

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra kvality a bezpečnosti potravin**



**Česká zemědělská  
univerzita v Praze**

**Optimalizace a validace metody pro stanovení reziduí  
v pšeničné slámě**

**Diplomová práce**

**Bc. Radovan Abu Dayyeh**

**Kvalita a zpracování zemědělských produktů**

**doc. Ing. Pavel Klouček, Ph.D.**

© 2020 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Optimalizace a validace metody pro stanovení reziduí pesticidů v pšeničné slámě" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 1.8. 2020

---

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval doc. Ing. Pavel Klouček, Ph.D. a Sebnem Kurhan za pomoc a poskytnutí užitečných rad při zpracování této diplomové práce.

# Optimalizace a validace metody pro stanovení reziduí pesticidů v pšeničné slámě

## Souhrn

Cílem diplomové práce bylo řešení aktuálního problému v zemědělské praxi, který se týká obsahu reziduí účinné herbicidní látky pyroxsulam ve slámě z ošetřených porostů obilovin, jejichž sláma se využívá při přípravě substrátu pro pěstování hub a při mulčování jahodníku a organickém hnojení zeleniny. Hlavním cílem práce bylo zavedení metody pro stanovení reziduí tohoto pesticidu. Dílčím cílem je provést monitoring obsahu ve slámě různého původu a při různých způsobech zpracování.

Hypotéza: Pomocí dostupné analytické instrumentace bude možné monitorovat obsah pyroxsulamu ve vzorcích slámy v závislosti na jednotlivých velikostech frakcí slámy.

Byly odebrány vzorky slámy od pěstitelů pšenice, kteří využívají různou intenzitu ošetření herbicidy s účinnou látkou pyroxsulam. Shromažděné vzorky slámy byly ošetřeny přípravky Mustang Forte a Corrello. Byla vypracována metodika na izolaci a stanovení reziduí herbicidu pyroxsulam ze slámy. Vzorky pro stanovení reziduí pesticidů byly extrahovány a pročištěny pomocí extrakce na pevné fázi. Jednotlivé látky byly identifikovány a kvantifikovány pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (HPLC/MS).

Výsledek měření ukázal, že frakce o velikosti 0,5 mm vykazují vyšší koncentrace reziduí pyroxsulamu, než frakce o vyšších velikostech.

**Klíčová slova:** pyroxsulam, sláma, residua, extrakce

# **Optimization and validation of analytical method for assessment of pesticide residues in wheat straw**

## **Summary**

The aim of the diploma thesis was to solve a current problem in agricultural practice, which concerns the content of residues of the active herbicide pyroxsulam in straw from treated cereals, whose straw is used in the preparation of substrates for mushroom growing and mulching strawberries and organic fertilization of vegetables. The main goal of this work was to introduce a method for determining the residues of this pesticide. The partial goal is to monitor the content of straw of various origins and processing.

Hypothesis: Using the available analytical instrumentation, it will be possible to monitor the content of pyroxsulam in straw samples depending on the individual sizes of straw fractions.

Straw samples were taken from wheat growers using different intensities of herbicide treatment with pyroxsulam. The collected straw samples were treated with Mustang Forte and Corrello. A methodology for the isolation and determination of residues of the herbicide pyroxsulam from straw has been developed. Samples for the determination of pesticide residues were extracted and purified by solid phase extraction. Individual substances were identified and quantified by liquid chromatography with mass spectrometry (HPLC / MS).

The measurement result showed that the 0.5 mm fractions showed higher concentrations of pyroxsulam residues than the higher size fractions.

**Keywords:** pyroxsulam, straw, residues, extraction

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíle práce</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b>	<b>9</b>
<b>3.1</b>	<b>Aminopyralid</b>	<b>9</b>
3.1.1	Zdravotní rizika	9
<b>3.2</b>	<b>Pyroxsulam</b>	<b>10</b>
3.2.1	Zdravotní rizika	10
<b>3.3</b>	<b>Mustang Forte</b>	<b>12</b>
<b>3.4</b>	<b>Corello</b>	<b>13</b>
<b>3.5</b>	<b>Analytické metody</b>	<b>14</b>
<b>3.6</b>	<b>HPLC</b>	<b>14</b>
<b>3.7</b>	<b>SPE</b>	<b>17</b>
<b>3.8</b>	<b>Detekce pesticidů a herbicidů</b>	<b>18</b>
<b>4</b>	<b>Metodika</b>	<b>23</b>
<b>4.1</b>	<b>Příprava vzorků pšeničné slámy</b>	<b>23</b>
<b>4.2</b>	<b>Příprava vzorků a extrakce</b>	<b>25</b>
<b>4.3</b>	<b>Proces přečištění</b>	<b>25</b>
<b>4.4</b>	<b>Optimalizace složení rozpouštědel ve finálních vzorcích</b>	<b>25</b>
<b>4.5</b>	<b>Kalibrační standardy</b>	<b>26</b>
<b>4.6</b>	<b>Validace metody</b>	<b>27</b>
<b>4.7</b>	<b>Analytické podmínky</b>	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky</b>	<b>30</b>
<b>5.1</b>	<b>Optimalizace aplikovaného rozpouštědla na finální vzorek</b>	<b>30</b>
<b>5.2</b>	<b>Validace metody</b>	<b>31</b>
5.2.1	Validační parametry	31
<b>6</b>	<b>Diskuze</b>	<b>34</b>
<b>7</b>	<b>Závěr</b>	<b>36</b>
<b>8</b>	<b>Literatura</b>	<b>37</b>

# 1 Úvod

Pesticidy jsou podle směrnice EP a Rady 2009/128/ES definovány jako přípravky na ochranu rostlin a biocidní přípravky. Přípravky na ochranu rostlin jsou jednosložkové nebo dvousložkové roztoky určené primárně k ochraně rostlin. Biocidní přípravky jsou směsi jedné či více účinných látek, které slouží k ničení, zneškodňování a odpuzování jakéhokoliv škodlivého organismu. [1]

Používání pesticidů v zemědělství je v současné době velmi aktuální a hojně řešená problematika. S rozvojem analytických metod a možností detekce pesticidů jsou některé účinné látky označovány jako potenciálně škodlivé pro lidské zdraví. Jedná se zejména o možnou karcinogenitu některých látek.

Velkým problémem je perzistence pesticidů, to znamená, jejich schopnost akumulovat se v organismu a dlouho setrvávat v potravinovém řetězci. Látky jako aminopyralid a pyroxsulam používané k ošetřování obilí, mohou migrovat do obilné slámy, která buď zůstává na poli jako posklizňový zbytek, který je poté zaorán, nebo je používána jako mulč pro pěstování jahod nebo rajčat. Na tomto uvedeném příkladu lze velmi dobře ilustrovat možnou migraci pesticidů z primárně ošetřené plodiny dále do meziproduktů až po konzumaci spotřebitelem.

## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

Cílem diplomové práce bylo řešení aktuálního problému v zemědělské praxi, který se týká obsahu reziduí účinné herbicidní látky pyroxsulam ve slámě z ošetřených porostů obilovin, jejichž sláma se využívá při přípravě substrátu pro pěstování hub a při mulčování jahodníku a organickém hnojení zeleniny. Hlavním cílem práce bylo zavedení metody pro stanovení reziduí tohoto pesticidu. Dílčím cílem je provést monitoring obsahu ve slámě různého původu a při různých způsobech zpracování.

Hypotéza: Pomocí dostupné analytické instrumentace bude možné monitorovat obsah pyroxsulamu ve vzorcích slámy v závislosti na jednotlivých velikostech frakcí slámy.



## 3 Literární rešerše

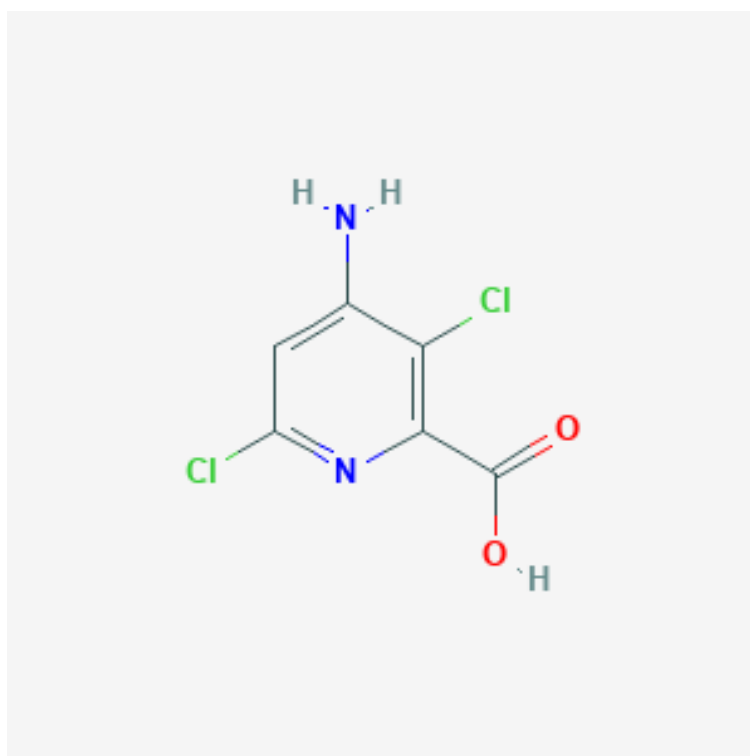
### 3.1 Aminopyralid

Aminopyralid je organochlorinový pesticid odvozený od kyseliny pikolinové. Jeho struktura odpovídá kyselině 3,6-dichlorované 4-aminopikolinové. Je používán jako herbicid patřící do skupiny pyridinů. [2] Jedná se o herbicid používaný pro ošetřování pšenice, na trvalých travních pastvinách, na nezemědělských a přírodních oblastech. Poskytuje široké spektrum postemergentní kontroly širokolistých agronomických plevelů a škodlivých, invazivních ročních, dvouletých i víceletých druhů plevelů. [3] Dále snižuje zamoření a potřebu opětovného ošetření stanovišť v závislosti na použité míře a cílových plevelech.

