

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Ústav pro životní prostředí

Studijní program: Ekologie a ochrana prostředí

Studijní obor: Ochrana životního prostředí



Iveta Křížová

Problematika dokazování použití pesticidních přípravků při nelegálních otravách zvířete

The issues of proving the use of pesticides in illegal poisoning of animals

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: prof. RNDr. Tomáš Cajthaml Ph.D.

Praha, 2022

Charles University

Faculty of Science

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Tomáše Cajthamla, Ph. D. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Předložená tištěná verze je totožná s elektronickou verzí vloženou do SIS. Tato práce ani její podstatná část nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 15.8.2022

.....
Iveta Křížová

Poděkování

Ráda bych poděkovala mému školiteli prof. RNDr. Tomáši Cajthamlovi, Ph.D. za odborné vedení této práce, trpělivost, ochotu a cenné rady, které mi věnoval při zpracování. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Jaroslavu Semerádovi, Ph.D. za pomoc, kterou mi věnoval v průběhu zpracování experimentální části práce.

Abstrakt:

Otravy pesticidními přípravky jsou celosvětovým problémem. Pesticidy jsou chemikálie určené k eliminaci nežádoucích organismů. Řada přípravků je pro svoji toxicitu zakázána, ale stále dochází k jejich zneužívání. Problém nastává při dokazování travičství kvůli nedostatku důkazů. Trasování chemikálií pomocí chemických atribučních signatur je relativně novou metodou používanou ve forenzních vědách, ale pesticidy jsou v tomto odvětví málo prozkoumány. V chemikáliích jsou vyhledávány charakteristické sloučeniny, které mohou poskytovat nezbytné informace o výrobě a používání nedovolených látek. Tato bakalářská práce se zabývá zneužitím pesticidních přípravků při nelegálních otravách zvěře. Zvláštní pozornost je věnována karbofuranu, který je v České republice nejčastěji zneužívaným pesticidem. Cílem experimentální části bylo analyzovat přípravky s karbofuranem a dokázat, že se jednotlivé přípravky od sebe kvalitativně liší.

Abstract:

Pesticide poisoning is a worldwide problem. Pesticides are chemicals designed to eliminate unwanted organisms. Many products are banned due to their toxicity, but they are still being abused. The problem arises in proving poisoning due to lack of evidence. Tracing chemicals using chemical attribution signatures is a relatively new method used in forensic sciences, but pesticides are understudied in this field. Characteristic compounds in chemicals are searched for that may provide the necessary information about produce and use illicit substances. This bachelor's thesis deals with the abuse of pesticide products in illegal poisoning of wildlife. Special attention is paid to carbofuran, which is the most frequently abused pesticide in the Czech Republic. The aim of the experimental part was to analyze carbofuran preparations and to prove that individual preparations differ qualitatively from each other.

Klíčová slova: Karbofuran, pesticidy, nelegální otravy, chemická analýza

Keywords: Carbofuran, pesticides, illegal poisoning, chemical analysis

Obsah

1	Seznam zkratek.....	2
2	Úvod.....	4
3	Teoretická část.....	5
3.1	Pesticidní přípravky.....	5
3.1.1	Dělení pesticidů.....	5
3.1.2	Toxicita pesticidů.....	7
3.2	Problematika ilegálních otrav.....	8
3.2.1	Nejčastěji zneužívané pesticidy.....	8
3.2.2	Trend v ilegálních otravách pesticidy.....	9
3.2.3	Analýza reziduí pesticidů.....	10
3.2.3.1	Příprava vzorků.....	11
3.2.3.2	Chromatografická analýza pesticidů.....	13
3.2.3.3	Použití hmotnostní spektrometrie jako detektor pro stanovení pesticidů.....	14
3.3	Karbofuran.....	15
3.3.1	Vlastnosti.....	15
3.3.2	Toxicita a její mechanismus.....	16
3.3.3	Cílové organismy otrav.....	18
3.3.4	Degradace karbofuranu.....	18
3.3.5	Chemická analýza.....	20
3.3.6	Otravy a legislativní opatření v České republice.....	21
3.3.6.1	Chemické atribuční signatury.....	22
3.3.6.2	Trasování otrav karbofuranem.....	23
4	Experimentální část.....	24
4.1	Použité chemikálie a přístroje.....	24
4.2	Příprava vzorků.....	24
4.3	Chromatografické podmínky.....	24
5	Výsledky a diskuse.....	25
6	Závěr.....	29
7	Seznam použité literatury.....	30

1 Seznam zkratek

ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric-Pressure Chemical Ionization)
C ₁₈ , C ₈ , C ₄	modifikované silikagely
CAS	chemické atribuční signatury (Chemical Attribution Signatures)
CNS	centrální nervová soustava
EI	elektronová ionizace (Electron Ionization)
ESI	elektrosprejová ionizace (Electrospray ionization)
FA	kyselina mravenčí (Formic Acid)
FMC	firma (Food Machinery Corporation)
GC	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
GCB	grafitizované saze (Graphitized Carbon Black)
GPC	gelová permeační chromatografie (Gel Permeation Chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)
HPLC-MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
IAE	imunoafinitní extrakce (Immuno-Affinity Extraction)
IC ₅₀	inhibiční koncentrace, která způsobí inhibici z 50 % (Inhibitory Concentration)
IT	analyzátor na principu iontové pasti (Ion Trap)
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a aplikovanou chemii (International Union of Pure and Applied Chemistry)
LC	kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
LD ₅₀	smrtná dávka pro 50 % testovaných jedinců (Lethal Dose)
LLE	extrakce kapalina-kapalina (Liquid-Liquid Extraction)
m/z	poměr hmotnost/náboj
MQ	ultra čistá voda (Milli-Q)
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
MSPD	matricová disperze v pevné fázi (Matrix Solid Phase Dispersion)
PFDA	Zákon o čistých potravinách a léčivech (Pure Food and Drug Act)
PNS	periferní nervová soustava

PSA	primární-sekundární amin (Primary-Secondary Amine)
Q	kvadrupólový analyzátor
QqQ-MS	trojitý kvadrupól hmotnostní spektrometrie
Q-TOF-MS	kvadrupólový hmotnostní spektrometr doby letu
RT	retenční čas
SFE	superkritická fluidní extrakce (Supercritical Fluid Extraction)
SPE	extrakce na pevné fázi (Solid Phase Extraction)
SPME	mikroextrakce na pevné fázi (Solid Phase Micro Extraction)
StDev	směrodatná odchylka (Standard Deviation)
TOF	analyzátor doby letu (Time Of Flight)
UHPLC-MS	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (Ultra High-Performance Liquid Chromatography)
UHPLC-MS/MS	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

2 Úvod

Ilegální otravy jsou celosvětovým problémem. Trávení zvíře pomocí pesticidů je nezákonné a nebezpečné. Podlehnout otravě mohou i jiná zvířata, než proti kterým nástrahy byli cíleně namířeny. Navíc použití takových nástrah proti ohroženým a kriticky ohroženým druhům může mít fatální následky na jejich populaci. Pesticidy jsou látky různých chemických struktur, vyvinuté k eliminaci nežádoucích organismů. Zvířata jsou trávena pomocí nástrah obsahujících toxické látky, jimiž velmi často jsou právě pesticidní přípravky. Některé pesticidy byly pro svoji toxicitu zakázány, ale stále jsou zneužívány v rámci ilegálních otrav (de Roma et al., 2018; Ruiz-Suárez et al., 2015). Jednou z takových toxických látek je karbofuran, který je v České republice nejčastěji zneužíván (Novotný et al., 2011). Karbofuran způsobuje akutní otravu již v malých dávkách, dochází k reverzibilní inhibici acetylcholinesterázy, díky čemuž nastává velmi bolestivá smrt v důsledku selhání dýchací soustavy (C. Gupta, 1994).

Zjistit, kdo zvíře otrávil je komplikované, především kvůli nedostatku důkazů. Relativně novou metodou ve forenzních analýzách je identifikace chemických atribučních signatur. Jedná se o identifikaci sloučenin, které se do přípravků dostávají při výrobě či další manipulaci a jsou pro ně charakteristické. Následné porovnávání těchto nalezených sloučenin ve vzorkách se sloučeninami z vytvořených databází lze využít při identifikaci zdroje v nelegálních činnostech.

Předmětem této bakalářské práce je rešerše o pesticidech, jejich zneužívání a analýze při ilegálních otravách se zaměřením na konkrétní pesticidní látku karbofuran a možné využití chemických atribučních signatur při jeho trasování a identifikaci při forenzních analýzách. Vlastní experimentální část se zabývá kvalitativní analýzou pesticidního přípravku Furadanu s cílem nalezení unikátních sloučenin. Z níže uvedené literární rešerše byly vyvozeny tři hypotézy. První hypotéza říká, že jednotlivé šarže Furadanu od stejného výrobce se budou od sebe lišit výskytem charakteristických sloučenin. Druhá hypotéza říká, že stejné detekované sloučeniny se budou lišit svými odezvami v jednotlivých šaržích Furadanu. A poslední třetí hypotézou je tvrzení, že Furadan, zabavený při nelegální činnosti, bude také odlišitelný od zbylých zakoupených přípravků.

3 Teoretická část

3.1 Pesticidní přípravky

Pesticidní přípravky jsou chemické látky určené k hubení živočichů, houbových organismů nebo plevelů, které ohrožují nejen zemědělské plodiny, ale i ostatní lesní a zahradní rostliny, skladované potraviny a průmyslové materiály. Nejvíce se používají na zemědělských půdách, ale uplatnění nachází i v domácnostech, městech nebo průmyslu. V roce 1906 v Americe přijali první zákon o čistých potravinách a léčivech (PFDA, angl. Pure Food and Drug Act) a v roce 1910 přišla první legislativa, zákon o insekticidech (Davis, 2014). Velký rozmach syntetických organických pesticidů přišel při 2. světové válce. Cílem Německa bylo vytvořit z insekticidů nervové látky pro vojenské účely, a tak vznikla velká skupina organofosforových sloučenin, které se dodnes používají jako pesticidy (R. Gupta, 2006). Díky úspěchům těchto výzkumů a úspěchům DDT, u kterého byly roku 1939 Dr. Paulem Müllerem objeveny jeho insekticidní vlastnosti, po roku 1945 přišel obrovský rozmach výroby pesticidních přípravků (Cremlyn & Seifert, 1985). U mnoho pesticidních látek byla zjištěna vysoká toxicita a jejich výroba byla posléze zakázána. Velký obrat přišel roku 1962 s vydáním knihy *Silent Spring* od Rachel Carson, která ve svém díle upozornila na rizika používání nebezpečných látek jako je třeba DDT. Kniha je mnohými považována za průlomovou, jelikož vedla ke vzniku ekologického hnutí a uvedení těchto problémů mezi veřejnost (Vail, 2015).

3.1.1 Dělení pesticidů

Dělit pesticidy můžeme hned z několika hledisek. Nejčastější dělení pesticidů je podle cílových organismů, zda jsou určené k hubení živočichů, rostlin či hub, nebo podle použitých účinných látek. Existuje, ale i další dělení, jako je např. podle způsobu účinku na chráněné plodině, působení na škůdci, původu nebo podle šířce účinnosti.

Jedno z nejčastějších dělení, podle cílového organismu, je následující:

- 1) zoocidy (proti živočichům),
 - a) insekticidy (hubení hmyzu),
 - b) rodenticidy (hubení hlodavců),
 - c) nematocidy (hubení háďátek),
 - d) moluskocidy (hubení měkkýšů),
 - e) akaricidy (hubení roztočů),

- 2) herbicidy (proti rostlinám),
- 3) fungicidy (proti houbám) (Cremlýn & Seifert, 1985).

Zoocidy jsou velmi rozsáhlou skupinou, která se dělí na mnoho podskupin a výše zmíněné jsou jedny z nejčastěji používaných.

Druhým nejčastějším způsobem, jakým jsou pesticidy klasifikovány je podle jejich chemické struktury a podle tohoto kritéria se dělí do 4 hlavních skupin na:

- 1) organochlorové sloučeniny,
- 2) organofosfátové sloučeniny,
- 3) karbamátové sloučeniny,
- 4) pyretroidy (Prieto Garcia et al., 2012).

Kromě těchto hlavních skupin existuje řada dalších, ovšem méně používaných, kterými jsou:

- 5) fenoxalkanové sloučeniny,
- 6) sloučeniny na bázi močoviny,
- 7) triazinové a diazinové sloučeniny,
- 8) látky na bázi bipyridylů,
- 9) látky na bázi toxických kovů (ALS Environmental, 2015).

Podle způsobu účinku, tedy jakým způsobem interagují s ošetřovanou rostlinou, se dělí na:

- 1) kontaktní (účinná látka zůstává na povrchu rostliny a působí při přímém styku se škůdcem),
- 2) systémové (pronikají do rostlinných pletiv a celá rostlina se stává jedovatou pro škůdce),
- 3) požerové (vstup přes trávicí ústrojí),
- 4) respirační (vstup pomocí dýchacího ústrojí) (Dirlbek, 1980).

