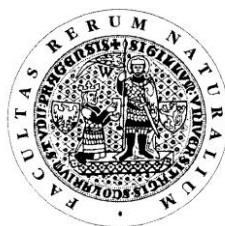


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Jana Trnovská

STANOVENÍ DIFLUBENZURONU METODOU HPLC

Determination of diflubenzuron by HPLC

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Praha 2012

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. 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.

V Praze dne 22. května 2012.

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. za trpělivost, vstřícnost, odborné vedení a cenné rady při zpracování výsledků.

Klíčová slova

HPLC, UV, pesticidy, diflubenzuron, kvantifikace

Seznam zkratek

| | |
|---|--|
| <i>A</i> | plocha píku |
| ACN..... | acetonitril |
| APCI..... | chemická ionizace za atmosférického tlaku |
| <i>As</i> | faktor asymetrie |
| <i>b</i> | signál šumu |
| <i>BCF</i> | biokoncentrační faktor |
| BHC..... | β-hexachlorocyklohexan |
| <i>c, c_a</i> | koncentrace analytu |
| DDT..... | dichlorodifenyltrichloroethan |
| ELISA..... | enzymová imunoanalýza |
| ESI..... | ionizace elektrosprejem |
| <i>F_m</i> | průtok mobilní fáze |
| GABA..... | kyselina γ-aminomáselná |
| <i>h</i> | výška píku |
| HPLC..... | vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| <i>k</i> | retenční faktor, rychlostní konstanta |
| <i>k_n, K_n</i> | konstanta charakteristická pro daný detekční systém |
| <i>K_{OW}</i> | rozdělovací koeficient n-oktanol-voda |
| <i>l</i> | koeficient linearity |
| <i>L_{1,2}</i> | interval spolehlivosti |
| LD ₅₀ | letální dávka pro 50 % jedinců vystavených dané dávce látky |
| LOD..... | limit detekce |
| LOQ..... | limit kvantifikace (stanovitelnosti) |
| <i>m</i> | směrnice kalibrační přímky |
| MeOH..... | methanol |
| MF..... | mobilní fáze |
| MS..... | hmotnostní spektrometrie |
| <i>n</i> | počet měření |

| | |
|---|---|
| N | počet teoretických pater na metr kolony |
| Q_1, Q_n | kritérium pro vyloučení odlehlých hodnot podle Deanova-Dixonova testu |
| Q_k | kritická hodnota kritéria pro vyloučení odlehlých hodnot podle Deanova-Dixonova testu |
| s_r | směrodatná odchylka |
| SF..... | stacionární fáze |
| R | rozpětí výsledků |
| RSD..... | relativní směrodatná odchylka |
| t'_R | redukovaný retenční čas |
| TEA..... | triethylamin |
| UV..... | ultrafialová oblast spektra |
| \tilde{x} | medián |
| \bar{x} | aritmetický průměr |
| $x_1, x_2, x_n, x_{n-1}, x_i, x_{\max}, x_{\min}$ | naměřené hodnoty |

Obsah

| | |
|---|----|
| 1 ÚVOD | 9 |
| 2 TEORETICKÁ ČÁST | 10 |
| 2.1 Insekticidy..... | 10 |
| 2.1.1 Klasifikace insekticidů | 10 |
| 2.1.2 Vliv insekticidů na necílové organismy | 12 |
| 2.1.3. Degradace insekticidů | 13 |
| 2.2 Diflubenzuron | 15 |
| 2.2.1. Struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti diflubenzuronu..... | 15 |
| 2.2.2 Mechanismus účinku diflubenzuronu | 16 |
| 2.2.3 Využití diflubenzuronu | 17 |
| 2.2.4. Rozklad diflubenzuronu v životním prostředí..... | 18 |
| 2.2.5 Metody používané k analýze diflubenzuronu | 20 |
| 2.2.6 Statistické zpracování výsledků a charakteristiky detekce | 23 |
| 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 25 |
| 3.1 Chemikálie | 25 |
| 3.2 Přístroje a pomůcky | 25 |
| 3.3 Experimentální podmínky..... | 26 |
| 3.4 Příprava zásobního roztoku | 26 |

| | |
|--|----|
| 4 VÝSLEDKY A DISKUSE | 27 |
| 4.1 Optimalizace složení mobilní fáze..... | 27 |
| 4.2 Kalibrační závislost, statistické zpracování výsledků..... | 32 |
| | |
| 5 ZÁVĚR | 36 |
| | |
| POUŽITÁ LITERATURA | 37 |

1 Úvod

Insekticidy jsou látky užívané nejčastěji pro ochranu hospodářsky využívaných rostlin (např. ovocných stromů) před škodlivým hmyzem. Méně často jsou používány pro omezení výskytu hmyzu v příbytcích pro hospodářská zvířata či jako součást přípravků na ochranu dřeva¹.

Mezi běžně používané insekticidy patří diflubenzuron, derivát benzoylfenylmočoviny. Po objevení jeho insekticidních účinků v 70. letech minulého století se jeho užívání rychle rozšířilo. K tomu přispěl jeho velmi specifický účinek proti hmyzu, který je dán mechanismem účinku - narušením syntézy chitinu. Bylo dokonce prokázáno, že tímto insekticidem není narušena syntéza chitinu hub².

Ačkoliv byl diflubenzuron považován za zcela bezpečný díky své nízké toxicitě pro savce, několik studií prokázalo jeho schopnost akumulovat se v tkáních organismů, díky čemuž hrozí otrava vyšších živočichů, kteří pozřou vícero zasažených jedinců³.

Vzhledem k riziku, kterým může diflubenzuron být pro necílové organismy, byla studována stabilita diflubenzuronu v životním prostředí a jeho nepřímé účinky. Například byl zkoumán vliv diflubenzuronu na chování necílového hmyzu⁴.

Ke stanovení diflubenzuronu se používají vysokoúčinná kapalinová chromatografie, plynová chromatografie a imunochemické metody. Nejčastějšími metodami detekce jsou UV spektrofotometrie a hmotnostní spektrometrie.

Cílem této bakalářské práce bylo nalézt optimální složení mobilní fáze pro analýzu diflubenzuronu metodou RP-HPLC a určit limit detekce a limit kvantifikace pro vybrané podmínky analýzy.

2 Teoretická část

2.1 Insekticidy

2.1.1 Klasifikace insekticidů

Insekticidy lze rozdělit podle několika kritérií, např. podle mechanismu účinku (viz tab. 1), podle skupiny škůdců, proti nimž jsou užívány, účinků na lidské zdraví a toxicity.

Tab. 1 Klasifikace pesticidů z hlediska mechanismu účinku - vybrané skupiny⁵

| Mechanismus účinku | Chemická podskupina | Příklady aktivních látek |
|---|-------------------------------|---|
| Inhibice acetylcholinesterasy | Karbamáty | Aldicarb, Carbofuran, Ethiofencarb, Methiocarb |
| | Organofosfáty | Dichlorvos, Malathion, Parathion, Thiometon |
| Blokace chloridových kanálů (řízených GABA) | Organochlorové cyklo dieny | Chlordan, Endosulfan |
| | Fenylpyrazoly | Ethiprol, Fipronil |
| Regulace sodíkových kanálů | Pyrethroidy, Pyrethriny | Allethrin, Bifenthrin, DDT, Methoxychlor |
| Narušení membrán trávicí trubice mikroorganismy | <i>Bacillus thuringiensis</i> | <i>B.t.israelensis</i> , <i>B.t.alzawai</i> , <i>B.t.tenebrionis</i> |
| | | <i>Bacillus sphaericus</i> |
| Inhibice biosyntézy chitinu | Deriváty benzoylmočoviny | Diflubenzuron, Flufenoxuron, Hexaflumuron, Noviflumuron, Teflubenzuron, Triflumuron |

Podle skupiny škůdců jsou insekticidy rozděleny na akaricidy (působí proti roztočům a pavoukům), aphicidy (např. proti mšicím), larvicidy (účinné proti larvám škůdců), látky účinné proti měkkýšům (slimáci, hlemýždi), nematocidy (účinné proti hád'átkům), termitocidy (proti termitům) a prostředky na ochranu dřeva⁶.

WHO (World Health Organisation) dělí pesticidy podle jejich toxicity. Dělení je založeno na akutní toxicitě (vyjádřené hodnotou LD₅₀) pro krysy při orálním a dermálním vstupu látky do organismu. Pesticidy jsou podle tohoto kritéria rozříděny do pěti skupin podle míry nebezpečí pro člověka (viz tab. 2).

