



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# SLEDOVÁNÍ VÝSKYTU MYKOTOXINŮ V PIVECH Z OBCHODNÍ SÍŤE

MONITORING OF THE OCCURRENCE OF MYCOTOXINS IN BEERS FROM MARKET RETAIL

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Simona Wawroszová

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Sylvie Běláková, Ph.D.

BRNO 2017

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1075/2016  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Simona Wawroszová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **Ing. Sylvie Běláková, Ph.D.**  
Akademický rok: 2016/17

### Název diplomové práce:

Sledování výskytu mykotoxinů v pivech z obchodní sítě

### Zadání diplomové práce zadání:

1. Vypracování přehledné literární rešerše na téma výskytu mykotoxinů v pivech se zaměřením na fusariové mykotoxiny a ochratoxiny.
2. Optimalizace a validace metod pro stanovení vybraných mykotoxinů v pivu.
3. Analýza souboru vzorků piv z obchodní sítě.
4. Zpracování výsledků a jejich porovnání s publikovanými daty.

### Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Simona Wawroszová  
student(ka)

-----  
Ing. Sylvie Běláková, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce se zabývá sledováním obsahu deoxynivalenolu, jeho metabolitu deoxynivalenol-3- $\beta$ -D-glukopyranosidu a ochratoxinu A v pivech z maloobchodní sítě z České republiky, Polska a Slovenska.

V teoretické části byla popsána obecná charakteristika mykotoxinů, jejich přenos ze sladovnického ječmene do piva a jejich výskyt v pivech. Dále byl zmíněn proces sladování a technologie výroby piva. Následně byly předloženy možnosti stanovení mykotoxinů chromatografickými a imunochemickými metodami.

V experimentální části bylo analyzováno celkem 30 vzorků piv. Pro stanovení ochratoxinu A byla použita ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí (UPLC/FLR) a pro stanovení deoxynivalenolu a jeho metabolitu vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (HPLC/MS). Ochratoxin A byl nalezen ve 25 vzorcích s rozmezí kontaminace 0,6 – 82,5 ng·l<sup>-1</sup>. Deoxynivalenol byl detekován ve 24 vzorcích s koncentračním rozmezím 2,29 – 12,57  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a deoxynivalenol-3- $\beta$ -D-glukopyranosid se vyskytoval v 19 vzorcích v rozmezí kontaminace 2,45 – 12,47  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Dále byl posuzován vzájemný vztah mezi vznikem gushingu a přítomnosti mykotoxinů v pivu. Mezi těmito dvěma parametry nebyla žádná závislost nalezena. Bylo tedy prokázáno, že přítomnost mykotoxinů v pivu nemůže být pokládán za přímý faktor vzniku gushingu

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Mykotoxiny, deoxynivalenol, ochratoxin A, pivo, HPLC/MS, UPLC/FLR

## **ABSTRACT**

This master thesis deals with monitoring of a content of deoxynivalenol, its metabolite deoxynivalenol-3- $\beta$ -D-glucopyranoside and ochratoxin A in beer samples collected from retail market in the Czech Republic, Poland and Slovakia.

The teoretical part describes general characteristics of mycotoxins, its transfer from field barely through malt to beer and its occurrence in beers. Malting process and brewing technology were also mentioned. Subsequently possibilities for a determination of the mycotoxins by the chromatografic and immunochemical method were presented.

The experimental section describes analysis of 30 samples of beer. The analyses were conducted using ultra high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection (UPLC/FLR) for ochratoxin A and high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometer (HPLC/MS) for deoxynivalenol and its metabolite. Ochratoxin A was detected in 25 of the 30 samples in concentration range of 0,6 – 82,5 ng·l<sup>-1</sup>. Deoxynivalenol was found in 24 of the 30 samples with concentration range of 2,29 – 12,57  $\mu$ g·l<sup>-1</sup> and deoxynivalenol-3- $\beta$ -D- glucopyranoside was occure in 19 of the 30 samples in concentration range of 2,45 – 12,47  $\mu$ g·l<sup>-1</sup>.

It was also assessed the relationship between beer gushing and presence of mycotoxins in beer. No connection between the parameters has been found. Consequently it is not possible to predict beer gushing from the presence of mycotoxins.

## **KEYWORDS**

Mycotoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A, beer, HPLC/MS, UPLC/FLR

WAWROSZOVÁ, S. *Sledování výskytu mykotoxinů v pivech z obchodní sítě*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 84 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Sylvie Běláková, Ph.D..

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT. Diplomová práce byla vypracovaná v rámci projektu TAČR TE02000177 „*Centrum pro inovativní využití a posílení konkurenceschopnosti českých pivovarských surovin a výrobků*“.

V Brně dne 4. 5. 2017

.....

Simona Wawroszová

### **Poděkování**

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Sylvii Bělákové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a podporu při řešení této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala pracovníkům Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Brně za pomoc a ochotu při práci v laboratoři.

# OBSAH

<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>2 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>9</b>
2.1 Mykotoxiny.....	9
2.2 Biologické účinky mykotoxinů.....	10
2.3 Výskyt mykotoxinů .....	12
2.4 Fusariové mykotoxiny .....	15
2.4.1 Trichotheceny.....	15
2.4.2 Fumonisin.....	17
2.4.3 Zearalenon.....	18
2.5 Aflatoxiny .....	19
2.6 Ochratoxin A .....	20
2.7 Maskované mykotoxiny.....	21
2.8 Legislativa.....	22
2.9 Sladovnický ječmen.....	23
2.9.1 Pěstování a požadavky na prostředí .....	24
2.9.2 Sladovnická jakost .....	25
2.9.3 Skladování ječmene a jeho vliv na kvalitu sladu .....	26
2.10 Slad .....	26
2.10.1 Sladování.....	26
2.10.2 Druhy sladu .....	27
2.11 Pivo.....	28
2.11.1 Technologie výroby piva.....	29
2.11.2 Druhy piv .....	32
2.12 Gushing.....	32
2.13 Přenos mykotoxinů ze surovin do piva.....	33
2.14 Výskyt mykotoxinů v pivu .....	34
2.15 Vzorkování pro analýzu mykotoxinů .....	35
2.16 Extrakce a čištění vzorku.....	35
2.17 Analytické metody stanovení mykotoxinů .....	36
2.17.1 Imunochemická metoda ELISA.....	37
2.17.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	37
2.17.3 Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC).....	39
2.17.4 Detektory.....	40

<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>44</b>
3.1 Přístroje a zařízení .....	44
3.2 Chemikálie .....	44
3.3 Popis analyzovaných vzorků .....	45
3.4 Analýza ochratoxinu A metodou UPLC/FLR .....	46
3.4.1 Extrakce OTA z piva .....	46
3.4.2 Příprava zásobního roztoku a kalibračních standardů .....	46
3.4.3 Podmínky stanovení a jejich optimalizace .....	46
3.5 Analýza deoxynivalenolu metodou HPLC/MS .....	47
3.5.1 Extrakce DON z piva .....	47
3.5.2 Příprava zásobního roztoku a kalibračních standardů .....	47
3.5.3 Podmínky stanovení a jejich optimalizace .....	48
3.6 Gushing .....	50
<b>4 VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>51</b>
4.1 Validace metody UPLC/FLR .....	51
4.1.1 Opakovatelnost nástřiku .....	51
4.1.2 Opakovatelnost extrakce .....	51
4.1.3 Linearita metody .....	51
4.1.4 Výtěžnost metody .....	52
4.1.5 Mez detekce a mez kvantifikace .....	53
4.2 Validace metody HPLC/MS .....	53
4.2.1 Opakovatelnost nástřiku .....	53
4.2.2 Linearita metody .....	53
4.2.3 Výtěžnost metody .....	54
4.2.4 Mez detekce a mez kvantifikace .....	55
4.3 Analýza ochratoxinu A metodou UPLC/FLR .....	55
4.4 Analýza deoxynivalenolu metodou HPLC/MS .....	60
4.5 Gushing .....	64
<b>5 ZÁVĚR .....</b>	<b>68</b>
<b>6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....</b>	<b>70</b>
<b>7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....</b>	<b>78</b>
<b>8 SEZNAM PŘÍLOH .....</b>	<b>79</b>
<b>9 PŘÍLOHY .....</b>	<b>80</b>

# 1 ÚVOD

Pivo je nejpopulárnější slabě alkoholický nápoj na světě, který se vyrábí ze sladovnického ječmene, chmele a pivovarských kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Česká republika patří mezi země s největší konzumací piva na osobu a rok. V roce 2015 se umístila na prvním místě se 143 litry na osobu a rok. Následuje Německo a Rakousko se 106 a 105 litry na osobu a rok. Při takto velké konzumaci je kontrola nežádoucích látek jak ve vstupních surovinách, tak v pivu velice důležitá. Mezi tyto nežádoucí látky patří bezesporu i mykotoxiny.

Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity mikroskopických vláknitých hub, zejména rodu *Fusarium*, *Penicillium* a *Aspergillus*. Největší význam z hlediska zdraví lidí a zvířat má pět druhů mykotoxinů. Jedná se o deoxynivalenol, zearalenon, fumonisiny, aflatoxiny a ochratoxin A. Vláknité houby rodu *Fusarium* jsou nejběžnějšími producenty trichothecenů, mezi které řadíme i deoxynivalenol, fumonisinů a zearalenonu, zatímco producenty ochratoxinu A jsou zejména plísně rodu *Aspergillus* a *Penicillium*. Otravy a toxické syndromy způsobené mykotoxiny, tzv. mykotoxikózy, mohou mít různé projevy. Některé mohou být karcinogenní, hepatotoxické, imunosupresivní, teratogenní i mutagenní. Výskyt těchto plísní, stejně tak i produkce mykotoxinů, jsou závislé na klimatických podmínkách, a tedy v určitých geografických pásmech se vyskytují některé mykotoxiny častěji než ostatní.

Mykotoxiny jsou chemicky i tepelně velmi stabilní sloučeniny a proto mohou přecházet z infikovaného ječmene do sladu během řízeného procesu sladování, při kterém vznikají vhodné podmínky pro jejich produkci. Obecně jsou mykotoxiny stabilní do 170 °C v neutrálním až kyselém prostředí a mohou tedy odolávat i procesu vaření piva. Z tohoto důvodu je analýze mykotoxinů v surovinách pro výrobu piva a v pivu věnována velká pozornost.

K analýze mykotoxinů byla vyvinuta celá řada analytických metod. Mezi nejběžněji užívané metody patří kapalinová chromatografie s UV nebo fluorescenční detekcí. V poslední době se ovšem rutinní metodou ke stanovení mykotoxinů a jejich derivátů stala vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí. Neméně důležitá a velice rozšířená je také imunochemická metoda ELISA, která se využívá pro rychlou a screeningovou analýzu mykotoxinů.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity produkované toxinogenními druhy mikromycet. Nejvýznamnějšími producenty nejznámějších mykotoxinů jsou mikroskopické vláknité houby rodu *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*, příklady jsou uvedeny v Tabulce 1. V současné době je známo přes 300 mykotoxinů, přičemž přibližně 20 z nich se může vyskytovat v potravinách či krmivech v toxikologicky závažných koncentracích. S ohledem na jejich všudypřítomnost se mohou vyskytovat téměř na všech úrovních potravního řetězce člověka i hospodářských zvířat. Výskyt mykotoxinů v potravinách a krmivech je považován za potenciální hrozbu na zdraví lidí i zvířat, a to buď v důsledku přímé kontaminace rostlinných materiálů a jejich produktů, anebo „přenesením“ mykotoxinů a jejich metabolitů do živočišných tkání, mléka a vajec po požití kontaminovaného krmiva [1, 2].

Je známo, že určitý mykotoxin může být produkován zástupci několika rodů vláknitých hub, a také že určitý druh plísní může produkovat dva i více mykotoxinů. Výskyt toxinogenních plísní v potravinách či krmivech ještě nemusí jednoznačně znamenat přítomnost mykotoxinů. Pokud je přítomnost mykotoxinů dokázána, může přetrvávat, i když se produkční houba v dané komoditě již nevyskytuje [3, 4].

Mykotoxiny jsou strukturně odlišné organické sloučeniny o nízké molekulové hmotnosti. Jsou těžko definovatelné a nelze je jednoduše zařadit do jednotlivých skupin sloučenin podle jejich chemické struktury, aniž by nebyl zohledněn jejich výskyt, producenti a intenzita jejich toxických účinků. Z toho důvodu se klasifikační systémy odrážejí od jednotlivých vědních disciplín. Mykologové rozdělují mykotoxiny podle houby, která je produkuje (Fusariové mykotoxiny). Lékaři je často uspořádávají podle orgánu, na který mají mykotoxiny vliv (neurotoxiny, imunotoxiny, hepatotoxiny), cytologové je zařazují do obecných skupin, jako jsou karcinogeny, mutageny nebo alergeny a z hlediska chemické struktury můžou být definované jako např. laktony a kumariny [5].

Ke klasifikaci mykotoxinů lze také použít mechanismus biosyntézy základního skeletu jejich molekuly. Řada významných mykotoxinů vzniká polyketidovou cestou. Jedná se zejména o patulin, ochratoxiny a citrinin, zearalenon a aflatoxiny. Meziproduktem podílejícím se na tvorbě příslušného polyketidu je acetylkoenzym A, který se v primárním metabolismu uplatňuje při výstavbě mastných kyselin a jiných sloučenin. Další významná cesta biosyntézy mykotoxinů vychází z mevalonové kyseliny. Z tohoto meziproduktu vznikají trichothecenové mykotoxiny obsahující seskviterpenový skelet [1].

V celosvětovém měřítku má z hlediska zdraví člověka největší význam pět mykotoxinů nebo jejich skupin. Jsou to aflatoxiny, ochratoxin A, fumonisiny, trichotheceny a zearalenon [6].

**Tabulka 1:** Příklady nejvýznamnějších mykotoxinů produkovaných mikroskopickými houbami rodu *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium* [1]

Producent mykotoxinů	Dominantní toxické sekundární metabolity
<b><i>Aspergillus spp.</i></b> <i>A. carneus</i> <i>A. clavatus</i> <i>A. flavus</i> <i>A. ochraceus</i> <i>A. oryzae</i> <i>A. parasiticus</i> <i>A. terreus</i> <i>A. tamarii</i> <i>A. versicolor</i>	citrinin patulin aflatoxiny B <sub>1</sub> a B <sub>2</sub> , cyklopiazonová kyselina ochratoxiny, penicillová kyselina cyklopiazonová kyselina aflatoxiny B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> citreoviridin, citrinin, patulin cyklopiazonová kyselina sterigmatocystin, cyklopiazonová kyselina
<b><i>Penicillium spp.</i></b> <i>P. aurantiogriseum</i> <i>P. camemberti</i> <i>P. citreonigrum</i> <i>P. citrinum</i> <i>P. aethiopicum</i> <i>P. purpurescens</i> <i>P. roqueforti</i> <i>P. simplissium</i>	cyklopiazonová kyselina, penicillová kyselina cyklopiazonová kyselina citreoviridin citrinin citrinin, patulin ochratoxin A patulin penicillová kyselina
<b><i>Fusarium spp.</i></b> <i>F. acuminatum</i> <i>F. anthropilum</i> <i>F. avenaceum</i> <i>F. crookwellense</i> <i>F. culmorum</i> <i>F. graminearum</i> <i>F. verticillioides</i> <i>F. semitectum</i> <i>F. tricinctum</i>	diacetoxyscirpenol, HT-2 toxin, T-2 toxin, moniliformin moniliformin moniliformin deoxynivalenol, nivalenol, zearalenon fusarin C, deoxynivalenol, nivalenol, zearalenon deoxynivalenol, diacetoxyscirpenol, zearalenon fumonisiny, fusarin C, moniliformin moniliformin, zearalenon, fusarenon-X fusarin C

## 2.2 Biologické účinky mykotoxinů

Mykotoxiny představují jeden z nejvýznamnějších problémů výživy hospodářských zvířat. Na jedné straně vyvolávají onemocnění zvířat s významným ekonomickým dopadem na produkci a reprodukci. Na druhé straně řada mykotoxinů může přecházet do živočišných produktů a tím ohrozit bezpečnost potravin a zdraví lidí [7].

Nemoci zvířat a člověka spojené s požíváním krmiv a potravin napadených mikroskopickými vláknitými houbami jsou známé po staletí. Různé mykotoxiny mají různé toxické účinky, které závisí na mnoha faktorech, jako je druh mykotoxinu, množství přijaté

dávky mykotoxinu, délkou zkrmování, druhem zvířete, jeho pohlavím a fyziologickým a patologickým stavem. Mykotoxiny jsou většinou mimořádně stabilní látky a jejich toxicita nebývá mnohdy běžnou kulinářskou úpravou surovin a potravin podstatně snížena. Toxicita mykotoxinů se testuje na různých modelech. Z obratlovců se nejčastěji používají myši, potkani a slepice. Kromě toho se na testování toxicity mykotoxinů používají někteří bezobratlí živočichové [3, 7, 8, 9].

Otravy a toxické syndromy způsobené mykotoxiny se souhrnně nazývají mykotoxikosa. Stejně jako všechny toxické syndromy tak i mykotoxikosa mohou být klasifikovány jako akutní nebo chronické. Akutní mykotoxikosa má obecně rychlý nástup a zřejmou toxickou reakci. Vzniká po požití vyšších dávek mykotoxinů, což způsobuje specifický a klinicky zjevný akutní syndrom onemocnění nebo smrt. Vyvolávají destrukci jater, ledvin, poškození oběhového systému a CNS. Také se uplatňuje hepatotoxický účinek (tuková degradace hepatocytů, nekrózy, cirhóza). Chronická mykotoxikosa je charakteristická opakovaným vystavením daného jedince středním a nízkým dávkám mykotoxinů po dlouhou dobu. Projevuje se teratogenními, mutagenními a karcinogenními účinky. Může docházet k poškození centra krvetvorby a ke zvýšení náchylnosti k infekčním chorobám. Významné jsou také pozdní účinky mykotoxinů, ty mohou být mutagenní, karcinogenní, embryotoxické, teratogenní, imunosupresivní a alergenní. V současné době je dáváno do souvislosti s mykotoxikosami u lidí a zvířat asi 50 mykotoxinů [4, 5, 8].

Mykotoxiny mohou vyvolávat patologické změny na orgánech (játra, ledviny) a sníženou plodnost (estrogenní syndrom). Vedou k alergickým reakcím a způsobují oslabení imunitního systému, kdy klesá odolnost organismu vůči infekčním onemocněním. Imunosupresivní účinky se u jednotlivých mykotoxinů značně liší a také jejich mechanismus působení na imunitní systém je rozdílný [7].

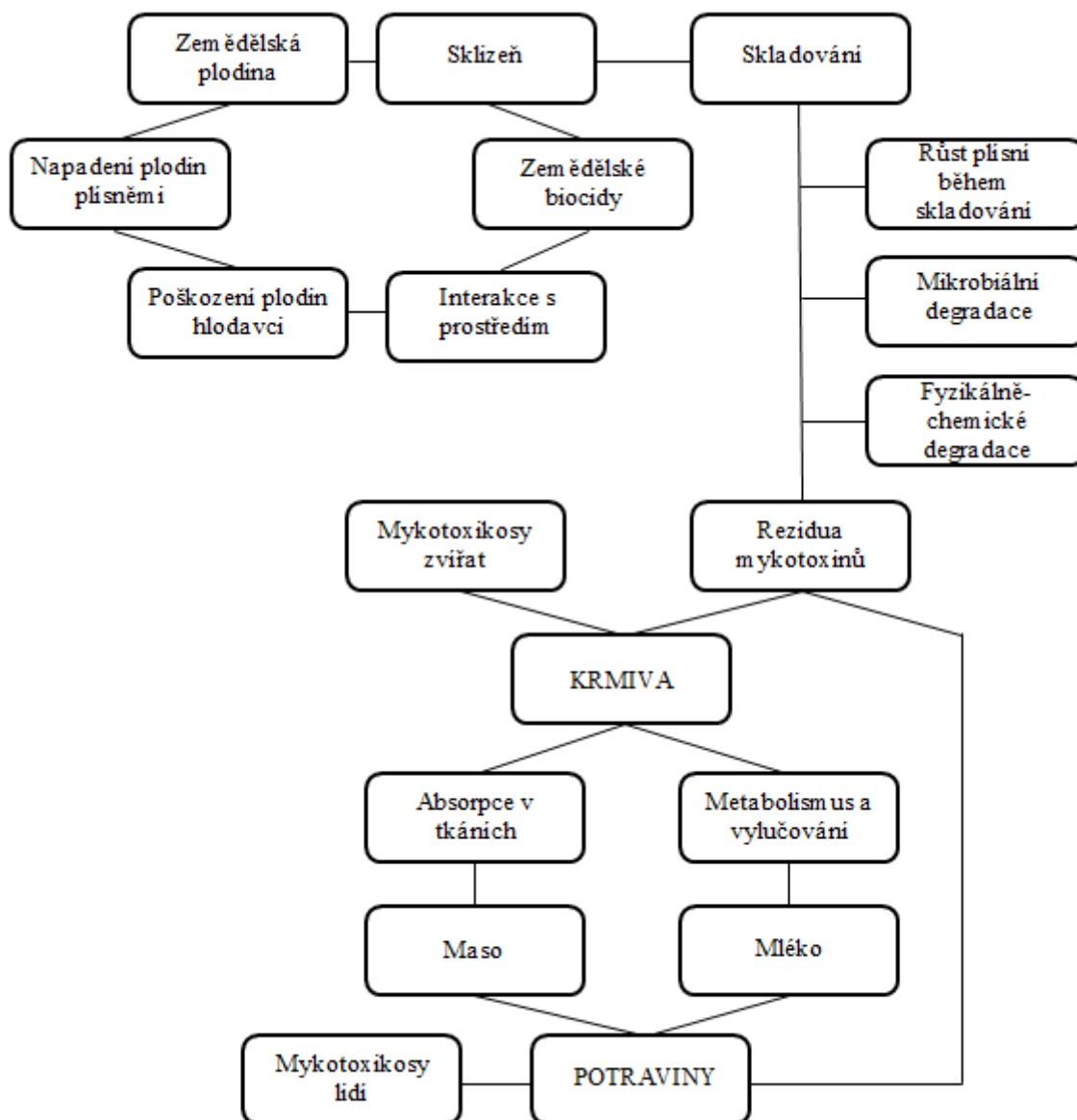
Karcinogenní účinky některých mykotoxinů byly potvrzeny v pokusech na zvířatech a přibývají důkazy, že alespoň aflatoxiny způsobují nádory jater u lidí. Mezi nejúčinnější karcinogeny patří aflatoxin B<sub>1</sub> a sterigmatocystin [3]. V Tabulce 2 jsou uvedeny některé mykotoxiny a jejich klasifikace do kategorií podle stupně karcinogenity podle IARC (Mezinárodní organizace pro výzkum rakoviny).

**Tabulka 2:** Klasifikace některých mykotoxinů do kategorií karcinogenů podle IARC [10]

<b>Mykotoxin</b>	<b>Kategorie karcinogenů</b>	
Aflatoxiny	1	Prokázaný karcinogen pro člověka
Fumonisin B <sub>1</sub> Ochratoxin A Sterigmatocystin	2B	Podezřelý karcinogen pro člověka
Deoxynivalenol Nivalenol Zearalenon T-2 toxin	3	Neklasifikovaný jako karcinogenní pro člověka

## 2.3 Výskyt mykotoxinů

Plísně kontaminují zrniny a krmné plodiny v průběhu celého výrobního procesu. Ke kontaminaci může dojít v před sklizňovém období, v období sklizně i v období skladování a také v různých fázích předcházejících jejich konzumaci. Průnik mykotoxinů do potravního řetězce člověka i hospodářských zvířat je znázorněn na Obrázku 1 [1].



**Obrázek 1:** Faktory ovlivňující výskyt mykotoxinů v potravinách a krmivech [1]

Faktory, které ovlivňují rozsah případné kontaminace zemědělských plodin mykotoxiny, jsou např. míra fyziologického stresu, kterému jsou rostliny vystaveny (nedostatek minerálií, slanost půdy,...), typ produkovaného mykotoxinu a schopnost rostliny je degradovat, virulence patogenní plísně [1].

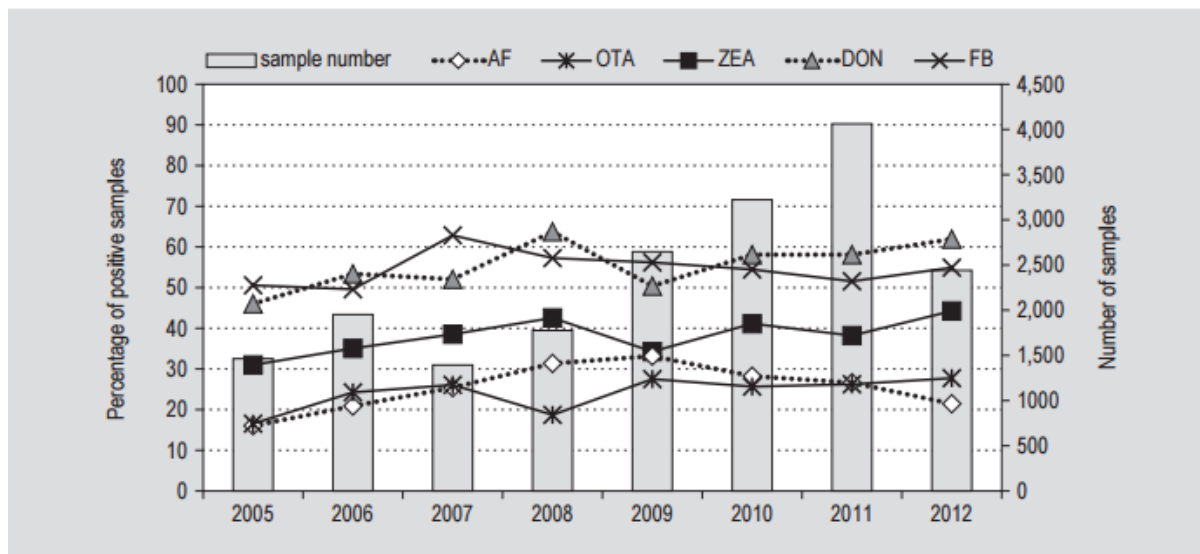
V předsklizňovém období sehrávají významnou roli také klimatické podmínky, které mají velkou roli ve všech vývojových stádiích mikromycet [11]. Ve prospěch produkce mykotoxinů působí zejména srážky (vysoká relativní vlhkost vzduchu) [1]. Dalším faktorem ovlivňující napadení fusárií jsou techniky pěstování, neboli polní management zahrnující např. střídání plodin v jednom poli, správné ošetření půdy po sklizni, systém zavlažování a další. V průběhu sklizně je velmi důležitým faktorem vlhkost, jelikož dostupná voda je limitujícím faktorem pro život fusárií [11].

Ke kontaminaci mykotoxiny může dojít i v období po sklizni, tj. během transportu, zpracování nebo skladování. Při skladování je kritickým faktorem limitujícím růst plísní obsah dostupné vody. Pokud dojde během sklizně k poruše vnější vrstvy zrn, které jsou pro plísně přirozenou bariérou, mohou spory plísní snadno získat potřebné živiny [1].

Optimální cestou vedoucí ke snížení výskytu mykotoxinů v lidské potravě a krmivech tvoří tři základní preventivní opatření:

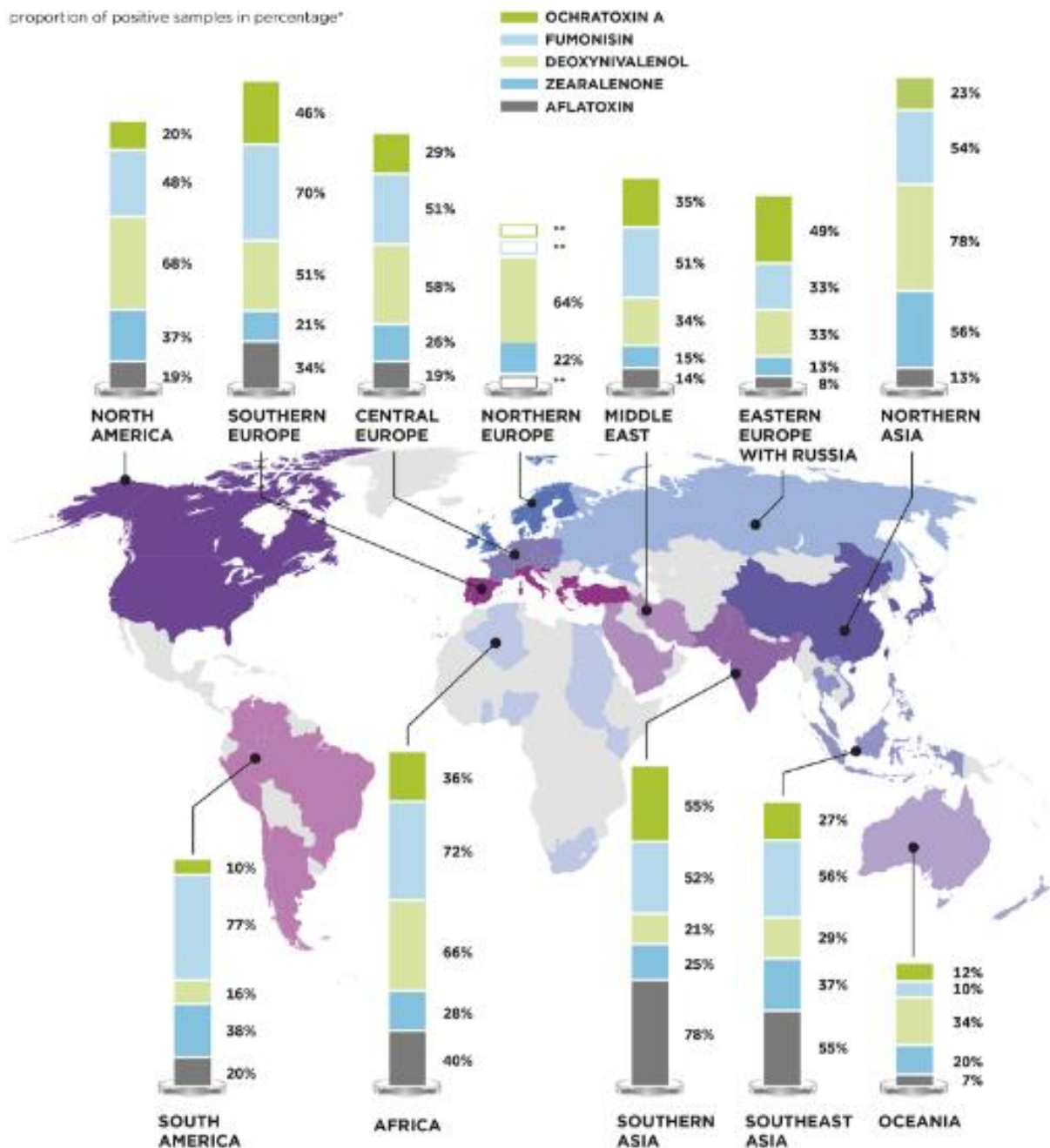
- Omezení infekce zemědělských plodin toxinogenními vláknitými houbami v období růstu plodin.
- Rychlé a správné vysušení sklizených zemědělských plodin a jejich správné skladování.
- Použití účinných fungicidních přípravků [12].

V určitých geografických pásmech se vyskytují některé druhy mykotoxinů častěji než ostatní. Rozšíření mykotoxinů je závislé na klimatických podmínkách. Obrázek 2 znázorňuje celkové množství analyzovaných vzorků v globálním rozměru od roku 2005 do roku 2012 a procentuální zastoupení pozitivních vzorků na jednotlivé mykotoxiny. Procentuální zastoupení pozitivních vzorků je v průběhu těchto let poměrně stabilní. Nejčastěji se vyskytujícím mykotoxinem je deoxynivalenol, dále pak fumonisiny, což také dokazuje Obrázek 3. Na něm je znázorněn výskyt pěti nejčastějších mykotoxinů (aflatoxiny, zearalenon, deoxynivalenol, fumonisiny, ochratoxin A) v jednotlivých částech světa [13].



