Sledování průniku pesticidů do složek životního prostředí

Ludmila Vaňharová

Bakalářská práce
2012/2013

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Ludmila VAŇHAROVÁ**
Osobní číslo:	**T10843**
Studijní program:	**B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor:	**Inženýrství ochrany životního prostředí**
Forma studia:	**prezenční**
Téma práce:	**Sledování průniku pesticidů do složek životního prostředí (teoretická práce)**

Zásady pro vypracování:

1. Zpracujte literární rešerši o používání vybraných pesticidů (propiconazol, prochloraz, acetamiprid, metconazole) v zemědělství a jejich možných dopadech na životní prostředí.

2. Vyberte a popište extrakční techniky vhodné pro izolaci vybraných pesticidů z půdy, vody a rostlinného materiálu.

3. Navrhněte a popište analytické metody vhodné pro jejich stanovení z vybraných matric.

Rozsah bakalářské práce:
Rozsah příloh:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

Vědecké články (Web of science), odborná literatura.

Vedoucí bakalářské práce:	**Ing. Lucie Vydrová, Ph.D.** Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
Datum zadání bakalářské práce:	**8. února 2013**
Termín odevzdání bakalářské práce:	**24. května 2013**

Ve Zlíně dne 8. února 2013

L.S.

UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ
Fakulta technologická

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: VAŇHAROVÁ LUDMILA Obor: CHTM-CH37

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby [1];
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 [2];
- beru na vědomí, že podle § 60 [3] odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 [3] odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 10.5.2013 Vaňharová

[1] *zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:*
(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

[2)] zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

[3)] zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Pesticidy jsou jakékoli látky, které slouží k hubení nežádoucích organismů. Jejich využití je rozšířeno do mnoha různých oblastí, ať už do zemědělství, lesního hospodářství či v oblasti veterinární a humánní. Nesprávné používání pesticidů může mít za následek úhyn ptáků či savců, dále také mohou být zasažena včelstva, jejichž úloha v přírodě je nezastupitelná a má přímou souvislost s existencí života na Zemi. Vybraní zástupci pesticidů jsou obsaženy v přípravcích běžně používaných v České republice na ochranu zemědělských plodin. V literární rešerši byly porovnávány metody extrakce pro různé matrice a dále byly popsány nejběžnější analytické metody pro stanovení vybraných analytů.

Klíčová slova: pesticidy, extrakce, separační metody, HPLC/MS

ABSTRACT

Pesticides are whichever substances used for killing of undesirable organisms. Their use is widespread to many different spheres, whether to agriculture, forestry or to veterinary and humane sphere. Wrong use of pesticides could be cause of the brids and mammals death, also could be affected bee colonies, whose role is irreplaceable in nature and is immediate casual for the existence of life on Earth. Selected representatives of pesticides are contained in preparations, which are commonly used in the Czech Republic for the protection of agricultural crops. There are compared methods of extraction for different matrixes in the literature search and described most common analytical methods for the determination of selected analytes, too.

Keywords: Pesticides, Extraction, Separation Methods, HPLC / MS

Motto: „Jedině příroda ví, co chce… nikdy nežertuje a nikdy nedělá chyby, ty dělá jen člověk.”
(Johann Wolfgang von Goethe)

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat vedoucí bakalářské práce paní Ing. Lucii Vydrové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, věnovaný čas a pomoc při zpracování bakalářské práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářská práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

1 ÚVOD 10

2 PESTICIDY 11

2.1 POJEM PESTICID 11

2.2 HISTORIE PESTICIDŮ 11

2.3 PESTICIDY V ČR 12

3 ROZDĚLENÍ PESTICIDŮ A JEJICH VYUŽITÍ 13

3.1 ZÁKLADNÍ ROZDĚLENÍ PESTICIDŮ A JEJICH VYUŽITÍ 13

3.2 VYBRANÍ ZÁSTUPCI PESTICIDŮ 14

3.2.1 Prochloraz 14

3.2.2 Propiconazol 15

3.2.3 Bumper® Super 15

3.2.4 Metconazol 18

3.2.5 Caryx® 18

3.2.6 Acetamiprid 20

3.2.7 Mospilan® 20 SP 20

4 VLIV PESTICIDŮ NA SLOŽKY ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ 22

4.1 VODA 22

4.2 PŮDA 22

4.3 VZDUCH 23

4.4 DEGRADACE A PERZISTENCE PESTICIDŮ 23

5 VLIV PESTICIDŮ NA ŽIVOČICHY 25

5.1 VLIV NA VČELY 25

5.2 VLIV NA PTACTVO 26

5.3 VLIV NA RYBY 26

5.4 VLIV NA ČLOVĚKA 27

6 METODY EXTRAKCEA STANOVENÍ PESTICIDŮ ZE SLOŽEK ŽP 28

6.1 EXTRAKCE NA TUHOU FÁZI (SPE) 28

6.2 SOXHLETOVA EXTRAKCE 30

6.3 ZRYCHLENÁ EXTRAKCE (ASE) 30

6.4 QUICK-EASY-CHEAP-EFFECTIVE-RUGEDAND-SAFE EXTRACTION (QUECHERS) 31

6.5 SUPERKRITICKÁ FLUIDNÍ EXTRAKCE (SFE) 32

7 METODY STANOVENÍ PESTICIDŮ 34

7.1 KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE 34

7.1.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) 34

7.1.2 Ultra rychlá kapalinová chromatografie (UPLC) 34

7.1.3 Detektory pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii 35

7.2 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE (MS) 36

7.2.1 Elektrosprejová ionizace (ESI) 36

7.2.2 Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) 37

7.2.3 Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) 37

7.2.4 Typy analyzátorů 38

7.2.5 Tandemová hmotnostní spektrometrie 38
7.3 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE (GC) 39
7.3.1 Detektory užívané ve spojení s GC 39
7.3.1.1 Detektor elektronového záchytu (GC/ECD) 39
7.3.1.2 Detekor FID (GC/NPD) 40
7.3.2 Hmotnostně-spektrometrický detektor 40
8 METODY STANOVENÍ JEDNOTLIVÝCH PESTICIDŮ 42
8.1 PROCHLORAZ 42
8.1.1 Prochloraz v houbách 42
8.1.2 Prochloraz v ovoci 42
8.2 PROCPICONAZOL 43
8.2.1 Propiconazol ve vodě 43
8.3 METCONAZOLE 44
8.3.1 Metconazol v kukuřici 44
8.3.2 Metconazol v dětské výživě 44
8.4 ACETAMIPRID 44
8.4.1 Acetamiprid ve vodě 44
8.4.2 Acetamiprid v čaji 45
9 ZÁVĚR 46
10 SEZNAM TABULEK 47
11 SEZNAM OBRÁZKŮ 48
12 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK 49
13 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 51

1 ÚVOD

Pesticidy jakožto přípravky určené k tlumení a hubení rostlinných škůdců, k ochraně rostlin, skladových zásob, zvířat a člověka jsou používány nejen v zemědělství, ale také lesnictví a ve veterinární oblasti. Celosvětově je registrováno několik stovek látek, které mohou být použity jako pesticidy. V České republice se mohou používat pouze přípravky, které schválí Státní rostlinolékařská správa. Každým rokem je na našem území použito několik tun těchto pesticidů, s čímž souvisí jejich možný průnik do různých složek životního prostředí a také potravních řetězců. V nejhorším případě může docházet až k nežádoucím otravám necílových organismů.

V rámci intenzivního zemědělství rostou také požadavky na zemědělské produkty, jako jsou vyšší výnosy, vyšší senzorická, nutriční či technologická jakost, a proto jsou neustále vyráběny nové druhy pesticidních přípravků. Tyto nově vyvíjené přípravky by měly splňovat zásadní požadavky jako je velký rozdíl mezi toxicitou pro cílové a necílové organismy, dále by měly být lehce biodegradovatelné a neměly by ovlivňovat systém žláz s vnitřní sekrecí u savců. S nově vyvíjenými pesticidy souvisí také moderní, přesné a citlivé analytické metody, díky nimž je možné detekovat již stopová množství těchto polutantů. K těmto analýzám jsou nejčastěji využívány separační metody s vhodnou detekcí, kterým předchází různé druhy, popř. kombinace, extrakčních metod.

2 PESTICIDY

2.1 Pojem pesticid

Podle definice FAO (Food and Agriculturre Organization) může být pesticidem libovolná látka či směs látek, která bude určena k prevenci před škůdci, jejich ničení či zvládání. Patří sem také přípravky používající se při onemocněních člověka a zvířat, dále přípravky proti nežádoucím rostlinám nebo živočichům, kteří škodí v průběhu výroby, zpracování, skladování, přepravy a uvádění potravin či zemědělských plodin na trh. Také sem podle definice patří látky, které napomáhají a regulují růst rostlin, zabraňují nežádoucímu pádu plodů před sklizní či látky sloužící jako ochrana před poškozením při přepravě a následném skladování.[1]

2.2 Historie pesticidů

Počátky zemědělství sahají do doby před 10.000 lety v Mezopotámii, kde se lidé věnovali pěstování pšenice, ječmene, hrachu, čočky, cizrny a lnu. V Číně asi před 7.500 lety pěstovali převážně rýži a proso. Tyto kulturní rostliny začaly trpět různými chorobami a byly napadány škůdci, proto lidé začali provádět různá opatření pro jejich ochranu. Sumerové přišli s nápadem použít síru jako prostředek proti hmyzu a roztočům, v Číně se s těmito problémy vypořádávali rtutí a sloučeninami arzenu. Peršané využívali pro ochranu své úrody sedmikrásky. Hojně se také využívalo solí z moře.[2] V 15. století lidé používali toxické sloučeniny arsenu, olova a rtuti. V 17. století byl extrahován nikotin sulfát z tabákových listů, který byl použit jako insekticid. V 19. století se začalo využívat pyrethrum jako přírodní pesticid. Pyrethrum je extrahováno z chryzantém a kořenů tropické zeleniny a používá se dodnes. Ve stejném století se začaly používat fungicidy proti plísni na ovoci také v Evropě, oxidy arsenu byly využity k likvidování plevele.

Ve 30. letech 20. století už nastala produkce synteticky vyráběných pesticidů a ve 40. letech už existovalo velké množství pesticidů. Mezi ně patřily insekticidy na principu alkylthiokyanátů nebo fungicidy proti patogenním houbám - salicylanilid a dithiokarbámáty.[3] Organofosfáty vytvořeny v roce 1937 byly za druhé světové války použity Němci jako bojová látka Sarin. Po roce 1940 následovala éra DDT, které je v dnešní době, ve většině států zakázáno používat.[4]

2.3 Pesticidy v ČR

V roce 2009 byla přijata směrnice Evropské rady (ER) a Evropského parlamentu (EP) 2009/128/ES, kterou se stanovil rámec pro činnost Evropského společenství za účelem dosažení udržitelného používání pesticidů. Spolu s ní byly přijaty dva další právní předpisy Evropského společenství, které jsou klíčové pro povolování přípravků na ochranu rostlin a pro jejich uvádění na trh – Nařízení EP a ER (ES) č. 1107/2009 a Nařízení EP a ER (ES) č. 1185/2009 o statistice pesticidů.[5]

Z výroční zprávy o životním prostředí za rok 2012 se můžeme dočíst o znečištění dusičnany, pesticidy a acidifikaci, které pochází ze zemědělské činnosti, dále erozních splachů z terénu a atmosférické depozice. Množství látek, které se dostane do půdy a vody, závisí na dávkování hnojiv a přípravků, které slouží pro ochranu rostlin, a také na tom, v jaké formě jsou aplikovány, jistými faktory jsou i eroze půdy a klimatické podmínky.[5]

3 ROZDĚLENÍ PESTICIDŮ A JEJICH VYUŽITÍ

3.1 Základní rozdělení pesticidů a jejich využití

Pesticidy působí především jako inhibitory enzymů, nebo narušují DNA. Některé katalyzují reakce, které způsobí narušení fotosyntézy v důsledku tvorby hyperoxidů mastných kyselin. Triaziny také mohou narušovat přenos elektronů při fotosyntéze. Jiné herbicidy pro změnu narušují tvorbu nukleových kyselin, či narušují přímo proces klíčení semen.[6]

Tabulka 1 Základní dělení pesticidů

podle působení	kontaktní	vytváří na povrchu vrstvu, která působí v místě ošetření
	systémové	mají schopnost penetrace kutikulou listů a jsou transportovány do celého systému rostliny
podle původu	přírodní	přírodního původu
	syntetické	uměle vyrobené
podle určení k hubení škůdců	akaricidy	roztoči
	algicidy	řasy
	arborocidy	stromy a keře
	avicidy	ptáci
	herbicidy	rostliny
	insekticidy	hmyz
	fungicidy	houby
	molluskocidy	hmyz
	piscicidy	ryby
	rodenticidy	hlodavci

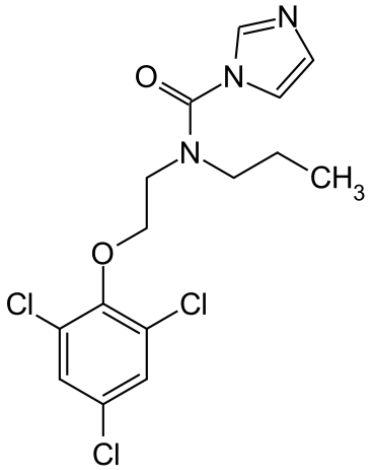
Podle typu aplikace můžeme pesticidy rozdělit na:

- postřiky, aerosoly,

- fumiganty (látky k hubení hmyzu ve formě par a plynů),
- popraše,
- pevné a tekuté nástrahy,
- mořidla,
- nátěry,
- impregnace (nasycování látky chemickými či přírodními látkami).

