

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie životního prostředí



Bc. Petra Kořínková

Stanovení vybraných pesticidů a jejich metabolitů technikou
kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí

Determination of Selected Pesticides and Their Metabolites
by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Ing. Ludmila Trojáková, Ph.D

Prof. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

Praha 2011

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelů Ing. Ludmily Trojákové, Ph.D. a Prof. RNDr. Evy Tesařové, CSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity a firmy ALS Czech Republic, s.r.o.

V Praze dne 12.5.2011

.....

podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Zdeňku Jirákovvi za nabídnuté téma, Ing. Ludmile Trojákové, Ph.D. a Ing. Taťaně Halešové za vedení diplomové práce a dozor nad experimentální částí, Ing. Jiřímu Pryčkovi, Ph.D. za praktické rady a konzultace ohledně LC-MS a firmě ALS Czech Republic, s.r.o. za umožnění realizace diplomové práce a poskytnutí LC-MS. Rovněž bych chtěla poděkovat Prof. RNDr. Evě Tesařové, CSc. za poskytnutí konzultací, připomínek a rad ohledně diplomové práce.

V Praze dne 12.5.2011

.....
podpis

Abstrakt

Pesticidy jsou sloučeniny určené k hubení, prevenci a kontrole škůdců a ochraně rostlin. Jejich široké použití v zemědělství způsobuje kontaminaci podzemních, povrchových i pitných vod, protože je čistírny odpadních vod nedokážou odstranit. Mezi jedny z nejvíce používaných pesticidů patří triazinové pesticidy. Jejich používání je ale celosvětově omezováno, z důvodu negativního vlivu na lidské zdraví i kontaminaci životního prostředí a to zvláště jejich metabolity, o jejichž toxicitě nejsou zatím žádné informace.

V této diplomové práci byla vyvinuta a validována metoda pro stanovení triazinových pesticidů atrazinu, cyanazinu, propazinu, simazinu a terbutylazinu a jejich metabolitů hydroxyatrazinu, desethylatrazinu, desisopropylatrazinu, hydroxyterbutylazinu a desethylterbutylazinu ve vodách pomocí LC-MS/MS s ionizačním zdrojem elektrosprejem. LOD byl v rozsahu 0,5-3,2 pg/ml, LOQ v rozsahu 1,5-9,6 pg/ml. V této práci byl proveden test stability mateřských látek těchto pesticidů, kde se ukázala mít největší vliv na jejich degradaci teplota. Provedený monitoring výskytu triazinových pesticidů a jejich metabolitů ve vodách v ČR odhalil nízké koncentrace mateřských látek v povrchových i podzemních vodách i přes jejich zákaz používání v letech 2004-2008. Byly také nalezeny vysoké koncentrace hydroxyatrazinu, které překročily hygienický limit.

Abstract

Pesticides are the substances designed for destroying, preventing and controlling of pests and protection of plants. Their wide usage in agriculture causes contamination of ground, surface and drinking water, because wastewater treatment plants are not able to remove them. Mostly used pesticides are triazine based pesticides. However their usage is worldwide reduced because of their negative influences on human health and contamination of environment especially with their metabolites, about their toxicity are no information.

A method for determination of triazine pesticides atrazine, cyanazine, propazine, simazine, terbuthylazine and their metabolites hydroxytriazine, desethyltriazine, desisopropyltriazine, hydroxyterbuthylazine a desethylterbuthylazine was developed and validated in this diploma work. The determination was realized by LC-MS/MS with electrospray ionization. LOD ranged between 0.5-3.2 pg/ml and LOQ between 1.5-9.6 pg/ml. A test of stability of the maternal substances of these pesticides was performed, in which temperature was found to have the biggest influence on their degradation. A monitoring of the presence of triazine pesticides and their metabolites in water was carried out in Czech Republic. Low concentrations of the maternal substances in surface water and ground water were determined, although their usage was prohibited in years 2004-2008. Concentration of metabolite hydroxyatrazine also passed beyond the hygienic limit.

Seznam zkratek:

2, 4-D	2,4-Dichlorofenoxyoctová kyselina
A	Plocha píku
ACN	Acetonitril
ATP	Adenosintrifosfát
ATR	Atrazin
C	Cynazin
<i>c</i>	Hmotnostní koncentrace (g l^{-1})
CAD	Množství kolizního plynu (arb)
CAS	Registrové číslo
CE	Kolizní energie (V)
CUR	Curtain gas (psi)
CXP	Výstupní potenciál na kolizní cele (V)
ČR	Česká republika
DAD	Detektor diodového pole
DDA	Didealkylatrazin
DEA	Desethylatrazin
DET	Desethylterbutylazin
DIA	Desisopropylatrazin
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DP	Deklastrační potenciál (V)
DT50	Poločas rozpadu (doba za kterou se rozloží 50% látky)
ECD	Detektor elektronového záchytu
EPA	Agentura pro ochranu životního prostředí
EP	Vstupní potenciál (V)
ESI	Elektrosprej
EU	Evropská unie
F	Fisherův test (F-test)
<i>f</i>	Počet stupňů volnosti
FID	Plamenově ionizační detektor
F_m	Průtoková rychlost (ml/min)
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
GS1 (2)	Tlak zmlžujícího (sušícího) plynu (psi)
HA	Hydroxyatrazin
HDEA	Hydroxydesethylatrazin
HDIA	Hydroxydesisopropylatrazin
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HT	Hydroxyterbutylazin
ISTD	Vnitřní standard
IS	Napětí na kapiláře v iontovém zdroji (V)
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí

LC-MS/MS	Kapalinový chromatograf s tandemovým hmotnostním spektrometrem
LCS	Fortifikovaný blank
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit stanovení
MB	Metodový blank
MCPA	4-Chloro-2-metylfenoxyoctová kyselina
MeOH	Methanol
MF	Mobilní fáze
MQ voda	Millipore voda
M_r	Relativní molekulová hmotnost
MRM přechod	Multiple reaction monitoring přechod
MS	Hmotnostní spektrometr
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
NEK	Norma environmentální kvality
NPK	Nejvyšší přípustná koncentrace
P	Propazin
pKa	Záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
PTFE septum	Polytetrafluoroethylenové septum
q_0	Kolizní cela
Q1	První kvadrupól
Q2	Druhý kvadrupól
R_e	Výtěžnost
RP	Roční průměr
RSD	Relativní směrodatná odchylka
S	Simazin
SD	Směrodatná odchylka
SF	Stacionární fáze
SRS	Státní rostlinolékařská správa
STD 100%	Standard 100%
SÚL	Seznam účinných látek
T	Terbutylazin
t	Čas (min)
TEM	Teplota (°C)
t_R	Retenční čas (min)
u	Kombinovaná standardní nejistota
u_a	Standardní nejistota typu A
u_b	Standardní nejistota typu B
U_c	Rozšířená nejistota
UV-VIS detektor	Detektor měřící spektra v ultrafialové a viditelné oblasti
ŽP	Životní prostředí
φ	Objemové procento

Obsah

1. ÚVOD	10
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	11
2.1 PESTICIDY	11
2.2 ROZDĚLENÍ PESTICIDŮ	12
2.3 PRODUKTY METABOLISMU PESTICIDŮ	13
2.4 LEGISLATIVNÍ POŽADAVKY NA LIMITY REZIDUÍ PESTICIDŮ A JEJICH METABOLITŮ VE VODĚ	14
2.5 SPOTŘEBY ÚČINNÝCH LÁTEK NA OCHRANU ROSTLIN V ČR	16
2.6 TRIAZINOVÉ PESTICIDY	21
2.6.1 <i>Metabolismus triazinových pesticidů</i>	24
2.6.2 <i>Metody analýzy triazinových pesticidů</i>	29
2.7 VALIDAČNÍ PARAMETRY	31
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, ROZTOKY, PŘÍSTROJE A POMŮCKY	35
3.1.1 <i>Standardní chemikálie</i>	35
3.1.2 <i>Rozpouštědla</i>	35
3.1.3 <i>Zásobní roztoky a jejich příprava</i>	36
3.1.4 <i>Použité přístroje a zařízení</i>	39
3.2 ANALÝZA TRIAZINOVÝCH PESTICIDŮ A JEJICH METABOLITŮ	39
3.2.1 <i>Ladění hmotnostního spektrometru</i>	39
3.2.2 <i>Optimalizace chromatografických podmínek</i>	41
3.2.2.1 <i>Optimalizace složení mobilní fáze</i>	41
3.2.2.2 <i>Optimalizace teploty na koloně</i>	42
3.2.2.3 <i>Optimalizace objemu nástřiku</i>	42
3.2.2.4 <i>Optimalizace separace sekundárních a terciálních metabolitů</i>	43
3.3 PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍ KŘIVKY	43
3.4 PŘÍPRAVA VZORKŮ	44
3.5 VALIDACE METODY	45
3.6 VYHODNOCOVÁNÍ VÝSLEDKŮ	46
3.7 VÝPOČTY A VYJADŘOVÁNÍ VÝSLEDKŮ	46
3.8 TEST STABILITY TRIAZINOVÝCH PESTICIDŮ	47
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	47
4.1 OPTIMALIZACE PARAMETRŮ HMTNOSTNÍHO SPEKTROMETRU	47
4.2 OPTIMALIZACE CHROMATOGRFICKÝCH PODMÍNEK	56
4.2.1 <i>Optimalizace složení mobilní fáze</i>	56
4.2.2 <i>Optimalizace teploty na koloně</i>	59
4.2.3 <i>Optimalizace objemu nástřiku</i>	60
4.2.4 <i>Optimalizace separace sekundárních a terciálních metabolitů</i>	62
4.3 OVĚŘENÍ METODY-VALIDACE	64
4.3.1 <i>Linearita</i>	64
4.3.2 <i>Mez detekce a kvantifikace</i>	64
4.3.3 <i>Správnost a přesnost měření</i>	65
4.3.4 <i>Odhad nejistoty měření</i>	67

4.4	TEST STABILITY TRIAZINOVÝCH PESTICIDŮ	69
4.5	MONITOROVÁNÍ TRIAZINOVÝCH PESTICIDŮ.....	73
5.	SOUHRN	76
6.	LITERATURA	79

1. Úvod

Pesticidy jsou sloučeniny určené k hubení, prevenci a kontrole škůdců používané ve formě přípravků na ochranu rostlin na zemědělských půdách, ale i na městských plochách, v domácnostech, ve zdravotnictví. Jejich široké použití v zemědělství způsobuje nejen kontaminaci zemědělských plodin, ale ovlivňuje i celé životní prostředí. Z důvodu jejich vysoké mobility ve vodách jsou pesticidy známými kontaminanty povrchových, a zejména podzemních vod. To může být problém z hlediska lidského zdraví, které může být ohroženo, protože běžné procesy čištění vod prakticky neodbourávají pesticidy rozpuštěné ve vodě.

Velkým problémem jsou také metabolity pesticidů, které jsou detekovány častěji a delší dobu než mateřské látky a mohou se lišit i svou toxicitou. Proto je důležité porozumět metabolismu pesticidů v životním prostředí. Pokud nejsou určeny koncentrace metabolitů, důsledky chemického použití pesticidu na kvalitu ať už podzemních nebo povrchových vod jsou často podceňovány. Z důvodu ochrany lidského zdraví proto legislativa udává limity pro výskyt pesticidů a jejich metabolitů v jednotlivých částech životního prostředí. Je tedy důležité nejen určit hlavní degradační cesty pesticidů, ale také vyvinout analytickou metodu ke stanovení koncentrace pesticidů a jejich metabolitů ve vodách.

Předmětem této diplomové práce je rešerše rozdělení, degradace, přehledu legislativních požadavků na kvalitu vody a spotřeb pesticidů v ČR, souhrn vlastností vybraných pesticidů a jejich metabolitů a určení jejich degradačních cest. Vlastní experimentální část se zabývá vývojem a validací metody pro stanovení triazinových pesticidů atrazinu, cyanazinu, propazinu, simazinu, terbutylazinu a metabolitů ammelinu, desisopropylatrazinu, desethylatrazinu, didealkylatrazinu, hydroxyatrazinu, hydroxydesisopropylatrazinu a hydroxydesethylatrazinu pomocí LC-MS.

2. Teoretická část

2.1 Pesticidy

Zákon 326/2004 Sb. definuje pesticidy jako přípravky na ochranu rostlin, tedy přípravky obsahující jednu nebo více účinných látek, upravené do formy, v níž jsou poskytovány uživateli a jsou určeny k ochraně rostlin nebo rostlinných produktů proti škodlivým organismům, k ovlivňování životních pochodů rostlin jinak než jako živiny, ke konzervaci rostlinných produktů nebo ničení nežádoucích rostlin či potlačování jejich růstu [1].

O schválení účinných látek obsažených v přípravcích rozhoduje Evropská komise. Státní rostlinolékařská správa (SRS), správní úřad rostlinolékařské péče s působností na území České republiky, každé čtvrtletí vydává ve svém Věstníku oznámení o zařazení/nezařazení účinných látek do seznamu účinných látek [1]. Přípravek na ochranu rostlin může být registrován, pokud účinná látka v něm obsažená je zařazena do seznamu účinných látek. O registraci přípravku poté rozhoduje SRS [2]. Po registraci může být přípravek uváděn na trh a používán [1].

Agentura pro ochranu životního prostředí (EPA) klasifikuje vlastnosti účinných látek podle jejich toxicity, karcinogenity a vlivu na životní prostředí (ŽP). V roce 2010 v ČR hodnotila z celkového počtu 317 schválených účinných látek 134 účinných látek. Z nich 7 vyhodnotila jako velmi toxické, 22 jako středně toxické, 73 jako málo toxické a 32 jako netoxické [3; 4]. Celkově 14 ze schválených účinných látek klasifikovala EPA jako vysoce toxické k vodním organismům, 2 jako známé kontaminanty ŽP a 39 jako potenciální kontaminanty [4].

Ze všech schválených účinných látek EPA vyhodnotila 113 látek: 15 z nich jako pravděpodobný karcinogen, 34 z nich jako možný karcinogen, 11 z nich jako neklasifikovatelný karcinogen a 53 z nich jako nepravděpodobný karcinogen [3; 4].

Z uvedených skutečností je zřejmé, že pesticidy představují rizika možné kontaminace vodních zdrojů, vlivů na lidské zdraví i zdraví živočichů, o to více, že běžné procesy čištění vod prakticky neodbourávají pesticidy a jejich metabolity rozpuštěné ve vodě, které posléze ovlivňují kvalitu pitných vod [5]. Je tedy nutné sledovat jejich výskyt pesticidů v ŽP.

2.2 Rozdělení pesticidů

Pesticidy se dělí podle několika hledisek. Nejzákladnější možností je dělení pesticidů dle biologické účinnosti na zoocidy, přípravky určené k hubení živočichů, herbicidy, přípravky k hubení rostlin a plevelů, fungicidy, přípravky k ničení hub, a speciální látky, kam řadíme regulátory růstu nebo repelenty. Zoocidy dělíme na několik podskupin, na základě toho proti jakým živočichům jsou směřovány [6]. V závorce jsou uvedeny příklady účinných látek z databáze pesticidů mající daný účinek [4].

1) Zoocidy

- a. Insekticidy – přípravky k hubení hmyzu (acetamiprid, karbofuran, fosalon)
- b. rodenticidy – přípravky k hubení hlodavců (lindan, arsenité a zinečnaté sloučeniny)
- c. nematocidy – přípravky k hubení háďátek (karbaryl, chlorpyrifos, forát)
- d. moluskocidy – přípravky k hubení měkkýšů (thiodikarb, methiokarb, fosforečnan železnatý)
- e. akaricidy – přípravky k hubení roztočů (chlorpyrifos, lindan)
- f. baktericidy – přípravky k ničení bakterií (dusičnan amonný, chloramin, morfolin, chinolin)

2) Herbicidy (dichlorfenoxyoctová kyselina, atrazin, chloridazon, diuron)

3) Fungicidy (kaptan, dinokap, tebukonazol)

Pesticidy dělíme na základě povahy účinné látky, kterou obsahují [7]. Příklady účinných látek jsou uvedeny v závorce [4]:

- 1) Organochlorové deriváty (aldrin, DDT, lindan)
- 2) Organofosfáty (chlorpyrifos, dimethoát, forát)
- 3) Karbamáty (fenoxycarb, karbofuran, karbaryl)
- 4) Pyrethroidy (cypermethrin, bifenthrin, deltamethrin)
- 5) Pesticidy na bázi fenoxycetové kyseliny (2,4-dichlorfenoxycetová kyselina)
- 6) Pesticidy na bázi močoviny (diuron, isoproturon, chloroturon)
- 7) Triazinové a diazinové pesticidy (atrazin, cyanazin, terbutylazin)
- 8) Pesticidy na bázi bipyridilů (dikvat a parakvat)
- 9) Pesticidy na bázi kovů (fenylrtuť, tributylcín, chlorid rtuťnatý)

Pesticidy dále můžeme rozdělit podle způsobu jejich působení na ošetřovaný organismus na [6; 8]:

- 1) Kontaktní – účinná látka neproniká do rostlinné tkáně a zůstává na povrchu pouze na místech, kam dopadla při aplikaci (DDT, dikvat)
- 2) Systémové – pronikají kutikulou do buněk a jsou rozváděny cévním systémem. Aplikace systémových pesticidů je dokonalejší, ale systémové přípravky jsou náchylné ke vzniku rezistence (glyphosát, terbutylazin)
- 3) Kombinované přípravky – obsahují jak kontaktní, tak systémovou látku

2.3 Produkty metabolismu pesticidů

Nejen pesticidy ale i jejich metabolity představují velké nebezpečí z hlediska vlivu na lidské zdraví i ŽP. Metabolity mnohých pesticidů jsou známými kontaminanty povrchových nebo podzemních vod a mohou být více toxické než mateřská látka. Proto je důležité pochopit osud pesticidů v životním prostředí [9].

Degradace pesticidů probíhá dvěma cestami, v biotickém prostředí za působení mikroorganismů, v abiotickém prostředí je ovlivňována světlem, přítomností vody (rozpuštěností), teplotou, pH i množstvím kyslíku [7; 10].

V biotickém prostředí zajišťují mikroorganismy degradaci, detoxikaci a deaktivaci xenobiotik dvěma biotransformačními fázemi. V první fázi biotransformace, která je katalyzovaná enzymy, dochází k zavedení polárních skupin, např. -OH, =O, -NH₂, a pesticid se tak stává polárnějším a tím rozpustnějším ve vodě. V druhé fázi biotransformace dochází ke konjugaci tohoto polárního metabolitu s kyselinou glukuronovou nebo glutathionem. Vznikající produkt je neaktivní a je posléze vylučován [7; 11]. Některé mikroorganismy jsou dále schopny neaktivní pesticid mineralizovat a využít např. s-triazinový kruh jako zdroj dusíku [12].

V abiotickém prostředí hraje důležitou roli fotolýza, která je jednou z nejvýznamnějších procesů vedoucích k eliminaci pesticidu z prostředí, a hydrolýza, která je silně závislá na hodnotě pH prostředí [7].

Pro degradaci pesticidu je důležitý zejména obsah kyslíku rozpuštěný ve vodě. Studie prokázaly, že v anaerobních podmínkách je jejich rozklad velmi malý, oproti jejich rozkladu za aerobních podmínek [10].

Dalším důležitým faktorem ovlivňující degradaci je teplota vody, s klesající teplotou vzrůstá perzistence pesticidu [7; 10].

Nízká teplota, anaerobní podmínky a nepřítomnost organismů tedy povedou ke snížené degradaci pesticidů [10].

Osud pesticidu v povrchové a podzemní vodě nebo v zemi je určen vztahem mezi retencí, transformací a transportním procesem. Sorpce ovlivňuje nejen tyto procesy ale i následně těkavost pesticidu, biodostupnost, degradaci a bioakumulaci. Pesticidy slabě adsorbované na půdní částice, mají vysokou mobilitu a představují tedy riziko kontaminace podzemních vod [10]. Velká adsorpce vede naopak k akumulaci pesticidu na volné či vázané částice v půdě, a snižuje jeho koncentraci ve vodě. To snižuje jeho biodostupnost, biologickou degradaci a pesticid je zadržován bez odbourání. Pomocí desorpce se poté stává pesticid přístupný k zpětnému vymytí do podzemní vody, k biotické či abiotické degradaci nebo transformaci [13]. Příkladem pesticidů s velkým sklonem k sorpci mohou být triazinové pesticidy (atrazin, cyanazin), naopak nízké tendence k sorpci mají fenylmočovinné pesticidy (linuron, chlorbromuron).

2.4 Legislativní požadavky na limity reziduí pesticidů a jejich metabolitů ve vodě

Rozsáhlá kontaminace vodního a půdního ekosystému si vynutila přijetí legislativy regulující oblast přípravků na ochranu rostlin z důvodu ochrany ŽP před znečištěním [14].

Přistoupením České republiky (ČR) do Evropské unie (EU) vznikla ČR povinnost řídit se evropskou legislativou [15].

Z důvodu ochrany lidského zdraví EU vydala Rámcovou směrnici o vodě 2000/60/ES, která usiluje o postupné omezení emisí, vypouštění a úniků nebezpečných látek do vody po celé Evropě a zajištění jejího dlouhodobého a udržitelného využívání. Směrnice se zabývá povrchovými vodami, pobřežními vodami a podzemními vodami a usiluje o zajištění dobrého chemického stavu útvarů povrchových i podzemních vod v celé Evropě. V případě **povrchových vod** je tento cíl vymezen pomocí limitů koncentrací specifických znečišťujících látek s významem pro EU, které jsou známé

jako prioritní polutanty [16]. Směrnice 2008/105/ES stanovuje normy environmentální kvality (NEK) [17]. V následující tabulce jsou z prioritních polutantů uvedeny pouze pesticidy (TAB. 1) [17].

TAB. 1: TABULKA PRIORITNÍCH A ZNEČIŠTUJÍCÍCH LÁTEK S VÝZNAMEM PRO EU

Název látky	RP ¹ -NEK vnitrozemské ³ povrchové vody	NPK ² -NEK vnitrozemské ³ povrchové vody	RP ¹ -NEK ostatní povrchové vody	NPK ² -NEK ostatní povrchové vody
	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
Alachlor	0,3	0,7	0,3	0,7
Atrazin	0,6	2,0	0,6	2,0
Chlorfenvinfos	0,1	0,3	0,1	0,3
Chlorpyrifos-ethyl	0,03	0,1	0,03	0,1
Cyklodienové pesticidy				
Aldrin				
Dieldrin	Σ = 0,01	nepoužije se ⁴	Σ = 0,005	nepoužije se ⁴
Endrin				
Isodrin				
DDT celkem	0,025	nepoužije se ⁴	0,025	nepoužije se ⁴
para-para-DDT	0,01	nepoužije se ⁴	0,01	nepoužije se ⁴
Diuron	0,2	1,8	0,2	1,8
Isoproturon	0,3	1,0	0,3	1,0

¹ RP – Roční průměr

² NPK – Nejvyšší přípustná koncentrace

³ Vnitrozemské povrchové vody zahrnují řeky a jezera a související umělé či výrazně upravené vodní útvary

⁴ Je-li NPK-NEK označena jako „nepoužije se“, pak se hodnoty RP-NEK považují za takové, které chrání také proti krátkodobým maximálním znečištěním v případě trvalých úniků, neboť jsou výrazně nižší než hodnoty odvozené na základě bezprostřední toxicity

Za monitorování koncentrací prioritních látek v povrchových vodách jsou zodpovědné členské státy v rámci svých monitorovacích programů [18]. V ČR tento monitoring provádí Český hydrometeorologický ústav [19].

Rámcová směrnice o vodě požaduje také dobrý chemický stav **podzemních vod**. Tento požadavek podporuje i Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2006/118/ES o ochraně podzemních vod proti znečištění a zhoršování stavu, v níž se stanoví opatření k posuzování, monitorování a limity znečištění podzemních vod [16]. Pro jednotlivé

pesticidy nebo jejich metabolity je zde určen limit 0,1 µg/l a pro součet jednotlivých stanovených pesticidů a jejich metabolitů platí limit 0,5 µg/l v podzemních vodách [20].

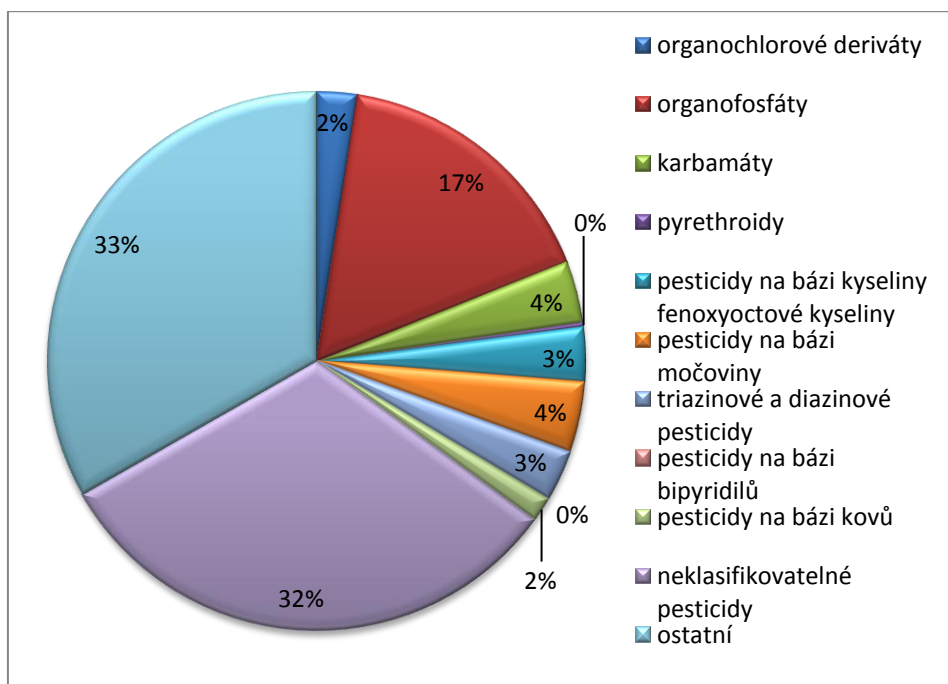
Oblast **pitných a teplých vod** reguluje Směrnice 98/83/ES o jakosti vody určené pro lidskou spotřebu, která stanovuje limit 0,1 µg/l pro každý jednotlivý pesticid nebo jeho metabolit, s výjimkou aldrinu, dieldrinu, heptachloru, heptachlorepoxydu, pro které platí limit 0,03 µg/l. Limit pro součet jednotlivých stanovených a kvantitativně zjištěných pesticidů a jejich metabolitů je 0,5 µg/l [21].

