

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2019

Bc. Václav Rejna

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Katedra anorganické technologie

Stanovení reziduí monomerů v kopolymerních hydrogelech  
určených pro agrochemické aplikace  
Bc. Václav Rejna

Diplomová práce

2019

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Václav Rejna**  
Osobní číslo: **C17550**  
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Anorganická technologie**  
Název tématu: **Stanovení reziduí monomerů v kopolymerních hydrogelech určených pro agrochemické aplikace**  
Zadávací katedra: **Katedra anorganické technologie**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Proveďte rešerši prací věnovaných HPLC akrylamidu, kyseliny akrylové a N, N'- methylenbisakrylamidu.
2. Na základě poznatků získaných literární rešerší navrhnete podmínky stanovení těchto sloučenin v komerčních a laboratorně připravených hydrogelech metodou HPLC.
3. Za podmínek syntézy škrobových hydrogelů navržených v diplomové práci Jana Hrocha (2018) připravte superabsorbent na bázi kukuřičného škrobu, akrylamidu a kyseliny akrylové a navrhnete způsob snížení obsahu či odstranění reziduí výchozích monomerů.
4. Dle časových možností proveďte experimenty vedoucí k posouzení vlivu připravených škrobových hydrogelů na retenční vodní kapacitu půdy a na rychlost jejího vysychání.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce:

**doc. Ing. Ladislav Svoboda, CSc.**

Katedra anorganické technologie

Datum zadání diplomové práce: **20. února 2019**

Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Petra Šulcová, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 10.5.2019

Bc. Václav Rejna

Děkuji panu doc. Ing. Ladislavu Svobodovi, CSc. za pomoc, cenné rady, trpělivost a připomínky při vedení této diplomové práce.

Diplomová práce vznikla za podpory projektu Modernizace praktické výuky a zkvalitnění praktických dovedností v technicky zaměřených studijních programech, reg. číslo CZ.02.2.67/0.0/0.0/16\_016/0002458 operačního programu Výzkum, vývoj a vzdělávání. Tento projekt je spolufinancován Evropskou unií.



EVROPSKÁ UNIE  
Evropské strukturální a investiční fondy  
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



## **ANOTACE**

Byly studovány retenční charakteristiky akrylamidu, kyseliny akrylové a N, N'-metylen-bisakrylamidu při vysokoúčinné kapalinové chromatografii v systému s obrácenými fázemi a navrženy optimální podmínky pro separaci a stanovení těchto látek. Byly připraveny hydrogely na bázi kukuřičného škrobu, akrylamidu a kyseliny akrylové a stanovena jejich bobtnavost, rozpustnost ve vodě, methanolu a ethanolu a obsah zbytkových monomerních složek. Následně byl sledován vliv připravených hydrogelů na retenční vodní kapacitu půdy a na rychlost jejího vysychání.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

HPLC, akrylamid, kyselina akrylová, N, N'-metylen-bisakrylamid, hydrogel

## **TITLE**

Determination of monomer residues in copolymer hydrogels intended for agrochemical applications

## **ANNOTATION**

Retention characteristics of acrylamide, acrylic acid and N, N'-methylene-bisacrylamide in reverse phase high-performance liquid chromatography were studied and optimal conditions for separation and determination of these compounds were proposed. The hydrogels from corn starch, acrylamide and acrylic acid hydrogels were prepared and their swelling capacity, solubility in water, methanol and ethanol and content of residual monomers were determined. Subsequently, the effects of the prepared hydrogels on the capillary soil water retention and on the rate of soil drying were monitored.

## **KEYWORDS**

HPLC, acrylamide, acrylic acid, N, N'-metylen-bisacrylamide, hydrogel

# OBSAH

|  |    |
|--|----|
| Seznam zkratk a značek.....  | 11 |
| Úvod .....   | 12 |
| 1 Teoretická část .....  | 13 |
| 1.1 Hydrogely.....   | 13 |
| 1.1.1 Rozdělení hydrogelů.....   | 14 |
| 1.1.2 Využití hydrogelů.....   | 15 |
| 1.1.3 Hydrogely na bázi roubovaných kopolymerů škrobu.....                 | 17 |
| 1.1.4 Toxikologické vlastnosti derivátů kyseliny akrylové.....             | 18 |
| 1.2 Kapalinová chromatografie .....  | 20 |
| 1.2.1 Princip kapalinové chromatografie.....                               | 20 |
| 1.2.2 Retenční charakteristiky.....  | 22 |
| 1.2.3 Účinnost chromatografické kolony .....                               | 23 |
| 1.2.4 Instrumentace v HPLC.....  | 26 |
| 1.2.5 HPLC akrylamidu, kyseliny akrylové a N, N'-methylen-bisakrylamidu .. | 29 |
| 1.3 Půda a její vlastnosti .....   | 33 |
| 1.3.1 Vodní režim půdy .....   | 33 |
| 1.3.2 Druhy půdní vody .....   | 34 |
| 1.3.3 Kapalná fáze půdy .....  | 35 |
| 2 Experimentální část .....  | 36 |
| 2.1 Chemikálie.....  | 36 |
| 2.2 Použité přístroje a zařízení .....                                     | 37 |
| 2.3 Pracovní postupy.....  | 38 |
| 2.3.1 HPLC akrylamidu, kyseliny akrylové a N, N'-methylen-bisakrylamidu .. | 38 |
| 2.3.1.1 Příprava standardních roztoků analytů a mobilních fází .....       | 38 |
| 2.3.1.2 Stanovení retenčních charakteristik sledovaných látek.....         | 38 |



|         |  |    |
|---------|--|----|
| 2.3.2   | Syntéza a analýza kopolymerního škrobového hydrogelu.....                              | 39 |
| 2.3.2.1 | Syntéza hydrogelu.....   | 39 |
| 2.3.2.2 | Stanovení bobtnacího poměru hydrogelu.....   | 39 |
| 2.3.2.3 | Stanovení vyluhovatelného podílu hydrogelu .....                                       | 40 |
| 2.3.2.4 | Stanovení obsahu monomerů ve výlužích hydrogelů metodou HPLC                           | 40 |
| 2.3.3   | Studium vlastností půdy po aplikaci hydrogelu .....                                    | 40 |
| 2.3.3.1 | Příprava vzorků půdy .....   | 40 |
| 2.3.3.2 | Stanovení plné vodní kapacity půdy .....   | 40 |
| 2.3.3.3 | Stanovení maximální kapilární vodní kapacity půdy.....                                 | 41 |
| 2.3.3.4 | Studium vlivu přítomnosti hydrogelu na rychlost vysychání půdy ...                     | 41 |
| 3       | Výsledky a diskuze.....  | 42 |
| 3.1     | HPLC akrylamidu, kyseliny akrylové a N, N'-methylen-bisakrylamidu .....                | 42 |
| 3.1.1   | Závislost retence sledovaných látek na koncentraci organické složky mobilní fáze ..... | 42 |
| 3.1.2   | Vliv pH mobilní fáze na retenci sledovaných látek.....                                 | 51 |
| 3.1.3   | Volba optimálního složení mobilní fáze pro současné stanovení sledovaných látek .....  | 54 |
| 3.2     | Vlastnosti připraveného kopolymerního škrobového hydrogelu.....                        | 56 |
| 3.2.1   | Bobtnací poměr hydrogelu.....  | 56 |
| 3.2.2   | Vyluhovatelnost hydrogelu .....  | 56 |
| 3.2.3   | Obsah zbytkových monomerů ve výluhu hydrogelu.....                                     | 58 |
| 3.3     | Studium vlastností půdy po aplikaci hydrogelu.....                                     | 59 |
| 3.3.1   | Plná vodní kapacita půdy .....   | 59 |
| 3.3.2   | Maximální kapilární vodní kapacita .....   | 60 |
| 3.3.3   | Rychlost vysychání.....  | 61 |
| 4       | Závěr.....   | 62 |
| 5       | Seznam použité literatury .....  | 65 |

|                       |    |
|-----------------------|----|
| Seznam ilustrací..... | 69 |
| Seznam tabulek.....   | 70 |
| Seznam rovnic.....    | 70 |

## Seznam zkratek a značek

$\varphi, \phi$  – objemová koncentrace

AAM – akrylamid

BA – kyselina boritá

BP – bobtnací poměr

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

KA – kyselina akrylová

konc. - koncentrace

MBA – N, N'- methylen-bisakrylamid

PSA – peroxidisíran amonný

RP – reverse phase

## Úvod

Hydrogely jsou látky, které mají značný potenciál pro využití v mnoha odvětvích. Jejich hlavní devízou je schopnost absorbovat velké množství vody. Vzhledem k této skutečnosti se nabízí jejich využití i v zemědělství pro zlepšení, schopnosti půdy zadržovat srážkovou a závlahovou vodu, případně fungovat současně jako nosiče živin pro rostliny. Produkty s vlastnostmi hydrogelů jsou široce využívány v medicíně, tkáňovém inženýrství, potravinářství a dalších odvětvích.

Jelikož jsou pro zemědělské účely komerčně dostupné a převážně používané syntetické hydrogely na bázi polyakrylamidu, event. kopolymerů akrylamidu s kyselinou akrylovou, je vzhledem k neurotoxickým, mutagenním a potenciálně karcinogenním účinkům akrylamidu na člověka žádoucí pečlivě sledovat přítomnost této sloučeniny ve všech produktech, se kterými člověk přichází do styku, neboť pro něj představuje značné zdravotní riziko. Za hlavní zdroj akrylamidu pro lidský organismus byla donedávna považována voda, kouření a kosmetika. Rozruch proto vyvolalo zjištění výskytu akrylamidu například v pečených a smažených výrobcích z brambor, sušenkách nebo kávě a problematice se věnuje řada výzkumných pracovišť.

Cílem této diplomové práce bylo navrhnout metodiku HPLC stanovení akrylamidu, kyseliny akrylové a N, N'-metylen-bisakrylamidu použitých k syntéze kopolymerního škrobového hydrogelu, připravit tento hydrogel dle postupu navrženého v diplomové práci J. Hrocha [1] a zbytkové monomery v něm stanovit. Dalším úkolem aplikační povahy bylo u připravených hydrogelů posoudit jejich vliv na retenční vodní kapacitu půdy a rychlost jejího vysychání.

# 1 Teoretická část

## 1.1 Hydrogely

Hydrogely tvoří skupinu polymerních materiálů, jejichž hydrofilní zesítená struktura umožňuje zadržet velké množství vody. Tato jejich vlastnost je využívána v řadě průmyslových a environmentálních oblastí. Schopnost hydrogelů absorbovat vodu je dána přítomností hydrofilních funkčních skupin navázaných na polymerní síť. Mnoho materiálů, přirozeně se vyskytujících i syntetických, odpovídá definici hydrogelů.

Během posledních dvou desetiletí byly přírodní hydrogely postupně nahrazovány syntetickými hydrogely, které mají delší životnost, vysokou sorpční kapacitu a vysokou pevnost. Syntetické polymery mají dobře definované struktury, které mohou být modifikovány tak, aby splňovaly požadavky na funkčnost. Rovněž se jedná o stabilní látky v širokém horizontu teplot [2].

V poslední době byly hydrogely definovány jako dvousložkové nebo vícesložkové systémy sestávající z 3D sítě polymerních řetězců a z vody, která vyplňuje prostor mezi makromolekulami. V závislosti na vlastnostech použitého polymeru (polymerů), jakož i na povaze a hustotě síťových spojů, mohou takové struktury v rovnováze obsahovat různá množství vody. V nabobtnalém stavu je hmotnostní podíl vody v hydrogelu mnohem vyšší než hmotnostní podíl polymeru [3].

Hydrogely mohou být syntetizovány různými chemickými způsoby. Ty zahrnují jak jednostupňové postupy, jako je polymerace a paralelní zesítení multifunkčních monomerů, tak vícestupňové postupy zahrnující syntézu polymerních molekul. Dnešní možnosti umožňují navrhovat a syntetizovat polymerní síť s řízením důležitých parametrů, jako je hustota zesítení, biologická degradace, mechanická pevnost a chemická a biologická odezva na podněty [4].