Tab. 2 Dělení pesticidů podle míry nebezpečí pro člověka⁷

| Skupina podle WHO | | LD ₅₀ pro krysy (mg/kg tělesné hmotnosti) | |
|-------------------|---|---|------------|
| | | Orální | Dermální |
| Ia | Extrémně nebezpečné | < 5 | < 50 |
| Ib | Vysoce nebezpečné | 5 - 50 | 50 - 200 |
| II | Středně nebezpečné | 50 - 2000 | 200 - 2000 |
| III | Mírně nebezpečné | > 2000 | > 2000 |
| U | Pravděpodobně nepředstavuje akutní nebezpečí | 5000 a více | |

2.1.2 Vliv insekticidů na necílové organismy

Mechanismus účinku insekticidů, které se dnes běžně používají pro velkoplošné ošetření hospodářských rostlin, je zpravidla znám a upřednostňují se ty insekticidy, jejichž účinek na savce je co nejmenší (dobrým příkladem jsou zde inhibitory syntézy chitinu).

Problémem je působení insekticidů na ostatní necílové skupiny organismů. Toxicita používaných insekticidů či jejich vliv na chování jsou testovány pro organismy žijící v blízkosti míst postřiku, pro opylovače a pro vodní organismy. Například byl testován vliv insekticidů na ryby (*Cyprinus carpio*)⁸, korýše (*Daphnia magna*)⁹ či hmyz (*Apis mellifera*)^{10,11}

Insekticidy mohou způsobit přímou otravu. Typickým příkladem jsou organochlorové insekticidy (BHC, DDT), jejichž toxicita vzhledem ke včelám byla testována již v 50. letech 20. století¹². Insekticidy, které jsou rozpustné v tukách, a ukládají se tedy ve tkáních, mohou dále způsobit otravu potravního řetězce - otrávený hmyz je pozřen vyšším živočichem, v jehož tukové tkáni se insekticid akumuluje tak dlouho, až dosáhne letální dávky pro daného živočicha (příkladem je otrava dravců po konzumaci mrtvých drobných vodních ptáků kontaminovaných organofosfáty³). Insekticid ve tkáních v menším množství, než je letální dávka, se může negativně projevit na plodnosti a celkovém zdraví⁶.

Užívání širokospektrálních neselektivních pesticidů v minulosti mělo negativní dopady na životní prostředí projevující se redukcí, či vymizením některých živočišných a rostlinných druhů. Redukce jednoho živočišného druhu vytváří ekologickou mezeru, která je zaplněna druhem, který byl dosud potlačován v důsledku kompetice. Tito sekundární škůdci se stávají problémem, pokud nejsou citliví k používaným pesticidům, a to vede ke zvyšování dávek známých pesticidů, či k vývoji nových účinných látek. Použití pesticidů dále může vést k odstranění zdrojů potravy (rostlin i živočichů) neškodných nebo dokonce prospěšných druhů⁶. Významným rizikem je i v současné době vznik rezistence k určité skupině pesticidů¹³.

Pro omezení těchto rizik je třeba znát přesný mechanismus účinku (což umožní odhadnout skupinu organismů, jež jsou daným pesticidem ohroženy). Jsou vedeny studie o toxicitě vůči necílovým organismům a o rychlosti a průběhu degradace účinných látek v životním prostředí.

2.1.3. Degradace insekticidů

Degradaci insekticidů lze popsat pomocí rovnic a modelů užívaných v toxikologii. Všechny systémy (živočichové, půda, voda) jsou zjednodušeny na třikompartmentové či čtyřkompartmentové modely. Odbourávání účinné látky lze popsat pomocí kinetiky prvního řádu (rov. 1), chování látky v prostředí pomocí biokoncentračního faktoru (rov. 2) či rozdělovacího koeficientu *n*-oktanol - voda (rov. 3)¹⁴.

$$-\frac{dc}{dt} = kc \quad (\text{rov. 1})$$

kde *c* je koncentrace látky, *t* je čas, *k* je rychlostní konstanta

$$BCF = \frac{c_{\text{org}}}{c_{\text{prost}}} \quad (\text{rov. 2})$$

kde *BCF* je biokoncentrační faktor, *c_{org}* je koncentrace látky v organismu, *c_{prost}* je koncentrace látky v prostředí

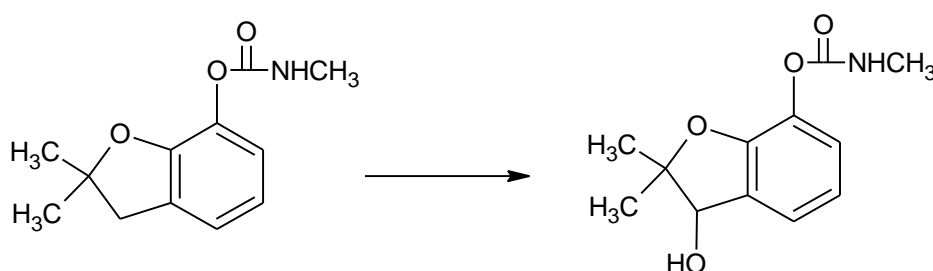
$$K_{\text{OW}} = \frac{c_{\text{okt}}}{c_{\text{H}_2\text{O}}} \quad (\text{rov. 3})$$

kde *K_{ow}* je rozdělovací koeficient *n*-oktanol - voda, *c_{okt}* je koncentrace látky v oktanolu, *c_{H₂O}* je koncentrace látky ve vodě

Prvním typem degradace je rozklad mikroorganismy. Mikroorganismy mají schopnost rozložit určitý insekticid díky adaptaci (schopnost odbourat toxickou látku přinesla mikroorganismu evoluční výhodu oproti dalším kmenům) či kometabolismu (např. mikroorganismy schopné rozložit bifenyly mají schopnost rozložit polychlorované bifenyly s nižším počtem atomů chloru). Mezi mikroorganismy přispívající k rozkladu pesticidů v půdě patří např. kmeny *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Penicillium* nebo *Pseudomonas*¹⁴.

Insekticid z prostředí dále ubývá odpařováním a fotodegradací. Míra odpařování závisí na hustotě nasycených par účinné látky nad kapalinou - čím vyšší je tato hodnota, tím více se látka odpařuje¹⁴. Fotodegradace se rozlišuje přímá (absorpce fotonu insekticidem vede k rozložení) a nepřímá (fotony jsou absorbovány jinými látkami citlivými na světlo a jejich fotochemické reakce vyvolají degradaci insekticidu)¹⁵.

Insekticidy se dále mohou odbourávat v organismech živočichů. První z reakcí je oxidace, díky které se lipofilní látky stávají hydrofilnějšími, a tedy přístupnějšími pro metabolizaci. Oxidace je katalyzována enzymy cytochrom P450. Oxidace je prováděna např. u karbofuranu (obr. 1), karbarylu nebo aldrinu.



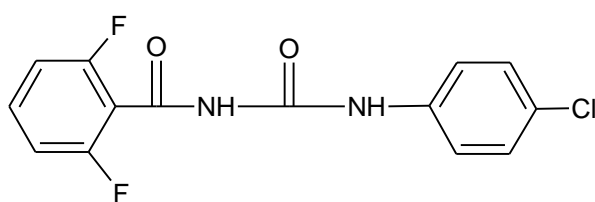
Obr. 1: Oxidace karbofuranu¹⁴

Na degradaci se dále podílí epoxidhydrólasy, které rozkládají epoxidy vzniklé činností cytochromu P450, glutathiontransferasa, jež se podílí na odstraňování volných radikálů, a hydrólasy štěpící estery a amidy¹⁴.

2.2 Diflubenzuron

2.2.1. Struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti diflubenzuronu

Systematický název diflubenzuronu (struktura viz obr. 2) podle IUPAC je 1-(4-chlorofenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)-močovina¹⁶ a patří do skupiny syntetických insekticidů, které jsou odvozeny od benzoylfenylmočoviny. Do skupiny dále patří např. flufenoxuron, hexaflumuron, novaluron a teflubenzuron⁵.



Obr. 2: Struktura diflubenzuronu¹⁶

Diflubenzuron je špatně rozpustný ve vodě a v nepolárních organických rozpouštědlech, v polárních organických rozpouštědlech je rozpustnost vyšší (např. v acetonu je rozpustnost při 20 °C 6,5 g/l)¹⁶. V tabulce 3 jsou shrnuty některé jeho další vlastnosti.

Tab. 3: Fyzikálně-chemické vlastnosti diflubenzuronu¹⁶

| Relativní molekulová hmotnost | Tenze par při 25 °C [Pa] | Stabilita ve vodě (úbytek po 3 týdnech v temnu a ve vodě o různém pH) | | |
|-------------------------------|--------------------------|---|------|------|
| | | pH 5 | pH 7 | pH 9 |
| 310,7 | $1,2 \cdot 10^{-7}$ | 4 % | 8 % | 26 % |

2.2.2 Mechanismus účinku diflubenzuronu

Deriváty benzoylfenylmočoviny jsou hojně užívány pro svou vysokou účinnost proti škodícímu hmyzu, jen výjimečně vznikající rezistenci a pro relativní bezpečnost pro vyšší živočichy, která je dána specifickým působením insekticidů na syntézu chitinu.

