

Stanovení pesticidů v environmentálním prostředí pomocí kapalinové chromatografie

Bc. Barbora Vachová

Diplomová práce
2021



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Barbora Vachová**
Osobní číslo: **T19399**
Studijní program: **N0712A030001 Environmentální inženýrství**
Studijní obor: **Environmentální inženýrství**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Stanovení pesticidů v environmentálním prostředí pomocí kapalinové chromatografie**

Zásady pro vypracování

1. Provedte literární rešerši o stanovení pesticidů pomocí kapalinové chromatografie.
2. Charakterizujte významné skupiny z řad pesticidů ve Zlínském kraji a připravte základní metodu pro jejich stanovení na kapalinové chromatografii.
3. Optimalizujte metodu na stanovení pesticidů pomocí kapalinové chromatografie a otestujte ji na reálných vzorcích.
4. Dosažené výsledky kriticky zhodnoťte a písemně přehledně zpracujte.

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

1. NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. Moderní HPLC separace v teorii a praxi. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
2. DONG, M. W. HPLC and UHPLC for practicing scientists. Second edition. Hoboken, NJ: Wiley, 2019. ISBN 978-1-119-31376-2.
3. LEE, Philip W. a Hiroyasu AIZAWA. Handbook of residue analytical methods for agrochemicals. Hoboken, NJ, USA: Wiley, c2003. ISBN 978-0-471-49194-1.
4. Vědecké zdroje zahrnuté v databázích Web of Science, ScienceDirect, SciFinder Scholar, Medline aj.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Štěpán Vinter, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Oponent diplomové práce: **Ing. Lenka Šenkárová, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce: **31. prosince 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

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

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta: Barbora Vachová

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Pesticidy jsou látky chemického nebo biologického charakteru, které jsou využívány proti rostlinným i živočišným škůdcům. Ovlivňují životní pochody v organismech, proto mohou při nevhodném či nadměrném použití představují riziko pro všechny složky životního prostředí i lidský organismus. Největší riziko pro člověka i živočichy pak představuje chronické působení pesticidů, proto je potřeba vyvíjet nové a dostupné metody pro monitoring jejich obsahu a transportu v různých složkách životního prostředí.

Tato diplomová práce se zabývá třemi chloracetanilidovými pesticidy a jejich metabolity OA a ESA a třemi pesticidy jiného chemického složení, tebuconazolem, methiocarbem a chlorpyrifosem. Součástí práce je jejich extrakce z vody a půdy pomocí extrakce na pevné fázi a QuEChERS, jak z reálných vzorků, tak laboratorních experimentů a jejich stanovení kapalinovou chromatografií s detekcí v ultrafialové oblasti pomocí detektoru diodového pole.

V modelovém 28denním laboratorním experimentu částečně docházelo k degradaci vybraných pesticidů ve vodě a v půdě, přičemž stanovené koncentrace byly nízké v koncentracích desítek $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Stanovený obsah pesticidů v reálných vzorcích nebyl vysoký, všechna stanovení byla pod 1 mg/kg . Ve vodách i půdách byl stanoven menší obsah pesticidů než jejich metabolitů.

Klíčová slova: pesticidy, extrakce na pevné fázi, QuEChERS, zemědělská půda, povrchová voda, podzemní voda, optimalizace, HPLC – DAD, kapalinová chromatografie

ABSTRACT

Pesticides are substances of a chemical or biological nature that are used against plant and animal pests. They affect life processes in organisms to pose a risk to all components of the environment and the human body if used inappropriately or excessively. The most significant risk for humans and animals is the chronic effects of pesticides, so it is necessary to develop new and available methods for monitoring their content and transport in various environmental components.

This diploma thesis deals with three chloracetanilide pesticides, their metabolites OA and ESA, and three pesticides with different chemical composition, tebuconazole, methiocarb and chlorpyrifos. Part of the work is their extraction from water and soil using solid phase extraction and QuEChERS, both from real samples and laboratory experiments and their determination by liquid chromatography with detection in the ultraviolet region using a diode array detector.

A model 28-day laboratory experiment showed the partial degradation of selected pesticides in water and soil, where the determined concentrations were in the units of tens of $\mu\text{g}/\text{kg}$.

The determined content of pesticides in real samples was not high. All determinations were below 1 mg/kg. The lower levels of pesticides than their metabolites were determined in water and soil.

Keywords: pesticides, solid phase extraction, QuEChERS, agricultural land, surface water, groundwater, optimization, HPLC – DAD, liquid chromatography

Chtěla bych poděkovat Ing. Štěpánu Vinterovi, Ph.D. za vedení mé diplomové práce, trpělivost a cenné rady.

Dále bych chtěla poděkovat Ing. Zuzaně Vinterové za přečtení práce a cenné připomínky.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodičům a příteli za podporu a Dáši, za přátelství z laborky, které snad bude celoživotním.

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

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 PESTICIDY	13
1.1 HISTORIE	13
1.2 PESTICIDNÍ PŘÍPRAVKY	13
1.3 KLASIFIKACE.....	14
1.3.1 Klasifikace dle biologického účinku	14
1.3.2 Klasifikace dle funkce pesticidu	14
1.3.3 Klasifikace dle chemického typu účinné látky.....	15
1.4 REZIDUA PESTICIDŮ V PŘÍRODĚ.....	15
1.4.1 Osud a transport pesticidů v životním prostředí	16
1.4.2 Faktory ovlivňující tvorbu reziduí	17
1.5 VLIV NA ZDRAVÍ.....	18
1.6 LEGISLATIVA.....	19
1.6.1 Rezidua pesticidů ve vodách.....	19
1.6.2 Rezidua pesticidů v půdách.....	20
1.7 SPOTŘEBA PESTICIDŮ VE ZLÍNSKÉM KRAJI	20
1.8 CHLORACETANILIDOVÉ PESTICIDY	21
1.8.1 Osud chloracetanilidových pesticidů v životním prostředí	21
1.8.2 Alachlor	22
1.8.3 Acetochlor	24
1.8.4 Metazachlor.....	26
1.9 DALŠÍ VYBRANÉ PESTICIDY	28
1.9.1 Chlorpyrifos	28
1.9.2 Methiocarb	30
1.9.3 Tebuconazole	33
2 EXTRAKČNÍ TECHNIKY	36
2.1 EXTRAKCE PEVNÝM SORBENTEM	36
2.2 QUENCHERS	39
3 KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE	42
3.1 SEPARAČNÍ PRINCIPY V KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFII.....	43
3.2 IZOKRATICKÁ A GRADIENTOVÁ ELUCE	43
3.3 DETEKTORY	44
3.3.1 UV/Vis absorpční detektory.....	44
3.3.2 Fluorescenční detektory	47
3.3.3 Hmotnostně – spektrometrické detektory	48
3.3.4 Rozlišení a stanovení účinných látek a jejich metabolitů	51

II PRAKTICKÁ ČÁST.....	52
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	53
4.1 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ.....	53
4.2 PRACOVNÍ POMŮCKY.....	53
4.3 CHEMIKÁLIE.....	54
4.4 STANDARDY	54
4.5 PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍCH ROZTOKŮ	55
4.6 OPTIMALIZACE METODY.....	56
4.6.1 Optimalizace izokratické eluce	56
4.6.2 Optimalizace gradientové eluce	57
4.6.3 Charakteristika analýzy	58
4.6.4 Limit detekce a mez stanovitelnosti.....	58
4.7 EXTRAKČNÍ METODY	59
4.7.1 Extrakce pevným sorbentem	59
4.7.2 Extrakce QuEChERS	60
4.8 ODBĚR, ZPRACOVÁNÍ A CHARAKTERISTIKA VZORKŮ.....	60
4.8.1 Odběr reálných vzorků.....	60
4.8.2 Metodika stanovení vlastností půdy pro laboratorní experiment	62
4.8.3 Laboratorní experiment s půdou	64
4.8.4 Laboratorní experiment s vodou	66
4.8.5 Zpracování reálných vzorků.....	66
5 DISKUZE A VÝSLEDKY	67
5.1 IZOKRATICKÁ A GRADIENTOVÁ ANALÝZA	67
5.1.1 Izokratické metody	67
5.1.2 Gradientové metody	68
5.1.3 Limit detekce a mez stanovitelnosti	71
5.2 VLASTNOSTI ZAHRADNÍ PŮDY	71
5.3 STANOVENÍ HUMINŮ VE VYBRANÝCH PŮDÁCH.....	73
5.4 LABORATORNÍ EXPERIMENT STANOVENÍ PESTICIDŮ V PŮDĚ.....	74
5.4.1 Certifikovaná půda - Lufa	74
5.4.2 Zahradní půda.....	76
5.5 LABORATORNÍ EXPERIMENT STANOVENÍ PESTICIDŮ VE VODĚ	78
5.6 REÁLNÉ VZORKY	80
5.6.1 Půdy.....	80
5.6.2 Vody.....	83
ZÁVĚR	86
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	88
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	95
SEZNAM OBRÁZKŮ	97

SEZNAM TABULEK.....	99
SEZNAM PŘÍLOH.....	101

ÚVOD

Pesticidy jsou látky využívané na prevenci a ochranu proti škůdcům. Jejich využití je v současnosti nezbytné pro vypěstování dostatečného množství potravy pro společnost. Účinkem pesticidních látek je působení na metabolismus škůdců a tím jejich kontrola a potlačení. Tyto látky jsou toxické nejen pro cílový organismus, ale mohou být toxické i pro člověka.

V Evropské Unii je roční spotřeba kolem 360 000 tun pesticidních přípravků, z toho v České republice se ročně spotřebuje kolem 4100 tun. Největšími spotřebiteli v EU jsou Francie, Španělsko, Itálie a Německo.

Tato práce se zabývá třemi chloracetanilidovými pesticidy, metazachlorem, acetochlorem a alachlorem a jejich metabolity a dále pak dvěma pesticidy často využívanými v České republice, methiocarbem, tebuconazolem a chlorpyrifosem, jehož použití bylo zakázáno v roce 2020.

Pesticidy byly z environmentálních vzorků extrahovány pomocí extrakce pevným sorbentem a extrakcí QuEChERS, a následně zakoncentrovány proudem dusíku. Pomocí vysoceúčinné kapalinové chromatografie byly stanoveny koncentrace pesticidů ve vzorcích.

Obsahy pesticidů byly stanoveny ve vzorcích povrchové vody, podzemní vody a zemědělské půdy odebraných ve Zlínském kraji. Byla také testována 28denní degradace vybraných pesticidů v půdě, certifikované půdě a vodě.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 PESTICIDY

Pesticid je jakákoli látka nebo směs látek, jak přírodního, tak syntetického původu, který je využit na prevenci, potlačení, ničení, odpuzení nebo eliminaci škůdců. Škůdcem je hmyz, plevel, zvěř, mikroorganismy a jiné. Jsou to většinou chemické látky, ale mohou být i pesticidy biologické, např. virové či bakteriální. (Tadeo 2008)

Jiná definice říká, že pesticidy jsou biologicky aktivní sloučeniny, využívané pro prevenci, ničení nebo kontrolu nad škůdci ovlivněním jejich metabolismu. (Rathore a Nollet 2012)

Pesticidy jsou sloučeniny člověkem využívané pro zvýšení výnosu potravin. Jejich použití je v dnešní době nezbytné z důvodu nutnosti užití stále narůstajícího počtu obyvatel. Kromě toho jsou ale pesticidy toxické a perzistentní. (Tadeo 2008)

1.1 Historie

Historie používání pesticidů sahá do hlubší minulosti, první zmínky sahají až před rok 1000 před naším letopočtem. Jako první pesticid měla být použita síra. V 15. století našeho letopočtu byly používány těžké kovy jako ochrana proti škůdcům, později byl jako insekticid využíván nikotin. Komerční využití pesticidů začalo ve 40. letech 20. století, kdy se začal používat dichlordifenyiltrichlorethan – DDT, který započal novou éru v boji člověka proti škůdcům a chorobám. Začaly se vyvíjet nové druhy chlorovaných uhlovodíků a organofosfátových pesticidů a masově se používat pro uspokojení potřeb lidí v oblasti potravin. Nicméně se začaly objevovat nepříznivé vlastnosti, a to znečištění životního prostředí, vrozené vady u zvířat a u lidí. DDT je v současnosti v mnoha zemích zakázáno, ale v rozvojových zemích se nadále využívá. (Rathore a Nollet 2012)

1.2 Pesticidní přípravky

Pesticidní přípravky se skládají z účinné látky (aktivní složka) a přídavných látek (inertní složka). Účinnou látkou je samotný pesticid, tedy látka s biologickým účinkem. Skupenství je pevné nebo kapalné a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti se sledují za normálních podmínek, aby odpovídaly podmínkám skladování, přepravy a aplikace. Přídavnými látkami jsou rozpouštědla, stabilizátory a plnidla. Podle použité účinné látky je vybráno rozpouštědlo, voda, pokud je pesticid rozpustný ve vodě, pokud ne, je rozpouštěn ve vhodném organickém rozpouštědle. Pro použití na potraviny nebo krmiva musí i přídavná látka splňovat potravinové tolerance. Funkce přídavných látek jsou různé. Napomáhají účinné látce dostat se do rostliny, zabraňují pění nebo spékání, prodlužují životnost

přípravku, zjednodušují jeho aplikaci nebo chrání přípravek před rychlou degradací. (Rathore a Nollet 2012; Tadeo 2008)

1.3 Klasifikace

Pesticidy jsou velmi početnou skupinou chemických látek, které je možné klasifikovat dle několika hledisek. Nejvýznamnější způsoby klasifikace jsou uvedeny v následujících podkapitolách.

1.3.1 Klasifikace dle biologického účinku

Tento typ klasifikace je obecně nejznámější a nejpoužívanější. Pesticidy se dělí do skupin podle škůdců, na které působí. Přehled nejvýznamnějších skupin je uveden v Tabulce 1.

Tabulka 1 Klasifikace pesticidů dle biologického účinku (Rathore a Nollet 2012)

Typ	Cílový činitel
Baktericidy	Bakterie
Defolianty	Opad listů (hormonálně)
Desikanty	Opad listů (vysušení)
Fungicidy	Houby
Herbicidy	Rostliny
Insekticidy	Hmyz
Miticidy /Akaricidy	Roztoči
Muloskocidy	Měkkýši
Nematicidy	Hlístice
Růstové regulátory	Regulují růst rostliny
Rodenticidy	Hlodavci
Konzervanty dřeva	Ochrana před dřevo požírajícími organismy a tlením

1.3.2 Klasifikace dle funkce pesticidu

V tabulce 2 jsou shrnuty tři možnosti jednoduché klasifikace pesticidů dle funkce. První skupinou je způsob kontaktu s cílovým činitelem, druhou skupinou je účinnost pesticidu na jednotlivé druhy patogenu a třetí skupina je založena na době aplikace pesticidu.

Tabulka 2 Klasifikace pesticidů dle způsobu a doby účinku (Rathore a Nollet 2012)

Typ	Působení
Kontaktní	přenos dotykem z povrchu rostliny
Systémové	proniká do pletiv, tím zabíjí rostlinu zevnitř
Respirační	přenos vdechováním
Požerové	přenos trávicím ústrojím
Totální	Hubí veškerou vegetaci
Širokospektré	Hubí určité skupiny
Selektivní	Hubí určité druhy
Preemergentní aplikace	před vzejitím rostliny nebo plevelu
Postemergentní aplikace	po vzejití rostliny nebo plevelu
Protektanty	před napadením patogenem
Eradikanty	po napadení patogenem

1.3.3 Klasifikace dle chemického typu účinné látky

Za dobu, co se pesticidy využívají, byly syntetizovány tisíce sloučenin. Jejich dělení podle jejich obecné chemické povahy je shrnuto v Tabulce 3. (Rathore a Nollet 2012)

Tabulka 3: Klasifikace pesticidů dle chemického typu účinné látky

Typ	typické použití
Organochlorované	Insekticidy
Organofosforečné	Insekticidy / herbicidy
Karbamáty	Insekticidy
Dithiokarbamáty	Fungicidy
Deriváty karboxylové kyseliny	Herbicidy
Substituované ureázy	Herbicidy
Triaziny	Herbicidy
Pyrethoidy	Insekticidy
Limonoidy	Insekticidy
Organokovové sloučeniny	Fungicidy
Fenoly	Insekticidy
Thiokyanáty	Insekticidy

1.4 Rezidua pesticidů v přírodě

Vlastností většiny pesticidů je omezená stabilita v životním prostředí, v rostlinách a v živočiších. Tato vlastnost je velmi důležitá, protože nejenom určuje jejich účinnost, ale také jejich bezpečné použití v zemědělství a zemědělských produktech.

Osud pesticidů závisí na biotických a biochemických transformacích, kterých se účastní živé organismy, a na fyzikálních, chemických a fotochemických procesech. Převládají biotické

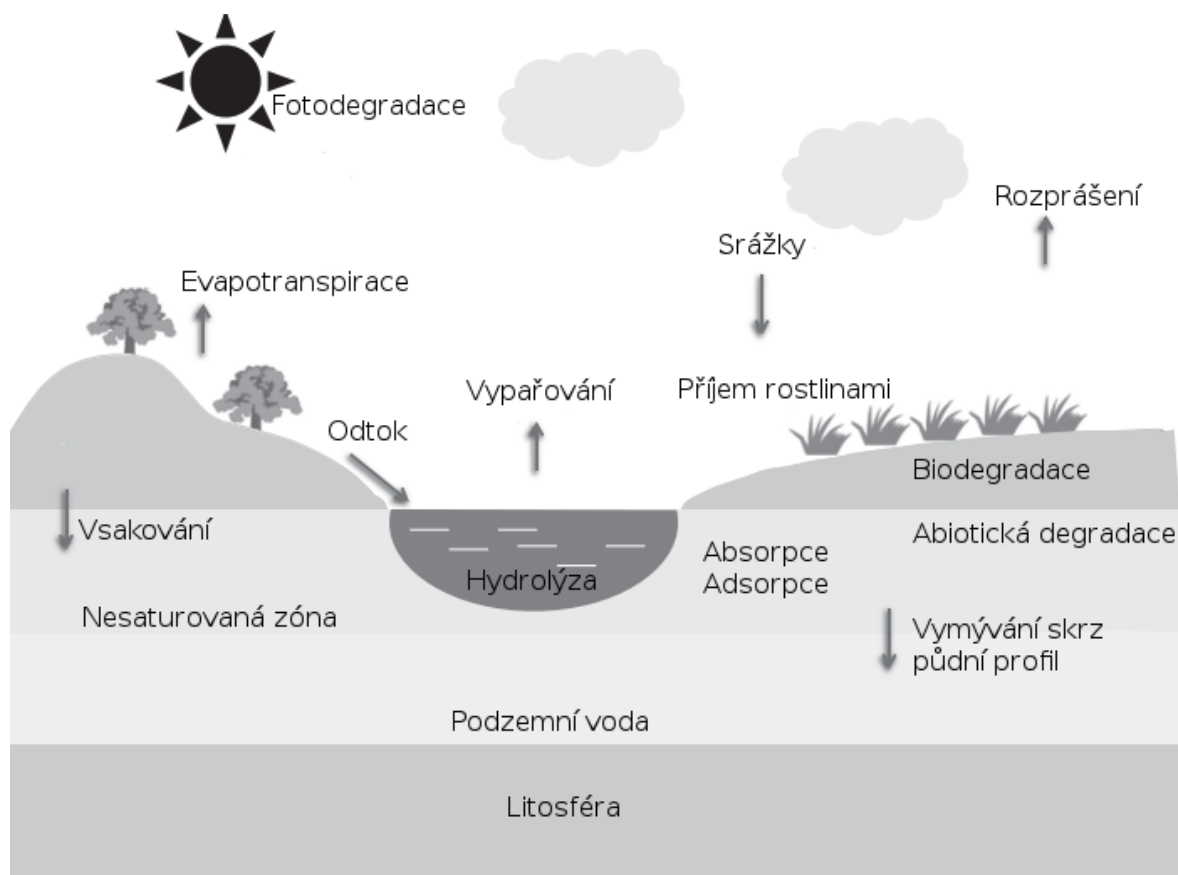
transformace katalyzované enzymy půdních organismů bakterií, aktinomycet a hub. Nejvyšší účinnost vykazují degradace pesticidů houbami. Jsou odolné vůči nepříznivým podmínkám, aktivní i v kyselém prostředí a houbové enzymy mají vyšší schopnost degradace pesticidů. Fotochemická transformace je omezena na dostupnost slunečního záření a také na sloučeniny citlivé na toto záření. Tvoří se vysoce reaktivní radikály, což vede k rekombinantním reakcím i k rozbití vazeb ve sloučeninách ve vodném prostředí. (Rathore a Nollet 2012; Verma et al. 2014)

Ve studii Hofmana (2018) byl téměř ve všech sledovaných orných půdách v ČR detekován alespoň jeden pesticid. V 81 % půd byla koncentrace pesticidů větší než 0,01 mg/kg a převážně se jednalo o více pesticidů najednou. Podobné koncentrace pesticidů v půdě stanovil i Pinto et al. (2010) v Mexiku nebo (Pszczolinska a Michel 2016) v Polsku.

Ze studie, která se věnuje reziduíům pesticidů v povrchových vodách v ČR, je zřejmé, že současný způsob hospodaření na orných půdách ČR má negativní vliv na jakost podzemních a povrchových vod. Měření koncentrací pesticidů ve vodní nádrži zaměřené na konkrétní pesticidy bylo prováděno tak, že odebírané vzorky měly maximální možnou délku zdržení v nádrži. Nálezy reziduí pesticidů bylo ve stovkách ng/l. (Ferenčík 2017) Podobné výsledky stanovení reziduí pesticidů v povrchových a dokonce i v pitných vodách mají ve svých studiích Hladik et al. (2008), konkrétně až 50 ng/l v pitné vodě na středozápadě Spojených Států amerických, dále pak Heberle et al. (2000) v řádech stovek ng/l v podzemních a povrchových vodách ve Švýcarsku. Sjerps et al. (2019) ve své studii popisuje stanovení mnoha druhů pesticidů ve zdrojích pitné vody, avšak s nižšími koncentracemi než v předchozích zmíněných studiích.

1.4.1 Osud a transport pesticidů v životním prostředí

Pesticidy se do složek životního prostředí dostávají přes rostliny nebo půdy, na které byly aplikovány. Poté, co se pesticidy dostanou do těchto složek životního prostředí, jejich osud podléhá mnoha různým cestám, jako je transformace a degradace, sorpce a desorpce, těkání, příjem rostlinami, transport v tekoucí vodě a transport do podzemních vod. Tyto zmíněné možnosti jsou vyobrazeny na Obrázku 1 (Rathore a Nollet 2012; Verma et al. 2014)



Obrázek 1: Osud a transport pesticidů v životním prostředí

1.4.2 Faktory ovlivňující tvorbu reziduí

Osud a chování pesticidů v přírodě lze předvídat na základě znalosti fyzikálně-chemických vlastností pesticidů, jako jsou jejich struktury, tlak par, acidobazický charakter, rozdělovací koeficienty a rozpustnost. Další důležitou vlastností pesticidu je perzistence, která se obvykle vyjadřuje jako poločas, tedy čas, za který se rozloží jedna polovina pesticidu na jiné produkty, než je mateřská sloučenina. (Radojevič a Bashkin 2006; Rathore a Nollet 2012)

Rozpustnost látky udává, jaké největší množství látky je možné rozpustit v daném množství rozpouštědla. Většinou se hodnota udává jako rozpustnost ve vodě, ale může se udávat i rozpustnost v jiných rozpouštědlech. Rozpustnost látky je ovlivněna rozpouštědlem, rozpouštěnou látkou a dalšími přítomnými látkami, teplotou a pro plyny i tlakem. (Rathore a Nollet 2012; Patnaik 2017)

Z rozdělovacích koeficientů je důležitý rozdělovací koeficient n-oktanol/voda K_{ow} , vyjadřující distribuci organických nepolárních sloučenin mezi vodu a přírodní tuhé fáze a organismy. Je definován jako poměr koncentrací dané látky rozpouštěné v n-oktanolu a vodě.

Hodnoty jsou zpravidla od -3, což značí velmi hydrofilní látky, po +10, což značí velmi hydrofobní látky. (Sangster 1997)

Dalším významným koeficientem je půdní adsorpční koeficient K_{oc} charakterizující schopnost pesticidů vázat se na půdní částice. Vyšší hodnoty znamenají silnější vazbu na půdní částice, a tedy horší biodegradaci. Je ale závislý nejen na konkrétním typu půdy, ale například i na její vlhkosti. (Rathore a Nollet 2012) Jeho logaritmus vyjadřuje mobilitu dané látky v prostředí, mobilita je klasifikována v následující Tabulce 4.

Tabulka 4: Klasifikace mobility látek v prostředí

log K_{oc}	Klasifikace
< 1	vysoce mobilní
1 - 2	mobilní
2 - 3	středně mobilní
3 - 4	málo mobilní
4 - 5	špatně mobilní
> 5	imobilní

Pro předvídání osudu pesticidů v životním prostředí je důležité znát i vlastnosti prostředí, kde se pesticid bude vyskytovat, např.: u půdy její vlhkost, obsah jílu a organické hmoty, pH a podobně. Dále přístup k povrchové a podzemní vodě, jejich chemické transformace a také forma, způsob aplikace a dávka u přípravku, který je aplikován. (Rathore a Nollet 2012; Patnaik 2017; Radojevič a Bashkin 2006)

1.5 Vliv na zdraví

Pesticidy jsou velice široká skupina chemických sloučenin. Je snaha vytvářet látky, které by působily selektivně, nicméně bývají, v různé míře, toxické i k jiným druhům, než proti kterým jsou určeny. Nepříznivé účinky na zdraví jak člověka, tak jiných živočichů mohou nastat jak po akutní expozici, tak při chronické expozici danou látkou. Expozice pesticidům mohou být náhodné, například při manipulaci s nimi, kontaminací potravin, jejich nevhodným použitím. Chronické účinky pesticidů jsou v současnosti sledovány lépe než v minulosti díky rozvoji analytických metod. (Rathore a Nollet 2012; Patnaik 2017)

Hlavními cestami vstupu pesticidů do těla jsou ústy do gastrointestinálního traktu, vdechnutím nebo kůží. V těle podléhají metabolickému rozkladu a jsou vylučovány močí, mateřským mlékem nebo výkaly, v těle se akumulují v tukových tkáních, játrech, ledvinách, ale i mozku nebo srdci. (Biziuk et al. 1996)

1.6 Legislativa

Pro jakékoli nakládání s pesticidy v Evropské Unii je směrodatná Směrnice Evropského Parlamentu a Rady 2009/128/ES ze dne 21. října 2009, *kteřou se stanoví rámec pro činnost Společenství za účelem dosažení udržitelného používání pesticidů*. Její působnost se týká pesticidů, které jsou určeny pro ochranu rostlin. Vymezuje podmínky pro přípravu, prodej, informace, rozšíření povědomí, nakládání s pesticidy i jejich obaly, aplikační zařízení a letecký postřik. Jsou zde uvedena i opatření pro ochranu vodního prostředí a pitné vody, rostlin a snížení použití a rizik pesticidů. Jsou zde nastíněny i sankce a poplatky.

