



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

**Fakulta potravinářské a biochemické technologie
Ústav analýzy potravin a výživy**

Metody hodnocení výskytu reziduí pesticidů v pylu a v medu

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Marie Suchanová, Dana Schusterová,
Vladimír Kocourek, Jana Hajšlová**

Praha, 2018

Dedikace:

Uplatněná certifikovaná metodika vznikla za finanční podpory Ministerstva zemědělství v rámci projektu QJ1610217 (Inovace systému integrované ochrany řepky pro omezení negativních dopadů současné technologie pěstování). Tato práce byla realizována také v “Operačním programu Praha - Konkurenceschopnost” (CZ.2.16/3.1.00/21537 a CZ.2.16/3.1.00/24503) za podpory “Národního programu udržitelnosti I” - NPU I (LO1601 - č.: MSMT-43760/2015).

© Marie Suchanová, Dana Schusterová, Vladimír Kocourek, Jana Hajšlová, 2018

ISBN 978-80-7592-031-7

OBSAH

1	CÍL METODIKY	4
2	TEORETICKÝ ÚVOD	5
3	VLASTNÍ POPIS METODIKY	6
3.1	Použitelnost metody	6
3.2	Princip metody	7
3.3	Bezpečnost práce	9
3.4	Chemikálie a spotřební materiál	9
3.5	Přístroje a zařízení.....	9
3.6	Pracovní postup.....	10
3.6.1	<i>Odběr a uchování vzorků</i>	<i>10</i>
3.6.2	<i>Příprava zásobních a pracovních roztoků standardů</i>	<i>10</i>
3.6.3	<i>Extrakce analytů ze vzorku.....</i>	<i>11</i>
3.6.4	<i>LC-MS/MS analýza</i>	<i>12</i>
3.6.5	<i>Kalibrační postup.....</i>	<i>16</i>
3.6.6	<i>Pracovní charakteristiky</i>	<i>18</i>
4	SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	21
5	POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY	21
6	EKONOMICKÉ ASPEKTY	21
7	SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	22
8	SEZNAM PUBLIKACÍ PŘEDCHÁZEJÍCÍCH METODICE	23
9	SEZNAM ZKRATEK	23
10	AUTOŘI A OPONENTI.....	24

1 CÍL METODIKY

Jedním z cílů projektu „Inovace systému integrované ochrany řepky pro omezení negativních dopadů současné technologie pěstování“ podporovaného Ministerstvem zemědělství je získání metody technologie pro minimalizaci rizik reziduí pesticidů v pylu a medu včel, jako příspěvek pro zdraví člověka a včely medonosné. Znalosti o výskytu reziduí rizikových pesticidů ve včelích produktech jsou klíčové pro analýzu rizika plynoucího pro včely z používání pesticidů. Rezidua je přitom nezbytné v těchto komplexních matricích spolehlivě detekovat, identifikovat a kvantifikovat i na ultrastopových koncentračních hladinách, které jsou řádově nižší, nežli je tomu v případě běžné úřední kontroly potravin, včetně produktů ekologického zemědělství.

Za tímto účelem byla navržena a validována optimalizovaná multireziduální metoda umožňující stanovení téměř 70 reziduí aktivních složek pesticidních přípravků v medu a pylu na hladinách výrazně nižších než 0,01 mg/kg. Analýza pesticidů se provádí metodou ultraúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

Validovaná metodika bude předána k využití pracovníkům laboratoří Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského v Brně (ÚKZÚZ) pro možné využití při monitorování výskytu reziduí v medu a pylu, s cílem ochrany opylovačů a udržování biodiverzity v agrárních ekosystémech s intenzivním hospodařením.

2 TEORETICKÝ ÚVOD

Pesticidy představují široké spektrum chemických látek, které jsou běžně používané při pěstování rostlin k jejich ochraně před škodami na produktech způsobenými činností hmyzu, plísní, plevelů a dalších škodlivých organismů. Řadí se mezi vysoce sledované cizorodé látky běžně přítomné v zemědělských plodinách, neboť mohou pro spotřebitele představovat zdravotní riziko.

Rezidua pesticidů aplikovaných před květem a v době květu řepky představují zátěž v přirozené potravě včel, která může být rizikem pro zdravotní stav včelstev. V současnosti intenzita chemické ochrany řepky stále stoupá. Na jaře se aplikují na řepku 3 – 4 postřiky insekticidy, 1 – 2 postřiky fungicidy a vedle toho další aplikace stimulátorů, desikantů a dalších látek. Ochrana řepky je v současné době ze všech plodin nejvíce v rozporu se systémem integrované ochrany rostlin podle platné legislativy.

V rámci projektu QJ1610217 byla v pylu zjištěna vyšší frekvence účinných látek a vyšší hodnoty výskytu reziduí než v medu. Nejčastěji se vyskytující účinnou látkou v pylu i v medu byl thiacloprid s výskytem v 90 až 95 % vzorků. Množství reziduí thiaclopridu bylo nejvyšší ze všech zjištěných účinných látek. Z dalších účinných látek, které se vyskytovaly jak v pylu, tak v medu s frekvencí více než 20 %, to byly v pořadí podle četnosti azoxystrobin, boscalid, dimoxystrobin a carbendazim. Pouze v pylu se s vysokou frekvencí vyskytovaly podle pořadí četností chlorpyrifos, tau-fluvalinate, cyproconazole, fluopyram, propiconazole, prothioconazole-desthio, prochloraz a fluazifop. V pylu bylo dále zachyceno celkem 20 dalších účinných látek pesticidů, které nebyly v hodnocených vzorcích medu vůbec zachyceny. Jejich frekvence i množství v pylu však bylo většinou nízké, jejich výskyt na jednotlivých odběrových stanovištích byl náhodný.

Přípravek na bázi chlorpyrifosu je zakázán pro použití do doby květu řepky z důvodu jeho silné toxicity pro včely. V rostlinách řepky pravděpodobně nedochází od ošetření do doby květu k degradaci chlorpyrifosu. Naopak, přípravky na bázi tau-fluvalinatu se používají pro ochranu řepky v době květu pro jeho deklarovanou neškodnost vůči včelám. Vysoká frekvence tau-fluvalinatu v pylu však ukazuje, že tato účinná látka může být vůči včelám riziková. Ojediněle byly v pylu detekovány pyretroidy (např. deltamethrin). Příčinami nízkého zachytu pyretroidů v pylu i medu může být jak jejich rychlá degradace reziduí, tak nízká frekvence jejich používání. Poslední účinnou látkou zachycenou v pylu byl methoxyfenozide, který se v ochraně

řepky nepoužívá. S vyšší frekvencí jsou v jarním období přípravky na bázi methoxyfenozidu používány pro ochranu ovocných sadů proti škodlivým druhům motýlů.

