

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Zavedení metody na stanovení vybraných triazinových  
pesticidů ve vodě metodou GC-MS/MS**

Bakalářská práce

**Jan Opekar**

Vedoucí práce: Ing. David Kahoun, Ph.D.

České Budějovice 2015

Opekar, J., 2015: Zavedení metody na stanovení vybraných triazinových pesticidů ve vodě metodou GC-MS/MS [Establishment of method for determination of selected triazine pesticides in water using GC-MS/MS. Bc. Thesis, in Czech] - 33 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## **Anotace**

This bachelor thesis deals with the determination of triazine pesticides in water using GC-MS/MS. Firstly, the development and optimisation of an analytical method was performed. The following parameters of the analytical method were chosen for optimization: carrier gas flow rate, temperature gradient, selection of SRM transitions and collision energy of SRM transitions. Then, several extraction parameters such as SPE column drying time, selection of elution solvent, sample pH and sample volume were optimised. Finally, the method was successfully validated and applied to the analysis of a real tap water sample.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 24. 4. 2015

.....  
Jan Opekar

# OBSAH

1	TEORETICKÁ ČÁST .....	1
1.1	Triazinové pesticidy.....	1
1.1.1	Atrazin .....	2
1.1.2	Simazin .....	3
1.1.3	Propazin .....	4
1.1.4	Terbutylazin.....	5
1.2	Analytické metody pro stanovení triazinů .....	6
1.2.1	Plynová chromatografie.....	6
1.2.2	Hmotnostní spektrometrie .....	7
1.3	Extrakce na tuhou fázi .....	9
1.3.1	Sorbenty pro stanovení triazinů.....	9
1.4	Porovnání analytických metod na stanovení triazinů .....	11
2	MATERIÁL A METODY.....	12
2.1	Použité chemikálie a činidla .....	12
2.2	Instrumentální vybavení a spotřební materiál .....	12
2.3	Příprava roztoků standardů .....	13
2.3.1	Příprava zásobních roztoků .....	13
2.3.2	Příprava pracovních roztoků.....	13
2.3.3	Příprava kalibračních roztoků.....	14
2.3.4	Příprava SPE kolonek a spikovaných vzorků vody.....	14
3	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	15
3.1	Optimalizace chromatografické separace .....	15
3.1.1	Testovací analýza .....	15
3.1.2	Optimalizace průtoku nosného plynu .....	16
3.1.3	Optimalizace teplotního gradientu .....	17
3.2	Optimalizace hmotnostní detekce.....	18
3.2.1	Volba SRM přechodů .....	18
3.2.2	Optimalizace kolizní energie SRM přechodů.....	18
3.3	Optimalizace extrakce .....	20
3.3.1	Optimalizace doby sušení SPE kolonky.....	20
3.3.2	Volba vhodného elučního rozpouštědla a jeho objemu.....	21
3.3.3	Optimalizace pH vzorku.....	22
3.3.4	Optimalizace objemu vzorku.....	23

3.4	Validace metody .....	24
3.4.1	Linearita.....	24
3.4.2	Správnost a přesnost .....	25
3.4.3	Rozsah .....	27
3.4.4	Mez detekce a mez stanovitelnosti .....	27
3.5	Testování metody na reálném vzorku vody.....	28
4	ZÁVĚR.....	29
5	REFERENCE .....	30
6	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	32
7	PŘÍLOHY .....	33

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Triazinové pesticidy

Pesticidy jsou anorganické či organické sloučeniny, které slouží k potlačení rostlinných a živočišných škůdců ohrožující zemědělské plodiny, zásoby potravin, různé průmyslové materiály nebo člověka samotného (1).

Z negativních vlivů pesticidů je velmi důležitá otázka ohledně jejich schopnosti přetrvávat v životním prostředí, takzvaná perzistence. Rychlost degradace látek v přírodě závisí na velkém množství faktorů, zejména na teplotě, pH či biologické aktivitě. Pokud se do půdního systému dostávají tytéž látky dlouhodobě, zvyšuje se schopnost půdy je rozkládat. V případě, že dojde k expozici vysokými dávkami pesticidu, může naopak biologická aktivita poklesnout a degradace se tím může potlačit, či dokonce dlouhodobě zastavit. Taková situace nastává při bodovém znečištění. Mezi významné látky s vysokou perzistencí, které mají nepříznivé ekologické dopady, patří i triazinové herbicidy (2).

Triaziny mají poměrně vysokou rozpustnost ve vodě (například rozpustnost atrazinu při 20 °C je 30 mg/l) a tendenci neadsorbovat se v půdě, proto se mohou tyto kontaminanty skrze půdu dostat do spodních vod. Některé triaziny jsou ve vodě relativně stabilní, jejich rozpustnost se snižuje se zvyšujícím se pH (3).

V případě, že se tyto pesticidy dostanou do půdy, rostliny je absorbují přes kořenový systém, a tím pádem mohou být transportovány po celé rostlině. Nejzávažnějším rizikem pesticidů na bázi triazinů je velmi nízká biodegradabilita a dlouhodobé přetrvávání ve vodním prostředí, případně možnost vzniku nitrosaminů (2).

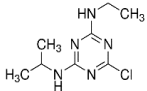
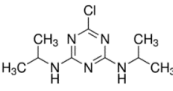
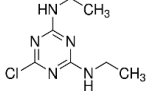
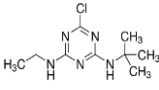
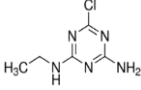
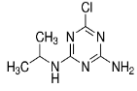
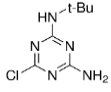
Triaziny mají relativně nízkou akutní toxicitu pro savce. Například atrazin a simazin vykazují při testování na krysách hodnotu LD50 3000 mg/kg. Hodnoty LD50 v rozmezí 182–334 mg/kg u krys indikují, že jde o mírně toxické látky. Mezi typické symptomy akutní otravy lze uvést například podráždění kůže a očí, zvracení, průjmy či svalová slabost (2).

Triaziny jsou látky zasahující do metabolismu pyrimidinových bází, které jsou součástí nukleových kyselin. Mechanismus jejich účinku spočívá v inhibici fotosyntézy. Většina z nich přerušuje fotosystém II, kdy se chlorofyl využívá k přeměně krátkých vlnových délek světla na energii. Bez této fáze fotosyntézy nejsou rostliny schopné produkovat potřebnou energii pro svůj růst (3).

V některých zemích je používání triazinových herbicidů zakázáno, případně se značně omezuje. Na základě rozhodnutí Evropské komise 2004/247/EC; 2004/248/EC platí zákaz distribuce a užívání atrazinu a simazinu v rámci Evropské unie od 1. srpna 2005 (4).

Stručné informace o analytech, na které je tato práce zaměřena, jsou uvedeny v Tab. I. Jde o triaziny a jejich degradační produkty, které se stanovují, jelikož jsou častými kontaminanty podzemních vod a dalších vodních zdrojů.

Tab. I: Přehled studovaných analytů.

Název analytu	Používaná zkratka	Strukturní vzorec	Mr [g/mol]	Číslo CAS
Atrazin	ATR		215,7	1912-24-9
Propazin	PRO		229,7	139-40-2
Simazin	SIM		201,7	122-34-9
Terbuthylazin	TBA		229,7	5915-41-3
Desisopropylatrazin	DIA		173,6	1007-28-9
Desethylatrazin	DEA		187,6	6190-65-4
Desethylterbuthylazin	DET		201,7	30125-63-4

### 1.1.1 Atrazin

Atrazin patří mezi nejčastěji monitorované triazinové herbicidy. Býval aplikován samostatně nebo v kombinaci s jinými pesticidy ve formě granulátu dispergovaného ve vodě nebo v podobě suspenzního koncentrátu. Atrazin sloužil jako pesticid účinný na dvouděložné plevely. Používal se v zemědělství, v lesnictví i ve vodních ekosystémech. Má relativně vysokou rozpustnost ve vodě a je přijímán jak kořeny, tak i listy. S výhodou se používá v sušších oblastech, jelikož nedochází k jeho vyplavování z půdy (5).

Primárním vstupem atrazinu do životního prostředí bylo jeho rozprašování na zemědělské rostliny a následný splach z polí. I když v České republice není registrován žádný přípravek s jeho obsahem, stále může docházet k sekundárním únikům z kontaminovaných míst (skládky odpadu a kontaminovaných zemín, bývalá skladiště agrochemikálií), kde může být atrazin přítomen z doby, kdy byl ještě používán (6).

Atrazin v půdě má tendenci vstupovat do rostlin, pomalu se rozkládat nebo se vyplavovat do povrchové nebo podzemní vody. Ve vodách se nachází rozpuštěný nebo sorbovaný na nerozpuštěných látkách minerální nebo organické povahy. V kyselých vodách se pomalu rozkládá hydrolýzou a N-dealkylací, v neutrálních a zásaditých vodách rozklad probíhá velmi pomalu. Atrazin se ve vzduchu může rozkládat reakcemi s chemickými látkami v ovzduší nebo se sorbovat na částičky prachu a sedimentovat. Atrazin je mírně toxický pro vodní prostředí, například pro některé řasy. Může negativně ovlivnit hormonální systém u některých obojživelníků. Atrazin nelze jednoznačně zařadit mezi perzistentní látky, nicméně poločas přeměny 2 roky v neutrálním prostředí spíše hovoří pro jeho zařazení do této skupiny (6).

K expozici atrazinem dochází v praxi pouze u pracovníků zacházejících přímo s atrazinem nebo konzumací kontaminované podzemní vody. Kontaminace potravin není až tak významná. Atrazin se však snadno vstřebává do trávicího traktu, mohou jej rychle absorbovat plíce a také neporušená kůže. Hlavní metabolickou transformaci představuje N-dealkylace a konjugace s glutathionem. Atrazin lze zařadit mezi herbicidy pro člověka málo toxické. Po akutní expozici dochází k podráždění kůže, očí, nevolnostem a zvracení. Může mimo jiné vyvolat i alergické reakce. U laboratorních zvířat působí toxicky nasvalový a nervový systém, játra, ledviny, srdce a způsobuje poruchy motoriky, koordinace a podchlazení (6).

Atrazin je bezbarvá látka s bodem tání 175–177 °C a hustotou 1,187 g/cm<sup>3</sup> při 20 °C. Jeho rozpustnost ve vodě při 20 °C je 30 mg/l (6).

### **1.1.2 Simazin**

Simazin patří mezi selektivní triazinové herbicidy. Působí přes kořenové systémy rostlin, především klíčících. Používá se tedy jako preemergentní selektivní herbicid hlavně při ošetření zeleniny, kde hubí nejrůznější druhy nežádoucího plevelu a travin. Na zelené části rostlin kontaktně nepůsobí, jelikož množství simazinu přijaté listy je bezvýznamné a není možné vyvolat herbicidní účinek. Simazin se také používá ve větším množství jako neselektivní herbicid pro plošné hubení plevelu, a to především na nezemědělské půdě. Před

rokem 1992 byl používán k hubení plevelu a řas rostoucích ve velkých akváriích, rybnících nebo i v chladicích věžích (7).