### 1.1.1 Rozdělení hydrogelů

Hydrogely mohou být klasifikovány dle mnoha faktorů:

- 1) Klasifikace na základě původu [5]
  - a. Přírodní
  - b. Syntetické
- 2) Klasifikace podle složení [6; 7; 8]
  - a. Homopolymerní hydrogely jsou takové hydrogely, které jsou odvozené od jediného druhu monomeru, jež je základní strukturní jednotkou obsahující jakoukoliv polymerní síť. Homopolymery mohou mít křížové vazby a závisí na povaze monomeru a polymerační technice.
  - b. Kopolymerní hydrogely se skládají ze dvou nebo více různých druhů monomerů s alespoň jednou hydrofilní složkou, uspořádanou v náhodném bloku nebo střídavé konfiguraci podél řetězce polymerní sítě.
  - c. Multipolymerní interpenetrační hydrogel (IPN), je vyroben ze dvou nezávislých tříd hydrogelů. Zesítěná syntetická a / nebo přírodní polymerní složka, obsažená ve formě sítě. V semi-IPN hydrogelech je jedna složka zesítěný polymer a druhá je nezesítěný polymer.
- 3) Klasifikace na základě konfigurace
  - a. Amorfní
  - b. Semikrystalická – komplex spojující amorfní a krystalickou fázi
  - c. Krystalická
- 4) Klasifikace na základě vazby [9]
  - a. Chemická – trvalé propojení sítě
  - b. Fyzikální – přechodná spojení, vznikající zapletením polymerních řetězců nebo fyzikální interakcí (iontové reakce, vodíkové vazby, hydrofobní reakce).
- 5) Klasifikace na základě struktury v závislosti na technice polymerace
  - a. Matrice
  - b. Film
  - c. Mikrosféra

- 6) Klasifikace podle síťového elektrického náboje
- a. Neiontové (neutrální)
  - b. Iontové (zahrnující aniontové nebo kationtové)
  - c. Amfoterní elektrolyt (amfolytický) obsahující kyselé a bazické skupiny
  - d. Biontové (polybetainy) obsahující jak aniontové, tak i kationtové skupiny v každé strukturně opakující se jednotce.

### 1.1.2 Využití hydrogelů

Od objevu prvních hydrogelů se jejich použití rozrostlo do mnoha odvětví. V současné době jsou hydrogely využívány v zemědělství, potravinářství, farmaceutickém průmyslu, biomedicínských aplikacích, tkáňovém inženýrství, hygienických produktech, ale také k tvorbě umělého sněhu, v diagnostice, při separaci biomolekul nebo buněk, v biosenzorech a dalších aplikacích [2].

V zemědělství se hydrogely využívají především pro jejich schopnost zlepšit půdní vlastnosti. Zlepšují využití půdní vláhly a přístup vody a minerálních látek ke kořenům rostlin. Opakovanými cykly bobtnání a vysychání rovněž provzdušňují půdu a přispívají k její drobtovité struktuře. Po aplikaci hydrogelů do půdy dochází ke snížení stresu rostlin při špatných klimatických podmínkách (např. při nedostatku srážek). V tomto směru se jako perspektivní jeví polysacharidové hydrogely na bázi alginátu sodného a montmorillonitové matrice, které jsou charakteristické dlouhodobým uvolňováním vody a živin. Hydrogely na bázi kyseliny akrylové jsou využívány na vázání těžkých kovů, na prevenci proti erozi půdy a na zvýšení dostupnosti vody pro rostliny [10].

Ve farmaceutickém průmyslu se s hydrogely setkáváme nejdříve, používaly se totiž při výrobě kontaktních čoček a tento produkt má blízko k české chemii, protože objevitelem nebyl nikdo jiný než Otto Wichterle [11].

Široké využití našly hydrogely v medicíně a farmacii, například při ošetřování ran, jako nosiče léčiv, při léčbě kostí, kůže a dutiny ústní. Jako jedny z prvních aplikací hydrogelů v lékařství byly kontaktní čočky, jejich objevitelem nebyl nikdo jiný než akademik Otto Wichterle. Tyto hydrogely jsou připravovány z přírodních materiálů, biopolymerů a/nebo biologicky odbouratelných polymerů [12].

V potravinářském průmyslu se hydrogely hojně využívají ve formě zahušťovadel a gelotvorných látek. Využívanými látkami jsou rostlinné gummy, deriváty celulózy nebo modifikované škroby. Jedná se o látky přírodního charakteru, které nejsou zdraví škodlivé [13].

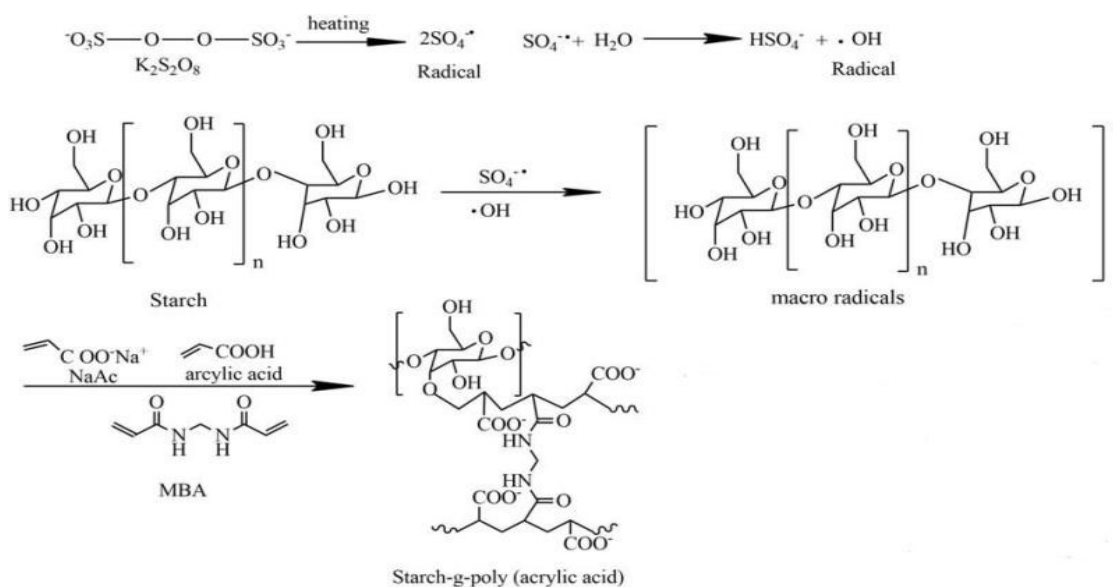
Hydrogely jsou dále používány jako iontově-výměnná a flokulační činidla a našly své využití i v oblasti čištění odpadních vod. Hlavními nečistotami odpadních vod jsou sloučeniny dusíku, fosforu, těžké kovy a dále viry, bakterie a mikroorganismy. Problém v odpadních vodách dělají těžké kovy, které jsou jedy pro živé organismy. Způsobů, jak tyto kovy z vody odstranit je několik – reversní osmóza, chemické srážení, elektrodialýza a použití iontoměničů. Tyto metody jsou nákladné, a proto se výzkum ubírá směrem využití přírodních látek na bázi polysacharidů, které by tyto polutanty zachycovaly na principu adsorpce. Kopolymery škrobu s polyakrylamidem dosahují dobrých výsledků jako flokulační činidla, hydrogely na bázi hydrolyzovaného škrobu a kyseliny akrylové jsou sorbenty využitelnými pro odstranění těžkých kovů. Těžké kovy, zejména rtuť, účinně zachycuje kopolymer škrobu a (poly)-metaakrylamidu [14].



### 1.1.3 Hydrogely na bázi roubovaných kopolymerů škrobu

Biodegradabilní hydrogely na bázi škrobů roubovaných kyselinou akrylovou a akrylamidem mohou být vhodnou ekologickou alternativou ke komerčním plně syntetickým polymerům kyseliny akrylové a akrylamidu. Vysoké bobtnavosti je dosaženo při sníženém obsahu potenciálně rizikového akrylamidu, lze je aplikovat v menších dávkách nežli syntetické produkty vykazující nižší bobtnavost (v rozmezí 250–300 g vody/g navážky hydrogelu), vedle funkce regulátoru půdní vláhly mohou být i zdrojem živin, zejména močovinového dusíku.

Nezanedbatelnou předností hydrogelů obsahujících ve své molekule karboxylové funkční skupiny pocházející z kyseliny akrylové je i jejich poměrně vysoká kationtově výměnná kapacita. Reakční schéma vzniku a strukturní vzorec graft-kopolymeru škrobu a kyseliny akrylové je uvedeno níže na obrázku. Další výzkum v oblasti hydrogelů na bázi roubovaných polysacharidů je zaměřen na optimalizaci podmínek jejich syntézy, na odstranění zbytkových monomerních nečistot z produktů a na přípravu biodegradabilních hydrogelů graftovaných zdravotně zcela nezávadnými monomery [1].



Obrázek 1 - Schéma vzniku kopolymeru škrobu a kyseliny akrylové zesítěného N, N'-metylen-bisakrylamidem [15]

### 1.1.4 Toxikologické vlastnosti derivátů kyseliny akrylové

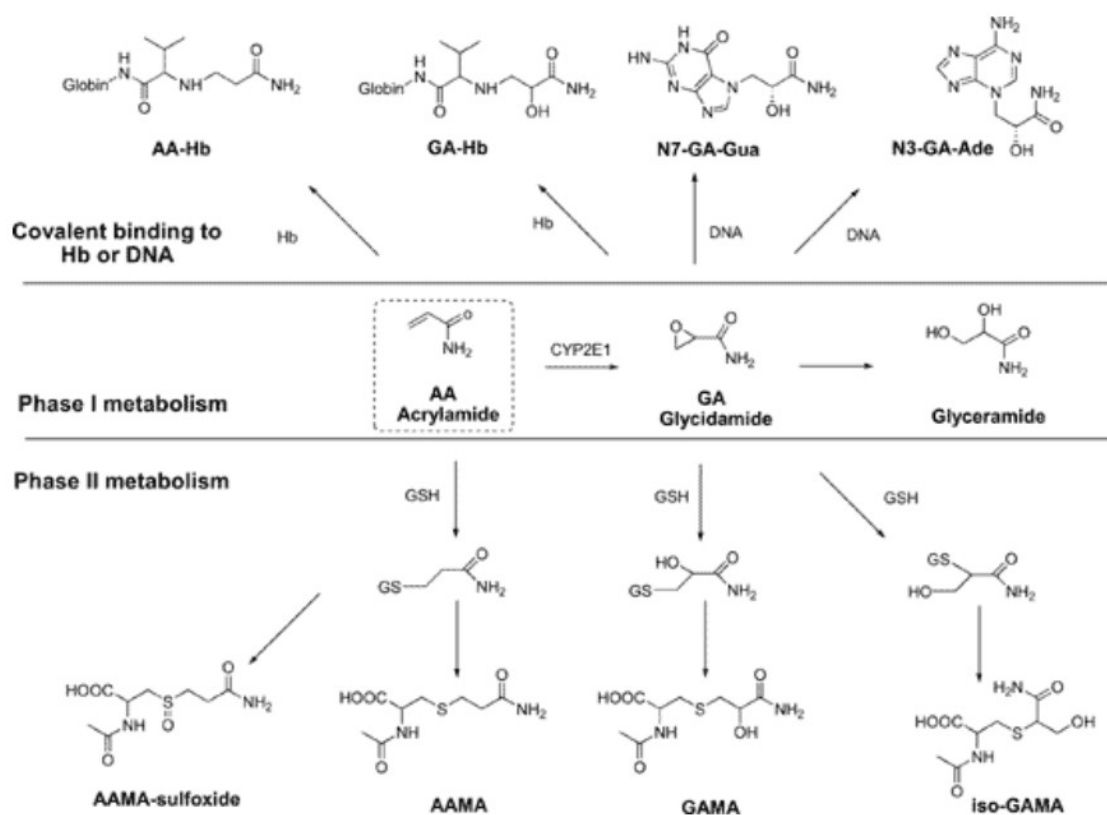
Akrylamid (AAM) je chemická látka používaná v mnoha průmyslových odvětvích po celém světě. Akrylamid se přirozeně tvoří v potravinách tepelně upravených (pečených, smažených) při vysokých teplotách. Nedávné výzkumy ukázaly, že akrylamid je neurotoxickým, reprodukčním toxikantem a karcinogenem pro živočišné druhy. U lidí byly pozorovány pouze neurotoxické účinky a pouze při vysokých úrovních expozice. Mechanismus základních neurotoxických účinků AAM, může být důvodem pro jiné toxické účinky pozorované u zvířat [16, 17].

