

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA PEDAGOGICKÁ
KATEDRA CHEMIE

Didaktické využití stanovení
vybraných pesticidů metodou
GC-ECD

Diplomová práce

Bc. Marek Feistinger

Navazující magisterské studium

Plzeň, 2019

Vedoucí práce: Ing. Jan Hrdlička, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně s
použitím uvedené literatury a zdrojů informací.

V Plzni, 24. Června 2019:

vlastnoruční podpis

Poděkování

V první řadě bych chtěl tímto poděkovat vedoucímu mé diplomové, práce panu Ing. Janu Hrdličkovi, Ph.D. za ochotu a trpělivost vynaloženou při mém zpracování této práce. Dále bych tímto chtěl poděkovat Bc. Václavu Ryplovi za inspiraci při řešení potíží v instrumentaci a v neposlední řadě Bc. Janu Rysovi, jež mi psychicky pomáhal zvládat dlouhé hodiny u chromatografu a vždy mi pomohl utřídit si myšlenky.

Obsah

Úvod.....	6
1. Teoretická část	7
1.1. Historie chromatografie.....	7
1.2. Principy a rozdělení chromatografie	8
1.2.1. Rozdělení podle uložení stacionární fáze:	8
1.2.2. Rozdělení podle využití mobilní fáze:.....	9
1.3. Základy plynové chromatografie.....	10
1.4. Základní komponenty plynového chromatografu	14
1.4.1. Přívod nosného plynu	14
1.4.2. Injektor.....	15
1.4.3. Kolony	16
1.4.4. Detektory	17
1.5. Pesticidy	20
1.5.1. Definice a rozdělení.....	20
1.5.2. Důvody používání.....	22
1.5.3. Struktura pesticidů	22
1.5.4. Vstup do životního prostředí	23
1.5.5. Metody stanovení.....	24
2. Praktická část	25
2.1. Úvod	25
2.2. Stanovované látky	25
2.2.1. 2,4-D	25
2.2.2. Flumioxazin	25
2.2.3. Thiacloprid.....	26
2.2.4. Standardy	27

2.3. Instrumentace	28
2.4. Použité chemikálie a chemické nádobí	29
2.4.1. Chemikálie	29
2.4.2. Chemické nádobí	29
2.5. Úprava metody	30
2.6. Extrakce	40
2.7. Reálné vzorky	42
3. Didaktická část	43
3.1. Pro základní školy	43
3.2. Pro střední školy a gymnázia	44
3.3. Pro vysoké a vyšší odborné školy	46
4. Závěr	48
5. Resumé	49
6. Zdroje	50
7. Seznam převzatých obrázků	51
8. Přílohy	52

Úvod

Kontaminace životního prostředí pesticidy je důležité téma. Je vhodné, aby s tímto tématem přišli do kontaktu i žáci na nižších stupních vzdělávání a byli seznámeni s důvody a důsledky jejich použití.

Tato práce má za cíl popsat postup vývoje metody stanovení vybraných pesticidů ve vzorcích životního prostředí a následné využití postupu vývoje a metody samotné v jednotlivých stupních vzdělávání.

Po teoretické stránce práce objasňuje, jak se chromatografie vyvíjela, jaké má výhody a využití. Zároveň seznámí čtenáře s jednotlivými komponenty plynového chromatografu a s jejich variantami.

1. Teoretická část

1.1. Historie chromatografie ^{4,5,6,7}

Je tomu již 116 let co, prvně spatřila světlo světa první chromatografie. Psal se rok 1903, kdy ruský botanik Michail Semjonovič Cvět úspěšně separoval jednotlivé rostlinné pigmenty. Jednalo se o směs chlorofylů a karotenoidů. Nebylo to však poprvé, co se o podobnou metodu M.S. Cvět pokoušel. Již dva roky před úspěšným pokusem se pokoušel o adsorpci barviv na bílkoviny v rámci své disertační práce. Úspěch však zaznamenal až v adsorpci na uhličitan vápenatý naplněný ve válci, přes který proplachoval rozpouštědlo s barvivou. Podařilo se mu zjistit, že se molekuly jednotlivých barviv pohybují přes uhličitan vápenatý rozdílnými rychlostmi. Barviva, jež měla menší vaznost, protékala rychleji, proto je bylo někdy třeba propláchnout přes delší válec. Poté pouze stačilo vytlačit uhličitan z válce a rozkrájet jej na jednotlivé různobarevné segmenty. Ze segmentů pak extrahovat patřičné barvivo. Jelikož se segmenty rozdělovaly podle barvy a sám Cvět (cvět = v ruském jazyce barva) je pojmenován po barvě, dal této metodě název chromatografie z řeckého chroma = barva a graphein = psaní. (poznámka autora – není důležité, jestli se jednalo o psaní=graphein, jak udává jeden zdroj, nebo o píši=grapho/grafó, jak udává zdroj jiný, nebo psaní= graphy, jak udává zdroj třetí, v každém případě koncovka grafie je odvozena od zapisování, jak už tomu bývá i u jiných metod).

Již od prvního využití je patrné, že v separační soustavě máme dvě fáze a to fázi pohyblivou (mobilní) a nepohyblivou (stacionární) velice podobně jako u filtrace, kde filtrační papír je fáze nepohyblivá a filtrovaná směs fáze pohyblivá. Děj chromatografie však není tak prostý a záleží zde na více faktorech.

Tento první pokus nebyl však dostatečně efektivní a selektivní. Vedlo to tudíž k pokusům o zdokonalení metody. Využil pak jemněji nadrceného uhličitanu vápenatého. Zde vyvstal však problém ve velice pomalém průchodu kapaliny. Muselo dojít ke zvýšení tlaku kapaliny, což dalo v důsledku vzniku vysokotlaké kapalinové chromatografii, v dnešní době známé jako HPLC (High Pressure Liquid Chromatography). Z počátku se využívalo tlaku jen 3,5 MPa, však časem se začalo využívat vyšších a vyšších tlaků. V dnešní době se využívají tlaky kolem 40 MPa.

Jak to často bývá při objevech, jež jsou příliš pokrokové, tak se na řadu let na chromatografii zapomnělo. Až v 30. letech 20. století dozrál čas na znovuobjevení metody chromatografie. Roku 1952 dostali za práci v oboru chromatografie Nobelovu cenu *Archer John Porter Martin a Richard Laurence Millington Synge*¹. Jejich průlom byl v geniálním využití silikagelu napuštěného vodou jako nepohyblivé fáze a s vodou nemísitelné pohyblivé fáze jako rozpouštědla. Toto provedení bylo a je dosud velice efektivní a zvýšilo tak mnohonásobně účinnost.³ Díky tomuto objevu se začaly používat rozdílné polarita fází. Z počátku se využívala polární stacionární fáze a nepolární fáze mobilní. Časem však byla vyvinuta kapalinová chromatografie na reverzní fázi, kde je polarita fází vyměněna, což umožnilo nové využití chromatografie.

1.2. Principy a rozdělení chromatografie^{5, 6, 7, 8, 19, 20}

Chromatografie je fyzikálně – chemická separační metoda. Tuto metodu lze využít jak k analýze separovaných látek, tak i k jejich samotné preparaci. Separace zde funguje na základě rozdílné afinity složek analytu k stacionární a mobilní fázi, jež jsou nemísitelné. Mobilní fáze nesoucí analyt prochází skrze fázi stacionární. Výsledkem měření je poté chromatogram, který vyjadřuje množství analyzované látky v čase, ve kterém prochází kolonou, kde zpravidla na ose x máme čas a na ose y intenzitu signálu detektoru. Další důležitou částí chromatografie je určení její účinnosti. Ta se určuje pomocí takzvaného teoretického patra. Čím více teoretických pater je, tím více jsou jednotlivé složky analytu rozděleny, protože o to méně se plocha separované látky rozmývá. Již A. J. P. Martin a R. L. M. Synge zjistili, že počet teoretických pater je úměrná délce kolony. Například teoretická kolona o délce 120 cm má počet teoretických pater v rozmezí 700 a 1200, zatímco táž kolona dlouhá 365 cm dosáhne až na počet 2000 pater.⁸ Dalším faktorem měnícím účinnost kolony je i teplota, za které k separaci dochází.

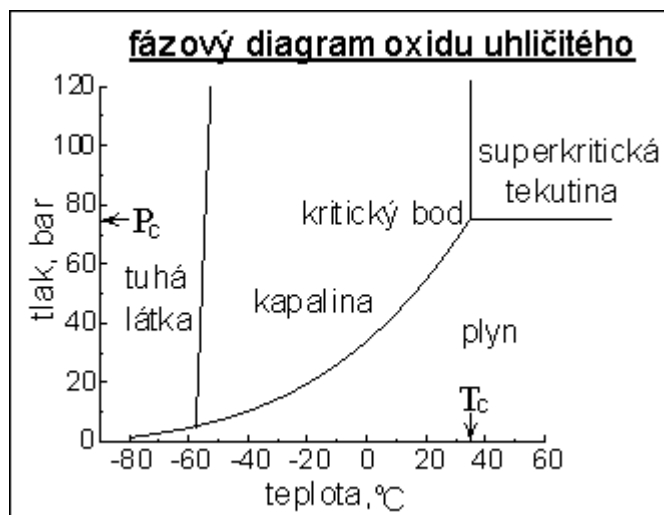
1.2.1. Rozdělení podle uložení stacionární fáze:

- Sloupcová - je, jak bylo uvedeno výše, vlastně nejstarší metodou chromatografie. Ve spojení s kapalnou mobilní fází, kdy je hnací silou pohybu gravitace, se dodnes omezeně využívá, např. při separaci jednotlivých produktů organických reakcí v laboratoři. Jejím postupným doplňováním a vývojem vznikly později jednotlivé metody chromatografie, kdy je hnací síla buď tlak plynu, či kapaliny a separovaná směs prochází různě uspořádanou kolonou.

- Papírová – využívá jako stacionární fázi speciálně upravený papír a mobilní fází je obvykle směs rozpouštědel. Je vhodná pro polárnější látky a díky jednoduchosti provedení je oblíbenou variantou pro didaktické využití.
- Tenkovrstvá – stacionární fázi je obvykle tenká vrstva vhodného materiálu, obvykle aluminy či modifikovaného silikagelu. Mobilní fází je opět směs rozpouštědel. Typické je její prostorové uspořádání, kdy se díky využití vztlínání mobilní fáze skrze fázi stacionární pohybují jednotlivé separované složky vzhůru. Pro jednoduchost provedení se dodnes využívá pro ověření čistoty látek nebo pro kontrolu průběhu organických syntéz.

1.2.2. Rozdělení podle využití mobilní fáze:

- Kapalinová – jako mobilní fáze se používají jednotlivá rozpouštědla, nebo jejich směsi. Využívá se zde rozdílu v rozpustnosti mezi rozpouštědly, nebo mezi fázemi. Využívá se také rozdílů polarity fází.
- Plynová – mobilní fází je zde nosný plyn. Využívají se zde inertní plyny jako je dusík, hélium a argon. Dalším nosným plynem je vodík, který má však redukující účinky.
- Fluidní – Tato fáze se používá v superkritické fluidní chromatografii (SFC). Jedná se o kapalinu v její superkritické fázi, tzn., že kapalina přesáhne svůj kritický bod. Do tohoto bodu se dostane po zahřátí nad svou kritickou teplotu a stlačením nad svůj kritický tlak^(Obr. 1). Využívá se při analýze sloučenin s vysokou molekulární hmotností, jakými jsou léčiva, polymery či ropa. Příkladem kapalin využívaných jako fluidní fáze je kapalný oxid uhličitý.



Obrázek 1: Fázový diagram oxidu uhličitého

1.3. Základy plynové chromatografie ^{8, 9, 10, 11}

U plynové chromatografie máme stacionární fázi ukotvenou v koloně. Může se jednat o kapalnou látku s vysokým bodem varu nanesenou v tenké vrstvě na inertním nosiči (křemen), nebo o pevnou látku (aktivní uhlí, oxid hlinitý silikagel, polymerní sorbenty a jiné). Název plynová chromatografie je odvozen od mobilní fáze. Používá se zde inertní nosný plyn, který nesmí ve velké míře reagovat s analytem (dusík, argon). Analytem může být plyn, nebo také kapalina s nízkým bodem varu, jež se dá jednoduše a kompletně převést na plyn. Samotný tlak nosného plynu způsobuje pohyb mobilní fáze.

Jedním z faktorů, jež kvalitativně určují složení analytu, je retenční čas. Značíme jej t_R a můžeme jej vyjádřit vztahem:

$$t_R = \frac{L}{u'}$$

Kde u' je průměrná lineární rychlost analytu v koloně, jež je měřená obvykle v $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ a L představuje délku kolony.

Dalším parametrem je mrtvý čas, jenž značíme t_M . Mrtvý čas je roven době, za kterou projde mobilní fáze kolonou. Pro jeho určení se používá plyn, jenž není zadržován stacionární fází. Takovému plynu říkáme značkovač (marker), avšak krom toho, že nesmí být zadržován stacionární fází, musí zároveň být rozeznatelný detektorem. V plynové chromatografii se často jako značkovač využívá methan.

Můžeme jej vyjádřit vztahem:

$$t_M = \frac{L}{u}$$

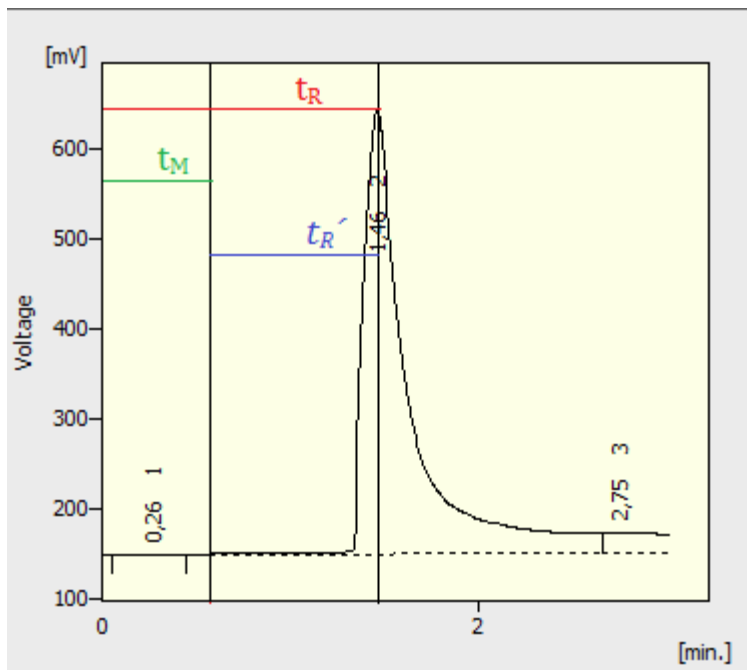
Kde u je lineární rychlost analytu v koloně, jež je měřená v $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ a L představuje průměrnou délku kolony.

