

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



Chemická bezpečnost potravin

Bakalářská práce

Autor: Lukáš Merta

Studijní program: B 1407 Chemie

Studijní obor: Chemie

Typ studia: Prezenční

Vedoucí práce: doc. RNDr. Barták Petr, Ph.D.

Termín odevzdání práce: 9. 5. 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou v seznamu použité literatury.

.....
podpis

Poděkování

Děkuji vedoucímu své bakalářské práce doc. RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D. za odborné rady, trpělivost, připomínky a čas, které mi během psaní bakalářské práce poskytl.

Souhrn

Předložená bakalářská práce se v teoretické části zabývá problematikou bezpečnosti potravin. Obsahuje ucelený přehled jednotlivých skupin kontaminujících látek. Vyšší pozornost je věnována skupině pesticidů, jsou zde popsány vlastnosti těchto látek, je zde také podán přehled současné legislativy a v závěru je věnována pozornost problematice stanovení této skupiny látek. Experimentální část je zaměřena na problematiku stanovení dichloropropu ve vzorku zeleného čaje. Pozornost je zde věnována srovnání výtěžností různých technik přečištění vzorků a volbě chromatografické kolony. V závěru této bakalářské práce je výběrem vhodné techniky přečištění a chromatografické kolony s následnou analýzou pomocí plynové chromatografie s hmotnostním detektorem provedeno stanovení dichloropropu v reálném vzorku zeleného čaje.

Obsah

1. ÚVOD	1
2. BEZPEČNOST POTRAVIN	1
3. ZAJIŠTĚNÍ BEZPEČNOSTI POTRAVIN	3
3.1 Hodnocení rizik	3
3.2 Řízení rizik	3
4. TOXICKÉ LÁTKY V POTRAVINÁCH	5
4.1 Klasifikace toxických látek.....	6
4.1.1 Přírodní toxické látky.....	6
4.1.1.1 Přírodní toxické látky rostlinného původu	7
4.1.1.1.1 Alkaloidy.....	7
4.1.1.1.2 Fytoestrogeny	7
4.1.1.1.3 Lektiny	7
4.1.1.1.4 Glykosidy	7
4.1.1.1.5 Alergeny	8
4.1.1.1.6 Inhibitory enzymů	8
4.1.1.2 Přírodní toxické látky živočišného původu	8
4.1.1.2.1 Alergeny	8
4.1.1.2.2 Biogenní aminy	8
4.1.1.2.3 Toxiny mořských živočichů	8
4.1.2 Cizorodé látky.....	9
4.1.2.1 Kontaminanty	9
4.1.2.1.1 Pesticidy	10
4.1.2.1.2 Průmyslové jedy	10
4.1.2.1.3 Přírodní toxiny.....	11
4.1.2.1.4 Veterinární léčiva	11
4.1.2.2 Aditiva.....	11
4.1.2.2.1 Látky prodlužující trvanlivost	12
4.1.2.2.2 Látky upravující aroma a chuť	13
4.1.2.2.3 Látky upravující barvu.....	14
4.1.2.2.4 Látky upravující texturu	14
4.1.2.2.5 Látky zvyšující biologickou hodnotu.....	14
4.1.2.2.6 Látky zvyšující biologickou hodnotu.....	14
4.1.2.2.7 Další aditivní látky.....	15
4.1.2.3 Sekundární cizorodé látky	15
5. PESTICIDY	15

5.1	Dělení pesticidů.....	15
5.2	Fyzikálně chemické vlastnosti	16
5.3	Vysvětlení základních pojmů	18
5.4	Toxicita pesticidů	19
5.4.1	Důležité účinky pesticidů	21
5.5	Kontaminace potravin po aplikaci pesticidů	21
5.5.1	Osud pesticidů po aplikaci ve vztahu ke kontaminaci potravin	21
5.5.2	Degradace, biotransformace.....	23
5.5.3	Změny při technologickém, či kulinárním zpracování.....	24
5.6	Registrace pesticidů	24
5.7	Současná legislativa ČR	26
5.8	Spotřeba pesticidů v ČR a ve světě	26
5.9	Kontrola a monitoring	29
6.	STANOVENÍ REZIDUÍ PESTICIDŮ V POTRAVINÁCH	30
6.1	Izolace reziduí	31
6.1.1	Extrakční techniky	32
6.2	Přečištění	42
6.3	Instrumentální metody pro stanovení pesticidů.....	42
6.4	Plynová chromatografie	43
6.4.1	Instrumentace	44
6.4.1.1	Nosný plyn	44
6.4.1.2	Dávkovač	45
6.4.1.3	Kolony.....	45
6.4.1.4	Detektor.....	46
6.4.1.4.1	Hmotnostní detektor	47
6.4.1.4.1.1	Iontový zdroj.....	47
6.4.1.4.1.2	Hmotnostní analyzátor	48
6.4.1.5	Termostat	49
7.	POPIS A STANOVENÍ DICHLORPROPU	50
8.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	52
8.1	Pracovní pomůcky	53

8.2	Chemikálie	53
8.3	Použité čisticí techniky při stanovení dichlorpropu ve vzorku zeleného čaje	53
8.3.1	Postup jednotlivých čisticích technik.....	54
8.3.2	Derivatizace	55
8.3.3	Analýza vzorků	55
9.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	55
10.	ZÁVĚR.....	61
11.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	62
12.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	69
13.	SEZNAM OBRÁZKŮ	71
14.	SEZNAM TABULEK.....	71
15.	PŘÍLOHY	72

1. Úvod

V dnešní době hrají chemické látky důležitou roli ve výrobě a distribuci jídla, je to dáno stále vyššími nároky spotřebitelů a legislativních požadavků. Použitím chemických látek při výrobě a distribuci potravin se dosahuje delší doby hygienické nezávadnosti a lze také ovlivnit další vlastnosti potravin, podle legislativních nároků. Používání těchto látek s sebou přináší i jistá rizika v potenciálním riziku na zdraví spotřebitelů vedlejšími efekty či samotnými rezidui těchto látek. Rovnováhu mezi výhodami a rizikem v používání těchto látek se snaží nalézt potravinářská legislativa.

V několika posledních letech došlo k výraznému nárůstu množství informací o řadě potenciálně toxických chemických látek pronikajících do potravních řetězců. Díky rozvoji citlivější analytické techniky jsou odhalována nová rizika spojená s chemickou bezpečností potravin a s nimi spojené rozsáhlé toxikologické studie. Problémem vědeckého hodnocení nového rizika je poměrně zdlouhavá identifikace nebezpečí, popis nebezpečí, charakter rizika, odhad expozice atd. Informace z oblasti bezpečnosti potravin bývají často rozptýlené, a pokud dochází k jejich hodnocení izolovaně od ostatních aspektů, pak mohou představovat zkreslení skutečně závažné situace a hodnocení tak vede k nesprávným rozhodnutím.

2. Bezpečnost potravin

Bezpečnost potravin zahrnuje hygienu samotné výroby potravin, kontrolní mechanismy, monitoring potravních řetězců a bezpečnost krmiv. Bezpečnost potravin je zajišťována kontrolní činností státních organizací a institucemi financovaných státem, a to zejména tvorbou legislativy, průběžnou a důslednou kontrolou zdravotní bezpečnosti a kvality, dlouhodobým monitoringem výskytu cizorodých látek, aplikací vědeckých stanovisek do praxe a informováním spotřebitelů [1].

Potravinou jsou definovány Ministerstvem Zemědělství zákonem číslo 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích, který definuje potraviny jako látky určené ke spotřebě

člověkem v nezměněném nebo upraveném stavu jako jídlo nebo nápoj (mimo léčiva a omamné psychotropní látky) [2].

Za zdravotně nezávadnou potravinu je považována taková, která splňuje požadavky na zdravotní nezávadnost a to jak chemické, fyzikální či mikrobiologické povahy.

Potraviny obsahují přirozeně se vyskytující sloučeniny rostlinného nebo živočišného původu, avšak při výrobě a zpracování se potraviny často dostávají do kontaktu s řadou mikroorganismů a přirozeně či uměle se vyskytujícími sloučeninami (např. sloučeninami vznikajícími při tepelné úpravě potraviny, látkami přídatnými, pesticidy, s cizorodými předměty, mikroorganismy atd.). Tyto sloučeniny mohou negativně ovlivnit bezpečnost potraviny. Nebezpečné vlastnosti potravin je možné dělit podle povahy na biologické, chemické či fyzikální.

Mikroorganismy a parazitické organismy představují biologická nebezpečí, neboť při svém životě, ať již v potravíně nebo poté v lidském těle, dokážou produkovat toxické metabolity. Známé jsou např. metabolity plísní nazývané mykotoxiny, které mají schopnost akumulace v organismu člověka a způsobovat tak zhoubná buněčná bujení [3].

Chemické nebezpečí mohou představovat jak samostatné chemické prvky, tak různé chemické sloučeniny anorganického i organického původu. Mohou to být látky přírodního charakteru např. alkaloidy, glykosidy atd., které si rostlina vytváří jako obranné látky, tak původu antropogenního, které se do potravního řetězce dostávají úmyslně např. pesticidy a jejich metabolity. Do potravního řetězce se mohou látky také dostat neúmyslně, pak jsou označovány jako látky znečišťující, patří sem např. aromatické uhlovodíky, dioxiny atd. Je třeba upozornit, že obsah reziduí v potravinách lze razantně snížit uplatňováním zásad správné zemědělské praxe, avšak u látek jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, se významné množství těchto látek do potravin dostává z imisí.

Fyzikální nebezpečí představují různé cizí předměty nebo mechanické nečistoty např. úlomky skla, skořápky, slupky atd. [4, 5].

3. Zajištění bezpečnosti potravin

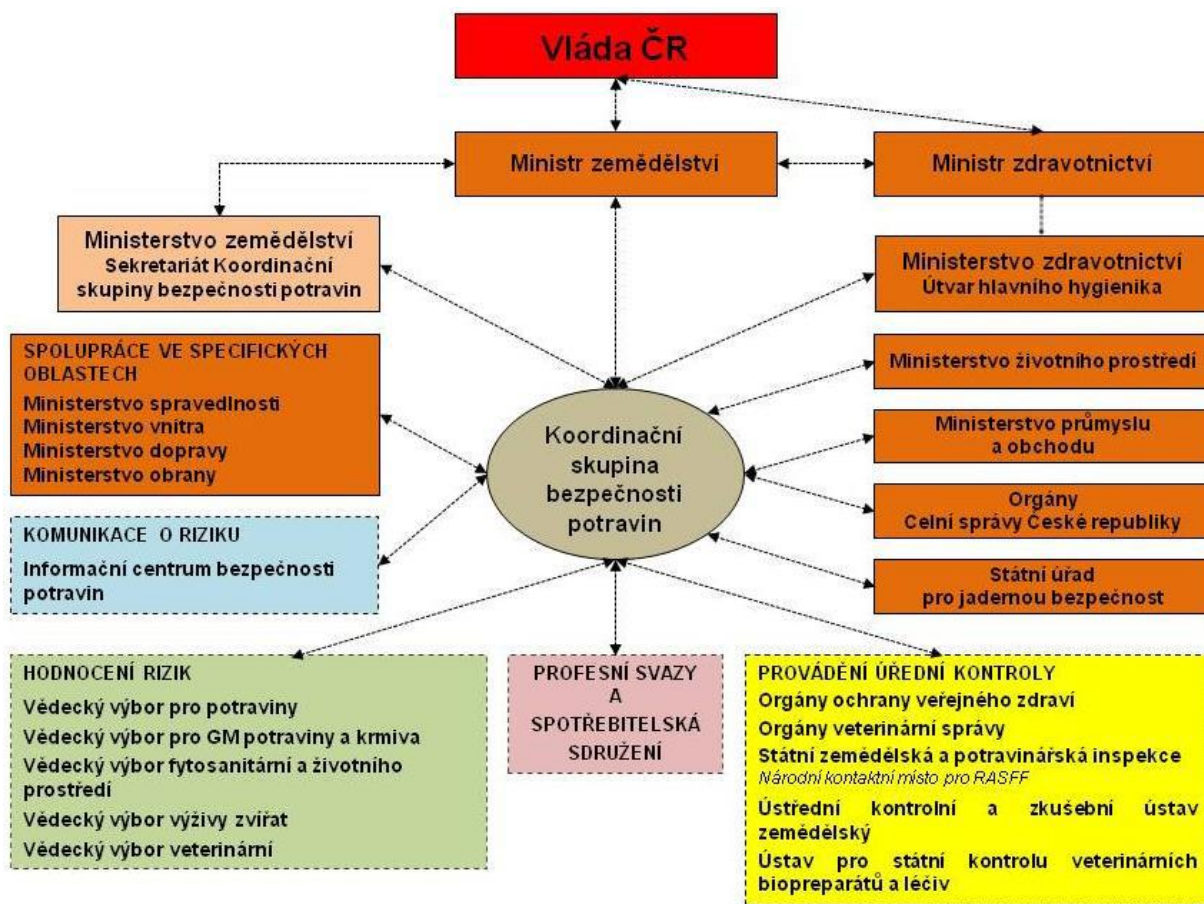
V ČR systém zajištění bezpečnosti potravin spadá pod rezorty ministerstva zemědělství a zdravotnictví. Tyto rezorty využívají k zajištění fungování tohoto systému spolupráce s jinými ministerstvy, orgány státní správy, nevládními organizacemi, výzkumnými ústavami či univerzitami. Systém bezpečnosti potravin je budován od roku 2001, kdy bylo v reakci na vydání Bílé knihy o zdravotní nezávadnosti potravin a souvisejících kroků EK přijato usnesení vlády týkající se Strategie zajištění bezpečnosti potravin v ČR [6].

3.1 Hodnocení rizik

Pojmem hodnocení rizika se rozumí vědecky podložený proces, který má za cíl podrobně popsat riziko, aby jej bylo možné účelně ovlivňovat. Tento proces je složen ze čtyř kroků: identifikace nebezpečí, popisu nebezpečí, hodnocení expozice a odhadu rizika. Hodnocení je prováděno na základě dat získaných dlouhodobým monitoringem, v menším množství ve výzkumných pracovištích, ale také kontrolní činnosti v celém řetězci od prvovýroby až po spotřebu potravin [7].

3.2 Řízení rizik

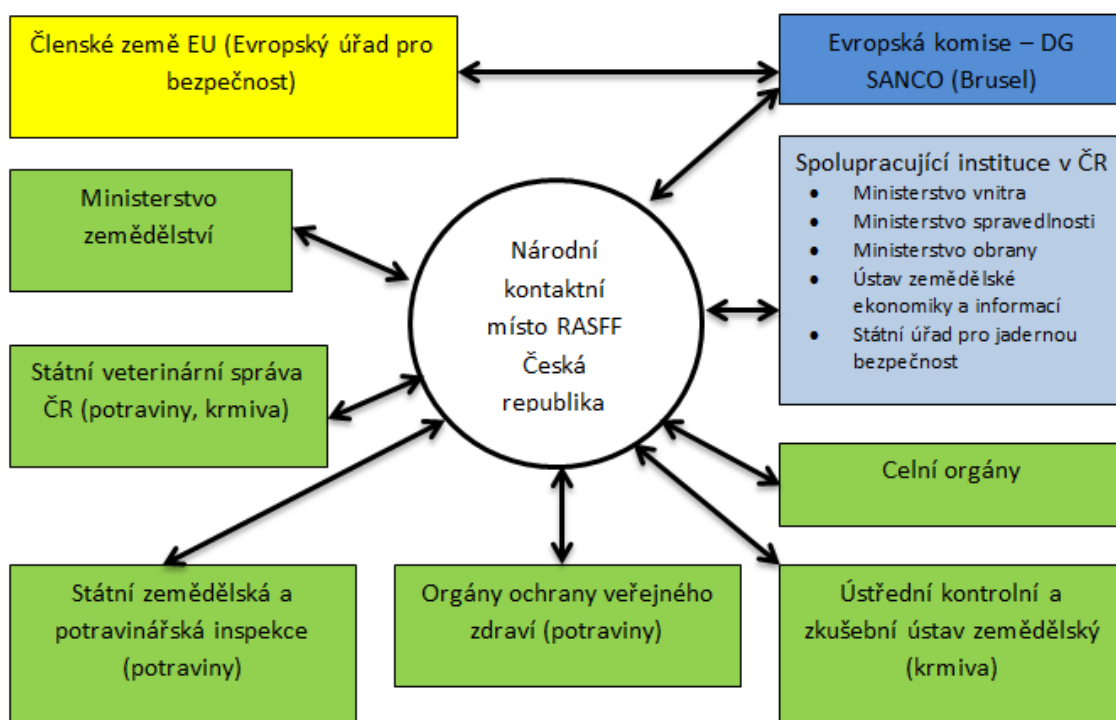
Potřeba zlepšit koordinaci všech vládních a nevládních institucí podílejících se na zajištění bezpečnosti potravin, vedla ke zřízení Koordinační skupiny bezpečnosti potravin. Tato nově zřízená Koordinační skupina je složena ze zástupců ústředních orgánů státní správy, orgánu státního dozoru, spotřebitelských a profesních organizací. Její hlavní činnosti je podílení se na koordinaci činnosti jednotlivých rezortů, stanovování priorit v oblasti bezpečnosti potravin a dále podílení se na spolupráci s institucemi bezpečnosti potravin členských států EU a EFSA [8, 9]. Systém zajištění bezpečnosti potravin v ČR popisuje schéma níže.



Obrázek 1: Schéma systému zajištění bezpečnosti potravin v ČR [10].

Dozorová činnost v oblasti bezpečnosti potravin je prováděna orgány státního dozoru Ministerstva zemědělství a to Státní veterinární správou, Státní zemědělskou a potravinářskou inspekcí, Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským a Ústavem pro kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, dále orgány Ministerstva zdravotnictví (orgány ochrany veřejného zdraví). Dozorová činnost je prováděna vykonáváním kontrolních aktivit, které jsou plánovány pro předem stanovené období a podléhajícím pravidelným hodnocením. Orgány státní správy a orgány státního dozoru nad potravinami a krmivy jsou zapojeny do Systému rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF), který plní funkci zajištění výměny informací mezi členskými zeměmi EU, o potravinách a krmivech vyskytujících se na společném trhu zemí EU, a které představují riziko v ohrožení zdraví lidí. Odbor bezpečnosti potravin Ministerstva zemědělství je pověřen zajištěním spolupráce a výměny informací mezi EFSA a ČR. EFSA má za úkol provádět nezávislá vědecká stanoviska, která následně poskytuje orgánům EU a také vytvářet podporu pro legislativní činnost v oblastech, týkajících

se bezpečnosti potravin a krmiv. Jednotlivé organizace se také podílejí na komunikaci o riziku, kdy informují veřejnost o aktuálních otázkách z oblasti bezpečnosti potravin a také se podílejí na vzdělávacích činnostech [6]. Schéma systému rychlého varování pro potraviny a krmiva je ukázáno na obrázku č. 11.

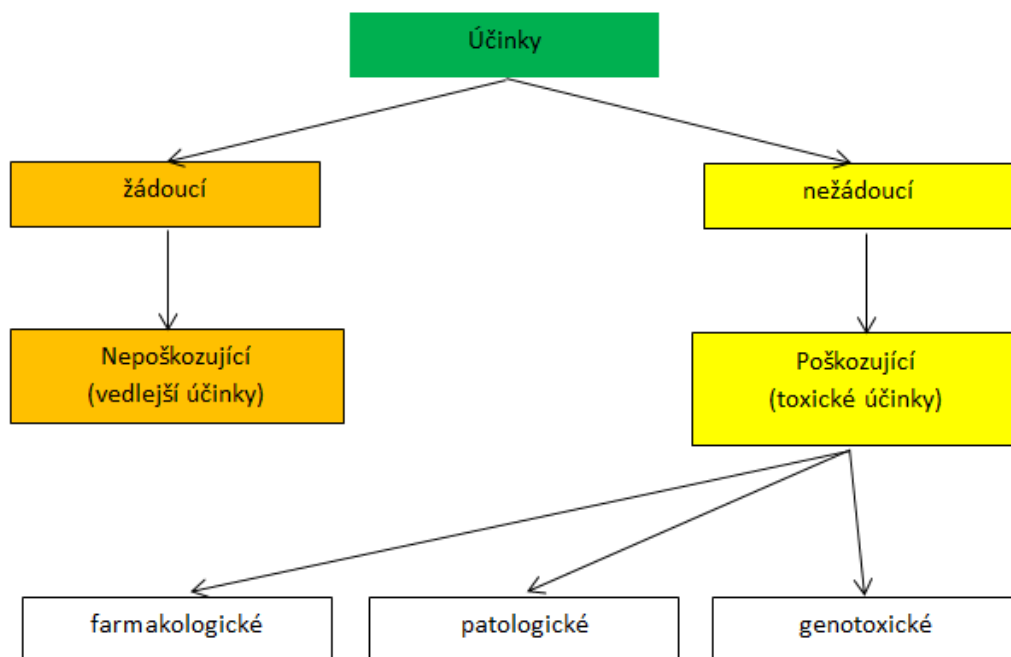


Obrázek 2: Schéma fungování RASFF v ČR [11].

4. Toxické látky v potravinách

V potravinách se často kromě látek prospívajících lidskému zdraví vyskytují i s toxické. Tuto skupinu látek rozlišujeme do dvou skupin: přírodní toxické látky a látky cizorodé. Toxický účinek závisí na toxicitě dané látky a na množství, které bylo organismem přijato ať už ústy, skrz kůži nebo jiným způsobem. Klasifikace účinků toxických látek je ukázána na obrázku č. 14. Pro látky obsažené v potravinách existuje tolerovatelný denní příjem (TDI), který představuje odhad množství chemického kontaminantu, které může být konzumováno denně během celého života, aniž by představovalo výrazné riziko pro zdraví. TDI označuje množství chemické látky, kterou byla potrava kontaminována z životního

prostředí (např. dioxiny, olovo). Často se lze setkat i s hodnotou ADI, což představuje odhad množství specifické látky v potravine, které lze konzumovat denně během celého života bez rizika škodlivosti. Hodnota ADI se vztahuje k látkám záměrně přidávaným do potravin nebo k látkám používaným při jejich výrobě (např. aditiva, rezidua pesticidů) [12, 13].



Obrázek 3: Klasifikace účinků toxických látek [14].

4.1 Klasifikace toxických látek

4.1.1 Přírodní toxické látky

Přírodní toxické látky jsou přirozenou součástí potravin a krmiv, vykazující různé biologické účinky. Jejich výskyt v potravinách je důsledkem genetických dispozic rostlinných nebo živočišných organismů je syntetizovat. Některé z těchto látek jsou často využívány ve farmaceutickém průmyslu [15].

4.1.1.1 Přírodní toxické látky rostlinného původu

4.1.1.1.1 Alkaloidy

Za alkaloidy jsou považovány dusíkaté bazické sloučeniny (tvořící soli s kyselinami), které jsou sekundárními metabolity a vykazují různé biologické účinky. Jedná se o heterogenní skupinu látek zahrnující více než 5000 sloučenin. Některé alkaloidy jsou součástí obranných systému rostlin (rostlinná antibiotika), některé se řadí mezi přírodní toxické aminokyseliny (např. ibotenová kyselina a agaritin), biogenní aminy (např. histamin) a mezi přírodní barviva (např. betalainy). V potravinách řada alkaloidů vzniká během termického zpracování potravin ze základních živin např. řada indolových alkaloidů (β -karboliny) vzniká z tryptofanu v Maillardově reakci. Alkaloidy je běžné klasifikovat na:

- pravé alkaloidy – jsou často heterocyklické dusíkaté báze odvozené od aminokyselin (např. nikotin v tabáku).
- pseudoalkaloidy – tvoří heterocyklické báze, s jinými prekurzory než aminokyselinami (např. solanin v bramborech).
- protoalkaloidy – jsou bazické aminy odvozené od aminokyselin. V protoalkaloidech není dusík součástí aromatického systému (např. kapsaicin v paprikách) [16].

