

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Analýza pesticidů v medu

Bakalářská práce

2022

Jana Prokopová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Jana Prokopová**
Osobní číslo: **C18102**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Analýza pesticidů v medu**
Téma práce anglicky: **Analysis of pesticides in honey**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Proveďte literární rešerši v souvislosti se zadaným tématem. Zaměřte se na popis pesticidů a jejich aplikací využívaných v českém zemědělství. Popište účinky pesticidů na včelu medonosnou. Text vhodně doplňte ilustračním materiálem (obrázky, schémata, tabulky).
2. Popište metody analýzy pesticidů v medu včetně úpravy vzorku.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Petra Kalendová, Ph.D.**
Katedra anorganické technologie

Datum zadání bakalářské práce: **7. února 2022**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Ing. Karel Ventura, CSc. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 21. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Analýza pesticidů v medu jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 29. 6. 2022

Jana Prokopová

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat vedoucí bakalářské práce paní Ing. Petře Kalendové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, vstřícnost a pomoc při tvorbě této práce.

ANOTACE

Práce se zabývá popisem, klasifikací, aplikací pesticidů a metodami jejich stanovení v medu. Dále jsou v práci uvedeny metody přípravy vzorku medu před analýzou a účinky pesticidů na člověka, životní prostředí a včelu medonosnou.

KLÍČOVÁ SLOVA

Pesticidy, včela medonosná, med, extrakce, kapalinová chromatografie, plynová chromatografie.

TITLE

Analysis of pesticides in honey

ANNOTATION

The thesis deals with the description, classification, application of pesticides and methods for their determination in honey. The methods of preparation of the honey sample before analysis and effects of pesticides on humans, the environment and the honey bee are also presented.

KEYWORDS

Pesticides, honeybee, honey, extraction, liquid chromatography, gas chromatography.

OBSAH

ÚVOD.....	10
1. MED.....	11
2. VČELA MEDONOSNÁ.....	12
3. PESTICIDY.....	14
3.1 Klasifikace pesticidů.....	14
3.1.1 Přírodní pesticidy.....	14
3.1.2 Syntetické pesticidy.....	14
3.1.3 Klasifikace podle cílového organismu.....	14
3.1.4 Klasifikace podle způsobu aplikace.....	15
3.1.5 Klasifikace podle způsobu působení.....	15
3.1.6 Klasifikace podle rozsahu účinku.....	16
3.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti pesticidů.....	16
3.2.1 Rozpustnost ve vodě.....	16
3.2.2 Rozdělovací koeficient oktanol-voda (K_{ow}).....	16
3.2.3 Disociační konstanta K_a	16
3.2.4 Biokoncentrační faktor BCF.....	16
3.2.5 Půdní adsorpční koeficient K_{OC}	17
3.3 Aplikace pesticidů.....	17
3.3.1 Aplikační formy pesticidů.....	17
3.3.2 Způsoby aplikace pesticidů.....	18
3.4 Toxicita pesticidů.....	18
4. ÚČINKY PESTICIDŮ.....	20
4.1 Pesticidy a lidské zdraví.....	20
4.2 Pesticidy a životní prostředí.....	20
4.3 Účinky pesticidů na včely.....	22
5. REZIDUA PESTICIDŮ.....	23
6. PESTICIDY VYUŽÍVANÉ V ČR.....	24
7. MOŽNOSTI STANOVENÍ PESTICIDŮ V MEDU.....	26
7.1 Příprava vzorku před analýzou.....	26
7.1.1 Extrakce kapalina – kapalina (LLE).....	26
7.1.2 Extrakce pevnou fází (SPE).....	27
7.1.3 Metoda QUECHERS.....	28

7.1.4	Miniaturizované techniky	29
7.2	Separace a detekce	35
7.2.1	Plynová chromatografie (GC).....	35
7.2.2	Kapalinová chromatografie (LC).....	37
8.	AKTUÁLNÍ TRENDY ANALÝZY PESTICIDŮ	41
9.	ZÁVĚR.....	43
10.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:.....	44

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: členové včelstva – dělnice, matka a trubec [28]	12
Obrázek 2: stavba těla včely [29]	13
Obrázek 3: Osud pesticidů v životním prostředí [31]	21
Obrázek 4: Dělicí nálevka [39]	27
Obrázek 5: Extrakce na pevné fázi [24]	28
Obrázek 6: Disperzní mikroextrakce kapalina – kapalina (DLLME) [42]	30
Obrázek 7: Umístění sorbentu (A), Mikroextrakce baleným sorbentem (MEPS) (B) [43] .	31
Obrázek 8: Mikroextrakce tuhou fází [24]	32
Obrázek 9: Magnetické míchadlo s adsorpční fází [45]	33
Obrázek 10: Přímé ponoření (DI)-SDME a headspace (HS)-SDME. [46]	34
Obrázek 11: Extrakce magnetickou tuhou fází (MSPE) [47]	34
Obrázek: 12: Schéma plynového chromatografu [24]	36
Obrázek 13: Schéma přístroje kapalinové chromatografie [30]	38
Obrázek 14: Postup TLC [24]	39
Obrázek 15: Způsoby vyvíjení mobilní fáze [24]	39
Tabulka 1: Účinné látky toxické pro včely [19]	22
Tabulka 2: Spotřeba účinných látek v ČR v letech 2018–2020 (kg) [32]	24
Tabulka 3: Přehled nejpoužívanějších účinných látek v ČR v roce 2007 a 2013, [33] . . .	25

ÚVOD

Pesticidy jsou přípravky, které se používají k tlumení chorob rostlin, hubení plevelů a škůdců a ochraně rostlin. Pesticidy mají schopnost ovlivnit základní procesy v živých organismech, díky tomu mohou ničit škodlivé činitele.

Používání pesticidů je v dnešní době prakticky nevyhnutelné. Používají se nejen k ochraně a zvýšení výnosů zemědělských plodin, ale ve značné míře i k nezemědělským účelům (údržba silnic, lesních nebo městských ploch). Pesticidy se do životního prostředí dostávají především přímou aplikací na půdu nebo při ošetření nadzemní části rostliny.

Cílem této práce je sepsání literární rešerše, která se zabývá pesticidy, jejich aplikací v českém zemědělství, účinky na včelu medonosnou a metodami jejich stanovení v medu.

Před analýzou pesticidů v medu je nutné provést úpravu vzorku. Pro úpravu vzorku medu před analýzou existuje celá řada metod. V současnosti se hojně využívá k úpravě vzorku metoda QuEChERS. K analýze pesticidů v upraveném vzorku medu se využívá metod plynové a kapalinové chromatografie. Všechny metody jsou popsány v této práci.

1. MED

Med je produkt přírodního původu, vyráběný z nektaru, medovice nebo sladkých rostlinných šťáv včelou medonosnou. Včela získává nektar, který přesune do medového sáčku, kde trávicí enzymy štěpí sacharózu na glukózu a fruktózu. Obsah naplněného medového sáčku předává dalším třem až čtyřem včelám, dokud nevzniká z nektaru surový med. Surový med dále včela vyplivne do plástve, kterou uzavře voskem, kde med dozrává a je následně odebírán [1,2].

Barva medu závisí na tom, zda včela použila k výrobě nektar nebo medovici. Med získaný z nektaru se nazývá med květový nebo také luční a je světlý. V případě, že k získání medu byla použita medovice, tak se med nazývá tmavý nebo lesní med a má velmi tmavě hnědou barvu. Jestliže včela sbírala nektar i medovici, tak vznikne med smíšený. Čím má med světlejší barvu, tím je chuťově jemnější. Medy tmavé barvy jsou ve většině případech aromatictější a mají zvláštní kořeněnou chuť. Když je med dlouho skladován, tak po nějaké době zkrystalizuje a tím velmi jeho barva zesvětlá (skoro až bílá) [3].

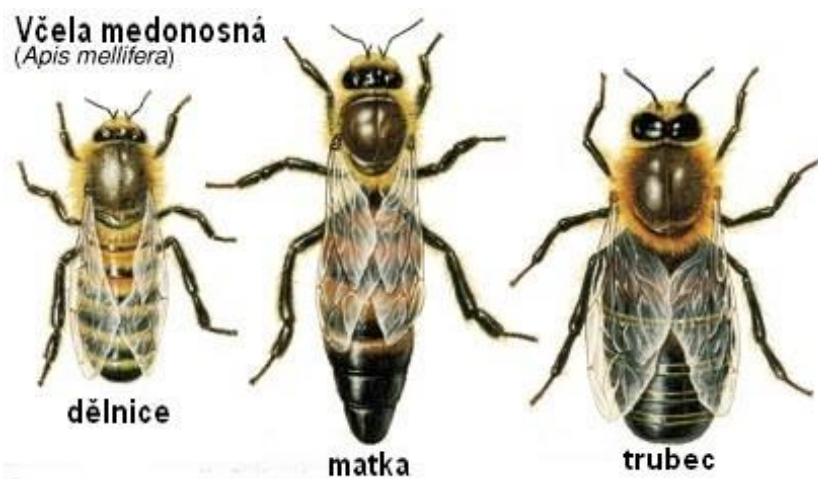
Díky svému složení je med znám také pod pojmem přesycený roztok cukru [4]. Složení medu je velmi proměnlivé, a to hlavně kvůli různorodosti nektaru, který včela použije k jeho výrobě. Sušina medu je z 90–95 % tvořena cukrem. Další složky jsou voda, organické kyseliny (kyselina octová, máselná, citronová), minerální látky (vápník, železo, zinek, draslík), enzymy (glukózooxidáza a kataláza), aminokyseliny a vitamíny (B1, B2, B3, B6, C) [1,2].

Med se využívá i jako léčivo. Při vnějším použití pomáhá rychleji uzdravit bodnutí hmyzem, rány, popáleniny a různá kožní onemocnění. Zapříčiňuje to osmotický vliv hroznového cukru, tím pádem se rychleji prokrví tkáň, vstřebává se vlhkost, čímž se vyplaví nečistoty, hnis a bakterie z rány. Při vnitřním použití je med spíše využíván jako prevence před nachlazením [3,4].

2. VČELA MEDONOSNÁ

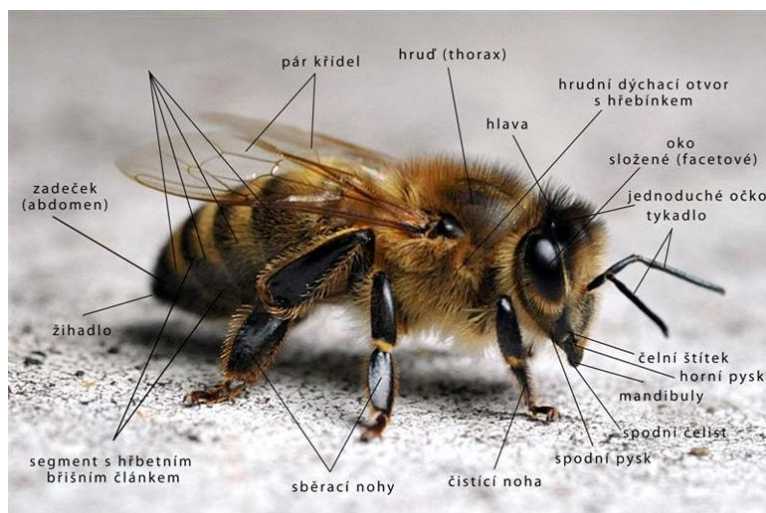
Včela medonosná patří k hmyzu společenskému, protože žije ve včelstvu. Včelstvo se skládá z několika druhů včel. Hlavním členem je matka neboli včelí královna, dále do včelstva patří dělnice a trubci [2,3].