Tento mechanismus zahrnuje interferenci s motorickými proteiny kinesinu v nervových buňkách nebo s fúzními proteiny při tvorbě vezikul na nervovém konci a případné smrti buněk. Neurotoxicita a výsledné změny chování mohou ovlivnit reprodukci zvířat vystavených AAM s výsledným sníženým reprodukčním schopností. Motorické proteiny kinesinu jsou dále důležité pro pohyblivost spermií, což by mohlo zapříčinit změny při reprodukci.

Největší podíl na denním příjmu AAM mají ve většině zemí následující potraviny: bramborové hranolky (16-30 %), bramborové lupínky (6–46 %), káva (13-39 %), pečivo a keksy (10-20 %) a chléb a topinky (10-30 %). Na základě šetření spotřeby potravin lze předpokládat průměrný přívod akrylamidu pro individua ve věku 17-70 roků na úrovni asi 40 ug/kg tělesné hmotnosti/den. Vzniku akrylamidu v potravinách nelze zabránit, lze však snížit hodnoty obsahu v potravinách. Doporučuje se omezit silné opekání při vysokých teplotách, a dosahování příliš tmavé barvy při pečení a opékání brambor, placek, chleba, pizzy a koláčů. Teploty při pečení v troubě by neměly překročit 200 °C, ve fritéze by teplota neměla překročit 175 °C [18].

Jelikož by jakákoli úroveň expozice genotoxické látky mohla potenciálně vést k poškození DNA a k rakovině, není možné stanovit tolerovatelný denní příjem akrylamidu v potravinách. Namísto toho byl proveden odhad rozmezí dávky, v jehož rámci akrylamid pravděpodobně způsobí malý, avšak měřitelný výskyt tumorů (takzvané „neoplastické“ účinky) nebo má jiné potenciální nežádoucí účinky (neurologické účinky, účinky na prenatální a postnatální vývoj a na mužské reprodukční schopnosti). Dolní hranice tohoto rozmezí se nazývá spodní limitní hodnota intervalu spolehlivosti referenční dávky (BMDL<sub>10</sub>)

U tumorů byla zvolena BMDL<sub>10</sub> 0,17 mg/kg tělesné hmotnosti/den. U jiných účinků byly neurologické změny považovány za nejrelevantnější při BMDL<sub>10</sub> 0,43 mg/kg tělesné hmotnosti/ den. Střední smrtelná dávka LD<sub>50</sub> se u savců pohybuje v rozmezí 100–200 mg/kg [19; 20].



Obrázek 2 - Metabolismus akrylamidu [21]

N, N' - methylen-bisakrylamid (MBA) způsobuje podráždění očí, plic a gastrointestinálního traktu u laboratorních zvířat. Hlodavcům, které byly podávány opakované perorální dávky MBA byla pozorována anémie, nespecifické účinky na nervový systém, dýchací potíže a poškození plic. U člověka se jednalo o alergickou kontaktní dermatitidu s potenciálními neurotoxickými a karcinogenními účinky. Může způsobit genetické vady, neplodnost a poškození orgánů. Střední smrtelná dávka LD<sub>50</sub> se u savců pohybuje v rozmezí 380–401 mg/kg [22; 23].

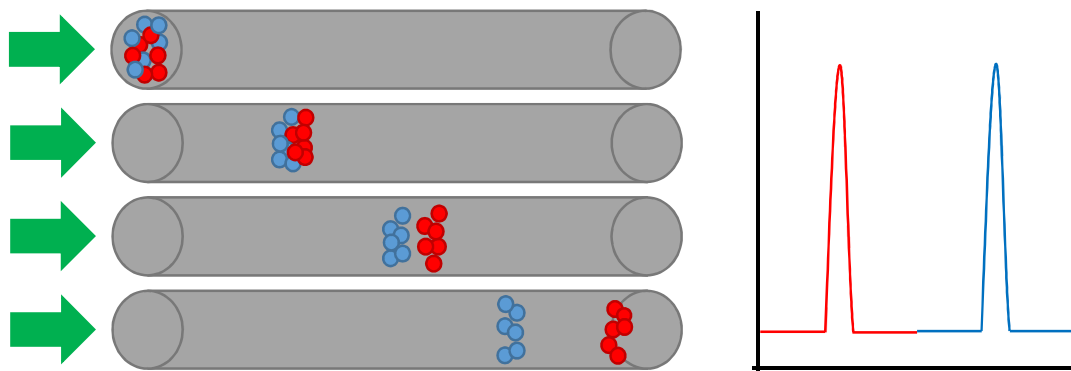
Kyselina akrylová je hořlavá, zdraví škodlivá látka. Způsobuje těžké poleptání kůže a očí, je zdraví škodlivá při vdechování a vysoce toxická pro vodní organismy. Střední smrtelná dávka LD<sub>50</sub> se u savců pohybuje v rozmezí 140–1400 mg/kg [24; 25].

## 1.2 Kapalinová chromatografie

### 1.2.1 Princip kapalinové chromatografie

Chromatografie je separační metoda založená na rozdílné distribuci rozdělovaných látek mezi dvěma nemísitelnými fázemi – mobilní (pohyblivou) fází a stacionární (nepohyblivou) fází. Mobilní fází je kapalina či plyn, stacionární fází se pak rozumí tuhá látka, případně kapalina ukotvená na tuhém nosiči. Tato fáze je v případě sloupcového uspořádání obsažena v chromatografické koloně ve formě sorbentu, může však být nanášena na deskovité podložce ve formě tenké vrstvy (tenkovrstvá chromatografie), případně na papírovém nosiči (papírová chromatografie) [26].

Nejznámějším a v praxi nejvíce používaným uspořádáním kapalinové chromatografie je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography). V takovémto kolonovém uspořádání je mobilní fáze do systému přiváděna pomocí vysokotlakého čerpadla a k separaci látek dochází za tlaků až několika desítek MPa, což eliminuje difuzní rozmývání jejich elučních zón v koloně s velmi jemnozrnným sorbentem a umožňuje dosahovat vysokých separačních účinností. Během průchodu separovaných látek kolonou dochází k opakovanému ustalování a porušování jejich rovnováhy mezi stacionární a mobilní fází a k rozdílnému zdržování na koloně způsobenému odlišnou afinitou k oběma fázím (Obrázek 3) [27].



Obrázek 3 - Separace dvousložkové směsi v chromatografické koloně [27]

Distribuci složek mezi dvěma fázemi lze popsat distribuční konstantou  $K_D$  definovanou rovnicí 1:

$$K_D = \frac{c_s}{c_m}$$

Rovnice 1 - Distribuční konstanta  $K_D$

kde  $c_s$  je koncentrace složky ve stacionární fázi a  $c_m$  koncentrace složky v mobilní fázi. Vyšší hodnota distribuční konstanty poukazuje na delší dobu setrvání molekuly ve stacionární fázi a tím vyšší retenci. Látky se tedy pro rozdělení musí lišit svými distribučními konstantami.

Podle fyzikálně chemických principů, na nichž je separace látek založena, se kapalinová chromatografie dělí na [28]:

- adsorpční (separace látek se uskutečňuje na základě rozdílné intenzity interakcí jejich molekul s povrchem adsorbentu, kterým může být případně nosič s chemicky zakotvenou kapalnou stacionární fází. Pokud má nepolární charakter, hovoří se o HPLC s obrácenou fází),
- iontově výměnnou (k separaci dochází na základě iontově výměnných rovnováh mezi analyty, ionexovou stacionární fází a složkami eluentu),
- gelovou permeační, při níž dochází k separaci látek dle velikosti jejich molekul a velikosti pórů gelu (malé molekuly pronikají do pórů gelu, zadržují se více, nežli velké),
- afinitní (stacionární fáze obsahuje zakotvené ligandy, na které se rozdělovaná látka váže).

Nejpoužívanější metodou HPLC v praxi je RP-HPLC (z angl. Reverse Phase HPLC), neboli HPLC s obrácenou fází, která se používá k separaci polárních látek. Při této metodě dochází k separaci látek na koloně s nepolárním charakterem náplně, např. na silikagelu jako nosiči s chemicky vázaným oktadecylovým řetězcem, za použití silně polárních rozpouštědel jako mobilní fáze. Tou nejčastěji bývají binární směsi voda-methanol a voda-acetonitril. K rozdělení směsi látek dochází na základě tzv. solvofobních (hydrofobních) interakcí, kdy jsou nepolární látky z mobilní fáze vytěsňovány a na základě Van der Waalsových sil poutány k povrchu sorbentu, a to tím silněji, čím je jejich polarita nižší. Silně polární látky interagují se stacionární fází málo či vůbec a jsou eluovány nejdříve, s klesající polaritou jejich retence na koloně vzrůstá. Zpravidla se pracuje v režimu gradientové eluce, při níž se během analýzy snižuje polarita mobilní fáze vyšším přidávkem složky organické fáze, což vede k rychlejší eluci nepolárních látek z kolony.

Bylo navrženo několik mechanismů a vztahů popisujících závislost retence chromatografovaných látek na složení mobilní fáze v systému s obrácenými fázemi, jako příklad lze uvést rovnicí 2 [29].

$$k' = k_0 \cdot 10^{-nc}$$

Rovnice 2 - Závislost retenčního faktoru na koncentraci méně polární složky mobilní fáze v systému s obrácenou fází

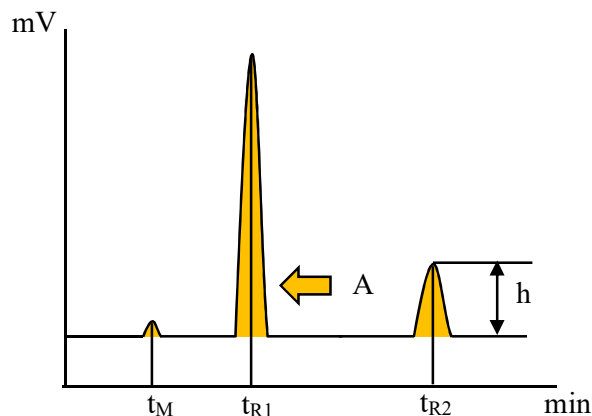
kde  $k'$  je retenční faktor,  $c$  koncentrace méně polární složky mobilní fáze a  $k_0$  a  $n$  jsou konstanty. Jak již bylo zmíněno výše, eluce může být prováděna dvěma způsoby. Tím prvním je tak zvaná isokratická eluce s mobilní fází o konstantním složení, a tedy neměnné eluční síle. Druhým typem je pak tzv. gradientová eluce, při níž se eluční síla mobilní fáze s rostoucím obsahem silnější eluční složky zvyšuje. Isokratická eluce je vhodnější v případě látek, které mají stejné nebo podobné fyzikálně-chemické vlastnosti, tedy i hodnotu  $K_D$ . Naproti tomu gradientová eluce přichází v úvahu u látek, které mají tuto vlastnost výrazně odlišnou a isokratická eluce by zde byla významně časově náročnější. Výstupem z analýzy je signál detektoru převedený do formy chromatografického záznamu – chromatogramu. Jedná se o časovou závislost veličiny měřené detektorem. Typickým tvarem těchto křivek je gaussovský průběh, který je označován jako pík.