Chitin má podpůrnou funkci v buněčné stěně hub a kutikule hmyzu, proto byl považován za vhodný cíl pro selektivní působení pesticidů. Syntéza chitinu je tvořena několika propojenými kroky: biotransformace jednoduchých sacharidů (glukóza, trehalóza), syntéza jednotek chitinsynthasy, jejich přesun do plazmatických membrán a aktivace, vytvoření dlouhých chitinových molekul, jejich přesunutí skrz plazmatickou membránu a spojení s proteiny kutikuly u hmyzu či se sacharidy v buněčné stěně hub.

Diflubenzuron významně potlačuje syntézu chitinu během vytváření nové kutikuly u embryí, larev a kukel hmyzu. Poškození chitoproteinové kostry exoskeletu způsobuje vznik slabé a měkké kutikuly, která vede k vysychání a smrti jedince².

O přesném místě zásahu se i v dnešní době vedou diskuse. Někteří autoři se domnívají, že insekticidem je zasažena chitinsynthasa, a to na základě genetického mapování, které ukázalo na spojitost mezi rezistencí vůči inhibitorům syntézy chitinu a mutací v genu kódujícím chitinsynthasu¹⁷. Tato teorie je podpořena také nalezenými rozdíly mezi chitinsynthasou hub (na které diflubenzuron nepůsobí) a hmyzu². Další náhled poskytuje sledování exprese genů v organismech zasažených insekticidem. Bylo zjištěno, že nebyla ovlivněna exprese genů kódujících enzymy podílející se na metabolismu chitinu, zasažena byla exprese genů kódujících proteiny kutikuly¹⁸.

Nalezení mechanismu inhibice syntézy chitinu je stále aktuálním tématem a rozvoj proteomiky poskytuje nové možnosti pro další výzkum.

2.2.3 Využití diflubenzuronu

Diflubenzuron je účinnou látkou insekticidu prodáváného v České republice pod obchodním názvem Dimilin[®] 48 SC, Dimilin[®] 25 WP, Dimilin[®] GR2 a Dimilin[®] TB2. Přípravky se liší obsahem účinné látky a obsaženými pomocnými látkami^{19, 20, 21, 22}.

Diflubenzuron je používán na ochranu proti širokému spektru škůdců, jejichž příklady jsou uvedeny v tabulce 4.

Tab. 4: Příklady škůdců, proti nimž je používán diflubenzuron

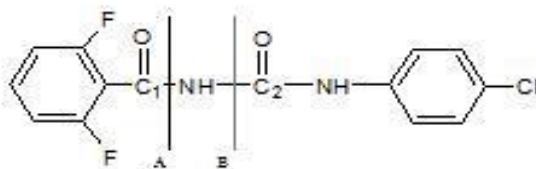
| Jméno škůdce | Napadená rostlina |
|--|-------------------|
| Obaleč jablečný, obaleč malvicový, píďalka podzimní, bekyně zlatořitná, mera hrušková, hálčivec jabloňový, molovka jablečná, klíněnky, předivky, podkopníčci ²³ | ovocné stromy |
| klíněnka jírovcová ²⁴ | jírovec maďal |
| květopas bavlníkový ²⁵ | bavlník |
| makadlovka (<i>Keiferia lycopersicella</i>) ²⁶ | rajče jedlé |

Diflubenzuron je dále používán pro hubení komárů²⁷, je účinný proti mouše domácí²⁸ a parazitům živočichů, např. koček²⁹.

2.2.4. Rozklad diflubenzuronu v životním prostředí

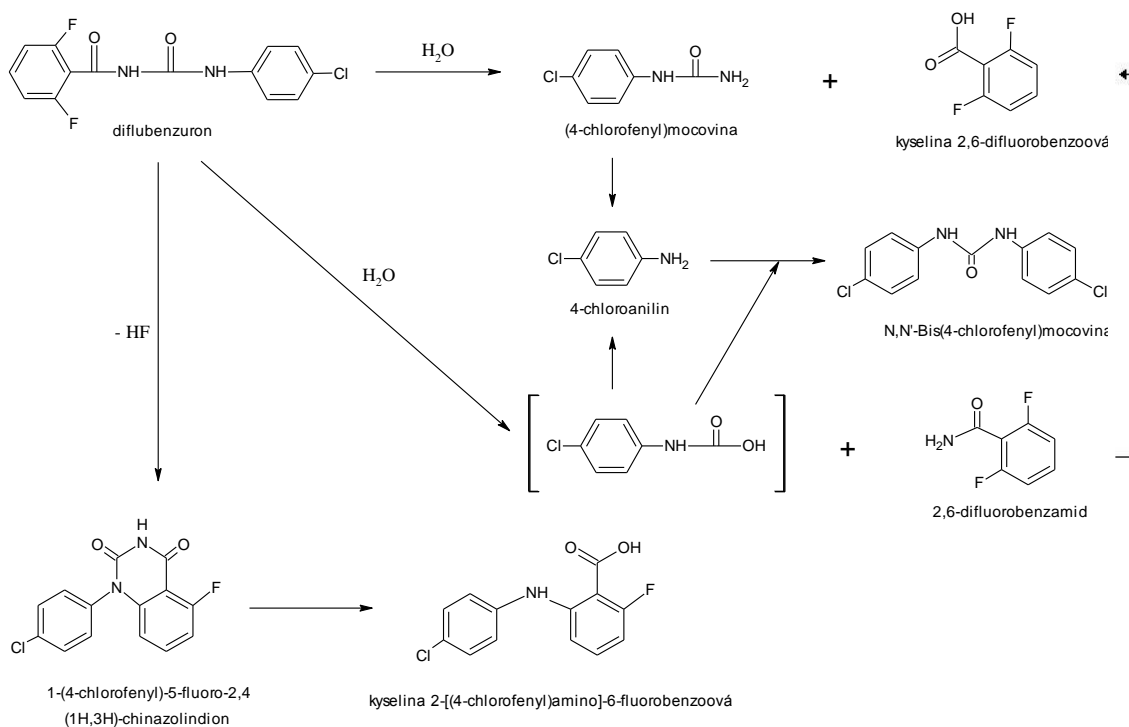
Hlavní cestou rozkladu diflubenzuronu v životním prostředí je fotodegradace, méně se projevuje hydrolyzá³⁰.

Prvním krokem je rozštěpení můstku mezi benzenovými jádry. Můstek může být rozštěpen na dvou místech: mezi atomy N1 a C1 (viz obr. 3) za vzniku 2,6-difluorobenzoové kyseliny a 4-chlorofenylmočoviny, nebo mezi atomy N1 a C2 za vzniku 2,6-difluorobenzamidu a 4-chloroformanilidu. 2,6-difluorobenzamid je rychle hydrolyzován na 2,6-difluorobenzoovou kyselinu, 4-chloroformanilid a 4-chlorofenylmočovina jsou dále přeměněny na 4-chloroanilin³¹.



Obr. 3: První krok rozkladu diflubenzuronu: štěpení vazby A mezi atomy C1 a N1, B mezi atomy C2 a N1

Studie zabývající se osudem diflubenzuronu ve vodě prokázala vliv pH na rychlost rozkladu: diflubenzuron se v kyselém prostředí téměř nerozkládá (i po 56 dnech od počátku experimentu zůstalo 99,5 % diflubenzuronu nerozloženo), v neutrálním a zásaditém prostředí je rozklad mnohem rychlejší (po 56 dnech zůstalo při pH 6 pouze 1,2 % diflubenzuronu nerozloženo, při pH 10 už po 14 dnech zbývalo ve vodě jen 1,7 % diflubenzuronu). Za podpory degradace vysokou teplotou bylo pomocí hmotnostního analyzátoru sestaveno schéma přeměny jednotlivých produktů (obr. 4)³². Při studiu degradace diflubenzuronu v rýžových polích v Kalifornii bylo zjištěno, že vzniklý fotolýzát ve vodě je pro modelový organismus (*Daphnia magna*) stejně toxický jako původní diflubenzuron³³.



Obr. 4: Schéma rozkladu diflubenuronu ve vodě³²

Osud diflubenuronu byl dále sledován v půdě, rostlinách³⁴ a organismech živočichů^{35,36}. Díky stabilitě benzenových jader bylo prvním krokem vždy štěpení močovinnového můstku, následně byl v půdě pozorován rozklad produktů štěpení až na oxid uhličitý^{37,38}. U živočichů nebyl osud diflubenuronu a jeho metabolitů sledován dostatečně dlouho na to, aby bylo možné popsat děje následující po rozštěpení močovinnového můstku^{35,36}.

2.2.5 Metody používané k analýze diflubenzuronu

Diflubenzuron byl analyzován v řadě přírodních matric, jako jsou voda, půda, rostliny a tkáň živočichů. Mezi nejčastěji používané metody patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie, méně často se v literatuře objevují plynová chromatografie a imunochemické metody.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je separační metoda založená na dělení látek podle jejich afinity ke stacionární fázi (SF). Mobilní fáze (MF) o různém složení (nejčastěji je jí směs vody a organického rozpouštědla) je systémem hnána vysokotlakou pumpou tlakem až 250 bar. Mezi nejčastější detektory patří spektrofotometrický a hmotnostní detektor.

