



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ  
FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ  
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

MYKOTOXINY V KVAŠENÝCH NÁPOJÍCH  
MYCOTOXINS IN FERMENTED BEVERAGES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE  
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

Jan Martiník

VEDOUcí PRÁCE  
SUPERVISOR

Ing. Sylvie Běláková, Ph.D.

BRNO 2020

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1574/2019 Akademický rok: 2019/20  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student: **Jan Martiník**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie  
Vedoucí práce: **Ing. Sylvie Běláková, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Mykotoxiny v kvašených nápojích

### Zadání bakalářské práce:

Extrakce patulinu z ciderů zakoupených v obchodní síti pomocí IA kolonek a analýza pomocí UPLC/PDA.

1. Vypracování přehledné literární rešerše na téma výskytu mykotoxinů v kvašených nápojích.
2. Optimalizace a validace metody pro extrakci a stanovení patulinu v kvašených nápojích.
3. Analýza souboru vzorků ciderů z obchodní sítě.
4. Zpracování výsledků a jejich porovnání s publikovanými daty.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2020:

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

-----  
Jan Martiník  
student(ka)

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

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, Csc.  
ředitel ústavu

V Brně, dne 31. 1. 2020

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

## **ABSTRAKT**

Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity plísní a hub, které napadají obiloviny, hrozny vína nebo jablka, které se používají na přípravu kvašených nápojů. Tato práce se zaměřuje na mykotoxin patulin, který se primárně nachází v ciderech. V teoretické části jsou popsány vybrané mykotoxiny, legislativa týkající se těchto mykotoxinů a jejich výskyt v kvašených nápojích. Část teoretické části je také věnována popisu kvašených nápojů a analytickým metodám sloužícím ke stanovení mykotoxinů v nápojích. Experimentální část se zabývá validačními parametry metody na stanovení patulinu a 5-HMF. Dále se také zabývá extrakcí těchto látek a jejím stanovením. Pro stanovení mykotoxinu patulinu byla použita extrakce pomocí kolonky EASIMIP™ PATULIN a koncentrace patulinu byla změřena pomocí ultra účinné kapalinové chromatografie s detekcí fotodiodového pole (UPLC/PDA). Stanovení patulinu a 5-HMF bylo provedeno v celkem 33 vzorcích ciderů, 9 vzorcích jablečných šťáv, 2 vzorcích vína a 2 vzorcích radlerů. Patulin byl nalezen u 6,1 % vzorků ciderů a u 44,4 % vzorků jablečných šťáv. 5-HMF byl nalezen u obou vín a radlerů, u 78,8 % ciderů a u 77,8 % jablečných šťáv. Ve výsledcích a diskuzi jsou zpracovány všechny výsledky měření. Výsledky měření byly porovnány se zahraničními studiemi.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Mykotoxiny, patulin, cider, UPLC, MIP

## **ABSTRACT**

Mycotoxins are toxic secondary metabolites of mold and fungi that attack cereals, wine grapes or apples, which are then used to produce fermented beverages. This thesis focuses on mycotoxin patulin which is primarily found in ciders. The theoretical part describes selected mycotoxins, legislation concerning these mycotoxins and their occurrence in fermented beverages. Section of the theoretical part is also dedicated to the description of fermented beverages and analytical methods used to determine mycotoxins in beverages. The experimental part deals with the validation parameters of the method for determination of patulin and 5-HMF. It also deals with the extraction and determination of these substances. Columns EASIMIP™ PATULIN were used in the extraction of patulin and 5-HMF and the concentration was measured by ultra high performance chromatography with photodiode array detection (UPLC/PDA). The determination of patulin and 5-HMF was performed in a total of 33 samples of cider, 9 samples of apple juice, 2 samples of wine and 2 samples of radler. Patulin was found in 6,1 % of cider samples and in 44,4 % of apple juice samples. 5-HMF was found in both wines and radlers, in 78,8 % of ciders and in 77,8 % of apple juices. All measurement data is processed in the results and discussion. The results were compared with foreign studies.

## **KEY WORDS**

Mycotoxins, patulin, cider, UPLC, MIP

MARTINÍK, Jan. *Mykotoxiny v kvašených nápojích*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/124274>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Sylvie Běláková.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

-----  
podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Rád bych poděkoval vedoucí bakalářské práce, paní Ing. Sylvii Bělákové, Ph.D., za pomoc při vypracování této bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Marku Pernicovi, Ph.D. za pomoc se zpracováním výsledků a Ing. Rastislavu Boškovi za rady a pomoc při přípravě vzorků.

Bakalářská práce vznikla za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE-RO1918

# OBSAH

1	ÚVOD .....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	8
2.1	Mykotoxiny .....	8
2.1.1	Dělení .....	8
2.1.2	Podmínky ovlivňující výskyt mykotoxinů .....	9
2.1.3	Aflatoxiny .....	9
2.1.4	Ochratoxin A .....	10
2.1.5	Zearalenon .....	11
2.1.6	Fumonisiný .....	12
2.1.7	Trichotheceny .....	12
2.1.8	Patulin .....	13
2.1.9	Legislativa .....	15
2.2	Kvašené nápoje .....	16
2.2.1	Pivo .....	16
2.2.2	Víno .....	17
2.2.3	Cider .....	18
2.2.4	Mykotoxiny v kvašených nápojích .....	18
2.2.5	Legislativa .....	20
2.3	Stanovení mykotoxinů .....	21
2.3.1	Vzorkování .....	21
2.3.2	Extrakce .....	21
2.3.3	Analýza .....	22
2.3.4	Validace .....	23
2.4	5-HMF .....	24
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	25
3.1	Seznam chemikálií .....	25
3.2	Seznam laboratorních pomůcek .....	25
3.3	Kalibrace patulinu a 5-HMF .....	26
3.4	Limity detekce a kvantifikace .....	26
3.5	Přesnost a správnost .....	26
3.6	Popis analyzovaných vzorků .....	26
3.7	Úprava zakalených vzorků .....	28
3.8	Extrakce patulinu .....	28
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	30
4.1	Kalibrační křivka patulinu .....	30
4.2	Kalibrační křivka 5-HMF .....	31

4.3	Limity detekce a kvantifikace.....	31
4.4	Přesnost a správnost.....	33
4.5	Obsah patulinu a 5-HMF ve vzorcích.....	33
4.6	Porovnání se zahraničními daty.....	35
5	ZÁVĚR .....	37
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	38
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	42
8	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	43

# 1 ÚVOD

Výroba kvašených nápojů patří v České republice mezi nejvýznamnější obory potravinářského průmyslu. Česká republika je hlavně známá svou výrobou piva. Česká republika je známá svými spodně kvašenými pivy, ze kterých se vyrábí ležáky. Na území České republiky se ale také vyrábí víno, a to hlavně na území jižní Moravy ve vinařských oblastech Znojemské, Mikulovské, Velkopavlovické a Slovácké. V České republice se také vyrábí cidery, ale pouze v malém množství v malých nebo i rodinných podnicích.

Hlavní součástí výroby těchto nápojů je kvasný proces, kdy dochází k přeměně cukernatých složek kvasinkami na ethanol a oxid uhličitý. Na přípravu piva se jako surovina využívá ječmenný slad. Pro přípravu vína se používají hrozny vinné révy, ovšem víno lze připravit i z jiných druhů ovoce. Cidery se připravují kvašením ovocné šťávy nebo kvašením koncentrátu vyrobeného z jablečné šťávy. V průběhu výroby těchto kvašených nápojů však může docházet k přechodu mykotoxinů z infikovaných surovin právě do těchto nápojů.

Mykotoxiny jsou sekundární toxické metabolity plísní a hub. Mezi nejvýznamnější rody plísní a hub produkující mykotoxiny patří rody *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*. Tyto organismy za vhodných podmínek produkují mykotoxiny. Mykotoxiny se od sebe liší strukturou průběhem biosyntézy nebo místem jejich toxického účinku. Při požití způsobují zdravotní problémy jako zvracení nebo bolest břicha. Mohou mít však také účinky mutagenní, hepatotoxické, karcinogenní atd.

Mezi nejvýznamnější mykotoxiny vyskytující se v pivě řadíme aflatoxiny, a to hlavně B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub>. Dále se v pivě vyskytují trichotheceny, do kterých patří mykotoxin deoxynivalenol, T-2 toxin a HT-2 toxin. Stanovují se také fumonisiny, zearalenon a ochratoxin A. Tyto mykotoxiny se do piva dostávají z infikovaného ječmene. Ve víně se nejčastěji stanovuje ochratoxin A, který se přirozeně vyskytuje v révě vinné. Mykotoxin, který je stanovovaný v ciderech je patulin, který se do výsledného produktu dostává ze shnilých a plesnivých jablek.

Cílem této bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši na téma výskytu mykotoxinů v kvašených nápojích. Byla optimalizována a validována metoda pro extrakci a stanovení patulinu a 5-HMF v kvašených nápojích pomocí UPLC/PDA. Byl proveden monitoring vzorků ciderů z obchodní sítě a výsledky byly porovnány s dříve publikovanými daty.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity produkované toxinogenními druhy mikromycet. Mikromycety jsou mikroskopické vláknité houby (plísně). Mykotoxiny jsou produkovány myceliem těchto mikromycetů a jsou tedy vylučovány do substrátu, na kterém rostou. Mykotoxiny se mohou ovšem vyskytovat i ve sporách některých těchto mikromycetů. [1][2]

Doposud bylo detekováno téměř tisíc různých mykotoxinů. Jednoznačně identifikováno jich bylo více než 300. Přibližně 20 z těchto mykotoxinů je možno nalézt v potravinách nebo krmivech pro zvířata. Jejich relativní molekulová hmotnost běžně nepřesahuje hodnotu 1000 Da. Mykotoxiny patří mezi velmi pestrá skupina sloučenin a nelze jednoduše řadit do jednotlivých skupin podle struktury. Při dělení je nutné brát v potaz výskyt mykotoxinů, jejich producenty, charakter nebo intenzitu jejich toxických vlastností. [1]

#### 2.1.1 Dělení

Jedna možnost rozdělení je podle druhu biosyntézy. Mezi mykotoxiny vznikající polyketidovou dráhou lze řadit mykotoxiny jako jsou například patulin, ochratoxiny, citrinin, zearalenon nebo aflatoxiny. Při tvorbě těchto mykotoxinů vzniká jako meziproduct acetylkoenzym A. Mezi seskviterpeny pak lze řadit mykotoxiny vznikající z kyseliny mevalonové. Takto vznikají například trichothecenové mykotoxiny. [1][2]

Další možností dělení je podle chemické struktury. Mezi furanofurany pak patří všechny aflatoxiny. Patulin a ochratoxiny lze řadit mezi nenasycené laktony. Deoxynivalenol a T-2 toxin patří do skupiny epoxytrichothecenů. [2]

Dělení lze také provádět pomocí toxicity daných mykotoxinů. LD<sub>50</sub> pro silně toxické mykotoxiny se pohybuje v jednotkách mg·kg<sup>-1</sup>. Pro středně toxické mykotoxiny má LD<sub>50</sub> hodnotu v desítkách mg·kg<sup>-1</sup> a pro slabě toxické mykotoxiny je tato hodnota ve stovkách mg·kg<sup>-1</sup>. [2]

*Tabulka 1: Rozdělení mykotoxinů podle akutní toxicity [2]*

<b>Toxicita</b>	<b>Mykotoxin</b>
Silně toxické	Aflatoxiny, patulin, ochratoxin A, T-2 toxin
Středně toxické	Citrinin
Slabě toxické	Zearalenon, Deoxynivalenol



Mykotoxiny lze také dělit podle místa jejich toxického účinku k cílovým orgánům.

Tabulka 2: Rozdělení mykotoxinů podle místa jejich toxického účinku [2]

Místo toxického účinku	Mykotoxin
Genotoxiny	Aflatoxiny, ochratoxin A, citrinin, zearalenon, patulin, trichotheceny, fumonisiny
Hematotoxiny	Aflatoxiny, ochratoxin A, zearalenon, trichotheceny
Imunotoxiny	Aflatoxiny, ochratoxin A, trichotheceny, patulin
Nefrotoxiny	Citrinin, ochratoxin A
Hepatotoxiny	Aflatoxiny
Dermatotoxiny	Trichotheceny
Estrogeny	Zearalenon
Neurotoxiny	Fumonisin

### 2.1.2 Podmínky ovlivňující výskyt mykotoxinů

Růst plísní a produkce mykotoxinů jsou ovlivněny mnoha podmínkami. Tyto podmínky ovlivňují produkci mykotoxinu jak během růstu rostliny před sklizní, tak i během sklizně a při následném skladování potravin. Mezi tyto podmínky lze řadit vlhkost, aktivitu vody, teplotu a přítomnost kyslíku. [2]

K růstu plísní a tvorbě mykotoxinů je potřeba správná vlhkost prostředí. U plísní, které rostou na skladovaných potravinách, je potřeba relativní vlhkost prostředí mezi 10 a 18 %. Mezi takovéto plísně lze řadit zástupce rodů *Aspergillus* a *Penicillium*, které produkují například aflatoxiny, ochratoxiny a patulin. Plísně rostoucí na polích potřebují vyšší relativní vlhkost než předem zmíněné plísně a to od 20 do 25 %. Mezi plísně rostoucí na polních rostlinách pak lze řadit plísně rodu *Fusarium*, které produkují fumonisiny a trichotheceny. [2]

Pro růst plísní je velmi důležitá i aktivita vody. Minimální aktivita vody potřebná k produkci mykotoxinů je 0,7. Většina plísní však potřebuje aktivitu vody daleko vyšší, a to větší než 0,95. Mezi plísně, kterým stačí nízká aktivita vody pak lze řadit zástupce rodů *Aspergillus* a *Penicillium*. [2]

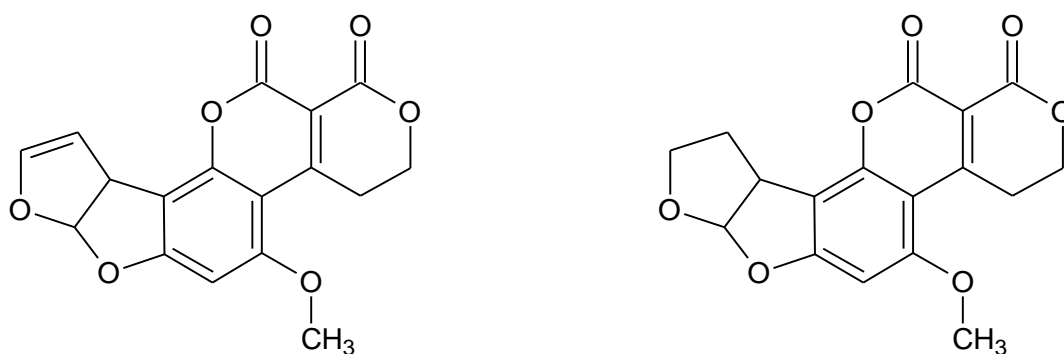
Dalším faktorem ovlivňující růst plísní je teplota. Optimální teplota pro růst plísně se pohybuje v rozmezí od 20 do 30 °C. Toto rozmezí je také optimální pro produkci většiny mykotoxinů. [2]