### 1.2.2 Retenční charakteristiky

Mezi základní charakteristické veličiny při dělení látek patří retenční nebo také eluční čas  $t_R$  a s ním související retenční objem  $V_R$ . Retenční čas je doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky (vrcholu píku). Retenční objem je pak objem mobilní fáze, která proteče za tuto dobu kolonou při objemovém průtoku  $F_M$ . V chromatografii je  $t_R$  kvalitativní charakteristikou látky, kvantitativním parametrem je potom plocha píku ( $A$ ), případně výška píku ( $h$ ). Vzájemný vztah mezi retenčním časem a retenčním objemem je dán rovnicí 3, na obrázku 2 je názorně vysvětlen význam kvalitativních a kvantitativních parametrů.

$$V_R = F_M \cdot t_R$$

Rovnice 3 - Výpočet retenčního objemu



Obrázek 4 - Kvantitativní a kvalitativní charakteristiky chromatografického procesu [27]  
 $t_R$  – retenční časy látek,  $t_M$  – retenční čas nezadržované složky (mrtvý čas),  $A$  – plocha píku,  
 $h$  – výška píku.

Z takto získaných parametrů lze vypočítat retenční (kapacitní) faktor  $k$  podle rovnice 4:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{V_R - V_M}{V_M}$$

Rovnice 4 - Výpočet retenčního faktoru

Z rovnice vyplývá, že všechny dělené látky v mobilní fázi setrvávají stejný čas, liší se pouze dobou setrvání ve stacionární fázi. Doba, po kterou látky zůstávají ve stacionární fázi je nazývána redukovaný retenční čas  $t'_R$ .

$$t'_R = t_R - t_M$$

Rovnice 5 - Výpočet redukovaného retenčního času

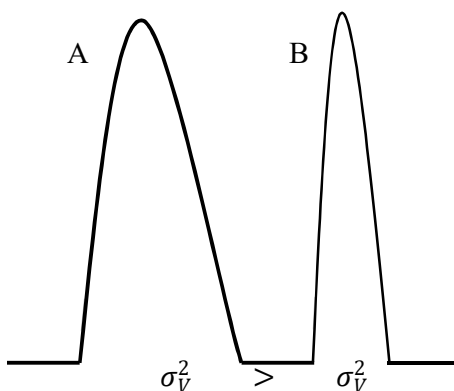
### 1.2.3 Účinnost chromatografické kolony

Cílem chromatografické separace je dosažení ideálního rozdělení látek v co možná nejkratším čase. Mírou účinnosti kolony je bezrozměrná veličina  $N$  nazývaná počet teoretických pater a definovaná rovnicí 6,

$$N = \frac{V_R^2}{\sigma_V^2} = \frac{t_R^2}{\sigma_T^2} = \frac{L^2}{\sigma_L^2}$$

Rovnice 6 - Výpočet počtu teoretických pater

příčemž  $\sigma_v$  je směrodatná odchylka chromatografického píku v objemových jednotkách a obdobně toto platí i pro vyjádření směrodatné odchylky v délkových jednotkách ( $L$ ,  $\sigma_L$ ) nebo v časových údajích ( $t_R$ ,  $\sigma_t$ ). Čím vyšší je počet teoretických pater  $N$ , tím méně je zóna analytu během průchodu kolonou rozšířena, a tím je tato kolona účinnější. Počet teoretických pater není pro danou kolonu konstantní veličinou, ale závisí na retenčním faktoru složky, která je pro výpočet použita a dále na stavu stacionární fáze (historii použití kolony). Vzhled píků analytu pro kolonu s nízkou (A) a vysokou účinností (B) je znázorněn na následujícím obrázku.



Obrázek 5 - Ukázka separační účinnosti kolony [27]

Počet teoretických pater kolony závisí na:

- délce kolony ( $L$ )
- retenčním faktoru (retenčním čase  $t_R$ )
- rychlosti průtoku mobilní fáze ( $u$ )
- velikosti částic náplně chromatografické kolony ( $d_p$ )
- teplotě ( $T$ )
- viskozitě mobilní fáze ( $\eta$ )



Pro praktické stanovení počtu teoretických pater se používá rovnice 7:

$$N = konst \left( \frac{V_R}{w} \right)^2$$

Rovnice 7 - Praktický výpočet počtu teoretických pater

kde  $w$  je šířka píku v jeho příslušné výšce. Nejčastěji je volena šířka píku v 50 % jeho výšky, kdy má konstanta hodnotu 5,54, nebo se šířka odečte na úrovni základní linie mezi průsečíky tečen proložených v inflexním bodě eluční křivky (odpovídá čtyřnásobku směrodatné odchylky). V tomto případě má konstanta hodnotu 16.

Účinnost separační kolony tak významně závisí na šířce elučních píků – čím bude větší, tím nižší bude počet teoretických pater, a tedy horší oddělení elučních zón separovaných látek. Existují kinetické děje, které způsobují rozmývání těchto zón, což má významný dopad na výsledný tvar chromatografického píku, a tím i na účinnost separace celého chromatografického procesu. Čím delší čas stráví molekula ve stacionární fázi, tím jsou tyto vlivy výraznější, a tím širší je eluční zóna.

Mezi nejvýznamnější děje, které mají na rozmývání eluční zóny vliv, patří tři nezávislé aditivní procesy:

- vířivá difúze analytu v mobilní fázi při průchodu náplní kolony,
- molekulární (podélná) difúze analytu v mobilní fázi,
- odpor proti převodu hmoty mezi mobilní a stacionární fází.

Pro výškový ekvivalent  $H$  teoretického patra, který by měl být co nejnižší, lze pak psát rovnici 8:

$$H = H_v + H_d + H_m$$

Rovnice 8 - Výpočet výškového ekvivalentu teoretického patra

kde  $H_p$  – příspěvek vířivé difúze,  $H_d$  – příspěvek molekulární difúze analytu a  $H_m$  – příspěvek odporu proti převodu hmoty.

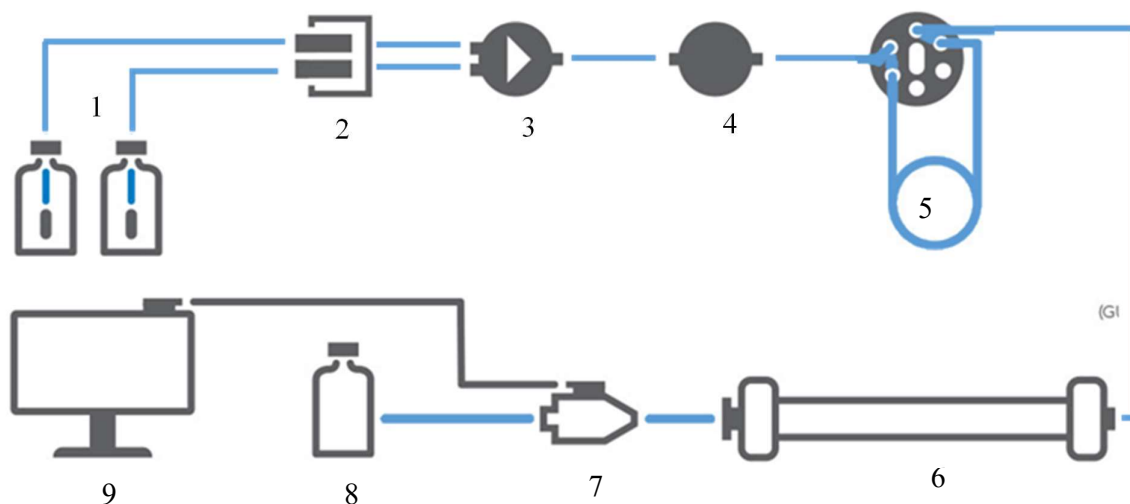
Analytik nemá při používání komerčních separačních kolon příliš možností, jak tyto negativní jevy eliminovat, neboť jsou dány vlastnostmi sorbentu ( $H_m$ ) a kvalitou naplnění kolony ( $H_v$ ). Optimalizací průtokové rychlosti eluentu lze pouze do určité míry potlačit příspěvek podélné difuze ( $H_d$ ), zvýšení teploty může vést ke zrychlení difuze molekul

separovaných látek v pórech částic sorbentu a snížení odporu vůči převodu hmoty ( $H_m$ ). A tak je nutné eliminovat zejména tzv. mimokolonové příspěvky k rozšíření eluční zóny v nástřikovém zařízení, spojovacích zařízeních (kapilárách, spojkách, filtrech) a v detektoru. Mimokolonové příspěvky mohou být nejvíce ovlivněny volbou spojovacích kapilár, a proto musí být tyto cesty mezi nástřikovým zařízením a kolonou a kolonou a detektorem voleny tak, aby zbytečně nezvyšovaly mrtvý objem celého chromatografického systému, a tím nepřispívaly k rozmývání elučních zón.

### 1.2.4 Instrumentace v HPLC

Kapalinový chromatograf se sestává z částí plnících tyto funkce:

- 1) uchování, filtrace, odplynění a transport mobilní fáze (zásobníky mobilní fáze, filtry, odplyňovací zařízení, vysokotlaké čerpadlo)
- 2) dávkování vzorku (autosampler, manuální dávkovací ventil)
- 3) separace látek (chromatografická kolona, termostat kolony)
- 4) detekce látek (detektor)
- 5) záznam dat pro následné vyhodnocení (počítač a software)



Obrázek 6 - Blokové schéma kapalinového chromatografu [30; 31]

1 - zásobníky mobilních fází, 2 – odplyňovač mobilních fází, 3 - směšovač, 4 - vysokotlaké čerpadlo, 5 - dávkovač vzorku, 6 - chromatografická kolona, 7 - detektor, 8 - sběrač frakcí, 9 - datová stanice

Kapalinový chromatograf může mít samozřejmě řadu modifikací. Některé komponenty lze vyřadit nebo naopak přidat. Při isokratické eluci je mobilní fáze vedena ze zásobníku mobilní fáze (1) do vysokotlakého čerpadla (4). Při gradientové eluci jsou proudy složek ze dvou nebo více zásobníků míseny podle zvoleného programu ve směšovači (3), který je zařazený před vysokotlakým čerpadlem (4). Gradientová eluce může být také uskutečněna pomocí dvou vysokotlakých čerpadel, kdy je směšovač zařazen až za nimi.

Zbavení mobilní fáze v ní rozpuštěného vzduchu je zajištěno odplyňovačem (2). Dále je mobilní fáze vedena přes zařízení pro dávkování vzorku (5) do chromatografické kolony (6), která je spojena s detektorem (7), za který může být zařazen sběrač jednotlivých frakcí (8). Z detektoru je signál veden do datové stanice (9), kde je uložen a následně zpracován. Ve všech konfiguracích je snahou vytvořit sestavu s co možná nejmenšími mimokolonovými mrtvými (volnými) objemy, aby nedocházelo k rozmývání chromatografických píků.

Každá kolona je složena ze dvou částí – vlastní tělo kolony, kterým je v rovná trubice s hladkým vnitřním povrchem a koncovka kolony. Koncovka má tři funkce: zajistit těsnost systému v oblasti tlaků používaných v HPLC, distribuovat mobilní fázi a analyt vždy rovnoměrně přes celý průřez chromatografického lože a zadržovat náplň kolony. Ke spojení kolony s dávkovačem a detektorem jsou používány kovové nebo polyetheretherketonové kapiláry a hydraulické spojky. Distribuce mobilní fáze i analytu vždy rovnoměrně přes celý průřez chromatografického lože musí být dosaženo v co nejmenším objemu a s minimálními mimokolonovými objemovými příspěvky pro zabránění rozšíření eluční zóny analytu. Způsob distribuce mobilní fáze i analytu ovlivňuje jak účinnost, tak rozlišení a projevuje se více u krátkých kolon o velkém vnitřním průměru než u dlouhých kolon malého vnitřního průměru [27].

Vedle vhodné kolony a složení mobilní fáze je pro úspěšnou chromatografickou analýzu nutné zvolit vyhovující typ detektoru. Pro HPLC je jich k dispozici několik lišících se měřenou veličinou, selektivitou (odezva závisí pouze na koncentraci analytu), resp. univerzálností (odezva je úměrná celkové vlastnosti eluátu), citlivostí, cenovou dostupností. K nejpoužívanějším patří detektory spektrofotometrický (UV–VIS), infračervený, fluorimetrický, refraktometrický, elektrochemický (amperometrický, coulometrický), vodivostní, hmotnostní spektrometr.

Pro látky absorbující v UV či viditelné oblasti spektra, je nejvíce používán spektrofotometrický detektor, v módu tzv. nepřímé fotometrie použitelný i pro detekci látek neabsorbujících. Pracuje s mezí detekce 0,1 – 1 ppm. Jeho pokročilou variantou je tzv. diode array (DAD) detektor umožňující snímat během analýzy UV-VIS spektra eluátu.