Simazin lze zařadit mezi středně perzistentní látky, v půdě přetrvává 1–5 měsíců. Herbicidní aktivita však může v půdě přetrvat ještě i rok po aplikaci. Na částice půdy se váže slabě či středně silně, schopnost adsorpce se však zvyšuje s přítomností jílových částic. I když je vázán slabě, jeho prostupnost vrstvami v zemi je limitována poměrně nízkou rozpustností, a tím se snižuje schopnost průniku do podzemních vod. Proto simazin zůstává především přibližně ve svrchních 5 cm půdy a neproniká hlouběji do oblasti kořenů rostlin. V extrémně propustných půdách, například písčitých náplavách, však může být splaven i do hlubších zón. Při vyšší hodnotě pH je nejdůležitější rozkladný proces mikrobiální degradace, při nižším pH dochází k hydrolyze. Může se také rozkládat vlivem UV záření, avšak efekt je za normálních podmínek malý. V ovzduší se může rozkládat reakcí s fotochemicky vzniklými hydroxylovými radikály (6).

Jde o bílou krystalickou látku s teplotou tání 225–227 °C a hustotou 1,318 g/cm<sup>3</sup> při 20 °C. Jeho rozpustnost ve vodě při 20 °C je 5 mg/l. Za normální teploty je stálý vůči zředěným alkáliím a minerálním kyselinám. Teprve při zvýšené teplotě nebo při vyšší koncentraci kyseliny probíhá substituce chloru za hydroxylovou skupinu (5).

### 1.1.3 Propazin

Tento herbicid je používán pro regulaci široolistého plevelu a jednoleté trávy. Je aplikován jako sprej v době sadby nebo ihned po výsadbě, avšak dříve, než vzejde plevel. Propazin je používán ve formě roztoku ve vodě (8).

Propazin není příliš silně adsorbován na půdní částice jako jiné triaziny. Ve většině půd se váže spíše slabě a v závislosti na teplotě, vlhkosti a pH půdy se může uvolnit. Jeho migrace půdním prostředím je limitován především jeho nízkou rozpustností ve vodě. Je odolný proti narušení hydrolyzou, fotolýzou nebo biodegradací. Má tendenci se vyplavovat do podzemních vod. Vyplavování propazinu je velmi pravděpodobné tam, kde jsou vysoké dešťové srážky nebo se provádí zavlažování (7).

Velká část propazinu může být rozložena půdními mikroorganismy. Některé z nich ho dokonce využívají jako zdroj energie nebo dusíku. Fotolýza a odpařování nejsou velmi významnými faktory při rozkladu propazinu. Poločas přeměny je 4–5 měsíců (8).

Propazin je absorbován kořeny rostlin. Poté dochází k transportu do vrchních částí rostliny, kde se hromadí v rostoucím výhonku a listech rostliny. Je klasifikován jako středně toxický herbicid. Mezi pracovníky, kteří vyrábí propazin, byla zaznamenána kontaktní



dermatitida. Propazin může narušovat metabolismus některých vitamínů B, konkrétně thiaminu (B1) a riboflavinu (B2) (8).

Propazin je krystalická bezbarvá pevná látka s teplotou tání 212–214 °C a hustotou 1,162 g/cm<sup>3</sup> při 20 °C. Jeho rozpustnost ve vodě je 5 mg/l při 20 °C. Je stabilní v neutrálním prostředí, v případě působení silnějších kyselin nebo zásad dochází k jeho hydrolyze. Je nehořlavý, ale teplem se může rozkládat. Termický rozklad může produkovat toxické oxidy uhlíku, dusíku a páry chloru (5).

#### **1.1.4 Terbutylazin**

Terbutylazin je herbicid, který spadá do skupiny chloro-triazinových pesticidů. V rostlinách, podobně jako u ostatních pesticidů triazinového typu, působí jako inhibitor fotosyntézy. Dostává se do rostliny přes kořeny, což zajišťuje možnost pre-emergentního i post-emergentního použití (9).

Po aplikaci na povrch rostliny většina látky setrvává na místě, v případě kontaktu s kořeny dochází k rychlé distribuci po celé rostlině. Metabolismus terbutylazinu byl prozkoumán použitím značeného <sup>14</sup>C TBA. Chemická přeměna probíhá dvěma základními procesy. Buď hydrolyzou, kdy dojde ke vzniku hydroxy-derivátu náhradou chloru v molekule nebo N-dealkylací. Rychlost přeměny je silně ovlivněna mnoha faktory jako teplota, vlhkost, mikrobiální aktivita či pH (10).

Terbutylazin je bezbarvá látka s bodem tání okolo 177–179 °C a hustotou 1,122 g/cm<sup>3</sup> při 20 °C. Jeho rozpustnost ve vodě při 20 °C je 8,5 mg/l (6).

## 1.2 Analytické metody pro stanovení triazinů

Volba vhodné separační techniky záleží na charakteru analyzovaných sloučenin. Pro stanovení triazinových herbicidů se jako velmi časté řešení, vzhledem k jejich vlastnostem, využívá plynová nebo kapalinová chromatografie. Chromatografie je separační technika, která umožňuje dělení složek obsažených ve vzorku. Vzorek se vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, mobilní fázi a nepohyblivou stacionární fázi. Stacionární fáze, též nazývána sorbent, může mít v chromatografii velmi rozdílnou formu. Může jít o částičky tuhé fáze o velikosti jednotek až stovek mikrometru, jindy se jedná o velmi tenkou vrstvu kapaliny na tuhých částicích nebo film nanesený na vnitřní straně kapiláry (11).

### 1.2.1 Plynová chromatografie

Při plynové chromatografii se k separaci složek ze vzorku využívají dvě heterogenní fáze. Mobilní fáze bývá zpravidla inertní plyn neboli nosný plyn. Jako stacionární fáze se nejčastěji používá kapalina ukotvená na inertním nosiči, méně často klasický sorbent (11).

V koloně dochází k dělení vzorku na základě rozdílné schopnosti složek zadržovat se na stacionární fázi. V průběhu separace se v koloně neustále vytváří a porušuje fázová rovnováha mezi mobilní a stacionární fází. Separovaná složka má při ustanovení rovnováhy určitou koncentraci ve stacionární fázi a v mobilní fázi. Poměr mezi těmito koncentracemi se nazývá distribuční konstanta. Tento parametr charakterizuje distribuci, tedy rozdělení, složky mezi obě fáze. Čím je hodnota distribuční konstanty vyšší, tím je složka více vázána stacionární fází a to má za důsledek delší zadržování v koloně. K efektivnímu oddělení dvou složek je nutné, aby byl dostatečně velký rozdíl mezi jejich distribučními konstantami. Jednotlivé složky opouštějící kolonu jsou poté detekovány v detektoru. Signál z detektoru je v závislosti na čase zaznamenáván ve formě chromatogramu. Z něho jsou následně vyhodnoceny kvalitativní a kvantitativní údaje o analyzovaných složkách ze vzorku (12).

Praktická měření je možné provádět několika základními pracovními technikami. Ty se liší v postupu, kterým je transportována analyzovaná směs kolonou. Jedna z nejvýznamnějších chromatografických technik je eluční metoda. Tato metoda je založena na vymývání inertním nosným plynem. Při tomto způsobu je analyzovaný vzorek jednorázově dávkován do proudu nosného plynu, těsně před samotným vstupem na kolonu. Složky opouštějí chromatografickou kolonu v čase, který je za daných experimentálních podmínek pro jednotlivé složky charakteristický, což je možné využít k jejich identifikaci. Výsledkem je chromatogram, který je tvořen sérií elučních píků. Kvantitativní zastoupení složek ve směsi lze získat vyhodnocením ploch píků pod křivkou (13).

Jednoduché upořádání, účinné oddělení jednotlivých složek, možnost dávkovat rychle za sebou malá množství vzorku, přehledný chromatografický záznam, který lze dobře zpracovat pro účely kvalitativní i kvantitativní analýzy, to vše patří mezi výhody eluční chromatografie. Tato technika prováděná za stálých podmínek, tedy teploty a tlaku, je velmi úspěšná jen v těch případech, kdy se složky analyzované směsi svými fyzikálními charakteristikami navzájem příliš neliší. Pokud se analyzuje za těchto podmínek směs látek výrazně rozdílnými vlastnostmi, jednotlivé složky opouštějí kolonu s velkými časovými prodlevami a jejich zóny jsou výrazně rozšířené. U složek zastoupených ve velmi malých koncentracích může dojít až ke splynutí píku se základní linií chromatogramu. Obojí vede k vážným chybám při vyhodnocování naměřených dat. Pro analýzu směsí uvedeného typu byla navržena speciální pracovní technika, jejíž cílem bylo zvýšit účinnost separace a rychlost analýzy. Technika, při které se během analýzy diskontinuálně nebo kontinuálně mění teplota, případně průtok, se označuje jako programovaná, respektive gradientová, plynová chromatografie. Se změnou teploty se mění sorpční vlastnosti stacionární fáze, a tím i hodnota distribuční konstanty (13).

### 1.2.2 Hmotnostní spektrometrie

Při stanovení triazinových pesticidů je plynová chromatografie často kombinovaná s hmotnostní spektrometrií. Jde o separační techniku založenou na interakci iontu s elektrickým a/nebo magnetickým polem. Poskytuje jak kvalitativní, tak i kvantitativní informace ohledně analyzované látky. Základní princip hmotnostní spektrometrie spočívá v tvorbě iontů z neutrálních prvků nebo molekul v iontovém zdroji, které se následně štěpí na fragmentové ionty, radikály a neutrální částice. Nabité částice jsou separovány v analyzátoru na základě poměru hmotnosti a náboje a poté zaznamenávány detektorem. Částice bez náboje zpravidla nejsou zaznamenávány, jelikož nepodléhají působení elektrického a magnetického pole. Výstupem je hmotnostní spektrum, které vyobrazuje závislost intenzity naměřeného signálu na poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) (14).

Ionizací molekuly složky pomocí elektronové ionizace dochází obvykle ke vzniku molekulárního radikalkationtu o jednotkovém náboji dle následující reakce:

$$M + e^- \rightarrow M^{+} + 2 e^-$$

Hmotnostní spektrometr se skládá z následujících základních částí: iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru, detektoru se zesilovačem, záznamového zařízení a vakuového systému (11).

V *Iontovém zdroji* vznikají z molekul vzorku nevratným odštěpením valenčních elektronů ionty. Nejběžnějším způsobem provedení je elektronová ionizace. Molekulový

iont se může rozpadat na fragmentové ionty a elektroneutrální částice. Úroveň fragmentace závisí jak na charakteru ionizované látky, tak i na použité energii ionizujících elektronů. Mezi hlavní výhody elektronové ionizace patří vysoká citlivost a možnost určit strukturu látky ze vzniklých fragmentových iontů pomocí knihovních spekter nebo na základě použití pravidel pro interpretaci EI spekter (11).

*Hmotnostní analyzátor* slouží k dělení generovaných iontů podle poměru  $m/z$ , kde  $m$  je hmotnost iontu a  $z$  je celkový náboj, který iont nese. Většina iontů má jednotkový náboj, proto se často říká, že v analyzátoch jsou ionty rozděleny na základě své molekulové hmotnosti. V GC/MS je běžně používán kvadrupólový analyzátor, skládá se ze čtyř rovnoběžných tyčových elektrod. Na každou z nich je přiváděna stejnosměrná složka napětí a složka radiofrekvenčního pole. Nastavení těchto parametrů lze v průběhu analýzy libovolně měnit a detektor tak může detekovat buď konkrétní vybrané ionty o různých hodnotách  $m/z$  nebo ionty v určitém zvoleném rozsahu  $m/z$  (12).

