

## **Endosíran (endosulfan)**

Endosulfan je chlororganický pesticid používaný také pod názvem Thiodan 35 EC jako insekticid (k hubení hmyzu) anebo akaricid (k hubení roztočů). Endosíran je toxičtější než DDT, způsobuje psychické potíže, poruchy motoriky a paměti. Vyvolává především akutní otravy zvířat, avšak vzhledem k ukládání v tukové tkáni může docházet i k chronickým otravám. Endosulfan rozpuštěný v rostlinném oleji je asi desetkrát toxičtější než ve vodných suspenzích. Mladá zvířata jsou citlivější než zvířata dospělá. Ryby jsou citlivější než savci a ptáci naopak odolnější. U ryb i obojživelníků byly pozorovány negativní vlivy na reprodukční systém. Je difúzním stimulantem centrálního nervového systému. Příznaky otrav endosulfanem: prudké křeče, bojácnost, zvýšená citlivost, slinění, ztráta koordinace pohybu. Jde o látku vysoce toxickou pro vodní zvířena, především pro ryby. Řadí se k látkám, které poškozují hormonální systém živočichů včetně člověka (endokrinní disruptor). Endosíran ve vodním prostředí (Cotham a Biddleman, 1989) degraduje během týdne. Endosíran degraduje především v aerobních podmínkách. Rychlost degradace (Ghadiri et al., 2001) závisí na teplotě půdy, vlhkosti, pH, obsahu organické hmoty a dalších fyzikálně-chemických parametrech.

### ***Standardizované metody stanovení***

**ISO 14507:2005** Soil quality – Pretreatment of samples for determination of organic contaminants

Mezinárodní norma specifikuje 3 metody předúpravy vzorků půd v laboratoři před vlastním stanovením organických polutantů. Jsou zde uvedeny postupy s ohledem na chemických charakter stanovovaných látek: těkavé organické látky, polotěkavé organické látky – matrice obsahuje částice větší než 2 mm pa, má heterogenní distribuci kontaminantu v matrici, stanovení stabilních organických látek, velikost půdních částic je < 2 mm a polutanty jsou homogenně rozšířeny v matrici. Organické látky, které jsou stabilní mohou být připraveny pro analýzu podle ISO 11464.

**ISO 10382:2002** Soil quality – Determination of organochloride pesticides and polychlorinated biphenyls – Gas chromatographic method with electron capture detection

Metoda popisuje kvantitativní stanovení sedmi polychlorovaných bifenyly a sedmnácti organochlorovaných pesticidů v půdách. Je použitelná pro všechny typy půd. Vzorek je extrahován směsí aceton/petrolether, extrakt je přečištěn sloupcovou chromatografií ( $Al_2O_3$ ) a stanoven metodou GC/ECD nebo GC/MS. V případě použití ECD je vhodné použít jinou GC (dvourozměrnou) metodu pro confirmaci.

**U.S. EPA Method 1656** Gas chromatography of organo-halide pesticides

Metoda je určena pro stanovení organohalidových pesticidů a dalších vyjmenovaných látek ve vodách, kalech, sedimentech a půdách. V případě, že vzorek kalu obsahuje > 30 % sušiny, je připraven extrakt obsahující pouze 1 % sušiny. Vzorky půd jsou extrahovány acetonitrilem a methylen chloridem metodou 3350 (extrakce ultrazvukem) nebo superkritickou fluidní extrakcí (metoda 3562). Extrakt je zpětně extrahován 2%  $Na_2SO_4$ , aby se odstranily vodorozpustné interferující látky. Dále je přečištěn metodami 3610, 3620 a 3640. Identifikace polutantů se provádí porovnáním retenčních časů.

**U.S. EPA 8080** Stanovení aldrinu, chlordanu, 4,4'-DDT, 4,4'-DDE, 4,4'-DDD, dieldrinu, endosíranu (endosíranu I,II), endrinu pomocí GC/ECD

