

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality zemědělských produktů

Obsah organických kontaminantů v medech
různého původu

Diplomová práce



Autor práce:

Ondřej Kotal

Obor studia:

Výživa a potraviny 🌾

Vedoucí práce:

Mgr. Petr Maršík, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně. Veškeré použité podklady, ze kterých jsem čerpal informace, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a řádně citovány v textu podle normy ČSN ISO 690:2011.

V Praze dne 11.4.2018

Ondřej Kotal

Poděkování

Děkuji Mgr. Petru Maršíkovi, PhD. za odborné vedení práce, věcné připomínky a přívětivou pomoc při řešení problematiky.

Rád bych také poděkoval Katedře kvality České zemědělské univerzity v Praze za poskytnuté zázemí a celé mé rodině za podporu po celou dobu mého studia.

Souhrn

Použití přípravku na ochranu rostlin nebo léčiva v úlu i v jeho bezprostřední blízkosti může kontaminovat med organickými látkami (antibiotiky, pesticidy). Včely létají pro nektar až několik kilometrů od svých stanovišť. v medu se tak mohou objevit organické kontaminanty ze širokého okolí. Pesticidy i antibiotika neprospívají zdraví a je třeba jejich obsah v potravinách hodnotit a zkoumat. Analýza organických kontaminantů v medech není jednoduchá, protože med je nejen směs sacharidů a vody, ale může zahrnovat více než 300 dalších interferujících látek.

Cílem práce bylo stanovení profilu organických kontaminantů (pesticidů a antibiotik) v medech různého původu. Pro práci bylo shromážděno více než 100 vzorků medu, ze kterých bylo vybráno 68 pro dobrou identifikaci původu či místa komerčního prodeje. Z těchto vzorků pak bylo 5 označeno ochrannou známkou ekologického zemědělství. Organické kontaminanty byly stanoveny pomocí UHPLC-MS/MS. Nejprve byla vyvinuta metoda pro identifikaci organických kontaminantů. Do vývoje byly zařazeny metody extrakce (LLE, SPE a QuEChERS). Konečná modifikace metody byla prováděna podle protokolu QuEChERS. Na 68 vzorcích medů z celého světa byl proveden screening na rezidua pesticidů a antibiotik. Dále byla provedena kvantitativní analýza vybraných 25 vzorků, pomocí kalibrační řady 17 komerčně dostupných standardů. V medu nebyla nalezena žádná antibiotika. Profil pesticidů byl potvrzen dvěma modifikovanými metodami. V 19 % vzorků nebyl nalezen ani jeden pesticid, ve 40 % byl nalezen jeden pesticid, ve 22 % dva pesticidy, v 16 % byly nalezeny tři pesticidy a ve 3 % čtyři pesticidy. Thiacloprid a carbendazim jsou nejčastěji se vyskytující organické kontaminanty v medu. Méně často byl detekován acetamiprid, imidacloprid, tebuconazol a coumaphos. Ojedinele byl přítomen acephate, azinphos-methyl a linuron. V medu nebyly detekovány azinphos-ethyl, chlorpyrifos, dichlorvos, ethopropos, fenchlorphos, parathion methyl a prothiofos. Profil pesticidů se liší v závislosti na druhu medu. Všechny vzorky květového medu obsahovaly pesticidy, řepkový med se lišil vysokými koncentracemi carbendazimu, profil pesticidů v citrusového medu byl velice rozmanitý a fynbosový med neobsahoval pesticidy žádné. Prodloužení doby extrakce nebo interakce se sorbenty má vliv na obsah i profil pesticidů v medu.

Klíčová slova: med, kontaminace, pesticidy, antibiotika, LC-MS

Summary

The use of a plant protection product or a medicinal product in the hive and in its immediate vicinity may contaminate with organic substances (antibiotics, pesticides). Bees fly for nectar up to a few miles from their habitats. Honey can thus appear organic contaminants from a wide range. Pesticides and antibiotics are not beneficial in health and their food content needs to be evaluated and tested. Analysis of organic contaminants in honey is not simple because honey is not only a mixture of carbohydrates and water but can include more than 300 other interfering substances.

The aim of the work was to determine the profile of organic contaminants (pesticides and antibiotics) in honey of different origins. More than 100 samples of honey were collected for the work, of which 68 were selected for good identification of origin or commercial sales. From these samples, 5 was marked with a trademark of organic farming. Organic contaminants were determined by UHPLC-MS / MS. First, a method for identifying organic contaminants was developed. Development methods include extraction methods (LLE, SPE and QuEChERS). The final modification of the method was performed according to the QuEChERS protocol. About 68 samples of honey from all over the world were screened for pesticide residues and antibiotics. In addition, a quantitative analysis of selected 25 samples was performed using a calibration series of 17 commercially available standards. No antibiotics were found in honey. The pesticide profile was confirmed by two modified methods. Not one pesticide was found in 19% of the samples, one pesticide was found in 40%, two pesticides were found in 22%, three pesticides were found in 16%, and three pesticides in 3%. Thiacloprid and carbendazim are the most common organic contaminants in honey. Less commonly, acetamiprid, imidacloprid, tebuconazole and coumaphos have been detected. Acephate, azinphos-methyl and linuron were rarely present. Azinphos-ethyl, chlorpyrifos, dichlorvos, ethopropos, fenchlorphos, parathion methyl and prothiofos were not detected in honey. The profile of pesticides varies depending on the type of honey. All samples of blossom honey contained pesticides, rapeseed honey differed from high concentrations of carbendazim, the pesticide profile in citrus honey was very diverse, and no fennel honey contained any pesticides. Extending the extraction time or interaction with sorbents affects the content and profile of pesticides in honey.

Key words: honey, contamination, pesticides, antibiotics, LC-MS

Obsah

1.	Úvod	1
2.	Cíl práce a hypotéza	2
3.	Literární přehled	3
3.1.	Med	3
3.1.1.	Složení	4
3.1.1.1.	Sacharidy	5
3.1.1.2.	Voda	5
3.1.1.3.	Bílkoviny a aminokyseliny	6
3.1.1.4.	Enzymy	6
3.1.1.5.	Organické kyseliny a fenolické sloučeniny	7
3.1.1.6.	Další složky	8
3.1.2.	Využití	9
3.1.2.1.	Nutriční hodnota	10
3.1.2.2.	Antioxidační aktivita	11
3.1.2.3.	Antimikrobiální aktivita	11
3.1.2.4.	Prebiotické účinky	12
3.1.2.5.	Další využití	13
3.2.	Nežádoucí kontaminanty v medu	13
3.2.1.	Hydroxymethylfurfural	14
3.2.2.	Sekundární metabolity rostlin	15
3.2.2.1.	Pyrrrolizidinové alkaloidy	16
3.2.2.2.	Grayanotoxin	17
3.2.3.	Ostatní kontaminanty	18
4.	Hledané organické kontaminanty v medu	20
4.1.	Antibiotika	20
4.2.	Pesticidy	21
5.	Moderní analýza organických kontaminantů v medu	22
5.1.	Homogenizace, extrakce a purifikace	23
5.1.1.	LLE	23
5.1.2.	SPE	24
5.1.3.	QuEChERS	24
5.1.4.	Další extrakční a purifikační metody	25
5.2.	Separace, ionizace, detekce	26
5.2.1.	Hmotnostní spektrometrie	27
5.2.2.	Chromatografická separace	31
5.2.3.	Další techniky separace, ionizace a detekce organických kontaminantů	34
6.	Experimentální část	36
6.1.	Použité vzorky	36
6.2.	Použitý materiál	37
6.3.	Vývoj extrakční metody	40
7.	Analýza	47
8.	Výsledky	49
10.	Diskuze	58
11.	Závěr	63
12.	Literární zdroje a prameny	64
13.	Přílohy a seznam příloh	95

1. Úvod

Pozitivní vlastnosti medu byly využívány již v daleké historii lidstva a jsou produktem vytrvalé práce včelích kolonií. Med je sbíraný z velké vzdálenosti od úlů. Skládá se z pylu a nektaru rostlin, vody a hmyzích sekretů. Cenný zemědělský produkt nenáročný na skladování je nasyceným roztokem vody, cukrů, enzymů, antioxidantů a dalších významných látek. V závislosti na místě sběru může mít med na lidský organizmus bohužel i negativní vliv. Více či méně jedovaté metabolity rostlin mohou migrovat až do včelích úlů, kde se stávají součástí medu. Podobné kontaminace byly využívány dávnými předky při rituálních obětních obřadech nebo pro usmrcení celých armád protivníků. Dnes jsou již medy filtrovány a kontrolovány na přítomnost nežádoucích metabolitů rostlin.

Dnes jsou jedním z problémů potravinové produkce v různé míře používané organické látky s biocidními účinky. Environmentální kontaminace antibiotik a pesticidů se kumuluje v zemědělských produktech a může negativně ovlivnit lidské zdraví již ve velmi malých dávkách. Aplikace léčiv ve včelích úlech nebo postřiky plodin v širokém okolí mohou kontaminovat med a tím ponížít jinak velmi kvalitní včelí produkt s blahodárnými rysy. V rámci lidské výživy a kvality potravin je nezbytné organickou kontaminaci v medech zkoumat, uvažovat a studovat.

Antibiotické látky jsou v některých zemích povoleny, což může znamenat odlišnost jejich profil v závislosti na původu medu. Schvalování pesticidních látek je na úrovni států i jiných společenství odlišné. Geografický původ tedy může znamenat i jiný profil. Každá zemědělská plodina má své vlastní postupy pro regulaci škůdců a chorob, druh medu tedy může znamenat různé zastoupení jednotlivých perzistentních kontaminantů v medu.

2. Cíl práce a hypotéza

Cílem diplomové práce je stanovit obsah organických kontaminantů (pesticidů a antibiotik) v medech různého původu na základě analýzy pomocí kapalinové chromatografie kombinované s hmotnostní spektrometrií.

Hypotéza:

Profil organických kontaminantů (pesticidů a antibiotik) se může lišit v závislosti na geografickém původu, druhu nebo místě komerčního prodeje medu.

3. Literární přehled

3.1. Med

Med je komplexní směs vody, sacharidů (glukóza, fruktóza, sacharóza, maltóza), kyseliny glukonové, dusíkatých sloučenin, organických kyselin, fenolových kyselin, flavonoidů, minerálních látek, bílkovin, aminokyselin, enzymů a jiných fyto-sloučenin. Med je jednou z nejsložitějších přirozeně produkovanou směsí sacharidů vůbec (Wang et al, 2004; Bertonecelj et al, 2007). Dle vyhlášky číslo 76/2003 Sb. je v České republice medem „potravina přírodního sacharidového charakteru, složená převážně z glukózy, fruktózy, organických kyselin, enzymů a pevných částic zachycených při sběru sladkých šťáv květů rostlin (nektar), výměšků hmyzu na povrchu rostlin (medovice) nebo na živých částech rostlin včelami *Apis mellifera*, které sbírají, přetvářejí, kombinují se svými specifickými látkami, uskladňují a nechávají dehydratovat a zrát v plástech.“

Ve většině zemí světa, včetně České republiky, je med dělen podle původu na květový a medovicový a dále obchodními úpravami jednotlivých států rozdělen podle způsobu získávání. U nás na vytočený, plástečkový, lisovaný, vykapaný, filtrovaný, pastový a pekařský med (National Honey Board, 2010; vyhl. č. 76/2003 Sb. §8). Z hlediska kvality a původu medu se stanovuje kyselost medu, elektrická vodivost, aktivita diastázy, obsah a původ fenolických látek a obsah hydroxymethylfurfuralu (vyhl. č. 76/2003 Sb.).

Vzhledem k nutriční, sensorické nebo biologické hodnotě medu, byl považován za velice důležitou potravinu již 8 tisíc let před naším letopočtem, což dokládají obrazy z doby kamenné (Bansal et al., 2005). V dobách starověkého Egypta, Číny, Řecka nebo Římu se med hojně využíval jako podpora hojení ran nebo byl podáván při onemocnění střev (Al-Jabri, 2005). Použití medu v Ayurvédském léčitelství je rovněž rozmanité. Od podpory trávení, bušení srdce, léčbě krátkozrakosti až po udržování zdravých zubů a dásní či jeho údajný pozitivní vliv na herpes (Telles et al., 2007). Je zajímavé, že téměř všechny známé léky starověkého Egypta obsahují med společně s vínem a mlékem. Byl zde také používán při mumifikaci i jako oběť bohům (Zumla a Lulat, 1989). Hippokrates ve starodávném Řecku používal med v kombinaci s octem pro úlevu od bolesti, vodu s medem pro hašení žízně, medovinu pak na vysoké horečky (Zumla a Lulat, 1989; Bansal et al., 2005). V islámské

medicině je zakotven ve Svatém Koránu jako všelék; muslimský prorok Mohammad doporučil užívání medu při průjmových onemocněních (Molan, 1999). Íránský vědec a lékař Avicenna před téměř 1000 lety používal med jako jeden z nejlepších léků při léčbě tuberkulózy (Asadi-Pooya et al., 2003).

3.1.1. Složení

Sacharidy a bílkoviny jsou důležitými složkami majícími různá procentuální zastoupení v medu (Ahmad et al., 2017). Med také obsahuje téměř všechny esenciální a neesenciální aminokyseliny (s výjimkou glutaminu a asparaginu), fruktózu, glukózu, sacharózu, maltózu a galaktózu, z minerálních látek jsou zastoupeny vápník, železo, hořčík, fosfor, draslík, sodík, zinek, měď, mangan, selen a fluorid, z vitamínů pak hlavně vitamín C, riboflavin, niacin, pantotenovou kyselinu, pyridinové deriváty, ale také látky jako cholin nebo betain (National Nutrient Database for Standard Reference, 2016).

Rozdíly ve složení jsou způsobené především biologickou diverzitou okolního prostředí a místní flóry (Rollin et al., 2013), podnebím a průměrnou teplotou prostředí (Goulson et al., 2003), které mají vliv na období sběru v závislosti na schopnosti termoregulace včel (Dudley et al., 2000). Především v chladnějších obdobích může mít určitý vliv na složení minoritních složek medu i schopnost některých rostlin udržovat či zvyšovat teplotu nektaru (Norgate et al., 2010). V neposlední řadě i spektrum obsažených látek ovlivňuje doba vymetání medu. (Pasiadis et al., 2018)

Webové stránky National Honey Board uvádějí, že jen na americkém trhu je více než 300 unikátních typů medů produkovaných z různé flóry (The National Honey Board, 2018). Každý druh medu má rozdílné aroma (Uckun a Selli, 2017), unikátní sensorické hodnoty (Tahir et al., 2015) a barevné odstíny (Anand et al., 2018), které reflektují různá spektra organických i anorganických sloučenin a propůjčují medům charakteristické fyzikálně-chemické vlastnosti (Gonzaga et al., 2016; Jimenez et al., 2016; Pita-Calvo a Vazquez, 2017; Bridi et al., 2017).

Více než 300 těkavých látek bylo identifikováno v medech již ve 20. století (White, 1975; Graddon, 1979; Häusler, 1989; Häusler, 1990). Specifickými látkami ve velice širokém výběru medů z celého světa se zabývá mnoho studií (Castro-Vázquez et al., 2003; Persano Oddo et al., 2007; Stanimirova et al., 2010; Consoni et al., 2015; Karabagias et al., 2017),

přítom některé mohou i ve stopovém množství vykazovat pozitivní účinky na lidské zdraví, jiné mohou nést účinky toxické (Islam et al., 2014).

3.1.1.1. Sacharidy

Med je v podstatě přesyceným roztokem cukrů, které tvoří jeho hlavní složku (okolo 95 % v sušině) (Bogdanov et al., 2008). Nutriční hodnoty medu závisí především na poměrech sacharidů, které se obvykle odráží i na sladkosti, viskozitě, granulaci, hygroskopických vlastnostech nebo rotaci polarizovaného světla, a tudíž i na celkové energetické hodnotě (Cavia et al., 2002; Sabatini, 2007).

Hlavními cukry nacházejícími se v medu jsou hexózy fruktóza (32-44 %) a glukóza (23-38 %), další sacharidy jsou zastoupeny maximálně v procentuálním množství – galaktóza, maltóza, sacharóza (Wang et al., 2014; National Nutrient Database for Standard Reference, 2016). Rozdíly v původu medu, jsou pak ve velice malých množstvích především oligosacharidů. Pomocí GC/MS analýzy Wetwitayaklung et al. (2018) identifikovali v medech odlišného původu 19 typů di a trisacharidů, například celobiózu, gentiobiózu, melibiózu, melezitózu nebo isomaltotriózu a trehalózy.

3.1.1.2. Voda

Voda je druhou nejvíce zastoupenou složkou medů. Její obsah je závislý na několika faktorech – zeměpisném původu, potažmo půdních a klimatických podmínkách, období vmetání, vlastnostech nasbíraného nektaru, stupni zrání, manipulaci během sklizně a extrakci, zpracování nebo skladování (Sabatini, 2007; Pontara et al., 2012). Standardně se obsah vody v medech pohybuje mezi 13-25 % (Simal et al., 1983). Optimálních 17% zajišťuje mikrobiologickou nezávadnost i snadnou manipulaci (Doner, 1977; White, 1978; Sabatini, 2007). Pro udržení zdravotní nezávadnosti a zamezení fermentace medů je důležité kontrolovat aktivitu vody, která by neměla přesáhnout hodnoty 0,6 (Bogdanov, 2011). Běžně se pro medy její hodnoty v medech pohybují v rozmezí 0,49 – 0,65 (Costa et al., 2013).

Bohužel med se stal díky své ekonomické povaze velice často falšovaným, respektive ředěným artiklem (Chen et al., 2011). Díky této skutečnosti jsou vyvíjeny nové, přesnější a jednodušší metody pro stanovení celkového množství vody v produkci. Například nová metoda analýzy s použitím mikrovlnné techniky založené na základě dielektrické permitivity

byla vyvíjena především pro svou rychlost zjišťování adice vody nebo cukerných roztoků již od několika málo procent (Li et al., 2017).

3.1.1.3. Bílkoviny a aminokyseliny

Bílkoviny a aminokyseliny medu jsou původem ze slinných žláz včel nebo z nektaru a pylu rostlin, malá množství pak z medovice vylučované stejnořídlým hmyzem. V medech bylo identifikováno kolem 20 rozdílných neenzymatických bílkovin, přičemž albuminy, globuliny a nukleoproteiny jsou pro medy společné (White, 1997; Doner, 2003).

Absolutní množství bílkovin se pohybuje kolem 0,1-0,5 %, nicméně například v medu vřesu obecného bylo identifikováno množství vyšší (1-2 %) (Sáinz-Laín a Gómez-Ferreras, 2000; Chua et al., 2013). Zdá se, že obsah bílkovin může být redukován vysokou teplotou při zahřívání a době skladování, nicméně nižší až nedetekovatelná množství mají také medy falšované (Almeida-Muradian et al., 2013). Nesprávná technologická praxe může urychlit Maillardovy reakce a další chemické procesy, které také mohou v důsledku vést k poklesu celkových bílkovin a aminokyselin (Spano et al., 2008).

Identifikace jednotlivých medů podle zastoupení aminokyselin je snížena nejen variabilním spektrem aminokyselin, ale skutečností, že samotné včely je přidávají do medu ve volné formě, takže se lze setkat s různým zastoupením v druhově stejných medech (Bogdanov a Martin, 2002).

3.1.1.4. Enzymy

Mezi dusíkaté látky patří i enzymy, v medu zastupují významné role, které mají podíl na mnoha fyzikálně-chemických reakcích. Hlavními enzymy obsaženými v medu jsou diastáza, invertáza, glukózooxidáza, méně důležitými pak kyselá fosfatáza, kataláza a beta-glukosidáza (White, 1979). Zdrojem invertázy a glukózooxidázy jsou především slinné žlázy včel (Doner, 2003), diastáza je produktem mikroorganismů v medu nebo je součástí medovice, která obsahuje také katalázu a kyselou fosfatázu, ty pak mohou být i v nektaru nebo pylu (White et al., 1953; White, 1957).

Enzymy v medu jsou termolabilní, proto jsou hojně využívány jako indikátory záhřevu a skladování. Diastáza neboli amyláza hydrolyzuje škroby na maltózu a dextriny (Balasubramanyam a Ramesha, 2011), glukózooxidáza oxiduje glukózu na kyselinu glukonovou

a peroxid vodíku, které jsou zodpovědné za antiseptickou funkci medu (Ohashi et al., 1999). Invertáza hydrolyzuje sacharózu na fruktózu, glukózu a je zdrojem oligosacharidů jako meziproductů její transglykosidické aktivity (White a Maher, 1953).

Zajímavý výzkum publikovali Al-Sherif et al. (2017), ve kterém porovnávají sekreci enzymů různými žlázami včel dvou poddruhů (*Apis mellifera carnica*, *Apis mellifera lamarckii*) v závislosti na jejich věku a úloze, vykonávané ve společenství úlu. Studie potvrdila existenci prokazatelných statistických rozdílů mezi poddruhy, ale i věku a úloze včel. Sekrece invertázy se zvyšovala hlavně s věkem včel, přitom změna během vývoje byla zaznamenána u *Apis mellifera carnica*, kdy se měnil poměr v sekrecích z různých vyměšovacích žláz. Zatímco sekrece amylázy u *Apis mellifera carnica* s věkem včel klesá, u *Apis mellifera lamarckii* je produkce nejnižší ve středním věku včely. Produkce glukózooxidázy se zdá být konstantní v obou podruzích i ve vývoji. Studie zabývající se producenty medu, respektive sekrecí jejich enzymů, jsou velice důležité hned ze dvou důvodů – za prvé mohou být data využita pro zvyšování kvality medu a za druhé vytváří vhodné podklady pro selekci a šlechtění včelích poddruhů pro získání produktů s vyšším obsahem ceněných látek.

3.1.1.5. Organické kyseliny a fenolické sloučeniny

Představují méně než 0,5 % pevného podílu medu, přesto mají zásadní vliv na chuť, barvu, vůni a antimikrobiologické aspekty medů (Ananias et al., 2013). Především organické kyseliny svou chemickou povahou zvyšují kyselost medu a elektrickou konduktivitu (Bogdanov, 2002; Vlaeva et al., 2017). Určité množství kyselin pochází přímo z nektaru, nicméně většina jsou produkty enzymů vylučovaných včelami nebo se nacházejí v medovici (Sancho et al., 2013). Kyselina octová bývá syntetizována osmofilními kvasinkami v medu a používá se proto jako ukazatel pro stanovení fermentace medu (Cavia et al., 2007). Kromě kyseliny octové bylo identifikováno v medu více než 30 dalších organických kyselin jako máselná, glukonová, citronová, mravenčí, maleinová, jablečná, šťavelová, pyrohroznová a jiné (Mato et al., 2003).

Polyfenoly nacházející se v medu lze rozčlenit na flavonoidy, fenolické kyseliny a deriváty fenolických kyselin (Grassi et al., 2010). V medech byly nalezeny sloučeniny jako quercetin, kaempferol, hesperidin, naringenin, luteolin, myricetin, kyselina galová a mnoho dalších (Martos et al., 2000; Yao et al., 2000; Tomás-Barberán et al., 2001; Yao et al., 2003;

Yao et al., 2004). Obecně pochází 90 % flavonoidů v medu z propolisu, jeho množství produkované včelami však nemá na botanický původ vliv (Martos et al., 2000).

Fenolické kyseliny a fenolické sloučeniny jsou také charakteristickým rysem botanického původu medu (Anklam, 1998; Kaškonienė a Venskutonis, 2010; Vlaeva et al., 2017), flavonoidy pak navíc pomáhají rozlišit med z hlediska jeho geografického původu (Ferrerres et al., 1991; Iurlina et al., 2009). Určení původu medu je velice důležité z důvodů globalizace trhu a častého falšování medů (Schievano et al., 2013). Daniele et al. (2012) hledali společné markery akátových, kaštanových, řepkových, levandulových, lipových, slunečnicových medů a medů z jedle. Ve 140 vzorcích stanovovali profily organických kyselin pomocí iontové chromatografie s elektrochemickým detektorem. Zjistili, že organické kyseliny jsou u těchto sedmi botanických druhů dobrým indikátorem původu medu. Mnoho dalších studií se zabývá profilováním a kvantifikací organických, především pak fenolických kyselin v medu použitím moderních analytických technik. Důvodem může být nejen ochrana spotřebitele před nelegálními praktikami některých producentů (Wabaidur et al., 2017), ale také vysoce ceněná antioxidační aktivita těchto látek (Neto et al., 2017) nebo další pozitivní vlastnosti, jako například ochrana úlů před parazity (Papezikova et al., 2017).

3.1.1.6. Další složky

Včelí med je kolekcí nesmírného množství různých látek pramenících z biologické diverzity okolí úlů. Tyto složky zastupují široké spektrum biologicky aktivních a fyzikálně-chemických vlastností.

Kromě sloučenin zmíněných v předchozích kapitolách se v medu vyskytují ještě minerály, tvořící postranní měřítko 0,02-1 % sušiny (Felsner et al., 2004). Obsah, množství a výběr minerálů je silně spjat s druhovým původem a schopností jejich distribuce rostlinami do nektaru nebo pylu v závislosti na rozpustnosti sloučenin s těmito minerály ve vodě a využití stejnokřídlým hmyzem (Sabatini, 2007). Zjednodušeně můžeme říci, že tmavé medy mají vyšší obsah minerálů než medy světlé barvy, nejvyšší obsah je v medech medovicových (Fernández-Torres et al., 2005; Karabagias et al., 2017). Z nutričního hlediska jsou však velice špatně biologicky využitelné (Pohl et al., 2012). Existují i studie, které zkoumají minerální zastoupení v závislosti na geografickém původu (Madejczyk a Baralkiewicz, 2008; Alqarni et al., 2012; Karabagias et al., 2017).

Vitamíny jsou v medu zastoupeny v tak malém množství, že nelze doporučit konzumaci medu jako zdroje těchto kofaktorů enzymů. Nejvíce zastoupen je vitamin C, který má silný antioxidační efekt. Ostatní vitamíny jsou v medech obsaženy v rozdílných, ale přesto velmi malých koncentracích (Ciulu et al., 2011; León-Ruiz et al., 2013). Kim a Brudzynski (2018) detekovali v pohankovém medu pomocí UPLC/UV/MS homologní MK2-MK7 vitamíny k vitamínu K2, které mohou mít určitý vliv nejen na normální funkce homeostázy a srážlivosti krve, ale především na léčbu osteoporózy (Booth et al., 2008; Kodama et al., 2017). Vzhledem k tomu, že v mase, mléčných výrobcích (Elder et al., 2006) nebo fermentovaných produktech (Schurgers a Vermeer, 2000) se vyskytuje pouze minimální množství, med může být dobrým zdrojem těchto benefitních látek.

Další látky jako karotenoidy, xantophyly a anthokyany (Alqarni et al., 2016), lipidické látky (například glyceridy, steroly, fosfolipidy, mastné kyseliny (Kapoulas et al., 1977)); terpeny, isoprenoidy, alkoholy, taniny, ketony, aldehydy a cyklické uhlovodíky jsou v medech zastoupeny ve velmi nízkých koncentracích a dotváří chuť, vůni a celkovou povahu medu (Jerkovic et al., 2009; Rahman et al., 2018).

3.1.2. Využití

Nutriční a vysoce ceněná senzorická specifičnost, významná antioxidační, antimikrobiální, antiparazitická, antihypertenzní a protizánětlivá aktivita jsou spolu s prebiotickými a probiotickými účinky hlavními pozitivními vlastnostmi medu. Vědecké výzkumy medu povyšují v jeho pozitivních přínosech nejen v oblastech výživy a lidského zdraví, ale do budoucna by mohl být využíván i jako konzervační či podpůrný prostředek v oblastech potravinářského a farmakologického průmyslu.

3.1.2.1. Nutriční hodnota

V lidské výživě je med vynikajícím zdrojem lehce dostupné energie, tvořené jednoduchými cukry, které se rychle vstřebávají do krve již v dutině ústní a nevyžadují předchozí štěpení v trávicích procesech (Bogdanov et al., 2008; Ajibola et al., 2012). Podle některých studií mají složky medu pozitivní vliv nejen na výkony a regeneraci sportovců (Earnest et al., 2000; Kreider et al., 2002), ale také na zdraví a celkové prospívání seniorů (Blasa et al., 2006). V kontrastu s vysokou energetickou hodnotou (306 kcal na 100 g) má med velice nízký obsah vitamínů, minerálů a bílkovin (Bogdanov et al., 2008). V porovnání se sacharózou jako nejvýznamnějším sladidlem se ukázal být prospěšnějším; obsahuje totiž enzymy, které podporují trávení cukrů a škrobů (Ajibola et al., 2012). Také nezanedbatelná produkce peroxidu vodíku glukózooxidázou nacházející se v medu může mít pozitivní vliv na antimikrobiální efekt v dutině ústní (Bogdanov, 2015). Další výhodou je zvýšený laxativní účinek a zlepšení absorpce vápníku přes střevní lumen, což může obzvláště v pokročilém věku pozitivně ovlivnit řídnutí kostní hmoty (Ariefdjohan et al., 2008). Nižší hodnota glykemického indexu oproti běžné sacharóze se pak odvíjí od vyššího obsahu fruktózy (Arcot a Brand-Miller, 2005). Obsah flavonoidů a fenolických sloučenin dává medu potenciál funkční potraviny s vysokým antioxidačním efektem (Gheldof a Engeseth, 2002). Cholin a acetylcholin nacházející se v medu může mít dobrý vliv na správnou funkci nervové a kardiovaskulární soustavy či reparaci buněčných membrán (Bogdanov, 2015).