4.1.1.1.2 Fytoestrogeny

Podle [17] jsou fytoestrogeny definovány jako látky rostlinného původu, které jsou v zažívacím traktu přeměňovány na látky s estrogenními účinky. Po chemické stránce se jedná o fenoly, které se strukturně a účinkem podobají steroidním hormonům.

4.1.1.1.3 Lektiny

Tato skupina přírodně toxických látek rostlinného původu je tvořena proteiny neimunitního původu, které mají schopnost rozpoznávat a vázat cukry, a to jak volné tak i vázané na glykoproteinech či glykolipidech. Nacházejí se v potravinách, jako jsou fazole, banány, obiloviny a další. Po požití nedostatečně termicky upravených potravin mohou nastat bolesti žaludku, průjemy a zvracení.

4.1.1.1.4 Glykosidy

Jedná se o organické sloučeniny, skládající se z cukru a necukerné složky. Patří sem např. kardioaktivní glykosidy, které ve vyšších koncentracích působí jedovatě nebo

kyanogenní glykosidy. Ty nejsou sami o sobě jedovaté, avšak jejich rozkladem může vznikat kyanovodík, který je toxický. Vyskytuje se v peckách peckovitého ovoce. Dále sem patří saponiny, které mají vlastnosti povrchově aktivních látek a také různě silnou hemolytickou aktivitu, a proto mohou působit i toxicky.

4.1.1.1.5 Alergeny

Jsou látky, které vyvolávají alergickou reakci, lidským organismem jsou vnímány jako cizorodé a brání se proti nim různým způsobem (kýchání, vyrážka, otok atd.) Častými alergeny je lepek (vyskytuje se v zrnech obilovin), sójová bílkovina (způsobuje poruchy trávení), bílkovina obsažená v arašidech atd.

4.1.1.1.6 Inhibitory enzymů

Tyto látky inhibují účinek trávicích enzymů, například inhibitor trypsinu, který se vyskytuje v tepelně neupravené sóji [18].

4.1.1.2 Přírodní toxické látky živočišného původu

Vyznačují se podobnými vlastnostmi jako přírodní toxické látky rostlinného původu.

4.1.1.2.1 Alergeny

K nejčastějším alergickým reakcím dochází po konzumaci vajec, kdy je alergická reakce vyvolána vaječnými bílkovinami. Jednou ze složek, kterou obsahuje vaječný bílek je bílkovina avidin. Tato bílkovina na sebe váže biotin a tím ho znehodnocuje. Často se vyskytuje alergická reakce na mléko a mléčné výrobky. Hlavními alergeny v těchto potravinách jsou syrovátkové bílkoviny a kasein.

4.1.1.2.2 Biogenní aminy

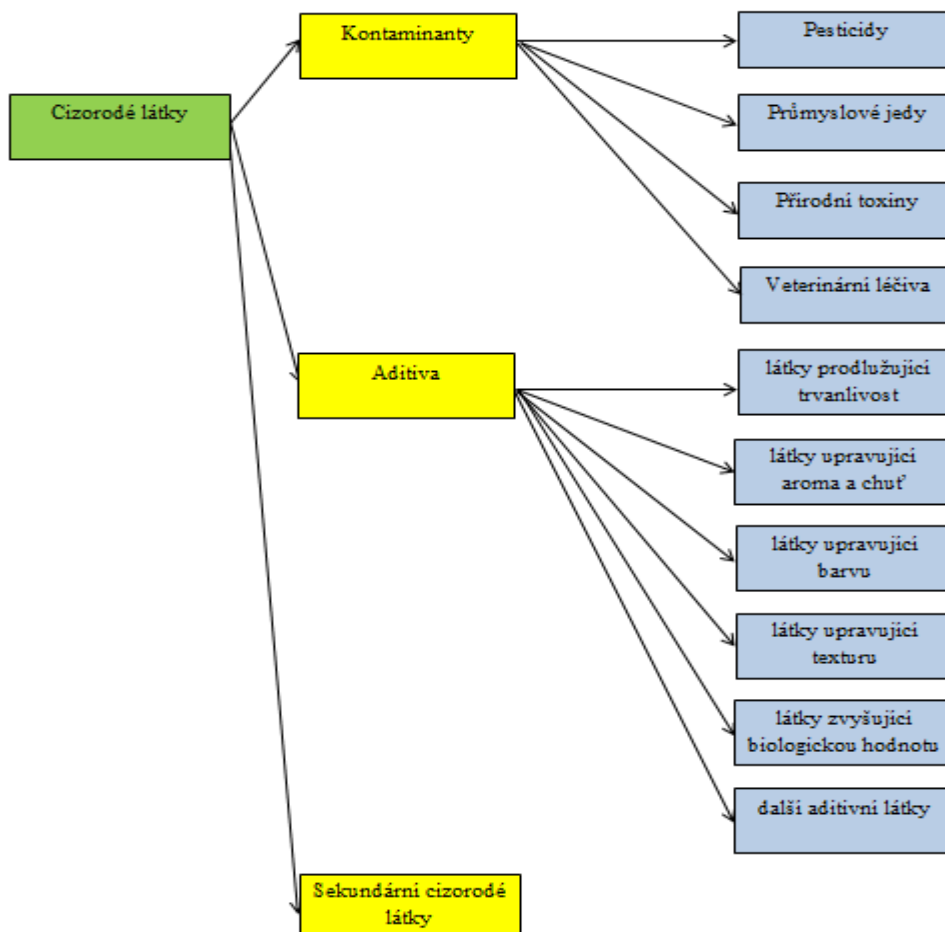
Vznikají v potravinách vlivem činnosti mikroorganismů. Ve vysokých dávkách vyvolávají zvracení, dýchací potíže a mohou ovlivňovat krevní tlak. Patří sem např. histamin či tyramin, jejichž vysoké množství bylo prokázáno ve zkaženém masu či sýrech.

4.1.1.2.3 Toxiny mořských živočichů

Patří sem například toxiny skupiny saxitoxinu, které produkují ústřice, škeble a mušle. U lidí jejich požití může způsobit paralytické otravy z měkkýšů, při vyšší konzumaci může dojít i k paralýze dýchacího traktu [18, 19].

4.1.2 Cizorodé látky

Cizorodé látky v potravinách jsou látky, které nejsou přirozenou součástí potravin. Rozdělení cizorodých látek uvádí následující schéma [20].



Obrázek 4: Rozdělení cizorodých látek.

4.1.2.1 Kontaminanty

Podle [21] jsou kontaminanty látky, které nejsou záměrně přidávány do potravin, jejich vstup do potravin je nahodilý.

Do potravinového řetězce pronikají kontaminující látky dvěma hlavními způsoby: zemědělskou produkcí nebo při skladování a zpracování složek potravin.

- Zemědělská produkce – v této oblasti dochází ke kontaminaci používáním pesticidních přípravků, hnojením (toxické kovy), imisní zátěží (např.

perzistentními organochlorovými sloučeninami), používáním veterinárních léčiv, dále může ke kontaminaci dojít i po napadení potravin mikroorganismy tvořící mykotoxiny atd.

- Skladování a zpracování – možnost kontaminace představuje především posklizňová aplikace pesticidů, napadení mikroorganismy, penetrace aditiv z plastů, dále může dojít při procesu zpracování ke vzniku toxických degradačních produktů z relativně netoxických pesticidů atd.

Jednoznačně klasifikovat kontaminanty nelze, protože se jedná o skupinu velmi různorodých látek. Kontaminanty lze dělit na pesticidy, průmyslové jedy, přírodní toxiny a veterinární léčiva [22, 23].

4.1.2.1.1 Pesticidy

Tato skupina kontaminujících látek bude podrobněji popsána v následující kapitole.

4.1.2.1.2 Průmyslové jedy

Jedná se především o těžké kovy, dusičnany, polychlorované bifenyly, ftaláty, polycyklické aromatické uhlovodíky, chlorované dioxiny. Obsah toxických kovů představuje jeden z ukazatelů hygienicko-toxikologické jakosti potravin. K nejvýznamnějším patří olovo, rtuť, kadmium a arsen. Ve vyšších koncentracích vykazují toxické účinky i esenciální prvky jako zinek, železo nebo stopové prvky měď, chrom, selen aj. Dusičnany jsou přirozenou složkou životního prostředí a potravních řetězců. Toxicita dusičnanů spočívá v jejich redukci na dusitany a následné oxidaci hemoglobinu na methemoglobin, tím dochází ke ztrátě funkce krve přenášet kyslík. Polychlorované bifenyly představují skupinu organických látek, které ve většině případů mají kumulativní vlastnosti a dochází k jejich ukládání v tuku zvířat. PCB snižují imunitu, poškozují hormonální soustavu, zvyšují cholesterol a způsobují poruchy reprodukce. Ftaláty (estery kyseliny ftalové) jsou používány jako změkčovadla při výrobě plastových obalů. Jelikož v PVC nejsou pevně vázány, dochází k jejich uvolňování do prostředí a následně může dojít k průniku do organismu (např. vdechnutím, potravou). Ftaláty ohrožují funkce ledvin a jater, snižují kvalitu spermií a mají rakovinotvorné účinky [24]. Polycyklické aromatické uhlovodíky vznikají např. při grilování masa, kdy spalováním odkapávajícího tuku a následným srážením se hromadí na povrchu grilované potraviny. PAU

mají perzistentní vlastnosti a jsou řazeny mezi karcinogenní látky. Dioxiny jsou umělé připravené a perzistentní organické látky. Hlavními zdroji jsou mléko, hovězí a drůbeží maso. Dioxiny svými kumulativními vlastnostmi poškozují imunitní systém, způsobují poruchy vývoje, vyvolávají rakovinu, mohou již ve velmi nízkých koncentracích narušovat centrální nervový systém [23].

4.1.2.1.3 Přírodní toxiny

Z hlediska zdraví se jedná o velmi nebezpečnou skupinu látek s karcinogenními, mutagenními či teratogenními účinky. Potravina slouží jako substrát pro růst plísní a bakterií a stává se tak zdrojem toxických látek, virů a parazitů. Nejvýznamnější patogenní bakterií je *Clostridium botulinum*, vytvářející toxické látky zvané botulotoxiny, které ve vysokých dávkách způsobují u lidského organismu obrnu dýchacích svalů a dušení.

4.1.2.1.4 Veterinární léčiva

Podle [25] tvoří veterinární léčiva farmakologicky a biologicky aktivní chemické látky používané k prevenci, léčbě a k diagnostice chorob u hospodářských zvířat. Aplikací veterinárních léčiv do krmiv či přímo do těla hospodářských zvířat dochází k průniku jejich reziduí do tkání, svaloviny, mléka, vajec atd. Rezidua léčiv tedy představují potenciální zdravotní riziko, a proto je nutná kontrola průniku veterinárních léčiv do potravinového řetězce. Hladiny reziduí léčiv jsou podmíněny farmakokinetickými parametry a to adsorpcí (stupeň adsorpce závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech sloučeniny), distribucí v tkáních, metabolismem a vylučováním [23].

4.1.2.2 Aditiva

Aditiva neboli látky přídatné jsou neodmyslitelnou součástí dnešních technologií výroby potravin. Důvody k jejich použití je zlepšit nebo zachovat trvanlivost, vzhled, konzistenci, chuť potravin, či zvýšit mísitelnost jednotlivých složek apod. Podle platné legislativy se za přídatné látky označují ty, které se zpravidla nepoužívají samostatně jako potravina, ani jako charakteristické potravinové přísady. Do potravin jsou přidávány při výrobě, balení, přepravě či skladování, přičemž se samy nebo jejich vedlejší produkty stávají součástí potravin. Mezi aditiva nejsou řazeny živiny (minerály, vitamíny, aminokyseliny),

kteře jsou do potravin zpravidla přidávané za účelem obnovení jejich původního obsahu. Použití aditiv je zakázáno u nezpracovaných potravinových surovin jako je másle, med, čaj, káva, minerální vody a různé zakysané mléčné výrobky. Při dlouhodobé nadměrné konzumaci potravin obsahujících aditivní látky může dojít ke vzniku alergií, aditivní látky mohou také narušit a poškodit některé makromolekuly v buňkách a tím snížit rychlost regenerace organismu.

Přítomnost přídatných látek je podle zákona nutné uvést na obalu potravin v sestupném pořadí podle klesajícího množství. V Zákonu o potravinách a v předpisech Evropské unie je stanovena nutnost uvést aditivum na potravinách buď celým názvem, nebo číselným kódem, který se skládá z velkého písmene E a trojmístného nebo čtyřmístného číselného kódu. Rovněž musí být uveden název kategorie. V některých případech musí být uveden i údaj o možnosti nepříznivého ovlivnění zdraví člověka [26, 27].

4.1.2.2.1 Látky prodlužující trvanlivost

Do této skupiny látek patří konzervační prostředky, neboli konzervanty a antioxidační látky. Konzervanty jsou sloučeniny chránící potraviny proti zkáze způsobené činností mikroorganismů. Chemická konzervace potravin neboli chemoanabióza má poměrně široký rozsah použití, často se uplatňuje v kombinaci s jinými anabiotickými i abiotickými konzervačními metodami. Při chemoanabióze dochází k inhibici činnosti mikroorganismů, avšak při dlouhodobém působení konzervantů v dostatečné koncentraci, může dojít i k jejich usmrcení. Účinek konzervantů spočívá v napadání klíčových složek buněk nebo ve změně prostředí mikroorganismů. Účinek je silně ovlivněn reakčními podmínkami, např. stupněm kyselosti kapalného podílu potravin, kde konzervační látky s povahou organických kyselin či jejich solí jsou vždy účinnější v kyselém prostředí, kde je jejich disociace potlačena. Nedisociované molekuly snáze přecházejí cytoplazmatickou membránou buněk. Důležitými konzervačními látkami je například kyselina benzoová a její soli (E 210 – 213). Tyto látky jsou inhibitory řady plísní, kvasinek a některých bakterií. Některé konzervanty lze použít pouze pro několik vyhláškou stanovených potravin (např. dusičnany, dusitany, kyselina boritá, lysozym atd.).

Podle [28] jsou antioxidační látky skupinou látek napomáhajících zvýšení trvanlivosti potravin. Jejich účinek spočívá v zabránění oxidace některých složek potravin. Častým projevem oxidace jsou barevné změny potravin (např. žluknutí tuků). Oxidační změny

mohou také znehodnocovat nutričně významné složky potravin a hygienicko-toxikologické vlastnosti. Mezi antioxidanty řadíme jak látky přírodní, například tokoferoly (E 306 – E 309), kyselinu askorbovou (E 300), tak i látky syntetické, například butylhydroxyanisol (E 320), butylhydroxytoluen (E 321) aj [29, 30].

4.1.2.2.2 Látky upravující aroma a chuť

Látky upravující aroma a chuť tvoří nejpočetnější skupinu přídatných látek. Patří sem látky aromatické, náhradní sladidla, regulátory kyselosti, látky hořké a povzbuzující a intenzifikátory aroma.

Látky aromatické mají za úkol upravovat vůni a chuť potravin, působením na čichové a chuťové receptory. Udělují potravinám aroma, které by jinak neměly v charakteristické intenzitě nebo vůbec. Patří sem například glutaman sodný, který je nejpoužívanější přídatnou látkou. Dodává potravinám výraznou masovou chuť. Jeho nadměrná konzumace může způsobit bolest hlavy, zvracení, astma aj. [31].

K náhradním sladidlům patří látky udělující potravině sladkou chuť, avšak nepatřící mezi monosacharidy či disacharidy. V porovnání s přírodními sladidly mají umělá sladidla vysokou sladivost a téměř žádný obsah energie. Mezi nejznámější patří sacharin a aspartam. Sacharin se vyrábí synteticky z toluenu, jeho sladivost je v porovnání se sacharózou 500x vyšší. Přidává se do nealkoholických nápoj, žvýkaček apod. [28]. Aspartam se vyrábí synteticky z fenylalaninu a kyseliny asparagové. Biodegradaci v těle člověka je rozkládán na methanol (toxický), fenylalanin (riziko pro osoby s vrozenou poruchou metabolismu) a kyselinu aspartamovou.

Regulátory kyselosti, jsou látky, které mění či udržují hodnotu pH potraviny. Jedná se především o organické i anorganické soli kyselin s pufracími účinky.

Látky hořké a povzbuzující zahrnují pouze kofein, chinin a oktaacetylsacharosu. Tyto sloučeniny jsou bez E-kódu. Kofein a chinin se smí používat pouze v nealkoholických nápojích.

Intenzifikátory aroma, slouží ke zvýraznění nebo regulaci původního aroma potraviny. Patří sem například kyselina L-glutamová a její sůl glutaman sodný, obě tyto látky se používají k zesílení a zvýraznění chuti masných výrobků.

4.1.2.2.3 Látky upravující barvu

Jedná se o skupinu senzoricky aktivních látek udělujících potravině barvu, kterou původně neměla nebo napomáhá obnovit původní barvu ztracenou při výrobních procesech, patří sem barviva a bělidla. Používány jsou jak barviva přírodního původu (např. karotenoidy, flavonoidy), syntetická (např. nitrobarviva, azobarviva), tak i přírodně identická, která mají stejnou strukturu jako přírodní barviva, avšak jsou uměle připravovány. Některá azobarviva mohou vyvolat alergické reakce a astmatické záchvaty, jejich používání je v některých zemích Evropy zakázáno (Německo, Rakousko) [32]. Jako bělidla jsou využívány bromičnany, chlorid dusitý a další. V zahraničí se často používají k bělení mouky, které je v ČR zakázáno [31].

4.1.2.2.4 Látky upravující texturu

Do této skupiny jsou řazeny emulgátory, zahušťovadla a želírující látky.

Emulgátory jsou povrchově aktivní látky, které umožňují tvorbu stejnorodé směsi ze dvou nemísitelných kapalných látek. Příkladem použití mohou být pekárenské výrobky, ve kterých emulgátory působí jako kondicionéry, které změkčují kůrku chleba a také zlepšují kvalitu mouky.

4.1.2.2.5 Látky zvyšující biologickou hodnotu

Zahušťovadla a želírující látky mají za úkol zvýšit viskozitu potraviny a tím udržet žádoucí texturu. Želírující látky zvyšují viskozitu potraviny vytvářením gelu. K této skupině aditivních látek patří především přírodní polysacharidy rostlin (např. škrob, celulóza, agar apod.), mikroorganismů (gellan) a modifikované polysacharidy.

4.1.2.2.6 Látky zvyšující biologickou hodnotu

Patří sem aminokyseliny, minerální látky, vitamíny, některé mastné kyseliny a vláknina. Tyto látky zvyšují biologickou hodnotu potravin a s jejich pomocí lze předcházet nedostatku některých výživově cenných látek v potravě populace.

4.1.2.2.7 Další aditivní látky

Řadí se zde kypřicí látky, lešticí látky, pěnotvorné látky a jiné. Jejich funkce je stručně popsána v příloze číslo 1. [23, 31].

4.1.2.3 Sekundární cizorodé látky

Tyto látky vznikají v potravinách vlivem nežádoucích reakcí, v důsledku špatného skladování. Mohou vznikat kvasnými procesy, hnitím (anaerobní rozklad bakteriemi), tlením (aerobní rozklad), plesnivěním apod. [33].

5. Pesticidy

Pesticidy jsou popsány v [34] jako chemikálie používané proti škodlivým živočichům, plevelům, a parazitickým houbám, které mohou ohrozit zemědělské, zahradní a lesní rostliny, zásoby potravin a zemědělských produktů, průmyslové materiály (textil, kůži, dřevo), užitečná zvířata nebo i samotného člověka.

Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) definuje pesticidy jako látky určené k prevenci, odpuzení, či kontrole škodlivých činitelů, především nežádoucích mikroorganismů, rostlin a živočichů během procesu výroby, transportu, distribuce a zpracování potravin, zemědělských komodit a krmiv [35].

Mezi pesticidy jsou také řazeny regulátory růstu, desikanty a inhibitory klíčení. Používání pesticidů umožnilo významně zvýšit zemědělskou produkci a omezit ztráty během sklizně a skladování. Používání pesticidů je spojeno s rizikem vnášení nezanedbatelného množství cizorodých látek do životního prostředí, kde tyto látky mohou mít vliv i na jiné než jen na cílové činitele [36].

5.1 Dělení pesticidů

Pesticidy je možno dělit podle několika hledisek. Základní dělení lze provést podle účinku na kontaktní, systémové, kombinované a mezostemické.

Účinná látka kontaktně působících pesticidů neproniká do nežádoucího organismu, ale zůstává na povrchu a tudíž působí pouze v místě aplikace.

Naproti tomu účinné látky systémových pesticidů působí nejen na povrchu cílových organismů, ale pronikají např. v případě rostlinných škůdců do rostlinných buněk, kde jsou dále rozváděny cévním systémem. Vlivem tohoto působení mohou být pesticidy obsaženy v celých plodech a odstranění reziduí nelze provést např. oloupáním ovoce.

Kombinované pesticidy obsahují kontaktní i systémovou látku. Tímto je značně sníženo riziko vzniku rezistence. V poslední době se spotřeba těchto přípravků stále zvyšuje [34].

U kvazi-systémových (mezostémických) pesticidů účinná látka působí na povrchu, kde dochází k ukládání do voskové vrstvičky a následnému odpaření [37].

Podle cílových škodlivých organismů, u kterých vede použití pesticidů resp. aktivních složek pesticidních přípravků k vyvolání toxického efektu, lze pesticidy dělit do několika skupin [38].

- herbicidy (proti plevelným rostlinám)
- fungicidy (proti houbovým chorobám)
- insekticidy (proti hmyzu)
- akaricidy (proti roztočům)
- nematocidy (proti haďatkům)
- molluskocidy (proti měkkyšům)
- rodenticidy (proti hlodavcům)

5.2 Fyzikálně chemické vlastnosti

Na základě fyzikálně chemických vlastností dané sloučeniny je umožněno přesněji popsat chování chemické látky v biologických a ekologických systémech.

- Rozdělovací koeficient oktanol – voda (K_{OW}) - Tímto parametrem lze vyjádřit afinitu dané látky k tukům. Látky s vysokou hodnotovou K_{OW} se snadno kumulují v tukové

složce živých organismů. Látky s hodnotami pK_{OW} vyššími než 4 jsou snadno rozpustné v tucích. Velikost hodnoty rozdělovacího koeficientu umožňuje předpovědět, ve kterých částech rostlin nebo zemědělských produktech se budou rezidua pesticidů nacházet. Naproti tomu sloučeniny s hodnotami $pK_{OW} < 0,5$ jsou velmi hydrofilní, proto nedochází k přechodu přes buněčnou membránu a nejsou také dostatečně absorbovány kořeny rostlin.

- Rozpustnost ve vodě - Je jedním z klíčových faktorů rozhodujícím o distribuci a stabilitě daného pesticidu v organismu či životním prostředí. Sloučeniny s dobrou rozpustností ve vodě, jsou snáze biodegradovatelné, avšak nejsou zadržovány v půdních částicích, a proto mohou proniknout do zdrojů pitné vody.
- Disociační konstanta (K_a) - Jelikož má řada pesticidů ve své struktuře ionizované skupiny, pak se stupeň disociace promítá do chování těchto pesticidů v daném prostředí. Stupeň disociace ovlivňuje také odpařování z vodného média, procesy solubilizace, sorpci na sedimenty a možnosti bioakumulace.
- Biokoncentrační faktor (BCF) – Podle [35] BCF vyjadřuje míru přechodu rezidua pesticidů z vodného prostředí a jeho schopnosti biokoncentrace v lipidickém podílu organismu. Je uváděn pro hydrofobní pesticidy a lze ho stanovit jako poměr rovnovážných koncentrací dané látky v organismu a ve vodě. BCF je přímo úměrný hodnotám pK_{ow} .
- Perzistence - vyjadřuje dobu, po kterou zůstává látka v prostředí nezměněná. Perzistenci lze také vyjádřit poločasem života dané látky, tzn. dobou, za kterou obsah dané látky v prostředí klesne na polovinu [39]. Z hodnot poločasu života se pesticidy dělí na non-perzistentní pesticidy (s hodnotou poločasu života menší než 30 dní), středně perzistentní (30 -100 dní) a vysoce perzistentní, jejichž hodnoty poločasu života jsou vyšší než 100 dní [40].
- Půdní adsorpční koeficient (K_{oc}) - Tímto parametrem je popsána schopnost pesticidu vázat se na půdní částice a také míra perzistence rezidua v půdním prostředí. Látky

s vyššími hodnotami K_{oc} jsou silně vázané na půdní částice, v důsledku čehož jsou obtížně biodegradovatelné a také imobilizované vůči pohybu v půdě a případnému odpaření.