Matka od včely dělnice je rozeznatelná na první pohled. Matka má značně větší zadeček a její hlavní úlohou je klást vajíčka. Její žihadlo nemá na konci háček, protože má žihadlo uzpůsobené k boji s jinou matkou, takže po bodnutí neumírá. Včela dělnice je menší než matka a nemá vyvinuté pohlavní orgány. Tyto včely tvoří nejpočetnější část včelstva. Má žihadlo, které je zakončené háčkem. Po bodnutí se tento háček zasekne například v kůži člověka, včela si vytrhne váček s jedem ze zadečku a následně umírá. Trubec je včelí sameček a jeho hlavní úlohou je oplodnit vajíčka nakladená matkou. Jsou větší a mohutnější než včely dělnice a nemají žihadlo (obrázek 1). Ve včelstvu žije pouze v letních měsících [2,3].



Obrázek 1: členové včelstva – dělňice, mamka a trubec [28]

Na obrázku 2 je znázorněna stavba těla včely medonosné. Včela medonosná patří mezi blanokřídlý hmyz a její tělo se skládá ze třech hlavních částí: hlava, hrud', zadeček a křídla [2,3].



Obrázek 2: stavba těla včely [29]

Hlavním včelím produktem je med, kterému je věnována předchozí kapitola. Další včelí produkty jsou propolis (pryskyřičná látka), vosk, mateří kašička a včelí jed. Tyto produkty se hojně využívají v lékařství a kosmetickém průmyslu [2,3].

3. PESTICIDY

Pesticidy jsou látky nebo směsi látek, které se používají k ochraně rostlin, potažmo plodů a krmiv před patogeny. V dnešní době jsou pesticidy nepostradatelnou součástí zemědělské výroby, používají se zejména v jarním a letním období [5,6]. Vlivu pesticidů podléhají veškeré složky biosféry-vzduch, půda, voda, rostliny i živočichové. Za jeden rok se ve světě použije téměř 3 miliardy kilogramů pesticidů. Tím, že jsou pesticidy takto hojně využívány, tak se zvyšuje výnosnost zemědělských produktů. Avšak nadměrné používání těchto látek vede k různým negativním účinkům na zdraví člověka, zvířata, půdu, ale i podzemní vodu [6].

3.1 Klasifikace pesticidů

Pesticidy lze obecně klasifikovat podle jejich původu, a to na přírodní nebo syntetické a dále podle cílového organismu [6].

3.1.1 Přírodní pesticidy

Jsou to pesticidy získané z přírodních zdrojů (rostliny, mikroby). Tyto pesticidy jsou netoxické pro savce a jsou v přírodě lehce odbouratelné. Nejčastěji využívané přírodní pesticidy: Glufosinát (produkovaný půdními bakteriemi *Streptomyces*), Leptospermon (izolován ze silice balmínu metlatého), Spinosad (nalezený v bakteriálním druhu *Saccharopolyspora spinosa*), Rotenon (vyskytuje se v kořenech rostlin, např. vinná réva), Sabadilla (obsažen v semenech tropické lilie) [6].

3.1.2 Syntetické pesticidy

Jedná se o celosvětově nejvyužívanější pesticidy. Tyto pesticidy jsou uměle vyráběné modifikací minerálů nebo chemických sloučenin. Syntetické pesticidy se dále dělí na organické a anorganické podle jejich chemické povahy [6].

3.1.3 Klasifikace podle cílového organismu

- Fungicidy – látky určené k hubení parazitních hub a plísní.
- Herbicidy – látky určené k hubení plevelů či nežádoucích rostlin.
- Insekticidy – látky určené k hubení hmyzu.
- Zoocidy – látky k hubení živočišných škůdců [5].
- Aficidy – prostředky určené k hubení mšic.
- Akaricidy – prostředky určené k hubení roztočů.

- Algicidy – prostředky určené k hubení řas.
- Avicidy – prostředky určené k hubení ptáků.
- Baktericidy – prostředky určené k hubení bakterií.
- Imagocidy – prostředky určené k hubení dospělého hmyzu.
- Larvicidy – prostředky určené k hubení larev.
- Moluskocidy – prostředky určené k hubení měkkýšů.
- Muscicidy – prostředky určené k hubení much.
- Nematocidy – prostředky určené k hubení červů.
- Ovicidy – látky působící na vajíčka škůdců.
- Pedikulicidy – prostředky určené k hubení vší.
- Piscicidy – prostředky určené k hubení ryb.
- Rodenticidy – prostředky určené k hubení hlodavců.
- Termiticidy – prostředky určené k hubení termitů [5].

3.1.4 Klasifikace podle způsobu aplikace

- Popraše (tuhé látky)
- Postřiky (kapaliny)
- Fumiganty (plyny nebo páry těkavých látek)
- Aerosoly [7]

3.1.5 Klasifikace podle způsobu působení

Kontaktní (dotykové) působící přímým stykem se škůdcem. Do této skupiny patří například rostlinné alkaloidy, pyrethroidy, organické sloučeniny chloru nebo fosforu. Požerové (perorální) způsobují otravu až při styku se zažívacím traktem živočicha. Jsou to především rotenticidy a některé insekticidy. Respirační pesticidy vnikají do těla respiračně nebo přes pokožku. Do této skupiny patří například kyanovodík, sirouhlík nebo kyselina chlorovodíková. Aplikují se formou plynování. Hloubkové (penetrační) pronikají do rostlinných orgánů jen v nejbližším okolí místa dopadu. Systémové pronikají do rostlinných orgánů nebo jsou nasávány společně s živným roztokem kořeny (převážně působí na žravý hmyz – mšice a housenky) [5].

3.1.6 Klasifikace podle rozsahu účinku

- Totální – hubí veškerou vegetaci. Jsou aplikovány na list a účinné látky jsou translokovány do stonků, oddenků a kořenů. Tím je rostlina totálně zničena.
- Širokospektré – mají široký rozsah účinku. Působí proti široké skupině plevelů a škůdců.
- Selektivní – působí proti úzké skupině plevelů (jednoděložné nebo dvouděložné rostliny) a škůdců. [8, 36].

3.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti pesticidů

Kvůli chemické odlišnosti mají pesticidy odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti. K predikci chování reziduí (zbytkové množství pesticidů, metabolitů pesticidů, rozkladné nebo rekční produkty) pesticidů v různých biologických systémech se využívají následující parametry [9].

3.2.1 Rozpustnost ve vodě

Sloučeniny, které se lépe rozpouštějí ve vodě jsou snáze biodegradovatelné. Tyto látky se také snadno odstraňují z povrchu rostlin omytím vodou (děšť, zalévání) a mohou se snadno dostávat do vodních toků nebo zdrojů pitné vody [9].

3.2.2 Rozdělovací koeficient oktanol-voda (K_{ow})

Rozdělovací koeficient oktanol-voda vyjadřuje afinitu rezidua k tukům. Látky s vysokou hodnotou K_{ow} (např. klasické organochlorové pesticidy) se hromadí v tukové složce živých organismů. Jako látky snadno rozpustné v tucích se považují sloučeniny s hodnotami pK_{ow} vyšší než 4 [9].

3.2.3 Disociační konstanta K_a

Disociační konstanta vyjadřuje schopnost látky disociovat za běžných podmínek ve vodním prostředí [9].

3.2.4 Biokoncentrační faktor BCF

Biokoncentrační faktor vyjadřuje míru přechodu rezidua pesticidu z vodného prostředí a biokoncentraci v určitém organismu. Udává se pro hydrofobní pesticidy a stanovuje se jako poměr rovnovážných koncentrací rezidua v organismu a vodě [9].

3.2.5 Půdní adsorpční koeficient K_{oc}

Půdní adsorpční koeficient udává schopnost pesticidu vázat se na půdní částice a tím charakterizuje míru perzistence (schopnost pesticidu přetrvávat v prostředí beze změny) rezidua v půdním prostředí [9].

3.3 Aplikace pesticidů

3.3.1 Aplikační formy pesticidů

Pesticidy se aplikují v různých formách. Používají se pevné, kapalné látky, aerosoly (směs kapalných nebo malých pevných částic v plynu – vznikne mlha nebo dým) nebo fumiganty (páry nebo plyny těkavých látek, například použití ve skleníku). Mezi pevné látky se řadí popraše, suchá mořidla, granuláty, tablety, nástrahy a insekticidní pásy. Popraše jsou jemné prášky, které obsahují spolu s účinnou látkou také nosnou látku, která je jemně mletá (například talek, křída, bentonit) a adheziva, což jsou látky, které zvyšují přilnavost. Tato forma aplikace se dříve hojně využívala, nyní je však na ústupu a využívá se jen zřídka. Granuláty mají obsaženou účinnou látku v malých, 1–2 mm velkých, tabletách, ze kterých se účinná látka postupně uvolňuje do půdy po aplikaci. Mořidla chrání osivo nebo sadbu před škůdci, aplikují se přímo na semeno nebo sazenici. Kapalné látky se dělí podle povahy roztoku na roztoky (koncentráty, které jsou před aplikací ředěny vodou a vzniká pravý roztok), emulze (emulgovatelný kapalný koncentrát je přidáván do vody), disperze a suspenze (práškový přípravek, který je obvykle rozpuštěn ve vodě). U postřiků je přípravek rozmíchán v určené koncentraci ve vodě. Tato forma aplikace se v dnešní době využívá nejvíce [10, 11].

Chemický přípravek se nanese přímo na kulturní rostlinu (formou postřiku). Tento způsob se především používá při aplikaci insekticidů, fungicidů a regulátoru růstu. Při aplikaci herbicidů nebo fungicidů se může účinná látka aplikovat kontaktní metodou. Některé herbicidy a zoocidy se vpravují přímo do půdy (v kapalné formě). Další možnou aplikací herbicidů je aplikace přípravku na povrch půdy. Fungicidní a insekticidní mořidla se nejčastěji nanášejí na povrch semen a sazenic. Další možné způsoby aplikace pesticidů jsou postřiky vodních ploch, vstřikování do půdy nebo pod vodní hladinu, naplnění uzavřených prostor výpary, plynem nebo dýmem. Použití chemických prostředků a návnad do oblasti pohybu škůdců [12].

3.3.2 Způsoby aplikace pesticidů

- Podle rozsahu: aplikace celoplošná, lokální, pásová, ohnisková, řádková, meziřádková, bodová.
- Podle časového rozvržení: aplikace jednorázová, opakovaná, dělená.
- Podle růstových fází plodin a plevelu: preemergentní a postemergentní aplikace.
 - Preemergentně aplikované herbicidy jsou z velké části přijímány kořeny rostliny. Většina těchto herbicidů působí na plevel jen ve fázi klíčení a vzcházení. U preemergentních aplikací je doporučeno aplikovat herbicid s vysokou dávkou vody (tím je na povrchu půdy vytvořen rovnoměrný herbicidní film). Aby byly tyto herbicidy účinné je nutné aplikovat herbicid do vlhké půdy. Do půdy se aplikují před vzklíčením semen plodiny.
 - Postemergentní aplikace jsou nejhojněji používané aplikace herbicidů (prováděné až po vzejití plodiny). Herbicidy jsou přijímány listy, kořeny nebo obojím současně. Tato aplikace herbicidů je nejefektivnější v časných růstových fázích plevelů, jelikož u starších rostlin jsou špatně přijímány a rozváděny účinné látky. Tyto herbicidy se aplikují v době, kdy je plodina již vzrostlá nebo vysázena.
- Podle období použití: během vegetačního období, v období vegetačního klidu [12].