Na druhé straně existují studie, které upozorňují na možnou manifestaci alergií po požití medu. Med obsahuje velké množství potencionálních alergenů ze včelích těl a produktů jejich metabolismu, pyl a nektar z různého spektra rostlin nebo například propolis (Dutau a Rance, 2009; Simon et al., 2009). IgE jedinců alergických na včelí jed reaguje také s mnoha bílkovinami nacházejícími se v medu a může tak vyvolat kaskádu systémových alergických reakcí (Guan, Li a Yin, 2016). Z imunologického hlediska je proto zakázána konzumace medu batolaty do 1 roku života. Existují také studie související s konzumací medu infikovaném spory *Clostridium botulinum* batolaty. Spory jsou schopny klíčit, růst a produkovat botulotoxin v nedostatečně vyvinutém trávicím traktu takto mladých jedinců, což může vést až ke smrti (Brown, 2000; Manyi-Loh et al., 2011).

3.1.2.2. Antioxidační aktivita

Antioxidační látky mají různé mechanismy reakcí, kterými snižují dopady reaktivního kyslíku a dusíku, inhibují enzymy zodpovědné za produkci superoxidativních aniontů nebo se podílejí na chelataci iontů těžkých kovů a také znemožňují radikálové řetězové reakce. (Ou et al., 2005; Pyrzynska a Biesaga, 2009)

Antioxidační aktivita medu úzce souvisí s místní flórou, ze které byl získáván. Roli hrají také environmentální podmínky a roční období sběru pylu či nektaru včelami (Vela et al., 2007; Ulsoy et al., 2010). Hlavními antioxidačními látkami v medech jsou výše zmíněné fenolové kyseliny, flavonoidy a produkty Maillardových reakcí melanoidy (Sancho et al., 2016). Spolu s glukooxidázou, katalázou, karotenoidy, organickými kyselinami, kyselinou askorbovou a specifickými bílkovinami jsou označovány jako antioxidanty medu (Al-Mamary et al., 2002; Beretta et al., 2005; Blasa et al., 2006; Nagai et al., 2006; Boukraa et al., 2014).

Z hlediska antioxidačních účinků má med vysoký potenciál v potravinářském průmyslu, kde může nahrazovat i doplňovat přírodní a syntetické antioxidanty přidávané do zpracovaných zemědělských produktů, potravinářských surovin nebo krmiv (Nagai et al., 2006). In vitro studie prokazují i inhibiční účinek na oxidaci sérových lipoproteinů (Gheldof a Engeseth, 2002; Schramm et al., 2003).

3.1.2.3. Antimikrobiální aktivita

Jak bylo popsáno v historických pramenech, med již v dávných dobách působil proti mikrobiálnímu agens. S objevem antibiotik se jeho antimikrobiální využití dostalo spíše do pozadí. Dnes jsme v situaci, kdy z různých důvodů vzrůstá rezistence k antibiotické léčbě, a proto by se jeho antimikrobiální potenciál mohl více uplatnit. (Walsh, 2003; Levy a Marshall, 2004).

Baktericidní a bakteriostatické účinky medu jsou intenzivně zkoumány po celém světě. Pro klinické účely je med nejdříve sterilizován gamma zářením, aby byly zničeny potencionální spory nacházející se ve vzorcích. (Postmes et al., 1995) Antimikrobiální aktivita je pak podle výzkumů závislá na několika faktorech, mezi které patří koncentrace peroxidů vodíku, methylglyoxalu, včelího defensinu-1 a době působení. (Paulus et al., 2012) Senzitivní jsou pak především kmeny *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* spp., *Streptococcus* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. a *Proteus* spp. (Kwakman et al., 2010; Paulus

et al., 2010; Paulus et al., 2012) Kromě antibakteriální aktivity byly zdokumentovány také antivirotické účinky proti *Rubella* virům (Zeina et al., 1996), Herpes virům (Hashemipour et al., 2014). V některých studiích byly prokázány také antiparazitní účinky proti *Leishmanii* (Zeina et al., 1997) a hlístici *Caenorhabditis elegans* (Sajid a Azim, 2012). Účinné působení Slovenských medů proti plísním z rodu *Penicillium* (Kacaniová et al., 2011) nebo proti rodu *Aspergillus*, *Candida* a *Trichophyton* u vzorků medů z Íránu (Katirae et al., 2014) a imunomodulační efekt při aspergillióze u myší (Nikaein et al., 2014) dále ilustruje mnohostranné využití medů z různých zemí světa.

3.1.2.4. Prebiotické účinky

Prebiotika jsou látky, které potencionálně stimulují střevní mikroflóru. Předpokládaným účinkem je nabídka dostatečného množství využitelné energie symbiotickým kmenům bakterií nejen v tlustém střevě v důsledku fermentace hlavně oligosacharidových jednotek. (Parracho et al., 2007; Boukraa et al., 2013) Inulinové fruktany, galaktooligosacharidy a laktulózy projdou nezměněny trávicím traktem až do tlustého střeva (Joanne, 2013), kde jsou dále fermentovány na laktát a některé mastné kyseliny s krátkým řetězcem (Nicholson et al., 2013). Ty jsou poté vstřebávány a využívány epiteliálními buňkami střevní sliznice (Den Besten et al., 2013).

V medu můžeme očekávat v závislosti na jeho původu široké spektrum oligosacharidů (Sanz et al., 2005), přičemž velice aktivní se zdá být v tomto směru panóza (Popa a Ustunol, 2011). *In vitro* i *in vivo* studie prokázaly pozitivní efekt na růst symbiotických bakterií *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium lactis* a dalších příbuzných kmenů (Shamala et al., 2000; Kajiwara et al., 2002; Haddadin et al., 2007; Tejpal et al., 2009; Landry et al., 2016).

Zajímavou aplikací může být obohacování mléka a mléčných produktů právě medem. V mléčných výrobcích medové oligosacharidy podporují růst, aktivitu a prospívání laktobacilů (Altman, 2010). Inhibiční potenciál proti *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori* a *Staphylococcus aureus* byl zkoumán v kozím a kravském mléce (Lucan et al., 2009). Popsané mechanismy účinku související s navázáním oligosacharidů na membránová adhezační místa patogenních bakterií a zamezí tak jejich přisednutí na lidské tkáně, jsou velice pravděpodobné (Boukraa et al., 2013; Altamimi et al., 2016).

3.1.2.5. Další využití

Cílem některých studií na zvířatech bylo ověření hypotézy protizánětlivého účinku medu. Příjem medu potkany s onemocněním střev se ukázal být účinný v léčbě střevní kolitidy (Kassim et al., 2010). Extrakty z medu i med samotný inhiboval mediátory zánětu a tím potlačoval vznik edému u laboratorních krys a králíků (Kassim et al., 2010; Kassim et al., 2012). Požití medu lidmi vykazovalo podobné účinky jako požití laboratorními zvířaty, především pak redukci prozánětlivých složek jako jsou tromboxan a prostaglandiny (Al-Waili a Boni, 2003).

Existují studie zabývající se vlivem dlouhodobé konzumace medu na snižování krevního tlaku. Hypertenze je úzce spojená s kardiovaskulárními poruchami, které jsou celosvětově na prvním místě v příčinách úmrtí (Erejuwa et al., 2012). Pokusy na krysách ukázaly pozitivní vliv na snižování hypertenze po sedmitýdenním podávání krmiva obsahujícího med a gamma-aminomáselnou kyselinu (Hiwatashi et al., 2010). Erejuwa et al. zjistili, že podávání medu diabetickým krysám snižuje systolický tlak mechanismem snižování oxidativního stresu v ledvinách redukcí hladiny malondialdehydů. Angiotensin I konverzní enzymy mají za úkol katalyzovat vznik angiotensinu II, který je známý nejen svým silným vasokonstrikčním účinkem (Chappell, 2015), ale i významným vlivem na endoteliální aktivitu a dysfunkci u obézních jedinců (Schinzari et al., 2018). Právě med vykazuje tyto ACE inhibiční účinky (Nagai et al., 2012; Leon-Ruiz et al., 2013).

3.2. Nežádoucí kontaminanty v medu

Mezi hlavní kontaminanty spojené s výrobou nebo skladováním patří 5-hydroxymethylfufural (HMF) jako produkt Maillardovy reakce spojené s tepelným zpracováním (Khalil et al., 2010).

Pyl z určitých druhů rostlin může mít na lidský organizmus psychoaktivní a toxické účinky, přestože je pro populaci včel a jejich larev neškodný. Tyto kontaminanty patří mezi sekundární metabolity rostlin, které jsou v potravinách obecně velmi rozšířené (Edgar et al., 2011).

3.2.1. Hydroxymethylfurfural

Sterilací a zahříváním medu lze prodloužit jeho trvanlivost, obnovit svěžest a zajistit na první pohled kvalitní med. Zahřátím medu však může dojít ke ztrátám cenných termolabilních látek, jako jsou vitaminy a některé esenciální aminokyseliny (Borrelli a Fogliano, 2005; Van Boekel et al, 2010). Vedle ztráty nutričních vlastností tak mohou vznikat nežádoucí látky, které nejsou v medu běžně přítomny. Některé z nich jako hydroxymethylfurfural, ale i heterocyklické aminy, nitrosaminy a polycyklické aromatické uhlovodíky představují určité riziko pro lidské zdraví (Skog et al, 1998).

Hlavním indikátorem snížené kvality medu v důsledku zahřívání je právě hydroxymethylfurfural. Je to cyklický aldehyd, který se spontánně tvoří Maillardovou reakcí nebo v důsledku dehydratace kyselých katalyzovaných hexóz (Belitz et al., 2009). Důkazem změn v zahřátých, špatně skladovaných nebo velmi starých medech může být skutečnost, že v medech čerstvých a správně uchovaných hydroxymethylfurfural přítomen není (Askar, 1984).

Codex Alimentarius zavádí v roce 2000 maximální možný obsah HMF na 80 mg/kg. (Alinorm 01/25 2000). Přitom doporučení Evropské unie jsou přísnější a pro med pocházející z jiných, než tropických oblastí doporučují pouze 40 mg/kg, z tropických pak stejnou hodnotu jako Codex Alimentarius - 80 mg/kg a pro medy s nízkou enzymatickou aktivitou pak pouze 15 mg/kg (EU směrnice 110/2001). Pro medy z tropických a subtropických oblastí jsou limity méně přísné vzhledem ke skutečnosti, že se zde HMF díky teplotním podmínkám běžně vyskytuje (Sodré et al., 2011). Zajímavé je, že kromě vyšší teploty při zpracování má pozitivní vliv na obsah HMF také přidávání komerčních cukrů při falšování (Fallico et al., 2006; Belay et al., 2013; Pentos a Deta, 2017). Hodnoty HMF rostou s nižším pH medů či při styku s železnými obaly (Gokmen a Morales, 2014). Bath a Singh (2001) poukázali na rozdílné obsahy HMF po zahřátí v medech pocházejících z různé flóry. V souvislosti se vznikem HMF v medech je také diskutována stabilita hexóz. Glukóza jako aldóza tvoří stabilnější kruhové struktury a je obecně méně reaktivnější než fruktóza (ketóza) (Küster, 1990). Určitou roli tedy hraje i poměr glukózy a fruktózy v medu (Kesic et al., 2014).

Khalil et al. zjišťovali hodnoty HMF v medu z Malaisie. Pro stanovení použili tři analytické metody: spektrofotometrickou metodu dle White (1979), starší spektrofotometrickou metodu dle Winkler (1955) a HPLC s absorpčním detektorem (fotodiodové pole). V medech skladovaných do šesti měsíců se hodnoty HMF pohybovaly v rozmezí 2,80 – 24,87 mg/kg. Nicméně ve stejných vzorcích skladovaných od 12 do 24 měsíců jeho hodnoty značně překračovaly povolenou mez pro bezpečnou konzumaci člověkem. V déle skladovaných medech našli po odečtení statistických odchylek 118,47 – 1139,95 mg/kg HMF, což je v některých případech více jak desetinásobné množství, než je povolené pro tropické medy. Kalabová et al. (2003) prováděli podobný výzkum na českých medech. Zjištěné hodnoty však nebyly tak vysoké. Během prvních dvou let nepřekročil ani jeden z 56 vzorků povolené hodnoty 40 mg/kg HMF. Během následujícího roku však 32 vzorků tento limit překročilo. Bylo potvrzeno, že hodnoty koncentrace HMF korelují se stářím medu. Bartáková et al. (2011) studovala v letech 2004-2011 vliv ohřívání medu pomocí mikrovlnné trouby. Pokus byl prováděn na 22 vzorcích medů od českých včelařů z let 2004 a 2006, ve dvou fázích, vždy následující léto po vymetání. Po zahřívání medu mikrovlnami po různou dobu při různém výkonu hodnoty HMF nijak výrazně nevzrostly.

3.2.2. Sekundární metabolity rostlin

Termín sekundární metabolit zahrnuje přírodní chemické látky produkované rostlinami, houbami a jinými organizmy, které se neúčastní procesů primárního metabolismu (Pichersky a Gang, 2000), ale uplatňují se zejména při jejich interakcích s okolním prostředím. Jsou charakterizovány jako organické sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností a velkou strukturní rozmanitostí. Jedna sloučenina je často typická pouze pro velice omezený počet druhů nebo rodů (Berenbaum 1995, Agrawal a Weber 2015). Sekundární metabolity rostlin se hromadí v jejich pletivech, nektaru nebo pylu (Lucchetti et al., 2016). Tyto metabolity mají různé uplatnění, především pak plní obranou funkci před plísněmi, bakteriemi, hmyzem a jinými živočichy (Schoonhoven et al., 2005). Existuje určitá teorie optimální obrany, která předpovídá korelaci mezi hodnotou tkáně a úrovní obrany tak, že distribuce sekundárních metabolitů jako defenzivních chemických sloučenin může být omezena pouze na kriticky významné tkáně (McCall a Fordyce, 2010; Cook et al., 2013). Toxické metabolity se ale vyskytují také v pylu. Zde je jejich role hůře vysvětlitelná – pyl je mimo jiné, odměnou pro

opylovače, tudíž by neměl být nijak toxický. Je možné, že je takto pyl v květech chráněn před ostatními živočichy a selektován pouze pro určitý druh opylovačů (Manson et al., 2012; Irwin et al. 2014; Tiedeken et al. 2016).

Sekundární metabolity mohou být přítomny v medu právě v období, kdy včely sbírají pyl z květů obsahujících tyto rostlinné toxiny. Toxické účinky pro člověka jsou prokázány u řady látek nalezených v medu. Kromě dobře známých pyrrolizidinových alkaloidů mají prokazatelné toxické účinky také grayanotoxin, hyoscin a hyscyamin (Reid, 2011), tutin (McNaughton a Goodwin, 2008), oleandrin nebo oleandigenin (Graeme, 2007). Před více než 20 lety bylo zjištěno, že včelstva mohou produkovat takto psychoaktivní a toxický med, aniž by tyto látky jakkoli ovlivňovaly jejich způsob života a životní funkce (Mayor, 1955). Například med shromažďovaný v oblastech kultivace opiového máku má významné narkotické a analgetické účinky (McAlpine, 2002). Med vyprodukovaný z květů čeledi Ericaceae a Solanaceae může vést k intoxikaci díky obsahu solaninů, glykoalkaloidů, saponinů a atropinu podobných látek (Palmer-Jones, 1965). Podobné toxické účinky může vykazovat například také med z rostliny *Senecio jacobaea* díky přítomnosti hepatotoxických pyrozillidních alkaloidů (Deinzer et al., 1977).

3.2.2.1. Pyrrolizidinové alkaloidy

PA jsou toxické sloučeniny, které produkují rostliny jako obranný mechanismus proti býložravcům, jejichž metabolity se mohou nevratně vázat na tkáň jater a další tkáň životně důležitých orgánů (Harborne a Moss, 1972; Wiedenfeld, 2011). Vysoké obsahy těchto toxinů u kojenců a plodu matky mohou způsobit progresivní chronickou toxicitu (Edgar et al., 2002). Jsou syntetizovány více než 6000 rostlinami (Betteridge et al., 2005) což jsou téměř 3 % kvetoucích rostlin (Edgar et al., 2011). Dosud bylo popsáno více než 600 těchto PA, které se přirozeně vyskytují v rostlinách (EFSA, 2007; Oplatowska et al., 2014), přičemž asi polovina je toxická pro zvířata a lidi. Chronické otravy takto kontaminovanými potravinami mohou způsobit jaterní cirhózu, plicní hypertenzi a pravděpodobně i rakovinu. (Edgar et al., 2011) V medech můžeme nalézt PA hlavně v čeledích rostlin jako Apocynaceae, Asteraceae, Boraginaceae a Fabaceae (Dübecke et al., 2011; EFSA, 2011; Valese et al., 2016). Jejich distribuce v rámci rostliny je závislá na čeledi, rostlinném orgánu, sezóně a lokalitě (Bodi et al., 2014).

Matteo et al. ve své studii ze Švýcarska z roku 2016 zkoumali obsahy různých PA z rostliny *Echium vulgare*. Měli k dispozici celkem devět vzorků ze dvou stanovišť, ve kterých stanovovali PA typický pro pyl a pro nektar z hadince. Koncentrace ve všech vzorcích nebyly zanedbatelné, avšak po přiřazení jednotlivých typů PA zjistili, že med obsahoval především nektarový a nikoli pylový typ alkaloidů z hadince. Vyvrací tak předešlé studie, které považují za hlavní zdroj PA právě pylová zrna (Boppré et al., 2005; Kempf et al., 2011). Toto zjištění je důležité především z důvodu účinnosti navrhované metody odstranění škodlivých PA pomocí filtrace pylu z medu (Kast et al., 2014). Na základě těchto studií (Lucchetti et al., 2016; Matteo et al., 2016) se zdá být efektivnějším řešením vyřazení rostlin produkujících PA z flóry oblastí včelstev nebo naopak.

3.2.2.2. Grayanotoxin

Grayanotoxin, známý také jako andromedotoxin, acetylandromedol nebo rhodotoxin, je ve spojení s medem široce diskutován odbornou veřejností. Je obsažen zejména v listech a květech rostlin čeledi Ericaceae zahrnující například *Rhododendron*, *Pieris* nebo *Agarista* a *Kalmia* (These et al., 2015). Tyto rostliny se vyskytují především v oblastech kolem Černého moře, ale i v Japonsku, Brazílii nebo Severní Americe (Constantine et al., 1967). Jen z rhododendronů bylo izolováno více jak 25 izoform grayanotoxinů (Qiang et al., 2011).

Toxicita grayanotoxinu spočívá v jeho schopnosti vázat se na receptory sodíkových kanálů uvnitř buňky (Seyama et al., 1988), kde jeho vazba g zabraňuje inaktivaci sodíkového kanálu, což udržuje buňku v depolarizovaném, tedy aktivovaném stavu (Maejima et al., 2003; Gunduz et al., 2007). Nejčastějším vazebným místem pro grayanotoxin v pokusech prováděných na zvířatech jsou neurony (Onat et al., 1991), z čehož plyne jeho zařazení mezi neurotoxiny a typické toxické působení s příslušnými symptomy (These et al., 2015). Med obsahující grayanotoxin je také nazývaný jako „mad honey“ (Jansen et al., 2012). Řecký bojovník Xenofon v roce 401 př. n. l. zaznamenal otravu takto kontaminovaným medem u celé armády vojáků. Popisované skutečnosti se nijak zvlášť neliší od dnešních medicínských a toxikologických poznatků (Šonka, 1974). Otravy způsobené tímto medem jsou typické hypotenzí, bradykardií, nevolností, zmateností a zvracením (Jansen et al., 2012). Tato otrava se velmi podobá cholinergnímu syndromu. (Bilir et al., 2017) V některých případech je přítomné rozmlžené vidění až halucinace (Kurtoglu et al., 2014). V nízkých koncentracích se může projevit jako

afrodiziakum nebo může mít potenciální medicínský význam pro léčbu kardiovaskulárního systému (Demircan et al., 2009).

Závažnost intoxikací grayanotoxinem z medu je variabilní a záleží na dávce a koncentraci. Nejčastějšími konzumenty jsou přitom muži středního věku a otravy se tlumí podáním atropinových injekcí (Silici a Timucin, 2015). Otravy vznikají hlavně v regionech okolo Černého moře, kde je med z rhododendronů užíván v rámci alternativního léčení jako lék na hypertenzi, diabetes mellitus nebo jako afrodiziakum (Gunduz et al., 2007; Koca a Koca, 2007). Grayanotoxin je v medu velmi stabilní; ani po 6 měsících se jeho hodnoty nijak výrazně nezměnily (Kurtoglu et al., 2014).

3.2.3. Ostatní kontaminanty

Dalšími kontaminanty v medech jsou například těžké kovy. Přítomnost olova, kadmia a arsenu je zajímavá z hlediska možnosti využití včelího společenstva jako bioindikátoru okolní kontaminace (Jones, 1987). Této skutečnosti může být využito při monitoringu životního prostředí v okolí tepelných elektráren (Silici et al., 2013). Při těchto analýzách je však velmi důležité brát v potaz různou distribuci těžkých kovů v orgánech rostlin, relativní kvantifikace je tedy jen ztěží možná (Sitarz-Palczak et al., 2015). Kontaminace těžkými kovy může vzniknout i při manipulaci s medem (Corredera et al., 2014; Bartelme, 2016). Analyzované vzorky z několika regionů zatížených zemědělskou činností nicméně vykazují hodnoty nižší, než jsou limity detekce (Bartalme, 2016; Aljedani et al., 2017; Altun et al., 2017). Studie, která zkoumala obsahy těžkých kovů v medech a včelách z úlů poblíž tepelných elektráren v Turecku, nezjistila žádné vyšší koncentrace těžkých kovů ve vzorcích medů (Silici et al., 2013).

Polycyklické aromatické uhlovodíky jsou antropogenními kontaminujícími látkami v životním prostředí. Potencionálně vykazují mutagenní nebo karcinogenní účinky (Ciemniak et al., 2013; Iwegbue et al., 2016). Tyto látky mohou být přítomny v medových produktech hlavně při špatné a nezodpovědné manipulaci (Corredera et al., 2014). Polycyklické aromatické uhlovodíky mají hydrofobní povahu a jsou tudíž v medu, který je polární povahy, akumulovány pouze v omezené míře (Perugini et al., 2009; Iwegbue et al., 2016). Nicméně kontaminace medů z městských regionů je vyšší než v horských řídcích obydlených částech (Dobrinás et al., 2008).

Perfluoroalkyly a polyfluotoalkyly (zkráceně PFA) jsou syntetické organofluorové sloučeniny široce používané průmyslové a spotřebitelské sféře (Kissa, 2001). Tyto látky mají všechny nebo téměř všechny atomy vodíku nahrazeny atomy fluoru. Lze je v zásadě rozdělit na dvě hlavní skupiny – perfluoralkylkarboxylové kyseliny a perfluorsulfonáty (Buck et al., 2011). Vzhledem k síle vazby mezi uhlíkem a fluorem jsou vysoce persistentní a odolné vůči biologické degradaci (Stahl et al., 2011). PFA jsou hojně používané v pracích prášcích, repelentních přípravcích a v mastnotě odolných papírových obalech (Rao a Baker, 1994). Jejich použití je možné také v hasicích přístrojích na hašení vysoce hořlavých kapalin (Taylor, 1999) a řadě dalších aplikací (US EPA, 2002). Expozice člověka spočívá zejména v konzumaci kontaminovaných potravin, nápojů nebo vdechování. EFSA zkoumala v letech 2000-2009 jejich přítomnost ve 4881 vzorcích různých potravin, z toho ve 30 vzorcích medu. V těchto medech byly sledovány pouze dvě sloučeniny a pozitivní byly pouze tři výsledky. EFSA také vyzývá Evropské státy k testování potravin za účelem monitoringu a zlepšení analytických metod v této oblasti (EFSA, 2011). Na tuto výzvu reagovala toxikologická studie z roku 2016, v rámci níž bylo analyzováno 26 vzorků medů z vybraných zemí severní, jižní a východní Evropy. Dle doporučení Evropské komise číslo 161 z roku 2010 byl kvantifikován obsah deseti sloučenin PFA na LC/MS-MS a pouze ve dvou medech z Anglie a Francie nebyly detekovány žádné PFA. Ze závěrů studie vyplývá, že vyšší koncentrace PFA jsou hlavně v medech pocházejících z jihoevropských zemí (Itálie a Španělsko) (Surma et al., 2016).

4. Hledané organické kontaminanty v medu

Z pohledu problematiky organické kontaminace medu jsou důležitá především antibiotika používaná pro léčbu bakteriálních chorob a parazitických onemocnění včel (Fujita a Kazuhiro, 2014). Do oběhu produkce medu vstupují také pesticidy jako řešení proti škůdcům, houbovým chorobám a dalším biologickým hrozbám v zemědělství (Pang et al., 2006; Cieslik et al., 2011)

4.1. Antibiotika

Nejčastěji se vyskytujícími včelími chorobami jsou Evropský (*Melissococcus plutonius*) a Americký (*Paenobacillus larvae*) mor včelího plodu (Kivrak et al., 2016). Mor, ale i varoáza a další nákazy včelstev mohou být účinně léčeny běžně používanými antibiotiky jako jsou sulfonamidy, tetracykliny, nitrofurany nebo makrolidy (Reybroeck et al., 2012). První aplikace antibiotik ve včelích úlech se datuje kolem roku 1940 (Kümmerer, 2009), od roku 1950 je pak hlavně v amerických státech přimícháván oxytetracyklin do cukrového příkrmu včel (Tian et al., 2012). V Evropské unii jsou již tyto veterinární přípravky pro léčbu včel zakázány dle nařízení 37/2010 (Commission Regulation 37/2010, 2010) a medy by tedy neměly obsahovat žádná rezidua (Council Regulation 2377/90, 1990). Nicméně chybí zde určitá harmonizace se zeměmi třetího světa a navíc je zdokumentováno mnoho případů nedovoleného zacházení s těmito léčivy jak v rozvojových zemích světa, tak i na území Evropské unie (Reybroeck et al., 2012).

Aplikace antibiotik má na kvalitu medu značný dopad, jelikož koncentrace reziduí dosahují až několika mg/kg (Reybroeck, 2017). Nejvyšší koncentrace jsou v medu detekovatelné přibližně do jednoho týdne po aplikaci, poté postupně klesají, ale rezidua většiny antibiotik jsou detekovatelná dokonce i rok po aplikaci léčiva (Reybroeck et al., 2012). Data z RASFF portálu ukazují, že v celých 71 % ze zachycených importovaných medů figurovaly nálezy antibiotických reziduí (Galarini et al., 2015). Rezidua antibiotik mohou přímo ovlivnit konzumenta, protože způsobují především alergické reakce u senzitivních osob (Wypych a Marsland, 2018), některé působí cytotoxicky na lidské jaterní buňky (Viluksela et al., 1996) a mohou být indukovat rezistentní kmeny bakterií (Tillotson et al., 2006) nebo inhibovat vývoj a růst kostry (Aramvash et al., 2017). Nitrofurany pak mají potencionálně karcinogenní efekt

(Reybroeck, 2014). Některá antibiotika, jako například tetracykliny, amfenikoly a další, se mohou přirozeně vyskytovat v přírodě. Jsou syntetizována rodem aktinobakterií *Streptomyces*. Například rezidua amfenikolových antibiotik pak můžeme nalézt v rostlinách (Berendsen et al., 1955), plodinách (Berendsen et al., 2013) i živočišných produktech (Yanových et al., 2014). Pozoruhodný je nález amfenikolového antibiotika v neregistrovaných přípravcích pro léčbu parazitického roztoče *Varroa destructor*. Yanových et al. (2017) měli za úkol otestovat pásy vkládané do úlu na rezidua chloramfenikolu. Pásy nevykazovaly pozitivitu chloramfenikolu na ELISA kitu, ale pomocí LC-MS/MS analýzy byli schopni detekovat koncentrace až 34,4 µg/kg. Přitom mimo léčbu včelích chorob je chloramfenikol zakázaný pro použití v živočišné produkci nejen v USA, Kanadě a EU, ale od roku 2002 i na Ukrajině. Ve srovnání s jinými potravinami se rezidua antibiotik v medu nacházejí mnohem častěji hlavně kvůli skutečnosti, že nejsou aktivně metabolizovány včelami, a navíc v medu vydrží i dlouho po jejich aplikaci v úlech (Reybroeck, 2017).

4.2. Pesticidy

Aplikace pesticidů je důležitou součástí zemědělství od nepaměti; již v dobách starověkého Řecka a Říma byly používány látky omezující škůdce (Jeong et al., 2012). Použití moderních pesticidů se však datuje až začátkem 19. století (Berg a Tam, 2018). Aktuálně existuje na trhu v Evropské unii více než 1100 registrovaných pesticidů (EU Pesticides database, 2018). Tyto pesticidy hrají důležitou roli při zvyšování zemědělské produkce (Kolberg et al., 2011), proto jejich spotřeba v posledních desetiletích výrazně vzrostla (Llorent-Martinez et al., 2011). Navzdory přínosu jsou zodpovědné za kontaminaci ovzduší, půdy (Fang et al., 2018), vody (Anderson et al., 2018) dokonce i medu (Tosi et al., 2018) a ostatních potravin (Koch et al., 2017). Alarmující je, že více než 98 % insekticidů a až 95 % herbicidů vůbec nedosáhne svého cílového druhu (Llorent-Martinez et al., 2011). Evropská komise stanovila maximální limity reziduí pesticidů v medech. Nicméně někteří autoři se domnívají, že med musí být bez jakýchkoliv chemických a biologických kontaminací, aby byl bezpečný pro lidskou spotřebu (Pinho et al. 2010).

Med může být kontaminován buď přímo nebo nepřímo. Přímá kontaminace vzniká v důsledku použití akaricidů pro hubení parazitického roztoče *Varroa jacobsoni* (Ruffinengo et al., 2005; Sata et al., 2005) nebo parazitické houby *Ascosphaera apis* (Blasco et al., 2011).