- Procesní faktor (P) - Hodnoty procesního faktoru se využívají pro vymezení rozsahu přechodu rezidua pesticidů do jednotlivých frakcí při výrobních procesech potravin, zdali reziduum přechází snáze do finálního produktu či odpadu z výroby atd. Procesní faktor je definován jako poměr mezi rezidui v produktu a v původní surovině (vztaženo na jednotku hmotnosti). Ve většině případu je hodnota procesního faktoru $P < 1$, výrazný pokles reziduí v potravině je způsoben např. mytím, vařením, fermentací atd. S hodnotami $P > 1$ je možno se setkat např. při lisování rostlinných olejů, kdy méně polární pesticidy obsažené v olejninách mohou snadněji přecházet do surového oleje [28, 35].

5.3 Vysvětlení základních pojmů

- Rezidua pesticidů

Pojmem rezidua pesticidů jsou podle [5] označovány zbytková množství pesticidů a jejich metabolitů, rozkladných nebo reakčních produktů, v potravinách, zemědělských plodinách nebo krmivech.

- Maximální limit reziduí (MLR)

Tímto limitem je označeno nejvyšší přípustné, toxikologicky přijatelné množství pesticidů (vyjádřené v mg/kg), které je výsledkem používání pesticidů v souladu se správnou zemědělskou praxí, nebo je výsledkem používání pesticidů, které způsobily kontaminaci životního prostředí a dnes již nejsou používanými pesticidy.

Je nutno podotknout, že MLR není toxikologický referenční bod a tudíž jeho mírné překročení neznamena bezprostřední ohrožení zdraví konzumenta, avšak ve vyšším množství, mohou tyto koncentrace být již rizikové a vyvolat symptomy akutní otravy či v případě dlouhodobého příjmu vedly k chronické intoxikaci. MLR je využíváno jako kritérium pro kontrolu příslušných předpisů pro aplikaci pesticidů [41].

- Toxikologický referenční bod

Toxikologický referenční bod udává hodnotu, která charakterizuje nebezpečnost pesticidu. Často je vyjádřen jako dávka pesticidu na kg tělesné hmotnosti průměrného zdravého člověka na den. Tato dávka představuje ještě akceptovatelné zdravotní riziko po přívodu do organismu člověka. Může být také vyjádřen hodnotami **ADI (Acceptable Daily Intake – akceptovatelný denní příjem)** a **RfD (Reference Dose – referenční dávka)** pro chronický celoživotní přívod nebo **ARfD (Acute Reference Dose – akutní referenční dávka)** pro akutní přívod (jednorázová dávka).

Hodnoty přijatelného denního přívodu ADI jsou stanovovány na základě NOAEL s využitím bezpečnostního faktoru (jeho typická hodnota je 100) vyplývající ze vztahu: $ADI = NOAEL/100$.

NOAEL (no observable adverse effect level) – dávka, při které ještě nebyl pozorován škodlivý účinek

LOAEL (lowest observable adverse effect level) – nejnižší dávka, při které byl pozorován škodlivý účinek [39]

5.4 Toxicita pesticidů

Při hodnocení rizik je nutné vycházet ze znalosti expoziční dávky či dietárního přívodu. Odhad dietárního přívodu je nepostradatelný pro posouzení přijatelnosti MLR a tomu odpovídající správné zemědělské praxe z hlediska ochrany zdraví konzumentů. Za bezpečný dlouhodobý denní přívod reziduí lze považovat takový, který nepřekračuje po přepočtu na kg tělesné hmotnosti příslušnou hodnotu ADI. Stanovení přesného chronického dietárního přívodu je však velmi obtížné, neboť v některých případech nejsou k dispozici potřebné údaje [5]. V mezinárodním hodnocení je nutné znát typické hladiny reziduí (průměry, mediány) experimentálně získané při aplikaci za podmínek správné zemědělské praxe. Dále je nutno znát typický podíl reziduí v jedlém podílu dané komodity, procesní faktory (vliv kulinárních a komerčních procesů) a další možné aplikace daného pesticidu, které mohou navýšit rezidua. Pro hodnocení na národní úrovni je dále nutno zohlednit např. podíl plodiny či příslušné komodity ošetřené příslušným přípravkem, podíl plodiny či

komodity pocházející z importu, výsledky monitorovacích aktivit a dozorové činnosti, výsledky studií spotřebního koše potravin, data o spotřebě potravin včetně údajů pro citlivé skupiny populace apod.

Účinek pesticidů je dán nejrůznějšími mechanismy. Podle mechanismů účinku lze pesticidy rozdělit do tří skupin:

- Jedy kumulační – tyto jsou v malých dávkách prakticky neškodné, po dosažení toxické koncentrace se jejich účinky začínají projevovat
- Jedy koncentrační – jejich účinek je úměrný dávce
- Jedy sumační – při jednorázových dávkách ve vyšším množství způsobují akutní a smrtelné otravy, avšak v nízkých a opakovaných nebo dlouhodobě působících dávkách se také projevuje jejich karcinogenní účinek [41].

Toxické účinky látek se stanovují dopředu tzv. biologickým pokusem na zvířatech. Míra toxicity je měřena a uváděna v tzv. **letální dávce (LD₅₀)**, vyjadřována v gramech nebo miligramech na 1 kg živé hmotnosti. Číslem 50 se značí množství látky, jehož požitím uhynie 50 % živých organismů a 50 % přežije [34].

Pomocí testů jsou toxické účinky zkoumány na:

- akutní toxicitu (do 28 dní)
- subakutní toxicitu (do 90 dní)
- chronickou toxicitu (1 – 2 roky)

Při chronickém působení delším jak dva roky již hodnota letální dávky nevyovídá o chronické toxicitě. Při chronickém působení toxických látek na organismus člověka se často vyskytuje alergická reakce, která představuje jeden z vedlejších účinků toxických látek.

5.4.1 Důležité účinky pesticidů

- karcinogenní účinky – existuje problém při jejich dokazování, sleduje se vznik konkrétního nádoru, jedná se o dlouhodobé pokusy
- mutagenní účinky – látky mající schopnost vyvolávat změny v bílkovinných řetězcích, v 95 % případech karcinogenní účinky předchází mutagenním
- teratogenní účinky – negativně ovlivňují embryonální vývoj
- strumigenní účinky – ovlivňují distribuci jódu do štítné žlázy [39]

Třída	Slovní hodnocení látek	LD ₅₀ pro laboratorního potkana (mg/kg)	
		orálně	dermálně
Ia	extrémně nebezpečné	< 5	< 50
Ib	vysoce nebezpečné	5 – 50	50 – 200
II	středně nebezpečné	50 – 2000	200 – 2000
III	málo nebezpečné	> 2000	> 2000
U	pravděpodobně bezpečné	> 5000	> 5000

Rozdělení pesticidů dle jejich nebezpečnosti podle WHO [42].

5.5 Kontaminace potravin po aplikaci pesticidů

Po aplikaci pesticidů podléhají aktivní složky pesticidních přípravků různým změnám, které vedou k postupnému poklesu koncentrace jejich reziduí, avšak zabránit průniku těchto látek do potravního řetězce člověka je nemožné. V potravinách jsou často detekovány ve stanovitelných koncentracích volná rezidua použitého pesticidu či produkty jeho transformace, část reziduí může být vázána v konjugátech či přímo na složky matrice [43].

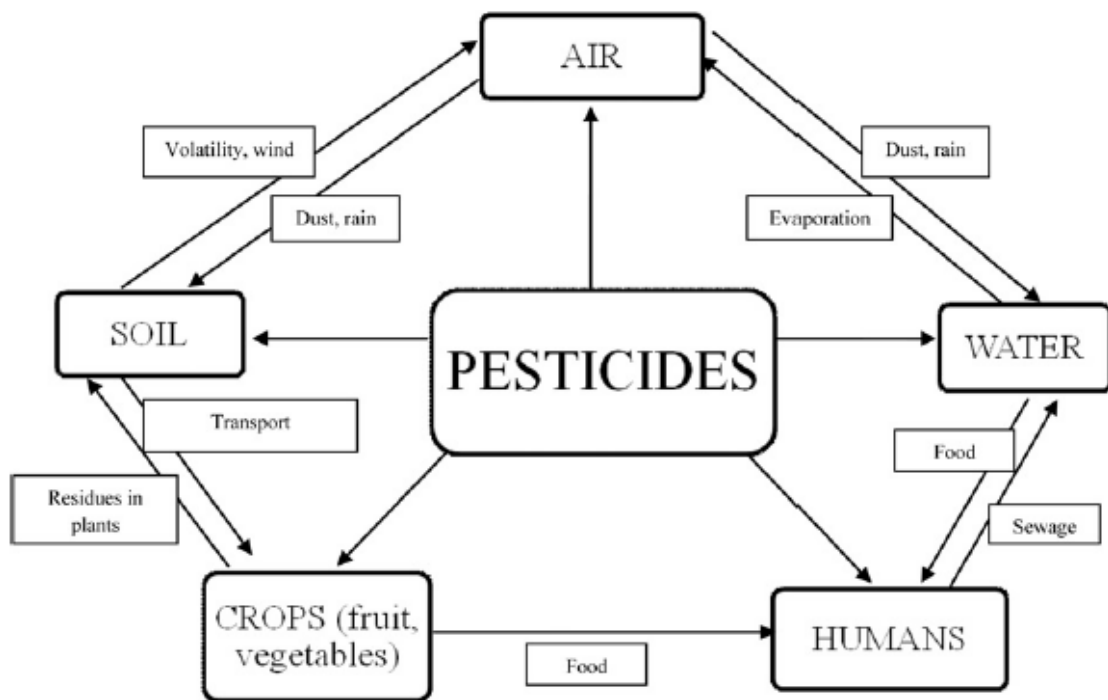
5.5.1 Osud pesticidů po aplikaci ve vztahu ke kontaminaci potravin

K průniku reziduí pesticidů může dojít přímo, kdy reziduum přechází z ošetřených plodin do produktů z nich vyrobených, nebo nepřímo, kdy dochází k přenosu reziduí

z kontaminovaného krmiva do hospodářských zvířat a následně do různých potravinářských produktů. Informace o distribuci reziduí a jejich chemické formě jsou často studovány prostřednictvím metabolických studií využívajících izotopy značené pesticidy.

Aplikace pesticidních přípravků v rostlinné výrobě probíhá často do půdy či na listovou plochu. Použitím pesticidních přípravků se systémovými účinky dochází k jejich penetraci kutikulou listů či příjmu kořenovým systémem, přičemž jsou v rostlině translokovány. Distribuce v rostlině nemusí být rovnoměrná, a tudíž rezidua mohou být i v částech rostlin, které nebyly pesticidem bezprostředně ošetřeny. Naproti tomu použitím pesticidů s kontaktními účinky dochází k lokalizaci pouze na povrch rostliny, a tudíž nedochází k jejich transportu do neošetřených částí. Pesticidní přípravky lze aplikovat také ve formě sprejů a prášků, přičemž tato forma aplikace může vést ke značné kontaminaci atmosféry a s tím spojeným transportem těchto přípravků ve formě par či pevných částic do neošetřovaných lokalit.

V případě živočišných produktů, jak již bylo řečeno výše, je nejčastějším zdrojem reziduí pesticidů kontaminované krmivo. K dalším zdrojům patří také dermální či inhalační expozice, ke které dochází např. při aplikaci insekticidů ve stájích. Po proniknutí reziduí do organismů může dojít k řadě změn aplikovaného pesticidu. Tyto informace o distribuci mateřského pesticidu, jeho degradačních produktech jsou požadovány při procesu registrace přípravku [44, 45, 46].



Tabulka 1: Schéma koloběhu pesticidů v prostředí [47].

5.5.2 Degradace, biotransformace

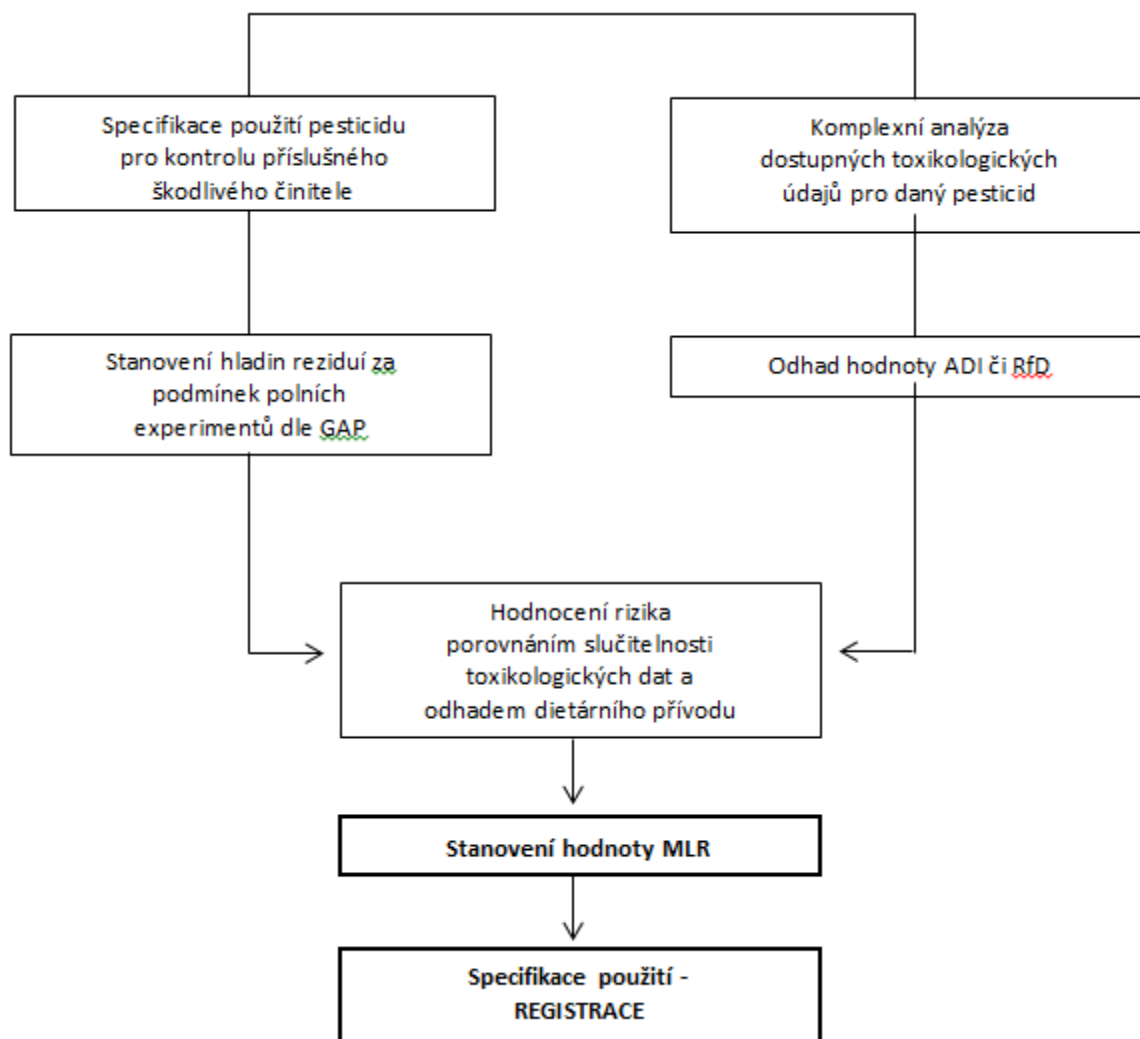
Po aplikaci pesticidů dochází k postupnému snižování koncentrace jejich reziduí, vlivem fyzikálně-chemických faktorů jako je sluneční záření, vlhkost, vyšší teplota nebo také oxidace vzdušným kyslíkem. V cílových i necílových organismech dochází také k postupné biotransformaci reziduí pesticidů, která je součástí detoxikačních pochodů. Pokles obsahu reziduí vzhledem k jednotce hmotnosti organismu, může také souviset se zředovacím efektem, ten je způsoben např. nárůstem biomasy v průběhu zrání dané plodiny a nemusí tedy přímo znamenat eliminaci či degradaci pesticidů [28]. V půdním prostředí mohou pesticidy podléhat také řadě změn, v závislosti na jejich fyzikálních vlastnostech. Může zde docházet k fotolýze v povrchových vrstvách, k odpařování do atmosféry či sorpci na půdní částice dále také k biodegradaci přítomnou mikroflórou, která může pesticidy využít jako substrát a konvertovat je až na jednoduché anorganické metabolity. Polární pesticidy či polární organické transformační produkty jsou vzhledem ke své dobré rozpustnosti ve vodě v půdním prostředí značně mobilní a mohou penetrovat až do zdrojů pitné vody [35].

5.5.3 Změny při technologickém, či kulinárním zpracování

Ze strany dietární expozice reziduí pesticidů je nutno brát skutečnost, že operace používané při kulinárním či komerčním technologickém zpracování kontaminovaných potravin mohou vést k významným koncentračním změnám. Jednak může dojít k poklesu v důsledku fyzikálně-chemické případně biochemické degradace, fyzikálních ztrát, mechanickému oddělení části potraviny obsahující vyšší koncentraci reziduí. Může také dojít k zakoncentrování rezidua v dané frakci vlivem nerovnoměrné distribuce reziduí ve výchozí komoditě nebo v důsledku vyšší afinity k dané frakci např. s podobnou polaritou. Při technologickém zpracování může také docházet k tvorbě toxických degradačních produktů z relativně netoxických mateřských pesticidů. Koncentrace reziduí může být dále ovlivněna různými mechanismy např. hydrolýzou, oxidačními a redukčními reakcemi (pečení, vaření, ohřev), rozpouštěním (mytí, macerace, blanžírování), vytěkáním (odpařování, propařování párou), distribucí mezi vodnou a lipidickou fází (lisování oleje), adsorpcí (filtrace, centrifugace) a podobně [48].

5.6 Registrace pesticidů

Státní rostlinolékařská správa (SRS) vydává pro ČR Seznam registrovaných přípravků na ochranu rostlin, pomocí které informuje veřejnost o přípravcích na ochranu rostlin, které jsou na základě rozhodnutí o registraci, povoleny k uvádění na trh a používání. Registrace pesticidů probíhá na základě získaných hodnot MLR, jejichž postup získání uvádí následující schéma [49].



Obrázek 5: Schéma registrace pesticidů na základě získaných hodnot MLR.

Mezinárodní doporučení pro hodnoty MLR vydává Codex Committee on Pesticide Residues (CCPR) vycházející z návrhů Joint Meeting on Pesticide Residues (JMPR), který tvoří společný expertní panel FAO a WHO. Na vědeckém hodnocení rizik regulovaných sloučenin v EU, mezi které patří i pesticidy se podílí European Food Safety Authority (EFSA). V USA zodpovídá za legislativu v oblasti MLR Food and Drug Administration (FDA).

5.7 Současná legislativa ČR

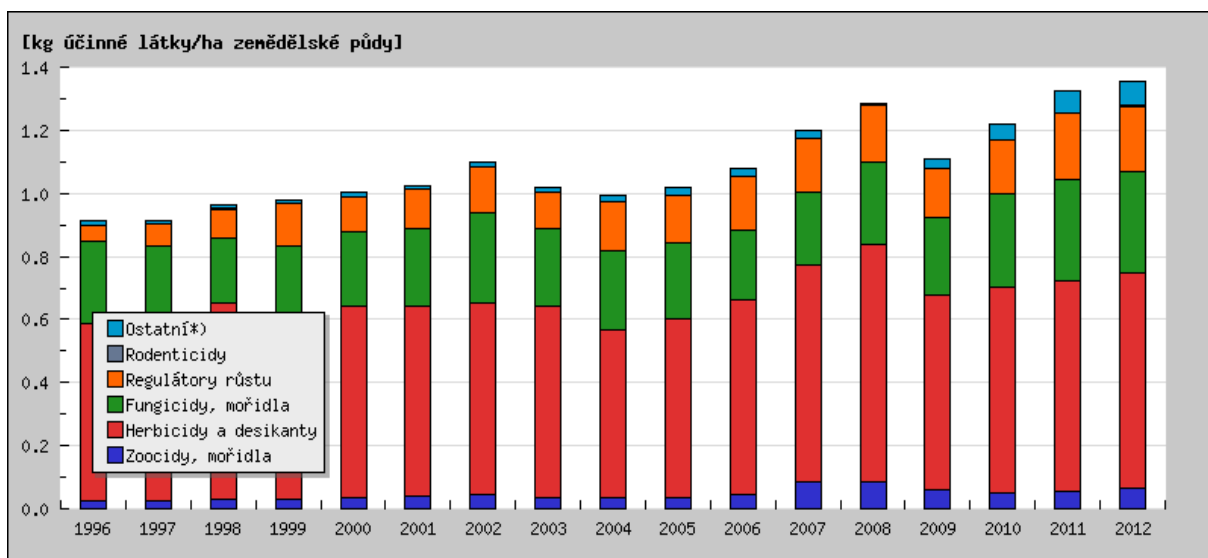
Rozhodnutí o registraci přípravků na ochranu rostlin v ČR je upraveno zákonem č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči. Posouzení přípravků z hlediska ochrany zdraví lidí zajišťuje Ministerstvo zdravotnictví ČR. Výsledkem posouzení přípravků je posudek, který je podkladem pro rozhodnutí o jeho registraci. Řízení o jeho registraci je koordinováno rostlinolékařskou správou spolu s MZ ČR [50].

Základní normou v ČR pro oblast potravin je zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích, ve znění pozdějších předpisů. Důležitou právní normou pro oblast pesticidů je vyhláška č. 158/2004 Sb., kterou se stanovuje maximální přípustné množství reziduí stanovených pesticidů v potravinách a potravinových surovinách. Novelizaci pro rezidua pesticidů v potravinách rostlinného původu přináší vyhláška č. 68/2005 Sb. V příloze č. 3 jsou pak uvedeny hodnoty MLR pro rezidua pesticidů v potravinách rostlinného původu a v příloze č. 4 pak hodnoty MLR pro potraviny živočišného původu. Hodnoty MLR jsou však ve velké míře harmonizované s legislativními předpisy EU.

Důležité normy v této oblasti jsou také zákon č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči, ve znění pozdějších předpisů, zákon č. 329/2004 Sb., o přípravcích a dalších prostředcích na ochranu rostlin, ve znění pozdějších předpisů a Směrnice 2002/63, která řeší komplexně problematiku odběru vzorků jak rostlinného tak živočišného původu pro účely kontroly reziduí pesticidů [51].

5.8 Spotřeba pesticidů v ČR a ve světě

Spotřeba pesticidů v ČR oproti konci 80. let výrazně poklesla. Mezi nejvýznamnější faktory podílejících se na snižování spotřeby patřila transformace zemědělství v 90. letech, rozvoj nových technologií a vědeckých poznatků, snaha co nejvíce zabránit negativním dopadům pesticidních látek na životní prostředí, a také snaha ČR o legislativní přiblížení se státům EU [52]. V posledních letech vlivem poklesu zemědělské plochy lze však sledovat nárůst spotřeby pesticidů na ha zemědělské plochy.



Obrázek 6: Spotřeba pesticidů na území ČR v letech 1996 až 2012 [52].

Celková spotřeba účinných látek za rok 2012 činí 5701 tun. Největší procento těchto látek činí pesticidy na ochranu obilovin, olejnin, kukuřice a řepy. Konkrétně u obilovin činí tato spotřeba přibližně 46 %, u olejnin 25 %, u kukuřice 11 % a na řepu připadá 6 % z celkového množství používaných pesticidních látek v ČR. Podle cílových organismů, největší podíl připadá na herbicidy a fungicidy, na které společně připadá 74 % veškerých používaných pesticidních látek [52]. Tabulka č. 2 ukazuje přehled spotřeby jednotlivých účinných látek v kg za rok 2012.