Další základní částí hmotnostního spektrometru je *iontový detektor se zesilovačem*, který slouží k zaznamenávání dopadajících iontů. Zde dochází k převodu proudu dopadajících iontů na proud elektronů. K detekci iontů se nejčastěji používá detektor s konverzní dynodou a fotonásobičem, který mění v konverzní elektrodě náraz iontu na vyražený elektron. Ten dopadá na fosforescenční stínítko, kde dojde k vyražení fotonu, který poté projde fotonásobičem (12).

Mezi hlavní přednosti techniky GC-MS patří spojení účinné separační techniky plynové chromatografie s identifikačními možnostmi hmotnostní spektrometrie. Při analýze vzorku technikou GC-MS se získají dva druhy záznamů: chromatogram a hmotnostní spektrum.

*Chromatogram* je záznam, který zobrazuje závislost odezvy detektoru na retenčním čase, tedy době, kterou látka setrvává v koloně od jejího nástřiku až po zaznamenání maxima píku detektorem. Lze z něho získat jak kvalitativní, tak kvantitativní informace o vzorku. Velikost plochy pod píkem je úměrná množství, respektive koncentraci látky ve vzorku (14).

*Hmotnostní spektrum* představuje závislost relativní intenzity iontového proudu na podílu  $m/z$ , intenzita je vztahována k fragmentu s nejvyšší hodnotou iontového proudu. Molekulární pík, který zpravidla odpovídá nejvyššímu poměru  $m/z$ , poskytuje informaci o molekulové hmotnosti sloučeniny. Základní pík je nejvyšší a je mu přiřazena 100 % intenzita. Při kvantitativním stanovení bývá využíváno metody absolutní kalibrace, vnitřního standardu nebo standardního přídatku (14).

## 1.3 Extrakce na tuhou fázi

Extrakce je separační proces, při kterém jsou v kontaktu dvě navzájem nemísitelné fáze, mezi které se distribuují analyty na základě jejich rozdělovacích koeficientů. Rozdělovací koeficient je definován jako poměr rovnovážných koncentrací rozpuštěné látky ve dvoufázovém systému. Přechod částice z jedné fáze do druhé je způsoben interakcí molekul extrakčního rozpouštědla s molekulami ve vzorku. Cílem extrakce je selektivní oddělení analytu od ostatních složek a jeho následné zakoncentrování (15).

Extrakce na tuhou fázi (SPE) je jednostupňová metoda, při které se analyt sorbuje na pevnou fázi, do níž přechází z plynné nebo kapalné fáze. Interakce analytu s tuhou fází musí být silnější než s fází kapalnou, ve které je rozpuštěn. Analyty se selektivně zadržují na sorbentu, který je umístěn ve formě sloupce nebo membrány v krátké kolonce (16).

Extrakce na tuhou fázi je vysoce efektivní metoda, která je v dnešní době využívána velmi frekventovaně. Používá se v široké škále stanovení, ať už jde o analýzy životního prostředí, farmaceutické či biochemické analýzy, ale i v organické chemii a v potravinářství. Výhody oproti klasické extrakci metodou kapalina–kapalina je nízká spotřeba rozpouštědla, úspora času a případná automatizace. Tato metoda umožňuje použití velkého množství různých sorbentů pro polární, hydrofóbní a iontové interakce. Hlavním účelem SPE je odstranění rušivých složek z matrice, selektivní zakoncentrování a izolace analytu. Zakoncentrováním se mohou významně snížit detekční limity, což je významný aspekt při stopové analýze (17).

V současné době lze SPE použít ve čtyřech základních modifikacích. *Selektivní extrakce* je záchyt pouze analytu, ostatní složky matrice prochází sorbentem bez zadržení, následuje eluce zachycených analytů. Při *selektivní eluci* dojde k záchytu analytu i ostatních složek matrice v sorbentu, eluuje se však pouze analyt. *Selektivní promývání* představuje zachycení analytu i ostatních složek matrice, poté jsou vymývány interferující složky, nakonec se provede eluce analytu. Při *odstranění matrice* jsou zachyceny interferující látky, analyt prochází bez zádrže (18).

### 1.3.1 Sorbenty pro stanovení triazinů

Před samotným výběrem vhodného sorbentu je nezbytné si nejprve zjistit co nejvíce informací o vzorku, uvážit vlastnosti matrice a analytu, a na základě toho poté zvolit vhodný typ tuhé fáze. Povaha analytu, tedy jeho polarita, funkční skupiny, povaha matrice, očekávaná koncentrace analytu, to vše jsou priority, které je třeba sledovat při výběru vhodného sorbentu. Triazinové pesticidy jsou spíše nepolární organické látky, proto se

používají SPE kolonky s nepolární fází. Nejlepšího zachycení analytu lze dosáhnout, když má zvolená pevná fáze podobnou polaritu jako analyt. Nejběžněji používané jsou C18 sorbenty, což je polymerně vázaná oktadecylová fáze na silikátové matici. K nepolárním interakcím dochází mezi uhlovodíkovými řetězci na funkční skupině sorbentu a analytu (17).

Téměř všechny organické sloučeniny vykazují nějaké nepolární interakce. Oproti tomu nemodifikovaný silikagel vykazuje spíše polární interakce. Typické sorbenty s výrazným nepolárním charakterem jsou již zmíněné C18 modifikované silikagely. Vykazují poměrně nízkou selektivitu, jelikož jejich funkční skupiny, alkyl substituenty, mohou interagovat téměř se všemi nepolárními analyty (17).

Velmi podobným typem jako jsou C18 sorbenty, jen s menšími obměnami, jsou kolonky Lichrolut EN. Sorbent tvoří ethylvinylbenzen-divinylbenzen polymer. Tyto kolonky byly vyvinuty především pro analýzy vzorků v životním prostředí. Mají velmi velký specifický povrch a výbornou sorpční kapacitu pro nepolární látky jako jsou třeba právě triazinové herbicidy. Nabízí hned několik výhod, především v tom, že se mohou použít v kombinaci s běžnými organickými rozpouštědly. S těmito kolonkami dochází k významné úspoře rozpouštědla, jelikož je požadováno jen malé množství na kondicionaci a eluci. Další výhodou je úspora času, neboť méně sorbentu znamená méně času na kondicionování a sušení. Ve srovnání s jinými kolonkami Lichrolut mají Lichrolut EN až desetkrát vyšší sorpční kapacitu (19).

Dalším možným typem sorbentu, na kterém lze účinně extrahovat triazinové pesticidy je Envi–Carb. Neporézní uhlíkatý základ kolonky umožňuje rychlý extrakční proces bez snížení sorpční schopnosti pro dané analyty. Protože uhlíkatý základ je neporézní, mohou být vzorky zpracovávány rychle, jelikož sorpce nevyžaduje rozptýlení analytu do porézní části. Navzdory tomu, že plocha povrchu částic je menší než na porézním silikagelu, kapacita pro stanovení pesticidu je postačující. Vzorek je převáděn přes kolonky pod tlakem nebo vakuem, eluce pesticidu je prováděna nízkou rychlostí. Extrakci analytů na tuhou fázi z vodných roztoků pomocí sorbentu Envi–Carb poskytuje významné výhody oproti klasické extrakci kapalina–kapalina nebo SPE na silikagelu a tuto techniku lze také snadno automatizovat (16).

Mezi novější typy SPE kolonek lze zařadit kolonky plněné MIP (molecularly imprinted polymers), které jsou určeny k selektivní extrakci jedné sloučeniny nebo skupiny strukturně podobných sloučenin. Kolonky MIP obsahují zesíťovanou polymerní fázi s „dutinkami“, stericky a chemicky komplementárními k molekule analytu. Přínos MIP představuje vysoký stupeň přečištění vzorku a vysoká selektivita dosažená rychlou

a snadnou úpravou vzorku. Tím jsou vhodnou volbou pro extrakci triazinů a jejich degradačních produktů při extrakcích z vody (15).

## 1.4 Porovnání analytických metod na stanovení triazinů

Stanovení triazinových herbicidů ve vodě je velmi často studované téma. Bylo testováno mnoho různých způsobů provedení. Následující tabulka shrnuje různé techniky a detekční limity, kterých bylo dosaženo ve vybraných pracích. V experimentální části pak budou porovnány výsledky mé práce s těmito hodnotami.

Tab. II: Přehled detekčních limitů u vybraných triazinů pro různé analytické techniky.

Analyt	Extrakční technika	Detekční technika	Mez detekce [ng/l]	Citace
DIA	SPE, uhlíkové nanotrubičky	GC-MS	40	(20)
DEA			50	
ATR			20	
ATR	SPME, PDMS vlákno	GC-MS	250	(21)
SIM			500	
SIM	SPE, Oasis MCX polymer	GC-MS	20	(22)
DEA			10	
DIA			10	
ATR			20	
PRO			20	
DIA	SPE, C18	GC-MS/MS	12	(23)
DEA			0,75	
ATR			0,75	
DET	SPE, MIP	LC-MS/MS	0,1	(24)
DIA			0,2	
DEA			0,2	
PRO			0,1	
ATR			0,1	
SIM			0,1	

Nejnižších detekčních limitů bylo u všech analytů dosaženo v práci (24), kde bylo využito techniky SPE s MIP sorbentem a kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí. V práci (23), kde bylo využito SPE s C18 sorbentem a GC-MS/MS bylo dosaženo výrazně nižších LOD u ATR a DEA v porovnání s případy, kde bylo využito standardní techniky GC-MS. Mez detekce u DIA vyšla srovnatelně s prací (22), kde bylo využito SPE s MCX polymerem a GC-MS.

## 2 MATERIÁL A METODY

### 2.1 Použité chemikálie a činidla

- Standardy triazinů: atrazin - čist. 99 %; desisopropylatrazin - čist. 95 %; desethylatrazin - čist. 99 %; propazin - čist. 99 %; terbutylazin - čist. 99 %; desethylterbutylazin - čist. 99 %; simazin- čist. 99 % (Riedel-de Haen)
- Vnitřní standard: deuterioatrazin - čist. 98,5 % (Dr. Ehrensrorfer)
- Ethylacetát - čist. pro HPLC (Chromservis)
- Acetonitril - čist. pro HPLC (Merck)
- Aceton - čist. p.a. (Penta)
- Metanol - čist. pro HPLC (Merck)
- n-hexan - čist. SupraSolv (Merck)
- Kyselina fosforečná - čist. 85 % (Penta)
- Hydroxid sodný p.a.- čist. 98 % (Penta)
- Helium - čist. 99,999 % obj. (Linde)
- Argon - čist. 99,99 % obj. (Linde)
- Dusík - čist. 99,99 % obj. (Linde)

### 2.2 Instrumentální vybavení a spotřební materiál

- Plynový chromatograf: Trace 1310 (Thermo)
- Chromatografická kolona: TR-5MS; fáze: phenylpolysilphenylene-siloxane, délka: 30 m; vnitřní průměr: 0,25 mm; tloušťka filmu 0,25 μm (Thermo)
- Hmotnostní detektor: TSQ 8000 Evo Triple Quadrupole (Thermo)
- SPE kolonky: SDB-L Styrene-Divinylbenzen Polymer 200mg/3ml (Strata)
- Analytické váhy: R200D (Sartorius Research)
- Dry-block: SBH130D/3 (Stuart)
- Nástavec pro odpařování vzorků: SBHCONC/1 (Stuart)
- pH metr: Star A111 (Thermo)
- Ultrazvuková lázeň: USC-THD (VWR)
- Aparatura pro SPE extrakci (Chromabond)
- Odměrné sklo třídy přesnosti A (Fisherbrand)
- Skleněné dávkovací mikrostříkačky o objemu 25, 50, 100, 250 a 500 μl (Hamilton)
- Dělicí nálevka se zábrusem NZ14/23 na výtoku; 1000 ml (Simax)
- Automatická nastavitelná pipeta 100-1000 μl: M1000 (Biohit)
- Ovládání GC-MS/MS systému a vyhodnocování naměřených dat bylo provedeno pomocí programu Xcalibur 3.0.63. Zpracování výsledků bylo prováděno v programu MS Office Excel 2007 a v programu EffiValidation 3.0.