Vysokou selektivitou a citlivostí se vyznačuje fluorimetrický detektor vhodný pro analyty emitující po vybuzení fluorescenční záření a schopný detekovat koncentrace 1–100 ppb. Neselektivním, univerzálním detektorem je naopak refraktometrický detektor, jehož odezva silně závisí na teplotě, na rychlosti průtoku a složení eluentu a nelze ho tedy použít pro gradientovou eluci. Selektivní pro látky podléhající oxidačně redukčním reakcím jsou detektory amperometrický a coulometrický měřící proud při průchodu těchto látek měrnou celou s elektrodami, Vodivé analyty lze výhodně detekovat vodivostním detektorem. Elektrochemické detektory vynikají rovněž vysokou citlivostí (1 – 100 ppb).

Univerzálním, a přitom vysoce citlivým detektorem je přístroj pro detekci rozptylu světla ELSD (Evaporative Light Scattering Detector) měřící rozptyl světla na tuhých částicích rozptýlených v proudu plynu po odpaření mobilní fáze (analyt musí být méně těkavý než eluent), je vhodný pro gradientovou eluci. Detekčním systémem vhodným současně pro kvalitativní a kvantitativní analýzu je hmotnostní spektrometr, kterým lze detekovat rovněž řádově jednotky až stovky ppb [32; 33].

Při výběru HPLC detektoru je třeba sledovat následující vlastnosti [27]:

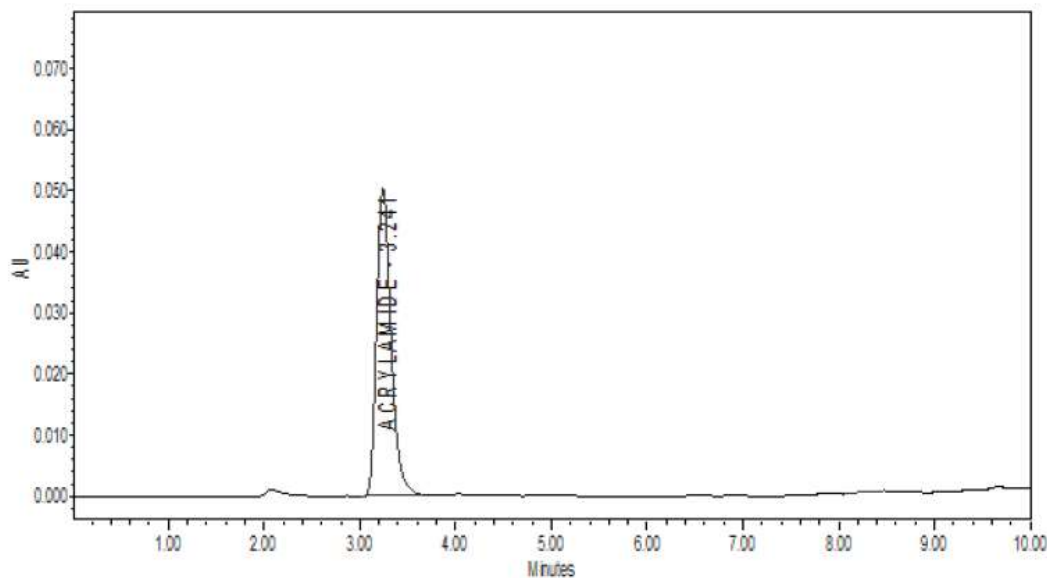
- vysoká citlivost a předvídatelná odezva
- odezva pro všechny analyty – univerzálnost
- specificita
- linearita (široký lineární dynamický rozsah)
- spolehlivost a snadnost použití
- nulový příspěvek k mimokolonovému rozmývání eluční zóny
- nedestruktivnost
- signál nezávislý na složení mobilní fáze (gradientová eluce)
- signál nezávislý na změně teploty a průtoku
- kvalitativní informace pro detekované píky

## 1.2.5 HPLC akrylamidu, kyseliny akrylové a N, N'-metylen-bisakrylamidu

V literatuře je uváděno několik způsobů a možností, jak k analýze studovaných látek přistupovat.

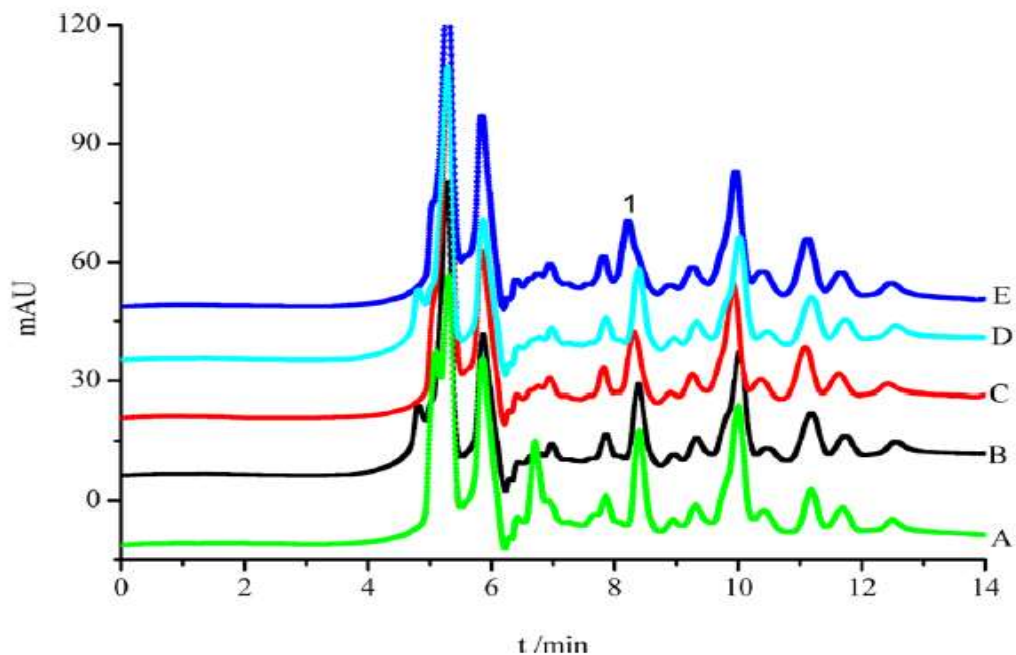
V práci [34] byla k separaci AAM, KA a MBA použita gradientová eluce na koloně C-18 Phenomenex Jupiter 5 $\mu$  C-18 300A, 4,6 mm x 25 cm s mobilní fází tvořenou směsí voda-methanol, doba gradientu činila 25 minut. PH mobilní fáze bylo upraveno přidavkem KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Chromatografované látky byly detekovány při 205 nm, teplota kolony činila 20 °C, průtok 1 ml/min, retenční časy měly hodnoty 5,0 min (AAM), 9,6 min (KA) a 23,1 min (MBA).

Následující zdroj [35] uvádí jako možnou aparaturu sestávající se z Phenomenex C18, 5 $\mu$ ; 4,6 mm x 250 mm s mobilní fází tvořenou tvořenou směsí voda-acetonitril (80:20). PH mobilní fáze bylo upraveno přidavkem kyseliny fosforečné, objem nástřiku 20  $\mu$ l, průtok byl nastaven na 1 ml/min a retenční časy měly hodnoty 3,24 min (AAM) a 8,25 (KA).



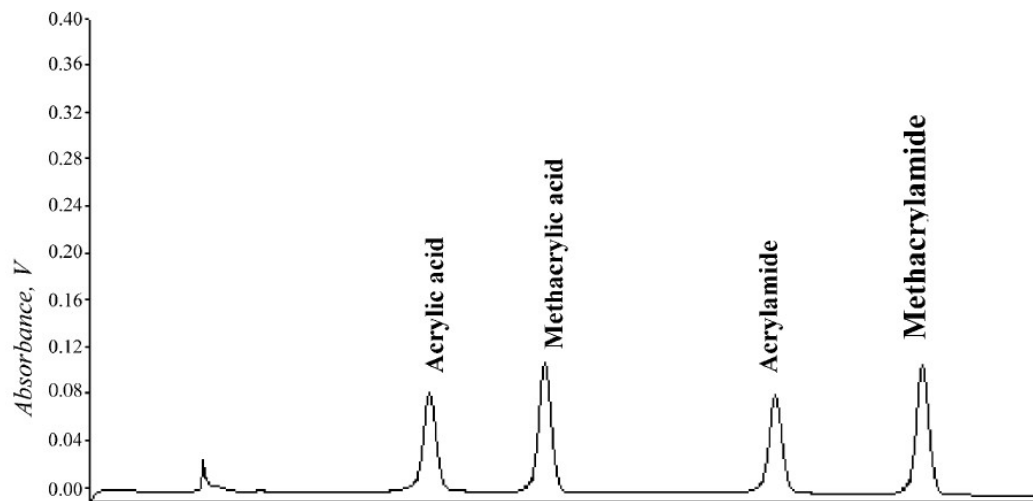
Obrázek 7 - Chromatogram stanovení AAM [35]

Další možností [36] bylo použití kolony Ultimate XB-C18 5 $\mu$ ; 4,6 mm x 250 mm s mobilní fází methanolu a vody (10:90), průtokem 0,5 ml/min, pH mobilní fáze nebylo měněno. Chromatografické látky byly detekovány při 200 nm, teplota kolony činila 30 °C. Retenční čas měl hodnotu 8,49 min (AAM).



Obrázek 8 - Chromatogram stanovení AAM [36]

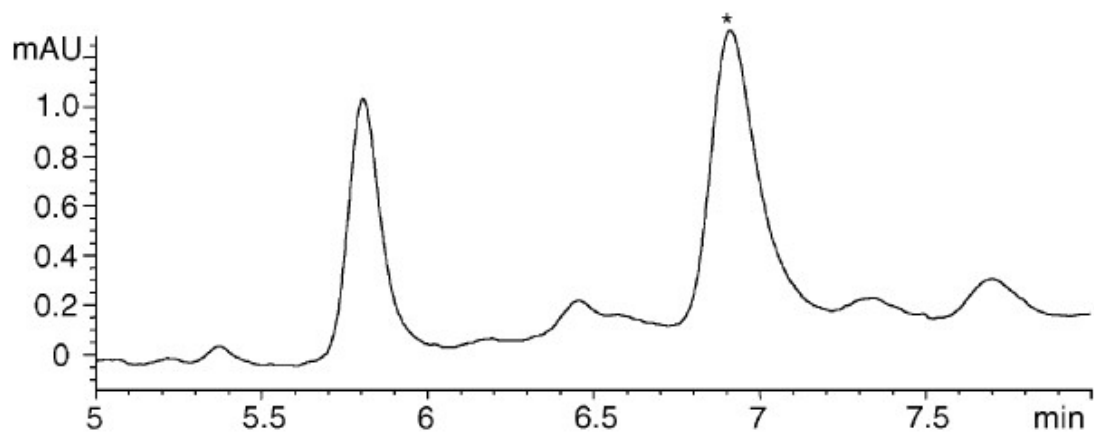
V další práci [37] bylo použito zařízení složeného z Shimadzu 10AD s UV detektorem (nastavena byla hodnota 200 nm), kolonou Aminex HPX- 87H, 7.8 mm x 300 nm, teplota kolony byla 30 °C pomocí termostatu CTO-10A Shimadzu. Mobilní fázi byl 20 obj.% acetonitril. Retenční čas měl hodnotu 36,51 min resp. 27,51 min (AAM) v závislosti na typu použitého eluentu v průběhu experimentu.



Obrázek 9 – Chromatogram stanovení AAM [37]

V následujícím pokusu [38] bylo použito spektrofotometrického detektoru Shimadzu, čerpadla Shimadzu LC600, autosampleru Alcott 728 s P.E. Nelson datovou stanicí. Použita byla kolona Nalco 4,6 mm x 150 mm; 5 $\mu$ . Chromatografované látky byly detekovány při 210 nm, průtok 0,6 ml/min, retenční časy měly hodnoty 16,5 min (AAM), 23,0 min (KA).