1.6.1 Rezidua pesticidů ve vodách

Nariadení vlády č. 401/2015 Sb. *Nariadení vlády o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech*, který stanovuje ukazatele a hodnoty přípustného znečištění vod, normy kvality vod a definuje seznam prioritních nebezpečných látek.

Vyhláška č. 120/2011 Sb. *Vyhláška, kterou se mění vyhláška Ministerstva zemědělství č. 428/2001 Sb., kterou se provádí zákon č. 274/2001 Sb., o vodovodech a kanalizacích pro veřejnou potřebu a o změně některých zákonů (zákon o vodovodech a kanalizacích), ve znění pozdějších předpisů*, kde jsou uvedeny požadavky na jakost surové vody. Je zde také definována mezní hodnota sumy pesticidů v surové vodě, 500 ng/l.

Vyhláška č. 83/2014 Sb. *Vyhláška, kterou se mění vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody, ve znění pozdějších předpisů*, která stanovuje hygienické požadavky na pitnou vodu a četnost a rozsah její kontroly. Jsou zde uvedeny nejvyšší mezní hodnoty pro jednotlivé pesticidy, 100 ng/l, i pro jejich sumu, 500 ng/l.

Vyhláška č. 264/2015 Sb. *Vyhláška, kterou se mění vyhláška č. 5/2011 Sb., o vymezení hydrogeologických rajonů a útvarů podzemních vod, způsobu hodnocení stavu podzemních vod a náležitostech programů zjišťování a hodnocení stavu podzemních vod*, kde jsou uvedeny podmínky pro hodnocení stavu podzemních vod a jejich mezní hodnoty znečištění pro jednotlivé pesticidy, 100 ng/l, i pro jejich sumu, 500 ng/l.

1.6.2 Rezidua pesticidů v půdách

V současnosti je v České republice platná Vyhláška č. 153/2016 Sb. *Vyhláška o stanovení podrobností ochrany kvality zemědělské půdy a o změně vyhlášky č. 13/1994 Sb., kterou se upravují některé podrobnosti ochrany zemědělského půdního fondu*, která však nedefinuje žádný obecný limit pro individuální pesticidy ani jejich sumu. Ve Vyhlášce č. 13/1994 Sb. *Vyhláška Ministerstva životního prostředí, kterou se upravují některé podrobnosti ochrany zemědělského půdního fondu*, byl stanoven limit sumy pesticidů v zemědělské půdě, 0,1 mg/l, ale tato vyhláška není platná od listopadu 2019.

Monitoring zemědělských půd je definován Vyhláškou č. 335/2017 Sb. *Vyhláška, kterou se mění vyhláška č. 275/1998 Sb., o agrochemickém zkoušení zemědělských půd a zjišťování půdních vlastností lesních pozemků, ve znění pozdějších předpisů*, ani zde však nejsou uvedeny limity pesticidů v půdách.

Limity reziduí pesticidů jsou stanoveny pouze pro potraviny a tabákové výrobky ve Vyhlášce č. 54/2004 Sb. *Vyhláška o potravinách určených pro zvláštní výživu a o způsobu jejich použití*.

1.7 Spotřeba pesticidů ve Zlínském kraji

Dle Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského bylo v roce 2019 spotřebováno ve Zlínském Kraji 101 955 kg účinných látek. Spotřebovány byly převážně na obiloviny, olejninu a kukuřici. Nejvíce bylo spotřebováno glyfosátu, 13 374 kg. Z dalších účinných látek byl hojně využíván chlorpyrifos, jehož použití je v Evropské Unii od roku 2020 zakázáno, spotřebováno ho bylo celkem 2 475 kg. 5 133 kg účinné látky tebuconazole bylo spotřebováno převážně na obilniny. Z chloracetanilidových pesticidů převládal metazachlor, 4 349 kg, nad metolachlorem, 901 kg. (ÚKZÚZ 2019)

Ve Zlínském kraji má největší spotřebu pesticidů okres Kroměříž, 43 524 tun za rok 2019 a spolu s okresem Uherské Hradiště v roce 2019 byla jejich spotřeba 81 % celého Zlínského Kraje. (ÚKZÚZ 2019)

Ze souhrnu pro celou Českou republiku pro rok 2019 vyplývá, že celkem bylo spotřebováno 4 135 tun pesticidních přípravků, z toho tvořily 1 287 tun účinné látky. Zlínský Kraj tedy tvoří 7,9 % spotřeby celé ČR. (ÚKZÚZ 2019)

1.8 Chloracetanilidové pesticidy

Chloracetanilidové pesticidy jsou N, N – disubstituované aniliny. Mezi sebou se liší alkylovými substituenty na anilinovém kruhu. Patří mezi nejčastější preemergentní pesticidy využívané po celém světě. Řadí se mezi systémové a selektivní pesticidy pro jednoděložné a dvouděložné plevely. Jejich roční spotřeba v ČR je 500 tun. (Nursalam, 2016, Fallis 2013; ALS Environmental 2015)

Všechny tři vybrané pesticidy – acetochlor, alachlor a metazachlor – se štěpí na mnoho různých metabolitů, v největší míře na metabolity OA (oxalová kyselina) a ESA (ethansulfonová kyselina), které jsou tedy nejvýznamnější. Na tyto metabolity se štěpí primárně mikrobiální aktivitou v půdě. Dochází k nahrazení atomu chloru a tím k lepší rozpustnosti ve vodě. Kromě toho je také zvýšena stabilita metabolitu oproti mateřské sloučenině a možnost vyluhování metabolitu podzemní vodou. Z toho je zřejmé, že metabolity chloracetanilidových pesticidů jsou perzistentnější, než jsou jejich mateřské sloučeniny. (Kodeš 2021; Rathore a Nollet 2012)

Chloracetanilidové pesticidy a jejich metabolity vykazují různé druhy genotoxicity. Jsou karcinogenní, mutagenní, teratogenní. Některé metabolity jsou často nebezpečnější než mateřské sloučeniny, jiné však téměř nejsou toxické. Rozkladem chloracetanilidových pesticidů vznikají převážně deriváty ESA a OA. Rozkladem přichází o atom chloru a tím se snižuje jejich toxicita oproti mateřské sloučenině. Některé studie tvrdí, že jsou pro člověka téměř netoxické, ale jsou naopak toxické pro vodní organismy. (Hladik et al. 2005; Kamrin 1997; Velisek et al. 2020)

1.8.1 Osud chloracetanilidových pesticidů v životním prostředí

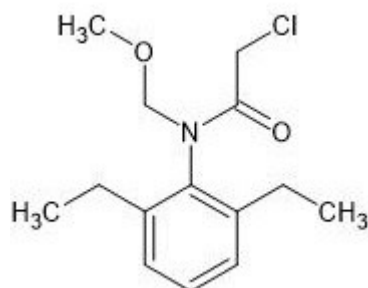
Chloracetanilidové pesticidy v půdě nejsou perzistentní, jejich poločas rozpadu je v rámci dní, maximálně týdnů, což je způsobeno především půdními mikroorganismy. V písčítých půdách jsou mobilnější, odtud se dostávají do podzemních vod. (Nursalam, 2016 a Fallis 2013; Tadeo 2008)

Ve vodě se rozkládají velmi rychle, díky mikroorganismům, k pomalejšímu rozkladu dochází ve vodách bez kyslíku. (Kamrin 1997; Rathore a Nollet 2012)

Rostlinami jsou přijímány kořeny, ve vyšších dávkách se ukládají ve vegetativních a reprodukčních částech rostliny, rychle metabolizují na ve vodě rozpustné metabolity. Kompletní metabolizace probíhá do 10 dnů. (Kamrin 1997; Nursalam, 2016 a Fallis 2013)

1.8.2 Alachlor

Alachlor, úplným názvem 2-chloro-2'6'-diethyl-N-(methoxymethyl)acetanilid je vyobrazen na Obrázku 2.



Obrázek 2: Strukturní vzorec alachloru

Alachlor je selektivní systémový preemergentní herbicid používaný proti travinám na kukuřičných, řepkových a sójových polích. Je absorbován klíčky a kořeny rostliny, kde interferuje s růstovými proteiny a zastavuje růst. Je jedním z nejužívanějších herbicidů a je dostupný ve formě granulí nebo v koncentrátu. Poločas rozpadu je udáván na 8 dní. (Kamrin 1997)

Patří mezi látky, které pravděpodobně ovlivňují endokrinní systém a mezi potenciální karcinogeny. (ALS Environmental 2015)

Použití alachloru v Evropské Unii bylo zakázáno Rozhodnutím Komise ze dne 18.12.2006 o nezařazení alachloru do přílohy I směrnice Rady 91/414/EHS a o odnětí povolení pro přípravky na ochranu rostlin obsahující tuto účinnou látku (2006/966/ES). (Eur – Lex 2021) Spotřeba zásob bylo povoleno do června 2008. Jeho metabolity jsou ale nadále vyplavovány z podzemních vod. (Kodeš 2021)

1.8.2.1 Fyzikální vlastnosti

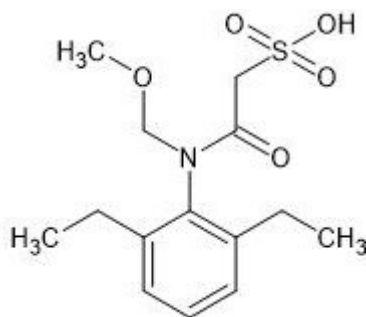
Alachlor je bezbarvá až nažloutlá krystalická sloučenina, která je rozpustná ve většině organických rozpouštědlech. (Kamrin 1997) Je středně mobilní, hodnota K_{oc} je 2,27. (GSI Environmental 2021). Její další fyzikálně-chemické vlastnosti jsou shrnuty v Tabulce 5.

Tabulka 5 Fyzikální vlastnosti alachloru (PubChem 2021)

sumární vzorec	C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂
CAS #	15972-60-8
molekulová hmotnost	269,77 g/mol
rozpuštnost ve vodě	242 mg/l
rozpuštnost v jiných rozpouštědlech	ve většině organických
bod tání	40 °C
tlak par (25 °C)	2,9 mPa
rozdělovací koeficient oktanol/voda	3,52

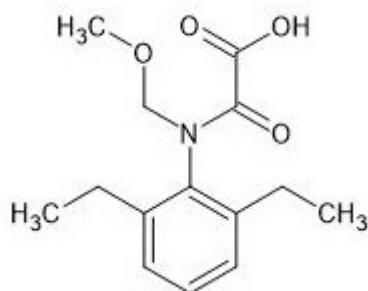
1.8.2.2 Metabolity

Alachlor se rozkládá na stabilní metabolity, které jsou i nyní, po více než deseti letech od ukončení užívání toho pesticidu v EU, detekovatelné, převážně v podzemních vodách. Dominantním metabolitem je alachlor ESA, jehož strukturní vzorec je vyobrazen na Obrázku 3. Jeho celý název je 2-[2,6-diethyl-N-(methoxymethyl)anilino]-2-oxoethansulfonová kyselina, jeho molekulová hmotnost je 315,39 g/mol. Je, podobně jako mateřská sloučenina středně mobilní, mobilita je 2,26. (Aga a Thurman 2001)



Obrázek 3: Strukturní vzorec alachloru ESA

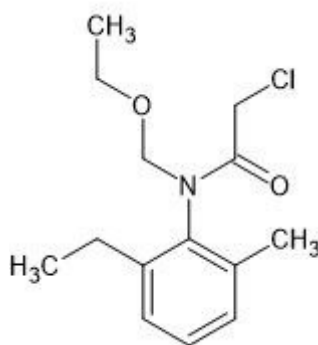
Druhým nejčastějším metabolitem alachloru je alachlor OA. Jeho molekulová hmotnost je 265,3 g/mol, celým názvem je to 2-[2,6-diethyl-N-(methoxymethyl)anilino]-2-oxalová kyselina a jeho struktura je na Obrázku 4. Mobilita je stejná jako u alachloru ESA, středně mobilní. (Aga a Thurman 2001)



Obrázek 4: Strukturální vzorec alachloru OA

1.8.3 Acetochlor

Acetochlor, úplným názvem 2-chloro-*N*-(ethoxymethyl)-*N*-(2-ethyl-6-methylphenyl)acetamide je vyobrazen na Obrázku 5.



Obrázek 5: Strukturální vzorec acetochloru

Acetochlor je selektivní systematický preemergentní herbicid používaný proti travinám převážně na polích s kukuřicí. Působí na klíčky a kořeny jednoletých travin a plevelů. Pevně je degradován mikrobiálně, poločas rozpadu je 3 měsíce. Jeho roční spotřeba v ČR byla okolo 200 tun, každý rok byl mezi prvními aplikovanými pesticidy. (ALS Environmental 2015)

V Evropské Unii bylo jeho použití zakázáno v roce 2011 Prováděcím nařízením komise (EU) č. 1372/2011 ze dne 21. prosince 2011, kterým se v souladu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh neschvaluje účinná látka acetochlor a mění rozhodnutí Komise 2008/934/ES. (Eur - Lex 2021) Jeho spotřebování bylo možné do června 2013. Podobně jako u alachloru a jiných chloracetanilidových pesticidů jsou jeho metabolity detekovány, převážně v podzemních vodách, doposud. (Kodeš 2021)

1.8.3.1 Fyzikální vlastnosti

Acetochlor je čirá olejovitá kapalina výrazného zápachu. Je středně mobilní, hodnota mobility je 2,13. (Ministerio de Sanidad 2013)

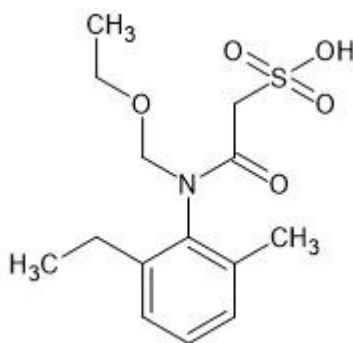
Její další vlastnosti jsou shrnuty v Tabulce 6.

Tabulka 6: Fyzikální vlastnosti acetochloru (PubChem 2021)

sumární vzorec	C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂
CAS #	34256-82-1
molekulová hmotnost	269.77 g/mol
rozpustnost ve vodě	233 mg/l
rozpustnost v jiných rozpouštědlech	ve většině organických
bod tání	10,6 °C
tlak par (20°C)	0,022 mPa
rozdělovací koeficient oktanol/voda	4,14

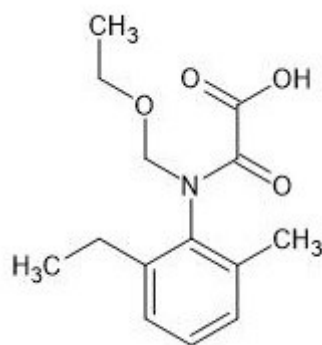
1.8.3.2 Metabolity

Metabolity acetochloru se dají, dle jejich mobility kolem 1,2, zařadit do kategorie mobilní. (Ministerio de Sanidad 2013) Dominantním metabolitem acetochloru je acetochlor ESA, celým názvem 2-[N-(ethoxymethyl)-2-ethyl-6-methylanilino]-2-oxoethanesulfonová kyselina. Jeho molekulová hmotnost je 315,39 g/mol, strukturně je vyobrazen na Obrázku 6.



Obrázek 6: Strukturní vzorec acetochloru ESA

Dalším významným metabolitem je acetochlor OA, celým názvem 2-[N-(ethoxymethyl)-2-ethyl-6-methylanilino]-2-oxalová kyselina. Molekulová hmotnost tohoto metabolitu je 265,3 g/mol, strukturně je vyobrazen na Obrázku 7.

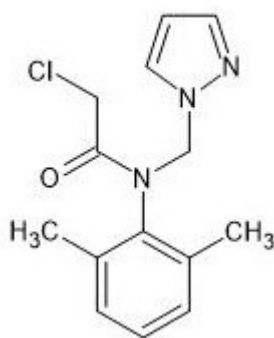


Obrázek 7: Strukturní vzorec acetochloru OA

O metabolitech acetochloru není mnoho informací. Ačkoli se v EU od roku 2013 nepoužívá, stále jsou jeho metabolity detekovány ve vodách, jsou tedy stabilní i po dobu několika let. (Kodeš 2021; Hladík et al. 2005)

1.8.4 Metazachlor

Metazachlor, úplným názvem 2-chlor-2',6'-dimethyl-N-(pyrazol-1-ylmethyl)acetanilid je vyobrazen na Obrázku 8.



Obrázek 8: Strukturní vzorec metazachloru

Metazachlor je preemergentní herbicid používaný při pěstování řepky olejky. Je relativně rozložitelný, poločas rozpadu je udáván na 3–9 dní, ale často je detekovatelný ve vodě, kam se dostává splachem z polí. V roce 2013 bylo v ČR spotřebováno 170 tun. (ALS Environmental 2015)

1.8.4.1 Fyzikální vlastnosti

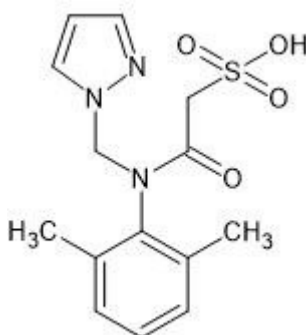
Metazachlor je bezbarvá krystalická látka, rozpustná ve většině organických rozpouštědlech. Ve vodě je udávána rozpustnost 450 mg/L a její mobilita je 2,13, tedy spíše mobilní. (European Chemicals Agency 2011) Její další fyzikálně-chemické vlastnosti jsou shrnuty v Tabulce 7.

Tabulka 7: Fyzikální vlastnosti metazachloru (PubChem 2021)

sumární vzorec	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O
CAS #	67129-08-2
molekulová hmotnost	277,75 g/mol
rozpustnost ve vodě	450 mg/l
rozpustnost v jiných rozpouštědlech	ve většině organických
bod tání	85 °C
tlak par	0,093 mPa
rozdělovací koeficient oktanol/voda	2,49

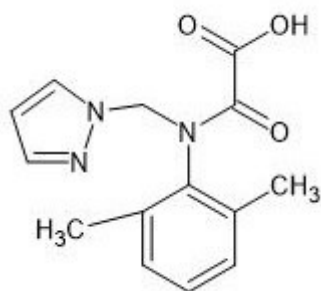
1.8.4.2 Metabolity

Metazachlor, podobně jako u jiných chloracetanilidových pesticidů, se poměrně rychle rozkládá na dominantní metabolit, metazachlor ESA, celým názvem 2-[2,6-dimethyl-N-(pyrazol-1-ylmethyl)anilino]-2-oxoethanesulfonová kyselina. Tento metabolit je vysoce mobilní, mobilita je kolem 0,1. (Dechene et al. 2014) Jeho molekulová hmotnost je 323,37 g/mol, strukturně je vyobrazen na Obrázku 9.



Obrázek 9: Strukturní vzorec metazachloru ESA

Druhým nejčastějším metabolitem metazachloru je metazachlor OA, celým názvem 2-[2,6-dimethyl-N-(pyrazol-1-ylmethyl)anilino]-2-oxalová kyselina. Je taktéž vysoce mobilní sloučeninou. (Dechene et al. 2014) Molekulová hmotnost této sloučeniny je 273,29 g/mol, strukturně je vyobrazena na Obrázku 10.



Obrázek 10: Strukturální vzorec metazachloru OA

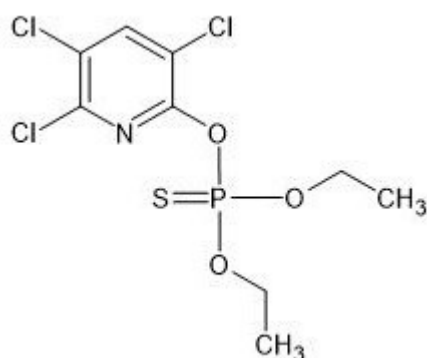
Podobně jako u předchozích pesticidů není k metabolitům mnoho informací, jak o toxicitě, tak o rozkladu. Z různých studií je zřejmé, že metabolity metazachloru jsou stabilní a detekovatelné, převážně v podzemních vodách, i po mnoho let. (Kodeš 2021)

1.9 Další vybrané pesticidy

Pro účely této diplomové práce byly vybrány tři další pesticidy, které nepatří mezi chloracetanilidové pesticidy. Kritériem bylo, aby byly hojně používány v České republice, a aby byly používány na kukuřici a řepku. Byly vybrány pesticidy chlorpyrifos, methiocarb a tebuconazole.

1.9.1 Chlorpyrifos

Chlorpyrifos, úplným názvem O,O-diethyl-O-(3,5,6-trichlor-2-pyridyl)-fosforthioát je strukturálně vyobrazen na Obrázku 11.



Obrázek 11: Strukturální vzorec chlorpyrifosu

Chlorpyrifos patří mezi kontaktní organofosfátové pesticidy. Původně byl používán na hubení komárů, později se začal používat jako insekticid proti celé řadě škůdců na plodinách jako bavlna, ovoce, kukuřice a obilninách. Jeho dalším použitím bylo přímé ošetření ovcí, krocánů, koní a psů, ale také budov. (Kamrin 1997; Ubaid ur Rahman et al. 2021)

Organofosfátové pesticidy jsou estery kyseliny ortho-, thio- a pyro- fosforečné. Jejich roční spotřeba v ČR je kolem 150 tun. Působí jako kontaktní a požerové jedy. Organofosfátové pesticidy jsou přítomné v biologických systémech relativně krátce, vyznačují se vysokou účinností. Jsou rozpustné ve vodě a snadno hydrolyzovatelné, z půdy jsou odstraněny do několika týdnů po aplikaci, výjimkou je právě chlorpyrifos, který je přítomen až po dobu 4 měsíců. Jsou hojně využívány díky jejich nízké perzistenci a vysoké účinnosti. (ALS Environmental 2015; Tadeo 2008; Kamrin 1997)

Chlorpyrifos byl jedním z nejužívanějších insekticidů v České republice, v roce 2019 byla jeho spotřeba 125 tun, v roce 2020 bylo ale jeho použití zakázáno Evropskou Unií. (ALS Environmental 2015, ÚKZÚZ, 2019, Eur - Lex 2021)

1.9.1.1 Fyzikální vlastnosti

Chlorpyrifos je bílá krystalická látka, někdy ve formě vloček, s typickým zápachem. Je málo mobilní. Jeho další vlastnosti jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8: Fyzikální vlastnosti chlorpyrifosu (PubChem 2021)

sumární vzorec	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
CAS #	2921-88-2
molekulová hmotnost	350,6 g/mol
rozpustnost ve vodě	1,12 mg/l
rozpustnost v jiných rozpouštědlech	ve většině organických
bod tání	42 °C
tlak par	2,4 mPa
rozdělovací koeficient oktanol/voda	4,96

1.9.1.2 Toxicita

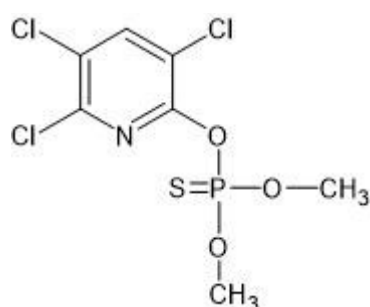
Akutní toxicita u lidí je nízká, působí na centrální nervový systém, kardiovaskulární systém, způsobuje respirační problémy a dráždí kůži. (Ubaid ur Rahman et al. 2021)

Chronická toxicita působí podobně jako akutní, navíc se přidávají problémy s pamětí, koncentrací, dezorientace, deprese, podráždění, noční můry, problémy s řečí, bolesti hlavy a další. (Kamrin 1997) Organofosfátové pesticidy jsou potencionálními mutageny a karcinogeny u lidí, s čímž jsou spojovány dědičné vady, reprodukční dysfunkce a různé vrozené vady, převážně v centrálním nervovém systému. (Ubaid ur Rahman et al. 2021)

Chlorpyrifos je také velmi toxický pro ptáky, ovlivňuje hlavně jejich rozmnožování. Také je velmi toxický pro vodní organismy, jak pro ryby, tak řasy a měkkýše. (Kamrin 1997; Ubaid ur Rahman et al. 2021)

1.9.1.3 Metabolity

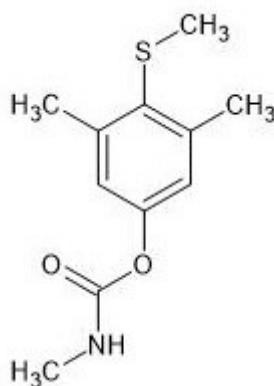
Hlavním metabolitem chlorpyrifosu je chlorpyrifos-methyl. Je to bezbarvá krystalická látka, korozivní k mědi, mosazi, cínu a železu. Strukturně je vyobrazen na Obrázku 12. (PubChem 2021) Byl také používán jako insekticid, byl stejně jako chlorpyrifos zakázaný Evropskou Unií v roce 2020. (Eur – Lex 2021)



Obrázek 12: Strukturní vzorec chlorpyrifos-methylu

1.9.2 Methiocarb

Methiocarb, úplným názvem 3,5-dimethyl-4-(methylsulfanyl)fenyl-methylkarbamát je vyobrazen na Obrázku 13.



Obrázek 13: Strukturální vzorec methiocarbu

Methiocarb je používán jako insekticid, akaricid a moluskocid. Patří do skupiny karbamátových pesticidů.

