

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení obsahu reziduí pesticidů u vybraných peckovin se zaměřením na  
dithiokarbamáty

Olga Krupková

Bakalářská práce

2018

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2017/2018

## **ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Olga Krupková**  
Osobní číslo: **C15022**  
Studijní program: **B2807 Chemické a procesní inženýrství**  
Studijní obor: **Ochrana životního prostředí**  
Název tématu: **Stanovení obsahu reziduí pesticidů u vybraných peckovin se zaměřením na dithiokarbamáty**  
Zadávající katedra: **Ústav environmentálního a chemického inženýrství**

### **Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :**

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou obecně na pesticidy z hlediska environmentálních dopadů.
2. Konkrétně se zaměřte na dithiokarbamáty a jejich deriváty a na způsoby jejich analýzy v peckovinách.
3. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 9/2012 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu" v platném znění.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Jaroslava Kořínková, Dr.**

Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Konzultant bakalářské práce:

**Dr. Ing. Zora Nývltová**

VÚOS

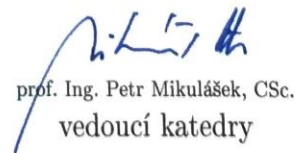
Datum zadání bakalářské práce: **6. února 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Petr Mikulášek, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 6. února 2018

## Prohlášení autora

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 27. 5. 2018

Olga Krupková

## **ANOTACE**

Práce se zabývá popisem, klasifikací a využitím pesticidů. Dále jsou v práci uvedeny environmentální aspekty a dopady pesticidů. Hlavní důraz je kladen na dithiokarbamáty a jejich deriváty. Dále se práce zabývá různými způsoby stanovení reziduí pesticidů v peckovinách.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Pesticidy, dithiokarbamáty, analýza, metoda GC-MS

## **ANNOTATION**

The thesis deals with the description, classification and utilization of pesticides. Furthermore, environmental aspects and impacts of pesticides are presented. The main focus is on dithiocarbamates and their derivatives. Further, the thesis deals with various methods of determination of pesticide residues in drupes.

## **KEYWORDS**

Pesticides, dithiocarbamates, analysis, GC-MS method

# OBSAH

ÚVOD.....	14
1. PESTICIDY .....	15
1. 1 Klasifikace pesticidů .....	15
1. 2 Obecné vlastnosti pesticidů.....	16
1. 3 Nežádoucí účinky pesticidů .....	17
1. 4 Bezpečné použití pesticidů.....	18
1. 5 Ekonomické aspekty výroby a aplikace pesticidů .....	19
1. 6 Fyzikálně - chemické faktory rozpadu pesticidů .....	19
2. VÝVOJ PESTICIDŮ.....	21
2. 1 Způsoby aplikace pesticidů .....	22
2. 2 Aplikační stroje .....	22
2. 3 Způsob účinku pesticidů .....	23
3. REZIDUA PESTICIDŮ .....	25
3. 1 Rizika reziduí pesticidů.....	25
3. 2 Monitoring reziduí pesticidů .....	25
3. 3 Maximální limity reziduí pesticidů .....	26
4. DITHIOKARBAMÁTY A JEJICH DERIVÁTY .....	27
4. 1 Nabam .....	28
4. 2 Thiram.....	28
4. 3 Mankozeb.....	30
4. 4 Propineb .....	32
5. ANALÝZA REZIDUÍ PESTICIDŮ.....	34
5. 1 Metody stanovení reziduí pesticidů .....	34
5. 1. 1 GC metody.....	34
5. 1. 1. 1 Příprava vzorků.....	36
5. 1. 1. 2 Metoda GC-MS .....	36

5. 1. 1. 3 GC-ECD stanovení .....	37
5. 1. 2 LC metody .....	37
5. 1. 2. 1 Multireziduální LC-MS metoda.....	37
5. 1. 2. 2 Kapalinová chromatografie s fotometrií .....	38
5. 1. 2. 3 LC s detekcí chemiluminiscence .....	39
5. 1. 2. 4 LC s UV a elektrochemická detekce.....	39
5. 1. 2. 5 HPLC-UV pro stanovení thiramu a thiomčoviny .....	40
6. Environmentální aspekty a dopady pesticidů .....	41
6. 1 Environmentální aspekty.....	41
6. 2 Environmentální dopady .....	42
7. ZÁVĚR .....	43
8. POUŽITÁ LITERATURA .....	44

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1- Rozklad pesticidů v prostředí [8] .....	20
Obrázek 2- Xylémová cesta [12] .....	24
Obrázek 3- Vzorec nabamu [19].....	28
Obrázek 4- Vzorec thiramu [20] .....	28
Obrázek 5- Metabolismus thiramu [21].....	29
Obrázek 6- Vzorec mankozebu [23] .....	30
Obrázek 7- Metabolismus mankozebu [22].....	31
Obrázek 8- Metabolity mankozebu [22] .....	31
Obrázek 9- Vzorec propinebu [25] .....	32
Obrázek 10- Metabolická cesta propinebu v rostlině [24].....	33
Obrázek 11- Schéma plynové chromatografie [29] .....	35
Obrázek 12- Chromatografický záznam pro HPLC-UV [34].....	40
Obrázek 13- Osud pesticidů v prostředí [37].....	41
Tabulka 1- Aplikace pro Thiram Granuflo [15] .....	30
Tabulka 2- Aplikace pro přípravek Dithane DG Neo-Tec [15].....	32
Tabulka 3- Aplikace pro přípravek Antre 70 WG [15] .....	33



## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

K <sub>ow</sub>	Rozdělovací koeficient oktanol-voda
K <sub>oc</sub>	Půdní adsorpční koeficient
BDF	Biokoncentrační faktor
LD <sub>50</sub>	Letální dávka, která udává množství pesticidů, při jejichž požití uhynie 50 % testovaných subjektů do 24 hod. od expozice
DDT	1,1,1-trichlor-2,2bis(4-chlorfenyl)ethan
WHO	Světová zdravotnická organizace
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství
CDA	Controlled droplet application
ULVA	Ultra-low volume application
MLR	Maximální limit reziduí
GC	Plynová chromatografie
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
HS	Head Space analýza
DTC	Dithiokarbamáty
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová a její soli
UV	Ultrafialové záření
DMD	Dimethyldithiokarbamáty
EBD	Ethylenbisdithiokarbamáty
PBD	Propylenbisdithiokarbamáty

# ÚVOD

Lidé se od počátku civilizace snažili zlepšovat životní podmínky. K těmto podmínkám patří zajišťování potravy. Hospodářské plodiny byly napadány škůdci a ty způsobovaly ztráty výnosu a hladomory, tyto události přispěly k aplikaci pesticidů [1].

První pesticidní přípravek byla síra, která se používala už před rokem 1000 př. n. l. na choroby kulturních rostlin. Bojování se zemědělskými škůdci chemickými metodami začalo od poloviny 19. století. Od této doby se setkáváme s ochranou rostlin pomocí používání přípravků k tomuto účelu. Do počátku 20. století se k hubení škůdců využívaly anorganické látky např. chlorečnan sodný, síran amonný, arzeničnan sodný, arzeničnan měďnatý, arzeničnan olovnatý, síran měďnatý nebo organické chemikálie získané z přírodních zdrojů. Aplikace arzenových pesticidů vedla ke vzniku nebezpečných reziduí v ošetřených plodinách, proto se hledaly méně nebezpečné látky. Třicátá léta 20. století jsou počátkem výroby syntetických pesticidů. Roku 1939 Paul H. Müller objevil vlastnosti DDT, které mají insekticidní účinky [1].

Pesticidy jsou chemické látky, které se používají proti škůdcům a parazitům, které narušují rovnováhu v zemědělských, okrasných a lesních rostlinách. Dále bývají použity pro ochranu potravin a zemědělských produktů, průmyslových materiálů, zvířat i člověka.

Pesticidy dělíme dle chemické povahy na organofosfáty, karbamáty, chlororganické sloučeniny, fenoly či aniliny.

Většina pesticidů je aplikována v zemědělství. Podle škodlivých činitelů je můžeme rozdělit na insekticidy (hubí hmyz), fungicidy (hubí houby) a herbicidy (hubí plevele).

Rizika spojená s použitím pesticidů jsou např. jejich negativní vliv na lidské zdraví, kde mohou působit toxicky na nervovou soustavu a způsobit poškození vývoje mozku. Dále také mohou mít nepříznivé dopady na životní prostředí, např. kontaminace povrchových a podzemních vod.

Cílem této bakalářské práce je zpracování literární rešerše, která se zabývá rozdělením pesticidů, vývojem pesticidů, environmentálním dopadem použití pesticidů a způsoby stanovení reziduí pesticidů, konkrétně dithiokarbamátů a jejich derivátů v peckovinách.

# 1. PESTICIDY

Pesticidy jsou chemické a biologické látky, které se převážně používají v zemědělství na ochranu rostlin proti rostlinným, živočišným a houbovým parazitům. Ovlivňují základní procesy v živých organismech, ničí a regulují škodlivé vlivy. Pesticidních přípravků s různým chemickým složením na trhu existuje celá řada. Způsoby jejich aplikace se pak odvíjí od fyzikálně – chemických vlastností [2].

I když mají pesticidy příznivý vliv na ochranu rostlin a hub, mohou mít i nepříznivé účinky na životní prostředí a lidské zdraví. Pesticidy například snižují kvalitu povrchové a odpadní vody. Lidé, kteří pracují s pesticidy, mohou být vystaveni otravám, kožnímu, nervovému a dýchacímu onemocnění. Chronické působení pesticidů je pro člověka nejnebezpečnější, může způsobovat rakovinu, vrozené vývojové vady a problémy s plodností [2].

Negativní vlivy můžeme omezit dodržováním ochranných lhůt mezi aplikacemi pesticidů a sklizní [2].

## 1. 1 Klasifikace pesticidů

Pesticidy lze klasifikovat podle několika faktorů. Mohou být rozděleny například podle jejich biologického účinku, stability nebo rozsahu účinku [2, 3].

Klasifikace podle biologického účinku:

- Herbicidy (ničí plevely)
- Fungicidy (ničí houby a plísně)
- Zoocidy (ničí živočišné škůdce)

Rozdělení zoocidů:

- Insekticidy (slouží proti působení hmyzu)
- Akaricidy (slouží proti působení roztočů)
- Nematocidy (slouží proti působení škůdců půdy)
- Rodenticidy (slouží k hubení hlodavců)
- Avicidy (slouží k hubení škodlivých ptáků)
- Moluskocidy (slouží k hubení měkkýšů)

Klasifikace podle stability:

- Snadno odbouratelné
- Perzistentní

Klasifikace podle způsobu působení:

- Dotykově působící (působí v místě ošetření)
- Systémově působící (přijímány kořenovým systémem a následně transportovány do celé rostliny)

Klasifikace podle rozsahu účinku:

- Totální
- Širokospektré
- Selektivní

Klasifikace podle toxického a fyzikálně-chemického účinku:

- Toxikanty s fyzikálním účinkem (např. petrolej)
- Toxikanty s chemickým účinkem

## 1. 2 Obecné vlastnosti pesticidů

Pesticidy mají rozdílnou chemickou strukturu, vykazují proto rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti. Pro predikci chování reziduí pesticidů v různých systémech se využívají následující parametry:

- Rozpustnost ve vodě  
Biodegradovatelnost sloučenin závisí na jejich dobré rozpustnosti ve vodě. Organochlorové látky bývají nejméně rozpustné (od  $1,2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  až po  $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), kdežto organofosforové pesticidy bývají dobře rozpustné (až  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ).
- Rozdělovací koeficient oktanol-voda ( $K_{ow}$ )  
Vyjadřuje afinitu reziduí k tukům. Organochlorové pesticidy mají vysokou hodnotu  $K_{ow}$ , díky tomu se snadno kumulují v tukových složkách živých organismů. Látky snadno rozpustné v tucích mají hodnoty  $pK_{ow}$  vyšší než 4.

