

Vědecký výbor výživy zvířat

**TOXICKÉ LÁTKY PŘÍRODNÍHO
PŮVODU (SEKUNDÁRNÍ
METABOLITY ROSTLIN A HUB)
V SUROVINÁCH PRO VÝROBU KRMIV
A MOŽNOSTI JEJICH STANOVENÍ**

**Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.
Ing. Bohumír Šimerda**

Praha, červen 2006



Výzkumný ústav živočišné výroby
Přátelství 815, Praha - Uhřetěves,
PSČ: 104 01, www.vuzv.cz

OBSAH

1	ÚVOD	3
2	Toxické látky přírodního původu v krmivech	6
2.1	Konsolidace legislativních předpisů	6
2.2	Klasifikace látek	6
2.2.1	Dusíkaté látky	8
2.2.1.1	Glukosinoláty	8
2.2.1.2	Alkaloidy	11
2.2.1.2.1	Alkaloidy zástupců čeledi Poaceae	11
2.2.1.2.2	Alkaloidy zástupců čeledi Fabaceae	17
2.2.1.2.3	Alkaloidy zástupců čeledi Asteraceae	19
2.2.1.2.4	Alkaloidy zástupců čeledi Solanaceae	20
2.2.1.2.5	Alkaloidy zástupců ostatních čeledí	23
2.2.1.3	Kyanogenní glykosidy	25
2.2.1.4	Nitroderiváty alifatických uhlovodíků	28
2.2.1.5	Toxické aminokyseliny a látky z nich vycházející	30
2.2.1.6	Inhibitory proteas	32
2.2.1.7	Lektiny	34
2.2.2	Látky bez obsahu dusíku	35
2.2.2.1	Fenolické látky	35
2.2.2.1.1	Mykotoxiny	35
2.2.2.1.2	Fytoestrogeny	37
2.2.2.1.3	Třísloviny	39
2.2.2.1.4	Alkylfenoly	42
2.2.2.1.5	Kumariny	42
2.2.2.1.6	Gossypol	44
2.2.2.2	Nefenolické látky	45
2.2.2.2.1	Saponiny	45
2.2.2.2.2	Ostatní toxické látky	46
2.3	Stanovení obsahu toxických látek	47
3	LITERATURA	50

1 ÚVOD

Problém toxických látek v krmivech vyřešila EU směrnicí Rady EU č. 2002/32/EC a je proto možné si představit, že v této oblasti je všechno v pořádku. Směrnice definuje toxické látky, které se nesmí v krmivu vyskytovat v nadlimitní koncentraci, ale nezahrnuje sloučeniny, které se mohou v krmivu nalézt (a také se v něm v některých případech vyskytují) a přesto jsou v určitých směrech škodlivé. Tato směrnice vznikla v roce 2002; v České republice však byla publikována ve Sbírce zákonů Vyhláška č. 451/2000 Sb., kterou se provádí zákon č. 91/1996 Sb., o krmivech, ve znění zákona č. 244/2000 Sb. (z 29. 12. 2000). Česká zákonná norma byla tedy v nedávné době upravena Vyhláškou č. 184/2004 Sb., kterou se změnila Vyhláška č. 451/2000 Sb., kterou se provádí zákon č. 91/1996 Sb., o krmivech, ve znění zákona č. 244/2000 Sb., aby bylo možné zohlednit řadu změn, které od roku 2002 vznikly.

Směrnice EU jsou závazné pro všechny členské státy, obsahují především základní fakta, která musí národní legislativy bezpodmínečně zohlednit. Je však na těchto národních legislativních orgánech, aby zahrnuly do zákonných norem svých zemí specifika, běžná pro teritoriální útvary (velmi dobře si s tímto faktem poradila Komise Evropského lékopisu, který zavazuje jednotlivé členské státy k převzetí evropských lékopisných článků do jejich lékopisů, ale zároveň umožňuje uvést v jejich lékopisech články národní). Pokud není tento fakt dostatečně citlivě řešen, dochází k paradoxům; např. v obilovinách v ČR musí být sledován mimo jiné obsah semen skočce obecného (*Ricinus communis* L.), ačkoliv tato rostlina není vůbec domácí v ČR (ani zavlečená), velmi ojediněle se vyskytuje jako okrasná rostlina nepřezívající jedno vegetační období (zato v jižní Evropě, např. ve Španělsku se vyskytuje běžně), semena tohoto taxonu mají velikost středně velké fazole (proto už při primárním čištění při polní sklizni by musela být dokonale odstraněna). Tento stav je možné z legislativního hlediska velmi dobře pochopit (z hlediska dovozu krmiv z jiných zemí), ale těžko jej lze pokládat za zcela smysluplný pro ČR ve znění uvedeném ve vyhláškách.

Na druhé straně existuje řada toxických rostlin, které mohou nejen negativně ovlivnit plnoprodukční zdraví zvířat, ale také konečného konzumenta a v žádné zákonné normě nejsou uvedeny. Této „tiché toxicitě“ není věnována dosud celosvětová pozornost, ačkoliv historie ukázala řadu negativních projevů [spásání ocúnu (*Colchicum autumnale* L.) nebo některých kozinců (*Astragalus* spp. L.)]. Ignoraci tohoto stavu lze již obtížně chápat a patrně se s ním nelze ztotožnit; legislativní orgány by měly brát v úvahu fakta, kterými disponují specialisté v dotyčné oblasti a zákonné normy by měly být co nejužší spojeny s realitou (strukturou

rostlinných taxonů na pastvinách, výskytem nežádoucích nebo nebezpečných druhů, postupy vedoucími k omezení těchto druhů v porostech, vztahům k ekologické rovnováze krajiny atd.) tak aby nedošlo k paradoxní situaci jako v dobách socialismu, kdy byl v některých oblastech naprosto zlikvidován výskyt ocúnu v travních porostech pesticidy, které významně ovlivnily ekosystém příslušné krajiny.

Při hodnocení toxicity rostlinných zdrojů, které mohou být běžnou součástí krmiva, se zdá být užitečné přesně definovat pojem této toxicity: její kvalitativní a kvantitativní úroveň. Je logické zařazovat do toxických látek také látky antinutriční, protože disponují určitou mírou toxicity; některé z nich nelze z krmiv odstranit, resp. jejich odstranění by bylo zatíženo neúměrnými finančními náklady. Poznání těchto faktů by však mělo být spojeno s navazujícím efektivním aplikovaným výzkumem, který by měl alespoň zčásti řešit eliminaci nežádoucích sloučenin. Sledování profilu odborné zemědělské literatury za posledních 10 let ale ukazuje, že problému je věnována poměrně malá pozornost: problematika toxických přírodních látek se v celé oblasti toxicity vyskytuje zhruba ve 3 % prací (převážnou většinu studia toxicity tvoří práce týkající se nežádoucích účinků metabolitů mikromycet (*Aspergillus*, *Fusarium* ad.), toxických kationtů a reziduálních metabolitů pesticidů). Ze zmíněných 3 % je maximálně polovina prací věnována hlubšímu studiu toxicity, většinou však na zjednodušených modelech. Do těchto údajů jsme úmyslně nezahrnuli v širší míře studie, týkající se sledování antinutričních účinků, protože se domníváme, že by to přesáhlo rámec této studie. Je škoda, že nemalé procento studia antinutriční aktivity přírodních látek bylo prováděno na zvířecích druzích, které mají k hospodářským zvířatům velmi daleko (potkan, krysa, myš) a tyto výsledky mají většinou jen publikační význam bez bližšího vztahu k praktickému použití.

V České republice je tedy v současnosti novelizovaná, a zdá se že i plně vyhovující vyhláška o toxických příměsích v krmivu. Jsme si však jisti, že je nutné informovat odbornou veřejnost o určitých rizikách, která nejsou předmětnou součástí vyhlášky, která však mohou být v některých případech velmi reálná.

V této studii jsme se věnovali účinkům toxických a potenciálně toxických látek především na savce; pokud hovoříme o jejich účincích na ptáky, pak většinou jen pro dokreslení obrazu celkové toxicity.

Nerozdělili jsme všechny škodlivé látky, o kterých je pojednáváno do dvou hlavních skupin, jak by se mohlo zdát logické – na látky bezprostředně toxické (např. alkaloidy) a látky antinutričního charakteru (např. glukosinoláty). Jsme přesvědčeni o škodlivosti obou typů látek (např. intoxikace alkaloidy je zřejmá velmi rychle, poškozování zdraví zvířat

antinutričními látkami probíhá pomalu, ale může přinést negativnější efekt), hranice mezi oběma skupinami nejsou ostré. Proto tyto látky popisujeme na základě jejich rámcových chemických struktur.

Hradec Králové, Šumperk

Autoři

2 Toxické látky přírodního původu v krmivech

2.1 Konsolidace legislativních předpisů (Komentář ke konsolidovanému znění vyhlášky č. 451/2000 Sb.

Konsolidované znění vyhlášky č. 451/2000 Sb., kterou se provádí zákon o krmivech, bylo sestaveno pracovníky odboru krmiv ÚKZÚZ jako pracovní materiál pro vnitřní potřebu odboru. Konsolidované znění nenahrazuje vyhlášku č. 451/2000 Sb., kterou se provádí zákon o krmivech, ve znění pozdějších předpisů a příslušná nařízení ES z oblasti výživy zvířat, která platí jako bezprostředně závazné předpisy Evropských společenství přímo.

Důvodem pro jeho zpracování byla skutečnost, že vyhláška č. 451/2000 Sb. byla již sedmkrát novelizována, a že se při projednávání její poslední novely neuskutečnil původně předpokládaný záměr vydat nové kompletní znění ve Sbírce zákonů, a to pro nával předpisů ministerstva zemědělství, které měly být projednány a zveřejněny do 1. května 2004.

Konsolidované pracovní znění zahrnuje vyhlášku č. 451/2000 Sb. ze dne 11. prosince 2000, kterou se provádí zákon o krmivech, a její další změny:

vyhlášku č. 343/2001 ze dne 24. září 2001,
vyhlášku č. 472/2001 ze dne 17. prosince 2001,
vyhlášku č. 169/2002 ze dne 18. dubna 2002,
vyhlášku č. 544/2002 ze dne 12. prosince 2002,
vyhlášku č. 284/2003 ze dne 26. srpna 2003,
vyhlášku č. 434/2003 ze dne 3. prosince 2003 a
vyhlášku č. 184/2004 ze dne 13. dubna 2004.

Současně je k textové části vyhlášky připojeno znění článku II, článku III a článku IV vyhlášky č. 184/2004 Sb. ze dne 13. dubna 2004, kterou se mění vyhláška č. 451/2000 Sb., při čemž článek II se týká přechodných ustanovení pro obaly krmných směsí, článek III stanoví nabytí účinnosti vyhlášky dnem jejího vyhlášení (tj. 23. 4. 2004) a další úpravy nabytí účinnosti a pozbývání platnosti určitých bodů této novely, a článek IV stanoví pozbývání účinnosti některých částí vyhlášky č. 343/2001 Sb. ze dne 24. září 2001, kterou se mění vyhláška č. 451/2000 Sb. V tomto článku je v konsolidovaném znění opravena chyba v citaci vyhlášky a je správně uvedeno číslo „451“ místo čísla „452“ chybně uvedeného ve Sbírce zákonů (částka 61 z 23. 4. 2004).

2.2 Klasifikace látek

Antinutriční a toxické látky se vyskytují ve všem, co živočichové přijímají jako potravu, přes intenzivní snahy jejich obsah omezit. Každá geografická oblast obsahuje specifické rostliny,

kteře těmito nepříznivými vlastnostmi disponují a tato fakta je potřeba znát^{1,2}. Studium veterinární toxikologie musí být sladěno s toxikologií humánní (zejména v současnosti, z důvodů etnických a behaviorálních): zjištění toxických látek, které se vyskytují v potravě pro člověka může být velmi přínosné pro studium v případě hospodářských zvířat (člověk je mnohem opatrnější na bezpečnost lidské stravy než na „čistotu“ krmiv pro hospodářská zvířata); jedná se nejen o běžné látky, jako jsou kyanogenní glykosidy, lathyrogeny, hydraziny, glukosinoláty a podobné goitrogenní látky, kumariny, saponiny, alkaloidy a glykoalkaloidy, lektiny, trypsinové inhibitory a chelatační látky (fytáty a oxaláty)^{3,4}, které se v těle nakonec zmetabolizují, ale i metabolity, které přejdou např. do mléka a hrají v něm negativní roli pro dalšího spotřebitele (negativní ovlivnění mláďat před odstavem, nebo zvýšení xenobiotické zátěže člověka)⁵. Přestože je řada rostlin surovinou pro potravinářský průmysl, nelze je přijímat zcela bezstarostně (resp. za jakýchkoliv podmínek) a přenášet je do oblasti krmivářství⁶; vždy je nutné vzít v úvahu živočišné species, jeho enzymovou výbavu a systém trávení, např. tymián a dobromysl, které jsou pro člověka naprosto běžnou kořeninou, která mu spíše prospívá, jsou poměrně toxické pro kočky, které jsou velmi citlivé na fenolické látky. Ptáci (slepice) jsou odolní vůči některým významným toxinům (kantharidinu), metabolizují ho jen zčásti a po požití brouků s obsahem těchto látek mohou být zdrojem závadného produktu. Pro většinu monogastričních savců jsou LD₅₀ většiny toxických látek nižší (někdy významně) než u přežvýkavců (velmi markantním příkladem jsou kardiotonické glykosidy ze *Scilla maritima* L., výrazně toxické pro hlodavce kromě králíka).

Toxické a zejména antinutriční látky jsou sledovány v píceinách⁷ a dalších krmivářských surovinách⁸, které jsou důležité v živočišné výrobě, např. v semenech (výliscích) olejnin; obsah tříslovin, fytové kyseliny a např. glukosinolátů je limitujícím faktorem pro použití nativních surovin⁹. Rostlinné toxiny v krmivu pro hospodářská zvířata musí být náležitě analyticky sledovány, jak to provádí např. Plant Toxins Research Group of the Australian Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO) v oblasti detekce a klasifikace 3 hlavních skupin toxinů: fomopsinů, korynetoxinů a pyrrolizidinových alkaloidů¹⁰. Jsou také sledovány moderní trendy ve výživě hospodářských zvířat a možné návaznosti výskytu reziduí; začínají být používány moderní analytické metody, které urychlují a ekonomizují postup analýz¹¹. S rozvojem technologií a analytických metod se ukazuje, že některé metody úpravy krmiva s cílem odstranit nežádoucí látky v primárních surovinách, mohou v krmivu naopak nežádoucí látky jiného charakteru vytvořit,

např. úprava píče amoniakem může zvýšit hladinu alkylimidazolů v této píči a sekundárně v moči, plazmě a mléce ovcí a krav¹².

Pro zlepšení kvality rostlinné suroviny, využitelné jak potraviny pro člověka, tak materiálu pro krmivářství jsou využívány genetické, genomové a molekulární přístupy; umožňují modifikovat spektrum esenciálních aminokyselin, lipidů, mastných kyselin, minerálních látek, sekundárních metabolitů s biologickým účinkem, antinutričních sloučenin, aromatických látek aj.¹³. Ačkoliv jsou tyto metody na vysoké úrovni, nemohou být uplatněny v praxi ve své původní míře ze společenských důvodů (konzervativismus části obyvatelstva, špatná reklama, intenzivní odpor ekologických organizací).

V řadě případů je velmi obtížné dosáhnout přesvědčivého snížení antinutričních (nebo také toxických) látek v krmivu za použití adekvátních finančních prostředků. V takových případech se volí do krmiva přísada, jejímž úkolem je eliminovat toxické účinky nežádoucích příměsí¹⁴. K sorpci toxických látek je také možné použít chitosanu, který je dispergován na aktivním uhlí; směs nevyvolává zácpu a jiné zažívací problémy¹⁵. Zcela kuriózní je návrh použít řezaných pneumatik jako preventivního prostředku před toxickým účinkem některých rostlinných sloučenin¹⁶.

2.2.1 Dusíkaté látky

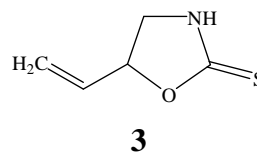
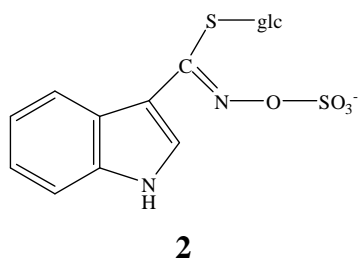
2.2.1.1 Glukosinoláty¹⁷

Glykosidické sloučeniny tohoto typu se vyskytují především ve 3 rostlinných čeledích, nejdůležitější z hlediska krmivářského je však jen čeleď Brassicaceae¹⁸. Do 60. let minulého století byly nazývány jako thioglukosidy, před tím jako hořčičné oleje. Tento profánní a zcela nesprávný pojem se udržuje dodnes, jak v lékařské terminologii, tak i v zemědělství. Je to paradoxní, protože samotné „hořčičné oleje“ (mustard oils) jsou těkavé produkty enzymové hydrolýzy.



V rostlinách hrají úlohu kromě jiného jako rezervní zdroj síry a dusíku a jejich metabolity fungují jako ochranné agens vůči konzumentům a škůdcům. Při studiu vlivu glukosinolátů na odolnost řepky a dalších brukvovitých rostlin vůči fomové hnilobě se zjistilo, že imperfektní stadium houby *Phoma lingam* je citlivé především na 3=

hydroxymethylindol, který vzniká z glukobrassicinu (**2**); z uživatelského hlediska zcela nežádoucí progoitrin se na rezistenci nepodílí.



Současné snahy o šlechtění řepky (00: Oglukosinoláty, Oeruková kyselina) jsou stále problematické, protože některé glukosinoláty lze šlechtěním ovlivnit, jiné nikoliv (např. glukobrassicin). Nezdá se také, že by obsah těchto látek měl významný vliv na požer řepky a např. hořčice sareptské, ale snížení hladin těchto látek je příznivé; zdá se totiž, že tkáň s obsahem indolových glukosinolátů jsou pro larvy chutnější než tkáň bez nich.

Skupina těchto látek je z chemického hlediska velmi široká, dělí se v podstatě na tři podskupiny (glukosinoláty s alkylovou a alkenylovou skupinou, glukosinoláty obsahující v alkylovém nebo alkenylovém řetězci hydroxyskupinu a glukosinoláty s indolovou skupinou) a na základě této struktury dochází při enzymovém štěpení ke vzniku různých metabolitů (thiokyanátů, isothiokyanátů (**1**) nebo oxazolidinthionů (**3**)).

V zástupcích čeledi Brassicaceae je obsaženo ve tkáních minimálně 10 glukosinolátů rozličné chemické struktury, maximálně 2-3 však tvoří převažující část spektra (semeno řepky: 75-90 % progoitrinu a glukonapinu).

Z hlediska praktického biologického účinku byly prozkoumány především ty taxony, jejichž morfologické části tvoří součást krmiva, tzn. hlavně extrahované řepkové šroty¹⁹ s obsahem 35-45 % surového proteinu s velmi příznivým spektrem aminokyselin^{20,21,22,23,24,25}.

Štěpné produkty glukosinolátů vyvolávají vjemy palčivosti, hořkosti, mohou navodit slzení, zhoršují chutnost pro zvířata, snižují příjem krmiva a tím užitkovost; látky s vyšší K_D , které se rychleji deponují do tukové tkáně, mohou přecházet zčásti do mléka a vajec a zhoršovat jejich uživatelskou kvalitu. Některé metabolity jsou pro savce a ptáky toxické: mají strumigenní efekt, jsou hepatotoxické a nefrotoxické, ovlivňují metabolismus nadledvin. Rozsah poškození organismu (především štítné žlázy) závisí na celkovém množství glukosinolátů, jejich spektru a délce doby, po kterou je zvíře přijímalo. Funkční změny na štítné žláze jsou následující:

- Klesá podíl jodu, který je žlázou zachycen,

- Vzrůstá podíl monojodthyroninu na úkor diiod- a trijodthyroninu, tím dochází k blokáde spojení dvou molekul diiodthyroninu na thyroxin,
- Snížené hladiny trijodthyroninu (T_3) a thyroxinu (T_4) ve žláze vede ke snížení sekrece obou látek do krevního oběhu,
- Thyroxin je považován za prekurzor trijodthyroninu, protože v případě savců se tato látka váže na buněčné proteiny asi 10x snadněji než thyroxin,
- Nižší hladiny T_3 a T_4 vyvolávají zvýšenou sekreci TSH, důsledkem je zvýšení aktivity štítné žlázy a její hypertrofie.

Na tomto poškození se účastní všechny tři hlavní metabolické produkty rozkladu glukosinolátů (thiokyanáty, isothiokyanáty, oxazolidinthiony), i když každý v odlišné míře. Stejně negativně se tyto glukosinoláty projevují na metabolismus ryb (*Oncorhynchus mykiss*)²⁶. 10% přísada extrahovaného řepkového šrotu s obsahem ~20 mMol glukosinolátů do krmiva prasat se ukázala jako nepříznivá z hlediska suprese T_4 ²⁷. 5-Vinyloxazolidin-2-thion (goitrin), látka bezprostředně zodpovědná za negativní postižení štítné žlázy, vznikající v rostlinné tkáni po procesním působení z progoitrinu (resp. z epiprogoitrinu), je relativně snadno degradovatelná ruminálním procesem, působením bakterií a protozoí, tak jako nemálo jiných metabolitů²⁸.