KATEGORIE	CELKEM	OBILOVINY	KUKUŘICE	ŘEPA CUKR A KRMNÁ	OLEJNINY	OSTATNÍ
CATEGORIES	TOTAL	CEREALS	MAIZE	BEET	OIL PLANTS	OTHERS
ADITIVUM	8 662,51	4 343,61	361,44	141,45	1 017,58	7,69
ADJUVANT	33 668,71	12 939,57	8 562,83	3 779,07	6 979,68	0
AKARICID	3 640,55	0	0	0	0	0,98
ANTITRANSPIRANT	81 365,92	9 105,19	1 349,52	750,43	65 203,56	174,77
BIOPREPARÁT	4 517,72	98,80	0	0	2 853,54	6,32
DESIKANT	31 376,42	3 047,75	5,24	0	16 400,03	18,33
FUNGICID	1 352 375,58	604 983,30	719,81	30 640,22	230 764,30	316 571,30
HERBICID	2 841 950,49	1 142 898,68	521 362,84	261 099,47	763 214,84	28 480,21
INSEKTICID	266 143,31	58 059,58	12 189,88	7 721,59	173 801,44	15,28
MOLUSKOCID	4 684,88	85,09	42,55	15,45	4 534,41	0
PASIVNÍ POMOCNÝ PROSTŘEDEK	163 352,55	42 558,23	54 852,69	14 559,66	35 764,94	66,96
PODPORA ZDRAVOTNÍHO STAVU	24 590,62	61,80	0	0	55,75	0
REGULÁTOR RŮSTU A VÝVOJE	871 718,87	758 459,46	1,04	4,22	111 226,16	5,62
REPELENT	4 724,60	0	0	0	0	336,69
RODENTICID	8 481,54	2 801,14	7,35	0	4 192,95	38,76
SEMIOCHEMIKÁLIE	43,80	0	0	0	0	0,02
CELKEM	5 701 647,00	2 639 442,20	599 455,19	318 711,56	1 416 009,18	221 722,93

Tabulka 2: Spotřeba jednotlivých účinných látek za rok 2012 (kg, l) [52].

Mezi největší spotřebitele na světě patří území Jižní Ameriky, Asie, Afriky a některé země Evropy. Naopak nejmenší spotřeba chemických ochranných látek je ve Skandinávských zemích nebo Rusku, což je zřejmě způsobeno přísnými ekologickými předpisy pro používání pesticidů [52, 53].

5.9 Kontrola a monitoring

Informace týkající se druhů a koncentrací reziduí pesticidů v potravinářských surovinách a produktech jsou stejně jako u jiných cizorodých látek především získávány prostřednictvím národních monitorovacích programů nebo v rámci cílených vyšetření, které jsou reakcí na aktuální problémy zjištěné v rámci různých monitorovacích programů. Ze získaných dat se také posuzuje účinnost legislativních opatření či lze tato data použít pro hodnocení zdravotních rizik.

Instituce zodpovědná za státní kontrolu reziduí pesticidů v oblasti potravin rostlinného původu je Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI). Provedení kontrol reflektuje signály ze zahraničí, nové informace z odborné literatury, podezření z vlastních měření či podněty spotřebitelů. Monitoring slouží jednak k identifikaci trendů, k vyhledávání potenciálních problémů (záměna přípravků, nepovolené použití pesticidů apod.), ale i jako významný zdroj informací pro stanovení hygienických limitů a posouzení dietární expozice obyvatelstva. Počet prováděných stanovení a analyzovaných vzorků v rámci kontroly a monitoringu je srovnatelný se zeměmi EU. Monitoring produktů živočišného původu zajišťuje Státní veterinární správa (SVS). Rezidua moderních pesticidů se vyskytují v potravinách živočišného původu jen ojediněle. Nejčastěji jsou nalézána rezidua organochlorových pesticidů a jejich metabolitů, které se kumulují v tukové složce. Přehled nejčastěji používaných účinných látek v přípravcích pro ochranu rostlin uvádí tabulka č. 3.

Látka	Celkem*	Obiloviny	Kukuřice	Řepa cukrová a krmná	Brambory	Olejniny	Ostatní
Celkem	5 139 343,104	2 365 349,993	592 902,838	819,134	139 534,156	462,461	118 474 440,760
chlormekvát chlorid	651 869,222	600 467,739	212,444	0	0	50 536,781	12,800
Glyfosát -IPA	530 167,436	280 312,003	43 245,471	5 403,139	4 367,553	148 563,041	20 261,202
Glyfosát	355 760,323	178 002,306	25 344,145	4 418,825	1 795,242	102 389,214	16 245,327
Acetochlor	232 452,936	161,261	200 668,177	37,457	1,372	31 583,133	0
Metazachlor	178 256,086	982,913	0	0	0	176 326,685	0
Isoproturon	156 233,026	156 018,901	58,677	0	44,226	111,222	0
Prochloraz	140 070,878	114 070,739	0,590	4 535,631	0	21 458,500	0,878
Chlorpyrifos	139 931,628	14 168,452	240,035	2 302,584	1 564,026	118 863,971	22,101
Chlorotoluron	132 387,693	124 773,617	97,399	50,912	1,244	7 331,832	132,689
Síra	107 826,643	1 750,182	0	0	0	0	0
Terbuthylazin	106 766,668	69,464	106 328,778	0	0,653	367,773	0
Glyfosát- potassium	106 232,678	42 925,930	15 044,319	1 299,153	1 079,481	36 301,756	3 023,169

* Spotřeba vyjádřena jako celkový objem používaných účinných látek (kg, l) za rok 2010

Tabulka 3: Přehled nejčastěji používaných účinných látek v přípravcích pro ochranu rostlin [54].

6. Stanovení reziduí pesticidů v potravinách

Volba vhodné analytické metody vychází z:

- pracovních charakteristik – mezi tyto charakteristiky patří mez detekce a stanovitelnosti, selektivita, specifická, rozsah a linearita, přesnost, robustnost
- účelu analýzy – může se jednat o kontrolu hygienické nezávadnosti, monitoring, orientační screening či výzkum
- znalosti historie vzorku – např. jaké pesticidní přípravky byly použity
- povahy rezidua – jedná-li se o mateřskou sloučeninu či metabolit

V dnešní době vlivem pokroku v oblasti instrumentace, současně s neustále se rozšiřujícím spektrem pesticidních látek a snižujícími se hodnotami hygienických limitů dochází k vyvolání potřeb další optimalizace stávajících a zavádění nových analytických postupů. K naplnění těchto cílů je ovšem hlavní podmínkou nutná komplexní znalost jak

vlastností sledovaných látek, tak i samotné rozlišení předností a limitujících faktorů jednotlivých technik. Nutnost pokrýt co největší spektrum stanovovaných reziduí, vyznačujících se širokým spektrem fyzikálně chemických vlastností, vedly k vývoji tzv. multireziduálních metod [55, 56]. Tyto nově zavedené multireziduální metody musí splňovat stanovené regulační požadavky a také aby svou přesností odpovídala i vědeckým účelům. S rozvojem kapilárních kolon a vývojem nových detektorů došlo k významnému rozšíření v používání plynové chromatografie. Avšak až s rozvojem HPLC došlo k rozšíření možností multireziduálních metod o rezidua pesticidů, která nebylo možné stanovit pomocí plynové chromatografie. Běžně se multireziduální metody skládají z těchto hlavních kroků: izolace, přečištění a detekce. Ke confirmaci pozitivních nálezů je využíváno plynové či kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem. Dále je nutno dodat, že vedle multireziduálních metod existují i speciální postupy pro jednotlivé či skupiny pesticidů, kterých se využívá tam, kde k jejich stanovení nelze multireziduální metody použít. Jako příklad bych uvedl fungicidy ze skupiny dithiokarbamátů, které se nepřímo stanovují jako sirouhlík [57, 58].

6.1 Izolace reziduí

Pesticidy ve vzorcích potravin se často nacházejí v nižších koncentracích, než vyžaduje jejich přímé stanovení. I proto je nutné před vlastním stanovením analyty předem izolovat a zkoncentrovat. Vlivem matričního efektu, může dojít k výrazné chybě, která při použití kalibrace pomocí standardů pesticidů rozpuštěných v čistém rozpouštědle, může dosáhnout i několika stovek procent. Často používaným způsobem izolace reziduí pesticidů je jejich extrakce vhodným organickým rozpouštědlem či směsí rozpouštědel. Volba závisí především na polaritě rezidua, obsahu vlhkosti či lipidů ve vzorku. Při vyšších obsazích vody a nižších koncentracích lipidů (přibližně do 5 %) se uplatňují s vodou mísitelná, polární rozpouštědla s nízkými body varu. Patří sem např. aceton, acetonitril a methanol [59,60]. V těchto případech je nutno v následném kroku rezidua převést do nepolárního rozpouštědla (reextrakcí), což umožňuje odstranit nejvíce hydrofilní koextrakty obsažené v primárním extraktu. Použití méně polárních rozpouštědel např. ethylacetátu, s přidavkem bezvodého síranu sodného (dehydratace vzorku) umožňuje zmíněný reextrakční krok vypustit. Po extrakci je nutné odstranit přirozené složky vzorku koextrahované spolu s analyty, za tímto účelem se často využívá adsorpční chromatografie, gelová permeační chromatografie nebo extrakce tuhou fází. Po této operaci nastává již vlastní identifikace a kvantifikace pomocí

separačních technik. Tato práce se bude zabývat identifikací a kvantifikací vybraného pesticidu ve vzorku zeleného čaje pomocí plynové chromatografie v kombinaci s vhodným detektorem [61, 62].

6.1.1 Extrakční techniky

Srovnání vlastností extrakčních technik je uvedeno v tabulce č. 4. Jejich podrobnější popis a princip použití je uvedeno v následujícím textu.

extrakční technika	výhody	nevýhody
LLE	<ul style="list-style-type: none"> • jednoduchá instrumentace 	<ul style="list-style-type: none"> • velká spotřeba rozpouštědel • časová náročnost • riziko tvorby emulzí
SPE	<ul style="list-style-type: none"> • časová náročnost • malá spotřeba rozpouštědel • široký výběr kolonek a adsorbentů 	<ul style="list-style-type: none"> • vyšší pořizovací náklady pevných fází (v některých případech je lze použít pouze jednou)
MSPD	<ul style="list-style-type: none"> • cena • malá spotřeba rozpouštědel 	
SPME	<ul style="list-style-type: none"> • jednoduchá aparatura • spotřeba rozpouštědel 	
SBSE	<ul style="list-style-type: none"> • jednoduchá aparatura • spotřeba rozpouštědel 	<ul style="list-style-type: none"> • malá kapacita vzorkovače
SFE	<ul style="list-style-type: none"> • automatizace • není nutné přečištění • úspora rozpouštědel • časová náročnost 	<ul style="list-style-type: none"> • náročnost na optimalizace extrakčních podmínek • nežádoucí vliv vody na účinnost • cena
MAE	<ul style="list-style-type: none"> • časová náročnost • malá spotřeba rozpouštědel • extrakce více vzorků současně 	<ul style="list-style-type: none"> • časová náročnost na chlazení extrakčních patron • nutné přečištění • re-adsorpce látek během ochlazování • rozpouštědlo musí absorbovat mikrovlny
Soxhletova extrakce		<ul style="list-style-type: none"> • dlouhá doba extrakce • spotřeba rozpouštědel • nutnost přečištění
Soxtec extrakce		<ul style="list-style-type: none"> • spotřeba rozpouštědla • časová náročnost
PLE	<ul style="list-style-type: none"> • časová náročnost • spotřeba rozpouštědel • automatizace 	<ul style="list-style-type: none"> • nutnost přečištění
QuEChERS	<ul style="list-style-type: none"> • spotřeba rozpouštědel • rychlá a levná extrakce • vysoká výtěžnost 	
USE	<ul style="list-style-type: none"> • extrakce více vzorků současně 	<ul style="list-style-type: none"> • nutnost přečištění • spotřeba rozpouštědel

Tabulka 4: Srovnání vlastností extrakčních technik [51-53, 56-66, 76].

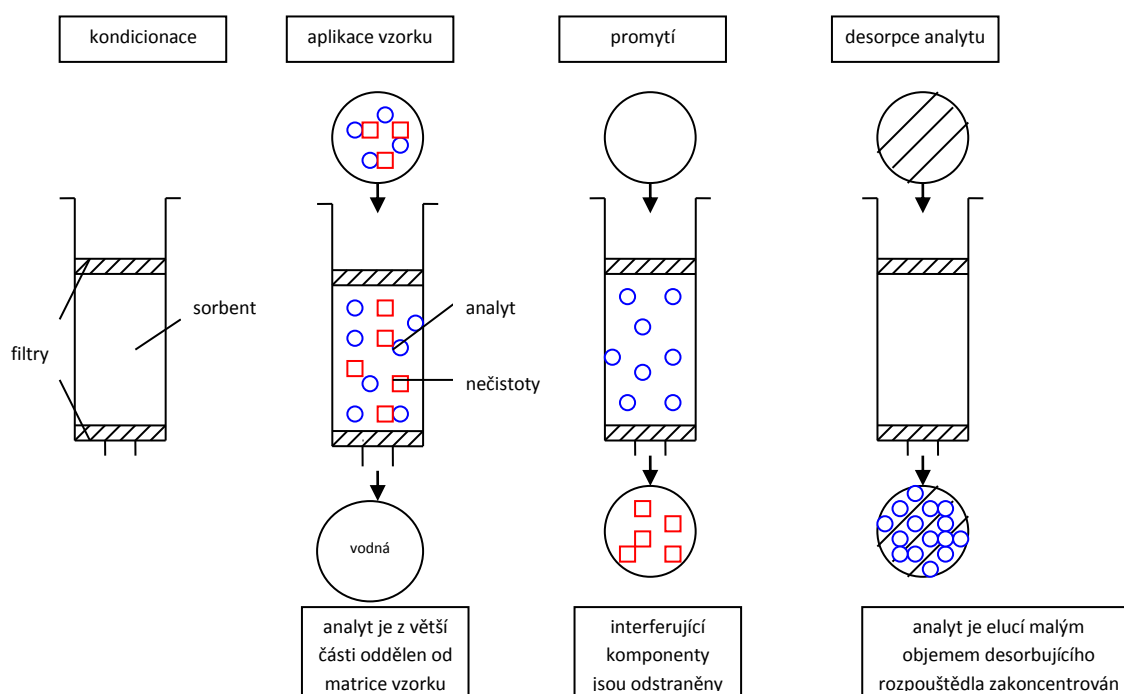
- Extrakce z kapaliny do kapaliny

Tato metoda je založena na přechodu rozpuštěné látky z jedné kapalné fáze do druhé kapalné fáze. V praxi bývá jedním rozpouštědlem voda (vodný roztok) a druhým organické rozpouštědlo, s vodou nemísitelné. Podmínkou je ustanovení fázové rovnováhy mezi kapalinami.

- SPE (extrakce tuhými fázemi)

Extrakci tuhými fázemi SPE je možno použít pro přípravu kapalných vzorků před chromatografickou analýzou. Často se také využívá k přečištění vzorků po extrakci. Hlavní nevýhodou je vysoká cena pevných fází, které se často dají použít pouze jednou [63].

Principem této metody je sorbování analytu na tuhou fázi z fáze kapalné. Vzhledem ke stejnému mechanismu retence jsou sorbenty používané v SPE podobné jako v kapalinové chromatografii. Lze použít automatické postupy přípravy vzorků, které umožní snížit čas a cenu přípravy vzorku. Princip použití SPE je zobrazen na obrázku č. 7. Lze vidět, že se SPE extrakce skládá ze čtyř základních kroků: kondicionace, aplikace vzorku, promytí a desorpce analytu.



Obrázek 7: Schéma SPE (off-line) [53].

Metodu SPE lze realizovat dvojím způsobem: nepřímou (off-line) nebo přímo (on-line). Při nepřímé SPE jsou využívány malé kolonky nebo extrakční disky z plastu či skla plněné sorbentem, jimž může být vzorek buď protlačován nebo prosáván.

Přímá (on-line) SPE je zautomatizována metoda, která vyžaduje určitou úpravu chromatografického přístroje. Je to dáno především tím, že sorpční kolona bývá spojena přímo s analytickou kolonou přepínacím ventilem. Toto spojení umožňuje volit tok mobilní fáze pouze analytickou kolonou nebo po přepnutí přepínacího ventilu do druhé polohy umožňuje desorpci vzorku zachyceného desorpční kolonou a tím jej vymýt přímo do analytické kolony.

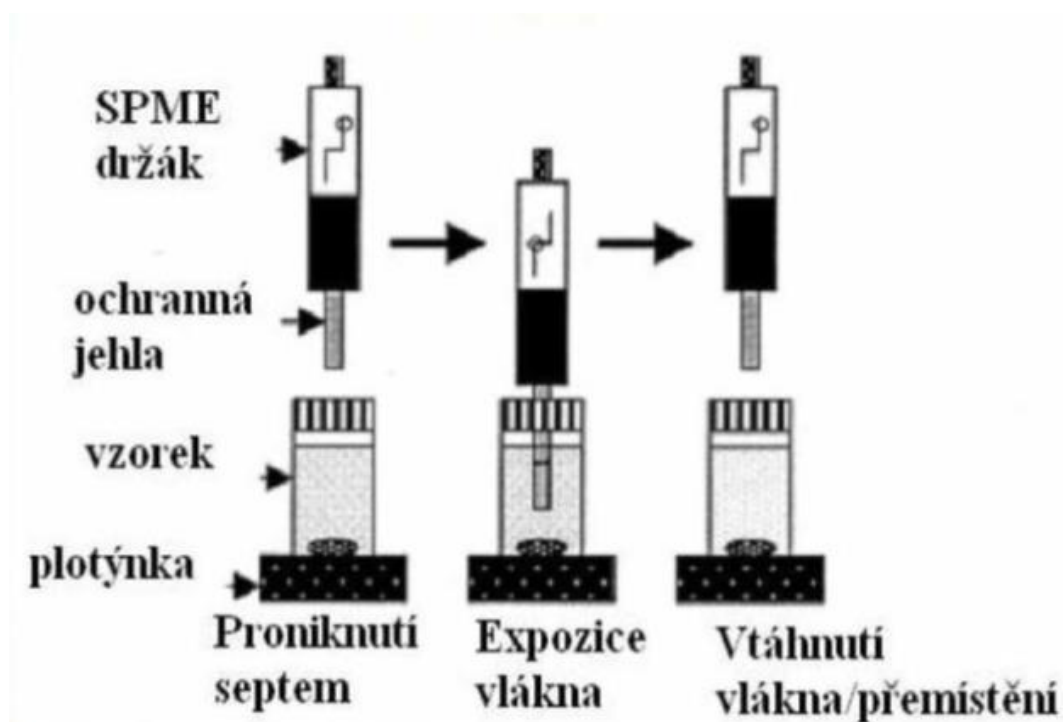
Volba sorbentů pro danou extrakci je určována povahou analytu, který má být zkoncentrován. Interakce mezi sorbentem a sledovaným analytem mají charakter Van der Waalsových sil (nepolární analyt), vodíkových vazeb, interakce dipól-dipól (polární analyt) či iontové interakce. Nutno také uvažovat vedle interakcí analytu a sorbentu také interakce mezi ostatními složkami vzorku a sorbentu, jelikož selektivita sorbentu není taková, aby došlo k zachycení pouze analytu. Sorbenty používané v SPE mohou mít charakter od nepolárních fází typů, C18, C8 až po sorbenty polární, dále mohou mít charakter polymerních sorbentů, ionexového typu či speciálních sorbentů. V analýze pesticidů jsou nejčastěji využívány sorbenty typu silikagelu s chemicky vázanými alkyly (např. oktadecylsilikagel, oktylsilikagel), polymerní sorbenty (např. divinylbenzenový kopolymer), v posledních letech se často využívána vysoce zesíťovaného sorbentu typu styren-divinylbenzen, který je charakteristický vyšším stupněm zesíťování, což zvyšuje jeho specifický povrch a poskytuje dosažení lepší interakce mezi analytem a sorbentem [64-66].

- MSPD (matrix solid-phase dispersion)

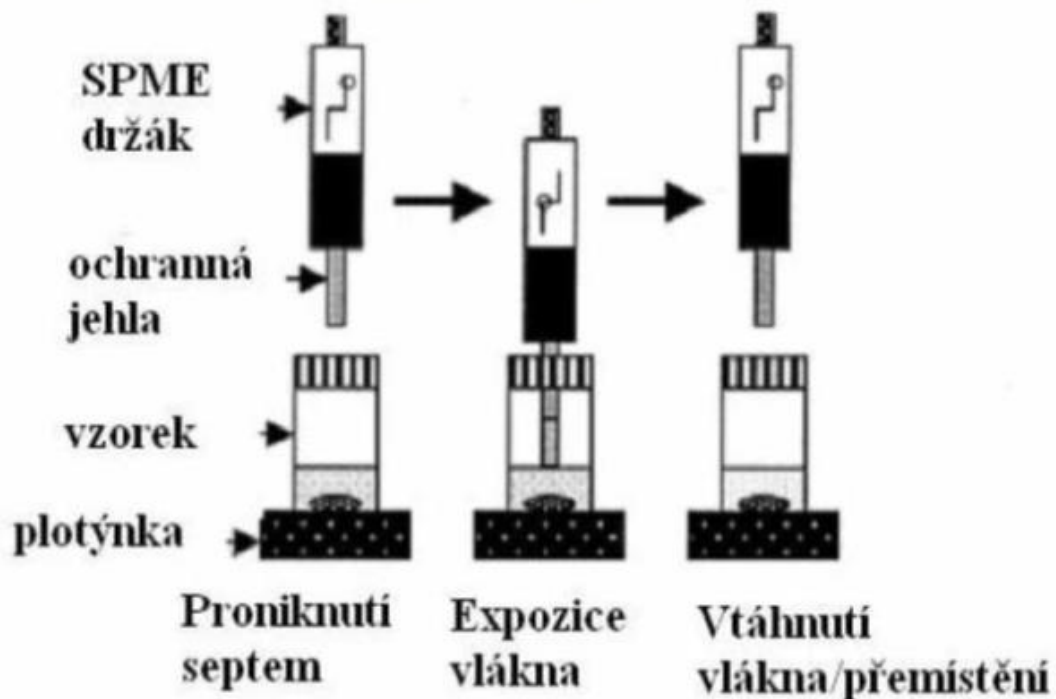
Principem extrakce disperzní tuhou fází je rozmělnění a homogenizace vzorku s vhodnou pevnou fází. Jejich promícháním dochází k rozrušení vzorku, následně se pevná fáze rozpouští a disperguje složky vzorku. Poté je směs vložena do patrony a analyt je eluován vhodným rozpouštědlem.

- SPME (solid phase microextraction)

Mikroextrakce tuhou fází je izolační metoda využívající sjednocení procesu vzorkování a extrakce. Principem této metody je expozice malého množství extrakční fáze v nadbytku vzorku a sorbování analytu na SPME vlákno dokud není dosaženo rovnováhy [67]. Oproti klasickým extrakčním metodám není analyt extrahován ze vzorku v co nejvyšší koncentraci, ale pouze do doby dosažení rovnováhy. Dosažení rovnovážného stavu je ovlivněno koncentrací analytu ve vzorku, typem a tloušťkou polymeru, který tvoří adsorpční fázi. Optimalizaci extrakčního procesu lze ovlivnit například typem polymeru pokrývajícím vlákno, tloušťkou stacionární fáze (těkavější látky vyžadují silnější vrstvu polymeru a slabší vrstva polymeru je vhodná pro sorpci méně těkavých analytů), hodnotou pH, teplotou, mícháním apod. Vzorkování u SPME je možno provádět dvěma způsoby, jednak přímým ponořením vlákna do vzorku (DI-SPME), nebo extrahováním analytu z prostoru nad vzorkem v uzavřené nádobě (HS-SPME). Použití HS-SPME je vhodné pro extrakci těkavých látek, kdy dochází k ustálení rovnováhy mezi vláknem a analytem v plynném stavu rychleji, než v případě použití DI-SPME [68]. Vzorkování při použití obou technik je ukázáno na obrázcích č. 8 a č. 9.



