



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

VYUŽITÍ VČELÍHO PYLU JAKO BIOINDIKÁTORU STAVU ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

THE APPLICATION OF POLLEN AS BIOINDICATOR OF THE ENVIRONMENTAL STATE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. KATEŘINA MAREČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. JOSEF ČÁSLAVSKÝ, CSc.

BRNO 2011



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0499/2010	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	Bc. Kateřina Marečková	
Studijní program:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)	
Studijní obor:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Využití včelího pylu jako bioindikátoru stavu životního prostředí

Zadání diplomové práce:

1. Vypracování literární rešerše zaměřené na možnosti využití pylu sbíraného včelami jako bioindikátoru stavu životního prostředí a na analytické postupy k tomuto účelu využívané
2. Návrh metody analýzy pylu v podmínkách laboratoří ÚCHTOŽP
3. Praktická aplikace navržené metody ve vybrané oblasti

Termín odevzdání diplomové práce: 20.5.2011

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Kateřina Marečková
Student(ka)

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Pesticidy a jejich nadměrné používání vede ke znečištění životního prostředí. Nedodržování pokynů pro jejich použití nesprávné postupy likvidace nevyužitých přípravků a obalů od nich vedou ke kontaminaci vod, půdy a také k otravě zvířat a užitečného hmyzu.

Včela medonosná je nejužitečnější tvor na naší planetě. Bez opylování rostlin by nejen neexistovalo kvalitní zemědělství, ale byla by nepředstavitelná existence rostlinné říše tak, jak ji lidstvo zná a využívá. Proto byla vytvořena pravidla, která se snaží chránit tyto užitečné tvory před neuváženým používáním pesticidů.

Cílem této práce bylo ověření možnosti využití včelích produktů jako bioindikátorů životního prostředí. V pylu a v medu bylo hledáno pět účinných látek, které byly obsaženy v pesticidech použitých při ošetření poli v Tasovicích. Vzorky pylu a medu byly zpracovány metodou QuEChERS a SPE, jako finální analytické metody bylo využito plynové chromatografie spojené s hmotnostní detekcí.

ABSTRACT

Pesticides and their excessive use lead to environmental pollution. Violation of the guidelines for their use disposal of empty containers could lead to contamination of water, soil and poisoning of animals and beneficial insects.

Honey bee is useful creature on our planet. Good farming depends entirely on the pollination, but whole vegetal kingdom couldn't exist if form known and used by mankind. Therefore, rules that protect these useful creatures against inadequate use of pesticides have been developed.

This study focuses on the evaluation of the possibility to use bee products as bioindicators of the state of environment. Five active substances which are components of pesticides used in the treatment of agricultural field around Tasovice village were analysed in the pollen and honey. For sample preparation QuEChERS and SPE methods were used, gas chromatography with mass spectrometric detection was employed as final analytical technique.

KLÍČOVÁ SLOVA

Pyl, včela, med, pesticid, dicamba, tritosulfuron, propiconazole, prochloraz, mesotrione, QuEChERS SPE, plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

KEYWORDS

Pollen, bee, honey, pesticides, dicamba, tritosulfuron, propiconazole, prochloraz, mesotrione, QuEChERS, SPE, fgas chromatography, mass spectrometry

MAREČKOVÁ, K. Využití včelího pylu jako bioindikátoru stavu životního prostředí. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 89 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Chtěla bych poděkovat doc. Ing. Josefu Čáslavskému, CSc. za ochotu se mnou nadále spolupracovat, za cenné rady a pomoc při zpracování a svému tátovi za poskytnutí matrice a cenných informací. Mé poděkování také patří Ing. Daniele Mácové za pomoc při měření a zpracování diplomové práce.

Zároveň bych chtěla poděkovat vedoucímu Zkušební laboratoře organické geochemie brněnské pobočky České geologické služby Mgr. Milanu Geršlovi, PhD., za poskytnutí zázemí pro realizaci experimentální části této diplomové práce.

Obsah

1	ÚVOD	6
2	TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1	Pyl	7
2.1.1	Složení pylu	9
2.1.2	Jak získáváme pyl	12
2.1.3	Využití a skladování pylu	13
2.2	Med	13
2.2.1	Vznik medu	13
2.2.2	Složení medu	14
2.2.2.1	Voda	14
2.2.2.2	Cukr	15
2.2.2.3	Dusíkaté sloučeniny	15
2.2.2.4	Organické kyseliny a minerály	15
2.2.2.5	Aromatické látky, vitaminy a hormony	15
2.2.2.6	Pevné částice a fyzikální vlastnosti	16
2.2.3	Hodnocení kvality medu	16
2.3	Pesticidy	17
2.3.1	Vlastnosti pesticidů	18
2.3.1.1	Rozpustnost	18
2.3.1.2	Adsorpce	18
2.3.1.3	Perzistence	18
2.3.1.4	Těkavost	18
2.3.1.5	Rozpad pesticidů	18
2.3.1.6	Pohyb pesticidů	18
2.3.2	Ochrana včel	18
2.4	Pesticidy aplikované na sledovaném území	19
2.4.1	ARRAT®	20
2.4.1.1	Obecné informace	20
2.4.1.2	Dicamba	20
2.4.1.3	Tritonsulfuron	22
2.4.2	BUMPER SUPER	25
2.4.2.1	Obecné informace	25
2.4.2.2	Prochloraz	26
2.4.2.3	Propicozanole	27
2.4.3	CALLISTO 480 SC	28
2.4.3.1	Obecné informace	28
2.4.3.2	Mesotrione	29
2.4.4	FUSILADE FORTE 150 EC	31
2.4.4.1	Obecné informace	31

2.4.4.2	Fluzifop-P-butyl	32
2.4.5	NURELLE D.....	33
2.4.5.1	Obecné informace	33
2.4.5.2	Chlorpyrifos	33
2.4.5.3	Cypermethrin.....	35
2.4.6	STARANE 250 EC	37
2.4.6.1	Obecné informace	37
2.4.6.2	Fluroxypyr.....	37
2.4.7	PICTOR.....	38
2.4.7.1	Obecné informace	38
2.4.7.2	Boscalid.....	39
2.4.7.3	Dimoxystrobin.....	40
2.5	Metoda QuEChERS.....	41
2.6	Kapalinová chromatografie s UV-VIS detektorem.....	41
2.6.1	Mobilní fáze	41
2.6.2	Stacionární fáze	42
2.6.3	Složení kapalinového chromatografu.....	42
2.6.3.1	Zásobníky mobilní fáze.....	42
2.6.3.2	Odplyňovací jednotka	43
2.6.3.3	Čerpadlo a gradient	43
2.6.3.4	Automatický dávkovač pro HPLC	43
2.6.3.5	Kolony v HPLC.....	43
2.6.3.6	Detektory v HPLC.....	43
2.7	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS).....	44
2.7.1	Plynová chromatografie	45
2.7.1.1	Zdroj a regulace nosného plynu	45
2.7.1.2	Dávkovací systém (Injektor)	45
2.7.1.3	Chromatografická kolona	45
2.7.1.4	Termostat.....	46
2.7.2	Hmotnostní spektrometrie	46
2.7.2.1	Ionizační techniky	46
2.7.2.2	Analyzátory v MS	46
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	49
3.1	Odběr vzorku.....	49
3.1.1	Oblast odběru	49
3.1.2	Vlastní odběr vzorků	51
3.1.2.1	Odběr rouskového pylu	51
3.1.2.2	Odběr plástového pylu	52
3.1.2.3	Odběr medu	52
3.2	Příprava vzorků.....	53
3.2.1	Přístroje a vybavení pro přípravu vzorků.....	53

3.2.2	Chemikálie	53
3.2.3	Postup	54
3.4	Analýza na GC/MS.....	56
3.4.1	Zařízení.....	57
3.4.2	Chemikálie a rozpouštědla	57
3.4.3	Chromatografické podmínky.....	58
3.4.3.1	Automatický dávkovač.....	58
3.4.3.2	Dávkování	58
3.4.3.3	Kolona	58
3.4.3.4	Termostat.....	58
3.4.4	Podmínky MS.....	58
3.4.5	Postup analýzy.....	58
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	59
4.1	Výsledky z analýzy LC/DAD.....	59
4.1.1	Vyhodnocení spektra pro vlnovou délku 230 nm	59
4.2	Výsledky z GC/MS	60
4.2.1	Analýza metodou SIM	60
4.2.1.1	Vyhodnocení standardů.....	60
4.2.1.2	Vyhodnocení kalibrační řady	61
4.2.1.3	Vynesení do grafické závislosti.....	62
4.2.1.4	Vyhodnocení vzorků	64
4.2.2	Výsledky z modu SCAN.....	69
4.3	Odběr vzorku.....	82
4.4	Příprava vzorků.....	82
4.5	Analýza LC/DAD.....	83
4.6	Analýza GC/MS.....	83
5	ZÁVĚR.....	84
6	POUŽITÁ LITERATURA	85
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	89

1 ÚVOD

Už od časů našich praprababiček a prapradědečků víme, že včely a včelí produkty jsou velmi prospěšné pro člověka a jeho zdraví. Už tenkrát se říkalo, že bez včel není života. Bez jejich opylování, by nejenom nebyla úroda, ale ani by nedocházelo k dalšímu rozšiřování rostlin. Včely díky sběru pylových částic a nektaru způsobují kvalitní opylování rostlin a tvoří nám med, pyl a mateří kašičku, které jsou velmi bohaté na řadu minerálních látek, aminokyselin a vitamínů, jež jsou zdraví velmi prospěšné. Med je na víc i chuťově velmi dobrý. Z včelích produktů se vyrábí nejen potravinové doplňky, ale i kosmetika a léčiva.

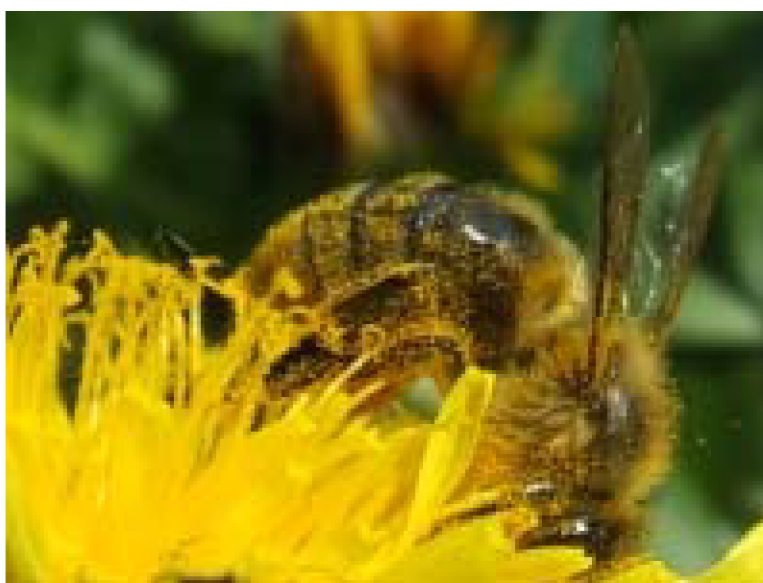
Postupným zvyšováním zemědělské činnosti dochází používáním hnojiv a postřiků pro ochranu rostlin proti hmyzu, plísním a bakteriím k přímému ohrožení včel a možné kontaminaci včelích produktů. Bohužel žádný přípravek určený proti hmyzu, neumí rozeznat škodlivý a užitečný hmyz. Je na lidech, aby s těmito prostředky zacházeli rozumně, s mírou a dodržovali doporučené postupy aplikace.

Česká republika patřila mezi první státy, kterému se podařilo prosadit zákon na ochranu včel. Zákon č. 147/1996 Sb., o rostlinolékařské péči, nám doporučuje, jak používat přípravky na ošetření plodin vzhledem ke včelám a zároveň nám určuje tzv. rizikový kvocient, který ukazuje, jak moc jsou dané přípravky nebezpečné pro včely.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Pyl

Pyl jsou rostlinné semenné buňky, které jsou sbírány včelami. Pylové zrnko je samčí pohlavní buňka, tzv. gameta. Skládá se z dvojité buněčné blány, tj. exina a intina. Při tvorbě samčích (pyl) a samičích (vejčíčka v semeníku) buněk dochází k rozdělení dědičné informace z původně dvojité sady na jednoduchou. Pylové buňky se tvoří v prašnicích, které jsou na konci nitkovitých tyčinek. Po dozrání pylových zrn dojde k prasknutí prašniku a pylová zrna se dostanou na povrch a odtud jsou roznášena hmyzem, vodou, vzduchem a také nejrůznějšími živočichy. Rostliny produkují mnohem větší množství pylu než je potřebné pro opylení.



Obrázek 1: Včela medonosná

Včela, která přiletí na květ, nachytává na své ochlupacené tělo zrnka pylu. Při letu na další květ jej pak pomocí nohou otírá a tvoří z pylu tzv. rousky, jenž se nachází na zadních párech nohou. Na vytvoření jednoho páru rousku musí včela obletět přibližně 80 květů. Důležité a velmi zajímavé je, že včela létá celý den jen na jeden druh rostlin. Podle barvy a tvaru rousku můžeme zjistit, o kterou rostlinu šlo.

Včely jednoho včelstva musí nasbírat během sezóny potřebné množství pylu pro svoji výživu. Toto množství obsahuje přibližně 6 milionů rousků, což znamená, že musí včely navštívit asi 250 milionů květů. Jeden rousek střední velikosti váží 4–10 mg a obsahuje 100 tisíc až 1 milion pylových zrn.

Včela po návratu do úlu vyhledá část plástu, kde jsou pylové zásoby, a do některé nezaplněné buňky vloží oba rousky. O další zpracování se postará jiná dělnice. Ta jej natlačí hlavou a kusadly do buňky tak, aby byl vytěsněn vzduch. Jak včely přinášejí další rousky, pylu v buňce přibývá. Pokud jsou plástové buňky zaplněné ze dvou třetin udusaným pylem, zavíčkují tyto dělnice buňky tzv. „pokličkou“, která je složena z medu a výměšků žláz.

V buňce pak probíhají enzymatické procesy. Proces začíná tím, že pylová zrna spotřebují zbývající vzduch v buňce za vytvoření oxidu uhličitého. Dochází dále ke spotřebě cukru

v bezkyslíkatém prostředí a tím dojde k vytvoření dalších organických kyselin, které spolu s kyselinou uhličitou působí konzervačně. Současně dochází k biochemickým procesům, které mění rouskový pyl na plástový. Tento plástový pyl má tmavší barvu, pastovitou konzistenci a nakyslou chuť.

Hlavním účelem pylu je především výživa plodu. Pyl smíchaný s medem slouží jako potrava pro starší dělnice a trubčí larvy. Mladý plod a larvy matky jsou živeny krmnou kašičkou, která je složena z pylu a výměšku žláz mladušek krmíček [1].



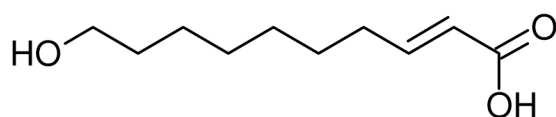
Obrázek 2: Pyl rouskový

Včelaři rozlišují dva druhy pylu. Pyl, který včela sbírá z květů, tzv. rouskový, je pyl nezpracovaný, neboli surový; pyl, který je plněn do plástu a dále je zpracováván, se nazývá pyl „perga“.



Obrázek 3: Plástový pyl - pyl „perga“

Aby nedocházelo ke klíčení rouskového pylu, přidávají včely do tohoto pylu inhibitor klíčení. Studie prokázaly, že se jedná o kyselinu 10-hydroxy-2-decenovou [1].



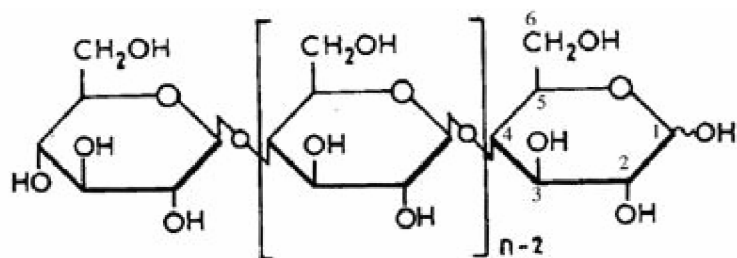
Obrázek 4: Kyselina 10-hydroxy-2-decenová

Při zavíčkování pylu v plástech dochází k biochemickým reakcím - kvašení, které zapříčiňují kyselost pylu. Ty jsou způsobeny vyšším množstvím kyseliny mléčné a také vedou ke zvýšení obsahu bílkovin rozpustných ve vodě. Z těchto důvodů byl zavíčkovaný pyl nazván „včelí chléb“ [1].

2.1.1 Složení pylu

Pyl obsahuje velké množství vitamínů, minerálů, proteinu, aminokyselin, enzymu a tuků. Každá rostlina má charakteristický pyl, který má svůj tvar a barvu.

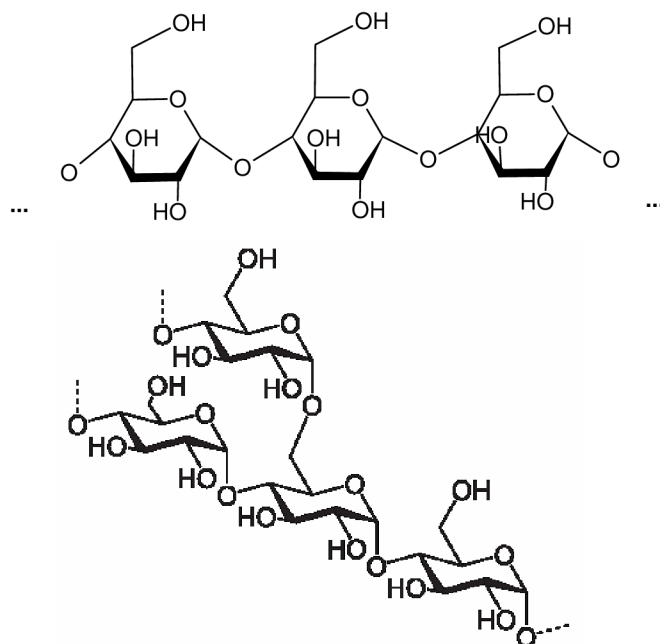
Pyl obsahuje asi 30 % vody. Převážnou částí sušiny pylu jsou sacharidy, z nichž jsou to hlavně škrob a celulóza. Dále je to glukóza, fruktóza a sacharóza, jejíž obsah může dosáhnout až 50 % všech cukrů [1].



Obrázek 5: Polysacharid - celulóza

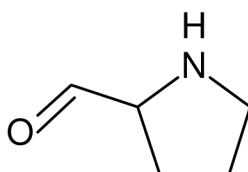
Tabulka 1: Základní složení pylu

Složka	Obsah [%]	
	Průměr	Rozsah
Voda	16	6–25
Celulóza	5	3–7
Sporopolenin	15	4–28
Glukóza	4	1–11
Fruktóza	5	1–9
Sacharóza	11	5–22
Škrob	2	1–8
Cukry celkem	26	13–37
Tuky	7	2–14
Bílkoviny	22	7–35
Popeloviny	6	2–10
Ostatní	3	–



Obrázek 6: Polysacharid škrob- amyulóza (nahore) a amylopektin (dole)

Pyl obsahuje také okolo 10 % lipidů, sterolů a mastných kyselin. Obsah bílkovin zaujímá třetinu sušiny pylu a jsou to převážně enzymy. Aminokyseliny tvoří asi 6 % sušiny a nejvyšší obsah z nich má prolin. Pyl obsahuje velké množství vitamínů, které svým množstvím a počtem nemohou konkurovat dalším včelím produktům s výjimkou mateří kašičky. Jedná se o vitamíny A, B- komplex, C, D, E, K, atd.



Obrázek 7: Prolin

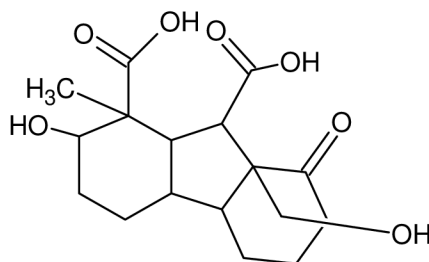
Tabulka 2: Obsah minerálních látek v pylu

Látka	Obsah ve 100 g pylu [mg]	Denní spotřeba člověka [mg]
Draslík	400–6300	4000
Fosfor	210–1000	700
Síra	160–1000	Neuvádí se
Hořčík	20–1000	400
Jod	Stopy	0,15
Měď	0,1–1,7	0,9
Sodík	0,2–1400	1500
Vápník	30–2900	1000
Zinek	2,5–21	15
Železo	5–760	18

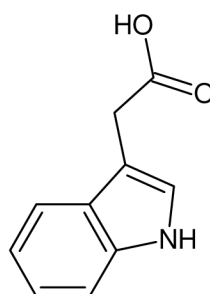
Tabulka 3: Obsah vitamínů v pylu

Látka	Obsah ve 100 g pylu [mg]	Denní spotřeba člověka [mg]
A	150–500	0,900
B ₁ (thiamin)	0,5–1,5	1,00
B ₂ (riboflavin)	0,5–1,9	1,70
B ₃ (kyselina nikotinová, naicin)	4–8	1,70
B ₅ (kyselina pantotenová)	0,7–5	10,0
B ₆ (pyridoxin)	0,3–0,9	2,00
B ₇ (H, biotin)	0,5–0,7	0,30
B ₉ (kyselina listová)	0,04–0,5	0,40
B ₁₂ (cyanocobalamin)	Stopy	0,006
C	5–20	60,0
D	stopy	0,01
E	2–30	20,00
K	Pouze v plástovém pylu	0,08

Asi 0,1 % z celkové hmotnosti pylu tvoří flavonoidní a karotenoidní barviva. Nukleonové kyseliny jsou obsaženy asi ze 2% sušiny a také jsou zde obsaženy růstové látky jako jsou gibereliny, auxiny a atd. nejvýznamnějším auxinem je kyselina 1H-indol-3-ylacetic (IAA).



Obrázek 8: Gibberelin



1H-indol-3-ylacetic acid

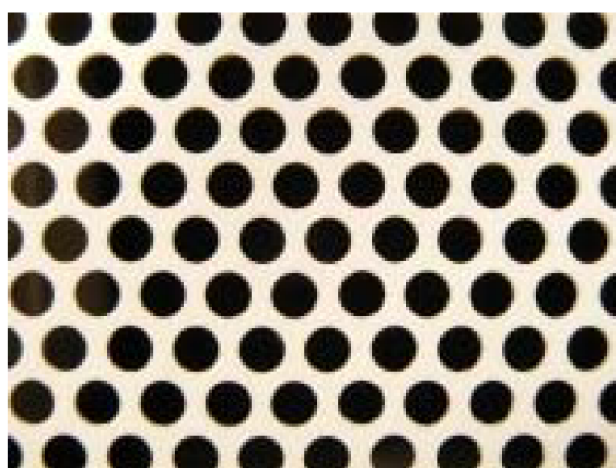
Obrázek 9: Strukturní vzorec molekuly kyseliny 1H-indol-3-ylaceticové.

Tabulka 4: Obsah aminokyselin v pylu

Aminokyselina	Obsah [%]
<i>Alanin</i>	0,04–0,20
<i>Valin</i>	0,01–0,20
<i>Glycin</i>	0,01–0,20
<i>Izoleucin</i>	0,01–0,16
<i>Lucin</i>	0,01–0,14
<i>Prolin</i>	0,20–5,00
<i>Treonin</i>	0,01–0,30
<i>Serin</i>	0,04–0,25
<i>Metionin</i>	0,01–0,12
<i>Fenylalanin</i>	0,01–0,14
<i>Asparagin</i>	0,03–0,60
<i>Glutamin</i>	0,01–0,28
<i>Tyroxin</i>	Stopové množství–0,12
<i>Lyzin</i>	0,03–0,13
<i>Arginin</i>	0,01 0,37
<i>Cystein, cystin</i>	Stopové množství–0,04
<i>Histidin</i>	Stopové množství–0,03
<i>Kyselina γ-aminomáselná</i>	Stopové množství–0,06

2.1.2 Jak získáváme pyl

Pro odběr rouskového pylu se používají tzv. pylochyty. Jedná se o mřížku s kulatými otvory. Pylochyty se umísťují buď do česna úlu, nebo do podmetu. Včela vracející se z venkovního prostředí musí prolézt touto mřížkou. Tím dochází k setření rousku, který padá do odběrné nádoby zakryté další mřížkou, nepropustnou pro včely.



Obrázek 10: Pylochytová vložka

Pro odběr pylu perga slouží speciální vypichovač, který má průměr vpichu přibližně shodný s průměrem ok v plástu.

2.1.3 Využití a skladování pylu

Pyl je ceněn jako potravinový doplněk pro vysoký obsah vitamínů, minerálů, stopových prvků a cenných bílkovin. Je často využíván sportovci jako doplněk stravy. Z lékařského hlediska je doporučován jako podpůrný prostředek při oslabení organismu a na podporu imunity. Z pylu se také vyrábějí preparáty využívané k léčbě alergií.

Při skladování pylu je nejdůležitější jeho vyčištění. V menším množství se cizí tělesa (části nohou, těl, křídel, atd.) odstraňují na podložce pomocí pinzety. Ve větších podnicích se používá zařízení s proudícím vzduchem, který z rozetřeného pylu vyfouká všechna cizí lehká tělesa.

V čerstvém stavu se pyl skladuje po delší dobu v ledničce, jinak dochází ke vzniku plísní. Také není doporučeno míchat čerstvý pyl s medem. Před dalším použitím je nutno pyl usušit. Je to z důvodu velkého množství vody, který je obsažen v tomto pylu. Menší množství se suší na podložce v suché místnosti při pokojové teplotě, větší množství se suší v sušičkách, kde teplota proudu vzduchu nesmí přesáhnout 35 °C.

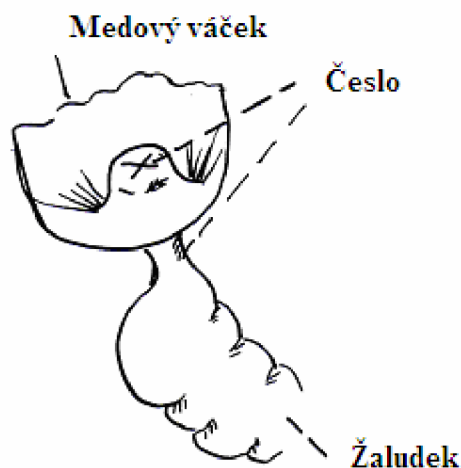
Pyl můžeme skladovat v plechovkách nebo v neprůsvitných sklenicích se šroubením [1].

2.2 Med

Med je nejpoužívanějším včelím produktem nejen pro lidi, ale i pro včely. Existují výpočty a studie, které říkají, že silné včelstvo dokáže spotřebovat 50 kg medu za rok, ale zkušenosti včelaři ví, že tato hodnota může být i dvojnásobná. Podle německé vyhlášky z roku 1967 je med považován za: „tekutou hustou nebo krystalickou potravinu, která je vytvořena včelami tak, že tento hmyz sbírá nektar květů a jiné sekrety z živých částí rostlin nebo sekrety hmyzu na rostlinách, obohacuje je a mění výměšky vlastního těla, ukládá do plástů a nechává zrát“. Podle české vyhlášky č. 76/2003 z 6. 3. 2003 je med „potravina přírodního sacharidového charakteru, složená převážně z glukózy, fruktózy, organických kyselin, enzymů a pevných částic zachycených při sběru sladkých šťáv květů rostlin (nektar), hustou lepkavou substancí vylučovanou stejnokřídlým hmyzem, zejména mšicemi (medovice), nebo na živých částech rostlin včelami (*Apis mellifera*), které sbírají, přetvářejí, kombinují se svými specifickými látkami, uskladňují a nechávají dehydratovat a zrát v plástech“.

2.2.1 Vznik medu

Včela pomocí svého jazýčku a sosáčku vyhledává nektar a ukládá si ho do medového včáku. Medový váček je tzv. česlo oddělené od žaludku.



Obrázek 11: Popis medového váčku

Včela spotřebuje jen malou část nektaru a vše ostatní přináší zpět do úlu. Starší mladušky odeberou létavkám nadílku. Odběr probíhá tak, že včely stojí hlavami k sobě a dotýkají se sosáčky. Když mladuška načerpá náklad, nabídne ho i jiným včelám. Tím dochází k zahuštění a s výměškou hltanových žláz dochází ke štěpení složitějších cukrů na jednodušší cukry. Po uložení do buněk dochází k dalším přeměnám. Nejdůležitější proces je odpaření vody, aby nedošlo ke kvašení medu.

Rozmanitost medu je velmi bohatá. Med může být lesní, květový, řepkový a další. Barva se pohybuje od téměř bezbarvé po zlatou až jantarově hnědou, zelenožlutou i černou.



Obrázek 12: Barevnost medu podle období květu rostlin

Konzistence medu je určena podle původu. Může být hustý, tekutý, tuhý a dokonce existuje i konzistence želé (z vřesu). Vůně a chuť jsou nejdominantnější vlastností, med může vonět a chutnat po květinách, lesu i ovoci. Chutě lidí jsou velmi odlišné a proto každému chutná jinak.

2.2.2 Složení medu

Med je směsice vody, cukru a jiných zdraví prospěšných látek. Specifické složení závisí na směsi květů, na dané lokalitě, ročním obdobím a na jednotlivých včelstvech. Hlavními složkami je cukr a voda v poměru 75:20 %. Zbývajících 5 % jsou ostatní látky.