3.4 Toxicita pesticidů

Pesticidy by měli co nejvíce působit proti cílovým organismům, a naopak co nejméně proti necílovým organismům. Toxicita pesticidu je charakterizována tzv. indexem toxicity LD₅₀ nebo LD₉₀. Index toxicity představuje dávku pesticidu, která usmrtí 50 % (90 %) testovaných zvířat při vstupu do těla různou cestou (orální, dermální, respirační) za určitou dobu [12].

Pesticidy lze rozdělit do následujících skupin podle toxicity pro člověka:

- Vysoce toxický (T+)
- Toxický (T)
- Zdraví škodlivý (Xn)
- Dráždivý (Xi)
- Žíravý (C) [12]

Zvláště se sleduje toxicita pesticidů na včely. Rozdělují se do tří skupin podle účinku:

- Přípravky pro včelu jedovaté, tyto přípravky se nesmějí aplikovat na rostliny, které včely opylovávají.
- Přípravky pro včelu škodlivé, nicméně při dodržení předepsané dávky nebo koncentrace se smějí aplikovat, ale pouze v případě, když včely nelétají (brzy ráno nebo večer).
- Přípravky pro včely téměř neškodné při dodržení předepsané dávky nebo koncentrace, které se mohou aplikovat i když včely létají [12].

4. ÚČINKY PESTICIDŮ

Přestože pesticidy mají kladné účinky v zemědělství, tvoří také zdravotní rizika pro člověka a životní prostředí [13]. Rozsáhlé aplikování pesticidů má nepříznivé účinky na všechny živé organismy, například v roce 1989 bylo uvedeno, že pyretroidy jsou velmi toxické pro ryby a dále bylo mnoha vědci poukázáno na to, že používání neonikotinoidů způsobuje úbytek populace včel. Toxikologické účinky pesticidů mohou vést k vyvolání oxidačního stresu, mitochondriální dysfunkce a stresu endoplazmatického retikula živých organismech. V Evropské unii je přísně řízen vývoj, distribuce a používání pesticidů podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009, k minimalizaci nepříznivého dopadu na lidské zdraví a životní prostředí [14].

4.1 Pesticidy a lidské zdraví

Pesticidy mohou způsobit různé zdravotní komplikace, jako například podráždění kůže, očí, nervové poruchy, poruchy imunitního systému a endokrinního systému. Dlouhodobé vystavení pesticidům například na pracovišti může vést k přechodné nebo trvalé změně imunitního systému. Tyto změny mohou zapříčinit například vznik rakoviny, zánětlivých onemocnění a u žen může docházet k samovolným potratům nebo dokonce k narození mrtvého dítěte [13, 15].

WHO (World Health Organization) rozděluje pesticidy do pěti tříd podle letální dávky:

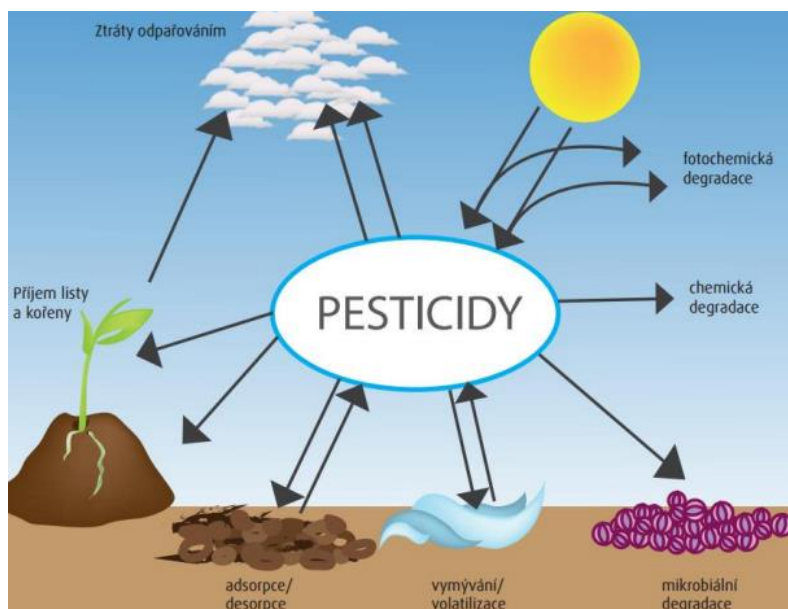
- extrémně nebezpečné ($LD_{50} < 5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)
- vysoce nebezpečné (LD_{50} od 5 do $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)
- mírně nebezpečné (LD_{50} od 50 do $500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)
- slabě nebezpečné ($LD_{50} > 500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)
- látky, které při normálním použití nepředstavují žádné riziko ($LD_{50} > 2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)

4.2 Pesticidy a životní prostředí

Pesticidy mají mimo jiné nepříznivé účinky i na životní prostředí (kontaminace vody, půdy a ovzduší nebo toxické účinky na necílové organismy). Osud pesticidů v životním prostředí je znázorněn na obrázku 3. Negativní účinky používání pesticidů jsou spojovány s:

- Účinky na necílové organismy (snížení populace některých prospěšných druhů).
- Kontaminací vody mobilními pesticidy nebo úletem pesticidů.
- Znečištěním ovzduší těkavými pesticidy.

- Poškození necílových rostlin.
- Poškození rotačních plodin vlivem reziduí pesticidů v zemi.
- Poškození plodin vlivem vysokých dávek, špatného načasování nebo nepříznivých podmínek při aplikaci [16].



Obrázek 3: Osud pesticidů v životním prostředí [31]

Chování pesticidů v životním prostředí ve značné míře závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech konkrétní sloučeniny. Fyzikálně-chemické vlastnosti pesticidů jsou popsány v kapitole 3.2. S osudem pesticidů v životním prostředí souvisí i perzistence reziduí pesticidů. Perzistence vyjadřuje poločas rozpadu, což je doba, za kterou obsah látky v prostředí klesne na polovinu. Na základě poločasu rozpadu se pesticidy rozdělují do 3 kategorií:

- Neperzistentní: poločas rozpadu je menší než 30 dnů (např. malathion)
- Středně perzistentní: poločas rozpadu je 30–100 dnů (např. benomyl)
- Vysoce perzistentní: poločas rozpadu je více než 100 dnů (např. prometon) [17]

Po aplikaci je půda prvním příjemcem pesticidů. V případě, kdy se látky pevně navážou na půdu, jedná se většinou o hydrofobní kationtové sloučeniny, které mohou tvořit dlouhodobě vázaná rezidua. Půdy jsou zdrojem znečištění podzemních vod (vlivem vyplavování rozpustných sloučenin a sloučenin vázaných na koloidy) a povrchových vod (odtok rozpustných sloučenin, sloučenin vázaných na koloidy a půdní částice). Při analýze vody jsou stále nacházeny i pesticidy, které jsou po mnoho let zakázané. Například se jedná o atrazin a simazin, které jsou v ČR zakázané od roku 2004 [18].

4.3 Účinky pesticidů na včely

Včela je považována za jeden z nejdůležitějších necílových organismů, který je vystaven nepříznivým účinkům pesticidů. Pesticidy, které souvisí s otravami včel, jsou chlorpyrifos, deltamethrin, cypermethrin a imidacloprid, které jsou vysoce toxické a prochloraz a thiakloprid, které jsou mírně toxické (tabulka 1).

Včela může být vystavena působení pesticidů různými způsoby. Jednou z možných cest je, kdy se pesticid aplikuje přímo na včelu a druhou je, že se kontaminované látky dostávají do úlu ve formě živin pro včelstvo. Pokud včela přijde do přímého kontaktu s aplikovanou látkou, může přímo na místě zahynout, to označujeme jako akutní toxický účinek. Ve druhém případě může být otráveno nepozorovaně celé včelstvo, což může mít za následek například to, že celé včelstvo zahyne, matka přestane klást vajíčka, larvy včel se budou špatně vyvíjet nebo včely budou méně odolné vůči svým přirozeným škůdcům (jejich imunitní systém je vlivem pesticidů poškozen). Tento typ expozice označujeme jako chronická expozice [19].

Tabulka 1: Účinné látky toxické pro včely [19]

Účinná látka	Typ pesticidu	Toxicita pro včelu
Acetamiprid	I	mírně toxický
Chlorpyrifos	I	vysoce toxický
Clothianidin	I	vysoce toxický
Dimoxystrobin	F	středně toxický
Imidacloprid	I	vysoce toxický
Kresoxim-methyl	F	mírně toxický
Prochloraz	F	mírně toxický
Tebukonazol	F	středně toxický
Thiakloprid	I	mírně toxický
Thiamethoxam	I	vysoce toxický
Cypermethrin	I	vysoce toxický
Deltamethrin	I	vysoce toxický
Fluvalinát	I	středně toxický

Legenda: I-insekticid F-fungicid

5. REZIDUA PESTICIDŮ

Aplikace prostředků na ochranu rostlin může zapříčinit výskyt reziduí pesticidů v potravinách. Ta se do potravin mohou dostávat přímo z ošetřených rostlin nebo nepřímo, kdy k přenosu dochází prostřednictvím krmiv nebo jejich opylovačů (maso, mléko, vejce, med), prostřednictvím půdy do dalších rostlin a jejich plodů nebo prostřednictvím vody a vzduchu. Výskyt reziduí pesticidů v potravinách představuje zdravotní rizika, o kterých je zmínka v předchozí kapitole 4.1 Pesticidy a lidské zdraví. Tato rizika musí být co nejvíce omezena, proto dochází k důsledné kontrole potravin a kontaminované potraviny se na trh neuvádějí [20].

V Evropské unii jsou stanoveny hodnoty maximálních limitů reziduí (MLR), což je nejvyšší přípustné množství pesticidů (vyjádřené v mg/kg) v potravinách a krmivech rostlinného a živočišného původu, nařízením č. 396/2005 pro vybrané pesticidní látky. Toto nařízení dále udává, pro jaké pesticidy není nutné stanovovat hodnoty MLR. Hodnoty MLR jsou překročeny až u 3 % vzorků potravin. U vzorků potravin dodávaných ze třetích zemí bývá překročení MRL detekováno nejvíce (6–8 % vzorků). Největší množství reziduí se vyskytuje v ovoci a zelenině. Naopak nejnižší množství reziduí se nachází v živočišných produktech. Konkrétně v medu jsou nejčastěji analyzována v nadlimitních koncentracích rezidua neonikotinoidových insekticidů (thiaklopid a acetamiprid) a fungicidu azoxystrobin [20].

6. PESTICIDY VYUŽÍVANÉ V ČR

V České republice se uplatňuje oznamovací systém v používání prostředků na ochranu rostlin. Fyzické i právnické osoby, které tyto prostředky používají k podnikání, musejí vést evidenci jejich použití a na vyžádání ÚKZÚZ (Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský) ji poskytnout [17,21]. V tabulce 2 je uvedena spotřeba účinných pesticidních látek v České republice za posledních několik let podle skupin. V tabulce 3 je znázorněn přehled nejpoužívanějších účinných látek v ČR v roce 2007 a 2013.