Většina plísní potřebuje pro svůj růst přístup kyslíku. Obecně platí, že plísně vyskytující se na povrchu substrátu potřebují ke svému růstu nejvíce kyslíku. Naopak plísně vyskytující se uvnitř substrátu nejsou tak závislé na přísunu kyslíku jako plísně na povrchu. [2]

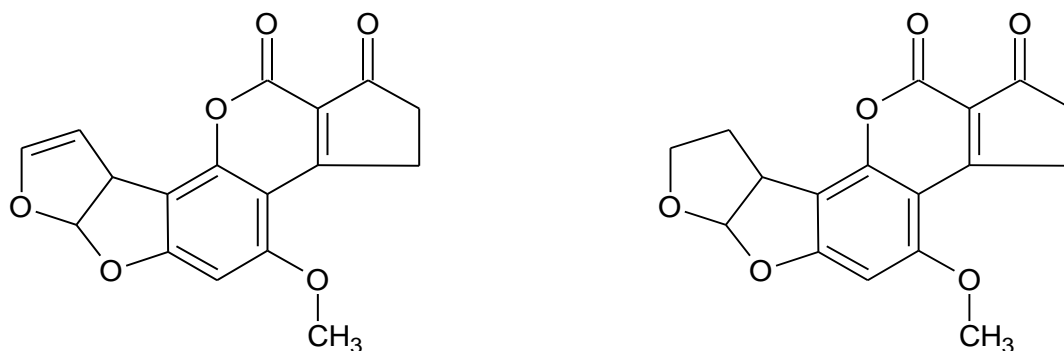
### 2.1.3 Aflatoxiny

Aflatoxiny jsou řazeny mezi vysoce toxické mykotoxiny. Z tohoto důvodu je obsah aflatoxinů velmi důkladně sledován. Mezi nejvýznamnější producenty aflatoxinů se řadí plísně

*Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*. K růstu těchto plísní a tvorbě aflatoxinů může za určitých podmínek docházet u všech druhů organických substrátů, avšak nejvíce aflatoxinů je nalezeno v kukuřici, podzemnici olejné a pistáciích. V současnosti je známo 13 přírodních aflatoxinů, z nichž nejznámější jsou aflatoxiny B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub>. Základem skeletu aflatoxinu B<sub>1</sub> a B<sub>2</sub> je kumarin kondenzovaný s cyklopentanonem. U aflatoxinů G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub> je to kumarin kondenzovaný s 5,6-dihydropyran-2-onem. Z hlediska biosyntézy lze aflatoxiny řadit mezi deketidy.[1][2][3]



Obrázek 1: Strukturální vzorce aflatoxinu G<sub>1</sub> a aflatoxinu G<sub>2</sub> [4]



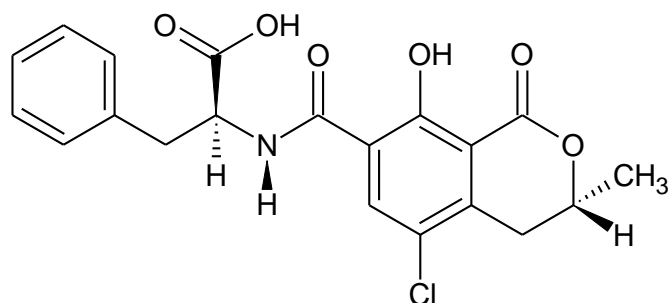
Obrázek 2: Strukturální vzorce aflatoxinu B<sub>1</sub> a aflatoxinu B<sub>2</sub> [4]

Aflatoxiny jsou podle toxicity řazeny do 1. třídy, tedy mezi prokázané karcinogeny pro člověka. Při expozici aflatoxinů na člověka může vznikat řada akutních i chronických onemocnění. Aflatoxiny se do těla dostávají primárně orální cestou, avšak mohou se do těla dostat také i inhalací. Mutagenita a karcinogenita u aflatoxinů klesá v řadě B<sub>1</sub> > G<sub>1</sub> > B<sub>2</sub> > G<sub>2</sub>. Aflatoxiny jsou známé svou hepatotoxicitou. Řada studií dokázala častý výskyt jaterních karcinomů u populace, která byla vystavena těmto toxinům. U zvířat dochází k snížení rychlosti růstu a zvýšení náchylnosti k infekcím. [1][2][5]

#### 2.1.4 Ochratoxin A

Ochratoxin A je produkován primárně dvěma druhy plísní, a to *Aspergillus ochraceus* a *Penicillium verrucosum*. Optimální teplota pro produkci tohoto toxinu plísní je při 28 °C, ale může být produkován i při teplotách od 15 do 37 °C. Ochratoxin A se řadí mezi nejvíce toxické zástupce ochratoxinů. Jeho toxické účinky jsou zejména způsobeny přítomností atomu chloru

ve struktuře jeho molekuly. Z hlediska biosyntézy je ochratoxin A řazen mezi pentaketidy. Ochratoxin A se hlavně vyskytuje v cereáliích. Přírodně se vyskytuje ve víně, ale může se nacházet i v některých luštěninách či kávě. [1][2][6]

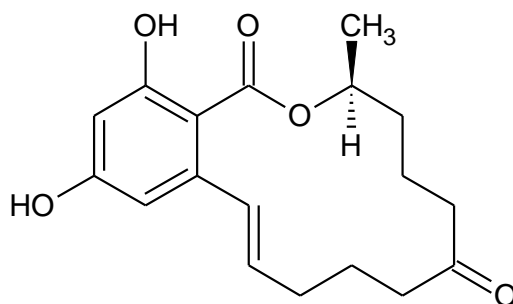


Obrázek 3: Strukturální vzorec ochratoxinu A [4]

Ochratoxin A má především nefrotoxické účinky, ale byla prokázána i genotoxicita a imunotoxicita této sloučeniny. Při výskytu dalších mykotoxinů s ochratoxinem A dochází k zesílení toxických účinků. Ochratoxin A je také mykotoxin, který je velmi často nalezen v krvi lidí vystavených mykotoxinům v potravě. Ochratoxin A se v krvi váže na lidský sérový albumin. [1][2][7]

### 2.1.5 Zearalenon

Zearalenon je sekundární metabolit hub rodu *Fusarium*. Mezi nejvýznamnější producenty zearalenonu patří druh *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* nebo *Fusarium equiseti*. Tento mykotoxin se převážně vyskytuje v obilovinách, jako je kukuřice, pšenice, či ječmen. Je však možné jej detekovat i v některých druzích koření. Z hlediska biosyntézy se jedná o fenolický lakton. Zearalenon je velmi stabilní sloučenina, a proto snadno přechází z obilovin do cereálních výrobků, chleba nebo do sladu a do piva. [1][2]



Obrázek 4: Strukturální vzorec mykotoxinu zearalenon [4]

Zearalenon se řadí mezi slabě toxické mykotoxiny. Zearalenon a jeho deriváty mají estrogení a anabolické účinky. Často se také vyskytuje s jinými mykotoxiny jako jsou trichotheceny, a výsledné toxické účinky pak jsou spojeny s jejich společným působením. Mykotoxikóza je charakterizována hyperestrogenním syndromem. To je způsobeno tím, že zearalenon má velmi podobnou strukturu molekuly jako steroidní hormony estrogeny. [1][2]

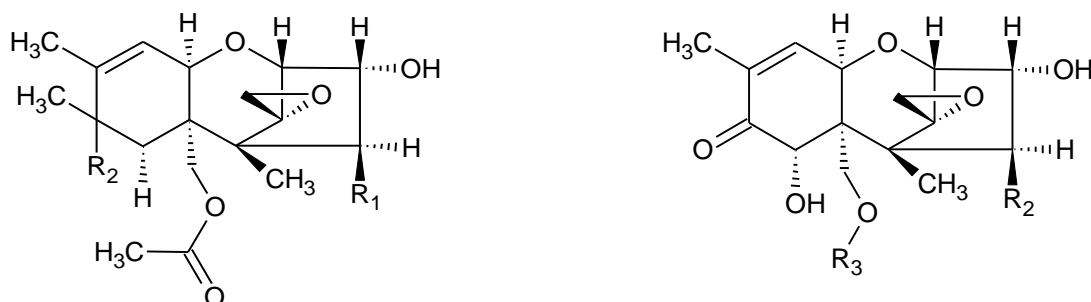
## 2.1.6 Fumonisin

Fumonisin jsou mykotoxiny produkované houbami rodu *Fusarium*. Celkem bylo identifikováno přes 20 druhů vláknitých hub z tohoto rodu, které produkují fumonisin. Mezi nejvýznamnější druhy podílející se na produkci fumonisinů lze řadit *Fusarium moniliformis*, *Fusarium proliferatum* nebo *Fusarium anthophilum*. Chemicky se jedná o složité alifatické sloučeniny. Podle způsobu biosyntézy je lze řadit do skupiny nonaketidů. Doposud bylo izolováno velké množství fumonisinů. Mezi nejvýznamnější z těchto mykotoxinů patří fumonisin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> a B<sub>3</sub>, které jsou častým kontaminantem krmiv a potravin. Fumonisin se nejčastěji nacházejí na potravinách a krmivech z kukuřice nebo rýže. [1][2][8]

Toxicita fumonisinů je úzce svázána s jejich podobností se sfingosinem. Bylo dokázáno, že v přítomnosti fumonisinů dochází k inhibici sfingolipidů. Sfingolipidy jsou velmi podstatné pro stavbu a fyziologickou činnost buněčné stěny. Ve velkém množství se nachází v mozku a jiných nervových tkáních. [1][2][8]

## 2.1.7 Trichotheceny

Trichotheceny jsou mykotoxiny produkované houbami rodu *Fusarium*. V současnosti bylo identifikováno přes 150 různých trichothecenů. Chemickou strukturou je možné trichotheceny řadit mezi tricyklické seskviterpeny s šestičlenným cyklem. Trichotheceny lze podle struktury dělit do 4 skupin: typ A, který neobsahuje na C-8 oxoskupinu, typ B, který má na C-8 oxoskupinu, typ C obsahuje epoxidovou skupinu na uhlících C-7 a C-8, nebo na uhlících C-8 a C-9. Poslední skupinou je typ D, který obsahuje makrocyclický kruh mezi uhlíky C-4 a C-5. [1][8]



Obrázek 5: Strukturální vzorce trichothecenů typu A a B [1][8]

Mezi trichotheceny typu A lze řadit mykotoxiny T-2 a HT-2. Do trichothecenů typu B řadíme mykotoxin nivalenol a deoxynivalenol. [8]

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

T-2 a HT-2 toxiny se řadí mezi trichotheceny typu A. Jsou si strukturou velmi podobné, přičemž HT-2 toxin je produktem deacetylace toxinu T-2. Toxin HT-2 je tedy metabolitem toxinu T-2. Z tohoto důvodu se oba tyto mykotoxiny doprovází v kontaminovaných potravinách. Produkovány jsou především houbami druhu *Fusarium poae* nebo *Fusarium sporotrichoides*. Vyskytují se převážně v obilovinách, a to převážně v ovsu. [1][8]

Oba toxiny mají imunotoxické a genotoxické účinky. Tyto toxiny snižují tvorbu DNA a mohou DNA dokonce poškozovat. T-2 toxin má také dermatologické účinky, kdy dochází k nekróze kůže. [2]

### 2.1.7.2 Deoxynivalenol (DON)

Mykotoxin Deoxynivalenol je produkován houbami rodu *Fusarium*, a to převážně druhy *Fusarium culmorum* nebo *Fusarium graminearum*. Podle způsobu syntézy lze DON řadit mezi seskviterpeny a podle chemické struktury jej řadíme mezi trichotheceny typu B. DON lze často najít v obilovinách, a to především v pšenici a ječmeni. [2][9]

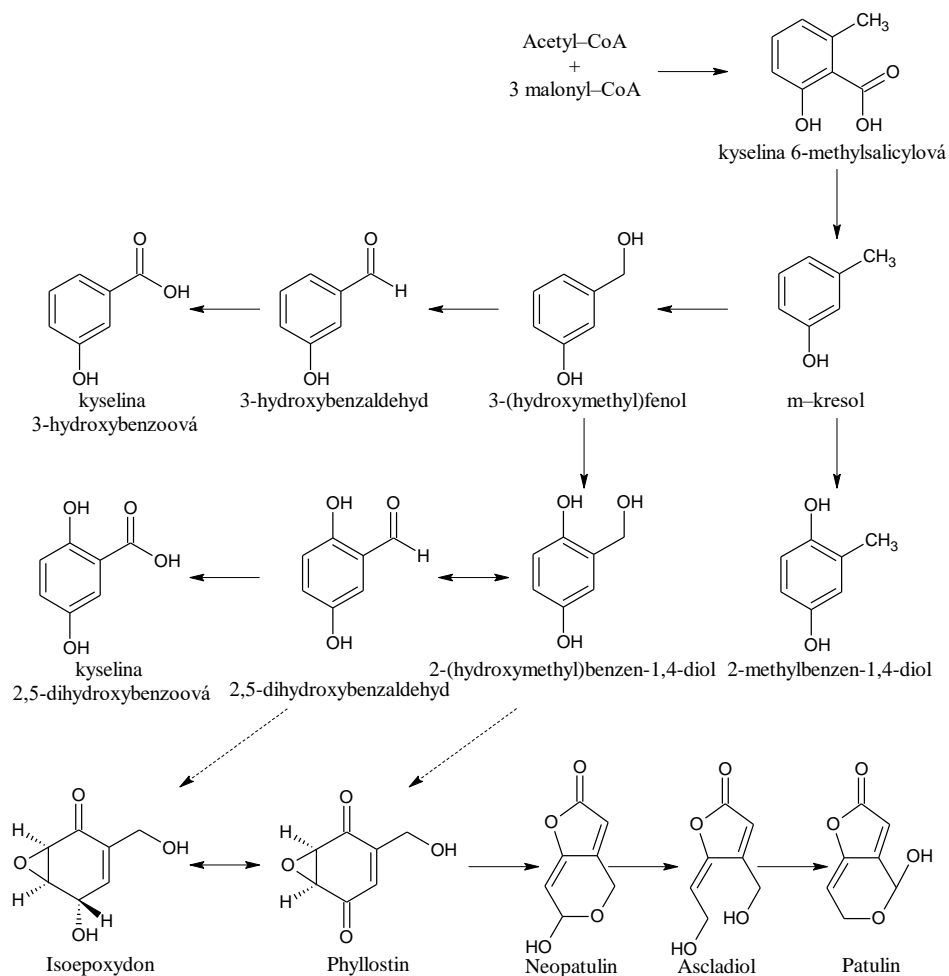
Toxické účinky DONu jsou hlavně spojovány se střevními problémy a zvracením. Cílem působení DONu jsou enterocyty, kde způsobuje inhibici syntézy proteinů a vyvolává apoptózu. [2][9]