3.2 Vybraní zástupci pesticidů

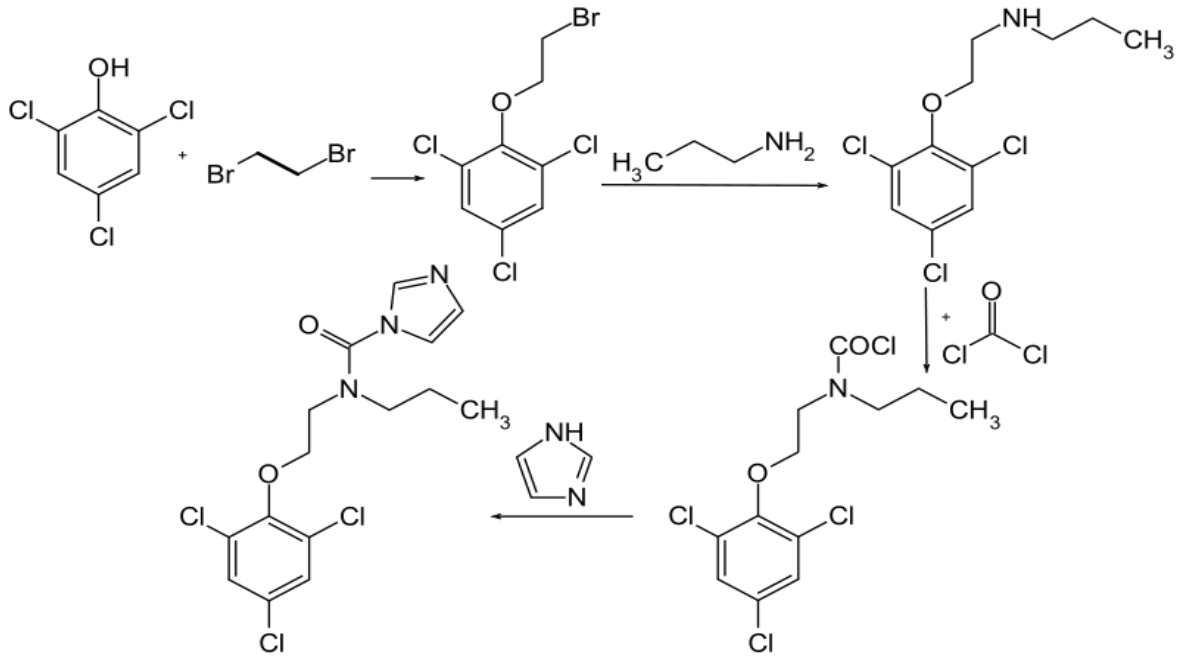
3.2.1 Prochloraz



Tabulka 2 Vlastnosti prochlorazu[7]

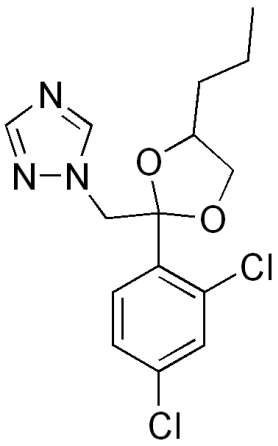
název	*N*-Propyl-*N*-(2-(2,4,6-trichlorphenoxy)ethyl)-1*H*-imidazol-1-carboxamid
CAS-No	67747-09-5
Log $K_{o/w}$	4,06
T.b.	150 °C
skupina	Imidazol
M	376,665 $g \cdot mol^{-1}$
vzorec	$C_{15}H_{16}Cl_3N_3O_2$
hustota	1,413 $g \cdot cm^{-3}$
LD_{50}	1600 $mg \cdot kg^{-1}$ (orálně krysy) 3000 $mg \cdot kg^{-1}$ (dermálně králík)

Prochloraz je imidazolový fungicid, který je široce používán v Evropě, Austrálii, Asii a Jižní Americe v zahradnictví a zemědělství. V testu Hershberger bylo zjišťováno, jak působí na reprodukci. Test byl prováděn na gravidních laboratorních myších. Výsledky ukázaly, že prochloraz významně snižoval plazmatickou a testikulární hladinu testosteronu mužských plodů, zatímco testikulární progesteron se jim zvýšil. U samců byly zjištěny samičí znaky.[8]



Obrázek 1 Rovnice syntézy prochlorazu[4]

3.2.2 Propiconazol



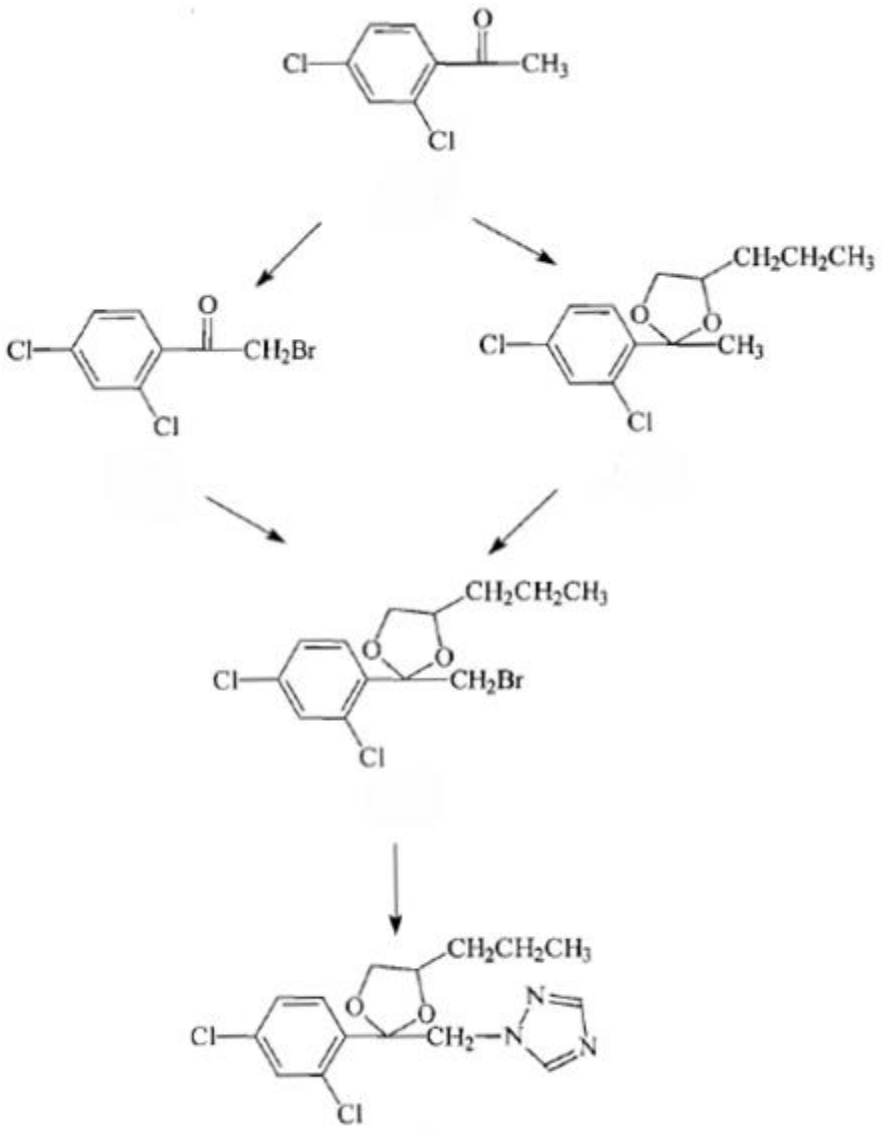
Tabulka 3 Vlastnosti propiconazolu[7]

název	1-(2-(2,4-Dichlorphenyl)- 4-propyl-1,3-dioxolan- 2-yl-methyl)-1*H*-1,2,4-triazol
CAS-No	60207-90-1
Log $K_{o/w}$	3,51
T.b.	150 °C
skupina	Triazol
M	376,665 $g \cdot mol^{-1}$
vzorec	$C_{15}H_{17}C_{l2}N_3O_2$
hustota	1,29 $g \cdot cm^{-3}$
LD_{50}	1517 $mg \cdot kg^{-1}$ (orálně krysy)

3.2.3 Bumper® Super

Tento fungicid obsahuje 90 g/l propiconazolu a 400g/l prochlorazu, jeho barva je čirá až nažloutlá, má svůj charakteristický zápach. Přípravek je klasifikován jako dráždivý pro oči, může vyvolat alergickou reakci a k životnímu prostředí je škodlivý. Je toxický pro vodní organismy a ve vodním prostředí může vyvolat dlouhodobě nepříznivé účinky. Propiconazol působí v pesticidu systémově, působí jako inhibitor biosyntézy ergosterolu patogenních hub.

Rozsah použití je poměrně široký, přípravek se používá na choroby pšenice, ječmene, cukrovky, krmné řepy, i řepky olejky. Působí proti braničatce pšeničné i plevelové, hnědé skvrnitosti, skvrničatce řepné, padlí řepnému, rzi řepné a větvenatce řepné.[9]

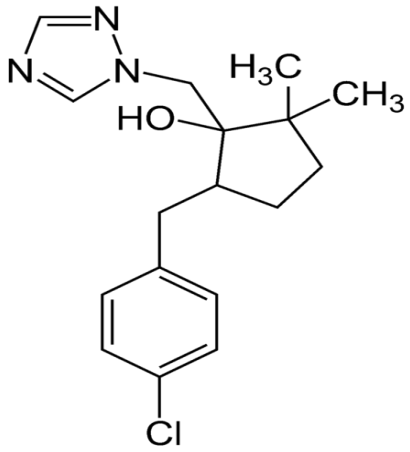


Obrázek 2 Rovnice syntézy propiconazolu[10]

Tabulka 4 Ekotoxikologické informace o přípravku Bumper[12]

Ekotoxikologické informace o přípravku Bumper		
Ryby:		
Pstruh duhový	LC_{50} (96 h)	Bumper = 4,2 mg/l
		Propiconazole = 3,72 mg/l
		Prochloraz = 1,43 mg/l
Vodní bezobratlí:		
Daphnia	EC_{50}	Propiconazole = 5,5 mg/l
Daphnia magna	EC_{50} (48 h)	Bumper P : = 11,0 mg/l
		Prochloraz = 0,85 mg/l
Řasy	EC_{50} (72 h)	Bumper P = 5,4 mg/l
	EbC_{50} (72 h)	Prochloraz = 0,28 mg/l
	ErC_{50} (72 h)	Prochloraz = 1,19 mg/l
	EC_{50}	Propiconazole 2,17 mg/l
Ptáci	LD_{50}	Prochloraz> 2000 mg/kg
		Propiconazole> 2000 mg/kg
Včely	LD_{50}	Propiconazole, prochloraz: není toxický na včely
Perzistence/rozložitelnost:	vlivem slunečního a UV záření	
Bioakumulační potenciál	propiconazol	BCF<100
Mobilita:	Propiconazole,prochloraz: nevyplavuje se do podzemní vody.	

3.2.4 Metconazol



Tabulka 5 Vlastnosti metconazolu[7]

název	(1*RS*,5*RS*;1*RS*,5*SR*)-5-(4-Chlorbenzyl)-2,2-dimethyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)cyclopentanol
CAS-No	125116-23-6
Log $K_{o/w}$	3,85
T.b.	285 °C
skupina	triazol
M	319,83 $g \cdot mol^{-1}$
vzorec	$C_{17}H_{22}ClN_3O$
LD_{50}	1459 $mg \cdot kg^{-1}$ (orálně krysy)

3.2.5 Caryx®

Přípravek obsahuje 2,7 hm% metconazolu, je klasifikován jako zdraví škodlivý při vdechování či požití a může vážně poškodit oči. Pro vodní organismy je toxický a může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí. Caryx je tekutý a má oranžové zbarvení, mírně zapáchá po kyselině octové. Jeho pH bylo naměřeno v kyselé oblasti a to 4,5 (měření probíhalo v neředěné formě). Hustota přípravku je 1,10 g/cm^3. V pokusech na zvířatech bylo prokázáno, že látka má vliv na poškození plodu matky v těle. Pesticid se využívá především jako růstový regulátor a fungicid ve formě kapalného koncentrátu určeného pro ošetření řepky olejky, aby se zajistilo její přezimování a zvýšila se její odolnost vůči poléhání, účinek byl prokázán také proti fomové hnilobě.[11] Tento pesticid je založen na principu účinku funkce látky mepiquate chlorid, jež razantně ovlivňuje tvorbu fytohormonů v rostlinách. Tato látka se zasluhuje o inhibici biosyntézy fytohormonu giberelin, což má za následek růstové zpoždění, zkrátí se délka hypokotylu[12], což je první lodyžní článek klíčící rostliny, článek mezi místem inzerce děloh a kořenovým systémem[13], výsledkem je tedy zvětšení průměru stonku, proto se stěny stanou pevnějšími, což umožní rostlině snadněji přezimovat. Pozitivní účinek metconazolu v této směsi je jak preventivní tak kurativní, rostlinu ochrání před napadením, je-li vystavena infekci. Perzistentní vlastnosti metconazolu jsou vynikající, takže je zajištěna dlouhodobá ochrana.[12]

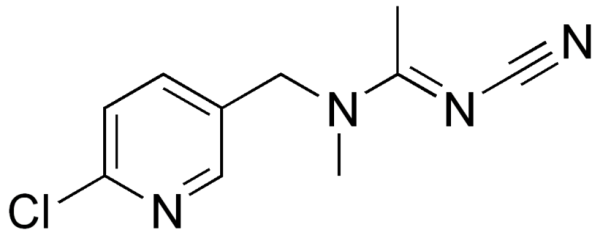
Triazoly, kam patří také propiconazol a metconazol, jsou inhibitory C-14 demethylacelanosterolu. Při konkrétním stanovení, které bylo provedeno na 14 druzích plísní, se zjišťovala i permeabilita buněk patogenu Taphrina deformans. Pesticidními látkami byl inhibován růst přibližně 50% patogenů. Propiconazol se zdál být spíše fungistatický než fungicidní proti Sclerotiumrolfsii, to znamená, že potlačoval růst houby a ne ji přímo zahubil. Při teplotě 15 až 31 ° C, nemá propiconazol na inhibiční účinek vliv. Při střední hodnotě pH v rozmezí 5,4 až 7,0 inhibice neprobíhala. Přestože tok některých látek, přes buněčnou membránu, byl změněn u buněk pěstovaných v médiu, kde koncentrace propiconazolubylaED$_{50}$, není hlavní příčinou inhibice růstu. V buňce došlo jen k malým změnám a to zřejmě v důsledku metabolických změn.[14]

Obrázek 3 Fomová hniloba[15]

Tabulka 6 Ekotoxikologické informace o přípravku Caryx[12]

Ekotoxikologické informace o přípravku Caryx		
Ryby:		
Pstruh duhový	LC_{50} (96 h)	10,55 mg/l
Vodní bezobratlí:		
Daphnia magna	EC_{50} (48 h)	14,64 mg/l
Vodní rostliny	EC_{50}(7 d)	3,44 mg/l
Včely		
Včela medonosná	LD_{50} (48 h)	98,5 µg, Apis mellifera(OECD-Směrnice 213)
	LD_{50} (48 h)	200 µg, Apis mellifera(OECD-Směrnice 214)
Perzistence/rozložitelnost:	Snadno podléhající biologickému rozkladu.	
Bioakumulační potenciál	Může doházet k hromadění v organismech.	

