

# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ  
ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO  
PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY  
INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

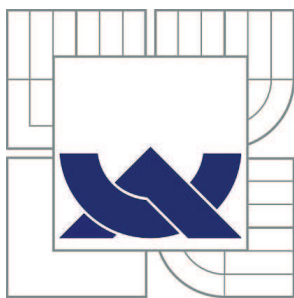
PYRETHROIDY V ABIOTICKÝCH A BIOTICKÝCH SLOŽKÁCH  
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE  
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

VERONIKA KOCIÁNOVÁ

BRNO 2011



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY  
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF  
ENVIRONMENTAL PROTECTION

## PYRETHROIDY V ABIOTICKÝCH A BIOTICKÝCH SLOŽKÁCH ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

PYRETHROIDS IN ABIOTIC AND BIOTIC ENVIRONMENTAL MATRICES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

VERONIKA KOCIÁNOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. MILADA VÁVROVÁ, CSc.

BRNO 2011



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

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0575/2010** Akademický rok: **2010/2011**  
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí  
Student(ka): **Veronika Kociánová**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie (B2801)  
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805R002)  
Vedoucí práce **prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.**  
Konzultanti:

### Název bakalářské práce:

Pyrethroidy v abiotických a biotických složkách životního prostředí

### Zadání bakalářské práce:

1. Zpracování literární rešerše
2. Výběr skupiny pyrethroidů pro hodnocení jejich zátěže ve vzorcích vybraných matric
3. Provedení odběru vzorků
4. Optimalizace metody na bázi separačních metod a její následné využití pro analýzu reálných vzorků
5. Zhodnocení získaných výsledků a jejich interpretace

### Termín odevzdání bakalářské práce: 6.5.2011

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

-----  
Veronika Kociánová  
Student(ka)

-----  
prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2011

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Syntetické pyrethroidy tvoří hlavní skupinu syntetických organických insekticidů, které se aplikují nejen v zemědělství, ale také v domácnostech či zdravotnických zařízeních. Syntetické pyrethroidy zaujímají asi 30% insekticidů na světovém trhu, čímž postupně nahrazují chemikálie aplikované pro hubení hmyzích škůdců, jakými jsou např. organochlorové a organofosfátové insekticidy. Pyrethroidy jsou umělou obdobou přírodních pyrethrinů. V porovnání s těmito látkami disponují pyrethroidy větší fotostabilitou, rezistencí vůči degradaci a lepší insekticidní aktivitou. Pyrethroidy jsou označovány jako silné neurotoxikanty, které působí na funkci nervové membrány tím, že interagují se sodíkovými kanálky. Pyrethroidy se vyskytují v abiotických i biotických složkách životního prostředí. Tato práce je zaměřena na stanovení těchto látek ve vzorcích vody pomocí metody GC-ECD, neboť ve své struktuře obsahují atomy dusíku a halogenů.

## **ABSTRACT**

Synthetic pyrethroids form the main class of synthetic organic insecticides, which are applied in agriculture, household, and public health. Synthetic pyrethroids account for more than 30% of insecticide use worldwide, thereby they gradually replace chemicals of insect pest control as organochlorine and organophosphate insecticides. Pyrethroids are synthetic derivatives of natural pyrethrins. In comparison with natural pyrethrins have pyrethroids greater photostability, greater resistance to degradation and greater insecticidal activity. Pyrethroids are labeled as potent neurotoxins, which interact with sodium channels. Pyrethroids occur in abiotic and biotic environmental matrices. In this study we focused on the determination of these compounds in environmental water samples by GC-ECD, because of the pyrethroids contain atoms of nitrogen and halogens in their structure.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** Pyrethroidy, pyrethriny, insekticidy, GC-ECD.

**KEYWORDS:** Pyrethroids, pyrethrins, insecticides, GC-ECD.

KOCIÁNOVÁ, V. *Pyrethroidy v abiotických a biotických složkách životního prostředí*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 47 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....  
Podpis

*Poděkování: Chtěla bych poděkovat vedoucí bakalářské práce paní prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. a Ing. Ludmile Mravcové, Ph.D. za odborné vedení a pomoc při zpracování této bakalářské práce.*

# 1 OBSAH

<b>1</b>	<b>OBSAH</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>PYRETHROIDY</b>	<b>9</b>
3.1	Základní charakteristika	9
3.2	První pyrethroidy na trhu	9
3.3	Rozdělení pyrethroidů	9
3.4	Vybrané pyrethroidy	10
3.5	Synergisté	12
3.6	Chiralita pyrethroidů	12
3.7	Chemické vlastnosti	13
3.8	Použití	14
3.9	Toxikologie	14
3.9.1	Charakteristiky biologické aktivity	14
3.9.2	Ovlivnění sodíkových kanálků	14
3.9.3	Ovlivnění chloridových kanálků	15
3.9.4	Způsob intoxikace	15
3.9.5	Vylučování	15
3.10	Vývoj a budoucnost chemie pyrethroidů	15
3.10.1	Studium přírodních pyretrínů	16
3.10.2	Vývoj syntetických pyrethroidů	16
3.10.3	Vývoj do budoucna	17
3.11	Osud pyrethroidů v životním prostředí	17
3.11.1	Přetrvávání některých pyrethroidů v životním prostředí	17
3.11.2	Fotodegradace	18
<b>4</b>	<b>PŘÍRODNÍ PYRETHRINY</b>	<b>19</b>
4.1	Extrakce pyrethrinů z kopretin	21
<b>5</b>	<b>STANOVENÍ PYRETHROIDŮ</b>	<b>22</b>

<b>5.1</b>	<b>Vzorkování vod</b>	<b>22</b>
<b>5.2</b>	<b>Příprava a úprava vzorku</b>	<b>22</b>
5.2.1	Extrakce kapalina-kapalina (LLE)	23
5.2.2	Extrakce na tuhou fázi (SPE)	23
5.2.3	Extrakce na magnetické míchadlo (SBSE)	24
5.2.4	Mikroextrakce tuhou fází (SPME)	24
<b>5.3</b>	<b>Analýza</b>	<b>24</b>
5.3.1	Plynová chromatografie (GC)	25
5.3.1.1	Plynový chromatograf	25
5.3.1.2	Detektory	25
5.3.1.2.1	Detektor elektronového záchytu	26
5.3.1.2.2	Hmotnostní spektrometr	26
5.3.2	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	26
5.3.2.1	Detektory	27
<b>6</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>28</b>
<b>6.1</b>	<b>Použité přístroje a zařízení</b>	<b>28</b>
6.1.1	Nastavení plynového chromatografu	28
<b>6.2</b>	<b>Chemikálie a standardy</b>	<b>29</b>
<b>6.3</b>	<b>Použité nádoby</b>	<b>29</b>
<b>6.4</b>	<b>Pracovní postup</b>	<b>29</b>
6.4.1	Příprava směsných a kalibračních roztoků	29
6.4.2	SPE	30
6.4.3	LLE	30
6.4.4	SPME	30
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b>	<b>31</b>
<b>7.1</b>	<b>Kalibrace</b>	<b>31</b>
<b>7.2</b>	<b>Extrakce pyrethroidů z vody</b>	<b>32</b>
7.2.1	Extrakce na tuhou fázi (SPE)	32
7.2.2	Extrakce kapalina – kapalina (LLE)	33
7.2.3	Extrakce reálných vzorků odpadní vody	35
7.2.4	Mikroextrakce na tuhou fázi (SPME)	37

<b>8</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>43</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ</b>	<b>44</b>
<b>10</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b>	<b>47</b>

## 2 Úvod

Pesticidy jsou přípravky, které se používají na ochranu rostlin v zemědělství a v lesnictví, a to proti houbám, rostlinným a živočišným škůdcům. V této práci jsme se zaměřili na insekticidy, které se používají při hubení hmyzích škůdců. Některé z nich však působí i na necílové organismy, které jsou pro člověka užitečné. V případě pyrethroidů se jedná hlavně o ryby a vodní bezobratlé organismy. Pyrethroidy jsou uměle vyrobené insekticidy, které mají široké využití. Tyto látky našly uplatnění nejen v zemědělství, lesnictví a veterinární medicíně, ale také ve zdravotnických zařízeních, skladech výrobků nebo v domácnostech. Na trhu jsou rozšířeny různé druhy insekticidů. Nejčastěji se jedná o organofosfátové a organochlorové sloučeniny, karbamáty a jiné přípravky na hubení hmyzu. Pyrethroidy se však v poslední době velmi rozšířily a udává se, že tvoří 30 % používaných insekticidů. US Environmental Protection Agency (EPA) vydala prohlášení, v němž nařizuje postupně omezovat používání organofosfátových insekticidů vzhledem k jejich možným toxickým účinkům na lidi, a to především na děti. Také používání organochlorových insekticidů se postupně snižuje, a proto se hledají insekticidy, které nebudou toxické pro člověka a budou šetrné pro složky životního prostředí [1].

## 3 PYRETHROIDY

### 3.1 Základní charakteristika

Pyrethroidy vznikly modifikací přírodních pyrethrinů, které snadno podléhají biologické degradaci a vyznačují se nízkou fotostabilitou. Pyrethroidy naproti tomu vykazují větší fotostabilitu, větší rezistenci vůči chemické a biologické degradaci, větší insekticidní aktivitu a menší toxicitu pro savce. Vyznačují se také nízkou perzistencí v životním prostředí a rychlou aktivitou vůči létajícímu hmyzu. Tento jev se označuje jako tzv. „knock down“ efekt. Hmyz je při kontaktu s těmito látkami velmi rychle omráčen, ztrácí koordinaci a schopnost létat. Výsledkem intoxikace bývá obvykle smrt. V přírodě existuje šest různých pyrethrinů, které mohou být zařazeny do dvou různých skupin: deriváty esterů kyseliny chrysantemové a deriváty esterů kyseliny pyretrové. Všechny tyto deriváty mají stejnou strukturu a liší se jen substituenty, které určují toxické vlastnosti daných látek proti hmyzu [1].

Základ struktury těchto sloučenin tvoří tři hlavní prvky, kterými jsou uhlík, kyslík a vodík. Dále jsou v jejich struktuře zabudovány také atomy dusíku, síry, fluoru, chloru a bromu. Dusík je součástí kyanidové funkční skupiny, která zvyšuje toxický účinek pyrethroidů. Molekuly pyrethroidů se skládají z kyselinové a alkoholové části, které spojuje centrální esterová vazba. Kyselinová část obsahuje dva chirální uhlíky, což znamená, že se pyrethroidy vyskytují jako stereoisomerní sloučeniny. Některé sloučeniny mají chirální uhlík také na alkoholové části. Díky tomuto uhlíku mohou mít pyrethroidy až tři chirální místa a vytvářet tak až osm stereoisomerů. Syntetické pyrethroidy se na trhu běžně vyskytují buď jako racemická směs, nebo jako samotné isomery [2].

### 3.2 První pyrethroidy na trhu

Jako první syntetický pyrethroid byl v roce 1949 vyroben allethrin. Jeho objevitelem byl LaForge. Allethrin však postrádal dostatečnou fotostabilitu a nebyl tak efektivní jako přírodní pyrethriny. Proto vědci pokračovali v hledání efektivnějších a stabilnějších sloučenin. V roce 1963 byl syntetizován tetramethrin, který však stále postrádal požadovanou insekticidní aktivitu. První syntetické pyrethroidy, které se vyznačovaly vyšší insekticidní aktivitou v porovnání s přírodními pyrethriny, byly resmethrin a cismethrin z roku 1966. V dalších letech se pak pracovalo na vytvoření fotostabilních pyrethroidů. V roce 1971 vyrobil Matsuo fenprothrin, v následujícím roce syntetizoval Elliott deltamethrin, cypermethrin a permethrin a v dalším roce přišel na trh Ohno s fenvaleratem. Od roku 1973 bylo nasyntetizováno více než 1000 různých pyrethroidů [2, 13].

Pro možnost porovnání lze uvést, že insekticidní aktivita permethrinu a phenothrinu, které jsou řazeny mezi pyrethroidy typu I, byla zvýšena zavedením kyanidové skupiny, čímž vznikly pyrethroidy typu II, jako např. cyfluthrin a  $\lambda$ -cyhalothrin [2].

### 3.3 Rozdělení pyrethroidů

Pyrethroidy se rozdělují do dvou základních kategorií. První skupinu tvoří pyrethroidy typu I, které neobsahují ve své molekule kyanidovou skupinu. Do druhé skupiny se řadí pyrethroidy typu II, které obsahují kyanidovou skupinu na  $\alpha$  pozici. Mezi pyrethroidy typu I patří například permethrin, phenothrin, resmethrin, allethrin a cismethrin. Mezi pyrethroidy typu II se zařazují například cypermethrin, fenvalerát, deltamethrin a cyphenothrin a mnoho dalších. Každá skupina se vyznačuje jinými toxickými účinky, jinými neurofyziologickými, chemickými a biologickými vlastnostmi a jinou insekticidní aktivitou. Působení pyrethroidů označovaných jako typ I vyvolává u intoxikovaných jedinců zápasení, agresivní chování a rostoucí tělesnou teplotou. Tento stav bývá označován jako tzv. „tremor syndrome“ (T syndrom). Příznaky

účinků pyretroidů, které se řadí do této skupiny, jsou velmi podobné těm, které jsou pozorovány při intoxikaci *p*, *p'*-DDT. Naproti tomu pyrethroidy typu II způsobují škrábání, rýpání, slinění, klesající tělesnou teplotou, svalové kontrakce, záchvaty a smrt. Tyto sloučeniny indukují tzv. „choreoathetosis and salivation syndrome“ (CS syndrom). Některé pyrethroidy se vyznačují účinky, které kombinují oba syndromy a bývají proto označovány jako látky, které indukují tzv. TS syndrom [1,2,3,11].

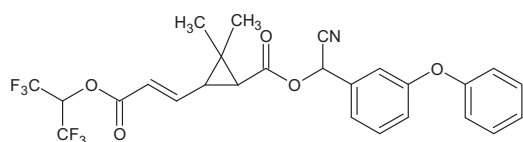
### 3.4 Vybrané pyrethroidy

V této práci se budeme zabývat stanovením 13 vybraných syntetických pyrethroidů. Sledované pyrethroidy jsou shrnuty v tabulce č. 1, v níž jsou také naznačeny syndromy, které jsou jednotlivými látkami vyvolávány. Esfenvalerát je jedním ze čtyř isomerů fenvalerátu, a proto jsou tyto dvě sloučeniny uvedeny ve stejné kolonce. Uvádí se, že esfenvalerát je nejaktivnější formou fenvalerátu. Většina vybraných pyrethroidů má ve své struktuře zabudovány atomy halogenů nebo dusíku, a proto je lze stanovit pomocí plynové chromatografie s detektorem elektronového záchytu. Pyrethroidy phenothrin a resmethrin však ve své molekule neobsahují ani halogeny a ani dusík. Tyto sloučeniny proto v naší práci nezjišťujeme, i když jsou obsaženy ve směsném roztoku. Lze je však stanovit metodou plynové chromatografie s hmotnostním detektorem [1].

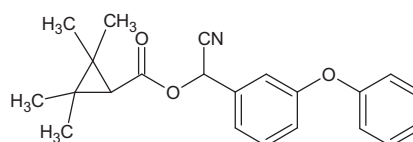
**Tabulka 1:** Vybrané pyrethroidy [1]

Název	Sumární vzorec	Molekulová hmotnost (g·mol <sup>-1</sup> )	log K <sub>ow</sub>	Syndrom
Acrinathrin	C <sub>26</sub> H <sub>21</sub> F <sub>6</sub> NO <sub>5</sub>	541,4	6,7	CS
Bifenthrin	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> ClF <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	422,9	8,2	T
Cyfluthrin	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>2</sub> FNO <sub>3</sub>	453,3	5,7	CS
Cyhalothrin	C <sub>23</sub> H <sub>19</sub> ClF <sub>3</sub> NO <sub>3</sub>	449,9	6,9	CS
Cypermethrin	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	416,3	6,0	CS
Deltamethrin	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> Br <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	505,2	6,2	CS
Fenpropathrin	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>	349,4	5,6	CS
Fenvalerát	C <sub>25</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>3</sub>	419,9	6,8	CS
Esfenvalerát				
Fluvalinát	C <sub>26</sub> H <sub>22</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	476,9	6,8	CS
Permethrin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	391,3	6,2	T
Phenothrin	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	350,5	6,0	T
Resmethrin	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	338,4	7,1	T

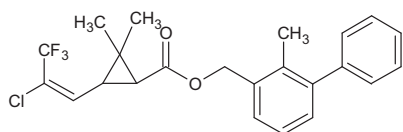
Na následujícím obrázku jsou naznačeny strukturální vzorce jednotlivých syntetických pyrethroidů. Každá molekula pyrethroidů je složena z alkoholové a kyselinové části, které jsou spojené esterovou vazbou. Kyselinová část je znázorněna na levé straně a alkoholová na pravé.