### 2.1.8 Patulin

Patulin je mykotoxin produkován plísněmi rodu *Penicillium*. Mezi nejvýznamnější producenty patří *Penicillium patulinum* a *Penicillium expansum*. Patulin se převážně vyskytuje v jablcích, ale jeho přítomnost byla prokázána i v jiném ovoci, jako jsou například hrušky, hroznové víno nebo pomeranče. Může se také vyskytovat v mase, kde dochází k jeho koncentraci po pozření obilovin kontaminovaných plísní *Aspergillus clavatus*. Mykotoxin patulin je indikátor špatných technologických postupů, při nichž se na výrobu používá shnilé ovoce nebo ovoce napadené plísněmi. U jablečných šťáv připravených z nahnílených jablek, byly nalezeny koncentrace patulinu v řádu jednotek  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . U průmyslově připravených jablečných moštů z předem netříděných jablek byla koncentrace patulinu až  $45 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Při smíchání šťávy z jednoho shnilého jablka obsahujícího více než  $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  patulinu a šťávy z 200 dobrých jablek vznikne mošt, který přesahuje limit koncentrace patulinu povolený Evropskou unií. [2][9][10]

Kontaminace patulinem se primárně nachází v té části ovoce, kde dochází k hnilobě a vzniku plísně. Tato část ovoce může být před zpracováním odstraněna. Avšak u jablek, která mají otevřený jádřinec, může docházet ke vzniku plísně zevnitř. Napadení jablka plísní pak nejde viditelně a napadenou část jablka pak nelze odstranit. Patulin je také schopný pronikat z napadené do okolní tkáně až do hloubky několik milimetrů. [11][12]

Chemicky se jedná o nenasycený lakton a z hlediska biosyntézy jej lze řadit mezi polyketidy. Jeho biosyntéza začíná kondenzací acetylu koenzymu A s třemi malonátovými jednotkami za vzniku kyseliny 6-methylsalicylové. **Obrázek 6** přesně popisuje biosyntézu patulinu. [2][13]



Obrázek 6: Biosyntetická dráha patulinu [2][13]

Patulin má imunotoxické, genotoxické a neurotoxické vlastnosti. Bylo zjištěno, že je schopen inhibovat syntézu proteinů a RNA a vytvářet přerušení ve vláknech DNA v buňkách *Echerichia coli*. Bylo také prokázáno, že má schopnost oxidovat vlákna DNA u lidí, a tím je poškodit. [14][15]

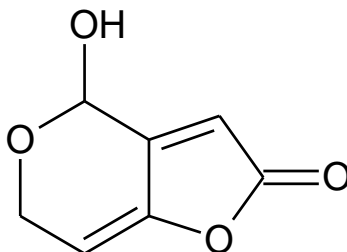
**CAS:** 149-29-1

**Název podle IUPAC:** 4-hydroxy-4H-furo (3,2-c) pyran-2 (6H)-one

**Sumární vzorec:** C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>

**Molekulová hmotnost:** 154 g·mol<sup>-1</sup>

**Strukturní vzorec:**



Obrázek 7: Strukturní vzorec patulinu

**Bod tání:** 110-111 °C, po vysušení 1 hodinu při 60 °C

**Optická otáčivost:**  $[\alpha]_D^{21} -6,2^\circ$  ( $c = 6,489 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  v chloroformu)

**Rozpustnost:** Rozpustný ve vodě, alkoholech, diethyl etheru, acetonu, benzenu, chloroformu, nerozpustný v petroletheru.

**Popis:** Patulin je bezbarvá krystalická látka bez zápachu. Patulin je nestabilní v alkalických roztocích. Ve vodných roztocích tvoří racemickou směs. Patulin absorbuje nejvíce záření při vlnové délce 276,5 nm. [2][4]

### 2.1.9 Legislativa

Maximální povolené limity vybraných mykotoxinů v potravinách jsou v Evropské unii stanoveny Nařízením komise (ES) č.1881/2006 v znění nařízení č.1126/2007, 105/2010 a 165/2010. Maximální limity pro vybrané mykotoxiny v obilovinách jsou uvedeny v Tabulce 3 a 4. [16]

Tabulka 3: Maximální povolené limity pro vybrané mykotoxiny v obilovinách [16]

Mykotoxin	Potravina	Maximální limit [ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]
Aflatoxiny	Všechny druhy obilovin a všechny výrobky pocházející z obilovin včetně zpracovaných výrobků z obilovin	B <sub>1</sub> 2,0
		$\sum B_1, G_1, B_2, G_2$ 4,0
Ochratoxin A	Nezpracované obiloviny	5,0
	Všechny produkty pocházející z nezpracovaných obilovin, včetně zpracovaných výrobků z obilovin a obilovin určených k přímé lidské spotřebě	3,0
Zearalenon	Nezpracované obiloviny jiné než kukuřice	100
	Obiloviny určené k přímé lidské spotřebě, obilná mouka	75
Fumonisy	Nezpracovaná kukuřice kromě nezpracované kukuřice určené ke zpracování mokřým mletím	4000
	Kukuřice určená k přímé lidské spotřebě, kukuřičné potraviny k přímé lidské spotřebě kromě potravin uvedených ve dvou bodech níže	1000
	Kukuřičné snídaňové cereálie a svačinky z kukuřice	800
	Kukuřičné příkrmy a ostatní příkrmy určené pro kojence a malé děti	200

Tabulka 4: Maximální povolené limity pro vybrané mykotoxiny v obilovinách [16]

Mykotoxin	Potravina	Maximální limit [ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]
T-2, HT-2	Nezpracované obiloviny a výrobky z nich	200 (*)
Deoxynivalenol	Nezpracované obiloviny, jiné než pšenice tvrdá, oves a kukuřice	1250
	Nezpracovaná pšenice tvrdá a oves	1750
	Obiloviny určené k přímé lidské spotřebě, obilná mouka	750

(\*) Doporučený denní limit pro  $\Sigma$  T-2 a HT-2

## 2.2 Kvašené nápoje

Kvašené nápoje jsou výrobky vzniklé fermentací. Fermentaci lze dělit na dva procesy, a to alkoholové kvašení a mléčné kvašení. Na výrobu mléčně kvašených výrobků se používají převážně bakterie mléčného kvašení, které přeměňují cukry na kyselinu mléčnou. Mezi produkty vytvořené mléčným kvašením lze řadit například kefír. Alkoholové neboli ethanolové kvašení je biologický proces, při němž kvasinky přeměňují cukry na ethanol a oxid uhličitý. Tímto procesem získávají kvasinky energii. Hlavní druh kvasinek využívaný na alkoholové kvašení je *Saccharomyces cerevisiae*. Nápoje obsahující 0,55 až 76 % obsahu alkoholu jsou považovány za alkoholické. Tyto nápoje lze dělit na vína, piva a likéry. [17][18][19]

### 2.2.1 Pivo

Pivo je jedno z nejstarších nápojů pocházejících z doby již před 7000 lety. Jedná se o slabě alkoholický nápoj, který je vyrobený z obilného sladu, vody a chmele působením mikroorganismů. Piva lze dělit podle druhu výroby na spontánně kvašená, svrchně kvašená a spodně kvašená. V České republice piva vyrábí převážně metodou spodního kvašení. [1][20]

Výroba piva začíná rozemletím sladu, kdy dochází k porušení vnějších vrstev zrna. Látky obsažené v endospermu se lépe extrahují, urychlí se jejich rozpouštění a biochemické změny potřebné pro výrobu piva. Endosperm obsahuje převážně škrob, který se procesem vystírání smíchává s nálevem varní vody. Následně probíhá rmutování, jehož cílem je rozštěpit a převést optimální podíl extraktu sladu do roztoku. Po odrmutování dojde ke scezení, kdy je mláto odděleno od sladiny. Do sladiny přidává chmel a při zahřívání dochází k chmelovaru. Během chmelovaru dochází k odpaření přebytečné vody, k inaktivaci enzymů, sterilizaci a inhibici mikroorganismů. Dále dochází k rozpouštění a izomeraci hořkých látek chmele, které dodávají pivu svou charakteristickou hořkou chuť. Do mladiny, jsou přidány kvasinky a dochází ke kvašení piva. Během procesu kvašení vzniká ethanol a pivo je postupně syceno oxidem uhličitým. Po ukončení kvašení se pivo nechává zrát a následně se filtruje, pasteruje a lahvuje. [20]

Pivo je tvořeno převážně vodou, jejíž obsah je v pivě větší než 90 %. Mezi další významné složky patří alkohol, jehož obsah se nejčastěji pohybuje v rozmezí 3 až 5 % a oxid uhličitý.



Látky, které dodávají pivu svou charakteristickou hořkou chuť, pochází z chmele. Mezi tyto látky patří monoepoxydy a epoxydy vznikající autooxidací  $\alpha$ -humulenu,  $\beta$ -karyofyllenu a dalších terpenů. Chuť pivu dodávají i aromatické látky, které vznikají především v procesu rmutování. [1][17]

### 2.2.2 Víno

Víno je alkoholický nápoj nejčastěji vyráběný fermentací plodů hroznového vína. Při výrobě vína dochází opět k přeměně cukernatých složek plodů kvasinkami na ethanol a oxid uhličitý. Fermentace vína může být provedena jak pomocí kvasinek, které se vyskytují na bobulích hroznů, tak dodatečným přidáním kvasinek. [17]

Před zpracováním jsou odstraněny všechny poškozené, shnilé nebo nezralé plody a bobule jsou odstopkovány. Odstopkování je nutné provádět velice šetrně, aby nedošlo k porušení jadérek v bobulích a tím uvolnění nežádoucích látek do šťávy vína. Poté dochází k lisování a sběru šťávy vína. Bílá vína se vyrábí kvašením vylisované šťávy z hroznů. Naopak u vín typu rose nebo u vín červených je nutné nejdříve bobule nechat zkvasit a až po vylisování takto zkvašených bobulí je možno pokračovat ve fermentaci vylisované šťávy. Při kvašení bobulí červených hroznů dochází k extrakci červených barviv ze slupky vína. [17][21]

Fermentace probíhá v nerezových tancích po dobu několika dní až měsíců. Kvašení probíhá při 20-30 °C pro vína červená a při 10-15 °C pro vína bílá. Čím vyšší je teplota při fermentaci, tím rychlejší je kvašení. V druhé fázi kvašení dochází také k přeměně kyseliny jablečné na kyselinu mléčnou, která dodává vínu jeho slabě kyselou chuť. Po ukončení fermentace se víno stáčí, aby došlo k odstranění usazenin. Dále se také používá číření, kdy se do vína přidávají čířící látky, které na sebe naváží malé částičky nečistot. Čířící látka je pak odstraněna filtrací. Víno je převedeno buď do lahví nebo do sudů, kde dochází k jeho zrání. Zrání vína může trvat několik měsíců až let. [17][22]

Vína se nejčastěji dělí podle obsahu cukru v hroznech. Tato vlastnost se nazývá cukernatost. Vína pak dostávají přívlastky podle této hodnoty. [1]

Tabulka 5: Rozdělení vín podle cukernatosti [1]

Označení	Přívlastek	Cukernatost [°NM]
Stolní víno	-	>11
Jakostní víno	-	>15
Jakostní víno s přívlastkem	Kabinet	>19
	Pozdní sběr	>21
	Výběr z hroznů	>24
	Výběr z bobulí	>27
	Výběr z cibéb	>31

Mezi vína s přívlastkem se řadí i vína ledová a slámová. Obě tato vína musí mít cukernatost vyšší než 27 °NM. Vína ledová však musí být sklízena při teplotách nižších, než je -7 °C. Vína slámová se vyrábí z hroznů, které byly před zpracováním skladovány po dobu alespoň 3 měsíců na slámě, nebo rákosu. [1]

### 2.2.3 Cider

Cider je alkoholický nápoj vyráběný fermentací jablečných šťáv, nebo koncentrátů. Mezi největší producenty ciderů lze zařadit Velkou Británii, Francii, Německo a Španělsko. Cidery jsou převážně čiré nápoje sycené oxidem uhličitým. Obsah alkoholu se pohybuje v rozmezí od 1,2 % do 8,5 %. Pro přípravu ciderů jsou nejvhodnější jablka obsahující kolem 15 % cukru. [23][24]

Fermentace ciderů se provádí většinou za pomoci kvasinek při teplotě mezi 15 až 25 °C. Při výrobě ciderů se často využívá malolaktické fermentace, kdy dochází k přeměně kyseliny jablečné v kyselinu mléčnou za vzniku vedlejšího produktu oxidu uhličitého. Oxidací polyfenolů při fermentaci vznikají látky, které dodávají cideru jeho charakteristickou barvu. Tento proces změny barvy lze zpomalit nebo úplně zastavit přidáním siřičitanů v průběhu kvašení. Po ukončení kvašení se cider stáčí buď přímo do lahví, nebo do sudů, kde může probíhat jeho zrání. Stejně jako u vína lze aplikovat číření, kdy se do cideru přidávají čířící látky, jako je třeba želatina, které na sebe naváží nečistoty. Před finálním lahvováním je cider většinou filtrován, pasterován a popřípadě uměle sycen oxidem uhličitým. [23]

### 2.2.4 Mykotoxiny v kvašených nápojích

Mykotoxiny se do kvašených nápojů dostávají z infikovaných surovin, které se na přípravu daných nápojů používají. Příkladem je pivo, do kterého mykotoxiny přecházejí z infikovaného ječmene. Většina mykotoxinů je v neutrálním a kyselém prostředí stabilní do teploty až 170 °C. Z těchto důvodů nedochází k jejich degradaci při vaření piva. Je tedy nutné dbát zvýšenou pozornost na sledování mykotoxinů v pivě. Běžná kontrola mykotoxinů v pivě pak obsahuje stanovení koncentrace těchto mykotoxinů. Mimo tyto toxiny se ještě také stanovuje koncentrace aflatoxinů, a to aflatoxinů B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>2</sub>. [25]

**Tabulka 6** uvádí výsledky stanovení mykotoxinů v pivech z obchodní sítě

Tabulka 6: Výsledky stanovení mykotoxinů v pivech v letech 2014 až 2018 [25]

