

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



Analýza pesticidů v potravinách

Diplomová práce

Autor: Lukáš Merta

Studijní program: N1407

Studijní obor: Analytická chemie

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

Typ studia: Prezenční

Termín odevzdání práce: 22. 4. 2016

Poděkování

Děkuji vedoucímu své diplomové práce doc. RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D. za odborné rady, připomínky, trpělivost a čas, které mi při práci na mé diplomové práci poskytl.

Prohlášení

Já, Lukáš Merta, prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci použil, jsou v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne

.....

podpis

Souhrn

Předložená diplomová práce se v teoretické části zabývá problematikou reziduí pesticidů v potravinách a to jak z oblasti chemické, tak i z oblasti kontaminace životního prostředí a potravin. Vyšší pozornost je věnována skupině fenoxxy herbicidů a vybraných chemických analogů. Skupina fenoxxy herbicidů byla vybrána z důvodu, že se jedná o jednu z nejčastěji používaných skupin herbicidů. Experimentální část je zaměřena na porovnání dvou metod úpravy vzorků. Srovnávanými metodami je extrakce kapalina-kapalina a modifikovaná metoda QuEChERS. Vyšší výtěžky poskytla metoda QuEChERS, která je v další části použita pro úpravu reálných vzorků. Následná detekce probíhá pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.

Summary

Teoretical part deals with issues of pesticide residues in food from field of chemical and enviromental. More attention is paid to group of phenoxy herbicides. Group of phenoxy herbicides was chosen because it is one of the most commonly used group of herbicides. Experimental part is focused on compare two methods treatment of samples. Methods to compare are liquid-liquid extraction and QuEChERS. Higher yields provided the method QuEChERS which is used for treatment of real samples. Mentioned compounds were analysed with the aid of GC-MS.

Obsah

1	Úvod	1
2	Pesticidy	1
2.1	Historie pesticidů	2
2.2	Rozdělení pesticidů	3
3	Biopesticidy	5
3.1	Srovnání biopesticidů s konvenčními pesticidy	7
4	Složení pesticidních přípravků	7
4.1	Účinné látky	7
4.1.1	Glyfosáty	8
4.1.2	Pyrethroidy	9
4.1.3	Organofosforové pesticidy	9
4.1.4	Karbamáty	10
4.1.5	Dinitroanilinové pesticidy	11
4.1.6	Močovinnové pesticidy	12
4.1.7	Triazinové pesticidy	12
4.1.8	Fenoxy alkanové kyseliny	12
4.2	Adjuvanty	15
4.3	Klasifikace adjuvantů	16
4.3.1	Surfaktanty	17
4.3.1.1	Ionogenní	18
4.3.1.1.2	Sulfáty	18
4.3.1.1.3	Sulfonáty	19
4.3.1.1.4	Karboxyláty	19
4.3.1.1.5	Fosfáty	19
4.3.1.1.6	Kationtové surfaktanty	20
4.3.1.1.7	Amfoterní	20
4.3.1.2	Neionogenní	20
4.3.2	Adjuvanty na bázi olejů	21
4.3.3	Adjuvanty na bázi minerálních látek	21
4.3.4	Barviva	22
4.3.5	Protiúletové přísady	22
4.3.6	Pěnicí přísady	22

4.3.7	Vodu upravující přísady	22
4.3.8	Přísady zajišťující snášenlivost (kompatibilitu)	22
4.3.9	pH adjuvanty	23
4.3.10	Protipěnění přísady	23
4.3.11	UV absorbenty	23
5	Formulace pesticidů	23
6	Rezidua pesticidů v životním prostředí a potravinách	24
6.1	Kontaminace životního prostředí	24
6.2	Kontaminace potravin	26
6.3	Rezidua pesticidů v potravinách	26
6.3.1	Výskyt reziduí pesticidů v potravinách v České republice	28
7	Fyzikální vlastnosti pesticidů	29
7.1	Rozpustnost ve vodě	29
7.2	Relativní molekulová hmotnost	30
7.3	Biokoncentrační faktor (BCF)	30
7.4	Rozdělovací koeficient v systému oktanol/voda	31
7.5	Půdní adsorpční koeficient	32
7.6	Tenze par	33
8	Chemické vlastnosti pesticidů	34
8.1	Fotolýza	34
8.2	Oxidačně-redukční reakce pesticidů	36
8.3	Hydrolyza pesticidů	37
8.4	Biodegradace	38
9	Stanovení reziduí pesticidů v potravinách	38
9.1	Derivatizace	40
9.2	Extrakce kapalina-kapalina	44
9.3	QuEChERS	47
9.3.1	Techniky QuEChERS	50
10	Aplikace QuEChERS technik	52
11	Experimentální část	54
11.1	Pracovní pomůcky	54
11.2	Chemikálie	54
11.3	Použité extrakční techniky při stanovení chlorfenoxy pesticidů a vybraných kyselin	55

11.4	Postup jednotlivých extrakčních technik	55
11.5	Instrumentace	56
12	Výsledky	57
12.1	Analýza standardů	57
12.2	Výtěžnost	58
12.3	Analýza reálných vzorků	59
12.4	Analýza imidaclopridu ve vzorku kukuřice	61
12.5	Analýza fenopropu a dichloropropu ve vzorku hroznového oleje odrůdy Pálava	61
12.6	Kvantifikace	62
12.6.1	Kvantifikace imidaclopridu ve vzorku kukuřice	62
12.6.2	Kvantifikace dichloropropu ve vzorku hroznového oleje odrůdy Pálava	64
12.6.3	Kvantifikace fenopropu ve vzorku hroznového oleje odrůdy Pálava	66
13	Diskuse	68
14	Závěr	72
15	Seznamy	73
16	Bibliografie	75

1 Úvod

Potraviny jsou nezbytné pro život. Mnoho lidí po celém světě trpí nedostatkem potravin. V západním světě tento problém není, a proto pozornost lidí západního světa je zaměřena při výběru potravin spíše než na kvantitu, na jiné faktory. Tyto faktory zahrnují cenu potravin, jednoduchost přípravy, čas nutný k přípravě potravin, vzhled, výživovou hodnotu a zdravotní hledisko. V minulosti mnoho lidí neposuzovalo zdravotní hledisko potravin jako kritérium výběru. Dnes se tento trend obrátil a stále více lidí se při výběru potravin ohlíží především na zdravotní aspekt. Pozornost zejména směřuje k pesticidním látkám v potravinách. Každým rokem světové organizace informují o stále se zvyšující spotřebě těchto látek v zemědělství. Veřejné mínění se proto stále častěji ptá „Jsou potraviny ještě bezpečné?“ Dnes existuje mnoho studií potvrzujících negativní účinky pesticidních látek na lidské tělo. Nutností je proto zvýšit pozornost k rizikům spojeným s používáním pesticidních látek, a to jak z hlediska lidské populace, tak z hlediska životního prostředí. Pozornost je v současnosti věnována studiím, které stanovují maximální přijatelné množství těchto látek v potravinách, aniž by došlo ke zvýšení zdravotních rizik. Výzkum také stále pracuje na vývoji jejich méně škodlivých alternativ.

2 Pesticidy

Anglické slovo „pesticide“ vzniklo složením dvou slov. Jednak anglickým slovem „pest“, což v překladu znamená škůdce a latinským „caedere“, které znamená zabíjet, jehož jeden slovesný tvar je „cida“.

Jsou to látky nebo směsi látek používaných pro odpuzení, potlačení nebo zahubení škůdců. Pesticidy mohou být jednak umělé připravené chemikálie organické nebo anorganické povahy ale také například různé živé organismy (houby, bakterie).

Mezinárodně uznávaná definice Organizace pro výživu a zemědělství definuje pesticidy jako látky nebo směsi látek sloužící k prevenci, hubení či zvládnutí různých organismů, které způsobují škody v průběhu výroby, zpracování, uskladňování či přepravy zemědělských komodit [1].

Možností aplikace pesticidů je mnoho. V dnešní době se staly nedílnou součástí intenzivního zemědělství a lesnictví. Jednak se aplikují přímo na zemědělských plochách, ale také například v oblasti skladování a zpracování zemědělských a lesnických produktů.

Uplatnění našly i v oblasti veterinární a humánní, kde působí proti organismům škodícím zvířatům a lidem. Avšak s jejich používáním je spojeno mnoho problémů. Při jejich aplikaci dochází k neúmyslnému rozšíření i do oblasti mimo cílový prostor. Kontaminaci podléhají všechny složky biosféry (voda, půda, ovzduší, živočichové).

2.1 Historie pesticidů

První zmínka o použití pesticidů pochází z doby 4500 let před naším letopočtem. V té době Sumerové využívali rozprašování elementární síry jako účinný insekticid. Další zmínka pochází z Číny, kdy okolo roku 3200 před naším letopočtem byly používány sloučeniny rtuti a arsenu pro hubení vši. V antickém Řecku se často farmáři potýkali s plísněmi, které napadaly jejich úrodu. Často proto spalovali různé materiály na návětrné straně, aby kouř byl pomocí větru vháněn do sadů či polí. Spalovali především hnůj, slámu nebo také ryby či kraby. Proti lezoucímu hmyzu požírajícímu úrodu oliv mazali kmeny stromů dehtem. Zatímco proti plevelným rostlinám bojovali postřikem z mořské vody.

Používanými pesticidy do roku 1940 byly především látky anorganického původu dostupné z přírodních zdrojů. Pesticidy organického původu byly spíše vedlejšími produkty při výrobě svítiplynu. Anorganické pesticidy se vyznačovaly velkým rozsahem použití, avšak disponovaly nižší selektivitou a fytotoxicitou.

Používání organických pesticidů koresponduje s rozvojem chemie, která významně transformuje společnost od 50. let minulého století. V poválečné době došlo k výraznému růstu populace. Tento růst sebou přinesl potřebu navýšit výrobu potravin. Jednou z možností bylo zvýšit zemědělskou plochu, avšak tato možnost měla již tenkrát své limity. Druhou možností bylo zvýšení úrody na stávající zemědělské ploše. Toho bylo dosaženo aplikací organických pesticidů. Organické pesticidy umožnily významně zvýšit produkci potravin, zisky farmářům a také posloužily jako ochrana proti nemocem. Příkladem může být rok 1945, kdy v Africe vypukla epidemie malárie. Přenašeči této nemoci byly infikovaní moskyti. Jejich usmrcením aplikací pesticidů bylo zabráněno v dalším šíření malárie. 50. léta minulého století byla také dobou, kdy se spotřebitelé a politikové příliš neznepokojovali potenciálními riziky, která doprovázela používání pesticidů. Tato poválečná doba sebou přinesla i jeden z nejznámějších pesticidů a to DDT. Chemickým názvem se jedná o 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorfenyl)ethan. Jako účinný insekticid byl identifikován chemikem Paulem Hermannem Müllerem poprvé v roce 1939. Paul Hermann Müller získal za objevení jeho insekticidních vlastností roku 1949 Nobelovou cenu. K jeho širšímu použití došlo v roce 1944 a do konce

60. let minulého století již celosvětová roční produkce přesáhla 2 miliony tun. V dalších letech byla zjištěna vysoká perzistence této látky v organismech i životním prostředí a proto bylo její používání ve vyspělých zemích zakázáno. Roku 1974 vešel v platnost zákaz používání DDT v Československu. Nicméně i dnes se u nás tato látka nachází v životním prostředí. Je to dáno zejména vysokou perzistencí vlastní účinné látky (DDT) tak i jeho metabolitem (DDE). Od 80. let již celosvětově platí pravidla a omezení týkající se používání pesticidů. Výzkum především směřuje k hledání pesticidů s vyšší selektivou a nižší perzistencí. Potřeba aplikační dávky na ha se snížila z kilogramu na pouhé gramy. Další vývoj jak snížit spotřebu konvenčních pesticidů se zaměřuje na zvýšení účinnosti stávajících pesticidů nebo jejich nahrazením biopesticidy, kterým bude věnována pozornost dále v textu.

2.2 Rozdělení pesticidů

Pesticidy je možné dělit podle několika hledisek. Podle původu, podle účinku účinné látky, podle selektivity účinku, podle toxicity, podle místa působení účinné látky, podle cílových organismů, podle chemické struktury, podle aplikační formy, podle molekulového mechanismu účinku, podle nebezpečnosti dle WHO.

Jedno z tradičních hledisek pro rozdělení pesticidů je jejich dělení podle původu na přírodní a syntetické. Mezi přírodní pesticidy patří živé organismy nebo jejich metabolické produkty. Jako příklad může posloužit rostlinný alkaloid nikotin obsažený v listech tabáku. Z listů získaný olej působí jako velmi účinný insekticid [2]. Syntetické pesticidy jsou vyráběny uměle, často jsou strukturálně podobné přírodním látkám. I přes jejich strukturální podobnost nesmí být používány v případě ekologického zemědělství [3].

Účinek účinné látky pesticidů může být přímý a nepřímý. Například v případě herbicidů s přímým kontaktním účinkem odumře pouze ta část rostliny, která se dostala do kontaktu s herbicidem. K pesticidním látkám používaným v ochraně rostlin jsou často přiřazovány i látky s nepřímým pesticidním účinkem. Řadí se sem deterenty (látky zabraňující požeru, inhibující příjem potravy), repelenty (látky odpuzující hmyz), atraktanty (látky působící jako feromony, které lákají hmyz do likvidačních pastí) a také například různé regulátory růstu rostlin.

Důležité je také dělení podle selektivity účinku. Rozlišují se pesticidy selektivní a širokospektrální (totální). Pesticidy se selektivním účinkem působí pouze na určité druhy organismů. Zatímco širokospektrální působí na všechny zasažené organismy.

Jiným kritériem pro dělení je toxicita. Toxicita je vlastnost chemické látky, která se vztahuje k míře schopnosti chemické látky být jedovatou. Pojem jed definoval „otec“ toxikologie Paracelsus. Jeho definice zní „Každá látka může být jedem, závisí jen na dávce“. Podle receptorové teorie je předpokladem toxického účinku dané látky vznik vazby mezi danou látkou a receptorem. Pokud vazba mezi látkou a receptorem je reverzibilní povahy, řadí se látka mezi jedy koncentrační. Intenzita toxického účinku stoupá s počtem obsazených receptorů, je tedy úměrná dávce. V druhém případě vazba mezi látkou a receptorem může být ireverzibilní povahy. V tomto případě se dané látky řadí mezi jedy sumační. Toxický účinek má aditivní charakter. Účinky jednotlivých expozic se sčítají. Vyšší a jednorázové dávky způsobují akutní či smrtelné otravy. Při podání nízkých opakovaných dávek se projevují především jejich karcinogenní účinky [4].

Důležitým kritériem pro rozdělení pesticidních látek je dělení podle místa působení účinné látky. První skupinu představují kontaktní pesticidy. Účinná látka v tomto případě neproniká do organismu, ale zůstává na povrchu a působí pouze v místě aplikace. Další skupinou jsou látky se systémovým působením, kdy účinná látka proniká do organismu a navíc působí i mimo místo aplikace. Existují však i pesticidy obsahující současně účinné látky s kontaktním i systémovým účinkem. Účinná látka může působit i mezostemicky. U této skupiny účinná látka proniká do svrchní části rostlin, ale oproti systémovým pesticidům neproniká již do dalších částí organismu.

Podle cílového škůdce, na kterého má účinná látka působit, lze pesticidy klasifikovat do mnoha skupin. Patří sem skupiny jako například herbicidy, jejichž cílovým organismem jsou rostliny, insekticidy (hmyz), akaricidy (roztoci) a další.

Z chemického hlediska pesticidní látky představují širokou skupinu látek. Základním kritériem pro jejich rozdělení podle chemické struktury je, zda se jedná o organické nebo anorganické látky. Základ molekulární struktury organických pesticidů představuje uhlík. Organické pesticidy jsou z chemického hlediska více komplexní látky, než je tomu v případě anorganických pesticidů. Ty jsou často strukturně jednodušší sloučeniny a oproti organickým většinou snadno rozpustné ve vodě. S rozpustností ve vodě souvisí také jejich environmentální perzistentnost, která je proto v případě organických pesticidů mnohem vyšší.

Pesticidy je možné dále dělit podle chemické struktury. Nicméně chemická struktura sama o sobě ještě nevyovídá o pesticidním účinku. Například zástupci organofosforových pesticidů mohou působit jako desikanty (merfos), nebo jako insekticidy (DDT, aldrin).

Důležitou podmínkou pro optimální účinek aplikovaných pesticidů je nutnost zvolit vhodnou formu aplikace pesticidů. Jedná se například o tablety různě rozpustné ve vodě, práškové přípravky, kapalné koncentráty a další. Podrobnější informace jsou uvedeny dále v textu.

Posledním kritériem v této práci je dělení podle Světové organizace pro výživu a zemědělství, FAO. Tato organizace dělí pesticidy do pěti tříd podle jejich nebezpečnosti. Podrobná tabulka je v příloze.

3 Biopesticidy

Biopesticid neboli biologický pesticid může být látka přírodního původu, mikroorganismus nebo látka produkovaná geneticky modifikovanou rostlinou [5]. Ve srovnání s konvenčními pesticidy se biopesticidy vyznačují vysokou specifitou vůči škůdcům. Tato specifita tedy minimalizuje možnost nežádoucího působení na jiné organismy. Biopesticidní látky jsou často produkované mikroorganismy nebo rostlinami jako produkty jejich metabolismu. Často jsou součástí obranných mechanismů a vyznačují se toxicitou či patogenitou vůči dané skupině škůdců [6]. Hlavním cílem při vývoji biopesticidů je snaha o přenesení těchto látek z oblastí jejich přirozeného výskytu na jiné cílové plodiny. K přenesení například dochází extrakcí těchto látek z původních organismů a jejich následnému rozprášení v cílové oblasti. Dalšími možnostmi může být buď výsadba rostlin s biopesticidními účinky v požadované lokalitě nebo genetická modifikace cílové rostliny. Geneticky modifikované rostliny jsou již samy schopny produkovat biopesticidní látky [7] [8].

Biopesticidy lze dělit do tří hlavních skupin:

1. Pesticidy mikrobiální povahy – aktivní složku představují např. viry, bakterie, houby. Příkladem mikrobiálního insekticidu jsou bakterie druhu *Bacillus thuringiensis*. Metabolický produkt těchto bakterií je prekurzorem toxinu, tzv. protoxin. Toxin představuje aktivní pesticidní látku. K přeměně protoxinu na toxin dochází například v trávicím traktu housenek jen za splnění optimálních podmínek. V tomto případě se jedná o alkalické prostředí a nutností je

přítomnost specifických proteáz a střevní mikroflóry. Tyto podmínky představují významnou specifitu k daným škůdcům. Mechanismus působení lze vysvětlit navázáním toxinu na střevní epitelové buňky. Epitelové buňky k sobě těsně přiléhají a tvoří epitelovou tkáň, která má krycí funkci vnitřních orgánů, v tomto případě střeva. Navázáním toxinu na střevní epitelové buňky vznikají v epitelu membránové kanálky, kterými uniká ATP. Tento proces vede ke snížení buněčného metabolismu, k hladovění, dehydrataci a smrti housenky [9] [7].

2. Geneticky modifikované rostliny – aktivní složka je produkována samotnou rostlinou. Genetickou modifikací se rostliny stávají odolnější proti nepříznivému klimatu, mají lepší nutriční hodnoty, ale také jsou odolnější proti škůdcům nebo nežádoucímu působení neselektivních pesticidů. Aby byla rostlina schopná samostatné produkce pesticidní látky, je nutno do jejího genomu vložit gen cizí [10].

Nejčastěji geneticky modifikovanou plodinou je kukuřice. Je také jedinou pěstovanou GMO plodinou schválenou EU k potravinářským účelům. Typickým škůdcem kukuřice je zavíječ kukuřičný. Ve stéblech a palicích kukuřice vytváří kruhové otvory a chodby. Takto napadená rostlina je náchylnější k plesnivění a snadno se láme. Ke zvýšení odolnosti proti tomuto škůdci byl do genomu kukuřice vložen cizí gen kódující produkci jedu. Takto geneticky modifikovaná kukuřice je schopna sama produkovat jed s insekticidními účinky pro specifické hmyzí škůdce.

Jiným příkladem je odrůda Golden Rice, geneticky modifikovaná rýže. Genetickou modifikací byla zlepšena odolnost proti škůdcům a nemocem, ale bylo také upraveno nutriční složení. Oproti přírodní rýži odrůda Golden Rice obsahuje vyšší obsah železa a beta-karotenu, který je prekurzorem vitamínu A [11] [10].

3. Pesticidy biochemické povahy – aktivní složku tvoří látky přírodního původu, které nemají toxický účinek na škůdce. Touto vlastností se liší oproti konvenčním pesticidům, které působí přímo na škůdce. K této skupině biopesticidů patří například hmyzí sexuální feromony nebo extrakty z rostlin vábící škůdce do pastí. Z těchto dvou příkladů lze vidět, že se jedná o látky

přírodního původu. Tyto látky se vyznačují snadnou degradovatelností a nízkou toxicitou. Na druhou stranu získání biochemických pesticidních látek je značně složitější než u látek získaných syntetickou cestou. Jejich cena je proto značně vyšší. Výzkum v této oblasti cílí k výrobě biochemických pesticidů syntetickou cestou [5] [9] [7].

3.1 Srovnání biopesticidů s konvenčními pesticidy

Jak již bylo uvedeno výše, hlavními výhodami biopesticidů je jejich vyšší selektivita a netoxicity pro necílové organismy. Z těchto důvodů se řadí mezi alternativy místo problematických konvenčních pesticidů. Na druhou stranu jejich složitější získávání podstatně zvyšuje cenu. Negativum také představuje jejich nižší biologický účinek. V případě GMO plodin je komplikace ještě složitější vlivem negativního postoje veřejného mínění. Veřejnost často poukazuje na nedostatečný výzkum vlivů GMO plodin na životní prostředí. Modifikací se rostliny často stávají odolnější k přežití v nehostinných podmínkách a to může vést k jejich nežádoucímu rozšíření i do necílových oblastí. V těchto oblastech se mohou chovat jako invazní plevelné rostliny. Dalším argumentem je možnost úniků genů křížením s planými druhy rostlin a tím narušení biodiverzity [5].

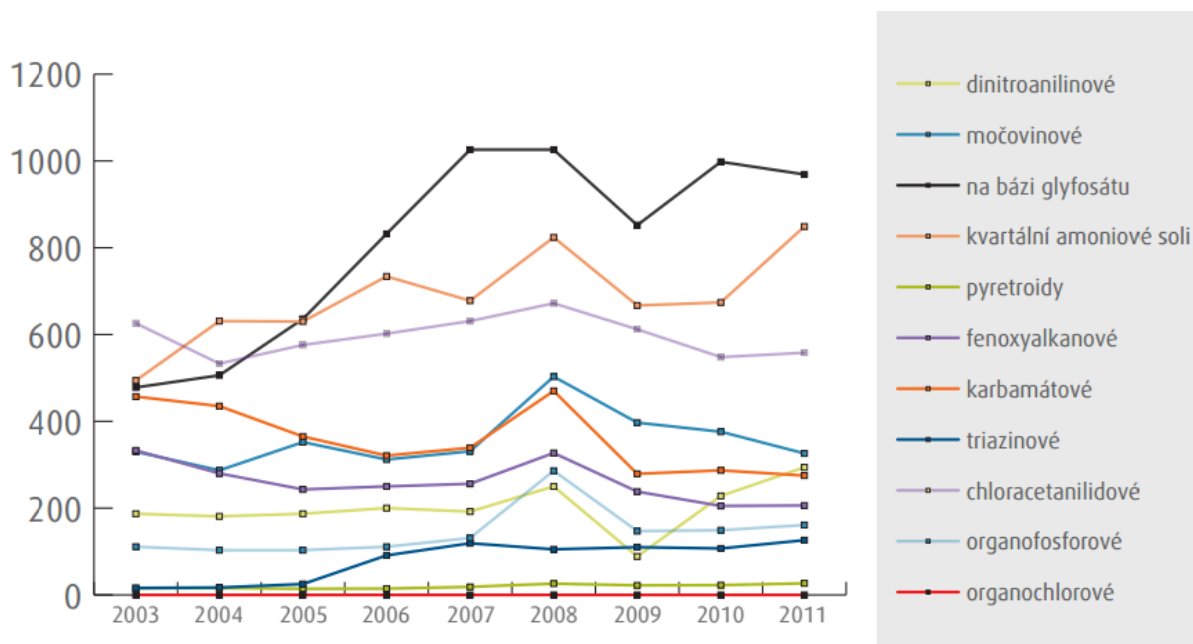
4 Složení pesticidních přípravků

Pesticidní přípravky obsahují tři základní složky. První z nich je účinná látka, která může být přítomna v pesticidním přípravku sama nebo ve směsi s dalšími účinnými látkami. Druhou je inertní složka a třetí složku tvoří adjuvanty. Hlavní funkce inertní složky a adjuvantu spočívají především v zachování stability a bezpečnosti přípravku při skladování či manipulaci, zlepšení dispergačních vlastností, zajištění dokonalého rozptýlení účinné látky a umožnění jednoduchého dávkování.

4.1 Účinné látky

Účinná látka jako jedna ze tří hlavních složek pesticidních přípravků představuje složku s pesticidním účinkem. V současnosti je v celosvětovém měřítku registrováno více než 800 účinných látek. V České republice se z tohoto počtu používá přibližně 250. Vývoj spotřeby účinných látek pesticidů podle chemické struktury ukazuje obrázek č. 1. Z dat lze vidět, že k dlouhodobě nejpoužívanějším skupinám účinných látek pesticidů patří glyfosáty, kvarterní amoniové soli, chloracetanilidové sloučeniny, močovinné pesticidy, karbamáty, sloučeniny

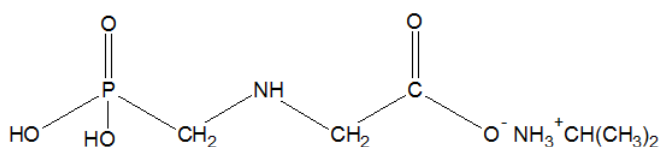
na bázi fenoxycetové kyseliny, organofosfáty a triazinové pesticidy. Chemické struktury a vlastnosti vybraných skupin účinných látek pesticidů budou popsány dále.



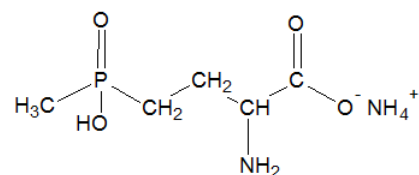
Obrázek 1: Přehled spotřeby pesticidních látek v letech 2003-2011 [12].