3.2.6 Acetamiprid



Tabulka 7 Vlastnosti acetamipridu[7]

název	(*E*)-N^1-[(6-Chlor-3-pyridyl)methyl]-N^2-cyano- N^1-methylacetamidin
CAS-No	135410-20-7
Log $K_{o/w}$	0,79
T.m.	98,9°C
skupina	neonikotinoid
M	222,68 $g \cdot mol^{-1}$
vzorec	$C_{10}H_{11}ClN_4$
LD_{50}	146 $mg \cdot kg^{-1}$ (orálně krysy)

3.2.7 Mospilan® 20 SP

Mospilan je insekticid, který ve svém složení obsahuje 20 hm% acetamipridu. Vzhledově se jedná o modrobílý jemný prášek bez charakteristického zápachu. pH jeho 1% roztoku se pohybuje v zásadité oblasti a to v rozmezí 8,5 – 8,6. Relativní hustota přípravku je 0,8 mg/l. Při styku s kůží a okem není dráždivý. Z hlediska ochrany životního prostředí je klasifikován jako nebezpečný, škodlivý pro vodní organismy a ve vodním prostředí může vyvolat dlouhodobě nepříznivé podmínky.[16] Používá se k hubení širokého spektra živočišných škůdců při ochraně rostliny, zejména působících škody sáním a požerem, je to například mšice chmelová, mandelinka bramborová, různé druhy molic a puklic, blýskáček řepkový, krytonosci a další druhy hmyzích škůdců, kteří mohou působit také na ovoci, zelenině a okrasných rostlinách.[9]

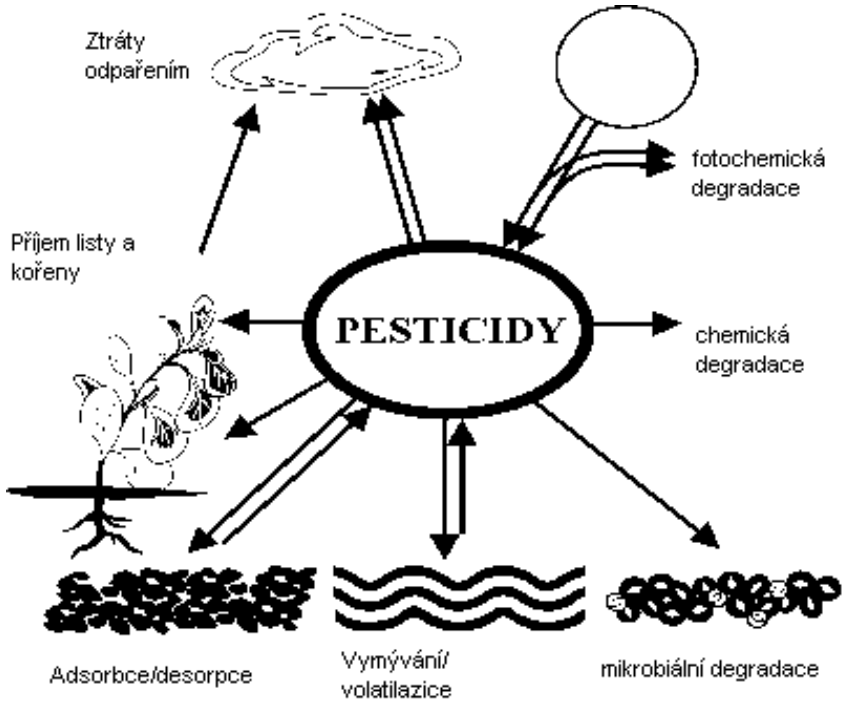
Tabulka 8 Ekotoxikologické informace o přípravku Mospilan[17]

Ekotoxikologické informace o přípravku Mospilan		
Ryby:		
Pstruh duhový	LC_{50} (48 h)	>100 mg/l
Vodní bezobratlí:		
Daphnia	EC_{50} (48 h)	>100 mg/l
Řasy	EC_{50} (72 h)	97,8 mg/l
Perzistence/rozložitelnost:	Není snadno biologicky odbouratelný. V půdě je rychle odbouratelný.	

Tabulka 9 Spotřeba jednotlivých účinných látek za rok 2011 v kg/l[18]

látka	**acetamiprid**	**metconazol**	**prochloraz**	**propiconazol**
celkem	4778,49	8026,80	169635,31	63590,61
obiloviny	23,28	588,97	143331,30	57617,46
kukuřice	0,00	0,00	0,00	7,78
luštěniny	2,37	7,19	0,00	0,00
řepa	0,00	0,00	4497,04	1011,83
brambory	114,66	0,00	0,00	0,00
pícniny	0,79	0,00	0,00	17,04
olejniny	4423,73	7429,99	21776,37	4903,77
chmel	26,83	0,00	0,00	0,00
zelenina	1,58	0,00	30,60	16,45
ovoce	183,88	0,00	0,00	0,00
réva	0,00	0,00	0,00	4,74
ostatní	1,44	0,65	0,00	11,54

4 VLIV PESTICIDŮ NA SLOŽKY ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ



Obrázek 4 Faktory působící na pesticidy po aplikaci[19]

4.1 Voda

Pesticidy, které byly použity na velkých plochách, se mohou například působením deště dostávat z nadzemních částí rostlin do půdy. Odtud mohou být pesticidy následně transportovány dále do podzemních i povrchových voda deponovány v říčních sedimentech, rybnících a oceánech.[19] Při průniku z ploch chemicky ošetřovaných zemědělských pozemků se mohou pesticidy stát zdrojem znečištění podzemních vod. Podzemní vody jsou nejčastěji znečišťovány organickými látkami (pesticidy, ropné látky), těžkými kovy, dusičnany a dalšími solemi.[20] Všechny vybrané pesticidy dlouhodobě, negativně ovlivňují vodní prostředí a jsou toxické pro vodní organismy.

4.2 Půda

V půdě může docházet k sorpci pesticidů na půdní částice (záleží na složení půdy, fyzikálně-chemických vlastnostech pesticidu - hodnotách půdního adsorpčního koeficientu, struktuře pesticidu, přítomnosti polárních funkčních skupin apod.), což omezuje možnosti odbourání pesticidů chemickými procesy (oxidace, redukce) nebo působením mikroorganismů. K adsorpci pesticidů může docházet prostřednictvím van der Wallsových

sil, vodíkových vazeb, tvorbou komplexů (např. mezi ionty Fe^{3+} nebo Al^{3+}atomy kyslíku nebo síry obsažených v molekule organofosfátů).[19]

4.3 Vzduch

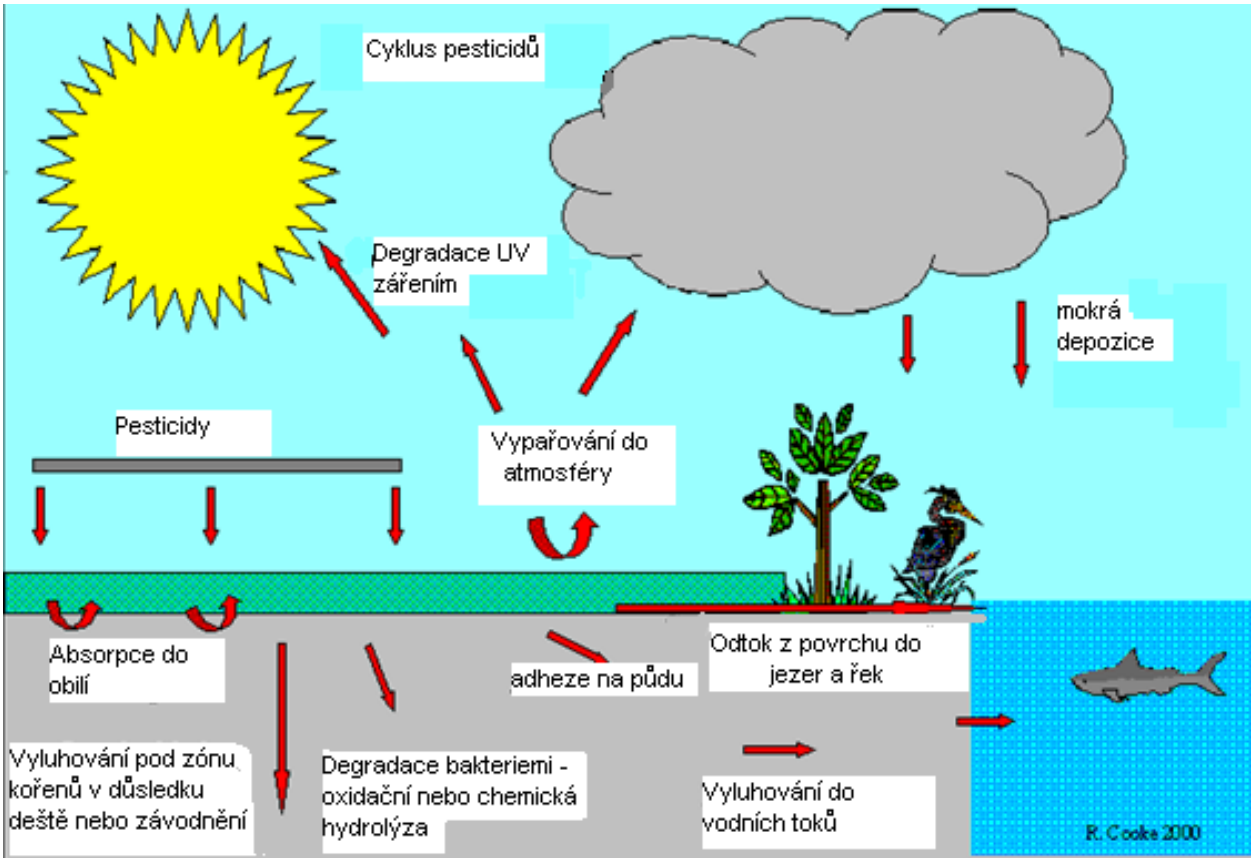
Rozprášené pesticidy, které nedosáhnou rychle povrchu země nebo hladiny vody, mohou být větrem unášeny ve velkých množstvích do značné vzdálenosti.[20] Pesticidní přípravky se vyrábějí v různých formách, které podmiňují způsob aplikace. Ta se provádí obvykle postřikem rostlin nebo ošetřením rostlin či půdy poprachy. Jak bylo naznačeno, dochází během rozprašování přípravků (kapalných nebo pevných) ke kontaminaci atmosféry a molekuly pesticidu se následně mohou vázat na pevné částice rozptýlené v atmosféře. Pesticidy sorbované na tuhé atmosférické částice nebo ve formě par, v závislosti na tlaku par a kapalin mohou být dále transportovány.[19]

4.4 Degradace a perzistence pesticidů

Pesticidy se mohou rozkládat účinkem fyzikálních, chemických, biologických a termických vlivů. Na obrázcích4 a 5 můžeme vidět jednotlivé možné způsoby degradace pesticidů. Jedním z významných procesů vedoucímu k odbourání pesticidů je fotolýza**,** kdy dochází účinkem záření nebo tepla k termickému rozkladu. K fotochemickým reakcím se řadí i procesy iniciované působením volných radikálů, které vznikají v prostředí účinkem slunečního záření. Další reakce jsou iniciovány působením vlhkosti, odpařováním, kyslíkem či mikroorganismy, které se vyskytují na povrchu rostliny či v půdě.[19] Pokles obsahu reziduí vztažených na jednotku hmotnosti může ale rovněž souviset se zřeďovacím efektem, respektive s nárůstem biomasy v průběhu zrání dané plodiny a nemusí tedy přímo znamenat eliminaci či degradaci pesticidu. Pohyb pesticidů v půdě je uskutečňován difuzí. Voda zde slouží jako transportní medium a může dále kontaminovat podzemní či povrchové vody.