Tabulka 2: Spotřeba účinných látek v ČR v letech 2018–2020 (kg) [32]

Kategorie	2018	2019	2020
Zoocidy, mořidla	242 727	223 984	163 133
Herbicidy a desikanty	2 006 524	1 836 730	1 657 374
Fungicidy, mořidla	1 378 257	1 411 708	1 307 899
Regulátory růstu	519 270	480 049	402 141
Rodenticidy	3 582	5 078	13 849
Ostatní	238 147	231 993	239 800
Celkem	4 388 507	4 189 542	3 784 196

Tabulka 3: Přehled nejpoužívanějších účinných látek v ČR v roce 2007 a 2013, [33]

Spotřeba účinných látek				
	r. 2007	tuny	r. 2013	Tuny
1	Glyfosfát	1015	Glyfosfát	935
2	Chlormekvát-chlorid	522	Chlormekvát-chlorid	632
3	Acetochlor	280	Tebukonazol	179
4	Isoproturon	143	Chlorpyrifos	178
5	Alachlor	137	Prochloraz	177
6	Chlormekvát	135	Metazachlor	170
7	Mankozeb	130	Pendimethalin	124
8	Terbuthylazin	119	Pethoxamid	115
9	Chlorpyrifos	118	Terbutylazin	113
10	Metazachlor	113	Chlorotoluron	107
11	Chlorotoluron	110	Acetochlor	101
12	Trifluralin	106	Metamitron	94
13	MCPA	94	Isoproturon	94
14	Pendimethalin	86	Fenpropimorf	80
15	2,4-D	83	Mankozeb	74
16	Fenpropimorf	63	S-metachlor	69
17	Karbendazim	56	2,4-D	66
18	Dimethachlor	54	Ethefon	62
19	Prochloraz	53	Dimethenamid	59
20	Metamitron	50	Spiroxamin	56
21	Tebukonazol	49	Propikonazol	56
22	Thiram	49	Fenpropidin	51
23	S-metachlor	47	MCPA	49
24	Propikonazol	44	Azoxystrobin	48
25	Chloridazon	39	Epoxikonazol	47
26	Ethefon	37	Dimethachlor	44
27	Mekoprop-P	27	Chloridazon	43
28	Fenpropidin	27	Folpet	39
29	Phenmedifam	27	Třípanát-methyl	38
30	Flusilazol	25	Kaptan	37

7. MOŽNOSTI STANOVENÍ PESTICIDŮ V MEDU

Med je hojně konzumován kvůli nutričním a antimikrobiálním vlastnostem, zbytky pesticidů v něm obsažené vedou ke snížení jeho kvality, ale i k ohrožení lidského zdraví. Používání pesticidů se v posledních letech velmi rozšířilo, proto je stanovení pesticidů v medu velmi důležité. Mimo výše zmíněná rizika, mohou být pesticidy v medu indikátorem kontaminace životního prostředí. Při analýze pesticidů v medu je nutné použít zvlášť citlivé a selektivní techniky, protože jejich koncentrace je obvykle velmi nízká a lze indikovat i několik pesticidů současně [22].

Nejvýznamnějšími analytickými technikami, v souvislosti s analýzou pesticidů, se staly miniaturizované přístupy k přípravě vzorků a kapalinová nebo plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií. Stanovení pesticidů v potravinách vyžaduje nejprve úpravu vzorku s následnou separací a kvantifikaci. Při přípravě vzorků se nejhojněji využívá konvenčních technik, extrakce kapalinou, avšak při jejich aplikaci se ale používá značné množství organických rozpouštědel, ta mohou být toxická, mohou kontaminovat prostředí a jsou drahá. Na základě těchto omezení byly vyvinuty nové techniky (viz kapitola 7.1 Příprava vzorku před analýzou), při kterých je spotřeba organických rozpouštědel nízká a jsou schopny detekovat pesticidy i ve velmi nízkých koncentracích [22].

Mimo extrakce a čištění má obrovský význam volba separačního/detekčního přístupu [22]. Pro analýzu pesticidů v medu se využívá několik metod, které jsou specifické pro pesticid, pro třídu pesticidů nebo pro několik pesticidů (multiclass metoda). Důležitou poznámkou je, že kvalita výsledku je úzce spojena s vhodným výběrem analytické metody [22].

7.1 Příprava vzorku před analýzou

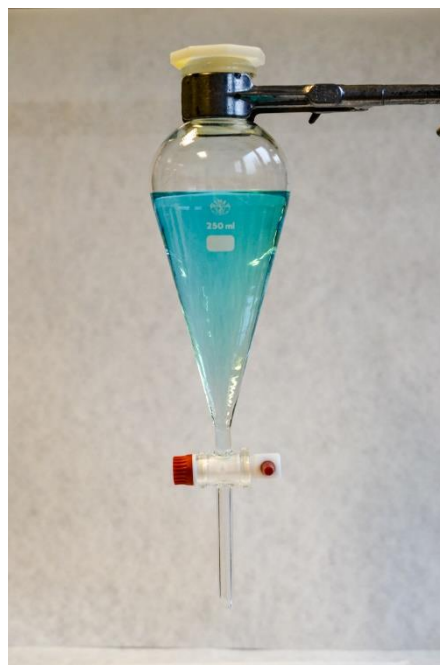
Příprava vzorku je velmi podstatným krokem analýzy. Obecně se řadí mezi nejnáročnější část celé analýzy, a to jak pracovní, tak i časově. Hlavní cíl přípravy vzorků je podpořit extrakci a obohacení analytů a co nejvíce odstranit interference [22].

7.1.1 Extrakce kapalina – kapalina (LLE)

Tato metoda umožňuje oddělit velké množství rušivé látky nebo izolovat stopové množství složky. Princip metody je založen na přechodu rozpuštěné látky z jedné kapalně fáze do druhé. Jestliže je použito vhodné extrakční činidlo, je LLE velmi účinnou separační metodou. Nejčastěji je jednou z fází používána voda (nebo vodný roztok), jako druhá fáze je používáno organické rozpouštědlo, které je s vodou nemísitelné. Rozpuštěná látka v jedné fázi přechází

při mísení fází do fáze druhé. Po ustanovení rovnováhy je poměr koncentrací rozpuštěné látky konstantní. LLE se nejčastěji provádí pomocí dělicích nálevek (obrázek 4) [37].

Nejpoužívanějšími organickými rozpouštědly jsou ethylacetát, acetonitril a methanol, mohou se ale používat i jiná. Poměr rozpouštědel a vodných roztoků má vliv na účinnost extrakce.



Obrázek 4: Dělicí nálevka [39]

Interference, například sacharidy a různé pigmenty, mohou být koextrahovány a mít vliv na výtěžnost pesticidů [22]. Tato metoda úpravy vzorku před analýzou má několik nevýhod, mezi ně patří tvorba emulzí nebo vysoká spotřeba organických rozpouštědel (při extrakci ve velkých objemech) [38].

7.1.2 Extrakce pevnou fází (SPE)

Extrakce pevnou fází je nejčastěji používanou technikou přípravy vzorku. SPE je založena na zachycení vybraných analytů na sorbentech a následnou elucí vhodnými rozpouštědly (obrázek 5) [22].

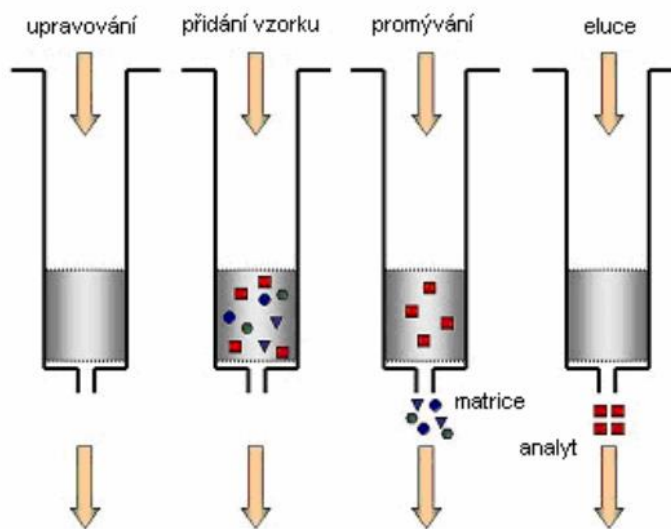
Klasické SPE sorbenty, jako jsou sorbenty na bázi oxidu křemičitého modifikované řetězci C8 nebo C18, postrádají selektivitu, protože analyty jsou zadržovány prostřednictvím nespecifických interakcí. Ostatní sloučeniny ve vzorku jsou tedy koextrahovány s cílovými analyty, což vede k významným matricovým efektům, zejména při použití kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Iontoměničové sorbenty mohou vykazovat selektivitu vůči iontovým analytům, pokud je zahrnut krok čištění [40].

Nejpoužívanějším sorbentem v SPE kolonkách pro čištění vzorků medu je křemičitan hořečnatý, ale mohou se používat i například oktadecylsilan, oktylsilan, silikagel, polydimethylsiloxan, polydivinylbenzen, monolitický oxid křemičitý, křemelina a primární či sekundární amin [22].

Jednotlivé kroky při SPE:

- Kondicionace – příprava kolonky na interakci složek vzorku se sorbentem.
- Aplikace vzorku
- Promytí
- Sušení – na vzduchu, inertním plynem.
- Eluce – desorpce analytů z pevné fáze [37].

Tato metoda je kombinací extrakce a čištění v jenom kroku, výsledkem je čistý extrakt, který lze okamžitě analyzovat metodou GC (plynová chromatografie) nebo LC (kapalinová chromatografie). Výhodou SPE je její jednoduchost, rychlost a nízká spotřeba rozpouštědla [22].



Obrázek 5: Extrakce na pevné fázi [24]

7.1.3 Metoda QUECHERS

QuEChERS, je zkratka pro Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (z angličtiny: rychlý, jednoduchý, levný, efektivní, robustní a bezpečný), je to metoda disperzní extrakce tuhou fází, která byla vyvinuta Anastassiadesem s kolektivem v roce 2003. Tato metoda se stala náhradou pro mnoho složitých analytických kroků. Jejím základem je používání síranu

hořečnatého (MgSO_4) a chloridu sodného (NaCl) na extrakci nebo separaci analytů vysolením a na disperzní extrakci na pevné fázi k čištění vzorků [22].

Již první verze metody měla skvělé výsledky pro mnoho pesticidů v různých matricích, následné testy odhalily, že stabilita nebo výtěžnost některých pesticidů je vyšší v závislosti na pH matrice. V případě medu, jsou časté změny typu rozpouštědla v extrakčním kroku (acetonitril, ethylacetát, methanol a aceton) a v množství vzorku (0,5–10 g).

Na základě analyzovaných pesticidů a vlastnostech vzorku se provedly změny v původním postupu QuEChERS. Jednou ze změn bylo přidání triethylaminu v acetonitrilu. Triethylamin byl vhodný pro stanovení pesticidů jako je klothianidin, thiamethoxam, imidakloprid a carbendazim, zlepšil se tvar píku, symetrie i rozlišení.

Další změnou byla výměna původního PSA sorbentu (slabý anexový sorbent, který se používá k extrakci silných kyselin a polykyselých sloučenin z vodných vzorků, který může být použit jako polární sorbent k extrakci polárních analytů z nevodných matric [41]) za C18 kolonky, které jsou schopné zachytit i imidaklopridový metabolit kyseliny 6-chlornikotinové. Při použití PSA se zadržovaly pesticidy, které obsahovaly skupiny karboxylových kyselin. Podle Kamela a kol. (2010) byla kyselina 6-chlornikotinová zcela neizolována, protože byla vázána na PSA [54]. K vyřešení tohoto problému bylo PSA nahrazeno kazetami C18 SPE, které umožňují extrakci tohoto metabolitu [22].

I přes hojné používání QuEChERS při analýze pesticidů v medu, má tato metoda nevýhody. Jednou z nich je, že vzorek by měl obsahovat více než 75 % vody, je tedy žádoucí, aby se vzorek medu rozpustil ve vodě, což vede ke snížení koncentrace v porovnání s ostatními technikami přípravy vzorku. Kvůli odstranění tohoto problému, se přidal krok odpařování, který byl vhodný pro stanovení organohalogenů, organofosforu, pyretroidů a regulátorů růstu hmyzu v medu [22].