Další negativní vlastností štěpných produktů glukosinolátů je navození krvácivosti jater až úhyn (především u drůbeže, prasata a přežvýkavci jsou podstatně méně citliví). Objevuje se také pokles plodnosti, dosud ne zcela objasněný, způsobený patrně nedostatečnou výživou matky v důsledku narušené činnosti štítné žlázy.

Studium biologické aktivity této skupiny látek je velmi živé a existují už poměrně přesná schémata, týkající se užití a koncentrace řepkových šrotů v závislosti na obsahu těchto látek v rostlinné tkáni. Nicméně i nízký obsah glukosinolátů (zejména 5-vinyloxazolidin-2-thionu (**3**)), který se neprojevuje sníženou užitkovostí, ani většinou biochemických parametrů metabolismu, zvyšuje výrazně riziko metabolické nerovnováhy zvířat a to právě permanentním zásahem do metabolismu T_3 a T_4 (snížením odolnosti vůči chorobám v chovech).

Byla vyvinuta řada metod, jejichž úkolem je snížit obsah těchto látek především v řepce. Někteří odborníci zastávají názor, že nejlepší cestou je aplikace genetických metod²⁹. Je to však pohled spíše idealizovaný než ideální: hodnocení všech souvislostí, které jsou spojeny s existencí 00-odrůd, jejich polní produkcí atd. nás prozatím jednoznačně nepřesvědčilo, že tato metoda je opravdu optimální. Má svoje limity, v určitém směru je dobře

využitelná, má však svoje zápory (napadání škůdci), a proto existuje snaha o zjištění praktických dimenzí využitelnosti tohoto postupu, který je velmi lákavý, a zčásti fiktivně se zdá, že přinese velké finanční úspory. V současnosti je pohled upřen spíše k reálnějším postupům, technologickým a biotechnologickým. Některé z těchto metod jsou však nepoužitelné, ač jsou efektivní, protože jsou zatíženy vyšší finanční náročností (extrakce organickými rozpouštědly). Patrně ideální (ovšem jen z hlediska nákladového) je konsekventní postup kondicionace a toastování: při kondicionaci odslupkovaných semen řepky se zvýší výtěžnost oleje a inaktivuje myrosináza, poté se provede extrakce nejčastěji benzínem a toastováním až kolem 100 °C se odstraní zbytky extrakčního solvensu a rozloží se zbývající glukosinoláty. Jakkoliv však vypadá popsáný postup jednoduše a ideálně, skrývá řadu záludností, k jejichž řešení je potřeba přistupovat citlivě. Zajímavou se zdá fyzikální metoda DIC (Detente Instantanee Controlee – Controlled Instantaneous Pressure Drop), po jejíž aplikaci dochází k zajímavému úbytku antinutričních látek v řepkových semenech³⁰. Fermentační ošetření řepkových šrotů je známé: ke šrotům se přidává jablečný (pektinový) odpad a vlhká směs je inokulována spory *Aspergillus griseus*, nebo *Rhizopus oligosporus*, případně *Mucor pusillus*; vzniklá hmota je po fermentaci využitelná v krmivářství i potravinářství³¹. Pro zlepšení stravitelnosti byly také prováděny pokusy s aplikací některých enzymů (pepsin, papain, trypsin, ficin, hemiceluláza); každý z těchto enzymů vnese do upravené hmoty jiné fyzikálně-chemické vlastnosti a sníží obsah antinutričních látek³². Čínští autoři publikovali fyzikální postup zpracování řepkových semen dvoustupňovou extrakcí, kterou jsou odstraněny thioglykosidy (bezamidové prostředí, methanol/hexan); řepkové výlisky jsou zcela prosté toxicity a mají velmi dobrý vzhled. Primární olej připravený z tohoto materiálu má údajně nízký obsah fosforu a volných mastných kyselin³³. Práce je pro další poučení bohužel nedostupná, aby bylo možné posoudit její ekonomickou realitu. Zajímavým postupem je aplikace roztoků některých kovových iontů: 0,1% Cu^{2+} snižuje hladinu gastrinu o ~90 % a eliminuje progoitrin, 0,1% Fe^{2+} snižuje hladinu goitrinu a progoitrinu při mletí. Oba kationty (aplikované ve formě chloridů) snižují aktivitu myrosinasy v průběhu procesu mletí (snížení je úměrné době mletí, kompletní inaktivace myrosinasy nastává po ~50 hodinách mletí)³⁴.

2.2.1.2 Alkaloidy

2.2.1.2.1 Alkaloidy zástupců čeledi Poaceae

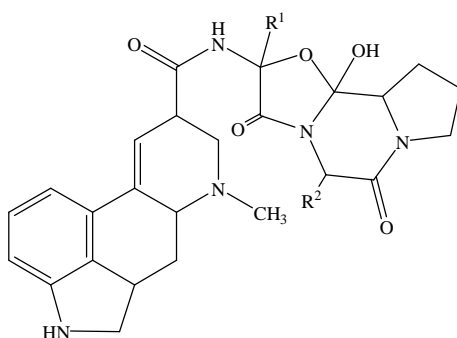
Čeď lipnicovitých není bohatá na alkaloidy, protože většina trav se vyvíjela současně s býložravci, kterým poskytovala potravu. Z tohoto důvodu mají taxony méně vyvinou

chemickou ochranu. Alkaloidy, vzniklé vlastním metabolizmem se proto vyskytují v travách jen velmi omezeně, převážnou část alkaloidních struktur tvoří především ergolinové a lolinové alkaloidy, jejichž producentem jsou endofytní houby žijící uvnitř rostlinných pletiv (*Acremonium* sp.), nebo zástupci vřeckovýtusných hub, vytvářející tuhé mycelium v klasech obilovin (*Claviceps* sp.).

Souhrnný pohled na alkaloidy v pícninářsky významných travách byl přehledně podán v 90. letech minulého století³⁵.

Tab. 1 Hlavní alkaloidy vyskytující se v zástupcích čeledi Poaceae

Taxon	Alkaloidy
<i>Festuca arundinacea</i> SCHREB. (kostřava rákosovitá)	Ergopeptinové (ergovalin) Deriváty lysergové kyseliny Klavinové Lolinové Peramin
<i>Festuca pratensis</i> HUDS. (kostřava luční)	N-acetyllolin N-fyrmyllolin perlolin
<i>Lolium perenne</i> L. (jílek vytrvalý)	Lolitremové (lolitrem B) Paxillin Peramin
<i>Lolium multiflorum</i> L. (jílek mnohokvětý)	Perlolin
<i>Phalaris arundinacea</i> L. (chrastice rákosovitá)	Hordenin Gramin Tryptaminové Karbolinové



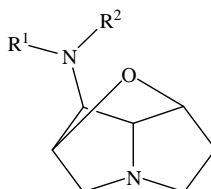
	R ¹	R ²
Ergotamin (4)	Methyl-	Benzyl-
Ergosin (5)	Methyl-	Isobutyl-
Ergovalin (6)	Methyl-	Isopropyl-
Ergostin (7)	Ethyl-	Benzyl-
Ergoptin (8)	Ethyl-	Isobutyl-
Ergonin (9)	Ethyl-	Isopropyl-

ALKALOIDY ERGOPEPTINOVÉ ŘADY

Převážné množství toxikologických údajů pochází od autorů z USA, kde je např. zemědělsky významná travina **košťava rákosovitá** pěstována na milionech hektarů a infekce porostů *Acremonium coenophialum* způsobuje po zkrmení obrovské hospodářské ztráty především v chovech skotu, ale také koní (fescue toxicosis). Toxicita se u skotu projevuje poklesem přírůstků, snížením dojivosti, obtížným zabřeznutím (nízké sérové hladiny prolaktinu), významně se snižuje schopnost regulovat tělesnou teplotu, dochází k omezení cirkulace krve v končetinách (projevy jsou markantní v období nízkých nebo vysokých teplot okolního prostředí). Po eliminaci poškozené píce se zvířata vrací zpravidla velmi rychle do normálního fyziologického stavu.

U klisen se prodlužuje doba březosti, nastávají problémy s tvorbou mléka v době sání, k porodu slabých a nevyvinutých zvířat, někdy úhynům. Klisny se během horkého počasí nadměrně potí. Sérové hladiny prolaktinu jsou sniženy.

Toxikologicky byla věnována pozornost ergovalinu: např. u jehňat, které dostávaly krmivo s touto látkou, se v průběhu teplotního stresu zvýšila rektální teplota a klesly sérové hladiny prolaktinu; ostatní alkaloidy košťavy mohou mít na intoxikaci synergický vliv³⁶. Synergický vliv těchto alkaloidů, doprovázejících ergovalin a ergin, byl prokázán u rostoucích potkanů³⁷; je ovšem otázka, zda model hlodavce s jeho specifickou enzymovou výbavou je vhodný jako verifikační fenomén tohoto jevu. Bylo také prokázáno, že suplementace vitamínem E nemá vliv u dojnic na symptomy spojené s příjmem intoxikované píce s košťavou rákosovitou³⁸.

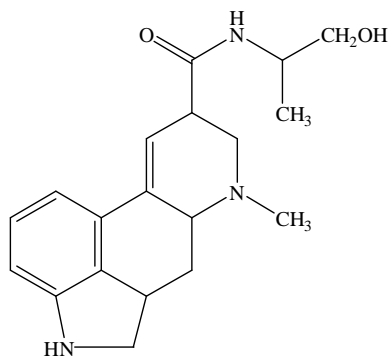


	R ¹	R ²
Norlolin (10)	H-	H-
Lolin (11)	H-	Methyl-
N-Methylolin (12)	Methyl-	Methyl-
N-Formylnorlolin (13)	H-	Formyl-
N-Acetylnorlolin (14)	H-	Acetyl-
N-Formyllolin (15)	Methyl-	Formyl-
N-Acetyllolin (16)	Methyl-	Acetyl-

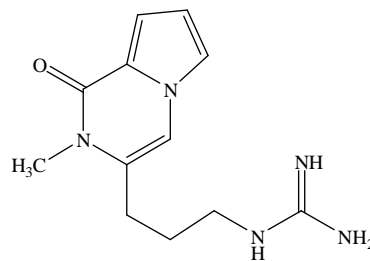
ALKALOIDY LOLINOVÉHO TYPU

Infekce košťavy je závažným problémem, kterému je věnována pozornost z různých pohledů, sleduje se např. vliv výšky seče košťavového a jílkového porostu na následnou

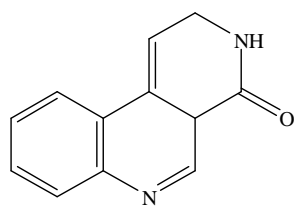
diseminaci infekce endofytem (*Neotyphodium* sp.) a z ní vyplývající tvorbu alkaloidů; ovlivnění této mutuální symbiomy mezi endofytem a travinou je velmi zásadní určitě i z pohledu ovlivnění okolního ekosystému³⁹.



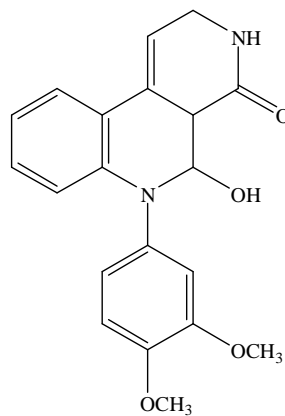
Ergonovin (17)



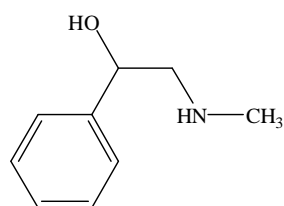
Peramin (18)



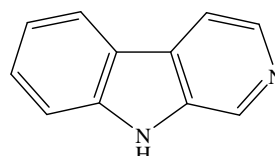
Perlolidin (19)



Perlolin (20)



Halostachin (21)



Norharman (22)

Velmi významně se na zvýšení toxicity tohoto typu alkaloidů podílí fyzický stres (zvýšená stájová teplota, nedostatek tekutin apod.). Obsah látek v píci, resp. seči, infikované houbou *Acremonium coenophialum* je různý, závisí na mnoha vnějších faktorech, obvyklé obsahy v píci kostřavy rákosovité jsou zhruba následující (přepočteno na sušinu píce): lolinové alkaloidy 1,8-5,0 mg/g, perlolin 2,0-3,0 mg/g, ergovalin 0,0003 mg/g, halostachin 0,001 mg/g, peramin 0,01 mg/g⁴⁰.

Situace je navíc komplikována tím, že výskyt alkaloidů v kostřavě rákosovité je většinou podstatně pestřejší než jak bylo uvedeno výše: *Acremonium coenophilum* je vřeckovýtrusná houba, systematicky velmi blízká rodu *Claviceps*, genová exprese řídící produkci metabolitů je na poměrně jednoduché úrovni, a proto stačí jen běžná změna podmínek (klima, elicitory v podobě kationtů, jiné houbové organizmy), aby došlo k výrazné změně metabolického profilu. Indolové alkaloidy, pocházející z tohoto druhu hub jsou reprezentovány pěti řadami, v kostřavě jsou přítomny zpravidla tři: ergopeptinové (zejména **6**), deriváty lysergové kyseliny (především s erginem) a klavinové alkaloidy (chanoklavin, penniklavin, elymoklavin, agroklavin ad.). Kromě této skupiny jsou přítomny lolinové alkaloidy (jednoduché pyrrolizidiny, zejména **15**, **16**) a další (**17** až **22**).

Další zástupce tohoto rodu, **kostřava luční**, s obsahem především lolinových alkaloidů, může být původcem především ekzematózních symptomů u jehňat.

Jílky a zejména **jílek vytrvalý** může způsobit velké hospodářské ztráty vznikem nervosvalového onemocnění (ryegrass staggers), běžné spíše v Austrálii a na Novém Zélandu, v Evropě se dosud vyskytuje poměrně vzácně (původcem je patrně převážně *Acremonium lolii*). Onemocnění se projevuje vrávoráním, kulhavostí, tremorem, narušením škrápy paznehtů, u těžké intoxikace může nastat úhyn ve stadiu tetanické křeče. Postižení se manifestuje především o období horkého počasí, důvodem je přítomnost neurotoxinů (indolisoprenových lolitremů), především lolitremu B (a pravděpodobně i paxillinu) v důsledku intenzivního metabolismu *Acremonium lolii* a také **18**. Obsah těchto látek významně kolísá, tak jak bylo řečeno už dříve. Z literatury je patrné, že řada studií některých taxonů je už na okraji zájmu, pozornost je však nadále věnována hybridům kostřavy rákosovité a jílku vytrvalého, jejichž promořenost je stále uváděna. U jílku byly také prováděny pokusy směřující ke genetické modifikaci endofytní houby *Neotyphodium lolii* a *Neotyphodium sp. Lp1* represí genů pro peptidové syntasy a tím snížení obsahu ergovalinu⁴¹. V jílku se vyskytují dva hlavní toxiny: ergopeptid ergovalin a z lolitremových alkaloid lolitrem B. Ergovalin je vasokonstrikční látka, převážně se vyskytující u infikované kostřavy rákosovité, lolitrem B je silně tremorogenní látka, hlavní marker v píceňkách z jílku, infikovaného endofytem; kanadští autoři našli významně pozitivní korelaci mezi kvantitativním výskytem obou látek v jílku, sledovaném v jejich oblastech⁴².

Jílek vytrvalý je také taxonem, který se používá nejen jako pícnina, ale také pro zakládání travních porostů. Promořenost osiva endofyty je zcela jistě významným faktorem, který je zodpovědný za infekci adventivních travních společenstev a nakonec emisi infekce do různých oblastí travních pokryvů a tím i pícnin. Z tohoto důvodu byl v Japonsku sledován

obsah ergovalinu a lilitremu B v osivu několika desítek kultivarů traviny z hlediska monitorování možné diseminace infekce. Ukázalo se, že obsah obou látek a tím infekce byla velmi výrazná u kultivarů používaných k zalučňování, zatímco u odrůd využívaných pícninářsky byla velmi nízká⁴³. Tak jako v případě jiných látek je proti toxicitě alkaloidů z jílku vyvíjena vakcína⁴⁴.

Zdá se, že infekce jílků endofyty jsou běžné ve všech oblastech zeměkoule, kde může houba metabolicky perzistovat: vypuknutí ergotické infekce na *Lolium rigidum* GAUD. je popisováno v roce 1996 v jižní Africe⁴⁵

Z dalších travních taxonů přichází v úvahu **chrastice rákosovitá**, v ČR se však nepěstuje jako kulturní rostlina, a proto nemá smyslu o ní blíže hovořit. Hlavními alkaloidy jsou sloučeniny β -karbolinového a tryptaminového typu, zdá se však, že tento typ alkaloidů lze odstranit do určité míry agrotechnickými zásahy (při hnojení dusíkem omezit amonnou formu), technologickým procesem (obsah látek výrazně klesá sušením a silážováním) a genetickými zásahy.

Velmi významnou skupinou alkaloidů, jejichž toxikologická významnost se stále udržuje, jsou námelové alkaloidy. Primární věckovýtrusnou houbou je *Claviceps purpurea* (Clavicipitaceae), produkující indolové alkaloidy (hlavní zástupci **4** až **9**). V současné době je známo více než 25 těchto alkaloidů, významných je však jen několik. Námelové alkaloidy se vyskytují v cereáliích (žito, pšenice, ječmen i oves), ale také v travách a na plevelných rostlinách (na některých zástupcích čeledi Apiaceae se velmi často vyskytuje *Claviceps paspali*, hlavní producent erginu a jeho derivátů); výskyt je hojnější při vlhkém počasí (vyšší infekce). Mycelium má formu sklerocia, které přežívá v půdě, za příhodných podmínek na jaře vyklíčí a systémem jarní a letní infekce se může houba silně rozšiřovat). Bylo pozorováno, že ve sklizeném obilí se může pohybovat podíl sklerocia až do 1 %, obsah alkaloidů je 0 - 0,6 %, profil alkaloidní frakce je nestandardní. V pícních a plevelných travách se na přítomnosti alkaloidů vedle námele (zejména *Claviceps paspali*) mohou podílet (a také prakticky podílejí) endofytní houby rodů *Balansia* sp., *Acremonium* sp.; dřívější uváděné údaje o možnosti některých zástupců rodů *Aspergillus* a *Penicilium* (taxonomicky vzdálených od rodu *Claviceps*), přispět tvorbou námelových alkaloidů jsou sice pravdivé, nicméně z praktického hlediska se v současnosti zdá, že vcelku zanedbatelné. V úvahu nepřichází ani semena rodu *Convolvulus*.

Alkaloidy *Claviceps* lze systematicky rozdělit do následujících skupin:

- Klavinové alkaloidy (klaviny),

- Alkaloidy na bázi lysergové kyseliny,
- Peptidové alkaloidy (ergopeptiny, ergopeptamy).

V podstatě lze říci, že námelové alkaloidy (extrakt z námele) je adrenolytikem; farmakologický účinek je velmi komplexní a lze jej rozdělit do 6 kategorií:

1. vasokonstrikce (periferní),
2. stahy uteru (periferní),
3. adrenolytický účinek (neurohumorální),
4. antiserotoninový účinek (neurohumorální),
5. útlum vasomotorického centra – rozšíření cév, pokles krevního tlaku, bradykardie (centrální),
6. stimulace sympatiku – tachykardie (centrální),

Podle kvantitativního profilu jednotlivých typů alkaloidů v myceliu se může projevit v pícnině převažující biologický účinek (toxicita), většinou se však jedná o periferní účinky. Velmi však záleží na živočišném druhu, kterému jsou tyto alkaloidy podány⁴⁶. V ČR se už námel na polích nepěstuje (pěstoval se v období zhruba 1970-1990 zejména na Litomyšlsku), klasické žito po získání námele se nezkrmuje, a proto nepřicházejí charakteristické intoxikace námelovinou už v úvahu (toto žito bylo podáváno v krmných směsích především kravám u nichž se vyskytovalo vysoké procento následného zmetání). Pokud existují ergotické otravy, pak jsou způsobeny většinou divokými kmeny *Claviceps*, *Acremonium* a při těchto otravách se uplatňují většinou další metabolity jiných typů hub (*Fusarium*), takže otrava se klinicky nemanifestuje jako čistě ergotická. Jsou stále významné, např. u selat, jejichž matky byly krmeny závadným krmivem, se mohou objevit nekrózy ušních boltců a ocasu, prasnice ztrácejí mléko, objevuje se anémie, může docházet k potratům.

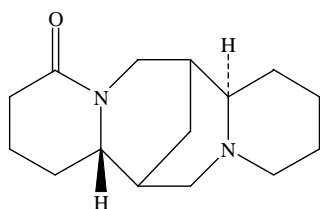
O toxikologickém významu námelových alkaloidů v živočišné produkci byla napsána velmi poučná přehledná práce⁴⁷.

2.2.1.2.2 Alkaloidy zástupců čeledi Fabaceae

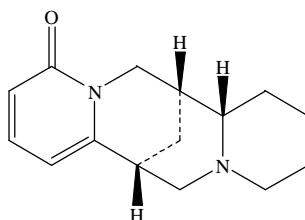
Tato čeleď je metabolicky velmi bohatá a to nejenom z hlediska toxických alkaloidů (v úvahu přichází pouze skupina chinolizidinových a pyrrolizidinových alkaloidů), ale také z hlediska jiných antinutričních látek (lektinů).