**Obrázek 2:** Celkový počet analyzovaných vzorků a pozitivní zastoupení jednotlivých mykotoxinů (aflatoxiny, ochratoxin A, zearalenon, deoxynivalenol, fumonisiny) ve světě v letech 2005 – 2012 [13].

Deoxynivalenol se nejčastěji vyskytuje v Severní Americe, střední a severní Evropě, severní Asii a v Africe. Nejméně rozšířeným mykotoxinem jsou aflatoxiny, které se vyskytují převážně v teplejších a vlhkých zeměpisných šířkách (jižní Asie a Afrika).



**Obrázek 3:** Výskyt mykotoxinů (ochratoxin A, fumonisiny, deoxynivalenol, zearalenon, aflatoxiny) a jejich procentuální zastoupení v různých částech světa [14]

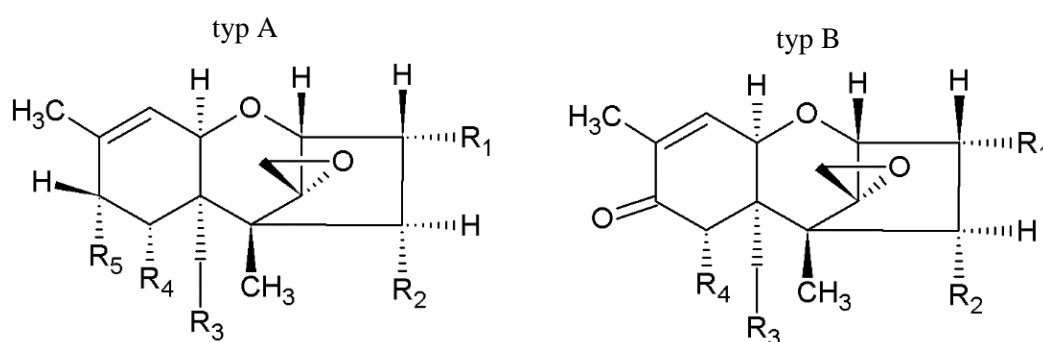
## 2.4 Fusariové mykotoxiny

Fusariové mykotoxiny jsou nežádoucí sekundární metabolity produkované mikroskopickými vláknitými houbami rodu *Fusarium*. Mezi nejčastějšími vyskytujícími druhy patří *F. graminearum* a *F. culmorum*, které způsobují onemocnění obilovin zvané Fuzárie vadnutí klasů (Fusarium head blight - FHB). Následkem je znehodnocení obilného zrna a také možnost tvorby fusariových mykotoxinů. Mikromycety rodu *Fusarium* bývají označovány jako polní plísně, které poškozují zrna v před sklizňovém období. Ovšem za příznivých podmínek mohou růst i v průběhu skladování. Mezi nejvýznamnější fusariové mykotoxiny patří trichotheceny, fumonisiny a zearalenon [11, 15].

### 2.4.1 Trichotheceny

Trichotheceny tvoří velkou skupinu mykotoxinů a patří mezi nejznámější toxiny produkované houbami rodu *Fusarium*. Z hlediska chemické struktury se jedná o tetracyklické seskviterpeny s šestičlenným cyklem. Zahrnují šestičlenný heterocyklus s kyslíkem a epoxyskupinu v poloze C-12, C-13. V poloze C-9, C-10 obsahují dvojnou vazbu. Proto se jim souhrnně říká 12,13-epoxy-9-trichotheceny [8, 16].

Trichotheceny jsou klasifikovány do 4 skupin podle počtu funkčních a substitučních skupin, a to A, B, C a D. Typ A obsahuje na uhlíku C-8 jinou funkční skupinu než ketonickou a patří zde např. T-2 toxin, HT-2 toxin, neosolaniol a diacetoxyscirpenol. Typ B má na uhlíku C-8 karbonylovou skupinu. Nejvýznamnějším zástupcem je 4-deoxynivalenol a nivalenol. Trichotheceny typu C obsahují kromě epoxyskupiny v poloze C-12, C-13 další epoxyskupinu v poloze C-7 a C-8 nebo C-8 a C-9. Typ D má makrocyclický kruhový systém mezi C-4 a C-15 spojený esterovými vazbami. Houby rodu *Fusarium* produkují pouze trichotheceny ze skupiny A a B (Obrázek 4) [8, 16]. Funkční skupiny jednotlivých trichothecenů ze skupiny A a B jsou uvedeny v Tabulce 3.



Obrázek 4: Strukturální vzorce trichothecenů typu A a B [8]

**Tabulka 3:** Funkční skupiny nejvýznamnějších trichothecenů ze skupiny A a B [8]

Typ	Název mykotoxinu	Zkratka	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
A	Monoacetoxyscirpenol	MAS	OH	OH	OCOCH <sub>3</sub>	H	H
	Diacetoxyscirpenol	DAS	OH	OCOCH <sub>3</sub>	OCOCH <sub>3</sub>	H	H
	T-2 tetraol	T-2 tetr.	OH	OH	OH	H	OH
	T-2 toxin	T-2 tox.	OH	OCOCH <sub>3</sub>	OCOCH <sub>3</sub>	H	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
	HT-2 toxin	HT-2 tox.	OH	OH	OCOCH <sub>3</sub>	H	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
	T-2 triol	T-2 triol	OH	OH	OH	H	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
	Neosolaniol	NEO	OH	OCOCH <sub>3</sub>	OCOCH <sub>3</sub>	H	OH
B	Nivalenol	NIV	OH	OH	OH	OH	-
	Fusarenon-X	FUS-X	OH	OCOCH <sub>3</sub>	OH	OH	-
	Deoxynivalenol	DON	OH	H	OH	OH	-
	3-acetyl-deoxynivalenol	3-ADON	OCOCH <sub>3</sub>	H	OH	OH	-
	15-acetyl-deoxynivalenol	15-ADON	OH	H	OCOCH <sub>3</sub>	OH	-

Trichotheceny typu C a D nejsou běžně v zemědělských plodinách detekovány, zatímco trichotheceny typu A a B jsou velmi rozšířené. Přítomnost jednoho, někdy i více zástupců bývá prokazována především v plodinách pěstovaných v mírném klimatickém pásmu Evropy, Ameriky a Asie. Mezi nejčastěji kontaminované plodiny patří ječmen, pšenice a kukuřice. Mezi další často napadané plodiny patří žito a oves a v menších koncentracích byly trichotheceny nalezeny také v rýži, čiroku, bramborách i sójových bobech [1, 8].

Trichotheceny vykazují širokou škálu biologické aktivity, jako např. antibakteriální, antifungální a cytotoxické vlastnosti. Některé jsou fyto toxické a většina z nich vykazuje pro živočichy větší či menší stupeň toxicity zahrnující také insekticidní efekt. Toxicita je vysvětlována především přítomností epoxyskupiny. Po kontaminaci trichotheceny může docházet k rozličným syndromům, například ke snižování příjmu nebo totálnímu odmítnutí potravy, k podráždění kůže a k dermálním nekrotám, zvracení, průjmům a krvácivosti [17].

### Deoxynivalenol (DON)

Deoxynivalenol je jedním z nejrozšířenějších trichothecenů patřících do skupiny B a vyskytujících se v obilovinách, jako je pšenice, ječmen, oves, žito a kukuřice. Při zkrmování DON kontaminované kukuřice bylo u prasat pozorováno zvracení (vomitus). Na základě toho byl odvozen triviální název tohoto mykotoxinu – vomitoxin. Rozsah kontaminace obilovin je pevně spojená s klimatickými podmínkami v dané lokalitě, s množstvím srážek a s mírou vlhkostí v době růstu a je závislá také na podmínkách skladování [18, 19].

Za podmínek příznivých pro růst toxinogenních plísní produkujících DON (nejvýznamnějším producentem je *Fusarium graminearum*), mohou jeho koncentrace dosáhnout až  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . V některých letech lze prokázat přítomnost deoxynivalenolu prakticky ve 100 % vyšetřovaných vzorků [1].

DON vykazuje velkou stabilitu během zpracování a vaření, což vysvětluje jeho rozsáhlou přítomnost v potravinách. Je velmi stabilní při teplotě  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ , méně stabilní pak při teplotě  $180 \text{ }^\circ\text{C}$  a při teplotě  $210 \text{ }^\circ\text{C}$  se rozloží během 30 – 40 minut [18].

Akutní toxicita se projevuje střevními potížemi, zvracením, může vzniknout akutní DON toxikóza. Způsobuje hemoragie, kožní změny, gastrointestinální onemocnění, má i teratogenní a imunosupresivní účinky [4].

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

T-2 toxin se zařazuje mezi trichotheceny typu A. Získal si velkou pozornost, jelikož se vyznačuje nejvyšší toxicitou ze všech trichothecenů. Ovšem ve srovnání s ostatními trichothecenovými mykotoxiny je méně často detekován. Je netěkavý a odolný vůči degradaci v různých prostředích, jako je světlo nebo teplota, ale v silně kyselém nebo alkalickém prostředí je účinně deaktivován [20].

HT-2 toxin je deacetylovaná forma T-2 toxinu, respektive jeho metabolit. V obilovinách se běžně vyskytují současně, jelikož jeden přechází v druhý. K hlavním producentům těchto mykotoxinů patří druhy plísní jako *Fusarium sporotrichioides*, *F. poae* a *F. graminearum* [1, 19, 21].

T-2 a HT-2 toxin mohou způsobovat celou řadu toxických účinků. Patří zde ztráta hmotnosti, která je způsobená rozsáhlým snížením počtu krevních destiček a bílých krvinek, což může vést k poškození DNA a dokonce i ke smrti. U lidí je s expozicí T-2 toxinu spojováno onemocnění zvané alimentární toxická aleukie (ATA). Dalšími příznaky intoxikace je zvracení, průjemy a časté jsou i bolesti hlavy [1, 19, 21].

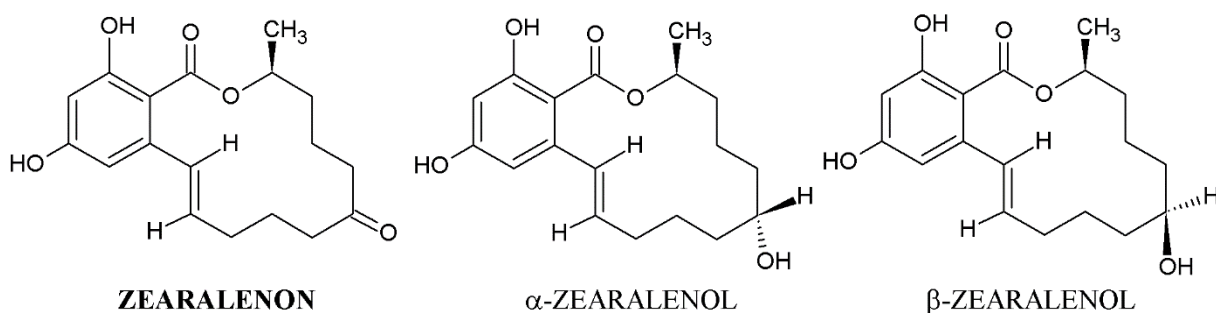
### **2.4.2 Fumonisin**

Doposud bylo identifikováno nejméně patnáct sloučenin, které byly zařazeny do této skupiny mykotoxinů, která byla objevena až na konci 80. let 20. století v Jihoafrické republice. Hlavními producenty fumonisinů jsou *Fusarium verticillioides* (syn. *Fusarium moniliforme*) a *Fusarium proliferatum* [11, 12, 22].

Nejvýznamnějším zástupcem je fumonisin B<sub>1</sub> (Obrázek 5), z toxikologického hlediska nejdůkladněji studován. Fumonisin B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> a B<sub>4</sub> jsou méně časté a strukturně se odlišují od fumonisinu B<sub>1</sub> v počtu a umístění hydroxylových skupin na uhlíkovém skeletu. Vesměs se jedná o velmi polární diestery propan-1,2,3-trikarboxylové kyseliny a pentahydroxyisokosanu s vázanou aminoskupinou. Zajímavá je také jejich podobnost se strukturou sfingosinu. Bylo prokázáno, že zejména fumonisin B<sub>1</sub> inhibuje enzym ceramid syntázu, který katalyzuje acylaci sfinganinu a tvorbu sfingosinu. Tato inhibice zvyšuje koncentraci intracelulárního sfinganinu



Zearalenon a jeho deriváty vykazují významné estrogení a anabolické účinky. ZON není akutně toxický, ovšem má schopnost způsobit hyperestrogenismus, zejména u prasat, dále u hovězího dobytka a drůbeže. Charakteristickým projevem je zduření rodidel. Ve srovnání s dospělými zvířaty mají nedospělé prasnice mnohem intenzivnější hyperestrogení projevy. I když intoxikace zearalenonem není fatální, většinou dochází k úhynu zvířete, a to z důvodu napadení vyhrěznutých orgánů bakteriální infekcí [27].



**Obrázek 6:** Chemická struktura zearalenonu a jeho metabolitů [12]

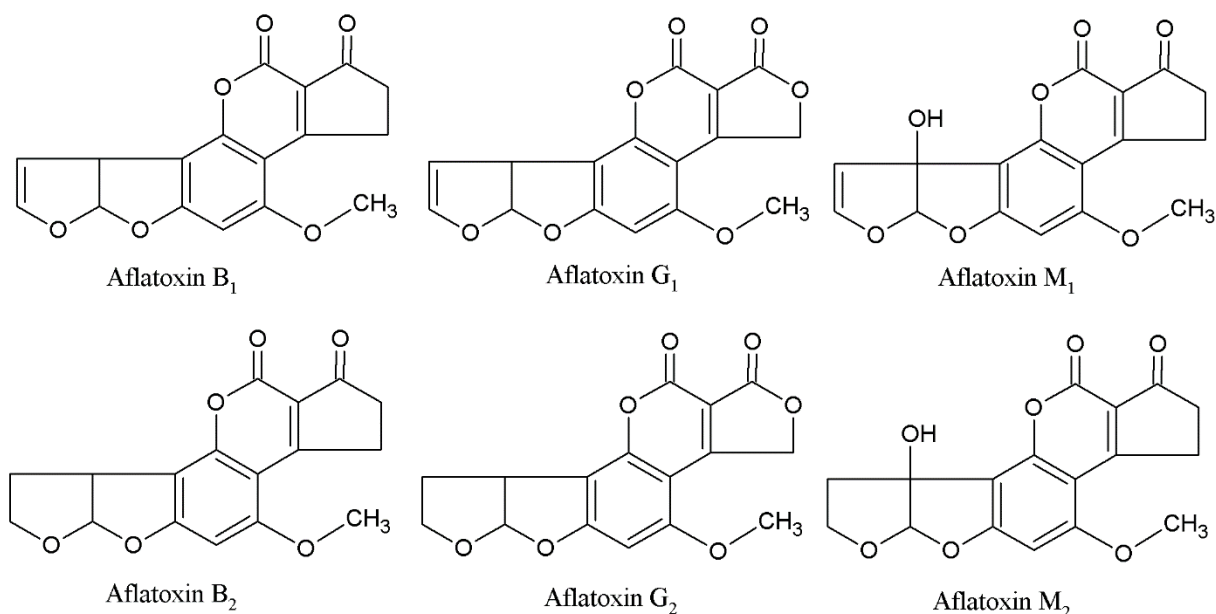
## 2.5 Aflatoxiny

Aflatoxiny patří, s ohledem na vysokou toxicitu, mezi nejvíce sledované mykotoxiny. Řadí se mezi deriváty difuranokumarinů produkované převážně kmeny *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*. Byly izolovány a charakterizovány během epidemie v roce 1960 ve Velké Británii, kdy uhynulo více než 100 000 krocanů po požití infikovaného krmiva. Díky požadavku na vyšší teplotu a vlhkost jsou aflatoxiny v našich klimatických podmínkách málo rozšířeny, avšak mohou být importovány s kontaminovanými potravinami z tropických a subtropických oblastí, kde jsou podmínky pro jejich růst ideální [1, 5, 19].

Celkem bylo identifikováno 18 druhů aflatoxinů, z nichž nejvýznamnější jsou aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>), G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>), M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) a M<sub>2</sub> (AFM<sub>2</sub>), jejichž strukturní vzorce jsou zobrazeny na Obrázku 7. Pojmenované jsou podle barvy fluorescence v UV světle. AFB<sub>1</sub> a AFB<sub>2</sub> fluoreskují modře (angl. blue), zatímco AFG<sub>1</sub> a AFG<sub>2</sub> fluoreskují zeleně (angl. green). Aflatoxiny nalezené v savčím mléce (angl. mammalian milk) jsou pojmenované AFM [16].

Mezi nejčastěji kontaminované potraviny patří zejména obiloviny jako kukuřice, pšenice, rýže. Dále se aflatoxiny mohou vyskytovat v arašídách, pistáciích, mandlích, sóji i fíkách. Kontaminované může být také mléko, kdy aflatoxiny do něj přecházejí z krmiva dojníc [19].

Expozice aflatoxiny může u zvířat i člověka vyvolat řadu akutních i chronických onemocnění. Podle IARC jsou aflatoxiny klasifikovány podle stupně karcinogenity do kategorie 1, přičemž aflatoxin B<sub>1</sub> je považován za nejúčinnější známý přirozený karcinogen. Karcinogenita obecně klesá v řadě AFB<sub>1</sub> > AFG<sub>1</sub> > AFB<sub>2</sub> > AFG<sub>2</sub>. U hospodářských zvířat chronická expozice aflatoxiny vede ke snížení rychlosti růstu, náchylnosti k infekcím, atd. [1, 28].



**Obrázek 7:** Chemická struktura aflatoxinu B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub> a M<sub>2</sub> [29]

## 2.6 Ochratoxin A

Při produkci ochratoxinů se uplatňují zejména dva rody *Aspergillus* (*A. ochraceus*) a *Penicillium* (*P. verrucosum*). V tropických a subtropických oblastech jsou ochratoxiny produkovány zejména vláknitými mikroskopickými houbami rodu *Aspergillus*. Naopak v oblastech mírného podnebného pásu a v chladnějších oblastech jsou produkovány spíše rodem *Penicillium*, jež zároveň produkuje nejtoxičtější mykotoxin této skupiny ochratoxin A (OTA), který je považován za nejvýznamnějšího zástupce [19, 27]. Růstové podmínky vláknitých mikroskopických hub pro produkci ochratoxinů jsou vymezeny v Tabulce 4.

**Tabulka 4:** Růstové podmínky producentů ochratoxinů [30]

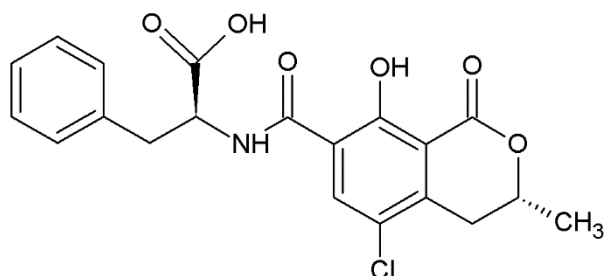
Růstové podmínky	<i>A. ochraceus</i>	<i>P. verrucosum</i>
Optimální teplota pro růst	24 – 37 °C	20 °C
Optimální teplota pro produkci ochratoxinu	31 °C	20 °C
Optimální pH růstu	3 - 10	6 - 7
Minimální vodní aktivita pro produkci ochratoxinu	0,80	0,86

Z chemického hlediska je OTA (3R)-*N*-[(5-chlor-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1*H*-2-benzopyran-7-yl)-karbonyl]-*L*-fenylalanin, který ve své molekule obsahuje fenylalanin se substituovaným (3R)-3,4-dihydromethylisokumarinem (Obrázek 8). Za vysokou toxicitu je zodpovědný přítomný atom chloru, kterým je substituovaný aromatický kruh [1].

Nejzávažnějším účinkem OTA zaznamenaným u zvířat je nefrotoxicita, dále byla prokázána jeho hepatotoxicita, genotoxicita a imunotoxicita [1]. Podle stupně karcinogenity je Mezinárodní organizací pro výzkum rakoviny (IARC) zařazen do kategorie 2B jako podezřelý karcinogen pro člověka [10]. U člověka je OTA metabolizován velmi pomalu

s poločasem rozpadu delším než 30 dnů. Téměř zcela se váže na plazmatické proteiny a hromadí se v ledvinách a játrech [2].

OTA se vyskytuje v řadě potravin jak rostlinného, tak i živočišného původu. Nejčastěji je nalézán v obilovinách (ječmen, pšenice, oves) a výrobcích z nich, dále v kukuřici, rýži, zelených kávových bobech, koření, vínu, aj. Vedle rostlinných produktů lze OTA nalézt v orgánech hospodářských zvířat, zejména v ledvinách vepřů [12, 27].



**Obrázek 8:** Chemická struktura ochratoxinu A [31]

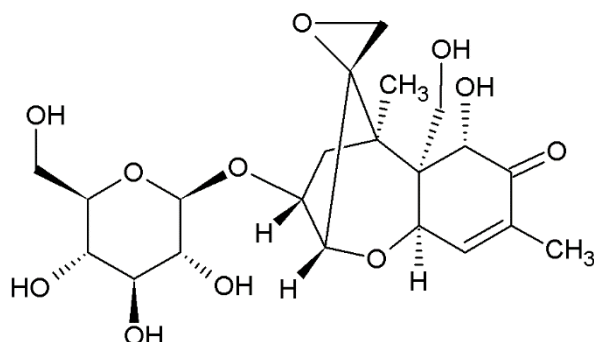
## 2.7 Maskované mykotoxiny

Kromě volných forem mykotoxinů, které jsou běžně sledovány, existují konjugované formy mykotoxinů, které bývají také označovány jako maskované mykotoxiny. Ještě donedávna unikaly běžné analýze, jelikož nejsou konvenčními analytickými metodami detekovány. Důvodem jsou jejich odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti, jako je jejich vyšší polarita a tím horší extrahovatelnost běžnými rozpouštědly a nedostupnost komerčních standardů [19, 32].

Jedná se zejména o konjugáty s mono- a oligosacharidy, které vznikají v průběhu detoxikačního procesu v kontaminovaných rostlinách [1]. Tento přirozený obranný mechanismus vede k eliminaci nežádoucích účinků mykotoxinů. V rostlinných orgánech, pletivech a organelách dochází k reakcím (oxidace, redukce, hydrolýza, methylace, glukosidace), při kterých za účasti enzymů dochází k přeměně toxinů s aktivními funkčními skupinami na deriváty nebo konjugáty, jejichž škodlivost pro rostliny je minimální a tedy mohou být ukládány ve vakuolách [19]. Některé transformace, které vedou k produkci maskovaných mykotoxinů, mohou snižovat toxicitu původních toxinů. Hodnocení toxicity všech derivátů mykotoxinů, které se vyskytují v potravinách, je důležité pro odhad zdravotního rizika představovaného sumou různých forem daného mykotoxinu [32].

Doposud byly identifikovány metabolity deoxynivalenolu, nivalenolu, T-2 toxinu, HT-2 toxinu, zearalenonu i ochratoxinu A. Bylo prokázáno, že v přirozeně infikovaných obilovinách se vyskytuje pouze deoxynivalenol-3- $\beta$ -D-glukopyranosid (D3G) a zearalenon-4- $\beta$ -D-glukopyranosid (Z4G) [32]. D3G (Obrázek 9) je nejznámějším a zatím nejprobádanějším konjugátem trichothecenů [1]. V přirozeně kontaminované kukuřici a pšenici byl D3G poprvé detekován v roce 2005. Poměr D3G k nemodifikovanému DON je velice variabilní a pohybuje se mezi 20 % až dokonce 70 % v závislosti na druhu obiloviny, genotypu a roku sklizně [33]. Relativně vysoké koncentrace D3G byly nedávno zjištěny ve sladu, pivu a dalších fermentovaných cereálních výrobcích, kdy molární poměr D3G/DON u některých vzorků může být  $\geq 1$ . Údaje o biologické dostupnosti a toxicitě D3G zatím nejsou zcela k dispozici, nicméně

dosavadní výzkumy naznačují, že enzymy určitých bakteriálních kmenů vyskytujících se ve střevech savců jsou schopné štěpit D3G na mateřský DON [1].



**Obrázek 9:** Strukturální vzorec deoxynivalenol-3-β-D-glukopyranosid [34]

## 2.8 Legislativa

V zájmu ochrany veřejného zdraví je nezbytné, aby se množství kontaminujících látek udrželo na toxikologicky přijatelných úrovních. Proto existují právní předpisy, které mají zajistit dosažení tohoto cíle. Legislativní regulace obsahu mykotoxinů v potravinách a krmivech je v současné době prováděna na úrovni nařízení ES. Maximální limity by měly být stanoveny na přísné úrovni, které je možno dosáhnout při dodržování správných zemědělských a výrobních postupů a při zohlednění rizika souvisejícího s konzumací potravin. Doporučení Komise 2006/583/ES ze dne 17. srpna 2006 k prevenci a snižování fusariových toxinů v obilovinách a výrobcích z obilovin obsahuje obecné zásady prevence a snižování kontaminace fusariovými toxiny (zearalenon, fumonisiny a trichotheceny) v obilovinách.

V současné době jsou maximální povolené limity fusariových mykotoxinů upraveny 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. Maximální limity pro aflatoxiny jsou upraveny nařízením komise (ES) č. 165/2010 ze dne 26. února 2010. Přehled legislativních limitů pro deoxynivalenol, zearalenon, aflatoxiny a ochratoxin A je uveden v Tabulce 5. Pro pivo legislativní limity nebyly dosud stanoveny.

Evropský úřad pro bezpečnost (EFSA) přijal roku 2006 vědecké stanovisko týkající se ochratoxinu A v potravinách a došel k závěru, že tolerovatelný týdenní příjem (TWI) je  $120 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}$  tělesné hmotnosti. Vědecký výbor pro potraviny stanovil v roce 1999 tolerovatelný denní příjem (TDI) deoxynivalenolu na  $1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  tělesné hmotnosti a v roce 2000 stanovil TDI zearalenonu na  $0,2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  tělesné hmotnosti.

**Tabulka 5:** Maximální povolené limity pro deoxynivalenol, zearalenon, ochratoxin A a aflatoxiny dle nařízení komise (ES) č. 1881/2006, 1126/2007, 165/2010

Mykotoxin	Potravina	Maximální limit [ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ]
Deoxynivalenol	Nezpracované obiloviny, jiné než pšenice tvrdá, oves a kukuřice	1250

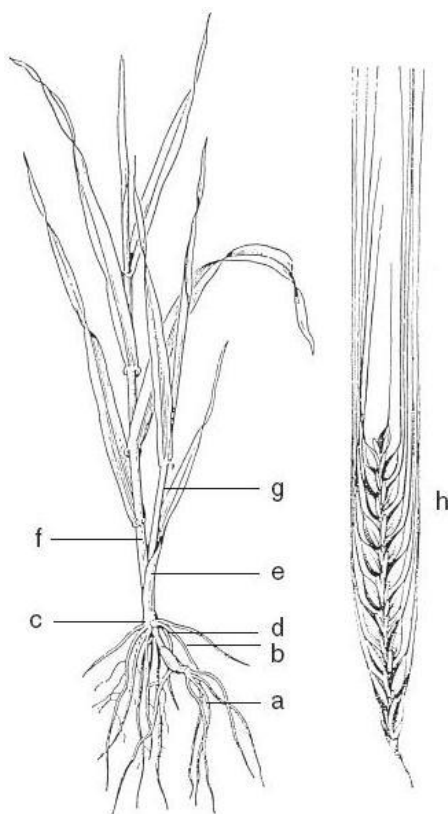
Mykotoxin	Potravina	Maximální limit [µg·kg <sup>-1</sup> ]	
	Nezpracovaná pšenice tvrdá a oves	1750	
	Obiloviny určené k přímé lidské spotřebě	750	
Zearalenon	Nezpracované obiloviny jiné než kukuřice	100	
	Obiloviny určené k přímé lidské spotřebě	75	
Ochratoxin A	Nezpracované obiloviny	5,0	
	Všechny produkty pocházející z nezpracovaných obilovin, včetně zpracovaných výrobků z obilovin a obilovin určených k přímé lidské spotřebě	3,0	
Aflatoxiny	Všechny druhy obilovin a všechny výrobky pocházející z obilovin včetně zpracovaných výrobků z obilovin	B <sub>1</sub>	Σ B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>
		2,0	4,0

## 2.9 Sladovnický ječmen

Ječmen je u nás základní surovinou pro výrobu sladu již od středověku a národohospodářským významem se řadí mezi hlavní plodiny světa. Kulturně pěstované ječmeny jsou jarní, které jsou vysévané v březnu, nebo ozimé, vysévané na podzim. Dále se ze sladařského hlediska dělí podle počtu plodných kvítků v klasu na ječmeny víceřadé a dvouřadé [35]. V našich podmínkách se pěstují ozimé i jarní formy ječmene, ovšem pro sladovnické účely převažuje pěstování jarních forem dvouřadého ječmene. Slady z ozimých ječmenů mohou způsobovat technologické problémy, a proto se jeho použití objevuje pouze jako alternativa při nízké sklizni jarního ječmene [36, 37]. Vlastnosti odrůd ječmene výrazně ovlivňuje kvalitu sladu a z něj vyrobeného piva. V současné době se pěstuje velké množství odrůd sladovnického ječmene, přičemž během několika let ztrácí odrůda ječmene svoje specifické genetické vlastnosti a následně dojde k jejich vyřazení [37].

Rostlina ječmene (Obrázek 10) je tvořena kořenovou soustavou, stéblem s kolénky, listy a květem. **Kořenovou soustavu** dělíme na primární a sekundární. Primární kořenová soustava se vytváří při klíčení obilky a tyto kořínky se nazývají zárodečné. Ječmen vytváří největší počet zárodečných kořínků (5-8) z našich obilovin. Sekundární kořenová soustava se vytváří o něco později, a to z odnožovacího kolénka [38, 39]. Kořenový systém zajišťuje pro rostlinu příjem živin, vody a ukotvení v substrátu [40]. **Stéblo** ječmene je obvykle 80 až 130 cm dlouhé, je kruhového průřezu, mírně kónické a duté, čímž je zajištěna její vysoká mechanická pevnost při nízké hmotnosti. Pomocí kolének je stéblo rozděleno na 4 až 8 článků, přičemž spodní článek je nejkratší a následující je vždy delší. Z horní části každého kolénka vyrůstá **list**, který je přisedlý a vztyčený. Má úzkou čepel a pochvu, která objímá kolénko a spodní část článku stébla [38, 39]. Květenstvím ječmene je nevětvený klas, který se skládá z klasového vřetena, a po jeho obou stranách střídavě vyrůstají klásky, které jsou tvořeny z několika květů. **Květ** je uzavřen vnější plevou, pluchou s osinou a vnitřní pluškou, které chrání květ před mechanickým

poškozením. Dále se květ skládá ze svrchního jednovaječného semeníku s dvěma pérovitými bliznami a obvykle třemi tyčinkami [38, 39]. **Obilka**, obecně označována také jako zrno nebo semeno, je složena z obalu, zárodku a endospermu, který je tvořený hlavně tenkostěnným parenchymatickým pletivem vyplněným škrobem. Obalovou vrstvou na hřbetní straně je plucha, na břišní straně pluška, dále následují oplodí a osemení. Na spodní hřbetní straně obilky se nachází zárodek, což je základ budoucí rostliny. Obsah vody v obilce se pohybuje od 12 do 15 %, zbytek je sušina, jejíž hlavní součástí je škrob [38, 39].