Rok	Mykotoxiny	Počet stanovených vzorků [-]	Pozitivní hodnoty [-]	Podíl pozitivních vzorků [%]	Rozmezí [ng·l <sup>-1</sup> ]** [μg·l <sup>-1</sup> ***]	Překročení nadlimitní hodnoty*
2014	Aflatoxiny	35	0	0,0	-	
	Deoxynivalenol	43	28	65,1	2,33–22,5	Ne
	Zearalenon	27	0	0,0	-	
	T-2 a HT-2 toxin	24	8	33,3	0,17–0,71	Ne
	Ochratoxin A	47	33	70,2	1,4–141	Ne
2015	Aflatoxiny	37	0	0,0	-	
	Deoxynivalenol	47	14	29,8	2,01–29,3	Ne
	Zearalenon	35	0	0,0	-	
	T-2 a HT-2 toxin	35	18	51,4	0,04–0,9	Ne
	Ochratoxin A	50	35	70,0	1,8–28,8	Ne
2016	Aflatoxiny	38	0	0,0	-	
	Deoxynivalenol	73	24	32,9	2,12–10,7	Ne
	Zearalenon	25	1	4,0	0,41	Ne
	T-2 a HT-2 toxin	25	4	16,0	0,04–0,82	Ne
	Ochratoxin A	78	62	79,5	1–134	Ne
2017	Aflatoxiny	35	0	0,0	-	
	Deoxynivalenol	50	29	58,0	2,09–13,9	Ne
	Zearalenon	30	0	0,0	-	
	T-2 a HT-2 toxin	29	7	24,1	0,3–0,85	Ne
	Ochratoxin A	49	45	91,8	1,3–77,3	Ne
2018	Aflatoxiny	55	0	0,0	-	
	Deoxynivalenol	57	44	77,2	2,03–17,0	Ne
	Zearalenon	40	0	0,0	-	
	T-2 a HT-2 toxin	43	38	88,4	0,05–1,8	Ne
	Ochratoxin A	67	51	76,1	1,4–56,1	Ne

\* Nadlimitní hodnota byla odvozena od nejvyšší nalezené koncentrace daného mykotoxinu, jejich TWI nebo TDI a doporučené konzumace piva za podmínek moderovaného pití alkoholu, které činí dvě 0,5 l piva pro muže a dvě 0,3 l piva pro ženy

\*\* jednotky ng·l<sup>-1</sup> platí pro aflatoxiny a ochratoxin A

\*\*\* jednotky μg·l<sup>-1</sup> platí pro deoxynivaleol, zearalenon a T-2 a HT-2 toxiny

Další z kvašených nápojů, u kterého je sledovaný obsah mykotoxinů je víno. U vína se nejvíce sleduje mykotoxin ochratoxin A, který se v hroznovém víně přirozeně vyskytuje. V průběhu výroby vína pak ochratoxin A přechází z hroznů do výsledného produktu. U vín, která jsou vyrobena z různých druhů ovoce je nutné testovat přítomnost i jiných mykotoxinů, a to hlavně

mykotoxinu patulinu v případě, kdy je jedna ze surovin na výrobu ovocného vína jablečná šťáva nebo jablka. [1][2]

Hlavním mykotoxinem, který se nachází v ciderech je patulin. Patulin se do ciderů dostává z plísní napadených jablek. Patulin je dobře rozpustný ve vodě, což umožňuje jeho velmi snadný přechod z plísně do tkáně jablka nebo již přímo do jablečné šťávy. V průběhu zpracování však lze přechod patulinu do výsledného produktu zabránit. Jednou z možností je skladování jablek za teploty <10 °C, kdy je produkce patulinu plísněmi nízká. Další možností je skladování jablek v modifikované atmosféře s nízkým obsahem kyslíku. Lze také využít fungicidy na potlačení růstu plísně. Je také doporučeno v průběhu skladování odstraňovat jablka napadená plísní a před zpracováním důkladně všechny jablka omýt vodou. Omytí jablek vodou je velmi účinný krok při výrobě cideru, avšak tento krok není dostatečný pro odstranění veškerého mykotoxinu z jablek. Další možnost odstranění patulinu při výrobě cideru je pasterizace. Tento postup však není dostatečně účinný díky teplotní odolnosti patulinu. [26][27]

### 2.2.5 Legislativa

Vědecký výbor pro kontaminující látky v potravinovém řetězci Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) proto stanovil pro tyto látky tolerovatelný denní příjem (TDI) a tolerovatelný týdenní příjem (TWI). Tyto tolerovatelné příjmy byly stanoveny pro ochratoxin A, deoxynivalenol a zearalenon. Pro mykotoxiny T-2 a HT-2 byl tento limit stanoven jako suma. [25]

Tabulka 7: Tolerovatelné denní příjmy vybraných mykotoxinů [25]

Mykotoxin	TDI [ $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ tělesné váhy]
Deoxynivalenol	1000
$\Sigma$ T-2, HT-2	100
Zearalenon	200
Ochratoxin A	120 (*)

(\*) hodnota v tabulce je určena pro TWI

Tabulka 8: Maximální limity patulinu v potravinách dle Evropské komise [16]

Potraviny	Limit [ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]
Ovocné šťávy, rekonstituované koncentrované ovocné šťávy a ovocné nektary	50
Lihoviny, jablečné víno a jiné fermentované nápoje získané z jablek nebo obsahující jablečnou šťávu	50
Pevné výrobky z jablek, včetně jablečného kompotu a jablečného pyré určené k přímé lidské spotřebě, kromě níže uvedených potravin	25
Jablečná šťáva a pevné výrobky z jablek, včetně jablečného kompotu a jablečného pyré, pro kojence a malé děti, takto označené a prodávané	10
Jiné než obilné příkrmy pro kojence a malé děti	10

Tabulka 9: Maximální limity ochratoxinu A v potravinách dle Evropské komise [16]

Potraviny	Limit [ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]
Víno (včetně šumivého vína, s výjimkou likérového vína a vína s obsahem alkoholu nejméně 15 % objemových) a ovocné víno	2
Aromatizovaná vína, aromatizované vinné nápoje a aromatizované vinné koktejly	2
Hroznová šťáva, rekonstituovaná koncentrovaná hroznová šťáva, hroznový nektar, rekonstituovaný hroznový mošt a rekonstituovaný koncentrovaný hroznový mošt určené pro lidskou spotřebu	2

## 2.3 Stanovení mykotoxinů

### 2.3.1 Vzorkování

První krok ke stanovení mykotoxinů ve vzorku je odběr vzorku. Tento proces se nazývá vzorkování. V průběhu tohoto procesu dochází k zmenšování primárního vzorku, kterým je zahájen odběr, až na laboratorní vzorek. Ten je znovu zmenšován až na vzorek analytický. Mykotoxiny ve vzorcích jsou velmi často distribuovány nehomogenně. Je proto nutné odběry a vzorkování provádět z šarží o značné hmotnosti nebo počtu kusů. [2][28]

### 2.3.2 Extrakce

Pro správné měření a následné vyhodnocení je nutné analyt vyextrahovat ze vzorku a správně vyčistit. V průběhu extrakce a čištění je důležité brát v potaz fyzikálně-chemické vlastnosti jak vzorku, tak i matrice, z které se analyt extrahuje. Čištěním a extrakcí dochází k odstranění látek, které by ve výsledné detekci mohly zasahovat do vyhodnocení obsahu měřeného analytu a tím zvyšovat nepřesnost měření. K extrakci analytu ze vzorku se nejčastěji používají metody extrakce na tuhé fázi (SPE) a metoda imunoafinitní chromatografie (IAC). [29][30]

**Extrakce na tuhé fázi (SPE)** je metoda, kdy dochází k selektivnímu zadržení látek na pevném sorbentu. Vzorek protéká kolonkou, která je naplněna tuhým sorbentem. Na tuhém sorbentu pak buď dojde k zachycení analytu, nebo k zachycení nečistot. V případě, kdy dojde k zachycení analytu na sorbentu je potom nutné provést eluci analytu ze sorbentu pomocí elučního činidla. V případě, kdy dojde k zachycení nečistot, již není nutné provádět eluci a analyt je možné odebírat přímo z objemu extraktu, který prošel danou kolonkou. [29]

**Imunoafinitní chromatografie (IAC)** je metoda velmi podobná extrakci na tuhé fázi. Molekuly analytu jsou opět zachycovány na pevné fázi kolonky. Imunoafinitní kolonky jsou ovšem založeny na specifické interakci mezi antigenem a protilátkou. Jako protilátka se bere daná fáze imunoafinitní kolonky, na kterou se váže mykotoxin (antigen). Po zachycení veškerého analytu kolonkou je nutné kolonku nejdříve promýt vhodným pufrům a následně eluovat pomocí vhodného rozpouštědla. [29][31]

**Molekulově imprintovaný polymer (MIP)** je druh imunoafinitní chromatografie, který se používá k extrakci analytů z různých potravinových matric. Stejně jako u imunoafinitní chromatografie zde dochází k specifickou interakci mezi pevnou fází kolony a daným analytem. Jako pevná fáze se využívají zesítené funkční polymery syntetizované v přítomnosti analytu. Analyt je následně odstraněn z polymeru a kolonka s polymerem je dále schopna vázat cílený analyt. Tato metoda byla prokázána jako dostatečně stabilní a často účinnější než předchozí druhy extrakce. [32]

### 2.3.3 Analýza

Výsledná detekce mykotoxinů se nejčastěji provádí chromatografickými metodami s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie, UV detektoru nebo fluorescenčního detektoru. Další možností stanovení analytu je imunochemická metoda ELISA. [29]

**Imunochemická metoda ELISA** je metoda založená na reakci antigenu s protilátkou. Při této metodě dochází k směšování mykotoxinu s enzymovým konjugátem. Tato směs je aplikována do speciálních mikrotitračních destiček. Jamky v této destičce jsou potaženy protilátkou specifickou pro daný mykotoxin. V dané protilátce je pouze omezený počet vazebných míst, což vede k soupeření konjugátu s mykotoxinem o tyto vazebná místa. Následně dojde k promytí destičky substrátem za vzniku specifického zbarvení, které se znovu změní po přidání stop činidla. Množství analytu se měří spektrofotometricky. [33]

**Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)** je separační metoda, při níž dochází k rozdělení látek mezi fází stacionární a mobilní. Stacionární fáze je tvořená specifickým sorbentem, který se nachází v chromatografické koloně. Mobilní fázi pak tvoří kapalina protékající chromatografickou kolonou, a tím i stacionární fází. Mobilní fáze je přiváděna se vzorkem do kolony za vysokého tlaku. Eluce pak může probíhat metodou isokratické mobilní fáze nebo gradientové mobilní fáze. V případě isokratické metody je složení mobilní fáze po celou dobu separace stejné, naopak při gradientové eluci dochází v průběhu separace ke změně složení mobilní fáze. Chromatograf se skládá ze zásobníků na mobilní fázi, vysokotlakého čerpadla, autosampleru, kolony a detektoru. [34]

**Ultra účinná kapalinová chromatografie (UPLC)** je metoda založená na stejném principu jako metoda HPLC. Dochází zde opět k separaci stanovované látky mezi mobilní a stacionární fází. Tato metoda má však lepší rozlišení a citlivost separace než metoda HPLC. Zvýšení účinnosti je dosaženo zmenšením částic sorbentu pod 2  $\mu\text{m}$ . Sníží se tím rozmývání analytů a zvýší se účinnost separace. Lze tedy separaci provádět za vyšších průtokových rychlostí, čímž dojde ke snížení času separace na koloně. Snížení velikosti částic ovšem způsobí zvýšení zpětný tlak na koloně. U UPLC se tak pracuje při vyšších tlacích než u běžných metod HPLC. [34]

**Hmotnostní spektrometrie (MS)** je analytická metoda, kdy dochází k přeměně vzorku na ionizovaný plyn. Výsledné ionty analytu pak mají určitou hmotnost  $m$  a náboj  $z$ . Pomocí těchto dvou vlastností lze tyto ionty detekovat. Jako první dochází při hmotnostní spektrometrii k ionizaci vzorku. Ionizace je možné docílit elektrosprejem, chemickou ionizací atd. Vzniklé

ionty jsou urychleny do hmotnostního analyzátoru. Analýza iontů je provedena na základě poměru  $m/z$ . [35]

**Detektor fotodiodového pole** (Photodiode array – PDA) je detektor sloužící k detekci ultrafialového záření nebo viditelného světla (UV/VIS). K detekci světla se používá lineární uspořádání fotodiod, které je schopné současně měřit větší množství vlnových délek. Světlo je přiváděno ze zdroje na zrcadlo, kde dojde k rozložení paprsku světla na jednotlivé vlnové délky. Jednotlivé paprsky pak prochází filtrem, který propustí pouze vlnovou délku potřebnou k měření. Světlo o této vlnové délce pak prochází měřící celou, kde dochází k absorpci záření eluátem a vzorkem. Vzniklé záření pak dopadá na zrcadlo, které zaostří toto záření. Záření prochází štěrbinou, která určí intenzitu vlnové délky světla dopadajícího na fotodiody. Světlo dopadá na mřížku, kde dojde k rozptýlení světla na jednotlivé vlnové délky a následně dopadá na pole fotodiod. Fotodiodami po dopadu světla prochází proud, z kterého lze vypočítat absorbanci vzorku. [36]

#### 2.3.4 Validace

Validace je proces, který je nutný k určení, zda je daná metoda vhodná pro získání relevantních dat. Validaci je nutné vždy provést před uvedením dané metody do praxe, při změně podmínek dané metody nebo před zavedením metody v jiné laboratoři. Pro určení validace metody se používají validační parametry. [37]

Mezi validační parametry se řadí správnost metody. Tento parametr je definován jako těsnost shody mezi průměrnou hodnotou získanou měřením a přijatou referenční hodnotou. Dáme-li množství analytu naměřeného danou metodou do poměru s referenční hodnotou, získáme výtěžnost dané metody. [37]

Dalším validačním parametrem je přesnost metody, která udává míru těsnosti shody mezi výsledky měření. U přesnosti je nutné měření provádět vždy za stejných podmínek. Výsledné chyby jsou poté náhodné. [37]

Linearita je schopnost metody poskytovat v dané oblasti výsledky, které jsou přímo úměrné koncentraci analyzované látky ve vzorku. U některých metod může být závislost nelineární. V těchto případech lze tuto závislost linearizovat matematickými aparáty nebo popisem dané funkce. [37]

Mezi validační parametry se dále řadí limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ). LOD nám udává, při jaké koncentraci analytu je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Poměr signál/šum by pro LOD měl mít hodnotu 3. LOQ udává, při jaké koncentraci analytu ve vzorku je přesnost a správnost metody dostatečná pro kvalitativní vyhodnocení. Pro LOQ by měl mít poměr signál/šum hodnotu 10. [37]

Selektivita metody nám určuje schopnost metody stanovit analyt ve vzorku v přítomnosti jiných látek, jejichž přítomnost je očekávána ve vzorku. Metoda je dostatečně selektivní, když je vliv jiných látek na výsledky měření zanedbatelný. [37]

## 2.4 5-HMF

**CAS:** 67-47-0

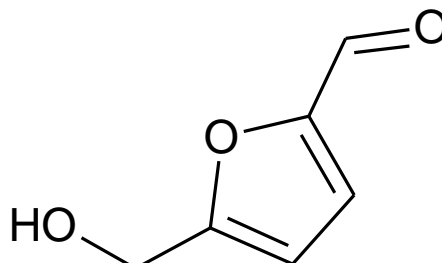
**Název podle IUPAC:** 5-(hydroxymethyl)-2-karbaldehyd

**Sumární vzorec:** C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>

**Molekulová hmotnost:** 126,11 g·mol<sup>-1</sup>

**Hustota:** 1,2062 g·cm<sup>-3</sup> při teplotě 25 °C

**Strukturní vzorec:**



Obrázek 8: Strukturní vzorec 5-HMF

**Bod tání:** 31,5-35 °C

**Index lomu:** 1,5627 při teplotě 18 °C

**Rozpustnost:** Rozpustný ve vodě methanolu, ethanolu, acetonu, ethylesteru kyseliny octové, etheru, benzenu, chloroformu.