Nepřímo mohou med kontaminovat pesticidy v příkrmu včel (Faucon et al., 2005; Kujakowski a Namiesnik, 2011) nebo samotné včely, které donesly pesticidy do úlu z prostředí ošetřeného nebo kontaminovaného pesticidy (Silvina et al., 2017). Značným problémem jsou chlorované pesticidy (DDT, benzen hexachlorid, methoxychlor), protože jsou velmi persistentní díky své nízké rozpustnosti a malé reaktivitě (Wang et al., 2007). I když je jejich výroba, užití i likvidace ve většině případů zakázána (Hung a Thiemann, 2002), rezidua v environmentálním prostředí jsou stále přítomna (Guzella et al., 2005). Problémem je jejich vysoká akumulace v rostlinách. Úroveň bioakumulace může dosáhnout až tisícinásobného množství ve srovnání s jejich koncentracemi ve vodě a ovzduší (Blasco et al., 2003). Do lidského potravinového řetězce se dostávají nejenom prostřednictvím tučných potravin, ale i prostřednictvím medu (Blasco et al., 2004; Yavuz et al., 2010; Kujawski et al., 2012; Malhat et al., 2015).

5. Moderní analýza organických kontaminantů v medu

Pro analýzu organických kontaminantů v medu se dnes používají různé metody v odlišných modifikacích. Některé metody jsou designované na odhalení co nejvyššího množství organických kontaminantů (Pang et al., 2006), jiné jsou více specifické se zaměřením na jednotlivé třídy těchto látek (Jovanov et al., 2015).

Existují i metody, které kombinují analýzy pesticidů, antibiotik (Lehotay et al., 2006) nebo polychlorovaných bifenyly (Al-Alam et al., 2017). Kvalita výsledků je vázána nejen na správnou interpretaci, ale i na vhodný výběr analytické metody (Garcia-Chao et al., 2010). Bez ohledu na typ metody vyžadují moderní analytické metody organických kontaminantů v medu alespoň tři základní kroky – extrakci analytů ze vzorku, separaci a detekci (Tette et al., 2016).

5.1. Homogenizace, extrakce a purifikace

Zásadním krokem v celém rozsahu analýzy je příprava vzorku. Obecně je to časově náročný proces, při kterém i malé chyby významně ovlivní finální výsledky (Kujawski a Namiesnik, 2011). Hlavním cílem přípravy vzorků medu je extrakce co nejvyššího množství různých organických kontaminantů, odstranění interferujících látek pro zlepšení selektivity a koncentrace hledaných analytů (Hercegova et al., 2007). Příprava vzorku medu před samotným měřením je nutná vždy. V medu se totiž nachází více než 300 látek, které mohou analýzu různým způsobem ovlivnit (Kujawski a Namiesnik, 2008). Mezi nejčastěji interferující látky patří sacharidy, pigmenty a lipidy (Rissato et al., 2006). Cílem přípravy vzorku v moderní analýze je nalézt jednotný protokol, který poskytne vysokou výtěžnost všech hledaných kontaminantů (Wiest et al., 2011) a zároveň bude bezpečný, rychlý, snadný a levný (Barganska et al., 2013). Existují jak zaběhnuté konvenční metody (LLE, SPE, QuEChERS) používané pro analýzu kontaminantů v medech i jiných matricích, tak i moderní miniaturizované metody (SPME, DLLME, IS-DLLME, SBSE, MSPE) hledající nové přístupy pro jednodušší a rychlejší stanovování reziduí různých chemických tříd při nízké spotřebě chemikálií.

5.1.1. LLE

Extrakce z kapaliny do kapaliny je nejběžnější extrakční a purifikační technikou používanou pro stanovení reziduí pesticidů v medu (Pirard et al., 2007). Pro LLE techniku je typické použití velkého množství vzorku a většího objemu různě toxického organického rozpouštědla (Anthemidis a Ioannou, 2009). Nejpoužívanějšími organickými rozpouštědly pro LLE medu jsou ethylacetát, acetonitril a methanol (Tette et al., 2018). Pro extrakci může být použit i ether (Yavuz et al., 2010) nebo kombinace rozpouštědel v různých poměrech (Pinho et al., 2010). Bohužel vícenásobná extrakce a manipulace se vzorky tuto metodu činí velice náchylnou na znečištění a vznik chyb (Pena-Pereira et al., 2009). Při optimalizaci extrakce jak pro pesticidy i pro antibiotika Debayle et al. (2008) přidávali jeden extrakční krok navíc s přídavkem kyseliny chlorovodíkové. Kyselina chlorovodíková i jiné kyseliny se v extrakčních metodách používají pro vyvázání sulfonamidů z jejich vazby na sacharidy pomocí kyselé hydrolýzy (Sheth et al., 1990), naopak pesticidy a antibiotika tetracyklinového typu jsou nejlépe extrahovány při neutrálním pH (Blanchflower et al., 1997; Lindsey, 2001).

LLE je často ještě kombinována s pročištěním pomocí SPE (Choudhary et al., 2008; Debayle et al., 2008) s použitím běžných sorbentů jako je $MgSO_4$, silikagel, florisil nebo PSA (Bezerra et al., 2010; Moniruzzaman et al., 2014; Orso et al., 2015). Inovací tohoto typu extrakce je použití LLE-LTP (nizkoteplotní tekuté kapalně extrakce), při které se vzorek rozpustí mezi dvě nemísitelné kapalně fáze s různými body tuhnutí a po zchlazení je kapalně fáze odebrána, přičemž nerozpustně látky zůstávají ve fázi tuhé. Používanými rozpouštědly mohou v tomto případě být např. acetonitril/voda (Goulard et al., 2008) nebo acetonitril/ethylacetát (Pinho et al., 2010).

5.1.2. SPE

Extrakce na pevně fázi je založena na principu navázání hledaných analytů na pevnou fázi a následně eluci těchto analytů vhodnými rozpouštědly (Pirard et al., 2007). Kombinuje postupy extrakce a purifikace v jediněm kroku a poskytuje tak pročištěně extrakty, které lze přímo analyzovat chromatografickými metodami (Amendola et al., 2011). Hlavními výhodami jsou jednoduchost, robustnost a nízká spotřeba rozpouštědel (Johnson et al., 1991). Například při použití kolonek s florisilem byl pro extrakci použit pouze 1 g medu a 3 ml směsi metanolu a vody (v poměru 1:9), přičemž výtěžnost byla od 89,9 – 102,4 % (García-Chao et al. 2010).

5.1.3. QuEChERS

„Quick, easy, cheap, effective, rugged, safe“ neboli „rychle, snadně, levně, efektivně, robustně a bezpečně“ je významem zkratky QuEChERS. Tuto metodiku, která klade velký důraz na dynamiku postupu a aplikovatelnost v jakékoliv laboratoři díky zjednodušení jednotlivých kroků, vyvinuli Anastassiades et al. (2002). Díky své robustnosti se stal protokol velmi populárním pro přípravu vzorků v mnoha studiích po celém světě (Cieslik et al., 2011). Postup nahrazuje mnoho složitějších kroků v tradičních metodách snadnějšími (Kolberg et al., 2011). Technika QuEChERS je hojně používána pro analýzy pesticidů v potravinách a je nejčastějším postupem pro přípravu vzorku medu (Kolberg et al., 2011; Sampaio et al., 2012; Kujawski et al., 2014; Tette et al., 2016; Al-Alam et al., 2017).

Přesto, že originální verze od Anastassiades et al. (2002) poskytovala vynikající výsledky pro stovky pesticidů v různých maticích, další experimenty poukázaly na rozdílnou výtěžnost pesticidů v závislosti na pH matrice (Anastassiades et al., 2003; Paya a Anastassiades et al.,

2007). Některé studie proto při testování vzorků medu snižují pH pomocí pufrů (Orso et al., 2015), jiné složitější analýzy antibiotik po okyselení během prvního kroku vzorky následně neutralizují přidáním fosfátů a hydroxidů (Shendy et al., 2015).

Calatayud et al. (2016) porovnávali efektivitu extrakce pesticidů modifikovaného QuEChERS (Wiest et al., 2011; Niell et al., 2015; Calatayud-Vernich et al., 2016), SPE (Blasco et al., 2011) a přímou extrakci (Ghini et al., 2004) na matricích medu a včel. Dospěli k závěru, že cena je nejnižší právě u QuEChERS, následně u SPE a nejdražší je použití metody LLE. Časově je opět nejúspornější metoda QuEChERS, jejíž provedení trvá 30-40 minut, metoda SPE může být provedena během 60-90 minut a metoda využívající LLE je časově nejnáročnější a její realizace trvá 150-180 minut. U medu byla nejvyšší výtěžnost v protokolu SPE 85 % (+/- 12 % RSD), poté 81 % (+/- 20 % RSD) u QuEChERS a nejnižších 75 % (+/- 13 % RSD) s použitím LLE z matrice včel ve stejných koncentracích.

5.1.4. Další extrakční a purifikační metody

Pro analýzu organických kontaminantů medu jsou používány i další modifikace uvedených metod s důrazem na ekologickou a ekonomickou stránku (Chen et al., 2008; Yu a Hu, 2009; Du et al., 2013; Vichapong et al., 2015; Zali et al., 2015). Při těchto metodách je výhodou především nízká spotřeba rozpouštědel a rychlost přípravy vzorku.

Minimalistickou metodou je **SPME (Solid phase microextraction)**. Kombinuje proces vzorkování, extrakce bez nebo s minimálním použitím organických rozpouštědel. Principem je absorpce látky na tuhou fázi nacházející se na kovové jehle, která je ponořena do rozpuštěného vzorku (Artur a Pawliszyn, 1990). Např. při experimentální analýze stopových množství 7 pesticidů o různé polaritě pomocí nanovláknů z polystyrenu bylo po optimalizaci dosaženo až 100 opakování bez fyzického poškození a ztráty výtěžnosti (Zali et al. 2015).

DLLME (Dispersive liquid liquid microextraction) je rychlá metoda s úplně minimální spotřebou rozpouštědel vyvinuta Rezaee et al. (2006), poměrně často používaná pro stanovení pesticidů v medu (Tette et al., 2015). Do vodného roztoku medu je aplikována směs extrakčního a disperzního rozpouštědla, po centrifugaci je oddělené usazené extrakční rozpouštědlo odebráno a analyzováno (Chen et al., 2008).

Modifikovanou metodu **IS-DLLME (Incoupled Syringe-Dispersive liquid liquid microextraction)** vyvíjeli Vichapong et al. (2015) pro stanovení neonikotinoidů v medu. Použití dvou injekčních stříkaček postavených proti sobě a pouze 100 μ l 1-oktanolu jako extrakčního rozpouštědla dosáhli limitu detekce od 0,25-0,5 ng/l.

SBSE (Stir bar sorptive extraction) je prováděna mícháním roztoku vzorku míchadlem pokrytým sorbentem po stanovený čas při dané rychlosti míchání (Baltussen et al., 2002). Metoda je dobrou alternativou ke konvenčním metodám. Výhody pro analýzy organofosforových pesticidů v matricích medu jsou: vysoká výtěžnost, dobrá reprodukovatelnost a pohodlné provedení (Yu a Hu, 2009).

Šafařík a Šafaříková (1999) vyvinuli extrakční metodu založenou na magnetických nebo magnetizovatelných adsorbentech. **MSPE (Magnetic solid-phase extraction)** byla testována v Číně na vzorcích medu a čaje, kdy byly pomocí uhlíkových nanotrubic plněných feritickým kobaltem stanovovány organochlorové pesticidy Du et al. (2013). Metoda má vysokou extrakční schopnost i vysokou výtěžnost, a tudíž i nízký detekční limit. Kromě toho mají hydrofobické nanotrubic velkou adsorpční kapacitu a na celou extrakční proceduru se spotřebuje malé množství méně toxických rozpouštědel.

5.2. Separace, ionizace, detekce

K separaci a detekci organických kontaminantů v medech se používá několik separačních a detekčních technik. Hlavním požadavkem techniky je zajištění vysoké selektivity i citlivosti (Masiá et al., 2016). Volba správné separační techniky závisí na zkoumaném analytu. Organické kontaminanty mohou být jak těkavé a termostabilní sloučeniny, tak i netěkavé a termolabilní (Kujawski et al., 2014). Pro analýzy jsou voleny především chromatografické systémy s různými detekčními systémy, právě v závislosti na tepelné stabilitě a těkavosti látek, kromě polaritě či velikosti molekul. Moderní analýza organických kontaminantů se dnes neobejde bez hmotnostní spektrometrie, která v posledních letech dominuje v analýzách širokého spektra látek po celém světě.

5.2.1. Hmotnostní spektrometrie

První zmínky o měření stabilních izotopů širokého spektra neradioaktivních látek byly v roce 1918 prezentovány F. W. Astonem pomocí hmotnostního spektrografu (Aston, 1919). Aktuální technika MS (Mass spectrometry) tedy hmotnostní spektrometrie funguje na principu stanovení hledaných analytů podle poměru jejich molekulové hmotnosti a náboje (m/z) (Glish a Vachet, 2003). Jedná se o destruktivní metodu s vysokými pořizovacími a provozními náklady, na druhou stranu s vysokou citlivostí, možností kvalitativní i kvantitativní analýzy při minimální spotřebě vzorku (McLafferty a Tureček, 1993). Dnes je nepostradatelnou součástí analytické laboratoře (Urban et al., 2016) a moderní analýzy kontaminantů v medu (Tette et al., 2015; Reybroeck, 2017) i v ostatních potravinách (Masiá et al., 2016; Shuqing et al., 2016). Díky své citlivosti a rychlosti hrála MS klíčovou roli v mnoha objevech farmakologicky účinných látek (Korfmacher et al., 2012; Oppenheimer et al., 2015; Roboz et al., 2016; Goodwin et al., 2017), při identifikaci biomarkerů (Lopez-Hernandez et al., 2016; Yong et al., 2017) či hodnocení bezpečnosti látek (Glish a Vachet, 2003). Hmotnostně spektrometrický systém se skládá z ionizačního zdroje, který ionizuje molekuly analytu a ty pak směřují do hmotnostního analyzátoru, kde se ionty v závislosti na typu a pokročilosti tohoto systému separují, případně fragmentují a dopadají na detektor, který snímá a moduluje signál vstupující do počítače.

Ionizační techniky kapalinové chromatografie

ESI (Electro spray ionization) je ionizační technikou pracující za atmosférického tlaku. Je jednou z nejpoužívanějších technik pro ionizaci při analýze organických kontaminantů (Rial-Otero et al., 2007). V roce 2002 byla na základě vývoje použití této techniky ve spojení s hmotnostní spektrometrií Johnovi Fennovi udělena Nobelova cena (The Nobel Prize in Chemistry, 2002). Řadí se mezi měkké ionizační techniky a nedochází při ní k významné fragmentaci analytů (Fenn et al., 1998). Podstatou je využití silného elektrického pole k oddělení kationtů a aniontů v roztoku vzorku a uplatnění jevu Coulombických explozí v kombinaci s principem Rayleighova limitu povrchového náboje (Kearle a Tang, 1993). ESI je nejpoužívanější metodou ionizace analytů organických kontaminantů v medech (Tette et al., 2015).

Další měkkou ionizační technikou používanou pro stanovení organických kontaminantů v soustavě s kapalinovou chromatografií je **APCI (Atmospheric pressure chemical ionization)**. Jedná se o chemickou ionizaci za atmosférického tlaku, při které jsou analyty převedeny do plynné fáze a následně ionizovány přenosem náboje podle principu elektronové afinity molekul prostřednictvím reakčního činidla, ionizovaného koronovým výbojem (Horning et al., 1973; Norková et al., 2013). Pro analýzu medu byla tato ionizační technika využita např. pro stanovení pesticidů 5-hydroxymethylfurfuralu (Tomasini et al. (2012).

Ionizační techniky plynové chromatografie

Typickou tvrdou ionizační technikou v plynové chromatografii je **EI (Electron ionization)**. Během ionizačního procesu jsou analyty fragmentovány podle popsaných pravidel a pro mnohé sloučeniny vznikají charakteristická hmotnostní spektra (Li et al., 2015). Typická spektra pro různé skupiny látek jsou shromažďována v mezinárodních knihovnách (například Wiley Registry of Mass Spectral Data nebo National Institute of Standards and Technology), kde je popsáno přes 600 000 známých spekter a struktur s retenčními indexy. Identifikace je složitější v případech, kdy jsou ionty méně specifické, především když chybí hlavní diagnostický molekulární iont (Lee a Shiea, 1998). Pro multireziduální analýzy pesticidů v medové matrici je EI stále nejpoužívanější ionizační technikou v plynové chromatografii (Zhen et al., 2006; Tette et al., 2015).

APCI ionizace může být využita pro stanovení velice malého množství pyretroidních pesticidů plynovou chromatografií (Li et al., 2015). Portolés et al. (2012) srovnávali použití EI a APCI zdroje na 8 pyretroidních insekticidech. Kvazi-molekulární ionty vznikající při chemické ionizaci velmi zlepšily selektivitu a sensitivitu v porovnání s elektronovou ionizací, při které byly tyto pesticidy silně fragmentovány. Pomocí GC-APCI-MS/MS mohou být pyretroidní kontaminanty stanovovány s detekčním limitem až 3 ng/kg.

Přímé ionizační techniky

Variantou přímé ionizace je ambientní technika **PSI (Paper spray ionization)**. Byla vyvinuta nedávno jako modifikace ESI (Cook et al. 2010). Proud iontů je generován z papíru s naneseným vzorkem, na který je přiváděno vysoké napětí a přímo vstupuje do hmotnostního spektrometru (Meher a Chen, 2015). PSI našlo uplatnění v oborech bioanalýzy (Lin et al., 2014), farmakokinetiky (Manicke et al., 2011; Takyi-Williams et al., 2015) nebo ve forenzních analýzách (Espy et al., 2014). V potravinách se pomocí PSI dají rychle a jednoduše stanovovat kontaminanty v mléce, mase, nápojích (Zhang et al., 2012) nebo azobarviva v chilli koření (Taverna et al., 2013). Evard et al. (2015) pomocí PSI-MS/MS stanovili pesticidy v citrusových plodech přímo z nastrohané kůry, bez jiné přípravy vzorku.

Hmotnostní analyzátoary

Hmotnostní analyzátoar slouží k dělení iontů v plynné fázi za vakua podle m/z (McLafferty a Tureček, 1993). Analyzátoar následuje v soustavě hned po iontovém zdroji a posílá rozdělené ionty do detektoru (Glish a Vachet, 2003). Základními parametry hmotnostních analyzátoarů jsou rozlišovací schopnost, hmotnostní rozsah, dynamický rozsah, rychlost a správnost určení m/z (Kandiah a Urban, 2013). Mezi základní analyzátoary patří jednoduché kvadrupóly, iontové pasti (2D i 3D), průletové analyzátoary (TOF), sektorové systémy, orbitrapy, tandemové systémy a hybridní systémy.

Principy jednoduchého kvadrupólu **Q (quadrupole)** byly publikovány Paul a Steinwedel (1953). Díky nízkým nákladům, jednoduché manipulaci a malým rozměrům se obyčejný kvadrupól stal velice oblíbeným a užívaným (Hogenboom et al., 1997). Dělení iontů v kvadrupólu je založeno na dosažení stabilní trajektorie iontů mezi čtyřmi tyčemi se stálým vysokofrekvenčním střídavým napětím spolu se střídajícím se kladným a záporným stejnosměrným napětím. Podle frekvence střídání stejnosměrného napětí vždy společného na protilehlých tyčích propouští kvadrupól pouze určité ionty s ekvivalentním m/z . **QqQ (Triple quadrupole)** neboli trojitý kvadrupól je soustava třech jednoduchých kvadrupólů za sebou, která umožňuje analýzy MS^2 . V QqQ je do prostředního kvadrupólu navíc zaveden kolizní plyn (argon, helium), který způsobuje excitaci vybraných iontů prvním kvadrupólem a ty jsou dále analyzovány kvadrupólem třetím (Picó et al., 2003). Amitraz a jeho metabolity v hruškách stanovovali

Tokman et al. (2009) pomocí LC-ESI-MS/MS s QqQ s výtěžností od 70 % - 106 % a poměrně vysokým LOD 10 mcg/kg. Trojitý kvadrupól dnes nahrazuje o něco starší techniku iontové pasti **IT (ion trap)**. IT je v podstatě kvadrupólová past se sférickou geometrií, ve které mohou probíhat experimentální analýzy až MS¹⁰ se získáním informací o struktuře jednotlivých iontů (Moneti et al., 2001). Tvoří ji pouze tři elektrody. Prstencová elektroda a dvě koncové elektrody jsou pod napětím, které je vhodnými poměry obměňováno tak, aby ionty v této pasti byly na základě jejich m/z dávkovány do detektoru. Ionty mohou být zadrženy v pasti v řádu milisekund až hodin (Picó et al., 2003). Nevýhodou iontové pasti může být nižší rozlišení nebo omezený dynamický rozsah či citlivost (McLuckey et al., 1994). **TOF (Time of flight)** je koncepčně nejjednodušším hmotnostním analyzátozem (Weickhardt et al., 1996). Separuje ionty na základě rychlosti průletu přesně definované dráhy v čase. Soustavy TOF analyzátořů ve spojení s MALDI byly velice oblíbené hlavně v devadesátých letech (Boughton et al., 2015). Nabízí vysoké rozlišení a přesnost v desítkách ng/l. TOF bývá vylepšen reflektroevým zrcadlem, které odráží putující ionty a prodlužuje dráhu. Tím umožňuje ještě rozlišení podobných molekul o stejném m/z jejichž čas dopadu na detektor se může lišit i o nanosekundy (Glish a Vachet, 2003). Hybridní kvadrupól ve spojení s průletovým analyzátozem **Q-TOF (Hybrid quadrupole-time of flight)** byl představen Morris et al. (1996). Q-TOF je hybridním systémem a kombinuje MS1 upravený trojitý kvadrupól s MS2 reflektroevým TOF (Guilhaus et al., 2000). Wang et al. (2017) analyzovali 40 antibiotik soustavou LC-Q-TOF/MS s LOQ nižšími než 10 µg/kg, v porovnání s technikami MS je LC-Q-TOF/MS, tedy MS/MS ideálním nástrojem pro identifikaci antibiotik v medu. Novým analyzátozem popsáným v roce 2000 je **Orbitrap** (Makarov, 2000). Vychází z předešlých technik iontového záchytu podle Kingdon (1923). Orbitrap se skládá z vnější soudkovité a centrální vřetenovité elektrody. Mezi těmito elektrodami se kombinují stabilní rotační trajektorie s kmity v podélné ose (Makarov, 2000). Tyto oscilace indukující proud na vnější elektrodě jsou pomocí Fourierovy transformace vyhodnocovány a přepočítávány na hmotnostní spektrum (Hu et al., 2005). Gómez-Pérez et al. (2012) stanovovali více jak 350 antibiotik a pesticidů v medech pomocí UHPLC-Orbitrap-MS. Většina analytů měla LOD menší než 10 mcg/kg. Nová studie od Saito-Shida et al. (2018) porovnávala rozlišení hmotnostních analyzátořů Orbitrap a TOF pro stanovení pesticidů v čaji. Na soustavách LC-Orbitrap-MS a LC-TOF-MS identifikovali 146 pesticidů v ředící řadě 0,01 – 0,01 mg/kg. Obě metody byly

srovnatelné, Orbitrap měl díky vyššímu rozlišení lepší selektivitu a senzitivitu v nejnižších koncentracích.

Hmotnostní detektory

Komerční hmotnostní spektrometry jsou osazeny různými typy detektorů, včetně elektronových násobičů, scintilačních detektorů s fotonásobiči, Faradayových válců, MCP (Multichannel plate) nebo Dalyových detektorů. Detektory jsou většinou přímo konstruované pro jednotlivé typy analyzátorů (Kandiah a Urban, 2012). Iontové pasti modulují signál pomocí elektronových násobičů (Moneti et al., 2001), TOF analyzátoři jsou zase vybaveny MCP detektory (Boughton et al., 2015). Vývoj detekčních systémů v hmotnostní spektrometrii stále probíhá, například firma CovalX nedávno představila svůj nový HM4 detektor sestavený pro velice přesnou detekci ultra velkých proteinových molekul větších než 2 MDa ve spojení s MALDI ionizátorem (CovalX systems, 2018).

5.2.2. Chromatografická separace

Vhodnou separační technikou je **HPLC (High pressure liquid chromatography)** neboli vysokoučinná kapalinová chromatografie. Využití nachází především při analýzách málo těkavých teplotně nestabilních látek (Masiá et al., 2016, Tette et al., 2015). Ve spojení s hmotnostní spektrometrií je HPLC účinným analytickým nástrojem pro hledání stopových množství v řádech několika $\mu\text{g}/\text{kg}$ až jednotek ng/kg zejména polárních organických kontaminantů v potravinových matricích (Turnipseed et al., 2011; Hu et al., 2014). Kapalinová chromatografie funguje na základě fyzikálně-chemického principu dělení látek mezi dvě navzájem nemísitelné fáze. Stacionární fázi tvoří kolona s širokou variabilitou sorbentů, kterými protéká mobilní fáze s dokonale rozpuštěným analytem (Niessen, 2006). Volba materiálu stacionární fáze a rozpouštědla fáze mobilní se pak odvíjí od hledaných analytů (Masiá et al., 2016). Při analýzách pesticidů v medech na HPLC je to nejčastěji postupný gradient směsi acetonitrilu nebo metanolu s vodou (Rial-Otero et al., 2007; Tette et al., 2015). Existuje mnoho studií využívajících technologie HPLC ve spojení MS nebo MS/MS detekcí pro stanovení reziduí pesticidů (Barganska et al., 2013; Naggar et al., 2015; Nakajima et al., 2015) nebo veterinárních léčiv (Lopez et al., 2008; Galarini et al., 2015; Orso et al., 2016) v medech.

Vývoj stacionárních fází s velikostí částic pod $2\ \mu\text{m}$, umožnil rychlou separaci s vysokou účinností. Avšak s nižším průměrem částic extrémně stoupá tlak v koloně, a proto je zapotřebí

použití ultra vysokého tlaku. UHPLC (Ultra-high performance liquid chromatography) nenabízí účinnost vyšší než HPLC kolony, ale především výrazně kratší dobu analýzy s širokým rozsahem průtoků mobilní fáze (Chandra et al., 2013). Pomocí UHPLC-ESI-MS/MS byla analyzována rezidua neonikotinoidů a jejich metabolitů v medech a včelách (Galeano et al. 2013; Kamel 2010). Pesticidy i antibiotika byly stanovovány i v soustavě UHPLC-Orbitrap-MS s limitem detekce 1-50 µg/kg pro více jak 350 organických kontaminantů (Gomez-Perez et al., 2012).

Další chromatografickou technikou používanou pro stanovení reziduí zejména těkavých a tepelně stabilních kontaminantů je **GC (Gas chromatography)** neboli plynová chromatografie. Je ideální pro kvantifikaci nízkých koncentrací látek ve složitějších matricích jako jsou pšeničná zrna (Kolberg et al., 2011) nebo med (Panseri et al., 2014). Funguje na stejném principu jako kapalinová chromatografie, od níž se liší především použitou mobilní fází, kterou je zde nosný plyn, a kolonou, kterou tvoří mnohonásobně delší dutá kapilára (Niessen, 2006). V plynové chromatografii lze stanovovat látky jejichž bod varu je nižší než 350 °C (McNair a Miller, 2011), jako jsou triazoly (Farajzadeh et al., 2014), karbamáty (Salami a Queiroz, 2013), pyrethroidy (Bonzini et al., 2011), organofosforové a organochlorové pesticidy (Rial-Otero et al., 2007). V porovnání s kapalinovou chromatografií nabízí vyšší rozlišení a větší kapacitu (Hernández et al., 2011). Další výhodou může být snadnější stanovení méně polárních analytů a elektronicky kontrolovaná separace teplotními programy (McEwen a McKay, 2005). Pro separaci pesticidů je pak rozhodující volba stacionární fáze v koloně odrážející polaritu pesticidů. Pro pesticidy se nejčastěji v GC analýzách používají nepolární kolony (5 % fenyl a 95 % dimethylpolysiloxan) (Pinho et al., 2010; Chienthavorn et al., 2012; Panseri et al., 2014) nebo středně polární kolony (50 % cyanopropylfenyl a 50 % dimethylpolysiloxan) (Choudhary a Sharma, 2008; Mukherjee, 2009). Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem bývala nejpoužívanější technikou pro analýzu pesticidů v potravinách (Farre et al., 2014), nicméně nové pesticidy jsou spíše polární, termolabilní a velice špatně se odpařují, jsou tedy lépe stanovitelné pomocí kapalinové chromatografie (Albero et al., 2004). Navíc kapalinová chromatografie umožňuje stanovit stopová množství širšího spektra organických kontaminantů včetně antibiotik (Wille et al., 2011; Orso et al., 2016; Tette et al., 2016; Reybroeck et al., 2017)

Kromě hmotnostní spektrometrie jsou v kapalinové i plynové chromatografii používány ještě jiné detekční metody. Hojně používaným detektorem organických kontaminantů (především halogenovaných) v medu je **ECD (Electron capture detector)** (Zacharis et al. 2012). Detektor elektronového záchytu byl vynalezen v roce 1957 (Lovelock, 1958). Ještě kolem roku 1974 byl detektorem s nejvyšší citlivostí v chemické analýze (Lovelock, 1974). Využívá principu měnící se vodivosti plynů v závislosti na přítomnosti nebo absenci analytu (Farwell a Rasmussen, 1976). Dalším detektorem použitým pro stanovení pesticidů v medu je **FPD (Flame photometric detector)** (Wang et al., 2010). Plamenově fotometrický detektor byl vyvinul v roce 1962 (Draeger a Draeger, 1962). FPD je detektorem kombinovaným s plynovou chromatografií, který umožňuje kvaliativně stanovovat např. sloučeniny síry, fosforu a kovů (Farwell a Rasmussen, 1976). Analyt prochází vodíkovým plamenem za přístupu vzduchu, uhlovodíky obsahující síru nebo fosfor způsobují chemoluminiscenci se specifickými vlnovými délkami, které po přechodu do fotonásobiče vyvolávají měřitelný elektrický signál (Zainullin a Berezkin, 2015). Pro stanovení organofosforových a organodusíkových pomocí GC lze použít i **NPD (Nitrogen-phosphorus detector)** (Chienthavorn et al., 2012) někdy označovaný jako termionicky specifický detektor. Vynalezl ho Kolb a Bischoff v roce 1974 modifikací plamenového ionizačního detektoru. Dusíko-fosforový detektor umí stanovit dusík a fosfor a využívá vodíkový plamen, kterým je zahříván kroužek z rubidia nebo cesia emitující elektrony. Když z kolony unikne sloučenina fosforu nebo dusíku, adsorbuje se na povrch kroužku a emise elektronů se zvýší (Draper, 1995). V soustavě s kapalinovou chromatografií můžeme v literatuře při analýze pesticidů dohledat i použití **UV/VIS spektrofotometrického detektoru**. Spektrofotometrické detektory jsou založeny na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm (Jovanov et al., 2015). Existují detektory s fixní nebo nastavitelnou vlnovou délkou, a tak zvané detektory diodového pole **DAD (Diode-array detector)**, které snímají celé spektrum v reálném čase. Pro kvantitativní analýzy využívají UV/VIS techniky Lambert-Beerova zákona (Vichapong et al., 2015). Stanovení organických kontaminantů pomocí HPLC-UV/VIS je celkem běžnou a méně náročnou technikou (Zhang et al., 2013; Moniruzzaman et al., 2014; Fan et al., 2015).