Při rozdílu obou již zmíněných časů získáme častěji používanou veličinu, již je redukovaný retenční čas. Značíme jej t_R' a odpovídá zpoždění analytu v koloně oproti pohybu inertní látky.

Vyjádřit jej můžeme vztahem:

$$t_R' = t_R - t_M$$

Kde t_M je mrtvý čas kolony a t_R je retenční čas.



Obrázek 2: Znázornění retenčních veličin

Potřebu vyčíslit zachycování zadržované látky umožňuje distribuční konstanta separované látky. Značíme jí K_D a s její vzrůstající hodnotou vzrůstá i záchyt ve stacionární fázi, což má za následek prodloužení retenčního času.

Vyjádříme ji vztahem:

$$K_D = \frac{C_s}{C_m}$$

Kde C_m odpovídá koncentraci separované látky v mobilní fázi, zatímco C_s uvádí koncentraci separované látky ve fázi stacionární.

Neméně důležitou veličinou získatelnou z těchto údajů je retenční faktor. Značíme jej k a získáme jej, jako podíl redukovaného retenčního času časem mrtvým a odpovídá poměru objemu analytu v mobilní fázi a stacionární fázi.

Vyjádřit jej můžeme těmito vztahy:

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

$$k = q \frac{V_S}{V_M}$$

Kde V_S znázorňuje objem analytu ve stacionární fázi, V_M objemu v mobilní fázi a q rozdělovací faktor, který určuje poměr afinity analytu k oboum fázím.

Veličinou popisující schopnost rozdělit od sebe dva analyty, jež jsou obsaženy v separované látce, je separační faktor. Značíme jej α a vyjadřuje nám zároveň i selektivitu. Tato veličina podléhá změně pouze na základě změny stacionární fáze, jelikož mobilní fáze je inertní a neměla by nijak reagovat. Ovlivnění průchodu stacionární fází můžeme docílit pomocí změny teploty a tlaku. U jednodušších jednodimenzionálních kolon je teplota a tlak při průchodu nosného plynu konstantní. Změnu podmínek při průchodu dokáží měnit jen kolony vícedimenzionální. Mezi tyto patří kolona umístěná v peci s teplotním programem a ventily upravující tlak nosného plynu, ve které se dokáží podmínky měnit v průběhu měření a umožňují nám od sebe lépe rozdělovat jednotlivé složky analytu (jednotlivé analyty).

Vyjádřit jej můžeme vztahem:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_{D,2}}{K_{D,1}}$$

Kde porovnáváme retenční faktor, nebo distribuční konstantu jednotlivých analytů, jejichž separaci posuzujeme.

Setkali jsme se zde již s odlišnostmi v kolonách. Veličinami umožňujícími porovnávat jednotlivé kolony mezi sebou při průchodu stejného analytu, jsou selektivita a účinnost. Parametrem účinnosti je počet teoretických pater, jež značíme n a můžeme jej vyjádřit vztahem:

$$n = \frac{L}{H}$$

Kde H je výškový ekvivalent teoretického patra a L představuje délku kolony.

Nebo jej zjednodušeně můžeme vyjádřit z parametrů píku konkrétního analytu vzorcem:

$$n = 5,545 \left(\frac{t_R}{Y_{1/2}} \right)^2$$

Kde $Y_{1/2}$ je šířka píku v polovině výšky.

1.4. Základní komponenty plynového chromatografu

1.4.1. Přívod nosného plynu^{12, 13}

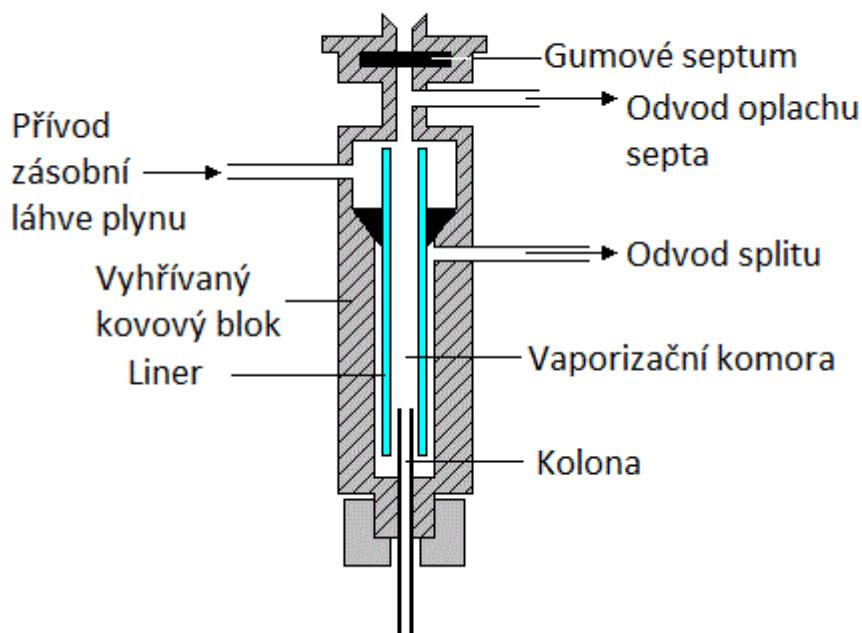
Zdrojem plynu je z pravidla tlaková lahev. Důležité je, aby byl nosný plyn dostatečné čistoty. Dodatečné čištění nosného plynu se může dít v přístroji systémem adsorbérů. Vodu zachytí molekulová síta. Dalším zachytávaným prvkem je kyslík. Z dusíku se zachytává pomocí mědi za zvýšené teploty, zatím co z vodíku se provádí platinovým katalyzátorem. Finálním adsorbérem je aktivní uhlí, jež dokáže sorbovat případné organické látky a další stopové nečistoty. Používaná čistota plynu bývá 4N (99,99%) až 6N (99,9999%) Krom čistoty je zapotřebí regulovat vstupní tlak nosného plynu. Ten je regulován v první řadě tlakovým ventilem na zásobní láhvi a v druhé řadě regulátory průtoku přímo v přístroji. Krom čistoty a tlaku nosného plynu je také důležité

použití plynu, který nebude poskytovat signál na použitém detektoru. Důležitou požadovanou vlastností plynu je jeho inertnost vůči analytu. Rychlost průchodu mobilní fáze kolonou ovlivňuje i hustota, viskozita plynu a velikost jeho molekul. Plyn jako je vodík tudíž bude kolonou procházet rychleji než námi využívaný dusík, nebo třeba argon, který má nejvyšší viskozitu z již zmíněných plynů. V neposlední řadě je důležitá ekonomická stránka výběru plynu, v tomto ohledu je velice výhodný dusík a vodík.

1.4.2. Injektor¹²

Injektor je vstupní část celého systému. Systém od vnějšího prostředí odděluje gumové septum, jež se propichuje dávkovací injekcí. Hned pod septem je jeden z odvodů zásobního plynu, jenž oplachuje septum a brání vniknutí nežádoucích látek do systému. Další částí je skleněný (křemenný, či kovový) liner, jež bývá vybaven filtrem ze skelné vaty, který brání kouskům gumy ze septa, aby zanášely vstup do kolony. Liner jako takový tvoří vaporizační komoru. Ta slouží k úplnému převedení vzorku do plynné fáze, zároveň brání vzorku, aby přišel do kontaktu s kovovým povrchem injektoru a nedošlo k nežádoucímu rozkladu. Vaporizační komora bývá temperovaná na vysokou teplotu. Částí injektoru bývá i takzvaný dělič toku, neboli split. Split je součást, která dělí vstříknutý vzorek na dvě části. První část jde do kolony a druhá část jde do odpadu. Toto sestavení však platí pro nástřik kapalných vzorků. Pro použití plynných vzorků se místo injektoru používají dávkovací smyčky a ventily. Důležité je, aby do nastříkovaného vzorku nevnikli vzduch a neznečistil tak vzorek. Další zásadou při nástřiku umožňující nám opakovatelnost měření je nástřik stálého objemu vzorku.

Injektor se splitem



Obrázek 3: Injektor

1.4.3. Kolony^{12,14}

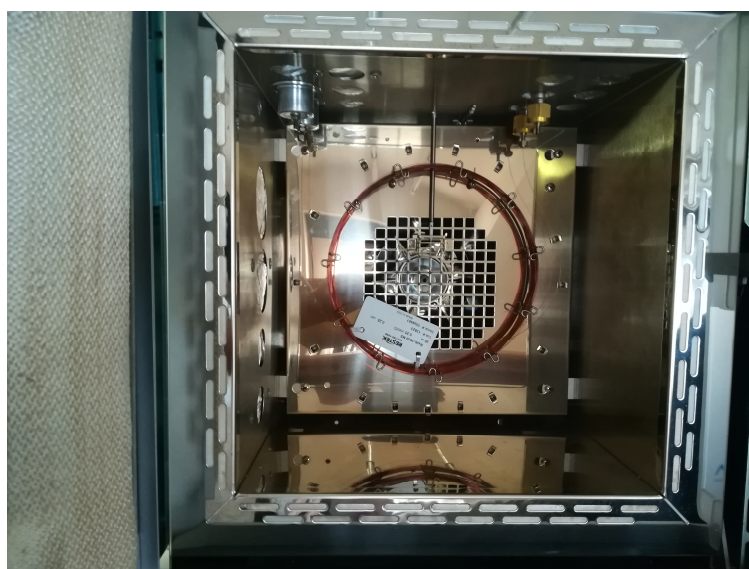
V samém základu dělíme kolony podle skupenství stacionární fáze. A to na kolony s kapalinovou stacionární fází a na kolony s pevnou stacionární fází. Dalším druhem dělení je náplňové a kapilárové kolony. Náplňové kolony jsou vyrobeny z kovu či skla a bývají naplněny tuhou stacionární fází, nebo pevným nosičem pokrytým kapalnou stacionární fází. Tyto kolony jsou zpravidla výrazně kratší. Mluvíme zde o délce 1-5 metrů, zato mají mnohem větší průměr (2-4 mm) oproti kolonám kapilárním. Kapilární kolony mají největší výhodu v jejich délce (10 – 100 m) a jejich malém vnitřním průměru (0,1 - 0,75 mm). Díky těmto parametrům kapilárové kolony mají mnohonásobně větší účinnost, nemusíme vyvinout tak velký tlak a zároveň stačí menší množství vzorku. Kapilárové kolony se vyrábějí z křemene, nebo skla a dělíme je na tři typy.

- WCOT (wall coated open tubular) – kde je na vnitřní stěně kapiláry nesena kapalina
- SCOT (support coated open tubular) – kde je na vnitřní stěně kapiláry upevněn nosič, na kterém je upevněna kapalina

- PLOT (porous layer open tubular) – kde je na vnitřní stěně kapiláry upevněn adsorbent

Jako stacionární fáze se, jak již bylo zmíněno, využívá silikagel, ale mimo něj i molekulární síta na bázi aktivního uhlí, alumina a především polymery. Polymery představují velikou výhodu ve škále jejich použití a možnostech specifického využití pro jeden konkrétní typ analytu. ^{příloha č. 1}

Kolony, jež byly zatíženy nad jejich technické teplotní maxima tzv. krvácí. Krvácení kolony je děj, při kterém se z povrchu kolony uvolňuje stacionární fáze a dochází tak k degradaci kolony. Zároveň tyto látky poskytují falešné signály na chromatogramu.



Obrázek 4: Křemenná kapilárová kolona

1.4.4. Detektory⁸

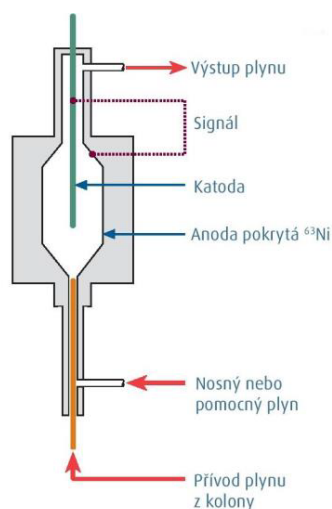
Základním účelem je detekce látek vycházející z kolony. Informaci o detekci látky přenáší na signál, který je interpretován v počítačovém programu jako chromatogram. Jednotlivé látky jsou v chromatogramu vyznačeny v podobě píku a jejich plocha odpovídá množství analyzované látky. V tomto pojetí se nebere v úvahu nosný plyn. Ten je volen tak, aby jej detektor nezachytil. Zpravidla dochází k jeho detekci, pokud není dostatečné čistoty. V plynové chromatografii existuje velké množství detektorů, které volíme podle specifikací analyzované látky.

1.4.4.1. Hmotnostní detektor (MS)

Funguje na principu hmotnostní spektroskopie, ve které se molekuly či atomy převedou na ionty. Tyto ionty se rozlišují na základě poměru hmotnosti a náboje (m/z). Tento typ detektoru je univerzální v mnoha ohledech. Dokáže sledovat pouze vybraný typ molekul a zbylé typy odstínit, což je ve směsích mnoha látek velice užitečné.

1.4.4.2. Detektor elektronového záchytu (ECD)

Principem tohoto detektoru je zachycení elektronů prvky nebo částmi molekul s vysokou elektronovou afinitou. Zdrojem konstantního pole elektronů je beta zářič v podobě niklu ^{63}Ni nebo tritia. Snížení množství elektronů jejich záchytem je detekováno jako změna úrovně signálu. Když jsou záření vystaveny prvky s vyšší elektronegativitou, tudíž s vyšší afinitou k přijímání elektronů, poskytuje detektor vyšší signál. Signál se odečítá od počátečního signálu nosného plynu, tudíž i prvky s vysokou elektronegativitou, jako má třeba dusík, mohou plnit účel nosného plynu, a taky se z ekonomických důvodů často využívá. Z těchto důvodů je ECD ideální pro stanovení halogenovaných a aromatických látek tedy i pro stanovení organochlorových pesticidů nebo pesticidů jejichž struktura obsahuje jedno nebo více aromatických jader.



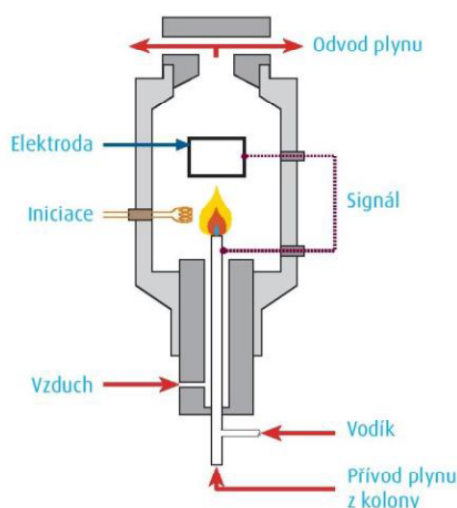
Obrázek 5: Schéma detektoru elektronového záchytu

1.4.4.3. Plameno-ionizační detektor (FID)

V tomto detektoru dochází k ionizaci plynu pomocí kyslíko-vodíkového plamene. Ionizovaný plyn je vodivý a vede elektrický proud, který je vyšší než proud,

který vede procházející nosný plyn. Tento proud je měřen dvojicí elektrod, mezi kterými prochází. Stupeň ionizace, tudíž i velikost vznikajícího proudu závisí na složení analytu. Jako analyt může sloužit velké množství látek, avšak jedny z nejčastěji analyzovaných látek bývají uhlovodíky. V kyslíko-vodíkovém plameni se ionizuje převážně uhlík. Pro uhlovodíky se jedná o univerzální detektor, který poskytuje signál prakticky pro všechny analyzované látky.