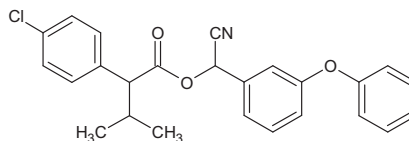
Acrinathrin



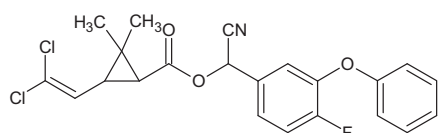
Fenpropathrin



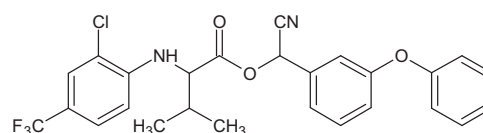
Bifenthrin



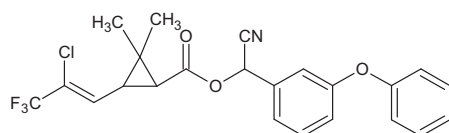
Fenvalerát



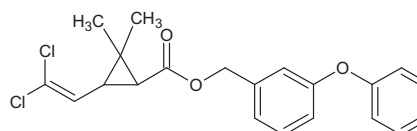
Cyfluthrin



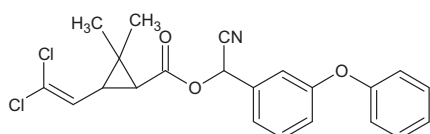
Fluvalinát



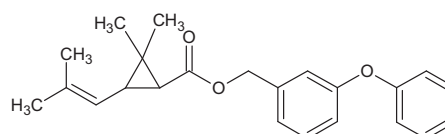
Cyhalothrin



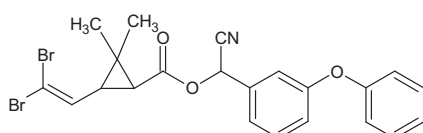
Permethrin



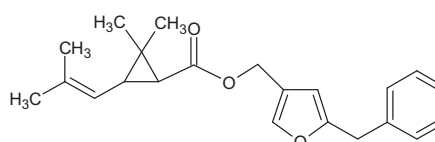
Cypermethrin



Phenothrin



Deltamethrin



Resmethrin

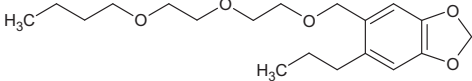
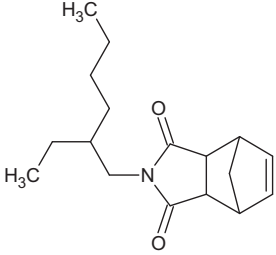
**Obrázek 1: Vybrané pyrethroidy [1,4]**

### 3.5 Synergisté

Pro zvýšení insekticidní aktivity pyrethroidů se k nim přidávají sloučeniny, které se označují jako synergisté. Synergismus je jev, při němž kombinace dvou látek vyvolává větší účinek, než jaký by odpovídal součtu účinků jednotlivých chemických látek. Mezi synergisty, které jsou k pyrethroidům přidávány, můžeme zařadit piperonyl butoxid, N-octylbicyklohepten dikarboximid, sulfoxid, sezamový olej a jiné. Nejčastěji používané synergisty shrnuje tabulka č. 2. Piperonyl butoxid působí tak, že inhibuje skupinu enzymů a zapojuje se do detoxikace pyrethroidů. Zabraňuje rychlému metabolismu pyrethroidů v těle zasaženého hmyzu a má zabezpečit, aby byl hmyz usmrcen. Výsledkem jeho působení je zvýšení toxického účinku pyrethroidů 10 - 150krát [11,29].

Někdy je toxicita pyrethroidů zvýšena také tím, že se k nim přidávají jiné druhy insekticidů, např. organochlorové insekticidy. Některé insekticidní repelenty obsahují organická rozpouštědla, např. alkoholy nebo petrolej. Tato organická rozpouštědla zvyšují celkovou toxicitu repelentu, ale představují také určité riziko pro složky životního prostředí [11].

**Tabulka 2:** *Látky, které se používají jako synergisté [11]*

Název	Chemická struktura	Sumární vzorec	Molekulová hmotnost (g·mol <sup>-1</sup> )
piperonyl butoxid		C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	338,6
N-octyl bicyklohepten dikarboximid		C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>2</sub>	275,4
sesamin		C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	354,4
isosafrol		C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	162,2

### 3.6 Chiralita pyrethroidů

Molekuly chirálních sloučenin se neshodují se svým zrcadlovým obrazem a vyskytují se ve dvou enantiomerních formách. Tyto isomery jsou opticky aktivní, což znamená, že stáčí rovinu polarizovaného světla doleva nebo doprava. Pokud na sebe položíme chirální molekulu a její enantiomer, neshodují se polohy všech jejich substituentů. Rovina symetrie rozděluje molekulu na dvě poloviny, které jsou vzájemným zrcadlovým obrazem. Má-li molekula rovinu symetrie, pak není chirální [5].

Syntetické pyrethroidy jsou chirální sloučeniny, které se skládají z optických stereoisomerů. Takové chirální sloučeniny jsou označovány jako enantiomery. Studie již prokázaly, že enantiomery téže sloučeniny mají stejné fyzikálně chemické vlastnosti a mohou vykazovat enantioselektivní chování při interakci s biologickým systémem. Při hodnocení chování a rizik

chirálních kontaminantů přítomných v životním prostředí by se mělo pohlížet na jejich enantioselektivitu [1].

Molekuly pyrethroidů jsou složeny z kyselinové a alkoholové části. Kyselinová polovina molekuly má dva chirální uhlíky. Díky těmto uhlíkům se pyrethroidy vyskytují jako stereoisomerní sloučeniny. Některé pyrethroidy obsahují také chirální uhlík na alkoholové části a z toho důvodu mohou mít pyrethroidy až tři chirální místa a vytvářet tak až osm stereoisomerů. Tato vlastnost má za následek to, že syntetické pyrethroidy jsou skupinou pesticidů vyznačující se jednou z nejvyšších chiralit. Některé pyrethroidy jsou syntetizovány opticky čisté, např. deltamethrin nebo bioresmethrin, zatímco některé pyrethroidy jsou prodávány jako produkty obohacené o enantiomery, např. allethrin, cyhalothrin nebo cypermethrin [6].

Enantiomery syntetických pyrethroidů se vyznačují různou insekticidní aktivitou, toxickými vlastnostmi vůči vodním bezobratlým živočichům nebo dobou přetrvávání v životním prostředí. Pro porovnání lze uvést, že permethrin má pouze dva z celkem čtyř stereoisomerů insekticidně účinné, zatímco cypermethrin má jen dva z celkem osmi stereoisomerů insekticidně účinné. Uvádí se, že trans isomer je degradován rychleji než cis isomer, avšak v některých případech bylo prokázáno, že méně aktivní enantiomer přetrvává v životním prostředí mnohem delší dobu než enantiomer s větší insekticidní aktivitou [7].

Proto je nutné stále vyvíjet rychlejší a citlivější analytické metody, které by byly vhodné pro stanovení jednotlivých enantiomerů. Nejčastěji se pyrethroidy stanovují pomocí plynové nebo kapalinové chromatografie [6].

Toxicita pyrethroidů velmi závisí na konfiguraci chirálního uhlíku v blízkosti karboxylové skupiny a každý isomer je charakterizován vlastní toxicitou. Jako příklad lze zmínit enantiomery permethrinu s konfigurací R na uhlíku v blízkosti karboxylové skupiny. Tyto enantiomery jsou pro mouchu domácí asi 25krát toxičtější než enantiomery s konfigurací S. Naproti tomu enantiomery fenvalerátu, mající na tomto uhlíku konfiguraci S (prostorově odpovídající konfiguraci R kyseliny dimethylcyklopropankarboxylové), jsou 10-100krát více toxické pro mouchu domácí než ty s konfigurací R. Podobné vlastnosti byly pozorovány také u fluvalinátu. Pokud se zaměříme na toxicitu insekticidů, které mají chirální uhlík na kyanidové funkční skupině, jež je umístěna na alkoholové polovině (např. fenvalerát nebo cypermethrin), můžeme konstatovat, že je toxicita ovlivněna konfigurací tohoto chirálního uhlíku. Látka s konfigurací S bývá pro mouchu domácí mnohem toxičtější než látka s R konfigurací. Obecně bývají cis isomery značně toxičtější než trans isomery [6, 7].

V mnoha případech obsahuje přípravek jen aktivní enantiomer, např. cypermethrin, jehož insekticidní aktivita náleží pouze enantiomerům 1R, cis,  $\alpha$ S a 1R, trans,  $\alpha$ S. U dalších šesti isomerů bylo prokázáno, že jsou inaktivní. Kromě toho, že dvou aktivních isomerů je cis více perzistentní v půdě než trans isomer. Použití racemické směsi není vhodné, neboť jsou do životního prostředí aplikovány neúčinné isomery. Tím roste spotřeba množství přípravku v porovnání s použitím opticky čistého přípravku. Preparáty vyrobené ze samostatného isomeru (např. deltamethrin) budou nejspíš mnohem účinnější než ty se čtyřmi nebo osmi isomery [6].

### 3.7 Chemické vlastnosti

Základem struktury pyrethroidů je esterově spojená alkoholová a kyselinová část. Změnou substituentů dochází také ke změnám insekticidní síly, aktivity a toxicity vůči savcům a ostatním organismům. Tyto halogenované, lipofilní a fotostabilní sloučeniny se vyznačují výjimečnou aktivitou proti mnoha druhům hmyzu. Ačkoliv jsou relativně bezpečné pro ptáky a savce, pro ryby jsou velmi toxické. S ohledem na log  $K_{ow}$  pyrethroidů můžeme konstatovat,

že syntetické pyrethroidy jsou ve vodě málo rozpustné, ale v organických rozpouštědlech a lipidech se dobře rozpouštějí. Pro tyto látky je typické, že se v přírodě sorbují na půdní částice. Rovněž se uvádí, že se pyrethroidy sorbují na povrch skleněných nádob, které jsou použity při manipulaci s těmito látkami během analýzy [1,2,13].

### 3.8 Použití

Pyrethroidy jsou používány především pro hubení hmyzích škůdců v domácnostech a zemědělství. Dále jsou aplikovány v průmyslu a ve veterinární medicíně. Pro jejich použití je vhodné severské podnebí, neboť toxicita těchto látek je vyšší při nízkých teplotách. Syntetické pyrethroidy se používají na hubení široké škály ektoparazitů sídlících nejen na velkých, ale také na malých zvířatech. Přípravky na bázi pyrethroidů se používají v různých formách. Nejčastěji se jedná o různé spreje, prášky, šampony, koupele nebo aerosoly. Allethrin je součástí malých papírových proužků, které se používají v uzavřených prostorech. Pyrethroidy permethrin a d-phenothrin byly použity ve válce v Perském zálivu, kdy bylo těmito látkami postříkované vojenské oblečení, aby odpuzovaly a zabíjely otravné mouchy a komáry. Permethrin byl na některých místech používán k léčbě proti vším a svrabu u člověka [9,16].

### 3.9 Toxikologie

Mechanismus účinku pyrethroidů je velmi složitý, obzvláště v případě, jsou-li použity v kombinaci s piperonyl butoxidem nebo s jinými insekticidy. Tyto látky inhibují metabolismus pyrethroidů v těle hmyzu. Hlavním cílovým místem všech pyrethroidů jsou sodíkové kanálky v nervové membráně [16].

#### 3.9.1 Charakteristiky biologické aktivity

Působení pyrethroidů se vyznačuje rychlým tzv. „knock-down“ efektem. Jakmile je hmyz zasažen insekticidem, je velmi rychle paralyzován a není schopen dále létat. Hmyz pak na následky intoxikace umírá. Za další přednosti těchto insekticidů můžeme považovat jejich nízkou toxicitu proti savcům, snadný rozklad v životním prostředí a vysokou účinnost proti hmyzu v kombinaci s jinými insekticidy. Vzhledem k těmto vlastnostem jsou některé pyrethroidy vhodné pro domácnost a jiné naopak pro zemědělství. Pyrethroidy, které disponují lepší chemickou stabilitou vůči světlu a vzdušné vlhkosti, jsou používány také jako agrochemikálie [10,11].

Pyrethroidy atakující centrální nervový systém jsou u savců metabolizovány a vylučovány dříve než stihnou zasáhnout nervový systém. Proto jsou málo toxické pro savce i člověka. Naproti tomu u hmyzu způsobují rozrušení a okamžitou paralýzu. Výsledkem intoxikace bývá smrt. Velkým nedostatkem těchto látek je jejich toxicita pro ryby a necílové vodní organismy, ale také pro včely [11].

#### 3.9.2 Ovlivnění sodíkových kanálků

Nervové buňky přijímají, vedou a předávají signály. Je-li neuron stimulován signálem, dochází k depolarizaci plazmatické membrány. Depolarizace vyvolá vlnu elektrického vzruchu označovanou jako akční potenciál. Ten vzniká souhrou napěťově řízených iontových kanálků. Když se otevřou sodíkové kanálky, začnou do axonu proudit sodné ionty a membrána se depolarizuje. Jakmile se depolarizace membrány dostane k maximu, dojde k inaktivaci sodíkových kanálků a sodné ionty přestanou proudit dovnitř. Sodíkové kanálky jsou právě primárním cílem působení pyrethroidů, které prodlužují otevření sodíkových kanálků. Pyrethroidy působí na axony v nervovém systému, interagují se sodíkovými kanálky

a ovlivňují přenos elektrického impulsu. To stimuluje nervové buňky a vytváří několik nervových šoků, jejichž výsledkem je celkové ochrnutí hmyzu [8,11].

Vyskytuje se zde určitá stereospecifita účinku, neboť některé isomery jsou mnohem toxickejší. Obvykle jsou cis isomery toxickejší než trans isomery. V článku od Anadóna a spol. [11] je uvedeno, že 1R a 1S cis isomery se k jednomu místu váží kompetitivně, zatímco k jinému místu se 1R a 1S trans isomery váží nekompetitivně. U savců bývá 1R isomer aktivní a 1S inaktivní. Tím se 1S isomer stává netoxický [11].

Pyrethroidy typu II výrazně zpoždují inaktivaci sodíkových kanálků oproti pyrethroidům typu I. Prodlužuje se doba, kdy jsou sodíkové kanálky otevřené, a následkem toho dochází k depolarizaci membrány. Tyto rozdíly v prodlužování otevření sodíkových kanálků nejspíš přispívají k odlišnostem v toxických účincích pyrethroidů typu I a II. Podmínky hyperexcitovatelnosti přetrvávají do doby, než jsou pyrethroidy odstraněny. Poté se kanálky vrátí do normálního stavu. Některé kanálky však zůstanou nezměněny a fungují bez vlivu pyrethroidů. Sodíkové kanálky se vyskytují v několika různých formách, které jsou také různě ovlivňovány působením pyrethroidů [9,10].

### 3.9.3 Ovlivnění chloridových kanálků

Chloridové kanálky se nacházejí v mozku, nervech, svalech a slinných žlázách. Tyto kanálky jsou regulovány protein kinázou C, která ovládá buněčnou excitovatelnost. Od sodíkových kanálků se liší v různých funkcích. Některé kanálky, které jsou citlivé na pyrethroidy, se řadí k tzv. maxi chloridovým kanálkům. Tyto kanálky jsou aktivovány depolarizací, mají vysokou konduktanci a jsou nezávislé na vápníku [11].

### 3.9.4 Způsob intoxikace

Nejčastější způsob intoxikace je umožněn dermální absorpcí, avšak vyskytují se také případy orální a inhalační depozice. Poločas života pyrethroidů v krvi je v rozmezí od 19 minut po 10 hodin, obvykle však trvá několik hodin. Dermální toxicita pyrethroidů je omezena jejich nízkou absorpcí a metabolickou destrukcí v kůži během absorpce [11,12].

Toxická síla pyrethrinů a pyrethroidů může být vysoká, intravenózně  $LD_{50}$  0,5 až  $>250 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , což je limitováno detoxikací v kůži, krvi a játrech. U člověka je biologická dostupnost pyrethroidů kožní absorpcí přibližně 1% v porovnání s 36% při žaludeční absorpci. Proto kožní expozice představuje relativně malé nebezpečí systémové otravy [9].

### 3.9.5 Vylučování

Pyrethroidy jsou přítomny ve tkáních s vysokým obsahem lipidů, např. v nervové tkáni. Tyto insekticidy se pomalu vylučují, a proto se mohou v těle kumulovat v tukové tkáni. U savců se jejich metabolity vylučují během několika dnů prostřednictvím moči a výkalů. Pro permethrin se udává, že vylučování trans isomeru probíhá rychleji než eliminace cis isomeru. Hlavní cesta, jakou u savců probíhá detoxikace pyrethroidů, je hydrolyza. Pyrethroidy jako permethrin, cypermethrin a deltamethrin jsou metabolizovány karboxylesterázou [11,12].

## 3.10 Vývoj a budoucnost chemie pyrethroidů

Počátky chemie, která se zabývá studiem pyrethroidů, se datují asi od roku 1910. Do dnešní doby prošla dvěma periodami vývoje. V první periodě bylo hlavním cílem objasnění chemické struktury přírodních pyrethrinů. Naproti tomu druhá perioda byla věnována vývoji jejich derivátů – syntetických pyrethroidů. Současné trendy lze řadit do třetí

periody vývoje. Dnes se hledají především takové látky, které by byly méně toxické pro necílové vodní organismy a ryby [13].

### 3.10.1 Studium přírodních pyretrínů

Y. Fujitani [13,39] separoval insekticidně aktivní sirupovitý ester z kopretin, který nazval „pyrethron“. R. Yamamoto [13,40,41] poté podrobil hydrolytické produkty pyrethronu oxidaci ozonem a izoloval kyselinu trans-karonovou a aldehyd; v roce 1923 poprvé potvrdil existenci cyklopropanového kruhu v molekulách přírodních pyretrínů. O rok později pak H. Staudinger a L. Růžička navrhli strukturu pyretrinu I a II [13,42]. Roku 1945 zjistili LaForge a Barthel, že se přírodní pyretriny skládají ze čtyř homologů – pyretrínů I a II a cinerinů I a II a stanovili jejich planární strukturu [13,43]. Později pak bylo zjištěno, že přírodní pyretriny obsahují celkem šest sloučenin, které se skládají z kyselinové a alkoholové části [13].

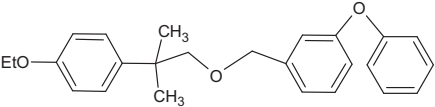
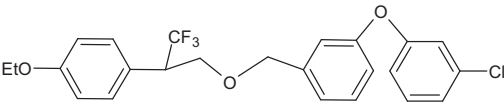
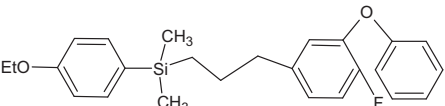
### 3.10.2 Vývoj syntetických pyretroidů

Některé pyretroidy vznikly tak, že byla zachována jejich kyselinová část (kyselina chryzantémová) a alkoholová část byla postupně obměňována. Tímto výzkumem se zabývali především vědci v Japonsku, UK a USA. Několik struktur vycházelo z přírodního pyrethrinu I, čímž vznikly pyrethroidy jako např. benathrin, japothrin, furamethrin nebo resmethrin. Tyto pyrethroidy byly používány hlavně k hubení škůdců v domácnostech [13].