Obecné schéma používané při stanovení reziduí pesticidů spočívá v 1) extrakci organickým rozpouštědlem, 2) přečištění, 3) separaci, identifikaci a kvantifikaci pomocí kapalinové nebo plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí.

Obvyklou metodou extrakce reziduí pesticidů z pylu a medu je metoda QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe – rychlá, snadná, levná, efektivní, robustní a bezpečná) [1].

Často používanou metodou přečištění je extrakce na tuhou fázi (SPE). Tato metoda je aplikována ve dvou formách: klasicky pomocí kolonek se sorbenty nebo disperzní (dSPE), kdy se sorbent přidává přímo do extraktu. Mezi běžně používané sorbenty se řadí florisil, aktivní uhlí (GCB), PSA (primární-sekundární amin), síran hořečnatý (MgSO_4), oktadecylsilan (C_{18}) a chlorid vápenatý (CaCl_2). [2-8]

Separace pesticidů se nejčastěji provádí plynovou (GC) nebo kapalinovou chromatografií (LC), přičemž volba závisí na vlastnostech pesticidů. S použitím GC je možné analyzovat převážně nepolární, těkavé a tepelně stabilní pesticidy. Přičemž pomocí LC lze analyzovat polárnější a méně těkavé pesticidy. Pro získání komplexních výsledků je vhodné použít obě metody. K detekci pesticidů se používá tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) s ionizací elektrosprejem (ESI) v případě LC a elektronovou ionizací (EI) v případě GC. Nejběžněji používané analyzátory iontů jsou průletový analyzátor (TOF) a kvadrupólový analyzátor (Q). [2-8]

3 VLASTNÍ POPIS METODIKY

3.1 Použitelnost metody

Metoda je obecně vhodná pro analýzu reziduí pesticidů v medu a pylu. Byla validována pro vybrané pesticidy převážně s insekticidním a fungicidním účinkem, které jsou nejčastěji používány pro ošetření řepky a další účinné látky, které byly v rámci monitoringu nacházeny v pylu a medu, nicméně metoda může být genericky rozšířena o další aktivní složky přípravků na ochranu rostlin.

3.2 Princip metody

Pesticidy jsou ze vzorku extrahovány acetonitrilem za intenzivního třepání v centrifugační kyvetě. Acetonitril je ze směsi s vodou oddělen po přidavku chloridu sodného a síranu hořečnatého. Analýza extraktů vzorků se provádí metodou ultraúčinné kapalinové chromatografie a s hmotnostní spektrometrií za ionizace elektrosprejem.

Tabulka I: Přehled stanovovaných účinných látek

#	Analyt (účinná látka)	CAS#
1	acetamiprid	[135410-20-7]
2	acrinathrin	[101007-06-1]
3	azoxystrobin	[131860-33-8]
4	benalaxyl	[71626-11-4]
5	bifenthrin	[82657-04-3]
6	boscalid	[1888425-85-6]
7	carbendazim	[10605-21-7]
8	clomazone	[81777-89-1]
9	cyfluthrin, beta-isomer	[68359-37-5]
10	cypermethrin	[52315-07-8]
11	cyproconazole	[113096-99-4]
12	diethyltoluamid (DEET)	[94271-03-1]
13	deltamethrin (cis-deltamethrin)	[52918-63-5]
14	desmedipham	[13684-56-5]
15	difenoconazole	[119446-68-3]
16	dichlormid	[37764-25-3]
17	dimethenamide	[163515-14-8]
18	dimethachlor	[50563-36-5]
19	dimoxystrobin	[149961-52-4]
20	ethofumesate	[26225-79-6]
21	etofenprox	[80844-07-1]
22	fenpropimorph	[67564-91-4]
23	fluazifop	[69806-50-4]
24	fluazifop-P-butyl	[79241-46-6]
25	fluopyram	[658066-35-4]
26	flurochloridone	[61213-25-0]
27	fluroxypyr	[81406-37-3]
28	flusilazole	[85509-19-9]
29	haloxyfop	[69806-34-4]
30	chloridazon	[1698-60-8]
31	chlorotoluron	[15545-48-9]
32	chlorpyrifos	[2921-88-2]
33	chlorpyrifos-methyl	[5598-13-0]
34	imazamox	[114311-32-9]

#	Analyt (účinná látka)	CAS#
35	indoxacarb	[144171-61-9]
36	kresoxim-methyl	[143390-89-0]
37	lambda-cyhalothrin	[91465-08-6]
38	lenacil	[2164-08-1]
39	malathion	[121-75-5]
40	mandipropamide	[374726-62-2]
41	metalaxyl	[57837-19-1]
42	metamitron desamino	[36993-94-9]
43	metazachlor	[67129-08-2]
44	metconazole	[125116-23-6]
45	napropamide	[15299-99-7]
46	pendimethalin	[40487-42-1]
47	pethoxamid	[106700-29-2]
48	phenmedipham	[13684-63-4]
49	picloram	[1918-02-1]
50	picoxystrobin	[117428-22-5]
51	piperonyl-butoxide	[51-03-6]
52	prochloraz	[67747-09-5]
53	propaquizafop	[111479-05-1]
54	propiconazole	[60207-90-1]
55	propyzamide	[23950-58-5]
56	prosulfocarb	[52888-80-9]
57	prothioconazole-desthio	[120983-64-4]
58	quinmerac	[90717-03-6]
59	quizalofop	[76578-12-6]
60	quizalofop-P-ethyl	[100646-51-3]
61	spiroxamin	[118134-30-8]
62	tau-fluvalinate	[102851-06-9]
63	tebuconazole	[107534-96-3]
64	terbuthylazine	[5915-41-3]
65	tetraconazole	[112281-77-3]
66	thiacloprid	[111988-49-9]
67	thiophanate-methyl	[23564-05-8]
68	triforine	[26644-46-2]
69	trinexapac ethyl	[95266-40-3]

3.3 Bezpečnost práce

Pesticidy zařazené do metody mají velmi rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti, odlišnou toxicitu i projevy intoxikace. S čistými a koncentrovanými standardy je proto třeba pracovat jako s toxickými materiály, tj. látkami, které po vdechnutí, požití nebo proniknutí kůží mohou i v malém množství způsobit akutní nebo chronické poškození zdraví. Zbytky standardů a zásobních standardních roztoků jsou ukládány samostatně a po expiraci řízeně likvidovány v souladu s interními předpisy.