Kontaktní pesticidy patří mezi prvně používané a až později byli vynalezeny lepší pesticidy se systémovým účinkem (Cremlýn & Seifert, 1985). Důvodem opožděnější aplikace je jejich selektivita, neboť vynalézt herbicid, který nepoškodí ošetřovanou plodinu, zatímco zlikviduje plevel, je značně obtížnější (Cremlýn & Seifert, 1985). Kontaktní pesticidy mají řadu nevýhod, a proto byli vyměněny za ty se systémovým účinkem. Důležitou nevýhodou může být závislost účinku na povětrnostních podmínkách nebo v případě herbicidů, působících jen na zasaženém místě, nedojde ke zničení celé rostliny (Cremlýn & Seifert, 1985).

Z hlediska původu se pesticidy dělí na přírodní a syntetické a z hlediska jejich účinnosti na selektivní, širokospektrální nebo totální. Selektivní přípravky jsou zaměřeny na úzkou skupinu organismů, zatímco širokospektrální jsou účinné proti širšímu spektru organismů. Způsoby aplikace jsou taky velmi pestré. Přípravky mohou být aplikovány ve všech 3 skupenstvích, ať už formou postřiků, zálivek, granulí, aerosolů nebo fumigantů.

3.1.2 Toxicita pesticidů

Odhaduje se, že až 90 % aplikací zemědělských přípravků se vůbec nedostane k cílovým organismům proti kterým jsou namířeny (Donovan et al., 2011). U většiny přípravků je jejich účinek mnohem rozsáhlejší, než se předpokládalo. Nežádoucí účinky se mohou projevit okamžitě, ale i po delší době, neboť mnoho látek je perzistentních nebo mají kumulativní vlastnosti. Rezidua pesticidů jsou známými kontaminanty životního prostředí, které můžeme detekovat v tkáních lidí, zvířat nebo ve vodě (Milatovic et al., 2006). Expozice pesticidům může způsobovat neurologické, psychiatrické, imunitní, metabolické a endokrinní poruchy a mnohdy jsou pesticidy karcinogenní či mutagenní (Prieto Garcia et al., 2012). Podle světové zdravotnické organizace (WHO, z angl. World Health Organization) se odhaduje, že dojde až k 1 milionu akutních otrav ročně způsobených pesticidy s úmrtností 0,4-1,9 % (Prieto Garcia et al., 2012). WHO také zavedla klasifikaci pesticidů podle hodnot dermální a orální LD₅₀ (z angl. Lethal Dose) u potkana zohledňující jejich toxicitu, která je uvedena v tabulce 1. LD₅₀ je smrtelná dávka, jejíž podání způsobí smrt u 50 % testovaných jedinců.

Tabulka 1: Klasifikace pesticidů na základě hodnot orální a dermální LD₅₀ u potkana. Převzato a upraveno od WHO, 2019.

Třída		LD ₅₀ pro potkana (mg/kg tělesné hmotnosti)	
		Orálně	Dermálně
Ia	Extrémně nebezpečné	<5	<50
Ib	Vysoce nebezpečné	5–50	50–200
II	Středně nebezpečné	50-2000	200-2 000
III	Mírně nebezpečné	Přes 2 000	Přes 2 000
U	Pravděpodobně není akutně nebezpečné	5 000 a více	

3.2 Problematika ilegálních otrav

Přestože je v Evropské unii (EU) v dnešní době úmyslné otrava zvířat nezákonná, v minulosti byly jedy hojně používány a tento jev může být hluboce zakořeněn ve společnosti. Cílem mohou být volně žijící, domácí i hospodářská zvířata, která jsou lidmi považována za škodlivá pro jejich činnosti, jako je např. zemědělství či chov. K otravě dochází pomocí nástrah, které mohou být různého typu. Většinou bývají přizpůsobené potravě organismu, na který jsou namířeny. Použity mohou být různé druhy toxických látek, avšak velmi často se v nástrahách nachází pesticidy jako trávící látka. Chiari a kol. uvádí, že až 50,3 % otrávených nástrah bylo pozitivní právě na pesticidy (Chiari et al., 2017).

3.2.1 Nejčastěji zneužívané pesticidy

Nejčastěji zneužívané pesticidy pro otravy jsou z řad insekticidů (Chiari et al., 2017; Novotný et al., 2011; Ruiz-Suárez et al., 2015; Wang et al., 2007). Např. Chiari a kol. uvádí, že z 956 analyzovaných nástrah byly přítomny z 53,2 % insekticidy, 34,3 % rodenticidy, 12,3 % moluskocidy a pouze 0,2 % tvořily herbicidy (Chiari et al., 2017). Tomu však nemusí být všude stejně. Např. de Roma a kol. nebo di Blasio a kol. uvádí největší zastoupení rodenticidů. V jedné studii byla u vzorků ze zvířat potvrzena přítomnost rodenticidů až v 67,4 % a insekticidů jen v 15,5 %, zatímco v analyzovaných nástrahách byl podíl těchto dvou skupin zhruba stejný (di Blasio et al., 2020). Důvod, proč vzorky z uhynulých zvířat v této studii byly pozitivní přibližně čtyřikrát více na rodenticidy než na insekticidy, zatímco analyzované nástrahy obsahovaly téměř stejné podíly, je vysvětlován přítomností více faktorů. Insekticidy v organismu mohou mít rychlejší tkáňovou distribuci a metabolizaci oproti rodenticidům nebo fakt, že rodenticidy obsahují chuťové látky, čímž mohou být zvířaty preferovány v konzumaci (di Blasio et al., 2020). Je zajímavé, že výše zmíněné studie byly prováděny v Itálii a přibližně ve stejném období, a přesto jsou takto odlišné.

V závislosti na chemické struktuře jsou nejběžnějšími skupiny pesticidů způsobující otravy v Evropě organofosfáty, karbamáty a antikoagulační rodenticidy (Berny, 2007). Studie se od sebe procentuálním zastoupením typů pesticidů liší. Některé uvádí největší podíl karbamátů (Wang et al., 2007), jiné největší zastoupení organofosfátů (Garcia-Repetto et al., 1998) a některé zase největší podíl organochlorových sloučenin (Chiari et al., 2017). Neobvyklá není ani přítomnost více než 1 pesticidu v nástraze (Chiari et al., 2017; di Blasio et al., 2020).

Některé pesticidní přípravky jsou více preferovány traviči než ostatní. Z karbamátů je to karbofuran (Chiari et al., 2017; de Shoo et al., 1999; Novotný et al., 2011; Ruiz-Suárez et al., 2015; Wang et al., 2007) a aldikarb (de Shoo et al., 1999; Ruiz-Suárez et al., 2015), z organofosfátů methamidofos (Chiari et al., 2017), mevinfos a parathion (de Shoo et al., 1999), z organochlorových sloučenin endosulfan (Chiari et al., 2017; de Roma et al., 2018; di Blasio et al., 2020) a ze skupiny antikoagulačních rodenticidů je významný brodifakum, bromadiolon nebo kumatetralyl (Chiari et al., 2017; di Blasio et al., 2020; Ruiz-Suárez et al., 2015). Preferovaný výběr těchto látek není náhodný a souvisí s jejich toxicitou. Byla zjištěna značná korelace mezi hodnotami LD₅₀ těchto látek a jejich četností otrav (Martínez-Haro et al., 2008). Pro představu jsou hodnoty LD₅₀ uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Hodnoty orální LD₅₀ pro potkana vybraných pesticidních látek. Převzato od Martínez-Haro a kol, 2008. a upraveno.

Sloučenina	Orální LD₅₀ pro potkana (mg/kg)
Brodifakum	0,16
Aldikarb	0,65
Bromadiolon	0,7
Karbofuran	9,55
Parathion	16
Methamidofos	17,25
Endosulfan	89,00

3.2.2 Trend v ilegálních otravách pesticidy

Ve víceletých studiích dokonce zaznamenali i sezónní změnu v otravách. Vyšší používání otrávených nástrah v zimě a na začátku jara oproti jiným ročním obdobím bylo zaznamenáno hned v několika studiích (Bille et al., 2016; Chiari et al., 2017). Zajímavé je, že de Roma a kol., kteří uváděli ve své studii jiné zastoupení pesticidů při otravách, uvádí i jiné sezónní rozložení otrav. Největší trend zaznamenali na přelomu jara a léta (de Roma et al., 2018). Sezónní rozložení nástrah by mohlo poukazovat na to, že travičství není nahodilé, ale cíleně zaměřené. Kladení nástrah v předjaří by mohlo být podmíněno narozením mláďat a vyšším tlakem na jejich odstranění.

Otrava pesticidy může nastat po schváleném použití, nesprávném použití, úmyslném zneužití, nebo může nastat incident, kde výsledky byly nejednoznačné (de Shoo et al., 1999). Některé sloučeniny byly již v minulosti pro svoji toxicitu v Evropské Unii zakázány, přesto některé z výše uvedených studií byly provedeny v době, kdy používání pesticidů, obsahující tyto sloučeniny, ještě nebylo zakázáno. V takovém případě by ve výsledcích nebylo zahrnuto pouze nelegální zneužívání těchto přípravků k otravám, ale i otravy způsobené po legální aplikaci. Ovšem už tehdy se v zemích se systémem registrace incidentů otrav prokázalo, že úmyslné zneužití takových přípravků tvoří 53-66 % ze všech případů (de Shoo et al., 1999). Kromě úmyslného zneužití existuje i mnoho případů, kdy přesná příčina nebyla prokázána, ale při zvážení prokázaných sloučenin a druhů obětí je velmi pravděpodobné, že se také jednalo o úmyslné zneužití, což by znamenalo mnohem větší podíl než, je výše uvedeno (de Shoo et al., 1999). Úmyslnost byla dokladována nadměrně vysokou koncentrací toxické látky (Ruiz-Suárez et al., 2015).

Po zákazu pesticidních přípravků se očekával významný pokles v jejich použití při otravách kvůli nižší dostupnosti. Taková situace ale nenastala a stálé používání i po zákazu bylo prokázáno např. u karbofuranu, endosulfanu, methamidofosu nebo aldikarbu (Chiari et al., 2017; de Roma et al., 2018; Ruiz-Suárez et al., 2015). Ruiz-Suárez a kol. dokonce identifikovali karbofuran a aldikarb v 75 % otrávených zvířat a až v 93,8 % otrávených nástrah v době, kdy už byly zakázané (Ruiz-Suárez et al., 2015). To pak vzbuzuje znepokojující otázku, kde a jak jsou tyto sloučeniny obstarávány. Uvažované mohou být staré zásoby z dob, kdy přípravky byly legální nebo jejich ilegální obchodování na černém trhu. Snadná dostupnost na trhu a dostupnost v různých pevných i kapalných formách mohla být další příčinou oblíbenosti opakovaně používaných přípravků. Ovšem jejich stálé používání i po zákazu toto vyvrací, a naopak poukazuje na znalosti travičů ohledně jejich toxicity (Martínez-Haro et al., 2008).

Je obecně známo, že zvířata, která umírají nebo mají bolesti, jsou na méně viditelných místech (nory, hnízda, nepřístupná místa) a proto ne vždy jsou po otravě objevena. Navíc ne všechna otrávená zvířata jsou odeslána na toxikologický rozbor, tedy počet takto otrávených zvířat může být mnohem větší.

3.2.3 Analýza reziduí pesticidů

Vzorky, ze kterých jsou pesticidy analyzovány, mohou být různých matricí. Může se jednat o biologické vzorky jako je krev, moč, žluč, obsah žaludku, střev a játra nebo otrávené nástrahy,

kteře se nejčastěji skládají z běžných potravin, především z masných výrobků nebo sýrů (de Roma et al., 2018). V případě nálezů uhynulé zvěře nebo nástrahy se jen velmi zřídka dá poznat jaký druh pesticidu byl použit, a tedy jaký je potřeba cíleně detekovat. Často se proto jedná o multireziduální metody, které musí být vhodné pro stanovení nejširšího spektra pesticidů ve velmi heterogenních maticích.

Obecný postup analýzy sestává ze tří základních částí, jimiž jsou izolace analytu z matrice, purifikace a odstranění maticových složek a vlastní kvalitativní a/nebo kvantitativní analýza, nejčastěji chromatografického typu.

3.2.3.1 Příprava vzorků

Jaká izolační metoda, extrakční rozpouštědla a postupy purifikace jsou vybrány záleží na povaze analytu i matrice. Nejčastěji volenými rozpouštědly jsou aceton, acetonitril, methanol, dichlormethan, ethylacetát, diethyl ether, voda, n-hexan a jejich směsi s různými podíly (Luzardo et al., 2014). N-hexan je vhodný pro extrakci z vodných matic a acetonitril z tukových tkání, protože ty jsou v acetonitrilu špatně rozpustné (Zayats et al., 2013). Valná většina pesticidů je hydrofobní, nejvíce pyrethroidy (Zayats et al., 2013). Izolace a purifikace jsou velmi důležité kroky, jelikož maticové komponenty mohou negativně ovlivňovat chromatograf a samotné stanovení.