2.2.2.1 Voda

Český med obsahuje průměrné množství vody od 16 – 23 %. Vše závisí na druhu květu. Bohatě na vodu jsou jetelové, vojtěškové a vřesové medy. Méně vody obsahují řepkové, luční a lesní medy.

Podle naší vyhlášky se za bezzávadný med používající ochrannou známku „Český med“ považuje ten, který má obsah vody menší než 20 %. Výjimku mají medy vojtěškové, jetelové. Voda podporuje kvašení medu, proto její množství v medu je tak důležité. Už při 19% obsahu je větší riziko zkvašení.

2.2.2.2 Cukr

Další nejdůležitější složkou v medu je cukr. V medu jsou dva hlavní cukry, a to tzv. *invertovaný cukr*, jehož množství v medu je asi 70 % a tzv. *řepný cukr*, jenž zaujímá pouze 5 %. Rozlišení těchto cukru spočívá v jejich složení. Zatímco invertovaný cukr je směs fruktózy a glukózy, cukr řepný neboli sacharóza je disacharid tvořený těmito dvěma jednoduchými cukry. V medu jsou obsaženy také jiné cukry, například trisacharidy (*melecitóza*), které ovlivňují krystalizaci medu nebo polysacharidy, jež se nazývají dextriny.

2.2.2.3 Dusíkaté sloučeniny

Jedná se o bílkoviny a aminokyseliny. Zastoupení bílkovin v medu se pohybuje kolem 0,4 %, což je naprosto nepatrné množství. Tyto látky pocházejí hlavně od včel. Je velmi zajímavé, že určují léčebné účinky medu. Z mnoha aminokyselin obsazuje první místo *prolin*, který se podílí na chuťových vlastnostech medu. Další složkou je acetylcholin a cholin mající význam při ukládání cukrů v orgánech.

Další dusíkaté sloučeniny jsou enzymy, které činí med tzv. živým produktem. Jejich funkce je ryze štěpícího charakteru - složitější živiny štěpí na jednoduché látky, které se vstřebávají do stěn tenkého střeva a přecházejí do krevního oběhu. Nejvýznamnější enzymy v medu jsou *diastáza*, která štěpí škrob, a *invertáza*, která štěpí cukr na glukózu a fruktózu.

Zajímavým enzymem je glukózooxidáza, která ve spojení se vzduchem mění malé množství glukózy na kyselinu glukonovou a dochází také ke tvorbě malého množství peroxidu vodíku, který je inhibitorem růstu bakterií.

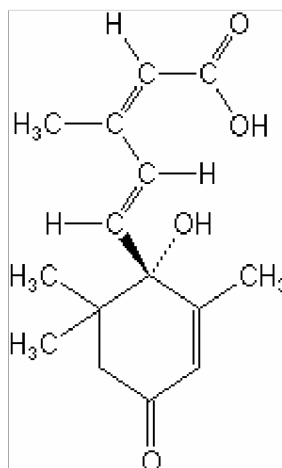
2.2.2.4 Organické kyseliny a minerály

Největší podíl na objemu kyselin má kyselina glukonová. Jinak se vyskytují v malém množství další organické kyseliny jako je kyselina mravenčí, mléčná, jablečná, citrónová, vinná, šťavelová a další.

Mezi minerální látky obsažené v medu patří draslík, vápník, chlór, fosfor, železo, mangan a mnoho dalších [2].

2.2.2.5 Aromatické látky, vitamíny a hormony

Aromatické látky dávají medu chuť. Jejich množství je tak nepatrné, že jejich přesnější stanovení bylo provedeno teprve v nedávné minulosti. Jedná se především o alkoholy, aldehydy, ketony, kyseliny a estery. Dále jsou obsaženy vitamíny A, B a C a také rostlinný hormon tzv. kyselina abscisová [2].



Obrázek 13: Kyselina abscisová

2.2.2.6 Pevné částice a fyzikální vlastnosti

Pevné částice, tj. prach, pylová zrna a další se dostávají do medu v průběhu snůšky a ukládání do buněk plástů. Buňky kvasinek, jež se nalézají v nektaru, ale i bakterie, které jsou během zrání medu zničeny, protože med působí sterilizačně. S medovicí se do medu dostávají také zelené řasy, které pocházejí z kůry stromů, také se mohou nalézt spory hub, rostlinná vlákna a štěpinky vosku.

Mezi fyzikální vlastnosti medu patří viskozita, elektrická vodivost, povrchové napětí, pH a další vlastnosti, které určují kvalitu medu [2].

2.2.3 Hodnocení kvality medu

Kvalita medu se v České republice řídila podle Vyhlášky 366/1997, která určovala limity vody, cukru a dalších vlastností medu. Po vstupu do Evropské unie v roce 2004 došlo k vytvoření nového předpisu, který vyhovuje požadavkům EU. Jedná se o Vyhlášku 76/2003 Sb. Ministerstva zemědělství ČR ze dne 6. 3. 2003.

Byla také přijata i podniková norma ČSV pro Český med (PN 01/1999). Tato norma zpřísňuje parametry. Medy, které splní limity v této normě, mohou používat ochrannou známku „Český med“. Tímto krokem chtějí naše zákony ochránit české včelaře před nežádoucím dovozem často nekvalitního a kontaminovaného medu z ciziny.

Rozdíl mezi starou a novou vyhláškou je, že došlo k vytvoření dvou nových kategorií medu. Jedná se o *med pekařský*, který dovoluje používat medy mírně kvašené s vyšším obsahem vody, a *medy filtrované*, tj. medy, které jsou filtrovány přes filtr o velikosti pórů od 20 µm. Dochází k zbavení pevných částic, především pylových zrn, tím se stávají tyto medy vhodné pro alergiky [3].

Tabulka 5: Fyzikálně - chemické parametry medu podle vyhlášky 366/1997 Sb.

Požadavky	Kvěťový med	Smíšený med	Medovicový med
<i>Obsah vody [% max]</i>	20	20	20
<i>Zdánlivá sacharóza [% max]</i>	5	10	10
<i>Redukující cukr [% max]</i>	65	60	60
<i>HMF [mg.kg⁻¹ max]</i>	40	40	40
<i>Vodivost [mS.m⁻¹]</i>	≤ 55	50–105	90–130
<i>Kyselost [mekv.kg⁻¹]</i>	40	40	40
<i>Obsah popela [% max]</i>	0,6	1,0	1,0
<i>Obsah látek ve vodě nerozpustných [% max]</i>	0,1	0,1	0,1

Tabulka 6: Fyzikálně - chemické parametry medu podle vyhlášky 76/2003 Sb.

Požadavky	Kvěťový med	Medovicový med	Pekařský med	Český med
<i>Obsah vody [% max]</i>	20	20	23	18
<i>Obsah sacharózy [% max]</i>	5	5	-	5
<i>Součet obsahu glukosy a fruktosy [% max]</i>	65	45	-	-
<i>HMF [mg.kg⁻¹ max]</i>	40	40	80	20
<i>Vodivost [mS.m⁻¹]</i>	≤ 80	≥ 80	-	-
<i>Kyselost [mekv.kg⁻¹]</i>	50	50	80	-
<i>Aktivita diastázy [°Schadeho min.]</i>	8	8	-	-
<i>Obsah látek ve vodě nerozpustných [% max]</i>	0,1	0,1	0,1	-

2.3 Pesticidy

Pesticidy jsou přípravky na ochranu rostlin proti různým škůdcům a plísním. Jako každá chemická látka či chemický výrobek se v naší přírodě přirozeně nevyskytují a za určitých podmínek mohou negativně působit na jednotlivé složky životního prostředí.

Každý, kdo používá chemické přípravky, by si měl uvědomit rizika možné kontaminace. Základní zásady ochrany životního prostředí a povinnost právnických či fyzických osob stanovuje zákon č. 17/1992 Sb., o životním prostředí [4].

Použití organochlorovaných pesticidů vedlo k masivní kontaminaci půdy, vody a ovzduší a tím i ke kontaminaci lidského organismu. Jejich persistence způsobuje kumulaci v životním prostředí, a proto dochází k opakovaným vstupům (vypařováním) z kontaminovaných složek. K jejich uvolnění dochází především v letních měsících nebo změnou sorpčních schopností půdy (pH, atd.).

Pesticidy vstupující do troposféry mohou být degradovány chemickými reakcemi nebo fotolyticky. Doba zdržení v troposféře závisí na rychlosti, s jakou podléhají přímé fototransformaci a na rychlosti fotooxidačních reakcí s reagenty (O₃, ·OH, NO_x a radikály) [5].

2.3.1 Vlastnosti pesticidů

2.3.1.1 Rozpustnost

Pesticidy jsou přípravky, které se snadno rozpouštějí ve vodě, a proto se dobře pohybují vodou v půdním horizontu [4].

2.3.1.2 Adsorpce

Postřiková kapalina je vázána na půdní částice, které ovlivňují její pohyb v půdě. K adsorpci dochází vlivem chemické reakce mezi pesticidy a půdními částicemi. Schopnost sorpce závisí tedy na organických složkách v půdě (humus) [4].

2.3.1.3 Perzistence

Perzistence souvisí s kumulací pesticidu ve složkách životního prostředí. Označuje dobu, po kterou se účinné látky v přípravku vyskytují v životním prostředí až do jejich rozpadu [4].

2.3.1.4 Těkavost

Těkavost souvisí s přeměnou pesticidů z kapalné fáze na plynnou fázi. Dochází k úniku pesticidů do ovzduší. Stupeň těkavosti tedy závisí na typu přípravku a na teplotě prostředí [4].

2.3.1.5 Rozpad pesticidů

Pesticidy v půdě a v jiných složkách životního prostředí se rozpadají či degradují na jednodušší chemické látky. Rychlost rozpadu závisí na perzistenci, na mikrobiálních reakcích v půdě, množství vody, teplotě. Vyšší teplota a vlhké podmínky mohou zvýšit rychlost rozpadu. Hlavními způsoby rozpadu je hydrolýza, mikrobiologické pochody a fotolýza [4].

2.3.1.6 Pohyb pesticidů

Pesticidy se mohou pohybovat různými způsoby. Vše závisí na vlastnostech každého přípravku. Pohyb z místa aplikace je umožněn třemi způsoby, a to vsakováním do povrchových vrstev půdy, smýváním z ošetřených rostlin nebo půdní erozí.

Z půdních vlastností, ovlivňujících pohyb pesticidů mezi složkami životního prostředí, jsou nejdůležitější struktura půdy, obsah organických sloučenin, výška hladiny spodní vody a propustnost podloží [4].

2.3.2 Ochrana včel

Pesticidy neumí rozeznat užitečný a neužitečný a užitečný hmyz. Proto se musí používat tak, aby způsobily co nejmenší škody na užitečném hmyzu, který příznivě působí na naši

přírodu. Mezi tento užitečný hmyz patří především včela medonosná. Patří mezi opylovače pěstovaných i planě rostoucích entomofilních rostlin. Vlivu pesticidů na včelstva se věnuje velká pozornost. Česká republika patří mezi první země, které se zaměřily na legislativní ochranu včel a velká pozornost je věnována také výzkumu.

Ochrana včel při používání přípravků na ochranu rostlin je legislativně řešena zákonem č.147/1996 Sb., o rostlinolékařské péči. Každý přípravek musí být zařazen podle klasifikace jako „škodlivý“ a relativně „neškodný“. Vše závisí na dávce nebo koncentraci postříkové kapaliny.

Základním kritériem pro klasifikaci pesticidů je hodnota rizikového kvocientu Q. Definice rizikového kvocientu je:

$$Q = \frac{M}{T}, \quad (1)$$

kde M je maximální hektarová dávka [g] a T je hodnota LD 50/ 24 hod přípravku v μg na včelu.

Pro včely vykazují jedovaté přípravky hodnotu $Q > 2500$. Mohou způsobit poškození plodu a změny v chování včel. Přípravky vykazující tuto hodnotu se nesmí používat na kvetoucí rostliny a stromy. „Nesprávné posouzení stavu porostu a špatný odhad doby rozkvětu je nejčastější příčinou hromadných otrav včel“ citováno z Praktické příručka pro zacházení s přípravky na ochranu rostlin [4].

K velkým otravám taky dochází díky úletům postříkové kapaliny na rostliny, které neošetřujeme. Jedná se zejména o javory, vrby a jivy a první jarní byliny, které poskytují první jarní pyl. Velkým problémem je reziduální neboli sekundární toxicita.

Škodlivé přípravky mají rizikový kvocient 1 od 50 do 2500 a nesmějí vykazovat sekundární toxicitu a ani změny na plodu a chování včel. Tyto přípravky lze použít na kvetoucí porost, ale zpravidla jen v době, kdy včely nelétají (večer nebo velmi brzo ráno).

Relativně neškodné jsou přípravky mající hodnotu rizikového kvocientu $Q < 50$ a nepoškozují plod a ani nevykazují změny v chování včel. Tyto přípravky lze potom použít po celý den, ale i přesto je doporučeno aplikovat je brzy ráno nebo večer.

Každý úhyn včel je nutné hlásit příslušné veterinární správě, která je povinná ohlásit tuto událost vyšším správním orgánům (Ministerstvo zemědělství, Výzkumný ústav včelařský) a udělat patřičné kroky, aby nedošlo k dalšímu úhynu včel [4].

2.4 Pesticidy aplikované na sledovaném území

Seznam pesticidů, které byly použity k ošetření plodin (máku, pšenice, řepky ozimy) v oblasti Tasovic, byly poskytnuty zemědělským družstvem vlastníků Nýrov. Jedná se o přípravky Arrat; Nurelle D; Callisto 480 SC, Starane 250 EC; Bumper Super; Pictor; Fusilade Forte.

2.4.1 ARRAT®

2.4.1.1 Obecné informace

Arrat® je selektivní herbicidní přípravek, který se používá proti dvouděložným plevelům. Aplikuje se na obilniny při jarním ošetření. Účinné látky zde jsou tritosulfuron ze skupiny sulfon – močoviny v koncentraci 250 g.kg^{-1} a dicamba ze skupiny aminobenzoových kyselin v koncentraci 500 g.kg^{-1} . Tyto látky jsou přijímány převážně zelenými listy a částečně kořeny z půdy.

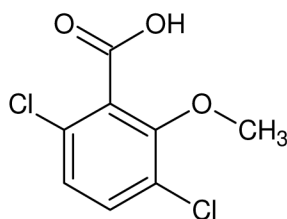
Tritosulfuron je přijímán převážně listy a v rostlině je přemísťován jak bazipetálně, tak i akropetálně. Tlumí dělení buněk a to tak, že narušuje biosyntézu bílkovin. Dicamba zase narušuje biochemické procesy auxinu a tím dochází k narušení dělení buněk. Obě dvě látky se navzájem podporují. Tritosulfuron nejprve zbrzdí růst plevelů a vyvolává zežloutnutí listů, dicamba způsobuje deformaci postižených plevelů a rostlina postupně hyne.

Arrat se používá na dvouděložné rostliny jako je laskavec, vydrol řepky, kokoška pastuší tobolka, svízel přítula, atd. Na trávy nepůsobí a nebyla u tohoto přípravku nutná žádná omezení z hlediska fytotoxicity. Přípravek je při dodržení aplikačních dávek přijatelný pro volně žijící zvěř, ptactvo a necílové členovce a půdní mikroorganismy. Je vysoce toxický pro řasy a nesmí dojít ke kontaktu s vodními zdroji. Prázdné obaly se doporučují několikrát propláchnout vodou. Tuto vodu lze použít pro další postřik. Obal se dává do sběru k recyklaci nebo k likvidaci ve spalovnách [6].



Obrázek 14: Průmyslové balení ARRATU

2.4.1.2 Dicamba



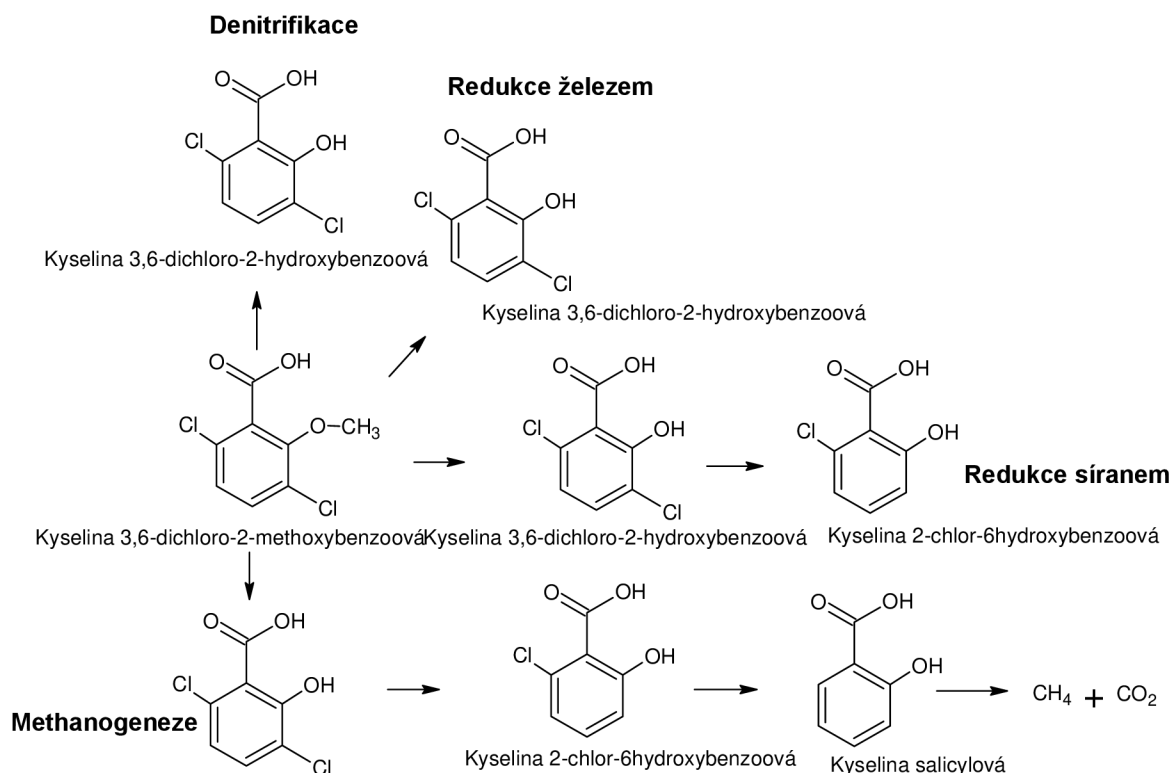
Obrázek 15: Strukturální vzorec - dicamba

Dicamba je podle názvosloví IUPAC *3,6-dichloro-2-methoxybenzoová kyselina* CAS číslem 1918-00-9. Tato sloučenina byla zaregistrována v EPA v roce 1967. Dicamba patří mezi benzoové sloučeniny. Jedná se o bílou až hnědou krystalickou látku, která se dobře rozpouští ve vodě. Teplota varu je 200 °C. Dicamba se špatně váže na půdní částice a počasí rozpadu v půdě se pohybuje v rozmezí 1 – 6 týdnů. Komerčně se prodává v podobě kapalin, tekutých koncentrátů, granulí, sprejů a atd.

Dicamba má nízkou toxicitu. Dráždí oči a má žíravé účinky na kůži. EPA identifikuje dicambu jako vývojový toxin v databázi zveřejněných toxinů. Způsobuje zarudnutí kůže a očí. Vdechování vyvolává kašel, zvracení, slabost, křeče.

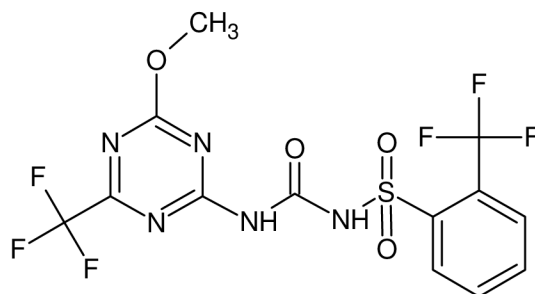
Dicamba napodobuje přírodní rostlinný hormon *auxin*, který je velmi důležitý pro správné dělení a růst buněk. V důsledku porušení cévní tkáně dochází k odumření rostliny. Je mírně toxická pro některé druhy kaktusu. Má velmi nízkou afinitu k většině typů půd a je vysoce mobilní; díky tomu dochází ke kontaminaci podzemních vod. Dicamba má nízkou toxicitu pro savce. Perorální LD₅₀ u potkanu je vyšší než 1750 mg.kg⁻¹ (podle EPA). Má také nízkou toxicitu pro ryby a včely. Orální dávka LD₅₀ pro včely se pohybuje od 3,6 až 10 mg na včelu a LD₅₀ u pstruha duhového je 135 mg.l⁻¹. Dicambové soli nejsou prakticky jedovaté pro ptáky, i když dicambové kyseliny vykazují mírnou toxicitu pro ptactvo. Neurotoxické účinky byly pozorovány na potkanech, psech a slepicích vzhledem k dávce [7].

Rychlost přeměny a degradace dicamby závisí na anaerobních podmínkách. Bylo vytvořeno několik různých redukčních podmínek pro degradaci dicamby, které jsou znázorněny na obrázku č. 16. Za methanogenních podmínek dochází k redukci dicamby na sloučeninu 3,6-dichlorsalicylátu, který se dále rozkládá na 6-chlorsalicylát a dále na kyselinu salicylovou až dochází k úplné degradaci na methan a oxid uhličitý. Za sulfonačních podmínek pravděpodobně dochází k redukci až na 6-chlorsalicylát. Bylo zjištěno, že dusičnany brání anaerobní degradaci dicamby, což by mohlo mít neblahé účinky na životní prostředí zejména v zemědělských oblastech, kde se hojně používají dusíkatá hnojiva. Při redukci dicamby dochází k tvorbě 3,6-dichlorsalicylátu, jehož toxicita může být vyšší než u samotné dicamby [8].



Obrázek 16: Transformační a degradační cesty dicamby za různých redukčních podmínek.

2.4.1.3 Tritonsulfuron



Obrázek 17: Strukturální vzorec – tritonsulfuron

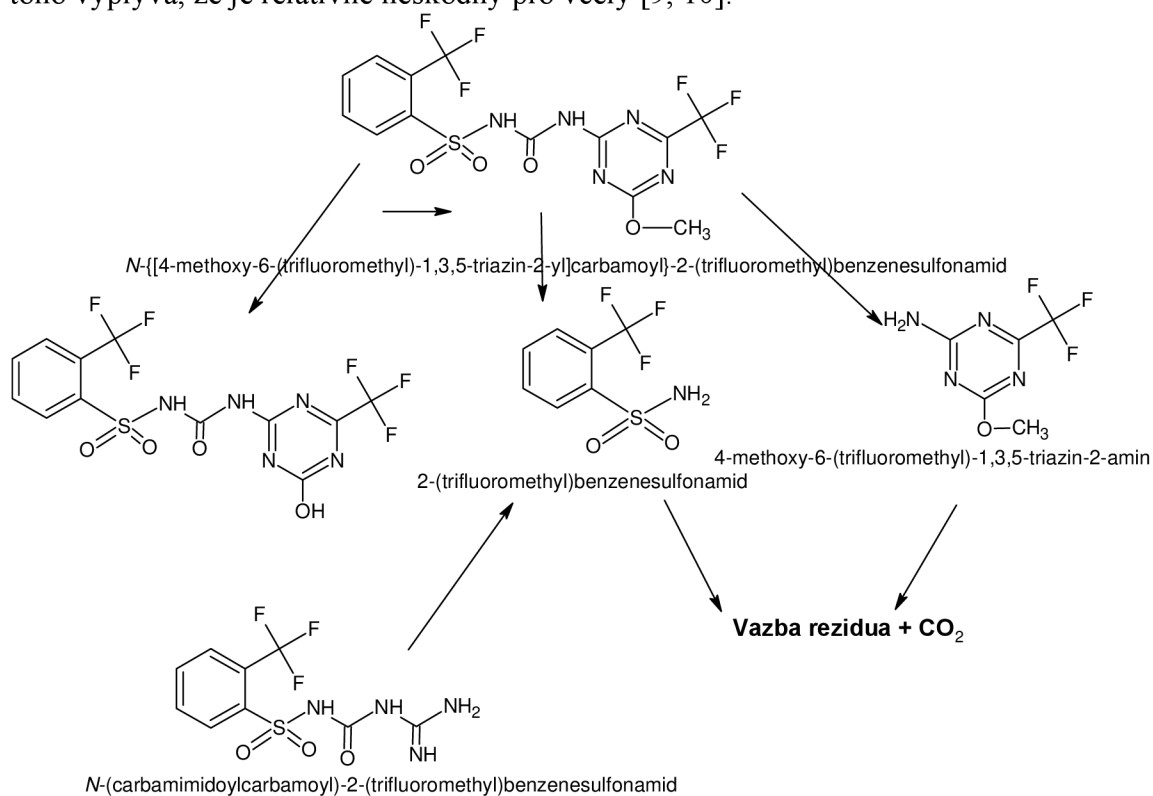
Tritonsulfuron je podle názvosloví IUPAC *1-[4-methoxy-6-(trifluoromethyl)-1,3,5-triazin-2-yl]-3-[2-(trifluoromethyl)benzensulfonyl]močovina* s molekulovou hmotností $445,3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a jeho CAS číslo je 142-469-14-5. Jedná se o systémový herbicid, který patří do skupiny sulfonylmočovín. Používá se k ošetření plodin (obiloviny, kukuřice) proti dvouděložným plevelům.

Jak už bylo uvedeno, tritonsulfuron je přijímán převážně listy a je systémově translokován v rostlině. Dochází k zablokování enzymu acetolaktát-syntázy (ALS). To má za následek hladovění a akumulaci toxických prekurzorů. Primární účinek je tedy omezení růstu nových buněk a zabránění dalšímu rozvoji plevele.

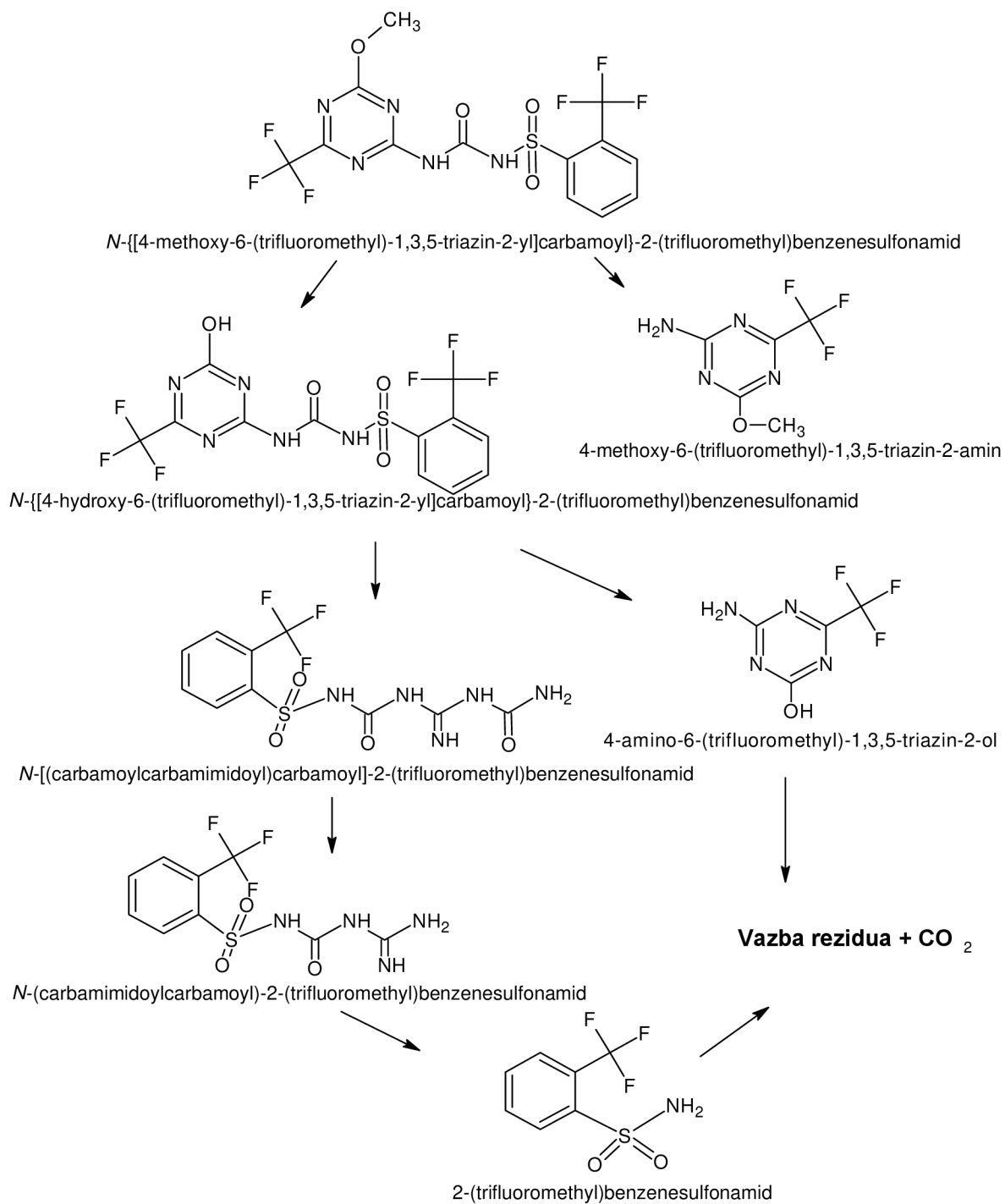
Je to bílá krystalická látka s bodem varu $168 \text{ }^\circ\text{C}$. Těkavost ($1,2023 \cdot 10^{-4} \text{ Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$) je velmi nízká. Tritonsulfuron je hydrolyticky a fotolyticky stabilní při běžných podmínkách v životním prostředí. Je dobře rozpustný v acetonu, dichlormethanu, ethylacetátu a v methanolu.