3.4 Chemikálie a spotřební materiál

- certifikované individuální standardy pesticidů, např. LGC (Dr. Ehrenstorfer, SRN), Sigma-Aldrich (USA) nebo jiných výrobců akreditovaných podle normy ČSN EN ISO 17034
- metanol – LiChrosolv, gradient grade, Merck (SRN)
- acetonitril – Chromasolv, gradient grade, Sigma-Aldrich (USA)
- aceton – p.a., Penta (ČR)
- síran hořečnatý, > 98 %, Fluka (USA)
- chlorid sodný, Penta (ČR)
- mravenčan amonný, 99,999 %, Sigma-Aldrich (USA)
- kyselina mravenčí pro hmotnostní spektrometrii, Sigma-Aldrich (USA)
- trifenylylfosfát: vnitřní standard Sigma-Aldrich (USA)
- pipetovací špičky 0,1 ml, 0,5 ml, 1 ml, 5 ml např. Combitip Advanced EPPENDORF
- centrifugační plastové zkumavky (kyvety), objem 15 ml, 50 ml, např. GOSSELIN (FR)
- oktadecylsilan C₁₈, např. Bondesil C₁₈, 40 μm, Varian (USA)
- PSA (primární-sekundární amin), např. Bondesil PSA, 40 μm, Agilent Technologies (USA)

Poznámka: chemikálie a materiály uvedených specifikací a dodavatelů byly použity při vývoji a validaci této metody, lze ale použít položky od alternativních dodavatelů, pokud vykazují stejné nebo lepší specifikace čistoty.

3.5 Přístroje a zařízení

- homogenizátor: Grindomix GM200 Retsch (SRN)
- zařízení pro přípravu deionizované vody Millipore Milli Q Integral 3, Millipore (Francie)
- centrifuga Hettich Rotina 35 R nebo 38 R, Hettich (SRN) s 15 ml a 50 ml kyvetami
- pipeta EPPENDORF MULTIPETTE Stream 1 μl – 50 ml
- běžné laboratorní sklo a vybavení
- LC-MS systém:
 - kapalinový chromatograf Waters Acquity UPLC (USA)
 - hmotnostním spektrometr Waters Xevo TQ-S (USA)
 - analytická kolona Acquity HSS T3, 100 × 2,1 mm; 1,8 μm, Waters (USA)

3.6 Pracovní postup

3.6.1 Odběr a uchování vzorků

Odběr vzorků pro stanovení pesticidů se provede podle platných metodik s přihlédnutím k zásadám uvedeným v ČSN 56 0253. Za reprezentativní množství vzorku se považuje nejméně 100 g medu, resp. 20 g pylu. Zkušební vzorky musí být v laboratoři uchovávány před analýzou při teplotě -18°C v mrazícím zařízení a připraveny pro analýzu v souladu s nařízením Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 396/2005, Příloha 1, část A, a normou ČSN EN 15 662.

3.6.2 Příprava zásobních a pracovních roztoků standardů

Certifikované standardy pesticidů se skladují v originálním balení v mrazícím zařízení při teplotě -18 °C nebo nižší. Z nich se připravují zásobní roztoky pesticidů nejčastěji do 10 ml odměrných baněk, optimální navážka standardu je 10 – 50 mg. Pro výpočet koncentrace je nezbytné koncentraci korigovat na čistotu standardu uvedenou v certifikátu dodaného výrobcem. Standard se doplňuje na příslušný objem zvoleným rozpouštědlem které podle dostupných dat splňuje následující kritéria:

- rozpustnost analytu v daném rozpouštědle
- kompatibilita rozpouštědla s LC-MS/MS
- stabilita standardu v daném rozpouštědle

Z důvodu stability zásobních standardů se používá 1% roztok kyseliny mravenčí v daném rozpouštědle. Zásobní roztoky jsou uchovávány při teplotě -18 °C s uzávěry zajištěnými proti úniku roztoku např. parafilmem. Ze zásobních roztoků pesticidů se postupným ředěním připraví primární směsné roztoky v acetonitrilu o koncentraci 50 µg/ml do 10 ml odměrných baněk. Jejich dalším smísením v 10 ml baňce vznikne zásobní směsný roztok (A) o koncentraci 5 000 ng/ml a 400 ng/ml, který je použit pro přípravu pracovních roztoků (B), viz **Tab. II**.

Tabulka II: Příprava zředěných směsných standardů v acetonitrilu pro přípravu matričních standardů

Výsledná koncentrace kalibračního roztoku (matriční standard) (C) [ng/ml]	Pracovní roztok (B) pro přípravu matričního standardu (C) [ng/ml]	Výsledný objem pracovního roztoku (A) [ml]	Zásobní směsný roztok (A) pro přípravu pracovního roztoku (B) [ng/ml]	Pipetovaný objem zásobního roztoku (A) [ml]	Pipetovaný objem acetonitrilu [ml]
100	2000	1	5000	0,40	0,60
50	1000	1	5000	0,20	0,80
20	400	2	5000	0,16	1,84
10	200	1	400	0,50	0,50
5	100	1	400	0,25	0,75
2	40	1	400	0,10	0,90
1	20	1	400	0,05	0,95

Kalibrační roztoky matričních standardů (C) jsou připravovány přidavkem pracovního roztoku standardu (B) v čistém rozpouštědle o vyšší koncentraci do extraktu matrice neobsahující rezidua sledovaných látek (příp. do extraktu matrice naředěného odpovídajícím způsobem). Extrakt matrice pro matriční kalibraci se připraví dle postupu uvedeném v kapitole 3.6.3, s tím rozdílem, že se během extrakce ke vzorku nepřidává roztok vnitřního standardu. Kalibrační roztoky matričních standardů jsou připraveny následovně: přímo do vialky s 0,9 ml extraktu matrice se přidá 0,05 ml pracovního roztoku standardu směsi pesticidů (B) a 0,05 ml vnitřního standardu TPP (trifenylfosfát) o koncentraci 1 µg/ml. Po uzavření se obsah třepáním promíchá. Takto připravené roztoky je možno skladovat při 5 °C až 1 měsíc.

Pro LC–MS je obvykle volen kalibrační rozsah v rozmezí 1 – 100 ng/ml a pokud koncentrace analytu ve vzorku tento rozsah přesahuje, je zapotřebí vzorek odpovídajícím způsobem naředit a měření zopakovat.

3.6.3 Extrakce analytů ze vzorku

Homogenizace vzorků se provádí ve výše uvedených zařízeních (viz kapitola 3.5). V případě medu se vzorek mírně nahřeje (asi 40 °C) a tyčinkou se 3 minuty promíchává.