Karbamáty jsou estery nebo deriváty kyseliny karbamové. Karbamátové pesticidy se používají nejčastěji jako insekticidy, ale také jako moluskocidy. Jejich roční spotřeba v ČR je okolo 300 tun, jejich mechanismus účinku je jak kontaktní, tak systémový. Působí na pohyblivé škůdce (larvy, dospělí jedinci), ne na jejich vajíčka. Patří mezi vysoce toxické látky pro obratlovce. Při prvních příznacích je poškození nervového systému reverzibilní. Karbamáty jsou relativně perzistentní, jejich poločas rozkladu je v rámci dní až týdnů. Snadno hydrolyzují a následně za přítomnosti světla podléhají fotodekompozici za vzniku mnoha produktů. (ALS Environmental 2015; Rathore a Nollet 2012)

1.9.2.1 Fyzikální vlastnosti

Methiocarb je bílá krystalická látka s charakteristickým zápachem. Je středně mobilní, log K_{oc} je 2,8. Další vlastnosti jsou uvedeny v Tabulce 9:

Tabulka 9: Fyzikální vlastnosti methiocarbu (PubChem 2021)

sumární vzorec	$C_{11}H_{15}NO_2S$
CAS #	2032-65-7
molekulová hmotnost	225,31 g/mol
rozpuštěnost ve vodě	27 mg/l
rozpuštěnost v jiných rozpouštědlech	ve většině organických
bod tání	120 °C
tlak par (20 °C)	0,015 mPa
rozdělovací koeficient oktanol/voda	3,11

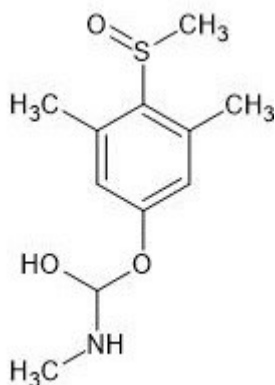
1.9.2.2 Toxicita

Methiocarb je akutně toxický perorálně a inhalačně, dermálně nebyla zjištěna akutní toxicita. Je vylučován převážně močí, nejsou důkazy, že by v těle akumuloval. Jeho účinky jsou nesystémové. (ALS Environmental 2015)

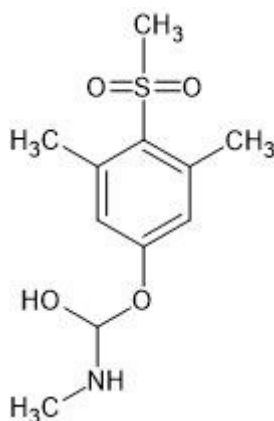
Je podezřelým karcinogenem a endokrinním disruptorem, nicméně se velmi rychle rozkládá, proto představuje riziko pro osoby s ním pracující, ne pro konzumenty potravin jím ošetřenými. (ALS Environmental 2015)

1.9.2.3 Metabolity

Methiocarb má dva významné metabolity, methiocarb sulfoxid a methiocarb sulfon. Methiocarb sulfoxid, celým názvem 3,5-dimethyl-4-methylsulfinylfenyl-N-methylkarbamát, má molekulovou hmotnost 241,31 g/mol. Methiocarb sulfon, má molekulovou hmotnost 257,31 g/mol a jeho celý název je 3,5-dimethyl-4-methylsulfonyl-fenyl-N-methylkarbamát. Toxicita se u obou předpokládá obdobná jako u samotného methiocarbu. Struktura methiocarb sulfoxidu je na Obrázku 14 a methiocarb sulfonu na Obrázku 15. (Plácido et al. 2013)



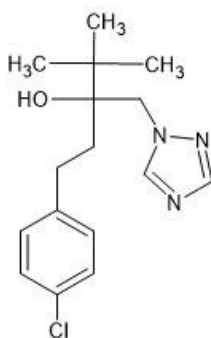
Obrázek 14: Strukturní vzorec methiocarb sulfoxidu



Obrázek 15: Strukturální vzorec methiocarb sulfonu

1.9.3 Tebuconazole

Tebuconazole, úplným názvem 1-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-3-(1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol je vyobrazen na Obrázku 16.



Obrázek 16: Strukturální vzorec tebuconazolu

Tebuconazole je pesticid ze skupiny triazolů a používá se jako fungicid. V roce 2013 bylo v ČR použito 179 tun pesticidů, ve kterých byl tebuconazole účinnou látkou. Je to systémový fungicid s preventivní účinností. (ALS Environmental 2015)

Triazoly jsou sloučeniny s pětičlenným kruhem, který obsahuje dva atomy uhlíku, tři atomy dusíku a dvě dvojné vazby. Jejich využití je nejen jako pesticidy, ale také antimykotika nebo ve fotografickém průmyslu. (PubChem 2021)

1.9.3.1 Fyzikální vlastnosti

Tebuconazole je bezbarvá krystalická látka, jejíž další fyzikální vlastnosti jsou uvedeny v Tabulce 10. Podle (European Chemicals Agency 2013) je na hranici mezi středně a málo mobilními látkami.

Tabulka 10: Fyzikální vlastnosti tebuconazolu (PubChem 2021)

sumární vzorec	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O
CAS #	107534-96-3
molekulová hmotnost	307,82 g/mol
rozpuštěnost ve vodě	36 mg/l
rozpuštěnost v jiných rozpouštědlech	ve většině organických
bod tání	105 °C
tlak par (20 °C)	0,0017 mPa
rozdělovací koeficient oktanol/voda	3,7

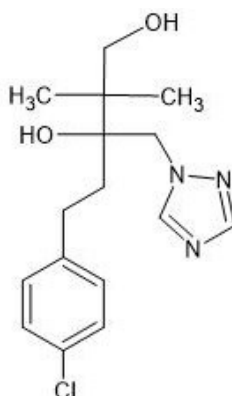
1.9.3.2 Toxicita

Tebuconazole vykazuje nízkou akutní orální a dermální toxicitu, střední riziko představuje inhalační vstup do těla. Při styku s kůží způsobuje podráždění. Působí na játra a nervový systém. Je potencionálním karcinogenem. (Environmental Protection Agency 2010)

1.9.3.3 Metabolity

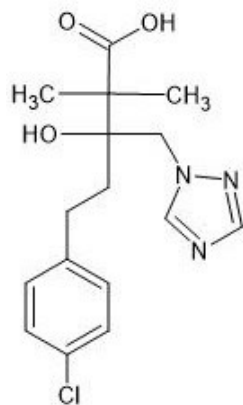
Mezi významné metabolity tebuconazolu se zařazují tebuconazole OH a tebuconazole COOH. Oba tyto metabolity vznikají v těle savců a jsou vylučovány močí. Tebuconazole OH je strukturně vyobrazen na Obrázku 17 a tebuconazole COOH na Obrázku 18.

Tebuconazole OH, celým názvem (4-chlorophenyl)-2,2-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-1,3-pentandiol, má molekulovou hmotnost 309,79 g/mol.



Obrázek 17: Strukturní vzorec tebuconazolu OH

Tebuconazole COOH, celým názvem 5-(4-chlorophenyl)-2,2-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-3-ol-pentanová kyselina, má molekulovou hmotnost 337,81 g/mol.



Obrázek 18: Strukturální vzorec tebuconazolu COOH

2 EXTRAKČNÍ TECHNIKY

Pro úspěšné stanovení pesticidů a jejich metabolitů v reálném vzorku je klíčová vhodná extrakční technika. Měla by být taková, aby výtěžnost pesticidů a jejich metabolitů byla téměř 100 % a zároveň, aby bylo ze vzorku odstraněno co nejvíce rušivých látek z matrice. Pesticidy jsou ale velmi široká skupina o různém chemickém složení i polaritách, je tedy nutné najít nejvhodnější extrakční metodu pro co nejširší skupinu. (Patnaik 2017; Wellings 2006)

Příprava vzorku pro analýzu, tedy i extrakce, jsou pro správné stanovení klíčové. Při extrakcích dochází ke zlepšení chromatografického stanovení analytů a jejich detekce a izolace rušivých látek. Tento krok může být zdrojem chyb, i velmi významných. Změna vzorku a tím i jeho znehodnocení může být způsobena procesy jak chemickými, tak biochemickými. (Wellings 2006; Patnaik 2017)

V současnosti je snaha zavádět takové postupy extrakcí, aby byly extrakce co nejúčinnější a zároveň zkrácení doby extrakce a také jejich miniaturizace, což souvisí i s nízkou spotřebou rozpouštědel. (Nasiri et al. 2019)

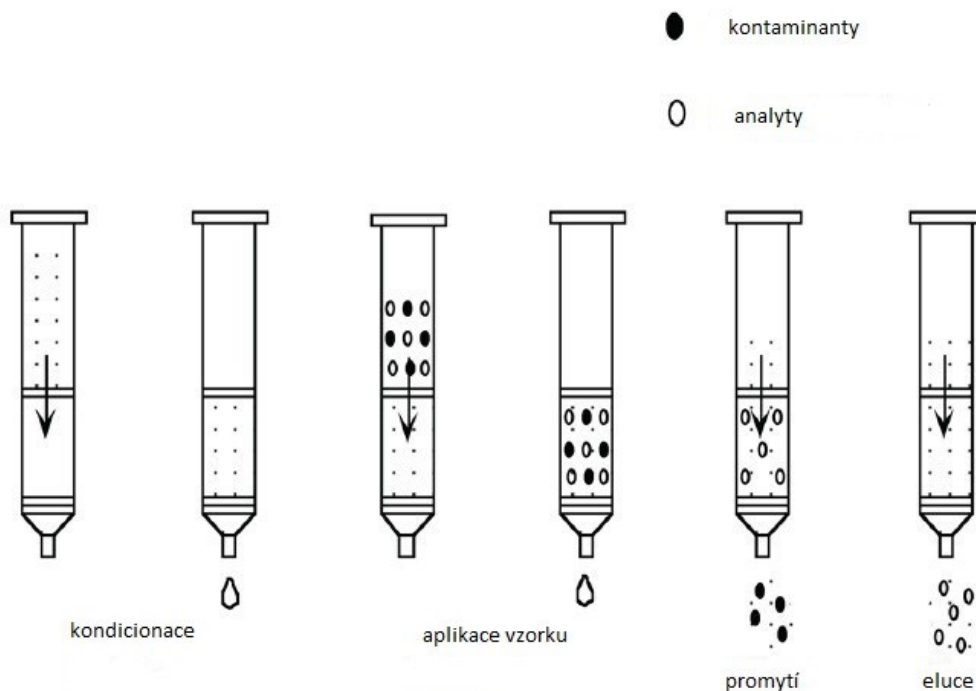
Kromě v současnosti nejvyužívanějších metod extrakce, extrakce pevným sorbentem a QuEChERS jsou dalšími možnostmi například Soxhletova extrakce, mikrovlnné extrakce nebo extrakce kapaliny kapalinou, které jsou ale náročnější jak na čas, tak na spotřebu rozpouštědel, nebo laboratorní vybavení. Relativně novou metodou je SPME (Solid Phase Micro Extraction), extrakce na vlákně potaženém vhodnou fází, která je rychlá, ekonomická a bez použití rozpouštědel. (Patnaik 2017; Nasiri et al. 2019)

2.1 Extrakce pevným sorbentem

Metoda SPE (Solid Phase Extraction – extrakce pevným sorbentem, někdy také jako extrakce tuhou fází) je rychlá, jednoduchá a opakovatelná metoda extrakce pro kapalné vzorky. Její výhodou je malé množství potřebných rozpouštědel a možnost automatizace. Je to metoda vhodná pro izolaci analytů, jejich vyčištění od nežádoucích látek, zakoncentrování a přečištění vzorků. Mechanismus je podobný jako při kapalinové chromatografii, je dostupné velké množství kolonek a extrakčních disků lišících se jak náplní, tak objemem. (Lee 2003; Nasiri et al. 2019)

V současnosti jsou pro environmentální analýzy nejvyužívanějšími náplněmi SPE kolonek oktadecylové řetězce (C18) a oktacylové řetězce (C8). (Radojevič a Bashkin 2006)

Extrakce pevným sorbentem se skládá ze čtyř kroků, které jsou uvedeny i na Obrázku 19.



Obrázek 19: Extrakce pevným sorbentem (Radojevič a Bashkin 2006)

1. Kondicionace SPE kolonky – tedy její příprava na použití, promytí vhodným rozpouštědlem a následné promytí vodou.
2. Aplikace vzorku – vzorek protéká přes náplň kolonky, selektivně se zachytává analyt, ostatní látky protékají kolonkou bez nasorbování.
3. Promytí kolonky – po aplikaci vzorku je kolonka promyta dostatečným množstvím vody, aby byly případné nečistoty odstraněny z náplně. Pokud je eluční roztok výrazně odlišný od promývacího, měla by být kolonka následně vysušena, nejlépe dusíkem.
4. Eluce analytu z kolonky – vhodným rozpouštědlem jsou látky desorbovány z náplně kolonky, poté jsou připraveny k analýze, nebo mohou být dále zpracovávány. Vhodnější je desorbovat vícekrát menším množstvím rozpouštědla než jednou větším množstvím.

Po provedení extrakce je možné, ve většině případů, kolonku regenerovat pomocí dostatečného množství rozpouštědla a vody na důkladné vyčištění náplně kolonky a následným vysušením. (Schenck et al. 2008)

Použití SPE v různých studiích je shrnuto v Tabulce 11.

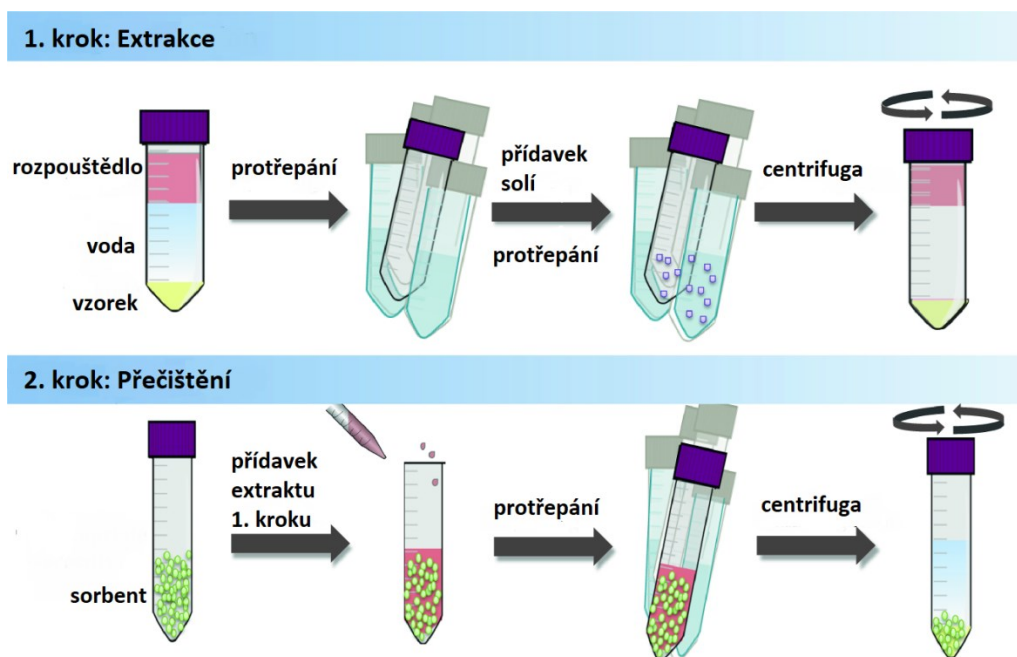
Tabulka 11: Použití SPE v různých studích

Studie	Pesticidy	Typ kolonky	Kondicionace	Vzorek	Eluce	Příprava vzorku pro analýzu
(Hladik et al. 2005)	Alachlor, acetochlor, triiaziny a jejich metabolity	Supelco Envi-Carb carbon (6 ml, 250 mg, PA)	10 ml 10 mM octan amonný v methanolu; 25 ml deionizované vody	500 ml při 6 ml/min	6 ml 10 mM octan amonný	rozděleno 2 x 3 ml; vysušeno dusíkem; 0,5 ml 10 mM octan amonný ve vodě pro DAD; 0,5 ml acetone pro MS
(Shoemaker 2002)	Alachlor, acetochlor a jejich metabolity	Supelco Envi-Carb carbon (6 ml, 250 mg, PA)	10 ml 10 mM octan amonný v methanolu; 25 ml deionizované vody	200 ml při 10 ml/min	5 ml 10 mM octan amonný	vysušeno dusíkem; 1 ml octan amonný ve vodě
(Shoemaker 2002)	Alachlor, acetochlor a jejich metabolity	Varian Bond Elut C18 (6 ml, 500 mg), Varian Bond Elut C18OH (3 ml, 500 mg)	10 ml methanol; 25 ml deionizované vody	200 ml při 6 ml/min	5 ml methanol	vysušeno dusíkem; 1 ml octan amonný ve vodě
(Junker-Buchheit a Witzemberger 1996)	Alachlor, acetochlor a jejich metabolity	LiChrolut EN (3 ml, 200 mg); LiChrolut RP-18 (8 ml, 1 g)	objem kolony methanolu; objem kolony deionizované vody	1 ml (200ng/l) při 5 ml/min	2 x 3 ml 1:1 methanol + ethyl acetát	
(Tuzimski 2009)	27 pesticidů z různých skupin	Bakerbond C18 (2000mg, 6 ml), C18 Plus (3000 mg, 6 ml)	6 ml dichlormethan; 6 ml methanol; 6 ml deionizované vody	1 l při 10 ml/min	5 ml dichlormethan	vysušeno; 1 ml dichlormethan

2.2 QuEChERS

Metoda QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) je metoda, která byla vyvinuta a publikována institutem *US Department of Agriculture Eastern Regional Research Center ve Wyndmooru, PA.* (Anastassiades et al. 2003)

Schématické znázornění extrakce QuEChERS je na Obrázku: 20.



Obrázek 20: Extrakce QuEChERS (Patnaik 2017)

Metoda je založena na dvou jednoduchých krocích. V prvním kroku dochází k extrakci požadované látky ze zhomogenizovaného vzorku pomocí organického rozpouštědla, nejčastěji se používá acetonitril, a roztoků solí. Ve druhém kroku dochází k přečištění organické fáze z prvního kroku pomocí disperzivní SPE. (Vera et al. 2013)

Metoda QuEChERS je používána pro extrakci různých chemických sloučenin, nejčastěji pesticidů a léčiv. Je velmi populární pro svou jednoduchost, nízké náklady, vysokou účinnost a to vše velmi rychle a s minimálním počtem kroků. (Vera et al. 2013)

V současnosti se vyrábí různé směsi solí přímo pro extrakci QuEChERS pro dané matrice. Základní směs, původně ze studie Anastassiades et al. (2003) je síran hořečnatý a PSA (etylendiamin-N-propyl obsahující primární i sekundární aminy) je vhodná pro odstranění vody, organických kyselin, mastných kyselin a cukrů. Pro mastné matrice se přidává C18 pro odstranění lipidů a sterolů. Pro pigmentované matrice se k původní směsi přidávají

grafitizované saze (GCB), pro odstranění pigmentů. QuEChERS je předmětem mnoha studií a nyní existuje více modifikací, každá vhodná pro jiný typ analytu. Tyto modifikace jsou shrnuty v následující Tabulce 12. (Patnaik 2017; Anastassiades et al. 2003; Scientific 2018)

Tabulka 12: Metody QuEChERS dle analytu

Analyt	Metoda	Poznámky
Citlivý na kyselé prostředí	QuEChERS (Anastassiades et al. 2003)	Nejjednodušší extrakce, nejčistší, nejpoužívanější
Citlivý na zásadité prostředí	AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) (Restek 2012)	Extrakční činidlo s octanem sodným, horší odstranění matrice
Citlivý na kyselé i zásadité prostředí	Evropská norma (EN 15662, 2018)	Vyvážená pro kyselé i zásadité analyty
Neutrální	Schenck et al. (2008)	Pro pigmentované matrice, Zdvojnásobení vrstvy PSA při SPE

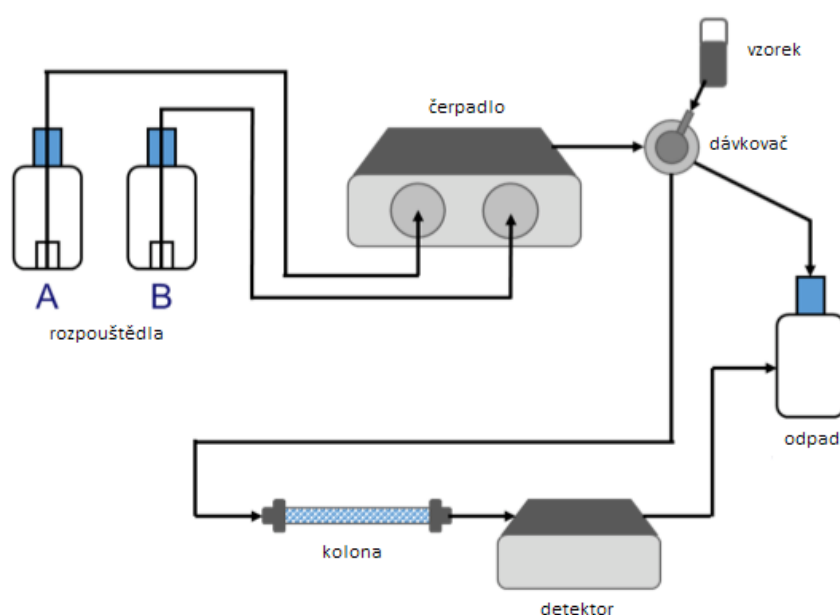
Použití QuEChERS v různých studiích je shrnuto v Tabulce 13.

Tabulka 13: Použití QuEChERS v různých studiích

Studie	Pesticidy	Vzorek	1. krok	Extrakt 1. kroku	2. krok	Finální vzorek
(Anastassiades et al. 2003)	16 pesticidů z různých skupin	10 g + 10 ml acetonitril	4 g MgSO ₄ , 1 g NaCl, centrifuga (5 min, 5000 rpm)	1 ml	150 mg MgSO ₄ , 25 mg PSA, centrifuga (1 min, 6000 rpm)	0,5 ml
(Wang et al. 2012)	Pyrazosulfuron-ethyl	10 g + 10 ml 1 % CH ₃ COOH v acetonitrilu	4 g MgSO ₄ , 1 g CH ₃ COONa, centrifuga (5 min, 5000 rpm)	1 ml	150 mg MgSO ₄ , 25 mg PSA, centrifuga (1 min, 6000 rpm)	0,5 ml
(Pinto et al. 2009)	Chlorované sloučeniny	2,5 g + 1,5 ml voda + 2,5 ml ethylacetát	1 g MgSO ₄ , centrifuga (5 min, 5000 rpm)		GC analýza	

3 KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

Kapalinová chromatografie (LC) je separační technika, u které je mobilní fází kapalina. Distribucí mezi mobilní fází (tekoucí kapalina) a stacionární fází (sorbent uvnitř kolony) dochází k rozdělení vzorku na základní složky. Vysocoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je moderní forma LC, při které je mobilní fáze čerpána kolonami s malými částicemi za vysokého tlaku. (Dong 2006) Je to technika vhodná pro kvantitativní i kvalitativní analýzu velkého množství sloučenin. (Nováková a Douša 2013) Schéma kapalinového chromatografu je znázorněno na Obrázku 21.



Obrázek 21: Schéma kapalinového chromatografu (Wellings 2006)

HPLC je technika vhodná na vícesložkovou analýzu reálných a komplexních směsí. Tato analýza je automatizovaná, rychlá a velmi přesná. Detekce je u HPLC možná několika typy citlivých a specifických detektorů, detekční limity se pohybují v řádu ng, i nižších. Nicméně detektory nejsou univerzální, detekce některých látek může být problematická. Účinnost separace je menší než u kapilární GC, tedy stanovení složitých směsí je problematické. HPLC má také mnoho provozních parametrů, tudíž je náročná na správné a funkční nastavení. (Dong 2006; Wellings 2006, Nováková a Douša 2013)

3.1 Separační principy v kapalinové chromatografii

Chromatografie s normální fází (NPC) je klasický separační režim, kdy se analyt adsorbuje/ desorbuje na polární stacionární fázi (oxid křemičitý, oxid hlinitý). Mobilní fáze je nepolární (např.: hexan). Nejdříve eluují nepolární sloučeniny, poté polární, proto je tento separační režim vhodný pro stanovení nepolárních sloučenin a také pro přečištění vzorků. (Dong 2006; Snyder et al. 2010)

Chromatografie s reverzní fází (RPC) je opakem NPC. Mobilní fáze je polární (voda, acetonitril, methanol), stacionární fáze je nepolární, je tvořena oktadecylem (C18) s oxidem křemičitým. Hydrofobní látky skupiny C18 tvoří vrstvu podobnou kapalině, se kterou interagují nepolární analyty, zatímco polární eluují. RPC je v současnosti nejpoužívanější režim HPLC, používá se pro přibližně 70 % analýz. Tento separační režim je vhodný pro stanovení polárních, středněpolárních a některých nepolárních sloučenin. (Dong 2006; Snyder et al. 2010; Radojevič a Bashkin 2006)

Mimo normální a reverzní fáze existují v kapalinové chromatografii i další typy fází. IEC je iontově výměnná chromatografie, kdy sorbent zachycuje určitý typ iontu výměnnou za jiný iont. Typické stacionární fáze jsou kationtové nebo aniontové. GPC je zkratka pro gelovou permeační chromatografii, při které je separace založena primárně na velikosti molekul analytu. Malé molekuly pronikají do pórů gelu – stacionární fáze – a jsou vyloučeny až nakonec, zatímco velké molekuly kolonu opouští spolu s mobilní fází. Dalšími možnostmi separace jsou například afinitní a chirální chromatografie. (Dong 2006; Radojevič a Bashkin 2006; Wellings 2006)

3.2 Izokratická a gradientová eluce

Izokratická eluce je vhodná pro analýzu směsí, složení mobilní fáze se v čase nemění. Pro směsi o různých polaritách je vhodnější použít eluci gradientovou, při které se v průběhu analýzy mění složení mobilní fáze a tím i její eluční síla. Výhodou gradientové eluce jsou právě lepší podmínky pro analýzu směsí látek o různých polaritách, s tím spojená vyšší sensitivita i pro později eluující píky, a také lepší rozlišení brzkých i pozdějších píků. Nevýhodou pro gradientovou eluci může být nepřítomnost binárního čerpadla, a tedy nemožnost měnit složení mobilní fáze v průběhu analýzy. Další nevýhodou pro gradientovou eluci může být vyšší náročnost na vytvoření metody a také to, že analýza s gradientovou elucí bývá časově náročnější než analýzy s izokratickou elucí. Na rozdíl od izokratické eluce je nutné u gradientové udávat složení mobilní fáze v průběhu analýzy

a také průtok, který se může v průběhu měnit. Průběh gradientové eluce bývá často navrhován pomocí počítačových programů. (Radojevič a Bashkin 2006; Wellings 2006; Snyder et al. 2010)

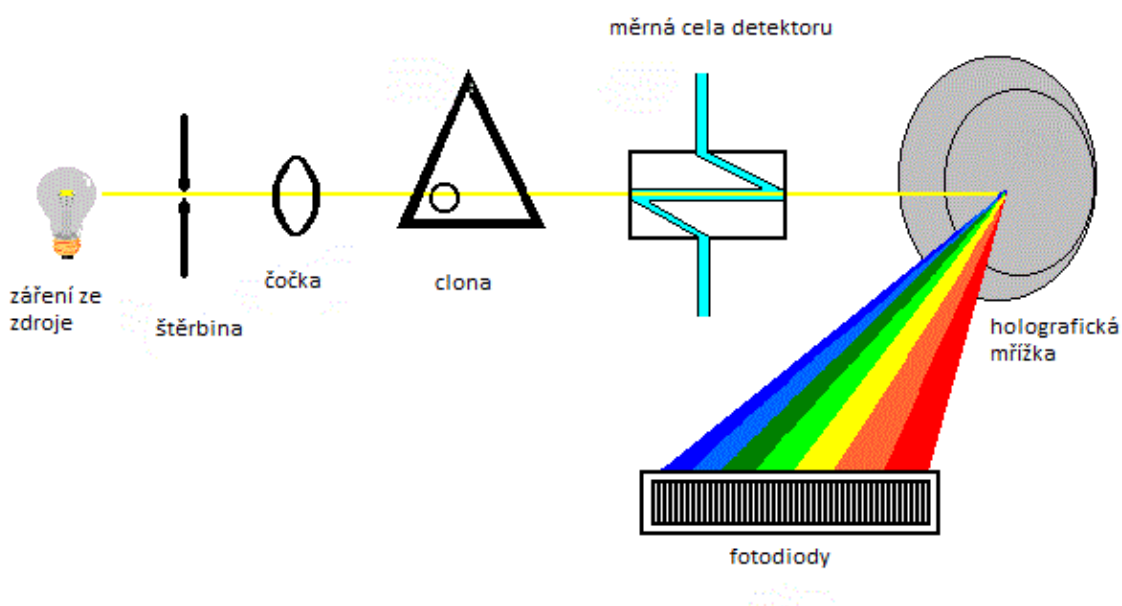
3.3 Detektory

Koncentrace eluujícího analytu je měřena detektorem. Pro HPLC existuje celá řada detektorů, které danou látku detekují podle různých vlastností. Detektor může být jak univerzální pro stanovení celé řady sloučenin, tak selektivní, pro stanovení pouze úzké skupiny analytů. Jedná se jak o detektory destruktivní, u kterých dochází ke znehodnocení analytu, tak i nedestruktivní. (Dong 2006, Nováková a Douša 2013)

3.3.1 UV/Vis absorpční detektory

UV/Vis absorpční detektory monitorují absorpci ultrafialového nebo viditelného světla v eluentu. Patří mezi nejpoužívanější detektory.