4.1.1 Glyfosáty

Z chemického hlediska se jedná o deriváty glycinu. Patří sem dvě sloučeniny a to glyfosát a glufosinát. Komerčně jsou dostupné ve formě solí: glyfosát jako isopropylamoniová sůl (obrázek č. 2a) a glufosinát ve formě amonné soli (obrázek č. 2b). Používají se jako širokospektré herbicidy s perzistencí okolo 14 dní. Mechanismus působení spočívá v inhibici enzymu EPSPS, z chemického hlediska se jedná o 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntázu. Uvedený enzym se podílí na biosyntéze aromatických aminokyselin. Jeho zablokováním dochází k narušení tvorby bílkovin [13] [12].



a)

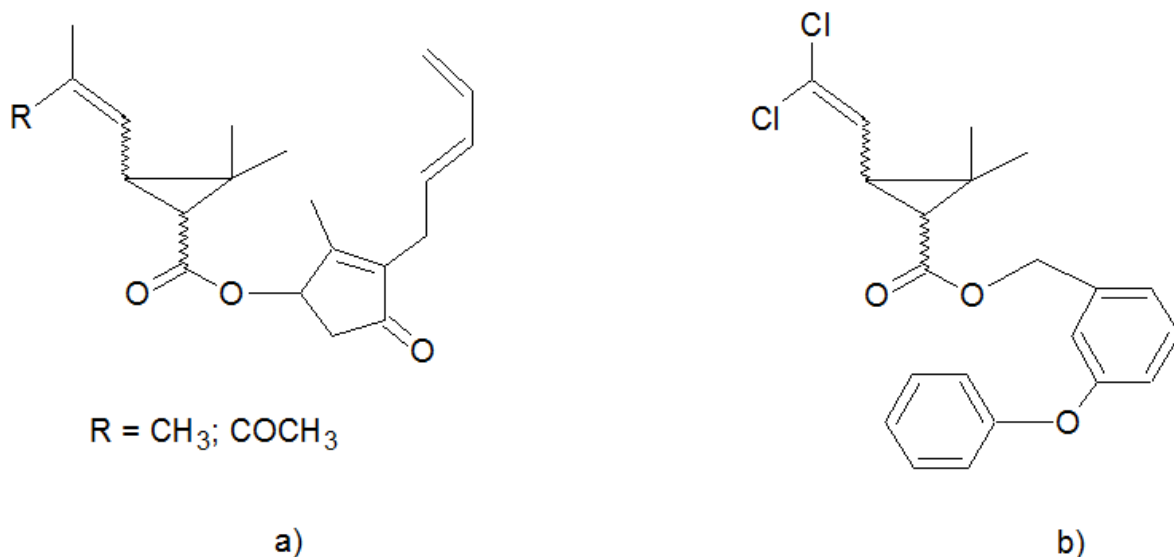


b)

Obrázek 2: Chemická struktura a) glyfosátu; b) glufosinátu.

4.1.2 Pyrethroidy

Pyrethroidy jsou syntetické sloučeniny strukturně podobné přírodním rostlinným pyrethrinům. Pyrethriny představují skupinu 2 sloučenin (obrázek č. 3a), vyskytují se v dalmátské chryzantémě někdy také nazývané jako dalmátská řimbaba. Výtažky těchto látek se používaly jako insekticidy již ve staré Persii přibližně v 5. století př. n. l. Syntetické pyrethroidy se dnes používají jako účinné insekticidy [14]. Oproti přírodním pyrethrinům se vyznačují vyšší toxicitou i perzistencí. Aby nebylo nutné aplikovat vysoké dávky toxičtějších pyrethroidů k dosažení optimálního účinku, prodávají se komerční pesticidní přípravky jako směsi obou skupin látek. Pyrethroidy působí jako axonové jedy. Blokují činnost sodíkových kanálků neuronových membrán. Výsledkem je znehybnění škůdce a následné usmrcení. Jedná se převážně o lipofilní látky s perzistencí okolo 3-4 týdnů. Nejvíce používaným pyrethroidem je permethrin (obrázek č. 3b), mezi další často užívané patří cypermethrin, deltamethrin, cyhalothrin a další.

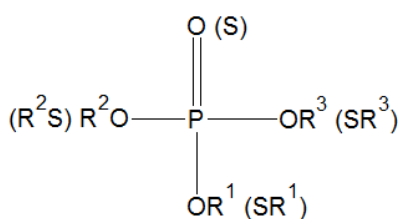


Obrázek 3: Chemická struktura a) pyrethrinů; b) permethrinu [15].

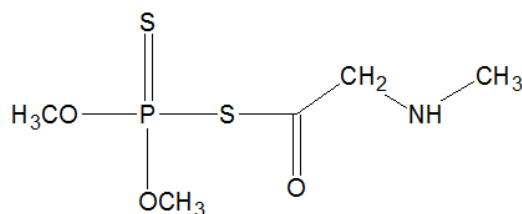
4.1.3 Organofosforové pesticidy

Z chemického hlediska organofosforové pesticidy představují estery kyseliny ortho-, thio-, pyro-fosforečné (obrázek č. 4a). Pesticidní účinek spočívá v ireverzibilním navázání

organofosforové sloučeniny na aktivní centrum enzymu acetylcholinesterázy (AChE). Dochází k inhibici AChE, která má za následek neschopnost neuronu ukončovat synaptické vedení signálu v cholinergních nervových vláknech. Výsledkem inhibice je život ohrožující stav spojený s dysfunkcí dýchacího centra. Vazba organofosforových sloučenin na aktivní místo enzymu je za běžných podmínek nevratná. V současnosti dochází ke zvyšování selektivního účinku organofosforových pesticidů a to výměnou oxo-forem za jejich thio-analoga. Thio-analoga reagují pouze se specifickými oxidázami vyskytujícími se převážně u hmyzích organismů. Organofosforové pesticidy představují látky s perzistencí v řádu dnů. Často se jedná o vysoce toxické látky. Mezi nejrizikovější zástupce patří Dimethoat (obrázek č. 4b), jehož poločas rozpadu v půdě je poměrně nízký (10- 16 dnů), avšak hodnota LC_{50} pro vodní organismy je velmi nízká a to 2,5 mg/l, LD_{50} pro teplokrevné organismy činí 342,5 mg/kg [13].



a)

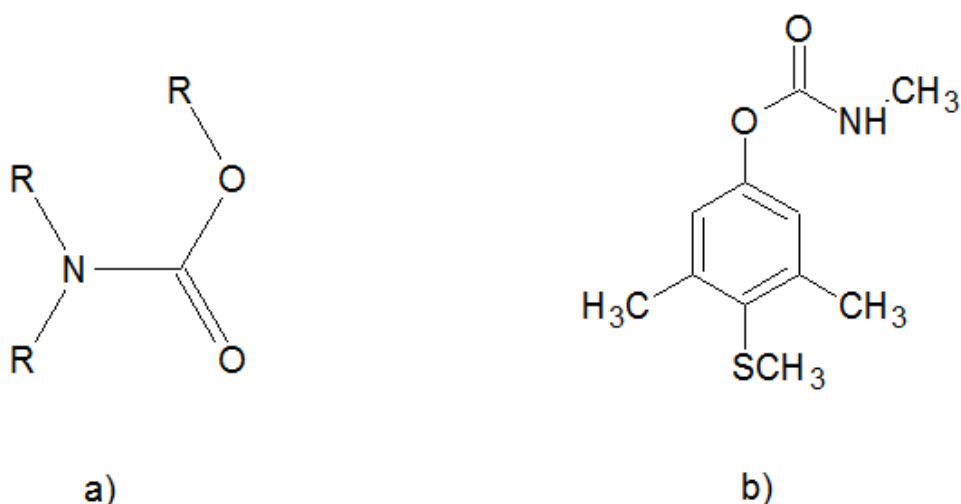


b)

Obrázek 4: Chemická struktura a) organofosforových pesticidů; b) dimethoátu [13].

4.1.4 Karbamáty

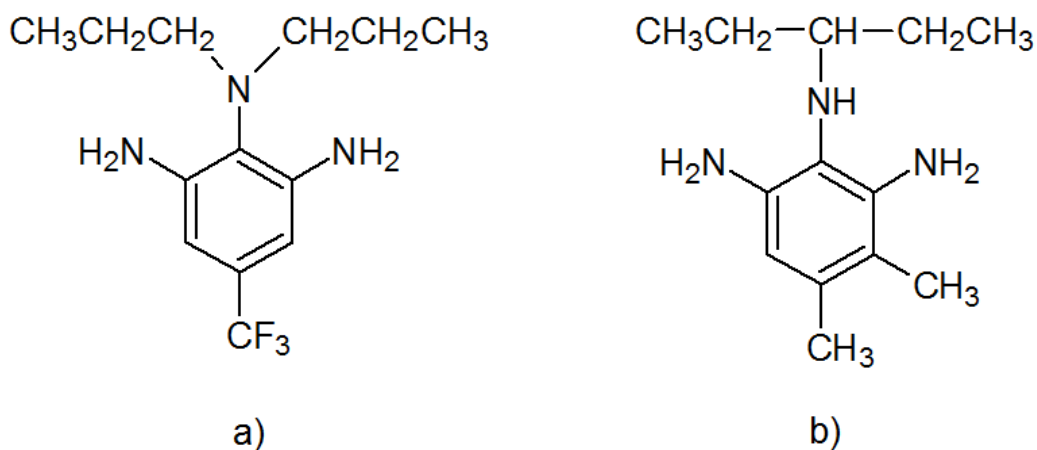
Karbamátové pesticidy jsou deriváty odvozené od kyseliny karbamové (obrázek č. 5a). Jsou široce používané jako insekticidy. Způsob jejich pesticidní aktivity je podobný jako v případě organofosforových pesticidů. Rozdíl spočívá v pseudoireverzibilní inhibici AChE. Ve vodním prostředí dochází k hydrolýze a následnému odštěpení karbamátové sloučeniny. V důsledku toho se AChE stává opět aktivní a může znovu plnit svou fyziologickou funkci. Nejrizikovějším zástupcem je Methiocarb (obrázek č. 5b) s poločasem rozpadu v půdě okolo 6 hodin a s hodnotou LD_{50} 35 mg/kg [13] [16].



Obrázek 5: Chemická struktura a) karbamátů; b) methiocarbu [16].

4.1.5 Dinitroanilinové pesticidy

Představují skupinu selektivních herbicidů. Používají se zejména pro zabránění klíčení semen citlivých plevelů, ale také k inhibici růstu kořenů již vzrostlých plevelů. Zástupci této skupiny jsou lipofilní sloučeniny s dobrou perzistencí v řádu měsíců. Největší aplikační rozšíření našly účinné látky trifluralin (obrázek č. 6a) a pendimethalin (obrázek č. 6b). Roční spotřeba v ČR dosahuje 100 tun [17].



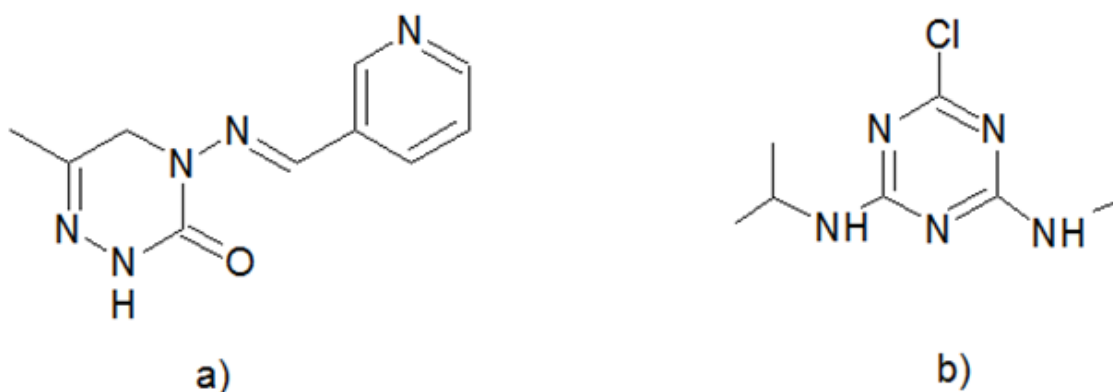
Obrázek 6: Chemická struktura a) trifluralinu; b) pendimethalinu [13].

4.1.6 Močovinové pesticidy

Používají se převážně jako systémové herbicidy. Inhibují průběh fotosyntézy u rostlin. Patří sem diuron, fenuron, nicosulfuron, rimsulfuron a další sloučeniny. Celková roční spotřeba v ČR se pohybuje okolo 350 tun [12].

4.1.7 Triazinové pesticidy

Jedná se o sloučeniny s vysokým herbicidním účinkem. Vyznačují se však nízkou biodegradabilitou a perzistencí v řádů měsíců až let. Perzistence je dále prodloužená jejich metabolity. Z tohoto důvodu Evropská komise v roce 2004 rozhodla o jejich nezařazení do Seznamu účinných látek. Výjimku a v ČR povolenou triazinovou pesticidní látku představuje pymetrozin s perzistencí okolo 12 dnů (obrázek č.7a). Dalšími zástupci zakázanými v ČR avšak povolenými v USA a řadě jiných zemí jsou atrazin (obrázek č. 7b), cyanazin, simazin, terbutylazin a další [18].



Obrázek 7: Chemická struktura a) pymetrozinu; b) atrazinu [19].

4.1.8 Fenoxy alkanové kyseliny

Představují skupinu nejrozšířenějších širokospektrálních systémových herbicidů. Způsobují poruchy látkové výměny a tím inhibují růst nadzemních i podzemních částí rostlin. Dostupné jsou ve formě kyselin, solí (sodné, draselné, alkylaminové) nebo ve formě esterů. Kyseliny a soli jsou nejčastěji aplikovány ve formě vodných roztoků. Jejich esterické formy vzhledem ke své nižší rozpustnosti ve vodě a vyšší těkavosti jsou komerčně dostupné ve formě emulzí [20].

Prvním připraveným fenoxý herbicidem byla 2,4-dichlorfenoxýoctová kyselina (2,4-D). Poprvé byla syntetizována v roce 1940 a o šest let později byla již komerčně dostupná. Tato sloučenina byla také používána během války ve Vietnamu za účelem defoliace lesních porostů a ničení zemědělských plodin s cílem vyvolání nedostatku potravin. V kombinaci s 2,4,5-trichlorfenoxýoctovou kyselinou (2,4,5-T) je tato směs známa jako Agent Orange. WHO zařazuje fenoxý alkanové herbicidy mezi toxické látky II. a III. třídy. Hodnota LD₅₀ (pro krysy) v případě 2,4-D a 2,4,5-T je stanovena na 375 mg/kg [21]. Další zástupce herbicidů na bázi fenoxý alkanových kyselin uvádí tabulka č. 1.

Herbicid	Systematický název Strukturní vzorec	
Dichlorprop	(R)-2-(2,4-dichlorfenoxy)propanová kyselina	(S)-2-(2,4-dichlorfenoxy)propanová kyselina
2,4 – DB	4-(2,4-dichlorfenoxy)butanová kyselina	
2,4,5 – T	(2,4,5-trichlorfenoxy)octová kyselina	
Fenoprop	(R)-2-(2,4,5-trichlorfenoxy)propanová kyselina	(S)-2-(2,4,5-trichlorfenoxy)propanová kyselina
Mecoprop	(R)-2-(4-chlor-2-methylfenoxy)propanová kyselina	(S)-2-(4-chlor-2-methylfenoxy)propanová kyselina
MCPB	4-(4-chlor-2-methylfenoxy)butanová kyselina	

Tabulka 1: Chemické struktury vybraných fenoxu alkanových pesticidů [22] [21].

4.2 Adjuvanty

Adjuvanty se v posledních desetiletích stávají stále důležitější součástí pesticidních přípravků. Zvyšující se intenzifikace zemědělské výroby vytváří nové nároky na vývoj účinnějších pesticidů. Nově zaváděné pesticidní přípravky musí splňovat stále se zvyšující nároky, jako jsou například nízké výrobní náklady, nízká perzistentnost v prostředí, vysoká účinnost účinné dávky při zachování nízké dávky, vysoká selektivita a nízká toxicita pro necílové organismy. Ke splnění těchto kritérií pomáhají právě přidávané adjuvanty [23]. Zdroj [24] uvádí, že vhodným výběrem adjuvantu lze dosáhnout až desetinásobného snížení dávky účinné látky při zachování stejné účinnosti. Přídavek adjuvantu vedl ke zvýšení biologické účinnosti pesticidního přípravku. Vyšší účinnosti bylo dosaženo zvýšením adheze kapek pesticidního přípravku, prodloužením doby vysychání a zvýšením odolnosti proti smytí deštěm.

Doba od objevení nové pesticidní látky a do jejího uvedení na trh trvá okolo 8-10 let [25]. To sebou přináší velkou finanční nákladnost. Proto firmy, vyvíjející nové pesticidní přípravky často zkoumají nové kombinace již registrovaných přípravků v kombinaci s novými nebo již zavedenými adjuvanty. Tyto nové kombinace často vedou ke zlepšení vlastností pesticidních přípravků [24].

Je nutné si uvědomit, že účinnost pesticidního přípravku je ovlivněna mnoha faktory. Významný vliv mají proměnlivé klimatické podmínky při samotné aplikaci jako např. teplota, vlhkost, srážky atd. Ke snížení účinnosti může vést také použití směsi různých přípravků [26] [23]. Důležitou roli hraje i způsob aplikace pesticidních přípravků. Dalším faktorem ovlivňujícím účinnost pesticidů je voda použitá k přípravě pesticidních přípravků. Voda v různých lokalitách se liší hodnotou pH a svou tvrdostí. Povrchové vody v České republice v závislosti na oblasti mají pH v rozmezí 6,5 – 9. Nejvhodnější je dešťová voda s pH 5 – 6 [27] [25]. Obecně platí, že každý pesticidní přípravek má svoji optimální hodnotu pH, při které poskytuje nejvyšší pesticidní účinnost. Snížení účinnosti při zvyšující se hodnotě pH bývá vysvětlováno vlivem alkalické hydrolýzy. Ta vede k rozkladu účinné látky na inaktivní formu. Příkladem může být herbicidní přípravek obsahující účinnou látku phenmedipham. Nejvyšší účinnost byla prokázána při hodnotě pH 5. Laboratorně bylo stanoveno, že účinnost klesne na polovinu po 50 dnech. Avšak při pH 7 k tomu dochází již po 15 hodinách a při pH 9 již po 10 minutách [27].

Pro přípravu pesticidních roztoků by měl být každý spotřebitel pesticidů schopen stanovit hodnotu pH vody. V případě neshody její hodnotu upravit vhodnými adjuvanty na hodnotu uvedenou na obalu.

4.3 Klasifikace adjuvantů

Klasifikaci adjuvantů ukazuje následující tabulka č. 2.

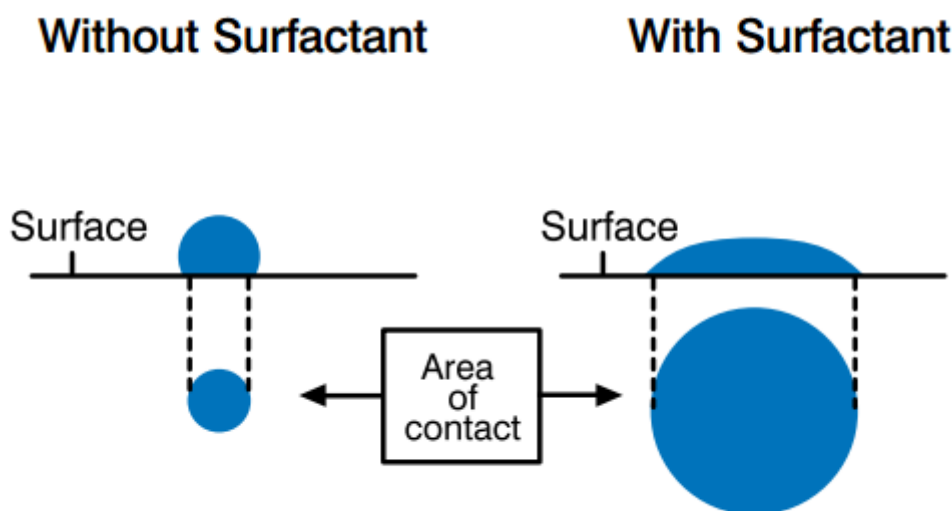
Adjuvanty	Surfaktanty	Ionogenní	Aniontové
			Kationtové
			Amfoterní
	Adjuvanty na bázi olejů	Neionogenní	
		Minerální oleje	
		Rostlinné oleje	
	Adjuvanty na bázi minerálních látek		
	Barviva		
	Protiúletové přísady		
	Pěnicí přísady		
	Depoziční a adhezivní přísady		
	Vodu upravující přísady		
	Přísady zajišťující snášenlivost		
	pH adjuvanty		
	Protipěnicí přísady		
	UV absorbenty		

Tabulka 2: Klasifikace adjuvantů [28] [25].

4.3.1 Surfaktanty

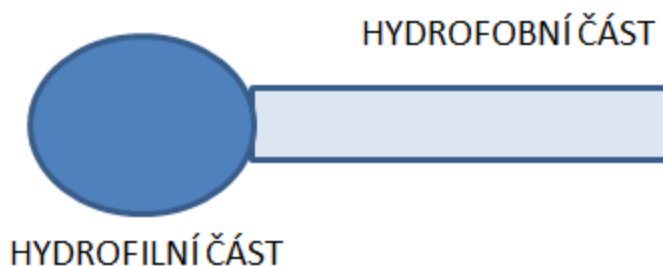
Slovo surfaktant pochází z anglického surfactant, které je zkratkou pro surface-active-agent [29]. Většina adjuvantů řadících se mezi aktivátory jsou surfaktanty (povrchově aktivní látky). Jak lze vidět na obrázku č. 8, surfaktanty zvyšují smáčivost povrchu a tím umožňují dosáhnout lepšího pokrytí povrchu cílového organismu. S vyšší smáčivostí souvisí zvýšení biologické účinnosti pesticidů. Jejich nejčastější uplatnění je ve spojení s aplikací dražších pesticidních přípravků. Zde umožňují značně snížit potřebnou dávku pesticidního přípravku na jednotku plochy, aniž by došlo ke snížení biologické účinnosti [28].

Je nutné si také uvědomit, že přidavkem surfaktantů se zvyšuje penetrace účinné složky pesticidů u všech druhů organismů. Negativním důsledkem je tedy snížení selektivity účinné látky [29].



Obrázek 8: Schéma účinku surfaktantů na smáčivost povrchů [29].

Molekuly surfaktantů se skládají z hydrofobní (nepolární části) a hydrofilní (polární) části. Ve dvoufázovém prostředí složeném z polární a nepolární fáze se hydrofilní část molekuly orientuje směrem k polární fázi. Je tvořena polárními funkčními skupinami např. sulfonovou, sulfátovou, karboxylovou atd. Zatímco hydrofobní část molekuly tvořená dlouhými uhlovodíkovými řetězci, obsahujícími 8 a více uhlíků je orientována k nepolární fázi. Jsou to tedy látky, které se koncentrují ve fázovém rozhraní a vytváří mezi nimi jakýsi můstek. Tím dochází ke snížení povrchového napětí na fázovém rozhraní [25] [24].



Obrázek 9: Schéma chemické struktury surfaktantů [23].

Surfaktanty lze dělit podle iontového charakteru hydrofilní složky na ionogenní a neionogenní. Rozdělení na tyto dvě skupiny souvisí s jejich chováním ve vodném prostředí. V případě ionogenních surfaktantů dochází ve vodném prostředí k jejich disociaci. Vznikající částice mohou nést kladný nebo záporný náboj nebo mohou nést náboje oba (amfolyty). Zatímco v případě neionogenních k disociaci nedochází [28] [25].

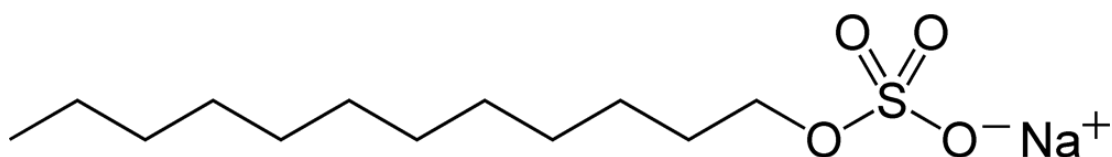
4.3.1.1 Ionogenní

4.3.1.1.1 Aniontové surfaktanty

Aniontové surfaktanty disociují na amfifilní anion a kation. Amfifilní aniont obsahuje polárně nabitou skupinu, připojenou na nepolární uhlíkový řetězec. Kationtem zpravidla bývá alkalický kov (Na^+ , K^+) nebo kvartérní amoniová sůl. Aniontové surfaktanty představují více než 50 % světové produkce surfaktantů. Řadí se sem například sulfáty, sulfonáty, mýdla nebo fosfáty [30].

4.3.1.1.2 Sulfáty

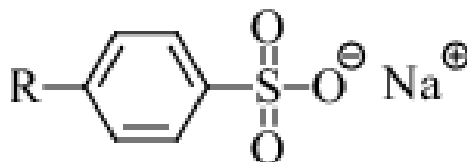
Jedná se o soli alkylesterů kyseliny sírové obecného vzorce $\text{R-O-SO}_3^-\text{M}^+$. Jsou připravovány reakcí vyšších alifatických alkoholů s nadbytkem kyseliny sírové. Sulfátová skupina je umístěna na konci alifatického řetězce. V průmyslovém měřítku dosáhly pro svou dobrou rozpustnost ve vodě a snadnou biologickou odbouratelnost značného rozšíření. Nejběžnějším zástupcem je lauryl sulfát sodný (obrázek č. 10) [25] [30].



Obrázek 10: Chemická struktura lauryl sulfátu sodného [31].

4.3.1.1.3 Sulfonáty

Sulfonáty obecného vzorce $R-SO_3^-M^+$, kde R je uhlíkovým řetězec, M^+ ion alkalického kovu nebo vodíkový kation. Dříve se používaly sulfonátové surfaktanty s rozvětvenými řetězci. Dnes jsou nahrazovány tenzidy s lineárními řetězci, které jsou snadněji biologicky odbouratelné. Ve srovnání se sulfáty jsou díky přímé vazbě síry a uhlíku odolnější vůči hydrolyze [30]. Mezi zástupce patří například alkylbenzen sulfonáty obrázek č. 11.



Obrázek 11: Chemická struktura alkylbenzen sulfonáty [30].

4.3.1.1.4 Karboxyláty

Patří sem především mýdla, která jsou z chemického hlediska sodné nebo draselné soli vyšších mastných kyselin obecného vzorce $R-COO^-M^+$. Jedná se o nejstarší a nejdéle používané aniontové surfaktanty. Mezi jejich výhody se řadí především nízké výrobní náklady, snadná dostupnost surovin nebo jejich dobrá odbouratelnost. Z nevýhod stojí za zmínku tvorba neaktivních surfaktantů ve vodných roztocích v přítomnosti vápenatých nebo hořečnatých iontů [30].