Med: 5 g medu se naváží s přesností na 0,01 g do 50 ml centrifugační kyvety a přidá se 5 ml 1% kyseliny mravenčí. Následně se přidá 10 ml acetonitrilu, kyveta se pevně uzavře a 2 min se obsah intenzivně promíchává třepáním. Do kyvety se přidá předvážený síran hořečnatý (4 g) a chlorid sodný (1 g). Kyveta se rychle uzavře a 1 min intenzivně třepe, aby ze síranu nevznikly hrudky. Během třepání se kyveta zahřívá, protože reakce vody se síranem hořečnatým je exotermní. Následně se přidá 100 µl roztoku vnitřního standardu o koncentraci 5 µg/ml a po důkladném protřepání se kyveta odstředí při 10 000 min⁻¹ po dobu 5 min. Z horní vrstvy

se odebere supernatant pomocí pasteurovy pipety do vialky. Výsledný obsah matrice v extraktu je 0,5 g/ml a koncentrace vnitřního standardu 50 ng/ml.

Pyl: 2 g pylu se naváží s přesností na 0,01 g do 50 ml centrifugační kyvety a přidají se 2 ml 1% kyseliny mravenčí. Kyveta se 30 sekund protřepává. Následně se přidají 4 ml acetonitrilu, kyveta se pevně uzavře a 4 min se obsah intenzivně promíchává třepáním. Do kyvety se přidá předvážený síran hořečnatý (0,8 g) a chlorid sodný (0,2 g). Kyveta se rychle uzavře a 4 min intenzivně třepe, aby ze síranu nevznikly hrudky. Během třepání se kyveta zahřívá, protože reakce vody se síranem hořečnatým je exotermní. Následně se přidá 40 µl roztoku vnitřního standardu o koncentraci 5 µg/ml a po důkladném protřepání se kyveta odstředí při 10 000 min⁻¹ po dobu 5 min. Z horní vrstvy se odeberou přibližně 3 ml supernatantu pomocí pasteurovy pipety do 15 ml centrifugační kyvety a kyveta se umístí na 2 hodiny do mrazničky (-18 °C). Ihned po vyjmutí kyvety z mrazničky se odebere přibližně 2 ml extraktu do 15 ml centrifugační kyvety a 1 min se intenzivně třepe s 50 mg C₁₈, 300 mg MgSO₄ a 50 mg PSA. Poté se kyveta odstředí při 6 000 min⁻¹ po dobu 2 minut a opatrně se odebere (Pasteurovou pipetou) přečištěný extrakt do vialky k analýze. Výsledný obsah matrice v extraktu je 0,5 g/ml a koncentrace vnitřního standardu 50 ng/ml.

3.6.4 LC-MS/MS analýza

Separace analytů se provádí pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC). Alikvotní podíl vzorku je separován na koloně Acquity HSS T3 a detekován pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie. Podmínky chromatografické separace, ionizace elektrosprejem i MS/MS detekce jsou popsány v Tabulce III a IV.

3.6.4.1 Příprava mobilní fáze

MF A1: 5mM mravenčan amonný a 0,1 % kyseliny mravenčí ve vodě: 1 l deionizované vody (objem se odměří odměrným válcem) se smíchá s 5 ml mravenčanu amonného o koncentraci 1 mol/l a následuje přidavek 1 ml kyseliny mravenčí.

MF B1: 5mM mravenčan amonný a 0,1 % kyseliny mravenčí v metanolu: 1 l metanolu (objem se odměří odměrným válcem) se smíchá s 5 ml mravenčanu amonného o koncentraci 1 mol/l a následuje přidavek 1 ml kyseliny mravenčí.

Tabulka III: Podmínky stanovení UHPLC–(ESI+)–MS/MS analýza reziduí pesticidů v medu a pylu pylu (technické parametry nastavení hmotnostního spektrometru vč. interface jsou určeny pro Waters Xevo TQ-S)

UHPLC	
kolona	Acquity HSS T3 (100 × 2,1 mm × 1,8 μm)
mobilní fáze	A: voda + 5mM mravenčan amonný + 0,1% kyselina mravenčí B: metanol + 5mM mravenčan amonný + 0,1% kyselina mravenčí
gradient	Čas
	Průtok
	A
	B
	Změna gradientu
	(min)
	(ml/min)
	%
	%
	0
	0,3
	90
	10
	1
	0,35
	50
	50
	lineárně
	11
	0,45
	5
	95
	lineárně
	12
	0,6
	0
	100
	lineárně
	14
	0,6
	0
	100
	skokově
	16
	0,5
	90
	10
	skokově
objem nastříkovaného vzorku	2,50 μl
teplota kolony	40 °C
teplota autosampleru	5 °C
Interface	
typ	API – typ ESI
ionizace	ESI +
„desolvation gas“	N ₂ , průtok: 800 l/h
„cone gas“	N ₂ , průtok: 150 l/h
„capillary voltage“	0,6 kV
„source offset“	10 V
„nebulizer“	7 Bar
„source temperature“	120 °C
„desolvation temperature“	350 °C
Hmotnostní analyzátor	
typ	trojitý kvadrupól
1Q - LM / HM / „ion energy“	2,49 / 14,81 / 0,7 (mění se v případě kalibrování MS)
„entrance / exit / gain“	1 / 1 / 1
2Q - LM / HM / „ion enegy“	2,8 / 14,85 / 0,7 (mění se v případě kalibrování MS)
„diff aperture one / two“	0 / 0,3 V
„colision gas“	argon, průtok: 0,14 ml/min