Je to látka nebezpečná pro životní prostředí. Vyznačuje nízkou akutní orální, dermální a inhalační toxicitou. Hodnota orální akutní toxicity pro potkana je $LD_{50} > 4\ 700\ \text{mg.kg}^{-1}$; hodnota inhalační akutní toxicity je $LD_{50\ 4h} > 5\ 400\ \text{mg.kg}^{-1}$; hodnota dermální akutní toxicity je $LD_{50} > 2\ 000\ \text{mg.kg}^{-1}$. Látka nemá dráždivé účinky na kůži ani na oči. Byly provedeny testy *in vivo* a *in vitro* na genotoxicitu a mutagenitu a nebyly prokázány žádné mutagenní a genotoxické účinky. Nebyl definován jako pravděpodobný karcinogen [9].

Tritonsulfuron je toxický pro vodní organismy. Letální koncentrace pro *Danio rerio* (Danio pruhované neboli zebříčka) po 96 hodinách je $10 - 100\ \text{mg.l}^{-1}$ a efektivní koncentrace pro *Daphnia magna* po 48 hodinách je $> 100\ \text{mg.l}^{-1}$. Není snadno biologicky odbouratelný. Byly provedeny testy na včelách a rizikový kvocient byl vypočítán na hodnotu menší než 50. Z toho vyplývá, že je relativně neškodný pro včely [9, 10].



Obrázek 18: Navržený degradační mechanismus tritonsulfuronu v půdě za aerobních podmínek.



Obrázek 19: Navržený degradační mechanismus tritonsulfuronu ve vodním sedimentu.

2.4.2 BUMPER SUPER

2.4.2.1 Obecné informace

Bumper Super je kombinovaný fungicidní přípravek se systémovým a lokálně systémovým účinkem ve formě emulgovatelného koncentrátu. Používá se k ochraně pšenice, ječmene, cukrové řepy a krmné řepy proti houbovým chorobám.

Účinné látky jsou zde prochloraz o koncentraci 400 g.l⁻¹ a propiconazole o koncentraci 90 g.l⁻¹. Je to bledě žlutá kapalina specifického zápachu a je považována za látku dráždivou a nebezpečnou pro životní prostředí. Při dodržení přesného dávkování a doporučeného používání je přijatelná pro včely, zvěř, ptáky, půdní organismy, žížal, dravé pestřenky *Episyrphus balteatus* a dravého střevlíka *Poecilus cupreus*. Tento přípravek, jak už bylo řečeno, je kombinovaný širokospektrální systémový a translaminární fungicid s preventivním, léčebným a eradikativním účinkem.

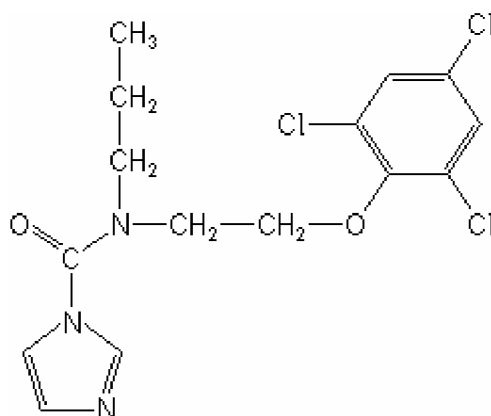
Bumper Super obsahuje dvě účinné látky triazolového a imidazolového typu. Díky těmto látkám dochází k inhibici biosyntézy ergosterolu. Prochloraz proniká do rostlinných pletiv, ale není rozváděn do neošetřených částí. Propiconazole je přijímán asimilačními orgány a v těle rostliny se pohybuje akropetálně xylenem směrem k novým částem rostliny.

Tento přípravek nepodléhá polymeraci a je v životním prostředí při normálních podmínkách stabilní. Nesmí přijít do styku s materiálem jako je vápenec a Bordeauxská směs. Tyto materiály způsobují redukci fungicidu. Produkty rozkladu pesticidu Bumper Super mohou být nebezpečné [11].



Obrázek 20: Průmyslové balení Bumper Super

2.4.2.2 Prochloraz

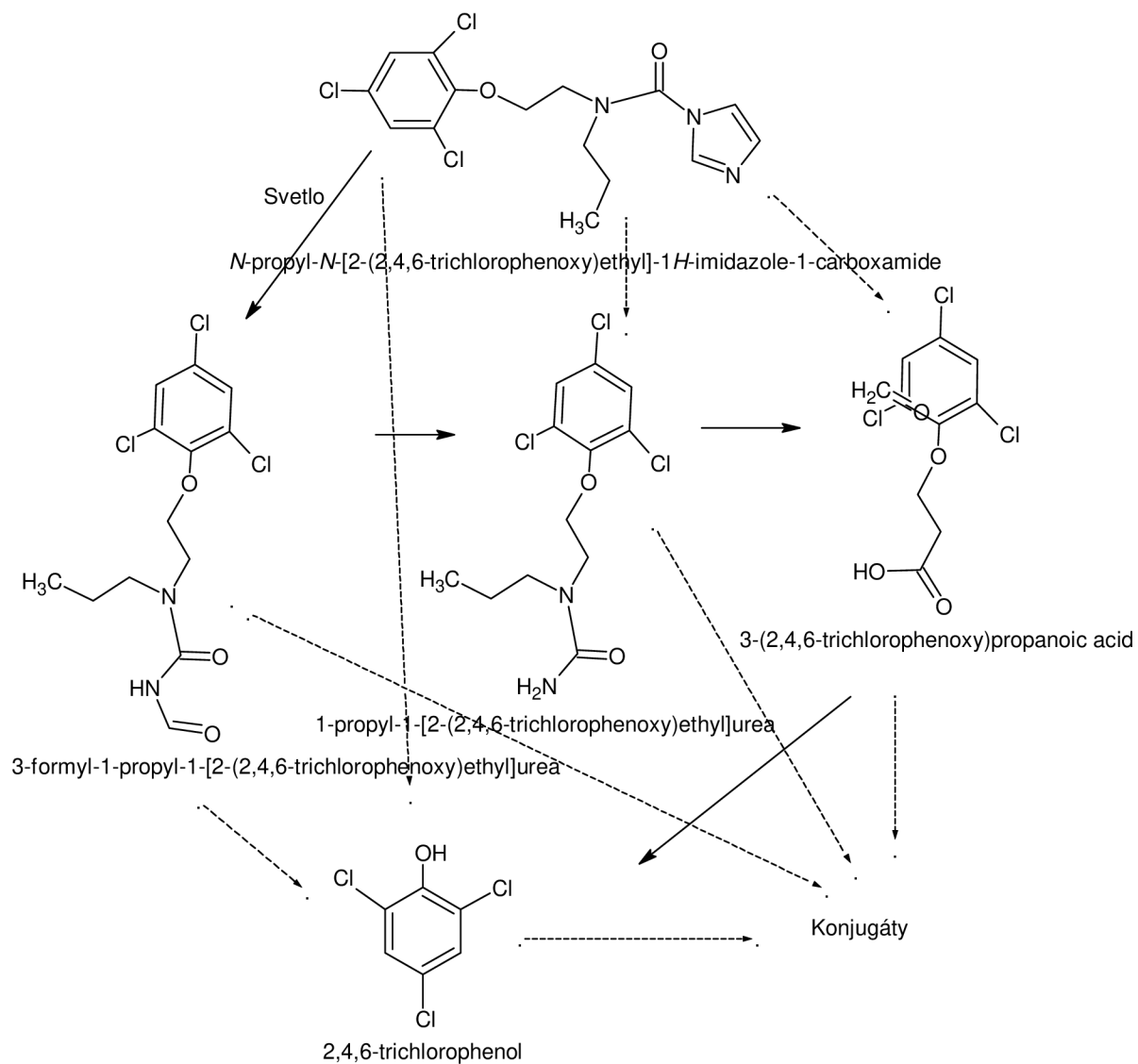


Obrázek 21: Strukturální vzorec – Prochloraz

Prochloraz je podle názvosloví IUPAC *N-propyl-N-[2-(2,4,6-trichlorofenoxy)ethyl]imidazol-1-karboxylamid* s molekulovou hmotností $367,7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a CAS číslem 67747-09-5.

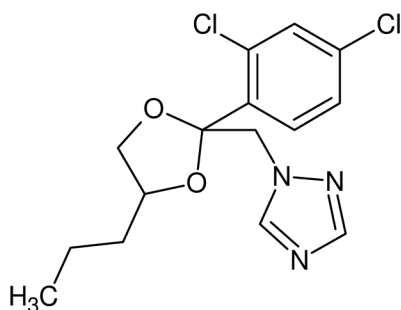
Je to bílá až hnědá krystalická látka charakteristického zápachu s bodem varu $41 \text{ }^\circ\text{C}$ a tlakem par $7,6\cdot 10^{-5} \text{ Pa}$ při $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Je dobře rozpustný v chloroformu, xylenu, diethyletheru, toluenu a acetonu. Bývá více stabilní v mírně kyselém prostředí.

Prochloraz dráždí oči a kůži. Projevila se zde nízká orální akutní toxicita pro hlodavce. Hodnota činí LD_{50} u potkana $1\ 600\text{--}2\ 000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Příznaky se projeví po 30 - 60 minutách po podání. Mezi projevy patří respirační porucha, CNS deprese, ataxie a další projevy. Je toxický pro vodní organismy a může vyvolat nepříznivé účinky ve vodním prostředí. Akutní toxicita pro pstruha duhového LC_{50} (96 h) je $3,05 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a efektivní koncentrace EC_{50} (48 h) pro *Daphnia magna* je $4,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Toxicita pro včelu se pohybuje pro orální podání LD_{50} $33,96 \text{ }\mu\text{g}/\text{včelu}$ a kontaktní podání je LD_{50} $186,88 \text{ }\mu\text{g}/\text{včelu}$. Rozkladné produkty zde jsou NO_x , CO, CO_2 a chloridy. Neprojevila se zde karcinogenita, mutagenita a ani teratogenita [12]. Všechny metabolity prochlorazu obsahují 2,4,6-trichlorfenolovou skupinu [13].



Obrázek 22: Metabolismus prochlorazu v rostlinách

2.4.2.3 Propiconazole



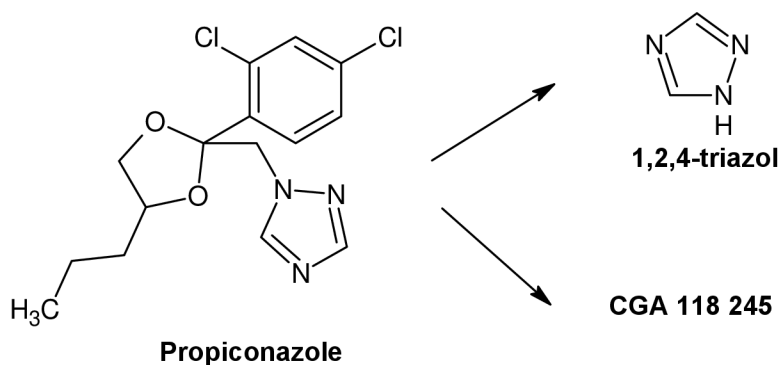
Obrázek 23: Strukturní vzorec - propiconazole

Propiconazole je podle názvosloví IUPAC *(2*RS*,4*RS*;2*RS*,4*SR*)-1-[2-(2,4-dichlorofenyl)-4-propyl-1,3-dioxolan-2-ylmethyl]-1*H*-1,2,4-triazol* s molekulovou hmotností $342,25 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a s CAS číslem 60207-90-1.

Je to žlutá kapalina s teplotou varu 180 °C a tenzí par 2,1.10⁻⁴ Pa. Dobře se rozpouští v methanolu, acetonu, etheru, chloroformu, benzenu a hexanu. Je to antimikrobiální fungicid, který byl poprvé zaregistrován v roce 1981 v registru EPA. Slouží k ochraně obilovin a semen. EPA rozšířila jeho toleranci v roce 1987 a znovu v roce 1993 a 1994. Vyskytuje se v průmyslovém balení jako emulgovatelné koncentráty, ale i pevné látky rozpustné ve vodě [14].

Má mírně nízkou akutní toxicitu. Akutní orální toxicita LD₅₀ pro krysu je 1517 mg.kg⁻¹. Při styku s očima způsobuje zakalení rohovky. Projevila se chronická toxicita u myši a potkanů. Byl nalezen benigní a maligní tumor jater. U savců došlo k projevům při dávkách 3,6 mg.kg⁻¹ denně. EPA proto zařadila propiconazole do kategorie možných karcinogenních látek. Také se projevila reprodukční toxicita na potkanech a myších. Při dávce 30 mg.kg⁻¹ docházelo ke kosterní deformaci u novorozených mláďat. Snížená velikost vrhu a hmotnost mláďat byla pozorována při 8 mg.kg⁻¹. Propiconazole je vývojový toxin v databázi zveřejněných toxinů. Je vysoce toxický pro ryby. Akutní koncentrace LC₅₀ (96 h) pro pstruha duhového je 0,9 – 1,2 mg.l⁻¹ a efektivní koncentrace EC₅₀ (48 h) pro *Daphnia magna* je 4,8 mg.l⁻¹. Pro ptáky a pro včely vykazuje nízkou toxicitu. Akutní toxicita LD₅₀ pro včely činí 100 µg/včelu.

Propiconazole se rozkládá na 1,2,4-triazol a CGA 118 245, které jsou mobilnější v půdě a jejich poločas rozpadu se pohybuje od 1–10 dnů při 20 °C. Tyto sloučeniny sice nevykazují karcinogenní účinky. Proto EPA doporučuje jistá opatření. Jak už bylo řečeno, tyto látky mají vyšší mobilitu v závislosti na složení půdy. Pohyblivější jsou v půdě, která je chudší na organickou hmotu. Je zde větší pravděpodobnost kontaminace podzemní vody [15, 16].



Obrázek 24: Degradace propiconazolu

2.4.3 CALLISTO 480 SC

2.4.3.1 Obecné informace

Callisto 480 SC je postřikový herbicidní přípravek ve formě suspenzního koncentrátu pro preemergentní a postemergentní hubení jednoletých dvouděložných plevelů a ježatky kuří nohy v kukuřici seté.

Účinná látka mesotrione, která je obsažena v tomto přípravku o koncentraci 480 g.l⁻¹, patří do skupiny triketonů. Mesotrione inhibuje p-hydroxyfenyl pyruvát dioxygenázu, která zasahuje do metabolismu biosyntézy karotenoidů. Látka je přijímána kořeny a listy, v rostlinách se šíří akropetálně a bazipetálně. Účinek se projevuje zbělením listů a

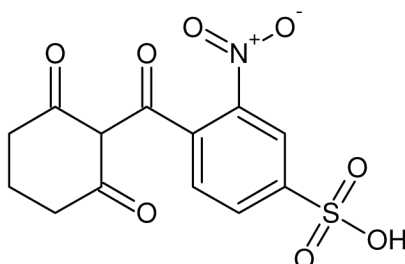
poškozením meristemických pletiv. První symptomy jsou patrné již po 5 – 7 dnech a zničení plevelu je až po 2 týdnech.

Přípravek je klasifikován jako nebezpečný pro životní prostředí a je vysoce toxický pro vodní organismy a vodní ekosystém. Je to béžová až žlutohnědá kapalina slabého zápachu. Za standardních podmínek je přípravek stabilní. Při hoření či tepelném rozkladu může docházet ke tvorbě toxických a dráždivých par [17].



Obrázek 25: Průmyslové balení CALLISTO 480 SC

2.4.3.2 Mesotrione



Obrázek 26: Strukturální vzorec mesotrione

Mesotrione je podle názvosloví IUPAC *2-(4-mesyl-2-nitrobenzoyl)cyklohexan-1,3-dion* o molekulové hmotnosti $339,32 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a CAS číslem 104206-82-8.

Je to pevná látka s bodem varu $360 \text{ }^\circ\text{C}$ a tlakem par $< 5,6 \cdot 10^{-6} \text{ Pa}$ při $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Dobře se rozpouští v acetonitrilu, acetonu, 1,2-dichloethanu, ethylacetátu, methanolu a xylenu. Je hydrolyticky stabilní. Doba degradace se pohybuje kolem 30 dnů při pH 4–9 a při teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C}$ [18].

Mesotrione má nízkou orální, dermální a inhalační akutní toxicitu. Mírně dráždí oči, ale nedráždí kůži a nepatří mezi senzibilující látky. Byly pozorovány subchronické a chronické efekty. U potkanů a myši docházelo k ovlivnění očních lézí, jater, ledvin a tělesné hmotnosti. Při zkoumání chronických a reprodukčních účinků bylo zjištěno, že dochází ke zvyšování hladiny tyrosinu u potkanů, myši a u psů. Zvýšená hladina tyrosinu v očích, játrech a ledvinách je pravděpodobně způsobená inhibicí p-hydroxyfenyl pyruvát dioxygenázy (HPPD). Nebyly prokázány žádné karcinogenní ani mutagenní účinky. U akutní a chronické studie nedošlo k žádným neurotoickým ani neuropatologickým účinkům.

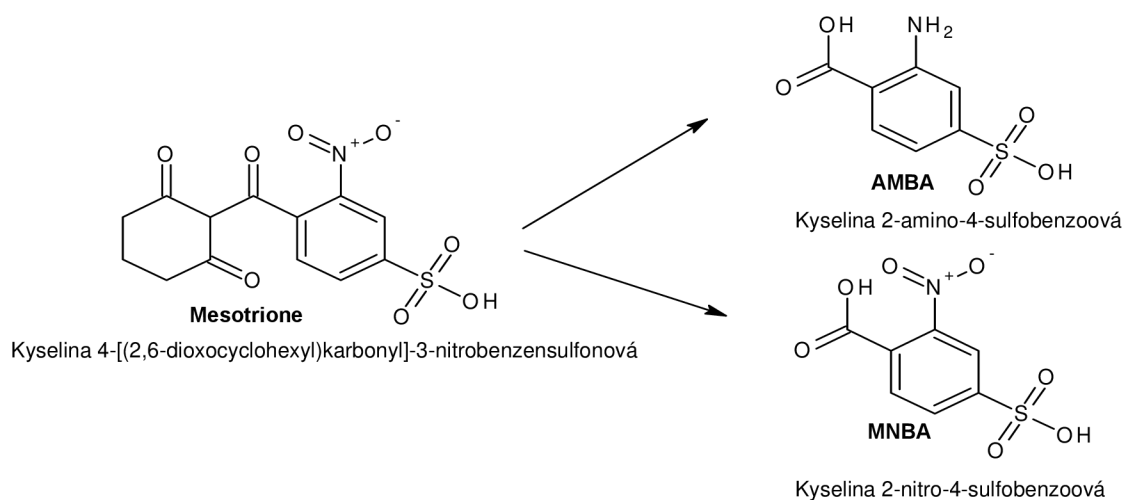
V reprodukční studii, kde se zkoumal vliv mesotrionu na více generacích, došlo při nejvyšší dávce u samce a samičky myši k odchlípení sítnice a k projevům šedého zákalu. Při studii subchronické a chronické toxicity na psech došlo u jedné feny při nejvyšší dávce ke snížení absolutní a relativní mozkové hmotnosti, ale u testované skupiny nedošlo k žádným projevům mikroskopických abnormalit mozkové tkáně.

Zjistilo se, že u dětí, které trpí tyrosinemií III (autosomální recesivní onemocnění, kde je nedostatek HPPD), může docházet k mentální retardaci nebo k neurologickým symptomům.

Mesotrione je mobilní sloučenina, která má omezenou perzistenci v půdě a ve vodním prostředí. V půdě dochází k rozkladu mesotrionu prostřednictvím aerobního metabolismu při podmínkách daného prostředí; poločas rozpadu mesotrionu se pohybuje od 5 do 32 dnů hlavně v závislosti na pH. Má nízkou sorpci v půdním sedimentu při všech testovaných pH (K_{oc} : 16,5-390 ml.g⁻¹). Relativně krátká retence v půdě způsobuje, že dochází ke smývání do povrchových vod.

Mesotrione, jak už bylo řečeno, se může do vodního prostředí dostat smýváním z rostlin, erozí a smyvem z půdy. Ve vodě je mesotrione stabilní vůči hydrolyze a relativně je odolný i vůči fotolýze, ale rychle se degraduje prostřednictvím aerobního ($t_{1/2}$ = 3–6 dnů) a anaerobního ($t_{1/2}$ = 4 dny) metabolismu. Při rozkladu mesotrionu dochází k tvorbě dvou hlavních rozkladných produktů, MNBA (2-nitro-4-sulfobenzoová kyselina) a AMBA (2-amino-4-sulfobenzoová kyselina).

Je zde malý rozdíl mezi metabolickými cestami mesotrionu u potkanů a v rostlinách. V rostlinách a v potkanech je mesotrione metabolizován na 4-OH-mesotrione, MNBA nebo AMBA. I když je 4-OH-mesotrione v rostlinách metabolizován na MNBA, tak v potkanech nedochází k metabolizaci na MNBA, ale dochází k vyloučení 4-OH-mesotrionu z organismu. U přežvýkavců dochází k metabolizaci mesotrionu pouze na AMBA [19].



Obrázek 27: Degradace mesotrione

2.4.4 FUSILADE FORTE 150 EC

2.4.4.1 Obecné informace

Fusilade forte 150 EC je selektivní postřikový herbicid, který se prodává ve formě koncentrované emulze. Je určený k hubení jednoletých a vytrvalých travnatých plevelů [20]. Patří mezi nové graminicidy s ISO link technologií. ISO link technologie je technologie, která má důmyslné sestavení olejů, adjuvantů, emulgátorů a surfaktantů. Tím nám zaručuje vyšší účinnost, rychlejší působení, odolnost vůči srážkám a vynikající mísitelnost.

Účinnou látkou je zde fluazifop-P-butyl v koncentraci 150 g.l⁻¹, který patří do skupiny fenol herbicidů. Rychle se vstřebává přes listy a rychle hydrolyzuje na kyselinu fluzifopovou. Tato kyselina je přepravována cévní tkání (ploem) a hromadí se v meristému, kde narušuje syntézu lipidů. Fluazifop-p-butyl inhibuje acetyl CoA karboxylázu, což je enzym katalyzující syntézu mastných kyselin. Dochází k přerušení dodávky mastných kyselin a tím dojde k narušení oblasti aktivního růstu [21].

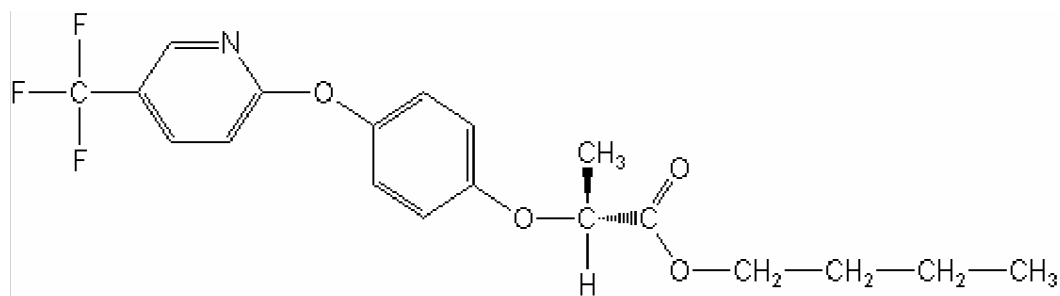
Působí selektivně s translokačními účinky proti travovitým plevelům, a to jednoletým i vytrvalým. Tento herbicid se používá na vzrostlé rostliny a jeho působení je velmi rychlé. Už po 7 dnech jsou patrné první příznaky. Teplé a vlhké počasí urychluje působení tohoto herbicidu [20].

Přípravek je klasifikován jako nebezpečný pro životní prostředí a je zdraví škodlivý. Je zakázané ho používat v okolí 5 m od vodního zdroje, protože je vysoce toxický pro vodní organismy a jeho působení ve vodním prostředí může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky. Může poškodit plod v těle matky a patří do skupiny látek senzibilizující při styku s kůží [22].



Obrázek 28: Průmyslové balení FUSILADE FORTE 150 EC

2.4.4.2 Fluazifop-P-butyl



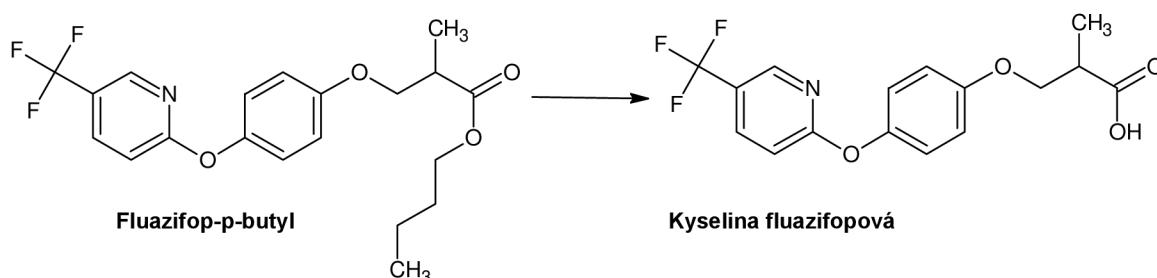
Obrázek 29: Strukturální vzorec fluazifop-p-butyl

Fluazifop-p-butyl je podle názvosloví IUPAC *butyl (R)-2-[4-[5-(trifluoromethyl)-2-pyridyloxy]fenoxy]propionát* o molekulové hmotnosti $386,36 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a s CAS číslem 79241-46-6.

Je to hnědá kapalina s bodem varu $154 \text{ }^\circ\text{C}$ při tlaku $0,03 \text{ hPa}$. Je nerozpustná ve vodě a koeficient oktanol/voda je $\log P_{\text{ow}} = 3,1$. Dobře se rozpouští ve většině organických rozpouštědel [22].

Fluazifop-p-butyl je prakticky netoxický pro savce a pro ptáky je mírně toxický. Může mírně dráždit kůži a může dojít k poškození očí. Při inhalaci dochází k podráždění dýchacího ústrojí. Orální toxicita LD_{50} pro potkana je $2,712 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, inhalační toxicita po 4 h je 5200 ppm a dermální toxicita LD_{50} pro králíka je $> 2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Fluazifop-p-butyl je vysoce toxický pro vodní ekosystém. Byl nalezen v rybí tkáni a v sedimentech. Může dlouhodobě poškodit vodní prostředí. Letální koncentrace pro *Daphnia Magna* po 48 h je větší než $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro pstruha duhového činí hodnota LC_{50} $1,37 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Fluazifop-p-butyl se degraduje především prostřednictvím mikrobiálního metabolismu a hydrolýzy. Fotolýzou ho nelze rozkládat. Poměrně pevně se váže na půdu, proto nedochází ke kontaminaci podzemní vody. Poločas rozpadu se pohybuje kolem 1–2 týdnů. Ve vodě dochází k degradaci na kyselinu fluazifopovou, která je stabilní ve vodním prostředí. V přípravku Fusilade forte 150 EC se používá tzv. S-izomer, který se lépe odbourává v přírodě. Důležité jsou podmínky, při kterých dochází k degradaci. Mezi hlavní podmínky patří vlhkost v půdě. Půdy, které měly vysoké procento vlhkosti, obsahovaly 8 % fluazifop-p-butylu po 48 h, zatímco půdy s nízkou vlhkostí obsahovaly po stejné době 90 % této účinné látky [21, 23].



Obrázek 30: Degradace fluazifop-p-butylu

2.4.5 NURELLE D

2.4.5.1 Obecné informace

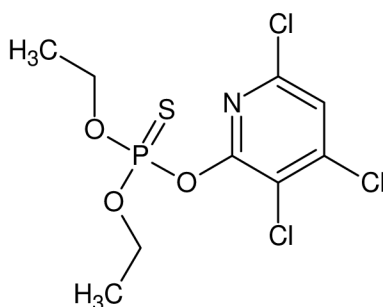
Nurelle D patří do skupiny insekticidních látek používající k ošetření obilnin, hrachu, cukrové řepy, řepky olejné, okrasných dřevin a dalších. Také se používá k ošetření lesních dřevin proti napadení lýkožroutem smrkovým.

Působí jako kontaktní, požerový a dýchací jed proti hmyzu s výrazným fumigačním efektem. Po ošetření rostlin proniká do jejich pletiv, ale není rozváděn cévními svazky. Jeho značná repelentní účinnost umožňuje ochránit rostlinu před výskytem viróz. Vykazuje reziduální afinitu, která snižuje počet nutných insekticidních zásahů. Přípravek Nurelle D obsahuje účinné látky chlorpyrifos o koncentraci 500 g.l⁻¹ a cypermethrin o koncentraci 50 g.l⁻¹. Je klasifikován jako zdraví škodlivý a jedovatý pro včely, vodní organismy a ryby [24].



Obrázek 31: Průmyslové balení insekticidu NURELLE D

2.4.5.2 Chlorpyrifos



Obrázek 32: Strukturální vzorec chlorpyrifosu

Chlorpyrifos je podle názvosloví IUPAC *O,O-diethyl-O-3,5,6-trichloro-2-pyridylphosphorothioate* s CAS číslem 2921-88-2 a molekulovou hmotností 350,59 g.mol⁻¹. Je to bílá krystalická látka, která se špatně rozpouští ve vodě, ale je dobře rozpustná ve většině organickým rozpouštědel. Rozkládá se při 160 °C a taje při 43 °C [25].

