

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Možnosti stanovení mykotoxinu patulinu v potravinách – rešerše

KRISTÝNA ŠILHAVÁ

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2019

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. RNDr. Daliboru Šatínskému, Ph.D. za odborné vedení bakalářské práce, za podporu, trpělivost, rady, inspiraci a cenné připomínky.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Podpis

Dne

OBSAH

1. POUŽITÉ ZKRATKY	6
2. ÚVOD.....	8
3. ZADÁNÍ A CÍL PRÁCE.....	9
4. MYKOTOXINY	10
4.1 Aflatoxiny.....	10
4.2 Ochratoxin	11
4.3 Zearalenon	11
4.4 Trichotheceny	12
5. PATULIN	13
5.1 Metody potlačení růstu patulinu.....	14
5.1.1 Fyzické odstranění plísní.....	14
5.1.2 Fermentace	14
5.1.3 Tepelné úpravy.....	15
5.1.4 Ultrafialové záření.....	15
5.2 Fyzikální a chemické vlastnosti.....	15
5.3 Biosyntéza patulinu.....	16
5.4 Toxicita patulinu	18
5.4.1 Akutní toxicita.....	18
5.4.2 Subakutní toxicita.....	18
5.4.3 Genotoxické účinky	18
5.4.4 Karcinogenita	19
5.4.5 Embryotoxicita a teratogenita	19
5.4.6 Imunotoxicita	19
5.5 Limity pro patulin v potravinách	20
6. ANALYTICKÉ METODY	21
6.1 Příprava vzorků	21
6.2 Metody extrakce	22
6.2.1 Liquid-liquid extraction (LLE)	22
6.2.2 Solid-phase extraction (SPE)	23
6.2.2.1 1.fáze – aktivace SPE kolonky.....	24
6.2.2.2 2.fáze – aplikace matrice obsahující analyty.....	24
6.2.2.3 3.fáze – aplikace vody nebo pufru (promytí).....	24

6.2.2.4	4.fáze – vymytí analytu (eluce).....	24
6.2.3	On-line SPE.....	26
6.2.4	dSPE (QuEChERS).....	26
6.2.5	Superkritická fluidní extrakce (SFE)	26
6.2.6	Gelová permeační chromatografie (GPC).....	27
6.2.7	Imunoafinitní chromatografie (IAC).....	27
6.3	Chromatografické metody.....	27
6.3.1	Tenkovrstvá chromatografie (TLC)	27
6.3.2	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	28
6.3.3	Plynová chromatografie (GC).....	30
6.3.4	Hmotnostní spektrometrie (MS)	31
6.4	Elektromigrační metody	32
6.4.1	Kapilární elektroforéza (CZE)	33
7.	MOŽNOSTI STANOVENÍ PATULINU.....	35
7.1	Stanovení patulinu v čiré a zakalené jablečné šťávě pomocí HPLC s UV detekcí.....	35
7.2	Stanovení patulinu v jablečných nápojích pomocí extrakce na molekulárně vtištěných polymerech (MIP)	36
7.3	Stanovení patulinu pomocí HPLC-DAD v jahodách	37
7.4	Stanovení patulinu v ovocném džemu pomocí UHPLC.....	38
7.5	Stanovení patulinu v jablečném džusu pomocí GC/MS	38
7.6	Stanovení patulinu v jablečném džusu pomocí mikro liquid-liquid-liquid extrakce	39
7.7	Stanovení patulinu pomocí magnetické extrakce na pevné fázi	40
7.8	Kvantitativní stanovení patulinu v jablečném džusu pomocí tenkovrstvé chromatografie	41
7.9	Stanovení patulinu pomocí kapilární zónové elektroforézy.....	42
8.	ZÁVĚR	46
9.	POUŽITÁ LITERATURA	47

1. POUŽITÉ ZKRATKY

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
ATP	adenosintrifosfát
BFCA	benzofuran-2-karboxylová kyselina
CAS	jednoznačný numerický identifikátor
CCD	charge-coupled device
CFME	continuous-flow microextraction
DAD	detektor diodového pole
DI-SDME	direct immersion single-drop microextraction
DLLME	dispersive liquid-liquid microextraction
dSPE	disperzní extrakce na tuhou fázi
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
ESI	ionizace elektrosprejem
FLD	fluorescenční detektor
GC	plynová chromatografie
GPC	gelová permeační chromatografie
HF-LPME	hollow fibre liquid phase microextraction
HMF	5-(hydroxymethyl)furfural
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HS-SDME	headspace single-drop microextraction
IAC	imunoafinitní chromatografie
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a aplikovanou chemii
LD ₅₀	střední smrtná dávka určující míru akutní toxicity
LH	luteinizační hormon
LLE	extrakce kapalina-kapalina

LLLME	liquid-liquid-liquid microextraction
MALDI	laserová desorpce za účasti matrice
MBTH	3-methyl-2-benzothiazolin hydrazon hydrochlorid
MF	mobilní fáze
MIP	molekulárně vtištěné polymery
MS	hmotnostní spektrometrie
MSA	6-methylsalicylová kyselina
MSPE	magnetická extrakce na pevnou fázi
PAT	patulin
PMTDI	prozatímní maximální tolerovaný denní příjem
RP	reverzní fáze
SDME	single-drop microextraction
SFE	superkritická fluidní extrakce
SPE	extrakce na pevnou fázi
T3	trijodthyronin
T4	thyroxin
TLC	tenkovrstvá kapalinová chromatografie
TSH	thyreotropin
UHPLC	ultra účinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelné záření

2. ÚVOD

Patulin je mykotoxin vyskytující se v potravinách, který může u člověka vyvolat lehké až vážné zdravotní potíže. Nebezpečný může být zejména pro malé děti, které ještě nemají vyvinutý obranný systém proti toxickým látkám. Proto byly stanoveny přísné limity Evropskou komisí, které jsou uvedeny v tabulce v textu. Nejčastěji stanovovanými potravinami jsou jablka a jablečné produkty, kde se patulin vyskytuje nejvíce.

První část bakalářské práce se zabývá obecným popisem tohoto mykotoxinu, jeho fyzikálními a chemickými vlastnostmi, biosyntézou a toxicitou.

V druhé části práce jsou popsány metody, kterými lze množství patulinu v různých produktech stanovit. Jsou zde popsány nejpoužívanější metody od původních nedokonalých po nové, používané v dnešní moderní analýze. V závěru práce jsou jednotlivé metody stanovení přehledně shrnuty do tabulky. Převážná většina informací byla čerpaná z odborných článků a odborné literatury.

3. ZADÁNÍ A CÍL PRÁCE

Zadáním a zároveň cílem této rešeršní bakalářské práce bylo nalézt a zpracovat informace o mykotoxinu patulinu a popsat metody, pomocí kterých je možné patulin stanovit.

4. MYKOTOXINY

Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity produkované plísněmi, které mohou kontaminovat širokou škálu potravin, potravinových doplňků a krmiv. Tyto potraviny mohou být patogenní pro lidi i zvířata, a proto je přítomnost těchto látek pro lidstvo velkou obavou. V současné době je známo několik set druhů mykotoxinů, z nichž největší pozornost věnujeme těm, které se mohou dostat do potravního řetězce lidí a zvířat. Jejich působení vyvolává různé toxické syndromy, kterým říkáme mykotoxikózy. Každý mykotoxin způsobuje jiné potíže a jeho toxicita závisí především na délce působení, dávce, věku postiženého a na jeho celkovém zdraví. Většina mykotoxinů negativně působí na játra, ledviny a imunitní systém. Přítomnost plísní v potravinách je tedy až na výjimky nežádoucí [1], [2].

K výskytu mykotoxinů dochází před sklizní v důsledku nepříznivých teplot, vlhkosti, nebo po sklizni během skladování, zpracování, balení nebo distribuce. Ke kontaminaci dochází přirozeně a je těžké se ji vyhnout i při dodržování zemědělských a výrobních postupů [3].

Obecné analýzy mykotoxinů jsou založeny na fyzikálně-chemických vlastnostech. Toxicita mykotoxinů se vyskytuje při velmi nízkých koncentracích, a proto je nutné použít velmi citlivé, selektivní a spolehlivé metody pro jejich stanovení. V současné době se vyvíjejí rychlé a přesné metody pro kvantitativní i kvalitativní analýzu mykotoxinů. Běžnými metodami pro stanovení jsou tenkovrstvá chromatografie (TLC), vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) s UV, DAD, FLD nebo MS detekcí, plynová chromatografie (GC), ultra účinná kapalinová chromatografie (UHPLC), nebo imunoenzymatická metoda ELISA [4].

Zatím je známo více než 300 druhů mykotoxinů. Mezi významné skupiny stanovovaných mykotoxinů v potravinách patří aflatoxiny, ochratoxiny, zearalenon, trichoteceton, deoxynivalenol a patulin [3].

4.1 Aflatoxiny

Aflatoxiny jsou mykotoxiny produkované kmeny *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*. Zejména *Aspergillus flavus* je běžným kontaminantem v zemědělství. Mezi nejčastěji stanovované aflatoxiny se řadí: B1, B2, G1 a G2.

Aflatoxin B1 je nejsilnějším známým karcinogenem. Aflatoxin nejčastěji kontaminuje obiloviny, ořechy, olejninu, koření a další potraviny a krmiva. Ke kontaminaci může dojít před sklizní důsledkem velkého sucha, nebo po sklizni při skladování, kdy je největším problémem vlhkost vzduchu. Kontaminace krmiva aflatoxinem souvisí se zvýšenou úmrtností hospodářských zvířat. Může dojít i ke kontaminaci mléčných výrobků, pokud budou hospodářská zvířata konzumovat aflatoxinem napadené krmivo. V játrech dochází k metabolické přeměně aflatoxinu B1 do hydroxylované formy nazývané jako aflatoxin M1. Aflatoxin způsobuje toxicitu a karcinogenitu jak u lidské tak i zvířecí populace. Onemocnění vyvolané tímto mykotoxinem se nazývá aflatoxikóza. Akutní aflatoxikóza vede ke smrti, chronická toxicita vede k rakovině nebo potlačení imunity. Primárním cílovým orgánem jsou játra [5].

4.2 Ochratoxin

Nejznámější ochratoxin A je produkován řadou různých druhů *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger* a další). Ochratoxiny můžeme nalézt v ječmenu, žitu, kávových zrnech, kakaových bobech, dále v nápojích jako je pivo a víno. Ochratoxin A je považován za karcinogen, teratogen a silný nefrotoxin. Kromě toho inhibuje syntézu ATP v mitochondriích [5], [6].

4.3 Zearalenon

Zearalenon se řadí mezi mykotoxiny, avšak svou chemickou strukturou se podobá spíše 17 – β - estradiolu (hormon produkováný ženskými pohlavními orgány). Zearalenon se někdy též nazývá jako fytoestrogen. Je to sekundární metabolit *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, nebo *Fusarium equiseti*. Nejčastěji se nachází v mouce a obilných produktech. Při konzumaci nakaženého obilí prasaty, skotem, nebo ovcemi byly pozorovány reprodukční problémy. Redukovaná forma zearalenonu má zvýšenou estrogení aktivitu. Zearalenon byl také užíván k léčbě postmenopauzálních příznaků u žen a byl patentován jako perorální antikoncepce [5], [7].

4.4 Trichotheceny

Trichotheceny tvoří metabolity produkovaných řadou rodů plísní jako například *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichoderma* a další. Obvykle se vyskytují jako kontaminující látky v potravinách a krmivech. Konzumace těchto mykotoxinů může způsobit krvácení do žaludku a zvracení, přímý kontakt způsobuje dermatitidu. Mezi trichotheceny se řadí diacetoxyscirpenol, deoxynivalenol, T-2 a další méně známé mykotoxiny. Deoxynivalenol je jedním z nejběžnějších mykotoxinů v zrnech obilí. Při požití velkých dávek zemědělskými zvířaty způsobuje nevolnost, zvracení a průjem. U nižších dávek vykazují hospodářská zvířata úbytek hmotnosti a odmítnutí potravy. Z tohoto důvodu se někdy deoxynivalenolu říká vomitoxin. Tento mykotoxin je méně toxický než mnoho jiných trichothecenů, za to se vyskytuje v obilí, kukuřici a nejčastěji v krmivu. Další trichotheceny způsobují širokou škálu gastrointestinálních, dermatologických a neurologických příznaků. Mykotoxin T-2 a diacetoxyscirpenol mohou u lidí způsobit onemocnění nazývané jako alimentární toxická aleukie. Projevuje se záněty kůže, zvracením, nekrózou v dutině ústní, krvácením z nosu a úst a poruchami centrální nervové soustavy [5], [8].

Tato bakalářská práce je zaměřena na mykotoxin, který se nejčastěji vyskytuje v jablkách, jablečných a jiných ovocných výrobcích, a tím je mykotoxin patulin.

5. PATULIN

Patulin, jiným názvem leucopin, mycoin, nebo clavatin, je jedním z mykotoxinů produkovaný širokou škálou plísní jako jsou *Penicillium*, *Aspergillus*, *Byssochlamys*, *Eupenicillium* a *Paecilomyces*. Nejvýznamnějším producentem patulinu jsou *Penicillium patulinum* a *Penicillium expansum* [9].

Patulin se vyskytuje u různých druhů nahnílého ovoce jako například jablka, hrušky, hrozny, pomeranče, broskve, jahody, černý rybíz a další. Dále se vyskytuje v zelenině (rajčata), obilninách, měkkých a sýrech [10].