Tabulka IV: Parametry pro MS/MS detekci jednotlivých pesticidů

	Ionizace	Kvantifikační přechod	Kolizní energie (V)	Konfirmační přechod	Kolizní energie (V)	Retenční čas (min)
acetamiprid	ESI+	223 > 126	20	223 > 56	15	2,65
acrinathrin	ESI+	559 > 208	12	559 > 181	36	10,07
azoxystrobin	ESI+	404 > 372	15	404 > 329	35	5,2
benalaxyl	ESI+	451 > 191	12	453 > 193	14	9,54
bifenthrin	ESI+	440 > 181	15	440 > 165	63	10,97
boscalid	ESI+	343 > 307	20	343 > 140	20	5,48
carbendazim	ESI+	192 > 160	18	192 > 132	28	2,41
clomazone	ESI+	240 > 125	18	240 > 89	46	4,97
cyfluthrin, beta- isomer	ESI+	451 > 191	12	453 > 193	14	9,44 / 9,54
cypermethrin	ESI+	433 > 191	14	435 > 193	14	9,83
cyproconazole	ESI+	292 > 70	18	292 > 125	24	5,73 / 5,94
DEET	ESI+	192 > 119	18	192 > 91	28	4,55
deltamethrin (cis- deltamethrin)	ESI+	523 > 281	14	521 > 279	14	9,84
desmedipham	ESI+	318 > 182	12	318 > 136	26	4,75
difenoconazole	ESI+	406 > 251	25	408 > 253	25	7,1 / 7,63
dichlormid	ESI+	208 > 81	12	208 > 98	14	3,81
dimethenamide	ESI+	276 > 244	14	276 > 168	26	5,46
dimethachlor	ESI+	256 > 224	15	256 > 148	25	4,84
dimoxystrobin	ESI+	327 > 205	10	327 > 116	21	6,67
ethofumesate	ESI+	304 > 121	20	304 > 161	25	5,2
etofenprox	ESI+	394 > 107	43	394 > 177	15	10,81
fenpropimorph	ESI+	304 > 147	28	304 > 117	55	5,16
fluazifop	ESI+	328 > 282	20	328 > 91	30	5,3
fluazifop-P- butyl	ESI+	384 > 282	22	384 > 328	16	8,39
fluopyram	ESI+	397 > 208	18	397 > 145	50	6,02
flurochloridone	ESI+	312 > 292	20	312 > 89	20	5,86
fluroxypyr	ESI+	255 > 181	22	255 > 209	16	3,32
flusilazole	ESI+	316 > 247	18	316 > 165	28	6,49
haloxyfop	ESI+	362 > 316	18	362 > 91	30	6,67
chloridazon	ESI+	222 > 92	25	222 > 77	30	2,75
chlorotoluron	ESI+	213 > 726	20	213 > 46	14	4,25
chlorpyrifos	ESI+	350 > 198	20	352 > 200	20	8,84
chlorpyrifos- methyl	ESI+	324 > 125	20	322 > 125	20	7,54
imazamox	ESI+	306 > 261	20	306 > 193	24	2,83
indoxacarb	ESI+	528 > 203	40	528 > 56	25	7,78
kresoxim- methyl	ESI+	314 > 116	12	314 > 206	7	6,74

	Ionizace	Kvantifikační přechod	Kolizní energie (V)	Konfirmační přechod	Kolizní energie (V)	Retenční čas (min)
lambda-cyhalothrin	ESI+	467 > 225	20	469 > 227	20	9,59
lenacil	ESI+	235 > 153	16	235 > 136	32	4,53
malathion	ESI+	331 > 127	12	331 > 99	24	5,67
mandipropamide	ESI+	412 > 328	14	412 > 356	8	5,53
metalaxyl	ESI+	280 > 220	13	280 > 192	17	4,62
metamitron desamino	ESI+	188 > 160	20	188 > 77	28	2,72
metazachlor	ESI+	320 > 70	22	320 > 125	36	7,24
metconazole	ESI+	272 > 129	16	272 > 171	18	6,25
napropamide	ESI+	294 > 70	20	294 > 125	38	5,58
pendimethalin	ESI+	282 > 212	10	282 > 194	17	8,93
pethoxamid	ESI+	296 > 131	20	296 > 250	12	6,29
phenmedipham	ESI+	301 > 168	10	301 > 136	22	4,88
picloram	ESI+	241 > 195	22	243 > 197	21	2,29
picoxystrobin	ESI+	368 > 145	22	368 > 205	10	6,58
piperonyl- butoxide	ESI+	356 > 177	11	356 > 119	37	8,71
prochloraz	ESI+	376 > 308	10	378 > 310	10	7,15
propaquizafop	ESI+	444 > 100	20	444 > 56	15	8,54
propiconazole	ESI+	342 > 159	34	342 > 69	22	7,04
propyzamide	ESI+	256 > 190	16	256 > 173	23	5,67
prosulfocarb	ESI+	252 > 91	22	252 > 128	13	8
prothioconazole- desthio	ESI+	314 > 70	18	312 > 70	18	6,35
quinmerac	ESI+	222 > 204	15	222 > 141	30	2,81
quizalofop	ESI+	344 > 299	18	346 > 301	18	6,42
quizalofop-P- ethyl	ESI+	373 > 299	22	373 > 91	32	8,22
spiroxamin	ESI+	298 > 144	20	298 > 100	32	5,18 / 5,26
tau-fluvalinate	ESI+	503 > 208	8	503 > 181	26	10,35
tebuconazole	ESI+	308 > 70	22	308 > 125	40	6,88
terbuthylazine	ESI+	230 > 174	16	230 > 69	35	5,46
tetraconazole	ESI+	372 > 159	30	372 > 70	20	6,14
thiacloprid	ESI+	253 > 126	20	253 > 90	37	2,84
thiophanate- methyl	ESI+	343 > 151	22	343 > 93	46	3,55
triforine	ESI+	435 > 390	10	437 > 392	10	4,83 / 5,06
trinexapac ethyl	ESI+	253 > 69	15	253 > 207	13	4,7
TPP (ISTD)	ESI+	327 > 152	40	327 > 77	35	7,15

3.6.4.2 Identifikace a kvantifikace analytů

Pro identifikaci a kvantifikaci se využívá analyzátor typu trojitý kvadrupól, kdy jsou specifické přechody měřeny v tzv. MRM módu („multiple reaction monitoring“). Identifikace analytů se provádí porovnáním retenčního času píku charakteristického produktového iontu (kvantifikační přechod) v chromatogramu neznámého vzorku a standardu.

Konfirmace pozitivních nálezů je založena na přítomnosti píku charakteristického produktového iontu (tzv. konfirmačního přechodu), přičemž poměr intenzit kvantifikačního a konfirmačního iontu odpovídá poměru těchto iontů v kalibračním standardu o odpovídající intenzitě.

Kvantitativní vyhodnocení je založeno na technice externí kalibrace s korekcí na vnitřní standard, metodou kalibrační křivky. V případě, že je nález analytu vyšší, než nejvyšší koncentrace kalibrační křivky, je možné vzorek ředit acetonitrilem. V tomto případě je pak potřeba příslušně naředit i extrakt blanku použitý pro matriční standardy a celou analýzu včetně kalibrace provést znovu.

3.6.5 Kalibrační postup

Kalibrace je zpravidla prováděna na minimálně čtyřech koncentračních hladinách odpovídajících předpokládaným nálezům. Kalibrace se provádí v každé sérii vzorků, v případě velkých sérií je řada kalibračních roztoků analyzována po 15-20 reálných vzorcích. Vzhledem k významnému vlivu matrice na relativní odezvy analytů (matriční efekty), je vhodné provádět kalibraci pomocí matričních standardů, tj. standardů připravených z extraktu vhodně zvoleného materiálu neobsahujícího rezidua analytů (blanku) - příprava matričních standardů - viz Kapitola 3.6.2. V odůvodněných případech je možné kvantifikovat metodou externí kalibrace z rozpouštědlových standardů, ale jen v případě že je zřejmé, že matriční efekt lze v daném případě zanedbat. Obecné požadavky na kalibrační a kontrolní postupy uvádí dokument SANTE/11813/2017, čl. C14 až C28.