- Tlak nasycených par  
Tento tlak se využívá pro hodnocení způsobu atmosférického transportu reziduí. Nižší hodnoty tlaku nasycených par ( $1 \cdot 10^{-7}$  mPa) způsobují, že látky bývají asociovány s pevnými částicemi.
- Půdní adsorpční koeficient  $K_{oc}$   
Charakterizuje schopnost pesticidů vázat se na půdní částice. Vyšší hodnoty  $K_{oc}$  způsobují silnější vázání a tím jsou obtížněji biodegradovatelné, málo se také vypařují a uvolňují do vody.
- Biokoncentrační faktor BCF  
Vyjadřuje přechod reziduí pesticidů z vodného prostředí, a také biokoncentraci v organismu [2, 3].

### 1. 3 Nežádoucí účinky pesticidů

Účinek pesticidů, který může být škodlivý živým organismům, závisí hlavně na toxicitě aktivní látky obsažené v přípravku. Pesticidy způsobují akutní a chronickou toxicitu. Akutní toxicita je vyjádřena letální dávkou  $LD_{50}$ . Letální dávka udává množství pesticidů, při jejichž požití uhynie 50 % testovaných zvířat do 24 hodin od expozice [4].

Rozdělení pesticidů dle letální dávky:

- Extrémně nebezpečné ( $LD_{50} < 5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )
- Vysoce nebezpečné ( $LD_{50}$  od 5 do  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )
- Mírně nebezpečné ( $LD_{50}$  od 50 do  $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )
- Slabě nebezpečné ( $LD_{50} > 500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )
- Látky, které nepředstavují žádné riziko ( $LD_{50} > 2000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )

K intoxikaci dochází, když se jedovatá látka dostane do těla. Doba, po kterou působí škodlivé účinky jedu v organismu, se označuje jako expozice. Nejčastější proniknutí pesticidů do organismu člověka je přes trávicí soustavu, kožní ústrojí nebo přes dýchací cesty. Vstup dýchacími cestami je nejvíce nebezpečný, látky jsou totiž rychleji vstřebávány a tím dochází k akutní otravě [4].

Je třeba individuální postup při posuzování toxicity, protože je nutné přihlídnout k vlastnostem daného pesticidního přípravku. Některé látky, které vykazují nízkou toxicitu, se však mohou v lidském organismu kumulovat a s jejich většími koncentracemi se stávají nebezpečnými. Další látky se nelehce metabolizují, a proto mohou být více škodlivé než látky se stejnou toxicitou, které se rozkládají za vzniku neškodných látek. V některých případech mohou být škodlivé i relativně nejedovaté látky, pokud jejich rozkladem vznikají toxické produkty [5].

#### **1. 4 Bezpečné použití pesticidů**

Správné používání pesticidů je ošetřeno právními předpisy, kvůli předcházení poškození zdraví člověka a životního prostředí. Používat se smějí pouze registrované pesticidy, které se podrobují kontrolám. Údaje na štítku obalu informují o používání daného přípravku. Měly by zde být uvedeny instrukce pro bezpečné a účinné aplikace a různé rady pro ochranu člověka, zvířat a životního prostředí. Také je zde uvedeno registrační číslo, které označuje schválené pesticidy podle předpisů. Toto číslo a názvy přísad jsou důležité v případě nehody [2, 6].

Další informace na štítku obsahují:

- Účel (pesticid nesmí být použit pro jiný účel, než ten, který je uveden na štítku)
- Oprávněné osoby, které mohou pesticid používat (běžný uživatel, profesionální uživatel, průmyslový uživatel)
- Ochranné pracovní pomůcky (zda jsou třeba)
- Uvedení omezení přístupu do prostor, kde se pracuje s pesticidy
- Jak správně používat pesticidy

Dodržováním tzv. ochranných lhůt, se může zabránit otravám způsobených pesticidy. Ochranná lhůta je doba mezi posledním ošetřením rostliny pesticidním přípravkem a její sklizní, během které nastal rozklad látky. Jednotlivé pesticidy mají různě dlouhou ochrannou lhůtu, závisí na stabilitě látky a na druhu rostliny.

Chlorované pesticidy mají velkou chemickou a biochemickou stálost. Jejich použití v praxi je omezené nebo už zastavené, i když ve složkách životního prostředí jsou stále dohledatelné [2, 6].

## 1. 5 Ekonomické aspekty výroby a aplikace pesticidů

Výroba pesticidů v plném rozsahu začala po roce 1945. Velký vliv na to měly výzkumy v době světové války. Hlavní byl objev DDT, zavedení herbicidů a výroby organofosforových insekticidů [1].

Kolem roku 1950 byla hodnota výroby pesticidních přípravků ve světě přibližně 8 miliard Kč. V šedesátých letech to bylo už 24 miliard a v roce 1980, se zvýšila hodnota výroby na přibližně 140 miliard Kč [1].

Orgány WHO (World Health Organization), FAO (Food and Agriculture Organization) a Ekonomická komise pro Evropu uvádějí, že v roce 1978 bylo v Evropě vyrobeno  $1,7 \cdot 10^9$  kg pesticidních přípravků. Nejvýznamnější evropský výrobce byl Sovětský svaz s produkcí až  $0,6 \cdot 10^9$  kg. V USA bylo ve stejném roce vyrobeno  $1,3 \cdot 10^9$  kg. Odhad současné světové produkce pesticidních přípravků je  $4,5\text{--}5 \cdot 10^9$  kg za rok [1].

Z vyráběných pesticidů mají největší podíl herbicidy 42 %, poté insekticidy 33,5 % a fungicidy 19,2 %. Ostatní skupiny zaujímají 5,3 % [1].

Ekonomicky nejvýznamnější aplikace herbicidů je u obilovin. Provádí se již 30 let a zlepšuje výnosy v průměru o 300 až  $400 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ . K zvýšení sklizně u kukuřice přispělo např. zavedení triazinových herbicidů, jedná se o  $22 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ . Díky tomu byla omezena agrotechnika, což přispělo k omezení lidské práce a spotřebě pohonných hmot. U brambor jsou významné chemické zásahy proti plísni, tyto zásahy umožnily zvýšení výnosů asi o 50 % [1].

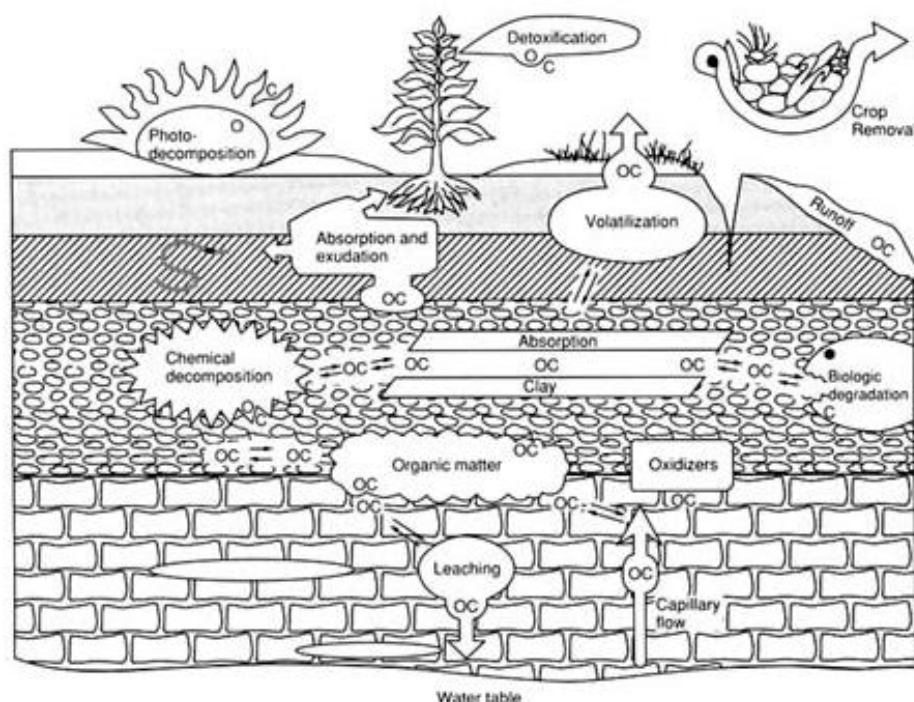
## 1. 6 Fyzikálně - chemické faktory rozpadu pesticidů

Rozklad pesticidů v prostředí (zobrazeno na obrázku 1) probíhá vlivem slunečního záření (fotolýza), teploty (odpařování), vlhkosti (hydrolýza), vzdušného kyslíku (oxidace) a mikroorganismů na povrchu rostlin či v půdě. Rychlost degradace je ovlivňována hlavně fyzikálně-chemickými faktory. Jsou-li podmínky prostředí extrémní, teprve tehdy mohou ovlivňovat rozpad pesticidů. Obsah reziduí pesticidů může také poklesnout díky tzv. „zřed'ovacímu efektu“, neboli s nárůstem biomasy během zrání plodiny, tím pádem nižší obsah pesticidů nemusí znamenat degradaci nebo eliminaci pesticidu. Místa, kde se můžeme setkat s pesticidy v prostředí, jsou voda a půda [7].

V půdě probíhá pohyb pesticidů difúzí nebo proudem vody. Voda může být transportní medium v rámci půdního tělesa, nebo může kontaminovat povrchové a podzemní vody. Sorpce a desorpce pesticidů v půdě souvisí se složením a obsahem humusu, někdy se zrnitostí půdy. Pesticidy se slabě iontovou nebo neiontovou vazbou jsou poutány hydrofobní vazbou [7].

Intenzita sorpce pesticidů v půdě je z 66 % tvořena organickou hmotou a z 23 % jílovou frakcí. Organická hmota je heterogenní, proto sorpční vlastnosti jsou ovlivňovány také její kvalitou. Sorpční kapacita půdy roste s klesajícím pH. Pokud ale je pH vodného roztoku větší než disociační konstanta pesticidu, tak dochází k jeho disociaci. Pesticid se pak vyskytuje ve formě aniontu, který je odpuzován záporným nábojem povrchu půdní částice a tím se stane mobilní v půdě [7].