**Obrázek 10:** Rostlina ječmene [38]

a – zárodečné kořínky, b – adventivní kořínky, c – odnožovací kolénko,  
d – oddenkový článek, e – koleoptile, f – hlavní stéblo, g – odnož, h – klas

### 2.9.1 Pěstování a požadavky na prostředí

Jarní ječmen se pěstuje napříč všemi klimatickými oblastmi, avšak vysoké sladovnické hodnoty lze dosáhnout za určitých půdně klimatických podmínek. Významným faktorem ovlivňujícím pěstování jarního ječmene je výběr půdního typu. Jarní ječmen je mnohem náročnější na půdu než jiné obiloviny, to vyplývá z jeho jemnějšího a mělčího kořenového systému a z potřeby intenzivního příjmu živin a vody z půdy během krátkého vegetačního období. Nejvhodnější jsou hlubší černozemě a hnědozemě s dostatkem jílu, který dokáže zadržovat vodu. Negativní vliv na růst jarního ječmene i sladovnickou kvalitu má kyselé půdní prostředí, které potlačuje tvorbu kořenového systému a snižuje účinnost živin [36, 41].

Jedním z rozhodujících činitelů z hlediska tvorby výnosů a technologické kvality je předplodina. Dlouhodobě nejlepší předplodinou jsou okopaniny hnojené chlévským hnojem, jako je cukrovka, brambory nebo kukuřice, které pomáhají udržovat a zlepšovat úrodnost půdy a také zvyšují biologickou činnost. Naproti tomu obilniny, a tedy i ječmen, obecně půdní aktivitu snižují. Po jejich opakovaném pěstování může docházet ke změně půdní mikroflóry a ke zhoršení fyzikálně - chemických vlastností půdy. Dalším důležitým intenzifikačním faktorem je organické hnojení, především zelené hnojení v kombinaci se slámou [36, 38, 41].

## 2.9.2 Sladovnická jakost

Ječmen dodávaný pro výrobu sladu musí splňovat podmínky zdravotní nezávadnosti a hygieny a v neposlední řadě je zapotřebí, aby nebyl kontaminován plísněmi a neobsahoval nepovolená množství jejich sekundárních metabolitů. Vlastnosti sladovnického ječmene a jeho vhodnost pro výrobu sladu a piva se hodnotí podle subjektivních, fyziologických, mechanických, fyzikálních, chemických a biochemických znaků, včetně odrůdové čistoty [42]. Základní a nejdůležitější technologickou vlastností zrna sladovnického ječmene je schopnost rychle a jednotně klíčit. Jakékoliv poškození zrn sladovnického ječmene způsobuje technologické problémy při výrobě a poškozuje kvalitu finálního výrobku [43].

Kvalitu, úroveň a vyrovnanost jednotlivých sledovaných sladovnických parametrů hodnotí ukazatel sladovnické jakosti (USJ). Požadavky na ječmen jako zemědělského výrobku určeného na výrobu pivovarského sladu jsou vymezeny normou ČSN 46 1100-5 [44, 41]. V rámci USJ jsou hodnoceny následující znaky, jejichž hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 6.

**Tabulka 6:** Přehled hodnocených jakostních parametrů sladovnického ječmene [38]

Znak	Rozpětí
Obsah dusíkatých látek – bílkovin v sušině [%]	10,7 – 11,2
Obsah extraktu [%]	80,9 – 82,5
Relativní extrakt při 45 °C [%]	37,0 – 41,0
Kolbachovo číslo – informuje o stupni rozluštění bílkovin	39,0 – 44,0
Diastatická mohutnost [WK]	220 – 280
Dosažitelný stupeň prokvašení [%]	79,0 – 82,0
Friabilita – křehkost [%]	79,0 – 86,0
Obsah $\beta$ -glukanů ve sladince [ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	150 – 200

Vedle těchto technologických parametrů, které jsou pravidelně zjišťovány, se zjišťuje ještě řada dalších znaků. Mezi nimi je klíčivost a energie klíčení, což jsou rozhodující parametry sladovnického ječmene. Dále to je podíl zrna nad sítem 2,5 mm, který charakterizuje vyrovnanost a plnost zrn v ječmeni. Vysoký podíl nad sítem 2,5 mm souvisí s výtěžností sladu a do určité míry ovlivňuje i obsah bílkovin i extraktivnost vyrobeného sladu.

Klasickým parametrem je hektolitrová hmotnost, která je závislá na mnoha faktorech, především na odrůdě, obsahu vody, klimatických podmínkách apod. Podává orientační

informaci o obsahu škrobu v ječmeni, který je jeho hlavní extraktivou součástí. Souvisí s velikostí, tvarem a hmotností zrna [36, 38, 42].

Hmotnost 1000 zrn je jedním z faktorů pro předpověď extraktu ječmene. To znamená, že čím je slad lépe rozluštěn, tím je nižší průměrná hodnota tohoto kritéria. Dalším parametrem je barva a jemnost pluchy, podle kterých se dá usuzovat, jak probíhala závěrečná fáze zrání, za jakých podmínek byl ječmen sklizen, jak byl ošetřen a uskladněn. Tyto a mnoho dalších požadavků, technologické postupy a hygienické předpisy v pivovarsko - sladařské výrobě je nezbytné respektovat [36, 38, 42].

### **2.9.3 Skladování ječmene a jeho vliv na kvalitu sladu**

Skladování ječmene je důležitou součástí technologie jeho zpracování na slad, jelikož je to jeden z parametrů ovlivňující jeho kvalitu. Cílem skladování sladovnického ječmene je zvýšení jeho kvality. Ihned po sklizni je zrno ječmene fyziologicky nevyzrálé a jeho posklizňové dozrávání musí probíhat podle určitých zásad.

Biologické procesy probíhající v zrně jsou řízeny vlhkostí vzduchu a zrna, přístupem vzduchu a také složením a výměnou plynu v prostoru mezi zrny. Optimální systém skladování by měl zajistit vysokou klíčivost při nízkých ztrátách prodýcháním. Nadměrná aerace zvyšuje ztráty prodýcháním a riziko biologického poškození suroviny vlivem zvýšení relativní vlhkosti plynu v prostoru mezi zrny. Také u skladování bez občasné aerace nebo při přemístění ječmene dochází ke zvyšování rizika poškození klíčivosti.

Různé odrůdy ječmene jsou různě citlivé na anaerobní podmínky skladování z hlediska snížení klíčivosti a klíčivé energie, což se nepříznivě projeví na kvalitativních parametrech sladu [45].

## **2.10 Slad**

### **2.10.1 Sladování**

Cílem sladování je vyrobít řízeným procesem klíčení a hvozdění z ječmene slad, obsahující potřebné enzymy a aromatické i barevné látky nezbytné pro výrobu určeného druhu piva [46].

Celý proces výroby sladu sestává z čištění a třídění ječmene, máčení ječmene, klíčení ječmene, hvozdění zeleného sladu, odkličování a uskladnění sladu [35, 38]. Čištění ječmene probíhá ve dvou stupních. Nejprve se na vibrujících sítích aspirátoru odstraní hrubé nečistoty, poté cizí příměsi a nakonec jemné příměsi jako je prach, písek apod. Následně se na triéru odstraňují půlky ječných zrn a kulatá zrna různých plevelů. Třídění ječmene podle velikosti zrn má velký technologický význam pro docílení jednotného máčení, klíčení a získání dokonale homogenního sladu. Ječmen se dělí na I. a II. třídu podle velikosti zrn. Zrna I. třídy mají velikost zrn nad 2,5 mm a zrna II. třídy mají velikost 2,2 až 2,5 mm [38].

Cílem máčení ječmene je zvýšení obsahu vody v zrně z původních asi 10-15 % na 40-47 %. Tímto vzniknou podmínky pro klíčení zrna a současně syntézu a aktivaci biokatalyzátorů enzymů. Dosažený obsah vody se nazývá stupeň domočení a liší se podle typu vyráběného

sladu [35, 46]. Při klíčení ječmene se mění složení zrna působením komplexů enzymů, které se postupně aktivují v obilkách. Důležité jsou především komplexy enzymů, které štěpí vysokomolekulární látky na nízkomolekulární sloučeniny, které se v průběhu hvozdění sladu a následně výroby piva podílejí na tvorbě jeho typických sensorických vlastností. Produktem klíčení je tzv. zelený slad [35].

Hvozdění je závěrečnou fází výroby sladu, kdy se zelený slad s vysokým obsahem vody převádí do skladovatelného a stabilního stavu snížením obsahu vody z původních asi 40 % na 3-5 %. Během hvozdění se zastavují životní pochody zárodků a také se tvoří barevné a aromatické látky, které jsou charakteristické pro jednotlivé druhy sladů [35, 38]. Na hvozdění navazuje odkličování sladu, při němž se slad zbaví kořínků, poškozených zrn a prachu, a současně se dochládí [38].

Čerstvě usušený slad není vhodný k okamžitému zpracování v pivovaru, ale je nutné nechat tuto surovinu až čtyři týdny odležet. Slad se po přečištění skladuje zejména v silech s automatickou regulací teploty a vlhkosti vzduchu a možností vhodného míchání [37].

### 2.10.2 Druhy sladu

Nejběžněji vyráběnými druhy sladů v České republice jsou světlý slad plzeňského typu a tmavý slad mnichovského typu, často uváděný jako bavorský slad. Přejídným typem mezi světlými a tmavými slady je slad vídeňský. Další typy speciálních sladů slouží pro zvýraznění určitých kvalitativních a specifických vlastností základních typů světlých a tmavých piv. Jednotlivé druhy sladů s typickými vlastnostmi se získávají výběrem odrůd ječmene a úpravami technologie máčení, klíčení a hvozdění. Podle požadovaných vlastností určitého druhu sladu se regulací technologických parametrů máčení a klíčení zajistí potřebná degradace vysokomolekulárních látek. Regulací hvozdění je poté dotvořena rozdílná tvorba barevných a aromatických látek [42].

Mezi speciální slady řadíme karamelové slady, barvicí slady, nakuřované slady, melanoidinové slady, diastatické slady, proteolytické slady, slady zvyšující redoxní kapacitu piva, slady pro výrobu piva pro celiaky aj. [42]. Některé typy základních a speciálních sladů jsou zobrazeny na Obrázku 11.

**Světlý slad plzeňského typu** je charakteristický nižší hodnotou barvy kongresní sladiny a barvy po povaření. Má dostatečné proteolytické rozluštění i aktivitu amylolytických enzymů zajišťujících dokonalé zcukření rmutů a sladiny. Tento typ sladu se používá pro výrobu světlých piv typu ležáků, konzumních piv a speciálních piv s různou koncentrací původní mladiny [37, 38, 42].

**Tmavý mnichovský slad** má typické vysoké hodnoty barvy kongresní sladiny, vyšší obsah bílkovin, nižší extraktivnost a aktivitu enzymů. Aroma je výrazné, čehož se dosáhne hlubším rozluštěním při klíčení. Ječmen pro výrobu mnichovského sladu je klíčen o 1 až 2 dny déle s vyšším obsahem vody a při vyšší teplotě než ječmen pro výrobu světlého sladu. Tento druh sladu se využívá pro přípravu tmavých piv [37, 38, 42].



**Obrázek 11:** Základní a speciální druhy sladů [47]

## 2.11 Pivo

Pivo je slabě alkoholický nápoj, který se vyrábí z obilného sladu, vody a chmele působením mikroorganismů pivovarských kvasinek, zejména *Saccharomyces cerevisiae* [37].

Chemické složení piva je velice rozmanité. Odhaduje se, že pivo obsahuje přes tři tisíce různých látek, z nichž se většina vyskytuje ve stopových množstvích. Mezi základní složky patří voda, jejíž kvalita přímo ovlivňuje kvalitu výsledného piva. Dále jsou to sacharidy, bílkoviny, oxid uhličitý, minerální látky, vitamíny, polyfenolové sloučeniny, pryskyřice, silice, hořké látky z chmele aj. Z vitamínů obsažených v pivu jsou nejvýznamnější především vitamíny ze skupiny B, jako je thiamin (B<sub>1</sub>), riboflavin (B<sub>2</sub>), pyridoxin (B<sub>6</sub>) a kobalamin (B<sub>12</sub>). Významné je také zastoupení minerálních látek, kde kromě draslíku a sodíku je v pivu obsažen fosfor, hořčík, železo, chrom, měď, zinek. Polyfenolové látky obsažené v pivu patří mezi nejdůležitější přirozené antioxidanty, které mohou chránit lidský organismus před působením volných radikálů. Polyfenoly chmele ovlivňují antioxidační aktivitu piva a potenciálně také senzoryckou stabilitu piva [48, 49]. V Tabulce 7 je uvedeno průměrné složení dvanáctistupňového světlého ležáku vyráběného v ČR.

**Tabulka 7:** Průměrné složení dvanáctistupňového světlého ležáku vyráběného v ČR [37]

Znak	Hodnoty	Jednotky
Původní extrakt	11,8	hmotn. %
Alkohol	3,9	hmotn. %
Alkohol	5,0	obj. %
Voda	920	g·l <sup>-1</sup>
Isohumulony	27	mg·l <sup>-1</sup>
Oxid uhličitý	5	g·l <sup>-1</sup>
Energetický obsah	1820	kJ·l <sup>-1</sup>
Sacharidy celkově	30	g·l <sup>-1</sup>
Dextriny	25	g·l <sup>-1</sup>

Znak	Hodnoty	Jednotky
Zkvasitelné cukry	5	g·l <sup>-1</sup>
β-glukany	250	mg·l <sup>-1</sup>
Pentozany	200	mg·l <sup>-1</sup>
Bílkoviny	4,3	g·l <sup>-1</sup>
Aminokyseliny (85 % slad, 15 % kvasinky)	140	mg·l <sup>-1</sup>
Nukleové kyseliny	1	mg·l <sup>-1</sup>
Polyfenoly (75 % slad, 25 % chmel)	185	mg·l <sup>-1</sup>
Organické kyseliny (octová, citronová, glukonová, mléčná, malonová, pyrohroznová)	450	mg·l <sup>-1</sup>
Vitamíny:		
Thiamin B1	70	μg·l <sup>-1</sup>
Riboflavin B2	250	μg·l <sup>-1</sup>
Niacin	5000	μg·l <sup>-1</sup>
Pantothenová kyselina	1200	μg·l <sup>-1</sup>
Pyridoxin B6	300	μg·l <sup>-1</sup>
Kobalamin B12	2	μg·l <sup>-1</sup>
Listová kyselina	200	μg·l <sup>-1</sup>
Estrogeny	< 40	μg·l <sup>-1</sup>
Minerální látky:		
Draslík	360	mg·l <sup>-1</sup>
Sodík	60	mg·l <sup>-1</sup>
Vápník	35	mg·l <sup>-1</sup>
Hořčík	85	mg·l <sup>-1</sup>
Fosfor	500	mg·l <sup>-1</sup>
Vedlejší produkty kvašení:		
Glycerol	1500	mg·l <sup>-1</sup>
Alifatické a aromatické alkoholy	100	mg·l <sup>-1</sup>
Estery	25	mg·l <sup>-1</sup>
Celkový SO <sub>2</sub>	5	mg·l <sup>-1</sup>

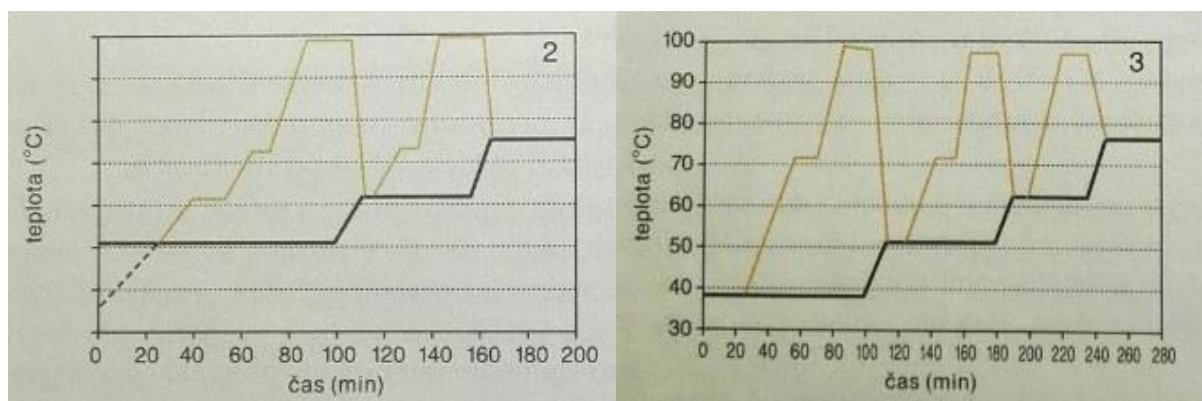
### 2.11.1 Technologie výroby piva

Výroba piva (schéma vyznačeno na Obrázku 13) začíná ve šrotovně, kde dochází k rozemletí sladu. Mechanické rozrušení zrna je potřebné pro zpřístupnění extraktivních látek sladu obsažené v endospermu a urychlení jejich rozpouštění a biochemické změny, které probíhají v dalších fázích přípravy mladiny. Endosperm obsahuje především škrob, dále dusíkaté látky různé molekulové hmotnosti, neškrobové polysacharidy a enzymy. Množství a složení extraktu získaného ve varním procesu z rozemletého sladu závisí na vlastnostech odrůdy ječmene, ze kterého byl slad připraven, na rozluštění sladu, výsledku mlecího efektu a technologii přípravy mladiny [37]. Šrotovna se nachází v blízkosti varny, jelikož sladový šrot je nevhodné uchovávat

delší dobu, z důvodů oxidačních změn způsobených vzdušným kyslíkem, jež má neblahé účinky na senzoryckou stabilitu piva [37].

Následuje proces vystírání, jehož cílem je dobře smíchat sladový šrot s nálevem varní vody ve vystíracích nádobách. Důležitá je teplota vody použitá na vystírku, která ovlivní rychlost průběhu následujících rmutovacích postupů. Teplota vystírací vody se volí podle kvality zpracovávaného sladu, postupu rmutování, zařízení varní soupravy a požadavků na kvalitu mladiny [37].

Třetina objemu této směsi se převede do rmutovací pánve, kde dochází k postupnému zahřívání na technologicky důležité teploty (kyselinotvorná teplota 35 - 38 °C, peptonizační teplota 45 - 50 °C, nižší cukrotvorná teplota 60 - 65 °C, vyšší cukrotvorná teplota 70 - 75 °C). Tento proces se nazývá rmutování. Nejvýznamnějším procesem rmutování je štěpení škrobu na sacharidy zkvasitelné pivovarskými kvasinkami působením amylolytických enzymů [35, 37]. Rmutování může probíhat dekokčním způsobem (Obrázek 12), kde dochází k povařování dílčích rmutů – podle počtu se dělí na jednormutové, dvourmutové a třírmutové. Nejčastěji se používají postupy dvourmutové. Třírmutový postup využívají např. pro výrobu světlého piva v Plzeňském Prazdroji. Infuzní postupy zajišťují rozpouštění a štěpení extraktu sladu dlouhodobým účinkem sladových enzymů bez mechanického a tepelného působení povařování rmutů [37].



**Obrázek 12:** Příklady dekokčních rmutovacích postupů (2 - dvourmutový postup, 3 - třírmutový postup, černá křivka – průběh teplot ve vystírací nádobě, oranžová křivka – průběh teplot ve rmutovací pánvi) [37]

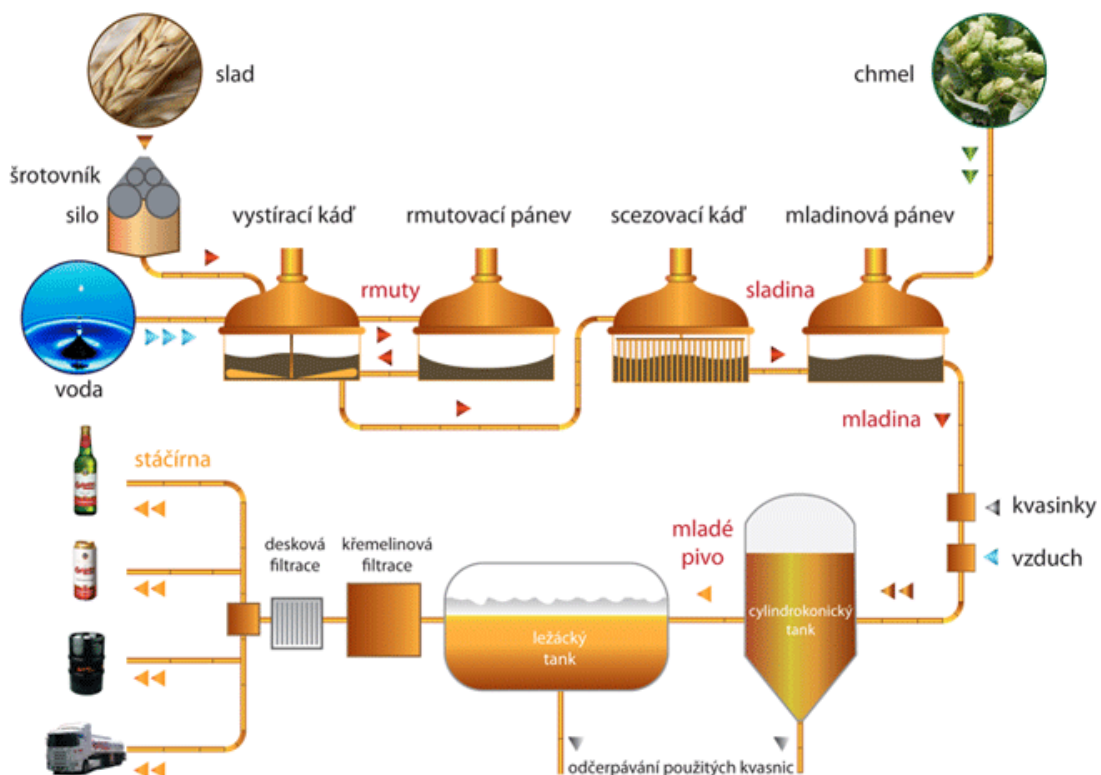
Po odrmutování následuje proces scezování. Je to fyzikální proces, při kterém se oddělí tzv. předek (roztok obsahující extraktivní látky sladu) od zbytků sladového šrotu neboli mláta [37]. Mláto se poté vyluhuje teplou vodou (proces vyslazování mláta) a výluh, tzv. výstřelek, se míchá s předkem [35].

Vzniklá sladina se v mladinové pánvi vaří s chmelem po dobu 90-120 minut, přičemž výsledným produktem je horká mladina. Při chmelovaru se mimo jiné odpaří přebytečná voda a mladina získá potřebnou koncentraci extraktu pro určitý druh piva [35, 38]. Dojde k inaktivaci enzymů, které přetrvaly předchozí proces výroby sladiny. Cílem je také mladinu sterilovat a inhibovat residuální mikroflóru z vody, sladu, chmele a zařízení, dále rozpustit a izomerovat hořké látky chmele, vytvořit produkty Maillardovy reakce a snížit hodnotu pH [37].

Uvařená mladina se ve varně pivovaru musí ochladit na zákvasnou teplotu, kdy se současně provzdušní a odstraní se z ní vyloučené kaly. Do ochlazené mladiny se přidají pivovarské kvasinky, převážně druh *Saccharomyces cerevisiae*. Základní rozdíly mezi spodními a svrchními kvasinkami je složení genetického materiálu, rozdílné složení buněčných stěn, stupeň zkvašování  $\alpha$ -rafinosy a rozdílné technologicky významné vlastnosti. Dojde k první fázi kvašení, tj. hlavní kvašení, za vzniku mladého piva. V této fázi vznikají jako základní produkty kvašení ethanol, oxid uhličitý a biomasa a dále řada vedlejších metabolitů, které mají zásadní význam pro buket piva. Doba hlavního kvašení je 7 až 12 dnů, v závislosti na koncentraci původní mladiny, teplotě kvašení a použitém kvasničném kmenu. Na závěr hlavního kvašení se podstatná část kvasnic oddělí, u spodního kvašení flokulací a sedimentací na dně nádob, u svrchního kvašení vyplavením na hladinu kvasného média [35, 37].

Druhá fáze kvašení, jež se nazývá dokvašování a zrání piva, probíhá za nižších teplot a za mírného přetlaku. Nejdůležitějšími reakcemi jsou pozvolné zkvašování zbylého extraktu zajišťující syčení piva oxidem uhličitým, zrání chuti a vůně piva způsobené změnou složení koloidních a těkavých látek a přirozené čiření vylučováním vysokomolekulárních látek z roztoku. Dokvašování a zrání piva probíhá v ležáckých nádobách v podzemních sklepích nebo v izolovaných chlazených budovách [35, 37].

Zralé pivo se filtruje, aby se po dobu několika měsíců nezměnila jeho čírost. V průběhu filtrace se z piva oddělují zákalotvorné částice a zbylé kvasničné buňky. Pro zvýšení biologické trvanlivosti piva dochází k jeho tepelným úpravám, k tzv. pasteraci, což je tepelná inaktivace mikroorganismů, které mohou kazit pivo [37, 38]. Takto připravené pivo se stáčí do přepravních obalů, nejčastěji láhví, plechovek a sudů [35].



Obrázek 13: Schéma výroby piva [50]

### 2.11.2 Druhy pív

Podle barvy rozeznáváme piva světlá, polotmavá a tmavá, popřípadě jejich směsi zvané piva řezaná [37]. Piva světlá jsou vyráběná převážně ze světlých sladů. Piva polotmavá a tmavá jsou vyráběná z tmavých sladů, sladů karamelových, případně barevných sladů ve směsi se světlými slady. Piva řezaná jsou vyráběná při stáčení smícháním světlých a tmavých pív stejné skupiny [51].

Dalším kritériem třídění piva je způsob kvašení. Jedná se o piva spontánně kvašená, jako je Lambik, Geuze, Faro a Kriek. Piva svrchně kvašená jsou vyráběná za použití kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *cerevisiae*. Řadíme zde piva typu Ale, Porter, Stout, Altbier, Kölsch a piva pšeničná. Piva spodně kvašená jsou vyráběná za použití kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *uvarum*. Kvašení probíhá za nižších teplot, tj. od 0 – 5 °C přičemž kvasinky při fermentačním procesu klesají na dno kádě. V České republice se až na výjimky vyrábějí pouze piva spodně kvašená [37, 51, 52].

Podle obsahu původního extraktu mladiny se piva dělí na lehká, která mají koncentraci extraktu původní mladiny do 7,99 %, piva výčepní mající extrakt původní mladiny v rozmezí 8,00-10,99 %, ležáky s 11,00-12,99 % extraktu původní mladiny a piva speciální, která mají koncentraci extraktu původní mladiny nad 13,00 % [38]. Obsah alkoholu v pivu odpovídá přibližně třetině hodnoty extraktu původní mladiny [35].

Dále se u nás vyrábějí piva nealkoholická s koncentrací alkoholu do 0,5 % objemových, piva se sníženým obsahem alkoholu od 0,5 % do 1,2 % objemových, portery s minimálně 18 % extraktu, piva se sníženým obsahem cukrů, pšeničná piva, kvasnicové pivo a piva ochucená [37, 38].

### 2.12 Gushing

Gushing (Obrázek 14) je nežádoucí jev, při kterém dochází k masivnímu samovolnému přepěnění piva po otevření láhve. Tento jev se netýká pouze piva, ale je pozorován i u mnoha dalších sycených nápojů [53]. Jelikož má pivní pěna podstatný vliv na vnímání spotřebitele, který se tak rozhoduje o kvalitě výrobku, je přepěnění piva negativní jev, který tak může poškozovat dobré obchodní jméno pivovaru. Proto se také jejímu studiu věnuje velká pozornost [54]. Gushing se může vyskytovat ojediněle nebo ve více pivovarech současně. Má sezónní povahu, což vedlo k souvislosti s jednotlivými sklizněmi ječmene a k hypotéze, že gushing je způsoben masivním pomnožením plísní, většinou v souvislosti s vlhkým počasím [42].

Gushing piva se tradičně rozděluje na primární a sekundární gushing. Primární gushing souvisí s tvorbou látek vznikajících při napadení obilky ječmene mikroskopickými vláknitými houbami. K těmto látkám patří zejména hydrofobiny. Jedná se o stabilní povrchově aktivní proteiny o velikosti kolem 10 kDa, které jsou resistantní vůči teplotám blízkým se teplotě varu vody. Mechanismus primárního gushingu zahrnuje tvorbu stabilních mikrobublinek z hydrofobinů, které slouží jako nukleační centra. Mikrobublinky tvoří centra pro uvolnění a další růst bublin oxidu uhličitého, které stoupají kapalinou a vynášejí rozpuštěný plyn z kapaliny a vyvolávají tedy gushing [42, 53, 55, 56, 57].

Příčinou sekundárního gushingu je zejména přítomnost zákalu, nečistot z lahví, kovových iontů či krystalků šřavelanu vápenatého v pivu [55]. Další centra pro uvolnění mikrobublinek oxidu uhličitého mohou zahrnovat i mikrobublinky jiných plynů, např. vzduchu, nepravidelný povrch lahví, pevné částice uvolněné z korunek nebo mikroorganismy, zejména kvasinky a plísně přítomné v pivě [42].

Stanovení náchylnosti piva ke gushingu má význam pro posouzení stočeného piva před expedicí. Složitější je předpověď gushingu ze surovin, nebo meziproduktů výroby piva, jako jsou slad, sladina, mladina nebo dokvašované pivo [58].



Obrázek 14: Gushing [59]

### 2.13 Přenos mykotoxinů ze surovin do piva

Fusariové mykotoxiny jsou poměrně stabilní sloučeniny a ve většině případů nepodléhají významné degradaci v průběhu běžných technologických operací a mohou přecházet do výsledných produktů určených k lidské spotřebě [60]. Existuje mnoho studií zabývajících se osudem přirozeně se vyskytujících nebo uměle přidávaných mykotoxinů v různých fázích výroby piva, které prokázaly průnik mykotoxinů z kontaminovaného zrna do piva [61]. Nejvíce informací je známo o DON, protože tento mykotoxin se v ječmeni vyskytuje nejčastěji a na vyšších hladinách než ostatní fusariové mykotoxiny [60].

Během sladování kontaminovaného ječmene vznikají vhodné podmínky pro rozvoj a růst toxinogenních plísní. K produkci mykotoxinů může docházet s růstem plísní a to zejména v průběhu máčení, klíčení a případně i hvozdění [62]. Schwarz a jeho spolupracovníci mikrosladovali v roce 1995 několik vzorků ječmene, které byly přirozeně infikovány *Fusarium graminearum* a kontaminovány mykotoxinem DON ( $4,8 - 22,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). V průběhu máčení ječmene se koncentrace DON snížila na hodnoty blízké nebo vyskytující se pod limitem kvantifikace. Důvodem tohoto významného poklesu může být rozpustnost DON ve vodě [63]. Obecně lze říci, že proces máčení přispívá k redukci mykotoxinů, které díky své polaritě zpravidla přechází do máčecí vody [60]. Po pětidenním procesu klíčení byl zaznamenán nárůst

koncentrace DON o 18 – 114 % ve srovnání s původním infikovaným ječmenem [63]. Během hvozdní nebyla pozorována žádná změna v hladinách koncentrace DON, spíše došlo k další mírné redukci. Je známo, že DON je stabilní až do 170 °C v neutrálním až kyselém prostředí [60, 62]. Množství toxinů produkovaných v různých stádiích sladování je závislé na mnoha faktorech, včetně kmene přítomné plísně, životaschopnosti a koncentrace plísně nebo také na přítomnosti synergických a antagonistických organismů [62].