Obrázek 8: Extrakční kroky při DI-SPME [69].

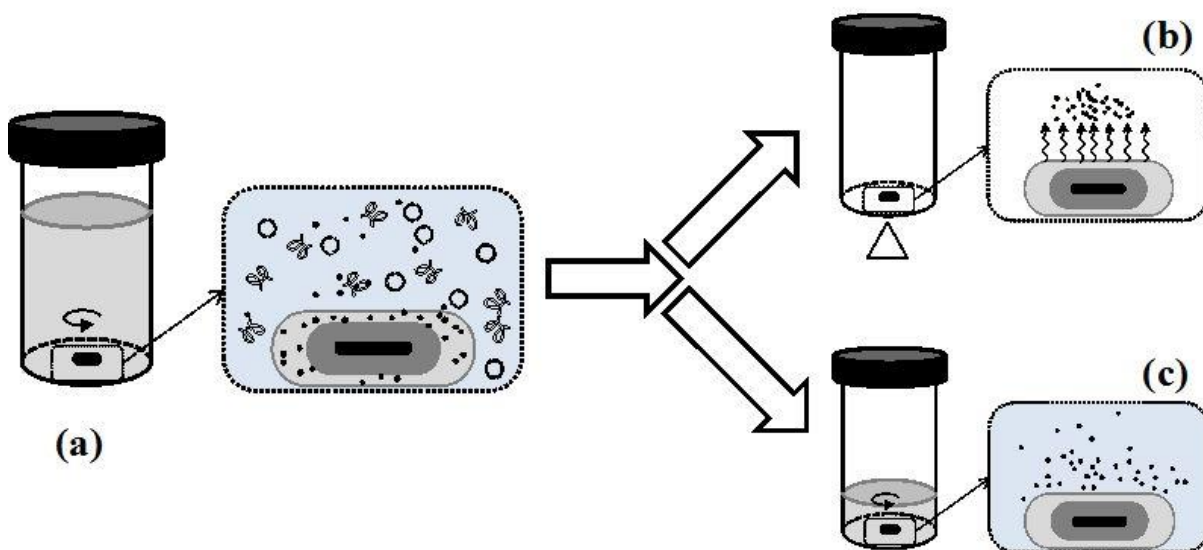


Obrázek 9: Extrakční kroky při HS-SPME [69].

- SBSE (stir bar sorption extraction)

Sorpční extrakce na míchadélku je metoda využívající míchadélko potažené polymerní fází, které je vloženo do nádoby s kapalným vzorkem či do headspace prostoru (pro vzorky plynné). Vzorek je míchán za nastavených fyzikálních a chemických podmínek, kdy dochází k sorpční extrakci do polymerní fáze. Po skončení extrakce, je nutné míchadlo vyjmout a opláchnout vhodným rozpouštědlem, aby došlo k odplavení solí, cukrů a nežádoucích látek (použitím vhodného rozpouštědla opláchnutí nezpůsobí ztrátu analytu, jelikož je pevně vázaný na stacionární fázi). Poté se míchadélko vysuší a je připraveno k desorpčnímu kroku. Desorpce se provádí jednak zvýšenou teplotou, při teplotním rozmezí 150 – 300 °C a době okolo 15 minut. Teplotní desorpční zařízení je tvořeno dvěma tepelnými odpařovači, kde první je zahříván za účelem desorpce analytu ze stacionární fáze a druhý je chlazen za účelem kryofokuse desorbovaných analytu. U tepelně nestálých látek se používá kapalinová desorpce, kdy se jako desorpční rozpouštědlo používá acetonitril, methanol, či směs jiných

rozpouštědel. Po desorpci jsou analyty zavedeny do separační techniky a detekovány. Princip SBSE extrakce s použitím teplotní a kapalinové desorpce je zobrazeno na obrázku č. 10.



Obrázek 10: Princip SBSE, extrakce (a), desorpce pro GC (b), desorpce pro LC (c) [70].

- SFE (superkritická fluidní extrakce)

Tato metoda je založena na rozpustnosti dané složky v rozpouštědle v nadkritickém stavu. Nadkritický stav vzniká zahřátím plynu nebo kapaliny na teplotu vyšší než je kritická teplota daného plynu nebo kapaliny, za současného zvýšení tlaku na hodnotu vyšší než je kritický tlak daného plynu nebo kapaliny. V tomto stavu se nadkritická tekutina svými vlastnostmi podobá vlastnostem plynů (viskozita) či kapalin (hustota). Rozpouštěcí schopností se tedy přibližuje kapalným rozpouštědlům, zatímco průnik do pevné matrice je usnadněn vlastnostmi plynů. Nejčastěji se pro SFE používá CO_2 v nadkritickém stavu. Rozpouštěcí schopnost CO_2 lze ovlivnit změnami tlaku a teploty. CO_2 v nadkritickém stavu je často používán k extrakci nepolárních pesticidů, ale lze ho přidávkem modifikátoru (acetonitril, methanol) použít i k extrakci polárních pesticidů [71].

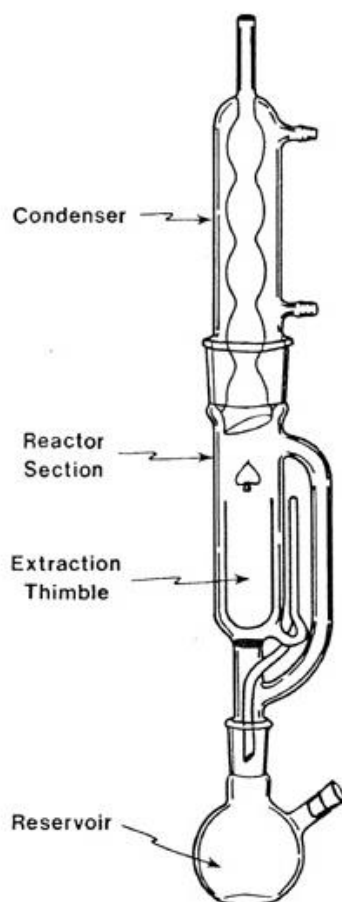
- MAE (mikrovlnná extrakce)

Mikrovlnná extrakce je využívána k extrakci organických polutantů z pevných matric. Hlavní výhodou této techniky je relativně krátká doba extrakce, kde navíc v porovnání se Soxhletovou extrakci vykazuje vyšší výtěžnost pro polární sloučeniny a také nižší spotřebu

rozpouštědla. Principem MAE je při dielektrickém ohřevu využití přeměny energie střídavého elektromagnetického pole o velmi vysoké frekvenci na energii tepelnou. Pro vznik tohoto děje je nutné působení elektromagnetického pole na polární molekuly materiálu. Tyto polární molekuly vytvářejí dipóly, které se snaží orientovat podle elektromagnetického pole a tím dochází ke tření a tvorbě tepla. Množství uvolněné tepelné energie roste s rostoucí hodnotou dielektrické konstanty. Pro termolabilní látky je vhodné zahřívat pouze matici vzorku, čímž následně dochází k uvolňování analytů do studeného rozpouštědla [72].

- Soxhletova extrakce

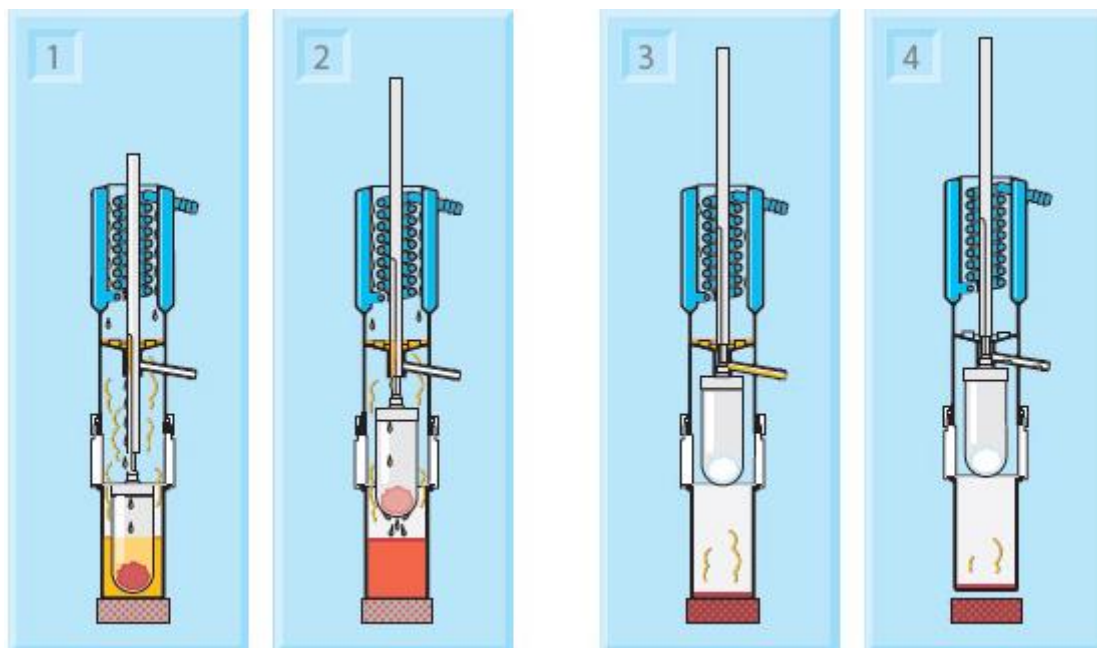
Často se používá pro izolaci jedné nebo více látek z pevných vzorků. Aparatura je složena z baňky, Soxhletova přístroje a chladiče. Pevný vzorek je umístěn v extrakční patroně, která může být buď z papíru či skla s fritou místo dna. Patrona je umístěna v Soxhletově aparatuře a po ohřevu daného rozpouštědla a dosažení jeho bodu varu, kondenzuje v chladiči a stéká do patrony se vzorkem, kde dochází k extrakci analytu a vrací se s ním do varné baňky, kde opět dochází k odpařování rozpouštědla. Nevýhodou této techniky je dlouhá doba extrakce 6 – 48 hodin, která může být snížena u modernějších přístrojů zautomatizováním celého procesu na 1 – 2 hodiny. Během celého procesu je nutno použít velké objemy organického rozpouštědla [73].



Obrázek 11: Soxhletův extraktor [74].

- Soxtec extrakce

Jedná se o nový typ automatických extraktorů, které slouží k rychlému stanovení extrahovatelných složek potravin, krmiv atd. Hlavní výhodou je plná automatizace, minimální kontakt uživatele s rozpouštědlem, nízká spotřeba rozpouštědla a příprava vzorků pro plynovou či kapalinovou chromatografii. Vzorek je umístěn v extrakční patroně a ponořen do vroucího rozpouštědla. Tím je dosaženo těsného kontaktu mezi analytem a rozpouštědlem, což vede k rychlé extrakci organického analytu. Následně je patrona vytažena nad hladinu rozpouštědla a po dobu přibližně 1 hodiny je vzorek promýván studeným rozpouštědlem. Získaný extrakt se odpaří. Doba extrakce se pohybuje kolem 3 hodin [73]. Princip Soxtec extrakce je zobrazen na obrázku č. 12.



Obrázek 12: Schéma Soxtec extrakce, ponoření do vroucího rozpouštědla (1), propláchnutí vzorku kondenzujícím rozpouštědlem (2), shromáždění čistého rozpouštědla pro další analýzy (3), ukončení extrakce (4) [75].

- Metody extrakce podporované tlakem

Tato technika kombinuje zvýšený tlak a teplotu ve spojení s kapalnými rozpouštědly k dosažení rychlé a efektivní extrakce analytu z pevného vzorku. V porovnání s klasickou kapalinovou chromatografií je vlivem zvýšené teploty a tlaku dosaženo vyšší difúzní rychlosti, zvýšení rozpustnosti analytu, dochází také k poklesu viskozity a povrchového napětí rozpouštědla. Zvýšením teploty a tlaku je dosaženo lepšího kontaktu analytu s rozpouštědlem a tím zlepšení výtěžnosti extrakce, které je dosaženo za použití menšího množství rozpouštědla a za kratší čas. Zvýšený tlak také udržuje rozpouštědlo v kapalném skupenství při dané teplotě. Používají se běžná organická rozpouštědla nebo voda ve stavu pod kritickým bodem. Patří sem např. metoda zrychlené extrakce podporovaná tlakem PSE (pressurized solvent extraction) [73, 76].

- QuEChERS (Quick-Easy-Cheep-Effective-Rugged-Saffe)

Jedná se o metodu rychlou, jednoduchou a levnou, vhodnou pro extrakci pesticidů patřících do různých chemických tříd. Tato metoda poskytuje kvalitní výsledky s minimálním počtem kroků a s nízkými nároky na spotřebu rozpouštědla či laboratorního vybavení. Původní postup této metody zahrnuje extrakci zhomogenizovaného vzorku pomocí jeho třepání s acetonem. V současné době je tento postup nahrazován třepáním s acetonitrilem, který je možno snadněji oddělit od vodné fáze přidávkem vhodných solí (bezvodý MgSO_4 a NaCl). Tím je umožněna dobrá separace fází bez manipulace s dalšími nepolárními organickými rozpouštědly a také lze získat velmi dobré výtěžky pro polární pesticidy. Jako velmi efektivní sušící činidlo se používá bezvodý MgSO_4 , následná hydratace probíhá okolo $40\text{ }^\circ\text{C}$ a zároveň se jedná o exotermickou reakci. Tato teplota není natolik vysoká, aby při ní docházelo k degradaci nebo volatilizaci přítomných pesticidů a zároveň pomáhá ověřit, zda v roztoku byla dostatečně odstraněna voda [59].

Dále je k zajištění fyzikální separace kontaminujících látek v roztoku analytu a odstranění zbytků vody obvykle použita centrifugace. Tento proces se nazývá disperzní SPE. Rozdíl disperzní SPE oproti klasické SPE je v přidání sorbentu přímo do extraktu. Metoda QuEChERS je určena pro vzorky obsahující vysoký podíl vlhkosti a ve srovnání s SPE vyžaduje méně času.

Jednotlivé kroky této metody jsou:

- Příprava vzorku a extrakce - vzorek je homogenizován a protřepán s acetonitrilem, dále jsou pro zvýšení efektivity extrakce přidány soli, báze nebo pufrы
- Přečištění pomocí dSPE – je zde využíváno MgSO_4 a SPE sorbentů k odstranění zbytku vody a kontaminantů z vyextrahovaného vzorku
- Analýza vzorku pomocí GC/MS nebo LC/MS [65, 77]
- Extrakce ultrazvukem (ultrasound assisted extraction)

Principem této metody je intenzivní pohyb vzorků v ultrazvukové lázni, který je způsoben proudy kapaliny vznikajícími pomocí ultrazvuku. Přitom dochází k rozpadu shluků částic, přičemž tepelný rozklad je snižován. Oproti technikám jako SFE a MAE se vyznačuje jednoduchostí, rychlostí a nízkým pořizovacím nákladům [78].

6.2 Přechištění

Po dokončení extrakce je z analyzovaného vzorku extrahováno mnoho interferujících látek spolu s cílovým analytem. Úkolem přechištění je odstranění těchto interferujících látek. Dominantní technikou k purifikaci potravinářských vzorků je již výše zmíněná technika SPE, za použití vhodného sorbentu. Často využívanou technikou k přechištění je také gelová permeační chromatografie (GPC), při které k dělení látek dochází na základě efektivního objemu molekuly (menší molekuly pronikají hlouběji do póru gelu a mají proto větší retenční objem, než velké molekuly. V analýze pesticidů jsou používány styren-divinylové gely s malým vylučovacím limitem. Výhodou této techniky je snadná automatizace. Další často používanou technikou je extrakce kapalina – kapalina (LLE). Principem této techniky je ustanovení fázové rovnováhy mezi dvěma nemísitelnými kapalinami. Většinou se jedná o vodný roztok a organické rozpouštědlo, kde dochází k přechodu analytu do organického rozpouštědla, ve kterém je lépe rozpustný. Analyt musí být v daném rozpouštědle co nejvíce rozpustný. Výhodou této techniky je její jednoduchost a dobrá efektivita. Mezi nevýhody lze řadit vysokou spotřebu rozpouštědel, časovou náročnost či riziko tvorby emulzí [79].

6.3 Instrumentální metody pro stanovení pesticidů

Instrumentální metody používané pro stanovení reziduí pesticidů musí splňovat požadavky stanovené nařízením (ES) č. 882/2004. Jako koncové instrumentální metody se nejčastěji využívá plynové a kapalinové chromatografie [80]. Srovnání vybraných metod a jejich vlastností shrnuje tabulka č. 5.

Technika	Výhody	Nevýhody	Řešení
GC/MS	-vysoká rozlišovací schopnost -vysoká citlivost a selektivita -existence knihovny hmotnostních spekter	-nevhodná pro tepelně nestabilní sloučeniny -vysoká spotřeba drahých vysoce čistých plynů	-derivatizace, v současné době se používá pouze u glyfosátů a degradačních produktů
LC-UV	-aplikace pro veškeré organické roztoky bez ohledu na těkavost nebo termostabilitu -složení MF a SF je variabilní	-nedostatečná účinnost separace a selektivita -velké množství drahých, toxických organických rozpouštědel	-vývoj více účinných a selektivních materiálů pro čištění a separaci (např. imunosorbenty)
LC-fluorescence	-vysoká selektivita, citlivost, nízké LOD	-málo sloučenin je fluoreskujících	-derivatizace
LC-MS	-aplikace pro veškeré organické roztoky bez ohledu na jejich těkavost a termostabilitu -variabilita mobilní a stacionární fáze	-je silně ovlivněna ko-extrakty z matrice -někdy obtížná identifikace použitím nevhodné ionizační techniky	-vývoj dobrého postupu separace a čištění vzorku -používání izotopově označených standardů -tandemová MS (MS/MS)

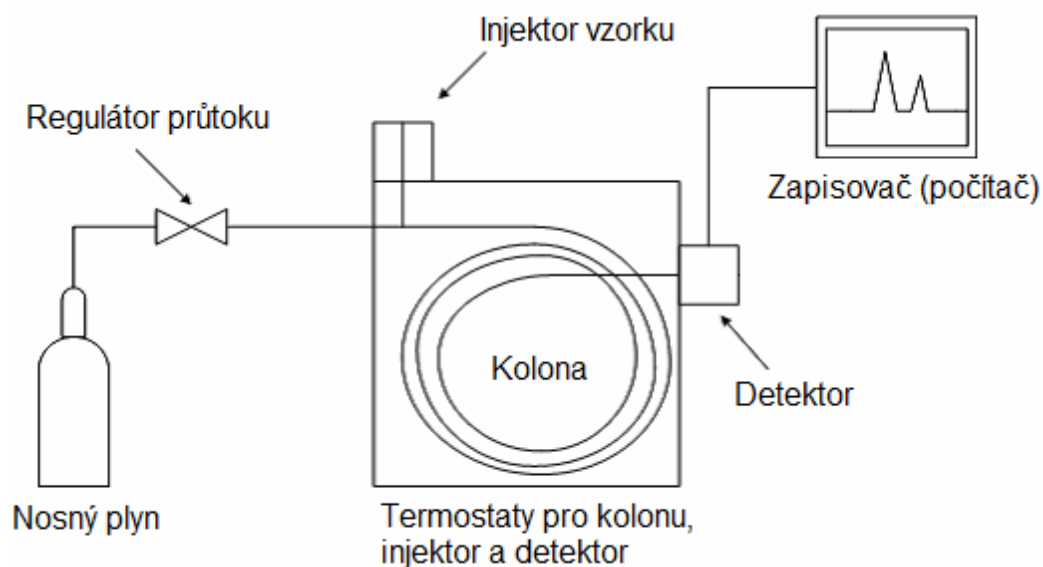
Tabulka 5: Srovnání vybraných instrumentálních metod a jejich vlastností [80].

6.4 Plynová chromatografie

Chromatografie je separační proces, který je založený na rozdělování sloučenin mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze – pohyblivou (mobilní) a nepohyblivou (stacionární). Mobilní fází u plynové chromatografie je plyn. Jednou z výhod této metody je její separační rychlost zejména při separaci složitých směsí látek, dále také možnost použít k analýze malé množství vzorku. Stanovované látky musí mít dostatečný tlak syté páry, teplotní stálost, relativní molekulovou hmotnost (menší než 1000) a bod varu menší než 400 °C [79]. Oproti kapalinové chromatografii má v komplexním uspořádání větší separační účinnost, selektivitu, rozlišení a citlivost. Uspořádání může být provedeno jako jednodimenzionální, kde se používá jeden separační mechanismus (jeden typ mobilní a stacionární fáze), nebo jako vícedimenzionální, kde se využívá spojení dvou a více chromatografických kolon pro lepší rozlišení vzorku [79].

6.4.1 Instrumentace

Schéma zařízení plynové chromatografie je zobrazeno na obrázku č. 13. Zařízení plynové chromatografie se skládá ze zásobníku mobilní fáze, regulátoru tlaku, dávkovače, chromatografické kolony a detektoru. Z tlakové láhve přechází nosný plyn redukčním ventilem do sušící trubice, regulátoru tlaku (ve kterém je možno nastavit požadovaný tlak na vstupu do kolony, resp. regulátoru průtoku). Vzorek je dávkován do prostoru injektoru, kde dojde k jeho odpaření. Dále je nosným plynem unášen do chromatografické kolony. V koloně dochází k rozdělení vzorku na složky, které jsou nosným plynem postupně vymývané do detektoru a následně dochází ke zpracování údajů. Teplota dávkovače, detektoru a kolony je regulována termostatem. Výsledky analýzy poskytují informace o kvalitativním a kvantitativním složení vzorku a také informace o účinnosti chromatografického systému [81].



Obrázek 13: Schéma plynového chromatografu.

6.4.1.1 Nosný plyn

Volba nosného plynu je ovlivněná více faktory, např. typem použitého detektoru, inertností, čistotou, cenou, hustotou, viskozitou plynu či požadavky na bezpečnost. Nosnými plyny je nejčastěji používán dusík, vodík, helium a argon, jejichž zdrojem jsou tlakové láhve, či generátory pracující na bázi molekulových sít. Vodík v porovnání s dusíkem má nesrovnatelně vyšší účinnost, které je dosaženo vlivem malé viskozity a velké tepelné vodivosti. Jeho nevýhodou je však hořlavost. Srovnatelnou účinnost jako vodík má

pouze helium, které spojuje výhody vodíky a dusíku, jeho nevýhodou je však cena. Vlastnosti mobilní fáze ovlivňují difúzi a průtok plynu kolonou, je tedy nutno zachovat jejich požadované vlastnosti. Pomocí molekulových sít lze nosný plyn vysušit, stopy kyslíku z dusíku je možno odstranit v kolonce naplněné mědí při zvýšené teplotě, stopy kyslíku z vodíku lze odstranit reakcí na Pt-katalyzátoru. Pokud by nosný plyn obsahoval vodu a kyslík mohlo by dojít k poškození stacionární fáze v koloně. Nosný plyn musí být vůči vzorku a stacionární fázi inertní. Průtok nosného plynu je možno ovlivňovat pomocí regulátoru tlaku a teploty [82].

6.4.1.2 Dávkovač

Funkcí dávkovače je rychle a spolehlivě dávkovat do kolony plynný, kapalný nebo tuhý vzorek. Plynný vzorek je dávkován injekčními mikrostříkačkami, obtokovými pipetami nebo dávkovacími kohouty. Kapaliny se dávkují injekčními stříkačkami skrz silikonovou zátku do vyhřátého dávkovacího prostoru. Tuhé vzorky je možno dávkovat jako vzorky v těkavých rozpouštědlech injekčními mikrostříkačkami. Dávkování lze provést

- nad ústí kolony - metoda vhodná především pro náplňové kolony
- přímo na kolonu (on-column) – metoda používaná především pro kapilární kolony
 - dávkování s děličem toku (split injection) – Děliče toku se využívá pro analýzu velkého množství složek ve vzorku, přičemž se na kolonu dostane pouze určitá část (přibližně 0,1 – 10 %), zbylá část je odvedena ventilem (split valve) do odpadu. Na kolonu je tedy vedena jen určitá část vzorků a poměr vzorku, který odejde do odpadu ku vzorku jedoucímu na kolonu, se nazývá rozdělovací poměr (split ratio).
 - dávkování bez děliče toku (splitless injection) – Těto metody se používá pro analýzu zředěných vzorků při stopové analýze, přičemž se na kolonu dostane 80 % z celého objemu vzorku. Při použití metody bez děliče toku, je používáno stejné zařízení jako s děličem toku, s tím rozdílem že odvod děliče je uzavřen [83].