Tyto detektory se skládají z deuteriové lampy, monochromátoru a malé průtokové kvyety. Monochromátory jsou pohyblivé mřížky nebo hranoly, kde je umožněn výběr vlnové délky. Běžný je duální paprsek, tedy světelný zdroj je rozdělen na vzorek a referenční materiál. Intenzita každého paprsku je monitorována samostatnou fotodiodou. Základní schéma UV/Vis detektoru je znázorněno na následujícím Obrázku 22.



Obrázek 22: Schéma detektoru diodového pole (Wellings 2006)

Principem UV/Vis absorpce je Lambert – Beerův zákon:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

Kde A je absorbance látky při dané vlnové délce, ε je molární absorpční koeficient látky při dané vlnové délce, b je tloušťka absorpční vrstvy a c je koncentrace. (Nováková a Douša 2013)

Neustále dochází ke zlepšování citlivosti a linearity detektorů. Životnost deuteriové lampy je přes 1000 hodin, u mnoha detektorů lze detekovat dvě a více vlnových délek. Detektor diodového pole DAD, také známý jako detektor fotodiodového pole PDA, funguje jako UV/Vis detektor s více snímanými vlnovými délkami. Tento detektor je vhodný pro vývoj metody, snímáním více vlnových délek ulehčuje identifikaci píku. (Nováková a Douša 2013, Snyder et al. 2010; Radojevič a Bashkin 2006)

Kapalinová chromatografie ve spojení s DAD je vhodná pro simultánní rozlišení více pesticidů, i z různých skupin. To je umožněno díky snímání více vlnových délek současně. (Cserhati a Szogyi 2012)

Problémem je rozlišení izomerů, jako jsou acetochlor a alachlor, stejně tak jejich metabolity ESA a OA. Zde se nejčastěji používají dvě kolony o různých velikostech částic, nicméně stále častější je požití hmotnostně-spektrometrických detektorů. (Hostetler a Thurman 2000; Shoemaker 2002)

Některé metody pro stanovení reziduí pesticidů a jejich metabolitů pomocí HPLC-DAD jsou uvedeny v Tabulce 14.

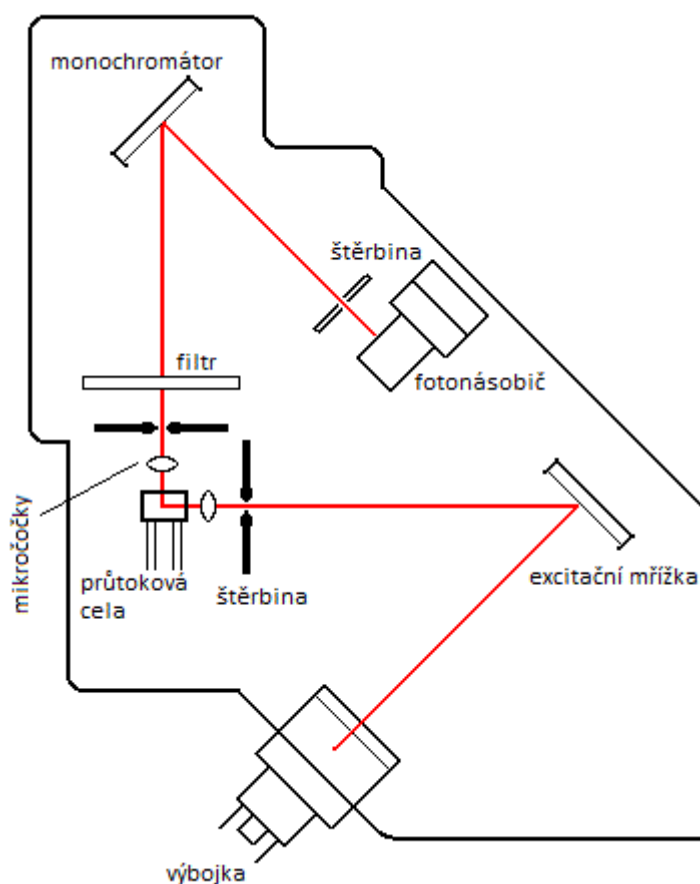
Tabulka 14: Metody pro stanovení pesticidů s využitím HPLC-DAD s limitem kvantifikace

Studie	Pesticidy	Objem vzorku [μ l]	Kolona (délka \times průměr, velikost částic)	Mobilní fáze	Průtok [ml/min]	Teplota [$^{\circ}$ C]	Vlnová délka [nm]	LOQ [μ g/l]
(Hladik et al. 2005)	Alachlor, acetochlor, triaziny a jejich metabolity	100	Luna C18 250 mm \times 4,6 mm, 5 μ m	izokraticky 60:35:5 (10 mM octan amonný; methanol: acetonitril)	1	60	210	0,1
(Junker-Buchheit a Witzelbacher 1996)	33 pesticidů z různých skupin		Li Chro CART 250-4 Superspher 100 RP-18 250mm \times 4 mm	gradient acetonitril - octan amonný		28	220; 245	7
(Hostetler a Thurman 2000)	Acetochlor, alachlor a jejich metabolity	50	Phenomenex C18 250 mm \times 3 mm, 5 μ m + Keystone 250 mm \times 4,6 mm; 3 μ m	izokraticky 60:35:5 (fosfátový pufr pH 7; methanol: acetonitril)	0	60	210	0,2
(Tuzimski 2009)	27 pesticidů z různých skupin	20	Zorbax Eclipse XDB C18 150 mm \times 4,6 mm, 5 μ m	gradient voda - acetonitril	1	22	202, 212, 222, 240, 254	0,6

3.3.2 Fluorescenční detektory

Fluorescenční detektor FLD monitoruje emisní záření, které látka vyzáří po absorpci excitačního elektromagnetického záření. Absorbovanou energii analyt vyzáří jako fluorescenci. Je vysoce citlivý, ale velmi selektivní. Je omezen na stanovení sloučenin s fluorescencí. Používá se na stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků – PAH. (Dong 2006; Patnaik 2017)

Fluorescenční detektor, jehož schéma je znázorněno na Obrázku 23, se skládá z xenonové výbojky, z excitačního a emisního monochromátoru, průtokové kvyety a fotonásobiče.



Obrázek 23: Schéma FLD detektoru (Patnaik 2017)

Pesticidy většinou nejsou fluorescenčními detektory stanoveny, ale jsou jimi stanoveny huminové látky. Huminové látky jsou makromolekulární látky na bázi uhlíku, které vznikají jako produkt biorefinančních procesů. Huminové látky se přirozeně vyskytují v půdách a do svých struktur adsorbují pesticidy. Fluorescenční detektory se využívají na studie změn fluorescenčních charakteristik huminových látek při interakci s pesticidy. (Spark a Swift

1994) Huminové látky jsou organického původu, vznikají rozkladem rostlin. Podle rozpustnosti ve vodě se dělí na huminy (nerozpustné ve vodě), huminové kyseliny (rozpustnost při pH 2 a vyšším) a fulvokyseliny (rozpustnost nezávisí na pH). Jsou obsaženy převážně v půdě a rašelině a jejich další rozklad je obtížný. (Lee 2003; Hesketh et al. 1996)

3.3.3 Hmotnostně – spektrometrické detektory

Hmotnostně – spektrometrické detektory, MS, analyzují ionty, které vznikají ionizací analytů z kapalné mobilní fáze, která musí být nejprve převedena do plynné fáze. Následně se takto vzniklé ionty analyzují určení poměru hmotnosti k náboji. Tyto detektory jsou univerzální a přitom vysoce selektivní a citlivé, nicméně destruktivní. Identifikace analytů je možná pomocí jejich hmotnostních spekter specifických pro každou látku. (Dong 2006; Wellings 2006; Radojevič a Bashkin 2006)

Pro ionizaci mobilní fáze je využíváno více typů ionizátorů. Často je ionizátorem Elektrosprej – ESI – Eluát prochází kapilárou s vysokým napětím, na konci kapiláry je vystříknuto mnoho nabitých kapiček, ze kterých je odpařováno rozpouštědlo, čímž vzniknou ionty. Stejně pracuje Nanoelektrosprej – nanoESI, s menším množstvím vzorku, nicméně je velmi náročný pro použití. Využívá se také Elektrochemická ionizace za atmosférického tlaku – APCI, která je na rozdíl od ESI vhodná i pro méně polární analyty. Její nevýhodou je nefunkčnost při nízkém průtoku HPLC. (Nováková a Douša 2013, Radojevič a Bashkin 2006)

Také analyzátorů u hmotnostně – spektrometrických detektorů je více typů. Používá se kvadrupól, iontová past a průletový analyzátor. (Dong 2006; Radojevič a Bashkin 2006)

MS detektory se s kapalinovou chromatografií používají buď samostatně, nebo v tandemu, tedy MS/MS. Tandemové zapojení zvyšuje citlivost metody. Metody s využitím MS detektoru nebo spojení MS/MS je pro rozlišení metabolitů nejrozšířenější. Acetochlor ESA a alachlor ESA, stejně tak jejich metabolity OA, jsou k sobě navzájem strukturální izomery, mají i stejnou molekulovou hmotnost. Ve spojení MS/MS detekce, vznikají ionty, které jsou částečně různé pro acetochlor ESA a alachlor ESA, analogicky pro OA, díky čemuž se je daří rozseparovat a analyzovat zvlášť. (Shoemaker 2002)

Metoda EPA 535 pro stanovení metabolitů ESA a OA chloracetanilidových pesticidů v povrchových vodách popisuje ve své studii Borton (2010). Používá gradient rozepsaný v Tabulce 15, spojený s detekcí MS/MS. Pro extrakci a zakoncentrování vzorků o objemu

250 ml použil metodu SPE, limit detekce LOD pro extrakt se pohybuje od 0,5 po 0,8 $\mu\text{g/l}$, pro vzorek je LOD od 0,002 po 0,004 $\mu\text{g/l}$, v závislosti na konkrétním metabolitu.

Tabulka 15: Gradient metody EPA 535

Čas [min]	Průtok [ml/min]	Mobilní fáze	
		5 mM octan amonný [%]	Methanol [%]
0	0,25	80	20
4	0,25	70	30
10	0,25	70	30
15	0,25	50	50
17	0,25	15	85
18	0,25	15	85
18,1	0,25	80	20
28	0,25	80	20

Některé metody stanovení reziduí pesticidů a jejich metabolitů pomocí HPLC-MS jsou uvedeny v tabulce 16.

Tabulka 16: Metody pro stanovení pesticidů s využitím HPLC-MS s limitem kvantifikace

Studie	Pesticidy	Objem vzorku [μl]	Kolona (délka × průměr, velikost částic)	Mobilní fáze	Průtok [ml/min]	Detekce	LOQ [μg/l]
(Hostetler a Thurman 2000)	Acetochlor, alachlor a jejich metabolity	50	2× Phenomenex C18 250 mm × 3 mm, 5 μm	0,3:24:35,7:40 (kyselina octová: ethanol: voda: acetonitril)	0,3	MS	0,2
(Borton 2010)	Acetochlor, alachlor a jejich metabolity	25	Restec Ultra C18 100 mm × 2,1 mm, 3 μm	gradient 5mM octanu amonného - methanol	0,25	MS/MS	
(Sjerps et al. 2019)	32 pesticidů z různých skupin		Hypersil GOLD C18 100 mm × 2,1 mm, 1,9 μm	gradient 0,05 % kyselina octová - 0,05 % kyselina octová v acetonitrilu	0,3	MS/MS	0,1

3.3.4 Rozlišení a stanovení účinných látek a jejich metabolitů

Pro rozlišení a stanovení velmi podobných pesticidních látek a jejich metabolitů (acetochlor a alachlor) je vhodnější hmotnostně – spektrometrická detekce, protože vznikají rozličné ionty, které pak mohou být izolovány a stanoveny zvlášť. Pro vyšší účinnost se využívají duální hmotnostně – spektrometrické detektory. (Borton 2010; Hostetler a Thurman 2000)

Pro kvalitativní stanovení většího množství pesticidů, i z různých skupin, je vhodný detektor diodového pole, kde je možné nastavit více vlnových délek, a ve spojení s gradientovou elucí a reverzní fází je možné simultánní stanovení pesticidů o různých polaritách. Tato metoda je tedy vhodná pro monitoring pesticidů ve vodách, půdách a dalších matricích. Rozlišení velmi podobných pesticidních látek a jejich metabolitů je ale velmi obtížné, často nereálné. (Hladik et al. 2005; Lee 2003; Tuzimski 2009)

Pesticidy a jejich metabolity jsou ovlivněny huminovými látkami, které s pesticidy interagují. Pesticidy jsou vázány do jejich molekul, huminové látky však nepodléhají mikrobiálnímu rozkladu, tedy zvyšují poločas rozpadu pesticidů. Huminové látky jsou však zdrojem živin pro rostliny, tedy i pro plevely, tudíž pokud interagují s pesticidy mohou zvyšovat rezistenci plevelů na pesticidy. (Spark a Swift 1994; Hesketh et al. 1996; Lee 2003; Radojevič a Bashkin 2006)

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Přístroje a zařízení

- Analytické váhy Kern ABJ 220-4NM
- Třepačka Heidolph REAX top
- Třepačka RS 10 basic
- SPE extraktor IST VacMaster, 10 pozic
- Čerpadlo KNF N86KN
- Centrifuga Hettich Rotanta 460 R
- Koncentrátor dusíkový LabEva
- Kapalinový chromatograf Agilent 1260 Infinity II s detektorem diodového pole a fluorescenčním detektorem
- Kolona InfinityLab Poroshell 120 EC-C18; 3,0 x 100 mm 2,7-Micron, 1000bar
- Kolona ZORBAX Extend-C18; Rapid Resolution HD 3,0 x 100 mm 1,8-Micron
- Spektrofotometr Unicam UV 500
- Muflová pec M505-1.1.

4.2 Pracovní pomůcky

- Kádinky
- Odměrné baňky (1000 ml, 100 ml, 50 ml, 25 ml, 10 ml, 5 ml)
- Odměrný válec (25 ml)
- PE zkumavky (50 ml, 15 ml)
- Pipety
- Injekční stříkačky
- SPE kolonky - Isolute C18 (100 mg, 3 ml), Biotage,
- SPE kolonky - Supelclean ENVI-18 (0,5 g; 6 ml), Supelco.

- QuEChERS – MgSO₄/NaCl/Na₂Cit/Na₃Cit a MgSO₄/PSA/C18, UCT.
- Filtrační papír ze skleněných mikrovláken, 50 µm, Papírna Pernštejn s.r.o.
- Filtr LUT Syringe 0,45 µm
- Vialky s víčky (10 ml, 2 ml)
- PE vzorkovnice o objemu 200 ml
- Skleněné vzorkovnice o objemu 250 ml

4.3 Chemikálie

- Methanol pro HPLC (Honeywell Riedel-de Haën, Německo)
- Acetonitril pro HPLC (Honeywell Riedel-de Haën, Německo)
- Demineralizovaná voda
- Kyselina fosforečná pro HPLC (Sigma-Aldrich Production GmbH, Švýcarsko)

4.4 Standardy

- Metazachlor (Sigma-Aldrich Production GmbH, Švýcarsko)
- Acetochlor (HPC Standards GmbH, Německo)
- Alachlor (Sigma-Aldrich Production GmbH, Švýcarsko)
- Tebuconazole (HPC Standards GmbH, Německo)
- Methiocarb (HPC Standards GmbH, Německo)
- Chlorpyrifos (HPC Standards GmbH, Německo)
- Metazachlor OA (Sigma-Aldrich Production GmbH, Švýcarsko)
- Metazachlor ESA (HPC Standards GmbH, Německo)
- Acetochlor OA (Sigma-Aldrich Production GmbH, Švýcarsko)
- Acetochlor ESA (HPC Standards GmbH, Německo)
- Alachlor OA (Sigma-Aldrich Production GmbH, Švýcarsko)

- Alachlor ESA (HPC Standards GmbH, Německo)

4.5 Příprava kalibračních roztoků

Z každého standardu uvedeného v kapitole 4.4 (mimo metazachlor ESA) byl připraven zásobní roztok v acetonitrilu o koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ o objemu 10 ml. Z takto připraveného zásobního roztoku byly postupným ředěním acetonitrilem a demineralizovanou vodou připraveny kalibrační roztoky v acetonitrilu a vodě 1:1, o koncentracích 10; 5; 2,5; 2; 1,25; 1; 0,75; 0,5; 0,25 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Zásobní roztok metazachloru ESA byl připraven přímo v acetonitrilu a vodě 1:1, o koncentraci $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, jelikož je v organických rozpouštědlech nerozpustný. Z takto připraveného zásobního roztoku byly postupným ředěním acetonitrilem a demineralizovanou vodou připraveny kalibrační roztoky v acetonitrilu a vodě 1:1, o koncentracích 10; 5; 2,5; 2; 1,25; 1; 0,75; 0,5; 0,25 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Alachlor byl rozpuštěn i ve vodě, zásobní roztok alachloru ve vodě byl připraven v koncentraci $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Takto připravený zásobní roztok byl použit pro optimalizaci metody SPE.

4.6 Optimalizace metody

4.6.1 Optimalizace izokratické eluce

Pro prvotní vytvoření izokratické metody byly využity poznatky ze studií, které se izokratickými metodami zabývají, například Hladik et al. (2005), Tuzimski (2009), Lee (2003), Radojevič a Bashkin (2006). Žádnou metodu není možné přesně opakovat, pokud k dispozici není stejná kolona, jako v publikovaných studiích.

Z uvedených studií bylo zjištěno, že pesticidy jsou stanovovány pomocí reverzních fází, přičemž mobilní fáze bývá acetonitril a methanol. Pro odzkoušení metodiky bylo nejprve pracováno pouze se standardem metazachloru, který byl připraven v koncentraci $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ve 100 % acetonitrilu i 100 % methanolu.

Pro nalezení vhodné izokratické metody pro stanovení metazachloru (kolona PoroShell) byly vyzkoušeny poměry mobilní fáze (rozpuštědlo:voda) 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80 a 10:90. Jako nejvhodnější byla vybrána metoda acetonitril:voda v poměru 60:40. V acetonitrilu docházelo k lepšímu stanovení metazachloru, v retenčním čase 2,8 minuty. K ještě lepšímu stanovení docházelo po rozpuštění standardu v acetonitrilu s vodou v poměru 1:1. Takto již byly upravovány všechny další standardy.

V některých studiích byla kolona vyhřívána na $60 \text{ }^\circ\text{C}$, proto bylo vyzkoušeno vyhřívání kolony z původních $25 \text{ }^\circ\text{C}$ na 30, 35, 40, 45, 50 a $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Tyto výhřevy nevedly k lepšímu stanovení, naopak snižují životnost kolony, proto od nich bylo upuštěno.

Parametry izokratické metody jsou shrnuty v Tabulce 17. Tato izokratická metoda byla později vyzkoušena na koloně Zorbax, nedošlo k výrazným změnám stanovení, ale došlo k lepšímu rozlišení píků jednotlivých standardů, nadále byla tedy využívána kolona Zorbax.

Tabulka 17: Parametry izokratické metody pro stanovení pesticidů

Průtok [ml/min]	Objem vzorku [μl]	Mobilní fáze		Teplota [°C]	Vlnová délka [nm]	Doba měření [min]
		% ACN : % H ₂ O				
0,3	20	60	40	25	194, 200, 210 , 220	10 minut

4.6.2 Optimalizace gradientové eluce

Gradientové metody se používají při potřebě lepšího stanovení více sloučenin o různých polaritách, například při rozlišení metabolitů. Optimalizace metody byla prováděna na koloně Zorbax.

První testovaný gradient byl EPA 535, který ve své studii prezentuje Borton (2010). Jeho popis je uveden v Tabulce 15 v kapitole 3.3.3. Mobilní fáze byla upravena na acetonitril s vodou. Tento gradient byl určen primárně pro rozlišení metabolitů pomocí MS detekce, při DAD detekci k rozlišení metabolitů acetochloru a alachloru nedošlo, ale alespoň byly stanoveny jako jeden pík.

Dalším testovaným gradientem byl lineární gradient se stejným složením mobilní fáze na začátku a na konci, jako v gradientu EPA 535. Tento gradient sice neposkytoval lepší rozlišení metabolitů než EPA 535, ale díky lineární změně složení mobilní fáze bylo dosaženo lepšího rozlišení pro všechny mateřské pesticidní látky. Acetochlor s alachlorem koeluovaly.

V kyselém prostředí dochází ke zvýšení retence slabých kyselin, a naopak ke snížení retence zásad a v zásaditém prostředí naopak. (Lee 2003) Metabolity OA a ESA jsou slabé kyseliny, proto byl připraven roztok 0,05 % kyselina fosforečná, který byl nadále používán v mobilní fázi namísto vody. Touto změnou koeluce nebyla vyřešena, ale došlo ke zvýšení účinnosti.

Gradientová metoda, která byla používána k vyhodnocení jak laboratorních experimentů, tak reálných vzorků je shrnuta v Tabulce 18

Tabulka 18: Parametry gradientové metody pro stanovení vybraných pesticidů

Průtok [ml/min]	Objem vzorku [μl]	Čas [min]	Mobilní fáze		Teplota [°C]	Vlnová délka [nm]
			% ACN : % H ₃ PO ₄ (0,05 %)			
0,25	50	0	15	85	25	194, 200, 210 , 220
		30	85	15		

4.6.2.1 Kalibrace

Pro kalibraci gradientové metody byla zvolena metoda kalibrační přímky, pro tuto metodu bylo vybráno pět koncentrací standardů, 0,25; 0,5; 1; 2,5 a 5 mg·l⁻¹. Byly vytvořeny dvě skupiny sloučenin, v první byl acetochlor a jeho metabolity se třemi vybranými pesticidy a ve druhé metazachlor a acetochlor s jejich metabolity. Bylo tak učiněno z důvodu překryvu retenčních časů acetochloru a alachloru a jejich metabolitů, DAD je schopen snímat

v určitých krocích celé spektrum dané sloučeniny, podle kterého lze stanovit, s jakou určitostí se jedná o danou látku.

Ve vyhodnocovacím programu byla vytvořena kalibrační metoda, která obsahuje kalibrace všech sloučenin, jejich absorpční spektrum po 2 nm a jejich retenční časy.

4.6.3 Charakteristika analýzy

Pro všechny sloučeniny, jak z izokratické tak gradientové metody, byly zjištěny následující charakteristiky (Dong 2006):

- Retenční čas t_R , doba průchodu látky kolonou, mrtvý čas t_M , doba průchodu látky, která není stacionární fází zachycena a redukovaný retenční čas t'_R , rozdíl retenčního a mrtvého času

$$t'_R = t_R - t_M$$

- Retenční faktor k , který udává, kolikrát více času stráví analyt ve stacionární než v mobilní fázi

$$k = \frac{t'_R}{t_M}$$

- Počet teoretických pater n , pro vyjádření účinnosti chromatografické kolony, kde W_b je šířka základny píku

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2$$

4.6.4 Limit detekce a mez stanovitelnosti

Limit detekce LOD odpovídá koncentraci, při které lze danou látku spolehlivě prokázat. Vyjadřuje se jako trojnásobek šumu základní linie, tedy:

$$LOD = \frac{3 \cdot S}{a}$$

Kde: LOD limit detekce [mg/l]

S šum základní linie

a směrnice kalibrační přímky z výšky píku

Mez stanovitelnosti LOQ [mg/l] odpovídá koncentraci, při které lze ještě stanovit koncentraci stanovované látky. Vyjadřuje se jako desetinásobek šumu základní linie, někdy také jako nejnižší bod kalibrace. (Lee 2003)

$$LOQ = \frac{10 \cdot S}{a}$$

4.7 Extrakční metody

4.7.1 Extrakce pevným sorbentem

Pro extrakci SPE byly vybrány dva typy kolonek C18, tedy vhodné pro environmentální organické vzorky. První testovanou kolonkou byla kolonka Isolute C18 (100 mg, 3 ml) od společnosti Biotage, druhou kolonkou byla Supelclean ENVI-18 (0,5 g; 6 ml) od společnosti Supelco. Byla testována jejich účinnost na roztoku standardu alachloru rozpuštěného ve vodě. Extrakce probíhala pomocí manifoldu s deseti pozicemi. Z vodného roztoku byly pesticidy extrahovány do mobilní fáze, došlo k částečnému odstranění nečistot a k zakoncentrování pro následnou analýzu pomocí HPLC-DAD. Extrakce probíhala následujícím postupem (Stehlík 2007):

1. Kondicionace kolonky – příprava kolonky na extrakci vzorku. Kondicionace byla provedena aplikací 3 ml methanolu, kdy byl ponechán prostor pro úplné zasáknutí do náplně kolonky, a následně 3 ml demineralizované vody.
2. Dávkování vzorku – nadávkování proběhlo ještě před úplným zasáknutím demineralizované vody z předchozího kroku, tedy ve chvíli, kdy se hladina pohybovala přibližně 1 mm nad náplní. Dávkovaný objem vzorku se odvíjel od typu matrice.
3. Promytí náplně a vysušení kolonky – k odstranění nečistot byla kolonka promyta 2 x 3 ml demineralizované vody, pesticidy zůstávají zachyceny v náplni kolonky. Následně byla kolonka sušena proudem vzduchu pomocí čerpadla po dobu přibližně 10 minut.
4. Eluce pesticidů – byla provedena mobilní fází acetonitrilem, 3 x 2 ml, eluent byl sbírán do skleněné vialky o objemu 15 ml a následně vysušen proudem dusíku na objem přibližně 0,5 ml, pomocí injekční stříkačky a 0,45 µm filtru byl takto upravený roztok přefiltrován do vialky a byl doplněn na objem 1 ml roztokem mobilní fáze acetonitril-voda 50:50.

5. Regenerace kolonky – byla provedena ihned po extrakci. Do kolonky bylo nadávkováno 5 ml methanolu (případně 3 + 2 ml pro kolonky o objemu 3 ml), následně byla vymyta 5 ml vody.

4.7.2 Extrakce QuEChERS

Pro extrakci QuEChERS byly vybrány kity dle normy EN 15662:2018, která se vztahuje na pesticidy v potravinách, nicméně by dané sety měly být použitelné i pro stanovení poesticidů ve vodách, půdách a sedimentech, pro které žádná norma přímo neurčuje složení QuEChERS.