Složením se jedná o bílý prášek bez zápachu s bodem rozpustnosti 163,5 °C. Aminopyralid je nejlépe rozpustný v methanolu, dále potom v ethylacetátu, acetonu a heptanu. Hůře rozpustný je ve vodném roztoku. Látka je stabilní při pH 5, 7 a 9 při teplotě 20 °C po dobu 31 dní. [4] Podle databáze pesticidů Evropské unie byla stanovena hodnota ADI na 0,26 mg/kg/den. [5]

#### 3.1.1 Zdravotní rizika

Údaje o akutní toxicitě dokazují, že aminopyralid má prostřednictvím orální, dermální a inhalační expozice nízkou toxicitu. Ve studii akutní neurotoxicity u potkanů nebyly nalezeny žádné účinky související s motorickou aktivitou nebo neuropatologická pozorování. Hodnota bez pozorovaných nežádoucích účinků (NOAEL) byla stanovena na 1000 mg/kg na základě klinických pozorování fekálního znečištění u samců a na základě pozorování znečištění moči u samic pozorovaných při hodnotě 2000 mg na kilogram tělesné hmotnosti. Aminopyralid byl dále podroben testu na mutagenitu s negativním závěrem, s výjimkou in vitro testu aberace chromozomů s využitím potkaních lymfocytů. Aminopyralid byl klasifikován jako nepravděpodobně karcinogenní pro člověka. Ve studiích karcinogenity u potkanů a myši nebylo zjištěno zvýšení počtu nádorů. [3]



Obrázek 1: Strukturální vzorec aminopyralidu [6]

## 3.2 Pyroxsulam

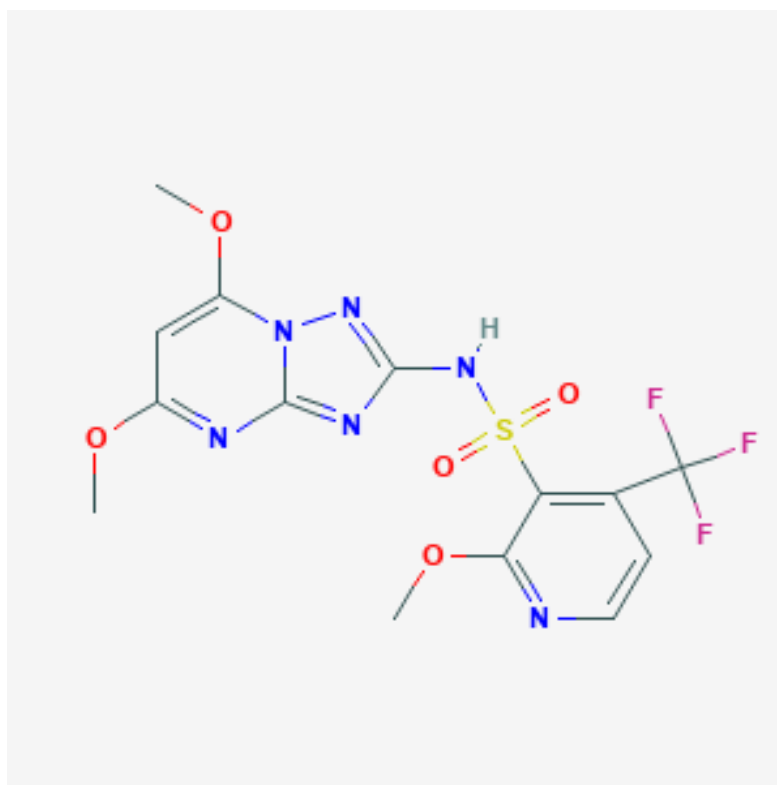
Pyroxsulam je postemergentní herbicid sloužící ke kontrole širokolistých plevelů a širokého spektra tráv v pšenici aplikovatelný pozemní nebo leteckou cestou. Patří do skupiny triazolopyrimidinů. Látka má vyšší bod rozpustnosti než aminopyralid a to konkrétně 208,3 °C. Pyroxsulam je stabilní při pH 4,06 při teplotě 24,4 °C. Nejlépe je rozpustný v oktanolu. Při porovnání rozpustnosti aminopyralidu v methanolu a pyroxsulamu v methanolu, je u pyroxsulamu nižší. [7] Podle databáze pesticidů Evropské unie byla hodnota tolerovaného denního příjmu (ADI) stanovena na hodnotu 0,9 mg/kg/den. [8]

### 3.2.1 Zdravotní rizika

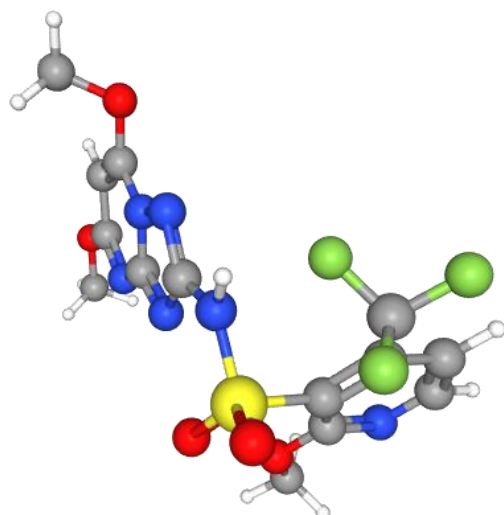
Akutní toxicita pyroxsulamu prostřednictvím orální, dermální a inhalační cesty je definována jako nízká až střední. V toxikologických studiích s opakovanou dávkou byla zjištěna nízká toxicita pomocí perorální a dermální expoziční cesty. U subchronických studií na myších, krysách a psech nebyly pozorovány žádné nežádoucí projevy spojené s léčbou. Ve studii, která zkoumala karcinogenitu u myší, byla stanovena hodnota LOAEL (Lowest

Observed Adverse Effect Level) neboli nejnižší dávka, při které byl pozorován škodlivý účinek na 1000 mg/kg/den. Potvrzujícím důkazem pro uvedené zjištění byl zvýšený výskyt alterace hepatocytů u myších samců. Výstupem této studie byla hodnota NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) neboli dávka při které ještě nebyl pozorován negativní účinek, ve výši 100 mg/kg/den. Závěrem lze říci, že neexistují žádné účinky, které by vedly k neurotoxicitě či jiným rizikům. Po vyloučení karcinogenity ve studiích na myších a potkanech je pyroxsulam klasifikován jako nepravděpodobně karcinogenní pro lidského jedince. [7]

Podle jednoho z největších producentů pesticidů chemické společnosti Dow AgroSciences s.r.o. je pyroxsulam látka, která se v půdních a vodních systémech rychle rozkládá mikrobiální degradací. V případě, že se látka uvolní do životního prostředí, lze ji odstranit zařízeními na čištění odpadních vod. Dále společnost Dow AgroSciences s.r.o. deklaruje, že látka má nízký biokoncentrační potenciál, to znamená, že její tendence hromadit se v potravinovém řetězci je nízká. Také možnost kontaminace podzemních vod pyroxsulamem je považována za nízkou. [9]



Obrázek 2: Strukturní vzorec pyroxsulamu [10]



Obrázek 3: 3D vzorec pyroxsulamu [11]

### 3.3 Mustang Forte

Mustang Forte je herbicidní přípravek vyráběný společností Dow AgroSciences s.r.o. používaný pro ošetřování obilovin. Účinnými látkami obsaženými v produktu jsou aminopyralid a florasulam. Podle webových stránek Registru přípravků na ochranu rostlin bylo uvádění oběhu na trh ukončeno 5. března 2019 a povoleno je pouze spotřebování zásob. [12] Spektrum účinnosti přípravku je poměrně široké. Účinný je proti následujícím plevelům: heřmánkovec přímořský, kokoška pastuší tobolka, výdrol řepky, peníze rolní, ptačinec žabinec, pcháč oset, rdesno červivec, violka trojbarevná, violka rolní, merlík bílý, pohanka svlačcovitá a svízel přítula. Podle dokumentu vydaném Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským mohou po ošetření obilnin zůstat po sklizni v půdě a slámě rezidua přípravků. Pro urychlení odbourávání těchto reziduí je nutné slámu rozřezat a co nejdříve po sklizni zapravit. Pokud nejsou rezidua účinných látek v rostlinných zbytcích zcela rozloženy, mohou následně poškodit citlivé plodiny. Sláma ošetřená tímto přípravkem ani hnůj od zvířat krmených touto slámou by neměl být použit pro kompostování. Dále by sláma z obilnin neměla být následně použita pro pěstování hub ani jahod. Přípravek se aplikuje postřikem při optimální teplotě 7–25 °C. [13]

Mustang Forte je bílá kapalina charakteristického zápachu s pH 5,4. Podle bezpečnostního listu vydaného společností Dow AgroSciences s.r.o. nejsou známy nebezpečné reakce při použití látky za normálních podmínek, dále je látka neschopná polymerizace a při běžných teplotách je tepelně stálá. Naopak při zvýšených teplotách se aktivní složka rozkládá

a produkty tohoto rozkladu mohou být oxid uhličitý a také toxické plyny oxid uhelnatý a chlorovodík. [14]

Dále dokument uvádí, že jednotlivé složky výrobku Mustang Forte jako estery 2,4-D, draselná sůl aminopyralid draselný nejsou látky, které nelze považovat za snadno biologicky odbouratelné. Nicméně to nutně neznamená, že látka není v životním prostředí biologicky odbouratelná. Na druhou stranu florasulam a propan-1,2-diol obsažené ve výrobku jsou považovány za látky snadno biologicky degradovatelné. Dalším parametrem, který je sledován je bioakumulační potenciál v ekosystému. Výše uvedené složky se považují za látky s nízkým biokoncentračním potenciálem. Potenciál mobility v půdě u aminopyralidu draselného a florasulamu je velmi vysoký. [14]

### **3.4 Corello**

Corello je herbicidní přípravek vyráběný společností Dow AgroSciences s.r.o. používaný zejména k ošetřování pšenice, žita a tritikale. Účinnou látkou je pyroxsulam v koncentraci 75 g/kg. [15] Přípravek se aplikuje na aktivně rostoucí plevele při podmínkách příznivých pro růst, to znamená teplo a vyšší vzdušná vlhkost. Citlivé plevele proti přípravku Corello jsou následující: chundelka metlice, svízel přítula, rozrazil perský, výdrol řepky, violka rolní, kokoška pastuší tobolka, peníze rolní, heřmánkovec přímořský, ptačinec žabinec, a sveřep jalový. Naopak více rezistentním je plevel svízel přítula. Corello se aplikuje postemergentně na podzim nebo na jaře od fáze třetího listu obilniny po fázi druhého kolénka. Podle dokumentu vydaném Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským by se sláma z porostů, kde byl aplikován přípravek Corello, neměla dále používat při pěstování hub. [16]

Veškeré stopy přípravku Corello je nutné ihned po aplikaci odstranit z postřikovače a mísících nádrží, aby nedošlo k eventuálnímu poškození dalších plodin ošetřovaných postřikovačem. Zároveň je vyloučené používat přípravek na pozemcích svažujících se k povrchovým vodám, z důvodu jejich možné kontaminace. [16]

Podle bezpečnostního listu vystaveného výrobcem přípravku se jedná o pevnou hnědavou látku s plesnivým a zatuchlým zápachem s pH 5,51. Při použití za běžných podmínek nedochází k nebezpečným reakcím. Látka je tepelně stálá při běžných teplotách a také neschopná polymerizace. Při rozkladu aktivní složky při zvýšených teplotách uvolňují toxické plyny. [17]

Dále bezpečnostní list uvádí, že pyroxsulam jako jedna ze složek přípravku, nelze považovat za látku snadno biologicky odbouratelnou, nicméně to nemusí znamenat, že látka nemůže být v životním prostředí biologicky degradovatelná. Další složkou je lignosulfonan sodný, který se odbourává v ekosystému velmi pomalu. Naproti tomu kyselina citronová je snadno biologicky odbouratelný. Biologická odbouratelnost nabývá hodnoty 97 %. Mineralizace dosahuje 70 %. Bioakumulační potenciál výše uvedených složek se také liší. Biokoncentrační potenciál pyroxsulamu, lignosulfanu sodného a kyseliny citronové je nízký, zatímco u složky klochintocet-mexyl, která může vyvolat alergickou reakci je střední. Dalším sledovaným parametrem je mobilita v půdě. Potenciál mobility pyroxsulamu v půdě je považován za vysoký. Oproti tomu u klochintocet-mexylu a lignosulfanu sodného existuje předpoklad, že jde o látky relativně imobilní. [17]