6.4.1.3 Kolony

V chromatografické koloně dochází k separaci vzorku. Účinnost kolony závisí na mnoha faktorech, zejména na rychlosti toku mobilní fáze, teplotě kolony a tloušťce

stacionární fáze. Před použitím je nutno kolonu nejprve kondicionovat, během kondicionace dochází k ustálení hladiny nulové linie a vymývání nečistot.

Chromatografické kolony je možno rozdělit na:

- Náplňové kolony – Jsou to skleněné nebo kovové trubice (nerezová ocel, Al, Ni, Cu) naplněné sorbenty nebo nosiči pokrytými kapalnou fází. Jejich délka bývá 1 až 5 m s průměrem 2 až 6 mm. Oproti kapilárním kolonám se vyznačují vyšší kapacitou, proto se používají k separaci nízkovroucích a málo zadržovaných plynů. Adsorbentem v GSC je silikagel, alumina, molekulová síta nebo adsorbenty na bázi polymerů. V případě GLC je stacionární fází kapalina, nanesená na inertní materiál (silikagel, křemelina nebo aktivovaná alumina), zakotvenou fází bývají polysiloxany, polyethylenglykoly, silikony atd.
- Kapilární kolony – Používány jsou křemenné kapiláry, ve kterých stacionární fáze je vázána na vnitřní stěnu kapiláry ve formě tenkého filmu. Oproti náplňovým kolonám se vyznačují až stokrát vyšší účinností. Délka kolon bývá v rozmezí 10 až 100 m s vnitřním průměrem v rozmezí 100 až 700 μm , kde vrstva stacionární fáze může mít tloušťku 0,1 až 10 μm

Kapilární kolony je dále možno rozdělit na tři typy:

- Kolony s kapalinou zakotvenou na vnitřních stěnách kapilární trubice (typ WCOT). Tloušťka filmu kapalné fáze bývá v rozmezí 0,01 μm až 5 μm
- typ SCOT, kde vrstvička nosiče je zakotvena na vnitřní stěně kapiláry smočená stacionární fází
- PLOT, u toho typu kapilární kolony je vrstvička pevného sorbentu na vnitřní straně kapiláry [83]

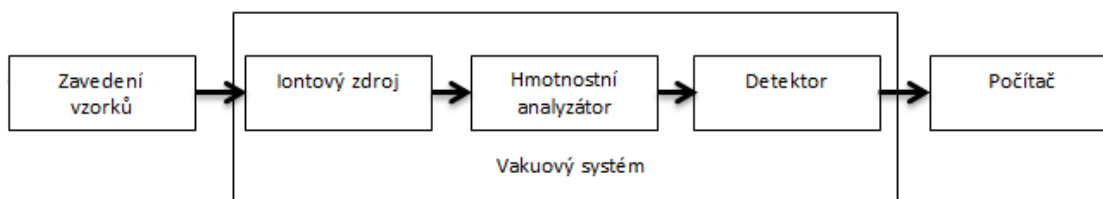
6.4.1.4 Detektor

Detektor je zařízení zaznamenávající změnu signálu při průtoku nosného plynu, který je výsledkem přítomnosti analytu v mobilní fázi, v závislosti na čase. Grafickým výstupem z detektoru, který vzniká během chromatografického procesu vyjadřující závislost signálu na elučním čase nebo objemu je chromatogram [83]. Detektory lze podle povahy signálu rozlišit na detektory koncentrační (ECD, TCD, PID) a hmotnostní (TID, FPD, FID). Detektory musí splňovat požadavky na stabilitu a reprodukovatelnost signálu, nízký šum, rychlou odezvu,

kteřá je nezávislá na rychlosti toku mobilní fáze, musí mít také vysokou citlivost či velký lineární dynamický rozsah [82].

6.4.1.4.1 Hmotnostní detektor

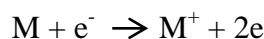
Může být používán jako samostatná technika, avšak často bývá spojen se separačními technikami (např. GC, HPLC, kapilární elektroforéza). Oproti klasickým detektorům poskytuje informace o struktuře analytu. Jednotlivé oddělené složky vzorku postupně opouštějí chromatografickou kolonu a vyhřívanou restriční kapilárou vstupují do hmotnostního spektrometru, kde jsou následně v iontovém zdroji ionizovány. Ionty jsou následně urychleny směrem k analyzátoru, kde dochází k jejich rozdělení podle jejich poměru hmotnosti k náboji (m/z) a následné detekci. Výstupem je hmotnostní spektrum [84]. Schéma hmotnostního detektoru je zobrazeno na obrázku č. 14.



Obrázek 14: Schéma hmotnostního detektoru.

6.4.1.4.1.1 Iontový zdroj

Iontové zdroje se obecně rozdělují na tvrdé a měkké. Tvrdé ionizační techniky se vyznačují fragmentací ionizované molekuly na menší části. Patří sem např. elektronová ionizace. Elektronovou ionizaci popisuje následující rovnice.

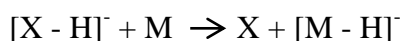


Při použití měkké ionizační techniky vznikají obvykle protonované molekuly (při záznamu kladných iontů) nebo deprotonované molekuly (při záznamu záporných iontů). Pojmem

protonovaná molekula je označen iont vznikající interakcí molekuly s protonem odcizeným z jiného iontu. Tento proces je vyjádřen následující rovnicí.



Deprotonovanou molekulou je označován iont vzniklý ztrátou protonu, což vyjadřuje následující rovnice.



Při použití měkké ionizační techniky získá ionizovaná molekula mnohem menší množství energie v porovnání s tvrdou ionizační technikou, a proto ve výsledných spektrech lze pozorovat zejména protonované či deprotonované molekuly s minimem fragmentovaných iontů. K nejšetrnějším měkkým technikám patří ionizace elektrosprejem (ESI) a ionizace laserem za účasti matrice (MALDI).

- Ionizace elektrosprejem (ESI) – princip této techniky je přívod analyzované látky (rozpuštěné ve vhodném rozpouštědle) vstupní kovovou kapilárou do iontového zdroje, ve kterém za pomoci proudu dusíku vznikají malé kapičky (aerosol), které díky vysokému napětí (3 – 5 kV) v kapiláře, jsou nositeli množství nábojů. Postupným odpařováním rozpouštědla dochází ke zmenšování povrchu i objemu kapiček a povrchová hustota elektrostatického náboje postupně roste. Při dosažení kritické hodnoty hustoty náboje, dojde k rozpadu nabitě kapičky na řadu mnohem menších kapiček nesoucích náboj. Tento cyklus rozpadů se opakuje tak dlouho, dokud není kapička dostatečně malá na to, aby mohlo dojít k uvolnění iontu z jejího povrchu.
- Ionizace laserem za účasti matrice (MALDI) – Při použití této techniky je vzorek nejprve rozpuštěn a smíchán s matricí. Následně je vykrytalizován na MALDI destičce, poté krátkými laserovými pulsy dochází k ionizaci molekul matrice, které následně ionizují přenosem protonu molekuly vzorku [85].

6.4.1.4.1.2 Hmotnostní analyzátor

Úkolem hmotnostního analyzátoru je separace iontů v plynné fázi podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z), dělení lze dosáhnout na základě různých fyzikálních principů. K separaci iontů dochází za vysokého vakua, aby nedocházelo ke kolizním srážkám

s neutrálními atomy. Hmotnostní analyzátory pracují ve dvou základních nastaveních a to SCAN, kde se registrují hmotnostní spektra v nastaveném rozsahu m/z či nastavení SIM, kde se sleduje intenzita jednoho nebo několika vybraných iontů v čase. Princip vybraných hmotnostní analyzátorů je uveden níže.

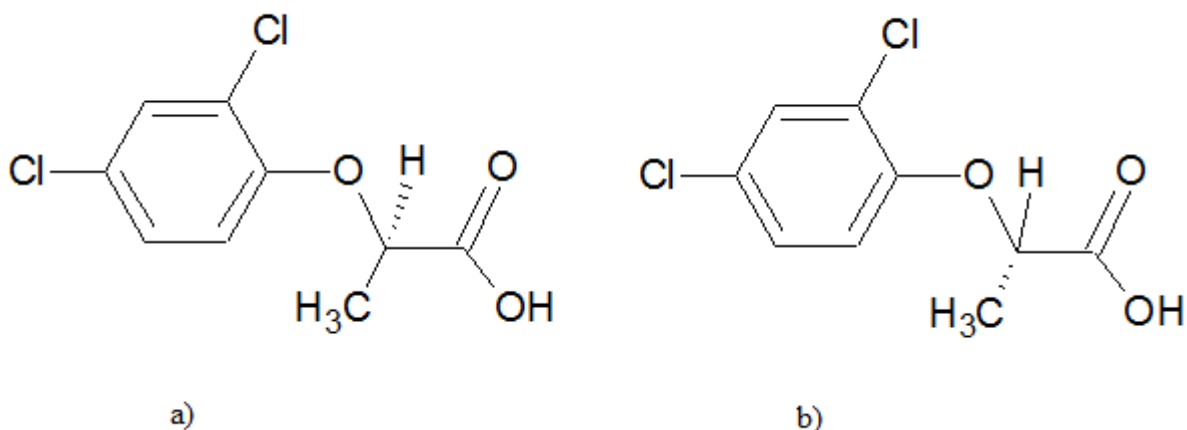
- Analyzátor doby letu (Time-of-Flight, TOF) – pracuje na měření doby letu urychlených iontů o stejné kinetické energii pohybujících se různou rychlostí v závislosti na (m/z).
- Kvadrupólový analyzátor (Quadrupole mass analyser, Q) – je složen ze čtyř kovových tyčí, kde na dvě protilehlé je vloženo kladné stejnosměrné napětí, na zbývající dvě záporné stejnosměrné napětí, přičemž je na všechny tyče superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí. Při přivedení iontu do středu kvadrupólu dochází k oscilaci jeho pohybu, kdy v daný časový okamžik, pro určitý poměr U/V , jsou oscilace stabilní pouze pro ion s určitou hodnotou m/z , který projde kvadrupólem a dostane se na detektor, ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Plynulou změnou hodnot stejnosměrného napětí U a amplitudy V při zachování stejného poměr, jsou postupně propuštěny na detektor všechny ionty.
- Magnetický analyzátor (Magnetic sector analyser) – využívá principu zakřivení dráhy iontů v magnetickém poli, které je závislé na hodnotě m/z . Při průchodu iontů s vyšší hodnotou m/z magnetickým polem, dochází k nižšímu zakřivení jejich dráhy, oproti iontům s nižší hodnotou m/z [84].

6.4.1.5 Termostat

Teplotou lze ovlivňovat rychlost a účinnost separace složek na koloně. Úkolem termostatu je ohřívání ale i chlazení dávkovače, kolony i detektoru na požadovanou teplotu, aby byl vzorek udržen v plynné fázi a na koloně separace probíhala v požadovaných časech. Podle typu kolon, lze stanovení provádět v teplotním rozmezí od $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $400\text{ }^{\circ}\text{C}$. Termostat dále umožňuje programovat plynulou změnu teploty, či udržet konstantní teplotu během celé operace [85].

7. Popis a stanovení dichlorpropu

Jedná se o organochlorový pesticid, odvozený od skupiny chlorfenoxy sloučenin. Ve své struktuře obsahuje chirální uhlík, a proto se vyskytuje v podobě dvou enantiomerů. Aktivním je však pouze (R)-(+)-enantiomer. (S)-(-)-enantiomer je jako herbicid neaktivní. Systematickým názvem se jedná o (R)-2-(2,4-dichlorophenoxy)propanovou kyselinu. Dichlorprop jako herbicid byl poprvé nabízen ve formě racemické směsi, avšak po zjištění neaktivity (S)-(-)-enantiomeru a s vývojem chirální syntézy byl postupně nabízen jen ve formě (R)-enantiomeru [86].

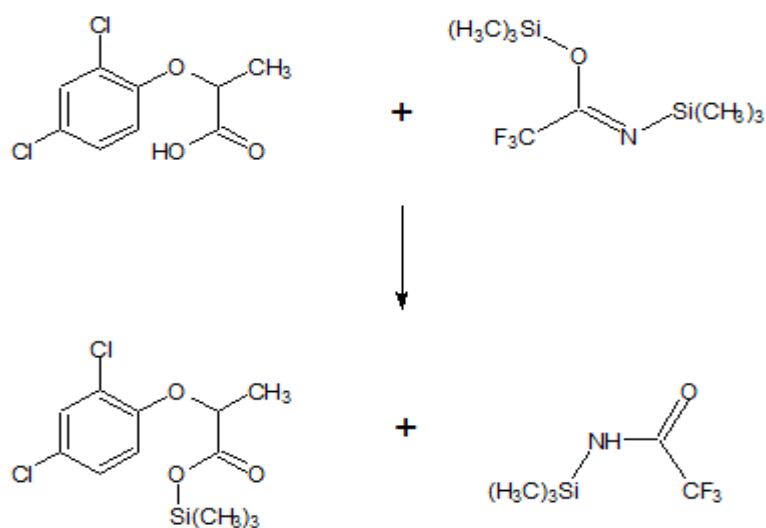


Obrázek 15: Struktura dichlorpropu, a) R-(+)-enantiomer, b) S-(-)-enantiomer.

Prvním krokem při stanovení dichlorpropu je jeho extrakce ze vzorku. Extrakt obsahující cílový analyt spolu s koextrahovanými látkami je nutno přečistit. Různé extrakční a čisticí metody byly popsány v kapitole 6. Přečištěný vzorek je dále analyzován nejčastěji pomocí plynové nebo kapalinové chromatografie s různými detektory. Dichlorprop obsahuje ve své struktuře polární karboxylovou skupinu, která má vliv na jeho chromatografické vlastnosti. Tuto skupinu je tedy nutno derivatizovat a tím snížit polaritu této skupiny. Současně dojde ke zvýšení tepelné stability, zvýšení těkavosti, citlivosti atd. Jako derivatizačních činidel se při stanovení dichlorpropu využívá různých silylačních a alkylačních činidel, které budou dále rozděleny z pohledu reakcí při derivatizaci. V případě

silylace bude blíže popsána i reakce dichlorpropu s BSTFA, která bude použita v experimentální části.

- **Alkylace** – je obvykle využívána jako ochrana pro –OH skupiny (alkoholů, fenolů, enolů atd.), karboxylových skupin, –SH a –NH skupin a pro ochranu jmenovaných skupin u derivátů těchto sloučenin. Alkylační činidla reagují s těmito sloučeninami za vzniku etherů, esterů, aminů a amidů těchto sloučenin. Obvykle používaným alkylačním činidlem je např. diazomethan [87].
- **Silylace** – je založena na reakci, kdy silylační činidlo působí na sloučeniny, které obsahují aktivní vodík vázaný v polární skupině (–OH, –SN, –NH, –COOH). Podle produktů silylace lze silylační činidla dělit do dvou hlavních skupin: produkující TMS a TBDMS deriváty. TMS deriváty jsou produkovány činidly jako BSTFA, MSTFA apod. TBDMS deriváty poskytuje například MTBSTFA. Silylační reakce probíhají v přítomnosti aprotického rozpouštědla například v pyridinu, tetrahydrofuran, acetonitrilu apod. Účinnost derivatizace je podmíněná dobou a teplotou zahřívání reakční směsi. Tyto podmínky jsou specifické pro dané analyty a použitá TMS činidla. TMS činidla a jejich deriváty jsou náchylné k vlhkosti, proto je nutno ji před derivatizací odstranit. TBDMS činidla se používají za účelem získání derivátů s vyšší hydrolytickou a tepelnou stabilitou. Silylační činidla jsou nejčastějším typem derivatizačních činidel v plynové chromatografii. Příklad derivatizace dichlorpropu pomocí BSTFA lze vidět na následujícím obrázku č. 16, kdy produktem derivatizace je trismethylsilyl derivát dichlorpropu [88, 89].



Obrázek 16: Schéma reakce dichlorpropu s BTSA.

8. Experimentální část

- analytické váhy
- ultrazvuková vodní lázeň – Elmasonis S40H
- odpařovací zařízení – Stuart SBH 130
- PSE extraktor – PSE One, Applied Separations Inc. USA
- plynový chromatograf Agilent 7890A s hmotnostním detektorem Agilent 5975C (Agilent, Palo Alto, CA, USA)
- kolony:
 - HP5-MS, 30m x 0,25mm x 0,25μm (Agilent, Palo Alto, CA, USA)
 - SLBTM-5ms, 30m x 0,25mm x 0,25μm (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- analytická odstředivka – Eppendorf centrifuge 5702
- SPE kolonka – Strata C18-E (55 μm, 70 Å), 200 mg/3 ml, Phenomenex, USA

8.1 Pracovní pomůcky

- kádinky
- mikropipety
- viálky
- další běžné laboratorní vybavení

8.2 Chemikálie

- chloroform (Lach-Ner)
- methanol (Lach-Ner)
- pyridin (Lach-Ner)
- kyselina chlorovodíková(Lach-Ner)
- ethylacetát (Lach-Ner)
- N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (Merck)

8.3 Použité čisticí techniky při stanovení dichlorpropu ve vzorku zeleného čaje

Čisticími technikami jsem zvolil extrakci pevným sorbentem, která byla použita jako čisticí krok při stanovení 3-indolactové kyseliny [90], dále jen „SPE extrakce“, druhým postupem čištění je technika popsána při stanovení kyseliny rozmarýnové [91], dále popsána jako „extrakce chloroformem“ a jako poslední jsem zvolil extrakci chloroformem s následnou úpravou podmínek pro druhou extrakci, jednak s použitím ethylacetátu jako extrakčního činidla, popsanou jako „extrakce chloroformem, ředění, okyselení, extrakce EtAc“ a s použitím chloroformu, popsanou jako „extrakce chloroformem, ředění, okyselení, extrakce chloroform“. Před samotným čisticím krokem je nutné provést extrakci analytu ze vzorku. V této práci jsem zvolil akcelerovanou extrakci za podmínek (150 bar, 150 °C, 2x10 minut) a jako rozpouštědlo bylo vzhledem k polaritě dichlorpropu použito methanolu. Z naváženého množství 2,93 g vzorku čaje umístěného do extrakční patrony jsem získal 13 ml extraktu. Z tohoto extraktu bylo odebráno 0,5 ml a naředěno methanolem 10 x na objem 5 ml, pro porovnání výtěžností výše jmenovaných extrakčních technik bylo k tomuto roztoku přidáno 50 µl standardního roztoku o koncentraci 1 mg/ml.

8.3.1 Postup jednotlivých čistících technik

- SPE Extrakce - SPE kolonka (C18) byla kondicionována promytím 3 ml methanolu a 1 ml 80% methanolu. Na kolonku byl nanesen 1 ml vzorku zředěný 0,2 ml vody, protékající eluát byl jímán do čisté plastové zkumavky. Kolonka byla promyta 1 ml 80% methanolu a eluát byl zachycen do téže zkumavky. Najímaný eluát byl zředěn 6 ml vodného roztoku kyseliny mravenčí (1,33%) a postupně nanesen na čistou SPE kolonku (C18) kondicionovanou promytím 3 ml methanolu 1 ml 1% kyseliny mravenčí v 20% methanolu. Kolonka byla promyta 1 ml 1% kyseliny mravenčí v 20% methanolu a analyt byl eluován 1,5 ml 1% kyseliny mravenčí v methanolu. Zachycený eluát byl odpařen do sucha a derivatizován
- Extrakce chloroformem – do mikrozkušavky byly odebrány 2 ml z připraveného roztoku, dále byl přidán 1 ml chloroformu a 0,5 ml destilované vody. Takto připravený roztok byl protřepán po dobu 1 minuty a dále centrifugován (10 000 otáček, 5 minut). Po centrifugaci došlo k rozlišení mezifází, ze které byla do připravené víálky odebrána horní fáze obsahující methanolickeý a vodný podíl.
- extrakce chloroformem, ředění, okyselení, extrakce EtAc – první krok této techniky je stejný jako výše popsaný u extrakce chloroformem. Druhým krokem je k odebrané horní fázi obsahující methanolickeý a vodný podíl přidat 5 ml destilované vody a 0,5 ml 3 M kyseliny chlorovodíkové, tento roztok protřepávat po dobu 1 minuty. Dále je nutno k tomuto roztoku přidat 2 ml ethylacetátu a po následném protřepání (1 minuta) centrifugovat (10 000 otáček, 5 minut). Po centrifugaci dojde k rozdělení fází, ze které je do připravené víálky odebírána horní (ethylacetátová) fáze.
- extrakce chloroformem, ředění, okyselení, extrakce chloroformem – první i druhý krok této techniky je stejný jako v případě použití předchozí extrakce s ethylacetátem v druhém extrakčním kroku, avšak namísto ethylacetátu se k připravenému roztoku přidá 1 ml chloroformu. Po protřepání a centrifugaci za stejných podmínek jako u předchozích čistících technik je do víálky odebírána spodní (chloroformová) fáze.

Viálky s odebranými podíly byly následně odpařovány za teploty 60 °C v proudu dusíku.

8.3.2 Derivatizace

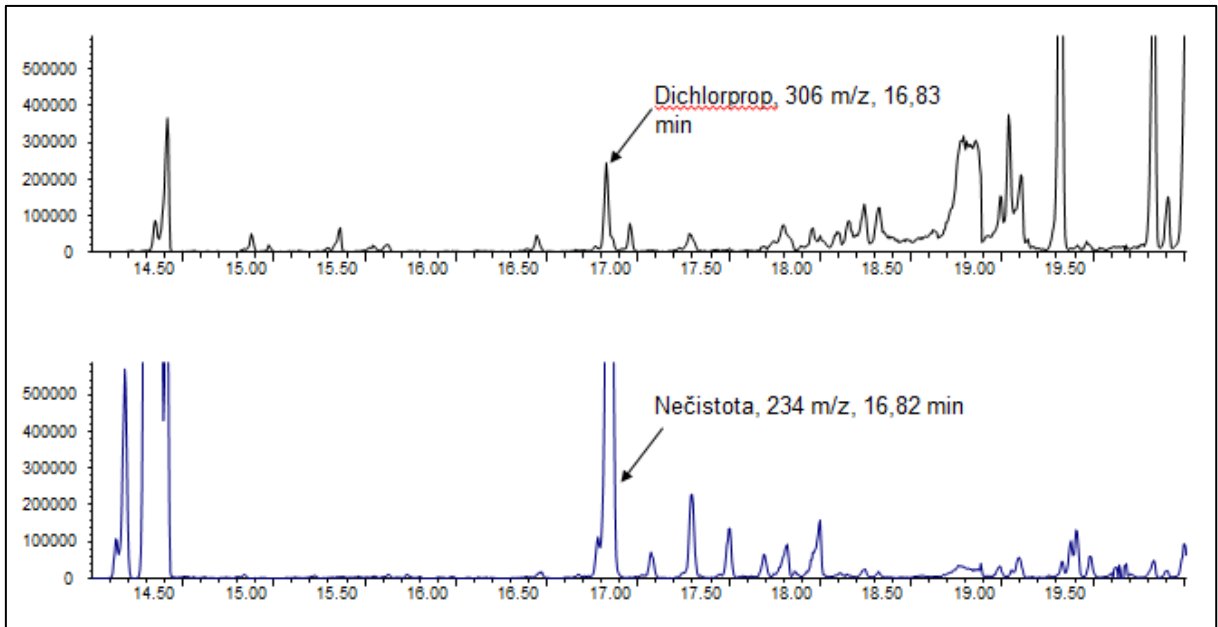
Po odpaření rozpouštědel bylo do jednotlivých viálek přidáno k derivatizaci dichlorpropu 80 μ l BTSFA a 80 μ l pyridinu. Zazátkované viálky byly termostovány (90 °C, 30 minut) a před analýzou ředěny 600 μ l hexanu.