Naopak další skupinu tvoří pyrethroidy, které vznikly modifikací kyselinové části, popřípadě esterové vazby. Do této skupiny se řadí pyrethroidy, kterým zůstala stabilní phenoxybenzyllová skupina jako alkoholová část a kyselinová část byla podrobně zkoumána. Permethrin a fenvalerát byly využívány především pro zemědělské účely, neboť se vyznačují dobrou chemickou stabilitou [13].

Další sloučeniny vznikly v 80. letech 19. století nahrazením esterové vazby jinou vazbou. Tyto látky se od původních pyrethrinů liší svou strukturou, a proto nepatří mezi klasické syntetické pyrethroidy. Patří sem sloučeniny jako například etofenprox, flufenprox nebo silafluofen. Silafluofen obsahuje ve své struktuře atom křemíku. Tato látka byla popsána a následně publikována v různých zemích téměř současně a je označována za látku, která je méně toxická pro ryby než klasické pyrethroidy [13].

**Tabulka 3: Nové látky podobající se pyrethroidům [13]**

Název	Chemická struktura	Sumární vzorec	Molekulová hmotnost (g·mol <sup>-1</sup> )
Etofenprox		C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	338,6
Flufenprox		C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>2</sub>	275,4
Silafluofen		C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	354,4

### 3.10.3 Vývoj do budoucna

Vzhledem k prokázané vysoké toxicitě pyrethroidů vůči rybám je jejich použití v okolí vodních systémů značně omezeno. Mají-li lidé doma akvárium, měli by dávat pozor při aplikaci těchto látek v uzavřených místnostech. Také v blízkosti rybníků nebo jiných vodních ekosystémů by se mělo dbát zvýšené opatrnosti při zacházení s pyrethroidy [13].

Silafluofen by mohl tento problém vyřešit, neboť se vyznačuje vysokou insekticidní aktivitou, nízkou toxicitou pro savce, vysokou chemickou stabilitou na světle, stabilitou vůči pH a jiným vlivům. Hlavními významnými vlastnostmi této sloučeniny jsou její nízká toxicita pro ryby a její působení jako kontaktní jed. Díky těmto vlastnostem se tato látka výrazně odlišuje od klasických pyrethroidů [13].

V Japonsku je toxická síla chemických látek, které negativně působí na ryby, rozdělena do tříd A, B a C. Třída C se vyznačuje vysokým toxickým účinkem pro ryby. Právě do této třídy jsou zařazeny také pyrethroidy. Naproti tomu třída A vykazuje nízkou toxicitu a patří sem již zmiňovaný silafluofen. Příčina nízké toxicity silafluofenu vůči rybám je však stále nejasná, a proto je zapotřebí provádět další studie, které by tuto nejasnost mohly vysvětlit [13].

### 3.11 Osud pyrethroidů v životním prostředí

Obecně syntetické látky vstupují do životního prostředí a stávají se zde součástí abiotických a biotických složek prostředí. Tyto látky pak znečišťují životní prostředí, rozkládají se v něm na různé degradační produkty, přeměňují se na metabolity a představují také určitou hrozbu pro lidské zdraví. Některé pyrethroidy jsou také považovány za možné mutageny [2, 15].

Pyrethroidy se do složek životního prostředí mohou dostat různými cestami. Závisí to především na tom, kde jsou přípravky na bázi pyrethroidů použity. V zemědělství jsou používány na ochranu rostlin proti škůdcům, ve veterinární medicíně na ochranu zvířat, dále jsou aplikovány v různých skladech nebo domácnostech. Po jejich aplikaci mohou být transportovány do povrchových vod, například splachováním z přívalových dešťů, popřípadě suchou nebo mokrou depozicí, a uvolňovány tak do spodních vod. Také při koupání zvířat, která byla ošetřena přípravkem obsahujícím pyrethroidy, se mohou dostat do vodního ekosystému. Do vodního ekosystému se kromě toho dostávají vymýváním z půdních částic, na které se pyrethroidy silně sorbují. Tyto částice jsou pak větrem, popřípadě vodou, transportovány do povrchových vod. Zde se částice usazují a stávají se součástí sedimentů. Sedimenty pak mohou být zvířeny a částice s nesorbovanými pyrethroidy transportovány na jiné místo. Ve vodním recipientu pak tyto látky působí toxicky na vodní organismy a ryby [2].

Do odpadních vod se pyrethroidy mohou dostat po aplikaci na kukuřici, bavlnu, rýži nebo zeleninu, popřípadě z výrobních provozů a distribučních center [11].

Pyrethroidy jsou toxické pro členovce a působí také na ryby, vodní hmyz a korýše. Vysoce citlivé na působení pyrethroidů mohou být nejen některé hmyzí druhy, ale také užiteční dravci a paraziti [11].

#### 3.11.1 Přetrvávání některých pyrethroidů v životním prostředí

Pyrethroidy nepřetrvávají v životním prostředí obvykle dlouhou dobu. Rychle podléhají hydrolýze a fotolýze. Dostanou-li se do půdy a sedimentů, podléhají mikrobiální degradaci. V některých literárních zdrojích se uvádějí poločasy života některých pyrethroidů. Například pro cyhalothrin se udává, že se pomalu hydrolyzuje na slunečním světle při pH 7-9 a je-li pH >9, probíhá hydrolýza rychleji. Hodnota poločasu života cyhalothrinu v půdě je asi 4-12

týdnů. Pro cypermethrin se uvádí poločas života v povrchové vodě asi 5 dní a v půdě 30 dní. Co se týká hydrolyzy deltamethrinu, uvádí se, že je mnohem stabilnější v kyselém než v bazickém prostředí s  $t_{1/2} = 2,5$  d při pH 9 a 25 °C. V povrchových vodách je jeho poločas života 2-4 dny, zatímco v půdě podléhá mikrobiální degradaci během 1-2 týdnů. Fenprothrin má poločas rozpadu v říční vodě 2,7 týdnů a rozpadá se v alkalickém prostředí. V půdě přetrvává asi 1-5 dní. Poločas rozpadu fenvalerátu se pohybuje mezi 2 až 6 dny ve sladké vodě, 27 až 34 dny v mořské vodě, asi 6 týdnů v sedimentech u ústí a 3 až 9 týdnů v půdách [2,14].

### 3.11.2 Fotodegradace

Pyrethroidy mohou být degradovány několika možnými procesy, jako např. fotodegradací, biodegradací, popřípadě hydrolyzou. Fotolýza je nejčastější způsob, jakým degradace probíhá, a je rychlejší než biodegradace nebo hydrolyza [15].

Ve svém článku Liu a spol. [15] simulovali přírodní podmínky při procesu fotodegradace a snažili se popsat reakční mechanismus. Rovněž zjistili, že degradační procesy probíhají podle kinetiky prvního řádu. Studii prováděli na dvou syntetických pyrethroidech, deltamethrinu a fenvalerátu. Studovali vliv počáteční koncentrace, světelné intenzity a rozpouštědla na fotodegradaci pyrethroidů. Dále se zabývali účinkem v přírodě běžně se vyskytujících látek na rychlost degradačního procesu. Mezi tyto sloučeniny patří především dusičnan sodný, chlorid sodný, peroxid vodíku a L-glutamová kyselina.

Ve svém experimentu použili jako zdroj UV záření rtuťovou výbojku a jako zdroj slunečního světla xenonovou výbojku. Rtuťová výbojka emituje ultrafialové světlo pod vlnovou délkou 300 nm s vysokým energetickým výkonem, čímž zesiluje fotolýzu. Xenonová výbojka však poskytuje záření s delší vlnovou délkou, nižší světelnou intenzitou a energií. Degradační rychlost pyrethroidů proto byla rychlejší při ozáření rtuťovou výbojkou než při ozáření xenonovou výbojkou [15].

Tito autoři publikované studie také zkoumali účinek použitého rozpouštědla na fotodegradaci. Jako zdroj záření v tomto pokusu použili rtuťovou výbojku. Zjistili, že degradace pyrethroidů v n-hexanu trvá asi 3 minuty, zatímco ve směsi methanol/voda (50:50) 15 minut. Rychlejší degradace se proto dosáhne v nepolárním organickém rozpouštědle, v porovnání s rozpouštědlem polárním [15].

Dále sledovali vliv senzibilizátorů na proces degradace. Pyrethroidy neabsorbují sluneční světlo, které dosahuje vlnové délky větší než 290 nm. Světlo, které má vlnovou délku nad 300 nm, nemůže rozštěpit chemickou vazbu v molekulách pyrethroidů. Aby mohly být pyrethroidy degradovány viditelným světlem, přidávají se k nim senzibilizátory, které produkují hydroxylové radikály HO·. Tyto radikály podporují degradaci pyrethroidů a urychlují fotolýzu [15].

## 4 PŘÍRODNÍ PYRETHRINY

Pyrethroidy jsou náhražkou přírodních pyrethrinů. Přírodní pyrethriny jsou extrakty, které se získávají vyluhováním suchých hlaviček chryzantém, např. *Chrysanthemum cinerariaefolium* (chryzantéma dalmatská), *Chrysanthemum coccineum* (chryzantéma perská). Tyto květiny se řadí do rodu *Chrysanthemum*. Bývají také nazývány jako kopretiny nebo řimbaby a jsou rozdělovány do dvou skupin. První skupina chryzantém je pěstována především jako zdroj insekticidně aktivních toxinů. Chryzantémy, které se řadí do druhé skupiny, však slouží pouze pro okrasné účely, neboť ve svých květech neobsahují insekticidně aktivní látky. Chryzantémy používané pro insekticidní účely jsou především pěstovány v Keni a obsahují šest toxinů: pyrethrin I a II, jasmolin I a II a cinerin I a II. Tyto látky jsou velmi rychle degradovány na světle. Další jejich vlastností je nízká toxicita pro savce a ptáky. Struktury jednotlivých toxinů, které jsou obsaženy v květech kopretin, jsou naznačeny v tabulce č. 4 [1,2,9,11].



**Obrázek 2:** *Chryzantéma dalmatská*[45]

Rostlina *Chrysanthemum cinerariaefolium* se řadí do řádu Hvězdícotvaré (*Asterales*), čeledi označované pod názvem *Compositae* (Složnokvěté) [44].

Kopretiny dorůstají do výšky přibližně 50 – 60 cm. Obsah pyrethrinů v suchých květech bývá v rozmezí od 0,5 do 2 %. Podle Kiriमितiho a spol. [17] je největší obsah pyrethrinů v semenech květin. Květy kopretin se sklízí krátce po jejich vykvetení. Po sklizni jsou květy důkladně vysušeny. Suché květy jsou následně rozemlety a extrahovány organickými rozpouštědly. Tímto procesem se získá požadovaný extrakt nebo esenciální oleje. Extrakt však obsahuje určité množství nežádoucích příměsí, které se dále odstraňují. Hlavním cílem extrakce je získání světle zbarveného produktu s vysokým obsahem aktivních složek. Neaktivnějšími složkami

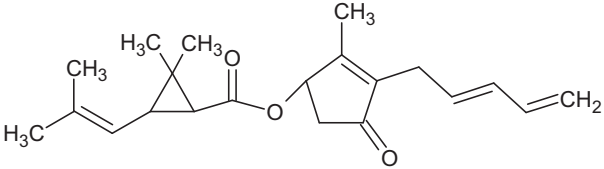
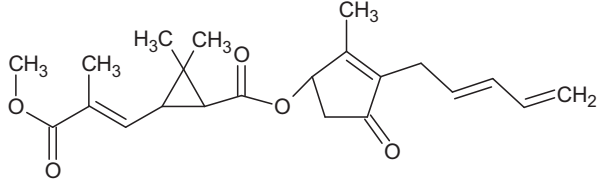
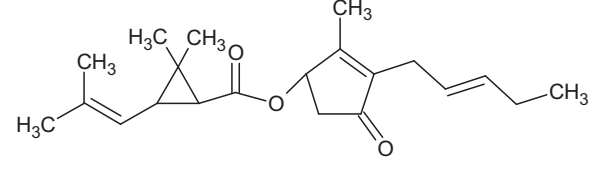
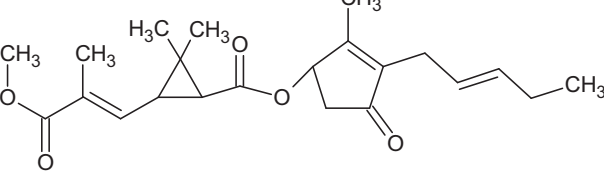
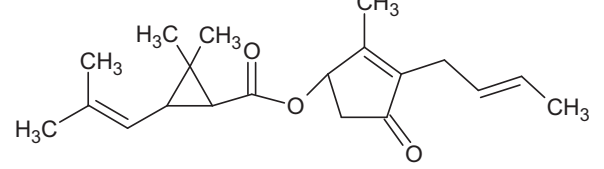
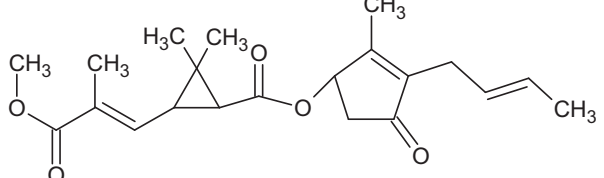
získaného extraktu jsou pyrethrin I a pyrethrin II. Pyrethrin I působí na škůdce během několika minut, zatímco pyrethrin II během několika sekund. Pyrethrin II je však hmyzem snadno metabolizován a během pár hodin je hmyz opět v pořádku. Proto je žádoucí, aby se tyto dvě látky používaly v kombinaci [13,17].

Původní domovinou rostliny *Chrysanthemum cinerariaefolium* je Dalmácie. Je to oblast bývalé Jugoslávie na pobřeží Jaderského moře. Říká se, že kopretiny byly poprvé objeveny v roce 1694. Obyvatelé této oblasti však zvláštní účinky těchto rostlin poznali pravděpodobně již dříve a používali je ve formě prášku pro insekticidní použití. Jejich insekticidní aktivita pak byla ověřena roku 1840 [13].

V USA byly kopretiny představeny po roce 1860 a v Japonsku až roku 1885. Postupně se pěstování kopretin dále rozšiřovalo. V roce 1898 se začalo s vyvážením suchých květin z Japonska. V roce 1938 pak produkce těchto květin v Japonsku dosáhla vrcholu. V tomto státě vyprodukovali přibližně 13 000 tun za rok. Po druhé světové válce však produkce kopretin klesla až na 1 000 tun za rok, protože produkce plodin a potravin byla v té době mnohem důležitější a potřebnější. Z tohoto důvodu předstihly státy jako Keňa a Tanzanie

Japonsko, které bylo do té doby hlavním producentem kopretin. Tyto dva státy disponovaly vhodnými klimatickými podmínkami pro pěstování kopretin a byly také státem podporovány. V současné době jsou africké státy Keňa, Tanzanie a Rwanda hlavními producenty kopretin. Mezi další důležité producenty lze zahrnout také Tasmánii a Papuu Novou Guineu [13].

**Tabulka 4:** *Toxiny obsažené v chryzantémách [13]*

Název	Chemická struktura	Sumární vzorec	Molekulová hmotnost (g/mol)
Pyrethrin I		$C_{21}H_{28}O_3$	328,5
Pyrethrin II		$C_{22}H_{28}O_5$	372,5
Jasmolin I		$C_{21}H_{30}O_3$	330,5
Jasmolin II		$C_{22}H_{30}O_5$	374,5
Cinerin I		$C_{20}H_{28}O_3$	316,4
Cinerin II		$C_{21}H_{28}O_5$	360,4

#### 4.1 Extrakce pyrethrinů z kopretin

Ve svých experimentech se Otterbach a spol. [16] zabývali extrakcí přírodních pyrethrinů z květin. Pro srovnání použili tři různé extrakční metody: Soxhletovu extrakci, extrakci ultrazvukem a superkritickou fluidní extrakci. Komerčně jsou květy extrahovány superkritickou fluidní extrakcí nebo extrakcí rozpouštědlem, např. metanolem, acetonem nebo petroletherem. Při použití extrakce rozpouštědlem se rostlinná hmota, která se již dále nezpracovává, odstraní filtrací a zbytek je použit pro další zpracování. Během čištění se ze surové pryskyřice odstraní nežádoucí složky, jako pigmenty, rostlinné vosky nebo oleje.

Ve svém experimentu autoři použili isopropanol pro Soxhletovu a ultrazvukovou extrakci a oxid uhličitý pro superkritickou fluidní extrakci. Všechny metody se za daných podmínek vyznačovaly dobrými výtěžnostmi. Superkritická fluidní extrakce byla značně rychlejší než zbylé metody. Tuto skutečnost autoři připisují vyššímu tlaku a teplotě a fyzikálním vlastnostem superkritické tekutiny [16].

Vlivem tlaku, teploty a velikosti částic na účinnost extrakce a kvalitu získaného extraktu se zabývali další autoři, kteří své výsledky publikovali [17]. Došli k závěru, že při vyšším tlaku je extrakce účinnější. Při nižší teplotě získávali extrakty s větším množstvím pyrethrinů a menším obsahem nežádoucích příměsí. Co se týče velikosti částic, zjistili, že částice menší jak 0,2 mm obsahují především nežádoucí příměsí a částice větší jak 0,9 mm mají nízký obsah pyrethrinů. Střední velikost částic obsahovala semena, a proto vykazovala vyšší obsah pyrethrinů.

## 5 STANOVENÍ PYRETHROIDŮ

Pyrethroidy se v životním prostředí vyskytují nejen ve vodě, ale také v půdě nebo sedimentech; mohou však být detekovány také ve vzduchu nebo v prachu nacházejícím se ve vnitřních prostorech. V této práci jsme se soustředili především na výskyt a stanovení pyrethroidů ve vodných matricích.

### 5.1 Vzorkování vod

Voda je heterogenní složka životního prostředí. Tento systém je heterogenní jak v prostoru, tak v čase, a proto je velmi obtížné získat reprezentativní vzorek vody. Každý vzorek by měl být odebrán vhodnou metodou, měl by reprezentovat místo a dobu odběru, a měl by být vhodně uchován a přepraven do laboratoře, v níž bude provedena analýza. Je vhodné odebrat buď směsný vzorek, čímž získáme průměrnou hodnotu, nebo více vzorků z několika míst, čímž získáme informace o rozložení analytu v celém objemu [18].