Významným taxonem, který je sledován, je především vlčí bob (lupina) - (*Lupinus* spp.); nešlechtěné druhy vyvolávají u hospodářských zvířat (i u přežvýkavců!) akutní otravy. V těchto taxonech bylo nalezeno přes 80 chinolizidinových alkaloidů, některé z nich jsou velmi toxické, především lupanin (**23**) a anagryrin (**24**); lupanin se vyskytuje v planém druhu

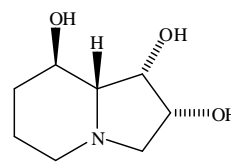
rostoucím u nás – vlčím bobu mnoholistém (*Lupinus polyphyllus* LINDL.), jsou přítomny i alkaloidy piperidinové. Po příjmu se u zvířat dostavuje nervozita, snížená pohyblivost končetin, křeče a úhyn. Citlivé jsou zejména ovce. Otravy jsou markantní především k podzimu, kdy je koncentrace látky v tkáních rostliny (v souvislosti se zráním) nejvyšší. U telat se objevuje „crooked calf syndrome“ (zkrácení předních nohou a jejich hákovité zakřivení, artrogrypóza), dalšími symptomy jsou skolióza, tortikollitida, lordóza a kyfóza; mláďata nejsou prakticky schopna existence, protože jejich vývoj je naprosto zabrzděn. Rostliny jsou výrazně hořké (hořkou chuť způsobují především alkaloidy) a u nešlechtěných druhů byly prokázány až v koncentraci 0,8 %, což je obtížně přijatelné pro výživářské použití. Ve zmíněném vlčím bobu mnoholistém se vyskytuje také anagyrin (až 0,15 %,), který je teratogenní, jak bylo prokázáno u krav.



23



24



25

Pro krmivářské účely se uvažuje použití jak zelené píce, tak především semen: ta jsou bohatá na primární metabolity (bílkoviny), obsahují však desítky procenta chinolizidinových alkaloidů. Tyto alkaloidy lze odstranit termicky (krátkým povařením, toastováním), anebo lépe extrakcí organickými rozpouštědly. Ačkoliv se extrakcí rozpouštědly odstraní minimálně 60 % přítomných alkaloidů, přesto se při zkrmování moučky slepicím dostávají alkaloidy do vajec (v sušeném bílku je 0,02-0,03 %, v sušeném žloutku 0,05-0,18 % těchto látek), která jsou zároveň nahořklá a organolepticky nepříliš atraktivní.

Podstatného snížení obsahu hořkých alkaloidů se dosahuje selekcí; je šlechtěn taxon *Lupinus albus* L.; v tzv. bezalkaloidních odrůdách je obsaženo 0,013-0,022 % alkaloidů v sušině píce. Ovlivnění genetického potenciálu lupin představuje velmi nosnou oblast zemědělského výzkumu, protože bezalkaloidní lupiny jsou zdrojem vysoce využitelného nutričního materiálu, který je velmi dobře pěstovatelný a relativně levný. Velmi intenzívně se pracuje na těchto metodách v Mexiku; na jeho teritoriu je asi 90 druhů, z nemalé části těchto druhů jsou využitelná semena, protože obsahují až 40 % proteinů a 15 % oleje (jmenovitě *Lupinus campestris*), obsahují však také antinutriční faktory (α -galaktosidy, fenolické látky,

chinolizidinové alkaloidy a sacharidy). První tři skupiny látek je možné odstranit postupem využívajícím extrakci vodou, roztokem alkálií a vodnými kyselinami. Tímto postupem se odstraní až 90 % alkaloidů, 60 % α -galaktosidů, a 65 % fenolických látek⁴⁸. Některé z fenolických látek této lupiny mají sice antimutagenní aktivitu [např. (+)-katechin]^{49,50}, je však otazné, zda se tento typ látek nepodílí výrazně na antinutriční aktivitě dalších přítomných sloučenin (katechiny jsou stavebními jednotkami kondenzovaných tríslovin, které mají adstringentní účinky).

Swainsonin (**25**) je indolizidinový alkaloid vyskytující se v některých taxonech čeledi Fabaceae, byl však také nalezen jako produkt fytopatogenní houby *Rhizoctonia*. Po spásání dobyt看em vyvolává tzv. lokoizmus; je inhibiorem α -mannosidasy a má vliv na syntézu N-glykosidových oligosacharidů – inhibuje lysozomální α -mannosidasu – Golgi mannosidasu II (tímto způsobem zasahuje do růstu a tvorby metastáz některých typů zhoubných nádorů, podporuje tvorbu buněk kostní dřene a je ve II. klinickém stadiu zkoušek jako léčivo použitelné při karcinomu prsu). Jeho spásání zvířaty však navozuje symptomy podobné genetickému onemocnění mannosidose. U přežvýkavců přechází po požití nadzemní části vlnice (locoweed: *Oxytropis sericea* NUTT.) do mléka, do tkání zvířete (ovce), navozuje tam toxicitu a zhoršuje kvalitu mléka^{51,52}.

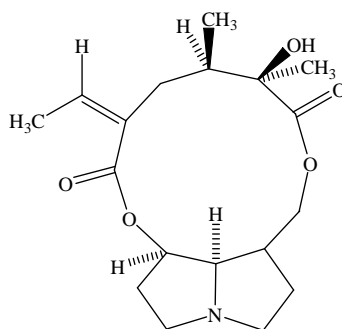
2.2.1.2.3 Alkaloidy zástupců čeledi Asteraceae

Toxickými alkaloidy, které se vyskytují v čeledi Asteraceae (a také v čeledích Fabaceae a Boraginaceae) jsou pyrrolizidinové alkaloidy. Jejich záludnost je o to větší, že některé jsou léčivými rostlinami a také zeleninou (např. *Borago officinalis*); jsou to esterově vázané necinové baze (bicyklický pyrrolizidinový skelet) s necikovou kyselinou nebo jejím fragmentem. Nenasycená necinová база je výrazně toxičtější než odpovídající forma nasycená. Tyto alkaloidy jsou buď makrocyclické diestery, otevřené diestery nebo monoestery.

Základní toxikózou je senecióza (poškození jater, rozvoj cirhózy, ascites); smrtelná dávka těchto alkaloidů se pohybuje od 0,5-3,5 mg.kg⁻¹ denního příjmu. Senecióza je onemocnění především hospodářských zvířat, spásající louky kontaminované starčky (*Senecio* sp.) nebo otočníky (*Heliotropium* sp.). Poškozeny mohou být nejenom játra, ale i plíce, i když toxické metabolity vznikají pouze v játrech. Příznaky otravy zvířat jsou víceméně stejné: prodloužení období mezi porodem a novým zabřeznutím, potraty, pokles hmotnosti, krvavé

průjmy, koma a smrt. U zvířat s delší dobou užitnosti (chovná zvířata, dojnice) se ve zvýšené míře vyvíjejí rakoviny jater, alkaloidy jsou také genotoxické⁵³.

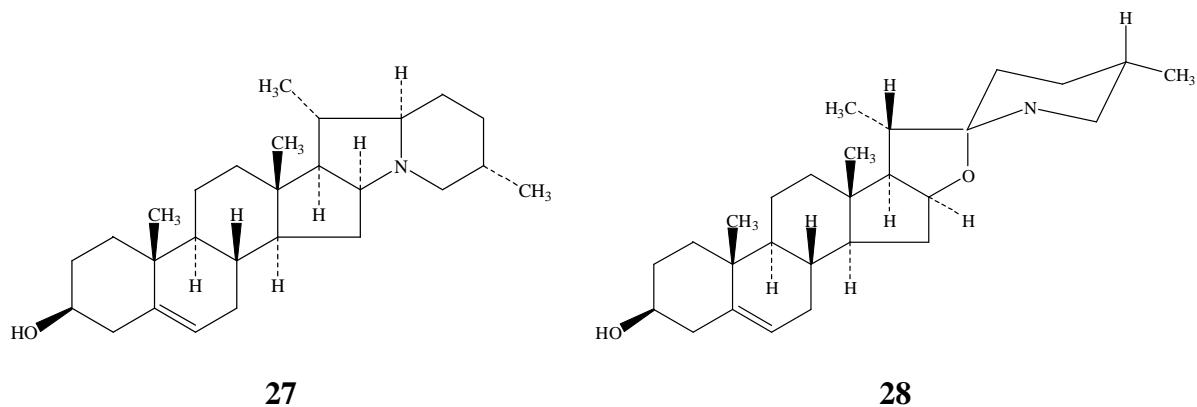
Toxickými taxony jsou v tomto případě v našich podmínkách starček obecný (*Senecio vulgaris* L.) a starček přímětník (*Senecio jacobaea* L.), které se za určitých podmínek mohou rozmnožit v lučních porostech, dostat se do zelené píce (být spásány) nebo do sena, kde je nebezpečí intoxikace relativně vysoké. Z pyrrolizidinových alkaloidů se v nich nalézají především senecionin (**26**), senecifylin a jejich N-oxidy; výrazně citliví jsou koně a skot. Úhyn nastává při příjmu čerstvého starčku v množství 4-8 % tělesné hmotnosti/den, zdá se však, že může být i nižší (ovce a kozy jsou odolnější a jsou ohroženy údajně až při příjmu 200-300 % tělesné hmotnosti). Malí hlodavci (králík, morče, křeček) jsou odolní. Bachorová mikroflóra se podílí na částečné degradaci alkaloidů⁵⁴; v silážích se alkaloidy mění na retronecin a v téměř nejedovaté dehydratační produkty. Část makrocyclických systémů však zůstává zachována (asi 20 mg/kg čerstvé siláže), a proto je i toto krmivo potenciálně toxické. Obsah alkaloidů v rostlinách bývá nejvyšší v době kvetení, tedy v době seče, resp. v době otav.



26

2.2.1.2.4 Alkaloidy zástupců čeledi Solanaceae

Z hlediska toxických látek přichází v úvahu pouze jediný taxon, a to je brambor obecný (*Solanum tuberosum* L.). Steroidní alkaloidy, které se vyskytují ve všech částech rostliny, jsou buď glykosidy solanidinu (**27**) (α -chakonin, β 1-chakonin, β 2-chakonin, γ -chakonin, α -solanin, β -solanin a γ -solanin), nebo glykosidy tomatid-5-en-3 β -olu (**28**) (α - a β -solamarin). Kromě toho jsou přítomny také aglykony.



Koncentrace alkaloidů v hlízách, které byly pečlivě a odpovídajícím způsobem uskladněny, se pohybuje pod 10 mg/100 g čerstvé hmoty (0,01 %). V průběhu stresu při vyorávání a při mechanickém poranění může obsah alkaloidů stoupnout v průběhu následujících 7 hodin na 15 mg (jsou-li ve tmě), případně na 30-76 mg/100 g (jsou-li na světle), v klíčcích může dosáhnout hodnoty až 1 g/100 g (v sušině až 5,8 g/100 g). Tyto látky se vařením nerozkládají a zůstávají v bramborách „na loupáčku“ a v hranolkách v průběhu jejich úpravy. Jsou-li brambory infikovány běžným agens, tj. *Phytophthora infestans*, dochází ke zhnědnutí a výrazným změnám v obsahu sekundárních metabolitů: obsah steroidních glykosidických alkaloidů se zvyšuje 3-4x, obsah chlorogenové kyseliny 25x a hydroxykumarinů 10-20x. Kromě toho se vytvářejí určité fytoalexiny (seskviterpeny lubimin, fytotuberin, rishitin, rishitinol, acetyldehydrorishitinol, solavetivon a solavetivenon).

V hlízách brambor jsou také přítomny lektiny (0,001-0,005 %), které mají vysokou tepelnou stabilitu (neztrácejí aktivitu ani při záhřevu na 80 °C). Jsou nespecifické vůči erytrocytárním krevním skupinám; jedná se o glykoproteiny o relativní mol. hmotnosti ca 50 kDa. Cukerný podíl tvoří zhruba 50 % molekuly, je v něm až 94 % L-arabiny a D-galaktosa. Tento lektin může být také v dimerní nebo tetramerní formě⁵⁵. V syrových hlízách se vyskytují také antinutriční látky – inhibitory Bowmanova-Birkova typu (P-I a P-II).

Největší problémy přináší obsah glykoalkaloidů: jejich obsah je chuťově postřehnutelný od obsahu ca 0,015 %; objevuje se pocit hořkosti, který trvá a maximální hodnoty dosahuje asi po minutě. Pocit palčivosti se vyvíjí asi minutu a trvá 3-5 minut. Tato fakta jsou však významná jen pro člověka, u zvířat nehrají asi významnou roli. Látky mohou být při zkrmování nekvalitních surovin nebezpečné, protože vyvolávají řadu zažívacích a nervových potíží: trávicí potíže spojené s průjmy, často s příměsí krve, silnými bolestmi břicha, slabostí, halucinacemi a křečemi. Dochází k inhibici acetylcholinesterasy (v mozku inhibuje rozklad acetylcholinu. Druhým mechanismem je schopnost narušovat membrány,

kteře obsahují steroly, jedná se tedy o účinky podobné účinkům saponinů. Tím dochází k poškození střevní mukózy a také dalších tkání, do nichž jsou vstřebané alkaloidy transportovány. Zdá se, že při tomto toxickém působení dochází nejprve k poškození střevní sliznice a teprve potom k neurologickým poruchám. Výrazně toxičtější jsou glykosidy, které jsou polárnější, mají nižší hodnotu distribuční konstanty než aglykony, které jsou lipofilnější; tyto aglykony se obtížně vstřebávají, procházejí střevy a ve významně vysoké míře se vylučují stolicí. Existuje názor, že glykoalkaloidy mohou vyvolat chronickou otravu, zcela objektivní důkazy však dosud chybějí.

Zbytky po zpracování brambor bývají dvojího druhu: tepelně zpracované a nativní. U nativních zbytků bramborové hmoty, které zůstávají po výrobě škrobu, je obsah bílkovin relativně vyšší (v sušině 4-20 %) a to v závislosti na odrůdě, uskladnění a dalších podmínkách. Tento materiál obsahuje velmi malé množství škrobu (max. do 1 %), obsahuje karotenoidy (určitá část je asociována s bílkovinami do formy karotenoproteinů a vázána tak na buněčné stróma-nedochází tak k jejich eluci v průběhu technologického procesu). Nepříznivou skutečností je obsah glykoalkaloidů, který se zvyšuje zahuštěním: glykosidické formy těchto látek se v průběhu výroby škrobu uvolňují do vod a odcházejí jako odpad, méně rozpustné aglykony však zůstávají vázány na rostlinnou tkáň. Čerstvé zbytky po výrobě škrobu musí být okamžitě konzervovány (sušeny), protože intenzívně hnědnou a snižuje se jejich kvalita. Přítomné fenolické látky s dihydroxyseskupením (ale také některé monofenoly) se stávají substrátem pro fenoloxidasu (zejména o-polyfenoloxidasu), které tyto sloučeniny oxidují na chinony (o-chinony), spontánně polymerizující na melaninová barviva, která se vážou na tkáň rozřezaných hlíz. Tyto fenolické látky jsou však také zodpovědné za neenzymové hnědnutí bramborových hlíz.

Rozdíl mezi dávkou přijatou z běžných a tzv. nebezpečných brambor může být překvapivě malý, orální akutní toxicita glykoalkaloidů je relativně vysoká. Z GIT se rozdílně vstřebávají, jak bylo řečeno už dříve, vylučují se feces; vyvolávají řadu zažívacích a nervových příznaků – trávicí poruchy a průjemy často s krví a silnými bolestmi břicha, slabostí, depresí, halucinacemi a křečemi. Projevy otravy se dostávají za 0,5-12 hodin po požití. V tomto směru jsou podobné působení saponinů; dochází tak k poškození buněk střevní mukózy a dalších tkání a orgánů, do nichž jsou vstřebané glykoalkaloidy transportovány, např. do krve a do jater; střevní bariéra se tak narušuje a do oběhu mohou vstupovat další toxiny.

Pro hospodářská zvířata chybějí spolehlivé údaje o toxických a letálních dávkách. U prasat a skotu se projevuje ztráta chuti k příjmu žrádla, zvýšené slinění, zažívací poruchy,

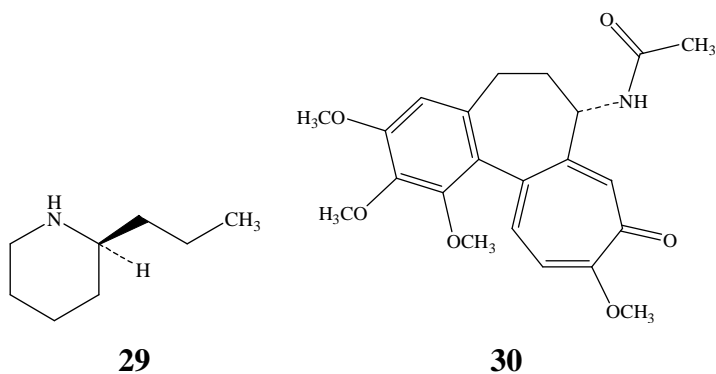
neklid, rozšíření zorniček, někdy selhání krevního oběhu. U mladého skotu dlouhodobě krmeného velkými dávkami brambor dochází k těžké chronické anémii. Zdá se, že drůbež je ke glykoalkaloidům odolnější, značně citlivé jsou však husy, zejména housata.

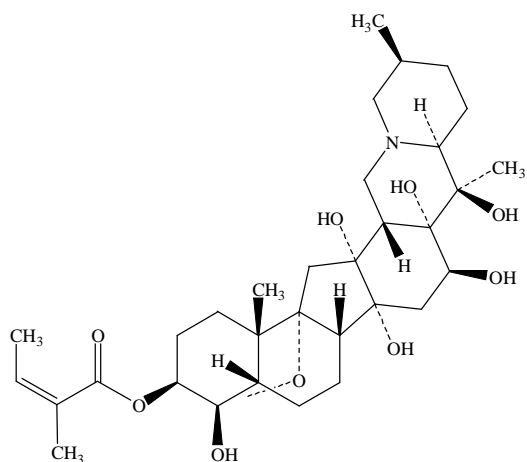
Problému obsahu glykoalkaloidů a jejich bezpečnosti, stejně tak jako fenoménu posklizňových změn v obsahu glykoalkaloidů byla věnována řada studií, např.^{56,57,58}.

2.2.1.2.5 Alkaloidy zástupců ostatních čeledí

Čeleď Apiaceae - miříkovité

Bolehlav plamatý (*Conium maculatum* L.) obsahuje piperidinové alkaloidy, především koniin (**29**), který má určité hemolytické účinky, ale především zasahuje do činnosti motorického nervového systému. Otrava nastává do 30 minut po příjmu rostlinné hmoty a smrt nastává za plného vědomí vlivem selhání dýchacích svalů. Nejvyšší obsah alkaloidů je před kvetením rostliny, především v květech a plodech. Intoxikace touto rostlinou však není běžná: je sice pravda, že se rostlina nárazově hojně vyskytuje na určitých pastvinách, její zápach po myšíně (zejména na suchého slunečného počasí) však zvířata odpuzuje. Nejvyšší nebezpečí hrozí na jaře, kdy jsou spásány mladé listy spolu s ostatní pící. Velmi citlivé jsou krávy, u nichž je krizová dávka 3,3 mg/kg ž. hm. Naproti tomu bylo pozorováno, že bahnice jsou významně odolnější: dávka 44 mg látky/kg ž. hm. měla jen mírné účinky. Nicméně byly pozorovány významné růstové defekty u jehňat, pokud jejich matky spásaly bolehlav v relativně nízkých množstvích, které však navodily chronickou toxicitu: dochází k hákovitému poškození končetin. U kůzlat se objevuje rozštěp patra. Tyto defekty se objevují nejen po koniinu, ale také po anabasinu (*Nicotiana glauca* GRAHAM, Tree Tobacco, který se vyskytuje jen na americkém kontinentu, nicméně anabasin je látky běžná i na teritoriu Evropy). Pokud se vyskytne bolehlav v senáži; významné nebezpečí nehrozí a to ani tehdy, jsou-li přítomny plody (nažky). Koniin (a další alkaloidy) jsou poměrně těkavé a rostlinná část pozbývá rychle toxicity. Tomuto problému byla věnována zajímavá přehledná práce⁵⁹.





31

Čeleď Ranunculaceae - pryskyřníkovité

Vzácné jsou zprávy o intoxikaci dobytka po spasení straček (*Delphinium* sp.). Tam, kde tyto rostliny divoce rostou, existuje nebezpečí při spásání kravami (3 mg/g hmoty jsou toxické)⁶⁰. Pro teritorium ČR je tento fakt nezajímavý; stračky volně v přírodě v travních společenstvech nerostou. Jediný podobný taxon, který přichází v úvahu, ostrožka polní (*Consolida regalis* S. F. GRAY) je drobnou rostlinou rostoucí v polních kulturách jako plevel, v poslední době ne však hojný.