8.3.3 Analýza vzorků

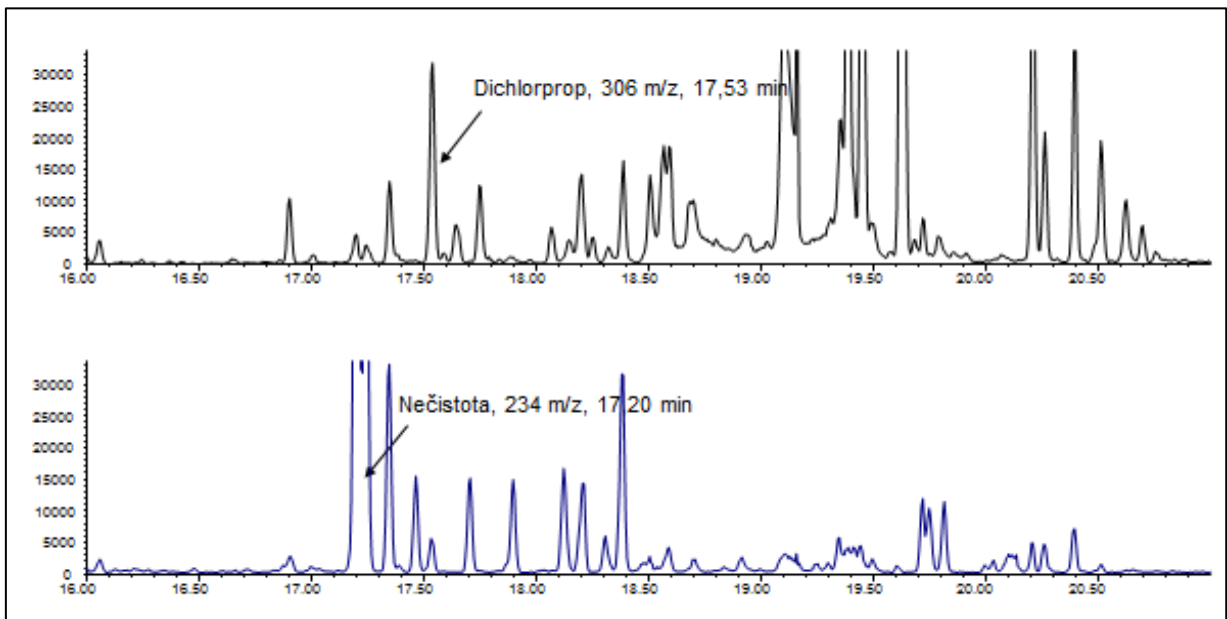
Vzorky byly analyzovány plynovým chromatografem Agilent 7890A s hmotnostním detektorem Agilent 5975C (Agilent, Palo Alto, CA, USA) za podmínek 50°C - 2min - 10°C/min - 300°C - 15min, nástřik: 1 μ l, dávkovací pulz 140 kPa, 0,4 min, 280°C.

9. Výsledky a diskuze

Po analýze derivatizovaných vzorků pomocí plynové chromatografie s hmotnostním detektorem byla z chromatogramu zjištěna přítomnost nečistoty, která jak lze vidět na obrázku č. 17 koeluuje s cílovým analytem. Tato nečistota způsobovala zkreslení výsledného signálu cílového analytu a bylo ji tedy nutné oddělit. Jednou z možností, které vedly ke snížení vlivu nečistoty na výsledném signálu, bylo snížení její koncentraci pomocí různých technik přečištění. Další možností pak byla volba jiné kolony, jejichž použitím jak lze vidět na obrázku č. 18, vedlo k oddělení koeluuující nečistoty od cílového analytu.

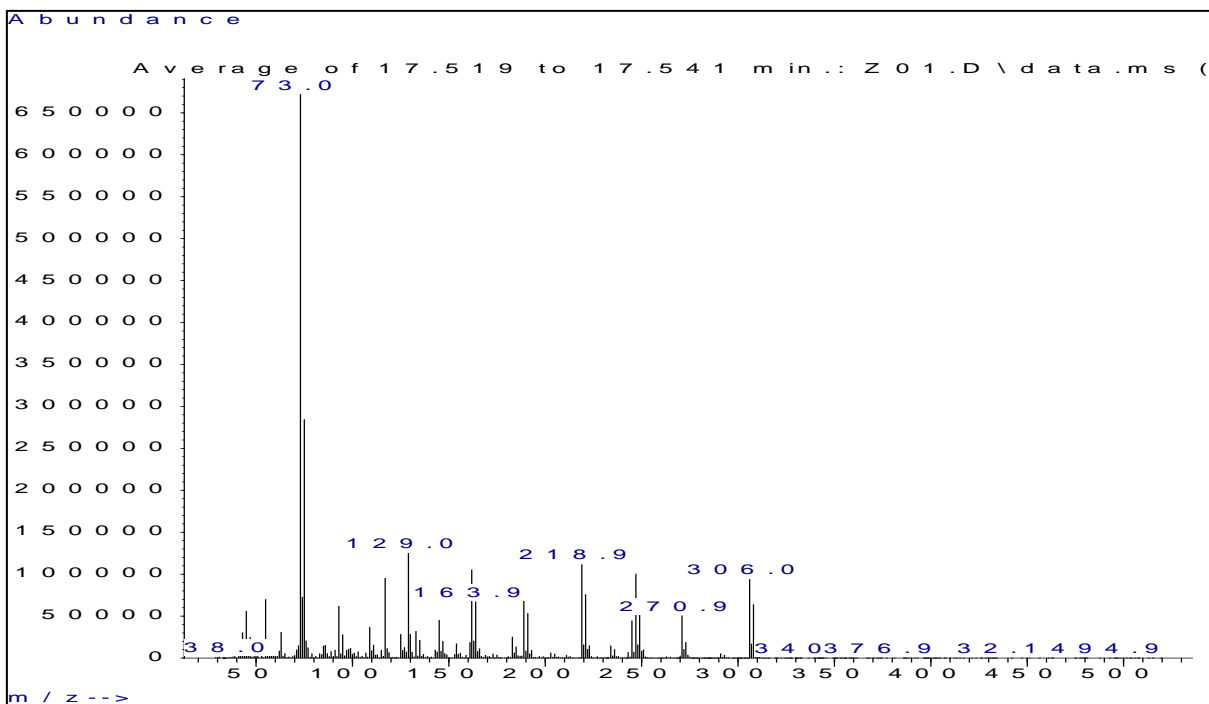


Obrázek 17: Chromatogram nepřečištěného vzorku se zředěnou maticí. Kolona: HP5-MS, 30m x 0,25mm x 0,25 μ m (Agilent, Palo Alto, CA, USA).



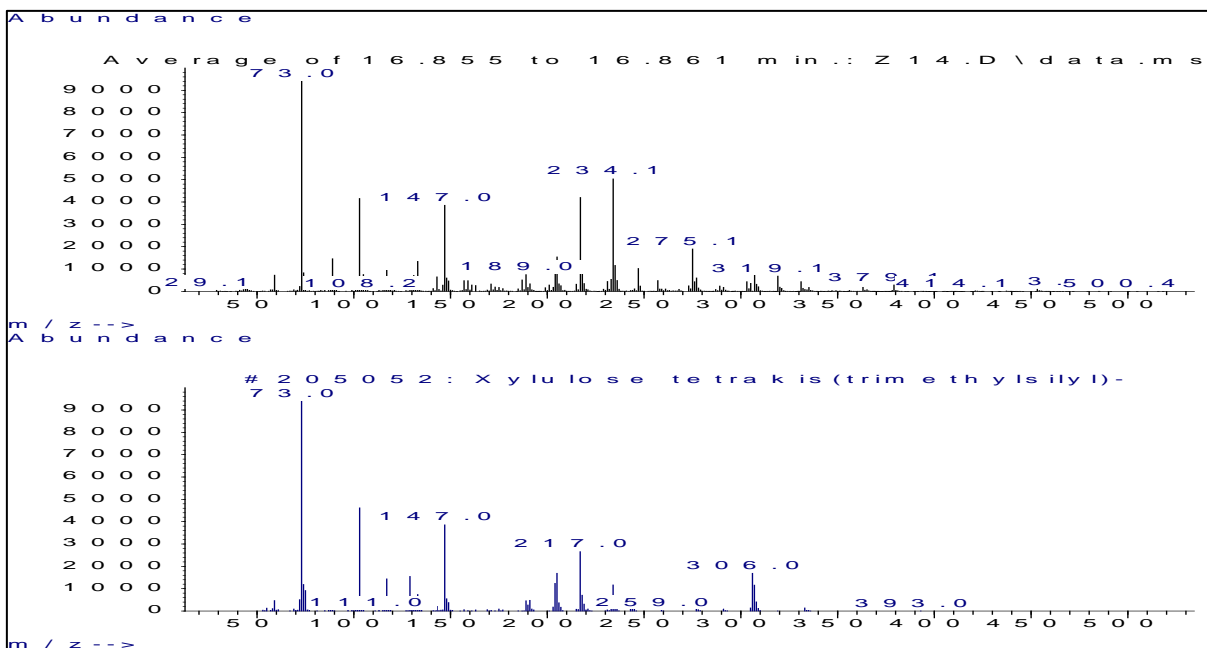
Obrázek 18: Chromatogram nepřečištěného vzorku se zředěnou maticí. Kolona: SLBTM-5ms, 30m x 0,25mm x 0,25 μ m (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

Získané spektrum standardu dichlorpropu obrázek č. 19 bylo použito k identifikaci nečistoty.

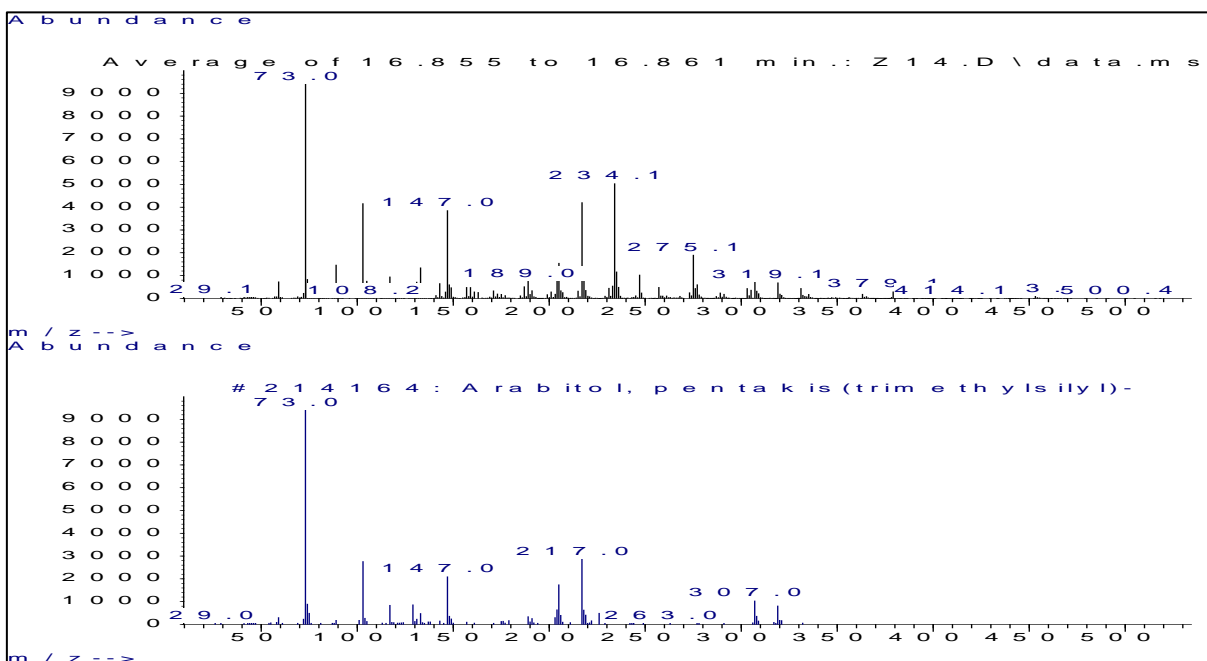


Obrázek 19: Hmotnostní spektrum standardu dichloropropu po derivatizaci BSTFA.

Odečtením spektra standardu dichloropropu od spektra získaného analýzou nepřečištěného extraktu bylo získáno rozdílové spektrum odpovídající nejpravděpodobněji silanizovaným derivátům nižších monosacharidů. Porovnáním získaného rozdílového spektra v knihovně spekter, byla nečistota nejpravděpodobněji identifikována jako derivát xylulósy obrázek č. 20, či derivát arabitolu obrázek č. 21.



Obrázek 20: Porovnání získaného rozdílového hmotnostního spektra nečistoty (horní spektrum) se spektrem tetrakis(trimethylsilyl) derivátu xyulósy (spodní spektrum).

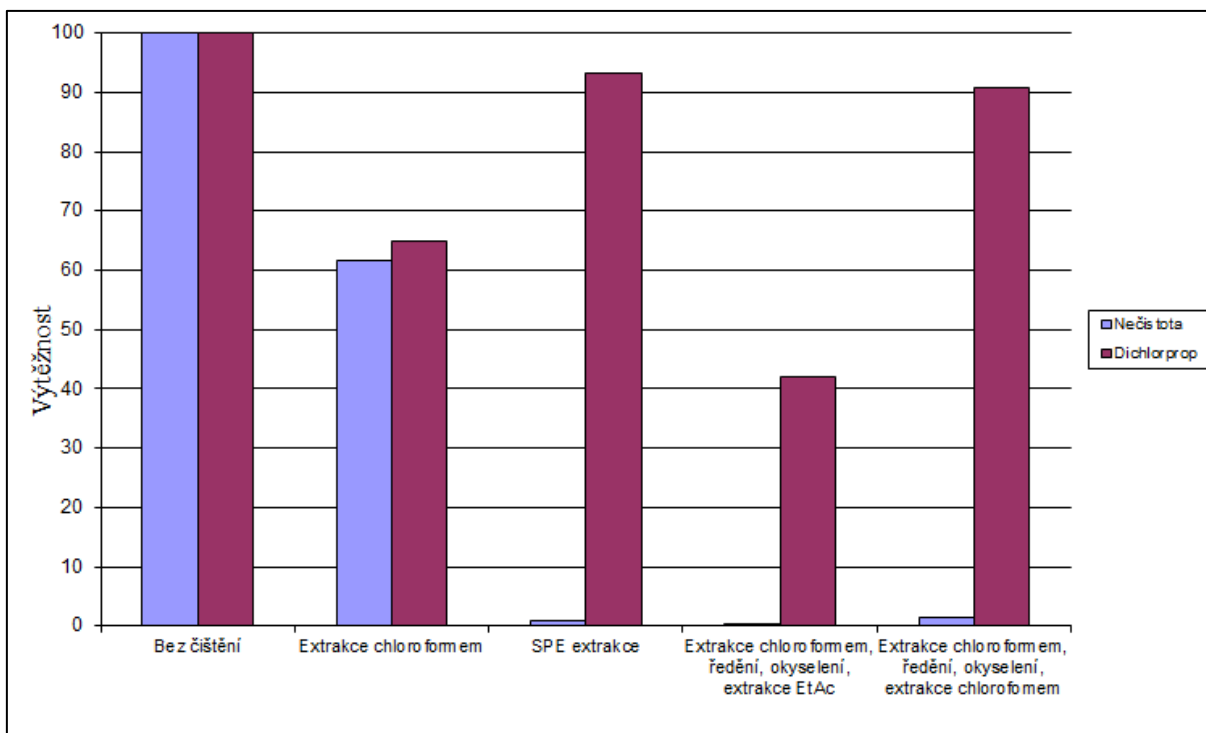


Obrázek 21: Porovnání získaného rozdílového hmotnostního spektra nečistoty (horní spektrum) se spektrem pentakis(trimethylsilyl) derivátu arabitolu (spodní spektrum).

Nutným předpokladem pro stanovení dichlorpropu je jeho maximální vyextrahování ze vzorku. Pro zlepšení limitu stanovitelnosti je vhodné extrakt přečistit případně i zakoncentrovat.

Přečištění vzorků bylo nutné k odstranění nečistot, zejména nečistoty současně eluující s cílovým analytem. Tato nečistota by ovlivňovala výsledný signál cílového analytu. V této práci jsem porovnal 4 techniky přečištění zředěných vzorků s přidavkem standardu se vzorkem bez přečištění. Zředění vzorku a přidavek standardu dichlorpropu umožnilo sledovat během čištění jak analyt tak složky matrice přítomné za normálních okolností v obrovském nadbytku.

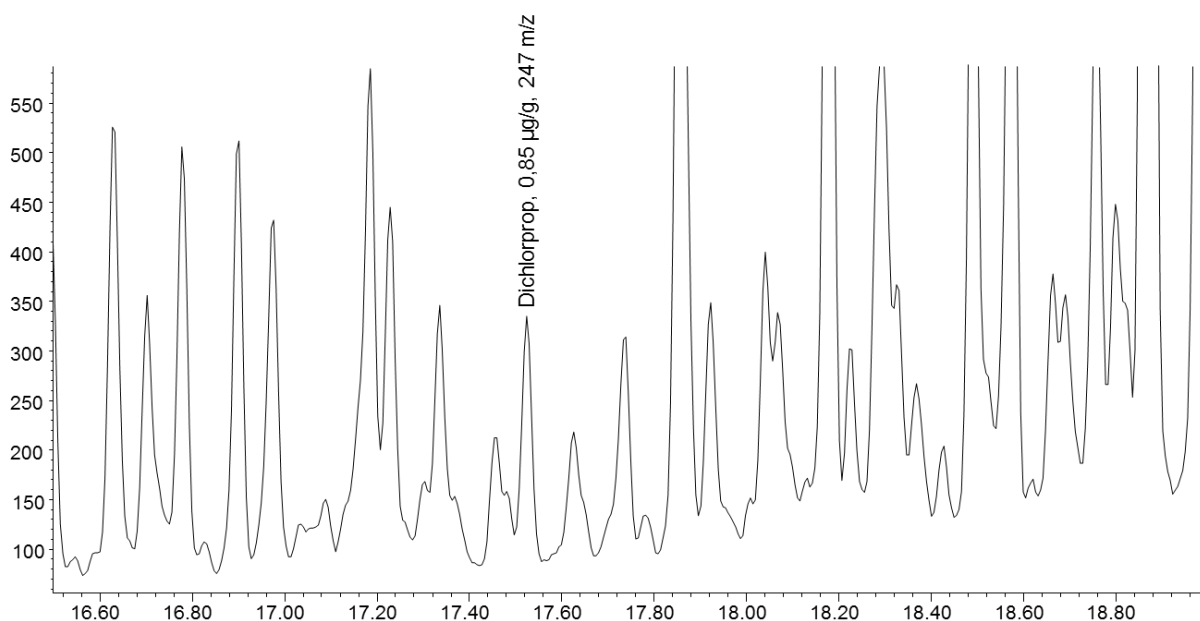
Za 100 % výtěžnost byla považována hodnota stanoveného množství standardu dichlorpropu a nečistoty ve zředěném vzorku bez čištění. Přehled výtěžností a koncentrací nečistoty po přečištění ukazuje obrázek č. 22. Je patrné, že nejvyšší výtěžnosti a to 93,16 % cílového analytu bylo dosaženo použitím SPE extrakce za současného 99,1 % snížení koncentrace nečistoty. Druhou nejvyšší výtěžnost poskytla extrakce chloroformem s následným ředěním, okyselením a extrakcí chloroformem, která činila 90,71 % a za současného snížení koncentrace nečistoty o 98,54 %. Nejvyšší účinnosti v odstranění nečistoty poskytla extrakce chloroformem s následným ředěním, okyselením a extrakcí EtAc, jejíž hodnota činila 99,85 %, avšak v porovnání s ostatními technikami poskytla jen 42,15 % výtěžnost cílového analytu. Extrakce chloroformem naopak poskytla nejnižší účinnost odstranění nečistoty s hodnotou 38,46 % a druhou nejnižší výtěžností s 64,89 % cílového analytu.



Obrázek 22: Srovnání výtěžností čistících technik.

Výběrem vhodné techniky přečištění následně proběhlo přečištění reálného vzorku, který byl dále derivatizován a analyzován pomocí plynové chromatografie. Výsledný chromatogram ukazuje obrázek č. 24. Jako techniku přečištění jsem zvolil extrakci s chloroformem s následným ředěním, okyselením a extrakcí chloroformem. I když tato technika poskytla druhou nejvyšší výtěžnost cílového analytu a také druhou nejvyšší účinnost odstranění nečistoty, poskytuje v porovnání s SPE, nižší časovou náročnost, cenu a také snížení rizika ucpaní kolonky koncentrovaným extraktem. V porovnání s extrakcí chloroformem s následným čištěním, okyselením a extrakcí EtAc, která poskytla nejvyšší účinnost odstranění nečistoty, poskytuje extrakce chloroformem více než dvojnásobnou výtěžnost cílového analytu.

V reálném vzorku zeleného čaje byla stanovena koncentrace dichloropropu 0,85 mg/kg. Na obrázku č. 24 lze vidět chromatogram této analýzy.



Obrázek 23: Chromatogram stanovení dichloropropu v reálném vzorku.

10. Závěr

Tato bakalářská práce má za cíl shrnout dostupné informace týkajících se problematiky bezpečnosti potravin a to jak z oblasti chemické, tak i legislativní. Vyšší pozornost je zde věnována skupině pesticidů, jejichž nadměrné či nevhodné používání představuje problém současnosti.

Praktická část je věnována porovnání výtěžností čistících technik při stanovení dichloropropu ve vzorku zeleného čaje. Pro porovnání výtěžnosti čistících technik bylo k analýze použito ředěného vzorku. Po zjištění čistící techniky s dostatečnou výtěžností a po zvážení všech argumentů byla vybrána technika s druhou nejvyšší dosaženou výtěžností, tato pak byla použita pro stanovení výtěžnosti v neředěném vzorku. Při vyhodnocení dat byla zjištěna přítomnost koeluující nečistoty, kterou se následně podařilo separovat od cílového analytu, jednak použitím jiné kolony tak i výběrem čistící techniky.