**Popis:** 5-HMF je bílá krystalická látka, která voní jako květy heřmánku a chutná jako máslo a karamel. [4]

Přítomnost 5-HMF v jablečných džusech a výrobcích z jablek je považována za indikaci zhoršování kvality výrobku. 5-HMF vzniká dehydratací ketopentóz v kyselých prostředích nebo za vysokého tlaku. 5-HMF vzniká také jako produkt Maillardovy reakce z redukcujících cukrů. Bylo také dokázáno, že při odpařování za vysokých teplot, kterého se využívá při výrobě koncentrátů, dochází k rychlejšímu vzniku 5-HMF. To je způsobeno neenzymatickým hnědnutím. Bylo také dokázáno, že při skladování dochází k postupnému růstu koncentrace 5-HMF ve sledovaném vzorku. [26][38]

Přírůstek koncentrace 5-HMF je tím rychlejší, čím je teplota skladování vyšší. Toho může být využito při stanovení stáří produktu. 5-HMF byl dříve přidáván do výrobků jako dochucovadlo. [26][38]



### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Seznam chemikálií

Tabulka 10: Seznam použitých chemikálií

Název	$M_r$ [ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ]	Čistota [%]	Výrobce	CAS	Země původu
Acetonitril	41,050	$\geq 99,90$	SIGMA-ALDRICH	75-05-8	Francie
Hydrogenuhličitan sodný	84,007	$\geq 99,00$	Lach-Ner, s.r.o.	144-55-8	Česká republika
Kyselina octová	60,050	$\geq 99,80$	Honeywell	64-19-7	Německo
Ethyl acetát	88,110	$\geq 99,70$	SIGMA-ALDRICH	141-78-6	Polsko
Diethyl ether	74,120	99,76	Lach-Ner, s.r.o.	60-28-7	Česká republika
Patulin	154,120	-	SIGMA-ALDRICH	149-29-1	Rakousko
5-HMF	126,110	$\geq 98,00$	SIGMA-ALDRICH	67-47-0	Čína

- Roztok pektinázy na odstranění zákalu ve vzorku [39]

#### 3.2 Seznam laboratorních pomůcek

- Analytické váhy (Denver Instrument)
- Předvážky (Sartorius)
- pH metr (Mettler Toledo)
- centrifuga (Rotina 420R)
- vakuový manifold (Supelco Visiprep)
- topné hnízdo na vialky (Evaterm – Spec)
- Kolonky EASIMIP™ PATULIN pro extrakci patulinu ze vzorku [40]
- Waters Acquity UPLC
- Waters Acquity UPLC PDA detector

Tabulka 11: Parametry stanovení patulinu metodou UPLC

Kolona	Luna Omega 1,6 $\mu\text{m}$ C18 100x2,1 mm
Teplota	40 °C
Tlak	70,327 MPa
Složení mobilní fáze	A (95 %) = $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}:\text{CH}_3\text{COOH}$ (98:2:0,1) B (5 %) = ACN
Průtok mobilní fáze	0,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
pH mobilní fáze	3,2
Objem nástřiku	10 $\mu\text{l}$
Detektor	UV-VIS (PDA)
Detekce	276 nm

### 3.3 Kalibrace patulinu a 5-HMF

Pro přípravu kalibračních roztoků byl použit standardní roztok patulinu o koncentraci  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a pevný standard 5-HMF. Tyto látky byly zředěny roztokem 0,1% kyseliny octové do skleněné vialky tak, aby byly vytvořeny směsné kalibrační roztoky patulinu a 5-HMF o koncentraci 50 až  $1000 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Jednotlivé signály kalibračních roztoků byly změřeny na přístroji UPLC/PDA.

### 3.4 Limity detekce a kvantifikace

Pro stanovení limitů detekce a kvantifikace byly do skleněné vialky vytvořeny roztoky patulinu a 5-HMF v 0,1% kyselině octové o koncentraci  $100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Roztoky byly 2krát zředěny do čistých skleněných vialek. Ředění roztoků patulinu a 5-HMF bylo opakováno do doby, až signál patulinu a 5-HMF, který byl získán měřením na UPLC/PDA vymizel. Na samotný výpočet limitu detekce a kvantifikace byl použit roztok o koncentraci, u kterého byl poměr signálu a šumu větší než 10. Pro tuto koncentraci byl signál patulinu a 5-HMF 6x změřen na přístroji UPLC/PDA.

### 3.5 Přesnost a správnost

Pro měření přesnosti a správnosti byly ze standardů patulinu a 5-HMF vytvořeny zásobní roztoky o koncentraci 50, 200 a  $1000 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Byl také vytvořen roztok placebo, který obsahoval pouze deionizovanou vodu a roztok 0,1% kyseliny octové. U zásobních roztoků patulinu a 5-HMF byly pro každou koncentraci provedeny extrakce podle bodu 3.8 3krát. Pro roztoky placebo a kyseliny octové byla extrakce podle bodu 3.8 provedena pouze jednou. Po extrakci roztoků bylo provedeno měření na UPLC/PDA.

### 3.6 Popis analyzovaných vzorků

Tabulka 12: Parametry analyzovaných vzorků ciderů

Značení	Zákal	Země výroby	Obsah alkoholu [%]	Surovina
C1	Ne	CZ	6,20	Mošt
C2	Ne	CZ	5,60	Mošt
C3	Ne	CZ	5,50	Mošt
C4	Ne	CZ	4,50	Mošt
C5	Ano	CZ	4,50	Mošt
C6	Ano	CZ	4,50	Mošt
C7	Ano	CZ	0,00	Mošt
C8	Ne	SK	4,80	Mošt
C9	Ano	CZ	4,50	Mošt
C10	Ne	CZ	4,00	Mošt
C11	Ano	CZ	7,75	Mošt
C12	Ano	CZ	7,75	Mošt
C13	Ne	CZ	5,00	Mošt

Tabulka 13: Parametry analyzovaných vzorků ciderů

Značení	Zákal	Země výroby	Obsah alkoholu [%]	Surovina
C14	Ne	CZ	4,50	Koncentrát
C15	Ne	CZ	4,50	Koncentrát
C16	Ne	CZ	5,00	Koncentrát
C17	Ne	CZ	4,50	Koncentrát
C18	Ne	SK	4,50	Koncentrát
C19	Ne	CZ	4,90	Mošt
C20	Ne	CZ	6,50	Mošt
C21	Ne	GB	5,50	Mošt
C22	Ne	ES	6,00	Mošt
C23	Ne	SK	4,30	Mošt
C24	Ne	CZ	7,00	Mošt
C25	Ano	CZ	6,00	Mošt
C26	Ne	CZ	5,00	Mošt
C27	Ne	CZ	4,80	Mošt
C28	Ne	CZ	4,50	Mošt
C29	Ne	CZ	6,50	Mošt
C30	Ne	CZ	6,50	Mošt
C31	Ano	CZ	6,50	Mošt
C32	Ne	FR	5,30	Mošt
C33	Ano	GB	7,50	Mošt

Tabulka 14: Parametry analyzovaných vzorků jablečných šťáv, radlerů a vín

Značení	Zákal	Země výroby	Obsah alkoholu [%]	Surovina
JŠ1	Ano	SK	0,0	Mošt
JŠ2	Ne	CZ	0,0	Mošt
JŠ3	Ne	CZ	0,0	Koncentrát
JŠ4	Ne	CZ	0,0	Koncentrát
JŠ5	Ne	SK	0,0	Koncentrát
JŠ6	Ano	CZ	0,0	Koncentrát
JŠ7	Ne	CZ	0,0	Mošt
JŠ8	Ano	CZ	0,0	Mošt
Radler1	Ne	CZ	2,2	Koncentrát
Radler2	Ne	CZ	<0,5	Koncentrát
Víno1	Ne	HU	10,0	Koncentrát
Víno2	Ne	ES	11,0	Mošt
Shnilá jablka	Ano	CZ	0,0	Mošt

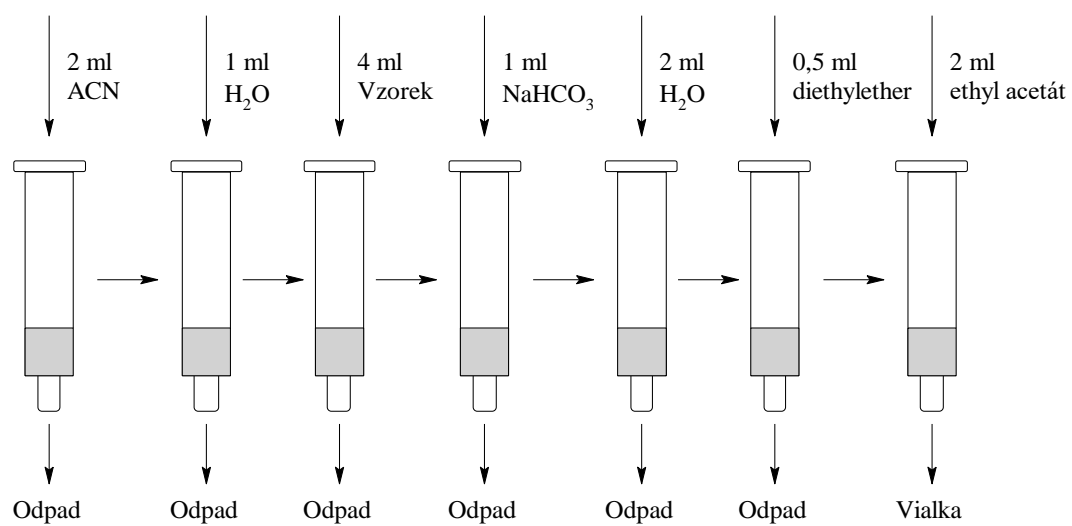
### 3.7 Úprava zakalených vzorků

Zakalené roztoky nebylo možné použít pro extrakci patulinu pomocí kolonek EASIMIP™ PATULIN. Zákal vzorku byl odstraněn pomocí roztoku enzymu pektinázy. Do centrifugační zkumavky o objemu 50 ml bylo nalito 20 ml vzorku, ke kterému bylo přidáno 130 µl roztoku enzymu pektinázy. Takto vzniklý roztok byl 30 sekund míchán na vortexu. Zkumavka byla vložena do kádinky s vodou vyhřátou na 40 °C. Vzorek byl udržován v takto vyhřáté vodě po dobu 2 hodin. Centrifugační zkumavka byla vytažena z kádinky a obsah byl zcentrifugován při 4000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut. Po odstředění byla pro extrakci patulinu použita čirá vrchní vrstva.

### 3.8 Extrakce patulinu

Pro extrakci patulinu bylo do centrifugační zkumavky o objemu 15 ml odebráno 2,5 ml analyzovaného vzorku. K tomuto objemu bylo přidáno 2,5 ml 2% roztoku kyseliny octové a vzniklý roztok byl promíchán na vortexu po dobu 60 sekund. Pro extrakci patulinu byly použity komerčně dostupné kolonky EASIMIP™ PATULIN, které byly uchyceny do vakuového manifoldu. Tyto kolonky byly aktivovány přidáním 2 ml acetonitrilu tak, aby průtok kolonkou činil 1 ml za minutu. Tato rychlost byla docílena kapáním 1 kapky za sekundu z ústí kolonky. Po aktivaci, byla kolonka promyta 1 ml deionizované vody opět o rychlosti 1 ml za minutu. Do kolonky byly přidány 4 ml zředěného roztoku analytu v 2% kyselině octové. Průtok zředěného analytu byl nastaven tak, aby odpovídal rychlosti 0,5 ml za minutu. Této rychlosti bylo docíleno kapáním 1 kapky za 2 sekundy z ústí kolonky. Kolonka byla promyta 1 ml 1% roztoku hydrogenuhličitanu sodného, 2 ml deionizované vody a 0,5 ml roztoku diethyletheru. Všechny tři tyto roztoky byly prokapávány rychlostí 1 ml za minutu. V průběhu celé extrakce bylo nutné dbát na to, aby nedošlo k promíchání jednotlivých kapalin v kolonce a zároveň aby nedošlo k vysušení kolonky. Kolonka byla vyjmuta z vakuového manifoldu a uchycena nad skleněnou vialku. Do kolonky byly přidány 2 ml 100% roztoku ethylesteru kyseliny octové a byla provedena eluce patulinu do vialky. Eluce probíhala rychlostí 0,5 ml za minutu. Zbytek kapaliny zachycený v pevné fázi kolonky byl vytlačen vzduchem pomocí injekční stříkačky. Do roztoku ve vialce byla přidána 1 kapka ledové kyseliny octové a vialka byla promíchávána po dobu 60 sekund. Roztok ve vialce byl vysušen proudem dusíku při teplotě 40 °C. Po vysušení byl do vialky přidán 1 ml 0,1% roztoku kyseliny octové. Vialka s kyselinou octovou byla opatrně promíchána tak, aby byla rozpuštěna veškerá residua na stěnách vialky. Veškerý roztok z vialky byl převeden do čisté skleněné vialky pro měření na UPLC/PDA.