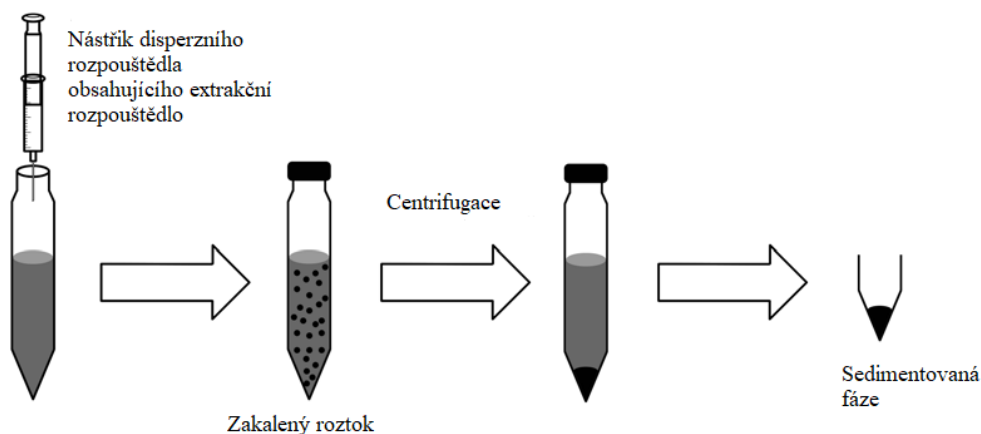
7.1.4 Miniaturizované techniky

7.1.4.1 Disperzní mikroextrakce kapalina – kapalina (DLLME)

Disperzní mikroextrakce kapalina–kapalina (DLLME) je jednoduchá a rychlá mikroextrakční technika založená na použití vhodného extrakčního činidla, tj. několika mikrolitrů organického rozpouštědla s vysokou hustotou, jako je tetrachlormetan, chloroform, sirouhlík, nitrobenzen, brombenzen, chlorbenzen nebo 1,2- dichlorbenzen a dispergačního rozpouštědla s vysokou mísitelností v extrakční i vodné fázi, jako je methanol, ethanol, acetonitril nebo aceton. Směs

extrakčního rozpouštědla a dispergačního rozpouštědla je rychle vstříkována do vzorku, to vede k tvorbě malých kapiček, které jsou rozptýleny ve vodném vzorku. Povaha emulgátoru (dispergační rozpouštědlo) může mít také vliv na distribuci velikosti kapiček, střední velikost kapiček a také na viskozitu emulze [22, 38].

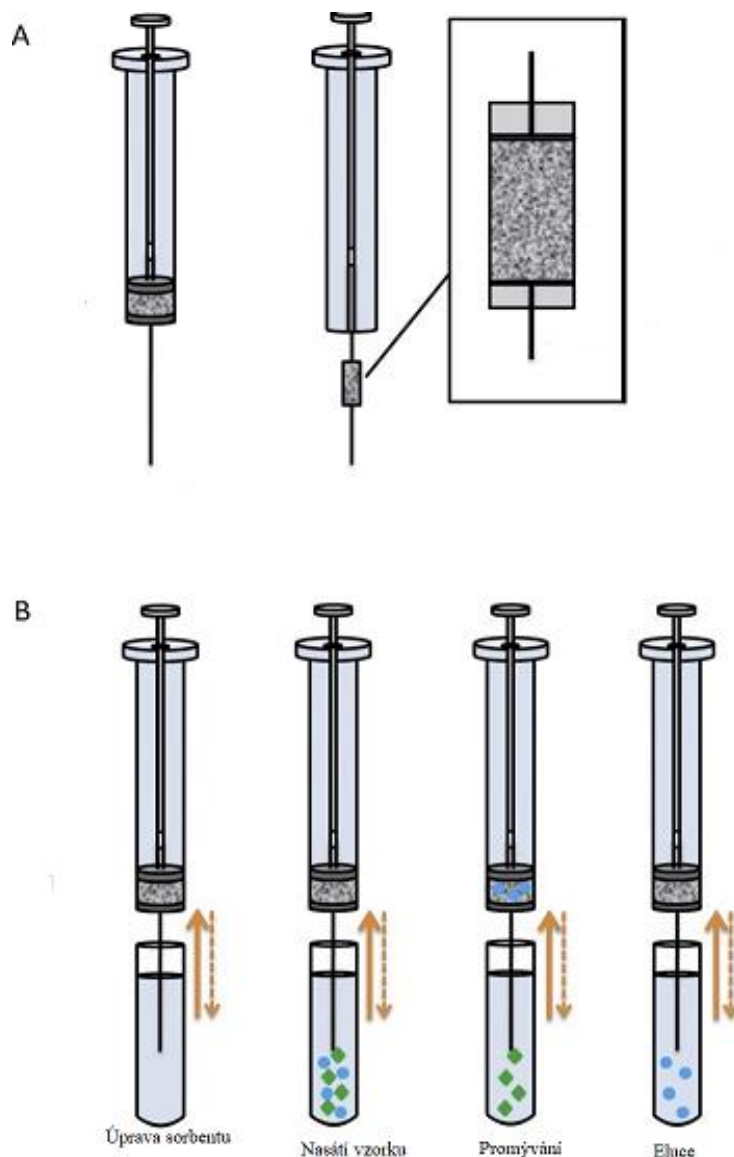
Disperze kapalina– kapalina hraje zásadní roli v separačních procesech a reakčních systémech. Je to proto, že velká plocha rozhraní díky disperzi usnadňuje přenos hmoty a rychlost reakce. Zákal je vytvořen ve vodné fázi díky jemné disperzi extrakčního činidla distribuovaného ve vodném vzorku, což je usnadněno disperzním rozpouštědlem. Po vytvoření zakaleného roztoku je povrch mezi extrakčním rozpouštědlem a vodným vzorkem velmi velký, takže rovnovážného stavu je dosaženo rychle, a proto je doba extrakce velmi krátká. To je hlavní výhoda DLLME. Po odstředění zakaleného roztoku je sedimentovaná fáze na dně kónické zkumavky izolována a analyzována nejvhodnější analytickou technikou [38]. Průběh DLLME je schematicky znázorněn na obrázku 6.



Obrázek 6: Disperzní mikroextrakce kapalina – kapalina (DLLME) [42]

7.1.4.2 Mikroextrakce baleným sorbentem (MEPS)

Tato metoda je založena na miniaturizaci metody SPE. Metodu MEPS je možné používat dvěma způsoby: sorbent je umístěn ve stříkačce a je oddělen dvěma polypropylenovými filtry anebo je možné sorbent umístit do malé nádoby, která se nachází mezi tělem stříkačky a jehlou (obrázek 7). MEPS se využívá s GC nebo LC. Sorbent musí být vybrán na základě vlastností stanovované látky. Běžně používané fáze jsou oxid křemičitý chemicky vázaný na C2, C8 a C18, katex s kyselinou benzensulfonovou, polymery (polystyrenové částice), molekulárně imprintované polymery (MIP) a monolitické organické sorbenty [22].



Obrázek 7: Umístění sorbentu (A), Mikroextrakce baleným sorbentem (MEPS) (B) [43]

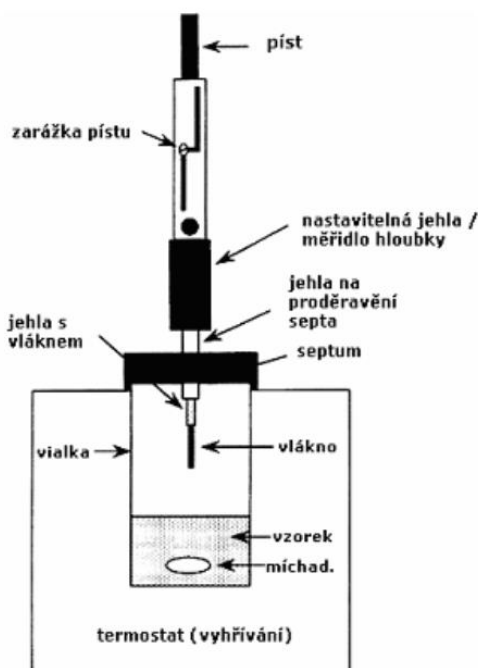
7.1.4.3 Mikroextrakce tuhou fází (SPME)

SPME se stala v současnosti jednou z nejúspěšnějších mikroextrakčních technik [38]. Mikroextrakce na pevné fázi je metoda, která kombinuje vzorkování a předkoncentraci v jediném kroku. Provádí se ponořením křemičitého vlákna potaženého stacionární fází do vodného vzorku [22].

SPME je technika mikroextrakce, kterou zavedli Arthur a Pawliszyn v roce 1990, kde se sorbent potažený vláknem z taveného oxidu křemičitého (který zapadá do jehly držáku SPME podobného injekční stříkačce) používá k extrakci a předkoncentraci cílových analytů ponořením vlákna do vzorku nebo vystavením vlákna do horního prostoru vzorku umístěného do uzavřené lahvičky (obrázek 8) [38]. Pro mikroextrakci lze použít jak

vysokomolekulární polymerní „kapaliny“, tak pevné sorbentové porézní materiály s velkým povrchem [22].

Po předem stanovené době mikroextrakce jsou analyty desorbovány z vlákna do analytického přístroje pro jejich stanovení. Desorpce analytů z vlákna může být tepelná nebo elucí organickými rozpouštědly [38].




Obrázek 8: Mikroextrakce tuhou fází [24]

7.1.4.4 Extrakce na magnetickém míchadle (SBSE)

Sorpční extrakce s míchadlem (SBSE) byla zavedena v roce 1999 jako metoda bezrozpouštědlové přípravy vzorků pro extrakci a obohacení organických sloučenin z vodných matric. SBSE je stále oblíbenější díky svému snadnému použití, vysoké citlivosti a reprodukovatelnosti [44].

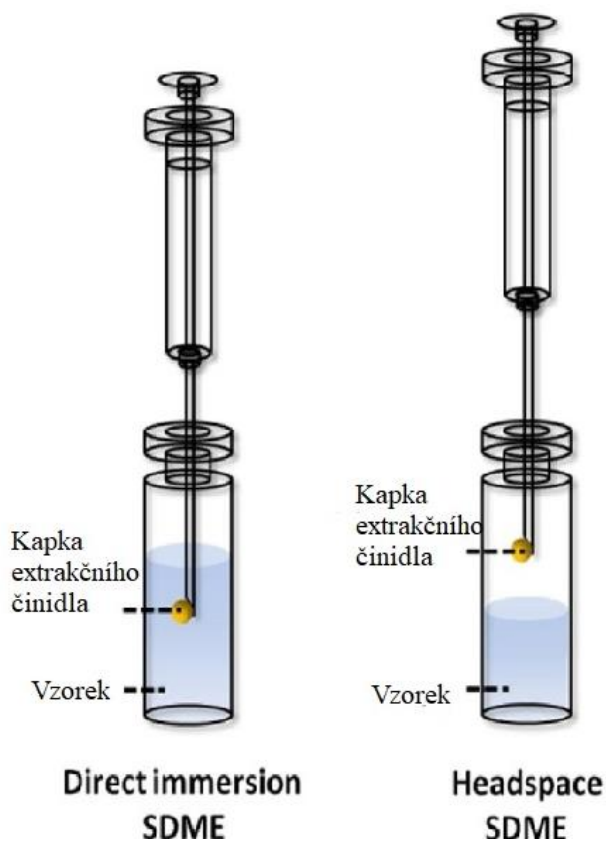
Metoda SBSE je založena na míchání vzorku míchadlem, které je potaženo sklem a adsorpční vrstvou (obrázek 9), po určitou dobu [45]. K obohacení analytu dochází během rozdělení mezi polymer a vodní fázi podle jejich distribuční konstanty a desorpce probíhá pomocí teploty injektoru (GC) nebo odstraněním kapaliny (LC). Tato metoda je hojně využívána díky vysokým výtěžkům a dobré reprodukovatelnosti [22].