Čím je rozklad či intenzita sorpce pesticidu nižší a čím vyšší je intenzita srážek (případně sklonitost terénu), tím je vyšší možnost transportu, musí se ale počítat s možnou kontaminací vod [7].



Obrázek 1 Rozklad pesticidů v prostředí [8]



## 2. VÝVOJ PESTICIDŮ

Toxikologickému výzkumu se musí podrobit všechny pesticidy před zavedením do praxe, kvůli vyhodnocení rizika pro životní prostředí a toxickému vlivu na člověka. První část výzkumu slouží k identifikaci sloučeniny, její struktury, složení a fyzikálně-chemických vlastností. Hodnotí se např. molekulové hmotnosti, teploty varu, rozpustnosti ve vodě a v tucích, sorpční koeficient v půdě, stálost a reakce v prostředí. Druhá část výzkumu obsahuje pokusy na zvířatech. Určují se tím akutní a chronická toxicita, rakovinotvorné, mutagenní a teratogenní účinky, vliv na plodnost a vliv na nervovou soustavu [5].

Nejprve se vybere skupina nových látek, o kterých se předpokládá, že by mohly mít pesticidní účinek. Následuje hledání vhodného způsobu syntézy několika představitelů. Po vyčištění a charakterizaci analytických údajů těchto chemikálií se zjistí potenciální pesticidní aktivita. V prvním testu (první screening) se použije velké množství dávky (500 ppm), tím se vytipují všechny látky, které vykazují nějaký účinek na testovaném organismu. Pokud je účinek zjištěn, opakuje se test na stejném organismu, ale s menší dávkou (200, 100 a 10 ppm). Dále probíhá řada testů, u kterých se méně aktivní látky vylučují ze sledování. V průměru, jen jedna látka ze 7 500 syntetizovaných látek, se stane komerčním pesticidem [5].

Podle pracoviště se liší metody výběru (screeningu). Obecně jsou látky testovány:

- Na významných druzích hmyzu (postřik, orální podání)
- Na fytopatogenních houbách (testy *in vitro*, *in vivo*)
- Na různých plevelech (aplikace na půdu, na list)
- Na dalších škůdcích (plži, háďátka, krysy,..)

Pokud se nějaká látka projeví jako slibná, následuje expanze testovaných organismů a započne práce chemiků. Chemici mají za úkol získat strukturní obměny původní sloučeniny a zvýšit biologickou účinnost. Zkoušení několika strukturních obdob dáva možnost najít vztah mezi účinností a strukturou, díky tomu může vzniknout účinnější pesticid. Látky, které obstojí řadu rigorózních laboratorních testů, jsou vyráběny a aplikují se různými způsoby, pro zjištění optimálního způsobu v polních podmínkách [1].

Počáteční testy jsou málo rozsáhlé a dělají se ve sklenicích. Následují malopolíčkové testy a poté velkoplošné polní pokusy (mohou probíhat za hranicemi výrobce). Konečná fáze

obsahuje testování chemikálií za akutních podmínek praktického využití státními výzkumnými zařízeními. Počet testovaných látek ve všech stupních vývoje pesticidů se zmenšuje, protože látky, které byly označeny za nevhodné, jsou z dalších testů eliminovány [1].

Od objevení vlastností chemikálie do uvedení na trh uběhne přibližně 6 let [1].

## 2. 1 Způsoby aplikace pesticidů

Použití pesticidů ve formě:

- Postřiků
- Poprašů
- Granulí
- Par
- Aerosolů
- Mořidel semen

## 2. 2 Aplikační stroje

Pro nejčastější aplikaci pesticidů se používají následující stroje:

- Hydraulické postřikovače s horizontálními rozstřikovači
- Hydraulické postřikovače s vertikálními rozstřikovači
- Velká postřikovací dmychadla pro použití v sadu a na plantážích

Větší množství použité vody a nízký tlak mají za následek, že kapky z rozstřikovače jsou větší. Hrubší postřiky se dostanou lépe k ošetřovanému povrchu než ty jemné, nebývají také snadno odváty větrem [9].

Jako transportní látka se používá nejčastěji voda. Je třeba ale vyšších tlaků, aby se postřik dokázal dostat až k vrcholům stromů v ošetřovaných sadech. Aby k tomu došlo, musí se použít postřikovač s výkonným dmychadlem, který umožňuje také aplikaci pesticidů s malým množstvím vody. Roztok či suspenze jsou pomocí rotujícího kotouče automatizovány a kapky jsou vyfukovány nahoru ke korunám stromů. Stejný princip je i u moderních přenosných rozstřikovačů, které mají uplatnění v menších zemědělstvích (aplikace kapalin v  $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ). Kapky jsou lehké, takže se s nimi dobře manipuluje. Existují postřikové aplikace pesticidů s volitelnou velikostí kapiček (např. controlled droplet

application – CDA). Tato aplikace má lepší uplatnění než ultranízkobjemové aplikace (např. ultra-low volume application – ULVA). Pro cílový objekt (hmyz, houba, plevel) zvolíme optimální rozměr kapiček [9, 10].

Herbicidy, které nemusí být zanášeny větrem, mají mít rozměr kapiček v postřiku 300  $\mu\text{m}$  při dávce 15  $\text{l}\cdot\text{ha}^{-1}$ , zatímco ochrana před moskyty si vyžaduje rozměr 20  $\mu\text{m}$  při 5  $\text{ml}\cdot\text{ha}^{-1}$ . Je žádoucí zachycení co největšího množství kapiček postřiku, závisí to ale na charakteru rostlin. Menší kapičky se zachycují snáze, proto se u obilovin dávkované množství pohybuje kolem 450  $\text{l}\cdot\text{ha}^{-1}$  [9, 10].

Použití pesticidních přípravků uvnitř budov vyžaduje jejich zvláštní formu. Využívá se fumigantních látek, které slouží také ke sterilizaci půdy. V několika případech je vhodné najít rovnováhu mezi rozpustností pesticidu v oleji a ve vodě. Prodloužení délky alkylového řetězce zvýší rozpustnost v olejích a lipidech [9].

## **2. 3 Způsob účinku pesticidů**

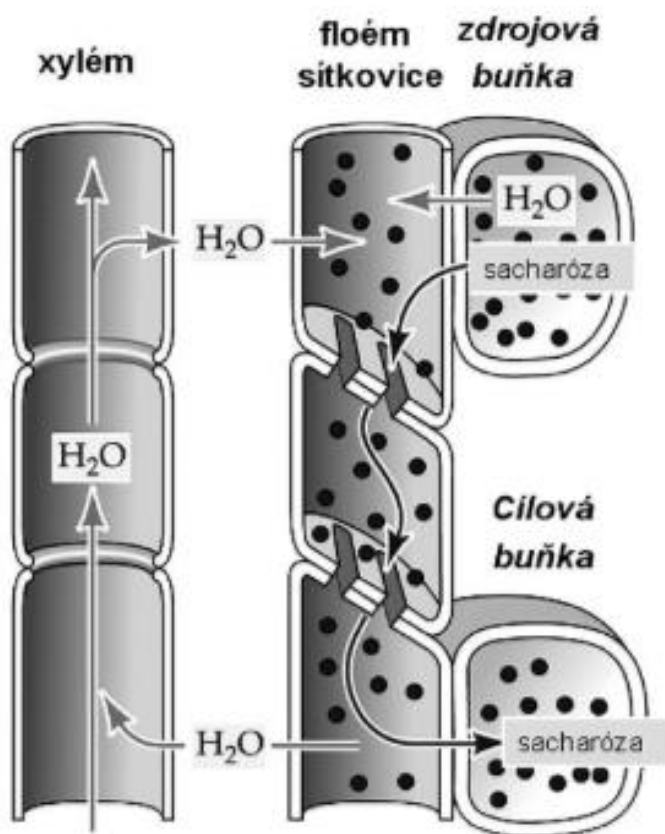
Účinný pesticid proniká do organismu na místo účinku. Stejný princip platí pro fungicidy, kde účinná látka proniká do vnitřních spor hub. Insekticidy pronikají kutikulou hmyzu a herbicidy povrchem rostlin [9, 11].

V rostlině probíhá translokace látek v následujících stupních:

1. Látka vstoupí do prostoru vnitřní tkáně. Roztoky a voda pronikají přes povrch listu do prostoru, jedná se o tu část rostliny, která komunikuje s okolím difuzí. Povrchová tkáň kontroluje odevzdání vody okolních prostor a umožňuje organickým molekulám vstoupit do rostlin ve formě roztoků (ale většina látek vstupuje vlasečnicemi kořenů). Z povrchu listu do prostoru uvnitř listu probíhá difuze vodného postřiku do doby, než se vypaří kapalný film. Příjem látek lze navýšit zvlhčovačem (např. glycerolem), pokud je limitujícím faktorem pro tento příjem rychlost odpařování filmu.
2. Látka se transportuje v xylému. Xylémová tkáň má v sobě vodní cesty (zobrazeno na obrázku 2), které mohou komunikovat s okolním prostředím volnou difuzí. Velká část vody a minerálů je transportována k listům od kořenů přes neživý xylém.

3. Látka je transportována ve floému, který se uskutečňuje v živé části buňky. Na rozdíl od transportu v xylému, se v transportu ve floému využívá metabolická energie.

Látky, které postoupily do xylému listu, pokračují do tkání rostlin přes floém [9, 11].



Obrázek 2 Xylémová cesta [12]

## **3. REZIDUA PESTICIDŮ**

### **3. 1 Rizika reziduí pesticidů**

Jedná se o zbytková množství pesticidů, metabolitů pesticidů a reakčních nebo rozkladných produktů [1].

Rezidui mohou být zasaženy nejen cílové kategorie, jako např. rostliny, ale i necílové organismy, včetně lidí. Vstup pesticidu do organismu člověka může být inhalační, dermální nebo orální cestou. Negativní účinek ovlivňuje dávka, absorpce, distribuce a metabolismus. K člověku si nejčastěji pesticidy najdou cestu přes potraviny. Do těchto potravin se pesticidy dostanou:

- Ošetřením během růstu (Úmyslně)
- Postřikem po sklizni (Úmyslně)
- Postřikem importované rostliny (Úmyslně)
- Zakázanými pesticidy z okolního prostředí (Neúmyslně)

Rezidua pesticidů mají na člověka akutní nebo chronický účinek. Chronické expozice vycházejí ze součtu průměrných hladin rezidua v potravinech nebo vycházejí z průměrné denní spotřeby potraviny [1].

### **3. 2 Monitoring reziduí pesticidů**

V současné době se monitoring provádí na více jak 120 druzích účinných látek. Každý rok se zveřejňuje doporučení Evropskou komisí, které pesticidy se mají kontrolovat. Dle toho doporučení připraví Státní zemědělská a potravinářská inspekce plán monitoringu. Do tohoto plánu se zařazují komodity s vysokou frekvencí pozitivních nálezů [13, 14].

Pro stanovení reziduí se používají metody multireziduální, či jednoúčelové. Multireziduální metody umožňují stanovení až stovek pesticidů najednou. Metody jednoúčelové využívají stanovení maximálně tří látek. Tyto metody jsou nejčastěji založené na chromatografickém stanovení [13, 14].