## 2.3 Příprava roztoků standardů

### 2.3.1 Příprava zásobních roztoků

Z každé standardní látky byl připraven samostatný zásobní roztok (ZR-zkratka pesticidu) navážením přesně asi 10 mg látky do 10 ml odměrné baňky, rozpuštěním a doplněním acetonitrem po rysku. Pro simazin bylo nutné použít metanol, jelikož v acetonitrilu má malou rozpustnost. Všechny zásobní roztoky byly uchovávány v chladničce při 5 °C po dobu nejdéle 6 měsíců.

### 2.3.2 Příprava pracovních roztoků

Směsný pracovní roztok (PR1-acetonitril) byl připraven odpipetováním 50 µl ze zásobních roztoků skleněnou dávkovací stříkačkou do 50 ml odměrné baňky a doplněním acetonitrem po rysku. Dále byl připraven další, desetkrát zředěný, pracovní roztok (PR2-acetonitril) pipetováním 1 ml PR1 do 10 ml odměrné baňky a doplněním acetonitrem po rysku. Dalším desítkovým ředěním byl připraven i 100x zředěný pracovní roztok (PR3-acetonitril). Ze zásobních roztoků byl dále připraven směsný pracovní roztok (PR1-ethylacetát) pipetováním 50 µl skleněnou dávkovací stříkačkou do 50 ml odměrné baňky a doplněním ethylacetátem po rysku. Dále byl připraven další, desetkrát zředěný, pracovní roztok (PR2-ethylacetát) pipetováním 1 ml PR1 do 10 ml odměrné baňky a doplněním ethylacetátem po rysku. Dalším desítkovým ředěním byl připraven i 100x zředěný pracovní roztok (PR3-ethylacetát).

Pracovní roztok vnitřního standardu deuterioatrazinu (IS-acetonitril) byl připraven pipetováním 100 µl zásobního roztoku IS do 50 ml odměrné baňky a doplněním acetonitrem po rysku. Pracovní roztok vnitřního standardu deuterioatrazinu (IS-ethylacetát) byl připraven pipetováním 100 µl zásobního roztoku IS do 50 ml odměrné baňky a doplněním ethylacetátem po rysku.

Všechny pracovní roztoky byly uchovávány v chladničce při 5 °C po dobu nejdéle 6 měsíců. Výsledné koncentrace v pracovních roztocích shrnuje následující tabulka.

Tab. III: Výsledné koncentrace analytů v pracovních roztocích.

Označení roztoku	Koncentrace analytů [ng/ml]							
	ATR	SIM	PRO	TBA	DIA	DEA	DET	IS
PR1	993	1006	999	1059	952	1019	1072	800
PR2	99,3	100,6	99,9	105,9	95,2	101,9	107,2	---
PR3	9,93	10,06	9,99	10,59	9,52	10,19	10,72	---

### 2.3.3 Příprava kalibračních roztoků

Bylo připraveno celkem 12 kalibračních úrovní v ethylacetátu, každá ve třech opakováních. Kalibrační roztoky byly připraveny do vialek o objemu 1,8 ml. Všechny pracovní roztoky byly zpracovány v den analýzy a nebyly dále uchovávány. Výsledné koncentrace v pracovních roztocích shrnuje následující tabulka.

Tab. IV: Přehled kalibračních roztoků.

Označení roztoku	Koncentrace analytu [ng/ml]	Objem PR1 [μl]	Objem PR2 [μl]	Objem PR3 [μl]	Objem IS [μl]	Objem ethylacetátu [μl]
T1	400	200	0	0	100	200
T2	200	100	0	0	100	300
T3	100	50	0	0	100	350
T4	50	25	0	0	100	375
T5	25	0	125	0	100	275
T6	10	0	50	0	100	350
T7	5	0	25	0	100	375
T8	2	0	10	0	100	390
T9	1	0	0	50	100	350
T10	0.5	0	0	25	100	375
T11	0.2	0	0	10	100	390
T12	0.1	0	0	5	100	395
BLANK	0	0	0	0	100	400

### 2.3.4 Příprava SPE kolonek a spikovaných vzorků vody

Před extrakcí byly SPE kolonky kondicionovány. Kolonky byly propláchnuty 2 x 2 ml ethylacetátu, 1 x 2 ml acetonu, 2 x 2 ml metanolu a 3 x 2 ml destilované vody, přičemž třetí objem 2 ml byl ponechán nad sorbentem SPE. V celém průběhu kondicionace se kolonka neponechávala vyschnout. K extrakci bylo do kádinky (250 ml) odměřeno odměrným válcem 200 ml vzorku nebo roztoku kalibračního standardu (acetonitril) ve stolní vodě (Dobrá voda). Do vzorku bylo vždy přidáváno 100 μl IS-acetonitril.

Obsah kádinky byl převeden do dělicí nálevky a k ní byla pomocí filtračního nástavce připojena předem připravená SPE kolonka. Ke kolonce byla připojena odsávací hadička. Po sorpci byly kolonky připojeny k odsávacímu zařízení, byly promyty dvakrát 1ml destilované vody a byly odsávány mírným podtlakem, aby se vysušila sorbovaná voda.

Do vialky (1,8 ml) ve stojanu byly umístěny SPE kolonky. Do širší části kolonky (nad sorbetem) bylo opatrně pipetováno 0,5 ml ethylacetátu a po jeho vsáknutí do sorbetu bylo ponecháno asi 5 minut na eluci a pak byl ze sorbetu vytlačen mírným přetlakem (pomocí plastové stříkačky). Tato operace byla zopakována ještě třikrát. Pak byla ze dna vialky odsáta skleněnou stříkačkou (100 μl) oddělená voda. Rozpouštědla byla opatrně odfoukána pomocí proudu dusíku (při 40 °C) přibližně na 500 μl.

## 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 3.1 Optimalizace chromatografické separace

#### 3.1.1 Testovací analýza

Testovací analýza směšného roztoku standardů a vnitřního standardu byla provedena za účelem identifikace sloučenin. Pro tento účel byl použit směšný pracovní roztok standardů v etylacetátu s koncentrací analytů 100 ng/ml. Píky byly identifikovány a byly jim přiřazeny hodnoty retenčních časů. Výchozí podmínky chromatografické separace jsou shrnuty v následujícím přehledu. Tyto parametry byly zvoleny na základě doporučení mého školitele.

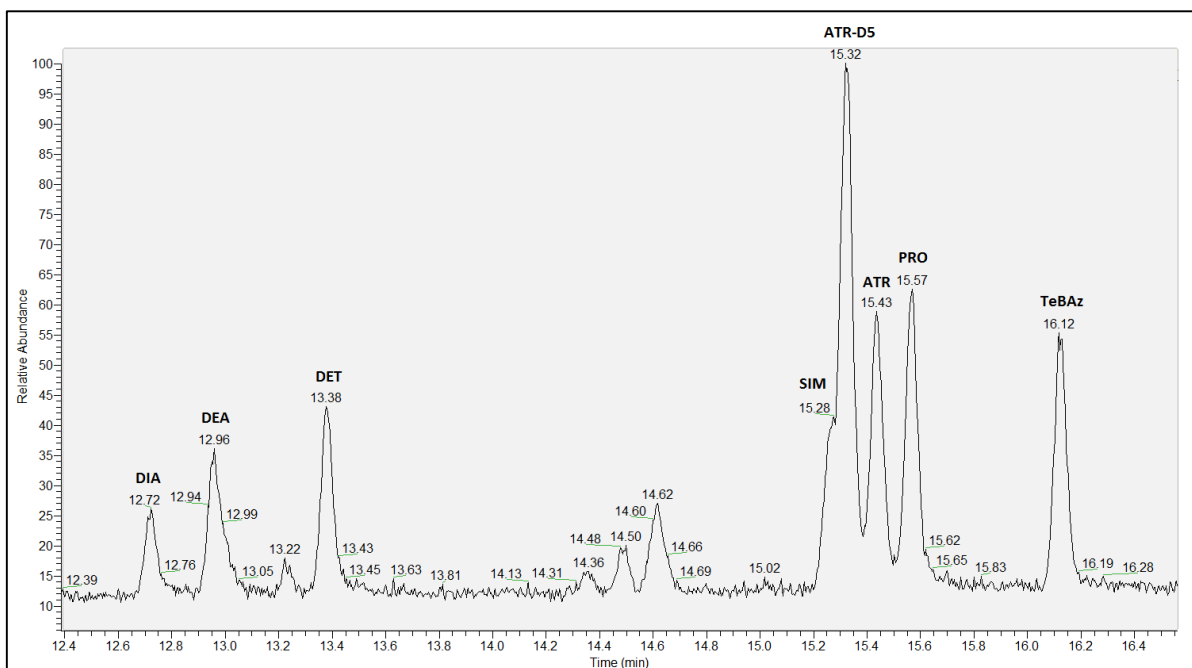
Podmínky separace:

- Objem nástřiku: 1  $\mu$ l
- Teplota injektoru: 230 °C
- Průtok plynu: 1,1 ml/min (konstantní)
- Detekce v rozsahu: 40–350 m/z
- Teplotní gradient je popsán v Tab. V

Tab. V: Výchozí teplotní gradient.

Fáze	Nárůst [°C/min]	Teplota [°C]	Doba setrvání [min]
počátek	0	50	1
1	80	140	0
2	5	210	0
3	20	260	0

Chromatogram první separace je uveden na Obr. 2. Vzhledem k tomu, že došlo ke koeluci simazinu s vnitřním standardem bylo doporučeno provést základní optimalizaci chromatografické separace. Testován byl různý průtok mobilní fáze kolonou a teplotní gradient.



Obr. 2: Chromatogram směrného roztoku standardů - testovací analýza.

### 3.1.2 Optimalizace průtoku nosného plynu

Různý průtok helia kolonou byl testován v rozsahu 1,1–1,5 ml/min. Pro účely optimalizace byl použit směrný pracovní roztok standardů v ethylacetátu s koncentrací analytů 100 ng/ml. Cílem bylo dosáhnout lepší kvality separace, především mezi simazinem a vnitřním standardem. Jako hodnotící kritérium bylo zvoleno rozlišení mezi vnitřním standardem a atrazinem. Rozlišení mezi simazinem a vnitřním standardem nemohlo být objektivně hodnoceno, jelikož u simazinu nebylo možné zjistit šířku píku v polovině výšky. Základní výsledky měření jsou uvedeny v Tab. VI., detailní výsledky měření jsou uvedeny v Tab. XXV.