Chlorpyrifos je širokospektrální insekticid pro různé druhy hmyzu. Je k dispozici v emulgovatelném koncentrátu, prachu, spreji či granulích. Působí na hmyz jako kontaktní žaludeční jed. Patří do skupiny organofosfátů, které narušují funkci enzymu cholinesterázy. Tento enzym je velmi důležitý pro správnou funkci nervového systému.

Otrava touto látkou může narušit nervovou a dýchací soustavu, ale i kardiovaskulární soustavu. Dráždí oči a kůži. Akutní orální a dermální toxicita u samců a samic potkanů přesahuje hodnotu 2000 mg.kg^{-1} . Bylo dokonce zaznamenáno i úmrtí člověka, kde došlo k otravě chlorpyrifosem nebo kombinací chlorpyrifosu s jinými aktivními přísadami.

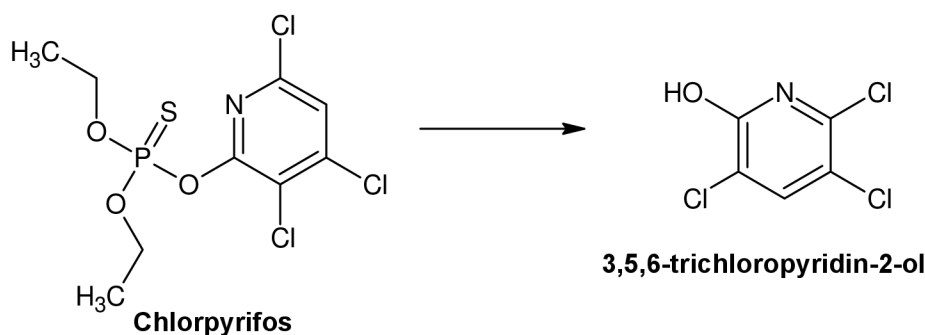
Organofosfátové insekticidy se vstřebávají všemi expozičními cestami. Když je toxické množství vdechnuto, tak první toxický účinek se projevuje zhoršeným dýcháním, krvavými výtoky z nosu, dušností, kašlem a dalšími příznaky. Při kontaktu s pokožkou může vyvolat lokalizované pocení či svalové kontrakce. Při zasažení očí může dojít k zhoršenému vidění, krváčení či slzení. Účinky se mohou objevit hned v prvních minutách nebo během 12 hodin. Smrt může být způsobena respiračním selháním či srdeční zástavou. Při toxikaci může dojít k trvalým následkům. Letální orální dávka LD_{50} u potkana se pohybuje od 82 do 270 mg.kg^{-1} .

Chronická toxicita může mít stejné projevy jako akutní. Dalšími symptomy chronické otravy mohou být poruchy paměti, dezorientace, podrážděnost, nespavost a další příznaky. Nebyly pozorovány, žádné reprodukční účinky, proto jej EPA nezařadila do skupiny reprodukčních toxických látek. V jiné studii byly pozorovány účinky, kdy při dávce 1 mg.kg^{-1} látky denně po dobu dvou generací se projevila zvýšená úmrtnost novorozenců.

U chlorpyrifosu nebyl zjištěn žádný teratogenní efekt. Došlo pouze k drobným kostním změnám a nastal pokles hmotnosti plodu, a to v případě, kdy se myšim po dobu 10 dnů podávala dávka 1 , 10 a 25 mg.kg^{-1} . Není také evidován jako potenciální mutagen a karcinogen.

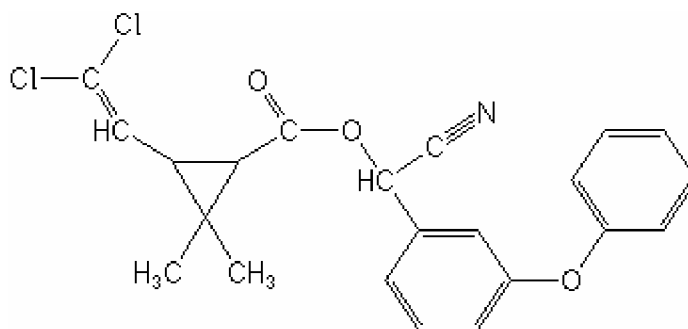
EPA vyžaduje, aby etiketa chlorpyrifosu obsahovala zvýrazněné údaje, že je tato látka nebezpečná pro ptáky, včely, volně žijící zvěř a vodní ekosystém. Orální toxicita LD_{50} pro bažanta je $8,41 \text{ mg.kg}^{-1}$ a pro divokou kachnu je tato hodnota 112 mg.kg^{-1} . Vysoce toxický je pro sladkovodní ryby a bezobratlé živočichy. Aplikace, kde se použije $4,5 \text{ mg}$ této účinné látky na jeden ar, může poškodit výrazně vodní ekosystém.

Chlorpyrifos se velmi snadno rozkládá ve všech složkách životního prostředí (voda, půda, rostliny a zvířata). Dochází k odštěpení vazby fosforu za vzniku 3,5,6-trichlor-2-pyridinolu (TCP), který je považován za toxikologicky nevýznamnou látku. V půdě a vodě, TCP je dále degradován prostřednictvím mikrobiální aktivity a fotolýzou za tvorby oxidu uhličitého a organických látek. U zvířat, může být TCP vylučován přímo nebo konjugací, v rostlinách dochází k odstranění konjugátů TCP [26].



Obrázek 33: Degradace chlorpyrifosu

2.4.5.3 Cypermethrin



Obrázek 34: Strukturální vzorec cypermethrinu

Podle názvosloví IUPAC se jedná o sloučeninu (*RS*)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (*IRS,3RS; IRS,3SR*)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylát s CAS číslem 52315-07-8 a molekulovou hmotností 416,3 g.mol⁻¹.

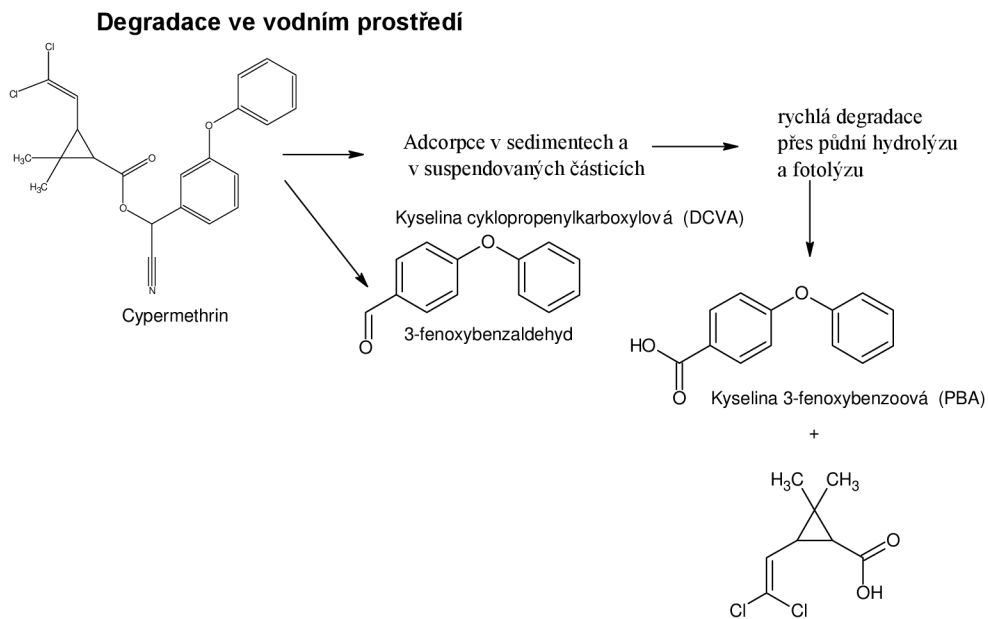
Jedná se o hnědou kapalinu, která je ve vodě nerozpustná, ale za to se dobře rozpouští ve všech organických rozpouštědlech. Je málo těkavá a má velmi nízký tlak par. Vyskytuje se v 8 různých izomerech, z nichž každý může mít své vlastní chemické a biologické účinky. Je stabilní a vyskytuje se v emulzích nebo v prášku.

Cypermethrin patří do skupiny syntetických pyrethroidů. Používá se k ošetření bavlny, řepky olejné, pšenice a dalších kulturních plodin. Považuje se za mírně toxický při orální a dermální expozici a příznaky otravy jsou brnění, svědění, ztráta kontroly močového měchýře, křeče a potlačuje také imunitní systém a tím dochází k rozvoji nemocí. Dráždí oči a může vyvolat alergickou reakci na kůži [27, 29].

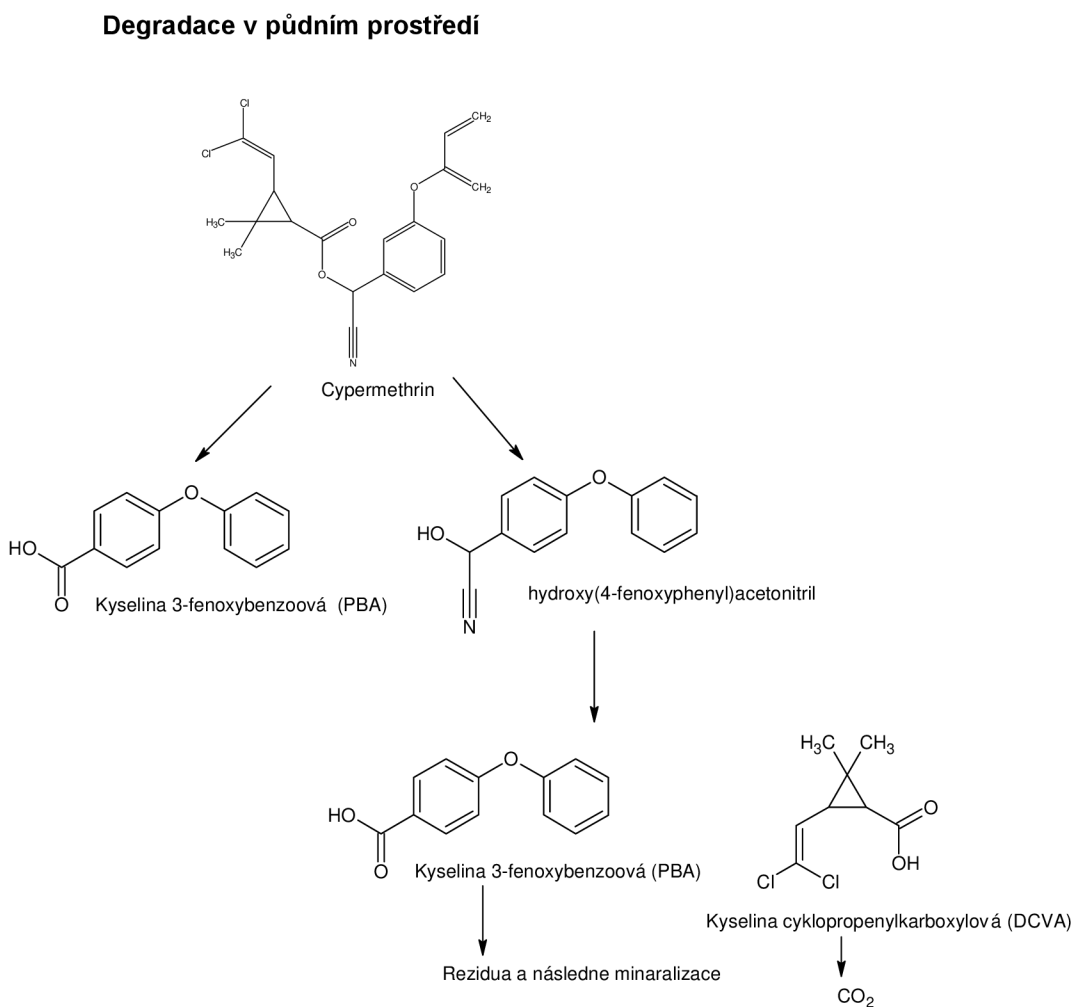
Orální dávka u potkanů je 250 mg.kg⁻¹ v kukuřičném oleji. Jak už bylo řečeno, každý izomer cis/trans může mít jiné toxikologické a biologické vlastnosti. V závislosti poměrů těchto izomerů v testovaných zvířatech se LD₅₀ pohybuje od 150 do 2000 mg.kg⁻¹. Žádné reprodukční a teratogenní účinky nebyly prokázány. Mutagenita nebyla zjištěna, ačkoliv byla při nejvyšší dávce nalezena zvýšená hladina mutagenních buněk v kostní dřeni u myši. Při bližším prozkoumání na lidských subjektech se tato vlastnost neprokázala. EPA klasifikovala cypermethrin jako možný lidský karcinogen kvůli zvýšené frekvenci výskytu nádorů plic u myši. Pro ptáky je prakticky netoxický, ale je vysoce toxický pro ryby a vodní organismy. Hodnota orální LD₅₀ pro *Daphnia magna* je 0,2 µg.l⁻¹. U ryb je metabolizován pomaleji než u savců a jeho kumulace ve vodních organismech je vysoká. Byl také vyhodnocen jako vysoce toxický pro včely. Akutní orální toxicita je 0,035 µg na včelu [28].

Poločas rozpadu se pohybuje od 4 do 12 dnů. Vše závisí na druhu půdy. Bylo dokázáno, že perzistence v písčité půdě je menší než v bahně. Ve Francii byla zjištěna kontaminace podzemní vody touto látkou a další případy kontaminace řeky byly zjištěny v USA [27, 28]. V půdě se vyskytuje jako směs *cis* a *trans* izomerů. *Cis* izomery jsou aktivnější než *trans* forma. Rozkládají se hydrolýzou nebo fotolýzou. Při hydrolýze dochází ke tvorbě 3-fenoxybenzoové kyseliny (PBA) a cyklopropenkarboxyl-derivátů kyselin. Za aerobních podmínek může dojít k další degradaci až na CO₂. Cypermethrin je hydrofobní a samotný je v půdě málo mobilní, zatímco jeho produkty rozpadu (PBA a DCVA) jsou v tomto prostředí velmi pohyblivé. Ve vodě se cypermethrin nerozpouští, a proto se rychle kumuluje v sedimentech a v půdě a tvoří tak rezervoár této látky. Za normálních teplotních podmínek a

pH 7 je ve vodním prostředí stabilní a hydrolyzuje se velmi pomalu. Při pH 9 je hydrolyzá rychlejší [28].



Obrázek 35: Degradace cypermethrinu ve vodním prostředí



Obrázek 36: Degradace cypermethrinu v půdním prostředí

2.4.6 STARANE 250 EC

2.4.6.1 Obecné informace

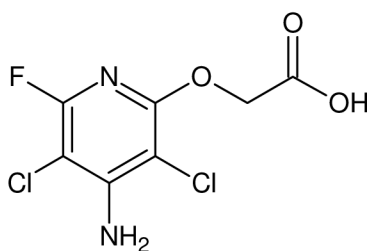
Tento pesticid patří do skupiny herbicidů používaný proti dvouděložným plevelům nejen v obilovinách, kukuřici, ovocných sadech, ale i v okrasných zahradách a trávnicích. Starane 250 EC proniká hluboko do rostlin pomocí jejich listů a pletiv.

Účinná látka fluroxypyr o koncentraci 250 g.l⁻¹ je velmi rychle vstřebána a translokována. Výsledek se projeví během pár hodin a dešťové srážky nikterak neovlivní působení tohoto přípravku. Vyrábí jej firma Synthesia a.s. v Pardubicích ve formě emulgovatelného koncentrátu, který je škodlivý pro včely a jedovatý pro ryby a vodní ekosystém [30].



Obrázek 37: Průmyslové balení STARANE 250 EC

2.4.6.2 Fluroxypyr



Obrázek 38: Strukturální vzorec fluroxypyru

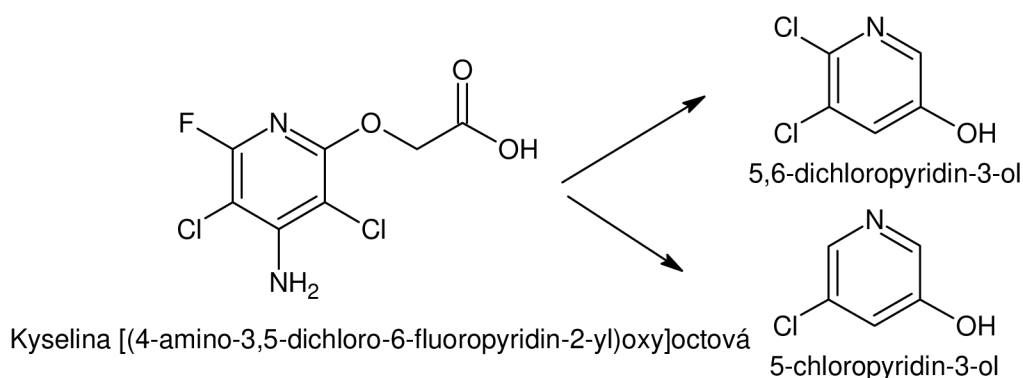
Fluroxypyr je podle názvosloví IUPAC *kyselina 4-amino-3,5-dichloro-6-fluoro-2-pyridyloxyoctová* s CAS číslem 69377-81-7 a molekulovou hmotností 255,03 g.mol⁻¹. Bod varu této sloučeniny se pohybuje od 232 °C až do 233 °C, tlak par je při 25 °C 1,26 mPa. Špatně se rozpouští ve vodě, jeho rozpustnost je 91 mg.l⁻¹, ale dobře se rozpouští v organických rozpouštědlech (aceton: 41,6 g.l⁻¹) [31].

Mezi příznaky otravy fluroxypyrem patří většinou bolesti hlavy, závratě, rozmazané vidění, svalové záškuby atd. K expozici může dojít vdechnutím a při styku s kůží (hlavně při výrobě přípravku). Obecná populace se může dostat do kontaktu s touto sloučeninou pouze z kontaminovaného ovzduší, potravy a vody, ojediněle dermální expozicí. Mírně dráždí oči a kůži. Fluroxypyr není metabolizován v organismu, ale je poměrně rychle vyloučen v moči. Bylo přitom dokázáno, že dochází k poškození ledvin a to má za následek poškození dalších

organů. Nepatří mezi karcinogeny ani mutageny a nebyla prokázána ani reprodukční toxicita. Orální letální dávka LD₅₀ u potkana je 2 405 mg.kg⁻¹ a dermální LD₅₀ pro králíky je > 5000 mg.kg⁻¹.

Dostane-li se přípravek do ovzduší, tak díky jeho tlaku par při 25 °C může existovat v plynné fázi a také jako částice v ovzduší. Dochází zde potom k fotochemickým reakcím. Poločas života fluroxypyru v ovzduší je 13 hodin. Částice jsou z atmosféry vyloučeny suchou a mokrou depozicí.

V půdě je fluroxypyr rychle degradován a poločas rozpadu se odhaduje na 1–3 týdny. Hlavními produkty rozpadu jsou dichloropyridinol a monochloropyridinol. Je škodlivý pro vodní organismy a může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním ekosystému. Nedochází k bioakumulaci fluroxypyru v rybách a vodních organismech [32].



Obrázek 39: Hlavní degradační metabolity fluroxypyru.

2.4.7 PICTOR

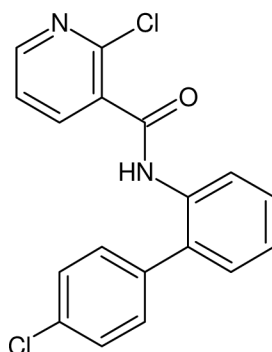
2.4.7.1 Obecné informace

Tento přípravek patří do skupiny fungicidů a na trhu je ve formě tekuté báze. Je nejpoužívanějším přípravkem, který slouží k ošetření řepky a slunečnice proti hlízence obecné, plísni šedé, fómové hnilobě a alternáriové skvrnitosti. Pictor obsahuje dvě účinné látky. Jedná se o boscalid o koncentraci 200 g.l⁻¹ a dimoxystrobin o koncentraci 200 g.l⁻¹. Přípravek lze mísit s běžnými insekticidy a kapalnými hnojivy.

Celý princip účinku těchto dvou účinných látek spočívá na blokaci mitochondriálního dýchání patogenu. Boscalid patří do nové skupiny fungicidů, tzv. anilinů. Blokuje energetický proces na úrovni mitochondriálního dýchání, na tak zvaném komplexu II. Dimoxystrobin patří do skupiny strobilurinů, blokuje mitochondriální přenos elektronů houby na tak zvaném komplexu III. Obě látky tak působí systémově, vykazují preventivní i kurativní účinek, takže chrání rostlinu před napadením, ale také po infekci [33].

Přípravek není snadno odbouratelný v životním prostředí a nesprávné použití tohoto přípravku může být zdraví škodlivé [34].

2.4.7.2 Boscalid

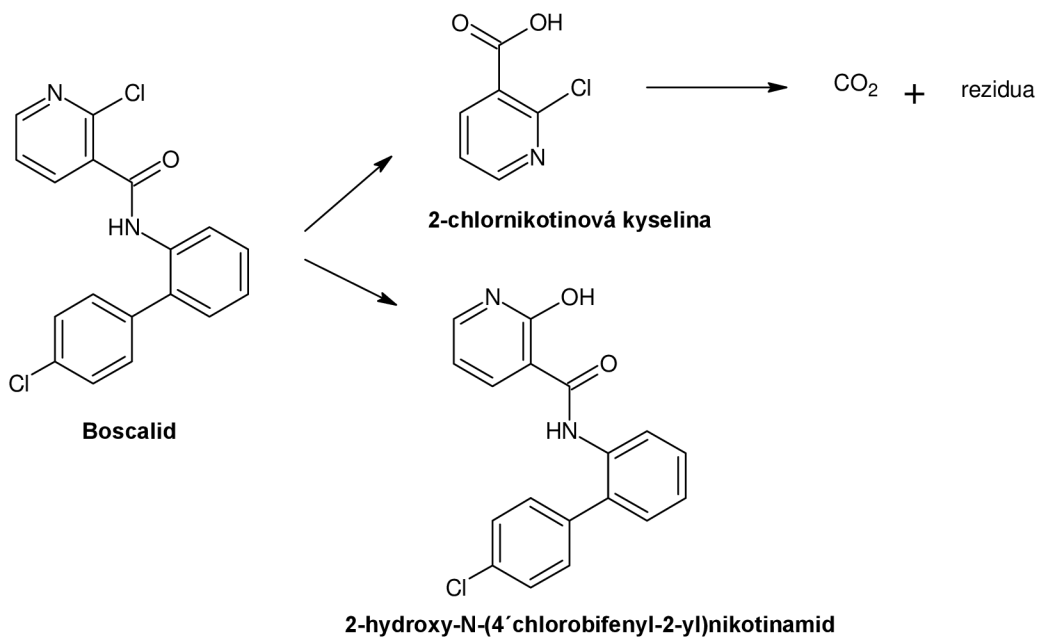


Obrázek 40: Strukturní vzorec boscalidu

Boscalid je podle názvosloví IUPAC *2-chlor-N-(4'-chlor-2-bifenylyl)nikotinamid* s CAS číslem 188425-85-6 a molekulovou hmotností 343,21 g.mol⁻¹. Bod varu je 447,27 °C a tlak par je 2.10⁻⁸ hPa při 25 °C. Je to bílá krystalická látka, která je velmi dobře rozpustná v organických rozpouštědlech [35].

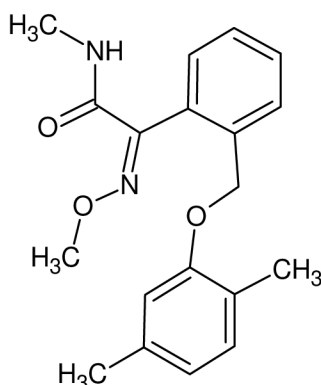
Boscalid má obecně nízkou toxicitu a EPA ho řadí do kategorie III. Při zkoumání subchronické toxicity na pokusných zvířatech došlo ke snížení či zvýšení tělesné hmotnosti a k poškození funkce jater a štítné žlázy. Studie na vývojovou a reprodukční toxicitu zaznamenala zvýšené množství potratů. U narozených mláďat došlo ke snížení tělesné hmotnosti. Při zkoumání chronických příznaků, kde byla zkoumána i karcinogenita, došlo ke zvýšení výskytu folikulárních buněk štítné žlázy, které jsou častou příčinou vzniku nádoru štítné žlázy. Větší výskyt těchto buněk byl zaznamenán u mužského pohlaví. U ženského pohlaví došlo k poškození funkce, ale nebyla prokázána karcinogenita. I když byly zjištěny sugestivní účinky karcinogenity, nezařadila EPA US tuto sloučeninu do registru látek, které mohou být potenciálními lidskými karcinogeny. Nebyla prokázána mutagenita a ani neurotoxicita.

Boscalid je mírně toxický pro vodní organismy, ale v důsledku malé koncentrace nelze považovat tuto látku za velmi nebezpečnou pro vodní ekosystém. Je prakticky netoxický pro zvířata. Jeho orální letální dávka LD₅₀ u potkana je > 5 000 mg.kg⁻¹, dermální dávka LD₅₀ u potkana je > 2 000 mg.kg⁻¹. Boscalid se velmi pomalu rozkládá ve většině půd. Má nízkou mobilitu, protože se sorbuje na organickou hmotu. Primární mechanismus degradace v půdě je aerobní rozklad, kdy dochází k tvorbě mnoha meziproductů a následné přeměně na CO₂ nebo vázaná rezidua. Mezi hlavní meziproducty se řadí 2-chlornikotinová kyselina a 2-hydroxy-N-(4'-chlorobifenylyl-2-yl)nikotinamid. Boscalid je hydrolyticky i fotolyticky stabilní ve vodě i v půdě. Vzhledem k nízké biologické rozložitelnosti boscalidu ve vodním prostředí dochází k ukládání této látky do sedimentu. Nedochozí ke kontaminaci podzemní vody, ale v případě nesprávného použití přípravku může dojít ke zvýšení jeho koncentrace v povrchových vodách. Boscalid se degraduje v sedimentech na 2-chlornikotinovou kyselinu, která podléhá mineralizaci za vzniku CO₂ a vázaných reziduí [36].



Obrázek 41: Aerobní degradace boscalidu v půdě a ve vodě

2.4.7.3 Dimoxystrobin



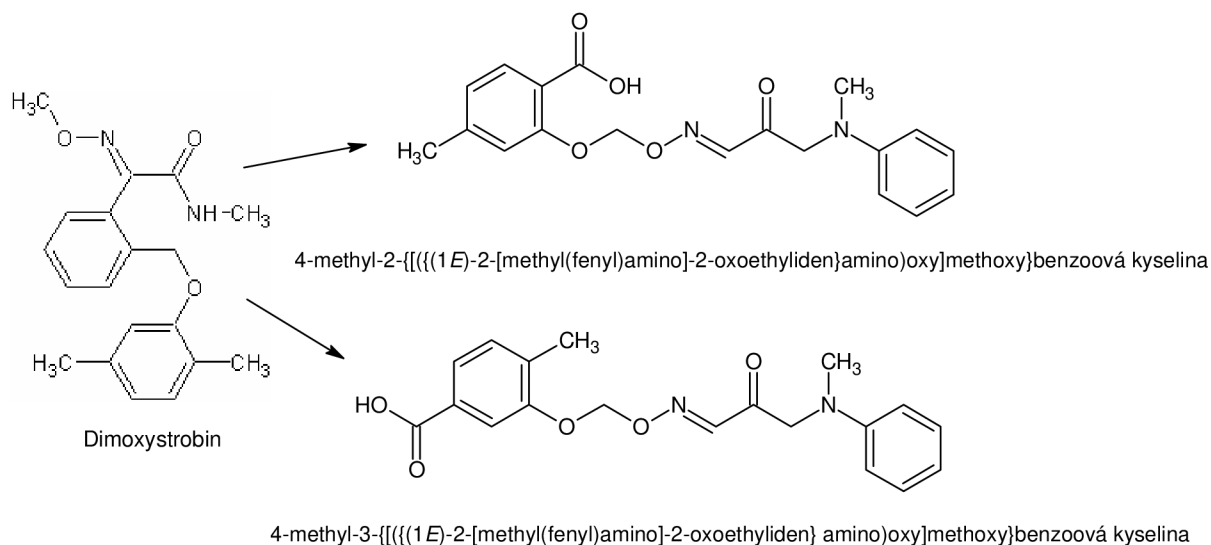
Obrázek 42: Strukturní vzorec dimoxystrobinu

Dimoxystrobin je podle názvosloví IUPAC *(E)*-2-(methoxyimino)-*N*-methyl-2-[α -(2,5-xylyloxy)-*o*-tolyl]acetamid s CAS číslem 149961-52-4 a s molekulovou hmotností 326,39 g.mol⁻¹.

Je to bílá krystalická látka, která se rozkládá již před bodem varu. Teplota, při které začne degradace, je 300 °C. Tlak par při 25 °C je 6.10⁻⁶ mPa. Ve vodě při 20 °C se rozpouští špatně (4,3 mg.l⁻¹), ale velmi dobře se rozpouští v organických rozpouštědlech (aceton: 72 g.l⁻¹).