### **3.5 Analytické metody**

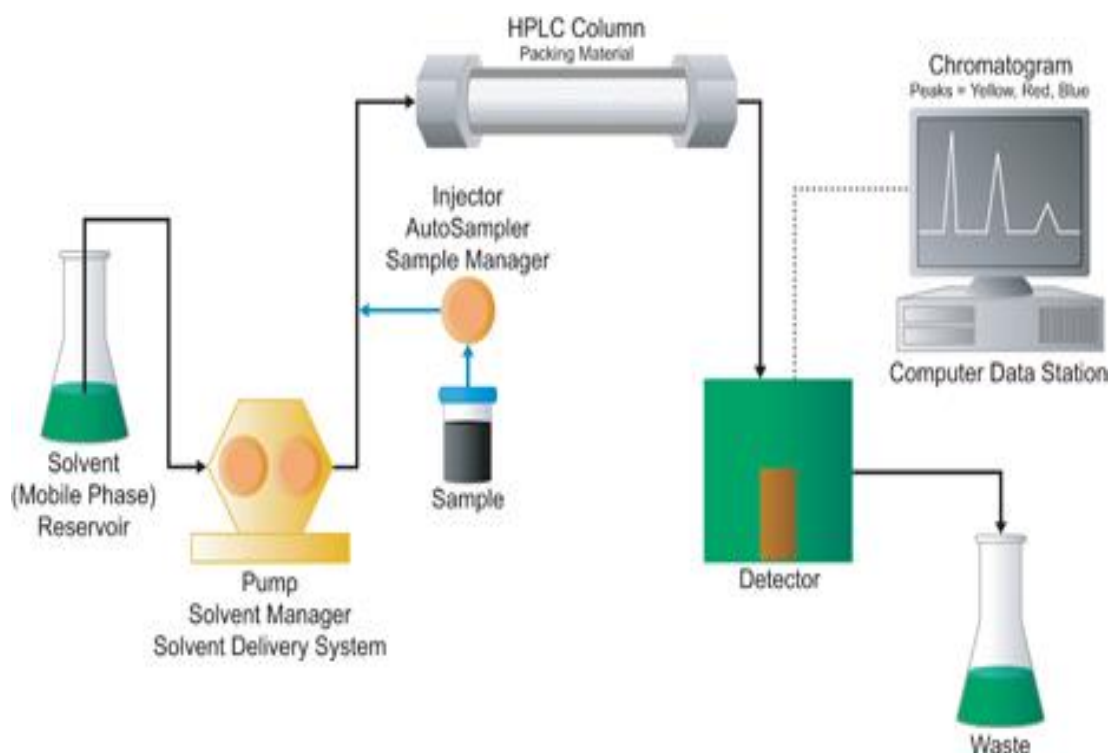
#### **3.6 HPLC**

Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) je hlavním analytickým nástrojem v současné vědě. Moderní HPLC nabízí vysoké rozlišení umožňující kvantitativní stanovení cílových analytů v komplexních maticích díky své kompatibilitě s řadou detektorů. [25]

V HPLC se běžně používají náplňové kolony a stacionární fáze. Jednou z nejoblíbenějších stacionárních fází HPLC používaných ve forenzní vědě je uhlovodík C18 (oktadekan). Tento materiál má přibližnou konzistenci jako svíčkový vosk. Mobilní fáze mohou být buď jedna kapalina, nebo roztok obsahující dvě nebo více mísitelných kapalin. [26]

HPLC má oproti GC některé významné výhody. Například v GC je stacionární fáze vždy polárnější než mobilní fáze (nic nemůže být méně polární než inertní plyn, jako je dusík nebo helium). V HPLC mohou být stacionární fáze a mobilní fáze navrženy tak, že stacionární fáze je méně polární než mobilní fáze. Oktadekan je příkladem velmi nepolární stacionární fáze. V takových případech se chromatografie označuje jako reverzní fáze. To může být velkou pomocí při oddělování směsi nepolárních látek, které by se dobře neoddělovaly pomocí polární stacionární fáze. Další výhodou HPLC oproti GC je to, že složení mobilní fáze může být během běhu změněno. Tomu se říká gradientová chromatografie. Někdy je žádoucí začít s relativně nepolární mobilní fází a poté postupně zvyšovat její polaritu přidáváním stále více polárního rozpouštědla. Toho lze snadno dosáhnout použitím dvou nebo více rozpouštědel a dvou nebo

více čerpadel. Počítač řídí množství každého rozpouštědla, čímž mění polaritu mobilní fáze za běhu. Gradientová chromatografie se používá, pokud analyt obsahuje složky s různou polaritou. Jeho použití může pomoci oddělit podobné látky s nízkou hmotností a zároveň udržet experiment na přiměřenou dobu. Je to poněkud analogické programování teploty v plynové chromatografii. Když mobilní fáze zůstává během běhu HPLC konstantní, nazývá se izokratická chromatografie. Protože se jako mobilní fáze používají kapaliny, je HPLC běžně provozována při pokojové teplotě, aby se odstranilo nebezpečí nárůstu tlaku, pokud se kapaliny dostanou blízko bodu varu. [26]



Obrázek 4: Schéma metody HPLC [28]

HPLC se stává stále populárnější ve forenzních vědeckých laboratořích. Některé ze stejných materiálů, které jsou separovány metodami plynové chromatografie (GC), lze také analyzovat pomocí HPLC. Vysoce účinná kapalinová chromatografie může být metodou volby pro separaci analytů, které jsou citlivé na teplotu, jako jsou výbušniny, které se rozkládají, někdy násilně, když jsou vystaveny teplu. Některé příklady pro analýzu jsou uvedeny níže: [26]

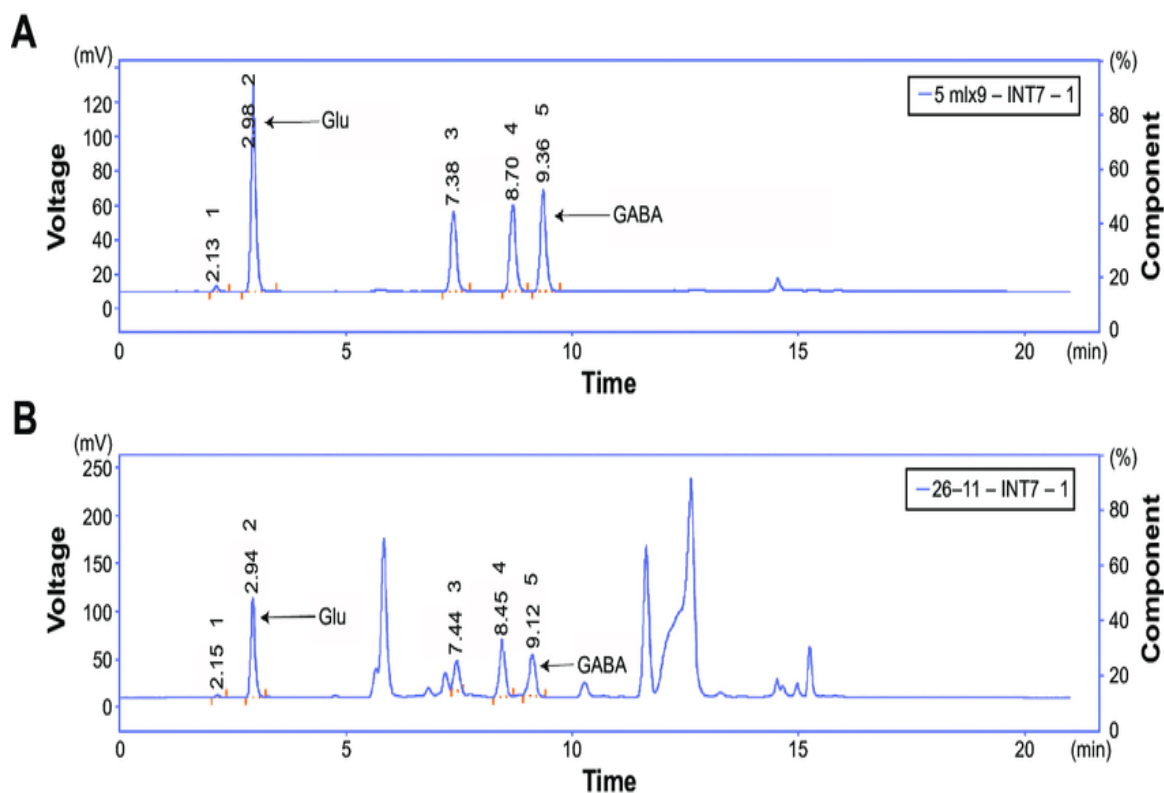
Léky: Mnoho kontrolovaných látek je analyzováno pomocí HPLC. Kromě toho lze také analyzovat léky odebrané z tělesných tekutin. Plynovou chromatografií jsou drogy častěji

identifikovány kvůli snadnosti použití hmotnostního spektrometru. Ačkoli jsou nástroje HPLC-MS v současné době komerčně dostupné, nejsou široce používány ve forenzních vědeckých laboratořích.

**Půdy:** Organické extrakce mohou být prováděny na půdě a různé látky mohou být separovány. Výsledkem je profil půdy. Látky ve směsi nejsou identifikovány, ale profil je užitečným způsobem, jak určit, zda by půda nalezená na místě činu mohla pocházet z konkrétního místa.