Dané kity obsahují 2 zkumavky s již připravenou směsí solí, pro správné a jednoduché provedení extrakce. V prvním kroku byl vzorek spolu s acetonitrem převeden do 50 ml PE zkumavky se směsí solí $MgSO_4/NaCl/Na_2Cit$. Vodné vzorky byly aplikovány přímo, 10 ml vodného vzorku spolu s 10 ml acetonitru bylo nalito do první zkumavky, pevné vzorky byly nejdříve zvlášť intenzivně nejméně jednu minutu promíchávány s 20 ml směsí acetonitril-voda 50:50 a pak teprve převedeny do první zkumavky. Zkumavka byla poté důkladně po dobu jedné minuty protřepávána a následně byl vzorek zcentrifugován při 4600 otáčkách po dobu 10 minut. Supernatant byl následně převeden do druhé, 15 ml PE zkumavky se směsí solí $MgSO_4/PSA/C18$, opět by důkladně po dobu jedné minuty protřepáván a centrifugován stejným způsobem jako předchozí. Postup byl proveden podle originálního postupu QUeChERS (Pinto et al. 2009)

Po extrakci byl získaný roztok zakoncentrován pod proudem dusíku, ze získaných přibližně 6 ml na objem přibližně 0,5 ml, pomocí injekční stříkačky a 0,45 μm filtru byl takto upravený roztok přefiltrován do vialky a byl doplněn na objem 1 ml roztokem mobilní fáze acetonitril-voda 50:50.

4.8 Odběr, zpracování a charakteristika vzorků

4.8.1 Odběr reálných vzorků

Půdní vzorky byly odebrány 28. 3. 2021 na pěti polích v okolí Kroměříže, vícebodový odběr do jedné PE vzorkovnice, a na jednom poli ve Zlíně – Malenovicích, 5 odběrů, každý do jedné PE vzorkovnice. Odběrová místa s jejich GPS souřadnicemi a popisem jsou uvedeny v Tabulce 19. Všechny vzorky byly odebírány pomocí nerezové lopatky z hloubky 15 – 25 cm. Do dalšího zpracování v laboratoři byly uloženy v lednici. V laboratoři byly vysušeny

na vzduchu po dobu 3 dnů, důsledně promíchány, rozmělněny v achátové třecí misce a prosyty na 2 mm sítu.

Tabulka 19: Odběrová místa půdy s popisem místa a vzorku

Místo odběru	GPS souřadnice	Popis místa	Popis vzorku
Trávník	49.2853347N, 17.4242011E	hluboká orba	tmavá půda, hrubé kusy
Bílany	49.3080039N, 17.4209931E	hluboká orba	tmavá půda
Skaštice 1	49.3235936N, 17.4273447E	podmítka	tmavá půda, velmi jemné kusy
Skaštice 2	49.3350672N, 17.4039986E	hluboká orba	velmi tmavá půda, hrubé kusy
Kroměříž	49.3137814N, 17.3992781E	podmítka	světlá půda
Malenovice	49.2020539N, 17.5782778E	hluboká orba	světlá půda

Vodné vzorky byly odebrány do skleněných vzorkovnic, 2 × 25 ml, do dalšího zpracování v laboratoři byly uloženy v chladu, pokud byla delší doba od odběru do extrakce, byly uloženy v mrazáku. Odběrová místa s GPS souřadnicemi jsou uvedena v Tabulce 20.

Tabulka 20: Odběrová místa vody s popisem místa a vzorku

Místo odběru	Datum odběru	GPS souřadnice	typ	Popis místa	Popis vzorku
Fryšták	11. 4. 2021	49.2690536N, 17.6901797E	stojatá voda	přehrada	čistá voda
Trávník 1	14. 4. 2021	49.2767958N, 17.4197056E	tekoucí voda	potok	velmi špinavá voda
Trávník 2	14. 4. 2021	49.2770617N, 17.4195983E	tekoucí voda	potok	čistá voda
Napajedla (HGS - 15)	28. 4. 2021	49.1384750N, 17.5256422E	vert		čistá voda
Topolná (HGS - 20)	28. 4. 2021	49.1223053N, 17.5313994E	vert		lehce zakalená voda

Vzorky byly odebírány třemi způsoby. V případě stojaté vody, byla vzorkovnice u břehu ponořena do vody, naplněna po okraj a zavíčkovaná. V případě tekoucí vody, v obou případech se jednalo o pomalu tekoucí úzké potoky, byla vzorkovnice ponořena proti směru toku, co nejbližší proudnici, naplněna po okraj a zavíčkovaná. Vrty, ze kterých byla odebírána voda, jsou hydrogeologické pozorovací vrty, tedy úzké a hluboké, voda byla

odebírána pomocí čerpadla. Nejprve byla odčerpána voda, která byla nahromaděna ve vrtu, aby došlo k naplnění vrtu čerstvou podzemní vodou. Poté byla pomocí čerpadla naplněna vzorkovnice až po okraj a zavičkována. Protokol o odběru vzorků z vrtů je v Příloze I.

4.8.2 Metodika stanovení vlastností půdy pro laboratorní experiment

4.8.2.1 Stanovení vlhkosti

Váženka byla sušena při teplotě 105 °C do konstantní hmotnosti, poté byla ponechána v exsikátoru do vychladnutí a zvážena na analytických vahách. Následně bylo naváženo přibližně 5 g půdy a zváženo na analytických vahách s přesností na 10 mg. Váženka se vzorkem byla umístěna do sušárny a byla sušena do konstantní hmotnosti při teplotě 105 °C, poté byla ponechána v exsikátoru, dokud nevychladla a následně byla zvážena na analytických vahách s přesností na 10 mg. Stanovení bylo provedeno třikrát vedle sebe. Hmotnostní vlhkost byla vypočítána podle vzorce:

$$w_{H_2O} = \frac{m_1 - m_2}{m_2 - m_0} \cdot 100$$

Kde: w_{H_2O} hmotnostní vlhkost [%]

m_0 hmotnost vysušené váženky [g]

m_1 hmotnost vysušené váženky s mokrým vzorkem [g]

m_2 hmotnost vysušené váženky s vysušeným vzorkem [g]

4.8.2.2 Stanovení organického podílu

Keramický kelímek byl sušen při teplotě 105 °C do konstantní hmotnosti, poté byl ponechán v exsikátoru do vychladnutí a zvážen na analytických vahách. Následně bylo naváženo přibližně 5 g půdy a zváženo na analytických vahách s přesností na 10 mg. Kelímek byl umístěn do muflové pece. Po dosažení teploty 550 °C byl vzorek v peci ještě žíhán po dobu 30 minut, následně byl umístěn do exsikátoru. Po vychladnutí byl s přesností na 10 mg zvážen na analytických vahách. Stanovení bylo provedeno třikrát vedle sebe. Organický podíl byl vypočítán podle vzorce:

$$m_o = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \cdot 100$$

Kde: m_o hmotnost organického podílu [g]

m_1 hmotnost vysušeného kelímku se vzorkem před žíháním [g]

m_2 hmotnost vysušeného kelímku se vzorkem po žihání [g]

4.8.2.3 Stanovení pH

Do vhodné skleněné vzorkovnice bylo umístěno přibližně 5 ml půdy a bylo přidáno 25 ml extrakčního činidla (1:1:1, demineralizovaná voda, 1 M KCl, 0,01 M CaCl₂). Vzorkovnice byla zavíčkovaná a třepána po dobu 30 minut na třepačce. Poté byla suspenze ponechána po dobu 1 hodiny v klidu a následně intenzivně promíchána. Bylo změřeno pH pomocí skleněné elektrody. Stanovení bylo provedeno třikrát vedle sebe.

4.8.2.4 Stanovení specifické elektrické vodivosti

Do skleněné vzorkovnice bylo umístěno 20 g vzorku a bylo přidáno 100 ml demineralizované vody. Nádoba byla uzavřena a třepána na třepačce po dobu 30 minut. Ihned po extrakci byla suspenze přefiltrována podtlakovou filtrací přes 50 µm filtrační papír se skleněným vláknem a následně byla změřena konduktivita pomocí skleněné elektrody. Stanovení bylo provedeno třikrát vedle sebe.

4.8.2.5 Sítová analýza

Přibližně 50 g na vzduchu vysušené půdy bylo nasypáno na soustavu sít s postupně se zmenšujícím průměrem ok. Půda byla proseta a každá frakce byla zvážena. Z celkové hmotnosti a hmotnosti jednotlivých frakcí bylo spočítáno procentuální zastoupení jednotlivých frakcí v půdě. Stanovení bylo provedeno dvakrát vedle sebe.

4.8.2.6 Spektrofotometrické stanovení huminových látek v půdách

Obsah huminových látek byl stanoven ve čtyřech vybraných půdách. Byla vybrána půda z Malenovic, jedna půda ze Skaštic jako zástupce orných půd z okolí Kroměříže, a dále Zahradní půda a Lufa, které byly použity v laboratorním testu. Stanovení bylo provedeno dvakrát vedle sebe.

Obsah huminových látek byl zjišťován spektrofotometricky. Huminové látky byly extrahovány následujícím postupem

Byl připraven 0,1 M hydroxid sodný o objemu 1 l, jeho skutečná koncentrace byla 0,0991 M. Do skleněné vzorkovnice o objemu 250 ml bylo naváženo 10 g půdy a bylo přidáno 100 ml NaOH. Vzorkovnice byly uzavřeny a třepány po dobu 4 hodin při frekvenci 150 kmitů za minutu. Vzorkovnice ponechány přes noc v klidu. Následně byl obsah vzorkovnic centrifugován (10 minut při 3000 rpm), poté byla změřena absorbance světla při vlnových

délkách 350, 370, 400, 450, 465, 500, 665 nm v supernatantu pro stanovení celkového obsahu huminových látek. Při stálém míchání byl upraveno pH supernatantu na $\text{pH} = 2$ pomocí 6 M HCl a opět byl ponechán přes noc v klidu. Okyselený supernatant byl centrifugován (10 minut při 3000 rpm), poté byla změřena absorpce světla při vlnových délkách 350, 370, 400, 450 a 500 nm v supernatantu pro zjištění koncentrace fulvokyselin. Ve sraženině po centrifugaci, která byla rozpuštěna v 0,1 M NaOH byly stanoveny huminové kyseliny absorpcí světla při vlnových délkách 465 a 665 nm. Absorbance byla pro každý vzorek stanovena vždy třikrát.

Ze tří stanovených absorbancí vedle sebe byla vypočtena průměrná absorbance pro danou vlnovou délku. Z kalibračních rovnic byla pro každou vlnovou délku vypočtena koncentrace v $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro přepočet na koncentraci v mg/kg bylo použito množství vzorku, množství použitého 1 M NaOH a sušina půdy, podle následujícího vzorce:

$$C_{[\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}]} = \frac{C_{[\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}]} \cdot V_{\text{NaOH}}}{m_v \cdot w_s}$$

Kde:	$C_{[\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}]}$	koncentrace huminových látek/ huminových kyselin/ fulvokyselin [mg/kg]
	$C_{[\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}]}$	koncentrace huminových látek/ huminových kyselin/ fulvokyselin [mg/l]
	V_{NaOH}	objem použitého 1 M NaOH [l]
	m_v	hmotnost vzorku půdy [kg]
	w_s	hmotnostní obsah sušiny ve vzorku [1]

4.8.3 Laboratorní experiment s půdou

Tento experiment byl inspirován diplomovou prací (Mikulicová 2011). Byl upraven pro potřeby této diplomové práce a dle dostupných materiálů. Jedna část experimentu byla pojata jako test rozkladu vybraných pesticidů v půdě v závislosti na čase, druhá jako test vyluhovatelnosti vybraných pesticidů, případně jejich metabolitů, do vody v závislosti na čase. Pro první část experimentu bylo využito extrakce metodou QuEChERS, protože je vhodná i pro pevné vzorky, pro druhou část byla zvolena extrakce vytřepáváním do vody a následná extrakce do mobilní fáze 50:50 metodou SPE, která je vhodná pouze pro kapalné vzorky.

4.8.3.1 *Modelová kontaminace půd*

Pro tento experiment byly použity 2 druhy půdy, zahradní půda o předem zjištěných vlastnostech a certifikovaná půda Lufa. Obě půdy byly prosity na 2 mm síť. Experiment byl naplánován tak, že extrakce do vody s extrakcí SPE a extrakce QuEChERS byly provedeny 1., 7., 14. a 28. den od aplikace pesticidů. Pesticidy byly rozděleny do dvou skupin, chloracetanilidové pesticidy, metazachlor, acetochlor a alachlor (součástí projektu), dále označovaná jako P a skupina námi vybraných pesticidů, tebuconazole, methiocarb a chlorpyrifos, dále označovaná jako N. Každý pesticid byl dávkován tak, aby koncentrace byla $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, což odpovídá zemědělské aplikaci, tedy do každé zkumavky bylo aplikováno 100 μl roztoku pesticidů o koncentraci každého pesticidu 10 mg l^{-1} tak, že vždy po přidání 25 μl byla zkumavka řádně promíchána pomocí vortexu.

Do PE zkumavek o objemu 15 ml bylo navažováno po 10 g půdy. Takto bylo připraveno celkem 72 vzorků půdy, pro každý typ půdy 36 zkumavek. Čtyři zkumavky od každého typu byly určeny pro stanovení pozadí, dvě pro extrakci SPE a dvě pro extrakci QuEChERS. Z dalších osmi zkumavek daného typu půdy určených pro den 1 byla do čtyř aplikována skupina P – dvě pro extrakci SPE, dvě pro extrakci QuEChERS, do zbylých čtyř skupina N. Analogicky byly pesticidy aplikovány i do zkumavek určených pro dny 7, 14 a 28.

4.8.3.2 *Extrakce do vody s následnou extrakcí SPE*

Obsah každé 15 ml zkumavky určené pro tuto část experimentu byl převeden do PE zkumavky o objemu 50 ml a bylo přidáno 20 ml vody. Takto připravené vzorky byly vytřepávány po dobu čtyř hodin při frekvenci 240 kmitů za minutu. Následně byly zfiltrány podtlakovou filtrací na 50 μm filtru. Takto získané filtráty byly extrahovány pomocí metody SPE, jejíž postup je uveden v kapitole 4.7.1. Kolonka Supelclean, která byla při tomto testu používána se dala regenerovat, ale pouze jedenkrát, poté byla natolik znehodnocena nečistotami z reálného přefiltrovaného vzorku, že již nebyla použitelná.

4.8.3.3 *Extrakce QuEChERS*

Obsah každé 15 ml zkumavky určené pro tuto část experimentu byl převeden do kádinky, kde byl po dobu minimálně jedné minuty důkladně promícháván s 20 ml roztoku acetonitrilu s vodou 50:50. Poté byl obsah kádinky převeden do PE zkumavky pro první část QuEChERS a dále bylo postupováno dle popisu této metody uvedené v kapitole 4.7.2.

4.8.4 Laboratorní experiment s vodou

Tento experiment kopíroval experiment s půdou, pesticidy byly aplikovány do 10 ml pitné vody tak, aby výsledná koncentrace každého vzorku byla $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Opět byly vytvořeny 2 skupiny pesticidů, P a N a byly připraveny vzorky jak pro extrakci SPE, tak pro extrakci QuEChERS. Pro obě extrakční metody bylo stanoveno pozadí.

Extrakce pevným sorbentem byla v případě experimentu s vodou jednodušší, do kondicionované kolonky se bez předchozích úprav rovnou aplikoval vzorek. Dále bylo postupováno obdobně, jako u experimentu s půdou v kapitole 4.8.3. Také extrakce QuEChERS byla pro experiment s půdou jednodušší, vzorek byl spolu s 10 ml acetonitrilu přímo nalit do první extrakční kolonky a nadále bylo postupováno stejně, jako u experimentu s půdou v kapitole 4.8.3.

4.8.5 Zpracování reálných vzorků

4.8.5.1 Půdní vzorky

Pro extrakci SPE bylo postupováno stejně, jako u laboratorního experimentu s půdou, tedy 10 g půdy bylo naváženo do PE zkušavky o objemu 50 ml, smícháno s 20 ml destilované vody a protřepáváno při 240 kmitech za minutu. Následně byly vzorky přefiltrovány podtlakovou filtrací na 50 μm filtru a filtráty byly extrahovány metodou SPE postupem, který je popsán v kapitole 4.7.1.

Pro extrakci QuEChERS bylo naváženo 10 g vzorku a dále bylo postupováno stejně jako u laboratorního experimentu s půdou, jak je popsáno v kapitole 4.7.2.

Každý vzorek byl extrahován dvakrát vedle sebe. Získané extrakty z obou extrakcí byly zakoncentrovány proudem dusíku na objem přibližně 0,5 ml, byly přefiltrovány na 0,25 μm filtru a doplněny na objem 1 ml roztokem acetonitril:voda v poměru 1:1.

4.8.5.2 Vodné vzorky

Všechny vzorky byly v laboratoři přefiltrovány na 50 μm filtru, poté byly extrahovány jak extrakcí QuEChERS, tak SPE. Pro extrakci QuEChERS bylo použito 10 ml vzorku a bylo postupováno stejně, jako v kapitole 6, pro extrakci SPE bylo použito 50 ml vzorku. Každý vzorek byl extrahován dvakrát vedle sebe. Všechny extrakty byly zakoncentrovány proudem dusíku na objem přibližně 0,5 ml, přefiltrovány na 25 μm filtru a doplněny na objem 1 ml roztokem acetonitril:voda 1:1.

5 DISKUZE A VÝSLEDKY

5.1 Izokratická a gradientová analýza

5.1.1 Izokratické metody

5.1.1.1 Charakteristika analýzy

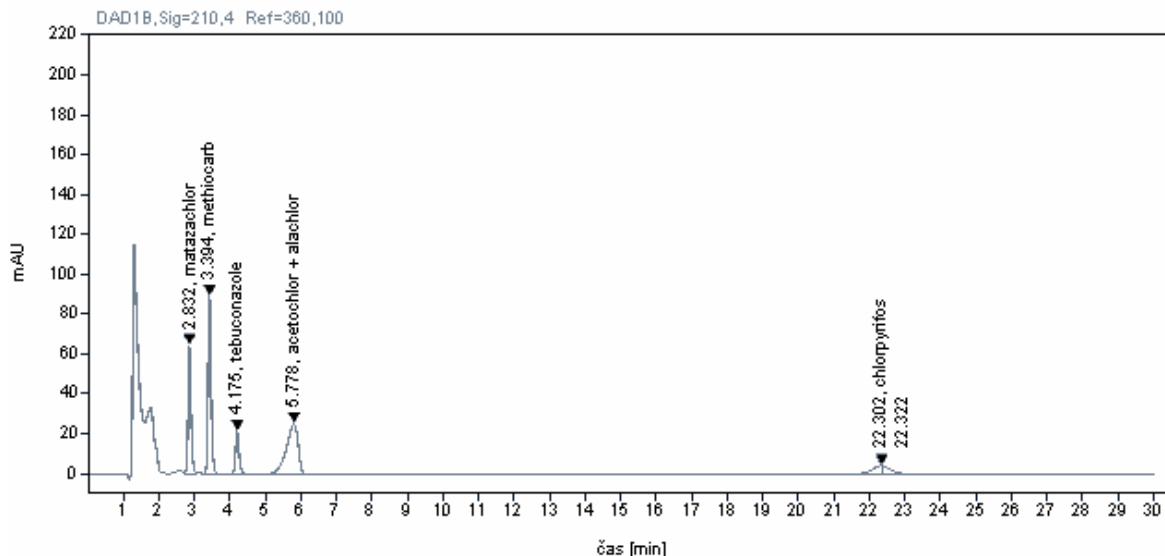
V Tabulce 21 jsou uvedeny charakteristiky izokratické analýzy pro jednotlivé sloučeniny. Mrtvý čas pro izokratickou analýzu je 1,274 min. Mimo chlorpyrifosu, který má také výrazně nejdelší retenční čas je zřejmé, že hodnoty teoretických pater nedosahují požadovaných hodnot (10 000), tedy tato metoda není dostatečně účinná. (Dong 2006) Dále je z Tabulky 21 patrné, že hodnoty retenčního faktoru se blížily optimální hodnotě mezi 2 a 10. V případě chlorpyrifosu se hodnota retenčního faktoru blíží ke 20, což značí velmi vysokou dobu analýzy.

Tabulka 21: Charakteristika izokratické analýzy

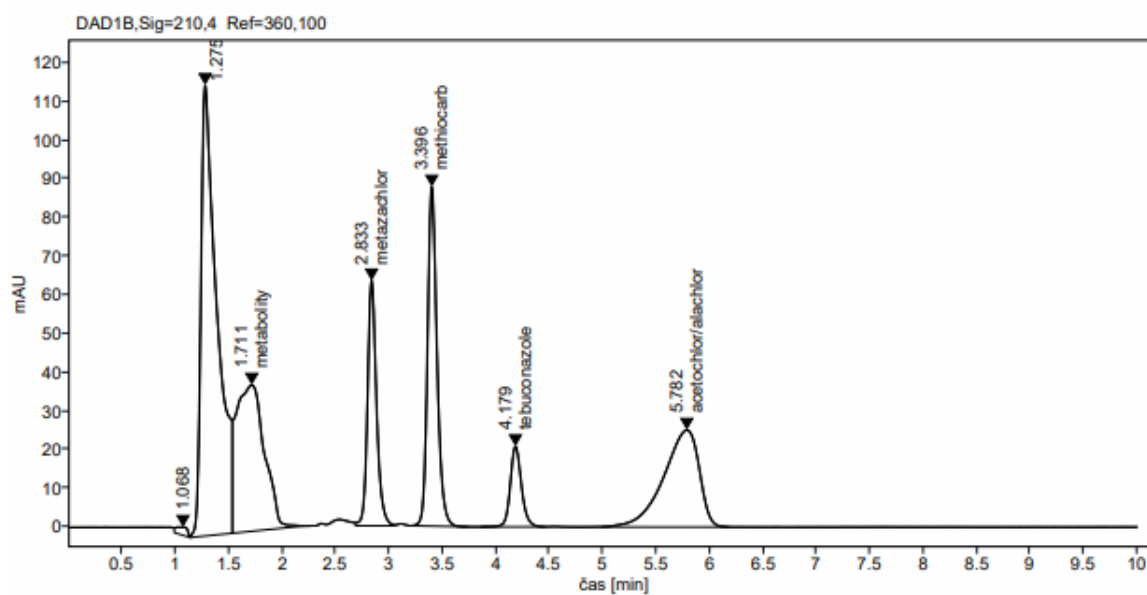
Analyt	t_R	t'_R	W_b	k	N
acetochlor/alachlor	5,778	4,504	1,288	3,54	322
metazachlor	2,832	1,558	0,365	1,22	963
methiocarb	3,394	2,12	0,571	1,66	565
tebuconazole	4,175	2,901	0,596	2,28	785
chlorpyrifos	22,302	21,028	0,732	16,51	14852

Na Obrázku 24 je chromatogram základních látek stanovených izokratickou metodou. Všechny vybrané pesticidy eluují v retenčních časech do sedmi minut, mimo chlorpyrifos, jehož retenční čas je 22,3 minuty.

Z Obrázku 25 je patrné, že metabolity chloracetanilidových pesticidů jsou při izokratické metodě koeluovány v blízkosti mrtvého času, tato metoda je tedy nedostačující pro jejich stanovení.



Obrázek 24: Chromatogram s retenčními časy vybraných pesticidů – izokratická eluce



Obrázek 25: Chromatogram s metabolity chloracetanilidových pesticidů – izokratická eluce

5.1.2 Gradientové metody

5.1.2.1 Charakteristika analýzy

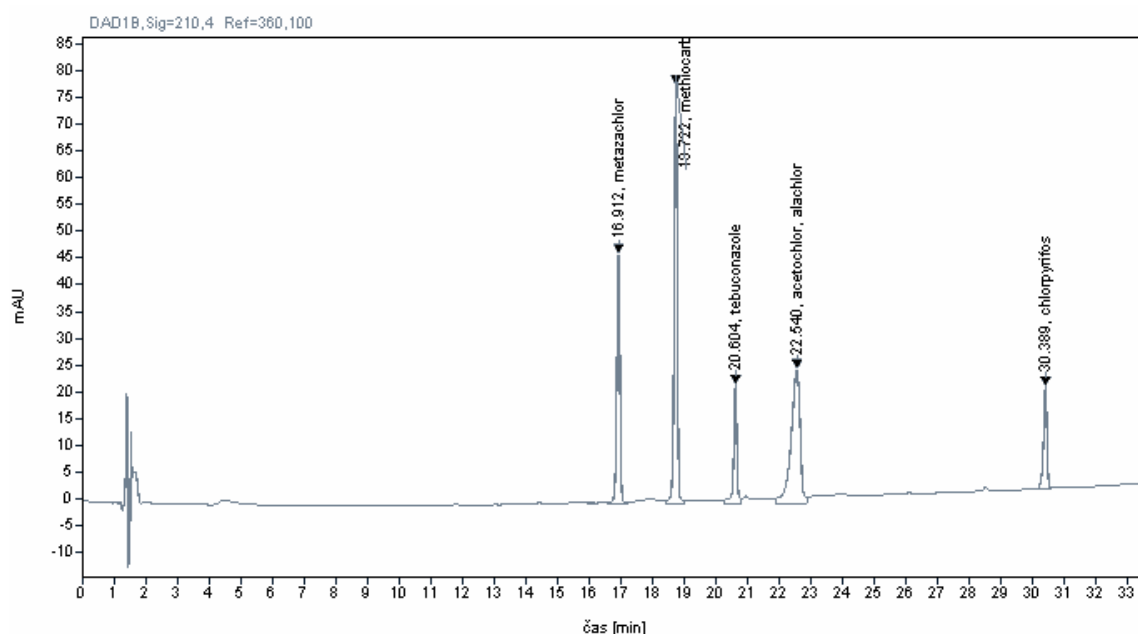
Mrtvý čas gradientové analýzy je 1,380 min. Na rozdíl od izokratické analýzy je gradientová dle výpočtů účinnější. Z Tabulky 22 je zřejmé, že počet teoretických pater proti izokratické eluci je vyšší, a to až s maximální hodnotou 28 000. Hodnoty retenčního faktoru se pohybují

v optimálním rozmezí 2 - 10, i když v některých případech hodnoty přesahují 20, což svědčí o časové náročnosti této analýzy.