5.2.3. Další techniky separace, ionizace a detekce organických kontaminantů

CE (Capillary electroforesis) neboli kapilární elektroforéza je založena na principu různé rychlosti pohybu iontů v elektrickém poli pufrovaného roztoku (Geiger et al., 2011). Využívá elektroforetické mobility a elektroosmotického toku k separaci látek, které je možné regulovat pomocí pH a iontové síly roztoku, teploty či přítomnosti organických rozpouštědel i jiných látek (Kumar et al., 2010). CE je výhodná zejména pro malou spotřebu vzorku i rozpouštědel, krátkou dobu analýzy a vysoké separační účinnosti (Kumar et al., 2010; Mullen et al., 2012), která je ovšem závislá na charakteru separovaných látek (Mikšík et al., 2008). Uplatnění nachází především při analýze polárních sloučenin, např. při stanovení disociačních konstant kyselin (Šolínová et al., 2006), či pro separaci peptidů (Kašička, 2012) a proteinů (El Rassi, 2010). Při analýze antibiotik a pesticidů byla tato technika použita např. v kombinaci s MS/MS pro jejich stanovení v mléce a (Blasco et al. 2009).

MALDI (Matrix-assisted laser desorption/ionization) využívá energie krátkého laserového pulsu, díky kterému dojde k lokální desorpci matrice s analytem ze speciální MALDI destičky. Ionty jsou následně urychleny a putují do hmotnostního analyzátoru (Tanaka et al., 1988). Za vývoj této metody dostal Koichi Tanaka Nobelovu cenu (The Nobel Prize of Chemistry, 2002).

MALDI je vhodné zejména pro screeningové testování širokého spektra látek (Murray, 2010), včetně proteinů a polymerů s vysokou molekulární hmotností (Fenselau et al., 2011). Své uplatnění nachází i v mikrobiologii jako spolehlivý nástroj pro identifikaci bakteriálních kmenů (Sandrin et al., 2013). Probíhající experimenty diagnostiky několika typů rakovinných markerů pomocí MALDI-TOF/MS odkrývají nové možnosti MALDI v oblasti moderní medicíny (Rodrigo et al., 2014). Experimenty detekce látek s nízkou molekulární hmotností a jejich kvantifikace dále rozšiřují možnosti aplikace této techniky (Rzagalinsky a Volmer, 2016) i na oblast stanovení organických kontaminantů. Siribhorn et al. (2012) použitím MALDI-MS pro identifikaci a kvantifikaci stanovili 12 z 15 pesticidů s limitem detekce od 1 ng/ml.

NMR (Nuclear magnetic resonance) je spektroskopickou metodou využívající nukleární magnetické rezonance pro zkoumání interakce atomových jader s magnetickým polem (Riegel a Leskowitz, 2016). Analyzuje přechody mezi spinovými stavy vyvolanými radiofrekvenčním zářením (Filho et al., 2014). Pomocí NMR lze určit složení a strukturu molekul zkoumané látky (Luchinat a Banci, 2016), případně i její množství (Ansari et al., 2016). V analýzách organických kontaminantů je skvělým nástrojem pro studie jejich metabolismu v živých buňkách (Luchinat a Banci, 2016; Hajirezaee et al., 2017) nebo detoxikačních procesů na povrchu kontaminované kůže (Elsinghorst et al., 2015). V rámci včelařství má využití při odhalování falšování (Dübecke et al., 2018) a zajištění autenticity (Gerhardt et al., 2018; Kuballa et al., 2018), případně kvantifikaci celého spektra sacharidů v komplexních matricích medů (Schievano et al., 2017).

6. Experimentální část

Pro potvrzení či vyvrácení vyslovené hypotézy byla experimentální část designována do dvou oddílů. V první části byla vyvinuta metoda pro spolehlivou extrakci organických kontaminantů (pesticidů a antibiotik) ze vzorku, v druhé části byla tato metoda aplikována na dvě screeningová šetření zmíněných reziduí. Nakonec probíhala kompletní analýza vybraných vzorků s použitím vyvinuté metody kvantifikací pomocí kalibrační řady komerčně dostupných pesticidů.

6.1. Použité vzorky

Více než 40 kolegů, přátel a známých bylo požádáno o dovoz komerčně dostupných medů z míst jejich výprav a turistických destinací po celém světě. Celkem bylo shromážděno více než 50 vzorků v období od 20.1.2017 do 25.2.2018. Další vzorky pocházely ze sbírky Katedry kvality zemědělských produktů na České Zemědělské Univerzitě. Vzorky byly po celou dobu skladovány ve tmě při pokojové teplotě. Z celkového počtu 108 vzorků bylo vybráno 68 na základě dohledatelného původu nebo místa komerčního prodeje. Pět vzorků bylo označeno jako produkt ekologického zemědělství s ochrannými známkami BIO nebo ORGANIC. V experimentu bylo stanoveno 17 vzorků z České republiky a 51 vzorků z celého světa. Každému medu bylo přiřazeno identifikační číslo v závislosti na databázi vytvořené mimo tuto práci, seznam analyzovaných vzorků je uveden v kapitole 8. Výsledky.

Druhové zařazení vzorků probíhalo dvěma způsoby. Během analýzy probíhající na ČZU v minulém roce byly některé vzorky testovány a identifikovány na základě obsahu fenolických látek, tato data byla použita v prvním případě. V druhém případě byly medy druhově zařazeny podle označení dostupného na etiketě. Druhové specifikace vzorků jsou uvedeny v kapitole 8. Výsledky.

6.2. Použitý materiál

Vzorky

68 vzorků medu z celého světa

Standardy pesticidů

Acephate, PESTANAL, Sigma-Aldrich, USA

Acetamiprid, PESTANAL, Sigma-Aldrich, USA

Azinphos-ethyl, PESTANAL, Sigma-Aldrich, USA

Carbendazim, PESTANAL, Sigma-Aldrich, USA

Coumaphos, PESTANAL, Sigma-Aldrich, USA

Imidacloprid, PESTANAL, Sigma-Aldrich, USA

Linuron, PESTANAL, Sigma-Aldrich, USA

Metazachlor, PESTANAL, Sigma-Aldrich, USA

Tebuconazol, PESTANAL, Sigma-Aldrich, USA

Thiacloprid, PESTANAL, Sigma-Aldrich, USA

Pesticide Mix A (2mg/ml 9:1 Hexan:Aceton), PESTANAL, Sigma-Aldrich, USA

Vnitřní standard

Thiacloprid-(thiazolidin ring-d4), ≥98 % (HPLC), Sigma-Aldrich, USA

Chromatografické kolony

Kinetex P5, 100A, 1,7 μm 100x2,1 mm, Fenomenex, USA

Acclaim TM RSLC, 120 C18, 120A, 2,2 μm, 120A, 100x2,1 mm, Thermo Fisher Scientific, USA

Rozpouštědla

Methanol s čistotou $\geq 99,9$ %, HiPerSolv CHROMANORM pro LC-MS, VWR International, ČR

Acetonitril s čistotou $\geq 99,9$ %, HiPerSolv CHROMANORM pro LC-MS, VWR International, ČR

Ethylacetát s čistotou $\geq 99,9$ %, HiPerSolv CHROMANORM pro LC-MS, VWR International, ČR

Chemické látky

MgSO₄, Lach:ner, ČR

CH₃COONa, Calbiochem, Merck

NaHCO₃, Lach:ner, ČR

NaSO₄, ≥ 99 %, Sigma-Aldrich, USA

Na₂HPO₄, Sigma-Aldrich, USA

Kyseliny a puřry

Kyselina octová, $\geq 99,9$ %, Sigma-Aldrich, USA

Kyselina citrónová, $\geq 99,5$ %, Sigma-Aldrich, USA

Sorbenty

PSA, SUPELLEAN, Sigma-Aldrich, USA

Aktivovaný florisil, SUPELLEAN, Sigma-Aldrich, USA

Kolonky, HLB Oasis, Waters, USA

Pomůcky

Kónické zkumavky určené pro centrifugy s víčky, 15 ml, Eppendorf, Německo

Kónické zkumavky určené pro centrifugy s víčky, 50 ml, Eppendorf, Německo

Mikrozkumavky, 2 ml, Eppendorf, Německo

Vialky s víčky, 4 ml, Agilent technologies, USA

Vialky s víčky a inzerty (200 μ l), 2 ml, Agilent technologies, USA

SPE manifold, Millipore, Sigma-Aldrich, USA

Zařízení

Automatická pipeta, 10 – 20 µl, Eppendorf, Německo

Automatická pipeta, 100 – 1000 µl, Eppendorf, Německo

Krokovací elektronická pipeta, 50 ml (dělení 0,1 ml), Eppendorf, Německo

Laboratorní váhy (e=1 mg; d=0,01/0,1 mg), SD 82/220.R2, Radwag, Polsko

Ultrazvuková lázeň, RA1680, Tesla, ČR

Vortex, RS-VF10, Phoenix Instruments, USA

Dusíkový koncentrátor, NDK200-2, Hang Zhou Miu Instruments, Čína

Rotační vakuová odparka, miVac Duo-plus, SP Industries, USA

Membránová vakuová pumpa, KNF Neuberg, Německo

Centrifuga, Rotanta 460R, Hettich, Německo

Integrovaný systém pro purifikaci vody, Milli-Q s LC-Pak ultrafiltrací, Merck, USA

UHPLC, Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, USA

Hmotnostní analyzátor, Q-TOF Impact II, Bruker Daltonik, USA

Software

Chromeleon Xpress, Chromeleon 6.80. SR15, Thermo Fisher Scientific, USA

ChemSketch 12.01, Advanced Chemistry Development, Kanada

Compass DataAnalysis 4.3, Bruker Daltonik GmbH, USA

TasQ client 4.3, Bruker Daltonik GmbH, USA

OtofControl 4.0, Bruker Daltonik GmbH, USA

HyStar 3.2, Bruker Daltonik GmbH, USA

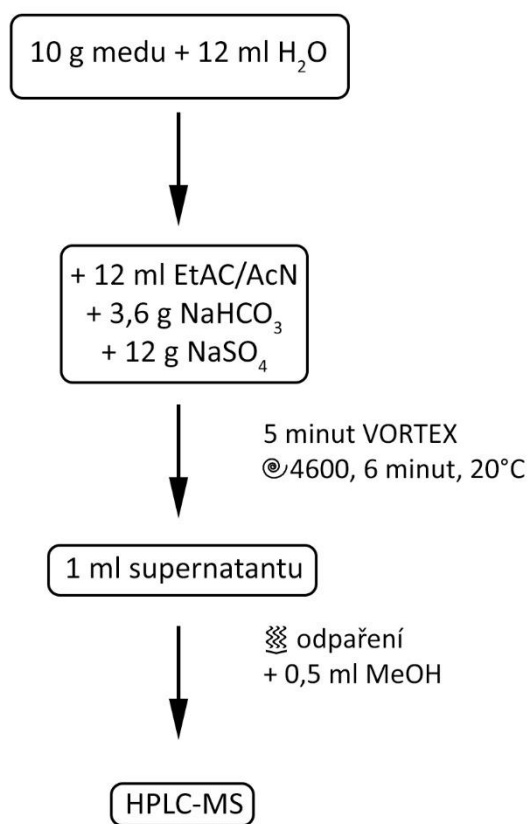
Statistica 12, StatSoft, USA

6.3. Vývoj extrakční metody

Pro přípravu vzorků byla vyvíjena metoda, aby se docílilo nejlepší detekce malých množství reziduí pesticidů i antibiotik v medových vzorcích. V návaznosti na několik předešlých studií používajících pro stanovení reziduí extrakce typu liquid-liquid (Kujawski a Namiesnik, 2011; Salami et al., 2013; Lopez et al., 2014; Panseri et al., 2014) byla testována metoda nejprve s použitím ethylacetátu a poté s použitím acetonitrilu (Obrázek č. 1).

Vzorek 10 g medu byl nejprve rozpuštěn ve 12 ml Milli-Q vody, poté bylo přidáno 12 ml ethylacetátu nebo acetonitrilu s 3,6 g NaHCO₃ a 12 g NaSO₄. Tento vzorek byl poté 5 minut míchán s použitím vortexu a na dalších 5 minut vložen do ultrazvukové lázně. Následovala centrifugace (20 °C, 4600 otáček, 6 min) a odebrání supernatantu, který byl pak odpařen v dusíkovém koncentrátoru. Takto odpařený vzorek byl rozpuštěn v 0,5 ml metanolu, převeden do 2 ml vialky, rozmíchán pomocí vortexu a analyzován.

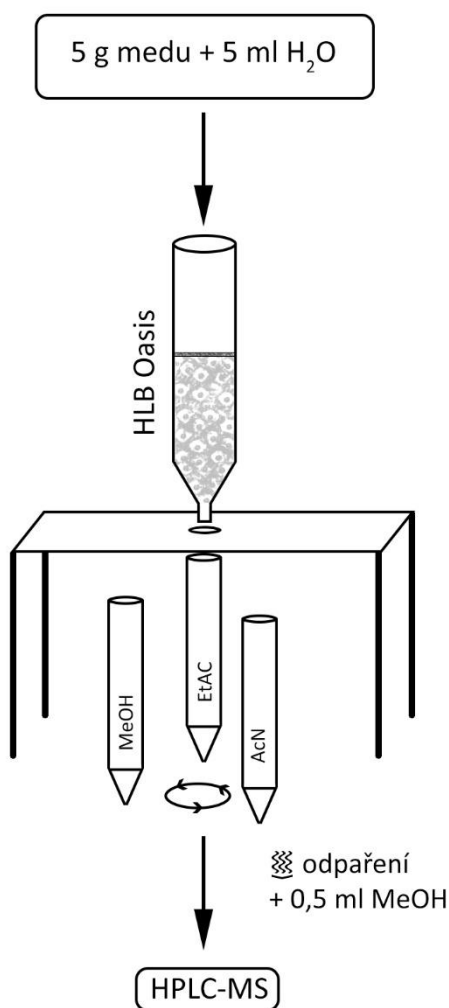
Obrázek č. 1: názorný postup LLE přípravy vzorku.



První ani druhá metoda liquid-liquid extrakce nakonec nebyla vyhodnocena jako vhodná vzhledem k relativně vysokému šumu.

Kvůli vysokému pozadí šumu u techniky LLE byla následně testována SPE metoda s použitím kolonek HLB Oasis od firmy Waters (Obrázek č. 2). Použitím rozpouštědel metanolu, acetonitrilu a etylacetátu byla prováděna standardní solid-phase extrakce. Nejprve bylo rozpuštěno 5 g medu v 10 ml Milli-Q vody. Pak byla kolonka připravena 5 ml metanolu, poté probíhalo postupné nanášení rozpuštěného vzorku. Následně byla kolona promývána metanolem, acetonitrilem a nakonec etylacetátem (sekvenční eluce). Eluáty byly odpařeny v dusíkovém koncentrátoru, rozpuštěny v 0,5 ml metanolu, rozmíchány pomocí vortexu a převedeny do 2 ml vialek.

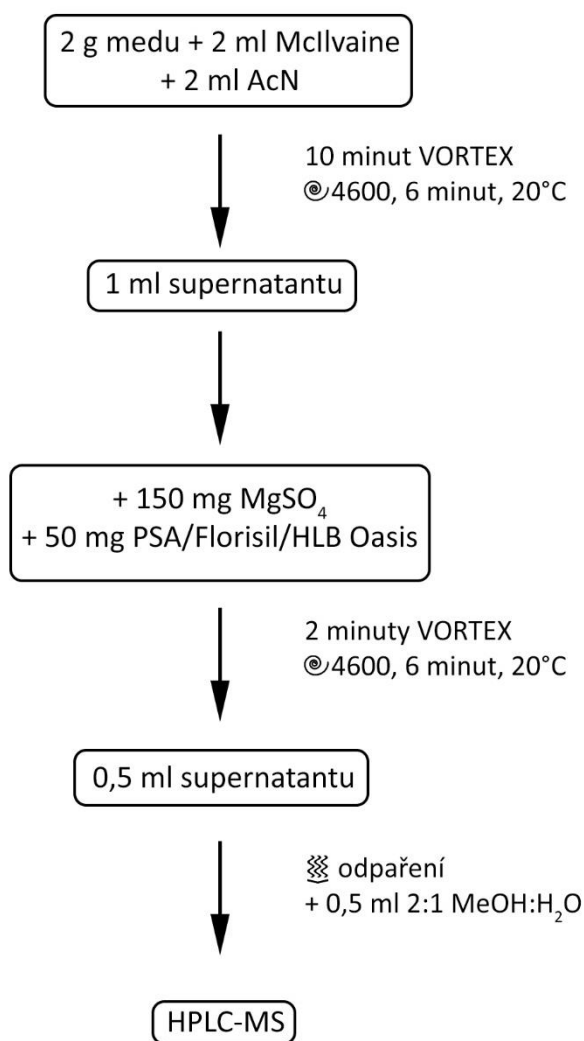
Obrázek č. 2: názorný postup SPE přípravy vzorku



Příprava vzorku pomocí SPE extrakce nebyla vhodná z důvodu velké časové náročnosti. Z výsledků měření při stanovení thiaclopridu se nejlépe jevil vzorek eluovaný etylacetátem.

Časová náročnost provedení SPE extrakce vedla k testování časově úspornějšího protokolu QuEChERS (Calatayud et al. 2016). Dalším postupem tedy bylo testování tří sorbentů (PSA, Florisil a sorbent odebraný z HLB kolonek) v modifikované metodě QuEChERS podle Orso et al. (2016) (Obrázek č. 3). Vzorek 2 g medu byl rozpuštěn ve 2 ml připraveného McIlvaine pufru (pH 4) a 2 ml acetonitrilu. Vzorek byl řádně rozmíchán po dobu 10 minut pomocí vortexu a poté vložen do centrifugy (20 °C, 4600 otáček, 6 min). Z usazeného vzorku byl odebrán 1 ml supernatantu a převeden do mikrozkušavek se 150 mg MgSO₄ a 50 mg vybraného sorbentu. Následovalo rozmíchání vortexem po dobu 2 minut a druhá centrifugace (20 °C, 15000 otáček, 6 min) a odebrání 0,5 ml supernatantu do vialek. Vzorek byl poté odpařen v dusíkovém koncentrátoru a rozpuštěn ve směsi metanolu a vody v poměru 2:1. Z analýzy bylo patrné, že nejlepšími sorbenty pro purifikaci vzorku medu byly PSA a Florisil.

Obrázek č. 3: názorný postup modifikované QuEChERS přípravy vzorku dle Orso et al. (2016)

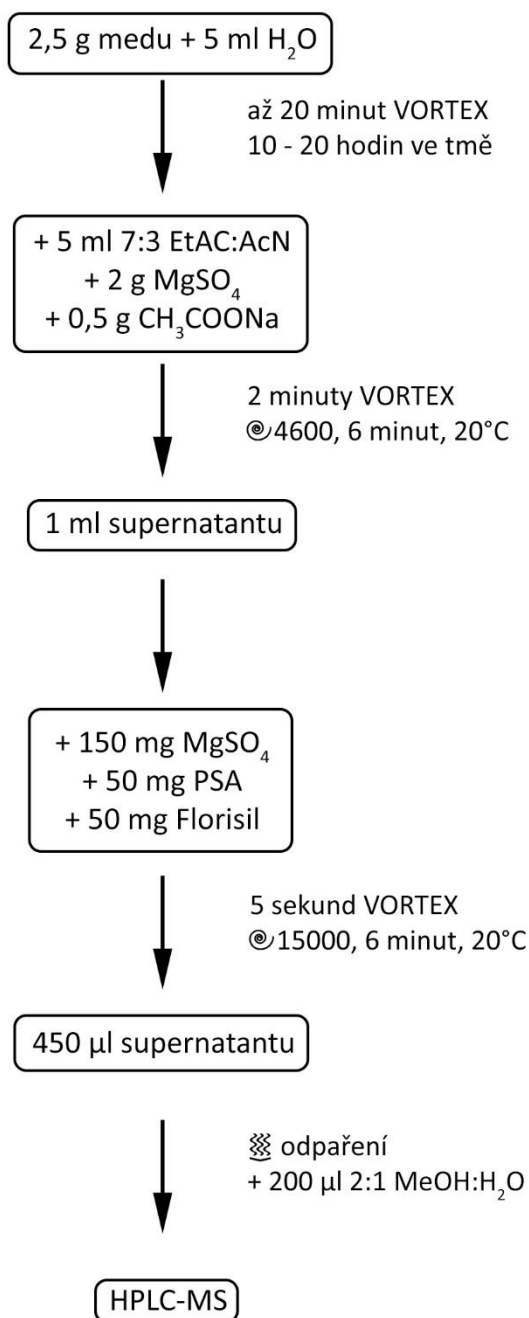


Pro lepší výtěžky při použití sorbentů PSA a Florisilu, jednoduššímu provedení a menší časové náročnosti byla nakonec zvolena modifikace metody QuEChERS dle Tette et al. (2016) (Obrázek č. 4).

Prvním krokem bylo navážení 2,5 g medu a přidáním 5 ml Milli-Q vody, následovalo rozmíchání vzorku pomocí vortexu, poté byly vzorky ponechány ve tmě 10-12 hodin pro dokonalé rozpuštění. Následoval krok extrakce. V první fázi testování této metody byla přidávána dle Tette et al. (2016) směs etylacetátu a acetonitrilu v poměru 3:7 s 1 % kyseliny octové, v návaznosti na předchozí testy SPE byl ve vlastní modifikaci zvolen opačný poměr rozpouštědel (etylacetát:acetonitril – 7:3), protože byl dle srovnání více efektivní. Do směsi medu, vody a rozpouštědel byly přidány 2 g MgSO₄ a 0,5 g CH₃COONa, tento roztok byl míchán

pomocí vortexu po dobu 2 minut. Po centrifugaci (20 °C, 4600 otáček, 6 min) byl odebrán 1 ml supernatantu a převeden do předem připravených mikrozkušavek s naváženou směsí 150 mg MgSO₄, 50 mg PSA a 50 mg Florisilu. Tyto mikrozkušavky byly jemně promíchány s použitím vortexu po dobu 5 sekund a vloženy do centrifugy (20 °C, 15000 otáček, 6 min). 450 µl supernatantu z mikrozkušavek bylo převedeno do vialek a odpařeno proudem dusíku, následně byl z důvodu vyšší koncentrace analytů tento vzorek rozpuštěn pouze ve 200 µl směsi metanolu a vody v poměru 2:1.

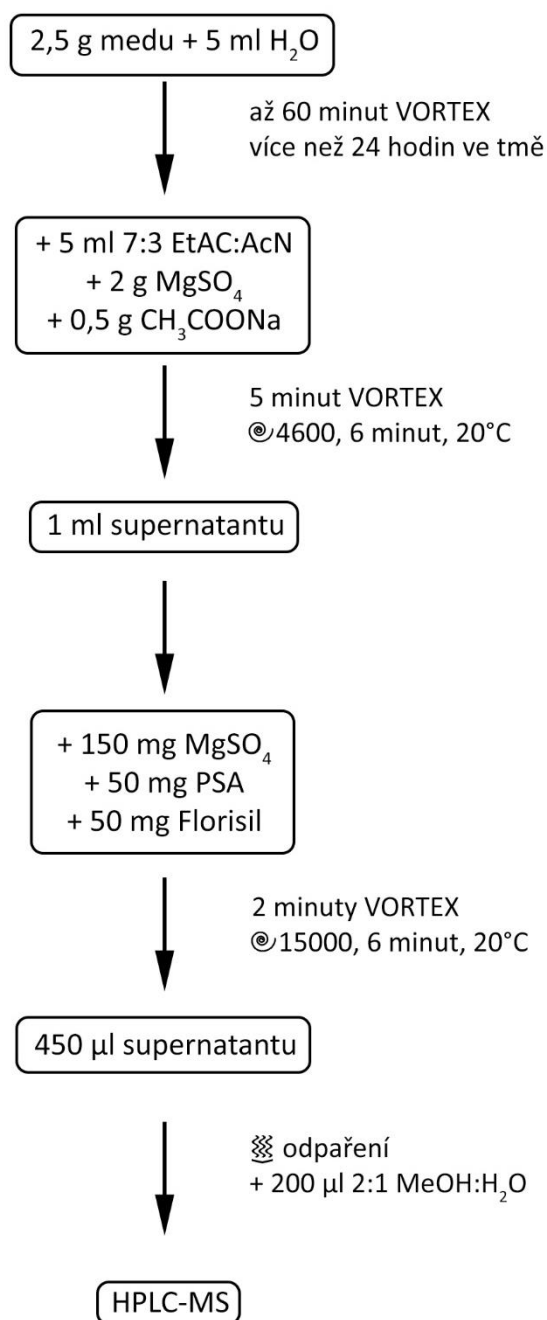
Obrázek č. 4: názorný postup modifikované QuEChERS přípravy vzorku dle Tette et al. (2016)



Tento protokol přípravy vzorku byl použit pro screening všech 68 vybraných vzorků na přítomnost reziduí pesticidů i antibiotik. Pro ověření účinnosti modifikace původní metody, bylo vždy 10 vzorků podrobena paralelní extrakci také originální metodou dle Tette et al. (2016).

Následná kvantitativní analýza vybraných 25 vzorků byla provedena ve 3 technických opakováních extrakce s použitím kalibrační řady roztoků a vnitřního standardu pro spolehlivou kvantifikaci. Příprava vzorků byla pro tuto analýzu mírně upravena. Rozpouštění vzorků probíhalo více než 24 hodin a vzorky byly častěji míchány pomocí vortexu. Extrakce vzorků rozpouštědly byla prodloužena na 5 minut, následně byl také prodloužen čas aplikace sorbentů na 2 minuty. Upravené schéma metody je na obrázku č. 5.

Obrázek č. 5: názorný postup modifikované QuEChERS přípravy vzorku pro analýzu 25 vybraných vzorků



7. Analýza

Analytické šetření bylo prováděno pomocí systému ultravysokotlaké kapalinové chromatografie (UHPLC) Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA) ve spojení s hmotnostním analyzátozem Q-TOF Impact II (Bruker Daltonik GmbH, Německo) s velmi vysokým rozlišením a vysokou přesností při stanovení molekulové hmotnosti (HRAM) hledaných analytů.

Antibiotika byla měřena v negativním módu. Jako mobilní fáze byla zvolena gradientová eluce A/B (A: H₂O s 0,1 % kyseliny mravenčí; B: methanol) s průtokem 300 µl/min při teplotě kolony 35°C. Objem vzorku v nástřiku činil 5 µl. Celková doba jedné analýzy byla 24 minut. Z důvodu minimalizace kontaminace zdroje byly pomocí vysokotlakých ventilů do analyzátoru eluovány analyty od 3,7 do 9 minut.

Tabulka č. 2: gradient mobilní fáze pro analýzu pesticidů

Čas [min]	0	1	10	17	18	24
Podíl B [%]	5	5	100	100	5	5

Analýza pesticidů probíhala v pozitivním módu. Mobilní fází byla opět gradientová eluce A/B (A: H₂O s 5mM NH₄HCO₂; B: methanol) s průtokem 250 µl/min při teplotě kolony 40°C. Nastřikovaný objem byl stejný jako pro analýzu antibiotik (5 µl). Celková doba jedné analýzy byla 21 minut. Vzhledem k široké škále polarit pesticidů nebylo využití vysokotlakých ventilů vhodné a vzorek byl po celou dobu analýzy eluován do analyzátoru.

Tabulka č. 3: gradient mobilní fáze pro analýzu pesticidů

Čas [min]	0	10	15	16	21
Podíl B [%]	40	100	100	40	40

Nastavení hmotnostního spektrometru bylo pro obě analýzy podobné. Kalibrace určení přesné molekulové hmotnosti byla v pozitivním i negativním módu prováděna pomocí molekulových hmotností klastrů formiátu sodného. Tento kalibrační roztok byl připravován česrtvý před každou analýzou. Hmotnostní rozsah analýzy se pohyboval v rozmezí 30 – 1000 m/z. Spektra byla zaznamenávána v módu úplného skenování (FullScan). Ionizační zdroj byl pro analýzu antibiotik nastaven na teplotu 200 °C s napětím 2,5 kV na vstupní kapiláře, pro analýzu pesticidů na 250 °C a 3,5 kV.

Analytická metoda vytvořená v programu otofControl 4.0 (Bruker Daltonik) definovala nastavení parametrů a kalibraci hmotnostního spektrometru. Parametry UHPLC byly konfigurovány pomocí programu Chromeleon Xpress (Thermo Fisher Scientific 6.8). Nastavení datové sekvence a koordinace jednotlivých modulů (LC a MS) v rámci analýzy bylo provedeno programem HyStar 3.2 (Bruker Daltonik). Data byla předběžně zpracována a vyhodnocena pomocí skriptů v rámci software DataAnalysis 4.3 (Bruker Daltonik).