Má nízkou toxicitu pro savce. Hodnota LD₅₀ pro potkana je > 5000 mg.kg⁻¹. Pro ptactvo je mírně toxický, hodnota LD₅₀ pro křepelku virginskou je > 2000 mg.kg⁻¹. Pro vodní prostředí a ryby je vysoce toxický. Letální koncentrace LC₅₀ pro pstruha duhového po 96 hodinách je 0,0434 mg.l⁻¹ a pro *Daphnia magna* je LC₅₀ po 48 hodinách 0,0394 mg.l⁻¹. Je podezřelý na karcinogenní a reprodukční účinky. Mutagenita a neurotoxicita nebyla prokázána. Dimoxystrobin se pokládá za látku perzistentní a v půdě se rozkládá aerobně. Poločas rozpadu je 210 dnů. Ve vodním prostředí při pH 7 a při 20 °C je velmi stabilní. Hlavními metabolity v půdě jsou 4-methyl-2-[[[(1*E*)-2-[methyl(fényl)amino]-2-

oxoethyliden} amino)oxy]methoxy}benzoová kyselina a 4-methyl-3-[[{(1E)-2-[methyl(fenyl)amino]-2-oxoethyliden} amino)oxy]methoxy}benzoová kyselina



Obrázek 43: Degradace dimoxystrobinu v půdě

2.5 Metoda QuEChERS

Extrakční metoda QuEChERS je velmi rychlá, jednoduchá extrakce a následné přečištění vzorku s použitím dSPE zkumavek.

Byla vyvinuta a publikována institutem US Department of Agricultural Eastern Regional Center ve Wyndmooru. Metoda QuChERS odstraňuje ze vzorku lipidy, sacharidy, organické kyseliny, steroly, proteiny, barviva a vodu. Je velmi rychlá a levná. Skládá se ze dvou kroků. První krok obnáší extrakci vzorku a frakcionaci pomocí organického rozpouštědla s roztokem solí. Druhým krokem je opět extrakce a přečištění organické vrstvy metodou SPE. Využití SPE techniky k čištění extraktů spočívá v odstranění nežádoucích komponent z extraktu, či jiného vzorku zachycením na sorbentu. Cílem je minimalizace sorpce stanovených analytů, které projdou přes kolonku a jsou jímány pro další zpracování a konečnou analýzu [38].

2.6 Kapalinová chromatografie s UV-VIS detektorem

Kapalinovou chromatografií je možno stanovit velký počet organických i anorganických látek. Patří mezi fyzikálně – chemické separační metody, využívající dělení látek za pomoci dvou fází. Tyto fáze se nazývají mobilní fáze (pohyblivá), v našem případě se jedná o kapalinu), a fáze stacionární (nepohyblivá). Za základ principu celé separace se považuje různá afinita složek vzorku k uvedeným fázím. Dá se říci, že čím větší je afinita vzorku ke stacionární fázi a menší k mobilní, tím se bude déle zdržovat v koloně.

2.6.1 Mobilní fáze

Mobilní fáze zde vystupuje jako hlavní nosič vzorku, který byl nastříknut dávkovacím ventilem. Vzorky, které mají vysokou afinitu k mobilní fázi, jsou dříve vymývány z kolony a

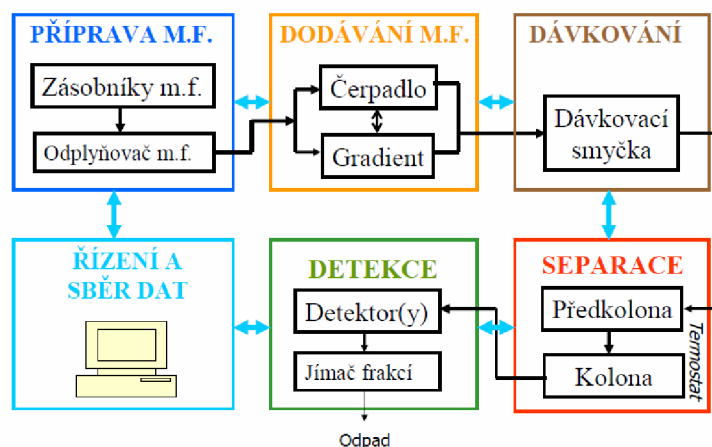
tím i jejich retenční časy jsou krátké. Dle složení mobilní fáze v průběhu analýzy rozlišujeme dva hlavní typy elucí. Při izokratické eluci je využito konstantní složení mobilní fáze. Všechny složky vzorku se začnou na začátku kolony pohybovat, ale každá z nich se pohybuje jinou rychlostí. Další možností je gradientová eluce, která využívá měnícího se složení mobilní fáze v průběhu měření. Všechny složky ve vzorku jsou zadrženy na koloně a postupným zvyšováním eluční síly mobilní fáze začnou kolonou migrovat.

2.6.2 Stacionární fáze

Stacionární fáze se nachází uvnitř kolony, přes kterou protéká mobilní fáze. Interakce mezi stacionární fází a vzorkem, stacionární fází a mobilní fází a mobilní fází a vzorkem jsou různé.

2.6.3 Složení kapalinového chromatografu

Základní části kapalinového chromatografu jsou zásobník mobilní fáze, odplyňovací jednotka, směšovač, vysokotlaká čerpadla, trojcestný ventil, dávkovací zařízení, kolona, detektor, jímač frakcí a zařízení pro zpracování dat. Existuje mnoho typů kapalinových chromatografů, které mají buď více částí, nebo méně, ale princip je stále stejný. Mobilní fáze protéká ze zásobníku do odplyňovací jednotky, dále do směšovače, kde dochází k míchání různých složek mobilní fáze (gradientová eluce). Odtud je vedena do vysokotlakého čerpadla až do dávkovacího ventilu. Zde dochází k vnesení vzorku do proudu mobilní fáze, která jej unáší do kolony. Chromatografická kolona je spojena s detektorem (např. UV-VIS,) a odtud může eluát pokračovat do jímače frakcí. Z detektoru je signál veden do vyhodnocovacího zařízení [39].



Obrázek 44: Schéma kapalinového chromatografu

2.6.3.1 Zásobníky mobilní fáze

Jedná se o zásobní láhve umístěné na horní části kapalinového chromatografu. Tyto láhve jsou většinou skleněné z čirého nebo tmavého skla o objemu 1 l nebo 2,5 l.

2.6.3.2 Odplyňovací jednotka

Mobilní fáze se vakuově odplyňuje při průtoku trubičkou z polopropustného materiálu umístěnou v evakuovaném prostoru. Materiál trubičky je propustný pro molekuly dusíku a kyslíku, ale nepropouští složky mobilní fáze.

2.6.3.3 Čerpadlo a gradient

V současnosti se nejčastěji využívají čerpadla s malým objemem pístu, osazená dvěma písty v sériovém uspořádání. Bezpulsní tok je zajištěn lineárním pohybem pístu prakticky po celý zdvih. Gradient je tvořen buď v nízkotlaké části (před čerpadlem), kde je možno míchat až čtyři složky mobilní fáze, nebo ve vysokotlaké; v tomto případě je čerpadlo osazeno dvěma dvoupístovými jednotkami a lze míchat pouze dvě složky mobilní fáze. [40] Nejčastěji využívanou mobilní fází v současné HPLC je směs vody s organickým modifikátorem (acetonitril, methanol, tetrahydrofuran).

2.6.3.4 Automatický dávkovač pro HPLC

Automatické dávkovače jsou vybavené zásobníkem, ve kterém jsou umístěny vialky se vzorky. Vzorek se dávkuje pomocí vícecestných (např. šesticestných) ventilů vybavených dávkovací smyčkou plněnou částečně nebo úplně. K zamezení kontaminace vzorku se používá oplach jehly. Prostor pro vialky se vzorky může být temperován a chráněn před světlem.

2.6.3.5 Kolony v HPLC

V HPLC se dnes používají převážně náplňové kolony vyrobené z nerezové oceli o průměru nejčastěji 4,6 nebo 2,1 mm a délce 10,15 nebo 25 cm. Jsou nejčastěji plněné částicemi stacionární fáze o malém průměru (3,5 μm a méně), částicemi s pevným inertním jádrem potaženým tenkou vrstvičkou stacionární fáze. Nejpopulárnější jsou náplně založené na silikagelu s povrchem modifikovaným dlouhými alkanovými řetězci (nejčastěji oktadecylem).

2.6.3.6 Detektory v HPLC

Detektory, které se nejčastěji spojují s kapalinovou chromatografií, jsou refraktometrický (měří index lomu eluátu), spektrofotometrický (měří absorpci UV a viditelné oblasti spektra), fluorescenční, elektrochemický (založený na sledování oxidačně-redukční reakce separovaných látek) a hmotnostní (sledování poměrů m/z po ionizaci separovaných složek). V našem případě byla kapalinová chromatografie spojena se spektrofotometrickým detektorem.

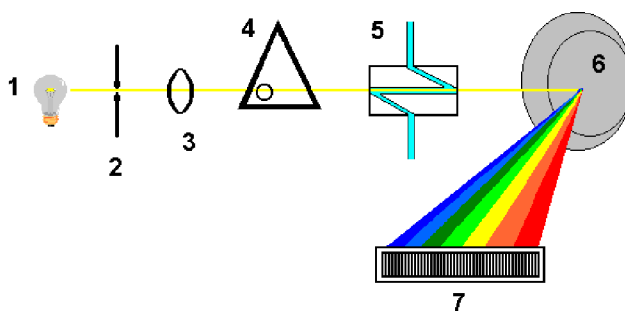
Spektrofotometrické detektory jsou založené na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek od 190 nm až po 800 nm. Vyhodnocení vzhledem ke kvantitě je založeno na Lambert–Beerovu zákonu, který říká, že absorpce je přímo úměrná koncentraci (c) absorbující látky a tloušťce absorbující vrstvy (l).

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

- ε molární absorpční koeficient
 c koncentrace absorbující složky
 l tloušťka absorbující vrstvy

(2)

Tento zákon platí jen v případě, že záření je monochromatické, roztoky musí být zředěné, absorbující záření nesmí podléhat žádným změnám a v roztoku musí být jen jedna absorbující složka. Pokud je v roztoku přítomno více složek, je celková absorbance sumou dílčích absorbcí jednotlivých složek. Detektor s diodovým polem (DAD) snímá celé UV-VIS spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace. Jeho schéma je na Obr. 46. Skládá se ze zdroje záření (1), štěrbin (2), čočky (3), clony (4), měrné cely detektoru (5), holografické mřížky (6) a diodového pole (7).



Obrázek 45: Schéma detektoru DAD

Záření ze zdroje prochází částmi detektoru. Na každou diodu dopadá zářivý tok odpovídající určité vlnové délce zeslabený absorpcí v cele detektoru. Každá fotodioda je spojena s kondenzátorem, jenž je nabitý na určitou hodnotu. Fotoelektrický proud vznikající po dopadu záření na diodu vybijí kondenzátor, přičemž míra jeho vybití je úměrná intenzitě dopadajícího záření. V dalším kroku se kondenzátory nabíjí a změří se náboj, který byl potřebný na jeho dobití. Velikost tohoto náboje se registruje pomocí vyhodnocovacího zařízení [41].

2.7 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS)

Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií se v současné době používá především k analýze těkavých organických polutantů a také semivolatilních sloučenin ve velmi složitých směsích.

Plynová chromatografie je separační metoda, při níž dochází k unášení vzorku nosným plynem (mobilní fáze) kolonou, ve které je obsažena stacionární fáze. Podle různých sorpčních schopností složky ve vzorku začnou interagovat s touto stacionární fází. Oddělené složky jsou dále unášeny nosným plynem kolonou a posléze vstupují do detektoru, kterým je v našem případě hmotnostní spektrometr [42].

2.7.1 Plynová chromatografie

2.7.1.1 Zdroj a regulace nosného plynu

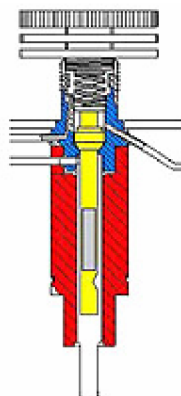
Jako mobilní fáze se používá nosný plyn, který nesmí nikterak ovlivňovat samotný vzorek a kolonu. Nejpoužívanější nosné medium je helium, vodík a dusík. Tyto plyny jsou dodávány v tlakových lahvích. Průtok je v současných plynových chromatografech regulován elektronickým zařízením [42].

2.7.1.2 Dávkovací systém (Injektor)

K dávkování vzorku do plynového chromatografu slouží injektor, ve kterém dochází k vnesení kapalného vzorku do proudu nosného plynu a k jeho velmi rychlému odpaření. V případě kapilárních kolon se dávkování vzorku může provádět několika způsoby:

- S děličem toku (split injection)
- Bez děliče toku (spliless injection)
- Dávkování přímo do kolony.
- Dávkování s programově zvýšenou teplotou

[43]



Obrázek 46: Split - spliless dávkovací zařízení

2.7.1.3 Chromatografická kolona

Srdcem každého chromatografu je kolona. Používají se náplňové a kapilární kolony. V plynové chromatografii se využívají především kapilární kolony o různých délkách a průměrech. Délky těchto kapilár se pohybují od 20 až do 200 m a průměr je nejčastěji v rozmezí 0,2 - 0,53 mm. Materiálem pro výrobu těchto kolon bývá křemen a kapilára, jenž je velmi křehká, se ještě pokrývá polyimidovou vrstvou, která ji chrání a dodává jí pružnost.

Na vnitřní stěně kapilární kolony se nachází stacionární fáze, která díky své povaze dokáže rozdělit složky unášené nosným plynem. V současnosti se používají stacionární fáze, které splňují následující požadavky:

- Vysoká reprodukovatelnost
- Tepelná odolnost
- Stabilita

V současnosti se nejvíce používají stacionární fáze na bázi siloxanů substituovaných methyl- a fenylskupinou, které jsou chemickou vazbou zachyceny na vnitřní stěně kapilární kolony. Nejčastěji jsou využívány stacionární fáze na bázi 5% difenylsiloxanu a 95% dimethylsiloxanu, označované jako DB-5, HP-5, RTX-5 atd. podle výrobce.

2.7.1.4 Termostat

Termostat zajišťuje vysokou teplotu dávkovače, který převádí vzorek do plynného skupenství. Dále udržuje stabilní teplotu v koloně a v detektoru. V průběhu analýzy lze teplotu na koloně programově měnit [43].

2.7.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie se zakládá na schopnosti dělit nabitě částice podle jejich poměru m/z v elektrickém, případně magnetickém poli. Tato metoda je použitelná pro všechny prvky. Je vysoce citlivá a poměrně nenáročná na množství vzorku. Zařízení se skládá ze vstupu vzorku, z iontového zdroje, iontové optiky, disperzního prvku, detektoru a vakuového systému [44].

2.7.2.1 Ionizační techniky

Elektronová ionizace (EI) je nejpoužívanější tvrdá ionizační technika. Principem této techniky je interakce analyzované látky s proudem urychlených elektronů (70 eV) za vzniku radikál - kationu (M^+). Jako zdroj elektronů se nejčastěji využívá elektricky žhavené rheniové nebo wolframové vlákno.

Chemická ionizace (CI) patří do skupiny měkkých ionizačních technik. Primárním zdrojem je opět proud urychlených elektronů, který ionizuje reakční plyn vyskytující se v iontovém zdroji ve výrazném nadbytku oproti vzorku. K ionizaci dochází v důsledku ion-molekulárních reakcí mezi reaktivními speciemi vzniklými z reakčního plynu a molekulami vzorku. Nejpoužívanějším reakčním médiem je methan.

Elektrosprej (ESI) je technika převodu iontů z kapalné fáze do plynné. Dochází ke vzniku nabitých kapének na konci sprejovací kapiláry v důsledku působení intenzivního elektrického pole.

Matrix Asssted Laser Desorption/Ionization (MALDI) je technika, kde vzorek je smíchán s matricí a nanesen na destičku s terčíky. Zdrojem záření jsou lasery pracující v UV a IČ spektru. Vzorek je ozářen laserem a tím je vyvoláno jeho odpaření a ionizace [45].

2.7.2.2 Analyzátoři v MS

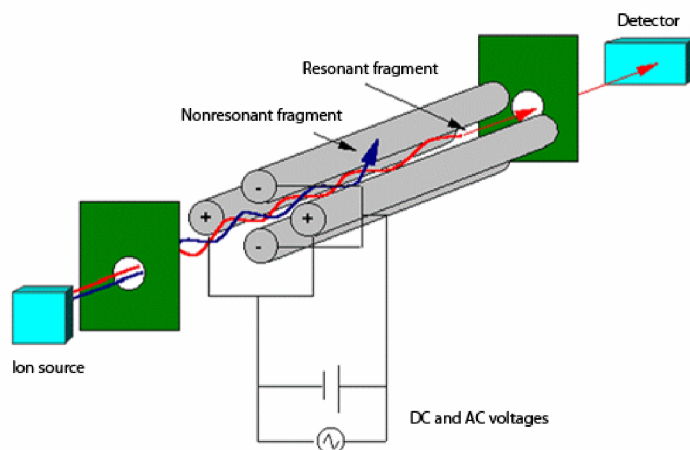
Funkcí analyzátorů je separace iontů na základě jejich poměru hmotnosti a náboje (m/z). Fyzikální principy, které k tomuto účelu využívají, jsou odchýlení iontů v elektrickém a magnetickém poli, oscilace iontů v elektrickém poli vytvořeném kombinací stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí, měření doby letu iontů, absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v magnetickém a elektrickém poli.

Magnetický analyzátor umožňuje prostorové rozdělení monoenergetického svazku iontů podle m/z . Ionty urychlené v iontovém zdroji mající stejnou kinetickou energii vstupují do magnetického pole elektromagnetu, kde opisují dráhu o různých poloměrech zakřivení a tím dochází k jejich rozdělení podle jejich efektivní hmotnosti.

Elektrostatický analyzátor (ESA) pracuje na stejném principu jako magnetický analyzátor, namísto magnetického pole využívá pole elektrické.

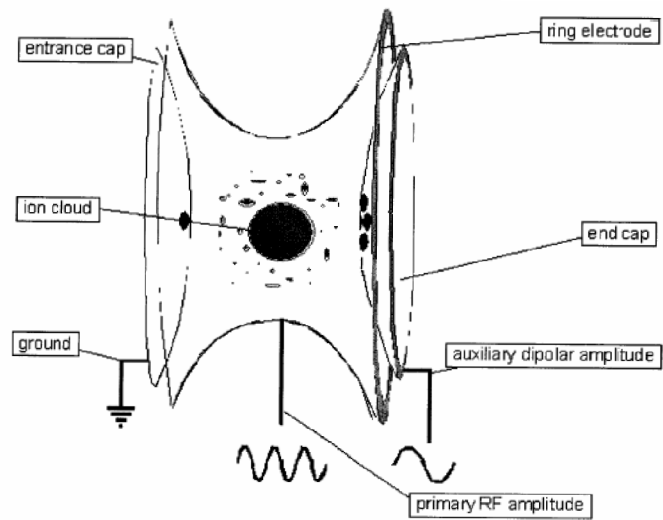
Průletový analyzátor (TOF) je nejjednodušším hmotnostním analyzátozem ve hmotnostní spektrometrii. Je tvořen prázdnou trubicí, do které pulsním způsobem vstupují ionty urychlené na stejnou kinetickou energii. Ionty s větší hmotností se pohybují nižší rychlostí než ionty lehčí. Čím delší je letová trubice, tím je rozdělení iontů lepší.

Kvadrupólový analyzátor (Q) je nejčastěji využíván ve spojení s plynovou nebo vysokoučinnou kapalinovou chromatografií. Zařízení se skládá ze čtyř kruhových tyčí, které jsou připojeny ke zdroji stejnosměrného a střídavého napětí. Ionty, které vcházejí do prostoru mezi těmito tyčemi, se dostanou do střídavého pole a začnou oscilovat. Při vhodném poměru stejnosměrného a střídavého napětí a dané hodnotě těchto napětí projdou jen ionty o určité hodnotě m/z .



Obrázek 47: Schéma kvadrupólu

Iontová past (IT) je zařízení, které umožňuje pomocí elektrického pole uzavřít ionty v ohraničeném prostoru. Iontová past se skládá ze tří součástí. Jedná se o vstupní a výstupní elektrodu kruhového průřezu a prstencovou středovou elektrodu. Krajní elektrody jsou uzemněny a na středovou elektrodu se vkládá vysokofrekvenční napětí s proměnnou amplitudou. Ionty jsou nuceny se pohybovat uvnitř iontové pasti na cyklických drahách. S rostoucí amplitudou napětí se ionty s rostoucí m/z dostávají na nestabilní trajektorie a opouštějí prostor směrem k detektoru [46].



Obrázek 48: Schéma iontové pasti

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Odběr vzorku

3.1.1 Oblast odběru

Město Kunštát se nachází v oblasti západního Boskovicka, v severozápadní části okresu Blansko. Krajina se rozprostírá v nejvýchodnější části Českomoravské vysočiny. Nazývá se Hornosvaratecká vrchovina a dosahuje na severozápadě a západě až 700 m.n.m. a směrem k jihovýchodu a východu se snižuje až na 300 m.n.m. Vrchy a kopce se spojují v horské hřebeny, které místy příkře spadají do údolí, místy přecházejí poznenáhlu do roviny. Z některých kopců je krásný pohled do krajiny, kde se střídají lesy jehličnaté se smíšenými, sady s hájky nebo poli, loukami a pastvinami oddělenými remízky. Území Kunštátu, Lysic a Olešnice patří do povodí řeky Svitavy a z menší části i do povodí řeky Svratky. V Kunštátě žije zhruba 2000 obyvatel. Od roku 1980 byl chráněný přírodní park pokřtěn na Halasovo Kunštátsko.

Zakladatelem městečka byl Kuna, syn Herolta z Obřan. První písemná zmínka o Kunovi je z roku 1281 v listině Alberta z Dubna. Město vystřídal mnoho názvu od Kunina Města až po Kunstadt a od roku 1872 již zůstal jeho dosavadní název „Kunštát“. Kuna, který věrně sloužil králi Přemyslu Otakarovi II., si vybral zdejší kraj a založil zde hrad a také město. To se velmi rychle rozrůstalo. Nejvýznamnější osobností Kunštátu je král Jiří z Poděbrad a z Kunštátu, který zde strávil dětství se svým poručíkem Heroldem z Kunštátu a Lestnice. Bývalý hrad byl poté přestavěn na zámek. Unikátním objevem z roku 1994 při opravách omítek na zámku došlo k objevení mnoha pozdně románských kamenických detailů patřících do románského stylu. Tím se náš zámek, který je jediným tohoto druhu na Moravě, zařadil mezi nejstarší šlechtické hrady.



Obrázek 49: Zámek Kunštát

Jedno z odběrových míst se nachází ve vesničce Sychotín, která je přiřazena pod Kunštát. Včelín č. 1 byl umístěn na konci této vesničky. V okolí se nacházela čerpací stanice a vede

zde hlavní silnice na Olešnici. Včelín byl obklopen smíšeným lesem a poblíž se nacházelo pole s řepkou a obilím.



Obrázek 50: Odběrové místo Sychotín - umístění včelínu

Druhé odběrové místo se nachází v oblasti Toubož. Poloha Toubož je asi 2 km jihozápadně od Kunštátu a opět patří pod obec Kunštát. Trvale zde žije přibližně 30 obyvatel. Je to malebná vesnička, kde se zastavil čas. V okolí se nacházejí jehličnaté a smíšené lesy a je zde mnoho neobdělávaných luk. Přibližně asi 1–2 km od včelína se nacházejí velké lány s řepkou olejkou, obilím a mákem.



Obrázek 51: Odběrové místo Toubož - umístění včelínu

3.1.2 Vlastní odběr vzorků

Byl odebírán pyl rouskový a pyl plástový. Analýza byla ještě doplněna odběrem medu. Odběr se prováděl přibližně po měsíci. Vše bylo závislé na počasí. V roce 2010 bylo jaro a léto velmi deštivým obdobím, takže odběr pylu nebylo možné provádět v přesnějších termínech. Termíny odběru jsou uvedeny v tabulce č. 7. Vzorky byly vysušeny při pokojové teplotě po dobu 48 hodin a poté uloženy v ledničce v polyethylenových sáčcích.

Tabulka 6: Data odběru pylu

Druh pylu	Datum	Místo odběru	Čas odběru [hod]	Teplota [°C]	Tlak [hPa]
Rouskový pyl	22. 5. 2010	Touboř	13:00	13,8	1020,7
	22. 5. 2010	Sychotín	19:30	13,8	1020,7
	25. 6. 2010	Touboř	18:00	23,0	1011,8
	25. 6. 2010	Sychotín	19:00	23,0	1011,8
	5. 8. 2010	Touboř	18:30	25,0	1015,3
	6. 8. 2010	Sychotín	19:30	23,0	1010,6
Plástový pyl	22. 5. 2010	Touboř	18:30	13,8	1020,7
	22. 5. 2010	Sychotín	19:30	13,8	1020,7
	8. 7. 2010	Sychotín	19:00	31,0	1022,3
	13. 7. 2010	Touboř	19:30	28,5	1016,6
	5. 8. 2010	Touboř	18:30	25,0	1015,6
	6. 8. 2010	Sychotín	19:30	23,0	1010,6

Tabulka 7: Data odběru medu

Datum medování	Druh medu
10. 6. 2010	Smíšený
26. 6. 2010	Smíšený
17. 7. 2010	Lesní
31. 7. 2010	Lesní

3.1.2.1 Odběr rouskového pylu

Rouskový pyl je pyl, který včely přinášejí do úlu, ale ještě není zpracovaný. Odběr se provádí pomocí speciální mřížky, nazývané „pylochyt“. Vždy v době odběru se mřížka umístila před česno v časných ranních hodinách a ještě tentýž den večer se tato mřížka oddělávala. Včely při přiletu z venku musí prolézt touto mřížkou. Při průchodu dojde k odpadnutí pylu do nerezové misky, umístěné pod česnem. Na následujících obrázcích je zobrazen odběr rouskového pylu.



Obrázek 52: 1. Odhalené česno; 2. - 3. montáž pylochyty; 4. ukázka způsobu průlezu včely touto mřížkou

3.1.2.2 Odběr plástového pylu

Plástový pyl je pyl, který je uložen v buňkách plástu. Tento druh pylu byl odebírán tzv. „vypíchnutím“ z buňky, kde je pyl umístěn. K tomu slouží tzv. „vypichovátko“, kterým se pyl odstraní, ale nedojde k velkému poškození buňky plástu.



Obrázek 53: Odběr plástového pylu

3.1.2.3 Odběr medu

Med byl odebírán vždy při medování. V roce 2010 se medovalo celkem 4x, a to v měsících červen až červenec. Zde bohužel nebylo možné oddělit med podle stanovišť. Po odvíčkování se rám s plástem uloží do medometu a odstředivou silou se med vytočí do medometu a po následném přecezení a vyčeření se stočí do potravinových plastových nádob. Med byl odebírán do zavařovacích sklenic.



Obrázek 54: Vzorky medu

3.2 Příprava vzorků

Vzorky pylu a medu byly připravovány podle článku „High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health“ [47]. Byla zde využita medota QuEChERS.

3.2.1 Přístroje a vybavení pro přípravu vzorků

- Analytické váhy, Sartorius, Německo
- Centrifuga
- SPE vybavení, Barker, model SPE-12G (Holandsko)
- TurboVap[®], Caliper Life Sciences, USA
- Teflonové filtry, Cronus filtr Syringe Teflon 4 mm, 0,45 Green
- injekční stříkačka a další běžné vybavení

3.2.2 Chemikálie

Extrakční roztok: Acetonitril: deionizovaná voda: kyselina octová (55:44:1)

- Acetonitril gradient grade pro chromatografii LiChrosolv[®], Merck (Německo)
- Deionizovaná voda
- kyselina octová 99 %, Penta, Chrudim

Vnitřní standard:

- Deuterovaný methiocarb, Dr Ehrenstorfer GmbH (Německo)

Standardy:

- Dicamba, Dr Ehrenstorfer GmbH (Německo)
- Propiconazol, Dr Ehrenstorfer GmbH (Německo)
- Chlorpyrifos, Dr Ehrenstorfer GmbH (Německo)
- Boscalid, Dr Ehrenstorfer GmbH (Německo)
- Mesotrione, Dr Ehrenstorfer GmbH (Německo)

QuChERS sloučeniny:

- Síran hořečnatý $MgSO_4$
- Anhydrid octanu sodného NaAc

SPE vybavení pro analýzu GC/MS:

- SPE kolonky:
 - 250 mg grafitizovaného uhlíku
 - 500 mg PSA
 - 800 mg anhydridu síranu hořečnatého $MgSO_4$
- Promývací roztok: Aceton: toluen (7:3)
 - Aceton, Chromservis s.r.o., Praha
 - Toluén pro chromatografii LiChrosolv (R), Merck, Německo

3.2.2.1 Postup

Do plastických zkumavek byly naváženy 3,0 g pylu. Poté bylo přidáno 30 ml extrakčního rozpouštědla (aceton: deionizovaná voda: kyselina octová (55:44:1) a asi 3 minuty se ručně třepalo. Do protřepaných vzorků bylo přidáno 20 μ l vnitřního standardu a opět se vzorky protřepaly. Do každé zkumavky bylo potom přidáno 6 g anhydridu síranu hořečnatého a 1,5 g anhydridu octanu sodného. Vzorky se třepaly po dobu asi 1 minuty a poté byly odstředěny centrifugou po dobu 2 minut při 2000 otáčkách.