**Obrázek 9** schematicky popisuje extrakci patulinu na kolonkách EASIMIP™ PATULIN



Obrázek 9: Schéma extrakce patulinu ze vzorku

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

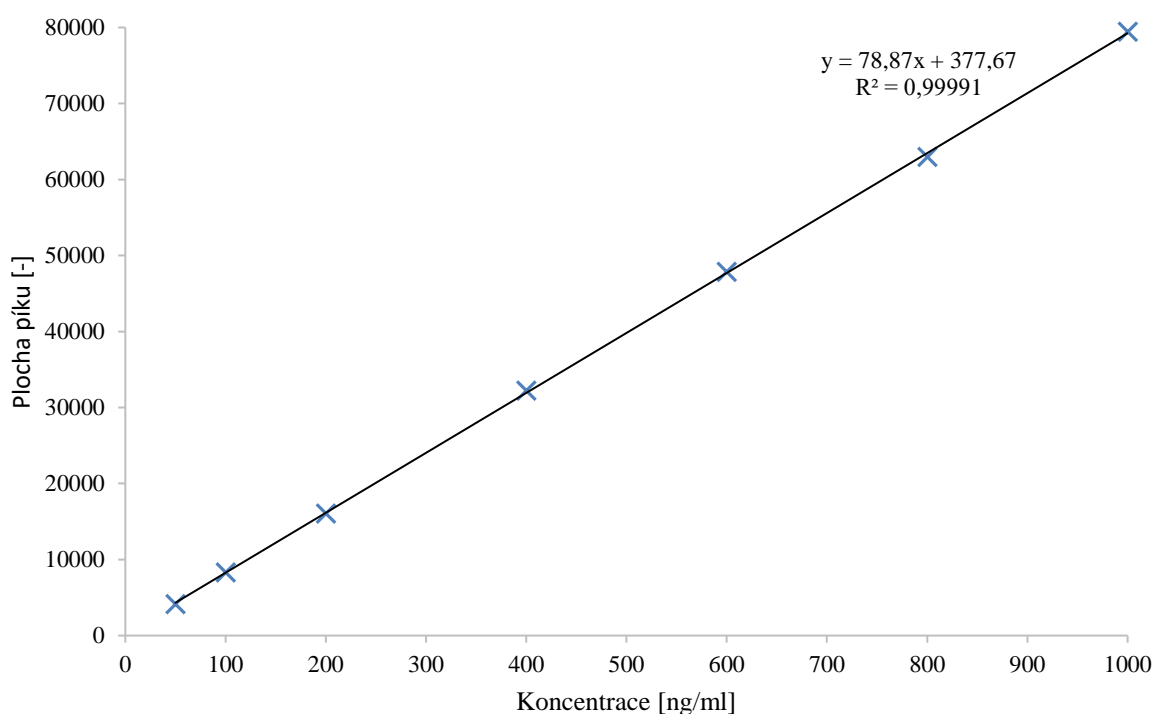
Byly stanoveny validační parametry metody pro měření obsahu patulinu v kvašených nápojích. Mezi tyto parametry patří kalibrační rozsah, linearita, limity detekce a kvantifikace, přesnost a správnost.

Bylo zjištěno, že vzorky ciderů obsahují také sloučeninu 5-HMF, která byla zachycena kolonkou EASIMIP™ PATULIN. Retenční čas této látky byl velmi blízký retenčnímu času analyzovaného patulinu (tento čas se lišil  $\Delta t = 0,289$  minut). Byly proto stanoveny validační parametry i pro sloučeninu 5-HMF.

V další fázi experimentu byla stanovena koncentrace patulinu a 5-HMF v 33 komerčně dostupných vzorcích ciderů, v 9 vzorcích jablečných šťáv, 2 vzorcích radlerů a 2 vzorcích ovocných vín.

### 4.1 Kalibrační křivka patulinu

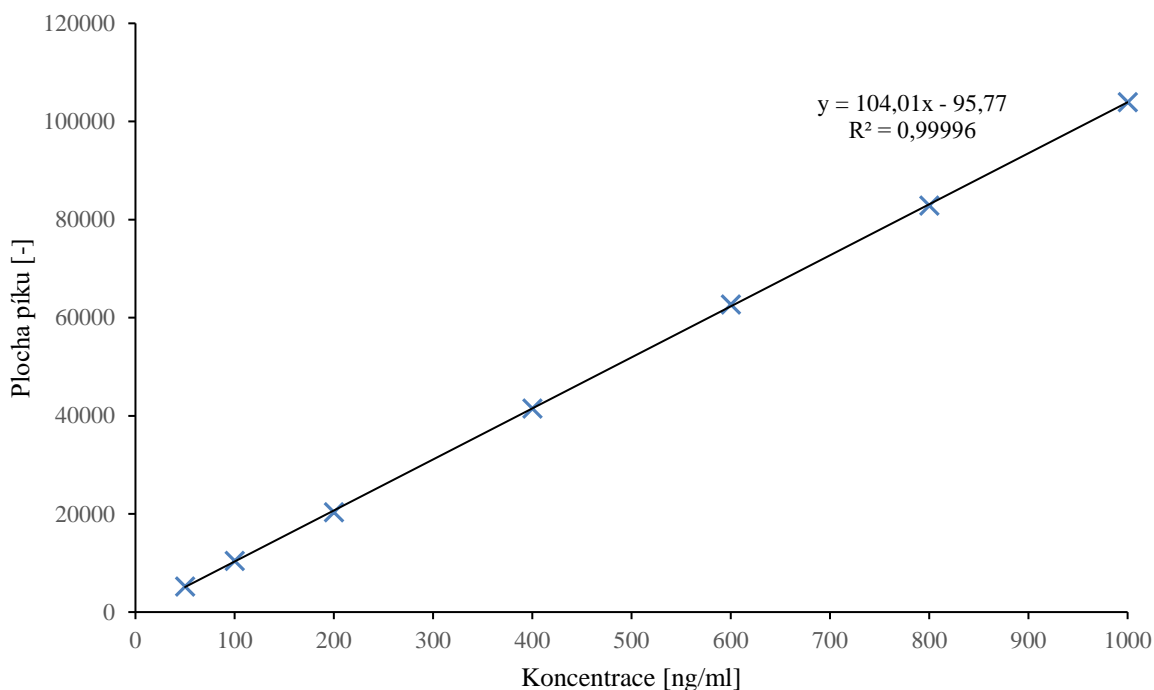
Kalibrační křivka pro stanovení obsahu patulinu byla vytvořena z hodnot signálů jednotlivých kalibračních roztoků standardu patulinu. Každý kalibrační standard byl do přístroje nastříknut 3krát a výsledná hodnota signálu byla vypočítána jako průměr všech tří hodnot. Tyto hodnoty byly proloženy křivkou lineární regrese. Rovnice této křivky činí  $y = 78,87x + 377,67$ . Kalibrační křivka je lineární v celém svém rozsahu od 50 do 1000  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Hodnota koeficientu determinace je  $R^2 = 0,99991$



Obrázek 10: Kalibrační křivka pro standardy patulinu

## 4.2 Kalibrační křivka 5-HMF

Kalibrační křivka pro stanovení obsahu 5-HMF byla vytvořena z hodnot signálů jednotlivých kalibračních roztoků standardu 5-HMF. Každý kalibrační standard byl do přístroje nastříknut 3krát a výsledná hodnota signálu byla vypočítána jako průměr všech tří hodnot. Tyto hodnoty byly proloženy křivkou lineární regrese. Rovnice této křivky činí  $y = 104,01x - 95,77$ . Kalibrační křivka je lineární v celém svém rozsahu od 50 do 1000  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Hodnota koeficientu determinace je  $R^2 = 0,99996$ .



Obrázek 11: Kalibrační křivka pro standardy 5-HMF

## 4.3 Limity detekce a kvantifikace

Limity detekce byly stanoveny měřením signálu roztoku patulinu a 5-HMF o koncentraci  $50 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Jednotlivé roztoky byly nastříknuty do přístroje 6krát, kde byly změřeny parametry jednotlivých chromatogramů. Mezi tyto parametry patří retenční čas, plocha píku, poměr signál/šum, symetrie píku a počet pater chromatografie. Z těchto hodnot byly vypočteny průměrné hodnoty těchto parametrů a jejich směrodatné odchylky. Limity kvantifikace byly vypočítány podle rovnice:

$$\text{LOQ} = \frac{c \cdot 10}{(s/\bar{s})} \cdot f_z$$

Limit detekce byl vypočítán podle rovnice:

$$\text{LOD} = \frac{\text{LOQ}}{3,3}$$

Koncentrace patulinu a 5-HMF se při extrakci z původního vzorku zdvojnásobí. Proto je nutné tuto změnu započítat jako faktor zředění ( $f_z$ ) ve výpočtu LOQ a LOD. Hodnoty LOD a LOQ jsou pak poloviční oproti hodnotám vypočítaným z měření na UPLC/PDA.

Tabulka 15: Tabulka naměřených parametrů pro patulin

	Retenční čas [min]	Plocha [-]	Signál/šum (s/š) [-]	Symetrie [-]
1	1,598	3961	15,6	0,80
2	1,596	3605	16,1	0,90
3	1,597	3469	15,7	0,90
4	1,590	3978	15,2	0,90
5	1,598	3726	14,7	0,90
6	1,591	3995	16,2	0,90
<b>Průměr</b>	<b>1,595</b>	<b>3789</b>	<b>15,6</b>	<b>0,90</b>
<b>SD</b>	<b>0,004</b>	<b>223</b>	<b>0,6</b>	<b>0,04</b>

Tabulka 16: Limity detekce a kvantifikace pro patulin

	Koncentrace [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]
LOD	4,9
LOQ	16,0

Výsledný retenční čas patulinu byl 1,6 minut. Pík patulinu byl dostatečně symetrický s hodnotou symetrie 0,90. Počet teoretických pater se pohyboval kolem hodnoty 2000. Výsledná hodnota limitu detekce pro patulin byla  $4,9 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a limitu kvantifikace  $16,0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Tabulka 17: Tabulka naměřených parametrů pro 5-HMF

	Retenční čas [min]	Plocha [-]	Signál/šum (s/š) [-]	Symetrie [-]
1	1,308	4335	11,2	0,70
2	1,309	4602	11,4	0,70
3	1,308	4144	11,0	0,70
4	1,306	4740	12,2	0,80
5	1,304	4313	10,8	0,80
6	1,304	4526	11,0	0,80
<b>Průměr</b>	<b>1,307</b>	<b>4443</b>	<b>11,3</b>	<b>0,80</b>
<b>SD</b>	<b>0,002</b>	<b>218</b>	<b>0,5</b>	<b>0,05</b>

Tabulka 18: Limity detekce a kvantifikace pro 5-HMF

	Koncentrace [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]
LOD	6,7
LOQ	22,2



Retenční čas 5-HMF byl 1,3 minut. Ačkoli se retenční časy patulinu a 5-HMF liší pouze o 0,3 minuty je rozlišení píků na chromatogramu dostatečné pro stanovení koncentrací jednotlivých analytů (**Obrázek 13**). Symetrie jednotlivých píků 5-HMF je dostačující s průměrnou hodnotou 0,8. Počet teoretických pater se pohyboval kolem hodnoty 2000. Hodnota limitu detekce 5-HMF metodu byla  $6,7 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a hodnota limitu kvantifikace byla  $22,2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

#### 4.4 Přesnost a správnost

Přesnost a správnost měření pro měření patulinu byla stanovena měřením koncentrací roztoků obsahující patulin o známé koncentraci, které prošly extrakčním procesem. Původní koncentrace patulinu v roztocích byla 50, 200 a 1000  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Pro každou hodnotu koncentrace byly provedeny tři extrakce. Výsledné hodnoty pro správnost se pohybovaly od 79,3 do 98,0 %. Přesnost výsledků byla pro všechny měření nižší než 4,2 %.

#### 4.5 Obsah patulinu a 5-HMF ve vzorcích

Tabulka 19: Naměřené koncentrace patulinu a 5-HMF ve vzorcích ciderů

Označení vzorku	5-HMF [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	SD [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	Patulin [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	SD [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]
C1	20,3	0,5	<LOD	-
C2	30,7	0,4	<LOD	-
C3	<LOD	-	<LOD	-
C4	<LOD	-	<LOD	-
C5	143,6	4,8	<LOQ (8,0)	0,7
C6	98,7	0,1	<LOQ (9,2)	0,2
C7	405,9	4,5	<LOD	-
C8	72,0	0,3	<LOD	-
C9	216,3	11,6	<LOD	-
C10	466,8	0,5	<LOD	-
C11	79,9	1,0	<LOD	-
C12	<LOQ (19,4)	1,2	<LOD	-
C13	<LOD	-	<LOD	-
C14	3707,0	70,5	<LOD	-
C15	2396,0	7,2	<LOD	-
C16	1006,5	9,1	<LOD	-
C17	877,0	10,7	<LOD	-
C18	2241,6	0,4	<LOD	-
C19	55,6	4,7	<LOD	-
C20	<LOQ (19,7)	0,7	<LOD	-
C21	95,0	0,8	<LOD	-
C22	<LOD	-	<LOD	-
C23	1567,0	8,9	<LOD	-

Tabulka 20: Naměřené koncentrace patulinu a 5-HMF ve vzorcích ciderů

Označení vzorku	5-HMF [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	SD [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	Patulin [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	SD [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]
C24	<LOD	-	<LOD	-
C25	<LOQ (9,2)	0,3	<LOD	-
C26	84,5	6,1	<LOD	-
C27	51,1	3,3	<LOD	-
C28	21,9	1,2	<LOD	-
C29	<LOQ (17,9)	0,9	<LOD	-
C30	<LOD	-	<LOD	-
C31	<LOD	-	<LOD	-
C32	25,4	0,1	<LOD	-
C33	<LOQ (15,4)	0,6	<LOD	-

Na měření obsahu patulinu v ciderech bylo celkem použito 33 různých vzorků ciderů z obchodní sítě v České republice. Patulin byl detekován pouze ve dvou vzorcích ciderů, u kterých byla koncentrace patulinu nižší než limit kvantifikace pro tuto analytickou metodu. Patulin se nacházel v 6,1 % všech testovaných vzorků ciderů.

5-HMF byl nalezen v 26 vzorcích, což odpovídá 78,8 % všech analyzovaných vzorků. Jednotlivé koncentrace se pohybovaly od <LOQ ( $9,2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) do  $3707,0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Vzorky, které obsahovaly koncentraci 5-HMF mimo kalibrační rozsah, byly zředěny a celkové měření bylo provedeno znovu.