Tato metoda je užívána pro stanovení koncentrace různých organochlorovaných pesticidů a polychlorovaných bifenyly v extraktech půd, sedimentů, vod a podzemních vod. Metodika umožňuje stanovit 26 pesticidů a Aroclorové směsi (PCB). Extrakce vzorků se provádí n-hexanem, po extrakci

se injektuje 2 – 5 µl vzorku do GC a analyt se separuje a detekuje pomocí ECD nebo elektrolytickým kondukčním detektorem (HECD). Interference způsobují látky, které jsou extrahovány společně s pesticidy a PCB, jedná se především o estery ftalátů. Interference ftalátů a jejich směsí jsou eliminovány pomocí HECD detektorů. Stanovení se provádí na plynovém chromatografu s detektorem ECD nebo HECD, kolony musí být následujícího typu: kolona I. – Supelcoport (100/200 mesh) pokryté 1,5 % SP 2250 a 1,95 % SP-2401, rozměr kolony 1,8 m x 4 mm, provedení sklo. Kolony II – Supelcoport (100/120 mesh) pokryté 3 % OV-1, rozměr 1,8 m x 4 mm, provedení sklo. Mez detekce 0,004 µg/l, koncentrační rozsah 0,5 – 30 µg/l. Citlivost metody závisí na koncentraci interferujících substancí, na typu použitého detektoru. Vzorky půd se uchovávají před analýzou v širokohrdlých skleněných lahvích s víčkem nebo v teflonových nádobkách. Láhev na uchování vzorků je nutné před použitím promýt destilovanou vodou a methanolem. Láhve se vzorky se uchovávají při teplotě do 4 °C. 30 g půdního vzorku se smíchá se 100 ml směsí methylenchloridu a acetonu (1:1) a směs se extrahuje v ultrazvukové lázni. Poté se kapalná část dekantuje a filtruje. Extrakt se vyčistí průchodem kolonou s anhydričným síranem sodným a koncentruje se v K-D koncentrátoru. Odparek se rozpustí v 50 ml n-hexanu a směs se koncentruje na 1 ml, poté se rozředí na 10 ml a uchovává se při teplotě 4 °C do doby analýzy na GC.

### **U.S. EPA 8081B** Organochlorine pesticide by GC

Metoda 8081 může být užita pro stanovení pesticidů v extraktech vzorků pevných a kapalných pomocí GC s ECD (detektor elektronového záchytu) nebo ELCD (elektrolytický konduktivní detektor). Technika umožňuje stanovit aldrin, chlordan, 4,4'-DDT, 4,4'-DDE, 4,4'-DDD, dieldrin, endosíran (I a II), endrin. Dále mohou být stanoveny i alachlor, mirex, nitrofen a další pesticidy. 20 – 30 g vzorku je extrahováno směsí hexan:aceton (1:1) nebo methylenchlorid:aceton (1:1) pomocí některé z těchto metod: 3540 (Soxhletovy extrakce), 3541 (automatizovaná Soxhletova extrakce), 3545 (tlaková kapalná extrakce), 3546 (mikrovlňná extrakce), 3550 (ultrazvuková extrakce), 3562 (superkritická fluidní extrakce). Po extrakci je vzorek čištěn od interferujících látek např.oxidem hlinitým (metoda 3610), Florisilem (metoda 3620), silikagelem (3630), gelovou permeační chromatografií (metoda 3640) a pro odstranění síry se používá metoda 3660. Po vyčištění je extrakt analyzován injektáží alikvotu do plynového chromatografu a analyzován buď GC/ECD nebo GC/ELCD. Kvantifikace se provede na základě kalibrační křivky se standardními roztoky.

Interference mohou způsobit kontaminovaná rozpouštědla, chemikálie, činidla, vzorky, přístrojové vybavení (kolony, nosný plyn, povrch detektoru apod.). Interference esterů ftalátů mohou vzniknout během přípravy vzorků (nepoužívat plastové obaly, nádobí apod.). Síra způsobuje na chromatogramu široké píky, proto musí být ze vzorku (hlavně sedimentů) odstraňována. Dále interferují pryskyřice, vosky a lipidy, které jsou odstraňovány gelovou permeační chromatografií (metoda 3640). Pokud jsou ve vzorku přítomné i jiné halogenované substance, mohou také interferovat. Pro jejich odstranění se používají následující metody 3630 (silikagel) – odstranění chlorofenolů, 3620 (Florisil) nebo 3610 (oxid hlinitý). PCB jsou odstraňovány metodou 3620 a 3630.