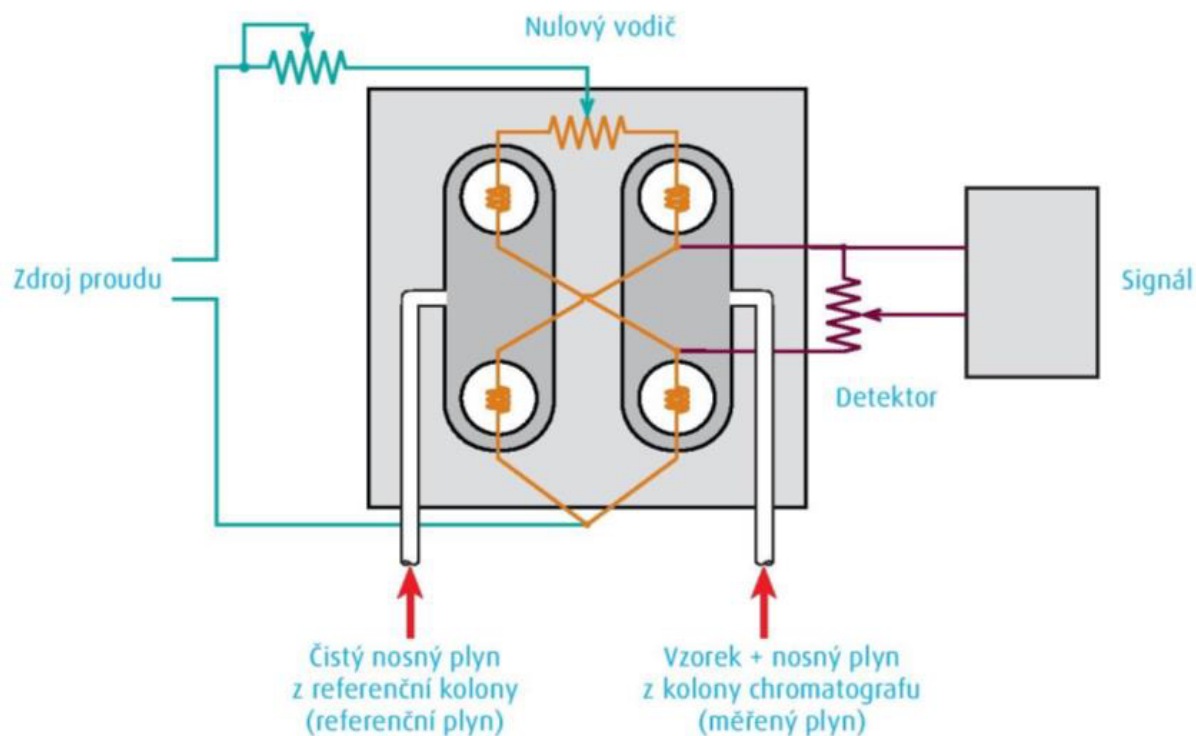
K jinému použití může sloužit plameno-ionizační detektor s tepelným zdrojem na bázi alkalického prvku. V takovémto provedení může tento detektor s výrazně vyšší citlivostí detekovat látky obsahující dusík, či fosfor. Mimo jiné výhody má tento detektor i schopnost samočištění, jelikož se všechny případné nečistoty plamenem spálí.



Obrázek 6: Schéma plameno-ionizačního detektoru.

1.4.4.4. Tepelně vodivostní detektor (TCD)

Na rozdíl od ostatních detektorů, tento pracuje nedestruktivně. Analyt je pouze zahříván žhavicím vláknem. K zahřívání dochází ve dvou komorách. V jedné dochází k zahřívání čistého nosného plynu a v komoře druhé k zahřívání nosného plynu s analytem. Měří se zde tepelná vodivost, a když je vyšší než v nosném plynu dojde k snížení teploty vlákna a naopak když je vodivost nižší. Změnou teploty vlákna docílíme změny proudu, která se zaznamenává, intenzita signálu dává informaci o koncentraci měřené látky. Tento detektor je zcela univerzální, reaguje na všechny látky a jen jeho výrazně nižší citlivost způsobila jeho vytlačení detektorem plameno-ionizačním.



Obrázek 7: Schéma tepelně vodivostního detektoru

1.5. Pesticidy¹⁵

1.5.1. Definice a rozdělení

Dle definice jsou pesticidy „sloučeniny nebo směsi sloučenin určené pro prevenci, ničení, potlačení, odpuzení či kontrolu škodlivých činitelů, to znamená nežádoucích mikroorganismů, rostlin a živočichů během produkce, skladování, transportu, distribuce a zpracování potravin, zemědělských komodit a krmiv“. Zdroj: Velíšek J.: Chemie potravin, Tábor 1999. Tato definice je velice široká a v rámci této práce se budeme soustředit na látky využívané na ochranu rostlin. Obecně jsou pesticidy látky toxické povahy, které v malých dávkách hubí vybrané živé organismy. Tento užší výběr látek má své rozdělení podle cílového organismu. Dělíme je na:

- Zoocidy – cílené na živočichy
 - Insekticidy – cílené na hmyz
 - Moluskocidy – jejichž cílem jsou měkkýši
 - Akaricidy – zacílené na roztoče
- Fungicidy – používané proti houbám a plísním

- Herbicidy – cílené na nežádoucí druhy rostlin

Krom dělení podle cílového organismu se tyto látky dělí i podle způsobu vstupu do organismu.

- Kontaktní – vstupují do organismu na místě kontaktu a také na témž místě účinkují
- Požerové – vstupují do organismu přímou konzumací rostliny, na které byl pesticid aplikován (zoocidy).
- Dýchací – Vstupují do organismu dýchacím ústrojím (plícemi, vzdušnicemi, nebo plicními vaky)

S preventivní aplikací souvisí i jedna z velice důležitých vlastností a tou je persistence neboli stálost. Od pesticidů je dnes požadováno, aby byly nepersistentní, neboli nestálé. Tyto pesticidy mají poločas rozpadu méně než 30 dnů. Mezi pesticidy s větším dopadem na životní prostředí patří pesticidy středně persistentní. Tyto pesticidy mají poločas rozpadu 30 – 100 dnů. Největší dopad však mají na životní prostředí pesticidy vysoce persistentní, jež mají poločas rozpadu více než 100 dnů. Příkladem tohoto typu je v dnešní době velice známé DDT, které je chemicky velice stabilní. I po více jak 40 letech od zákazu jeho používání stále můžeme nalézt tento pesticid a jeho rezidua v půdě a vodě. DDT a jeho rezidua se mohou kumulovat v životním prostředí a také v živých organismech. Příkladem může být kumulace v potravním řetězci Orla bělohlavého, jež mělo za následek ztenčení skořápky jejich vajec, což se projevilo významným snížením jejich populace. Důležité je, že většina pesticidů je lipofilní povahy a dobře se v tukách kumulují. S tím také souvisí koloběh pesticidů v přírodě. Při výskytu pesticidu ve vodním prostředí se pesticid samotný hromadí v mikroskopických vodních organismech. V jejich konzumentech (ryby) se koncentrace pesticidů zvyšuje. Ty bývají potravou dravých ptáků, ryb či savců, u kterých koncentrace pesticidu v organismu roste. Tyto lipofilní látky se z krve vstřebávají přímo do tukové tkáně, zde se kumulují a působí škodlivě na organismus (mutagenně, karcinogenně atd.). Do letální fáze tato intoxikace dojde až při dosažení určité koncentrace, nebo rychlému úbytku tukové tkáně a vyplavení nakumulovaných pesticidů do organismu.

1.5.2. Důvody používání

V současné době do této definice spadá několik set registrovaných látek pro ochranu rostlin. Využívají se pro ochranu zemědělských plodin, na jejichž ochranu je kladen vyšší a vyšší důraz. Bez ochrany se snižují výnosy pěstování a to má ekonomický i ekologický dopad. Ekologický dopad není tak zjevný jako dopad ekonomický, avšak s menší efektivitou roste potřeba využití vyšší plochy pro pěstování, což vede k vyššímu zatížení životního prostředí. Příkladem tohoto procesu je mýcení deštných pralesů za účelem zvětšení plochy pro pěstování palmy olejné. Na zvýšení efektivity pěstování má velký vliv i růst lidské populace a zvýšení chovu zvířat. Za účelem zvýšení efektivity pěstování došlo k tvorbě rozsáhlých monokultur jednotlivých rostlinných druhů. Tyto monokultury jsou však náchylnější na šíření nemocí a škůdců, což přispívá k nátlaku na zemědělce k používání pesticidů. Kromě aplikace v případech přemnožení škůdců se pesticidy aplikují i preventivně. Dochází k tvorbě plánů postřiků na větší časové období, aby se zabránilo rezistenci škůdců proti účinné látce pesticidu. Prosto se po sobě nepoužívají pesticidy se stejnou účinnou látkou.

1.5.3. Struktura pesticidů^{21, 22, 23}

1.5.3.1. Organochlorové pesticidy

Tento typ pesticidů má v uhlovodíkovém řetězci vázaný chlór, případně i jiný halogen. Hlavním mechanismem účinku je inhibice transportu Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} iontů v neuronech. Velkou nevýhodou těchto pesticidů je jejich stabilita a nízká akutní toxicita i pro savce. Jejich vysoká perzistence jim umožňuje akumulaci a transport v rámci biosféry i hydrosféry. Mezi nejznámější pesticidy tohoto typu spadá již zmíněný DDT, neboli 1,1,1-trichlor-2,2-bis-(4-chlorfenyl)ethan, jež se ve čtyřicátých letech minulého století používal ve velké míře jako insekticid. I přes jeho vysokou perzistenci (2-20let) se přeměňuje na toxičtější variantu a to na DDE neboli di-p-chlordifenyldichlorethan, u kterého byly prokázány karcinogenní a mutagenní účinky.

1.5.3.2. Organofosfáty

Jedná se o deriváty odvozené od kyseliny fosforečné a thiofosforečné. Tyto pesticidy jsou velice toxické pro hmyz, tudíž se využívají jako insekticidy. Nemají však

účinky pouze na hmyz, některé útočné bojové látky jsou také odvozené od zmíněných kyselin. Příkladem může být sarin jakožto nervově paralytická látka. Stejně jako sarin tyto pesticidy fungují na základě inhibice enzymů, nejčastěji acetylcholinesterázy na nervových synapsích. I v menších dávkách představují riziko akutní otravy. V takovýchto případech nastává letargie, namáhavé dýchání, diarea, zvracení, křeče a následná smrt. Naopak výhodou těchto látek je nízká perzistence a to sice v řádech několika týdnů. Také se na rozdíl od organochlorových látek nekumulují v prostředí. Při nedosažení letální dávky se v organismu u savců a ptáku rychle metabolizuje. Jedním z rizik je také otrava užitečných druhů hmyzu, jako jsou včely.

1.5.3.3. Karbamáty

Představují deriváty kyseliny karbamové a pracují na principu reverzibilní inhibice acetylcholinesterázy. Jedním ze zástupců této skupiny je karbofuran. Použití tohoto pesticidu je zakázané v Evropské unii i ve Spojených státech Amerických. Způsoboval otravy dravých ptáků, je potencionálně karcinogenní a narušuje hormonální regulace organismu. Je vysoce toxický pro obratlovce, včetně člověka.

1.5.3.4. Pyrethroidy

Jedná se o syntetickou podobu přírodních látek pyretrinů extrahovaných z květů Řimbaby z čeledi hvězdnicovitých. Látky z této skupiny jsou insekticidy. Mají však i repelentní účinky. Jejich velkou výhodou je nízká perzistence, obzvláště při kontaktu s UV zářením.

Mezi strukturně odlišné pesticidy patří též triaziny, neonikotinoidy a mnohé další.

1.5.4. Vstup do životního prostředí

Pesticidy se do životního prostředí dostávají již při jejich výrobě a přepravě. Další možností jsou odpary ze skládek odpadů, kde se likvidují přepravní obaly a v úvahu připadají i případné nehody. Z největší části však do životního prostředí vstupují jejich přímou aplikací. Nejčastěji jsou aplikovány v zemědělství za specifickým účelem, avšak ztráty při strojní aplikaci mohou činit až 30%. Další procenta z aplikovaných pesticidů mohou být smyta, či degradována samotnou rostlinou. Tyto splachy mohou prosakovat do spodních vod, či být smyty do vod povrchových.

K dalším ztrátám dochází i odparem a tyto ztráty bývají velmi vysoké. Odpařený pesticid poté kondenzuje a spadá se srážkami zpět na zem. V zemi bývají degradovány půdními organismy.

Nejvyšší pravděpodobnost kontaminace vod je při aplikaci pesticidu na velké souvislé plochy. Nedochozí však jen k lokální kontaminaci povrchových vod. Znalost koloběhu vody v přírodě nám umožní nahlédnout do rozsáhlosti možné kontaminace.

1.5.5. Metody stanovení

Protože je obvykle ve vzorcích ze ŽP přítomno více pesticidů současně, včetně reziduí, jsou pro stanovení obvykle využívány separační metody.

Jedna z nejčastěji využívaných metod na stanovení pesticidů, nebo jejich reziduí ve vzorcích ze životního prostředí bývá kapalinová chromatografie a to sice HPLC, která čítá mnoho možností separace a analýzy, nebo UPLC. Jako detektor je u této metody obvykle využit MS v různých provedeních. Mimo tyto metody se využívá i gelové permeační chromatografie. V neposlední řadě se využívá i plynová chromatografie, která je již popsána v předešlých kapitolách. Zde je možné použít jako detektor opět hmotnostní spektroskopii, (dnes z důvodu citlivosti obvykle zapojeno několik MS za sebou) a nebo pro halogenované či aromatické pesticidy ECD.

2. Praktická část

2.1. Úvod

Tato část práce má za účel znázornit postup a průběh výzkumu a jeho výsledky.