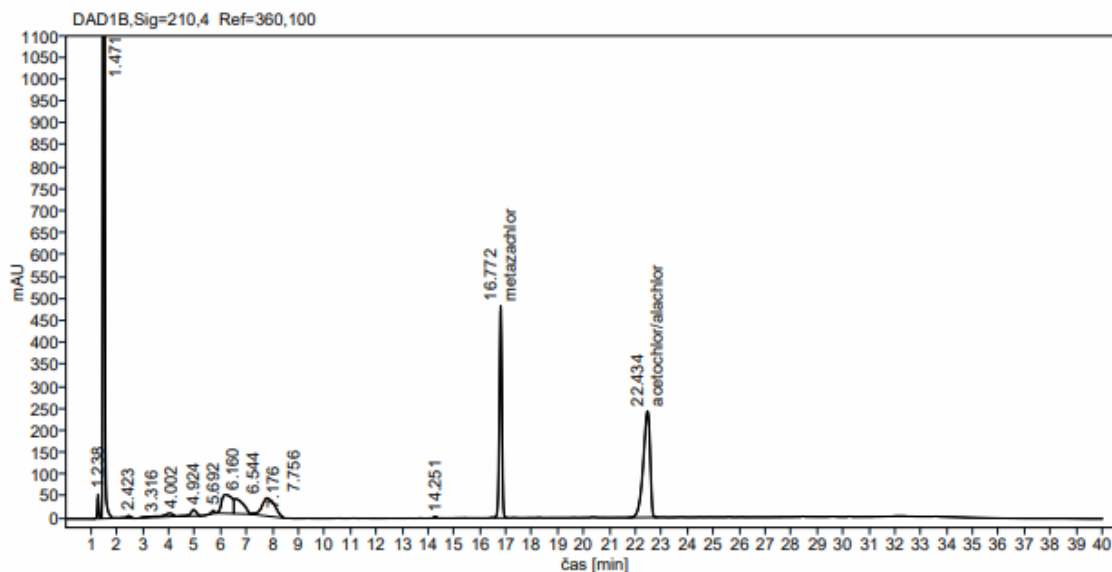
Tabulka 22: Charakteristika gradientové analýzy

Analyt	t_R	t'_R	W_b	k	N
metazachlor OA	6,036	4,656	0,226	3,37391	11413
metazachlor ESA	6,5	5,12	0,212	3,71014	15041
acetochlor ESA/alachlor ESA	9,893	8,513	0,235	6,16884	28356
acetochlor OA/alachlor OA	10,849	9,469	1,5	6,86159	837
metazachlor	16,889	15,509	0,862	11,2384	6142
acetochlor/alachlor	22,52	21,14	1,278	15,3188	4968
tebuconazole	20,609	19,229	0,856	13,9341	9274
chlorpyrifos	30,38	29	0,771	21,0145	24842
methiocarb	18,717	17,337	0,831	12,563	8117

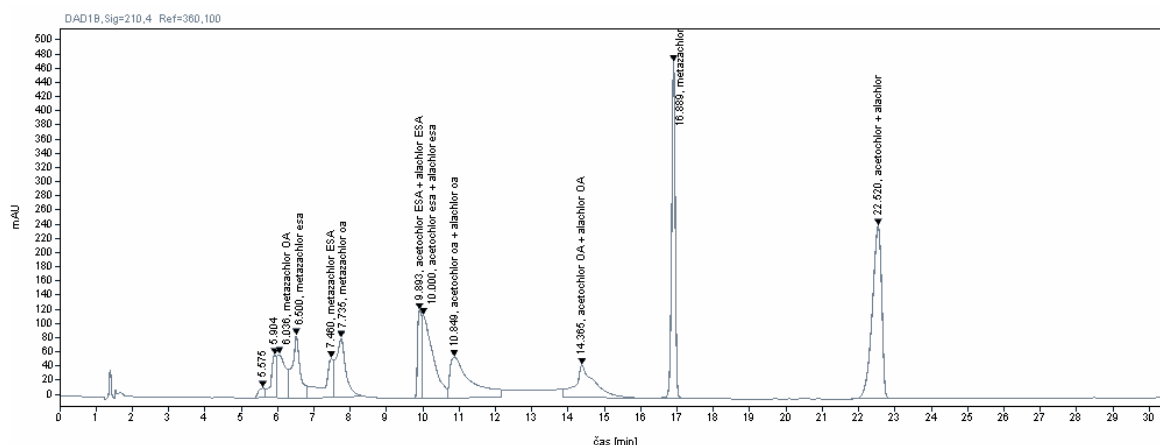
Separace analytů gradientovou metodou jsou zobrazena na Obrázku 26. Acetochlor aalachlor jsou eluovány jako jeden pík, ostatní analyty jsou dobře separovány. Na Obrázku 27 je vyobrazen chromatogram chloracetanilidových pesticidů v mobilní fázi acetonitril – voda. Je patrné, že metabolity nebyly dostatečně rozlišeny a při srovnání s Obrázkem 28 (mobilní fáze acetonitril – kyselina fosforečná ve stejné koncentraci) je zřejmé, že část metabolitů nebyla zachycena a stacionární fázi opouští v mrtvém čase.



Obrázek 26: Chromatogram s retenčními časy vybraných pesticidů – gradientová eluce



Obrázek 27: Chromatogram s retenčními časy chloracetanilidových pesticidů a jejich metabolitů se MF (ACN:H₂O) – gradientová eluce



Obrázek 28: Chromatogram s retenčními časy chloracetanilidových pesticidů a jejich metabolitů s MF (ACN/H₃PO₄) – gradientová eluce

5.1.2.2 Kalibrační přímky standardů

Kalibrace z plochy píku byla využita pro veškeré stanovení a výpočty koncentrací vzorků. V následující Tabulce 23 jsou uvedeny rovnice kalibračních přímek standardů, kalibrační přímky jsou vyobrazeny v Příloze II.

Tabulka 23: Kalibrační přímky standardů

Analyt	R ²	rovnice přímky
acetochlor	0,9994	$y = 937,01x + 78,757$
alachlor	0,9995	$y = 1211,2x + 10,422$
acetochlor ESA/alachlor ESA	0,9993	$y = 471,26x + 21,19$
acetochlor OA/alachlor OA	0,9941	$y = 186,65x - 54,054$
metazachlor	0,9999	$y = 1164,1x - 27,553$
metazachlor ESA	0,7902	$y = 311,2x - 152,24$
metazachlor OA	0,9964	$y = 284,81x - 10,382$
methiocarb	0,9988	$y = 1580,4x + 42,83$
tebuconazole	0,9812	$y = 216,15x + 138,94$
chlorpyrifos	0,9577	$y = 221,08x + 138,2$

5.1.3 Limit detekce a mez stanovitelnosti

Podle vzorců uvedených v kapitole 4.6.4 byly vypočítány limity detekce a meze stanovitelnosti pro všechny standardy. Tyto limity jsou uvedeny v Tabulce 24. Nejnížší mez stanovitelnosti má methiocarb, acetochlor aalachlor. Nejvyšší mez kvantifikace má tebuconazole. Tyto hodnoty jsou vyšší než ve studiích Hladik et al. (2005), Tuzimski (2009), Hostetler a Thurman (2000) které mají nižší limity detekce i kvantifikace.

Tabulka 24: Vypočtené hodnoty LOD a LOQ všech standardů

S = 0,45	a	LOD [mg/l]	LOQ [mg/l]
acetochlor	937,01	0,0014	0,005
alachlor	1211,2	0,0011	0,004
acetochlor ESA/alachlor ESA	471,26	0,0029	0,010
acetochlor OA/alachlor OA	186,65	0,0072	0,024
metazachlor	1164,1	0,0012	0,004
metazachlor ESA	311,2	0,0043	0,014
metazachlor OA	284,81	0,0047	0,016
methiocarb	1580,4	0,0009	0,003
tebuconazole	216,15	0,0062	0,021
chlorpyrifos	221,08	0,0061	0,020

5.2 Vlastnosti zahradní půdy

Postupem popsáním v kapitole 7.1 byly zjištěny vlastnosti zahradní půdy, které jsou uvedeny v Tabulce 25. Obsah organických látek je zde kolem 7,5 %, z hodnoty pH lze

usoudit, že půda je mírně kyselá. Sušina dosahovala téměř 99 %. Konduktivita je $0,158 \pm 0,59$ mS/cm, což značí nízký obsah solí.

Tabulka 25: Vlastnosti zahradní půdy

vzorek	W _{H2O} [%]	mo [g]	pH	σ [mS/cm]
1	1,98	7,37	6,38	0,113
2	1,95	7,50	6,28	0,241
3	1,97	7,67	6,29	0,120
průměr	1,97	7,51	6,32	0,158
odchylka	0,01	0,12	0,04	0,059

Byla provedena síťová analýza, jejíž shrnutí je v Tabulce 26. Největší procentuální zastoupení tvoří frakce větší než 2 mm, 81 %. Druhou významnou frakcí s 15, 5 % tvoří velikost částic mezi 1 a 2 mm. Zbylá procenta tvoří frakce menší než 1 mm. Podle dostupných charakterizací se jedná o lehkou hlinitopísčitou půdu. (Sánka et al. 2018)

Tabulka 26: Síťová analýza zahradní půdy

Vzorek	1		2		Průměr	
	m [g]	Zastoupení [%]	m [g]	Zastoupení [%]	Zastoupení [%]	Odchylka
> 2	41,5	83,40	39,61	79,2358	81,32	2,08
> 1	6,85	13,77	8,74	17,4835	15,62	1,85
> 0,5	0,74	1,49	0,86	1,72034	1,60	0,11
> 0,2	0,36	0,72	0,43	0,86017	0,79	0,06
> 0,1	0,19	0,38	0,31	0,62012	0,50	0,11
< 0,1	0,12	0,24	0,04	0,08002	0,16	0,08
Suma	49,76		49,99			

Souhrn vlastností zahradní půdy a certifikované půdy Lufa je přehledně uveden v Tabulce 27. Zahradní půda je výrazně sušší než certifikovaná, má vyšší organický podíl, 7,5 % oproti necelým 2 %. Zahradní půda je slabě kyselá, zatímco vodný výluh Lufy má pH = 7,5, Lufa je tedy alkalická.

Tabulka 27: Vlastnosti zahradní půdy a certifikované půdy Lufa

	Zahradní půda	Lufa
Vlhkost [%]	$1,97 \pm 0,01$	$73,19 \pm 0,5$
Organický podíl [%]	$7,51 \pm 0,12$	$1,83 \pm 0,25$
pH	$6,32 \pm 0,4$	$7,5 \pm 0,1$
Vodivost [mS/cm]	$0,158 \pm 0,59$	×

5.3 Stanovení huminů ve vybraných půdách

Postupem popsáním v kapitole 7.5 byly stanoveny koncentrace huminových kyselin a fulvokyselin.

V Tabulce 28 jsou stanovené koncentrace huminových kyselin. Nejvyšší obsah huminových kyselin má Zahradní půda, $3100 \pm 223 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Tento obsah je výrazně jiný než v orné půdě ve Skašticích $850 \pm 38 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a je také o téměř třetinu vyšší než v Malenovicích. Obsah huminových kyselin ve Skaštické ornici se blíží obsahu v certifikované půdě, kde je obsah huminových látek velmi nízký. Dle studie Fasurová a Pospíšilová (2010)

Tabulka 28: Vypočtené koncentrace huminových kyselin ve vybraných půdách

Půda	A465 [1]	A665 [1]	Korekce ředění	CHK [mg/l]	CHK [mg/kg]	odchylka
Skašnice	0,151	0,021	3	83,29	850	38
Zahradní půda	0,254	0,038	7	303,77	3100	223
Malenovice	0,184	0,027	7	231,68	2364	158
Lufa	0,290	0,082		63,69	134	23

Obsah fulvokyselin ve vybraných půdách, Tabulka 29, je pro zahradní půdu a půdu v Malenovicích nižší, než byl obsah huminových kyselin, u Skaštické půdy a u Lufy je obsah vyšší. Nejvyšší obsah fulvokyselin má zahradní půda, $1706 \pm 256 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Tabulka 29: Vypočtené koncentrace fulvokyselin ve vybraných půdách

Půda	A350 [1]	A370 [1]	A400 [1]	A450 [1]	A500 [1]	CFK [mg·l ⁻¹]	CFK [mg·kg ⁻¹]	odchylka
Skašnice	0,628	0,402	0,214	0,091	0,042	96,98	990	53
Zahradní půda	0,947	0,630	0,349	0,157	0,073	167,14	1706	256
Malenovice	0,909	0,569	0,296	0,122	0,054	136,71	1395	82
Lufa	0,229	0,142	0,077	0,037	0,020	30,85	370	40

Nejvyšší obsah huminových látek byl stanoven v zahradní půdě, která byla použita do modelového experimentu s půdou. Těchto látek obsahovala výrazně více než další stanovované půdy. To značí, že zahradní půda měla více živin pro rostliny než půdy orné.

Lze předpokládat že stanovení pesticidů v orných půdách bude tedy objektivnější, neboť výsledky nejsou v takové míře ovlivněny obsahem huminových látek.

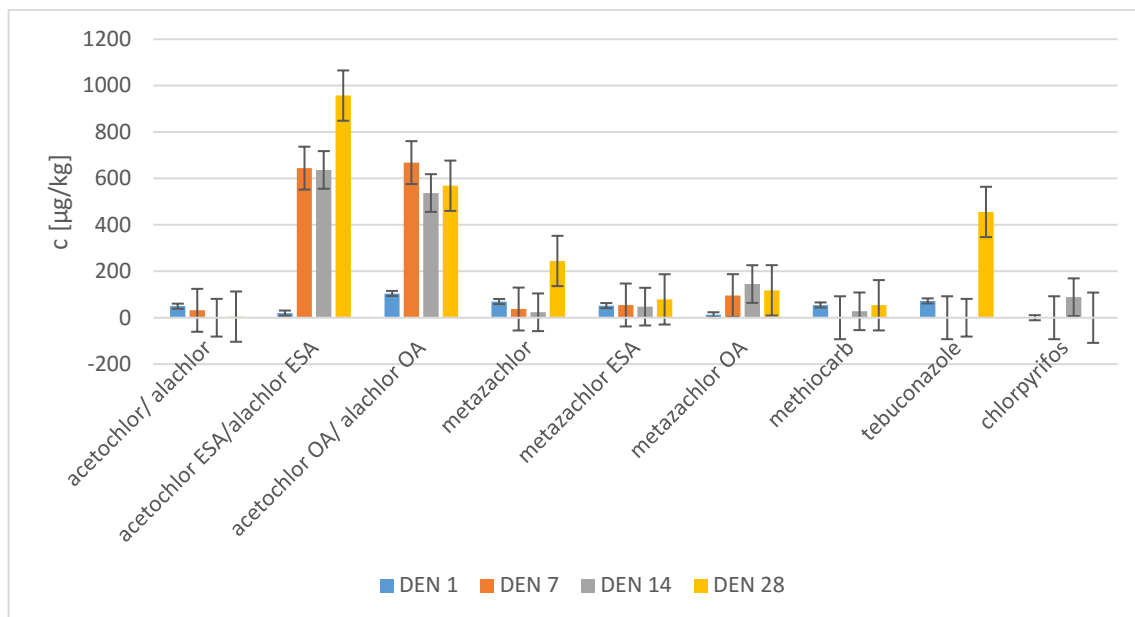
5.4 Laboratorní experiment stanovení pesticidů v půdě

Všechny výsledky byly přepočteny do koncentrace $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ původního vzorku.

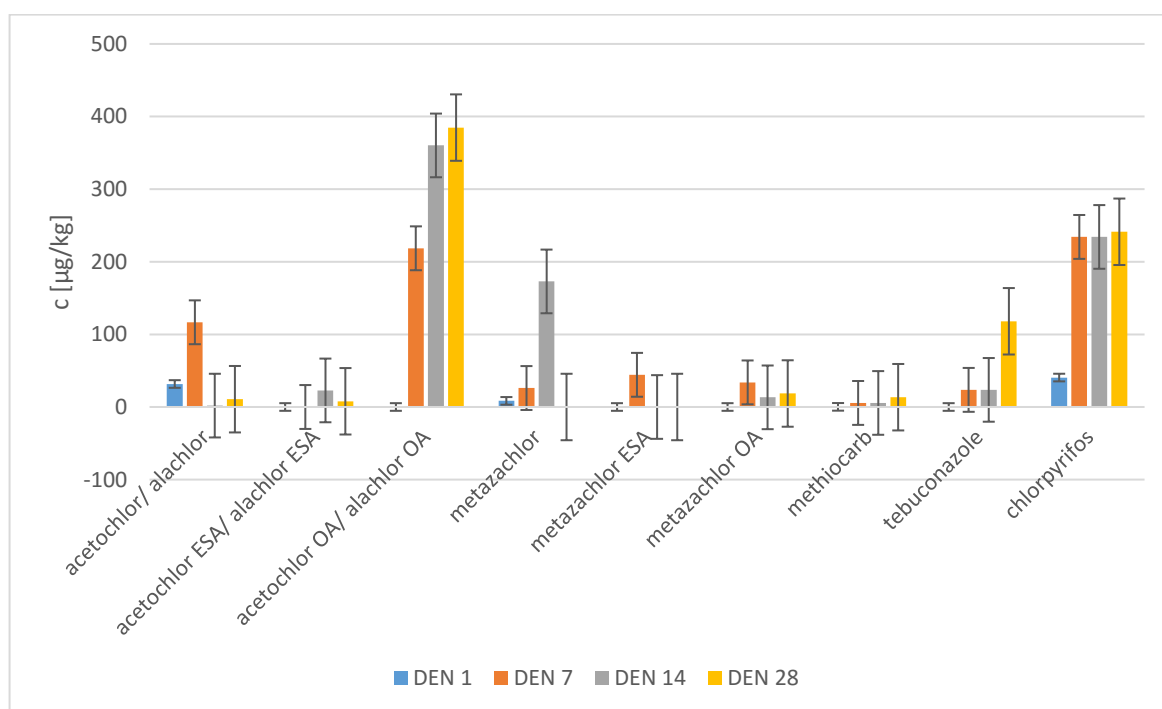
5.4.1 Certifikovaná půda - Lufa

Na Obrázku 29 je vyobrazen graf obsahu jednotlivých pesticidů v Lufě extrahovaných metodou SPE v jednotlivých dnech. Je zřejmé, že koncentrace metabolitů acetochloru a alachloru se zvyšují, první den byla koncentrace metabolitů ESA $19 \pm 2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, metabolitů OA $104 \pm 18 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 28. den byly koncentrace metabolitů ESA $957 \pm 11 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a metabolitů OA $569 \pm 8 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Koncentrace mateřských sloučenin se snižuje, první den byla koncentrace acetochloru s alachlorem $49 \pm 4 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 28. den byla koncentrace těchto pesticidů $4,7 \pm 0,1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Zvyšování metabolitů acetochloru a alachloru potvrzuje i graf na Obrázku 30 pro extrakci QuEChERS. Extrakcí QuEChERS byl extrahován i chlorpyrifos v koncentraci 234 ± 8 pro 7. den, jeho koncentrace v dalších dnech zůstává stejná. Z grafů je také zřejmé, že po extrakci SPE dochází k lepšímu stanovení chloracetanilidových než pro extrakci QuEChERS, pro pesticidy methiocarb, tebuconazol a chlorpyrifos je účinnější extrakce QuEChERS. Koncentrace těchto methiocarbu a tebuconazolu, na rozdíl od předpokladů roste, pro chlorpyrifos zůstává konstantní.

Chromatogram modelových vzorků Lufy extrahovaných pomocí SPE je na Obrázku 44 v Příloze III a vzorků Lufy extrahovaných pomocí QuEChERS na Obrázku 45 v Příloze 3.



Obrázek 29: Laboratorní experiment – Lufa – SPE



Obrázek 30: Laboratorní experiment – Lufa – QuEChERS

V Tabulce 30 jsou procentuálně uvedeny výtěžky, oproti koncentraci, která byla do experimentálních vzorků Lufy aplikována. Výtěžky jsou velmi nízké, často pod 10 %, účinnější byly extrakce SPE. Nejvyšší výtěžky byly stanoveny 28. den, nejnižší den 1., což je v rozporu s rozkladnou teorií. Ve srovnání s diplomovou prací Mikulicová (2011), která měla koncentrace v řádu tisíců $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, jsou stanovené koncentrace velmi nízké.

Tabulka 30: Procentuální výtěžek oproti teoretické koncentraci - Lufa

Den testu	1		7		14		28	
	SPE	Q	SPE	Q	SPE	Q	SPE	Q
acetochlor/alachlor	4,97	3,17	3,20	11,67	ND	0,19	0,47	1,07
metazachlor	6,97	0,84	3,74	2,61	2,35	17,29	24,46	ND
methiocarb	5,49	0,02	ND	0,56	2,76	0,56	5,37	1,35
tebuconazole	7,25	ND	ND	2,36	ND	2,36	45,58	11,80
chlorpyrifos	ND	4,05	ND	23,42	8,84	23,42	ND	24,13

5.4.2 Zahradní půda

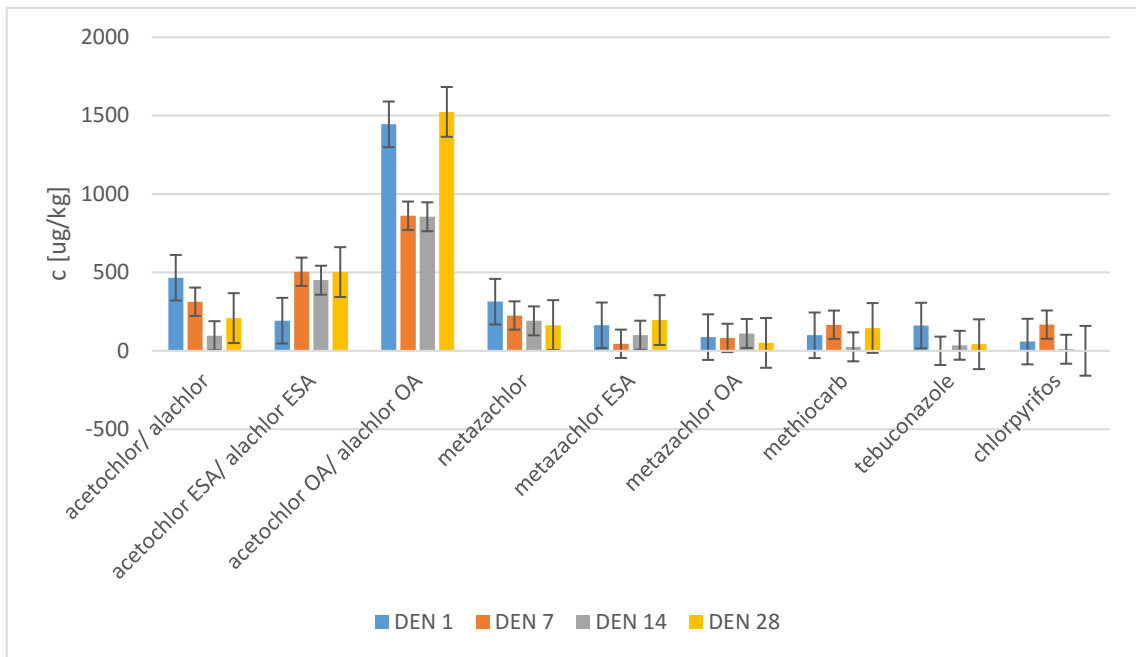
U zahradní půdy, Obrázky 31 a 32 jsou poznatky podobné jako u Lufy, stanovení SPE je pro chloracetanilidové účinnější, pro pesticidy z jiných skupin naopak extrakce QuEChERS.

Z Obrázku 33 lze vyčíst, že koncentrace chloracetanilidových pesticidů v čase klesá, což bylo například potvrzeno i ve studii Vryzas et al. (2007). Metazachlor klesl z původní koncentrace $314 \pm 4 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ na koncentraci $164 \pm 8 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

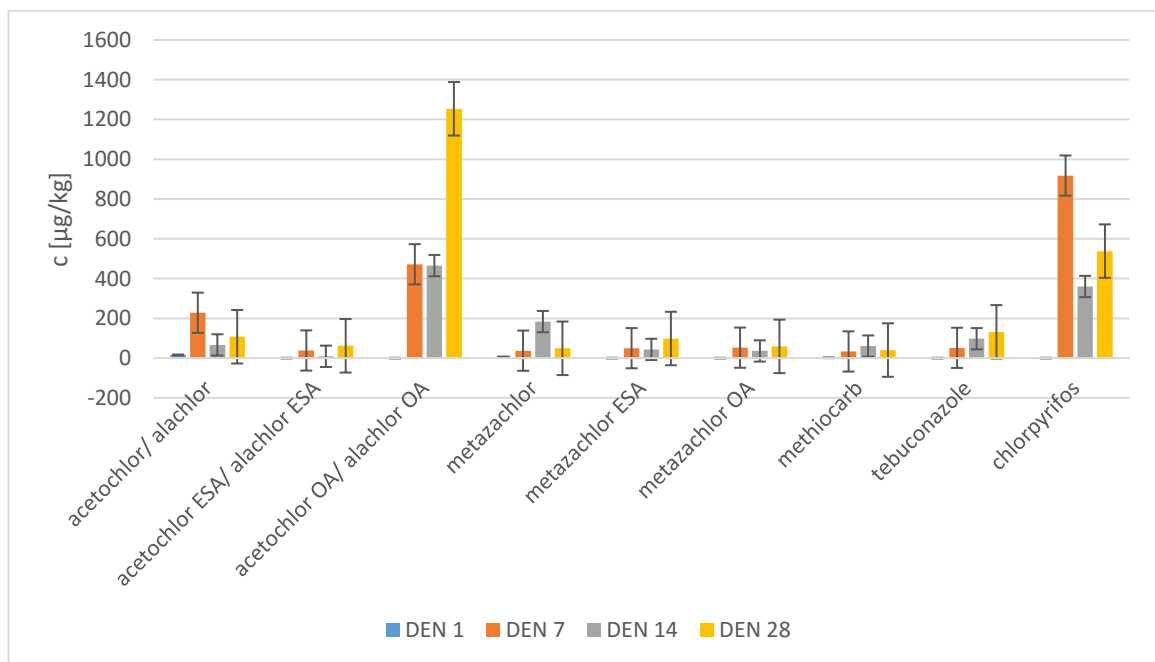
Obrázek 34 ukazuje stanovení po extrakci QuEChERS, podobně jako u Lufy byla tato extrakce účinná pro metabolity acetochloru OA aalachloru OA a pro chlorpyrifos. Koncentrace chlorpyrifosu byla po extrakci QuEChERS 28.den $538 \pm 27 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Chlorpyrifos byl ve studii Masiá et al. (2015) stanoven v reálné půdě, hodnota koncentrace zde byla $2851 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

V porovnání s certifikovanou půdou byly stanoveny vyšší koncentrace, nicméně v porovnání s diplomovou prací Mikulicová (2011) jsou však stále velmi nízké.

Chromatogram modelových vzorků zahradní půdy extrahovaných pomocí SPE je na Obrázku 46 v Příloze III a vzorků zahradní půdy extrahovaných pomocí QuEChERS na Obrázku 47 v Příloze III.



Obrázek 31: Laboratorní experiment – Zahradní půda – SPE



Obrázek 32: Laboratorní experiment – Zahradní půda – QuEChERS

Tabulka 31 ukazuje procentuální výtěžky pesticidů v zahradní půdě. V porovnání s certifikovanou půdou byly stanoveny vyšší koncentrace, nicméně v porovnání s diplomovou prací Mikulicová (2011) jsou však stále velmi nízké. Procentuální výtěžky jsou vyšší pro extrakty SPE, metazachlor v čase ubývá, podle stanovených koncentrací, které

jsou uvedeny v grafu na Obrázku 33, jeho metabolity naopak rostou. U ostatních pesticidů ani u extrakce QuEChERS není tento pokles zřejmý, také se může jednat o ovlivnění maticí, kdy jiné látky mohou s analyty koeluovat.