4.3.1.1.5 Fosfáty

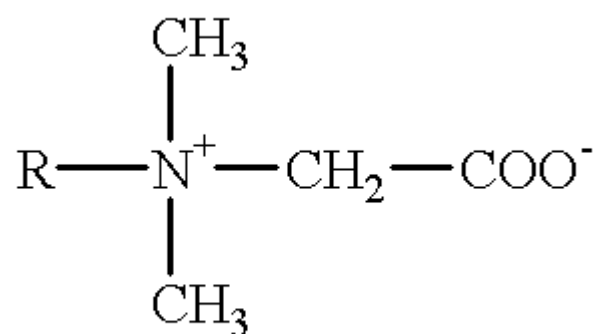
Jedná se o estery a diestery kyseliny fosforečné a alifatických nebo aromatických alkoholů obecného vzorce $RO-PO_3^-M^+$. Jejich používání je stále více z ekologických i finančních důvodů omezováno. Fosfáty se totiž podílí na procesu eutrofizace vod. Tedy procesu vyvolaném nadměrným zvýšením anorganických živin ve vodních ekosystémech. Vlivem eutrofizace dochází v zasažených vodních ekosystémech k nadměrnému růstu řas a sinic. Tento jev je doprovázen snížením množství kyslíku ve vodě a způsobuje uhynutí vodních živočichů [31].

4.3.1.1.6 Kationtové surfaktanty

Ve vodném prostředí disociují na povrchově aktivní kation a povrchově neaktivní anion. V roce 2014 se podílely 6 % na celkové spotřebě surfaktantů [29]. K jejich většímu rozšíření brání v porovnání s aniontovými surfaktanty nižší detergenční schopnosti a vyšší cena. Z chemického hlediska se jedná o primární až kvartérní aminy. Na atomu dusíku nesoucí kladný náboj musí být vázán alespoň jeden dostatečně dlouhý hydrofobní uhlíkový řetězec a další alkylové substituenty [32].

4.3.1.1.7 Amfoterní

Amfoterní surfaktanty ve své struktuře obsahují skupiny nesoucí kladný i záporný náboj obrázek č. 12. Přítomnost opačně nabitých skupin uděluje molekule amfoterní charakter. pH prostředí určuje, který náboj bude převažovat. Záporný náboj převažuje v alkalickém pH a amfoterní molekula se zde bude chovat jako aniontový surfaktant. Zatímco v kyselém pH bude převažovat kladný náboj a molekula se bude chovat jako kationtový surfaktant. Vyznačují se dobrými detergenčními vlastnostmi a snadnou biodegradovatelností, avšak jejich cena je vysoká. Patří sem především alkylbetainy obsahující kladně nabitý kvartérní dusík a záporně nabitou funkční skupinu (například karboxylovou) [25] [28].



Obrázek 12: Chemická struktura amfoterních surfaktantů [25].

4.3.1.2 Neionogenní

Jak již z názvu vyplývá, neionogenní surfaktanty neposkytují ve vodných roztocích ionty. Rozpustnost ve vodných roztocích umožňují přítomné polární hydrofilní skupiny např. (amino nebo hydroxylové skupiny). Hydrofobní část tvoří alifatický nebo alkylfenolový řetězec. Jejich význam spočívá především v chemické nereaktivitě s jinými složkami.

Přídavkem neionogenních surfaktantů nedochází ke změně vlastností ostatních složek pesticidního přípravku.

Nejběžněji používanými neionogenními surfaktanty jsou oxyethylenáty mastných alkoholů nebo alkylpolyglykosidů [33].

4.3.2 Adjuvanty na bázi olejů

Podle původu se adjuvanty na bázi olejů dělí na minerální a rostlinné oleje. Minerální oleje jsou směsi uhlovodíků různých molekulových hmotností získávaných destilací z ropy. V surovém stavu obsahují aromatické uhlovodíky, rozpouštědla a další látky, které mohou působit na organismy toxicky. Je proto nutná jejich další rafinace a zbavení se nežádoucích příměsí [3]. Přidávají se například do herbicidních přípravků, kde zajišťují vyšší příjem účinné látky rostlinou. Minerální oleje naruší povrchovou vrstvu vosků nebo způsobí vznik trhlinek, kterými může účinná látka snadněji prostupovat [25].

Rostlinné oleje jsou získávány lisováním nebo extrakcí rozpouštědly. Po tomto prvním kroku produkty obsahují řadu nežádoucích příměsí, které bývají přirozenými součástmi semen. Jedná se především o fosfolipidy, slizy, barviva, vosky a další látky. Tyto příměsi způsobují například nežádoucí zabarvení oleje, zápach, usazování a jiné. Usazování by mohlo například způsobit značné komplikace při dávkování optimální koncentrace pesticidního přípravku. Jako adjuvanty zvyšují smáčivost, snižují odpařování pesticidního roztoku, účinné látky usnadňují prostupnost skrze voskovou vrstvu rostlin a také poskytují vyšší odolnost vůči srážkám [29] [25].

4.3.3 Adjuvanty na bázi minerálních látek

Adjuvanty na bázi minerálních látek se přidávají k pesticidnímu přípravku, pokud obsahuje více účinných složek. Bylo prokázáno, že mísením více účinných složek může jedna snižovat účinnost druhé. Tomuto negativnímu působení je zabráněno přídavkem minerálních látek. Mechanismus účinku roztoků minerálních látek není přesně znám. Nejčastěji se používá hydroxid hlinitý, fosforečnan hlinitý nebo fosforečnan vápenatý [31].

4.3.4 Barviva

Slouží k detekci vynechaných míst při aplikaci pesticidů. Mohou být již součástí pesticidního přípravku nebo se k němu přidávají při jeho přípravě. Nelze používat potravinářská barviva, protože u nich nelze předvídat jejich reakci se složkami v roztoku pesticidu. Jedná se o látky, které jsou schváleny a označeny jako pesticidní pomocné látky [23].

4.3.5 Protiúletové přísady

Používají se zejména při letecké aplikaci. Mění viskozitu a elastické vlastnosti pesticidního přípravku. Při aplikaci vznikají kapky s větším průměrem a hmotnostní. Tím je omezen nežádoucí přenos větrem mimo místo aplikace. Jako protiúletové přísady se například používají polyakrylamidy nebo polysacharidy [23].

4.3.6 Pěnicí přísady

Při aplikaci vytváří pěnu, pomocí které je možné detekovat konec aplikačního pásma a následně navázat další aplikační jízdu. Tím se dosahuje kvalitnějšího plošného pokrytí bez zbytečných přestřiků [34].

4.3.7 Vodu upravující přísady

Jak již bylo zmíněno výše, pro optimální účinnost účinné látky je nutné při její přípravě použít vodu s vhodnými vlastnostmi. Voda může obsahovat vysoké koncentrace solí, které mohou reagovat s účinnou látkou a tím ji přeměnit na neaktivní formu. Například v tvrdé vodě obsažené vápenaté a hořečnaté ionty tvoří s glyfosátem vápenaté a hořečnaté soli. Tím dochází ke snížení pesticidního účinku. Negativní působení těchto iontů lze redukovat přidávkem síranu amonného. Vědecky byla dokázána větší prostupnost amonných solí glyfosátu povrchem rostlin [35].

4.3.8 Přísady zajišťující snášenlivost (kompatibilitu)

Zajišťují chemickou a fyzikální kompatibilitu mezi jednotlivými složkami pesticidního přípravku. Při smíchání přísad může docházet ke vzniku sraženin, které se projeví zvýšením nehomogenity a také poklesem účinnosti pesticidního přípravku [34].

4.3.9 pH adjuvanty

Hodnota pH hraje důležitou roli v účinnosti pesticidů. Každá složka pesticidů má svou optimální hodnotu pH při které poskytuje nejvyšší pesticidní účinek. Složky pesticidů mohou podléhat jak kyselé tak zásadité hydrolýze, která vede ke snížení účinnosti. Na druhou stranu změnou pH lze v některých případech docílit vyšší rozpustnosti složek pesticidů nebo zvýšit kompatibilitu jednotlivých složek a tím docílit zvýšení účinnosti. pH pufrů bývají často již součástí prodáváných pesticidů. Pokud tomu tak není, k úpravě pH se používají pH adjuvanty. Ke snížení pH se využívá kyseliny fosforečné nebo fosforečných solí. Zatímco ke zvýšení pH se používá uhličitan sodný. Je nutné si uvědomit, že účinek pH adjuvantů je ovlivňován alkalitou vody použitou k přípravě pesticidního roztoku. Čím vyšší alkalita voda tím vyšší je potřebné množství adjuvantu k úpravě pH [35] [23].

4.3.10 Protipěnicí přísady

Pěna je heterogenní směs plynu v kapalině (pevné látce). Tvorba pěny je nežádoucím jevem vyskytujícím se například při přípravě pesticidního roztoku za použití měkké vody nebo při čištění aplikačního zařízení. Jako protipěnicí přísady se využívá dimethylpolysiloxanů, oxidu křemičitého nebo alkoholů. Tyto látky snižují povrchové napětí na fázovém rozhraní plynu a kapaliny a tím zabraňují tvorbě pěny [24] [31].

4.3.11 UV absorbenty

Vlivem UV složky slunečního záření může docházet k fotolýze a tedy rozkladu složek pesticidu. Tomu lze zabránit přidáním UV absorbentů, které tuto složku absorbují. Mohou také bránit jejich rozkladu tím, že upraví jejich fyzikální a chemické vlastnosti [31].

5 Formulace pesticidů

Jak již bylo uvedené dříve, pesticidní přípravky jsou tvořeny jednou nebo více účinnými látkami, inertní složkou a adjuvanty. Všechny složky dohromady tvoří tzv. formulační typ [17]. Jednotlivé formulační typy především usnadňují manipulaci s pesticidními přípravky. Umožňují také výběr pesticidního prostředku podle ceny nebo podle dostupných aplikačních

zařízení [36] [13]. V následující tabulce č. 3 je uvedeno přehledné rozdělení základních formulačních typů a jejich aplikační vlastnosti.

Kapalné formulace	Olejový koncentrát	+ není nutno ředit - speciální aplikační zařízení
	Emulgovaný koncentrát	+ snadná kombinovatelnost - velký korozivní účinek, zvýšená prostupnost pokožkou (zdravotní riziko)
	Koncentrovaná emulze	+ nižší hořlavost - nestálost při skladování
	Roztoky	+ snadná manipulace - chemická a fyzikální nestálost při skladování
Pevné formulace	Smáčitelné dispergovatelné prášky	+ skladovatelnost, cena - sedimentace, komplikované dávkování, prašnost
	Popraše	+ přímá aplikace - zdravotní riziko při aplikaci, snadný drift při aplikaci
	Granulované pesticidy	+ přímá aplikace - speciální aplikační zařízení
	Pelety	+ přímá aplikace, snadnost dávkování - speciální aplikační zařízení
Ostatní typy formulace	Plynné formulace	+ snadná aplikace - snadný drift, zdravotní hledisko
	Aerosoly	+ snadná aplikace, skladovatelnost - zdravotní riziko při aplikaci, snadný drift

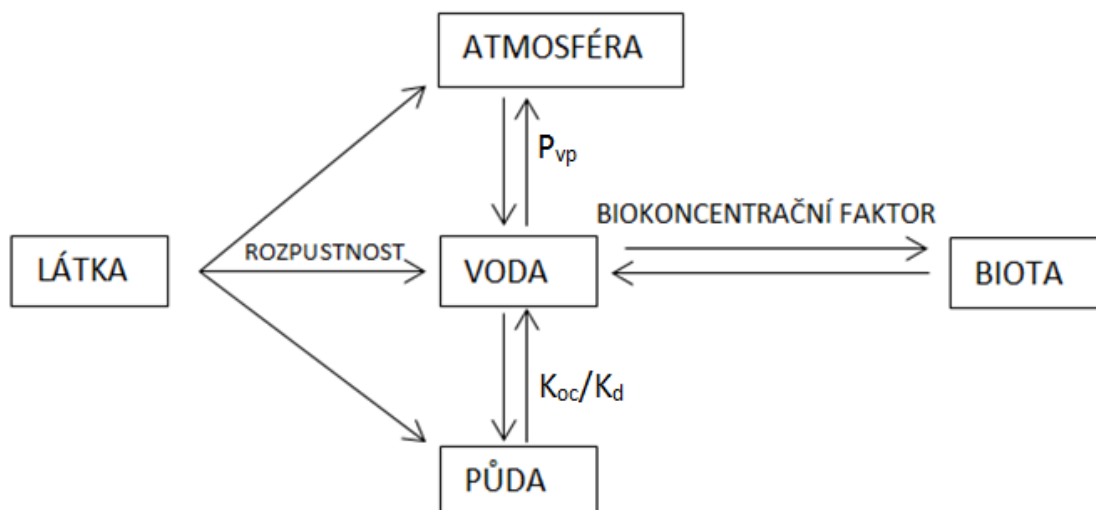
Tabulka 3: Přehled základních formulačních typů a jejich aplikační vlastnosti [36] [17] [37] [38].

6 Rezidua pesticidů v životním prostředí a potravinách

6.1 Kontaminace životního prostředí

Při aplikaci pesticidů dochází k nežádoucímu transportu části aplikační dávky mimo cílovou složku. Kontaminaci podléhají všechny složky životního prostředí: voda, vzduch, půda a biota. O velikosti frakce pesticidní látky, která bude kontaminovat jednotlivé složky,

rozhoduje mnoho vlivů. Například fyzikálně chemické vlastnosti pesticidu, formulační typ, povětrnostní podmínky a další. Obrázek č. 13 ukazuje, které fyzikálně chemické vlastnosti pesticidní látky ovlivňují její distribuci do jednotlivých složek životního prostředí [39] [40].



Obrázek 13: Schéma zobrazující působení fyzikálně chemických vlastností látky na její distribuci v životním prostředí [15].

Studie [41] zkoumala distribuci organofosforového kontaktního insekticidu parathionu po jeho aplikaci. Parathion byl postřikem aplikován na kukuřičné pole v množství 50 kg/ha. Po aplikaci byl parathion detekován na listech kukuřice v množství 0,5 kg/ha. To tedy znamená, že okolo 99 % pesticidního přípravku nedosáhlo cílové oblasti. Další detekce proběhla v následujících 5 dnech. Každý den byl sledován pokles koncentrace parathionu na listech. 5. den koncentrace již klesla přibližně na 0,1 kg/ha. Analýza potvrdila přítomnost degradačních produktů, které se na tomto poklesu podílely spolu s povětrnostními vlivy. Studie tedy ukázala, jak rychle může být pesticidní látka distribuována a degradována v životním prostředí.

Pesticidy představují skupinu látek s různými fyzikálně chemickými vlastnostmi [3]. Distribuce a degradace v životním prostředí je proto specifická pro každou látku nebo skupinu látek. Distribuce je ovlivňována fyzikálními procesy jako například adsorpcí, sedimentací nebo těkavostí. Naproti tomu degradace je způsobena chemickými nebo biologickými procesy, například oxidačními, redukčními, hydrolýzou, fotolýzou atd. [42].

6.2 Kontaminace potravin

V předchozích kapitolách byly ukázány příklady fyzikálně-chemických vlastností pesticidních látek, které ovlivňují jejich chování v životním prostředí. V poslední době vyvinuté pesticidní prostředky vykazují již malou až střední perzistenci a jejich akumulace a přechod do potravních řetězců je nízký. I přes tento pokrok se v potravinách stále objevují tzv. rezidua pesticidů. Tento pojem představuje zbytková množství účinných látek pesticidů, jejich metabolitů, reakční a rozkladné produkty, které se v důsledku používání pesticidních přípravků vyskytují v potravinách, krmivech nebo v životním prostředí [3].

K průniku reziduí pesticidů do potravního řetězce dochází buď přímo anebo nepřímo. V případě přímého průniku se rezidua z ošetřených plodin dostávají do produktů z nich připravených. V druhém případě se jedná o nepřímý průnik reziduí pesticidů do potravního řetězce. Dochází zde k přenosu reziduí například do masa nebo mléka kontaminovaným krmivem. K nepřímému průniku může docházet i prostřednictvím půdy, vody nebo vzduchu. Po aplikaci pesticidních přípravků může část reziduí zůstat v ošetřené půdě a kontaminovat následně pěstované plodiny. Přenosem vodou nebo vzduchem mohou být rezidua pesticidů transportována do různých potravních zdrojů [43].

6.3 Rezidua pesticidů v potravinách

Pokud se rezidua pesticidů vyskytují v potravinách, působí na lidský organismus chronickou nebo akutní toxicitou. Chronická toxicita je definována jako účinek látky po jejím dlouhodobém příjmu v relativně nízkých dávkách. Vyjadřuje se přijatelnou denní dávkou v mg pro člověka, tzv. ADI. Akutní toxicita představuje účinek po jedné aplikaci dané látky. Vyjadřuje se tzv. letální dávkou, LD₅₀. Letální dávka je definována jako množství pesticidu v mg na kg hmotnosti pokusného zvířete, kdy po požití jedné dávky zahyne 50 % pokusných zvířat [44].

Účinky pesticidních látek na lidský organismus jsou stále aktuálním tématem. V ohrožení jsou jednak lidé, kteří konzumují potraviny obsahující rezidua pesticidů, tak i lidé vystavení pesticidním látkám při jejich výrobě. Mnohé studie potvrzují, že dlouhodobá expozice nízkých dávek může například vést k různým vývojovým vadám, ovlivnění plodnosti, rakovině atd. Problematiku účinků reziduí pesticidů na lidský organismus komplikuje fakt, že dosud není k dispozici vhodná vědecká metoda, pomocí které by bylo možné posoudit účinky směsi chemikálií [36] [44].

Zdravotní rizika pesticidních látek jsou vyhodnocována v průběhu jejich povolování. V současnosti je povoleno uvádět na trh jen přípravky, které jsou uvedeny v nařízení EU č. 540/2011 o schválených účinných látkách. Součástí nařízení je i hodnocení, které má za úkol zaručit, že použití látek uvedených v nařízení nebude představovat nežádoucí zdravotní riziko pro člověka z hlediska výskytu jejich reziduí v potravinách. V nařízení č. 396/2005 byly dále pro vybrané pesticidní látky Evropskou unií stanoveny maximální limity reziduí, MRL. Hodnota MRL představuje horní přípustnou koncentraci rezidua pesticidu jak pro potraviny živočišného a rostlinného původu, tak i pro krmiva. Nařízení také obsahuje seznam látek, pro které není potřeba stanovit hodnoty MRL. Pokud pesticidní látka není uvedena v tomto nařízení, platí pro ni standardní hodnota MRL 0,01 mg/kg.

Aby nedocházelo k překračování hodnot MRL reziduí pesticidů v potravinách a krmivech je nutné dodržovat zásady správné zemědělské praxe, SZP. Zásadami SZP jsou především pokyny, kterými by se měl uživatel daného přípravku řídit. Je zde například uvedeno na jaký typ škůdce daný prostředek slouží, způsob jeho aplikace, termín aplikace, minimální intervaly mezi aplikacemi atd. [45].

Po uvedení pesticidního přípravku na trh je kontrolováno dodržování stanovených hodnot MRL v potravinách a krmivech. Postup těchto kontrol zahrnuje odběr vzorků a následnou analýzu s identifikací reziduí pesticidů a zjištěním hodnot MRL. V České republice jsou úřední kontroly v případě potravin živočišného původu prováděny Státní veterinární správou, SVS. V případě potravin rostlinného původu kontroly vykonává Státní zemědělská a potravinářská inspekce, SZPI. Nadlimitní nálezy jsou těmito orgány hlášeny do Systému rychlého varování pro potraviny a krmiva, RASFF. Poté jsou tyto potraviny staženy z trhu [46].

Bezpečnost potravin je jedním ze základních pilířů evropské potravinové politiky, který má za cíl ochránit zdraví spotřebitelů. Pojem bezpečnost potravin v sobě zahrnuje hygienu výroby potravin, monitoring potravních řetězců, bezpečnost krmiv a kontrolní činnost. Kontrolní činnosti příslušných státních orgánů se v České republice řídí Víceletým kontrolním plánem pro rezidua pesticidů. Tento plán je vydáván sekci hlavního hygienika Ministerstva zdravotnictví ve spolupráci s dozorovými orgány (SZPI, SVS) a to vždy na dva roky. Obsahuje kritéria pro výběr komodit, počet odebraných vzorků nebo analyzovaná rezidua pesticidů. Výběr komodit je zohledněn na celkovou spotřebu jednotlivých druhů potravin v České republice, spotřební koš, výsledky kontrol v předchozích letech a nařízením Evropské komise. Počty vzorků jsou stanoveny tak, aby umožnily stanovit typický obsah reziduí

u vybraných komodit a zmapovat trendy. Výběr analyzovaných reziduí pesticidů se řídí několika kritérii, jako například: nejčastěji používané účinné látky, výsledky kontrol v předcházejících letech, nařízením EK, spotřebním košem, laboratorní kapacitou atd. [45].

6.3.1 Výskyt reziduí pesticidů v potravinách v České republice

Ministerstvo zemědělství ČR každoročně zveřejňuje zprávu o výskytu reziduí pesticidů v potravinách, krmivech a surovinách pro jejich výrobu. Kontrolní činnost provedla SZPI spolu se SVS. V roce 2014 bylo ke stanovení reziduí pesticidů odebráno 1582 vzorků. Pozitivní nález sledovaných účinných látek byl zaznamenán u 956 vzorků, což představuje 60 % z celkového počtu vzorků. Dále bylo zjištěno u 65 vzorků (4,1 %) překročení hodnot MRL a 39 vzorků (2,5 %) bylo hodnoceno jako nevyhovující. Za nevyhovující vzorek je považován ten, u něhož je překročena hodnota MRL i po zohlednění nejistoty měření [46]. Tabulka č. 4 ukazuje přehled výsledků monitoringu reziduí pesticidů v ČR v roce 2014 s uvedenými druhy potravin.

Vzorky	Počet	Bez nálezu	Vzorky s pozitivním nálezem	Vzorky překračující MRL	Nevyhovující vzorky
Potraviny živočišného původu	50	45	5	0	0
Dětská výživa	12	10	2	0	0
Obilniny	70	57	13	0	0
Rybí výrobky	5	2	3	0	0
Zpracované výrobky	108	69	39	0	0
Potraviny rostlinného původu	1328	370	893	65	39
Celkem	1573	553	955	65	39

Tabulka 4: Přehled výsledků monitoringu reziduí pesticidů v potravinách za rok 2014 [46].

Za nevyhovující vzorky bylo stanoveno 39 vzorků potravin rostlinného původu. Přehled vybraných kontaminovaných potravin a reziduí pesticidů v nich stanovených v roce 2014 uvádí tabulka č. 5. Postihem pro podniky dodávající tyto nevyhovující potraviny na trh byly navrženy sankce ve formě pokut. V případě dovozu těchto potravin ze zahraničí, nebyly tyto zásilky vpuštěny do České republiky.

Dalšími možnými prostředky zabraňujícími ohrožení zdraví spotřebitele jsou například tato opatření: stažení zásilky z trhu, opakované zkoušky kontaminované potraviny v dalších šaržích nebo omezení společnosti podnikat v potravinářském průmyslu.

Potravina	Pesticid	Četnost
Mrkev	Chlorečnany	2
Rajčata	Chlorečnany	2
Kešu ořechy	Chlorečnany	1
Petržel	Chlorečnany	1
Banány	Dinotefuran	1
Čínské zelí	Chloryfos	2
Čaj	Acetamiprid	1
	Profenofos	1
	Tebuconazole	2
	Buprofezin	1

Tabulka 5: Přehled potravin a kontaminujících reziduí v roce 2014 [46].

7 Fyzikální vlastnosti pesticidů

7.1 Rozpustnost ve vodě

Vlastnost ovlivňující distribuci a stabilitu pesticidů v jednotlivých složkách životního prostředí. Například látky s velkou rozpustností ve vodě jsou méně náchylné na kumulaci v půdě nebo živých organismech.

Rozpustnost ve vodě za definovaných podmínek (p, T) udává množství rozpuštěné látky v objemové jednotce vodné fáze, při které je v rovnováze s látkou v jejím aktuálním stavu (s, l, g). Obvykle je vyjadřována jako množství látky v gramech na 100 g rozpouštědla nebo

také v jednotkách ppm [47] [43]. Převodové vztahy mezi jednotkami používanými pro vyjádření rozpustnosti ukazuje obrázek č. 14.

$$1 \text{ part per million} = 1 \text{ ppm} = \frac{1}{1 \text{ million}} = \frac{1 \text{ mg}}{1 \times 10^6 \text{ mg}} = \frac{1 \text{ mg}}{1 \text{ kg}} = \frac{1 \text{ mg}}{1 \text{ l}}$$

Obrázek 14: Převodové vztahy mezi jednotkami pro vyjádření rozpustnosti [43].

7.2 Relativní molekulová hmotnost

Relativní molekulová hmotnost představuje sumu relativních hmotností jednotlivých atomů tvořících molekulu. Je to jedinečná vlastnost každé chemické sloučeniny (ne v případě stereoizomerů). Důležitost této fyzikální vlastnosti lze také ukázat na příkladu aplikace kontaktního herbicidu postřikem. Vlivem vyšší relativní molekulové hmotnosti dochází k menším ztrátám například odpařením nebo desorpce z povrchu cílové rostliny atd. Je nutné si však uvědomit, že rychlost odpařování či adsorpce je ovlivněná i dalšími vlastnostmi (teplotou, mezimolekulovými silami, tenzí par atd.) [48].

7.3 Biokoncentrační faktor (BCF)

Biokoncentrační faktor je indikátorem toho, jak velké množství chemické látky bude akumulováno v živém organismu. Jedná se o bezrozměrnou veličinu, která udává poměr koncentrace chemické látky v živém organismu a její koncentrace ve vodě obrázek č. 15 [26].

$$BCF = \frac{\text{koncentrace chemické látky v živém organismu}}{\text{koncentrace chemické látky ve vodě}}$$

Obrázek 15: Rovnice výpočtu biokoncentračního faktoru [26].

Hodnota BCF je založená na dosažení rovnováhy. Vysvětlení lze ukázat na následujícím příkladu ryby ve vodě, ve které je přítomen herbicid atrazin. BCF atrazinu pro systém ryba/voda je 110. Tato hodnota představuje maximální dosažitelný poměr koncentrací

v živém organismu a ve vodě. Znamená tedy, že koncentrace látky v rovnováze bude v organismu 110-krát vyšší než její koncentrace ve vodě. Jestliže koncentrace atrazinu ve vodě je vysoká, bude docházet k rychlejší absorpci až do dosažení daného poměru koncentrací. V opačném případě bude absorpce pomalejší, avšak také bude pokračovat jen do dosažení hodnoty BCF [49].