DON je v průběhu procesu vaření piva velmi stabilní. Niessen (1993) ve své studii ukazuje, že se během rmutování koncentrace DON čtyřnásobně zvýšila. Z toho se dá usuzovat, že se DON může během rmutování uvolňovat z proteinových konjugátů [62]. Některé studie ukázaly zvýšení hladiny DON během kvašení. Böhm-Schraml a jeho spolupracovníci (1997) uvedli, že během prvních 20 hodin fermentace došlo k nárůstu koncentrace DON, nicméně následně docházelo postupně k jejímu snižování. Pokles hladiny DON by mohl být důsledkem absorpce buňkami kvasinek nebo může souviset s extracelulárním metabolismem [62]. Schwarz a kol. v roce 1995 vařili pivo z přirozeně infikovaného ječného sladu, který obsahoval 1,8 – 17,3  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  DON. Výsledky ukázaly, že v konečném pivu zůstalo 80 až 93 % DON a pouze stopové množství se nacházelo v mlátě [63].

## 2.14 Výskyt mykotoxinů v pivu

Pivo je nejpopulárnější alkoholický nápoj na světě. V Evropě je 37 % alkoholu spotřebováno ve formě piva [64]. Přední místo ve statistikách o spotřebě piva z roku 2015 zaujímá Česká republika se 143 litry na osobu a rok. Následuje Německo a Rakousko se 106 a 105 litry na osobu a rok [65]. Při takto extrémně vysoké konzumaci je velmi důležitá kontrola obsahu nežádoucích látek v pivu i ve vstupních surovinách, mezi které bezesporu patří i mykotoxiny. Vzhledem k tomu, že kontaminace sladovnického ječmene a dalších cereálií určených k výrobě piva plísněmi rodu *Fusarium*, stejně tak i životaschopnost těchto plísní v obilí, jsou závislé na klimatických podmínkách a nejsou tedy konstantní, můžou být hladiny DON a jiných fusariotoxinů značně proměnlivé. Proto jsou roční průzkumy fusariotoxinů v pivu zapotřebí [66]. Stručný přehled některých studií zabývajících se výskytem mykotoxinů v pivu je uveden v Tabulce 8.

**Tabulka 8:** Některé studie zobrazující výskyt mykotoxinů (DON, OTA, HT-2, ZON) v pivu

Mykotoxin	Země původu piv	Positivní / Celkem	$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	Reference
DON	Německo	20 / 24	24,5 – 43,1	Rodríguez-Carrasco et al. [67]
	Španělsko	45 / 60	25,2 – 47,7	
	Česká republika	89 / 119	2,0 – 44,0	Běláková et al. [68]
	Rakousko	25 / 33	4,5 – 29,5	Papadopoulou-Bouraoui et al. [66]
	Francie	24 / 27	4,1 – 30,3	
OTA	Německo	— / 250	0,01 – 0,29	Bresch et al. [69]
	Itálie	3 / 10	0,020 – 0,022	Visconti et al. [70]
	Španělsko	24 / 31	0,044	Araguas et al. [71]
	Česká republika	107 / 132	< 0,001 – 0,195	Běláková et al. [72]

Mykotoxin	Země původu piv	Positivní / Celkem	$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	Reference
HT-2	Německo	9 / 24	29,3 – 38,2	Rodriguez-Carrasco et al. [67]
	Francie	1 / 5	29,5	
	Španělsko	2 / 60	25,1 – 30,4	
ZON	Německo	44 / 44	0,35 – 2,0	Bauer et al. [73]
	Polsko	8 / 57	< 0,259 – 0,368	Kuzdralinski et al. [74]
	Irsko	2 / 2	0,458 – 0,546	

## 2.15 Vzorkování pro analýzu mykotoxinů

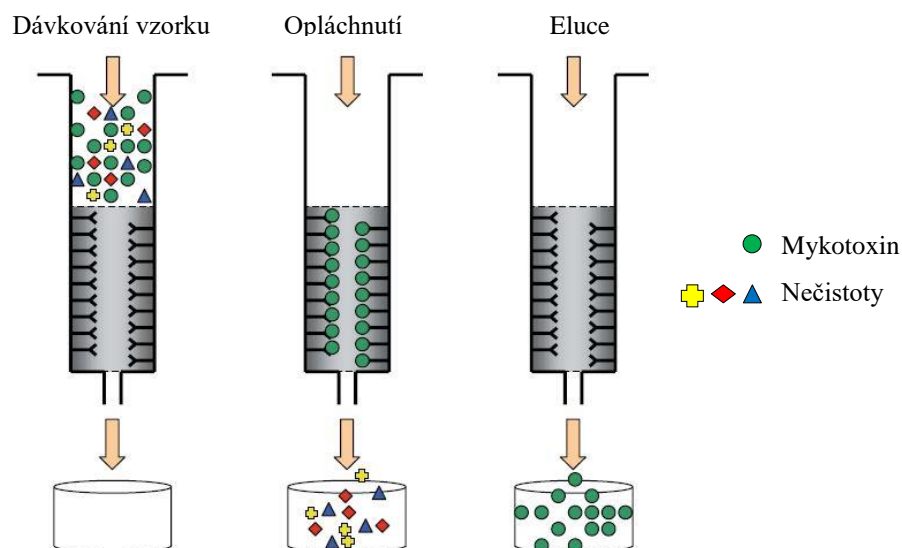
Proces vzorkování je vícestupňový proces, který je zahájen odběrem primárního vzorku. Jeho dalším postupným zmenšováním se získá laboratorní vzorek, který vstupuje do analytické laboratoře, kde se z něho připraví vzorek analytický, přičemž oba vzorky musí splňovat podmínku vhodné velikosti. Odběr vzorku, jeho další zmenšování a skladování musí probíhat způsobem, který neovlivní žádnou významnou vlastnost vzorkovaného objektu [75].

Při vzorkování potravin za účelem jakékoliv analýzy je obecně považováno za nezbytné, aby odebraný vzorek reprezentoval celou šarži. Mykotoxiny patří mezi analyty, které jsou v potravinách a zemědělských komoditách distribuovány obzvláště nehomogenně. Je to dáno zejména tím, že mikroskopické vláknité houby produkující mykotoxiny se běžně vyskytují v izolovaných místech, tzv. ložiscích, nebaleného nebo sypkého materiálu, případně na jednotlivých plodech, semenech nebo zrnech [76]. Vzhledem k vysoké heterogenitě mykotoxinů jsou pro získání reprezentativních vzorků velmi důležité plány odběru vzorků a je nezbytné odebrat dostatečné množství dílčích vzorků [76, 77].

## 2.16 Extrakce a čištění vzorku

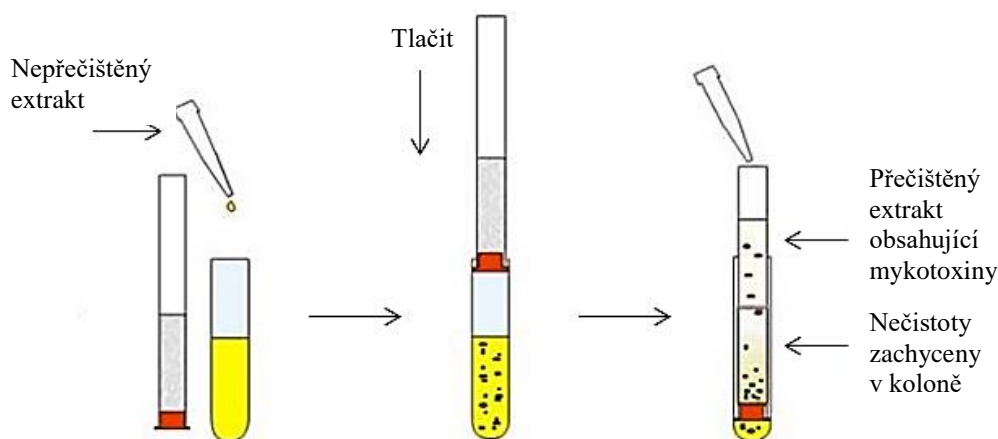
Většina analytických metod využívající se ke stanovení mykotoxinů je závislá na správném provedení extrakčních a čistících metod, s výjimkou metody ELISA, u které není potřeba vzorek přečišťovat [78]. Způsob použití extrakce k odstranění mykotoxinů z matrice závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech jak matrice, tak i stanovovaného toxinu. Čištěním vzorku se odstraní látky přítomné v extraktu, které by mohly interferovat s detekovaným analytem [77, 78].

K čištění vzorků v analýze mykotoxinů jsou široce používané imunoafinitní kolonky (IAC), (Obrázek 15). Kolonky obsahují protilátku specifickou k mykotoxinu imobilizovanou na pevném nosiči. Po průchodu extraktu vzorku kolonkou se molekuly mykotoxinu selektivně naváží na protilátku. Promývacím puřrem se z kolonky odstraní případné nečistoty. Nadávkováním elučního rozpouřtředla na kolonku se molekuly mykotoxinu uvolní z protilátky a dojde tak k jejich eluci z kolonky [79].



**Obrázek 15:** Princip imunoafinitní kolonky [79]

Další velice účinnou a rychlou metodou k extrakci a čištění vzorků je extrakce tuhou fází (SPE). Tato metoda extrakce je založena na selektivním zadržování látek přítomných v extraktu vzorku na tuhém sorbentu [79]. Jako příklad může být uvedena kolonka MycoSep® ROMER (Obrázek 16), která je vtačována do zkumavky obsahující extrakt vzorku. Extrakt je tak nucen stoupat vzhůru přes kolonku a tím se filtrovat. Nečistoty zůstávají zachyceny v čistící kolonce a přečištěný extrakt obsahující mykotoxiny se poté odejme [80].



**Obrázek 16:** Extrakce na pevné fázi na kolonce MycoSep® ROMER [80]

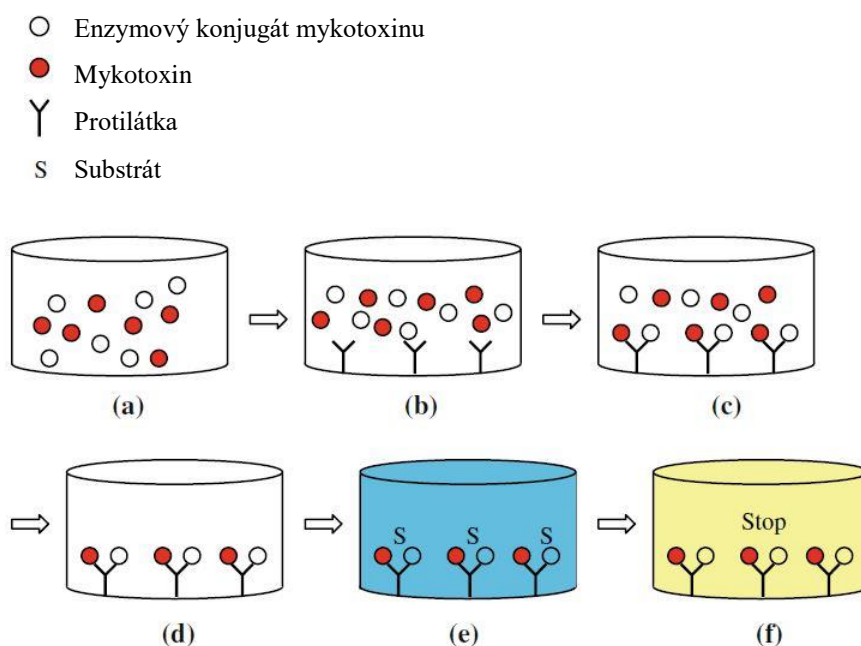
## 2.17 Analytické metody stanovení mykotoxinů

Stanovení mykotoxinů a způsob rychlé a přesné kvantitativní a kvalitativní analýzy byly předmětem zájmu mnoha výzkumníků. Byly vyvinuty různé analytické metody, které mají různou citlivost a přesnost. Běžnými metodami jsou chromatografie na tenké vrstvě, vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí nebo fluorescenční detekcí nebo také imunochemické metody. V dnešní době je však rutinní metodou používanou k analýze mykotoxinů a jejich derivátů kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí [2, 77].

### 2.17.1 Imunochemická metoda ELISA

V dnešní době se ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) stala velice rozšířenou metodou k rychlému stanovení mykotoxinů vzhledem k její relativně nízké ceně a snadné aplikaci. Tato metoda je jednoduchá, specifická, citlivá a přenosná pro použití v terénu a může být zcela kvantitativní. V porovnání s konvenčními metodami, jako je chromatografie na tenké vrstvě nebo vysokoúčinná kapalinová chromatografie, jsou nároky na extrakci a čištění vzorku často menší. Testovací sady jsou navíc komerčně dostupné pro významné mykotoxiny, jako jsou aflatoxiny, fumonisiny, trichotheceny, zearalenon, ochratoxin A, citrinin [77, 78, 79].

ELISA je založena na reakci antigenu s protilátkou. Princip ELISA testu je znázorněn na Obrázku 17. Antigen (mykotoxin) se smísí s enzymovým konjugátem mykotoxinu a aplikují se do jamek mikrotitrační destičky jejíž stěny jsou potaženy protilátkou specifickou k antigenu. Antigen soutěží s konjugátem o omezený počet vazebných míst na molekulách protilátky. Po promytí jamek substrátem dojde ke vzniku modrého zbarvení. K zastavení reakce se využívá stop činidlo, přičemž dojde ke změně zbarvení. Detekce se provádí spektrofotometricky při vhodné vlnové délce [79].



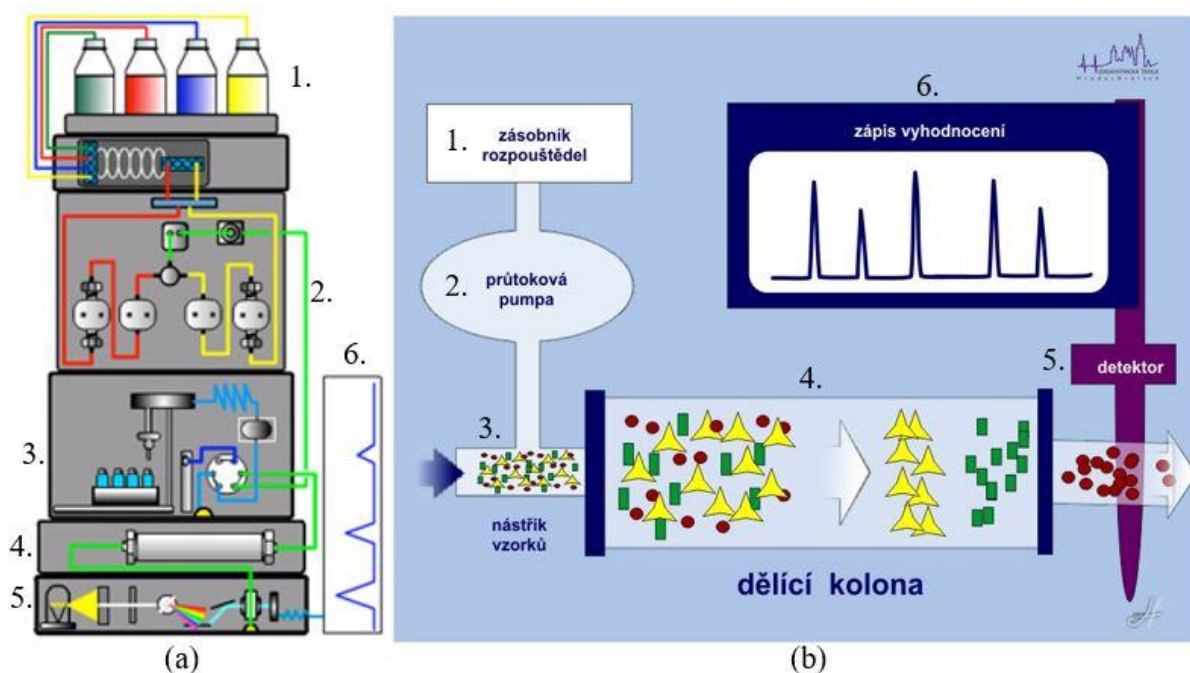
**Obrázek 17:** Princip kompetitivní ELISA pro analýzu mykotoxinů. (a) Smíchání vzorku s konjugátem; (b) aplikace směsi do protilátkou potažených jamek; (c) vázání mykotoxinu na protilátku během inkubační doby; (d) vymytí nevázaných složek v promývacím kroku; (e) přidání substrátu za vzniku modrého zbarvení; (f) přidání stop roztoku pro zastavení reakce [79]

### 2.17.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je separační technika, která s vysokou přesností a specifitou separuje směsi látek na jednotlivé složky. Její výhodou při použití pro rutinní analýzu je jednak to, že může být plně automatizovaná a také příprava a čištění vzorků je poměrně jednoduché [81]. Kapalinová chromatografie je založená na separaci látek mezi dvě

nemísitelné fáze: mobilní a stacionární. Stacionární fáze je umístěná v chromatografické koloně ve formě sorbentu. Kapalná mobilní fáze pak tímto sorbentem protéká. Stacionární fáze může být buď tuhá látka (adsorpční, iontoměničová, gelová a afinitní chromatografie) nebo kapalina zakotvená na tuhém nosiči (rozdělovací chromatografie) [82]. U HPLC s normální fází (NP-HPLC) je mobilní fáze nepolární (hexan, metylenchlorid, atd.) a stacionární fáze polární (silikagel). Molekuly vzorku jsou více či méně přitahovány k částicím v koloně oproti mobilní fázi. Méně polární molekuly jsou pak eluovány jako první. HPLC s obrácenou fází (RP-HPLC) využívá polární mobilní fázi (voda, polární rozpouštědla, nebo jejich směsi) a nepolární stacionární fázi (C-18 nebo fenyl) [81]. U vysokoúčinné kapalinové chromatografie je mobilní fáze přiváděná do systému pomocí čerpadla za vysokého tlaku. Eluce mobilní fáze může být buď isokratická, kdy je složení mobilní fáze konstantní, nebo gradientová, kdy se složení mobilní fáze mění v průběhu analýzy [82].

Kapalinový chromatograf se skládá z několika základních částí. Schéma a princip kapalinového chromatografu je znázorněn na Obrázku 18. K uchování mobilní fáze slouží zásobníky mobilní fáze a k jejímu transportu se používá vysokotlaké čerpadlo. Autosampler, popřípadě manuální dávkovací ventil, slouží k dávkování vzorku na chromatografickou kolonu, ve které dochází k samotné separaci látek. Separovaný analyt vycházející z kolony je detekován při průchodu detektorem. Signál z detektoru je poté převeden do chromatogramu, který je tvořen řadou píků [82].



**Obrázek 18:** Schéma kapalinového chromatografu (a) [83]; Princip kapalinové chromatografie (b) [84]

Mobilní fáze se uchovává ve skleněných nádobách, ale je třeba mít na paměti, že může docházet k uvolňování silikátu ze skla, a proto je vhodné používat k uchování mobilní fáze vždy stejné zásobní láhve. Nevhodné je použití láhví z plastu, jelikož zde dochází ke kontaminaci mobilní fáze uvolňováním látek použitých při přípravě plastu. Zásobníky mobilní fáze obsahují speciální filtry, které zachytávají suspendované tuhé částice před vstupem mobilní fáze do HPLC systému [82].

Odplynění mobilní fáze je důležitým krokem úpravy mobilní fáze před vstupem na chromatografickou kolonu. Provádí se zejména proto, aby nedocházelo k uvolňování bublinek rozpuštěných plynů. Kyslík rozpuštěný v mobilní fázi má negativní vliv na detekci, zejména při fluorescenční detekci. Přítomný kyslík má schopnost zhášení emise záření, a je tak příčinou ztráty účinnosti kolony. Odplynění se provádí buď probubláváním heliem nebo vakuovým odplyňovačem, který je rychlejší a v dnešní době více používaný [82].

Základní vlastností každého čerpadla je zajištění stabilního průtoku mobilní fáze. Kvantitativní výsledky by v opačném případě mohly být nepřesné. Existuje několik typů čerpadel. Pneumatická čerpadla pracují za konstantního tlaku a zcela bezpulzně, avšak kvůli konstrukční náročnosti se tento typ čerpadel v současnosti nepoužívá. U čerpadel injekčního typu je průtok mobilní fáze kolonou konstantní a je také bezpulzní. Nevýhodou ovšem je limitace objemu mobilní fáze, daný objemem pracovního válce, a také cena čerpadla. Pístová čerpadla umožňují neomezené dávkování mobilní fáze bez přerušování toku. V důsledku střídání sací a výtlačné fáze ovšem dochází ke kolísání průtoku mobilní fáze. To je vyřešeno zařazením další hlavy, jejíž píst pracuje v opačné fázi. Nejvýhodnější čerpadlo se dvěma písty je se sériovým uspořádáním [82].

Chromatografické kolony se vyrábějí převážně z nerezové oceli. A to proto, že je vysoce antikorozivní. Vnitřní povrch kolony by měl odolávat vysokým tlakům a také chemickému působení mobilní fáze. Jsou používány kolony o vnitřním průměru 2,1 až 5 mm a délce 10 až 300 mm. Velikost částic náplně kolony se pohybuje od 1 až do 10  $\mu\text{m}$  [82].

K identifikaci separovaných látek je podstatný retenční čas. Je to doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky. Kvantitativní analýza se provádí počítačovou integrací plochy pod píkem [85].

### **2.17.3 Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC)**

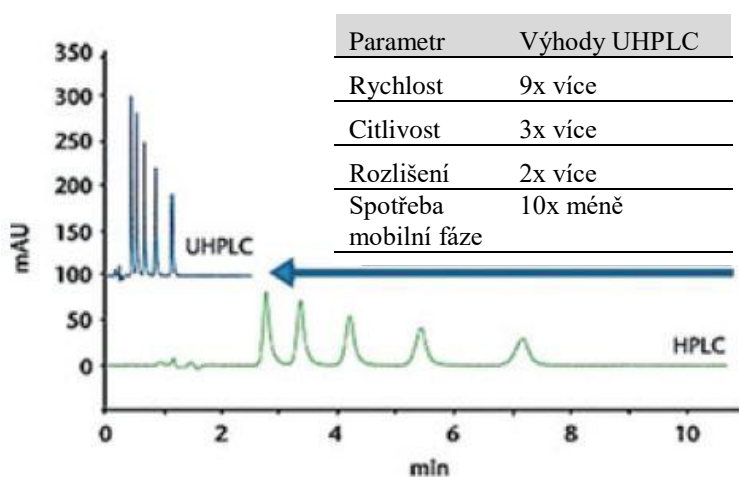
Cílem moderních trendů v kapalinové chromatografii je v první řadě získání co nejrychlejší chromatografické separace při zachování nebo zlepšení její kvality z hlediska účinnosti a rozlišení, ale i citlivosti daného měření. V ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografii (UHPLC) je pro zvýšení účinnosti separace využíváno částic chromatografického sorbentu menších než 2  $\mu\text{m}$  [82]. Při redukci částic zlepšíme převod hmoty, tím potlačíme rozmývání, a tedy zvýšíme účinnost. Přitom lze při použití takto malých částic účinnosti dosáhnout při mnohem vyšších průtokových rychlostech, což má za následek rychlejší separaci. Je ovšem nutné zdůraznit, že kolony naplněné sorbentem s tak malým průměrem částic generují mnohonásobně vyšší zpětný tlak než běžné chromatografické kolony [86]. Při optimální lineární průtokové rychlosti bude částice o velikosti 1,7  $\mu\text{m}$  vytvářet zpětný tlak 27x vyšší než 5  $\mu\text{m}$  částice [82].

Konvenční kapalinové chromatografy pracují při tlacích 30 – 40 MPa, zatímco UHPLC při 100 MPa a více. UHPLC systém musí tedy v první řadě být schopen pracovat za ultra vysokých tlaků a musí splňovat určité požadavky, které jsou zaměřeny zejména na robustnost čerpadla. Dále jsou kladeny vysoké nároky na robustnost dávkovacího systému, rychlé dávkovací cykly,

přesné dávkování velmi malých objemů, co nejmenší zpoždění gradientu, minimální mimokolonové objemy, vhodné stacionární fáze [82].

Pro UHPLC jsou dostupné stacionární fáze pro reverzní, normální i iontově výměnnou chromatografii. Základním materiálem je buď silikagel, nebo hybridní materiál a velikost částic se obvykle pohybuje od 1,5 do 2,0  $\mu\text{m}$ . Kolony mají většinou délku od 50 do 150 mm [82].

Díky této technologii lze zkrátit analýzy až devětkrát, citlivost zlepšit třikrát a dvakrát lze zlepšit rozlišení. Takové zrychlení se projeví jednak v úspoře energie a času, ale také v téměř desetinásobné úspoře organických rozpouštědel. Porovnání HPLC a UHPLC chromatogramu a výčet vylepšených parametrů UHPLC oproti HPLC je uvedeno na Obrázku 19 [86].



**Obrázek 19:** Porovnání HPLC a UHPLC chromatogramu (v tabulce je uveden výčet vylepšených parametrů UHPLC oproti HPLC) [86]

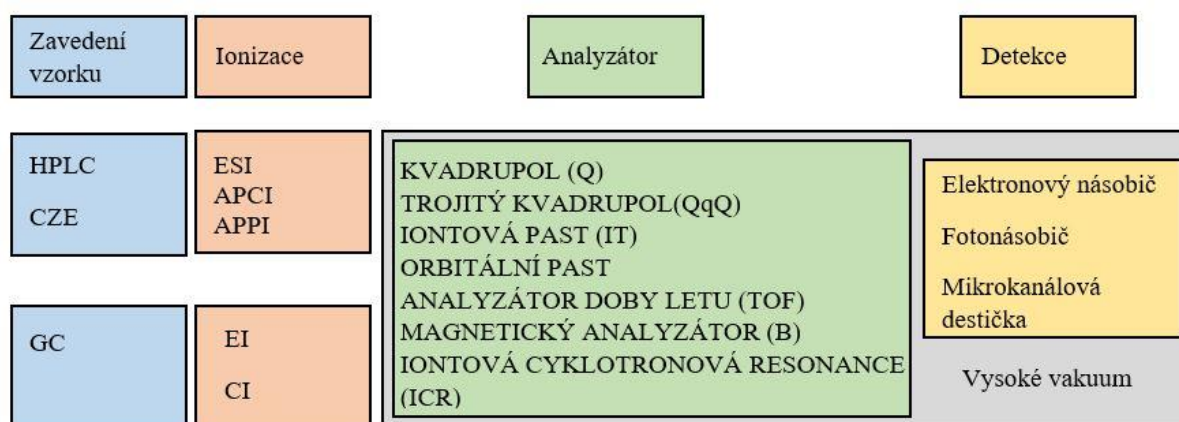
## 2.17.4 Detektory

Pro kapalinovou chromatografii se využívá celá řada detektorů, které jsou umístěny vždy za kolonou. Jedná se o UV-VIS detektory, fluorescenční detektory, vodivostní detektory, elektrochemický detektory, refraktometrické detektory a hmotnostně spektrometrické detektory [82, 87]. V této diplomové práci byl využit ke stanovení deoxynivalenolu hmotnostní detektor a ke stanovení ochratoxinu A detektor fluorescenční.

### 2.17.4.1 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometry (MS) jako detektory v HPLC patří do skupiny spojených technik. Jsou velmi specifické a kromě údajů z chromatogramu poskytují spektrální údaje o identitě látky [82]. Hmotnostní spektrometrie je separační technika, která převádí vzorek na ionizovanou plynnou fázi a vzniklé ionty separuje podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje  $m/z$ . Prvním krokem v této technice je odpaření vzorku. Následuje ionizace, která převádí molekuly na nabitě částice v iontovém zdroji. Poté dojde k akceleraci iontů do hmotnostního analyzátoru, který dělí vzniklé ionty na základě jejich poměru  $m/z$  a nakonec

dochází k detekci iontů [85]. Schématické znázornění procesu detekce MS, nejpoužívanějších ionizačních technik a přehled analyzátorů je uveden na Obrázku 20.



**Obrázek 20:** Schématické znázornění procesu detekce MS [82]

## Ionizační techniky

Existuje celá řada ionizačních technik, které se podle množství vnitřní energie po ionizaci dělí na tzv. tvrdé, kdy molekula při ionizaci získá nadbytek vnitřní energie, a měkké, které jsou šetrné a molekuly získávají mnohem menší množství energie, a proto zde méně pozorujeme fragmentové ionty. Ionizační techniky mohou probíhat za sníženého tlaku (EI, CI, MALDI) nebo za atmosférického tlaku (ESI, APCI, APPI), což má největší význam po spojení s HPLC/MS [88]. Pro různé typy látek se využívají různé typy ionizačních technik.

**Elektronová ionizace (EI)** patří do skupiny tvrdých ionizačních technik a jedná se o nejstarší ionizační techniku. Ionizace probíhá za pomoci wolframového nebo rheniového vlákna, které emituje svazek elektronů. Pokud se emitovaný elektron přiblíží k valenčním elektronům molekuly, tak dojde k ovlivnění jejich magnetických polí. To má za následek uvolnění valenčního elektronu a vzniku radikalkationtu. Vytěšňovací elektrodou jsou vzniklé ionty vypuzeny z iontového zdroje do hmotnostního analyzátoru. Nevýhodou EI je fakt, že ionty získávají nadbytek vnitřní energie, což může vést k rozsáhlé fragmentaci (rozpad na menší nabitě a nenabitě části). Kvůli tomu je nemožné určit molekulové hmotnosti některých typu látek. Výhodou ovšem je dostupnost rozsáhlých knihoven EI spekter [88, 89].

**Chemická ionizace (CI)** je principem podobná elektronové ionizaci s tím rozdílem, že ve zdroji je přítomen reakční plyn. Tím je nejčastěji methan, isobutan nebo amoniak. Pomocí ionizujících elektronů jsou nejprve ionizovány molekuly reakčního plynu, které následně ion-molekulárními reakcemi ionizují molekuly analytu. Jedná se o měkkou ionizační techniku [88].

**Ionizace laserem za účasti matrice (MALDI)** může probíhat za různých tlaků, přičemž se jedná o měkkou ionizační techniku. Na MALDI terčík se nanese vzorek společně s matricí a následně je ozářen krátkým laserovým pulsem, kdy jeho energie je touto matricí absorbována. Tímto dojde k desorpci matrice a její ionizaci. Excitované molekuly matrice jsou stabilizovány

přenosem protonu na analyt nebo může dojít ke kationizaci molekul analytu za vzniku iontů analytu. Tyto ionty jsou poté urychleny do hmotnostního analyzátoru. Jako matrice pro UV lasery se nejčastěji používají aromatické karboxylové kyseliny jako je např. kyselina 2,5-dihydroxybenzoová nebo kyselina 5-chlorsalicylová [88, 90].

**Ionizace elektrosprejem (ESI)** se řadí mezi měkké ionizační techniky a téměř při ní nedochází k fragmentaci analytů [90]. Tato metoda je omezená pouze pro látky středně polární až iontové a nelze ji použít při práci s nepolárními mobilními fázemi a pro nepolární sloučeniny [88]. Roztok je veden kovovou kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí. Na výstupu z kapiláry dojde k rozprášení roztoku za pomoci zmlžujícího plynu, přičemž dojde ke vzniku kapiček nesoucích na povrchu velké množství nábojů. Při dosažení kritické hodnoty povrchového náboje dojde k rozpadu na ještě menší kapičky s rozdělením původních nábojů. Tento proces vede až k uvolnění iontů [88, 90].

**Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)** se také řadí mezi měkké ionizační techniky a uspořádání iontového zdroje je podobné jako u ESI, avšak na kapiláře není vloženo napětí a u jejího konce je umístěna výbojová jehla. Na konci kapiláry dochází k rozprášení eluátu pneumatickým zmlžovačem. Vzniklý aerosol je rychle odpařen v krátké zóně vyhřívané na vysokou teplotu. Vložením vysokého napětí na výbojovou jehlu, nacházející se v blízkosti výstupního konce sondy, dochází ke koronárnímu výboji, jímž jsou ionizovány molekuly mobilní fáze a následně molekuly analytu (ionizace ionty vzniklémi z mobilní fáze – reakčním plynem) [89, 91].

**Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)** má stejné uspořádání jako APCI s tím rozdílem, že pro ionizaci není použita výbojová jehla ale zdroj UV záření. Tuto techniku je možné použít i pro nepolární látky [88].