Čeleď Colchicaceae – ocúnovité

Ocún jesenní (*Colchicum autumnale* L.) obsahuje v nadzemní části kolchicin (**30**). Ocún kvete v časném podzimu. Ekologie kvetení tohoto taxonu je odlišná od ostatních rostlin (ale běžná pro čeleď Colchicaceae): v časném létě vyrůstají velké listy s plodným stvolem, který nese tobolku s mnoha semeny, v časném podzimu rostlina kvete. Zdá se, že nebezpečí intoxikace je větší spíše v časném létě, protože nadzemní hmota a obsah kolchicinu v ní je právě v tomto období vyšší než v časném podzimu, kdy jsou louky z velké části spasené a květy zaujímají relativně malý kvantitativní profil bylinného patra. Sušením se toxicita rostliny nesnižuje; udává se, že toxická je dávka zhruba 1 kg čerstvé nadzemní části/100 kg ž. hm. Alkaloid je mutagenní, po požití se poměrně rychle vstřebává, silně se váže na plazmatické a buněčné proteiny, je eliminován žlučí a reabsorbován znova ve střevě, což vyvolává nebezpečí kumulace malých dávek a nástup chronické toxicity. Symptomy jsou vomitus, křeče v zažívacím ústrojí, křečovitě močení, vodnaté až hlenovité feces, krvácení v GIT, krev v moči, často paralýza končetin. Nezdá se, že by digestivní systém přežvýkavců

významně snižoval toxicitu této látky; látka přechází do mléka a významně zhoršuje jeho kvalitu. V nižších dávkách vyvolává u zvířat abortus.

Čeleď Melanthiaceae - kýchavcovité

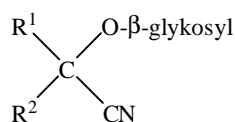
Veratrum sp. (*Veratrum album* L. – kýchavice bílá, *Veratrum californicum* DUR. – kýchavice kalifornská ad.), případně rod *Zygadenus* sp. – spojivec (tento taxon přichází v úvahu prakticky jen oblasti Střední a Severní Ameriky) obsahují tzv. veratrové alkaloidy (celkem asi 60 steroidních alkaloidů; alkaloidní směs se nazývá veratrin, obsahuje především cevadin (**31**) cyklopamin, cykloposin, germin, germidin, jervin, rubijervin, protoveratrin A, protoveratrin B a další). Alkaloidy jsou distribuovány v celé rostlině, která je robustní, listnatá a v horských oblastech se může vyskytovat na pastvinách. Tyto sloučeniny patří mezi jedny z nejjedovatějších látek. Dochází především ke znečitlivění sliznic, kýchání, krvácení z nosu, slzení, překrvení spojivek, snížení krevního tlaku, bradykardii, bradypnoe, nakonec selhání dechu a srdeční činnosti. Sušením se toxicita nesnižuje, přežvýkavci nejsou metabolicky zvýhodněni oproti monogastrickým živočichům. Uvádí se, že dávka 200 g suché kýchavice je letální i pro velká zvířata. U koz a ovcí způsobuje např. významné kongenitální defekty mláďat ve vývoji mozku a faciální oblasti, pokud matky spásaly kýchavici (obr. 1: cyklopie - 14denní mládě po expozici matky *Veratrum californicum* DUR.)⁶¹.



Obr. 1 Cyklopie

2.2.1.3 Kyanogenní glykosidy

Tyto látky jsou v přírodě relativně běžné^{62,63,64}, jejich výskyt je soustředěn ve významných čeledích (Linaceae, Rosaceae, Malaceae, Amygdalaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae), jejichž někteří zástupci poskytují suroviny pro výrobu krmných směsí (len setý, maniok, jetele, štirovník, vikev) a z těchto důvodů je nutné mít o látkách přehled.



32

Toxický kyanovodík (HCN) vzniká kyanogenezí z kyanogenní glykosidu (32): aglykony jsou tvořeny α -hydroxynitrily (kyanhydriny), které jsou stabilizovány sacharidem navázaným na hydroxylovou skupinu. Volné α -hydroxynitrily jsou stabilní ve vodném prostředí jen při slabě kyselém pH. Štěpení kyanogenních glykosidů probíhá prakticky ve 3 krocích. U glykosidů obsahujících navázanou β -D-glukopyranosu se působením β -glukosidasy odštěpí glukosa a vznikne α -hydroxynitril, který se působením α -hydroxynitrilyasy štěpí na HCN a aldehyd (keton). U glykosidů, u nichž je disacharidová složka, je prvá fáze hydrolyzy dvouступňová. Nejprve se hydrolyzuje glykosidová vazba disacharidu, přechodně vznikne jednodušší glykosid a ten teprve potom podlehy výše popsané hydrolyze.

Tab. 2 Obsah kyanovodíku v některých rostlinách⁶⁵

Taxon	Část	Obsah HCN (mg/kg)	
		Čerstvá	suchá
Jetel plazivý (<i>Trifolium repens</i> L.)	Píce		0-800
Štírovník růžkatý (<i>Lotus corniculatus</i> L.)	Píce		200-1500
Len setý (<i>Linum usitatissimum</i> L.)	Semena	200-300	
Vikev úzkolistá (<i>Vicia sativa</i> ssp. <i>angustifolia</i> (GRUFB.) GAUD.)	Semena	520	
Čirok (<i>Sorghum</i> spp.)	Mladé listy	600	
Maniok (hořké odrůdy) (<i>Manihot esculenta</i> CRANTZ)	Listy Kůra hlíz Dřeň hlíz	1040 840 330	
Fazol měsíční (<i>Phaseolus lunatus</i> L.)	Boby	100-4000	
Zblochan vodní (<i>Glyceria aquatica</i> (L.) WAHL.)	Listy	1500-4300	

Ze zdrojů, které jsou v ČR využívány ke krmným účelům přichází v úvahu lněné semeno (resp. lněné pokrutiny), jetele a štírovník. Nejvíce údajů je o jeteli plazivém. Za limitní hodnotu obsahu HCN se považuje 370 mg/kg sušiny, u současných českých odrůd se

hladiny pohybují v rozmezí 210-750 mg/kg sušiny patrně proto, že současné šlechtění je zaměřeno především na agrotechnické vlastnosti, aniž by byla věnována náležitá pozornost obsahu HCN.

Velmi významné je také využití lněných pokrutin. Je to odpad z výroby oleje, kterého je k dispozici velké množství, a proto jsou vypracovávány metody, jak snížit jeho toxicitu, resp. zbavit jej oleje a zároveň inaktivovat kyanogenní sloučeniny⁶⁶. Zdá se, že zbavení oleje je důležitým faktorem pro zkrmování: výlisky s obsahem oleje na vzduchu po krátké době oxidují, tvrdnou a fermežovitě zapáchají (oxidace ALA a CLA, konjugace produktů), což není pro výživu vhodné. I tak má však případné použití olejnatých pokrutin velmi příznivý vliv, např. na obsah DHA ve slepičích vejcích⁶⁷. Protože je tvorba mastných kyselin u rostlinných taxonů geneticky fixována, pracuje se v současné době v Evropě velmi intenzívně na šlechtění lnů s vysokým obsahem olejové kyseliny a nízkými obsahy ALA a CLA (po vzoru olivového oleje), který slibuje výhodnější organoleptické a technické vlastnosti pro krmivářské využití.

Toxikologické studie a významnost se soustřeďují především na množství uvolněné HCN, i když při celkovém posuzování škodlivých účinků je potřeba zhodnotit také obsah nenarušených kyanogenních glykosidů, α -hydroxynitrilů, aldehydů nebo ketonů. Rozhodujícím toxickým účinkem je inhibice cytochromoxidasy a zábrana buněčného dýchání; zprostředkovaně jsou zasaženy i další enzymy a některé biochemické pochody, postiženy jsou mozek a srdce. Počátečními projevy otravy jsou intenzivnější dýchání, periferní znecitlivění, ztráta rovnováhy, dýchací obtíže, tetanické křeče, ochrnutí až úhyn. Aktivita hydrolytických enzymů kyanogenních rostlin a nespecifických glykosidas z jiných složek krmiva může vyvolat u monogastričních živočichů jen omezené uvolnění HCN. Glykosidasy mají optimální oblast štěpení 4,0-6,2, α -hydroxynitrilasy ještě nižší; tyto podmínky neodpovídají trávicímu traktu monogastričních živočichů. K částečnému štěpení glykosidů dochází až ve střevě, působením jeho mikroflóry, hydrolýza je neúplná, část glykosidů se vstřebává v intaktní formě a může tak později vyvolat toxicitu. Je nutné si uvědomit, že existují značné rozdíly mezi jednotlivými živočišnými druhy a nakonec i jedinci: např. chronická intoxikace byla zjištěna u prasat krmených tepelně neupraveným maniokem, obsahujícím kolem 500 mg HCN/kg, v případě drůbeže je údajů málo, užitkovost zřejmě klesá při obsahu HCN v krmivu vyšším než 100 mg/kg. U přežvýkavců existuje více stupňů volnosti: hydrolýzu provádí řada bacherových bakterií, záleží na jejich spektru a také na druhu sloučeniny, která je hydrolyzována (rizikový je zejména prunasin). Rozsah detoxikace HCN na thiokyanát, resp. formaldehyd je nízký, rozhodující je vstřebávání HCN z bacheru (které probíhá rychle, protože se snižuje disociace molekuly HCN). Přežvýkavci jsou proto výrazně citlivější než

ostatní skupiny zvířat. Míra intoxikace klesá, je-li současně podána velká dávka škrobových krmiv (běžné potravní sacharidy působí jako určité antidotum vůči intoxikaci HCN, část HCN se patrně aduje na glukózu, uvolněnou hydrolyzou škrobu). Detoxikace HCN v játrech probíhá na thiokyanát, který je velmi málo toxický; její míra závisí na obsahu síry, v tomto případě nejlépe na přísunu methioninu. Vzniklé thiokyanáty jsou strumigenní a je tedy nutnost podávat zvýšenou dávku jodu. Zvýšený přísun kyanogenních glykosidů také nepříznivě ovlivňuje hladinu selenu v krvi ovcí a jehňat a zvyšuje náchylnost jehňat vůči nutriční myopatii, jak bylo prokázáno u jetele plazivého.

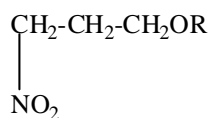
Bylo také zjištěno, že jak kondenzované, tak hydrolyzovatelné třísloviny inhibují hydrolyzu kyanogenních glykosidů β -glukosidasami. Proto je při dostatku tříslovin v krmné dávce účinek kyanogenních glykosidů na přežvýkavce nízký, je však potřeba zvolit určitý konsenzus, protože zvýšený obsah tříslovin má naopak za následek snížení využitelnosti krmné dávky, protože tyto látky působí antinutričně, vyvazují bílkoviny.

Aproximativně se předpokládá, že letální dávka HCN je pro ovce 2,0-2,4 mg/kg ž. hm. Při lehkých otravách se např. u ovcí objevuje nechutenství, přetrvávající až do odeznění příznaků intoxikace. Je-li skot dobře živen, pak je tolerovatelná denní dávka HCN podstatně vyšší, dosahuje až 50 mg/kg ž. hm., opak nastává u zvířat podvyživených. Je také známo, že jednorázový přísun HCN je podstatně nebezpečnější než přísun chronický, při kterém snesou zvířata podání vyšších dávek (15-20 mg/kg ž. hm.). Jetele plazivý je možné spásat až do dávky 1000 mg/kg sušiny, pokud je ve smíšeném porostu v obvyklém zastoupení.

Omezení účinku HCN spočívá v blokádě kyanogeneze inaktivací β -glukosidas, nebo odstraněním glykosidů (což je problematičtější), případně kombinací obou metod. Jako schůdné se jeví genetické manipulace a příprava siláží. Relativně nebezpečné je seno s obsahem kyanogenních rostlin, zejména je-li podáno ve formě granulí.

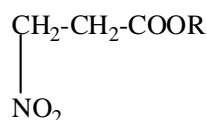
2.2.1.4. Nitroderiváty alifatických uhlovodíků

Tato skupina toxinů je výrazně úzká: jedná se prakticky jen o deriváty propanu, resp. 3-nitropropanol (**33**) a jeho oxidovanou formu 3-nitropropionovou kyselinu (**34**). Vyskytují se v rostlinách ve volné formě, častěji však ve formě glykosidu (miseroxotin **35**), nebo ve formě esterů s D-glukosou (jednotlivé hydroxyskupiny D-glukosy jsou esterifikovány až do stupně triesterů; při esterifikaci poloacetalového hydroxyly jsou možné dva anomery).



R= H 3-nitropropanol (**33**)

R= β -D-glc miserotoxin (**35**)



R= H 3-nitropropionová kys. (**34**)

R= β -D-glc: estery

33 a **35** se vyskytují jen druhů rodu *Astragalus* spp.⁶⁸ - ca 420 taxonech, z nichž většina roste na teritoriu USA. Z evropských druhů jsou přítomny např. v taxonu *A. lusitanicus* LAM., toxickém pro ovce. Kyselina 3-nitropropionová **34** a její mono- až triestery s D-glukosou (6-monoester, korollin, koronillin, koronarian, karakin, cibarian) se vyskytují významně v čičorce pestré (*Coronilla varia* L.), štírovníku růžkatém (*Lotus corniculatus* L.) a dalších taxonech z čeledi Fabaceae (ale i z jiných čeledí, které však nejsou z pícninářského hlediska zajímavé)⁶⁹.

Zmíněné glykosidy a estery jsou hydrolyzovány enzymy bachorové mikroflóry; rychlejší hydrolyza nastává u esterů, pomalejší u glykosidu. U monogastrických zvířat, resp. hlodavců, je výskyt mikrobiální β -glukosidasy výrazně nižší, miserotoxin se štěpí podstatně pomaleji a vstřebává se nerozštěpený. V případě esterů je situace jednodušší: esterasy jsou běžně přítomné v tenkém střevě, a proto se zde estery **34** s glukosou štěpí rychle. Po rozštěpení **35** dochází v játrech na jeho oxidaci na **34** a poměrně rychlé eliminace. Toxicita nitroderivátů je založena na dvou mechanismech účinku:

1. *methemoglobinémii*, způsobené dusitanovými ionty, které vznikají metabolizací **34**,
2. *inhibicí sukcinát-dehydrogenasy* a tím blokadí mitochondriálního dýchání. Tato ireverzibilní změna je způsobena karbaniontem vznikajícím z **34**, který se vytváří z volné kyseliny při fyziologickém pH na některých citlivých místech organismu (v mozku, kde bylo této nemetabolizované látky nalezeno významné množství),

Příznaky otravy u zvířat jsou nechutenství, paralýza končetin, ztráta rovnováhy, obtížné dýchání a ztuhlost svalů na krku; smrt nastává zástavou dechu a vznikem apnoe. Chronický přísun látky **34** v subletální dávce může vyvolat příznaky Huntingtonovy choroby (neurodegenerativní onemocnění mozku typu chorei). Existuje názor, že terminálně toxická je 3-nitropropionová kyselina, ne 3-nitropropanol nebo miserotoxin. Nelze se s ním zcela ztotožnit, protože 3-nitropropanol má vyšší hodnotu K_D než 3-nitropropionová kyselina, která je výrazně polární a z organismu je eliminována zcela jistě rychleji než 3-nitropropanol; už samotný název „miserotoxin“ naznačuje, že tato sloučenina má velmi těžký toxikologický obraz (miserere). Na druhé straně je nutné vzít v úvahu, že v našich podmínkách je otrava

spásáním kozinců podstatně vzácnější než spásání čičorky pestré nebo štírovníku růžkatého, které se běžně vyskytují a dokonce systematicky pěstují.

Přežvýkavci mají pochopitelně vyšší detoxikační kapacitu vůči 34 než hlodavci, kteří jsou významně citlivější vůči této látce; hodnoty detoxikační účinnosti u hlodavců jsou uváděny na ca 0,4 $\mu\text{mol/ml}$ bachorové šťávy/hod., pro 33 je tato hodnota 4-5x nižší. Většina bachorových bakterií snáší hladiny nitrosloučenin na úrovni 20-60 mg/kg ž. hm., jsou to však dávky, které u některých jedinců navozují otravu. Vůči těmto látkám jsou vysoce citliví koně, z přežvýkavců pak samice v období laktace.

Přes všechny tyto nepříznivé jevy existuje stále výzva studovat použití čičorky pestré (*Coronilla varia* L.) jako potenciální pícniny (tato rostlina je jak v Evropě, tak zejména v USA intenzívně šlechtěna): je podstatně méně hořká než vojtěška, obsahuje více živin a její stravitelnost je také lepší. V tomto ohledu však bude nutné vyčkat na výsledky dalších studií.

2.2.1.5 Toxické aminokyseliny a látky z nich vycházející

Lathyrogenní aminokyseliny, jejich deriváty a dipeptidy jsou obsaženy v několika desítkách druhů rodu *Lathyrus spp.* (hrachor) a *Vicia spp.* (vikev); po jejich konzumaci se vyvíjí lathyriismus (neurolathyriismus). Nejcitlivější skupinou je drůbež; z pokusů na ovcích se ukázalo, že bachorová mikroflóra přežvýkavců se dokáže vyrovnat s těmito toxickými látkami a poměrně úspěšně je metabolizovat.

Příčinou lathyriismu jsou β -kyano-L-alanin (*Vicia sativa* L.), β -N-oxalylamino-L-alanin, α,γ -diaminomásečná kyselina a její γ -N-oxalylderivát. Semena hrachoru setého obsahují 0,1-2,5 % β -N-oxalylamino-L-alaninu, α,γ -diaminomásečná kyselina je zastoupena v semenech hrachu lesního a hrachoru dlouholistého zhruba v 1,5 %. Onemocnění postihuje CNS, projevuje se ztrnutím a slabostí svalů, zejména paralýzou svalů končetin. Úmrtí jsou zřídka, je to však intoxikace obtěžující. Pro detoxifikaci semen *Vicia sativa* L. byla vypracována metoda, je však otázkou, do jaké míry se uplatní případně v praxi⁷⁰.

Osteolathyriismus je dalším typem onemocnění, charakterizovaného poruchou metabolismu kolagenu a elastinu a vycházejícího z biologického účinku β -aminopropionitrilu a jeho β -(γ -glutamyl)-derivátu, které se vyskytují v řadě druhů hrachoru, zejména v hrachoru vonném (*L. odoratus* L.), avšak problémy mohou nastat i po příjmu jiných taxonů, např. v semenech zástupců rodu *Vicia ssp.* se vyskytuje kole 0,15 % β -kyanoalaninu a 0,6 % γ -glutamyl- β -kyanoalaninu, které mohou být rizikové pro drůbež: zvyšuje se propustnost membrán vajec a zhoršuje se pevnost skořápky. Hrachor setý, který je pěstitelsky nenáročnou

rostlinou s vysokým obsahem bílkovin, však nelze z tohoto pohledu významně používat v píceňářství; účinek neurotoxinů jej pro tuto oblast významně diskvalifikuje. Existují různé metody, jak tuto hladinu snížit, prakticky je však většina z nich ve velkoprodukci jen těžko použitelná. Jediným, snad reálným způsobem, je vaření semen do měkka a teprve potom jejich úprava. Tento postup však zvyšuje finanční náročnost na přípravu krmiva a je otázkou, zda bude moci být prakticky přijat.

Toxické látky tohoto typu jsou charakteristické především pro zástupce čeledi Fabaceae, rostoucí v tropických oblastech, na jejichž využití je zájem nejen v zemích původního výskytu. Výskyt těchto látek v níže uvedených rostlinách je nutnou obranou, ekologicky vynucenou, většinou proti hmyzím škůdcům.

Role kanavaninu jako ochranného faktoru, značně toxického vůči řadě mikroorganismů a hmyzu, je už delší dobu znám. Jeho toxicita je závislá na živočišném druhu, který jej přijímá: např. u kuřat vyvolává rychlé a výrazné zpomalení růstu, a to i po termickém zpracování suroviny (autoklávovaná semena *Canavalia ensiformis* (L.) DC.). Savci jsou na látku méně citliví, avšak i u nich nastává zpomalení růstu; např. u prasat klesá příjem krmiva s přídavkem kanavaninu v dávce 0,8 g/kg krmiva. Rozdíly v odlišných účincích této látky na savce a ptáky vyplývají z odlišného způsobu vylučování nadbytečného dusíku z organismu; u ptáků nefunguje ornitinový cyklus a nemohou ani syntetizovat arginin, proto pro ně představují argininové analogy toxické látky. U savců je kanavanin do určité míry metabolizován cyklem, jehož meziprodukty jsou po odštěpení močoviny kanalin, O-ureidohomoserin a kanavanin-sukcinát. Existují pokusy s úpravou semen kanavale pražením a využitím této suroviny v drůbežářství⁷¹.