	Standard PDMS Twister
	
Phase	Polydimethylsiloxane (PDMS)
Enrichment	Unspecific sorption of apolar compounds $\log(K_{ow}) > 4$. The polarity range can be extended by adding salt to the sample (salting out).
Application examples	Pesticides, PAHs and other contaminants in water PAHs in seafood (QuEChERS) 2,4,6-TCA and other off-odors in wine and water Flavors and off-flavors in food and beverages

Obrázek 9: Magnetické míchadlo s adsorpční fází [45]

7.1.4.5 Mikroextrakce na jedné kapce (SDME)

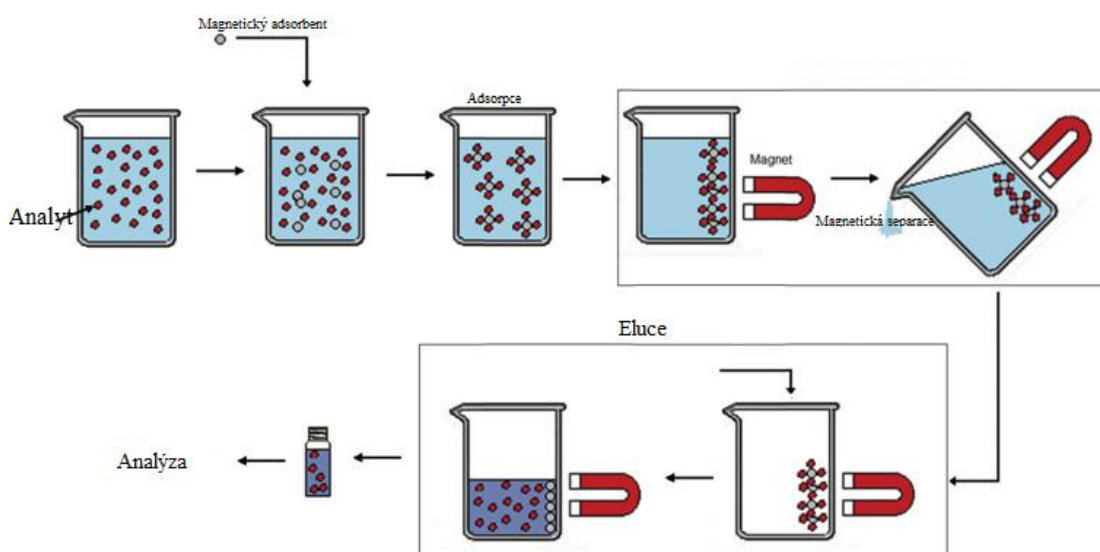
Techniky mikroextrakce jednou kapkou jsou účinnými přístupy k předúpravě vodných vzorků. Hlavní výhoda SDME spočívá v miniaturizaci procesu extrakce rozpouštědlem, čímž se minimalizují rizika spojená s používáním toxických organických rozpouštědel. Techniky SDME jsou tedy nákladově efektivní a méně škodlivé pro životní prostředí. V praxi lze pro provádění SDME použít dva hlavní přístupy – přímé ponoření (DI)-SDME a headspace (HS)-SDME (obrázek 10). SDME lze propojit s více nástroji pro separaci a detekci analytů, jako je HPLC, atomová absorpční spektrometrie, hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií, kapilární elektroforéza a GC [46].



Obrázek 10: Přímé ponoření (DI)-SDME a headspace (HS)-SDME. [46]

7.1.4.6 Extrakce magnetickou tuhou fází (MSPE)

Metoda je založena na využití magnetických nebo magnetizovatelných adsorbentů. Analyt je extrahován pomocí magnetického adsorbentu, který se přidá do roztoku. K regeneraci adsorbentu s adsorbovaným analytem je potřeba vhodný magnetický separátor. Analyt je poté eluován a zanalyzován. Sorbenty, které se používají v MSPE jsou magnetické nanočástice, Fe_3O_4 nebo $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ [22]. Postup MSPE je znázorněn na obrázku 11.



Obrázek 11: Extrakce magnetickou tuhou fází (MSPE) [47]

7.2 Separace a detekce

K separaci a detekci pesticidů v medu bylo použito několik analytických metod. Kvůli nízké koncentraci těchto sloučenin a složitosti matrice je nezbytné použití analytických technik, které poskytují vysokou selektivitu a citlivost. GC–EI–MS (Plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií s elektronovou ionizací) LC–ESI–MS/MS (kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií s elektrosprejem) jsou nejpoužívanější techniky pro multireziduální analýzu pesticidů ve včelích produktech. Volba separační techniky závisí většinou na vlastnostech pesticidů, které jsou předmětem zájmu. Těnkavé, polotěnkavé a tepelně nestabilní sloučeniny lze stanovit pomocí GC, zatímco netěnkavé a tepelně stabilní sloučeniny by měly být stanoveny pomocí LC [22].

7.2.1 Plynová chromatografie (GC)

Plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (MS) je považována za výkonnou techniku pro stanovení nízkých hladin kontaminantů v komplexních maticích. Proto se významně využívá pro stanovení pesticidů v medu [22].

GC je kombinována s dalšími různými detekčními systémy pro analýzu medu. Ačkoli je GC často uváděna jako nejúčinnější separační nástroj, vyžaduje derivatizační krok pro netěnkavé a tepelně nestabilní sloučeniny. To zavádí další manipulaci a reakci, která může potenciálně snížit reprodukovatelnost a rychlost výtěžnosti [22]. Plynová chromatografie se využívá pro kvalitativní a kvantitativní analýzu těnkavých látek. Velkou výhodou GC je, že analýza je rychlá, jednoduchá a k analýze je potřeba jen velmi malé množství vzorku [22].

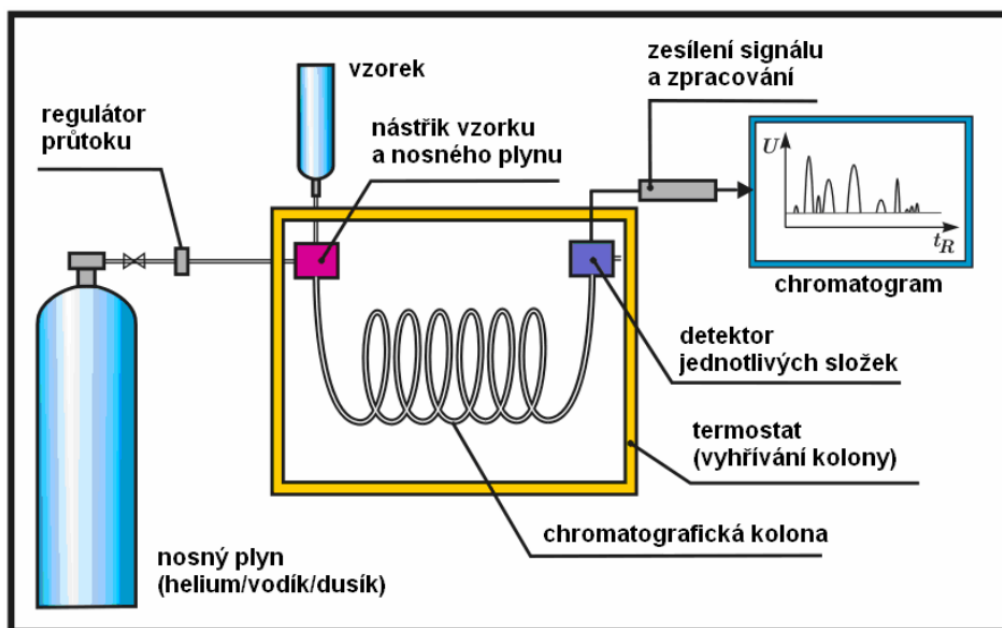
Volba GC kolony je velmi důležitým úkolem při analýze pesticidů. Stacionární fáze by měla být zvolena v závislosti na polaritě pesticidů. Pro analýzu pesticidů v medu se nejčastěji používají nepolární kolony (5 % fenyl, 95 % dimethylpolysiloxan). Kolony se v GC používají: náplňové (trubice s adsorbentem nebo nosičem se zakotvenou kapalnou fází – sklo, nerezová ocel) nebo kapilární (z křemenného skla, potaženy filmem polyimidu) [25].

Mobilní fáze je tvořena nosným plynem, nejvíce používané jsou inertní plyny (helium, argon, vodík, dusík). Pro volbu mobilní fáze se zohledňují tyto faktory: viskozita, účinnost, reaktivita, čistota, typ používaného detektoru a cena plynu. Průtok mobilní fáze musí být takový, aby bylo dosaženo co nejefektivnějšího rozdělení látek na koloně [22].

V minulosti byla GC–MS nejrozšířenější technikou k analýze reziduí v potravinách ve srovnání s LC–MS. HPLC byla nejúspěšněji aplikována na analýzu tepelně nestabilních pesticidů. Dnes

používané pesticidy jsou však polárnější, tepelně nestabilní nebo se snadno odpařují, proto je dnes vhodnější analýza kapalinovou chromatografií [22].

Na obrázku 12 je znázorněno schéma plynového chromatografu. Analyzovaná látka je vstříknuta do nástřikového prostoru, zplyněna a následně unášena mobilní fází do kolony se stacionární fází. Složky analyzované směsi jsou indikovány detektorem a následně vyhodnocovány počítačem.



Obrázek: 12: Schéma plynového chromatografu [24]

7.2.1.1 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS)

V posledních desetiletích se metody pro stanovení stopových hladin pesticidů značně změnily. Od počátku 70. let byla většina rutinních analýz reziduí pesticidů prováděna plynovou chromatografií v kombinaci s elektronovým záchytem nebo plamenovou fotometrickou detekcí. V dnešní době lze pomocí GC kombinované s MS získat současné stanovení a potvrzení reziduí pesticidů jedním přístrojem v jednom analytickém cyklu. Ve většině případů je citlivost získaná pomocí GC/MS podobná jako u klasických GC detektorů. Selektivitu GC/MS lze upravit výběrem vhodných molekulárních a fragmentových iontů, aby se zabránilo interferencím ze společně extrahovaných materiálů ve vzorku. Proto se používání GC s detekcí ECD (detektor elektronového záchyty), NPD (dusíko-fosforový detektor) nebo FPD (plamenový fotometrický detektor) v laboratořích při analýze reziduí pesticidů omezilo [26].

Ve srovnání s kapalinovou chromatografií propojenou s hmotnostní spektrometrií (LC/MS) představuje GC/MS několik výhod, vyšší chromatografické rozlišení, vyšší kapacitu píku a použití jedné mobilní fáze (helium nebo vodík) [27].

Ionizaci pesticidů v GC/MS lze provádět pomocí elektronové ionizace (EI) anebo chemické ionizace (CI) v pozitivním a negativním módu. Kromě toho jsou k dispozici systémy GC–MS s kvadrupólovou iontovou pastí, analyzátozem doby letu (TOF) nebo tandemové hmotnostní spektrometry.