2.2. Stanovované látky

2.2.1. 2,4-D

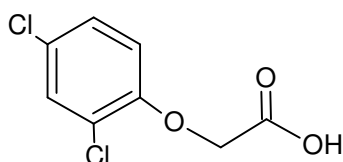
$C_8H_6Cl_2O_3$

CAS – 94-75-7

HPC – 673133

M= 221,04 g/mol

Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová



Obrázek 8: Strukturální vzorec pesticidu 2,4-D

Pesticid 2,4-D patří do skupiny selektivních herbicidů a patří mezi světově nejužívanější herbicidy. Užívá se pro jeho druhovou selektivitu. Cíleně hubí dvouděložné rostliny, tudíž je vhodný na ochranu rostlin jednoděložných. Mezi jednoděložné rostliny patří světově nejpěstovanější čeleď, a to Poaceae, neboli Lipnicovité. Do této čeledi patří veškeré obilniny pšenicí počínaje a rýží s kukuřicí konče. Tento pesticid nechvalně proslul během války ve Vietnamu, kde byl využit americkou armádou jako defoliant ve směsi pesticidů s kódovým názvem Agent Orange, jež letecky aplikovali na vietnamskou džungli za účelem zbavit vegetaci listů. Tento pesticid byl vybrán, protože jej lze snadno detekovat ECD a je tedy vhodným modelovým analytem pro testování metody a postupů zpracování vzorku.

2.2.2. Flumioxazin ^{16,17}

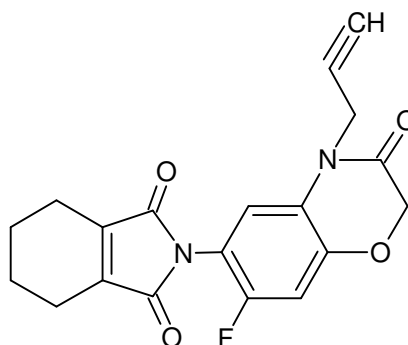
$C_{19}H_{15}FN_2O_4$

CAS – 103361-09-7

HPC – 675893

M= 354,33 g/mol

N-[7-fluor-3-oxo-4-(prop-2-yn-1-yl)-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazin-6-yl]cyklohex-1-en-1,2-dikarboximid



Obrázek 9: Strukturní vzorec flumioxazinu

Tento pesticid patří do skupiny herbicidů a je používán v ozimé pšenici. Na rozdíl od předešlého herbicidu, tento působí na jednoděložné i dvouděložné rostliny. Na rostliny působí přes listy. Na povrchu půdy dokáže vytvořit ochrannou vrstvu, které když se klíčící plevel dotkne listy, uhynie. Tento analyt byl vybrán, neboť bylo zjištěno, že byl na určitých místech použit a bylo možné odebrat vzorky splachové vody z pole po dešťových srážkách.

2.2.3. Thiacloprid ^{16, 18}

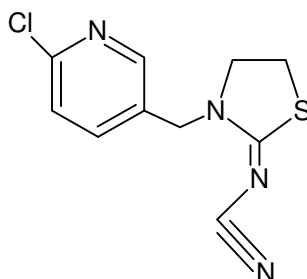
C₁₀H₉ClN₄S

CAS – 111988-49-9

HPC – 673982

M= 252,72 g/mol

(Z)-N-{3-[(6-chloro-3-pyridinyl)methyl]-1,3-thiazolan-2-yliden}kyanamid



Obrázek 10: Strukturní vzorec thiaclopridu

Thiacloprid je na rozdíl od výše uvedených látek řazen do jiné skupiny. Patří mezi insekticidy a užívá se na široké spektrum rostlin. Jedná se o požerový a kontaktní insekticid ze skupiny chloronicotinylů a narušuje přenos impulzů nervového systému hmyzu stimulací

nikotin acetylcholinových receptorů. Tento analyt byl zvolen ze shodných důvodů jako předchozí. Přesto zde jsou odlišnosti, neboť tato látka je teplotně labilní a při teplotě nástřiku se rozkládá. Přesto byla do výzkumu zařazena, neboť byla předpokládána možnost, že některý z produktů rozpadu bude možné detekovat pomocí ECD.

2.2.4. Standardy

Před vytvořením standardů bylo zapotřebí zvolit vhodné rozpouštědlo. Pesticidy jsou látky většinou dobře rozpustné v organických rozpouštědlech. Nejúčinnější rozpouštědla bývají dichlormethan a chloroform. Tato rozpouštědla jsou ovšem pro naši metodu značně nevhodná, jelikož chlór v dichlormethanu a chloroformu dává v ECD intenzivní signál. Proto bylo třeba vybírat z jiných rozpouštědel. Další o něco méně účinná rozpouštědla byla methanol a aceton. Přesto, že byl aceton účinnější, byl vybrán methanol z důvodu manipulace. Aceton se odpařuje mnohem rychleji než methanol, který se sám odpařuje velice rychle. Při navažování methanolu se ukázalo, že za laboratorních podmínek se odpařuje přibližně rychlostí 1 mg/s.

Základní prvotní standardy byly vytvořeny rozpuštěním 1 mg stanovované látky v 790 mg methanolu p.a., což odpovídá koncentraci 1 mg/ml. Hodnota 790 mg je vypočtena z hustoty methanolu, jež činí 0,79 kg na 1 litr. Tyto standardy byly uloženy do vzorkovnic o objemu 2 ml a uloženy v mrazáku. Z těchto standardů byly poté tvořeny další vzorky o nižších koncentracích. Následuje seznam připravených umělých vzorků o různém složení.

Tabulka č.1: **Ředění standardů.**

Název	objem methanolu v μl	objem pesticidu v μl	typ vzorku	výsledná koncentrace $\mu\text{g/ml}$
V1	450	40 st 2,4-D	2,4-D	81,6
V2	450	40 st F	Flumioxazin	81,6
V3	450	40 st T	Thiacloprid	81,6
V1.1	360	40 V1	2,4-D	8,16
V2.1	360	40 V2	Flumioxazin	8,16
V3.1	360	40 V3	Thiacloprid	8,16
V2.2	90	10 V2.1	Flumioxazin	0,816
V2.3	180	10 V2.1	Flumioxazin	0,408
V1.2.0	450	50 st	2,4-D	100
V1.2.1	450	50 V1.2.0	2,4-D	10
V1.2.2	450	50 V1.2.1	2,4-D	1
V2.2.0	450	50 st	Flumioxazin	100
V2.2.1	450	50 V2.2.0	Flumioxazin	10
V2.2.2	450	50 V2.2.1	Flumioxazin	1
V3.2.0	450	50 st	Thiacloprid	100
V3.2.1	450	50 V3.2.0	Thiacloprid	10
V3.2.2	450	50 V3.2.1	Thiacloprid	1
V1.2.0.1	450	50 st	2,4-D	100

Z tabulky je patrné, že při tvorbě prvních vzorků došlo k chybě při pipetování. Výsledná koncentrace měla být 1 $\mu\text{g/ml}$.

2.3. Instrumentace

Plynový chromatograf DANI Master s ECD a křemennou kapilárovou kolonou Restek Rxi – 5ms (Crossbond % diphenyl / 95% dimethyl polysiloxan) o délce 30 metrů a šířce 0,25 mm, s maximální pracovní teplotou 350°C a s maximální teplotou při dlouhodobé zátěži 330°C (při vyšší teplotě dochází k tzv. krvácení kolony, čili degradaci účinného povrchu kolony). Druhou kolonou, která byla při měření využita je kolona Restek Rxi – 35Sil MS o délce 30 metrů a průměru 0,25 mm, tato kolona má maximální teplotu 360°C a krvácení hrozí od 340°C.

Nastavení parametrů stanovení, záznam dat a jejich zpracování byla provedena s využitím počítačového programu Clarity .



Obrázek 11: GC DANI Master

2.4. Použité chemikálie a chemické nádobí

2.4.1. Chemikálie

Methanol p.a.

Flumioxazin

Thiacloprid

2,4-D

2.4.2. Chemické nádobí

Analytické váhy

Vzorkovnice o objemu 2 ml

Kopistka

Automatická pipeta 10-1000 μ l

Automatická pipeta 1-40 μ l

Automatická pipeta 1-10 ml

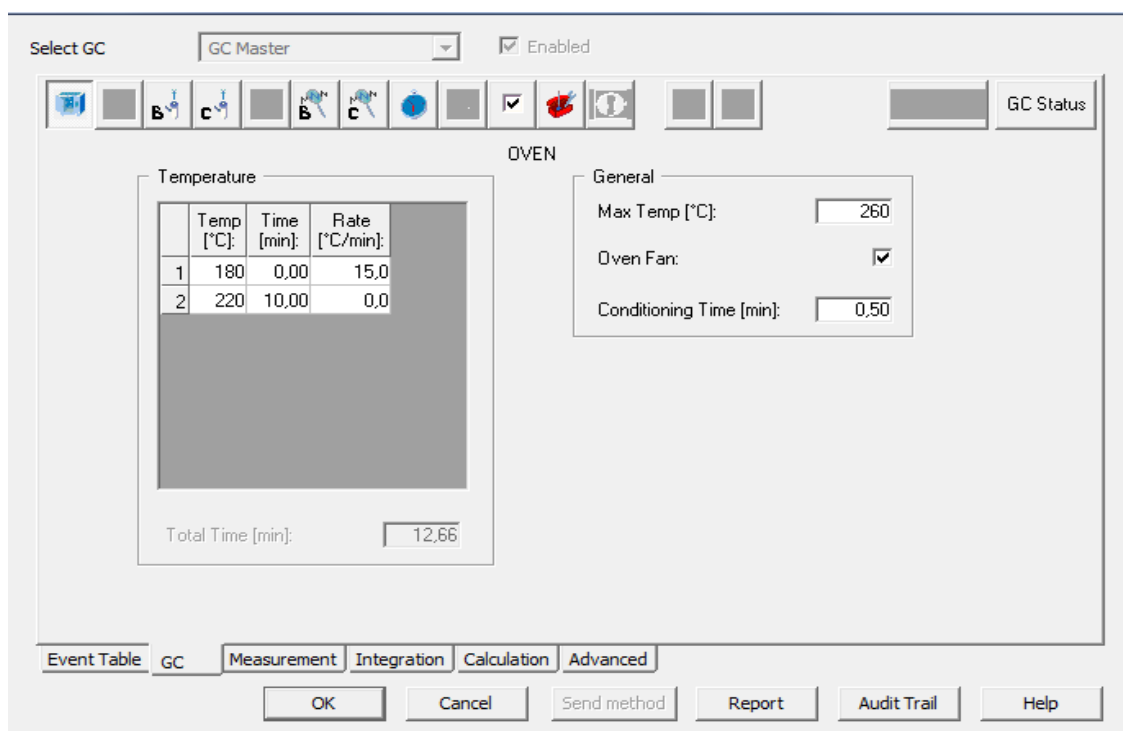
2.5. Úprava metody

Metody byly upravovány v programu Clarity, jehož uživatelské rozhraní je zachyceno na obrázcích 11 až 13.

1. TestECD3

Tato původní metoda vyplývá z testovací metody použité při ověřování funkčnosti ECD. Byla upravena pro stanovování pesticidu Laudis, který jsem stanovoval v rámci své bakalářské práce⁸. Průchod kolonou začíná na injektoru se splitem. Ten byl vytemperovaný na teplotu 280°C, s oplachem splitu 30 ml/min a ředěním splitem 1:20. Teplotní program pece začíná na 180°C. Teplotním spádem 15 °C/min se kolona temperuje na teplotu 220°C a při této teplotě se kolona ponechá 10 minut. Z toho vyplývá, že celková doba průchodu látky kolonou je 12,66 min. Cesta

mobilní fáze končí na detektoru, který je vytemperován na teplotu 280.



Obrázek 12: Teplotní program pece u metody TestECD3

Select GC: GC Master Enabled

INJECTOR C : S/SL

Temperature
 Temperature control:
 Temp [°C]: 280

Press/Flow
 Press/Flow control:
 Control Mode: Flow

	Flow [ml/min]	Time [min]	Rate [ml/min ²]
1	1.5	0.00	0.0

Pulsed Injection
 Pulsed Pressure:
 Press [bar]: 0.00
 Time [min]: 0.00

Gas Saving
 Gas Saving:
 Flow [ml/min]: 20.0
 Time [min]: 2.00

Column
 Carrier Gas: N2
 Column Output: Ambient
 Diameter [mm]: 0.25
 Length [m]: 30.0
 Film Thickness [µm]: 0.25

Split
 Mode: Split
 Split Flow [ml/min]: 30.0
 Split Ratio: 1: 20

Septum Purge
 Septum Purge [ml/min]: 5.0

Event Table GC Measurement Integration Calculation Advanced

OK Cancel Send method Report Audit Trail Help

Obrázek 13: Nastavení injektoru u metody TestECD3

Select GC: GC Master Enabled

DETECTOR C : ECD

Temperature
 Temperature control:
 Temperature [°C]: 280

Flows
 Flow control:
 Aux Type: N2
 Aux [ml/min]: 25

Signal
 Min.Half-Peak Width [s]: 0.60
 Digital Acq.Rate[Hz]: 25

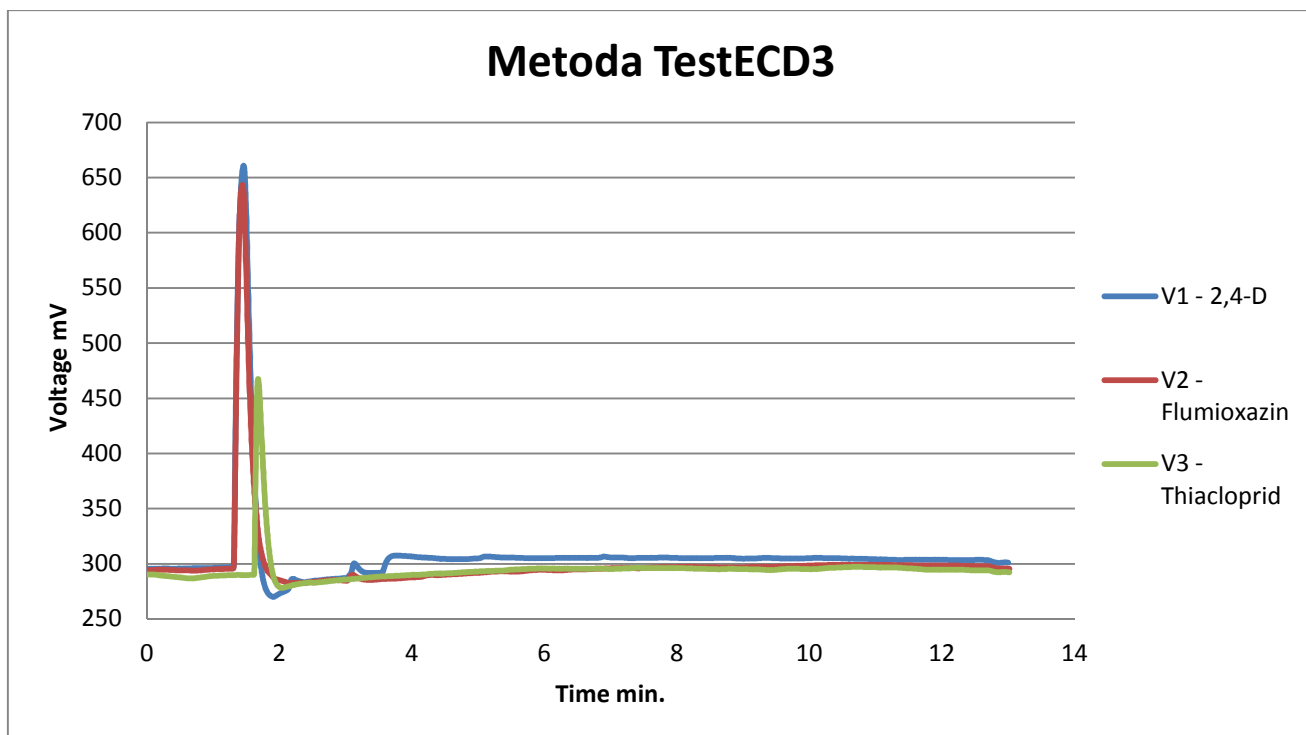
Signal Zeroing
 Signal Target [mV]: 0.00