Toxická neesenciální aminokyselina mimosin narušuje reprodukční procesy, je teratogenní, navozuje ztrátu srsti, může vyvolat až úhyn; vyskytuje se v nati taxonu *Leucaena leucocephala* (LAM.) DE WIT. (Fabaceae), rostoucí v tropech Střední Ameriky, úspěšně pěstovaná i v subtropických oblastech. Jejím nesporným kladem jsou vysoké výnosy s vysokým obsahem dusíkatých látek, jak je u většiny zástupců čeledi Fabaceae obvyklé. Obsahuje však až do 5 % mimosinu v sušině listů a mladých výhonků. Proto mohou krmné dávky pro drůbež obsahovat maximálně 10 % přídavku této suroviny a pro neadaptované přežvýkavce do 30 % leukaeny⁷². Osud mimosinu v organismu přežvýkavců je v současnosti už dobře znám: bachorové mikroorganismy odštěpí alifatický řetězec za vzniku 3,4-dihydroxypyridinu, který se vyskytuje ve dvou stabilizovaných formách (enol- a ketoformě). V menší míře se také vytváří méně účinný 2,3-dihydroxypyridin. U neadaptovaných přežvýkavců se 3,4-dihydroxypyridin – aktivní strumigen – vylučuje močí buď volný, nebo

konjugovaný ve formě glukuronidu, část se vylučuje i feces. Jak akutní, tak chronické otravy se projevují nechutenstvím, vypadáváním srsti, snížením přírůstků až úbytkem hmotnosti, charakteristickým zvětšením štítné žlázy, až snížením plodnosti samic. Po vyřazení přísady rostliny z krmné dávky se stav poměrně rychle stabilizuje. Její škodlivé účinky se výrazně snižují silážováním. Pokud je adaptována mikroflóra přežvýkavců mikroorganismy, schopnými štěpit 3,4-dihydroxypyridin, pak se situace významně stabilizuje. Bakterií, která je schopná metabolizovat 3,4-dihydroxypyridin je *Synergises jonesii*, pocházející z bachoru havajských koz, tímto mikroorganizmem je možné naočkovat zařívací ústrojí jen několika jedinců ve stádu, po určité době se pozitivní infekce samovolně rozšíří. Je zřejmé, že tento problém nebude v nejbližší době v ČR problémem, který by musel zemědělský výzkum řešit.

Zcela běžnější látkou, která se může v krmivu vyskytnout, je L-DOPA (L-3,4-dihydroxyfenylalanin), vyskytující se v nemalém obsahu v semenech bobu obecného (*Vicia faba* L.). V nevyzrálém materiálu, který se může dostat do zkrmování, je 5-6 % této látky (zráním obsah rychle klesá). Této látce se přisuzuje účast na vzniku favizmu⁷³.

Zástupci čeledi Fabaceae jsou velmi atraktivními surovinami pro krmivářský průmysl⁷⁴, při jejich šlechtění je však nutné nalézt konsenzus mezi obsahem nežádoucích složek a bezproblémovým výnosem; v řadě případů je možné snížit obsah uvedených toxických látek na nízkou úroveň, utrpí tím však výnos, obsah dusíkatých látek a sacharidů a kvalita pěstitelských porostů, na které by bylo nutné aplikovat pesticidy. Proto je nutné hledat možnosti snížení účinků těchto látek úpravami suroviny na jiné úrovni.

2.2.1.6 Inhibitory proteas⁷⁵

V řadě významných krmivářských surovin se vyskytují polypeptidy a proteiny, které vytvářejí s proteasami stabilní komplexy a tím tlumí jejich enzymovou aktivitu. Dochází ke snížení užitkovosti zvířat, zhoršuje se jejich zdravotní stav a nepříznivě je tak ovlivněna ekonomika chovu. V současnosti se také kriticky posuzují ekologické důsledky, protože feces s nadbytkem dusíkatých látek zvyšuje zátěž životního prostředí.

Tyto látky zasahují obě skupiny enzymových systémů:

Endopeptidasy (trypsin, chymotrypsin) mají optimum při pH 7,5-8,5, štěpí peptidové vazby tvořené karboxyly zásaditých aminokyselin lysinu a argininu. Chymotrypsin štěpí peptidové vazby vzniklé z karboxylů aromatických aminokyselin.

Exopeptidasy působí na nízemolekulární peptidy (karboxypeptidasy odštěpují aminokyseliny od karboxylového konce řetězce, aminopeptidasy hydrolyzují vazby aminoskupinového konce peptidů).

Inhibitory proteas se dělí do hlavních skupin:

1. inhibitory serinových proteas (Kunitzův typ, Bowmanův-Birkův typ),
2. inhibitory sulfhydrylových proteas,
3. inhibitory kyselých proteas,
4. inhibitory metaloproteas.

Svémi účinky a výskytem jsou nejzávažnější inhibitory serinových proteas; vzhledem k významu ve výživě jsou tyto látky sledovány především v zástupcích čeledí Fabaceae, Solanaceae a Poaceae. Jejich biologické účinky jsou následující:

1. potlačují růst zvířat,
2. omezují štěpení bílkovin a jejich stravitelnosti u drůbeže, nevýznamně u hlodavců; bílkoviny krmiva se vylučují trusem,
3. snižují absorpci dusíku a síry z tepelně neupravené sojové moučky u drůbeže a hlodavců, ale mechanismus těchto jevů je odlišný,
4. vyvolávají hypertrofii a hyperplazii slinivky břišní a zvýšené vylučování enzymů touto žlázou,
5. stimulují syntézu trypsinu a chymotrypsinu ve slinivce, čímž vzrůstá potřeba methioninu a cysteinu, které je nutné dodávat do krmiva aditivně,
6. způsobují endogenní ztráty dusíku a síry,
7. zvyšují tvorbu a uvolňování cholecystokininu, resp. dalších látek s podobnou funkcí, které stimulují sekreci enzymů ze slinivky.

Za technicky nejschůdnější možnost omezení nepříznivých účinků je pokládáno šlechtění na snížený obsah těchto látek (bohužel jsou to někdy látky nízkomolekulární, zapojené do intermediárního metabolismu rostlin a jejich hladiny lze snížit jen nepatrně), proto musí být celá záležitost řešena komplexně. Největší zájem je soustředěn na soju, kde byly vyšlechtěny 00 odrůdy (nízký obsah inhibitorů proteas, nízký obsah lektinů), obsah inhibitorů u jednotlivých rostlin určitého typu je však v rámci porostu značně nevyrovnaný a to v závislosti na poloze lusku na hlavním stonku, což významně ztěžuje situaci. Možnost otevírá geneticky manipulované osivo, bude-li reálné jeho široké použití.

Při termických a technologických úpravách se bere v úvahu také snaha o snížení obsahu lektinů a dalších antinutričních složek, ale současně musí být také posouzen vliv zákroku na stravitelnost bílkovin krmiva. Prozatím se jako optimální jeví tepelná úprava (var, autoklávování, toastování, extruze v závislosti na použité surovině). Velmi často bývají přidávány alkalické siřičitany, které změni konformaci disulfidických můstků a tím do značné míry inhibitory proteas inaktivují.

2.2.1.7 Lektiny⁷⁶

Látky, které byly dříve označovány jako fytohemaglutininy, mají významný antinutriční charakter, zejména v případě mláďat. Jedná se o glykoproteiny nebo proteiny, u nichž alespoň jedna složka neplní funkci katalyzátoru, ale váže se reverzibilně na určitý mono- nebo disacharid buněčné stěny střevní mukózy, případně jiných tkání.

Tato skupina je z hlediska základního výzkumu velmi živá, protože má obecně medicínský význam, nepřináší jen poznatky v oblasti živočišné výroby; látky byly zjištěny ve více než tisíci taxonech rostlin různých čeledí. Velmi významně se vyskytují především v zástupcích čeledi Fabaceae, ale také Solanaceae a Poaceae.

Z hlediska biologických účinků je nutné konstatovat, že:

1. obecnou vlastností je jejich vysoká odolnost vůči štěpení proteolytickými enzymy *in vivo*,
2. intenzita vazby lektinu na sacharidy přítomné na povrchu buněk lumenálního střevního epitelu závisí na typu lektinu; pevnou vazbu vytvářejí jen tři typy těchto látek:
 - s komplexní specifitou (univerzální), např. lektin fazolu obecného,
 - specifické vůči N-galaktosaminu, např. lektin soji,
 - specifické vůči N-acetylglukosaminu, např. lektin pšeničných klíčků,
3. vazba lektinů specifických vůči glukose/mannose (hrách, čočka) je jen omezená, nedochází prakticky ke škodlivému působení na živočichy,
4. nejzávažnější antinutriční účinky má lektin(y) fazolu obecného, který je vysoce akutně toxický pro prasata, kuřata, hlodavce a člověka; vede k následujícím poruchám:
 - zpomalují až zastavují růst při více než 1 % v pokusné dietě způsobují rychlé úbytky hmotnosti až úhyn,
 - vyvolávají hypertrofii tenkého střeva,
 - poškozují epitel tenkého střeva, zvyšují obnovu jeho buněk a vyvolávají zvýšenou sekreci jeho hlenu,
 - zvyšují počet bakterií v tenkém střevě,
 - snižují aktivitu řady střevních enzymů,
 - omezují resorpci jodu při enterohepatální cirkulaci tyroxinu, čímž zvyšují jeho ztráty ve výkalech,
 - vyvolávají hypertrofii slinivky, jater a atrofii brzlíku.

V současnosti je nejúčinnější formou zásahu tepelné zpracování materiálu (nejlépe mokrou cestou); pokud se provádí autoklávování suchých semen, pak je potřeba zvýšit teplotu alespoň na 120 °C. V případě drůbeže se ukázal jako pozitivní přídavek putrescinu.

2.2.2 Látky bez obsahu dusíku

Tato skupina látek je reprezentována především sekundárními metabolity rostlin, případně hub; nebyly do ní zařazeny látky, které lze chápat jako primární metabolity, např. fytová kyselina, které byla věnována rozsáhlá studie VVVZ.

2.2.2.1 Fenolické látky

Fenolické látky tvoří patrně nejrozsáhlejší část celé skupiny sekundárních metabolitů – antinutričních a toxických látek⁷⁷; jejich výskyt v rostlinném materiálu je prakticky neodstranitelný (mykotoxiny, třísloviny, fytoestrogeny) a většinou je nutné volit různé jiné metody, aby byl jejich vliv snížen na minimum.

Některé z těchto látek nebudou rozlišovány podle chemické struktury, ale podle charakteru vzniku v rámci metabolismu (mykotoxiny), nebo biologického účinku (fytoestrogeny), protože tento biologický účinek je dominantní a zahrnuje látky poněkud odlišného typu.

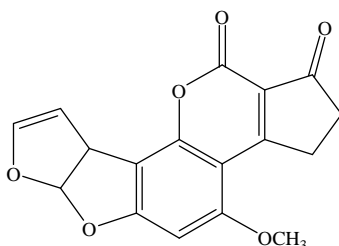
2.2.2.1.1 Mykotoxiny

Jedná se o relativně uzavřenou skupinu metabolitů mikromycet, spadající do širší oblasti mykotoxinů. Původně byly izolovány tzv. aflatoxiny z mycelia *Aspergillus flavus* LINK ex FRIES a z tekutého média na němž byla tato houba kultivována. Jsou to významné toxické látky, v přírodě široce rozšířené v potravinářských surovinách (arašídy, arašídová mouka, mouka ze semen bavlníku, kukuřice, sušené chilli papriky ad.), nevhodně uskladňovaných pícninách a se vyskytují jen v zástupcích cereáliích, a proto se k nim upírá velká toxikologická a hygienická pozornost. Jejich hepatotoxicita a kancerogenita jsou obecně známy a bylo by zcela zbytečné ji znova probírat, protože na toto téma byly ve VVVZ napsány od roku 2002 minimálně 2 vědecké studie, a proto zde bude tento problém řešen jen obrysově:

Tab. 3 Hlavní mykotoxinů v krmivech⁷⁸

Rod*	Metabolity
<i>Alternaria</i>	Tenuazonová kyselina, alternariol, alternariolmethylether
<i>Aspergillus</i>	Aflatoxiny B1, B2, G1, G2, sterigmatocystin, cyklopiazonová kyselina, ochratoxin A
<i>Fusarium</i>	Deoxynivalenol, nivalenol, zearalenon, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol
<i>Penicillium</i>	Patulin, ochratoxin A, citrinin, penetrem A, cyklopiazonová kyselina

* do přehledu nebyly zařazeny metabolity rodu *Claviceps* ad., protože o nich bylo pojednáno separátně v kapitole 2.2.1.2.1



36

Jednou z nejvýznamnějších látek je aflatoxin B₁ (**36**). Základní a reprezentativní literatura je uvedena v přehledných kompendiích^{78,79} a přednáškách⁸⁰ a není potřeba je široce rozebírat. Hladiny mykotoxinů jsou stanoveny Vyhl. 451/2000 Sb., kterou se provádí zákon č. 91/1996 Sb., o krmivech, ve znění zákona č. 244/2000 Sb., resp. Vyhláškou č. 184/2004 Sb., kterou se změnila Vyhláška č. 451/2000 Sb. Na rozdíl od jiných škodlivých látek je tato skupina metabolitů pro konečného příjemce velmi škodlivou, protože např. aflatoxiny jsou látky poměrně velmi stabilní a přecházejí s jatečnými produkty do další části potravního řetězce. Nejčastějším zdrojem aflatoxinů je arašídová moučka, v současnosti však nezaujímá v roli toxikantu významné postavení. Velké množství mykotoxinů vzniká při uskladňování cereálií, ale především, v kovových zásobnících při výrobě krmiv, kde je velmi často vyskytující se bolus zdrojem prakticky permanentních reinfekcí obsahu nádrže. Situace se komplikuje dále používáním dlouhodobě uskladňovaných cereálií, které mohou být kontaminovány organickými zbytky pocházejícími z hlodavců a mohou tak zatěžovat toxický obraz připraveného krmiva.

Vzhledem ke své vysoké toxicitě může už nepatrně mikrobiálně pozměněné krmivo vyvolat u zvířete náznak onemocnění. Jeho příznaky a průběh závisí na typu toxinu, přijatém množství, expozici, pohlaví, plemenu a výživovém stavu.

Příznaky primární mykotoxikózy se projevují obecně destruktivními změnami na orgánech, rozdíly mezi působením jednotlivých toxinů jsou patrné až po chronickém příjmu.

Vedle tohoto faktu se vyskytují sekundární mykotoxinová onemocnění vyvolaná příjmem malých množství specifických toxinů. Zvířata jsou citlivější k infekcím a v důsledku narušení imunity klesá jejich přirozená odolnost.

Diagnóza mykotoxikóz je problémová: příznaky u zvířat jsou nespecifické, což ztěžuje jejich rozpoznání a tak je jediným reálným vodítkem sledování obsahu mykotoxinů v krmivu, při použití reprezentativních vzorků.

2.2.2.1.2 Fytoestrogeny

Fytoestrogeny jsou reprezentovány poměrně širokou skupinou látek, které vykazují do jisté míry účinek podobný přirozeným (endogenním) estrogenům, tj. zhutnění děložního epitelu, podobně jako je tomu v případě říje. Přirozeným estrogenem samic je estradiol (3,17- β -estradiol), který zasahuje především estrogení α -receptory a vyvolává tak charakteristické estrogení účinky.

Přirozené estrogeny vyšších rostlin, které se uplatňují v píci, patří prakticky do 3 strukturních skupin:

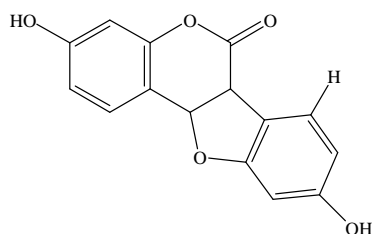
- *kumestany* – kumestrol, 4'-methoxykumestrol, repensol, trifoliol (čeleď Fabaceae),
- *isoflavony* – daidzein, formononetin, genistein, biochanin A (čeleď Fabaceae),
- *lignany lariciresinového typu* – sekoisolariciresinol, matairesinol ad. (čeleď Linaceae)
- *ostatní fytoestrogení sloučeniny dosud neidentifikované*

Závažné jsou především první dvě skupiny látek, protože mohou navodit nepříznivé účinky.

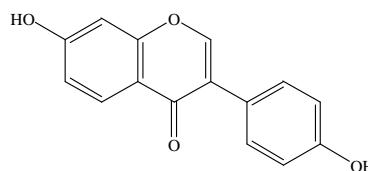
Kumestany se vyskytují v jetelovinách, v jiných taxonech nebyly nalezeny; hlavním představitelem je kumestrol (**37**), který je převládajícím estrogenem vojtěšky, běžně je v odrůdách plazivých jetelů a jeteli inkarnátu. Jeho estrogení aktivita je 30-40x vyšší než u isoflavonů (patrně v důsledku vyšší afinity k estrogením α -receptorům; isoflavony mají afinitu především k estrogenímu β -receptoru, což se projevuje příznivě ve vztahu k osteoporóze); přesto je však jejich účinek podstatně nižší než u diethylstilbestrolu.

Isoflavony se liší od ostatních flavonoidních látek tím, že boční aromatický B cyklus je připojen na pyronový systém v poloze 3, nikoliv v poloze 2, jak je to běžné u klasických flavonoidů. Tato strukturní změna významně mění biologickou aktivitu těchto látek (např. daidzein, **38**). Tyto látky jsou soustředěny především do významných zástupců čeledi Fabaceae (tato čeleď je z hlediska chemosystematického prakticky jediným místem, v němž jsou isoflavony významně soustředěny). Jsou významnou součástí potravy hlavně

vegetariánů, v lidském potravním řetězci se navíc vyskytují jako součástí doplňků stravy s velmi příznivými (protirakovinnými) účinky, v produkci hospodářských zvířat, která se řídí jinými pravidly, však nemusí jejich abundantní obsah přinášet optimální efekty.



37



38

Lignany lariciresinolového typu jsou běžně přítomny v krmných dávkách, pokud jsou do nich přidávány lněné pokrutiny. Isolariciresinol a jeho diglukosid jsou střevními bakteriemi štěpeny na účinný lignan matairesinol, který navozuje fytoestrogenní aktivitu; podle údajů literatury se však vůbec nezdá být toxikologicky významná.

Ostatní fytoestrogenní sloučeniny dosud neidentifikované vycházejí z různých struktur a většinou nebyl dosud izolovány a identifikovány (zde je velké pole pro zemědělský výzkum); např. srha a jílek mají vysokou estrogenní aktivitu, téměř takovou, jako jetele na začátku kvetení, kumestany ani isoflavony však neobsahují (kostřava luční má aktivitu slabou, bojínek nepatrnou a lipnice prakticky nulovou). Estrogenní aktivita však byla zjištěna také při zkrmování řepného chrástu a pícní slunečnice. Fytoestrogenní účinek vykazuje poměrně velká skupina přírodních látek, které mohou být strukturálně dosti odlišné: důležité však je, aby obsahovaly základní farmakofor, kterým mohou interagovat s oběma estrogenními receptory.

Píce z nehojených a nekultivovaných porostů a porostů, které trpěly suchem a jinými stresovými faktory, má výrazně vyšší estrogenní aktivitu než píce získaná z porostů v příznivých pěstebních podmínkách. Obsah isoflavonů je také ovlivňován světelnou intenzitou.

Při sušení jetelů vojtěšek se snižuje hladina isoflavonů až o 80 % (mezní hodnota), protože pomalé mortální procesy navozují rozklad těchto látek (o flavonoidech je známo, že jsou při sušení relativně málo stabilní a rozkládají se v důsledku účinku polyfeloxydaseového systému). Naopak při horkovzdušném sušení do 100 °C zůstává zachována prakticky plná aktivita. Látky zůstávají v píci jak ve formě aglykonů, tak ve formě glykosidů; ty se rozkládají až v zažívacím traktu zvířat. Silážováním se estrogenní aktivita zvyšuje o desítky až stovky procent; estrogenní aktivita siláže je nerovnoměrná v rámci silážních jímek a kromě toho

může vytrvat relativně dlouhou dobu (může docházet ke vzniku látek *de novo*, stejně tak jako v bachorovém systému přežvýkavců). V takovém případě se hovoří o hyperestrogenizmu.

Metabolismus těchto látek a jejich biologická aktivita je dosti závislá na typu zvířete, které prekuzory estrogenů přijalo. Při zkrmování endogenně aktivní píce je obsah metabolitů fytoestrogenů velmi vysoký v porovnání s obsahem endogenních estrogenů zvířat. Fytoestrogeny mají vliv na šíři účinku hormonů (a to i androgenů).

Účinky na reprodukci se mohou projevit inhibicí sekrecí živočišných estrogenů; tím je narušena ovulace, pohyb vajíček ve vejcovodu, vzniká nepravá říje (nepravá březost) a objevují se degenerativní změny pohlavního ústrojí. Dostavují se nepravidelné intervaly mezi říjemi, dlouhodobá říje (nymfomanie), nadměrná sekrece hlenu, překrvení děložní sliznice, na vaječnicích se objevují cystické znetvořeniny folikulu, současně se zvyšuje kontrakce dělohy a vejcovodů. Snižuje se transport vajíček a omezuje se možnost oplodnění. Stupeň působení estrogenů na organismus se liší podle jednotlivých zvířat (např. daidzein je netoxický a neovlivňuje reprodukční cyklus krysích samic⁸¹), přijaté dávky a doby expozice. Celkově lze říci, že tyto látky mohou vykazat určité riziko⁸².

Metabolické účinky (účinky na výši přírůstků) se projevují pozitivně jen u samců přežvýkavců. Mladé porosty s vysokou fytoestrogenní aktivitou mají galaktogenní aktivitu, zvyšuje se jak množství mléka, tak jeho tučnost, zvyšuje se také množství prolaktinu produkovaného hypofýzou, nezabřežlým jalovicích se na pastvě mocně vyvíjí vemeno, beranům se účinkem formononetinu prodlužují prsní bradavky a dokonce se objevuje tekutina připomínající mléko.

