



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

MULTIREZIDUÁLNÍ STANOVENÍ PESTICIDŮ V JEČMENI A VE SLADU METODOU LC/MS S EXTRAKCÍ QUECHERS

THE MULTIRESIDUE DETERMINATION OF PESTICIDES IN BARLEY AND MALT BY THE LC/MS METHOD WITH
QUECHERS EXTRACTION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Kateřina Posoldová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. Renata Mikulíková, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1720/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Kateřina Posoldová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. RNDr. Renata Mikulíková,
Ph.D.**

Název diplomové práce:

Multireziduální stanovení pesticidů v ječmeni a ve sladu metodou LC/MS s extrakcí QuEChERS

Zadání diplomové práce:

- Zpracování literární rešerše na téma:
 - Pesticidy a jejich využití v ochraně ječmene (obilovin)
 - Možnosti stanovení reziduí pesticidů v ječmeni a ve sladu
- Optimalizace extrakce pesticidů z ječmene a sladu metodou QuEChERS a stanovení pesticidů metodou LC/MS.
- Validace metody extrakce pesticidů z ječmene a sladu metodou QuEChERS a stanovení pesticidů metodou LC/MS.
- Stanovení reziduí pesticidů v ječmeni a sladu metodou LC/MS s extrakcí QuEChERS.

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

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

Bc. Kateřina Posoldová
studentka

doc. RNDr. Renata Mikulíková,
Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

Abstrakt

Tématem této diplomové práce je stanovení pesticidů v ječmeni a sladu. Ječmen patří ke druhé nejvíce pěstované obilnině v České republice. Aby se dosahovalo vyšších výnosů, větší kvality zrna a zabránilo se ztrátám, využívají se prostředky na ochranu rostlin – pesticidy. Nevýhodou použití je jejich negativní vliv na zdraví lidí, zvířat a životní prostředí. Rezidua pesticidů a jejich metabolitů mohou zůstat v potravinách, a proto je dobré sledovat jejich obsah. Možnosti stanovení jsou různé, ale v poslední době je využívána metoda extrakce QuEChERS, která celý proces přípravy vzorků urychluje.

Praktická část shrnuje optimalizaci a validaci metody QuEChERS a následné stanovení množství analytů pomocí metody UPLC-MS/MS. Analyzoval se obsah 148 pesticidů ve 30 vzorcích ječmene a 20 vzorcích sladu pocházejících ze sklizně z roku 2021 v České republice.

Summary

The topic of this thesis is the determination of pesticides in barley and malt. Barley is one of the second most cultivated cereals in the Czech Republic. In order to achieve higher yields, higher grain quality, and avoid losses, plant protection products - pesticides - are used. The disadvantage of their use is their negative impact on human and animal health and the environment. Residues of pesticides and their metabolites can remain in a food, so it is a good idea to monitor their content. There are various options for determination, but recently the QuEChERS extraction method has been used, which speeds up the whole sample preparation process.

The practical part summarizes the optimization and validation of the QuEChERS method and the subsequent quantification of analytes by UPLC-MS/MS. The content of 148 pesticides in 30 barley and 20 malt samples from the 2021 harvest in the Czech Republic was analysed.

Klíčová slova

ječmen, slad, ochrana rostlin, pesticidy, LC-MS/MS

Keywords

barley, malt, plant protection, pesticides, LC-MS/MS

POSOLDOVÁ, K. *Multireziduální stanovení pesticidů v ječmeni a ve sladu metodou LC/MS s extrakcí QuEChERS*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2022. 62 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Renata Mikulíková, Ph.D..

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je majetkem fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana fakulty chemické VUT v Brně.

Bc. Kateřina Posoldová

Ráda bych na tomto místě chtěla poděkovat vedoucí mé diplomové práce doc. RNDr. Renatě Mikulíkové, Ph.D., za odborné vedení, trpělivost, vstřícný přístup a čas. Dále bych poděkovala konzultantovi Ing. Zdeňku Svobodovi za vstřícnost, cenné rady, ochotu a trpělivost při vedení mé práce a Výzkumnému ústavu pivovarskému a sladařskému, a. s. Velké díky patří mé rodině a příteli za trpělivost a podporu při celé délce studia.

Bc. Kateřina Posoldová

Obsah

1	Úvod	8
2	Teoretická část	9
2.1	Ječmen	9
2.1.1	Taxonomie	9
2.1.2	Odrůdy	10
2.1.3	Anatomie zrna	12
2.1.4	Složení zrna ječmene	12
2.1.5	Choroby a škůdci ječmene	13
2.1.6	Klimatické podmínky pro pěstování ječmene	15
2.1.7	Další využití ječmene	16
2.2	Slad	16
2.2.1	Postup výroby	17
2.3	Ochrana rostlin	17
2.4	Pesticidy	17
2.4.1	Rozdělení pesticidů	18
2.4.2	Použití pesticidů	19
2.4.3	Zákony a vyhlášky v EU	19
2.4.4	Dopady použití pesticidů	21
2.5	Možnosti stanovení pesticidů v ječmeni a sladu	22
2.5.1	Extrakce	22
2.5.1.1	QuEChERS	23
2.5.1.2	Modifikace metody	23
2.5.2	Separční metody stanovení pesticidů	24
2.5.2.1	Plynová chromatografie	24
2.5.2.2	Kapalinová chromatografie	25
2.5.3	Hmotnostní spektrometrie	26
3	Cíl práce	29
4	Experimentální část	30
4.1	Využité přístroje a chemikálie	30
4.1.1	Přístroje a pomůcky	30
4.1.2	Chemikálie	30
4.2	Příprava kalibračních roztoků	31
4.3	Příprava vzorků	31
4.4	Příprava mobilních fází a roztoků pro UPLC-MS/MS	32
4.5	Optimalizace QuEChERS	33
4.5.1	Optimalizace ředění vzorku	33
4.5.2	Optimalizace přečištění vzorku	33
4.6	Validace QuEChERS	33
4.7	Stanovení pesticidů metodou UPLC-MS/MS	35

5	Výsledky a diskuze	37
5.1	Optimalizace metody QuEChERS	37
5.2	Validace metody QuEChERS UPLC-MS/MS	38
5.3	Stanovení reziduí pesticidů v ječmeni a sladu	40
6	Závěr	43
7	Literatura	44
8	Seznam použitých zkratk	49
9	Přílohy	51

1. Úvod

Ječmen, jakožto polní plodina, která je označována jako jedna z nejstarších obilnin má v naší zemi bohaté tradiční kořeny. V České republice se pěstuje hlavně ječmen jarní, který je využíván především ke sladování. Díky šlechtění se v posledních letech zvyšuje odolnost a výnosnost této plodiny. Existuje řada odrůd, které jsou doporučovány pro výrobu Českého piva, které má zeměpisně chráněné označení. Protože je každoročně alespoň jedna nová odrůda zapsána, existuje přehled odrůd, který má pod záštitou Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. Největší potíží při pěstování jsou škůdci a nemoci ječmene. Mnoha těmto příkořím lze předcházet nebo je lze zmírnit pomocí přípravků na ochranu rostlin.

Regulace a ochrana před nepříznivými vlivy je v dnešní době žádoucí, pro předcházení ztrátám na úrodě, zvyšování produkce a samotné zkvalitnění sklizeného ječmene. Jedna z nejvýznamnějších ochran, ke které by se mělo uchýlovat po selhání neinvazivních metod, je použití pesticidů. Jedná se o chemické látky nebo mikroorganismy, které se snaží ochránit rostlinu před plevem, škůdci nebo houbovými chorobami. Protože se mnohdy jedná o silné chemické sloučeniny, jejich použití reguluje mnoho zákonů a nařízení. Jejich vliv na životní prostředí, lidské zdraví a okolní faunu a flóru je vysoce rizikový, proto v posledních letech stoupá snaha o snížení spotřeby pesticidů a jejich nahrazení za méně nebezpečné přípravky. Protože tyto látky používané na ochranu mohou zůstat v ječmeni, je nutné sledovat jejich rezidua. Pro většinu chemických látek existují maximální přípustné limity jejich obsahu v potravinách.

Stanovení reziduí a metabolitů pesticidů je možné pomocí různých analytických metod, avšak nejvyužívanějšími jsou kapalinová a plynová chromatografie ve spojení s hmotností spektrometrií. Pro přečištění vzorků před samotnou analýzou je možné použít mnoho metod, ale v posledních letech je velmi využívána metoda QuEChERS. Jedná se o rychlý a nenáročný postup, při kterém je nízká spotřeba rozpouštědel a chemikálií. Metoda je velmi lehce modifikovatelná a všestranně využitelná.

Většinu pesticidů můžeme nazvat jako látky nebezpečné pro člověka. Kvůli tomu je potřebná rychlá a přesná kontrola jejich množství v potravinách. Metoda QuEChERS je díky své rychlosti a přesnosti nejlepší volba, jak toto množství stanovit. Předpisy a ustanovení pojednávající o reziduí pesticidů v potravinách jsou neustále kontrolovány a měněny podle nových poznatků a studií.

2. Teoretická část

2.1. Ječmen

Ječmen, *hordeum vulgare*, je jednou z nejstarších obilnin, jehož počátky v pěstování se datují 10 tisíc let před n. l. Pěstování této plodiny v České republice má bohatou tradici, především odrůdy ječmene jarního, který je využíván ve sladovnictví. Po pšenici je to nejpěstovanější plodina na polích. v tabulce 2.1 je souhrnný přehled ploch a sklizní ječmene (jarní a ozimý) za poslední roky. Plocha pro pěstování ječmene klesla v řádu 10 let jen málo a drží si hranici nad 300 tisíci hektary, ale v letech 1990–2000 byla plocha nad 500 tisíci hektary. Pokud se tedy podíváme na vývoj plochy za posledních 20 let, je jasné, že plocha klesá, i když za posledních 10 let k viditelným změnám nedošlo [1] [2] [3].

Tabulka 2.1: Vývoj plochy a sklizní ječmene (upraveno) [2]

	Plocha [ha]	Sklizeň [t]	Výnos [t·ha ⁻¹]	
roky	1998	577 694	2 093 101	3,62
	1999	542 910	2 137 376	3,94
	2011	372 780	1 813 679	4,87
	2012	382 330	1 616 467	4,23
	2013	348 992	1 593 760	4,57
	2014	350 518	1 967 049	5,61
	2015	365 946	1 991 415	5,44
	2016	325 725	1 845 254	5,67
	2017	327 707	1 712 279	5,23
	2018	324 724	1 606 034	4,95
	2019	319 583	1 718 061	5,38
	2020	331 911	1 816 182	5,47

2.1.1. Taxonomie

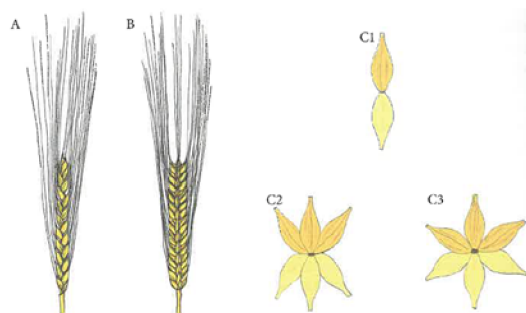
Ječmen je řazen do čeledi lipnicovitých, jehož diploidním druhem je ječmen setý *Hordeum vulgare* L., u kterého rozeznáváme podle uspořádání klasu:

- **Ječmen setý, víceřadý** – se třemi klásky plodnými (šestiřadý a čtyřřadý), jeho ozimá forma je využívána v krmivářství
- **Ječmen setý, přechodný** – prostřední klasy má plodné, pěstován především v Tibetu, Asii, Švédsku
- **Ječmen setý, dvouřadý** – střední klásek plodný, je rozdělen na variety bezpluchý, paví, vzpřímený nebo nící

Členění ječmene je založeno na morfologických znacích rostliny. Charakteristické jsou tři jednokvěté klasy. Ječmen setý dvouřadý je plodný pouze na středním klásku, a tak se na lichoklasu, tedy nepravém klasu, vytváří dvě řady obilek. Toto uspořádání je vidět na

obrázku 2.1 konkrétně A a C1. Dva postranní klásky mají zakrnělou pluchu a plušku a jsou neplodné. Ječmen setý dvouřadý nicí je nejrozšířenější sladovnickou odrůdou (varietou). Při zrání se nepravý klas ohýbá, háčkuje se, a obilka je obalená pluchou, která je zakončena osinou.

Ječmen setý víceřadý je plodný na všech třech kláscích. Podle uspořádání obilek můžeme pozorovat čtyřřadé a šestiřadé lichoklasy. Obě formy mají šest obilek, ale liší se rozmístěním, které je vyobrazeno na obrázku 2.1 (část C2 a C3) [1] [4].



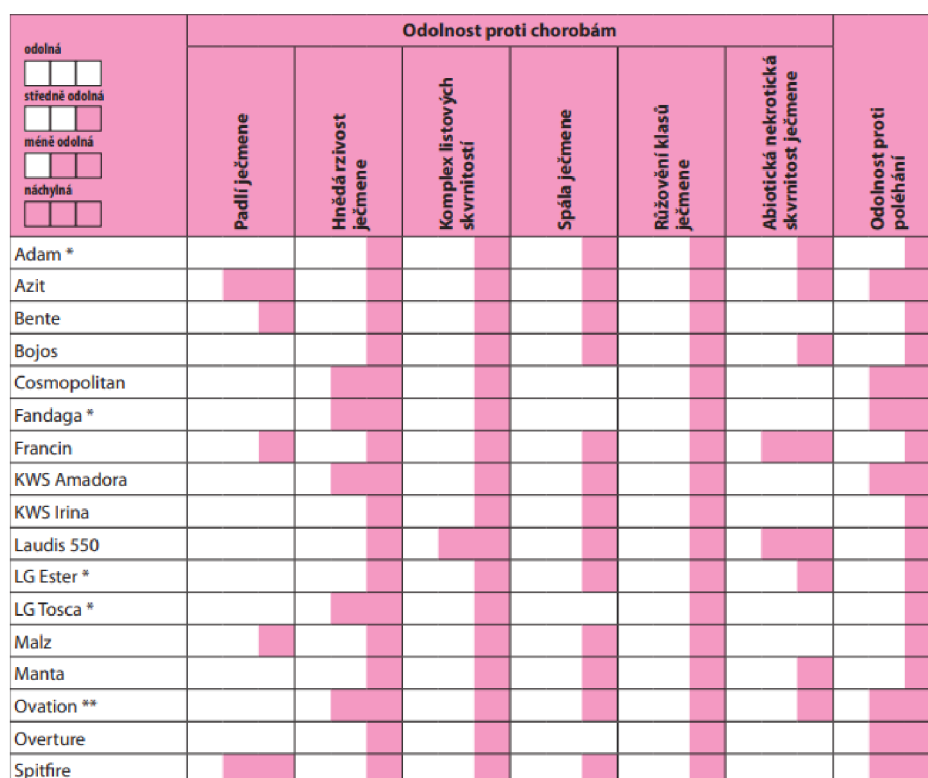
Obrázek 2.1: *Lichoklasy ječmene (A - dvouřadý, B - víceřadý, C - uspořádání obilek)* [5]

2.1.2. Odrůdy

Jako je tomu i u jiných hospodářsky využívaných plodin je základním prvkem kvality ječmene jeho odrůda. Hlavním účelem, proč je dnes ječmen šlechtěný, je zajištění požadavků pěstitelských, sladařských a hygienických. Šlechtěním je docíleno požadovaného obsahu látek v zrnech pro konkrétní odvětví v hospodářství či průmyslu. Cílem je zvýšit výnosnost, zlepšit sladovnickou kvalitu ječmene a zvýšit odolnost vůči chorobám a škůdcům. v České republice se zaměřuje především na šlechtění ječmene určeného pro sladovnické účely. Sladovny požadují ječmen nejen s určitým chemickým složením, ale i s určitými subjektivními, mechanickými, fyzikálními, fyziologickými a biochemickými znaky. Ukazatel sladovnické jakosti (USJ) je souborem znaků, které jsou vyobrazeny v tabulce 2.2 a jsou také nejdůležitějším cílem šlechtění sladovnických odrůd. U šlechtění je důležité zohlednit i vliv prostředí na sledované znaky jakosti. Protože každoročně přibývá mnoho nových odrůd, vydává Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ) každý rok publikaci *Obilniny*, kde se nachází seznam doporučených odrůd a jejich přehled. Na obrázku 2.2 je vidět souhrn odrůd a jejich odolnosti vůči chorobám [5] [6] [7].

Tabulka 2.2: Parametry sledované pro sladovnickou kvalitu odrůd [6]

Kvalita zrna	Hmotnost tisíce zrn [g]
	Sladovnická jakost ¹ [-]
Zrnko	Obsah dusíkatých látek [%]
Slad	Extrakt v sušině [%]
	Relativní extrakt při 45 °C [%]
	Kolbachovo číslo [%]
	Diastatická mohutnost [j WK]
	Dosažitelný stupeň prokvašení [%]
	Friabilita [%]
	β -glukany ve sladince [mg·l ⁻¹]
	Čírost sladiny ² [-]



Obrázek 2.2: Diagram odolnosti odrůd (* menší počet dat – nová odrůda, ** odrůda nebyla v roce 2019 hodnocená) [7]

¹Sladovnická jakost je hodnocena 1-9, kdy nejnížší číslo není určeno pro sladování²Čírost sladiny: 1 – čirá, 2 – slabě opalizující, 3 – opalizující

Pro zeměpisně chráněné označení „České pivo“ jsou doporučovány odrůdy ječmene:

- Bojos (registrace 2005)
- Francin (registrace 2014)
- Laudis 550 (registrace 2013)
- Malz (registrace 2002)
- Manta (registrace 2016)
- LG Stangast (registrace 2021)³
- LG Ester (registrace 2020)⁴

Jedná se o kategorii sladovnických odrůd ječmene [7] [8].