Do SPE kolonek, obsahujících 250 mg grafitizovaného uhlíku a 500 mg PSA, byla přidána třetí vrstva 800 mg anhydridu síranu hořečnatého. Kolonky byly aktivovány 4 ml směsného roztoku (aceton: toluen (7:3)). Do aktivovaných kolonek se přidalo 10 ml extraktu vzorku a 4 ml směsného roztoku (Aceton: toluen) a eluát byl jímán do 20 ml skleněných vialek.

Takto pročištěné vzorky byly odpařeny pod dusíkem pomocí přístroje TurboVap[®] při teplotě vodní lázně 50 °C po dobu 40 min. Zkoncentrované vzorky byly naředěny 400 μ l acetonu a byly přefiltrovány přes teflonový filtr do 2 ml vialek pro automatický dávkovač GC/MS.



Obrázek 55: Ukázka přípravy vzorků: Panel 1: Zkumavka s roztokem vzorku; Panel 2: SPE zařízení, Panel 3: Vzorky pylu nachystané na zkoncentrování

3.3 Analýza pomocí HPLCs UV-VIS detekcí

3.3.1 Zařízení

- Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, USA)
- UV-VIS detektor s diodovým polem
- Software ChemStation for LC systém, Rev. B.01.03 (204)



Obrázek 56: Agilent 1100 Series HPLC

3.3.2 Chemikálie a rozpouštědla

Standardy

- Boscalid v cyklohexanu
 - Koncentrace 10 mg.l^{-1} ; čistota: 99,5 %, hmotnost: 5,026 mg
- Dicamba v acetonitrilu
 - Koncentrace 100 mg.l^{-1} ; čistota: 99,0 %, hmotnost: 2,528 mg
- Chlorpyrifos v cyklohexanu
 - Koncentrace 100 mg.l^{-1} ; čistota: 99,0 %, hmotnost: 2,528 mg
- Propiconazole v cyklohexanu
 - Koncentrace 100 mg.l^{-1} ; čistota: 97,5 %, hmotnost: 5,129 mg
- Mesotrione
 - Pevná krystalická látka, hmotnost: 1 g

Rozpouštědla:

- Acetonitril, Multisolvent, Scharlau Chemie (Barcelona)
- Deionizovaná voda

3.3.3 Chromatografické podmínky

3.3.3.1 Autosampler

Objem dávkovaného vzorku byl nastaven na 10 μl .

3.3.3.2 Mobilní fáze

Jako mobilní fáze byly použity acetonitril (ACN) a deionizovaná voda (DW). Gradient mobilní fáze trval 8 minut a jeho nastavení je uvedeno v tabulce č. 9.

Tabulka 8: Gradient mobilní fáze

t [min]	Poměr ACN :DW
0	10:90
2	20:80
4	50:50
6	80:20
8	100:0

3.3.3.3 Kolona

Byla použita kolona ZORBAX[®] SB – C18 o rozměrech 3,0 x 250 mm s velikostí částic náplně 5 μm , pro maximální teplotu 90 °C a tlak 350 bar (Agilent Technologies). Průtok mobilní fáze kolonou byl nastaven na 0,5 ml.min⁻¹.

3.3.3.4 Termostat

Termostat kolony byl nastaven na teplotu 25 °C.

3.3.4 UV – VIS DAD detektor

UV-VIS detektor s diodovým polem byl nastaven pro zobrazení chromatogramů při vlnových délkách 230 nm, 254 nm, 270 nm a 275 nm.

3.3.5 Postup analýzy

Měření probíhalo na uvedené koloně v systému obrácených fází. Byly změřeny standardy při uvedených podmínkách.

3.4 Analýza na GC/MS

Vzorky byly proměřeny v modu SCAN a SIM. Celková doba analýzy trvala 13 minut.

3.4.1 Zařízení

Agilent 6890 Series GC Systém (Agilent Technologies, USA)

Agilent 5973 Network Mass Selective Detector (Agilent Technologies, USA)

Software Enhanced ChemStation (Agilent Technologies, USA), verze 00.00.38



Obrázek 57: Agilent 6890 Series GC System / Agilent 5973 Network Mass Selective Detector

3.4.2 Chemikálie a rozpouštědla

Standardy

- Boscalid v cyklohexanu
 - Koncentrace 10 mg.l⁻¹; čistota: 99,5 %, hmotnost: 5,026 mg
- Dicamba v acetonitrilu
 - Koncentrace 100 mg.l⁻¹; čistota: 99,0 %, hmotnost: 2,528 mg
- Chlorpyrifos v cyklohexanu
 - Koncentrace 100 mg.l⁻¹; čistota: 99,0 %, hmotnost: 2,528 mg
- Propiconazole v cyklohexanu
 - Koncentrace 100 mg.l⁻¹; čistota: 97,5 %, hmotnost: 5,129 mg
- Mesotrione
 - Pevná krystalická látka, hmotnost: 1 g

Rozpouštědla:

- Aceton pro organickou stopovou analýzu SupraSolv(R), Merck, Německo
- Hexan pro organickou analýzu, J. T. Baker, Holandsko

3.4.3 Chromatografické podmínky

3.4.3.1 Automatický dávkovač

Automatický dávkovač byl nastaven na nástřik objemu vzorku 1 μl . Na vypláchnutí stříkačky byl použit aceton a hexan.

3.4.3.2 Dávkování

Bylo využito bezděličové dávkování. Teplota při nástřiku byla 250 °C. Jako nosný plyn bylo použito helium čistoty 99,998 %, při průtoku 1,3 ml/min (konstantní průtok).

3.4.3.3 Kolona

Byla použita kolona HP-5MS 5 % Phenyl MethylSiloxan o rozměrech 30 m x 250 μm x 0,25 μm (Agilent Technologies).

3.4.3.4 Termostat

Termostat byl nastaven na počáteční teplotu 60 °C. Tato teplota se podržela 0,5 min a poté byla zvyšována rychlostí 25 °C za minutu do 300 °C.

3.4.4 Podmínky MS

Teploty, které byly nastaveny na hmotnostním spektrometru, jsou uvedeny v tabulce č. 10. Tyto teploty byly nastaveny po celou dobu měření.

Tabulka 9: Teploty nastavené na hmotnostním spektrometru

Teplota transferline	298 °C
Teplota iontového zdroje	230 °C
Teplota kvadrupólu	150 °C

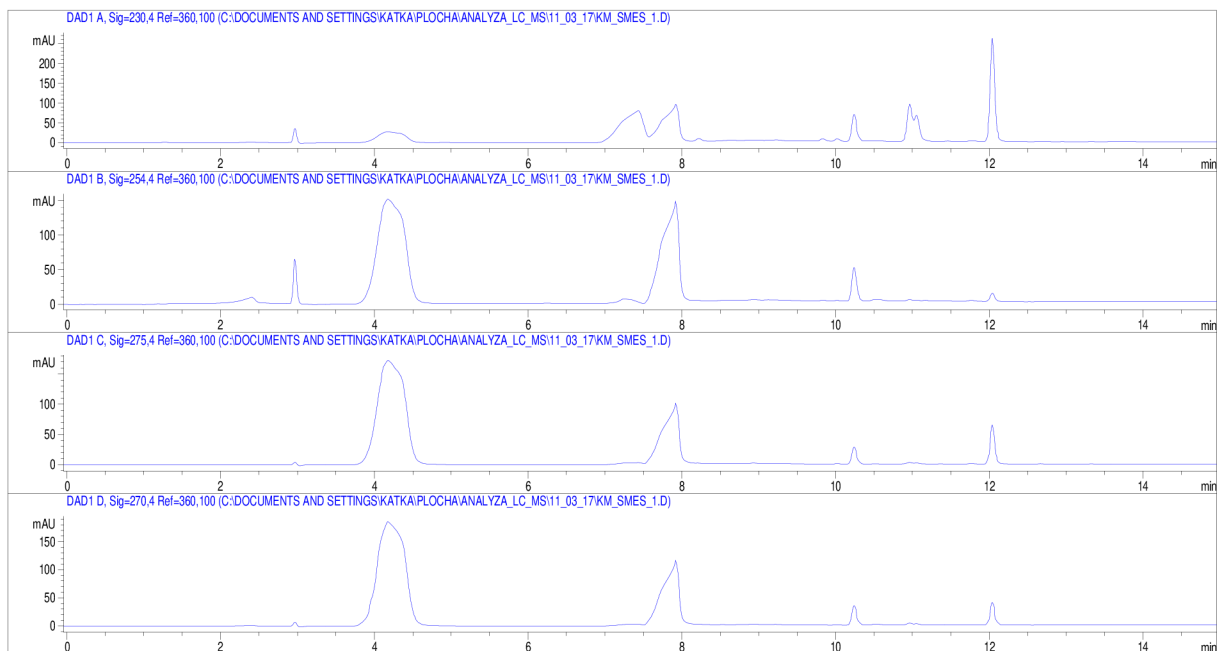
3.4.5 Postup analýzy

Byly změřeny standardy určených účinných látek. Dále byla proměřena kalibrace pro standardy o koncentracích 100 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, 80 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, 60 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, 30 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, 15 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, 5 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ (Dicamba, Chlorpyrifos, Mesotrione, Propiconazol) a pro Boscalid byla připravena kalibrační řada 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, 8 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, 6 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, 3 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, 1,5 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, 0,5 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Dále byly změřeny vzorky pylu a medu metodou SCAN a SIM.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Výsledky z analýzy LC/DAD

Na kapalinovém chromatografu Agilent 1100 Series s UV-VIS DAD detektorem byly proměřeny standardy vybraných účinných látek, tj. Boscalid, Dicamba, Chlorpyrifos, Mesotrione, Propiconazole při vlnových délkách 230 nm, 254 nm, 270 nm a 275 nm. Pro vyhodnocení byla vybrána vlnová délka 230 nm.

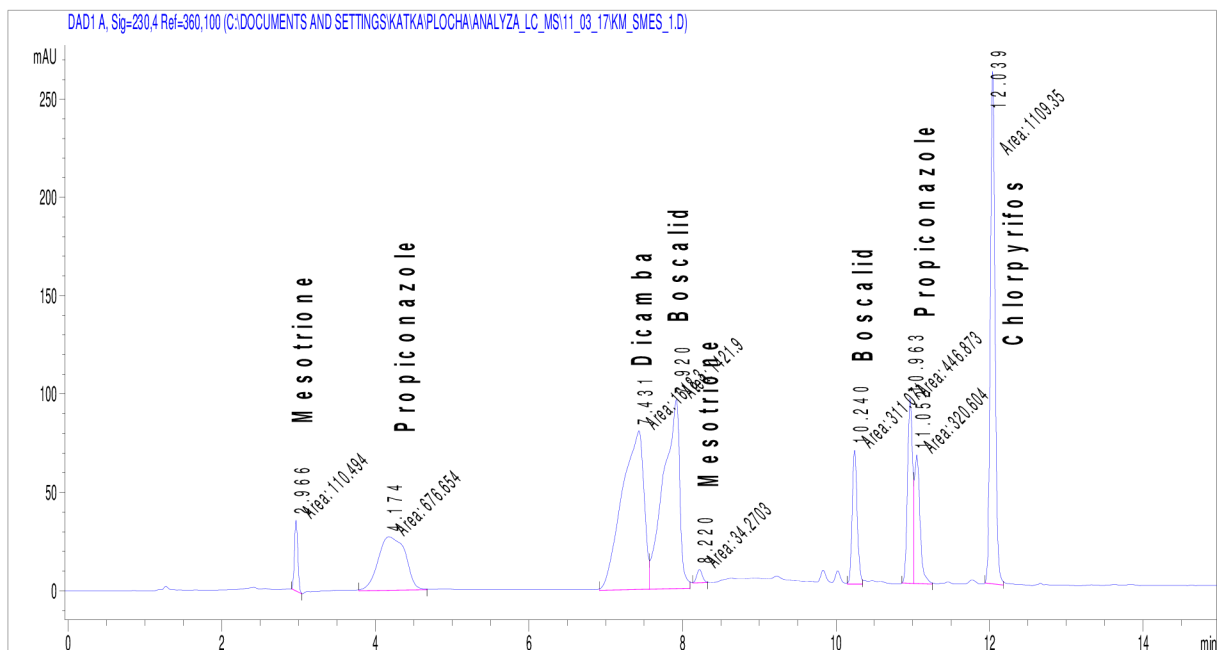


Chromatogram 1: Chromatogram standardů pro vlnové délky 230 nm, 254 nm, 275 nm, 270 nm

4.1.1 Vyhodnocení spektra pro vlnovou délku 230 nm

Tabulka 10: Spektrum standardů při vlnové délce 230 nm - naměřené údaje

Retenční čas t_R [min]	Název standardu	Plocha [mA.s]	Výška [mA]
2,966	Mesotrione	110,5	36,6
4,174	Propiconazole	676,7	27,3
7,431	Dicamba	1618,3	80,9
7,920	Boscalid	1421,9	96,4
8,22	Mesotrione	34,3	6,8
10,24	Boscalid	311,1	68,7
10,963	Propiconazole	446,9	94,4
11,052	Propiconazole	320,6	65,9
12,039	Chlorpyrifos	1109,4	262,2



Chromatogram 2: Chromatogram standardů pro vlnovou délku 230 nm

4.2 Výsledky z GC/MS

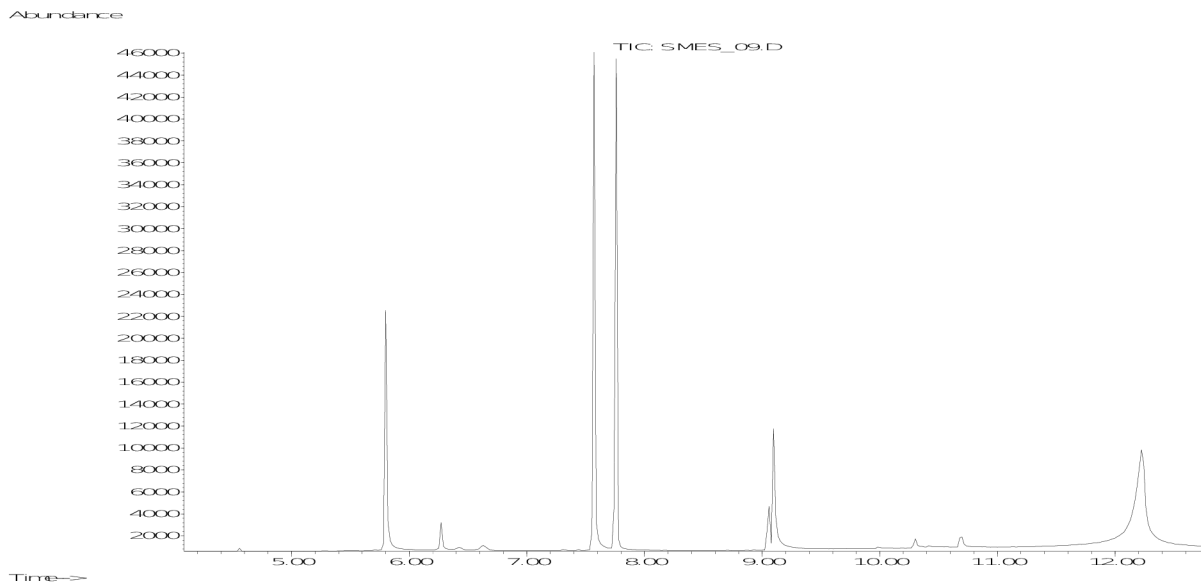
4.2.1 Analýza metodou SIM

4.2.1.1 Vyhodnocení standardů

Bylo měřeno na plynovém chromatografu Agilent 6890 Series GC System s hmotnostním spektrometrem Agilent 5973 Network Mass Selective Detector. Byly proměřeny standardy vybraných účinných látek, tj. Boscalid, Dicamba, Chlorpyrifos, Mesotrione, Propiconazol při standardních podmínkách stanovení pesticidů. Podmínky jsou uvedeny v experimentální části v podkapitole 3.4.

Tabulka 11: Vyhodnocení standardů

Názvy standardů	Retenční čas t_R [min]
<i>Boscalid</i> ($c = 10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	10,69
<i>Dicamba</i> ($c = 100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	6,27
<i>Chlorpyrifos</i> ($c = 100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	7,76
<i>Mesotrione</i> ($c = 1000 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	12,23
<i>Propiconazole</i> ($c = 100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	9,06 a 9,10
<i>Methiocarb (ISTD)</i> ($c = 100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	5,08 a 7,57



Chromatogram 3: Naměřené standardy

4.2.1.2 Vyhodnocení kalibrační řady

Pro standardy dicamba, chlorpyrifos, propiconazole byly hodnoty kalibrační řady $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, $15 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, $30 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, $60 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, $80 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Pro boscalid byly hodnoty $0,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, $1,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, $3 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, $6 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, $8 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

Vzorový výpočet kalibrační řady pro hodnotu $80 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$

Výchozí koncentrace je $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$

$$V_2 = 100 \mu\text{l}$$

$$c_2 = 80 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$$

$$c_1 = 10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$$

$$\underline{V_1 = ?}$$

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

$$10 \cdot V_1 = 80 \cdot 100$$

$$\underline{\underline{V_1 = 80 \mu\text{l}}}$$
 standardu o koncentraci $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$

Mez Stanovitelnosti LOQ

Odpovídá koncentraci, při které je přesnost stanovení taková, že dovoluje kvantitativní vyhodnocení.

$$LoQ = \frac{c \cdot 10}{S/N} \quad (3)$$

N šum základní linie, S výška píku standardu nejmenší koncentrace v kalibrační řadě.

Mez detekce LOD

Odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu.

$$LoD = \frac{c \cdot 3}{S/N} \quad (4)$$

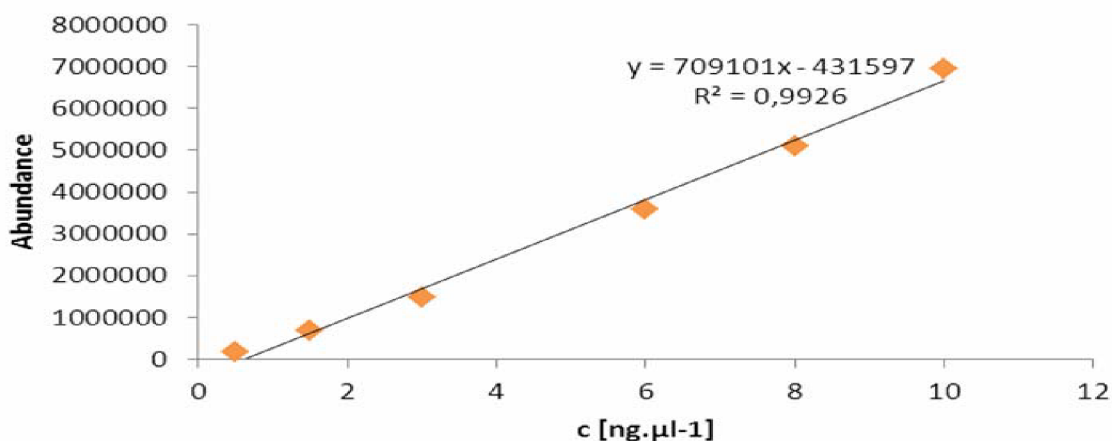
Tabulka 12: Hodnoty meze stanovitelnosti a meze detekce pro standardy

Název standardu	LOQ [ng.µl ⁻¹]	LOD [ng.µl ⁻¹]
<i>Boscalid</i>	1,309	0,393
<i>Dicamba</i>	39,27	11,77
<i>Chlorpyrifos</i>	0,2890	0,008
<i>Mesotrione</i>	13,77	4,132
<i>Propiconazole</i>	1,045	0,314

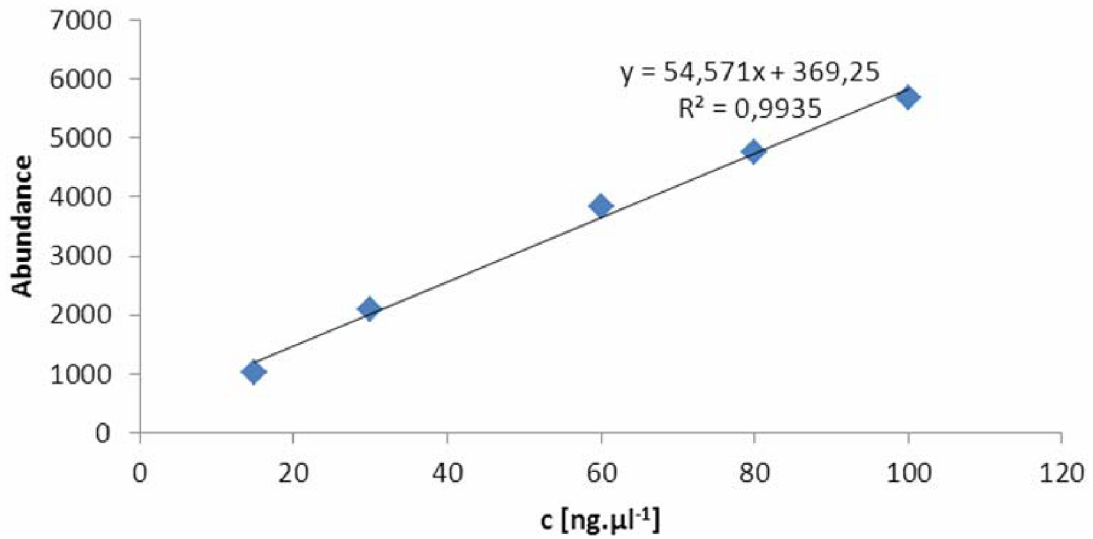
4.2.1.3 Vynesení do grafické závislosti

Tabulka 13: Hodnoty kalibrační řady

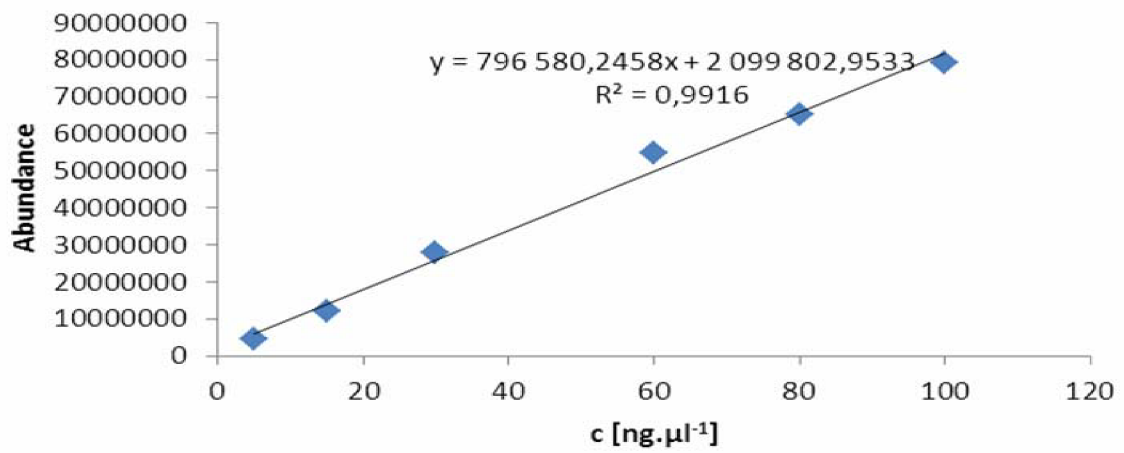
Boscalid		Dicamba		Chlorpyrifos		Mesotrione		Propiconazol	
c [ng.µl ⁻¹]	Plocha [A]	c [ng.µl ⁻¹]	Plocha [A]	c [ng.µl ⁻¹]	Plocha [A]	c [ng.µl ⁻¹]	Plocha [A]	c [ng.µl ⁻¹]	Plocha [A]
0,5	160731	5	-	5	4481115	5	3278	5	1375783
1,5	689524	15	1012	15	12230950	15	13136	15	6357533
3	1474890	30	2105	30	27864543	30	19272	30	12317999
6	3590814	60	3829	60	54633935	60	40545	60	22331257
8	5104762	80	4766	80	65144088	80	51060	80	32698754
10	6953619	100	5687	100	79252458	100	70575	100	42658765



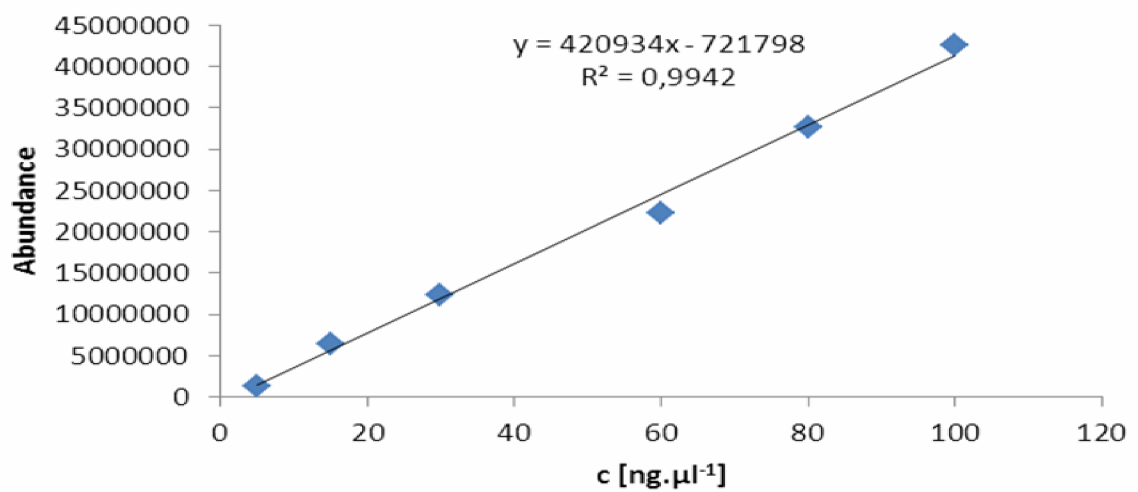
Graf 1: Kalibrační závislost pro Boscalid



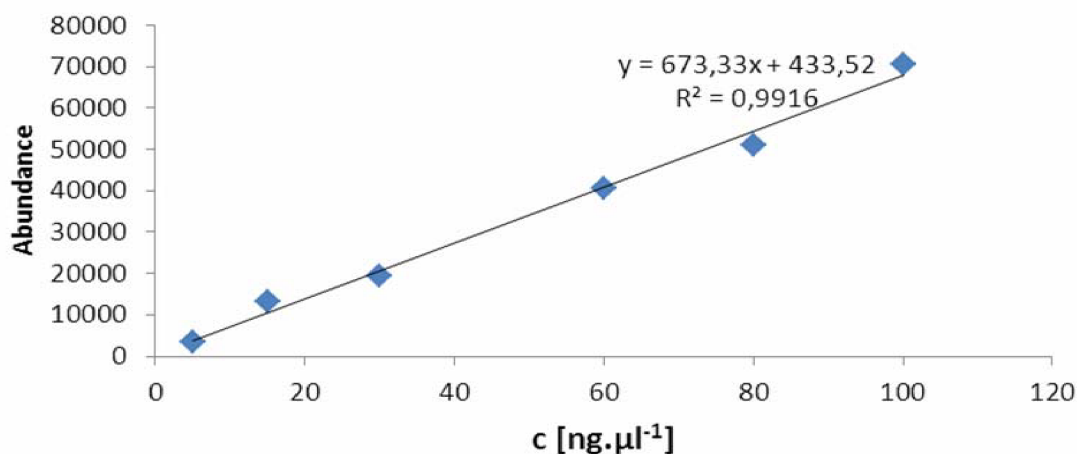
Graf 2: Kalibrační závislost pro Dicambu



Graf 3: Kalibrační závislost pro Chlorpyrifos



Graf 4: Kalibrační závislost pro propiconazole



Graf 5: Kalibrační závislost pro Mesotrione

4.2.1.4 Vyhodnocení vzorků

Vzorky rouskového pylu a medu byly obohaceny standardy. Objemy standardů, které byly použity pro nástřík, jsou pro boscalid ($c = 10 \text{ ng.}\mu\text{l}^{-1}$) 100 μl , pro mesotrione ($c = 100 \text{ ng.}\mu\text{l}^{-1}$) 50 μl a pro ostatní standardy ($c = 10 \text{ ng.}\mu\text{l}^{-1}$) 25 μl . Objem vnitřního standardu činil 20 μl . V tabulce č. 13 a 14 jsou vyhodnoceny vzorky s přidavkem standardů.

Tabulka 14: Koncentrace standardů ve vzorcích s přidavkem, zakonzentrovaných na objem 0,4 ml.