Pro analýzu diflubenzuronu se téměř výhradně používá rozdělovací chromatografie v reverzním módu na oktadecylové stacionární fázi, nejčastějšími mobilními fázemi jsou směsi acetonitril-voda a methanol-voda s různým zastoupením jednotlivých složek. V tabulce 5 je přehled systémů použitých pro analýzu diflubenzuronu.

Tab. 5: Separační systémy používané pro analýzu diflubenzuronu metodou HPLC

| Matrice | SF | MF | Detekce | Limit detekce | Limit kvantifikace |
|-----------------------------|-----|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|--------------------|
| podzemní voda ³⁹ | C8 | ACN-MeOH, grad. (25% - 100% ACN) | UV (245 nm) APCI-MS | 0,44 µg/l 0,92 µg/l | - - |
| podzemní voda ⁴⁰ | C18 | MeOH-voda, grad. (75% - 90% MeOH) | fotochemicky indukovaná fluorescence | 0,01 µg/l | 0,04 µg/l |

Pokračování tab. 5

| Matrice | SF | MF | Detekce | Limit detekce | Limit kvantifikace |
|--|-----|---|--------------------------------|--|--|
| jablka, rajčata ⁴¹ | C18 | MeOH-voda 80/20 (v/v) | UV (254 nm) | - | 50 µg/kg |
| hrozny, víno ⁴² | C18 | MeOH-voda, grad. (10% - 100% MeOH) | UV (260 nm) | - | 4 - 5 µg/kg |
| jablka, hrušky ⁴³ | C18 | ACN-voda 70/30 (v/v) | UV (254 nm) | 20 µg/l | - |
| citrusové plody ⁴⁴ | C18 | ACN-voda, grad. (88% - 90% ACN) | UV (200 nm) | - | 0,25 µg/g |
| říční voda, zelenina ⁴⁵ | C18 | ACN-voda, grad. (55% - 100% ACN) | ESI-MS | voda: 0,003 µg/l zelenina: 1,43 µg/kg | voda: 0,007 µg/l zelenina: 5,00 µg/kg |
| houby ⁴⁶ | C18 | MeOH-voda, grad. (80% - 95% MeOH) | APCI-MS | 14,2 µg/kg | - |
| okurky ⁴⁷ | C18 | ACN-voda, grad. (75% - 90% ACN) | chemilumi- -niscence ACN | 0,09 µg/ml | 0,29 µg/ml |
| listy jírovce maďalu ²⁴ | C18 | MeOH/CH ₃ COONH ₄ grad. (65% - 100% MeOH) | UV (257 nm) | 0,09 µg/ml | 0,15 µg/ml |

Plynová chromatografie

Mobilní fázi v plynové chromatografii je plyn, nejčastěji dusík, vodík či helium. Na rozdíl od kapalinové chromatografie analyt s mobilní fází neinteraguje. K detekci analytů se používají plamenově-ionizační, tepelně-vodivostní, elektrochemické a optické detektory nebo detektory elektronového záchytu.

Plynová chromatografie je hojně užívaná metoda při analýze pesticidů. Pro analýzu diflubenzuronu není příliš vhodná kvůli jeho termolabilitě, a tedy nutnosti derivatizace. V literatuře byla popsána analýza diflubenzuronu v jablkách pomocí derivatizace anhydridem kyseliny heptafluorobutanové⁴⁸.

Termolabilitu diflubenzuronu však lze i využít. Bylo zjištěno, že tepelný rozklad diflubenzuronu vede k reprodukovatelnému vzniku tří fragmentů (4-chlorofenylisokyanát, 4-chloroanilin a 2,6-difluorobenzamid), pomocí kterých lze stanovit množství původní látky⁴⁹.

Imunochemické metody

Imunochemické metody jsou založeny na specifické vazbě látky (analytu) a protilátky. Pro svou citlivost, specifičnost, rychlost analýzy, možnost automatizace a nízkou cenu byly hojně využívány v klinických analýzách. Na počátku 80. let byly představeny jako vhodná metoda pro analýzu pesticidů⁵⁰.

V následujícím období byly syntetizovány hapteny pro analýzu diflubenzuronu⁵¹ a dalších látek odvozených od benzoylfenylmočoviny^{52,53}. Aplikace metody ELISA na analýzu těchto látek ve vodě a půdě prokázala, že metoda je s limity detekce < 3 ppb dostatečně citlivá⁵².

Dále byl vytvořen kit pro rychlou analýzu diflubenzuronu v terénu, jehož výsledky korespondují s imunochemickými metodami i HPLC analýzami prováděnými v laboratoři⁵⁴.

2.2.6 Statistické zpracování výsledků a charakteristiky detekce

Soubor analytických výsledků bývá zatížen chybami, které ovlivňují přesnost a správnost analýzy. Chyby mohou být hrubé (způsobené chybou analytika), systematické (nejčastěji způsobené instrumentací) a náhodné.

Hrubé chyby vedou k výskytu odlehlých hodnot v souboru výsledků. Odlehlé hodnoty lze určit např. pomocí Deanova-Dixonova testu pro 1 - n paralelních výsledků porovnáním vypočtených hodnot Q_1 a Q_n (rov. 4, a rov. 5)⁵⁵ s tabelovanou kritickou hodnotou Q_k . Jsou-li Q_1 či Q_n větší než Q_k , je výsledek odlehlý.

$$Q_1 = \frac{x_2 - x_1}{R} \quad (\text{rov. 4})$$

$$Q_n = \frac{x_n - x_{n-1}}{R} \quad (\text{rov. 5})$$

kde R je rozpětí, $R = x_{\max} - x_{\min}$,

x_1, x_2, x_n a x_{n-1} jsou naměřené hodnoty

Dalšími veličinami, které popisují přesnost výsledků, jsou směrodatná odchylka (s_r) a relativní směrodatná odchylka (RSD). Pro menší počet výsledků než 20 se používá výpočtu směrodatné odchylky z rozpětí hodnot (rov. 6), pro vyšší počet se směrodatná odchylka počítá z čtverců rozdílů (rov. 7)⁵⁶. Relativní směrodatnou odchylku lze spočítat podle rov. 8⁵⁵.

$$s_r = k_n \times R \quad (\text{rov. 6})$$

kde k_n je tabelovaná hodnota, R je rozpětí

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (\text{rov. 7})$$

kde x_i je naměřená hodnota, \bar{x} je aritmetický

průměr, n je počet paralelních měření

$$\text{RSD} = \frac{s_r}{\tilde{x}} \times 100\% \quad (\text{rov. 8})$$

kde \tilde{x} je medián (je-li $n > 20$, dosazuje se aritmetický průměr)

Analytický výsledek lze dále popsat pomocí intervalu spolehlivosti $L_{1,2}$ (rov. 9)⁵⁵, tedy intervalu, v němž daný výsledek leží s určitou pravděpodobností.

$$L_{1,2} = K_n \times R \quad (\text{rov. 9})$$

kde K_n je tabelovaná hodnota, R je rozpětí

Limit detekce vyjadřuje koncentraci, již je možno detektorem bezpečně rozpoznat od šumu, limit kvantifikace je nejnižší koncentrace analytu, již lze s určitou spolehlivostí ve vzorku stanovit. Limit detekce a kvantifikace lze vypočítat pomocí šumu základní linie a směrnice kalibrační přímky (rov. 11 a rov. 12).

$$\text{LOD} = \frac{3 \times b}{m} \quad (\text{rov. 11})$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times b}{m} \quad (\text{rov. 12})$$

kde b je šum základní linie, m je směrnice kalibrační přímky

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

- acetonitril CHROMASOLV for HPLC (Sigma-Aldrich, Německo)
- methanol CHROMASOLV for HPLC (Sigma-Aldrich, Německo)
- octan amonný, p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)
- triethylamin ReagentPlus, čistota 99,5 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- diflubenzuron, standard Pestanal (Sigma-Aldrich, Německo)
- deionizovaná voda

3.2 Přístroje a pomůcky

- kapalinový chromatograf Dionex (Sunnyvale, CA, USA): vysokotlaká pumpa P580, detektor UVD 170S
- dávkovací ventil Rheodyne s 20 μ l smyčkou (Cotati, CA, USA)
- kolona SunFire C18 (150 mm \times 4,6 mm, 5 μ m) a předkolona SunFire C18 (20 mm \times 4,6 mm, 5 μ m) od (Waters, USA)
- injekční stříkačka Hamilton 25 μ l (Bonaduz, Švýcarsko)
- ultrazvuk Ultrasonic LC30H (Elma, Německo)
- analytické váhy APX-100 (Denver Instrument, USA)
- pH metr 3510 (Jenway, Velká Británie)
- spektrofotometr Agilent 8453 (Agilent Technologies, USA)
- software pro záznam a zpracování dat: Chromeleon PeakNet 6 version 6.0.1, Origin 6.0 (OriginLab Corporation, USA)

3.3 Experimentální podmínky

Pro nalezení optimálních podmínek pro analýzu diflubenzuronu byly použity mobilní fáze acetonitril-voda, methanol-voda, methanol-voda s přidavkem triethylaminu o výsledné koncentraci 0,1% a methanol-0,01M octan amonný (pH = 7). K analýze bylo využito různých objemových zastoupení jednotlivých složek mobilních fází.