Rozlišení bylo spočteno pomocí vztahu:  $R_{ATR,IS} = \frac{2 \cdot (t_{R,ATR} - t_{R,IS})}{w_{ATR} + w_{IS}} = \frac{2 \cdot \Delta t_R}{w_{ATR} + w_{IS}}$

kde R je rozlišení,  $t_R$  je retenční čas a w je šířka píku v polovině výšky.

Tab. VI: Rozlišení mezi IS a ATR v závislosti na průtoku helia.

Průtok helia kolonou [ml/min]	Doba analýzy [min]	Rozlišení IS/ATR [1]
1,1	18,6	1,28
1,2	18,3	1,20
1,3	18,0	1,16
1,4	17,8	1,16
1,5	17,5	1,19

Optimálního rozlišení mezi IS a ATR bylo dosaženo při průtoku 1,1 ml kolonou, doba analýzy se v případech vyšších hodnot průtoku výrazně nezkrátila. Pro další analýzy tedy byla ponechána hodnota průtoku helia 1,1 ml.

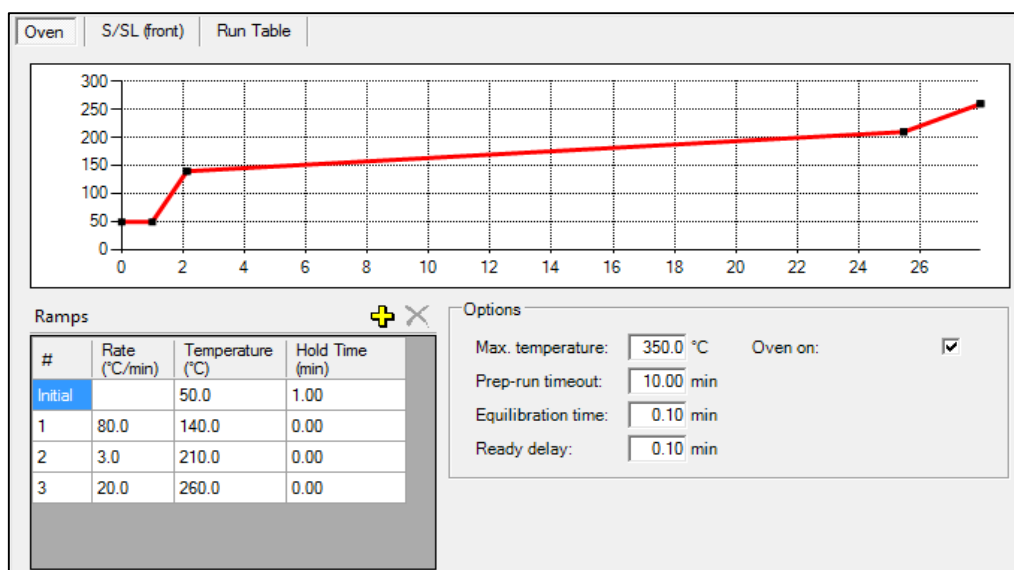
### 3.1.3 Optimalizace teplotního gradientu

Různý nárůst teploty byl testován v oblasti 140–210 °C, jelikož bylo prokázáno, že tato oblast má největší vliv na kvalitu separace. Pro účely optimalizace byl použit směsný pracovní roztok standardů v ethylacetátu s koncentrací analytů 100 ng/ml. Jako hodnotící kritérium bylo opět zvoleno rozlišení mezi vnitřním standardem a atrazinem a bylo spočteno pomocí vztahu uvedeného v Kap. 3.1.2. Základní výsledky měření jsou uvedeny v Tab. VII., detailní výsledky měření jsou uvedeny v Tab. XXVI.

Tab. VII: Rozlišení mezi IS a ATR v závislosti na teplotním gradientu.

Nárůst teploty [°C/min]	Doba analýzy [min]	Rozlišení IS/ATR [1]
1	74,6	1,16
2	39,6	1,22
3	27,9	1,26
5	18,6	1,07
10	11,6	0,78

Bylo zjištěno, že optimálního rozlišení mezi vnitřním standardem a atrazinem je dosaženo při nárůstu teploty 3 °C/min, tato hodnota byla tedy zvolena jako optimální. Při tomto teplotním programu došlo i k mírnému zlepšení separace mezi simazinem a vnitřním standardem. Veškeré parametry optimálního teplotního gradientu jsou uvedeny na Obr. 3.



Obr. 3: Optimální teplotní gradient.

## 3.2 Optimalizace hmotnostní detekce

### 3.2.1 Volba SRM přechodů

Na základě doporučení mého školitele byly zvoleny k testování prekurzorové a produktové ionty (viz Kap. 7, Tab. XXVII). Pro každý analyt byly vybrány dva přechody, z nichž jeden je určen ke kvantifikaci a druhý slouží k ověření, tedy identifikaci. Přechody určené ke kvantifikaci byly vybrány na základě nejvyšších hodnot S/N. Analyzován byl směsný pracovní roztok standardů v ethylacetátu s koncentrací analytů 100 ng/ml. V Tab. VIII jsou uvedeny dvojice iontů, které byly zvoleny pro jednotlivé typy SRM přechodů.

Tab. VIII: Vybrané SRM přechody.

Analyt	Přechod ke kvantifikaci	Přechod k ověření
DIA	173 → 145	173 → 158
DEA	187 → 172	187 → 145
DET	201 → 145	201 → 186
SIM	201 → 173	201 → 186
ATR	215 → 200	215 → 173
PRO	214 → 172	229 → 214
TBA	229 → 173	214 → 173
IS	220 → 205	---

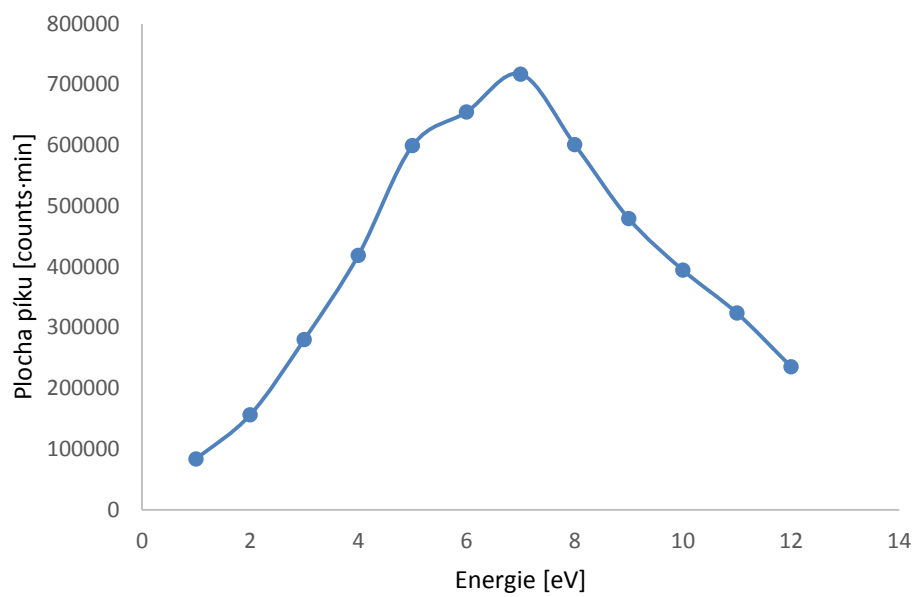
### 3.2.2 Optimalizace kolizní energie SRM přechodů

Cílem této optimalizace bylo nastavit energii v kolizní cele v retenčních časech odpovídajícím jednotlivým analytům tak, aby plochy píků byly co největší při zachování alespoň 10 % prekurzorového iontu. Analyzován byl směsný pracovní roztok standardů v ethylacetátu s koncentrací analytů 100 ng/ml. Tab. IX shrnuje optimální hodnoty energií odpovídající SRM přechodům určeným ke kvantifikaci.

Tab IX: Optimální kolizní energie odpovídající jednotlivým SRM přechodům.

SRM přechod	DIA 173 → 145	DEA 187 → 172	DET 201 → 145	SIM 201 → 173	ATR 215 → 200	PRO 214 → 172	TBA 229 → 173	IS 220 → 205
Kolizní energie [eV]	7	8	8	7	8	8	7	8

Bylo prokázáno, že optimální hodnota kolizní energie je u většiny analytů 8 eV, u DIA, SIM a TBA 7 eV. Na Obr. 5 je jako příklad vyobrazena závislost plochy píku na kolizní energii u SRM přechodu ATR 215 → 200.



*Obr. 5: Závislost plochy píku u přechodu ATR 215 → 200 na kolizní energii.*

### 3.3 Optimalizace extrakce

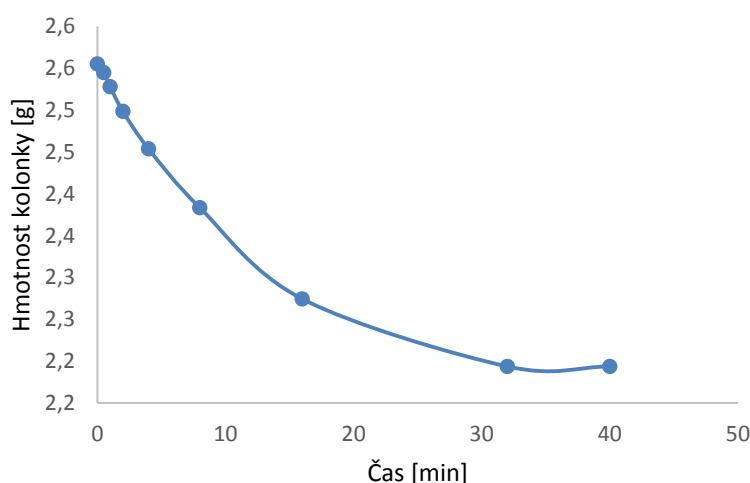
V rámci této kapitoly byly testovány různé parametry, které mohou mít vliv na výtěžek extrakce. Spikované vzorky byly připravovány dávkováním 100  $\mu$ l PR1-acetonitril do 200 ml stolní vody a byly extrahovány dle postupu uvedeného v Kap. 2.3.4. Referenční vzorky byly připraveny ze směsného pracovního roztoku standardů v ethylacetátu (PR1-ethylacetát) přímo do vialky na odpovídající koncentrační úrovni po zkoncentrování analytů.

#### 3.3.1 Optimalizace doby sušení SPE kolonky

Nejdříve byla zjištěna závislost hmotnosti kolonky se sorbovanou vodou na době sušení. Bylo zjištěno, že po 40 minutách již nedochází k výrazné změně hmotnosti kolonky, takže po této době by měla být kolonka vhodně připravena k provedení eluce organickým rozpouštědlem. Výsledky shrnuje Tab. X.

Tab. X: Závislost hmotnosti kolonky na době sušení.

Čas [min]	Hmotnost kolonky [g]		
	1	2	3
0	2,5550	2,6557	2,7344
0,5	2,5447	2,5578	2,5328
1	2,5281	2,5459	2,5224
2	2,4983	2,5280	2,5026
4	2,4536	2,4987	2,4694
8	2,3833	2,4419	2,4081
16	2,2742	2,3368	2,3048
32	2,1936	2,2126	2,1948
40	2,1936	2,2120	2,1946



Obr. 6: Závislost hmotnosti kolonky č. 1 na době sušení.