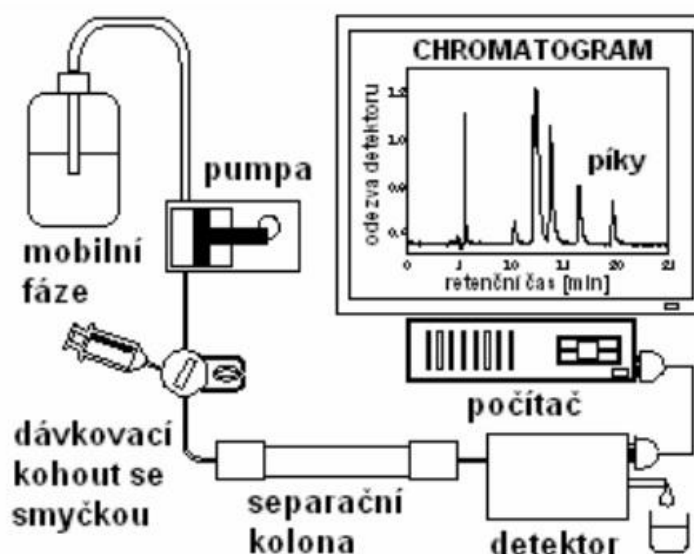
Chemická ionizace se používá mnohem méně, nicméně CI/MS v pozitivním i negativním módu poskytuje lepší selektivitu pro několik pesticidů ve srovnání s EI. Výsledkem jsou chromatogramy se sníženou interferencí matrice. Intenzita signálu různých pesticidů se však liší mnohem více ve srovnání s EI. GC/MS s chemickou ionizací je přednostně zaměřena pouze na speciální třídy látek, např. organohalogenové pesticidy a organofosfáty. [26].

7.2.2 Kapalinová chromatografie (LC)

Kapalinová chromatografie (obrázek 13) se také široce používá k analýze pesticidů v medu, zejména pro tepelně labilní sloučeniny. Nejvhodnějším a nejpoužívanějším detektorem pro tento druh analýzy je hmotnostní spektrometr, ale jsou využívány i jiné typy detektorů. Tyto jiné typy detektorů se však obecně používají k analýze pouze několika málo pesticidů nebo několika tříd pesticidů [22].

Tandemová hmotnostní spektrometrie spojená s kapalinovou chromatografií umožňuje detekci pesticidů v nízkých koncentracích v komplexních maticích. Tento systém zlepšuje citlivost, snižuje maticové interference a přidává strukturální informace [22].

Mobilní fází u kapalinové chromatografie je kapalina. O separaci složek vzorku rozhodují jejich interakce se stacionární fází, ale i druh mobilní fáze. Při LC se využívají různé mechanismy separace (adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, molekulově síťový efekt). V LC je nižší příspěvek molekulární difúze složky než v GC, protože kapalina má vyšší viskozitu než plyn. Na základě uspořádání stacionární fáze rozlišujeme kolonovou, tenkovrstvou nebo papírovou LC [22].

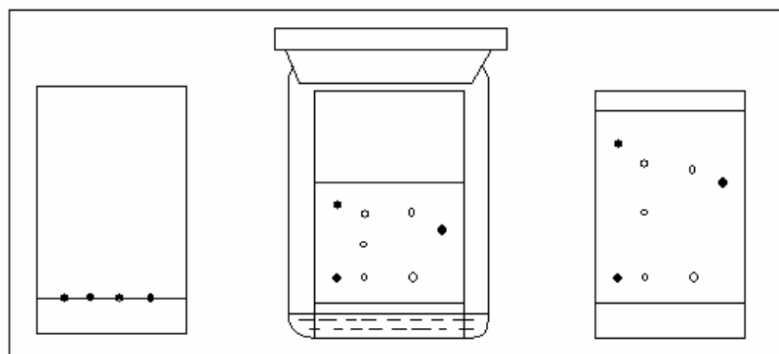


Obrázek 13: Schéma přístroje kapalinové chromatografie [30]

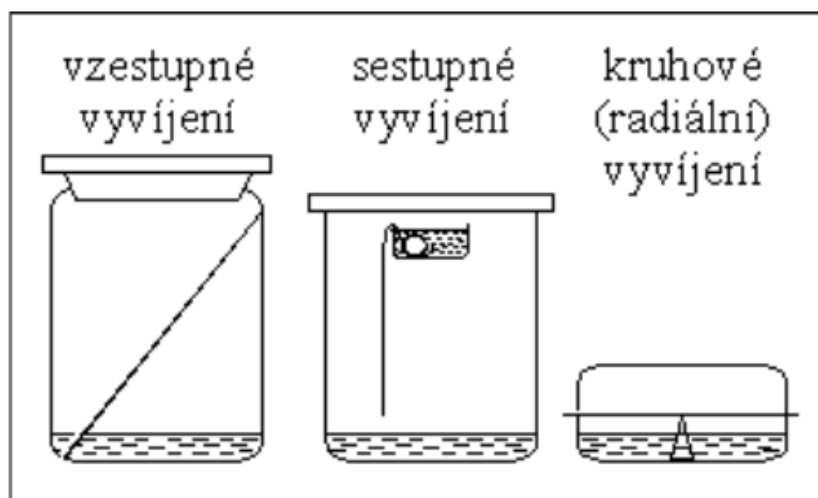
7.2.2.1 Papírová chromatografie (PC) a chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Stacionární fáze TLC může být ve formě kapaliny, která je zakotvená na tenké vrstvě v adsorbentu. V PC je stacionární fází kapalina, která je zakotvená na chromatografickém papíru. V PC i TLC je mobilní fází kapalina. Jako mobilní fáze se často používá cyklohexan, isopropanol, aceton, voda, toluen a další. Jako konkrétní stacionární fáze se může v TLC používat silikagel, oxid hlinitý, iontoměnič a další. Podložní materiál pro stacionární fázi se využívá skleněná deska nebo hliníková folie [34].

Obě metody jsou realizovány stejným způsobem. Na tenkou vrstvu nebo chromatografický papír je aplikována kapka analyzovaného vzorku. Poté je tenká vrstva (nebo chromatografický papír) jedním koncem ponořena do mobilní fáze tak hluboko, aby kapky analyzované látky zůstaly nad hladinou mobilní fáze. Mobilní fáze začne prosakovat tenkou vrstvou, zároveň dochází k transportu a dělení analyzovaného vzorku. Konec analýzy je tehdy, kdy mobilní fáze dorazí do blízkosti druhého konce tenké vrstvy. Tenká vrstva je vysušena, poté jsou na ní patrné skvrny jednotlivých složek vzorku v různé vzdálenosti od počátku (chromatogram) [34]. Jestliže nejsou analyzované látky viditelné po vyvíjení mobilní fází, skvrny je nutné zviditelnit. Ke zviditelnění skvrn jsou využívány postřiky činidly, UV záření, fluorescence [49]. Tento postup chromatografie je znázorněn na obrázku 14. Obrázek 15 znázorňuje možné způsoby vyvíjení mobilní fáze.



Obrázek 14: Postup TLC [24]



Obrázek 15: Způsoby vyvíjení mobilní fáze [24]

7.2.2.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC je metoda založená na distribuci látek mezi stacionární a mobilní fází. Stacionární fází je tuhá látka nebo kapalina, která je ukotvena na tuhém nosiči, zatímco mobilní fáze je výhradně tvořena tekutinou. Stacionární fáze je umístěna v chromatografických kolonách, kterými protéká mobilní fáze, hnaná pomocí vysokotlakého čerpadla. Na fázovém rozhraní mezi stacionární a mobilní fází dochází opakovaně k sorpci a desorpci stanovovaných látek [50]. V HPLC se používají stacionární fáze s obsahem malých částic pravidelného tvaru a stejné velikosti, homogenně vyplňující kolonu. Díky těmto vlastnostem dosahuje velmi vysoké účinnosti. Mobilní fáze protéká za působení vysokého tlaku (jednotky až desítky MPa), díky tomu bývá tato metoda často nazývána vysokotlaká kapalinová chromatografie [35]. Vzorku se dává velmi malé množství (mikrolitry), proto jsou k detekci nutné velmi citlivé detektory, umožňující kontinuální sledování složek na výstupu z kolony. Signál detektoru je zpracováván počítačem [35].

Hlavní výhoda HPLC je její velká oblast použitelnosti: analýza iontů, polárních i nepolárních látek, málo těkavé, tepelně stabilní i vysokomolekulární látky. Jako další výhodu můžeme řadit možnost ovlivnění separace složením mobilní fáze, která se podílí na separaci. Nevýhoda je náročná instrumentace HPLC a složitý mechanismus separace na rozdíl od GC. Detektory používané v HPLC: spektrometrický, fluorimetrický, refraktometrický, hmotnostní, elektrochemický [35].

8. AKTUÁLNÍ TRENDY ANALÝZY PESTICIDŮ

Ve studii Hvězdová a kol. (2018) bylo analyzováno 75 orných půd z ČR. Ve vzorcích půd byla prokázána přítomnost 53 pesticidů a 15 transformačních produktů. Z analyzovaných látek se v půdách nejčastěji vyskytovaly triazinové herbicidy a konazolové fungicidy, chloracetanilidové herbicidy, fenpropidin a diflufenican. Na vzorcích půdy byl proveden extrakční postup založený na metodě QuEChERS (viz kapitola 7.1 Příprava vzorku před analýzou). Následně byly extrakty analyzovány kapalinovou chromatografií spojenou s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). V této studii bylo zjištěno, že orné půdy často obsahují mnohočetná rezidua pesticidů ve znatelném množství několik měsíců po poslední možné aplikaci [18].

Ve studii Hamidreza Ardalani (2021) byl zkoumán vliv quercetinu na obsah tří pesticidů u včel: imidaklopid (insekticid), tebukonazol (fungicid) a tau-fluvalinát (insekticid a akaricid). Quercetin je jednou z nejrozšířenějších fytochemikálií v rostlinách, proto je hojně zastoupen ve stravě včel. V této studii byly včely rozděleny do dvou hlavních skupin a krmeny buď quercetin-sacharózovou pastou nebo pouze sacharózou po dobu 72 hodin. Poté byly orálně vystaveny imidaklopidu nebo kontaktně vystaveny tau-fluvalinátu nebo tebukonazolu. Po 1 hodině orální expozice nebo 24 hodinách kontaktní expozice byly včely uspány CO₂, usmrceny zmrazením a extrahovány metodou QuEChERS. Následně byly stanoveny koncentrace tří pesticidů a quercetinu ve včelách pomocí tandemové HPLC/MS. HPLC. U včel krmených quercetinem nebyl pozorován žádný významný vliv na koncentraci tebukonazolu nebo tau-fluvalinátu. V tělech včel, které byly vystaveny imidaklopidu bylo patrné snížení koncentrace tohoto pesticidu. Výsledky této studie podporují hypotézu, že quercetin zvyšuje metabolizaci imidaklopidu. [51].

Ve studii Kadlíkové a kolektivu (2021) byly porovnávány pesticidy nalezené u mrtvých/umírajících včel. Kromě mrtvých nebo umírajících včel byly analyzovány živé včely a včelí chléb odebraný z plodového plástu pro určení kontaminace v úlu. Vzorky odebrané z úlů i včely byly extrahovány metodou QuEChERS a následně zanalyzovány pomocí tandemové HPLC/MS. Nejvýznamnějšími pesticidy souvisejícími s otravami byly vysoce toxický chlorpyrifos, deltamethrin, cypermethrin a imidaclopid a mírně toxický prochloraz a thiaklopid. Téměř všechny případy otrav byly vyšetřovány v souvislosti s řepkou [52].