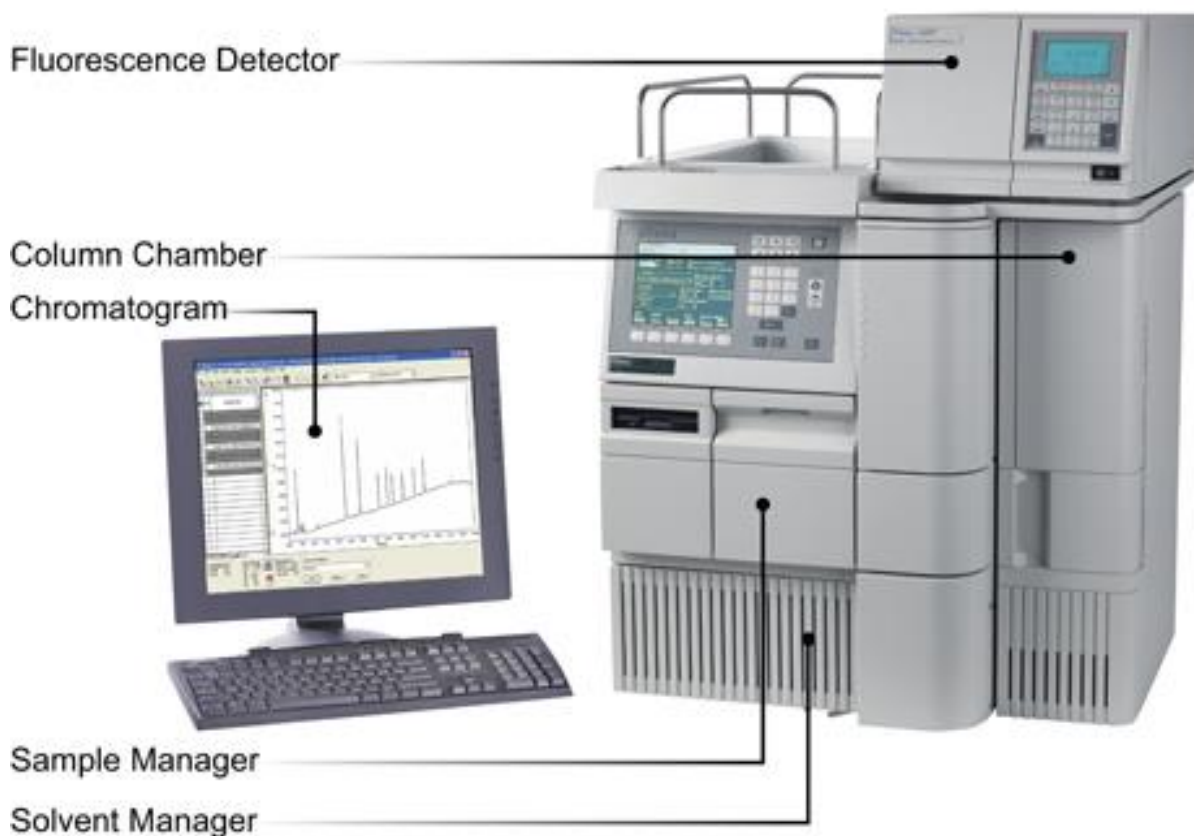
**Výbušniny:** Může být bezpečné provozovat výbušné extrakty pomocí GC kvůli vysokému teplu, ale HPLC je ideální metoda pro separaci výbušných zbytků.

**Inkousty a barviva:** Stanovení viditelných a UV spekter inkoustů je užitečné při porovnání psacího nástroje a psaní na dokument. HPLC může být také použita ke sledování stárnutí inkoustu, protože zasychá a degraduje. Barviva mohou být extrahována z vláken a také separována pomocí HPLC. [26]



Obrázek 5: Příklad chromatogramu [29]





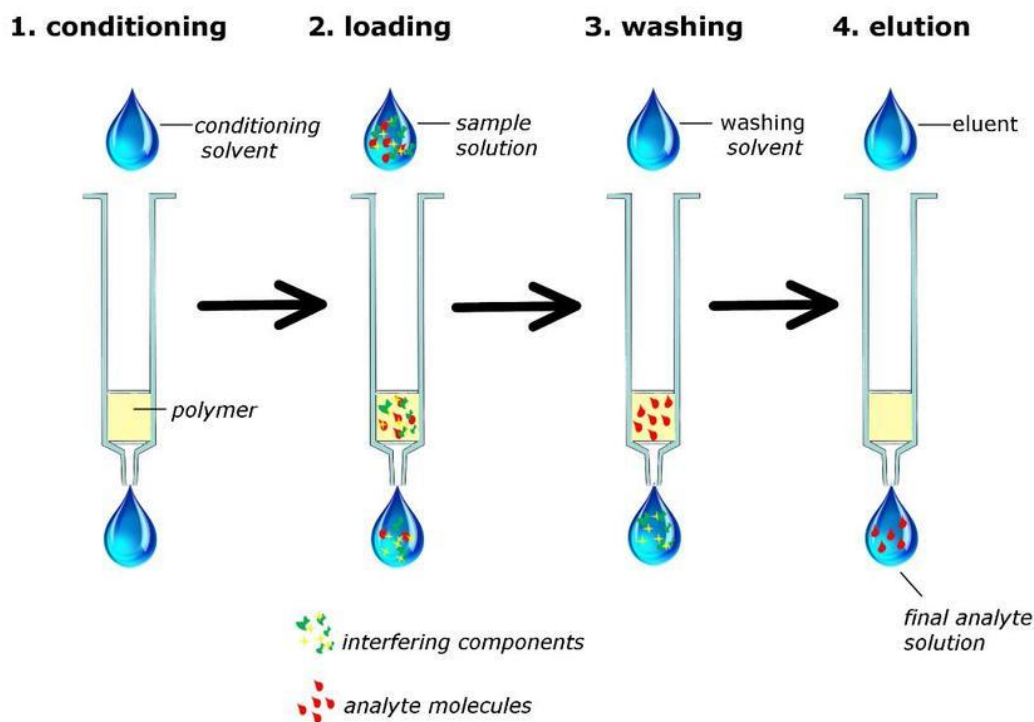
Obrázek 6: Technické uspořádání HPLC [28]

### 3.7 SPE

Extrakce na pevné fázi (SPE) je metoda extrakce, která používá pevné fáze a kapalné fáze pro izolaci jednoho analytu z roztoku. Obvykle se používá k vyčištění vzorku před použitím chromatografické nebo jiné analytické metody pro kvantifikaci množství analytu (analytů) ve vzorku.

Obecným postupem je naplnění roztoku do fáze SPE, smytí nežádoucích složek a poté vyplavení požadovaných analytů dalším rozpouštědlem do sběrné zkumavky. Extrakce v pevné fázi používají stejný typ stacionárních fází, jaké se používají ve sloupcích kapalinové chromatografie. Stacionární fáze je obsažena ve skleněné nebo plastové koloně nad fritou nebo skleněnou vlnou. Sloupec může mít fritu na horní části stacionární fáze a moho a také uzavírací kohout pro řízení toku rozpouštědla přes sloupec. Komerční kazety SPE mají kapacitu 1-10 ml a jsou po použití zlikvidovány. Obvykle se používají k vyčištění vzorku před použitím chromatografické nebo jiné analytické metody pro kvantifikaci množství analytu (analytů) ve vzorku.

Postupy extrakce na pevné fázi se používají nejen k extrakci stop organických sloučenin ze vzorků životního prostředí, ale také k odstranění rušivých složek komplexních matic za účelem získání čistšího extraktu obsahujícího požadované analyty. SPE technika je široce používána pro izolaci analytů z kapalné matrice a vyčištěných extraktů. [27]



Obrázek 7: Znárodnění metody SPE [30]

### 3.8 Detekce pesticidů a herbicidů

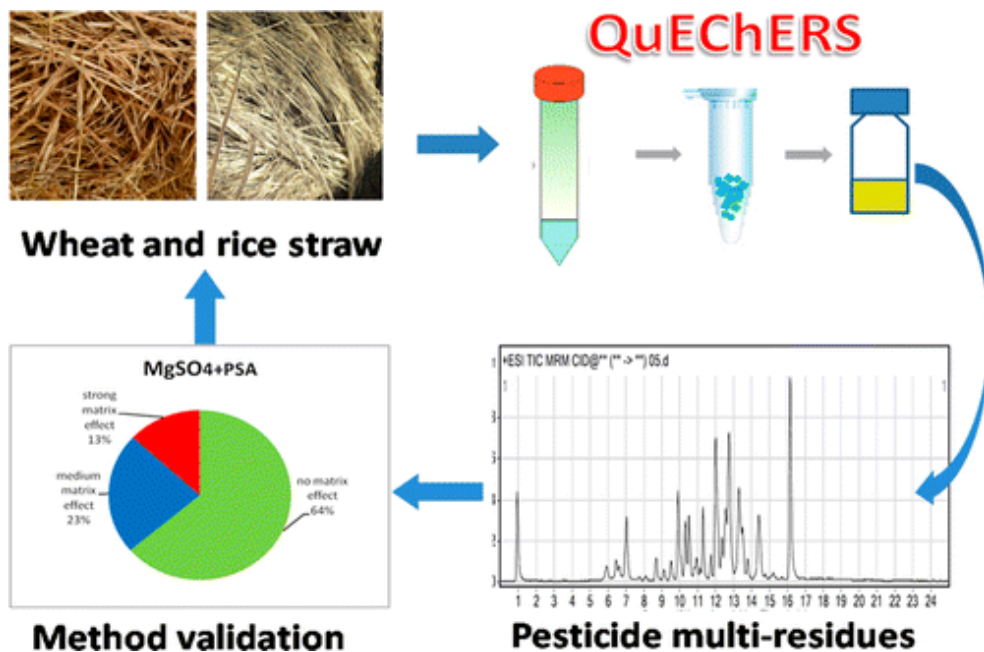
Pro detekci pesticidů a herbicidů jsou nejčastěji používány vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Kapalinová chromatografie lze modifikovat na velmi vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (UPLC), používanou jako vylepšení předchozí metody HPLC. Další používanou metodou je metoda zvaná QuEChERS. Běžná je i kombinace více metod pro zajištění snadnější a efektivnější detekce.

Přítomnost pesticidů v ekosystému, to znamená v půdě, v biologickém materiálu nebo v podzemních vodách, případně v samotných potravinách je v současné době velmi řešenou

problematikou. Právě jejich výskyt v ekosystému a v samotných potravinách, jako například v ovoci či zelenině je brán jako potenciální riziko pro zdraví konzumentů.

Jednou ze studií zabývajících se touto problematikou je studie publikovaná v roce 2015 Zhaoem a kolektivem vědců. Studie se zabývá detekcí tří reziduí herbicidů a to konkrétně florasulam, fluroxypyru, a halauxifen-methylu. Pro detekci bylo použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie následovaná tandemovou hmotnostní spektrometrií. Vzorky byly extrahovány směsí acetonitrilu a vody, následované disperzním čištěním v pevné fázi a samotnou detekcí. Cílové analyty byly detekovány v pětiminutových cyklech pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie vybavenou velmi pevnou křemíkovou kolonou připojenou ke zdroji elektronové ionizace v pozitivním režimu. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu o koncentraci 0,2 % obj. a vody, která byla pumpou čerpána průtokovou rychlostí 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Během detekce byla teplota kolony udržována při 40  $^{\circ}\text{C}$  z důvodu snížení viskozity vzorku. Teplota vzorků byla nastavena na 10  $^{\circ}\text{C}$ . Následný objem nástřiku činil 3  $\mu\text{L}$ . Všechny tři herbicidy byly eluovány v časovém rozmezí pěti minut. Pro analýzu byl použit hmotnostní spektrometr s trojnásobným kvadrupólem připojeným ke zdroji elektronové ionizace. Jako nebulizační plyn byl použit dusík, kolizním plynem byl argon. Typickými podmínkami tandemové hmotnostní spektrometrie bylo kapilární napětí o hodnotě 3,0 kV; teplota zdroje 150  $^{\circ}\text{C}$  a teplota desolvatace 350  $^{\circ}\text{C}$ . Před samotnou analýzou byly vzorky podrobeny homogenizaci. Vzorky o hmotnosti 10 g pšeničného zrna, 10 g půdy a 5 g slámy byly naváženy do 50 mL teflonových centrifugačních zkumavek. Do každé matrice byl naspikován standard. Pro účely porovnání byl použit blank, který byl podroben totožnému procesnímu postupu, nicméně bez přidání standardu. Poté byly zkumavky umístěny do vortexu na 3 minuty a dále ponechány 2 hodiny při pokojové teplotě pro dosažení rovnoměrné distribuce pesticidů. Následně byly do každé zkumavky přidány 10 mL acetonitrilu a 10 mL destilované vody a opětovně umístěny do vortexu. Poté došlo k přidání 5 g NaCl. Proces vortexování byl následně několikrát opakován až po dosažení výsledného supernatantu, který byl dále přefiltrován přes 0,22  $\mu\text{m}$  nylonový filtr. Všechny vialky byly před samotnou analýzou protřepány a umístěny do autosampleru pro provedení analýzy. [18]