Nejčastěji používaná metoda pro izolaci analytu při stanovení pesticidů je extrakce tuhými fázemi (SPE, z angl. Solid Phase Extraction). Principem SPE je sorpce a následná desorpce analytu nebo matrice na sorbent ve formě disků nebo kazet umístěný v koloně. Existuje modifikace, kdy je sorbent umístěn v pipetové špičce (Hernández-Mesa & Moreno-González, 2022). Sorbenty jsou z různých materiálů, nejčastěji používaný je primární-sekundární amin (PSA), Florisil (křemičitan hořečnatý), oxid hlinitý, modifikované silikagely (C_{18} , C_8 , C_4) nebo grafitizované saze (GCB, z angl. graphitized carbon black) (Anastassiades et al., 2003; Barker, 2007; Schenck & Hobbs, 2004; Usui et al., 2014). Pro vzorky s vysokým obsahem tuku byly vyvinuty sorbenty jako je Z-sep (sorbent na bázi zirkonia) nebo EMR-Lipid pro selektivnější čištění (Hernández-Mesa & Moreno-González, 2022). Nejoblíbenější z mikroextrakcí je mikroextrakce na pevné fázi (SPME, angl. Solid Phase Micro Extraction), která se používá pro kapalně vzorky, zahrnující extrakci na tenké vlákno z taveného oxidu křemičitého potaženého stacionární fází (Hernández-Mesa & Moreno-González, 2022; Tekel et al., 2001).

Další využívanou metodou může být superkritická fluidní extrakce (SFE, z angl. Supercritical Fluid Extraction), extrakce kapalina-kapalina (LLE, z angl. Liquid-Liquid Extraction), matricová disperze v pevné fázi (MSPD, z angl. Matrix Solid Phase Dispersion), imunoafinitní extrakce (IAE, z angl. Immuno-Affinity Extraction), gelová permeační chromatografie (GPC, z angl. Gel Permeation Chromatography) nebo nová metoda extrakce QuEChERS (z angl. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) (Anastassiades et al., 2003; Barker, 2007; Hernández-Mesa & Moreno-González, 2022; Luzardo et al., 2014; Schenck & Hobbs, 2004; Tekel et al., 2001; Usui et al., 2014).

U MSPD je pevný nebo polotuhý vzorek míchán s pevným nosným materiálem s navázanou fází, čímž spojuje homogenizaci vzorku a extrakci analytu do jednoho kroku (Barker, 2007). To je výhodou, jelikož tradiční SPE vyžaduje, aby byl vzorek před přidáním do SPE kolony již v kapalném stavu, čímž se omezuje používání rozpouštědel a další manipulace. Nevýhodou ale je, že vzorek musí mít nízký obsah tuků a neměl by být úplně bezvodý (Tekel et al., 2001).

Stejně jako u SPE je LLE použitelná pouze pro kapalné vzorky, navíc extrakty z LLE obsahují více rušivých látek než extrakty z SPE (Usui et al., 2014). SFE má vysoké izolační i purifikační účinky, jelikož superkritická kapalina dobře proniká matricí, ale nevýhodou jsou velké požadavky na čistotu CO₂ a vysoké náklady (Tekel et al., 2001). Obvykle se SFE používá především pro pevné matrice, jelikož obsah vody ve vzorku má nepříznivý vliv na výtěžnost, a proto je metoda vhodná pro bezvodé vzorky nebo se přidává dehydratační materiál (Tekel et al., 2001).

IAE se používá pro kapalné vzorky, výhodou je možnost využívání pouze methanolu jako rozpouštědla a možnost regenerace kazet, ale nevýhodou je možnost afinity na strukturně podobné sloučeniny a náročnost výroby protilátek (Tekel et al., 2001).

Největším problémem při extrakcích obecně bývá velká přítomnost lipidů ve vzorku a pro takové vzorky se často využívá metoda GPC (Luzardo et al., 2014), jejíž principem je separace podle molekulové hmotnosti. Používá se jako dodatečný purifikační krok pro kapalné matrice. Pesticidy mají v porovnání s lipidy, polysacharidy nebo bílkovinami mnohem menší molekuly, které pronikají hlouběji do pórů gelu, zatímco větší molekuly jsou rychleji unášeny mobilní fází a tím účinně separovány. Mohou být využity i další interakce s gelem, např. adsorpce nebo polarita.

Relativně novou a velmi slibnou metodou je QuEChERS, jejíž název je zkratkou pro „rychlou, snadnou, levnou, efektivní, robustní a bezpečnou metodu“ a kterou v roce 2003 vyvinuli pro

stanovení pesticidů v potravinách (Anastassiades et al., 2003). Principem metody je extrahování 10 g pevného vzorku intenzivním mícháním s 10 ml acetonitrilem, přebytečná voda je dále odstraněna vysolováním pomocí solí NaCl a MgSO₄ a následně je vzorek míchán s SPE sorbentem jako purifikační krok (Schenck & Hobbs, 2004). Klasická SPE je časově náročná a pracná, zatímco zpracování vzorku, od homogenizace po purifikaci, touto metodou zabírá pouze 5 minut (Usui et al., 2014).

Navíc není zapotřebí žádné speciální vybavení (homogenizátory a mixéry) a spotřebuje se u toho minimální množství rozpouštědel (Anastassiades et al., 2003). Metoda byla vyvinuta pro stanovení pesticidů z potravin, ale Usui a kol. metodu modifikovali pro biologické pevné i kapalné vzorky (Usui et al., 2014). Běžně se ve forenzních toxikologických analýzách odebírají vzorky krve a moči, jelikož se s nimi dobře manipuluje, ale ne vždy je to možné. Především u mrtvých zvířat, a proto modifikaci této metody ještě rozšířili na stanovení z jater (Usui et al., 2014). Navíc v této studii doložili, že vzorky jater mohou obsahovat mnohem větší koncentrace jedů než jejich příslušné vzorky krve (Usui et al., 2014). Tato metoda je prozatím nejvhodnější volbou pro stanovování reziduí pesticidů, ale vzorky po této úpravě mohou obsahovat větší množství matričních látek (Hernández-Mesa & Moreno-González, 2022).

3.2.3.2 Chromatografická analýza pesticidů

V současnosti se pro kvalitativní a/nebo kvantitativní stanovení reziduí využívá kapalinová (LC, z angl. Liquid Chromatography) nebo plynová chromatografie (GC, z angl. Gas Chromatography) ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS, z angl. Mass spectrometry). Metody jsou oblíbené díky vysoké citlivosti, selektivitě a schopnosti stanovení více pesticidů z různých tříd ze složitých matic (Stachniuk & Fornal, 2016). LC nebyla dříve tolik používána, protože byla spojována s detektory diodového pole, UV nebo fluorescenčními detektory, které jsou méně selektivní a citlivé než GC systémy, ale po vyvinutí nových detekčních metod na principu MS se dostala do popředí (Alder et al., 2006).

S vývojem technologií se přešlo na vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii spojenou s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS, z angl. High-Performance Liquid Chromatography) nebo ultra vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii spojenou s hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS, z angl. Ultra High-Performance Liquid Chromatography) díky zvýšené rozlišovací schopnosti a možnosti stanovení nižších limitů kvantifikace (Hernández-Mesa & Moreno-González, 2022). Většina postupů využívá metodu HPLC s reverzní fází s použitím gradientové eluce s lineárním

zvýšením podílu organického rozpouštědla, čímž jsou hydrofilní molekuly eluovány jako první, následují molekuly s nižší polaritou až nakonec jsou eluovány hydrofobní molekuly. Pro zlepšení separace se přidává organická kyselina, nejčastěji mravenčí nebo octová (Stachniuk & Fornal, 2016). Pomocí HPLC se obvykle stanovují polární, netěkavé látky a pomocí GC nepolární a těkavé látky. Netěkavé látky lze stanovit i pomocí GC, ale je nutné je derivatizovat, což je náročné. HPLC je mnohem citlivější na stanovení reziduí pesticidů, obecně dokáže analyzovat mnohem větší rozsah analytů než GC (Stachniuk & Fornal, 2016), ale např. organochlorové pesticidy a pyrethroidy jsou lépe stanovitelné pomocí GC (Alder et al., 2006).

3.2.3.3 Použití hmotnostní spektrometrie jako detektor pro stanovení pesticidů

Hmotnostní spektrometr měří poměr hmotnost/náboj (m/z) nabitých molekul a skládá se ze tří základních částí. Z iontového zdroje, který převádí analyt do ionizovaného stavu, analyzátoru, kde jsou vzniklé ionty separovány podle příslušných hodnot m/z a detekční části, kde jsou ionty zaznamenávány (Stachniuk & Fornal, 2016).

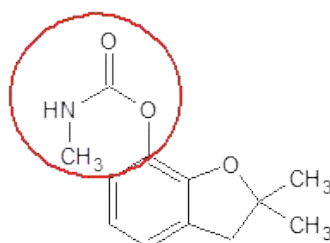
Nejčastěji používané ionizační metody pro stanovení reziduí pesticidů u systému HPLC-MS je elektrosprejová ionizace (ESI, z angl. Electrospray Ionization) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI, z angl. Atmospheric-Pressure Chemical Ionization) (Stachniuk & Fornal, 2016). Obě metody se řadí mezi měkké ionizace (tvoří se převážně molekulové ionty) (Hernández-Mesa & Moreno-González, 2022). ESI je základní metoda určená pro středně a vysoce polární látky používaná v pozitivním i negativním módu iontů, kdy jsou detekovány právě jen příslušné pozitivně nebo negativně nabitě ionty (Stachniuk & Fornal, 2016). Principem ionizace pomocí ESI je vkládání vysokého napětí na kapiláru, kterou je veden eluent, a následné vystavení nebulizačnímu plynu a elektrickému poli, čímž vznikají nabitě aerosolové kapičky (Stachniuk & Fornal, 2016). APCI je podobná metoda, používá se k analýze menších a tepelně stabilnějších molekul se střední a nízkou polaritou (Stachniuk & Fornal, 2016). U této metody je eluent převeden do plynné fáze vlivem zahřívání a působením nebulizačního plynu a následně ionizován pomocí korónového výboje na elektrodě (Stachniuk & Fornal, 2016). Pro stanovení pesticidů z potravin ve spojení s HPLC-MS se APCI používá méně než ESI a většinou jen v pozitivním módu (Hernández-Mesa & Moreno-González, 2022; Stachniuk & Fornal, 2016). U GC se nejčastěji používá elektronová ionizace (EI, z angl. Electron Ionization), což je typ tvrdé ionizace (vznikají fragmentované ionty), jejíž principem je vznik iontů srážkami molekul analytu

s proudem elektronů z externího zdroje (Hernández-Mesa & Moreno-González, 2022; Stachniuk & Fornal, 2016).

Analyzátozem, používaným pro multireziduální analýzu pesticidů v hmotnostní spektrometrii, bývá kvadrupólový hmotnostní analyzátozem (Q-MS, z angl. Quadrupole), analyzátozem doby letu (TOF-MS, z angl. Time-Of-Flight) nebo hmotnostní analyzátozem na principu iontové pasti (IT-MS, z angl. Ion Trap) (Stachniuk & Fornal, 2016). Nejčastější modifikací hmotnostního spektrometru je sériové zapojení několika analyzátozemů, stejného i jiného typu, za sebou (Stachniuk & Fornal, 2016). Tandemovým zapojením hmotnostní spektrometrie se zvyšuje separační účinnost, zlepšuje se selektivita i citlivost (Stachniuk & Fornal, 2016). Nejvyužívanější ve spojení s HPLC pro stanovení pesticidů je trojitý kvadrupól hmotnostní spektrometrie (QqQ-MS), kde první a třetí kvadrupól slouží jako hmotnostní filtr a prostřední jako kolizní buňka, nebo kvadrupólový hmotnostní spektrometr doby letu (Q-TOF-MS), který je podobný jako QqQ-MS, jen je třetí kvadrupól nahrazen TOF analyzátozemem (Stachniuk & Fornal, 2016).

3.3 Karbofuran

Karbofuran je toxická sloučenina, která se používá jako účinná látka v pesticidních přípravcích. V roce 1967 byl uveden na trh firmou FMC (Food Machinery Corporation) pod obchodním názvem Furadan jako širokospektrální nematocid (Richards, 2011). Po objasnění toxických účinků a po mnohých incidentech otrav zvířat i lidí se začalo uvažovat o zákazu této látky, ovšem ještě v dnešní době existují země, které povolují jeho aplikaci. Od roku 2008 je jakékoliv použití přípravků s obsahem karbofuranu zakázáno v členských zemích Evropské Unie (EU, 2008b), ale stálou výrobou a používáním v ostatních zemích často dochází k nelegálnímu zneužívání např. i v České republice. Karbofuran patří do skupiny karbamátových pesticidů, vyznačujících se přítomností karbamátové skupiny, která je znázorněna na obrázku 1.