BCF je ovlivňován řadou vlivů. Rozpustnost chemické sloučeniny v různých prostředích je ovlivňována její polaritou. Čím polárnější sloučeniny tím vyšší rozpustnost ve vodě, avšak menší rozpustnost v živočišných tkáních. Platí tedy, že méně polární látky jsou snadněji akumulovány v živých organismech a mají tedy vyšší hodnoty BCF. Množství nepolární látky v tkáni také závisí na obsahu tukové složky v organismu. Každý živý organismus se liší obsahem tukové složky, a proto každý bude schopen absorbovat různé množství chemických látek. Posledním vlivem ovlivňujícím hodnotu BCF o kterém bych se rád zmínil je vliv metabolismu. Metabolický systém živého organismu se snaží snížit koncentraci absorbované sloučeniny. Dochází k její biotransformaci (zvýšením polarity) a tím ke snížení její koncentrace v organismu [26] [49].

BCF lze tedy považovat za indikátor schopnosti chemické sloučeniny akumulovat se v potravním řetězci. Poskytuje také informaci o tom, v jaké složce životního prostředí bude látka více akumulována. Vyšší hodnota BCF ukazuje na vyšší hodnoty koeficientů K_{ow} a K_{oc} . Význam těchto koeficientů bude vysvětlen v dalším textu.

7.4 Rozdělovací koeficient v systému oktanol/voda

K_{ow} je definován jako poměr rovnovážné koncentrace sloučeniny v oktanolu a ve vodné fázi (obrázek č. 16). K_{ow} představuje bezrozměrnou hodnotu, která se často vyjadřuje v logaritmickém tvaru jako $\log K_{ow}$ a dosahuje hodnot v rozsahu od -3 do 7. Platí, že sloučeniny s vyšší hodnotou K_{ow} se snáze absorbují v půdě a živých organismech [50] [51].

$$K_{ow} = \frac{\text{koncentrace chemické látky v oktanolové fázi}}{\text{koncentrace chemické látky ve vodné fázi}}$$

Obrázek 16: Rovnice výpočtu rozdělovacího koeficientu v systému oktanol/voda [52].

Na hodnotu K_{ow} má vliv zejména polarita sloučeniny. Známe pravidlo říkájící, že podobné se rozpouští v podobném, poukazuje na vyšší rozpustnost polárnějších látek ve vodě. Tyto látky budou mít tedy nižší hodnoty K_{ow} . Studie [52] uvádí, že k růstu K_{ow} dochází při vzrůstu hodnot těchto vlastností: bodu varu, relativní molekulové hmotnosti, hustoty a velikostí plochy fázového rozhraní.

7.5 Půdní adsorpční koeficient

Schopnost látek adsorbovat se na půdní částice je jedním z hlavních faktorů ovlivňujících jejich transport v životním prostředí. Adsorpce látky v půdě je definována půdním adsorpčním koeficientem, jehož hodnota je bezrozměrná. Hodnota K_{oc} je ovlivněna řadou vlastností jak ze strany půdy, tak i ze strany chemické sloučeniny. Jednotlivé typy půd se liší obsahem organického uhlíku, hodnotou pH, salinitou a obsahem organické matrice v půdním roztoku. Chemické látky ovlivňují hodnotu K_{oc} zejména svou polaritou [53].

K určení hodnot půdního adsorpčního koeficientu je nutné stanovit nejprve sorpční koeficient (K_d). Sorpční koeficient je definován jako poměr koncentrace sloučeniny v půdě a její koncentrace ve vodě. Jak lze vidět na obrázku č. 17, ve výpočtu K_{oc} je zahrnut procentuální obsah organického uhlíku.

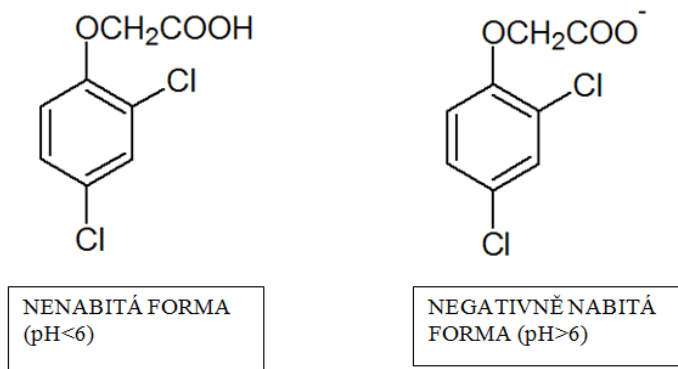
$$K_d = \frac{\text{koncentrace chemické látky v půdě}}{\text{koncentrace chemické látky ve vodě}}$$

$$K_{oc} = \frac{K_d \times 100}{\% \text{ organického uhlíku}}$$

Obrázek 17: Rovnice výpočtu půdního adsorpčního koeficientu [53].

Z rovnice na obrázku č. 17 lze pozorovat významný vliv procentuálního obsahu organického uhlíku na hodnotu K_{oc} . Organická složka půdy je zejména nepolárního charakteru a často negativně nabitá. Bude tedy docházet k zadržování nepolárních nebo kladně nabitých látek. Lze tedy definovat vztah, který říká, že čím vyšší bude procentuální obsah organického uhlíku, tím vyšší bude adsorbované množství nepolárních nebo kladně nabitých látek [27] [53].

Vliv pH na hodnotu Koc lze vysvětlit na příkladu známého herbicidu 2,4-D. Tento herbicid se může v půdě vyskytovat ve své nabitě a nenabitě formě, obrázek č. 18. Je zřejmé, že při hodnotě pH nižší než 6, se 2,4-D vyskytuje v nenabitě formě. Nenabitá forma bude vykazovat vyšší sorpci na organický podíl v půdě. Jak již bylo zmíněno výše, organická složka půdy mívá často i negativní náboj. Je tedy zřejmé, že při hodnotě pH půdy vyšší než 6, bude záporně nabitá forma 2,4-D zadržována méně [53] [39].



Obrázek 18: Chemické struktury nabitě a nenabitě formy herbicidu 2,4-D [1].

Voda obsažená v půdě obsahuje v sobě řadu rozpuštěných solí. Ionty nesoucí kladný náboj budou konkurovat jiným stejně nabitým iontům při adsorpci na negativně nabitou organickou složku půdy. S rostoucím množstvím rozpuštěných solí ve vodné složce bude docházet k poklesu adsorpce kladně nabitých látek.

Vodný podíl půdy také obsahuje suspendovaný podíl organické složky. Ten je schopen na sebe vázat nepolární nebo kladně nabitě látky a transportovat je z půdy ven.

Dalším faktorem ovlivňujícím adsorpci chemických látek v půdě je polarita dané látky. Polární látky jsou oproti látkám nepolárním více rozpustné ve vodě. Snadněji budou přecházet do vodné fáze a jejich mobilita v půdě bude velká [53] [54].

7.6 Tenze par

V úvodu kapitoly o kontaminaci životního prostředí bylo uvedeno, že ke kontaminaci dochází u všech složek životního prostředí. Nyní bude pozornost zaměřena na kontaminaci atmosféry. Odhady mluví, že okolo 10 % pesticidního přípravku se při aplikaci uvolní do

atmosféry. Dochází tedy ke kontaminaci atmosféry, kde se molekuly pesticidů pojí s pevnými nebo kapalnými částicemi v atmosféře. Následně dochází k jejich transportu mimo cílový prostor [55].

K posouzení schopnosti látky kontaminovat atmosféru se využívá její tenze par. Tenze par je definována jako tlak v jednosložkovém systému, kdy za definované teploty je v rovnováze fáze plynná s fází kapalnou nebo pevnou. Je to nejvyšší tlak za dané teploty, při jakém se látka může vyskytovat v rovnovážném plynném stavu. Současně představuje nejnižší tlak za dané teploty, při jakém se látka může vyskytovat v kapalném nebo pevném stavu.

Tenze par je obvykle vyjadřována třemi způsoby a to v mm/Hg, Pa nebo v atm. Vztah mezi těmito jednotkami ukazuje následující obrázek č. 19 [56].

$$1 \text{ atm} = 760 \text{ mm Hg} = 101325 \text{ Pa}$$

Obrázek 19: Převodové vztahy mezi jednotkami pro vyjádření tenze par [56].

Z hlediska kontaminace atmosféry látky s vysokou tenzí par představují značný problém. Snadno těkají a jsou unášeny v atmosféře do rozlehlých ploch. V opačném případě látky s nízkou tenzí par, které jsou rozpustné ve vodě, představují potenciální riziko v akumulaci ve vodě. V případě látek méně rozpustných ve vodě, dochází k jejich akumulaci v půdě nebo organismech [55].

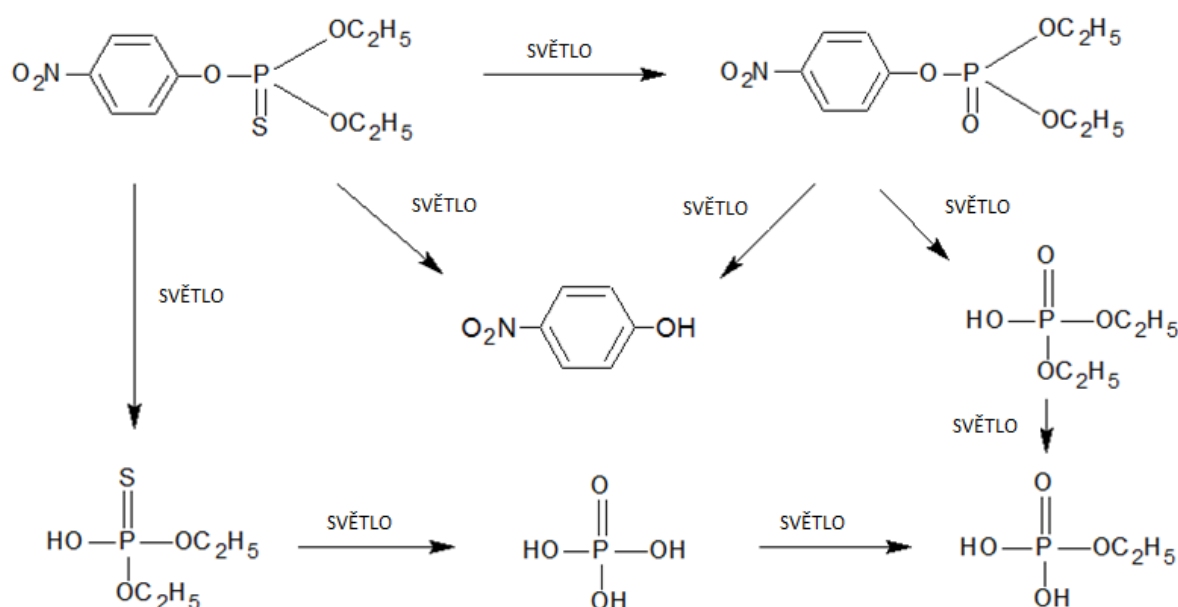
8 Chemické vlastnosti pesticidů

8.1 Fotolýza

Jak již bylo uvedeno dříve, při použití pesticidních přípravků dochází ke kontaminaci složek životního prostředí. Vlivem transportu dochází ke kontaminaci necílových oblastí. Pesticidní látky v životním prostředí podléhají také různým degradačním procesům. V případě fotolýzy se jedná o fotochemickou reakci vlivem působení slunečního záření nebo reakci s volnými radikály. Produkty těchto reakcí mohou ale i nemusí být více toxické než původní látky [57].

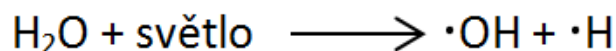
Slunce emituje záření různých vlnových délek a tedy i energií. Fotolyticky působí záření o vlnové délce od 290 – 400 nm. Záření v tomto rozsahu vlnových délek představuje z celkového množství emitovaného záření asi 4 %. Záření o vlnové délce menší než 290 nm je pohlcováno v ozónové vrstvě. Zatímco záření vlnové délky větší než 400 nm nemá většinou již dostatečnou energii k narušení chemických vazeb molekul.

Chemické látky mohou být fotolyticky degradovány buď přímo anebo nepřímo. V případě přímé degradace, chemické látky reagují přímo se zářením dostatečné energie a dochází k rozrušení jejich chemických vazeb. Na obrázku č. 20 je možné vidět různé dráhy fotolytických reakcí pesticidu parathionu, které jsou ovlivňovány vnějšími podmínkami (teplotou, vlhkostí, přítomnými složkami atd.) [47] [57] [48].

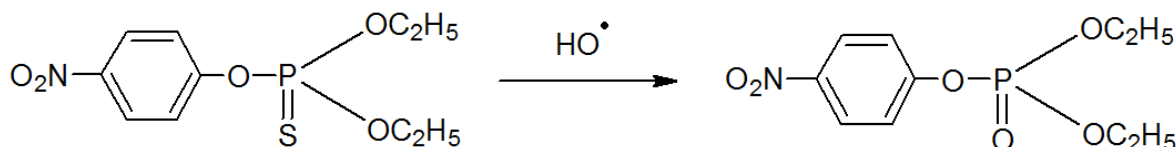


Obrázek 20: Fotolytické reakce parathionu [58].

V druhém případě může světlo fotolyzovat jinou molekulu ve vzduchu, která bude následně reagovat s pesticidní látkou. Tento typ fotolýzy je umožněn především přítomností vlhkosti ve vzduchu. Vlivem záření dostatečné energie dochází k reakci uvedené na obrázku č. 21 [57], kdy produkty reakce jsou vysoce reaktivní radikály. Takto vzniklé radikály mohou reagovat s molekulami přítomnými v atmosféře. Jako příklad je uvedena na obrázku č. 22 reakce parathionu s hydroxylovým radikálem.



Obrázek 21: Reakce fotolýzy vody [57].



Obrázek 22: Fotolytická reakce parathionu [58].

K fotolytické degradaci organických látek dochází zejména v atmosféře, v povrchové vrstvě vodních ekosystému, na povrchu půdních částic nebo také například na povrchu kontaktně ošetřených rostlin [3].

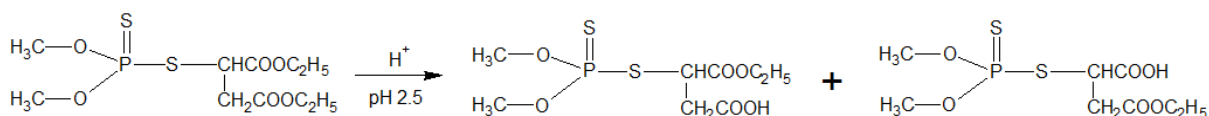
Fotolytická degradace látek je ovlivňována řadou faktorů, například počasím, přítomnými částicemi, vlhkostí atd. Velký význam lze přisoudit denní době. V poledne kdy stojí slunce nejvýše na obloze, procházejí sluneční paprsky nejmenší vrstvou atmosféry. Dochází tedy k nejmenšímu pohlcování fotonů atmosférou a zvyšuje se tedy pravděpodobnost srážky s pesticidními látkami [57] [43].

8.2 Oxidačně-redukční reakce pesticidů

K oxidaci pesticidů dochází reakcí mezi pesticidy a vhodnými oxidačními činidly. Oxidační produkty mohou být toxičtější a dosahovat vyšší perzistence ve srovnání s původními látkami. Probíhá ve všech složkách životního prostředí. Oxidace je jeden ze základních biotransformačních mechanismů v organismech pro odbourávání cizorodých látek. K oxidačním procesům dochází i v potravinách a to vlivem přidaného ozonu. Jeho funkce spočívá v zabránění nežádoucí činnosti organismů, která by vedla ke snížení hygienické nezávadnosti potravin. V potravinách se mohou nacházet rezidua pesticidů, která by mohla reagovat s přítomným ozonem [59] [60].

Při redukčních reakcích reagují pesticidy s vhodnými redukčními činidly. Tyto činidla jsou obvykle protonovaná. Jako příklad lze uvést reakci organofosforového insekticidu

malathionu, který podléhá redukční reakci v kyselém vodném prostředí (obrázek č. 23). Při reakci dochází k substituci ethylové skupiny za proton. Z původní sloučeniny vznikají dvě izomerické jednosytné sloučeniny. Následnými reakcemi vznikají dále dvojsytné produkty. Výsledkem těchto redukčních reakcí je snížení pesticidního účinku malathionu. V tabulce č. 6 lze vidět, že v případě dvojsytné formy malathionu bylo nutné k dosažení srovnatelných hodnot LD₅₀ mateřské sloučeniny zvýšit dávku tisíckrát.



Obrázek 23: Kysele katalyzovaná redukční reakce malathionu [47].

Sloučenina	LD50 (μg/kg)
Malathion	0,00001
Malathion (jednosytný)	0,00035
Malathion (dvojsytný)	0,01

Tabulka 6: Hodnoty LD50 pro jednotlivé formy sloučeniny malathionu [47].

8.3 Hydrolýza pesticidů

Mnoho sloučenin používaných jako pesticidy jsou rozpustné ve vodě. Jejich rozpustnosti ve vodě se využívá při jejich přípravě. K rozpouštění může také docházet v životním prostředí. Hydrolýza představuje rozkladnou reakci chemických látek, při níž se spotřebovává voda. Při hydrolýze může docházet k degradaci (rozkladu) původních chemických látek. Obzvláště je tento děj patrný v případě organofosforových a karbamátových sloučenin, a to při pH vyšším než 7. Hydrolýzou dochází k rozkladu účinné látky a tedy i ke snížení účinnosti pesticidního přípravku [61] [42] [50].

8.4 Biodegradace

Pod pojmem biodegradace se rozumí proces biologického odbourávání xenobiotik z organismů. Biodegradace probíhající v živých organismech představuje ochranný mechanismus. Vstupem xenobiotika do organismů dochází ke spuštění ochranného mechanismu, který se snaží například zvýšit jeho rozpustnost ve vodě a tím urychlit jeho vyloučení z organismu. Proces vedoucí ke zvýšení rozpustnosti xenobiotika je podporován enzymy oxidásou a hydrolásou. Princip spočívá v zavedení polárních funkčních skupin do mateřské sloučeniny, nebo její rozštěpení za vzniku polárnějších produktů. Tyto produkty vstupují následně do sekundárních reakcí s malými polárními endogenními sloučeninami a vytváří produkty, které jsou již snadno vyloučitelné z organismu [62].

9 Stanovení reziduí pesticidů v potravinách

Stanovení pesticidů v potravinových matricích je obtížný úkol. Tyto matrice jsou často velmi komplexní a sledovaný analyt je přítomen v nízkých koncentracích. Navíc při extrakci sledovaného analytu ze vzorku dochází i ke koextrakci jiných složek z matrice [63]. Koextrahované složky způsobují interference a nepříznivě tak ovlivňují stanovení analytu. I přes pokrok v instrumentální technice je nutným požadavkem pro kvantitativní stanovení reziduí pesticidů v potravinách výběr vhodné metody přípravy vzorků, která v sobě zahrnuje izolaci rezidua a odstranění interferentů krokem přečištění. Za posledních několik desetiletí bylo představeno mnoho různých metod přípravy vzorků. Většina z nich má několik společných kroků, kterými jsou homogenizace a extrakce do organického rozpouštědla [64] [63]. Organické rozpouštědlo bývá používáno samotné a také ve směsi s vodou nebo jiným organickým rozpouštědlem. Přidávají se k němu různé složky pro úpravu pH. K izolaci reziduí z potravinové matrice se využívá různých extrakčních technik. Mezi nejstarší, ale v současnosti stále používanou patří extrakce kapalina-kapalina, LLE (z anglického liquid-liquid extraction). Tato extrakční technika bude dále popsána podrobněji v samostatné kapitole. Mezi moderní extrakční techniky lze řadit například superkritickou fluidní extrakci (SFE), zrychlenou extrakci rozpouštědlem (ASE), extrakci podporovanou mikrovlnným zářením (MAE), extrakci na pevné fázi (SPE) a její různé modifikace. Jednou z nejnověji používaných extrakčních technik je technika QuEChERS, která bude dále popsána v samostatné kapitole. Další vývoj v hledání nových extrakčních technik se zaměřuje na zvýšení účinnosti v odstraňování interferentů, snížení extrakčního času a množství

rozpouštědel nebo na možnost on-line spojení s detekčními systémy [63] [65]. Důležité je podotknout, že každá extrakční technika má své výhody i nevýhody (tabulka č. 7).

Technika	Výhody	Nevýhody
MAE	+ snadné provedení + současná extrakce více vzorků + malé množství extrakčního rozpouštědla + časová úspora	- nízká selektivita extrakce - extrakt nutno přechistit - nepoužitelná pro termolabilní látky - nutný čas na vychladnutí
SFE	+ značně redukováná spotřeba rozpouštědel + extrakce termolabilních sloučenin + časová úspora + možnost automatizace	- cena aparatury - relativně komplikované srovnání s jinými extrakčními technikami
SPE	+ čistota extraktu + snadná automatizace + vysoké výtěžky	- cena (SPE kolonky na jedno použití)
ASE	+ snadná automatizace + časová úspora + průměrná spotřeba rozpouštědel + jednoduché provedení	- cena aparatury - nízká selektivita extrakce - extrakt nutno přechistit
SPME	+ možnost opakovaného použití jednoho vlákna + cena + kompatibilita s nástřikovým zařízením pro GC + použití rozpouštědel může být zcela eliminováno	- problém s reprodukovatelností - optimalizace metody - nízký výtěžek analytů
MSPD	+ cena + možnost aplikace za podmínek <i>in situ</i> + nízká spotřeba rozpouštědel	- nevhodná pro suché vzorky nebo obsahující vysoký obsah lipidů - nízký výtěžek analytů
LLE	+ jednoduchost provedení	- nízká selektivita - spotřeba rozpouštědel

Tabulka 7: Vlastnosti vybraných extrakčních technik [66] [63] [7] [39].

V současnosti se ke stanovení reziduí pesticidů v potravinách využívá separačních technik ve spojení s různými způsoby detekce. Jedná se například o plynovou chromatografii, vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, chromatografii na tenké vrstvě, superkritickou fluidní chromatografii, kapilární elektroforézu nebo imunochemické metody. Avšak nejvíce rozšířenými je plynová a vysokoúčinná kapalinová chromatografie [67] [68].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie dosahuje velkého významu pro stanovení termolabilních a netěkavých látek. Výhodou také představuje možnost nástřiku velkého množství vzorku (1-2 ml), které umožňuje dosáhnout vysoké citlivosti analýzy. V případě kapalinové chromatografie je možnost kombinace s různými typy detektorů, které se vyznačují různou citlivostí a selektivitou. Nejčastěji používanými typy detektorů jsou například UV-VIS detektor, PDA detektor nebo MS detektor [67].

Plynová chromatografie nabíla značného významu především svou vysokou citlivostí pro separaci a stanovení těkavých sloučenin. Omezení pro použití plynové chromatografie však představuje netěkavost některých sloučenin nebo jejich termolabilita. Některé zdroje uvádí limitující teplotu okolo 400 °C a molekulovou hmotnost okolo 1000. Výhodou použití plynové chromatografie v analýze pesticidů je její možnost kombinace s různými detektory [68]. Nejpožívanější v současnosti je však spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Význam však mají i jiné typy detektoru jako například plamenově fotometrický detektor (FPD), termoionizační detektor (TID) nebo detektor elektronového záchyty (ECD). Tyto typy detektorů umožňují dosáhnout vyšší selektivity a citlivosti pro určité skupiny pesticidních sloučenin [69]. Jako vhodný příklad lze uvést srovnání GC-MS a GC-ECD při stanovení 10 organofosforových pesticidů v rostlinném oleji. Zdroj [65] uvádí dosažení lepších kvantitativních výsledků v případě GC-ECD u všech 10 sledovaných pesticidních sloučenin.

9.1 Derivatizace

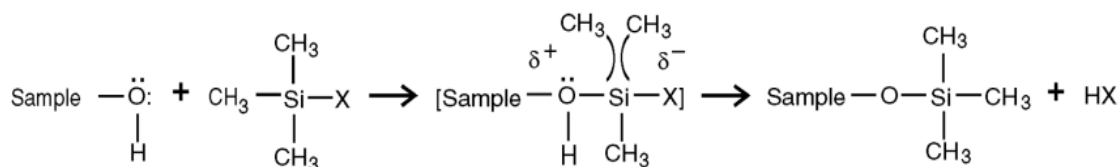
V předchozí kapitole byla uvedena vhodnost použití plynové chromatografie pro těkavé a termostabilní sloučeniny. Netěkavé a termolabilní látky lze však upravit derivatizací. Derivatizace je procesem chemické modifikace sloučeniny za účelem vytvoření nové sloučeniny s vlastnostmi vhodnými pro analýzu pomocí plynové chromatografie [70]. Různými způsoby derivatizace lze zvýšit těkavost, tepelnou stabilitu nebo například chromatografické vlastnosti původních sloučenin. Sloučeniny obsahující polární funkční

skupiny jsou často intermolekulárními silami drženy u sebe a tím vykazují nízkou těkavost. Derivatizací těchto polárních funkčních skupin jsou intermolekulární síly oslabeny a důsledkem je vzrůst jejich těkavosti. V případě sloučenin s nízkou molekulovou hmotností může naopak přílišná těkavost být problémem. Při manipulacích se vzorkem může docházet ke ztrátám odtěkáním. Derivatizace umožňuje snížit jejich těkavost. Modifikací polárních funkčních skupin sloučenin dochází také k potlačení adsorpce těchto látek na aktivní povrch kolon nebo ke zlepšení detekčních vlastností. Například navázáním halogenovaných substituentů je možné významně zlepšit detekční vlastnosti v případě použití ECD [71].

Hlavními typy derivatizace jsou silanizace, alkylace a acylace. Vlastnosti jednotlivých typů jsou uvedeny v tabulce č. 8.

- **silylace** – nejčastěji používaný typ derivatizace, produktem jsou silyl deriváty. Proces silylace probíhá mechanismem nukleofilní substituce (SN2). Není vhodné, aby ve vzorku byla přítomna voda nebo alkohol. Silylační činidlo reaguje s těmito složkami dříve než s analytem a bylo by obtížné dosáhnout kvantitativních výsledků derivatizace. Jako rozpouštědlo se nejčastěji používá pyridin. Pro zajištění kvantitativních výsledků je doporučeno derivatizační směs zahřívat při 90 °C po dobu 30 minut [72].

Obrázek č. 24 ukazuje mechanismus obecné silylační reakce. Průběh reakce je ovlivněn odstupující skupinou. Reakce probíhá snadněji, pokud odstupující skupina vykazuje nízkou bazicitu, schopnost stabilizovat negativní náboj v tranzitním stavu a vykazuje slabou nebo žádnou π zpětnou vazbu mezi odstupující skupinou a atomem křemíku.