O pesticidech obecně platí, že jejich rychlost degradace je při optimálních podmínkách ovlivňována zejména jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Organofosfáty a karbamáty nejsou dlouhodobě perzistentní látky. Fosfor organofosfátu resp. uhlík karbamátové funkční skupiny může být atakován nukleofilními nebo oxidačními činidly. Pro dekontaminaci lze použít roztok hydroxidu sodného, peroxidu vodíku, manganistanu draselného, chlornanu vápenatého, nebo i vápenného. Doba reakce je v řádu vteřin až desítek minut. Pro mimochemickou dekontaminaci lze použít sorbenty vyvazující

pesticid na základě fyzikálně-chemických interakcí. Výhodou sorbentů je menší agresivita vůči materiálům, kdy nezpůsobují korozi, tření plastických hmot, nebo degradaci textilií. Nouzově lze jako sorbent použít např. cement, substráty pro pěstování květin, různé hlinky a případně i obyčejnou zeminu. Tyto způsoby odstranění se týkají větších množství pesticidů, jako jsou nevyužité přípravky nebo přípravky s prošlou spotřební lhůtou.[1]



Obrázek 5 Pohyb pesticidu v prostředí[30]

5 VLIV PESTICIDŮ NA ŽIVOČICHY

5.1 Vliv na včely

Snižování populací včelstev a dalších přirozených opylovačů se stává celosvětovým problémem. Situace je o to vážnější, že výskyt těchto hmyzích zástupců má přímou souvislost se životem na Zemi. Jednou z mnoha příčin může být také používání pesticidních prostředků. Analýzy prokázaly obsah vysoce toxických neonikotinoidů – insekticidů v pylu a v plástvích včelstev. K analýze vzorků byla použita kapalinová chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí, analyzovány byly pyly nalezené v úlech a zjišťovalo se několik potenciálních cest expozice spojené s ošetřováním kukuřice neonikotinoidy. Včely jsou těmto sloučeninám vystavovány v celém svém pasoucím období, pozorován byl i výskyt pesticidů v okolí polí upravovaných těmito prostředky. Vzorky byly odebírány jak z polí, tak i z oblastí neosázených, kde byl výskyt pesticidů také prokázán. Koncentrace imidaclopridu v půdním vzorku byla 2,9 – 7,3 ng/g. Z vybraných pesticidů byl stanoven v pylu mimo jiné i propiconazol, jehož koncentrace se pohybovala kolem 10 ng/g.[21] V Anglii a Walesu byly největším nebezpečím rezidua pesticidů triazofosů, jejichž výskyt souvisel s pěstováním řepky olejné, studie obsahovala seznam navštívených míst (polí). Zapisovala se úmrtnost včel a vyšetřovalo se, zda neuhynuly z důvodu nemoci. Byly provedeny analýzy na přítomnost reziduí pesticidů.[22]

Imunitní systém včel je ovlivněn několika faktory, mezi něž se v posledních 10 letech zařadilo i používání pesticidů. Vedle pylu, nektaru a prachu, je dalším zdrojem kontaminace pro včely gutace rostliny, tedy vylučování přebytečné vody rostlinou v podobě kapek, zvláště ve vlhkém prostředí. Pokusy ukázaly, že semena rostlin ošetřených neonikotinoidy, které byly ve styku s vodou produkovanou gutací po vyklíčení obsahovaly neonikotinoidy také. Semena kukuřice ošetřené klothianidem obsahovaly ve vyprodukované tekutině neonikotinoidy o koncentracích až 8ng/ml. Koncentrace v rostlině sice rychle klesá, ale pesticidy je možno detekovat i po několika týdnech.[23]

V článku z května 2012se hovoří, že byla nalezena rezidua acetamipridu a thiaclopridu v biomedu v množství 0,01 mg/kg, respektive 0,03 mg/kg, toto stopové množství nebylo pro člověka zásadně ohrožující, ale i tak musel být výrobek stažen z výroby. Konvenční med nemá vůbec stanoveny žádné limity na obsah reziduí pesticidů a může obsahovat rezidua pesticidů i ve vyšším než stopovém množství.[24] Stirlingská univerzita uvádí,

že běžně užívané pesticidy včely zabíjí tak, že poškodí jejich schopnost orientace. Zmatené včely se do úlů nemusí vůbec vracet nebo je jejich výkon při sběru omezený. Včely mají pak v úlu menší množství potravy, a proto dochází ke snížení počtu včel.[25]

5.2 Vliv na ptactvo

Škodlivé účinky pesticidů na necílové organismy byly prokázány také u ptáků. Jedním z míst, kde se ptáci mohou setkat s různými druhy pesticidů, jsou například golfová hřiště, kde dochází k rozsáhlému využívání pesticidů pro údržbu travnatých ploch. Ke kontaminaci může dojít také u vodního ptactva, to může přijít do kontaktu s pesticidy splavenými ve vodách. Nejvíce jsou však ovlivněny druhy ptáků, pro něž jsou biotopem právě pole. V době, kdy se líhnou mláďata, by se mělo používání pesticidních přípravků omezit na minimum, neboť pak dochází k velkému úhynu například koroptve polní, strnada obecného nebo vrabce polního, protože pesticidy zabíjí druhy hmyzu, které slouží ptactvu jako potrava.[26]

V článku z března 2013 je zmíněno, že neonikotinoidy mají nejen velmi negativní vliv na včely, ale jejich účinek se také podepisuje na ptactvu, autor píše, že zabíjet může i jedno pouhé zrno pšenice ošetřené imidaclopridem. Nenikotinoidy poškozují reprodukční schopnosti ptáků. Jedním z neodpustitelných mýtů o moderních pesticidech je, že by ošetřené obilniny měly zvířata odpuzovat. Laboratorní testy však nemohou jasně prokázat, jak se chovají hladová zvířata na poli.[27]

5.3 Vliv na ryby

Pesticidy, jsou velmi nebezpečné pro vodní prostředí, které zásadním způsobem mění a pro vodní život jsou toxické. K masovému úhynu ryb dochází většinou v případě havárií, při akutní expozici. V 60. – 80. letech minulého století byly pesticidy příčinou úhynů ryb u tří až šesti procent případů hromadných otrav. Při chronické expozici dochází k narušení fyziologických a reprodukčních procesů, koncentrace pesticidu může ovlivnit i chování jednotlivých organismů.[28] Ohrožení může přijít do vodního ekosystému, i pokud je látka použita proti nežádoucí rostlině, na kterou jsou vázány organismy, kterým slouží jako potrava. Může také dojít ohrožení samočisticí vlastnosti vody.[29]

5.4 Vliv na člověka

Pesticidy samozřejmě ohrožují i samotného člověka. Ať už jsou to zaměstnanci společností, které pesticidy vyrábí či lidé, kteří pesticidy nevědomě konzumují v potravinách a vodě nebo jsou jimi ohroženi, když jsou aplikovány na zemědělských půdách. U lidí, kteří přijdou s pesticidy do styku, mohou nastat kožní problémy, alergie, dýchací a nervová onemocnění nebo může dojít přímo k otravě. Jsou-li lidé pesticidům vystavováni po dlouhou dobu, může dojít k výskytu nádorových onemocnění, porušení reprodukční schopnosti nebo problémům s imunitním systémem.[30]

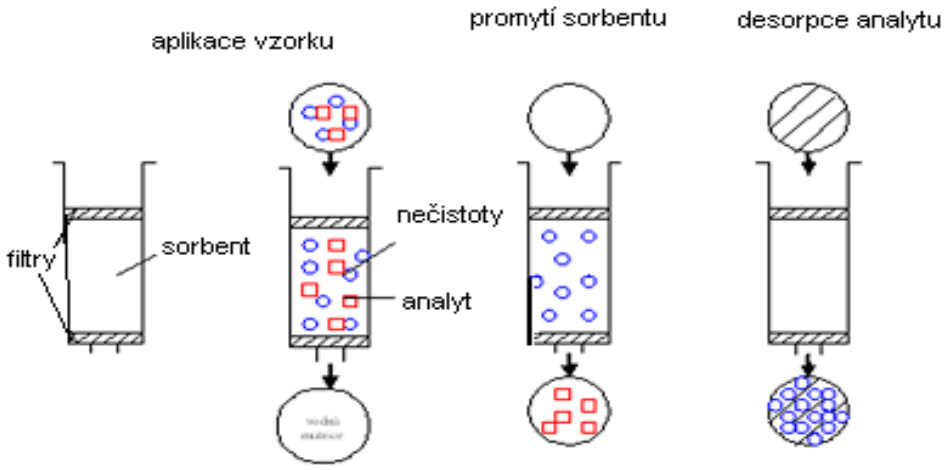
6 METODY EXTRAKCEA STANOVENÍ PESTICIDŮ ZE SLOŽEK ŽP

Extrakce, je separační metoda, při které jsou spolu v kontaktu dvě navzájem nemísitelné fáze nebo se spolu fáze mísí omezeně. Analyt se poté dělí na základě odlišných rozdělovacích koeficientů, tedy na rozdílné schopnosti rozpouštět se v jednotlivých rozpouštědlech. Dochází ke kontaktu dvou makroskopicky oddělených fází. Tato metoda separace bývá prováděna tak, aby nedošlo jen k samotné separaci, ale také k zakoncentrování analytu z velkého objemu na malý objem kontaktní fáze – extrakční činidlo. Extrakce je využívána v mnoha odvětvích. V poslední době se využívá i superkritické extrakce, při této metodě se kapaliny i pevné látky extrahují plyny v nadkritickém stavu - to je stav nad jejich kritickým bodem.[31], [32]. Způsoby extrakce můžeme rozdělit podle skupenství fází do čtyř skupin. Metoda extrakce kapalina-kapalina, plyn-kapalina, využívá se pro extrakci těkavých látek z kapaliny, tuhá fáze-kapalina nebo plyn-pevná látka.[33]

6.1 Extrakce na tuhou fázi (SPE)

Extrakce na tuhou fázi – Solid Phase Extraction (SPE) je technika, která slouží pro úpravu vzorků a má na poli analytické chemie velký význam. Tato metoda extrakce je hojně využívána v analýzách týkajících se životního prostředí, kde je využívána při sledování polutantů jak ve vzduchu tak i vodě a půdě. Mezi její výhody patří selektivita, opakovatelnost, rychlost, citlivost a její kombinovatelnost s různými metodami stanovení například s plynovou nebo kapalinovou chromatografií.[34] Při použití této techniky se můžeme vyhnout řadě problémů, které jsou spojovány s další metodou úpravy vzorků, a tou je extrakce kapalina – kapalina. Obrovskou výhodou této metody je malá spotřeba organických rozpouštědel, které bývají povětšinou jedovaté látky, ničící ozónovou vrstvu, ale jsou i jinak nebezpečné. SPE je nejčastěji používána při zpracování kapalných vzorků, využívá se obzvlášť pro extrakci středně těkavých látek a látek netěkavých. Nejdůležitějším krokem je volba sorbentů, jejichž nabídka je široká. Metodou SPE můžeme najednou zpracovat 12, 24 či 96 vzorků a je možná i automatizace procesu. Na obrázku 6 můžeme vidět schéma, jaký je postup při použití SPE kolonky. Pevnou fází bývá nejčastěji chemicky modifikovaný silikagel s navázanými různými funkčními skupinami. Využívají se materiály se strukturou polymeru, každý z těchto materiálů má svoje specifické sorpční vlastnosti. Princip jeho použití spočívá v naplnění krátkých kolon, terčíků o průměru 3 cm, které slouží pro samotné vzorkování a mají tloušťku kolem 1 mm.

Můžeme je však použít i ve formě až 1 m dlouhé trubice naplněné rozpouštědlem.[34] Celý proces probíhá v kolonkách, kterým se říká „cartridges“. Průtok v nich je zajištěn buď gravitací nebo pozitivním či negativním tlakem. Je možné použít i metodu k zajištění průtoku pomocí injekční stříkačky, ta se ale využívá jen zřídka. K oddělení nečistot a analytu dochází po promytí sorbentu, analyt se dostane ven pomocí desorpce.[35] Při desorpci je především snaha o vysokou účinnost a o zisk co nejmenšího množství desorbovaného analytu. Budeme-li chtít při desorpci využít termické vlastnosti, oddělíme analyt zachycený na polymerním materiálu pouhým zvýšením teploty, k tomu nám postačí klasické vyhřívané pícky.[34]



Obrázek 6 Schéma metody SPE[35]

Ve srovnání s tradičními metodami extrakce má SPE mnoho atraktivních funkcí. Je snadná a méně nákladná, používá se při ní menší množství rozpouštědla. SPE patří mezi multifunkční techniky, má ale i své nevýhody a jednou z nich je například to, že se mohou SPE kolony ucpat ve svých centrech pevnými a mastnými složkami pocházejícími ze vzorku. Kazeta SPE by měla být vybrána v závislosti na fyzikálně-chemických vlastnostech (polarita – retence pigmentů, chemická struktura látky) pesticidů, které jsou vyhledávány v určitém vzorku, a v závislosti na povaze vzorku.[39]

6.2 Soxhletova extrakce

Soxhletova extrakce je používaná pro stanovení pesticidů v půdách. Při extrakci se používá obvykle 300 ml vhodného rozpouštědla a extrakce trvá přibližně 16-24 hodin. Což můžeme považovat za nevýhodu, ale moderní přístroje dokážou extrakci provést za postupu, kdy si vystačí s 50 – 100 ml rozpouštědla a dobou 2 – 4 hodin.[34] Metoda má také několik zajímavých výhod, například, že je vzorek opakovaně promýván čerstvými částmi extraktu, což usnadní posun rovnováhy. Také systém Soxhletova extraktoru, v němž se technika provádí, udržuje relativně vysokou teplotu. Princip metody spočívá v tom, že vložíme tuhou látku do upravené patrony vyrobené z papíru či silikátů. Budeme-li systém zahřívat, nastane vypařování rozpouštědla, jeho páry budou kondenzovat v chladiči a budou zvolna přecházet do připravené patrony, až dojde k požadovanému zaplnění, přeteče rozpouštědlo spolu se stanovovaným analytem do baňky. Soxhletova extrakce je velmi jednoduchá metoda, nevyžaduje přílišnou námahu a můžeme získat vysokou výtěžnost ze vzorku.[36] Při této metodě extrakce se rozpouštědlo v dolní části celého systému zahřívá a v horní části se opět zkapalňuje, přes vzorek tedy prochází mnoha cykly jedna a ta samá dávka rozpouštědla aniž bychom museli do systému přidávat další množství.[37]