Current
 Current Control:
 Current [nA]: 1.600

Event Table GC Measurement Integration Calculation Advanced

OK Cancel Send method Report Audit Trail Help

Obrázek 14: Nastavení detektoru u metody TestECD3

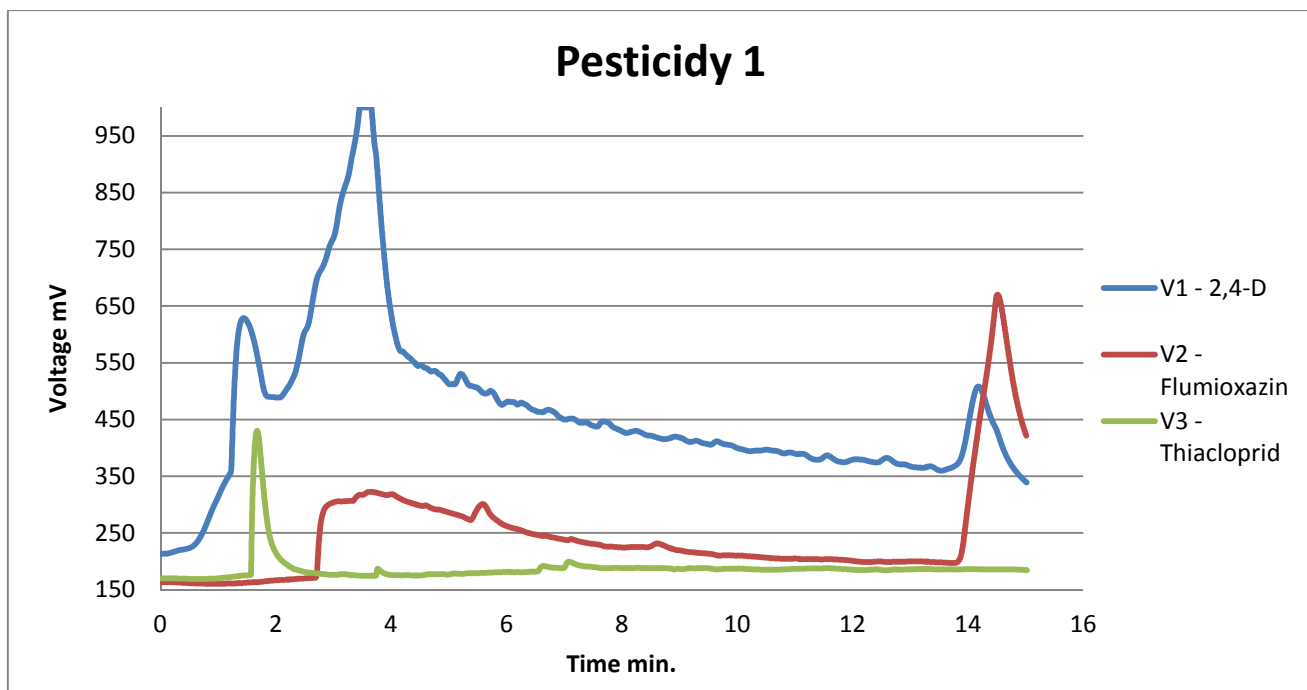


Obrázek 15: Výsledný chromatogram získaný metodou TestECD3

Takto nastavená metoda nám neumožnila prokázat pesticidy v připravených umělých vzorcích.

2.Pesticidy1

V návaznosti na nedostatečnost předchozí metody jsme vyzkoušeli snížit teplotu nástříku na 250°C aby nedošlo k okamžitému rozpadu molekul pesticidu a následně i snížit startovní teplotu kolony na 120°C gradientem růstu 45°C/min který se zastaví na teplotě 200°C a dále pokračuje rychlostí 15°C/min až na teplotu 240°C ve které setrvá po dobu 18 minut. Teplota 240 °C byla limitní, neboť v peci chromatografu byla současně připojena i kolona pro stanovení alkoholů s tímto teplotním limitem. Touto změnou nastavení se zvýšila i celková doba průchodu kolonou na 22,43 minut. Taktéž došlo ke snížení průtoku splitu na 15 ml/min a tím na ředění 1:10, což mělo zvýšit množství analytu vstupujícího na kolonu Poslední a neméně důležitou změnou bylo zvýšení teploty detektoru na 330°C.



Obrázek 16: Výsledný chromatogram získaný metodou Pesticidy 1

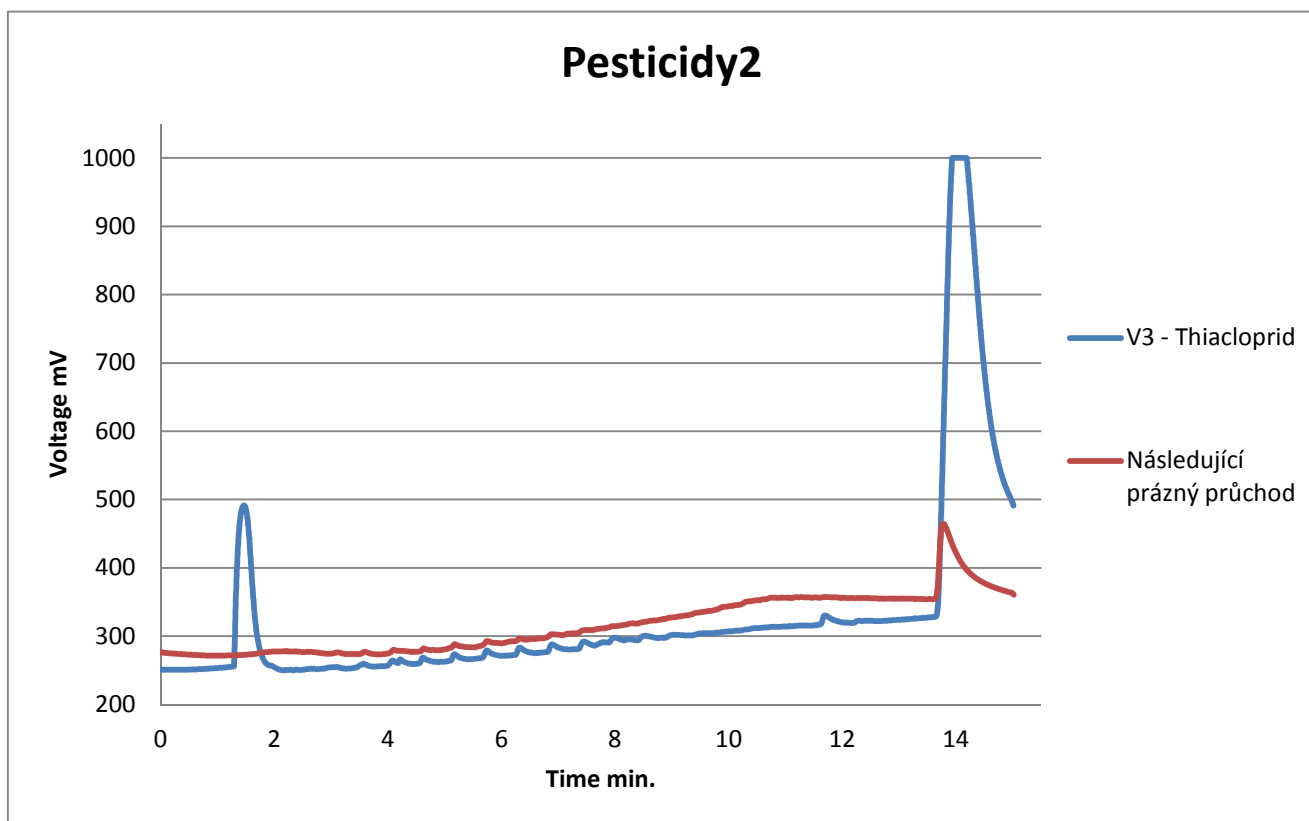
Z výše uvedených chromatogramů (obrázek 15) je patrné, že změny v metodě se odrazili i na chromatogramu. Je zde důležité podotknout, že nástřik probíhal v opačném pořadí, a to sice ve sledu V3, V2 V1. Je tudíž zjevné, že doba, po kterou mobilní fáze prochází kolonou je nedostatečná a stanovovaná látka zůstává v koloně do dalšího měření. Na samotném průchodu vzorku V3 to není patrné, ale v navazujícím průchodu se již tento děj zřetelně projeví.

3. Pesticidy 2

Před tvorbou této metody došlo ke změně kolony. Místo stávající byla zvolena kolona Restek Rxi – 35Sil MS o délce 30 metrů a průměru 0,25 mm, tato kolona vydrží vyšší teplotu až to 360°C a tudíž vyšší rozložení mobilní fáze. Zároveň byla demontována kolona na stanovení alkoholů a nebylo tedy nutné brát na ni při nastavení teplotního programu ohled.

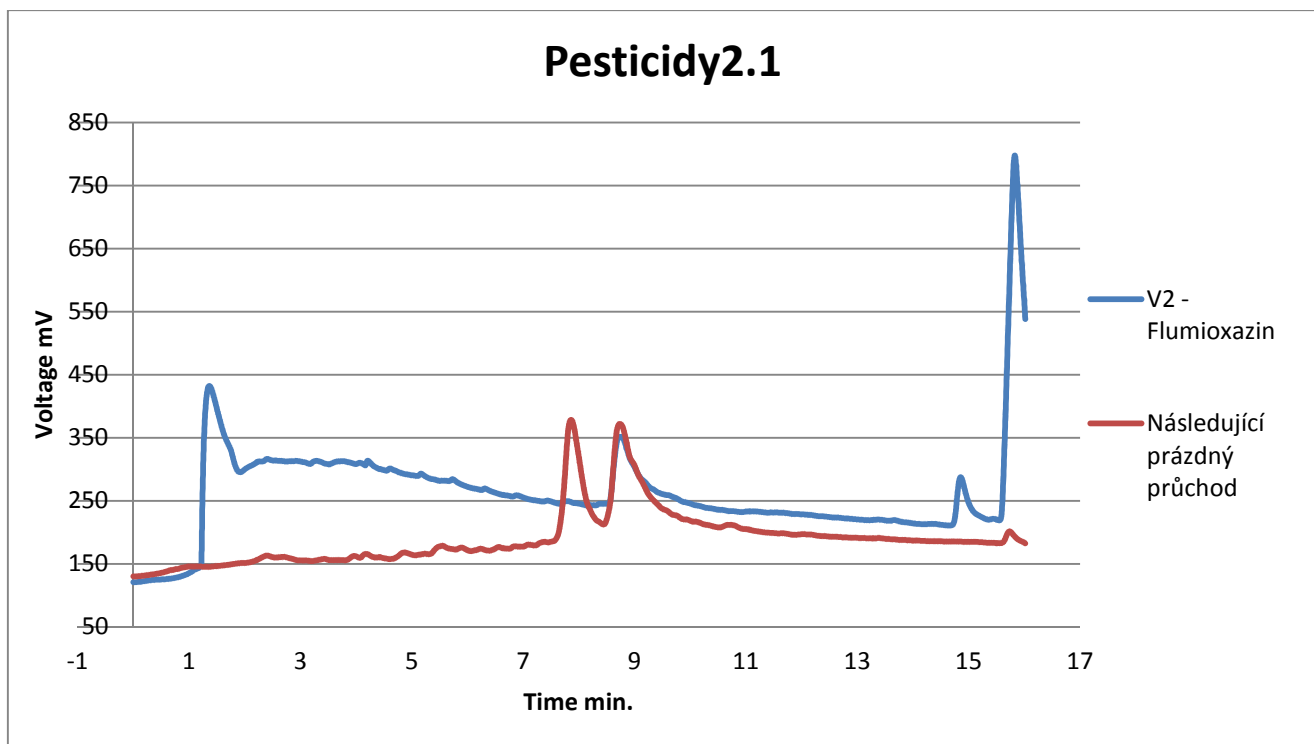
Parametry použité kolony se velice podobají kolonám prodávaných pro analýzu pesticidů, jako je např. Restek Rtx-CLPesticides. Proto byl jako výchozí teplotní program a další parametr nastaveny parametry doporučené prodejcem v katalogu Phenomenex, Chromatography product guide 2019/20, i s vědomím, že originálně bylo pro dané stanovení použito jako nosný plyn helium. Tj. změna teplotního programu, jež

se liší pouze v konečné teplotě a době jejího ponechání. Konečná teplota byla 330°C a byla ponechána po dobu 4,5 minuty. Celková doba průchodu tudíž byla 14,93 minut.



Obrázek 17: Výsledný chromatogram získaný metodou Pesticidy 2

Jak z chromatogramu vyplývá, metoda nebyla účinná a vzorek stále za dobu průchodu neprošel celý. Z tohoto důvodu následující měření po promytí kolony od setrvávajícího vzorku byla jednorázově prodloužena doba průchodu na 17 minut. Došlo též k snížení teploty kolony a detektoru na 300°C za účelem snížení základního signálu. Označena byla pracovním názvem Pesticidy 2.1.