Tabulka 31: Procentuální výtěžek oproti teoretické koncentraci – Zahradní půda

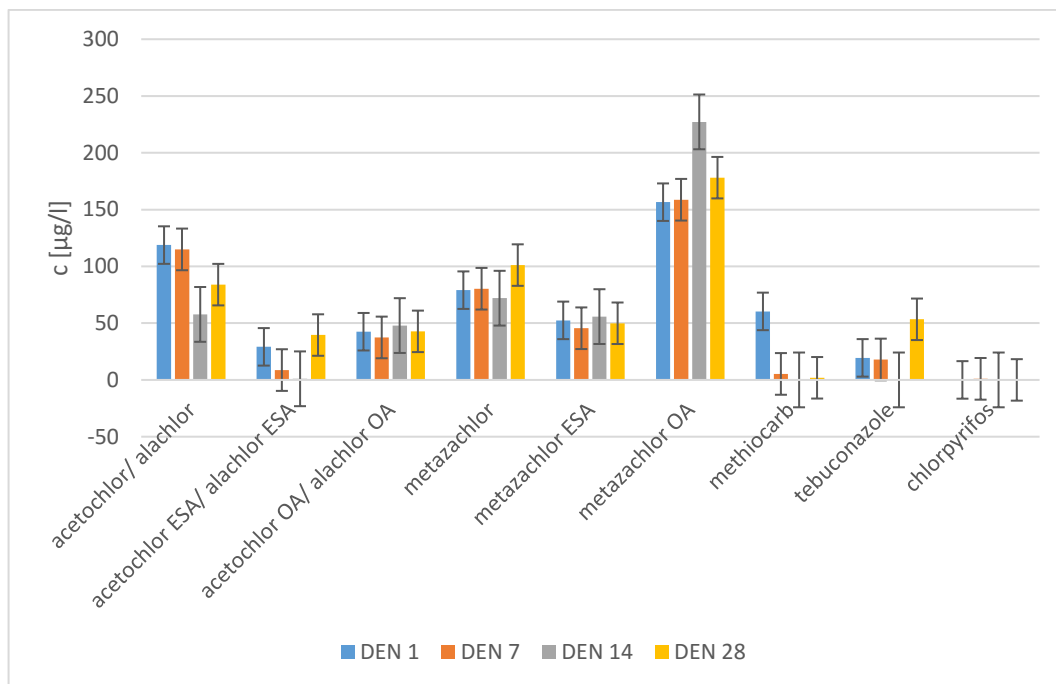
Den testu	1		7		14		28	
	SPE	Q	SPE	Q	SPE	Q	SPE	Q
acetochlor/alachlor	46,60	1,62	31,29	22,81	9,66	6,63	20,88	10,74
metazachlor	31,37	0,58	22,52	3,74	19,09	18,37	16,41	4,92
methiocarb	9,91	0,16	16,63	3,34	2,53	6,05	14,57	4,05
tebuconazole	16,11	ND	98,23	5,16	3,53	9,73	4,21	13,21
chlorpyrifos	5,90	ND	16,68	91,79	1,00	36,01	72,01	53,81

5.5 Laboratorní experiment stanovení pesticidů ve vodě

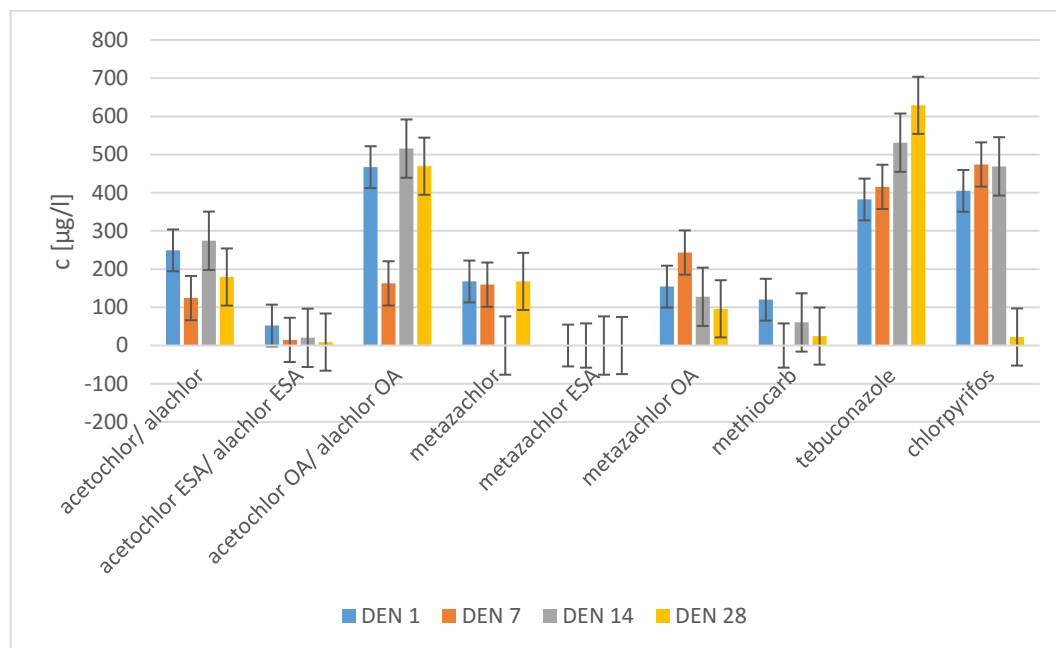
Všechny koncentrace byly přepočteny do koncentrace $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ původního vzorku.

Stanovení pesticidů v laboratorním experimentu s vodou, které je graficky vyobrazeno na Obrázku 33 a 34 opět potvrzuje, že extrakce SPE je pro chloracetanilidové pesticidy účinnější než metoda QuEChERS. Pro všechny pesticidy i jejich metabolity zůstává koncentrace víceméně stejná po celou dobu experimentu, v rozmezí $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, to tedy značí, že degradace pesticidů probíhá primárně v půdě.

Chromatogram modelových vzorků vody extrahovaných pomocí SPE je na Obrázku 58 v Příloze III.



Obrázek 33: Laboratorní experiment – Voda – SPE



Obrázek 34: Laboratorní experiment – Voda – QuEChERS

V Tabulce 32 jsou vypočtené výtěžky pesticidů z experimentu s vodou. Pro vodu byla účinnější extrakce QuEChERS, i tak jsou výtěžky nízké. To potvrzuje i studie Heberle et al. (2000), který měl hodnoty výtěžnosti acetochloru a alachloru 44 – 92 % v povrchové vodě.

Výtěžnost pro vody byla vyšší než pro zahradní půdu a Lufu.

Tabulka 32: Procentuální výtěžek oproti teoretické koncentraci – Voda

Den testu	1		7		14		28	
	SPE	Q	SPE	Q	SPE	Q	SPE	Q
acetochlor/ alachlor	11,87	24,91	11,49	12,42	5,77	27,43	8,39	17,93
metazachlor	7,90	16,77	8,03	15,95	7,19	ND	10,11	16,78
methiocarb	6,03	12,00	0,53	ND	ND	6,05	0,19	2,47
tebuconazole	1,94	38,23	1,80	41,54	ND	53,10	5,34	62,88
chlorpyrifos	ND	40,48	0,10	47,39	ND	46,91	ND	2,23

5.6 Reálné vzorky

Reálné vzorky upravené tak, jak je uvedeno v kapitole 7.4 byly stanovovány gradientovou metodou.

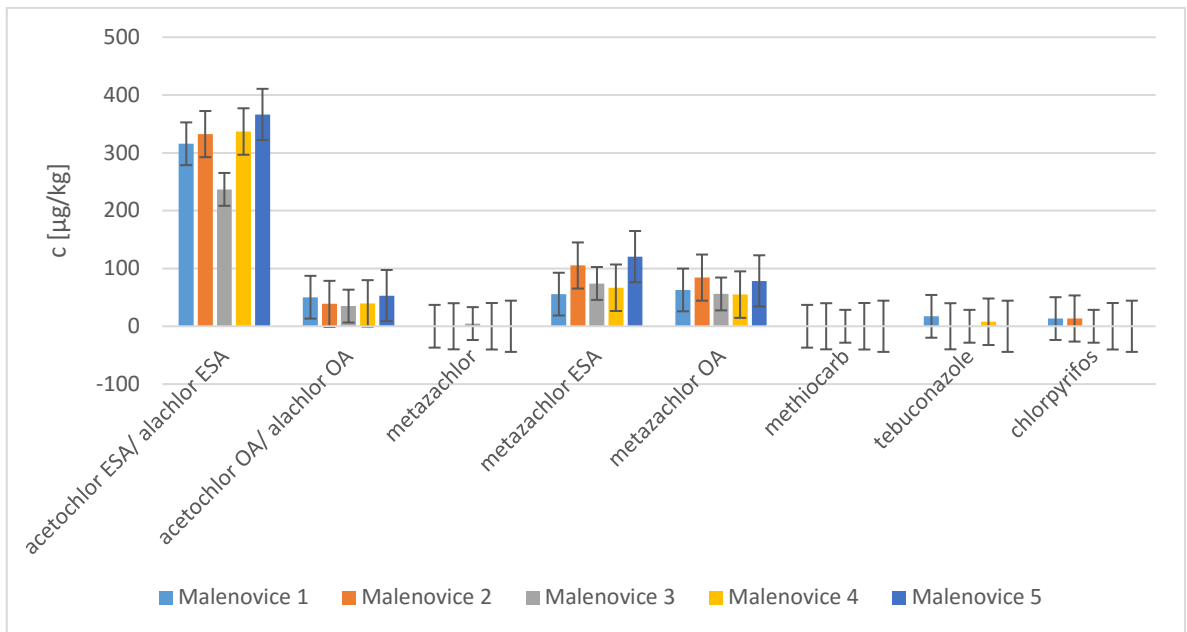
5.6.1 Půdy

Z Obrázku 35 a 36 je zřejmé, že v reálných půdách byly pomocí extrakce SPE stanoveny převážně metabolity chloracetanilidových pesticidů, což bylo pozorováno i v laboratorním experimentu. Stanoveny byly ve vyšších koncentracích než je uváděno ve studii Hofman (2018).

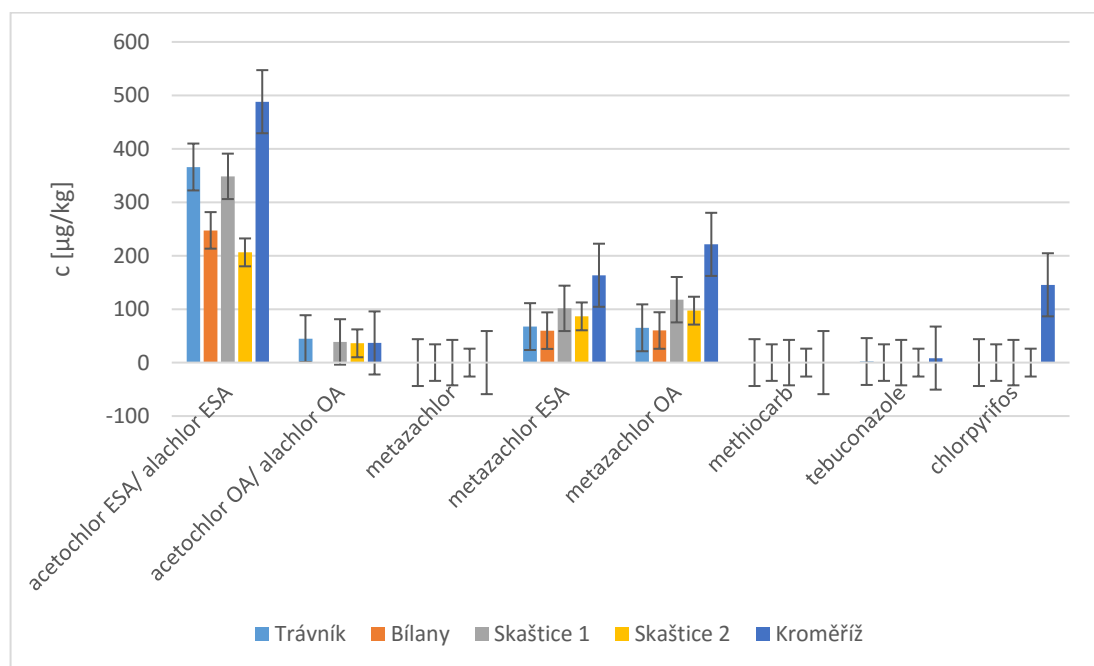
Nejvyšší koncentrace měly metabolity acetochlor ESA a alachlor ESA, průměrně $350 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Ostatní pesticidní látky byly stanoveny v nízkých koncentracích, což by souhlasilo s předpokladem, že dochází k jejich rychlé degradaci v prostředí.

Chromatogram reálných vzorků půdy extrahovaných pomocí SPE je na Obrázku 549 v Příloze III.



Obrázek 35: Reálné půdy - Malenovice – SPE

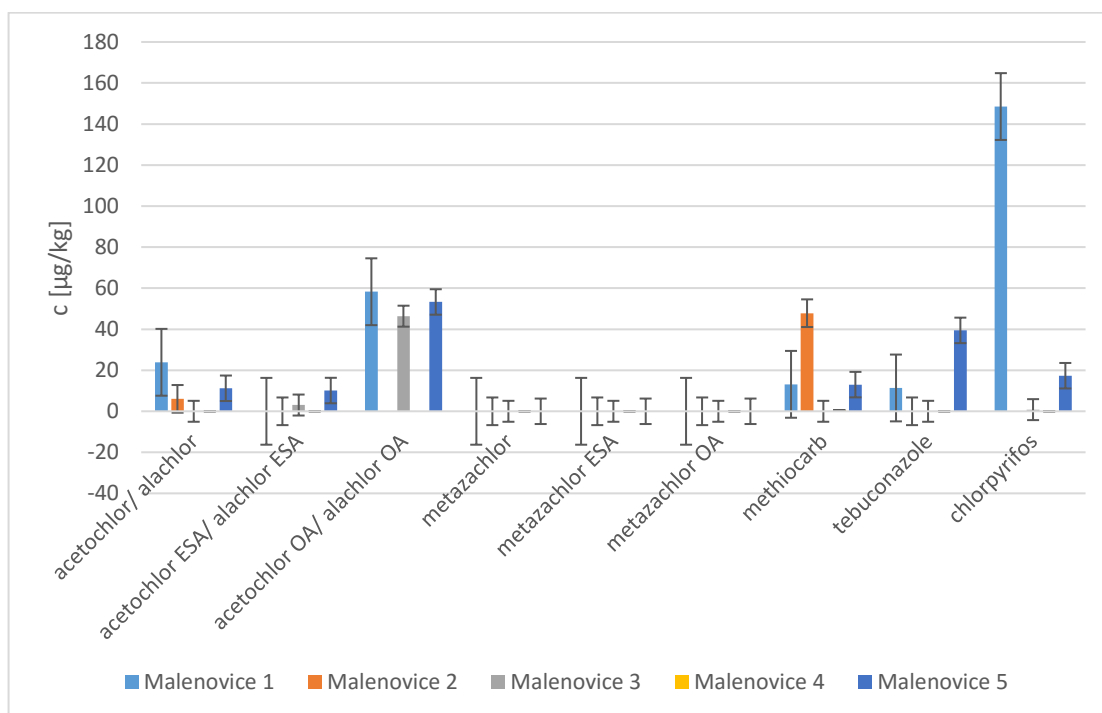


Obrázek 36: Reálné půdy, okolí Kroměříže – SPE

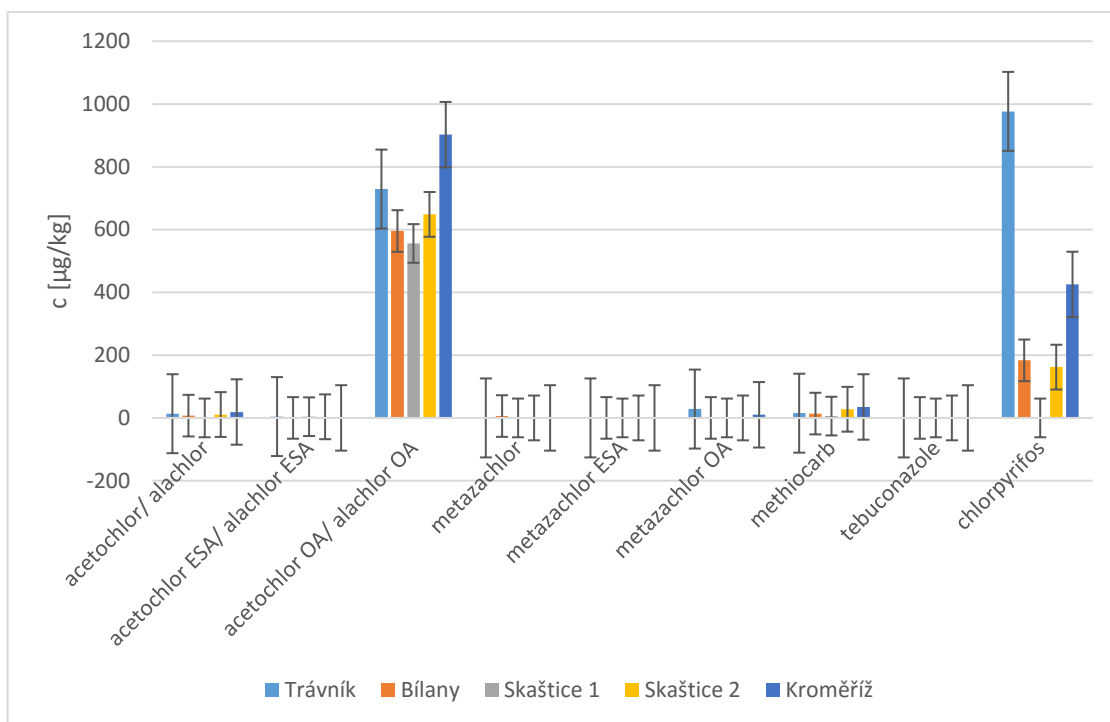
Pouze metabolity acetochlor OA a alachlor OA a chlorpyrifos byly stanoveny v reálných půdách extrahovaných metodou QuEChERS, jak je vyobrazeno na Obrázku 39 a 40. V případě reálných vzorků extrahovaných metodou QuEChERS lze konstatovat, že účinnost pro vybrané pesticidní látky je velmi nízká a jak je z Obrázku 37 a 38 patrné, lze pozorovat pouze metabolit acetochloru OA a alachloru OA a chlorpyrifos v koncentraci tento jev byl

taktéž pozorován při modelovém pokusu v laboratoři. To může být způsobeno složením QuEChERS kitu, který obsahuje velké množství komponentů, jejich úprava (např.: snížení navážky jednotlivých komponent) by mohla vést k lepším výsledkům extrakce. To by bylo vhodné vyzkoušet v laboratorních podmínkách, u reálných vzorků je možné, že dané analyty nejsou přítomny.

Důležitým poznatkem je, že metodou QuEChERS se ve větší míře extrahuje methiocarb chlorpyrifos, který se pomocí extrakce SPE objevuje pouze jednou, z toho se dá usuzovat, že pro tyto pesticidy je vhodnější použití metody QuEChERS.



Obrázek 37: Reálné půdy – Malenovice – QuEChERS



Obrázek 38: Reálné půdy – okolí Kroměříže – QuEChERS

Koncentrace pesticidních látek jsou nízké, vyšší koncentrace mají metabolity, což potvrzuje, že jsou v půdě rezistentnější.

Jednotlivé pozice odběru vzorků se svým obsahem pesticidů příliš neliší.

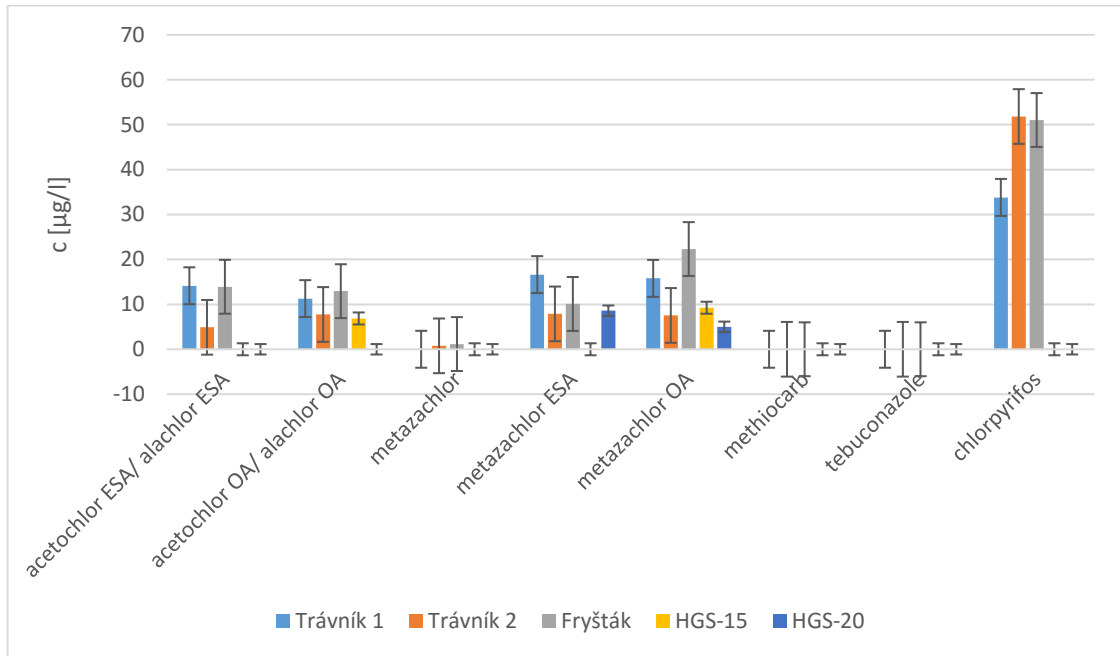
5.6.2 Vody

Ve vzorcích reálné vody, Obrázek 39 a 40 nedošlo k záchytu chloracetanilidových pesticidů, ale byly stanoveny jejich metabolity. V povrchových vodách Trávník 2 a Fryšták bylo stanoveno malé množství metazachloru v koncentracích kolem $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, ve vzorcích upravovaných metodou SPE. Vzorky upravené extrakcí SPE neobsahovaly methiocarb a nejvyšší koncentrace byla stanovena u chlorpyrifosu v povrchových vodách v koncentracích až $50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Je to zajímavým faktem, protože chlorpyrifos po extrakci SPE nebyl detekován v půdách ani v experimentech s vodou a půdou.

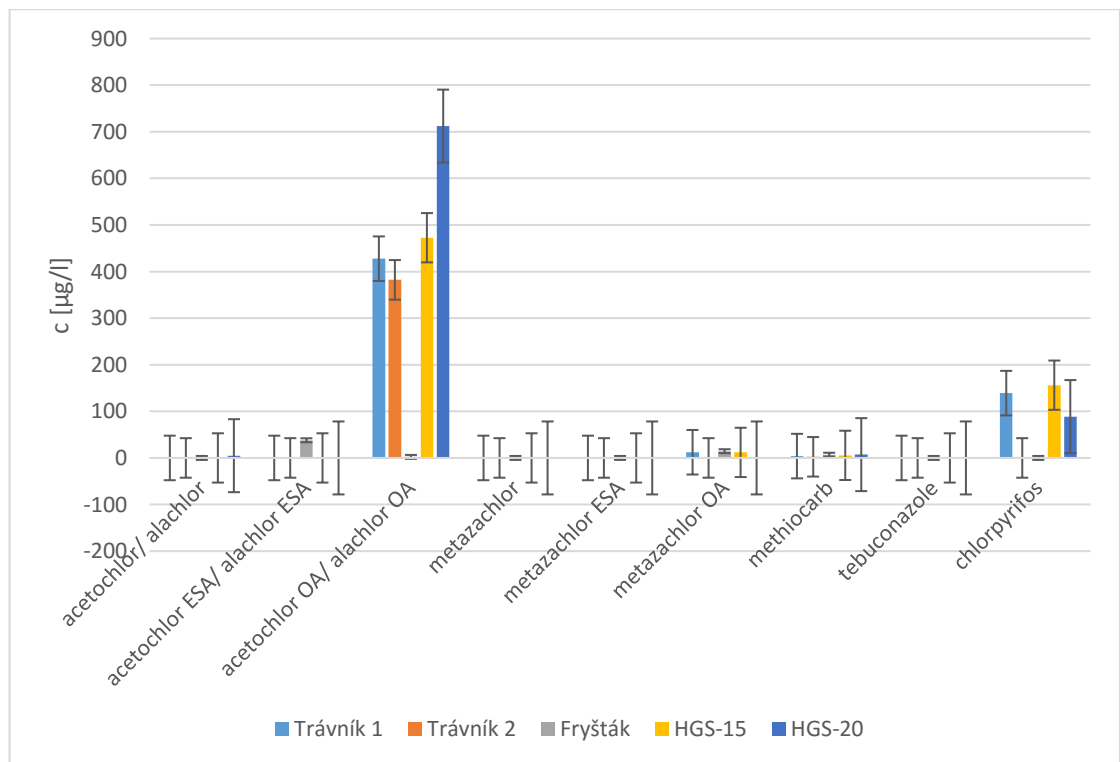
Zajímavé je porovnání povrchových vzorků s podzemními vodami, ve kterých byly nejvíce zastoupeny metabolity metazachloru. Obsah ostatních metabolitů byl v podzemních vodách v zanedbatelném množství, jinak se od povrchových vod výrazně nelišily.

Ve studii Lazič et al. (2013) byly stanoveny koncentrace acetochloru $0,02 - 0,041 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a alachloru $0,05 - 0,78 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ v povrchových vodách.

Chromatogram reálných vzorků vody extrahovaných pomocí SPE je na Obrázku 50 v Příloze III a vzorků vody extrahovaných pomocí QuEChERS na Obrázku 51 v Příloze III.



Obrázek 39: Reálné vody – SPE



Obrázek 40: Reálné vody – QuEChERS

Jak je patrné z teoretické části, stanovení pesticidů se ve vodách a půdách pohybuje v koncentracích $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ je velmi časově náročná věc, jak na instrumentaci, tak na optimalizaci metody a tím často může docházet k získání falešně pozitivních výsledků.

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo připravit základní metodu pro stanovení pesticidů v environmentálních vzorcích a tuto metodu ověřit na reálných vzorcích. Gradientová metoda je vhodná pro stanovení jak vybraných pesticidních látek, tak metabolitů chloracetanilidových pesticidů, nicméně se nepodařilo mezi sebou rozlišit koelující acetochlor a alachlor a jejich metabolity. To se nepodařilo ani pomocí UV spekter, jejich spektra jsou velmi podobná. Vzhledem k omezením UV stanovení je pro tyto koelující sloučeniny vhodnější použít kapalinovou chromatografii s hmotnostní detekcí.

Součástí základní charakteristiky bylo stanovení základních vlastností zahradní půdy, která byla použita pro laboratorní experiment, dále pak byly u zahradní půdy, certifikované půdy Lufa a dvou orných půd stanoveny obsahy huminových látek. Zahradní půda měla obsah huminových látek nejvyšší, $5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, přibližně o polovinu více než orné půdy a Lufa, což značí, že stanovení v zahradní půdě je více ovlivněno maticí.