Průtok mobilní fáze byl zvolen 0,7 ml/min, při vyšším tlaku v systému byl snížen na 0,6 ml/min.

Na spektrofotometru bylo proměřeno spektrum diflubenzuronu v oblasti 200 - 350 nm. Nalezené lokální maximum při 256 nm bylo použito pro UV detekci.

3.4 Příprava zásobního roztoku

Zásobní roztok standardu byl připraven rozpuštěním 10,0 mg standardu v 10 ml 100% methanolu. Tento zásobní roztok byl následně ředěn acetonitrem či methanolem na požadované koncentrace.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Optimalizace složení mobilní fáze

Podle údajů v literatuře byly pro analýzu diflubenzuronu testovány mobilní fáze acetonitril-voda^{43, 44, 45, 47}, methanol-voda^{40, 41, 42, 46}, methanol-0,01M octan amonný²⁴ a nově methanol-voda s přídavkem triethylaminu, jehož výsledná koncentrace v mobilní fázi byla 0,1% (dále pouze 0,1% TEA). Byla sledována retence diflubenzuronu a základní chromatografické charakteristiky (asymetrie, počet teoretických pater na metr kolony) při použití mobilních fází s různým objemovým zastoupením organického modifikátoru. Vzorek diflubenzuronu pro optimalizaci byl připraven naředěním zásobního roztoku standardu na koncentraci 10 µg/ml.

Získaná data jsou shrnuta v tabulce 6.

Tab. 6: Vybrané charakteristiky separace diflubenzuronu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií v reverzním módu. Stacionární fáze: C18, mobilní fáze: acetonitril-voda, methanol-voda, methanol-voda s 0,1% TEA, methanol-0,01M octan amonný s různým objemovým zastoupením organického modifikátoru. F_m - průtok mobilní fáze, t'_R - redukovaný retenční čas, k - retenční faktor, N - počet teoretických pater na metr kolony, A_s - asymetrie píku.

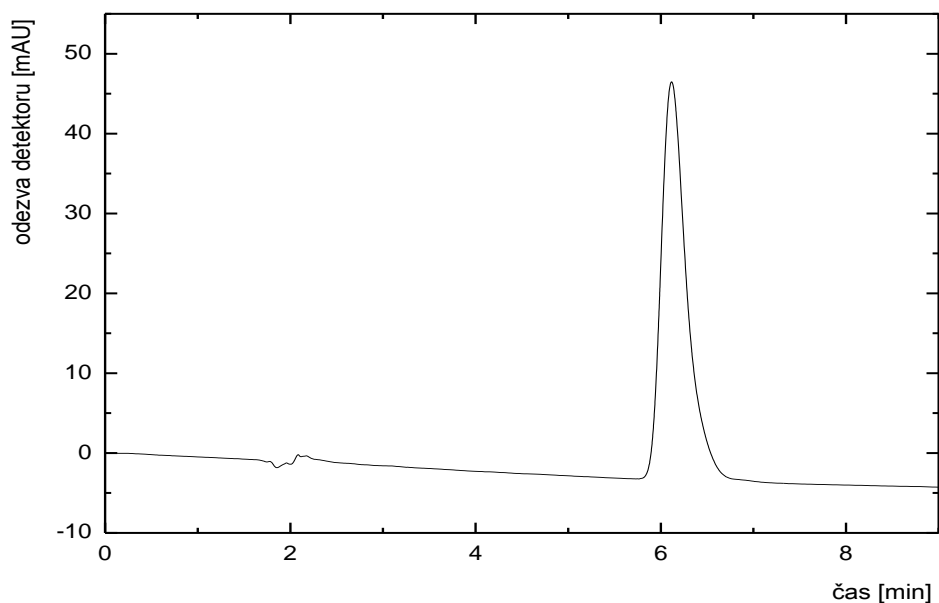
| Mobilní fáze | F_m [ml/min] | t'_R [min] | k | N | A_s |
|-------------------------|-------------------|-----------------|------|-------|-------|
| ACN-voda 80/20 (v/v) | 0,7 | 2,135 | 0,92 | 14247 | 1,42 |
| ACN-voda 75/25 (v/v) | 0,7 | 2,944 | 1,36 | 15193 | 1,42 |
| ACN-voda 70/30 (v/v) | 0,7 | 4,158 | 2,12 | 17307 | 1,50 |
| ACN-voda 60/40 (v/v) | 0,7 | 8,023 | 4,20 | 21813 | 1,62 |

Pokračování tab. 6

| Mobilní fáze | F_m [ml/min] | t'_R [min] | k | N | As |
|--|-------------------|-----------------|------|-------|------|
| MeOH-voda 80/20 (v/v) | 0,7 | 4,203 | 1,58 | 13440 | 1,41 |
| MeOH-voda 75/25 (v/v) | 0,7 | 7,247 | 2,75 | 16780 | 1,66 |
| MeOH-voda 70/30 (v/v) | 0,7 | 13,288 | 5,05 | 16913 | 1,60 |
| MeOH-voda 0,1 % TEA 80/20 (v/v) | 0,6 | 3,403 | 1,15 | 11693 | 1,57 |
| MeOH-voda 0,1 % TEA 75/25 (v/v) | 0,6 | 4,983 | 1,61 | 11673 | 1,64 |
| MeOH-voda 0,1 % TEA 70/30 (v/v) | 0,7 | 6,972 | 2,70 | 13367 | 1,72 |
| MeOH/CH ₃ COONH ₄ 80/20 (v/v) | 0,7 | 4,009 | 1,41 | 10487 | 1,17 |
| MeOH/CH ₃ COONH ₄ 75/25 (v/v) | 0,7 | 7,170 | 2,50 | 12120 | 1,14 |
| MeOH/CH ₃ COONH ₄ 70/30 (v/v) | 0,7 | 12,804 | 4,51 | 12093 | 1,22 |

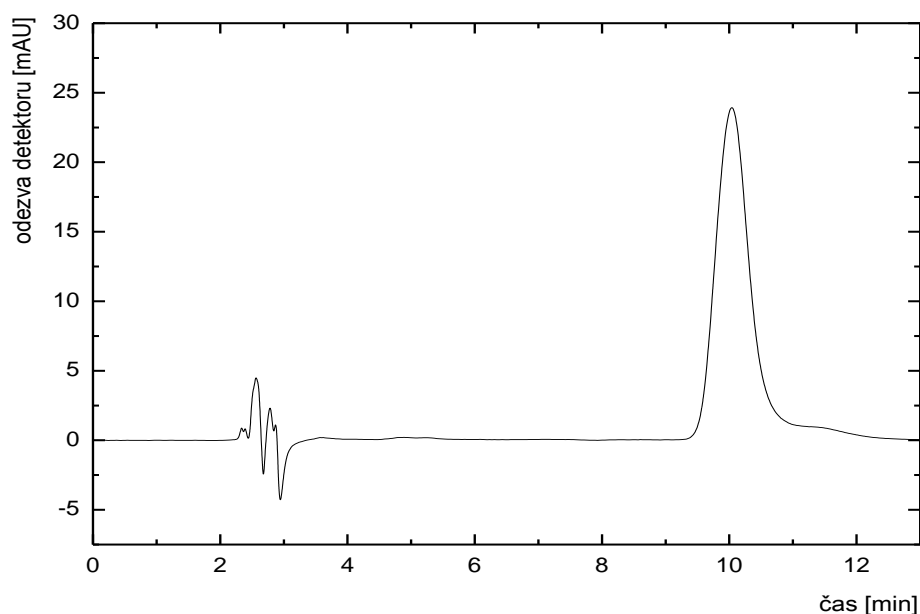
Z naměřených dat je patrné, že ve všech testovaných mobilních fázích stoupá retence analytu a zvyšuje se účinnost kolony se snižujícím se obsahem organické složky v mobilní fázi.

Mobilní fáze acetonitril-voda se ukázala být nejvhodnější vzhledem k dosahovaným vysokým účinnostem a nízkým tlakům na koloně (kolem 70 bar). Pro další analýzy bylo vybráno složení mobilní fáze acetonitril-voda 70/30 (v/v) a získaný chromatogram je ukázán na obr. 5. Mobilní fáze s objemovým zastoupením 60 % acetonitrilu se jevila lepší z hlediska účinnosti, ale nebyla vybrána kvůli vyšší asymetrii a době analýzy. Nevýhodou pro kvantitativní analýzu bylo rozmývání píku diflubenzuronu, které komplikuje přesnou integraci plochy píku.