## Hmotnostní analyzátoři

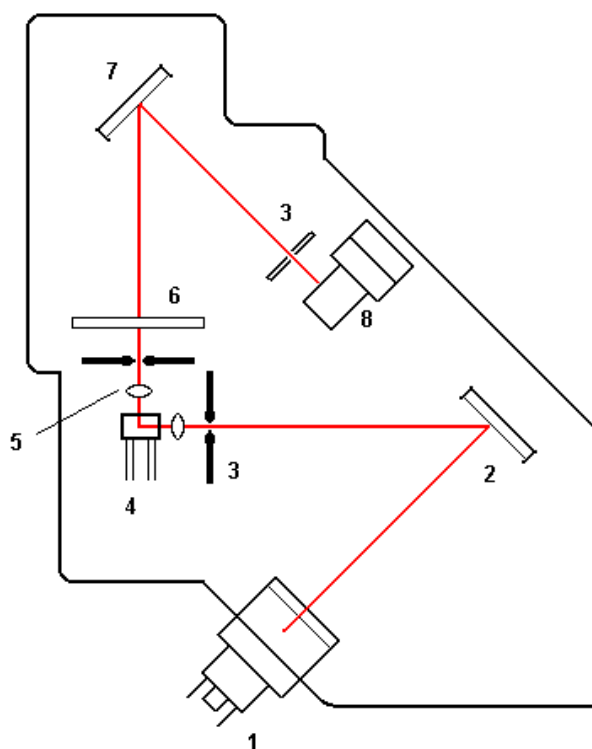
Hmotnostní analyzátoři slouží k separaci iontů na základě jejich poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). K dělení iontů je možné využít různé fyzikální principy. Magnetický nebo elektrostatický analyzátor využívá odchýlení trajektorie v magnetickém a elektrickém poli. Kvadrupol nebo iontová past využívá zase různou stabilitu oscilací v elektrickém poli vytvářeném kombinací stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí. Analyzátor doby letu (TOF) využívá různou dobu rychlosti letu iontů [88, 92].

Nejběžnějším analyzátořem je kvadrupólový analyzátor, který se skládá ze čtyř stejných kovových tyčí kruhového průřezu. Na dvě protilehlé tyče je vloženo kladné stejnosměrné napětí a na další dvě záporné. Současně je na všechny tyče vloženo i vysokofrekvenční střídavé napětí. Ionty mezi tyčemi oscilují vlivem střídavého elektrického pole. Při určitých hodnotách střídavého a stejnosměrného napětí projdou kvadrupólem ionty o určité  $m/z$ , ty ostatní jsou na tyčích zachyceny. Trojrozměrnou obdobou kvadrupólového analyzátoru je iontová past. Oba tyto analyzátoři vykazují poměrně nízkou rozlišovací schopnost [88, 92].

### 2.17.4.2 Fluorescenční detekce

Fluorescenční detektory (Obrázek 21) jsou založeny na principu fluorescence a měření sekundárního, emisního záření, které látka vydá po absorpci primárního, excitačního elektromagnetického záření. Absorpcí elektromagnetického záření přecházejí molekuly látek ze základního singletového elektronového stavu do různých vibračních hladin excitovaného singletového elektronového stavu. Excitovaná molekula absorbovanou energii opět vyzáří jako fluorescenci, nebo ji také může přeměnit zcela jiným mechanismem na energii vibrační. Ztrátou vibrační energie přejde molekula nejprve do základního vibračního stavu a pak emituje fluorescenční záření [82].

Moderní fluorescenční detektory umožňují měřit v průtokové kytvě detektoru excitační fluorescenční spektra při konstantní vlnové délce emitovaného fluorescenčního záření, nebo emisní fluorescenční spektra při nastavené vlnové délce excitačního záření [82].



**Obrázek 21:** Schéma fluorescenčního detektoru. 1 – výbojka, 2 – excitační mřížka (monochromátor), 3 – štěrba, 4 – průtoková cela, 5 – mikročočky, 6 – cut-off filtr, 7 – emisní mřížka (monochromátor), 8 – fotonásobič [93]

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Tato práce je zaměřená na sledování výskytu ochratoxinu A (OTA), deoxynivalenolu (DON) a jeho metabolitu deoxynivalenol-3- $\beta$ -D-glukopyranosidu (D3G) v českých, polských a slovenských pivech stáčená do skleněných lahví. Celkem bylo analyzováno 30 druhů pív českého, polského a slovenského původu zakoupených v maloobchodních sítích v roce 2016. Pro analytické stanovení OTA v pivu byla použita metoda ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s fluorescenčním detektorem (UPLC/FLR). Analýza byla provedena po předchozím přečištění přes imunoafinitní kolonky OCHRAPREP®. DON a jeho metabolit D3G byl analyzován pomocí metody kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (HPLC/MS) po přečištění přes imunoafinitní kolonky DONPREP®. Tyto vybrané vzorky pív byly také testovány na úroveň gushingu, která byla stanovena metodou vyvinutou ve Sladařském ústavu v Brně (metoda VÚPS).

#### 3.1 Přístroje a zařízení

- Laboratorní váha Sartorius GE 512-0 CE
- Laboratorní sklo
- Centrifuga Sigma 2-16 KC
- Třepačka
- Elektrická vodní lázeň Medigen
- Automatické pipety
- Mikrostríkačka Hamilton 710 NR
- Rotační vakuová odparka IKA® RV 10
- Vakuové zařízení Visiprep™ SPE Vacuum Manifold
- Imunoafinitní kolonky OCHRAPREP®, R-Biopharm
- Imunoafinitní kolonky DONPREP®, R-Biopharm
- Ultrazvuk ELMA S120 Elmasonic
- pH metr Mettler Toledo
- Ultra vysokoúčinný kapalinový chromatograf Waters Acquity UPLC
- Fluorescenční detektor Waters Acquity UPLC
- Kapalinový chromatograf Finnigan Surveyor
- Hmotnostní detektor Finnigan LCQ Advantage MAX

#### 3.2 Chemikálie

- Deionizovaná voda
- Methanol (Sigma-Aldrich, LC-MS CHROMASOLV® Fluka)
- Methanol (Sigma-Aldrich, CHROMASOLV®, gradient grade for HPLC,  $\geq 99,9$  %)
- Acetonitril (Sigma-Aldrich, CHROMASOLV®, gradient grade for HPLC,  $\geq 99,9$  %)
- Octan amonný (Sigma-Aldrich, Fluka 73594-25G-F)
- Standard ochratoxinu A (Sigma-Aldrich, Fluka 34037-2ML-R)
- Standard deoxynivalenolu (Sigma-Aldrich, Fluka 34124-2ML)
- Standard deoxynivalenol 3- $\beta$ -D-glukopyranosidu (Sigma-Aldrich, Fluka 32911-1ML)

- Certifikovaný referenční materiál ochratoxinu A (Trilogy®, Product number TR-O100)
- Kyselina mravenčí (Lach-Ner)
- PBS pufr

Příprava: Do kádinky bylo naváženo 19,1 g hydrogenfosforečnanu sodného a bylo přidáno 800 ml deionizované vody. Do druhé kádinky bylo naváženo 1,8 g dihydrogenfosforečnanu draselného a bylo přidáno 200 ml deionizované vody. Oba roztoky byly smíchány a byly umístěny na ultrazvuk po dobu 5 minut. pH výsledného fosfátového pufru bylo upraveno 2 M hydroxidem sodným na hodnotu 7,4.

### 3.3 Popis analyzovaných vzorků

Pro účel analýzy ochratoxinu A a deoxynivalenolu, včetně jeho metabolitu deoxynivalenol-3- $\beta$ -D-glukopyranosidu, bylo vybráno celkem 30 druhů piv. Jednalo se o 10 piv českých, 12 piv polských a 8 piv slovenských. Piva byla zakoupena v maloobchodních sítích v České Republice, Polsku a na Slovensku v roce 2016. Převážně se jednalo o piva světlá typu ležáky s výjimkou jednoho polského piva (vzorek č. 22) a slovenského piva (vzorek č. 27), která byla tmavá. Seznam analyzovaných piv včetně jejich hodnot obsahu alkoholu je uveden v Tabulce 9.

**Tabulka 9:** Seznam analyzovaných vzorků českých, polských a slovenských piv

Číslo vzorku	Název piva	Množství alkoholu [%]	Pasterizace	Expirace
<b>ČESKÁ PIVA</b>				
1	Bernard světlý	4,9	NE	16. 5. 2016
2	Budweiser budvar	5,0	ANO	22. 6. 2016
3	Černá Hora	4,8	ANO	9. 6. 2012
4	Gambrinus Excelent	4,7	ANO	28. 8. 2016
5	Lobkowicz	4,7	ANO	9. 6. 2016
6	Pardál Echt	4,5	ANO	26. 5. 2016
7	Pilsner Urquell	4,4	ANO	27. 7. 2016
8	Starobrno Medium	4,7	NE	06. 2016
9	Velkopopovický Kozel Premium	4,8	ANO	20. 7. 2016
10	Zlatopramen	4,9	ANO	02. 2016
<b>POLSKÁ PIVA</b>				
11	Zubr	6,0	ANO	30. 6. 2016
12	Tatra	5,0	NE	9. 6. 2016
13	Okocim	5,6	ANO	21. 9. 2016
14	EB Premium	5,2	ANO	22. 6. 2016
15	Żywiec APA	5,4	ANO	27. 7. 2016
16	Harnaš	6,0	ANO	19. 1. 2017
17	Tyskie Gronie	5,5	ANO	-
18	Zywiec biale	4,9	ANO	16. 7. 2016
19	Zlote Lwy	5,6	ANO	-

Číslo vzorku	Název piva	Množství alkoholu [%]	Pasterizace	Expirace
20	Zywiec Marcowe	5,4	ANO	18. 9. 2016
21	Zywiec premium	5,6	ANO	22. 7. 2016
22	Ksiazecze Ciemne Premium	4,1	ANO	6. 6. 2016
SLOVENSKÁ PIVA				
23	Corgoň	4,8	ANO	18. 6. 2017
24	Stein	5,0	ANO	4. 4. 2017
25	Zlatý bažant '73	4,5	ANO	13. 1. 2017
26	Horden	5,0	ANO	12. 3. 2017
27	Steiger tmavý	4,5	ANO	26. 3. 2017
28	Steiger svetlý ležiak	5,0	ANO	12. 4. 2017
29	Steiger výčapný ležiak svetlý	4,5	ANO	14. 3. 2017
30	Zlatý bažant	5,0	-	16. 6. 2017

### 3.4 Analýza ochratoxinu A metodou UPLC/FLR

#### 3.4.1 Extrakce OTA z piva

Ochratoxin A (OTA) v pivu byl analyzován po předchozím přečištění přes imunoafinitní kolonku OCHRAPREP®. Vzorek piva byl nejprve odplyněn na ultrazvuku a následně bylo upraveno pH na 7,2 pomocí 2M roztoku hydroxidu sodného. 25 ml takto upraveného vzorku bylo nanášeno přímo na imunoafinitní kolonku. K propláchnutí kolonky bylo použito 50 ml PBS pufru. Eluce byla provedena pomocí 2 ml 98% methanolu s 2% kyselinou octovou. Eluát byl následně odpařen do sucha na vakuové rotační odparce. Před nástřikem byl vzorek rozpuštěn v 500 µl 50% methanolu a nadávkován do vialek s vloženým insertem.

#### 3.4.2 Příprava zásobního roztoku a kalibračních standardů

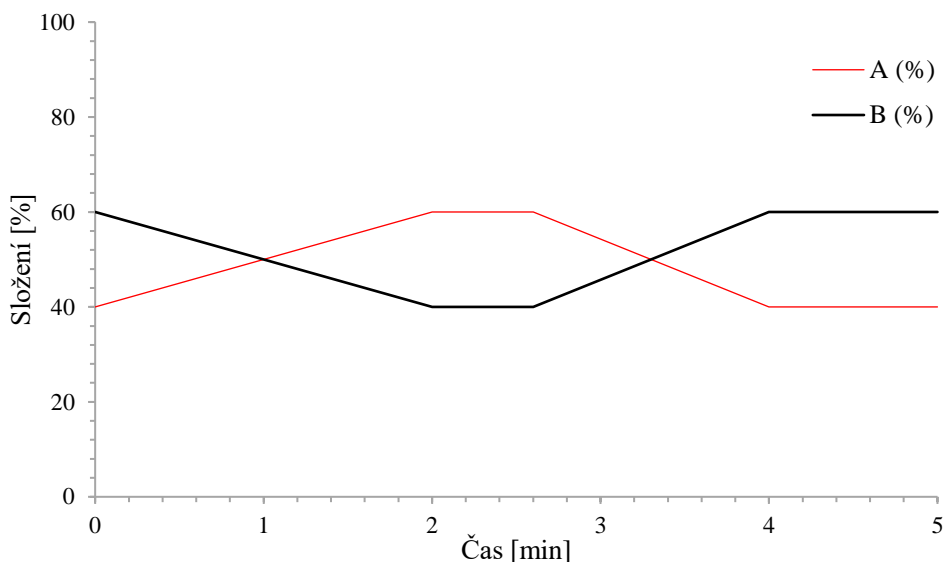
Zásobní roztok ochratoxinu A o koncentraci 100 ng·ml<sup>-1</sup> byl připraven pomocí komerčního standardu OTA pořízený od firmy Sigma-Aldrich o koncentraci 10 µg·l<sup>-1</sup> (přesná koncentrace je 10,52 µg·l<sup>-1</sup>). Do vialky bylo napipetováno 990 µl 50% methanolu a následně bylo přidáno 10 µl standardu OTA.

Dále bylo ředěním zásobního roztoku připraveno 8 kalibračních standardů o koncentraci 0,05; 0,1; 0,2; 0,6; 1; 2; 5 a 10 ng·ml<sup>-1</sup>.

#### 3.4.3 Podmínky stanovení a jejich optimalizace

Pro analytické stanovení OTA v pivu byl použit ultra vysokoúčinný kapalinový chromatograf Acquity UPLC ve spojení s fluorescenčním detektorem. Separace byla provedena na chromatografické koloně Ascentis® Express C18 (15 cm × 3,0 mm s velikostí částic 2,7 µm). Teplota na koloně byla nastavena na 40 °C. Jako mobilní fáze byl použit acetonitril (ACN)

s 0,1% kyselinou mravenčí (HCOOH) a deionizovaná voda okyselená pomocí HCOOH na pH 2,8. Separace byla provedena s gradientovou elucí (Obrázek 22), při průtoku mobilní fáze  $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  a při nástřiku  $10 \text{ } \mu\text{l}$ . Excitační a emisní vlnová délka byly 335 nm a 440 nm. Délka analýzy jednoho vzorku byla 5 minut.



**Obrázek 22:** Zobrazení gradientové eluce UPLC/FLR (A - acetonitril, B - okyselená voda)

### 3.5 Analýza deoxynivalenolu metodou HPLC/MS

#### 3.5.1 Extrakce DON z piva

Pro stanovení DON v pivu metodou HPLC/MS musel být vzorek přečištěn přes imunoafinitní kolonku DONPREP®. Vzorek piva byl nejprve odplyněn na ultrazvuku po dobu 15 minut. Na imunoafinitní kolonku bylo přímo nanášeno 2 ml takto upraveného vzorku. K promytí kolonky bylo použito 6 ml deionizované vody. Eluce byla provedena pomocí 2 ml 99,9% methanolu s průtokem jedné kapky za sekundu nebo pomaleji. Odebraný vzorek byl odpařen do sucha na rotační vakuové odparce a následně rozpuštěn v 1 ml 50% methanolu.

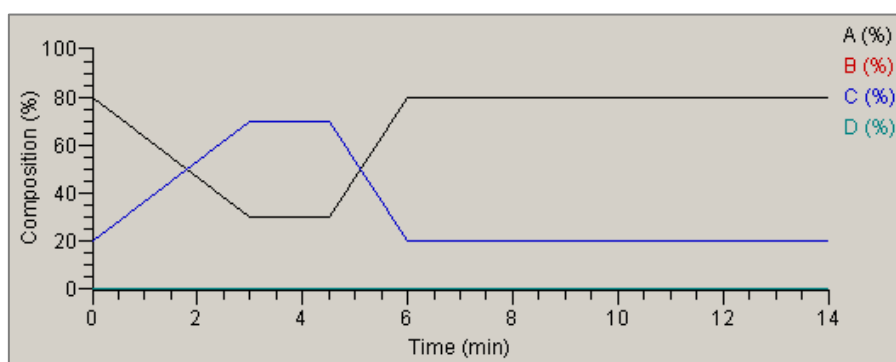
#### 3.5.2 Příprava zásobního roztoku a kalibračních standardů

K přípravě zásobního roztoku byl použit standard DON o koncentraci  $101,5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  a standard D3G o koncentraci  $51,2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ .  $10 \text{ } \mu\text{l}$  standardu DON a  $20 \text{ } \mu\text{l}$  standardu D3G byly nadávkovány do  $970 \text{ } \mu\text{l}$  50% methanolu.

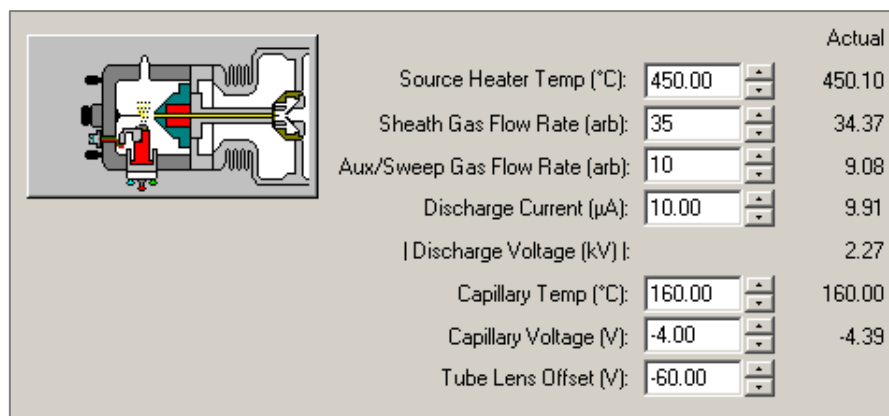
Kalibrační standardy byly připraveny nadávkováním  $10, 50, 100$  a  $200 \text{ } \mu\text{l}$  zásobního roztoku do příslušného objemu 50% methanolu tak, aby výsledný objem byl 1 ml. Ředěním byly získány kalibrační roztoky o koncentraci  $10, 50, 100$  a  $200 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

### 3.5.3 Podmínky stanovení a jejich optimalizace

K analýze DON a D3G ve vzorcích piva byl použit kapalinový chromatograf HPLC Finnigan Surveyor ve spojení s hmotnostním detektorem Finnigan LCQ Advantage MAX. K separaci byla použita chromatografická kolona Synergi 4 $\mu$  Hydro RP 80A 150 x 3 mm. Teplota kolony byla nastavena na 40 °C. Jako mobilní fáze byl použit 10 mM octan amonný (A) a methanol (C) s průtokem 0,5 ml·min<sup>-1</sup>. Objem nástřiku vzorku byl 25  $\mu$ l. K separaci byla použita gradientová eluce, která je vyznačena na Obrázku 23. Délka analýzy jednoho vzorku byla 14 minut. Jako iontový zdroj hmotnostního detektoru byla použita chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) s negativním módem, jejíž parametry jsou vyznačeny na Obrázku 24.



**Obrázek 23:** Zobrazení gradientové eluce HPLC/MS (A - 10 mM octan amonný, C - methanol)



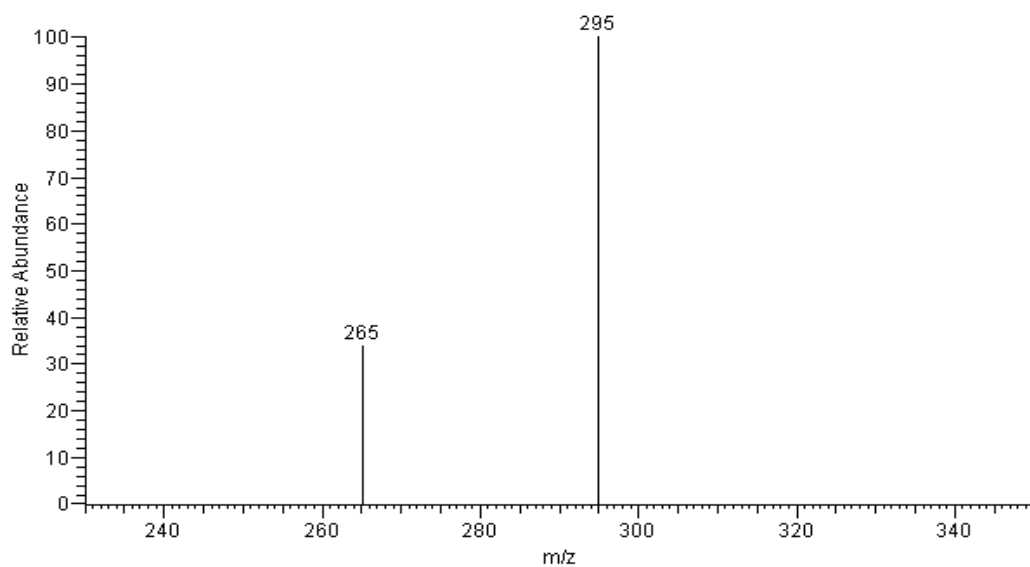
**Obrázek 24:** Parametry APCI

Před každým měřením byla provedena diagnostika iontového zdroje. Záznam testu je uveden v Příloze I.

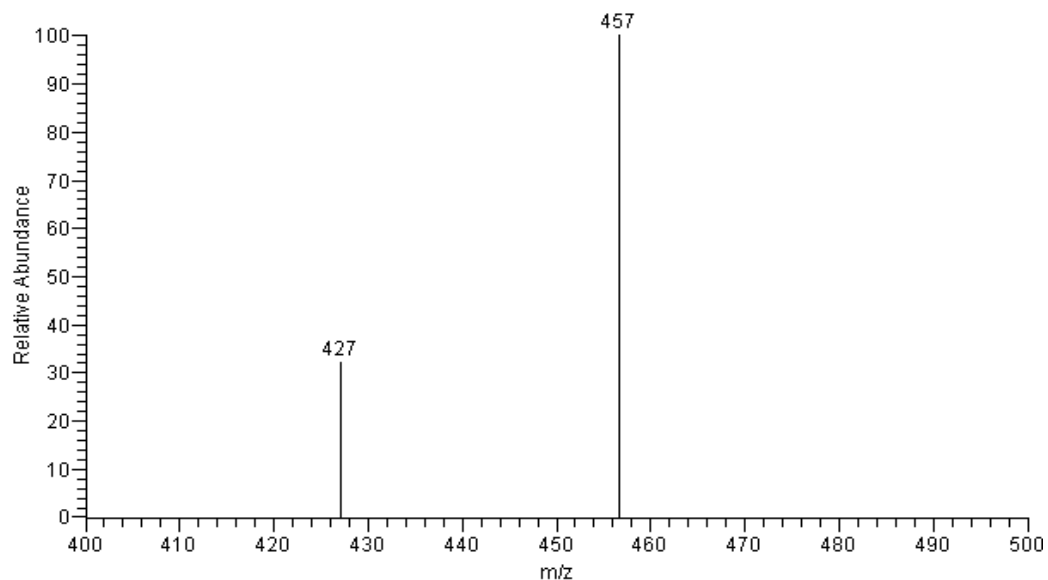
Pro kvantifikaci DON a D3G byly sledovány dva MRM přechody. Prekurzory a produktové ionty jsou uvedeny v Tabulce 10 a hmotnostní spektra fragmentových iontů jsou zobrazeny na Obrázku 25 a 26.

**Tabulka 10:** Vybrané MS/MS parametry pro DON a D3G

Mykotoxin	Mr	Prekurzorový ion	MRM 1	MRM 2
DON	296	$[M + CH_3COO]^-$	355 → 295	355 → 265
D3G	458	$[M + CH_3COO]^-$	517 → 457	517 → 427



**Obrázek 25:** Hmotnostní spektrum fragmentace DON



**Obrázek 26:** Hmotnostní spektrum fragmentace D3G

### 3.6 Gushing

Úroveň gushingu v jednotlivých lahvových pivech byla stanovena metodou vyvinutou ve sladařském ústavu v Brně (metoda VÚPS).

Láhve byly pasterizovány ve vertikální poloze při teplotě 62°C po dobu 20 minut. Po vychlazení byly umístěny horizontálně na třepačku. Třepání probíhalo při 50 kmitech za 1 minutu a výkyvu 25 mm z výchozí pozice po dobu  $72 \pm 2$  hodiny při teplotě  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . Po třech dnech bylo třepání zastaveno, láhve byly vyjmuty z třepačky a zváženy. Poté se ponechaly v klidu po dobu 10 minut. Po uplynutí této doby byly láhve obráceny 3x během 10 sekund a následně ponechány v klidu 30 sekund. Poté byly láhve otevřeny při teplotě, která byla shodná s teplotou, při které byly láhve třepány. Ve finále byly láhve znovu zváženy i se zátkou. Úroveň gushingu byl vypočítán jako rozdíl mezi váhou před otevřením a po otevření láhve.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1 Validace metody UPLC/FLR

K posouzení kvality analytického postupu byla provedena validace metody. Mezi ověřované validační parametry byly vybrány opakovatelnost nástřiku a extrakce, linearita metody, výtěžnost, mez detekce a mez kvantifikace.

#### 4.1.1 Opakovatelnost nástřiku

Pro určení opakovatelnosti nástřiku byla využita relativní směrodatná odchylka (*RSD*), vypočítána podle:

$$RSD = \frac{s}{x} \cdot 100 \%$$

kde *s* je směrodatná odchylka a *x* je průměr měření.

Data pro vyhodnocení opakovatelnosti byla naměřena na identickém chromatografickém systému, stejným pracovníkem a během krátkého časového rozmezí. Stanovení bylo provedeno opakovanou analýzou po 5 stanovení. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 11.

**Tabulka 11:** Naměřené hodnoty koncentrace OTA pro stanovení opakovatelnosti nástřiku

Analyt	c [ng·ml <sup>-1</sup> ]					x	s	RSD [%]
	1	2	3	4	5			
OTA	4,94	4,81	4,79	4,79	4,85	4,83	0,06	1,18

#### 4.1.2 Opakovatelnost extrakce

Opakovatelnost extrakce byla zjištěna opakovanou extrakcí a následnou analýzou jednoho a téhož vzorku piva. Vzorek byl analyzován třikrát během jednoho dne na identickém chromatografickém systému. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí *RSD*, které bylo diskutováno v kapitole 4.1.1. Výsledky opakovatelnosti extrakce jsou uvedeny v Tabulce 12.

**Tabulka 12:** Naměřené hodnoty koncentrace OTA pro stanovení opakovatelnosti extrakce

Analyt	c [ng·l <sup>-1</sup> ]			x	s	RSD [%]
	1	2	3			
OTA	112,26	110,74	96,69	106,56	7,00	6,58

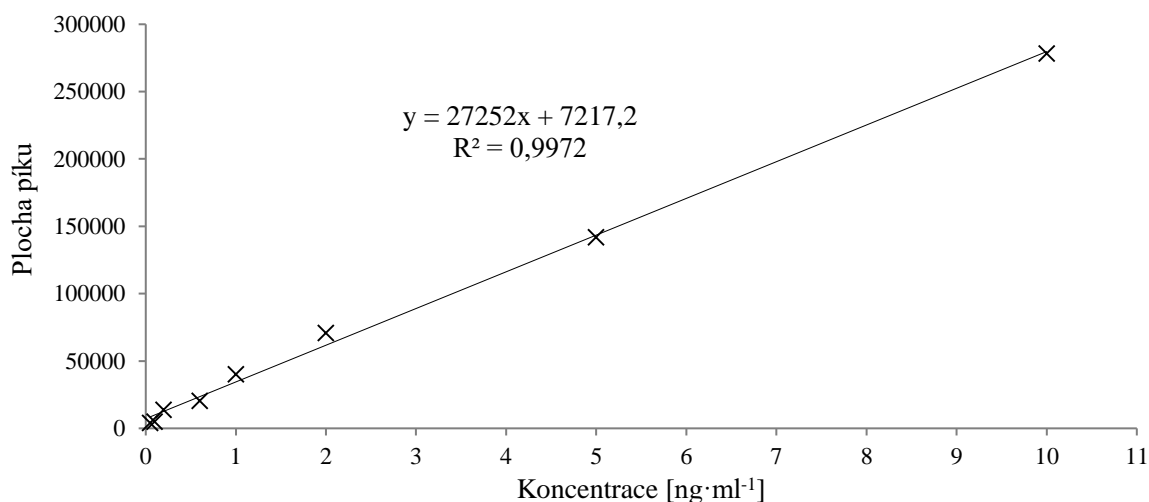
#### 4.1.3 Linearita metody

Linearita metody byla počítána ze závislosti plochy píku standardu na jeho koncentraci. Kalibrační křivka byla sestavena z osmi kalibračních roztoků o různé koncentrační hladině,

kteře byly zvoleny s ohledem na obsah ochratoxinu A ve stanovovaných vzorcích piva. Hodnocení linearitě bylo provedeno pomocí korelačního koeficientu R, který charakterizuje těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných. Hodnota R pro ochratoxin A byla v daném rozsahu 0,9985. Hodnoty koncentrace a plochy píků jsou uvedeny v Tabulce 13 a kalibrační závislost pro OTA je znázorněna na Obrázku 27. Chromatogramy kalibračních roztoků jsou uvedeny v Příloze II.

**Tabulka 13:** Koncentrace a plochy píků jednotlivých kalibračních roztoků OTA

c [ng·ml <sup>-1</sup> ]	0,05	0,1	0,2	0,6	1	2	5	10
Plocha píků	3962	4888	13672	20425	40046	70840	141987	278342



**Obrázek 27:** Kalibrační závislost OTA

#### 4.1.4 Výtěžnost metody

Výtěžnost charakterizuje poměr množství analytu získaného analytickou metodou k přijaté referenční hodnotě. Pro posouzení výtěžnosti metody byl použit certifikovaný referenční materiál (CRM) s deklarovaným množstvím ochratoxinu A ( $7,0 \pm 1,8 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

CRM byl připraven k analýze následujícím způsobem. Bylo naváženo 10 g CRM a následně přidáno 200 ml 60% acetonitrilu. Roztok byl 50 min třepán na třepače a poté odstředěn v centrifuze. 2 ml supernatantu bylo smícháno s 22 ml PBS pufru a takto připravený roztok byl nanesen na kolonku OCHRAPREP®. K propláchnutí kolonky bylo použito 50 ml PBS pufru. Eluce byla provedena 2 ml roztoku 98% methanolu a 2% kyseliny octové. Eluát byl odpařen na rotační vakuové odparce a následně rozpuštěn v 500  $\mu\text{l}$  50% methanolu.

Takto připravený CRM byl na UPLC/FLR proměřen pětkrát. Průměrná hodnota činila  $5,124 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Výtěžnost metody je tedy 73,2 %.

#### 4.1.5 Mez detekce a mez kvantifikace

Mez detekce (LOD) a mez kvantifikace (LOQ) byly určeny z chromatogramu kalibračního roztoku s nejnižší koncentrační hladinou. Mez detekce byla vypočítána jako trojnásobek poměru signálu a šumu, zatímco mez kvantifikace jako desetinásobek poměru signálu a šumu.

**Tabulka 14:** Výsledné hodnoty LOD a LOQ pro OTA

Analyt	LOD [ng·l <sup>-1</sup> ]	LOQ [ng·l <sup>-1</sup> ]
OTA	0,1	0,5

## 4.2 Validace metody HPLC/MS

Mezi ověřované validační parametry byly vybrány opakovatelnost nástřiku, linearita metody, výtěžnost, mez detekce a mez kvantifikace.