Obrázek 24: Schéma mechanismu obecné silylační reakce [73].

Častým silylačním činidlem a činidlem použitým v experimentální části je BSTFA (bistrimethylsilyltrifluoroacetamid). Jedná se o vysoce těkavou látku, která byla poprvé k derivatizace použita v roce 1968 [73].

- **Acylace** – Acylace polárních skupin sloučenin probíhá pomocí acyl anhydridů, acyl halidů nebo aktivovaných acyl amidů. Při acylační reakci s acyl anhydridy a acyl halidy vznikají jako vedlejší produkty reakce kyseliny, které je nutno před GC analýzou odstranit. Například použitím vhodného rozpouštěla se schopností vázat kyselé vedlejší produkty. V případě použití aktivovaných acyl amidů tyto vedlejší produkty nevznikají. Hlavními produkty reakcí acylačních činidel se sloučeninami s aktivním vodíkem jsou estery, thioestery a amidy. [74].
- **Alkylace** – Při tomto způsobu derivatizace dochází k nahrazení polárních funkčních skupin alkylovou skupinou. Výslednými produkty jsou příslušné estery, ethery, alkyl aminy nebo alkyl amidy [75].

Typ derivatizace	Výhody	Nevýhoda
Silylace	• Schopnost derivatizovat široké spektrum sloučenin • Velký výběr derivatizačních činidel • Snadné provedení	• Citlivost silylačních činidel na vlhkost • Nutnost použít aprotická rozpouštědla
Acylace	• Významné zvýšení citlivosti ECD při použití halogenovaných činidel • Hydrolytická stability derivátů	• Náročnější příprava acylačních činidel oproti silylačním činidlům • Nutno před GC analýzou odstranit vedlejší kyselé produkty • Citlivost acylačních činidel na vlhkost • Toxicita acylačních činidel
Alkylace	• Velký výběr derivatizačních činidel • Možnost volby derivatizačních podmínek (silně kyselé až silně alkalické) • Některé reakce lze provádět ve vodném prostředí • Stabilita derivátů	• Použitelnost pouze u aminů nebo kyselin • Toxicita alkylačních činidel

Tabulka 8: Typy derivatizace a jejich vlastnosti [74] [75] [73] [70].

V průběhu objevování stále nových pesticidních látek různých fyzikálně-chemických vlastností bylo stále nutnější hledat nové metody, které by umožnily identifikovat a kvantifikovat co nejširší spektrum těchto látek.

Multireziduální metody obvykle zahrnují jeden nebo více kroků umožňujících extrakci, přečištění a detekci více reziduí pesticidů společně. Vývoj multireziduálních metod zahrnuje testování jednotlivých kroků a hledání limitů jejich použitelnosti. Testování je prováděno na různých typech vzorků a se sloučeninami s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi [64]. Tři základní kroky multireziduálních metod (extrakce, přečištění, detekce) mohou dále sestávat z více dílčích kroků. Těmito dílčími kroky může být v případě extrakčního kroku například použití několika různých rozpouštědel, která umožní extrakci určité skupiny analytů podle jejich fyzikálně-chemických vlastností. Dílčí kroky přečištění jsou navrhovány k přečištění extraktu tak, aby umožnily co nejpřesnější následnou detekci [64] [68].

Svou univerzálností jsou multireziduální metody vhodné pro stanovení reziduí pesticidů ve vzorcích potravin s neznámou historií ošetření [76].

9.2 Extrakce kapalina-kapalina

Výběr vhodného rozpouštědla je základním požadavkem pro optimální provedení extrakce kapalina-kapalina. Volba se řídí několika požadavky. Jedním z nich je například povaha složky, kterou chceme izolovat. K orientačnímu určení vhodných rozpouštědel lze využít Liebiegova pravidla, které zní „Podobné se rozpouští v podobném“. Použití je možno uvést na příkladu extrakce naftalenu z vody, kdy je vhodnější k izolaci naftalenu použít benzen než třeba ester [77].

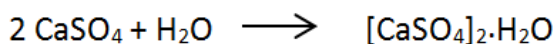
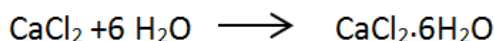
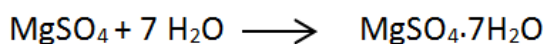
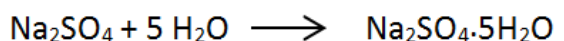
Další kritérium pro volbu vhodného rozpouštědla je čistota rozpouštědla. Dostatečná čistota rozpouštědla je nezbytností pro zabránění potenciálních interferencí. Pokud rozpouštědlo nemá dostatečnou čistotu (obsahuje nečistoty), dochází při prekoncentraci odpařováním rozpouštědla ze vzorku i k zakoncentrování těchto nečistot. Obecně platí, že rozpouštědla s vyšší čistotou jsou i dražší. Je tedy nutné najít optimální poměr mezi čistotou a cenou [78].

Volba rozpouštědla se také řídí podle typu detektoru. Rozpouštědlo by nemělo svým signálem negativně ovlivňovat měření signálů sledovaných analytu. Názorným příkladem je nevhodnost použití acetonitrilu pokud detekce bude probíhat pomocí dusíko-fosforového detektoru nebo použití methylenchloridu v případě detektoru citlivého na přítomnost halogenů. Jiným příkladem může být nevhodnost použití rozpouštědel absorbujících záření vlnové délky využívané k detekci analytů například u UV detektorů [79].

Mezi další požadavky na volbu rozpouštědla patří například dipólový moment rozpouštědla, teplota varu, toxicita nebo hořlavost. Dipólový moment rozpouštědla zvyšuje selektivitu extrakce pro látky odpovídající polaritu. Lze například extrahovat nepolární látky z vodné matrice do nepolárního rozpouštědla a tím se zbavit polárních interferentů. Rozpouštědlo lze volit i podle teploty varu, například pokud je nutná výměna rozpouštědla ovlivňujícího odezvu detektoru odpařením za jiné vhodnější rozpouštědlo. Rozpouštědla se dále liší svou toxicitou. Při práci s rozpouštědly s toxickými vlastnostmi je nutné dbát zvýšené pozornosti a dodržovat bezpečnostní opatření. Zvýšená pozornost a bezpečnostní opatření platí také při práci s hořlavými rozpouštědly. Například diethylether, sirouhlík nebo aceton jsou hořlaviny 1. třídy s bodem vzplanutí do 21 °C.

Předpokladem pro vytvoření dvousložkového systému rozpouštědel je jejich vzájemná nemísitelnost nebo omezená mísitelnost. Nejčastěji se využívá systému, ve kterém je jedna fáze organická a druhá vodná. Tabulka č. 9 ukazuje vzájemnou mísitelnost jednotlivých rozpouštědel. Distribuce látky mezi dvěma fázemi se řídí Nernstovým distribučním zákonem, který zní „Jakékoliv sloučeniny se rozdělí mezi dvě nemísitelná rozpouštědla takovým způsobem, aby poměr koncentrací v obou fázích zůstal konstantní“. Rovnováha mezi koncentracemi analytu v obou fázích (charakteristická pro daný analyt v daném systému) je vyjádřena distribuční konstantou K_D . V systému voda-organická fáze je K_D vyjádřena jako poměr rovnovážné koncentrace látky v organické fázi k její rovnovážné koncentraci ve fázi vodné (obrázek č. 25). Podmínkou pro separaci dvou látek je odlišná hodnota jejich distribučních konstant [80].

Významným problémem extrakce kapalina-kapalina je částečná mísitelnost dvou nemísitelných rozpouštědel. Například při extrakci organické látky z vodné fáze do organického rozpouštědla. Při odebrání organické fáze je v této fázi rozpuštěné určité množství vody. Abychom potlačili částečnou rozpustnost organického rozpouštědla ve vodné fázi, je nutný přídavek anorganické soli. Anorganická sůl po reakci s vodou vytváří hydráty (obrázek č. 26) a tím dochází k jejímu odstranění z organické fáze.

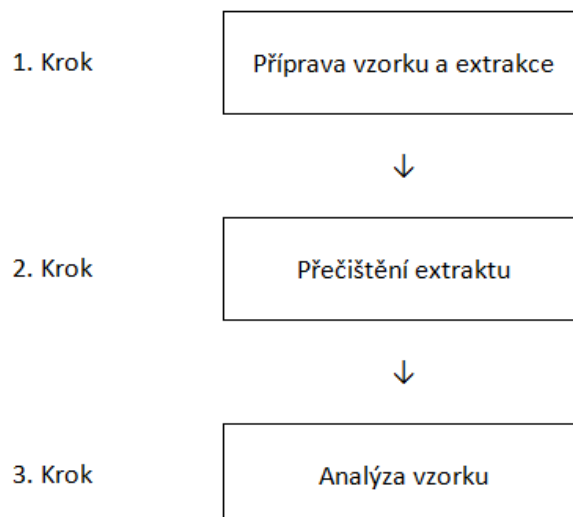


Obrázek 26: Reakce sušících činidel s vodou [83].

Nevýhodou může být také tvorba emulzí, které vznikají při prudkém protřepání extrakční směsi. Existuje však několik způsobů jejich odstranění a to například přidavkem většího objemu extrakčního činidla, přidavkem anorganické soli nebo odstředěním [80].

9.3 QuEChERS

Tuto techniku poprvé použili v roce 2000 Steven J. Lehotay a Michelangelo Anastassiades. Název, který je složeninou počátečních písmen šesti slov již vystihuje základní vlastnosti této techniky (Quick - rychlá, Easy - jednoduchá, Cheap - levná, Effective - efektivní, Rugged – robustní, Safe – bezpečná). QuEChERS metoda poskytuje významné zvýšení efektivity a propustnosti v laboratořích. Sada 20 extraktů může být připravena za méně než 60 minut jedním pracovníkem [84]. Tato metoda vyžaduje jen několik ml rozpouštědla za dosažení dostatečné návratnosti. Příkladem může být analýza stopadesátí pesticidů v obilovinách pomocí GC/MS, při které bylo využito QuEChERS techniky. Při této analýze bylo dosaženo při koncentracích 5 – 200 µg/kg návratnosti v rozmezí 70-120 % s RSD okolo 20 % [76] [85]. Jak lze vidět na obrázku níže, metoda se skládá ze tří kroků a to z přípravy vzorku a extrakce, přečištění a analýzy.



Obrázek 27: Základní kroky QuEChERS techniky.

Nutným předpokladem jako každé metody je zajistit vhodný odběr a přípravu vzorku. Součástí přípravy vzorku je jejich dostatečná homogenizace. Často se provádí za chlazení, aby nedocházelo ke ztrátě analytů. K extrakci se používají různá extrakční rozpouštědla v závislosti na povaze vzorku a dalším postupu stanovení analytu. Vodu je nutno odstranit ze vzorku před nadávkováním do chromatografické kolony z důvodu možnosti deaktivace sorbentu či ovlivnění výsledného signálu detektoru. Při extrakci současně dochází k odstranění nečistot a interferentů [86]. Ke vzorku se také přidávají přídavky různých pufrů a solí. Tyto přídavky slouží ke zvýšení účinnosti extrakce, k odstranění vody nebo k ochraně citlivých analytů. Účinnost extrakce se zjišťuje například přidáním roztoku vnitřního standardu ke vzorku před extrakcí a stanovením jeho výsledné koncentrace ve vzorku po extrakci. Při extrakci původního vzorku jsou s analytem koextrahovány i nežádoucí látky. Tyto nežádoucí látky by mohly se stanovovaným analytem interferovat a tím komplikovat jeho výslednou identifikaci a kvantifikaci. Interferenty mohou také způsobit poškození analytické instrumentace [84] [86]. Je tedy nutno zařadit po extrakci krok přečištění. K přečištění se v metodě QuEChERS využívá dSPE [76]. Jedná se o poměrně novou extrakční a čistící techniku. Oproti jiným technikám pracuje za laboratorních podmínek a je tedy použitelná i pro extrakci méně stabilních látek. Ve srovnání s klasickými technikami

dSPE pracuje s menšími objemy rozpouštědel. Avšak tyto objemy jsou stále natolik velké, že je nutné jejich odpaření před koncovou analýzou. Rozdíl mezi klasickou SPE a dSPE spočívá v umístění sorbentu. U dSPE je často sorbent (+ různé soli) rozetřen spolu se vzorkem. Touto směsí je naplněna kolonka (tělo stříkačky) a směs je stlačena. Dále dochází k eluci analytu pomocí vhodného rozpouštědla. Výsledný extrakt se následně centrifuguje a je připraven k další analýze. U SPE je sorbent již součástí kolonky. Volbu vhodného sorbentu určuje povaha matrice a analytu. Přehled jednotlivých druhů sorbentů ukazuje tabulka č. 10.

Sorbent	Vlastnosti
Aminopropyl	Odstranění cukrů a mastných kyselin.
ChloroFiltr	Odstranění chlorofylu z acetonitrilových extraktů bez ztrát polárních aromatických pesticidů.
C18	Odstranění dlouhých řetězců mastných kyselin, sterolů a jiných nepolárních interferentů.
Grafitizovaný uhlík (GCB)	Odstranění pigmentů, polyfenolů a jiných polárních sloučenin.
Primární sekundární amin (PSA)	Odstranění cukrů a mastných kyselin, organických kyselin a lipidů. S přídavkem C18 odstranění sterolů.
MgSO ₄	Odstranění vody z organické fáze.

Tabulka 10: Přehled jednotlivých druhů sorbentů a jejich vlastnosti [87] [76] [86].

Posledním krokem je analýza již přečištěného extraktu pomocí plynové či kapalinové chromatografie. Plynová chromatografie je vhodná k analýze těkavých, teplotně stabilních látek a přednost oproti použití kapalinové chromatografie dostává v případě analýzy obtížně ionizovatelných sloučenin pomocí ESI nebo chemické ionizace za atmosférického tlaku. Kapalinová chromatografie je především vhodná pro analýzu polárních, tepelně labilních, netěkavých sloučenin bez nutnosti derivatizace [88]. V literatuře zaměřené na problematiku techniky QuEChERS byly nejčastěji tyto separační techniky kombinované s MS detektorem.

9.3.1 Techniky QuEChERS

V současnosti jsou akceptovány tři oficiální QuEChERS techniky. Výběr vhodné QuEChERS techniky je založen na povaze vzorku, stanovovaném analytu a použité separační technice [88] [85]. Hlavní rozdíly mezi jednotlivými technikami ukazuje následující přehled:

1. Originální (Anastassiades and Lehotay, 2003) [89]

- ke snížení koncentrace polárních interferentů se používá přídavek NaCl
- menší počet činidel umožňuje dosáhnout lepšího přečištění
- nepoužívá se kyselina octová, která by mohla být problematická pro stanovení pomocí GC/MS
- proces přečištění pomocí dSPE

2. AOAC 2007.01 [83] [89]

- k ochraně citlivých analytů před degradací v bazické oblasti se používá pufr složený z 1 % kyseliny octové v acetonitrilu a octanu sodného
- metoda poskytuje vyšší extrakční výtěžek pro sloučeniny citlivé na pH
- v extrakčním kroku se používá kyselina octová (její nadbytek může přetížit PSA sorbent používaný v kroku přečištění a ovlivnit výsledek GC analýzy)

3. Buffered (EN15662) [89]

- ke snížení koncentrace polárních interferentů se používá NaCl
- k ochraně citlivých analytů v bazické oblasti se využívá několika pufracích činidel

Následující tabulka č. 11 ukazuje podrobně jednotlivé kroky výše uvedených QuEChERS technik.

1. Krok – Extrakční proces

Originální (Anastassiades and Lehotay)	AOAC (AOAC 2007.01)	Buffered (EN 15662)
10 g vzorku + 10 ml acetonitrilu + roztok IS v acetonitrilu protřepat	10 g vzorku + 15 ml 1 % vodný roztok kyseliny octové + roztok IS v acetonitrilu protřepat	10 g vzorku + roztok IS v acetonitrilu protřepat
↓	↓	↓
+ 4 g MgSO ₄ a 1 g NaCl třepat 1 minutu centrifugace 5 minut při 5000 rpm	+ 6 g MgSO ₄ a 1 g octanu sodného třepat 1 minutu centrifugovat 5 minut při 5000 rpm	+ 4 g MgSO ₄ , 1 g NaCl, 1 g dihydrátu citronanu sodného, 0,5 g hydrogen citronanu sodného třepat 1 minutu centrifugovat 5 minut při 5000 rpm

2. Krok – Extrakce disperzní tuhou fází – Proces přechištění

↓	↓	↓
odebrat 1 ml supernatantu do mikro centrifugační zkumavky obsahující 150 mg MgSO ₄ a 50 mg PSA třepat 1 minutu centrifugovat 1 minutu při 6000 rpm	odebrat 1 ml supernatantu do zkumavky pro dSPE obsahující MgSO ₄ , PSA (C18, GCB) třepat 30 sekund centrifugovat 1 minutu při 1500 rpm	odebrat 1 ml do zkumavky pro dSPE obsahující 25 mg PSA a 150 mg MgSO ₄ (+ 2,5 nebo 7,5 mg GCB k odstranění pigmentů) třepat 30 sekund (5 minut při použití GCB) centrifugovat 5 minut při 3000 rpm

3. Krok – Analýza vzorku

↓	↓	↓
odebrat 0,5 ml do viálky pro GC či LC analýzu	konzervace pro GC/MS přídavkem toluenu, nebo 6,7 mM kyselinou mravenčí pro LC/MS	konzervace 5 % kyselinou mravenčí v ACN analýza s GC/MS nebo LC/MS

Tabulka 11: Jednotlivé kroky QuEChERS technik [76] [84].

10 Aplikace QuEChERS technik

Techniky QuEChERS jsou svou rychlostí a efektivitou vhodnou alternativou ke klasickým technikám úpravy vzorků v multireziduálních analýzách pesticidů [90]. V posledních letech z těchto klasických technik úpravy vzorků se do popředí dostala extrakce tuhou fází, která poskytuje také vysokou efektivitu. Avšak rozdíl v rychlosti a efektivitě mezi technikou QuEChERS a SPE nastává v případě úpravy vzorků s komplexní matricí. Komplexní matrice obsahuje většinou mnoho nečistot různých fyzikálně chemických vlastností. K dostatečnému přečištění je tedy nutno v případě extrakce tuhou fází použít několik SPE kolonek s různými vlastnostmi. Tento požadavek způsobí významný nárůst ceny a také zvýší komplexnost celého procesu úpravy vzorků. Technika QuEChERS využívá jako krok přečištění disperzní extrakci tuhou fází, která je v porovnání s konvenční SPE jednodušší a levnější [90] [91].

Původní QuEChERS techniky byly navrženy pro vzorky ovoce a zeleniny s vysokým obsahem vody (nad 80 %) a kyselostí v rozsahu 5-8 pH [92]. V současnosti existuje již nespočet různých modifikací třech základních QuEChERS technik používaných v analýzách pesticidů. Modifikované QuEChERS techniky poskytují vyšší propustnosti vzorků, potlačují degradaci citlivých analytů nebo rozšiřují aplikační oblast na nové typy matric. Při analýze reziduí pesticidů ve vzorcích potravin se přihlíží na obsah vody v těchto matricích. Pro zajištění optimálních výsledků extrakce je nutné, aby matrice obsahovala dostatečné množství vody. Ke vzorkům ovoce a zeleniny s obsahem vody v rozmezí 25 – 80 % vody je nutné přidat na každý 1 g vzorku 1 ml H₂O. U vzorků ovoce a zeleniny s obsahem vody nad 80 % přídavek vody není nutný. V případě vzorků obilovin, sušeného ovoce nebo například kořenů je nutné na 1 g vzorku přidat alespoň 2 ml vody [91] [90] [92].

Různé zdroje zabývající se modifikacemi QuEChERS technik také popisují nutnost vhodně zvolit typ sorbentů pro přečištění vzorků podle typů matrice. Některé druhy ovoce a zeleniny jako například špenát, červená paprika nebo mrkev obsahují vysoký obsah nepochlápáných pigmentů (karotenoidů nebo chlorofylu). Jiné zase například obsahují různé množství mastných kyselin nebo sacharidů. Všechny tyto nečistoty působí značně negativně, pokud je následná analýza prováděna zejména pomocí plynové chromatografie. Nečistoty se často hromadí v nástřikovém prostoru nebo rychle zanášejí liner. Na výběr vhodnému sorbentů k přečištění extraktů je tedy kladená zvýšená pozornost [86] [93]. Typy sorbentů a jejich použití ukazuje tabulka č. 11. v kapitole 9.3.

Výše bylo uvedeno, že původní QuEChERS techniky byly navrženy pro vzorky obsahující více než 80 % vody a s aciditou v rozsahu 5-8 pH. Práce [94] se zabývala možností aplikace QuEChERS techniky i na vzorky s aciditou nižší než 5 pH. Výsledkem bylo zjištění, že při extrakci reziduí pesticidů z matric s nižšími hodnotami pH, dochází k výraznému zvýšení množství koextrahovaných interferentů, které mají za následek zhoršení kvantifikace a zvýšení nároků na údržbu instrumentace. Na tyto překážky poukazují studie [95] [94] zabývající se analýzou reziduí pesticidů v citrusových plodech. Navíc také popisují zvýšenou citlivost některých pesticidů na nízké pH, které významně zhoršilo jejich výsledky výtěžností. Problematikou aplikace klasické Buffered (EN15662) QuEChERS techniky na vzorky citrusových plodů se zaměřila studie [96]. Výsledkem byla modifikace původní techniky v podobě přidavku 600 µl 5 M roztoku NaOH, který zajistil optimální výtěžnost sledovaných analytů.

Obecně jsou základní QuEChERS techniky aplikovány na vzorky s obsahem tuků do 2 %. Potraviny s vyšším obsahem tuků často obsahují také výrazně nižší % obsah vody než optimálních 80 %. Jak bylo již uvedeno výše ke vzorkům s nízkým obsahem vody je nutno na 1 g vzorku přidat alespoň 2 ml H₂O. Pro připomenutí: techniky QuEChERS jsou založeny na rozdělování složek vzorku mezi vodnou a acetonitrilovou fází s následným přidavkem anorganických solí. Je tedy nutné ke vzorkům s nízkým obsahem vody přidat na 1 g vzorku alespoň 2 g H₂O. Přídavek anorganických solí usnadní přechod analytů z vodné do acetonitrilové frakce. Analýzu těchto typů matric dále komplikuje přítomnost lipidů, které jsou často koextrahovány spolu s analyty do acetonitrilové fáze. Je tedy nutné extrakty přechistit. Pro snížení množství lipidů v acetonitrilové fázi se nejčastěji používá sorbent C18 nebo GCB. Při úpravě vzorků pomocí klasických technik bylo k přečištění extraktů matric s vyšším obsahem tuků nejčastěji využíváno extrakce kapalina-kapalina, gelové permeační chromatografie, superkritické fluidní chromatografie a extrakce tuhou fází [97].

V posledních letech se stala novou výzvou pro srovnání QuEChERS technik s klasickými technikami úpravy vzorků jejich aplikace na vzorky s obsahem tuků nad 2 %, jako jsou například rostlinné oleje nebo obilniny. Touto problematikou se zabývalo několik prací, jejichž výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 12. Jedná se vždy o multi-reziduální stanovení vybraných pesticidních látek ze skupiny pyrethroidů, organofosforových, organochlorových a triazinových pesticidů. Pro srovnání jsou uvedeny i klasické techniky úpravy vzorků.

Matrice	Extrakce	Přečištění	Identifikace	Výtěžnost %	RSD %	LOD mg kg ⁻¹
Olivový olej	LLE (acetonitril-hexan)	GPC	GC-MS ²	84–110	1-16	<0,01 [98]
Sójový olej	LLE (acetonitril-hexan)	LLE (acetonitril-hexan)	GC-FID	73-166	2-18	0,0001-0,001 [99]
Olivový olej	LLE (acetonitril-hexan)	SPE (C18)	GC-ECD	71-107	2-12	0,002-0,05 [100]
Olivový olej	SFE (CO ₂)	SPE	GC-MS	70-120	<10	<0,05 [101]
Slunečnicový olej	SPE (C18), hexan	GCB	GC-ECD	94-105	1-5	<0,002 [102]
Olivový olej	QuEChERS (acetonitril-voda)	dSPE (PSA-GCB-C18)	GC-MS	70-120	<15	<0,01 [93]
Rýže	QuEChERS	PSA, C18	LC-MS	71-97	1-13	0,0005-0,01 [103]

Tabulka 12: Srovnání vybraných technik úpravy vzorků.

Z tabulky č. 12 je možno vidět, že techniky QuEChERS umožňují dosáhnout srovnatelných výsledků výtěžností jako klasické techniky. Avšak jejich výhodou je rychlost provedení a cena.

11 Experimentální část

- analytické váhy
- plynový chromatograf Agilent 7890A s hmotnostním detektorem Agilent 5975C (Agilent, Palo Alto, CA, USA)
- kolona – HP-5MS, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm
- odstředivka – Eppendorf centrifuge 5702

11.1 Pracovní pomůcky

- mikropipety
- kádinky
- víálky
- další běžné laboratorní pomůcky

11.2 Chemikálie

- methanol (Lach-Ner)
- pyridin (Lach-Ner)
- N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid, BSTFA (Merck)

- heptan (Lach-Ner)
- hexan (Lach-Ner)
- MgSO_4 (Merck)
- NaCl (Merck)
- analytické standardy (Sigma-Aldrich)

11.3 Použité extrakční techniky při stanovení chlorfenoxy pesticidů a vybraných kyselin

K vyextrahování chlorfenoxy pesticidních látek a vybraných kyselin jsem zvolil dvě extrakční techniky. První z nich je extrakce kapalina-kapalina za použití heptanu a methanolu jako extrakčních rozpouštědel. Druhou použitou extrakční technikou je vlastní modifikovaná metoda QuEChERS.

11.4 Postup jednotlivých extrakčních technik

Údaje v závorkách platí pro pracovní postup použitý při analýze vzorku kukuřice. Hodnoty před závorkou pak pro pracovní postup použitý při analýze vzorku rostlinného oleje.

- Extrakce kapalina-kapalina – Pracovní postup spočíval v odvážení 1 g vzorku rostlinného oleje (5 g vzorku kukuřice) do centrifugační zkumavky. Dále byl do centrifugační zkumavky přidán 1 ml methanolu (5 ml). Vzorek byl důkladně protřepáván po dobu 1 minuty. K protřepanému vzorku byly přidány 2 ml heptanu (10 ml) a opětovně byl vzorek důkladně protřepáván 1 minutu. K rozdělení fází a odstranění případných pevných nečistot ze vzorku byl obsah v centrifugační zkumavce centrifugován v odstředivce po dobu 5 minut při 4400 otáčkách. Po vyjmutí z odstředivky již bylo možno vidět rozdělení fází, kdy horní fáze byla methanolová a spodní heptanová. Pro další analýzu byla odebírána do připravené viálky horní methanolová fáze obsahující sledované analyty. Viálky s odebranou fází byla umístěna do odpařovacího zařízení, kde byl její obsah pomocí proudu dusíku odpařen do sucha. Takto upravený vzorek byl připraven k derivatizaci. Postup derivatizace sestával z přidání 75 μl pyridinu a 75 μl derivatizačního činidla (BSTFA). Následně byla uzavřená viálka termostatována při 90 °C po dobu 30 minut. V posledním kroku derivatizace byla viálka vyjmuta z termostatu a po jejím vychladnutí bylo k obsahu přidáno 350 μl hexanu. Následně byla viálka zazátkována a vzorek byl připraven pro GC analýzu.