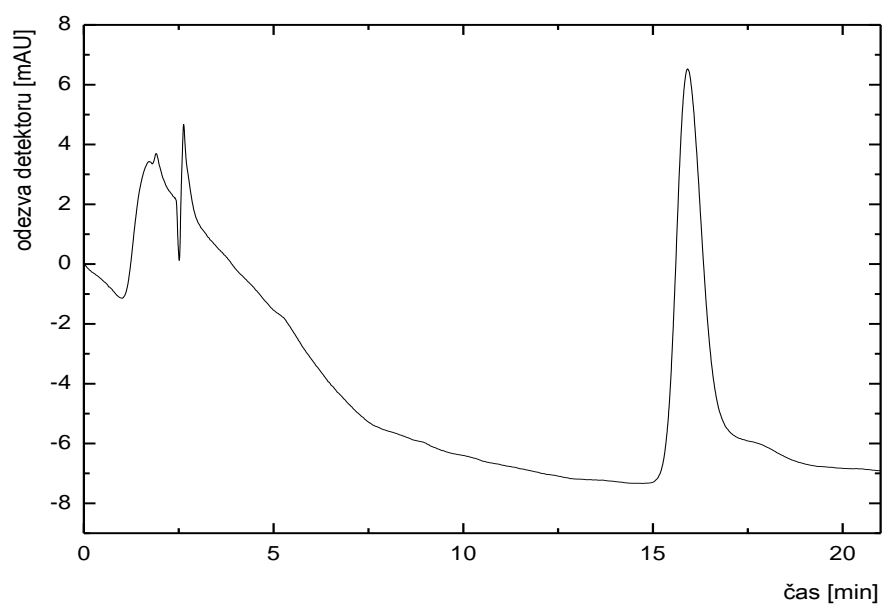
Obr. 5: Chromatogram analýzy standardu diflubenzuronu. Mobilní fáze: ACN-H₂O 70/30 (v/v), průtok MF: 0,7 ml/min. UV detekce při 256 nm.

Hodnota asymetrie je nejnižší při použití mobilní fáze methanol-0,01M octan amonný, při použití této mobilní fáze by tedy kvantifikace byla přesnější. Vzhledem k nižší účinnosti separace ale tato mobilní fáze nebyla považována za vhodnější než mobilní fáze acetonitril-voda. Ukázka separace při složení MF methanol-0,01M octan amonný 75/25 (v/v) je na obrázku 6.

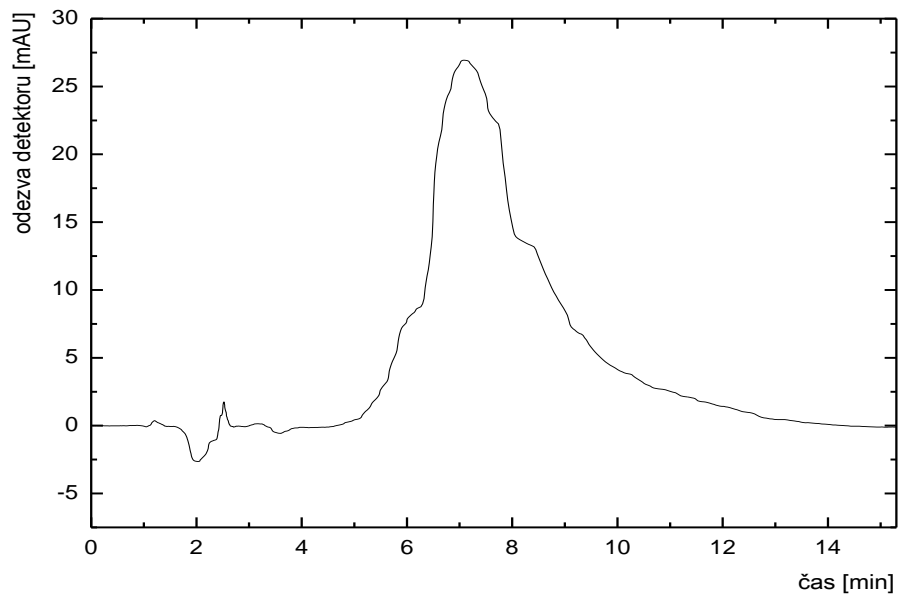


Obr. 6: Chromatogram analýzy standardu diflubenzuronu. Mobilní fáze MeOH-CH₃COONH₄ 75/25 (v/v), průtok MF: 0,7 ml/min. UV detekce při 256 nm.

Mobilní fáze o složení methanol-voda se vyznačovala nižší účinností a podobnou asymetrií jako mobilní fáze acetonitril-voda. Díky nižší eluční síle methanolu byla retence diflubenzuronu, a tedy i čas analýzy, vyšší. Nevýhodou této mobilní fáze jsou vyšší tlaky na koloně (kolem 160 bar). Přítomnost 0,1% triethylaminu v mobilní fázi MeOH-voda nenaplnila očekávání ohledně vyšší účinnosti a nižší asymetrie. Vyšší, nebo nižší přídavek triethylaminu by mohl parametry analýzy zlepšit, ale problémem byl vysoký tlak na koloně. Při průtoku 0,7 ml/min se blížil 200 bar, proto musel být průtok snížen na 0,6 ml/min. Chromatogramy analýz diflubenzuronu s mobilní fází methanol-voda s přídavkem a bez přídavku triethylaminu jsou uvedeny na obrázcích 7 a 8.



Obr. 7: Chromatogram analýzy standardu diflubenzuronu. Mobilní fáze MeOH-voda 70/30 (v/v), průtok MF: 0,7 ml/min. UV detekce při 256 nm.

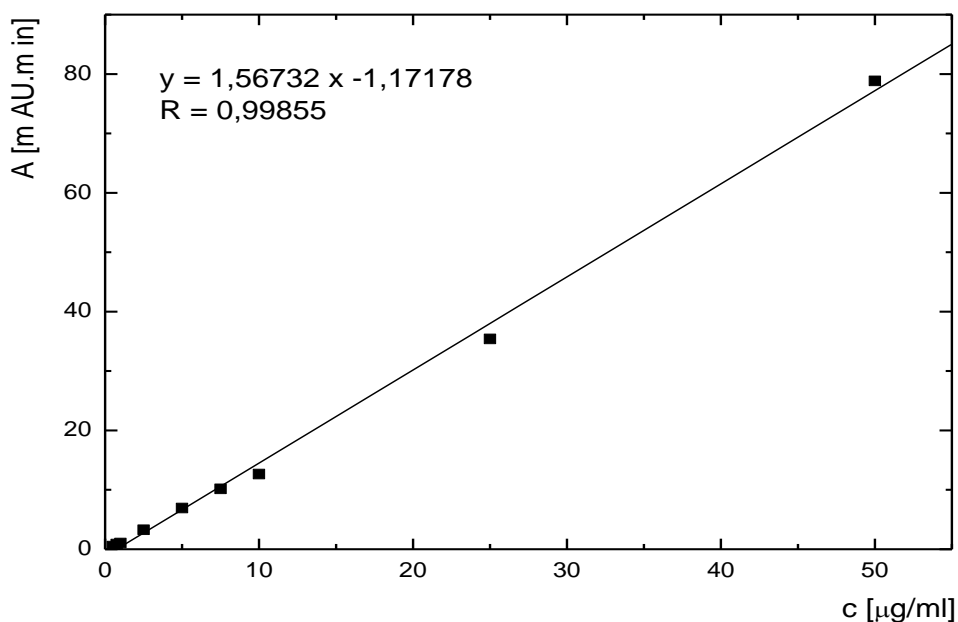


Obr. 8: Chromatogram analýzy standardu diflubenzuronu. Mobilní fáze MeOH-voda s 0,1% TEA 75/25 (v/v), průtok MF: 0,6 ml/min. UV detekce při 256 nm.