2.1.3. Anatomie zrna

Zrno ječmene má podlouhlý tvar na obou stranách do špičky. Obilka je složena z pluch, oplodí, osemení, aleuronové vrstvy, endospermu, vrstvy stlačených buněk, štítku, zárodku a štětičky. Endosperm je nejdůležitější částí, která se během technologického zpracování mění. Obsahuje malá a velká škrobová zrna. Aleuronová vrstva je složena ze tří řad buněk obsahující především dusíkaté látky, cukry, polyfenoly, ale i vápník, hořčík, draslík a fosfor. Během klíčení je nutné, aby buněčné stěny umožnily pohyb enzymům směrem k endospermu. Aleuronová vrstva po signálu od zárodku a po plné hydrataci tvoří hydrolytické enzymy, které slouží k degradaci škrobového endospermu. Živou částí zrna je klíček (zárodek), který má ze sladařského pohledu velký význam. Skládá se z dusíkatých látek, lipidů, cukrů, minerálních látek a vitamínů skupiny B. Na povrchu obilky jsou pluchy, které se skládají z pluchy a plušky. U pluchatých zrn jsou pluchy přilehlé k oplodí, ale k anatomii zrna se neřadí. Obalové vrstvy, osemení a oplodí, jsou ochranou před vysycháním endospermu a klíčku. Také jde o regulátory klíčení, protože ovlivňují přístup vzduchu ke klíčku. Po dozrání jsou obalové vrstvy pouze mechanickou ochranou. Z pohledu složení jsou bohaté na vlákninu, fosfor, hořčík, železo a vápník [5] [9].

2.1.4. Složení zrna ječmene

Zrno ječmene obsahuje 84 % sušiny a 12–14 % vody. Voda ve skladovaném ječmeni nesmí klesnout pod 10 %, protože by se snížila klíčivost kvůli narušení enzymů. Sušina je tvořena organickými (98 %) a minerálními látkami. Největší část organických látek zastupují sacharidy a dusíkaté látky. Poměr jednotlivých složek je ovlivněn geneticky, klimatickými podmínkami při růstu, půdním podložím a podmínkami pěstování [5] [9].

Důležitými látkami, které se během technologického zpracování ječmene mění, jsou dusíkaté látky. Jejich obsah v ječmeni určeném ke sladování je považován za příznivý v rozmezí 7–11 %. Ječné bílkoviny jsou albuminy, globuliny, gluteiny a prolamin (hordein). Hordein

³Nejnovější odrůda registrovaná pro CHZO „České pivo“

⁴Nejvýnosnější odrůda doporučená pro CHZO „České pivo“

je podobný gliadinu, který je obsažen v pšenici. Globuliny a albuminy jsou bílkoviny rozpustné v roztocích solí albuminy navíc i ve vodě. Prolaminy jsou rozpustné v alkoholických roztocích a gluteiny v alkalických. Gluteiny spolu s prolaminy komplikují proces sčezování a globuliny ovlivňují zákal piva. Naopak albuminy mají pozitivní vliv na pěnivost piva. Nízkomolekulární látky ječmene, které jsou zastoupeny aminokyselinami a amidy, jsou významné při tvorbě kořínků, při fermentaci a při tvorbě sensoricky aktivních látek sladu. Proteiny obsahují z aminokyselin ve větším zastoupení prolin, leucin, valin, fenylalanin. Lysin je limitující aminokyselinou. Složené dusíkaté látky zastupují nukleoproteiny, fosfoproteiny, glykoproteiny, chromoproteiny a lipoproteiny. Výsledné látky po štěpení bílkovin, které probíhá při klíčení (viz kapitola 2.2.1), ovlivňují zpracování ječmene, průběh kvašení při výrobě piva a jeho finální produkt [4] [5] [9].

Obsah tuků (lipidů) je v zrně proměnlivý a je negativně ovlivněn hnojením pomocí dusíku, protože se stoupajícím obsahem dusíkatých látek klesá jejich obsah. Z nenasycených mastných kyselin jsou zastoupeny kyseliny linolová, olejová, linolenová. Lipidy jsou zásobárnou energie během sladování a jsou využívány metabolismem kvasinek při fermentaci. Mají kladný i záporný vliv na výrobu piva a konečný produkt. Negativně je ovlivněna stabilita pěny a chuť, která je tvořena sensorickými látkami, karbonyly, a nazývá se jako stará chuť piva. Naopak pozitivní jsou polární lipidy, které pěnu piva stabilizují [4] [9].

Největším zástupcem sacharidů je škrob s průměrným obsahem 65 %, který je složen nejčastěji z 25 % amylosy a 75 % amylopektinu. Jak bylo popsáno v kapitole 2.1.3, největší část škrobu se nachází v endospermu ve formě zrn. K největší degradaci dochází během rmutování, kdy jsou škrobová zrna zpřístupněna enzymům. Další vyšší zastoupení má sacharosa a rafinosa, které jsou přítomny v aleuronové vrstvě a klíčku kde slouží jako zdroj energie při respiraci ječmene při jeho skladování. Velmi důležitým polysacharidem jsou β -glukany nacházející se v endospermu. Mají velký význam ve zdravé životosprávě člověka, protože při konzumaci se snižuje hladina cholesterolu v krvi a podílejí se na imunitě člověka. Také v pivovarnictví má tento polysacharid význam. Při vystírání a rmutování (procesy při výrobě piva) jsou jeho frakce extrahovány do vody a dochází k enzymové hydrolýze. Pokud by teplota při rmutování a vystírání inaktivovala enzymy, nedošlo by tedy k hydrolýze β -glukanů a mohly by nastat problémy během dalších procesů výroby piva. Například špatná sedimentace mladiny, tvorba zákalů, sraženin a z toho plynoucí těžší filtrace piva [4] [5] [10].

v ječmeni se také nachází rozpustná i nerozpustná vláknina. Přibližně 50 % všech minerálních látek ječmene zastupují prvky jako jsou draslík, fosfor, křemík, vápník, železo a selen. Z vitamínů to jsou B_3 , B_5 , B_6 jako zástupci vitamínů rozpustných ve vodě, které při technologickém postupu výroby sladu nedegradují. Zástupce vitamínů rozpustných v tucích zastupují vitamín E a karotenoidy, jako prekurzory vitamínu A. Množství vitamínů ve sladu kolísá podle zvolených teplot při technologických postupech [4] [5] [10].

2.1.5. Choroby a škůdci ječmene

Nejvýznamnější hospodářské choroby napadající listy ječmene jarního jsou: padlí ječmene, hnědá skvrnitost ječmene, rez ječná a spála ječmene. Ječmen ozimí je náchylný na paľuškovou hnilobu. Jedná se o choroby houbové, které negativně ovlivňují výnos a kvalitu

zrna. Jako ochrana se pravidelně aplikují fungicidy (kapitola 2.4). Zpravidla se používá kombinace více účinných látek společně a tím se zvyšuje a rozšiřuje jejich působení.

Mezi nemoci přenášené osivem patří pruhovitost ječmene, hnědá skvrnitost, prašná a krytá snětivost ječmene. Příklady nemocí jsou vyobrazeny na obrázku 2.3. Mimo hnědou skvrnitost, která je přenášena zbytky po sklizni i osivem, můžeme tyto choroby zničit pomocí moření [1] [5].



Obrázek 2.3: *Choroby ječmene (vlevo hnědá skvrnitost, vpravo prašná snět) [11]*

Do klasových chorob se řadí ty, které jsou způsobeny rodem *Fusarium*, které jsou přenášeny osivem nebo jsou způsobeny paličkovici nachovou. Způsobují růžovění nebo vadnutí klasů. Ke sledování těchto patogenů došlo po zjištění, že produkují mykotoxiny, jako je DON, T-2 a HT-2 toxin nebo ZEA. Ječmen napadený touto plísní, který je zpracováván na slad, může způsobit přepěňování piva. Hnědé a černé skvrny na obilce může způsobit čerň, která je přenášena osivem. Hnědé skvrny v oblasti zárodku jsou tzv. „zahnědlé špičky“, které mají původ bakteriální, plísňový anebo za změnu barvy může biochemický proces, který je podobný enzymatickému hnědnutí. Sklerocium paličkovice nachové nacházející se v klasu, je jedovaté a způsobuje onemocnění zvané ergotismus [1] [5].

Výskyt jednotlivých onemocnění ječmene kolísá v závislosti na použité agrotechnice, ale i na počasí v průběhu daného roku. Mořením osiva lze předcházet nebo alespoň snížit výskyt chorob přenášených osivem. Na trhu s prostředky na ochranu rostlin existuje 52 produktů určených na moření ječmene a z toho 9 má rozhodnutí, že je možné spotřebovat jejich zásoby. V tabulce 2.3 je vypsáno několik mořidel spolu s účinnými látkami. Mořidla jsou zapsána v registru přípravků na ochranu rostlin, který má na starosti ÚKZÚS. Používání a vše spojené s přípravky na ochranu rostlin zařizuje zákon č. 326/2004 Sb., vyhláška č. 132/2018 Sb., vyhláška č. 206/2012 Sb. a vyhláška č. 327/2012 Sb. [1] [5] [12].

Tabulka 2.3: Přípravky na ochranu rostlin s účinnými látkami [12]

Obchodní název	Účinná látka
Celest power	Fludioxonyl, Sedaxan
Kinto Duo ⁵	Prochloraz, Tritikonazol
Orius 5 FS	Imazalil, Tebukonazol
Polyversum ⁶	<i>Pythium oligandrum M1</i>
Vibrance Gold	Difenokonazol, Fludioxonyl, Sedaxan

Zástupci živočišných škůdců mohou být mšice, kohoutci, třásněnky a bejlmorka sedlová. Mšice sají na listech a klasech a vytváří medovici, která brání dýchání rostlině a tím ječmen předčasně stárne. Mšice jsou také přenašeči virových onemocněních. Třásněnky sají na mladých částech ječmene, tedy i na zrnech, a tím způsobují sníženou klíčivost obilek. Kohoutí dospělci a larvy napadají žilnatinu listů. Larvy bzunky ječné a drátovci mohou za odumírání rostlin. Larvy bejlmorky sedlové se nacházejí nad kolénky, kde tvoří sedlovité háčky. Jejich přemnožení snižuje výnosnost. Kněžice velká, kuželovitá a nosatá způsobují běloklasost sáním. Většina skladištních škůdců patří do třídy hmyzu. Řadí se k nim pilous černý, lesák skladištní, mol obilný, potěmník skladištní nebo roztoč sladokaz moučný. Ve skladech mohou být škůdci z řad savců jako myši, potkani a krysy, které jsou nejen problémem snižující kvalitu a objem ječmenu či sladu, ale jsou i přenašeči patogenních organismů. Škůdci a jejich trus, chloupky a látky která sami produkují, způsobují ve špatně zabezpečených skladech problém [5].

Dalším škodlivým prvkem při pěstování ječmene je plevel. Ten negativně ovlivňuje jeho růst, výnosnost a může způsobit přenos chorob a škůdců. Také ztěžuje sklizeň a posklizňové úpravy ječmene. Jednoleté druhy plevelu, které nejčastěji ohrožují ječmen jsou:

- Hořčice polní
- Oves hluchý
- Penízek rolní
- Heřmánkovec nevonný a další.

Zástupce víceletých druhů je pcháč rolní, mléč rolní a pýr plazivý [5].

2.1.6. Klimatické podmínky pro pěstování ječmene

Ječmen je možné pěstovat ve všech podmínkách, avšak vysoké sladařské kvality dosahuje na území Polabské nížiny, nižších lokalitách Středočeské pahorkatiny a na střední části Moravy, tedy na úrodné Hané. Aby bylo dosaženo největšího potenciálu vybrané odrůdy a měl vysoký výnos, je doporučeno sázet ječmen na černozemích a hnědozemích. Protože má ječmen slabší kořenový systém, měla by být půda středně těžká až písčitohlinitá. Také je dobré zajistit přiměřený obsah vláhy, živin a pH v rozmezí od 6 do 7,1. Ječmen je taktéž citlivý na rovnoměrnost hnojení v půdě. Jak bylo zmíněno v kapitole 2.1.4, dávky

⁵Do spotřebování zásob

⁶Jedná se o registrovaný přípravek použitelný i v ekologickém zemědělství

dusíku ovlivňují chemické složení v obilce. Pro sladovnický ječmen je nežádoucí vysoký obsah dusíkatých látek, proto je vhodné hnojit půdu před setím a nejpozději po zasetí do růstu třetího listu. Pokud byla předplodina cukrová řepa a zaorával se chrást, není dobré sladovnickou odrůdu ječmene hnojit dusíkem [1] [3] [5].

Nejlépe se jarnímu ječmeni bude dařit po okopaninách jako je cukrová řepa nebo brambory, které byly hnojeny. Avšak dobrou předplodinou může být i pšenice. K rizikovým faktorům předplodin se řadí zaorávání chrástu a slámy, protože zvyšují možnost polehávání ječmene a negativně ovlivňují kvalitu zrna [1] [3] [5].

Půdu je nutné připravit správnou orbou. Ječmenu jarnímu vyhovuje včasná podzimní střední orba, kterou je možno nahradit kombinátory nebo kypřiči. Pokud je příprava ponechána na jaro, je dobré začít až po vyzrání půdy, protože ječmen je náchylný k zamazání. Pokud je příprava pro ozimý ječmen, ta se neodlišuje od jiných ozim. Je tedy nutné po orbě počkat alespoň 3 týdny, podle přecházející plodiny, a také je vhodné urovnat povrch půdy.

Termín pro výsev ječmene jarního je ideální zvolit v měsíci březnu podle vlhkosti půdy. Pro ozimý ječmen je to měsíc září [1] [3] [5].

2.1.7. Další využití ječmene

Nejčastěji pěstovanými sladovnickými odrůdami jsou ječmeny jarní dvouřadé. Ozimý ječmen dvouřadý je sladařsky nevýznamný, proto je používán v krmivářství. Ječmen se může uplatnit také v průmyslu, kde slouží k výrobě lihu (whisky) nebo kosmetických a farmakologických přípravků. Odrůdy s vysokým výskytem β -glukanů je možné využít v potravinářství jako dietní potravinu (kroupy). Bezpluchý ječmen je využit pro výrobu vloček a müsli [1] [4].

2.2. Slad

Slad se vyrábí ve sladovnách, které již v dnešní době nejsou často součástí pivovarů. Podle způsobu výroby se dělí slad na typy:

- Slad český (plzeňský) – slouží k výrobě piv s nižším extraktem, se středním obsahem alkoholu.
- Slad bavorský (mnichovský) – vyrobené pivo má nižší obsah alkoholu a vyšší extrakt.
- Slad vídeňský – jedná se o přechod mezi sladem českým a bavorským.
- Slad karamelový – cukry v sladu jsou zkaramelizované a enzymy jsou neaktivní, proto se tento slad nekvasí. Výsledné pivo je tmavé.
- Slad barvicí (pražený) – slad je pražen, dokud skoro nezuhelnatí. Pivu dodává až černou barvu.
- Slad pšeničný – slouží k výrobě německých pšeničných piv, někdy je dodáván i k sladu ječnému, pro zkvalitnění pěny [1] [13].

2.2.1. Postup výroby

Slad je ječmen prošlý sladováním, což zahrnuje 5 charakteristických kroků.

- a) Příjem, čišění, třídění a skladování zrna
- b) Máčení ječmene
- c) Klíčení ječmene
- d) Hvozdění zeleného sladu
- e) Úprava, skladování, expedice hotového sladu

Máčení má za cíl zvýšit obsah vody v ječmeni, aby proběhlo klíčení a enzymové reakce. Probíhá v kónických náduvnících, které v dnešní době mohou být plně automatické. Následné klíčení se děje na humnech nebo v pneumatických zařízeních. Při tomto procesu dochází ke změnám morfologickým, histologickým a metabolickým, probíhá aktivace enzymů a nastává tzv. rozluštění zrna. Další fází je hvozdění, při kterém se zastavuje klíčení, aktivita enzymů a snižuje se obsah vody. Finálním krokem je odkličování a leštění sladu [1].

2.3. Ochrana rostlin

K ochraně a regulaci škodlivých vlivů na ječmen jsou používány metody přímé a nepřímé. Metody nepřímé je možné nazývat jako preventivní. Řadí se mezi ně správná příprava půdy, dodržování střídání plodin podle pravidel, kvalitní osiva i hnojiva, dodržování termínů a vysévání odolných odrůd pro konkrétní oblasti. Přímé metody zahrnují biologické, mechanické, fyzikální, chemické metody anebo jejich kombinace. Biologické způsoby ochrany používají organismy, které jsou nepřátelské vůči organismům, které napadají obilniny. Snaží se mezi nimi vytvořit rovnováhu, a tím zamezit poškození obilnin. K fyzikálním metodám ošetření půdy se řadí tepelná ochrana před houbami, viry nebo plevely. K nejnáročnějším způsobům ochrany patří mechanické metody. Lze je využít na menších plochách, kde je možné napadenou rostlinu nebo její část snadněji odstranit. Poslední metodou je chemická, která zahrnuje použití přípravků, pesticidů. Měla by být využívána v případě, že ostatní způsoby ochrany selhaly, protože s sebou nese řadu rizik [3] [14].