6.3 Zrychlená extrakce (ASE)

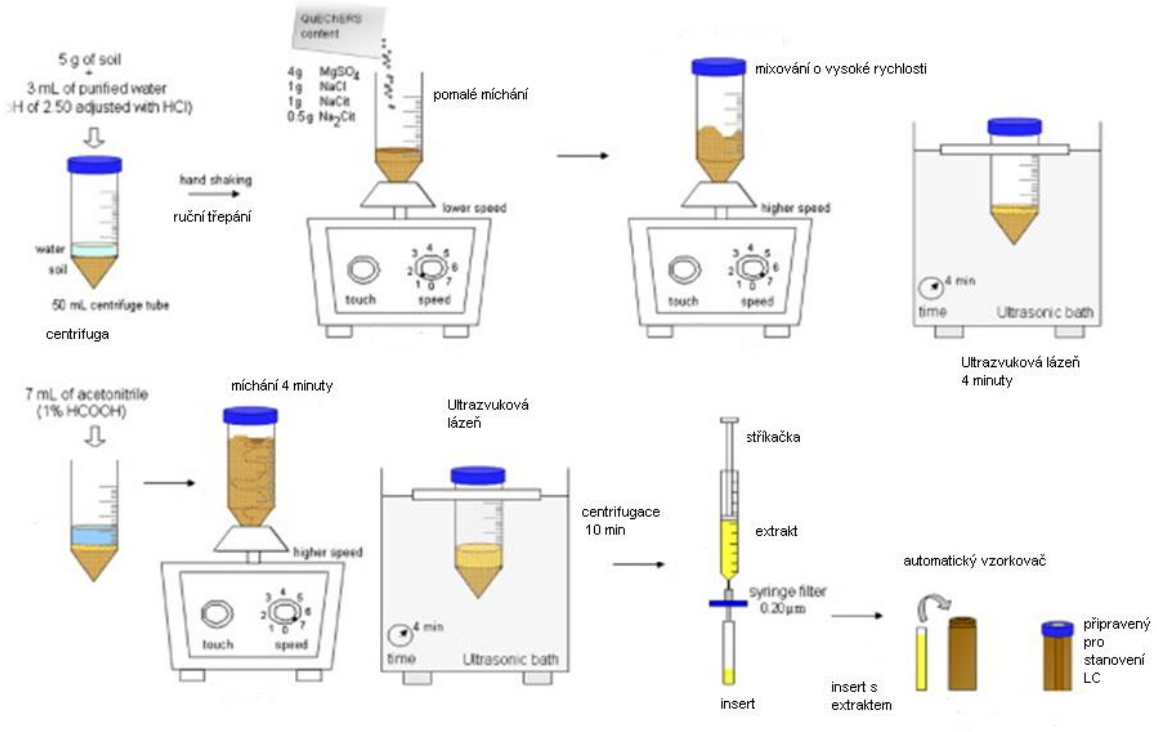
Metoda zrychlené extrakce – Accelerated Solvent Extraction (ASE), známá také jako tlaková kapalinová extrakce (PLE) využívá stejné látky jako extrakce Soxhletova a jelikož má probíhající kinetika vyšší rychlost, na rozdíl od Soxhleta je možné extrakci provést za 20 minut a můžeme využít i jinak málo účinných rozpouštědel. Vyšší rychlosti dosáhneme zvýšením teploty (až 200 °C) a tlaku (až 20 MPa), vyšší tlak nám udrží rozpouštědlo ve stavu kapaliny, v krátkém časovém úseku, což vede k lepší účinnosti extrakce.[34] Tato technika se považuje za relativně novou, používá se zde malé množství vody v organickém rozpouštědle. Při vysoké teplotě, viskozita s povrchovým napětím klesá, což má za následek podstatné zvýšení extrakčního poměru. Rozpouštědlo se udržuje pod jeho bodem varu za použití vysokého tlaku, který jej nutí vniknout do vzorku. Při tomto způsobu extrakce nemusí být použito velké množství rozpouštědla. Ačkoliv vysoká teplota zvyšuje účinnost, může vést i k degradaci tepelně labilních sloučenin. Extrakce bývá úspěšně používaná při stanovení pesticidů, ve vzorcích různého původu.

Metoda byla speciálně vyvinuta pro stanovení neonikotinoidů v meruňkách, broskvích, hruškách, celeru a cuketách. Výhodou ASE je také, že má nízkou produkci odpadu a analytici nejsou vystavení škodlivým rozpouštědlům, nicméně vzorky, které obsahují velké množství vody, musí být před extrakcí vysušeny.[32], [34], [42]

6.4 Quick-Easy-Cheap-Effective-Rugedand-Safe Extraction (QuEChERS)

Další vhodný způsob extrakce je metoda QuEChERS, ta spočívá ve dvou krocích, extrakci kapalina-kapalina a čištění pomocí disperzní látky. Metoda byla vytvořena za účelem stanovení pesticidů v ovoci a zelenině. Vzorek je extrahován pomocí protřepávání s acetonitrilem za přídavku solí. Ve druhém kroku se používá extrakce tuhou fází, kdy se analyt sorbuje na primární sekundární amin (PSA), který je navázán na křemelině nebo alumině.[38] Extrakce QuEChERS, neboli metoda disperzní SPE, pojmenována počátečními písmeny následujících slov Quick, Easy, Cheap, Effective, Ruggedand a Safe je, jak vyplývá z názvu, snadná, levná, efektivní, silná a bezpečná. Je velmi rozšířená a oblíbená pro stanovování multireziduí pesticidů v potravinářských nebo zemědělských výrobcích.

Po extrakci s vodou mísitelnými rozpouštědly v přítomnosti vysoké koncentrace soli (chloridu sodného nebo síranu hořečnatého) či pufrovací látky (citrátu) obsahuje kapalná organická fáze pesticid. Po protřepání a odstřeďování, je alikvotní podíl organické fáze podroben dalšímu čištění pomocí SPE.[39] Na obrázku 7 můžeme vidět schéma, jak metoda probíhá. Následně je extrakt podroben analýze nebo se uloží za vhodných podmínek k dalšímu zpracování. Jako analytická koncovka může být použita např. kapalinová chromatografie, což je metoda vhodná pro zemědělské vzorky či vzorky potravin, které mají nízký obsah tuku, chlorofylu a karotenoidu.[40]



Obrázek 7 Schéma metody QuEChERS[41]

6.5 Superkritická fluidní extrakce (SFE)

Superkritická fluidní extrakce- Supercritical Fluid Extraction (SFE) využívá superkritickou tekutinu pro extrakci organických látek z matrice a je oblíbenou metodou při analýze kontaminantů v půdě, rostlinné a živočišné hmotě. Považuje se za alternativu k Soxhletově extrakci tuhé fáze. Superkritická tekutina je tekutina, která je při určité teplotě a tlaku nad svými kritickými hodnotami, za těchto podmínek vykazuje kapalina rychlou difuzivitu a viskozitu, jež jsou typické pro plynnou fázi, ale také má dobré solvatační vlastnosti (vlhčení), které jsou charakteristické pro kapaliny. Vlastnosti plynné fáze umožní pronikat do vzorku a navázat kontakt s analyty mnohem rychleji než kapalné rozpouštědlo. Po navázání dojde k využití solvatačních vlastností tekutiny k uvolnění analytů.[42] Obvykle se používá CO_2 v nadkritickém stavu, při teplotě 310 °C a tlaku 72 kPa, v tomto stavu není reaktivní a dosahuje potřebné čistoty, tato metoda je poměrně levná.[43] CO_2 je vhodný pro extrakci nepolárních látek, protože je tato metoda velmi citlivá na vodu, není vhodná pro stanovení mokrých vzorků. Ty je dobré před stanovením dehydratovat například pomocí oxidu křemičitého (Celite) nebo bezvodým síranem sodným, výběr materiálu musí být adekvátní ke stanovované látce, protože některá dehydratační činidla mohou zachycovat i některé pesticidy. Pro použití metody

ke stanovení polárních látek by bylo nutné přidat k CO_2 vhodná rozpouštědla.[6] Velký význam má také volba vhodných podmínek tak, aby došlo k narušení vazeb. Účinnost extrakce tedy ovlivňují tyto faktory: volba dehydratačního činidla, tlak, teplota v extrakční komůrce, přidaný objem a druh modifikátoru, statický a dynamický čas extrakce, průtok superkritické tekutiny a druh zachytávače analytů. Výhodou této metody jsou nízké časové nároky a malé množství potřebných rozpouštědel. Nevýhody pak najdeme ve vysokých pořizovacích nákladech, těžké optimalizaci a v omezení separace.[6], [44]

7 METODY STANOVENÍ PESTICIDŮ

K identifikaci a kvantifikaci pesticidů se využívají techniky plynové chromatografie (GC) a vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC). Plynová chromatografie se využívá pro identifikaci a kvantifikaci látek s dostatečně nízkým bodem varu, umožňujícím jejich převedení do plynného stavu a separaci na chromatografické koloně (mezi často používané detektory patří detektor elektronového záchytu (ECD), dusíko-fosforový detektor (NPD), plamenově-fotometrický detektor (FPD) a hmotnostně-spektrometrický detektor (MS), umožňující ověření identity látek. Kapalinová chromatografie se používá pro analýzu pesticidů, jejichž fyzikálně-chemické vlastnosti znemožňují stanovení metodou plynové chromatografie. Jako příklad je možno uvést termolabilní karbamátové insekticidy. K detekci lze využít např. spektrofotometrického detektoru, v poslední době velice často také hmotnostně-spektrometrického detektoru (LC/MS).[3],[6],[47]

7.1 Kapalinová chromatografie

7.1.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Metoda stanovení pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí – highperformance liquid chromatogramy/massspectrometry (HPLC-MS)je v porovnání např. s kapalinovou chromatografií s UV – VIS detekcí složitější metodou. K dělení složek směsi dochází na kolonách, na základě fyzikálně-chemických vlastností. Vysoký stupeň separace, je zajištěn také vhodnou stacionární fází, která se skládá z malých částic o definované velikosti, má vysokou hustotu, homogenitu a také velký hydrodynamický odpor. Průtok mobilní fáze systémem je zajištěn čerpadlem, které pracuje se za vysokého tlaku (desítky MPa). Detekce je provedena pomocí hmotnostních detektorů, ty nám dají informace o jednotlivých strukturách látek v hmotnostním spektru.[32],[34],[45]

7.1.2 Ultra rychlá kapalinová chromatografie (UPLC)

Ultra rychlá kapalinová chromatografie, využívá charakteristických vlastností částic, optimalizace systému, designu detektoru, zpracování dat a řízení. Separace probíhá na základě speciálních sorbentů, které vynikají svými vlastnostmi, jako je mechanická pevnost či mimořádně účinná separace. Proces probíhá při vyšších tlacích, než jsou použity v HPLC, ty jsou zde až 100 MPa a také vše probíhá při vysokých rychlostech, díky tomu

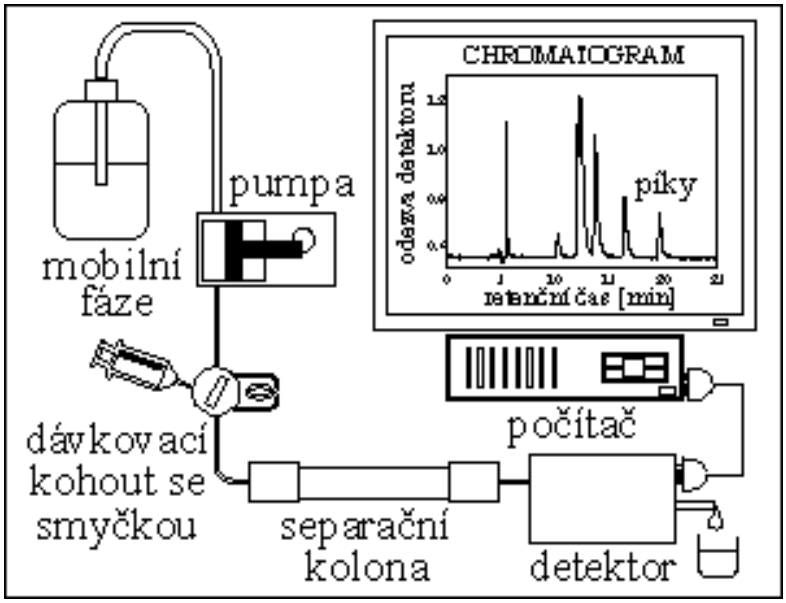
dochází k dramatickému nárůstu v samotném rozlišení, citlivosti a rychlosti analýzy. Tato nová analytická metoda, zachovává samotnou praktičnost a zásady HPLC, avšak podává lepší chromatografický výkon.[45],[46]

Analyt může být separován pomocí dělícího systému, který se skládá z několika částí. Vyhřívané UPLC kolony mohou být vybavené C 18 reverzní fází ohraničenou substrátem etylenu (BEH). Jako mobilní fáze se používá voda, acetonitril či jiné přísady. Při stanovení pesticidů ve vodě podle konkrétního příkladu byla UPLC provedena následovně. Proces proběhl při zvoleném průtoku 400 μl/min s výchozím gradientovou elucí. Gradient eluce se provedl s 0,1% vodným roztokem kyseliny mravenčí a acetonitrilu o vysoké čistotě (LC-MS) jako mobilní fází. Stanovení proběhlo při teplotě 45 °C. Teplota vzorků chlazených v autosamplerech byla 5 °C. Výsledky dokázaly, že tato metoda je velmi citlivá a selektivní pro stanovení pesticidů ve vodě. Vyvinutá metoda byla použita pro stanovení 31 pesticidů v povrchových vodách s UPLC-ESI-MS/MS analýzou za pouhých 8 min. Tyto SPE-UPLC-MS/MS metody mohou být použity pro rutinní analýzy pesticidů, které se v životním prostředí ve vodě nachází ve stopových množstvích a pro stanovení nových pesticidů, které v současné době nejsou ještě analyzovány.[47]

7.1.3 Detektory pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii

Detektorem pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii může být spektrofotometrický detektor (UV/VIS), který měří absorbanci eluátu. UV/VIS detektor s diodovým polem nám umožní zaznamenat v reálném čase celé spektrum chromatografické separace. Rozlišení detektoru určuje počet fotodiod. Při této metodě je možno detekovat analyt při libovolné vlnové délce a poté porovnávat spektra s knihovnou spekter. Některé spektrofotometrické detektory mohou mít fixní vlnovou délku. Jako zdroje záření se při těchto metodách používají kadmiové, rtuťové nebo zinkové výbojky.[48]

Jinou možnost detekce představují fluorescenční detektory měřící emisní záření, tedy sekundární záření, jež vyzařuje látka po absorpci excitačního (primárního) elektromagentického záření, což způsobuje přechod molekul ze základních stavů do stavů s vyššími vibračními hladinami. Absorbovaná energie molekulou je poté vyzářena jako fluorescence, pokud se jí molekula nezbaví jinou možností. Emitované záření mívá vyšší vlnovou délku než záření excitované.[48]



Obrázek 8 Schéma kapalinové chromatografie[49]

7.2 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Výsledkem spojení separačních metod s hmotnostní spektrometrií jsou velmi citlivé a selektivní metody, díky nim můžeme identifikovat i strukturně analyzovat ionizovatelné látky. Sledovaný vzorek je analyzován na základě rozdělení iontů podle hodnoty poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Získáme informace, které se týkají relativního zastoupení stejného měrného náboje ve stanovované směsi a také informace o struktuře samotné látky čehož je využito při její identifikaci.[50],[32] Detekce může být realizována pomocí hmotnostních detektorů, které nám mohou poskytnout také informace o jednotlivých strukturách látek v hmotnostním spektru.[32],[34],[55] Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií je realizováno pomocí sprejových ionizačních technik za atmosférického tlaku.