Tyto limity jsou vodítkem stanovení limitů detekce a kvantifikace pro analytické metody.

2.5 Spotřeby účinných látek na ochranu rostlin v ČR

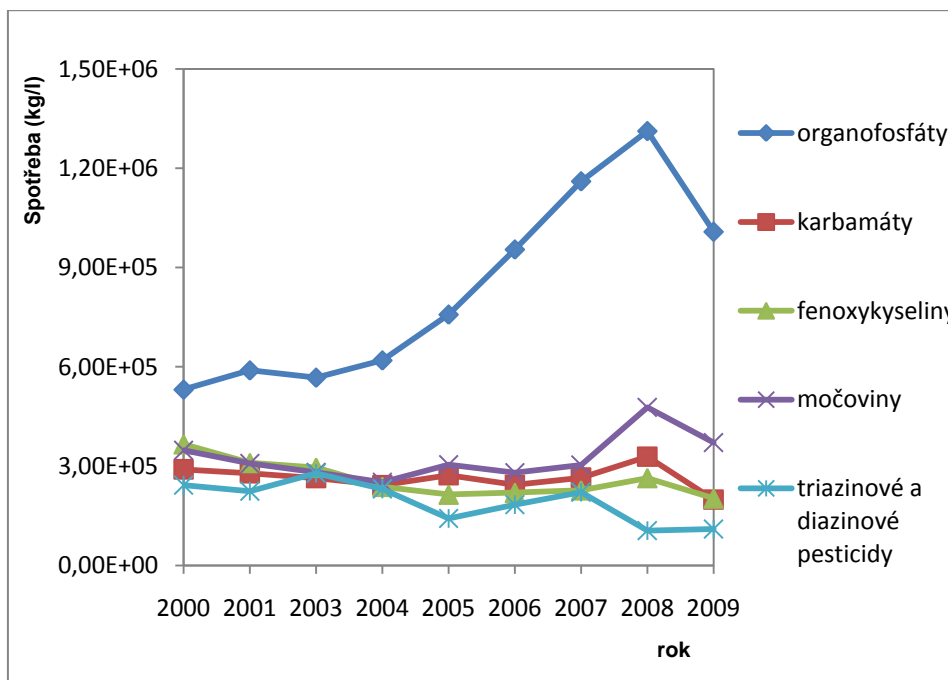
Česká republika je jedna z mála zemí, ve které funguje oznamovací systém v používání prostředků na ochranu rostlin [15]. Fyzické i právnické osoby používající přípravky na ochranu rostlin při podnikání, jsou povinni vést evidenci jejich použití. Evidenční doklady musí být uchovány nejméně 5 let a musí být poskytnuty SRS na její žádost [1]. SRS na svých webových stránkách poté vždy zpětně za rok zveřejňuje spotřeby přípravků na ochranu rostlin.

Z dat uvedených SRS, patří dlouhodobě k nejpoužívanějším skupinám pesticidů organofosfáty, karbamáty, pesticidy na bázi fenoxycetové kyseliny, močoviny a triazinové a diazinové pesticidy. Toto dokazuje i graf rozdělení účinných látek podle skupin v ČR v roce 2007 (OBR. 1) [22].



OBR. 1: GRAF ROZDĚLENÍ ÚČINNÝCH LÁTEK PODLE SKUPIN V ČR V ROCE 2007

Následující graf se zaměřuje na trend spotřeby vybraných nejpoužívanějších skupin účinných látek za posledních 10 let (OBR. 2) [23].



OBR. 2: GRAF SPOTŘEB ÚČINNÝCH LÁTEK PODLE SKUPIN V LETECH 2000-2009

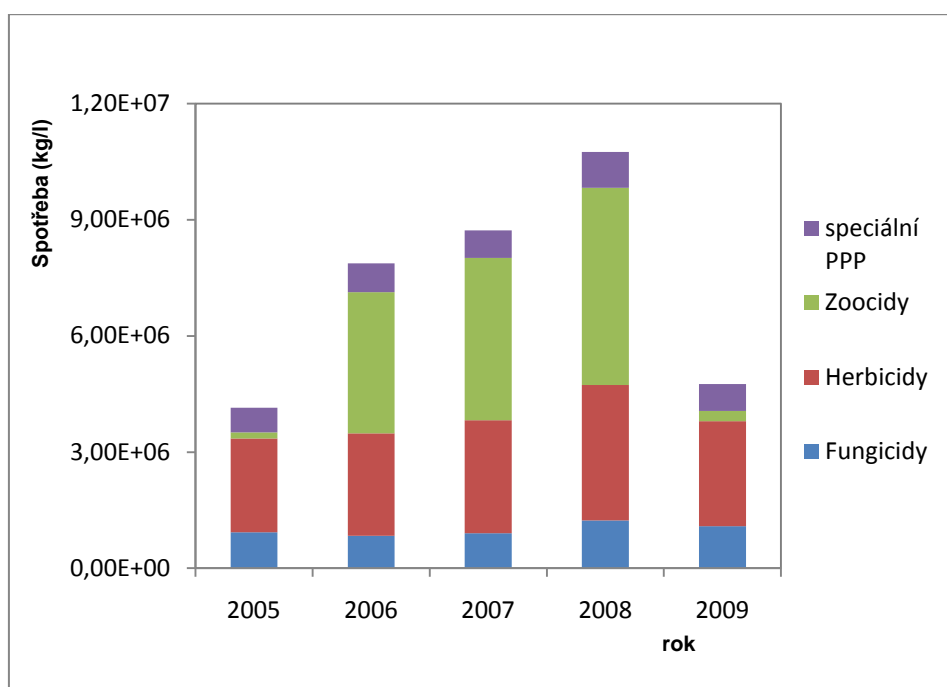
V grafu si lze povšimnout rostoucí spotřeby organofosfátových pesticidů. Na tomto trendu se podílí zvýšené používání glyfosátu a jeho dalších forem, a to zejména z důvodu nízké toxicity, karcinogenity a vysokého účinku proti rostlinám [23; 24]. V roce 2009 ovšem spotřeba organofosfátů zaznamenala pokles. Důvodem může být zákaz používání fosalonu a fenitrothionu rozhodnutím Komise 2006/1010/ES a 2007/379/ES z důvodu nebezpečí kontaminace podzemních vod fosalonem a nebezpečí působení fenitrothionu a jeho metabolitů na spotřebitele [25; 26]. Fenitrothion i fosalon totiž patří mezi středně toxické látky z hlediska lidského zdraví [27].

Slabý nárůst v roce 2008 také zaznamenává používání močoviny, zejména chlorotoluronu, chlorsulfuronu a linuronu [28]. Tyto močoviny jsou mírně toxické až netoxické a patří mezi herbicidy [29]. Fenoxykalkanové kyseliny, na jejichž produkci se podílí hlavně 2,4-dichlorfenoxycetová kyselina (2,4-D) a 2-metyl-4-chlorfenoxycetová kyselina (MCPA), vykazují stabilní spotřebu, jsou málo toxické, a jsou to taktéž účinné herbicidy [30].

Jinak stabilní spotřeba karbamátů ukazuje v roce 2009 pokles, za což může rozhodnutí Komise 2007/415/ES nezařadit, resp. vyřadit se Seznamu účinných látek karbofuran a karbosulfan [31]. K tomuto rozhodnutí vedla Komisi obava z důsledků expozice spotřebitelů i ŽP těmito látkami a jejich metabolity [32; 33]. Karbofuran totiž patří mezi látky s vysoce toxickým účinkem na lidské zdraví, karbosulfan patří mezi středně toxické látky [34; 35].

Na spotřebě poslední skupiny, triazinových a diazinových herbicidů, se podepsalo rozhodnutí Komise 2004/248/ES nezařadit atrazin do Seznamu účinných látek z důvodu kontaminace podzemních vod jak atrazinem, tak i jeho metabolity [36]. Po vypočtení stávajících zásob atrazinu po 31. prosinci 2007, v roce 2008 dochází k poklesu spotřeb triazinových a diazinových pesticidů. Herbicid atrazin ale bývá nahrazován terbutylazinem [13], který působí také jako herbicid, ale i algicid a biocid [37]. Zvyšující se spotřeba terbutylazinu vyrovnává klesající trend spotřeb triazinů [23]. Terbutylazin byl ale v roce 2008 rozhodnutím Komise 2008/934/ES také zakázán [38], po jeho vyčerpání zásob po 31. prosinci 2011 se pravděpodobně spotřeby triazinů ještě sníží, pokud se nenajde i jeho nástupce.

Herbicidy zaujímají na našem trhu důležité místo, což ukazují jejich spotřeby v letech 2005-2009 (OBR. 3) [23].



OBR. 3: GRAF SPOTŘEB ÚČINNÝCH LÁTEK PODLE BIOLOGICKÉ ÚČNOSTI V ČR V LETECH 2005-2009

Z grafu vyplývá, že herbicidy i fungicidy mají stabilní spotřeby. Zoocidy ale zaznamenaly v roce 2006 velký nárůst. To má jistě souvislost se zvyšující se spotřebou organofosfátových pesticidů, jejichž zástupci často patří mezi insekticidy [5]. Proti hmyzu jsou ale zaměřeny také karbamáty [34; 35]. Pokles produkce zoocidů v roce 2009 zřejmě způsobily zákazy používání některých zástupců karbamátů i organofosfátů, jak již bylo řečeno u předešlého grafu.

S novými vědeckými poznatky a technickým vývojem přibývá nových a podložených informací o působení účinných látek a s nimi i rozhodnutí Komise o jejich povolení či zakázání [39]. Například tři z dvaceti z nejpoužívanějších účinných látek v ČR v roce 2009 byly již Komisí zakázány. Acetochlor, prochloraz a terbutylazin byly vyřazeny ze Seznamu účinných látek rozhodnutím Komise 2008/934/ES [38]. Acetochlor se používá na ochranu hlavně kukuřice před jednoděložnými (psárka rolní) a dvouděložnými plevely (heřmánek, peníze rolní) [40]. Prochloraz se používá u obilnin k ochraně před plísněmi a následnou skvrnitostí nebo stéblolamem [41]. Terbutylazin je herbicid působící na jednoleté dvouděložné plevely. Citlivě působí např. na merlíka bílého nebo rdesno blešníka [42]. Lhůtou pro zlikvidování jejich zásob a skončení používání je 31. prosinec 2011 [38]. V roce 2009 ale stále patřily mezi nejvíce používané účinné látky. TAB. 2 uvádí přehled 20 nejvíce používaných účinných látek

v ČR v roce 2009 s uvedením jejich působení, toxicity a karcinogenity podle EPA a zařazením do skupiny podle povahy účinné látky [31; 43].

TAB. 2: TABULKA 20 NEJVÍCE POUŽÍVANÝCH ÚČINNÝCH LÁTEK V ČR V ROCE 2009

Účinná látka	Spotřeba 10 ³ kg l ⁻¹	Biologická účinnost [4; 45]	Skupina [4]	Toxicita EPA [4; 45]	Karcinogenita EPA [4; 45]
1. Chlormekvat chlorid	636,0	růstový regulátor	neklasifikovatelný	slabě toxický	– ¹
2. Glyfosát IPA	410,8	herbicide	organofosfát	– ¹	– ¹
3. Acetochlor	292,0	herbicide	neklasifikovatelný	slabě toxický	neklasifikovatelný karcinogen
4. Glyfosát	263,9	herbicide	organofosfát	slabě toxický	nepravděpodobný karcinogen
5. Metazachlor	180,9	herbicide	neklasifikovatelný	– ¹	– ¹
6. Glyfosát draselný	161,7	herbicide	organofosfát	– ¹	– ¹
7. Chlorotoluron	148,1	herbicide	močovinový pesticid	– ¹	– ¹
8. Chlorpyrifos	138,5	zoocid	organofosfát	středně toxický	nepravděpodobný karcinogen
9. Isoproturon	133,3	herbicide	močovinový pesticid	– ¹	– ¹
10. Prochloraz	110,5	fungicid	neklasifikovatelný	– ¹	možný karcinogen
11. Terbutylazin	109,5	herbicide, zoocid	triazinový pesticid	slabě toxický	neklasifikovatelný karcinogen
12. Mankozeb	94,39	fungicid	karbamát	netoxický	pravděpodobný karcinogen
13. Tebukonazol	89,39	fungicid	neklasifikovatelný	středně toxický	možný karcinogen
14. MCPA	89,14	herbicide	fenoxycetová kyselina	středně toxický	nepravděpodobný karcinogen
15. Pendimethalin	83,20	herbicide	neklasifikovatelný	středně toxický	možný karcinogen
16. Dimethachlor	79,82	herbicide	neklasifikovatelný	– ¹	– ¹
17. 2,4-D	68,33	herbicide, růstový regulátor	fenoxycetová kyselina	slabě až středně toxický	neklasifikovatelný karcinogen
18. Metamitron	63,03	herbicide	triazinový pesticid	slabě toxický	– ¹
19. Karbendazim	58,86	fungicid	neklasifikovatelný	slabě toxický	možný karcinogen
20. Propiconazol	56,79	fungicid	neklasifikovatelný	středně toxický	možný karcinogen

¹Informace nebyla k dispozici

Tabulka dokazuje, že herbicidy patří mezi nejvíce využívané pesticidy. Na jejich vysoké spotřebě se podílí hlavně glyfosát a jeho další formy, které můžeme najít mezi šesti nejvíce používanými pesticidy. Stále přibývá nových účinných látek, které nemůžeme zařadit podle jejich povahy do skupin (viz 2.2 Rozdělení pesticidů), stejně jako nejsou dostupné informace o toxicitě a karcinogeně některých z nich. Je možné, že s novými vědeckými poznatky se ukáže, že jsou toxické nebo karcinogenní a Komise je z důvodu ochrany lidského zdraví či ŽP v příštích letech zakáže stejně jako již zmíněný acetochlor, prochloraz nebo terbutylazin.

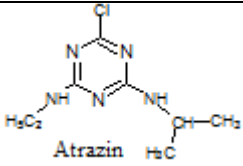
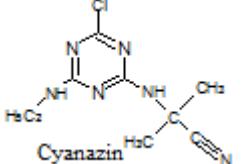
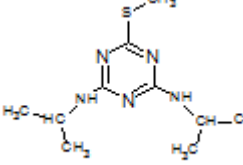
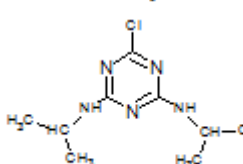
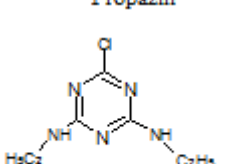
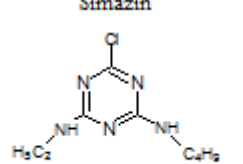
2.6 Triazinové pesticidy

Triazinové pesticidy, patří mezi hojně využívanou skupinu účinných látek v ČR (OBR. 2). Mezi triaziny patří např. atrazin, cyanazin, simazin, propazin, prometryn, pymetrozin a terbutylazin. Triaziny působí jako herbicidy (atrazin, cyanazin, simazin), méně jako zoocidy (pymetrozin) nebo fungicidy (některé deriváty triazinů) [44]. V posledních letech ale roste starost ohledně jejich perzistence, mobility a toxicity, a to jak mateřských látek, tak i jejich metabolitů kvůli vysoké reziduální koncentraci objevující se ve vodním prostředí [7; 13]. Z důvodu kontaminace podzemních vod atrazinem, simazinem a jejich metabolity rozhodla Komise rozhodnutím 2004/248/ES a 2004/247/ES o jejich nezařazení do Seznamu účinných látek [36; 46]. Nařízením Komise 2076/2002/ES bylo rozhodnuto o nezařazení cyanazinu, prometrynu a propazinu do Seznamu účinných látek (SÚL) [47]. Rozhodnutím Komise 2008/934/ES byl ze Seznamu vyřazen i terbutylazin [48]. V současné době je tedy v ČR povoleno jen několik málo triazinových pesticidů, z nichž pouze pymetrozin se u nás používá, jak vyplývá z tabulky celkových spotřeb účinných látek, kterou každoročně zveřejňuje SRS [23].

Triaziny se používají ke kontrole listnatého a travnatého plevelu u takových plodin jako je kukuřice, čirok nebo cukrová řepa [49; 50]. V případě insekticidu pymetrozinu je mechanismus účinku založen na blokaci příjmu potravy savých škůdců (mšice, molice) [51].

Triazinové pesticidy jsou tvořeny různě substituovaným triazinovým kruhem [44]. Struktura vybraných triazinů je ukázána v TAB. 3, s uvedeným přehledem jejich toxicity a karcinogenity podle EPA a legislativy, která povoluje či zakazuje jejich užívání v ČR.

TAB. 3: STRUKTURA VYBRANÝCH TRIAZINOVÝCH PESTICIDŮ

Účinná látka [9; 52; 53]	Toxicita [44]	Karcinogenita [44]	Legislativa [31]
 <p>Atrazin</p>	slabě toxický	nepravděpodobný karcinogen	Rozhodnutí Komise 2004/248/ES o nezařazení do SÚL
 <p>Cyanazin</p>	středně toxický	nožný karcinogen	Nařízení Komise 2076/2002/ES o nezařazení do SÚL
 <p>Prometryn</p>	slabě toxický	nepravděpodobný karcinogen	Nařízení Komise 2076/2002/ES o nezařazení do SÚL
 <p>Propazin</p>	slabě toxický	nepravděpodobný karcinogen	Nařízení Komise 2076/2002/ES o nezařazení do SÚL
 <p>Simazin</p>	slabě toxický	nepravděpodobný karcinogen	Rozhodnutí Komise 2004/247/ES o nezařazení do SÚL
 <p>Terbutylazin</p>	slabě toxický	neklasifikovatelný karcinogen	Rozhodnutí Komise 2008/934/ES o nezařazení do SÚL

Triaziny zasahují do fotosyntézy tím, že se váží na D1 protein sloužící k elektronovému transportu při světelné fázi fotosyntézy, čímž inhibují elektronový transport. Tímto jsou dotčeny i procesy závislé na vzniku energie z fotosyntézy jako je otevírání stomat a transport iontů, a rostlina odumírá. Atrazin má navíc xenoestrogenní účinky, jehož důsledkem je feminizace savců [13]. Následující tabulka uvádí přehled fyzikálně-chemických a ekotoxikologických vlastností vybraných triazinů (TAB. 4) [45].

TAB. 4: FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ A EKOTOXIKOLOGICKÉ VLASTNOSTI VYBRANÝCH TRIAZINŮ

Účinná látka	CAS	M _r	pKa ¹	Rozpustnost ² ve vodě/hexanu/acetonu g · l ⁻¹	DT50 při vodní hydrolyze ³ /fotolýze ⁴ dny
Atrazin	1912-24-9	215,68	1,70	0,035/0,110/– ⁸	86/2,1
Cyanazin	21725-46-2	240,69	12,9	0,171/15,00/19,50	– ⁵ / – ⁷
Prometryn	7287-19-6	241,36	4,10	0,033/5,500/240,0	– ⁶ /30
Propazin	139-40-2	229,71	1,70	0,008/– ⁸ / – ⁸	83 ⁶ /0,8
Simazin	122-34-9	201,66	1,62	0,005/0,003/1,500	96 ⁶ /1,9
Terbutylazin	5915-41-3	229,71	2,00	0,007/0,410/41,00	– ⁶ / – ⁷

¹ pKa byla měřena při 25 °C

² Rozpustnost byla měřena při 20 °C

³ Hydrolyza ve vodním prostředí probíhala při 20 °C a pH 7

⁴ Fotolýza ve vodním prostředí probíhala při pH 7

⁵ Stabilní od pH 5 do pH 9, hydrolyza jen silnými kyselinami nebo bázemi

⁶ Stabilní za normálních podmínek, hydrolyza jen v kyselých a bazických podmínkách

⁷ Stabilní při fotolýze

⁸ Hodnota nebyla k dispozici

Jak dokazuje předcházející tabulka, rozpustnost triazinů ve vodě je velmi nízká a liší se u jednotlivých zástupců. Triaziny jsou odolné vůči hydrolyze nebo hydrolyza probíhá pomalu. Nejúčinnější se zdá být fotolýza, ale některé triaziny jsou vůči ní stabilní. Velkým problémem triazinů je tedy nízká biodegradabilita a dlouhodobé přetrvávání ve vodním prostředí jak mateřských látek, tak jejich metabolitů [7].

2.6.1 Metabolismus triazinových pesticidů

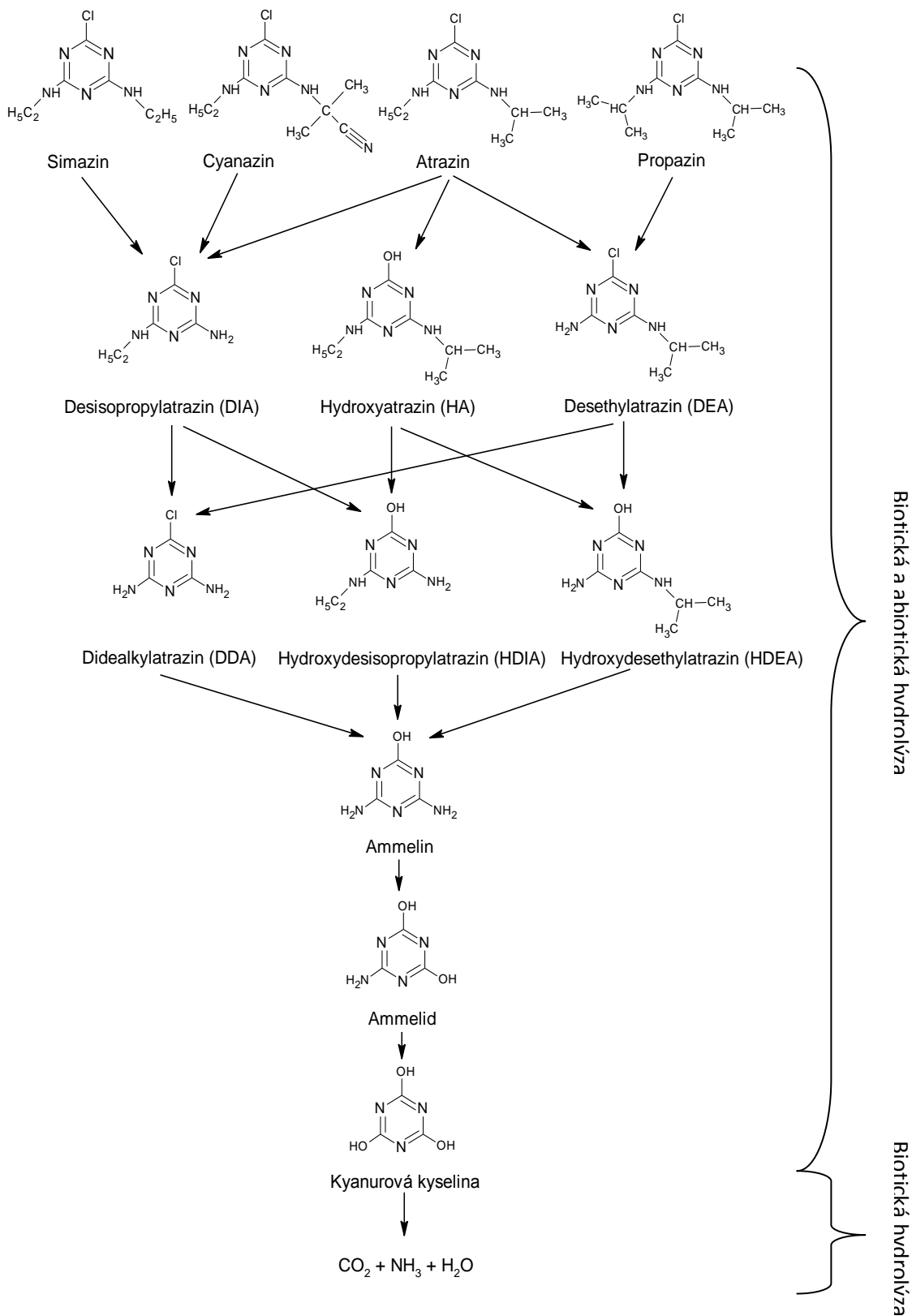
Triaziny do ekosystému vstupují hlavně přímou aplikací na plodiny, roli zde hraje ale i atmosférická depozice [13].

Protože jsou tyto herbicidy relativně málo ve vodě rozpustné, mohou se vyskytovat v povrchových vodách nebo přecházet do podzemních vod, také se mohou sorbovat na půdní částičky [52]. Tato sorpce v kombinaci s nízkou rozpustností triazinů ve vodě je příčinou jejich nízké biodegradace.

Metabolismus dříve hodně používaných triazinů jako je atrazin, cyanazin, propazin, prometryn a simazin je již prostudován [49]. Poskytují desethylovaný a desisopropylovaný atrazin [52]. Metabolismus ostatních triazinů je málo známý [49].

Triaziny se rozkládají v ŽP jak za biotických tak abiotických podmínek na dealkylované metabolity. Cyazin a simazin poskytují desisopropylatrazin (DIA) a propazin desethylatrazin (DEA). Atrazin může tvořit jak DIA, DEA, tak i hydroxylovaný metabolit hydroxyatrazin (HA) [52]. Prometryn poskytuje metabolit desisopropylprometryn [49] a terbutylazin desethylterbutylazin (DET) a hydroxyterbutylazin (HT) [7]. Jednotlivé reakce je obtížné rozdělit na biotické a abiotické, protože se často dějí paralelně a vedou ke stejným výsledným produktům. Kompletní mineralizace triazinů se ale zdá být převážně biotickou reakcí [13].