Následně bylo ovšem nutné zjistit, zda doba sušení nemá vliv na výtěžek extrakce. Pro testování byly použity kolonky, které byly sušeny po dobu 16, 32 a 40 minut. Výsledky prokazují, že doba sušení nemá vliv na výtěžek extrakce. Jako optimální doba sušení SPE kolonky byla tedy zvolena doba 40 minut, jelikož se tím eliminovala nutnost odstraňovat oddělenou vodu z vialky po provedení eluce. Vliv sušení na výtěžek extrakce shrnuje Tab. XI.

Tabulka XI: Závislost doby sušení na výtěžek extrakce.

Doba sušení [min]	Výtěžek extrakce [%]						
	DIA	DEA	DET	SIM	ATR	PRO	TBA
16	80,9	100,2	97,7	104,1	99,6	100,3	105,0
32	80,2	100,0	98,6	107,9	98,7	100,9	105,7
40	81,3	99,2	98,5	109,4	101,0	102,5	105,2

### 3.3.2 Volba vhodného elučního rozpouštědla a jeho objemu

Za účelem dosažení optimálních hodnot výtěžností analytů byla testována celkem tři různá eluční rozpouštědla. Eluce byla prováděna 4 x 500 µl methanolu, 6 x 500 µl hexanu a 4 x 500 µl ethylacetátu. Pro každé eluční rozpouštědlo byla použita vlastní SPE kolonka a každá z frakcí každého elučního rozpouštědla byla analyzovaná zvlášť. Podíl analytů v jednotlivých frakcích je shrnutý v Tab. XII. Tyto podíly jsou vyjádřeny jako plocha píku analytu v dané frakci ku celkové ploše, respektive součtu ploch piků ve všech frakcích.

Tabulka XII: Podíl analytů v jednotlivých elučních frakcích.

Kolonka	Frakce	Zastoupení analytů v elučních frakcích [%]							
		DIA	DEA	DET	SIM	IS	ATR	PRO	TBA
1	EtAc 1	82,4	82,4	82,2	82,4	83,5	82,3	82,9	81,1
	EtAc 2	15,5	15,1	15,4	14,9	15,9	15,3	14,7	16,0
	EtAc 3	2,1	2,5	2,4	2,7	0,6	2,4	2,4	2,9
	EtAc 4	0,0	<0,1	<0,1	<0,1	0,0	<0,1	0,0	0,0
2	Hex 1	0,0	0,0	61,2	15,3	0,0	<0,1	3,6	0,1
	Hex 2	0,0	6,0	4,8	8,3	4,5	11,7	7,8	3,7
	Hex 3	0,0	4,1	22,8	3,5	20,0	6,2	14,0	14,8
	Hex 4	0,0	67,8	0,0	13,8	21,4	18,2	19,7	23,2
	Hex 5	0,0	21,6	1,0	28,1	17,6	25,5	24,3	26,5
	Hex 6	0,0	0,4	10,2	31,0	36,5	38,5	30,6	31,7
3	MeOH 1	59,3	58,2	55,8	48,8	56,2	50,9	48,6	45,9
	MeOH 2	21,7	22,8	24,4	30,4	33,7	30,0	31,2	32,7
	MeOH 3	11,2	11,6	12,5	12,7	5,9	11,7	12,9	13,5
	MeOH 4	7,8	7,4	7,4	8,1	4,3	7,5	7,3	7,9

Z naměřených hodnot je patrné, že v případě použití ethylacetátu se většina analytů eluuje již v první frakci. Hexan je nevhodné rozpouštědlo, protože eluovány byly pouze méně polární analyty, zejména ATR, PRO a TBA. V případě methanolu došlo k eluci u všech analytů, ale poněkud pozvolněji než v případě použití ethylacetátu. Z výše uvedených výsledků vyplývá, že optimálním elučním rozpouštědlem k extrakci analytů z dané SPE kolonky je ethylacetát.

Celkové hodnoty výtěžnosti extrakce v závislosti na druhu elučního rozpouštědla jsou shrnuty v Tab. XIII.

*Tabulka XIII: Výtěžnost extrakce v závislosti na použitém rozpouštědle.*

Rozpouštědlo	Výtěžnost extrakce [%]					
	DIA	DEA	DET	SIM	ATR	PRO
Et Ac	96,9	97,1	100,0	100,8	92,4	94,9
Hexan	0,0	0,1	0,1	0,6	3,0	7,6
MeOH	103,0	98,9	96,5	97,1	87,4	83,3

### 3.3.3 Optimalizace pH vzorku

Hodnota pH vzorku vody může mít v některých případech zásadní vliv na výtěžnost extrakce. Z tohoto důvodu byl testován vliv tří různých hodnot pH (3,7,9) na výtěžek extrakce. Vzorky vody byly pH upravovány pomocí zředěné kyseliny fosforečné (1:1, v/v) a 1M roztoku NaOH. Přesné hodnoty pH byly změřeny pomocí pH metru se skleněnou elektrodou. Výsledky výtěžností extrakcí jsou shrnuty v Tab. XIV.

*Tab. XIV: Vliv pH na výtěžnost extrakce.*

pH	Výtěžek extrakce [%]						
	DIA	DEA	DET	SIM	ATR	PRO	TBA
2,92	74,0	92,2	96,2	101,6	96,9	95,8	98,7
7,02	71,8	89,1	96,0	105,3	98,5	99,4	101,8
9,04	73,2	94,4	99,0	103,8	99,8	101,2	105,1

Na základě výsledků testování bylo prokázáno, že pH roztoku nemá významný vliv na výtěžnost extrakce. Pro další analýzy bylo rozhodnuto neupravovat pH vzorků za předpokladu, že se jejich hodnota pH pohybuje v uvedeném rozmezí.

### 3.3.4 Optimalizace objemu vzorku

Posledním optimalizovaným parametrem byl objem vzorku k extrakci. Testování bylo provedeno v rozsahu 200–1000 ml vzorku vody. Do 1000 ml vzorku bylo nadávkováno 100 µl roztoku PR1-acetonitril, do 500 ml 50 µl a do 200 ml 20 µl, a to z toho důvodu, aby koncentrace analytů byla stejná ve všech testovaných vzorcích. V Tab. XV je shrnutý vliv objemu vzorku na výtěžnost extrakce.

Tab. XV: Vliv objemu použitého vzorku na výtěžnost extrakce.

Objem [ml]	Výtěžek extrakce [%]						
	DIA	DEA	DET	SIM	ATR	PRO	TBA
1000	32,2	95,7	98,8	98,1	96,7	97,7	100,0
500	60,8	102,5	104,8	103,7	102,1	104,0	105,3
200	108,0	105,1	108,7	113,2	98,2	100,1	103,0

Bylo prokázáno, že optimální výtěžnost u DIA je v případě použití 200 ml vzorku k extrakci, u ostatních analytů neměl tento parametr příliš významný vliv. Jako optimální objem vzorku vody k extrakci byl tedy zvolen objem 200 ml.

### 3.4 Validace metody

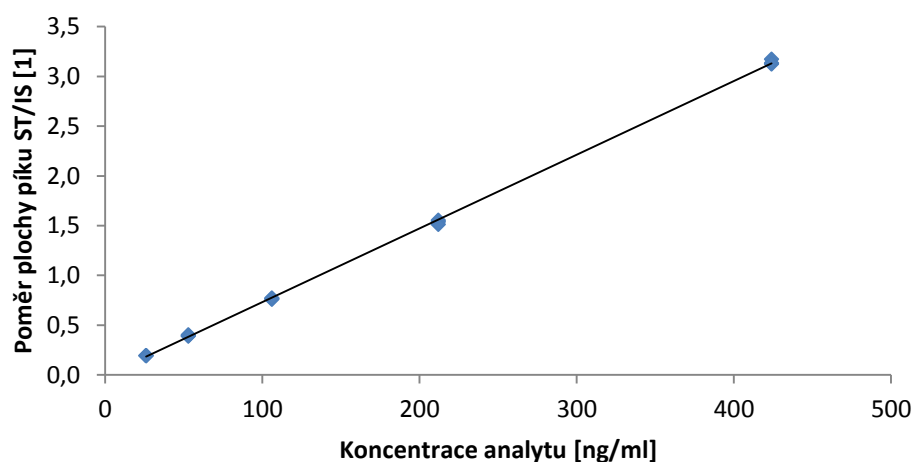
Po provedené optimalizaci základních podmínek chromatografické separace, hmotnostní detekce i postupu extrakce byla provedena validace analytické metody, kterou má být prokázáno, že je metoda vhodná a způsobilá pro kvantitativní analýzu vybraných pesticidů. Mezi základní validační parametry patří linearita, přesnost, správnost, rozsah, mez detekce, mez stanovitelnosti.

#### 3.4.1 Linearita

Pracovní rozsah byl u všech analytů zvolen na koncentračních úrovních T1–T5, jelikož nižší koncentrační úrovně nebylo možné u žádného z analytů zahrnout do kalibrace s přijatelnou přesností a správností. Každá koncentrační úroveň byla změřena ve 3 nezávislých opakováních. Následující přehled (viz Tab. XVI) shrnuje základní validační charakteristiky týkající se linearity. Rovnice kalibrační přímky jsou uvedeny ve tvaru  $y = k \cdot x + q$ , kde  $k$  je směrnice přímky,  $q$  intercept,  $y$  představuje poměr plochy píku standardu ku ploše píku vnitřního standardu a  $x$  je koncentrace standardu v ng/ml. Ve všech případech byla splněna kritéria přijatelnosti (korelační koeficient  $\geq 0,9990$ , QC koeficient  $\leq 5\%$ ), která byla přejata z publikace Handbook of Chemometrics and Qualimetrics (25) a byla vyhodnocena v programu Effvalidation 3.0.

Tab. XVI: Přehled parametrů kalibračních závislostí jednotlivých analytů.

Parametr	DIA	DEA	DET	SIM	ATR	PRO	TBA
Směrnice [ml/ng]	0,0070	0,0074	0,0061	0,0072	0,0059	0,0161	0,0074
Intercept [1]	-0,0480	-0,0831	-0,0362	-0,0161	-0,0038	-0,0241	-0,0083
Korelační koeficient [1]	0,9993	0,9981	0,9993	0,9992	0,9997	0,9997	0,9997
QC koeficient [%]	2,63	4,37	2,68	2,65	1,80	1,72	1,70



Obr. 7: Graf kalibrační závislosti TBA.

### 3.4.2 Správnost a přesnost

Dalšími hodnocenými validačními parametry byla přesnost vyjádřená jako opakovatelnost pomocí relativní směrodatné odchylky (RSD) a správnost vyjádřená jako výtěžnost, a to pro všech 5 koncentračních úrovní T1–T5. Každá koncentrační úroveň byla změřena ve 3 nezávislých opakováních.

V Tab. XVII jsou uvedeny hodnoty přesnosti a v Tab. XVIII jsou uvedeny hodnoty správnosti pro jednotlivé koncentrační úrovně analytů. Toto testování bylo provedeno na vzorcích, které byly připraveny stejným způsobem jako kalibrační roztoky, tzn. pouze ředěním pracovních roztoků ethylacetátem bez vlivu extrakčního postupu.