### 4.2.1 Opakovatelnost nástřiku

Pro určení opakovatelnosti nástřiku byla využita relativní směrodatná odchylka (*RSD*), vypočítána podle:

$$RSD = \frac{s}{x} \cdot 100 \%$$

kde *s* je směrodatná odchylka a *x* je průměr měření.

Data pro vyhodnocení opakovatelnosti byla naměřena na identickém chromatografickém systému, stejným pracovníkem a během krátkého časového rozmezí. Stanovení bylo provedeno opakovanou analýzou pro 3 stanovení. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 15.

**Tabulka 15:** Stanovení opakovatelnosti nástřiku pro DON a D3G

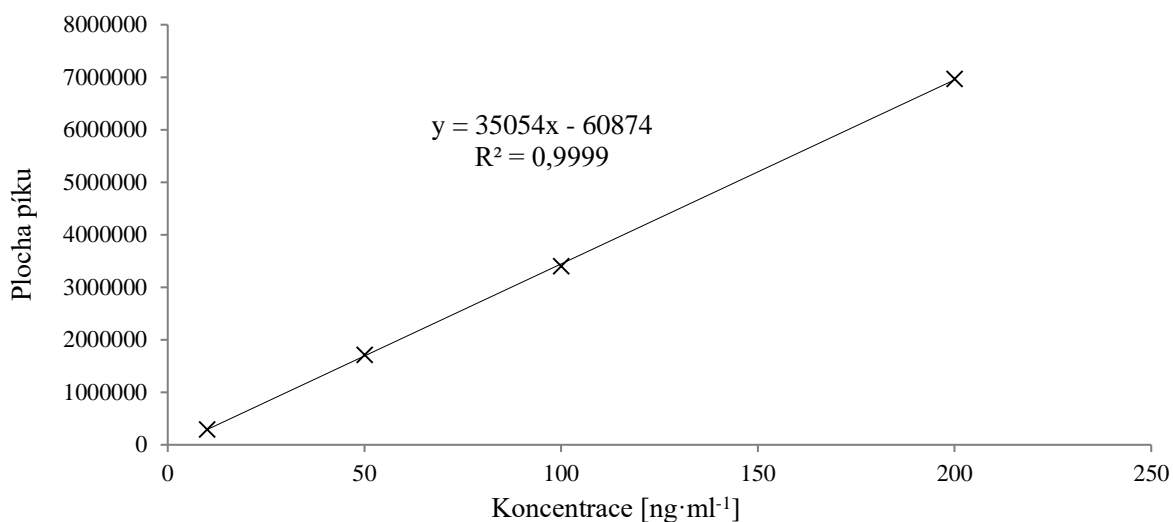
Analyt	c [ng·ml <sup>-1</sup> ]			x	s	RSD [%]
	1	2	3			
DON	66,98	76,14	65,94	34,84	2,29	6,57
D3G	104,67	116,85	132,65	118,06	11,46	9,70

### 4.2.2 Linearita metody

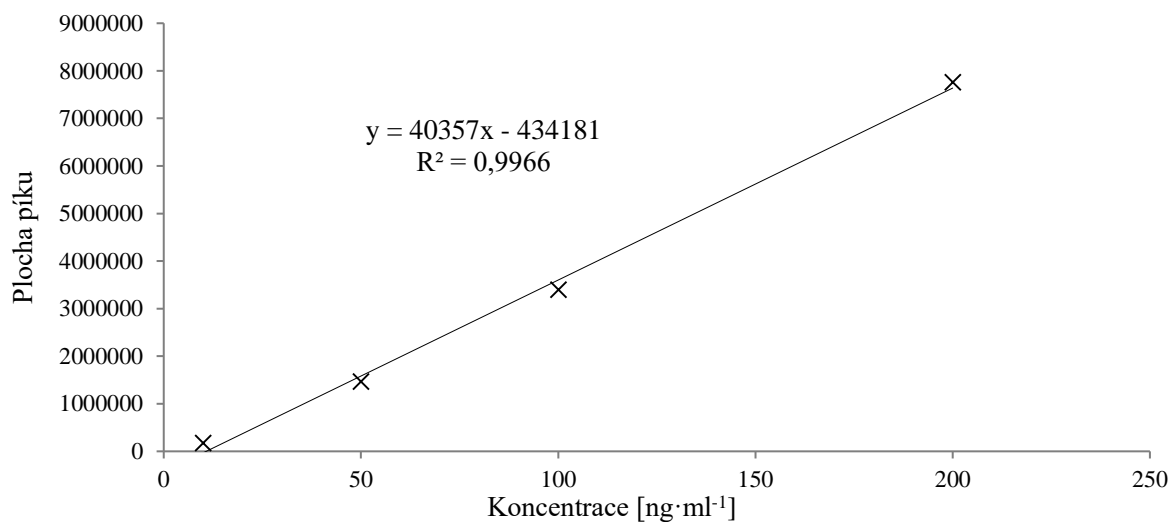
Kalibrační křivka byla sestavena ze čtyř kalibračních roztoků o různé koncentrační hladině, které byly zvoleny s ohledem na obsah DON a D3G v analyzovaných vzorcích piv. Hodnocení linearity bylo provedeno pomocí korelačního koeficientu *R*, který charakterizuje těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných. Hodnota *R* pro DON byla v daném rozsahu 0,9999 a pro D3G 0,9983. Hodnoty koncentrace a plochy píků jsou uvedeny v Tabulce 16 a kalibrační závislosti pro DON a D3G jsou znázorněny na Obrázku 28 a 29.

**Tabulka 16:** Koncentrace a plochy píků jednotlivých kalibračních roztoků DON a D3G

c [ng·ml <sup>-1</sup> ]		10	50	100	200
Plocha píku	DON	294157	1714801	3401457	6965393
	D3G	170824	1464057	3398186	7758682



**Obrázek 28:** Kalibrační závislost DON



**Obrázek 29:** Kalibrační závislost D3G

#### 4.2.3 Výtěžnost metody

Pro posouzení výtěžnosti metody byla použita analýza vzorku s přidavkem standardní látky. Vzorek piva byl obohacen standardní látkou DON a D3G na třech koncentračních hladinách. Výtěžnost pro DON se pohybovala v rozmezí 111,0 – 115,5 % a pro D3G 112,0 – 121,4 %.

**Tabulka 17:** Výtěžnost metody pro DON a D3G ( $C_R$  – teoretická koncentrace standardní látky ve vzorku;  $C_S$  – nalezená koncentrace standardní látky ve vzorku)

Analyt	Hladina	$C_R$ [ng·ml <sup>-1</sup> ]	$C_S$ [ng·ml <sup>-1</sup> ]	Výtěžnost [%]
DON	1	20,00	22,20	111,0
	2	50,00	57,62	115,3
	3	100,00	115,47	115,5
D3G	1	20,00	23,00	115,0
	2	50,00	60,68	121,4
	3	100,00	112,02	112,0

#### 4.2.4 Mez detekce a mez kvantifikace

Mez detekce (LOD) a mez kvantifikace (LOQ) byly určeny z chromatogramu kalibračního roztoku s nejnižší koncentrační hladinou. Mez detekce byla vypočítána jako trojnásobek poměru signálu a šumu, zatímco mez kvantifikace jako desetinásobek poměru signálu a šumu.

**Tabulka 18:** Hodnoty LOD a LOQ pro DON a D3G

Analyt	LOD [μg·l <sup>-1</sup> ]	LOQ [μg·l <sup>-1</sup> ]
DON	0,68	2,26
D3G	0,70	2,33

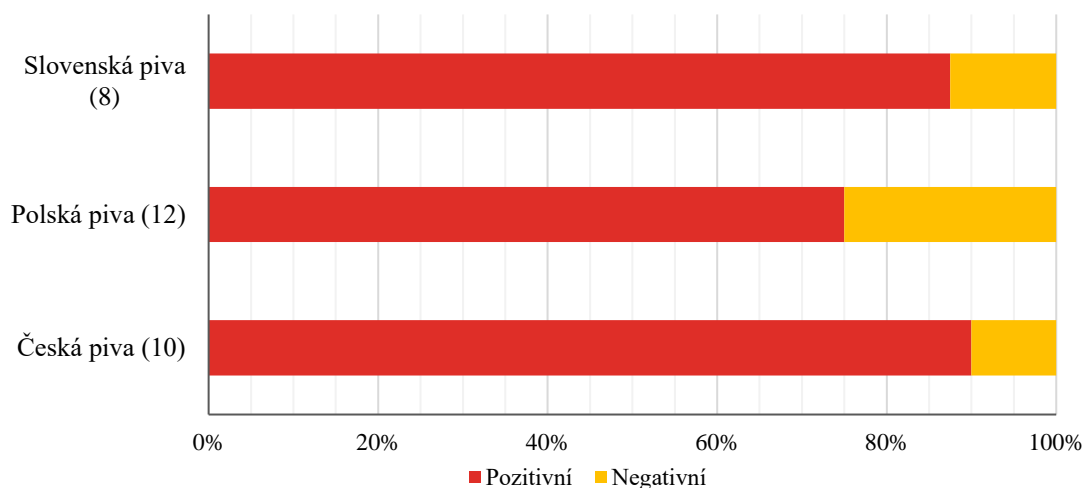
### 4.3 Analýza ochratoxinu A metodou UPLC/FLR

Ochratoxin A je mykotoxin, který může mít negativní vliv nejen na zdraví zvířat, ale i lidí. Do piva se OTA může dostat zejména z kontaminovaného ječmene nebo dalších pomocných látek používaných v procesu výroby piva. Jelikož se jedná o poměrně stabilní sloučeninu, odolává i procesu vaření piva. Pro kvantitativní stanovení OTA v pivu, cereáliích a dalších potravinových komoditách byly vyvinuty různé analytické metody. Nejčastěji používanými metodami jsou kapalinová chromatografie ve spojení s fluorescenční nebo hmotnostní detekcí nebo také imunochemické metody, včetně metody ELISA [94]. V rámci této práce bylo na přítomnost ochratoxinu A testováno celkem 30 druhů piv českého, polského a slovenského původu za použití instrumentální metody UPLC/FLR.

Celkové rozložení výskytu OTA v pivech je znázorněno na Obrázku 30. Česká piva byla kontaminována ochratoxinem A z 90 %, polská piva ze 75 % a piva slovenská byla kontaminována z 87 %. Ve slovenských pivech, jak ukazují průměrné hodnoty koncentrace OTA zobrazené v Tabulce 19, bylo nalezeno o 78 % větší množství OTA než v pivech polských. Česká piva obsahovala o 67 % větší množství OTA než piva polská.

**Tabulka 19:** Celkový přehled kontaminace vzorků českých, polských a slovenských piv OTA

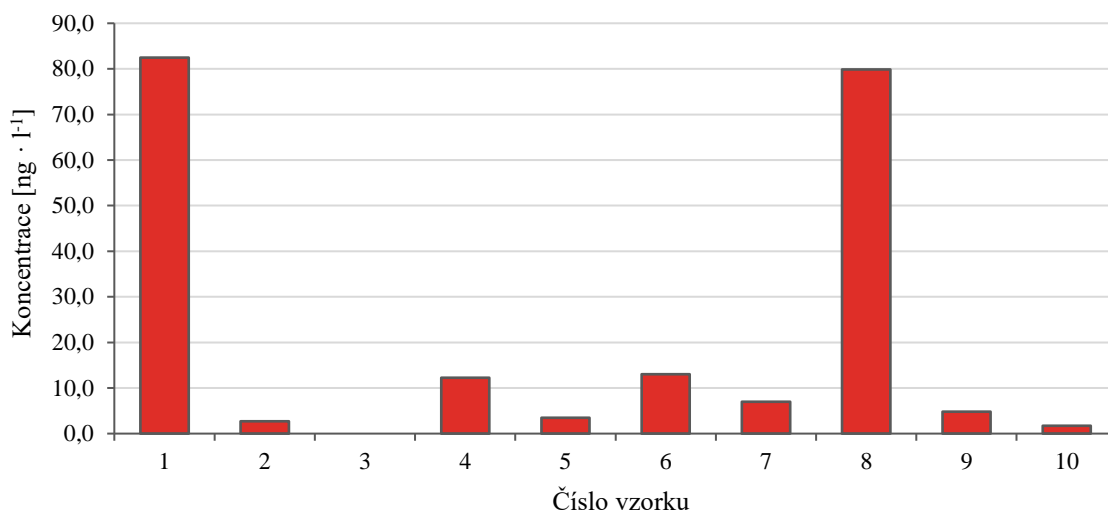
	<b>Celkem vzorků</b>	<b>Pozitivních vzorků</b>	<b>Min [ng·l<sup>-1</sup>]</b>	<b>Max [ng·l<sup>-1</sup>]</b>	<b>Průměr [ng·l<sup>-1</sup>]</b>
<b>Česká piva</b>	10	9	1,8	82,5	20,7
<b>Polská piva</b>	12	9	0,6	49,3	6,8
<b>Slovenská piva</b>	8	7	1,9	78,5	31,3

**Obrázek 30:** Rozložení výskytu OTA v českých, polských a slovenských pivech. V závorce je vždy uveden celkový počet analyzovaných vzorků

Konkrétní naměřené hodnoty ochratoxinu A v jednotlivých vzorcích piva českého, polského a slovenského původu jsou uvedeny v Tabulce 20 - 22 a dále jsou graficky znázorněny na Obrázcích 31 - 33.

**Tabulka 20:** Naměřené hodnoty OTA v jednotlivých vzorcích českých piv metodou UPLC/FLR

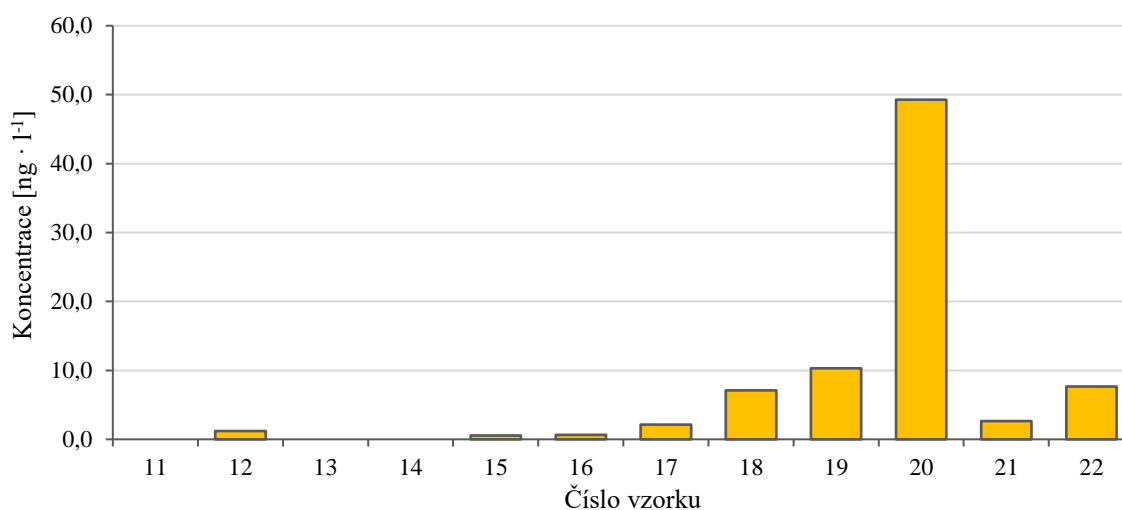
<b>Číslo vzorku</b>	<b>Název piva</b>	<b>OTA [ng·l<sup>-1</sup>]</b>
1	Bernard světlý	82,5
2	Budweiser budvar	2,7
3	Černá Hora	< LOQ
4	Gambrinus Excelent	12,3
5	Lobkowicz	3,5
6	Pardál Echt	13,0
7	Pilsner Urquell	7,0
8	Starobrno Medium	79,9
9	Velkopopovický Kozel Premium	4,8
10	Zlatopramen	1,8



**Obrázek 31:** Grafické znázornění výskytu OTA v jednotlivých vzorcích českých piv

**Tabulka 21:** Naměřené hodnoty OTA v jednotlivých vzorcích polských piv metodou UPLC/FLR

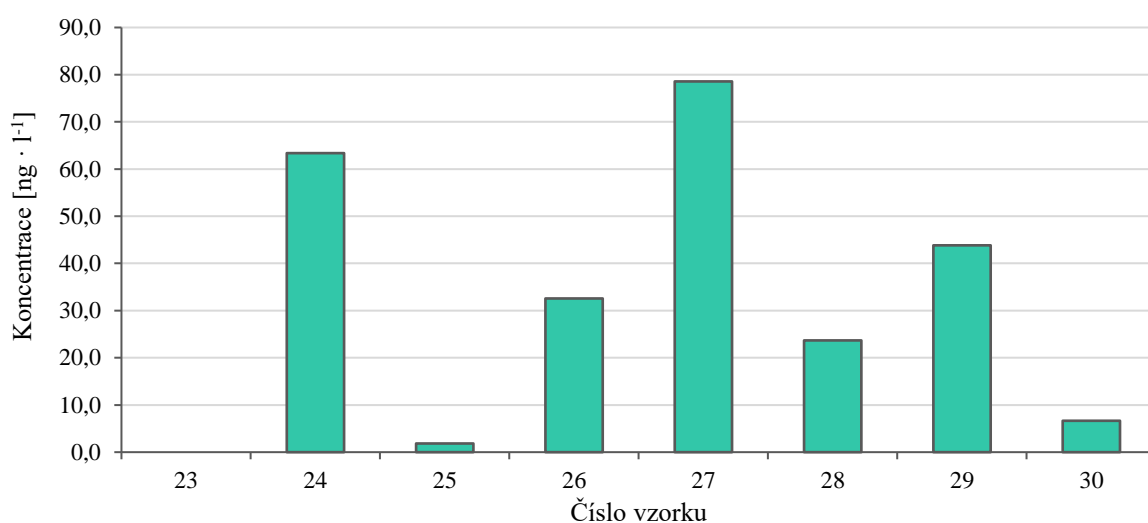
Číslo vzorku	Název piva	OTA [ng·l <sup>-1</sup> ]
11	Zubr	< LOQ
12	Tatra	1,2
13	Okocim	< LOQ
14	EB Premium	< LOQ
15	Żywiec APA	0,6
16	Harnaš	0,6
17	Tyskie Gronie	2,1
18	Zywiec biale	7,1
19	Zlote Lwy	10,3
20	Zywiec Marcowe	49,3
21	Zywiec premium	2,7
22	Ksiazecze Ciemne Preminum	7,7



**Obrázek 32:** Grafické znázornění výskytu OTA v jednotlivých vzorcích polských piv

**Tabulka 22:** Naměřené hodnoty OTA v jednotlivých vzorcích slovenských piv metodou UPLC/FLR

Číslo vzorku	Název piva	OTA [ $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ]
23	Corgoň	< LOQ
24	Stein	63,4
25	Zlatý bažant '73	1,9
26	Horden	32,6
27	Steiger tmavý	78,5
28	Steiger svetlý ležiak	23,7
29	Steiger výčapný ležiak svetlý	43,8
30	Zlatý bažant	6,6

**Obrázek 33:** Grafické znázornění výskytu OTA v jednotlivých vzorcích slovenských piv

Nejvyšší hodnota OTA v českých pivech byla nalezena ve vzorku č. 1, a to  $82,5 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ , v polských pivech ve vzorku č. 20 ( $49,3 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a ve slovenských pivech ve vzorku č. 27 ( $78,5 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Všechny získané hodnoty OTA v analyzovaných pivech byly poměrně nízké v porovnání s některými publikacemi. Například Bresch et. al. v Německu v roce 2000 provedli testování 250 druhů piv, kdy koncentrace OTA se pohybovala v rozmezí  $10 - 290 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$  [69]. V Kanadě, Scott a Kanhere našli OTA ve 26 ze 41 testovaných vzorků piv s hodnotou OTA do  $200 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$  [95]. V Turecku testoval Gumus et. al. v roce 2004 celkem 150 druhů piv (135 vzorků místních piv a 15 vzorků importovaných piv), přičemž OTA se vyskytoval ve 42 vzorcích piv a to v rozmezí  $100 - 8100 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$  [69]. Další srovnání je uvedeno v přehledné Tabulce 23.

**Tabulka 23:** Některé studie zobrazující výskyt OTA v pivech

Země původu piv	Počet vzorků pozitivních / celkem	Koncentrace OTA [ $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	Reference
Kanada	26 / 41	< 200	Scott a Kanhere [95]
Německo	— / 250	10 – 290	Bresch et al. [69]
Itálie	3 / 10	20 – 22	Visconti et al. [70]

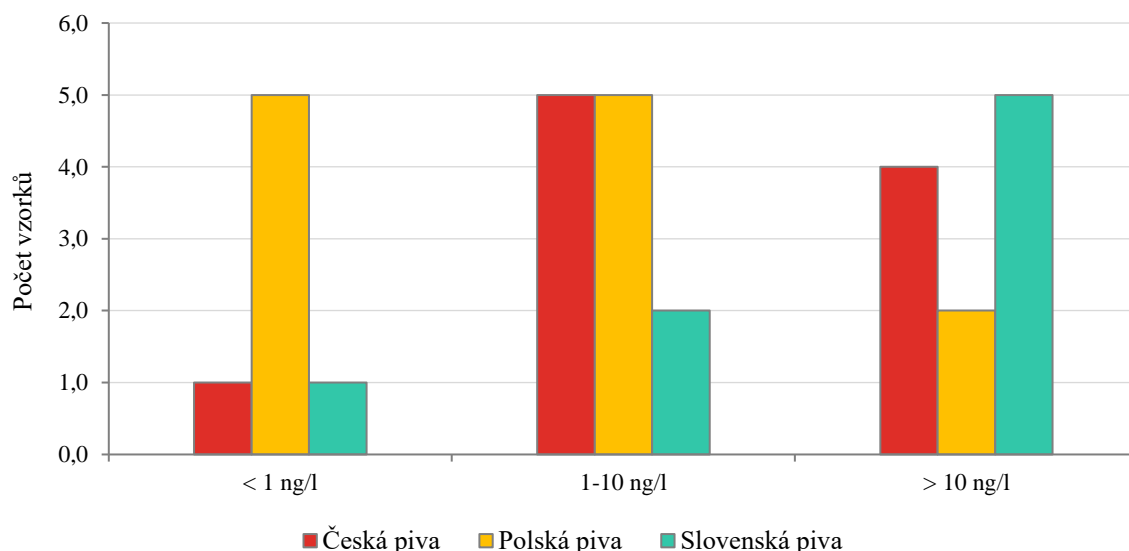
Země původu pív	Počet vzorků pozitivních / celkem	Koncentrace OTA [ng·l <sup>-1</sup> ]	Reference
Turecko	42 / 150	100 – 8100	Gumus et al. [69]
Dánsko	21 / 21	1 – 160	Jorgensen [96]
Bulharsko	20 / 32	40 – 200	Yordanova et al. [97]
Belgie	51 / 62	10 – 185	Tangni et al. [98]
Španělsko	24 / 31	44	Araguas et al. [71]
Japonsko	21 / 22	12,5	Nakajima et al. [99]
Korea	—	200 – 300	Park et al. [97]
Česká republika	107 / 132	< 1,0 – 194,6	Běláková et al. [72]
Česká republika	9 / 10	1,75 – 82,47	
Polsko	9 / 12	0,58 – 49,25	
Slovensko	7 / 8	1,86 – 78,54	

Podle nálezu OTA byla všechna analyzovaná piva rozdělená do tří kategorií (Obrázek 34).

V první kategorii s obsahem OTA menším než 1 ng·l<sup>-1</sup> se vyskytuje nejmenší počet vzorků (7), z čehož 5 vzorků jsou piva polská, 1 vzorek je pivo slovenské a 1 vzorek pivo české.

Největší zastoupení analyzovaných vzorků pív se vyskytuje ve druhé kategorii o koncentraci OTA v rozmezí 1 – 10 ng·l<sup>-1</sup>. Jedná se o 12 vzorků, přičemž pouze 2 vzorky jsou vzorky slovenských pív. Dále se zde nachází 5 pív českých a 5 pív polských.

Ve třetí kategorii, kde je koncentrace OTA větší než 10 ng·l<sup>-1</sup>, se nachází 11 vzorků. Největší zastoupení zde mají slovenská piva s počtem vzorků 5. Z českých pív se zde nachází 4 vzorky a z polských pív 2 vzorky.



**Obrázek 34:** Rozdělení vzorků podle kategorií v závislosti na množství OTA a zastoupení jednotlivých druhů pív

Legislativní limity pro výskyt OTA v pivu nebyly dosud stanoveny, nicméně jsou v některých evropských zemích stanoveny směrné hodnoty, jako např. v Nizozemsku ( $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), ve Finsku ( $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a v Itálii ( $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) [97]. V roce 2006 byl stanoven Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA) tolerovatelný týdenní příjem (TWI) pro OTA  $120 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$  tělesné hmotnosti. Při vypití 0,5 l piva, ve kterém byla zjištěna nejvyšší koncentrace OTA  $82,5 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$  by byl spotřebitel vystaven dávce 41,2 ng OTA. Aby průměrný muž vážící 83 kg překročil TWI, musel by vypít 241 takto kontaminovaných püllitrových piv za týden. Dá se tedy konstatovat, že obsah OTA v těchto analyzovaných pivech nepředstavuje žádné významné zdravotní riziko.

#### 4.4 Analýza deoxynivalenolu metodou HPLC/MS

Deoxynivalenol a jeho metabolit deoxynivalenol-3- $\beta$ -D-glukopyranosid jsou nejčastěji vyskytující se mykotoxiny ve sladu a v pivu v Evropských zemích [100]. Vzhledem k tomu, že je pivo konzumováno mnoha lidmi po celém světě a jedná se o nejpobulárnější alkoholický nápoj na světě, jeho kvalita a obzvláště jeho dopad na budoucí zdravotní stav konzumenta nesmí být brán na lehkou váhu [101]. DON se může vyskytovat v pivu, jsou-li suroviny použité pro jeho výrobu kontaminované [66]. Jeho hlavním rostlinným metabolitem je D3G, který vykazuje sníženou toxicitu vůči rostlinám, a to jako takzvaný maskovaný mykotoxin [64].

Součástí této práce je sledování kontaminace mykotoxinem DON a jeho metabolitem D3G v 30 vzorcích piv, které byly analyzovány metodou HPLC/MS. Z 10 českých piv bylo pozitivních na DON 100 % vzorků a na D3G 30 % vzorků. Rozmezí kontaminace DON je  $3,07 - 10,70 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a D3G  $2,66 - 12,47 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Z 12 polských piv bylo pozitivních na DON 7 vzorků a na D3G 10 vzorků. DON byl nalezen ve vzorcích polských piv v rozmezí  $2,47 - 8,19 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a D3G v rozmezí  $2,59 - 10,68 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Z 8 slovenských piv bylo pozitivních na DON 7 vzorků a na D3G 6 vzorků. Kontaminace DON se pohybovala v rozmezí  $2,29 - 12,57 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , rozmezí kontaminace D3G je  $2,45 - 10,13 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Celkový přehled kontaminace piv na DON a D3G je uveden v Tabulce 24.

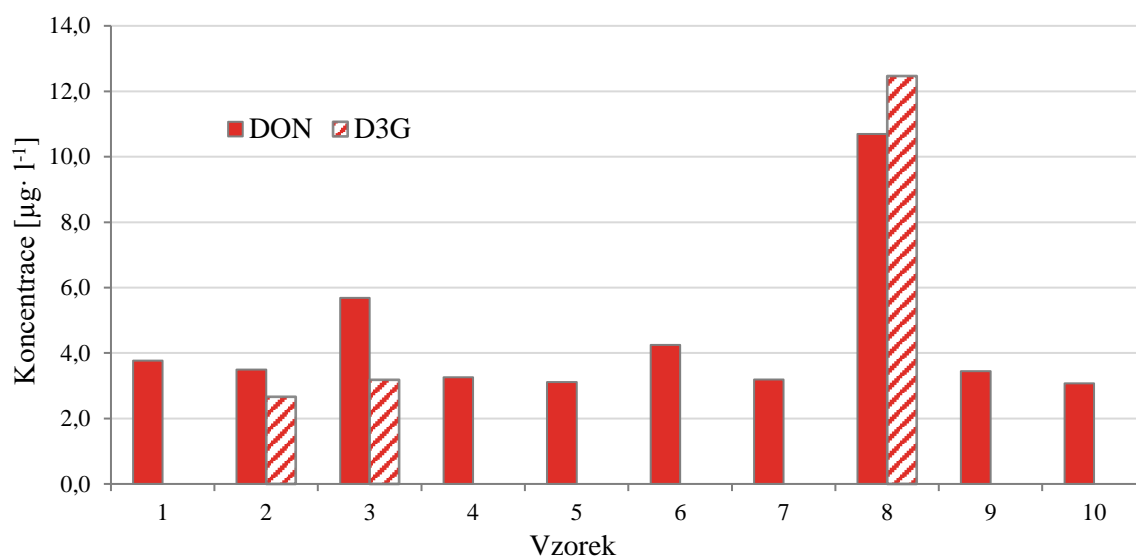
**Tabulka 24:** Celkový přehled kontaminace českých, polských a slovenských piv na DON a D3G

	Celkem vzorků	Mykotoxin	Pozitivních vzorků	Min [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	Max [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	Průměr [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]
Česká piva	10	DON	10	3,07	10,70	4,40
		D3G	3	2,66	12,47	6,10
Polská piva	12	DON	7	2,47	8,19	4,79
		D3G	10	2,59	10,68	4,94
Slovenská piva	8	DON	7	2,29	12,57	5,19
		D3G	6	2,45	10,13	5,63

Veškeré naměřené hodnoty pro vzorky českých, polských a slovenských piv jsou k dispozici v Tabulkách 25 – 27. Grafické znázornění kontaminace DON a D3G v jednotlivých pivech je zobrazeno na Obrázcích 35 – 37.