Vzorkujeme-li tekoucí vodu, musíme počítat s přítomností suspendovaných částic. Je lepší, odebrat vzorek ze středu toku, neboť při březích hrozí odebrání velkého množství zvířených částic. U stojatých vod musíme pamatovat na to, že zde dochází k výškové stratifikaci. Obvykle se vzorek odebírá z větší hloubky, kterou je nutné zaznamenat do protokolu o odběru. Vzorky podzemní vody se odebírají ze studní nebo z vrtů. Sledované insekticidy se do podzemních vod nedostávají, neboť se silně sorbují na půdní částice [18].

Osoba, která odebírá vzorek, musí odebraný vzorek řádně označit a vyplnit protokol o jeho odběru. Záznam obsahuje základní popis vzorku, jako je účel odběru vzorku, typ a druh vzorku, způsob odběru, místo odběru a jeho bližší popis, den a čas odběru, označení vzorkovnice, teplota vody a vzduchu při odběru, hodnota průtoku nebo vodní stav [19].

Způsob odebrání vzorku závisí na tom, zdali se jedná o vodu stojatou či tekoucí. Podle druhu odebírané vody se pak volí vhodné vzorkovače. Rozlišují se vzorkovače automatické nebo manuální. Automatické vzorkovače se používají k odebrání vzorků tekoucích vod v časových intervalech, popřípadě v závislosti na průtoku vody. Manuální vzorkovače jsou nádoby o určitém objemu, které jsou opatřeny uzavíracím mechanismem. Tyto vzorkovače jsou vhodné pro vzorkování stojatých vod, např. rybníků nebo jezer [19].

Abaseer a spol. [20] se zmiňují o vlivu kyselosti vzorku na stabilitu pyrethroidů. Udávají, že stabilita pyrethroidů se zvýšila při pH 4 a snížila při pH 8. Neokyselené vzorky je možno uchovávat 5 dní bez jakéhokoli ovlivnění spolehlivosti výsledků.

### 5.2 Příprava a úprava vzorku

Příprava a úprava vzorku jsou časově náročné a velmi pracné části celé analýzy vzorku. Během tohoto postupu dochází k odstranění balastních látek z matrice a k zakoncentrování analytu. Obvykle se používají různé extrakční techniky, což jsou dělicí metody založené na distribuci složky mezi dvě fáze. Kapalné vzorky se nejčastěji upravují pomocí extrakce z kapaliny do kapaliny nebo extrakce tuhou fází. V dnešní době se pro stanovení pyrethroidů ve vodných matricích hojně využívá novějších extrakčních technik, jakými jsou mikroextrakce tuhou fází nebo extrakce na magnetické míchadlo. Předností využití nových technik je možnost použití menšího množství vzorku a redukce ztrát analytu [19].

Pokud stanovujeme pyrethroidy v půdách či sedimentech, využívá se extrakce ultrazvukem a mikrovlnná extrakce [20].

### 5.2.1 Extrakce kapalina-kapalina (LLE)

Principem této metody je distribuce analytu mezi dvě vzájemně nemísitelné kapaliny (rozpouštědla), v nichž má analyt různou rozpustnost. Platí pravidlo: „Podobné v podobném se rozpouští“. Znamená to, že když extrahujeme nepolární látky z vody, použijeme nepolární nebo málo polární rozpouštědla a naopak. Výhodou této metody je široká škála použitých rozpouštědel a využití levného aparátu. Extrakce z kapaliny do kapaliny se provádí v dělicích nálevkách. Přechod analyzované sloučeniny z vody do organického rozpouštědla je zajišťován a urychlován třepáním jejich směsi. Velkou nevýhodou LLE je použití velkého množství rozpouštědel a její časová náročnost [18].

### 5.2.2 Extrakce na tuhou fázi (SPE)

Tato technika je velmi účinná a spolehlivá, její hlavní předností je nízká spotřeba organických rozpouštědel, která znamenají zátěž pro životní prostředí. SPE je metoda vhodná pro středně těkavé až netěkavé sloučeniny. Při této úpravě vzorku se uplatňuje rovnovážná distribuce analytu mezi kapalinou a tuhou fází (sorbentem) [18].

Celý postup SPE se skládá z několika kroků. V prvním kroku je důležité vybrat vhodnou SPE kolonku nebo disk. Volba závisí jednak na typu fáze, ale také na množství sorbentu a velikosti kolonky nebo disku. Kondicionace kolonek znamená, že se sorbent před analýzou aktivuje vhodným rozpouštědlem nebo směsí rozpouštědel. Poté následuje dávkování vzorku, které by nemělo být rychlejší než 5 ml/min. Sorbent se zachyceným analytem se promyje stejným rozpouštědlem, které bylo obsaženo ve vzorku. Tím se odstraní rušivé vlivy. Následuje promytí eluentem, které má vyšší eluční sílu než původní rozpouštědlo, avšak nižší, než finální eluční rozpouštědlo. Pro vymývání analytu se použije vhodné rozpouštědlo, které odstraní stanovené sloučeniny ze sorbentu. Obecně se udává, že je lepší použít na vymytí analytu spíše dva menší objemy rozpouštědla než jeden velký. Získaný eluát se odpaří do sucha a přidá se malý objem rozpouštědla, v němž se analyt rozpustí a použije se k další analýze [21,22].

Při SPE se obvykle používají tři různé druhy sorbentů. Jedná se o normální fázi, reverzní (obrácenou) fázi a iontoměnič. Normální fáze má polární charakter, což znamená, že se přednostně budou sorbovat polární sloučeniny. Jako polární funkční skupiny jsou používány aminová nebo kyanidová skupina. Na reverzní fázi se naopak zadržují nepolární sloučeniny. Nepolárními funkčními skupinami jsou například oktadecyl, oktyl nebo methyl. Iontové výměnné sorbenty obsahují buď kationové nebo aniontové funkční skupiny. Kationově výměnná fáze bude extrahovat analyty s pozitivním nábojem a naopak. Nejčastěji se používají SPE kolonky C18 na bázi silikátů a kopolymer styren-divinyl benzenu [21,23].

SPE kolonka je obvykle z polypropylenu. Na jedné straně má široký vstupní otvor, kudy je přiváděn vzorek, a na druhé straně úzký konec. Uvnitř kolonky je umístěn sorpční materiál, který má hmotnost mezi 50 mg a 10 g a je umístěn mezi dvěma fritami, které jsou většinou z polyethylenu s velikostí pórů 20  $\mu\text{m}$ . Jako další lze použít disky s tloušťkou asi 0,5 mm a průměrem v rozmezí 47 až 70 mm. Disky jsou umístěny do filtračního zařízení a s použitím vakua je vzorek filtrován. Kolonky i disky mají své výhody i nevýhody. Např. použitím disků trvá filtrace 1 litru vzorku asi 10 minut, zatímco s použitím kolonky trvá extrakce asi 100 minut [21].

V publikované studii Gil-García a spol. [24] použili pro stanovení pyrethroidů ve vzorcích vody C18 kolonky, které aktivovali použitím methanolu, n-hexanu a Milli-Q vody. K eluci byl použit n-hexan. Výtěžnost popsaného postupu extrakce se pohybovala mezi 72-115 %.

SPE kolonky byly použity pro stanovení pyrethroidů také v další publikaci [25]. Pro kondicionaci kolonek zvolili kombinaci acetonu, methanolu a směsi methanol/voda.

Po nanesení vzorku byly SPE kolonky promyty směsí methanol/voda a analyty byly eluovány toluenem. Obsah pyrethroidů v získaném eluátu byl stanoven pomocí GC-ECD. Získané výtěžnosti byly dostačující; dále bylo ověřeno, že přidavek organického rozpouštědla ke vzorku vody (např. methanolu) zvýšil výtěžnost extrakce, a to díky potlačení adsorpce pyrethroidů na sklo [25].

### 5.2.3 Extrakce na magnetické míchadlo (SBSE)

SBSE je metoda, která obvykle nevyžaduje použití organických rozpouštědel. Tato extrakční technika byla vyvinuta v roce 1999. Používá se zde magnetické míchadlo, které je potaženo vrstvou polydimethylsiloxanu (PDMS). Míchadlo je po extrakci tepelně desorbováno v GC-MS nebo je použito malé množství organického rozpouštědla, které je pak nanášeno na LC kolonu. Tato metoda poskytuje nižší detekční limity a je časově méně náročná než SPME. V článku publikovaném Feo a spol. [35] je uvedeno, že SBSE poskytuje vysoké výtěžnosti a dobré detekční limity pro hydrofobní látky, jako jsou pyrethroidy [23, 35].

### 5.2.4 Mikroextrakce tuhou fází (SPME)

Poprvé byla SPME vyvinuta v roce 1989 Pawliszynem a jeho spolupracovníky [23]. Její předností je spojení vzorkování, extrakce a zakoncentrování vzorku vody. Tato technika nevyžaduje rozpouštědla ani složité aparatury. SPME metodu lze kombinovat jak s plynovou, tak s kapalinovou chromatografií. Hlavním cílem této metody je dosažení rovnovážného stavu, který závisí na koncentraci analytu ve vzorku a na typu a tloušťce polymeru na křemenném vláknu. Dobu extrakce určuje distribuční konstanta, která obvykle roste s rostoucí molekulovou hmotností a bodem varu. Těkavé látky se lépe sorbují na silnější vrstvu polymeru, zatímco středně těkavé vyžadují slabší vrstvu. Křemenné vlákno je pokryto materiálem, který se vyznačuje vysokou sorpční schopností [18, 23].

Provedení SPME je velmi jednoduché. Křemenné vlákno potažené sorbentem se umístí buď přímo do vzorku vody, nebo nad hladinu, kde je plynná fáze nasycena analytem. Po určité době, kdy se analyt nasorbuje na vlákno, se extrakce ukončí. Vlákno s analytem se umístí do plynového chromatografu, kde dojde k desorpci buď tepelné (GC) nebo pomocí rozpouštědla (HPLC) [26].

Parrilla Vázquez a spol. [27] spojili SPME s kapalinovou chromatografií s fluorescenční detekcí. Metoda, kterou použili pro stanovení insekticidů v povrchové vodě, byla selektivní, účinná a jednoduchá. Ve svém experimentu dosáhli velmi dobrých výtěžků.

Někteří autoři se zabývali také srovnáním jednotlivých extrakčních technik. Například v článku od Li a spol. [28] srovnávali mikroextrakci tuhou fází s extrakcí tuhou fází a s extrakcí z kapaliny do kapaliny, spojenou s extrakcí tuhou fází. Obsah pyrethroidů ve vzorcích stanovili pomocí metody GC-ECD. K jednotlivým vzorkům vody přidávali pufr o pH 4. Jako sorbety použili pro LLE/SPE Florisil, pro SPE C18 kolonky a pro SPME polydimethylsiloxan (PDMS). SPME poskytovala velmi dobré výsledky, které byly srovnatelné s LLE/SPE, avšak výtěžky SPE byly oproti ostatním technikám velmi malé. Také Fernandez-Alvarez a spol. [29] získali metodou SPME spojenou GC-ECD dobrých výtěžků.

## 5.3 Analýza

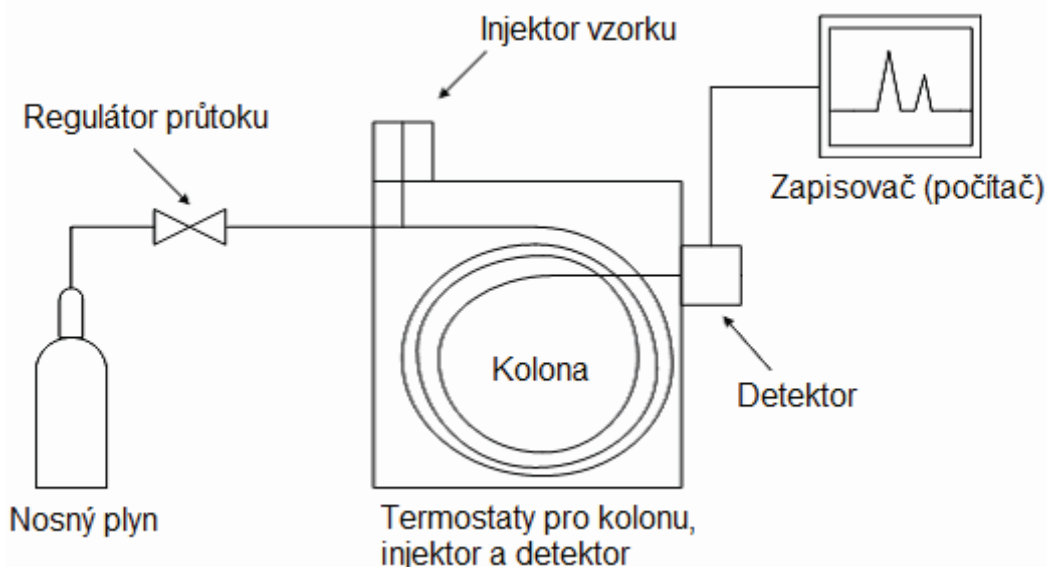
V dnešní době se k analýze organických látek používají velmi často separační techniky. Chromatografie je metoda, jejíž princip spočívá v ustavení rovnováhy složek mezi dvěma fázemi. Tyto fáze mají odlišné vlastnosti. Jedna z nich se nazývá stacionární (nepohyblivá) a druhá mobilní (pohyblivá). Během ustavování rovnováhy dochází k interakcím mezi analytem a mobilní fází, analytem a stacionární fází a mezi mobilní a stacionární fází.

### 5.3.1 Plynová chromatografie (GC)

Plynová chromatografie je analytická separační metoda, jejíž hlavní přednosti spočívají v rychlé a jednoduché analýze, malém množství vzorku potřebného pro analýzu a účinné separaci analyzovaných látek. Podle typu stacionární fáze se rozlišují dva druhy chromatografických technik. Je-li stacionární fází pevná látka, hovoří se o adsorpční plynové chromatografii. Distribuce analyzované látky spočívá v její adsorpci na povrch pevné látky. Pokud je však stacionární fází kapalina, jedná se o rozdělovací chromatografii [21]

#### 5.3.1.1 Plynový chromatograf

Plynový chromatograf je složen z několika částí. První část tvoří zásobník nosného plynu. Nosný plyn pouze transportuje analyzované složky kolonou a neinteraguje se složkami ani se stacionární fází. Obvykle se používají vodík, dusík nebo helium. Za zásobníkem následuje regulátor tlaku a průtoku. Obvykle se udržuje konstantní průtok a tlak je proměnnou veličinou; někdy se však nastavuje konstantní tlak a mění se jeho průtok. Analyt se do chromatografu nastříkuje pomocí injektoru. Jeho součástí je liner, v němž se vzorek vlivem vysoké teploty rychle odpaří a smíchá se s nosným plynem. Je zde umístěn také dělič toku, který umožňuje nástřik jen části vzorku. Pokud dávkujeme s děličem toku, jedná se o tzv. split dávkování. Dávkujeme-li bez děliče toku, použijeme tzv. splitless dávkování, které je vhodné především pro stopovou analýzu. Po nastříknutí vzorku do kolony nastává separace analyzovaného vzorku. V dnešní době se většinou používají kapilární kolony z křemenného skla potažené vrstvou polyimidu. Kolona je umístěna v termostatu, který se zahřívá podle předem nastaveného teplotního programu. Vhodným teplotním programem lze dosáhnout účinné separace jednotlivých složek. Za kolonou se nachází detektor, za nímž následuje počítač [30].



Obrázek 3: Zjednodušené schéma plynového chromatografu [31]

#### 5.3.1.2 Detektory

Pro detekci se v plynové chromatografii používá několik typů detektorů. Nejčastěji se jedná o tepelně vodivostní detektor (TCD), plamenově ionizační detektor (FID), detektor elektronového záchyty (ECD) a hmotnostní spektrometr (MS). Pro stanovení pyrethroidů se převážně používají ECD a MS. V mnoha člancích se udává, že ECD se vyznačuje velmi

dobrou selektivitou, zatímco MS je vhodný spíše pro identifikaci neznámých látek, neboť lze porovnat získané spektrum s knihovnou spekter.

#### 5.3.1.2.1 Detektor elektronového záchytu

Do plynové chromatografie byl ECD zaveden roku 1960. Tento detektor využívá schopnosti látek vytvořit negativní ion zachycením nízkoenergetického elektronu. Zdrojem elektronů je  $\beta$  zářič, obvykle se jedná o  $^{63}\text{Ni}$  s energií 67 eV. Detektor je tvořen malou komůrkou, jejíž vnitřní stěny jsou potaženy fólií s  $\beta$  zářičem. V komůrce jsou umístěny dvě sběrné elektrody a nachází se zde také výstup kolony [32].

Principem detekce je zachycování elektronů elektronegativními atomy, funkčními skupinami nebo molekulami. Nosný plyn je v detektoru ionizován  $\beta$ -zářením, čímž vznikají kationy nosného plynu a pomalé elektrony. Protéká-li pouze samotný nosný plyn, je ionizační proud konstantní. Když je plyn smíchán s analyzovanou složkou, která je schopna pohltit elektrony, dochází ke snížení proudu. Tento proud je detekován a vyhodnocován [32].

ECD detektor poskytuje odezvu na sloučeniny, které ve své struktuře obsahují atomy halogenů, fosforu, síry nebo dusíku. Kvůli selektivní citlivosti k halogenovaným sloučeninám je tento detektor vhodný pro stopovou analýzu pesticidů ve složkách životního prostředí [33].

#### 5.3.1.2.2 Hmotnostní spektrometr

Tento detektor je vhodný především pro identifikaci neznámých sloučenin a stanovení jejich struktur. Hmotnostní spektrometrie slouží k určení hmotností atomů, molekul a jejich částí po převedení na ionty [35].

Spektrometr se skládá z několika částí. První část tvoří iontový zdroj, který umožňuje převedení látky do ionizovaného stavu. Ionizační techniky se rozdělují na měkké a tvrdé. Měkké ionizační techniky se vyznačují malým přebytkem energie, která je dodána molekule, a nízkou pravděpodobností fragmentace. Pokud dodaná energie stačí na to, aby došlo k fragmentaci vzniklého iontu, hovoří se o tzv. tvrdých technikách. Ionizace se provádí například nárazem elektronů, kdy se ionty tvoří díky interakci analyzované látky s proudem urychlených elektronů, nebo chemickou ionizací, při níž je energie z proudu urychlených elektronů přenášena pomocí reakčního media [35].