Tabulka XVII: Přesnost vyjádřená jako opakovatelnost – analyt v ethylacetátu.

Koncentrační úroveň	Kriterium přijatelnosti: RSD [%]	Přesnost [%]						
		DIA	DEA	DET	SIM	ATR	PRO	TBA
T1 – 400 µg/l	≤ 15	2,1	2,3	0,8	0,9	1,3	1,4	0,8
T2 – 200 µg/l		1,2	1,2	2,0	3,5	0,5	0,8	1,3
T3 – 100 µg/l		1,9	3,4	1,0	3,7	1,4	1,1	1,0
T4 – 50 µg/l	≤ 21	4,3	5,5	1,7	7,0	4,3	3,4	1,8
T5 – 25 µg/l		0,7	0,2	3,4	2,1	4,3	2,2	0,2

Tabulka XVIII: Správnost vyjádřená jako výtěžnost – analyt v ethylacetátu.

Koncentrační úroveň	Kriterium přijatelnosti: Výtěž. [%]	Správnost [%]						
		DIA	DEA	DET	SIM	ATR	PRO	TBA
T1 – 400 µg/l	80 – 110	100,3	101,0	100,7	100,3	100,0	100,3	100,3
T2 – 200 µg/l		100,0	95,7	97,3	98,3	99,7	99,0	98,7
T3 – 100 µg/l		98,0	98,7	98,7	99,0	100,3	99,3	99,0
T4 – 50 µg/l	60 – 115	99,6	103,7	103,3	101,3	100,0	101,3	103,0
T5 – 25 µg/l		106,3	112,0	109,0	107,6	100,7	103,7	105,3

Na základě naměřených dat bylo zjištěno, že přesnost metody se pohybuje v rozmezí 0,2–7,0 % a správnost metody se pohybuje v rozmezí 95,7–112,0 %. Nejvyšší přesnost byla dosažena v případě TBA, jejíž hodnota RSD činila v průměru 1 %. Naopak nejnižší přesnost byla zjištěna v případě SIM, kde tento parametr dosáhl hodnoty 3,5 % a byly zde navíc získány výsledky s celkově největší variabilitou (na koncentrační úrovni T4).

Při zamýšleném použití metody pro kvantitativní stanovení pesticidů v reálných vzorcích vod je však nezbytné provést i hodnocení přesnosti a správnosti analýzy vzorků vod se známým obsahem těchto pesticidů. Pro tyto účely byly připraveny modelové vzorky stolní vody o objemu 200 ml s přidavkem 100 µl pracovního roztoku vnitřního standardu (IS-acetonitril), které byly následně obohaceny přidavkem známého objemu směsného

standardu o známé koncentraci (tzv. spikované vzorky). Objem a koncentrace přídatku standardu byl shodný s objemem a koncentracemi pracovních roztoků použitých pro přípravu kalibračních roztoků na koncentračních úrovních T1–T5 (viz Tab. IV). Tyto vzorky pak byly extrahovány dle zoptimalizovaného postupu extrakce a poté analyzovány. Rozsah testování spikovaných vzorků byl shodný s rozsahem testování vzorků, které byly připraveny pouze ředěním pracovních roztoků ethylacetátem bez vlivu extrakčního postupu. V Tab. XIX jsou uvedeny hodnoty přesnosti analýz na jednotlivých koncentračních úrovních spikovaných vzorků. Tyto hodnoty jsou uvedeny jako relativní směrodatná odchylka výsledků.

*Tabulka XIX: Přesnost vyjádřená jako opakovatelnost – spikované vzorky vod.*

Koncentrační úroveň [µg/l]	Kriterium přijatelnosti: RSD [%]	Přesnost [%]						
		DIA	DEA	DET	SIM	ATR	PRO	TBA
1	≤ 30	3,2	2,0	1,5	0,8	1,0	0,6	0,5
0,5		7,7	7,3	3,2	1,7	0,3	1,7	0,7
0,25		5,8	4,1	1,8	1,9	1,0	0,2	0,4
0,125		4,3	2,5	2,3	0,8	1,3	0,4	0,6
0,0625		1,5	0,3	2,9	3,4	1,0	1,2	1,7

*Tabulka XX: Správnost vyjádřená jako výtěžnost – spikované vzorky vod.*

Koncentrační úroveň	Kriterium přijatelnosti: Výtěž. [%]	Správnost [%]						
		DIA	DEA	DET	SIM	ATR	PRO	TBA
1	40 – 120	74,6	99,3	102,9	98,2	99,8	100,1	107,4
0,5		68,3	88,2	95,7	94,7	98,4	98,6	104,2
0,25		84,1	96,5	99,0	96,1	96,8	95,8	101,5
0,125		92,3	107,2	104,9	99,6	97,5	98,4	102,3
0,0625		109,1	114,3	113,5	108,1	98,2	99,1	104,8

Výsledky hodnocení přesnosti metody, jejíž postup zahrnoval i extrakci analytů z matrice, jsou téměř shodné s výsledky přesnosti získané analýzami standardních roztoků. Hodnoty přesnosti se pohybovaly v rozmezí 0,2–7,7 %, což poukazuje na minimální vliv extrakce na hodnotu tohoto validačního parametru. Nejvyšší přesnosti bylo dosaženo opět v případě TBA (průměrná hodnota RSD 0,8 %). Nejnižší přesnost však byla u spikovaných vzorků zjištěna v případě DIA, u kterého průměrná hodnota RSD byla 4,5 %.

Výsledky správnosti metody zahrnující postup extrakce však vykazují širší rozmezí hodnot výtěžností (68,3–114,3 %) než v případě postupu bez extrakce (95,7–112,0 %). Vliv extrakce na hodnotu tohoto parametru byl očekáván, protože téměř nikdy nedojde k dokonalému (úplnému) zachytu veškerého množství analytu ani k jeho dokonalé (úplné) eluci ze sorbentu. Navíc matrice téměř vždy obsahuje nějaké interferující látky, které mohou

ovlivnit proces ionizace a/nebo koeluovat s daným analytem. Nejvyšší správnosti bylo dosaženo v případě PRO (průměrná hodnota výtěžnosti 98,4 %) a ATR (průměrná hodnota výtěžnosti 98,1 %). U některých analytů sice bylo dosaženo i lepší průměrné výtěžnosti (SIM – 99,3 %; DEA – 101,1 %), ale hodnoty výtěžností na jednotlivých koncentračních úrovních se lišily více, než v případě PRO a ATR. Nejnižší správnost byla zjištěna v případě DIA s průměrnou hodnota výtěžnosti 85,7 % a variabilitou na jednotlivých koncentračních úrovních v rozmezí 68,3–109,1 %.

Ve všech případech byla splněna uvedená kritéria přijatelnosti přejatá z publikace Guidelines for Standard Method Performance Requirements (26), čímž bylo prokázáno, že metoda poskytuje výsledky s přijatelnou přesností a správností.

### 3.4.3 Rozsah

Na základě výsledků linearity, přesnosti a správnosti bylo potvrzeno, že analytická metoda poskytuje výsledky s dostatečnou přesností správností v rozsahu koncentrací analytů ve vodách uvedených v Tab. XXI.

Tab. XXI: Koncentrační rozsahy pro stanovení vybraných triazinů ve vodě.

Mez	Koncentrace analytu ve vodě [ng/l]						
	DIA	DEA	DET	SIM	ATR	PRO	TBA
Dolní	60	63	68	63	63	63	65
Horní	953	1020	1073	1005	993	1000	1060

Metoda je tedy vhodná pro stanovení těchto vybraných pesticidů v pitné vodě dle požadavků aktuálně platné legislativy České republiky (Vyhláška č. 252/2004 Sb.), která stanovuje nejvyšší mezní hodnotu pro tyto pesticidy na úrovni 100 ng/l a nejvyšší mezní hodnotu pro sumu pesticidů na úrovni 500 ng/l (27).

### 3.4.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce byla vyhodnocena jako koncentrace, pro kterou výška píku odpovídajícího analytu byla trojnásobná oproti průměrné výšce šumu základní linie. Mez stanovitelnosti byla vyhodnocena jako koncentrace, pro kterou výška píku odpovídajícího analytu byla desetinásobná oproti průměrné výšce šumu základní linie. Hodnoty poměru signálu k šumu (S/N) byly použity z vyhodnocovacího programu Xcalibur. V Tab. XXII jsou LOD a LOQ získané z kalibračních roztoků připravených v ethylacetátu, v Tab. XXIII jsou hodnoty získané ze spikovaných vzorků.

Tab. XXII: LOD a LOQ získané z analýzou kalibračních roztoků.

Parametr	Koncentrace [ng/l]						
	DIA	DEA	DET	SIM	ATR	PRO	TBA
LOD	1000	200	700	300	100	200	200
LOQ	3200	700	2100	1100	300	700	700

Tab. XXIII: LOD a LOQ získané analýzou spikovaných vzorků.

Parametr	Koncentrace [ng/l]						
	DIA	DEA	DET	SIM	ATR	PRO	TBA
LOD	13	2,5	9,3	1,3	1,3	0,8	0,8
LOQ	38	8,3	28	4,3	4,3	2,5	2,8

V porovnání s hodnotami, které jsou uvedeny v Tab. II poskytovala tato metoda u většiny analytů nižší LOD v porovnání s pracemi, kde bylo využito GC-MS. Bylo dosaženo řádově velmi podobných hodnot meze detekce u analytů DIA, DEA a ATR jako v práci (23), kde bylo použito SPE s C18 sorbentem a GC-MS/MS. Ovšem v porovnání s prací (24), kde bylo využito k extrakci vzorků SPE s MIP sorbentem a technika LC-MS/MS, nebylo u žádného z analytů dosaženo zdaleka tak nízkých detekčních limitů.

### 3.5 Testování metody na reálném vzorku vody

Pro testování metody na reálném vzorku vody byla použita pitná voda z vodovodního systému PŘF JU (budova C, 1. patro, místnost 01 047). Analýza vzorku vody byla provedena ve třech nezávislých opakováních. Pro hodnocení kvality (čistoty) přípravy vzorku, čistoty chemikálií i přístroje byla také provedena analýza slepého vzorku. Bylo zjištěno, že vzorek vody obsahuje stopová množství atrazinu a desethylatrazinu. Konkrétní hodnoty koncentrací těchto analytů však nemohou být uvedeny, protože výsledky se v obou případech pohybovaly v oblasti mezi mezí detekce a mezi stanovitelnosti. Obsahy zbývajících sledovaných pesticidů se pohybovaly pod mezí detekce metody. Výsledky analýzy jsou uvedeny v Tab. XXIV.

Tab. XXIV: Analýza vody z vodovodního systému PŘF JČU.

Analyt	DIA	DEA	DET	SIM	ATR	PRO	TBA
Koncentrace [ng/l]	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD



## 4 ZÁVĚR

V teoretické části této práce byly shrnuty základní informace o vlastnostech a použití vybraných triazinových pesticidů a možnosti jejich stanovení ve vodě. Důraz byl kladen zejména na extrakci analytů pomocí sorpce na tuhou fázi a jejich následné stanovení plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí.