### 3. 3 Maximální limity reziduí pesticidů

Maximální limit reziduí (MLR) pesticidů udává maximální legální limit reziduí. Jedná se o nejvyšší přípustné, toxikologicky přijatelné množství pesticidů (vyjádřené v  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). MLR je výsledkem použití pesticidních přípravků v souladu se správnou zemědělskou praxí, při ochraně rostlin během vegetace a skladování. Také mohou hodnoty MLR být výsledkem kontaminace životního prostředí dnes již nepoužívanými pesticidy [15].

Maximální limity reziduí jsou spíše pro kontrolu dodržení předpisů. Zdraví člověka není neohroženo mírným překročením MLR, ale až při vysokém překročení maximálního limitu reziduí [15].

U peckovin je například MLR pro pesticidy alpha-cypermethrin (suma izomérů) a amitrazu (směs amitrazu a N-(2,4-dimethyl-phenyl)-N-methyl-formamidinu) kolem  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Pesticid bitertanol má hodnotu MRL v peckovinách  $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Bromopropylate zase hodnotu  $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  v peckovinách [16].

U dithiokarbamatů (vyjádřené jako  $\text{CS}_2$ , včetně manebu, zinebu, thiramu a propinebu) je hodnota MLR pro slivoně, meruňky, třešně a broskve  $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  [17].

## 4. DITHIOKARBAMÁTY A JEJICH DERIVÁTY

Dithiokarbamáty jsou skupinou organických fungicidů, které se používají k ochraně před rostlinnými chorobami. Reprezentují široce používanou skupinu kontaktních (tj. nesystémových) pesticidů. Existuje asi 15 sloučenin, nejčastěji využívané u nás jsou nabam, thiram, mankozeb a propineb. O zavedení se zasloužily Tisdale a Williams v roce 1934. Nejdůležitější deriváty jsou odvozeny od dimethyldithiokarbamové kyseliny, jiné alkyl skupiny fungitoxicitu snižují. Využívají se v zemědělství k potlačení houbových chorob u ovoce a zeleniny (vinná réva, rajčata, listová zelenina, banánovníky), v domácí chemii, v průmyslu (při výrobě neoprenů, při vulkanizaci gumy) [9, 18].

Podle substituce na atomech síry se rozdělují na:

- Alifatické
- Aromatické
- Alifaticko-aromatické

Alifatické DTC lze dělit podle uhlíkového skeletu na:

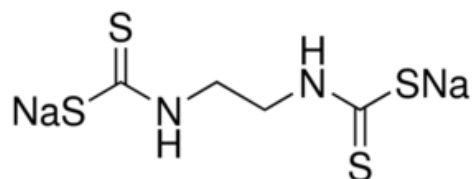
- Dimethyldithiokarbamáty (DMD)
- Ethylenbisdithiokarbamáty (EBD)
- Propylenbisdithiokarbamáty (PBD)

Většinou se jedná o komplexy s přechodnými kovy (Mn, Zn, Cu.), které jsou obtížně rozpustné a málo stabilní v kyselém prostředí (tj. pak i v přítomnosti rostlinné matrice).

DTC pak degradují přes kyselinu až na sirouhlík. Proto také není vhodné např. vzorky ovoce před analýzou homogenizovat mixováním apod. A z tohoto důvodu degradace se také obsah DTC v potravinách či obilninách uvádí v  $\text{mg CS}_2 \cdot \text{kg}^{-1}$ .

## 4. 1 Nabam

Nabamem nazýváme disodnou sůl ethylenbis(dithiokarbamové) kyseliny, jejíž vzorec je zobrazen na obrázku 3. Nabam má fungicidní účinky. Používá se proti kazům kořenů révy. Má sklon k fytotoxicitě jako listový fungicid. Za deště bývá málo perzistentní, proto je nejčastěji nahrazen nerozpustnými manganatými a zinečnatými solemi (maneb a zineb), které jsou pro savce málo toxické, pro krysy je hodnota  $LD_{50}$  kolem  $7000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  [13].

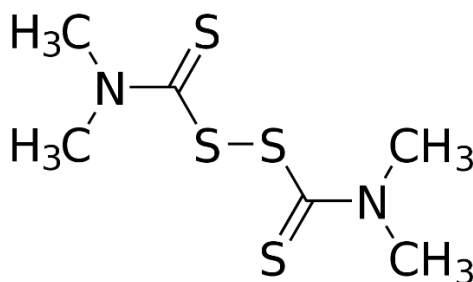


Obrázek 3 Vzorec nabamu [19]

## 4. 2 Thiram

Thiramem nazýváme tetramethylthiuramdisulfid, či bis(dimethylthiokarbamoyl)disulfid. Vzorec thiramu je znázorněn na obrázku 4 a jeho metabolismus na rostlinách je zobrazen na obrázku 5. Vykazuje fungicidní účinky [15].

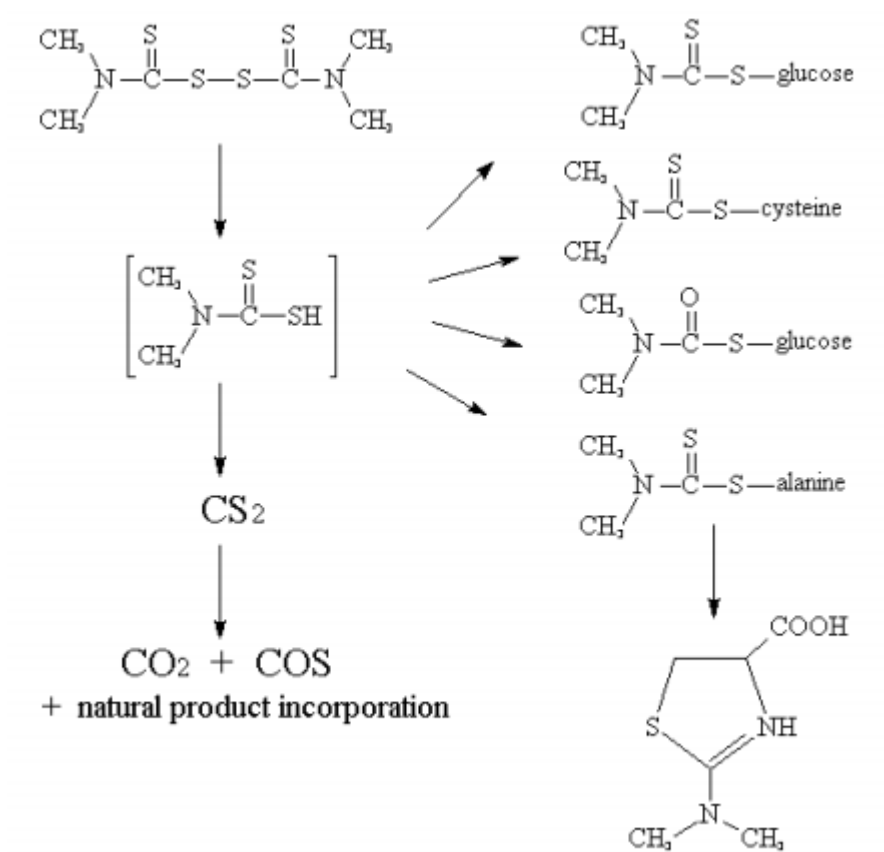
Příprava thiramu se provádí reakcí sirouhlíku s dimethylaminem za přítomnosti roztoku hydroxidu sodného, následně probíhá oxidace výsledné sodné soli dithiokarbamové kyseliny vzduchem,  $\text{NO}_x$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{Cl}_2$  či  $\text{I}_2$  [15].



Obrázek 4 Vzorec thiramu [20]



Thiram je obsažen v přípravcích Pellacol, Stopkus, Thiram Granuflo, Vitavax 2000. Thiram Granuflo (aplikace tohoto přípravku jsou uvedeny v tabulce 1) je kontaktní fungicid s velmi dobrou účinností proti strupovitosti jabloně, plísní šedé na vinné révě a kadeřavosti broskvoně [15].



Obrázek 5 Metabolismus thiramu [21]

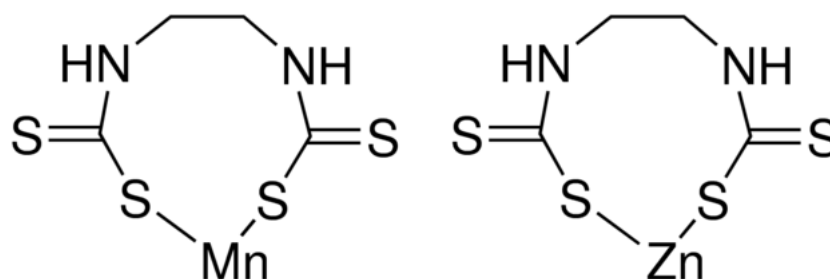
**Tabulka 1 Aplikace pro Thiram Granuflo [15]**

Plodina	Choroba	Termín aplikace	Dávka [kg]*	Postřiková kapalina [l]*
Broskvoň	Kadeřavost	na podzim po opadu listu	3	200-1000
Hrušeň	Strupovitost	do fáze zeleného pupene	3	200-1000
Hrušeň	Skvrnitost	do fáze zeleného pupene	3	200-1000
Jabloň	Strupovitost	preventivně od fáze zeleného pupene	3	300-1000
Vinná réva	Plíseň šedá	výjimečně ve fázi dokvétání	3 až 4	200-1000

