



VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE

Pesticidy a mykotoxiny v biopotravinách: 1. Moderní analytické metody

Jana Hajšlová, Věra Schulzová, Vladimír Kocourek, a kol.



mezinárodní konference ekologického zemědělství

11. září 2014 v Lednici



VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE



FAKULTA POTRAVINÁŘSKÉ
A BIOCHEMICKÉ TECHNOLOGIE
VŠCHT PRAHA

Ústav analýzy potravin a výživy

Metrologická a zkušební laboratoř



Některé látky povolené v ekologickém zemědělství

Povolení	Název	Popis, požadavky na složení, podmínky použití
A	Azadirachtin z <i>Azadirachta indica</i> (Neem tree)	Insekticid
A	Včelí vosk	Prostředek k ochraně řezů a roubů
A	Polysulfid vápenatý	Fungicid
A	Parafinový olej	Insekticid, akaricid
A	Lecitin	Fungicid
B	Rostlinné oleje	Insekticid, akaricid, fungicid, baktericid a prostředek proti
A	Draselná sůl mastných kyselin (mazlavé mýdlo)	Insekticid
A	Pyretriny z <i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i>	Insekticid
A	Feromony	Návnada, narušuje pohlavní chování; pouze v pastích a rozprašovačích
A	Výtažek z <i>Quassia amara</i>	Insekticid, repelent
A	Pyretroidy (pouze deltametrin nebo lambda-cyhalotrin)	Insekticid; pouze v pastích se zvláštními návnadami, pouze proti <i>Bactrocera oleae</i> a <i>Ceratitis capitata</i> Wied."

piperonyl-butoxid ?

Pesticidy v EZ: pozitivní nálezy dost časté...

Výskyt pesticidů v rámci ekologického zemědělství:

- ☞ přenosem z okolních pozemků (často nezaviněné), nevhodná manipulace, např. během skladování, transportu,...
- ☞ při úmyslném použití nepovoleného pesticidu přímo ekologickým zemědělcem



Návrh:

V případě reziduí pesticidů by se pro bioprodukty tolerovala tzv. orientační hodnota do úrovně 0,01 mg/kg (10 µg/kg).

Jinak též tzv. „baby-food limit“.

Maximální Limity Reziduí (MLR): nařízení 396/2005/ES

NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) C. 396/2005

ze dne 23. února 2005

o maximálních limitech reziduí pesticidů v potravinách a krmivech rostlinného a živočišného původu a na jejich povrchu a o změně směrnice Rady 91/414/EHS

(Text s významem pro EHP)



http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm

MLR - určuje nejvyšší přípustnou koncentraci pesticidu, která je důsledkem jeho bezpečném použití s cílem:

- ☛ předcházet nepovolenému nebo nadměrnému používání pesticidů,
- ☛ chránit zdraví konzumentů ošetřených plodin a prostředí *(zejména včely !!!)*.





VŠCHT PRAHA



Ústav analýzy potravin a výživy
Zkušební laboratoř VŠCHT Praha
akreditovaná ČIA (1316.2)
podle EN ISO/IEC 17025:2005

<http://www.vscht.cz/homepage/zamery/akl>



AKREDITACE zkušební laboratoře dle EN ISO 17025:2005

AUTORIZACE úřední laboratoře SZPI dle nař. 882/2004/ES:

 **STÁTNÍ ZEMĚDĚLSKÁ
A POTRAVINÁŘSKÁ INSPEKCE**
ÚSTŘEDNÍ INSPEKTORÁT
Květná 15, 603 00 Brno

Na základě ustanovení čl. 5 a 12 odst. 1 nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 882/2004 o úředních kontrolách za účelem ověření dodržování právních předpisů týkajících se krmiv a potravin a pravidel o zdraví zvířat a dobrých životních podmínkách zvířat, v platném znění (dále jen „nařízení (ES) č. 882/2004“), a za podmínek uvedených v čl. 12 odst. 2 a 3 tohoto nařízení

se tímto vydává


pověření č. 32 na provádění analýz vzorků odebraných při úředních kontrolách

pro držitele:

**úřední laboratoř: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Ústav analýzy potravin a výživy, Metrologická a zkušební laboratoř
se sídlem Praha 6, Technická 5, PSČ 166 28, IČ: 60461373.**

Toto pověření se vydává na dobu neurčitou a v rozsahu a za podmínek stanovených v příložené Zprávě z ověření způsobilosti laboratoře pro účely přejímání výsledků zkoušek

V Brně dne 24. 6. 2014


Ing. Martin Klanica
ústřední ředitel

Pověření se přijímá
(razítko a podpis oprávněné osoby)

 
NÁRODNÍ AKREDITAČNÍ ORGÁN

Signatář EA MLA
Český institut pro akreditaci, o.p.s.
Olšanská 54/3, 130 00 Praha 3

vydává
v souladu s § 16 zákona č. 22/1997 Sb., o technických požadavcích na výrobky, ve znění pozdějších předpisů

OSVĚDČENÍ O AKREDITACI

č. 272 / 2014

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
se sídlem Technická 5, 166 28 Praha 6, IČ 60461373

pro zkušební laboratoř č. 1316.2
Metrologická a zkušební laboratoř

Rozsah udělené akreditace:

Chemická analýza potravin včetně nápojů a doplňků stravy, potravinářských a farmaceutických surovin a produktů, krmiv, chemických přípravků, biologických materiálů rostlinných i živočišných, složek životního prostředí a forenzních vzorků včetně návykových látek vymezená přílohou tohoto osvědčení.

Toto osvědčení je dokladem o udělení akreditace na základě posouzení splnění akreditačních požadavků podle

ČSN EN ISO/IEC 17025:2005

Subjekt posuzování shody je při své činnosti oprávněn odkazovat se na toto osvědčení v rozsahu udělené akreditace po dobu její platnosti, pokud nebude akreditace pozastavena, a je povinen plnit stanovené akreditační požadavky v souladu s příslušnými předpisy vztahujícími se k činnosti akreditovaného subjektu posuzování shody.

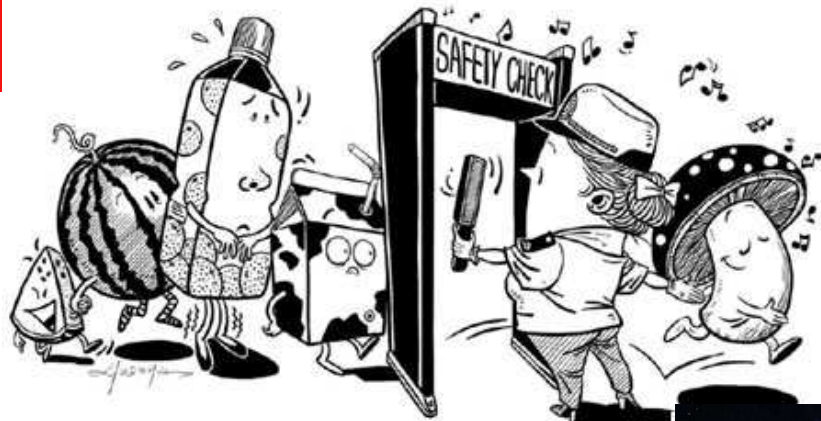
Udělení akreditace je platné do 29.04.2019

V Praze dne 29.04.2014


-1-


Ing. Jiří Růžička, MBA
ředitel
Českého institutu pro akreditaci, o.p.s.





**Jaké detekční techniky zvolit ?
Jak změřit množství ?**

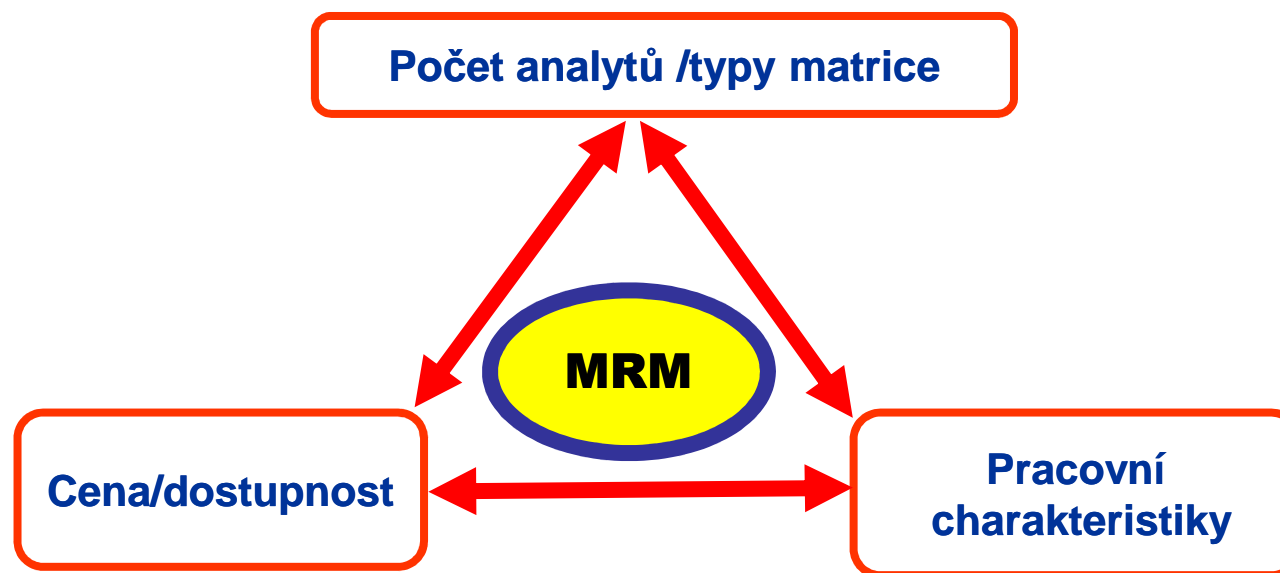
GC-MS/MS



LC-MS/MS



STRATEGIE MULTIREZIDUÁLNÍCH METOD



- metody pro daný pesticid (SRM) **X** pro velkou skupinu látek (MRM)
- MRM musí zahrnout sloučeniny různých fyzikálně-chemických vlastností
- princip: (i) homogenizace, (ii) extrakce, (iii) přečištění primárního extraktu, (iv) identifikace/kvantifikace a (v) konfirmace (potvrzení) analytů metodami kapalinové a plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (LC-MS/MS, GC-(HR)MS)

Multireziduální metody pro efektivní kontrolu (2014)