Obrázek 1: Karbofuran, červeně vyznačena karbamátová skupina.

3.3.1 Vlastnosti

Systematickým názvem podle Mezinárodní unie pro čistou a aplikovanou chemii (IUPAC, z angl. International Union of Pure and Applied Chemistry) se sloučenina nazývá 2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranyl-N-methylkarbamát. Jedná se o bílou krystalickou látku bez zápachu, která je nebezpečná pro organismy při požití, kontaktu s kůží i vdechování a která je vysoce toxická pro vodní organismy akutně i chronicky (EU, 2008a). Karbofuran je sice rozpustný v polárních i nepolárních rozpouštědlech, ale pesticidní přípravek Furadan, který obsahuje většinou 3-15 % karbofuranu a už tolik rozpustný není. Granule Furadanu jsou na bázi oxidu křemičitého (FMC, 2013), který je v běžných rozpouštědlech nerozpustný. Nejčastěji se vyrábí ve formě fialových kuliček, které jsou zapracovány do půdy a následně se pozvolna uvolňují, ale může být používán i jako kapalný přípravek.

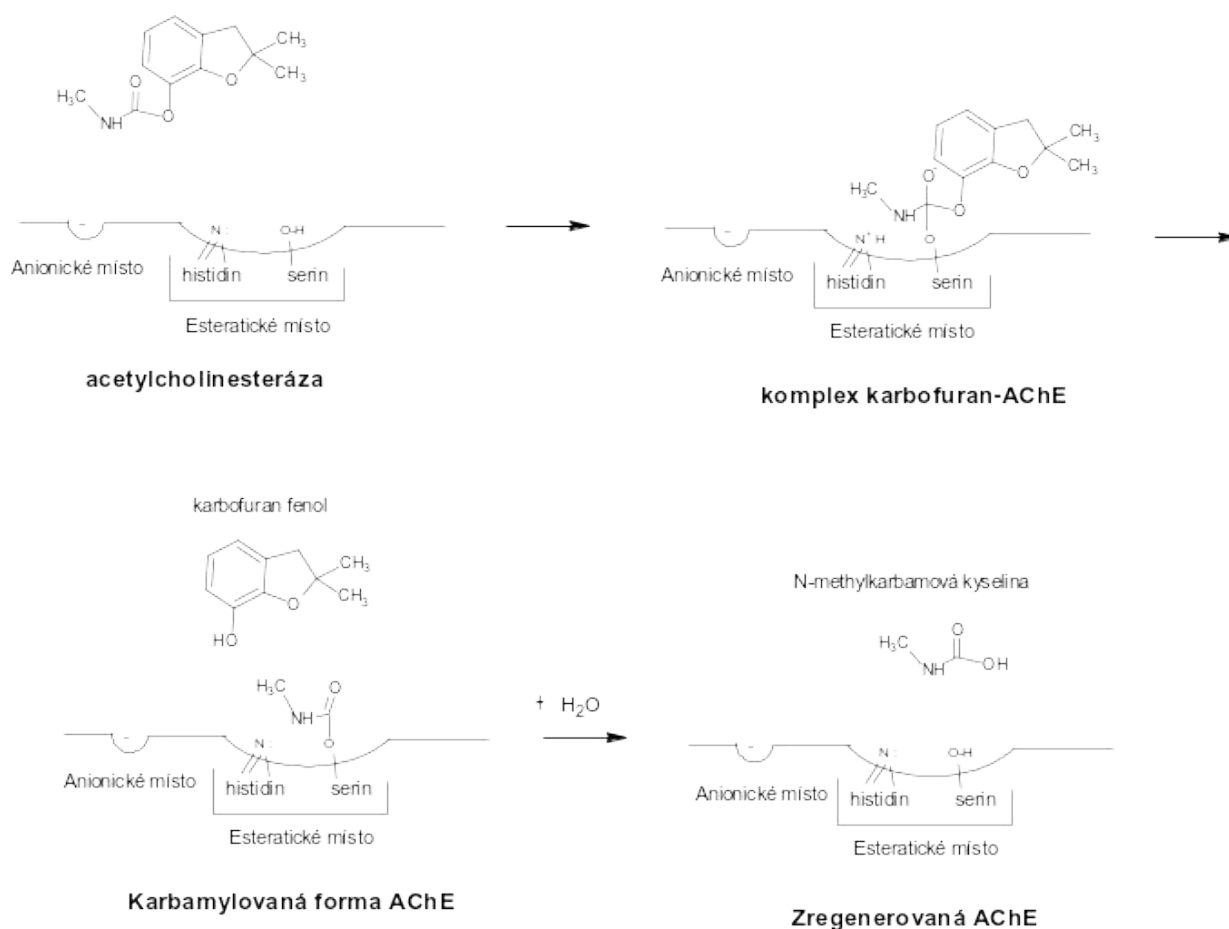
Při orálním požití je karbofuran plně absorbován, rovnoměrně distribuován a biotransformován (Ferguson et al., 1984). Při metabolizaci vzniká mnoho vedlejších produktů, ale hlavní metabolity, které primárně vznikají jsou 3-hydroxykarbofuran, 3-ketokarbofuran, 3-ketokarbofuran-fenol a jejich příslušné konjugáty (Metcalf et al., 1968). Metabolity karbofuranu tvoří konjugáty s kyselinou glukuronovou a sulfátem (Ferguson et al., 1984), čímž se stávají více polárními a násobně rozpustnějšími ve vodě, což je důležité pro eliminaci toxické látky z organismu.

3.3.2 Toxicita a její mechanismus

Karbofuran patří mezi jedny z nejvíce toxických látek používaných v zemědělství. Na základě hodnot orální LD₅₀ pro potkana (8 mg/kg) WHO rozhodlo o zařazení do kategorie Ib, tedy do kategorie vysoce nebezpečných látek (WHO, 2019). Jedná se o látku, která je toxická od začátku expozice, nepotřebuje žádnou metabolickou aktivaci a je přímým inhibitorem enzymu acetylcholinesterázy (AChE), stejně jako ostatní karbamátové insekticidy (Mineau et al., 2011).

Na enzym se může navázat substrát za vzniku enzym-substrátového komplexu. Místa, kde se může substrát navázat jsou dvě, nazývají se anionické a esteratické místo. AChE patří mezi serinové hydrolázy, způsobuje rozklad neurotransmiteru acetylcholinu (ACh) hydrolýzou za vzniku cholinu a acetátu (Thapa et al., 2017). K této hydrolýze dochází v esteratickém místě, kde se nachází aminokyseliny serin a histidin (C. Gupta, 1994). Vzniklá acetylová skupina se váže na hydroxylovou skupinu serinu, čímž je enzym acetylován (C. Gupta, 1994). To netrvá dlouho, jelikož je tato vazba velmi rychle hydrolyzována a enzym AChE se obnovuje. V případě otravy karbofuranem dochází k velmi podobné reakci. Karbofuran působí jako substrát, dochází

k rozštěpení na karbofuran-fenol a karbamylovou skupinu, která se váže na hydroxylovou skupinu serinu (C. Gupta, 1994). Inhibice karbamátem je reverzibilní, jelikož vzniklá karbamylová forma AChE je spontánně hydrolyzována (Picciotto et al., 2012), narušila od organofosfátových pesticidů, které inhibují ireverzibilně. AChE je sice regenerována odštěpením N-methylkarbamové kyseliny, ale reakce je řádově pomalejší než v případě acetylové skupiny (C. Gupta, 1994). V momentě, kdy je AChE takto inhibována, není schopna hydrolyzovat ACh, který se díky tomu hromadí v synapsích. Kromě inhibice AChE může blokovat i jiné enzymy obsahující serin, jimiž jsou například karboxylesterázy a butyrylcholinesterázy (C. Gupta, 1994). Mechanismus inhibice AChE karbofuranem je znázorněn na obrázku 2.



Obrázek 2: Schéma mechanismu inhibice acetylcholinesterázy karbofuranem. Převzato od Gupta C. 1994 a upraveno.

Akutní toxicitu způsobuje právě karbamátová skupina. Ze skupiny karbamátů se karbofuran ukazuje jako nejúčinnější inhibitor díky svojí jednodušší struktuře. Obecně u karbamátů se IC_{50} (koncentrace látky, která způsobí 50 % inhibici, z angl. Inhibitory Concentration) snižuje, čím delší a objemnější je postranní řetězec látky (Hermona Soreq & Haim Zakut, 1989).

ACh je jedním z nejdůležitějších neurotransmiterů, jelikož ovlivňuje řadu kritických funkcí, ale je také neuromodulátorem, čímž mění dráždivost neuronů a tím průběh synaptického přenosu (Picciotto et al., 2012). Působí jako neurotransmitter nejen v centrální nervové soustavě (CNS), ale v rámci periferní nervové soustavy (PNS) se objevuje ve všech autonomních gangliích a v mnoha autonomně inervovaných orgánech (Colovic et al., 2013).

ACh stimuluje jak muskarinové, tak nikotinové receptory. Při jeho nadměrné akumulaci v synaptických štěrbinách dochází k nadměrné stimulaci těchto receptorů a následné ztrátě citlivosti (Milatovic et al., 2006). Muskarinové účinky jsou charakteristické především vlivem na parasimpatikus, projevující se jako slinění, slzení, zvracení, křeče, může dojít k poškození dýchacího a srdečního systému (R. Gupta, 2006). Nikotinové účinky se projevují v sympatiku a mají za následek svalový třes až těžkou svalovou paralýzu (R. Gupta, 2006).

3.3.3 Cílové organismy otrav

Cílovými organismy mohou být jakákoliv zvířata. Často jsou postihována volně žijící zvířata, z nichž to při úmyslných otravách pesticidy bývají z 63-98 % ptáci (de Shoo et al., 1999), především dravci (Novotný et al., 2011). Nejčastěji trávenými druhy dravých ptáků jsou káňata, následovaná druhy jako jsou jestřábi, moták pochop, luňák červený nebo sokol stěhovavý a z ostatního ptactva jsou to často krkavci, bažanti, holuby nebo kachny (de Shoo et al., 1999; Dietrich et al., 1995).

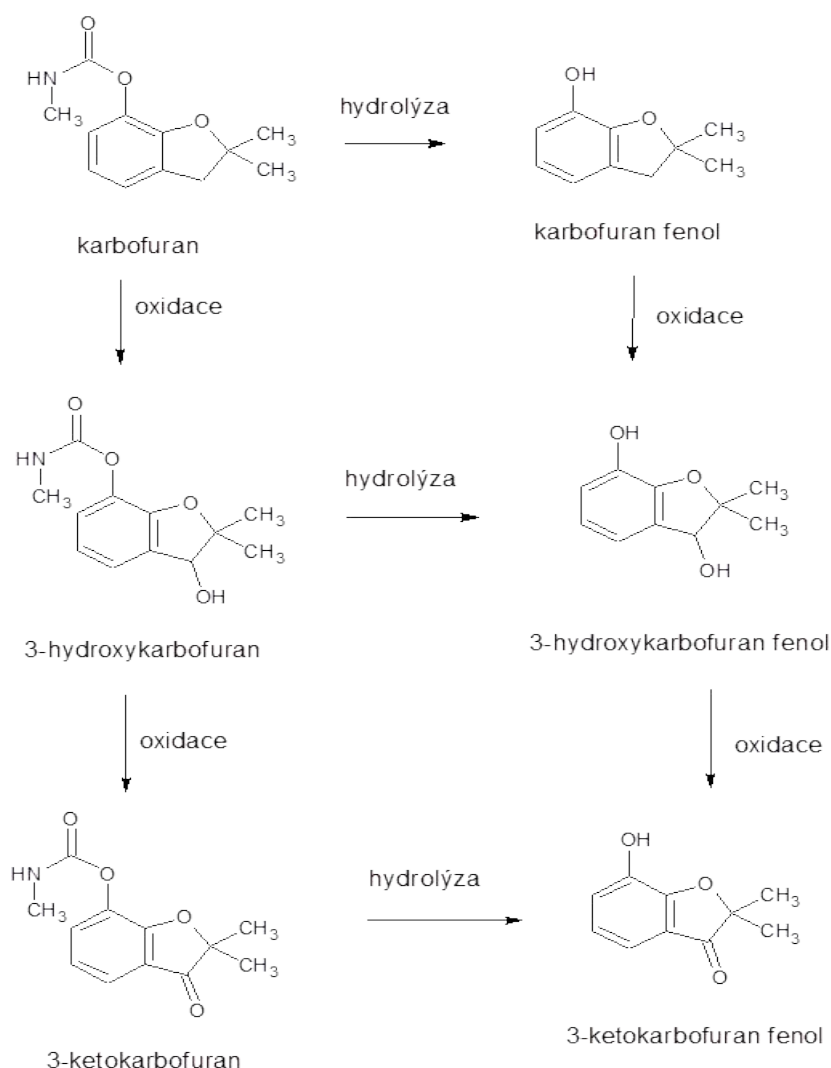
Není náhodou, že oběťmi karbofuranu se často stávají ptáci, jelikož jsou na něj velmi citliví. Větší citlivost ptáků oproti savcům k insekticidům inhibující cholinesterázu není častá, ale právě u karbofuranu tomu tak je (Mineau et al., 2011). Proto ve srovnání s ostatními pesticidy má karbofuran jednu z nejvíce zaznamenaných toxicit pro ptactvo v rámci všech celosvětově registrovaných insekticidů (Mineau et al., 2011). Otrava dravce může být způsobena jak primárně, tak sekundárně. O primární otravu se jedná, pokud je nástraha s toxickou látkou cíleně nastražena proti dravému ptáku. K sekundární otravě dochází, pokud je primární otrávená oběť zkonsumována dravcem a ve svém těle obsahuje zbytky toxické látky dostačující na otravu sekundární oběti. I tato skutečnost není neobvyklá a je popsáno mnoho případů, kdy k sekundární otravě pesticidy dochází (Balcomb, 1983; Dietrich et al., 1995; Krone et al., 2017).