Výše popsaná metoda vykazovala velmi dobrou přesnost a správnost. Výtěžnost u všech tří herbicidů se pohybovala v rozmezí 75,8 a 114,6 %, s relativní standardní odchylkou uvnitř dne menší než 6,01 % a mezi denní relativní standardní odchylkou menší než 4,02 %. Meze kvantifikace se pohybovaly mezi 0,14 a 7,68  $\mu\text{g}/\text{kg}$  pro každý herbicid. [18]



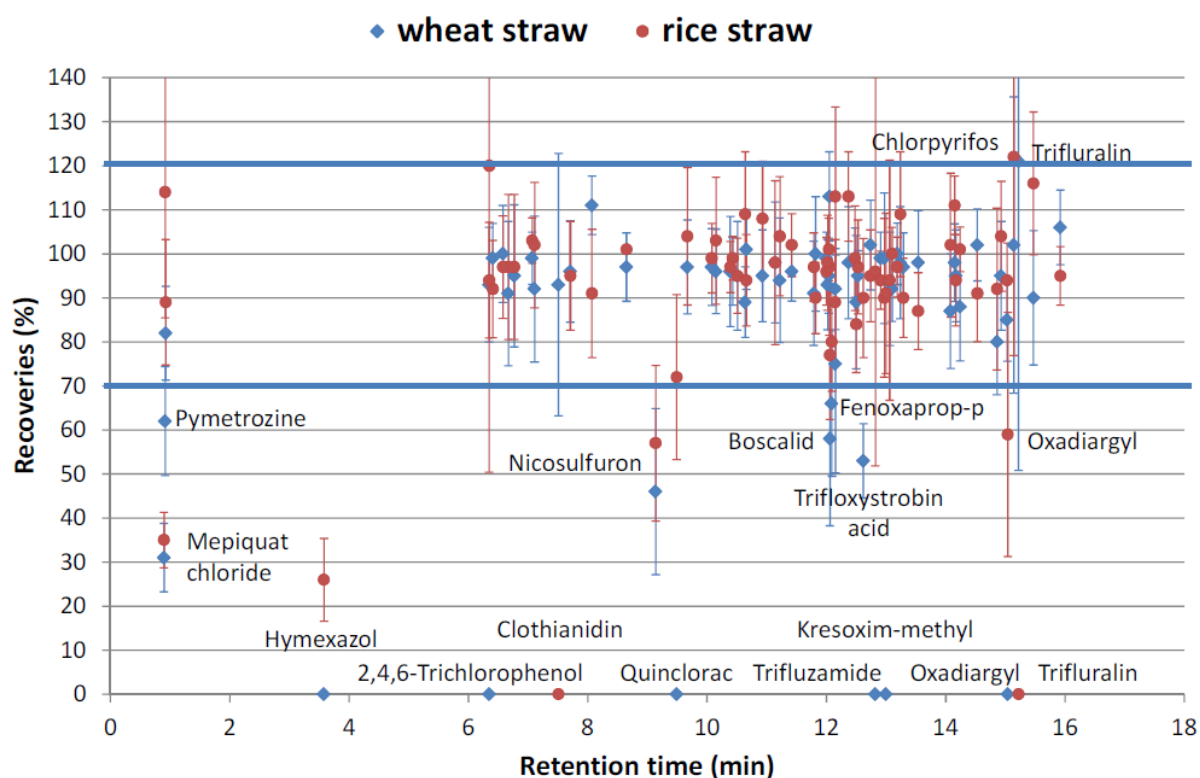
Obrázek 8: Grafické znázornění analýzy s využitím metody QuEChERS [19]

Další studie popisující řešenou problematiku byla publikována v roce 2016 Zhangem a kolektivem vědců. Zmíněná studie popisuje použití metody QuEChERS spolu s kapalinovou chromatografií a tandemovou hmotnostní spektrometrií určenou s cílem provést multiresiduální analýzu pesticidů a pšeničné a rýžové slámě. Uvedená zvalidovaná metoda sloužila k rychlému stanovení 69 pesticidů v různých úrovních koncentrace. V kvantitativní analýze se výtěžnosti pohybovaly v rozmezí od 70 do 120 % a u většiny stanovovaných analytů byla dosažena relativní směrodatná odchylka menší než 20 %. Dále většina analytů dosahovala podobné linearitě a to konkrétně  $R^2$  větší než 0,98. Přidání 0,1 % kyseliny mravenčí do vzorků nebo nikoliv při extrakce acetonitrilem vedlo k podobným výsledkům, pouze s rozdílem použití jiného sorbentu v disperzní extrakci na pevné fázi. Při porovnání autoři studie dospěli k názoru, že obě

metody jsou efektivní a účinné pro multiresiduální analýzu stanovovaných pesticidů ve vzorcích pšeničné a rýžové slámy. [19]

Tabulka 1: Podmínky pro chromatografické gradienty při LC-MS/MS analýzy [19]

Čas (min)	Acetonitril (%)	Roztok 0,1 % kyseliny mravenčí s vodou
0	1	99
0,5	1	99
2	30	70
4	30	70
8	70	30
10	70	30
11	99	1
16	99	1
17,5	1	99
25	1	99



Obrázek 9: Graf výtěžností jednotlivých 69 pesticidů v závislosti na retenčním čase v pšeničné a rýžové slámě [19]

Studie problematiky pesticidů se zabývala také studie vydaná v roce 2016 Pangem a kolektivem vědců. Pro stanovení čtyř herbicidů v půdě, pšenici a pšeničné slámě byla použita metoda QuEChERS spolu s kapalinovou chromatografií následovanou tandemovou hmotnostní

spektrometrií. Byly stanovovány čtyři herbicidy a to konkrétně florasulam, carfentrazone-ethyl, fluroxypyr-meptyl, and fluroxypyr. Úpravou množství grafitizované saze lze dosáhnout výtěžnosti v rozmezí 80 až 110 %. Kinetika rozptýlení uvedených čtyř herbicidů v půdě, pšeničné slámě a v pšenici se lišila. Například zbytkové koncentrace po uplynutí dvou hodin po ošetření byly vyšší v pšeničné slámě než v půdě a dále ve slámě nastala rychlejší degradace herbicidů v porovnání s půdou a pšeničným zrnem. Stanovená rezidua v půdě, pšeničné slámě a v pšeničném zrně byly všechna pod hranicí maximálních residuálních limitů (MRL) stanovených legislativou. Použitá metoda stanovení byla souhrnně označena jako univerzální a snadná na provedení. [20]

Studie vydaná v roce publikovaná v roce 2012 Tianem a kolektivem vědců sledovala stanovení reziduí aminopyralidu, clopyralidu a picloramu v zelenině a v ovoci. Konkrétně se jednalo o vzorky lilků, okurek a rajčat. Z ovoce o vzorky jablek a hroznů. Ke stanovení byla použita ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie s použitím tandemové hmotnostní spektrometrie. Použitá metoda zahrnuje extrakci směsí 1% kyseliny mravenčí a acetonitrilu, která vykazovala vysokou extrakční účinnost. Poté následovalo přečištění vzorku 50 mg karbonové saze. Chromatografická separace byla provedena na koloně C18 použitím eluce binárním gradientem, který obsahoval methanol a 0,2 % kyseliny mravenčí v destilované vodě. K stanovení sloučenin bylo zapotřebí tři minut. Při použití čtyř koncentračních stupňů, a to 0,05; 0,1; 0,5 a 1,0 mg/kg, se jednotlivé průměrné výtěžnosti pohybovaly v rozmezí od 66,5 % do 109,4 % s relativní směrodatnou odchylkou v rozpětí od 1,1 do 19,7 % pro všechny analyty. Limity detekce (LOD) byly pod hranicí 0,010 mg/kg a limity kvantifikace (LOQ) nepřesáhly hodnotu 0,036 mg/kg, což jsou hodnoty nižší než maximální residuální limity (MRL), které jsou v rozmezí 0,5 až 5,0 mg/kg. Použitá metoda poskytla dobré limity detekce a limity kvantifikace u zeleninových a ovocných vzorků, s výjimkou vzorku lilku. Souhrnem lze říci, že metoda poskytla velmi kvalitní výsledky pro všechny tři pesticidy ve vzorcích ovoce a zeleniny. [21]

## 4 Metodika

### 4.1 Příprava vzorků pšeničné slámy

Jednotlivé vzorky pšeničné slámy byly naváženy na hmotnost  $5 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ . Tyto vzorky byly dále extrahovány na automatickém extraktoru s použitím methanolu jako rozpouštědla. Následující tabulka přehledně shrnuje jednotlivé vzorky pšeničné slámy, velikost jejich frakcí a také jejich pracovní označení.

Tabulka 2: Seznam vzorků pšeničné slámy

Vzorky	Frakce (mm)	Označení
Pšenice čistá	0,5	1A
Pšenice čistá	1,0	1B
Pšenice čistá	1,5	1C
1 rok hanč	0,5	3A
1 rok hanč	1,0	3B
1 rok hanč	1,5	3C
2 roky hanč	0,5	4A
2 roky hanč	1,0	4B
2 roky hanč	1,5	4C
Čerstvá hanč	0,5	5A
Čerstvá hanč	1,0	5B
Čerstvá hanč	1,5	5C

Do extrakčních zkumavek byly vloženy jednotlivé vzorky slámy a kousky vaty pro zlepšení izolace. Před samotnou extrakcí byla část vzorků naspikována aminopyralidem a pyroxsulamem z důvodu zjištění tepelné stability jednotlivých herbicidů při působení zvýšené extrakční teploty a také z důvodu dalšího stanovení v rámci experimentu. Extrakce probíhala



Obrázek 10: Automatický extraktor od společnosti Velp Scientifica

při teplotě 210 °C ve třech fázích: imersion, washing recovery.

Po provedení extrakce se k vypařeným naspikovaným i nenaspickovaným vzorkům přidalo 1,5 mL methanolu. Pro dosažení opětovného rozpuštění vzorků byly vzorky umístěny do ultrazvukové lázně. Obsah byl přepipetován do ependorfeč a umístěn do centrifugy na 10 minut při 17000 otáčkách/s. Poté byla provedena extrakce na pevnou fázi, tzv. SPE extrakce. Její princip spočívá ve střídavém promívání vzorků polárním a nepolárním rozpouštědlem, v našem případě se jedná o destilovanou vodu a methanol. Celý proces se skládá z pěti kroků. Nejprve dojde k prolití vzorku 5 ml methanolu, ve druhém kroku potom 5 ml destilované vody. Ve třetím kroku dojde k zachycení vzorku na silikagelu, který je součástí SPE patrony. Ve čtvrtém kroku dojde znovu k prolití vzorků destilovanou vodou a tím k vyplavení polárních látek ze vzorků. V posledním kroku dojde k prolití vzorků methanolem, který způsobí vyplavení



méně polárních až nepolárních látek ze vzorků, jimiž jsou v našem případě stanovované pesticidy.