Patulin se vyskytuje hlavně u plodů poškozených plísněmi, avšak neznamená to, že plod nakažený plísní bude patulin obsahovat. Plíseň pouze naznačuje možnou přítomnost patulinu. Přesto by se měla zhodnotit senzorická stránka suroviny před tím, než dojde k výrobě určitého produktu. Růst plísní je také velmi ovlivňován počasím. Vlhké podnebí v období sklizně zvyšuje riziko hniloby. Patulin se nevyskytuje pouze v zemědělských plodinách a jejich produktech, ale může být dokázán i v mase, které je kontaminované po nakrmení zvířat obilninou napadenou plísní *Aspergillus clavatus*. [11] Ve větší míře se však tento mykotoxin vyskytuje ve výrobcích z jablek, jako jsou jablečné mošty, džusy, nebo dětské přesnídávky. Tyto produkty se nejčastěji vyrábějí z poškozených (mechanicky nebo hmyzem) a popadaných jablek. Je zde tedy vyšší riziko kontaminace nežádoucími organismy. Kontaminace potravin je nevyhnutelným a nepředvídatelným globálním problémem. Mykotoxiny mohou nakazit zemědělské plodiny během jejich růstu, sklizně, skladování nebo zpracování i tam, kde jsou správné zemědělské postupy. Celková kvalita potravin je vysoce závislá na kvalitě výchozích surovin. Na kvalitu ovoce a zeleniny mohou mít ve velké míře vliv podmínky, při kterých se tyto potraviny uchovávají. Pro růst patulinu je nejideálnější teplota mezi 4–25 °C, proto je vhodné skladovat čerstvé potraviny co nejkratší dobu, aby se zabránilo vzniku kontaminace [12], [13].



Obrázek 1: Jablko kontaminované patulinem – postup hniloby [14]

5.1 Metody potlačení růstu patulinu

Existuje mnoho metod, které mají vliv na snížení možnosti kontaminace jablek či jablečných produktů patulinem. K potlačení růstů plísní se například osvědčilo balení do ochranné atmosféry, kde je vyšší obsah oxidu uhličitého a nízký obsah kyslíku. Další možností pro kontrolu růstu plísní a mykotoxinů při skladování je aplikace fungicidů. Pro ochranu ovocných plodů se používají například benzimidazolové fungicidy, fludioxonil nebo roztok chlornanu sodného [15].

5.1.1 Fyzické odstranění plísní

Až 54 % patulinu lze odstranit z infikovaného ovoce nebo zeleniny omýváním vodou, nebo ponořením do vody. Mytím odstraníme případné nečistoty, hmyz, nebo plísně. Patulin je navíc ve vodě rozpustná molekula, takže může být tímto způsobem odstraněna. Dříve se doporučovalo, aby se před zpracováním a skladováním vyřízla poškozená část plodu. Tímto způsobem se obsah patulinu zredukuje, avšak patulin je schopný difuze v plodu, což znamená, že pro dekontaminaci nestačí pouze fyzicky odstranit napadenou část, protože jablko je kontaminované v celém svém objemu. Napadená jablka či jiné potraviny je tedy třeba vyřadit. Existují další kroky, kterými můžeme snížit obsah patulinu [12], [15].

5.1.2 Fermentace

Fermentace či kvašení je proces, při kterém působí mikroorganismy a jejich enzymy a přeměňují cukry na alkohol, plyn nebo kyseliny. Pro degradaci patulinu v jablečné šťávě se osvědčilo působení kvasinky *Saccharomyces cerevisie*, která

je schopná snížit obsah patulinu až o 90 %. Proto se patulin nenachází v alkoholických ovocných nápojích (cider, kalvados). Patulin byl ale nalezen u fermentovaných produktů, do kterých byla dodatečně přidána jablečná šťáva [16], [18].

5.1.3 Tepelné úpravy

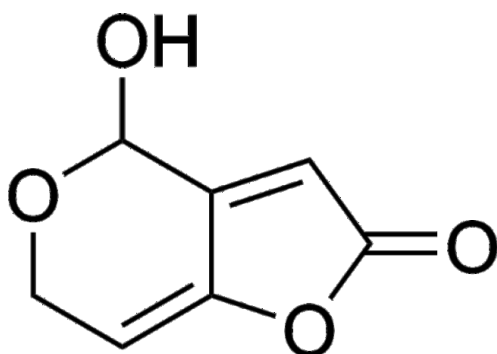
Tepelná úprava, jako například pasterizace, je běžný způsob konzervace potravin. Pasterizace je mírné tepelné ošetření, které slouží k prodloužení doby skladování. Teplota, která se však pro ošetření používá (většinou kolem 75-79 °C) je nedostačující, jelikož patulin je relativně stabilní do teploty 100 °C a není tímto procesem rozložen. Jeho obsah lze snížit zahříváním při 120 °C po dobu 20 minut o 93 %. Tím ale zároveň dochází k degradaci nutričních látek (vitamín C) [17].

5.1.4 Ultrafialové záření

Ultrafialové záření (UV) je metoda, která se typicky používá k ničení mikroorganismů. Osvědčila se i při degradaci patulinu. Po vystavení UV záření došlo ke snížení obsahu patulinu až o 43 % a zároveň nedošlo ke změnám složení, degradaci nutričních látek, změnám pH nebo změně sensorických vlastností. Účinnost této metody může snížit zákal, který se objevuje v ovocných mošttech. Zákal lze odstranit čistícími či filtračními procesy. Dále může metodu ovlivnit kyselina askorbová, která se do šťáv přidává pro její antioxidační vlastnosti. Redukce patulinu v jablečné šťávě byla neúčinnější při ozařování světlem o vlnové délce 222 nm [15].

5.2 Fyzikální a chemické vlastnosti

Strukturní vzorec:



Obrázek 2: Strukturní vzorec patulinu [19]

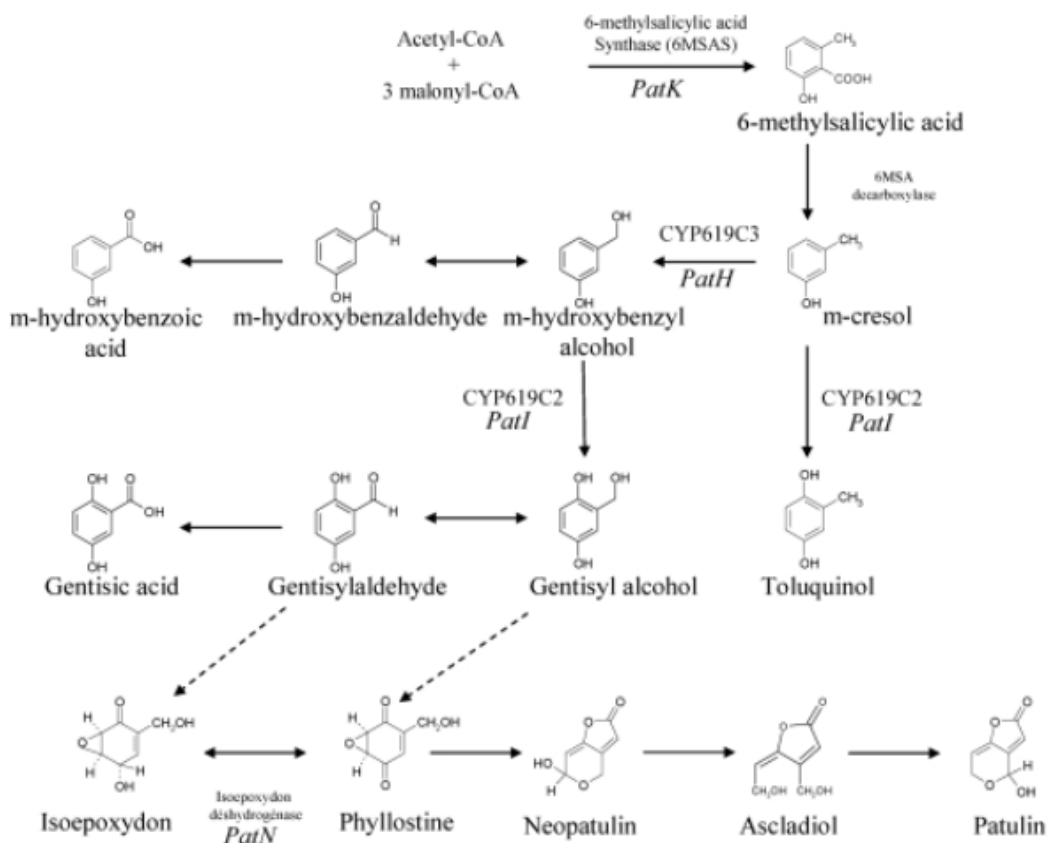
Název IUPAC:	4-hydroxy-4H-furo[3,2-c]pyran-2(6H)-one
Další názvy:	2-hydroxy-3,7-dioxabicyklo[4.3.0]nona-5,9-dien-8-on Claviform, Expansin, Clavacin, Clavatin, Gigantin, Leucopin, Clairformin
Sumární vzorec:	C ₇ H ₆ O ₄
Číslo CAS:	149-29-1
Molekulová hmotnost:	154,12 g/mol
Bod tání:	105 – 108 °C, po vysušení 1 hodina při 60 °C
Rozpustnost:	Rozpustný ve vodě a organických rozpouštědlech, alkoholech, acetonu, benzenu, chloroformu, etylacetátu Nerozpustný v petroleteru
Absorpční maximum:	$\lambda_{\max} = 276 \text{ nm}$
Popis:	Bílá krystalická látka bez zápachu [9]

5.3 Biosyntéza patulinu

Patulin je nenasycený heterocyklický lakton s polyketidovou strukturou. Polyketidy jsou velká skupina sekundárních metabolitů, které obsahují karbonylové a methylenové skupiny. Polyketidy jsou syntetizovány v bakteriích, houbách nebo rostlinách postupnou kondenzací acetyl-CoA nebo propionyl-CoA s malonyl-CoA.

Biosyntetická dráha patulinu je dobře prozkoumaná a zahrnuje několik kondenzačních a redoxních reakcí, které jsou katalyzované enzymy. Prvním krokem při vzniku patulinu je tvorba kyseliny 6-methylsalicylové (6-MSA) kondenzací jedné molekuly acetyl-CoA se třemi molekulami malonyl-CoA. Tato reakce je zprostředkována enzymem 6-methylsalicylát syntázou, který má několik enzymatických aktivit a skládá se ze čtyř identických polypeptidových řetězců. Dalším krokem biosyntézy patulinu je konverze 6-MSA na m-kresol prostřednictvím enzymu 6-MSA dekarboxylázy. Poté se methylová skupina m-kresolu oxiduje za vzniku aldehydové skupiny. Tento krok je následován hydroxylační reakcí, která vede k tvorbě

gentisaldehydu. Hydroxylace vyžaduje aktivitu NADPH a molekulárního kyslíku. Dále následuje přeměna gentisaldehydu na strukturu se dvěma kruhy, vyžadující otevření kruhu zprostředkované monooxygenázou nebo dioxygenázou. Vznikají postupně 4 postaromatické prekurzory patulinu: isoepoxydon, phyllostin, neopatulin a ascladiol. Existuje možná hypotéza, že po syntéze gentisaldehydu nastává epoxidační krok. Syntéza patulinu je regulována množstvím živného dusíku v půdě. Čím více dusíku je, tím se zvyšuje jeho syntéza. To ale neplatí pro všechny dusíkaté sloučeniny. Například při přidání amoniových iontů dochází rychle ke ztrátě sekundárního metabolismu. K potlačení biosyntézy nedochází ani u uhlíku. Glukosa je optimální zdroj sacharidů pro syntézu patulinu. Bylo prokázáno, že také mangan je základním požadavkem pro biosyntézu. Mangan působí při biosyntéze na úrovni transkripce. K optimální transkripci dochází, když je hodnota pH půdy 5,0 a snižuje se při zvýšení nebo snížení pH [20].



Obrázek 3: Biosyntéza patulinu [20]

5.4 Toxicita patulinu

Patulin byl poprvé izolován v roce 1943 z *Penicillium griseofulvum* a *Penicillium expansum*. Původně byl studován jako antibiotikum, ale později byl zavržen kvůli své vysoké toxicitě jak u lidí, tak zvířat, a z důvodu objevení jiných a účinnějších antibiotik. Studie prokázaly, že patulin je genotoxický, mutagenní, teratogenní a imunotoxický [21].

5.4.1 Akutní toxicita

Při pozorování u hlodavců bylo zjištěno, že hodnota LD₅₀ při perorálním podání se vyskytuje po podání 29-55 mg/kg tělesné hmotnosti. Při intravenózním, intraperitoneálním nebo subkutánním podání je patulin 3 – 6x toxičtější. Projevy, které se po podání objevily jsou: křeče, dyspnoe, plicní kongesce, edém, ulcerace nebo distenze gastrointestinálního traktu. Patulin mění funkci intestinální bariéry a střeva jsou prvním orgánem, které jsou v kontaktu s mykotoxinem [20].

5.4.2 Subakutní toxicita

U potkanů se studovala subakutní toxicita a prokázalo se, že podání patulinu způsobuje úbytek váhy, změny žaludku a střev a změny renálních funkcí. Opakované dávky vedou ke změnám neurotoxicity (třes, křeče) a inhibici několika enzymů. Podobné účinky byly pozorovány u myši, křečků a kuřat. U opic nebyly pozorovány žádné známky toxicity. Pouze opice, které dostávaly 5 mg patulinu na kilogram tělesné hmotnosti po dobu dvou týdnů odmítaly poslední tři dny svou potravu. Měřily se také hladiny hormonů u potkanů, kteří dostávali 0,1 mg/kg tělesné hmotnosti po dobu šedesáti nebo devadesáti dnů. Šedesátidenní expozice zvýšila hladinu testosteronu v plazmě a snížila hladinu hormonu T4. U hormonů T3, TSH a LH nedošlo k žádným změnám. Při devadesáti denní expozici se zvýšila hladina testosteronu a LH bez dalších klinických příznaků. Histologické vyšetření štítné žlázy ukázalo infiltraci lymfatických buněk a zvětšení intersticiální tkáně [20].