### **U.S. EPA 8270** Stanovení aldrinu, chlordanu, chlorfenvinfosu, 4,4'-DDT, 4,4'-DDE, 4,4'-DDD, dieldrinu, endosíranu (endosíranu I, II), endrinu

Tato technika je vhodná pro stanovení koncentrace 259 polotěkavých organických látek v extraktech půd, odpadů a podzemních vod. Metodika je aplikovatelná i na vody povrchové. 30 g pevného vzorku se extrahuje v ultrazvukové vodní lázni, poté se vzorek koncentruje na 1 ml, pro analýzu GC/MS se používá 10 µl vzorku. Separace a determinace jednotlivých polutantů se provádí na GC/MS. Kolony GC mají následující rozměry: 30 m x 0,25 mm (nebo 0,32 mm), tloušťka 1 µm, s vrstvou silikagelu. Vzorky půd jsou uchovány stejně jako v případě metody U.S. EPA č. 8080. Extrakt z půdních vzorků se připravuje z navážky 30 g, smícháním se směsí methylenchlorid:aceton (1:1) v ultrazvukové lázni, čas 3 min. Poté se extrakt dekantuje nebo filtruje. Extrakce se opakuje 2 – 3 x. Nakonec se extrakty spojí, vyčistí se kolonou, která obsahuje síran sodný a koncentrují se na objem 1 ml v K-D koncentrátoru. Roztok methylenchloridu s obsahem 50 ng/l dekafluorotrifenylfosfinu (DFTPP) je využíván pro ladění systému GC/MS každých 12 hod. Rozsah stanovení 660 – 3 330 µg/kg sušiny.

**U.S. EPA 1699** Stanovení atrazinu, chlorpyrifosu, dieldrinu, aldrinu, endrinu, endosíranu, 4,4'-DDT, 2,4'-DDE, 4,4'-DDE, 4,4'-DDD, o,p'-DDT, p,p'-DDT a jiných pesticidů

Tato metoda zahrnuje extrakci vzorku, extrakty jsou koncentrovány odpařením na rotační vakuové odparce nebo pomocí odpařovače Kuderna-Danish. Extrakty jsou poté ve vhodném rozpouštědle injektovány do HRGC/HRMS (objem 20  $\mu$ l). Extrakty je nutné čistit na aminopropylenové a mikrosilikagelové koloně, popř. gelovou permeační chromatografií. Pokud jsou v extraktu stanovovány organochlorované pesticidy, je vhodné pro další čištění použít silikagel Florisil nebo oxid hlinitý. Bezprostředně před injektáží nabarvený interní standard je přidáván ke každému extraktu. Analyt je separován GC a detekován vysoce-rezoluční hmotnostní spektrometrií – monitoruje se  $m/z$  pro každou stanovovanou komponentu. Jednotlivé pesticidy jsou identifikovány srovnáním GC retenčního času a iontové abundance s korespondenčním retenčním časem autentického standardu a teoretickým nebo požadovaným poměrem  $m/z$ . Zdrojem interferencí z hlediska jejich možné kontaminace mohou být činidla, sklo, chemikálie. Mohou se projevovat interference látek, které jsou společně extrahovány s pesticidy – PCB, chlorované a bromované dibenzodioxiny a dibenzofurany, methoxybifenyly, bromované bifenylestery apod. Tyto látky musí být eliminovány čistícími procedurami. Detekční limity jsou závislé na úrovni interferencí spíše než na instrumentálních limitacích (stanovovány jsou metodou 40 CRF 136, appendix B).

**California Department of Food and Agriculture, patří k U.S. EPA, má standardizované metodiky, Metoda 309 Determination of selected pesticides collected on XAD-4 resin by High Performance Liquid Chromatography Ion Trap Mass Spectrometry and Gas Chromatography Mass Spectrometry.**

[http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/em\\_herb\\_methd.htm](http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/em_herb_methd.htm)

Metoda je vhodná ke stanovení 26 pesticidů včetně chlorpyrifosu a simazinu s mezí detekce 0,25 – 2  $\mu$ g/kg. Pesticidy jsou extrahovány s XAD-4 ethylacetátem. HPLC je vybaven kolonou C-18 a hmotnostním detektorem.

### *Nestandardizované metody stanovení*

**Fatoki O.S., Awofolu R.O. (2003): Methods for selective determination of persistent organochlorine pesticide residues in water and sediments by capillary gas chromatography and electron-capture detection, Journal of Chromatography A, 983, 225-236.**

Vzorky půdy a sedimentů mohou být extrahovány buď pomocí Soxhletovy extrakce nebo mikrovlnné extrakce. Jako rozpouštědlo se nejčastěji užívá petrolether, hexan nebo dichlormethan. Extrakce vzorků u obou procedur probíhá obdobně jako u jiných metod. Získané extrakty jsou analyzovány na plynovém chromatografu s detektorem elektronového záchytu, na kapilárních kolonách naplněných  $\text{SiO}_2$  (30 m x 0,53, tloušťka filmu 0,2  $\mu$ m). Injektáž vzorku (1  $\mu$ l) se provádí manuálně, teploty injektoru a detektoru jsou 250  $^\circ\text{C}$  a 350  $^\circ\text{C}$ . Teplota je udržována na 120  $^\circ\text{C}$ , a poté je zvyšována s rychlostí 20  $^\circ\text{C}/\text{min}$ . na 150  $^\circ\text{C}$ , a pak až na 250  $^\circ\text{C}$ , s rychlostí 5  $^\circ\text{C}/\text{min}$ . Jako nosný plyn se používá hélium, jako maskující dusík. Rychlost toku nosného plynu je 2 ml/min. a maskujícího 28 ml/min.