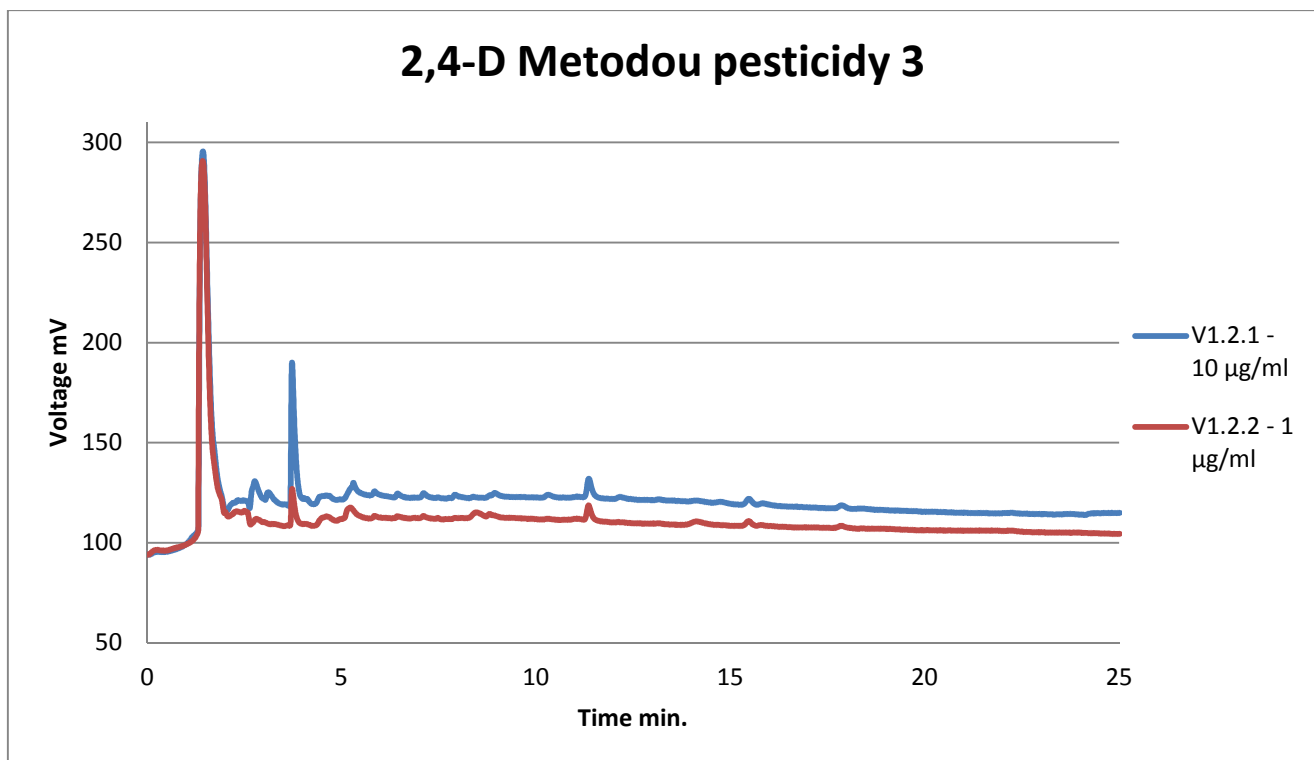


Obrázek 18: Výsledný chromatogram získaný metodou Pesticidy 2.1

Toto upravení metody však nemělo velký vliv na výsledný chromatogram. Proto následovalo další upravení metody.

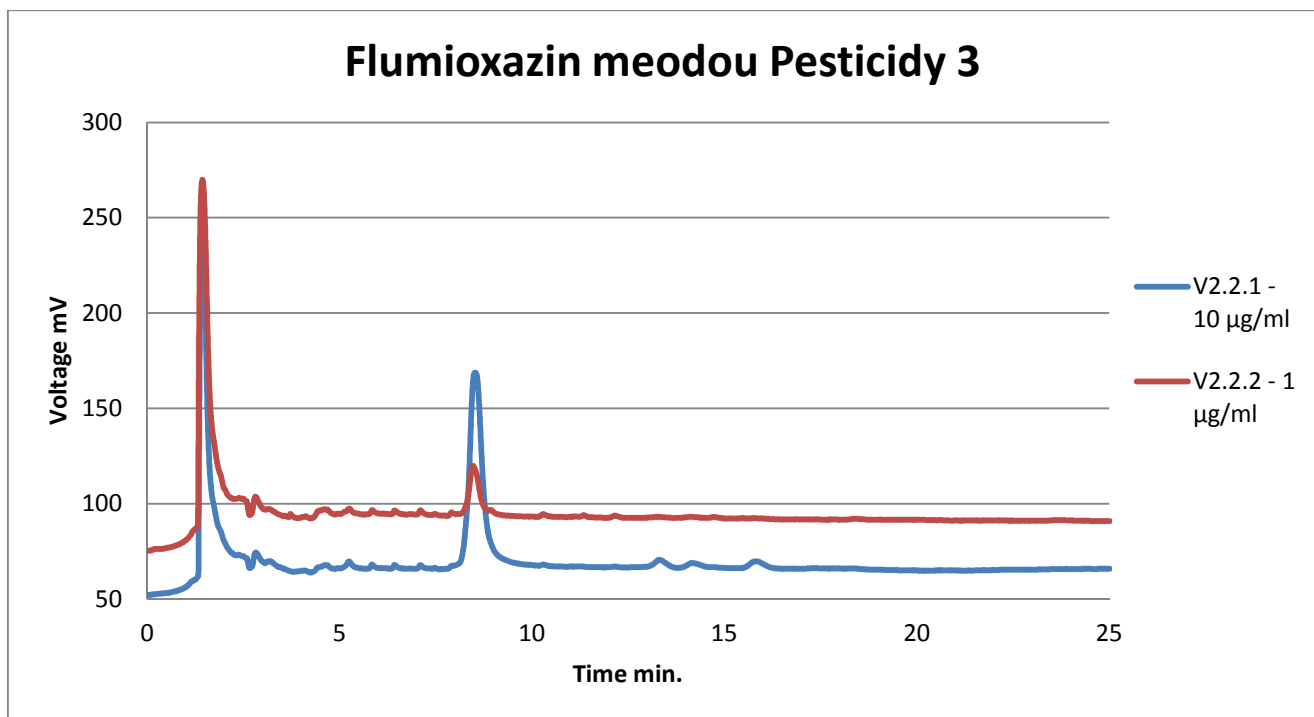
4. Pesticidy 3.0

Oproti minulé metodě došlo k mnohým změnám. V samotném počátku došlo k zvýšení, teploty nástřiku na 280°C, průtok splitu na 22,5 ml/min a tím i ředění splitem na 1:15. Teplota, na kterou byla zahřívána kolona, byla změněna také. Teplotní program začínal na 160°C s teplotním gradientem 30 °C/min. Účelem bylo předcházet možné kondenzaci analytu na začátku kolony. Tento teplotní gradient se po dosažení 200 °C změnil na rychlost 15 °C/min až do dosažení 270. Při dosažení 270 °C byla tato teplota ponechána po dobu 19 minut. Jediným nezměněným parametrem byla teplota detektoru a to 330 °C.

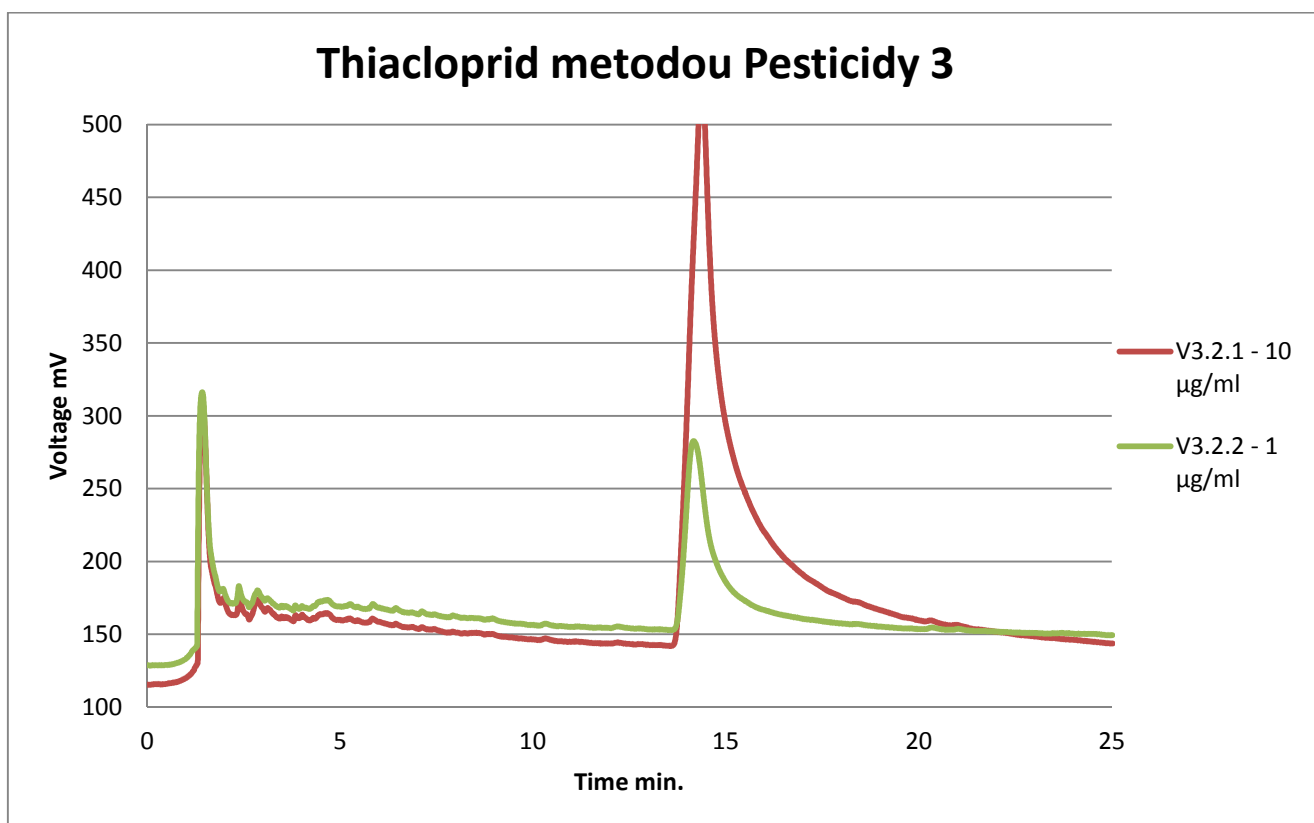


Obrázek 19: Soubor chromatogramů analyzovaného pesticidu 2,4-D získaný metodou Pesticidy 3

Tato metoda již přinesla cílené výsledky. Na obrázku 18 lze zřetelně vidět výskyt píku v retenčním čase 4,6 min. Můžeme zde spatřit i vliv koncentrace na výšku a plochu píku.

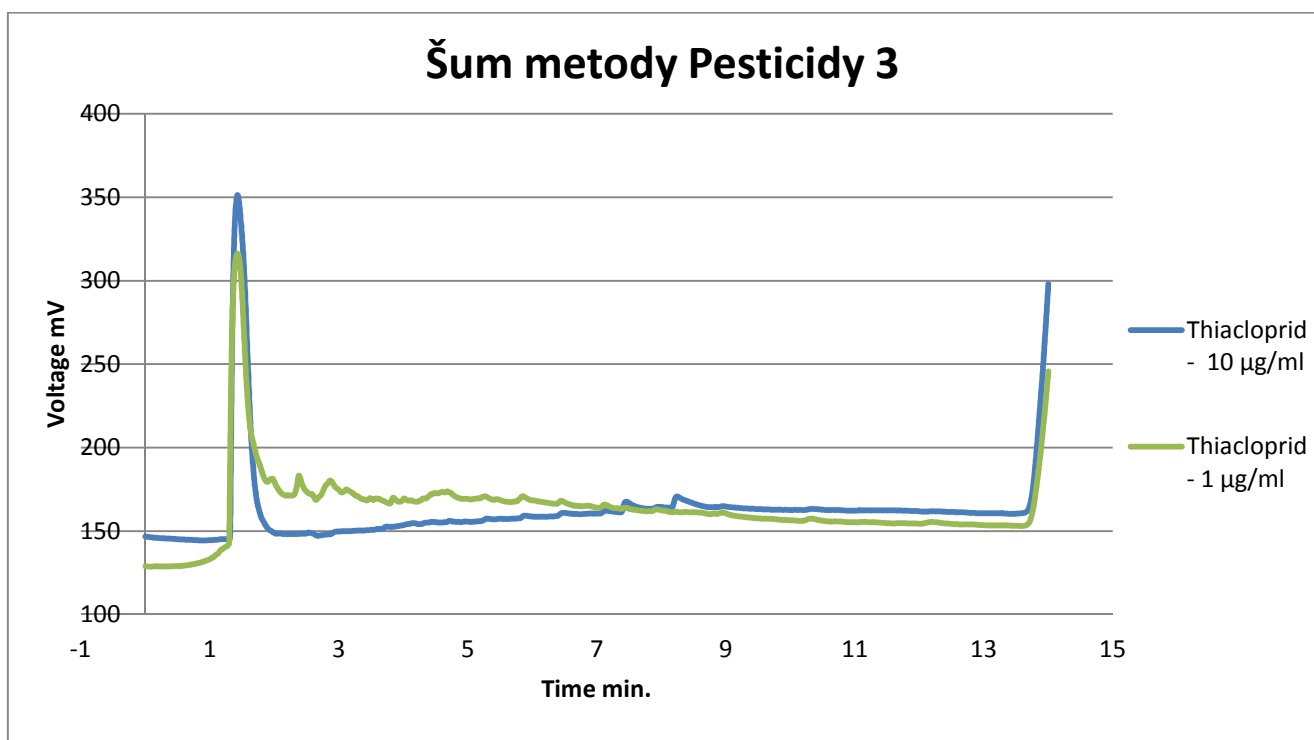


Obrázek 20: Soubor chromatogramů analyzovaného pesticidu Flumioxazin získaný metodou Pesticidy 3



Obrázek 21: Soubor chromatogramů analyzovaného pesticidu Thiacloprid získaný metodou Pesticidy 3