Degradační cesty vybraných triazinů jsou zobrazeny na obr. 4 [49]. Následující tabulka dále uvádí některé bakterie a plísňe, které se podílejí na metabolismu triazinů a konečné produkty, na které je přeměňují (TAB. 5).



OBR. 4: SCHÉMA DEGRADACE NĚKTERÝCH TRIAZINOVÝCH PESTICIDŮ

TAB. 5: BAKTERIE A PLÍSNEĚ, KTERÉ SE PODÍLEJÍ NA DEGRADACI TRIAZINŮ

Organismy	Substrát	Konečný produkt	Ref.
<i>Pseudomonas sp.</i>	Atrazin	Desethylatrazin+desisopropylatrazin	[54]
<i>Agrobacterium radiobacter J14A</i>	Atrazin	CO ₂	[55]
<i>Rhodococcus corallinus strain 11</i>	DDA	CO ₂ + NH ₃ + H ₂ O	[56]
<i>Rhodococcus corallinus strain 11</i>	Ammelin	CO ₂ + NH ₃ + H ₂ O	[56]
<i>Pseudomonas sp. strain A</i>	DDA	CO ₂ + NH ₃ + H ₂ O	[57]
<i>Pseudomonas sp. strain A</i>	Ammelin	CO ₂ + NH ₃ + H ₂ O	[57]
<i>Pseudomonas sp. strain A</i>	Kyanurová kyselina	CO ₂ + NH ₃ + H ₂ O	[57]
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Simazin	Dealkylovaný simazin	[58]

Z tabulky vyplývá, že degradovaný substrát i výsledný konečný produkt závisí na konkrétním kmenu bakterie. Bakterie mají totiž k dispozici jiné enzymy k degradaci substrátu, proto také existuje snaha o hybridizaci DNA, tak aby byly do mikroorganismu vloženy geny, které kódují biodegradaci požadovaného triazinu. Mikroorganismy si mimo jiné podmiňují přítomnost omezeného množství uhlíku, některé přítomnost kyslíku a mohou mít určen koncentrační limit, při jehož překročení začínají biodegradovat pesticid [12].

O triazinových metabolitech existuje jen málo informací. Z fyzikálně-chemických vlastností jsou známy jen molekulové hmotnosti a u některých metabolitů rozpustnosti ve vodě. Poločasy rozpadu nejsou uvedené v žádné z databází [44; 45]. Jejich určování se ale zabývají různé studie, o kterých bude později zmínka. TAB. 6 shrnuje fyzikálně-chemické a ekotoxikologické vlastnosti metabolitů triazinových pesticidů [44; 45; 59].

TAB. 6: FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ A EKOTOXIKOLOGICKÉ VLASTNOSTI METABOLITŮ TRIAZINŮ

Metabolit	Sumární vzorec	M_r	Rozpustnost ¹ ve vodě $g \cdot l^{-1}$
Ammelin	$C_3H_5N_5O$	127,10	– ²
Ammelid	$C_3H_4N_4O_2$	128,09	– ²
Desethylatrazin	$C_6H_{10}ClN_5$	187,63	3,20
Desisopropylatrazin	$C_5H_8ClN_5$	173,60	0,67
Desethylterbutylazin	$C_7H_{12}ClN_5$	201,68	0,33
Hydroxyatrazin	$C_8H_{15}N_5O$	197,24	0,01
Hydroxydesethylatrazin	$C_6H_{11}N_5O$	169,18	– ²
Hydroxydesisopropylatrazin	$C_5H_9N_5O$	155,16	– ²
Hydroxyterbutylazin	$C_9H_{17}N_5O$	211,33	0,01
Kyanurová kyselina	$C_3H_3N_3O_3$	129,06	2,70

¹ Rozpustnost byla měřena při 20 °C

² Hodnota nebyla k dispozici

Bylo prokázáno, že hlavním zdrojem DIA je atrazin, a to z 75%. Cyanazin se na produkci DIA podílí jen z 25%, a jen stopová množství pocházejí ze simazinu, který je ovšem transformován na DIA mnohem rychleji než atrazin [60]. Atrazin je také zodpovědný za většinu množství DEA, asi z 98%. Zbylá procenta připadají na degradaci propazinu. Propazin a simazin tedy nijak významně nepřispívají k produkci DIA nebo DEA [52].

Chemickou, biologickou nebo fotochemickou hydrolyzou dochází k nahrazení chloru v atrazinu nebo dealkylovaných metabolitů ostatních triazinů hydroxyskupinou na druhé pozici triazinového kruhu a vzniku hydroxymetabolitů. Bylo prokázáno, že fotolýza atrazinu v přítomnosti huminových látek vede k tvorbě spíše dealkylovaných produktů, naopak v jejich nepřítomnosti se preferuje tvorba HA [61].

Četnost analýz závisí na stabilitě analytů, místě a době odběru vzorku, velikosti toku povrchových vod, kdy v důsledku velkého toku může dojít k naředění vzorků [62], a na hydrologických podmínkách, tedy množství srážek, v jejichž důsledku může dojít ke splachům z polí [52; 5].

Koncentrace metabolitů ve vodách se mohou obecně rovnat nebo být vyšší než koncentrace mateřské látky. Bylo zjištěno, že z důvodu kumulace jsou koncentrace metabolitů triazinových pesticidů v podzemních vodách často vyšší než koncentrace

mateřské látky. Studie zkoumající výskyt a distribuci vybraných pesticidů prokázala, že koncentrace atrazinu v podzemních vodách byla poloviční oproti jeho dvěma reziduím DEA a DIA [9].

V povrchových vodách se ale poměr koncentrací metabolitu a mateřské látky mění. Na jaře, v době aplikace herbicidu je koncentrace mateřské látky vyšší oproti koncentraci jeho metabolitů. Ve vegetačním období se koncentrace metabolitů a mateřské látky vyrovnají, a na podzim již může koncentrace metabolitu překonat koncentraci mateřské látky [63].

K nejčastěji detekovaným metabolitům triazinů patří hydroxyatrazin, jehož koncentrace se výrazně liší podle doby odběru. U vzorků odebíraných před setbou plodin převažuje jako degradační produkt HA a jeho koncentrace může být až třikrát vyšší než koncentrace DEA. U vzorků odebíraných po setbě se jejich koncentrace vyrovnávají [61]. Oproti desethylovaným produktům se desisopropylované metabolity nacházejí v ŽP dvakrát až třikrát méně často [51].

Tato zjištění závisí hlavně na stabilitě metabolitů. Poločas rozpadu hydroxyatrazinu v povrchových vodách je mezi 32-165 dny. U dealkylovaných produktů není jasné, jak dlouho zůstávají v prostředí. Studie uvádí jejich poločas rozpadu mezi 5-9 dny [61] a 22-58 dny [64]. Nebezpečí spočívá hlavně v relativní rozpustnosti metabolitů, čímž vzniká riziko kontaminace povrchových a podzemních vod, a tendenci k vazbě na půdní částice, díky které metabolity přetrvávají v ŽP a mohou být více perzistentní než mateřské látky [61]. Ještě 10 let po zákazu používání atrazinu v Německu v roce 1991 byly atrazin a desethylatrazin nejčastějšími herbicidy detekovanými v podzemních vodách. Po delším měření byl zjištěn všeobecný trend v pomalém snižování koncentrace atrazinu v podzemních vodách, a zároveň slabý vzrůst koncentrace desethylatrazinu [12].

Z detekce herbicidů a jejich metabolitů vyplynulo následující pořadí stability, které odpovídá i jejich poločasům rozpadů. Stabilita látek: HA > atrazin > DEA >> DIA > cyanazin [62].

2.6.2 Metody analýzy triazinových pesticidů

Pro stanovení triazinových pesticidů se tradičně využívalo systémů plynové nebo kapalinové chromatografie s takovými detektory jako je plamenově ionizační detektor (FID), detektor elektronového záchytu (ECD), absorpční detektor pracující v oblasti UV záření, detektor s diodovým polem či fluorescenční detektor. Bylo ovšem využíváno i elektroforézy s UV-VIS detektorem [65].

Pro svou citlivost i selektivitu se ale stále více využívá hmotnostního spektrometru jako detektoru ve spojení s již zmíněnými separačními metodami [65], čímž je umožněno provádět stopovou kvalitativní i kvantitativní analýzu ve složitých maticích [66; 67].

Protože degradační produkty triazinových pesticidů jsou polárnější než jejich mateřské látky, pro využití plynové chromatografie s hmotností detekcí by vyžadovaly derivatizaci. Proto je vhodnější pro analýzu triazinů a jejich metabolitů spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí [65]. Kapalinová chromatografie-hmotnostní spektrometrie (LC-MS) je jedna z neúčinnějších technik pro analýzu polárních termálně nestabilních pesticidů ve vzorcích ze ŽP [13]. Hmotnostní spektrometr zde představuje strukturně selektivní detektor umožňující kromě obvyklé registrace zón látek eluovaných z kolony provést i jejich identifikaci na základě zaznamenaného hmotnostního spektra. Použitím dvou hmotnostních analyzátorů tandemově uspořádaných dále dosáhneme vyššího rozlišení, citlivosti i selektivity [66].

Následující tabulka shrnuje přehled separačních systémů instrumentace LC-MS používaných v analýze triazinových pesticidů (TAB. 7.)

TAB. 7: METODY STANOVENÍ TRIAZINOVÝCH PESTICIDŮ

Vzorek	Analyt	SF ¹	MF ²	Typ eluce	Detekce	LOD ³	Ref.
Povrchová, podzemní voda	Atrazin, propazin, simazin	C18	H ₂ O (A), MeOH (B), 10% CH ₃ COOH(C)	grad.	MS-MS (ESI) ⁴	0,6-4,0 ng/l	[13]
Podzemní voda	Atrazin, simazin	C18	ACN (A), 0,1% HCOOH (B)	grad.	MS-MS (ESI) ⁴	0,6-0,8 ng/l	[68]
Vodovodní voda, odpadní voda po vyčištění	DEA, HA, atrazin, cyanazin, simazin, propazin, terbutylazin	C18	5 mM HCOONH ₄ v H ₂ O:MeOH (80:20, v/v) (A), 5 mM HCOONH ₄ v H ₂ O:MeOH (90:10, v/v) (B)	grad.	MS-MS (ESI) ⁴	2-5 µg/l	[69]
Povrchová podzemní voda	Terbutylazin, DET, HT, simazin, DIA	C18	ACN (A), 1 mM HCOOH (B)	grad.	MS-MS (ESI) ⁴	2-25 ng/l	[70]
Povrchová voda	DIA, DEA, simazin, atrazin, cyanazin	C18	H ₂ O (A), ACN (B)	grad.	MS-MS (ESI) ⁴	0,06-0,32 ng/l	[71]
Povrchová voda	Atrazin, DEA, simazin, terbutylazin,	C18	0,1% HCOOH (A), 0,1% HCOOH v MeOH (B)	grad.	MS-MS (ESI) ⁴	0,15-0,6 ng/l	[72]

¹SF – Stacionární fáze

²MF – Mobilní fáze

³LOD – Limit detekce

⁴ESI – Ionizace elektrosprejem

Z uvedené tabulky vyplývá jako nejvhodnější podmínka pro separaci triazinů pomocí kapalinové chromatografie reverzní mód s použitím stacionární fáze C18 a měnícím se složením mobilní fáze, kterou tvoří nejčastěji voda, methanol a vodný roztok kyseliny mravenčí. Triaziny byly detekovány tandemovým hmotnostním spektrometrem, který využíval elektrosprej jako iontový zdroj.

Stanovení triazinových pesticidů v této práci se zakládalo právě na těchto závěrech.

2.7 Validační parametry

Aby bylo zaručeno, že analytická metoda je vhodná pro získání spolehlivých dat, musí být tato metoda validována. Validace je podle normy ISO/IEC 17 025 „potvrzení zkoumáním a opatření objektivního důkazu o tom, že jsou splněny určité požadavky pro uvažované použití [73].“ Validační protokol poté popisuje metody a postupy validačních zkoušek a zahrnuje validační parametry i jejich výpočet. Výběr validačních parametrů vždy závisí na zamýšleném použití dané metody, tak aby postačovaly potřebám zákazníka. Validačními parametry mohou být [73]:

- Linearita
- Limit detekce (LOD)
- Limit stanovitelnosti (LOQ)
- Správnost
- Přesnost
- Nejistota výsledku

Pro účely metody stanovení triazinových pesticidů byly vybrány právě tyto parametry. Pro jejich výpočet se často používá směrodatná odchylka. Je tedy nutné, si nejprve definovat tento parametr.

Směrodatná odchylka je rozdíl mezi skutečnou a střední hodnotou měřené veličiny. Vzhledem k tomu, že skutečná hodnota je ale nedostupná, nahrazujeme směrodatnou odchylku pouze jejím odhadem [73; 74]:

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

kde n je počet měření, x_i je skutečná hodnota měření, a \bar{x} je aritmetický průměr měření.

V této práci je často používána relativní směrodatná odchylka, její výpočet je uveden níže [74]:

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 [\%]$$

Kde SD je směrodatná odchylka a \bar{x} je aritmetický průměr měření.

Linearita je chápána jako přímková závislost mezi odezvou instrumentace (analytickým signálem) a koncentrací analytu, má úzký vztah ke kalibraci [73, 74]. Pro test linearity se mohou použít kalibrační směsi, pomocí kterých se připraví sada roztoků o koncentracích pokrývajících pracovní rozsah metody. Tyto roztoky mohou být měřeny stejným počtem opakování (vyvážený plán) nebo mohou být měřeny v počátečním a koncovém bodě pracovního rozsahu desetkrát, roztoky mezi těmito dvěma body jsou měřeny jen jednou (nevyvážený plán) [73].

Při testování linearity musí být nejprve potvrzeno, že rozptyly analytického signálu podle kalibrační křivky jsou stejné. Poté je kalibrační závislost proložena lineární funkcí. Pokud není linearita kalibrační křivky potvrzena, proloží se experimentálními body kalibrační křivky kvadratická závislost a testuje se, zda experimentální body vyhovují kvadratickému vztahu [73]. Ke zjištění, zda je daná kalibrační křivka lineární, můžeme použít Mandelův test. Ten porovnává lineární model s určitým nelineárním (v našem případě polynomickým) modelem pomocí jejich směrodatných odchylek reziduí podle vztahu [75]:

$$\hat{F} = \frac{SD_{lin}^2 - SD_{pol}^2}{SD_{pol}^2} = \frac{\frac{\sum_{i=1}^m (y_i - \hat{y}_i)^2}{m-2} - \frac{\sum_{i=1}^m (y_i - \hat{y}_i)^2}{m-3}}{\frac{\sum_{i=1}^m (y_i - \hat{y}_i)^2}{m-3}}$$

Kde $(y - \hat{y}_i)^2$ je suma reziduí daného modelu a $(m - 2)$, popř $(m - 3)$ je počet stupňů volnosti daného modelu (f).

Faktor \hat{F} se následně porovná s kritickou hodnotou rozdělení F na hladině významnosti 0,05 pro $f_{lin}=1$ a $f_{pol}= 1,2,\dots,n$. Pokud je $\hat{F} \geq F_{\alpha; f_{lin}, f_{pol}}$ nemůže být pro danou kalibrační křivku použita lineární závislost [75].

Mez detekce (LOD) je dána nejmenším množstvím analytu ve vzorku, které může být detekováno. Existuje více přístupů k odhadu meze detekce. Jedním z nich, a také v této práci použitým, je princip založený na detekci koncentrace analytu ve vzorku, který v detekčním systému vykazuje zvolený poměr (2-3x) signálu k šumu [73].

Mez stanovitelnosti (LOQ) je nejnížší množství analytu ve vzorku, které může být stanoveno s předem zadanou nejistotou. Odpovídá hodnotě slepého pokusu plus desetinásobek směrodatné odchylky slepého pokusu [73].

Správnost vyjadřuje odchylku výsledku od skutečné hodnoty nebo přijaté referenční hodnoty. Může být ověřena srovnáním s výsledky naměřenými nezávislou laboratoří [73; 74].

Se správností metody souvisí její **výtěžnost** (R_e), je totiž součástí odhadu nejistot výsledku. Výtěžnost vyjadřuje účinnost separace dané metody, udává poměr množství analytu získaného danou analytickou metodou k přijaté referenční hodnotě [74]:

$$R_e = \frac{n_{II}}{n_I} \times 100 \text{ [%]}$$

Kde n_{II} je koncentrace analytu a n_I koncentrace referenčního materiálu.

Přesnost vyjadřuje variabilitu výsledků, získaných za předem stanovených podmínek. Obvykle může být vyjádřena směrodatnou odchylkou opakovatelnosti nebo směrodatnou odchylkou reprodukovatelnosti [73]. Opakovatelnost vyjadřuje těsnost shody mezi výsledky nezávislých měření stejného analytu provedených stejnou metodou, stejným experimentátorem, na stejném přístroji, na stejném místě, za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu. Mez opakovatelnosti je pak hodnota, o které lze s 95% pravděpodobností předpokládat, že bude pod ní ležet nebo jí bude rovna absolutní hodnota rozdílu mezi dvěma výsledky zkoušek, které byly získány za stejných podmínek opakovatelnosti. Reprodukovatelnost vyjadřuje těsnost shody mezi výsledky měření stejného analytu ve vzorcích stejného materiálu, jsou-li jednotlivá měření prováděna stejnou metodou ale za různých podmínek: různými pracovníky, na různých přístrojích, i v různém čase. Mez reprodukovatelnosti je pak hodnota, o které lze s 95% pravděpodobností předpokládat, že bude pod ní ležet nebo jí bude rovna absolutní hodnota rozdílu mezi dvěma výsledky zkoušek, které byly získány za stejných podmínek reprodukovatelnosti [73].

Nejistota měření je parametr přidružený k výsledku měření, který charakterizuje míru rozptýlení hodnot, jež by mohly být důvodně přisuzovány měřené veličině [73]. Nejistota má více složek. Některé z těchto složek mohou být odhadnuty na základě statistického rozdělení výsledků série měření a mohou být vyjádřeny výběrovými směrodatnými odchylkami (nejistota typu A). Odhady ostatních složek se vyhodnocují z předpokládaných rozdělení pravděpodobnosti na základě zkušeností nebo jiných informací a mohou být vyjádřeny také výběrovými směrodatnými odchylkami (nejistota typu B) [73]. Nejistota výsledku vyjádřená směrodatnými odchylkami se nazývá

standardní nejistota. Jejich souhrnem pak získáme *kombinovanou standardní nejistotu*. Veličinu definující interval hodnot zahrnující výsledek měření, o němž lze předpokládat, že obsahuje velký podíl z rozdělení hodnot, které by mohly být důvodně přiřazeny k měřené veličině, nazýváme *rozšířená nejistota* [74].

K odhadu nejistoty se může přistupovat dvěma způsoby. První způsob „složka po složce“ je založen na detailní analýze celého postupu, kdy jsou určeny jednotlivé složky, vstupní veličiny, které přispívají k nejistotě. Tyto příspěvky jsou pak sečteny a sloučeny do kombinované nejistoty. Druhý způsob „shora dolů“ využívá informace o celkové výkonnosti metody např. z validační zprávy či mezilaboratorního porovnání, tak aby se využilo co nejvíce možných zdrojů nejistoty [73].

3. Experimentální část

3.1 Použité chemikálie, roztoky, přístroje a pomůcky

3.1.1 Standardní chemikálie

V TAB. 8 jsou uvedeny použité standardy spolu s jejich CAS čísly, hmotnostními koncentracemi i dodavateli.

TAB. 8: POUŽITÉ STANDARDY

Standard	CAS	c (rozpuštěno v) ng/μl	Dodavatel
Atrazin	1912-24-9	100 (v ACN)	Dr. Ehrenstorfer
Atrazin D5	–	100 (v ACN)	Dr. Ehrenstorfer
Atrazin-2-hydroxy	2163-68-0	100 (v MeOH)	Dr. Ehrenstorfer
Atrazin-desethyl	6190-65-4	100 (v ACN)	Dr. Ehrenstorfer
Atrazin-desisopropyl	1007-28-9	100 (v ACN)	Dr. Ehrenstorfer
Atrazin-desisopropyl D5	–	100 (v ACN)	Dr. Ehrenstorfer
Atrazin-desethyl-desisopropyl	3397-62-4	100 (v ACN)	Sigma-Aldrich
Atrazin-desethyl-2-hydroxy	19988-24-0	Neat (99,2%)	Sigma-Aldrich
Atrazin-desisopropyl-2-hydroxy	7313-54-4	Neat (99,7%)	Sigma-Aldrich
Atrazin-desethyl-desisopropyl-2-hydroxy	645-92-1	Neat (97,5%)	Sigma-Aldrich
Cyanazin	21725-46-2	100 (v ACN)	Dr. Ehrenstorfer
Dimethoat D6	–	100 (v ACN)	Dr. Ehrenstorfer
Propazin	139-40-2	10 (v ACN)	Dr. Ehrenstorfer
Propazin	139-40-2	100 (v ACN)	Dr. Ehrenstorfer
Simazin	122-34-9	100 (v MeOH)	Sigma-Aldrich
Terbutylazin	5915-41-3	100 (v MeOH)	Sigma-Aldrich
Terbutylazin-desethyl	5915-41-3	100 (v ACN)	Dr. Ehrenstorfer
Terbutylazin-2-hydroxy	66753-07-9	10 (v ACN)	Dr. Ehrenstorfer

3.1.2 Rozpouštědla

Milli Q (Millipore) voda, $R > 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$

Methanol pro reziduální analýzu pesticidů, Pestinorm, West Chester, USA

Acetonitril pro HPLC, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Kyselina mravenčí pro LC-MS, 98 %, Fluka, St. Louis, USA

Octan amonný pro MS, 99%, Fluka, St. Louis, USA

Thiosíran sodný pentahydrát, $\geq 99,5\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

3.1.3 Zásobní roztoky a jejich příprava

- *Zásobní roztoky jednotlivých standardů o hmotnostní koncentraci 1 µg/ml* byly připraveny odebráním 100 µl základního roztoku daného standardu (atrazin, atrazin D5, hydroxyatrazin, desisopropylatrazin, desisopropylatrazin D5, desethylatrazin, cyanazin, dimethoát D6, simazin, terbutylazin, desethylterbutylazin) do 10 ml odměrné baňky a doplněny po rysku acetonitrilem.
- *Zásobní roztoky propazinu a hydroxyterbutylazinu o koncentraci 1 µg/ml* byly připraveny odebráním 1000 µl základního roztoku standardu do 10 ml odměrné baňky a doplněny po rysku acetonitrilem.
- *Zásobní roztok hydroxydesethylatrazinu o koncentraci 50 µg/ml* byl připraven navážením 5 mg standardu ve 100 ml odměrné baňce a rozpuštěním v acetonitrilu a methanolu (1:1, v/v).
- *Zásobní roztok hydroxydesethylatrazinu o koncentraci 1 µg/ml* byl připraven odebráním 200 µl zásobního roztoku hydroxydesethylatrazinu o koncentraci 50 µg/ml do 10 ml odměrné baňky rozpuštěním v acetonitrilu.
- *Zásobní roztok hydroxydesisopropylatrazinu o koncentraci 20 µg/ml* byl připraven navážením 5 mg standardu ve 250 ml odměrné baňky a rozpuštěním v acetonitrilu a methanolu (1:1, v/v).
- *Zásobní roztok hydroxydesisopropylatrazinu o koncentraci 1 µg/ml* byl připraven odebráním 500 µl zásobního roztoku hydroxydesisopropylatrazinu o koncentraci 20 µg/ml do 10 ml odměrné baňky a rozpuštěním v acetonitrilu.
- *Zásobní roztok ammelinu o koncentraci 100 µg/ml* byl připraven navážením 10 mg standardu ve 100 ml odměrné baňce a rozpuštěním v acetonitrilu a 0,05 M roztoku hydroxidu sodného (1:1, v/v).
- *Zásobní roztok ammelinu o koncentraci 1 µg/ml* byl připraven odebráním 100 µl zásobního roztoku ammelinu o koncentraci 100 µg/ml do 10 ml odměrné baňky a doplněním acetonitrilem po rysku.
- *Směsný standard TRI A 1000 ng/ml* byl připraven odebráním Hamiltonovou stříkačkou 50 µl základního roztoku standardu atrazinu, desethylatrazinu, hydroxyatrazinu, cyanazinu, simazinu, terbutylazinu, desethylterbutylazinu do 5 ml odměrné baňky, v případě hydroxyterbutylazinu bylo odebráno 500 µl.

Odměrná baňka byla doplněna po rysku acetonitrilem.

- *Spike 50 ng/ml* byl připraven odebráním 500 μl směsného standardu TRI A 1000 ng/ml do 10 ml odměrné baňky a doplněním po rysku acetonitrilem.
- *Směsný standard Degrad 1000 ng/ml* byl připraven odebráním Hamiltonovou stříkačkou 200 μl zásobního roztoku hydroxydesethylatrazinu o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$, 500 μl zásobního roztoku hydroxydesisopropylatrazinu o koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$, a 100 μl zásobního roztoku ammelinu o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ do 10 ml odměrné baňky. Odměrná baňka byla doplněna po rysku acetonitrilem a obsah promíchán.
- *Spike A 50 ng/ml* byl připraven odebráním 500 μl směsných standardů TRI A 1000 ng/ml a Degrad 1000 ng/ml do 10 ml odměrné baňky a doplněn po rysku acetonitrilem.
- *ISTD 1000 ng/ml* byl připraven odebráním 100 μl základních roztoků vnitřních standardů atrazinu D5, desisopropylatrazinu D5 a dimethoátu D6 do 10 ml odměrné baňky a doplněn po rysku acetonitrilem.
- *Směsný standard TRI B 1000 ng/ml* byl připraven odebráním 100 μl základních roztoků standardů atrazinu, desethylatrazinu, desisopropylatrazinu, hydroxyatrazinu, cyanazinu, simazinu, terbutylazinu, desethylterbutylazinu a 1000 μl standardů propazinu a hydroxyterbutylazinu do 10 ml odměrné baňky a doplněním po rysku acetonitrilem.
- *Pracovní roztok o koncentraci 50 ng/ml* byl připraven ředěním směsného standardu TRI B 1000 ng/ml a ISTD 1000 ng/ml. Do 10 ml odměrné baňky bylo Hamiltonovou stříkačkou odměřeno 500 μl každého z těchto roztoků a doplněno acetonitrilem po rysku.
- *ISTD 10 ng/ml* byl připraven odebráním 100 μl roztoku ISTD 1000 ng/ml do 10 ml odměrné baňky a doplněním po rysku acetonitrilem.
- *Spike 10 ng/ml* byl připraven odebráním Hamiltonovou stříkačkou 100 μl směsného roztoku TRI B 1000 ng/ml do 10 ml odměrné baňky a doplněním po rysku acetonitrilem.
- *Spike 2 ng/ml* byl připraven odebráním 20 μl směsného standardu TRI B 1000 ng/ml do 10 ml odměrné baňky a doplněním po rysku acetonitrilem.