V rámci praktické části byla nejprve provedena optimalizace chromatografické separace. Nejlepších podmínek bylo dosaženo při průtoku nosného plynu 1,1 ml/min a teplotním gradientu s nárůstem 3 °C/min. Poté byla provedena optimalizace hmotnostní detekce, která zahrnovala volbu vhodných SRM přechodů a optimalizaci jejich kolizní energie (optimální hodnoty činily 7 a 8 eV). Následně byl vypracován postup extrakce pesticidů z vody na tuhou fázi pomocí SDB-L sorbentu. Optimálních podmínek extrakce bylo dosaženo při použití 200 ml vzorku vody, sušení SPE kolonky po dobu 40 minut a eluci pomocí 4 x 500 µl ethylacetátu. Poté byla provedena základní validace metody, v rámci které byly hodnoceny následující validační parametry: linearita, přesnost (vyjádřená jako opakovatelnost), správnost, rozsah, mez detekce a mez stanovitelnosti. Bylo zjištěno, že vypracovaná analytická metoda vyhovuje všem kritériím přijatelnosti v rozsahu 60–1000 ng/l (koncentrace analytu ve vodě), a tím bylo prokázáno, že je způsobilá pro zamýšlené použití. Metoda je rovněž vhodná pro stanovení těchto vybraných pesticidů v pitné vodě dle požadavků aktuálně platné legislativy České republiky (Vyhláška č. 252/2004 Sb.), která stanovuje nejvyšší mezní hodnotu pro tyto pesticidy na úrovni 100 ng/l. Meze detekce se pohybovaly v rozsahu 0,8–13 ng/l. V porovnání s diskutovanými pracemi, které využívali techniku GC-MS, bylo v této práci využívající techniku GC-MS/MS dosaženo celkově nižších detekčních limitů.

Nakonec byla metoda použita pro analýzu reálného vzorku pitné vody z vodovodního systému PřF JU. Analýzou bylo zjištěno, že voda obsahuje stopové množství atrazinu a desethylatrazinu, jejichž konkrétní hodnoty však nemohly být uvedeny, protože výsledky se v obou případech pohybovaly v oblasti mezi mezí detekce a mezí stanovitelnosti.

Další práce by mohla být zaměřena na testování různých typů chromatografických kolon, nejnovějších typů sorbentů nebo jiných extrakčních technik. Velký potenciál také skrývá použití kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí, která umožňuje stanovení i polárnějších analytů a za jistých podmínek i dosažení nižších mezí detekce.

## 5 REFERENCE

1. Cremllyn, R. Pesticidy. Praha : SNTL, 1985.
2. Mikulka J., Kneifelová M. Rizika kontaminace potravin a pitné vody herbicidy. [Online] 2004. [Citace: 21. 1 2015.] <http://www.phytosanitary.org/projekty/2003/vvf-12-03.pdf>.
3. Kamrin, A. Pesticides profiles (toxicity, enviromental impact, and fate). Lewis Publishers, 1997. ISBN 1-56670-190-2.
4. European Commission. Health and consumers. [Online] [Citace: 3. 2 2015.] [http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/legal\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/legal_en.htm).
5. Zbirovský M., Myška J., Zemánek J. Herbicidy – chemické prostředky proti plevelům. Praha : Československá akademie ved, 1960.
6. Integrovaný registr znečišťování. [Online] [Citace: 8. 2 2015.] <http://www.irz.cz/node/14>.
7. Vendlova, J. Stanovení triazinových herbicidů ve vodách. 2009.
8. The extension toxicology network. [Online] 8. 3 2015. <http://extoxnet.orst.edu/>.
9. World Health Organization. [Online] [Citace: 15. 2 2015.] <http://www.who.int/en/>.
10. Smolin, Edwin M. Chemistry of Heterocyclic Compounds: s-Triazines and Derivatives, Volume 13. London: Interscience Publishers, 2008.
11. Churáček, J. Analytická separace látek. Praha : SNTL. ISBN 80-03-60569-8.
12. Klouda, P. Moderní analytické metody. Ostrava : Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-02.
13. E. Smolková, L. Felzl. Analýza látek v plynném stavu. Praha : SNTL, 1991. ISBN 80-03-00604-X.
14. Holčapek, M. Hmotnostní spektrometrie v organické analýze. [Online] Univerzita Pardubice. [Citace: 30.. 3. 2015.] <http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php>.
15. Coufal, Pavel. Separační metody. [Online] Univerzita Karlova v Praze. [Citace: 31. 1 2015.] <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf>.
16. Solid phase extraction. [Online] [Citace: 5. 3 2015.] <http://www.sigmaaldrich.com/>.
17. Macherey-Nagel. Solid Phase Extraction Application Guide. [Online] 11. 3 2015.
18. Poustka, J. Extrakce na tuhou fázi. [Online] 21. 2 2015. <http://web.vscht.cz/~poustkaj/>.
19. Solid-phase extraction with Lichrolut. [Online] [Citace: 23. 2 2015.] [www.chromatography.merck.de](http://www.chromatography.merck.de).
20. Min, G., Wang, S., Zhu, H., Fang, G., Zhang, Y. Multi-walled carbon nanotubes as solid-phase extraction adsorbents for determination of atrazine and its principal metabolites in water and soil samples by gas chromatography-mass spectrometry. Elsevier. 2008.

21. Rocha, C., Pappas, E.A., Huang, C. Determination of Trace Triazine and Chloroacetamide Herbicides in Tile-Fed Drainage Ditch Water Using Solid-Phase Microextraction Coupled with GC-MS. *Environ. Pollution* 2008. 2008, 152, 239–244.
22. Jianga, H., Adams, C.D., Koffskeyb, W. Determination of chloro-s-triazines including didealkylatrazine using solid-phase extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 2005, 1064, 219–226.
23. Csi, Z., Wang., D., Ma, W.T. Gas chromatography/ion trap mass spectrometry applied for the analysis of triazine herbicides in environmental waters by an isotope dilution technique. *Anal. Chim. Acta.* 2005, 503, 263–270.
24. M. Jesús García-Galán, M. Silvia Díaz-Cruz. Determination of triazines and their metabolites in environmental samples using molecularly imprinted polymer extraction, pressurized liquid extraction and LC–tandem mass spectrometry. *Journal of Hydrology.* 2009.
25. Massart, D.L., a další. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part A.* Amsterdam : Elsevier, 1997. ISBN 0-444-89724-0.
26. Communities, Association of Analytical. *Guidelines for Standard Method Performance Requirements.* Appendix F, p. 9. [Online] 2012.
27. Vyhláška č. 252/2004 Sb. kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody.

## 6 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

<b>ATR</b>	atrazin
<b>ATR-D5</b>	deuterovaný atrazin
<b>CAS</b>	registrační číslo chemických látek
<b>DEA</b>	desethylatrazin
<b>DET</b>	desethylterbutylazin
<b>DIA</b>	desisopropylatrazin
<b>FS</b>	detekce v daném rozsahu hmot
<b>GC</b>	plynová chromatografie
<b>GC-MS</b>	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
<b>GC-MS/MS</b>	plynová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
<b>IS</b>	vnitřní standard
<b>LC</b>	kapalinová chromatografie
<b>LD50</b>	střední smrtelná dávka
<b>LOD</b>	mez detekce
<b>LOQ</b>	mez stanovitelnosti
<b>MS</b>	hmotnostní spektrometrie
<b>MS/MS</b>	tandemová hmotnostní spektrometrie
<b>N/A</b>	daný údaj není dostupný
<b>PR</b>	pracovní roztok
<b>PRO</b>	propazin
<b>SIM</b>	simazin
<b>S/N</b>	poměr signálu k šumu
<b>SPE</b>	extrakce na tuhou fázi
<b>SPME</b>	mikroextrakce na tuhou fázi
<b>SRM</b>	detekce konkrétních přechodů
<b>ST</b>	standard
<b>TBA</b>	terbutylazin
<b>ZR</b>	zásobní roztok

## 7 PŘÍLOHY

Tab. XXV: Data k vypočtení rozlišení mezi IS a ATR v závislosti na průtoku helia.

Průtok helia kolonou [ml/min]	Retenční čas IS [min]	Retenční čas ATR [min]	Šířka píku v polovině výšky IS [min]	Šířka píku v polovině výšky ATR [min]	Rozlišení IS/ATR [1]
1,1	15,32	15,44	0,09	0,09	1,28
1,2	15,00	15,12	0,10	0,10	1,20
1,3	14,73	14,84	0,10	0,09	1,16
1,4	14,47	14,58	0,10	0,09	1,16
1,5	14,23	14,34	0,10	0,09	1,19

Tab. XXVI: Data k vypočtení rozlišení mezi IS a ATR v závislosti na teplotním gradientu.

Nárůst teploty [°C/min]	Retenční čas IS [min]	Retenční čas ATR [min]	Šířka píku v polovině výšky IS [min]	Šířka píku v polovině výšky ATR [min]	Rozlišení IS/ATR [1]
1	22,17	22,39	0,20	0,18	1,16
2	17,85	18,00	0,13	0,12	1,22
3	15,32	15,44	0,10	0,09	1,26
5	12,49	12,57	0,08	0,07	1,07
10	9,35	9,39	0,05	0,05	0,78

Tab. XXVII: Hodnoty specifických hmotností prekurzorových a produktových iontů.

Analyt	Specifická hmotnost iontu [m/z]		
	Ion prekurzoru	Produktový iont 1	Produktový iont 2
DIA	173	158	145
DEA	187	172	145
DET	201	186	145
SIM	201	186	173
ATR	215	200	173
PRO	229	214	172
TBA	229	214	173
IS	220	205	178

Tab. XXVIII: Plochy píků vybraných SRM přechodů v závislosti na energii v kolizní cele.

Energie [eV]	Plocha píku [counts·min]														
	DIA		DEA		DET		SIM		IS	ATR		PRO		TBA	
	173-145	173-158	187-145	187-172	201-145	201-186	201-173	201-186	220-205	215-173	215-200	229-214	214-172	229-173	214-173
1	103249	43115	36515	125058	96664	54108	116443	53995	193012	83666	102214	80900	283771	154415	31895
2	205367	88765	66259	249291	158515	109966	224690	99243	335236	156411	168421	143473	470616	283666	56883
3	397075	173007	126482	476880	280591	220549	441233	182008	602887	280332	312822	258535	781051	508736	101567
4	576191	257554	184334	724098	409594	311848	653670	283990	947599	419046	475028	393389	1114832	734682	144212
5	825301	356743	280741	1032493	622111	427311	973148	427128	1405739	599408	708933	596646	1717506	1060474	210886
6	864084	384176	284310	1032851	709351	413878	949126	448957	1595246	654871	816495	703279	1984570	1133969	230620
7	938693	427033	336195	1073976	817858	429256	1027246	504305	1863260	717228	876446	806520	2318447	1235374	233177
8	840411	406211	338838	1138152	843960	370935	936180	477770	1889252	601292	949057	830089	2395316	1138598	245243
9	676618	337341	290716	895633	776417	298687	681930	412879	1671723	479241	768659	711894	2135630	911386	195776
10	571216	305430	267546	798038	738610	258059	543977	368506	1527210	394619	712407	657226	1993815	767372	170117
11	496401	281098	261216	737661	733667	232318	424812	341274	1423735	323790	694660	643077	1940810	659950	149861
12	363811	226788	204740	600213	632130	191421	306938	283330	1241439	235676	594534	511398	1674149	473356	119539