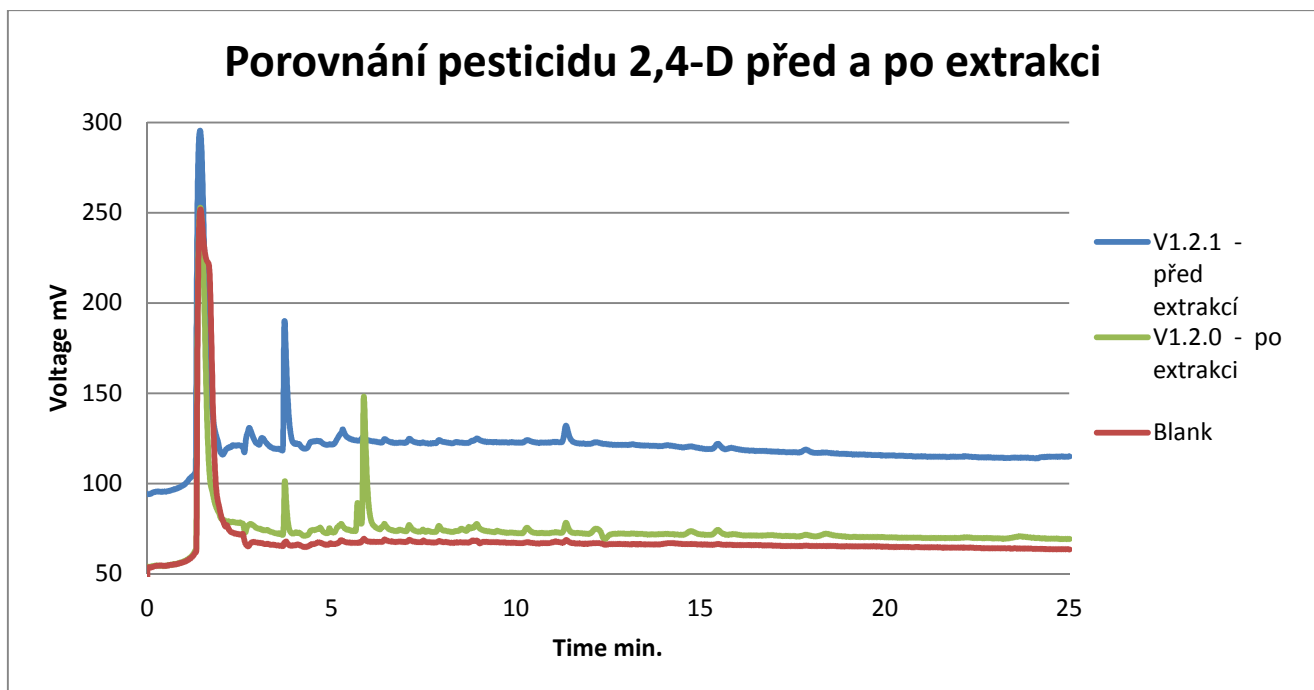
Velice dobrých výsledků se nám podařilo docílit i u Flumioxazinu (Obr. 19) a u Thiaclopridu (Obr. 20). Avšak na všech uvedených chromatogramech lze vidět poměrně vysoký poměr šumu (Obr. 21), který s měřenou hodnotou signálu roste. Projevuje se jako velké množství píků o malé ploše. Šum si můžeme vyložit jako výchylku v signálu detektoru. Šum může být způsoben nedostatečnou čistotou rozpouštědla, či nečistotami ve vzorku, či vnesenými se vzorkem. Tento šum se projevil výrazněji po výměně komponentů během série měření a jeho vznik je patrný na Obr. 21, kde původní chromatogram (před výměnou komponentů) koncentrace 10 $\mu\text{g/ml}$, u které by se předpokládalo šum vyšší má v důsledku šum nižší než koncentrace 1 $\mu\text{g/ml}$ po výměně komponentů. Při výměně komponent je třeba dbát na dostatečný oplach komponent nosným plynem. Komponentou, jež se vyměňuje nejčastěji, je gumové septum. Vysoká hodnota šumu snižuje mez detekce a může způsobit chybu, v případě záměny za signál analytu.



Obrázek 22: Výřez ze souboru chromatogramů Thiaclopridu získaný metodou Pesticidy 3 s přiblížením na šum

2.6. Extrakce

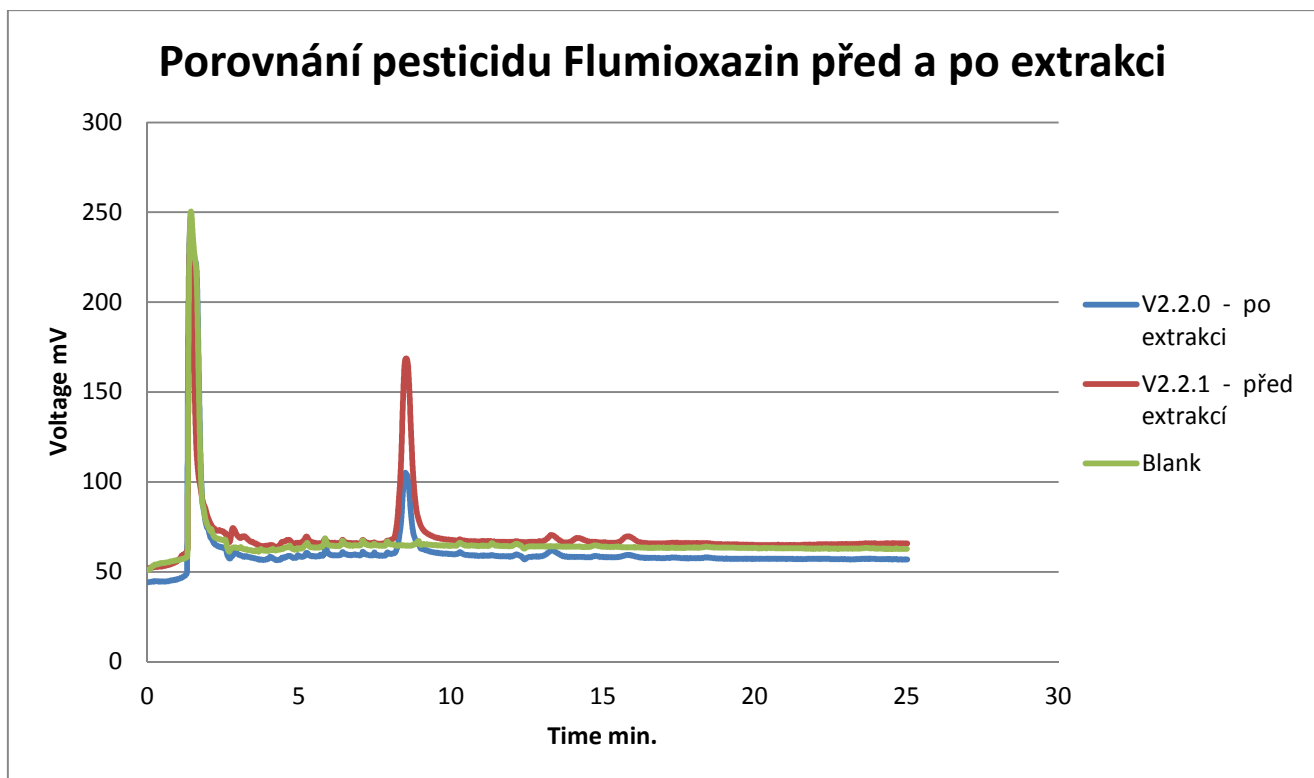
Extrakce byly provedeny pomocí jednorázových kolon Strata C18-E (55 μ m, 70A), 500mg/3ml. Tato kolona byla zvolena jako univerzální pro nepolární látky, i s rizikem, že výtěžnost extrakce pesticidů nebude optimální. Průchod vzorku extrakční kolonou umožňovala skleněná pozicová vakuová vana do které byly kolony zasazeny a ve které byl tvořen podtlak pomocí olejové vývěvy. Před samotnou extrakcí musí být kolony aktivovány. K tomu dochází po propláchnutí 3ml methanolu, poté 3 ml destilované vody, následném propláchnutí pomocí 5% methanolu a následného 2-5 minutového sušení. Při proplachování se využívá podtlaku. Po aktivaci kolony se vodný vzorek o objemu 3 ml nechá prosát kolonou. Analyt je ze vzorku extrahován na kolonu. Poté je z kolony vymyt methanolem a zachycen do vzorkovnic. Důležité je regulovat tlak a tok, aby nedošlo k vyfoukání analytu ze vzorkovnice. Jako první byla vyzkoušena extrakce pesticidu 2,4-D. Byl extrahován umělý vodný vzorek tvořený 3ml destilované vody a 0,1 ml umělého vzorku V1.2.0, který měl koncentraci 100 μ g/ml. Spolu s pesticidem byl extrahován i slepý vzorek (blank) v podobě destilované vody.



Obrázek 23: Soubor chromatogramů extrakce pesticidu 2,4-D

Z chromatogramu je viditelné, že extrakce proběhla úspěšně. Důležité je však poukázat na změny, jež proběhly. Krom svého obvyklého retenčního času 4,6 min pesticid vytvořil pík i v retenčním čase 5,88 min na rozdíl od původního chromatogramu. Správnost extrakce nám potvrzuje blank, ve kterém je prokazatelně jen čistý methanol, avšak je třeba poukázat na chvost, jež pík methanolu tvoří.

Druhým extrahovaným pesticidem byl Flumioxazin. Umělý vzorek vody byl tvořen z 3 ml destilované vody a 0,1 ml vzorku V2.2.0 o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$, který nám posloužil i jako standard pro odhad koncentrace Flumioxazinu v reálném vzorku.



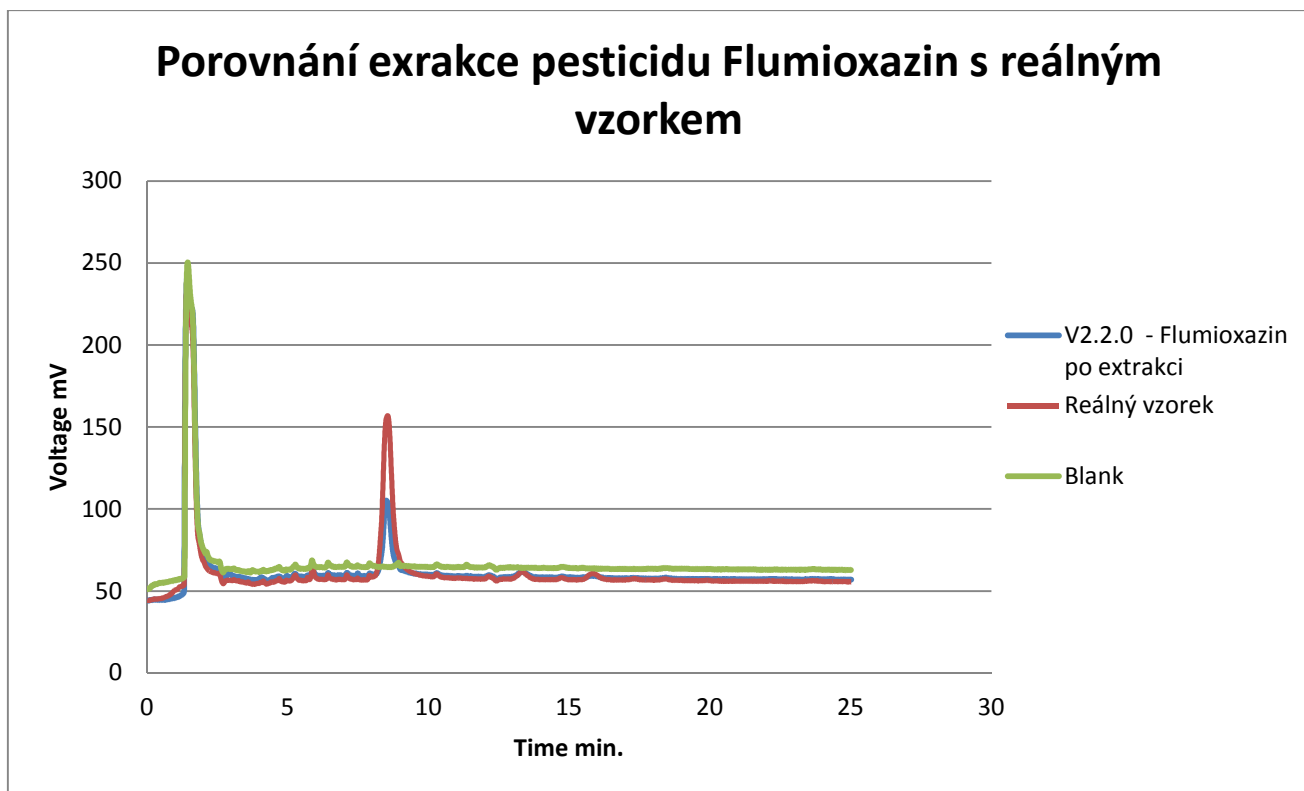
Obrázek 24: Soubor chromatogramů extrakce pesticidu Flumioxazin

Extrakce proběhla úspěšně a tento pesticid se extrakcí nezměnil. Můžeme zde opět pozorovat lehké chvostování píku methanolu ve slepém vzorku.

Thiacloprid nebyl testován na vodných vzorcích, jelikož nebyla předpokládána jeho přítomnost v reálných vzorcích.

2.7. Reálné vzorky

Odběr reálných vzorků byl proveden na základě informací o plánovaných aplikacích pesticidů na pěstební plochy. Pesticidy se nesmí aplikovat na pěstební plochy v době kdy jsou předpokládány srážky, aby nedošlo ke smytí a následnému splachu pesticidu do povrchových vod. Proto k odběru vzorků došlo až po srážkách následujících po aplikaci a v místech kde gravitační spád vody z pěstební plochy hromadil. Minimální množství potřebné na extrakci je celkem 10 ml. Na jednu extrakci je potřeba 3 ml vzorku a je vhodné každou extrakci podpořit dvěma opakováními. Zbývající 1ml je rezerva kvůli ztrátám vzniklých manipulací se vzorkem.



Obrázek 25: Soubor chromatogramů extrakce reálného vzorku a pesticidu Flumioxazinu

Extrakce reálného vzorku proběhla úspěšně. V retenčním čase 8,55 min byl zjištěn pík odpovídající pesticidu Flumioxazin. Stanovení pesticidu v neupraveném reálném vzorku bylo značně neočekávané. Byla předpokládána nutnost zahušťování reálného vzorku, aby se dosáhlo vyšší koncentrace případného pesticidu. Tento postup však nebyl u tohoto vzorku nutný. Odhadovaná koncentrace pesticidu ve vzorku byla cca 5 µg/ml.

3. Didaktická část^{24, 25}

3.1. Pro základní školy

Součástí učiva na základní škole je téma voda, její druhy a její znečištění. Zde se žáci mohou seznámit s pesticidy jako polutanty podzemních i povrchových vod. V této části je také očekáváno uvedení příkladů znečištění vzduchu a vody a navržení preventivních opatření. Znalosti získané při práci umožňují lépe pochopit a tím interpretovat problematiku životního prostředí, šíření pesticidů v životním prostředí a

jejich dopady. Možné je i zkombinovat tyto znalosti s principy rozpustnosti látek a rozdílech mezi polárními a nepolárními rozpouštědly. V této oblasti je možné využití krátkého pokusu, při kterém se voda obarví lipofilním barvivem a opatrně se převrství vrstvou oleje o shodné mocnosti. Při tomto pokusu barvivo přechází do olejové fáze a znázorňuje tak pohyb pesticidů mezi prostředím a živočichem. Z mezipředmětových vztahů je možné připomenout převody jednotek objemu a hmotnosti probíraných v hodinách fyziky. Také výpočty ředění a koncentrací se mohou skloubit s hodinami matematiky a počítání s procenty. A v neposlední řadě využití znalostí o pesticidech a jejich použití v hodinách přírodopisu, ať již v hodinách na téma rostlin, tak na téma obratlovců, nebo člověka. Další využití těchto poznatků nalezneme v hodinách na téma chemie a společnost, kde se očekává orientace ve využívání a přípravě chemických látek a jejich vliv na zdraví člověka a životní prostředí.

3.2. Pro střední školy a gymnázia

Na vyšším stupni vzdělání se může využít vše využitelné pro základní školy a tyto poznatky prohloubit.