5.4.3 Genotoxické účinky

Výsledky testování na genotoxicitu byly různorodé, většina testů prováděných na savčích buňkách však byla pozitivní. Některé testy ukázaly, že patulin poškozuje

syntézu DNA. Tyto genotoxické účinky mohou souviset s jeho schopností reagovat se sulfhydrylovými skupinami nebo s volnými aminokyselinami proteinů. Patulin k nim má silnou afinitu, což vede k narušení propustnosti buněčných membrán a narušení aktivity enzymů [20].

5.4.4 Karcinogenita

V současné době nelze hodnotit, zda patulin způsobuje u člověka karcinogenitu. Z tohoto hlediska se patulin řadí do 3. kategorie, což znamená, že látka může vyvolat obavy k možným karcinogenním účinkům, ale informace o jejich karcinogenitě jsou nedostatečné [20].

5.4.5 Embryotoxicita a teratogenita

Patulin může způsobit poškození plodu. Podání 2 mg/kg tělesné hmotnosti u potkanů vyvolalo potrat u všech embryí. U myši stejná dávka, podávaná perorálně, vyvolala úmrtí potomků. Příčinou bylo plicní nebo kožní krvácení, nebo krvácení do mozku. Patulin také zvýšil frekvenci vadných embryí [20].

5.4.6 Imunotoxicita

Patulin může inhibovat některé makrofágové funkce, dále může dojít k inhibici syntézy bílkovin a změně membránových funkcí. Patulin také výrazně snižuje produkci kyslíku [20].

Nejvíce jsou intoxikací patulinu ohroženy malé děti. Kojenci mají oproti dospělým jedincům odlišné nutriční nároky. Konzumují specifickou stravu (velké množství jablečných produktů), která je v poměru k jejich hmotnosti vydatnější než u dospělých lidí. Děti také nemají ještě natolik vyvinutý detoxikační systém, a nemají se, jak chránit proti škodlivým vlivům různých kontaminantů. Největší problém, co se týče expozice mykotoxinů, se vyskytuje v rozvojových zemích, kde je nízká životní úroveň spojená s častějším výskytem potravin nakažených různými druhy plísní. Evropská komise proto navrhla limitní hodnoty pro patulin v kojenecké a dětské výživě na 10 µg/kg [22].

5.5 Limity pro patulin v potravinách

Tabulka 1: Maximální přípustné limity patulinu v některých potravinách podle Evropské komise [23]

Potraviny	Maximální limit (µg/kg)
Ovocné šťávy, rekonstituované koncentrované ovocné šťávy a ovocné nektary	50
Lihoviny, jablečné víno a jiné fermentované nápoje získané z jablek nebo obsahujících jablečnou šťávu	50
Pevné výrobky z jablek, včetně jablečného kompotu a jablečného pyré určené k přímé lidské spotřebě	25
Jablečná šťáva a pevné výrobky z jablek včetně jablečného kompotu a jablečného pyré, pro kojence a malé děti, takto označené a podávané	10
Jiné než obilné příkrmy pro kojence a malé děti	10

V tabulce jsou uvedeny maximální přípustné limity mykotoxinů pro potraviny dle Nařízení Komise 1881/2006 z roku 2006.

Maximální limity by měly být stanoveny na přísné úrovni, které je možno rozumně dosáhnout při dodržování správných zemědělských a výrobních postupů a měly by být stanoveny na co nejnižší dosažitelné úrovni.

Vědecký výbor pro potraviny na svém zasedání ze dne 8. března 2000 schválil prozatímní maximální tolerovaný denní příjem (PMTDI) patulinu 0,4 µg/kg tělesné hmotnosti [23].

6. ANALYTICKÉ METODY

Vysoké nároky na analýzu potravin vyžadují citlivé, spolehlivé, přesné a rychlé metody, kterými lze stanovit stopové koncentrace nežádoucích látek, zejména vysoce toxických mykotoxinů. Jednoznačná identifikace a přesná kvantifikace hraje zásadní roli v kontrole kvality potravin. Metody pro analýzu mykotoxinů zahrnují metody chromatografické, elektromigrační, imunoanalytické, či imunochromatografické. Na imunoanalytickém principu funguje metoda ELISA, při které dochází k reakci se specifickými protilátkami. Je to rychlá screeningová metoda. V případě pozitivního nálezu pak většinou následuje ověření referenční metodou. Chromatografické metody zahrnují TLC, HPLC-DAD, HPLC-FLD, LC-MS, nebo GC-MS. HPLC-MS se stala hlavní metodou pro analýzu mykotoxinů. Tato metoda na rozdíl od metody GC-MS nevyžaduje derivatizaci a nemá tak vysoké požadavky na přípravu vzorku. Kapilární elektroforéza navzdory velké separační účinnosti, krátké době analýzy a všestrannosti nezískala takovou popularitu jako HPLC pro analýzu mykotoxinů. To je způsobeno pravděpodobně jejími horšími detekčními limity pokud není ve spojení s MS [24], [25].

Abychom dosáhli co nejspolehlivějších výsledků, je nutné před vlastní analýzou provést několik základních kroků. Mezi tyto kroky patří odběr vzorku, příprava vzorku, extrakce a čištění [26].

6.1 Příprava vzorků

Příprava vzorků je prvním a zásadním vícestupňovým procesem při analýze. Správný postup při odběru vzorku, mletí a homogenizaci je předpokladem pro získání spolehlivých analytických výsledků. Příprava začíná odebráním vzorků do vhodné, čisté nádoby, aby nedošlo ke kontaminaci, nebo k jeho poškození. Proto, abychom získali reprezentativní vzorek, je potřeba udělat opatření, aby nedošlo k ovlivnění obsahu mykotoxinu. Počáteční množství toxinu by mělo být zachováno. Kontaminace mykotoxiny bývá obvykle heterogenní. Často se vyskytují problémy při odběru vzorku a přípravě homogenního vzorku. Při odběru a přípravě vzorku záleží na tom, v jakém stavu se nacházejí – pevném nebo kapalném. Kapalně vzorky by se měly před odebráním důkladně promíchat. U těchto vzorků se dá předpokládat, že je rozšíření v daném produktu rovnoměrné. U pevných vzorků se naopak předpokládá, že je jejich

rozšíření nerovnoměrné. Celý vzorek se musí jemně rozemlít a promíchat, aby došlo k homogenizaci. Následuje rozpuštění vzorku ve vhodném rozpouštědle [27].

Stanovované vzorky jsou často tvořeny makromolekulárními látkami a maticí která tvoří potíže při následné analýze. Mezi makromolekuly řadíme hlavně proteiny, lipoproteiny, lipidy a nukleové kyseliny. K odstranění těchto nežádoucích látek využíváme metodu zvanou denaturace. Při denaturaci dochází k narušení sekundární a terciární konformace bílkovin. Můžeme zvolit fyzikální denaturaci za zvýšené teploty nebo chemickou denaturaci za použití silných kyselin nebo zásad [28].

6.2 Metody extrakce

Extrakce je další důležitá část pro následující analýzu. Dochází při ní k oddělení analyzované látky od ostatních složek. Závisí na fyzikálně chemických vlastnostech vzorku. Extrakce může být prováděna metodami kapalina-kapalina (LLE), extrakcí na pevné fázi (SPE), superkritickou fluidní extrakcí (SFE), gelovou permeační chromatografií (GPC), nebo imunoafinitní chromatografií (IAC) [29].

6.2.1 Liquid-liquid extraction (LLE)

LLE je velmi účinná separační metoda, při které dochází k přenosu rozpuštěné látky z jednoho rozpouštědla do druhého. Tato dvě rozpouštědla jsou vzájemně nemísitelná, nebo částečně mísitelná. Často bývá jedním z rozpouštědel voda nebo vodná směs a druhá nepolární organická kapalina. Rozpouštědlem nemísitelným s vodou může být například chloroform, ethylacetát, toluen nebo diethylether. Výtěžnost extrakce závisí především na rozdělovacím koeficientu extrahovaných látek. Rovnovážený koeficient je poměr koncentrací rozpuštěné látky ve dvou nemísitelných nebo omezeně mísitelných rozpouštědlech. Rozdělovací koeficient je bezrozměrná veličina a je závislá na hodnotách pH. Metoda se často provádí při pH, kde je analyt neionizován, aby byl usnadněn přechod do organické fáze. Pokud máme analyty kyselé povahy, snížíme pH matrice a pak extrahujeme. Pokud je naopak analyt bazické povahy, pH v matrici zvýšíme. Pokud je analyt amfolytické povahy, tak upravíme pH v biomatrici na hodnotu izoelektrického bodu, nebo jednu funkční skupinu derivatizujeme a poté extrahujeme [30].

Tato metoda je v praxi vcelku často využívána, má však několik nevýhod. Extrakce je časově náročná, obtížně automatizovatelná a spotřebovává se při ní velké množství nebezpečných rozpouštědel. LLE je málo účinná pro vysoce polární sloučeniny a nemůže být specifická pro určitý analyt, protože rozpouštědlo může extrahovat všechny molekuly, které mají podobné fyzikálně chemické vlastnosti. Schopnost extrahovat velké množství analytů, které se liší strukturou a chemickou povahou, vyžaduje kombinaci rozpouštědel s různou polaritou [31].

Extrakce se nejčastěji prováděla v dělicí nálevce vytřepáváním. Nálevka se naplní roztokem a přidá se do ní vhodné rozpouštědlo, ve kterém je extrahovaná látka dobře rozpustná. Nálevka s daným obsahem se uzavře, protřepe a nechá se stát, než dojde k oddělení složek. Čím bude větší rozdělovací koeficient analytu, tím lépe se analyt oddělí a vyextrahuje do organické fáze. LLE můžeme provádět jedнокrokově nebo víceřrokově. Opakováním extrakce s menším objemem rozpouštědla se účinnost dané metody zvýší.

V dnešní době je snaha zavádět nové techniky, které jsou více citlivé, snadněji automatizovatelné, selektivnější a hlavně mají nižší spotřebu organických rozpouštědel a menší produkci toxického odpadu. Proto se dnes často využívá extrakce na mikrotitračních destičkách či extrakce přímo do malých HPLC vialek v objemu 1-5 ml. Tím se extrakce stává levnější a zároveň i šetrnější k životnímu prostředí.

Mikroextrakce kapalnou fází (liquid-phase microextraction (LPME)) se vyznačuje zkrácením času extrakce oproti klasické LLE, není tolik náročná na provedení, obsahuje méně kroků, a vyžaduje minimální objemy rozpouštědel. Analyty se zde také rozdělují mezi vodnou a organickou fází, které jsou vzájemně nemísitelné. Mezi LLME techniky řadíme: single-drop microextraction (SDME), hollow fibre liquid phase microextraction (HF-LPME) a dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME). SDME se dále dělí na direct immersion (DI-SDME), headspace (HS-SDME), liquid-liquid-liquid microextraction (LLLME) a continuous-flow microextraction (CFME) [32].

6.2.2 Solid-phase extraction (SPE)

Častěji využívanou metodou pro přípravu vzorků je metoda SPE. Slouží k rychlému a snadnému oddělení požadovaného analytu z kapalného vzorku, nebo k oddělení od nečistot. Tato metoda má oproti LLE několik výhod. SPE není tolik

náročná na provedení. Celý proces zabere méně času, a přitom dochází k účinnější separaci s vyšší čistotou extraktu. Další výhodou je nižší spotřeba organických rozpouštědel. Pracuje se s menším objemem vzorku, takže je metoda rychlejší, efektivnější, levnější a více bezpečná. Nevýhodou je, že pro všechny látky nejsou na trhu dostupné vhodné SPE kolonky, a že jsou pouze na jedno použití, takže je velká spotřeba materiálu. Principem separace je zadržení požadované látky na pevné fázi ohraničené fritami, která je umístěna v kolonce. Extrakci obvykle tvoří čtyři následující kroky [33].

6.2.2.1 1.fáze – aktivace SPE kolonky

V prvním kroku je nutná aktivace SPE kolonky, která je většinou na bázi silikagelu modifikovaného reverzní fází (RP). V suchém, neaktivním stavu není kolonka s reverzní fází připravena k zachytu analytů. Promytí sorbentu vhodným rozpouštědlem vytvoří vhodné podmínky pro následující nanesení vzorku. K promývání se obvykle používá methanol, acetonitril, ale i další organická rozpouštědla.