- QuEChERS – Postup použité techniky QuEChERS spočíval v odvážení 1 g vzorku rostlinného oleje (5 g vzorku kukuřice) do centrifugační zkumavky. Ke vzorku byl přidán 1 ml H₂O (10 ml H₂O) a vzorek byl protřepáván po dobu 1 minuty. V dalším kroku bylo ke vzorku přidáno 1,5 ml acetonitrilu (15 ml). Vzorek byl dále protřepáván po dobu 1 minuty. Do centrifugační zkumavky se vzorkem a rozpouštědly byla následně přidána směs 200 mg MgSO₄ a 50 mg NaCl (1000 mg MgSO₄ a 250 mg NaCl). Obsah centrifugační zkumavky byl protřepáván 1 minutu. Poté byla centrifugační zkumavka umístěna do odstředivky na 5 minut při 4400 otáčkách. Po vyjmutí byla k dalšímu postupu odebírána do připravené víálky acetonitrilová fáze. Obsah víálky byl následně odpařen proudem dusíku. Takto upravený vzorek byl připraven k derivatizaci. Postup derivatizace byl stejný jako v případě použití extrakce kapalina-kapalina.

11.5 Instrumentace

Vzorky byly analyzovány plynovým chromatografem Agilent 7890A s hmotnostním detektorem Agilent 5975C (Agilent, Palo Alto, CA, USA). Analýza probíhala za podmínek 50°C - 2min - 10°C/min - 300°C - 15min, nástřik: 1μl, dávkovací pulz 140 kPa, 0,4 min, 280°C. Hmotnostní detektor pracoval v režimu Solvent delay. Data byla sbírána v režimu SIM od 7. minuty analýzy. Pro jednotlivé analyty byly vždy sbírány signály odpovídajících hodnot m/z. Monitorování iontů jednotlivých analytů započalo v čase uvedeném v tabulce č. 13 jako „počátek měření“ a trvalo vždy do začátku měření iontů dalšího analytu.

Analyt	počátek měření (min)	signál (m/z)	signál (m/z)
Klofibrová kyselina	7.00	143	286
Dicamba	16.50	203	292
MCPA	17.00	213	272
Dichlorprop	17.25	247	306
2,4-D	17.60	233	292
Fenoprop	18.50	255	340
Thiacloprid	19.70	265	325
Flufenamová kyselina	20.00	263	353
Imidacloprid	21.00	268	327
Meklofenamová kyselina	23.00	242	367

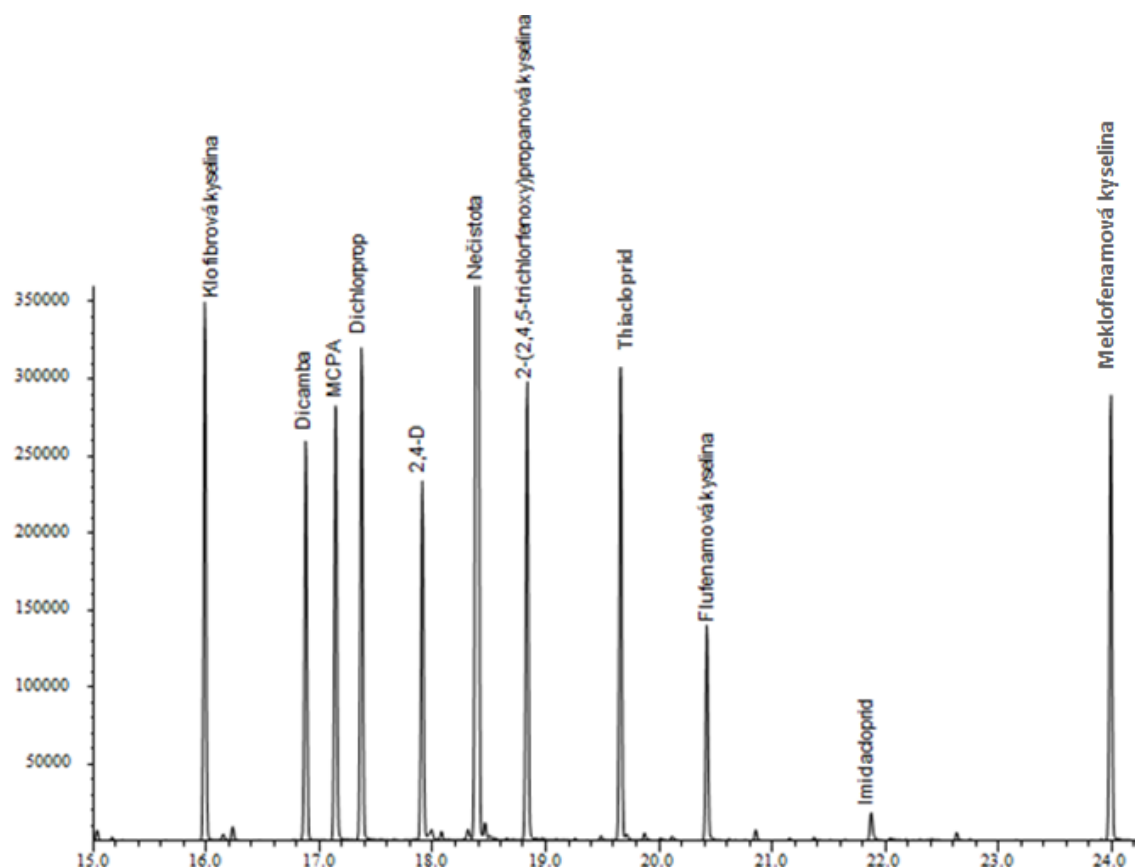
Tabulka 13: Časový průběh monitorování jednotlivých analytů.

12 Výsledky

12.1 Analýza standardů

Pro určení retenčních časů jednotlivých analytů byla provedena analýza směsného roztoku standardů. Roztok byl připraven odebráním 20 μl každého z 10 standardů o koncentraci 1 mg/ml do společné zkumavky Eppendorf. Ze vzniklé směsi bylo do připravené víálky odebráno 40 μl a následně byl obsah odpařen do sucha. Následovala derivatizace stejným postupem jako při derivatizaci reálných vzorků. Postup derivatizace sestával z přidání 75 μl pyridinu a 75 μl derivatizačního činidla (BSTFA). Následně byla uzavřená víálka termostátována při 90 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 minut. Poslední krok derivatizace spočíval ve vyjmutí víálky z termostatu, v přidání 350 μl hexanu k jejímu obsahu a zazátkování. Takto připravený vzorek byl analyzován plynovým chromatografem s hmotnostní detekcí.

Výsledky analýzy standardů lze vidět na obrázku č. 28. Hodnoty retenčních časů jednotlivých analytů jsou pro přehlednost vypsány v tabulce č. 14.



Obrázek 28: Chromatogram analýzy standardů.

Standard	t _r [min]
Klofibrová kyselina	15,98
Dicamba	16,88
MCPA	17,14
Dichlorprop	17,37
2,4-D	17,91
Fenoprop	18,91
Thiacloprid	19,68
Flufenamová kyselina	20,42
Imidacloprid	21,87
Meklofenamová kyselina	23,99

Tabulka 14: Analyty a jejich retenční časy.

12.2 Výtěžnost

Výtěžnost byla stanovena na vzorku slunečnicového oleje a to za použití extrakce kapalina-kapalina a modifikované metody QuEChERS. Pro vyhodnocení obou extrakčních technik byly připraveny 4 vzorky obsahující vždy 1 g vzorku slunečnicového oleje. Pro každou metodu vždy 2 vzorky. Jeden bez přídavku směšného standardu a druhý s přídavkem. Směsný standard byl připraven odebráním 20 µl každého standardu o koncentraci 1 mg/ml do společné zkumavky Eppendorf. Z takto připraveného směšného standardu bylo ke vzorku slunečnicového oleje odebráno 40 µl a to vždy do vhodně označených centrifugačních zkumavek. Vzorky slunečnicového oleje byly vždy uloženy do ultrazvukové lázně po dobu pěti minut. Poté byly vzorky upraveny pomocí vybraných extrakčních technik s následnou derivatizací a analýzou pomocí plynového chromatografu s hmotnostní detekcí. Výtěžnost byla určena jako podíl ploch jednotlivých píků ve vzorku oleje s přídavkem standardu a v čistém standardu. Vzorky bez přídavku směšného standardu byly použity pro kontrolu obsahu sledovaných látek v použitém oleji, žádný ze sledovaných pesticidů nebyl za těchto podmínek detekován. Výsledky ukazuje tabulka č. 15, číselné hodnoty představují průměrnou hodnotou získanou ze dvou měření pro každou techniku. Je

možno vidět dosažení lepších výtěžností všech analytů při použití modifikované metody QuEChERS.

Analyt	Výtěžnost LLE (%)	Výtěžnost QuEChERS (%)
Dicamba	50,30	83,55
Dichlorprop	45,35	70,75
2,4-D	50,80	69,70
Fenoprop	46,80	78,25
Imidacloprid	28,65	33,40
MCPA	52,85	74,60
Klofibrová kyselina	50,30	83,55
Flufenamová kyselina	43,05	91,05
Meklofenamová kyselina	35,20	54,95
Thiacloprid	36,25	41,75

Tabulka 15: Srovnání výsledků výtěžností LLE a QuEChERS.

12.3 Analýza reálných vzorků

Vybrané techniky úpravy vzorků byly použity při analýze reálných vzorků pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Vybrané vzorky a případné pozitivní nálezy sledovaných analytů jsou uvedeny v tabulce 16. Pokud vzorek není ve formě dostupné v obchodech, je u něho uvedené označení „*“, tyto vzorky slouží jako suroviny při výrobě potravin.

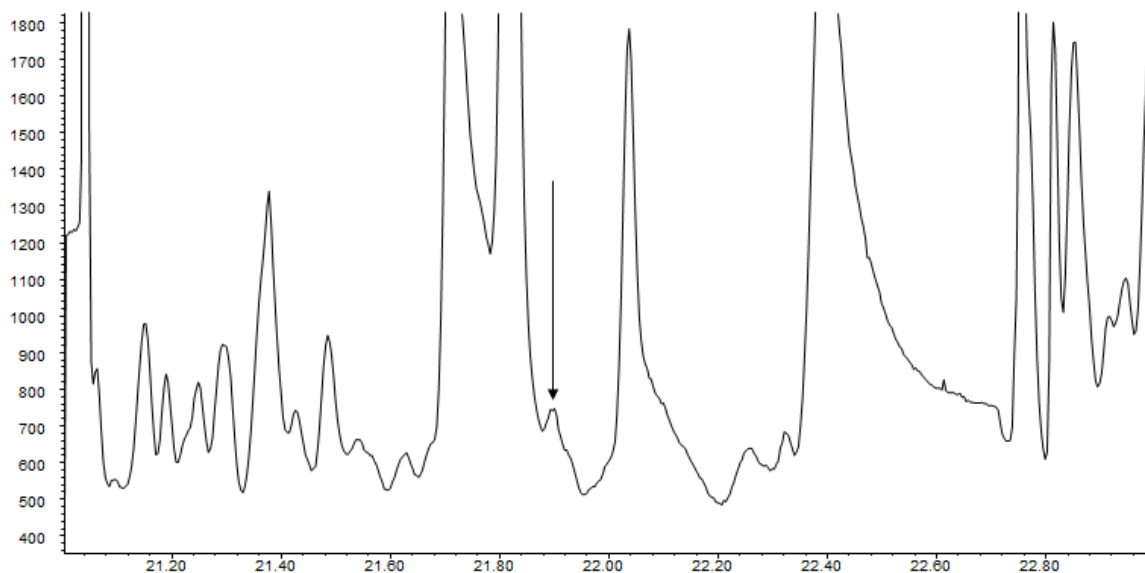
Vzorek	Pozitivní nález	Vzorek	Pozitivní nález
Proso	X	Kokos	X
Mák	X	Sója	X
Arašídý	X	Ovesné vločky	X
Chia	X	Káva	X
Pohanka	X	Fazole bílá	X
Sezam	X	Čočka	X
Hrách žlutý	X	Cizrna	X
Hrách zelený	X	Kukuřice *	imidacloprid
Pšenice *	X	Slunečnice	X
Oves *	X	Olivový olej (Terra Creta)	X
Slunečnicový olej (Vitae Dóro)	X	Olivový olej (Kaiser Franz Josef)	X
Slunečnicový olej (Promienna)	X	Hroznový olej (Olitalia)	X
Slunečnicový olej (Lukana)	X	Arašídový olej (Olitalia)	X
Slunečnicový olej (Clever)	X	Rýžový olej (Basso)	X
Olivový olej (Speroni Ololiva)	X	Kokosový olej (Drogerie markt)	X
Hroznový olej – Frankovka *	X	Hroznový olej – Zweigltrebe *	X
Hroznový olej – Rulandské šedé *	X	Hroznový olej – Dornfelder *	X
Hroznový olej – Ryzlink rýnský *	X	Hroznový olej – Pálava *	fenoprop; dichlorprop

Tabulka 16: Výsledky analýz reálných vzorků.

Pozitivního výsledku na sledované analyty bylo dosaženo u vzorku kukuřice a vzorku hroznového oleje odrůdy Pálava. Ve vzorku kukuřice byla zjištěna přítomnost insekticidu imidaclopridu, vzorek hroznového oleje odrůdy Pálava obsahoval rezidua pesticidů fenopropu a dichlorpropu. Pozornost v další části této diplomové práce se proto zaměřila na kvantifikaci zjištěných reziduí pesticidů v jednotlivých vzorcích. Extrakční postup byl proveden modifikovanou metodou QuEChERS, která poskytla lepší hodnoty výtěžnosti.

12.4 Analýza imidaclopridu ve vzorku kukuřice

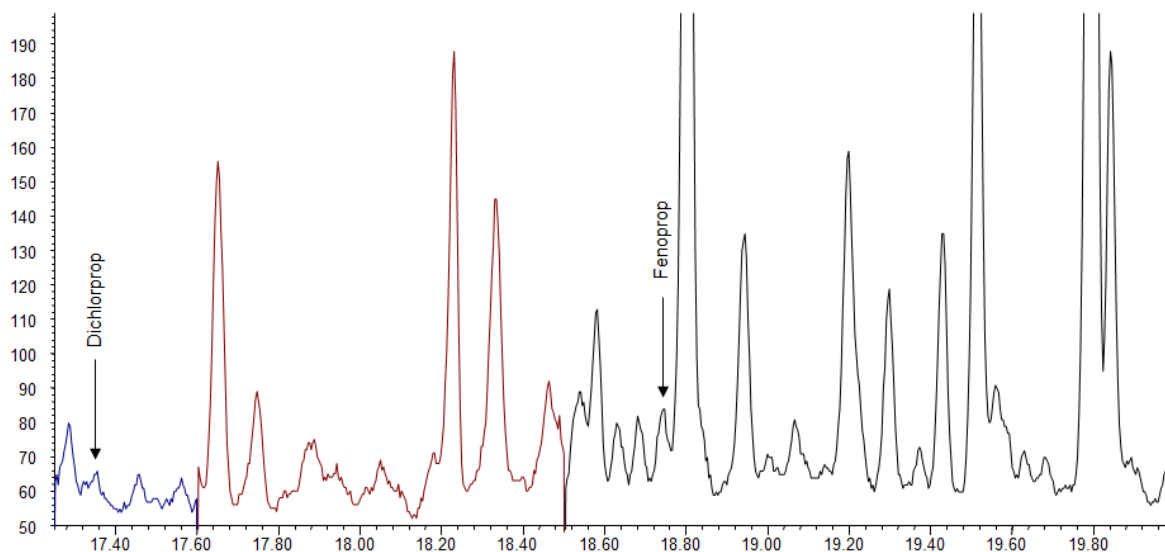
Na obrázku č. 29 je možno vidět výsledek analýzy vzorku kukuřice s vyznačeným píkem odpovídajícím analytu imidaclopridu.



Obrázek 29: Chromatogram analýzy vzorku kukuřice.

12.5 Analýza fenopropu a dichloropropu ve vzorku hroznového oleje odrůdy Pálava

Na obrázku č. 30 je možno vidět výsledek analýzy vzorku hroznového oleje odrůdy Pálava s vyznačeným i píky odpovídajícími analytům dichloropropu a fenopropu.



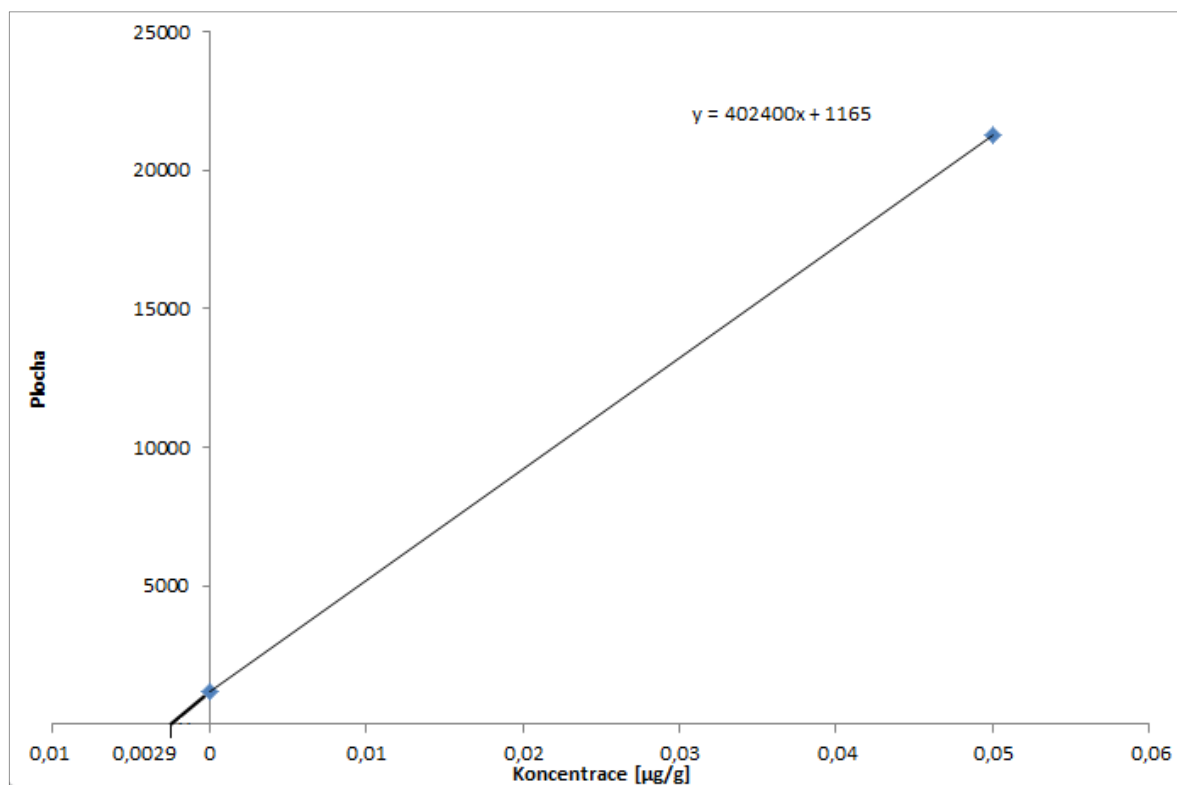
Obrázek 30: Chromatogram analýzy vzorku hroznového oleje odrůdy Pálava.

12.6 Kvantifikace

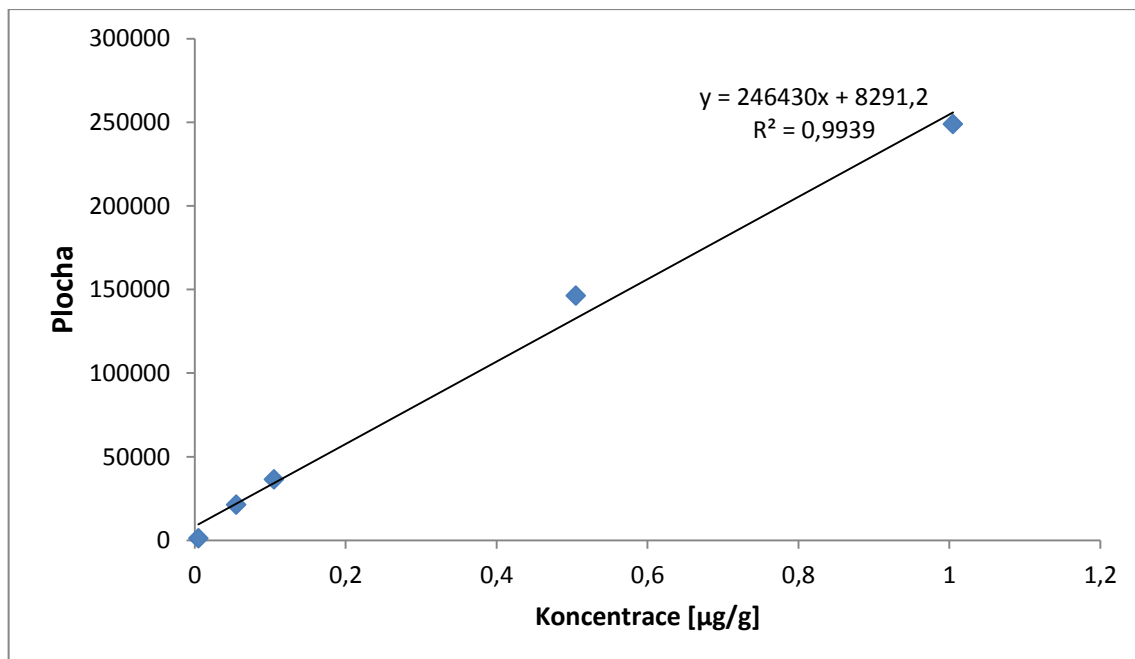
12.6.1 Kvantifikace imidaclopridu ve vzorku kukuřice

Pro předběžný odhad koncentrace imidaclopridu ve vzorku bylo využito přímého srovnání ploch píků odpovídajících analýze vzorku a vzorku s přidavkem standardu o koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$. Odhadovaná koncentrace byla vypočtena na 3,5410 $\mu\text{g/kg}$ vzorku.

Pro přesnější kvantifikaci bylo využito metody standardního přidavku. Optimalizovaným postupem byl analyzován vzorek kukuřice bez přidavku a vzorek se standardním přidavkem imidaclopridu o koncentraci 0,05 $\mu\text{g/g}$. Získané plochy píků byly využity pro výpočet hledané koncentrace imidaclopridu. Vypočtená souřadnice průsečíku kalibrační přímky s osou koncentrací odpovídá hledané koncentraci imidaclopridu 0,0028915 $\mu\text{g/g}$, tj. 2,8951 $\mu\text{g/kg}$ (obrázek č. 31). Pro ověření linearity závislosti odezvy na koncentraci v širším koncentračním rozmezí byla sestrojena kalibrační závislost analýzou vzorků kukuřice se standardními přidavky imidaclopridu o koncentracích 0,05; 0,1; 0,5; 1 $\mu\text{g/g}$. Výsledný graf je uveden na obrázku č. 32.



Obrázek 31: Standardní přidavek imidaclopridu.



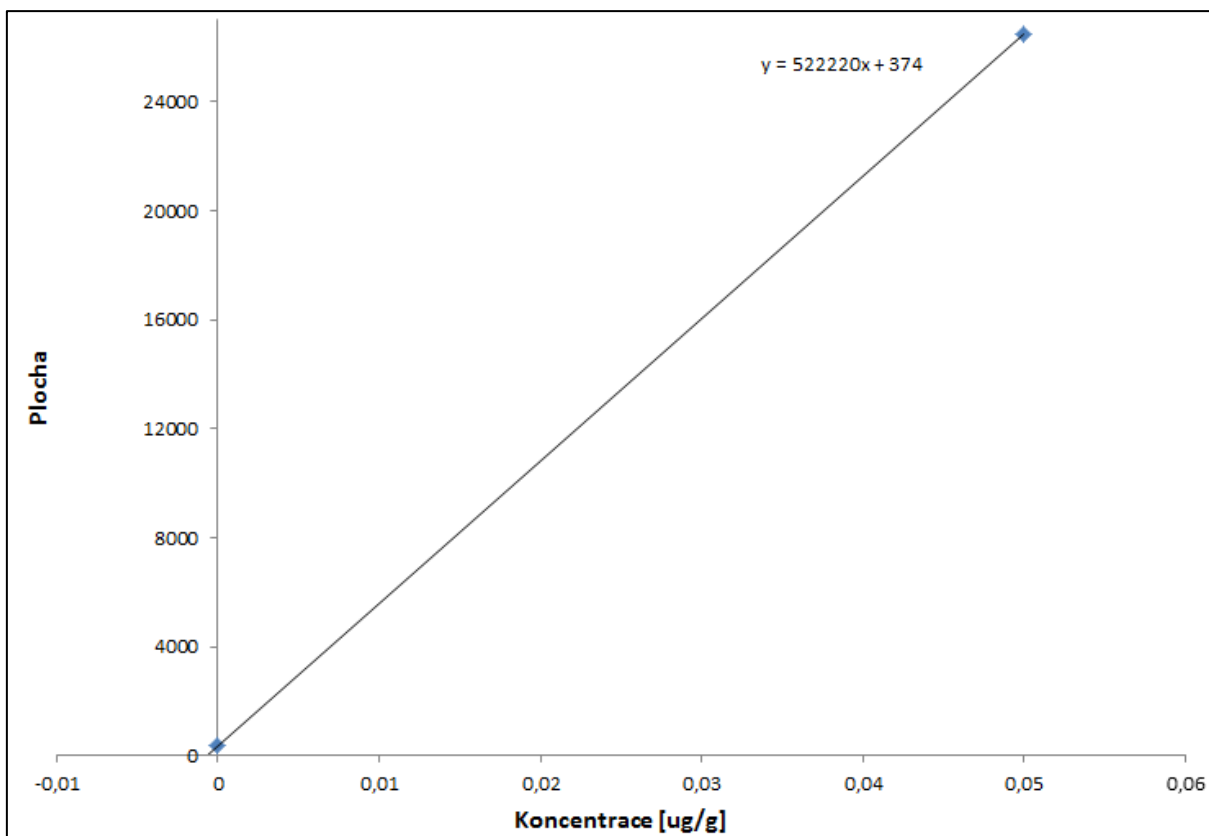
Obrázek 32: Standardní přídavky imidaclopridu – ukázka kalibrační závislosti s matricovými standardy.