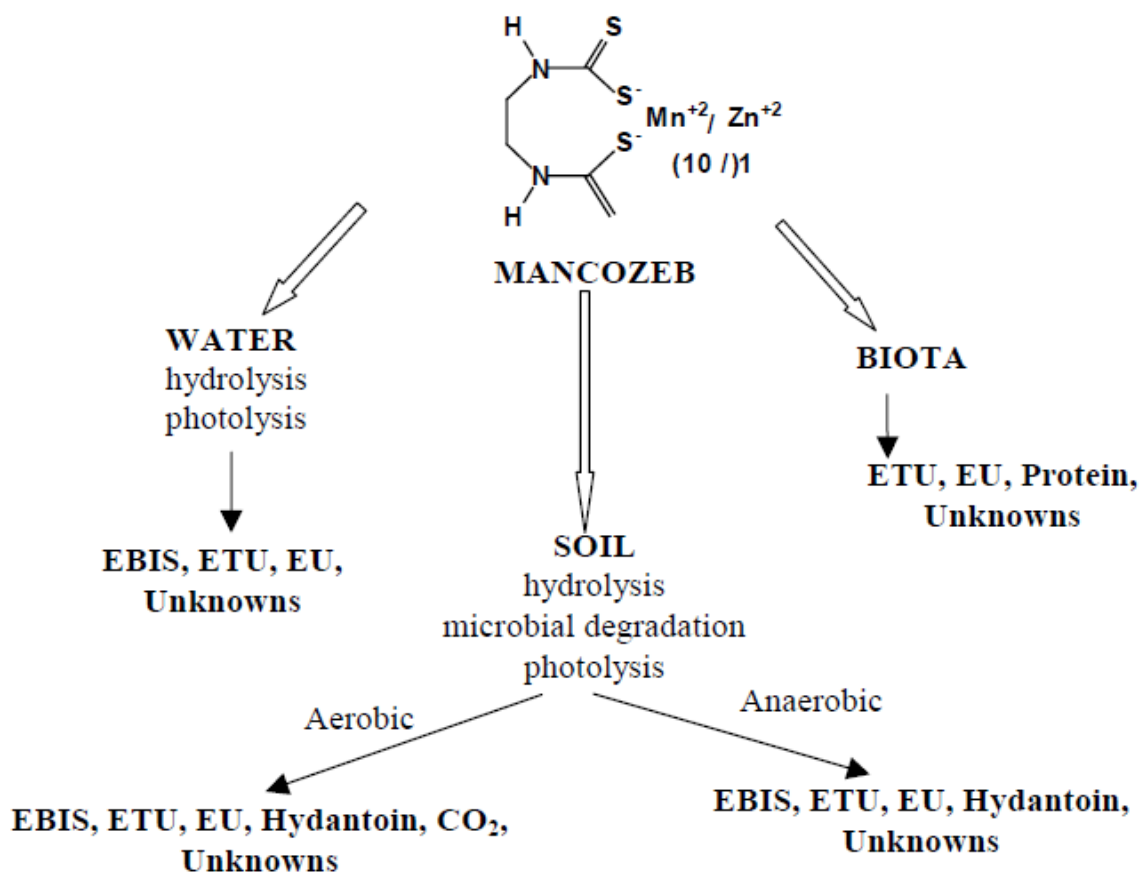
\*Jednotky hmotnosti a objemu jsou vztaženy na jednotku plochy 1 ha.

### 4. 3 Mankozeb

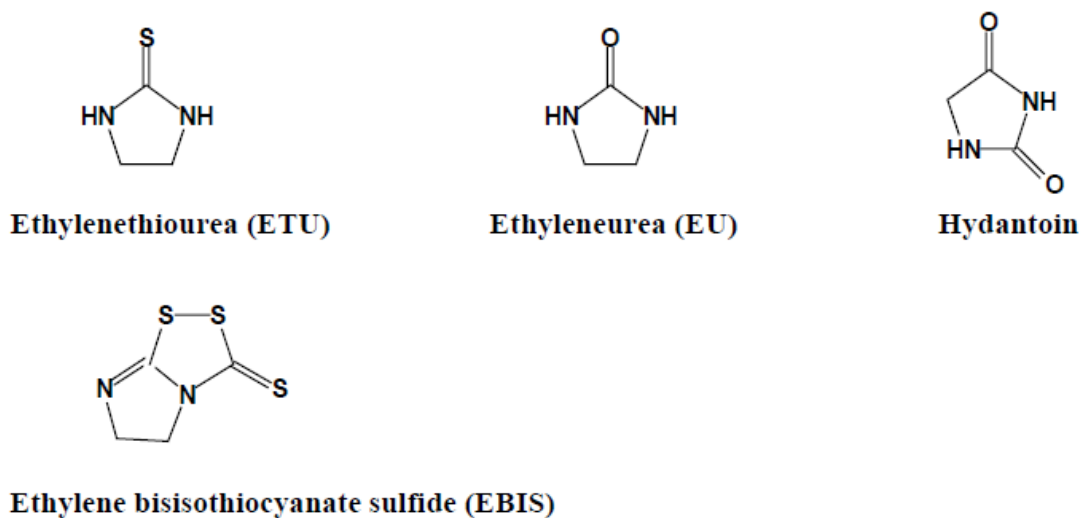
Jedná se o N,N'-ethylenbis(dithiokarbamat), který je znázorněn na obrázku 6. Mankozeb je polymerní manganato-zinečnatý komplex s fungicidním účinkem. Tato sloučenina má zanedbatelný tlak par, proto má malý potenciál dostat se do ovzduší. Ve vodě se může rychle hydrolyzovat s poločasem rozpadu kratším než dva dny. Hydrolyzou degraduje na ethylenthioamocovinu, ethylenmočovinu a ethylenbisisothiokyanát-sulfid (znázorněno na obrázku 7). V aerobních podmínkách se metabolity (znázorněny na obrázku 8) dále rozkládají a vytvářejí CO<sub>2</sub>. Mankozeb se mírně váže na půdy s hodnotami adsorpčního koeficientu (K<sub>d</sub>) od 7 do 12 cm<sup>3</sup>·g<sup>-1</sup>. Sloučenina má středně mobilní potenciál v půdách, ale vzhledem k relativně vysoké míře chemické a mikrobiální degradace není pravděpodobné, že by se dostala do podzemních vod [15, 22].



**Obrázek 6 Vzorec mankozebu [23]**



Obrázek 7 Metabolismus mankozebu [22]



Obrázek 8 Metabolity mankozebu [22]

Mankozeb slouží k ochraně polních plodin, zeleniny, ovocných dřevin a okrasných rostlin před listovými skvrnitostmi a puchrovitostí. Tato sloučenina je obsažena v přípravcích Criterium, Drago, Nautila WP, Dithane DG Neo-Tec a Palmas. Pro přípravek Dithane DG Neo-Tec jsou uvedeny aplikace v tabulce 2 [15].

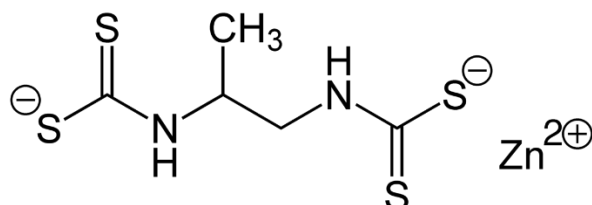
**Tabulka 2 Aplikace pro přípravek Dithane DG Neo-Tec [15]**

Plodina	Choroba	Termín aplikace	Dávka [kg]*
Broskvoň	Suché listy	Kdykoliv	2
Meruňka	Suché listy	Kdykoliv	2
Slivoň	Puchrovitost	Při rašení	2

\*Jednotky hmotnosti jsou vztaženy na 1 ha půdy.

#### 4. 4 Propineb

Sumární vzorec propinebu je  $(C_5H_8N_2S_4Zn)_x$ , na obrázku 9 je jeho strukturní vzorec. Jedná se o fungicid aplikovaný zejména na ovocné stromy, vinnou révu a některé druhy zeleniny. Metabolismus propinebu je znázorněn na obrázku 10. Kvůli slunečnímu záření podléhá v prostředí rychlému rozkladu. Jeho rezidua dráždí oči a kůži, může vyvolávat alergické reakce. Ukládá se ve štítné žláze a u zvířat má negativní účinek na plicní tkáň. Může být toxický pro vodní organismy, ale navzdory všem negativním účinkům je netoxický pro ptáky a včely. Akutní toxicita orální  $LD_{50}$  pro krysy je víc než  $5000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  [15, 24].



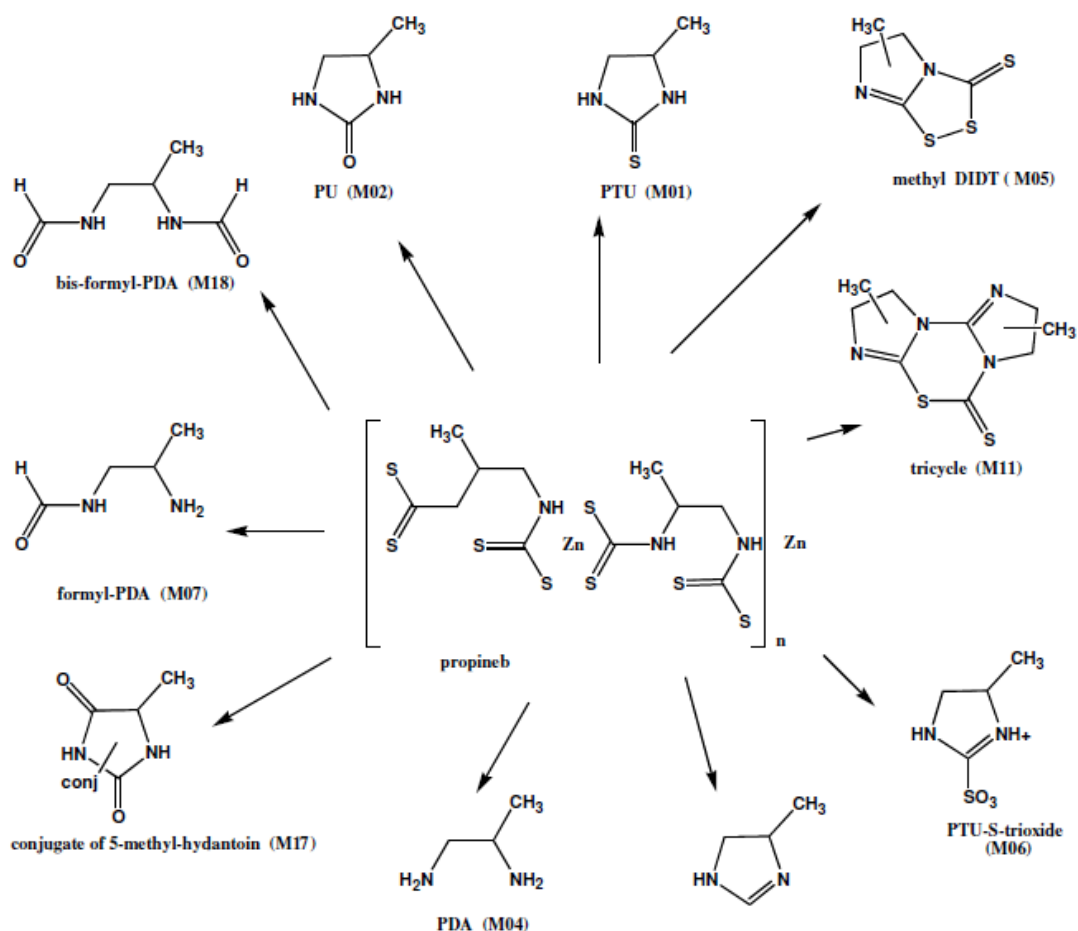
**Obrázek 9 Vzorec propinebu [25]**

Přípravek, ve kterém je tato látka obsažena je Antre 70 WG, který se používá pro ochranu rajčat, višňí a třešňí před skvrnitostí listu a strupovitostí peckovin. Aplikace pro tento přípravek jsou uvedeny v tabulce 3 [15].

**Tabulka 3 Aplikace pro přípravek Antre 70 WG [15]**

Plodina	Choroba	Termín aplikace	Dávka [kg]*	Postřiková kapalina [l]*
Rajče	Hnědá skvrnitost	na počátku infekce	2,25	600-1000
Třešeň	Skvrnitost listu	při prvních příznacích choroby	2,25	300-1000
Višeň	Strupovitost peckovin	při prvních příznacích choroby	2,25	300-1000

\*Jednotky hmotnosti a objemu vztaženy na 1 ha půdy.