6.2.2.2 2.fáze – aplikace matrice obsahující analyty

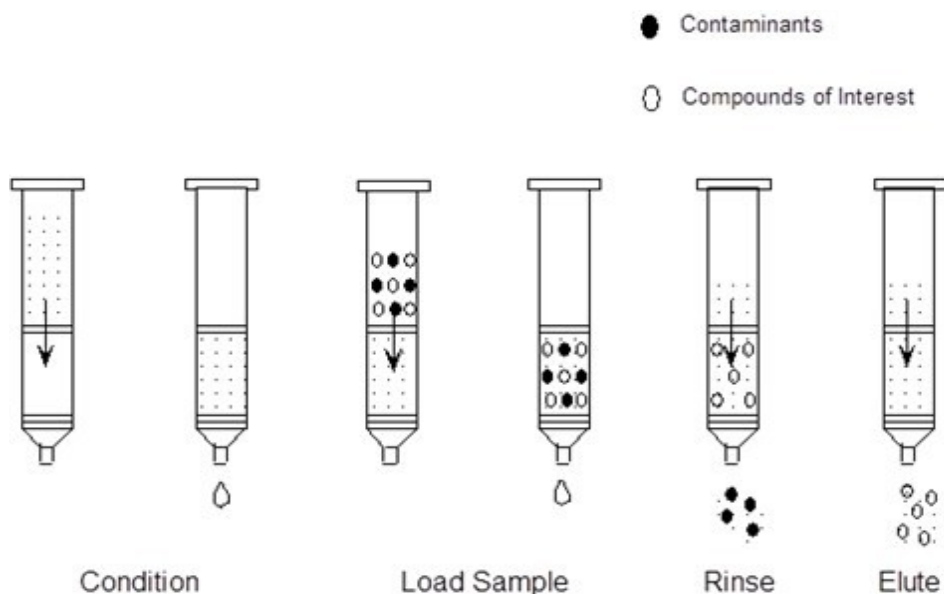
Ve druhé fázi dochází k aplikaci naředěné matrice ve vhodném rozpouštědle, která obsahuje analyty. Analyty se zachytí na sorbentu a většina balastu se vyplaví z kolonky.

6.2.2.3 3.fáze – aplikace vody nebo pufru (promytí)

V této fázi se do kolonky aplikuje voda nebo vhodný pufr a dojde k vymytí a odstranění zbytků matrice. V kolonce zůstane zachycený prakticky pouze analyt.

6.2.2.4 4.fáze – vymytí analytu (eluce)

V posledním kroku, po vymytí všech komponent kromě analytu, se na kolonku nanese vhodný eluent, který má vyšší eluční sílu než voda a vyplaví analyt do připravené zkumavky. Používá se methanol nebo acetonitril [34], [35].



Obrázek 4: Průběh SPE extrakce [36]

Podstatou úspěšné extrakce je volba vhodného sorbentu. Ideálně by měl být specificky zadržován pouze analyt, ale často se s analytem zadržují i některé nežádoucí interferující látky. Podle typu analytu bychom tedy měli zvolit SPE na reverzních (obrácených) fázích, SPE na normálních fázích, iontoměničce nebo afinitní sorbenty.

Reverzní fáze je tvořená polární nebo středně polární maticí a nepolární stacionární fází. Analyt bývá středně polární až nepolární. Nejčastěji se používá modifikovaný oxid křemičitý C-18, stacionární fáze na bázi polymeru, nebo stacionární fáze na bázi grafitického uhlíku.

Normální fáze SPE je tvořena středně až nepolární maticí a polární stacionární fází. Analyt je také polární. Stacionární fází bývá nejčastěji silikagel. Silikagelové sorbenty jsou levné, snadno se derivatizují, ale mají nevýhodu v tom, že jsou chemicky nestabilní [37].

V SPE hraje významnou roli pH. Stejně jako u HPLC platí, že silikagel je stabilní v rozmezí pH 2-7, proto jsou vhodnější modifikované stacionární fáze, které bývají stabilní v celém rozsahu pH, to znamená od 1 do 14.

Iontově výměnná SPE je použita pro sloučeniny, které jsou v roztoku v ionizované formě. Rozlišujeme dva typy měničů iontů. První jsou anexy, které slouží k výměně aniontů, a druhé katexy, které mění kationty [38].

6.2.3 On-line SPE

Extrakci SPE můžeme provádět i v on-line uspořádání, kdy je proces spojen přímo s metodou HPLC. Výhodou je, že můžeme vzorek dávkovat přímo do systému a nepředchází tomu samotná úprava vzorku. Provoz je plně automatizovaný. Touto on-line metodou můžeme zvýšit přesnost a citlivost prováděné analýzy [39].

6.2.4 dSPE (QuEChERS)

Tato metoda extrakce byla zavedena s cílem nahradit původní extrakční metody, které jsou mnohdy náročné na provedení i vybavení a tím i drahé. Zkratka QuEChERS v sobě skrývá šest anglických slov: quick, easy, cheap, effective, rugged a safe. V překladu se tedy jedná o metodu, která je rychlá, jednoduchá, levná, vysoce účinná, robustní a bezpečná. Oproti SPE, kde pro odstranění interferujících látek potřebujeme více kolonek, metodou QuEChERS odstraníme proteiny, barviva, sacharidy a další interferující látky v jednom kroku. Nejdříve provádíme extrakci homogenního vzorku za použití malého množství organického rozpouštědla a roztoků solí, a následně extrahujeme a přečišťujeme organické vrstvy pomocí disperzní SPE (dSPE). Takto připravený přečištěný extrakt je vhodný pro analýzu GC nebo HPLC technikami [40].

6.2.5 Superkritická fluidní extrakce (SFE)

Superkritická fluidní extrakce je metoda, při které je rozpouštědlo převedeno do nadkritického (superkritického) stavu. SFE je použitelná pouze pro látky, které snášejí nadkritické podmínky. Nadkritický stav, je stav tekutiny, která se nachází nad svou kritickou teplotou a nad kritickým tlakem. Nadkritickou teplotou a tlakem rozumíme teplotu nad 31 °C a tlak nad 73 MPa. Nadkritická tekutina má některé vlastnosti blízké se vlastnostem tekutin a jiné vlastnostem plynu. Nejčastějším extrakčním činidlem je oxid uhličitý, který je chemicky stabilní, dobře dostupný, levný, bezpečný, není toxický, korozivní a hořlavý. Protože má oxid uhličitý nepolární charakter, přidávají se k němu při extrakci organické modifikátory, například methanol, ethanol, nebo acetonitril. SFE se vyznačuje vysokou účinností a malou spotřebou rozpouštědel, její provedení je však velmi náročné [41].

6.2.6 Gelová permeační chromatografie (GPC)

GPC je metoda vhodná pro přečištění vzorků a stanovení patulinu i dalších mykotoxinů. K separaci dochází na základě velikosti molekul analyzovaných látek. Stacionární fází tvoří gel, který obsahuje póry, do kterého pronikají částice určité velikosti. Velké molekuly do pórů neproniknou a jsou uneseny proudem mobilní fáze. Takto můžeme oddělit vysokomolekulární nežádoucí látky od nízkomolekulárních analytů [42], [43].

6.2.7 Imunoafinitní chromatografie (IAC)

Pro analýzu některých mykotoxinů je vhodné i použití imunoafinitních kolonek. IAC je separační metoda, která je založená na afinitě protilátek. Pomocí této metody můžeme izolovat konkrétní antigen nebo protilátku. Imunoafinitní kolonky jsou vhodné pro čištění vzorků potravin a jejich následnou analýzu. Použité protilátky vykazují vysokou specifitu vůči příslušnému mykotoxinu. Kolonky jsou malé a jejich použití vede k výraznému snížení spotřeby rozpouštědel a času zpracování. Kolonky umožňují rychlou a jednoduchou přípravu vzorku. Jejich nevýhodou je vysoká cena a nízká stabilita a životnost [42].

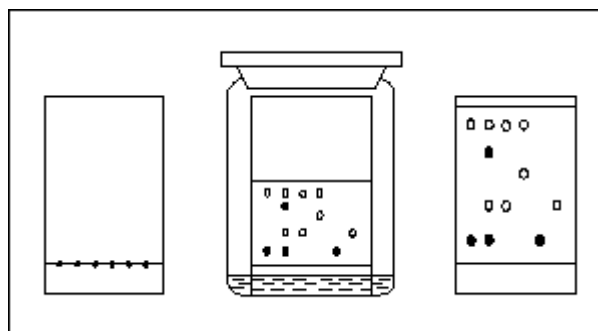
6.3 Chromatografické metody

Chromatografické metody jsou fyzikálně-chemické metody, při kterých dochází k rozdělení vzorku mezi dvě fáze (stacionární a mobilní). Chromatografie může probíhat buď v plošném nebo kolonovém uspořádání. Podle toho pak rozlišujeme chromatografii tenkovrstvou, která je příkladem plošného uspořádání a chromatografii kapalinovou nebo plynovou, při kterých dochází k separaci analyzovaného vzorku na chromatografické koloně.

6.3.1 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

TLC je velmi rozšířená separační metoda. Spolu s papírovou chromatografií se řadí mezi plošné chromatografické metody. U papírové chromatografie tvoří stacionární fází papír, u TLC je to hliníková destička pokrytá sorbentem, nejčastěji silikagelem. Na destičce, která může být různě veliká (nejméně však alespoň 5 x 5 cm), se označí startovací linie a na ní se poté nanese vzorek tenkou kapilárou. Kromě vzorku

se na destičku nanášejí standardy. Destička s nanesenými látkami se vloží do vyvíjecí komory, která je nasycena parami elučního činidla. Rozpouštědlo začne vzlínat vzhůru a unáší s sebou analyzované složky vzorku. Proces ukončíme, až vyvíjení dosáhne tzv. čela, destičku vyndáme a necháme jí usušit. Pokud nejsou složky barevné, použijeme činidla, která složky obarví. Někdy se používá pro detekci skvrn UV lampa. Poměr vzdálenosti skvrny od startu ke vzdálenosti startu od čela nám určí hodnotu retardačního faktoru. Nabývá hodnot od 0 do 1 a slouží ke kvalitativnímu vyhodnocení [29].

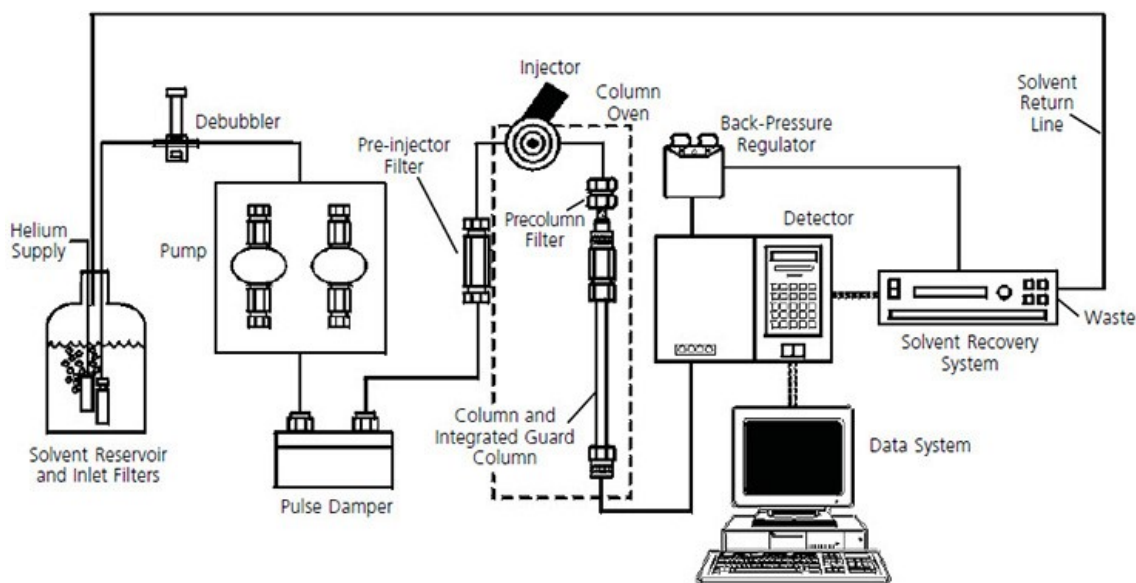


Obrázek 5: Princip TLC - 1) nanesení vzorku, 2) vyvíjení v komoře, 3) oddělené složky [44]

6.3.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC je rychlá separační metoda, která od sebe spolehlivě odděluje jednotlivé složky směsí. Je to v praxi velmi často využívaná laboratorní metoda. Při HPLC dochází k rozdělení látek ve směsi mezi mobilní a stacionární fázi. Mobilní fází je v tomto případě kapalina, která protéká chromatografickou kolonou a do zařízení je přiváděna za vysokého tlaku pomocí čerpadla. Stacionární fází je nejčastěji silikagel, který bývá modifikován reverzní fází. V HPLC rozeznáváme dva typy uspořádání fází, které může být normální (samotný silikagel), nebo častěji obrácené (reverzní). Při reverzních fázích se používají modifikované silikagely například silikagel s chemicky vázaným alkylem C18 (oktadecylsilikagel). Dnes bývá silikagel také často modifikován dalšími RP fázemi, jako jsou C-8, methyl, fenyl, fenyl-hexyl, pentafluorofenyl, nitril a jiné další [41].

Obecně se kapalinový chromatograf skládá z následujících částí: zásobníky mobilní fáze, odplyňovač mobilní fáze, směšovač, vysokotlaké čerpadlo, dávkovač vzorku, chromatografická kolona, termostat, detektor, počítač a software [41].



Obrázek 6: Schéma kapalinového chromatografu [45]

Separace látek může probíhat buď za isokratické nebo gradientové eluce. Při isokratické eluci se po celou dobu separace používá stálé složení mobilní fáze. Při eluci gradientové se mění složení mobilní fáze a to tak, aby v průběhu separace rostla eluční síla MF. Gradientová eluce vede ke zkrácení času analýzy, a ke snížené spotřebě organických rozpouštědel [41].