12.6.2 Kvantifikace dichlorpropu ve vzorku hroznového oleje odrůdy Pálava

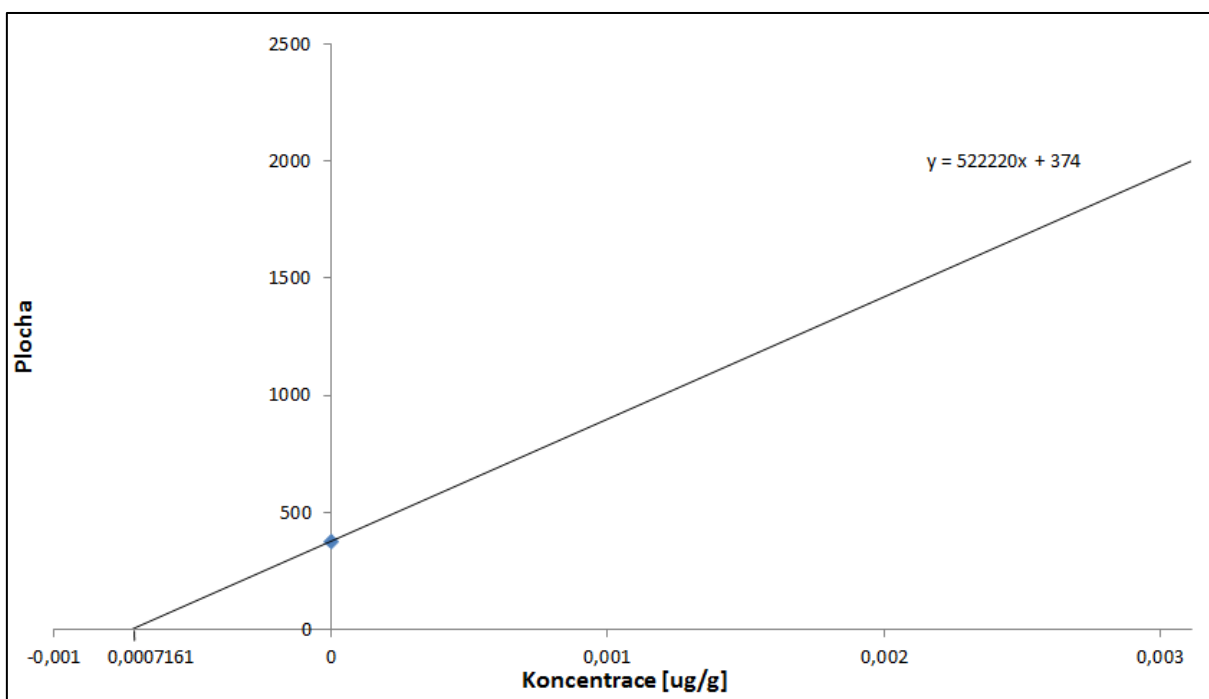
K odhadu množství dichlorpropu ve vzorku hroznového oleje odrůdy Pálava bylo využito přímého srovnání ploch píků odpovídajících analýze vzorku bez přídavku standardu a vzorku s přídavkem standardu o koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$. Odhadovaná koncentrace byla stanovena na 0,5941 $\mu\text{g/kg}$.

Pro přesnější kvantifikaci analytu dichlorpropu bylo využito metody standardního přídavku. Modifikovaným postupem byl analyzován vzorek kukuřice bez přídavku a vzorek se standardním přídavkem dichlorpropu o koncentraci 0,05 $\mu\text{g/g}$. Získané plochy píků byly využity pro výpočet hledané koncentrace dichlorpropu (obrázek č. 33). Vypočtená souřadnice průsečíku kalibrační přímky s osou koncentrací odpovídá hledané koncentraci dichlorpropu 0,0007161 $\mu\text{g/g}$, tj. 0,7161 $\mu\text{g/kg}$ (obrázek č. 34). Obrázek č. 34 je detailem obrázku č. 33.

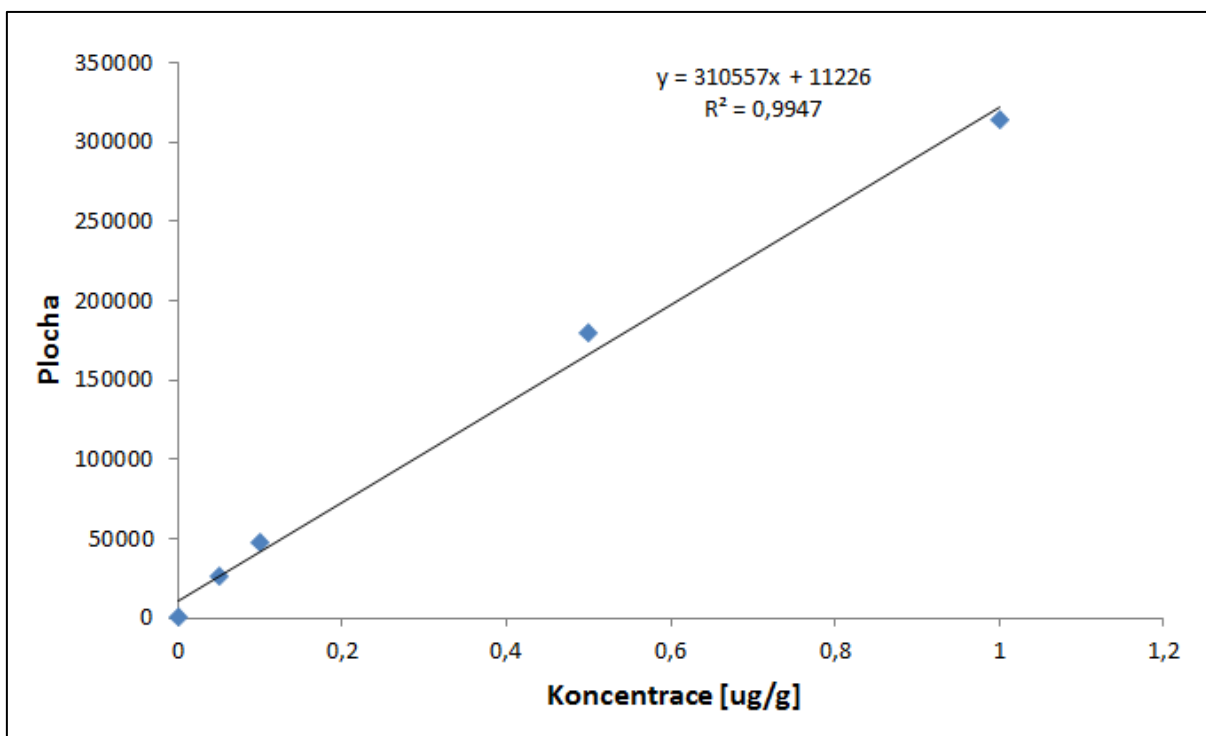
Pro ověření linearitu závislosti odezvy na koncentraci v širším koncentračním rozmezí byla sestrojena kalibrační závislost analýzou vzorků kukuřice se standardními přídavky dichlorpropu o koncentracích 0,05; 0,1; 0,5; 1 $\mu\text{g/g}$. Výsledný graf je uveden na obrázku č. 35.



Obrázek 33: Standardní přidavek dichloropropu.



Obrázek 34: Detail obrázku č. 33 - standardní přidavek dichloropropu.



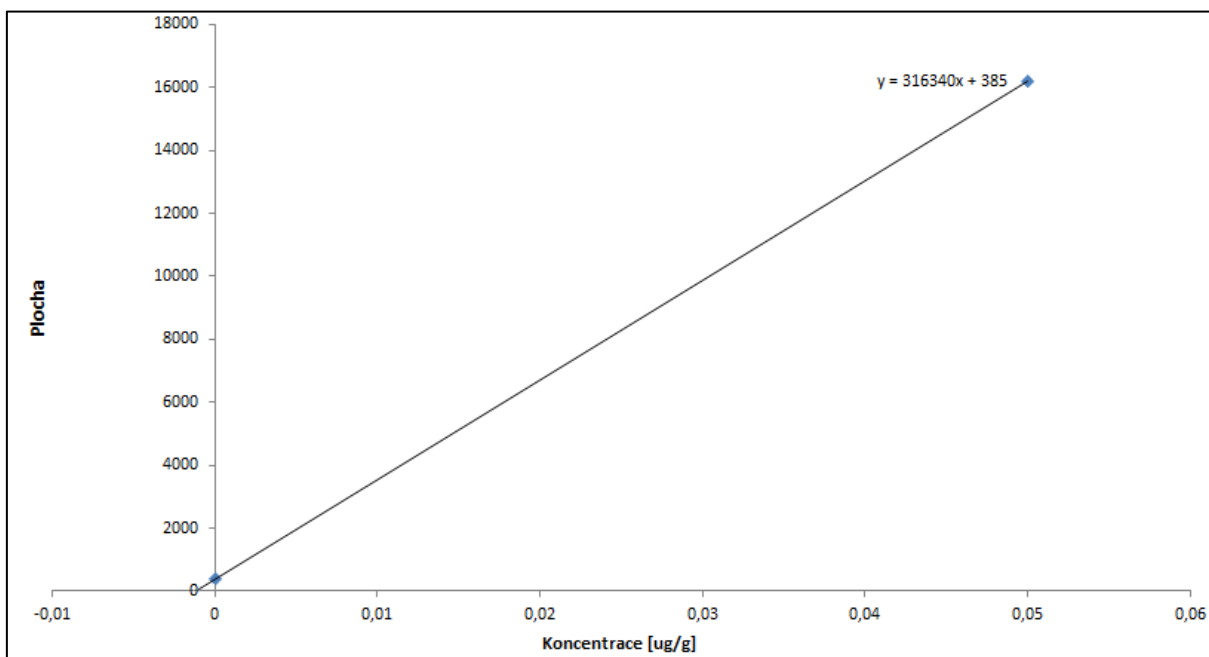
Obrázek 35: Standardní přídávky dichlorpropu – ukázka kalibrační závislosti s matricovými standardy.

12.6.3 Kvantifikace fenopropu ve vzorku hroznového oleje odrůdy Pálava

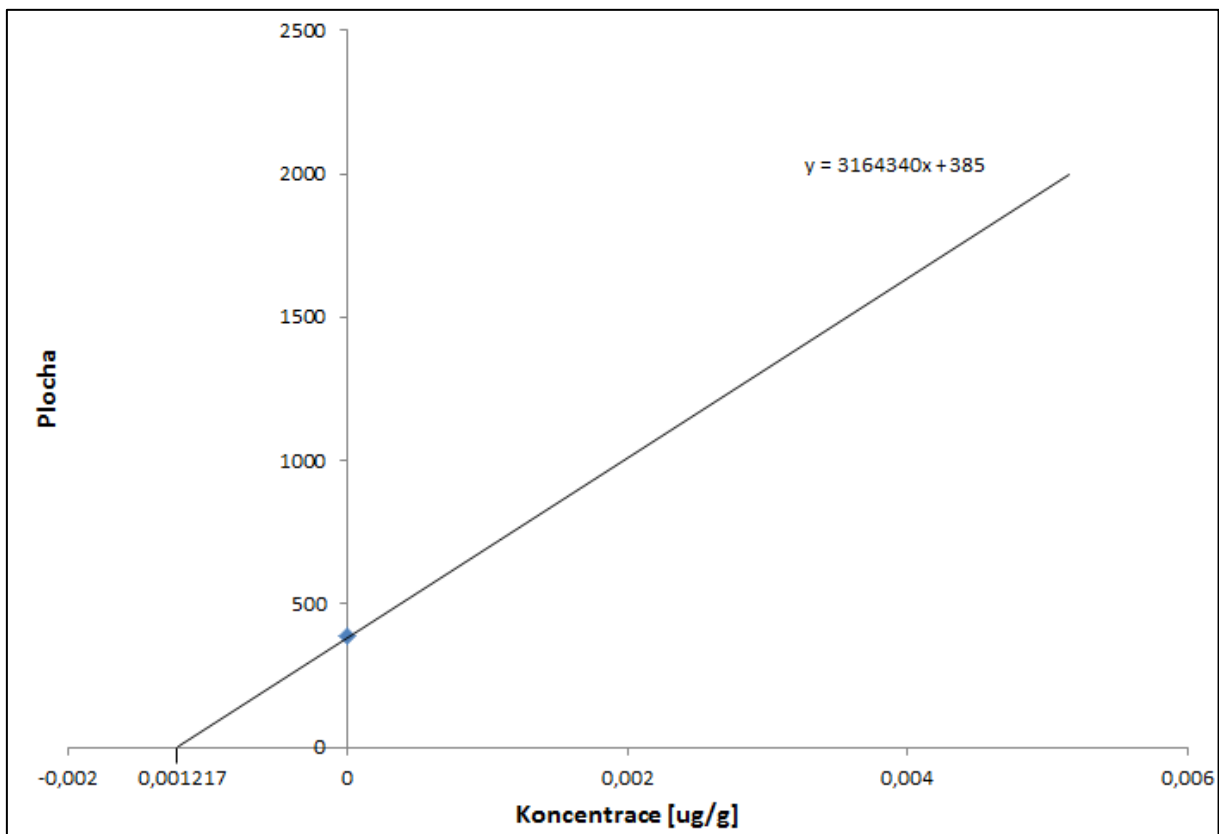
K předběžnému odhadu koncentrace fenopropu ve vzorku bylo využito přímého srovnání ploch píků odpovídajících analýze vzorku a vzorku s přídávkem standardu o koncentraci 1 µg/ml. Odhadovaná koncentrace byla vypočtena na 0,8879 µg/kg vzorku.

Pro přesnější kvantifikaci bylo využito metody standardního přídávku. Modifikovaným postupem byl analyzován vzorek kukuřice jednak bez přídávku a jednak vzorek se standardním přídávkem fenopropu o koncentraci 0,05 µg/g. Získané plochy píků byly využity pro výpočet hledané koncentrace fenopropu (obrázek č. 36). Vypočtená souřadnice průsečíku kalibrační přímky s osou koncentrací odpovídá hledané koncentraci fenopropu 0,0012170 µg/g, tj. 1,2170 µg/kg (obrázek č. 37). Obrázek č. 37 je detailem obrázku č. 36.

Pro ověření linearity závislosti odezvy na koncentraci v širším koncentračním rozmezí byla sestrojena kalibrační závislost analýzou vzorků kukuřice se standardními přídávky fenopropu o koncentracích 0,05; 0,1; 0,5; 1 µg/g. Výsledný graf je uveden na obrázku č. 38.

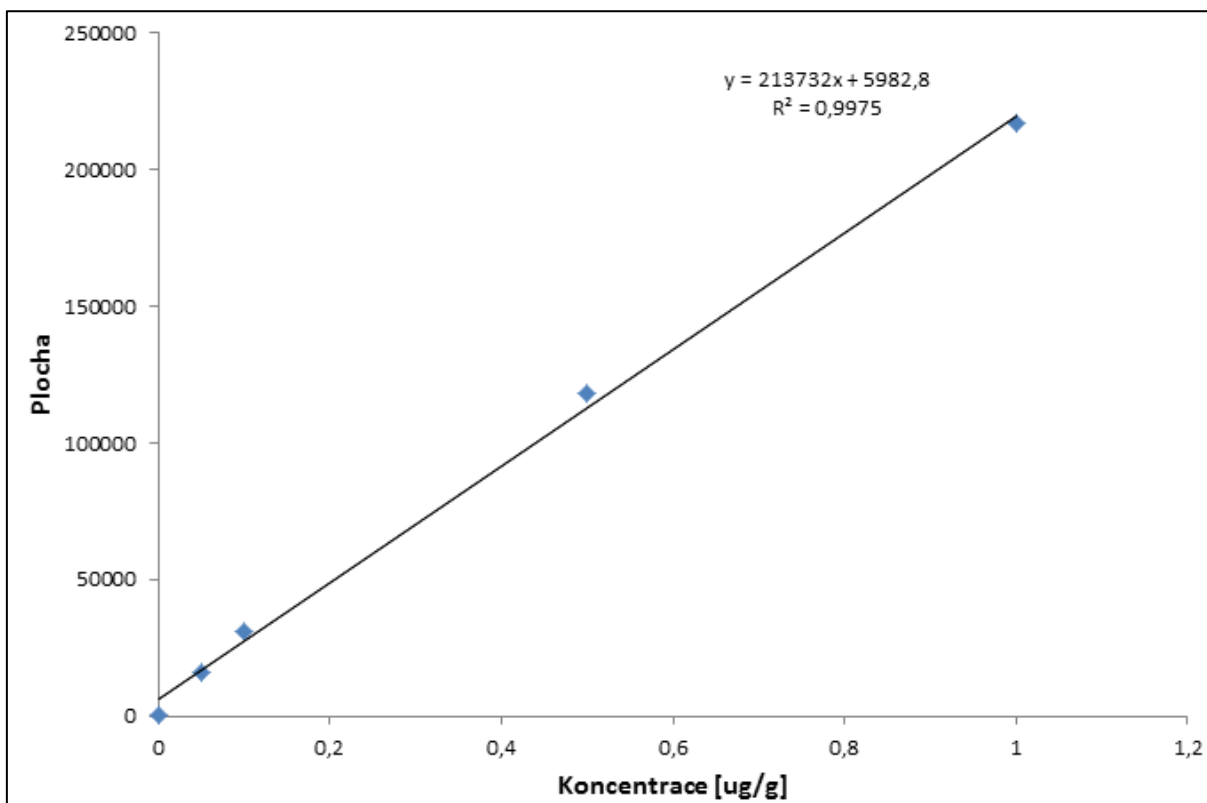


Obrázek 36: Standardní přidavek fenopropu.



Obrázek 37: Detail obrázku č. 36 - standardní přidavek dichloropropu.

Pro ukázkou kalibrační závislosti s matricovými standardy byl dále analyzován vzorek hroznového oleje odrůdy Pálava obsahující standardní přídavky fenopropu o koncentracích 0,1; 0,5; 1 µg/g. Výsledný graf je uveden na obrázku č. 38.



Obrázek 38: Standardní přídavky dichlorpropu – ukázka kalibrační závislosti s matricovými standardy.

13 Diskuse

Experimentální část této diplomové práce si kladla za cíl porovnat dvě metody úpravy vzorků na základě dosažených výtěžností pro vybranou skupinu analytů a následně metodu poskytující vyšší výtěžnosti aplikovat na analýzu reálných vzorků. Z výsledků v experimentální části bylo stanoveno, že modifikovaná metoda QuEChERS poskytuje vyšší výtěžnosti u všech sledovaných analytů ve srovnání s použitou extrakcí kapalina-kapalina. Modifikovaná metoda QuEChERS vycházela z původního postupu použitého při analýze reziduí fenoxys kyselin v rýži s následnou detekcí pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Původní postup spočíval v navážení 10 g vzorku do plastické centrifugační zkumavky. Dále přídavku 5 ml H₂O a 10 ml acetonitrilu.

Následně byl vzorek s přísávkou rozpoušááel protřepáván 1 minutu. V dalšíh kroku byly ke vzorku přídány 4 g MgSO_4 a 1 g NaCl a směs byla protřepávána 1 minutu. Následovala centrifugace při 3800 rpm po dobu jedné minuty. Po centrifugaci byl odebrán 1 ml supernatantu do nové centrifugační zkumavky obsahující 250 mg PSA sorbentu a 1500 mg MgSO_4 . Směs byla protřepávána 1 minutu a následně centrifugována při 3800 rpm po dobu 1 minuty. Přečišááený extrakt byl kvantitativně převeden do víálky a odpařen do sucha při 40 °C. Následně byl rekonstituován na 1 ml pomocí mobilní fáze. Před aplikací upraveného vzorku do UPLC-ESI-MS/MS byl filtrován přes 0,2 μm filtr.

Původní metoda QuEChERS byla modifikována a následně testována a porovnávána s extrakcí kapalina-kapalina a to na vzorcích s obsahem tuků do 20 % a také na vzorcích s vysokým obsahem tuků a to nad 90 %. Postup modifikované metody QuEChERS se liší podle typu vzorků.

V případě vzorků s obsahem do 20 % tuků (olejiny, semínka apod.) bylo namísto 10 g naváženo 5 g vzorků. Po přísávkách rozpoušááel a centrifugaci bylo ke vzorku přídáno 1000 mg MgSO_4 a 250 mg NaCl . Po protřepání a další centrifugaci byla namísto odebrání 1 ml supernatantu kvantitativně odebrána veškerá acetonitrilová fáze a to především z důvodu menší navážky vzorku a snahy o co nejvyšší zakoncentrování sledovaných analytů. Odebraná acetonitrilová fáze byla sbírána do víálky a následně umístěna do odpařovacího zařízení. Byl tedy vynechán krok přečišááení v podobě přídání 250 mg PSA sorbentu a 1500 g MgSO_4 . Analýza byla zakončena plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí. Pro zajišááení kvantitativních výsledků bylo nutné zařadit před detekcí derivatizaci. Jako derivatizační činidlo bylo využito BSTFA. Výběr tohoto činidla spočíval především ze zkušenosti s jeho použitím při vypracovávání bakalářské práce. Po derivatizaci byl obsah víálky již jen rekonstituován přísávkou hexanu.

Pro aplikaci modifikovaného postupu metody QuEChERS na vzorky obsahující více než 90 % tuků (rostlinné oleje) byl postup dále úpraven. Namísto 5 g vzorků byl navážen 1 g vzorku rostlinného oleje. Ke vzorku byl přídán 1 ml H_2O a 1,5 ml acetonitrilu. Poměr objemů rozpoušááel zůstal zachován. Jelikož navážka byla 5x nižší ve srovnání s navážkami vzorků obsahujícími nad 2 % tuků bylo sníženo i množství přísáávaných solí a to na 200 mg MgSO_4 a 50 mg H_2O . Další postup se již shodoval s modifikovaným postupem uvedeným u vzorků s obsahem tuků nad 2 %.

Modifikovaný postup metody QuEChERS pro vzorky s obsahem tuků nad 90 % byl srovnán s metodou extrakce kapalina-kapalina. Ke srovnání byl použit vzorek rostlinného oleje, do kterého byl přidán směsný roztok standardů sledovaných analytů. U tohoto vzorku byla pro každou metodu sledována výtěžnost cílových analytů.

Ze získaných hodnot výtěžností je zřejmé, že modifikovaná metoda QuEChERS poskytla vyšší hodnoty výtěžností pro všechny sledované analyty v porovnání s použitou extrakcí kapalina-kapalina. Vyšších hodnot výtěžností bylo dosaženo i přesto, že k přečištění bylo využito pouze přidavku H₂O a acetonitrilu. Dále bylo použito menší množství anorganických solí.

Modifikovaná metoda byla dále aplikována jednak na vzorky s obsahem tuků nad 2 %, tak i na vzorky s obsahem tuků nad 90 %. Celkem bylo analyzováno 35 druhů potravin a 3 suroviny, které slouží jako suroviny při výrobě potravin. Pozitivní nálezy byly detekovány u 2 vzorků, jednak u vzorku kukuřice a u vzorku hroznového oleje odrůdy Pálava.

Koncentrace detekovaných reziduí pesticidů ukazuje tabulka č. 16. Z tabulky je patrné, že ani v jednom případě stanovená koncentrace reziduí nepřesáhla povolenou hodnotu MLR. Nalezení rezidua imidaclopridu ve vzorku zrna kukuřice nebylo překvapením. Tato účinná látka patří v současnosti mezi nejčastěji aplikovanou herbicidní látku pro ošetřování kukuřičných polí. Stanovená koncentrace v analyzovaném vzorku kukuřice je přibližně 42x nižší než je limitní koncentrace daná legislativou pro suroviny, které jsou určené pro výrobu potravin z ní. Pokud bychom porovnali stanovenou koncentraci imidaclopridu ve vzorku s hodnotou MLR pro potraviny, jedná se již jen o přibližně osmi násobek. Je možno ale předpokládat, že koncentrace tohoto rezidua by byla v konečné potravíně nižší. Je to dáno především procesem zpracování této suroviny při výrobě potravin z ní. Často při výrobě potravin také dochází k mísení základních surovin a tedy i tímto způsobem by mohlo dojít k poklesu koncentrace rezidua na kg potraviny.

V případě vzorku hroznového oleje se jednalo již o finální produkt. V tomto vzorku byla nalezena rezidua pesticidů dichlorpropu a fenopropu. Ani v jednom případě nebyla překročena limitní hodnota daná legislativou. Stanovená koncentrace nicméně nevypovídá nic o tom, jaké koncentrace reziduí byly přítomny v surovině, ze které je tento olej získáván. Hroznový olej je získáván lisováním za studena ze semen bobulí vinné révy. Získaný výlisek je dále zpracováván a v každém kroku dochází k poklesu koncentrace přítomných reziduí pesticidů. Pozitivní nález reziduí dichlorpropu a fenopropu nebyl také překvapením. Obě

detekované pesticidní látky jsou dnes často používány ve směsi s dalšími chlorfenoxxy herbicidy k chemickému ošetřování vinic. Pro snížení kontaminace herbicidními prostředky je při aplikaci kladena zvýšena pozornost na to, aby se herbicidní prostředky nedostali do kontaktu s listy vinné révy. Navíc k chemickému ošetřování vinic dochází často i několik měsíců před sklizní. Tímto je také poskytnuta určitá doba, při které dochází k rozpadu částí reziduí. Z informací uvedených v teoretické části se dá předpokládat, že se tyto látky mohou dostat do kontaktu s vinnou révou i jinými způsoby a tedy ke kontaminaci v menší míře dochází vždy.

Vzorek	Reziduum pesticidu	Metoda srovnání ploch píků [µg/kg]	Metoda standardních přídavků [µg/kg]	MLR pro potraviny [µg/kg]
Kukuřice	Imidacloprid	0,8879	1,2170	10, 50*
Hroznový olej - Pálava	Dichlorprop	0,5941	0,7161	50
Hroznový olej - Pálava	Fenoprop	3,5410	2,8951	50

Tabulka 17: Stanovené koncentrace nalezených reziduí pesticidů.

*MLR pro suroviny určené pro výrobu potravin

14 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo shrnout dostupné informace týkající se problematiky reziduí pesticidů v potravinách a to jak z oblasti chemické, tak i z oblasti kontaminace životního prostředí a potravin. Pozornost je více věnována skupině fenoxys herbicidů a několika vybraným strukturně blízkým kyselinám. Volba fenoxys herbicidů vycházela ze zkušenosti při vypracovávání bakalářské práce, ve které byla pozornost věnována analýze fenoxys herbicidu dichlorpropu ve vzorcích čajů. Tato skupina látek byla také vybrána proto, že se jedná o jednu z nejčastěji používaných skupin herbicidů.