Neobvyklá není ani situace otrav u domácích zvířat. Nejběžnější příčinou takových situací bývají sousedské konflikty a dochází k pohazování otrávených nástrah v ulicích nebo veřejných parcích

a loukách. Nástrahy jsou pak cílené především na psi a kočky, ale mohou to být i hospodářská zvířata (Wang et al., 2007).

3.3.4 Degradace karbofuranu

Karbofuran podléhá degradaci v půdě i vodě, ale především podléhá fotodegradaci. Degradální produkty vznikají především hydrolýzou nebo oxidací a mezi hlavní produkty patří karbofuran-fenol, 3-hydroxykarbofuran, 3-ketokarbofuran a jejich příslušné fenoly (Donovan et al., 2011). Hlavní degradační produkty jsou znázorněny na obrázku 3.



Obrázek 3: Schéma degradace karbofuranu. Převzato a upraveno od Donovan a kol., 2011.

V půdě je degradace ovlivněna mnoha faktory, jimiž jsou pH, teplota, obsah jílu a organické hmoty, přítomnost mikroorganismů nebo vlhkost (Lalah et al., 2011). Karbofuran podléhá spíše chemické přeměně než mikrobiální degradaci (C. Gupta, 1994). Poločas rozpadu v půdě se pohybuje okolo 15-38 dnů (Greenhalgh & Belanger, 1981). Koncentrace 3-hydroxykarbofuranu

byla maximální v sedmém dni od aplikace a koncentrace 3-ketokarbofuranu dosahovala maxima okolo 16. dne od aplikace, což dokazuje, že se 3-ketokarbofuran tvoří až z 3-hydroxykarbofuranu (Greenhalgh & Belanger, 1981).

Ve vodním prostředí je primárním mechanismem degradace hydrolýza (C. Gupta, 1994) a jeho rezidua jsou přítomna do tří měsíců (Iesce et al., 2006). Karbofuran je také UV nestabilní, produktem jeho fotolýzy je hlavně karbofuran-fenol (Metcalf et al., 1968; Samanidou et al., 1988). Navíc bylo zjištěno, že fototransformace nevyžaduje přítomnost kyslíku (Iesce et al., 2006). Je stabilní spíše v kyselém prostředí (Donovan et al., 2011). Obecně v alkalické oblasti dochází ke zvýšenému štěpení vazby C-O (Iesce et al., 2006). Poločas rozpadu ve vodném prostředí, při změně pH v závislosti na působení UV záření, je uveden v tabulce 3.

Tabulka 3: Poločas rozpadu karbofuranu při různém pH v závislosti na osvětlení UV zářením ve vodném prostředí. Převzato a upraveno od Iesce a kol., 2006.

pH	Neosvíceno UV zářením	Osvíceno UV zářením
7,1	7 701 h	495 h
9	3 h	1 h

Přítomnost pouze karbamátové funkční skupiny dává karbofuranu schopnost větší perzistence oproti jiným karbamátovým insekticidům (Iesce et al., 2006). Inhibici AChE způsobuje právě karbamátová skupina a jestli degradační nebo metabolické produkty budou také toxické závisí na jejím zachování (Donovan et al., 2011).

3.3.5 Chemická analýza

Zda byl při otravě použit karbofuran lze zjistit identifikací přítomnosti samotného karbofuranu nebo jeho metabolitů či degradačních produktů. Analyzován může být z jakýchkoliv matric, ať už z půdních a vodních vzorků nebo z rostlinných a živočišných tkání. Z živočišných tkání se nejčastěji analyzují játra, obsah žaludku nebo střev, krevní plazma nebo krevní sérum (Berny, 2007). Karbofuran může být stanoven stejně jako ostatní karbamáty, tedy metodou GC-MS nebo HPLC-MS, jak bylo výše zmiňováno. V dnešní době se pro identifikaci karbofuranu používá i ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií UHPLC-MS/MS, která má kratší čas analýzy než tradiční HPLC-MS (Chen et al., 2021).

Tyto přímé chemické analýzy jsou časově náročné, velmi nákladné a stanovované látky mohou být již zdegradované, proto se někdy otrava identifikuje pomocí měření aktivity AChE (Berny,

2007; C. Gupta, 1994; Wobeser et al., 2004). Nejčastěji se používá mozková aktivita, která je snížena při intoxikaci o 20-80 % (Berny, 2007), ale je pospáno i stanovení aktivity AChE v krvi (Worek et al., 1999). Jedná se o nepřímý důkaz, inhibici AChE nezpůsobuje pouze karbofuran, ale celá řada karbamátů a organofosfátů, tudíž toto stanovení není příliš průkazné pro identifikaci přímo karbofuranu, ale spíše intoxikace těmito dvěma skupinami pesticidů.

Ale ani identifikace karbofuranu a jeho metabolitů nemusí být vždy jednoznačná. Existují sloučeniny, z kterých může karbofuran vznikat jako degradační produkt nebo mohou mít stejné metabolity (Donovan et al., 2011). Takovými látky jsou například karbosulfan, benfurakarb nebo furathiokarb, což jsou všechno také karbamátové insekticidy (Donovan et al., 2011). Při analýze by se toto mělo brát v úvahu a měla by se ve vzorku vyloučit přítomnost těchto strukturně podobných látek.

3.3.6 Otravy a legislativní opatření v České republice

V České republice platí zákon č. 246/1992 Sb. Zákon národní rady na ochranu zvířat proti týrání, který vysloveně zakazuje odchyťovat nebo usmrcovat volně žijící zvíře pomocí jedovatých nástrah a jedů v jakýchkoliv formách (Česká národní rada, 1992). Důležitý je i zákon č. 449/2001 Sb. Zákon o myslivosti, který upravuje podmínky lovu zvěře a zakazuje lovit zvěř způsobem, kterým se zbytečně trýzní a trávit ji jedem (Parlament České republiky, 2001). Takové protiprávní jednání může být vyhodnoceno jako trestný čin. Otrava karbofuranem rozhodně není šetrná metoda k usmrcení. Při vysokých koncentracích může ke smrti dojít řádově v minutách od aplikace, ale v případě přežití příznaky intoxikace, jako jsou křeče, zvracení, nehybnost a dušnost, mohou přetrvávat až po dobu sedmi dní (Hudson et al., 1984). Může se tedy jednat o smrt velmi pomalou a bolestivou, nalezení otrávených dravců mají často křečovitě roztažená křídla a zaťaté pařáty. Otravy se navíc často týkají kriticky ohrožených druhů, což může mít fatální následky na jejich populaci.

V posledních 2 letech přibývá zpráv z řad médií o dalších otravách karbofuranem napříč celou republikou. Ať už se jedná o uhynulé luňáky červené na Kolínsku, Břeclavsku, Klatovsku nebo Jičínsku, orly mořské na Královéhradecku a Hodonínsku, káňata lesní na Klatovsku, nebo ostatní predátory, jako třeba lišky (CNN Prima NEWS, 21 C.E., 2020a, 2020b, 2020c). Dlouhou dobu se nedařilo otrávená zvířata nikomu dosvědčit, ale přelomový okamžik nastal roku 2021, kdy byl v ČR poprvé někdo odsouzen za travičství divoké zvěře.

Dopadnout traviče není vůbec jednoduché. K těmto činům dochází na volně přístupných a často odlehlých místech, kde se důkazy jen těžko shání. Otrávená těla zvířat se mnohdy nachází na místech, které jsou vzdálené od míst s nástrahou. Především mrtví ptáci, kteří mohou uletět delší vzdálenost, než se projeví účinky jedu. Mnohdy jsou důvodná podezření ohledně toho, kdo zvířata otrávil, ale problém nastává při dokazování těchto činů. K odsouzení je pak potřeba jasný důkaz nebo svědectví, kterého se kvůli zachování dobrých sousedských vztahů a strachu nechtějí lidé účastnit.

Poměrně nedávno se ve forezních vědách začalo využívat tzv. chemických atribučních signatur pro trasování chemických látek. V dnešní době je tato metoda hojně používána pro pašování drog nebo zneužívání chemických bojových látek, ale pesticidy jsou v této oblasti velmi málo prozkoumány.

3.3.6.1 Chemické atribuční signatury

Chemické atribuční signatury (CAS, z angl. Chemical attribution signatures) jsou obecně definovány jako vedlejší produkty, nečistoty, produkty degradace, metabolity nebo různé syntézní prekurzory, které se do výrobků mohou dostat ze surovin, při procesu syntézy nebo při manipulaci po výrobě (Mayer et al., 2018). Profilování nečistot je užitečné pro porovnávání vzorků s cílem identifikace zdroje, jelikož vzorky, které pocházejí ze stejných zdrojů, vznikly stejnou syntézou nebo pocházejí ze stejné zeměpisné oblasti, mají statisticky nerozlišitelné profily nečistot, narozdíl od vzorků z odlišných zdrojů (Daéid & Waddell, 2005; Fraga et al., 2012; Hoggard et al., 2010).

Jako CAS mohou být použity:

- nečistoty (ze zdrojových materiálů, zařízení nebo manipulace),
- aditiva,
- nezreagované látky,
- vedlejší produkty (vzniklé ať už při syntéze výchozích materiálů nebo reakcí mezi přítomnými činidly a nečistoty),
- produkty rozkladu,
- produkty hydrolýzy a
- fyzikálně-chemické vlastnosti látek (např. izotopové poměry, izomery atd.) (The U.S. Department of Homeland Security (DHS), 2015).

Nejlepší CAS jsou rekalcitrantní látky, takové prekurzory jsou totiž i nadále přítomny v nezměněné formě, nezávisle na typu použitých chemikálií, zařízení pro syntézu nebo fyzikálních podmínkách (Mayer et al., 2018). Většina signatur pochází právě z nečistot přítomných v daných reagentech nebo z nečistot, které vzniknou jako vedlejší produkt mezi činidly (Mazzitelli et al., 2012).

Pokud jde o použitelnost na vzorky v reálném světě, je to trochu komplikovanější, jelikož se musí brát v potaz, že vzorky mohou být pozmeněné environmentálními faktory, ať už před nebo po odběru (Fraga et al., 2016).

3.3.6.2 Trasování otrav karbofuranem

Identifikování jednotlivých CAS v přípravcích Furadanu by se dalo využít pro trasování a dokazování nezákonných otrav volně žijících zvířat karbofuranem. Za předpokladu, že různé firmy vyrábějící Furadan mohou používat jinou cestu syntézy, používají jiné suroviny nebo od jiných dodavatelů a jinak při celém procesu výroby s přípravky manipulují, by jednotlivé přípravky měly obsahovat sloučeniny charakteristické pro daného výrobce. Rozlišitelné od sebe by mohly být i jednotlivé šarže od stejných výrobců, jelikož výrobní podmínky nebyly stejné.

Tím pádem Furadan, který byl použit při nelegální otravě a jehož zbytky se nacházejí v nalezené nástraze nebo mrtvém zvířeti, by měl obsahovat charakteristické CAS, díky kterým by se mohl identifikovat pachatel. Nutná by byla tvorba databáze či knihovny, ve které by byly zaznamenány různé CAS, které byly detekovány v přípravcích Furadanu a přiřazeny k daným výrobcům a šaržím. Jelikož je prodej Furadanu v České republice zakázaný, mohli bychom se tímto dozvědět, od jakého výrobce se sem přípravky dostávají. Ale především v případě nálezu a zabavení přípravku Furadanu v něčím vlastnictví, by se velmi rychle a snadně dalo porovnáním nalezených CAS zjistit, zda byl použit při otravě. To by mohlo poskytnout potřebný důkaz k travičství.