- *Pracovní roztoky standardů o koncentraci 10 ng/μl* byly připraveny odebráním 50 μl základního roztoku daného standardu (atrazin, cyanazin, simazin, terbutylazin) do tmavé vialky o objemu 1 ml a naředěny 450 μl acetonitrilu.
- *1% HCOOH* byla připravena odměřením 10 ml kyseliny mravenčí do 1 l odměrné baňky, která obsahovala MQ vodu. Odměrná baňka byla poté doplněna po rysku.
- *5 mM CH₃COONH₄* byl připraven navážením 385 mg octanu amonného a rozpuštěním v 1 l MQ vody.
- *0,1% HCOOH* byla připravena odpipetováním 1 ml kyseliny mravenčí do 1 l odměrné baňky, která obsahovala MQ vodu. Odměrná baňka byla poté doplněna po rysku.
- *0,5% HCOOH* byla připravena odměřením 5 ml kyseliny mravenčí do 1 l odměrné baňky, která obsahovala MQ vodu. Odměrná baňka byla poté doplněna po rysku.
- *10% HCOOH* byla připravena odměřením 10 ml kyseliny mravenčí do 100 ml odměrné baňky, která obsahovala MQ vodu. Odměrná baňka byla poté doplněna po rysku.
- *Na₂S₂O₃ · 5H₂O 0,05 mol/l* byl připraven navážením 1,3 g pentahydrátu thiosíranu sodného do 100 ml odměrné baňky, která byla poté doplněna MQ vodou po rysku.

3.1.4 Použité přístroje a zařízení

Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series, Santa Clara, USA

Hmotnostní detektor API 4000 Applied Biosystems, Carlsbad, USA

Analytická kolona s reverzní fází Zorbax SB-AQ (150 x 3 mm; 3,5 µm)

Syringe pumpa, Harvard Apparatus 11 plus, Holliston, USA

Centrifuga 38 R s výkonem 13 000 RCF, Hettlich Zentrifugen, Tuttlingen, DE

Analytické váhy s citlivostí na 0,00001 g, Sartorius, Göttingen, DE

pH metr MP 220, Mettler Toledo, Praha, ČR

Stříkačky Hamilton v rozsahu 50-2500 µl

Kalibrované automatické pipety 100 µl, 200 µl, 1000 µl a 10 000 µl

2 ml tmavé krimpovací vialky

Víčka se silikon/PTFE septem

5, 10, 25, 50, 250 ml a 1000 ml odměrné baňky

Běžné laboratorní sklo (odměrné válce, kádinky)

Jednorázové šroubovací plastové zkumavky (13 ml)

3.2 Analýza triazinových pesticidů a jejich metabolitů

K analýze triazinových pesticidů a jejich metabolitů byl použit kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series (Santa Clara, USA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem od firmy Applied Biosystems API 4000 (Carlsbad, USA) s iontovým zdrojem elektrosprejem a hmotnostním analyzátozem lineárním trojitým kvadrupólem.

3.2.1 Ladění hmotnostního spektrometru

Laděním hmotnostního detektoru je umožněno správně nastavit optimální podmínky analýzy daného analytu. K ladění je nejvýhodnější využít standard analyzované sloučeniny nebo alespoň ladit na látku strukturně podobnou.

V našem případě byly využity standardy analytů. Ladění bylo provedeno manuálně v programu Analyst® 1.5 od Applied Biosystems/MDS Analytical Technologies Instruments optimalizováním parametrů MS/MS a na základě těchto dat byly vybrány vhodné MRM (multiple reaction monitoring) přechody, tedy přechody prekurzorů (parentních iontů) na produktové ionty (dceřiné ionty), které jsou charakteristické pro

každou látku. Pro každý analyt byly stanovovány dva přechody, tak aby metoda vyhovovala požadavkům na provádění analytických metod [76].

Zásobní roztoky standardů o koncentraci 1 µg/ml byly do hmotnostního detektoru kontinuálně dávkovány pomocí syringe pumpy rychlostí 10,00 µl/min do toku mobilní fáze s nastaveným průtokem (F_m) 0,4 ml/min. Pro stanovení vhodných MRM přechodů bylo testováno použití dvou mobilních fází. První mobilní fáze (MF 1) byla složena z vody, methanolu a 1% kyseliny mravenčí (40:50:10, v/v), druhá mobilní fáze (MF 2) byla složena z vody, methanolu a 5 mM octanu amonného (40:50:10, v/v).

Při ladění standardů byl použit iontový zdroj elektrosprej (ESI). Standardy atrazin, atrazin D5, desisopropylatrazin, desisopropylatrazin D5, desethylatrazin, cyanazin, propazin, simazin, terbutylazin, desethylterbutylazin i dimethoát D6 byly laděny za podmínek MF 1 i MF 2 v kladném módu, hydroxymetabolity hydroxyatrazin, hydroxyterbutylazin, hydroxydeisopropylatrazin, hydroxydesethylatrazin a ammelin byly laděny i v záporném módu.

Optimální nastavení parametrů hmotnostního spektrometru je uvedeno v TAB. 9.

TAB. 9: PARAMETRY HMOTNOSTNÍHO SPEKTROMETRU PRO ESI

Parametr MS	MF 1 ¹	MF 2 ²
CAD ³ (arb)	5	6
CUR ⁴ (psi)	30	30
GS1 ⁵ (psi)	80	80
GS2 ⁶ (psi)	50	50
IS ⁷ (V)	5000	5000
TEM ⁸ (°C)	400	400

¹MF 1 – A: H₂O, B: MeOH, C: 1% HCOOH (40:50:10, v/v)

²MF 2 – A: H₂O, B: MeOH, D: 5 mM CH₃COONH₄ (40:50:10, v/v)

³CAD – Množství kolizního plynu

⁴CUR – Curtain gas

⁵GS1 – Tlak zmlžujícího plynu

⁶GS2 – Tlak sušícího plynu

⁷IS – Napětí na kapiláře v iontovém zdroji

⁸TEM – Teplota zmlžujícího plynu

Ionizace: Pozitivní a negativní mód

3.2.2 Optimalizace chromatografických podmínek

Chromatografická separace triazinových pesticidů byla prováděna na kapalinovém chromatografu Agilent 1100 Series s analytickou kolonou Zorbax SB-AQ (150 x 3 mm; 3,5 μm). Složení mobilní fáze bylo optimalizováno. Gradientové složení mobilních fází je uvedeno v TAB. 10, časy, kdy jde mobilní fáze do detektoru v TAB. 11.

TAB. 10: GRADIENT MOBILNÍ FÁZE

<i>t</i> min	F_m^1 μl/min	A ² %	B ³ %	C ⁴ %
0,0	400	75	15	10
35,7	400	0	90	10
37,0	400	0	90	10
37,1	400	75	15	10
55,0	400	75	15	10

¹F_m – Průtok mobilní fáze

²A: H₂O

³B: MeOH

⁴C: 1% HCOOH

Objem nástřiku: 900 μl

Rychlost nástřiku: 500 μl/min

Teplota na koloně: 40 °C

Teplota v autosampleru: laboratorní

Ionizace: Pozitivní mód

TAB. 11: NASTAVENÍ PŘEPÍNACÍHO VENTILU

<i>t</i> min	Poloha
0,0	odpad
8,5	MS
45,0	odpad

3.2.2.1 Optimalizace složení mobilní fáze

Pro zjištění optimálního složení mobilní fáze bylo provedeno srovnání chromatografické separace pomocí kolony Zorbax SB-AQ a třech mobilních fází obsahující různá objemová procenta kyseliny mravenčí. První mobilní fáze byla složena

z vody, methanolu a 1% kyseliny mravenčí (MF A), druhá z vody, methanolu a 5% kyseliny mravenčí (MF B), třetí mobilní fáze neobsahala žádné aditivum, byla tvořena pouze vodou a methanolem (MF C). Kolony byly termostatovány na teplotu 40 °C, gradientové složení mobilních fází odpovídalo gradientu uvedenému v TAB. 10. Pro optimalizaci byly použity pracovní roztoky o koncentraci 0,5 ng/ml, které svým pH odpovídaly pH mobilních fází. Tyto tři pracovní roztoky byly připraveny odebráním 250 µl Spiku 50 ng/ml do 25 ml baněk a doplněním daným rozpouštědlem. První odměrná banka byla doplněna po rysku MQ vodou (pH 8,26), druhá 0,1% HCOOH (pH 2,90) a třetí 0,5% HCOOH (pH 2,48).

3.2.2.2 Optimalizace teploty na koloně

K určení optimální teploty na koloně, bylo provedeno srovnání chromatografických separací za teplot 30 °C a 40 °C. Toto srovnání bylo provedeno s použitím MF A na koloně Zorbax SB-AQ. Pro test vlivu teploty na koloně byl vytvořen pracovní roztok o koncentraci 0,5 ng/ml s hodnotou pH 2,90 (kapitola 3.2.2.1).

3.2.2.3 Optimalizace objemu nástřiku

Vliv objemu nástřiku na účinnost a separaci analýzy byl testován na vzorku vody připraveném podle kap. 3.4. Vzorek byl dávkován do smyčky o objemu 300 µl, 500 µl a 900 µl. U každého nástřiku byla provedena tři opakování, z nichž byl vyhodnocen průměr.

Uvedené testy byly měřeny v MRM módu a vždy mezi nimi byl proveden jeden nástřik vzorku na ustálení podmínek. U každého testu byly poté provedeny tři opakování, z nichž byl vyhodnocen průměr. Přehled provedených testů je uveden v TAB. 12.

TAB. 12: PŘEHLED EXPERIMENTŮ PRO OPTIMALIZACI

Test č.	Kolona	Teplota na koloně °C	φ^1 (HCOOH) %
1	Zorbax SB-AQ	40	1
2	Zorbax SB-AQ	40	5
3	Zorbax SB-AQ	40	0
4	Zorbax SB-AQ	30	1

¹ φ – Objemové procento

3.2.2.4 Optimalizace separace sekundárních a terciálních metabolitů

Pro optimalizaci separace sekundárních a terciálních metabolitů byl připraven pracovní roztok o koncentraci 0,5 ng/ml, který svým složením odpovídal složení mobilní fáze. Tento pracovní roztok byl připraven odebráním 250 µl Spiku A 50 ng/ml do 25 ml odměrné baňky a doplněním 0,1% HCOOH (pH 2,90) po rysku.

3.3 Příprava kalibrační křivky

Pro stanovení rozsahu kalibrace byla rozhodující hodnota hygienického limitu, která je legislativou stanovena na 0,1 ng/ml, jako maximální koncentrace jednotlivých pesticidů a jejich metabolitů obsažených v pitných a podzemních vodách. Kalibrační křivka byla proto sestrojena od koncentrace 0,005 ng/ml do 1 ng/ml.

Jednotlivé body kalibrační křivky byly připraveny ředěním pracovního roztoku o koncentraci 50 ng/ml roztokem 0,1% HCOOH.

V následující tabulce je uvedena příprava jednotlivých kalibračních bodů (TAB. 13).

TAB. 13: PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍ KŘIVKY

Kalibrační bod	Odebíraný objem µl	Roztok	Objem odměrné baňky ml	Koncentrace analytů ng/ml
STD 1	500	Prac. roztok c=50 ng/ml	25	1,000
STD 2	250	Prac. roztok c=50 ng/ml	25	0,500
STD 3	100	Prac. roztok c=50 ng/ml	50	0,100
STD 4	2500	STD 2	25	0,050
STD 5	500	STD 2	25	0,010
STD 6	250	STD 2	25	0,005

3.4 Příprava vzorků

Příprava vzorků zahrnuje pouze přidavek vnitřních standardů, úpravu pH a centrifugaci k odstranění mechanických nečistot.

Vzorky vod byly před samotnou přípravou nejprve homogenizovány protřepáním celého objemu. Do jednorázových plastových zkumavek bylo kalibrovanou pipetou přidáno 10 ml vzorku a 100 μ l roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ pro redukci případného chlóru, který může být přítomen v pitné vodě z úpravny vody. Do vzorku bylo posléze Hamiltonovou stříkačkou přidáno 100 μ l roztoku ISTD 10 ng/ml a 100 μ l roztoku 10% HCOOH. Tímto byl vzorek z původního pH 8,26 okyselen na pH 2,77. Vzorek byl následně promíchán a umístěn do centrifugy nastavené na relativní odstředivou sílu (RCF) 3000 x g po dobu 3 minut. Po odstředění byly vzorky převedeny pomocí plastové Pasteurovy pipety do 2 ml tmavých krimpovacích vialek a zavřeny víčky se silikon/PTFE septy.

Spolu se vzorky byl vždy připravován i metodový blank (MB), fortifikovaný blank (LCS) a tzv. standard 100% obsahující stanovované látky i vnitřní standardy o přesné koncentraci 0,1 ng/ml. Pomocí těchto kontrolních vzorků je vypočítávána výtěžnost metody i vnitřních standardů, na které jsou poté korigovány výsledky. Metodový blank byl připravován stejným způsobem jako běžné vzorky, kdy místo 10 ml vzorku bylo použito 10 ml MQ vody. Fortifikovaný blank byl připravován jako blank, ale byl obohacen 100 μ l roztoku stanovovaných analytů o koncentraci 10 ng/ml (Spike 10 ng/ml). Standard 100% byl připravován do 10 ml kalibrované odměrné baňky, do které bylo přidáno přibližně 5 ml MQ vody, 100 μ l roztoku Spike 10 ng/ml, 100 μ l roztoku ISTD 10 ng/ml a 100 μ l 10 % HCOOH. Odměrná baňka byla doplněna MQ vodou po rysku a promíchána. Takto připravený STD 100% byl přelit do tmavé 2 ml vialky se silikon/PTFE uzávěrem.

3.5 Validace metody

V průběhu validace metody byly ověřovány tyto parametry: ověření linearity v rozsahu cca 5-1000 pg/ml, odhad limitů detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ), výpočet správnosti (výtěžnosti) extrakčního postupu na třech koncentračních hladinách, výpočet přesnosti metody na třech koncentračních hladinách, ověření výtěžnosti u jiných typů matric a odhad nejistoty celkového analytického postupu. Při validaci byla použita podzemní, povrchová a balená voda.

Pro ověření linearity byla připravena kalibrační křivka podle kapitoly 3.3.

Pro zjištění limitů detekce a kvantifikace bylo připraveno sedm fortifikovaných matric podzemní vody na koncentrační úrovni 20 ng/l. Tyto matrice byly připraveny podle postupu v kapitole 3.4, pouze byly naspikovány 100 µl Spiku 2 ng/ml. K této sadě byl připraven i matricový blank a standard 100% na úrovni 20 ng/l.

Za účelem výpočtu správnosti a přesnosti bylo připraveno sedm fortifikovaných matric podzemní vody na koncentračních hladinách 20 ng/l, 100 ng/l a 1000 ng/l. Matrice byly připraveny podle postupu v kapitole 3.4 a byly naspikovány 100 µl Spiku 2 ng/ml, 100 µl Spiku 10 ng/ml či 1000 µl Spiku 10 ng/ml podle dané koncentrační úrovně. Byly také připraveny tři fortifikované matrice balené a povrchové vody na koncentrační úrovni 100 ng/l, které byly naspikovány 100 µl Spiku 10 ng/ml. K sadě fortifikovaných matric byly vždy připraveny matricové blanky, dále byly připraveny standardy 100% s danou koncentrační úrovní.

Pro výpočet odhadu nejistoty měření bylo připraveno pět duplicitních stanovení fortifikovaných matric podzemní vody na koncentračních hladinách 20 ng/l, 100 ng/l a 1000 ng/l a fortifikovaných matric balené a povrchové vody na koncentrační hladině 100 ng/l. Byly připraveny i matricové blanky a standardy 100% na daných koncentračních úrovních.

3.6 Vyhodnocování výsledků

Při vyhodnocování vzorků muselo být nejprve ověřeno, zda retenční časy jednotlivých analytů souhlasily ve všech standardech i fortifikované matrici. Poté byly vyhodnoceny plochy kalibračních bodů, kontrolních vzorků, i samotných vzorků. Kalibrační křivka byla proložena polynomickou závislostí. Z rovnic regrese kalibračních křivek pro jednotlivé analyty byly po dosažení hodnot jejich ploch za neznámou y získány hodnoty koncentrací daného analytu. Výpočet výsledků z kalibrační křivky byl prováděn pomocí softwaru Analyst® 1.5 od Applied Biosystems/MDS Analytical Technologies Instruments.

3.7 Výpočty a vyjadřování výsledků

Výsledky byly dále zpracovány v Microsoft Excel makru, kde byly koncentrace vypočtené v programu Analyst korigovány na výtěžnosti interních standardů, které představovaly izotopicky značené pesticidy, v jejichž molekule bylo nahrazeno pět a více vodíkových atomů deuteriem. Hodnoty koncentrací byly korigovány podle následujícího vzorce:

$$c_{A \text{ kor}} = c_{A \text{ vz}} \times \frac{c_{IS \text{ STD } 100\%}}{c_{IS \text{ vz}}} [\mu\text{g/l}]$$

Kde $c_{A \text{ kor}}$ je koncentrace analytu po korekci, $c_{A \text{ vz}}$ koncentrace analytu ve vzorku odečtená z kalibrační křivky, $c_{IS \text{ STD } 100\%}$ koncentrace interního standardu ve standardu 100%, $c_{IS \text{ vz}}$ koncentrace interního standardu ve vzorku.

TAB. 14 uvádí jednotlivé analyty a k nim přiřazené interní standardy.

TAB. 14: INTERNÍ STANDARDY, NA KTERÉ SE KORIGUJÍ VÝTĚŽNOSTI ANALYTU

Analyt	Interní standard
Atrazin	Atrazin D5
Cyanazin	Atrazin D5
Desethylatrazin	Desisopropylatrazin D5
Desethylterbutylazin	Atrazin D5
Desisopropylatrazin	Desisopropylatrazin D5
Hydroxyatrazin	Atrazin D5
Hydroxyterbutylazin	Dimethoát D6
Propazin	Atrazin D5
Simazin	Atrazin D5
Terbutylazin	Atrazin D5

3.8 Test stability triazinových pesticidů

Z každého standardu triazinového pesticidu byly připraveny tři vzorky v plastových láhvích o koncentraci 1 ng/ml tak, aby odpovídaly koncentraci nejvyššímu bodu kalibrační křivky. Z pracovních roztoků standardů o koncentraci 10 ng/μl bylo Hamiltonovou stříkačkou odebráno 25 μl do plastových láhví s 250 ml MQ vody. Takto byly z každého roztoku standardu naspikovány 3 láhve o výsledné koncentraci standardu 1 ng/ml. Ze základního roztoku propazinu, bylo Hamiltonovou stříkačkou odebráno 25 μl do 250 ml MQ vody. Takto byly standardem naspikovány celkem 3 láhve. Hodnota pH vzorků byla 8,26.

Jedna láhev od každého standardu byla umístěna do chladničky o teplotě 5 °C ± 2 °C, druhá za okno na jižní stranu laboratoře o teplotě 23 °C ± 2 °C a třetí do skříně o teplotě 25 °C ± 1 °C. Ke každé sadě láhví byla připravena láhev s 250 ml MQ vody. Každá láhev byla vždy označena názvem standardu a jeho umístěním (např. Atrazin_chladnička).

První den přípravy (0. den) byly vzorky láhví připraveny podle postupu v kapitole 3.4 a analyzovány, s nimi byla připravena i kalibrační křivka podle kapitoly 3.3. Takto byly připravené vzorky po pěti a poté po devíti dnech analyzovány. Přehled experimentů je uveden v tabulce níže (TAB. 15)

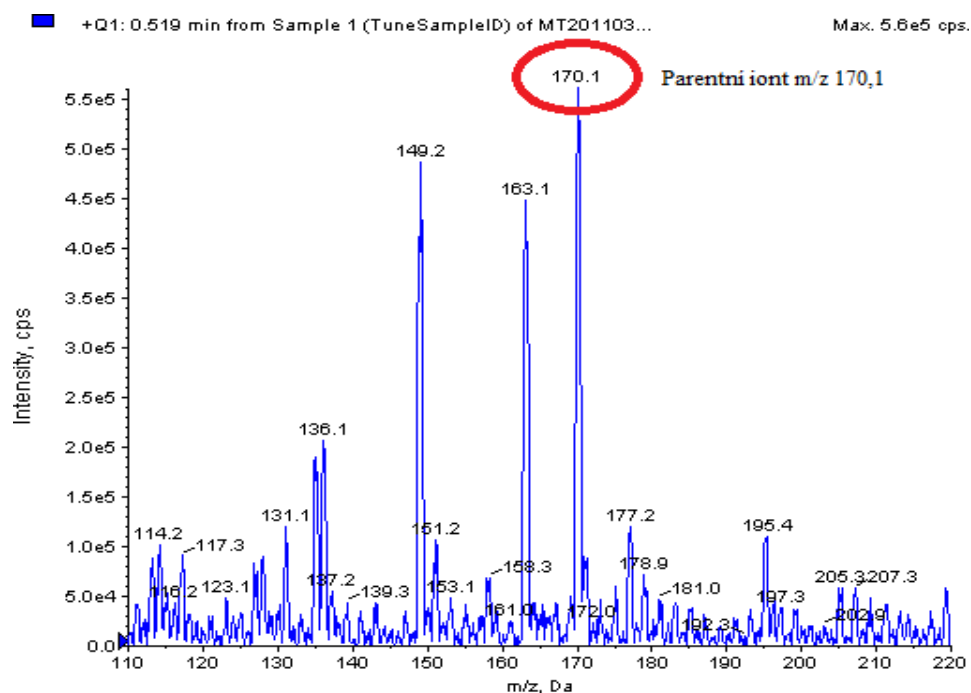
TAB. 15: PŘEHLED EXPERIMENTŮ STABILITY TRIAZINOVÝCH PESTICIDŮ

Pokus	Světlo	Tma	5 °C	23 °C	25 °C
1		x	x		
2	x			x	
3		x			x

4. Výsledky a diskuze

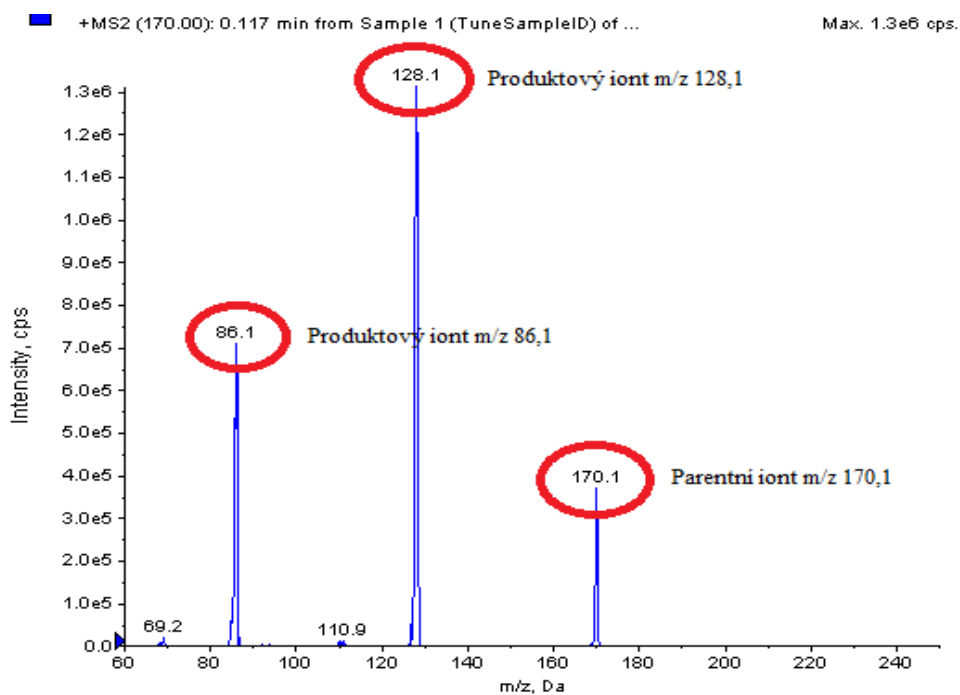
4.1 Optimalizace parametrů hmotnostního spektrometru

Optimalizace parametrů hmotnostního spektrometru pro nalezení MRM přechodů zahrnuje dva hlavní kroky. Prvním krokem je výběr hmoty molekulového (parentního) iontu stanovované látky. Tento výběr je prováděn prvním kvadrupólem (Q1) v módu MS1. Příklad hmotnostního spektra je ukázán na OBR. 5.



