
- 34** NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 856/2005 ze dne 6.6.2005 doplňující nařízení (EC) 466/2001 týkající se fusariových mykotoxinů.
- 35** RICHARD E., ET AL. Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silane, *Food and Chemical Toxicology*, **2007**, 45, 2420-2425.
- 36** <http://encyklopedie.seznam.cz/heslo/94022-silaz>, staženo dne 4.2.2009.
- 37** BATA Á., LÁSZTITY R. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms, *Trends in Food Science and Technology*, **1999**, 10, 223-228.
- 38** ERIKSEN G.S., Pettersson H.: Toxicological evaluation of trichothecenes in snímal feed, *Animal Feed Science and Technology*, **2004**, 114, 205-239.
- 39** SULYOK, M. et al. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Anal Bioanal Chem*, **2007**, 389, 1505-1523.
- 40** MOL, H.G.J., et al. Toward a Generic Extraction Method for Simultaneous Determination of Pesticides, Mycotoxins, Plant Toxins, and Veterinary Drugs in Feed and Food Matrixes. *Anal. Chem.*, **2008**, 80, 9450-9459.
- 41** LACINA, O., et al. Multi-residue method for the analysis of pesticides and mycotoxins in cereals by LC-MS/MS. *Chem. Listy*, **2008**, 99, 1234-1237.
- 42** LANGSETH, W.; RUNDBERGET, T. Instrumental methods for determination of nonmacrocylic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. *Journal of chromatography*, **1998**, 815, 103-121.
- 43** KRŠKA, R.; WELZIG, E.; BOUDRA, H. Analysis of Fusarium toxins in feed. *Animal feed science and technology*, **2007**, 137, 241-264.

- 44** SCHWARZ, P.; CASPER, H.; BEATTIE, S. Fate and development of naturally occurring Fusarium mycotoxins durin malting and brewing. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, **1995**, 53, 121-127.
- 45** KRŠKA, R. Performance of modern sample preparation techniques in the analysis of Fusarium mycotoxins in cereals. *Journal of chromatography*, **1998**, 815 (1), 49-57.
- 46** VYHLÁŠKA MINISTERSTVA ZEMĚDĚLSTVÍ ČR č.211/2004 Sb. o metodách zkoušení a způsobu odběru a přípravy kontrolních vzorků za účelem zjišťování jakosti a zdravotní nezávadnosti potravin nebo surovin určených k jejich výrobě
- 47** KRŠKA, R. Performance of modern sample preparation techniques in the analysis of Fusarium mycotoxins in cereals. *Journal of chromatography*, **1998**, 815 (1), 49-57.
- 48** KRŠKA, R., et al. Mycotoxin analysis: An update. *Food additives and contaminants*, **2008**, 25 (2), 152-163.
- 49** KRŠKA, R.; MOLINELLI, A. Mycotoxin analysis: State-of-the-art and future trends. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **2007**, 387 (1), 145-148.
- 50** KOCH P. State of art of trichothecenes analysis, *Toxicology Letters*, **2004**, 153, 109-112.
- 51** SORENSEN L.K. Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spektrometry, *Journal of Chromatography B*, **2005**, 820, 183-196.
- 52** TREBSTEIN A., SEEFELDER W. Determination of T-2 a HT-2 toxins in cereals including oats after immunoaffinity cleanup by liquid chromatography and fluorescence detection, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**, 56, 4968-4975.
- 53** ZÖLLNER P., MAYER-HELM B. Trace mycotoxin analysis in komplex biological and foof matrice by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spektrometry, *Journal of Chromatography A*, **2006**, 1136, 123-169.
- 54** RUPRICH J. A OSTRÝ V. Determination of the mycotoxin deoxynivalenol in beer by commercial ELISA tests and estimation of the exposure dose from beer for the population in the Czech Republic, *Central European Journal of Public Health*, **1995**, 4, 224-229.
- 55** MALÍŘ F., OSTRÝ V.: Vlákňité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka, **2003**, ISBN 80-7013-395-3
- 56** Opinion of the SCF on fusarium toxins part 5: T-2 toxin and HT-2 toxin http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out88_en.pdf (25. března 2009)
- 57** LANGSETH W., RUNDBERGET T.: The occurrence of HT-2 toxin and other trichothecenes in Norwegian cereals, *Mycopathologia*, **1999**, 147, 157-165.