Od každého vzorku byly připraveny dvě vialky. Jedna vialka příslušného vzorku obsahovala 1 mL destilované vody jako rozpouštědla a druhá vialka příslušného vzorku obsahovala 1 mL methanolu jako rozpouštědla. Takto připravené vzorky dále putovaly k finální analýze pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC. Výše popsany postup byl vzhledem k nepoužitelnosti naměřených výsledků nahrazen postupem uvedeným v následující kapitole.

## **4.2 Příprava vzorků a extrakce**

Prvním krokem bylo navážení 10 g důkladně zhomogenizovaného vzorku pšeničné slámy. Pro účely validace byl ke vzorkům přidán pyroxsulam o koncentracích 0,01; 1,00 a 10,0 ppb. Naspikované vzorky byly poté ustáleny po dobu 2 hodin před provedením extrakce. V dalším kroku byly vzorky extrahovány za přidání 50 ml acetonitrilu a umístění do mechanické třepačky po dobu 40 minut při pokojové teplotě. Poté byly vzorky centrifugovány po dobu 5 minut při otáčkách 3500 RCF. Dále bylo 25 ml supernatantu zkoncentrováno pro účely vysušení za použití rotačního evaporátoru. (30 °C, 0,09 MPa). Získaná směs byla rozpuštěna ve 2,5 mL methanolu pro následující proces přečištění. [22]

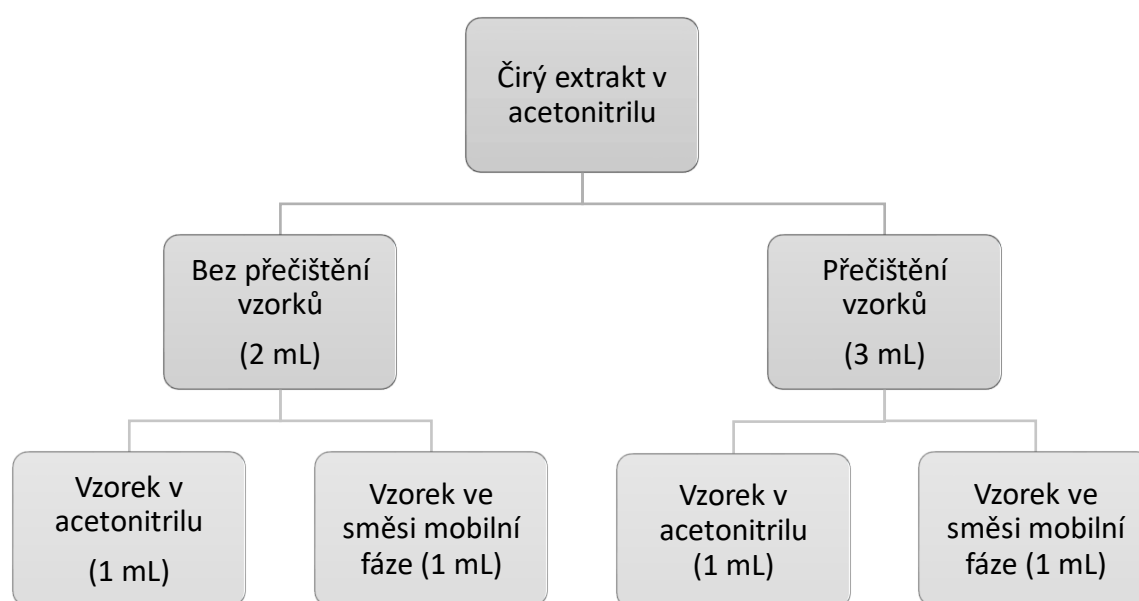
## **4.3 Proces přečištění**

Získaná směs byla purifikována za použití C18 SPE patrony. SPE patrona byla nejprve kondicionována 5 mL vody. Dále byly 2 mL směsi převedeny do patrony. Následná eluce byla provedena za použití 5 ml směsi methanol:voda v poměru 10:1. Tento krok byl opakován třikrát. Rozpuštěný eluát byl poté zkoncentrován až do úplné suchosti. Získané residuum bylo nakonec znovu rozpuštěno ve 2 ml methanolu, přefiltrováno a za pomoci nylonové stříkačky o průměru 0,22 µm injektováno pro finální chromatografickou analýzu. [22]

## **4.4 Optimalizace složení rozpouštědel ve finálních vzorcích**

Supernatant získaný v předchozích krocích byl za účelem vyčištění extrahovaných vzorků rozdělen na dvě části. Před fází přečištění vzorku byl 1 mL čirého supernatantu odebrán

do lahvičky a následně přímo analyzován. Alikvot 1 mL supernatantu byl také přenesen do mikrocentrifugační zkumavky a acetonitril byl odpařen za pomoci proudu dusíku N<sub>2</sub>. Zbytek byl obnoven stejným objemem směsi chromatografické mobilní fáze v poměrovém složení 1:1 obsahující 2mM amonné soli, 0,1 % kyselinu mravenčí s přidavkem vody a methanolu. Tato směs byla převedena do zkumavek a umístěna do ultrazvukové lázně na dobu 10 minut. Mikrocentrifugační zkumavky byly centrifugovány při 15000 RCF při teplotě 4 °C po dobu 5 minut a získaný supernatant byl přenesen do chromatografických lahviček.



Obrázek 11: Optimalizace a výběr rozpouštědla ve finálních vzorcích

Pro přečištění vzorků byl použita stejná metodika popsaná výše.

## 4.5 Kalibrační standardy

Pro kvantifikaci zbytků pyroxsulamu ve vzorcích byly připraveny dvě různé kalibrační křivky ve směsi mobilní fáze:

- Externí kalibrační křivka
- Matrix-uzavřená kalibrační křivka

Oba rozsahy koncentrací kalibračních standardů byly mezi 0,03-33,3 ng / ml, signální odezva byla shromážděna v 5 datových bodech, které vykazují vysokou linearitu a regresní součinnost vyšší než 0,99. Kalibrační křivky C byly vytvořeny s použitím plošných hodnot složeného signálu a vážení  $1 / x$

Skupina 1-B byla vybrána jako slepý vzorek.

Skupina 1-B byla extrahována za stejných analytických podmínek, ale bez přidání vnitřního standardu. Alikvotní část 6 ml bez čištění extraktu vzorku byla přenesena do skleněné vzorkové nádoby a acetonitril se odpařil do celkového sucha pod N<sub>2</sub> proudem a suchý extrakt se rozpustil ve stejném objemu mobilní fáze směsi, byl vystaven působení ultrazvuku, odstředěn a získán konečný čirý extrakt, který byl použit pro kalibraci odpovídající matice, aby se minimalizoval maticový efekt.

Maticový efekt byl také vypočten v rámci požadavku na validaci metody podle následující rovnice [23]:

$$\text{Matrix effect \%} = \left[ \left( \frac{\text{Slope of Matrix} - \text{Matched cal. curve}}{\text{Slope of external cal. curve}} \right) - 1 \right] * 100$$

Pouze pokud je maticový efekt menší než 20 % maticového efektu (bude počítán podle srovnání externích standardů), budou použity kalibrační standardy v rozpouštědle (externí standard) (SANCO / 825/00 rev.8.1, 2010).

## 4.6 Validace metody

Metoda extrakce a kvantifikace byla validována z hlediska citlivosti / linearity, maticového efektu, LOQ (limit kvantifikace), specifčnosti, přesnosti (zkreslení), přesnosti, iontového poměru a retenčního času.

✓ Linearita byla zkontrolována z 5 úrovní kalibrace (odchylka zpětně vypočtené koncentrace od skutečné koncentrace (<± 20 %)).

Maticový efekt byl vypočítán porovnáním odezvy od standardů pro rozpouštědla a standardů odpovídajících matici.

✓ Limit kvantifikace (LOQ) je dán jako nejnižší úroveň špiček splňující výkonnostní kritéria metody pro pravdivost a přesnost (≤MRL-maximální limit reziduí)

✓ Specifčnost bude odezva v slepých vzorcích a slepých kontrolních vzorcích v hodnotě 30 % limitu)

✓ Správnost, průměrná výtěžnost pro každou testovanou úroveň hrotu (píku) (70-120 %).

✓ Přesnost, opakovatelnost pro každou testovanou úroveň hrotu (≤20 %)

✓ Ion poměr (2 ionty, hmotnostní rozlišení pro izolaci prekursoru iontů by měla být stejná nebo lepší než rozlišení jednotky hmotnosti)

✓ retenční čas ( $\pm 0,1$  min)

Validace metody byla provedena za použití 2 hladin špiček (píků) (10 ng / ga 100 ng / g) a 3 replikátů každého vzorku stejně tak jako slepého vzorku.

#### 4.7 Analytické podmínky

Před LC-MS analýzou, Fluoropyram d 4 a standardům pyroxsulamů připravených v mobilní fázi na koncentraci 50 ppb byly přímo injektovány do MS k optimalizaci na následující podmínky: (potenciál (DP, V), vstupní potenciál (EP, V), energie srážky (CE, volty) a CXP (volty) a získané fragmenty Q1 a Q3 (tabulka 3).

Tabulka 3: Výsledky optimalizace sloučenin

Složení optimalizace	Hmotnost Q1 (Da)	Hmotnost Q3 (Da)	Doba setrvání	ID	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
	401,998	209	150	Fluoropyram d 4 -Quant	26	10	29	10
	401,998	177,9	150	Fluoropyram d 4 -Qual	26	10	37	0
	434,9 35	195	150	Pyroxsulam Quant	56	10	35	10
	434,9 35	124	150	Pyroxsulam_ Qual-1	56	10	67	14

Analytické podmínky LC byly upraveny tak, aby se minimalizovalo ukládání pyroxsulamů v systému. Podmínky LC jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Podmínky kapalinové chromatografie

Podmínky kapalinové chromatografie	Mobilní fáze A: 2 mM NH <sub>4</sub> - formiát, 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě
	Mobilní fáze B: Methanol
<b>Program Gradient Flow</b>	

Čas	Průtok (ml / min)	A. Konc. (%)	B. Konc. (%)
0	0,3	60	40
2.00	0,3	10	90
9.00	0,3	10	90
9.10	0,3	40	60
13.5	0,3	40	60
14	0,3	60	40
15	0,3	100	0
Sloupová trouba		40 ° C	
Vstřikovací objem		2 ul	
Sloupec		C18	
Teplota autosampleru		+ 18 ° C	
			<b>Celkový čas: 1 4,000 min.</b>

Podle fixních retenčních časů sloučenin byl vzorek směřován ke zdroji nebo odpadu. Podmínky integrovaného ventilu jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Integrované seřízení ventilu