Screeningový test pesticidů byl prováděn na vzorcích medu vždy s jedním opakováním pro zjištění orientačního obsahu analytů. Sérii 5 vzorků vždy dělila jedna analýza čistého rozpouštědla pro kontrolu čistoty (pozadí šumu, kontaminace přenosem zbytků analytů mezi vzorky) chromatografického systému. Screening antibiotik byl proveden stejným způsobem, navíc s měřením kalibrační řady (5; 10; 50; 100; 200 ng/ml).

Sekvence měření 25 vzorků pro určení přesného obsahu reziduí pesticidů v medech byla provedena na třech opakováních paralelně extrahovaných vzorků. Tyto série byly vždy odděleny jednou analýzou čistého rozpouštědla, aby bylo zabráněno případné kontaminaci mezi jednotlivými vzorky medu. V této sekvenci byla použita kalibrační řada roztoků (0,1; 0,5; 1; 5; 10; 20; 50; 100; 200 a 500 ng/ml).

Všechny výstupy z měření byly zpracovány jako hrubá data v programu Compas DataAnalysis, kde byly pro spolehlivou identifikaci porovnány retenční časy a spektra s komerčně dostupnými standardy. Kvantifikace a metodické vyhodnocení bylo provedeno v programu TasQ 4.3 (Bruker Daltonik).

Statistická analýza

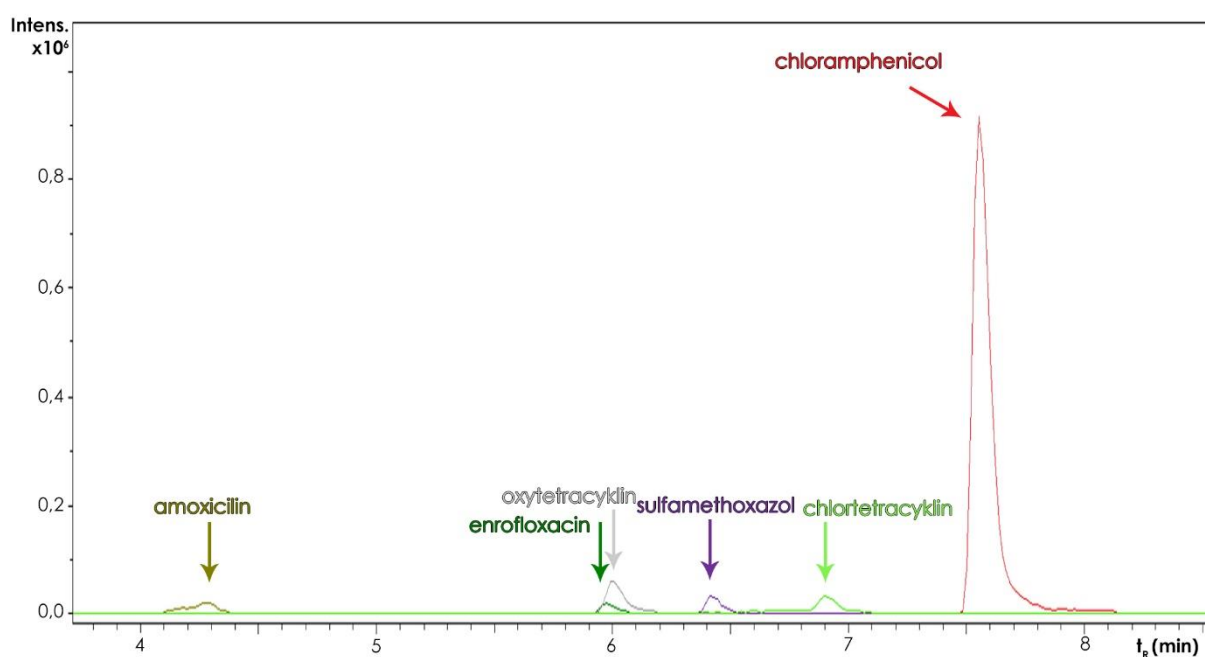
Pro statistické vyhodnocení rozdílů mezi zjištěnými koncentracemi pesticidů v medu a jejich maximálními reziduálními limity (MRL) byl použit jednovýběrový obostranný Studentův t-test. Výpočet kalibračních závislostí a spolehlivosti jejich proložení (R^2) byla použita metoda lineární regrese. Zhodnocení vlivu detekovaných pesticidů a rozdílnosti/podobnosti jednotlivých vzorků bylo provedeno pomocí analýzy hlavních komponent (PCA). Uvedené analýzy byly prováděny pomocí software Statistica 12.0.

8. Výsledky

Během diplomové práce bylo provedeno více než 240 analýz vzorků medu, které zahrnovaly vývoj metody, screening reziduí pesticidů a antibiotik, analýzy s opakováním na náhodně vybraných vzorcích pro stanovení reziduí pesticidů v medu.

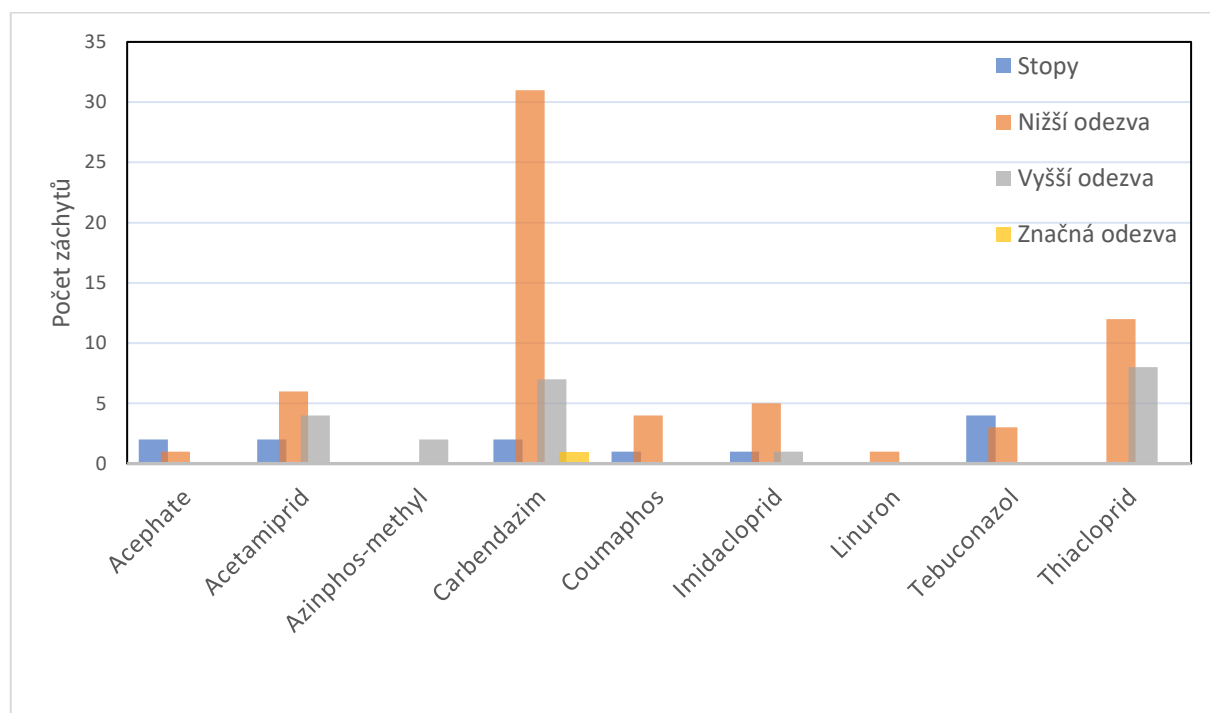
V rámci screeningu antibiotik nebyl ani jednom z 68 testovaných vzorků medu zaznamenán žádný pozitivní záchyt. Screening zahrnoval těchto pět antibiotik: amoxicilin, chloramfenikol, chlortetracyklin, oxytetracyklin, sulfamethoxazol (obr. 6), která byla vybrána na základě předchozí rešerše.

Obrázek č. 6: UHPLC-MS/MS chromatogram standardního roztoku antibiotik (500 ng/ml)



Ve screeningu pesticidů bylo celkem 96 pozitivních záchytů v 68 vzorcích (graf č. 1), z toho ve 27 byl nalezen jeden pesticid, v 15 dva pesticidy, v 11 byly nalezeny tři pesticidy a ve dvou čtyři pesticidy. Ve 13 vzorcích nebyl nalezen ani jeden pesticid. Nejvyšší počet různých druhů pesticidů bylo nalezeno ve vzorcích č. 35 a 36. Orientační porovnání relativního množství v rámci jednotlivých pesticidů bylo provedeno na základě srovnání plochy píků daného pesticidu v jednotlivých vzorcích. Na základě těchto výstupů byly vytvořeny 4 diskrétní kategorie: stopy (ST), nižší odezva (+), vyšší odezva (++) a značná odezva (+++). Kompletní vyhodnocení screeningu reziduí 17 pesticidů se nachází v tabulce č. 3.

Graf č.1: počet pozitivních vzorků u jednotlivých pesticidů



Tabulka č. 3: výsledky screeningové analýzy pesticidů

ČÍSLO VZORKU	ZEMĚ PŮVODU NEBO KOMERČNÍHO PRODEJE	DRUHOVÉ ZAŘAZENÍ	ACEPHATE	ACETAMIPRID	AZINPHOS-METHYL	CARBENDAZIM	COUMAPHOS	IMIDACLOPRID	LINURON	TEBUCONAZOL	THIACLOPRID
1	Kambodža	Lesní				++		+			
2	Thajsko	Longanový				+					
3	Thajsko	Lesní			+	+			+		
4	Maďarsko	Nektarový	+			+					+
5	Spojené arabské emiráty	Nektarový směsný				+					
6	Itálie	Květový				+					
7	Portugalsko	Květový						+			
8	Spojené státy americké	Nektarový směsný				+					
9	Španělsko	Nektarový směsný	ST								
10	Vietnam	Nektarový směsný**				++		+			
11	Spojené státy americké	Medovicový				+	+				
12	Srí lanka	Nektarový směsný**		ST		+					
13	Indie	Lesní				+		+			
14	Mexiko	Nektarový**									
15	Chile	Nektarový směsný				+	+				
16	Mexiko	Nektarový směsný									
17	Írán	Nektarový směsný									
18	Seychelská republika	Lesní					+				
19	Indie	Nektarový směsný				+					
20	Nizozemsko	Nektarový směsný									
21	Spojené státy americké*	Medovicový									
22	Spojené státy americké	Kyslounový				+					
23	Spojené státy americké	Květový				+					
24	Indie*	Medovicový				+					
25	Brazílie*	Květový				++					
26	Spojené státy americké	Květový				+					
27	Nizozemsko*	Květový				+					
28	Ukrajina	Nektarový směsný**		++		++				+	
29	Ukrajina	Akátový**				+					
30	Maďarsko	Akátový**				++					
31	Spojené státy americké*	Lesní				+					
32	Spojené státy americké	Jetelový									
33	Jihoafrická republika	Citrusový			+	++		++			
34	Maďarsko	Akátový		+		+					+
35	Velká Británie	Květový		+		+				ST	++
36	Írán	Lesní	ST			+	ST	+			
37	Spojené státy americké	Jetelový				ST					
38	Indonésie	Lesní									

ČÍSLO VZORKU	ZEMĚ PŮVODU NEBO KOMERČNÍHO PRODEJE	DRUHOVÉ ZAŘAZENÍ	ACEPHATE	ACETAMIPRID	AZINPHOS-METHYL	CARBENDAZIM	COUMAPHOS	IMIDACLOPRID	LINURON	TEBUCONAZOL	THIACLOPRID
39	Thajsko	Květový				+		ST			
40	Rakousko	Květový				+					+
41	Kazachstán	Květový				ST					
42	Spojené státy americké	Medovicový				+					
43	Bulharsko	Nektarový směsný**									++
46	Česká republika	Nektarový směsný**									+
51	Česká republika	Květový**								+	++
52	Ukrajina	Nektarový směsný**									
53	Ukrajina	Nektarový směsný**									
54	Lotyšsko	Nektarový směsný**								ST	+
55	Česká republika	Akátový**									++
56	Česká republika	Květový lesní**		+		+					+
57	Česká republika	Medovicový**					+				
58	Česká republika	Květový		+		+					+
63	Česká republika	Medovicový**				++				ST	++
67	Česká republika	Medovicový**		++							+
68	Česká republika	Akátový**									
69	Česká republika	Medovicový**									
77	Česká republika	Ostropestrcový**		+							++
82	Slovensko	Nektarový směsný		++						+	
84	Česká republika	Řepkový				+++				ST	++
86	Česká republika	Květový		++							+
89	Spojené arabské emiráty	-									
90	Indie	Květový				+					
91	Spojené státy americké	-				+					
93	Česká republika	Nektarový směsný**				+					+
94	Česká republika	Medovicový**									++
95	Česká republika	Nektarový směsný**		+		+					+
96	Jihoafrická republika	Fynbosový***									
98	Česká republika	Akátový**		ST		+					+

ST=stopy, +=nižší odezva, ++=vyšší odezva, +++=značná odezva, *medy komerčně dostupné jako produkty ekologického zemědělství (BIO/ORGANIC), **druh medu identifikován na základě předchozí analýzy na ČZU, ***etésiová vegetace jižní Afriky

Z výsledků screeningu pesticidů je vidět, že země původu nebo komerčního prodeje nemá na obsah pesticidů významný vliv. Medy z Indonésie, Jihoafrické republiky a Mexika neobsahují žádné z vybraných pesticidů. Z ostatních států nebyly žádné analyzované pesticidy detekovány ve dvou vzorcích z České republiky a po jednom vzorku medu ze Spojených států amerických, Nizozemska, Spojených arabských emirátů a Íránu. Španělský med a med z Kazachstánu obsahují těchto pesticidů pouze stopová množství.

Je patrné, že druhový původ může mít v některých případech na obsah pesticidů v medu vliv. V květovém medu jsou totiž ve všech vzorcích pozitivní detekce pesticidů. Přičemž jiné rozšířené druhy medu (lesní, nektarový směsný nebo medovicový) většinou obsahují alespoň jeden z testovaných pesticidů. Mezi vzorky neobvyklých druhů jsou v závislosti na druhu významné. Jetelové vzorky ze Spojených států amerických neobsahují téměř žádné detekovatelné množství pesticidů, fynbosový med z Jihoafrické republiky rovněž neobsahuje žádné hledané analyty. Naproti tomu citrusový med rovněž z Jihoafrické republiky obsahuje početnou škálu pesticidů. Stejně tak i český řepkový med obsahuje značné množství carbendazimu.

Závislost mezi původem a druhovým zařazením medů je spíše kauzální. Dva vzorky nektarových smíšených medů z Ukrajiny jsou bez záchytu, přičemž jiný nektarový smíšený med z Ukrajiny obsahuje hned tři různé pesticidy. Podobným příkladem jsou hned čtyři pozitivní vzorky medovicového medu z České republiky a jeden bez detekovatelného množství. Vzorky lesních medů zvyšují možnost kauzalit, protože pouze jeden vzorek pocházející z Indonésie je bez záchytu.

Pokračováním analýzy pesticidů bylo ověření kroků screeningové metody s kvantifikací na náhodně vybraných vzorcích, které byly již dříve analyzovány v rámci screeningu. Celkem bylo vybráno 25 vzorků (1, 3, 4, 7, 10, 15, 17, 21, 25, 28, 32, 33, 35, 38, 40, 43, 51, 57, 63, 67, 77, 82, 84, 86 a 96). Kvůli vysokému výskytu reziduí thiaclopridu byla analýza rozšířena o použití vnitřního standardu (deuterovaný thiacloprid-d₄). Výtěžnost u analytu tak mohla být spočítána pomocí vnitřního standardu přímým porovnáním. Hodnoty výtěžnosti se kromě čtyřech vzorků pohybovaly mezi 76 – 89 %. Množství zahrnující přepočet na základě zjištěné výtěžnosti jsou uvedena v příloze č. 1.

Pro každý vzorek byla provedena tři opakování a hodnoty v tabulce č. 4 jsou výsledným průměrem těchto měření. Z hodnot šumu a kalibrační přímky byly vypočteny limity detekce (LOD) a limity kvantifikace (LOQ) pro každý ze zkoumaných analytů, uvedené v tabulce č. 3.

Tabulka č.3: hodnoty lineární funkce, R^2 , limit detekce (LOD), limit kvantifikace (LOQ) a maximální reziduální limit (MRL) pro jednotlivé hledané pesticidy

PESTICID	LINEÁRNÍ FUNKCE	R^2	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	MRL EU ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
ACEPHATE	$y=0,2551x-4,707$	0,9735	4,4	7,6	20
ACETAMIPRID	$y=3000,4x-4655,6$	0,9996	1,8	2,4	200
AZINPHOS-ETHYL	$y=260,93x-48,798$	0,9994	1,4	4,4	N.S.
AZINPHOS-METHYL	$y=552,9x+7157$	0,9994	1,5	5,2	N.S.
CARBENDAZIM	$y=32940x-23108$	0,9998	0,7	0,8	1000
CHLORPYRIFOS	$y=7946x-2128217$	0,8508	6,4	11,2	50
COUMAPHOS	$y=9930x-22940$	0,9981	2,3	2,4	100
DICHLORVOS	$y=9281x-11742$	0,9981	1,3	1,4	N.S.
ETHOPROPOS	$y=21013x-42929$	0,9993	2,1	2,3	N.S.
FENCHLORPHOS	$y=113,9+1662$	0,9949	2,2	3,4	N.S.
IMIDACLOPRID	$y=12188x+5157$	0,9999	1,8	5,3	50
LINURON	$y=7400x-10165$	0,9995	1,4	1,6	N.S.
METAZACHLOR	$y=11060x+2807$	0,9992	0,2	0,7	50
PARATHION METHYL	$y=44,7x+1619$	0,9996	2,4	4,2	10
PROTHIOFOS	$y=1050x+374,6$	0,9999	0,1	1,3	N.S.
TEBUCONAZOL	$y=11042x-20739$	0,9994	2	2,3	50
THIACLOPRID	$y=0,9980x+0,4272$	0,9953	0,5	1,8	200

N.S. – limit v Evropské unii není stanoven

Rezidua acetamipridu byla detekována celkem v 36 % vzorků (9) v hodnotách 7,1 – 91,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Pro carbendazim byly pozitivní záchyty v 56 % vzorků (14) mezi 4,4 – 911 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a jeden vzorek po připočtení směrodatné odchylky překročil MRL v EU (dle nařízení ES 396/2005). Coumaphos byl detekován v 16 % vzorků (4) s hodnotami od 12,7 – 16,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Imidacloprid byl nalezen v 16 % vzorků (4) v hodnotách 10,1 – 73,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, v jednom případě (33) překročil MRL stanovené v EU a ve dvou případech nebylo dosaženo hodnot pro spolehlivou kvantifikaci. Jeden vzorek (4 %) obsahoval metazachlor v množství 5,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Tebuconazol byl ve 28 % vzorků (7) v množství od 9,9 do 33,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Thiacloprid byl detekován v 96 % vzorků, z toho v 58 % (14) nedosahoval většího množství než 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, v 17 % (4) pozitivních záchytů byla koncentrace vyšší než 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Tabulka č.4: výsledky kvantifikace pesticidů v jednotlivých vzorcích

ČÍSLO VZORKU	ZEMĚ NEBO MÍSTO KOMERČNÍHO PRODEJE	DRUH	ACETAMIPRID (µg/kg)	CARBENDAZIM (µg/kg)	COUMAPHOS (µg/kg)	IMIDACLOPRID (µg/kg)	METAZACHLOR (µg/kg)	TEBUCONAZOL (µg/kg)	THIACLOPRID (µg/kg)
1	Kambodža	Lesní		22±1,8					6,1±0,4
3	Thajsko	Lesní							4,7±0,1
4	Maďarsko	Nektarový	9,2±0,3	6,7±0,4	12,7±0,7				13,2±0,1
7	Portugalsko	Květový				14,4±1,3			5,4±0,1
10	Vietnam	Nektarový směsný		33,8±2,4					6,2±0,1
15	Chile	Nektarový směsný		6,2±0,4	14,4±1,8				5,3±0,4
17	Írán	Nektarový směsný							6,1±0,3
21	Spojené státy americké	Medovicový							5,6±0,3
25	Brazílie	Květový		31,9±2,2		<LOQ			5,9±0,3
28	Ukrajina	Nektarový směsný	91,4±3	59,9±2,5		<LOQ		16,4±2	6,5±0,3
32	Spojené státy americké	Jetelový	7,1±0,1	6,9±0,3					6,1±0,3
33	Jihoafrická republika	Citrusový		74±8,5		73,3±2**	5,8±1	11±0,7	6,3±0,2
35	Velká Británie	Květový	10,1±0,7	7±0,5				9,9±0,5	157,1±3
38	Indonésie	Lesní		6,2±0,2		10,1±1,4			6,2±0,1
40	Rakousko	Květový	7,7±0,3	6	13,2±0,4				10,5±0,7
43	Bulharsko	Nektarový směsný							93,7±4,4
51	Česká republika	Květový						28,1±2,2	119,8±2
57	Česká republika	Medovicový			16,6±1,3				7±0,3
63	Česká republika	Medovicový		97,5±8				12,6±1,8	117±2,7
67	Česká republika	Medovicový	43,3±3,1						42,5±2,3
77	Česká republika	Ostropestřcový	12,7±0,3	4,4±0,1					66,2±2
82	Slovensko	Nektarový směsný	55,8±2,2					33,6±0,9	6,7±1
84	Česká republika	Řepkový		911±98,8*				13±0,7	143,5±3,1
86	Česká republika	Květový	65,3±0,6						21,8±5,4
96	Jihoafrická republika	Fynbosový							

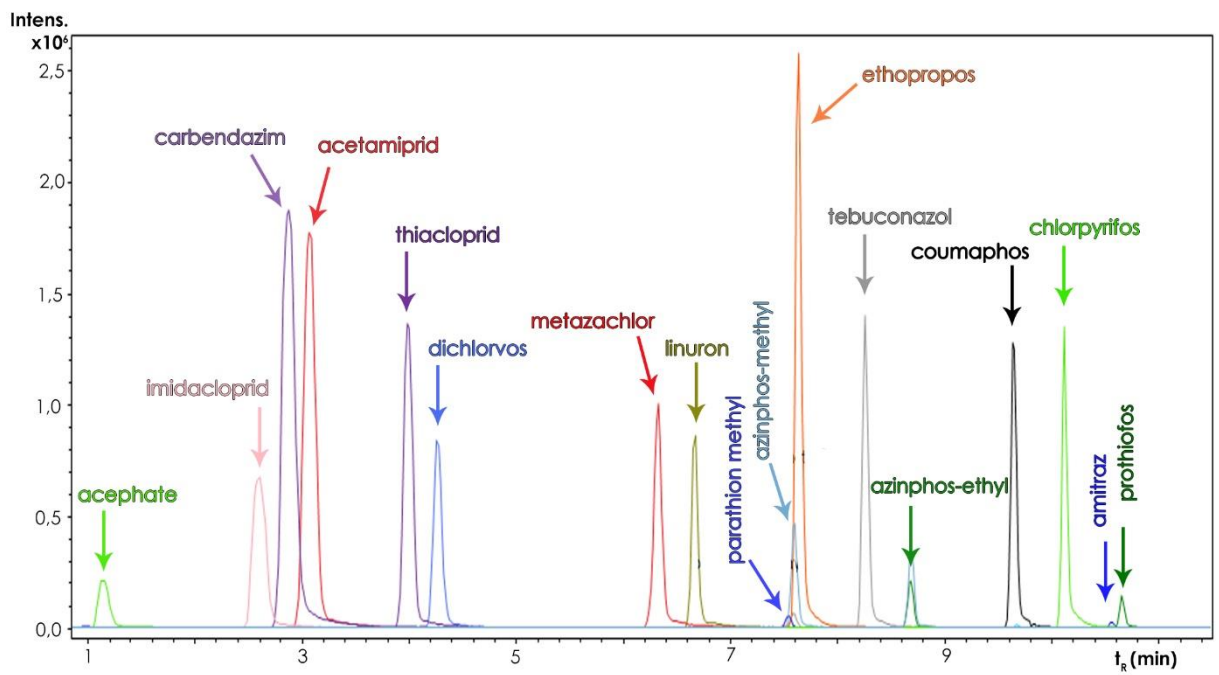
<LOQ – mimo limit kvantifikace

* hodnota se statisticky významně neliší od MRL pro medy v EU (jednovýběrový t-test, p>0,11)

** hodnota statisticky významně převyšuje stanovený MRL pro medy v EU (jednovýběrový t-test, p<0,01)

Mezi metodou screeningové analýzy a její modifikací pro kvantifikaci jsou vidět určité rozdíly. Jedná se především o velmi malá množství reziduí pesticidů thiaclopridu, carbendazimu a coumaphosu. Tato množství mohla být vytěžena ze vzorků delší extrakcí. Naopak chybí záchyty acephatu, azinphos-methylu, imidaclopridu a linuronu. Doba interakce se sorbenty pravděpodobně měla vliv na analýzu těchto reziduí. Naměřené koncentrace imidaclopridu u vzorku č. 33 a 7 tak mohou být vyšší.

Obrázek č. 6: UHPLC-MS/MS chromatogram standardního roztoku pesticidů (500 ng/ml)



9. Diskuze

Med je historicky považován za velice důležitou a hodnotnou potravinu (Bansal et al., 2005). Starověké civilizace med využívaly k léčbě různých onemocnění (Al-Jabri, 2005; Asadi-Pooya et al., 2003; Zumla a Lulat, 1989). Významná antioxidační, antimikrobiální nebo protizánětlivá aktivita je v dnešní době, kdy zájem o výživu všeobecně stoupá, vyhledávaným a zkoumaným fenoménem (Kassim et al., 2012; Paulus et al., 2012; Sancho et al., 2016). Jak poznamenal Khalil et al. (2010), naopak kontaminanty v medu mohou mít zásadní vliv na jeho pozitivní účinky. Vysoké hladiny HMF, sekundární metabolity z rostlin, ale i obsah pesticidů či antibiotik negativně ovlivňuje kvalitu medu (Cieslik et al., 2011; Edgar et al., 2011; Fujita a Kazuhiro, 2014).

Antibiotika

Antibiotická rezidua mohou být v medu obsažena zejména jako důsledek legálního i nelegálního použití léčiv při onemocnění včel. V evropských medech nebyla detekována žádná antibiotická rezidua, což může být důsledkem zákazu použití léčiv na území Evropské unie. Zajímavé však je, že nebyla detekována ani rezidua v medech ze zemí třetího světa, kde většinou nelegální nejsou a jejich použití by tak mohlo být časté vzhledem k výskytu včelích chorob. Výběr zkoumaných reziduí byl přitom dobře sestaven v návaznosti na předchozí záchyty těchto antibiotik v reálných vzorcích (Reybroeck et al., 2012). Je tedy možné, že použitá metoda QuEChERS nebyla schopna dostatečně dobře odhalit hledaná antibiotika. Tento fakt podporují výsledky studie z Íránu (Mahmoudi et al., 2014), ve které detekovali rezidua v každém testovaném vzorku. Nicméně pomocí metody QuEChERS byla identifikována rezidua chloramphenicolu ve studii od Pan et al. (2006), který byl s vysokou odezvou měřen i během analýzy v diplomové práci. Pan et al. (2006) v jejich modifikaci metody používali jako extrakční rozpouštědlo acetonitril v kombinaci s purifikací pomocí PSA. Screening byl tedy prověřen metodou s použitím vyššího podílu acetonitrilu, ale ani v této interpretaci nebyla detekována žádná rezidua. Rozdíl v purifikaci byl použitím PSA v kombinaci s florisilem místo PSA samotného. Tento vliv ale vyvrací studie na vývoj metody od Orso et al. (2016), ve které purifikace pomocí florisulu v kombinaci s PSA vykazovala výtěžnost 70 – 120 % pro 13 hledaných reziduí antibiotik. Nulová detekce reziduí sulfomethoxazolu může být způsobena absencí silné kyseliny během extrakce (Schwaiger a Schuch, 2000), která je nutná pro vyvázání

sulfonamidových antibiotik z vytvořených vazeb s cukry. Podle velkého počtu předchozích studií (Reybroeck, 2017) bylo nastavení hmotnostního spektrometru v módu full-scan víceméně shodné. Je tedy opravdu možné, že ani jeden z testovaných vzorků neobsahoval žádná rezidua antibiotik. Je však třeba podotknout, že antibiotika v medech dosahují nejvyšší koncentrace do jednoho týdne od vzniku kontaminace a poté se postupně rozkládají (Reybroeck et al., 2012). Některé medy byly i více než dva roky staré a skladované při pokojové teplotě. Antibiotika jsou na rozdíl od některých pesticidů méně perzistentní a přípustná je tedy i možnost degradace na rozkladné produkty, které však vyžadují hlubší prozkoumání a analýzy pomocí MS/MS konfigurace, které nejsou součástí této práce.

Pesticidy

Determinace pesticidů v matrici medu není jednoduchou záležitostí (Malhat et al., 2015). Široké spektrum interferujících látek a obsah reziduí ve velmi nízkých koncentracích (Tette et al., 2016) činí analýzu pesticidů v medu náročnou na extrakční i purifikační postupy. Vývoj metody pro odhalení kontaminace pesticidy ukázal, že i menší rozdíly v protokolu extrakce mohou zásadně ovlivnit pozitivitu či negativitu záchytu, především u neonikotinoidových pesticidů, jakými jsou imidacloprid nebo thiacloprid. V zásadě jde o dva důležité kroky v metodě QuEChERS. Navýšení času extrakce pravděpodobně pomohlo vyčistit ze vzorků více pesticidů, naopak delší interakce se sorbenty během purifikace mohla vést k odstranění některých reziduí. Tyto dva efekty jsou také zmíněny ve studii (Tette et al., 2016), ze které byla čerpána inspirace pro jejich ověření. Rozdíly mezi screeningovým testováním a kvantifikační analýzou vybraných vzorků mohou být také dány důkladnějším rozmícháváním vzorku s vodou. Interakce a degradace pesticidů ve vodě popsal Lartiges a Garrigues (1995), avšak rozdíl mezi dobou rozmíchání vzorku ve vodě byl oproti popsaným mechanismům v článku zanedbatelný.