- 58** CREPPY E. E.: Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe, *Toxicology Letters*, 2002, *127*, 19-28.
- 59** LUTSKY I. I., MOR N.: Alimentary toxic aleukia (septic angina, endemic panmyelotoxicosis, alimentary hemorrhagic aleukia): t-2 toxin-induced intoxication of cats, *American Journal of Pathology*, **1981**, *104*, 198-191.
- 60** Codex Alimentarius Commission, Discussion paper on deoxynivalenol, USA wheat and barley scab initiative, available from http://www.scabusa.org/pdfs/02-03_CODEX_DON.pdf, **2002** (25. března 2009)
- 61** Scientific Committee on Food, Opinion on Fusarium toxins Part 1: Deoxynivalenol (DON), Annex VI to the minutes of the 119th Plenary meeting, **1999**
- 62** IMATHIU S., et al., Investigation of fusarium infection and mycotoxin production in oats, Book of abstracts: European Fusarium seminar, 19-22, **2006**
- 63** PETTERSSON H.: T-2 and HT-2 toxins in Oats and Oat Products, Dept. Animal Nutrition and Management, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, **2007**
- 64** HAJŠLOVÁ J., et al., Occurrence of trichothecene mycotoxins in cereals harvested in the Czech Republic, *Czech Journal of Food Science*, 2007, *25*, 339–350.
- 65** FURLONG E. B., et al. Mycotoxins and fungi in wheat harvested during 1990 in test plots in the state of Sao Paulo Brazil, *Mycopathologia*, 1995, *131*, 185–190.
- 66** GRABARKIEWICZ-SZCZESNA J., et al. Distribution of trichothecene mycotoxins in maize ears infected with *F. graminearum* and *F. crookwellense*, *Mycotoxin Research*, **1996**, *12*, 45–50.
- 67** STRATTON G. W., et al. Levels of five mycotoxins in grains harvested in Atlantic Canada as measured by high performance liquid chromatography, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **1993**, *24*, 399–409.
- 68** MAJERUS P., et al. T-2 and HT-2 toxin analysis in cereals and cereal products following IAC cleanup and determination via GC-ECD after derivatization, *Mycotoxin Research*, **2008**, *24*, 24-30.
- 69** SCHOLLENBERGER M., et al. A survey of Fusarium toxins in cereal-based foods marketed in an area of southwest Germany, *Mycopathologia*, **1999**, *147*, 49–57.
- 70** TREBSTEIN A., et al. Determination of T-2 and HT-2 Toxins in Cereals Including Oats after Immunoaffinity Cleanup by Liquid Chromatography and Fluorescence Detection, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**, *56*, 4968–4975.

- 71** LABUDA R., et al. Incidence of trichothecenes and zearalenone in poultry feed mixtures from Slovakia, *International Journal of Food Microbiology*, **2005**, *105*, 19-25.
- 72** PŘÍHODA J., et al. Cereální chemie a technologie I: cereální chemie, mlýnská technologie, technologie výroby těstovin, VŠCHT Praha, ISBN 8070805307, **2004**.
- 73** BENDA V., et al. Biologie II – Nauka o potravinářských surovinách, VŠCHT Praha, ISBN 8070804025, **2000**.
- 74** CHO S. S., DREHER M. L.: Handbook of Dietary Fiber, Taylor & Francis, **2001**.
- 75** MARASAS W. F. O.: Discovery and occurrence of the Fumonisin: A historical perspective; *Environmental Health Perspectives*, **2001**, *109*, 239-243.
- 76** RHEEDER J. O., et al. Production of Fumonisin analogs by *Fusarium* species; *Applied and Environmental Microbiology*, **2002**, *68*, 2101 – 2105.
- 77** PLACINTA C. M., et al. *Fusarium* mycotoxins: A review of global implications for animal health, welfare and productivity; *Animal Feed Science and Technology*, **1999**, *80*, 183 – 205.
- 78** SYDENHAM E. W., et al. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of Transkei, South Africa; *J. of Agric. and Food Prot.*, **1990**, *38*, 1900 – 1903.
- 79** WEIDENBÖRNER M.: Foods and fumonisins; *Eur. Food Res. Technik.*, **2001**, *212*, 262 – 273.
- 80** SORIANO J. M., DRAGACCI S.: Occurrence of fumonisins in foods; *Food Res. Int.*, **2004**, *37*, 985 – 1000.
- 81** SAUNDERS D. S., et al. Control of Fumonisin: Effects of Processing; *Env. Health Persp.*, **2001**, *109*, 333 – 336.
- 82** DAŠKO. L., et al. Determination of Fumonisin B1 and B2 in Beer; *Czech J. Food. Sci.*, **2005**, *23*: 20 – 26.
- 83** de NIJS M., et al. Fumonisin B1 in maize for food production imported in The Netherlands; *Food Addit. and Cont.*, **1998**, *15*, 385 – 388.
- 84** SANCHIZ V., et al. Occurrence of fumonisins B1 and B2 in corn based products from the Spanish market; *App. Env. Biochem.*, **1994**, *60*: 2147 – 2148.
- 85** SYDENHAM E.W., Potential of alkaline-hydrolysis for removal of fumonisins from contaminated corn, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1995**, *43* (5), 1198-1201.
- 86** VOSS K.A., et al., [Fate of fumonisins during the production of fried tortilla chips](#), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, *49* (6), 3120-3126.

- 87** DOMBRINK-KUTZMAN M.A. et al., [Effect of nixtamalization \(alkaline cooking\) on fumonisins-contaminated corn for production of masa and tortillas](#), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 48 (11), 5781-5786.
- 88** RAMIREZ M. L., et al. Natural occurrence of fumonisins and their correlation to *Fusarium* contamination in commercial corn hybrids growth in Argentina; *Mycopathologia*, **1996**, 135, 29 – 34.
- 89** ABBAS H. K., et al. Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas; *Crop Protection*, **2006**, 25, 1 – 9.
- 90** EDWARDS, S.G. Influence of agricultural practices on fusarium infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins, *Toxicology Letters*, **2004**, 153, 29-35.
- 91** MALACHOVA A., et al. Nivalenol-glucoside: Analytical approaches to determination of this new masked mycotoxin, 4th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, Prague, Czech Republic 4.-6.11., str. 393, **2009**.