**Obrázek 10 Metabolická cesta propinebu v rostlině [24]**

## 5. ANALÝZA REZIDUÍ PESTICIDŮ

Postupy stanovení reziduí pesticidů se skládají ze tří základních kroků:

- Izolace analytů z matrice.  
Nejběžnější izolace reziduí je jejich extrakce pomocí organického rozpouštědla. Volba tohoto rozpouštědla závisí na obsahu lipidů a vlhkosti ve vzorku a polaritě rezidua. Při vysokém obsahu vody se uplatňují polární rozpouštědla (aceton, methanol, acetonitril). V tomto případě jsou rezidua v následném kroku převedena do nepolárního rozpouštědla (reextrakce). Během tohoto postupu dochází k eliminaci hydrofilních koextraktů nacházejících se v primárním extraktu (zůstávají ve vodné fázi) [26, 27].
- Odstranění přirozených komponent vzorku koizolovaných spolu s analyty.  
Nejběžnějšími koextrakty jsou různé typy pigmentů, lipidické sloučeniny, silice, pryskyřice atd. Frakcionací nazýváme oddělení těchto látek od analytu. Frakcionace se provádí adsorpční chromatografií na silikagelu či oxidu hlinitém. Předpoklad úspěšného oddělení je různá polarita koextraktu a silikagelu [26, 27].
- Vlastní identifikace a následná kvantifikace analytů.  
Nejčastěji se pro stanovení používá plynová chromatografie, kde se využívá stanovení dithiokarbamátů jako  $CS_2$  v kyselém prostředí. U polárních sloučenin se využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC, u LC metod jsou dithiokarbamáty stanovovány v podobě aniontů [26, 27].

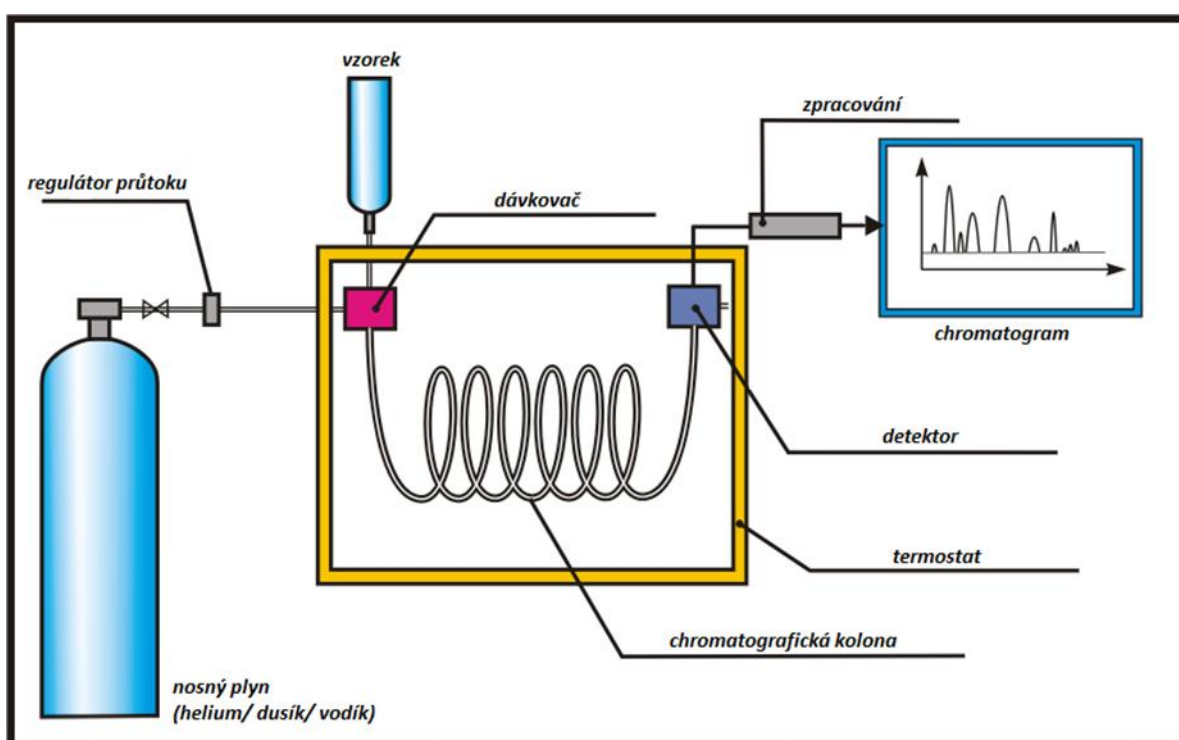
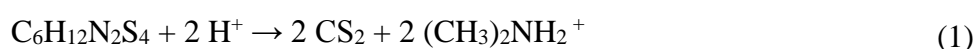
### 5. 1 Metody stanovení reziduí pesticidů

#### 5. 1. 1 GC metody

Plynová chromatografie (viz. Obrázek 11) slouží pro separaci látek mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, tj. fáze mobilní (pohyblivá) a stacionární (nepohyblivá). Mobilní fází je tzv. nosný plyn (nejčastěji dusík nebo helium). Oproti kapalinové chromatografii má větší separační účinnost, selektivitu a citlivost [2, 28].

Rezidua dithiokarbamatových fungicidů bývají na povrchu vzorku a ve vodném prostředí můžou být náchylná k rozkladu. Vysoké teploty též mohou způsobit rozklad. Z těchto důvodů se vzorky analyzují nehomogenizované. Menší plody se mohou analyzovat celé, ty větší se musí tzv. zmenšit, třeba rozkrojením na menší kusy, které se dají do reakční nádoby, kde probíhá katalytický rozklad dithiokarbamatů. Obsah CS<sub>2</sub>, který chceme kvantifikovat, probíhá na externí kalibraci. Kalibrace je připravena přidavky definovaných hladin standardu thiramu k matici slepého vzorku [28].

Rozklad thiramu na CS<sub>2</sub> probíhá podle rovnice (1):



Obrázek 11 Schéma plynové chromatografie [29]

### 5. 1. 1. 1 Příprava vzorků

Analýza vzorků nejlépe probíhá, když jsou ještě čerstvé, tj. ihned po dodání do laboratoře. Pokud je nutné skladování, tak nejlépe při teplotě nižší než  $-18\text{ °C}$  [30].

Vzorky, které mají nízký obsah vody, se homogenizují třeba přidávkem kapalného  $\text{N}_2$  nebo suchého ledu. Je třeba dbát na to, aby se zamrazený vzorek zbytečně nerozmrazil [30].

Jedna z možností přípravy vzorku spočívá v navážení 1–3 g vzorku do 20 ml HS vialky, přidají se 2 ml vody a 6 ml činidla ( $\text{SnCl}_2$  ve 4,5 M  $\text{HCl}$ ). Vialka se musí ihned uzavřít, aby byla vzduchotěsná, pak se umístí do vyhřívaného prostoru agitátoru v HS jednotce. Vzorky se třepou po dobu 60 min při  $80\text{ °C}$ , během této doby by se mělo průběžně se vzorky třepat. Po 60 min se vialky musí přenést do podavače na automatizovaný nástřík. Z vytemperované vialky na  $40\text{ °C}$  se provede nástřík  $500\ \mu\text{l}$  plynné fáze nad vzorkem [30, 31].

Další možností přípravy vzorku je, že 50 g vzorku se naváží do 250 ml reakční nádoby, přidá se 25 ml isooktanu a 150 ml činidla ( $\text{SnCl}_2$  ve 4,5 M  $\text{HCl}$ ). Lahev se uzavře, aby se do ní nedostal vzduch, protřepe se a následně se vloží do sušárny po dobu 2 h při  $80\text{ °C}$ . Každou půl hodinu se lahev se vzorkem musí protřepat, protože celý vzorek by se měl nacházet v činidle. Po uplynutí reakční doby se vzorek odebere ze sušárny a nechá se vychladnout na  $25\text{ °C}$ . Z horní izooktanové vrstvy se odebere 1,8 ml podílu do 2 ml vialky. Šroubovací víčko se musí pevně uzavřít a vzorek je připraven na analýzu [30, 31].

### 5. 1. 1. 2 Metoda GC-MS

GC-MS je zkratka pro Gas Chromatograph/Mass Spectrometr, tj. plynový chromatograf s hmotnostní spektrometrií [2, 30, 32].

Dithiokarbamáty se stanovují jako sirouhlík, rozkládají se v kyselém prostředí za katalytického působení  $\text{Sn}^{2+}$  a  $\text{CS}_2$  pomocí GC–MS po nástříku z plynné fáze [28].

Princip metody je založen na aplikaci vzorku, který obsahuje analyt do vyhřívaného injektoru, kde dochází k odpaření. Látky, které se stanovují, musí být těkavé, aby mohly přejít do plynného skupenství. Bod varu nesmí být vyšší než  $360\text{ °C}$ . Molekuly vzorku jsou unášeny tzv. nosným plynem (mobilní fází) do kolony. V koloně se analyt sorbuje stacionární fází, buď se rozpustí, nebo se adsorbuje na pevném sorbentu. Z kolony pak vystupují separované



látky do detektoru. Signál detektoru odpovídá změnám koncentrace separovaných látek [28, 30, 32].

### **5. 1. 1. 3 GC-ECD stanovení**

Stanovení obsahu reziduí dithiokarbamátů probíhá pomocí plynové chromatografie s detektorem elektronového záchytu. Při průchodu molekul v blízkosti detektoru dojde k záchytu elektronů ze vzorku, to způsobí snížení proudu. Vzorky se nejprve zhomogenizují a oddělí se kvartací 0,5 kg homogenitu, ze kterého se pak navažuje na extrakci. Vzorky jsou extrahovány ethylacetátem pomocí vysokoobrátkového homogenizátoru Ultra Turrax [5, 32].

### **5. 3. 2 LC metody**

LC metody se provádí kolonovým uspořádáním, kde uplatňuje lineární oblast adsorpční izoterm. Jednorázově se zavádí směs s kontinuálním tokem. Princip separace je založen na různé afinitě ke stacionární fázi a různé distribuci mezi mobilní a stacionární fází. U LC metod se dithiokarbamáty stanovují ve formě aniontů, které vznikají po alkalickém působení v přítomnosti komplexního činidla (EDTA). Pokud jde o požadavky, pouze LC - MS metody jsou dostatečně selektivní a citlivé [33].

### **5. 2. 2. 1 Multireziduální LC-MS metoda**

Jedná se o kapalinovou chromatografii s hmotnostní detekcí. Principem této metody je, že vzorky jsou zhomogenizovány a následně je 0,5 kg homogenátu odděleno kvartací. Homogenát je pak navažován na extrakci. Navážky vzorku jsou extrahovány acetonitrilem. Extrakty vzorku se zfiltrují a dále jsou odpařeny (např. na rotační vakuové odparce), nakonec jsou převedeny do methanolu. Jednotlivé pesticidy se identifikují pomocí tandemového hmotnostního spektrometru. K oddělení a separaci matrice a pesticidů se používá reverzní kolona C-18. Mobilní fází zde je methanol (0,01M) a octan amonný ve vodě. Kalibrační metody využívají standardy matrice pro kompenzaci nežádoucích efektů matrice [5].