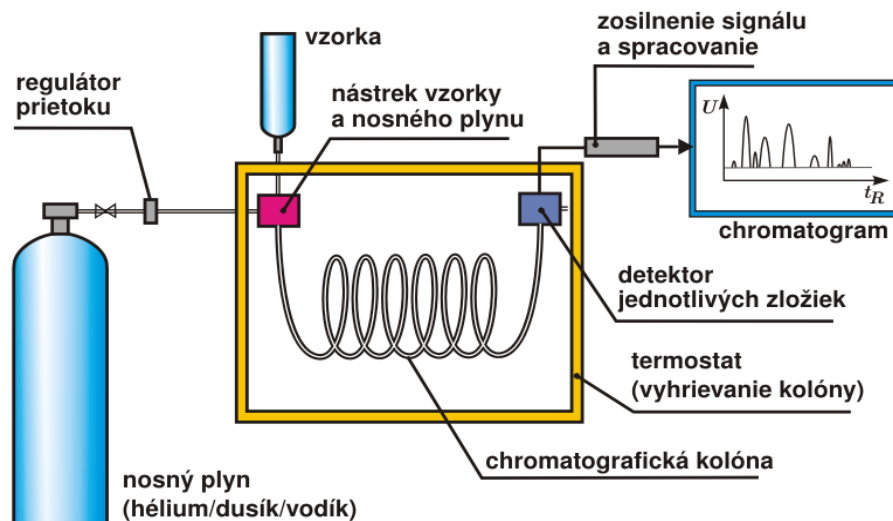
Průběh chromatografické separace zaznamenává detektor, umístěný co nejbližší za analytickou kolonou, aby nedocházelo k rozmývání separovaných zón. Ideální HPLC detektory by měly být vysoce citlivé, univerzální pro všechny analyty, nedestruktivní, lineární, spolehlivé a snadné pro použití. Často využívaný detektor je spektrofotometrický s UV nebo VIS detekcí, které absorbují záření v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm, případně PDA (DAD, detektory s diodovým polem), které snímají celé spektrum bez přerušení separace. Citlivé fluorescenční detektory měří emisní záření, které látka vyzáří po absorpci primárního záření. Dále rozeznáváme detektory elektrochemické, amperometrické, coulometrické, detektory na bázi aerosolu nebo refraktometrické. Nejmodernějším typem detektoru je hmotnostní detektor, který našel kromě analýzy potravin využití i v mnoha dalších aplikacích [41].

Výsledkem zpracování signálu je chromatogram, na kterém jsou zobrazeny píky jednotlivých oddělených složek vzorku. Osa x na chromatogramu udává retenční čas v minutách. Osa y popisuje odezvu detektoru. Metoda HPLC slouží ke kvalitativnímu i kvantitativnímu hodnocení vzorku. K identifikaci látek slouží retenční časy nebo retenční objemy. Hodnotu retenčního času můžeme získat pomocí vyhodnocovacího

softwaru. Každá látka má za určitých podmínek charakteristický retenční čas. Pro kvantitativní vyhodnocení používáme plochu pod píkem dané látky. Hodnocení probíhá metodou vnějšího nebo vnitřního standardu [46].

6.3.3 Plynová chromatografie (GC)

Plynová chromatografie je další separační metodou, která se oproti kapalinové chromatografii liší skupenstvím mobilní fáze. Mobilní fází je zde inertní plyn, který unáší vzorky v plynné fázi chromatografickou kolonou. Mobilní fáze neinteraguje se složkami vzorku, pouze je unáší. Nejčastěji používanými plyny jsou dusík, vodík nebo helium. Plynová chromatografie je vhodná pro analyty, které je možné převést do plynného stavu derivatizační reakcí. Vzorek by měl být těkavý a v průběhu separace by nemělo dojít k jeho degradaci. V plynové chromatografii se používají náplňové nebo kapilární kolony. Kapilární kolony jsou tvořeny křemennou kapilárou a její délka se pohybuje od 20 metrů výš. Náplňové kolony jsou oproti kapilárním kratší a jsou vyrobené ze skla nebo nerezové oceli. Kolona bývá umístěna v termostatu a teplota v celém systému by měla být přísně kontrolována. Plyny se dávkuje do proudu mobilní fáze dávkovacím ventilem. Používané detektory v plynové chromatografii by měly splňovat podobné podmínky jako u kapalinové chromatografie. Signál detektoru by měl mít nízkou úroveň šumu, měl by být stabilní a reprodukovatelný. Detektor by měl být také citlivý. V GC se používají detektory tepelně vodivostní, plamenově ionizační, plamenově fotometrický, detektor elektronového záchytu a další [29].

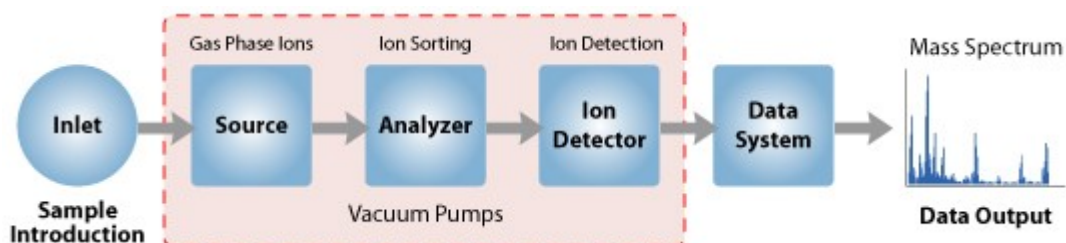


Obrázek 7: Schéma plynového chromatografu [47]

6.3.4 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie je metoda, při které dochází k převedení neutrálních molekul vzorku na ionizovanou plynnou fázi a následně k rozdělení vzniklých iontů podle podílu jejich hmotností a náboje m/z . MS je vysoce specifická a citlivá metoda, která poskytuje jak kvalitativní (strukturní) informace, tak i kvantitativní analýzu stopových koncentrací analytů. Při spojení hmotnostního spektrometru s dalšími separačními metodami, hlavně s kapalinovou nebo plynovou chromatografií, můžeme docílit ještě větší citlivosti. Proto se tandemové MS techniky používají pro analýzu stopových koncentrací mykotoxinů potravinách, ale nachází i mnoho dalších uplatnění [33].

Hmotnostní spektrometr se skládá z následujících částí: iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor a systém na sběr a vyhodnocení dat (počítač), jak je uvedeno na obrázku [48].



Obrázek 8: Blokové schéma hmotnostního spektrometru [49]

Iontový zdroj slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice. Může dojít k rozpadu na fragmentované ionty, které vznikají v závislosti na použitém způsobu ionizace. Rozlišujeme tvrdé a měkké ionizační techniky, a to na základě toho, jakou energií na molekulu působíme. Při tvrdé ionizaci (elektronová ionizace (EI)) je dodáváno velké množství energie a je vždy přítomna fragmentace molekuly. Zatímco u měkkých ionizačních technik je množství energie malé a z toho důvodu dochází k minimální fragmentaci. Výsledkem je vznik protonovaných nebo deprotonovaných molekul. Mezi měkké ionizační techniky patří ESI – ionizace elektrosprejem, APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku, MALDI – laserová desorpce za účasti matrice a jiné [29].

Hmotnostní analyzátor slouží k rozdělení iontů v plynné fázi za vakua podle poměru hmotnosti a náboje. Zejména vakuum je důležitou součástí každého hmotnostního spektrometru. Za vysokého vakua dochází k úspěšné separaci iontů a nedochází mezi nimi ke vzájemným kolizím. Nejčastěji využívanými analyzátory jsou iontová past, analyzátor doby letu, kvadrupólový analyzátor, magnetický analyzátor a iontová cyklotronová resonance [29], [33].

Detektory slouží k převedení iontů na použitelný signál, poté co jsou separovány hmotnostním analyzátorem. Nejčastějšími detektory používanými v hmotnostní spektrometrii jsou elektronový násobič a fotonásobič.

Výsledkem zpracování signálu vhodným zařízením, je hmotnostní spektrum, které nám udává závislost intenzity iontů na jejich m/z [48], [50].

6.4 Elektromigrační metody

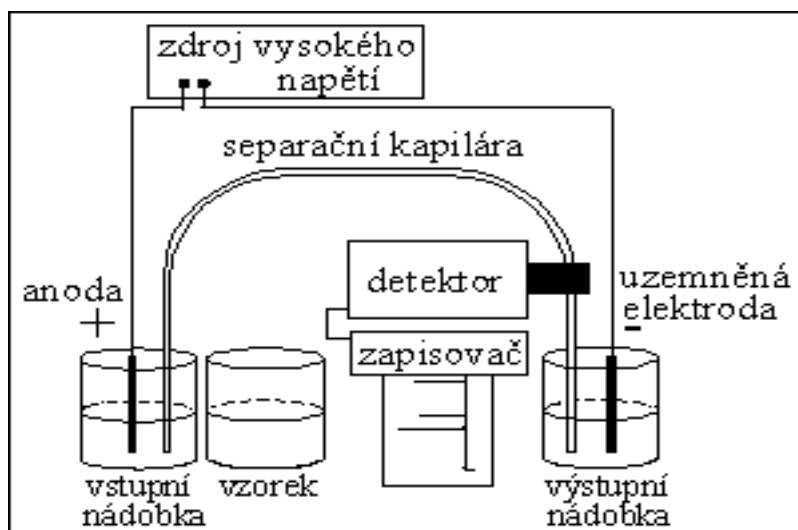
Elektromigrační metody patří mezi separační metody, které využívají dvou elektrokinetických jevů – elektroforézu a elektroosmózu. Elektricky nabitě částice se pohybují ve stejnosměrném elektrickém poli, které vzniká po vložení konstantního napětí mezi dvě elektrody. Kationty se pohybují směrem ke katodě, anionty k anodě a neutrální částice se nepohybují, nebo jsou unášeny elektroosmotickým tokem. Principem separace látek je rozdílná rychlost migrace částic v elektrickém poli. Každá látka je charakteristická elektroforetickou pohyblivostí, což je veličina, která udává rychlost pohybu určité nabitě částice v elektrickém poli. Částice s větší elektroforetickou pohyblivostí se pohybují rychleji a během separace se dostávají

dopředu na rozdíl od částic s menší pohyblivostí, které se pohybují pomaleji. Tímto pak dochází k rozdělení do jednotlivých zón [33].

6.4.1 Kapilární elektroforéza (CZE)

Kapilární elektroforéza je metoda založená na migraci elektricky nabitých látek kapilárou vlivem stejnosměrného elektrického pole.

Základní zařízení pro kapilární elektroforézu je tvořeno kapilárou, dávkovačem vzorku, zdrojem stejnosměrného vysokého napětí, ze dvou nádobek naplněných elektrolytem, do kterých jsou vloženy konce kapiláry, ze dvou elektrod, detektoru, termostatu a počítače [30].



Obrázek 9: CZE - přístrojové uspořádání [51]

CZE pracuje na podobném principu jako základní elektroforéza, pouze se liší uspořádáním. Namísto separačního gelu se zde využívá křemenná kapilára, která je obvykle pokrytá tenkou vrstvou polyamidu, který slouží ke snížení její křehkosti a poskytuje jí odolnost vůči prasknutí. Kapilára může být dlouhá asi 20 až 100 cm a její vnitřní průměr se pohybuje okolo 20-100 μm . Většina kapilár má na vnitřním povrchu záporný náboj, díky kterému vzniká elektroosmotický tok. Elektroosmotický tok je hybnou silou v CZE. Záporný náboj, který je na povrchu kapiláry, způsobuje přitahování kationtů z roztoku. Kationty migrují směrem ke katodě. Ke katodě putují v tomto případě i anionty a díky EOF můžeme pomocí kapiláry stanovit jak kationty, tak i anionty současně. Vzorek, který se dávkuje do kapiláry je unášen nosným proudem elektrolytu a rozdělen do jednotlivých zón podle elektroforetické pohyblivosti. Způsob,

jakým se vzorek dávkuje do kapiláry, může být hydrodynamický nebo elektrokinetický [52].

Detektory jsou většinou založené na absorpční spektrometrii nebo fluorimetrii. V současné době je velmi rozšířené i použití tandemové techniky CZE-MS. Detekce jednotlivých zón je zajištěna snímáním signálu přímo v kapiláře.

Výhodou kapilární elektroforézy je možnost využití vyššího napětí, což zvyšuje efektivitu analýzy. Vyšší napětí ale může způsobit vyšší tvorbu tepla, což by mohlo ovlivnit rozšíření zón. Teplota může mít vliv na migrační časy a účinnost separace, proto jsou v systému CZE umístěny termostaty, které udržují stálou teplotu analýzy [48], [50].

7. MOŽNOSTI STANOVENÍ PATULINU

Patulin je díky své struktuře poměrně hydrofilní a polární molekula s M_w 154,12 a pK_a 12,10. Tyto fyzikálně-chemické vlastnosti značně ztěžují jeho oddělení od malých a polárních molekul převážně z hydrofilní (vodné) matrice. Při stanovování patulinu bychom měli věnovat pozornost tomu, aby nedocházelo k interferencím s 5-hydroxymethylfurfurem (5-HMF), nebo s fenolovými sloučeninami, kvůli podobné struktuře a chování jako má patulin. 5-hydroxymethylfurfural je nejčastější interferencí a vzniká degradací cukrů. Stanovení patulinu v potravinách je tedy vcelku náročný úkol, ale byly vyvinuty metody, kterými lze dosáhnout spolehlivých výsledků [53].

Tato bakalářská práce uvádí stručný přehled několika metod, které se zabývají stanovením patulinu v ovoci a ovocných, nejčastěji jablečných produktech.