Integrovaný ventil	Celkový čas (min)	Pozice	Směr
	0	B	Zdroj
	6.5	A	Odpad

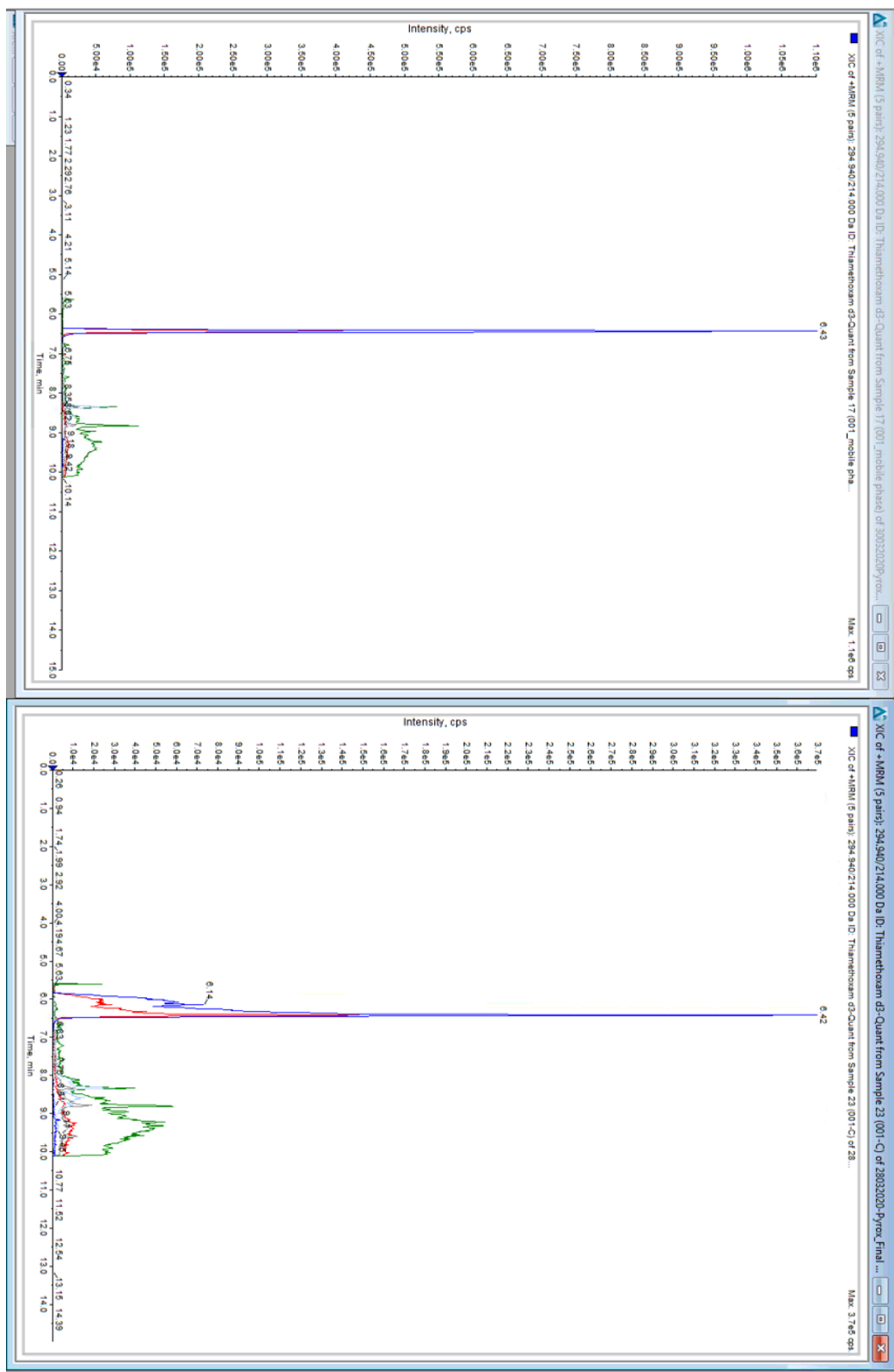
Podmínky hmotnostní spektrometrie jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6: Podmínky hmotnostní spektrometrie (MS)

<b>Podmínky MS</b>	Záložní plyn (Cur)	40 l / min
	Kolizní plyn (CS)	Střední
	Napětí IonSpray (IS)	5500
	Teplota (TEM)	550 ° C
	Iontový zdrojový plyn (GS1)	40 l / min
	Iontový zdrojový plyn (GS2)	60 l / min

## 5 Výsledky

### 5.1 Optimalizace aplikovaného rozpouštědla na finální vzorek



Obrázek 12: Změna pozadí a intenzity podle použitého rozpouštědla ve stejném vzorku (A: mobilní fáze, B: acetonitril)

Výsledky ukázaly, že vzorky rozpuštěné ve vodě a methanolu (50:50, obj./obj.) mají nižší pozadí, vyšší intenzitu signálu a ostřejší tvar píku (obrázek A). V případě acetonitrilu (ACN) jako rozpouštědla byla signální odezva snížena a tvar píku byl narušen (obrázek B).

## 5.2 Validace metody

### 5.2.1 Validační parametry

Preciznost-opakovatelnost (RSD%) byla vypočtena pro pyroxsulam na 2 úrovních stoupání (0,03 ng / g a 1 ng / g).

Přesnost-zotavení byla stanovena ze studií obnovy, ve kterých byly vzorky špičaté na dvou úrovních koncentrace pyroxsulamu (0,03 ng / g a 1 ng / g).

Mez kvantifikace, kvantifikační limity (LOQ) byly stanoveny jako nejnižší úroveň špičky, pro kterou byla splněna kritéria přijatelnosti.

Kritéria pro přijetí výsledků validace

➤ Aby byl pyroxsulam přijat jako validovaný, musela být splněna následující kritéria pro přesnost a správnost:

- ✓ Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti by měla být  $\leq 20$  %
- ✓ Průměrná relativní výtěžnost musí být mezi 70-120 %.

Výsledky validace jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7: Výsledky validace (kalibrace odpovídající matici). Limit detekce byl stanovena podle nejnižší úrovně špičky, který splnil kritéria přijatelnosti.

	Úroveň spikování	Detekované množství (ng/g)	Sd. deviace $\pm$	RSD% - Přesnost	Zjištěná úroveň	Výtěžnost %- Správnost	Maticový efekt	LOQ
Slepý vzorek	0	0,1431	0,05	<b>37,43%</b>	0	<b>0</b>	<b>55,05%</b>	<b>0.03 ppb</b>
Spikování 0.03	0.03	0,1750	0,00	<b>2,42%</b>	0,0318	<b>106,07%</b>		
Spikování 1	1	1,0098	0,12	<b>11,59%</b>	0,8666	<b>86,66%</b>		

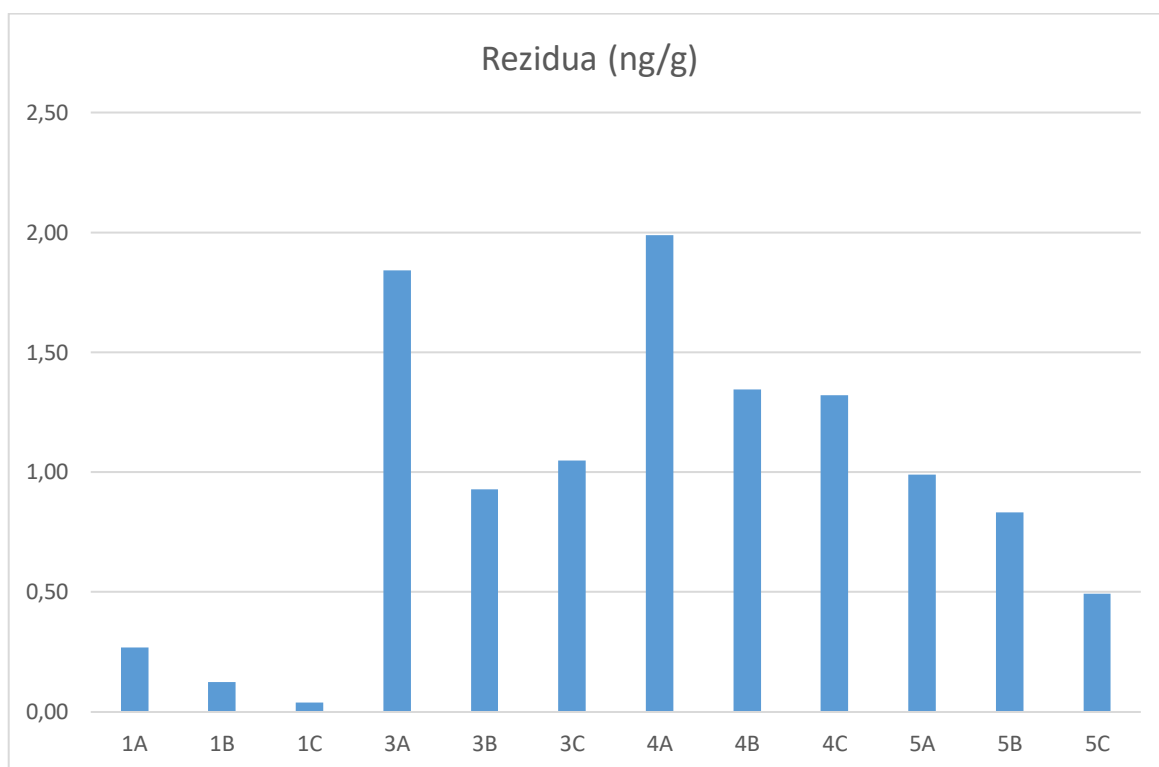
Po dokončení validace metody byly vzorky různých velikostí (0,5 cm, 1,0 cm a 1,5 cm) extrahovány stejnou metodou validace vzorků a získané údaje jsou uvedeny v tabulce 8. Podle získaných výsledků lze vyvodit závěru, že velikost částic silně ovlivňuje detekované hladiny

reziduí ve vzorcích slámy. Vyšší množství pyroxsulamu bylo detekováno v menší velikosti částic vzorků slámy představujících stejnou skupinu vzorků, rozdělenou v tabulce uvedené výše.

Tabulka 8: Reziduální hodnoty pyroxsulamu ve vzorcích

Vzorek	Reziduum (ng/g)	Std. Dev.
1A	0,2701	0,01
1B	0,1239	0,04
1C	0,0397	0,01
3A	1,8424	0,26
3B	0,9298	0,02
3C	1,0500	0,07
4A	1,9885	0,64
4B	1,3460	0,41
4C	1,3223	0,19
5A	0,9895	0,01
5B	0,8323	0,10
5C	0,4922	0,00





Obrázek 13: Reziduální množství pyroxsulamu ve vzorcích, podle velikosti částic

## 6 Diskuze

Vzorky byly připraveny podle validační zprávy EN 15662: 2008 28 [24].

Vzhledem k tomu, že v rámci výzkumných projektů existují různé přístupy, bylo rozhodnuto, že oba výsledky budou (s použitím čištění vzorků i bez něj) porovnány a zvážení těchto výsledků by pomohlo optimalizaci a validaci další metodiky. V důsledku toho bylo rozhodnuto pokračovat v analýze bez kroku čištění, protože výtěžky byly velmi nízké. Dosahovaly hodnot pod 20 % a nejsou v práci uvedeny.