Pomocí LC-elektrosprejové ionizace (ESI) - MS probíhá příprava a derivatizace vzorku pomocí methyljodidu na koloně C-18 v režimu s negativním iontem. Touto metodou se určuje zineb, maneb a mancozeb [32, 33].

Pomocí LC se za atmosférického tlaku v režimu pozitivních iontů stanovuje ziram rozpuštěný v chloroformu (2 až 20 mg·l<sup>-1</sup>). Touto metodou se stanovuje i neutrální dithiokarbamáty (thiram) v rostlinách. Po homogenizaci vzorku se provede eluce směsí dichlormethan/methanol v koloně pomocí matrice s pevnou fází. Thiram nemůžeme stanovovat z vysoce kyselého ovoce [32].

### **5. 2. 2. 2 Kapalinová chromatografie s fotometrií**

Tato metoda je vhodná pro stanovení manebu, zinebu, mankozebu a propinebu v ovoci a zelenině. Extrakce probíhá na povrchu vzorku vodným EDTA roztokem a separace na koloně Sephadex LH-20 s 0,1 M EDTA jako elučním činidlem. Tato metoda byla přijata jako oficiální metoda (tj. metoda DFG S 21, zavedená v roce 1987 německou výzkumnou nadací pro analýzu ethyl a propyl(bisdithiokarbamátu). Thiram, ziram a zineb se určují pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí (HPLC-UV) na koloně s reverzní fází (Nucleosil RP-18) po dvou samostatných extrakčních technikách. Thiram je extrahován chloroformem a přímo nastříkovan na HPLC. Zineb a ziram jsou extrahovány z povrchu plodin vodným alkalickým roztokem EDTA/cysteinu; následně jsou extrahovány anionty dithiokarbamátoů do organického rozpouštědla jako iontové páry s tetrabutylamoniem sulfátem a jsou derivatizovány methylovou skupinou jodidu v jednom kroku [32, 33].

Stanovení zinebu a manebu v půdě, jablku a salátu po extrakci vodným alkalickým roztokem EDTA s následnou separací na koloně C18. Samostatný průběh je stanoven ve vzorcích po extrakci dichlormethanem za použití sloupce s obrácenou fází a s komplexací na sloupci s Cu<sup>2+</sup> [33].

Stanovení ziramových zbytků na špenátu probíhá pomocí LC za použití vodného roztoku obsahujícího 1 mM EDTA a 10 mM tetrabutylammoniumchloridu jako elučního činidla.

Metoda byla publikována firmou Atienza. Autoři zkoušeli dva různé extrakční postupy pro lyofilizované vzorky:

- Roztok methanolu/vodného roztoku EDTA a následně rozdělení kapaliny a kapaliny s čistým hexanem.
- Nadkritický oxid uhličitý obsahující methanol jako organický modifikátor.

Výtěžky získané z extrakce s oxidem uhličitým byly obecně nižší než ty s roztokem methanolu [32, 33].

### **5. 2. 2. 3 LC s detekcí chemiluminiscence**

Metoda spočívá v aplikaci iontového páru pomocí LC s detekcí chemiluminiscence např. v okurkách a jablkách. Extrahují se vzorky rozřezané na malé kousky s vodným pufrem obsahujícím 10 mM tetrabutylammonium hydrogen sulfátu, EDTA, hydrogenfosforečnanu sodného a 0,1 % tri-(2-karboxyethyl)fosfinu jako stabilizátor pro dithiokarbamáty. Výsledky metody ve výtěžcích 88-109 % u okurky a jablka se nacházejí v rozmezí od 1 do 10 mg·kg<sup>-1</sup> [32, 33].

### **5. 2. 2. 4 LC s UV a elektrochemická detekce**

LC s UV a elektrochemická detekce je rychlá metoda pro stanovení dithiokarbamátů (ziram, maneb, zineb, mankozeb a propineb). Extrakce probíhá za použití vodného extrakčního pufru (pH 11,0) obsahujícího tetrabutylammoniumhydrogensulfát, EDTA a hydrogenfosforečnan sodný. Pro stabilizaci dithiokarbamátů se používá hydrogensířičitan sodný (1 g·l<sup>-1</sup>), který se přidá do extrakčního pufru před použitím. Během gelové chromatografie, která zde slouží k předčištění, se dithiokarbamáty oddělují např. pomocí kolony Supelcogel ODP-50 (C18-polyvinylalkoholu) za použití methanolu jako extrakčního činidla. Validace metody pro různé druhy ovoce a zeleniny vedlo k nárůstu o 72-111 % [32].

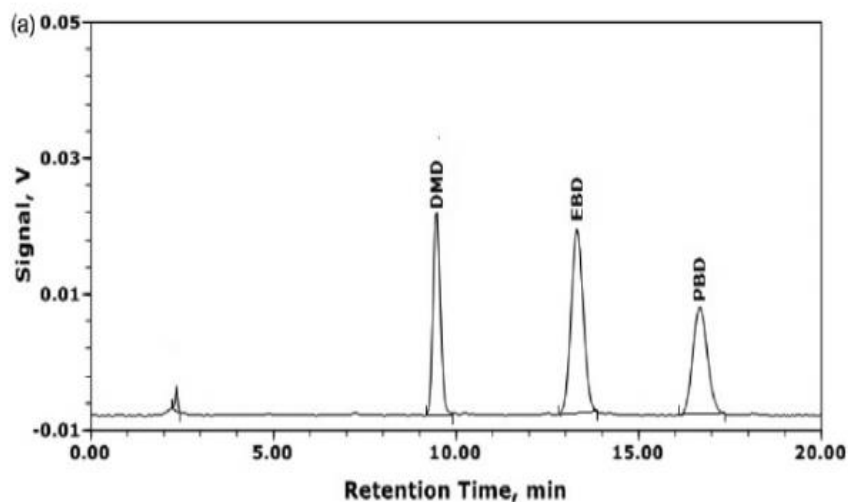
Metoda s použitím nové alkalicky stabilní obrácené fáze (XTerra RP18) zvyšuje stabilitu DTC v extraktech alkalických vzorků přidáním cysteinu. Výtěžek se pohybuje kolem 93 – 120 %. Thiram se může stanovovat stejnou chromatografií. Odděluje se extrakcí pufrem

obsahujícím siřičitan. Thiram se stanovuje z okurek 0,05 až 0,5 mg CS<sub>2</sub>·kg<sup>-1</sup> s účinností v rozmezí 78-91 % [32].

### 5. 2. 2. 5 HPLC-UV pro stanovení thiramu a thiomčoviny

Tato metoda se využívá pro stanovení thiramu a thiomčoviny v zrnech pšenice ošetřených komerčním fungicidem (Thiram 75 WP). Po extrakci drceného vzorku chloroformem, filtraci a odpaření extraktů se zbytky rozpustí v acetonitrilu a oddělí se na koloně C18 s acetonitrilem/vodou jako elučním činidlem. Z pšeničného zrna, na kterém je navázaný thiram, máme rozsah 0,2-0,8 mg·kg<sup>-1</sup>, výtěžky bývají kolem 90-99 % [32].

Maneb a jeho hlavní metabolity (ethylthiomčovina, ethylenbissulfid (EBIS) a ethylenmočovina) se stanovuje z rajčat, která jsou nakrájena a extrahována pomocí směsi acetonitrilu, dichlormethanu a chloroformu. Analýza se provádí obrácenou fází sloupce s acetonitrilem, methanolem a 100 mM vodným dodecylsíránem sodným. Chromatografický záznam této metody je zobrazen na obrázku 12 [32, 33].

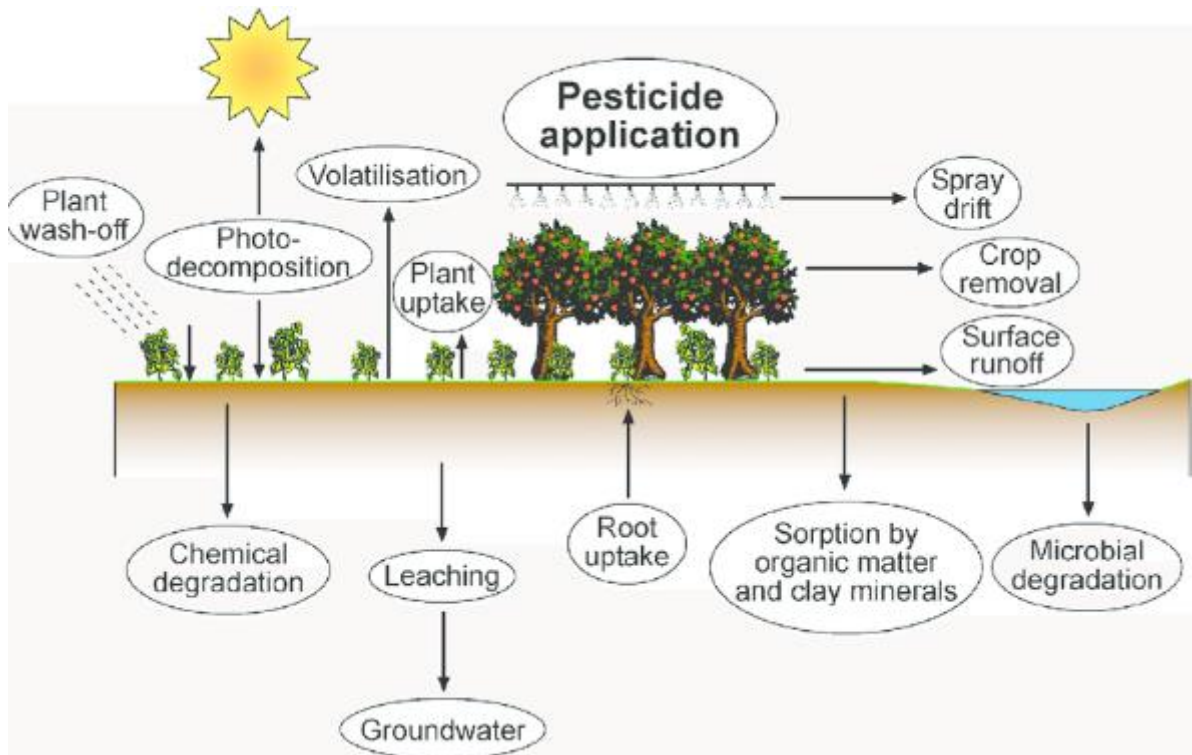


Obrázek 12 Chromatografický záznam pro HPLC-UV [34]

## 6. Environmentální aspekty a dopady pesticidů

### 6.1 Environmentální aspekty

Znečištění a zatížení životního prostředí pesticidy je způsobeno jejich aplikací na rostliny a půdu. Jejich osud v prostředí je zobrazen na obrázku 13 [35, 36].