Za iontovým zdrojem následuje hmotnostní analyzátor. V něm dojde k filtraci iontů podle poměru hmotnosti a náboje. Jako analyzátoři se často používají kvadrupol a iontová past. Kvadrupol je složen ze čtyř tyčí, které jsou napojeny na zdroj střídavého napětí. Ionty vlétnou do prostoru mezi tyčemi a začnou zde oscilovat. Ionty o určitém poměru hmotnosti a náboje projdou kvadrupolem a ostatní ionty se zachytí. Iontová past se skládá ze vstupní a výstupní elektrody a středové prstencové elektrody, na niž je přiváděno napětí s proměnnou amplitudou. Ionty se dostanou do iontové pasti, kde se pohybují po kruhových drahách. Jak roste amplituda napětí, dostávají se ionty s rostoucím poměrem hmotnosti a náboje z původní trajektorie a míří do detektoru. Pro detekci se používají násobičové detektory nebo detektory, které zaznamenávají elektrický proud, jež vzniká dopadem iontů [35].

Použití GC v kombinaci s negativní chemickou ionizací s detekcí MS vyzkoušeli Feo a spol. [36]. Při extrakci ultrazvukem byl jako extrakční činidlo použit chloroform. Touto metodou dosáhli vysokých výtěžností, obvykle kolem 80-100 %.

### 5.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Tato separační metoda se vyznačuje vysokou účinností, robustností a dobrou opakovatelností. Jako mobilní fáze je použita kapalina, která je umístěna v zásobní lahvi a je dodávána pomocí čerpadla. Analyzovaný vzorek se dávkuje na kolonu pomocí dávkovací

smyčky či automatického dávkovače. Kolona používaná v HPLC bývá obvykle trubice z nerez, v níž je umístěna stacionární fáze. Stejně jako u plynového chromatografu, je i zde za kolonou umístěn detektor, napojený na počítač. Rozlišuje se normální a reverzní HPLC. Co se týká normální HPLC, je stacionární fáze polárnější než mobilní. Pokud je však stacionární fáze méně polární než mobilní fáze, hovoří se o reverzní HPLC [34].

#### **5.3.2.1 Detektory**

Pro HPLC bylo vyvinuto několik detektorů, které se odlišují v konstrukci, funkci, selektivitě a citlivosti. Obvykle se používají spektrofotometrický detektor (UV-VIS), fluorescenční detektor, hmotnostní spektrometr nebo refraktometrický detektor. Pyrethroidy lze stanovit HPLC spojenou s fluorescenčním detektorem popřípadě s UV detektorem. Touto metodou se zabýval Kim a spol. [37]. Tito autoři se soustředili na stanovení deltamethrinu v krvi a v tkáních krysy. Deltamethrin nejprve vyextrahovali do acetonitrilu a extrakt dávkovali přímo na kolonu. Acetonitril použili díky tomu, že dobře rozpouští lipofilní sloučeniny. Do své metody nezahrnuli odpařování rozpouštědla. Během svého experimentu dosáhli vysoké výtěžnosti, dobré linearitě a přesnosti. V článku, který publikoval López-López a spol. [38], byla studována selektivita a vliv rušivých elementů na stanovení pyrethroidů. HPLC ve svém experimentu spojili s fluorescenční detekcí. Rušivé vlivy jsou příčinou několika systematických chyb. Ovlivňují strmost kalibrační křivky a tím také stanovení přesné koncentrace. Také přítomnost jiných pesticidů může ovlivnit selektivitu měření.

## 6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 6.1 Použité přístroje a zařízení

Plynový chromatograf Hewlett – Packard 6890 N Series II

- Automatický dávkovač HP 7683
- PTV inlet
- Nosný plyn vodík – vyvíječ vodíku Dominic Hunter 20 H Generator (Dominic Hunter, United Kingdom)
- Make-up plyn dusík
- Software: HP GC ChemStation Rev. A. 10. 01
- Dva <sup>63</sup>Ni mikro-detektory elektronového záchytu (μECD)
- Dvě paralelní kolony
  - Přední detektor: HF-8 (SGE, USA), 50 m x 0,22 mm i. d., tloušťka filmu stacionární fáze 0,25 μm, 8% phenyl polycarboran-siloxane
  - Zadní detektor: DB-17 MS (Agilent J&W, USA), 60 m x 0,25 mm i. d., tloušťka filmu stacionární fáze 0,25 μm, ( 50% phenyl)-methyl polysiloxane

Plynový chromatograf HP 6890 Series (pro SPME)

- Automatický dávkovač HP 6890
- Software: HP GC ChemStation Rev. A. 06. 01

Třepačka

Vakuová odparka (vše BÜCHI Laborortechnik AG, Švýcarsko)

- vodní lázeň Büchi Heating Bath B-490
- rotační vakuová odparka Büchi Rotavapor R-205
- elektronické řízení vakua Büchi Vac V-500

SPE zařízení

- Baker SPE – 12G
- Manifold 12 pozic (Supelco, Německo)

Sušárna

- ULE 500 (Memmert, Německo)

Analytické váhy

- SCALTEC SPB31 (Scaltec Instrument GmbH, Německo)

Přístroj pro sušení dusíkem

- EVATERM (LABICOM s.r.o., Česká republika)

Magnetická míchačka

- IKA – WERKE RTC basic

#### 6.1.1 Nastavení plynového chromatografu

HP 6890 Series II

- Injektor: nastříkovaný objem 2  $\mu\text{l}$
- Inlet: PTV program, Splitless mód  
teplotní program – počáteční teplota 90  $^{\circ}\text{C}$  po dobu 0,1 min; poté zahříváno po 720  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  na 350  $^{\circ}\text{C}$  a drženo 5 min; následně 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  na teplotu 220  $^{\circ}\text{C}$
- Kolona: konstantní průtok 1,1 ml/min
- Pec: teplotní program – počáteční teplota 100  $^{\circ}\text{C}$  po dobu 0 min, poté zahříváno po 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  na 310  $^{\circ}\text{C}$  a drženo 15 min; celková doba analýzy 36 minut
- Detektor: 300  $^{\circ}\text{C}$ , průtok dusíku 10 ml/min

#### HP 6890 Series

- Inlet: teplota 250  $^{\circ}\text{C}$
- Pec: teplotní program – počáteční teplota 100  $^{\circ}\text{C}$  držena 1 min, dále zahříváno po 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  na 300  $^{\circ}\text{C}$  a drženo 9 min; celková doba analýzy 30 minut

## 6.2 Chemikálie a standardy

Technické plyny: dusík 4.7 SIAD Czech spol. s r.o. Braňany u Mostu

Standardy:

- Pyrethroidy 2000 ng/ml v toluenu (acrinathrin (ACRI), bifenthrin (BIFE),  $\beta$ -cyfluthrin (CYFL),  $\lambda$ -cyhalothrin (CYHA), cypermethrin (CYPE), deltamethrin (DELTA), esfenvalerát (ESFE), fenprothrin (FENP), fenvalerát (FENV),  $\tau$ -fluvalinát (FLUV), permethrin (PERM), phenothrin (PHEN), resmethrin (RESM)) ; SIGMA ALDRICH (převzato z VŠCHT Praha)

Rozpouštědla:

- n-hexan – Merck (Německo)
- acetonitril – Lachema (Neratovice)
- methanol – J.T. Baker (Nizozemí)
- dichlormethan – J.T. Baker (Nizozemí)
- toluen – Lachema (Neratovice)
- ethylacetát – Merck (Německo)

Ostatní: bezvodý síran sodný, MiliQ voda, SPE kolonky ENVI 18 (6 ml, množství sorbentu 0,5 g a 1 g, Supelco), SPME vlákna 100  $\mu\text{m}$  PDMS, 65  $\mu\text{m}$  PDMS-DVB, 85  $\mu\text{m}$  PA (vše Supelco)

## 6.3 Použité nádoby

Vialky (1,6 ml, 4 ml, 8 ml, 12 ml), mikropipety, běžné laboratorní sklo.

## 6.4 Pracovní postup

### 6.4.1 Příprava směsných a kalibračních roztoků

Pro kalibraci byly připraveny směsné kalibrační roztoky o koncentracích 1, 5, 10, 50 a 100  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Pro optimalizaci metody byl připraven směsný pracovní roztok o koncentraci 153  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

#### **6.4.2 SPE**

Pro optimalizaci metody byla použita MiliQ voda. Nejprve bylo odebráno 300 µl směsného roztoku standardu, což odpovídalo 46 ng, a roztok byl odpařen do sucha. Poté byly pyrethroidy rozpuštěny v 1 ml MeOH/ACN (50:50). Pro extrakci byly použity SPE kolonky ENVI 18, které byly postupně kondicionovány 5 ml MeOH, 5 ml hexanu, 5 ml MeOH a 5 ml MiliQ vody. Pro eluci pyrethroidů bylo použito 10 ml směsi hexan/DCM (50:50) a hexan/DCM (80:20) a čistého ethylacetátu. Eluáty odpařeny do sucha a vzorek rozpuštěn v toluenu.

#### **6.4.3 LLE**

Pro tento postup bylo použito 200 ml vody, k níž byly přidány standardy pyrethroidů stejným způsobem jako při SPE. K připraveným vzorkům bylo přidáno vždy 50 ml organického rozpouštědla. Pro extrakci byly použity směsi hexan/DCM (50:50) a hexan/DCM (80:20) a ethylacetát. Pro porovnání byla část vzorků protřepána dvakrát a část třikrát, vždy po 15 minutách. Po extrakci byly roztoky odděleny v dělicí nálevce. Organická část byla vysušena bezvodým síranem sodným. Získané eluáty byly nejprve na vakuové odparce zahuštěny na menší objem a zbytek byl poté odpařen do sucha. Následně byl vzorek rozpuštěn v toluenu a analyzován.

#### **6.4.4 SPME**

Také v tomto případě byly ke vzorku vody přidány pyrethroidy stejným způsobem jako v předchozích postupech. Pro tuto metodu bylo použito 25 ml destilované vody. Pro extrakci byla použita tři různá vlákna: polydimethylsiloxan (PDMS), polydimethylsiloxan–divinylbenzen (PDMS–DVB) a polyakrylát (PA). Extrakce byla provedena dvěma různými způsoby: head space a ponořením vlákna do vzorku vody. Vzorek vody byl temperován 5 minut při teplotě 80°C. U všech vzorků dodrženy stejné podmínky, tj. 80°C, 20 minut sorpce a míchání na stupni 9.

## 7 VÝSLEDKY A DISKUZE

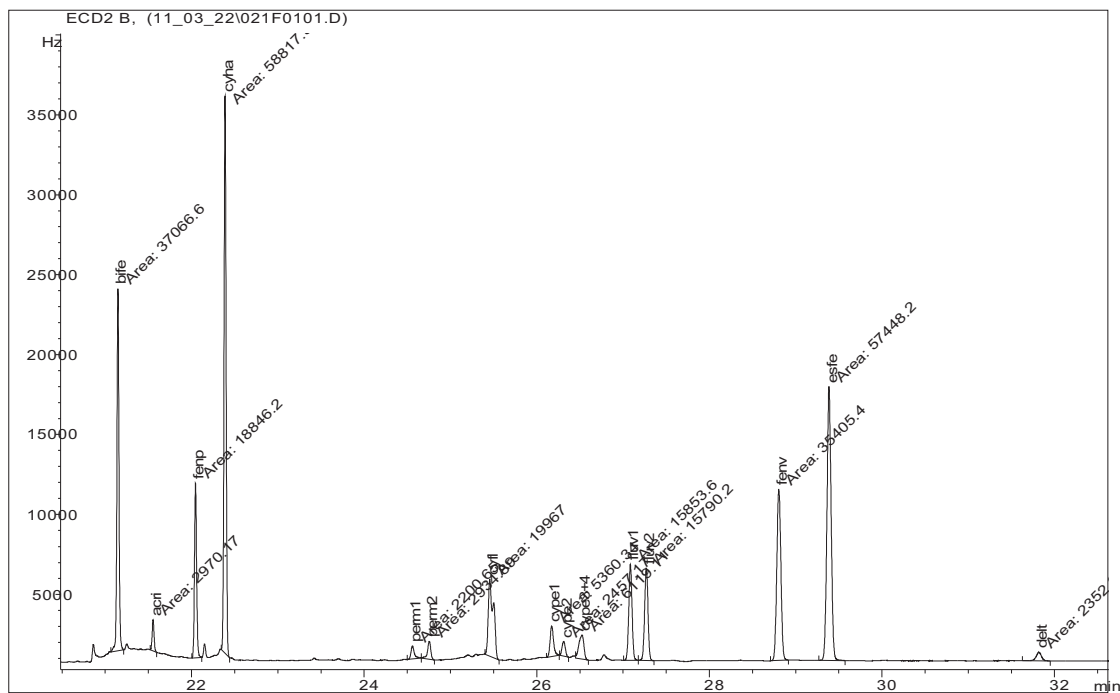
### 7.1 Kalibrace

V první fázi praktické části byly připraveny a následně proměřeny kalibrační roztoky (směsný standard, viz. 6.4.1) vybraných pyrethroidů. V tabulce č. 5 jsou shrnuty retenční časy jednotlivých látek a rovnice kalibračních přímk. Pro všechny analyty byly vypočteny limity detekce a kvantifikace používaného přístroje.

**Tabulka 5:** Retenční časy, limity detekce a kvantifikace používaného přístroje a rovnice kalibračních přímk vybraných pyrethroidů; LOD a LOQ byly určeny pro metodu plynové chromatografie, celkové limity celé metody budou záviset na množství extrahovaného vzorku vody.

Sloučenina	Retenční čas (min)	LOD (ng·ml <sup>-1</sup> )	LOQ (ng·ml <sup>-1</sup> )	Rovnice kalibrační přímk	R <sup>2</sup>
BIFE	21,159	0,2	0,6	Y = 339,9 X - 407,4	0,9985
ACRI	21,566	1,7	5,5	Y = 61,8 X - 201,2	0,9896
FENP	22,060	0,3	1,2	Y = 195,2 X - 375,0	0,9969
CYHA	22,402	0,2	0,7	Y = 640,9 X - 1738,0	0,9962
PERM1	24,581	2,5	8,3	Y = 65,9 X - 53,6	0,9979
PERM2	24,775	2,9	9,5	Y = 65,8 X - 57,9	0,9980
CYFL	25,475	1,4	4,8	Y = 219,1 X - 603,9	0,9963
CYPE1	26,189	3,7	12,4	Y = 174,1 X - 146,5	0,9977
CYPE2	26,335	3,6	11,8	Y = 174,7 X - 104,7	0,9974
CYPE3+4	26,548	3,6	11,8	Y = 175,2 X - 182,4	0,9976
FLUV1	27,103	0,9	3,1	Y = 358,0 X - 524,6	0,9951
FLUV2	27,294	1,1	3,6	Y = 357,9 X - 505,9	0,9953
FENV	28,838	0,5	1,8	Y = 386,4 X - 1004,9	0,9958
ESFE	29,420	0,4	1,2	Y = 627,2 X - 1532,8	0,9970
DELT	31,840	15,3	51,0	Y = 18,4 X - 83,7	0,9918

Obrázek č. 4 znázorňuje chromatogram kalibračního roztoku o koncentraci 100 ng·ml<sup>-1</sup>. Permethrin, cypermethrin a fluvalinát se vyskytují ve svých izomerních formách, a proto jsou pro ně charakteristické dva píky, pro cypermethrin čtyři píky. Třetí a čtvrtý pík cypermethrinu však nejsou separovány. Také cyfluthrin se vyskytuje ve dvou izomerních formách a jejich píky nejsou zcela separovány.



**Obrázek 4:** Chromatogram kalibračního roztoku o koncentraci  $100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$

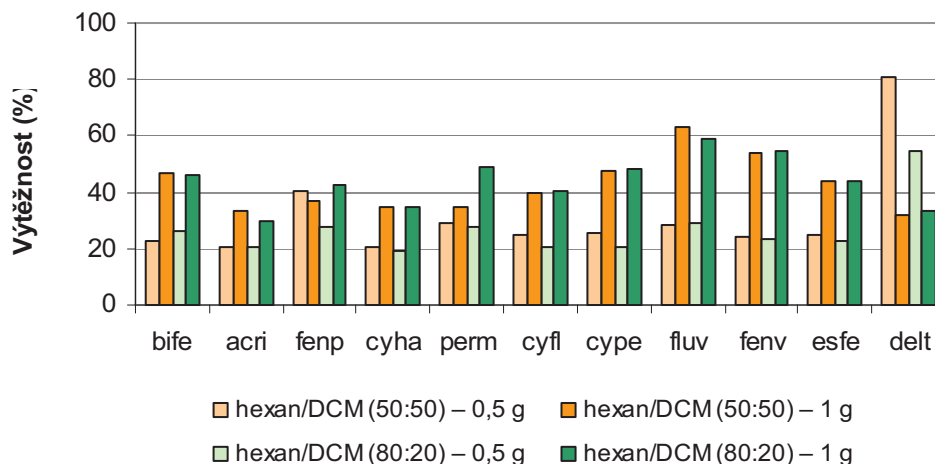
## 7.2 Extrakce pyrethroidů z vody

V další části jsme se zaměřili na izolaci insekticidů ze vzorků vody. Pro izolaci insekticidů byly zvoleny extrakční metody, které se lišily nejen v provedení, ale především v získaných výtěžnostech. Nejprve jsme se soustředili na extrakci na tuhou fázi, dále pak na extrakci kapalina – kapalina a na závěr byla otestována možnost využití mikroextrakce na tuhou fázi. Většina experimentů byla provedena na modelových vzorcích vody. Pro ověření metod SPE a LLE bylo použito také reálných vzorků odpadní vody z ČOV Brno Modřice.