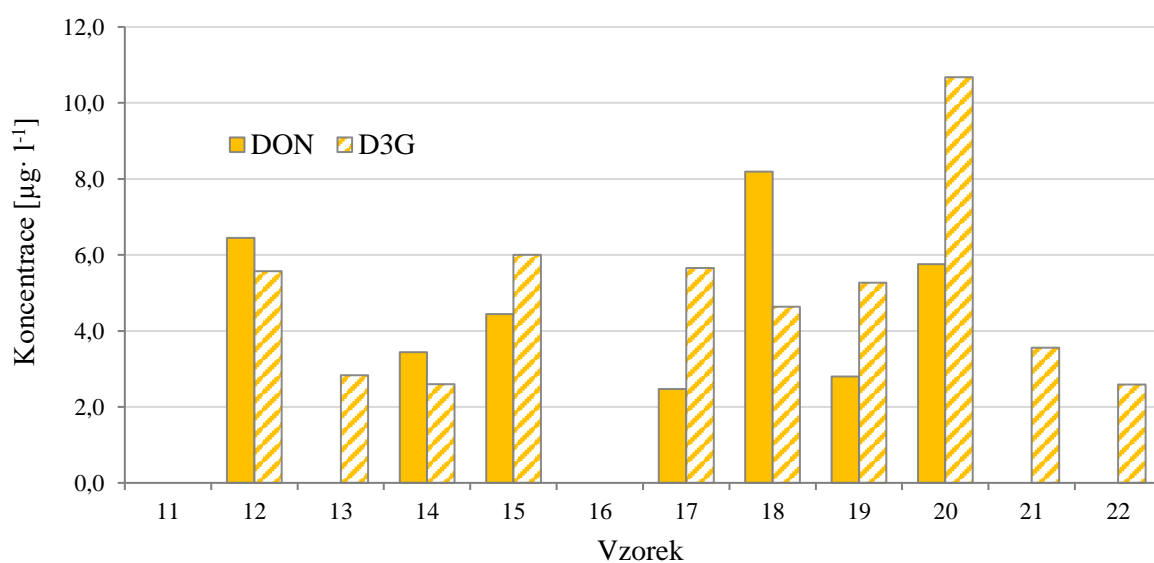
**Tabulka 25:** Stanovené hodnoty DON a D3G ve vzorcích českých piv metodou HPLC/MS

Číslo vzorku	Název piva	DON [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	D3G [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	D3G/DON
1	Bernard světlý	3,77	< LOQ	-
2	Budweiser budvar	3,50	2,66	0,49
3	Černá Hora	5,69	3,18	0,36
4	Gambrinus Excelent	3,26	< LOQ	-
5	Lobkowicz	3,11	< LOQ	-
6	Pardál Echt	4,25	< LOQ	-
7	Pilsner Urquell	3,19	< LOQ	-
8	Starobrno Medium	10,70	12,47	0,75
9	Velkopopovický Kozel Premium	3,45	< LOQ	-
10	Zlatopramen	3,07	< LOQ	-

**Obrázek 35:** Grafické znázornění výskytu DON a D3G v českých pivech**Tabulka 26:** Stanovené hodnoty DON a D3G ve vzorcích polských piv metodou HPLC/MS

Číslo vzorku	Název piva	DON [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	D3G [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	D3G/DON
11	Zubr	< LOQ	< LOQ	-
12	Tatra	6,45	5,57	0,56
13	Okocim	< LOQ	2,83	-
14	EB Premium	3,44	2,60	0,49
15	Żywiec APA	4,44	6,00	0,87
16	Harnaš	< LOQ	< LOQ	-

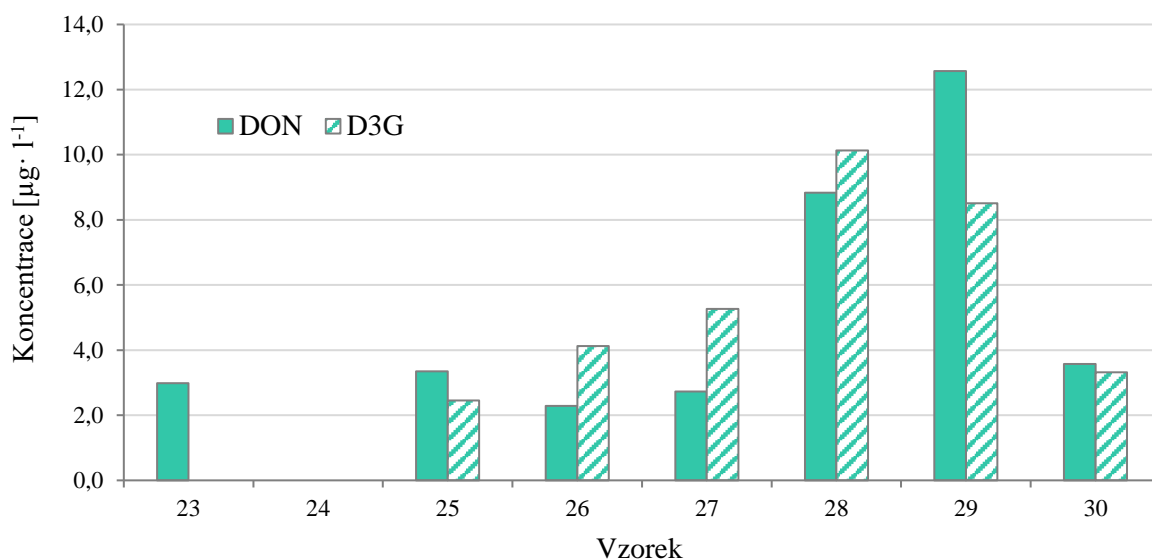
Číslo vzorku	Název piva	DON [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	D3G [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	D3G/DON
17	Tyskie Gronie	2,47	5,66	1,48
18	Zywiec biale	8,19	4,64	0,37
19	Zlote Lwy	2,80	5,27	1,22
20	Zywiec Marcowe	5,76	10,68	1,20
21	Zywiec premium	< LOQ	3,56	-
22	Ksiazecze Ciemne Preminum	< LOQ	2,59	-



Obrázek 36: Grafické znázornění výskytu DON a D3G v polských pivech

Tabulka 27: Stanovené hodnoty DON a D3G ve vzorcích slovenských piv metódou HPLC/MS

Číslo vzorku	Název piva	DON [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	D3G [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	D3G/DON
23	Corgoň	2,98	< LOQ	-
24	Stein	< LOQ	< LOQ	-
25	Zlatý bažant '73	3,35	2,45	0,47
26	Horden	2,29	4,12	1,17
27	Steiger tmavý	2,73	5,26	1,25
28	Steiger svetlý ležiak	8,83	10,13	0,74
29	Steiger výčapný ležiak svetlý	12,57	8,50	0,44
30	Zlatý bažant	3,58	3,32	0,60



**Obrázek 37:** Grafické znázornění výskytu DON a D3G ve slovenských pivech

Nejvyšší hodnota DON v českých pivech ( $10,70 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) byla nalezena ve vzorku č. 8, v němž byla nalezena i nejvyšší hodnota D3G ( $12,47 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ). U polských piv byla nalezena nejvyšší hodnota DON u vzorku č. 18 ( $8,19 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), kdežto nejvyšší hodnota D3G byla nalezena u vzorku č. 20 ( $10,68 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Ve slovenských pivech byla nejvyšší koncentrace DON ve vzorku č. 29 ( $12,57 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a nejvyšší hodnota D3G ve vzorku č. 28 ( $10,13 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Tyto zjištěné koncentrace jsou velmi nízké oproti některým předchozím průzkumům, které dokládají mírně vyšší kontaminaci. Ruprich a Ostrý v roce 1995 detekovali DON v 59 ze 77 vzorků piv v rozmezí  $7 - 70 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  [102]. Schothorst a Jekel v roce 2003 našli DON pouze ve 3 z 51 vzorků holandských piv, a to v rozmezí  $26 - 41 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  [103]. Papadopoulou-Bouraoui et al. v roce 2004 provedli výzkum 313 vzorků piv z evropských zemí. DON se vyskytoval v 272 vzorcích s koncentrací v rozmezí  $4,0 - 56,7 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  [66]. Další studie poskytující informace o výskytu DON v pivech jsou uvedeny v Tabulce 28.

Molární poměry D3G/DON se pohybovaly u českých piv v rozmezí  $0,36 - 0,75$ , u polských piv  $0,37 - 1,48$  a u slovenských piv  $0,44 - 1,25$ . Ve srovnání s DON, obsah D3G může být nižší, stejný nebo vyšší a není tedy možné předpovědět koncentraci D3G z měření samotného DON [64]. Varga et al. uvádí molární poměr D3G/DON v rozmezí  $0,11 - 1,25$  ve studii z roku 2013 při testování 374 piv [64], Kostelanska et al. (2009) uvádí molární poměry D3G/DON  $0,58 - 1,24$  ve 176 světlých a tmavých pivech [104]. Zvýšení poměru D3G/DON v pivu může být způsobeno různými postupy při výrobě piva. Během fáze klíčení při sladování hladiny DON a jeho metabolitů vzrůstají ve srovnání s koncentrací v původních zrnech ječmene. Zvyšování množství D3G je způsobeno zejména díky vysoké enzymatické aktivitě a pokračuje také při rmutování [64].

**Tabulka 28:** Některé studie zobrazující výskyt DON v pivech

Země původu piv	Počet vzorků pozitivních / celkem	Koncentrace DON [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	Reference
38 zemí světa	289 / 374	3,0 – 89,3	Varga et al. [64]
Chorvatsko	6 / 11	< 0,5 – 18,6	Bertuzzi et al. [61]
Itálie	13 / 17	< 0,5 – 6,7	
Polsko	57 / 57	7,5 – 70,2	Kuzdralinski et al. [74]
Belgie	8 / 8	13,4 – 25,8	
Německo	20 / 24	24,5 – 43,1	Rodriguez-Carrasco et al. [67]
Španělsko	45 / 60	25,2 – 47,7	
Brazílie	17 / 53	127 - 501	Piacentini et al. [101]
Česká republika	89 / 119	2,0 – 44,0	Běláková et al. [68]
Slovensko	9 / 12	5,5 – 36,9	Papadopoulou-Bouraoui et al. [66]
UK	25 / 33	4,1 – 30,8	
Rakousko	25 / 33	4,5 – 29,5	
Německo	45 / 46	4,0 – 40,5	
Francie	24 / 27	4,1 – 30,3	
Česká republika	10 / 10	3,07 – 10,70	
Polsko	7 / 12	2,47 – 8,19	
Slovensko	7 / 8	2,29 – 12,57	

Legislativní limity pro výskyt DON v pivu nebyly dosud stanoveny. V roce 1999 byl ovšem stanoven Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA) tolerovatelný denní příjem (TDI) pro DON na  $1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  tělesné hmotnosti. Nejvyšší nalezená koncentrace DON v analyzovaných pivech byla ve slovenském pivu  $12,57 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Aby průměrný muž vážící 83 kg překročil TDI, musel by vypít 13 takto kontaminovaných půllitrových piv za den. Nejedná se tedy o závažně vysokou koncentraci, která by představovala hrozbu na zdravotní stav konzumentů.

#### 4.5 Gushing

Gushing, neboli přepěňování piva, je negativní jev, při kterém dochází v okamžiku otevření láhve k náhlému samovolnému uvolnění oxidu uhličitého doprovázeného tvorbou obrovského množství krátce trvajících bublinek v celém objemu piva, což vede k rychlé expanzi s prudkým vzpěněním piva z láhve [105]. Vliv na přepěňování piva mají hydrofobiny vznikající při napadení obilky ječmene mikroskopickými vláknitými houbami, které navíc mohou produkovat mykotoxiny [53]. Jedním z cílů této práce bylo posoudit existenci vzájemných vztahů mezi gushingem a přítomností mykotoxinů v pivu. Úroveň gushingu byla stanovena celkem ve 30 vzorcích piv českého, polského a slovenského původu metodou vyvinutou ve sladařském ústavu v Brně (metoda VÚPS). Výsledné hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 29.

V českých pivech se naměřené hodnoty gushingu pohybovaly v rozmezí 0 – 99 g·500 ml<sup>-1</sup>. Nejvyššího gushingu dosáhlo pivo, u kterého byla zjištěna i nejvyšší koncentrace OTA (82,5 ng·l<sup>-1</sup>) a které neprošlo procesem pasterizace. Pasterizace piva na 60 °C může přispívat ke snížení gushingu a to tak, že dochází ke zvyšování vnitřního tlaku v pivu, což vede k rozpuštění mikroskopických bublinek [106]. Nejvyšší koncentrace DON byla nalezena ve vzorku piva č. 8 (10,70 µg·l<sup>-1</sup>), kde byla zjištěna i zvýšená koncentrace OTA (79,9 ng·l<sup>-1</sup>). Toto pivo nebylo pasterizováno a vykazovalo gushing 40 g·500 ml<sup>-1</sup>.

V polských pivech se úroveň gushingu pohybovala v rozmezí 0 – 96 g·500 ml<sup>-1</sup>. Všechna tato piva byla pasterizována. Nejvyšší hodnota gushingu byla nalezena ve vzorku č. 21, ve kterém byla koncentrace OTA 2,7 ng·l<sup>-1</sup> a koncentrace DON byla pod limitem kvantifikace. Ostatní vzorky piva, ve kterých nebyla nalezena nulová úroveň gushingu, měly koncentraci OTA pod limitem kvantifikace.

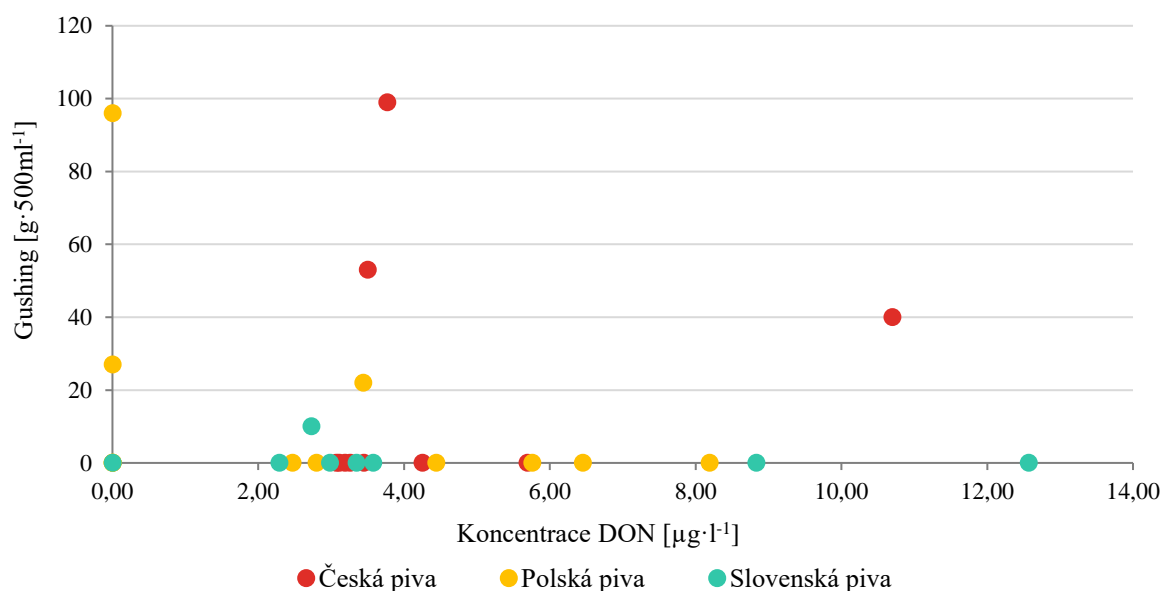
U vzorků slovenských piv vykazoval gushing pouze jediný vzorek, a to vzorek č. 27 s naměřenou hodnotou 10 g·500 ml<sup>-1</sup>. Toto pivo bylo pasterizováno a také obsahovalo nejvyšší koncentraci OTA (78,5 ng·l<sup>-1</sup>) z této skupiny piv. Koncentrace DON v tomto pivu je 2,73 µg·l<sup>-1</sup>.

**Tabulka 29:** Hodnoty stanovení gushingu v analyzovaných vzorcích piv českého, polského a slovenského původu

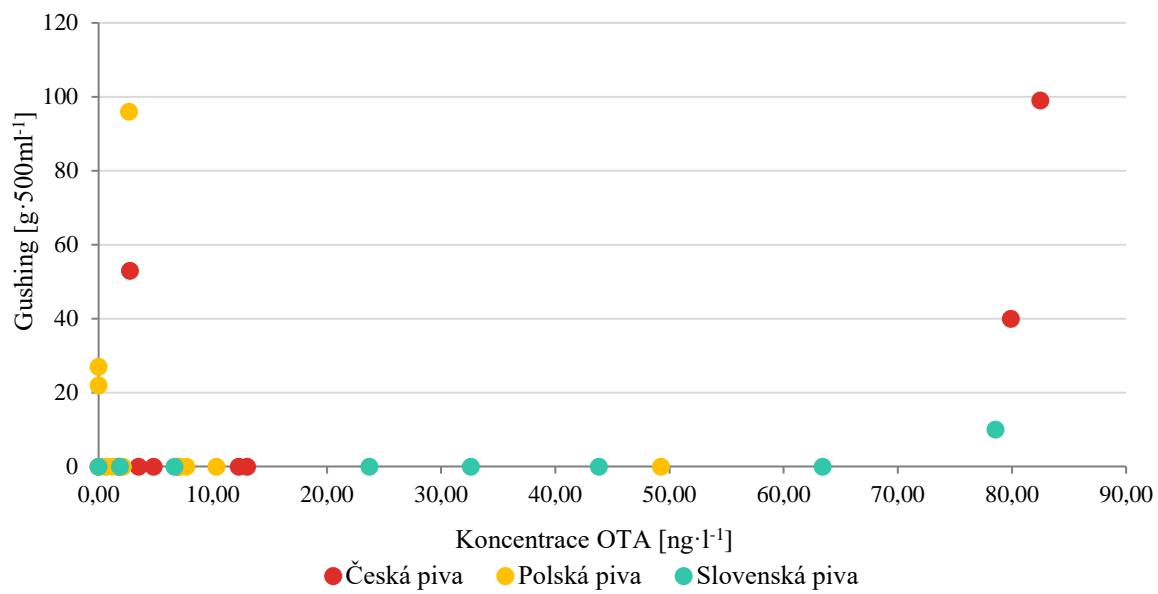
Země původu	Číslo vzorku	Množství alkoholu [%]	Pasterizace	DON [µg·l <sup>-1</sup> ]	OTA [ng·l <sup>-1</sup> ]	Gushing [g·500 ml <sup>-1</sup> ]
Česká republika	1	4,9	NE	3,77	82,5	99
	2	5,0	ANO	3,50	2,7	53
	3	4,8	ANO	5,69	< LOQ	0
	4	4,7	ANO	3,26	12,3	0
	5	4,7	ANO	3,11	3,5	0
	6	4,5	ANO	4,25	13,0	0
	7	4,4	ANO	3,19	7,0	0
	8	4,7	NE	10,70	79,9	40
	9	4,8	ANO	3,45	4,8	0
	10	4,9	ANO	3,07	1,8	0
Polsko	11	6,0	ANO	< LOQ	< LOQ	27
	12	5,0	NE	6,45	1,2	0
	13	5,6	ANO	< LOQ	< LOQ	0
	14	5,2	ANO	3,44	< LOQ	22
	15	5,4	ANO	4,44	0,6	0
	16	6,0	ANO	< LOQ	0,6	0
	17	5,5	ANO	2,47	2,1	0
	18	4,9	ANO	8,19	7,1	0
	19	5,6	ANO	2,80	10,3	0
	20	5,4	ANO	5,76	49,3	0
	21	5,6	ANO	< LOQ	2,7	96

Země původu	Číslo vzorku	Množství alkoholu [%]	Pasterizace	DON [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	OTA [ $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	Gushing [ $\text{g}\cdot 500\text{ ml}^{-1}$ ]
	22	4,1	ANO	< LOQ	7,7	0
Slovensko	23	4,8	ANO	2,98	< LOQ	0
	24	5,0	ANO	< LOQ	63,4	0
	25	4,5	ANO	3,35	1,9	0
	26	5,0	ANO	2,29	32,6	0
	27	4,5	ANO	2,73	78,5	10
	28	5,0	ANO	8,83	23,7	0
	29	4,5	ANO	12,57	43,8	0
	30	5,0	-	3,58	6,6	0

Grafické porovnání úrovně gushingu pív s množstvím DON v nich přítomných je zobrazeno na Obrázku 38 a porovnání s množstvím OTA je zobrazeno na Obrázku 39. Ani v jednom případě nebyla zpozorována žádná vzájemná závislost mezi těmito dvěma parametry. Bylo tedy prokázáno, že přítomnost a množství mykotoxinů v pivu nemůže být pokládán za přímý faktor vzniku gushingu. Gushing piva může sloužit pouze jako signál pro spotřebitele na možný výskyt některých mykotoxinů [106]. Těchto závěrů docílili Munar a Sebree (1997), stejně jako i Sarlin et. al (2005), kteří uvedli, že přítomnost DON v pivu a vznik gushingu mohou být na sobě nezávislé [55].



**Obrázek 38:** Přítomnost DON v analyzovaných pivech versus úroveň gushingu



**Obrázek 39:** Přítomnost OTA v analyzovaných pivech versus úroveň gushingu

## 5 ZÁVĚR

Sledování potenciálně toxických látek vstupujících do potravního řetězce člověka je nedílnou součástí moderní lidské společnosti. V zájmu ochrany veřejného zdraví je nezbytné udržet množství kontaminujících látek na toxikologicky přijatelných úrovních. Mezi kontaminující látky patří i mykotoxiny, což jsou sekundární metabolity vláknitých mikroskopických hub. Vzhledem k tomu, že vykazují vysokou toxicitu, je jejich výskyt regulován legislativou a byly tedy nastaveny maximální limity v jednotlivých potravinách a surovinách pro výrobu potravin. Maximální povolené limity vybraných mykotoxinů v potravinách jsou stanoveny Nařízením komise (ES) č.1881/2006. Mykotoxiny se nejčastěji vyskytují v obilovinách a tedy i ve sladovnickém ječmeni. Ačkoli jsou mykotoxiny poměrně stabilní sloučeniny a mohou přecházet z kontaminovaného ječmene až do piva, nejsou legislativní limity pro pivo doposud stanoveny.

Tato diplomová práce se zaměřuje na výskyt mykotoxinů v pivech se zaměřením na fusariové mykotoxiny a ochratoxin A. V práci proto byla shrnuta charakteristika fusariových mykotoxinů a ochratoxinů, byl popsán jejich přenos ze sladovnického ječmene do piva a také jejich výskyt v pivech. Další kapitoly se věnovaly technologii výroby sladu a piva a následně i metodám stanovení mykotoxinů.

V rámci této diplomové práce bylo analyzováno na přítomnost ochratoxinu A, deoxynivalenolu a jeho metabolitu deoxynivalenol-3- $\beta$ -D-glukopyranosidu celkem 30 druhů piv. Jednalo se o 10 piv českých, 12 piv polských a 8 piv slovenských. Pro analytické stanovení OTA v pivu byla použita metoda ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s fluorescenční detekcí (UPLC/FLR). OTA byl nalezen v koncentraci větší než limit kvantifikace ( $LOQ = 0,5 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ) v 9 vzorcích českých piv, 9 vzorcích polských piv a 7 vzorcích piv slovenských. Rozmezí kontaminace OTA v českých pivech byla  $1,8 - 82,5 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ , v polských pivech  $0,6 - 49,3 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$  a ve slovenských pivech  $1,9 - 78,5 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ . V porovnání s některými publikovanými daty byly naměřené hodnoty OTA poměrně nízké. Přestože bylo kontaminováno OTA celkem 83 % vzorků všech piv, můžeme říct, že obsah OTA v analyzovaných pivech nepředstavuje pro konzumenta významné zdravotní riziko.

Všech 30 vzorků piv byly následně podrobeny analýze metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (HPLC/MS), kdy byla sledována kontaminace mykotoxinem DON a D3G. V koncentraci větší než limit kvantifikace ( $LOQ = 2,26 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) byl DON nalezen ve všech 10 vzorcích českých piv, kdežto D3G ( $LOQ = 2,33 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) byl nalezen pouze ve 3 vzorcích. Rozmezí kontaminace DON byla  $3,07 - 10,70 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a D3G  $2,66 - 12,47 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Z 12 polských piv bylo pozitivních na DON 7 vzorků a na D3G 10 vzorků. DON byl nalezen ve vzorcích polských piv v rozmezí  $2,47 - 8,19 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a D3G v rozmezí  $2,59 - 10,68 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Z 8 slovenských piv bylo pozitivních na DON 7 vzorků v rozmezí  $2,29 - 12,57 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a na D3G 6 vzorků v rozmezí  $2,45 - 10,13 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Tyto naměřené hodnoty jsou zcela v souladu s publikovanými daty, některé studie uvádějí i mírně vyšší kontaminaci. Stejně jako u OTA, tak i přítomnost DON a jeho metabolitu D3G v těchto analyzovaných pivech v takto nízkých koncentracích nepředstavuje žádné významné zdravotní riziko pro konzumenta.

Dalším cílem této práce bylo posoudit existenci vzájemných vztahů mezi přítomností DON a OTA v pivu a gushingem. Úroveň gushingu byla stanovena celkem ve 30 vzorcích piv českého, polského a slovenského původu metodou vyvinutou ve sladařském ústavu v Brně (metoda VÚPS). U českých piv se gushing vyskytoval v rozmezí 0 – 99 g·500ml<sup>-1</sup>, u polských piv v rozmezí 0 – 96 g·500ml<sup>-1</sup>, u slovenských piv vykazoval gushing pouze jediný vzorek s naměřenou hodnotou 10 g·500ml<sup>-1</sup>. Mezi přítomností DON a OTA v pivech a úrovní gushingu nebyla nalezena žádná vzájemná souvislost, což jen potvrzuje závěry některých publikací.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] VELÍŠEK, J. a HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin II*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [2] ZÖLLNER, P. a MAYER-HELM, B. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2006, Vol. 1136, pp. 123-169.
- [3] BETINA, V. *Mykotoxíny: chémia - biológia - ekológia*. Bratislava: Alfa, 1990. Edícia potravinárskej literatúry. ISBN 80-050-0631-4.
- [4] KALHOTKA, L. *Mikromycety v prostředí člověka: vláknité mikromycety (plísně) a kvasinky*. V Brně: Mendelova univerzita, 2014. ISBN 978-80-7375-943-8.
- [5] BENNETT, J. W. a KLICH, M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. 2003, vol. 16, issue 3, pp. 497-516.
- [6] POLISENSKA, I., PFOHL-LESZKOWICZ, A., HADJEBA, K., DOHNAL, V., JIRSA, O., DENESOVA, O., JEZKOVA, A. a MACHARACKOVA, P. Occurrence of ochratoxin A and citrinin in Czech cereals and comparison of two HPLC methods for ochratoxin A detection. *Food Additives and Contaminants*. 2010, vol. 27, issue 11, pp. 1545-1557.
- [7] SUCHÝ, P. a HERZIG, I. Plísně a mykotoxiny - Prevence jejich vzniku a dekontaminace v krmivech. *Vědecký výbor výživy zvířat* [online]. 2005 [cit. 7. 8. 2016]. Dostupné na www: <http://www.vuzv.cz/sites/File/vybor/Hezig,%20Such%20BD-Plisne%20a%20mykotoxiny.pdf>
- [8] RADOVÁ-SYPECKÁ, Z. a HAJŠLOVÁ, J. Mykotoxiny v zemědělské produkci ve vazbě na agrární systém. *Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí* [online]. 2004 [cit. 2. 6. 2016]. Dostupné na www: <http://www.phyto-sanitary.org/projekty/2003/vvf-13-03.pdf>
- [9] MALÍŘ, F., OSTRÝ, V. a NOVOTNÁ, E. Toxické účinky vybraných trichotecenových (epoxytrichotecenových) mykotoxinů u člověka. *Kontakt: časopis pro ošetřovatelství a sociální vědy ve zdraví a nemoci*. 2013, roč. XV, č. 1, str. 89-99.
- [10] Mycotoxins Factsheet.[online]. 2011 [cit. 8. 8. 2016]. Dostupné na www: [https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/Factsheet%20Mycotoxins\\_2.pdf](https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/Factsheet%20Mycotoxins_2.pdf)
- [11] HAJŠLOVÁ, J. Mykotoxiny a jejich konjugáty v potravinářských surovinách a krmivech: trendy, rizika dietární expozice, možnosti prognózy osudu při zpracování. *Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí* [online]. 2008 [cit. 2. 6. 2016]. Dostupné na www: <http://www.phyto-sanitary.org/projekty/2008/Projekt1.pdf>
- [12] RADOVÁ-SYPECKÁ, Z. a HAJŠLOVÁ, J. Incidence mykotoxinů v cereáliích produkovaných v ČR, vazba na agrotechnická opatření. *Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí* [online]. 2003 [cit. 7. 8. 2016]. Dostupné na www: <http://www.phyto-sanitary.org/projekty/2002/vvf-04-02.pdf>
- [13] SCHATZMAYR, G. a STREIT, E. Global occurrence of mycotoxins in the food and feed chain: facts and figures. *World Mycotoxin Journal*. 2013, vol. 6, issue 3, pp. 213-222. ISSN 1875-0710.