2.4. Pesticidy

Pesticidy jsou chemické látky nebo mikroorganismy určené pro ochranu rostlin před škůdci. Jsou to prostředky k prevenci a hubení škůdců, kteří záporně ovlivňují produkci, skladování a zpracování potravin, krmiv, zemědělských produktů a výrobků ze dřeva. Pesticidy mají největší využití v zemědělství, kde se aplikují proti plevelům, živočišným škůdcům či houbovým chorobám. Díky nim se zvyšuje výnosnost plodin, která je ovlivněna klimatickými změnami. Jejich aplikace vzrostla po druhé světové válce. V roce 2020

bylo v České republice použito 11 046 598 kg přípravků na ochranu rostlin a pomocných přípravků. Na ječmen jarní bylo spotřebováno celkem 162 825,19 kg účinných látek z nichž nejpoužívanější byl chlormekvát. K pesticidům lze zařadit i látky jako jsou feromony, odpuzující látky (repelenty), odlistňovače nebo regulátory růstu rostlin. Patří k nim i biocidy, což jsou látky působící proti škodlivým organismům mimo rostliny [15] [16] [17].

2.4.1. Rozdělení pesticidů

Pesticidy lze rozdělit na skupiny podle biologického účinku:

1. Herbicidy – jde o látky hubící plevel a nežádoucí vegetaci
2. Fungicidy – působí proti plísním
 - a) postřiky
 - b) mořidla
 - c) průmyslové
3. Zoocidy
 - a) Insekticidy – hubí hmyz
 - b) Repelenty, atraktanty – odpuzení / vábení živočichů
 - c) Nematocidy – hubí půdní škůdce (hádátka)
 - d) Rodenticidy – hubí hlodavce
 - e) Akaricidy – hubí pavouky a roztoče
 - f) Moluskocidy – hubí měkkýše

Další dělení:

1. organochloridové látky
2. organofosfátové látky
3. karbamáty
4. pyretroidy
5. neonikotinoidy [15] [18]

2.4.2. Použití pesticidů

Přípravky mají stanovené postupy pro jejich aplikaci. Je nutné použít kvalitní a zkontrolovanou techniku, dodržet dávkování a množství pesticidu, aplikovat pesticid určený pro danou rostlinu v nejlepší době, času i teplotě. Pokyny k použití má každá chemikálie uvedené na své etiketě. Po aplikaci přípravku je možné sklízet po uplynutí ochranné lhůty - čas, který musí uběhnout mezi posledním použitím prostředku a dobou sklizně. Předpokládá se, že za stanovenou lhůtu poklesne obsah látek na bezpečnou hranici, která je určena předpisy [3] [14] [15] [19].

2.4.3. Zákony a vyhlášky v EU

Nařízení Evropského parlamentu a rady (ES) č. 1107/2009 specifikuje přípravky na ochranu rostlin (POR) a jejich uvádění na trh. V nařízení se definují pojmy jako:

- safenery – přídavné látky přípravků potlačující jejich fytotoxicitu
- synergenty – látky s nízkým účinkem nebo bez něj, přidávané do přípravků pro podporu účinků látek
- rezidua – látky a jejich metabolity nacházející se v rostlinách, jejich produktech, vodě nebo v živočišných produktech, jako zbytky přípravků na ochranu rostlin

Dále je zde popsán schvalovací postup jak pro účinné látky, tak pro samotné POR. S žádostí o schválení musejí být provedeny testy na účinnost látky, dopad na obyvatelstvo a životní prostředí. Musejí být také zvaženy negativní dopady na necílové organismy. Schválené výrobky nesmějí působit utrpení a bolest obratlovcům, nesmějí mít budoucí vliv na zdraví lidí, rostlin ani nesmí ohrozit životní prostředí [20].

V roce 2009 byla vydána směrnice Evropského parlamentu a Rady 2009/128/ES, která se snaží o zavedení udržitelného používání pesticidů. Jedná se o snižování používání pesticidů, a tím snižování rizik na životním prostředí a lidské zdraví. Vybízí k alternativním postupům, k používání nízkorizikových pesticidů nebo k využití biologických metod. Požaduje po členských státech kontrolu aplikačních zařízení a také, aby se určité oblasti jako dětská hřiště nebo parky označily jako zóny bez použití pesticidů. Rovněž zahrnuje ochranu vody pomocí pásem určitých vzdáleností od vodních ploch, která je nutné dodržovat. Na stránkách Evropské unie⁷ lze vyhledat, že v České republice je povoleno 261 látek a z toho 8 je nízkorizikových (jsou uvedeny v tabulce 2.4) a 42 z nich jsou potenciály na změnu, protože nesou velká rizika [21].

⁷<https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/active-substances/?event=search.as>

Tabulka 2.4: *Seznam nízkorizikových pesticidů schválených v ČR (upraveno) [22]*

Bacillus amyloliquefaciens kmen FZB24	Není vyžadováno MLR
Coniothyrium minitans (kmen CON/M/91-08) (DSM 9660)	
Fosforečnan železitý	
Virus mozaiky Mild Pepino izolát VC 1	
Virus mozaiky Mild Pepino izolát VX 1	
Virus mozaiky Pepino kmen CH2 izolát 1906	
Hydrogenuhlčitan draselný	
Trichoderma atroviride kmen SC1	

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 396/2005 o maximálních limitech reziduí uvádí definice a produkty, u kterých se stanovují rezidua pesticidů. Nejvyšší přípustná množství reziduí pesticidů je regulováno pomocí maximálních limitů reziduí tzv. MLR. Limity a jejich aplikace jsou stanoveny dvěma způsoby: světově a evropsky. Nařízení z roku 2008 přenáší posuzování rizika MLR pesticidů na Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA), ale také jejich pravidelnou revizi. MLR jsou vždy uvedeny pro každou komoditu odděleně. Hlavní skupiny komodit jsou uvedeny v tabulce 2.5. V roce 2018 bylo vydáno nařízení Komise (EU) 2018/62, které aktualizuje nařízení č. 396/2005 tak, že dává přesné popisy produktů a částí, kterých se dané MLR týká. Na webových stránkách Evropské komise⁸ je dostupný seznam s více jak 600 aktivními látkami, u kterých je stanoven limit reziduí pro ječmen [15] [19] [23].

Tabulka 2.5: *Komodity, u nichž se kontrolují rezidua pesticidů (upraveno) [24]*

Ovoce, čerstvé nebo zmrazené; ořechy
Zelenina, čerstvá nebo zmrazená
Luštěniny
Olejnata semena a olejnaté plody
Obiloviny
Čaje, káva, bylinné čaje, kakao a rohovník
Chmel
Koření
Cukronosné rostliny
Produkty živočišného původu - suchozemští živočichové
Produkty živočišného původu - ryby, rybí výrobky, koryši, měkkýši a ostatní potraviny z mořských a sladkovodních živočichů
Produkty nebo části produktů určené výhradně k produkci krmiv
Zpracovatelné potravinářské produkty

⁸<https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/mrls/?event=search.pr>

2.4.4. Dopady použití pesticidů

Pozitivním faktorem používání pesticidů je zajištění potravy pro lidstvo, rychlý a účinný prostředek při nadměrném výskytu škůdců, či pomoc v rozvojových zemích v boji proti malárii. Používání pesticidů má však negativní dopad na životní prostředí, zdraví lidí a živočichů. Jejich rezidua mohou znečišťovat vodu, ovzduší, půdu ale i samotné zemědělské produkty nebo hubit užitečné živočichy a poškozovat vegetaci. Mezi další problémy způsobené používáním pesticidů můžeme zařadit: možnost vzniku rezistence u škůdců, biokumulaci a také pomalou degradaci v prostředí. Existuje mnoho studií, které ilustrují výskyt pesticidů po celém světě. V článku [25] jsou shrnuty studie, které ukazují, že rezidua pesticidů, používající se na ochranu rostlin, se vyskytují i v pobřežních oblastech jako například: Filipíny, Karibské moře, Arktida, Brazílie ale i Baltské moře. Tento výskyt je pravděpodobně způsoben nadužíváním pesticidů v minulém století, kdy se o dopadu těchto látek na životní prostředí mnohé nevědělo. Chemikálie, které jsou biokumulativní a rezistentní začaly být v roce 2002 regulovány díky Stockholmské úmluvě, kterou podepsala řada zemí i Evropská unie. Je zaveden seznam, který obsahuje perzistentní organické polutanty (POP). Jde o látky toxické, neodbouratelné po mnoho let, rozšířené po celém světě díky přírodním koloběhům a jsou hromaděny v živých organismech. Tento seznam obsahuje okolo 30 chemických látek, které jsou zakázány nebo omezeny. Jedná se o pesticidy, ale i průmyslové chemikálie. Například DDT, aldrin, PCB nebo lindane [14] [25] [26] [39].

Zvýšené používání pesticidů vede i ke zvýšenému počtu případů otrav nebo úmrtí. Nejvyšší rizika jsou především v rozvojových zemích. Nej náchylnější osoby na toxicitu pesticidů jsou zejména děti a pracovníci v zemědělství, kteří s pesticidy pracují. Látky do organismu prostupují kůží či vdechnutím při aplikaci nebo požitím ošetřeného produktu. Ve studii toxicity [27] bylo u většiny pesticidů vyhodnoceno rizikové orální požití. Existuje však několik látek, u kterých je rizikovější dermální vstřebání [28].

Rozmanitost chemických látek vede k různým toxickým účinkům na organismy. Organofosfáty (OP) (např. malathion, chlorpyrifos) a karbamáty (např. aldicarb, fenobucarb) působí na nervové vzruchy na úrovni acetylcholinesterázy. OP jsou označovány za toxické pro obratlovce a členovce. Další skupinou látek jsou organochloridové sloučeniny (OC) (např. aldrin, DDT), které působí na hormonální receptory, protože jsou si strukturně podobné. Nejvíce ohrožují organismy, které jsou na vrcholu stravovací pyramidy, tedy dravé ptáky a člověka. OC jsou považovány za endokrinní disruptory a jsou ukládány v tukových tkáních jak lidí, tak zvířat. Způsobují inhibici nebo změnu regulačních funkcí hormonů. To vede u mužů k rakovině varlat, prostaty a snížené plodnosti. U žen způsobují rakovinu prsu, endometriózu. U lidí obecně mění funkci štítné žlázy a utlumuje imunitu. Neonikotinoidy (např. acetamiprid, imidacloprid) působí na nervový systém hmyzu, a to vede k paralýze a smrti. Prováděcí nařízení Komise (EU) č. 485/2013 zavádí restrikce při používání tří látek z této skupiny. Tyto látky mají podle studií za následek velký úhyn včel medonosných ve 21. století, na kterých závisí velká část potravinářského průmyslu. Pyretroidy (např. cypermethrin, fenvalerate) ovlivňují tok na sodíkových kanálcích na buněčných membránách, což u hmyzu vede k celkové paralýze. U lidí může vyvolat alergickou reakci, hyperaktivitu nebo agresivitu. [18] [25] [26] [27] [29] [30].

2.5. Možnosti stanovení pesticidů v ječmeni a sladu

Principem stanovení obsahu pesticidů v různých matricích je jejich separace od složek matrice s následnou identifikací a kvantifikací vhodnou analytickou metodou.

Separativní metody, které mohou být úplné nebo částečné, vyžadují energii oproti zpětnému procesu (směšování). Separaci lze rozdělit na analytickou a preparativní. Analytická separace má za cíl odstranit nežádoucí látky, které by mohli v analýze vzorku znehodnotit výsledky. Pokud se separační metoda spojí s měřicí technikou jako je hmotnostní spektrometrie, lze určovat o jaké odseparované látky se jedná. v tabulce 2.6 jsou vypsány separační techniky.

Tabulka 2.6: *Separativní metody (upraveno) [31]*

Metoda
1. mechanická separace fází
a) srážení
b) destilace
c) extrakce
d) ionto výměnná
2. chromatografie
3. elektroforéza
4. frakcionace tokem v poli

Za chromatografii lze považovat techniku, která separuje látky za pomoci stacionární a mobilní fáze podle rozlišné rychlosti pohybu daných složek analytu. V kolonové chromatografii je stacionární fáze v koloně a mobilní fáze se skrze ni pohybuje. Při této metodě nedochází jen k separaci, ale také ke stanovení složek ve zkoumaném analytu [31].

2.5.1. Extrakce

Extrakce je rovnovážný postup, který se řídí Nernstovým zákonem o distribuci. Jde o rozpouštění látky mezi dvě nemísitelné kapaliny. Leckdy tento proces může mít určitá omezení. Například při extrakci z vodných roztoků musí být extrahovadlo nemísitelné a nemůže tvořit emulze. Při tomto postupu je také vysoká spotřeba rozpouštědel a při tom vzniká i odpad k likvidaci. Také je velká většina procesů prováděna ručně a tudíž jde o zdoluhavý krok analýzy. Tyto nevýhody může vyřešit extrakce na pevné fázi (solid-phase extraction – SPE). Principem je zachycení analytu anebo naopak nečistot na pevné fázi tvořené silikagelem, který je pokryt organickou látkou. Vzorek může být protlačen skrze náplň stříkačkou, stlačeným plynem anebo odsán pomocí vývěvy. Lze tedy extrahovat látku z velkého objemu, která se zachytí na náplni a poté je extrahována jen malým množstvím správného rozpouštědla. Tímto způsobem dojde i k zakoncentrování vzorku. V průtokových systémech je možné tuto techniku automatizovat. Dalším typem extrakce analytů je QuEChERS [31] [32].

2.5.1.1. QuEChERS

Metoda QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe) je rychlá, snadná, levná, účinná, robustní a bezpečná. První zmínka o analýze je z roku 2002 v publikaci [33], kterou vypracoval Michelangelo Anastassiades, zakladatel metody QuEChERS. Jde o extrakci a přečištění vzorků potravin určených na multireziduální analýzu pesticidů. Jedná se o velmi nenáročnou analýzu, která nepotřebuje mnoho laboratorního vybavení, rozpouštědel, samotného vzorku, a i přesto snižuje počet kroků při přípravě a možnost ztráty analytů [33] [34] [35] [36].

Prvotní metoda QuEChERS zahrnovala 10 gramů vzorku, 10 ml acetonitrilu, 4 g bezvodého $MgSO_4$ a 1 g $NaCl$. Po přidání solí byl vzorek v centrifugační zkumavce promíchán na vortexu. Po centrifugaci byl 1 ml z vrstvy acetonitrilu odebrán do malé centrifugační vialky, která obsahovala 25 mg primární sekundární aminu a 150 mg bezvodého $MgSO_4$. Po promíchání a centrifugaci byl vzorek analyzován [33] [34] [35] [36].

Použití acetonitrilu jako extrakčního činidla je jednodušší a efektivnější volbou oproti acetonu nebo ethyl-acetátu, které jsou běžně využívány v multireziduálních metodách. Dalším přídatkem jsou soli, které umožňují rozdělení rozhraní kapalina-kapalina a druhou extrakci. Příklad $NaCl$ je používán v mnoha metodách stanovení multireziduí pesticidů k nasycení vodné fáze. $MgSO_4$ přináší v extrakci vyšší výtěžnost, vyšší objem horní (organické) vrstvy, protože dokáže vázat velké množství vody. V dalším kroku je využíváno přečištění pomocí pevné fáze. Dále využívané předčišťovací kroky jsou kapalinová disperzní mikroextrakce (DLLME), mikroextrakce na pevné fázi (SPME), extrakce na pevné fázi (SPE), technologie molekulárního otisku (MIT) a extrakce na mikropevné fázi (μ -SPE). Pro účely této metody, aby bylo přečištění co nejefektivnější, byla zvolena disperzní pevná fáze (d-SPE). Jeví se jako levnější a libovolně kombinovatelnou metodou. Protože přečištění neprobíhá za velkých objemů, není potřeba velkého množství rozpouštědla a každý si může pevnou fázi namíchat z látek podle potřeb. Nejčastější využití mají látky jako primární-sekundární aminy (PSA), grafitizované uhlí (GCB), polymery, okta-decylsilan (ODS) nebo alumina (Al_2O_3). GBC snadno odstraňuje polyfenoly, pigmenty a polární sloučeniny. K pevné disperzní fázi se přidává $MgSO_4$ aby se odstranila přebytečná voda a čištění mohlo proběhnout lépe [33] [34] [35] [36].

2.5.1.2. Modifikace metody

Komplexnost potravinářských matric má podíl na vyvíjení nových modifikací metody QuEChERS, protože původní metoda se zaměřovala na ovoce a zeleninu, tedy na komodity s vysokým obsahem vody a s nízkým obsahem tuků. Díky úpravám se metoda osvědčila při multireziduálních analýzách pesticidů problematických matric. Potíže způsobují produkty, která obsahují vysokou koncentraci tuku, chlorofylu, jsou vysoce pigmentované nebo obsahují malé množství vody. V tabulce 2.7 jsou uvedeny matrice s navázkou a přídatkem vody.

2.5. MOŽNOSTI STANOVENÍ PESTICIDŮ V JEČMENI A SLADU

Tabulka 2.7: Průvodce pro přidání množství vody ke vzorku z metody EN [35]

Typ matrice	Hmotnost vzorku [g]	Hmotnost vody[g]
Ovoce a zelenina (>80 % vody)	10	0
Ovoce a zeleniny (25–80 % vody)	10	X ⁹
Obilovina	5	10
Sušené ovoce	5	7,5
Med	5	10
Koření	2	10

Existují tři standartní metody, které jsou uznávány mnoha evropskými i mezinárodními orgány. Pro všechny metody jsou základní kroky extrakce kapalina-kapalina, promíchání a odstředění, přečištění a promíchání a odstředění. Poté následuje analýza kapalinovým nebo plynovým chromatografem [35] [37].

Originální metoda QuEChERS se neliší od té původní popsané výše (v kapitole 2.5.1.1). Jako extrahovadlo je použit acetonitril, pro lepší dělení jsou použity soli $MgSO_4$, $NaCl$ a pro přečištění je využit PSA. Jedná se o sorbent odstraňující polární pigmenty, organické kyseliny, cukry a mastné kyseliny [35].