### 7.2.1 Extrakce na tuhou fázi (SPE)

Pro SPE byly použity kolonky se sorbetem Envi 18 (silikagel modifikovaný C18). Testovány byly dva typy kolonek, které se odlišovaly v množství sorbentu v kolonkách (0,5 g a 1 g). V grafu č. 1 je patrný rozdíl v extrakčních výtěžnostech při použití odlišných kolonek. Zvýšené množství sorbentu zajistilo lepší výtěžnosti pro většinu pyrethroidů (větší sorpční kapacita). Výjimkou byl deltamethrin, u něhož byla větší výtěžnost u 0,5 gramových kolonek. Dále je v grafu č. 1 porovnán vliv eluční směsi rozpouštědel (poměr hexanu a DCM) na výtěžnost extrakce. Z grafu jednoznačně vyplývá, že výsledky byly obdobné pro oba poměry. Přesto bylo dosaženo lepších účinností se směsí hexanu a DCM, smíchaných v poměru 50:50. Ze všech uvedených výsledků je zřejmé, že námi získané výtěžnosti nebyly pro stanovení dostačující, v nejlepších případech se pohybovaly v rozmezí od 30 do 60 %. Pro další stanovení by bylo vhodné otestovat i další typy sorbentu, se kterým by mohlo dojít ke zvýšení účinností extrakce.

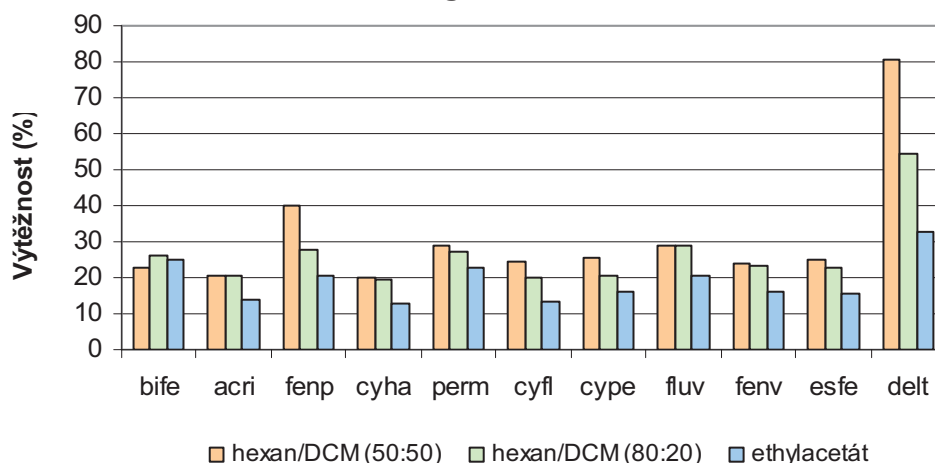
### Porovnání výtěžnosti SPE kolonek Envi C18



**Graf 1:** Výtěžnost vybraných pyrethroidů v závislosti na množství sorbentu v SPE kolonkách a poměru n-hexan:DCM v eluční směsi.

U 0,5 gramových kolonek byl také sledován vliv použití organických rozpouštědel tvořících eluční směsi na výtěžnost extrakce. Navíc byl testován i ethylacetát. Tuto závislost znázorňuje graf č. 2. Pro směsi hexanu a DCM byly obecně získány lepší výtěžnosti než pro čistý ethylacetát. Nejvyšší výtěžnosti bylo dosaženo u deltamethrinu (až 81%).

### Porovnání elučních směsí pro SPE s 0,5 g sorbentu



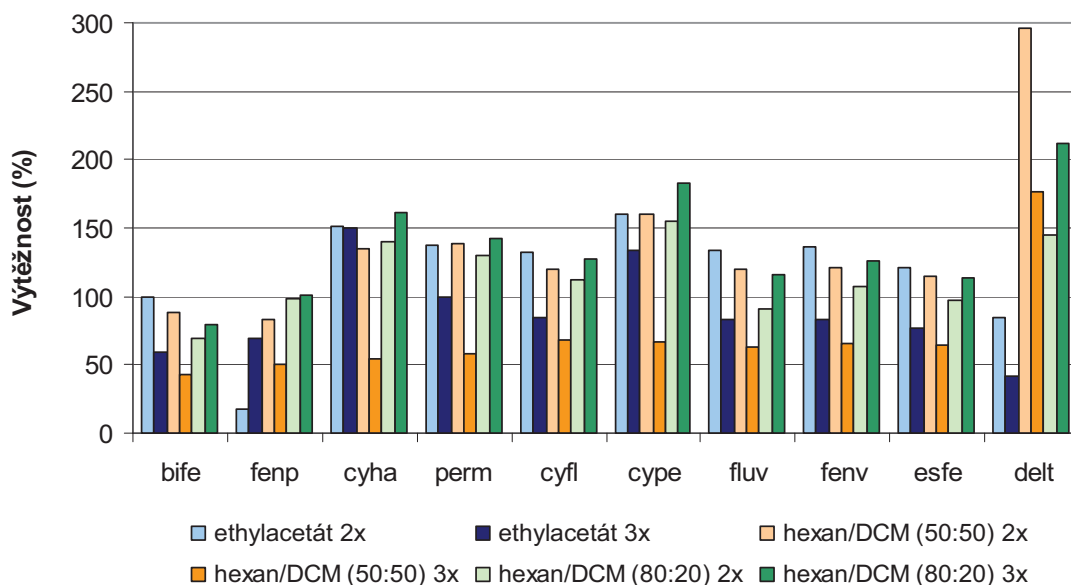
**Graf 2:** Výtěžnost vybraných pyrethroidů při sorpci na 0,5 g SPE kolonku v závislosti na zvolené eluční směsi rozpouštědel

#### 7.2.2 Extrakce kapalina – kapalina (LLE)

Dalším typem extrakce, která byla ověřována, byla extrakce kapalina – kapalina. K samotné extrakci byla použita stejná rozpouštědla jako při SPE eluci (n-hexan/DCM 50:50 a 80:20, ethylacetát). Byl také ověřen vliv počtu extrakcí jednoho vzorku na výtěžnost. Vzorky byly daným rozpouštědlem extrahovány 2krát nebo 3krát (vždy po 50 ml). Srovnání získaných výtěžností je prezentováno v grafu č. 3. Pomocí LLE byly v porovnání s SPE

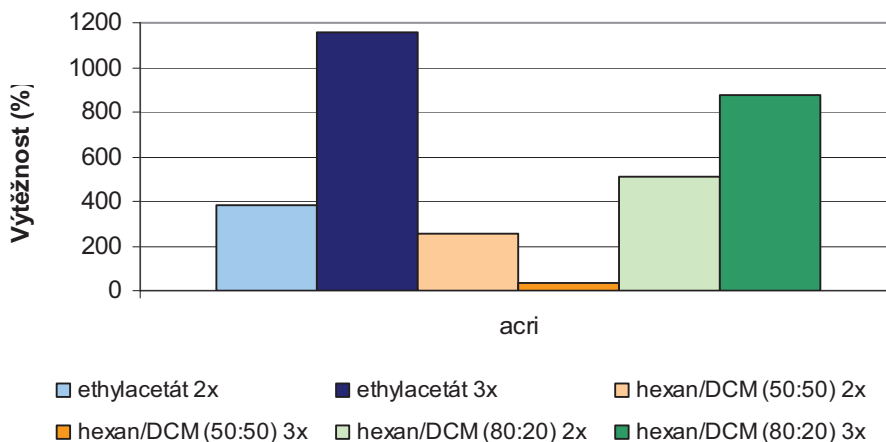
prokázány mnohem vyšší výtěžnosti. U většiny pyrethroidů se v závislosti na postupu extrakce pohybovaly výtěžnosti v rozmezí od 50 do 150 %. Při této extrakci zřejmě docházelo i ke koextrakci z matrice (byla použita vodovodní voda), což mohlo způsobit, že dosažené výtěžnosti byly v některých případech příliš vysoké (platí především pro deltamethrin a acrinathrin). Pro acrinathrin jsou uvedeny výtěžnosti v grafu č. 4, protože jeho výtěžnost byla oproti ostatním pyrethroidům několikanásobně vyšší. Výtěžnosti pro všechny typy rozpouštědel byly obdobné. Dobře viditelný rozdíl je mezi dvojnásobnou a trojnásobnou extrakcí. Výtěžnost při dvojnásobné extrakci byla pro ethylacetát a hexan/DCM 50:50 vyšší (i o 50 %) než při trojnásobné extrakci. Pro směs hexan/DCM 80:20 tomu bylo naopak.

### Extrakce kapalina–kapalina



**Graf 3:** Výtěžnost vybraných pyrethroidů v závislosti na zvoleném rozpouštědle a počtu extrakcí

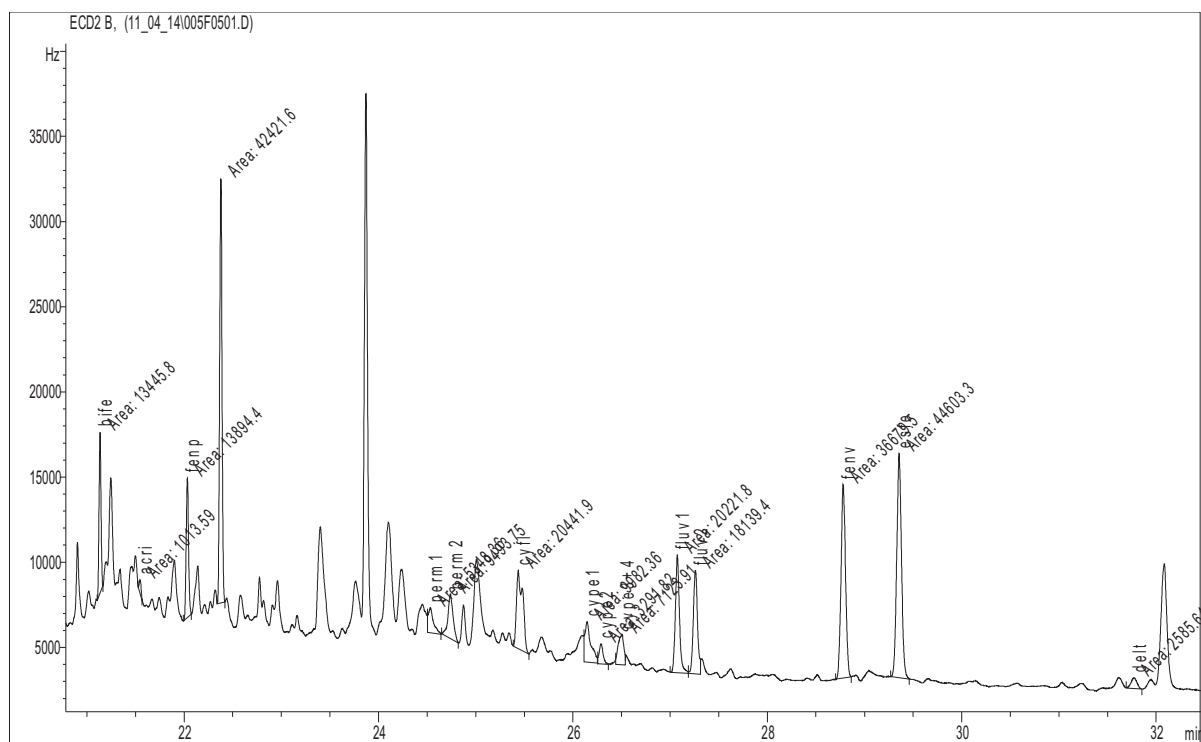
### Výtěžnost extrakce kapalina–kapalina pro acrinathrin



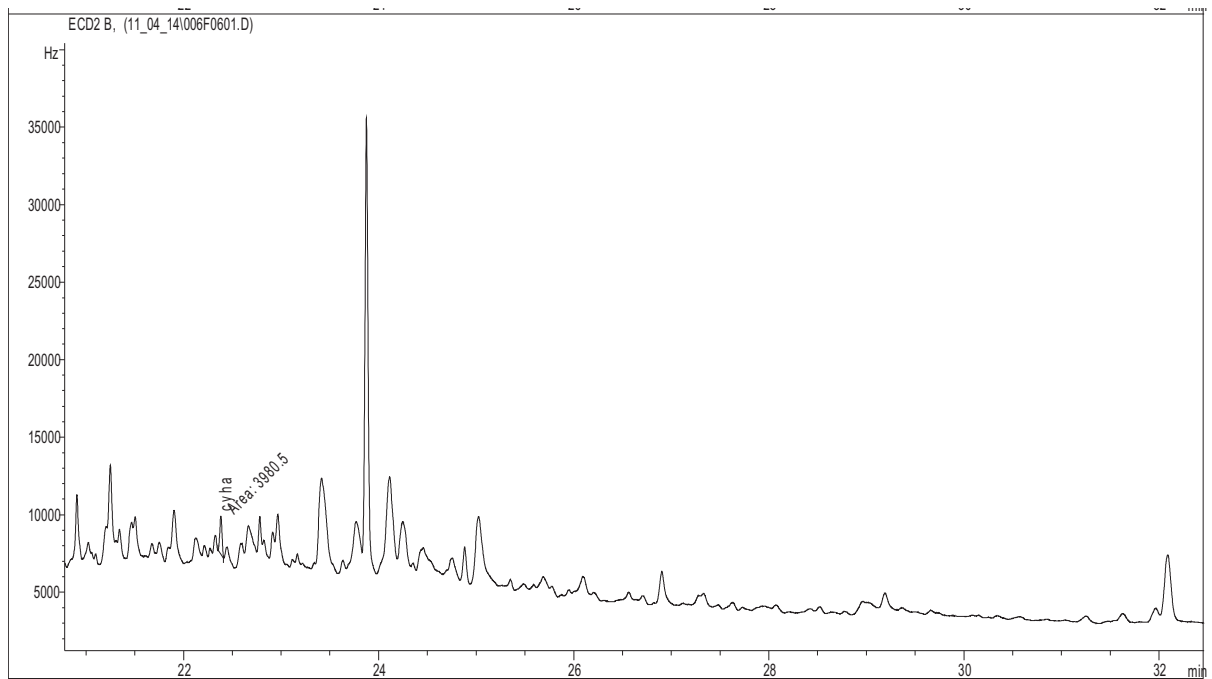
**Graf 4:** Výtěžnost acrinathrinu v závislosti na zvoleném rozpouštědle a počtu protřepání

### 7.2.3 Extrakce reálných vzorků odpadní vody

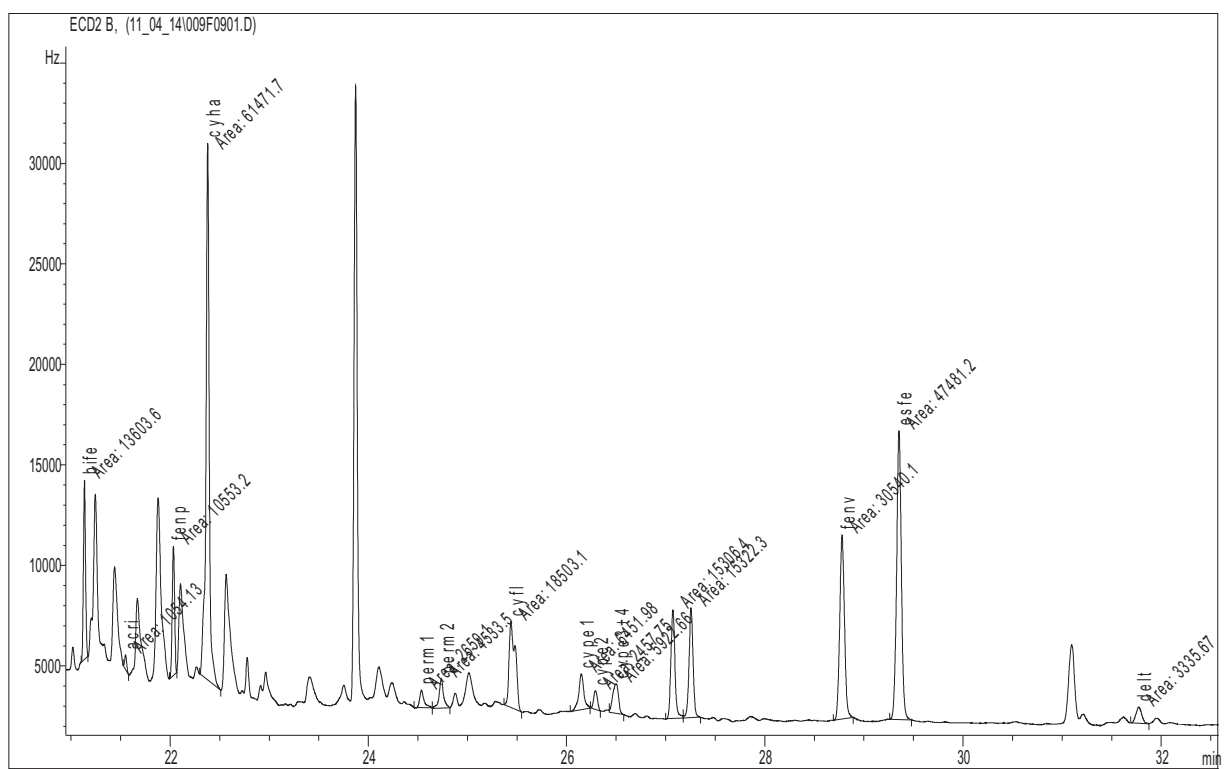
Tyto dvě extrakční metody (SPE a LLE) byly použity i pro reálné vzorky odpadní vody. Na přítoku a na odtoku odpadní vody odebrané z čistírny odpadních vod (ČOV) Brno – Modřice byly odebrány slévané 24hodinové vzorky vody. Pro analýzu bylo použito 200 ml zfiltrované vody, vždy jednou s přidavkem standardu (50 ng) a jednou bez jeho přidavku. Voda z přítoku a odtoku byla extrahována pomocí LLE (2krát 50 ml, hexan/DCM (80:20)) SPE (1 g selucí hexan/DCM (80:20)). Ve vzorcích na přítoku byly detekovány některé pyrethroidy v případě, kdy byla použita metoda SPE. Po extrakci LLE se ve vzorcích bez přidavku nepodařilo identifikovat žádný z analytů. Pomocí metody SPE bylo možné určit některé pyrethroidy i díky charakteristickému tvaru píků. To u LLE nebylo možné, protože docházelo k větší koextrakci látek z matrice. Ve vzorku odpadní vody na přítoku byly identifikovány fenvalerát, esfenvalerát, fluvalinát a cyfluthrin. Výsledky nebyly hodnoceny kvantitativně, protože ještě bude nutné ověřit si výtěžnosti přímo na reálných vzorcích z hlediska posouzení matričního efektu a vyloučit falešně pozitivní výsledky. Také by bylo vhodné použít pro ověření konfirmační metodu pomocí GC-MS.