7.2.1 Elektrosprejová ionizace (ESI)

Ionizaci pomocí elektrospreje můžeme pokládat za jednu z nejšetrnějších technik ionizace, zejména proto, že pracuje za normálního tlaku. Principem tohoto druhu ionizace je, že stanovovaná látka, která je předem rozpuštěna ve vhodném rozpouštědle, se dostává do iontového zdroje pomocí vstupní kapiláry, na které je vloženo vysoké napětí. Na výstupu z kapiláry dochází ke zmlžení vzorku pomocí zmlžujícího plynu. Vzniklé kapičky nesou na povrchu náboj a vlivem odpařování rozpouštědla dochází ke zvyšování

hustoty tohoto náboje a následné tzv. Coulombické explozi, což je rozpad na ještě menší kapičky za současného rozdělení náboje. Tento proces je neustále opakován, až do chvíle vzniku samotných iontů. Ionty pak přecházejí do hmotnostního analyzátoru. Metoda není příliš vhodná, nachází-li se ve vzorku detergenty či soli, proto je nutné předčišťování a odsolování vzorků.[51],[32],[34]

7.2.2 Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)

Dalším způsobem ionizace může být chemická ionizace za atmosférického tlaku. Jedná se o metodu, při které kombinujeme proces vypařování za vysoké teploty a elektrického výboje zároveň při procesu zamlžování. Eluát je na konci kapiláry zmlžen do zóny s vysokou teplotou. Elektrický výboj nejprve ionizuje mobilní fázi a až poté jsou ionizovány molekuly analytu. Vzniklé elektrony jsou usměrňovány pomocí elektrod do analyzátoru. Metodu lze použít, potřebujeme-li určit sumární vzorec stanovované látky nebo pro kvantifikaci.[52] APCI je druhá nejčastější používaná ionizační technika při stanovení pomocí HPLC/MS a je vhodná pro látky nepolární či mírně polární.[53]

7.2.3 Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)

Metoda fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) je považována za vhodnou při stanovení nepolárních a velmi labilních látek. Uspořádání přístroje je stejné jako u předešlé metody APCI jen u APPI se místo jehly s napětím používá k ionizaci UV záření. Jako zdroj UV záření se používá kryptonová výbojka s energií fotonů, která je větší než ionizační energie nepolárních molekul, ale menší než ionizační energie mobilní fáze. Dochází tedy k selektivní ionizaci analytu.[53]

7.2.4 Typy analyzátorů

Kvadrupólový analyzátor využívá pro dělení iontů jejich průchod mezi čtyřmi kovovými tyčemi, které jsou rozmístěny po kružnici paralelně. Na protilehlé tyče je umístěno stejné napětí, které vzniká kombinováním stejnosměrné a střídavé složky. Napětí jsou na dvě tyče volena jen v okamžiku, kdy mohou projít mezi tyčemi ionty s určitou hodnotou m/z nebo případně s m/z hodnotou z určitého omezeného intervalu. Zbylé ionty jsou vypuštěny z elektrického pole a zachytí se na kvadrupólových tyčích. Postupným plynulým měněním hodnot stejnosměrné a střídavé složky jsou analyzovány všechny ionty v rozmezí m/z. Kvadrupól slouží jako filtr k naskenování daného spektra, což můžeme považovat jako výhodu. Mezi jeho nevýhody potom patří například nízké rozlišení. Jeho použití je vhodné pro GC/MS a HPLC/MS.[54]

Trojitý kvadrupól je hmotnostní analyzátor, který se skládá ze tří kvadrupólů, přičemž ten prostřední slouží jako kolizní cela, do níž je zaveden kolizní plyn sloužící pro excitaci iontů vybraných pomocí prvního kvadrupólu. Fragmenty vzniklé v prostředním kvadrupólu jsou pak detekovány posledním, třetím kvadrupólem. Tento typ analyzátoru se využívá při metodách stanovení MS^2 a kvantitativních analýzách. Na rozdíl od iontové pasti zde může docházet k opakovaným kolizním excitacím.[53]

Iontová past funguje obdobně jako kvadrupólový analyzátor, má ale ve své konstrukci jen tři elektrody. Jedna z elektrod je kruhová a dvě zbylé jsou vyklenuté do prostoru kruhu, kde se shromažďují ionty v oblaku. Ionty jsou v této iontové pasti zdrženy po dobu milisekund nebo déle. Jako základní plyn se zde používá helium o tlaku v řádu 0,1 Pa. Helium vlivem tření brzdí pohyb iontů, což má za důsledek právě vznik iontového oblaku. Změnou veličin jsou ionty převedeny směrem k detektoru. Tento typ hmotnostního analyzátoru má výhodu v malých rozměrech, ve své citlivosti – možno měřit MS^n. Mezi jeho nevýhody patří například nízké rozlišení či možnost rušivých reakcí.[55]

7.2.5 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Detekce pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie provádíme ve dvou fázích, stručně řečeno, v první fázi se vybere „mateřský ion“, na jehož základě pak ve druhé fázi probíhá už samotná detekce. Bude-li metoda propojena se separační metodou, je vhodné použít fáze tři, kdy budou odděleny analyzátory celou. V první fázi se vybere „mateřský ion“, při druhé fázi se převede do kolizní cely, kde dochází k fragmentaci „mateřského iontu“

a skenování. Kolizní cela je zaplněna plynem, například to může být argon, či xenon, je důležité, aby byl inertní. Na třetím kvadrupólu se rozdělí vzniklé dceřiné ionty. Samotné stanovení probíhá ve dvou procesech. Při prvním procesu ionty dle jejich poměru m/z přechází přednostně do kolizní cely, v níž dojde k (CID) kolizní disociaci, tedy nárazům molekul inertního plynu a ionty se rozpadnou na fragmenty. Při druhém procesu jsou tyto fragmenty, znovu v závislosti na jejich m/z převáděny k detektoru. Výsledek nám tedy podá informace v podobě hmotnostního spektra s informacemi o každém typu iontů a jeho fragmentech.[34],[55]

7.3 Plynová chromatografie (GC)

Plynová chromatografie je rychlá, účinná metoda, při níž není potřeba velkých množství vzorků. Nevýhodou je, že sledovaný analyt musí být termicky stabilní popř. převeditelný na termicky stabilní formu. Při této metodě je vzorek pomocí mirkostříkačky, přes těsnící silikonovou gumu nadávkován do proudu mobilní fáze plynu, jejímž zásobníkem je tlaková nádoba. Nosným plynem může být helium, dusík, vodík nebo argon. Na koloně dochází k separaci v závislosti na schopnosti látky vázat se na stacionární fázi. Metoda se používá především pro separaci plynů, nedisociovatelných kapalin, organokovových sloučenin a pevných organických molekul s molekulovou hmotností menší než 1000.[32],[34]

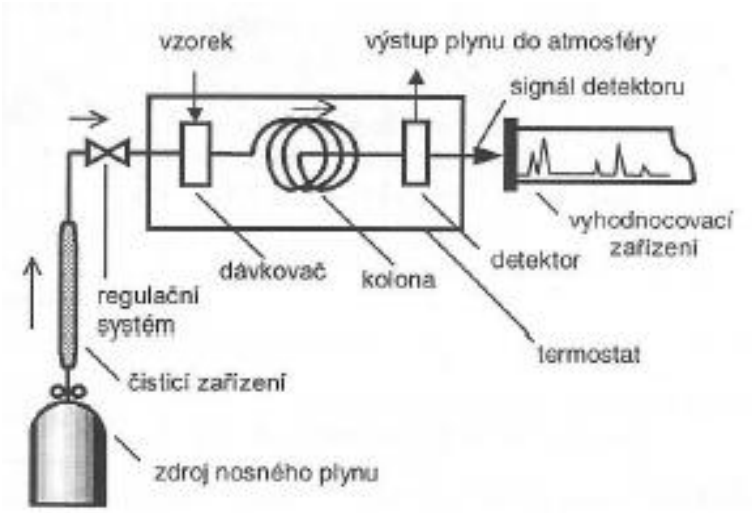
7.3.1 Detektory užívané ve spojení s GC

7.3.1.1 Detektor elektronového záchytu (GC/ECD)

Detektor elektronového záchytu má ve své konstrukci radioaktivní zářič, vyzařující záření β, které slouží pro ionizaci molekul dusíku nebo argonu. Po ionizaci tohoto nosného plynu dochází k uvolňování pomalých elektronů.[32],[55] Metoda využívá procesu tvorby negativních iontů eluovanou látkou a záchytu nízkoenergetické záporně nabité částice. Proces tvorby je závislý od elektronové konfigurace atomů z molekul a na elektronové afinitě. Detekce je provedena pomocí měrné cely. Detektor je velmi citlivý vůči látkám, které mají ve své struktuře výrazně elektronegativní funkční skupiny, jako jsou halogeny či nitroskupiny. Ale naopak pro aminy, alkoholy a uhlovodíky nám dává nízkou odezvu.[32],[34],[55]

7.3.1.2 Detekor FID (GC/NPD)

Plamenově ionizační detektor (FID) je tvořen malým hořáčkem, do kterého přichází nosný plyn z kolony. Do spodní části detektoru je přiváděn vzduch jako oxidant. V plamenu vzniká malé množství iontů, v tomto stádiu je vodivost minimální a detektor vykazuje minimální konstantní odezvu. Vstoupí-li do plamene látka spalitelná ve vodíkovém plamenu, dochází ke vzniku fragmentů, zvýšení vodivosti a ionizačního proudu.[56] Detektor dusík fosfor je modifikovaný FID (plamenově ionizační detektor). Je to selektivní termoionizační detektor s alkalickým kovem. Modifikace funguje na principu vložení soli alkalického kovu v perličce či prstenci, který se vloží do prostoru hořáku. Detekování proběhne na základě ionizace alkalického kovu vlivem spálených organických látek, které obsahují atomy dusíku či fosforu.[57]



Obrázek 9 Schéma plynového chromatografu[55]

7.3.2 Hmotnostně-spektrometrický detektor

Při spojení plynové chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí se využívá elektronová ionizace. Tlak par musí být minimálně 10^{-6} Torr. Ionty jsou tvořeny při nárazu paprsku elektronů do molekul vzorku v plynné fázi. Energie elektronů se volí kolem 70 eV, musí být vyšší než energie meziatomových vazeb. Molekula nárazem získá velký přebytek energie a začnou se tvořit fragmenty. Metoda se využívá se pro určení sumárních vzorců, kvantifikaci a strukturní analýzy. Při tomto způsobu ionizace se vzorek zahřívá

na 400 °C, což znamená, že tato metoda ionizace není vhodná pro tepelně labilní vzorky, pro ně byly vyvinuty alternativní metody ionizace.[58]

Analyzátorem může být např. sektorový analyzátor, který funguje na principu, že zrychlené ionty vstoupí do magnetického pole utvořeného elektromagnetem, jež zaujímá tvar kruhové výseče. Pohyb iontů v kruhové dráze potom zaručí působení silových účinků magnetického pole. Na detektor dopadnou v okamžiku, kdy se rovnají odstředivé a dostředivé síly, ionty s určitým poměrem m/z. Částice, které mají odlišnou hmotnost, se pohybují v dráze s jiným poloměrem.[59] Ve spektru je potom zaznamenána změna magnetické indukce. Existuje možnost, kdy se může měnit urychlovací potenciál, ale protože tato metoda diskriminuje ionty s velkou hmotností, není využívána.[60]

8 METODY STANOVENÍ JEDNOTLIVÝCH PESTICIDŮ

8.1 Prochloraz

8.1.1 Prochloraz v houbách

Rezidua prochlorazu v houbách byla sledována v Číně. Jako metoda extrakce zde byla zvolena extrakce na pevnou fázi. V této metodě byl použit jako rozpouštědlo acetonitril a spolu s látkou Celite 545, který byl přidán k reprezentativnímu vzorku. Po filtraci byl vzniklý extrakt pročištěn pomocí kapalinového rozdělovacího procesu za použití roztoku NaCl s dichlormetanem. Prochloraz byl stanoven pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí (HPLC-MS). Mez detekce byla 0,038 mg/kg, průměrná výtěžnost byla v rozmezí od 82,6% až 100,3%. Navržená metoda je jednoduchá, rychlá, ekonomická a má dobrou linearitu.[61]