Kalibrace, korekce na vnitřní standard a další vyhodnocení naměřených dat je zpracováváno pomocí softwarového vybavení LC-MS/MS, případně je jako alternativu možno použít program Microsoft Excel, přičemž je kontrolována linearita kalibrační křivky a rozptyl pomocí koeficientu determinace (R^2).

Pro výpočet koncentrace analytu ve vzorku metodou externí kalibrace s korekcí na vnitřní standard se korekce provádí následujícím způsobem:

$$A_N = \frac{A_a}{A_{IS}},$$

tyto hodnoty jsou následně vynášeny do závislosti na koncentraci analytu (ng/ml). Z kalibrační závislosti lze tedy vypočítat koncentraci analytu ve vzorku (ng/ml) a přepočet koncentrace analytu ve vzorku metodou externí kalibrace následovně:

$$C_{vz} = C_{cal} \cdot f$$

$$f = \frac{V_{extrakt}}{m}$$

A_N	korigovaná plocha
A_a	plocha analytu
A_{IS}	plocha vnitřního standardu
C_{vz}	koncentrace analytu ve vzorku (µg/kg)
C_{cal}	koncentrace analytu vypočítaná z kalibrační závislosti (ng/ml)
$V_{extrakt}$	objem extraktu (ml)
m	navážka vzorku (g)
f	přepočítávací faktor (obsah matrice v extraktu)

V případě, že není dostupná vhodná matrice bez obsahu cílových pesticidů, lze kalibrovat pomocí metody standardního přídávku, přičemž by se měla volit taková koncentrace přidávaných analytů, aby odezva detektoru stoupla o přibližně o 50 %, ale je nutné ověřit, aby koncentrace analytu po přídávku byla stále v lineárním rozsahu metody (dle aktuálního stavu přístroje nebo dle Tabulky V). Aby byl vliv matrice shodný v analyzovaném vzorku a ve standardním přídávku je vhodné volit přídávky standardu o malém objemu ve srovnání s objemem vzorku (např. 0,95 ml vzorku a 0,05 ml standardu). Výpočet koncentrace pomocí metody standardního přídávku je následující:

$$C_{VZ} = \frac{A_{VZ} \cdot C_{PŘ}}{A_{VZ+PŘ} - \frac{V_{VZ}}{V_{VZ} + V_{PŘ}} \cdot A_{VZ}}$$

A_{VZ}	plocha analytu ve vzorku
$A_{VZ+PŘ}$	plocha analytu ve vzorku po přidavku standardu
V_{VZ}	objem vzorku při přípravě přidavku (ml)
$V_{PŘ}$	objem standardu při přípravě přidavku (ml)
C_{VZ}	koncentrace analytu vypočítaná z metodou standardního přidavku (ng/ml)
$C_{PŘ}$	koncentrace analytu přidaná přidavkem standardu (ng/ml)

Přepočet na navážku vzorku se provádí stejným způsobem jako v předchozím případě.

3.6.6 Pracovní charakteristiky

Pracovní charakteristiky metody byly zjišťovány pro pesticidy ve vzorcích pylu a medu na základě přidavku standardů ke vzorkům neobsahující cílové látky. Po přidavku roztoku byl vzorek promíchán a byl ponechán minimálně 20 min při laboratorní teplotě. Následně byla provedena extrakce výše popsaným extrakčním postupem, viz kapitola 3.6.3. Průměrná výtěžnost a opakovatelnost postupu byla dokumentována koncentrační hladině 0,04 mg/kg a 0,004 mg/kg v případě medu. Vzhledem k obtížné dostupnosti pylu bez obsahu cílových pesticidů byla validace pro tuto matrici provedena pouze na hladině 0,04 mg/kg. Získané pracovní charakteristiky metody pro jednotlivé matrice jsou uvedeny v Tabulce V. Aktuální meze stanovitelnosti jsou vždy poněkud závislé na aktuálním stavu analytického systému a je proto třeba, aby byly zahrnuty do pravidelné verifikace metody (spolu s kontrolou výtěžnosti).

Pro všechny pesticidy uvedené v Tabulce V umožňuje tato metoda s velmi dobrou přesností – tj. opakovatelností a výtěžností – měřit rezidua pesticidů na koncentračních hladinách menších než 0,01 mg/kg. Pro většinu cílových analytů bylo dosaženo meze kvantifikace 0,002 mg/kg. Zároveň tato metoda poskytuje velmi dobré a stabilní pracovní charakteristiky, které zcela splňují požadavky dokumentu SANTE/11813/2017 závazného pro úřední kontrolu reziduí pesticidů.

Tabulka V: Výťažnosti, opakovatelnosti (RSD) a meze kvantifikace (LOQ) dosažené při validaci (n=6)

	Med					Pyl			Lineární rozsah od-do (mg/kg)**
	Výtěžnost %	RSD %	Výtěžnost %	RSD %	LOQ mg/kg	Výtěžnost %	RSD %	LOQ mg/kg	
	0,04 mg/kg		0,004 mg/kg			0,04 mg/kg			
acetamiprid	93	1	99	7	0,002	91	3	0,002	LOQ - 0,20
acrinathrin	95	4	94	9	0,004	81	7	0,004	LOQ - 0,20
azoxystrobin	95	1	96	2	0,002	88	2	0,002	LOQ - 0,10
benalaxyl	94	1	98	3	0,002	101	1	0,002	LOQ - 0,20
cyfluthrin, beta isomer	95	6	<LOQ	<LOQ	0,010	100	1	0,020	LOQ - 0,20
bifenthrin	95	2	93	6	0,002	106	3	0,002	LOQ - 0,20
boscalid	93	3	97	3	0,002	97	2	0,002	LOQ - 0,20
carbendazim	81	3	83	5	0,002	77	2	0,002	LOQ - 0,20
clomazone	93	1	97	3	0,002	93	2	0,002	LOQ - 0,20
cypermethrin	95	4	95	7	0,010	88	1	0,010	LOQ - 0,20
cyproconazole	97	1	96	4	0,002	84	2	0,002	LOQ - 0,20
DEET	92	1	94	4	0,002	98	3	0,002	LOQ - 0,20
deltamethrin	95	4	99	5	0,002	100	6	0,004	LOQ - 0,20
desmedipham	93	2	93	3	0,002	92	2	0,002	LOQ - 0,20
difenoconazole	96	1	95	3	0,002	83	3	0,002	LOQ - 0,20
dichlormid	93	2	102	9	0,004	103	4	0,004	LOQ - 0,10
dimethachlor	95	1	98	4	0,002	90	2	0,002	LOQ - 0,10
dimethenamid	94	1	97	3	0,002	92	2	0,002	LOQ - 0,20
dimoxystrobin	95	2	101	4	0,002	95	2	0,002	LOQ - 0,20
ethofumesate	96	2	94	4	0,002	95	2	0,002	LOQ - 0,10
etofenprox	92	3	93	3	0,002	102	2	0,004	LOQ - 0,20
fenpropimorph	92	1	95	3	0,002	75	1	0,002	LOQ - 0,10
fluazifop	94	2	99	7	0,002	62*	1	0,002	LOQ - 0,20
fluazifop-P-butyl	93	2	93	5	0,002	84	2	0,002	LOQ - 0,20
fluopyram	94	2	96	2	0,002	95	2	0,002	LOQ - 0,20
flurochloridone	93	3	98	3	0,002	100	3	0,002	LOQ - 0,20
fluroxypyr	93	10	<LOQ	<LOQ	0,01	67*	1	0,01	LOQ - 0,20
flusilazole	95	2	95	3	0,002	86	2	0,002	LOQ - 0,20
haloxyfop	93	4	94	9	0,004	70	4	0,004	LOQ - 0,20
chloridazon	92	2	97	3	0,002	88	3	0,002	LOQ - 0,20
chlorotoluron	93	2	99	4	0,002	116	3	0,002	LOQ - 0,20
chlorpyrifos	94	3	94	4	0,002	86	2	0,002	LOQ - 0,20
chlorpyrifos-methyl	95	5	69	15	0,002	88	5	0,002	LOQ - 0,20
imazamox	90	2	94	5	0,002	67*	1	0,002	LOQ - 0,20
indoxacarb	97	3	92	7	0,002	85	3	0,002	LOQ - 0,20
kresoxim-methyl	92	8	98	16	0,002	91	6	0,010	LOQ - 0,10
lambda-cyhalothrin	96	4	128	7	0,004	75	1	0,010	LOQ - 0,20