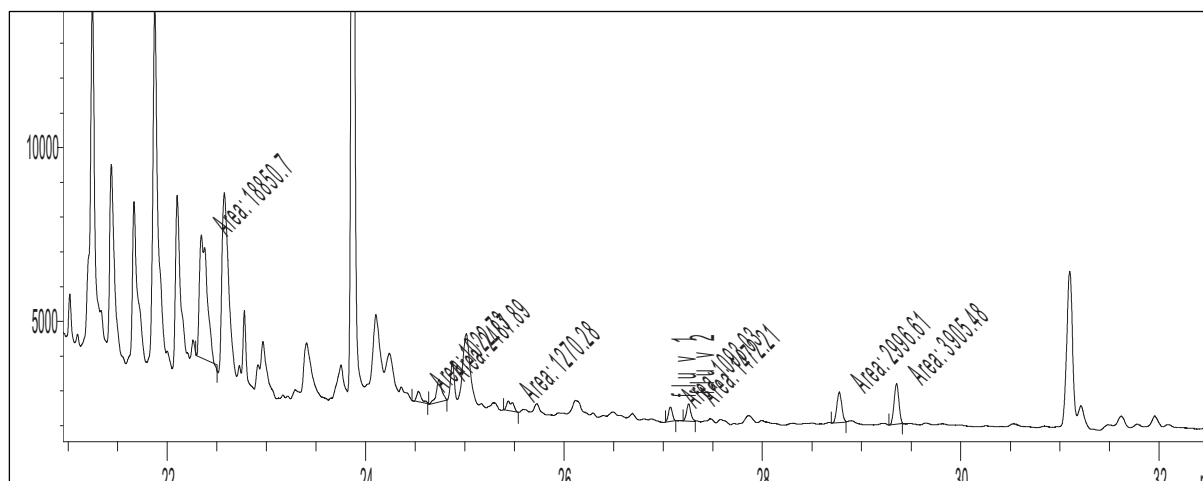
Obrázek 5: Chromatogram při extrakci LLE, vzorek vody na přítoku s přidavkem standardu



**Obrázek 6:** Chromatogram při extrakci LLE, vzorek vody na přítoku bez přidavku



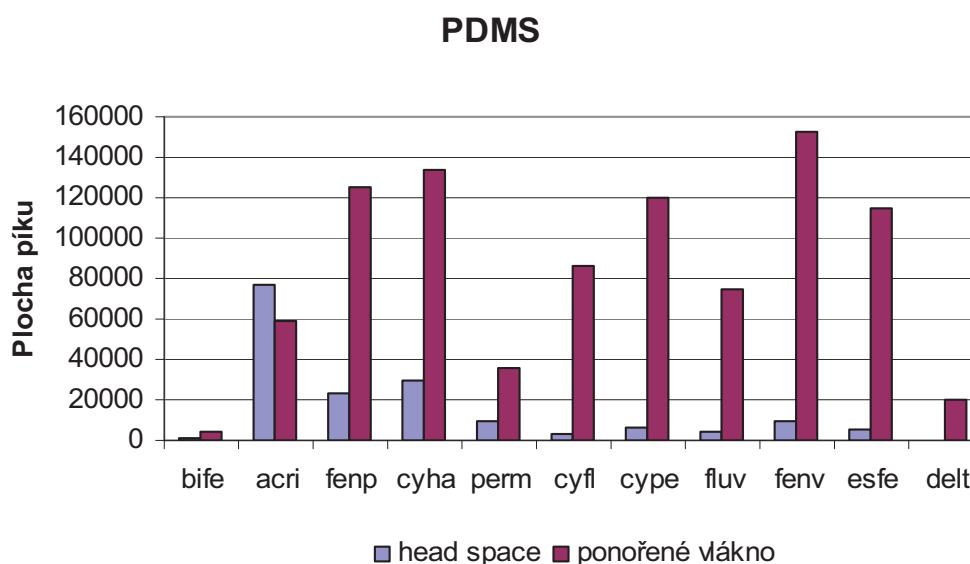
**Obrázek 7:** Chromatogram při extrakci SPE, vzorek vody na přítoku s přidavkem standardu



**Obrázek 8:** Chromatogram při extrakci SPE, vzorek vody na přítoku bez přídavku

### 7.2.4 Mikroextrakce na tuhou fázi (SPME)

Poslední ověřovanou metodou, která je v literatuře často uváděna [27,28,29], byla metoda mikroextrakce na tuhou fázi (SPME). K analýzám byla použita destilovaná voda s přídavkem standardu. Prozatím byl ověřován pouze vliv typu vlákna a vzorkování s ponořením nebo v parní fázi (head space) na účinnost extrakce. Další optimalizace bude provedena až v rámci zpracování diplomové práce. Byla testována tři vlákna: polydimethylsiloxan (PDMS), polydimethylsiloxan–divinylbenzen (PDMS–DVB) a polyakrylát (PA). Pro porovnání účinnosti extrakce byla použita plocha píků v chromatogramu. Pomocí grafu č. 5 jsou porovnány plochy píků jednotlivých standardů získané při použití PDMS vlákna a při dvou typech vzorkování (ponoření a parní fáze). Je zřejmé, že při ponoření vlákna do vzorku bylo dosaženo mnohem lepší sorpce vybraných pyrethroidů, než při head space. U acrinathrinu byla pozorována vyšší sorpce v případě head space, což je nejspíš způsobeno tím, že tento analyt je těkavější, v porovnání s ostatními pyrethroidy.

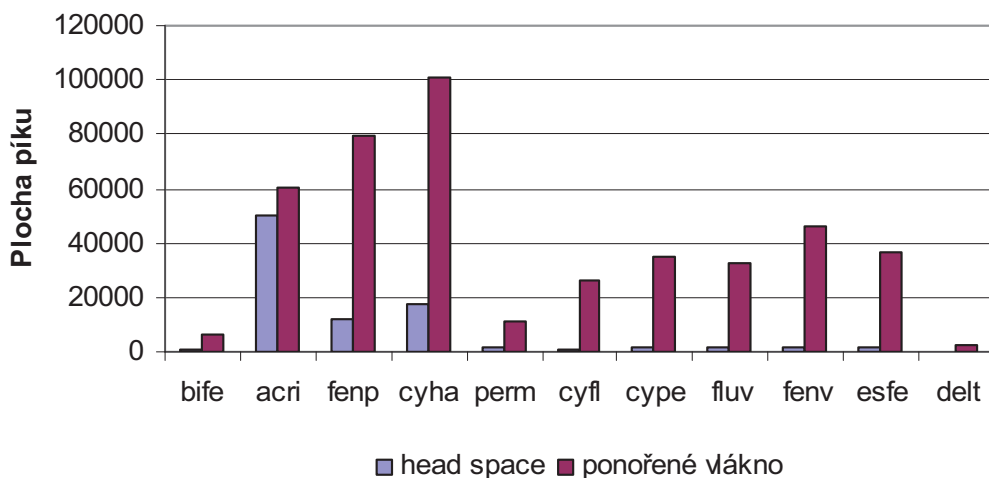


**Graf 5:** Porovnání PDMS vlákna při vzorkování ponořením do vzorku vody a při head space

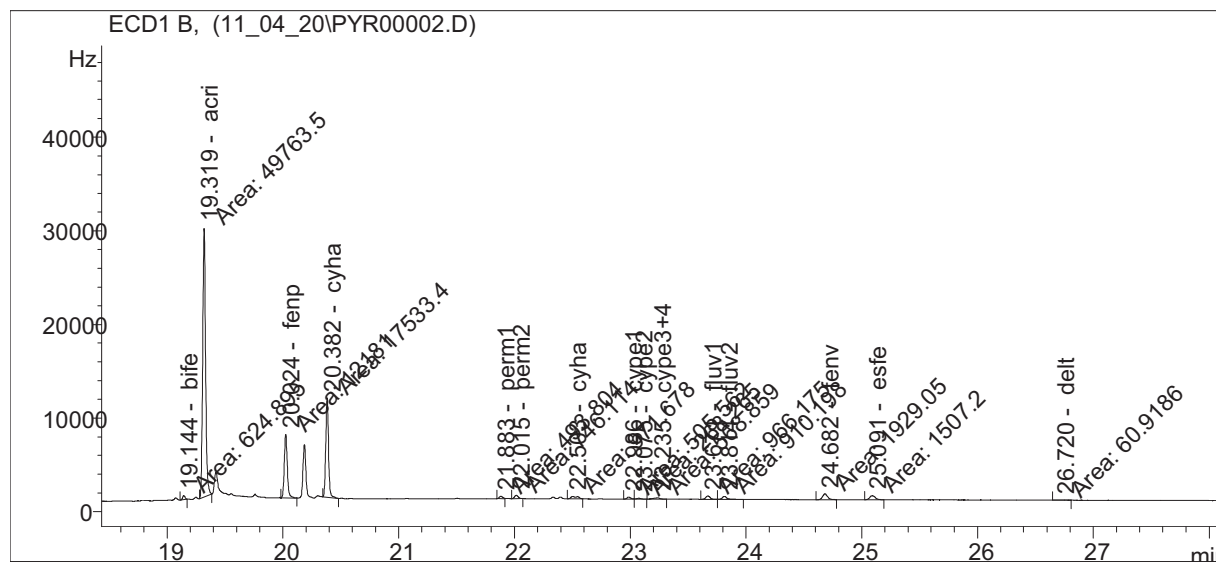
Na následujících obrázcích jsou znázorněny chromatogramy získané při použití PDMS vlákna.



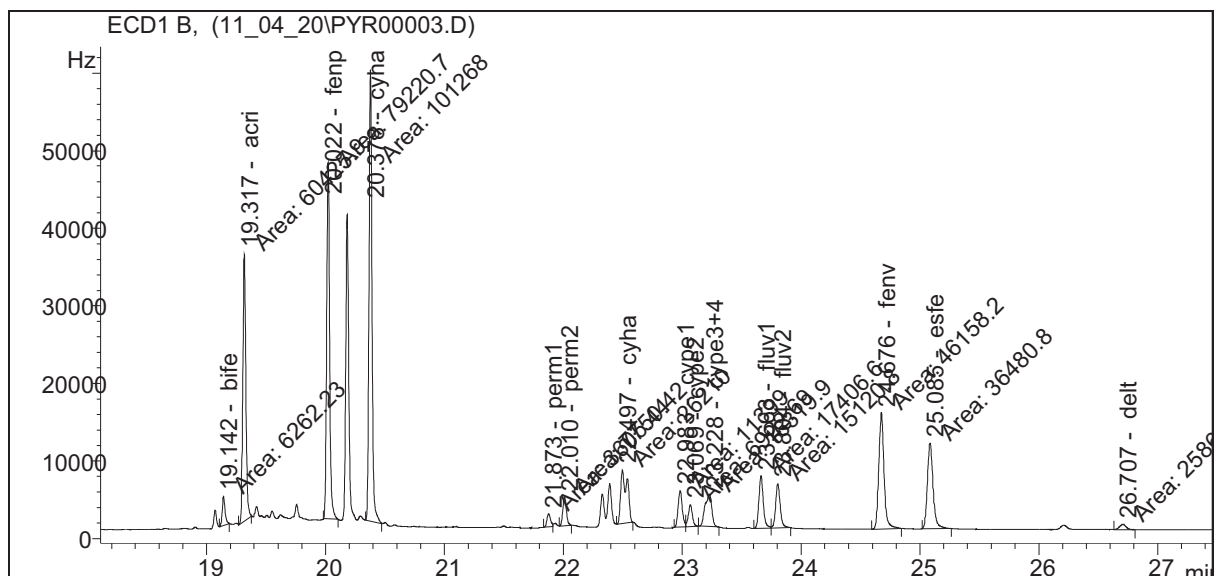
## PDMS-DVB



**Graf 6:** Porovnání PDMS–DVB vlákna při vzorkování ponořením do vzorku vody a při head space

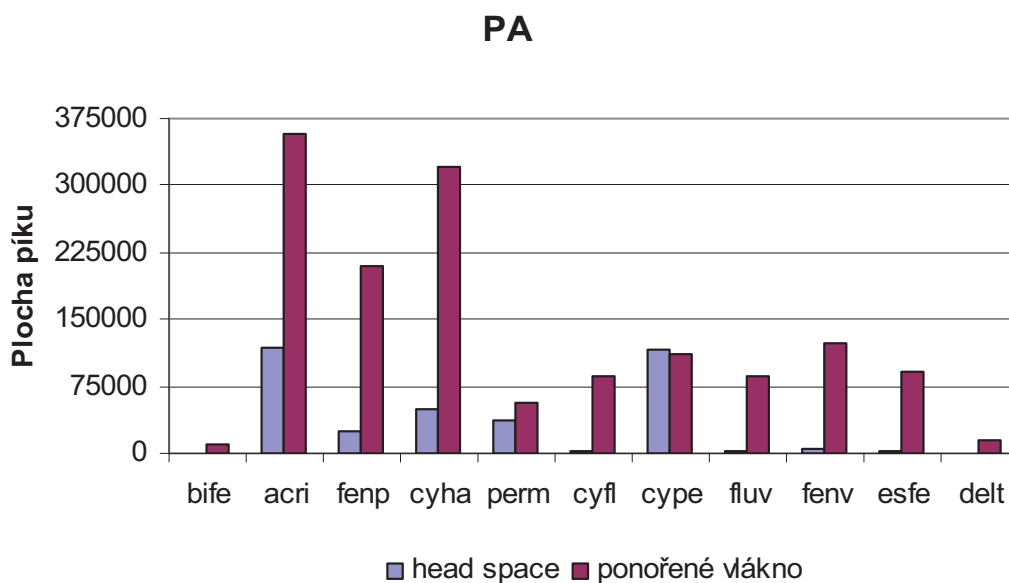


**Obrázek 11:** Chromatogram při použití PDMS–DVB vlákna – head space

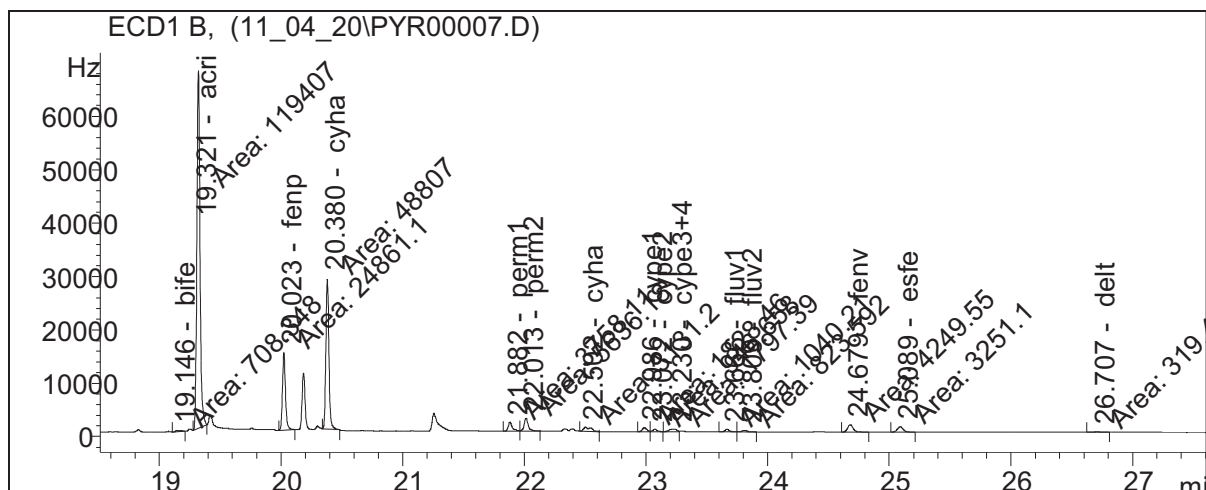


**Obrázek 12:** Chromatogram při použití PDMS–DVB vlákna – ponořené vlákno

V grafu č. 7 jsou uvedeny plochy píků v závislosti na způsobu vzorkování pro použití polyakrylátového vlákna. I zde byla sorpce vyšší při ponoření vlákna do vzorku vody než při sorpci nad hladinou vzorku. Nepatrně vyšší sorpce při head space pozorována pouze u cypermethrinu.