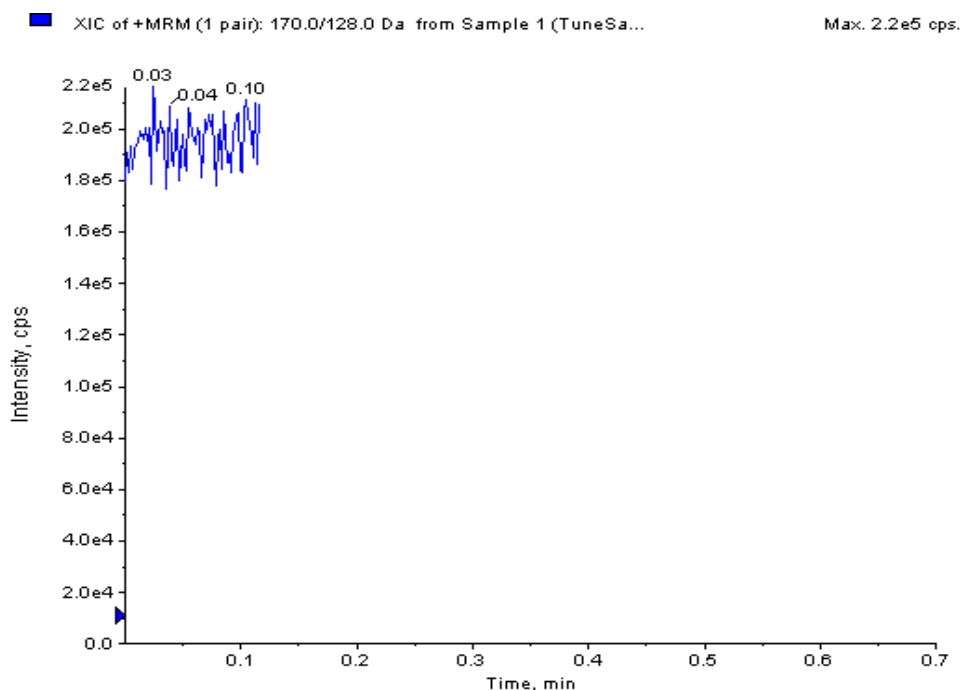
OBR. 5: HMOTNOSTNÍ SPEKTRUM HYDROXYDESETHYLATRAZINU

Vybraný parentní iont podstoupí v kolizní cele (q_0) fragmentaci a vzniknou produktové (dceřiné) ionty. Druhý kvadrupól (Q2) poté provede výběr hmoty produktových iontů (OBR. 6).



OBR. 6: PRODUKTOVÉ IONTY PARENTNÍHO IONTU HYDROXYDESETHYLATRAZINU

V módu MRM byly posléze hledány optimální hodnoty kolizní energie, deklastračního potenciálu a dalších parametrů hmotnostního spektrometru pro daný MRM přechod a byla testována stabilita odezvy tohoto přechodu (OBR. 7).



OBR. 7: STABILITA ODEZVY MRM PŘECHODU HYDROXYDESETHYLATRAZINU M/Z 170 → 86

Při ladění hmotnostního spektrometru byly roztoky standardů dávkovány do toku dvou mobilních fází MF 1 a MF 2. MRM přechody byly hledány za použití iontového zdroje ESI u mateřských látek a některých metabolitů s použitím obou druhů mobilních fází pouze v kladném módu. U hydroxymetabolitů byly z důvodu možné ionizace podmínky optimalizovány i v záporném módu.

Parametry nastavení hmotnostního spektrometru za použití MF 1 a MF 2 byly již uvedeny v TAB. 9. Následující TAB. 16 uvádí výsledek ladění hmotnostního spektrometru pro analýzu triazinových pesticidů a jejich metabolitů za těchto podmínek.

TAB. 16: LADĚNÍ TRIAZINOVÝCH PESTICIDŮ A JEJICH METABOLITŮ ZA POUŽITÍ ELEKTROSPREJE

Standard	Pozitivní mód		Negativní mód	
	MF 1 ¹	MF 2 ²	MF 1 ¹	MF 2 ²
Ammelin	✓	✗	✗	✗
Atrazin	✓	✓	– ³	– ³
Atrazin D5	✓	✓	– ³	– ³
Cyanazin	✓	✓	– ³	– ³
Dimethoát D6	✓	✓	– ³	– ³
Desethylatrazin	✓	✓	– ³	– ³
Desethylterbutylazin	✓	✓	– ³	– ³
Desisopropylatrazin	✓	✓	– ³	– ³
Desisopropylatrazin D5	✓	✓	– ³	– ³
Didealkylatrazin	✓	✓	– ³	– ³
Hydroxyatrazin	✓	✓	✗	✓
Hydroxydesisopropylatrazin	✓	✓	✗	✗
Hydroxydesethylatrazin	✓	✓	✗	✓
Hydroxyterbutylazin	✓	✓	✗	✗
Propazin	✓	✓	– ³	– ³
Simazin	✓	✓	– ³	– ³
Terbutylazin	✓	✓	– ³	– ³

¹MF 1 – A: H₂O, B: MeOH, C: 1% HCOOH (40:50:10, v/v)

²MF 2 – A: H₂O, B: MeOH, D: 5 mM CH₃COONH₄ (40:50:10, v/v)

³Hodnoty nebyly naměřeny

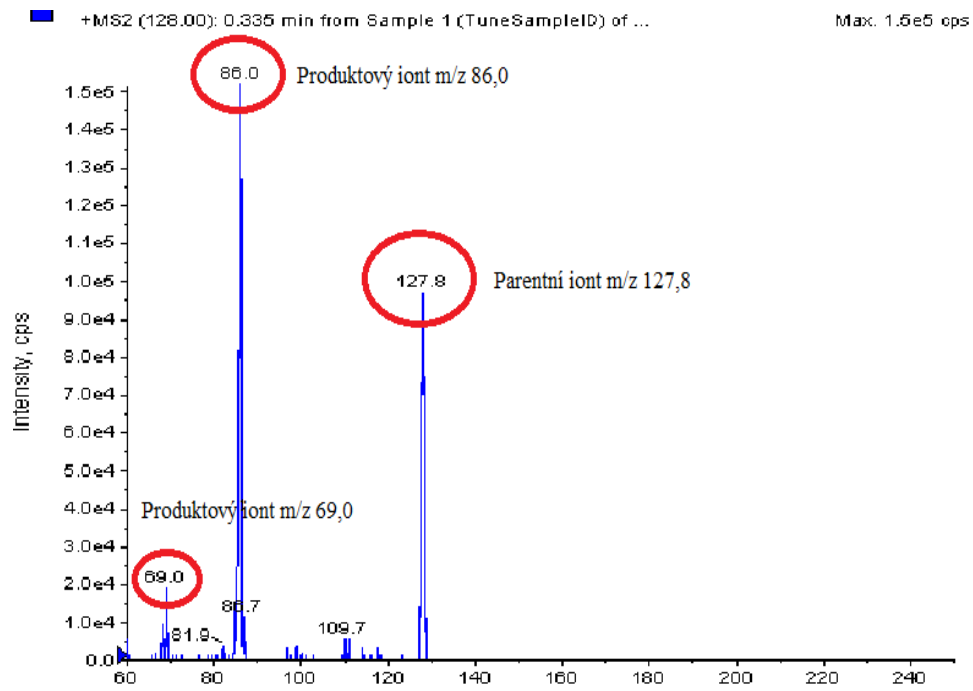
F_m: 0,4 ml/min

Parametry MS: viz TAB. 9

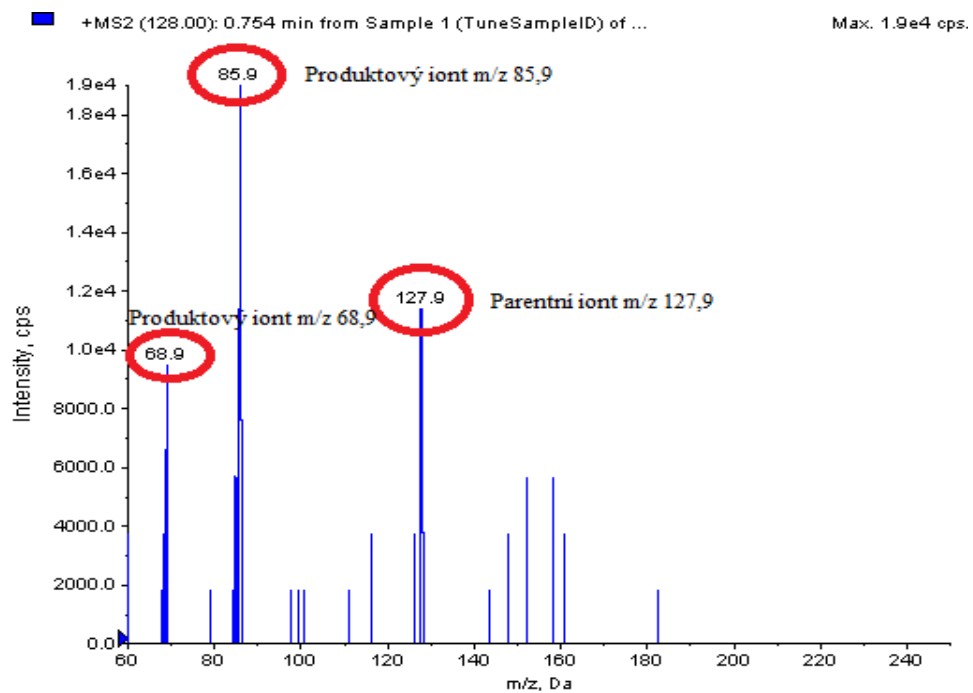
Iontový zdroj: ESI

V negativním módu vykazovaly hydroxymetabolity velmi nízké MRM přechody. U některých z nich se podařilo určit pouze jeden nebo dokonce žádný přechod, proto bylo pro jejich další stanovení využíváno kladné ionizace.

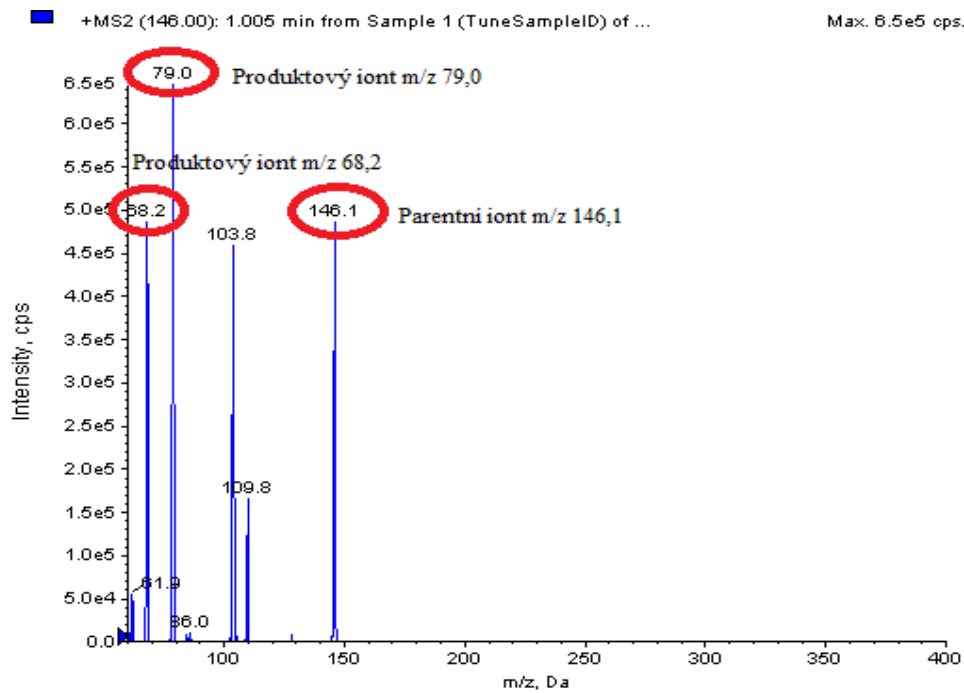
Intenzita MRM přechodů v kladném módu se jak u mateřských látek, tak u metabolitů lišila v závislosti na použití mobilní fáze. Rozdíly intenzit mezi použitím mobilní fáze MF 1 a MF 2 jsou ukázány na příkladu metabolitů ammelinu (OBR. 8, OBR. 9), didealkylatrazinu (OBR. 10, OBR. 11), hydroxydesethylatrazinu (OBR. 12, OBR. 13) a hydroxydesisopropylatrazinu (OBR. 14, OBR. 15).



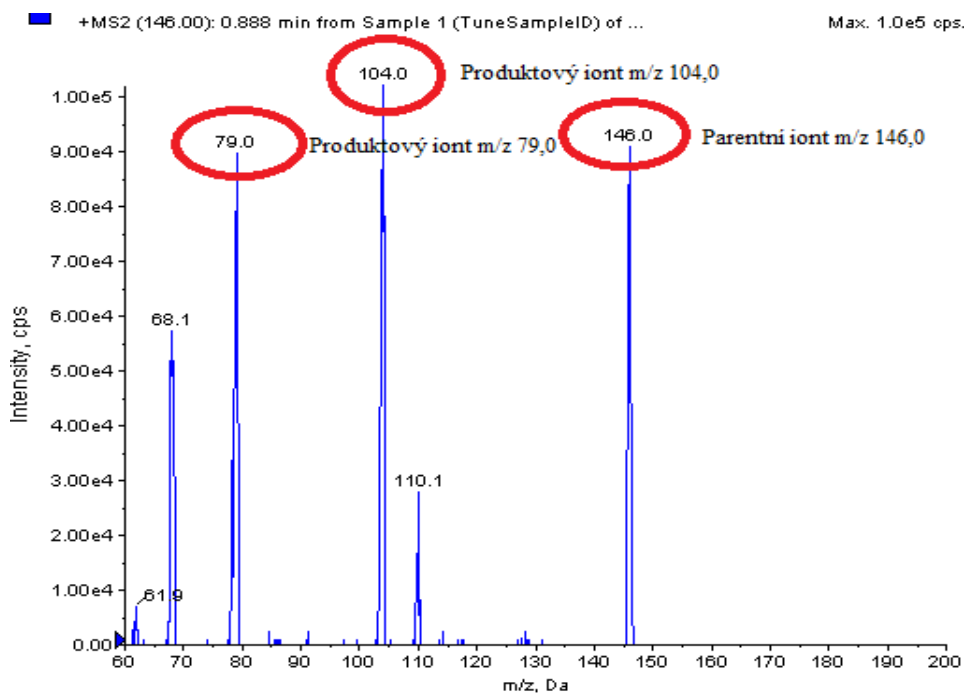
OBR. 8: MRM PŘECHOD AMMELINU V Kladném módu za použití MF 1



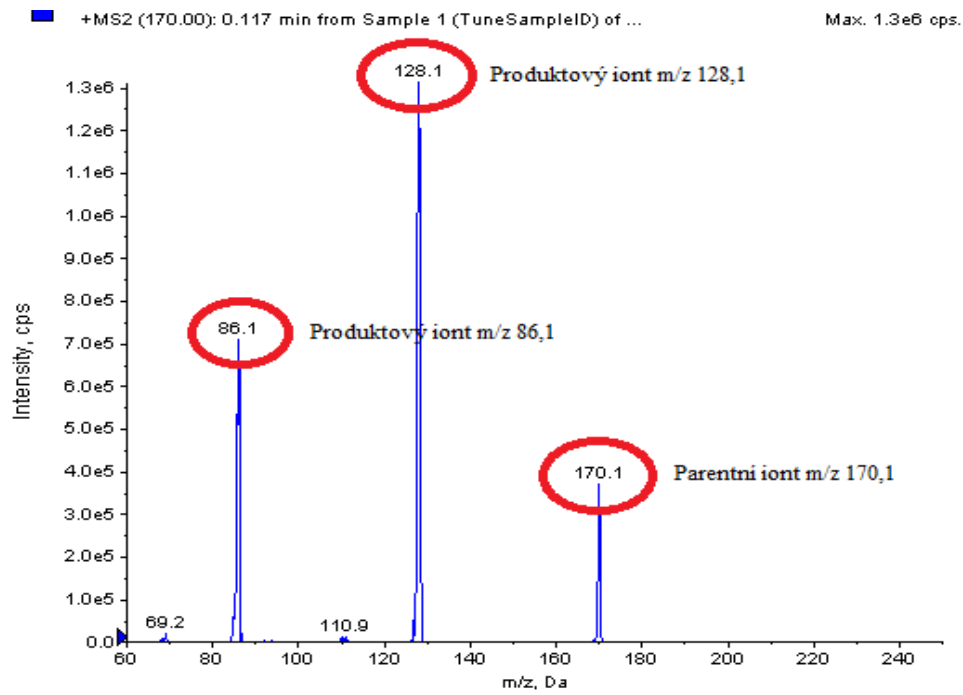
OBR. 9: MRM PŘECHOD AMMELINU V Kladném módu za použití MF 2



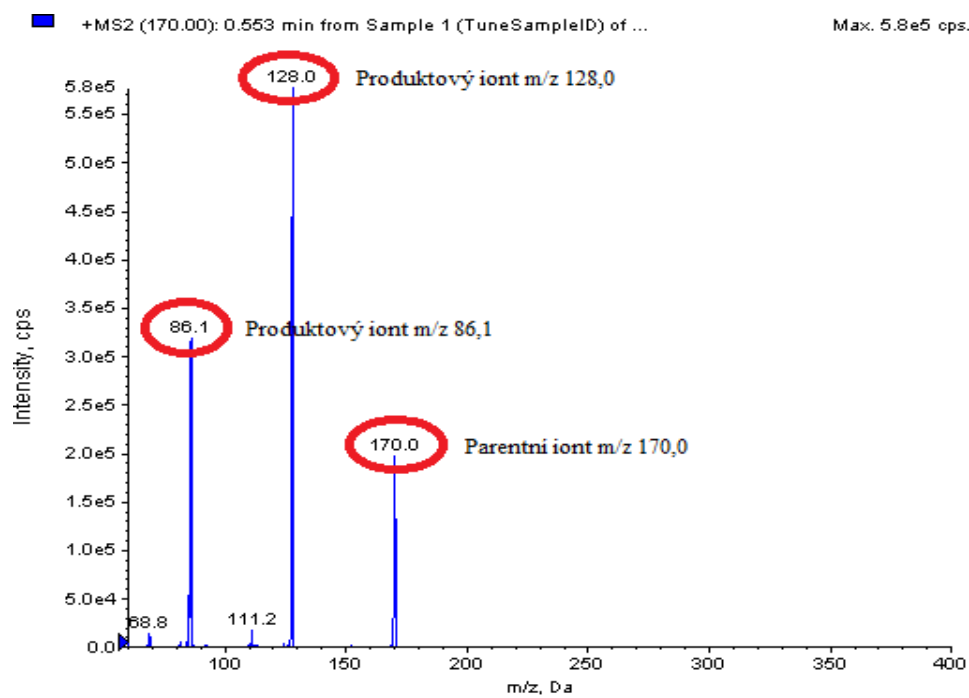
OBR. 10: MRM PŘECHOD DIDEALKYLATRAZINU V Kladném módu za použití MF 1



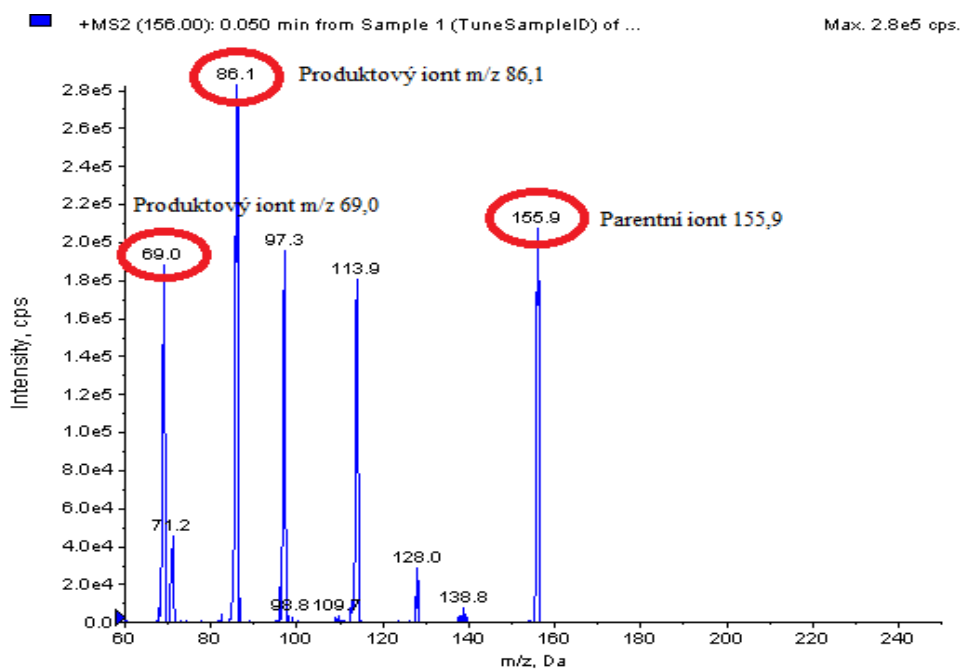
OBR. 11: MRM PŘECHOD DIDEALKYLATRAZINU V Kladném módu za použití MF 2



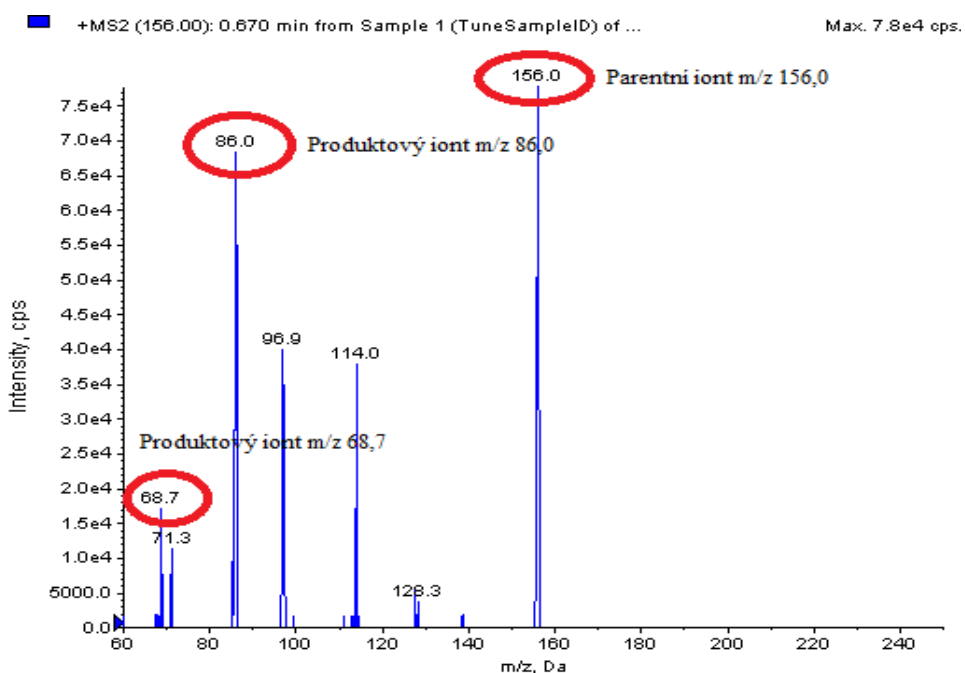
OBR. 12: MRM PŘECHOD HYDROXYDESETHYLATRAZINU V Kladném módu za použití MF 1



OBR. 13: MRM PŘECHOD HYDROXYDESETHYLATRAZINU V Kladném módu za použití MF 2



OBR. 14: MRM PŘECHOD HYDROXYDESIISOPROPYLATRAZINU V Kladném módu za použití MF 1



OBR. 15: MRM PŘECHOD HYDROXYDESIISOPROPYLATRAZINU V Kladném módu za použití MF 2

Jak vyplývá z předešlých obrázků, nejintenzivnější MRM přechody poskytly standardy při použití MF 1, tedy mobilní fáze složené z vody, methanolu a 1% kyseliny mravenčí. Přechody pro jednotlivé látky spolu s nastavením optimálních podmínek jejich detekce jsou uvedeny v TAB. 17.

TAB. 17: MRM PŘECHODY PRO TRIAZINOVÉ PESTICIDY A JEJICH METABOLITY

Analyt	Molekulový iont	Dceřiný iont	DP ¹	EP ²	CE ³	CXP ⁴
	m/z	m/z	V	V	V	V
Ammelin 1	127,8	86,0	50	10	23	15
Ammelin 2	127,8	69,0	55	10	35	12
Atrazin 1	216,3	174,0	63	10	24	10
Atrazin 2	218,4	176,2	63	10	26	10
Atrazin D5 1	221,3	179,1	63	10	24	10
Atrazin D5 2	223,4	180,9	63	10	25	11
Cyanazin 1	241,2	213,8	56	9	25	21
Cyanazin 2	241,2	103,8	56	9	42	20
Desethylatrazin 1	188,3	146,1	47	11	23	26
Desethylatrazin 2	190,2	148,0	47	11	23	26
Desethylterbutylazin 1	202,3	146,2	55	8	23	25
Desethylterbutylazin 2	202,3	78,9	55	8	36	14
Desisopropylatrazin 1	174,2	96,1	59	4	27	17
Desisopropylatrazin 2	174,2	68,1	59	4	39	12
Desisopropylatrazin D5 1	179,1	100,9	59	10	26	18
Desisopropylatrazin D5 2	179,1	69,2	59	10	41	13
Didealkylatrazin 1	146,0	103,8	38	10	25	18
Didealkylatrazin 2	146,0	79,0	50	10	24	15
Dimethoát D6 1	236,2	204,9	43	11	14	11
Dimethoát D6 2	236,2	130,9	43	11	30	8
Hydroxyatrazin 1	198,1	156,1	53	10	23	25
Hydroxyatrazin 2	198,1	86,0	53	10	31	17
Hydroxydesethylatrazin 1	170,1	128,1	51	10	23	7
Hydroxydesethylatrazin 2	170,1	86,1	53	10	32	16
Hydroxydesisopropylatrazin 1	155,9	86,1	41	10	23	15
Hydroxydesisopropylatrazin 2	155,9	69,0	53	10	37	13
Hydroxyterbutylazin 1	211,9	156,1	47	10	22	16
Hydroxyterbutylazin 2	211,9	86,0	47	10	33	16
Propazin 1	229,9	188,1	67	5	24	11
Propazin 2	229,9	146,2	67	5	31	8
Simazin 1	202,2	124,1	66	11	25	7
Simazin 2	202,2	131,8	66	11	26	25
Terbutylazin 1	230,3	174,2	53	10	24	15
Terbutylazin 2	230,3	96,1	53	10	37	19

¹DP – Deklastrační potenciál²EP – Vstupní potenciál³CE – Kolizní energie⁴CXP – Výstupní potenciál na kolizní cele

1 – Kvantifikační přechod

2 – Konfirmační přechod

MF – A: H₂O, B: MeOH, C: 1% HCOOH
(40:50:10, v/v)F_m: 0,4 ml/min

Iontový zdroj: ESI

Parametry hmotnostního spektrometru viz TAB. 9

Ionizace: Pozitivní mód

4.2 Optimalizace chromatografických podmínek

4.2.1 Optimalizace složení mobilní fáze

Jak bylo popsáno v kapitole 3.2.2.1, bylo provedeno srovnání chromatografických separací s použitím analytické kolony Zorbax SB-AQ pro tři mobilní fáze s různým objemovým procentem kyseliny mravenčí (MF A, B, C). Tato optimalizace byla provedena na roztoku obsahujícím pouze některé mateřské látky a metabolity bez přítomnosti sekundárních a terciálních metabolitů, z důvodu nedostupnosti standardů.