	Med					Pyl			Lineární rozsah od-do (mg/kg)**
	Výtěžnost %	RSD %	Výtěžnost %	RSD %	LOQ mg/kg	Výtěžnost %	RSD %	LOQ mg/kg	
	0,04 mg/kg		0,004 mg/kg			0,04 mg/kg			
lenacil	93	1	98	4	0,002	97	3	0,002	LOQ - 0,20
malathion	92	1	95	0	0,002	98	2	0,002	LOQ - 0,20
mandipropamide	93	2	95	3	0,002	95	2	0,002	LOQ - 0,20
metalaxyl	94	2	90	4	0,002	87	1	0,002	LOQ - 0,10
metamitron desamino	93	3	96	2	0,002	91	3	0,002	LOQ - 0,20
metazachlor	93	3	96	2	0,002	91	3	0,002	LOQ - 0,20
metconazole	93	1	97	3	0,002	81	2	0,002	LOQ - 0,20
napropamide	93	2	93	4	0,002	95	2	0,002	LOQ - 0,10
pendimethalin	93	2	95	5	0,002	85	3	0,002	LOQ - 0,20
pethoxamid	93	1	97	3	0,002	101	2	0,002	LOQ - 0,20
phenmedipham	93	2	96	6	0,002	101	3	0,002	LOQ - 0,20
picloram	94	5	102	10	0,010	NA	NA	0,020	LOQ - 0,20
picoxystrobin	93	4	97	3	0,002	97	4	0,002	LOQ - 0,04
piperonyl-butoxide	93	1	93	3	0,002	107	2	0,002	LOQ - 0,04
prochloraz	93	1	99	4	0,002	100	2	0,002	LOQ - 0,20
propaquizafop	93	2	93	3	0,002	91	1	0,002	LOQ - 0,20
propiconazole	95	1	99	4	0,002	98	2	0,002	LOQ - 0,20
propyzamide	90	2	99	4	0,002	97	3	0,002	LOQ - 0,10
prosulfocarb	92	1	95	0	0,002	97	1	0,002	LOQ - 0,20
prothioconazole-desthio	94	2	93	3	0,002	87	2	0,002	LOQ - 0,20
quinmerac	88	1	94	4	0,002	13*	8	0,002	LOQ - 0,20
quizalofop	90	14	<LOQ	-	0,010	64*	11	0,020	LOQ - 0,20
quizalofop-P-ethyl	93	1	94	2	0,002	82	1	0,002	LOQ - 0,20
spiroxamin	95	2	95	5	0,002	75	1	0,002	LOQ - 0,20
tau-fluvalinate	95	4	93	6	0,002	84	6	0,002	LOQ - 0,20
tebuconazole	93	2	95	5	0,002	78	2	0,002	LOQ - 0,20
terbuthylazine	93	1	98	3	0,002	92	2	0,002	LOQ - 0,04
tetraconazole	94	2	94	4	0,002	116	6	0,002	LOQ - 0,20
thiacloprid	93	2	95	3	0,002	68*	7	0,002	LOQ - 0,20
thiophanate-methyl	88	2	97	3	0,002	104	4	0,002	LOQ - 0,20
triforine	101	4	97	17	0,002	88	7	0,004	LOQ - 0,20
trinexapac-ethyl	91	3	94	9	0,002	85	2	0,002	LOQ - 0,20

* Výsledky lze korigovat na výtěžnost, případně využít postup bez přečištění extraktu, pro dosažení lepší výtěžnosti

** Lineární rozsah je stanoven jako lineární část kalibrační křivky

4 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

V poslední době bylo v odborných publikacích popsáno několik multireziduálních analytických metod pro stanovení reziduí pesticidů v medu a pylu pomocí HPLC-MS/MS a některé z nich i založené na extrakční metodě QuEChERS. Tyto metody byly zpravidla určeny pro kontrolu reziduí v medu jako potravině. Výhody metody popsané v této metodice spočívají především v jejím rozsahu a vysoké citlivosti, protože pokrývá téměř 70 jednotlivých pesticidních látek, které se ve vzorcích mohou reálně vyskytovat na stopových až ultrastopových hladinách. Tyto pesticidy jsou vybrány cíleně, na základě údajů o jejich spotřebě na relevantní plodiny v ČR [9].

Výhody uvedené metody jsou rovněž rychlost, kdy je vzorek k měření připraven během několika minut, minimální náklady na vybavení laboratoře (z přístrojů se používá pouze centrifuga a váhy) a díky selektivní extrakci pesticidů ze vzorku i malé množství ko-extraktů. To umožňuje vynechání přečišťovacího kroku v případě medu a využití jednoduchého a rychlého přečištění v případě pylu.

Pracovní charakteristiky popisované metody pro stanovení vybraných reziduí pesticidů ve vzorcích medu a pylu byly validovány. Byly dosaženy limity kvantifikace výrazně nižší než 0,01 mg/kg, tudíž je touto metodou možné efektivně monitorovat i velmi nízké hladiny reziduí všech relevantních pesticidů akutně ohrožujících opylovače.