V rámci experimentu byly používány dvě metody extrakce pesticidů z půd a vod, extrakce SPE a QuEChERS. Navzdory očekáváním byla extrakce SPE účinnější pro půdy, což je pravděpodobně způsobeno vlivem matrice, kdy jsou ze vzorků půdy extrahovány i jiné látky, například huminové látky, které ovlivňují stanovení. Extrakce QuEChERS byla vyhodnocena jako vysoce selektivní pro některé analyty, proto by bylo vhodné upravit její složení. Bylo ověřeno, že dosažené výsledky velmi výrazně záleží na volbě extrakční techniky, která ovlivňuje celou analýzu.

Modelové experimenty degradace pesticidů v čase prokázaly, že stanovené koncentrace byly velmi nízké, avšak v průběhu času často docházelo k jejich růstu, Koncentrace neodpovídaly teoretické hodnotě dle výtěžnosti ani srovnáním s jinou studií. Pro lepší stanovení by byla vhodná aplikace většího množství pesticidu, vzorky by byly méně ovlivněny vlivem matrice, nicméně takové množství by neodpovídalo reálné aplikaci pesticidů do půd.

Detekce pesticidů v reálných půdách byly nízké, do $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, nejvyšší koncentrace byly stanoveny u metabolitů chloracetanilidových pesticidů, což potvrzuje jejich rezistenci v přírodě. U reálných půd jsou srovnatelná stanovení jak po extrakci SPE, tak po extrakci QuEChERS, pravděpodobně nebylo ovlivnění maticí tak významné jako u zahradní půdy, což je potvrzeno i stanovením huminů v orných půdách.

Extrakce nejsou srovnatelné u vzorků reálných vod, extrakcí QuEChERS byly získány metabolity chloracetanilidových pesticidů v koncentracích kolem $500 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, ale pomocí SPE

extrahovány nebyly. Tyto koncentrace metabolitů byly stanoveny u povrchových vod ze zemědělské oblasti a u podzemních vod z vrtů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AGA, D. S. a E. M. THURMAN, 2001. Formation and Transport of the Sulfonic Acid Metabolites of Alachlor and Metolachlor in Soil. *Environmental Science and Technology* [online]. **35**(12), 2455–2460. ISSN 0013936X. Dostupné z: doi:10.1021/es991264s

ALS ENVIRONMENTAL, 2015. *ALS Pesticidy*.

ANASTASSIADES, Michelangelo, Steven J. LEHOTAY, Darinka ŠTAJNBAHER a Frank J. SCHENCK, 2003. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and „Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC International* [online]. **86**(2), 412–431. ISSN 10603271. Dostupné z: doi:10.1093/jaoac/86.2.412

BIZIUK, M., A. PRZYJAZNY, J. CZERWINSKI a M. WIERGOWSKI, 1996. Occurrence and Determination of Pesticides in Natural and Treated Waters. *Journal of Chromatography A* [online]. **754**(1–2), 103–123. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(96)00297-X

BORTON, Christopher, 2010. EPA Method 535: Detection of Degradates of Chloroacetanilides and other Acetamide Herbicides in Water by LC / MS / MS. *AB SCIEX*. 1–5.

CSERHATI, Tibor a Maria SZOGYI, 2012. Chromatographic Determination of Pesticides in Foods and Food Products. *Journal of Nutrition & Food Sciences* [online]. **02**(02), 58–68. Dostupné z: doi:10.4172/2155-9600.1000126

ČSN EN 15662, 2018. *Potraviný rostlinného původu - Multimetoda pro stanovení reziduí pesticidů s použitím analýzy založené na GC a LC po extrakci acetonitrilem/separaci a předčištění pomocí disperzní SPE - Modulární metoda QuEChERS (Norma k přímému použití jako ČSN)*. 2018.

DECHENE, Annika, Ingrid ROSENDAHL, Volker LAABS a Wulf AMELUNG, 2014. Sorption of Polar Herbicides and Herbicide Metabolites by Biochar-amended Soil. *Chemosphere* [online]. **109**, 180–186. ISSN 18791298. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2014.02.010

DONG, Michael W., 2006. *Modern HPLC for Practicing Scientists*. B.m.: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. ISBN 9780471727897.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2010. *Tebuconazole, Pesticide Tolerances*

[online]. 2010. ISSN 00976326. Dostupné z: doi:10.1016/0196-335x(80)90058-8

EUROPEAN CHEMICALS AGENCY, 2011. *Committee for Risk Assessment RAC: Annex I Background Document to the Opinion proposing harmonised classification and labelling at Community level of Hexabromocyclododecane (HBCDD)*.

EUROPEAN CHEMICALS AGENCY, 2013. *Tebuconazole Product-type 10 (Construction material preservatives)*.

FASUROVÁ, N a L POSPÍŠILOVÁ, 2010. Characterization of Soil Humic Substances By Ultraviolet-Visible and Synchronous Fluorescence Spectroscopy Charakteristika Půdních Huminových Látek Metodami Ultrafialové-. *Journal of Central European Agriculture*. **11**(3), 351–358.

FERENČÍK, Martin, 2017. Rezidua pesticidů v povrchových vodách - legislativa , rizika , aktuální stav Legislativní požadavky na používání pesticidů a jejich přítomnost ve vodách. *agromanual.cz* [online]. 1–8. Dostupné z: <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/ochrana-obecne/rezidua-pesticidu-v-povrchovych-vodach-legislativa-rizika-aktualni-stav>

GSI Chemical Properties Database [databáze online]. GSI Environmental, 2211 Norfolk St., Suite 1000, Houston, TX 77098, dostupné z: <https://www.gsi-net.com/en/publications/gsi-chemical-database.html>

HEBERLE, Siegrun A., Diana S. AGA, Roland HANY a Stephan R. MÜLLER, 2000. Simultaneous Quantification of Acetanilide Herbicides and Their Oxanilic and Sulfonic Acid Metabolites in Natural Waters. *Analytical Chemistry* [online]. **72**(4), 840–845. ISSN 00032700. Dostupné z: doi:10.1021/ac991046h

HESKETH, Nicholas, Malcolm N. JONES a Edward TIPPING, 1996. The interaction of some pesticides and herbicides with humic substances. *Analytica Chimica Acta* [online]. **327**(3), 191–201. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/0003-2670(96)00081-5

HLADIK, Michelle L., Edward J. BOUWER a A. Lynn ROBERTS, 2008. Neutral Degradates of chloroacetamide Herbicides: Occurrence in Drinking Water and Removal During Conventional Water Treatment. *Water Research* [online]. **42**(20), 4905–4914. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2008.09.008

HLADIK, Michelle L., Jonie J. HSIAO a A. Lynn ROBERTS, 2005. Are Neutral Chloroacetamide Herbicide Degradates of Potential Environmental Concern? Analysis and

Occurrence in the Upper Chesapeake Bay. *Environmental Science and Technology* [online]. **39**(17), 6561–6574. ISSN 0013936X. Dostupné z: doi:10.1021/es050268w

HOFMAN, Jakub, 2018. Rezidua pesticidů v orných půdách České republiky Relevantní výzkum realizovaný ve Výzkumném centru pro toxické látky v prostředí. *agromanual.cz* [online]. 1–12. Dostupné z: <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/ochrana-obecne/rezidua-pesticidu-v-ornych-pudach-ceske-republiky>

HOSTETLER, Kenneth A. a E. M. THURMAN, 2000. Determination of Chloroacetanilide Herbicide Metabolites in Water Using High-performance Liquid Chromatography-diode Array Detection and High-Performance Liquid Chromatography/mass Spectrometry. *Science of the Total Environment* [online]. **248**(2–3), 147–155. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/S0048-9697(99)00538-0

JUNKER-BUCHHEIT, A. a M. WITZENBACHER, 1996. Pesticide Monitoring of Drinking Water With the Help of Solid-phase Extraction and High-performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. **737**(1), 67–74. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/0021-9673(95)01337-7

KAMRIN, Michael, 1997. *Pesticide Profiles* [online]. ISBN 0849321794. Dostupné z: doi:10.1201/9781420049220

KODEŠ, Vít, 2021. Matazachlor a jeho vliv na kvalitu vod v ČR. *agromanual.cz*. 6.

LAZIČ, Sanja, Dragana ŠUNJKA a Grahovac RADANA, 2013. Determination of Some Pesticides in Drainage Water.

LEE, Philip W, 2003. *Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals VOLUME 1 and VOLUME 2*. ISBN 978-0471491941.

MASIÁ, Ana, Karina VÁSQUEZ, Julián CAMPO a Yolanda PICÓ, 2015. Assessment of two extraction methods to determine pesticides in soils, sediments and sludges. Application to the Túria River Basin. *Journal of Chromatography A* [online]. **1378**, 19–31. ISSN 18733778. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2014.11.079

MIKULICOVÁ, Petra, 2011. *Analytické metody pro studium obsahu herbicidů v půdě*. B.m. Masarykova univerzita.

MINISTERIO DE SANIDAD, 2013. *Proposal for Harmonised Classification and Labelling Substance Name : Styrene CAS Number :*

NASIRI, Maryam, Hossein AHMADZADEH a Amirhassan AMIRI, 2019. Sample Preparation and Extraction Methods for Pesticides in Aquatic Environments: A Review. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* [online]. **123**, 115772. ISSN 18793142. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2019.115772

NURSALAM, 2016, metode penelitian a A.G FALLIS, 2013. *Handbook of Pesticides - Methods of Pesticide Residues Analysis*. ISBN 9788578110796.

PATNAIK, Pradyot, 2017. *Handbook of Environmental Analysis: Chemical Pollutants in Air, Water, Soil, and Solid Wastes, Third Edition* [online]. ISBN 9781498745628. Dostupné z: doi:10.1201/9781315151946

PINTO, Carmelo García, María Esther Fernández LAESPADA, Sara Herrero MARTÍN, Ana María Casas FERREIRA, José Luis Pérez PAVÓN a Bernardo Moreno CORDERO, 2009. Simplified QuEChERS Approach for the Extraction of Chlorinated Compounds from Soil Samples. *Talanta* [online]. **81**(1–2), 385–391. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2009.12.013

PLÁCIDO, Alexandra, Paula PAÍGA, David H. LOPES, Manuela CORREIA a Cristina DELERUE-MATOS, 2013. Determination of Methiocarb and Its Degradation Products, Methiocarb Sulfoxide and Methiocarb Sulfone, in Bananas Using QuEChERS Extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **61**(2), 325–331. ISSN 00218561. Dostupné z: doi:10.1021/jf304027s

PSZCZOLINSKA, Klaudia a Monika MICHEL, 2016. The QuEChERS Approach for the Determination of Pesticide Residues in Soil Samples: An Overview. *Journal of AOAC International* [online]. **99**(6), 1403–1414. ISSN 10603271. Dostupné z: doi:10.7540/jaoacint.16-0274

PubChem [databáze online]. National Center for Biotechnology Information, U.S.National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD20894, dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/about.html>

RADOJEVIČ, Miroslav a Vladimir N. BASHKIN, 2006. *Practical Environmental Analysis*. Second. B.m.: RSCPublishing. ISBN 0854046799.

RATHORE, Hamir Singh a Leo M.L. NOLLET, 2012. *Pesticides: Evaluation of environmental pollution* [online]. ISBN 9781439836255. Dostupné z: doi:10.1201/b11864

RESTEK, 2012. *QuEChERS Methodology : AOAC Method*.

SÁŇKA, M., R. VÁCHA, Š. POLÁKOVÁ a P. FIALA, 2018. Kritéria pro hodnocení produkčních a ekologických vlastností půd. 99.

SCHENCK, Jfrank J., Amy N. BROWN, Lynda V. PODHORNIAK, Alesia PARKER, Michelle RELIFORD a Jon W. WONG, 2008. A Rapid Multiresidue Method for Determination of Pesticides in Fruits and Vegetables by Using Acetonitrile Extraction/Partitioning and Solid-Phase Extraction Column Cleanup. *Journal of AOAC International* [online]. **91**(2), 422–438. ISSN 10603271. Dostupné z: doi:10.1093/jaoac/91.2.422

SCIENTIFIC, Thermo Fisher, 2018. *Selecting the Appropriate QuEChERS Extraction Method for Pesticides in Foods*. 2018.

SHOEMAKER, Jody A., 2002. Novel Chromatographic Separation and Carbon Solid-Phase Extraction of Acetanilide Herbicide Degradation Products. *Journal of AOAC International* [online]. **85**(6), 1331–1337. ISSN 10603271. Dostupné z: doi:10.1093/jaoac/85.6.1331

SJERPS, Rosa M.A., Pascal J.F. KOOIJ, Arnaut VAN LOON a Annemarie P. VAN WEZEL, 2019. Occurrence of Pesticides in Dutch Drinking Water Sources. *Chemosphere* [online]. **235**, 510–518. ISSN 18791298. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2019.06.207

SNYDER, L. R., J. J. KIRKLAND a W. DOLAN, J, 2010. *Introduction to modern liquid chromatography* [online]. third. Hoboken, New Jersey: Wiley. ISBN 9780470167540. Dostupné z: doi:10.1093/jaoac/58.1.169

SPARK, K. M. a R. S. SWIFT, 1994. Investigation of the Interaction Between Pesticides and Humic Substances Using Fluorescence Spectroscopy. *Science of the Total Environment, The* [online]. **152**(1), 9–17. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/0048-9697(94)90546-0

STEHLÍK, Petr, 2007. *Stanovení vybraných strobilurinových pesticidů v ječmeni, sladu a pivu*. B.m. Fakulta Chemická.

TADEO, José L., 2008. *Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples*. ISBN 9780849375521.

TUZIMSKI, Tomasz, 2009. Application of SPE-HPLC-DAD and SPE-HPTLC-DAD to the Analysis of Pesticides in Lake Water. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC* [online]. **22**(4), 235–240. ISSN 09334173. Dostupné z: doi:10.1556/JPC.22.2009.4.1

UBAID UR RAHMAN, Hafiz, Waqas ASGHAR, Wahab NAZIR, Mansur Abdullah SANDHU, Anwaar AHMED a Nauman KHALID, 2021. A Comprehensive Review on Chlorpyrifos Toxicity With Special Reference to Endocrine Disruption: Evidence of Mechanisms, Exposures and Mitigation Strategies. *Science of the Total Environment* [online]. **755**. ISSN 18791026. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2020.142649

ÚKZÚZ, 2019. *Spotřeba účinných látek obsažených v přípravcích na ochranu rostlin v okresech Zlínského kraje v roce 2019*.

VELISEK, Josef, Alzbeta STARA, Jan KUBEC, Eliska ZUSKOVA, Milos BURIC a Antonin KOUBA, 2020. Effects of Metazachlor and its Major Metabolite Metazachlor OA on Early Life Stages of Marbled Crayfish. *Scientific Reports* [online]. **10**(1), 1–9. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-57740-1

VERA, Jose, Luísa CORREIA-SÁ, Paula PAÍGA, Idalina BRAGANÇA, Virgínia C. FERNANDES, Valentina F. DOMINGUES a Cristina DELERUE-MATOS, 2013. QuEChERS and soil analysis. An Overview. *Sample Preparation* [online]. **1**(June). ISSN 2299-677X. Dostupné z: doi:10.2478/sampre-2013-0006

VERMA, Jay Prakash, Durgesh Kumar JAISWAL a R. SAGAR, 2014. Pesticide Relevance and Their Microbial Degradation: a-state-of-art. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* [online]. **13**(4), 429–466. ISSN 15729826. Dostupné z: doi:10.1007/s11157-014-9341-7

VRYZAS, Zisis, Ageliki TSABOULA a Euphemia PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, 2007. Determination of alachlor, metolachlor, and their acidic metabolites in soils by microwave-assisted extraction (MAE) combined with solid phase extraction (SPE) coupled with GC-MS and HPLC-UV analysis. *Journal of Separation Science* [online]. **30**(15), 2529–2538. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.200700198

WELLINGS, Donald A., 2006. *A Practical Handbook of Preparative HPLC*. Oxford: Elsevier. ISBN 9781856174664.

Směrnice Evropského Parlamentu a Rady 2009/128/ES ze dne 21. října 2009, kterou se stanoví rámec pro činnost Společenství za účelem dosažení udržitelného používání pesticidů. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/cs/TXT/?uri=CELEX%3A32009L0128>

Vyhláška č. 264/2015 Sb. Vyhláška, kterou se mění vyhláška č. 5/2011 Sb., o vymezení hydrogeologických rajonů a útvarů podzemních vod, způsobu hodnocení stavu podzemních vod a náležitostech programů zjišťování a hodnocení stavu podzemních vod. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2015-264>

Vyhláška č. 83/2014 Sb. Vyhláška, kterou se mění vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody, ve znění pozdějších předpisů. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2014-83>

Vyhláška č. 120/2011 Sb. Vyhláška, kterou se mění vyhláška Ministerstva zemědělství č. 428/2001 Sb., kterou se provádí zákon č. 274/2001 Sb., o vodovodech a kanalizacích pro veřejnou potřebu a o změně některých zákonů (zákon o vodovodech a kanalizacích), ve znění pozdějších předpisů. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2011-120>

Nářízení vlády č. 401/2015 Sb. Nářízení vlády o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2015-401>

Vyhláška č. 153/2016 Sb. Vyhláška o stanovení podrobností ochrany kvality zemědělské půdy a o změně vyhlášky č. 13/1994 Sb., kterou se upravují některé podrobnosti ochrany zemědělského půdního fondu. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2016-153>

Vyhláška č. 13/1994 Sb. Vyhláška Ministerstva životního prostředí, kterou se upravují některé podrobnosti ochrany zemědělského půdního fondu. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1994-13>

Vyhláška č. 335/2017 Sb. Vyhláška, kterou se mění vyhláška č. 275/1998 Sb., o agrochemickém zkoušení zemědělských půd a zjišťování půdních vlastností lesních pozemků, ve znění pozdějších předpisů. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2017-335>

Vyhláška č. 54/2004 Sb. Vyhláška o potravinách určených pro zvláštní výživu a o způsobu jejich použití. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2004-54>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

- AOAC Association of Official Analytical Chemists – Asociace sdružení analytických chemiků
- CAS# Chemical Abstracts Service – registrační číslo chemické sloučeniny
- ČR Česká republika
- DAD Diod Array Detector – detektor diodového pole
- DDT dichlordifenyltrichlormethan
- ESA ethansulfonová kyselina
- EU Evropská Unie
- FLD Fluorescence Detector – fluorescenční detektor
- GC Gas Chromatography – plynová chromatografie
- GCB grafitizované saze
- GPC Gel Permeation Chromatography – gelová permeační chromatografie
- HPLC High Performance Liquid Chromatography – vysoceúčinná kapalinová chromatografie
- IEC Ion Exchange Chromatography – iontově-výměnná chromatografie
- K_{oc} půdní adsorpční koeficient
- K_{ow} rozdělovací koeficient n-oktanol/voda
- LC Liquid Chromatography – kapalinová chromatografie
- LOD Limit of Detection – limit detekce
- LOQ Limit of Quantification – limit kvantifikace
- NPC Normal Phase Chromatography – chromatografie s normálními fázemi
- OA Oxalová kyselina
- PDA Photo Diode Detector – fotofiodový detektor
- PSA ethylendiamin-N-propyl obsahující sekundární i primární aminy
- QuEChERS Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe – extrakční metoda
- RPC Reverse Phase Chromatography – chromatografie s reverzními fázemi

SPE Solid Phase Extraction – extrakce pevným sorbentem

SPME Solid Phase Micro Extraction – mikroextrakce pevnou fází

UV/Vis Ultra Violet/ Visible Light – ultrafialové a viditelné světlo

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Osud a transport pesticidů v životním prostředí	17
Obrázek 2: Strukturní vzorec alachloru	22
Obrázek 3: Strukturní vzorec alachloru ESA	23
Obrázek 4: Strukturní vzorec alachloru OA	24
Obrázek 5: Strukturní vzorec acetochloru	24
Obrázek 6: Strukturní vzorec acetochloru ESA.....	25
Obrázek 7: Strukturní vzorec acetochloru OA	26
Obrázek 8: Strukturní vzorec metazachloru	26
Obrázek 9: Strukturní vzorec metazachloru ESA.....	27
Obrázek 10: Strukturní vzorec metazachloru OA.....	28
Obrázek 11: Strukturní vzorec chlorpyrifosu	28
Obrázek 12: Strukturní vzorec chlorpyrifos-methylu.....	30
Obrázek 13: Strukturní vzorec methiocarbu.....	31
Obrázek 14: Strukturní vzorec methiocarb sulfoxidu.....	32
Obrázek 15: Strukturní vzorec methiocarb sulfonu.....	33
Obrázek 16: Strukturní vzorec tebuconazolu.....	33
Obrázek 17: Strukturní vzorec tebuconazolu OH.....	34
Obrázek 18: Strukturní vzorec tebuconazolu COOH	35
Obrázek 19: Extrakce pevným sorbentem (Radojevič a Bashkin 2006)	37
Obrázek 20: Extrakce QuEChERS (Patnaik 2017).....	39
Obrázek 21: Schéma kapalinového chromatografu (Wellings 2006).....	42
Obrázek 22: Schéma detektoru diodového pole (Wellings 2006)	44
Obrázek 23: Schéma FLD detektoru (Patnaik 2017).....	47
Obrázek 24: Chromatogram s retenčními časy vybraných pesticidů – izokratická eluce ...	68
Obrázek 25: Chromatogram s metabolity chloracetanilidových pesticidů – izokratická eluce	68
Obrázek 26: Chromatogram s retenčními časy vybraných pesticidů – gradientová eluce ..	69
Obrázek 27: Chromatogram s retenčními časy chloracetanilidových pesticidů a jejich metabolitů se MF (ACN:H ₂ O) – gradientová eluce.....	70
Obrázek 28: Chromatogram s retenčními časy chloracetanilidových pesticidů a jejich metabolitů s MF (ACN/H ₃ PO ₄) – gradientová eluce	70
Obrázek 29: Laboratorní experiment – Lufa – SPE	75
Obrázek 30: Laboratorní experiment – Lufa – QuEChERS	75
Obrázek 31: Laboratorní experiment – Zahradní půda – SPE.....	77
Obrázek 32: Laboratorní experiment – Zahradní půda – QuEChERS	77

Obrázek 33: Laboratorní experiment – Voda – SPE	79
Obrázek 34: Laboratorní experiment – Voda – QuEChERS	79
Obrázek 35: Reálné půdy - Malenovice – SPE.....	81
Obrázek 36: Reálné půdy, okolí Kroměříže – SPE	81
Obrázek 37: Reálné půdy – Malenovice – QuEChERS	82
Obrázek 38: Reálné půdy – okolí Kroměříže – QuEChERS	83
Obrázek 39: Reálné vody – SPE.....	84
Obrázek 40: Reálné vody – QuEChERS	84
Obrázek 41: Kalibrační přímky acetochloru,alachloru a jejich metabolitů s rovnicemi přímky.....	Chyba! Záložka není definována.
Obrázek 42: Kalibrační přímky metazachloru a jeho metabolitů s rovnicemi přímky	Chyba! Záložka není definována.
Obrázek 43: Kalibrační přímky methiocarbu, tebuconazolu a chlorpyrifosu s rovnicemi	Chyba! Záložka není definována.
Obrázek 44: Chromatogram modelového vzorku Lufy extrahovaného pomocí SPE	Chyba! Záložka není definována.
Obrázek 45: Chromatogram modelového vzorku Lufy extrahovaného pomocí QuEChERS	Chyba! Záložka není definována.
Obrázek 46: Chromatogram modelového vzorku zahradní půdy extrahovaného pomocí SPE	Chyba! Záložka není definována.
Obrázek 47: Chromatogram modelového vzorku zahradní půdy extrahovaného pomocí QuEChERS	Chyba! Záložka není definována.
Obrázek 48: Chromatogram modelového vzorku vody extrahovaného pomocí SPE	Chyba! Záložka není definována.
Obrázek 49: Chromatogram reálných vzorků půdy extrahovaných pomocí SPE	Chyba! Záložka není definována.
Obrázek 50: Chromatogram reálných vzorků vody extrahovaných pomocí SPE	Chyba! Záložka není definována.
Obrázek 51: Chromatogram reálných vzorků půdy extrahovaných pomocí QuEChERS	Chyba! Záložka není definována.

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Klasifikace pesticidů dle biologického účinku (Rathore a Nollet 2012).....	14
Tabulka 2 Klasifikace pesticidů dle způsobu a doby účinku (Rathore a Nollet 2012).....	15
Tabulka 3: Klasifikace pesticidů dle chemického typu účinné látky.....	15
Tabulka 4: Klasifikace mobility látek v prostředí	18
Tabulka 5 Fyzikální vlastnosti alachloru (PubChem 2021).....	23
Tabulka 6: Fyzikální vlastnosti acetochloru (PubChem 2021).....	25
Tabulka 7: Fyzikální vlastnosti metazachloru (PubChem 2021).....	27
Tabulka 8: Fyzikální vlastnosti chlorpyrifosu (PubChem 2021).....	29
Tabulka 9: Fyzikální vlastnosti methiocarbu (PubChem 2021)	31
Tabulka 10: Fyzikální vlastnosti tebuconazolu (PubChem 2021)	34
Tabulka 11: Použití SPE v různých studiích	38
Tabulka 12: Metody QuEChERS dle analytu.....	40
Tabulka 13: Použití QuEChERS v různých studiích	41
Tabulka 14: Metody pro stanovení pesticidů s využitím HPLC-DAD s limitem kvantifikace	46
Tabulka 15: Gradient metody EPA 535.....	49
Tabulka 16: Metody pro stanovení pesticidů s využitím HPLC-MS s limitem kvantifikace	50
Tabulka 17: Parametry izokratické metody pro stanovení pesticidů.....	56
Tabulka 18: Parametry gradientové metody pro stanovení vybraných pesticidů.....	57
Tabulka 19: Odběrová místa půdy s popisem místa a vzorku	61
Tabulka 20: Odběrová místa vody s popisem místa a vzorku	61
Tabulka 21: Charakteristika izokratické analýzy.....	67
Tabulka 22: Charakteristika gradientové analýzy	69
Tabulka 23: Kalibrační přímky standardů	71
Tabulka 24: Vypočtené hodnoty LOD a LOQ všech standardů.....	71
Tabulka 25: Vlastnosti zahradní půdy	72
Tabulka 26: Síťová analýza zahradní půdy	72
Tabulka 27: Vlastnosti zahradní půdy a certifikované půdy Lufa.....	72
Tabulka 28: Vypočtené koncentrace huminových kyselin ve vybraných půdách.....	73
Tabulka 29: Vypočtené koncentrace fulvokyselin ve vybraných půdách	73
Tabulka 30: Procentuální výtěžek oproti teoretické koncentraci - Lufa.....	76
Tabulka 31: Procentuální výtěžek oproti teoretické koncentraci – Zahradní půda	78
Tabulka 32: Procentuální výtěžek oproti teoretické koncentraci – Voda.....	80

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Protokol o odběru vzorků z vrtů

Příloha P II: Kalibrační přímky

Příloha P III: Chromatogramy