AOAC QuEChERS metoda zahrnuje stejné kroky jako výše popsaná originální metoda. Liší se přidáním 1% kyseliny octové do acetonitrilu. Vysolení probíhá za pomoci $MgSO_4$ a přečištění pomocí d-SPE, která obsahuje PSA a C18. Sorbent oktadecyl odstraňuje steroly a mastné sloučeniny s dlouhým řetězcem [35] [37].

Poslední standartní technikou je EN metoda (Evropská). Pro extrakci je použit acetonitril, následuje vysolování pomocí $MgSO_4$, $NaCl$ a citrátové soli, která slouží jako pufr ke kontrole pH. Pro přečištění od nežádoucích látek z matrice je zvolena d-SPE složená z PSA, C18 a $MgSO_4$ [35] [37].

I když metoda byla vyvinuta na vzorcích zeleniny a ovoce, stanovují se pesticidy i v obilovinách. Jde o složité stanovení kvůli jejich rozmanité a složité matici, proto se provádí zřídka v porovnání s ovocem a zeleninou. Problémem je nízký obsah vody, který je vyřešen přidáním vody ke vzorku. Pro těžko odstranitelné lipidy se používají sorbenty jako C18 v kombinaci s PSA. K přečištění silně pigmentovaných vzorků je vhodné zvolit GCB anebo chlorofiltr. Pro odstranění lipidových zbytků je také možné zařadit krok vymrazování [35].

2.5.2. Separační metody stanovení pesticidů

Ke stanovení obsahu pesticidů v potravinách se nejčastěji využívají metody plynové a kapalinové chromatografie v kombinaci s různými typy detektorů.

2.5.2.1. Plynová chromatografie

V plynové chromatografii jde o separaci vzorků unášených pomocí mobilní fáze (MF), která je inertním plynem, skrze stacionární fázi (SF), která je umístěna v koloně.

⁹X = 10 – obsah vody v 10 g vzorku

Dávkovaný vzorek může být kapalný nebo plyný, musí být těkavý a nesmí u něj docházet k degradaci při vysokých teplotách. Nástřik analyzovaného vzorku do přístroje probíhá buď přímo na kolonu nebo do dávkovací komory, která je vyhřívána. Analyt je unášen MF na kolonu, která je umístěna v termostatu. Aby došlo k dokonalému rozdělení vzorku, používá se teplotní gradient, což znamená, že se teplota po dobu analýzy zvyšuje. Poslední částí plynového chromatografu je detektor, který pomáhá převádět vlastnost analyzované látky na měřitelnou veličinu. Patří mezi ně detektor tepelné vodivosti, elektronového zachytu, plamenově ionizační, plamenově fotometrický a hmotností spektrometr – nejčastěji využívaný selektivní detektor [32] [38].

2.5.2.2. Kapalinová chromatografie

V kapalinové chromatografii, která se řadí do kolonové chromatografie, je mobilní fáze (MF) kapalina, která unáší kapalný vzorek systémem a stacionární fáze (SF) se nachází v koloně. Principem je rovnovážné dělení složek analytu mezi mobilní a stacionární fázi. Za nejvíce využívanou chromatografii se dá označit vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). V této metodě je využíváno malých částic (3–10 μm) v koloně a vysokých tlaků kapaliny (řády desítek MPa). Schéma přístroje je vyobrazeno na obrázku 2.4.

První částí přístroje je zásobník mobilních fází. U kapalinového chromatografu může být 1 nebo více zásobníků s rozpouštědly, tedy skleněných reagenčních lahví. Pokud při separaci použijeme jedno rozpouštědlo anebo jejich směs neměnnou po celou dobu analýzy, jedná se o izokratickou eluci. Druhým typem eluce je gradientová, při níž je mobilní fáze složena alespoň ze dvou rozpouštědel a po dobu separace se mění její složení, a to skokově nebo kontinuálně. Častěji je využívána eluce gradientová, protože zvyšuje účinnost separace. Míchání mobilní fáze je umožněno pomocí směšovacího ventilu. Mezi ventilem a zásobníky je odplyňovač, který slouží k odstranění prachových částí a rozpouštěných plynů. Odstraňování může probíhat za pomoci vakua anebo probubláváním inertního plynu [31] [32].

Čerpadlo je druhou částí systému přístroje. Je nutné, aby splňovalo několik požadavků: schopnost vytvoření tlaku až 40 MPa, bezpulsní tok, umožnění průtoků v rozmezí 0,1–10 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a odolnost vůči korozi. Nejčastěji využívaným materiálem je nerezová ocel, keramika nebo titan. Mnohokrát zastoupenými čerpadly jsou pístová, která mají konstantní objemový průtok MF. Jejich konstrukce připomíná injekční stříkačky, které jsou spojeny se zásobníkem mobilní fáze, a to v paralelním nebo sériovém zapojení [31] [32].

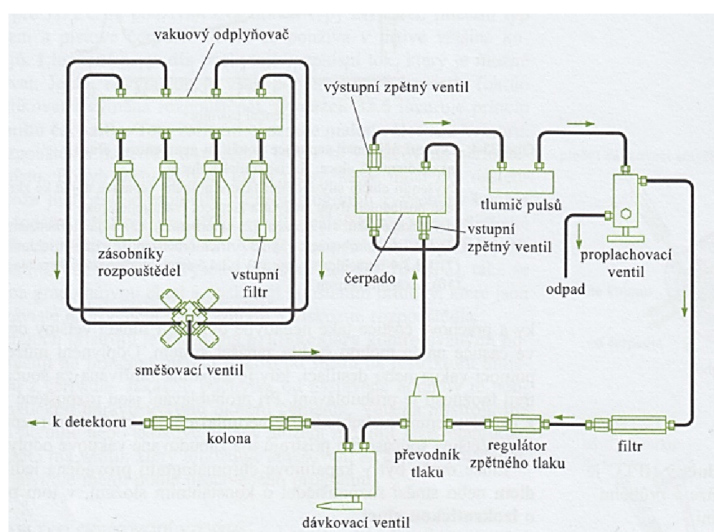
Dávkování vzorku je prováděno pomocí dávkovacího ventilu se smyčkou, který je předem plněn vzorkem. Tyto smyčky jsou měnitelné a díky tomu je možné měnit objem dávkovaného vzorku. V dnešní době jsou již skoro všechny přístroje vybaveny autosamplery, tedy automatickými dávkovači vzorků, které si sami vzorek vyberou se zásobníku s vilkami [31] [32].

Celá separace se děje na koloně, které musí být odolná vůči vysokému tlaku a taky chemicky stabilní při průtoku MF. Nejčastěji se vyrábí z nerezové oceli, skla nebo plastů. Některé nerezové kolony mají vnitřní stranu ze skla nebo polymeru. Obsahují částice sorbentů nebo nosiče SF. Další důležitou součástí přístroje je předkolona, která má stejnou

2.5. MOŽNOSTI STANOVENÍ PESTICIDŮ V JEČMENI A SLADU

stacionární fázi jako analytická (hlavní) kolona a má funkci ji chránit. Zabraňuje nečistotám ze vzorku a mobilní fáze, aby kontaminovaly drahou analytickou kolonu. Obě kolony jsou umístěny v termostatu, protože kontrola nad stálou teplotou vede k reprodukovatelnosti měření výsledků [31] [32].

Poslední částí kapalinového chromatografu je detektor. Lze jej rozdělit na selektivní, kdy výsledkem je signál roven koncentraci analytu ve vzorku a detektor univerzální, kde je signál roven vlastnosti celého eluátu. Aby mohl být detektor využit, musí mít možnost měření při malých objemech MF a jejího průtoku. Nejvíce využívaným detektorem je spektrometrický, kde se využívá ultrafialového nebo viditelného záření k detekci analyzovaných látek. Dále hojně využívaným detektorem je s fotodiodovým polem, který poskytuje celá spektra analytů. Také existují fluorimetrické, elektrochemické, vodivostní nebo refrakto-metrické detektory. Kombinací HPLC s hmotnostní spektrometrií, lze získat velmi vysoce selektivní detekci látek [31] [32].



Obrázek 2.4: Blokové schéma kapalinového chromatografu [31]

2.5.3. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometr je všestranný analytický přístroj získávající informace o neznámé látce. Poskytuje sdělení o molekulové hmotnosti, prvkovém složení a také o struktuře analyzované látky. Při této metodě jsou molekuly analyzované látky převedeny na ionizované částice, které jsou dále rozděleny podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) a výsledkem je hmotnostní spektrum [31] [32].

Hmotnostní spektrometr je složen z iontového zdroje, analyzátoru, detektoru a vakuového systému sestávající z mechanických a difuzních vývěv. Uspořádání těchto částí lze vidět na obrázku 2.5 [31] [32].

Prvním krokem v analýze vzorku je ionizace, která je možná pro kapalné, plynné i pevné skupenství. V tabulce 2.8 jsou uvedeny ionizační techniky pro vzorky v daném skupenství. Elektrosprej v podstatě není ionizační technika, principem je převod iontů z kapalné do plynné fáze. Vzorek je přiváděn do kapiláry, která je pod proudem. Proti kapiláře je v ko-

2.5. MOŽNOSTI STANOVENÍ PESTICIDŮ V JEČMENI A SLADU

moře elektroda, která je také vstupem dále do přístroje. Kapalný vzorek je tedy přiváděn vysokou rychlostí kapilárou, kde se vlivem elektrostatických sil vytvoří Taylorův kužel. Na jeho vrcholu dochází ke sprejování kapének, které jsou dále vysušovány a po čase dochází ke Coulombické explozi, kdy se primární kapénka rozpadá na menší. Tento jev se opakuje do té doby, dokud nezůstanou jen nabitě ionty analyzované látky. Ty jsou přitahovány protielektrodou a putují dále hmotnostním spektrometrem. Tento typ ionizace za atmosférického tlaku je nejvíce využíván v kombinaci s kapalinovou chromatografií [31] [32].

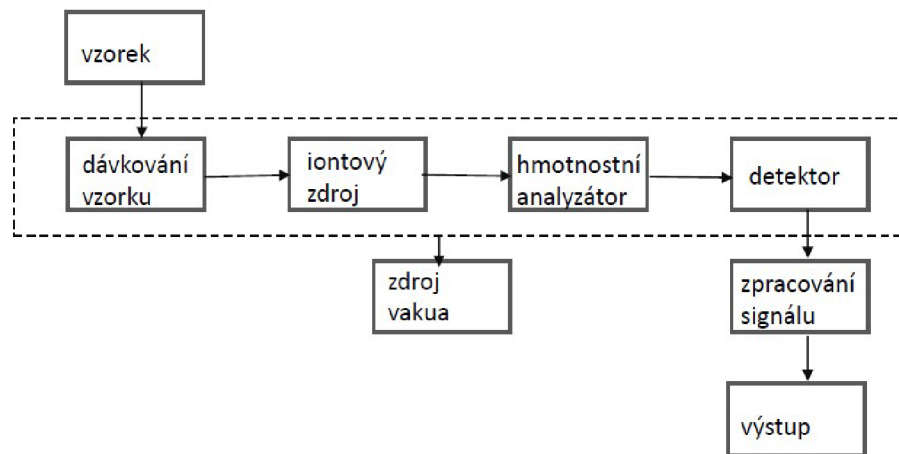
Tabulka 2.8: *Iontové zdroje podle skupenství vzorku* [31] [32]

Skupenství	Technika	Zkratka
Plynné	Elektronové ionizace	EI
	Chemická ionizace	CI
Kapalné	Elektrosprej za ATM	ESI
	Chemická ionizace za ATM	APCI
	Fotoionizace za ATM	APPI
Pevné	MALDI	
Prvková analýza	Indukčně vázané plazma	ICP

Další částí přístroje je analyzátor, který má za úkol rozlišit jednotlivé ionty podle poměru m/z a vypustit je na detektor. Mezi ně se řadí magnetický analyzátor, elektrostatický analyzátor, kvadrupólový analyzátor, průletový analyzátor, sférická iontová past, iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací a orbitrap. Kvadrupól je tvořen čtyřmi tyčemi na průřezu kulatými nebo hyperbolickými. Iont vchází do detektoru rovnoběžně s tyčemi a jeho dráha je ovlivněna kolmo. Vždy na dvě protilehlé tyče je vkládáno napětí a tím ionty při průletu opisují šroubovici. Pokud iont narazí do tyče, vyběhne a je odsát pryč ze systému. Analyzátor funguje jako filtr, kdy je iontům o určitém m/z povolen průlet. V tandemových technikách (MS/MS) je využíván trojitý kvadrupól (QQQ/QqQ), kdy první kvadrupól má za úkol vybrat prekurzorový iont, v druhém dochází ke kolizi a třetí skenuje produktové ionty podle m/z . Mohou být zvoleny i jiné módy jako je například sken hmotnostních ztrát [31] [32].

Poslední částí MS jsou detektory, které slouží k převedení signálu na měřitelnou jednotku. Mezi zástupce patří elektronásobič s kontinuální dynodou nebo s diskrétními dynodami a mikrokanálová destička [31] [32].

2.5. MOŽNOSTI STANOVENÍ PESTICIDŮ V JEČMENI A SLADU



Obrázek 2.5: *Blokové schéma hmotnostního spektrometru [31]*

3. Cíl práce

Cílem této diplomové práce, která se zabývá pesticidy v ječmeni a jejich stanovením, je vypracování a shrnutí těchto bodů:

- vypracování literární rešerše shrnující problematiku pěstování ječmene, využívání pesticidů a možnosti stanovení reziduí pesticidů
- optimalizaci a validace extrakce metodou QuEChERS
- stanovení reziduí pesticidů v ječmeni a sladu metodou LC/MS s extrakcí QuEChERS

4. Experimentální část

4.1. Využité přístroje a chemikálie

4.1.1. Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy, Denver instrument (USA)
- Běžné laboratorní sklo
- Centrifuga Rotina 420R, Hettich (Německo)
- Centrifugační zkumavky 50 ml
- Kalibrované skleněné pipety
- Kapalinový chromatograf s hmotnostním detektorem (trojitý kvadrupól), Acquity UPLC-XEVO TQS micro (USA)
- Kolona Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm 2,1 \times 100 mm, Waters (Irsko)
- Kombinovaná lednice s mrazákem, Liebherr (Německo)
- Laboratorní mlýnek
- LUT Syringe Filters PVDF 13 mm, 0,22 μm , LABICOM (Česká republika)
- pH metr Seven compact pH meter S210, Mettler Toledo (USA)
- Předvážky GE512-0CE, Sartorius (Německo)
- Třepačka KS 260 basic, IKA (Německo)
- Vialky 2 ml, víčka se septem
- Vortex TTS 3 digital, Yellowline by IKA (Německo)

4.1.2. Chemikálie

- Aceton, Supelco (Německo)
- Acetoniril pro LC-MS, Supelco (Německo)
- Argon čistoty 4.8 (kolizní plyn v MS/MS)
- Dimethyl sulfoxide pro HPLC (Japonsko)
- Dusík čistoty 4.5 (zamlžovací plyn v elektrosprejové ionizaci)
- Kyselina citronová, Sigma-aldrich (Rakousko)
- Kyselina mravenčí, VWR (Spojené království)
- Methanol pro LC-MS, Supelco (Německo)
- Octan amonný, Sigma-aldrich (Německo)
- QuEChERS PKG50 (4000 mg MgSO_4 , 1000 mg NaCl), UCT (USA)
- QuEChERS PKG100 (150 mg MgSO_4 + 150 mg PSA + 50 mg CEC 18), UCT (USA)

- Sada 10 LC multipesticidů, Restek (Německo) - obsah standardů je v příloze
- 2-propanol, Supelco (Francie)

Všechny chemikálie byly použity v čistotě pro HPLC-MS

4.2. Příprava kalibračních roztoků

Byl připraven 20% roztoku methanolu s H_2O přečištěnou pro HPLC pro ředění kalibračních roztoků standardů pesticidů. Z 10 vialek multipesticidů od firmy Restek byl připraven roztok 11. bodu kalibrační křivky do 10 ml odměrné baňky. Z každé vialky pesticidů bylo pipetováno 50 μl a objem byl doplněn 20% roztokem methanolu. Další roztoky kalibrační křivky byly ředěny postupně z vyšších koncentrací a body byly připraveny podle tabulky 4.1. Takto připravené vzorky byly následně přefiltrovány pomocí PVDF filtru do vialek a uzavřeny víčkem se septem. Připravené kalibrační roztoky se následně analyzovaly metodou UPLC-MS/MS

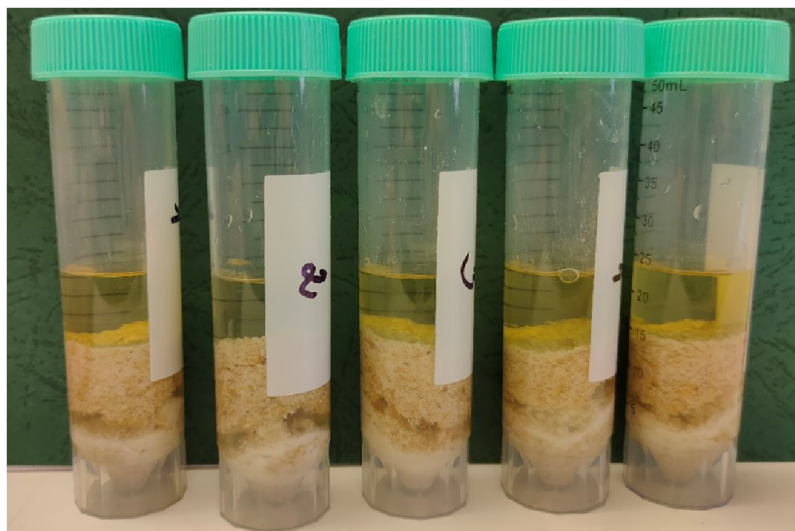
Tabulka 4.1: *Body kalibrační křivky*

Číslo standardu	Koncentrace [$n \cdot ml^{-1}$]
1	0,25
2	1
3	2,5
4	5
5	10
6	15
7	25
8	50
9	100
10	250
11	500

4.3. Příprava vzorků

Ječmen a slad je nejprve rozemlet na laboratorním mlýnku. Do centrifugační zkumavky (50 ml) se naváží 5 g vzorku. Poté se přidá 10 ml H_2O přečištěné pro HPLC a 10 ml acetonitrilu. Směs se vortexuje do promíchání vzorku. Poté se zkumavka umístí na 1 hodinu na třepačku. Ke vzorku se přidá 5 g směsi $MgSO_4$ a $NaCl$ (1:4), směs je po dobu 1 minuty vortexovaná a následně se provádí centrifugace 10 min při $4000 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$. Supernatant se sleje a je následně přečištěn buď před d-SPE a nebo je vymražen uložením na 24 hodin do mrazáku. Poté se odebere horní vrstva, která je zředěna 10x pomocí 20% roztoku methanolu v H_2O přečištěnou pro HPLC, který byl využit i pro ředění kalibračních roztoků. Následně je vzorek přefiltrován pomocí PVDF filtru do vialky a uzavřen víčkem se septem. Takto připravený vzorek je analyzován metodou UPLC-MS/MS.