8.1.2 Prochloraz v ovoci

Ve Španělsku byly pesticidy sledovány v ovoci, které bylo zpracováno na nealkoholické nápoje. Při přípravě těchto nápojů nebyly definovány žádné parametry, které by stanovovaly limity pro výskyt pesticidů, přestože hlavními spotřebiteli těchto výrobků jsou děti. Při této metodě byla vyvinuta screeningová metoda, která automaticky vyhledává až 100 pesticidů v ovoci spotřebovaném na výrobu nealkoholických nápojů. Vybrané vzorky byly analyzovány pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí, přičemž byl použit analyzátor doby letu (LC-TOF-MS). Extrakce proběhla metodou SPE. Jako sorbent zde byl použit hydrofilně-lipofilní vyvážený polymer ve formě kazety a jako eluční rozpouštědlo byl použit metanol. Potvrzení cílových druhů látek bylo založeno na porovnávání retenčního času a přesném měření poměru hmotnosti a náboje protonovaných molekul a fragmentů iontů. S danou metodou, bylo proměřeno přes 100 druhů ovoce, které se používá pro výrobu nápojů získaných od 15 různých zemí z podniků, se značkou, která je distribuována po celém světě a nalezeny byly relativně vysoké koncentrace pesticidů ve většině analyzovaných vzorků. Zjištěná hodnota koncentrací byla v řádech mikrogramů na litr. Překročila až 300 krát hodnoty, které jsou stanoveny pro balenou vodu.[62]

8.2 Procpiconazol

8.2.1 Propiconazol ve vodě

V Číně byl sledován spolu s dalšími pesticidy v podzemní vodě propiconazol. Extrakce vzorku proběhla pomocí roztoku ethylacetátu a hexanu v poměru 1:1. K následnému vysušení vzorku byl použit bezvodý síran sodný. Rezidua pesticidů byla stanovena pomocí plynové chromatografie. Detekce byla zprostředkována detektorem s elektronovým záchytem. Detekční limity se pohybovaly v rozmezí ng/l. Nalezené koncentrace propiconazolu se pohybovaly kolem 2 ng/l. Tato metoda představuje velkou výhodu díky své vysoké citlivostí a přesností.[63]

V západní Africe byla provedena studie obsahu pesticidů hned v několika jezerech. Stanovován byl obsah reziduí pesticidů jak ve vodě, tak i v rybách. Vědci se zaměřili na organofosforečné a organochlorované pesticidy, mezi nimi byl i propiconazol. Extrakce byla provedena metodami kapalina-kapalina a kapalina-pevná fáze za použití roztoku ethylacetátu a dichlormetanu v poměru 1:1. Analýza proběhla opět pomocí plynové chromatografie s hmotnostně – spektrometrickou detekcí. Průměrné koncentrace reziduí pesticidů nalezené ve vodě byly v řádu 0,1 mg/l až 1 mg/l. Průměrné koncentrace nalezené v rybách se pohybovali v řádu 0,008 mg/l až 0,01 mg/l, což jsou hodnoty, které se mohou negativně projevit na zdraví člověka.[64]

Ve Švýcarsku byl sledován propiconazol s etaconazolem, tyto látky mají velmi podobnou strukturu i vlastnosti. Stanovení proběhlo ve vzorcích rostlin, půdy i vody. Nejprve byl vzorek extrahován do metanolu, následně byl přidán definovaný objem vody a po té dichlormetan (LLE). Přečištění proběhlo pomocí extrakce na tuhou fázi. Jako sorbent zde byl použit materiál s obsahem hliníku. Stanovení proběhlo pomocí plynové chromatografie s detekcí plamenově ionizačního detektoru (GC/NPD). Návratnost byla v rozmezích 76-100%, metoda je tedy považována za vhodnou pro stanovování těchto pesticidů s fungicidním účinkem. Detekční limity byly 0,02 mg/kg v ovoci, obilí a půdě. 0,05 mg/kg u ostatních rostlinných materiálů, a 0,001 mg/kg ve vodě.[65]

8.3 Metconazole

8.3.1 Metconazol v kukuřici

Valent U.S.A. Corporation provedla stanovení metconazolu v kukuřici následujícím způsobem. Homogenizovaný vzorek byl upraven a následně extrahován metodou kapalina - kapalina. Po odpaření na daný objem byl směsný vzorek přečištěn pomocí extrakce na tuhou fázi, jako sorbent byl použit C18. Vzorky byly analyzovány pomocí GC/NDP. Nalezené koncentrace se pohybovaly v rozmezí 0,01 – 0,1 mg/kg.[66]

8.3.2 Metconazol v dětské výživě

Kojenci a malé děti jsou vůči znečištění životního prostředí velmi choulostivé, škodliviny mohou vážně ohrozit jejich zdraví a samotný vývoj. V Srbsku byl sledován metconazol, který byl aplikován na ovoce následně zpracované ve výrobě. Extrakce byla provedena pomocí metody QuEChERS. Acetonitrilový extrakt byl přečištěn na SPE kolonce naplněné PSA sorbentem a bezvodým síranem manganatým, k eluci byl použit aceton. Poté se vzorek vysušil a vysušené zbytky se rozpustily v toluenu. Stanovení proběhlo dvěma metodami, první byla kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí. Druhou metodou byla plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí. Tyto metody patří při stanovování pesticidů mezi velmi výhodné, protože pesticidy jsou většinou těkavé a tepelně stabilní látky. Nalezené koncentrace pesticidů se pohybovaly v rozmezí 5 – 250 ng/l. Výsledky byly ve většině případů v souladu se směrnicí vydanou Evropskou unií (0,01 mg/kg) až na pár výjimek.[67]

8.4 Acetamiprid

8.4.1 Acetamiprid ve vodě

V Japonsku byly sledovány pesticidy, které spadají do skupiny neonikotinoidů, konkrétně zde bylo sledováno množství acetamipridu v povrchové vodě (řece). Metodou stanovení byla LC/MS/(APPIMS). Metoda fotoionizace za atmosférického tlaku byla pro skupinu neonikotinoidů velmi účinná. Kladně nabité molekuly byly generovány pomocí fotoionizace za vysokého tlaku, zatímco záporné byly generovány pomocí elektrosprejové ionizace. Ionizace byla potvrzena ultravysokým rozlišením MS. Vzorky byly upraveny extrakcí na pevnou fázi. Koncentrace neonikotinoidů se pohybovala mezi 0,47 - 2,1 ng/l. Stanovení probíhalo v období, kdy jsou neonikotinoidy aplikovány na rostliny,

takže je zde větší pravděpodobnost kontaminace vodního prostředí. Tato látka je toxická pro vodní živočichy, ale koncentrace, které byly prokázány v řece, byly relativně nízké a vodní prostředí nebylo závažným způsobem ovlivněno.[68]

8.4.2 Acetamiprid v čaji

V Číně byl sledován acetamiprid a dalších 7 pesticidů v čaji. Pro stanovení byla použita LC/MS/MS. Extrakce vzorku proběhla zrychlenou extrakcí pomocí rozpouštědla acetonu v dichlormetanu (1:1)a extrakt byl následně čištěn extrakcí na pevnou fázi. Vzorek byl ionizován elektrosprejem a proměřen v reakčně monitorovacím módu (MRM). Ke kvantifikaci byla využita metoda vnitřního standardu pro imidacloprid a acetamiprid. Nalezené koncentrace pesticidů se pohybovaly kolem 10 μg/kg. [69]

9 ZÁVĚR

V předložené bakalářské práci je zpracována literární rešerše na téma Sledování průniku pesticidů do složek životního prostředí. Je zmíněno ovlivnění složek prostředí, jako jsou voda, půda a vzduch, pesticidy a dále jejich chování v těchto složkách a také vliv na organismy v nich žijících. Následně jsou zde ve stručnosti charakterizovány vybrané pesticidní látky a přípravky běžně používané v zemědělství, v nichž jsou obsaženy.

Mezi nejvhodnější metody extrakce těchto látek patří extrakce na pevnou fázi (SPE), tato metoda je vhodná pro vzorky v různých skupenstvích, je poměrně snadná, rychlá a levná. Další výhodou je velmi nízká spotřeba rozpouštědel a kombinovatelnost s různými analytickými metodami při stanovení. Její disperzní provedení, čili metoda extrakce QuEChERS je také vhodnou metodou, zvláště pro zemědělské vzorky a vzorky potravin, je ale také publikováno její použití při extrakci z půdy. Své výhody nese metoda extrakce QuEChERS již ve svém názvu, opět mezi ně patří úspora času, nákladů, rozpouštědel a celková nenáročná proveditelnost.

Vhodnou koncovou analytickou technikou pro stanovení pesticidů je kapalinová chromatografie (LC), s trojitým kvadrupólem jako analyzátorem a hmotnostně spektrometrickou detekcí (MSD) či detekcí UV záření a viditelného světla (UV/VIS), vhodnou ionizační metodou může být velmi často používaná elektrosprejová ionizace (ESI). Další analytickou metodou může být plynová chromatografie s detektorem elektronového záchytu (ECD) nebo plamenově ionizačním detektorem (FID, NPD). Spojením plynové chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí získáme vysoce citlivou a selektivní metodu při stanovování termicky stabilních pesticidů v různých matricích.

10 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Základní dělení pesticidů 13
Tabulka 2 Vlastnosti prochlorazu 14
Tabulka 3 Vlastnosti propiconazolu 15
Tabulka 4 Ekotoxikologické informace o přípravku Bumper 17
Tabulka 5 Vlastnosti metconazolu 18
Tabulka 6 Ekotoxikologické informace o přípravku Caryx 19
Tabulka 7 Vlastnosti acetamipridu 20
Tabulka 8 Ekotoxikologické informace o přípravku Mospilan 21
Tabulka 9 Spotřeba jednotlivých účinných látek za rok 2011 v kg/l 21

11 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Rovnice syntézy prochlorazu 15
Obrázek 2 Rovnice syntézy propiconazolu 16
Obrázek 3 Fomová hniloba 19
Obrázek 4 Faktory působící na pesticidy po aplikaci 22
Obrázek 5 Pohyb pesticidu v prostředí 24
Obrázek 6 Schéma metody SPE 29
Obrázek 7 Schéma metody QuEChERS 32
Obrázek 8 Schéma kapalinové chromatografie 36
Obrázek 9 Schéma plynového chromatografu 40

12 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku

APPI – fotoionizace za atmosférického tlaku

ASE (PLE) – zrychlená extrakce

BCF – bioakumulační faktor

BEH - substrát etylenu

Cas-NO – identifikační číslo

CID – detektor s kolizní celou

DDT - 1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan

EbC_{50} – akutní toxicita, statická, biomasa

EC_{50} - efektivní koncentrace látky, kdy dojde k úhynu či imobilizaci 50% organismů

ECD – detektor se záchytem elektronů

EP - Evropský parlament

ErC_{50} – akutní toxicita, statická, rychlost růstu

ER - Evropská rada

FAO - food and argiculture organization

FID – plamenově-ionizační detektor

FPD – detektor plamenově-fotometrický

GC – plynová chromatografie

HPLC – vysoce účinná kapalinová chromatografie

$K_{o/w}$ – rozdělovací koeficient oktanol/voda

LC_{50}- koncentrace škodlivé látky, kdy mortalita testovaných organismů je rovna 50%

LC/MS – kapalinová chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí

MRM - reakční monitorovací mód

MS – hmotnostní spektrometrie

NPD – detektor dusík-fosfor

PSA – primární sekundární amin (sorbent)

SFE – superkritická fluidní extrakce

SPE – extrakce na pevnou fázi

SPE-UPLC-MS/MS – extrakce na tuhou fázi ve spojení s ultra rychlou kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií s hmotnostně-spektrometrickou detekcí

T.b. – teplota varu

T.m. – teplota tání

TOF – analyzátor doby letu

UPLC-ESI-MS/MS – ultra rychlá kapalinová chromatografie – s elektrosprejovou ionizaci a hmotnostní spektrometrie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí

UV/VIS spektrometrie – spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti

13 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] VLČEK, V., POHANKA, M. Enviromentální aspekty užití organofosorových a karbamátových pesticidů schválených k užití v České republice. *Chemické listy*, 2011, vol. 105, p. 908–912.

[2] UNSWORTH, J. History of Pesticide Use. *IUPAC* [online]. 2010 [cited 2013-03-05]. Available from http://agrochemicals.iupac.org/index.php?option=com_sobi2&sobi2Task=sobi2Details&catid=3&sobi2Id=31 .

[3] STEHLÍKOVÁ, K. *Stanovení polárních pesticidů v environmentálních vzorcích*. Brno, 2010. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně. Vedoucí práce Mgr. Jiří Kohoutek.

[4] En.wikipedia.org. *Wikipedia* [online]. 26.2.2012 [cited 2012-04-21]. Available from http://en.wikipedia.org/wiki/Pesticide

[5] Zpráva o životním prostředí české republiky za rok 2010. [online]. [cited 2013-02-8]. Available from http://www.cenia.cz/web/www/web pub2.nsf/$pid/CENMSFVH9QDN/$FILE/Zpr%C3%A1va_o_%C5%BDP_%C4%8CR_2010_120111.pdf

[6] MIKULICOVÁ, P. *Analytické metody pro studium obsahu herbicidů v půdě.* Brno, 2011. Diplomová práce. Masarykova univerzita v Brně. Vedoucí práce doc. RNDr. Zdeněk Šimek, CSc

[7] Wikipedia: *Die freie Enzyklopädie*.[online]. [cited 2013-04-12]. Available from http://de.wikipedia.org/wiki/Wikipedia:Hauptseite

[8] VINGGAARD, A. Prochloraz: an imidazole fungicide with multiple mechanisms of action. *Int. J. Androl.*, 2006, vol. 26, p. 186–191.