Výsledky diplomové práce poukazují na možné souvislosti mezi profilem, obsahem, druhem a geografickým původem nebo zemí komerčního prodeje. Z pozitivních záchytů během testů můžeme konstatovat, že geografický původ či země komerčního prodeje má na profil organických kontaminantů určitý vliv. Z 11 vzorků medu ze Spojených států amerických bylo 9 pozitivních na přítomnost carbendazimu. V indických medech byl rovněž detekován především carbendazim. Thiacloprid byl přítomen ve všech vzorcích z Evropy, což také potvrzuje studie od Mitchell et al. (2017) publikovaná ve vědeckém časopise Science, která

prověřovala med na rezidua neonikotinoidů. Ve studii ze 198 vzorků medů z celého světa našli právě největší procento thiaclopridu v evropských medech. Wang et al. (2007) analyzovali 38 vzorků medů z několika oblastí po celém světě na obsah organochlorových pesticidů, z jejich pozorování však nevyplývá, že by měl profil těchto druhů pesticidů nějaký vliv v závislosti na původu z rozvojových nebo vyspělých zemí. Výsledky mohou být navíc zkresleny, protože země komerčního prodeje nemusí nutně zaručovat původ medu. Značný nárůst producentů medu v posledních deseti letech zejména v Asii (Vanengelsdorp a Meixner, 2010) a neúplná harmonizace s dovozem z rozvojových zemí (Reybroeck et al., 2012) může znamenat jinou geografickou historii, než je uvedeno na etiketě. V Evropské unii je pak původ takového medu označován jako „Směs medů ze zemí EU i mimo země EU“, což názorně vystihuje problém s dohledatelností a poskytováním informací o původu medu zákazníkovi. Data z diplomové práce mohou prokazovat souvislost. Vzhledem k omezenému počtu vzorků jak v této práci, tak i v dostupné vědecké literatuře, nemůže být jednoznačně konstatována závislost mezi profilem organických kontaminantů a geografickým původem. Je třeba provést analýzy na mnohem větším počtu vzorků z více oblastí světa pro úplné potvrzení této hypotézy.

Druhový původ má na profil vybraných organických kontaminantů patrný vliv. Vzhledem k absenci dostupné vědecké literatury, která by zkoumala takto široký výběr druhů, se nenabízí dostatečné porovnání výsledků s jinými analýzami. Nicméně data shromážděná během této práce poukazují na 100 % kontaminaci více nespécifikovaných květových medů především carbendazimem, tato skutečnost by mohla být vysvětlena expanzí zemědělství do úrodných oblastí s kvetoucími rostlinami, nebo přímé umístění včelích úlů na loukách, které jsou díky větru a migraci perzistentních pesticidů rovněž kontaminovány (Fang et al., 2018). Zajímavý je ovšem výsledek u lesních medů. Všechny tyto medy kromě jednoho vzorku z Indonésie obsahovaly jeden nebo více pesticidů. Kontaminace je zřejmě značně rozsáhlá, protože zasahuje i do lesních oblastí nebo je označení mylné a včely navštěvují rozsáhlejší území, než se předpokládá. S tím také souvisí překvapivě bohatý záchyt u vzorků medu s deklarovaným původem produkce ekologického zemědělství. Z pěti vzorků byly čtyři vzorky s pozitivním záchytem, z toho jeden vzorek po kvantifikaci obsahu vykazoval nadprůměrné hodnoty carbendazimu a menší množství dalších pesticidů. Jen jediný vzorek z horské oblasti ve Spojených státech neobsahoval ani jeden z analytů. Tato informace by mohla poskytnout námět k další studii těchto typů medu, které mohou prokázat chybné předpoklady o doletu a sběru nektaru rostlin z širokého okolí úlů.

Použití pesticidů má zásadní roli na zvyšování produkce v moderním zemědělství (Kolberg et al., 2011). Různé druhy zemědělských plodin vyžadují rozdílné spektrum a různá množství pesticidů (Anderson et al., 2018; Berg a Tam, 2018). Díky této skutečnosti bylo pro kvantitativní analýzu vybráno více vzorků s deklarovaným jednodruhovým původem (řepkový, citrusový, jetelový, fynbosový, ostropestřcový), pro ověření tohoto tvrzení. Z kvantifikační analýzy v této práci je zajímavá vysoká hodnota reziduí carbendazimu v řepkovém medu z České republiky. Po započtení směrodatné odchylky hodnoty překračují MRL, které jsou již tak velmi benevolentní (1 mg/kg) oproti ostatním testovaným pesticidům. Tento vzorek (č. 84) dosahoval až deseti násobku obsahu pesticidů oproti jiným kvantifikovaným vzorkům s pozitivními hodnotami pro carbendazim. Tento záchyt tak přímo poukazuje na závislost mezi druhovým původem medu a profilem i obsahem pesticidů, protože právě carbendazim je jedním ze dvou nejpoužívanějších fungicidů pro chemickou kontrolu a redukci houby *Sclerotinia sclerotiorum*, která je zodpovědná až za 80 % ztráty při sklizních řepky (Wang et al., 2014). Druhým podobným příkladem je vzorek (č. 33) citrusového medu z Jihoafrické republiky. Značná variabilita pesticidů obsažených v tomto vzorku potvrzuje skutečnost více násobného ošetření citrusových sadů v jižní Africe během sezóny (Mutengwe et al., 2016). Citrusové sady jsou totiž velice náchylné k chorobám (Garcerá et al., 2016). Naopak ve fynbosovém medu nebyl detekován ani jeden z vybraných pesticidů. Fynbos je jihoafrická étesiová vegetace složena zejména ze zakrslých keřů, které přežívají za velice drsných podmínek při kritickém nedostatku živin (Lemaire et al, 2016). V tomto prostředí nemá žádný význam použití pesticidů, protože zde žádné zemědělské plodiny neprosívají, jak poznamenal Brandmayr (2016). Včelaři v jižní Africe přesouvají své úly na stanoviště fynbosových vegetačních pásů, protože zde včely prospívají (Hartigh, 2016). Ze screeningové i kvantitativní analýzy v diplomové práci vyplývá, že v tomto medu se nemusíme organických kontaminantů obávat.

Při sestavování experimentu pro stanovení profilu organických kontaminantů byl předpokládán pozitivní záchyt antibiotik v medech pocházejících z rozvojových zemí. Tato domněnka se nepotvrdila. Ani v geografických oblastech, ve kterých nejsou regulace pesticidů zákony tak přísné, nebyly výsledky analýzy profilů organických kontaminantů odlišné od jiných vzorků například z České republiky nebo Spojených států amerických. Vyslovenou hypotézu prokazatelně potvrzují pouze druhová zařazení, kde se jedná hlavně o odlišnosti neobvyklé flóry fynbosu jako zemědělstvím nedotčené oblasti, a naopak vysoké naměřené hodnoty u

medu řepkového a široká variabilita pesticidních látek v medu citrusovém. Pro správné zhodnocení geografické závislosti je tedy zapotřebí použití vzorků s přesným určením stanovišť včelích úlů a rozsáhlejší průzkum okolí, popřípadě možností doletu jednotlivých dělnic.

10. Závěr

- Analýzou pomocí UHPLC-qTOF-MS byly stanoveny profily organických kontaminantů v medech z celého světa.
- Země komerčního prodeje nebo geografický původ medu nemá na profil pesticidů vliv. Hypotéza o závislosti profilu organických kontaminantů v medu na zemi původu se tudíž nepotvrdila.
- Naproti tomu druhový původ jistý vliv na profil a množství pesticidů mít může.
 - Řepkový med obsahoval vysoký obsah carbendazimu.
 - Profil pesticidů citrusového medu byl značně variabilní.
 - Všechny vzorky květového medu obsahovaly pesticidy.
 - Fynbosový med neobsahoval žádná rezidua.
- Medy pocházející z produkce ekologického zemědělství mohou obsahovat rezidua pesticidů.
- Z toho vyplývá, že dílčí hypotéza o určitém vlivu druhu medu na obsah organických kontaminantů (zejména pesticidů), platí.
- V žádných vzorcích nebyla detekována antibiotická rezidua. Pro ověření je však třeba provést další analýzy jejich metabolitů a produktů degradace.

11. Literární zdroje a prameny

Agrawal, A. A. and Weber, M. G. (2015) 'On the study of plant defence and herbivory using comparative approaches: how important are secondary plant compounds', *Ecology Letters*. Wiley Online Library, 18(10), pp. 985–991.

Ahmad, R. S. *et al.* (2017) 'Phytochemistry, metabolism, and ethnomedical scenario of honey: A concurrent review', *International Journal of Food Properties*. Taylor & Francis, 20(sup1), pp. S254–S269.

Ajibola, A., Chamunorwa, J. P. and Erlwanger, K. H. (2012) 'Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth', *Nutrition & metabolism*. BioMed Central, 9(1), p. 61.

Al-Alam, J. *et al.* (2017) 'A multiresidue method for the analysis of 90 pesticides, 16 PAHs, and 22 PCBs in honey using QuEChERS–SPME', *Analytical and bioanalytical chemistry*. Springer, 409(21), pp. 5157–5169.

Al-Jabri, A. A. (2005) 'Honey, milk and antibiotics', *African Journal of Biotechnology*. Academic Journals (Kenya), 4(13).

Al-Sherif, A. A., Mazeed, A. M. and Hagag, E. E. (2012) 'Activity of hypopharyngeal gland in secreting honey-elaborating enzymes in Carniolan and Egyptian honeybees', *Egyptian Academic Journal of Biological Science*, 5(2), pp. 167–173.

Al-Waili, N. S. and Boni, N. S. (2003) 'Natural honey lowers plasma prostaglandin concentrations in normal individuals', *Journal of medicinal food*. Mary Ann Liebert, Inc., 6(2), pp. 129–133.

Al-Sherif, A. A. *et al.* (2017) 'Activity of salivary glands in secreting honey-elaborating enzymes in two subspecies of honeybee (*Apis mellifera* L)', *Physiological Entomology*. Wiley Online Library, 42(4), pp. 397–403.

Albero, B., Sánchez-Brunete, C. and Tadeo, J. L. (2004) 'Analysis of Pesticides in Honey by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography– Mass Spectrometry', *Journal of agricultural and food chemistry*. ACS Publications, 52(19), pp. 5828–5835.

- Alder, L. *et al.* (2004) 'The ECHO technique—the more effective way of data evaluation in liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis', *Journal of chromatography A*. Elsevier, 1058(1–2), pp. 67–79.
- Alqarni, A. S. *et al.* (2014) 'Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia', *Journal of Saudi Chemical Society*. Elsevier, 18(5), pp. 618–625.
- Alqarni, A. S., Owayss, A. A. and Mahmoud, A. A. (2016) 'Physicochemical characteristics, total phenols and pigments of national and international honeys in Saudi Arabia', *Arabian Journal of Chemistry*. Elsevier, 9(1), pp. 114–120.
- Altamimi, M., Abdelhay, O. and Rastall, R. A. (2016) 'Effect of oligosaccharides on the adhesion of gut bacteria to human HT-29 cells', *Anaerobe*. Elsevier, 39, pp. 136–142.
- Amendola, G., Pelosi, P. and Dommarco, R. (2010) 'Solid-phase extraction for multi-residue analysis of pesticides in honey', *Journal of Environmental Science and Health Part B*. Taylor & Francis, 46(1), pp. 24–34.
- Anand, S. *et al.* (2018) 'Characterization of Physico-Chemical Properties and Antioxidant Capacities of Bioactive Honey Produced from Australian Grown *Agastache rugosa* and its Correlation with Colour and Poly-Phenol Content', *Molecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 23(1), p. 108.
- Anastassiades, M., Maštovská, K. and Lehotay, S. J. (2003) 'Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides', *Journal of Chromatography A*. Elsevier, 1015(1–2), pp. 163–184.
- Anderson, B. S. *et al.* (2018) 'Changing patterns in water toxicity associated with current use pesticides in three California agriculture regions', *Integrated environmental assessment and management*. Wiley Online Library, 14(2), pp. 270–281.
- Ansari, S. *et al.* (2016) 'Quantitative ³¹P NMR for Simultaneous Trace Analysis of Organophosphorus Pesticides in Aqueous Media Using the Stir Bar Sorptive Extraction Method', *Journal of Applied Spectroscopy*. Springer, 83(4), pp. 717–721.
- Anthemidis, A. N. and Ioannou, K.-I. G. (2009) 'Recent developments in homogeneous and dispersive liquid–liquid extraction for inorganic elements determination. A review', *Talanta*. Elsevier, 80(2), pp. 413–421.

- Arcot, J. and Brand-Miller, J. (2005) 'A preliminary assessment of the glycemic index of honey', *A Report for the Rural Industries Research and Development Corporation. Publication. Citeseer*, (05/027).
- Ariefdjohan, M. W. *et al.* (2008) 'Acute and chronic effects of honey and its carbohydrate constituents on calcium absorption in rats', *Journal of agricultural and food chemistry. ACS Publications*, 56(8), pp. 2649–2654.
- Arthur, C. L. and Pawliszyn, J. (1990) 'Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers', *Analytical chemistry. ACS Publications*, 62(19), pp. 2145–2148.
- Asadi-Pooya, A. A., Pnjehshahin, M. R. and Beheshti, S. (2003) 'The antimycobacterial effect of honey: an in vitro study.', *Rivista di biologia*, 96(3), pp. 491–495.
- Askar, A. (1984) 'Flavour changes during production and storage of fruit juices', *Fluessiges Obst*, 51, pp. 564–569.
- Balasubramanyam, M. V and Ramesha, I. (2011) 'Amylase and starch content in ripening of honey of indigenous hive bee *Apis cerana indica*', *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences (JCBPS). Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 2(1), p. 237.
- Baltussen, E., Cramers, C. and Sandra, P. (2002) 'Sorptive sample preparation—a review', *Analytical and bioanalytical chemistry. Springer*, 373(1–2), pp. 3–22.
- Bansal, V., Medhi, B. and Pandhi, P. (2005) 'Honey—a remedy rediscovered and its therapeutic utility.'
- Bargańska, Ż., Ślebioda, M. and Namieśnik, J. (2013) 'Pesticide residues levels in honey from apiaries located of Northern Poland', *Food Control. Elsevier*, 31(1), pp. 196–201.
- Bartáková, K. *et al.* (2011) 'Impact of microwave heating on hydroxymethylfurfural content in Czech honeys', *Czech J. Food Sci*, 29, pp. 328–336.
- Bartelme, M. (2016) 'How minerals, heavy metals affect honey', *Food Technology*, 70(2), p. 14.
- Bassam, Z., Zohra, B. I. and Saada, A.-A. (1997) 'The effects of honey on Leishmania parasites: an in vitro study', *Tropical doctor. SAGE Publications Sage UK: London, England*, 27(1_suppl), pp. 36–38.

- Bath, P. K. and Singh, N. (1999) 'A comparison between *Helianthus annuus* and *Eucalyptus lanceolatus* honey', *Food Chemistry*. Elsevier, 67(4), pp. 389–397.
- BATH, P. K. and SINGH, N. (2001) 'Effect of microwave heating on hydroxymethylfurfural formation and browning in *Helianthus annuus* and *Eucalyptus lanceolatus* honey', *Journal of food science and technology*. Association of Food Scientists and Technologists, 38(4), pp. 366–368.
- Berenbaum, M. R. (1995) 'The chemistry of defense: theory and practice', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Acad Sciences, 92(1), pp. 2–8.
- Bertoncelj, J. *et al.* (2007) 'Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey', *Food Chemistry*. Elsevier, 105(2), pp. 822–828.
- den Besten, G. *et al.* (2013) 'The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism', *Journal of lipid research*. ASBMB, 54(9), pp. 2325–2340.
- Bezerra, D. S. S. *et al.* (2010) 'MSPD procedure combined with GC-MS for the determination of procymidone, bifenthrin, malathion and pirimicarb in honey', *Química Nova*. SciELO Brasil, 33(6), pp. 1348–1351.
- Blanchflower, W. J. *et al.* (1997) 'Confirmatory assay for the determination of tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline and its isomers in muscle and kidney using liquid chromatography-mass spectrometry', *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. Elsevier, 692(2), pp. 351–360.
- Blasa, M. *et al.* (2006) 'Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants', *Food Chemistry*. Elsevier, 97(2), pp. 217–222.
- Blasco, C. *et al.* (2011) 'Analysis of insecticides in honey by liquid chromatography–ion trap-mass spectrometry: Comparison of different extraction procedures', *Journal of Chromatography A*. Elsevier, 1218(30), pp. 4892–4901.
- Van Boekel, M. *et al.* (2010) 'A review on the beneficial aspects of food processing', *Molecular Nutrition & Food Research*. Wiley Online Library, 54(9), pp. 1215–1247.
- Bogdanov, S. *et al.* (2008) 'Honey for nutrition and health: a review', *Journal of the American College of Nutrition*. Taylor & Francis, 27(6), pp. 677–689.

- Bogdanov, S. (2015) 'Honey as nutrient and functional food: A review', *Bee Prod Sci*, 1, pp. 1–28.
- Bogdanov, S., Martin, P. and Lullmann, C. (2002) 'Harmonised methods of the international honey commission', *Swiss Bee Research Centre, FAM, Liebefeld*.
- Bonfiglio, R. *et al.* (1999) 'The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds', *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. Wiley Online Library, 13(12), pp. 1175–1185.
- Bonzini, S. *et al.* (2011) 'Predicting pesticide fate in the hive (part 1): experimentally determined τ -fluvalinate residues in bees, honey and wax', *Apidologie*. Springer, 42(3), pp. 378–390.
- Booth, S. L. *et al.* (2008) 'Effect of vitamin K supplementation on bone loss in elderly men and women', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Oxford University Press, 93(4), pp. 1217–1223.
- Borrelli, R. C. and Fogliano, V. (2005) 'Bread crust melanoidins as potential prebiotic ingredients', *Molecular nutrition & food research*. Wiley Online Library, 49(7), pp. 673–678.
- Boughton, B. A. *et al.* (2016) 'Mass spectrometry imaging for plant biology: a review', *Phytochemistry Reviews*. Springer, 15(3), pp. 445–488.
- Boukraâ, L., Abdellah, F. and Ait-Abderrahim, L. (2013) 'Antimicrobial properties of bee products and medicinal plants', *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. [Internet][cited 2017 May 20]. Available from: <http://www.formatex.info/microbiology4/vol2.html>.
- Brown, K. L. (2000) 'Control of bacterial spores', *British Medical Bulletin*. Oxford University Press, 56(1), pp. 158–171.
- Bruins, C. H. P. *et al.* (1999) 'On-line coupling of solid-phase extraction with mass spectrometry for the analysis of biological samples: I. Determination of clenbuterol in urine', *Journal of Chromatography A*. Elsevier, 863(1), pp. 115–122.
- Buck, R. C. *et al.* (2011) 'Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: terminology, classification, and origins', *Integrated environmental assessment and management*. Wiley Online Library, 7(4), pp. 513–541.

- Calatayud-Vernich, P. *et al.* (2016) 'Influence of pesticide use in fruit orchards during blooming on honeybee mortality in 4 experimental apiaries', *Science of the Total Environment*. Elsevier, 541, pp. 33–41.
- Camarero, M. del M. C. (2002) 'Estudio del envejecimiento de mieles de burgos y galicia: influencia de la ganulación inducida'. Universidad de Burgos.
- Castro-Vázquez, L., Pérez-Coello, M. S. and Cabezudo, M. D. (2003) 'Analysis of volatile compounds of rosemary honey. Comparison of different extraction techniques', *Chromatographia*. Springer, 57(3–4), pp. 227–233.
- Cech, N. B. and Enke, C. G. (2000) 'Relating electrospray ionization response to nonpolar character of small peptides', *Analytical chemistry*. ACS Publications, 72(13), pp. 2717–2723.
- Cech, N. B. and Enke, C. G. (2001) 'Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals', *Mass Spectrometry Reviews*. Wiley Online Library, 20(6), pp. 362–387.
- Cieślik, E. *et al.* (2011) 'Evaluation of QuEChERS method for the determination of organochlorine pesticide residues in selected groups of fruits', *Food Chemistry*. Elsevier, 125(2), pp. 773–778.
- Ciulu, M. *et al.* (2011) 'RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey', *Talanta*. Elsevier, 83(3), pp. 924–929.
- Constantine, G. H., Sheth, K. and Catalfomo, P. (1967) 'Grayanotoxin I. Occurrence in additional Ericaceae species', *Journal of pharmaceutical sciences*. Wiley Online Library, 56(11), pp. 1518–1519.
- Cook, D. *et al.* (2013) 'Norditerpene alkaloid concentrations in tissues and floral rewards of larkspurs and impacts on pollinators', *Biochemical Systematics and Ecology*. Elsevier, 48, pp. 123–131.
- Cooper, R. A., Molan, P. C. and Harding, K. G. (2002) 'The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds', *Journal of Applied microbiology*. Wiley Online Library, 93(5), pp. 857–863.
- CovalX Systems (2018) *HM4 High-Mass systems*. Available at: <http://www.covalx.com/hm4%0A>.

- Cumulative, C. (2007) 'Revised N-Methyl Carbamate Cumulative Risk Assessment'. Citeseer.
- Debayle, D., Dessalces, G. and Grenier-Loustalot, M. F. (2008) 'Multi-residue analysis of traces of pesticides and antibiotics in honey by HPLC-MS-MS', *Analytical and bioanalytical chemistry*. Springer, 391(3), pp. 1011–1020.
- Deinzer, M. L. *et al.* (1977) 'Pyrrolizidine alkaloids: their occurrence in honey from tansy ragwort (*Senecio jacobaea* L.)', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 195(4277), pp. 497–499.
- Demircan, A. *et al.* (2009) 'Mad honey sex: therapeutic misadventures from an ancient biological weapon', *Annals of Emergency Medicine*. Elsevier, 54(6), pp. 824–829.
- Dhewa, T. and Goyal, N. (2009) 'Effect of Inulin, Honey and Gum Acacia on Growth of Human Faecal Potential Probiotic Lactobacilli.', *IUP Journal of Life Sciences*, 3(3).
- Domingo, J. L. (2017) 'Concentrations of environmental organic contaminants in meat and meat products and human dietary exposure: A review', *Food and Chemical Toxicology*. Elsevier, 107, pp. 20–26.
- Doner, L. W. (1977) 'The sugars of honey—a review', *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Wiley Online Library, 28(5), pp. 443–456.
- Du, Z., Liu, M. and Li, G. (2013) 'Novel magnetic SPE method based on carbon nanotubes filled with cobalt ferrite for the analysis of organochlorine pesticides in honey and tea', *Journal of separation science*. Wiley Online Library, 36(20), pp. 3387–3394.
- Dübecke, A. (2015) 'NMR-Profiling of Honey—The New Approach in Honey Authenticity Testing', *eFOODLab international*, 3, pp. 14–16.
- Dübecke, A. *et al.* (2018) 'NMR profiling a defense against honey adulteration', *American Bee Journal*. Tentamus Global Center of Excellence for Food Fraud, Flughafendamm 9a, Bremen, Germany: Dadant and Sons, Inc, 158(1), pp. 83–86. Available at: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85041299135&partnerID=40&md5=957b6538077fa7ee34492a1f1a45b257>.
- Earnest, C. *et al.* (2000) 'Effects of pre-exercise carbohydrate feedings on glucose and insulin responses during and after resistance exercise', *J Strength Cond Res*, 14, p. 361.

- EC (2009) 'No Pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin (Commission Regulation (EU) n 37/2010)', *Official Journal of the European Communities*.
- Edgar, J. A. *et al.* (2011) 'Pyrrolizidine alkaloids in food: a spectrum of potential health consequences', *Food Additives & Contaminants: Part A*. Taylor & Francis, 28(3), pp. 308–324.
- Edgar, J. A., Roeder, E. and Molyneux, R. J. (2002) 'Honey from plants containing pyrrolizidine alkaloids: a potential threat to health', *Journal of agricultural and food chemistry*. ACS Publications, 50(10), pp. 2719–2730.
- EFSA (2007) 'Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission related to pyrrolizidine alkaloids as undesirable substances in animal feed', *EFSA Journal*, 447, pp. 1–51. doi: dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2007.447.
- Erejuwa, O. O. *et al.* (2012) 'Honey supplementation in spontaneously hypertensive rats elicits antihypertensive effect via amelioration of renal oxidative stress', *Oxidative medicine and cellular longevity*. Hindawi Publishing Corporation, 2012.
- Espy, R. D. *et al.* (2014) 'Paper spray and extraction spray mass spectrometry for the direct and simultaneous quantification of eight drugs of abuse in whole blood', *Analytical chemistry*. ACS Publications, 86(15), pp. 7712–7718.
- EU (2018) *Pesticides database*. Available at: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database>.
- EU EC (2018) *RASFF Portal*. Available at: <http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert>.
- Evans, J. D. *et al.* (2009) 'Colony collapse disorder: a descriptive study', *PloS one*. Public Library of Science, 4(8), p. e6481.
- Fang, Y. *et al.* (2018) 'Organochlorine pesticides in soil and air at and around a compound contaminated site: vertical distribution, soil–air exchange and risk evaluation', *Stochastic Environmental Research and Risk Assessment*. Springer, 32(4), pp. 1179–1188.

- Farajzadeh, M. A., Mogaddam, M. R. A. and Ghorbanpour, H. (2014) 'Development of a new microextraction method based on elevated temperature dispersive liquid-liquid microextraction for determination of triazole pesticides residues in honey by gas chromatography-nitrogen phosphorus detection', *Journal of Chromatography A*. Elsevier, 1347, pp. 8–16.
- Farré, M., Picó, Y. and Barceló, D. (2014) 'Application of ultra-high pressure liquid chromatography linear ion-trap orbitrap to qualitative and quantitative assessment of pesticide residues', *Journal of Chromatography A*. Elsevier, 1328, pp. 66–79.
- Faucon, J. *et al.* (2005) 'Experimental study on the toxicity of imidacloprid given in syrup to honey bee (*Apis mellifera*) colonies', *Pest management science*. Wiley Online Library, 61(2), pp. 111–125.
- Fenn, Tanaka, Wüthrich, *et al.* (2002) *The Nobel Prize in Chemistry*. Available at: https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002.
- Fenselau, C. and Demirev, P. (2011) *Rapid characterization of microorganisms by mass spectrometry*. ACS Publications.
- Freitas, L. G. *et al.* (2004) 'Quantification of the new triketone herbicides, sulcotrione and mesotrione, and other important herbicides and metabolites, at the ng/l level in surface waters using liquid chromatography-tandem mass spectrometry', *Journal of Chromatography A*. Elsevier, 1028(2), pp. 277–286.
- Galarini, R. *et al.* (2015) 'Multiclass determination of 27 antibiotics in honey', *Food Control*. Elsevier, 48, pp. 12–24.
- Garcerá, C. *et al.* (2017) 'Sustainable Use of Pesticide Applications in Citrus: A Support Tool for Volume Rate Adjustment', *International journal of environmental research and public health*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 14(7), p. 715.
- García-Chao, M. *et al.* (2010) 'Validation of an off line solid phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of systemic insecticide residues in honey and pollen samples collected in apiaries from NW Spain', *Analytica Chimica Acta*. Elsevier, 672(1–2), pp. 107–113.

- Geiger, M., Hogerton, A. L. and Bowser, M. T. (2011) 'Capillary electrophoresis', *Analytical chemistry*. ACS Publications, 84(2), pp. 577–596.
- Gerhardt, N. *et al.* (2018) 'Volatile Compound Fingerprinting by Headspace Gas Chromatography-Ion Mobility Spectrometry (HS-GC-IMS) for the Authenticity Assessment of Honey as Benchtop Alternative to ¹H-NMR Profiling', *Analytical chemistry*. ACS Publications.
- Ghini, S. *et al.* (2004) 'Occurrence and distribution of pesticides in the province of Bologna, Italy, using honeybees as bioindicators', *Archives of environmental contamination and toxicology*. Springer, 47(4), pp. 479–488.
- Gidamis, A. B. *et al.* (2004) 'Quality evaluation of honey harvested from selected areas in Tanzania with special emphasis on hydroxymethyl furfural (HMF) levels', *Plant Foods for human nutrition*. Springer, 59(3), pp. 129–132.
- Glish, G. L. and Vachet, R. W. (2003) 'The basics of mass spectrometry in the twenty-first century', *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group, 2(2), p. 140.
- Goodwin, R. J. A., Bunch, J. and McGinnity, D. F. (2017) 'Mass Spectrometry Imaging in Oncology Drug Discovery', in *Advances in cancer research*. Elsevier, pp. 133–171.
- Goulart, S. M. *et al.* (2008) 'Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection', *Talanta*. Elsevier, 75(5), pp. 1320–1323.
- Graddon, A. D., Morrison, J. D. and Smith, J. F. (1979) 'Volatile constituents of some unifloral Australian honeys', *Journal of agricultural and food chemistry*. ACS Publications, 27(4), pp. 832–837.
- GU, S. *et al.* (2016) 'Review on application of mass spectrometry-based techniques in food allergen analysis', *Chinese Journal of Chromatography*, 7, p. 2.
- Gustavsson, S. Å. *et al.* (2001) 'Studies of signal suppression in liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry using volatile ion-pairing reagents', *Journal of Chromatography A*. Elsevier, 937(1–2), pp. 41–47.
- Haddadin, M. S. Y. *et al.* (2007) 'Effect of honey on the growth and metabolism of two bacterial species of intestinal origin'. Citeseer.
- Harborne, J. B. (1972) 'Phytochemical ecology.', *Phytochemical ecology*. Academic Press.