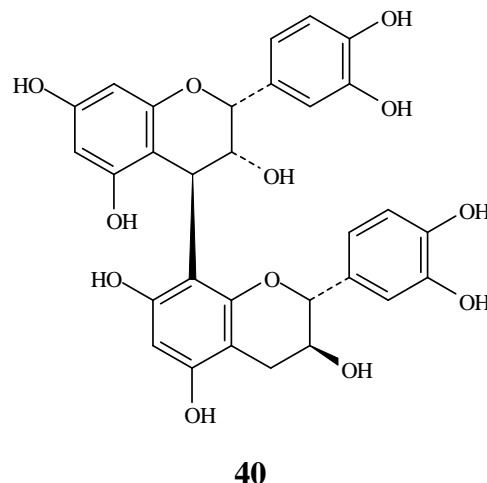
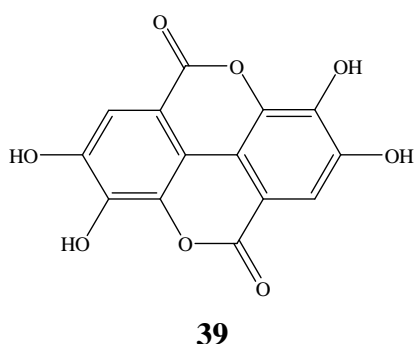
Morfogenetické a karcinogenní účinky způsobují, že se narušuje vývoj normálního samičího pohlavního ústrojí. Důsledkem může být zvýšený výskyt karcinogenních buněk v okolí děložního krčku.

Možnosti omezení negativních účinků jsou sporné: doporučuje se tyto účinky minimalizovat pěstováním druhů a odrůd s nízkou estrogenní aktivitou, efektivní výživou porostů, účinnou ochranou proti chorobám a škůdcům (isoflavony působí jako ochranný činitel) a konzervací podle výše uvedených zásad. Doporučuje se také využít znalostí šlechtitelských postupů, ale prozatím se zdá, že tento postup není příliš úspěšný.

2.2.2.1.3 Třísloviny

Jsou to sloučeniny relativně rozpustné ve vodě (M_r 500-3000 Da), srážejí bílkoviny, vytvářejí komplexy s celulosou, škrobem, alkaloidy, některými minerálními látkami a mohou mít svíravou chuť. Rozdělují se na třísloviny:

1. *hydrolyzovatelné* (estery gallové kyseliny a jejích oligomerů, digallové až pentagallové, např. hexahydroxydifenová kyselina (**39**) s glukosou, případně ellagové kyseliny s glukosou), které se podle uvedené struktury dělí na gallotaniny a ellagotaniny,
2. *kondenzované* (jsou tvořeny kondenzací flavanolových jednotek, např. prokyanidin B-1 (**40**), které jsou zpravidla ve vodě méně rozpustné než hydrolyzovatelné,
3. *smíšené* (estery gallové kyseliny s katechinem), které jsou méně běžné než předchozí typy; mají vlastnosti jak hydrolyzovatelných, tak kondenzovaných tříslovin.



Všechny tři skupiny látek jsou z hlediska své molekulární hmotnosti dostatečně malé, aby pronikly do interfibriálních prostorů bílkovinných vláken, zároveň je však jejich velikost dostatečná k tomu, aby mohly vytvářet můstky mezi bílkovinnými řetězci na více místech.

Tab. 4 Nejvýznamnější krmné plodiny obsahující třísloviny

Skupina	Taxony
Pícniny	<i>Lotus corniculatus</i> L. <i>Lotus pedunculatus</i> CAV. <i>Onobrychis viciifolia</i> SCOP. <i>Coronilla varia</i> L. <i>Lespedeza cuneata</i> (DUM.-COURS.) G. DON.
Semena luskovin	<i>Vicia faba</i> L. <i>Pisum sativum</i> L. <i>Phaseolus vulgaris</i> (L.) SAVI
Semena plodin jiných čeledí	<i>Sorghum bicolor</i> (L.) MOENCH. <i>Brassica napus</i> L. <i>Hordeum vulgare</i> L.

Rozhodující co do výskytu i nutričních účinků na hospodářská zvířata se jeví kondenzované třísloviny.

Třísloviny mají příznivé i nepříznivé účinky na krmnou dávku⁸³: při vysokém obsahu snižují příjem krmiva, stravitelnost bílkovin a sacharidů a užítkovost zvířat. Při nízkých až středních dávkách brání u přežvýkavců nadmutí a zvyšují tok neamoniakálního dusíku a esenciálních aminokyselin z bachoru a tím zvyšují využitelnost bílkovin krmiva.

Nepříznivé účinky se projevují především snížením příjmu krmiva v důsledku zhoršení chutnosti a také zhoršení trávicích procesů (třísloviny vytvářejí se sacharidy, především však s bílkovinami konjugáty, které jsou obtížně rozpustné ve vodě a obtížně stravitelné). Rovněž se vytvářejí komplexy mezi tříslovinami a glykoproteiny slin; může se sice zvyšovat produkce slin, ale zároveň dochází k inaktivaci enzymů. Zajímavý kompenzační mechanismus se vyskytuje u hlodavců, v omezené míře u skotu a ovcí: po určité době příjmu kondenzovaných tříslovin v krmivu se zvětší příušní žlázy, které začnou vylučovat abundantní množství bílkovin, bohatých na prolin; tato aminokyselina způsobuje prostorově otevřené uspořádání molekul bílkovin a jejich velkou afinitu vůči kondenzovaným tříslovinám, fungují tedy jako určitý detoxikační činitel vůči kondenzovaným tříslovinám. Bylo prokázáno, že podobné obranné mechanismy (v souvislosti s profilem býložravé stravy) mají i jiní živočichové.

Po zvýšeném příjmu tříslovin dochází ke zpomalení růstu (v důsledku sníženého příjmu krmiva a jeho využitelnosti), protože se vyvazuje především methionin a lysin. Citliví jsou především monogastriční živočichové, u přežvýkavců dochází k jevu jen při vysokém zastoupení kondenzovaných tříslovin v krmné dávce.

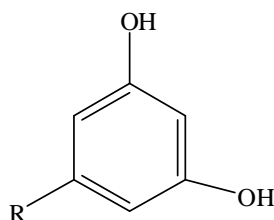
V důsledku reakce tříslovin s trávicími enzymy dochází ke snížené stravitelnosti polysacharidů (inhibice celulasy, α -amylasy, lipasy a trypsinu). Velmi nepříznivá je toxicita kondenzovaných tříslovin pro bachorovou flóru – tyto látky mohou výrazně posunout její profil. Tento typ tříslovin může být pro přežvýkavce také akutně toxický (třísloviny dubů): působením bachorové tannasy dochází k uvolnění gallové kyseliny, která se přímo resorbuje, dochází k její metabolizaci na pyrogallol, který realizují svoji toxicitu. Ta se projevuje v první řadě postižením jater (až nekrózou), krvavými gastroenteritidami a poškozením ledvin.

Příznivé účinky jsou významné především u přežvýkavců. Spočívají ve faktu, že krmivo s obsahem kondenzovaných tříslovin snižuje pevnost a stabilitu pěny, kterou za normálních okolností vytvářejí některé rozpustné bílkoviny bobovitých píceň (vojtěška, jetel luční) v trávicím traktu a významně se tak podílejí proti vzniku tympanie. Tyto látky také zvyšují využití bílkovin: komplexy s bílkovinami jsou stále a téměř nerozpustné při pH 3,5-7,0. Při hodnotách nižších než 3,5 a vyšších než 8,0 jsou málo stálé a bílkoviny se z nich mohou

uvolňovat. Při desintegraci, jako je přežvýkání se v bachoru při pH 5,5-7,0 vytvářejí nerozpustné komplexy kondenzovaných tříslovin s bílkovinami. Tím je zablokováno štěpení bílkovin a deaminace uvolněných aminokyselin, snižují se koncentrace amoniaku v bachoru, močovinnového dusíku v krevní plazmě a ztráty dusíku močí. Komplexy pak přecházejí do kyselého prostředí slezu a do tenkého střeva, kde se rozkládají a teprve tam probíhá hydrolyza bílkovin a jejich trávení. Tímto způsobem se zvyšuje využitelnost esenciálních aminokyselin. Uvedený efekt je smysluplný pouze v případě, že v krmivu existuje výrazná převaha bílkovin nad tříslovinami, protože v případě existence nadbytku tříslovin se uplatňují jejich všechny negativní procesy, jak o tom bylo už hovořeno. V některých případech mohou působit pozitivně proti střevním parazitům⁸⁴. Vlivu tříslovin na digestivní procesy u přežvýkavců byla věnována řada článků, především přehledného charakteru, byl např. diskutován vliv kondenzovaných tříslovin na ruminální fermentaci a nadýmání u pasoucího se dobytka⁸⁵, mikrobiální interakce s tříslovinami a souvislosti ve výživě⁸⁶, vztah mezi rostlinnými fenolickými látkami, produktivitou a zdravím přežvýkavců⁸⁷, interakce střevní flóry s tříslovinami v krmivu⁸⁸ ad.

2.2.2.1.4 Alkylfenoly

Tato skupina látek je v pícninách reprezentována alkyl- a alkenylderiváty resorcinolu:



R=alkyl-, alkenyl- (C₁₅ až C₂₅)

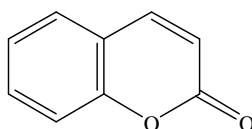
Vyskytují se v obilninách (žito, tritikale, pšenice), především ve vnější vrstvě obilky, a proto jich podstatná část zůstává v otrubách. Jejich průměrný obsah se pohybuje od 0,2-1 mg/g obilek. Kolísání obsahu je dáno jak genetickými vlivy, tak vlivy prostředí. Nejsou významně toxickou složkou krmiva, jejich obsah by však neměl překročit 1 mg/g cereálií (především u žita), protože při vyšší koncentraci klesá příjem krmiva.

2.2.2.1.5 Kumariny

Kumarinové látky jsou sloučeniny obecně toxické nejen pro hospodářská zvířata, ale prakticky pro všechny živočichy: mohou indukovat hepatotoxicitu⁸⁹, navozovat alergii a

zhoubné bujení pokožky. Vyskytují se běžně ve velké části rostlin, které živočichové přijímají a v nízkých koncentracích pro ně mohou být dokonce prospěšné (mají spasmolytické, cholagogní a digestivní účinky).

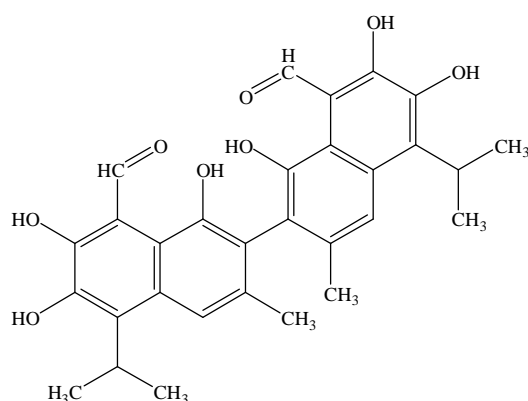
Nejvýznamnější látkou z hlediska toxicity hospodářských zvířat je bezesporu kumarin – lakton (Z)-kumarové kyseliny (**41**).



41

Kyselina kumarová se běžně vyskytuje ve velké části rostlin (travních porostech), nikoliv volná, ale většinou ve formě glykosidů. Při mortálních procesech (schnutí sena) dochází vlivem mechanického stresu, anebo vliv účinku glukosidas k odštěpení cukerné složky za vzniku volné kumarové kyseliny, která velmi snadno cyklizuje na svůj vnitřní lakton – kumarin.; tento proces je signalizován charakteristickou vůní. Velmi významná je tato vůně, objeví-li se v travních porostech zejména komonice (*Melilotus officinalis* (L.) PALLAS – komonice lékařská, *Melilotus albus* MEDIC. – komonice bílá)⁹⁰. V komonici bílé může být až 25 g kumarinu (včetně jeho prekurzorů)/kg. Kumarin je vonnou látkou, které se zvířata vyhýbají, protože jim chutná hořce, nepředstavuje pro však významné nebezpečí. To nastává teprve tehdy, pokud seno zaplesniví, zejména, je-li infikováno mikromycetou *Penicillium jensenii*, která vyvolá velmi rychlý přechod kumarinu na dikumarol. Dikumarol kompetitivně brzdí tvorbu protrombinu v játrech vzhledem ke své podobnosti s vitamínem K a v důsledku toho může dojít k poměrně rozsáhlým krvácením. V rámci enzové výbavy existuje rozdílná citlivost jednotlivých živočišných druhů, citlivé jsou např. březí husy a dojnice v plné dojivosti.

2.2.2.1.6 Gossypol



42

Tento žlutý fenolický pigment, obtížně rozpustný ve vodě, s antioxidačními vlastnostmi, relativně kyselého charakteru, se vyskytuje v různých částech bavlníku, nejčastěji je však přítomen v pigmentových tělískách bavlníkových semen, v nichž tvoří 20-40 % hmotnostního obsahu. Výskyt v semenech má velký ekonomický význam; čím vyšší je jeho obsah, tím nižší je kvalita bavlníkového oleje (používaného jako potravina) a šrotů (používaných jako krmivo).

Gossypol (42) vykazuje přímou toxicitu, ale také reaguje s bílkovinami, což způsobuje toxicitu protahovanou, protože to vede ke zhoršování krmné hodnoty.

U hospodářských zvířat se mohou bavlníkové šroty zkrmovat jen s opatrností: citlivé jsou dojnice na začátku laktace a mláďata s dosud nevyvinutými předžaludky. U monogastrických zvířat je možné šroty zkrmovat jen omezeně; toxicita látky vzrůstá s přísadou olejů nebo jiných tukovitých látek. Pokud jsou ve šrotech přítomna neporušená pigmentová tělíška, je jejich toxicita vyšší než při běžném obsahu gossypolu, patrně v důsledku přítomnosti dalších toxických látek. Za bezpečnou dávku pro prasata se považuje 0,01 hm. % volného gossypolu v krmné dávce (v odrůdách *Gossypium hirsutum* L. se pohybuje obsah gossypolu v rozmezí 2-6 %). U slepičích brojlerů byla nalezena významná závislost: je-li poměr enantiomerů (+)-gossypolu/(-)-gossypolu významně vyšší, pak je toxicita krmiva výrazně nižší, než je-li tomu obráceně⁹¹; tento fakt byl pozdějšími studiemi rozpracován a potvrzen⁹². U býčků snižuje současný přídavek vitamínu E toxicitu gossypolu⁹³.

Toxicita se u monogastrických zvířat projevuje sníženým příjmem krmiva, úbytkem tělesné hmotnosti, průjmem, odbarvováním srsti, hemolytickou anémií, výskytem serózní tekutiny v tělních dutinách, plicích a v perikardu, degenerativními změnami jater a sleziny,

krvácivostí v játrech, tenkém střevě a žaludku. U nosnic reaguje s železem obsaženým ve žloutku a způsobuje jeho olivově zelené zbarvení. Může zhoršit líhivost vajec. Toxicita je způsobena několika mechanismy:

- a) vazbou železa do formy chelátu a navozením anémie,
- b) reakcí s aminoskupinami aminokyselin a bílkovin, tvorbou Schiffových bazí a tím zásahem do řady důležitých biochemických procesů,
- c) zásahem do některých enzymových reakcí podílejících se na spermatogenezi (dočasné snížení plodnosti u krys, opic, křečků, mužů, nikoliv však u myší a králíků,
- d) gossypol přechází do žloutku vajec.

Existuje snaha o detoxikaci gossypolu: lze jej eliminovat reakcí se síranem železnatým (nejčastěji), nebo jinou železnatou solí, uvádí se však, že lze použít i jiných kationtů (sodných, draselných, vápenatých). Je termolabilní, a proto se za varu po dobu 20 minut rozkládá. Efektivní se zdá postup propařování parami ethanolu⁹⁴.

2.2.2.2 Nefenolické látky

2.2.2.2.1 Saponiny

Saponiny jsou velmi sledovanou skupinou látek⁹⁵, protože se jedná o sloučeniny fyziologicky (toxikologicky) významné:

- a) mají hořkou, až svíravou chuť,
- b) ve vodných roztocích vytvářejí stabilní pěnu,
- c) hemolyzují erythrocyty *in vitro*,
- d) jsou toxické pro poikilothermní živočichy (hmyz, plže, ryby),
- e) mají schopnost reagovat se žlučovými kyselinami, cholesterolem a dalšími 3β-hydroxysteroidy za vzniku směsných micel.

Biologická aktivita saponinů, resp. jejich nežádoucí účinky, jsou velmi závislé na aglykonu, např. u saponinů vojtěšky existuje názor, že účinnost klesá v pořadí medikagenová kyselina – hederagenin – sojasapogenoly A a B.

Saponiny exkretované kořeny vojtěšky do půdy, mají patrně velké allelopatické účinky: ve velmi nízkých koncentracích stimulují růst následných plodin, ve vysokých je silně inhibují; velmi citlivý je např. ozimý ječmen. Vysokou účinnost v tomto směru vykazuje např. 3-O-glukosid kyseliny medikagenové⁹⁶.

V krmivech přicházejí v úvahu především pentacyklické, triterpenové saponiny (soja, vojtěška a příbuzné pícniny); steroidní saponiny se vyskytují pouze v ovsu (jak obilkách, tak slámě).

Vojtěška obsahuje v sušině (podle odrůdy) 0,3-2 % těchto látek (většinou glykosidů medikagenové kyseliny a sojasapogenolů); výskyt saponinů bývá vyšší ve 2. a 3. seči (tento fakt koreluje s fenofází rostliny). Tak jako u řady mnoha jiných užitkových rostlin, je výskyt saponinů nejvyšší těsně před kvetením, v měkkých tkáních (listech) je obsah vyšší než ve sklerenchymatických stoncích. Významnou hořkostí a dráždivým účinkem na hrdlo disponují s největší pravděpodobností glykosidy kyseliny zanhové.

V odtučněných sójových šrotech je průměrně 0,3-0,5 % saponinů, především glykosidů a cukerných esterů 5 typů sojasapogenolů. Prozatím není z přehledu literatury patrné, že by sójové sapogenoly vykonávaly významný negativní efekt z antinutričního hlediska.

Biologickou aktivitu vykazují především intaktní saponiny, které mají navázanou cukernou složku; ta zvyšuje rozpustnost látky, schopnost tvořit micely, ovlivňovat povrchové napětí, měnit elektrolytovou rovnováhu a tím narušovat normální fyziologické procesy ve tkáni, především střevní mukóze. V průběhu střevní pasáže dochází k hydrolýze (střevní enzymy a střevní bakterie), vznikají aglykony s podstatně horší rozpustností a vyšší distribuční konstantou, setrvávají především ve střevě a tam mohou vykonávat také určitý biologický účinek. Hemolytické saponiny (a to je velká část saponinů triterpenových, steroidní saponiny touto vlastností disponují prakticky zanedbatelně), narušují propustnost a celistvost buněk mukózy tenkého střeva. Po tomto narušení střevních buněk dochází zpravidla k resorpci některých nežádoucích látek (bakteriálních toxinů aj.). Tuto vlastnost mají např. saponiny odvozené od zanhové kyseliny, a proto je vhodné, aby odrůdy vojtěšky byly šlechtěny na nízký obsah těchto látek.

Při vysokém příjmu krmiv se saponiny dochází ke zpomalení růstu zvířat, zdá se, že snižuje využitelnost zinku, zpomaluje se průchod tráveniny trávicím traktem, tím nastává nižší příjem krmiva.

Omezení obsahu saponinů v pícech je záležitostí problémovou, ačkoliv existují velmi povzbudivé odborné zprávy uvádějící možnost snížit obsah těchto látek v krmivářských surovinách. Obsah saponinů v rostlinách je genetickou záležitostí, v řadě případů lze jejich obsah snížit, ale dosud neexistují zprávy o tom, že by se podařilo připravit pícniny s jejich zanedbatelným množstvím. Snížení je však realizovatelné technologicky: např. silážováním zavadlé vojtěšky dochází k poměrně rychlému rozkladu saponinů, jejichž aglykonem je medikagenová kyselina, ve hmotě zůstávají látky na bázi sajosaponinu I, který je významně stálejší. Účinné (ale málo praktické) je provedení vodné extrakce, prakticky neúčinné je nabobtnání a vaření ve vodě.

2.2.2.2 Ostatní toxické látky

Z dalších skupin látek přicházejí v úvahu kardioaktivní glykosidy, které mohou poškodit srdeční činnost; existuje poměrně kuriózní zpráva o intoxikaci koní, které se napásli hlaváčkovce letního (*Adonis aestivalis*)⁹⁷, který je v některých oblastech plevelem v pícninách. Nať obsahuje glykosidy podobně jako v případě hlaváčku jarníku, *Adonanthe vernalis* (např. cymarín), které jsou sice výrazně polární, nepravidelně se vstřebávají, do určité míry se také rozkládají v GIT, nicméně jsou toxické a mohou teoreticky přinést savcům komplikace. V tomto ohledu mohou být toxické také některé trýzele (*Erysimum* sp.), které se mohou v některých letech běžně vyskytovat v určitých typech travních porostů.