Chromatografická separace v dalším případě [39] byla provedena na koloně Atlantis dC18 s průtokem 1 ml/min při teplotě 25 °C. Mobilní fází byly postupně acetonitril a methanol. Akrylamid byl detekován při 226 nm. Retenční čas AAM byl 6,92 min.



Obrázek 10 - Chromatogram stanovení AAM [39]



### 1.3. Půda a její vlastnosti

Půda je základním výrobním prostředkem v zemědělství. Na její kvalitě (bonitě, zúrodnění) v podstatě závisí zemědělská produkce. Péče o půdu je předmětem jejího zúrodnování, tj. soustavy různých agrotechnických a melioračních opatření, která chrání půdu před poškozováním, zlepšují její vývojové podmínky a zabezpečují tak vyšší výnosy pěstovaných plodin. Zúrodnovací opatření se v současné době při intenzivní rostlinné výrobě stávají jedním z limitujících faktorů a je mu nutno jim věnovat zvýšenou pozornost. Mezi nejdůležitější patří agrotechnické zásahy vedoucí ke zlepšení vodního režimu půdy, a proto je v této kapitole věnována pozornost pouze této půdní vlastnosti.

Půda je polydisperzní systém tvořený částicemi různé velikosti. Z hlediska sorpční půdní schopnosti mají především význam částice koloidních rozměrů – tedy v rozmezí 1–2000 nm a též částice molekulárně disperzní (pod 1 nm). V půdě se spolu s těmito jemnými částicemi nacházejí i částice hrubší (prach, jemný písek). Na povrchu těchto hrubších částic jsou elektrostatickými silami drženy částice koloidní a molekulárně disperzní.

Skupina koloidně disperzních částic je v půdě reprezentována hlavně jílovými minerály, dále polymerní koloidní kyselinou křemičitou (= hydratovaným oxidem křemičitým) a též koloidními částicemi hydratovaných oxidů železitých a hlinitých. Z organických látek sem náleží huminové kyseliny, fulvokyseliny a další humusové látky. Plocha tvořená těmito koloidy je velká, což má značný význam především pro fyzikální a fyzikálně-chemické děje v půdě. K molekulárním disperzním částicím patří ionty a molekuly solí, kyselin a zásad v kapalně fázi – půdním roztoku. Tyto molekulární disperze mají význam pro chemické reakce v půdě probíhající.

#### 1.3.1. Vodní režim půdy

Kapalná fáze půdního systému je tvořena vodou, resp. vodnými roztoky anorganických i organických látek. Voda se vyskytuje v půdě v různém množství i v různých formách, takže její vodní režim, což je souborné označení vlivů a působení vody na půdu, se může v závislosti na vlastnostech půdy (půdních typech) více či méně lišit. Maximální množství vody, které může půda přijmout, je dáno půdní pórovitostí. V pórech se voda může pohybovat, a to buď v důsledku gravitačního působení vsakovat, nebo vlivem kapilárních sil vzlínat.

### 1.3.2. Druhy půdní vody

Podle druhu interakcí a pohyblivosti v půdě lze vodu rozdělit na vodu vázanou (adsorpčně nebo kapilárně) a vodu volnou (též gravitační).

Vázanou vodu v půdě poutají různé síly, takže nepodléhá účinkům zemské gravitace. Nejpevněji je voda poutána chemickými vazbami (voda konstituční, hydrátová), méně pevně je již vázána voda fyzikální adsorpcí na povrchu jílových částic. Na tuto takzvanou hydroskopickou vodu navazuje ve vnějších vrstvách voda obalová. V jemných kapilárách (pórech) o průměru nejvýše 0,2 mm je držena kapilární voda, kterou mohou přijímat rostliny svým kořenovým systémem, neboť je již poutána velmi slabě. Kapilární voda tedy představuje významnou zásobárnu této nepostradatelné látky pro výživu rostlin.

Volná (gravitační) voda vyplňuje hrubší póry, jimiž účinkem gravitace prosakuje do hloubky. Dosáhne-li při tomto pohybu nepropustné vrstvy (jílové nebo skalní), začne se hromadit a vytváří se voda podzemní.

Ukazatelem vodního režimu půdy jsou tak zvané hydrolimity – určité vlhkostní stavy půdy, které vyznačují rozdíly mezi jednotlivými druhy vody v půdě (vázaná a volná) a jednak charakterizují pohyblivost a fyziologickou využitelnost vody. Nejdůležitější jsou tyto hydrolimity:

- a) plná vodní kapacita, což je maximální množství vody, které může půda pojmout při zaplnění všech půdních pórů vodou. Při tomto stavu je půda nasycena vodou a zamokřuje se.
- b) retenční vodní kapacita (též maximální kapilární vodní kapacita nebo absolutní vodní kapacita) odpovídá největšímu množství vody zadržené v kapilárách.
- c) adsorpční vodní kapacita udává nejmenší množství vody hydroskopické a obalové. Při tomto stavu je půda prakticky zcela vyschlá.

### 1.3.3. Kapalná fáze půdy

Kapalnou fází půdy tvoří půdní roztok. Jeho koncentrace kolísá v normálních půdách v rozmezí 0,05 – 0,15 %. U zasolených půd může dosáhnout i hodnot nad 1%. Složení a koncentrace půdního roztoku závisí na těchto faktorech:

- 1) Půdní vlhkosti,
- 2) Úrovní hnojení a druhu použitých hnojiv,
- 3) Pěstovaných plodinách,
- 4) Aktivitě biologické činnosti,
- 5) Kvalitě a množství vody v závlahách.

Koncentrace anorganických solí v půdním roztoku silně ovlivňuje osmotický tlak v rostlinách. Při abnormálně vysokých dávkách hnojiv (~ 1000 kg čistých živin na ha) se osmotický tlak prudce zvýší a dochází k poklesu výnosu. Normálně se osmotický tlak pohybuje v hodnotách 0,02 – 0,1 MPa. Při překročení hodnoty 1 MPa zastavují rostliny růst.

Je logické, že osmotický tlak zvláště zvyšují vodorozpustná průmyslová hnojiva (např. dusičnan amonný, síran amonný a draselné sole). Je proto důležité regulovat různými opatřeními obsah půdní vody v určitých mezích (odvodňování zamokřených půd, úprava půdní struktury mechanickou kultivací či aplikací materiálů upravujících její pórovitost a granulometrii, zavlažování, aplikace materiálů zadržujících vláhu, např. hydrogelů) a současně udržovat optimální poměr objemů pórů vyplněných půdním vzduchem a vodou [40; 41].

## 2 Experimentální část

### 2.1 Chemikálie

Agrisorb, Agroprotec s.r.o. – Humpolec, ČR

Floria, AGRO CS a. s. – Říhov, ČR

Stockosorb Micro, Finstar s.r.o. – Kolín, ČR

Stockosorb Medium, Finstar s.r.o. – Kolín, ČR

Akrylamid, Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Německo

Kyselina akrylová 99 %, Sigma – Aldrich, USA

N,N'-metylen-bis-akrylamid, Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Německo

Hydroxid draselný p.a, Lach – Ner s.r.o., Neratovice

Peroxodisíran amonný p.a., Lachema N.P., Brno

Kukuřičný škrob, Sigma – Aldrich, USA

Kyselina fosforečná 85% - Lach – Ner s.r.o., Neratovice

Methanol CHROMASOLV™ LC-MS Ultra – Honeywel, Německo

Acetonitril – VWR International s.r.o., ČR

Ethanol denaturovaný

Dusík 99,99%, Linde Gas, a.s., ČR

## 2.2 Použité přístroje a zařízení

Kapalinový chromatograf sestavený z čerpadla LC-AD20, UV-VIS detektoru SPD-20A (obojí od Shimadzu Corp., Japonsko), amperometrického detektoru DECADE Elite SC (Antec Scientific, Nizozemsko), kolony Separon SGX C18, 150x3 mm, 7  $\mu$  (Tessek, ČR) a nástřikového ventilu typ D se smyčkou o objemu 10  $\mu$  (ECOM, spol. s r.o.)

Sušárna UNB 400, Memmert, Německo

Analytické váhy AV264C, Ohaus, USA 41

Předvážky Scaltec SPO 51, Scaltec Instruments GmbH, Německo

pH metr pHi 04, Labio a.s., ČR

Vakuová sušárna „Vacuo – Temp, J.P. Selecta, Španělsko

Magnetická míchačka s ohřevem, Heidolph, Německo

Trojhrdlá baňka o objemu 100 ml s kulatým dnem a aparatura pro inertní dusíkovou atmosféru

Trojhrdlá baňka o objemu 200 ml s kulatým dnem a aparatura pro inertní dusíkovou atmosféru

Filtrační aparatura – odsávací baňka a Büchnerova nálevka

Laboratorní teploměr

Běžné laboratorní nádobí

## **2.3 Pracovní postupy**

### **2.3.1 HPLC akrylamidu, kyseliny akrylové a N, N'-methylen-bisakrylamidu**

#### **2.3.1.1 Příprava standardních roztoků analytů a mobilních fází**

Byly připraveny standardní roztoky akrylamidu, kyseliny akrylové a N, N'-methylen-bisakrylamidu. Při přípravě standardního roztoku AAM bylo naváženo 0,0144 g, převedeno do 100 ml odměrné baňky a doplněno na předepsaný objem destilovanou vodou. Z takto připraveného roztoku bylo odpipetováno 0,5 ml do 100 ml odměrné baňky, která byla poté doplněna na předepsaný objem destilovanou vodou. Takto připravený roztok měl koncentraci  $1 \times 10^{-5}$  M. Stejným způsobem byly připraveny i roztoky KA (naváženo 0,0724 g a následně z něho pipetováno 0,1 ml) a MBA (naváženo 0,1542 g a následně odpipetováno 0,1 ml). Jejich koncentrace činily rovněž  $1 \times 10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup>.

Při HPLC analýzách byly jako mobilní fáze použity vodné roztoky acetonitrilu a methanolu. V případě acetonitrilu činil jeho obsah 0,1; 0,5; 1; 5 a 10 obj. %, u mobilní fáze tvořené vodným roztokem methanolu činila koncentrace tohoto rozpouštědla 1; 2; 5; 10; 15; a 20 obj. %. K přípravě standardních roztoků i mobilních fází byla použita převařená demineralizovaná voda. Úprava pH byla provedena pomocí H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> zředěné vodou v poměru 1:5, přičemž se na požadovanou hodnotu (3; 4; 5 a 6) nastavilo pH vody, která se teprve poté smísila s příslušným množstvím acetonitrilu nebo methanolu.

#### **2.3.1.2 Stanovení retenčních charakteristik sledovaných látek**

Retence AAM, KA a MBA v systému obrácených fází se měřila na kapalinovém chromatografu, jehož sestava je uvedena v kap. 2.2, v mobilních fázích, jejichž složení je uvedeno v kap. 2.3.1.1. Závislosti retence těchto látek na pH mobilní fáze byly zjištěny pro eluenty o  $\phi$  (MeOH) = 5% a  $\phi$  (ACN) = 2%. Při všech chromatografických experimentech činil průtok mobilní fáze 0,5 ml/min, eluát byl detekován při 210 nm a citlivosti 0,01 AUFS. Výstupní signál detektoru byl pro každý experiment ukládán do chromatografické stanice Clarity. Mrtvý objem kolony byl stanoven nástřikem 10  $\mu$ l acetonu zředěného vodou v poměru 1:100, mobilní fází byl 5% MeOH o pH 3.