7.1 Stanovení patulinu v čiré a zakalené jablečné šťávě pomocí HPLC s UV detekcí

Ke stanovení byla použita metoda HPLC s detekcí v UV oblasti. Patulin se z jablečné šťávy extrahuje pomocí ethylacetátu. Pro přečištění je zvolena technika extrakce kapalina-kapalina roztokem uhličitanu sodného. Extrakce se provádí v dělicí nálevce o objemu 100 ml, kam se přidá 10 ml vzorku jablečné šťávy a 20 ml ethylacetátu a protřepává se po dobu 1 minuty. Nechají se od sebe oddělit vrstvy, odpustí se do dvou různých baněk a vodná vrstva se převede zpět do dělicí nálevky. K vodné vrstvě se opět přidá 20 ml ethylacetátu a celý proces se třikrát zopakuje. Dále se provede odstranění interferujících látek pomocí uhličitanu sodného taktéž v dělicí nálevce. Po oddělení vrstev se spodní vrstva vypustí a vrchní se nalije přes filtrační papír obsahující bezvodý síran sodný do baňky. Tento postup se také zopakuje třikrát. Následuje příprava vzorku. Roztok se odpaří na vodní lázni na malý objem, který se převede do skleněné vialky. Roztok se následně odpaří proudem dusíku ve vodní lázni. Odparek se nechá rozpustit v 1 ml vody a převede do vialky určené pro HPLC analýzu. Na začátku analýzy se připraví kalibrační křivka s pěti kalibračními standardy. Dávkuje se 50 μ l vzorku. Rychlost průtoku mobilní fáze kolonou je 1 ml za minutu. Jako mobilní fáze bylo použito 95 objemových dílů vody s 5 objemovými díly acetonitrilu a 0,095 objemovým dílem kyseliny chloristé. Jako analytická kolona byla

zvolena C 18 kolona s reverzní fází na koncích pokrytá fází s obsahem 12 – 17 % uhlíku. Detekce se provádí při vlnové délce 276 nm.

Možným problémem této metody může být přítomnost interferující látky 5-HMF, což může způsobit obtíže při stanovení patulinu s využitím UV detekce. Další nevýhodou je poměrně vysoká spotřeba rozpouštědel [54].

7.2 Stanovení patulinu v jablečných nápojích pomocí extrakce na molekulárně vtištěných polymerech (MIP)

Molekulární imprinting slouží k syntéze polymerů, které mají vysoké rozlišovací schopnosti pro rozpoznání určitých molekul nebo skupin. MIP vznikají při procesu polymerizace. Metoda výroby je založena na tvorbě komplexu mezi templátem a funkčním monomerem. Po ukončení procesu polymerizace se odstraní templát a následně vzniknou na polymeru vazebná místa, která jsou schopná rozpoznávat přesně ty molekuly, které byly původně použity jako templát. MIP mají vysokou afinitu k cílovým molekulám, jsou vysoce odolné proti různým fyzikálním a chemickým podmínkám, jako jsou například vysoká teplota nebo působení rozpouštědel a obrovskou výhodou je také to, že se dají používat i opakovaně několik let, protože si dlouho zachovávají selektivní schopnosti. MIP nacházejí široké uplatnění hlavně v analytické a biomedicínské chemii, hojně se využívají v kapalinové chromatografii nebo kapilární elektroforéze a pro extrakci na pevné fázi [55].

Kontaminace mykotoxiny ve stopových koncentracích vyžaduje citlivou a selektivní analytickou metodu pro jejich určování. Cílem této práce bylo najít vhodné podmínky pro stanovení patulinu v jablečných nápojích. Pro urychlení a usnadnění metody došlo ke spojení on-line SPE a HPLC s přepínáním kolon, což je umožněno pomocí vícecestného přepínacího ventilu řízeného pomocí počítače. Při přepínání kolon se používá stále stejná mobilní fáze, mění se však kolony. Na analytické koloně dochází k vlastní separaci a přepínání kolon umožnilo dosažení izolace patulinu.

Při této metodě byly testovány čtyři kolony, ze kterých byla vybrána ta, která měla nejlepší separační schopnosti. Tou nejlepší byla kolona Kinetex Biphenyl 100A, 100 x 4,6 mm s velikostí částic 5 µl. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1,0 ml/min a byl použit 20% ethylacetát v acetonitrilu s vodou, za tlaku 5,5 MPa a při laboratorní

teplotě. Pro nástřik bylo použito 50 µl pracovního roztoku. Při takto nastavených podmínkách byly získané píky dostatečně vysoké a bez výrazného chvostování.

Při vývoji této metody bylo nutné optimalizovat separaci patulinu od strukturálně podobné interferující složky hydroxymethylfurfuralu, proto byla připravena pětikrát vyšší koncentrace HMF než PAT. Bylo nutné najít vhodné chromatografické podmínky (kolona, mobilní fáze, gradientová eluce), aby došlo k co nejlepší separaci. Použitím extrakční předkolony naplněné Supel MIP Patulin sorbentem došlo k rozdělení píků interferujících látek matrice a PAT. Byly zkoumány různé roztoky pro promývání předkolony a jako nejlepší byl vybrán 1% roztok NaHCO₃.

Při výběru vhodné mobilní fáze se nejdříve testovaly poměry organické a vodné fáze za izokratické eluce a po zvolení vhodného poměru se využilo eluce gradientové, která zvýšila rychlost analýzy a zvýšila separační účinnost.

Detekce se prováděla na univerzálním UV-VIS detektoru při vlnové délce 276 nm.

Pomocí SPE MIP bylo dosaženo extrakce patulinu z jablečných nápojů, avšak nebylo možné odstranit všechny interferující složky. Díky tomu byla výtěžnost kolem 122 % [39], [53].

7.3 Stanovení patulinu pomocí HPLC-DAD v jahodách

Většina metod, které se používají pro stanovení patulinu v jablkách nebo produktů z jablek, nejsou vhodné pro stanovení v jiném ovoci, jako jsou například jahody nebo borůvky. Tyto druhy ovoce mají oproti jablkům složitější matrice. Cílem analytiků bylo vyvinout metodu pro stanovení složitějších matic u různých druhů ovoce. Pro extrakci patulinu ze vzorků jahod byla použita rychlá, snadná a efektivní metoda QuEChERS. Tato technika je alternativou pro LLE a SPE extrakce a často se využívá ve vzorcích, které mají složitou matici. Jahody byly nejdříve homogenizovány pomocí mixéru. Homogenát se vložil do centrifugy a promýval se acetonitrilem. Poté byla přidána sůl a po minutě třepání se nechal vzorek centrifugovat, aby se oddělila vodná a organická fáze. Poté byl vzorek vysušen, promyt a zfiltrován do vialky pro HPLC analýzu. Analýza probíhala pomocí HPLC s detekcí diodového pole (HPLC-DAD). Dávkovalo se 20 µl vzorku a rychlost průtoku mobilní

fáze je 0,5 ml za minutu a byl použit acetonitril s vodou v poměru 1:9. Chromatografická separace se prováděla na koloně Zorbax Eclipse Plus-C18 Rapid, 150 x 4,6 mm, s velikostí částic 3,5 µm ve spojení se Zorbax Eclipse Plus-C18, 12,5 x 2,1 mm, s velikostí částic 5 µm. Detekce se provádí při vlnové délce 274 nm [56].

7.4 Stanovení patulinu v ovocném džemu pomocí UHPLC

Ke stanovení patulinu v ovocných džemech byla použita nová extrakční kolona připravená z křemičitanu hořečnatého, silikagelu, křemeliny a síranu vápenatého. Vzorek se hydrolyzoval pektinázou, extrahoval acetonitrem a čistil se extrakcí v pevné fázi. K separaci byla použita kolona Eclipse Plus C18, 100 x 2,1 mm, s velikostí částic 1,8 µm a jako mobilní fáze byl použit 0,8 % roztok tetrahydrofuranu s vodou, s průtokovou rychlostí 0,5 ml/min. Detekce probíhala při vlnové délce 276 nm. Byl zkoumán účinek pektinázy na výtěžnost extrakce a čistící účinek extrakční kolony v pevné fázi. Výtěžnost vzorků byla od 86,58 % do 94,84 %. Prokázalo se, že nová extrakční kolona měla dobrou účinnost čištění. Ultra účinná kapalinná chromatografie (UHPLC) měla vysokou separační účinnost. Metoda je jednoduchá, přesná a má význam pro kontrolu kvality potravin [57].

7.5 Stanovení patulinu v jablečném džusu pomocí GC/MS

Byla vyvinuta citlivá a selektivní metoda kvantifikace patulinu v jablečném džusu pomocí GC/MS. Pro extrakci patulinu ze vzorku byla použita metoda QuEChERS. Při přípravě vzorku bylo 5 ml vzorku přeneseno do 50 ml polypropylenové zkumavky. K tomu byl přidán známý objem patulinu a 15 ml acetonitrilu. Tato směs byla silně protřepávána po dobu 1 minuty. Po třepání byla přidána směs $\text{MgSO}_4/\text{NaCl}/\text{Na}_2\text{CO}_3$ v poměru 4:1:0,5 a následovalo opět minutové třepání. Následně byl vzorek 5 minut centrifugován při 4000 otáčkách za minutu. Při této práci bylo zkoumáno, jaký vliv má objem rozpouštědla. Bylo zjištěno, že objem má významný vliv na poměr plochy píku. Nejlepších výsledků bylo dosaženo právě při použití 15 ml acetonitrilu. Zkoumané objemy byly od 5 do 20 ml.

Pro extrakci bylo 11,5 ml supernatantu přeneseno do 15 ml polypropylenové zkumavky obsahující 400 mg sekundárního aminu a 1200 mg MgSO_4 . Směs byla

1 minutu protřepávána a odstředěna při 5000 otáčkách za minutu. Následně bylo odebráno 9,5 ml supernatantu a přeneseno do kádinky, kam bylo přidáno 150 µl ledové kyseliny octové. Vzorek byl odpařen do sucha pod jemným proudem dusíku.

Poté následovala derivatizace. Po odpaření se přidalo 300 µl acetonitrilu a 100 µl N, O-bis-trimethylsilyl trifluoracetamidu. Směs byla zahřívána při 70 °C po dobu 30 minut. Po ochlazení byla směs odpařena za použití proudu dusíku a bylo přidáno 100 µl CH₂Cl₂ a 50 µl hexachlorbenzenu jako vnitřního standardu. Do systému GC/MS bylo dávkován 1 µl.

Pro detekci a stanovení patulinu byl použit MS detektor. Nosným plynem bylo helium s konstantním průtokem 1 ml za minutu. Celková doba analýzy byla 31 minut.

Výsledky této práce ukázaly, že postup QuEChERS je velmi rychlý, levný a jednoduchý způsob extrakce nízkých koncentrací patulinu ve vzorcích jablečné šťávy. Výťažnost patulinu ve vzorcích byla v rozmezí 79,9 – 87,9 % [58].

7.6 Stanovení patulinu v jablečném džusu pomocí mikro liquid-liquid-liquid extrakce

Pro stanovení patulinu byla vytvořena rychlá a jednoduchá analytická metoda, při které byla použita jednorázová liquid-liquid-liquid mikroextrakce ve spojení s vysoce účinnou kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií. Zatímco ostatní metody většinou vyžadovaly komplikovanější úpravu vzorku zahrnující čištění, odpaření a opětovné rozpuštění vzorku, tato metoda byla provedena pouze z jedné extrakce, při které bylo spotřebováno velmi malé množství rozpouštědla. Oproti jiným metodám také využití HPLC/MS poskytuje vysokou selektivitu a citlivost.

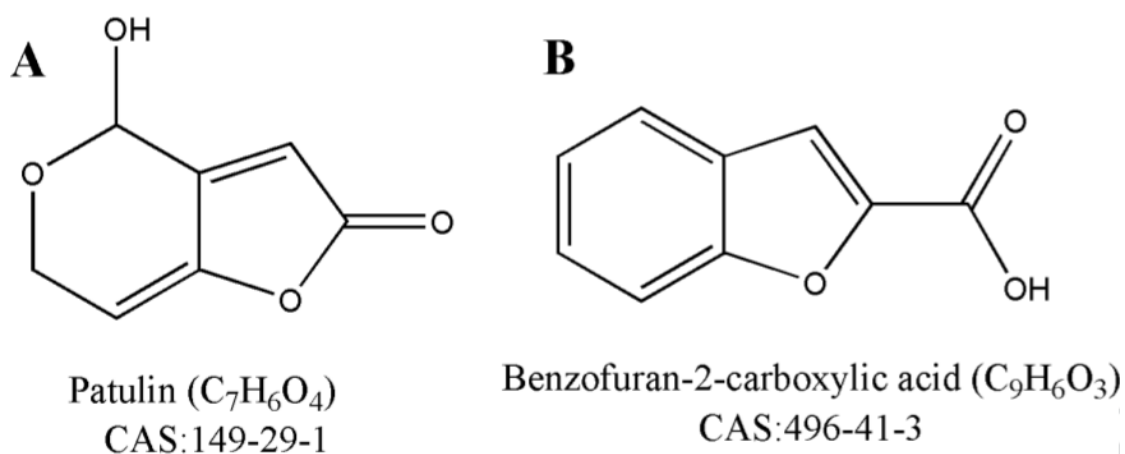
Stanovení patulinu touto metodou bylo dosaženo krátké doby přípravy, snadné manipulace, nízké spotřebě rozpouštědel a vysoké přesnosti. Celý analytický proces netrval více než 20 minut. Pro přípravu vzorku bylo použito 10 ml jablečné šťávy, která byla převedena do odměrné baňky s přídavkem 0,5 g chloridu sodného a 1,5 ml ethylacetátu.