4.4. PŘÍPRAVA MOBILNÍCH FÁZÍ A ROZTOKŮ PRO UPLC-MS/MS



Obrázek 4.1: Připravené vzorky ječmene po centrifugaci

4.4. Příprava mobilních fází a roztoků pro UPLC-MS/MS

Byla připravena mobilní fáze A, 10 mM octanu amonného ve vodě přečištěné pro HPLC. Na analytických vahách se navážilo 770,8 mg octanu amonného, který byl převeden kvantitativně do reagenční láhve o objemu 1 litr a byl zalit superčistou vodou. Totéž bylo provedeno pro mobilní fázi B 10 mM octan amonný v methanolu. Na pH metru bylo upraveno pH mobilních fází pomocí kyseliny mravenčí na hodnotu 5. Další roztoky byly připraveny podobným způsobem do reagenčních lahví o objemu 1 litr podle tabulky 4.2. Láhve byly po dobu 15 minut v ultrazvukové lázni pro zajištění dokonalé homogenity roztoku. Všechny chemikálie byly použity v čistotě pro HPLC-MS.

Tabulka 4.2: Roztoky pro UPLC-MS/MS analýzu

Oplach jehly		Oplach těsnění		Uchování kolony	
[ml]		[ml]		[ml]	
370	7,44 mM kyselina citronová v H_2O	100	2-propanol	200	Methanol
90	Methanolu	900	H_2O ¹	800	H_2O
190	Acetonitril				
190	2-propanol				
90	Aceton				
70	Dimethyl sulfoxid				

¹voda přečištěná pro HPLC

4.5. Optimalizace QuEChERS

4.5.1. Optimalizace ředění vzorku

Protože počáteční podmínky gradientové eluce LC analýzy začínaly na 98 % vodné fáze bylo nutné vzorky v acetonitrylu naředit vodou fází, aby nedocházelo k rozmývání píků analytů při analýze, čímž by mohlo docházet ke snížení citlivosti metody.

Pro zjištění optimálního ředění, byly připraveny vzorky ječmene podle postupu v kapitole 4.3. Vzorků obohacených o 0,5 ml pesticidů o koncentraci $500 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ bylo připraveno celkem 12. Část byla ředěna 2× a druhá část 10×. Takto připravené vzorky byly následně přefiltrovány pomocí PVDF filtru do vialek a uzavřeny víčkem se septem. Vzorky se následně analyzovaly metodou UPLC-MS/MS. Výsledná koncentrace pesticidů by měla být pro ředění 2× $12,5 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ a pro ředění 10× $2,5 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Respektive $0,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ pro ředění 2× a $0,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ pro ředění 10×. Po vyhodnocení výsledků bylo zvoleno ředění 10×, aby nedocházelo k rozmývání píků analytů při analýze, čímž může docházet ke snížení citlivosti metody.

4.5.2. Optimalizace přečištění vzorku

K přečištění vzorků byly testovány metody vymražení a přečištění přes d-SPE, která obsahovala PSA + MgSO_4 + CEC 18.

Kontrolní vzorečky ječmene a sladu byly naváženy do zkumavek a obohaceny o 4 ml interního standardu pesticidů o koncentraci $25 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Dále bylo postupováno podle výše popsaného postupu v kapitole 4.3. Část vzorků byla přes noc zamrazena. U druhé části se využilo přečištění pomocí d-SPE. Z horní vrstvy se odebral 1 ml do vialky, která obsahovala směs PSA + MgSO_4 + CEC 18. Vzorky byly vortexovány po dobu 1 minuty a poté byla provedena centrifugace. Takto připravené vzorky byly 10× zředěny 20% roztokem methanolu a následně přefiltrovány pomocí PVDF filtru do vialek a uzavřeny víčkem se septem. Takto připravené vzorky se poté analyzovaly metodou UPLC-MS/MS. Výsledná koncentrace pesticidů po ředění by měla být $1 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, tedy $0,2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Po vyhodnocení obou postupů přečištění bylo u většiny analyzovaných pesticidů dosaženo průměrně o 10 % vyšší výtěžnosti obohacených vzorků metodou vymražení.

4.6. Validace QuEChERS

Pro validaci metody byla naměřena opakovatelnost tak, že byl vzorek ječmene nachystán podle předchozího postupu 6× a obohacen o 200 μl pesticidů o koncentraci $5000 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, kdy výsledná koncentrace analytů by měla být $10 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ po ředění 10× a tedy $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Pro výpočty byly použity následující vzorce:

Aritmetický průměr je číselná hodnota získaná ze součtu jednotlivých čísel a vydělena jejich počtem [41] [42].

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad (4.1)$$

\bar{X} je průměr, X_i je hodnota měření, n je počet měření, i je pořadí měření

Limit kvantifikace je koncentrace vzorku, který umožňuje při zpracování výsledků kvantitativní vyhodnocení. Nejčastěji se jedná o první bod kalibrační křivky [41] [42] [43].

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot n \cdot k}{b} \quad (4.2)$$

n je výška šumu v základní linii, k je plocha/výška píku, b je směrnice kalibrační křivky

Linearita je možnost metody poskytnout odezvu přístroje na koncentraci analytu. Jedná se o přímkovou závislost dvou veličin na sobě, tedy závislost šumu na koncentraci. Lineární závislost se matematicky zapisuje následovně:

$$y = a + bx \quad (4.3)$$

a je posunutí na ose y , b je směrnice kalibrační křivky [41] [42] [43]

„Opakovatelnost metody je definována jako těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky zkoušek získanými za podmínek opakovatelnosti“ [43]. Vzorky jsou analyzovány během krátkého časového úseku v jedné laboratoři, jedním pracovníkem za použití stejných laboratorních pomůcek a přístrojů. Lze ji vyjádřit jako relativní směrodatnou odchylku.

Směrodatná odchylka udává, jak se jednotlivé hodnoty liší od průměru daných hodnot [41] [42] [43].

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}} \quad (4.4)$$

s je směrodatná odchylka, X_i je hodnota měření, \bar{X} je průměr, n je počet měření

Relativní směrodatná odchylka je hodnota poskytující informaci o odchýlení od aritmetického průměru. Nejčastěji se udává v procentech [41] [42] [43].

$$s_r = \frac{s}{\bar{X}} \quad (4.5)$$

s_r je relativní směrodatná odchylka, \bar{X} je průměr

4.7. Stanovení pesticidů metodou UPLC-MS/MS

Připravené vzorky ječmene, sladů a vzorky pro optimalizaci metody byly před samotnou analýzou skladovány v lednici.

Na kapalinovém chromatografu byly nastaveny podmínky podle následující tabulky 4.3 a gradientová eluce podle tabulky 4.4. Pro separaci byla využita kolona Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm 2,1 \times 100 mm značky Waters. Pro kalibraci byly použity připravené kalibrační roztoky v rozmezí 0,25–500 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Hmotnostní detektor měřil v MS/MS režimu, jako kolizní plyn byl použit argon o čistotě 4.8. Pro ionizaci byl použit elektrosprej (ESI), kde zamlžovacím plynem byl dusík o čistotě 4.5. V MRM režimu skenování byly sledovány produktové kvantifikační a konformační ionty vzniklé štěpením prekurozorových iontů jednotlivých analytů v kolizní cele. Sledované prekursorové a produktové ionty jsou uvedeny příloze v tabulce 9.1. Podmínky v iontovém zdroji jsou uvedeny v tabulce 4.5. Celý přístroj je vidět na obrázku 4.2

Instrumentace UPLC-MS/MS byla ovládána programem MassLinx. Naměřená data byla v programu MassLinx vyhodnocena. Identifikace analyzovaných pesticidů byla provedena srovnáním retenčního času a sledovaných iontů se standardem. Kvantifikace analyzovaných pesticidů byla provedena výpočtem z kalibračních závislostí integrací píků kvantifikačních iontů.

Tabulka 4.3: Podmínky separace

Průtok mobilní fáze	0,450 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
Objem nástřiku vzorku	5 μl
Teplota kolony	45 $^{\circ}\text{C}$

Tabulka 4.4: Složení mobilní fáze při gradientové eluci

Čas [min]	Mobilní fáze [%]	
	Mobilní fáze A	Mobilní fáze B
0–12,25	98	2
12,25–13,00	1	99
13,00–17,00	98	2

Tabulka 4.5: Podmínky MS ionizace

Mód iontového zdroje	ES+
Teplota iontového zdroje	120 $^{\circ}\text{C}$
Teplota desolvatace	400 $^{\circ}\text{C}$
Průtok dusíku při zmlžování	200 $\text{l}\cdot\text{hod}^{-1}$
Průtok dusíku při desolvataci	1000 $\text{l}\cdot\text{hod}^{-1}$

4.7. STANOVENÍ PESTICIDŮ METODOU UPLC-MS/MS

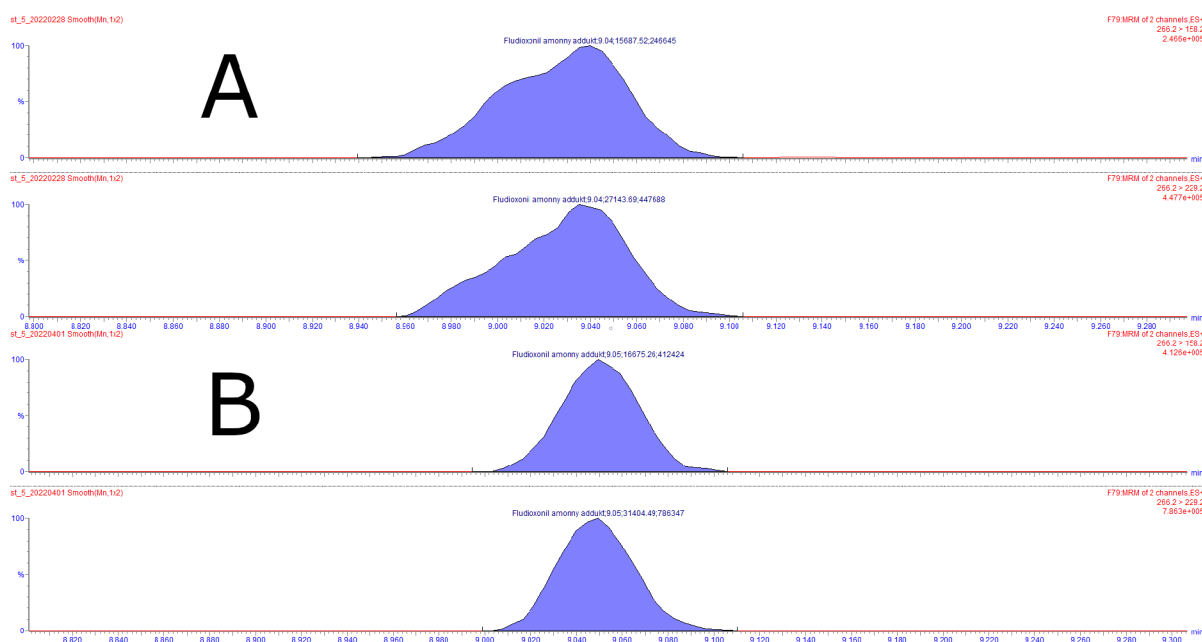


Obrázek 4.2: *Acquity UPLC-XEVO TQS micro – využitý pro experimentální část*

5. Výsledky a diskuze

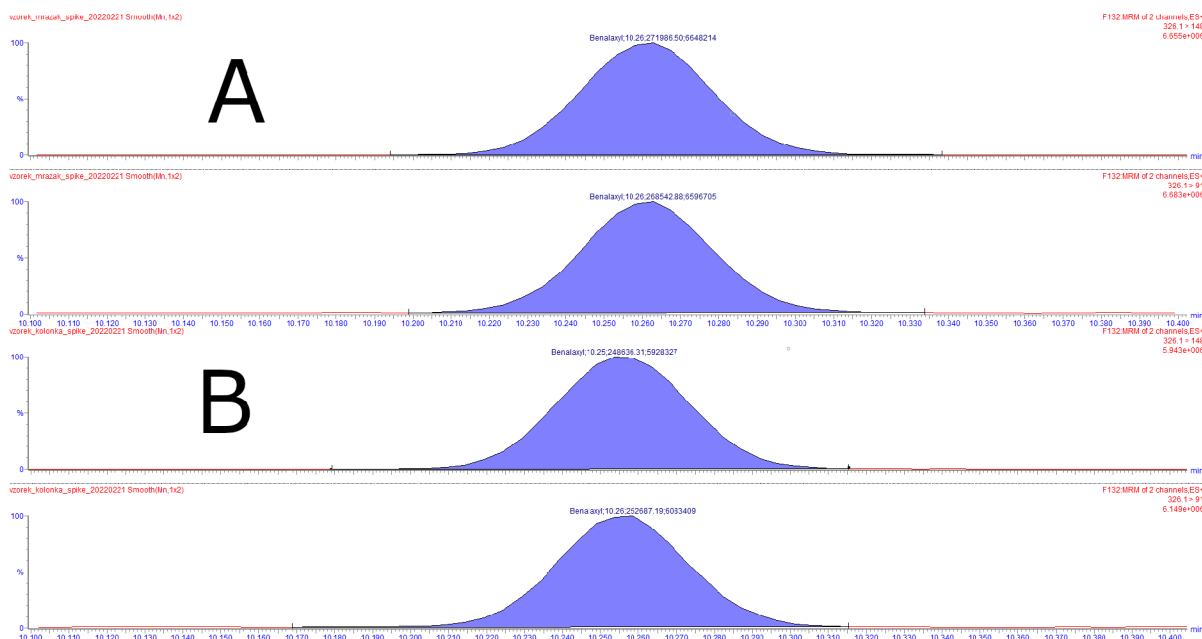
5.1. Optimalizace metody QuEChERS

Metodou QuEChers byly analyzované pesticidy vyextrahovány do acetonitrylu. Protože počáteční podmínky gradientové eluce LC analýzy začínaly na 98 % vodné fáze, bylo nutné připravené vzorky v acetonitrylu naředit vodnou fází, aby nedocházelo k rozmývání píků analytů při analýze, přičemž může docházet ke snížení citlivosti metody. Tento problém je řešen v knize [43]. Proto bylo při analýze vzorků optimalizováno jejich ředění. Byly testovány dvě úrovně ředění, a to 2× a 10×. Na obrázku 5.1 je porovnání chromatogramů ředěného standardu fludioxonilu. Je zde patrná výrazná deformace píku při ředění 2× (část A), která se u ředění 10× neobjevuje (část B). A proto byly všechny analyzované vzorky 10× ředěny.



Obrázek 5.1: Porovnání chromatogramu ředěného standardu fludioxonil. A – 2× ředění, B – 10× ředění

Dalším krokem optimalizace bylo porovnání přechištování vzorků pro analýzu. K přechištění vzorků byly testovány metody vymražení a d-SPE, která obsahovala PSA + $MgSO_4$ + CEC 18. Po vyhodnocení obou postupů přechištění vzorků bylo u většiny analyzovaných pesticidů dosaženo průměrně o 10 % vyšší výtěžnosti obohacených vzorků metodou vymražení. Na obrázku 5.2 je porovnání plochy píků u pesticidu benalaxyl, kde větší plocha je u vymražení (vyobrazení A) než u přechištění pomocí d-SPE (část B).



Obrázek 5.2: Ukázka chromatogramu pesticidu benalaxyl A – přečištění vymražením, B – přečištění d-SPE

Zatímco v publikaci [37] je zmíněno, že přečištění pomocí vymrazení je nejčastěji využíváno pro stanovení pesticidů v olejích, tak publikace [40] zmiňuje použití zmrazení jako součást přečištění i u obilovin. Publikace [37] a [48] je souhrnem mnoha metod QuEChERS, kde jsou popsány různé postupy při přečišťování pro různé potravinářské komodity např. čaj, tabák, rýže nebo olivy.

Proto byl pro analýzu ječmene zvolen postup, který zahrnoval přečištění pomocí zmrazeného supernatantu obrázek 5.2 (část A) a ředění vzorku před samotnou analýzou 10× 5.1 (část B).

Navážka vzorku při extrakci nebyla optimalizovaná a byla použita navážka 5 g, která byla zmíněna ve studiích [37] a [35], kde podle postupů mají obilniny navážku 5 g vzorku spolu s 10 g vody.