Na chemicky zaměřených středních školách by stanovení pesticidů ve vodě mohlo být přínosné v mnoha ohledech. První možností co by se žáci mohli naučit a co by bylo přínosné pro jejich chemické vzdělání je ovládnutí analytických vah a správný způsob navažování. Konkrétně navažování 1 mg pesticidu na požadovanou přesnost je velice obtížné. Příhodné by bylo, aby se žáci cvičili v navažování například v najemno nadrcené kuchyňské soli. Další problematikou je navažování methanolu. Ve školních podmínkách by byl účelnější ethanol, jelikož methanol je jedovatá látka, se kterou žáci nesmí přijít do kontaktu. Tyto rozpouštědla se rychle odpařují, tudíž rychle mění hmotnost a je zapotřebí navažovat s vyšší navázkou a spočítat si jaké množství se stihne odpařit.

Spolu s navažováním se mohou žáci seznámit s ředěním, výpočtem koncentrací a hmotnostními zlomky.

Další dovedností, kterou si mohou žáci osvojit je pipetování a pokud má škola k dispozici automatické pipety, tak i dovednost jejich obsluhy.

Pokračovat žáci mohou v učení se správnému odběru reprezentativního vzorku. Reprezentativní vorek by měl interpretovat všechny vlastnosti látky, ze které se vzorek odebírá a chybný odběr vzorku představuje nejvyšší procento při chybě v analýze. U pevných vzorků se to dělá metodou čtvercování. U kapalných vzorků je to o něco složitější. Tam se předpokládá homogenita, už v základu je však třeba odebrat vzorek na více místech a více úrovních hloubky a tento objem smísit.

Dalším krokem je extrakce samotná. Jedná se o nepolární sorbent, takže při průchodu vodného roztoku se v sorbentu zachytí nepolární látky. Ty jsou pak vymyty nepolárním rozpouštědlem. Důležitý parametr, který jsme ovšem nestanovovali, je účinnost extrakce. Podle ní se dá přesně určit původní množství analytu ve vzorku.

V poslední řadě si žák může osvojit metody nástřiku, důležité základy manipulace s analytem, způsoby jak zabránit znečištění a obsluhu plynového chromatogramu.

Krom chemických středních škol by se daly poznatky o extrakci, životním prostředí a toxicitě pesticidů využít i na gymnáziích. Kde se také mohou žáci procvičit ve výpočtech koncentrací a rovnicích ředění.

Využití by tyto poznatky mohly mít i v podobě projektu, ve kterém by žáci kontaktovali lokální zemědělce. Tento projekt by pravděpodobně probíhal ve spolupráci a chemickou vysokou školou nebo odborným ústavem schopným stanovení pesticidů provést, či případně průběh analýzy žákům předvést v rámci exkurze. Samotné kontaktování lokálních zemědělců by navazovalo na předmět Český jazyk, ve kterém se žáci učí psát formální dopis. Poté by po zjištění potřebných informací odebrali vzorky a mohli by je na laboratorním cvičení upravovat. Následně by učitel zaslal vzorek na analýzu do předem dohodnuté instituce a předal výsledky žákům, nebo by žáci absolvovaly exkurzi. Data získaná z analýzy by na hodinách informatiky převedli do grafů a zpracovali v podobě protokolů a prezentací. Prezentace samotná je opět průřezovým tématem spojující Český jazyk, mediální vzdělávání a chemii. Tento projekt by mohl být pro žáky zajímavý a zároveň přínosný a poskytl by žákům samotný vhled do problematiky pesticidů a jejich stanovování.

Kromě uvedených možností využití zde jsou ještě další vyplývající z RVP pro gymnázia. V kapitole ORGANICKÁ CHEMIE očekávané výstupy předpokládají, že

žák dokáže charakterizovat skupiny organických sloučenin včetně jejich vlivu na životní prostředí. K této části učiva je možné přiřadit učivo o organochlorových sloučeninách z kapitoly o pesticidech. Největší užitek však tato práce může mít v rámci výstupů o znalostech základních kvantitativních a kvalitativních analýz a jejich praktickém využití.

Konkrétní obory mimo chemické střední školy můžeme hledat i v zemědělských oborech. Příkladem jsou rostlinolékařství, agropodnikání, lesnictví, vinohradnictví a jiné. Dalšími obory mimo chemii a zemědělství jsou Ekologie a životní prostředí, nebo také analýza potravin.

3.3. Pro vysoké a vyšší odborné školy

Použití pro studenty vysoké a vyšší odborné školy je na začátku stejné jako pro žáky školy střední. Navazuje na ně dovednost výpočtů v chromatografii, které jsou uvedeny v teoretické části a také možnost terénního získávání vzorků a jejich analýzy v laboratoři.

Využití této metody by bylo možné v podobě jednodenních praktik, na které by si již studenti donesli vzorky vody, nebo by jim byly školou poskytnuty.

Vzorky pro školu mohou být buď uměle vyrobeny, což je samo o sobě jednodušší a spolehlivější varianta, nebo mohou být nabrány z terénu a uskladněny v mrazáku. Samotný odběr vzorků není snadný. Zemědělci mají zákonem přikázáno aplikovat postřik pouze za předpokladu, že v průběhu následujících dnů nedojde k dešťovým srážkám. Je však vhodnější nabrat vzorky vody krátkou dobu po postřiku zemědělské půdy a následném dešti. Ideální pro takovéto odběry je vodní tok, či plocha v údolí pod zemědělskou plochou, na kterou byl pesticid aplikován. Není potřebné velké množství vzorku. 9 ml postačí na sérii s dvěma opakováními. Tudíž je vhodné nabrat větší množství vzorku, a když učitel prokáže přítomnost pesticidů, může následně zbytek vzorku zamrazit a použít pro další praktika.

Studenti si při praktikách osvojí postupy úprav reálného vzorku, který může být zakoncentrován a nebo přefiltrovat od nečistot. Nebo si v rámci praktik připraví vzorek umělý a procvičí se v navažování velice nízkých navážek a výpočtu koncentrace. Studenti si připraví vzorky o dvou známých a odlišných koncentracích, aby pomocí dat

získaných analýzou těchto vzorků mohli docílit dvoubodové kalibrace. Poté se studenti seznámí se základy nástřiku vzorku do injektoru. Dalším krokem je vyhodnocení dat jako takových. Student se naučí vypočítávat koncentraci na základě plochy píku a typ pesticidu na základě retenčního času. Učitel by mohl studentům připravit vzorek o neznámém složení a neznámé koncentraci. Studenti by měli za úkol stanovit konkrétní pesticid a vypočítat jeho koncentraci využitím dat z dvoubodové kalibrace.

Tato práce zároveň otvírá možnosti pro témata dalších bakalářských a diplomových prací. Pro bakalářskou práci by mohlo být vhodné optimalizovat metodu i na další pesticidy, zvýšení robustnosti metody, zlepšení poměru signál/šum a také zjištění mezí stanovitelnosti a mezí detekce. Pro navazující diplomovou práci by mohlo být úkolem stanovení pesticidů na dalších zařízeních, jako je HPLC nebo UPLC podle možností pracoviště. Také je zde možnost zjišťování pesticidů v dalším prostředí, jako je půda, nebo rostliny.

4. Závěr

Byly prostudovány možnosti stanovení pesticidů s ohledem na dostupné vybavení a pesticidy, jež byly v dané době a místě používány

Pro vybrané analyty byla postupně modifikována metoda jejich stanovení na přístroji DANI Master s ECD.

Metoda byla otestována pomocí umělých vzorků různých koncentrací

Byl navržen a na umělých vzorcích otestován postup extrakce s využitím komerčních kolonek pro SPE

Navržený kompletní postup byl použit pro analýzu reálného vzorku splachové vody

Bylo zhodnoceno možné využití získaných poznatků o chování pesticidů a procesech použitých při jejich stanovení pro výuku na různých stupních škol s důrazem na VŠ vzdělávání, kde je možné problematiku řešit v celé své komplexnosti.

Po teoretické stránce práce obsahuje historii a základy plynové chromatografie. Popis základních komponentů, jejich význam a jejich možné kombinace.

Výsledkem této práce je metoda pro plynový chromatograf s ECD využitelná ke stanovení vybraných pesticidů ve vodě. Zároveň tato práce může být i jistým návodem na tvorbu metody pro GC-ECD. Jak provádět extrakci a jak zacházet s plynovým chromatografem DANI Master.

Po didaktické stránce práce obsahuje jednotlivé aspekty využití práce v různých úrovních vzdělání.

5. Resumé

Gas chromatography with electron capture detector (GC-ECD) is a method suitable for the determination of halogenated and aromatic substances. Most of pesticides fits to at least one of these groups. Pesticides are a frequently discussed environmental problem. The objective of this work was to develop a suitable method for the analysis of these pesticides using selected standards. Next step was to prepare a procedure for extracting pesticides from samples obtained by rainwater sampling, where flushes from fields after spraying are expected. Finally, the evaluation of the possibilities of applying the acquired experience and knowledge to chemistry teaching at various levels of schools.

We have prepared standards of selected pesticides of known concentration in methanol. The prepared solutions were used to determine the conditions of assay, in which we gradually modified the flow through the column, the column temperature program and the analysis duration. After finding suitable assay conditions, we've tested standards of different concentrations. In the next phase, we verified the conditions for the extraction of analytes from water samples.

The inclusion of projects in teacher's education at the university is discussed. Based on the experience and knowledge gained during the preparation of the pesticide determination method, we've selected the areas of curriculum at primary and secondary schools, where it is possible to include individual knowledge in the topics of teaching not only chemistry but also other subjects within the cross-curricular relations.

We've created a method, which allows us to determine selected pesticides in limited conditions.

6. Zdroje

- 1- <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1952/summary/> 30.5. 2019
- 2- *A new form of chromatogram employing two liquid phases* A. J. P. Martin, R. L. M. Synge Biochemical Journal Dec 01, 1941,35(12)1358-1368;DOI: 10.1042/bj0351358
- 3- <http://www.biochemj.org/content/35/12/1358> 30.5. 2019
- 4- Švec F.: Co dnes hýbe kapalinovou chromatografií?, In: *Chem. Listy* **2009**, 103, s. 266-270.
- 5- Sobotníková J., Bosáková Z. a kol: HISTORIE, SOUČASNOST A PERSPEKTIVY ANALYTICKÝCH SEPARAČNÍCH METOD NA KATEDŘE ANALYTICKÉ CHEMIE PŘÍRODOVĚDECKÉ FAKULTY UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE, In: *Chem. Listy* **2010**, 104, s. 1226-1231.
- 6- Vacíček O.: Využití metod kapalinové chromatografie k separaci oligonukleotidu modifikovaných genotoxickými látkami, Masarykova univerzita v Brně, Brno 2007.
- 7- Kraitr M., Richtr V.: TENKOVSTVÁ CHROMATOGRFIE VE VÝUCE, CHEMIE, CHEMIE XX sborník katedry chemie Západočeské univerzity v Plzni, Plzeň 2004.
- 8- Feistinger M.: Určení přítomnosti halogenovaných látek ce vybraných vzorcích životního prostředí metosou plynové chromatografie, ZČU v Plzni, Plzeň 2016.
- 9- Zachař P., Sýkora D., Plynová chromatografie, VŠCHT Praha
- 10- Štulík K. a kol.: Analytické separační metody. Karolinum, Praha 2004.
- 11- Volka K. a kol.: Analytická chemie II. VŠCHT, Praha 1997.
- 12- Čabala R.: Plynová chromatografie Instrumentace Základní přednáška, Univerzita Karlova v Praze. Praha 2008.
- 13- Sapoušek A., Plynová chromatografie v bioplynových technologiích se zaměřením na analýzu neuhlíkových plynů. Mendelova univerzita v Brně, Brno 2018.
- 14- Základní analýza potravin, přednáška 6. - https://web.vscht.cz/~koplíkr/ČástA6_3.pdf Staženo 30.5. 2019
- 15- Tesařová J.: Rezidua pesticidů a jejich dopady na životní prostředí, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno 2009.
- 16- <https://www.agromanual.cz/cz/index.php> 30.5. 2019
- 17- Kyselina_2,4-dichlorfenoxycetová - https://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_2,4-dichlorfenoxycetová 30.5. 2019
- 18- Thiacloprid - <https://en.wikipedia.org/wiki/Thiacloprid> 30.5. 2019
- 19- Superkritická fluidní extrakce http://sch.vscht.cz/materialy/stud_mgr/sfe_web_2014.pdf 22.06. 2019
- 20- Superkritická fluidní chromatografie (SFC) - <http://www.airproducts.cz/industries/Analytical-Laboratories/analytical-lab-applications/product-list/supercritical-fluid-chromatography-sfc-analytical-laboratories.aspx?itemId=42AF782BE91C477392272665C2F06A03> 22.06. 2019
- 21- Haluzíková M.: Pesticidy jejich vliv na cílové organismy a metody odstraňování, VYSOKÁ ŠKOLA BĀŇSKÁ – TECHNICKÁ UNIVERZITA OSTRAVA, Ostrava 2013

22- Loučka T.: Chemie životního prostředí, Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, Ústí nad Labem 2014

23- Sarin - <https://cs.wikipedia.org/wiki/Sarin> 22.06. 2019

24- RVP - <https://www.rvp.cz> 23.06. 2019

25- RVP G - <http://www.nuv.cz/t/rvp-pro-gymnazia> 23.06. 2019

7. Seznam převzatých obrázků

Obrázek 1 – Fázový diagram oxidu uhličitého

<https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/gc.html> staženo 22.6. 2019

Obrázek 3 – Gas Chromatography,

<https://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/gaschr.htm> staženo 30.5. 2019

Obrázek 5 – The Linde Group, http://www.linde-gas.cz/internet.lg.lg.cze/cs/images/Detektor_4_6_200979_15732.pdf

staženo 10.6.2016.

Obrázek 6 – The Linde Group, http://www.linde-gas.cz/internet.lg.lg.cze/cs/images/PlamenoizolacniDetektor_INNA_22_4_200979_15731.pdf

staženo 10.6.2016.

Obrázek 7 – The Linde Group, http://www.linde-gas.cz/internet.lg.lg.cze/cs/images/TVD_4_6_200979_15733.pdf,

staženo 10.6.2016.

8. Přílohy

- 1) Převzato z Čabala R.: Plynová chromatografie Instrumentace Základní přednáška, Univerzita Karlova v Praze. Praha 2008.
 - polystyren (Chromosorb103) -aminy, amidy, alkoholy, aldehydy, ketony
 - styren-divinylbenzen(Chromosorb102, PorapakP) -permanentníplyny, voda, alkoholy
 - ethylvinyl-divinylbenzen(PorapakQ) -uhlovodíky, vodnéroztoky org. látek, NOx
 - polyvinylpyrolidon(PorapakR) -voda, HCl, Cl₂, C₁-C₆alkany
 - polyvinylpyridin(PorapakS) -alkoholy
 - 2,6-difenyl-*p*-fenylenoxid(Tenax) -alkoholy, glykoly, ethanolamin
 - ethylenglykol-dimethylakrylát(PorapakT) -formaldehyd, voda