## 2.3.2 Syntéza a analýza kopolymerního škrobového hydrogelu

### 2.3.2.1 Syntéza hydrogelu

Hydrogel byl připraven dle upraveného postupu převzatého z diplomové práce Ing. Jana Hrocha [1]. Do 200 ml trojhrdlé baňky bylo odměřeno 40 ml destilované vody a 2,0 g AAM. Směs se ponechala dvě minuty míchat na magnetické míchačce. Poté se za stálého míchání přidalo 3,8 ml KA a směs se zneutralizovala 5 ml 45% KOH na pH = 6-7, což bylo ověřeno pH metrem. Zneutralizovaná směs byla poté ohřívána na vodní lázni na  $40 \pm 3$  °C a poté byla 20 minut ponechána při této teplotě probublávat dusíkem. Následně byly přidány 4,0 g kukuřičného škrobu, přívod dusíku se zavedl nad hladinu reakční směsi a po 15 minutách míchání byl přidán 1 ml 1% roztoku PSA jako iniciátoru (případně ještě 1 ml MBA jako síťovacího činidla). Poté byla směs míchána po dobu 30 minut za neustálého ohřevu na  $40 \pm 3$  °C na vodní lázni pod dusíkovou atmosférou až do vzniku viskózní konzistence. Poté byla baňka zazátkována a vložena na 2 hodiny do sušárny vyhřáté na 75 °C. Gumovitý produkt byl rozstříhán na malé kousky o velikosti cca 1–2 mm a sušen při laboratorní teplotě 1–2 dny do konstantní hmotnosti.

### 2.3.2.2 Stanovení bobtnacího poměru hydrogelu

Pro stanovení bobtnacího poměru byla použita metoda T-bagu. Na analytických vahách bylo naváženo 25 mg hydrogelu připraveného podle návodu uvedeného v kap. 2.3.2.1. Hydrogel byl vložen do sáčku předem zváženého v suchém i mokřém stavu. Sáček s hydrogelem byl poté vložen do 250 ml kádinky se 100 ml destilované vody. Hydrogel byl ponechán bobtnat po dobu 3 hodin, kdy byla zaznamenána maximální bobtnavost, která se již dále nezvyšovala. Sáček se vzorkem byl poté sušen ve vakuové sušárně při 85 °C do konstantní hmotnosti. Ze zjištěných hmotností byl vypočítán bobtnací poměr (BP) hydrogelu dle vztahu 9:

$$BP = \frac{m_1 - m_2 - m_3 - m_4}{m_3 - m_4} = \left[ \frac{\text{g vody}}{\text{g sušiny}} \right]$$

Rovnice 9 - Výpočet bobtnacího poměru

$m_1$  – hmotnost nabobtnalého hydrogelu a mokřého sáčku;  $m_2$  – hmotnost mokřého sáčku;

$m_3$  – hmotnost suchého sáčku se sušinou hydrogelu;  $m_4$  – hmotnost suchého sáčku (vše uvedeno v gramech). [1]

### **2.3.2.3 Stanovení vyluhovatelného podílu hydrogelu**

Byl proveden výluh komerčních i připravených hydrogelů (nezesítněného i zesítněného) v ethanolu a methanolu. Navážka hydrogelu činila 1 g na 50 ml extrakčního činidla. Směs se ponechala jednu hodinu míchat, následně se získaný extrakt odfiltroval na nálevce přes filtrační papír a převedl do 50 ml odměrné baňky. Po vyschnutí byl hydrogel zvážen a zjištěn jeho hmotnostní úbytek (výsledky viz Tabulka 12 a Tabulka 13). U každého hydrogelu byla extrakce provedena paralelně ze tří vzorků.

### **2.3.2.4 Stanovení obsahu monomerů ve výluzích hydrogelů metodou HPLC**

Methanолоvé extrakty získané vyluhováním komerčních i syntetizovaných hydrogelů byly analyzovány na kapalinovém chromatografu v mobilní fázi voda-methanol (95:5) o pH=3 (výsledky viz Tabulka 14) [42]

## **2.3.3 Studium vlastností půdy po aplikaci hydrogelu**

### **2.3.3.1 Příprava vzorků půdy**

Vzorek půdy o hmotnosti cca 5 kg byl odebrán na poli v okolí obce Lázně Bohdaneč. Vzorek byl následně zbaven organických zbytků a kamenů a ponechán vyschnout volně na vzduchu do konstantní hmotnosti. Poté se zemina prosela přes síto o velikosti oka 2,0 mm a podsítná frakce se uložila do PE lahve. [43]

### **2.3.3.2 Stanovení plné vodní kapacity půdy**

Plná vodní kapacita je hydrolimitem označujícím maximální vlhkost půdy, při které jsou všechny póry zaplněny vodou. Do skleněné chromatografické kolony o průměru 20 mm a délce 40 cm opatřené na výtoku fritou a kohoutem bylo předloženo 25 ml vody a do ní postupně vsypáno 25 g připravené zeminy. Po sedimentaci částic se odpustil podíl vody tak, aby její hladina právě dosáhla horního okraje vrstvy nasypané zeminy. Objem vody obsažené v pórech zeminy se určil jako rozdíl předloženého a vypuštěného objemu vody.



### **2.3.3.3 Stanovení maximální kapilární vodní kapacity půdy**

Maximální kapilární vodní kapacita půdy, nazývaná také jako retenční vodní kapacita půdy, udává maximální objem vody, kterou je půda schopná zadržet ve svých kapilárních pórech. Ze vzorku připravené zeminy byl odvážen podíl 25 g, který byl převeden do skleněné chromatografické kolony obsahující 25 ml vody. Po usazení půdních částic se kohout nechal otevřený po dobu 24 hodin a do podstaveného odměrného válce se jíkala volně vytékající voda. Z rozdílu vneseného a vyteklého množství vody byla vypočítána maximální kapilární vodní kapacita. Stejný postup byl zopakován s půdou obsahující 1% hmotnostní podíl nezesíťového hydrogelu. Experiment byl pro každý vzorek půdy 3x zopakován.

### **2.3.3.4 Studium vlivu přítomnosti hydrogelu na rychlosti vysychání půdy**

Do kádinky 150 ml o průměru 3,5 cm bylo naváženo 10 g půdy a 0,25 g hydrogelu, směs byla promíchána a překryta vrstvou 15 g půdy. Obsah hydrogelu tedy odpovídal 1 hm. %. Následně bylo opatrně přidáno 11 ml vody, což odpovídá plné vodní kapacitě použité půdy. Tento postup byl zopakován 3x pro každý z hydrogelů (syntetizovaný, Floria [44], Agrisorb [45]), i s půdou bez hydrogelu. Takto připravené vzorky byly ponechány 480 hodin schnout a v intervalech po 24 hodinách byl zaznamenáván úbytek jejich hmotnosti.

### 3 Výsledky a diskuze

#### 3.1 HPLC akrylamidu, kyseliny akrylové a N, N'-metylen-bisakrylamidu

##### 3.1.1 Závislost retence sledovaných látek na koncentraci organické složky mobilní fáze

Byl studován vliv koncentrace methanolu a acetonitrilu ve vodné mobilní fázi na hodnotu retenčního faktoru AAM, KA a MBA na koloně s chemicky vázanou nepolární fází C18 za účelem nalezení optimálních podmínek pro jejich vzájemnou separaci. Vzhledem k acidobazickým vlastnostem těchto sloučenin (KA je středně silná kyselina, AAM a MBA ve své molekule obsahují bazický atom dusíku) byly tyto závislosti proměřeny i při různém pH eluentu, neboť disociace či protonizace funkčních skupin těchto sloučenin by mohla mít (zejména u KA) na retenci značný vliv.

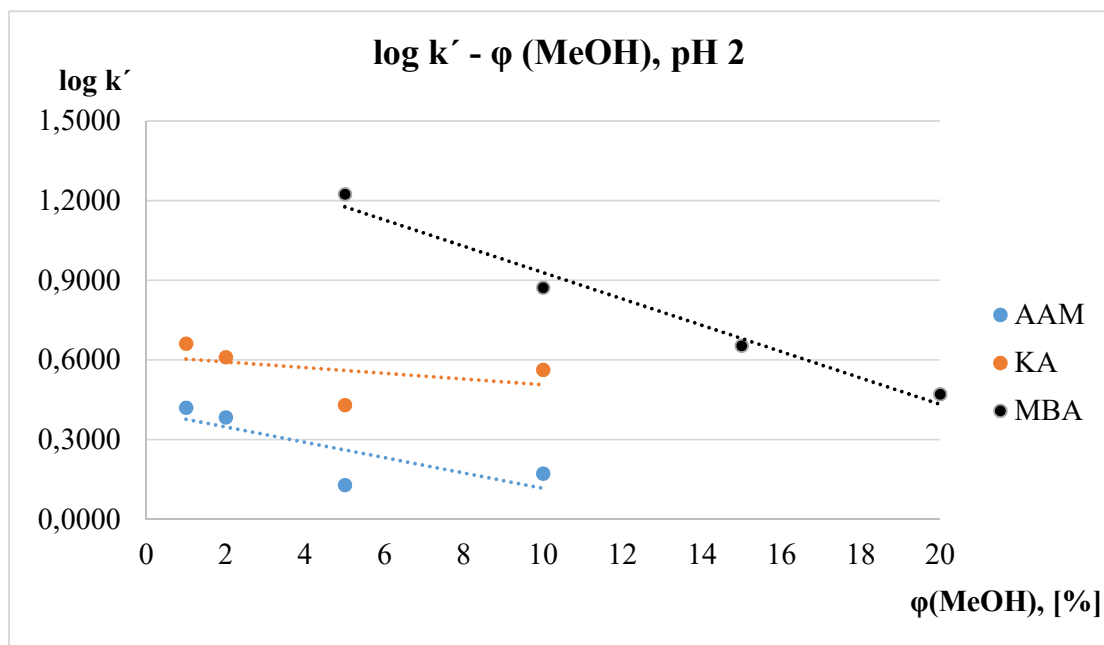
Výsledky těchto experimentů provedených za podmínek popsanych v kap. 2.3.1.2 jsou uvedeny v tabulkách 1 až 8 a v grafické podobě jako závislosti logaritmu retenčního faktoru na koncentraci organické složky mobilní fáze při určitém pH (Obrázky 11 až 18). Je z nich zřejmé, že se zvyšujícím se obsahem MeOH či ACN v mobilní fázi retence sledovaných látek na koloně s fází C18 klesá, což je v souladu s principy RP HPLC. Pro odchylky v chování kyseliny akrylové v mobilních fázích s ACN při pH 4 (viz Obrázek 16) a s MeOH při pH 5 (viz Obrázek 17) je nesnadné nalézt vysvětlení, vzhledem k poměrně značnému rozptylu hodnot  $\log k'$  je jejich proložení přímkou dosti násilné. Prozatím, pokud nebudou provedeny další ověřovací experimenty, nelze vyvozovat jednoznačné závěry.

V ostatních případech byl mechanismus chromatografie s obrácenou fází lineárními závislostmi logaritmu retenčních faktorů na koncentraci organické složky mobilní fáze potvrzen a odpovídá teoretickému vztahu uvedenému v rovnici 2. To také umožňuje predikci retence sledovaných analytů v různě koncentrovaných mobilních fázích a volbu podmínek pro dosažení jejich účinné separace (viz kap. 3.1.2).

Současně byl prokázán významný vliv pH mobilní fáze na retenci kyseliny akrylové (viz kap. 3.1.2). Pro mrtvý objem kolony byla stanovena hodnota 1,34 ml.