Taková metoda je kvalitativní, ale dala by se využít i po kvantitativní stránce. Ne vždy se musí přípravky od sebe lišit výskytem unikátních sloučenin, a proto by se mohl brát v potaz různý poměr jednotlivých látek v přípravcích. Navíc majitel, který ve svém vlastnictví drží přípravek Furadanu, jej vystavuje novým environmentálním faktorům, které by zase mohly poskytovat charakteristické CAS. Nejspíše by se jednalo o nové nečistoty z manipulace nebo jiné podíly degradačních produktů kvůli vystavení novým podmínkám prostředí.

4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie a přístroje

Furadan 3GR, PT BINA GUNA KIMIA (Indonésie)

neznámý vzorek Furadanu pocházející z trestné činnosti (Slovensko)

CLASSIC Vortex Mixer – VELP® Scientifica (Itálie)

analytické váhy – Ohaus Corporation AV114C Adventurer™ Pro (Švýcarsko)

methanol pro LC-MS CHROMASOLV™, ≥ 99,9 %, Honeywell (Francie)

kyselina mravenčí pro LC-MS LiChropur™, 97,5-98,5 %, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

acetonitril pro HPLC, HiPerSolv CHROMANORM, ≥ 99,9 %, VWR® Chemicals (Francie)

kapalinový chromatograf HPLC Agilent 1260 Infinity II (USA)

hmotnostní spektrometr LC/Q-TOF Agilent 6546 (USA)

4.2 Příprava vzorků

Pro analýzu bylo získáno 8 vzorků Furadanu. Zásobní roztoky o koncentraci 1000 ppm (30 ppm karbofuranu) byly připraveny odvážením 2,0 mg Furadanu a rozpuštěním ve 2 ml methanolu. Furadan 3GR se z více jak 90 % skládá z krystalického oxidu křemičitého (FMC, 2013), který je v methanolu nerozpustný. Tento podíl zůstal na dně vialek. Následně byly roztoky promíchány a naředěny na požadovanou koncentraci 100 ppm, což odpovídalo 3 ppm karbofuranu. Ředění probíhalo pipetováním 100 µl ze zásobního roztoku Furadanu a doplněním 900 µl methanolu do LC-MS vialek, které byly následně dány k analýze. K těmto vzorkům byl stejným způsobem připraven kontrolní vzorek, který neobsahoval žádný Furadan.

4.3 Chromatografické podmínky

K analýze byl použit kapalinový chromatograf Agilent 1260 Infinity II ve spojení s hmotnostním spektrometrem Agilent 6546 LC/Q-TOF jako detektorem s ESI zdrojem ionizace. Látky byly separovány pomocí kolony Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3.0 x 100 mm, 2.7 µm. Mobilní fáze A tvořila MQ (ultra čistá voda, Milli-Q) + 0,1 % FA (kyselina mravenčí, z angl. Formic Acid) a fázi B tvořil acetonitril + 0,1 % FA. Vzorek byl na kolonu o teplotě 40 °C dávkován o objemu 2,0 µl. Mobilní fáze protékala rychlostí 0,4 ml/min. Analýza jednoho vzorku trvala 38,1 minut. Procentuální složení mobilní fáze v průběhu analýzy jsou znázorněny v tabulce 4.

Tabulka 4: Procentuální složení mobilní fáze v čase.

Čas [min]	Fáze A [%]	Fáze B [%]
0,00	95	5
0,50	95	5
26,00	0	100
33,00	0	100
34,00	95	5
38,00	95	5

5 Výsledky a diskuse

Vzorky byly vyhodnocovány v programu Agilent MassHunter Qualitative Analysis. Analyzovány byly v záporném i kladném módu, ale následné vyhodnocování probíhalo pouze v kladném, jelikož v negativním skoru žádné sloučeniny nebyly detekovány. Vyhodnocovány byly retenční časy sloučenin, jejich m/z a odezvy. Následně byla data upravena v programu Microsoft Excel.

Vzorky 1-7, pocházející od stejného výrobce, byly dodány firmou PT BINA GUNA KIMIA z Indonésie. Jednotlivé vzorky měly různé šarže a jak je vidět v tabulce 5, vzorky se od sebe lišily přítomností různých sloučenin. Z detekovaných sloučenin se podařilo ve všech vzorkách identifikovat karbofuran s m/z 222,1126 a karbofuran-fenol s m/z 165,0910. Ostatní látky zůstaly neznámé a jiné degradační produkty se nepodařilo identifikovat.

Tabulka 5: Přítomnost detekovaných látek ve vzorcích 1-8, jejich m/z a průměrné retenční časy.

m/z ¹	RT (avg) ²	Stdev ³	Vz 1	Vz 2	Vz 3	Vz 4	Vz 5	Vz 6	Vz 7	Vz 8
59,0490	6,972	0,4490	×	×	×	×	✓	×	×	✓
77,0386	15,579	0,6200	✓	✓	✓	✓	✓	✓	×	✓
81,9374	1,003	0,0007	×	×	✓	×	×	×	✓	×
107,0702	12,141	0,4497	×	×	✓	×	×	✓	×	×
119,0857	15,643	0,6026	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
123,0442	15,647	0,5990	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
137,0599	15,646	0,5997	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
147,0807	15,644	0,6025	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
150,0676	15,615	0,6815	✓	×	×	✓	✓	✓	×	✓

Pokračování tabulky 5: Přítomnost detekovaných látek ve vzorcích 1-8, jejich m/z a průměrné retenční časy.

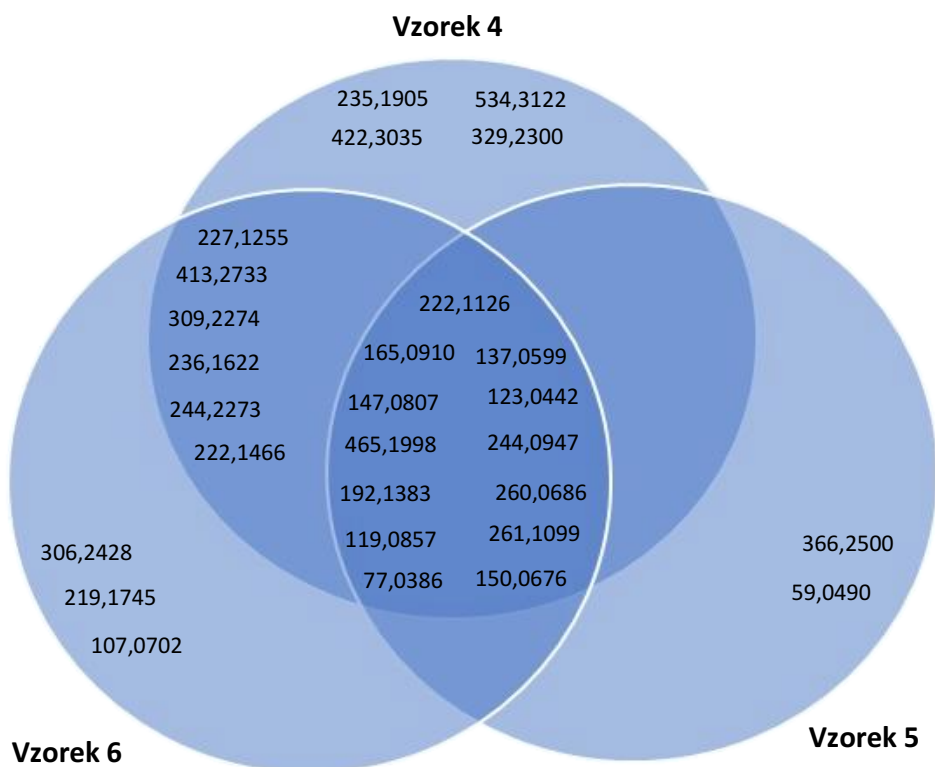
m/z	RT (avg)	StDev	Vz 1	Vz 2	Vz 3	Vz 4	Vz 5	Vz 6	Vz 7	Vz 8
165,0910	15,646	0,6001	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
165,1638	16,240	0,2199	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓
178,1227	1,298	0,0153	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✗	✗
192,1383	16,809	0,8618	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
219,1745	15,217	0,6865	✓	✗	✓	✗	✗	✓	✗	✗
222,1126	15,647	0,5989	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
222,1466	14,222	0,3971	✓	✗	✓	✓	✗	✓	✗	✗
227,1255	15,806	0,5208	✓	✗	✓	✓	✗	✓	✗	✓
235,1905	16,249	0,5731	✓	✓	✗	✓	✗	✗	✗	✓
236,1622	15,513	0,5301	✓	✗	✓	✓	✗	✓	✗	✗
244,0947	15,645	0,6011	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
244,2273	13,740	0,4450	✗	✗	✓	✓	✗	✓	✗	✗
260,0686	15,518	0,5991	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
261,1099	16,410	0,8164	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
279,1692	27,612	0,1435	✓	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗
306,2428	13,791	0,6371	✗	✗	✓	✗	✗	✓	✗	✗
309,2274	13,118	0,3707	✗	✗	✓	✓	✗	✓	✗	✗
329,2300	18,583	0,8601	✓	✗	✗	✓	✗	✗	✓	✓
348,7228	8,780	0,1400	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✓
366,2500	29,742	0,1025	✗	✓	✗	✗	✓	✗	✗	✗
413,2723	29,824	0,3514	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗	✗
422,3035	33,473	0,3967	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✓	✓
465,1998	15,645	0,6047	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
534,3122	16,575	0,3762	✓	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗

¹ m/z - poměr hmotnost náboj

² RT (avg) – průměrný retenční čas

³ StdDev - směrodatná odchylka (z angl. Standard Deviation)

Některé sloučeniny byly detekovány v každém vzorku, zatímco jiné byly přítomny jen v určitých případech. V tabulce 5 je také vidět, jaké sloučeniny mají jednotlivé vzorky mezi sebou společné. Na první pohled si jsou některé vzorky podobnější svým složením než ostatní. To potvrzuje Vennův diagram na obrázku 4, na kterém jsou znázorněny vybrané sloučeniny z tabulky 5, které byly detekovány ve vzorcích 4, 5 a 6.



Obrázek 4: Vennův diagram znázorňující společné sloučeniny detekované ve vzorcích 4, 5 a 6. Jednotlivé sloučeniny jsou zapsány svými hodnotami m/z.

Sloučeniny jsou v diagramu charakterizovány pomocí hodnot m/z. Pomocí překrývajících se kruhů jsou vizuálně znázorněny sloučeniny, které byly detekovány ve více vzorcích. Ve všech třech bylo stanoveno 13 společných látek. Vzorky 4 a 6 pak obsahovaly dalších šest společných sloučenin. Ve vzorku 5 se nevyskytovaly žádné společné sloučeniny se vzorkem 4 ani se vzorkem 6. Na tomto diagramu je dobře znázorněna podobnost vzorků 4 a 6 oproti vzorku 5.

Každý vzorek navíc obsahoval látky, které byly detekovány pouze v jednom vzorku. Tyto sloučeniny by se mohly brát jako CAS pro trasování nebo dokazování při travičství, jak bylo zmiňováno výše. Vzorky se lišily počtem těchto unikátních sloučenin, což je znázorněno v tabulce 6. Tyto sloučeniny, jejich m/z, retenční časy a odezvy jsou zaznamenány v příloze 1. Při vyhledávání sloučenin byla v programu nastavena prahová hodnota výšky píku nad 50 000

counts (z angl. dopady iontů na detektor). Pokud by se tato mez snížila, charakteristických nečistot je možno zaznamenat více.

Tabulka 6: Počet detekovaných sloučenin, které se vyskytovaly pouze v jednom vzorku.

	Vz 1	Vz 2	Vz 3	Vz 4	Vz 5	Vz 6	Vz 7	Vz 8
Počet specifických sloučenin	8	9	10	4	7	12	6	7

Odlišnost mezi vzorky je především kvalitativní. Většina látek měla přibližně stejné odezvy, které jsou zobrazeny v příloze 2. Ovšem u třech sloučenin se významně lišily odezvy stejných CAS v jednotlivých vzorcích a jejich hodnoty jsou uvedeny v tabulce 7. Látka s m/z 178,1227 má ve vzorku 3 dvakrát menší odezvu než ve vzorku 2 a skoro čtyřikrát menší než ve vzorku 1. Látka s m/z 279,1692 byla obsažena ve vzorku 1 téměř pětkrát více než ve vzorku 3 a látka s m/z 413,2723 se vyskytovala takřka dvakrát více ve vzorku 4 než ve vzorku 6.