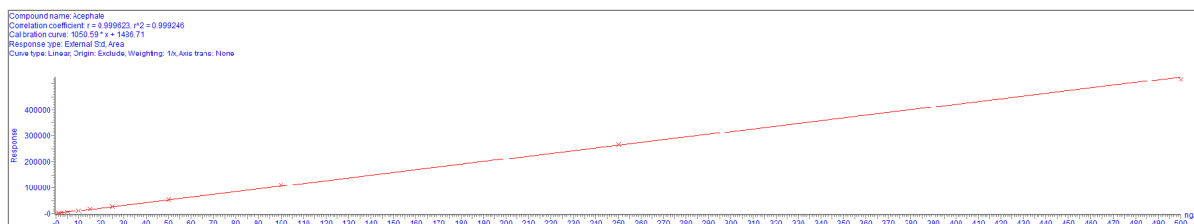
5.2. Validace metody QuEChERS UPLC-MS/MS

Po proměření 6 vzorků ječmene byla z výsledků na opakovatelnost vypočtena rozšířená nejistota a výtěžnost pro každý pesticid. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 9.2. Rozšířená nejistota byla vypočtena podle výše uvedených výpočtů v kapitole 4.6

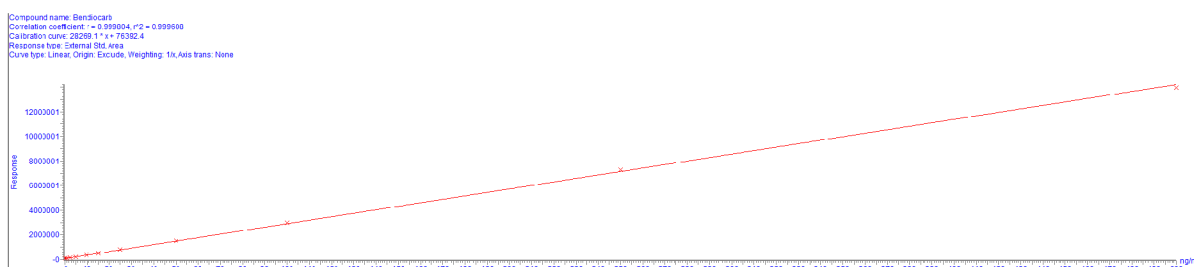
Validace použité metody stanovení reziduí pesticidů zahrnovala stanovení linearitu kalibračních závislostí, výtěžnosti extrakce obohacených vzorků, stanovení limitu kvantifikace a stanovení nejistoty měření z opakovatelnosti.

5.2. VALIDACE METODY QUECHERS UPLC-MS/MS

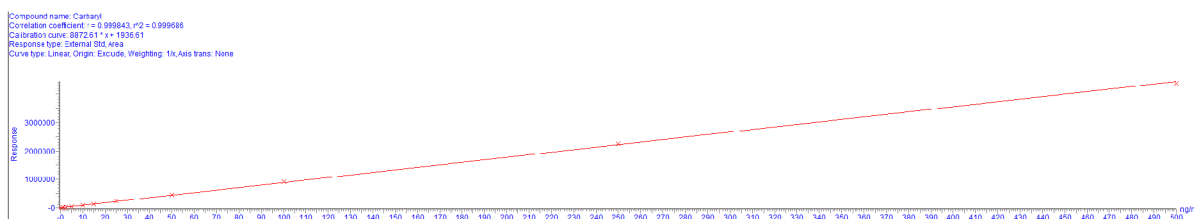
Kalibrační křivky sledovaných analytů byly lineární v rozmezích uvedených v tabulce 9.2. Korelační koeficienty kalibračních křivek byly v rozmezí 0,999 9–0,988 7. Na obrázcích 5.3 až 5.6 jsou ukázky kalibračních křivek.



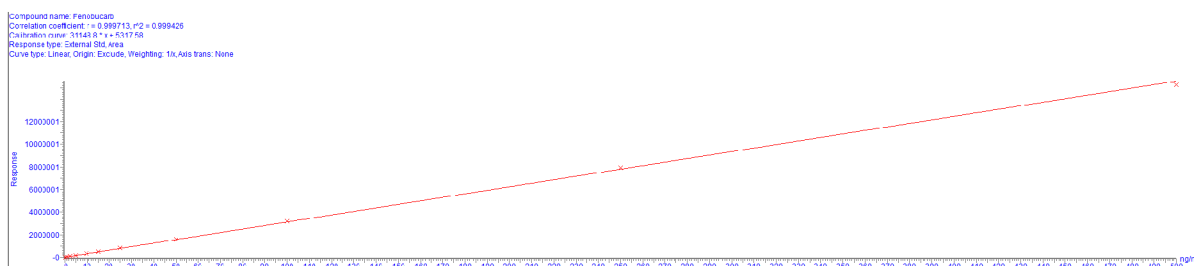
Obrázek 5.3: Ukázka kalibrační křivky – acephate



Obrázek 5.4: Ukázka kalibrační křivky – bendiocarb



Obrázek 5.5: Ukázka kalibrační křivky – carbaryl



Obrázek 5.6: Ukázka kalibrační křivky – fenobucarb

Výtěžnosti jednotlivých analytů extrakcí QuEChERS se pohybovaly v rozmezí 50–130 % a jsou uvedeny v příloze v tabulce 9.2.

Limit kvantifikace pro jednotlivé analyty vycházel z rovnice 4.2 a byl stanoven experimentálně postupným ředěním kalibračních roztoků a jedná se o nejnižší bod kalibračních

5.3. STANOVENÍ REZIDUÍ PESTICIDŮ V JEČMENI A SLADU

křivek. Limity kvantifikací všech sledovaných pesticidů byly nižší než maximální limity reziduí stanovené nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 396/2005.

Rozšířená nejistota stanovení analyzovaných pesticidů byla vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka vypočítaná z opakovatelnosti dle vztahů 4.4 a 4.5. Rozšířená nejistota měření uvedená v tabulce 9.2 je součinem relativní směrodatné odchylky a koeficientu rozšíření $k = 2$, což pro normální rozdělení odpovídá pravděpodobnosti pokrytí přibližně 95 %.

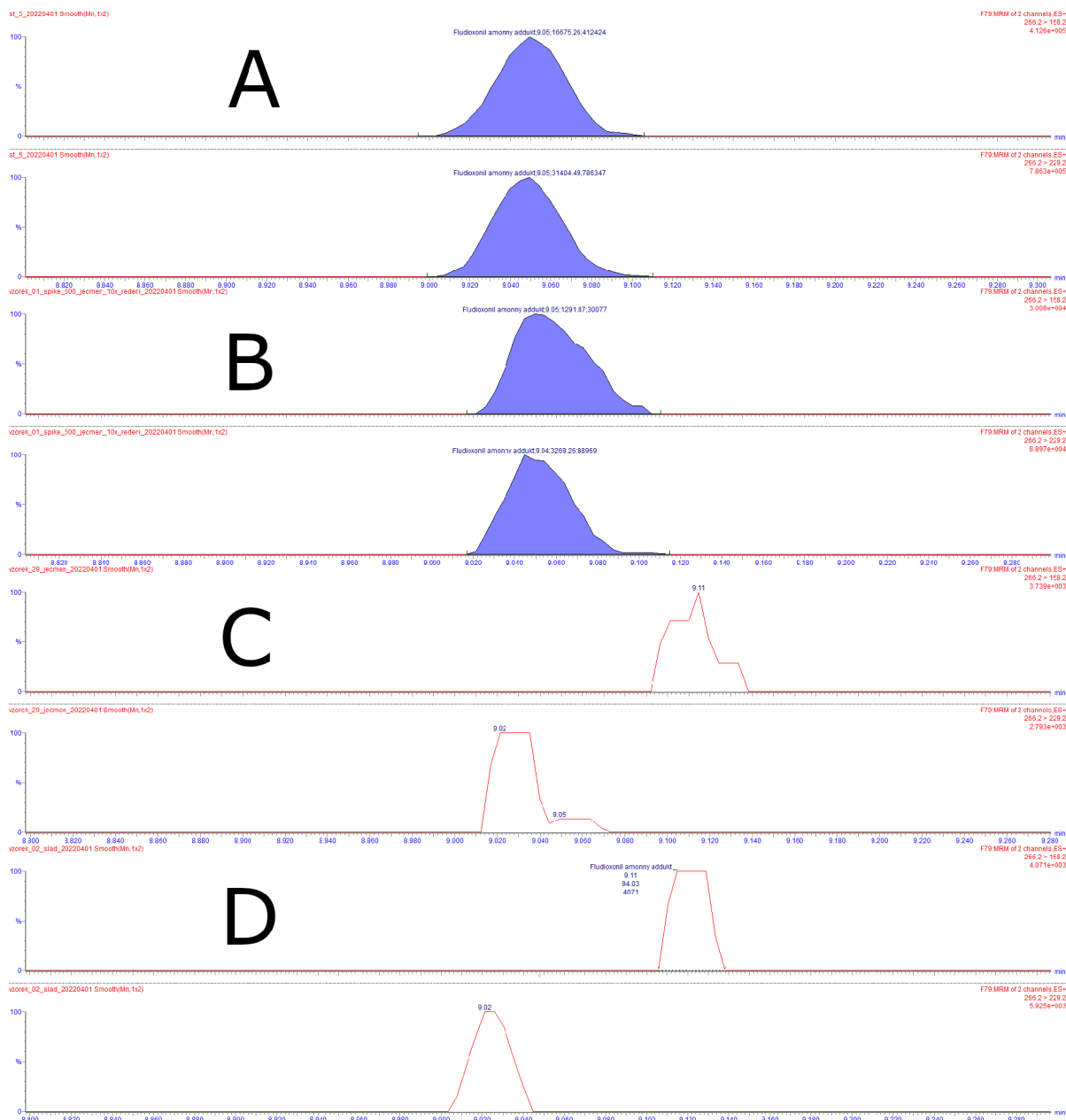
Optimalizovaná a validovaná metoda QuEChERS UPLC-MS/MS je vhodná pro stanovení reziduí pesticidů v ječmeni a sladu.

5.3. Stanovení reziduí pesticidů v ječmeni a sladu

Rezidua pesticidů byla analyzována u 30 vzorků ječmene a 20 vzorků sladů, jejichž odrůdy jsou uvedeny v tabulce 5.1 respektive 5.2. Vzorky ječmenů pro analýzu pocházely z ČR ze sklizně 2021. Vzorky sladů pro analýzu byly vyrobeny z ječmenů z ČR ze sklizně 2021. Multireziduální analýzou bylo ve vzorcích stanovováno 148 pesticidů, přehled analytů je v příloze v tabulce 9.1. Stanovení obsahu pesticidů v analyzovaných vzorcích bylo realizováno optimalizovanou metodou QuEChERS UPLC-MS/MS. Vyhodnocení analýz bylo provedeno pomocí programu MassLynx.

Na obrázku 5.7 jsou ukázky chromatogramů analyzovaných vzorků v porovnání se standardem (fludioxonil) a obohaceným vzorkem ječmene. Na obrázku je vidět, že chromatogramy ječmene (část C) a sladů (část D) neobsahují píky kvantifikačních ani konformačních iontů a je viditelný pouze záznam na úrovni šumu. Záměrem chromatogramy standardu (část A) a obohaceného vzorku ječmene (část B) zobrazují integrované píky kvantifikačních a konformačních iontů.

5.3. STANOVENÍ REZIDUÍ PESTICIDŮ V JEČMENI A SLADU



Obrázek 5.7: Ukázka chromatogramu pesticidu fludioxonil. A - standard, B - obohacený vzorek, C - vzorek ječmene, D - vzorek sladu

Obsahy všech sledovaných pesticidů v analyzovaných vzorcích byly pod mezí kvantifikace metody (příloha tabulka 9.2) z čehož vyplývá, že nepřekročily maximální limity reziduí (příloha tabulka 9.1) stanovené nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 396/2005. Z výsledků lze usuzovat, že v České republice jsou pesticidy při ochraně ječmene pravděpodobně používány podle legislativy a jsou dodržovány ochranné lhůty. Lze tedy předpokládat, že ječmen vypěstovaný v České republice a z něj vyrobené slady jsou z hlediska obsahu reziduí pesticidů bezpečné a nepředstavují riziko pro spotřebitele. Nicméně na základě výsledků publikací [44] [45] [46] [47] nelze riziko obsahu reziduí pesticidů v potravnářských komoditách zcela vyloučit. V publikaci [46] byl detekován pesticid carbendazim v okurkách, v článku [45] byly analyzovány zelené čaje u kterých se prokázala

5.3. STANOVENÍ REZIDUÍ PESTICIDŮ V JEČMENI A SLADU

přítomnost pesticidů chlorpyrifos, bifenthrin, λ -cyhalothrin v koncentracích vyšších než je MLR. V publikaci [44] která stanovovala rezidua pesticidů v rýži odhalila překročení MLR u tří pesticidů. Publikace zaměřující se na plodiny z Kamerunu detekovala velké množství pesticidů v nadlimitním množství u černého a bílého pepře, kávy, kakaa, sojových bobů nebo chilli papriček.

Proto je nezbytné mít vhodnou analytickou metodu pro stanovení reziduí pesticidů, kterou lze využít pro průběžnou kontrolu kvality nejenom ječmene a sladu, ale i ostatních potravinářských komodit.

Tabulka 5.1: *Vzorky ječmene*

Označení vzorku	Odrůda	Označení vzorku	Odrůda
1	Overture	16	Bojos
2	Bojos	17	Bojos
3	Laudis 550	18	Overture
4	LG Stamgast	19	Laudis 550
5	Overture	20	Overture
6	Bojos	21	Francin
7	Bojos	22	Laudis 550
8	Overture	23	Bojos
9	Bojos	24	Bojos
10	Bojos	25	Overture
11	Manta	26	Bojo
12	Bojos	27	Laudis 550
13	Bojos	28	Overture
14	Laudis 550	29	Bojos
15	Overture	30	Bojos

Tabulka 5.2: *Vzorky sladu*

Označení vzorku	Odrůda	Označení vzorku	Odrůda
S1	Bojos	S11	Overture
S2	Manta	S12	Tosca
S3	Bojos	S13	Laudis 550
S4	Overture	S14	Bojos
S5	Overture	S15	Laudis 550
S6	Laudis 550	S16	KWS Irina
S7	Overture	S17	Bojos
S8	Bojos	S18	RGT Planet
S9	Bojos	S19	KWS Amadora
S10	Overture	S20	RGT Planet

6. Závěr

Tato diplomová práce pojednává o stanovení pesticidů v ječmeni a sladu. Teoretická část popisuje ječmen, jeho chemické složení, podmínky pro jeho pěstování a choroby. Další část popisuje přípravky na ochranu rostlin, tedy pesticidy, jejich rozdělení, použití a omezení, které jsou dány zákony a nařízeními. Poslední část pojednává o možnostech stanovení pesticidů. Jednou z metod je QuEChERS, postup, který je rychlý a nenáročný, a proto je velmi využívaný. Dále jsou popsány analytické metody, které byly využity při vypracování experimentální části.

Experimentální část se nejprve zabývá optimalizací a validací metody stanovení pesticidů v ječmeni a sladu. Z validačních parametrů lze usuzovat, že metoda byla upravena správně a je možné ji využít pro stanovení reziduí pesticidů.

Optimalizovanou metodou QuEChERS UPLC-MS/MS byly analyzovány rezidua pesticidů ve vzorcích ječmene a sladů. Nejprve byly připraveny kalibrační roztoky pesticidů. Pro každý pesticid zvlášť byl limitem kvantifikace první bod kalibrační křivky, výsledky jsou uvedeny v tabulce 9.2. Dále byly připraveny vzorky ječmene a sladů metodou extrakce QuEChERS. Analyzovaný ječmen a slad byly ze sklizně 2021 v České republice. Extrakcí QuEChERS byly ve vzorcích analyzovány rezidua pesticidů metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Pro stanovení byla využita gradientová eluce a sledování MRM přechodů v hmotnostním spektrometru. Ve vzorcích ječmene a sladů bylo sledováno celkem 148 pesticidů (viz příloha tabulky 9.1 a 9.2). Ze vzorků připravených podle kapitoly 4.6 byla vypočtena výtěžnost metody a relativní rozšířená spolehlivost. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 9.2.

Obsahy všech sledovaných pesticidů ve vzorcích ječmene a sladů byly pod mezí kvantifikace použité metody a nepřekročily maximální limity reziduí (viz tabulka 9.1) stanovené nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 396/2005. Z výsledků lze usuzovat, že v České republice jsou pesticidy pravděpodobně používány podle legislativy a jsou dodržovány ochranné lhůty. Lze tedy předpokládat, že ječmen vypěstovaný v České republice a z něj vyrobené slady jsou z hlediska obsahu reziduí pesticidů bezpečné a nepředstavují riziko pro spotřebitele. Přesto je nezbytné mít vhodnou analytickou metodu pro stanovení reziduí pesticidů, kterou lze využít pro průběžnou kontrolu kvality nejenom ječmene a sladů, ale i ostatních potravinářských komodit.