Ve studii Roszko a kolektivu (2016) se zabývali zhodnocením přítomnosti vybraných persistentních organických polutantů a reziduí pesticidů ve včelím pylu. Rezidua pesticidů byla

identifikována v 60 % testovaných vzorků včelího pylu. Identifikované sloučeniny byly převážně aktivními složkami fungicidních přípravků. Nejčastěji se vyskytujícími pesticidy v pylu byly triazolový fungicid tebuconazol, prothiokonazol a neonikotinoidní insekticid thiaklopid. Nejvyšší koncentrace pesticidu byla stanovena pro prothiokonazol. Pro stanovení výše zmíněných pesticidů byla použita metoda GC/MS. Maximální limity reziduí stanovené předpisy EU pro pesticidy v potravinách byly překročeny u 28 % zanalyzovaných vzorků. [53].

9. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo provést literární rešerši zabývající se pesticidy a metodami jejich stanovení v medu. Pesticid je přípravek určený k potlačení chorob, ochraně rostlin a hubení plevelů nebo živočišných škůdců. Nejhojněji jsou pesticidy využívány v zemědělství pro zvýšení produkce. Navzdory tomu, že používání pesticidů v zemědělství zvyšuje produkci, tak ale pro člověka a další živočichy mohou být toxické. V této práci je konkrétně zmíněna toxicita a negativní vliv pesticidů pro člověka a včelu medonosnou. Mezi nejtoxičtější pesticidy pro včely medonosné se řadí chlorpyrifos, deltamethrin, cypermethrin a imidacloprid.

Zbytky pesticidů obsažené v medu mohou snížit jeho kvalitu, ale také mohou ohrozit při konzumaci lidské zdraví. Pro analýzu pesticidů v medu je nutné použít citlivé a selektivní techniky, vzhledem k nízkému obsahu pesticidů v medu.

Převážná část práce je věnována úpravě vzorku před analýzou a metodám stanovení pesticidů. K úpravě vzorku je možné využít celou řadu metod. V současnosti se nejvíce využívá metoda QuEChERS spojená s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Nakonec jsou zmíněny aktuální trendy při analýze pesticidů ve medu.

10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:

- [1] Eilidh I. Ramsay, Suresh Rao a kol., *Honey in oral health and care: A mini review*, Journal of Oral Biosciences, Volume 61, Issue 1, 2019, Pages 32-36
- [2] KAREŠ, Jiří. *Med jako lék*. Praha Agentura VPK, 2004. ISBN 80-7334-041-0 str. 6-10
- [3] KNOLLEROVÁ, Rasso. *Knižka o medu*. Falken Verlag GmbH, 1995, český překlad-Košťálová, Ludmila. Praha, Granit 1996. ISBN 80-85805-43-X str. 30-51
- [4] Pasupuleti VR, Sammugam L. a kol., *Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits*. Oxid Med Cell Longev. 2017
- [5] Sdružení lesních školkařů České republiky ve spolupráci s Lesy Tábor a.s., *Praktické příklady použití chemických prostředků v boji proti škůdcům, chorobám a plevelu v lesních školkách*, Protivín, Lesnická práce s.r.o, 2006. ISBN 80-86386-77-5, str. 5-13
- [6] Akanksha Sharma, Ananya Shukla a kol., *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Global trends in pesticides: A looming threat and viable alternatives, Volume 201, 15. September 2020
- [7] OBENGER, Jan. Trojan, Václav. *Příručka chemické ochrany rostlin*. Praha, Státní nakladatelství technické literatury, 1976. str. 45-56
- [8] Hnutí duha, *Pesticidy kolem nás mění vývoj malých dětí*, Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/7-kolokvium-efsa-kumulativni-ucinky-pesticidu.aspx>
- [9] HAJŠLOVÁ Jana, KOCOUREK Vladimír, *Osud prostředků pro ochranu rostlin v potravním řetězci člověka*, VVF: PROJ/2003/5/deklas, 2004, str. 3-21
- [10] ŠIMEK Miloslav, *Základy nauky o půdě*, České Budějovice, Jihočeská univerzita, Biologická fakulta, 2004, ISBN 80-7040-667-4, str. 120-121
- [11] KAZDA Jan, *Choroby a škůdci polních plodin, ovoce a zeleniny*, Praha: Zemědělec 2003, ISBN 80-86726-03-7, str. 149-152
- [12] TRUNEČKA Karel, *Technika a metody v ochraně rostlin*, V Brně: Mendlova zemědělská a lesnická univerzita, 2003, ISBN 80-7157-722-7, str. 21-22
- [13] Gun-Hwi Lee, Kyung-Chul Choi, *Adverse effects of pesticides on the functions of immune system*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, Volume 235, 2020

- [14] Lu Yang, Yinghuan Wang a kol., QSAR modeling the toxicity of pesticides against *Americamysis bahia*, Volume 258, 2020
- [15] SCHETTLER Ted, Simerová Lucie, *Generace v ohrožení reprotoxické látky v životním prostředí*, Praha: Arnika, 2008, ISBN 978-80-254-5703-0, str. 115-134
- [16] Christos A. Damalas, Ilias G. Eleftherohorinos, *Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators*, 2011, Issue Pesticides and Health, str. 1402-1419
- [17] ALS Czech Republic, s.r.o, *ALS Pesticidy*, Na Harfě 336/9 190 00 Praha 9, dostupné z: [pesticidy-2015.pdf \(alsglobal.cz\)](#)
- [18] Martina Hvězdová, Petra Kosubová a kol., *Currently and recently used pesticides in Central European arable soils*, *Science of The Total Environment*, Volumes 613–614, 2018, str. 361-370
- [19] Klara Kadlikova, Marta Vaclavikova a kol., *The investigation of honey bee pesticide poisoning incidents in Czechia*, *Chemosphere*, Volume 263, 2021
- [20] Pepperný Karel, *Rezidua pesticidů v potravinách – zdravotní rizika a aktuální stav*, 2015, dostupné z: [Rezidua pesticidů v potravinách – zdravotní rizika a aktuální stav, SZÚ \(szu.cz\)](#)
- [21] [Spotřeba POR a účinných látek obsažených v POR \(ÚKZÚZ\) \(eagri.cz\)](#)
- [22] Patrícia Amaral Souza Tette, Letícia Rocha Guidi a kol., *Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods*, *Talanta*, Volume 149, 2016, Pages 124-141
- [23] J.J. Jiménez, J.L. Bernal a kol., *Sample preparation methods to analyze fipronil in honey by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection*, *Journal of Chromatography A*, Volume 1187, Issues 1–2, 2008, Pages 40-45
- [24] dostupné z: OPLETAL, Lubomír, DRAŠAR, Pavel. *Fytochemické metody: 1. Izolace obsahových látek*. 1994. vyd. Praha, 1994. 142 s. ISBN 80-7066-912-8
- [25] Balinova, A., Mladenova, R. a kol., *Solid-phase extraction on sorbents of different retention mechanisms followed by determination by gas chromatography-mass spectrometric and gas chromatography-electron capture detection of pesticide residues in crops*, *Journal of Chromatography A*, 2007
- [26] Alder, L., Greulich, K. a kol., (2006), *Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC–MS or LC–MS/MS?* *Mass Spectrom. Rev.*, 25: 838-865.

- [27] Du-Xin Li, Lin Gan a kol., *Gas chromatography coupled to atmospheric pressure ionization mass spectrometry (GC-API-MS): Review*, Analytica Chimica Acta, Volume 891, 2015, Pages 43-61
- [28] dostupné z: <http://med-pisek.cz/vcely/>
- [29] dostupné z: <https://www.ivcelarstvi.cz/vcela-medonosna/>
- [30] dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/images/obr21.gif>
- [31] ALS Pesticidy. ALS Czech Republic [online]. [cit. 2022-4-22]. Dostupné z: <http://alsglobal.cz/website/var/assets/media-cz/pdf/als-pesticidy.pdf>
- [32] dostupné z:
[Spotřeba účinných látek a přípravků na ochranu rostlin POR a pomocných prostředků PP v letech 2009 2020 česká verze opr.pdf \(eagri.cz\)](#)
- [33] ALS Czech Republic, s.r.o, *ALS Pesticidy*, Na Harfě 336/9 190 00 Praha 9, dostupné z: [pesticidy-2015.pdf \(alsglobal.cz\)](#)
- [34] MALEŠ, Željko, MEDIC-ŠARIĆ, Marica. Optimization of TLC analysis of flavonoids and phenolic acids of *Helleborus atrorubens* Waldst. et Kit.. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis [online]. 2001 [cit. 2009-05-18], s. 353-359
- [35] http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/nanobiometalnet/ucebni-pumucky/UP_6_Kapalinova%20chromatografie%20s%20různými%20typy%20detekce%20pro%20analýzu%20biologicky%20významných%20látek.pdf
- [36] AgroBio Opava, *Co jsou pesticidy?* [online]. [cit. 2022-4-22]. Dostupné z: <https://agrobio.cz/poradna/clanek/166>
- [37] <https://docplayer.cz/15463881-Extrakcni-metody-studijni-material-1-obecn-charakteristika-extrakce-2-extrakce-kapalina-kapalina-lle-3-alkalicka-hydrolyza.html>
- [38] Francisco Pena-Pereira, Isela Lavilla a kol., *Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review*, Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, Volume 64, Issue 1, 2009, Pages 1-15

- [39] Dostupné z: https://is.muni.cz/do/sci/UChem/um/laboratorni_tehnika/pages/nalevky_nasyvky_filtrace.html
- [40] Yandi Fu, Federica Pessagno a kol., *Preparation and evaluation of molecularly imprinted polymers as selective SPE sorbents for the determination of cathinones in river water*, *Microchemical Journal*, Volume 175, 2022
- [41] <https://www.biotage.com/isolute-psa>
- [42] Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Fig-1-Scheme-of-DLLME-procedure_fig1_233667604
- [43] Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Microextraction-by-packed-sorbent-MEPS-in-syringe-set-up-and-barrel-insert-and-needle_fig3_339111425
- [44] Frank David, Pat Sandra, *Stir bar sorptive extraction for trace analysis*, *Journal of Chromatography A*, Volume 1152, Issues 1–2, 2007, Pages 54-69
- [45] GERSTEL Worldwide, *Twister*, [online]. [cit. 2022-4-30]. Dostupné z: <https://www.gerstel.com/sites/default/files/2022-03/s00135-707-02-Supplies-Twister-en.pdf>
- [46] Isaac Delove Tegladza, Tong Qi a kol., *Direct immersion single-drop microextraction of semi-volatile organic compounds in environmental samples: A review*, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 393, 2020
- [47] dostupné z: <https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S000326701500906X-gr1.jpg>
- [49] Československý lékopis. 4. vyd. Praha : Avicenum, zdravotnické nakladatelství, n.p., 1987. 3 sv. (412, 948, 595 s.)
- [50] Klouda P., *Moderní analytické metody*, Pavel Klouda, Ostrava, 2003
- [51] Hamidreza Ardalani, Nanna Hjort Vidkjær a kol., *Dietary quercetin impacts the concentration of pesticides in honey bees*, *Chemosphere*, Volume 262, 2021
- [52] Klara Kadlikova, Marta Vaclavikova a kol., *The investigation of honey bee pesticide poisoning incidents in Czechia*, *Chemosphere*, Volume 263, 2021
- [53] Marek Łukasz Roszko, Marta Kamińska a kol., *of Selected Persistent Organic Pollutants (PCB, PBDE) and Pesticides in Honey Bee Pollen Sampled in Poland*, *PLOS ONE*, December 2016

[54] Kamel, Agric. *Refined Methodology for the Determination of Neonicotinoid Pesticides and Their Metabolites in Honey Bees and Bee Products by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)* Food Chem. 2010