- Hashemipour, M. A. *et al.* (2014) 'Antiviral Activities of Honey, Royal Jelly, and Acyclovir Against HSV-1.', *Wounds: a compendium of clinical research and practice*, 26(2), pp. 47–54.
- Hercegová, A., Dömötöróvá, M. and Matisová, E. (2007) 'Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination', *Journal of Chromatography A*. Elsevier, 1153(1–2), pp. 54–73.
- Hernández, F. *et al.* (2011) 'Gas chromatography coupled to high-resolution time-of-flight mass spectrometry to analyze trace-level organic compounds in the environment, food safety and toxicology', *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier, 30(2), pp. 388–400.
- Hiwatashi, K. *et al.* (2010) 'Antihypertensive effect of honey-based beverage containing fermented rice bran in spontaneously hypertensive rats.', *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi= Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*. Japanese Society of Food Science and Technology (Nihon Shokuhin Kogyo Gakkai), 57(1), pp. 40–43.
- Holčapek, M. *et al.* (2004) 'Effects of ion-pairing reagents on the electrospray signal suppression of sulphonated dyes and intermediates', *Journal of mass spectrometry*. Wiley Online Library, 39(1), pp. 43–50.
- Horning, E. C. *et al.* (1973) 'New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure', *Analytical Chemistry*. ACS Publications, 45(6), pp. 936–943.
- Hu, F.-Y. *et al.* (2014) 'Determination of 26 veterinary antibiotics residues in water matrices by lyophilization in combination with LC–MS/MS', *Journal of Chromatography B*. Elsevier, 949, pp. 79–86.
- Huang, D., Ou, B. and Prior, R. L. (2005) 'The chemistry behind antioxidant capacity assays', *Journal of agricultural and food chemistry*. ACS Publications, 53(6), pp. 1841–1856.
- Chambers, E. *et al.* (2007) 'Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses', *Journal of Chromatography B*. Elsevier, 852(1–2), pp. 22–34.
- Chandra, S. *et al.* (2013) 'Switch from HPLC to UPLC: A novel achievement in liquid chromatography technique-A review', *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, 21(1), pp. 237–246.
- Chappell, M. C. (2015) 'Biochemical evaluation of the renin-angiotensin system: the good, bad, and absolute?', *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*.

- American Physiological Society Bethesda, MD, 310(2), pp. H137–H152.
- Chen, H. *et al.* (2008) 'LC determination of chloramphenicol in honey using dispersive liquid–liquid microextraction', *Chromatographia*. Springer, 68(7–8), pp. 629–634.
- Chen, L. *et al.* (2011) 'Determination of Chinese honey adulterated with high fructose corn syrup by near infrared spectroscopy', *Food Chemistry*. Elsevier, 128(4), pp. 1110–1114.
- Chienthavorn, O. *et al.* (2012) 'Purge and trap with monolithic sorbent for gas chromatographic analysis of pesticides in honey', *Analytical and bioanalytical chemistry*. Springer, 402(2), pp. 955–964.
- Chiesa, L. M. *et al.* (2016) 'The occurrence of pesticides and persistent organic pollutants in Italian organic honeys from different productive areas in relation to potential environmental pollution', *Chemosphere*. Elsevier, 154, pp. 482–490.
- Choudhary, A. and Sharma, D. C. (2008) 'Pesticide residues in honey samples from Himachal Pradesh (India)', *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer, 80(5), pp. 417–422.
- Chow, J. (2002) 'Probiotics and prebiotics: a brief overview', *Journal of Renal Nutrition*. Elsevier, 12(2), pp. 76–86.
- Ikonomou, M. G., Blades, A. T. and Kebarle, P. (1990) 'Investigations of the electrospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry', *Analytical Chemistry*. ACS Publications, 62(9), pp. 957–967.
- Ioannidou, M. D. *et al.* (2005) 'Direct determination of toxic trace metals in honey and sugars using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry', *Talanta*. Elsevier, 65(1), pp. 92–97.
- Irwin, R. E. *et al.* (2014) 'Secondary compounds in floral rewards of toxic rangeland plants: impacts on pollinators', *Journal of agricultural and food chemistry*. ACS Publications, 62(30), pp. 7335–7344.
- Islam, M., Khalil, M. and Gan, S. H. (2014) 'Toxic compounds in honey', *Journal of applied toxicology*. Wiley Online Library, 34(7), pp. 733–742.

- Ismaiel, O. A. *et al.* (2008) 'Monitoring phospholipids for assessment of ion enhancement and ion suppression in ESI and APCI LC/MS/MS for chlorpheniramine in human plasma and the importance of multiple source matrix effect evaluations', *Journal of Chromatography B*. Elsevier, 875(2), pp. 333–343.
- Jessome, L. L. and Volmer, D. A. (2006) 'Ion suppression: a major concern in mass spectrometry', *Lc Gc North America*. ADVANSTAR, 24(5), p. 498.
- Johnson, W. E., Fendinger, N. J. and Plimmer, J. R. (1991) 'Solid-phase extraction of pesticides from water: possible interferences from dissolved organic material', *Analytical chemistry*. ACS Publications, 63(15), pp. 1510–1513.
- Jones, K. C. (1987) 'Honey as an indicator of heavy metal contamination', *Water, Air, and Soil Pollution*. Springer, 33(1–2), pp. 179–189.
- Jovanov, P. *et al.* (2015) 'Development of HPLC-DAD method for determination of neonicotinoids in honey', *Journal of Food Composition and Analysis*. Elsevier, 40, pp. 106–113.
- Kacániová, M. *et al.* (2010) 'Antiradical activity of natural honeys and antifungal effect against *Penicillium* genera', *Journal of Environmental Science and Health Part B*. Taylor & Francis, 46(1), pp. 92–96.
- Kajiwara, S., Gandhi, H. and Ustunol, Z. (2002) 'Effect of honey on the growth of and acid production by human intestinal *Bifidobacterium* spp.: an in vitro comparison with commercial oligosaccharides and inulin', *Journal of Food Protection*. International Association for Food Protection, 65(1), pp. 214–218.
- Kalabova, K. *et al.* (2003) 'Hydroxymethylfurfural in Czech honeys', *Czech Journal of Animal Science*. Citeseer, 48(12), pp. 551–557.
- Kandiah, M. and Urban, P. L. (2013) 'Advances in ultrasensitive mass spectrometry of organic molecules', *Chemical Society Reviews*. Royal Society of Chemistry, 42(12), pp. 5299–5322.

- Kang, J., Hick, L. A. and Price, W. E. (2007) 'Using calibration approaches to compensate for remaining matrix effects in quantitative liquid chromatography/electrospray ionization multistage mass spectrometric analysis of phytoestrogens in aqueous environmental samples', *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. Wiley Online Library, 21(24), pp. 4065–4072.
- Karabagias, I. K. *et al.* (2017) 'Characterization and geographical discrimination of commercial Citrus spp. honeys produced in different Mediterranean countries based on minerals, volatile compounds and physicochemical parameters, using chemometrics', *Food chemistry*. Elsevier, 217, pp. 445–455.
- Karsa, D. R. (1999) *Design and selection of performance surfactants*. CRC Press.
- Kasicka, V. (2012) 'Recent developments in CE and CEC of peptides (2009-2011)', *Electrophoresis*. Wiley-V CH Verlag GmbH, 33(1), pp. 48–73.
- Kasiotis, K. M. *et al.* (2014) 'Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC–MS/MS screening: reported death incidents in honeybees', *Science of the Total Environment*. Elsevier, 485, pp. 633–642.
- Kassim, M. *et al.* (2010) 'Ellagic acid, phenolic acids, and flavonoids in Malaysian honey extracts demonstrate in vitro anti-inflammatory activity', *Nutrition research*. Elsevier, 30(9), pp. 650–659.
- Katirae, F. *et al.* (2014) 'Antifungal activity of Iranian honeybees against *Candida*, *Aspergillus* species and *Trichophyton rubrum*', *Journal of food processing and preservation*. Wiley Online Library, 38(5), pp. 2078–2082.
- Khalil, M. I., Sulaiman, S. A. and Gan, S. H. (2010) 'High 5-hydroxymethylfurfural concentrations are found in Malaysian honey samples stored for more than one year', *Food and chemical toxicology*. Elsevier, 48(8–9), pp. 2388–2392.
- King, R. *et al.* (2000) 'Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization', *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. Elsevier, 11(11), pp. 942–950.
- Kissa, E. (2001) *Fluorinated surfactants and repellents*. CRC Press.

- Kivrak, I., KIVRAK, Ş. and Harmandar, M. (2016) 'Development of a rapid method for the determination of antibiotic residues in honey using UPLC-ESI-MS/MS', *Food Science and Technology (Campinas)*. SciELO Brasil, 36(1), pp. 90–96.
- Kodama, Y. *et al.* (2017) 'Effectiveness of vitamin K2 on osteoporosis in adults with cerebral palsy', *Brain and Development*. Elsevier, 39(10), pp. 846–850.
- Koch, S. *et al.* (2017) 'Pesticide Residues in Food: Attitudes, Beliefs, and Misconceptions among Conventional and Organic Consumers', *Journal of food protection*. International Association for Food Protection, 80(12), pp. 2083–2089.
- Kolberg, D. I. *et al.* (2011) 'Development of a fast multiresidue method for the determination of pesticides in dry samples (wheat grains, flour and bran) using QuEChERS based method and GC-MS', *Food chemistry*. Elsevier, 125(4), pp. 1436–1442.
- Korfmacher, W. and Yu, K. (2012) 'Mass Spectrometry: The premier analytical tool for DMPK scientists in a drug discovery environment', *LC GC North America*. Advanstar Communications, 30(8), pp. 640–647.
- Kreider, R. B. *et al.* (2002) 'Honey: An Alternative Sports Gel.', *Strength & Conditioning Journal*. LWW, 24(1), pp. 50–51.
- Kuballa, T. *et al.* (2018) 'Application of NMR for authentication of honey, beer and spices', *Current Opinion in Food Science*. Elsevier, 19, pp. 57–62.
- Kujawski, M. W. *et al.* (2014) 'Determining pesticide contamination in honey by LC-ESI-MS/MS-Comparison of pesticide recoveries of two liquid-liquid extraction based approaches', *LWT-Food Science and Technology*. Elsevier, 56(2), pp. 517–523.
- Kujawski, M. W. and Namieśnik, J. (2008) 'Challenges in preparing honey samples for chromatographic determination of contaminants and trace residues', *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier, 27(9), pp. 785–793.
- Kujawski, M. W. and Namieśnik, J. (2011) 'Levels of 13 multi-class pesticide residues in Polish honeys determined by LC-ESI-MS/MS', *Food Control*. Elsevier, 22(6), pp. 914–919.
- Kumar, A., Malik, A. K. and Picó, Y. (2010) 'Sample preparation methods for the determination of pesticides in foods using CE-UV/MS', *Electrophoresis*. Wiley Online Library, 31(13), pp. 2115–2125.

- Kümmerer, K. (2009) 'Antibiotics in the aquatic environment—a review—part I', *Chemosphere*. Elsevier, 75(4), pp. 417–434.
- Kuster, B. F. M. (1990) '5-Hydroxymethylfurfural (HMF). A review focussing on its manufacture', *Starch-Stärke*. Wiley Online Library, 42(8), pp. 314–321.
- Kwakman, P. H. S. *et al.* (2010) 'How honey kills bacteria', *The FASEB Journal*. FASEB, 24(7), pp. 2576–2582.
- Kwakman, P. H. S. and Zaat, S. A. J. (2012) 'Antibacterial components of honey', *IUBMB life*. Wiley Online Library, 64(1), pp. 48–55.
- Landry, B. K. U. *et al.* (2016) 'Honey, Probiotics and Prebiotics', *RESEARCH JOURNAL OF PHARMACEUTICAL BIOLOGICAL AND CHEMICAL SCIENCES*. RJPBCS RESEARCH JOURNAL PHARMACEUTICAL, BIOLOGICAL & CHEMICAL SCIENCES RJPBCS RESEARCH JOURNAL PHARMACEUTICAL, BIOLOGICAL & CHEMICAL SCIENCES, PRODDATUR, 00000, INDIA, 7(5), pp. 2428–2438.
- Lee, C.-Y. and Shiea, J. (1998) 'Gas chromatography connected to multiple channel electrospray ionization mass spectrometry for the detection of volatile organic compounds', *Analytical chemistry*. ACS Publications, 70(13), pp. 2757–2761.
- Lehotay, S. J. *et al.* (2006) 'Development of an analytical method to quantify and identify multiple pesticides, antibiotics, and other residues in honey', in *ABSTRACTS OF PAPERS OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*. AMER CHEMICAL SOC 1155 16TH ST, NW, WASHINGTON, DC 20036 USA, p. 627.
- Lehotay, S. J. (2006) 'Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe approach for determining pesticide residues', in *Pesticide protocols*. Springer, pp. 239–261.
- León-Ruiz, V. *et al.* (2013) 'Antioxidant, antibacterial and ACE-inhibitory activity of four monofloral honeys in relation to their chemical composition', *Food & function*. Royal Society of Chemistry, 4(11), pp. 1617–1624.
- Leverence, R. *et al.* (2007) 'Signal suppression/enhancement in HPLC-ESI-MS/MS from concomitant medications', *Biomedical Chromatography*. Wiley Online Library, 21(11), pp. 1143–1150.

- Levy, S. B. and Marshall, B. (2004) 'Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses', *Nature medicine*. Nature Publishing Group, 10(12s), p. S122.
- Li, Z. *et al.* (2017) 'Evaluation of water content in honey using microwave transmission line technique', *Journal of Food Engineering*. Elsevier, 215, pp. 113–125.
- Lin, C.-H. *et al.* (2014) 'Paper spray-MS for bioanalysis', *Bioanalysis*. Future Science, 6(2), pp. 199–208.
- Lindsey, M. E., Meyer, M. and Thurman, E. M. (2001) 'Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry', *Analytical chemistry*. ACS Publications, 73(19), pp. 4640–4646.
- Liu, J. *et al.* (2010) 'Development, characterization, and application of paper spray ionization', *Analytical chemistry*. ACS Publications, 82(6), pp. 2463–2471.
- Llorent-Martínez, E. J. *et al.* (2011) 'Trends in flow-based analytical methods applied to pesticide detection: A review', *Analytica chimica acta*. Elsevier, 684(1–2), pp. 30–39.
- López-Hernández, Y. *et al.* (2016) 'Mass spectrometry applied to the identification of Mycobacterium tuberculosis and biomarker discovery', *Journal of applied microbiology*. Wiley Online Library, 121(6), pp. 1485–1497.
- Lucchetti, M. A. *et al.* (2016) 'Pyrrolizidine alkaloids from *Echium vulgare* in honey originate primarily from floral nectar', *Journal of agricultural and food chemistry*. ACS Publications, 64(25), pp. 5267–5273.
- Lučan, M. *et al.* (2009) 'Inhibitory effect of honey-sweetened goat and cow milk fermented with *Bifidobacterium lactis* Bb-12 on the growth of *Listeria monocytogenes*.', *Mljekarstvo/Dairy*, 59(2).
- Madejczyk, M. and Baralkiewicz, D. (2008) 'Characterization of Polish rape and honeydew honey according to their mineral contents using ICP-MS and F-AAS/AES', *Analytica Chimica Acta*. Elsevier, 617(1–2), pp. 11–17.
- Maejima, H. *et al.* (2003) 'Distinct sites regulating grayanotoxin binding and unbinding to D4S6 of Nav1.4 sodium channel as revealed by improved estimation of toxin sensitivity', *Journal of Biological Chemistry*. ASBMB, 278(11), pp. 9464–9471.

- Mahmoudi, R., Norian, R. and Pajohi-Alamoti, M. (2014) 'Antibiotic residues in Iranian honey by ELISA', *International journal of food properties*. Taylor & Francis, 17(10), pp. 2367–2373.
- Makarov, A. (2000) 'Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis', *Analytical chemistry*. ACS Publications, 72(6), pp. 1156–1162.
- Mallet, C. R., Lu, Z. and Mazzeo, J. R. (2004) 'A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts', *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. Wiley Online Library, 18(1), pp. 49–58.
- Manicke, N. E. *et al.* (2011) 'Quantitative analysis of therapeutic drugs in dried blood spot samples by paper spray mass spectrometry: an avenue to therapeutic drug monitoring', *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. Springer, 22(9), pp. 1501–1507.
- Manson, J. S. *et al.* (2012) 'Cardenolides in nectar may be more than a consequence of allocation to other plant parts: a phylogenetic study of *Asclepias*', *Functional Ecology*. Wiley Online Library, 26(5), pp. 1100–1110.
- Manyi-Loh, C. E., Ndip, R. N. and Clarke, A. M. (2011) 'Volatile compounds in honey: a review on their involvement in aroma, botanical origin determination and potential biomedical activities', *International Journal of Molecular Sciences*. Molecular Diversity Preservation International, 12(12), pp. 9514–9532.
- Martel, A.-C. *et al.* (2006) 'Tetracycline residues in honey after hive treatment', *Food additives and contaminants*. Taylor & Francis, 23(3), pp. 265–273.
- Masiá, A. *et al.* (2016) 'Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry: a review', *Analytica chimica acta*. Elsevier, 936, pp. 40–61.
- Matamoros, V. *et al.* (2012) 'Analytical procedures for the determination of emerging organic contaminants in plant material: A review', *Analytica chimica acta*. Elsevier, 722, pp. 8–20.
- Mayor, A. (1955) 'Mad honey!', *Archaeology*, 48, pp. 32–40.
- McAlpine, A. (2002) *Adventures of a Collector*. Allen & Unwin.

McCall, A. C. and Fordyce, J. A. (2010) 'Can optimal defence theory be used to predict the distribution of plant chemical defences?', *Journal of Ecology*. Wiley Online Library, 98(5), pp. 985–992.

McEwen, C. N. and McKay, R. G. (2005) 'A combination atmospheric pressure lc/ms: gc/ms ion source: advantages of dual AP-LC/MS: GC/MS instrumentation', *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. Elsevier, 16(11), pp. 1730–1738.

McLafferty, F. W. and Turecek, F. (1993) *Interpretation of mass spectra*. University science books.

McLuckey, S. A. *et al.* (1994) 'Ion trap mass spectrometry using high-pressure ionization', *Analytical chemistry*. ACS Publications, 66(14), p. 737A–743A.

McNaughton, D. E. and Goodwin, R. M. (2008) 'Reducing the threat to toxic honey poses to the New Zealand beekeeping industry and consumers', *Horticult Food Res Inst New Zealand*.

Meher, A. K. and Chen, Y.-C. (2015) 'Tissue paper assisted spray ionization mass spectrometry', *RSC Advances*. Royal Society of Chemistry, 5(114), pp. 94315–94320.

Mei, H. *et al.* (2003) 'Investigation of matrix effects in bioanalytical high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays: application to drug discovery', *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. Wiley Online Library, 17(1), pp. 97–103.

Meixner, M. D. (2010) 'A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them', *Journal of invertebrate pathology*. Elsevier, 103, pp. S80–S95.

Mikšík, I. *et al.* (2008) 'Comparison of CE-MS and LC-MS analyses of avian eggshell matrix proteins', *Chromatographia*. Springer, 67(1), pp. 89–96.

Mitchell, E. A. D. *et al.* (2017) 'A worldwide survey of neonicotinoids in honey', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 358(6359), pp. 109–111.

Molan, P. C. (1999) 'Why honey is effective as a medicine. 1. Its use in modern medicine', *Bee world*. Taylor & Francis, 80(2), pp. 80–92.

Moneti, G. *et al.* (2001) 'Direct coupling of a nano-high-performance liquid chromatography column to an ion trap designed for a gas chromatography/mass spectrometry system', *Rapid*

- Communications in Mass Spectrometry*. Wiley Online Library, 15(17), pp. 1609–1617.
- Moniruzzaman, M. *et al.* (2014) 'Determination of mineral, trace element, and pesticide levels in honey samples originating from different regions of Malaysia compared to Manuka honey', *BioMed research international*. Hindawi, 2014.
- Mullen, W. *et al.* (2012) 'Performance of different separation methods interfaced in the same MS-reflection TOF detector: A comparison of performance between CE versus HPLC for biomarker analysis', *Electrophoresis*. Wiley Online Library, 33(4), pp. 567–574.
- Murray, P. R. (2010) 'Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology', *Clinical Microbiology and Infection*. Wiley Online Library, 16(11), pp. 1626–1630.
- Mutengwe, M. T., Chidamba, L. and Korsten, L. (2016) 'Pesticide residue monitoring on South African fresh produce exported over a 6-year period', *Journal of food protection*. International Association for Food Protection, 79(10), pp. 1759–1766.
- Al Naggar, Y. *et al.* (2015) 'Organophosphorus insecticides in honey, pollen and bees (*Apis mellifera* L.) and their potential hazard to bee colonies in Egypt', *Ecotoxicology and environmental safety*. Elsevier, 114, pp. 1–8.
- Nakajima, T. *et al.* (2015) 'Determination and surveillance of nine acaricides and one metabolite in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry', *Food Additives & Contaminants: Part A*. Taylor & Francis, 32(7), pp. 1099–1104.
- Niell, S. *et al.* (2015) 'QuEChERS adaptability for the analysis of pesticide residues in beehive products seeking the development of an agroecosystem sustainability monitor', *Journal of agricultural and food chemistry*. ACS Publications, 63(18), pp. 4484–4492.
- Niessen, W. M. A. (2006) *Liquid chromatography-mass spectrometry*. CRC Press.
- Nicholson, J. K. *et al.* (2012) 'Host-gut microbiota metabolic interactions', *Science*. American Association for the Advancement of Science, p. 1223813.
- Nikaein, D. *et al.* (2014) 'Effect of honey as an immunomodulator against invasive aspergillosis in BALB/c mice', *Journal of Apicultural Research*. Taylor & Francis, 53(1), pp. 84–90.
- Norková, R., Jaklová, J. and VÁCLAV, K. (2013) 'IONIZAČNÍ TECHNIKY A ROZHRANÍ PRO

SPOJENÍ KAPILÁRNÍCH ELEKTRO-MIGRAČNÍCH METOD S HMOTNOSTNĚ SPEKTROMETRICKOU DETEKČÍ', *Chem. Listy*, 107, pp. 949–955.

Ohashi, K., Natori, S. and Kubo, T. (1999) 'Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.)', *The FEBS Journal*. Wiley Online Library, 265(1), pp. 127–133.

Onat, F. *et al.* (1991) 'Site of action of grayanotoxins in mad honey in rats', *Journal of Applied Toxicology*. Wiley Online Library, 11(3), pp. 199–201.

Oppenheimer, S. R. and Wehr, A. Y. (2015) 'Imaging mass spectrometry in drug discovery and development'. Future Science.

Orso, D. *et al.* (2016) 'Simultaneous determination of multiclass pesticides and antibiotics in honey samples based on ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry', *Food Analytical Methods*. Springer, 9(6), pp. 1638–1653.

Palmer-Jones, T. (1965) 'Poisonous honey overseas and in New Zealand.', *The New Zealand medical journal*, 64(399), pp. 631–637.

Pan, C. *et al.* (2006) 'Determination of chloramphenicol residues in honey by monolithic column liquid chromatography-mass spectrometry after use of quechers clean-up', *Acta Chromatographica*. UNIVERSITY OF SILESIA, 17, p. 320.

Pang, G.-F. *et al.* (2006) 'Multi-residue method for the determination of 450 pesticide residues in honey, fruit juice and wine by double-cartridge solid-phase extraction/gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry', *Food Additives and Contaminants*. Taylor & Francis, 23(8), pp. 777–810.

Pang, G.-F. *et al.* (2006) 'Validation study on 660 pesticide residues in animal tissues by gel permeation chromatography cleanup/gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry', *Journal of Chromatography A*. Elsevier, 1125(1), pp. 1–30.

Panseri, S. *et al.* (2014) 'Occurrence of pesticide residues in Italian honey from different areas in relation to its potential contamination sources', *Food Control*. Elsevier, 38, pp. 150–156.

Parracho, H., McCartney, A. L. and Gibson, G. R. (2007) 'Probiotics and prebiotics in infant nutrition', *Proceedings of the Nutrition Society*. Cambridge University Press, 66(3), pp. 405–411.

Payá, P. *et al.* (2007) 'Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection', *Analytical and bioanalytical chemistry*. Springer, 389(6), pp. 1697–1714.

Pena-Pereira, F., Lavilla, I. and Bendicho, C. (2009) 'Miniaturized preconcentration methods based on liquid–liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review', *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. Elsevier, 64(1), pp. 1–15.

Pentoś, K. and Łuczycza, D. (2017) 'Dielectric properties of honey: the potential usability for quality assessment', *European Food Research and Technology*. Springer, pp. 1–8.

Pérez-Fernández, V., García, M. Á. and Marina, M. L. (2010) 'Characteristics and enantiomeric analysis of chiral pyrethroids', *Journal of Chromatography A*. Elsevier, 1217(7), pp. 968–989.

Persano-Oddo, L., Piana, M. L. and D'Albore, G. R. (2007) 'I mieli regionali italiani', *Caratterizzazione melissopalinoologica*, p. 139.

Picó, Y., Blasco, C. and Font, G. (2004) 'Environmental and food applications of LC–tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: An overview', *Mass spectrometry reviews*. Wiley Online Library, 23(1), pp. 45–85.

Pichersky, E. and Gang, D. R. (2000) 'Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective', *Trends in plant science*. Elsevier, 5(10), pp. 439–445.

de Pinho, G. P. *et al.* (2010) 'Optimization of the liquid–liquid extraction method and low temperature purification (LLE–LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography', *Food Control*. Elsevier, 21(10), pp. 1307–1311.

- Pirard, C. *et al.* (2007) 'Development and validation of a multi-residue method for pesticide determination in honey using on-column liquid-liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry', *Journal of Chromatography A*. Elsevier, 1152(1-2), pp. 116-123.
- Pohl, P. *et al.* (2012) 'Bioaccessibility of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn from commercial bee honeys', *Food Chemistry*. Elsevier, 134(1), pp. 392-396.
- Popa, D. and Ustunol, Z. (2011) 'Influence of sucrose, high fructose corn syrup and honey from different floral sources on growth and acid production by lactic acid bacteria and bifidobacteria', *International journal of dairy technology*. Wiley Online Library, 64(2), pp. 247-253.
- Porrini, C. *et al.* (2003) 'Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination', *Apiacta*, 38(1), pp. 63-70.
- Portolés, T. *et al.* (2012) 'Advantages of atmospheric pressure chemical ionization in gas chromatography tandem mass spectrometry: pyrethroid insecticides as a case study', *Analytical chemistry*. ACS Publications, 84(22), pp. 9802-9810.
- Postmes, T., Van Den Bogaard, A. E. and Hazen, M. (1995) 'The sterilization of honey with cobalt 60 gamma radiation: a study of honey spiked with spores of *Clostridium botulinum* and *Bacillus subtilis*', *Experientia*. Springer, 51(9-10), pp. 986-989.
- Przybyłowski, P. and Wilczyńska, A. (2001) 'Honey as an environmental marker', *Food chemistry*. Elsevier, 74(3), pp. 289-291.
- Pyrzyska, K. and Biesaga, M. (2009) 'Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey', *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier, 28(7), pp. 893-902.
- Qiang, Y., Zhou, B. and Gao, K. (2011) 'Chemical constituents of plants from the genus *Rhododendron*', *Chemistry & Biodiversity*. Wiley Online Library, 8(5), pp. 792-815.
- Rao, N. S. and Baker, B. E. (1994) 'Textile finishes and fluorosurfactants', in *Organofluorine Chemistry*. Springer, pp. 321-338.
- El Rassi, Z. (2010) 'Electrophoretic and electrochromatographic separation of proteins in capillaries: an update covering 2007-2009', *Electrophoresis*. Wiley Online Library, 31(1), pp. 174-191.

- REGULATION, H. A. T. (1990) 'Council regulation (EEC) no 2377/90 of 26 June 1990 laying down a community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin', *Official JL*, 224, pp. 1–8.
- Reid, M. (2011) 'Background on toxic honey', *New Zealand Food Safety Authority*, Accessed on July, 25, p. 2011.
- Ren, Y. *et al.* (2017) 'Serum Biomarker Identification by Mass Spectrometry in Acute Aortic Dissection', *Cellular Physiology and Biochemistry*. Karger Publishers, 44(6), pp. 2147–2157.
- Reybroeck, W. *et al.* (2012) 'Antimicrobials in beekeeping', *Veterinary microbiology*. Elsevier, 158(1–2), pp. 1–11.
- Rezaee, M. *et al.* (2006) 'Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction', *Journal of Chromatography A*. Elsevier, 1116(1–2), pp. 1–9.
- Riegel, S. D. and Leskowitz, G. M. (2016) 'Benchtop NMR spectrometers in academic teaching', *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier, 83, pp. 27–38.
- Rissato, S. R. *et al.* (2006) 'Método multirresíduo para monitoramento de contaminação ambiental de pesticidas na região de Bauru (SP) usando mel como bio-indicador', *Química Nova*. SciELO Brasil, pp. 950–955.
- Roboz, G. J. and Roboz, J. (2016) 'The application of mass spectrometry to leukemia drug discovery'. Taylor & Francis.
- Ruffinengo, S. *et al.* (2005) 'LD50 and repellent effects of essential oils from Argentinian wild plant species on *Varroa destructor*', *Journal of Economic Entomology*. BioOne, 98(3), pp. 651–655.
- Sabatini, A. G., Bortolotti, L. and Marcazzan, G. L. (2007) *Conoscere il miele*. Avenue media.
- Sahin, H. *et al.* (2015) 'Grayanotoxin-III detection and antioxidant activity of mad honey', *International journal of food properties*. Taylor & Francis, 18(12), pp. 2665–2674.
- Sajid, M. and Azim, M. K. (2012) 'Characterization of the nematicidal activity of natural honey', *Journal of agricultural and food chemistry*. ACS Publications, 60(30), pp. 7428–7434.