Standard	$C_{\text{standardu}}$ [ng.µl ⁻¹] v 0,4 ml
Boscalid ($C = 10 \text{ ng.}\mu\text{l}^{-1}$)	0,833
Dicamba ($C = 100 \text{ ng.}\mu\text{l}^{-1}$)	2,083
Chlorpyrifos ($C = 100 \text{ ng.}\mu\text{l}^{-1}$)	2,083
Mesotrione ($C = 100 \text{ ng.}\mu\text{l}^{-1}$)	41,67
Propiconazol ($C = 100 \text{ ng.}\mu\text{l}^{-1}$)	2,083

Vzorový výpočet koncentrace chlorpyrifosu ve vzorku za dne 22. 5. 2010 Sychotín

Rovnice regrese :

$$y = 796580,2458x + 2099802,9533$$

$$x = c = \frac{y - 2099802,9533}{796580,2458} \text{ [ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}\text{]}$$

Za y se dosadí plocha píku daného standardu

Pro chlorpyrifos ze dne 22. 5. 2010 Sychotín

$$y = 33933702$$

$$c = 1,624 \text{ ng} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ v } 2,13 \text{ g pylu}$$

$$c = 0,762 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1} \text{ v } 1 \text{ g pylu}$$

$$c = 76,2 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1} \text{ ve } 100 \text{ g pylu}$$

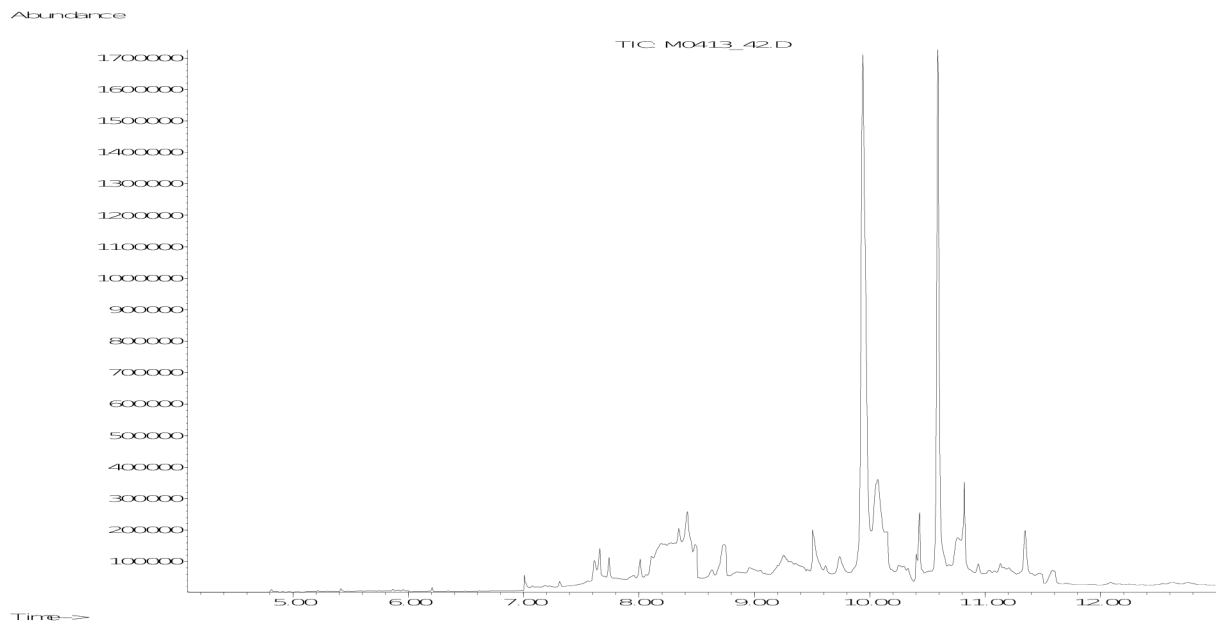
Tabulka 15: Naměřené a vypočítané hodnoty pro vzorky rouskového pylu s přidavkem standardů.

Datum odběru	Místo odběru	m vzorku pylu [g]	Název standardu	Retenční čas t_R [min]	c [ng·μl ⁻¹]	c [ng·μl ⁻¹] v 1 g pylu	c [ng·μl ⁻¹] ve 100 g pylu
22. 5. 2010	Sychotín	2,130	Boscalid	10,56	0,852	0,400	40,00
			Dicamba		Pod limit detekce		
			Chlorpyrifos	7,99	1,624	0,7620	76,20
			Mesotrione	12,22	36,97	17,35	1735,9
			Propiconazole	9,47	2,099	0,986	98,60
22. 5. 2010	Touboř	3,052	Boscalid	10,58	0,630	0,210	21,00
			Dicamba		Pod limit detekce		
			Chlorpyrifos	8,10	1,117	0,366	36,60
			Mesotrione	12,24	44,15	14,54	14,540
			Propiconazole	9,47	2,130	0,698	69,80
25. 6. 2010	Sychotín	3,0356	Boscalid	10,58	0,869	0,290	29,00
			Dicamba		Pod limit detekce		
			Chlorpyrifos	8,10	1,491	0,491	49,10
			Mesotrione	12,25	33,68	11,09	1109
			Propiconazole	9,48	1,974	0,650	65,00
25. 6. 2010	Touboř	3,0848	Boscalid	10,57	0,712	0,231	23,10
			Dicamba		Pod limit detekce		
			Chlorpyrifos	8,10	1,090	0,535	53,50
			Mesotrione	12,25	37,29	12,08	1208,9
			Propiconazole	9,48	2,085	0,676	67,60
8. 5. 2010	Touboř	0,9821	Boscalid	10,57	0,597	0,607	60,70
			Dicamba		Pod limit detekce		
			Chlorpyrifos	8,10	1,955	1,991	19,91
			Mesotrione	12,35	27,00	27,49	2749

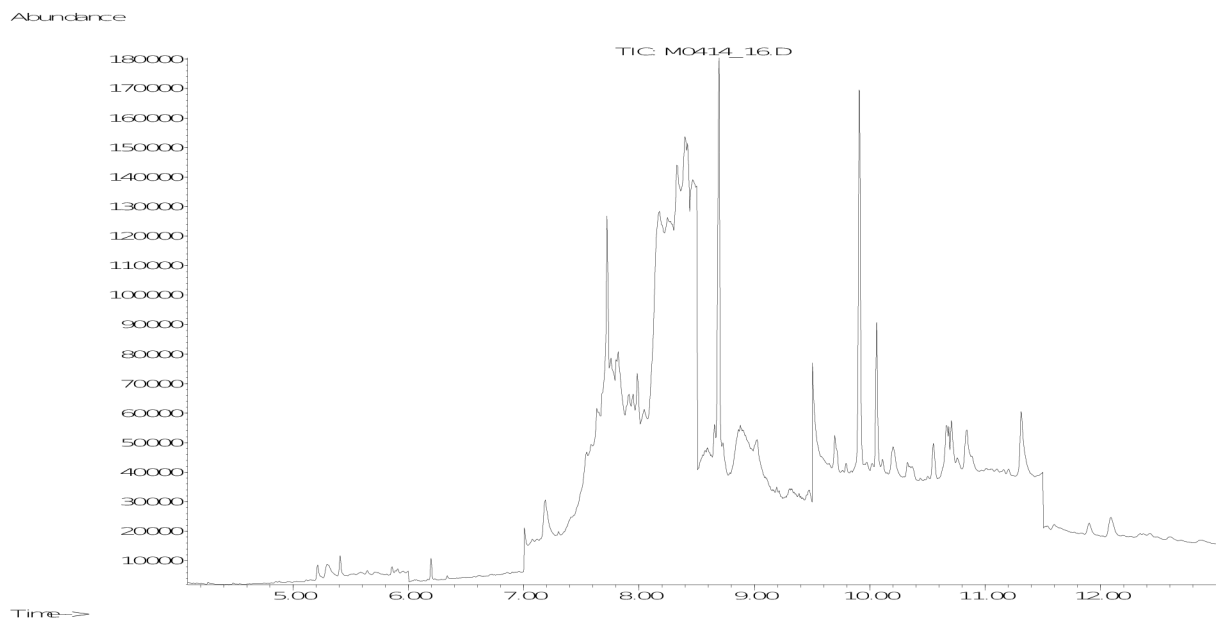
			Propiconazole	9,48	2,169	2,208	220,8
6. 8. 2010	Sychotín	3,0757	Boscalid	10,59	0,645	0,210	21,00
			Dicamba		Pod limit detekce		
			Chlorpyrifos	8,11	1,813	0,589	5,900
			Mesotrione	12,24	38,86	12,63	1263
			Propiconazole	9,50	1,829	0,595	59,50

Tabulka 16: Naměřené a vypočítané hodnoty pro vzorky medu s přidavkem standardů.

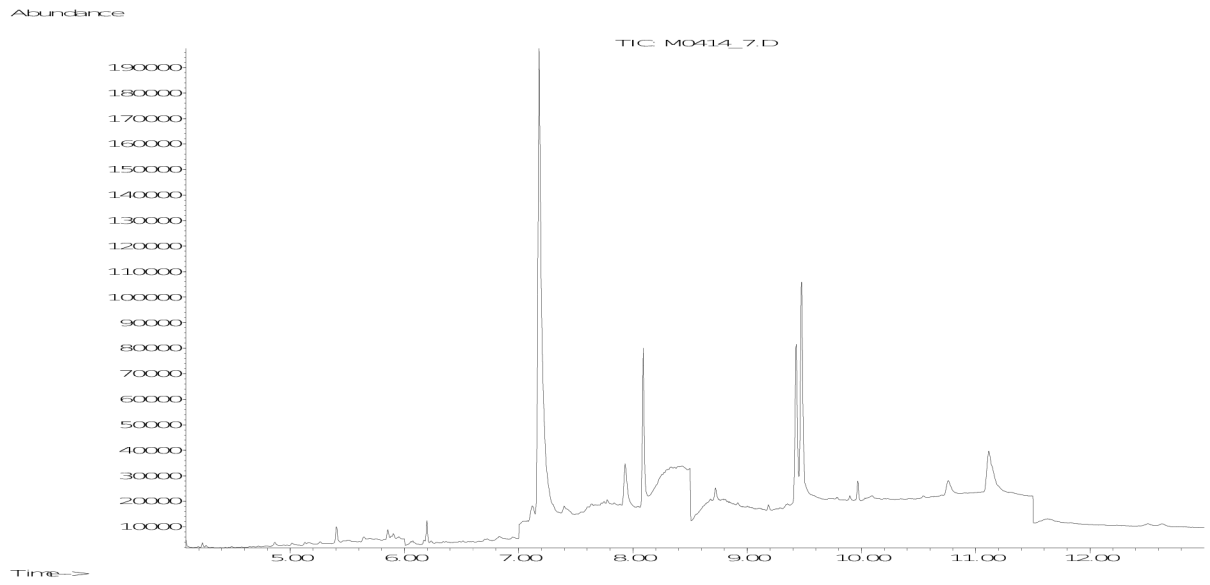
Datum odběru	Typ medu	m medu [g]	Název standardu	Retenční čas t_R [min]	c [ng.μl ⁻¹]	c [ng.μl ⁻¹] v 1 g medu	c [ng.μl ⁻¹] ve 100 g medu
17.7.2010	Lesní	6,842	Boscalid	10,55	0,776	0,113	11,30
			Dicamba		Pod limit detekce		
			Chropyrifos	8,07	1,489	0,218	21,80
			Mesotrione	12,21	40,50	5,919	591,9
			Propiconazole	9,43	1,923	0,281	28,10
31.7.2010	Lesní	5,8152	Boscalid	10,54	0,817	0,140	14,00
			Dicamba		Pod limit detekce		
			Chropyrifos	8,07	1,725	0,297	29,70
			Mesotrione	12,24	34,66	5,962	596,2
			Propiconazole	9,42	1,827	0,314	31,40
10.6.2010	Smíšený	5,725	Boscalid	10,53	0,649	0,113	11,30
			Dicamba		Pod limit detekce		
			Chropyrifos	8,07	1,625	0,284	28,40
			Mesotrione	12,23	37,83	6,609	660,9
			Propiconazole	9,45	1,872	0,327	32,70
25.6.2010	Smíšený	6,1984	Boscalid	10,54	0,618	0,100	10,00
			Dicamba		Pod limit detekce		
			Chropyrifos	8,07	1,514	0,244	24,40
			Mesotrione	12,21	41,12	6,634	663,4
			Propiconazole	9,43	2,457	0,396	39,60



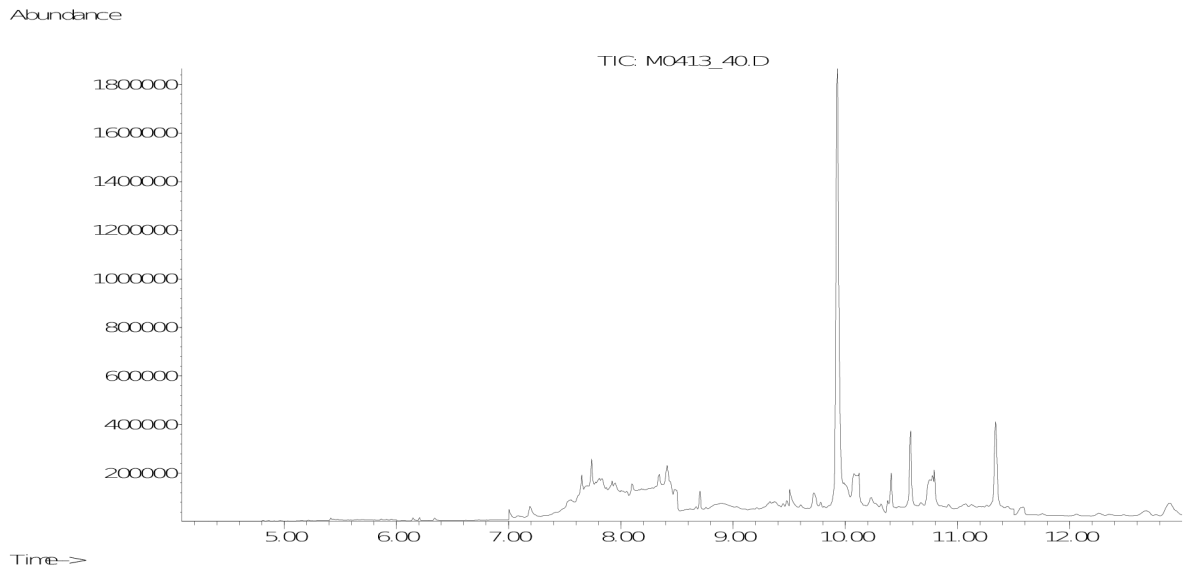
Chromatogram 4: Rouskový pyl z 6. 8. 2010 - Sychotín (SIM)



Chromatogram 5: Plástový pyl z 6. 8. 2010 - Sychotín (SIM)



Chromatogram 6: Med z 25. 6. 2010 (SIM)

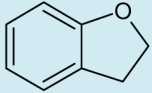
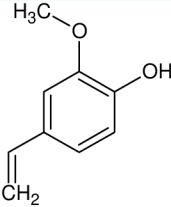
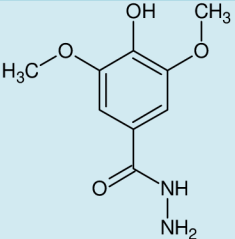
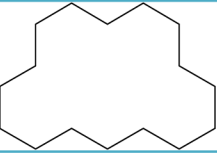
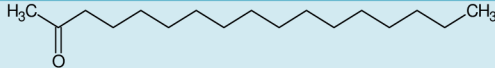


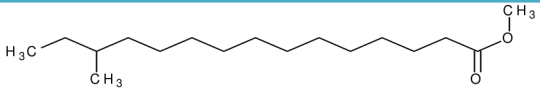
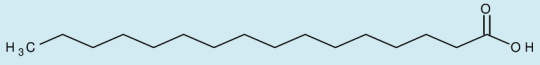
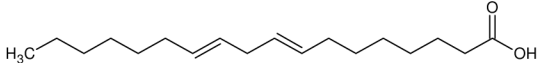
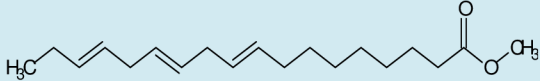
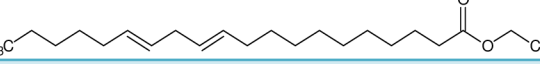

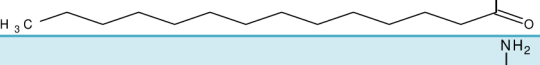

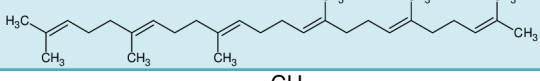
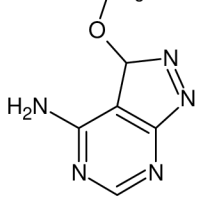
Chromatogram 7: Rouskový pyl z 25.6. 2010 - Sychotín (SIM)

4.2.2 Výsledky z modu SCAN

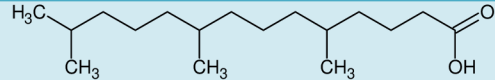
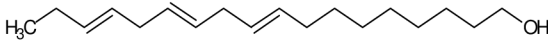
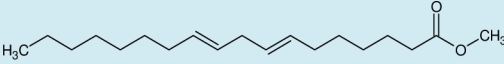
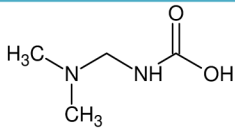
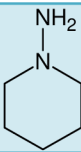
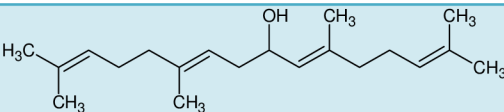
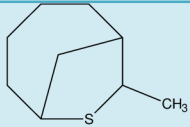
Vzorky byly vyhodnoceny metodou SCAN a spektra byla srovnána s knihovnou spekter NIST 05.L. Všechny nalezené sloučeniny jsou uvedeny v tabulkách č. 15, 16, 17, 18, 19, 20.

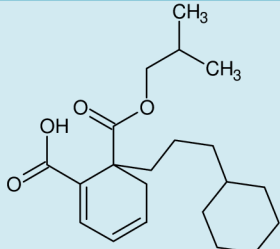
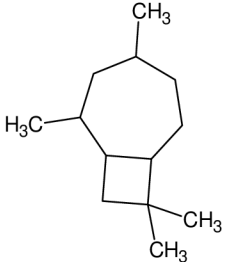
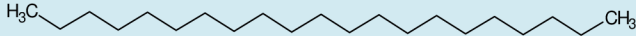
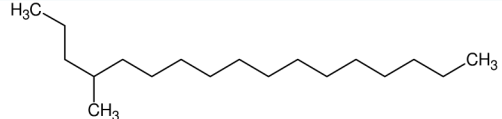
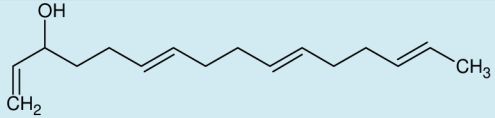
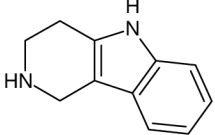
Tabulka 17: Sloučeniny společné pro všechny vzorky rouskového pylu.

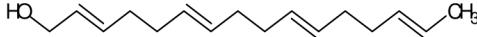
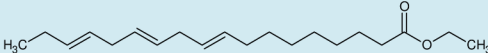
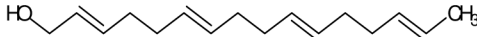
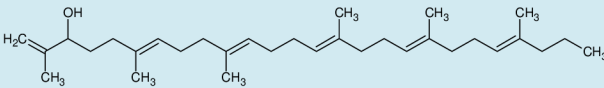
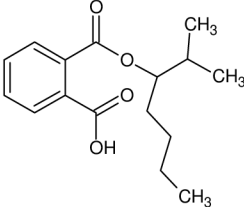
Retenční čas t_R [min]	Název sloučeniny	Struktura	Pravděpodobný původ
4,393	2,3-Dihydrobenzofuran		Kontaminace z kolony
4,918	2-methoxy-4-vinylfenol		Kontaminace z laboratoře
7,146	4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzohydrazid		?
7,542	Cyklohexadekan		Důkaz přítomnosti živých organismů
7,619	2-heptadekanon		Biogenní lipidy

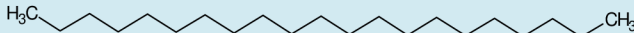
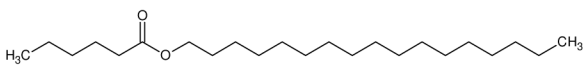
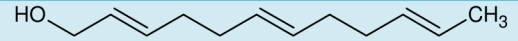
7,712	Methylester kyseliny 14-methylpentadekanové		Důkaz přítomnosti živých organismů
7,978	Kyselina n-hexadecanová		Důkaz přítomnosti živých organismů
8,395	Methylester kyseliny 8,11-octadekadienové		Důkaz přítomnosti živých organismů
8,432	9,12,15-octadecatrienoic, methyl ester		Biogenní lipid
8,636	Ethylester kyseliny linoleové		Biogenní produkt
8,665	9,12,15-octadecatrienoic, ethyl ester		Biogenní produkt
9,138	2-Pentadecanon		Biogenní produkt
9,397	9-octadecenamid		Biogenní produkt
10,254	1,6,10,14,18,22-tetracosahexane-3-ol		
10,864	squalen		Biogenní produkt
12,360	4-amino-3-methoxypyrazolo(3,4-d)pyrimid		?

Tabulka 18: Sloučeniny charakteristické pro jednotlivé vzorky rouskového pylu.

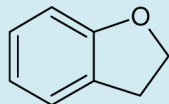
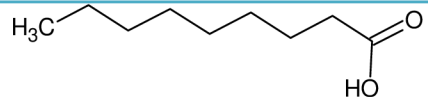
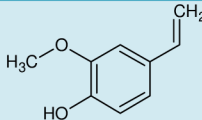
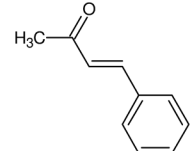
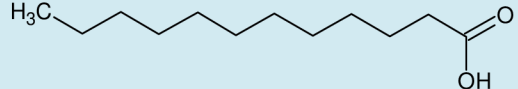
Datum odběru vzorku	Retenční čas t_R [min]	Název sloučeniny	Struktura	Pravděpodobný původ
22. 5. 2010 Sychotín	7,387	6,10,14-trimethyl-2-pentadecanon,		Důkaz přítomnosti živých organismů
	7,623	9,12,15-octadecatrien-1-ol		Biogenní produkt
	8,713	7,10-octadecadienoic acid, methyl ester		Biogenní lipid
	9,075	Kyselina [(dimethylamino)methyl]karbamová		Biogenní produkt
	9,656	?		
	9,685	?		
	10,025	1-piperidinamid		Produkt rostlin (<i>Piper nigrum</i>)
	10,143	?		
	10,258	3,7,11,16-tetrahexadeca-2,6,10,14-tetraen-1-ol		Biogenní vosky
	10,550	?		
	10,679	8-methyl-7-thiabicyclo[4.2.1]nonan		Produkt rostlin

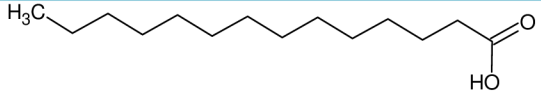
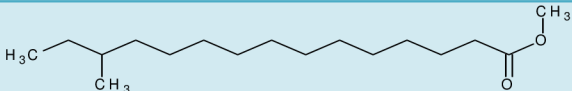
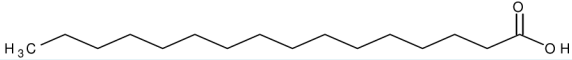
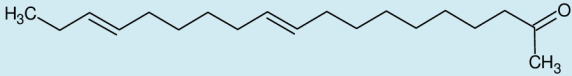
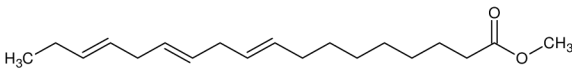
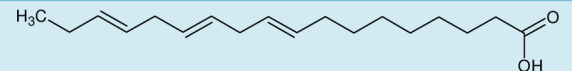
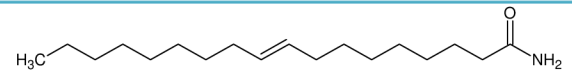
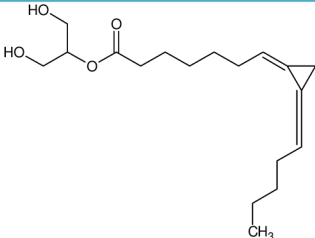
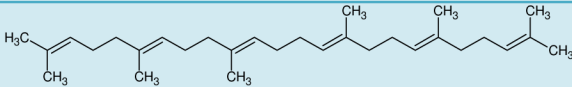
	7,911	isobutyl ester 2-cyclohexylethylftalové kyseliny		Biogenní produkt
	8,698	4-methylene-2,8,8-trimethylbicyclo[5.2.0]nonan		Produkt rostlin (Chrysanéma)
	9,234; 9,530; 9,648; 10,032; 10,520; 10,698; 10,749; 12,109	?		
25. 6. 2010 Sychotín	8,329	Heneicosane		Biogenní původ
	9,098	4-methylheptadecan		Alkan biogenniho původu
	9,412; 9,571	1,6,10,14-hexadecatetraen-3-ol		Biogenní vosky
	9,678	2,3,4,5-tetrahydro-1H-pyrido[4,3-b]indol		Produkt rostlin

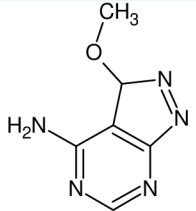
	9,903; 10,066; 10,177;	?		
	10,299; 10,879; 11,008; 11,329	Hexadeca-2,6,10,14- tetraen-1-ol		Biogenní vosky
	11,518; 12,006; 12,194; 12,590	?		
25. 6. 2010 Toubor	8,769	ethyl ester 9,12,15- octadecatrienové kyseliny		Biogenní vosky
	10,280	Hexadeca-2,6,10,14- tetraen-1-ol		Biogenní produkt
	10,543	2,6,10,15,19,23- hexamethyl-1,6,10,14,18,22- tetracohexan		Biogenní vosky
	9,704; 9,896; 10,055; 10,361; 10,701; 11,518; 11,950; 12,579	?		
5.8. 2010 Toubor	7,915	Kyselina 1-butyl-2- methylpropyl-1,2- benzenedikarboxylová		Laboratorní kontaminace
	9,888; 10,047; 10,358; 10,687; 10,801; 11,315	?		

6. 8. 2010 Sychotín	8,399	Heneicosane		Alkan biogenní původu
	9,419	heptadecyl ester hexanoiové kyseliny		Biogenní lipid
	10,317	2,6,10-dodecatrien-1-ol		Biogenní lipid
	9,718; 9,18; 10,055; 10,406; 10,557; 10,731; 11,544	?		

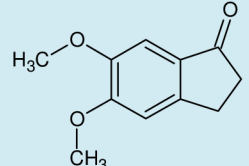
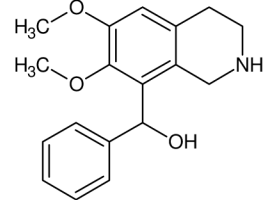
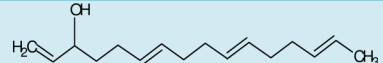
Tabulka 19: Sloučeniny společné pro všechny vzorky plástového pylu.

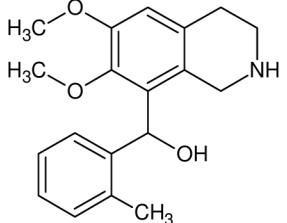
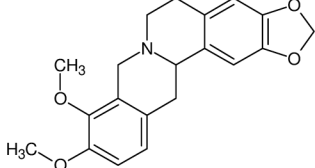
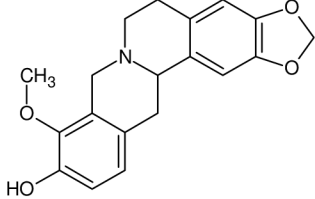
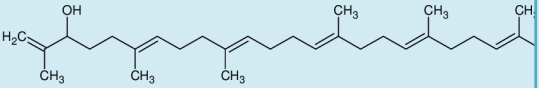
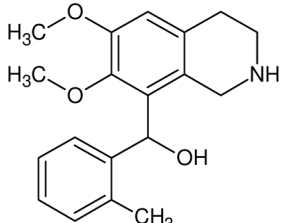
Retenční čas t_R [min]	Název sloučeniny	Struktura	Pravděpodobný původ
4,349	2,3-dibenzofuran		Kontaminace z kolony
4,645	Kyselina nonanová		Důkaz přítomnosti živých organismů
4,915	2-Methoxy-4-vinylfenol		Kontaminace z kolony
5,158	4-fenyl-3-buten-2-on		Kontaminace z laboratoře
6,149	Kyselina dodekanová		Důkaz přítomnosti živých organismů

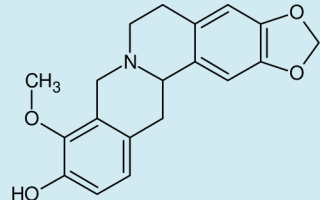
7,047	Kyselina tetradekanová		Důkaz přítomnosti živých organismů
7,531	?		
7,708	methyl ester kyseliny 14-methylpentadekanové		Biogenní lipid
7,911	Kyselina n-hexadekanová		Biogenní lipid
8,396	Methyl ester kyseliny 9,15-octadekanové		Biogenní lipid
8,425	Methyl ester kyseliny 9,12,15-octadecatrikové		Biogenní lipid
8,665	Kyselina 9,12,15-octadekatrienová		Důkaz přítomnosti živých organismů
9,408	9-octadekenamide		Biogenní lipid
9,667	?		
9,704	?		
10,036	?		
10,457	ethyl ester kyseliny 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)-9-(3-hexenylidencyclopropylidene)-Nonanové ,		Biogenní lipid
10,520	?		
10,683	?		
10,857	Squalen		Biogenní produkt

11,263	?		
11,500	?		
12,338	4-amino-3-methoxypyrazolo(3,4-d)pyrimidin		?
12,534	?		

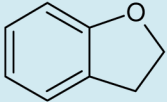
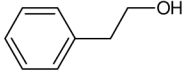
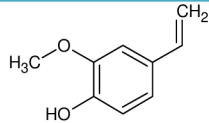
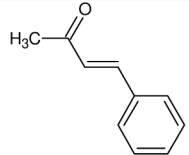
Tabulka 20: Sloučeniny charakteristické pro jednotlivé vzorky plástového pylu.