7. Literatura

- [1] ZIMOLKA, Josef. *Speciální produkce rostlinná - rostlinná výroba: (polní a zahradní plodiny, základy pícninářství)*. 2., nezměn. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2008. ISBN 978-80-7375-230-9.
- [2] Definitivní údaje o sklizni zemědělských plodin - 2021. *Český statistický úřad* [online]. Česká republika, 2022, 23.02.2022 [cit. 2022-05-06]. Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/definitivni-udaje-o-sklizni-zemedelskych-plodin-2021>
- [3] ŠNOBL, Josef a Josef PULKRÁBEK. *Základy rostlinné produkce*. Vyd. 2., přeprac. V Praze: Česká zemědělská univerzita, 2005. ISBN 978-80-213-1340-8.
- [4] BULKOVÁ, Věra. *Rostlinné potraviny*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a ne- lékařských zdravotnických oborů, 2011. ISBN 978-80-7013-532-7.
- [5] BASAŘOVÁ, Gabriela. *Sladařství: teorie a praxe výroby sladu*. Praha: Havlíček Brain Team, 2015. ISBN 978-80871109-47-2.
- [6] PRUGAR, Jaroslav. *Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský ve spolupráci s komisí jakosti rostlinných produktů ČAZV, 2008. ISBN 978-80-86576-28-2.
- [7] HORÁKOVÁ, Vladimíra a Olga DVOŘÁKOVÁ. *Obilniny 2021: Seznam doporučených odrůd 2020 pšenice ozimá, pšenice jarní, ječmen jarní, ječmen ozimý, tritikale ozimé, oves setý, přehled odrůd tritikale jarní, žito ozimé, oves nahý*. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. Národní odrůdový úřad, 2021. ISBN 978-80-7401-201-3. Dostupné také z: http://eagri.cz/public/web/file/677470/Obilniny_2021.pdf
- [8] DOLEŽAL, Ing. Stanislav. Novinky v ječmeni pro České pivo. *Agromanual.cz* [online]. Česká republika, 01.02.2022 [cit. 2022-05-06]. Dostupné z: <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/osivo-a-sadba-1/novinky-v-ječmeni-pro-ceske-pivo>
- [9] PELIKÁN, Miloš, Drahomír MÍŠA a František DUDÁŠ. *Technologie kvasného průmyslu*. 2. nezm. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2002. ISBN 80-715-7578-X.
- [10] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [11] POZDĚNA, Josef. Atlas chorob. In: *Agromanual.cz* [online]. [cit. 2022-05-06]. Dostupné z: <https://www.agromanual.cz/cz/atlas/choroby>
- [12] Vyhledávání v registru přípravků. *EAGRI: Registr přípravků na ochranu rostlin* [online]. Česká republika [cit. 2022-05-06]. Dostupné z: <https://eagri.cz/public/app/eagriapp/POR/Vyhledavani.aspx?type=0&vyhledat=A&stamp=1651789554653>

- [13] VERHOEF, Berry. *Velká encyklopedie piva*. Čestlice: Rebo Productions, 2003. ISBN 80-723-4283-5.
- [14] TAUFEROVÁ, Alexandra a Michaela PETRÁŠOVÁ. *Rostlinná produkce*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-716-9.
- [15] KIZLINK, Juraj. *Technologie chemických látek II.: zpracování ropy, paliva a petrochemie, chemické speciality, pesticidy, dezinfekční látky, tenzidy, plasty a kaučuk, aditiva a pomocné chemikálie, výbušniny, biotechnologie, organizace pro chemii*. Brno: Vysoké učení technické, 2001. ISBN 80-214-2013-8.
- [16] AHMED, Farid E. Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2001, **20**(11), 649-661. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/S0165-9936(01)00121-2
- [17] Spotřeba v jednotlivých letech: Spotřeba přípravků na ochranu rostlin a pomocných prostředků a spotřeba účinných látek obsažených v POR a PP v jednotlivých letech. *EAGRI: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský* [online]. Česká republika [cit. 2022-05-06]. Dostupné z: <https://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/pripravky-na-or/ucinne-latky-v-por-statistika-spotreba/spotreba-pripravku-na-or/spotreba-v-jednotlivych-letech>
- [18] MAHMOOD, Isra, Sameen Ruqia IMADI, Kanwal SHAZADI, Alvina GUL a Khalid Rehman HAKEEM. Effects of Pesticides on Environment. *Plant, Soil and Microbes: Implications in Crop Science*. Cham: Springer International Publishing, 2016, 2016-03-02, s. 253-269. ISBN 978-3-319-27453-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-27455-3_13
- [19] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin 2*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [20] NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1107/2009 ze dne 21. října 2009 o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh a o zrušení směrnic Rady 79/117/EHS a 91/414/EHS. In: *Úřední věstník Evropské unie*. 2009, svazek 52, L 309. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2009/1107/oj>
- [21] Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2009/128/ES ze dne 21. října 2009, kterou se stanoví rámec pro činnost Společenství za účelem dosažení udržitelného používání pesticidů. In: *Úřední věstník Evropské unie*. 2009, svazek 52, L 309. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX:32009L0128>
- [22] EU Pesticides database: Search Active substances, safeners and synergists. *European Commission* [online]. [cit. 2022-05-06]. Dostupné z: <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/active-substances/?event=search.as>
- [23] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) C. 396/2005 ze dne 23. února 2005 o maximálních limitech reziduí pesticidů v potravinách a krmivech rostlinného a živočišného původu a na jejich povrchu a o změně směrnice Rady 91/414/EHS. In: *Úřední věstník Evropské unie*. 2005, svazek 48, L 70. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32005R0396>

- [24] Nařízení Komise (EU) 2018/62 ze dne 17. ledna 2018, kterým se nahrazuje příloha I nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 396/2005. In: *Úřední věstník Evropské unie*. 2018, ročník 61, L 18. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32018R0062>
- [25] CARVALHO, Fernando P. Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security*. 2017, **6**(2), 48-60. ISSN 20483694. Dostupné z: doi:10.1002/fes3.108
- [26] AKTAR, Wasim, Dwaipayan SENGUPTA a Ashim CHOWDHURY. Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*. 2009, **2**(1), 1-12. ISSN 1337-9569. Dostupné z: doi:10.2478/v10102-009-0001-7
- [27] GAINES, Thomas B. Acute toxicity of pesticides. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1969, **14**(3), 515-534. ISSN 0041008X. Dostupné z: doi:10.1016/0041-008X(69)90013-1
- [28] DAMALAS, Christos A. a Ilias G. ELEFTHEROHORINOS. Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2011, **8**(5), 1402-1419. ISSN 1660-4601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph8051402
- [29] CRISP, T. M., E. D. CLEGG, R. L. COOPER, et al. Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. *Environmental Health Perspectives*. 1998, **106**(suppl 1), 11-56. ISSN 0091-6765. Dostupné z: doi:10.1289/ehp.98106s111
- [30] Prováděcí nařízení Komise (EU) č. 485/2013 ze dne 24. května 2013, kterým se mění prováděcí nařízení (EU) č. 540/2011, pokud jde o podmínky schválení účinných látek klothianidin, thiamethoxam a imidakloprid, a kterým se zakazuje použití a prodej osiva ošetřeného přípravky na ochranu rostlin obsahujícími uvedené účinné látky. In: *Úřední věstník Evropské unie*. 2013, svazek 56, L 139. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32013R0485>
- [31] SKOOG, Douglas A., Donald M. WEST, F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019. ISBN 978-80-7592-043-0.
- [32] ČÁSLAVSKÝ, Josef a Jiří Georg Kamil ŠEVČÍK. *Analýza organických látek: učební text projektu "Příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy": modul K02-2014*. Český Těšín: 2 THETA, 2014. Analytical standards and equipment. ISBN 978-80-260-7085-6.
- [33] Anastassiades, M., Lehotay, S. & Štajnbaher, D. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) approach for the determination of pesticide residues. (2003,1)
- [34] ANASTASSIADES, Michelangelo, Steven J LEHOTAY, Darinka ŠTAJNBAHER a Frank J SCHENCK. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 2003, **86**(2), 412-431. ISSN 1060-3271. Dostupné z: doi:10.1093/jaoac/86.2.412

- [35] MUSARURWA, Herbert, Luke CHIMUKA, Vusumzi Emmanuel PAKADE a Nikita Tawanda TAVENGWA. Recent developments and applications of QuEChERS based techniques on food samples during pesticide analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2019, **84**. ISSN 08891575. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2019.103314
- [36] LEHOTAY, Steven J, Mary O-NEIL, Josée TULLY, et al. Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 2007, **90**(2), 485-520. ISSN 1060-3271. Dostupné z: doi:10.1093/jaoac/90.2.485
- [37] REJCZAK, Tomasz a Tomasz TUZIMSKI. A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chemistry*. 2015, **13**(1), 980-1010. ISSN 2391-5420. Dostupné z: doi:10.1515/chem-2015-0109
- [38] ZÁRUBA, Kamil. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-950-1.
- [39] Stockholm convention. *Stockholm convention* [online]. Switzerland, 2019 [cit. 2022-05-06]. Dostupné z: <http://chm.pops.int>
- [40] FERREIRA, Jordana Alves, Joana Maria Santos FERREIRA, Viviane TALAMINI, et al. Determination of pesticides in coconut (*Cocos nucifera* Linn.) water and pulp using modified QuEChERS and LC—MS/MS. *Food Chemistry*. 2016, **213**, 616-624. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2016.06.114
- [41] BURGESS, Chris. *Valid analytical methods and procedures: A best practice approach to method selection, development and evaluation*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000. ISBN 978-1-84755-228-0.
- [42] HARVEY, David. *Modern analytical chemistry*. Boston: McGraw-Hill, 2000. ISBN 00-723-7547-7.
- [43] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [44] HARISCHANDRA NAIK, R, M S PALLAVI, K PAVAN KUMAR, et al. Determination of 72 Chemical Pesticides and Estimation of Measurement of Uncertainty in Rice Using LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Food Analytical Methods*. 2021, **14**(9), 1788-1805. ISSN 1936-9751. Dostupné z: doi:10.1007/s12161-021-02000-9
- [45] LI, Jianxun, Mengyuan SUN, Qiaoying CHANG, Xueyan HU, Jian KANG a Chunlin FAN. Determination of Pesticide Residues in Teas via QuEChERS Combined with Dispersive Liquid—Liquid Microextraction Followed by Gas Chromatography—Tandem Mass Spectrometry. *Chromatographia*. 2017, **80**(9), 1447-1458. ISSN 0009-5893. Dostupné z: doi:10.1007/s10337-017-3362-7
- [46] FAN, Sufang, Junmei MA, Meirong CAO, Juan WANG, Leilei ZHANG, Yan ZHANG, Qiang LI a Jia CHEN. Simultaneous determination of 15 pesticide residues in Chinese cabbage and cucumber by liquid chromatography-tandem mass spectrometry utilizing online turbulent flow chromatography. *Food Science and Human Wellness*. 2021, **10**(1), 78-86. ISSN 22134530. Dostupné z: doi:10.1016/j.fshw.2020.06.003

- [47] GALANI, Joseph, Michael HOUBRAKEN, Abukari WUMBEI, Joseph DJEUGAP, Daniel FOTIO a Pieter SPANOGHE. Evaluation of 99 Pesticide Residues in Major Agricultural Products from the Western Highlands Zone of Cameroon Using QuE-ChERS Method Extraction and LC-MS/MS and GC-ECD Analyses. *Foods*. 2018, **7**(11), 184-201. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods7110184
- [48] GEETA SINGH a SEEMA MISHRA. QuEChERS: A Microextraction Technique for Pesticide Residue Analysis in Food Commodities. *International Journal of Advanced Research in Science, Communication and Technology*. 2021, **12**(4), 438-443. ISSN 2581-9429. Dostupné z: doi:10.48175/IJARSCT-2441

8. Seznam použitých zkratek

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
ATM	atmosférický tlak
CI	chemická ionizace
C18	oktadecyl sorbent
DDT	1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan; dichlordifenyltrichlorethan
DON	deoxynivalenol
DLLME	disperzivní mikroextrakce kapalina-kapalina (dispersive liquid-liquid microextraction)
d-SPE	disperzní extrakce na pevné fázi
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority)
EI	elektronové ionizace
ESI	elektrosprej za atmosférického tlaku
EU	evropská unie
GCB	grafitizované uhlí (graphitized carbon black)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
CHZO	chráněné zeměpisné označení
ICP	indukčně vázané plazma
LC	kapalinová chromatografie
LC/MS	kapalinová chromatografie s detekcí pomocí hmotnostního spektrometru
MALDI	matricí asistovaná laserová ionizace
MF	mobilní fáze
MIT	technologie molekulárního otisk
MLR	maximální limit reziduí
MRM	monitorování vícenásobných reakcí (multiple reaction monitoring)

MS	hmotnostní spektrometrie
m/z	hmotnost/náboj
OC	organochloridové sloučeniny (organochlorines compounds)
ODS	oktadecylsilan
OP	organofosfátové sloučeniny (organophosphate compounds)
PCB	polychlorované bifenyly (polychlorinated biphenyls)
POP	perzistentní organické látky (persistent organic pollutant)
POR	přípravky na ochranu rostlin
PSA	primární-sekundární amin
QQQ	trojitý kvadrupól
QuEChERS	metoda rychlé, snadné, levné, efektivní, robustní a bezpečné extrakce (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)
RT	retenční čas
SF	stacionární fáze
SPE	extrakce na pevné fázi (Solid-phase extraction)
SPME	mikroextrakce na pevné fázi
tzn.	to znamená
UPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie (ultra Performance Liquid Chromatography)
USJ	ukazatel sladovnické jakosti
ÚKZÚS	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
ZEA	zearalenon
μ -SPE	extrakce na mikropevné fázi

9. Přílohy

Tabulka 9.1: *Seznam pesticidů, sledované ionty, MLR*

Název	Retenční čas [min]	Prekurzorový iont [m/z]	Kvantifikační iont [m/z]	Konformační iont [m/z]	MLR [mg·kg ⁻¹]
3 -Hydroxycarbofuran	5,3	238	163	181	0,01 (suma carbofuran)
Acephate	2,5	183,9	125	142,95	0,01
Acetamiprid	5,2	223	56,1	126	0,05
Acibenzolar-S-methyl	8,7	210,9	69	135,9	0,05
Aldicarb sulfone	3,4	223	86	148	0,02 (suma aldicarb)
Aldicarb sulfoxide	3,2	207	89	132	0,02 (suma aldicarb)
Ametryn	8,5	228,1	68,1	186,1	0,01
Aminocarb	4,5	209	137	152	není definováno
Azoxystrobin	8,5	404	329	372	1,5
Benalaxyl	10,3	326,1	91	148	0,05
Bendiocarb	7	224,1	109	167	0,01
Benzoximate	10,6	364	105	199,1	0,01
Boscalid	9,1	324,9	139,9	307	4
Bromuconazole	9,4	376	70,1	158,9	0,1
	10,5	376	70,1	158,9	
Bupirimate	9,8	317	108	166	0,05
Buprofezin	11,2	306,1	57,4	201	0,01
Butafenacil	9,6	492	180	331	není definováno
Butocarboxim	6	213	75	156	0,01
Butoxycarboxim	6	213	75	156	0,01
Carbaryl (sevin)	7,4	202,1	127,1	145,1	0,5
Carbendazim	100.0	4,9	192,1	132,1	2
Carbetamide	6,5	237	118	192	0,01

Tabulka 9.1: *Seznam pesticidů, sledované ionty, MLR*

Název	Retenční čas [min]	Prekurzorový iont [m/z]	Kvantifikační iont [m/z]	Konformační iont [m/z]	MLR [mg·kg ⁻¹]
Carbofuran	7,1	222,11	123	165,1	0,01 (suma carbofuran)
Carboxin	7,3	236	87	143	0,03
Carfentrazone ethyl	10,1	412	346	366	0,05
Clethodim	10,9	360	164	268,1	0,1
Clofentezine	10,5	303	102	138	0,02
Clothianidin	4,7	250	132	169	0,04
Cyazofamid	9,8	325	107,9	261	0,02
Cycluron	8,3	199	69,2	89,1	0,01
Cymoxanil	5,4	199,03	110,9	127,88	0,01
Cyproconazole	9,3	292,2	70,2	125,1	0,2
	9,5	292,2	70,2	125,1	
Cyprodinil	9,9	226	93	108	4
Desmedipham	8,4	301	136	182	0,01
Diclobutrazol	10,1	328	70	158,9	0,01
Diclotophos	4,7	238	112	193	0,01
Diethofencarb	8,8	268	124	226	0,01
Difenoconazole	10,8	406	111,1	251,1	0,3
Diflubenzuron	9,9	311,1	141,1	158,15	0,01
Dimethoate	5	230,1	125	199	0,02
Dimethomorph	9,1	388,1	165	300,9	0,1
	9,4	388,1	165	300,9	
Dimoxystrobin	10,1	327	116,1	205,2	0,01
Dinotefuran	2,1	203	113	129	0,01
Dioxacarb	5,1	224,1	123,1	167,1	0,01
Diuron	8,1	233	46,3	72,1	0,01
Epoxiconazole	9,7	330	101	121,04	1,5

Tabulka 9.1: *Seznam pesticidů, sledované ionty, MLR*

Název	Retenční čas [min]	Prekurzorový iont [m/z]	Kvantifikační iont [m/z]	Konformační iont [m/z]	MLR [mg·kg ⁻¹]
Eprinomectin	12,2	915,6	144	154; 186	není definováno
Etaconazole	9,7	328,1	159	205	není definováno
Ethiofencarb	7,6	226,1	107	164	0,01
Ethiprole	9,1	414,1	350,9	396,9	0,01
Ethirimol	7,1	210,1	98	140	0,05
Ethofumesate	8,9	287,1	121,1	259,1	0,03
Famoxadone	10,4	392,2	238	331,1	0,2
Fenamidone	9,1	312,1	92	236,1	0,01
Fenarimol	9,7	331	81	268	0,02
Fenbuconazole	9,9	337	70,1	125	0,2
Fenhexamid	9,6	301,97	55,18	97,12	0,01
Fenobucarb (BPMC)	8,8	208	94,9	152	0,01
Fenpropimorph	9,1	304,2	57,2	147,1	0,4
Fenpyroximate	11,8	422,2	138,1	366,1	0,01
Fenuron	4,8	222	150	165	0,01
Flonicamid	3,8	230,1	148,05	203,07	0,4
Flubendiamide	10,2	683	274	408	0,01
Fludioxonil	9,1	266,2	158,2	229,2	0,01
Flufenacet (fluthiamide)	9,7	364	152,1	194,1	0,1
Fluometuron	7,6	233,2	46,4	72,2	0,005
Fluoxastrobin	9,7	4590	188	427	0,5
Fluquinconazole	9,5	376	306,9	348,8	0,01
Flutolanil	9,2	324,1	65	262,1	0,01
Flutriafol	8,1	302,1	70,2	123,1	0,15
Forchlorfenuron	8,1	248,1	93	129	0,02
Formetanate HCl	3	222	46	165	0,01