Extrahované vzorky byly nejprve analyzovány v LC QQQ podle EN 15662: 2008 - Potraviny rostlinného původu-Stanovení reziduí pesticidů pomocí GC-MS a / nebo LC MS / MS. Finální analýze předcházela extrakce acetonitrilem a čištění pomocí disperzní metody QuEChERS.[24] Navrhované podmínky kapalinové chromatografie však nepřinesly konzistentní výsledky. Z toho důvodu byla metodika kapalinové chromatografie změněna, jak je uvedeno výše.

Kalibrace externího standardu byly nejprve připraveny v acetonitrilu, aby byla zachována uniformita s extrakty vzorků, ale poté bylo rozpouštědlo změněno z acetonitrilu na směs vody a methanolu v poměru mobilních fází 50:50 v důsledku prokazování vyšší ionizační účinnosti, čímž byly získány konzistentní fragmenty s nižší ionizační energií v kalibrech. Podobně byla připravena kalibrační křivka odpovídající matici směsi mobilní fáze. Vzorky byly také rozpuštěny v mobilní fázi.

Byl zjištěn maticový efekt >20 % a výpočty byly provedeny podle kalibrační křivky odpovídající matici. Mez kvantifikace byla stanovena jako 0,03 ng/g jako nejnižší špičková hladina, která splňovala kritéria. Nižší velikost částic poskytla vyšší množství pyroxsulamu.

Studie zmíněné v literární rešerši se zabývali detekcí jiných pesticidních látek v různém biologickém materiálu. Tudíž nelze směřodatně porovnávat hodnoty získané v rámci tohoto měření s hodnotami získanými ve zmíněných studiích.

V původním zadání figuroval i herbicid aminopyralid, který je uveden v literární rešerši. Nicméně laboratorní práce a detekce tohoto herbicidu byla tak technicky a časově náročná, že nebylo možné ho detekovat a použít naměřené výsledky v této diplomové práci. Aminopyralid se během laboratorního měření choval nepředvídatelně, znečišťoval chromatografickou kolonu a zatěžoval technické vybavení kapalinové chromatografie. Údržba kapalinového chromatografu a jeho následné čištění zabralo spoustu času a ve finále znemožnilo naměření požadovaných dat. Kvůli těmto vzniklým problémům musel být postup několikrát obměňován až do té doby, než bylo dosaženo výsledků.

Rozsah naměřených dat byl také do velké míry ovlivněn situací, ve které vznikal. Mám na mysli situaci spojenou s uzavřením fakulty na několik měsíců a nemožnost pokračování laboratorního měření.

Navzdory zmíněným problémům spojených s prací na této diplomové práci byla naplněna stanovená hypotéza a to vypracování a zvalidování metody detekující rezidua pyroxsulamu v pšeničné slámě a také jeho detekce a porovnání reziduálního množství herbicidu v závislosti na jednotlivých velikostech frakcí tohoto biologického materiálu.

Výsledek měření ukázal, že frakce o velikosti 0,5 mm vykazují vyšší koncentrace reziduí pyroxsulamu, než frakce o vyšších velikostech.

## 7 Závěr

Hypotéza této diplomové práce, která zněla zoptimalizovat a zvalidovat metodu stanovení reziduí pyroxsulamu v pšeničné slámě a stanovit koncentrace reziduí pyroxsulamu v závislosti na velikosti jednotlivých frakcí pšeničné slámy.

Navzdory zmíněným problémům spojených s laboratorním měření na této diplomové práci byla stanovená hypotéza naplněna. Byla vypracována a zvalidována metoda detekující rezidua pyroxsulamu v pšeničné slámě a také bylo detekováno a porovnáno reziduální množství herbicidu v závislosti na jednotlivých velikostech frakcí tohoto biologického materiálu.

Výsledek měření ukázal, že frakce o velikosti 0,5 mm vykazují vyšší koncentrace reziduí pyroxsulamu, než frakce o vyšších velikostech.

Vzhledem k aktuálnosti problematiky používání pesticidů v zemědělství je dané téma hojně řešeno v rámci mnoha studií po celém světě a to zejména ve spojení s možným negativním dopadem nadměrného používání těchto látek na lidské zdraví a životní prostředí.

## 8 Literatura

- [1] Pesticidy. *Bezpečnost potravin* [online]. [cit. 2020-08-02]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76690.aspx>
- [2] Aminopyralid. *National Library of Medicine* [online]. [cit. 2020-08-02]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aminopyralid>
- [3] Pesticide Fact Sheet. *United States Office of Prevention, Pesticides Environmental Protection and Toxic Substances Agency* [online]. [cit. 2020-08-02]. Dostupné z: [https://www3.epa.gov/pesticides/chem\\_search/reg\\_actions/registration/fs\\_PC-005100\\_10-Aug-05.pdf](https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-005100_10-Aug-05.pdf)
- [4] Aminopyralid-Experimental Properties. *PubChem* [online]. [cit. 2020-08-02]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aminopyralid#section=Experimental-Properties>
- [5] Aminopyralid-EU-Pesticides-Data. *PubChem* [online]. [cit. 2020-08-02]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aminopyralid#section=EU-Pesticides-Data>
- [6] Aminopyralid-2D-Structure. *PubChem* [online]. [cit. 2020-08-02]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aminopyralid#section=2D-Structure>
- [7] Pesticide Fact Sheet. *United States Office of Prevention, Pesticides Environmental Protection and Toxic Substances Agency* [online]. [cit. 2020-08-02]. Dostupné z: [https://www3.epa.gov/pesticides/chem\\_search/reg\\_actions/registration/fs\\_PC-005100\\_10-Aug-05.pdf](https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-005100_10-Aug-05.pdf)
- [8] Pyroxsulam-EU-Pesticides-Data. *PubChem* [online]. [cit. 2020-08-02]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11571555#section=EU-Pesticides-Data>
- [9] Product Safety Assessment Pyroxsulam. *Dow.com* [online]. [cit. 2020-08-02]. Dostupné z: [https://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDOWCOM/dh\\_07cf/0901b803807cfdfb.pdf?](https://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDOWCOM/dh_07cf/0901b803807cfdfb.pdf?)

[filepath=productsafety/pdfs/noreg/233-00536.pdf?filepath=productsafety/pdfs/noreg/233-00536.pdf&fromPage=GetDoc](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11571555#section=Structures)

[10] Pyroxsulam-Structures. *PubChem* [online]. [cit. 2020-08-02]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11571555#section=Structures>

[11] Pyroxsulam-3D-Conformer. *PubChem* [online]. [cit. 2020-08-02]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11571555#section=3D-Conformer>

[12] Mustang Forte. *Registr přípravků na ochranu rostlin* [online]. [cit. 2020-08-02]. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/app/eagriapp/POR/Detail.aspx?id=29308>

[13] Mustang Forte. *Registr přípravků na ochranu rostlin* [online]. [cit. 2020-08-02]. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/app/eagriapp/POR/Detail.aspx?id=29308>  
– dokument PDF

[14] Mustang Forte-Bezpečnostní list. *Dowagro.com* [online]. [cit. 2020-08-02]. Dostupné z: [https://www.dowagro.com/content/dam/hdas/Dowagro\\_Czech/pdfs/0901b803809aad87.pdf](https://www.dowagro.com/content/dam/hdas/Dowagro_Czech/pdfs/0901b803809aad87.pdf)

[15] Corrello. *Registr přípravků na ochranu rostlin* [online]. [cit. 2020-08-02]. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/app/eagriapp/POR/Detail.aspx?id=27863>

[16] Corrello. *Registr přípravků na ochranu rostlin* [online]. [cit. 2020-08-02]. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/app/eagriapp/POR/Detail.aspx?id=27863>  
– dokument PDF

[17] Corrello-Bezpečnostní list. *Pronachem.cz* [online]. [cit. 2020-08-02]. Dostupné z: <https://www.pronachem.cz/userfiles/lists/Corello.pdf>

[18] Zhao H, Xu J, Dong F, Liu X, Wu Y, Wu X, Zheng Y. 2015. *Simultaneous determination of three herbicides in wheat, wheat straw, and soil using a quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method with ultra high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry*. *Journal of Separation Science* 38:1164–1171.

- [19] Zhang Z, Feng M, Zhu K, Han L, Sapozhnikova Y, Lehotay SJ. 2016. *Multiresidue analysis of pesticides in straw roughage by liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64:6091–6099.
- [20] Pang N, Wang T, Hu J, Dong B. 2017. *Field evaluation and determination of four herbicides in a wheat ecosystem by a simple and versatile QuEChERS method with liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Toxicological & Environmental Chemistry* 99:376–389.
- [21] Tian Y, Liu X, Dong F, Xu J, Lu C, Kong Z, Wang Y, Zheng Y. 2012. *Simultaneous determination of aminopyralid, clopyralid, and picloram residues in vegetables and fruits using ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. *Journal of AOAC International* 95:554–9.
- [22] Liu et al. 2011. *Rapid residue analysis of four triazopyrimidine herbicides in soil, water and wheat by UPLC coupled MS-MS*
- [23] Yingying Bi, Lijun Han, Shuangyu Song, Wei Yao, Fayi Qin, Yanjun Xu and Qiong Wu (2020). *Method validation, storage stability and field trial for residues of florasulam and pyroxsulam in cereal by liquid chromatography with tandem mass spectrometry*, *Food Additives & Contaminants: Part A*
- [24] EN 15662:2008. *Foods of plant origin-Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE-QuEChERS-method*
- [25] GIKA, H., G. KAKLAMANOS, P. MANESIOTIS a G. THEODORIDIS. *Chromatography: High-Performance Liquid Chromatography. Encyclopedia of Food and Health* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 93-99 [cit. 2020-08-03]. DOI: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00159-8. ISBN 9780123849533. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123849472001598>
- [26] HOUCK, Max M. a Jay A. SIEGEL. *Separation Methods. Fundamentals of Forensic Science* [online]. Elsevier, 2010, 2010, s. 123-153 [cit. 2020-08-03]. DOI: 10.1016/B978-0-12-374989-5.00006-5. ISBN 9780123749895. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123749895000065>

[27] ŻWIR-FERENC, Agata; BIZIUK, Marek. *Solid Phase Extraction Technique--Trends, Opportunities and Applications*. Polish Journal of Environmental Studies, 2006, 15.5.

[28] How Does High Performance Liquid Chromatography Work? *Waters* [online]. [cit. 2020-08-03]. Dostupné z: [https://www.waters.com/waters/en\\_AU/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en\\_AU](https://www.waters.com/waters/en_AU/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_AU)

[29] HPLC. *ResearchGate* [online]. [cit. 2020-08-03]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/HPLC-FD-analysis-of-five-kinds-of-amino-acids-Notes-A-Mixed-amino-acid-standards-B\\_fig5\\_303397671](https://www.researchgate.net/figure/HPLC-FD-analysis-of-five-kinds-of-amino-acids-Notes-A-Mixed-amino-acid-standards-B_fig5_303397671)

[30] SPE. *ResearchGate* [online]. [cit. 2020-08-03]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/General-steps-for-solid-phase-extraction-SPE\\_fig2\\_320024643](https://www.researchgate.net/figure/General-steps-for-solid-phase-extraction-SPE_fig2_320024643)