Podmínky testu optimalizace MF jsou uvedeny v následující tabulce (TAB. 18). Výsledné retenční časy a plochy píků za optimalizovaných podmínek uvádí TAB. 19.

TAB. 18: PODMÍNKY OPTIMALIZACE SLOŽENÍ MOBILNÍ FÁZE

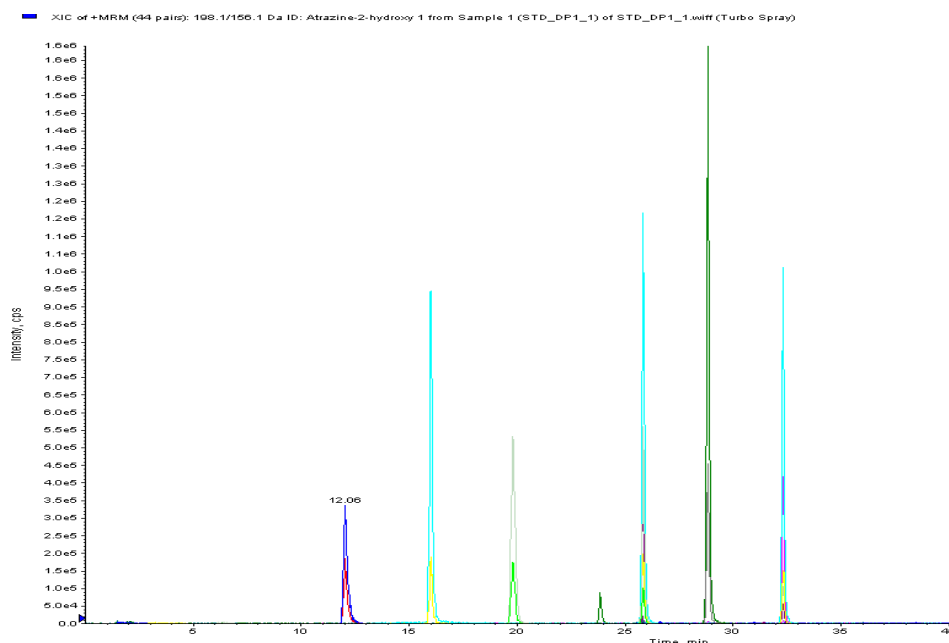
Test č.	Kolona	Teplota na koloně °C	φ^1 (HCOOH) %
1	Zorbax SB-AQ	40	1
2	Zorbax SB-AQ	40	5
3	Zorbax SB-AQ	40	0

¹ φ – Objemové procento

TAB. 19: RETENČNÍ ČASY TRIAZINŮ PŘI OPTIMALIZACI SEPARAČNÍHO SYSTÉMU

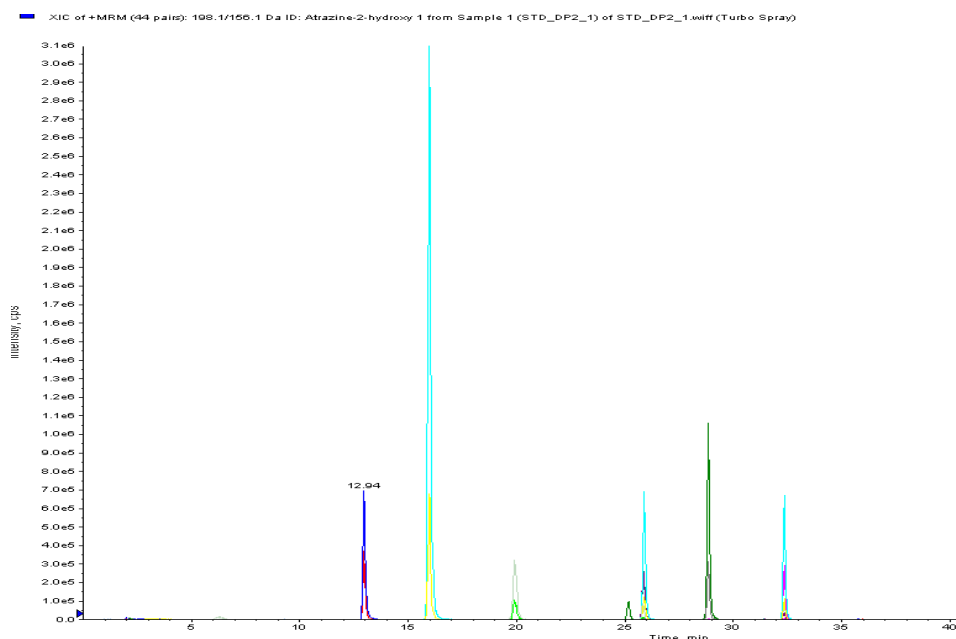
Analyt	t_R (1) min	A (1) e^6	t_R (2) min	A (2) e^6	t_R (3) min	A (3) e^6
Atrazin 1	28,87	13,10	28,77	7,99	24,80	20,40
Atrazin 2	28,87	3,69	28,77	2,19	24,80	5,81
Hydroxyatrazin 1	12,06	9,16	13,03	5,67	12,91	9,50
Hydroxyatrazin 2	12,06	2,07	13,03	2,64	12,91	4,37
Desethylatrazin 1	19,81	6,13	19,69	3,48	14,95	10,50
Desethylatrazin 2	19,81	2,00	19,69	1,15	14,95	3,37
Cyanazin 1	25,83	4,11	25,75	0,57	21,45	4,94
Cyanazin 2	25,83	0,82	25,75	0,10	21,45	0,92
Simazin 1	25,82	3,47	25,70	2,22	21,28	5,76
Simazin 2	25,82	3,30	25,70	2,10	21,28	5,49
Terbutylazin 1	32,33	7,40	32,29	4,49	28,98	11,20
Terbutylazin 2	32,33	1,10	32,29	0,68	28,98	1,68
Hydroxyterbutylazin 1	16,01	8,30	16,52	16,50	18,36	16,90
Hydroxyterbutylazin 2	16,01	1,63	16,52	3,37	18,36	3,26
Desethylterbutylazin 1	25,83	9,70	25,71	4,06	21,43	16,40
Desethylterbutylazin 2	25,83	1,76	25,71	1,00	21,43	2,92

Při použití kolony Zorbax SB-AQ, mobilní fáze obsahující 1% HCOOH (Test 1), a teplotě 40 °C bylo dosaženo dobré chromatografické separace do 33. minuty, při které byla většina analytů oddělena od sebe. Cyanazin, simazin i desethylterbutylazin eluovaly ve stejném čase (26. minuta), ale protože mají jiné MRM přechody, toto překrytí nepředstavovalo při detekci a kvantifikaci MS detektorem problém. Za nalezených podmínek triaziny poskytly symetrické píky s vysokou intenzitou (OBR. 16).



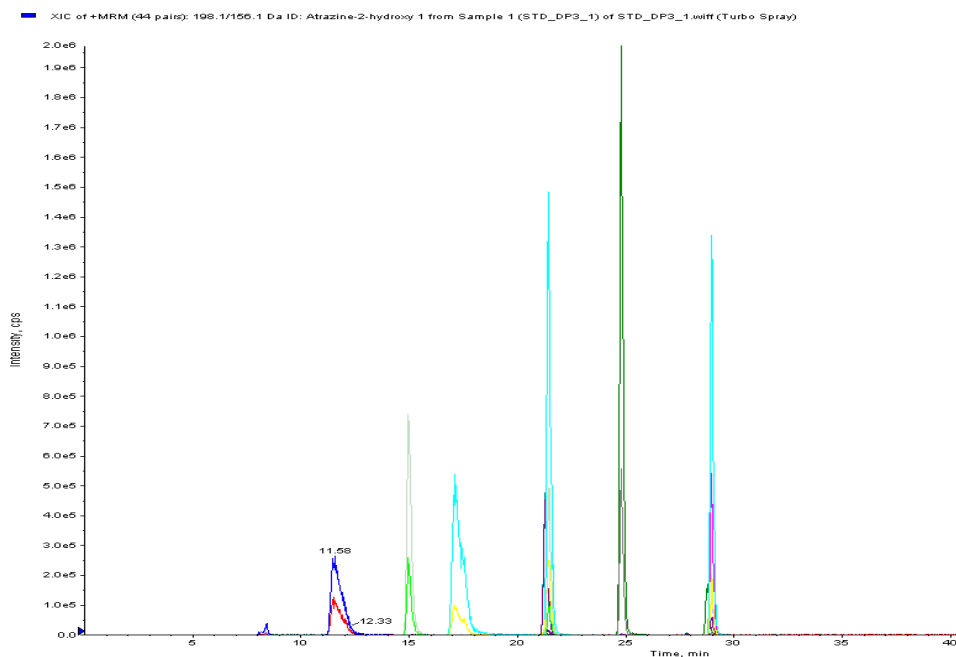
OBR. 16: SEPARACE TRIAZINŮ S POUŽITÍM KOLONY ZORBAX SB-AQ A MOBILNÍ FÁZE SLOŽENÉ Z VODY, METHANOLU A 1% KYSELINY MRAVENČÍ (GRADIENT VIZ TAB. 10)

Za stejných podmínek při použití mobilní fáze obsahující 5% HCOOH (Test 2) došlo ke snížení retence méně polárních triazinů a vzrůstu retence triazinů polárnějších. Nicméně triaziny cyanazin, simazin i desethylterbutylazin od sebe stále nebyly odděleny. Za těchto podmínek intenzita píků mírně poklesla. Výjimku představoval pouze hydroxyterbutylazin (16. minuta), jehož intenzita až dvojnásobně vzrostla (OBR. 17).



OBR. 17: SEPARACE TRIAZINŮ S POUŽITÍM KOLONY ZORBAX SB-AQ A MOBILNÍ FÁZE SLOŽENÉ S VODY, METHANOLU A 5% KYSELINY MRAVENČÍ (GRADIENT VIZ TAB. 10)

V případě, kdy nebylo použito žádné aditivum (Test 3), se retence nepolárních triazinů ještě více snížila, popř. zvýšila u polárních triazinů, a doba analýzy nepřekročila 29 minut. Rozpuštění standardů ve vodě a poté analýza bez přítomnosti HCOOH, ale zapříčinila rozmytost píků (OBR. 18).



OBR. 18: SEPARACE TRIAZINŮ S POUŽITÍM KOLONY ZORBAX SB-AQ A MOBILNÍ FÁZE SLOŽENÉ Z VODY A METHANOLU (GRADIENT VIZ TAB. 10)

4.2.2 Optimalizace teploty na koloně

V předešlé kapitole byly ukázány separace za použití analytické kolony Zorbax SB-AQ a různého objemového procenta kyseliny mravenčí. Jako neúspěšnější separace s použitím této kolony byla vyhodnocena analýza s mobilní fází obsahující 1% kyseliny mravenčí.

V tomto neúspěšnějším separačním systému byl testován vliv teploty termostatu, která byla oproti původní teplotě 40 °C nastavena na 30 °C.

Podmínky separací jsou uvedeny v TAB. 20 a získané výsledky v TAB. 21.

TAB. 20: PODMÍNKY OPTIMALIZACE TEPLoty NA KOLONĚ

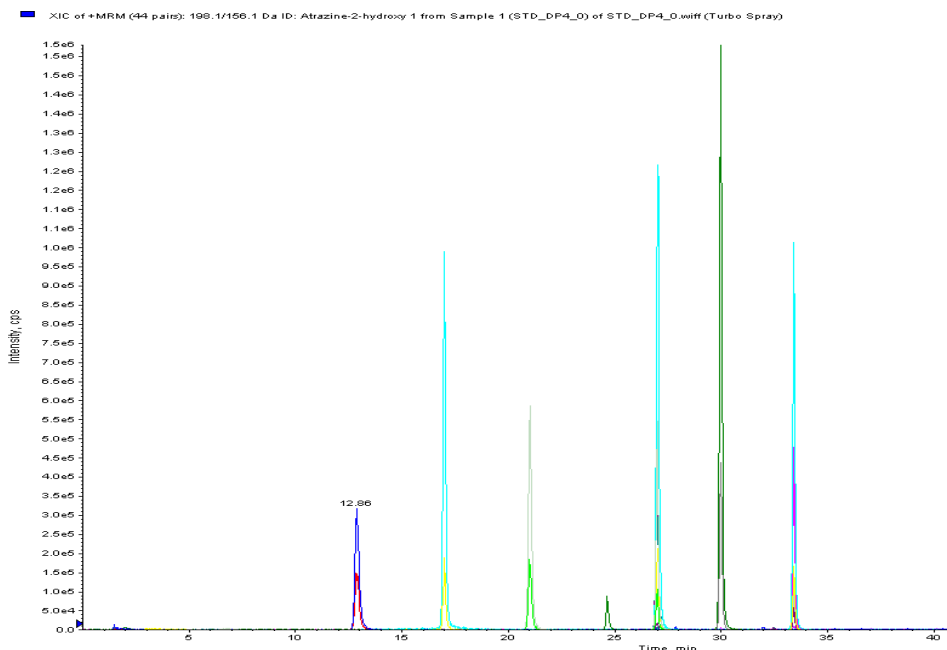
Test č.	Kolona	Teplota na koloně °C	φ' (HCOOH) %
1	Zorbax SB-AQ	40	1
4	Zorbax SB-AQ	30	1

¹ φ – Objemové procento

TAB. 21: RETENČNÍ ČASY A PLOCHY PÍKŮ TRIAZINŮ PŘI OPTIMALIZACI TEPLoty NA KOLONĚ

Analyt	t_R (1) min	A (1) e^6	t_R (4) min	A (4) e^6
Atrazin 1	28,87	13,10	30,02	13,20
Atrazin 2	28,87	3,69	30,02	3,76
Cyanazin 1	25,83	4,11	26,08	2,37
Cyanazin 2	25,83	0,82	26,08	0,5
Desethylatrazin 1	19,81	6,13	21,21	5,79
Desethylatrazin 2	19,81	2,00	21,21	1,83
Desethylterbutylazin 1	25,83	9,70	26,08	10,00
Desethylterbutylazin 2	25,83	1,76	26,08	1,71
Hydroxyatrazin 1	12,06	9,16	12,86	5,41
Hydroxyatrazin 2	12,06	2,07	12,86	2,56
Hydroxyterbutylazin 1	16,01	8,30	17,08	9,02
Hydroxyterbutylazin 2	16,01	1,63	17,08	1,81
Simazin 1	25,82	3,47	26,07	3,45
Simazin 2	25,82	3,30	26,07	3,20
Terbutylazin 1	32,33	7,40	33,48	8,07
Terbutylazin 2	32,33	1,10	33,48	1,19

Při testech vlivu teploty 30 °C na koloně Zorbax SB-AQ s mobilní fází s obsahem 1% HCOOH (Test 4), se prodloužila retence analytů a separace jinak odpovídala analýze za stejných podmínek s vyšší teplotou (Test 1). Tuto separaci ukazuje OBR. 19.



OBR. 19: SEPARACE TRIAZINŮ S POUŽITÍM KOLONY ZORBAX SB-AQ, MOBILNÍ FÁZE SLOŽENÉ Z VODY, METHANOLU A 1% KYSELINY MRAVENČÍ A TEPLoty 30 °C (GRADIENT VIZ TAB. 10)

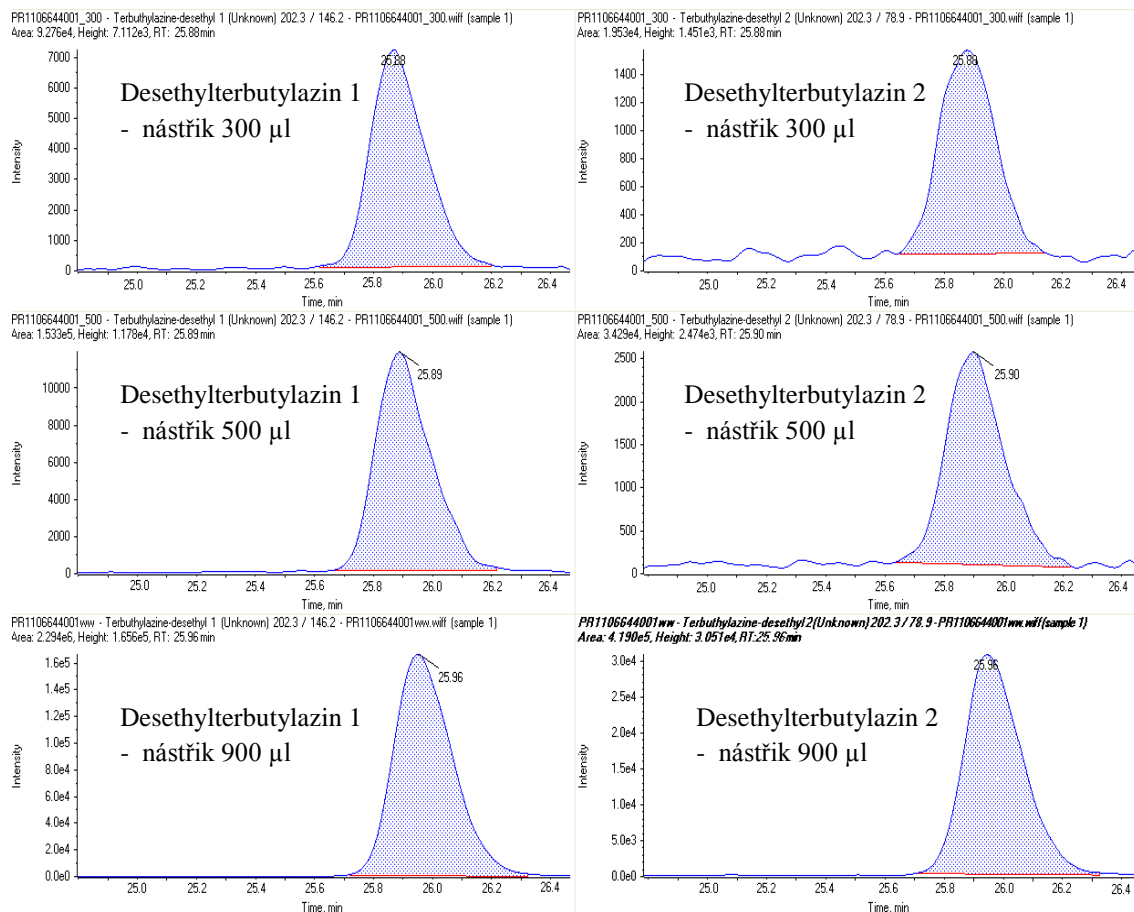
4.2.3 Optimalizace objemu nástřiku

Vliv objemu nástřiku na účinnost a separaci analýzy byl testován na vzorku vody. Vzorek byl dávkován do dávkovací smyčky o objemu 300 μ l (1), 500 μ l (2) a 900 μ l (3) a separace byla prováděna za optimálních chromatografických podmínek, tedy koloně Zorbax SB-AQ, mobilní fází složené z vody, methanolu a 1% kyseliny mravenčí a teplotě 40 °C. Výsledné retenční časy i plochy píků standardů jsou uvedeny v TAB. 22.

TAB. 22: VLIV OBJEMU NÁSTŘIKU NA ANALÝZU VZORKŮ

Analyt	t _R (1)	A (1)	t _R (2)	A (2)	t _R (3)	A (3)
	min	e ⁵	min	e ⁵	min	e ⁵
Atrazin 1	28,22	2,15	28,23	3,74	28,28	36,90
Atrazin 2	28,22	0,71	28,23	1,17	28,27	11,60
Cyanazin 1	25,38	1,21	25,39	1,95	25,41	4,15
Cyanazin 2	25,38	1,15	25,39	1,77	25,41	0,86
Desethylatrazin 1	19,83	1,61	19,91	2,74	19,93	21,10
Desethylatrazin 2	19,83	0,48	19,91	0,84	19,93	6,52
Desethylterbutylazin 1	25,88	0,93	25,89	1,53	25,96	22,90
Desethylterbutylazin 2	25,88	0,19	25,89	0,34	25,96	4,19
Desisopropylatrazin 1	14,45	0,92	14,46	1,09	14,48	1,77
Desisopropylatrazin 2	14,45	0,85	14,46	1,00	14,49	1,71
Hydroxyatrazin 1	11,83	0,30	12,04	0,47	12,34	1,33
Hydroxyatrazin 2	11,82	0,16	12,03	0,22	12,34	0,65
Hydroxyterbutylazin 1	15,84	1,48	15,94	2,43	16,10	4,79
Hydroxyterbutylazin 2	15,84	0,34	15,94	0,61	16,10	1,08
Propazin 1	30,62	1,31	30,63	2,29	30,67	20,30
Propazin 2	30,62	1,31	30,63	2,17	30,67	20,80
Simazin 1	25,37	1,08	25,39	1,80	25,45	1,29
Simazin 2	25,37	1,07	25,39	1,76	25,45	12,50
Terbutylazin 1	32,48	6,05	32,49	1,03	32,52	48,80
Terbutylazin 2	32,48	0,91	32,49	1,47	32,52	6,96

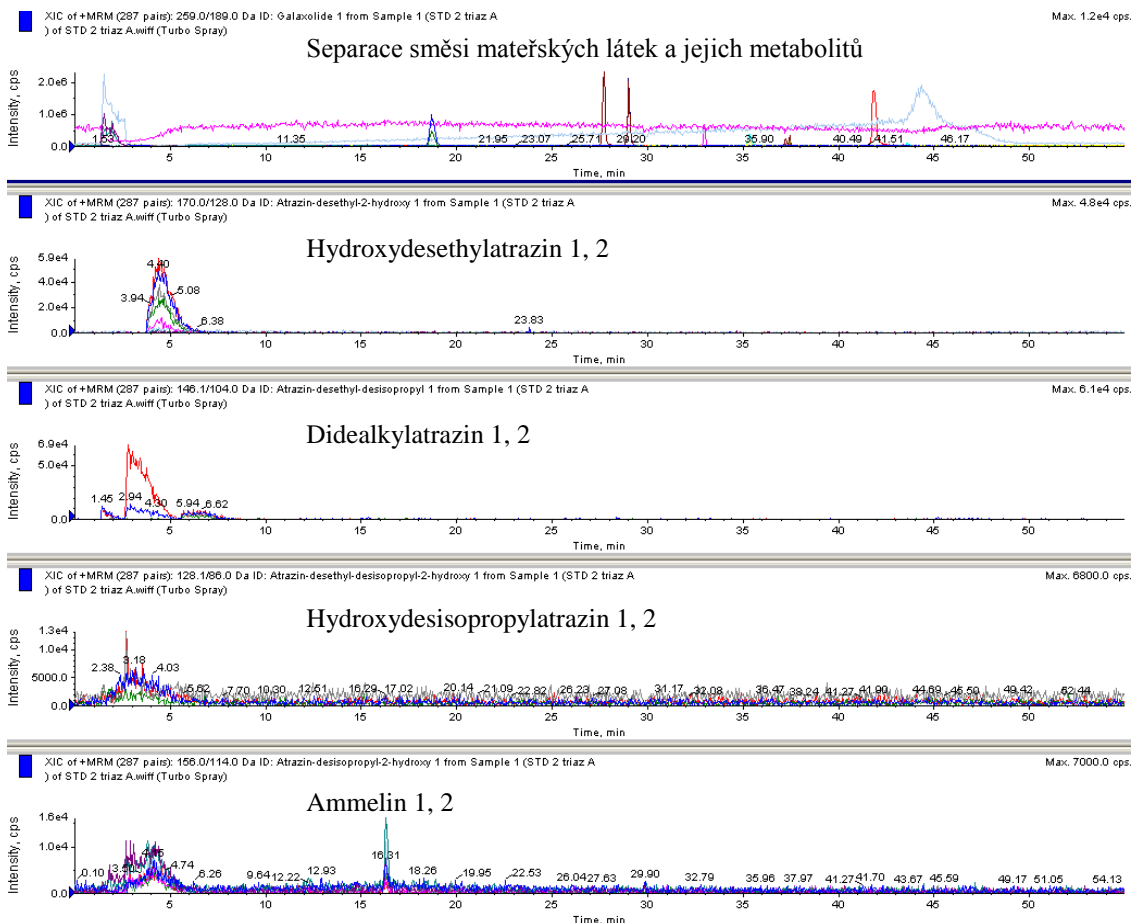
Vliv objemu nástřiku se ukázal mít vliv na analýzu reálného vzorku a její citlivost a to z důvodu matričních efektů. Při nižším objemovém nástřiku 300 µl (1) se snížily plochy i intenzity píků a zvýšil se šum základní linie, což znamenalo zvýšení limitů detekce i kvantifikace. Při vyšších objemových nástřicích 500 µl a 900 µl (2; 3) se snižoval vliv matrice, úměrně se zvyšovaly plochy i intenzity píků, došlo k dramatickému poklesu šumu základní linie a mohly být zaručeny nízké LOD i LOQ. Na obr. 20 je ukázána analýza desethylterbutylazinu při změně objemů nástřiků.