11. Seznam použité literatury

1. *Bezpečnost potravin v ČR* [online]. 2012 [cit. 2014-03-19]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/kategorie/bezpecnost-potravin-v-cr.aspx>
2. *Právní předpisy Ministerstva Zemědělství* [online]. Ministerstvo zemědělství [cit. 2014-03-19]. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe_uplna-zneni_zakon-1997-110-viceoblasti.html
3. DRÁPAL, J. a kol. *Mikrobiologické kontaminanty v potravinách* [online]. Státní zdravotní ústav, 23. 2. 2004 [cit. 2014-01-02]. Dostupné z: http://czvp.szu.cz/vedvybor/dokumenty/studie/mikro_2003_2_deklas.pdf
4. DRÁPAL, J. a kol. *Předměty běžného užívání přicházející do styku s potravinami a pokrmy* [online]. Státní zdravotní ústav, 19. 4. 2004 [cit. 2014-01-07]. Dostupné z: http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/dokumenty/studie/pbu_2003_3_deklas.pdf
5. DRÁPAL, J. a kol. *Rezidua pesticidů v potravinách* [online]. Státní zdravotní ústav, 31. 10. 2005 [cit. 2014-01-02]. Dostupné z: http://czvp.szu.cz/vedvybor/dokumenty/studie/pest_2005_1_deklas.pdf
6. PALÁSEK, J. *Bezpečnost potravin* [online]. EPOS Brno [cit. 2013-12-27]. Dostupné z: <http://www.eposcr.eu/wp-content/uploads/2011/04/Bezpecnost-potravin.pdf>
7. [online]. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno [cit. 2014-03-19]. Dostupné z: <http://www.vfu.cz/inovace-bc-a-navmgr/pub-files/realizovane-klicove-aktivity/2012-2013/h2rk/index/h2rk-rizeni-kvality-a-bezpecnosti-potravin---tema-1-zs-12-13.pdf>
8. *Evropský úřad pro bezpečnost potravin ve stručném přehledu* [online]. European Food Safety Authority, 2008 [cit. 2014-01-12]. Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/en/aboutefsa/docs/corporatebrochurecs.pdf>
9. *Víceletý kontrolní plán pro rezidua pesticidů 2012 - 2014* [online]. Ministerstvo zdravotnictví, 2012. Dostupné také z: http://eagri.cz/public/web/file/246957/_10610_1_Stan_obsahu_rezidui_pesticidu_GCMS_final.pdf
10. *Systém zajištění bezpečnosti potravin* [online]. Ministerstvo zemědělství, 2012 [cit. 2014-28-03]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/kategorie/system-zajisteni-bezpecnosti-potravin.aspx>
11. *Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva RASFF* [online]. Státní zemědělská a potravinářská inspekce, 2011 [cit. 2014-03-28]. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1002819&nid=11414>

12. SHIBAMOTO, T. a L. F. BJELDANES. *Introduction to food toxicology*. 2nd ed. London: Academic Press, 2009, 309 s.. ISBN 978-0-12-374286-5.
13. KVASNIČKOVÁ, A. *Akceptovatelný a tolerovatelný denní příjem chemické látky* [online]. Informační centrum bezpečnosti potravin, 2011 [cit. 2014-01-06]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/akceptovatelný-a-tolerovatelný-denní-přijem-chemické-látky.aspx>
14. HYNIE, S. *Mechanismus působení toxických látek* [online]. Ústav lékařské biochemie, 2005 [cit. 2014-01-03].
15. GÖRNER, F. a L. VALÍK. *Aplikovaná mikrobiologie požívatin: principy mikrobiologie požívatin, potravinářsky významné* Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s.. ISBN 80-967064-9-7.
16. *Alkaloidy* [online]. Biotox, 2007 [cit. 2014-06-01]. Dostupné z: <http://www.biotox.cz/toxikon/rostliny/alkaloidy.php>
17. MINÁŘOVÁ, J. *Fytoestrogeny - Metabolismus a potenciální vliv na zdraví člověka*. Brno: Nakladatelství MU, Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2006. Bakalářská práce. Vedoucí práce Jiří Slanina. 33 s. [cit. 2014-03-27]. Dostupné z: http://is.muni.cz/th/85216/prif_b_b1/cela_prace11.pdf
18. *Toxické látky v potravinách* [online]. Víš co jíš, 2012 [cit. 2014-01-06].
19. KOMPRDA, T. *Obecná hygiena potravin*. Brno: MZLU, 2004. ISBN 978-80-7157-757-7.
20. *Přirozeně toxické a cizorodé látky v požívatinách, aditiva, bakteriální a plísňová znečištění ...* [online]. České Budějovice: 2012 [cit. 2014-02-01]. Dostupné z: http://kgv.zf.jcu.cz/upload/Prezentace/JKkgv-UNC/14_prednaska_toxicke_latky_aditiva.pdf
21. DOHNAL, V. *Toxikologie potravin* [online]. Brno: MZLU, 2007 [cit. 2014-03-27]. Dostupné z: <http://www.chemi.muni.cz/~vlasta/TOPOPOT2007-05.pdf>
22. ČERMÁK, B. a kol. *Výživa člověka..* České Budějovice: JU, Zemědělská fakulta, 2002, 224 s.. ISBN 80-7040-576-7.
23. CEJPEK, K. *Cudzorodé látky v potravinách. 2. diel. Kontaminanty*. Banská Bystrica: Metodické centrum, 2000, 20 s.. ISBN 80-8041-312-6.
24. PETRLÍK, J. *Ftaláty* [online]. Arnika, 2010 [cit. 2014-02-02]. Dostupné z: <http://arnika.org/ftalaty>
25. DOUŠA, M. [online]. [cit. 2014-04-12]. Dostupné z: <http://hplc1.sweb.cz/Vet/home.htm>
26. KLESCHT, V. I. HRNČIŘÍKOVÁ a L. MANDELOVÁ. *Éčka v potravinách*. Brno: Computer Press, 2006, 108 s.. ISBN 80-251-1292-6.

27. ŠKOPEK, B. M. VOLDŘICH a kol. *Přehled potravinářských aditivních látek*. Plzeň: Typos-DigitalPrint, 2004, 128 s.. ISBN 80-86229-98-0.
28. PÍCKOVÁ, Š. *Nebezpečná aditiva?* Brno: 2007. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně, Lékařská fakulta [cit. 2014-04-15]. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/142378/lf_b/Nebezpecna_aditiva.txt
29. INGR, I. *Základy konzervace potravin*. Brno: Mendlova zemědělská a lesnická univerzita, 1999. ISBN 80-7157-396-5.
30. PETROŠOVÁ, K. *Antioxidanty*. Praha: Sun, 2010, 111 s.. ISBN 978-80-7371-344-7.
31. KODL, J. a B. TUREK. *Přidatné a aromatické látky, kontaminanty a potravní doplňky v nové potravinářské legislativě*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1998, 64 s.. ISBN 80-86153-67-3.
32. *Zelené potraviny Champion Bio* [online]. 2008 [cit. 2014-04-19]. Dostupné z: <http://zelenepotraviny1.webnode.cz/prisady-v-potravinach-i-ii/>
33. ODSTRČIL, J. a M. ODSTRČILOVÁ. *Chemie potravin*. Berno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2006, 164 s.. ISBN 80-7013-435-6.
34. CREMLYN, R. a R. SEIFERT. *Pesticidy*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1985, 244 s..
35. HAJŠLOVÁ, J. J. TICHÁ a V. KOCOUREK. *Rezidua pesticidů v ovoci a zelenině, možnosti minimalizace*. Praha: Vědecký výbor fytoosanitární a životního prostředí, 2005. Dostupné také z: <http://www.phytoosanitary.org>
36. MIKULICOVÁ, P. *Analytické metody pro studium obsahu herbicidů v půdě*. Brno: 2011. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Ústav biochemie. Dostupné také z: https://is.muni.cz/th/211567/prif_m/DIPLOMOVA_PRACE.pdf
37. KAZDA, J. *Chemická ochrana rostlin*. 2003 [cit. 2014-01-05]. Dostupné z: http://etext.czu.cz/php/skripta/skriptum.php?titul_key=56
38. *Praktické příklady použití chemických prostředků v boji proti škůdcům, chorobám a plevele v lesních* Protivín: Vydalo Sdružení lesních školkařů České republiky v nakl. a vydavatelství Lesnická práce, 2006, 36 s.. ISBN 80-86386-77-5.
39. PROUSEK, J. *Rizikové vlastnosti látek*. Bratislava: Slovenská technická univerzita v Bratislavě, 2005. ISBN 80-227-2199-9.
40. KERLE, J. J. JENKINS a P. A. VOGUE. *Understanding pesticide persistence and mobility for*

- groundwater and surface water protection*. Oregon State University, Extension Service, 1994.
41. VOPRŠALOVÁ, M. a P. ŽÁCKOVÁ. *Základy toxikologie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum: 2000, 231 s.. ISBN 80-7184-282-6.
 42. *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009*. World Health Organization, 2010. ISBN 978-92-4-154796-3.
 43. *WHO Guidelines for Predicting Dietary Intake of Pesticide Residues: Report GEMS/Food in ...*. World Health Organization Geneva, 1997.
 44. HELFERICH, W. a C. K. WINTER. *Food toxicology*. CRC Press, 2001.
 45. KARLÍČEK, R. a kol. *Analytická chemie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 2005, 281 s.. ISBN 80-246-0348-9.
 46. HAJŠLOVÁ, J. a V. KOCOUREK. *Osud prostředků pro ochranu rostlin v potravním řetězci člověka*. Praha: Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí, 2007. Dostupné také z: <http://www.phyto-sanitary.org>
 47. FENIK, J. M. TANKIEWICZ a M. BIZIUK. Properties and determination of pesticides in fruit and vegetables [online]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2011, č. 6, s. 814-26 [cit. 2014-03-24]. ISSN 0165-9936. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993611000938>
 48. HAMILTON, D. a S. CROSSLEY. *Pesticide Residues in Food and Drinking Water: Human Exposure and Risk*. John Wiley and Sons, 2004.
 49. *Rezidua pesticidů v potravinách*. Brno: Vědecký výbor pro potraviny: Státní zdravotní ústav, 2005. Dostupné také z: <http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/vvp.htm>
 50. KOCOUREK, V. *Úvod do potravinářské legislativy* [online]. VŠCHT Praha, 2013. Dostupné také z: http://web.vscht.cz/~kocourev/files/Leg_SBP_4_W.pdf
 51. *Právní předpisy ČR – základní informace* [online]. Ministerstvo zemědělství, 2012 [cit. 2014-01-18]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/kategorie/pravni-predpisy-cr-zakladni-informace.aspx>
 52. *Kvalita zemědělské půdy* [online]. Informační systém statistiky a reportingu, 2013 [cit. 2013-01-03]. Dostupné z: <http://issar.cenia.cz/issar/page.php?id=1608>
 53. *Subgroup of Agriculture and the Environment* [online]. [cit. 2014-01-12]. Dostupné z: http://www.personal.ceu.hu/students/06/Alexander_Romanov/GIS_assignment_Agriculture-web.htm
 54. *Spotřeba účinných látek podle kategorií (kg, l) - názvy úč. l. česká verze* [online]. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. Dostupné také z: <http://eagri.cz/public/web/ukzuz/>

portal/pripravky-na-or/

55. ALBERO, B. C. SANCHEZ-BRUNETE a J. TADEO. Multiresidue determination of pesticides in juice by solid-phase extraction and gas Amsterdam: Elsevier Science BV, 15. května 2005, s. 917-24. ISSN 0039-9140.
56. AHMED, F. Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. London: Elsevier Science London, 2001, s. 649-61. ISSN 0165-9936.
57. FERRER, I. et al. Multi-residue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography-time-of-flight Journal of Chromatography A, 29. července 2005, č. 1, s. 81-90. ISSN 0021-9673.
58. SANCHEZ-BRUNETE, C. B. ALBERO a L. GONZALEZ. Analysis of pesticide residues in juice and beverages. Taylor and Francis Inc, 2004, č. 3-4, s. 165-75. ISSN 1040-8347.
59. ANASTASSIADES, M. S. LEHOTAY a D. STAJNBAHER. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive Gaithersburg: Journal of AOAC International, 2003, s. 412-31. ISSN 1060-3271.
60. HAJŠLOVÁ, J. a kol. Příprava vzorku pro stanovení reziduí pesticidů v potravinách. *Chemické listy* [online]. Praha: Česká zemědělská a potravinářská inspekce, 1. září 1998, s. 777-83 [cit. 2014-04-18]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1998_10_777-783.pdf
61. TAN, G. H. a M. K. CHAI. Sample preparation in the analysis of pesticides residue in food for chromatographic techniques. Rijeka: InTech, 2011, s. 28-59.
62. TEKEL, J. T. HUDECOVA a K. PECNIKOVA. Isolation and purification techniques for pesticide residue analyses in samples of plant or animal European Food Research and Technology, 2001, č. 4-5, s. 250-58. ISSN 1438-2377.
63. CARABIAS-MARTINEZ, R. U. GARCIA-HERMIDA a E. RODRIGUEZ-GONZALO. Behaviour of carbamate pesticides in gas chromatography and their determination with extraction and Journal of Separation Science, 2005, s. 2130-38. ISSN 1615-9306.
64. DEMOLINER, A. et al. Development and Validation of a Method using SPE and LC-ESI-MS-MS for the Determination of Multiple Sao Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2010, s. 1424-33. ISSN 0103-5053.
65. CHERTA, L. et al. Comparison of Simple and Rapid Extraction Procedures for the Determination of Pesticide Residues in Food Analytical Methods , 2013, č. 6, s. 1671-84. ISSN 1936-9751.
66. *Extrakce na pevnou fázi* [online]. Labicom s. r. o. [cit. 2014-01-15]. Dostupné z: http://www.labicom.cz/administrace/ckfinder/userfiles/files/8-Prezentace_SPE_kolonky_250511.pdf

67. *Mikroextrakce tuhou fází* [online]. 1997 [cit. 2014-04-18]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/15720/11.pdf>
68. CHARVÁTOVÁ, M. *Využití metody SPME při analýze látek pocházejících z polymerů kontaminujících potravní řetězce ...* [online]. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2006 [cit. 2014-29-03]. Dostupné z: <http://soubory.vfu.cz/fvhe/metoda-spme/>
69. *Mikroextrakce tuhou fází* [online]. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2006 [cit. 2014-29-03]. Dostupné z: http://fvhe.vfu.cz/export/sites/fvhe/adresa/sekce_ustavy/uvozp/Teorie_SPME.pdf
70. DIÉZ, C. et al. *Recent Advances in the Extraction of Triazines from Water Samples* [online]. Agricultural and Biological Sciences, 29. 5. 2013 [cit. 2014-24-03]. ISBN 978-953-51-1122-1. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-advances-in-research/recent-advances-in-the-extraction-of-triazines-from-water-samples>
71. LEHOTAY, S. J. Supercritical fluid extraction of pesticides in food. *Journal of Chromatography A*, 17. října 1997, č. 1-2, s. 289-312. ISSN 0021-9673.
72. LETELLIER, M. a H. BUDZINSKI. Microwave assisted extraction of organic compounds. *EDP Sciences*, 1999, č. 3, s. 259-71. ISSN 0365-4877.
73. RIDDELLOVÁ, K. *Izolační a separační metody* [online]. VŠCHT Praha [cit. 2014-02-22]. Dostupné z: http://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM_LE_ASE_MASE_0907.pdf
74. RENTON, J. *Laboratory studies of acid generation from coal associated rocks* [online]. West Virginia University [cit. 2014-16-01]. Dostupné z: <http://wvmdtaskforce.com/proceedings/83/rent/83ren.htm>
75. *Soxtec 8000 system* [online]. Foss [cit. 2014-03-24]. Dostupné z: http://www.foss.dk/-/media/Images/CA/soxtec8000/soxtech_extraction_sketch%20jpg.ashx
76. RAMOS, L. E. KRISTENSON a M. BRINKMAN. Current use of pressurized liquid extraction and subcritical water extraction in environmental ... [online]. *Journal of Chromatography*, 2002, s. 3-29 [cit. 2014-01-14]. ISSN 0021-9673. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967302013365>
77. FURLANI, Z. et al. Analysis of pesticide residues in sugarcane juice using QuEChERS sample preparation and gas *Kidlington: Elsevier Science Ltd*, 1. června 2011, č. 3, s. 1283-87. ISSN 0308-8146.
78. BIDARI, A. et al. Sample preparation method for the analysis of some organophosphorus pesticides residues in tomato *Kidlington: Elsevier Science Ltd*, 15. června 2011, s. 1840-44. ISSN 0308-8146.

79. FERNANDES, V. C. et al. Determination of Pesticides in Fruit and Fruit Juices by Chromatographic Methods. *Journal of Chromatographic Science*, 2011, s. 715-30. ISSN 0021-9665.
80. AGUERA, A. M. CONTRERAS a A. FERNANDEZALBA. Gas chromatographic analysis of organophosphorus pesticides of horticultural concern. *Journal of Chromatography A*, 3. prosince 1993, s. 293-300. ISSN 0021-9673.
81. ŠTUHLÍK, K. a kol. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004, 264 s.. ISBN 80-246-0852-9.
82. SOMMER, A. K. *Základy analytické chemie II*. VUTIUM, 2000.
83. POPL, M. a J. KUBÁT. *Základy chromatografie*. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1980.
84. POUSTKA, J. *Hmotnostní spektrometrie - Mass Spektrometry (MS)* [online]. VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2014-02-22]. Dostupné z: <http://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20MS%20PRINCIP%20A%20IONIZACE%20%20102007.pdf>
85. PREISLER, J. *Hmotnostní spektrometrie biomolekul* [online]. Masarykova univerzita: Oddělení analytické chemie Ústavu chemie, 2013 [cit. 2014-02-23]. Dostupné z: <http://bart.chemi.muni.cz/courses/MS%20Bio%20CZ%202013.pdf>
86. KEGLEY, S. et al. *PAN Pesticide Database* [online]. San Francisco: Pesticide Action Network, 2010 [cit. 2014-05-03]. Dostupné z: http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC33424
87. GRAB, R. a E. BARRY. *Modern Practice of Gas Chromatography*. 4. Wiley-Interscience, 11. 6. 2004. ISBN 978-0471229834.
88. ZAIKIN, V. a J. HALKET. *A Handbook of Derivatives for Mass Spectrometry*. IM Publications LLP, 12. 5. 2009, 513 s.. ISBN 978-1901019094.
89. ZAIKIN, V. a J. HALKET. *Derivatization in mass spectrometry - Acylace* [online]. *European journal of mass spectrometry*, 5. 9. 2003, 13 s. [cit. 2014-04-05]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14624012>
90. ROLČÍK, J. et al. Purification of 3-indolylacetic acid by solid phase extraction. *Journal of Separation Science*, 2005, **28** (12), 1370-74.
91. TÓTH, J. et al. *Rosmarinic acid - an important phenolic active compound of lemon balm* [online]. Bratislava: Comenius University, 2003 [cit. 2014-04-30]. Dostupné z: https://www.fpharm.uniba.sk/fileadmin/user_upload/admin/Acta_facultatis/Tomus_L/Pharm-15_T__th_J-Mrlianov_i_M-Teke-_ov_i_D-Kore_eov_i_M.pdf

92. *Dělení potravinářských přídatných látek podle funkce ve výrobku* [online]. [cit. 2014-04-19].
Dostupné z: http://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/prilohy/2_Deleni_PPL_Uprava2_fin.pdf

12. Seznam použitých zkratk

ADI	přijatelný denní přívod
ARfD	akutní referenční dávka
BCF	biokoncentrační faktor
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
CCPR	Kodexový výbor pro rezidua veterinárních léčiv v potravinách
ČR	Česká republika
dSPE	extrakce na disperzní pevné fázi
ECD	detektor s elektronovým záchytem
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
EK	Evropská komise
ESI	elektrosprejová ionizace
EtAc	ethylacetát
EU	Evropská unie
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FID	plamenově ionizační detektor
FPD	plamenově fotometrický detektor
GAP	správná zemědělská praxe
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostním detektorem
GPC	gelová permeační chromatografie
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
JMPR	Join Meeting on Pesticide Residues

Ka	disociační konstanta
Koc	půdní adsorpční koeficient
Kow	rozdělovací koeficient n-oktanol/voda
LC/MS	kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem
LC/UV	kapalinová chromatografie s UV detektorem
LD₅₀	letální dávka
LLE	extrakce kapalina - kapalina
LOAEL	nejnižší zjištěná zdravotně účinná koncentrace
MAE	mikrovlákná extrakce
MALDI	ionizace laserem za přítomnosti matrice
MLR	maximální limit reziduí
MSPD	extrakce disperzní tuhou fází
MZ	Ministerstvo zemědělství
NOAEL	nejvyšší zjištěná zdravotně neúčinná koncentrace
P	procesní faktor
PAU	polyaromatické uhlovodíky
PCB	polychlorované bifenyly
PID	fotoionizační detektor
PLE	kapalinová extrakce podporovaná tlakem
PSA	primární, sekundární aminy
PSE	akcelerovaná extrakce
PVC	polyvinylchlorid
QuEChERS	Quick-Easy-Cheep-Effective-Rugged-Safe
RASFF	Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva
RfD	referenční dávka
SBSE	mikroextrakce na míchací tyčince
SFE	superkritická fluidní extrakce
SPE	extrakce tuhou fází
SPME	mikroextrakce tuhou fází
SVS	Státní veterinární správa
SZPI	Státní zemědělská a potravinářská inspekce
TCD	tepelně vodivostní detektor

TDI	tolerovatelný denní přívod
TID	termoionizační detektor
TOF	analyzátor doby letu
UAE	extrakce ultrazvukem
USA	Spojené státy americké
WHO	Světová zdravotnická organizace

13. Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma systému zajištění bezpečnosti potravin v ČR

Obrázek 2: Klasifikace účinků toxických látek [9]

Obrázek 3: Klasifikace cizorodých látek.

Obrázek 4: Schéma registrace pesticidů na základě získaných hodnot MLR.

Obrázek 5: Spotřeba pesticidů na území ČR v letech 1996 až 2012 [39]

Obrázek 6: Schéma SPE (off-line), desorpce rozpouštědlem zapojení off-line. [69]

Obrázek 7: Schéma SPE (off-line), desorpce rozpouštědlem zapojení off-line [50]

Obrázek 8: Schéma SPME, zavedení vzorkovací jehly (a), vysunutí SPME vlákna (b), zavádění na GC kolonu (c), zavádění do HPLC dávkovače (d) [51]

Obrázek 9: Princip SBSE, extrakce (a), desorpce pro GC (b), desorpce pro LC (c) [51]

Obrázek 10: Soxhletův extraktor. [54]

Obrázek 11: Schéma Soxtec extrakce, ponoření do vroucího rozpouštědla (1), propláchnutí vzorku kondenzujícím rozpouštědlem (2), shromáždění čistého rozpouštědla pro další analýzy (3), ukončení extrakce (4) [55]

Obrázek 12: Schéma plynového chromatografu.

Obrázek 13: Schéma hmotnostního detektoru.

14. Seznam tabulek

Tabulka 1: Schéma koloběhu pesticidů v životním prostředí [35]

Tabulka 2: Spotřeba jednotlivých účinných látek za rok 2012 (kg, l)

Tabulka 3: Přehled nejčastěji používaných účinných látek v přípravcích pro ochranu rostlin.

[40]

Tabulka 4: Srovnání extrakčních technik

Tabulka 5: Srovnání vybraných instrumentálních metod a jejich vlastností.

15. Přílohy

Tabulka 6: Rozdělení aditivních látek podle funkční skupiny pro účely značení a popis jejích funkcí v potravinách. Převzato z [92].

<i>Funkční skupina (pro účely značení)</i>	<i>Popis</i>
1. Antioxidanty	Prodlužují údržnost potravin a chrání je proti zkáze způsobené oxidací, jejímiž projevy jsou např. žluknutí tuků a barevné změny potravin.
2. Balicí plyny	Plyny jiné než vzduch, které se zavádějí do obalu před, během nebo po plnění potravin do obalu.
3. Barviva, bělidla	Udělují potravině barvu, kterou by bez jejich použití neměla, nebo obnovují barvu, která byla během technologického procesu poškozena nebo zeslabena.
4. Emulgátory	Vytvářejí nebo udržují stejnorodou směs dvou nebo více nemísitelných kapalných fází v potravině.
5. Konzervanty	Prodlužují údržnost potravin a chrání je proti zkáze způsobené činností mikroorganismů.
6. Kyseliny	Zvyšují kyselost potravin nebo jí udělují kyselou chuť.
7. Kypřicí látky	Látky nebo směsi látek, které vytvářejí plyny, a tak zvyšují objem těsta.
8. Látky zlepšující mouku	Látky jiné než emulgátory, které se přidávají k mouce nebo do těsta za účelem zlepšení pekařské kvality.
9. Látky zvýrazňující chuť a vůni	Zvýrazňují již existující chuť nebo vůni potravin.
10. Lešticí látky	Po nanesení na vnější povrch udělují potravině lesklý vzhled nebo vytvářejí ochranný povlak. Povlaky, které jsou jedlé nebo které jsou snadno odstranitelné, se

	nepovažují za lešticí látky.
11. Modifikované škroby	Získávají se chemickým zpracováním jedlých škrobů v nativním stavu nebo škrobů předtím pozměněných fyzikálními nebo enzymovými postupy nebo pozměněných působením kyselin, zásad nebo bělicích činidel.
12. Nosiče a rozpouštědla	Užívají se k rozpouštění, ředění, disperzi (rozptylování) a jiné fyzikální úpravě přídatné látky, potravního doplňku a arómatu, aniž přitom mění jejich technologickou funkci nebo mají vlastní technologický efekt. Jejich užití usnadňuje manipulaci, aplikaci nebo použití přídatné látky.
13. Odpěňovače	Zabraňují vytváření pěny nebo snižují pění.
14. Pěnotvorné látky	Umožňují vytváření stejnorodé disperze plynné fáze v kapalné nebo tuhé potravíně.