Tabulka 21: Naměřená koncentrace patulinu a 5-HMF ve vzorcích jablečných šťáv, radlerů a vína

Označení vzorku	5-HMF [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	SD [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	Patulin [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	SD [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]
JŠ1	<LOQ (12,9)	0,7	<LOQ (10,3)	0,6
JŠ2	994,8	5,8	<LOD	-
JŠ3	1182,8	7,3	<LOD	-
JŠ4	1310,0	8,0	<LOD	-
JŠ5	2495,1	87,3	<LOD	-
JŠ6	4146,7	9,1	<LOD	-
JŠ7	1456,6	2,1	16,6	0,0
JŠ8	<LOD	-	154,6	2,4
Radler1	1270,3	18,5	<LOD	-
Radler2	2919,6	9,6	<LOD	-
Víno1	1634,6	81,0	<LOD	-
Víno2	100,1	4,3	<LOD	-
Shnilé jablko	<LOD	-	2070,2	40,1

Měření obsahu patulinu bylo provedeno také pro vzorky jablečných šťáv, radlerů, vín a moštu získaného ze shnilého jablka. U čtyř z těchto vzorků byl zjištěn patulin, přičemž koncentrace ve vzorcích se pohybovala od <LOQ (10,3) do 2070,2  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Patulin byl nalezen u 30,8 % měřených vzorků jablečných šťáv, radlerů a vín. U vzorku jablečné šťavy 8 (JŠ8) byla stanovena koncentrace patulinu 154,6  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Tato koncentrace překračuje limit 50  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , který je stanovený Evropskou unií. Z tohoto důvodu byl podán podnět na Státní zemědělskou a potravinářskou inspekci. Celkově byl patulin nalezen v 11,1 % vzorků nakoupených z obchodní sítě. [16]

U vzorku jablečné šťavy získané ze shnilého jablka byla nalezena koncentrace patulinu 2070,2  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Tato hodnota je více než 40krát vyšší než maximální limit stanovený Evropskou unií. Takto vysoká hodnota potvrzuje předpoklad, že shnilé a plesnivé ovoce obsahuje vysokou koncentraci patulinu. [16]

5-HMF byl nalezen v 84,6 % z testovaných vzorků. Koncentrace 5-HMF se u těchto vzorků pohybovala od <LOQ (12,9  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) do 4146,7  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . V případě naměření vysoké koncentrace patulinu a 5-HMF (mimo kalibrační rozsah) ve vzorku byl vzorek naředěn a opakovaně změřen.

#### **4.6 Porovnání se zahraničními daty**

Výskyt patulinu jako přirozeného kontaminantu jablek a jablečných výrobků je celosvětový problém. Jeho obsah v jablečných výrobcích byl sledovaný v mnoha publikacích. Ve výrobcích z jablek se často také vyskytuje 5-HMF, který je produktem Maillardovy reakce. Tuto sloučeninu lze použít pro indikaci chuti nebo k určení stáří produktu. 5-HMF je často stanovovaný spolu s patulinem v produktech vyrobených z jablek nebo jablečné šťavy.

Příkladem je článek autorů Spedaro a kolektiv, který popisuje výskyt patulinu ve vzorcích jablečných šťáv a jablečných šťáv míchaných s jinými ovocnými šťávami. Autoři uvádějí, že patulin byl kvantifikován ve 47 z 135 testovaných vzorků. Autoři v této práci také porovnávali obsah patulinu v zakalených a čirých jablečných šťávách a došli k závěru, že zákal nemá vliv na obsah patulinu v jablečných šťávách. Dále uvádí, že obsah patulinu v jablečných šťávách závisí na použití surovin pro výrobu dané šťavy. Vzorky vyrobené pouze z jablek obsahovali v průměru vyšší množství patulinu než vzorky šťavy vyrobené smícháním různých druhů ovocných šťáv. Obsah patulinu v těchto 47 vzorcích se pohyboval od 1,58 do 55,41  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Pouze u jednoho vzorku byl obsah patulinu vyšší než 50  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , což je maximální limit povolený evropskou legislativou. Procento vzorků obsahující patulin bylo 34,8 %. Toto číslo je 3krát vyšší než procento vzorků (11,1 %), u kterých byl zjištěn patulin v této bakalářské práci. Nejvyšší koncentrace patulinu stanovená v tomto článku byla téměř 3krát nižší než maximální koncentrace patulinu stanovená v této bakalářské práci. [41]

Autoři Harris a kolektiv sledovali obsah patulinu v celkem 159 vzorcích jablečných džusů a ciderů, které byly zakoupeny v obchodních řetězcích ve státě Michigan. Patulin byl zjištěn v celkem 37 vzorcích, což odpovídá 23,3 % měřených vzorků. Procento vzorků obsahující mykotoxin patulin bylo 2krát vyšší než procento vzorků obsahujících patulin zjištěný touto bakalářskou prací. Téměř polovina (48,6 %) ze vzorků obsahovala koncentraci patulinu vyšší,

než je maximální limit stanovený Evropskou unií. Nejvyšší naměřená koncentrace ( $2,7 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) přesahovala koncentraci patulinu stanovenou u vzorku šťávy ze shnilých jablek ( $2070,2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ). [42]

Dalším příkladem je článek autora Anene a kolektivu, kteří sledovali obsah patulinu ve dvaceti komerčně dostupných vzorcích obsahujících jablečnou šťávu. Na extrakci použili technologii molekulově imprintovaného polymeru. U tří z testovaných vzorků byl kvantifikován patulin o koncentraci  $3,20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,544 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $0,205 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Patulin obsahovalo 15 % vzorků. Tato hodnota se blíží procentuální hodnotě vzorků obsahující patulin v této bakalářské práci, ale všechny hodnoty jsou vyšší než nejvyšší koncentrace patulinu stanovená v této bakalářské práci. Nejvyšší stanovená koncentrace těmito autory byla opět vyšší než koncentrace stanovená ve vzorku shnilého jablka ( $2070,2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ). [32]

V článku autora Lee a kolektivu byl vedle sebe stanovován obsah patulinu a 5-HMF v 66 vzorcích ovocných šťáv. Patulin byl stanoven ve třech vzorcích. To odpovídá 4,5 % celkových vzorků, což je téměř 3krát méně než procento vzorků obsahující patulin v této bakalářské práci. Koncentrace patulinu v těchto vzorcích se pohybovala od  $13,1$  do  $33,7 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Analyt 5-HMF byl nalezen u všech vzorků a jeho koncentrace byla mezi  $0,08$  a  $91,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . [43]

Obsah patulinu a 5-HMF byl také sledován v článku autorů Abu-Bakar, Makahleh a Saad. Tito autoři sledovali obsah patulinu a 5-HMF v 18 vzorcích jablečných šťáv. Autoři provedli extrakci analytů pomocí extrakce z kapaliny do kapaliny a jednotlivé koncentrace analytů pak změřili pomocí HPLC–DAD. Patulin byl stanoven ve 14 vzorcích, avšak pouze dva vzorky mohly být kvantifikovány. Koncentrace v těchto vzorcích byla  $20$  a  $30 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Patulin byl nalezen u 77,8 % vzorků. Toto číslo je 7krát vyšší než nálezy v této bakalářské práci, ale v žádném vzorku koncentrace patulinu nepřekročila hodnotu  $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Analyt 5-HMF byl nalezen u všech vzorků. Jeho koncentrace se pohybovala od  $0,23$  do  $22 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . [44]

## 5 ZÁVĚR

V bakalářské práci byla řešena problematika výskytu mykotoxinů v kvašených nápojích. Cílem práce byla extrakce mykotoxinu patulinu z ciderů zakoupených v obchodní síti pomocí MIP kolonek a jeho následná analýza pomocí UPLC/PDA.

Literární rešerše se zabývá popisem vybraných mykotoxinů, jejich výskytem a legislativními ošetřeními týkajícími se výskytu těchto mykotoxinů v potravinách. Dále literární rešerše uvádí popis výroby kvašených nápojů, výskyt mykotoxinů v kvašených nápojích a legislativní opatření související s mykotoxiny v těchto nápojích. V literární rešerši je také uveden popis 5-HMF, který byl touto metodou stanoven.

Experimentální část bakalářské práce lze rozdělit do dvou částí. V první části uvedena optimalizace stanovení mykotoxinu patulinu a 5-HMF pomocí extrakce na komerčně dostupných kolonkách EASIMIP<sup>TM</sup> PATULIN a měření na přístroji UPLC/PDA. Druhá část experimentální části se zabývá popisem extrakce patulinu a 5-HMF z jednotlivých vzorků ciderů, vín, radlerů a jablečných šťáv.

Při porovnání naměřených dat s údaji dostupnými v literatuře lze usoudit, že cidery připravované na území České republiky jsou vyráběny z kvalitního ovoce, u kterého dochází ke kvalitnímu skladování před zpracováním. Lze také usoudit, že ovoce je před použitím do ciderů kvalitně roztřízeno a shnilé nebo plesnivé kusy, které obsahují patulin, jsou odstraněny.

Z validačních parametrů vyplývá, že tato metoda je vhodná pro stanovování obsahu patulinu v kvašených nápojích. Metoda má dostatečnou výtěžnost, kalibrační křivka je lineární v oblasti měření, LOD a LOQ je dostatečně nízký na to, aby byla metoda vhodná k měření koncentrace patulinu, které jsou jak nižší, tak vyšší, než je maximální limit koncentrace stanovený Evropskou unií. Metoda je dostatečně rychlá a má i dobré rozlišení v přítomnosti 5-HMF, který se ve kvašených nápojích také nachází.

## 6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [2] MALÍŘ, František a Vladimír OSTRÝ. *Vláknité mikromycety (plísně), mykotoxiny a zdraví člověka*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2003. ISBN 80-7013-395-3.
- [3] BAYMAN, Paul a Peter J. COTTY. Genetic diversity in *Aspergillus flavus*: association with aflatoxin production and morphology. *Canadian Journal of Botany* [online]. 1993, **71**(1), 23-31 [cit. 2020-07-19]. DOI: 10.1139/b93-003. ISSN 0008-4026. Dostupné z: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/b93-003>
- [4] PubChem. *PubChem* [online]. USA: National Center for Biotechnology Information [cit. 2020-02-03]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [5] *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene*. Volume 82. Lyon: IARC Press Lyon, 2002.
- [6] BATTILANI, P., A. PIETRI a A. LOGRIECO. Risk assessment and management in practice: ochratoxin in grapes and wine. *Mycotoxins in Food* [online]. Elsevier, 2004, 2004, s. 244-261 [cit. 2020-07-19]. DOI: 10.1533/9781855739086.2.244. ISBN 9781855737334. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781855737334500161>
- [7] IL'ICHEV, Yuri V., Jennifer L. PERRY a John D. SIMON. Interaction of Ochratoxin A with Human Serum Albumin. Preferential Binding of the Dianion and pH Effects. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2002, **106**(2), 452-459 [cit. 2020-07-19]. DOI: 10.1021/jp012314u. ISSN 1520-6106. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp012314u>
- [8] HAJŠLOVÁ, J. *Mykotoxiny a jejich konjugáty v potravinářských surovinách a krmivech: trendy, rizika dietární expozice, možnosti prognózy osudu při zpracování*. Vědecký výbor fytoosanitární a životního prostředí [online]. 2008 [cit. 20. 7. 2020]. Dostupné na www: <http://www.phytoosanitary.org/projekty/2008/Projekt1.pdf>
- [9] HAJŠLOVÁ, J. *Mykotoxiny*. Vědecký výbor fytoosanitární a životního prostředí [online]. 2009 [cit. 20. 7. 2020]. Dostupné na www: <http://www.phytoosanitary.org/projekty/2009/Projekt1.pdf>
- [10] MORPHET, James. WATERS CORPORATION. *Rapid Analysis of Patulin Contamination in Apple Juice*. UK, 2007, 6 s. Dostupné také z: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720002410en.pdf>
- [11] MOSS, Maurice O. Mycotoxin review - 1. *Aspergillus and Penicillium*. *Mycologist* [online]. 2002, **16**(03) [cit. 2020-07-21]. DOI: 10.1017/S0269915X02003014. ISSN 0269-915X. Dostupné z: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0269915X02003014](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0269915X02003014)

- [12] OSTRY, Vladimír, Jarmila SKARKOVA a Jiri RUPRICH. Occurrence of penicillium expansum and patulin in apples as raw materials for processing of foods — case study. *Mycotoxin Research* [online]. 2004, **20**(1), 24-28 [cit. 2020-07-21]. DOI: 10.1007/BF02946705. ISSN 0178-7888. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02946705>
- [13] PUEL, Olivier, Pierre GALTIER a Isabelle OSWALD. Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin. *Toxins* [online]. 2010, **2**(4), 613-631 [cit. 2020-02-03]. DOI: 10.3390/toxins2040613. ISSN 2072-6651. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6651/2/4/613>
- [14] LEE, Kil-Soo a Robert RÖSCHENTHALER. DNA-damaging activity of patulin in Escherichia coli. *Applied and environmental microbiology* [online]. 1986, **52**(5), 1046–1054 [cit. 2020-07-21]. Dostupné z: <https://aem.asm.org/content/aem/52/5/1046.full.pdf>
- [15] LIU, Bing-Hui, Feng-Yih YU, Ting-Shuan WU, Shuan-Yow LI, Mao-Chang SU, Mei-Chine WANG a Shin-Mei SHIH. Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2003, **191**(3), 255-263 [cit. 2020-07-21]. DOI: 10.1016/S0041-008X(03)00254-0. ISSN 0041008X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X03002540>
- [16] *Nářizení komise (ES) č 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity kontaminujících látek v potravinách*. In: . Dostupné také z: <https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1881:20120401:CS:PDF>
- [17] *Fermented Beverages: Volume 5. The Science of Beverages*. Elsevier, 2019. ISBN 9780128152713.
- [18] DONALIES, Ute E. B., Huyen T. T. NGUYEN, Ulf STAHL a Elke NEVOIGT. Improvement of Saccharomyces Yeast Strains Used in Brewing, Wine Making and Baking. STAHL, Ulf, Ute E. B. DONALIES a Elke NEVOIGT, ed. *Food Biotechnology* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008, s. 67-98 [cit. 2020-07-15]. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. DOI: 10.1007/10\_2008\_099. ISBN 978-3-540-70535-2. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/10\\_2008\\_099](http://link.springer.com/10.1007/10_2008_099)
- [19] MAYO, Baltasar, Mohammed AMMOR, Susana DELGADO a Ángel ALEGRÍA. Fermented Milk Products. TAMANG, Jyoti a Kasipathy KAILASAPATHY, ed. *Fermented Foods and Beverages of the World* [online]. CRC Press, 2010, 2010-07-08, s. 263-288 [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.1201/EBK1420094954-c9. ISBN 978-1-4200-9495-4. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/EBK1420094954-c9>
- [20] BASAŘOVÁ, Gabriela. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010. ISBN 978-80-7080-734-7.
- [21] BAMFORTH, Charles W., ed. *Food, Fermentation and Micro-organisms* [online]. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2005 [cit. 2020-07-16]. DOI: 10.1002/9780470995273. ISBN 9780470995273.