LC-MS/MS: 361

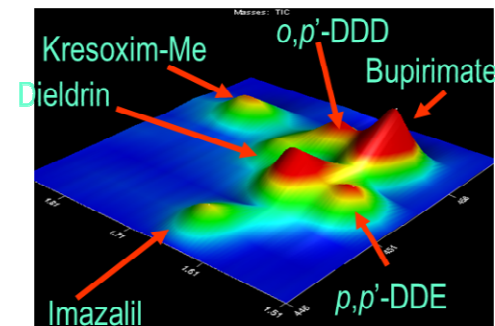
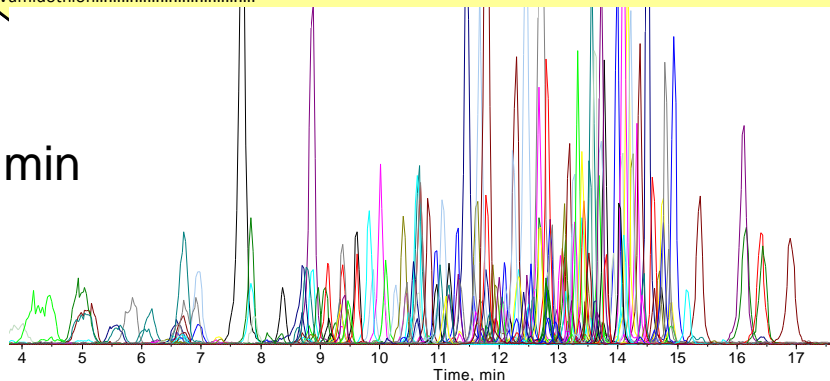
Abamectin, Acephate, Acetamiprid, Acetochlor, Acrinathrin, Alachlor, Aldicarb, Aldicarb-sulfone, Aldicarb-sulfoxide, Ametryn, Atrazine, Azadirachtin, Azoxystrobin, Benalaxyl, Bendiocarb, Bitertanol, Boscalid, Bromoxynil, Carbaryl, Carbendazim, Carbofuran, Carbofuran-3-hydroxy, Chloroxuron, Chlorsulfuron, Cinerin, Clofentezine, Clomazone, Clothianidin, Cyanazine, Cyazofamid, Cymoxanil, Cyproconazole, Demeton-S-methyl, Demeton-S-methyl-sulfone, Desmedipham, Desmethylpirimicarb, Desmetryn, Dichlorvos, Dicrotophos, Diethofencarb, Diflubenzuron, Diflufenican, Dimethenamide, Dimethoate, Dimethomorph, Dimoxystrobin, Diniconazole, Disulfoton, Disulfotone-sulfone, Disulfotone-sulfoxid, Diuron, DMSA, DMST, Dodine, EPN, Epoxiconazole, Ethiofencarb, Ethofumesate, Etofenprox, Etrifos, Fenamiphos, Fenamiphos-sulfon, Fenamiphos-sulfoxide, Fenazaquin, Fenbuconazole, Fenhexamid, Fenoxaprop-P, Fenpropathrin, Fenprophimorph, Fenpropidin, Fenpyroximate, Fensulfothion, Fenthion, Fipronil, Fonicamid, Fluazifop, Fluazifop-P-butyl, Fluazinam, Fludioxonil, Flufacenate, Flufenacet, Flufenoxuron, Fluoxastrobin, Fluquinconazole, Fluroxypry, Flusilazole, Formetanate, Formothion, Haloxifop-acid, Hexaconazole, Hexazinon, Hexythiazox, Imazalil, Imazaquin, Imazethapyr, Imidacloprid, Indoxacarb, Iodosulfuron-methyl, Iprovalicarb, Isoproturon, Jasmolin, Lenacil, Linuron, Lufenuron, Mefenpyr-diethyl, Mepanipyrim, Neprobil, Metalaxyl, Metazachlor, Metconazole, Methamidophos, Methiocarb-sulfone, Methiocarb-sulfoxide, Methomyl, Methoxyfenozide, Metobromuron, Metolachlor, Metolcarb, Metoxuron, Mevinphos, Monocrotophos, Monolinuron, Monuron, Myclobutanil, Naled, Napropamide, Neuron, Norflurazon, Omethoate, Oxadixyl, Oxamyl, Oxydemeton-methyl, Paclobutrazol, Pencycuron, Phenmedipham, Phorate, Phorate-sulfon, Phorate-sulfoxide, Phosphamidon, Picoxystrobin, Piperonylbutoxide, Pirimicarb, Prochloraz, Prometon, Prometryn, Propachlor, Propamocarb, Propaquizafop, Propiconazole, Propoxur, Propyzamide, Proquinazid, Prosulfocarb, Pyraclostrobin, Pyrethrin, Pyridate, Pyrifenoxy, Pyrimethanil, Pyriproxyfen, Quinmerac, Quinoxifen, Quizalofop-P-ethyl, Resmethrin, Simazine, Simetryn, SpinosynA, SpinosynD, Spiroxamin, Tau-Fluvalinate, Tebufenozyde, Tebufenpyrad, Teflubenzuron, Terbufos-sulfoxide, Terbutylazine, Terbutryn, Thiabendazole, Thiacloprid, Thiamethoxam, Thiodicarb, Thiometon, Thiophanate-methyl, Tolyfluanid, Triadimenol, Trichlorfon, Triflumuron, Triforine, Vamidothion.....

GC-MS: 174

azinphos-ethyl, azinphos-methyl, bifenthrin, bupirimate, buprofezin, cadusafos, carbophenothion, chlorfenvinphos, chlorpropham, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, cyfluthrin, cyhalothrin, cypermethrin, cyprodinil, deltamethrin, diazinon, dichlofluanid, diclofop-methyl, difenoconazole, ethion, ethoprophos, fenarimol, fenoxycarb, fonofos, haloxifop-ethoxyethyl, haloxifop-methyl, heptenophos, isofenphos, isofenphos-methyl, kresoxim-methyl, malaoxon, malathion, mecarbam, methacrifos, methidathion, methiocarb, oxyfluorfen, penconazole, pendimethalin, permethrin, phenothrin, phenthoate, phosalone, phosmet, pirimiphos-ethyl, pirimiphos-methyl, profenofos, propargite, propham, pyrazophos, pyridaben, quinalphos, sulfotep, tebuconazole, terbufos, terbufos-sulfone, tetraconazole, tolclofos-methyl, triadimefon, triazophos, trifloxystrobin

bromophos-ethyl, bromophos-methyl, bromopropylate, chlorobenzilate, chlorothalonil, DDD (o, p'), DDD (p, p'), dicofol, dieldrin, diphenylamine, endosulfan (alpha), endosulfan (beta), endosulfan-sulfate, endrin, fenamidone, fenchlorphos, fenitrothion, fenthion, fenvalerate (1), fenvalerate (2), flucythrinate, fluvalinate, HCH (alpha), HCH (beta), HCH (delta), HCH (gamma), heptachlor-epoxide (endo), heptachlor-epoxide (exo), iprodione, methoxychlor, nitrofen, parathion-ethyl, parathion-methyl, phenylphenol (o), procymidone, prothiofos, pyridaphenthion, quintozene, tecnazene, tefluthrin (cis), tetradifon, trifluralin, vinclozolin

20 min

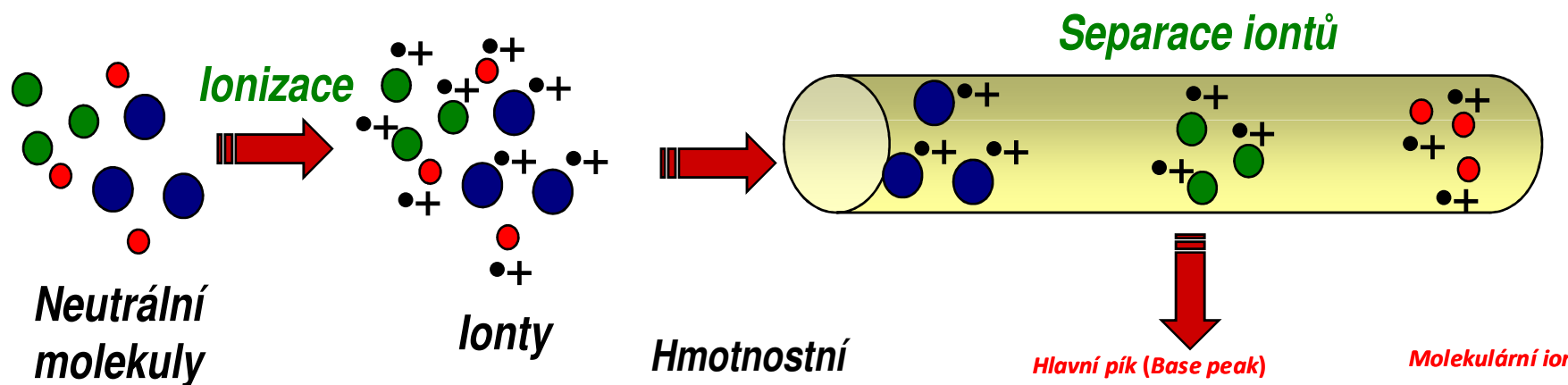


Rezidua v potravinách: 2004 - 2013

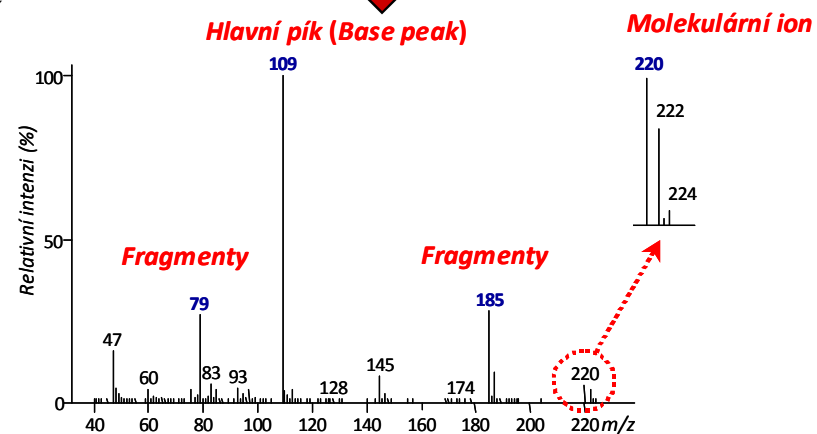
Zdroj: Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI)

	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Celkový počet vzorků	762	819	1100	920	921	1076	1076	1101	1017	872
Počet sledovaných pesticidů (včetně metabolitů)	145	150	184	184	338	309	309	371	405	410
Počet analýz	70 409	88 078	125 265	93 169	138 490	298 765	333 181	358 065	379 927	334 546
Počet vzorků s pozitivním nálezem	316	301	332	326	369	753	659	638	668	521
Počet vzorků s nadlimitním nálezem	7	10	3	14	11	7	16	14	7	4

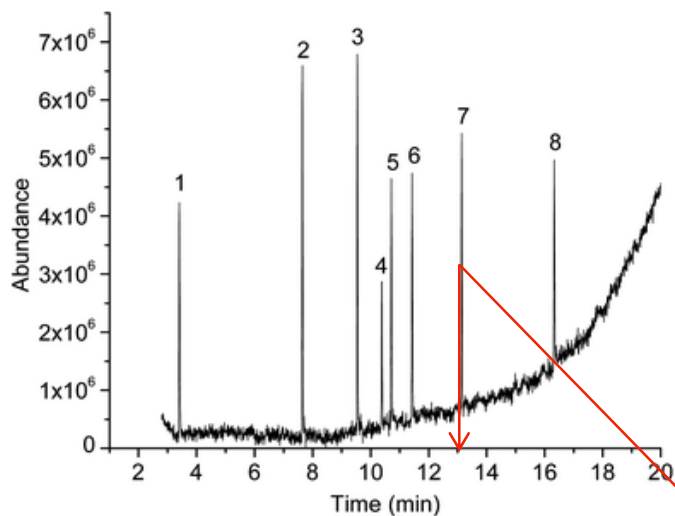
Hmotnostní spektrometrie



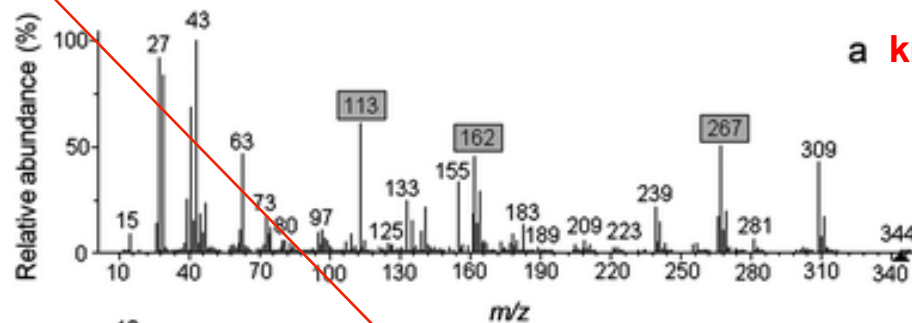
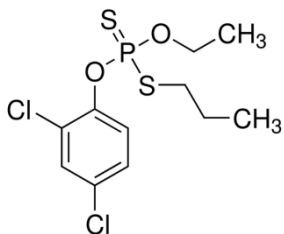
Hmotnostní spektrum



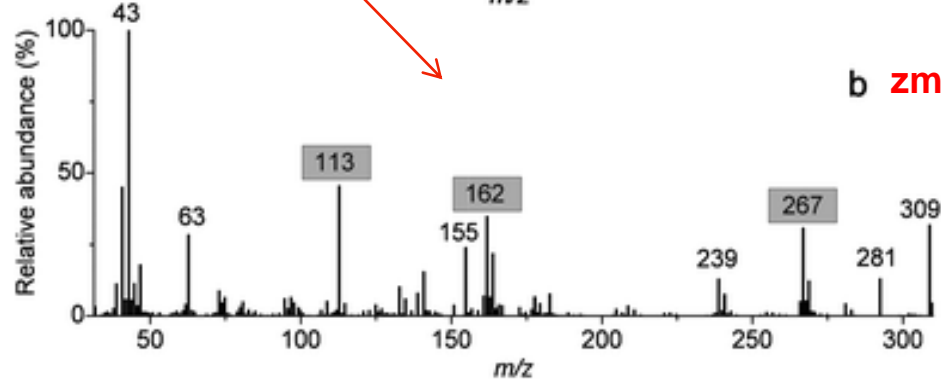
Hmotnostní spektrometrie: příklad identifikace



prothiofos (v EU nepovolený !)



a knihovna NIST

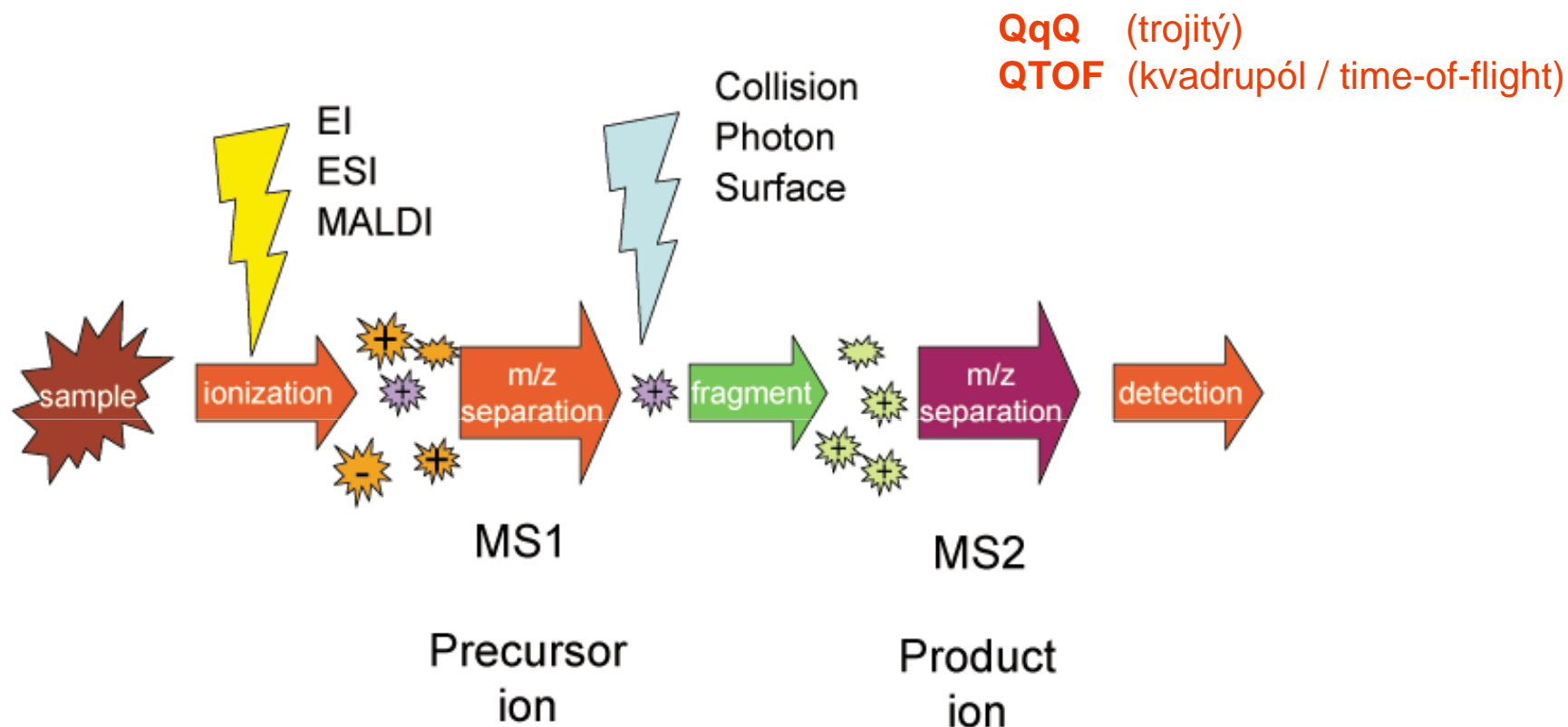


b změřené spektrum

Identifikace:

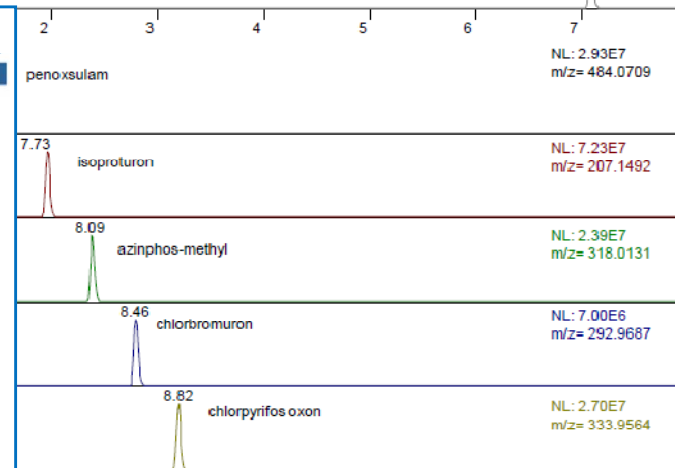
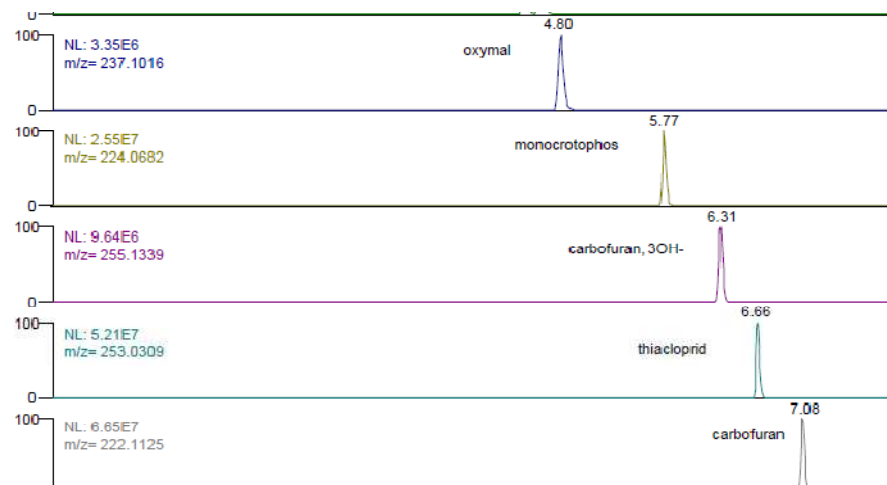
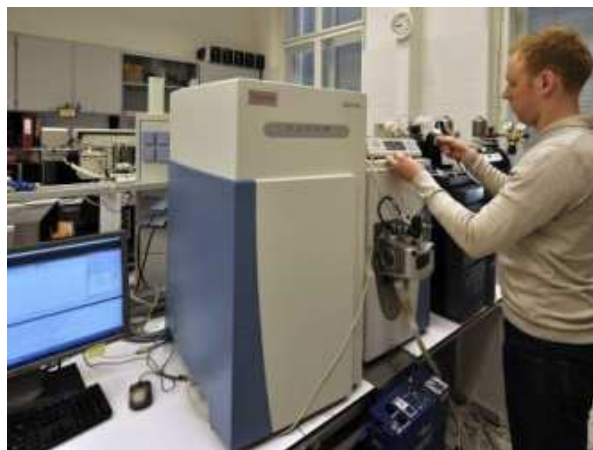
- retenční čas v systému (RT)
 - charakteristické ionty a poměry intenzit
- porovnání s referenčním standardem*

Detekce x Identifikace látky



Princip tandemové hmotnostní spektrometrie (MS-MS)

Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením



HR-MS:
rezidua v cibuli (0,01 mg/kg)

3. HRMS Database

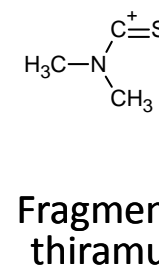
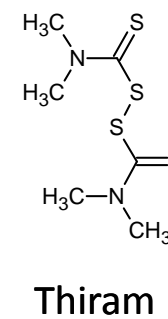
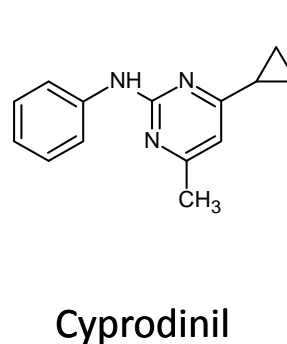
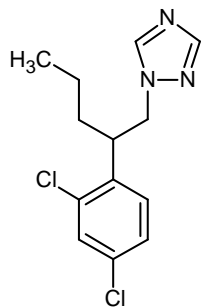
Compound	Molecular Formula	Retention Time (min)	Theoretical Mass
Ametryn	C9H17N5S	18.47	227.1199
Ametryn F1	C8H14N5S	18.47	212.0964
Ametryn F2	C6H9N5S	18.47	183.0573
Ametryn F3	C5H8N5S	18.47	170.0495
Azinphos Methyl	C10H12N3O3PS2	29.38	317.0052
Azinphos Methyl F1	C8H6N3O	29.38	160.0505
Azinphos Methyl F2	C7H4O	29.38	104.0257
Benalaxyl	C20H23NO3	26.00	325.1672
Benalaxyl F1	C18H20NO	26.00	266.1539
Benalaxyl F2	C13H16NO3	26.00	234.1125
Benalaxyl F3	C11H14NO	26.00	176.1070
Benalaxyl F4	C12H16NO2	26.00	206.1176
Benalaxyl F5	C10H14N	26.00	148.1121
cyfluthrin	C23H22ClF3O2	28.33	422.1255

Rozlišení m/z: Bio- vs. konvenční

Experimental m/z	Theoretical m/z	Elemental composition	Mass error (ppm)	Tentative identification	Ion type
284.0707	284.0716	C ₁₃ H ₁₅ Cl ₂ N ₃	-2.9	penconazol	[M+H] ⁺
88.0218	88.0221	C ₃ H ₆ NS	0.5	fragment thiramu	[M] ⁺
226.1337	226.1344	C ₁₄ H ₁₆ N ₃	-0.8	cyprodinil	[M+H] ⁺
179.1433	179.1435	C ₁₂ H ₁₉ O	1.3	neidentifikováno	-
263.2369	263.2375	C ₁₈ H ₃₁ O	-0.2	linolová kyselina	[RCO] ⁺
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮

a mnoho dalších...

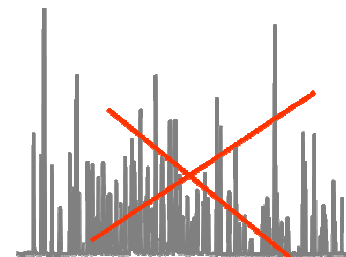
PESTICIDY



Zavedení nové techniky

'AMBIENT MASS SPECTROMETRY'

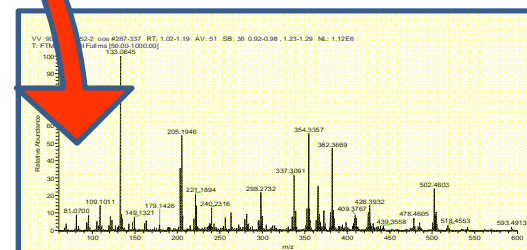
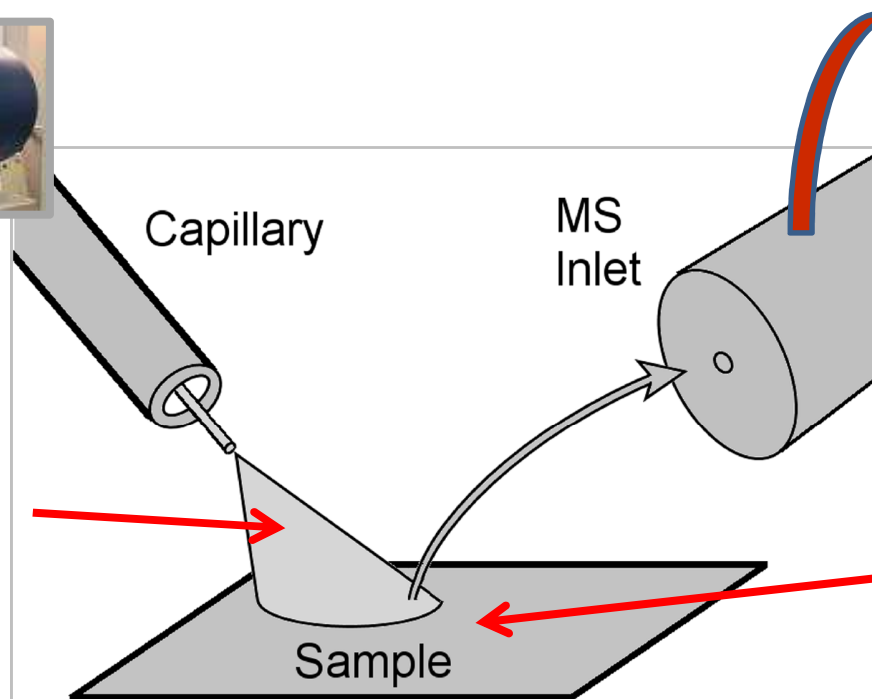
Direct Analysis in Real Time



Hmotnostní spektrum



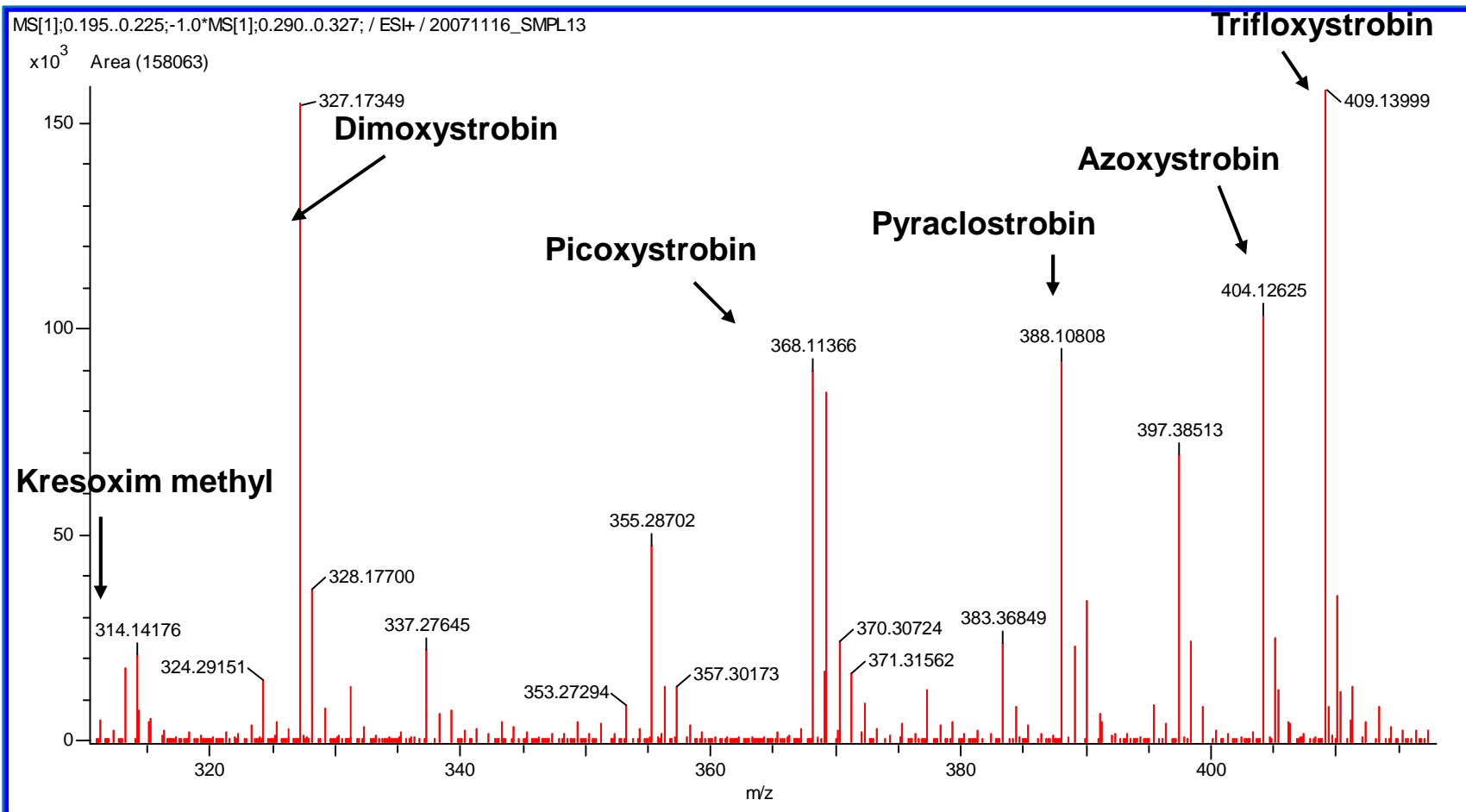
Excitované He
200- 400°C



Termodesorpce (~ APCI)

Přímá MS-DART (Direct Analysis in Real Time)

[M+H]⁺ hmotnostní spektrum ethylacetátového extraktu pšenice s přidavkem strobilurinů (0,12 mg.kg⁻¹)



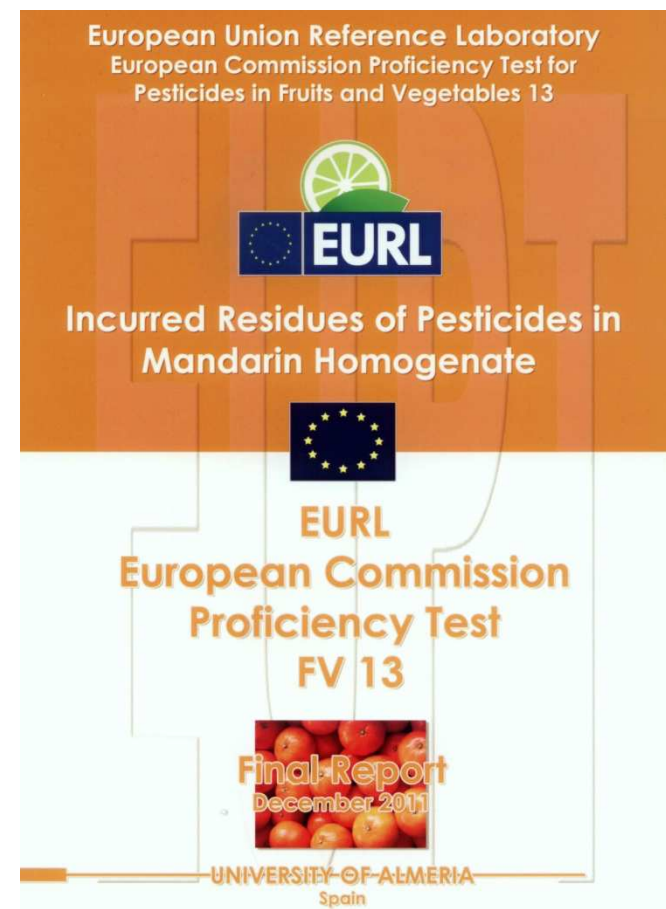
Schůrek J., Václavík L., Hooijerink H.D., Lacina O., Poustka J., Sharman M., Caldow M., Nielen M.W.F., Hajšlová J.: Control of Strobilurin Fungicides in Wheat Using Direct Analysis in Real Time Accurate Time-of-Flight and Desorption Electro spray Ionization Linear Ion Trap Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 80 (24): 9567–9575, 2008.

Ústav analýzy potravin a výživy VŠCHT Praha: účast v mezilaboratorních testech EU RL

Účast 144 úředních a referenčních laboratoří z EU a EFTA, 62 klasifikováno „GOOD“, VŠCHT na 8. místě s 19 pesticidy a SWZ = 0,4 (nejlepší má 0,3 a nejhorší 5,0)

Table 4.6.1.1 Performance and Classification of laboratories in Category A using the SW

Lab Code	No. of z-scores achieved in total (n)	SWZ	Classification
Lab002	19	0.3	Good
Lab136	17	0.3	Good
Lab005	19	0.3	Good
Lab032	19	0.3	Good
Lab150	19	0.3	Good
Lab013	19	0.3	Good
Lab004	19	0.4	Good
Lab097	19	0.4	Good
Lab024	19	0.4	Good
Lab120	19	0.4	Good
Lab096	19	0.4	Good
Lab094	19	0.4	Good
Lab029	19	0.5	Good
Lab145	19	0.5	Good



Ústav analýzy potravin a výživy VŠCHT Praha (Lab002): mezilaboratorní test EU RL: do 72 hodin výsledky ! („které z až 1000 různých pesticidů tam jsou ?“)



European Union Reference Laboratory for Residues of Pesticides
Pesticides in Fruits and Vegetables

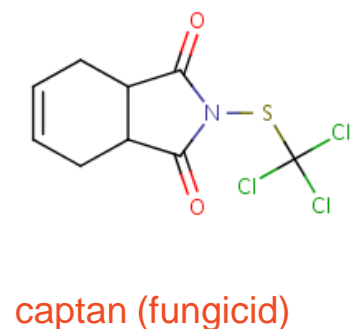
European Commission Proficiency Test for Pesticide Residues in Fruits and Vegetables Screening Methods 05 Preliminary Report

Laboratory Code Total No of Reporting Laboratories = 58 (* NRCL-FV)	Evaluated Pesticides (22) (in green pesticides with concentration <100 ppb)																				Reported Pesticides by Laboratory	% of Reported Pesticides by Laboratory		
	Aldicarb sulfone	Aldicarb sulfoxide	Atrazine	Beta-Cyfluthrin	Bromoxynil	Clomazone	Dieltarin	Dituron	Fluaziflam	Rufenacet	Metamifltron	Methomyl#	Mefltribuzin	Molinate	Oxamyl	Picloram	Picollinatén	Propamocarb	Prosulfocarb	Quinoclamine			Thiodicarb#	Triflumizole
Lab001	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	18	82
Lab002	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	22	100
Lab003*																							0	0
Lab004*	R	R				R	R	R		R	R	R		R		R	R	R	R	R	R	R	16	73
Lab005*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	21	95
Lab006*	R	R	R	R					R		R	R		R		R	R	R	R	R	R	R	15	68
Lab007	R	R		R					R		R	R		R				R	R			R	14	64
Lab008	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R	R		R				R	R			R	16	73
Lab009	R	R	R		R	R			R		R			R				R	R			R	15	68
Lab010*		R	R	R	R	R	R	R		R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	15	68
Lab011	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	21	95
Lab012*	R	R	R	R					R		R	R		R				R	R			R	13	59
Lab013	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	20	91
Lab014*	R	R	R	R	R	R	R	R		R	R			R				R	R			R	19	86
Lab015*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	11	50
Lab016*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	19	86
Lab017	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	20	91
Lab018		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	17	77
Lab019	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	14	64
Lab020*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	18	82
Lab021	R		R	R		R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	18	82
Lab022	R	R	R	R		R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	15	68
Lab023	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	18	82
Lab024*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	19	86
Lab025*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	55
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	20	91

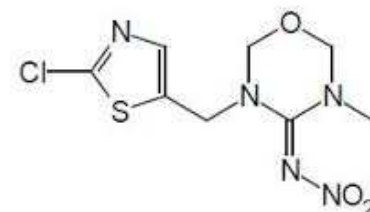
Zpráva ze 6.3.2013

100 % úspěšnost: jen 4 laboratoře z 61 !

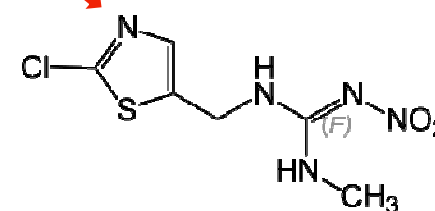
Stanovení degradačních produktů



THPI (tetrahydroftalimid)
není v definici reziduí !



thiamethoxam

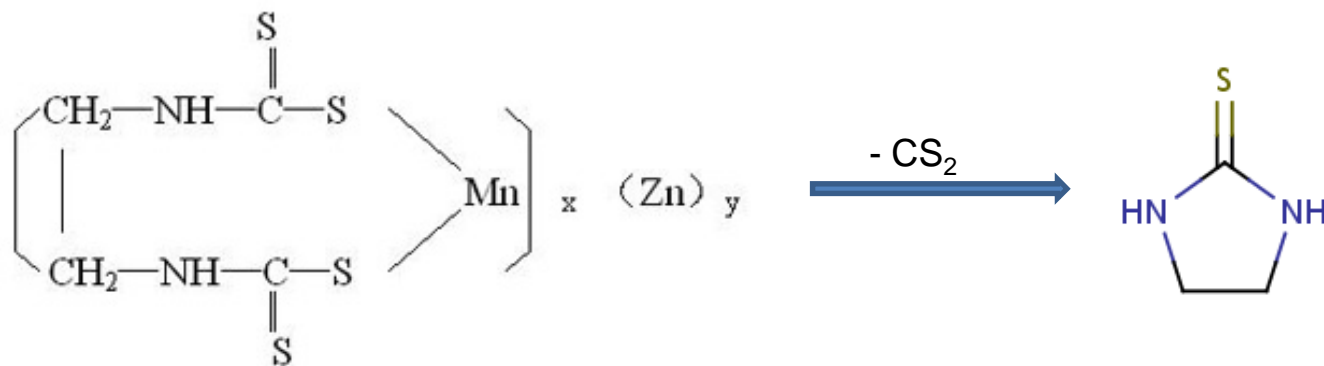


clothianidin



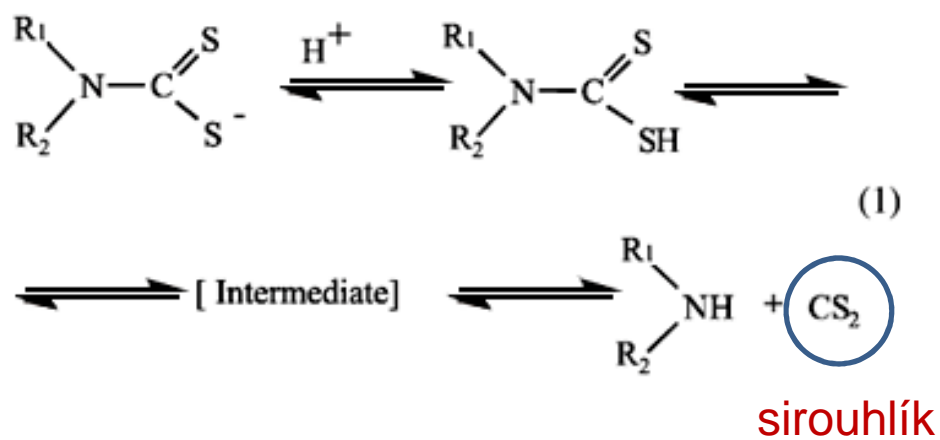
Pesticid	Definice reziduí (dle nařízení 396/2005/ES)
Thiamethoxam	Suma thiamethoxamu + clothianidinu vyjádřená jako thiamethoxam
Carbofuran	Suma carbofuranu a 3-hydroxy-carbofuranu vyjádřená jako carbofuran
Methiocarb	Suma methiocarbu + methiocarb sulfonu + methiocarb sulfoxidu vyjádřená jako methiocarb
Chlorpropham	Chlorpropham a 3-chloroanilin vyjádřený jako chlorpropham
Prochloraz	Suma prochloraz + jeho metabolity obsahující 2,4,6-trichlorophenolovou skupinu vyjádřené jako prochloraz

Stanovení degradačních produktů

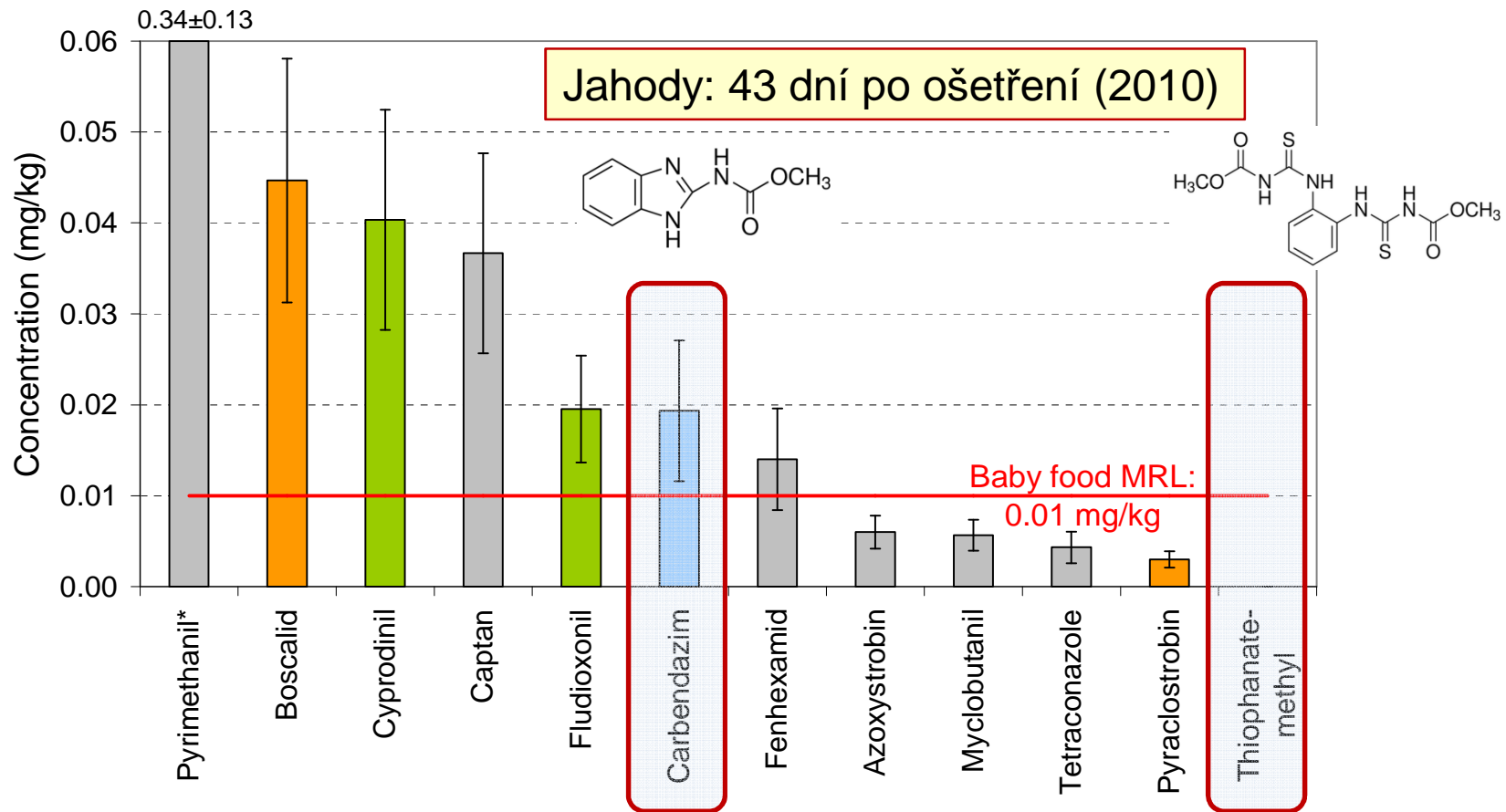


dithiokarbamat – mancozeb (Dithan)

ethylenethiomočovina
(karcinogenní, mutagenní a teratogenní)



Stanovení degradačních produktů



carbendazim

← thiophanate methyl
(TOPSIN M70 WP)

Strategie založená na 'fingerprintech'

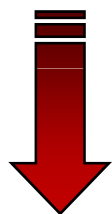
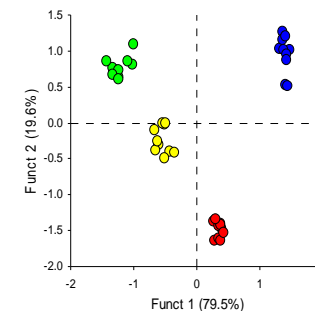
Vzorky



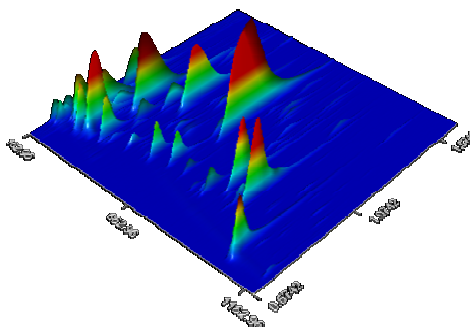
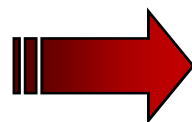
Výstup: hypotéza
přijatá / zamítnutá

Act. Group	Pred. Group (Holdout)				Correctly Classified
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	
Group 1	10	0	0	0	1.000
Group 2	0	10	0	0	1.000
Group 3	0	0	10	0	1.000
Group 4	0	0	0	10	1.000
Overall Correct Classification Rate					1.000

Analýza dat



Analytická
instrumentace



Výstup:
fingerprinty



No.	Group	Var1	Var2	Var3	Var4	Var5	Var6	Var7	Var8	Var9	Var10
1	Group 1	0.488	0.158	0.217	0.564	0.069	0.242	0.115	0.064	0.019	0.005
2	Group 1	0.496	0.166	0.222	0.580	0.070	0.249	0.057	0.033	0.020	0.013
3	Group 1	0.083	0.043	0.032	0.001	0.022	0.140	0.001	0.001	0.008	0.002
...
11	Group 2	0.866	0.045	0.736	0.029	0.026	0.025	0.000	0.004	0.010	0.011
12	Group 2	0.853	0.043	0.703	0.028	0.026	0.024	0.000	0.004	0.009	0.000
13	Group 2	0.724	0.027	1.000	0.016	0.043	0.049	0.000	0.003	0.007	0.014
...
21	Group 3	0.264	0.098	0.060	0.015	0.028	0.153	0.000	0.001	0.015	0.006
22	Group 3	0.273	0.097	0.061	0.015	0.029	0.154	0.000	0.001	0.015	0.005
23	Group 3	0.435	0.016	0.010	0.000	0.012	0.165	0.000	0.001	0.002	0.000
...
38	Group 4	1.000	0.008	0.002	0.000	0.020	0.092	0.005	0.004	0.001	0.014
39	Group 4	0.783	0.007	0.000	0.005	0.045	0.036	0.000	0.002	0.000	0.022
40	Group 4	0.849	0.000	0.000	0.006	0.051	0.038	0.000	0.004	0.000	0.026

Datová matice

AMS na VŠCHT



Ústav analýzy potravin a výživy
VŠCHT PRAHA



ASAP
(Xevo QTOF, Waters)



DART
(Exacte, Thermo)



DART
(AccuTOF LP, Jeol)



ASAP
(Synapt G2 HDMS, Waters)

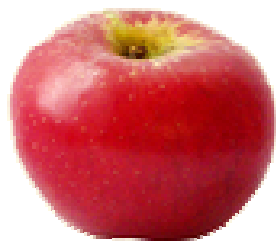
DART
(Q-Exacte, Thermo)

2004 2005 2006 2007 2008 2009 2010 2011 2012

Vzorky jablek

Přehled

	Rubinola	Melrose	Topaz
Čerstvá (10/2010)	40	30	79
BIO	20	15	41
Konvenční	20	15	38
Sklad (04/2011)	0	20	40
BIO	0	10	20
Konvenční	0	10	20
Celkem	40	50	119



Rubinola



Melrose



Topaz

- ▶ **Celkem 209 vzorků jablek**
 - ▶ **Odrůdy: RUBINOLA, MELROSE, TOPAZ**
 - ▶ **Produkce: Bio- / Konvenční**
 - ▶ **Skladování: čerstvá / skladovaná**

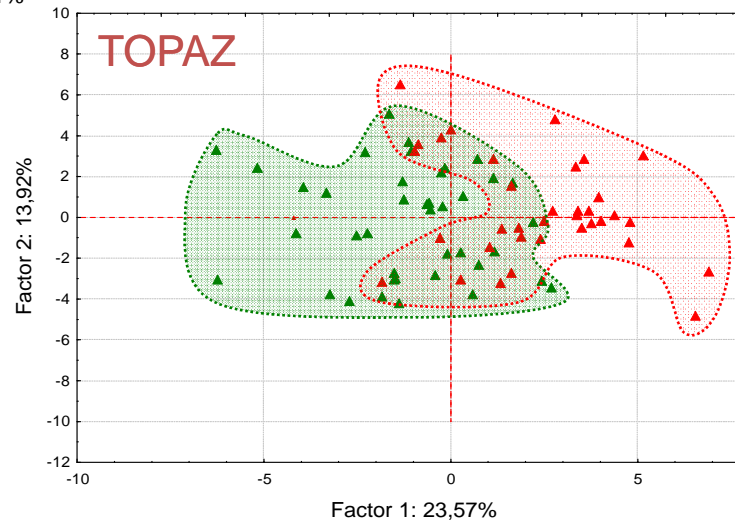
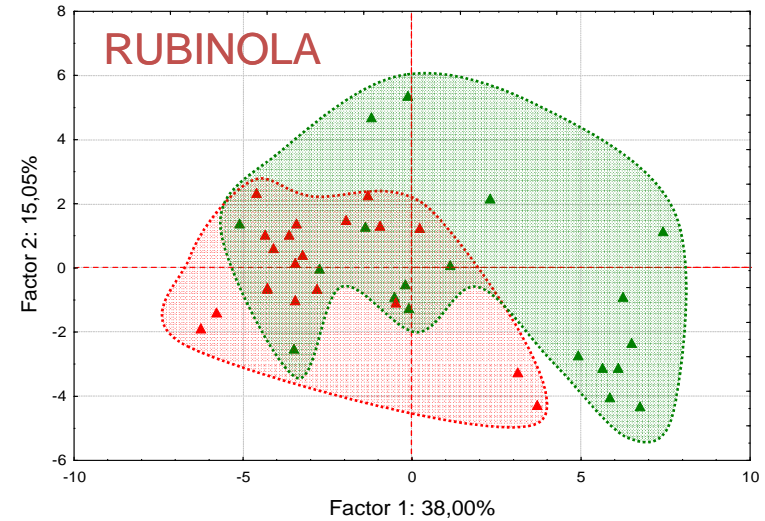
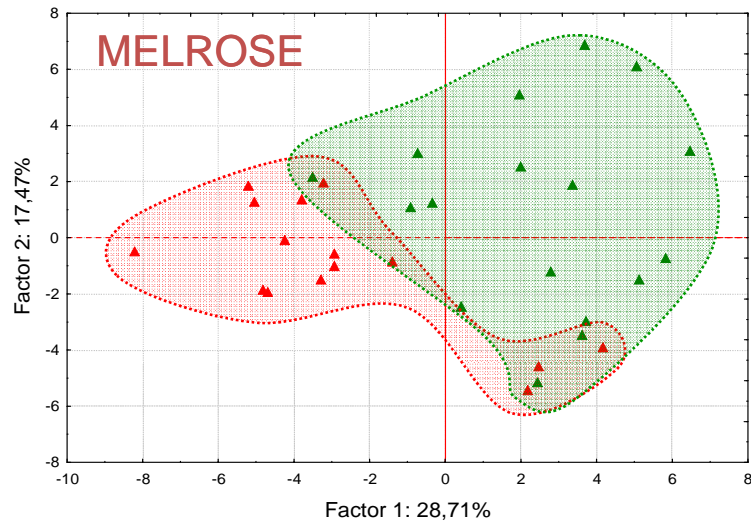
PESTICIDY APLIKOVANÉ PŘI KONVENČNÍ PRODUKCI

Datum:	Pesticid:
14/04/2010	cyprodinyl
20/04/2010	dithianon
27/04/2010	thiram
03/05/2010	pyrimethanil
08/05/2010	difenoconazol
11/05/2010	chlorpyrifos-methyl
21/05/2010	cyprodinyl, captan
27/05/2010	penconazol, metoxyfenozid
28/05/2010	acetamiprid
04/06/2010	dodin
10/06/2010	fluquinconazol, pyrimethanil
18/06/2010	thiram
05/08/2010	penconazol
25/08/2010	thiram

Analýza dat: Bio- vs. konvenční (Konv)

Analýza hlavních komponent (PCA)

► Proměnné: normalizované intenzity 63 iontů vybraných z DART-MS spekter



BIO-produkty
Konvenční

Analýza dat: Bio- vs. konvenční (Konv)

Lineární diskriminační analýza

MELROSE – proměnné: 7 hlavních komponent

Model development				Model validation		
Melrose	BIO	KONV	Classification rate	BIO	KONV	Classification rate
BIO	15	0	100%	14	1	93.3%
KONV	0	15	100%	1	14	93.3%
Rozpoznávací schopnost			100%	Predikční schopnost		93.3%

RUBINOLA – proměnné: 9 hlavních komponent

Model development				Model validation		
Rubinola	BIO	KONV	Classification rate	BIO	KONV	Classification rate
BIO	20	0	100%	20	0	100.0%
KONV	0	20	100%	1	19	95.0%
Rozpoznávací schopnost			100%	Predikční schopnost		97.4%

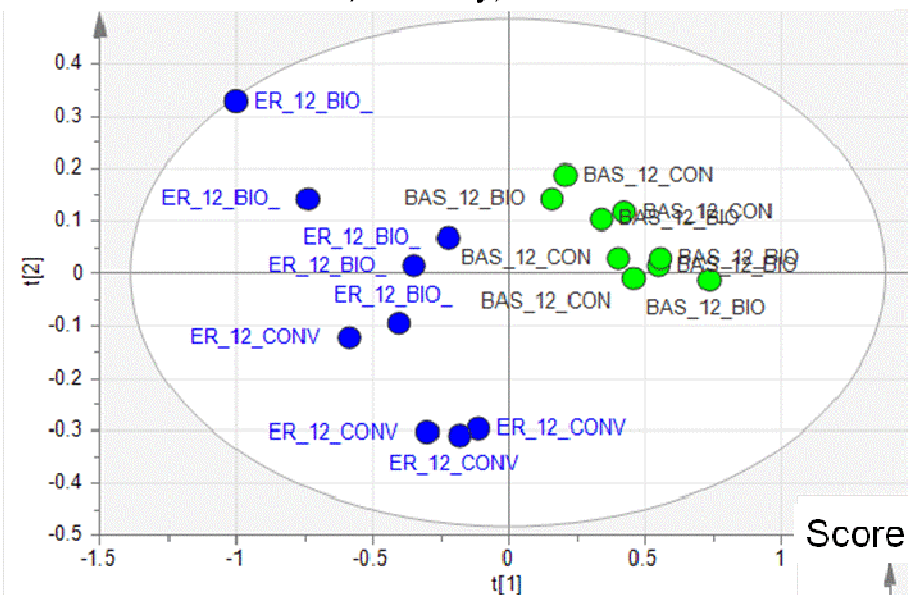
TOPAZ – proměnné: 9 hlavních komponent

Model development				Model validation		
Rubinola	BIO	KONV	Classification rate	BIO	KONV	Classification rate
BIO	40	0	100%	40	0	100.0%
KONV	0	40	100%	0	40	100.0%
Rozpoznávací schopnost			100%	Predikční schopnost		100.0%

Rajčata a pšenice: PLS-DA modely



Score Scatter Plot, locality, tomatoes



■ Basilicata
■ Emilia_Romagna

lokalita / bio-

← Rajčata

Rozpoznávání: 100%

Predikční schopnost: 100%

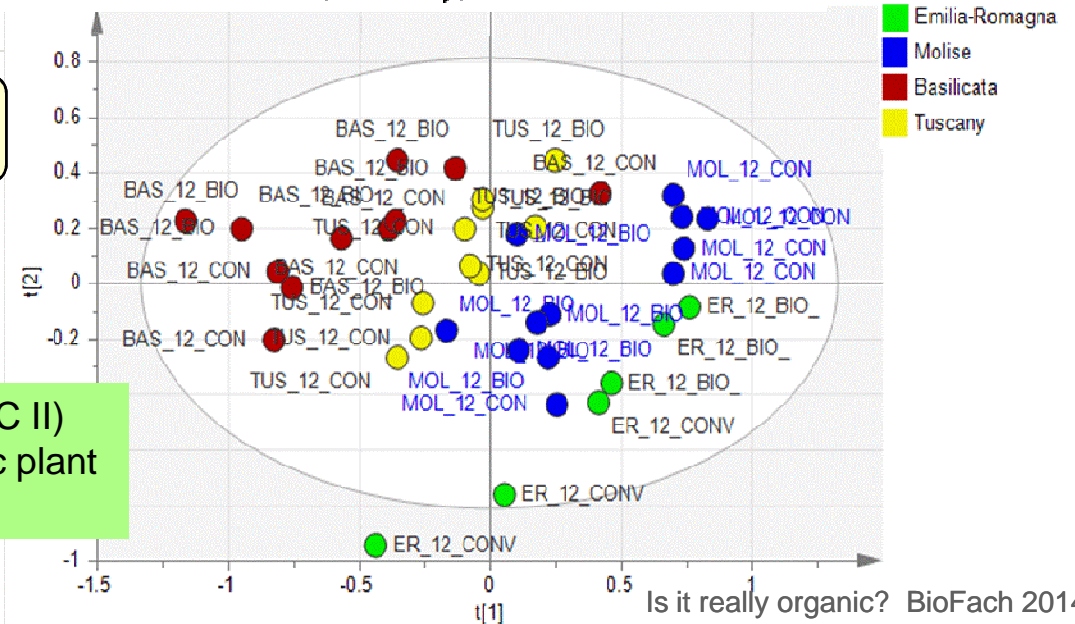
Pšenice →

Rozpoznávání: 100%

Predikční schopnost: 72%

AuthenticFood (ERA-NET-CORE ORGANIC II)
Fast methods for AUTHENTICation of organic plant based FOODs

Score Scatter Plot, locality, wheat



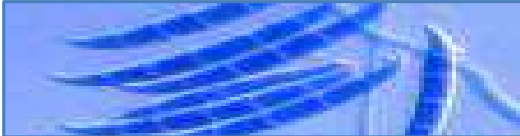






■ Emilia-Romagna
■ Molise
■ Basilicata
■ Tuscany

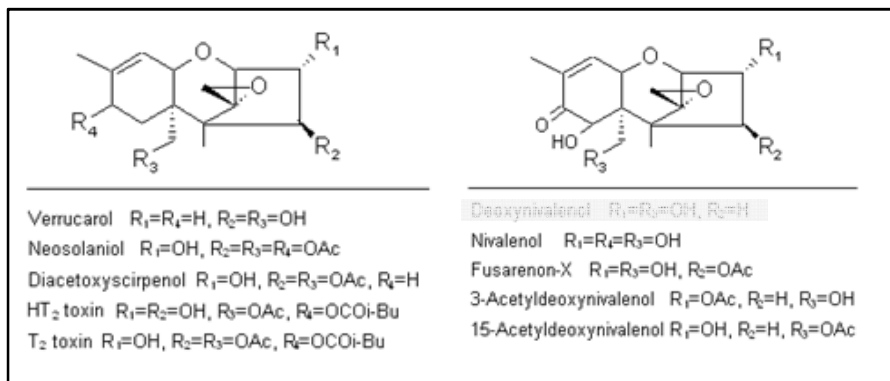
Mykotoxiny

Toxické sekundární metabolity mikroskopických vláknitých hub

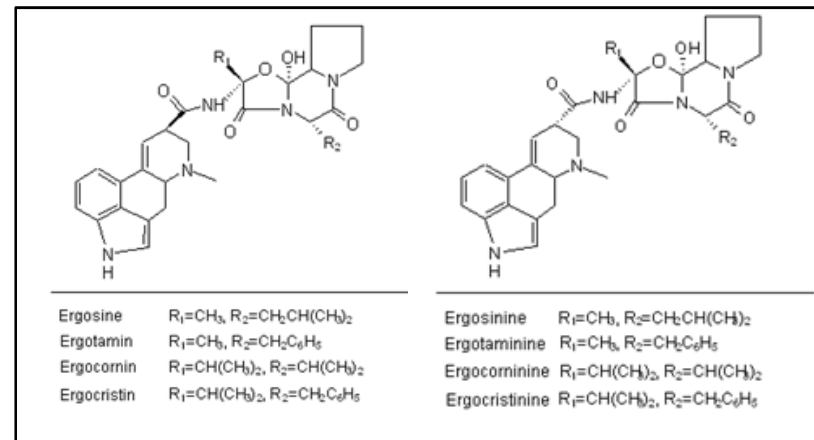
Jen část je v EU regulovaných

<p>Stachybotrylactam <i>Stachybotrys spp.</i></p> 	<p>Phomopsin A <i>Phomopsis spp.</i></p> 	
<p>Aflatoxin B1, B2, G1, G2 Gliotoxin Sterigmatocystin <i>Aspergillus spp.</i></p> 	<p>Ergocornine Ergocorninine Ergocristine Ergocristinine Ergocryptine Ergocryptinine Ergometrine Ergosine Ergosinine Ergotamine Ergotaminine Agroclavine <i>Claviceps spp.</i></p> 	<p>3-acetyldeoxynivalenol 15-acetyldeoxynivalenol Beauvericine Deoxynivalenol DON-3-glucoside Diacetoxyscirpenol Enniatine A, A1, B, B1 Fumonisin B1, B2, B3 Fusarenon-X HT-2 toxin Neosolaniol Nivalenol T-2 toxin Verrucarol Zearalenone α-zearalenol β-zearalenol</p>
<p>Alternariol Alternariol-methylether Tentoxin Tenuazonic acid <i>Alternaria spp.</i></p> 	<p>Cyclopiazonic acid, Citrinin, Meleagrin, Mycophenolic acid, Ochratoxin A, Patulin, Paxilline, Penicillic acid, Penitrem A, Roquefortine C, Verruculogen <i>Penicillium spp.</i></p> 	<p><i>Fusarium spp.</i></p>

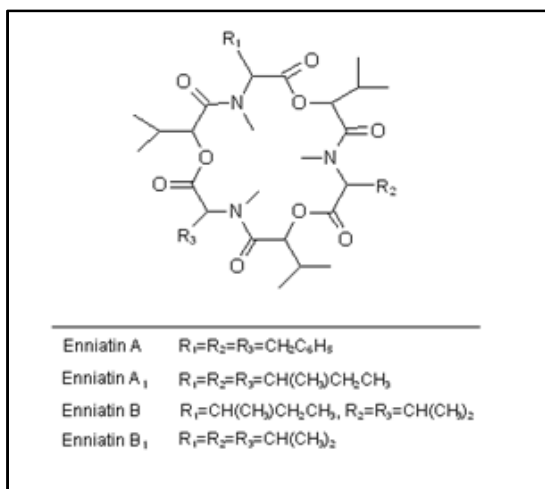
Neregulované mykotoxiny



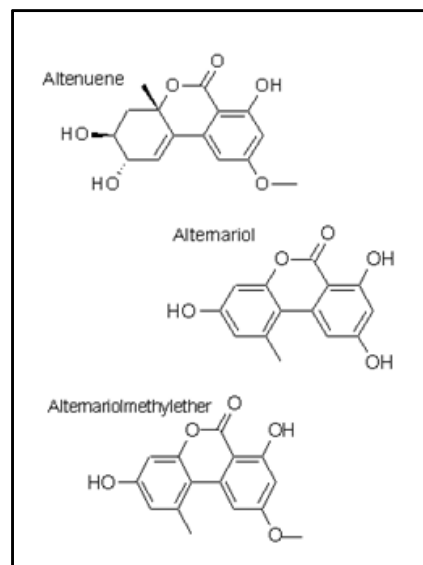
Trichotheceny



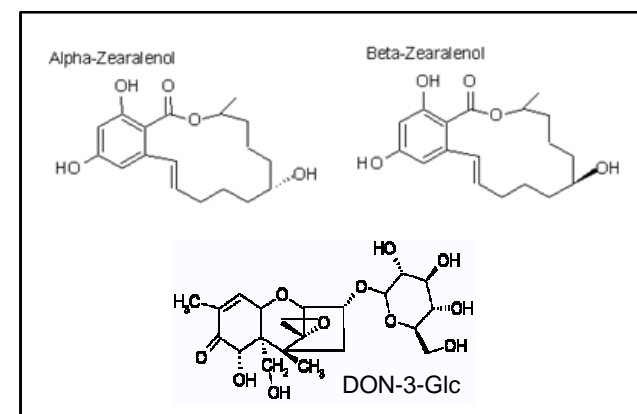
**Námelové alkaloidy
(ergot alkaloids)**



Enniatiny

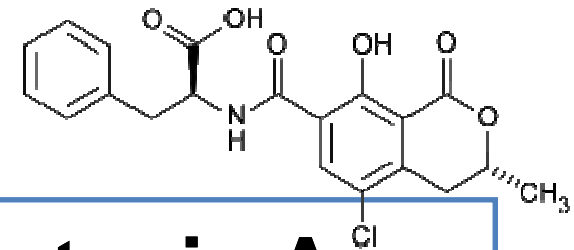


**Alternariové
mykotoxiny**



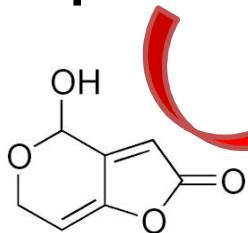
**metabolity
mykotoxinů**

Mykotoxiny v ovoci



Patulin

Plísně rodu *Aspergillus*,
Penicillium – poškozené,
přezrálé plody



Indikátor špatných
výrobních postupů

Ovoce (jablka, hrušky,
pomeranče, meruňky,..)



Tepelná stabilita, kyselé
prostředí

Ovocné výrobky (džusy, kompoty)

Ochratoxin A

Plísně rodu *Aspergillus*,
Penicillium



Ovoce (jablka,
hroznové víno,..)

Tepelná stabilita

Ovocné výrobky
(džusy, víno, rozinky)

Prokázaná toxicita obou
mykotoxinů

→ **maximální limity**
(Nařízení 1881/2006/ES)

Limity v obilovinách (Nařízení 1881/2006/ES)

Deoxynivalenol ⁽¹⁷⁾	µg/kg
Nezpracované obiloviny ⁽¹⁸⁾ ⁽¹⁹⁾ , jiné než pšenice tvrdá, oves a kukuřice	1 250
Nezpracovaná pšenice tvrdá a oves ⁽¹⁸⁾ ⁽¹⁹⁾	1 750
Obiloviny určené k přímé lidské spotřebě, obilná mouka, otruby a klíčky ve formě konečného výrobku uváděného na trh pro přímou lidskou spotřebu kromě potravin uvedených v bodech 2.4.7, 2.4.8 a 2.4.9	750
Pečivo (včetně malého běžného pečiva), jemné a trvanlivé pečivo, sušenky, svačinky z obilovin a snídaněové cereálie	500
Obilné příkrmy a ostatní příkrmy určené pro kojence a malé děti ⁽²⁾ ⁽⁷⁾	200

Ochratoxin A	µg/kg
Nezpracované obiloviny	5,0
Obilné příkrmy a ostatní příkrmy určené pro kojence a malé děti ⁽²⁾ , ⁽⁷⁾	0,50

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 401/2006 kterým se stanoví metody odběru vzorků a metody analýzy pro úřední kontrolu množství mykotoxinů v potravinách

Počet dílčích vzorků, které mají být odebrány, v závislosti na hmotnosti šarže obilovin a výrobků z obilovin

Hmotnost šarže (tuny)	Počet dílčích vzorků	Hmotnost souhrnného vzorku (kg)
$\leq 0,05$	3	1
$> 0,05 - \leq 0,5$	5	1
$> 0,5 - \leq 1$	10	1
$> 1 - \leq 3$	20	2
$> 3 - \leq 10$	40	4
$> 10 - \leq 20$	60	6
$> 20 - \leq 50$	100	10

MRM pro 288 pesticidů + 38 mykotoxinů

Journal of Chromatography A, 1262 (2012) 8–18



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma



Critical assessment of extraction methods for the simultaneous determination of pesticide residues and mycotoxins in fruits, cereals, spices and oil seeds employing ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry

Ondrej Lacina, Milena Zachariasova, Jana Urbanova, Marta Vaclavikova, Tomas Cajka, Jana Hajslova*

Institute of Chemical Technology, Prague, Faculty of Food and Biochemical Technology, Department of Food Analysis and Nutrition, Technicka 3, 166 28 Prague 6, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 April 2012

Received in revised form 24 August 2012

Accepted 30 August 2012

Available online 5 September 2012

Keywords:

Pesticide residues

Mycotoxins

Sample preparation

Liquid chromatography–tandem mass spectrometry

ABSTRACT

This study addresses a current trend in chemical food safety control represented by an effort to integrate analyses of various groups of food contaminants/toxicants into a single, high-throughput method. The choice of optimal sample preparation step is one of the key conditions to achieve good performance characteristics. In this context, we investigated the possibility to expand the scope of the three multi-analyte extraction procedures employed earlier in other studies for rapid isolation of either pesticides or mycotoxins from plant matrices. Following procedures were tested: A – aqueous acetonitrile extraction followed by partition (QuEChERS-like method), B – aqueous acetonitrile extraction, and C – pure acetonitrile extraction. On the list of target analytes, we had 288 pesticides (including ‘troublesome’ acidic, basic and base-sensitive compounds) together with 38 mycotoxins (including all EU regulated ones and many ‘emerging’ toxins on the European Food Safety Authority (EFSA) list). The matrices selected for the experiments, apple baby food, wheat flour, spices and sunflower seeds, represented various composition categories in terms of moisture, fat and extractable compounds (e.g. pigments and essential oils) content. In preliminary experiments, acceptable recoveries (70–120%) for most of

DĚKUJI ZA POZORNOST,



POKRAČOVÁNÍ POZDĚJI...