- [14] Occurrence of mycotoxins in various geographic regions [online]. [cit. 8. 8. 2016]. Dostupné na www: <http://wageningenacademic.metapress.com>
- [15] SÝKOROVÁ, S. a NEDĚLNÍK, J. Mykotoxiny – stav výskytu v zemědělských surovinách a krmivech v ČR a v Evropě. *Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí* [online]. 2004 [cit. 2. 6. 2016]. Dostupné na www: <http://www.phyotosanitary.org/old/projekty/2003/vvf-15-03.pdf>
- [16] FUNG, F. a CLARK, R. F. Health Effects of Mycotoxins: A Toxicological Overview. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* [online]. 2004, vol. 42, issue 2, pp. 217-234 [cit. 3. 6. 2016]. DOI: 10.1081/CLT-120030947. ISSN 0731-3810. Dostupné na www: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1081/CLT-120030947>
- [17] COLE, R. J. a COX, R. H. The Trichothecenes. *Handbook of Toxic Fungal Metabolites* [online]. Elsevier, 1981, s. 153 [cit. 3. 6. 2016]. DOI: 10.1016/B978-0-12-179760-7.50010-3. Dostupné na www: [https://www.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=9oZKi3n9QhkC&oi=fnd&pg=PP1&dq=COLE,+R.J.+a+COX,+R.H..+Handbook+of+Toxic+Fungal+Metabolites.+New+York:+Academic+Press,+1981.&ots=s8aRWXIfuK&sig=\\_W3y9n8TVvtBPuTA0CGcSBPXfZY&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://www.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=9oZKi3n9QhkC&oi=fnd&pg=PP1&dq=COLE,+R.J.+a+COX,+R.H..+Handbook+of+Toxic+Fungal+Metabolites.+New+York:+Academic+Press,+1981.&ots=s8aRWXIfuK&sig=_W3y9n8TVvtBPuTA0CGcSBPXfZY&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
- [18] GIRARDET, C., BONNET, M. S., JDIR, R., et al. The Food-Contaminant Deoxynivalenol Modifies Eating by Targeting Anorexigenic Neurocircuitry. *PLoS ONE* [online]. 2011, vol. 6, issue 10, e26134- [cit. 9. 6. 2016]. DOI: 10.1371/journal.pone.0026134. ISSN 1932-6203. Dostupné na www: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0026134>
- [19] HAJŠLOVÁ, J. Mykotoxiny. *Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí* [online]. 2009 [cit. 9. 6. 2016]. Dostupné na www: <http://www.phyotosanitary.org/projekty/2009/Projekt1.pdf>
- [20] LI, Y., WANG, Z., BEIER, R. C., SHEN, J., SMET, D., SAEGER, S. a ZHANG, S. T-2 Toxin, a Trichothecene Mycotoxin: Review of Toxicity, Metabolism, and Analytical Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011, vol. 59, issue 8, pp. 3441-3453.
- [21] LI, Y., ZHANG, J., WU, Y., LIU, G., SONG, L., LI, Y., YANG, J. a YOU, Y. High-sensitive Chemiluminescent immunoassay investigation and application for the detection of T-2 toxin and major metabolite HT-2 toxin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2016 [cit. 11. 6. 2016]. DOI: 10.1002/jsfa.7801. ISSN 00225142. Dostupné na www: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.7801>
- [22] MARIN, S., RAMOS, A. J., CANO-SANCHO, G. a SANCHIS, V. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*. 2013, vol. 60, pp. 218-237.
- [23] VOSS, K.A., SMITH, G. W. a HASCHEK, W. M. Fumonisin: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. *Animal Feed Science and Technology*. 2007, vol. 137, issue 3-4, pp. 299-325.
- [24] SORIANO, J.M. a DRAGACCI, S. Occurrence of fumonisins in foods. *Food Research International*. 2004, vol. 37, issue 10, pp. 985-1000.
- [25] Fumonisin B1 [online]. [cit. 2. 9. 2016]. Dostupné na www: [http://www.chemicalbook.com/Search\\_EN.aspx?keyword=FUMONISIN%20B1](http://www.chemicalbook.com/Search_EN.aspx?keyword=FUMONISIN%20B1)

- [26] DRÁPAL, J., ETTLEROVÁ, K., HAJŠLOVÁ, J., JECHOVÁ, M., KOZÁKOVÁ, M., MALÍŘ, F., MÜLLEROVÁ, D., OSTRÝ, V., RUPRICH, J., SOSNOVCOVÁ, J., ŠPELINA, V. a WINKLEROVÁ, D. Pravděpodobnostní modelování přívodu zearalenonu z potravin na bázi obilovin. *Vědecký výbor pro potraviny*. 2007. VVP:INFO/2007/21/deklas/ZEN
- [27] MALÍŘ, F. a OSTRÝ, V. *Vláknité mikromycety (plísně), mykotoxiny a zdraví člověka*. Brno: Mikada, 2003. ISBN 80-7013-395-3.
- [28] KARAASLAN, M. a ARSLANĞRAY, Y. Aflatoxins B1, B2, G1, and G2 contamination in ground red peppers commercialized in Sanliurfa, Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2015, vol. 187, issue 4.
- [29] Chemická struktura aflatoxinu B1, B2, G1, G2, M1 a M2 [online]. [cit. 7. 9. 2016]. Dostupné na www: [https://www.researchgate.net/figure/262878341\\_fig2\\_Fig-2-Chemical-structure-of-aflatoxin-B1-B2-M1-and-M2](https://www.researchgate.net/figure/262878341_fig2_Fig-2-Chemical-structure-of-aflatoxin-B1-B2-M1-and-M2)
- [30] REDDY, L. a BHOOLA, K. Ochratoxins—Food Contaminants: Impact on Human Health. *Toxins* [online]. 2010, vol. 2, issue 4, pp. 771-779 [cit. 19. 9. 2016]. DOI: 10.3390/toxins2040771. ISSN 2072-6651. Dostupné na www: <http://www.mdpi.com/2072-6651/2/4/771/>
- [31] MEULENBERG, E. P. Immunochemical Methods for Ochratoxin A Detection: A Review. *Toxins* [online]. 2012, vol. 4, issue 12, pp. 244-266 [cit. 19. 9. 2016]. DOI: 10.3390/toxins4040244. ISSN 2072-6651. Dostupné na www: <http://www.mdpi.com/2072-6651/4/4/244/>
- [32] BERTHILLER, F., CREWS, C., DALL'ASTA, C. et al. Masked mycotoxins: A review. *Molecular Nutrition*. 2013, vol. 57, issue 1, pp. 165-186.
- [33] RYCHLIK, M., HUMPF, H., MARKO, D., DÄNICKE, S., MALLY, A., BERTHILLER, F., KLAFFKE, H. a LORENZ, N. Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including “masked” mycotoxins. *Mycotoxin Research*. 2014, vol. 30, issue 4, pp. 197-205.
- [34] Deoxynivalenol-3-β-D-glukopyranosid [online]. [cit. 24. 9. 2016]. Dostupné na www: [http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB72456507.htm](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB72456507.htm)
- [35] BASAŘOVÁ, G. *České pivo*. 3. dopl. vyd. Praha: Havlíček Brain Team, 2011. ISBN 978-80-87109-25-0.
- [36] POLÁK, B., ONDERKA, M. a VÁŇOVÁ, M. *Základy pěstování a zpracování sladovnického ječmene*. Vyd. 1. V Praze: Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR, 1998. ISBN 80-710-5166-7
- [37] BASAŘOVÁ, G., ŠAVEL, J., BASAŘ, P. a LEJSEK, T. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010. ISBN 978-80-7080-734-7.
- [38] KOSAŘ, K. *Technologie výroby sladu a piva*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2000. ISBN 80-902-6586-3.
- [39] BENDA, V. *Biologie II: Nauka o potravinářských surovinách*. 3. přepr. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2000. ISBN 80-708-0402-5.
- [40] KLIMEŠOVÁ, J., STŘEDA, T. a HAJZLER, M. Yield and quality of spring barley in relation to root system size. In: *MendelNet 2011: Proceedings of International Ph.D.*

- Students Conference* [online]. Brno: Mendel University in Brno, Faculty of Agronom, 2011, s. 648-655 [cit. 14. 10. 2016]. ISBN 978-80-7375-563-8. Dostupné na [www: http://mnet.mendelu.cz/mendelnet2011/articles/27\\_klimesova\\_506.pdf](http://mnet.mendelu.cz/mendelnet2011/articles/27_klimesova_506.pdf)
- [41] ČERNÝ, L. *Jarní sladovnický ječmen: pěstitelský rádce*. Praha: Pro katedru rostlinné výroby, FAPPZ, ČZU v Praze vydalo vydavatelství Kurent, 2007. ISBN 978-80-87111-04-8.
- [42] BASAŘOVÁ, G. *Sladařství: teorie a praxe výroby sladu*. Praha: Havlíček Brain Team, 2015. ISBN 978-80-87109-47-2.
- [43] PSOTA, V., SACHAMBULA, L., a TVARŮŽEK, J. Vybraná kritéria kvality ječmene pro výrobu sladu. *Úroda, vědecká příloha* [online]. 2012, č. 12, s. 435-438 [cit. 15. 10. 2016]. Dostupné na [www: http://www.vuvt.cz/content/files/aktualni\\_poznatky/vedecka\\_priloha\\_2012.pdf](http://www.vuvt.cz/content/files/aktualni_poznatky/vedecka_priloha_2012.pdf)
- [44] HORÁKOVÁ, V., DVOŘÁČKOVÁ, O. a MEZLÍK, T. *Seznam doporučených odrůd 2014: pšenice ozimá, ječmen jarní, ječmen ozimý, tritikale ozimé, oves setý (pluchatý), hrách polní*. Brno: Ústřední a kontrolní ústav zemědělský Brno, Národní odrůdový úřad, 2014. ISBN 978-80-7401-089-7.
- [45] MIKYŠKA, A. a PROKEŠ, J. Systém skladování ječmene a jeho vliv na kvalitu sladu a piva. *Kvasný průmysl*. 2009, roč. 55, č. 3.
- [46] BRÁNYIK, T., a DOSTÁLEK, P. Sladařství: sylabus k předmětu. In: *ESO: Vysoká škola chemicko - technologická v Praze* [online]. 2010 [cit. 15. 11 2014]. Dostupné na [www: http://old.vscht.cz/kch/download/sylaby/sladarstvi.pdf](http://old.vscht.cz/kch/download/sylaby/sladarstvi.pdf)
- [47] Druhy sladů [online]. [cit. 31. 3. 2016]. Dostupné na [www: http://www.slad.cz/slady.php](http://www.slad.cz/slady.php)
- [48] KOLLÁR, A. *Pivo: zdraví, souvislosti, žízeň, obezita, alkoholismus, kuriozity*. Brno: Akademické nakladatelství CERM, 2012, 153 s. ISBN 978-80-7204-795-6.
- [49] MIKYŠKA, A., HAŠKOVÁ, D., HORÁK, T. a JURKOVÁ, M. Vliv typu chmelové suroviny na antioxidační vlastnosti piva. *Kvasný průmysl*. 2010, roč. 56, č. 7-8.
- [50] Schéma výroby piva [online]. [cit. 17. 2. 2017]. Dostupné na [www: http://www.mobilnipivovary.cz/technicke-reseni-vyrobniho-procesu-piva-v-minipivovarech-mobbeer-a-hardbeer/](http://www.mobilnipivovary.cz/technicke-reseni-vyrobniho-procesu-piva-v-minipivovarech-mobbeer-a-hardbeer/)
- [51] VYHLÁŠKA Ministerstva zemědělství ze dne 23. února 2000, kterou se mění vyhláška Ministerstva zemědělství č. 335/1997 Sb., kterou se provádí § 18 písm. a), d), h), i), j) a k) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro nealkoholické nápoje a koncentráty k přípravě nealkoholických nápojů, ovocná vína, ostatní vína a medovinu, pivo, konzumní líh, lihoviny a ostatní alkoholické nápoje, kvasný ocet a droždí. Sbírnka zákonů č. 45/2000. Str. 567, částka 16.
- [52] VERHOEF, B. *Encyklopedie piva*. 2. vyd. Čestlice: Rebo Productions, 1999. ISBN 80-723-4116-2.
- [53] BĚLÁKOVÁ, S., BENEŠOVÁ, K., MIKULÍKOVÁ, R. a SVOBODA, Z. Faktory ovlivňující gushing. *Kvasný průmysl*. 2012, roč. 58, č. 3, s. 62-65.

- [54] POŠTULKOVÁ, M., VITOUŠOVÁ, K., NOVÁK, P., FIALA, J., RŮŽIČKA, M. a BRÁNYIK, T. Historie a nové trendy v oblasti výzkumu přepěňování piva. *Kvasný průmysl*. 2013, roč. 59, č. 10-11, s. 317-320.
- [55] SARLIN, T., NAKARI-SETALA, T., LINDER, M., PENTTILA, M. a HAIKARA, A. Fungal Hydrophobins as Predictors of the Gushing Activity of Malt. *Journal of the Institute of Brewing*. 2005, vol. 111, issue 2, pp. 105-111.
- [56] SHOKRIBOUSJEIN, Z., GALAN, D. R., MICHIELS, C., GEBRUERS, K., VERACHTERT, H., MARTENS, J., PEETERS, C. a DERDELINCKX, G. Effect of a magnetic field on dispersion of a hop extract and the influence on gushing of beer. *Journal of Food Engineering*. 2015, vol. 145, pp. 10-18.
- [57] POSTULKOVA, M., RIVEROS-GALAN, D., CORDOVA-AGIULAR, K., ZITKOVA, K., VERACHTERT, H., DERDELINCKX, G., DOSTALEK, P., RUZICKA, M. C. a BRANYIK, T. Technological possibilities to prevent and suppress primary gushing of beer. *Trends in Food Science*. 2016, vol. 49, pp. 64-73.
- [58] ŠAVEL, J., KOŠIN, P. a BROŽ, A. Náchylnost piva k přepěňování vyvolanému různou dobou třepání láhve. *Kvasný průmysl*. 2014, roč. 60, č. 6, s. 151-159.
- [59] LINDER, M. B., SZILVAY, G. R., NAKARI-SETÄLÄ, T. a PENTTILÄ, M. E. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005, vol. 29, issue 5, pp. 877-896.
- [60] MALACHOVÁ, A., HAJŠLOVÁ, J., EHRENBERGEROVÁ, J., KOSTELANSKÁ, M., ZACHARIÁŠOVÁ, M., URBANOVÁ, J., CERKAL, R., ŠAFRÁNKOVÁ, I., MARKOVÁ, J., VACULOVÁ, K. a HRSTKOVÁ, P. Fusariové mykotoxiny v zrně ječmene jarního a jejich přenos do sladu. *Kvasný průmysl*. 2010, roč. 56, č. 3, s. 131-137.
- [61] BERTUZZI, T., RASTELLI, S., MULAZZI, A., DONADINI, G. a PIETRI, A. Mycotoxin occurrence in beer produced in several European countries. *Food Control*. 2011, vol. 22, issue 12, pp. 2059-2064.
- [62] WOLF-HALL, C. E. Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. *International Journal of Food Microbiology*. 2007, vol. 119, issue 1-2, pp. 89-94.
- [63] SCHWARZ, P. B., CASPER, H. H., a BEATTIE, S. Fate and development of naturally occurring Fusarium mycotoxins during malting and brewing. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 1995, vol. 53, pp. 121-127.
- [64] VARGA, E., MALACHOVA, A., SCHWARTZ, H., KRŠKA, R. a BERTHILLER, F. Survey of deoxynivalenol and its conjugates deoxynivalenol-3-glucoside and 3-acetyl-deoxynivalenol in 374 beer samples. *Food Additives*. 2013, vol. 30, issue 1, pp. 137-146.
- [65] Beer Statistics - 2016 Edition. In: *The Brewers of Europe* [online]. Belgium, 2016. [cit. 29. 3. 2017]. ISBN 978-2-9601382-7-6. Dostupné na [www: http://www.brewersofeurope.org/site/media-centre/index.php?doc\\_id=840&class\\_id=31&detail=true](http://www.brewersofeurope.org/site/media-centre/index.php?doc_id=840&class_id=31&detail=true)
- [66] PAPADOPOULOU-BOURAOUI, A., T. VRABCHEVA, S. VALZACCHI, J. STROKA a E. ANKLAM. Screening survey of deoxynivalenol in beer from the

- European market by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Food Additives and Contaminants*. 2004, vol. 21, issue 6, pp. 607-617.
- [67] RODRÍGUEZ-CARRASCO, Y., FATTORE, M., ALBRIZIO, S., BERRADA, H. a MAÑES, J. Occurrence of Fusarium mycotoxins and their dietary intake through beer consumption by the European population. *Food Chemistry*. 2015, vol. 178, pp. 149-155.
- [68] BĚLÁKOVÁ, S., K. BENEŠOVÁ, R. MIKULÍKOVÁ, Z. SVOBODA a J. ČÁSLAVSKÝ. Monitoring výskytu deoxynivalenolu v pivech z obchodní sítě v letech 2009–2012. *Kvasný průmysl*. 2013, roč. 59, č. 10-11, s. 292-295.
- [69] GUMUS, T., ARICI, M. a DEMIRCI, M. A Survey of Barley, Malt and Beer Contamination with Ochratoxin A in Turkey. *Journal of the institute of brewing*. 2004, vol. 110, issue 2, pp. 146-149.
- [70] VISCONTI, A., PASCALE, M. a CENTONZE, G. Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2000, vol. 888, issue 1-2, pp. 321-326. ISSN 00219673.
- [71] ARAGUAS, C., GONZALEZ-PENAS, E. a LOPEZ DE CERAIN, A. Study on ochratoxin A in cereal-derived products from Spain. *Food chemistry*. 2005, vol. 92, pp. 459-464. ISSN 0308-8146.
- [72] BĚLÁKOVÁ, S., BENEŠOVÁ, K., MIKULÍKOVÁ, R. a SVOBODA, Z. Výskyt ochratoxinu A v pivech. *Kvasný průmysl*. 2015, roč. 61, č. 2, s. 34-37.
- [73] BAUER, J. I., GROSS, M., GOTTSCHALK, C. a USLEBER, E. Investigations on the occurrence of mycotoxins in beer. *Food Control*. 2016, vol. 63, pp. 135-139. ISSN 09567135.
- [74] KUZDRALIŃSKI, A., SOLARSKA, E. a MUSZYŃSKA, M. Deoxynivalenol and zearalenone occurrence in beers analysed by an enzyme-linked immunosorbent assay method. *Food Control*. 2013, vol. 29, issue 1, pp. 22-24. ISSN 09567135.
- [75] KOPLÍK, R. Přednášky z předmětu Analytické metody ve forenzní analýze: Odběr vzorků [online]. [cit. 24. 3. 2017]. Dostupné na www: <http://web.vscht.cz/~koplikr/>
- [76] ZACHARIÁŠOVÁ, M., HAJŠLOVÁ, J., URBANOVÁ, J., KOCOUREK, V. a CUHRA, P. Pesticidy a mykotoxiny - vzorkování a analytické metody. In: STEJSKAL, V. a FRAŇKOVÁ, M. Metody odběru a analýzy vzorků komodit, potravin a půdy. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2009, s. 20-23. ISBN 978–80–7427–025–3.
- [77] RAHMANI, A., JINAP, S. a SOLEIMANY, F. Qualitative and Quantitative Analysis of Mycotoxins. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2009, vol. 8, issue 3, pp. 202-251.
- [78] TURNER, N. W., SUBRAHMANYAM, S. a PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2009, vol. 632, issue 2, pp. 168-180.
- [79] ZHENG, M. Z., RICHARD, J. L. a BINDER, J. A Review of Rapid Methods for the Analysis of Mycotoxins. *Mycopathologia*. 2006, vol. 161, issue 5, pp. 261-273.

- [80] MycoSep® and MultiSep®. In: *Romer Labs* [online]. [cit. 16. 3. 2015]. Dostupné na [www: http://www.romerlabs.com/en/products/mycotoxins/mycosep-multisep/](http://www.romerlabs.com/en/products/mycotoxins/mycosep-multisep/)
- [81] NOLLET, L. M. L. *Food analysis by HPLC*. 2nd ed., rev. and exp. New York: Marcel Dekker, 2000. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.). ISBN 08-247-8460-X.
- [82] NOVÁKOVÁ, L. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1. vyd. Praha: Lucie Nováková, 2013, 299 s. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [83] Schéma kapalinového chromatografu [online]. [cit. 2. 3. 2017]. Dostupné na [www: http://www.chromacademy.com/HPLC-Operation-part-2.html](http://www.chromacademy.com/HPLC-Operation-part-2.html)
- [84] Princip kapalinové chromatografie [online]. [cit. 2. 3. 2017]. Dostupné na [www: http://labmet.zshk.cz/vyuka/hplc.aspx](http://labmet.zshk.cz/vyuka/hplc.aspx)
- [85] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [86] OLŠOVSKÁ J. a JURKOVÁ, M. Nové trendy v kapalinové chromatografii a jejich využití v analýze piva a pivovarských surovin. *Kvasný průmysl*. 2012, roč. 58, č. 6, s. 166-170.
- [87] SOMMER, L. *Základy analytické chemie II*. Vyd. 1. V Brně: Vutium, 2000, 347 s. ISBN 80-214-1742-0
- [88] HOLČAPEK, M. Experimentální metody strukturálního výzkumu: Hmotnostní spektrometrie. In: *Michal Holčapek. Mass spektrometry Group @ University of Pardubice* [online]. [cit. 7. 11. 2015]. Dostupné na [www:http://holcapek.upce.cz/vyuka-struktura.php](http://holcapek.upce.cz/vyuka-struktura.php)
- [89] HOLČAPEK, M. a JANDERA, P. Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). *Chemické Listy*. 1998, roč. 92, s. 278-286.
- [90] NORKOVÁ, R., JAKLOVÁ DYTRTOVÁ, J. a KAŠIČKA, V. Ionizační techniky a rozhraní pro spojení kapilárních elektromigračních metod s hmotnostně spektrometrickou detekcí. *Chemické Listy*. 2013, roč. 107.
- [91] Thermo electron corporation: *Finngan™ Ion Max API Source, Hardware Manual*. Revision A. San Jose: Technical publications, 2003
- [92] VOLNÝ, M. Hmotnostní spektrometrie: přehled zajímavých oblastí aktuálního vývoje. *Chemické Listy*. 2011, roč. 105, s. 230-236.
- [93] Schéma fluorescenčního detektoru [online]. [cit. 11. 3. 2017]. Dostupné na [www: http://www.hplc.cz/Teorie/FL\\_detector.html#\\_Obr](http://www.hplc.cz/Teorie/FL_detector.html#_Obr)
- [94] PAGKALI, V., PETROU, P. S., SALAPATAS, A. et al. Detection of ochratoxin A in beer samples with a label-free monolithically integrated optoelectronic biosensor. *Journal of Hazardous Materials*. 2017, vol. 323, pp. 75-83. ISSN 03043894.
- [95] SCOTT, P. M. a KANHERE, S. R., Determination of ochratoxin A in beer. *Food Addit. Contam.* 1995, vol. 12, issue 4, pp. 591–598.

- [96] JØRGENSEN, K. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*. 1998, vol. 15, issue 5, pp. 550-554. ISSN 0265203X
- [97] YORDANOVA, P. a VRABCHEVA, T. Ochratoxin A in bulgarian beer and wine. *Advances in Bulgarian Science*. 2006, vol. 4, pp. 12-19. ISSN 1312-6164
- [98] TANGNI, E. K., PONCHAUT, S., MAUDOUX, M., ROZENBERG, R. a LARONDELLE, Y. Ochratoxin A in domestic and imported beers in Belgium: occurrence and exposure assessment. *Food Additives and Contaminants*. 2002, vol. 19, issue 12, pp. 1169-1179. ISSN 0265-203X.
- [99] NAKAJIMA, M., TSUBOUCHI, H. a MIYABE, M., A survey of ochratoxin A and aflatoxins in domestic and imported beers in Japan by immunoaffinity and liquid chromatography. *J. AOTAC Int*. 1999, vol. 82, issue 4, pp. 897-902.
- [100] KOSTELANSKA, M., ZACHARIASOVA, M., LACINA, O., FENCLOVA, M., KOLLOS, A-L. a HAJLSLOVA, J. The study of deoxynivalenol and its masked metabolites fate during the brewing process realised by UPLC-TOFMS method. *Food Chemistry*. 2011, vol. 126, issue 4, pp. 1870-1876. ISSN 03088146.
- [101] PIACENTINI, K. C., SAVI, G. D., OLIVO, G. a SCUSSEL, V. M. Quality and occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in craft beer. *Food Control*. 2015, vol. 50, pp. 925-929. ISSN 09567135.
- [102] RUPRICH, J. a OSTRY, 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, vol. 3, issue 4, pp. 224-229.
- [103] SCHOTHORST, R. C. a JEKEL, A. A. Determination of trichothecenes in beer by capillary gas chromatography with flame ionisation detection. *Food Chemistry*. 2003, vol. 82, issue 3, pp. 475-479. ISSN 03088146.
- [104] KOSTELANSKA, M., HAJLSLOVA, J., ZACHARIASOVA, M. et al. Occurrence of Deoxynivalenol and Its Major Conjugate, Deoxynivalenol-3-Glucoside, in Beer and Some Brewing Intermediates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, vol. 57, issue 8, pp. 3187-3194. ISSN 0021-8561.
- [105] ČEPIČKA, J., ŠROGL, J. a ŠKACH, J. Z výzkumu a praxe: Samovolné přepěňování piva – gushing. *Kvasný průmysl*. 1993, roč. 39, č. 4, s. 98-102.
- [106] SHOKRIBOUSJEIN, Z., DECKERS, S. M., GEBRUERS, K. et al. Hydrophobins, beer foaming and gushing. *Cerevisia*. 2011, vol. 35, issue 4, pp. 85-101. ISSN 13737163.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku
ATA	Alimentární Toxická Aleukie
CI	Chemická ionizace
DON	Deoxynivalenol
D3G	Deoxynivalenol-3- $\beta$ -D-glukopyranosid
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
EI	Elektronová ionizace
ELISA	Imunochemická metoda
ESI	Ionizace elektrosprejem
FHB	Fuzáriové vadnutí klasů
FLR	Fluorescenční detekce
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IAC	Imunoafinitní chromatografie
IARC	Mezinárodní organizace pro výzkum rakoviny
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit kvantifikace
MALDI	Ionizace laserem za účasti matrice
MS	Hmotnostní spektrometrie
OTA	Ochratoxin A
SPE	Extrakce tuhou fází
TDI	Tolerovatelný denní příjem
TWI	Tolerovatelný týdenní příjem
TOF	Analyzátor doby letu
UHPLC	Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
USJ	Ukazatel sladovnické jakosti
VÚPS	Výzkumný ústav pivovarský a sladařský
ZON	Zearalenon
Z4G	Zearalenon-4- $\beta$ -D-glukopyranosid

## **8 SEZNAM PŘÍLOH**

Příloha I. Protokol diagnostiky iontového zdroje APCI

Příloha II. Chromatogramy kalibračních roztoků OTA

Příloha III. Chromatogram OTA ve vzorku č. 1 (UPLC/FLR)

Příloha IV. Chromatogram DON a D3G ve vzorku č. 8 (HPLC/MS)

## 9 PŘÍLOHY

### Příloha I: Protokol diagnostiky iontového zdroje APCI

Begin All Diagnostics Status Test Loop

End All Diagnostics Status Test Loop

All Diagnostics Status Test Results

+15 V - Pass

+150 V - Pass

+205 V - Pass

+24 V - Pass

+28 V - Pass

+35 V - Pass

+36 V - Pass

+5 V - Pass

-15 V - Pass

-150 V - Pass

-205 V - Pass

-28 V - Pass

8 kV PS current - Pass

Ambient temp. - Pass

Analyzer temp. - Pass

Aux gas flow - Pass

Capillary temp. - Pass

Capillary voltage - Pass

Convectron - Pass

Detected RF - Pass

Dynode voltage - Pass

Intermultipole lens - Pass

Ion gauge - Pass

Main RF DAC - Pass

Multiplier setting - Pass

Multiplier voltage - Pass

Multipole 1 offset - Pass

Multipole 2 offset - Pass

Multipole RF mod. - Pass

Multipole det. RF - Pass

RF amp. output - Pass

RF det. temp. - Pass

RF gen. temp. - Pass

RF modulation - Pass

Sheath gas flow - Pass

Source heater temp. - Pass

Trap DC Offset - Pass

Tube/gate lens - Pass

Starting All Diagnostics Scan Tests

10:25:34: Start scan readback test on device Auxiliary amplitude (V) -- 0 to 83.2

10:25:39: Scan readback test ended

10:25:41: Result: PASSED

10:25:41: Start scan readback test on device Main RF DAC (16-bit) -- 0 to 65535

10:25:46: Scan readback test ended

10:25:48: Result: PASSED

10:25:48: Start scan readback test on device Vernier RF DAC (16-bit) -- 0 to 65535

10:25:53: Scan readback test ended

10:25:55: Result: PASSED

10:25:55: Start scan readback test on device Auxiliary amplitude DAC (Vp-p) -- 0 to 83.2

10:26:00: Scan readback test ended

10:26:01: Result: PASSED

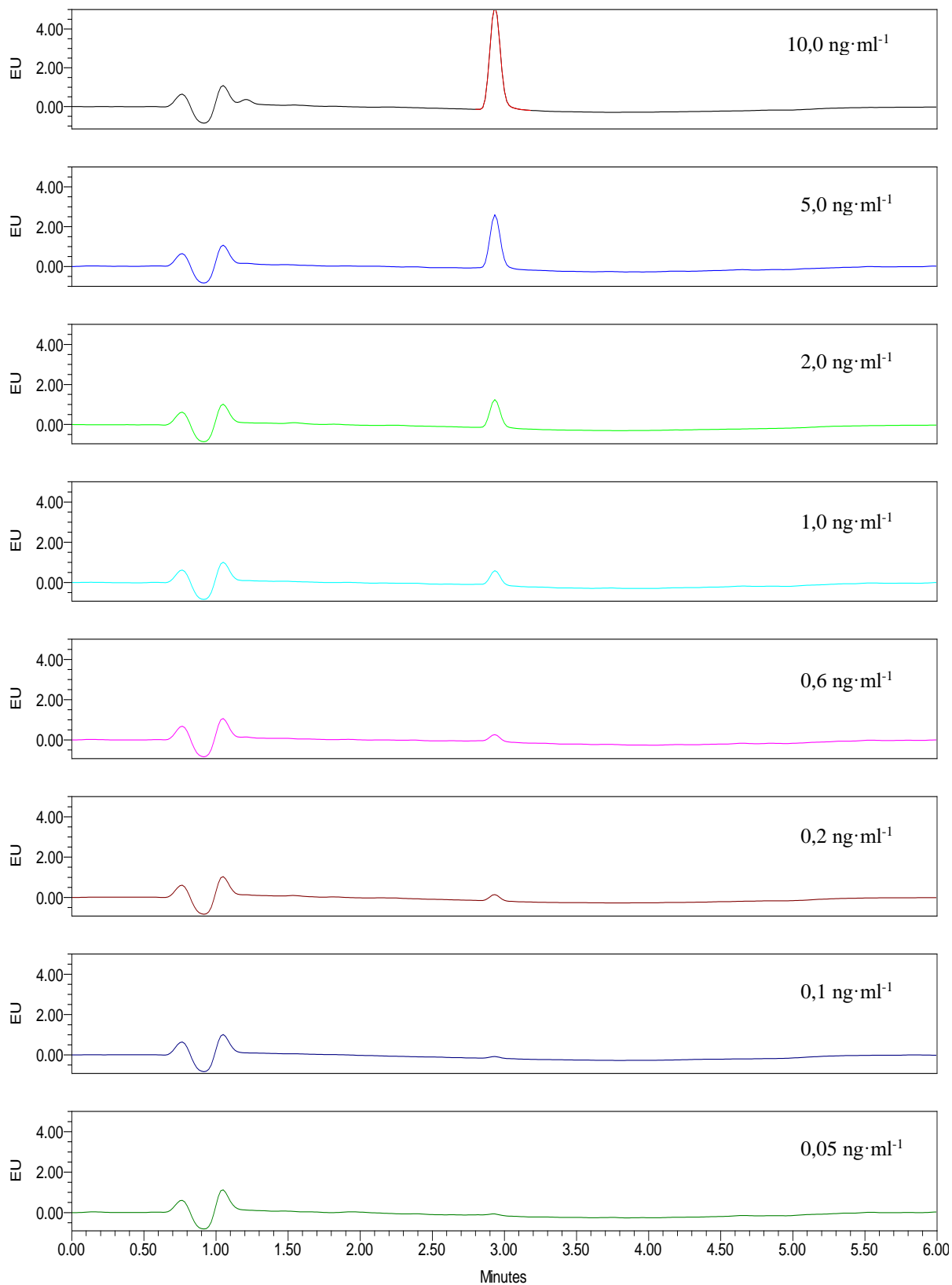
10:26:01: Start scan readback test on device Multipole 1 offset (V) -- -132 to 132

10:26:06: Scan readback test ended

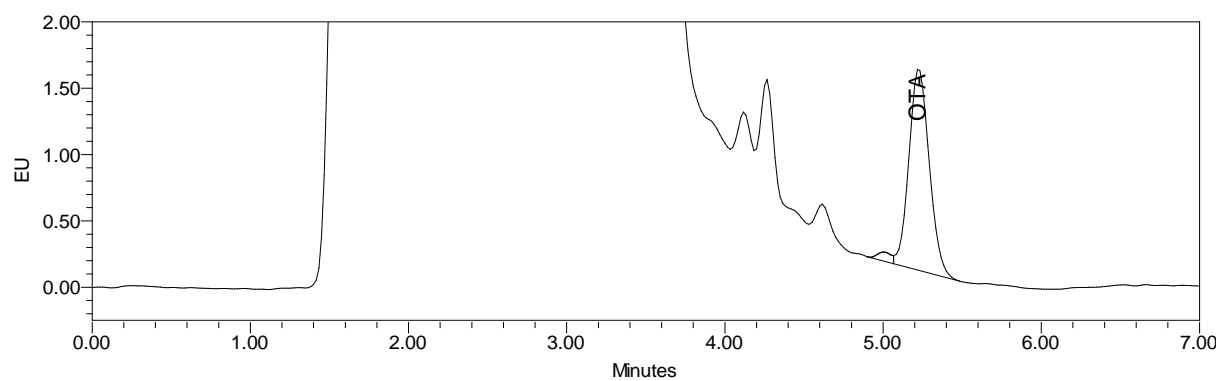
10:26:08: Result: PASSED

10:26:08: Start scan readback test on device Multipole 2 offset (V) -- -132 to 132  
10:26:13: Scan readback test ended  
10:26:15: Result: PASSED  
10:26:15: Start scan readback test on device Multipole lens (V) -- -136 to 136  
10:26:20: Scan readback test ended  
10:26:22: Result: PASSED  
10:26:22: Start scan readback test on device Multipole det. RF amp. (Vp-p) -- 0 to 600  
10:26:27: Scan readback test ended  
10:26:29: Result: PASSED  
10:26:29: Start scan readback test on device Trap Offset (V) -- -133.347 to 134.018  
10:26:34: Scan readback test ended  
10:26:36: Result: PASSED  
10:26:36: Start scan readback test on device Tube gate (V) -- -200 to 198  
10:26:41: Scan readback test ended  
10:26:43: Result: PASSED  
10:26:43: Start scan readback test on device Multiplier (V) -- 0 to -2200  
10:26:57: Scan readback test ended  
10:26:59: Result: PASSED  
10:26:59: Start scan readback test on device Aux/sweep gas flow (arb) -- 0 to 60  
10:28:34: Scan readback test ended  
10:28:36: Result: PASSED  
10:28:36: Start scan readback test on device Sheath gas flow (arb) -- 20 to 100  
10:30:19: Scan readback test ended  
10:30:21: Result: PASSED  
10:30:21: Start scan readback test on device Capillary Voltage (V) -- -132 to 132  
10:30:26: Scan readback test ended  
10:30:28: Result: PASSED  
10:30:28: Final result: PASSED

**Příloha II:** Chromatogramy kalibračních roztoků OTA



**Příloha III:** Chromatogram OTA ve vzorku č. 1 (UPLC/FLR)



**Příloha IV:** Chromatogram DON a D3G ve vzorku č. 8 (HPLC/MS)