- [22] WALKER, Graeme a Graham STEWART. Saccharomyces cerevisiae in the Production of Fermented Beverages. *Beverages* [online]. 2016, **2**(4) [cit. 2020-07-16]. DOI: 10.3390/beverages2040030. ISSN 2306-5710. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2306-5710/2/4/30>
- [23] BAMFORTH, C.W. Fermented Beverages. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems* [online]. Elsevier, 2014, 2014, s. 124-136 [cit. 2020-07-16]. DOI: 10.1016/B978-0-444-52512-3.00154-6. ISBN 9780080931395. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444525123001546>
- [24] LEA, Andrew. *Craft cider making*. Third edition. Ramsbury, Marlborough: The Crowood Press, 2015. ISBN 978-1-78500-015-7.
- [25] OLŠOVSKÁ, Jana, Vladimíra JANDOVSKÁ, Sylvie BĚLÁKOVÁ, Petra KUBIZNIAKOVÁ, Tomáš VRZAL a Karel ŠTĚRBA. Monitoring of potential contaminants in beer from the Czech Republic. *KVASNY PRUMYSL* [online]. 2019, **65**(3) [cit. 2020-07-22]. DOI: 10.18832/kp2019.65.84. ISSN 2570-8619. Dostupné z: <http://www.kvasnyprumysl.eu/index.php/kp/article/view/123>
- [26] GÖKMEN, Vural a Jale ACAR. Simultaneous determination of 5-hydroxymethylfurfural and patulin in apple juice by reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 1999, **847**(1-2), 69-74 [cit. 2020-07-22]. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00133-8. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967399001338>
- [27] IOI, J., Ting ZHOU, Rong TSAO a Massimo F. MARCONE. Mitigation of Patulin in Fresh and Processed Foods and Beverages. *Toxins* [online]. 2017, **9**(5) [cit. 2020-07-22]. DOI: 10.3390/toxins9050157. ISSN 2072-6651. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6651/9/5/157>
- [28] KOPLÍK, R. Přednášky z předmětu Analytické metody ve forenzní analýze: Odběr vzorků [online]. [cit. 2020-07-18]. Dostupné na www: <http://web.vscht.cz/~koplikr/>
- [29] RAHMANI, A., S. JINAP a F. SOLEIMANY. Qualitative and Quantitative Analysis of Mycotoxins. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2009, **8**(3), 202-251 [cit. 2020-07-19]. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2009.00079.x. ISSN 15414337. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2009.00079.x>
- [30] TURNER, Nicholas W., Sreenath SUBRAHMANYAM a Sergey A. PILETSKY. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2009, **632**(2), 168-180 [cit. 2020-07-19]. DOI: 10.1016/j.aca.2008.11.010. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267008019193>
- [31] CUTLER, Paul. Immunoaffinity Chromatography. CUTLER, Paul. *Protein Purification Protocols* [online]. New Jersey: Humana Press, 2003, s. 167-178 [cit. 2020-07-19]. DOI: 10.1385/1-59259-655-X:167. ISBN 1-59259-655-X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1385/1-59259-655-X:167>
- [32] ANENE, Amira, Karim HOSNI, Yves CHEVALIER, Rafik KAFLAT a Souhaira HBAIEB. Molecularly imprinted polymer for extraction of patulin in apple juice samples. *Food Control*. 2016, **70**, 90-95.

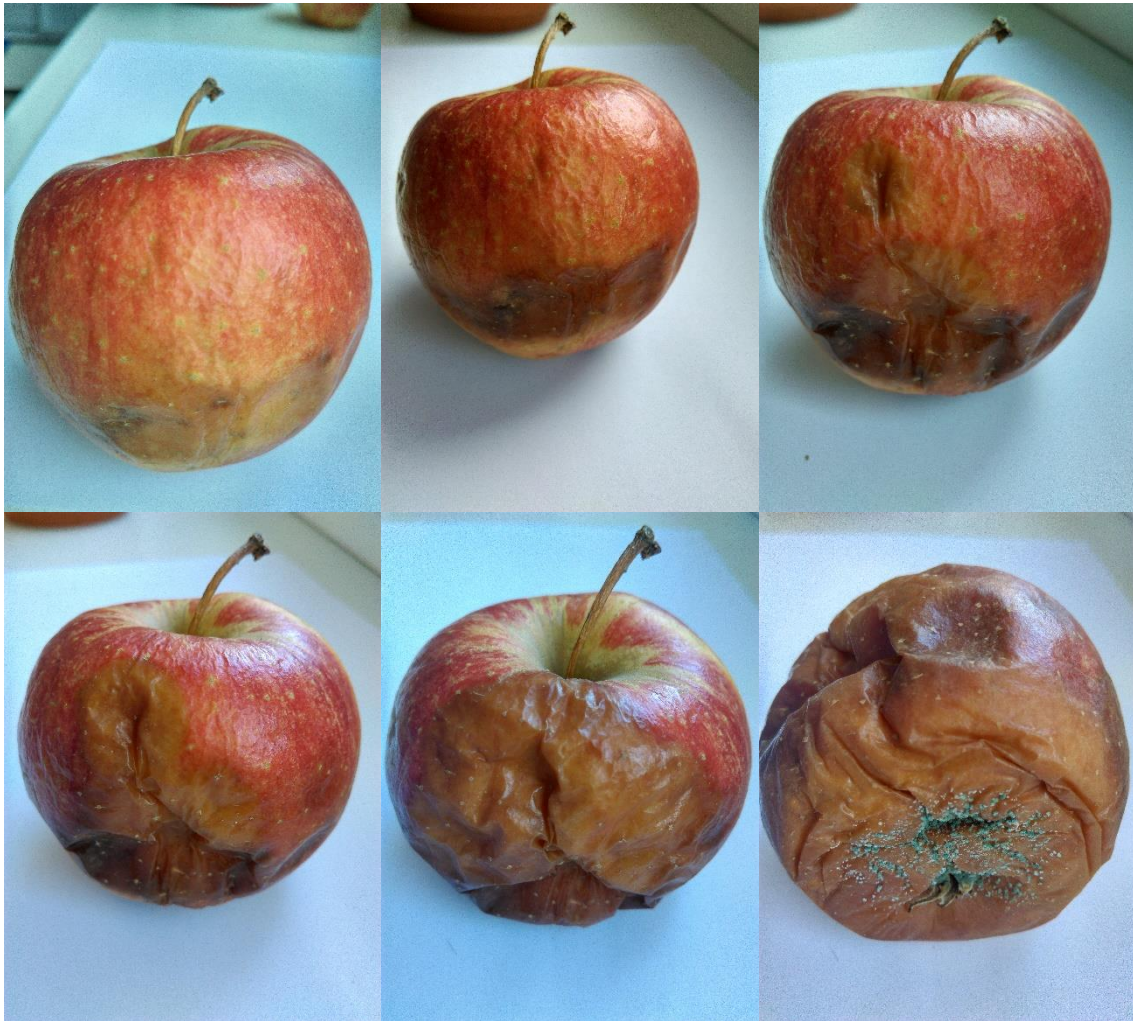


- [33] ZHENG, M. Z., RICHARD, J. L. a BINDER, J. *A Review of Rapid Methods for the Analysis of Mycotoxins*. *Mycopathologia*. 2006, vol. 161, issue 5, pp. 261-273.
- [34] NOVÁKOVÁ, L. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1. vyd. Praha: Lucie Nováková, 2013, 299 s. ISBN 978-80-260-4243-3
- [35] GROSS, Jürgen. *Mass Spectrometry: A Textbook*. Heildeberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004. ISBN 978-3-642-07388-5.
- [36] *ACQUITY UPLC Photodiode Array Detector: Getting started guide*. Milford, USA, 2005. Dostupné také z: <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/71500108703ra.pdf>
- [37] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [38] HUSØY, Trine, Margaretha HAUGEN, Michaël MURKOVIC, et al. Dietary exposure to 5-hydroxymethylfurfural from Norwegian food and correlations with urine metabolites of short-term exposure. *Food and Chemical Toxicology*. 2008, **46**(12), 3697-3702.
- [39] Pectinase. *R–Biopharm* [online]. [cit. 2020-03-25]. Dostupné z: <https://food.r-biopharm.com/products/pectinase-2/>
- [40] EASIMIP™ PATULIN. *R–Biopharm* [online]. [cit. 2020-03-25]. Dostupné z: <https://food.r-biopharm.com/products/easimiptm-patulin/>
- [41] SPADARO, D., A. CIAVORELLA, S. FRATI, A. GARIBALDI a M.L. GULLINO. Incidence and level of patulin contamination in pure and mixed apple juices marketed in Italy. *Food Control* [online]. 2007, **18**(9), 1098-1102 [cit. 2020-07-10]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2006.07.007. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713506001897>
- [42] HARRIS, KERRI L., GERD BOBE a LESLIE D. BOURQUIN. Patulin Surveillance in Apple Cider and Juice Marketed in Michigan. *Journal of Food Protection* [online]. 2009, **72**(6), 1255-1261 [cit. 2020-07-10]. DOI: 10.4315/0362-028X-72.6.1255. ISSN 0362-028X. Dostupné z: <https://meridian.allenpress.com/jfp/article/72/6/1255/164548/Patulin-Surveillance-in-Apple-Cider-and-Juice>
- [43] LEE, Tien Ping, Ronnie SAKAI, Normaliza Abdul MANAF, Ainolsyakira Mohd RODHI a Bahruddin SAAD. High performance liquid chromatography method for the determination of patulin and 5-hydroxymethylfurfural in fruit juices marketed in Malaysia. *Food Control* [online]. 2014, **38**, 142-149 [cit. 2020-07-10]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.10.018. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713513005410>
- [44] ABU-BAKAR, Nur-Bahiyah, Ahmad MAKAHLEH a Bahruddin SAAD. Vortex-assisted liquid–liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of furfurals and patulin in fruit juices. *Talanta* [online]. 2014, **120**, 47-54 [cit. 2020-07-10]. DOI: 10.1016/j.talanta.2013.11.081. ISSN 00399140. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914013009697>

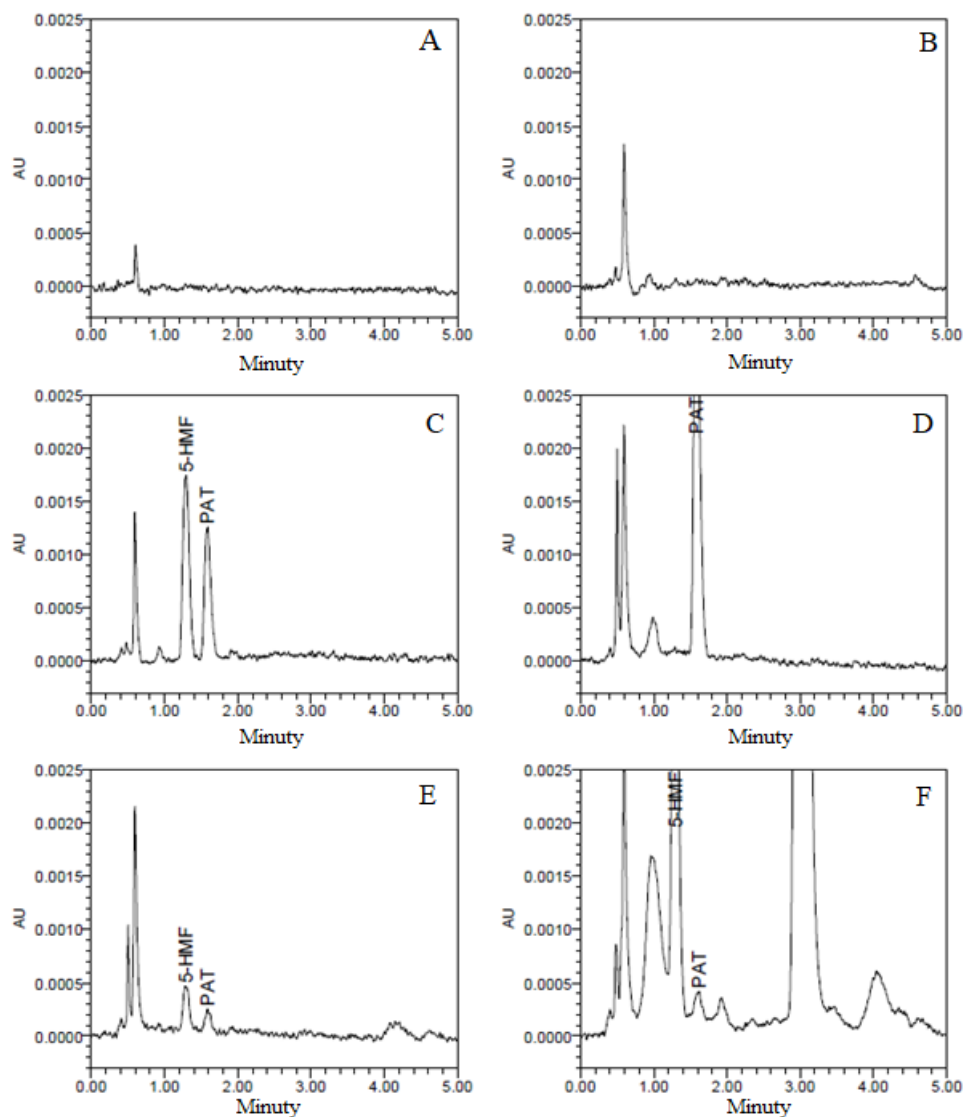
## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

UPLC	Ultra účinná kapalinová chromatografie
PDA	Detektor s fotodiodovým polem (Photodiode-array)
MIP	Molekulově imprintovaný polymer
DON	Deoxynivalenol
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
TDI	Tolerovatelný denní příjem
TWI	Tolerovatelný týdenní příjem
SPE	Extrakce na pevné fázi
IAC	Imunoafinitní chromatografie
HPLC	Vysoko účinná kapalinová chromatografie
MS	Hmotnostní spektrometrie
UV/VIS	Ultraviolet-visible
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit kvantifikace
5-HMF	5-(hydroxymethyl)furfural
ACN	Acetonitril
SD	Směrodatná odchylka
DAD	Detektor s diodovým polem (Diode-array detector)
ELISA	Enzymed-linked immunosorbent essay

## 8 SEZNAM OBRÁZKŮ



*Obrázek 12: Průběh hniloby jablka a vzniku plísňe po dobu jednoho měsíce*



Obrázek 13: Chromatogramy vybraných měření

Chromatogram A zobrazuje měření pro čistý roztok 0,1% kyseliny octové (blank). Chromatogram B zobrazuje měření placebo a chromatogram C zobrazuje měření směsného standardu patulinu a 5-HMF o koncentraci  $100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Na chromatogramu D je výsledek měření pro jablečný džus AJ8, pro který byla výsledná koncentrace patulinu  $154,6 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Chromatogram E zobrazuje měření vzorku jablečného džusu AJ1, u kterého byla změřena koncentrace patulinu  $<\text{LOQ}$  ( $10,3 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a koncentrace 5-HMF  $<\text{LOQ}$  ( $12,9 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Chromatogram F pak zobrazuje výsledné měření pro cider C6, u kterého byla koncentrace patulinu  $<\text{LOQ}$  ( $9,2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a koncentrace 5-HMF  $98,7 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .