

MONITORING REZIDUÍ FUNGICIDŮ POUŽÍVANÝCH V OCHRANĚ SLADOVNICKÉHO JEČMENE

MONITORING OF RESIDUES OF FUNGICIDES USED IN MALTING BARLEY PROTECTION

RENATA MIKULÍKOVÁ, ZDENĚK SVOBODA, SYLVIE BĚLÁKOVÁ, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Sladařský ústav, Mostecká 7, 614 00 Brno / Research Institute of Brewing and Malting, Plc., Malting Institute, Mostecká 7, CZ-614 00 Brno, e-mail: mikulikova@brno.beerresearch.cz

Mikulíková, R. – Svoboda, Z. – Běláková, S.: Monitoring reziduí fungicidů používaných v ochraně sladovnického ječmene. Kvasny Prum. 54, 2008, č. 11–12, s. 332–337.

V posledních letech se strobiluriny staly velmi významnou skupinou účinných látek používaných proti chorobám ječmene i chmele. Jsou to látky se širokým fungicidním účinkem. Vyznačují se velmi variabilními vlastnostmi, včetně spektra jejich účinnosti. Působí především preventivně, mají však i kurativní a některé i eradikativní účinnost. Všechny působí kontaktně, některé také hloubkově nebo systemicky.

Vzhledem k nárůstu rozsahu použití strobilurinů v ochraně ječmene a chmele bylo nezbytné zavést sledování jejich reziduí v surovině, mezproduktu i finálním produktu.

Mikulíková, R. – Svoboda, Z. – Běláková, S.: Monitoring of residues of fungicides used in malting barley protection. Kvasny Prum. 54, 2008, č. 11–12, s. 332–337.

During the last years strobilurines have become a very important group of efficacious substances used against the diseases of barley and hop. These are substances with a wide fungicide effect. Their characters, including the efficacy spectrum, are very variable. They affect mainly preventively, but also curatively and they even have eradication effects. All of them act in contact, some of them also in depth or systemically.

Considering the increase in the extent of strobilurine use in the protection of barley and hop, it was necessary to introduce monitoring of their residues in raw materials, intermediaries and a final product.

Mikulíková, R. – Svoboda, Z. – Běláková, S.: Monitoring der zum Braugerstenschutz angewandten Fungizidresidui. Kvasny Prum. 54, 2008, Nr. 11–12, S. 332–337.

In den letzten Jahren die gegen die Gersten- und Hopfenkrankheiten angewandten Strobilurins ist eine bedeutende Fungizidwirkungsgruppe geworden. Strobilurins sind eine Stoffe mit einer hohen Fungizidwirkung und sehr variablen Eigenschaften einschließlich des Wirkungsspektrums. Strobilurins wirken vor allem präventiv, jedoch wiesen auch eine Kurativwirkung, davon einige Strobilurins auch eine eradikative Wirkung auf. Alle Strobilurins wirken kontaktweise, einige Strobilurins wirken tiefweisse oder systemisch. In Ansehung zum Anstieg des Strobilurinseinsatzbereiches im Bereich des Gersten- und Hopfenschutzes war es nötig, eine Verfolgung von Strobilurinsresiduen im Rohstoff, im Zwischenprodukt und in dem fertigen Produkt einzuführen.

Микуликова, Р. – Свобода, З. – Белакова, С.: Мониторинг остатков фунгицидов применяемых в защите пивоваренного ячменя. Kvasny Prum. 54, 2008, No. 11–12, стр. 332–337.

В последние годы стробилурины стали очень важной группой эффективных веществ применяемых против болезням ячменя и хмеля. Это вещества с широким фунгицидным действием. Отличаются очень изменяемыми свойствами, включая спектр их эффективности. Воздействуют прежде всего превентивно, но у них куративная и у некоторых тоже эрадикативная действенность. Все действуют конактно, некоторые тоже глубинно или системично.

Учитывая нарастание области применения стробилуринов в защите ячменя и хмеля было необходимо ввести исследование их остатков в сыре, полупродуктах и готовом изделии.

Klíčová slova: fungicidy, strobiluriny, GC-MSD, ječmen, slady, pivo

Keywords: fungicides, strobilurines, GC-MSD, barley, malt, beer

1 ÚVOD

Strobiluriny představují v současné době velmi významnou skupinu fungicidních účinných látek. Vyznačují se především specifickým působením a velmi širokým spektrem účinnosti.

Do komerčního užívání se dostaly v roce 1996, jako produkty firmy Syngenta (azoxystrobin) a BASF (kresoxim-methyl). V současné době jsou komerčně využívány strobilurinové účinné látky uvedené v tab. 1 [1].

Tab. 1 Přehled komerčně používaných strobilurinů / List of commercially used strobilurines

Strobilurin / Strobilurines	Společnost / Company
Azoxystrobin	Syngenta
Kresoxim-methyl	BASF
Metominostrobin	Shionogi
Trifloxystrobin	Bayer
Pyraclostrobin	BASF
Picoxystrobin	Syngenta
Dimoxystrobin	BASF
Fluoxastrobin	Bayer
Orysastrobin	BASF

1 INTRODUCTION

Today strobilurines represent a very important group of fungicidal efficacious substances. Their action is specific and they have a very wide efficacy spectrum.

They got into commercial use in 1996 as products of the companies Syngenta (azoxystrobin) and BASF (kresoxim-methyl). Currently following strobilurine effective substances have been used commercially [1] (Tab. 1).

Natural strobilurines (*Strobilurus* and *Oudemansiella*) were isolated from wood-rotting bracket fungi. These wood decay fungi produce fungicidially acting substances in defense against lower fungi. The name strobilurine comes from *Strobilurus tanacellus*, one of the first fungi from which they were isolated.

Strobilurines represent an important group of efficient fungicides and together with oxazoline-diones (famoxadone) and imidazolinones (fenamidone) they are Qo inhibitors (Quinone outside Inhibitors). Their action is based on the inhibition of mitochondrial respiration, they block Qo instead of cytochrom b, which is a part of cytochromal complex bc₁, localized in the inner mitochondrial membrane of fungi. The transfer of electrons between cytochrom b and cytochrom c₁ is blocked, and thus production of ATP is inhibited and the energy cycle of fungi is disrupted. Originally, strobilurines are natural substances produced by higher fungi, e.g. *Strobilurus tanacellus* (strobilurine A) *Oudemansiella mucida* (oudemansin A). Chemically they belong to methoxyacrylates (e.g. azoxystrobin and picoxystrobin), methoxycar-

Přírodní strobiluriny byly izolovány z dřevokazných stopkovýtřusých hub (*Strobilurus* a *Oudemansiella*). Tyto dřevokazné houby produkují fungicidně působící látky na obranu před nižšími houbami. Označení strobiluriny pochází z vědeckého názvu *Strobilurus tanacellus*, jedné z prvních hub, z nichž byly izolovány.

Strobiluriny představují významnou skupinu účinných fungicidních látek řazených z hlediska působení mezi Qo inhibitory (Quinone outside Inhibitors) spolu s oxazoline-diony (fomoxadone) a imidazolinony (fenamidone). Působí tak, že inhibují mitochondriální respiraci, blokují Qo místo cytochromu b, který je součástí cytochromálního komplexu bc₁ lokalizovaného uvnitř mitochondriální membrány hub. Blokován je transfer elektronů mezi cytochromem b a cytochromem c₁, čímž dochází k zastavení produkce ATP a narušení energetického cyklu houby. Strobiluriny jsou původně přírodní látky produkované vyššími houbami, např. *Strobilurus tanacellus* (strobilurin A), *Oudemansiella mucida* (oudemansin A). Chemicky jsou řazeny mezi metoxyakryláty (např. azoxystrobin a picoxystrobin), metoxykarbamáty (pyraclostrobin), oximino acetáty (kresoxim-methyl, trifloxystrobin), oximino-acetamidy (dimoxystrobin aj.) a dihydro-dioxazinony (fluoxastrobin). Vyznačují se velmi variabilními vlastnostmi, včetně spektra účinnosti. Účinkují především preventivně, mají však i kurativní a některé i eradikativní účinnost. Všechny působí kontaktně, některé hloubkově, translaminárně nebo systemicky (azoxystrobin a picoxystrobin). V rostlině se pohybují akropetálně. Mají velmi širokou účinnost, působí na houby vřecovýtřusé (*Ascomycetes*), stopkovýtřusé (*Basidiomycetes*), houby nedokonalé (*Anamorphic fungi*) i oomycety (*Oomycetes*). Jsou vysoce ohroženy vznikem rezistence (cross rezistence v rámci Qol fungicidů) [1].

Rezistence byla prokázána u více patogenních hub, u obilovin u padlí travního (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*), braničnatky pšeničné (*Mycosphaerella graminicola*), hnědé skvrnitosti ječmene (*Pyrenophora teres*), helminthosporiosy pšenice (*Pyrenophora tritici-repentis*) a u ostatních plodin např. u strupovitosti jabloně (*Venturia inaequalis*), plísně révy (*Plasmopara viticola*) a padlí révy (*Erysiphe necator*). Při použití strobilurinů je třeba důsledně dodržovat opatření proti vzniku rezistence.

Proti houbovým chorobám ječmene jsou v ČR používány azoxystrobin (Amistar), picoxystrobin (Acanto, Acanto Prima), trifloxystrobin (Sfera 267,5 EC), fluoxastrobin (Fandango 200 EC) a kresoxim-methyl (Juwel, Juwel Top). Proti houbovým chorobám chmele je v ČR registrován azoxystrobin (Ortiva). Vzhledem k nárůstu rozsahu použití strobilurinů v ochraně ječmene a chmele a jejich stabilitě v rostlině je nezbytné zavést sledování jejich reziduí v surovině, meziproduktech i finálním produktu.

Protože tyto látky mohou znamenat potenciální nebezpečí pro lidské zdraví a životní prostředí (tab. 2), bylo cílem naší práce optimalizovat metodu stanovení azoxystrobinu (obr. 1), kresoxim-methylu (obr. 2), picoxystrobinu (obr. 3) a trifloxystrobinu (obr. 4) v ječmeni, sladu a pivu a provést monitoring jejich výskytu ve vybraných vzorcích ječmene, sladu a piva.

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Standardy a chemikálie

Standardy: azoxystrobin (99,5 %, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Německo), picoxystrobin (99,9 %, Riedel-de Haën, Německo), kresoxim-methyl (96,6 %, Riedel-de Haën, Německo), trifloxystrobin (99,2 %, Riedel-de Haën, Německo)

Tab. 2 Maximální limit reziduí pro ječmen (Vyhláška č. 381/2007 Sb. ze dne 19. prosince 2007) / Maximum limits of residues in barley (Notice no. 381/2007 Coll. of 19 December 2007)

CAS	Název pesticidu Name of pesticide	MLR pro ječmen MLR for barley (mg.kg ⁻¹)
131860-33-8	azoxystrobin	0,3
143390-89-0	kresoxim-methyl	0,05
117428-22-5	picoxystrobin	0,2
141571-21-7	trifloxystrobin	0,3

bamates (pyraclostrobin), oximino acetates (kresoxim – methyl, trifloxystrobin), oximino-acetamides (dimoxystrobin, etc.), and dihydro-dioxazinones (fluoxastrobin). Their characters, including the efficacy spectrum, are very variable. They act mainly preventively, but also curatively and some even have eradicated effects. All of them act in contact, some of them in depth or translamarily or systemically (azoxystrobin and picoxystrobin). They move acropetally in a plant. Their efficacy is very wide, they are active against sac fungi (*Ascomycetes*), bracket fungi (*Basidiomycetes*), imperfect fungi (*Anamorphic fungi*) and oomycetes (*Oomycetes*). They are highly imperilled by the origin of resistance (cross resistance within the Qol fungicides) [1].

Resistance was proved in other pathogenic fungi, in cereals, powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*), septoria blotch (*Mycosphaerella graminicola*), net blotch (*Pyrenophora teres*), helminthosporioses in wheat (*Pyrenophora tritici-repentis*), and in the other crops, e.g. in apple, scab (*Venturia inaequalis*), grapevine downy mildew (*Plasmopara viticola*), and grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*). When applying strobilurines, observance of all provisions is highly recommended to avoid the development of resistance.

Following fungicides are used against fungal diseases of barley in the CR: azoxystrobin (Amistar), picoxystrobin (Acanto, Acanto Prima), trifloxystrobin (Sfera 267.5 EC), fluoxastrobin (Fandango 200 EC), and kresoxim-methyl (Juwel, Juwel Top). Azoxystrobin (Ortiva) is registered against fungal diseases of hop in the CR. Considering the increase in the extent of strobilurine use in the protection of barley and hop and their stability in a plant, it is necessary to introduce monitoring of their residues in raw materials, intermediaries and the final product.

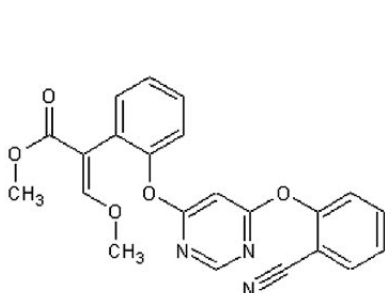
As these substances can be potentially dangerous for human health and the environment (Tab. 2), the aim of our study was to optimize the method for the determination of azoxystrobin (Fig. 1), kresoxim-methyl (Fig. 2), picoxystrobin (Fig. 3) and trifloxystrobin (Fig. 4) in barley, malt and beer and to carry out monitoring of their occurrence in barley, malt and beer samples.

2 MATERIAL AND METHODS

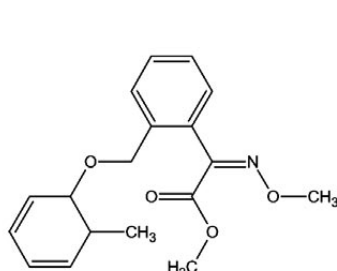
2.1 Standards and chemicals

Standards: azoxystrobin (99.5 %, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Germany), picoxystrobin (99.9 %, Riedel-de Haën, Germany), kresoxim-methyl (96.6 %, Riedel-de Haën, Germany), trifloxystrobin (99.2 %, Riedel-de Haën, Germany).

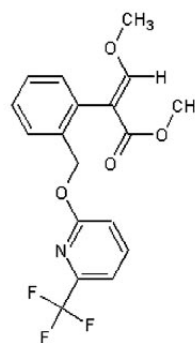
Columns: ENVITMCarbII/PSA 500/500 mg (Supelco, USA), LiChrolut EN 200 mg (Merck, Germany), Discovery DSC-18 (Supelco, USA).



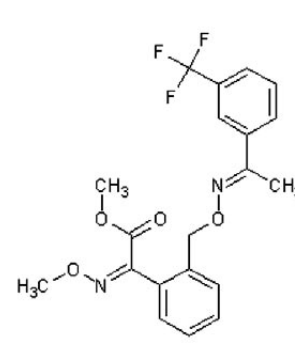
Obr. 1 / Fig. 1 Azoxystrobin



Obr. 2 / Fig. 2 Kresoxim-methyl



Obr. 3 / Fig. 3 Picoxystrobin



Obr. 4 / Fig. 4 Trifloxystrobin

Kolony: ENVI™CarbII/PSA 500/500 mg (Supelco, USA), LiChrolut EN 200 mg (Merck, Německo), Discovery DSC-18 (Supelco, USA)
Chemikálie: NaOH (Merck, Německo), methanol, acetone, acetonitril, toluen, ethylacetát (Sigma Aldrich, USA), destilovaná voda.

2.2 Vzorky ječmene, sladu a piva

Bylo analyzováno celkem 50 vzorků sladovnického ječmene, které byly získány z různých pěstebních oblastí ČR. Dále bylo analyzováno 50 vzorků sladu vyrobeného ze získaných vzorků ječmene.

Analýzované vzorky piva byly zakoupeny náhodným výběrem v obchodní síti (25 vzorků).

2.2.1 Příprava vzorků ječmene a sladu

K 20 g pomleté matrice se přidá 60 ml směsi methanol:acetone (8:2). Proveďte se extrakce směsi v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut. Extrakt se odstředí při 6500 min⁻¹ po dobu 15 minut při 10–15 °C. Získané roztoky se převedou do varných baněk (250 ml) a odpaří do sucha na vakuové odparce. Odpařený vzorek se rozpustí v 5 ml acetonitrilu v ultrazvukové lázni po dobu 1 minuty. Směs se přechistí na SPE kolonce [2]. Pro přechistění byly testovány 3 typy SPE kolon – ENVI™CarbII/PSA, LiChrolut EN, Discovery DSC-18.

Kolona ENVI™CarbII/PSA byla kondicionována 5 ml směsi acetonitril:toluen (3:1). Na kondicionovanou kolonu bylo nanášeno 5 ml extraktu ječmene (sladu) v acetonitrilu. Analyty byly eluovány 3 ml směsi acetonitril:toluen (3:1). Získaný eluát byl zakonzentrován na rotační vakuové odparce, odparek byl převeden do 0,5 ml ethylacetátu.

Kolony LiChrolut EN a Discovery DSC-18 byly kondicionovány 5 ml methanolu a 5 ml destilované vody. Na kondicionované kolony bylo nanášeno 5 ml extraktu ječmene (sladu) a kolony byly promyty 1 ml destilované vody. Po vysušení dusíkem (15 min) byly analyty eluovány 2x5 ml směsi ethylacetát:voda (1:1). Takto získané eluáty byly zakonzentrovány na rotační vakuové odparce, odpary byly převedeny do 0,5 ml ethylacetátu.

Chemicals: NaOH (Merck, Germany), methanol, acetone, acetonitrile, toluene, ethyl acetate (Sigma Aldrich, USA), distilled water.

2.2 Samples of barley, malt and beer

Total of 50 samples of malting barley acquired from various growing areas of the CR were analysed. In addition, 50 samples of malt produced from the acquired barley samples were analysed.

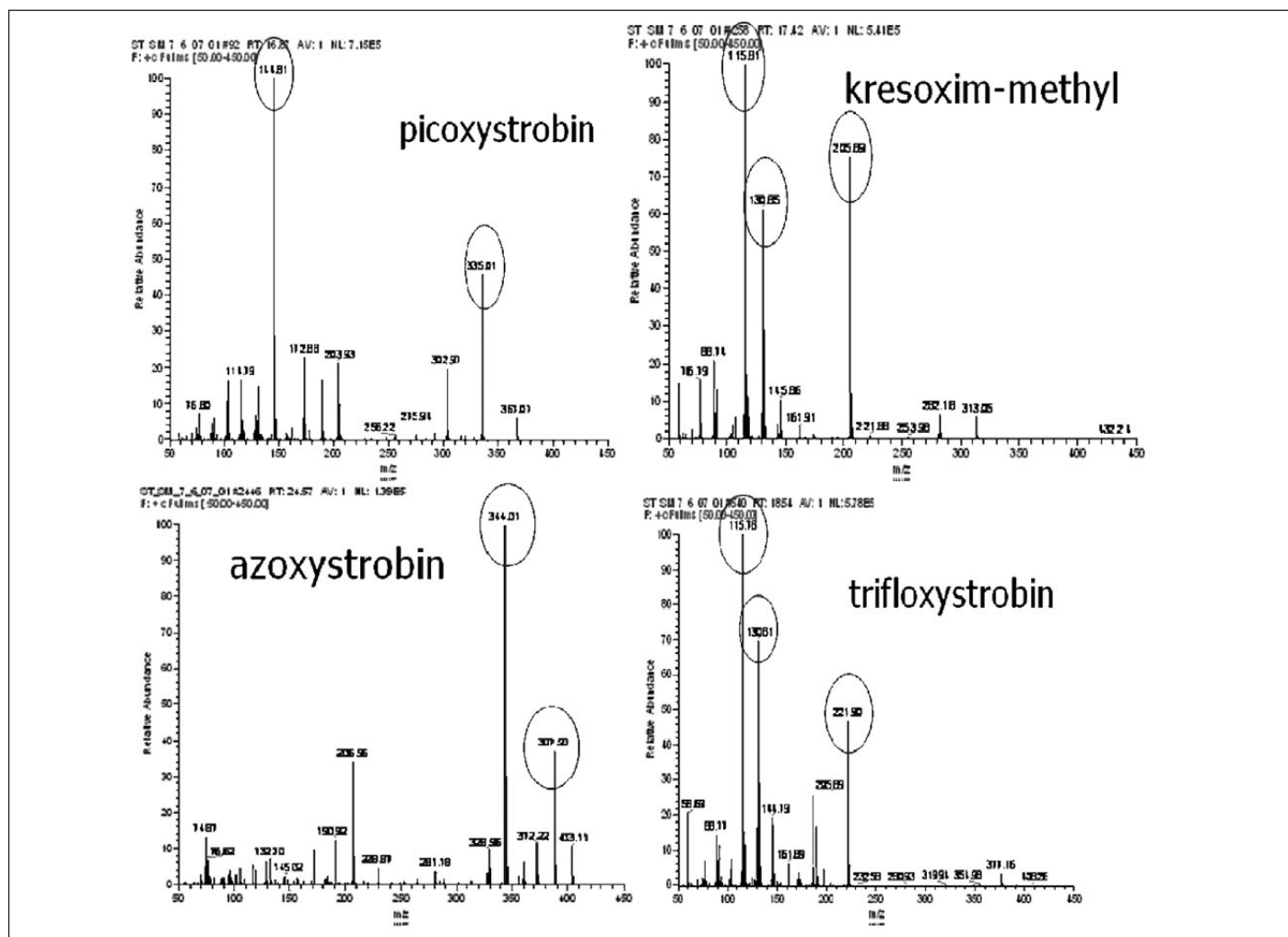
The analysed beer samples were randomly selected and bought in retail shops (25 samples).

2.2.1 Preparation of samples of barley and malt

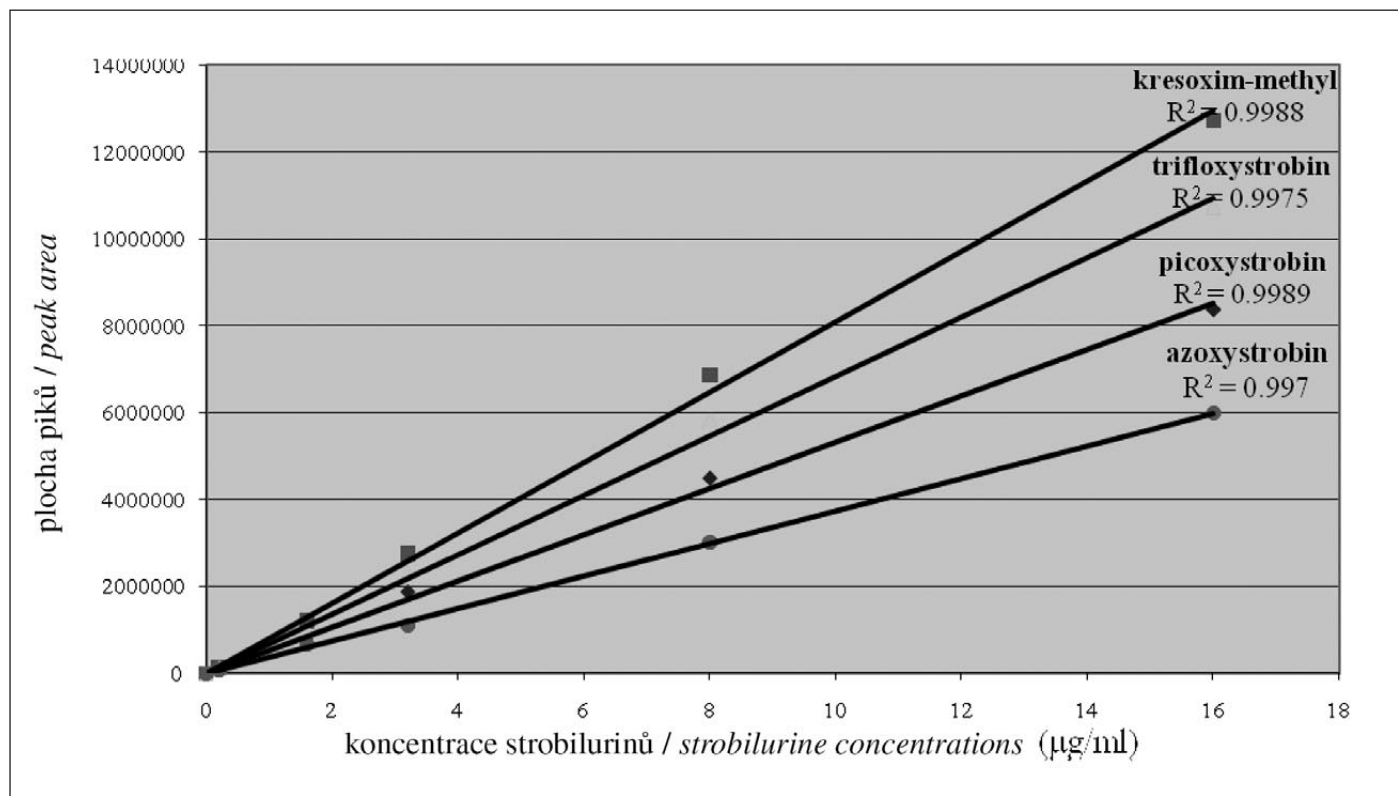
60 ml of methanol/acetone mixture (8:2) was added to 20 g of ground matrix. Extraction of the mixture was performed in an ultrasound bath for 30 minutes. The extracted mixture was centrifuged at 6500 RPM for 15 min at 10–15 °C. The obtained solutions were transferred to boiling flasks (250 ml) and evaporated to dryness on a vacuum evaporator. The obtained dry residue was dissolved with 5 ml of acetonitrile in the ultrasound bath for 1 minute. The mixture was purified through the SPE column [2]. Three types of SPE columns were tested for purification – ENVI™CarbII/PSA, LiChrolut EN and Discovery DSC-18.

The ENVI™CarbII/PSA column was conditioned with the 5 ml acetonitrile:toluene mixture (3:1). 5 ml of barley (malt) extract in acetonitrile was transferred to the conditioned column. Analytes were eluted with 3 ml of an acetonitrile:toluene mixture (3:1). The obtained eluate was concentrated on a vacuum rotary evaporator, the evaporation residue was transferred to ethyl acetate (0.5 ml).

The LiChrolut EN and Discovery DSC-18 columns were conditioned with 5 ml of methanol and 5 ml of distilled water. 5 ml of barley (malt) extract was transferred to the conditioned columns and the columns were washed with distilled water (1 ml). After drying with nitrogen (15 min) the analytes were eluted with 2 x 5 ml mixture of ethyl-acetate:water (1:1). The obtained eluates were concentrated on the vacuum rotary evaporator, the evaporation residues were transferred to 0.5 ml of ethyl acetate.



Obr. 5 / Fig. 5 Hmotnostní spektra strobilurinů / Mass spectra of strobilurines



Obr. 6 / Fig. 6 Kalibrační křivky strobilurinů / Calibration curves of strobilurines

2.2.2 Příprava vzorků piva

U 100 ml vzorku piva se upraví přidávkem roztoku NaOH pH na 6 a takto upravený vzorek se přečistí přes SPE kolonku. Pro přečištění byly testovány 2 typy kolon ENVITCarbII/PSA a LiChrolut EN.

Kolona ENVITTMCarbII/PSA byla kondicionována 5 ml směsí acetonitril:toluen (3:1). Na kondicionovanou kolonku bylo nanášeno 100 ml piva. Analyty byly eluovány 3 ml směsí acetonitril:toluen (3:1). Získaný eluát byl zakonzentrován na rotační vakuové odparce, odparek byl převeden do 0,5 ml ethylacetátu.

Kolona LiChrolut EN byla kondicionována 5 ml methanolu a 5 ml destilované vody. Na kondicionovanou kolonku bylo nanášeno 100 ml piva a kolona byla promyta 1 ml destilované vody. Po vysušení dusíkem (15 min) byly analyty eluovány 2x5 ml směsí ethylacetát:voda (1:1). Takto získaný eluát byl zakonzentrován na rotační vakuové odparce, odparek byl převeden do 0,5 ml ethylacetátu.

2.3 Instrumentace a chromatografické stanovení

Analýzy vzorků byly prováděny na plynovém chromatografu (Trace GC Ultra, Thermo Finnigan) spojeném s hmotnostním detektorem (Trace DSQ, Thermo Finnigan). K separaci analyzovaných látek byla použita kapilární kolona DB5-MS (30m x 0.25mm i.d., 0.25 µm) s následujícím teplotním programem: počáteční teplota 70 °C po dobu 1 min, nárůst teploty 10 °C.min⁻¹ do 280 °C, setrvání 5 min. Programovaný průtok nosného plynu He byl od 1.5 ml.min⁻¹ do 3 ml.min⁻¹. Teplota PTV injektoru 280 °C, splitless režim po dobu 0,8 min. Teplota spojovací části GC a MSD byla 200 °C. Hmotnostní spektrometr byl nastaven v SCAN (50–450 m/z) a SIM (Selected Ion Monitoring) modu (EI+ – pozitivní elektronová ionizace) a vybrané hodnoty (m/z) pro jednotlivé analyty byly:

azoxystrobin – 344, 388 (m/z)
trifloxystrobin – 116, 131, 222 (m/z)
picoxystrobin – 145, 335 (m/z)
kresoxim-methyl – 116, 131, 222 (m/z).

Identifikace analyzovaných strobilurinů byla provedena na základě retenčních časů a specifických iontů m/z (obr. 5), kvantifikace byla provedena pomocí kalibračních křivek (obr. 6).

2.2.2 Preparation of beer samples

pH of the beer sample (100 ml) was adjusted to pH 6 by adding NaOH solution and the sample was then purified through the SPE column. For purification two types of SPE columns – ENVITTMCarbII/PSA and LiChrolut EN were tested.

The ENVITTMCarbII/PSA column was conditioned with 5ml of acetonitrile:toluene mixture (3:1). 100 ml of beer was transferred to the conditioned column. The analytes were eluted with 3 ml of acetonitrile:toluene mixture (3:1). The obtained eluate was concentrated on the on the vacuum rotary evaporator, the evaporation residue was transferred to 0.5 ml of ethyl acetate.

The LiChrolut EN column was conditioned with 5 ml of methanol and 5 ml of distilled water. 100 ml of beer was transferred to the conditioned column and the column was washed with 1 ml of distilled water. After drying with nitrogen (15 min) the analytes were eluted with 2x5 ml mixture of ethylacetate:water (1:1). The obtained eluate was concentrated on the vacuum rotary evaporator, the evaporation residue was transferred to 0.5 ml of ethyl acetate.

2.3 Instrumentation and chromatographic determination

The analyses of samples were performed on the gas chromatograph (Trace GC Ultra, Thermo Finnigan) connected to the mass detector (Trace DSQ, Thermo Finnigan). To separate the analysed substances the DB5-MS capillary column (30m x 0.25mm i.d., 0.25 µm) with following thermal program was used: initial temperature 70 °C for 1 min, increase in temperature 10 °C.min⁻¹ to 280 °C, maintained for 5 min. Programmed flow of carrying gas He was from 1.5 ml.min⁻¹ to 3 ml.min⁻¹. Temperature of PTV injector 280 °C, splitless regime for 0.8 min. Temperature in the transfer line between GC and MSD was 200 °C. The mass spectrometer was adjusted in SCAN (50–450 m/z) and SIM (Selected Ion Monitoring) mode (EI+ – positive electron ionisation) and selected values (m/z) for relevant analytes were as follows:

azoxystrobin – 344, 388 (m/z)
trifloxystrobin – 116, 131, 222 (m/z)
picoxystrobin – 145, 335 (m/z)
kresoxim-methyl – 116, 131, 222 (m/z)

Identification of the strobilurines analysed was performed on the basis of retention times and specific ions m/z (Fig. 5), quantification was carried out using calibration curves (Fig. 6).

Tab. 3 Ječmen a slad (SPE – EnviTMCarbII/PSA) / *Barley and malt (SPE – EnviTMCarbII/PSA)*

	SPE výtěžnost SPE recovery %	LOQ mg.kg ⁻¹	RSD %
Azoxystrobin	83–88	0.003	8–12
Kresoxim - methyl	80–84	0.002	5–7
Picoxystrobin	85–90	0.002	5–7
Trifloxystrobin	82–87	0.002	7–10

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Byly testovány tři typy extrakčních SPE kolonek – ENVITMCarbII/PSA, LiChrolut EN a Discovery DSC-18 pro vzorky ječmene a sladu a dva typy kolonek – ENVITMCarbII/PSA a LiChrolut EN pro vzorky piva.

Kolanka ENVITMCarbII/PSA poskytovala velice dobré výsledky pro vzorky ječmene a sladu. Při optimalizaci kolony byly prováděny eluce analytů různými elučními objemy (10 ml, 6 ml, 4 ml a 3 ml) směsi acetonitril:toluen (3:1). Jako nevhodnější byl zjištěn objem 3 ml, při kterém docházelo k nejmenší eluci interferentů a k nejvyšší výtěžnosti. Kolanka však nebyla vhodná pro analýzy vzorků piva, protože docházelo k rozmývání analytů a k eluci interferujících látek.

Kolanky LiChrolut EN a Discovery DSC-18 nebyly vhodné pro analýzy ječmene a sladu. Při použití těchto kolonek docházelo k nedostatečnému oddělení interferujících látek, které měly při chromatografické analýze stejné retenční časy jako stanovované analyty.

Pro analýzy vzorků piva byla nejvhodnější kolanka LiChrolut EN. Tato kolanka je vhodná pro zakoncentrování a čištění větších objemů a u vzorků piva docházelo k dostatečnému oddělení interferujících látek.

Byla optimalizována metoda stanovení strobilurinů v ječmeni, sladu a pivu [3]. Validační parametry pro jednotlivé matrice a SPE kolony jsou uvedeny v tab. 3 a 4.

Výsledky stanovení jednotlivých látek ve sladu, ječmeni a pivu jsou uvedeny v tab. 5.

4 ZÁVĚR

Strobilurinové pesticidy představují skupinu pesticidů, jež má poměrně široké spektrum účinnosti proti houbovým chorobám. Jedná se o relativně novou skupinu látek, která nemusí být dokonale prozkoumána a možné dlouhodobé následky jejich reziduí nejsou dostatečně přesně popsány. Tyto látky tedy mohou znamenat zdravotní riziko pro lidský organismus.

Cílem této práce bylo zjistit možné stopy strobilurinových pesticidů v ječmeni, sladu a pivu. Případný nadlimitní výskyt reziduí by mohl ohrozit konzumenta, proto je nutné je sledovat. Přípustné limity reziduí jsou stanoveny Vyhláškou č. 381/2007 Sb. ze dne 19. prosince 2007 o stanovení maximálních limitů reziduí v potravinách a surovinách.

Byly analyzovány vybrané v ochraně sladovnického ječmene v ČR nejvíce používané strobiluriny – azoxystrobin, kresoxim-methyl, picoxystrobin a trifloxystrobin.

V současnosti není popsáno mnoho metod, které se zabývají stanovením strobilurinů v obilovinách nebo pivu [4, 5, 6, 7, 8]. Většina uveřejněných prací se věnuje stanovení těchto látek v ovoci a hroznech révy vinné. Proto bylo nutné optimalizovat metodu pro stanovení v obilovinách a pivu. Obiloviny, tedy analyzovaný ječmen, obsahují značné množství barviv, především chlorofylu, které značně znepřehledňují stanovení metodou GC-MSD, protože mohou překrývat stanovované analyty a dále zatěžují iontový zdroj. Obdobná situace nastává i u vzorků piva, kde je nezbytné odstranit interferující barviva.

Byla optimalizována a validována metoda stanovení vybraných

Tab. 4 Pivo (SPE – LiChrolut EN) / *Beer (SPE – LiChrolut EN)*

	SPE výtěžnost SPE recovery %	LOQ mg.l ⁻¹	RSD %
Azoxystrobin	88–90	0.003	< 8
Kresoxim - methyl	87–90	0.002	< 5
Picoxystrobin	90–95	0.002	< 5
Trifloxystrobin	87–91	0.002	< 5

3 RESULTS AND DISCUSSION

Three types of extraction SPE columns – ENVITMCarbII/PSA, LiChrolut EN and Discovery DSC-18 for samples of barley and malt and two types of columns – ENVITMCarbII/PSA and LiChrolut EN for samples of beer were tested.

The ENVITMCarbII/PSA column provided very good results for barley and malt samples. To optimize the column, the analytes were eluted using various elution volumes (10 ml, 6 ml, 4 ml and 3 ml) of the acetonitrile:toluene mixture (3:1). The 3 ml volume was found as the most suitable; it provided the least elution of interferents and the highest recovery. But this column was not suitable for the analyses of beer samples due to washing off the analytes and elution of the interfering substances.

The LiChrolut EN and Discovery DSC-18 columns were not suitable for the analyses of barley and malt. When using these columns, the interfering substances were insufficiently separated and at chromatographic analyses they had the same retention times as the determined analytes.

The LiChrolut EN column proved to be the most suitable for the analyses of beer samples. This column is suitable for concentration and purification of bigger volumes and in the beer samples, the interfering substances were sufficiently separated.

The method for determination of strobilurines in barley, malt and beer was optimized [3]. Validation parameters for the individual matrices and SPE columns are given in tables (Tab. 3, 4). Results of the determination of individual substances in barley, malt and beer are given in tab. 5.

4 CONCLUSION

Strobilurine pesticides represent a group of pesticides with a quite wide spectrum of efficiency against fungal diseases. A relatively new group of substances is regarded here which has not been perfectly investigated and possible long-term consequences of their residues have not been sufficiently described. These substances may therefore represent health risk for the human organism.

The aim of this study was to determine possible traces of strobilurine pesticides in barley, malt and beer. Possible excessive occurrence of residues could endanger a consumer, for this reason it is necessary to monitor them. Acceptable limits of residues are given by the Notice no. 381/2007 Coll. of 19th December 2007 on determination of maximum limit of strobilurine residues in foods and raw materials.

Selected strobilurines, the most frequently applied in protection of malting barley in the CR, were analysed – azoxystrobin, kresoxim-methyl, picoxystrobin, trifloxystrobin.

So far only few methods for the determination of strobilurines in cereals or beer have been described [4, 5, 6, 7, 8]. Majority of the published studies have been focused on the assessment of these substances in fruit and wine grapes. Therefore, it was necessary to optimize the method for the determination in cereals and beer. Cereals, i.e. determined barley, contain a considerable amount of dyes, first of all chlorophylls, which considerably hamper the analysis with the GC-MSD method as they can overlap the determined analytes

Tab. 5 Obsah reziduí strobilurinů v analyzovaných vzorcích / *Content of strobilurine residues in the analysed samples*

	Počet analyzovaných vzorků Number of analysed samples	azoxystrobin	kresoxim-methyl	picoxystrobin	trifloxystrobin
Ječmen / <i>barley</i>	50	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Slad / <i>malt</i>	50	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Pivo / <i>beer</i>	25	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

strobilurinů v ječmeni, sladu a pivu. Pro přečištění extraktů z ječmene, sladu a vzorků piva byla optimalizována SPE metoda výběrem vhodných kolonek pro jednotlivé matrice. Pro ječmen a slad byla nejvhodnější kolonka ENVI™CarbII/PSA a pro vzorky piva kolonka LiChrolut EN.

Obsahy strobilurinů ve všech analyzovaných vzorcích byly pod mezí stanovení a tedy i pod hodnotou maximálního limitu reziduí (MLR) daného Vyhláškou č. 381/2007 Sb. ze dne 19. prosince 2007 o stanovení maximálních limitů reziduí v potravinách a surovinách.

Poděkování

Výsledků bylo dosaženo v rámci Výzkumného záměru **MSM 6019369701**.

Zpracováno na základě přednášky na 34. Pivovarsko-sladařském semináři v Plzni 23.–24. 10. 2008
Lektorovali Ing. Petr Ackermann, CSc., Státní rostlinolékařská správa,
a Mgr. Vilém Reinöhl, CSc., MZLU Brno
Do redakce došlo 6. 11. 2008

Literatura / References

1. Barlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M., Dobrzanski, B. P.: The strobilurin fungicides. *Pest. Manag. Sci.* **58**, 2002, 649–662.
2. Balinova, A., Mladenova, R., Shtereva, D.: Solid-phase extraction on sorbents of different retention mechanisms followed by determination by gas chromatography – mass spectrometric and gas chromatography – electron capture detection of pesticide residues on crops. *J. Chrom. A.* **1150**, 2007, 136–144.
3. Christensen, H. B., Granby, K.: Method validation for strobilurine fungicides in cereals and fruit. *Food Addit. Contam.* **18**, 2001, 866–874.
4. Farid, E. A.: Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. *Tr. A.C.* **20**, 2001, 649–661.
5. De Melo Areu, S., Correia, M., Herbert, P., Santos, L., Alves, A.:

and they further load the ion source. Similar situation is also with beer samples where it is necessary to remove interfering ballast substances.

The method for the determination of selected strobilurines in barley, malt and beer was optimized and validated. For purification of extracts from barley and malt and beer samples the SPE method was optimized by selection of suitable columns for the individual matrices. The most appropriate column for barley and malt was ENVI™CarbII/PSA and the LiChrolut EN column for the beer samples.

Strobilurine contents in all the analysed samples were below the detection limit and thus also below the maximum limit of residues (MLR) given by the Notice no. 381/2007 Coll. of 19th December 2007 on determination of maximum residue limits in foods and raw material.

Acknowledgments

Results were achieved in the framework of the Research Plan of the **MSM 6019369701**.

Translated by Mgr. Vladimíra Nováková

Screening of grapes and wine for azoxystrobin, kresoxim-methyl and trifloxystrobin fungicides by HPLC with diode array detection. *Food Addit. Contam.* **22**, 2005, 549–556.

6. Cabras, P., Angioni, A., Garau, V. L., Parisi, F. M., Brandolini, V.: Gas chromatographic determination of azoxystrobin, fluazinam, kresoxim-methyl, mepanipyrim, and tetraconazole in grapes, must, and wine. *J. AOAC Int.* **81**, 1998, 1185–1189.
7. Navalén, A., Prieto, A., Araujo, L., Vilchez, J. L.: Determination of pyrimethanil and kresoxim-methyl in green groceries by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chrom. A.* **975**, 2002, 355–360.
8. Cabras, P., Angioni, A., Garau, V. L., Minelli, E. V.: Gas chromatographic determination of cyprodinil, fludioxonil, pyrimethanil, and tebuconazole in grapes, must, and wine. *J. AOAC Int.* **80**, 1997, 867–870.

Náchodský pivovar představuje další pivní unikát

V roce 2008 přišel Pivovar Náchod, a. s., se zajímavou novinkou z rodiny svrchně kvašených piv, které jsou v segmentu komerčních pivovarů pořád ještě výjimkou. Jedná se o svrchně kvašené tmavé pivo anglo-irského původu – PRIMÁTOR Stout. Vyrábí se infuzní technologií ze čtyř druhů sladů (českého, bavorského, nakuřovaného, barvicího), praženého ječmene, nesladovaného ovsa a z originálních britských chmelů. Pro toto pivo je charakteristická velmi tmavá barva, výrazná chuť praženého ječmene, silná hořkost, ovocné tóny, krémová plnost a smetanová pěna. V portfoliu Pivovaru Náchod doplní ostatní speciální piva typu Weizenbier a English Pale Ale.

Pivovar Náchod, a. s., je již po řadu let proslulý svými experimenty se speciálními a u nás neobvyklými druhy piv. I když jde o kla-

sický komerční pivovar, jeho portfolio je více než srovnatelné se sortimentem restauračních mikropivovarů. V našich podmínkách neobvyklou filozofii komentoval pro tisk generální ředitel Josef Hlavatý: „Jedná se o další přirozený krok v naší filozofii – Specialisty na speciály – s cílem obohacovat český pivní trh o netradiční produkci a neomezovat spotřebitelské chutě pouze na jeden typ piva, konkrétně český ležák. Uvědomujeme si, že se tak trochu dáváme do boje se značně konzervativním přístupem českého konzumenta piva, ale právě zvyšující se odbyt v segmentu speciálních piv v posledním období nám potvrzuje, že i u nás po letech izolace a zakonzervování spotřebitelských zvyklostí se postupně objevuje skupina konzumentů, která je ochotná experimentovat a neomezuje se jen na uniformní řadovou produkci.“

Nové pivo PRIMÁTOR Stout bude nabízeno nejširší veřejnosti prostřednictvím obchodních řetězců a nezávislé maloobchodní sítě, v další fázi pak bude dodáváno do sítě vybraných gastronomických zařízení. Pivo bude vyráběno ve vratných lahvích typu NRW o objemu 0,5 l. Pro gastronomické účely budou k čepování využívány sklenice se speciálním designem. Na podporu prodeje pivovar připravuje řadu marketingových aktivit, k nimž budou patřit především ochutnávky v místě prodeje, dále k tomuto účelu speciálně vyrobené POS/POP, a to vše v kombinaci s komunikačními a PR aktivitami prostřednictvím tisku a dalších médií. Pivovar plánuje v budoucnu vyrábět přibližně 2000 hl tohoto speciálního druhu piva.

Podle tiskové zprávy – F2

Předvánoční novinka Plzeňského Prazdroje

V listopadu představil Plzeňský Prazdroj, a. s., novou značku piva – Gambrinus 11° Excelent. Stejně jako jeho sourozenci, Gambrinus výčepní světlý (10°) a Gambrinus Premium (12°), i Gambrinus 11° Excelent se vyrábí tradičním pivovarským postupem s odděleným hlavním kvašením a zráním. Gamb-

rinus se vaří pouze ze tří přírodních pivovarských surovin (ječný slad, chmel a voda) a jako všechny výrobky značky Gambrinus tak splňuje podmínky k používání chráněného označení České pivo. Jméno Excelent pro novou plzeňskou jedenáctku vzešlo z internetové srpnové ankety mezi samotnými konzumenty.

Gambrinus 11° Excelent je pivo pro širší skupinu konzumentů a nejrůznější příležitosti, v obchodní síti se objevil v druhém listopadovém týdnu. Dodává se v klasických 0,5 l lahvích, a to v přepravkách i multipacích po osmi kusech, a v KEG sudech (50 a 30 l). Tisková zpráva Plzeňského Prazdroje, a. s.