[9] AGROMANUÁL. *Agromanuál: Vše o přípravcích na ochranu rostlin* [online]. 2003 [cited 2013-03-10]. Available from http://www.agromanual.cz/cz/pripravky/fungicidy/fungicid/bumper-super.html

[10] HAZEL, D. *Synthesisofthe fungicide propiconazole a systemicfoliar fungicide: Diplomová práce*. Dublin: Dublin Institute of Technology, 2000. Vedoucí práce Dr. P. Mulligan

[11] Agromanuál. AGROMANUÁL. *Agramanual.cz: Vše o přípravcích na ochranu rostlin* [online]. 2003 [cited 2013-03-10]. Available from http://www.agro.basf.cz/agroportal/cz/cs/crop_protection/vyhled_v_n__p__pravk__podle_parametr_/product_details_1446.html

[12] BASF THE CHEMICAL COMPANY. *Bezpečnostní list* [online]. Praha, 2013 [cited 2013-03-10]. Available from

http://www.agro.basf.cz/agroportal/cz/cs/crop_protection/vyhled_v_n__p__pravk__podle_parametr_/product_details_1446.html

[13] WINTER, V. Anatomie: Embyro. *Embryo* [online]. 2004 [cited 2013-03-10]. Available from http://www.botanika.upol.cz/atlasy/anatomie/anatomieCR47.pdf

[14] SANCHOLLE, M., WEETE, J., et al. Effects of triazoles on fungi: I. Growth and cellular permeability. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1984, vol. 21, no. 1, p. 31–44.

[15] Fomová suchá hniloba, 2011. Syngeta.com. Avaiablehttp://www.syngenta.com/country/cz/cz/reseni-syngenta/choroby/Pages/fomova-sucha-hniloba.aspx

[16] Agromanuál. *Agramanual.cz: Vše o přípravcích na ochranu rostlin* [online]. 2003 [cited 2013-03-10]. Avaiable from http://www.agromanual.cz/cz/pripravky/insekticidy/insekticid/mospilan-20-sp.html

[17] SUMIAGRO CZECH. *Bezpečnostní list*. 4.3.2004. Dostupné z: agromanual.cz

[18] MUSIL, B. ČR - Státní rostlinolékařská správa: SEKCE PŘÍPRAVKŮ NA OCHRANU ROSTLIN ODBOR POSTREGISTRAČNÍ KONTROLY. *Spotřeba - účinné látky v roce 2011* [online]. 2012 [cit. 2013-03-10]. Available from http://eagri.cz/public/web/file/162025/spotreba_UL_2011.pdf

[19] *Osud prostředků pro ochranu rostlin v potravním řetězci člověka: Vědecký výbor fytosanitární a životního prostředí*. Edited by Hajšlová, J., Kocourek, V. 2004.

[20] Pesticidy. *Arnika* [online]. 2010 [cited 2012-04-21]. Available from http://arnika.org/pesticidy

[21] KRUPKE, C. *Multiple Routes of Pesticide Exposure for Honey Bees Living Near Agricultural Fields*. 2012, č. 7, s. 1. DOI: 10.1371/journal.pone.0029268.

[22] GREIG-SMITH, P., THOMPSON, H. Incidents of poisoning of honeybees (Apis mellifera) by agricultural pesticides in Great Britain 1981–1991. *Crop Protection*, 2012, vol. 13, p. 567–581..

[23] REETZ, J., ZUEHLKE, S. Neonicotinoid insecticides translocated in guttated droplets of seed-treated maize and wheat: a threat to honeybees? *Apidologie*, 2011, vol. 42, no. 5, p. 596–606.

[24] Šlo o zcela zanedbatelné množství, tvrdí o nalezených pesticidech výrobce biomedu. *Ekolist.cz* [online]. 2012 [cited 2013-03-08]. Available from

http://ekolist.cz/cz/zpravodajstvi/zpravy/slo-o-zcela-zanedbatelne-mnozstvi-tvrdi-o-nalezenych-pesticidech-vyrobce-biomedu.

[25] VONDRÁŠKOVÁ, Š. Revize výzkumu vlivu neonikotinoidů na včely. *Agronavigator.cz* [online]. 2012 [cited 2013-04-07]. Available from http://www.agronavigator.cz/service.asp?act=email&val=119551 .

[26] PETŘÍKOVÁ, M. *Enviromentální pozadí golfových hřišť. Green jako potenciální hrozba: Diplomová práce*. Brno: Masarykova univerzita v Brně, 2010.. Vedoucí práce vedoucí práce: Ing. Zbyněk Ulčák, Ph.D.

[27] ARMSTRONG, D. Pesticide is costly for bees, then birds, then?. *Earthtimes.org* [online]. 2013 [cited 2013-04-07]. Available from http://www.earthtimes.org/pollution/pesticide-costly-bees-birds/2298/ .

[28] VELÍŠEK, J. Rezidua pesticidů ve vodách a jejich vliv na ekosystémy povrchových vod a chov ryb. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích* [online]. 2013 [cited 2013-02-19]. Available from http://www.rostlinolekari.cz/pages/23_velisek.pdf .

[29] HEČA, R. *Akumulace rizikových látek u ryb: Bakalářská práce*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008. Vedoucí práce prof. Ing. Stanislav Kráčmar, DrSc.

[30] ŠUTA, M. Opatrně s pesticidy. *Ekolist.cz* [online]. 2009 [cited 2013-03-08]. Available from http://ekolist.cz/cz/publicistika/nazory-a-komentare/opatrne-s-pesticidy.

[31] ŠNITA, D., et al. *Chemické inženýrství*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2006. 318 p. ISBN 80-7080-589-7.

[32] OPEKAR, F., JELÍNEK, I. *Základní analytická chemie: Učební texty Univerzity Karlovy v Praze*. Praha: Karolinum, 2003. ISBN 80-246-0553-8.

[33] *Extrakce,* 2013. [online]. Pedagogická fakulta Masarykovy univerzity. [cited 2013-03-10]. http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech-old/soubory/operace/separacni_metody/extrakce.pdf

[34] ŠTULÍK, K. *Analytické separační metody: Učební texty Univerzity Karlovy v Praze*. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-0852-9.

[35] ZBRANKOVÁ, V. *Extrakce pevným sorbentem*. [online]. UTB. [cited 2013-03-10] Available from uiozp.ft.utb.cz/studmat/.../Extrakce_pevnym_sorbentem.doc

[36] LUQUE DE CASTRO, M. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *J. Chromatogr., A*, 2010, vol. 1217, no. 16, p. 2383–2389. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.11.027.

[37] VALENTOVÁ, E. Moderní separační metody. *Chempoint.cz* [online]. 2012 [cited 2013-03-11]. Available from http://www.chempoint.cz/moderni-separacni-metody

[38] WIEST, L., BULETÉ, A., et al. Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. *J. Chromatogr., A*, 2011, vol. 1218, p. 5743–5756. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.06.079.

[39] QuEChERS. In: *Sigmaaldrich* [online]. 2013. vyd. [cited 2013-02-7]. Available from http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/55228u?lang=en&region=CZ

[40] DASHTBOZORG, Z., RAMEZANI, M., et al. Optimization and validation of a new pesticide residue method for cucumber and tomato using acetonitrile-based extraction-dispersive liquid–liquid microextraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*, 2012, , no. 5, p. 1192–1198. DOI: 10.1039/C2AY26287H.

[41] BRAGANÇA, I., PLÁCIDO, A., et al. QuEChERS: A new sample preparation approach for the determination of ibuprofen and its metabolites in soils. *Sci. Total Environ.*, 2012, vol. 433, p. 281–289.

[42] CHUCHVALEC, P., NOVÁK, J., et al. Kritické veličiny látek a jejich predikace. *Chemické listy*, 2007, vol. 101, p. 989–993.

[43] DUROVIC, R., DORDEVIC, T., et al. Modern Extraction Techniques for Pesticide Residues Determination in Plant and Soil Samples. In STOYTCHEVA, M. (ed.). *Agricultural and Biological Sciences*. Srbsko: Institute of Pesticides and Environmental Protection, Belgrade, 2011, p. 221–233.

[44] KIRCHNER, M., MATISOVÁ, E. Súčasné metódy a nové trendy v izolácii rezíduí pesticídov. *Chemické listy*, 2003, vol. 98, p. 396–405.

[45] SCHWARTZ, M. UPLC™: An Introduction and Review. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 2007, vol. 28, no. 7-8, p. 1253–1263. DOI: 10.1081/JLC-200053046.

[46] HPLC.cz. ČESKÁ CHROMATOGRAFICKÁ ŠKOLA - HPLC. *Chromatografické fórum - HPLC* [online]. 1999-2013 [cited 2013-04-19]. Available from http://www.hplc.cz/

[47] GERVAIS, G., BROSILLON, S., et al. Ultra-pressure liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry for multiresidue determination of pesticides in water. *J. Liq. Chromatogr.*, 2008, vol. 1202, no. 2, p. 163–172.

[48] CVAČKA, J. Detekce ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii.. *Web.natur.cuni.cz* [online]. 2010 [cited 2013-05-09]. Available from http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc3.pdf .

[49] COUFAL, P. High performance liquidchromatography.. *Web.natur.cuni.cz* [online]. 2004 [cited 2013-05-08]. Available from http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html .

[50] HUTOVÁ, E. *Matematická analýza v hmotnostní spektrometrii.: Bakalářská práce*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, 2010. 53 p.Vedoucí bakalářské práce Ing. Martin Valla.

[51] HOLČAPEK, M., JANDERA, P. Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). *Chemické listy*, 1998, vol. 92, p. 278–286.

[52] POUSTKA, J. Hmotnostní spektrometrie. *vscht.cz* [online]. 2007 [cited 2013-05-09]. Available from http://web.vscht.cz/poustkaj/ISM%20MS%20PRINCIP%20A%20IONIZACE%20%20102007.pdf .

[53] HOLČAPEK, P. Ionizační techniky. *upce.cz* [online]. 2013 [cited 2013-05-09]. Available from http://holcapek.upce.cz/teaching/02_IonizacniTechniky.pdf .

[54] Základy hmotnostní spektrometrie. *Pmfhk.cz* [online]. [cited 2013-05-09].Available from http://www.pmfhk.cz/Prednasky/Hmotnostni_spektrometrie_08.pdf

[55] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Šenov: Pavel Klouda, 2003. 132 p. ISBN 80-86369-07-2.

[56] ZACHAŘ, P., SÝKORA, D. Plynová chromatografie. *vscht.cz* [online]. [cited 2013-05-09]. Available from http://www.vscht.cz/anl/lach2/GC.pdf .

[57] BRZOBOHATÁ, A. *Forenzní zhodnocení monitorování hladin citalopramu, zolpidemu a mirtazapinu.: Disertační práce*. Brno: Masarykova univerzita v Brně, 2009. Vedoucí práce Prof. MUDr. Miroslav Hirt, CSc.

[58] SUN, F. Electron Ionization. *School of Chemical Science* [online]. [cited 2013-05-16]. Available from http://scs.illinois.edu/massSpec/ion/ei.php .

[59] GRULICHOVÁ, E. *2D mapování otolitů metodou LA-ICP-MS.: Diplomová práce*. Brno: Masarykova univerzita v Brně, 2011. Vedoucí práce Mgr. Markéta Holá, Ph.D.

[60] MILDE, D. Hmotnostní spektrometrie. *upol.cz* [online]. 2003-2010 [cited 2013-05-17]. Available from http://ach.upol.cz/user-files/intranet/10-im-ms-1352292974.pdf .

[61] LIU, X., LI, Q., et al. Determination of Prochloraz Residues in Mushroom with Solid Phase Extraction-High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Analytical Science*, 2008, vol. 24, no. 6, p. 735–737. ISSN 1004-4957.

[62] GARCIA, J., GILBERT-LOPEZ, A., et al. Determination of pesticide residues in fruit-based soft drinks. *Anal. Chem.*, 2008, vol. 80, no. 23, p. 8966–8974. DOI: 10.1021/ac8012708.

[63] SONG, S., ZHU, R. Determination of chlorothalonil, propiconazole, hexaconazole, azoxystrobin and β-cypermethrin in groundwater by gas chromatogramy with elektron captured etector.. *Rock and Mineral Analysis*, 2011, vol. 30, no. 2, p. 174–177. ISSN 0254-5357.

[64] ESSUMANG, D., TOGOH, G., et al. Pesticide residues in the water and fis (Lagoon Tilapia) samples from lagoon in Ghana. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, 2009, p. 19–27. ISSN 1011-3924.

[65] BÜTTLER, B. Gas Chromatographic Determination of Propiconazole and Etaconazole in Plant Material, Soil, and Water. *J. Agric. Food Chem.*, 1983, vol. 31, no. 4, p. 762–765. DOI: 10.1021/jf00118a021.

[66] VALENT U.S.A. CORPORATION DETERMINATION OF cis- AND trans-METCONAZOLE IN CROPS. *Valent technical center* [online]. 2003 [cited 2013-03-06]. Available from http://ir4.rutgers.edu/Other/Analytical_Methods/Metconazole_V10116-01.pdf .

[67] VUKOVIC, G., SHTEREVA, D., et al. Application of GC–MSD and LC–MS/MS for the determination of priority pesticides in baby foods in Serbian market. *LWT - Food Science and Technology*, 2010, vol. 49, no. 2, p. 312–319.

[68] YAMAMOTO, A., HISATOMI, H., et al. Evaluation of river pollution of neonicotinoids in Osaka City (Japan) by LC/MS with dopant-assisted photoionisation.. *Journal of Environmental Monitoring*, 2011, vol. 14, no. 8, p. 2189–2194. ISSN 1464-0325.

[69] HU, B., CAI, H., et al. Determination of eight pesticide residues in tea by liquid chromatography-tandem massspectrometry and its uncertainty evaluation.. *Se Pu*, 2012, vol. 30, no. 9, p. 889–895. ISSN 1000-8713.