Tabulka 7 : Odezvy sloučenin v jednotlivých vzorcích

m/z	Vz 1	Vz 2	Vz 3	Vz 4	Vz 6
178,1227	242 697	150 288	66 225	×	×
279,1692	408 342	×	87 509	×	×
413,2723	×	×	×	218 185	110 477

Vzorek 8 pochází z trestné činnosti na Slovensku, byl poskytnut od psovodky Mgr. Kláry Hlubocké a širší informace o něm nejsou známy. Je tedy dost možné, že nebude pocházet od stejného výrobce. Vzorek by navíc mohl obsahovat nové CAS vzniklé environmentálními faktory nebo by mohl mít odlišné odezvy, např. u degradačních produktů. Ovšem toto tvrzení nebylo nijak potvrzeno. Je ale možné, že některá ze specifických sloučenin, které byly detekované jen ve vzorku 8, nemusí být unikátní jen pro tento vzorek, ale může to být charakteristická sloučenina pro výrobce. Nejspíše se jednalo také o 3% Furadan, jelikož odezva u karbofuranu je srovnatelná s ostatními vzorky.

6 Závěr

Tato bakalářská práce se zabývá používáním pesticidních přípravků při nelegálních otravách zvířete a problematikou při jejich dokazování. Dále ukazuje možnosti analýzy vzhledem k dokazování použití konkrétního přípravku.

Otravy pesticidními přípravky jsou stále aktuální záležitostí. V této práci byl důraz kladen na karbofuran, který je obsažen v nejvíce zneužívaném pesticidním přípravku Furadanu v České republice. Trávit zvířete pomocí nástrah s jedy je nezákonné a často velmi bolestivé. V posledních letech přibývá čím dál více případů otrav dravců karbofuranem a z výše uvedené literární rešerše vyplývá, že při takovýchto otravách je největší problém nedostatek důkazů k usvědčení pachatele. Relativně novou metodou ve forenzních vědách pro trasování toxických látek se stala detekce chemických atribučních signatur. Metoda je značně využívána u pašování drog nebo u výroby chemických bojových plynů, jenže existuje jen velmi málo záznamů o využití při otravách pesticidy a žádný záznam o aplikaci na karbofuran.

Cílem experimentální práce bylo analyzovat několik šarží přípravku Furadanu a dokázat, že se od sebe kvalitativně liší. Analyzováno bylo 8 vzorků Furadanu. Vzorky 1-7 byly zakoupené přípravky, zatímco vzorek 8 pocházel z trestné činnosti. Každý vzorek obsahoval minimálně 4 sloučeniny, které se v žádném jiném nenašly. Tím byla potvrzena první i třetí hypotéza, říkájící, že jednotlivé šarže Furadanu se od sebe budou lišit výskytem charakteristických sloučenin a že Furadan, zabavený při nelegální činnosti, bude také odlišitelný od zbylých zakoupených přípravků. Druhá hypotéza, že stejné sloučeniny se mohou v jednotlivých šaržích lišit svými odezvami, byla také potvrzena, ale pouze u třech detekovaných sloučenin. Některé vzorky si navzájem byly více podobné než jiné díky výskytu společných látek.

V této práci bylo dokázáno, že přípravky Furadanu jsou od sebe kvalitativně odlišitelné. Jednotlivé CAS by mohly poskytovat nezbytné důkazy při travičství, a proto detekce CAS se zdá být slibnou metodou pro dokazování nebo trasování karbofuranu při nelegálních činnostech. Prozatím jsme pracovali s nepozměněnými přípravky Furadanu. Zda by se detekce těchto specifických sloučenin dala aplikovat na Furadan extrahovaný z biologických tkání nebo nástrah bude předmětem dalšího výzkumu.

7 Seznam použité literatury

- Alder, L., Greulich, K., Kempe, G., & Vieth, B. (2006). Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC-MS or LC-MS/MS? *Mass Spectrometry Reviews*, 25(6). <https://doi.org/10.1002/mas.20091>
- ALS Environmental. (2015). *ALS Pesticidy*.
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., & Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86(2). <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>
- Balcomb, R. (1983). Secondary Poisoning of Red-Shouldered Hawks with Carbofuran. In *Source: The Journal of Wildlife Management* (Vol. 47, Issue 4). <https://about.jstor.org/terms>
- Barker, S. A. (2007). Matrix solid phase dispersion (MSPD). In *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* (Vol. 70, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.06.005>
- Berny, P. (2007). Pesticides and the intoxication of wild animals. In *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 30, Issue 2). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2007.00836.x>
- Bille, L., Toson, M., Mulatti, P., Dalla Pozza, M., Capolongo, F., Casarotto, C., Ferrè, N., Angeletti, R., Gallochio, F., & Binato, G. (2016). Epidemiology of animal poisoning: An overview on the features and spatio-temporal distribution of the phenomenon in the north-eastern Italian regions. *Forensic Science International*, 266. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.07.002>
- Česká národní rada. (1992). *Zákon č. 246/1992 Sb. Zákon České národní rady na ochranu zvířat proti týrání*. <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1992-246>
- Chen, S., Yu, Y., Ma, J., Wen, C., Wang, X., & Zhou, Q. (2021). Simultaneous determination of carbofuran and 3-hydroxycarbofuran in duck liver by an UPLC-MS/MS. *Acta Chromatographica*, 33(4). <https://doi.org/10.1556/1326.2020.00827>
- Chiari, M., Cortinovis, C., Vitale, N., Zanoni, M., Faggionato, E., Biancardi, A., & Caloni, F. (2017). Pesticide incidence in poisoned baits: A 10-year report. *Science of the Total Environment*, 601–602. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.158>
- CNN Prima NEWS. (21 C.E.). *Karbofuran*. <https://cnn.iprima.cz/karbofuran-zabil-kriticky-ohrozene-lunaky-cervene-umirali-pomalou-a-v-bolestech-21352>
- CNN Prima NEWS. (2020a). *Karbofuran*. <https://cnn.iprima.cz/travici-zabiji-dravce-i-selmy-policii-stale-unikaji-3397>
- CNN Prima NEWS. (2020b). *Karbofuran*. <https://cnn.iprima.cz/karbofuran-zase-zabijel-kdo-travi-orly-morske-2812>
- CNN Prima NEWS. (2020c). *Karbofuran*. <https://cnn.iprima.cz/dalsi-kriticky-ohrozeny-dravec-jako-obet-travicu-jed-muze-zabit-i-cloveka-2187>
- Colovic, M. B., D.Z., K., T.D., L.-P., a.M., B., & V.M., V. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11(3).
- Cremllyn, R. J. W., & Seifert, R. (1985). *Pesticidy*.

- Daéid, N. N., & Waddell, R. J. H. (2005). The analytical and chemometric procedures used to profile illicit drug seizures. *Talanta*, 67(2). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.05.018>
- Davis, F. R. (2014). *Banned : A History of Pesticides and the Science of Toxicology*.
- de Roma, A., Miletti, G., D'Alessio, N., Marigliano, L., Bruno, T., Gallo, P., Binato, G., & Esposito, M. (2018). Inspective and toxicological survey of the poisoned baits and bites. *Forensic Science International*, 287. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.03.038>
- de Shoo, G. R., Scheidegger, N. M. I., & de Jong, F. M. W. (1999). Vertebrate wildlife incidents with pesticides: A European survey. *Pesticide Science*, 55(1). [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9063\(199901\)55:1<47::aid-ps859>3.0.co;2-%23](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9063(199901)55:1<47::aid-ps859>3.0.co;2-%23)
- di Blasio, A., Bertolini, S., Gili, M., Avolio, R., Leogrande, M., Ostorero, F., Ru, G., Dondo, A., & Zoppi, S. (2020). Local context and environment as risk factors for acute poisoning in animals in northwest Italy. *Science of the Total Environment*, 709. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136016>
- Dietrich, D. R., Schmid, P., Zweifel, U., Schlatter, C., Jenni-Eiermann, S., Bachmann, H., Bühler, U., & Zbinden, N. (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A case study. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 29(1). <https://doi.org/10.1007/BF00213099>
- Dirlbek, K. (1980). *Chemická ochrana rostlin a životní prostředí člověka*.
- Donovan, S., Taggart, M., & Richards, N. (2011). An Overview of the Chemistry, Manufacture, Environmental Fate and Detection of Carbofuran. In *Carbofuran and Wildlife Poisoning: Global Perspectives and Forensic Approaches*. <https://doi.org/10.1002/9781119998532.ch1>
- EU. (2008a). *EU Regulation (EC) No 1272/2008*.
- EU. (2008b). *ROZHODNUTÍ KOMISE o nezařazení karbofuranu do přílohy I směrnice Rady 91/414/EHS a o odnětí povolení přípravkůna ochranu rostlin obsahujících tuto látku*.
- Ferguson, P. W., Dey, M. S., Jewell, S. A., & Krieger, R. I. (1984). Carbofuran metabolism and toxicity in the rat. *Toxicological Sciences*, 4(1). <https://doi.org/10.1093/toxsci/4.1.14>
- FMC. (2013). *Furadan 3G - Safety data sheet*.
- Fraga, C. G., Bronk, K., Dockendorff, B. P., & Heredia-Langner, A. (2016). Organic Chemical Attribution Signatures for the Sourcing of a Mustard Agent and Its Starting Materials. *Analytical Chemistry*, 88(10). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00766>
- Fraga, C. G., Segó, L. H., Hoggard, J. C., Acosta, G. A. P., Viglino, E. A., Wahl, J. H., & Synovec, R. E. (2012). Preliminary effects of real-world factors on the recovery and exploitation of forensic impurity profiles of a nerve-agent simulant from office media. *Journal of Chromatography A*, 1270. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.10.053>
- Garcia-Repetto, R., Soria, M. L., Gimenez, M. P., Menendez, M., & Repetto, M. (1998). Deaths from pesticide poisoning in Spain from 1991 to 1996. *Veterinary and Human Toxicology*, 40(3).
- Greenhalgh, R., & Belanger, A. (1981). Persistence and Uptake of Carbofuran in a Humic Mesisol and the Effects of Drying and Storing Soil Samples on Residue Levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29(2). <https://doi.org/10.1021/jf00104a006>
- Gupta, C. (1994). Invited review: Carbofuran toxicity ramesh. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 43(4), 383–418. <https://doi.org/10.1080/15287399409531931>

- Gupta, R. (2006). Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds. In *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-088523-7.X5000-5>
- Hermona Soreq, & Haim Zakut. (1989). *Human cholinesterases and anticholinesterases*.
- Hernández-Mesa, M., & Moreno-González, D. (2022). Current Role of Mass Spectrometry in the Determination of Pesticide Residues in Food. *Separations*, 9(6), 148. <https://doi.org/10.3390/separations9060148>
- Hoggard, J. C., Wahl, J. H., Synovec, R. E., Mong, G. M., & Fraga, C. G. (2010). Impurity profiling of a chemical weapon precursor for possible forensic signatures by comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometry and chemometrics. *Analytical Chemistry*, 82(2). <https://doi.org/10.1021/ac902247x>
- Hudson, R. H., Tucker, R. K., & Haegele, M. A. (1984). Handbook of toxicity of pesticides to wildlife: second edition. *Resource Publication - US Fish & Wildlife Service*, 153.
- Ilesce, M. R., della Greca, M., Cermola, F., Rubino, M., Isidori, M., & Pascarella, L. (2006). Transformation and ecotoxicity of carbamic pesticides in water. *Environmental Science and Pollution Research*, 13(2). <https://doi.org/10.1065/espr2005.10.285>
- Krone, O., Auls, S., & Neurath, H. (2017). Case report: secondary poisoning in a white-tailed sea eagle caused by carbofuran. *European Journal of Wildlife Research*, 63(6). <https://doi.org/10.1007/s10344-017-1148-8>
- Lalah, J. O., Otieno, P. O., Richards, N., Odino, M., Frank, L., Cotterill, A., Dolrenry, S., Hazzah, L., Ogada, D., Virani, M. Z., & Martins, D. J. (2011). A Chronicling of Long-Standing Carbofuran Use and its Menace to Wildlife in Kenya. In *Carbofuran and Wildlife Poisoning: Global Perspectives and Forensic Approaches*. <https://doi.org/10.1002/9781119998532.ch3>
- Luzardo, O. P., Ruiz-suárez, N., Valerón, P. F., Camacho, M., Zumbado, M., Henríquez-hernández, L. A., & Boada, L. D. (2014). Methodology for the identification of 117 pesticides commonly involved in the poisoning of wildlife using gc-ms-ms and lc-ms-ms. *Journal of Analytical Toxicology*, 38(3). <https://doi.org/10.1093/jat/bku009>
- Martínez-Haro, M., Mateo, R., Guitart, R., Soler-Rodríguez, F., Pérez-López, M., María-Mojica, P., & García-Fernández, A. J. (2008). Relationship of the toxicity of pesticide formulations and their commercial restrictions with the frequency of animal poisonings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69(3). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.05.006>
- Mayer, B. P., Valdez, C. A., DeHope, A. J., Spackman, P. E., & Williams, A. M. (2018). Statistical analysis of the chemical attribution signatures of 3-methylfentanyl and its methods of production. *Talanta*, 186. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.026>
- Mazzitelli, C. L., Re, M. A., Reaves, M. A., Acevedo, C. A., Straight, S. D., & Chipuk, J. E. (2012). A systematic method for the targeted discovery of chemical attribution signatures: Application to isopropyl bicyclophosphate production. *Analytical Chemistry*, 84(15). <https://doi.org/10.1021/ac300859j>
- Metcalfe, R. L., Fukuto, T. R., Collins, C., Borck, K., El-Aziz, S. A., Munoz, R., & Cassil, C. C. (1968). Metabolism of 2,2-Dimethyl-2,3-dihydrobenzofuranyl-7 N-Methylcarbamate (Furadan) in Plants, Insects, and Mammals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 16(2). <https://doi.org/10.1021/jf60156a033>
- Milatovic, D., Gupta, R. C., & Aschner, M. (2006). Anticholinesterase toxicity and oxidative stress. In *TheScientificWorldJournal* (Vol. 6). <https://doi.org/10.1100/tsw.2006.38>