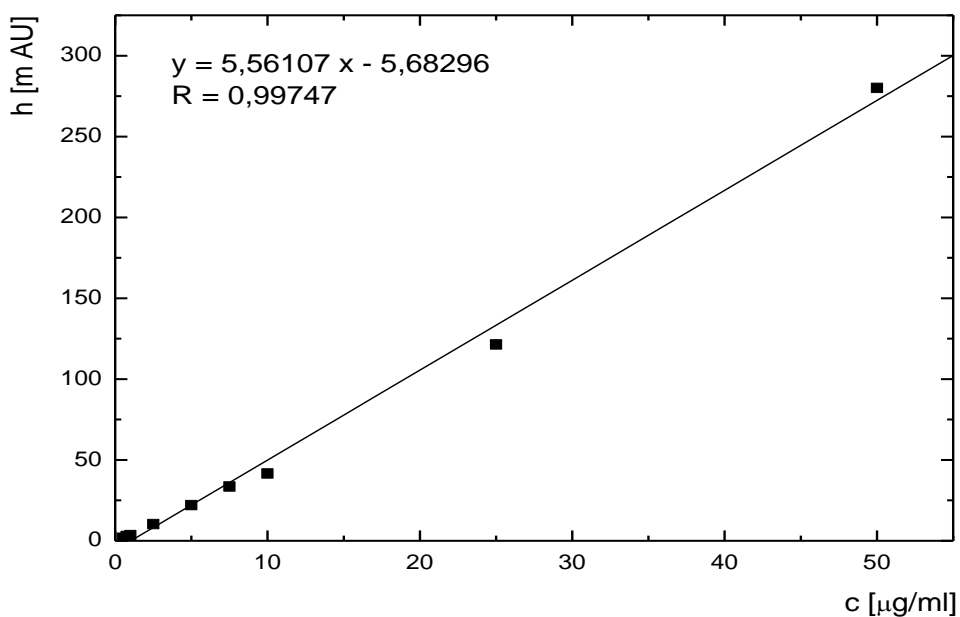
4.2 Kalibrační závislost, statistické zpracování výsledků

Ze zásobního roztoku standardu diflubenzuronu byly ředěním připraveny roztoky o koncentracích 0,5, 0,75, 1, 2,5, 5, 7,5 10, 25 a 50 $\mu\text{g/ml}$. Každá koncentrace byla proměřena pětkrát za použití vybrané mobilní fáze acetonitril-voda 70/30 (v/v) s průtokem 0,7 ml/min a výsledky byly statisticky zpracovány.

Na obrázku 9 je uvedena kalibrační závislost ploch píků na koncentraci diflubenzuronu, na obrázku 10 je uvedena kalibrační závislost výšek píků na koncentraci diflubenzuronu. Výsledky regresní analýzy jsou uvedeny v rámci obrázků.



Obr. 9: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci diflubenzuronu při použití mobilní fáze ACN-H₂O 70/30 (v/v) s průtokem 0,7 ml/min.



Obr. 10: Kalibrační závislost výšky píku na koncentraci diflubenzuronu při použití mobilní fáze ACN-H₂O 70/30 (v/v) s průtokem 0,7 ml/min.

Statistické zpracování naměřených hodnot

Mezi statisticky zpracovaná data patří plochy a výšky píků (pro $n = 5$). Byly sledovány medián, směrodatná odchylka (tabelovaná hodnota k_5 je rovna 0,4299), relativní směrodatná odchylka, interval spolehlivosti (tabelovaná hodnota K_5 je rovna 0,51). Vypočtené údaje pro plochy píků jsou uvedeny v tabulce 7, údaje pro výšky píků v tabulce 8.

Tab. 7: Statistické zpracování naměřených ploch píků.

\tilde{A} - medián plochy píku, s_r - směrodatná odchylka, RSD - relativní směrodatná odchylka, $L_{1,2}$ - interval spolehlivosti.

| c [$\mu\text{g/ml}$] | \tilde{A} [mAU.min] | s_r [mAU.min] | RSD [%] | $L_{1,2}$ [$\mu\text{g/ml}$] |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------|------------|-----------------------------------|
| 0,5 | 0,5465 | 0,0609 | 11,14 | 0,1340 |
| 0,75 | 0,8334 | 0,1322 | 15,86 | 0,2909 |
| 1,0 | 1,0227 | 0,0411 | 4,02 | 0,0904 |
| 2,5 | 3,2742 | 0,2049 | 6,26 | 0,4509 |
| 5 | 7,0554 | 0,2025 | 2,87 | 0,4456 |
| 7,5 | 10,0960 | 0,3024 | 3,00 | 0,6654 |
| 10 | 12,8368 | 0,3769 | 2,94 | 0,8293 |
| 25 | 35,4779 | 0,4352 | 1,23 | 0,9576 |
| 50 | 76,3062 | 0,7103 | 0,93 | 0,8423 |

Tab. 8: Statistické zpracování naměřených výšek píků.

\tilde{h} - medián výšky píku, s_r - směrodatná odchylka, RSD - relativní směrodatná odchylka, $L_{1,2}$ - interval spolehlivosti.

| c [$\mu\text{g/ml}$] | \tilde{h} [mAU] | s_r [mAU] | RSD [%] | $L_{1,2}$ [$\mu\text{g/ml}$] |
|-----------------------------|----------------------|----------------|------------|-----------------------------------|
| 0,5 | 1,980 | 0,116 | 5,86 | 0,2552 |
| 0,75 | 2,958 | 0,228 | 7,71 | 0,5017 |
| 1 | 3,552 | 0,070 | 1,97 | 0,1540 |
| 2,5 | 10,241 | 0,188 | 1,84 | 0,4137 |
| 5 | 22,258 | 0,462 | 2,07 | 1,0166 |
| 7,5 | 33,440 | 0,618 | 1,85 | 1,3599 |
| 10 | 42,360 | 1,812 | 4,28 | 3,9871 |
| 25 | 123,668 | 3,638 | 2,94 | 8,0051 |
| 50 | 275,957 | 9,564 | 3,47 | 21,0447 |

Z dat shrnutých v tabulce 7 je patrné, že se stoupající koncentrací diflubenzuronu klesala relativní směrodatná odchylka naměřených ploch píků, výsledky tedy byly přesnější. Z tabulky 8 plynou obdobné závěry ohledně přesnosti stanovení - relativní směrodatná odchylka výšek píků byla také nejvyšší pro nízké koncentrace diflubenzuronu.

Určení limitu detekce a kvantifikace

Limit detekce a limit kvantifikace byly vypočteny pomocí rov. 11 a rov. 12. Pro výpočet byla použita směrnice kalibrační závislosti výšky píku na koncentraci analytu získaná regresní analýzou. Šum základní linie chromatogramu byl určen jako 0,025 mAU.

Vypočtená hodnota limitu detekce je 0,01 $\mu\text{g/ml}$, pro limit kvantifikace byla vypočtena hodnota 0,04 $\mu\text{g/ml}$.

Z literatury je patrné, že tyto hodnoty se blíží údajům ze studií, jež se zabývaly stanovením diflubenzuronu ve vodě s UV detekcí³⁹ či fotochemickou detekcí⁴⁰. Analýza s hmotnostní detekcí⁴⁵ má limity nižší.

5 Závěr

Analýza diflubenzuronu byla provedena v RP-HPLC systému s UV detekcí. Byly vyzkoušeny čtyři mobilní fáze s různým objemovým zastoupením jednotlivých složek: acetonitril-voda, methanol-voda, methanol-voda s 0,1% obsahem triethylaminu a methanol-0,01M octan amonný. Pro UV detekci byla po proměření spektra diflubenzuronu vybrána vlnová délka 256 nm.

Píky diflubenzuronu při analýzách s použitím mobilní fáze methanol-0,01 M octan amonný se vyznačovaly dobrou symetrií, nevýhodou byla nižší účinnost a vyšší tlak na koloně. Použití mobilní fáze methanol-voda vedlo k nesymetrickým píkům a jen o málo lepší účinnosti. Ta nebyla zvýšena ani přidávkem triethylaminu. Přídavek triethylaminu nebyl dále upravován vzhledem k příliš vysokému tlaku na koloně. Nejlepší výsledky poskytla mobilní fáze acetonitril-voda. Účinnost separace zde rostla se snižujícím se obsahem acetonitrilu. Jako optimální bylo vybráno složení mobilní fáze acetonitril-voda 70/30 (v/v). Objemové zastoupení 60/40 poskytující vyšší účinnost nebylo zvoleno kvůli vyšší asymetrii píku a vysoké retenci.

V optimálních podmínkách (tedy mobilní fáze acetonitril-voda 70/30 (v/v), průtok 0,7 ml/min) byly proměřeny kalibrační závislosti ploch a výšek píků na koncentraci diflubenzuronu. Každé měření bylo provedeno pětkrát a naměřené plochy a výšky píků byly statisticky zpracovány. Byla zjišťována směrodatná odchylka, relativní směrodatná odchylka a interval spolehlivosti, dále byl určen limit detekce a limit kvantifikace.

Největší rozptyl výsledků, a tedy nejnižší přesnost, byl zaznamenán u nižších koncentrací. Zde relativní směrodatná odchylka dosahovala až 15 %. U vyšších koncentrací se relativní směrodatná odchylka pohybovala kolem 3 %. Relativní směrodatné odchylky byly nižší u kalibrační závislosti výšky píku na koncentraci diflubenzuronu.

Vypočtená hodnota limitu detekce byla 0,01 $\mu\text{g/ml}$ a pro limit kvantifikace byla vypočtena hodnota 0,04 $\mu\text{g/ml}$. Tyto hodnoty korespondují s údaji v literatuře.