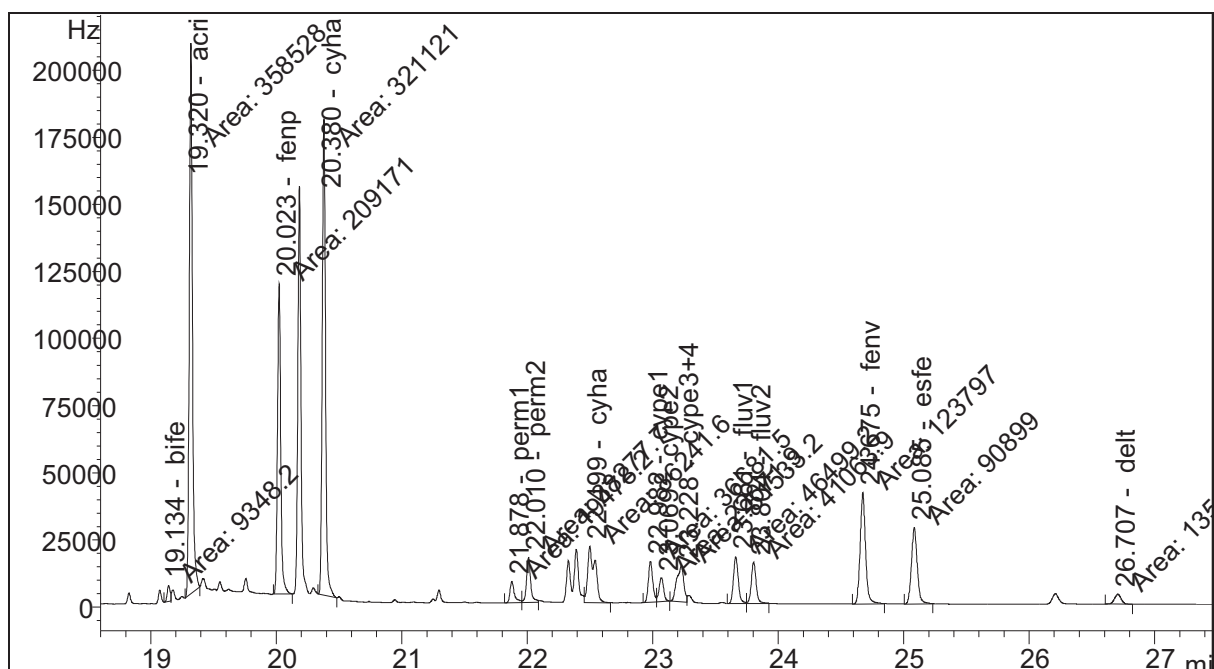


**Graf 7:** Porovnání PA vlákna při vzorkování ponořením do vzorku vody a při head space



**Obrázek 13:** Chromatogram při použití PA vlákna – head space

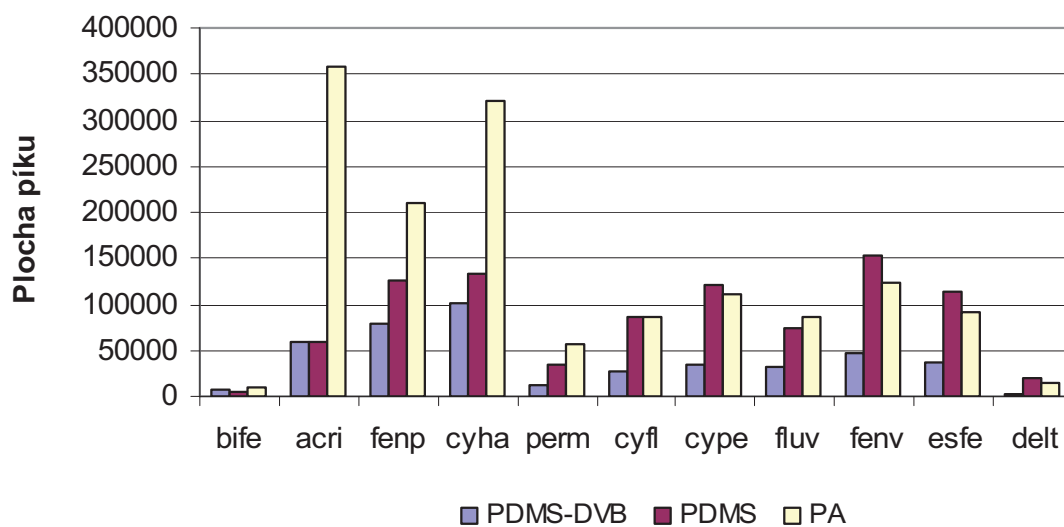
Z obrázků 13 a 14 je velmi dobře patrné, že při použití PA vlákna byly získané hodnoty výšek pík největší (v porovnání s ostatními vlákny). Důležitá je i poměrně velká intenzita prokázaná u deltametrinu, který má nejnižší odezvu.



**Obrázek 14:** Chromatogram při použití PA vlákna – ponořené vlákno

V následujících grafech jsou porovnávána použitá vlákna při jejich ponoření do vody a při provedení head space. Při ponoření vláken do vody došlo k lepší sorpci na PDMS a PA vláknech. Stejná situace nastala při head space. Pro látky těkavější byla účinnost extrakce vyšší při použití PA vlákna. Pro látky méně těkavé by bylo naopak vhodnější použití PDMS vlákna. Po zhodnocení všech aspektů tohoto experimentu bude pravděpodobně dále používáno pro optimalizaci metody PDMS vlákno, a to při přímém ponoření do vzorku vody. PA vlákno bylo účinnější u látek, které mají při analýze vysoké odezvy a v důsledku toho i nižší detekční limity. Proto bude vhodnější se orientovat podle analytů s nižšími odezvami.

## Ponořené vlákno



**Graf 8:** Porovnání účinnosti extrakce jednotlivých vláken při jejich ponoření do vzorku vody

## 8 ZÁVĚR

V předložené bakalářské práci byla zpracována teoretická část (podrobná rešerše) zaměřená na pyrethroidy, které se používají jako insekticidy. Práce byla směřována do oblasti stanovení pyrethroidů ve vzorcích vody. K tomuto účelu se nejčastěji používají tři typy extrakce, a to extrakce kapalina – kapalina, extrakce na tuhou fázi a mikroextrakce na tuhou fázi. Všechny tyto extrakční postupy byly přehledně popsány v teoretické části. K analýze extraktu je možné použít plynovou chromatografii s detektorem elektronového záchytu, případně s hmotnostním detektorem. V této práci byl použit detektor elektronového záchytu.

Praktická část této práce byla zaměřena především na získání praktických zkušeností s různými typy extrakce vybraných analytů ze vzorků vody, dále na porovnání výtěžností při použití vybraných extrakčních technik a na ověření stanovení pyrethroidů pomocí SPME. Získané výsledky budou dále rozvíjeny a především následně aplikovány pro analýzu reálných vzorků odpadních i povrchových vod, což by mělo být řešeno v rámci diplomové práce.

Při extrakci pomocí SPE byly analyzovány vzorky destilované vody s přidavkem standardu. Použity byly kolony se sorbentem na bázi C18 ve dvou množstvích – 0,5 g a 1 g. Dále byly testovány tři typy rozpouštědel použitých při eluci z SPE kolonek. Lepších výtěžností bylo dosaženo s použitím kolony s 1 g sorbentu, a to při eluci směsí rozpouštědel n-hexan/dichlormethan. Vliv poměru těchto rozpouštědel nebyl výrazný. Celkové výtěžnosti pro jednotlivé standardy se pohybovaly rozmezí od 30 do 60 %.

Extrakce kapalina-kapalina byla použita pro vzorek vody o objemu 200 ml. Vzorek byl třepán 2krát nebo 3krát, vždy s 50 ml rozpouštědel. Účinnější bylo třepání 2x 50 ml extrakční směsí. Získané výtěžnosti byly vyšší než v případě použití SPE (50 – 150 %). Problém byl naopak s koextrakcí některých dalších látek z vody, které potom zvyšovaly odezvu a tím extrémně i stanovené koncentrace analytů (acrinathrin, deltamethrin).

Metody SPE a LLE byly také použity pro extrakci pyrethroidů z odpadní vody z ČOV Brno – Modřice. Voda byla odebírána na přítoku a odtoku z ČOV (24hodinové vzorky). Ve vzorku na přítoku byly v extraktu získaném metodou SPE identifikovány fenvalerát, esfenvalerát, fluvalinát a cyfluthrin.

Poslední ověřovanou metodou prováděnou na modelových vzorcích vody byla mikroextrakce na tuhou fázi. Bylo zjištěno, že je to metoda vhodná pro stanovení námi analyzovaných pyrethroidů. Větší účinnosti bylo dosaženo při extrakci s ponořením vlákna do vzorku vody. Byla testována celkem tři vlákna, a to polydimethylsiloxan (PDMS), polydimethylsiloxan–divinylbenzen (PDMS–DVB) a polyakrylát (PA). PA vlákno bylo nejúčinnější při extrakci těkavějších analytů acrinathrinu, fenprothrinu, cyhalothrinu a permethrinu a vlákno PDMS bylo vhodnější pro méně těkavé pyrethroidy.

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] FEO, M. L.; ELJARRAT, E.; BARCELÓ, D. Determination of pyrethroid insecticides in environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2010, 29, 7, [cit. 2011-02-12]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [2] EISLER, Ronald. *Eisler's Encyclopedia of Environmentally Hazardous Priority Chemicals*. Amsterdam: Elsevier, 2007. 0 s. ISBN 978-0-444-53105-6.
- [3] MIYAMOTO, Junshi , et al. Pyrethroids, nerve poisons: how their risks to human health should be assessed. *Toxicology Letters* [online]. 1995, 82-83, -, [cit. 2011-03-15]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [4] VAN HOECK, Els; DAVID, Frank; SANDRA, Pat.. Stir bar sorptive extraction for the determination of pyrethroids in water samples : A comparison between thermal desorption in a dedicated thermal desorber, in a split/splitless inlet and by liquid desorption. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, 1157, 1-2, [cit. 2011-03-22]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [5] MCMURRY, John. *Organická chemie*. 1. Brno: VUTIUM, 2007. 1176 s. ISBN 978-80-214-3291-8.
- [6] PÉREZ-FERNÁNDEZ, Virginia; GARCÍA, Maria Ángeles; MARINA, Maria Luisa. Characteristics and enantiomeric analysis of chiral pyrethroids. *Journal of Chromatography A* [online]. 2010, 1217, 7, [cit. 2011-02-26]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [7] LIU, Weiping; QIN, Sujie; GAN, Jianying. Chiral Stability of Synthetic Pyrethroid Insecticides. *Journal of Chromatography A* [online]. 2005, 53, 10, [cit. 2011-02-26]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [8] HRSTKA, Miroslav. *Obecná biologie*. 1. Brno: VUT, FCH, 2005. 112 s. ISBN 80-214-3057-5.
- [9] WEXLER, Philip, et al. *Encyklopedia of Toxicology*. 2. UK: Elsevier Ltd., 2005. ISBN 0-12-745354-7.
- [10] RAY, Davie E.; FRY, Jeffrey R. A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2006, 111, 1, [cit. 2011-03-15]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [11] ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRANAGA, M. R.; MARTÍNEZ, M. A. Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. *The Veterinary Journal* [online]. 2009, 182, 1, [cit. 2011-03-15]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [12] UYAMA, Jun, et al. Toxicokinetics of pyrethroid metabolites in male and female rats . *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. 2010, 30, 1, [cit. 2011-02-26]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [13] KATSUDA, Yoshio. Development of and future prospects for pyrethroid chemistry. *Pesticide Science* [online]. 1999, 55, 8, [cit. 2011-02-26]. Dostupný z WWW: <apps.isiknowledge.com>.
- [14] MACKAY, Donald, et al. *Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals : Nitrogen and Sulfur Containing Compounds and Pesticides*. 2. USA: Taylor&Francis Group, 2006. 3196-4182 s. ISBN 978-1-56670-687-2.
- [15] LIU, Pengyan, et al. Photodegradation mechanism of deltamethrin and fenvalerate. *Journal of Environmental Sciences* [online]. 2010, 22, 7, [cit. 2011-03-26]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [16] OTTERBACH, A.; WENCLAWIAK, B. V. Ultrasonic/S Soxhlet/supercritical fluid extraction kinetics of pyrethrins from flowers and allethrin from paper strips. *Fresenius*

- Journal of Analytical Chemistry* [online]. 1999, 365, 5, [cit. 2011-03-26]. Dostupný z WWW: <apps.isiknowledge.com>.
- [17] KIRIAMITI, H. K., et al. Pyrethrin extraction from pyrethrum flowers using carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids* [online]. 2003, 26, 3, [cit. 2011-03-26]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [18] POPL, Milan; FÄHNRIK, Jan. *Analytická chemie životního prostředí*. 4. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 1999. 218 s. ISBN 80-7080-336-3.
- [19] REEVE, Roger, et al. *Introduction of Environmental Analysis*. 2. England : John Wiley&Sons, Ltd, 2002. 301 s. ISBN 0-471-49295-7.
- [20] ABASEER, Saeed S., et al. An overview of sample preparation and extraction of synthetic pyrethroids from water, sediment and soil. *Journal of Chromatography A* [online]. 2010, 1217, 35, [cit. 2011-03-26]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [21] DEAN, John R., et al. *Methods for Environmental Trace Analysis*. 2. England : John Wiley&Sons, Ltd, 2003. 259 s. ISBN 0-470-84422-1.
- [22] PROCHÁZKOVÁ, Dana. Extrakce tuhou fází (SPE) a mikroextrakce tuhou fází SPME) – extrakční metody pro přípravu vzorku k analýze. In HELÁN, Václav. *Analýza organických látek*. 2. Český Těšín: THETA, 2005. s. 32. ISBN 80-86380-29-7.
- [23] PICÓ, Yolanda, et al. Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. *Journal of biochemical and biophysical methods* [online]. 2006, 70, 2, [cit. 2011-03-15]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [24] GIL-GARCÍA, M. D., et al. Simple, rapid solid-phase extraction procedure for the determination of ultra-trace levels of pyrethroids in ground and sea water by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectroscopy. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [online]. 2006, 20, 16, [cit. 2011-03-26]. Dostupný z WWW: <apps.isiknowledge.com>.
- [25] VAN DER HOFF, G. René, et al. Automated solid-phase extraction coupled to gas chromatography with electron-capture detection: a combination of extraction and clean-up of pyrethroids in the analysis of surface water. *Journal of Chromatography A* [online]. 1996, 719, 1, [cit. 2011-03-22]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [26] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [27] PARRILLA VÁZQUEZ, P.; MUGHARI, Ahmed R.; MARTÍNEZ GALERA, M. Application of solid-phase microextraction for determination of pyrethroids in groundwater using liquid chromatography with post-column photochemically induced fluorimetry derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* [online]. 2008, 1188, 2, [cit. 2011-02-26]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [28] LI, Hong-Ping; LIN, Chiu-Hua ; JEN, Jen-Fon . Analysis of aqueous pyrethroid residuals by one-step microwave-assisted headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with electron capture detection. *Talanta* [online]. 2009, 79, 2, [cit. 2011-02-26]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [29] WOUNDNEH, Million B.; OROS, Daniel R. Pyrethroids, pyrethrins, and piperonyl butoxide in sediments by high-resolution gas chromatography/high-resolution mass spectrometry . *Journal of Chromatography A* [online]. 2006, 1135, 1, [cit. 2011-03-26]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [30] FERNANDEZ-ALVAREZ, Maria, et al. Simultaneous determination of traces of pyrethroids, organochlorine and other main plant protection agents in agricultural soils by

- headspace solid-phase microextraction–gas chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2008, 1188, 2, [cit. 2011-02-12]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [31] SOMMER, Lumír, et al. *Základy analytické chemie II*. 1. Brno: VUTIUM, 2000. 346 s. ISBN 80-214-1742-0.
- [32] Zjednodušené schéma plynového chromatografu [online]. [cit. 2011-04-18]. Dostupný z WWW: <cheminfo.chemi.muni.cz/chem\_sekce/predmety/C7300/GC/uvod.pdf>.
- [33] HELÁN, Václav, et al. *Analýza organických látek*. 2. Český Těšín: 2 THETA, 2005. 502 s. ISBN 80-86380-29-7.
- [34] CHURÁČEK, Jaroslav; KOTRLÝ, Stanislav. *Analytická chemie II*. 1. Pardubice: VŠCHT v Pardubicích, 1983. 189 s.
- [35] NĚMCOVÁ, Irena, et al. *Spektrometrické analytické metody II*. 1. Praha: Karolinium, 1998. 162 s. ISBN 80-7184-586-8.
- [36] FEO, M. L.; ELJARRAT, E.; BARCELÓ, D. A rapid and sensitive analytical method for the determination of 14 pyrethroids in water samples. *Journal of Chromatography A* [online]. 2010, 1217, 35, [cit. 2011-03-26]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [37] KIM, Kyu Bong, et al. Rapid determination of the synthetic pyrethroid insecticide, deltamethrin, in rat plasma and tissues by HPLC. *Journal of Chromatography B* [online]. 2006, 834, 1-2, [cit. 2011-03-26]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [38] LÓPEZ-LÓPEZ, T., et al. Determination of pyrethroids in vegetables by HPLC using continuous on-line post-elution photoirradiation with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2001, 447, 1-2, [cit. 2011-03-26]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [39] FUJITANI, Y. Chemistry and pharmacology of insect powder. *Arch Exp Pathol Pharmacol*. 1909, 61, 47-75.
- [40] YAMAMOTO, R. The insecticidal principle in *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Par II and III. On the constitution of pyrethronic acid. *J Chem Soc Jpn*. 1923, 44, 311-330.
- [41] YAMAMOTO, R. On the insecticidal principle of insect powder. *Inst. Phys Chem Res Tokyo*. 1925, 3, 193.
- [42] STAUDINGER, H.; Růžička, L. Insektentotende stoffe. I–IV and VIII–X. *Helv Chim Acta*. 1924, 7, 177-458.
- [43] LaForge, F. B.; BARTHEL, W. F. Constituents of pyrethrum flowers. XVIII. The structure and isomerism of pyrethrolone and cinerolone. *J Org Chem*. 1945, 10, 114-120.
- [44] MAREČEK, František, et al. *Zahradnický slovník naučný*. 1. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1994. 440 s. ISBN 80-85120-51-8.
- [45] Chryzantéma dalmatská [online]. [cit. 2011-04-18]. Dostupný z WWW: <www.summagallicana.it>.

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- EPA – Environmental Protection Agency
- T, CS, TS – tremor, choreoathetosis and salivation, tremor and salivation syndrome
- p, p'-DDT – 1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorofenyl)ethan
- UK – Spojené království
- USA – Spojené státy americké
- LLE – extrakce z kapaliny do kapaliny
- SPE – extrakce na tuhou fázi
- SBSE – extrakce na magnetické míchadlo
- SPME – mikroextrakce tuhou fází
- LC – kapalinová chromatografie
- PDMS – polydimethylsiloxan
- PDMS–DVB – polydimethylsiloxan–divinylbenzen
- PA – polyakrylát
- GC – plynová chromatografie
- GC–ECD – plynový chromatograf s detekcí elektronového záchytu
- GC–MS – plynový chromatograf s hmotnostním detektorem
- TCD – tepelně vodivostní detektor
- FID – plamenově ionizační detektor
- HPLC – vysoko účinná kapalinová chromatografie
- UV–VIS – spektrofotometrický detektor
- ACRI – acrinathrin
- BIFE – bifenthrin
- FENP – fenprothrin
- CYHA – cyhalothrin
- PERM – permethrin
- CYFL – cyfluthrin
- CYPE – cypermethrin
- FLUV – fluvalinate
- ESFE – esfenvalerate
- FENV – fenvalerate
- DELT – deltamethrin
- LOD – limit detekce
- LOQ – limit kvantifikace