Obrázek 13 Osud pesticidů v prostředí [37]

Při aplikaci je dávka pesticidu rozdělena mezi rostlinu a půdu, ztráty způsobené úletem při aplikaci postřikem mohou činit 10-30 %, letecky mohou být ztráty až 50 %. Do atmosféry se pesticidy dostávají výparem, až 80 %. Jedná se o největší procentuální ztráty do životního prostředí. Do půdy se ztráty pesticidů dostávají průsakem. Splavování pesticidů do povrchových vod je kolem 2 % [35, 36].

V půdě jsou pesticidy nejčastěji degradovány mikroorganismy nebo se absorbují (chemisorpce). Mohou se ale i vázat na minerální a organické složky v půdním prostředí a následně se mohou vodou zředit a vypařit. Velkou roli hrají kořeny rostlin, které vstřebávají tyto látky [35, 36].

Degradace pesticidů jsou závislé na teplotě a vlhkosti - při vyšších hodnotách se degradace zrychluje. Úplná degradace je stav, kdy je pesticid rozložen na oxid uhličitý, metan, minerální látky a humus [35, 36].

Do vodního prostředí se pesticidy dostávají smyvem např. z povrchu listu a dále mohou pokračovat splavem a průsakem do povrchových a podzemních vod. Průsaky jsou ovlivněny množstvím a frekvencí srážek. Pesticidy aplikované na velkých plochách vlivem prudkých dešťů splavou do řek a rybníků [17].

V ovzduší se nacházejí pesticidy, které se vypařily po aplikaci na rostliny či půdu. Pesticidy se v atmosféře rozkládají, probíhá jejich distribuce a nakonec se ukládají na místech, kde nebyly původně aplikovány [35, 36].

## **8. 2 Environmentální dopady**

Účinky pesticidů na životní prostředí mohou být nepříznivé, například pesticidní přípravek může účinkovat víc na likvidátory škůdce a samotný škůdce nemusí být zasažen. Škůdce může zvyšovat produkci svého potomstva (vznik rezistentní populace) a dochází k jeho přemnožení [38, 39].

Vlivem pesticidů v prostředí může docházet k patologickým vlivům na zvířata, konkrétně ke změnám na potomstvu, snížení plodnosti u zvířat a zvýšení karcinogenity [38, 39].

Pokud se zvýší toxicita prostředí, způsobí perzistenci pesticidů v půdě. Pesticidy se mohou přeměnit v látky, které mohou být více toxické než původní látka. Vodou se tyto látky mohou dostat na místa, kde nebyly pesticidy použity [38, 39].

Do lidského organismu se pesticidy mohou dostat dermálně, inhalačně nebo orálně. U lidí způsobují karcinogenitu, mutagenitu, teratogenitu, reprodukční toxicitu a neurotoxicitu [38, 39].

## 7. ZÁVĚR

V současné době vzrůstá poptávka po nízkoreziduálním ovoci, která se dostává k realizování výzkumu na jakost produktů zemědělství. Součástí poptávky je i obsah prospěšných látek pro zdraví. Degradace zbytkových množství reziduí pesticidů přinese zdravotní výhody, způsobí větší jistotu na trhu (trh omezuje limity obsahu reziduí) a pěstitelům sníží ztráty v důsledku poškození ovoce škůdci.

Aby mohlo být požadavkům vyhověno, bylo potřeba nejdříve poznat dynamiku degradace pesticidů, které se aplikují v různých režimech ošetřování u dosud nezkoumaných peckovin. Dále bylo nutné zhodnotit vlivy posklizňových úprav.

Tato práce je zaměřena obecně na pesticidy a jejich rezidua z hlediska environmentálních, toxikologických a ekonomických dopadů. V práci jsou popsány vlastnosti, použití, vlivy, různé aplikace a vývoj pesticidů. Konkrétně se práce zaměřuje na charakteristiku dithiokarbamátů a jejich derivátů a na způsoby jejich stanovení v peckovinách. Dále jsou v práci uvedené metody stanovení dithiokarbamátů plynovou a kapalinovou chromatografií.

Různé metody stanovení reziduí pesticidů a dynamika jejich degradace v prostředí s následnými vlivy na životní prostředí a člověka uvedené v této práci mohou být přínosem pro výzkum na jakost produktů zemědělství.

## 8. POUŽITÁ LITERATURA

1. Cremllyn, R.; Pesticidy, SNTL, Praha 1, 1985, 8 – 117.
2. Bukáčková, M.; Stanovení vybraných pesticidů pomocí plynové chromatografie, VUT Brno, 2012, 8 – 14.
3. Garcia, P.F., Hernandez, C.A.; Pesticides: Clasification, uses and toxicity. Measure of exposure and genotoxic risks, Journal od research in environmental science and toxikology, Vol. 1 (11), 279-293.
4. Kizlink, J.; Technologie chemických látek, VUT Brno, 2005, 282.
5. Hajšlová, J., Kocourek, V.; Osud prostředků pro ochranu rostlin v potravním řetězci člověka, Vědecký výbor fytosanitární a životního prostředí, 2004, 42.
6. Matthews, G. A.; Pesticides, Health, Safety and the Environment. USA: Blackwell Publishing Ltd, 2006. 248.
7. Vlček, V., Pohanka, M.; Environmentální aspekty užití organofosforových karbamátových pesticidů schválených k užití v České republice, Ústav Agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin, Mendelova Univerzita v Brně, Chemické listy, 2011.
8. Obrázek rozkladu pesticidů v prostředí, dostupný na:  
<https://www.nap.edu/read/2132/chapter/12>
9. Dvořáková, S.; Rezidua pesticidů v potravinách [semestrální práce], Zdravotně sociální fakulta JU, České Budějovice, 2014, [25. 3. 2018], dostupné na:  
<http://slideplayer.cz/slide/11186684/>.
10. Novida, M., Omar, D., Karlzama, N.M.; Application of pesticide in pest management: The case of lowland egetable growers, International food research, Journal 23, 85-94.
11. Wright, D. A., Welbourn, P.; Environmental toxikology, Cambridge Iniversity: Press, 2002. 630
12. Obrázek xylémové cesty, dostupný na:  
<http://docplayer.cz/12165513-Mineralni-vyziva-rostlin-mineralni-ziviny-kolobeh-zivin-mechanizmy-transportu-mineralnich-zivin-v-rostline-funkce-jednotlivych-zivin.html>
13. Nabam, Pubchem, 2008, [26. 3. 2018],  
dostupné na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/nabam#section=Top>.
14. Jallow, M.F.A., Awadh, G.D., Albaro, M.S., Devi, V.Y., Ahmad, N.; Monitoring



- of pesticide residues in commonly used fruits and vegetables in Kuwait, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2017, 1-7.
15. Agromanuál, 2018, [26. 3. 2018],  
dostupné na: <https://www.agromanual.cz/cz/pripravky/fungicidy/fungicid>.
  16. 322/1999 Sb. Vyhláška Ministerstva zdravotnictví, kterou se stanoví maximální limity reziduí pesticidů.
  17. Hodnoty MLR, dostupné na: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.selection&language=EN>
  18. Nabizour, H., Ghammany, S., Ashuri, S., Aghbolagh Shokri, Z.; Synthesis of a new dithiocarbamate compound and study of its biological properties, *Synthesis of dithiocarbamates ligand*, *Org. Chem.*, 2010, 75-80.
  19. Vzorec nabamu, dostupný na: <http://www.sigmaldrich.com/catalog/product>
  20. Vzorec Thiram, dostupný na: <http://en.m.wikipedia.org/wiki/thiram>
  21. Schéma metabolismu thiramu, PDF soubor, dostupný na:  
[http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/JMPR/Evaluation96/thiram.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation96/thiram.pdf)
  22. Xu, Sue; Environmental fate of mancozeb, *Environmental monitoring and risk management*, Department of pesticide regulation, Sacramento, CA, 2000, 2 -9.
  23. Vzorec mankozebu, dostupný na:  
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/mancozeb12345801801711?lang=en&region=CZ>
  24. MacLachlan, D; Propineb, *Fisheries and Forestry*, 903 – 904.
  25. Vzorec propinebu, dostupný na: [www.insecticidechina.com/](http://www.insecticidechina.com/)
  26. Drumea, V., Saviac, C., Nita, R., Olaria, L.; Modern techniques of analysis for the pesticide residues: Assessment in plant materials, *Scientific Bulletin, Series F. Biotechnologies*, Vol. 18, 2014, 211-212.
  27. Hajšlová, J., Kocourek, V., Poustka, J., Cuhra, P.; Příprava vzorku pro stanovení reziduí pesticidů v potravinách, *Chemické listy* 92, 1998, 777 – 779.
  28. Balinova, A., Mladenova, R., Shtereva, D.; Solid-phase extraction on sorbents of different retention mechanisms followed by determination by gas chromatography-mass spectrometric and gas chromatography-electron capture detection of pesticide residues in crops, *Journal of Chromatography A*, 2007, Vol. 1150, No. 1-2.

29. Schéma plynové chromatografie, dostupné na: <http://sk.m.wikipedia.org/Súbor-schema>
30. Zbírál, J.; Stanovení obsahu reziduí dithiokarbamátů metodou GC- MS, Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, 2015, 1 – 7.
31. Slater, G.F., Dempster, H.S., Sherwood, B., Ahad, J.; Headspace analysis. A new application for isotopic characterization of dissolved organic contaminants, University of Toronto, 1999, 190-194.
32. Gómez, M. J., Gómez-Ramos, M. M., Aguera, A., Mezcua, M., Herrera, S., Fernández-Alba, A. R.; A new gas chromatography/mass spectrometry method for the simultaneous analysis of target and non-target organic contaminants in waters. Journal of Chromatography A. 2009, Vol. 1216, No. 18.
33. Crnogorac, G., Schwack, W; Residue analysis od dithiocarbamate fungicides, Trends in analytical chemistry, Vol. 28, No. 1, 2009, 40 – 48
34. Obrázek chromatografického záznamu, dostupný na: [https://www.researchgate.net/figure/HPLC-chromatograms-UV-detector-set-at-272-nm-a-Standards-16-m-g-mL-A-1-for-EBDs-and\\_fig1\\_261999488](https://www.researchgate.net/figure/HPLC-chromatograms-UV-detector-set-at-272-nm-a-Standards-16-m-g-mL-A-1-for-EBDs-and_fig1_261999488)
35. Tesařová, J; Rezidua pesticidů a jejich dopady na životní prostředí, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2009, 15 – 17.
36. Tiryaki, O., Temur, C., The fate of pesticides in the environment, J. Biol. Environ. Sci., 2010, 29-38.
37. Obrázek osudu pesticidů v prostředí, dostupný na: [https://www.researchgate.net/figure/Processes-responsible-for-the-fate-of-applied-pesticides-in-the-environment\\_fig2\\_230794737](https://www.researchgate.net/figure/Processes-responsible-for-the-fate-of-applied-pesticides-in-the-environment_fig2_230794737)
38. Matthews, G. A.; Pesticides, Health, Safety and the Environment. USA: Blackwell Publishing Ltd, 2006. 248.
39. Sande, D., Mullen, J., Wetzstein, M., Houston, J.; Environmental Impacts from pesticide use: A case study of soil fumigation in Florida tomato production, International journal of environmental research and public health, 2011, 4649-4659.