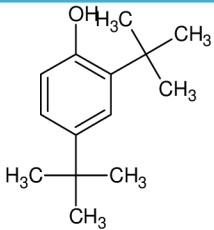
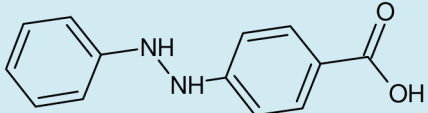
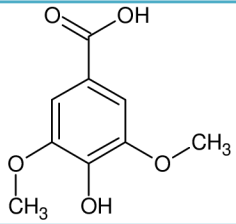
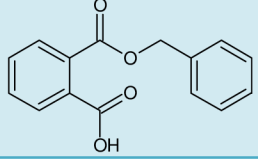
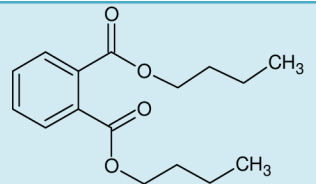


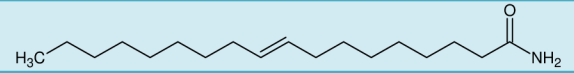
Datum odběru vzorku	Retenční čas t_R [min]	Název sloučeniny	Struktura	Pravděpodobný původ
8. 7. 2010 Sychotín	10,469	5,6-dimethoxy-1-indanon		Produkt rostlin
	10,624; 10,790	6,7-dimethoxy-1-phenmethanol-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin,		Alakloid
	10,999	?		
5. 8. 2010 Touboř	10,258	1,6,10,14-hexadecatetraen-3-ol		Biogenní produkt

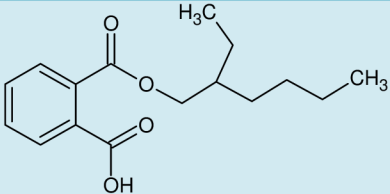
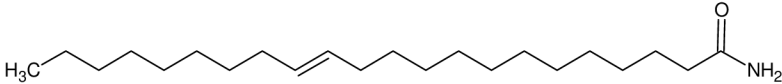
	10,661	6,7-dimethoxy-1-phenmethanol-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin,		Alkaloid
	11,259	?		
	11,825	Canadin		Biogenní produkt (Alkaloid)
	11,995	?		
	12,228	Cheilanthifolin		Biogenní produkt (Alkaloid)
6. 8. 2010 Sychotín	10,258	2,6,10,15,19,23-hexamethyl-1,6,10,14,18,22-tetracohehexan		Biogenní vosky
	10,668; 10,820	6,7-dimethoxy-1-phenmethanol-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin		Alkaloid

	12,250	Cheilanthifolin		Biogenní produkt (Alkaloid)
--	--------	-----------------	---	--------------------------------

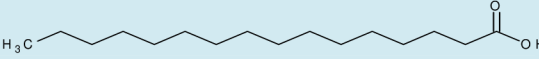
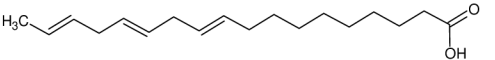
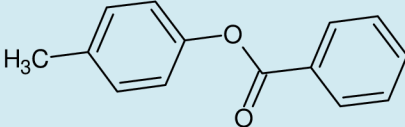
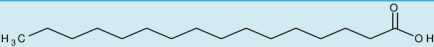
Tabulka 21: Sloučeniny společné pro všechny vzorky medu.

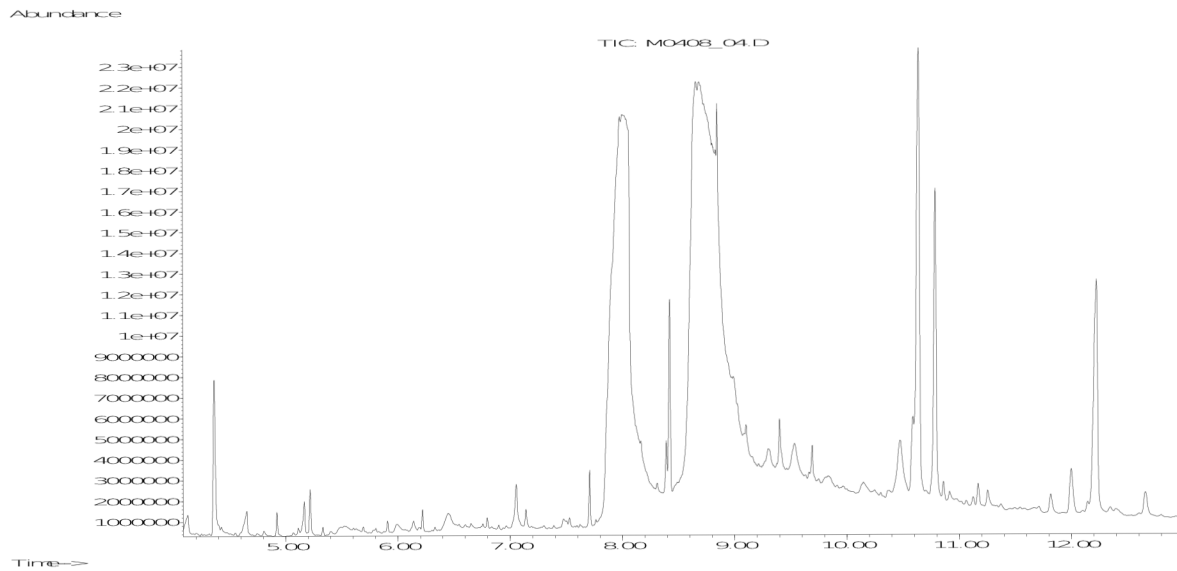
Retenční čas t_R [min]	Název sloučeniny	Struktura	Pravděpodobný původ
4,397	2,3-dihydrobenzofuran		Laboratorní kontaminace
4,449	2-fenylethanol		Rostlinný produkt (Růže)
4,944	2-methoxy-4-vinylphenol		Laboratorní kontaminace
5,181	4-phenyl-3-buten-2-one		Laboratorní kontaminace

5,905; 6,178	2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-fenol		Produkt rostlin
6,962	Kyselina 4-(2-fenylhydrazino)benzoová		?
7,135	Kyselina 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoová		Biogenní produkt
7,693	Benzylftalát		Laboratorní kontaminace
7,760	?		
7,897	Dibutylftalát		Laboratorní kontaminace
8,322	?		
8,643	9,12,15-octadecatrien-1-ol		Biogenní produkt
8,706	Hexadekanamid		Biogenní lipid
9,349	9-octadecenamid		Biogenní lipid

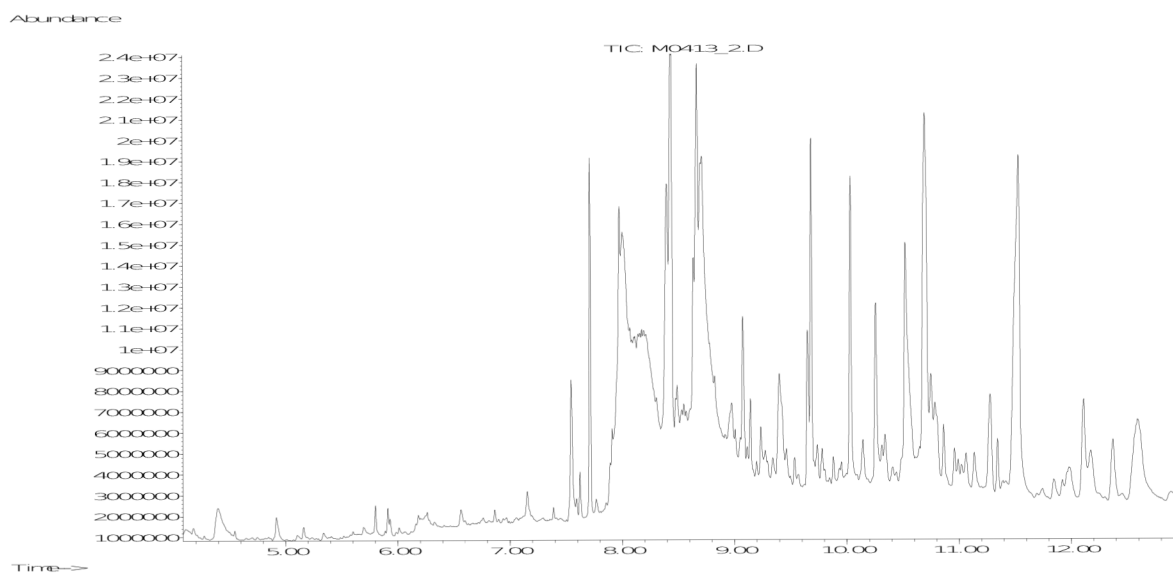
9,944	mono(2-ethylhexyl)ester kyseliny 1,2-benzendikarboxylové		Laboratorní kontaminace
10,679	13-dokosenamide		?

Tabulka 22: Sloučeniny charakteristické pro jednotlivé vzorky medu.

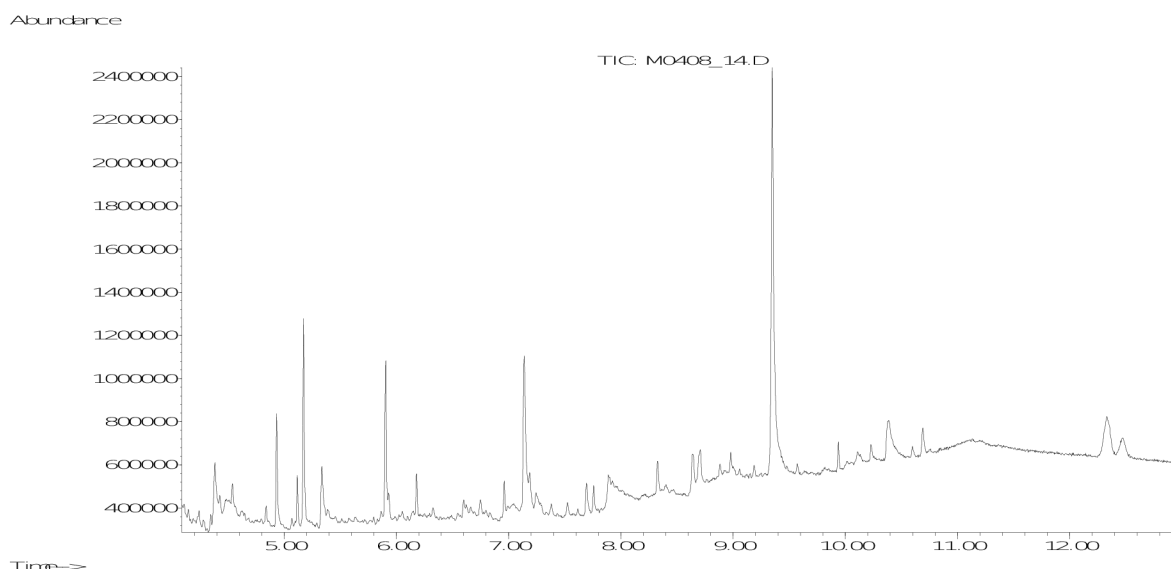
Datum odběru vzorku	Retenční čas t_R [min]	Název sloučeniny	Struktura	Pravděpodobný původ
31. 7. 2010	7,90	Kyselina n-hexadekanová		Biogenní lipid
	8,617	Kyselina 9,12,15-octadecatrienová		Důkaz přítomnosti živých organismů
	12,364	?		
	4,837	?		
	6,178	?		
	6,962	Kyselina 4-methylfenylester benzoová		?
	12,327	?		
10. 6. 2010	7,893	Kyselina n-hexadecanová		Biogenní lipid



Chromatogram 8: Plástový pyl z 8. 7. 2010 - Sychotín



Chromatogram 9: Rouskový pyl z 22. 5. 2010 - Touboř



Chromatogram 10: Med z 31. 7. 2010 (SCAN)

4.3 Odběr vzorku

Vzorky pylu byly poskytnuty Lubomírem Marečkem ze Sychotína, který včelaří už přes 30 let. Odběry vzorků byly prováděny ve dvou stanovištích. První včelín byl umístěn na konci Sychotína, kudy vede hlavní cesta na Olešnici a poblíž se vyskytuje čerpací stanice. Druhý včelín se nachází na Touboři, kde byl obklopen pouze smíšenými lesy a lány s řepkou a obilím.

Byla snaha odebírat vzorky po měsíci, ale z důvodu špatných klimatických podmínek pro rok 2010, kdy docházelo k častým srážkám a bouřkovému počasí, jsou odběry uskutečňovány a jen tehdy, kdy bylo možné se ke včelstvu přiblížit.

K odběru pylu byly použity pylochytové mřížky, které se naistalovaly před česno v časných ranních hodinách a demontáž a sběr vzorků byl uskutečněn na večer, obvykle kolem 19 hodiny.

Med byl odebírán jen tehdy, kdy bylo naplánováno medování pro obě stanoviště. V tabulce č. 8 jsou uvedeny termíny medování a tím i termíny odběru medu.

4.4 Příprava vzorků

Vzorky pylu a medu byly zpracovány podle článku „High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health“ [47]. Kde jsme se nechaly inspirovat přípravou vzorků pomocí metody QuEChERS. Tato metoda je poměrně rychlá. Vzorky pylu a medu se po centrifugaci dále zpracovávaly metodou SPE. Kolonky, které byly použity pro tuto část, se skládaly z 250 mg gravitovaného černého uhlí 500 mg PSA, 800 mg anhydridu síranu hořečnatého $MgSO_4$. Množství vzorků, které bylo odebíráno pro SPE, bylo 10 ml a dále se vzorky zakoncentrovaly pomocí TurboVapu II. Na objem 0,4 ml. Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí GC/MS.

4.5 Analýza LC/DAD

Při měření standardů byly zkoušeny různé gradienty mobilní fáze, různé vlnové délky i změna mobilních fází. Gradient mobilních fází, uvedený v tabulce č. 9 v experimentální části, byl pro vyhodnocení údajů relativně nejlepší. Většinou docházelo k překrytí standardu.

Volba vlnové délky 230 nm vyplývala opět z naměřených údajů. Při vlnové délce 230 nm došlo k zobrazení všech standardů.

Byly zkoušeny dvě různé mobilní fáze, a to acetonitril:deionizovaná voda a methanol:deionizovaná voda. Při volbě methanol:voda nedocházelo k zobrazení standardů v průběhu měření, proto byla zvolena mobilní fáze acetonitril: deionizovaná voda.

Ze získaných výsledků vyplynulo, že metoda HPLC/DAD není vhodná pro analýzu těchto látek.

4.6 Analýza GC/MS

Metoda byla optimalizována na standardní podmínky stanovení pesticidů plynovou chromatografií. Byly proměřeny standardy a následně probíhala příprava kalibrační řady. Měření probíhalo metodou SIM. Při měření kalibračních roztoků Dicamby při koncentraci $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ již nebyla viditelná odezva. Koncentrace, která byla přidávána při přípravě vzorku, činila $2,0833 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a tato hodnota je pod limitem detekce. Při proměření vzorku došlo ke zjištění úbytku přidaných standardů. Tento úbytek se pohyboval od 2 do 40 %. Pravděpodobně došlo k těmto ztrátám při extrakci tuhou fází.

Při měření metodou SCAN byla změřena kvalita vzorku pylu a medu. Pyl a med obsahoval mnoho biogenní lipidů a vosků, ale byly zjištěny i látky, jejichž spektra nebyla shodná se spektry z knihovny spekter. Objevily se zde i sloučeniny, jejichž pravděpodobný původ souvisí z kontaminací vzorku během přípravy nebo kontaminací z kolony.

5 ZÁVĚR

Pesticidy a jejich nadměrné používání vede ke kontaminaci abiotických složek—voda, půda. Tato práce se zaměřuje na využití včelího pylu jako bioindikátoru životního prostředí.

Vzorky pylu a medu byly poskytnuty včelařem Lubomírem Marečkem z oblasti Kunštátu. V těchto vzorcích byly hledány pesticidy, které použilo na ochranu polí Zemědělské družstvo vlastníků Nýrov. Pro jejich zjištění byla použita metoda plynové chromatografie s hmotností detekcí.

Při přípravě vzorků metodou QuECHRS jsme zjistili, že tato metoda pro stanovení pesticidů v pylu a medu by byla vhodná jen v případě dalšího čištění těchto vzorků. Plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí byly analyzovány vzorky pylu a medu, a to metodou SIM určenou pro kvantifikaci sledovaných látek. K vyhodnocení naměřených výsledků byly připraveny a proměřeny kalibrační řady standardů. Metodou SCAN se zjišťovala kvalita pylu a medu. Pro identifikaci sloučenin byla použita knihovna spekter NIST05.L. Pyl i med obsahují mnoho biogenních lipidů a vosků, ale i sloučeniny, které není možné identifikovat na základě porovnání s knihovními spektry.

Zvolená metoda GC/MS je vhodná pro stanovení obsahu pesticidů ve vzorcích pouze v případě použití lepšího analyzátoru (např. iontová past).

Dle mého názoru lze pyl i med použít jako bioindikátoru stavu životního prostředí, protože velice závisí na poloze a umístění včelínů a toho, co se vyskytuje v okruhu 5 km doletu včel. V našem případě byly včelíny umístěny mezi lesy a loukami, tudíž došlo k minimální kontaminaci odebraných vzorků.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1]. TITĚRA, Dalibor. *Včelí produkty mýtů zbavené: med, vosk, pyl, mateří kašička, včelí jed, propolis*. Vyd.1. Praha: Brázda, 2006. 175 s. ISBN 80-209-0347-X.
- [2]. WEISS, Karel. *Víkendový včelař: Škola včelaření s nástavnými úly*. 1. Libeznice: Víkend, 2005. Med, s. 166-188. ISBN 80-7222-368-2. [část knihy]
- [3]. PŘIDAL, Antonín. Naším vstupem do EU se změnilo hodnocení a zkoušení medu. Norma Český med je nadále zárukou vysoké kvality. *Moderní včelař* [online]. 2005, 2, 2-PŘEDJAŘÍ, [cit.2011-02-16]. Dostupný z WWW: <<http://user.mendelu.cz/apridal/text/c013a.pdf>>. [e-článek]
- [4]. PETERKA, Václav, et al. *Praktická příručka pro zacházení s přípravky na ochranu rostlin*. Praha: Statní rostlinolekářská sprava, Agrospoj, 2001. 265 s. [knihy]
- [5]. Kolektiv autorů. *Kompendium ochrany kvality ovzduší*. Vydání 1. Chrudim: Vodní zdroje Ekomonitor spol. s.r.o., 2008. 408 s. ISBN 978-80-86832-38-8. [knihy]
- [6]. Etiketa: Arrat. Ludwigshafen: BASF AG, 2008. 5 s. [standard]
- [7]. EXTTOXNET: *Dicamba* [online]. Oregon State University: Oregon State University, June 1996 [cit. 2011-02-10]. Extension Toxicology Network Pesticide Information Profiles. Dostupné z WWW: <<http://exttoxnet.orst.edu/pips/dicamba.htm>>. [webová stránka]
- [8]. W. MILLIGAN, Peter; M. HÄGGBLÖM, Max. Biodegradation and Biotransformation of Dicamba under Different Reducing Conditions. *Environ. Sci. Technol.* 6. March 1999, 33, 8, s. 1224–1229. [článek]
- [9]. Tritosulfuron: Report and Proposed Decision. *In Monograph*. Germeny : BASF AG, 2002. s. 705. [příspěvek]
- [10]. 67/548/EEC. Bezpečnostní list: Tritosulfuron. Praha: Sigma Aldrich, 2010. 5 s.
- [11]. Zákon č. 356/2003 Sb. Bezpečnostní list: Bumper Super. Jesenice : Agrovita spol.s r.o, 1.2.1996;. 7 s. [standard]
- [12]. 1907/2006/EC. Safety data sheet: Prochloraz. Praha: Sigma-Aldrich spol. s r.o., 12. 3. 2010. 5 s. [standard]
- [13]. Česko. Příloha 1: NÁZVY A DEFINICE REZIDUÍ PESTICIDŮ. In Sbírká zákonů. 31. 12. 2007, 117/2007, s. 5479. Dostupný také z WWW: <http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/ostatni/Legislativa-ostatni_uplnazneni_vyhlaska-2007-381.html>. [legislativa]

- [14]. 1907/2006/EC. Safety data sheet: Propiconazole. Praha: Sigma-Aldrich spol. s r.o., 13. 3. 2010. 6 s. [standard]
- [15]. Toxipedia [online]. 2006 [cit. 2011-04-12]. *Propiconazole*. Dostupné z WWW: <<http://toxipedia.org/display/toxipedia/Propiconazole>>.
- [16]. 98/8/EC. Directive 98/8/EC concerning the placing biocidal products on the market: *Propiconazole Product-type 8* (Wood preservatives). Finsko: European parliament, November 2007. 83 s. [standard]
- [17]. Přípravek na ochranu rostlin: *CALLISTO 480 SC*. In Etiketa. Praha: Syngenta Czech s.r.o., 2004. s. 3. [příspěvek]
- [18]. Zákon č. 356/2003 Sb. Bezpečnostní list: *CALLISTO 480 SC PESA*. Praha: Syngenta Czech s.r.o. 3. června 2004. 11 s. [standard]
- [19]. LEVY, Sarah J. Mesotrione: Human-Health Risk Assessment for Section 3 New Uses on Soybeans. In *Memorandum*. Washigton, D.C.: UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, August 12 2009. s. 38. Decision No.: 401466. [příspěvek]
- [20]. Etiketa: Fusilade Forte 150 EC. Praha: Syngenta Czech s.r.o., 2010. 3 s.
- [21]. TU, Mandy; HURD, Callie ; RANDALL, John M. *Weed Control Methods Handbook: Tools and Techniques for Use in Natural Areas* [online]. [s.l.]: The Nature Conservancy, April 2001, June 2003 [cit. 2011-03-07]. Dostupné z WWW: <<http://www.csu.edu/cerc/documents/WeedControlMethodsHandbook.pdf>>. [e-kniha]
- [22]. ES 1907/2006 . Fluazifop-p-butyl: Bezpečnostní list. Praha: Syngenta Czech s.r.o., 2004. 12 s.
- [23]. SAVOIA, Peter. Revised Fluazifop-P-Butyl. Amended Human Health Risk Assessment to Support Use on Bananas, Citrus, Grapes, Sugar Beets, and the Establishment of a Tolerance on Imported Potatoes: Fluazifop-P-Butyl. In *OFFICE OF CHEMICAL SAFETY AND POLLUTION PREVENTION. MEMORANDUM [online]*. WASHINGTON, D.C.: UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, January 4, 2011 [cit. 2011-03-07]. Dostupné z WWW: <<http://www.regulations.gov/#!documentDetail;D=EPA-HQ-OPP-2009-0980-0005>>. DP No.: 385178. [e-příspěvek]
- [24]. *NURELLE D*. In Etiketa [online]. Praha: Dow AgroSciences s.r.o., 1997, 2004 [cit. 2011-03-10]. Dostupné z WWW: <http://www.agrokrom.cz/texty/pripravky/nurelle_d.pdf>. [e-příspěvek]
- [25]. 93/112/EC. Chlorpyrifos: Bezpečnostní list. Thatcham: Makhteshim Agan, 2000. 6 s.

- [26]. Chlorpyrifos. In E X T O X N E T: Extension Toxicology Network [online]. Oregon: Oregon State University, 1993, 1996 [cit. 2011-03-10]. Dostupné z WWW: <<http://extoxnet.orst.edu/pips/chlorpyr.htm>>. [e-příspěvek]
- [27]. Pesticide Information Profiles: *Cypermethrin*. In *Extension Toxicology Network* [online]. Oregon: Oregon State University, 1996 [cit. 2011-03-28]. Dostupné z WWW: <<http://extoxnet.orst.edu/pips/cypermet.htm>>. [e-příspěvek]
- [28]. APPENDIX I a II: Cypermethrine. In *EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL* [online]. Brusel: EUROPEAN COMMISSION, 2004 [cit. 2011-03-28]. Dostupné z WWW: <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list_cypermethrin.pdf>. [e-příspěvek]
- [29]. JONES, DeeAn. Enviromental fate of cypermethrine: Cypermethrine. In *Environmental Monitoring & Pest Management. Sacramento: Department of Pesticide Regulation, 1999*. s. 10. [příspěvek]
- [30]. Starane 250 EC: Etiketa. In *Etiketa*. Pardubice: Synthesia, a.s., 2006. s. 2. [příspěvek]
- [31]. Review report for the active substance fluroxypyr: APPENDIX I: Identity, physical and chemical properties. In *Directorate-General Health & Consumer Protection. Brusel: European Commission, 1999*. s. 35.
- [32]. FLUROXYPYR. In *Hazardous Substances Data Bank* [online]. Bethesda, USA: National Library of Medicine, 1999, 2004 [cit. 2011-04-02]. Dostupné z WWW: <<http://www.nlm.nih.gov/>>. [e-příspěvek]
- [33]. Pictor. In *Etiketa*. Research Triangle Park: BASF AG, Agricultural Products, 2010. s. 6. [příspěvek]
- [34]. Směrnice 1907/2006/ES. Pictor: Bezpečnostní list. Praha: BASF spol. s r.o., 2009 17. března. 10 s. Dostupné z WWW: <http://www.zznpe.cz/_cms/_files/248/Pictor.pdf>. [standard]
- [35]. Chemspider [online]. 2006 [cit. 2011-04-12]. *Nicobifen - boscalid*. Dostupné z WWW: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.184713.html>>.
- [36]. *Boscalid*. In *Pesticide Fact Sheet* [online]. USA: United States Office of Prevention, Pesticides Environmental Protection and Toxic Substances Agency, Juli 2003 [cit. 2011-04-04]. Dostupné z WWW: <<http://www.epa.gov/opprd001/factsheets/boscalid.pdf>>. ISSN issn. [e-příspěvek]

- [37]. *Pesticide Properties DataBase (PPDB)* [online]. 30. March 2011 [cit. 2011-04-12]. Dimoxystrobin (Ref: BAS 505F). Dostupné z WWW: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/Reports/246.htm>>. [webová stránka]
- [38]. Chromservis [online]. 2008 [cit. 2011-04-12]. *Produkty*. Dostupné z WWW: <<http://chromservis.cz>>.
- [39]. VAŠÍČEK, Ondřej. *Využití metod kapalinové chromatografie k separaci oligonukleotidů modifikovaných genotoxickými látkami*. Brno, 2007. 57 s. Bakalářská práce. Masarykova univerzita.
- [40]. ČÁSLAVSKÝ, Josef: *Instrumentální a strukturní analýza: Úvod, Kapalinová chromatografie*. Brno, 2009. 40-104 s. Přednášky. Vysoké učení technické Brno.
- [41]. Chromatografické fórum HPLC [online]. 1999-2010, 2011 [cit. 2011-04-015]. UV/VIS HPLC detektory. Dostupné z WWW: <<http://www.hplc.cz/>>.
- [42]. Prof. RNDr. SOMMER, Lumír DrSc. a kolektiv. *Základy analytické chemie II*. Brno : VUTIUM, 2000. 351 s. ISBN 80-214-1742-0.
- [43]. ŠEVČÍK, Jiří. *PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE A JEJÍ APLIKACE V ORGANICKÉ ANALÝZE*. Praha, 2002. 40 s. Učební text. Katedra analytické chemie PřF UK, ISBN 80-902432-9-0. [akademická práce]
- [44]. ČÁSLAVSKÝ, Josef, *Hmotnostní spektrometrie: Úvod, Historie*. Brno, 2009-2010. 65 s. Učební texty. VUT Fakulta chemická.
- [45]. ČÁSLAVSKÝ, Josef, *Hmotnostní spektrometrie: Ionizační techniky*. Brno, 2009-2010. 109 s. Učební texty. VUT Fakulta chemická.
- [46]. ČÁSLAVSKÝ, Josef, *Hmotnostní spektrometrie: Analyzátory*. Brno, 2009-2010. 96 s. Učební texty. VUT Fakulta chemická.
- [47]. Christopher A. Mullin, Maryann Frazier, James L. Frazier, Sara Ashcraft, Roger Simonds, Dennis vanEngelsdorp, Jeffery S. Pettis. High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health. *PLoS ONE*. 2010, 5, s. 1-19.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN	Acetonitril
AMBA	2-amino-4-sulfobenzoová kyselina
CAS	Chemical Abstracts Service
CGA 118 245	Rezidua propiconazolu
CI	Chemická ionizace
CoA	Koenzym A
ČGS	Česká geologická služba
DW	Deionizovaná voda
EC50	Efektivní koncentrace
EI	Elektronová ionizace
EPA US	US Environmental Protection Agency
ESA	Elektrostatický analyzátor
ESI	Elektrosprej
GC/MS	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HFM	Hydroxymethylfural
IAA	1H-indol-3-ylacetic acid
IČ	Infračervená oblast záření
IT	Iontová past
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LC/DAD	Kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole
LD50	Letální dávka
MALDI	Matrix Assisted Desorption Ionization
MNBA	2-nitro-4-sulfobenzoová kyselina
MS	Hmotnostní spetrometrie
NO _x	Oxidy dusíku
O ₃	Ozón
PBA	3-phenoxybenzoová kyselina
Q	Rizikový kvocient hodnocení pesticidů
Q	Kvadrupól
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe
SPE	Extrakce tuhou fází
TCP	3,5,6-trichlor-2-pyridinol
TOF	Průletový analyzátor
UV-VIS	Ultrafialová a viditelná oblast záření