- Salami, F. H. and Queiroz, M. E. C. (2012) 'Microextraction in packed sorbent for the determination of pesticides in honey samples by gas chromatography coupled to mass spectrometry', *Journal of chromatographic science*. Oxford University Press, 51(10), pp. 899–904.
- Sampaio, M. R. F. *et al.* (2012) 'Determination of pesticide residues in sugarcane honey by QuEChERS, and liquid chromatography', *Journal of the Brazilian Chemical Society*. SciELO Brasil, 23(2), pp. 197–205.
- Sanna, G. *et al.* (2000) 'Determination of heavy metals in honey by anodic stripping voltammetry at microelectrodes', *Analytica Chimica Acta*. Elsevier, 415(1–2), pp. 165–173.
- Sanz, M. L. *et al.* (2005) 'In vitro investigation into the potential prebiotic activity of honey oligosaccharides', *Journal of agricultural and food chemistry*. ACS Publications, 53(8), pp. 2914–2921.
- Satta, A. *et al.* (2005) 'Formic acid-based treatments for control of *Varroa destructor* in a Mediterranean area', *Journal of economic entomology*. BioOne, 98(2), pp. 267–273.
- Seyama, I. *et al.* (1988) 'Grayanotoxin opens Na channels from inside the squid axonal membrane', *Biophysical journal*. Elsevier, 53(2), pp. 271–274.
- Shamala, T. R., Shri Jyothi, Y. and Saibaba, P. (2000) 'Stimulatory effect of honey on multiplication of lactic acid bacteria under in vitro and in vivo conditions', *Letters in applied microbiology*. Wiley Online Library, 30(6), pp. 453–455.
- Shendy, A. H. *et al.* (2016) 'Development and validation of a modified QuEChERS protocol coupled to LC–MS/MS for simultaneous determination of multi-class antibiotic residues in honey', *Food chemistry*. Elsevier, 190, pp. 982–989.
- Sheth, H. B. *et al.* (1990) 'Reaction of reducing sugars with sulfathiazole and importance of this reaction to sulfonamide residue analysis using chromatographic, colorimetric, microbiological, or ELISA methods', *Journal of agricultural and food chemistry*. ACS Publications, 38(4), pp. 1125–1130.

- Shou, W. Z. and Naidong, W. (2003) 'Post-column infusion study of the "dosing vehicle effect" in the liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis of discovery pharmacokinetic samples', *Rapid communications in mass spectrometry*. Wiley Online Library, 17(6), pp. 589–597.
- Schievano, E., Tonoli, M. and Rastrelli, F. (2017) 'NMR Quantification of Carbohydrates in Complex Mixtures. A Challenge on Honey', *Analytical chemistry*. ACS Publications, 89(24), pp. 13405–13414.
- Schoonhoven, L. M. (1998) 'Plant chemistry: endless variety', *Insect-Plant Biology: From Physiology to Evolution*. Chapman & Hall, pp. 31–82.
- Silici, S. *et al.* (2016) 'Acute effects of grayanotoxin in rhododendron honey on kidney functions in rats', *Environmental Science and Pollution Research*. Springer, 23(4), pp. 3300–3309.
- Silici, S. *et al.* (2016) 'Honeybees and honey as monitors for heavy metal contamination near thermal power plants in Mugla, Turkey', *Toxicology and industrial health*. SAGE Publications Sage UK: London, England, 32(3), pp. 507–516.
- Silici, S. and Atayoglu, A. T. (2015) 'Mad honey intoxication: a systematic review on the 1199 cases', *Food and chemical toxicology*. Elsevier, 86, pp. 282–290.
- Silvina, N. *et al.* (2017) 'Neonicotinoids transference from the field to the hive by honey bees: Towards a pesticide residues biomonitor', *Science of the Total Environment*. Elsevier, 581, pp. 25–31.
- Simal, J., Huidobro, J. and Araquistain, J. L. (1983) 'Parámetros de calidad de la miel: determinación del contenido en agua [Quality parameters of honey: Determination of water content]', *Offarm*, 2, pp. 243–248.
- Simon, A. *et al.* (2009) 'Medical honey for wound care—still the "latest resort"?', *Evidence-based complementary and alternative medicine*. Hindawi, 6(2), pp. 165–173.
- Skog, K. I., Johansson, M. A. E. and Jägerstad, M. I. (1998) 'Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake', *Food and Chemical Toxicology*. Elsevier, 36(9–10), pp. 879–896.

- Slavin, J. (2013) 'Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits', *Nutrients*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 5(4), pp. 1417–1435.
- Stahl, T., Mattern, D. and Brunn, H. (2011) 'Toxicology of perfluorinated compounds', *Environmental Sciences Europe*. Springer, 23(1), p. 38.
- Stahnke, H. *et al.* (2012) 'The influence of electrospray ion source design on matrix effects', *Journal of Mass spectrometry*. Wiley Online Library, 47(7), pp. 875–884.
- Stahnke, H., Reemtsma, T. and Alder, L. (2009) 'Compensation of matrix effects by postcolumn infusion of a monitor substance in multiresidue analysis with LC–MS/MS', *Analytical chemistry*. ACS Publications, 81(6), pp. 2185–2192.
- Stanimirova, I. *et al.* (2010) 'Tracing the geographical origin of honeys based on volatile compounds profiles assessment using pattern recognition techniques', *Food Chemistry*. Elsevier, 118(1), pp. 171–176.
- Stüber, M. and Reemtsma, T. (2004) 'Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS', *Analytical and bioanalytical chemistry*. Springer, 378(4), pp. 910–916.
- Sunner, J., Nicol, G. and Kebarle, P. (1988) 'Factors determining relative sensitivity of analytes in positive mode atmospheric pressure ionization mass spectrometry', *Analytical Chemistry*. ACS Publications, 60(13), pp. 1300–1307.
- Surma, M., Zieliński, H. and Piskuća, M. (2016) 'Levels of contamination by perfluoroalkyl substances in honey from selected European countries', *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. Springer, 97(1), pp. 112–118.
- Šafaříková, M. and Šafařík, I. (1999) 'Magnetic solid-phase extraction', *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. Elsevier, 194(1–3), pp. 108–112.
- Šolínová, V. *et al.* (2006) 'Determination of acid–base dissociation constants of amino- and guanidinopurine nucleotide analogs and related compounds by capillary zone electrophoresis', *Electrophoresis*. Wiley Online Library, 27(5-6), pp. 1006–1019.
- Šonka Jaroslav (1947) *Xenofón Anabaze*. Praha: Odeon.
- Takyi-Williams, J. *et al.* (2015) 'Application of paper spray–MS in PK studies using sunitinib and benzethonium as model compounds', *Bioanalysis*. Future Science, 7(4), pp. 413–423.

- Taverna, D. *et al.* (2013) 'High-throughput determination of Sudan Azo-dyes within powdered chili pepper by paper spray mass spectrometry', *Journal of Mass Spectrometry*. Wiley Online Library, 48(5), pp. 544–547.
- The National Honey Board (2018) *Honey varieties*. Available at: <http://www.honey.com/honey-at-home/learn-about-honey/%0Ahoney-varieties%0A>.
- Tian, B. *et al.* (2012) 'Long-term exposure to antibiotics has caused accumulation of resistance determinants in the gut microbiota of honeybees', *MBio*. Am Soc Microbiol, 3(6), pp. e00377-12.
- Tiedeken, E. J. *et al.* (2016) 'Nectar chemistry modulates the impact of an invasive plant on native pollinators', *Functional Ecology*. Wiley Online Library, 30(6), pp. 885–893.
- Tillotson, G. S., Doern, G. V and Blondeau, J. M. (2006) 'Optimal antimicrobial therapy: the balance of potency and exposure', *Expert opinion on investigational drugs*. Taylor & Francis, 15(4), pp. 335–337.
- Tomasini, D. *et al.* (2012) 'Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified QuEChERS method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry', *Talanta*. Elsevier, 99, pp. 380–386.
- Tosi, S. *et al.* (2018) 'A 3-year survey of Italian honey bee-collected pollen reveals widespread contamination by agricultural pesticides', *Science of the Total Environment*. Elsevier, 615, pp. 208–218.
- Trufelli, H. *et al.* (2011) 'An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry', *Mass spectrometry reviews*. Wiley Online Library, 30(3), pp. 491–509.
- Turnipseed, S. B. *et al.* (2011) 'Analysis of veterinary drugs and metabolites in milk using quadrupole time-of-flight liquid chromatography– mass spectrometry', *Journal of agricultural and food chemistry*. ACS Publications, 59(14), pp. 7569–7581.
- Ulusoy, E., Kolayli, S. and Sarikaya, A. O. (2010) 'Antioxidant and antimicrobial activity of different floral origin honeys from Turkiye', *Journal of food biochemistry*. Wiley Online Library, 34(s1), pp. 321–335.
- Urban, P. L. (2016) 'Quantitative mass spectrometry: an overview'. The Royal Society.

- US EPA (2002) *Fluorochemical use, distribution and release overview*. Available at: <http://www.regulations.gov/EPA-HQ-OPPT-2002-0051-0003>.
- US EPA (2006) 'Organophosphorus cumulative risk assessment'.
- US EPA (2011) 'Pyrethrins/pyrethroid cumulative risk assessment'.
- USDA (2016) *National Nutrient Database for Standard Reference Basic Report: 19296, Honey*.
- Use, F. (1999) 'Distribution and Release Overview; US EPA Public Docket AR226-0550; 3M Company: St', Paul, MN, May, 26.
- Vela, L., de Lorenzo, C. and Perez, R. A. (2007) 'Antioxidant capacity of Spanish honeys and its correlation with polyphenol content and other physicochemical properties', *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Wiley Online Library, 87(6), pp. 1069–1075.
- Vichapong, J., Burakham, R. and Srijaranai, S. (2015) 'In-coupled syringe assisted octanol–water partition microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of neonicotinoid insecticide residues in honey', *Talanta*. Elsevier, 139, pp. 21–26.
- Vlaeva, I. *et al.* (2017) 'Using differential scanning calorimetry, laser refractometry, electrical conductivity and spectrophotometry for discrimination of different types of Bulgarian honey', in *Journal of Physics: Conference Series*. IOP Publishing, p. 12034.
- Walsh, C. (2003) *Antibiotics: actions, origins, resistance*. American Society for Microbiology (ASM).
- Wang, C.-W., Chen, W.-T. and Chang, H.-T. (2014) 'Quantification of saccharides in honey samples through surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using HgTe nanostructures', *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*. Springer, 25(7), pp. 1247–1252.
- Wang, X. H., Gheldof, N. and Engeseth, N. J. (2004) 'Effect of processing and storage on antioxidant capacity of honey', *Journal of Food Science*. Wiley Online Library, 69(2).
- Wang, Y. *et al.* (2014) 'Detection of resistance in *Sclerotinia sclerotiorum* to carbendazim and dimethachlon in Jiangsu Province of China', *Australasian Plant Pathology*. Springer, 43(3), pp. 307–312.

- Wang, Y. N. (2004) 'Food safely calls for "green pesticide"', *Qinhuangdao Daily*, 2.
- Weaver, R. and Riley, R. J. (2006) 'Identification and reduction of ion suppression effects on pharmacokinetic parameters by polyethylene glycol 400', *Rapid communications in mass spectrometry*. Wiley Online Library, 20(17), pp. 2559–2564.
- Weickhardt, C., Moritz, F. and Grotemeyer, J. (1996) 'Time-of-flight mass spectrometry: State-of-the-art in chemical analysis and molecular science', *Mass spectrometry reviews*. Wiley Online Library, 15(3), pp. 139–162.
- White Jr, J. W. (1975) 'Physical characteristics of honey', *Honey: A Comprehensive Survey*. E. Crane, ed.
- Wiedenfeld, H. (2011) 'Plants containing pyrrolizidine alkaloids: toxicity and problems', *Food Additives & Contaminants: Part A*. Taylor & Francis, 28(3), pp. 282–292.
- Wiest, L. *et al.* (2011) '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*. Elsevier, 1218(34), pp. 5743–5756.
- Yavuz, H. *et al.* (2010) 'Determination of some organochlorine pesticide residues in honeys from Konya, Turkey', *Environmental monitoring and assessment*. Springer, 168(1–4), pp. 277–283.
- Yu, C. and Hu, B. (2009) 'Sol–gel polydimethylsiloxane/poly (vinylalcohol)-coated stir bar sorptive extraction of organophosphorus pesticides in honey and their determination by large volume injection GC', *Journal of separation science*. Wiley Online Library, 32(1), pp. 147–153.
- Zali, S. *et al.* (2015) 'Electrospun nanostructured polystyrene as a new coating material for solid-phase microextraction: Application to separation of multipesticides from honey samples', *Journal of Chromatography B*. Elsevier, 1002, pp. 387–393.
- Zeina, B., Othman, O. and Al-Assad, S. (1996) 'Effect of honey versus thyme on Rubella virus survival in vitro', *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. Mary Ann Liebert, Inc. 2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA, 2(3), pp. 345–348.

Zhang, Z., Cooks, R. G. and Ouyang, Z. (2012) 'Paper spray: a simple and efficient means of analysis of different contaminants in foodstuffs', *Analyst*. Royal Society of Chemistry, 137(11), pp. 2556–2558.

Zhao, X. and Metcalfe, C. D. (2008) 'Characterizing and Compensating for Matrix Effects Using Atmospheric Pressure Chemical Ionization Liquid Chromatography– Tandem Mass Spectrometry: Analysis of Neutral Pharmaceuticals in Municipal Wastewater', *Analytical chemistry*. ACS Publications, 80(6), pp. 2010–2017.

Zhou, S. and Cook, K. D. (2001) 'A mechanistic study of electrospray mass spectrometry: charge gradients within electrospray droplets and their influence on ion response', *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. Elsevier, 12(2), pp. 206–214.

Zumla, A. and Lulat, A. (1989) 'Honey--a remedy rediscovered.', *Journal of the Royal Society of Medicine*. Royal Society of Medicine Press, 82(7), p. 384.

12. Přílohy a seznam příloh

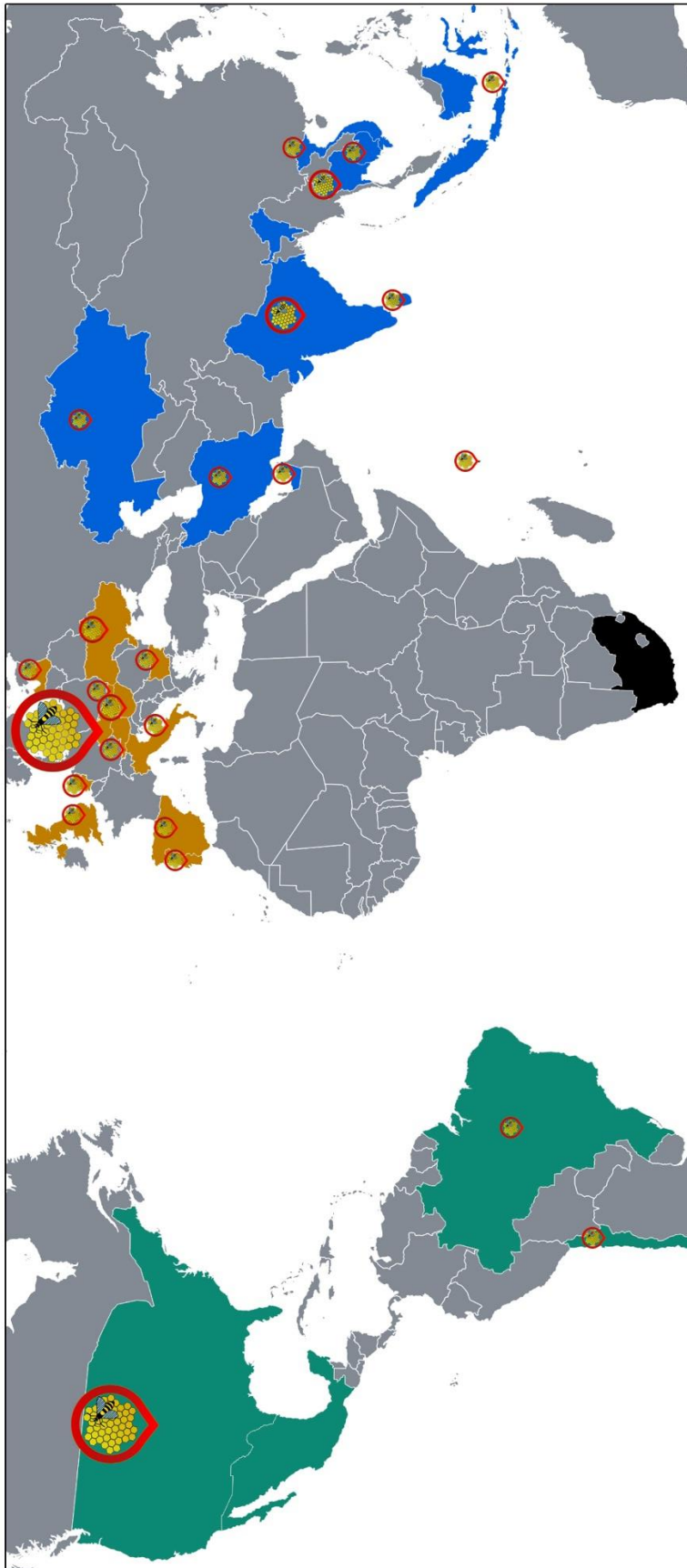
Příloha č. 1

Vypočítané hodnoty pro thiacloprid se zahrnutou výtěžností:

ČÍSLO VZORKU	VÝTĚŽNOST (%)	VYPOČÍTANÁ HODNOTA (µg/kg)
1	80	6,1
3	70	6,1
4	83	15,4
7	89	6
10	84	6
15	54	6,4
17	76	6,3
21	76	5,8
25	83	5,7
28	83	6,3
32	85	6
33	85	6
35	80	157
38	88	5,8
40	84	10,2
43	48	103
51	79	120,8
57	78	7
63	78	119
67	80	42,5
77	86	63
82	62	7
84	79	160,7
86	69	23,7
96	81	6,3

Příloha č. 2

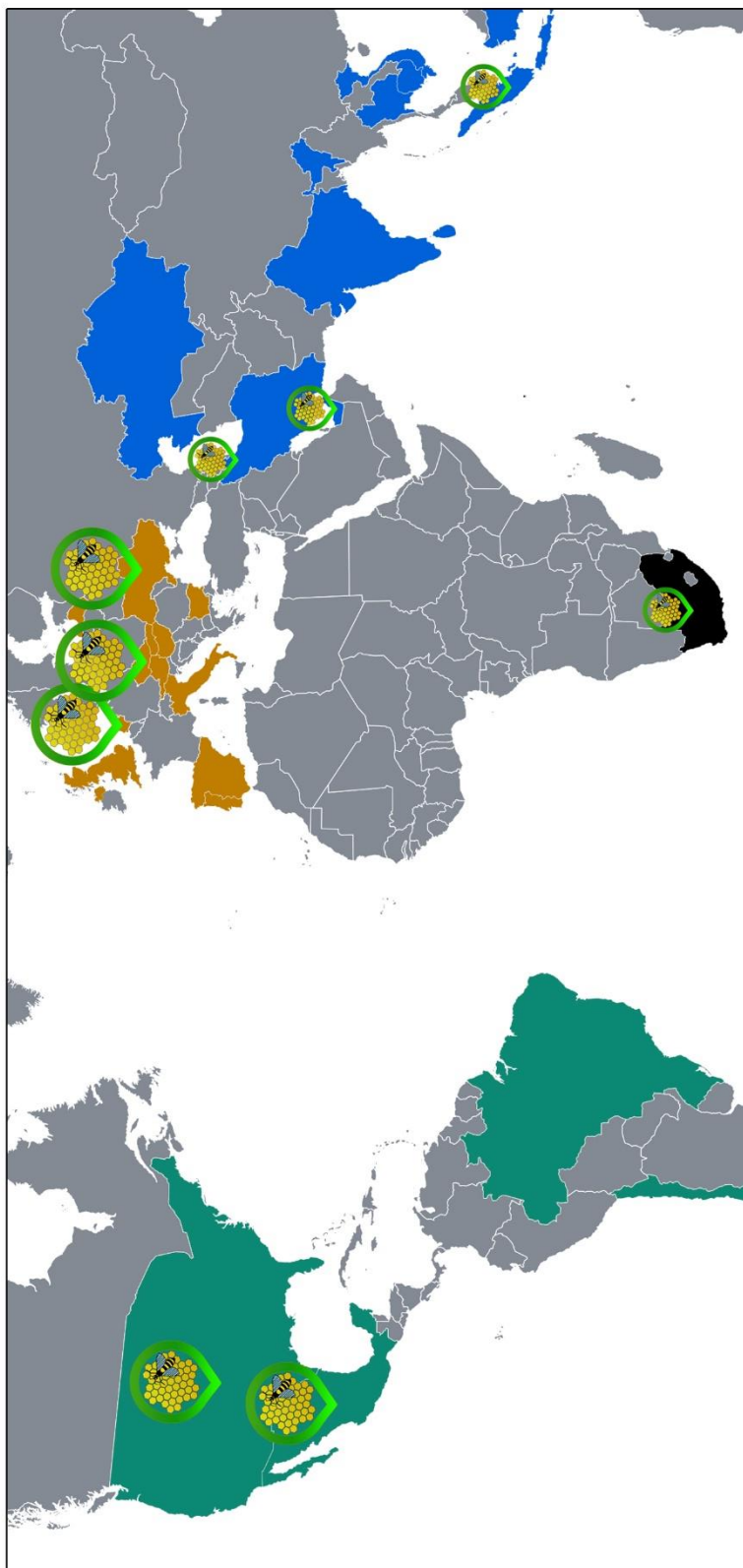
Mapa vzorků s pozitivními záchyty pesticidů v medech podle screeningové analýzy:



Pozitivní vzorky: USA (9), Chile (1), Brazílie (1)
Indie (4), Thajsko (3), Kazachstán (1), Írán (1), Spojené arabské emiráty (1), Indonésie (1), Kambodža (1),
Vietnam (1), Srilanská demokratická socialistická republika (1)
ČR (14), Ukrajina (2), Maďarsko (2), Rakousko (1), Itálie (1), Španělsko (1), Portugalsko (1), Spojené království (1),
Lotyšsko (1), Nizozemí (1)
Seychelská republika (1)

Příloha č. 3

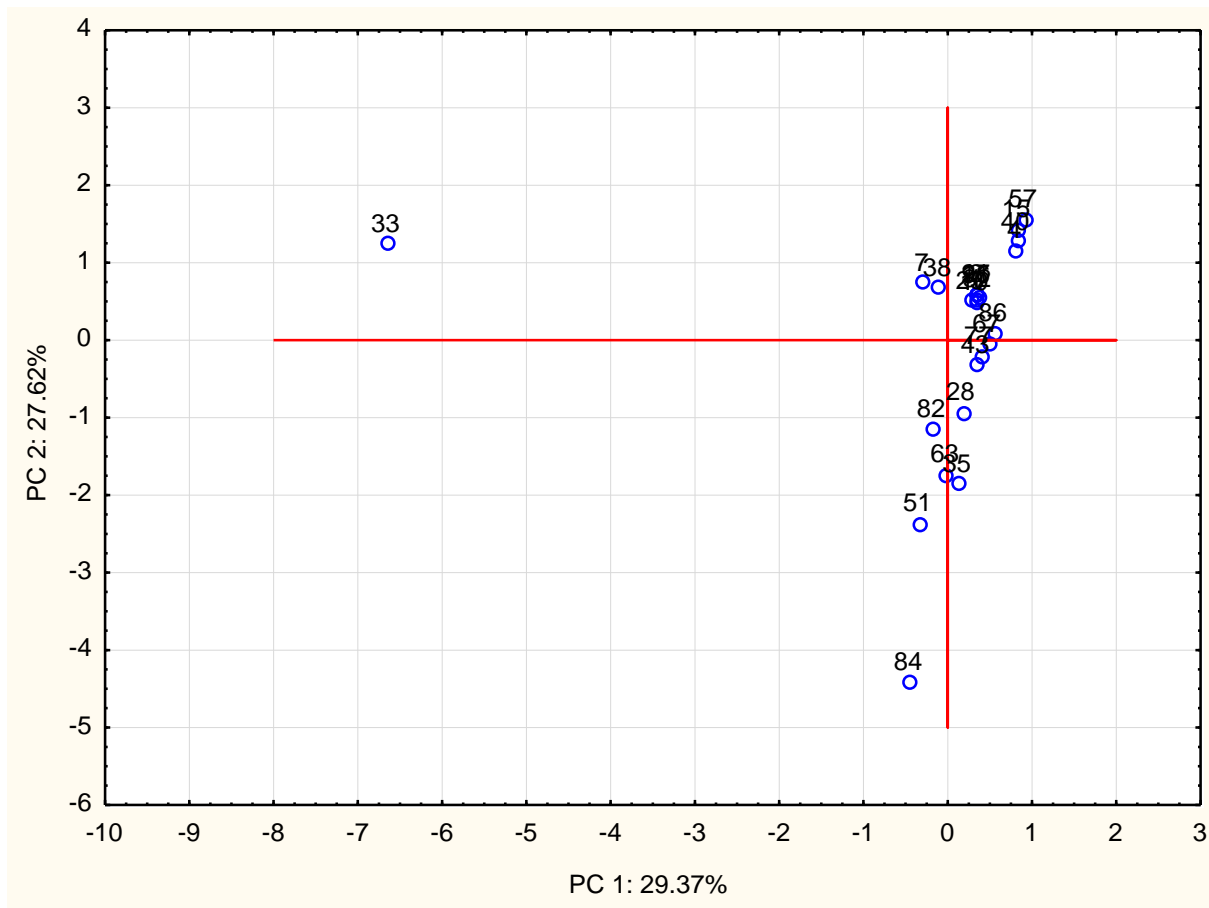
Mapa vzorků bez detekovaných pesticidů v medech podle screeningové analýzy:



Vzorky bez detekovaných pesticidů: USA (2), Mexiko (2)
Írán (1), Spojené arabské emiráty (1), Indonésie (1)
ČR (2), Ukrajina (2), Nizozemsko (2)
Jihoafrická republika (1)

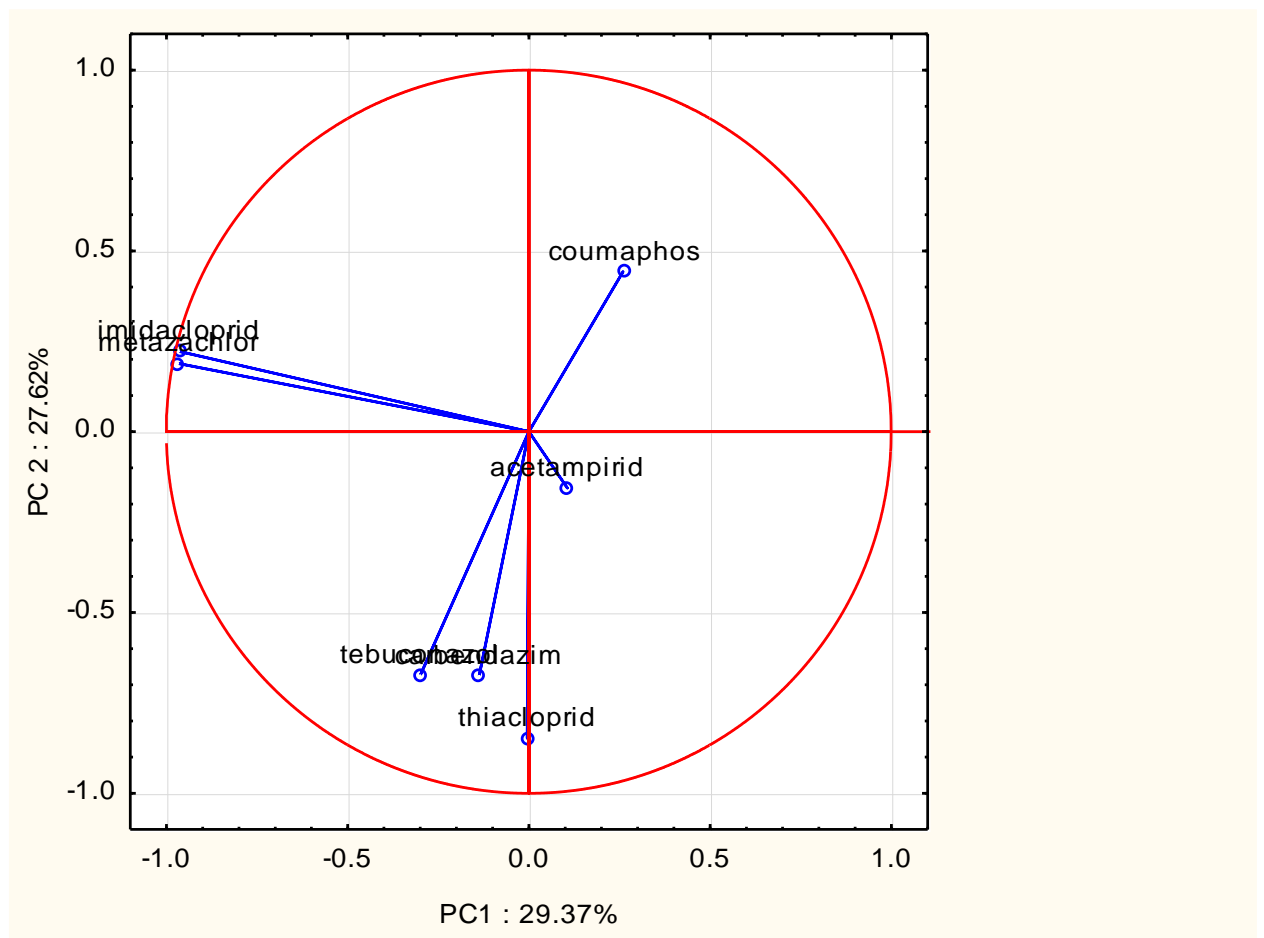
Příloha č. 4

Graf analýzy PCA – komponentní skóre:



Příloha č. 5

Graf analýzy PCA – komponentní váhy:



Seznam příloh

- Příloha č. 1: kvantifikace thiaclopridu se zahrnutou výtěžností
- Příloha č. 2: mapa vzorků s pozitivními záchyty pesticidů v medech podle screeningové analýzy
- Příloha č. 3: mapa vzorků bez detekovaných pesticidů v medech podle screeningové analýzy
- Příloha č. 4: Graf analýzy PCA – komponentní skóre
- Příloha č. 5: Graf analýzy PCA – komponentní váhy