OBR. 20: VLIV OBJEMU NÁSTŘIKU NA ANALÝZU DESETHYLTERBUTYLAZINU

4.2.4 Optimalizace separace sekundárních a terciálních metabolitů

Po dodání standardů ammelinu, didealkyltriazinu, hydroxydesethyltriazinu a hydroxydesisopropyltriazinu, byly tyto analyty přidány do směsi triazinových pesticidů a separovány optimalizovanou chromatografickou metodou pro jejich stanovení, tedy metodou tvořenou analytickou kolonou Zorbax SB-AQ a mobilní fází složenou z vody, methanolu a 1% kyseliny mravenčí a teplotě kolony 40 °C. Obrázek separace s vybranými přechody těchto metabolitů je ukázán na OBR. 21.



OBR. 21: SEPARACE SEKUNDÁRNÍCH A TERCÍÁLNÍCH METABOLITŮ ZA POUŽITÍ KOLONY ZORBAX SB-AQ, MOBILNÍ FÁZE SLOŽENÉ Z VODY, METHANOLU A 1% KYSELINY MRAVENČÍ (GRADIENT VIZ TAB. 10)

Jak je vidět z obrázku, pouze metabolit hydroxydesethylatrazin byl za těchto podmínek eluován z kolony a detekován hmotnostním spektrometrem. U ostatních metabolitů došlo buď k eluci v pozdějším retenčním čase, nebo jejich špatné detekci. Pro jistotu byly standardy metabolitů přeladěny. Po nadávkování směsi měla ale separace stejný výsledek. Separace za použití kolony Zorbax SB-AQ a mobilní fáze složené z vody, methanolu a 1% kyseliny mravenčí byla tedy vyhodnocena jako nevhodná pro stanovení sekundárních a terciálních metabolitů triazinových pesticidů a metoda byla validována bez těchto metabolitů.

4.3 Ověření metody-validace

4.3.1 Linearita

Linearita byla ověřena na šesti koncentračních hladinách v rozsahu 5-1000 pg/ml (A) a čtyřech koncentračních hladinách v rozsahu 10-0500 pg/ml (B). V TAB. 23 jsou uvedeny výsledky testu linearity podle Mandelova testu (viz kapitola 2.7):

TAB. 23: VÝSLEDKY TESTU LINEARITY PRO JEDNOTLIVÉ ANALYTY

Analyt	A ¹	B ²	Analyt	A ¹	B ²
Atrazin 1	✗	✓	Dimethoát D6 1	✗	✓
Atrazin 2	✓	✓	Dimethoát D6 2	✗	✓
Atrazin D5 1	✗	✓	Hydroxyatrazin 1	✗	✓
Atrazin D5 2	✓	✓	Hydroxyatrazin 2	✗	✓
Cyanazin 1	✗	✓	Hydroxyterbutylazin 1	✗	✓
Cyanazin 2	✗	✓	Hydroxyterbutylazin 2	✗	✓
Desethylatrazin 1	✓	✓	Propazin 1	✗	✓
Desethylatrazin 2	✓	✓	Propazin 2	✓	✓
Desethylterbutylazin 1	✓	✓	Simazin 1	✗	✓
Desethylterbutylazin 2	✓	✓	Simazin 2	✗	✓
Desisopropylatrazin 1	✗	✓	Terbutylazin 1	✗	✓
Desisopropylatrazin 2	✗	✓	Terbutylazin 2	✗	✓

¹A: Kalibrace 5-1000 pg/ml

²B: Kalibrace 10-500 pg/ml

U většího rozsahu kalibrace nebyla závislost pro většinu analytů lineární, ale polynomičká. Protože pro potřeby laboratoře byla nutná kalibrace v rozsahu 5-1000 pg/ml, byla zvolena polynomičká závislost pro všechny analyty.

4.3.2 Mez detekce a kvantifikace

Odhad limitů detekce a kvantifikace byl proveden na základě vyhodnocení 7 nezávislých fortifikovaných matric balené, povrchové a podzemní vody na koncentrační úroveň 20 ng/l, každé měření bylo opakováno 3x.

Mez detekce (LOD) byla vyjádřena výpočtem:

$$\text{LOD} = k \times SD [\mu\text{g/l}]$$

Kde SD je směrodatná odchylka koncentrace ve fortifikované matrici, k je koeficient Studentova rozdělení pro $n-1$ počet opakování na hladině významnosti 0,01 ($k=2$).

Mez kvantifikace (LOQ) byla vypočtena podle vztahu:

$$LOQ = 3 \times LOD \text{ [}\mu\text{g/l]}$$

Kde LOD je hodnota meze detekce.

Hodnoty LOD i LOQ pro jednotlivé analyty jsou uvedeny v TAB. 24.

TAB. 24: MEZE DETEKCE A KVANTIFIKACE PRO JEDNOTLIVÉ ANALYTY

Analyt	LOD ¹ pg/ml	LOQ ² pg/ml
Atrazin	1,0	3,0
Cyanazin	0,7	2,1
Desethylatrazin	0,5	1,5
Desethylterbutylazin	2,1	6,3
Desisopropylatrazin	1,9	5,7
Hydroxyatrazin	3,1	9,3
Hydroxyterbutylazin	3,2	9,6
Propazin	1,0	3,0
Simazin	1,0	3,0
Terbutylazin	1,3	3,9

¹LOD – Limit detekce

²LOQ – Limit kvantifikace

4.3.3 Správnost a přesnost měření

Pro vyjádření správnosti měření bylo využito výtěžnosti extrakčního postupu, přesnost měření byla vyjádřena relativní směrodatnou odchylkou opakovatelnosti měření.

Za účelem výpočtu výtěžnosti extrakčního postupu a opakovatelnosti měření bylo připraveno sedm fortifikovaných matric na koncentračních úrovních 20 ng/l (1), 100 ng/l (2) a 1000 ng/l (3) a standardy 100% na jednotlivých koncentračních úrovních. Získané hodnoty byly otestovány pomocí Grubbsova testu na hladině významnosti 0,05 a nebyla vyřazena žádná hodnota. Výtěžnost a opakovatelnost byla také ověřena na balené (A) a povrchové vodě (B), na koncentrační hladině 100 ng/l ve třech opakováních.

Výtěžnost postupu byla vypočtena podle následujícího vzorce:

$$R_e = \frac{c_{LCS} - c_{MB}}{c_{STD\ 100\%}} \times 100 [\%]$$

Kde c_{LCS} je koncentrace analytu korigovaná na interní standard ve fortifikované matici, c_{MB} je koncentrace analytu korigovaná na interní standard v metodovém blanku, $c_{STD\ 100\%}$ je koncentrace analytu ve standardu 100%.

Hodnoty výtěžnosti postupu a přesnosti měření na jednotlivých koncentračních hladinách pro podzemní vodu jsou uvedeny v TAB. 25. TAB. 26 uvádí tyto hodnoty pro balenou a povrchovou vodu na koncentrační hladině 100 ng/l.

TAB. 25: VÝTĚŽNOST POSTUPU A PŘESNOST MĚŘENÍ PRO PODZEMNÍ VODU

Analyt	$R_e^1(1)^3$ %	$RSD^2(1)^3$ %	$R_e^1(2)^4$ %	$RSD^2(2)^4$ %	$R_e^1(3)^5$ %	$RSD^2(3)^5$ %
Atrazin	98,30	1,5	97,70	2,6	100,8	1,2
Cyanazin	111,4	3,4	103,1	2,5	106,2	4,0
Desethylatrazin	100,2	1,5	108,4	1,6	104,5	5,6
Desethylterbutylazin	100,5	3,1	98,10	3,2	102,1	1,1
Desisopropylatrazin	118,0	2,0	132,1	0,8	135,8	1,3
Hydroxyatrazin	91,10	8,9	73,40	7,6	93,80	7,5
Hydroxyterbutylazin	101,2	9,1	83,70	2,9	98,30	3,8
Propazin	97,90	1,7	96,70	1,5	96,50	3,0
Simazin	105,0	2,2	100,0	2,1	98,40	3,0
Terbutylazin	98,00	2,5	94,10	1,8	98,60	1,5

¹ R_e – Výtěžnost

²RSD – Relativní směrodatná odchylka

³1: Koncentrační úroveň 20 ng/l

⁴2: Koncentrační úroveň 100 ng/l

⁵3: Koncentrační úroveň 1000 ng/l

TAB. 26: VÝTĚŽNOST POSTUPU A PŘESNOST MĚŘENÍ PRO BALENOU A POVRCHOVOU VODU

Analyt	$R_e^1(A)^3$	$RSD^2(A)^3$	$R_e^1(B)^4$	$RSD^2(B)^4$
	%	%	%	%
Atrazin	100,9	1,5	102,5	1,9
Cyanazin	110,7	3,7	107,5	0,8
Desethylatrazin	100,6	1,6	105,0	2,4
Desethylterbutylazin	90,50	1,0	97,80	1,6
Desisopropylatrazin	113,5	1,4	110,8	2,2
Hydroxyatrazin	100,4	0,4	108,3	4,0
Hydroxyterbutylazin	89,50	0,8	97,30	5,1
Propazin	99,90	2,8	99,00	1,4
Simazin	95,10	3,6	102,6	1,0
Terbutylazin	100,5	2,5	103,4	0,3

¹ R_e – Výtěžnost

²RSD – Relativní směrodatná odchylka

³A: Balená voda

⁴B: Povrchová voda

4.3.4 Odhad nejistoty měření

Odhad nejistoty měření byl založen na principu „shora dolů“. Opakovaně byly měřeny fortifikované blanky a fortifikované matrice na různých koncentračních úrovních, na jejichž základě byla vypočtena relativní reprodukovatelnost a odhad nejistoty výtěžnosti metody. Tento způsob odhadu zahrnuje příspěvky nejistot z navažování standardů, odměřování objemů, dávkování vzorku, ředění, vliv reálných matric a opakovatelnost měření přístroje.

Relativní reprodukovatelnost měření byla získána z pěti duplicitních stanovení podzemní, povrchové a balené vody na koncentračních úrovních popsanych v kapitole 4.3.3. Relativní reprodukovatelnost byla vypočtena podle vzorce:

$$u_a = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \left(\frac{x_{i1} - x_{i2}}{\bar{x}_{i1,2}} \right)^2}{2n}} \times 100 [\%]$$

Kde x_{i1} je hodnota koncentrace prvního měření, x_{i2} je hodnota koncentrace druhého měření, $\bar{x}_{i1,2}$ je aritmetický průměr koncentrací dvou měření a n je počet stanovení.

Nejistota výtěžnosti postupu byla vyjádřena rozdílem mezi průměrnou naměřenou výtěžností u matric a 100%, tedy intervalem (100- R_e).

TAB. 27 uvádí nejistotu reprodukovatelnosti a odhad nejistot výtěžnosti pro jednotlivé analyty.

TAB. 27: NEJISTOTA REPRODUKOVATELNOSTI A VÝTĚŽNOSTI PRO JEDNOTLIVÉ ANALYTY

Analyt	u_a^1 %	u_b^2 %
Atrazin	1,1	1,6
Cyanazin	1,9	7,8
Desethylatrazin	1,5	3,8
Desethylterbutylazin	1,6	3,2
Desisopropylatrazin	1,6	11,3
Hydroxyatrazin	3,8	10,1
Hydroxyterbutylazin	3,8	6,5
Propazin	1,9	2,0
Simazin	1,2	2,8
Terbutylazin	1,5	2,7

¹ u_a : Nejistota reprodukovatelnosti

² u_b : Nejistota výtěžnosti

Na základě standardních nejistot pak byla vypočtena kombinovaná nejistota pro jednotlivé analyty podle vzorce:

$$u = \sqrt{u_A^2 + u_B^2} [\%]$$

Kde u_A^2 je standardní nejistota typu A a u_B^2 je standardní nejistota typu B.

Z kombinované nejistoty dále byla vypočtena rozšířená nejistota:

$$U_c = k \times u [\%]$$

Kde k je číselný koeficient ($k=2$) a u je kombinovaná standardní nejistota.

Výsledné hodnoty kombinované a rozšířené nejistoty pro jednotlivé analyty jsou uvedeny v následující tabulce (TAB. 28).

TAB. 28: KOMBINOVANÁ A ROZŠÍŘENÁ NEJISTOTA PRO JEDNOTLIVÉ ANALYTY

Analyt	u^1 %	U_c^2 %
Atrazin	2	4
Cyanazin	8	16
Desethylatrazin	4	8
Desethylterbutylazin	4	8
Desisopropylatrazin	11	22
Hydroxyatrazin	11	22
Hydroxyterbutylazin	7	14
Propazin	3	6
Simazin	3	6
Terbutylazin	3	6

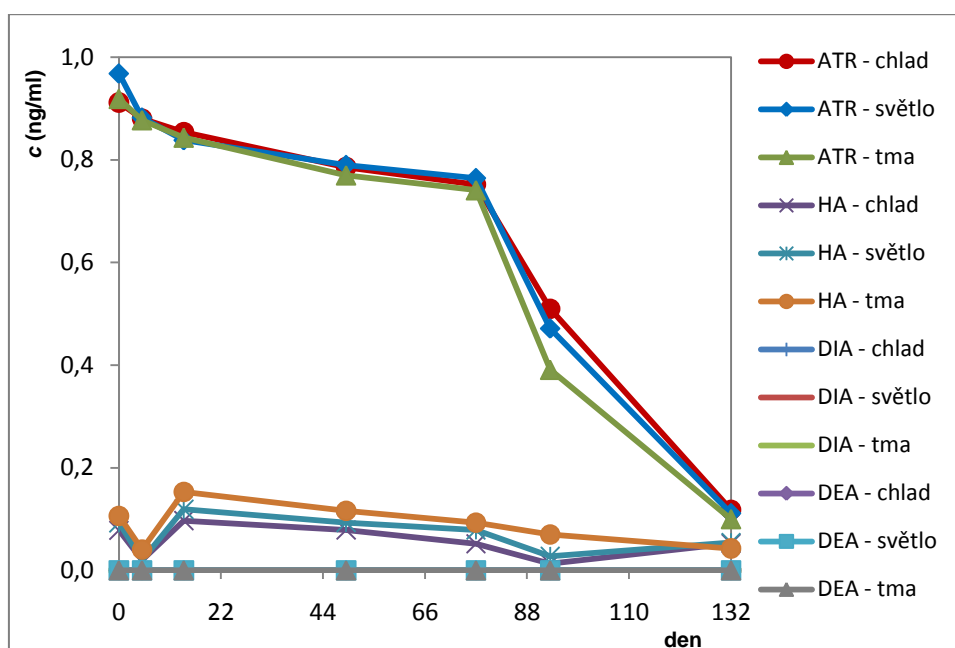
¹ u : Kombinovaná nejistota

² U_c : Rozšířená nejistota

4.4 Test stability triazinových pesticidů

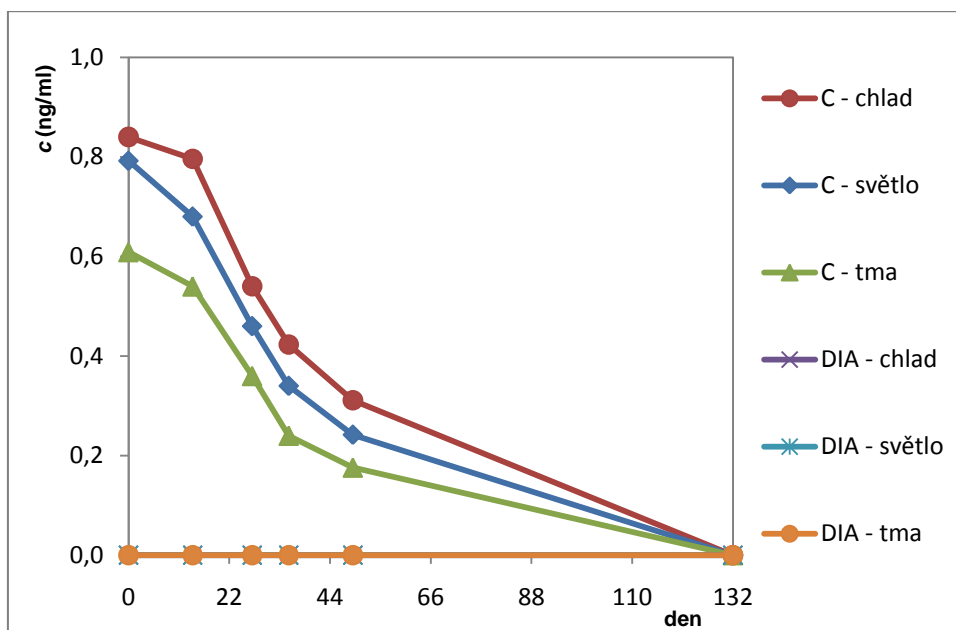
Test stability triazinových pesticidů probíhal v plastových láhvích s počáteční koncentrací 1 ng/ml každého triazinového pesticidu. Jedna láhev od každého standardu byla umístěna do chladničky, druhá do skříně a třetí za okno. Byl sledován vliv teploty a světla na stabilitu triazinových pesticidů, konkrétní podmínky byly již popsány v kapitole 3.8. Tento test byl ukončen po 132 dnech.

Grafy popisující rozklad triazinových pesticidů atrazinu (ATR) (OBR. 22), cyanazinu (C) (OBR. 23), propazinu (P) (OBR. 24), simazinu (S) (OBR. 25) a terbutylazinu (T) (OBR. 26) a vznik patřičných metabolitů popsanych v kapitole 2.6.1 jsou uvedeny níže.



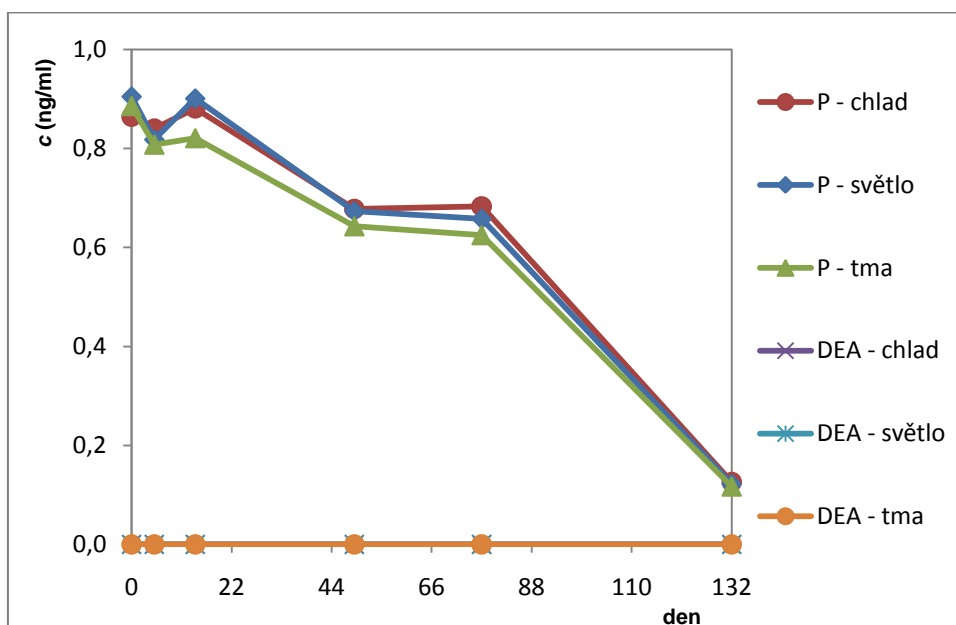
OBR. 22: TEST STABILITY ATRAZINU

Jak ukazuje OBR. 22, rozdíly koncentrace atrazinu u vzorků umístěných v různých prostředích se vzájemně téměř nelišily. Bylo očekáváno podle informací uvedených v kapitole 2.3, že k nejrychlejšímu rozkladu atrazinu dojde vlivem fotolýzy, tedy u vzorků umístěných za oknem. Vzhledem k tomu, že ale v období průběhu testu stability (prosinec-březen) byla intenzita slunečního záření velmi nízká, pokles koncentrace u vzorků umístěných za oknem byl srovnatelný s ostatními prostředími, a fotolýza se zde uplatnila jen minimálně. V případě atrazinu měla největší vliv teplota prostředí, kdy k největšímu poklesu koncentrace došlo u vzorků umístěných ve skříni, kde byla teplota $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, k menšímu u vzorků umístěných za oknem, kde byla teplota $23\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ a nejmenšímu poklesu u vzorků umístěných v chladničce s $5\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Tyto rozdíly byly patrné zejména od 93. dne testu. V tento den také poklesla koncentrace atrazinu na polovinu u vzorků uskladněných v chladničce. O dva dny dříve (91. den) poklesla koncentrace atrazinu na polovinu u vzorků uskladněných za oknem a v den 89. u vzorků ve skříni. Rozkladem atrazinu se objevily nízké koncentrace hydroxyatrazinu, ale desethylatrazin nebo desisopropylatrazin nebyly zjištěny. Rozklad atrazinu v nepřítomnosti huminových látek vede totiž ke tvorbě hydroxyatrazinu, jak již bylo řečeno v kapitole 2.6.1.



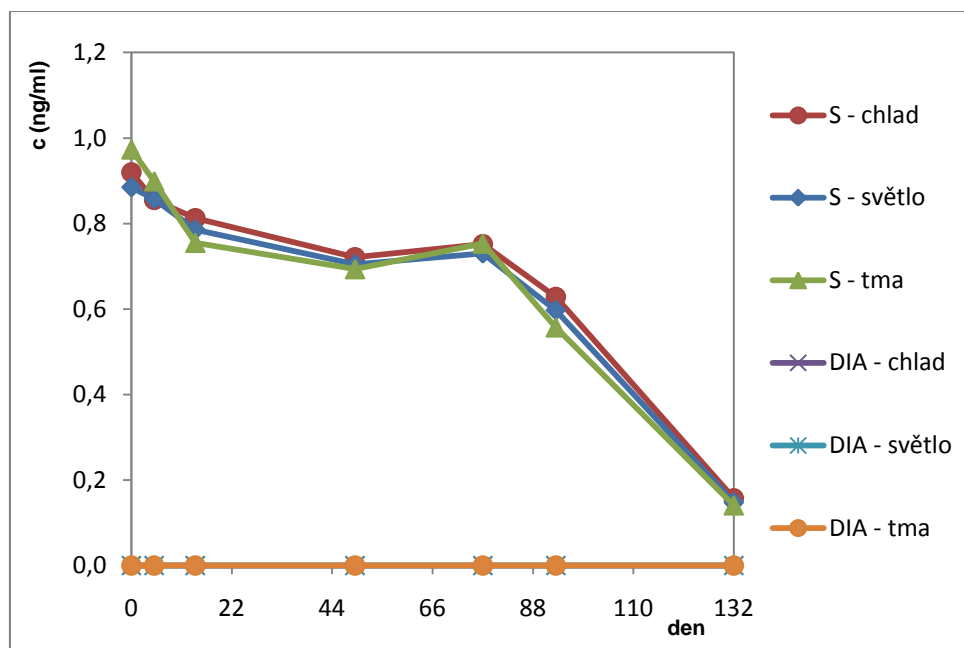
OBR. 23: TEST STABILITY CYANAZINU

Jak je vidět z OBR. 23, umístění v různých prostředích mělo velký vliv na stabilitu cyanazinu. Pokles koncentrací cyanazinu se zvyšoval s rostoucí teplotou prostředí, a i zde se ukázala mít fotolýza malý vliv. K rozpadu cyanazinu na 50% své původní koncentrace došlo zhruba 17. dne pro vzorky uchované ve skříni, 24. dne u vzorků uchovaných za oknem a 30. dne u vzorků uchovaných v chladničce. V roztoku nebyla zaznamenána žádná přítomnost desisopropylatrazinu.



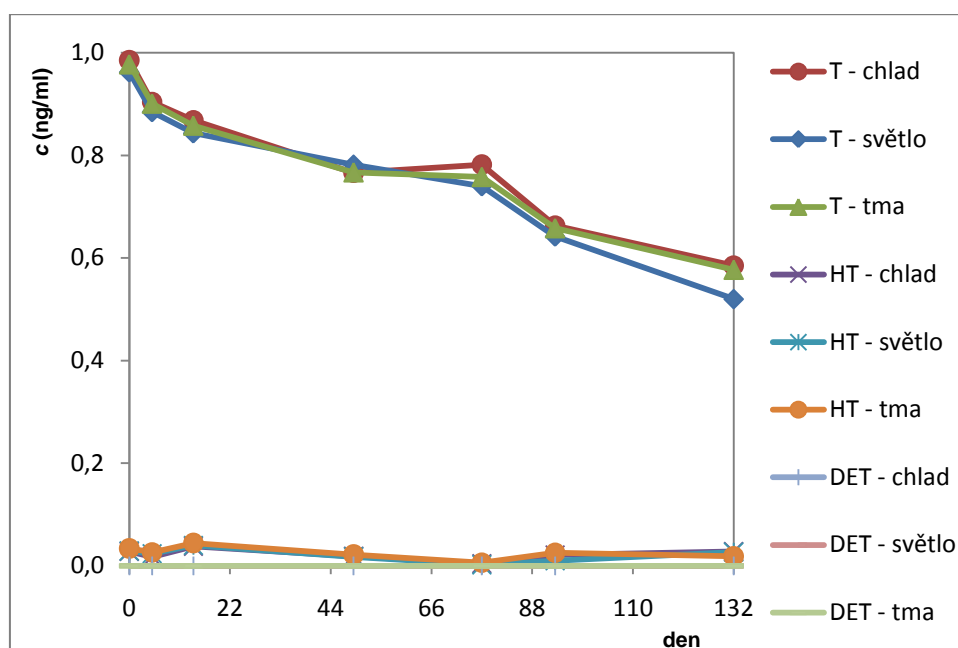
OBR. 24: TEST STABILITY PROPAZINU

Trend v poklesu koncentrací se zvyšující se teplotou pokračoval i u propazinu (OBR. 24). Největší pokles byl tedy zaznamenán u vzorků umístěných ve skříni, menší u vzorků umístěných za oknem, který byl srovnatelný s poklesem koncentrace u vzorků umístěných v chladniče. Poločas rozpadu propazinu se pohyboval u vzorků uskladněných v chladniče kolem 95. dne, u vzorků za oknem kolem 94. dne a u vzorků ve skříni kolem 91. dne. I přes rozklad propazinu nebyla v roztoku zaznamenána přítomnost desethylatrazinu.