Praktická část se věnuje porovnání dvou metod úpravy vzorků. Záměrně byly vybrány metody úpravy vzorků, z nichž první byla extrakce kapalina-kapalina, která je dnes považována za jednu z nejstarších metod úpravy vzorků. Jako druhá metoda úpravy vzorků byla vybrána moderní, dnes stále častěji používaná metoda QuEChERS. Původní metody QuEChERS se aplikovaly především na vzorky s obsahem tuků do 2 % a proto se aplikace v poslední době stále více soustředily na rozšíření použitelnosti této metody na vzorky s obsahem tuků nad 2 %. K porovnání výtěžností vybraných metod úpravy vzorků byla provedena analýza vzorků slunečnicového oleje, ke kterým byly přidány roztoky 10 vybraných standardů. Vyhodnocením byla stanovena vyšší výtěžnost u všech 10 vybraných standardních látek v případě použití metody QuEChERS. Dále v praktické části této diplomové práce byla pozornost zaměřena na analýzu reálných vzorků, k jejichž úpravě byla použita metoda QuEChERS. Bylo analyzováno 30 vzorků s obsahem tuků nad 2 %. Pozitivní nález byl detekován v případě vzorku kukuřice a vzorku hroznového oleje odrůdy Pálava. Ve vzorku kukuřice byla zjištěna přítomnost rezidua pesticidu imidaclopridu. Vzorek hroznového oleje obsahoval rezidua dichlorpropu a fenopropu. Pro kvantifikaci bylo využito metody standardního přídatku. Nalezené koncentrace se pohybovaly v rozmezí 0,9-1,2 µg/kg pro analyt imidacloprid, 0,6-0,7 µg/kg v případě dichlorpropu a 2,9-3,5 µg/kg v případě analytu fenopropu. Ani v jednom případě nedošlo k překročení hodnoty maximálního limitu reziduí.

15 Seznamy

Obrázek 1: Přehled spotřeby pesticidních látek v letech 2003-2011 [12].	8
Obrázek 2: Chemická struktura a) glyfosátu; b) glufosinátu.	8
Obrázek 3: Chemická struktura a) pyrethrinů; b) permetrinu [15].	9
Obrázek 4: Chemická struktura a) organofosforových pesticidů; b) dimethoátu [13].	10
Obrázek 5: Chemická struktura a) karbamátů; b) methiocarbu [16].	11
Obrázek 6: Chemická struktura a) trifluralinu; b) pendimethalinu [13].	11
Obrázek 7: Chemická struktura a) pymetrozinu; b) atrazinu [19].	12
Obrázek 8: Schéma účinku surfaktantů na smáčivost povrchů [29].	17
Obrázek 9: Schéma chemické struktury surfaktantů [23].	18
Obrázek 10: Chemická struktura lauryl sulfátu sodného [31].	19
Obrázek 11: Chemická struktura alkylbenzen sulfonáty [30].	19
Obrázek 12: Chemická struktura amfoterních surfaktantů [25].	20
Obrázek 13: Schéma zobrazující působení fyzikálně chemických vlastností látky na její distribuci v životním prostředí [15].	25
Obrázek 14: Převodové vztahy mezi jednotkami pro vyjádření rozpustnosti [43].	30
Obrázek 15: Rovnice výpočtu biokoncentračního faktoru [26].	30
Obrázek 16: Rovnice výpočtu rozdělovacího koeficientu v systému oktanol/voda [52].	31
Obrázek 17: Rovnice výpočtu půdního absorpčního koeficientu [54].	32
Obrázek 18: Chemické struktury nabitě a nenabitě formy herbicidu 2,4-D [1].	33
Obrázek 19: Převodové vztahy mezi jednotkami pro vyjádření tenze par [57].	34
Obrázek 20: Fotolytické reakce parathionu [59].	35
Obrázek 21: Reakce fotolýzy vody [58].	36
Obrázek 22: Fotolytická reakce parathionu [59].	36
Obrázek 23: Kysele katalyzovaná redukční reakce malathionu [47].	37
Obrázek 24: Schéma mechanismu obecné silylační reakce [74].	41
Obrázek 25: Rovnice výpočtu distribuční konstanty v systému voda-organická fáze [83].	46
Obrázek 26: Reakce sušících činidel s vodou [84].	47
Obrázek 27: Základní kroky QuEChERS techniky.	48
Obrázek 28: Chromatogram analýzy standardů.	57
Obrázek 29: Chromatogram analýzy vzorku kukuřice.	61
Obrázek 30: Chromatogram analýzy vzorku hroznového oleje odrůdy Pálava.	62
Obrázek 31: Standardní přídavek imidaclopridu.	63
Obrázek 32: Standardní přídavky imidaclopridu – ukázka kalibrační závislosti s matricovými standardy.	63
Obrázek 33: Standardní přídavek dichlorpropu.	65
Obrázek 34: Detail obrázku č. 33 - standardní přídavek dichlorpropu.	65
Obrázek 35: Standardní přídavky dichlorpropu – ukázka kalibrační závislosti s matricovými standardy.	66
Obrázek 36: Standardní přídavek fenopropu.	67
Obrázek 37: Detail obrázku č. 36 - standardní přídavek dichlorpropu.	67
Obrázek 38: Standardní přídavky dichlorpropu – ukázka kalibrační závislosti s matricovými standardy.	68

Tabulka 1: Chemické struktury vybraných fenoxu alkanových pesticidů [22] [21].	14
Tabulka 2: Klasifikace adjuvantů [28] [25].	16
Tabulka 3: Přehled základních formulačních typů a jejich aplikační vlastnosti [36] [17] [37] [38].	24
Tabulka 4: Přehled výsledků monitoringu reziduí pesticidů v potravinách za rok 2014 [46].	28
Tabulka 5: Přehled potravin a kontaminujících reziduí v roce 2014 [46].	29
Tabulka 6: Hodnoty LD50 pro jednotlivé formy sloučeniny malathionu [47].	37
Tabulka 7: Vlastnosti vybraných extrakčních technik [67] [64] [7] [39].	39
Tabulka 8: Typy derivatizace a jejich vlastnosti [75] [76] [74] [71].	43
Tabulka 9: Mísitelnost jednotlivých rozpouštědel [82].	46
Tabulka 10: Přehled jednotlivých druhů sorbentů a jejich vlastnosti [88] [77] [87].	49
Tabulka 11: Jednotlivé kroky QuEChERS technik [77] [85].	51
Tabulka 12: Srovnání vybraných technik úpravy vzorků.	54
Tabulka 13: Časový průběh monitorování jednotlivých analytů.	56
Tabulka 14: Analyty a jejich retenční časy.	58
Tabulka 15: Srovnání výsledků výtěžností LLE a QuEChERS.	59
Tabulka 16: Výsledky analýz reálných vzorků.	60
Tabulka 17: Stanovené koncentrace nalezených reziduí pesticidů.	71

16 Bibliografie

- [1] [Online] [Citace 16. Únor 2016.] http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation98/24deval.pdf.
- [2] Booker, Ch.; et al. Experimental Investigations into the Insecticidal, Fungicidal, and Bactericidal Properties of Pyrolysis Bio-oil from Tobacco Leaves Using a Fluidized Bed Pilot Plant. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* **2010**, 49 (20), 10074–10079. ISSN: 0196-4321.
- [3] [Online] [Citace 26. Leden 2016.] <http://www.bezpecnostpotravin.cz/efsa-odhalila-pesticidy-v-evropskych-biopotravinach.aspx>.
- [4] [Online] [Citace 15. Březen 2016.] <https://www.natur.cuni.cz/chemie/analchem/cabala/ke-stazeni/ekotoxikologie/soubor-prednasek-ekotoxikologie-zs-2015/ekotoxikologie-3/>.
- [5] [Online] [Citace 18. Únor 2016.] <http://rl.zf.jcu.cz/docs/ruzne/ruz-biologicka-ochra-20ef1e9eba.pdf>.
- [6] [Online] [Citace 25. Leden 2016.] <https://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>.
- [7] Lenteren, J.; et al. *Quality control and production of biological control agents: theory and testing procedures*; CABI Publishing, 2003, ISBN: 0851998364.
- [8] Steiner, W. Distribution of entomopathogenic nematodes in the Weiss Alps. *Revue suisse de zoologie*; BioStor, 1996; Vol. 103, pp 439–452, ISSN: 0035-418X.
- [9] Pasternak, J. Principles and Application of Recombinant DNA. *Molecular Biotechnology*, 4th ed.; ASM Press, 2009; pp 121–123, ISBN: 1555814980.

- [10] Kažmierski, T.; et al. *Genetické modifikace - možnosti jejich využití a rizika*; Ministerstvo životního prostředí České republiky: Praha, 2008. ISBN: 978-80-7212-493-0.
- [11] Roudná, M.; et al. *Genetické modifikace v České republice a opatření k zajištění biologické bezpečnosti*; Ministerstvo životního prostředí: Praha, 2011. ISBN: 978-80-7212-566-1.
- [12] [Online] [Citace 14. Únor 2016.] <http://alsglobal.cz/website/var/assets/media-cz/pdf/als-pesticidy.pdf>.
- [13] Carlile, B. *Pesticide Selectivity, Health and the Environment*; Cambridge University Press: Cambridge, 2006. ISBN: 0521811945
- [14] Hendley, P.; et al. *Synthetic Pyrethroids: Occurrence and Behavior in Aquatic Environments*; American Chemical Society, 2008. ISBN: 0841274339
- [15] Ragas, A.; et al. Cumulative risk assessment of chemical exposures in urban environments. *Environ. Int.* **2011**, 37 (5), 872–881. ISSN: 0160-4120.
- [16] Dhouib, I.; et al. Carbamates pesticides induced immunotoxicity and carcinogenicity in human. *J Appl Biomed* **2016**, 14 (2), 85–90. ISSN: 1214-021X.
- [17] MacBean, C.; et al. *Pesticide Manual*; British Crop Protection Council: Hampshire, 2012. ISBN: 978-1-901396-86-7.
- [18] [Online] [Citace 16. Únor 2016.] <http://www.bezpecnostpotravin.cz/nove-potravinarske-predpisy-eu-brezen-2004.aspx>.
- [19] Li, P.; et al. *Anal. Chim. Acta* **2013**, 781, 63–71. ISSN: 0003-2670.

- [20] Butz, S.; et al. Determination of phenoxyalkanoic acids and other acidic herbicides at the low ppt level in water applying solid-phase extraction with RP-C18 material. *J. Chromatogr. A* **1994**, 677(1), 63–74. ISSN: 0021-9673.
- [21] Hajšlová, J.; et al. Analysis of chlorophenoxy acids and other acidic contaminants in food crops. *Sci. Total Environ.* **1993**, 132 (2), 259–274. ISSN: 0048-9697.
- [22] Maryadele, J.; et al. *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, 15th ed.; Royal Society of Chemistry, 2013. ISBN: 1849736707.
- [23] Bunting, J.; et al. Adjuvant Selection for Foramsulam Activity. *Crop Prot.* **2004**, 23 (4), 361–366. ISSN: 0261-2194.
- [24] Green, M.; et al. Surfactant Structure and Concentration Strongly Affect Rimsulfuron Activity. *Weed Technol.* **1993**, 7 (3), 633–640. ISSN: 0890-037X.
- [25] McMullan, P. Utility Adjuvants. *Weed Technol.* **2000**, 14, 792–797. ISSN: 0890-037X.
- [26] Hill, D.; et al. *Pests and Diseases of Tropical Crops: Principles and Methods (Intermediate Tropical Agriculture Series)*; Longman Group United Kingdom, 1983. ISBN: 0582606144.
- [27] [Online] [Citace 20. Únor 2016.]
<http://www.agronavigator.cz/service.asp?act=email&val=62398>.
- [28] Bareš, M.; et al. *Chemie a technologie tensidů a detergentů*; Státní nakladatelství technické literatury: Praha, 1982.
- [29] Blažej, A.; et al. *Tenzidy*, 1st ed.; Alfa: Bratislava, 1977.
- [30] Warner, M.; et al. *Anionic Surfactants*, 7th ed.; Dekker, 1976. ISBN: 0824761588.

- [31] Jursík, M.; et al. Důležité aspekty herbicidní ochrany: Adjuvanty. *Listy cukrov. řepař.* **2011**, 127 (12), 384–388. ISSN: 1210-3306.
- [32] Quilles, J.; et al. Modulation of the activity and selectivity of the immobilized lipases by surfactants and solvents. *Biochem. Eng. J.* **2015**, 93 (15), 274–280. ISSN: 1369-703X.
- [33] Bialowas, E.; et al. Raw material reserves, production and application of surfactants at the turn to a new millenium. *Przem. Chem.* **2001**, 80 (10), 449–452. ISSN: 0033-2496.
- [34] Sieverdich, F.; et al. New low dose polysiloxane tank mixture adjuvant for pre- and post-emergence herbicide application. *J. Plant Diseases and Protect* **2008**, (21), 659–664. ISSN: 1861-3837.
- [35] Nalewaja, J.; et al. Influence of diammonium sulfate and other salts on glyphosate phytotoxicity. *Pestic. Sci.* **1993**, 38 (2), 77–84. ISSN: 0031-613X.
- [36] Ackerman, P.; et al. *Metodická příručka ochrany rostlin proti chorobám, škůdcům a plevelům. I. polní plodiny*; Česká společnost rostlinolékařská: Praha, 2008. ISBN: 978-80-02-02087-5.
- [37] Smočková, M.; et al. Vliv způsobu výživy a ošetřování na zaplevelení porostů trav na semeno v ekologickém zemědělství. *Úroda* **2013**, 12, 304–307. ISSN: 0139-6013.
- [38] Macháč, R.; et al. Výživa, hnojení a ochrana travosemenných kultur. *Úroda* **2008**, 56 (4), 77–79. ISSN: 0139-6013.
- [39] Lijie, W.; et al. Dynamic microwave-assisted extraction combined with continuous-flow microextraction for determination of pesticides in vegetables. *Food Chem.* **2016**, 192, 596–602. ISSN: 0308-8146.

- [40] Barriada, M.; et al. Comparison of pressurized liquid extraction and microwave assisted extraction for the determination of organochlorine pesticides in vegetables. *Talanta* **2007**, 71 (3), 1345–1351. ISSN: 0039-9140.
- [41] Eugene, K.; et al. Predicted Bioconcentration Factors and Soil Sorption Coefficients of Pesticides and Other Chemicals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1980**, 4 (1), 26–38. ISSN: 0147-6513.
- [42] Virgil, F.; et al. Degradation of selected organophosphate pesticides in water and soil. *J. Agric. Food Chem.* **1979**, 27 (4), 706–708. ISSN: 0021-8561.
- [43] Davies, J.; et al. Reduction of pesticide exposure with protective clothing for applicators and mixers. *Occup. Environ. Med.* **1982**, 24 (6), 464–468. ISSN: 1076-2752.
- [44] [Online] [Citace 20. Únor 2016.] http://www.szu.cz/uploads/documents/cpl/Materily_ze_seminaru/Materialy_2010/rezidua_pesticidu_v_potravinach_Pepperny.pdf.
- [45] [Online] [Citace 16. Únor 2016.] <http://www.bezpecnostpotravin.cz/maximalni-limity-rezidui-pesticidu-v-potravinach-a-krmivech.aspx>.
- [46] [Online] [Citace 15. Leden 2016.] <http://www.szpi.gov.cz/clanek/zprava-o-vysledcich-narodniho-a-koordinovaneho-monitoringu-rezidui-pesticidu-v-potravinach-za-rok-2014.aspx>.
- [47] Gunther, F.; et al. Residues of Pesticides and Other Contaminants in the Total Environment. *Residue reviews* **1983**, 89 (1), 156-158. ISSN: 0179-5953.
- [48] Muthukannan, K.; et al. Classification of diseased plant leaves using neural network algorithms. *journal of engineering and applied sciences* **2015**, 10 (4), 1913–1919. ISSN: 1819-6608.

- [49] Solla, S.; et al. Bioaccumulation of pharmaceuticals and personal care products in the unionid mussel *Lasmigona costata* in a river receiving wastewater effluent. *Chemosphere* **2016**, *146*, 489–496. ISSN: 0045-6535.
- [50] Mackay, D.; et al. *Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals*, 2nd ed.; CRC Press, 2006. ISBN: 1566706874.
- [51] Valkó, K.; et al. Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1037* (2), 299–310. ISSN: 0021-9673.
- [52] Mailhot, H.; et al. Empirical relationships between the 1-octanol/water partition coefficient and nine physicochemical properties. *Environ. Sci. Technol.* **1988**, *22* (12), 1479–1488. ISSN: 0013-936X.
- [53] Wauchope, R.; et al. Pesticide soil sorption parameters; theory, measurement, uses, limitations and reliability. *Pest Manag. Sci* **2002**, *58* (5), 419–445. ISSN: 1526-498X.
- [54] Mortimer, K.; et al. Linear solvation energy relationships: Important differences between aqueous solubility. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91* (7), 1996–2004. ISSN: 1089-5639.
- [55] Roháč, V.; et al. Measurements of Saturated Vapor Pressure above. *J. Chem. Eng. Data* **1998**, *43* (5), 770–775. ISSN: 0021-9568.
- [56] Zábranský, M.; et al. Vapor pressures for a group of high-boiling. *Thermochim. Acta* **1994**, *245* (10), 121–144. ISSN: 0040-6031.
- [57] Johnsen, J.; et al. A complete quantum mechanical study of chlorine photodissociation.. *J. Chem. Phys.* **2012**, *136* (16), 164–310. ISSN: 0021-9606.

- [58] Bavcon, K.; et al. Comparison of photocatalysis and photolysis of malathion, isomalathion, malaaxon, and commercial malathion—Products and toxicity studies. *Water Res.* **2007**, *41* (19), 4504–4514. ISSN: 0043-1354.
- [59] Shelley, C.; et al. Evolution of Efficient Pathways for Degradation of Anthropogenic Chemicals. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *5* (8), 559–566. ISSN: 1552-4450.
- [60] Niranjana, A.; et al. Factors influencing the degradation of soil-applied endosulfan isomers. *Soil Biol. Biochem.* **2000**, *32* (11), 1697–1705. ISSN: 0038-0717.
- [61] Osman, A.; et al. Studies on the persistence of some carbamate insecticides in the aquatic environment—I. Hydrolysis of sevin, baygon, pyrolan and dimetilan in waters. *Water Res.* **1971**, *5* (12), 1191–1205. ISSN: 0043-1354.
- [62] Berny, P.; et al. Impact of local agricultural and industrial practices on organic contamination of little egret (*Egretta garzetta*) eggs in the Rhone Delta, southern France. *Environ. Toxicol. Chem.* **2002**, *21* (3), 520–526. ISSN: 0730-7268.
- [63] Smalling, K.; et al. Multi-residue method for the analysis of 85 current-use and legacy pesticides in bed and suspended sediments. *J. Chromatogr. A.* **1210** (1), 8–18. ISSN: 0021-9673.
- [64] Rissato, S.; et al. Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography–mass spectrometry and application in environmental contamination. *Food Chem.* **2007**, *101* (4), 1719–1726. ISSN: 0309-8146.
- [65] Alves, A. Comparison between GC-MS-SIM and GC-ECD for the determination of residues of organochlorine and organophosphorus pesticides in Brazilian citrus essential oils. *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23* (2), 171–180. ISSN: 0103-5053.
- [66] Kristenson, M.; et al. Matrix Solid-Phase Dispersion Micro-Extraction of Pesticides from Single Insects with Subsequent GC–MS Analysis. *Chromatographia* **2004**, *59* (5), 315–320.

- [67] González, R.; et al. Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta* **2008**, 76 (1), 211–225. ISSN: 0039-9140.
- [68] Wiest, L.; 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**, 1218 (34), 5743–5756. ISSN: 0021-9673.
- [69] Chen, B.; et al. Screening and quantification of 304 pesticides and related organic pollutants in surface water using dispersive liquid–liquid microextraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry. *Anal. Methods*. **2014**, 6 (6), 1743–1752. ISSN: 1759-9660.
- [70] Martins, J.; et al. Determination of 24 pesticide residues in fortified wines by solid-phase microextraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59 (13), 6847–6855. ISSN: 0021-8561.
- [71] Fei, T.; et al. Determination of six organophosphorus pesticides in water by single-drop microextraction coupled with GC-NPD. *Chromatographia* **2013**, 77 (5), 487–492. ISSN: 0009-5893.
- [72] Yu, B.; et al. Determination of nine hydroxylated polybrominated diphenyl ethers in water by precolumn derivatization–gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2015**, 14 (19), 19–25. ISSN: 0021-9673.
- [73] Zaine, J.; et al. Optimization of the derivatization protocol of pentacyclic triterpenes prior to their gas chromatography–mass spectrometry analysis in plant extracts. *Talanta* **2016**, 147, 35–43. ISSN: 0039-9140.

- [74] Topolewska, A.; et al. Evaluation of four derivatization methods for the analysis of fatty acids from green leafy vegetables by gas chromatography. *J. Chromatogr. B* **2015**, 990, 150–157. ISSN: 1570-0232.
- [75] Vorbeck, M.; et al. Preparation of methyl esters of fatty acids for gas–liquid chromatography. Quantitative comparison of methylation techniques. *Anal. Chem.* **1961**, 33 (11), 1512–1514. ISSN: 0003-2700.
- [76] Zeying, H.; et al. Multiresidue analysis of over 200 pesticides in cereals using a QuEChERS and gas chromatography-tandem mass spectrometry-based method. *Food Chem.* **2015**, 167, 372–380. ISSN: 0308-8146.
- [77] Minkyu, C.; et al. Rapid determination of organochlorine pesticides in fish using selective pressurized liquid extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chem.* **2016**, 205, 1–8. ISSN: 0308-8146.
- [78] Mojtaba, S.; et al. Combination of solid-phase extraction with dispersive liquid–liquid microextraction followed by GC–MS for determination of pesticide residues from water, milk, honey and fruit juice. *Food Chem.* **2016**, 204, 289–297. ISSN: 0308-8146.
- [79] Chunhong, J.; et al. Extraction of pesticides in water samples using vortex-assisted liquid–liquid microextraction. *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217 (37), 5868–5871.
- [80] Lo, T.; et al. *Handbook of Solvent Extraction*; Krieger Pub Co, 1991. ISBN: 0894645463.
- [81] [Online] [Citace 11. Únor 2016.] <http://www.scharlab.com/tabla-reactivos-mezclabilidad.php>
- [82] [Online] [Citace 1. Březen 2016.] http://agrienvarchive.ca/pubs/bowman_Kow_coeff_insect.pdf

- [83] Schmidt, M.; et al. Making the case for QuEChERS-gas chromatography of drugs. *Trends Anal. Chem.* **2016**, *75*, 49–56. ISSN: 0165-9936.
- [84] Delgado, Z.; et al. Determination of tocopherols and sitosterols in seeds and nuts by QuEChERS-liquid chromatography. *Food Chem.* **2016**, *192*, 825–830. ISSN: 0308-8146.
- [85] Paz, M.; et al. Validation of QuEChERS method for organochlorine pesticides analysis in tamarind (*Tamarindus indica*) products: Peel, fruit and commercial pulp. *Food Control* **2015**, *54*, 374–382. ISSN: 0956-7135.
- [86] Chamkasem, N.; et al. Analysis of 19 PCB congeners in catfish tissue using a modified QuEChERS method with GC–MS/MS. *Food Chem.* **2016**, *192*, 900–906. ISSN: 0308-8146.
- [87] Ozgur, G.; et al. Evaluation of QuEChERS sample preparation and liquid chromatography–triple-quadrupole mass spectrometry method for the determination of 109 pesticide residues in tomatoes. *Food Chem.* **2015**, *176*, 319–332. ISSN: 0308-8146.
- [88] González, D.; et al. Determination of carbamates in edible vegetable oils by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a new clean-up based on zirconia for QuEChERS methodology. *Talanta* **2014**, *128*, 299–304. ISSN: 0039-9140.
- [89] Urairat, K.; et al. Evaluation of a modified QuEChERS method for analysis of mycotoxins in rice. *Food Chem.* **2014**, *153*, 44–51. ISSN: 0308-8146.
- [90] Anastassiades, M.; et al. Fast Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning, “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *J. AOAC Int.* **2003**, *86* (2), 412–431. ISSN: 1060-3271.

- [91] Lehotay, S.; et al. Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study. *J. AOAC Int.* **2007**, *90* (2), 485–520. ISSN: 1060-3271.
- [92] Lehotay, S.; et al. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217* (16), 2548–2560. ISSN: 0021-9673.
- [93] Lehotay, S.; et al. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. *J. AOAC Int.* **2005**, *88* (2), 630–638. ISSN: 1060-3271.
- [94] Anneli, K.; et al. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1187* (1-2), 58–66. ISSN: 0021-9673.
- [95] Carmen, F.; et al. Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218* (42), 7634–7639. ISSN: 0021-9673.
- [96] [Online] [Citace 5. Březen 2016.] <http://www.crl-pesticides.eu/library/docs/cf/FP417%201%20%203%20%20udgave%20engelsk%20version.pdf>
- [97] Díez, C.; et al. Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1131* (1-2), 11–23. ISSN: 0021-9673.
- [98] Ballesteros, E.; et al. Simultaneous multidetermination of residues of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in olive and olive-pomace oils by gas chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1111* (1), 89–96. ISSN: 0021-9673.

- [99] Hiskia, A.; et al. Determination of Organophosphorus Pesticide Residues in Greek Virgin Olive Oil by Capillary Gas Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46 (2), 570–574. ISSN: 0021-8561.
- [100] Amvrazi, E.; et al. Multiresidue Method for Determination of 35 Pesticides in Virgin Olive Oil by Using Liquid–Liquid Extraction Techniques Coupled with Solid-Phase Extraction Clean Up and Gas Chromatography with Nitrogen Phosphorus Detection and Electron Capture Detection. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54 (26), 9642–9651. ISSN: 0021-8561.
- [101] Ono, Y.; et al. Pesticide multiresidue analysis of 303 compounds using supercritical fluid extraction. *Anal. Sci.* **2006**, 22 (11), 1473–1476. ISSN: 0910-6340.
- [102] Ramesh, A.; et al. Rapid preconcentration method for the determination of pyrethroid insecticides in vegetable oils and butter fat and simultaneous determination by gas chromatography-electron capture detection and gas chromatography-mass spectrometry.. *Analyst* **1998**, 123 (9), 1799–1802. ISSN: 0003-2654.
- [103] Urairat, K.; et al. Rapid determination of phenoxy acid residues in rice by modified QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* **2008**, 626 (1), 10–20. ISSN: 0003-2670.