Poměrně velmi okrajovou záležitostí je intoxikace některými seskviterpeny: je popisována hepatotoxicita a cholestáza u kryš, které přijaly 9-oxo-10,11-dehydroageraforon, izolovaný z nati *Eupatorium adenophorum*⁹⁸. O tomto faktu je potřebné se zmínit z toho důvodu, že v našich středoevropských podmínkách dochází v posledních letech k stále se zvyšující expanzi sadce konopáče (*Eupatorium cannabinum* L.), který se vyskytuje v travních společenstvech, obsahuje podobné látky a může nepříznivě ovlivnit metabolismus zvířat. Přímé intoxikace popsány nejsou, není prozatím ani publikován metabolismus u přežvýkavců a monogastričních živočichů, ale možné proto, že tato rostlina se nestala prozatím významně plevelnou.

2.3 Stanovení obsahu toxických látek

Níže uvedený přehled stanovení toxických látek v krmivech a krmivářských surovinách je pouze instruktivní; má poskytnout přehled metod a postupů, které se v této oblasti používají, anebo jsou perspektivní. Nejedná se o detailní výčet analytických metod.

Toxickým sloučeninám rostlinného a živočišného původu je věnována poměrně významná pozornost; z přehledu literatury je však patrné, že se zájem týká pouze látek, jejichž toxicita je známa historicky (námelové alkaloidy a jim podobné indolové alkaloidy, toxické nefyziologické aminokyseliny apod.). Není však věnována dostatečná pozornost sloučeninám, resp. rostlinám, které se mohou objevovat v lučních porostech a navodit někdy výraznou toxicitu (např. seskviterpeny). V této souvislosti přichází také v úvahu potřeba širšího studia osudu toxických látek v organizmu; nejsou zcela jasně určeny metabolické cesty mnoha látek, o jejichž potenciální toxicitě se ví a tím není zřejmé, do jaké míry mohou ovlivňovat konečného konzumenta a navodit u něj nepříznivé příznaky (především pozdější alergické reakce).

Tato záležitost je však v první řadě otázkou společenské objednávky a především záležitostí finanční.

Tab. 5 Stanovení obsahu toxických a antinutričních látek v krmivářských surovinách, perspektivních zdrojích a krmivu

Látka (látky)	Surovina	Metody
Glukosinoláty	Rostlinné části (Brassicaceae)	Spektrofotometrie uvolněné glukosy ^{99,100}
Námelové a podobné indolové alkaloidy	Pícnina (Sorghum)	imunoassay ¹⁰¹ , FIA-DCh ¹⁰²
Fabaceae alkaloidy Lupanin, anagyrin, swainsonin	Rostlinné části	HPLC/MS ¹⁰³ , HRGC ¹⁰⁴
Asteraceae alkaloidy Senecionin, senecifylin ad.	Rostlinné části	¹ H a ¹³ C NMR ¹⁰⁵
Solanaceae alkaloidy Glykosidy solnanidinu, Glykosidy tomatidolu	Hlízy transgenních brambor	HPLC/MS ¹⁰⁶
Alkoxyfenoly	Izoláty	RP-TLC ¹⁰⁷
Alkaloidy Apiaceae Koniin	Nař <i>Conium maculatum</i> L.	Extrakce alkaloidů z alkalického prostředí, TLC, barevná reakce s Dragendorffovým č., denzitometrie ¹⁰⁸
Alkaloidy Ranunculaceae	Rostlinné části (<i>Delphinium</i> spp.)	FTIS ¹⁰⁹
Alkaloidy Colchicaceae Kolchicin	Rostlinné části	RIA ¹¹⁰ , TLC-denzitometrie ¹¹¹
Alkaloidy Melanthiaceae Veratrum	Rostlinné části (<i>Veratrum</i>)	LC ¹¹²
Kyanogenní glykosidy	Rostlinné části	Specifické potenciometrické biosenzory (stanovení kyanidu) ¹¹³
3-nitropropionová kyselina a deriv.	Rostlinné části	Hydrolyza za tlaku, spektrofotometrie ¹¹⁴
Toxické aminokyseliny	Rostlinné části	Spektrofotometrie barevného produktu ¹¹⁵ RP-HPLC ¹¹⁶ , CE ¹¹⁷
Kanavanin	Rostlinná část	CE ESI/MS ¹¹⁸
Inhibitory proteas	soja	ELISA, FLIA ¹¹⁹
Lektiny	Sója v potravinách	ELISA ¹²⁰
Kumestany	Voda, rostliny	LC-ESI-MS/MS ¹²¹
Isoflavony	Potrava, sójové přípravky Rostlinné části sérum	HPLC-EMS ¹²² HPCE ¹²³ HPLC/EI-MS ¹²⁴
Třísloviny	Rostlinné části Třísloviny v rostlinné potravě	HPLC-UV-ESI/MSn ¹²⁵ , HPLC a CE ¹²⁶ NIRS ¹²⁷
Kumariny	Různé rostlinné části Bovinním sérum	RP-HPLC ¹²⁸ , HSCCC ¹²⁹ , CZE ¹³⁰ , CS-PM/GC-MS ¹³¹ , HPLC ¹³² Spektrofluorometrie ¹³³
Gossypol	Rostlinné části	PM-TC/HPLC ¹³⁴ , chirální HPLC – oddělení enantiomerů ¹³⁵
Saponiny	Rostlinné části	HPLC ¹³⁶
Kardiotonické glykosidy	Rostlinné části (<i>Coronilla varia</i>)	HPLC ¹³⁷

Vysvětlivky:

CS-PM/GC-MS	concurrent solid-phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry
CE	capillary electrophoresis
CZE	capillary zoned electrophoresis
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FIA-DCh	flow injection analysis-direct chemiluminiscence
FLIA	functional lectin immuno assay
HPCE	high pressure capillary electrophoresis
HPLC	high pressure liquid chromatography
HPLC/EI-MS	high pressure liěquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry
HRGC	high resolution gas chromatography
HSCCC	high speed counter current chromatography
LC-ESI-MS/MS	liquid chromatography-electrospray interface/tandemic mass spectrometry
NIRS	near infrared spectroscopy
PM-TC/HPLC	packed micro-tips columns/high pressure liquid chromatography
RIA	Radioimmunoassay
RP-HPLC	reversed phase/igh pressure liquid chromatography
RP-TLC	reversed phase/thin layer chromatography

3. LITERATURA

- ¹ Yeruham, I., Shlosberg, A.: Poisonous plants in the eastern Mediterranean basin. *Vet. Human Toxicol.* **46**(1), 32-38 (2004); *Chem. Abstr.* **140**, 316298.
- ² Seawright, A. A., Hrdlicka, J., Lee, J. A., Ogunsan, E. A.: Toxic substances in the food of animals: some recent findings of Australian poisonous plant investigations. *J. Appl. Toxicol.* **2**(2), 75-82 (1982).
- ³ Salunkhe, D., K., Wu, M. T.: Toxicants in plants and plant products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **9**(3), 265-324 (1977).
- ⁴ Pokorný, J.: Přírodní toxické látky v potravinách. *Čas. Lék. Čes.* **136**(9), 267-270 (1997).
- ⁵ Liener, I. E.: Toxins in cow's milk and human milk. *J. Nutr. Environm. Med.* **12**(3), 175-186 (2002).
- ⁶ Tase, Ch.: Plant poisonings. Mushrooms, green Japanese apricot, potatoes, wild plants. *Sogo Rinsho* **48**(11), 2613-2616 (1999); *Chem. Abstr.* **131**, 347600.
- ⁷ D'Mello, J. P. F., Duffus, C. M., Duffus, J. H.: Toxic substances in Crop Plants. Royal Chem. Society, Cambridge 1991, 339 pp.; *Chem. Abstr.* **116**, 254411.
- ⁸ Bondi, A., Alumot, E.: *Progr. Food Nutr. Sci.* **11**(2), 115-151 (1987).
- ⁹ Matthaus, B.: Antinutritive compounds in different oilseeds. *Fett/Lipid* **99**(5), 170-174 (1997); *Chem. Abstr.* **127**, 148537.
- ¹⁰ Than, K. A., Stevens, V., Knill, A., Gallagher, P. F., Gaul, K. L., Edgar, J. A., Colegate, S. M.: Plant-associated toxins in animal feed: Screening and confirmation assay development. *Anim. Feed Sci. Technol.* **121**(1-2), 5-21 (2005); *Chem. Abstr.* **143**, 458737.
- ¹¹ Brambilla, G., De Filippis, S.: Trends in animal feed consumption and the possible consequences on residue tests. *Anal. Chem. Acta* **529**(1-2), 7-13 (2005); *Chem. Abstr.* **142**, 315384.
- ¹² Muller, L., Sivertsen, T., Langseth, W.: Ammoniated forage poisoning: concentrations of alkyimidazoles in ammoniated forage and in milk, plasma and urine in sheep and cow. *Acta Vet. Scand.* **39**(4), 511-514 (1998); *Chem. Abstr.* **130**, 307660.
- ¹³ Galili, G., Galili, S., Lewinsohn, E., Tadmor, Y.: Genetic, molecular and genomic approaches to improve the value of plant foods and feeds. *Crit. Rev. Plant Sci.* **21**(3), 167-204 (2002); *Chem. Abstr.* **137**, 368739.
- ¹⁴ Xie, Z., Kan, Z., Liu, Z., Li, J.: A natural composition for increasing the yield of lean meat, and its preparation method and application. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu CN 1586275* (2005); *Chem. Abstr.* **143**, 439144.
- ¹⁵ Okuma, T., Ishikawa, K., Fukasaka, N.: Adsorbents for toxic substances and their use for foods and feeds. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2005232138* (2005); *Chem. Abstr.* **143**, 210970.
- ¹⁶ Haymore, Ch. P., Heller, A.: Inclusion of shredded tires to prevent deleterious effects of noxious plants. *U.S. US 6346241 B1* (2002); *Chem. Abstr.* **136**, 133949.
- ¹⁷ Mithen, R.: Glucosinolates: Biochemistry, genetics and biological activity. *Plant Growth Reg.* **34**(1), 91-103 (2001).

-
- ¹⁸ Griffiths, D. W., Birch, A. N. E., Hillman, J. R.: Antinutritional compounds in the Brassicaceae: analysis, biosynthesis, chemistry and dietary effect. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* **73**(1), 1-18 (1998).
- ¹⁹ Piva, G., Pietri, A., Maccagni, A., Santi, E.: Antinutritional compounds of rapeseed meal. *Rivista Ital. Sost. Grasse* **62**(2), 99-103 (1985).
- ²⁰ Mawson, R.: Rapeseed-meal glucosinolates and their antinutritional effects. Part 2. Flavour and palatability. *Nahrung* **37**, 366-344 (1993).
- ²¹ Mawson, R.: Rapeseed-meal glucosinolates and their antinutritional effects. Part 3. Animal growth and performance. *Nahrung* **38**, 166-177 (1994).
- ²² Mawson, R.: Rapeseed-meal glucosinolates and their antinutritional effects. Part 4. Goitrogenicity and internal organs abnormalities in animals. *Nahrung* **38**, 178-191 (1994).
- ²³ Mawson, R.: Rapeseed-meal glucosinolates and their antinutritional effects. Part 5. Animal reproduction. *Nahrung* **38**, 588-598 (1994).
- ²⁴ Mawson, R.: Rapeseed-meal glucosinolates and their antinutritional effects. Part 6. Taint in end-products. *Nahrung* **39**(1), 21-41 (1995).
- ²⁵ Mawson, R.: Rapeseed-meal glucosinolates and their antinutritional effects. Part 7. Processing. *Nahrung* **39**(1), 32-41 (1995).
- ²⁶ Burel, C., Boujard, T., Kaushik, S. J., Boeuf, G., Mol, K. A., Van der Geyten, S., Darras, V. M., Kuhn, E. R., Pradet-Balade, B., Querat, B., Quinsac, A., Krouti, M., Ribailier, D.: Effects of rapeseed meal-glucosinolates on thyroid metabolism and feed utilization in rainbow trout. *General Comp. Endocrinol.* **124**(3), 343-358 (2001); *Chem. Abstr.* **136**, 262541.
- ²⁷ Schone, F., Rudolph, B., Kirchheim, U., Knapp, G.: Counteracting the negative effects of rapeseed and rapeseed press cake in pig diets. *B. J. Nutr.* **78**(6), 947-962 (1997).
- ²⁸ Geertman, E. J. M., Op den Camp, H. J. M., Jansen, H. J., Op den Camp, R. G. L., Huis in 't Veld, J. H. J., Vogels, G. D.: *J. Environ. Sci. Health, Part A: Environ. Sci. Engineering* **A29**(9), 2009-2021 (1994).
- ²⁹ Vageeshbabu, H. S., Chopra, V. L.: Genetic and biotechnological approaches for reducing glucosinolates from rapeseed-mustard meal. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* **6**(2), 53-62 (1997); *Chem. Abstr.* **127**, 343837.
- ³⁰ Haddad, J., Allaf, K.: Detoxification of rapeseed meal by controlled instantaneous pressure drop. *EAAP Publ.*, 110(Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Oilseeds), 323-327, Wageningen Academic Press 2004; *Chem. Abstr.* **141**, 242250.
- ³¹ Kujawa, M., Kujawa, M., Macholz, R., Diedrich, M., Mieth, G., Zydek, G.: Microbiol treatment of glucosinolate-containing plant raw material. Ger (East) DD 242344, A1 19870128; *Chem. Abstr.* **107**, 38374.
- ³² Mahajan, A., Dua, S.: Improvement of functional properties of rapeseed (*Brassica campestris* var. *toria*) meal by reducing antinutritional factors employing enzymic modification. *Food Hydrocoll.* **12**(3), 349-355 (1998); *Chem. Abstr.* **130**, 94743.
- ³³ Shi, M., Shen, S., Zhang, J.: Extraction of rapeseed with MeOH-amino/hexane by double liquid phase. *Zhongguo Youzhi* **21**(6), 25-27 (1996); *Chem. Abstr.* **126**, 224490.

-
- ³⁴ Kroll, J., Kujawa, M., Baumgrass, R.: The influence of mechanolytic procedures on the content of antinutritive compounds in rapeseed. *Nahrung* **32**(8), 801-802 (1988).
- ³⁵ Cheeke, P. R.: Endogenous toxins and mycotoxins in forage grasses and their effects on livestock. *J. Anim. Sci.* **73** (3), 909-918 (1995).
- ³⁶ Gadberry, M. S., Denard, T. M., Spiers, D. E., Piper, E. L.: Effects of feeding ergovaline on lamb performance in a heat stress environment. *J. Anim. Sci.* **81**(6), 1538-1545 (2003); *chem. Abstr.* **139**, 179311.
- ³⁷ Piper, E. L., Gadberry, M. S., Denard, T. M., Johnson, Z., Flieger, M.: Effect of feeding ergovaline and ergine on growing rats. *Neotyphodium/Grass Interact.*, [Proc. Int. Symp. Acremonium/Grass Interact.], 3rd, 437-439. (Bacon, C. W., Hill, N. S., eds), Plenum Press, New York 1997.; *Chem. Abstr.* **128**, 240583.
- ³⁸ Jackson, J. A., Harmon, R. J., Tabeidi, Z.: Effect of dietary supplementation with vitamin E for lactating dairy cows fed tall fescue hay infected with endophyte. *J. Dairy Sci.* **80**(3), 569-572 (1997); *Chem. Abstr.* **126**, 276718.
- ³⁹ Salminen, S. O., Grewal, P. S., Quigley, M. F.: Does Mowing height influence alkaloid production in endophytic tall fescue and perennial ryegrass? *J. Chem. Ecol.* **29**(6), 1319-1328 (2003); *Chem. Abstr.* **139**, 241607.
- ⁴⁰ Yates, S. G., Petroski, R. J., Powell, R. G.: Analysis of loline alkaloids in endophyte-infected tall fescue by capillary gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 182-185 (1990).
- ⁴¹ Panaccione, D. G., Johnson, R. D., Wang, J., Young, C. A., Damrongkool, P., Scott, B., Schardl, C. L.: Elimination of ergovaline from a grass-Neotyphodium endophyte symbiosis by genetic modification of the endophyte. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **98**(22), 12820-12825 (2001); *Chem. Abstr.* **136**, 304917.
- ⁴² Hovermale, J. T., Craig, A. M.: Correlation of ergovaline and lolitrem B levels in endophyte-infected perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *J. Veter. Diagnost. Investig.: Offic. Publ. Of the Am. Assoc, Veter. Labor. Diagnosticians, Inc.* **13**(4), 323-327 (2001).
- ⁴³ Maejima, A., Saiga, S., Inoue, T., Tsuiki, M.: Endophyte infection rate and alkaloid concentrations in seeds of commercial cultivars of perennial ryegrass. *Grassland Sci.* **46**(1), 52-57 (2000); *Chem. Astr.* **133**, 56054.
- ⁴⁴ Than, K. A., Cao, Y., Michalewicz, A., Edgar, J. A.: Development of a vaccine against annual ryegrass toxicity. *Toxic Plants Other Nat. Toxicants*, [Proc. Int. Symp. Poisonous Plants] 5th, Meeting Dfate 1997, 165-168. (Garland, T., Barr, A., C., eds), CAB International, Wallingford 1998; *Chem. Abstr.* **130**, 166811.
- ⁴⁵ Schneider, D. J., Miles, C. O., Garthwaite I., Van Halderen, A., Wessels, J. C., Lategan, H. J.: First report of field outbreaks of ergot-alkaloid toxicity in South Africa. *The Onderstepoort J. Vet. Res.* **63**(2), 97-108 (1996).
- ⁴⁶ Mainka, S., Daenicke, S., Wolff, J., Matthes, S., Boehme, H.: Influence of ergot feeding on piglets and chicken. *Mycotoxin Res.* **19**(2), 207-212 (2003); *Chem. Abstr.* **141**, 255764.
- ⁴⁷ Shelby, R. A.: Toxicology of ergot alkaloids in agriculture. *Med. Aromat. Plants – Industr. Profiles*, 6(Ergot), 469-477, Harwood Acad. Press 1999; *Chem. Abstr.* **131**, 115429.

-
- ⁴⁸ Jimenez-Martinez, C., Pedrosa, M. M., Muzquiz, M., Davila-Ortiz, G.: Elimination of quinolizidine alkaloids, α -galactosides and phenolic compounds from *Lupinus campestris* seed by aqueous, acid and alkaline thermal treatment. EAAP Publication, 110(Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Oilseeds), 343-346, Academic Publishers, Wageningen 2004; Chem. Abstr. **141**, 294965
- ⁴⁹ Jimenez, C., Loarca-Pina, G., DAvila, G.: *Lupinus campestris* seed as a source of compounds with antimutagenic activity. EAAP Publication, 110(Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Oilseeds), 101-105, Academic Publishers, Wageningen 2004; Chem. Abstr. **141**, 170882.
- ⁵⁰ Martinez, C. J., Loarca-Pina, G., Ortiz, G. D.: Antimutagenic activity of phenolic compounds, oligosachcahrides and quinolizidinic alkaloids from *Lupinus campestris* seeds. Food Add. Contam. **20**(10), 940-948 (2003).
- ⁵¹ Stegelmeier, B. L., James, L. F., Panter, K. E., Gardner, D. R., Ralphs, M. H., Pfister, J. A.: Tissue swainsonine clearance in sheep chronically poisoned with locoweed (*Oxytropis sericea*). J. Anim. Sci. **76**(4), 1140-1144 (1998); Chem. Abstr. **129**, 13366.
- ⁵² Taylor, J. B., Strickland, J. R.: Appearance and disappearance of swinsonine in serum and milk of lactating ruminants with nursing young following a single dose exposure to swainsonine (locoweed: *Oxytropis sericea*). J. Anim. Sci. **80**(9), 2476-2484 (2002); Chem. Abstr. **137**, 368889.
- ⁵³ Fu, P. P., Xia, Q., Lin, G., Ming, W.: Genotoxic pyrrolizidine alkaloids – mechanisms leading to DNA adduct formation and tumorigenicity. Int. J. Mol. Sci. **3**(9), 948-964 (2002); Chem. Abstr. **138**, 216625.
- ⁵⁴ Johnston, W. H., Craig, A. M., Blythe, L. L., Hovermale, J. T., Walker, K.: Pyrrolizidine alkaloid detoxification by an ovine ruminal consortium and its use as a ruminal supplement in cattle. Toxic Plants Other Nat. Toxicants [Proc. Int. Symp. Poisonous Plants], 5th, Meeting Date 1997, 185-190, (Garland, T., Barr, A. C., eds), CAB International, Wallingford 1998; Chem. Abstr. **130**, 138711.
- ⁵⁵ Hager ROM 2003: Drogen und Arzneistoffe. Technol. Zentrum, Univ. Würzburg, 2002.
- ⁵⁶ Friedman, M.: Composition and safety evaluation of potato berries, potato and tomato seeds, potatoes, and potato alkaloids. ACS Symp. Ser. (1992), 484(Food Saf. Assess.), 429-462.
- ⁵⁷ Friedman, M., McDonald, G. M.: Postharvest changes in glycoalkaloid content of potatoes. Adv. Exp. Med. Biol. **1999**(459), 121-143.
- ⁵⁸ Nazarenko, E. A., Skryševskaja, I. V., Korpan, J. I.: Potato glycoalkaloids: distribution, physical and chemical properties, toxicity and methods of detection. Bioopolimeri i Klitina **18**(6), 478-484 (2002); Chem. Abstr. **139**, 21125.
- ⁵⁹ Lopez, T. A., Cid, M. S., Bianchini, M. L.: Biochemistry of hemlock (*Conium maculatum* L.) alkaloids and their acute and chronic toxicity in livestock. Toxicon **37**(6), 841-865 (1999); Chem. Abstr. **131**, 54845.
- ⁶⁰ Pfister, J. A., Gardner, D. R., Panter, K. E., Manners, G. D., Ralphs, M. H., Stegelmeier, B. L., Schoch, T. K. L.: (*Delphinium* spp.) poisoning in livestock. J. Nat. Toxins **8**(1), 81-94 (1999).
- ⁶¹ ---: <http://teratology.org/members/JMFpresentation/sld011.htm>