Použitá literatura

1. Morgan D. R. (ed.): *Pesticides, chemicals and health*. Sevenoaks, Edward Arnold 1992
2. Cohen E.: *Pest Manag. Sci.* 57, 946 (2001)
3. Elliott J. E., Wilson L. K., Langelier K. M., Mineau P., Sinclair P. H.: *Ecotoxicology* 6, 219 (1997)
4. Kruger K., Schumann R. D.: *J. Appl. Entomol.* 115, 526 (1993)
5. IRAC International MoA Working group: *IRAC MoA Classification Scheme*. Dostupné z URL: <www.ircac-online.org/wp-content/uploads/MoA-Classification.pdf> [cit. 18.3.2012]
6. Hurst P., Hay A., Dudley N.: *The Pesticide Handbook*. London, Journeyman Press 1991
7. WHO: *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009*. Geneva, WHO 2010
8. Clasen B., Loro V. L., Carraneo R.: *Ecotox. Environ. Safe.* 77, 45 (2012)
9. Zhang A. P., Xie X. M., Ye J., Lin C. M., Hu X. Y.: *Environ. Chem. Lett.* 9, 369 (2011)
10. Schneider Ch. W., Tautz J., Gruenewald B., Fuchs S.: *PloS ONE* 7. Dostupné z URL: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0030023>> [cit. 16.4.2012]
11. Amir O. G., Peveling R.: *J. Appl. Entomol.* 128, 242 (2004)
12. Weaver N.: *J. Econ. Entomol.* 42, 973 (1949)
13. Durand R., Bouvresse S., Berdjane Z.: *Clin. Microbiol. Infec.* 18, 338 (2012)
14. Stenersen J.: *Chemical Pesticides, Mode of Action and Toxicology*. Boca Raton, CRC Press 2004
15. Gatidou G., Iatrou E.: *Environ. Sci. Pollut. R.* 18, 949 (2011)
16. WHO: *Diflubenzuron, Health and Safety Guide*. Geneva, WHO 1995

17. Van Leeuwen T., Demaeght P., Osborne E. J., Dermauw W., Gohlke S., Nauen R., Grbic M., Tirry L., Merzendorfer H., Clark R. M.: *P. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 4407 (2012)
18. Merzendorfer H., Kim H. S., Chaudhari S. S., Kumari M., Specht C. A., Butcher S., Brown S. J., Manak J. R., Beeman R. W., Kramer K. J., Muthukrishnan S.: *Insect Biochem. Molec.* 42, 264 (2012)
19. Bezpečnostní list Dimilin[®] 48 SC, Chemtura. Dostupné z URL:
<http://www.chemturaagrosolutions.com/deployedfiles/ChemturaAgrosolutions/CAS_Czech%20Republic-cz-CZ/BU%20Documents/Material%20Safety%20Data%20Sheets/files/MSDS%20Dimilin%2048%20SC%20cz.pdf> [cit. 22.3.2012]
20. Bezpečnostní list Dimilin[®] 25 WP, Chemtura. Dostupné z URL:
<<http://www.chemturaagrosolutions.com/deployedfiles/Business%20Units/Crop%20Protection-cs-CZ/Document%20Downloads/Material%20Safety%20Data%20Sheets/MSDS%20Dimilin%2025%20WP%20cz.pdf>> [cit. 22.3.2012]
21. Bezpečnostní list Dimilin[®] GR2, Chemtura. Dostupné z URL:
<<http://www.chemturaagrosolutions.com/deployedfiles/Business%20Units/Crop%20Protection-cs-CZ/Document%20Downloads/Material%20Safety%20Data%20Sheets/MSDS%20Dimilin%20GR2%20cz.pdf>> [cit. 22.3.2012]
22. Bezpečnostní list Dimilin TB2, Chemtura. Dostupné z URL:
<http://www.chemturaagrosolutions.com/deployedfiles/ChemturaAgrosolutions/CAS_CzechRepublic-cs-CZ/BU%20Documents/Material%20Safety%20Data%20Sheets/files/MSDS%20Dimilin%20TB2%20cz.pdf> [cit. 22.3.2012]
23. Grosscurt A. C., Pels T.: *Acta Hortic.*, 300 (1995)
24. Nejmanová J., Cvačka J., Hrdý I., Kuldová J., Mertelík J., Muck A., Nešněrová P., Svatoš A.: *Pest. Manag. Sci.* 62, 274 (2006)
25. Villavaso E. J., Haynes J. W., McGovern W. L., Jones R. G., Smith J. W.: *J. Econ. Entomol.* 88, 1631 (1995)
26. Silva G. A., Picanco M. C., Bacci L., Crespo A. L. B., Rosado J. F., Guedes R. N. C.: *Pest. Manag. Sci.* 67, 913 (2011)
27. Seccacini E., Lucia A., Harburguer L., Zerba E., Licastro S., Masuh H.: *J. Am. Mosquito Contr.* 24, 398 (2008)
28. Kristensen M., Spencer A. G., Jespersen J. B.: *Pest Manag. Sci.* 57, 82 (2001)

29. Henderson G., Foil L. D.: *J. Med. Entomol.* 30, 619 (1993)
30. Marsella A. M., Jaskolka M., Mabury S. A.: *Pest Manag. Sci.* 56, 789 (2000)
31. Metcalf R. L., Po-Yung L., Bowlus S.: *J. Agric. Food Chem.* 23, 359 (1975)
32. Ivie G. W., Bull D. L., Veech J. A.: *J. Agric. Food Chem.* 28, 330 (1980)
33. Mabury S. A., Crosby D. G.: *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 1908 (1996)
34. Bull D. L., Ivie G. W.: *J. Agric. Food Chem.* 26, 515 (1978)
35. Ivie G. W.: *J. Agric. Food Chem.* 26, 81 (1978)
36. Opdycke J. C., Miller R. W., Menzer R. E.: *J. Agric. Food Chem.* 30, 1224 (1982)
37. Nimmo W. B., Willems A. G. M., Joustra K. D., Verloop A.: *Pest. Sci.* 17, 403 (1986)
38. Nimmo W. B., Willems A. G. M., Joustra K. D.: *Pest. Sci.* 29, 39 (1990)
39. Ferrer I., Pichon V., Hennion M.-C., Barcelo D.: *J. Chromatogr. A* 777, 91 (1997)
40. García M. D. G., Galera M. M., Martínez D. B., Gallego J. G.: *J. Chromatogr. A* 1103, 271 (2006)
41. Balinova A.: *J. Chromatogr. A* 823, 11 (1998)
42. Miliadis G. E., Tsiropoulos N. G., Aplada-Sarlis P.G.: *J. Chromatogr. A* 835, 113 (1999)
43. Bicchi C., Balbo C., Binello A., DAmato A.: *J. High Resol. Chromatogr.* 19, 105 (1996)
44. Valenzuela A. I., Lorenzini R., Redondo M. J., Font G.: *J. Chromatogr. A* 839, 101 (1999)
45. Martínez D. B., Galera M. M., Vásquez P. P., García M. D. G.: *Chromatographia* 66, 533 (2007)
46. Barnes K. A., Startin J. R., Thorpe S. A., Reynolds S. L., Fussell R. J.: *J. Chromatogr. A* 712, 85 (1995)
47. García M. D. G., Galera M. M., Martínez D. B., Valverde R. S.: *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1973 (2007)
48. Mensah J. K., Lundanes E., Greibrokk T., Holen B.: *J. Chromatogr. A* 765, 85 (1997)
49. Wimmer M., Smith R. R.: *J. Agric. Food Chem.* 39, 280 (1991)

50. Hammock B. D., Mumma R. O.: Potential of Immunochemical Technology for Pesticide Analysis. In: *Recent Advances in Pesticide Analytical Methodology*. Harvey J., Zweig G., Cannizaro R., Dishburger H., Sherma J. (eds.). Washington DC: American Chemical Society, 1980, p. 321-352
51. Wie S. I., Hammock B. D.: *J. Agric. Food Chem.* 30, 949 (1982)
52. Wang S., Allan R. D., Skeritt J. H., Kennedy I. R.: *J. Agric. Food Chem.* 46, 3330 (1998)
53. Wang S., Allan R. D., Skeritt J. H., Kennedy I. R.: *J. Agric. Food Chem.* 47, 3416 (1999)
54. Wang S., Hill A. S., Kennedy I. R.: *Analytica Chimica Acta* 468, 209 (2002)
55. *Základní praktika z analytické chemie*. Skriptum Univerzity Karlovy v Praze, Katedra analytické chemie, 2004. Dostupné z URL:
<web.natur.cuni.cz/analchem/zprakt/navody.pdf> [cit. 4.5.2012]
56. *Statistické zpracování výsledků*. Návod k pokročilému praktiku, Katedra analytické chemie UK. Dostupné z URL:
<web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/navody/statistika.pdf> [cit. 4.5.2012]