Tabulka 9.1: *Seznam pesticidů, sledované ionty, MLR*

Název	Retenční čas [min]	Prekurzorový iont [m/z]	Kvantifikační iont [m/z]	Konformační iont [m/z]	MLR [mg·kg ⁻¹]
Fuberidazole	5,6	185	156	157	0,05
Hexaconazole	10,4	314	70,1	159	0,01
Hexythiazox	11,5	353	168,1	228,1	0,2
Chlorantraniliprole	8,3	481,6	283,9	450,9	0,02
Chlorotoluron	7,7	213	46	72	0,1
Chloroxuron	9,5	291,11	72,02	164,1	0,02
Imazalil	8,2	297	69	159	0,01
Imidacloprid	4,7	256,1	175,1	209,1	0,01
Ipconazole	10,9	334,2	70	125	0,01
Iprovalicarb	9,5	321,1	119,1	203,1	0,01
	9,6	321,1	119,1	203,1	
Isoprocarb	8	194,1	95,1	137,1	0,01
Isoproturon	8,1	207	47	72	0,01
Kresoxim methyl	10,1	314,1	116	131,2; 206	0,15
Linuron	8,8	249,1	160,1	182	0,01
Mandipropamid	9,3	411,8	125	328,1	0,01
Mefenacet	9,4	299	120	148	0,01
Metalaxyl	8,3	280,1	192,1	220,1	0,01
Metconazole	10,5	320,1	70	125	0,4
Methabenzthiazuron	7,9	222	150	165	0,01
Methamidophos	1,8	142	93,9	124,9	0,01
Methiocarb	8,9	226	121	169	0,1 (suma methiocarb)
Methomyl	3,8	163	88	106	0,01
Methoprotryne	8,6	272,2	170,2	198,2	0,01
Methoxyfenozide	9,3	369,2	149,1	313,23	0,01
Metobromuron	7,8	259,1	148,1	170	0,01

Tabulka 9.1: *Seznam pesticidů, sledované ionty, MLR*

Název	Retenční čas [min]	Prekurzorový iont [m/z]	Kvantifikační iont [m/z]	Konformační iont [m/z]	MLR [mg·kg ⁻¹]
Metribuzin	6,8	215	89	131	0,1
Mevinphos	5,2	225,1	127,1	193,1	0,01
	5,9	225,1	127,1	193,1	
Mexacarbate (Zectran)	7,3	223,2	151	166,1	není definováno
Monocrotophos	4,3	224,1	109	127,1	0,02
Monolinuron	7,4	215,04	99	126,01	0,01
Moxidectin	12,7	640,5	199	498,3; 528,4	není definováno
Myclobutanil	9,4	289,1	70,2	125,1	0,01
Neburon	10	275	57	88	0,01
Nitenpyram	3,7	271,1	125,9	224,9	0,01
Omethoate	2,9	214,1	125,1	183,1	0,02
Oxadixyl	6,6	279,1	132,21	218,96	0,01
Oxamyl	3,6	237	72	90	0,01
Paclobutrazol	9,2	294,1	70,2	125,1	0,01
Penconazole	10,2	284	70,1	159	0,01
Phenmedipham	8,6	301	136	168	0,01
Picoxystrobin	10	368	145,1	205,1	0,01
Pirimicarb	7,3	239,1	72	182,1	0,05
Prochloraz	10,4	375,84	70,12	265,86; 307,92	0,03
Promecarb	9,2	208,1	109	151	0,01
Prometryne	9,3	242	158	200,1	0,01
Propamocarb	3,2	189,1	102	144	0,01
Propham	7,8	180	120	138	0,01
Propiconazole (Tilt)	10,3	342	69	159	2
Propoxur (baygon)	7	210	93	111	0,05
Pymetrozine	3,8	218	79	105	0,05

Tabulka 9.1: *Seznam pesticidů, sledované ionty, MLR*

Název	Retenční čas [min]	Prekurzorový iont [m/z]	Kvantifikační iont [m/z]	Konformační iont [m/z]	MLR [mg·kg ⁻¹]
Pyraclostrobin	10,4	388,1	163	193,9	1
Pyrimethanil	8,6	200	82	107	0,05
Quinoxyfen	11,4	308	161,9	197	0,2
Rotenone	9,9	395	192,1	213,1	0,01
Secbumeton	8,1	226,2	100,2	170,2	0,01
Spiromesifen	11,7	371,1	255,1	273,1	0,02
Spiroxamine	9,2	298	100	144	0,05
	9,3	298	100	144	
Tebuconazole	10,2	308	70,1	125	2
Tebuthiuron	7,2	229	116	172	0,01
Temephos (Abate)	11,3	466,8	125	418,9	0,01
Terbumeton	8,3	226,1	114,1	170,1	0,01
Thiacloprid	5,7	253	90,1	126	0,9
Thiamethoxam	4	292	132	211,2	0,4
Thidiazuron	6,9	221	102	128	0,01
Triadimefon	9,3	294,1	69,3	197,2	0,01
Triadimenol	9,5	296,1	70,2	99,1	0,05
Tricyclazole (Beam)	6	190	136	163	0,01
Triflumizole	10,5	359	139,1	156,1	0,02
Triflumuron	10,5	359	139,1	156,1	0,01
Vamidotion (Vamidoate)	5,2	288	118	146	0,01

Tabulka 9.2: *Tabulka validačních parametrů*

Analyt	LOQ [ng·ml ⁻¹]	LOQ [mg·kg ⁻¹]	Rozmezí kalibrace [ng·ml ⁻¹]	Rozmezí kalibrace [mg·kg ⁻¹]	RSD [%]	výtěžnost [%]	MLR [mg·kg ⁻¹]
3-Hydroxycarbofuran	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	29	75,5	0,01 (suma carbofuran)
Acephate	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	8	53,8	0,01
Acetamiprid	1,00	0,020	1-500	0,02-10	27	74,2	0,05
Acibenzolar-S-methyl	1,00	0,020	1-500	0,02-10	41	74,2	0,05
Aldicarb sulfone	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	26	67,7	0,02 (suma aldicarb)
Aldicarb sulfoxide	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	23	61,4	0,02 (suma aldicarb)
Ametryn	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	37	72,3	0,01
Aminocarb	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	26	68,8	není definováno
Azoxystrobin	1,00	0,020	1-500	0,02-10	43	68,1	1,50
Benalaxyl	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	37	69,3	0,05
Bendiocarb	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	22	70,1	0,01
Benzoximate	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	44	78,5	0,01
Boscalid	1,00	0,020	1-500	0,02-10	41	75,8	4,00
Bromuconazole I	0,25	0,005	0,25-250	0,005-5	44	60,4	0,01
Bromuconazole II	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	41	59,9	
Bupirimate	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	50	70,7	0,05
Buprofezin	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	50	55,1	0,01
Butafenacil	1,00	0,020	1-500	0,02-10	51	61,9	není definováno
Butocarboxim	0,25	0,005	0,25-500	0,02-10	36	74,2	0,01
Butoxycarboxim	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	26	69,0	0,01
Carbaryl (sevin)	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	29	69,1	0,50
Carbendazim	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	25	62,2	2,00
Carbetamide	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	33	73,8	0,01
Carbofuran	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	29	68,2	0,01 (suma carbofuran)
Carboxin	1,00	0,020	1-500	0,02-10	32	69,2	0,03

Tabulka 9.2: *Tabulka validačních parametrů*

Analyt	LOQ [ng·ml ⁻¹]	LOQ [mg·kg ⁻¹]	Rozmezí kalibrace [ng·ml ⁻¹]	Rozmezí kalibrace [mg·kg ⁻¹]	RSD [%]	výtěžnost [%]	MLR [mg·kg ⁻¹]
Carfentrazone ethyl	2,50	0,050	2,5-500	0,05-10	69	64,3	0,05
Clethodim	1,00	0,020	1-250	0,02-5	45	64,7	0,10
Clofentezine	1,00	0,020	1-250	0,02-5	53	60,1	0,02
Clothianidin	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	29	72,0	0,04
Cyazofamid	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	47	75,9	0,02
Cycluron	0,25	0,005	0,25-250	0,005-5	31	71,8	0,01
Cymoxanil	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	28	72,2	0,01
Cyproconazole I	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	51	67,9	0,20
Cyproconazole II	1,00	0,020	1-500	0,02-10	41	63,6	
Cyprodinil	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	59	58,9	4,00
Desmedipham	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	46	67,1	0,01
Diclobutrazol	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	40	56,3	0,01
Diclotophos	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	26	68,9	0,01
Diethofencarb	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	46	89,8	0,01
Difenoconazole	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	61	65,3	0,30
Diffubenzuron	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	67	63,0	0,01
Dimethoate	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	25	76,1	0,02
Dimethomorph I	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	45	62,7	0,1
Dimethomorph II	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	50	66,3	
Dimoxystrobin	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	44	67,5	0,01
Dinotefuran	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	24	63,8	0,01
Dioxacarb	0,25	0,005	0,25-100	0,005-2	27	82,8	0,01
Diuron	0,25	0,005	0,25-250	0,005-5	32	62,7	0,01
Epoxiconazole	1,00	0,020	1-500	0,02-10	42	65,2	1,50
Eprinomectin	2,50	0,050	2,5-500	0,05-10	59	120,1	není definováno

Tabulka 9.2: *Tabulka validačních parametrů*

Analyt	LOQ [$ng \cdot ml^{-1}$]	LOQ [$mg \cdot kg^{-1}$]	Rozmezí kalibrace [$ng \cdot ml^{-1}$]	Rozmezí kalibrace [$mg \cdot kg^{-1}$]	RSD [%]	výtěžnost [%]	MLR [$mg \cdot kg^{-1}$]
Etaconazole	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	46	63,3	není definováno
Ethiofencarb	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	29	67,5	0,01
Ethiprole	0,25	0,005	0,25-250	0,005-5	35	60,9	0,01
Ethirimol	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	29	57,9	0,05
Ethofumesate	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	57	76,9	0,03
Famoxadone	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	69	71,7	0,20
Fenamidone	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	46	73,8	0,01
Fenarimol	2,50	0,050	2,5-500	0,05-10	48	52,2	0,02
Fenbuconazole	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	56	63,0	0,20
Fenhexamid	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	49	74,1	0,01
Fenobucarb (BPMC)	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	32	71,8	0,01
Fenpropimorph	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	56	69,9	0,40
Fenpyroximate	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	87	121,9	0,01
Fenuron	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	4	62,9	0,01
Flonicamid	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	26	77,8	0,40
Flubendiamide	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	43	71,3	0,01
Fludioxonil	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	50	88,1	0,01
Flufenacet (fluthiamide)	1,00	0,020	1-250	0,02-5	43	70,1	0,10
Fluomethuron	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	32	75,8	0,01
Fluoxastrobin	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	46	65,2	0,50
Fluquinconazole	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	54	61,3	0,01
Flutolanil	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	46	77,4	0,01
Flutriafol	1,00	0,020	1-500	0,02-10	41	65,9	0,15
Forchlorfenuron	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	35	70,0	0,02
Formetanate HCl	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	26	63,5	0,01

Tabulka 9.2: *Tabulka validačních parametrů*

Analyt	LOQ [$ng \cdot ml^{-1}$]	LOQ [$mg \cdot kg^{-1}$]	Rozmezí kalibrace [$ng \cdot ml^{-1}$]	Rozmezí kalibrace [$mg \cdot kg^{-1}$]	RSD [%]	výtěžnost [%]	MLR [$mg \cdot kg^{-1}$]
Fuberidazole	1,00	0,020	1-500	0,02-10	32	60,4	0,05
Hexaconazole	0,25	0,005	0,25-250	0,005-5	49	58,4	0,01
Hexythiazox	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	73	62,7	0,20
Chlorantraniliprole	1,00	0,020	1-500	0,02-10	55	59,6	0,02
Chlorotoluron	1,00	0,020	1-500	0,02-10	32	71,8	0,10
Chloroxuron	1,00	0,020	1-250	0,02-5	51	70,7	0,02
Imazalil	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	42	71,4	0,01
Imidacloprid	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	29	71,5	0,01
Ipconazole	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	46	57,3	0,01
Iprovalicarb I	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	37	69,4	0,01
Iprovalicarb II	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	39	71,0	
Isoprocarb	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	30	69,5	0,01
Isoproturon	0,25	0,005	0,25-100	0,005-2	31	69,2	0,01
Kresoxim methyl	0,25	0,005	0,25-250	0,005-5	44	63,1	0,15
Linuron	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	33	74,2	0,01
Mandipropamid	0,25	0,005	0,25-250	0,005-5	47	65,0	0,01
Mefenacet	5,00	0,100	5-500	0,1-10	40	56,9	0,01
Metalaxyl	0,25	0,005	0,25-250	0,005-5	32	68,3	0,01
Metconazole	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	46	57,2	0,40
Methabenzthiazuron	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	32	67,2	0,01
Methamidophos	0,25	0,005	0,25-250	0,005-5	14	51,4	0,01
Methiocarb	1,00	0,020	1-250	0,02-5	43	72,1	0,1 (suma methiocarb)
Methomyl	0,25	0,005	0,25-250	0,005-5	22	72,2	0,01
Methoprotryne	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	39	68,5	0,01
Methoxyfenozide	0,25	0,005	0,25-100	0,005-2	45	65,3	0,01

Tabulka 9.2: *Tabulka validačních parametrů*

Analyt	LOQ [ng·ml ⁻¹]	LOQ [mg·kg ⁻¹]	Rozmezí kalibrace [ng·ml ⁻¹]	Rozmezí kalibrace [mg·kg ⁻¹]	RSD [%]	výtěžnost [%]	MLR [mg·kg ⁻¹]
Metobromuron	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	33	68,5	0,01
Metribuzin	0,25	0,005	0,25-250	0,005-5	24	69,0	0,10
Mevinphos I	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	27	73,0	0,01
Mevinphos II	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	26	72,5	
Mexacarbate (Zectran)	1,00	0,020	1-250	0,02-5	32	62,5	není definováno
Monocrotophos	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	80	51,8	0,02
Monolinuron	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	30	72,6	0,01
Moxidectin	1,00	0,020	1-500	0,02-10	84	79,6	není definováno
Myclobutanil	0,25	0,005	0,25-250	0,005-5	44	72,6	0,01
Neburon	0,25	0,005	0,25-250	0,005-5	41	59,0	0,01
Nitenpyram	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	32	52,3	0,01
Omethoate	1,00	0,020	1-500	0,02-10	22	61,6	0,02
Oxadixyl	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	32	66,3	0,01
Oxamyl	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	26	68,3	0,01
Paclobutrazol	0,25	0,005	0,25-250	0,005-5	49	75,0	0,01
Penconazole	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	44	61,6	0,01
Phenmedipham	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	46	72,1	0,01
Picoxystrobin	0,25	0,005	0,25-250	0,005-5	50	67,8	0,01
Pirimicarb	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	29	73,8	0,05
Prochloraz	1,00	0,020	1-250	0,02-5	54	65,2	0,03
Promecarb	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	36	75,2	0,01
Prometryne	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	45	78,8	0,01
Propamocarb free base	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	23	56,2	0,01
Propham	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	35	62,2	0,01
Propiconazole (Tilt)	1,00	0,020	1-500	0,02-10	42	57,1	2,00

Tabulka 9.2: *Tabulka validačních parametrů*

Analyt	LOQ [ng·ml ⁻¹]	LOQ [mg·kg ⁻¹]	Rozmezí kalibrace [ng·ml ⁻¹]	Rozmezí kalibrace [mg·kg ⁻¹]	RSD [%]	výtěžnost [%]	MLR [mg·kg ⁻¹]
Propoxur (baygon)	1,00	0,020	1-100	0,02-2	27	71,0	0,05
Pymetrozine	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	30	75,2	0,05
Pyraclostrobin	2,50	0,050	2,5-250	0,005-5	59	68,0	1,00
Pyrimethanil	1,00	0,020	1-250	0,02-5	88	75,4	0,05
Quinoxyfen	0,25	0,005	0,25-100	0,005-2	70	58,2	0,20
Rotenone	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	44	75,0	0,01
Secbumeton	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	26	74,9	0,01
Spiromesifen	1,00	0,020	1-250	0,02-5	75	83,7	0,02
Spiroxamine I	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	44	89,7	0,05
Spiroxamine II	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	38	81,9	
Tebuconazole	1,00	0,020	1-500	0,02-10	34	67,4	2,00
Tebuthiuron	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	23	80,3	0,01
Temephos (Abate)	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	79	49,3	0,01
Terbumeton	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	29	71,9	0,01
Thiacloprid	2,50	0,050	2,5-500	0,05-10	25	72,7	0,90
Thiamethoxam	1,00	0,020	1-250	0,02-5	23	67,4	0,40
Thidiazuron	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	45	72,7	0,01
Triadimefon	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	65	77,0	0,01
Triadimenol	2,50	0,050	2,5-250	0,05-5	36	62,5	0,05
Tricyclazole (Beam)	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	26	59,8	0,01
Triflumizole	1,00	0,020	1-100	0,02-2	55	72,4	0,02
Triflumuron	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	31	59,5	0,01
Vamidotion (Vamidoate)	0,25	0,005	0,25-500	0,005-10	27	61,9	0,01