OBR. 25: TEST STABILITY SIMAZINU

V případě simazinu (OBR. 25) byl pokles koncentrací v různých prostředích téměř vyrovnaný. To dokazují i poločasy rozpadu, které byly u vzorků umístěných ve skříni 99 dnů, za oknem 102 dnů a nejméně v chladniče 103 dnů. Stejně jako v předešlých případech, nebyla v roztoku zaznamenána přítomnost jeho rozkladného produktu desisopropylatrazinu.

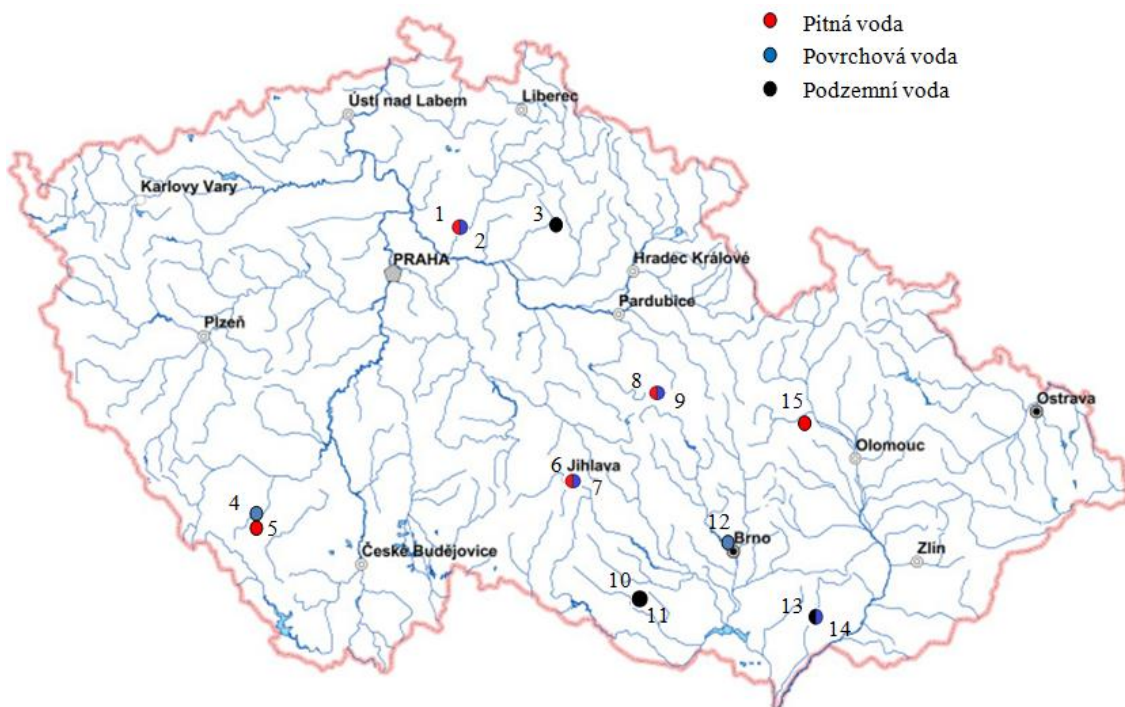


OBR. 26: TEST STABILITY TERBUTYLAZINU

Pokles koncentrací terbutylazinu ve vzorcích v různých prostředích byl také srovnatelný (OBR. 26). Rozdíly se zvýšily kolem 90. dne, kdy se zvýšil rozklad terbutylazinu ve vzorcích za oknem a jeho koncentrace tak byly nejnižší ve srovnání se vzorky ve skříní a v chladničce. Oproti ostatním triazinovým pesticidům byl způsoben největší pokles jeho koncentrace zřejmě fotolýzou. Poločasu rozpadu terbutylazinu nebylo za dobu testu stability dosaženo, lze ale předpokládat, že jeho koncentrace by klesla na 50% přibližně 135. den u vzorků umístěných za oknem, 151. den u vzorků ve skříní a 162. den u vzorků v chladničce. Rozkladem terbutylazinu vzniklo malé množství hydroxyterbutylazinu, které se takřka neměnilo. Přítomnost desethylterbutylazinu nebyla v roztoku zaznamenána.

4.5 Monitorování triazinových pesticidů

Bylo odebráno a analyzováno celkem 6 vzorků pitných vod, 7 vzorků povrchových vod a 2 vzorky podzemních vod z celé České republiky za účelem zjištění přítomnosti triazinových pesticidů a jejich metabolitů v životním prostředí. Konkrétní odběrová místa jsou zobrazena na mapě níže (OBR. 27), jejich seznam je uveden v TAB. 29. Výsledky analýzy těchto vod jsou uvedeny v TAB. 30.



OBR. 27: MAPA ODBĚROVÝCH MÍST

TAB. 29: SEZNAM ODBĚROVÝCH MÍST A NÁZVY OZNAČENÍ VZORKŮ

č.	Vzorek
1	Pitná voda Mnichovo Hradiště
2	Řeka Jizera
3	Podzemní voda Češov
4	Řeka Blanice
5	Pitná voda Vodňany
6	Pitná voda Jihlava
7	Řeka Jihlava
8	Pitná voda Borová
9	Povrchová voda Borová
10	Podzemní voda Křepice 1
11	Podzemní voda Křepice 2
12	Řeka Svatka
13	Podzemní voda Ježov
14	Povrchová voda Ježov
15	Pitná voda Doubravice

TAB. 30: VÝSLEDKY MONITOROVÁNÍ TRIAZINOVÝCH PESTICIDŮ V ČR

Vzorek č.	ATR ng/ml	DEA ng/ml	DIA ng/ml	HA ng/ml	C ng/ml	P ng/ml	S ng/ml	T ng/ml	DET ng/ml	HT ng/ml
1	0	0	0	0,044	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0,150	0	0	0	0	0	0
3	0,029	0,047	0,008	0,032	0	0	0,001	0	0	0
4	0	0	0	0,088	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0,092	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0,051	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0,048	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0,199	0	0	0	0	0	0
10	0	0,009	0	0,016	0	0	0	0	0	0
11	0,02	0,026	0,0122	0,020	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0,061	0	0	0	0	0	0,005
13	0	0	0	0,008	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0,007	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0,056	0	0	0	0	0	0

Z tabulky výsledků našeho monitoringu je vidět, že i když jsou triazinové pesticidy zakázané a již se nepoužívají, zbytková množství samotných mateřských látek stále přetrvávají v ŽP. U podzemních vod (vzorek č. 3, 10, 11) byla zjištěna různě velká koncentrace metabolitů atrazinu desethylatrazinu a desisopropylatrazinu. Tyto hodnoty se ale pohybovaly v řádech jednotek až desítek pg/ml, a nepřekročily hygienické limity. Jistě překvapující bylo však zjištění, že metabolit hydroxyatrazin se u všech námi analyzovaných vzorků, tedy ve vodách pitných, povrchových i podzemních, vyskytl všude mimo jediného vzorku č. 8. Tyto koncentrace již nebyly zanedbatelné a v případě vzorku č. 2 a 9 (řeka Jizera a povrchová voda Borová) dokonce překročily hranici hygienického limitu 0,1 ng/ml.

5. Souhrn

V rešeršní části této práce byl podán přehled legislativních požadavků na kvalitu vody a spotřeby pesticidů v ČR. Práce se zabývala triazinovými pesticidy, jejich metabolity, a vlivem na ŽP.

Experimentální část byla věnována vývoji, optimalizaci a validaci LC-MS metody pro stanovení vybraných triazinových pesticidů a jejich metabolitů. K analýze byl použit kapalinový chromatograf ve spojení s hmotnostním spektrometrem. Jako optimální nastavení parametrů hmotnostního spektrometru byly využity parametry doporučené výrobcem. Standardy triazinových pesticidů a jejich metabolitů byly naladěny za těchto podmínek. Separace probíhala na koloně Zorbax SB-AQ tvořené stacionární fází s oktadecylovým řetězcem a endkapovaným silikagelovým nosičem. Mobilní fáze byla složena z vody, methanolu a 1% kyseliny mravenčí, pro separaci byla použita gradientová eluce. Teplota na koloně byla 40 °C. Jednotlivé analyty eluovaly z kolony v pořadí podle klesající polarity. Optimalizované podmínky pro separaci a detekci triazinových pesticidů shrnuje TAB. 31.

TAB. 31: PODMÍNKY ANALÝZY TRIAZINOVÝCH PESTICIDŮ A JEJICH METABOLITŮ

Analyt	Molekulový iont	Dceřiný iont	t _R	DP	EP	CE	CXP
	m/z	m/z	min	V	V	V	V
Hydroxyatrazin 1	198,1	156,1	12,10	53	10	23	25
Hydroxyatrazin 2	198,1	86,0	12,10	53	10	31	17
Desisopropylatrazin 1	174,2	96,1	14,47	59	4	27	17
Desisopropylatrazin 2	174,2	68,1	14,47	59	4	39	12
Hydroxyterbutylazin 1	211,9	156,1	16,07	47	10	22	16
Hydroxyterbutylazin 2	211,9	86,0	16,07	47	10	33	16
Desethylatrazin 1	188,3	146,1	18,45	47	11	23	26
Desethylatrazin 2	190,2	148,0	18,45	47	11	23	26
Simazin 1	202,2	124,1	24,37	66	11	25	7
Simazin 2	202,2	131,8	24,37	66	11	26	25
Desethylterbutylazin 1	202,3	146,2	24,60	55	8	23	25
Desethylterbutylazin 2	202,3	78,9	24,60	55	8	36	14
Cyanazin 1	241,2	213,8	24,68	56	9	25	21
Cyanazin 2	241,2	103,8	24,68	56	9	42	20
Atrazin 1	216,3	174,0	27,49	63	10	24	10
Atrazin 2	218,4	176,2	27,49	63	10	26	10
Propazin 1	229,9	188,1	30,14	67	5	24	11
Propazin 2	229,9	146,2	30,14	67	5	31	8
Terbutylazin 1	230,3	174,2	31,15	53	10	24	15
Terbutylazin 2	230,3	96,1	31,15	53	10	37	19

Vytvořená metoda nebyla vhodná pro separaci sekundárních a terciálních triazinových pesticidů ammelinu, didealkylatrazinu, hydroxydesethylatrazinu a hydroxydesisopropylatrazinu.

Byly ověřeny základní validační parametry.

Pro všechny analyty byla zvolena polynomická kalibrační závislost v rozsahu 5-1000 pg/ml. Hodnoty LOD se pohybovaly v rozmezí 0,5-3,2 pg/ml a hodnoty LOQ ležely v intervalu 1,5-9,6 pg/ml. Správnost a přesnost metody se lišila v závislosti na použitém analytu, jeho koncentraci a matrici. Hodnoty správnosti vyjádřené výtěžností se pohybovaly od 73,4% do 135,8% pro podzemní vodu, od 89,5% do 113,5% pro balenou a v rozmezí 97,3% až 110,8% pro povrchovou vodu. Přesnost vyjádřená relativní směrodatnou odchylkou opakovatelnosti měření byla 0,8-9,1% pro podzemní vodu, 0,8-3,7% pro balenou a 0,3-5,1% pro povrchovou vodu. Výpočet nejistoty byl založen na postupu „shora dolů“. Rozšířená nejistota pro triazinové pesticidy a jejich metabolity byla 4-22%.

V práci byl dále proveden test stability triazinových pesticidů atrazinu, cyanazinu, propazinu, simazinu a terbutylazinu. Ukázalo se, že na jejich rozkladu měla jen malý vliv fotolýza, nejvyšší pokles koncentrací byl zapříčiněn zvýšenou teplotou. Výjimkou byl pouze terbutylazin, u kterého byl nejvyšší pokles koncentrace zaznamenán, byl-li vzorek vystaven slunečnímu záření. Během tohoto testu byly zjištěny pouze nízké koncentrace metabolitů hydroxyatrazinu rozkladem atrazinu a hydroxyterbutylazinu rozkladem terbutylazinu. Přítomnost ostatních metabolitů nebyla v roztoku zaznamenána. Pořadí stability triazinových pesticidů podle poločasů rozpadů bylo: terbutylazin >> simazin > propazin ~ atrazin >> cyanazin.

Součástí této práce byl také monitoring výskytu triazinových pesticidů v povrchových, podzemních a pitných vodách v ČR. Bylo zjištěno, že přestože se tyto triazinové pesticidy již neužívají, stále jsou v ŽP v nízkých koncentracích přítomny. Nízké koncentrace primárních metabolitů triazinů nalezené ve všech zkoumaných typech vod však nepřekročily hygienické limity. Výjimkou byl hydroxyatrazin, který byl zjištěn téměř ve všech analyzovaných vzorcích v poměrně vysokých koncentracích, jež ve dvou případech dokonce hygienický limit 0,1 µg/l překročily. Hydroxyatrazin se tímto ukázal být velmi stálým metabolitem v ŽP. Protože metabolity triazinových pesticidů byly objeveny i v pitných vodách, potvrdilo se, že čistírný odpadních vod nejsou schopny takto nízké koncentrace pesticidů a jejich metabolitů odstranit.

6. Literatura

- [1] Zákon č.326/2004 Sb.
- [2] Státní rostlinolékařská správa: *O nás*. Dostupné z URL: <<http://eagri.cz/public/web/srs/portal/o-nas/>> [cit. 3.2.2011]
- [3] United States Environmental Protection Agency: *Pesticides*. Dostupné z URL: <<http://www.epa.gov/pesticides/health/index.htm> /> [cit. 15.11.2010]
- [4] PAN pesticides database: *OR Chemical Category Search*. Dostupné z URL: <http://www.pesticideinfo.org/List_Chemicals.jsp?> [cit. 19.10.2010]
- [5] Thurman, E. M.; Goolsby, D. A.; Meyer, M. T.; Mills, M. S.; Pomes, M. L.; Kolpin, D. W.: *Environ. Sci. Technol.* **26**, 2440–2447 (1992)
- [6] Kazda, J.: *Chemická ochrana rostlin*. Dostupné z URL: <http://www3.czu.cz/php/skripta/skriptum.php?titul_key=56> [cit. 19.10.2010]
- [7] Caracciolo, A. B.; Fajardo, C.; Grenni, P.; Sacca, M. L.; Amalfitano, S.; Ciccoli, R.; Martin, M.; Gibello, A.: *FEMS Microbiol. Ecol.* **71**, 127-136 (2010)
- [8] Váňa, J.: *Skripta z předmětu ekologie a ekotechnika*. Dostupné z URL: <<http://stary.biom.cz/clen/jv/obsah.html>> [cit. 20.11.2010]
- [9] Kolpin, D. W.; Thurman, E. M.; Goolsby, D. A.: *Environ. Sci. Technol.* **30**, 335-340 (1996)
- [10] Jacobsen, O. S.; Bossi, R.: *FEMS Microbiol. Rev.* **20**, 539-544 (1997)
- [11] Kvasničková, E.: *Xenobiochemie*, Praha, Karolinum 1995
- [12] Ralebitso, T. K.; Senior, E.; van Verseveld, H. W.: *Biodegradation* **13**, 11-19 (2002)
- [13] Tappe, W.; Groeneweg, J.; Jantsch, B.: *Biodegradation* **13**, 3-10 (2002)
- [14] Dujakovič, N.; Grujič, S.; Radišič, M.; Vasiljevič, T.; Laušević, M.: *Anal. Chim. Acta* **678**, 63-72 (2010)
- [15] Neumeister, L.; Sarapatka, B.; Kuzma, S.; Samsonova, P.; Urban, J.; Bubenikova, I.; Sweeney, S.: *Pesticides in Central and Eastern European Countries Usage, Registration, Identification and Evaluation Part 3*. Dostupné z URL: <http://www.pan-germany.org/download/Czech_CY_Rep.pdf> [cit. 20.11.2010]
- [16] Evropská komise: *Oznámení týkající se vody č. 8*. Dostupné z URL: <<http://ec.europa.eu/environment/water/participation/pdf/waternotes/WN8->

Pollution-CS.pdf> [cit. 20.11.2010]

- [17] Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2008/105/ES
- [18] Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/60/ES
- [19] Český hydrometeorologický ústav: *Sledování jakosti vod*. Dostupné z URL: <<http://voda.chmi.cz/ojv2/>> [cit. 22.1.2011]
- [20] Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2006/118/ES
- [21] Vyhláška č.252/2004 Sb.
- [22] Státní rostlinolékařská správa: *Spotřeba přípravků na OR v roce 2007*. Dostupné z URL: <http://eagri.cz/public/web/file/62864/_09_spotreba_skupin_ucinnych_latek_kg_1_.htm> [cit. 6.2.2011]
- [23] Státní rostlinolékařská správa: *Spotřeba přípravků na OR v jednotlivých letech*. Dostupné z URL: <<http://eagri.cz/public/web/srs/portal/pripravky-na-or/spotreba-pripravku-na-or/spotreba-v-jednotlivych-letech/spotreba-pripravku-na-or-v-roce-2000.html>> [cit. 6.2.2011]
- [24] PAN Pesticides Database: *Glyphosate*. Dostupné z URL: <http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC33138> [cit. 6.2.2011]
- [25] Rozhodnutí Komise 2006/1010/ES
- [26] Rozhodnutí Komise 2007/379/ES
- [27] PAN Pesticides Database: *Moderately Acute Toxins*. Dostupné z URL: <http://www.pesticideinfo.org/List_Chemicals.jsp?ChemToxList=S_AcuteModerate&dEPA_PCCode=y&dCAS_No=y&ChooseSearchType=Anywhere&ChemClassList=&dEPA_Reg=y&dClassList=y&ChemName=&dS_BA=y&ResultCnt=50&ChemUseList=&dDPR_Chem_Code=y&ChemRegList=&dUseList=y&offset=100> [cit. 6.2.2011]
- [28] Státní rostlinolékařská správa. *Spotřeba přípravků na OR v roce 2008*. Dostupné z URL: <http://eagri.cz/public/web/file/62821/_08_spotreba_ucinnych_latek_kg_1_08.htm> [cit. 6.2.2011]
- [29] PAN Pesticides Database: *Urea*. Dostupné z URL: <http://www.pesticideinfo.org/List_Chemicals.jsp?ChemToxList=&dEPA_PCCo

de=y&dCAS_No=y&ChooseSearchType=Begin&ChemClassList=Urea&dEPA_Reg=y&dClassList=y&ChemName=&dS_BA=y&ResultCnt=50&ChemUseList=&dDPR_Chem_Code=y&ChemRegList=&dUseList=y&offset=0>
[cit.21.11.2010]

- [30] PAN Pesticides Database: *Chlorophenoxy acid or ester*. Dostupné z URL: <http://www.pesticideinfo.org/List_Chemicals.jsp?> [cit. 6.2.2011]
- [31] Státní rostlinolékařská správa: *Věstník 2011*. Dostupné z URL: <http://eagri.cz/public/web/file/100675/Oznameni_o_zarazeni_a_o_nezarazeni_u_cinnych_latek_leden_2011__2_.pdf> [cit. 7.2.2011]
- [32] Rozhodnutí Komise 2007/415/ES
- [33] Rozhodnutí Komise 2007/416/ES
- [34] PAN Pesticides Database: *Carbofuran*. Dostupné z URL: <http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC35055> [cit. 7.2.2011]
- [35] PAN Pesticides Database *Carbosulfan*. Dostupné z URL: <http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC33396> [cit. 7.2.2011]
- [36] Rozhodnutí Komise 2004/248/ES
- [37] PAN Pesticides Database: *Atrazine*. Dostupné z URL: <http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC35042> [cit. 7.2.2011]
- [38] Rozhodnutí Komise 2008/934/ES
- [39] Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1107/2009/ES
- [40] Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž: *Přípravky na ochranu rostlin*. Dostupné z URL: <http://www.agrokrom.cz/texty/pripravky/Guardian_Extra.pdf> [cit. 7.2.2011]
- [41] AgriStar – agrochemicals s.r.o.: *Přípravky na ochranu rostlin*. Dostupné z URL: <<http://www.agristar.cz/data/etikety/prochloraz-450-ec.pdf>> [cit. 7.2.2011]
- [42] KeMiChem: *Přípravky na ochranu rostlin*. Dostupné z URL: <<http://kemichem.cz/referencni-pripravky-insekticidy-herbicidy-desikanty-fungicidy/kemichem-terbuthylazin-i-500-sc>> [cit. 7.2.2011]
- [43] Státní rostlinolékařská správa. *Spotřeba přípravků na OR v roce 2009*. Dostupné

z URL:<http://eagri.cz/public/web/file/100356/Spotreba_ucinnych_latek__kg_l_.htm> [cit. 7.2.2011]

- [44] PAN Pesticides Database: *Triazine*. Dostupné z URL: <http://www.pesticideinfo.org/List_Chemicals.jsp?dCAS_No=y&dDPR_Chem_Code=y&ChemName=&ResultCnt=50&dClassList=y&dS_BA=y&dUseList=y&ChemClassList=Triazine&ChemToxList=&dEPA_Reg=y&dEPA_PCCode=y&ChooseSearchType=Begin&ChemRegList=&ChemUseList=&offset=-1> [cit. 7.2.2011]
- [45] Pesticide Properties DataBase: *Pesticide Active Ingredients*. Dostupné z URL: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/index.htm>> [cit. 7.2.2011]
- [46] Rozhodnutí Komise 2004/247/ES
- [47] Nařízení Komise 2076/2002/ES
- [48] Rozhodnutí Komise 2008/934/ES
- [49] Scribner, E. A.; Thurman, E. M.; Zimmerman, L. R.: *Sci. Total Environ.* **248**, 157-167 (2000)
- [50] Pick, F. E.; van Dyk, L. P.; Botha, E.: *Chemosph.* **25**, 335-341 (1992)
- [51] Syngenta Česká republika. *Ochrana rostlin-insekticidy*. Dostupné z URL: <http://www.syngenta.com/country/cz/cz/ochrana-rostlin/insekticidy/Documents/chess_50_wg_popis.pdf> [cit. 12.2.2011]
- [52] Thurman, E. M.; Meyer, M. T.; Mills, M. S.; Zimmerman, L. R.; Perry, C. A.; Goolsby, D. A.: *Environ. Sci. Technol.* **28**, 2267-2277 (1994)
- [53] Sanlaville, Y.; Guittonneau, S.; Mansour, M.; Peicht, E. A.; Meallier, P.; Kettrup, A.: *Chemosph.* **33**, 353-362 (1996)
- [54] Behki, R. M.; Khan, S. U.: *J. Agric. Food Chem.* **34**, 746-749 (1986)
- [55] Struthers, J. K.; Jayachandran, K.; Moorman, T. B.: *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3368-3375 (1998)
- [56] Cook, A. M.; Huetter, R.: *J. Agric. Food Chem.* **32**, 581-585 (1984)
- [57] Cook, A. M.; Huetter, R.: *J. Agric. Food Chem.* **29**, 1135-1143 (1981)
- [58] Kaufman, D. D.; Kearney, P. C.; Sheets, T. J.: *J. Agric. Food Chem.* **13**, 238-242 (1965)
- [59] Look for Chemicals. *Product*. Dostupné z URL: <<http://www.lookchem.com/>> [cit. 20.12.2010]

- [60] Mills, M. S.; Thurman, E. M.: *Environ. Sci. Technol.* **28**, 600–605 (1994)
- [61] Schmitt, P.; Freitag, D.; Sanlaville, Y.; Lintelmann, J.; Kettrup, A.: *J. Chromatogr. A* **709**, 215-225 (1995)
- [62] Lerch, R. N.; Blanchard, P. E.; Thurman, E. M.: *Environ. Sci. Technol.* **32**, 40-48 (1998)
- [63] Kolpin, D. W.; Thurman, E. M.; Linhart, S. M.: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **35**, 385-390 (1998)
- [64] Schottler, S. P.; Eisenreich, S. J.; Capel, P. D.: *Environ. Sci. Technol.* **28**, 1079-1089 (1994)
- [65] Martínez Vidala, J. L.; Plaza-Bolaños, P.; Romero-González, R.; Garrido Frenich, A.: *J. Chromatogr. A* **1216**, 6767-6788 (2009)
- [66] Štulík, K.; Ševčík, J.; Pacáková, V.; Jelínek, I.; Coufal, P.; Bosáková, Z.: *Analytické separační metody*, Praha, Karolinum 2005
- [67] Němcová, I.; Engst, P.; Jelínek, I.; Sejbál, J.; Rychlovský, P.: *Spektrometrické analytické metody II.*, Praha, Karolinum 1998
- [68] Mezcuá, M.; Agüera, A.; Lliberia, J. L.; Cortés, M. A.; Bagó, B.; Fernández-Alba, A. R.: *J. Chromatogr. A* **1109**, 222-227 (2006)
- [69] Díaz, L.; Llorca-Pórcel, J.; Valor, I.: *Anal. Chim. Acta* **624**, 90-96 (2008)
- [70] Hernández, F.; Ibáñez, M.; Pozo, O. J.; Sancho, J. V.: *J. Mass Spectrom.* **43**, 173-184 (2008)
- [71] Palma, P.; Kuster, M.; Alvarenga, P.; Palma, V. L.; Fernandes, R. M.; Soares, A. M. V. M.; López de Alda, M. J.; Barceló, D.; Barbosa, I. R.: *Environment International* **35**, 545-551 (2009)
- [72] Freitas, L. G.; Götz, C. W.; Ruff, M.; Singer, H. P.; Müller, S. R.: *J. Chromatogr. A* **1028**, 277-286 (2004)
- [73] Suchánek, M.: *Kvalimetric, 10. Jakost v analytické laboratoři 2000*, Eurachem 2000
- [74] Douša, M.: *HPLC.CZ-validační program*. Dostupné z URL: http://www.hplc.cz/Validace/program_validace.htm [cit. 12.2.2011]
- [75] Danzer, K.; Currie, L. A.: *Pure Appl. Chem.* **70**, 993-1014 (1998)
- [76] Rozhodnutí Komise 2002/657/ES