**Rodil R., Popp P. (2006): Development of pressurized subcritical water extraction combined with stir bar sorptive extraction for the analysis of organochlorine pesticides and chlorobenzenes in soil., Journal of Chromatography A, 1124, 82-90.**

Tato metodika stanovuje výše zmíněné organochlorové pesticidy pomocí GC/MS. Pro úpravu vzorku půdy využívá PSWE (voda-acetonitril, 75:25), která je následována SBSE a GC/MS stanovením. Procedura nabízí rychlou a jednoduchou metodu pro stanovení organochlorových pesticidů. Extrakce není časově náročná. Optimalizované podmínky extrakce: 10 g půdy je extrahováno směsí voda – acetonitril (75:25, v/v) po dobu 180 min. při míchací rychlosti 1 000 rpm, po extrakci se zařízení propojí s termodesorpční tubou GC-MS. Termodesorpce probíhá za následujících podmínek:

desorpční teplota 250 °C, rychlost toku hélia 150 ml/min., desorpční čas 5 min. Transferová linie mezi termodesorpčním zařízením a studeným injekčním systémem (CIS) je nastavena na 250 °C. Po desorpci CIS podmínky jsou následující: teplota – 20 °C, následuje ohřátí na 250 °C (čas 2 min.) při rychlosti 10 °C/s. Kapilární kolony (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm tloušťka) byly užity pro následující program: 50 °C, 2 min. isotermálně, 15 °C/min do 160 °C, 2 min. isotermálně, pak 5 °C/min. do 280 °C a udržování 4 min. Nosný plyn – hélium s rychlostí toku 1 ml/min. Kvantifikace vzorku byla provedena interní kalibrací. Procedura poskytuje limit detekce 0,002 – 4,7 ng/g pro všechny sledované komponenty.

**Shegunova P., Klánová J., Holoubek I. (2007): Residues of organochlorinated pesticides in soil from the Czech Republic, Environmental Pollution 146, 257-261.**

5 g půdy se extrahuje dichlormethanem v automatickém extraktoru Büchi Systém B-811. Po extrakci se extrakt vyčistí, v případě, že půda obsahuje velké množství pryskyřic, používá se gelová permeační chromatografická kolona (Bio-Beads SX-3, 50 cm x 0,8 cm, zrnitost gelu 200 – 400 mesh). 1 ml extraktu se injektuje a eluuje se chloroformem, objem se poté redukuje za mírného proudu dusíku při pokojové teplotě. Frakcionace se provede na chromatografické koloně naplněné Florisilem (5 g aktivovaný při 130 °C, 4 hod. s přísávkem 10 % vody), kolona se nejdříve promyje 50 ml n-hexanu. Vzorek se eluuje do dvou frakcí – 20 ml 20% roztoku n-hexan:dichlormethan (chlornan, aldrin, isodrin, heptachlor) a 50 ml dichlorethanu (zbývající organochlorované pesticidy). Objem vzorků se redukuje na 5 ml rotační vakuovou odparkou, a pak mírným proudem dusíku na konečný objem 0,2 ml. Organochlorované pesticidy se analyzují na GC/MS, který je spojen s iontovou pastí hmotnostního spektrometru za pomoci EI/MS-MS módu. Chromatografická separace se provádí na DB-5MS kolonách (náplň silikagel, parametry kolony 60 m x 0,25 mm, tloušťka 0,25 µm), jako nosný plyn se používá hélium (rychlost toku 30 cm/s). Teplotní program kolony: počáteční teplota 80 °C po dobu 1 min., rychlostní krok 20 °C/min až do dosažení 200 °C, poté rychlostní krok je 1,5 °C/min. do 260 °C, rychlostní krok 15 °C/min do dosažení 300 °C. Injektuje se množství 1 µl vzorku, injektor a iontový zdroj se udržují při teplotách 250 °C, 275 °C a 200 °C.