Při této studii byl zjišťován vliv několika parametrů, které ovlivňují účinnost extrakce. Prvním zkoumaným parametrem byl vliv doby extrakce. Ukázalo se, že doba extrakce významně ovlivňuje účinnost extrakce. Extrahované množství patulinu se rychle zvyšovalo od 1 minuty do 20 minut, poté bylo dosaženo rovnováhy

a po 20 minutách již nedocházelo ke zvýšení intenzity signálu. Ukázalo se tedy, že ideální doba extrakce je 20 minut. Vliv na extrakci měla i volba rozpouštědla. Jako rozpouštědlo byl použit ethylacetát a hexan v různých objemových poměrech. Z těchto experimentů bylo zjištěno, že nepolární hexan není pro extrakci patulinu vhodný, protože má nízkou extrakční účinnost vzhledem k polaritě patulinu. V důsledku toho byl jako extrakční činidlo vybrán čistý ethylacetát. Dále se sledoval účinek soli na intenzitu signálu. V této studii byl do vzorku přidán chlorid sodný a nejvyšší intenzity bylo dosaženo při přidání 0,5 g této látky. S vyšší koncentrací soli byl již signál konstantní [59].

7.7 Stanovení patulinu pomocí magnetické extrakce na pevné fázi

Pro extrakci patulinu byly použity magnetické částice obsahující benzofuran-2-karboxylovou kyselinu (BFCA), které se přidaly do roztoku vzorku a patulin se poté adsorboval na jejich povrch. Benzofuran-2-karboxylová kyselina je důležitým meziproduktem pro syntézu mnoha organických sloučenin a má velmi podobnou strukturu jako patulin.



Obrázek 10: Chemická struktura patulinu (A) a benzofuran-2-karboxylové kyseliny (B) [60]

BFCA byla na magnetické částice navázána přes peptidovou vazbu. Tyto peptidové vazby můžeme vidět na spektrech z infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací. Mezi BFCA a patulinem se tvoří vodíkové vazby, díky kterým se PAT na magnetické částice adsorbuje. Magnetické částice byly připraveny přidáním FeCl₃.6H₂O a FeCl₂.4H₂O do ionizované vody. Následně se přidal po kapkách

amoniak a tato směs se intenzivně 2 hodiny míchala při 40 °C. Vysrážené nanočástice se promyly neionizovanou vodou a ethanolem a byly sušeny ve vakuu při 40 °C po dobu 12 hodin. Extrakce se prováděla v Erlenmeyerově baňce s 50 ml jablečného džusu s upraveným pH na 5 a bylo přidáno 40 mg magnetických nanočástic. Erlenmeyerova baňka se nechala 25 minut protřepávat, aby se patulin adsorboval na magnetické částice. Následně se částice třikrát promyly deionizovanou vodou a patulin se eluoval pomocí methanolu. Takto upravený vzorek byl dávkován do HPLC a zanalyzován. Jako mobilní fáze byla použita směs methanolu a vody v poměru 1:9 s průtokovou rychlostí 0,8 ml za minutu. Chromatografická separace probíhala na koloně Zorbax SB-C18 o velikosti 150 x 4,6 mm a Detekce se prováděla při vlnové délce 276 nm.

Většina analytických metod pro stanovení patulinu využívá ethylacetát jako primární extrakční činidlo. Tento způsob úpravy je však většinou drahý, časově náročný a je při něm spotřebováno velké množství organických rozpouštědel. Použití magnetických nanočástic může významně zkrátit dobu trvání procesu, takže se dá během krátkého času provést velké množství analýz vzorků. Zároveň je tato metoda šetrná a ekologická, jelikož je při práci spotřebováno velmi malé množství rozpouštědel. Použití magnetických částic jako sorbentu je také snadnou metodou k oddělení analytů a má větší výtěžnost než běžně používané SPE metody. Obrovskou výhodou je také to, že se magnetické částice dají použít nejméně 20krát bez ztráty adsorpční schopnosti [60].

7.8 Kvantitativní stanovení patulinu v jablečném džusu pomocí tenkovrstvé chromatografie

V této práci byla pro stanovení patulinu použita metoda TLC s kvantifikací pomocí fluorescence z UV lampy v kombinaci s charge-coupled device (CCD) detektorem. TLC je levná, rychlá analytická technika poskytující kvalitativní výsledky vizuální kontrolou. CCD je moderním detektorem, jehož základem je destička z čistého křemíku, na kterou jsou připojeny plošné elektrody. Pokud dopadne na křemík, který se nachází v elektrickém poli foton, dojde k přechodu valenčního elektronu z vazby na atom křemíku a oddělí se od sebe náboje, které putují každý na jinou stranu destičky.

Intenzita dopadající záření je úměrná počtu uvolněných nábojů. CCD je citlivý na změny intenzity stopových koncentrací mykotoxinů.

10 g vzorku jablečné šťávy bylo dvakrát extrahováno 20 ml ethylacetátu a poté přečištěno pomocí extrakce s 10 ml roztoku uhličitanu sodného. Extrahované vzorky byly vysušeny bezvodým síranem sodným a přeneseny na kolonu se silikagelem naplněnou 8 g silikagelu. Patulin byl eluován z kolony s 10 ml ethylacetátu a po odpaření rozpouštědla byl extrakt znovu rozpuštěn ve chloroformu. Chromatografická separace byla provedena na TLC destičce potažené silikagelem. Destičky se vyvíjely v nádobě s toluenem, ethylacetátem a kyselinou mravenčí v objemovém poměru 5:4:1. Pro identifikaci byly destičky postříkané 0,5 % methylbenzothiazolinon hydrazin hydrochloridem (MBTH). Patulin se pod UV světlem s vlnovou délkou 366 nm barvil žlutooranžově. Intenzita fluorescence byla zaznamenána CCD kamerou.

Výsledky potvrdily, že je metoda účinná pro stanovení patulinu v jablečné šťávě, nicméně tyto metody jsou v dnešní době pro analýzu vyřazeny, z důvodu nedostatečné citlivosti a problematického oddělení od matrice [61].

7.9 Stanovení patulinu pomocí kapilární zónové elektroforézy

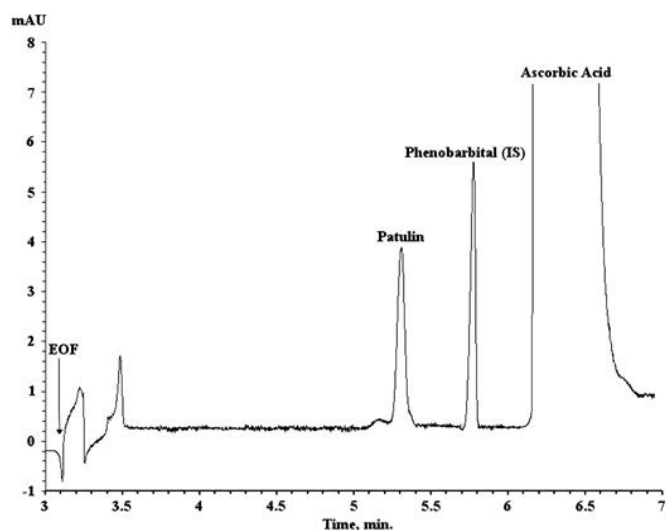
V této studii byla vyvinuta jednoduchá, rychlá, přesná a citlivá metoda CZE. Při použití metod HPLC se většinou řeší problém s interferující molekulou HMF, který má s patulinem podobnou strukturu, polaritu a chromatografické vlastnosti. Cílem této studie bylo vyvinout metodu, při které by analýza PAT probíhala bez rušení molekuly HMF.

Systém CZE byl použit s UV detektorem s diodovým polem a kapilárou z taveného oxidu křemičitého o délce 50 cm. Všechny standardy a vzorky byly vstříkovány přes kapiláru po dobu 10 sekund za použití hydrodynamického dávkování. Signály byly detekovány při 276 nm a celková doba analýzy byla 10 minut.

Patulin byl ze vzorku extrahovaný pomocí LLE. 5 ml homogenizované jablečné šťávy se dvakrát extrahovalo 10 ml ethylacetátu po dobu 1 minuty. Poté se přidaly 2 ml 1,5 % roztoku uhličitanu sodného a opět se nechalo 1 minutu protřepávat. Následně se přidalo 2,5 g bezvodého síranu sodného a vysušený extrakt se filtroval přes filtrační papír, který se přelil 2 ml ethylacetátu. Extrakt se nechal odpařit do sucha při 40 °C

pod jemným proudem dusíku. Zbytek se rozpustil v 0,5 ml metanolu, k čemuž se přidalo 0,5 ml kyseliny askorbové. Přidání kyseliny askorbové má účinky na stabilitu patulinu a zároveň má účinky antioxidační. Roztok byl dávkován do CZE.

Po rozdělení do jednotlivých zón se na elektroferogramu ukázalo, že PAT není ovlivněn HMF, protože se HMF jako látka s neutrálním chováním pohybovala s elektroosmotickým tokem.



Obrázek 11: Záznam separace [62]

Metoda byla validována a aplikována pro stanovení patulinu v jablečné šťávě bez jakéhokoliv vlivu interference z HMF. Tato metoda by mohla být používána pro rutinní analýzu ovocných šťáv a jablečných výrobků [62].

Tabulka 2: Souhrnná tabulka metod pro stanovení patulinu

Metoda	Substance	Kolona	MF/pufr	Extrakce	Detektor	LOD/LOQ	Zdroj
HPLC	Jablečné nápoje	Kinetex Biphenyl (100 x 4,6 mm, 5 µm)	Ethylacetát v acetonitrilu/voda	SPE	UV detektor	-	[53]
HPLC	Čirá, zakalená jablečná šťáva, protlak	Kolona s reverzní fází C18	Voda/acetonitril/kyselina chloristá	LLE	UV detektor	-	[54]
HPLC	Jahody	Zorbax Eclipse Plus-C18 (150 x 4.6 mm, 3.5 µm), Zorbax Eclipse Plus-C18 (12,5 x 2.1 mm, 5 µm)	Acetonitril/voda	QuEChERS	DAD	LOD - 1.5 µg/kg LOQ - 5 µg/kg	[56]
UHPLC	Ovocný džem	Eclipse Plus C18 (100 x 2.1 mm, 1.8 µm)	Tetrahydrofuran/voda	SPE	UV detektor	LOD – 10,22 µg/kg	[57]
GC – MS	Jablečný džus	Agilent HP-5MS column (30 m x 0.25 mm)	Helium	QuEChERS	MS detektor	LOD - 0.4 µg/kg LOQ -1.3 µg/kg	[58]
HPLC – MS	Jablečný džus	ACQUITY UPLC®BEH C18 (50 x 2.1 mm, 1.7 µm)	Octan amonný/voda/acetonitril	LLL-ME	MS detektor	LOD- 0.5 µg/kg LOQ- 2 µg/kg	[59]

HPLC	Jablečný džus	Zorbax SB-C18 (150 x 4.6 mm)	Methanol/voda	MSPE	UV detektor	LOD – 0.15 µg/kg LOQ – 0.5 µg/kg	[60]
TLC	Jablečný džus	SIL G-25HR (20 x 20 cm)	Toluen/ethylacetát/ kyselina mravenčí	-	UV/CCD detektor	LOD - 0.005 µg/spot LOQ - 14 µg l ⁻¹ /spot	[61]
CZE	Jablečný džus	Křemenná kapilára (50 cm, 75 µm)	Tetraboritan sodný/acetonitril	LLE	UV detektor	LOD - 5.9 × 10 ⁻³ LOQ- 1.79 × 10 ⁻² µg/mL	[62]

8. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo vyhledat informace o patulinu, jednoho z mykotoxinů vyskytujícího se převážně v jablkách a jablečných produktech. Všechny nalezené informace byly seřazeny do jednotlivých kapitol. Dále bylo cílem sepsat analytické metody, kterými lze patulin stanovit.

V první části, která je teoretická, jsou popsány informace o mykotoxinech. Dále jsou stručně popsány mykotoxiny, které jsou v praxi nejvíce sledovány, společně s jejich charakteristikou. Následně se práce věnuje konkrétnímu mykotoxinu patulinu, který je i tématem práce. Kapitoly jsou věnovány výskytu patulinu v potravinách, podmínkám optimálního růstu a metodám potlačení růstu, dále jsou zde uvedeny základní fyzikální a chemické vlastnosti, cesta syntézy patulinu, akutní a chronická toxicita a poslední kapitola v teoretické části je věnována limitům, které by měly výrobci potravin splňovat.

Analytická část je věnována kromě metod stanovení i přípravě vzorků před analýzou a extrakčním metodám. Z analytických metod jsou popsány chromatografické metody, kam patří nejpoužívanější vysokoúčinná kapalinová chromatografie, dále hmotnostní spektrometrie a elektromigrační metody.

Co se tedy týče metod stanovení patulinu, nejvíce se používá metoda HPLC s různými typy detekce. Další metody jako plynová chromatografie nebo hmotnostní spektrometrie jsou v porovnání s HPLC používány méně. To je způsobeno pravděpodobně komplikovanější derivatizací pro GC a horší ionizací molekuly patulinu pro MS detekci.

Metody pro stanovení mykotoxinů jsou stále zdokonalovány. Cílem je najít metodu, která by byla rychlá, levná, nenáročná na přípravu, citlivá a zároveň šetrná k životnímu prostředí. Používají se tedy metody, u kterých je spotřebováno malé množství vzorků a rozpouštědel. Přehled jednotlivých metod stanovení je uveden v tabulce v závěrečné části práce.

9. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] *Mykotoxiny tvorba a původci* [online]. [cit. 2019-04-21]. Dostupné z: http://old-biomikro.vscht.cz/vyuka/mzp/2014-03-21_Mykotoxiny9.pdf
- [2] *Mykotoxiny u obilovin* [online]. [cit. 2019-04-21]. Dostupné z: http://www.bezpecna-krmiva.cz/soubory/3-mykotoxiny_u_obilovin.pdf
- [3] *Bezpečnost potravin - mykotoxiny* [online]. [cit. 2019-04-21]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76672.aspx>
- [4] NAWAZ, Muhammad Azhar Hayat, Sajid RAUF, Akhtar HAYAT, Gaelle CATANANTE, Rizwan RAZA a Jean-Louis MARTY. *Determination of Mycotoxins in Food*. WONG, Yiu-chung a Richard J LEWIS, ed. *Analysis of Food Toxins and Toxicants* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2017, 2017-07-14, s. 137-168 [cit. 2019-04-23]. DOI: 10.1002/9781118992685.ch5. ISBN 9781118992685. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118992685.ch5>
- [5] BENNETT, J. W. a M. KLICH. *Mycotoxins. Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2003, 16(3), 497-516 [cit. 2019-04-22]. DOI: 10.1128/CMR.16.3.497-516.2003. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>
- [6] LI, Qian, Zhen DONG, Weiguang LIAN, et al. *Ochratoxin A causes mitochondrial dysfunction, apoptotic and autophagic cell death and also induces mitochondrial biogenesis in human gastric epithelium cells*. *Archives of Toxicology* [online]. [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1007/s00204-019-02433-6. ISSN 0340-5761. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00204-019-02433-6>
- [7] ROGOWSKA, A., P. POMASTOWSKI, G. SAGANDYKOVA a B. BUSZEWSKI. *Zearalenone and its metabolites: Effect on human health, metabolism and neutralisation methods*. *Toxicon* [online]. 2019, 162, 46-56 [cit. 2019-04-22]. DOI: 10.1016/j.toxicon.2019.03.004. ISSN 00410101. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010119300650>
- [8] HASCHEK, Wanda M. a Val R. BEASLEY. *Trichothecene Mycotoxins. Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents* [online]. Elsevier, 2009, 2009, s. 353-369 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1016/B978-012374484-5.00026-2. ISBN 9780123744845. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123744845000262>
- [9] Krajská hygienická stanice Královehradeckého kraje se sídlem v Hradci Králové. *Plísňe v potravinách* [online]. [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: http://www.khshk.cz/e-learning/kurs7/ploha_2.html

- [10] WRIGHT, Sandra AI. Patulin in food. *Current Opinion in Food Science* [online]. 2015, 5, 105-109 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1016/j.cofs.2015.10.003. ISSN 22147993. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214799315001289>
- [11] KRMENČÍK J.: *Patulin*. [Online] 2007 [cit. 2019-02-16]. Dostupné z: <http://www.biotox.cz/toxikon/mikromycety/patulin.php>
- [12] *The prevention and reduction of patulin contamination in apple juice and apple juice ingredients in other beverages. Official Journal of the European Union* [online]. 2003 [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:203:0054:0059:EN:PDF>
- [13] BRANDON, E.F.A., A.J. BAARS, J.D. Te BIESEBEEK, A.G. OOMEN, M.I. BAKKER a C. DE HEER. *Risk assessment of patulin intake from apple containing products by young children. World Mycotoxin Journal* [online]. 2012, 5(4), 391-403 [cit. 2019-04-22]. DOI: 10.3920/WMJ2012.1426. ISSN 1875-0710. Dostupné z: <https://www.wageningenacademic.com/doi/10.3920/WMJ2012.1426>
- [14] *Better Tools for Fast and Convenient Patulin Analysis* [online]. [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/food-beverage/patulin-apple-spe.html>
- [15] 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. 2019-04-22]. DOI: 10.3390/toxins9050157. ISSN 2072-6651. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6651/9/5/157>
- [16] Informační centrum bezpečnosti potravin. *Jablečné víno (cider) neobsahuje patulin* [online]. 2003 [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: [https://www.bezpecnostpotravin.cz/jablecne-vino-\(cider\)-neobsahuje-patulin.aspx](https://www.bezpecnostpotravin.cz/jablecne-vino-(cider)-neobsahuje-patulin.aspx)
- [17] Biotox. *Ochrana zdraví občanů v domácnostech: plísňě a mykotoxiny v potravinách* [online]. [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: <http://www.biotox.cz/toxikon/mikromycety/potravinovy.php>
- [18] Safe food alliance, ed. *Patulin v ovoci* [online]. 2017 [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: <https://safefoodalliance.com/uncategorized/patulin-in-fruit/>
- [19] *Strukturní vzorec patulinu* [online]. 2017 [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Patulin#/media/File:Patulin.png>
- [20] PUEL, Olivier, Pierre GALTIER a Isabelle OSWALD. *Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin. Toxins* [online]. 2010, 2(4), 613-631 [cit. 2019-04-22]. DOI: 10.3390/toxins2040613. ISSN 2072-6651. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6651/2/4/613>

- [21] HOPMANS, Ellen C. Patulin: *a Mycotoxin in Apples. Department of Food Science & Technology* [online]. 1997, (91) [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: <http://ucce.ucdavis.edu/files/datastore/234-166.pdf>
- [22] SHERIF, Sherif O., Emad E. SALAMA a Mosaad A. ABDEL-WAHHAB. *Mycotoxins and child health: The need for health risk assessment. International Journal of Hygiene and Environmental Health* [online]. 2009, 212(4), 347-368 [cit. 2019-04-22]. DOI: 10.1016/j.ijheh.2008.08.002. ISSN 14384639. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S143846390800062X>
- [23] *Nariadení Komise (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách.* Dostupné na: <https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1881:20120401:CS:PDF>
- [24] 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. 2019-04-22]. 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>
- [25] Informační centrum bezpečnosti potravin. *Rychlá a přesná analytika mykotoxinů* [online]. 2009 [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/rychla-a-presna-analytika-mykotoxinu.aspx>
- [26] ŠIMŮNEK, Jan. *Mykotoxiny* [online]. 2003 [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: http://www.med.muni.cz/predmety/preventivni/MYKOTW/mt_anaob.htm
- [27] OTLES, Semih. *Methods of Analysis of Food Components and Additives, Second Edition. 2, přepracované vydání.* CRC Press, 2011. ISBN 1439815526.
- [28] BETINA, Vladimír. *Chromatografie mykotoxinů.* Elsevier Science, 1993. ISBN 9780080858623.
- [29] ZÁRUBA, Kamil. *Analytická chemie.* Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-950-1
- [30] MAJER J. *Analytická chémie: učebnica pre farmaceutické fakulty.* Martin: Osveta 1989, 1. vydání. ISBN (váz.). Slovenské učebnice.
- [31] BERK, Zeki. *Extraction. Food Process Engineering and Technology* [online]. Elsevier, 2013, 2013, s. 287-309 [cit. 2019-04-22]. DOI: 10.1016/B978-0-12-415923-5.00011-3. ISSN 9780124159235. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124159235000113>
- [32] SADÍLEK, Petr. *Moderní trendy v úpravě vzorků biologického materiálu k analýze vybraných biologicky aktivních látek.* 2012. Disertační práce. UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE.

- [33] KLOUDA P. *Moderní analytické metody*. Ostrava 2003. ISBN 80-86369-07-2. Strana 46.
- [34] ŠEVČÍK, Václav. *Optimalizace SPE pro stanovení perfluorovaných organických kyselin*. Praha, 2010. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze.
- [35] *Guide to Solid Phase Extraction* [online]. 1998 [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>
- [36] *Solid-Phase Extraction (SPE): The Mechanics of SPE* [online]. 2019 [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: [http://abacus-lab.net/analytical-chemistry/extraction/solid-phase-extraction-\(spe\)/](http://abacus-lab.net/analytical-chemistry/extraction/solid-phase-extraction-(spe)/)
- [37] *Sample Preparation Solid Phase Extraction –Overview* [online]. [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: https://www.chromacademy.com/lms/sco53/Sample_Preparation_Solid_%20Phase_Extraction_Overview.pdf
- [38] *Extrakce pevnou fází v analýze vybraných syntetických inhibitorů fosfodiesterázy pde-5 metodou hplc/ms*. Olomouc, 2013. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci
- [39] HOLZNEROVÁ, Anežka. *Testování a optimalizace on-line SPE HPLC podmínek pro stanovení mykotoxinu patulinu v jablečných nápojích*. Hradec Králové, 2015. Diplomová práce. UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE.
- [40] *Extrakční a Clean-Up dSPE zkumavky QuEChERS pro reziduální analýzu pesticidů v potravinách* [online]. [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: <https://www.chromservis.eu/i/dspe-quechers?lang=CZ>
- [41] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [42] ROUDNÁ, Iva. *Mykotoxiny a lidské zdraví*. Hradec Králové, 2014. Bakalářská práce. UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE.
- [43] VÁVROVÁ, Jaroslava. *Gelová permeační chromatografie (GPC)* [online]. [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd/hypertext/AJAZG.htm>
- [44] *Thin Layer Chromatography, TLC* [online]. [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/tlcpc.html>
- [45] *Components of an HPLC System* [online]. 2019 [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/hplc-troubleshooting-guide.html>
- [46] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-802-6042-440.

- [47] *Schematický náčrt plynového chromatografu*. [online]. 2006 [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: https://sk.wikipedia.org/wiki/Plynov%C3%A1_chromatografia#/media/File:SchematicGC.png
- [48] CIBIČEK, Norbert a Jan VACEK. *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-3951-8.
- [49] Premier Biosoft. *Mass Spectrometry*. Premier Biosoft. [Online] [cit. 2019-03-01] http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/mass-spectrometry.html
- [50] *Český lékopis 2009*. Praha: Grada, 2009. 978-80-247-2994-7
- [51] *Capillary Zone Electrophoresis, CZE* [online]. [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/cze.html>
- [52] KAŠIČKA, Václav. *Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod* [online]. 1997 [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: http://ww.w.chemicke-listy.cz/docs/full/1997_05_320-329.pdf
- [53] LHOTSKÁ, Ivona, Anežka HOLZNEROVÁ, Petr SOLICH a Dalibor ŠATÍNSKÝ. *Critical comparison of the on-line and off-line molecularly imprinted solid-phase extraction of patulin coupled with liquid chromatography*. *Journal of Separation Science* [online]. 2017, 40(23), 4599-4609 [cit. 2019-04-22]. DOI: 10.1002/jssc.201700940. ISSN 16159306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201700940>
- [54] ČSN EN 14177: *Potraviny – Stanovení patulinu v čiré a zakalené jablečné šťávě a protlaku – Metoda HPLC s přečištěním na rozhraní kapalina/kapalina*. 2003.
- [55] ŠTOSSOVÁ, Aneta. *Využití molekulově imprintovaných polymerů pro analýzu metaloproteinů*. 2018. Bakalářská práce. MASARYKOVA UNIVERZITA.
- [56] SADOK, Ilona, Agnieszka SZMAGARA a Magdalena Maria STANISZEWSKA. *The validated and sensitive HPLC-DAD method for determination of patulin in strawberries*. *Food Chemistry* [online]. 2018, 245, 364-370 [cit. 2019-04-22]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.10.093. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814617317338>
- [57] LÜ, Weichao, Shuchang SHEN a Chao WANG. *Determination of patulin in fruits and jam by solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography*. *Chinese Journal of Chromatography* [online]. 2017, 35(11) [cit. 2019-04-22]. DOI: 10.3724/SP.J.1123.2017.07005. ISSN 1000-8713. Dostupné z: <http://pub.chinasciencejournal.com/article/getArticleRedirect.action?doiCode=10.3724/SP.J.1123.2017.07005>

- [58] KHARANDI, Niloofar, Mehran BABRI a Jila AZAD. *A novel method for determination of patulin in apple juices by GC–MS*. Food Chemistry [online]. 2013, 141(3), 1619-1623 [cit. 2019-04-22]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.05.080. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814613006717>
- [59] LI, Xianjiang, Hongmei LI, Wen MA, Zhen GUO, Xiaomin LI, Xiuqin LI a Qinghe ZHANG. *Determination of patulin in apple juice by single-drop liquid-liquid-liquid microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry*. Food Chemistry [online]. 2018, 257, 1-6 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.02.077. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618303145>
- [60] YU, Youwei a Zhefeng FAN. *Determination of patulin in apple juice using magnetic solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography*. Food Additives & Contaminants: Part A [online]. 2016, , 1-9 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1080/19440049.2016.1266394. ISSN 1944-0049. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19440049.2016.1266394>
- [61] WELKE, Juliane Elisa, Michele HOELTZ, Horacio Alberto DOTTORI a Isa Beatriz NOLL. *Quantitative analysis of patulin in apple juice by thin-layer chromatography using a charge coupled device detector*. Food Additives & Contaminants: Part A [online]. 2009, 26(5), 754-758 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1080/02652030802662746. ISSN 1944-0049. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652030802662746>
- [62] GURAY, T., M. TUNCEL a U. D. UYSAL. *A Rapid Determination of Patulin Using Capillary Zone Electrophoresis and its Application to Analysis of Apple Juices*. Journal of Chromatographic Science [online]. 2013, 51(4), 310-317 [cit. 2019-04-22]. DOI: 10.1093/chromsci/bms142. ISSN 0021-9665. Dostupné z: <https://academic.oup.com/chromsci/article-lookup/doi/10.1093/chromsci/bms142>