5 POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metoda byla primárně vyvinuta pro analýzy v laboratořích Ústředního zkušebního a kontrolního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ), případně dalších institucí a laboratoří, za účelem sledování hladin reziduí pesticidů v produktech včel. Tyto údaje jsou pro analýzu rizika plynoucího pro včely z používání přípravků na ochranu rostlin klíčové.

Popisovaná metoda poskytuje rychlou a přesnou informaci o množství reziduí pesticidů v medu a pylu. Parametry a pracovní charakteristiky analytické metody založené na principu UHPLC-MS/MS jsou pro sledovaná rezidua pesticidů v souladu s požadavky uvedených v závazném dokumentu SANTE/11813/2017 [10].

6 EKONOMICKÉ ASPEKTY

Využití metodiky kontrolními laboratořemi umožní zvýšit efektivitu zjišťování výskytu reziduí pesticidů v medu a pylu, což se významně projeví v efektivnějším hodnocení a řízení rizik spojených s využíváním přípravků na ochranu rostlin (POR) s vysokou toxicitou pro

opylovače. Výsledným přínosem bude minimalizace rizik pro životní prostředí, zejména pro opylovače a přirozené nepřátele škůdců a k podpoře biodiverzity.

Ekonomicky významný přínos nepochybně vyplyne v celé oblasti zajištění řádného opylení plodin a v oblasti prevence a vyšetřování úhynu včel, případně účinné kontroly dodržování správné zemědělské praxe při aplikaci POR. Konkrétní finanční přínosy předpokládané v této oblasti nelze však přesně kvantifikovat.

Co se týká samotného analytického postupu, implementace metody zahrnuje zjištění aktuálních pracovních charakteristik, zejména ověření dostatečnosti limitů kvantifikace, linearity, ale také verifikaci metody pomocí přidavku pesticidů na předem známou hladinu a zjištění výtěžnosti, případně i opakovatelnosti metody v podmínkách konkrétní laboratoře. Za předpokladu, že by bylo provedeno 20 verifikačních a kontrolních analýz, přičemž provozní náklady na jednu analýzu by byly 3200 Kč, celkové náklady na implementaci by se rovnaly 64 tis. Kč.

Zhodnocení z hlediska ekonomických aspektů bylo provedeno za předpokladu, že laboratoř, která chce uvedenou metodu zavést, již má zkušenosti s LC-MS analýzou a vlastní tak kapalinový chromatograf s tandemovým hmotnostním spektrometrem. K realizaci analýz je tedy pak potřebné jen běžné vybavení laboratoře, viz kapitoly 3.4 a 3.5, další investice nejsou potřebné.

7 SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- [1] Annastasiades M., Lehotay S.J., Štajnbaher D., Schenck F.J.: Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and „dispersive solid-phase extraction“ for the determination of pesticide residue in produce, *J. AOAC* (2003) 86:412–431.
- [2] KASIOTIS, K.M. a kol., Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC–MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees, *Science of the Total Environment*, č. 485–486, s. 633–642, 2014.
- [3] TETTE, P.A.S. a kol., Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods, *Talanta*, č. 149, s. 124-141, 2016.
- [4] WIEST, L. a kol., Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography A*, sv. 34, č. 1218, s. 5743-5756, 2011.
- [5] VÁZQUEZ, P.P. a kol., A sensitive and efficient method for routine pesticide multiresidue analysis in bee pollen samples using gas and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, č. 1426, s. 161-173, 2015.
- [6] A, K., Refined methodology for the determination of neonicotinoid pesticides and their metabolites in honey bees and bee products by liquid chromatography-tandem mass

spectrometry (LC-MS/MS), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, sv. 10, č. 58, s. 5926-5931, 2010.

- [7] ORSO, D. a kol., Multiresidue determination of pesticide residues in honey by modified QuEChERS method and gas chromatography with electron capture detection, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, sv. 8, č. 25, 2014.
- [8] KUJAWSKI, M.W., PINTEAUX, E. a NAMIESNIK, J., Application of dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of selected organochlorine pesticides in honey by gas chromatography–mass spectrometry, *European Food Research and Technology*, sv. 8, č. 234, s. 223-230, 2012.
- [9] Spotřeba přípravků na ochranu rostlin (POR) a dalších prostředků (DP) a spotřeba účinných látek obsažených v POR a DP; UKZUZ; Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/pripravky-na-or/ucinne-latky-v-por-statistika-spotreba/spotreba-pripravku-na-or/>; přístup získán 24.9.2018.
- [10] Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/11813/2017.

8 SEZNAM PUBLIKACÍ PŘEDCHÁZEJÍCÍCH METODICE

Této práci nepředchází žádné publikované studie.

9 SEZNAM ZKRATEK

CAS	Chemical Abstract Services Number
DEET	diethyltoluamid
dSPE	disperzní extrakce na tuhou fázi
EI	elektronovou ionizací
ESI	v MS: ionizace elektrosprejem
GC	plynová chromatografie
GCB	aktivní uhlí
ISTD	vnitřní standard
LC	kapalinová chromatografie; UHPLC: ultraúčinná kapalinová chromatografie
LOQ	mez kvantifikace (<i>Limit of quantification</i>)
MRM	multiple reaction monitoring
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
PSA	primární-sekundární amin
Q	kvadrupólový analyzátor
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe
SPE	extrakce na tuhou fázi
SZPI	Státní zemědělská a potravinářská inspekce
TOF	průletový analyzátor
ÚKZÚZ	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

10 AUTOŘI A OPONENTI

Metodu zpracovali:

Ing. Marie Suchanová, Ph.D. (25 %), Ing. Dana Schusterová (25 %), prof. Ing. Vladimír Kocourek, CSc. (25 %), prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc. (25 %)

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,
Ústav analýzy potravin a výživy, FPBT
Technická 3, 166 28 Praha 6 - Dejvice

Září 2018, Praha

Oponenti:

- 1) **Odborník v oboru: Ing. Radim Štěpán, Ph.D.**, Inspektorát SZPI v Praze, NRL, Za Opravnou 300/6, 150 00 Praha 5
- 2) **Státní správa: Ing. Markéta Pospíchalová**, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Hroznová 63/2, 656 06 Brno

Marie Suchanová, Dana Schusterová, Vladimír Kocourek, Jana Hajšlová

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Metody hodnocení výskytu reziduů pesticidů v pylu a v medu

Vydala: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Technická 5, 166 28 Praha 6

Oponenti: Ing. Radim Štěpán, Ph.D., Ing. Markéta Pospíchalová

Rok vydání: 2018

Počet stran: 25

Elektronická verze publikace ve formátu PDF na CD-ROM.