-
- ⁶² Tewe, O. O., Iyayi, E. A.: Cyanogenic glycosides, in: Cheeke, P. (ed.): Toxicants of plant origin, Vol. II Glycosides. CRC Press, Boca Raton 1989, pp. 43-60.
- ⁶³ Kakes, P.: Properties and functions of the cyanogenic system in higher plants. *Euphytica* **48**(1), 25-43 (1990).
- ⁶⁴ Davis, R.H.: Cyanogens, in: D'Mello, J. P. H., Duffus, C. M., Duffus, C. J. H. (eds): Toxic substances in crop plants. Royal Soc. Chem. Press, Cambridge 1991, pp. 202-225.
- ⁶⁵ Kalač, P., Míka, V.: Přirozené škodlivé látky v rostlinných krmivech. Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1997, 318 s.
- ⁶⁶ Varga, T. K., Diosady, L. L.: Simultaneous extraction of oil and antinutritional compounds from flaxseed. *J. Am. Oil Chem. Assoc.* **71**(6), 603-607 (1994); *Chem. Abstr.* **121**, 229394.
- ⁶⁷ Wang, H., Zhang, S., Yin, N., Guo, A., Yan, F.: Effects of flaxseed on the content of docosahexaenoic acid (DHA) in egg yolk and tissue. *Shoudu Yike Daxue Xuebao* **24**(1), 27-29 (2001); *Chem. Abstr.* **140**, 374508.
- ⁶⁸ Niknam, V., Ebrahimzadeh, H., Maassoumi, A. A.: Toxic nitro compounds in *Astragalus* species. *Biochem. Syst. Ecol.* **31**(6), 557-562 (2003).
- ⁶⁹ Majak, W., Pass, M. A.: Aliphatic nitro compounds. In: Cheeke, P. (ed.): Toxicants of plant origin. Vol. II. CRC Press, Boca Raton 1989, s. 143-159.
- ⁷⁰ Darre, M. J., Minior, D. N., Tatake, J. G., Ressler, C.: Nutritional Evaluation of Detoxified and Raw Common Vetch Seed (*Vicia sativa* L.). Using Diet of Broilers. *J. Agric. Food Chem.* **46**(11), 4675-4679 (1998).
- ⁷¹ Leon, A., Vargas, R. E., Michelangeli, C., Melcion, J.-P., Picard, M.: Detoxification of jackbean (*Canavalia ensiformis* L.) with pilot scale roasting II: Nutritional value for poultry. *Anim. Feed Sci. Technol.* **73**(3-4), 231-242 (1998); *Chem. Abstr.* **129**, 94868.
- ⁷² Kamada, Y., Oshiro, N., Oku, H., Hongo, F., Chinen, I.: Mimosine toxicity in broiler chicks fed *Leucaena leucocephala* seed powder. *Anim. Sci. Technol.* **68**(2), 121-130 (1997); *Chem. Abstr.* **126**, 316608.
- ⁷³ Bjerg, B., Eggum, B. O., Olsen, O., Soerensen, H.: Antinutritional and favism inducing factors in *Vicia faba* L.: nutritional value of faba beans; metabolism and properties of vicine, convicine and dopa-glucoside. *World Crops: Production, Utilization, Description*, (1984), 10(*Vicia Faba*), 287-296.
- ⁷⁴ Ariza, N., Martin-Cabrejas, M. A., Esteban, R. M., Molla, E., Lopez-Andreu, F. J.: Evaluation of antinutritional factors and nitrogen compounds of selected pea cultivars (*Pisum sativum* L.). EAAP Publication, 110(Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Oil Seeds), 35-38, Wageningen Academic Publ., Wageningen 2004.
- ⁷⁵ Kalač, P., Míka, V.: Přirozené škodlivé látky v rostlinných krmivech. Ústav zemědělských a potravinářských informací Praha, Praha 1997, s. 185-194.
- ⁷⁶ Kalač, P., Míka, V.: Přirozené škodlivé látky v rostlinných krmivech. Ústav zemědělských a potravinářských informací Praha, Praha 1997, s. 194-202.
- ⁷⁷ Singleton, V. :: Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods. *Adv. Food Res.* **27**, 149-242 (1981); *Chem. Abstr.* **96**, 18718.

-
- 78 Kalač, P., Míka, V.: Přirozené škodlivé látky v rostlinných krmivech. Ústav zemědělských a potravinářských informací Praha, Praha 1997, s. 257-271.
- 79 Scudamre, K. A., Livesey, C. T.: Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *J. Sci. Food Agric.* **77**(1), 1-17 (1999).
- 80 Šimerda, M.: Možnosti řešení problémů s plísněmi a mykotoxiny. 13. seminář firmy DELACON Biotechnik ČR „Jak po zákazu antibiotických stimulátorů růstu“, 11. května 2006, Senohraby.
- 81 Lamartiniere, C. A., Wang, J., Smith-Johnson, M., Eltoum, I.-E.: Daidzein: bioavailability, potential for reproductive toxicity, and breast cancer chemoprotection in female rats. *Toxicol. Sci.* **65**(2), 228-238 (2002); *Chem. Abstr.* **136**, 294152.
- 82 Ward, W. E., Thompson, L. U.: Dietary estrogens of plant and fungal origin: Occurrence and exposure. *Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 3, Issuer Pt. L.*, s. 101-128 (Metzler, M, ed.), Springer Verlag, Berlin 2002; *Chem. Abstr.* **136**, 324610.
- 83 Jean-Blain, C.: Nutritional and toxicological aspects of tannins. *Rev. Med. Vet.* **149**(10), 911-920 (1998); *Chem. Abstr.* **130**, 208895.
- 84 Butter, N. L., Dawson, J. J., Buttery, P. J.: Dietary tannins help reduce parasites in sheep. *Feed Mix* **8**(2), 32-34 (2000); *Chem. Abstr.* **133**, 251649.
- 85 McMahan, L. R., McAllister, T. A., Berg, B. P., Majak, W., Acharya, S. N., Popp, J. D., Coulman, B. E., Wang, Y., Cheng, K.-J.: A review of the effects of forage condensed tannins on ruminal fermentation and boat grazing cattle. *Can. J. Plant Sci.* **80**(3), 469-485 (2000).
- 86 McSweeney, C. A., Palmer, B., McNeill, D. M., Krause, D.O.: Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* **91**(1-2), 83-93 (2001); *Chem. Abstr.* **135**, 272017.
- 87 Waghorn, G. C., McNabb, W. C.: Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proc. Nutr. Soc.* **62**(2), 383-392 (2003); *Chem. Abstr.* **139**, 350050.
- 88 Goel, G., Puniya, A. K., Aguilar, C. N., Singh, K.: Interaction of gut microflora with tannins in feeds. *Naturwissenschaften* **92**(11), 497-503 (2005).
- 89 Diawara, M. M., Williams, D. E., Oganessian, A., Spitsbergen, J.: Dietary psoralens induce hepatotoxicity in C57 mice. *J. Nat. Toxins* **9**(2), 179-195 (2000); *Chem. Abstr.* **133**, 218598.
- 90 Hammouda, F. M., Rizk, A. M., E-Nasr, M. M. S., Abou-Youssef, A. A., Ghaleb, H. A., Madkour, M. K., Pholand, A. E., Wood, G.: Poisonous plants contaminating edible ones and toxic substances in plant foods. II. Flavonoids and coumarins of *Melilotus*. *Fitoterapia* **54**(6), 249-255 (1983).
- 91 Bailey, C. A., Stipanovic, R. D., Ziehr, M. S., Haq, A. U., Sattar, M. K., Kubena, L. F., Kim, H. L., de Vieira, R.: Cottonseed with a high (+)- to (-)-gossypol enantiomer ration favorable to broiler production. *J. Agric. Food Chem.* **48**(11), 5692-5695 (2000).
- 92 Lordelo, M. Y., Davis, A. J., Calhoun, M. C., Dowd, M. K., Dalen, N. M.: Relative toxicity of gossypol enantiomers in broilers. *Poultry Sci.* **84**(9), 1376-1382 (2005)

-
- ⁹³ Velsquez-Pereira, J., Risco, C. A., McDowell, L. R., Staples C. R., Prichard, D., Chenoweth, P. J., Martin, F. G., Williams, S. N., Rojas, L. X., Calhoun, M. C., Wilkinson, N. S.: Long-term effects of feeding gossypol and vitamin E to dairy calves. *J. Dairy Sci.* **82**(6), 1240-1251 (1999); Chem. Abstr. **131**, 143995.
- ⁹⁴ Hron, J. R., Wan, P. J., Kuk, M. S.: Ethanol vapor deactivation of gossypol in cottonseed meal. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **73**(10), 13337-13339 (1996); Chem. Abstr. **125**, 274213.
- ⁹⁵ Price, K. R., Johnson, L. T., Fenwick, G. R.: The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuffs. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **26**(1), 27-135 (1987).
- ⁹⁶ Oleszek, W.: Allelopathic potentials of alfalfa (*Medicago sativa*) saponins – their relation to antifungal and hemolytic activities. *J. Chem. Ecol.* **19**, 1063-1074 (1993).
- ⁹⁷ Woods, L. W., Siligenzi, M. S., Booth, M. C., Rodger, L. D., Arnold, J. S., Puschner, B.: Summer pleasant's eye (*Adonis aestivalis*) poisoning in three horses. *Vet. Pathol.* **41**(3), 215-220 (2004); Chem. Abstr. **141**, 365352.
- ⁹⁸ Bhardwaj, R., Singh, A., Sharma, O. P., Darwa, R. K., Kurade, N. P., Mahato, S. B.: Hepatotoxicity and cholestasis in rats induced by the sesquiterpene, 9-oxo-10,11-dehydroageraphorone, isolated from *Eupatorium adenophorum*. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **15**(5), 279-286 (2001); Chem. Abstr. **136**, 81187.
- ⁹⁹ VanEtten, C. H., McGrew, C. E., Daxenbichler, M. E.: Glucosinolate determination in cruciferous seeds and meals by measurement of enzymatically released glucose. *J. Agric. Food Chem.* **22**(3), 483-7 (1974).
- ¹⁰⁰ Heaney, R. K., Spinks, E. A., Fenwick, G. R.: Improved method for the determination of the total glucosinolate content of rapeseed by determination of enzymically released glucose. *Analyst* **113**(10), 1515-1518 (1988).
- ¹⁰¹ Molloy, J. B., Moore, C. J., Bruyeres, A. G., Murray, S. A., Blaney, B. J.: Determination of dihydroergosine in sorghum ergot using an immunoassay. *J. Agric. Food Chem.* **51**(14), 3916-3919 (2003).
- ¹⁰² Polo-Marti, E., Catala-Icardo, M., Lahuerta-Zamora, L., Anton-Fos, G. M., Martinez-Calatayud, J.: Theoretical prediction of the chemiluminescence behaviour of the ergot alkaloids. Direct flow injection chemiluminescence determination of ergotamine tartrate. *Anal. Chim. Acta* **527**(2), 177-186 (2004).
- ¹⁰³ Ganzera, M., Dharmaratne, H. R. W., Nanayakkara, N. P. D., Khan, I. A.: Determination of saponins and alkaloids in *Caulophyllum thalictroides* (blue cohosh) by high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. *Phytochem. Anal.* **14**(1), 1-7 (2003).
- ¹⁰⁴ Nossack, A. C., Vilegas, J. H. Y., von Baer, D., Lanças, F. M.: Supercritical Fluid Extraction and Chromatographic Analysis (HRGC-FID and HRGC-MS) of *Lupinus* spp. alkaloids. *J. Braz. Chem. Soc.* **11**(5), 495-501 (2000).
- ¹⁰⁵ Pieters, L. A. C., Van Zoelen, A. M., Vrieling, K., Vlietinck, A. J.: Determination of the pyrrolizidine alkaloids from *Senecio jacobaea* by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry* **27**(8), 754 – 759 (2005).
- ¹⁰⁶ Stobiecki, M., Matysiak-Kata, I., Franski, R., Skala, J., Szopa, J.: Monitoring changes in anthocyanin and steroid alkaloid glycoside content in lines of transgenic potato plants using liquid chromatography/mass spectrometry. *Phytochemistry* **62**(6), 959-969 (2003).

-
- ¹⁰⁷ Pyka, A.: New method of calculation of the partition coefficients of selected alkoxyphenols investigated by RPTLC. *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC* **17**(1), 58-60 (2004).
- ¹⁰⁸ Lopez, T. A., de la Torre, M. L., Cid, M. S.: An efficient TLC method for analysis of gamma-coniceine and coniine in *Conium maculatum* L. foliage. *J. Planar. Chromatogr. Mod. TLC.* **17**(3), 218-223 (2004).
- ¹⁰⁹ Gardner, D. R., Manners, G. D., Ralphs, M. H., James A. Pfister, J. A.: Quantitative Analysis of Norditerpenoid Alkaloids in Larkspur (*Delphinium* spp.) by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Phytochem. Anal.* **8**(2), 55-62 (1997).
- ¹¹⁰ Poulev, A., Deus-Neumann, B., Bombardelli, E., Zenk, M. H.: Immunoassays for the quantitative determination of colchicine. *Planta Med.* **60**(1), 77-83 (1994).
- ¹¹¹ Bodoki, E., Oprean, R., Vlase, L., Tamas, M., Sandulescu, R.: Fast determination of colchicine by TLC-densitometry from pharmaceuticals and vegetal extracts. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **37**(5), 971-977 (2005).
- ¹¹² Suladze, T. S., Vachnadze, V. J., Tsakadze, D. M., Gedevanishvili, M. D., Tsutsunava, L. E., Malazoniya, N. A.: Alkaloid accumulation dynamics in *Veratrum lobelianum* growing in Georgia and biological activity of Jervine. *Chem. Nat. Comp.* **42** (1), 71-74 (2006).
- ¹¹³ Keusgen, M., Kloock, J. P., Knobbe, D. T., Juenger, M., Krest, I., Goldbach, M., Klein, W., Schoening, M. J.: Direct determination of cyanides by potentiometric biosensors. *Sens. Actuators B.* **103**(1-2), 380-385 (2004).
- ¹¹⁴ Sovová, M., Karlíček, R., Opletal, L., Králová, S., Žáčková, P.: Výzkum *Coronilla varia* L. V. Stanovení 3-nitropropionové kyseliny během ontogeneze. *Českoslov. Farm.* **34** (6), 212-216 (1985).
- ¹¹⁵ Archibald, R. M.: Colorimetric determination of canavanine. *J. Biol. Chem.* **165**(1), 169-178 (1946)
- ¹¹⁶ Capetillo-Leal, M., Reyes-Ramírez, R. R., Sandoval-Castro, C. A.: Determinación de L-canavanina por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa y por colorimetría. *Rev. Biomed.* **10**(1), 17-22 (1999).
- ¹¹⁷ Sookie La, S., Ahn, S., Kim, J.-H., Goto, J., Choi, O.-K., Kim, K.-R.: Enantioseparation of chiral aromatic amino acids by capillary electrophoresis in neutral and charged cyclodextrin selector modes. *Electrophoresis* **23**(24), 4123-4131 (2002).
- ¹¹⁸ Schultz, C. L., Moini, M.: Analysis of underivatized amino acids and their D/L-enantiomers by sheathless capillary electrophoresis/electrospray ionization-mass spectrometry. *Anal. Chem.* **75**(6), 1508-1513 (2003).
- ¹¹⁹ Helsing, M., Bleeker, H., van Biert, R., Sleijsters-Selis, H., van Duijn, G., van Westerop, H., Vlooswijk, R. A. A.: Analysis of proteinaceous antinutritional compounds in soya oilseed products. *ACS Symposium Ser. 621*(Immunoassays for Residue Analysis), 219-230, Am. Chem. Soc. 1996; *Chem. Abstr.* **124**, 258838.
- ¹²⁰ Rizzi, C., Galeoto, L., Zoccatelli, G., Vincenzi, S., Chignola, R., Peruffo, A. D. B.: Active soybean lectin in foods: quantitative determination by ELISA using immobilised asialofetuin., *Food Res. Int.* **36**(8), 815-821 (2003).

-
- ¹²¹ Bacaloni, A., Cavaliere, C., Faberi, A., Foglia, P., Samperi, R., Lagana, A.: Determination of isoflavones and coumestrol in river water and domestic wastewater sewage treatment plants. *Anal. Chim. Acta* **531**(2), 229-237 (2005).
- ¹²² Umphress, S. T., Murphy, S. P., Franke, A. A., Custer, L. J., Blitz, C. L.: Isoflavone content of foods with soy additives. *J. Food. Compos. Anal.* **18**(6), 533-550 (2005).
- ¹²³ Luo, Q. Z., Dai, K. J., Ma, A. D., Luo, J. B.: Analysis of puerarin and daidzein in Gegen Qinlian preparations by high performance capillary electrophoresis. *Yaowu Fenxi Zazhi* **24**(1), 11-13 (2004).
- ¹²⁴ Morandi, S., Locati, D., Ferrario, F., Chiesa, G., Arnold, A.: A simple method for the characterization and quantification of soy isoflavone metabolites in the serum of MMTV-Neu mice using high performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry with multiple reaction monitoring. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **19**(2), 153-161 (2005).
- ¹²⁵ Papagiannopoulos, M., Wollseifen, H. R., Mellenthin, A., Haber, B., Galensa, R.: Identification and quantification of polyphenols in carob fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MSn. *J. Agric. Food Chem.* **52**(12), 3784-3791 (2004).
- ¹²⁶ Juang, L. J., Sheu, S. J., Lin, T. C.: Determination of hydrolysable tannins in the fruit of *Terminalia chebula* Retz. by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Sep. Sci.* **27**(9), 718-724 (2004).
- ¹²⁷ Landau, S., Dvash, L., Decandia, M., Cabiddu, A., Shapiro, F., Molle, G., Silanikove, N.: Determination of poly(ethylene glycol)-binding to browse foliage, as an assay of tannin, by near-infrared reflectance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **52**(3), 638-642 (2004).
- ¹²⁸ He, Z. D., Qiao, C. F., Han, Q. B., Cheng, C L., Xu, H. X., Jiang, R . W., But, P. P. H., Shaw, P. C.: Authentication and quantitative analysis on the chemical profile of cassia bark (cortex cinnamomi) by high-pressure liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **53**(7), 2424-2428 (2005).
- ¹²⁹ Li, H. B., Chen, F.: Simultaneous separation and purification of five bioactive coumarins from the Chinese medicinal plant *Cnidium monnieri* by high-speed counter-current chromatography. *J. Sep. Sci.* **28**(3), 268-272 (2005).
- ¹³⁰ Yue, M. E., Jiang, T. F., Liu, X., Shi, Y. P.: Separation and determination of coumarins from *Cacalia tangutica* by capillary zone electrophoresis. *Biomed. Chromatogr.* **19**(3), 250-254 (2005).
- ¹³¹ Tellez, M. R., Khan, I. A., Schaneberg, B. T., Crockett, S. L., Rimando, A. M., Kobaisy, M.: Steam distillation-solid-phase microextraction for the detection of *Ephedra sinica* in herbal preparations. *J. Chromatogr. A* **1025**(1), 51-56 (2004).
- ¹³² Tian, S. Y., Wei, C. Y., Zhou, D. W., Feng, N., Pan, R.: Determination of 7,8-dihydroxycoumarin in roots, stems, leaves and flowers of *Stellera chamaejasme* L. by high performance liquid chromatography. *Fenxi-Huaxue* **32**(12), 1627-1630 (2004).
- ¹³³ Liu, J. Q., Tian, J. N., He, W. Y., Xie, J. P., Hu, Z. D., Chen, X. G.: Spectrofluorimetric study of the binding of daphnetin to bovine serum albumin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **35**(3), 671-677 (2004).

-
- ¹³⁴ Meyer, R., Vorster, S., Dubery, I. A.: Identification and quantification of gossypol in cotton by using packed micro-tips columns in combination with HPLC. *Anal. Bioanal. Chem.* **38**(4), 719-724 (2004).
- ¹³⁵ Cass, Q. B., Oliveira, R. V., de-Pietro, A. C.: Determination of gossypol enantiomer ratio in cotton plants by chiral high performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **52**(19), 5822-5827 (2004).
- ¹³⁶ Oleszek, W. A.: Chromatographic determination of plant saponins. *J. Chromatogr. A* **967**(1), 147-162 (2002).
- ¹³⁷ Opletal, L., Vokáč, K., Hanuš, V., Sovová, M., Blunden, G., Patel, A., Dacke, C. G.: Simultaneous determination of cardenolides and coumarins in the seeds of *Coronilla varia* L. *Fol. Pharm. Univ. Carol.* **XXI-XXII**, 95-99 (1998).