- Mineau, P., Porter, S., & Meteyer, C. U. (2011). Carbofuran: Toxicity, Diagnosing Poisoning and Rehabilitation of Poisoned Birds. In *Carbofuran and Wildlife Poisoning: Global Perspectives and Forensic Approaches*. <https://doi.org/10.1002/9781119998532.ch2>
- Novotný, L., Misík, J., Honzlová, A., Ondráček, P., Kuča, K., Vávra, O., Rachač, V., & Chloupek, P. (2011). Incidental poisoning of animals by carbamates in the Czech Republic. *Journal of Applied Biomedicine*, 9(3), 157–161. <https://doi.org/10.2478/v10136-009-0035-3>
- Parlament České republiky. (2001). *Zákon č. 449/2001 Sb. Zákon o myslivosti*. <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2001-449>
- Picciotto, M. R., Higley, M. J., & Mineur, Y. S. (2012). Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. In *Neuron* (Vol. 76, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.036>
- Prieto Garcia, F., Cortés Ascencio, S. Y., Oyarzun, J. C. G., Hernandez, A. C., & Alvarado, P. V. (2012). Pesticides: classification, uses and toxicity. Measures of exposure and genotoxic risks. *Journal of Research in Environmental Science and Toxicology*, 1(11).
- Richards, N. (2011). Carbofuran and Wildlife Poisoning: Global Perspectives and Forensic Approaches. In *Carbofuran and Wildlife Poisoning: Global Perspectives and Forensic Approaches*. <https://doi.org/10.1002/9781119998532>
- Ruiz-Suárez, N., Boada, L. D., Henríquez-Hernández, L. A., González-Moreo, F., Suárez-Pérez, A., Camacho, M., Zumbado, M., Almeida-González, M., del Mar Travieso-Aja, M., & Luzardo, O. P. (2015). Continued implication of the banned pesticides carbofuran and aldicarb in the poisoning of domestic and wild animals of the Canary Islands (Spain). *Science of the Total Environment*, 505. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.093>
- Samanidou, V., Fytianos, K., Pfister, G., & Bahadir, M. (1988). Photochemical decomposition of carbamate pesticides in natural waters of northern Greece. *Science of the Total Environment*, 76(1). [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(88\)90287-2](https://doi.org/10.1016/0048-9697(88)90287-2)
- Schenck, F. J., & Hobbs, J. E. (2004). Evaluation of the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (QuEChERS) approach to pesticide residue analysis. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 73(1). <https://doi.org/10.1007/s00128-004-0388-y>
- Stachniuk, A., & Fornal, E. (2016). Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Pesticide Residues in Food. In *Food Analytical Methods* (Vol. 9, Issue 6). <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0342-0>
- Tekel, J., Hudecová, T., & Pecníková, K. (2001). Isolation and purification techniques for pesticide residue analyses in samples of plant or animal origin. In *European Food Research and Technology* (Vol. 213, Issues 4–5). <https://doi.org/10.1007/s002170100379>
- Thapa, S., Lv, M., & Xu, H. (2017). Acetylcholinesterase: A Primary Target for Drugs and Insecticides. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 17(17). <https://doi.org/10.2174/1389557517666170120153930>
- The U.S. Department of Homeland Security (DHS). (2015). *Chemical attribution signature studies for chemical threat agents*.
- Usui, K., Hashiyada, M., Hayashizaki, Y., Igari, Y., Hosoya, T., Sakai, J., & Funayama, M. (2014). Application of modified QuEChERS method to liver samples for forensic toxicological analysis. *Forensic Toxicology*, 32(1). <https://doi.org/10.1007/s11419-013-0199-0>

- Vail, D. D. (2015). Toxicity abounds: New histories on pesticides, environmentalism, and Silent Spring. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 53. <https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2015.07.009>
- Wang, Y., Kruzik, P., Helsberg, A., Helsberg, I., & Rausch, W. D. (2007). Pesticide poisoning in domestic animals and livestock in Austria: A 6 years retrospective study. *Forensic Science International*, 169(2–3), 157–160. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.08.008>
- WHO. (2019). *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2019*.
- Wobeser, G., Bollinger, T., Leighton, F. A., Blakley, B., & Mineau, P. (2004). Secondary poisoning of eagles following intentional poisoning of coyotes with anticholinesterase pesticides in western Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, 40(2). <https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.2.163>
- Worek, F., Mast, U., Kiderlen, D., Diepold, C., & Eyer, P. (1999). Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clinica Chimica Acta*, 288(1–2). [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(99\)00144-8](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(99)00144-8)
- Zayats, M. F., Leschev, S. M., Petrashkevich, N. v., Zayats, M. A., Kadenczki, L., Szitás, R., Dobrik, H. S., & Keresztény, N. (2013). Distribution of pesticides in n-hexane/water and n-hexane/acetonitrile systems and estimation of possibilities of their extraction isolation and preconcentration from various matrices. *Analytica Chimica Acta*, 774. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.03.003>

Příloha 1: Detekované sloučeniny, které se vyskytovaly pouze v jednom vzorku. Jejich m/z, retenční časy a odezvy.

		Vz 1	Vz 2	Vz 3	Vz 4	Vz 5	Vz 6	Vz 7	Vz 8
	m/z	117,0910	235,1694	132,0593	375,2602	205,1005	130,1591	228,2325	131,0490
1	RT	6,580	22,657	15,024	27,113	28,689	8,365	25,153	15,063
	odezva	15 909	29 524	11 449	22 229	223 198	53 472	58 526	8 641
	m/z	215,1254	249,1850	192,1401	408,3100	304,3409	171,1492	268,2041	405,2650
2	RT	6,568	22,711	1,296	33,325	24,823	13,384	19,280	27,987
	odezva	231 295	21 384	37 213	29 913	162 285	53 871	32 822	27 726
	m/z	228,2406	267,1720	223,1330	414,3305	363,3109	215,1373	290,2092	407,3330
3	RT	29,594	22,440	16,624	27,113	30,491	30,840	20,226	32,062
	Odezva	85 565	41 921	18 360	24 124	23 007	40 014	35 687	30 761
	m/z	304,3119	267,1957	302,1548	419,286	371,3251	233,0786	350,2693	422,2920
4	RT	28,711	17,521	27,737	27,112	29,828	13,691	23,803	27,987
	Odezva	63 743	13 055	32 312	22 880	19 181	51 283	40 230	27 651
	m/z	442,3377	365,1053	326,3808		429,2496	251,1854	355,2245	428,3060
5	RT	15,171	1,168	29,243		29,776	11,910	22,250	24,416
	Odezva	23 881	42 408	32 162		35 874	33 997	31 406	100 184
	m/z	631,1942	394,2566	336,3195		441,1936	252,9973	370,736	456,338
6	RT	33,727	21,788	30,239		30,019	22,098	8,929	25,453
	Odezva	31 946	23 364	42 700		21 569	72 214	10 817	115 033

Pokračování přílohy 2: Detekované sloučeniny, které se vyskytovaly pouze v jednom vzorku. Jejich m/z, retenční časy a odezvy.

		Vz 1	Vz 2	Vz 3	Vz 4	Vz 5	Vz 6	Vz 7	Vz 8
	m/z	633,1510	414,2769	458,3496		634,4596	278,2116		512,4160
7	RT	33,737	30,596	29,229		29,336	12,081		27,315
	Odezva	69 642	39 079	19 995		11 832	30,386		22 088
	m/z	649,1249	425,2234	519,3742			283,1752		
8	RT	33,733	29,764	14,518			7,995		
	Odezva	54 797	115 153	17 472			59 156		
	m/z		425,2877	652,4115			327,2017		
9	RT		33,070	11,320			8,771		
	Odezva		9 703	52 849			52 938		
	m/z			739,5005			385,2970		
10	RT			33,687			30,385		
	odezva			9 757			45 417		
	m/z						430,3905		
11	RT						28,891		
	Odezva						44 859		
	m/z						556,2486		
12	RT						21,933		
	odezva						21 959		

Příloha 3: Odezvy detekovaných látek v jednotlivých vzorkách, jejich m/z a retenční časy.

m/z ¹	RT (avg) ²	Stdev ³	Vz 1	Vz 2	Vz 3	Vz 4	Vz 5	Vz 6	Vz 7	Vz 8
59,0490	6,972	0,4490	×	×	×	×	14 950	×	×	13 150
77,0386	15,579	0,6200	29 655	27 759	28 438	27 209	29 354	23 225	×	28 545
81,9374	1,003	0,0007	×	×	19 082	×	×	×	21 739	×
107,0702	12,141	0,4497	×	×	27 647	×	×	52 371	×	×
119,0857	15,643	0,6026	98 428	88 628	92 197	94 927	93 975	77 304	83 538	97 165
123,0442	15,647	0,5990	1 403 302	1 300 841	1 354 149	1 347 893	1 319 178	1 070 887	1 201 354	1 396 521
137,0599	15,646	0,5997	126 630	111 977	122 092	121 103	115 242	92 499	102 932	119 963
147,0807	15,644	0,6025	185 155	164 974	174 704	173 778	168 886	130 956	143 644	173 509
150,0676	15,615	0,6815	12 690	×	×	11 798	11 156	9 113	×	14 045
165,0910	15,646	0,6001	4 080 020	3 695 038	3 791 972	3 836 692	3 761 074	3 056 240	3 306 670	4 033 365
165,1638	16,240	0,2199	12 113	×	×	×	×	×	×	10 965
178,1227	1,298	0,0153	242 697	150 288	66 225	×	×	×	×	×
192,1383	16,809	0,8618	82 437	71 595	64 540	70 613	61 429	45 749	57 975	70 592
219,1745	15,217	0,6865	42 480	×	44 839	×	×	45 968	×	×
222,1126	15,647	0,5989	4 651 004	4 251 222	4 325 292	4 312 040	4 303 509	3 426 894	3 799 766	4 513 905
222,1466	14,222	0,3971	53 209	×	60 522	47 914	×	53 806	×	×
227,1255	15,806	0,5208	63 579	×	56 946	55 199	×	56 869	×	55 366
235,1905	16,249	0,5731	45 250	39 560	×	45 913	×	×	×	43 230
236,1622	15,513	0,5301	45 618	×	37 231	42 517	×	40 521	×	×
244,0947	15,645	0,6011	468 579	539 026	532 174	476 749	592 294	426 998	561 334	535 497

Pokračování přílohy 4: Odezvy detekovaných látek v jednotlivých vzorkách, jejich m/z a retenční časy.

m/z ¹	RT (avg) ²	Stdev ³	Vz 1	Vz 2	Vz 3	Vz 4	Vz 5	Vz 6	Vz 7	Vz 8
244,2273	13,740	0,4450	×	×	41 509	32 724	×	37 902	×	×
260,0686	15,518	0,5991	68 988	87 974	81 166	74 980	95 188	72 351	98 073	79 104
261,1099	16,410	0,8164	107 995	77 658	95 599	90 559	70 434	66 102	50 940	82 807
279,1692	27,612	0,1435	408 342	×	87 509	×	×	×	×	×
306,2428	13,791	0,6371	×	×	31 804	×	×	30 219	×	×
309,2274	13,118	0,3707	×	×	42 909	27 769	×	36 700	×	×
329,2300	18,583	0,8601	32 879	×	×	35 621	×	×	46 423	32 008
348,7228	8,780	0,1400	×	16 199	×	×	×	×	×	15 163
366,2500	29,742	0,1025	×	23 883	×	×	21 891	×	×	×
413,2723	29,824	0,3514	×	×	×	218 185	×	110 477	×	×
422,3035	33,473	0,3967	×	×	×	28 078	×	×	24 496	26 948
465,1998	15,645	0,6047	40 639	51 117	48 713	41 641	58 480	39 533	56 280	48 767
534,3122	16,575	0,3762	21 817	×	×	21 352	×	×	×	×

¹ m/z - poměr hmotnost náboj

² RT (avg) – průměrný retenční čas

³ StdDev - směrodatná odchylka (z angl. Standard Deviation)