Tabulka 1 - Retenční charakteristiky AAM, KA a MBA v mobilní fázi H<sub>2</sub>O-MeOH (pH 2)

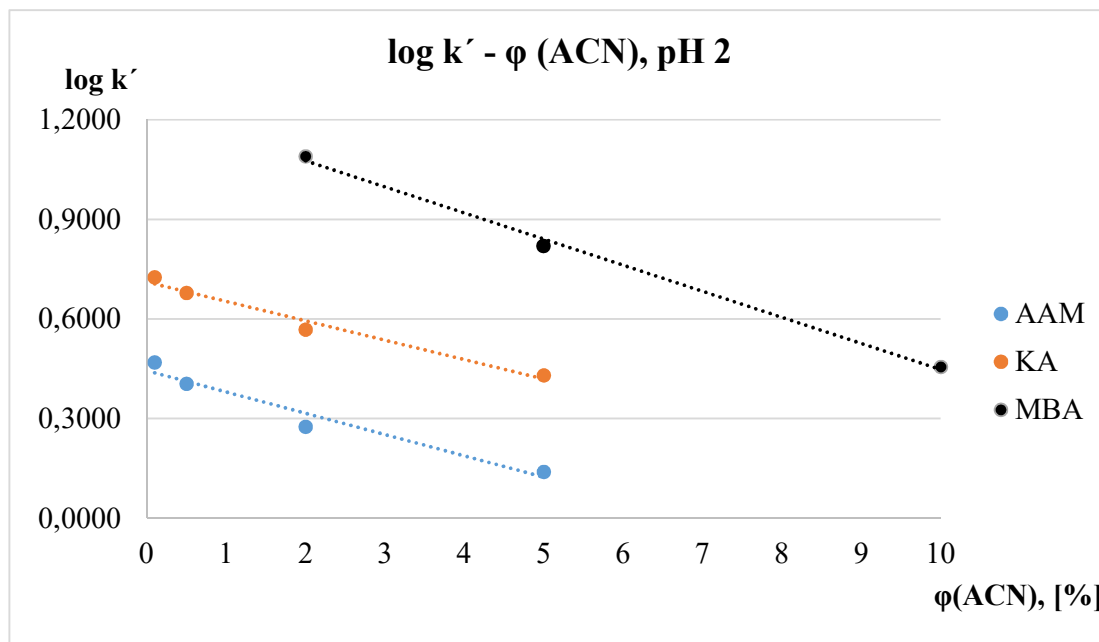
| Látka | $\varphi$ (MeOH), %    |      |                        |      |                        |       |                        |      |                        |      |                        |      |
|-------|------------------------|------|------------------------|------|------------------------|-------|------------------------|------|------------------------|------|------------------------|------|
|       | 1                      |      | 2                      |      | 5                      |       | 10                     |      | 15                     |      | 20                     |      |
|       | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'   | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'   | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'    | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'   | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'   | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'   |
| AAM   | 4,86                   | 2,63 | 4,58                   | 2,42 | 3,58                   | 1,38  | 3,33                   | 1,49 | -                      | -    | -                      | -    |
| KA    | 7,48                   | 4,58 | 6,80                   | 4,07 | 4,97                   | 2,69  | 3,87                   | 3,66 | -                      | -    | -                      | -    |
| MBA   | -                      | -    | -                      | -    | 23,63                  | 16,78 | 11,42                  | 7,45 | 7,40                   | 4,50 | 5,40                   | 2,96 |



Obrázek 11 - Závislosti kapacitních poměrů AAM, KA a MBA na  $\varphi$  (MeOH) v mobilní fázi H<sub>2</sub>O-MeOH (pH 2)

Tabulka 2 - Retenční charakteristiky AAM, KA a MBA v mobilní fázi H<sub>2</sub>O-ACN (pH 2)

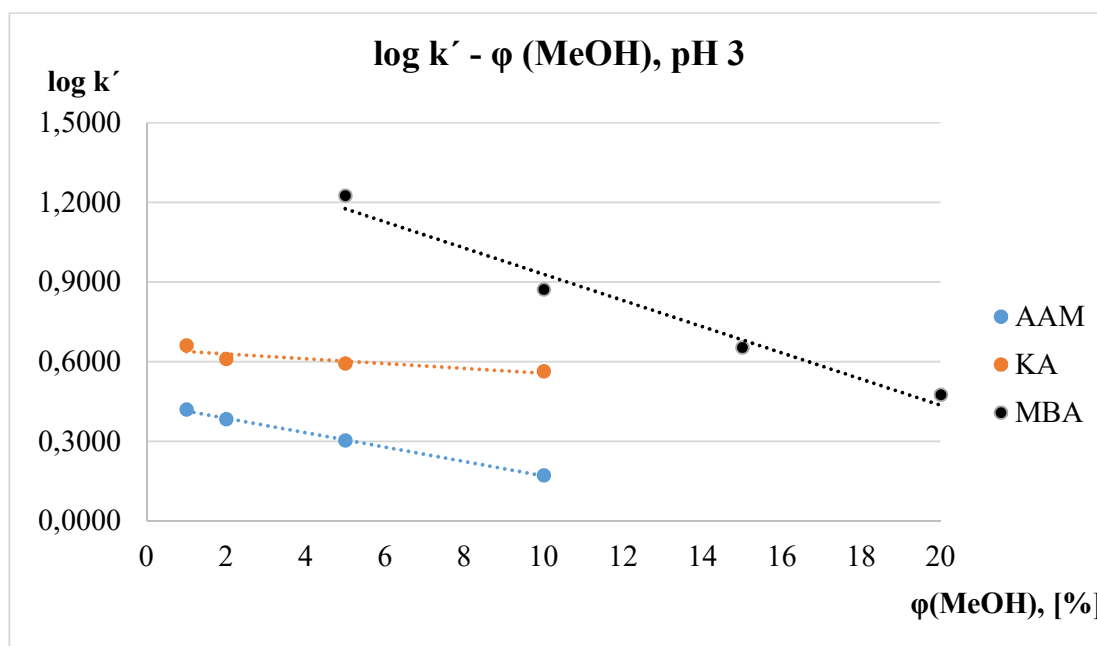
| Látka | $\phi$ (ACN), % |      |               |      |               |       |               |      |               |      |
|-------|-----------------|------|---------------|------|---------------|-------|---------------|------|---------------|------|
|       | 0,1             |      | 0,5           |      | 2             |       | 5             |      | 10            |      |
|       | $V_R$<br>[ml]   | $k'$ | $V_R$<br>[ml] | $k'$ | $V_R$<br>[ml] | $k'$  | $V_R$<br>[ml] | $k'$ | $V_R$<br>[ml] | $k'$ |
| AAM   | 5,29            | 2,95 | 4,75          | 2,54 | 3,87          | 1,89  | 3,19          | 1,38 | -             | -    |
| KA    | 8,47            | 5,32 | 7,74          | 4,78 | 6,30          | 3,70  | 4,95          | 2,69 | -             | -    |
| MBA   | -               | -    | -             | -    | 35,7          | 12,32 | 8,69          | 5,49 | 5,17          | 2,86 |



Obrázek 12 - Závislosti kapacitních poměrů AAM, KA a MBA na  $\phi$  (MeOH) v mobilní fázi H<sub>2</sub>O-ACN (pH 2)

Tabulka 3 - Retenční charakteristiky AAM, KA a MBA v mobilní fázi H<sub>2</sub>O-MeOH (pH 3)

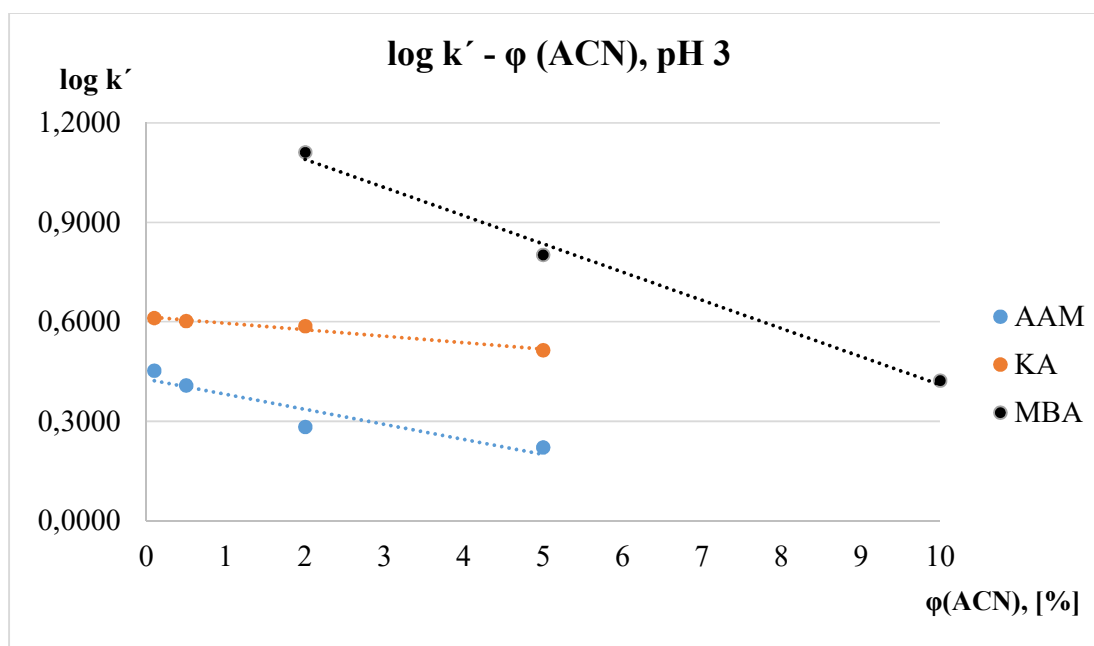
| Látka | φ (MeOH), %            |      |                        |      |                        |       |                        |      |                        |      |                        |      |
|-------|------------------------|------|------------------------|------|------------------------|-------|------------------------|------|------------------------|------|------------------------|------|
|       | 1                      |      | 2                      |      | 5                      |       | 10                     |      | 15                     |      | 20                     |      |
|       | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'   | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'   | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'    | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'   | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'   | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'   |
| AAM   | 4,58                   | 2,63 | 4,38                   | 2,42 | 4,03                   | 2,01  | 3,33                   | 1,49 | -                      | -    | -                      | -    |
| KA    | 7,51                   | 4,58 | 6,80                   | 4,07 | 4,49                   | 3,92  | 3,89                   | 3,66 | -                      | -    | -                      | -    |
| MBA   | -                      | -    | -                      | -    | 23,83                  | 16,78 | 11,32                  | 7,45 | 7,37                   | 4,50 | 5,34                   | 2,99 |



Obrázek 13 - Závislosti kapacitních poměrů AAM, KA a MBA na φ (MeOH) v mobilní fázi H<sub>2</sub>O-MeOH (pH 3)

Tabulka 4 - Retenční charakteristiky AAM, KA a MBA v mobilní fázi H<sub>2</sub>O-ACN (pH 3)

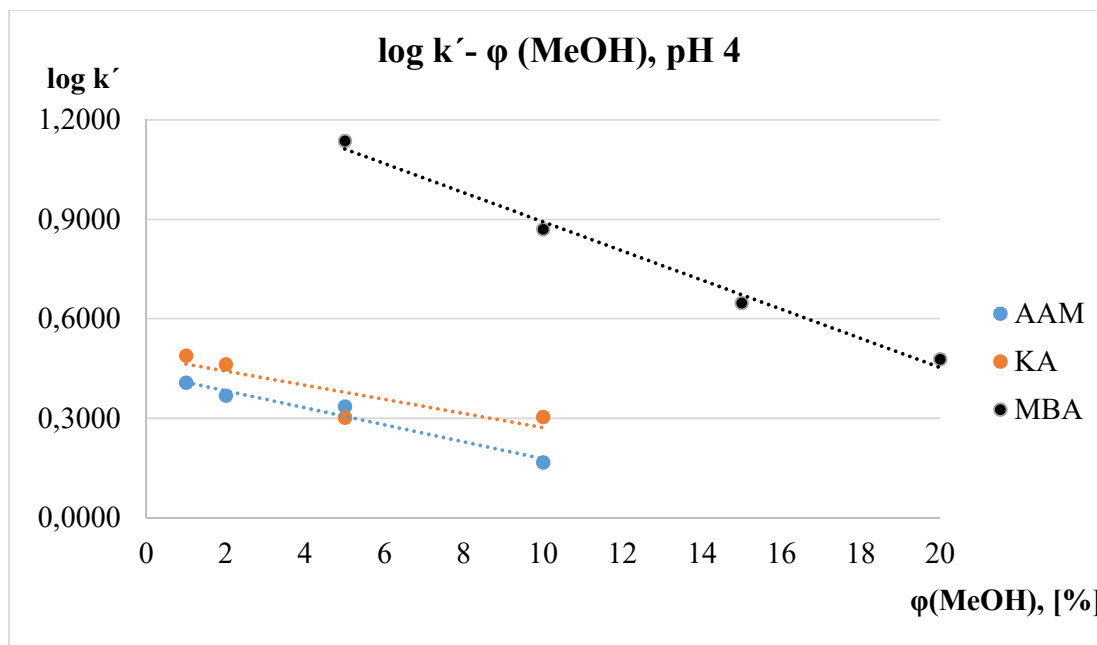
| Látka | $\phi$ (ACN), %        |      |                        |      |                        |       |                        |      |                        |      |
|-------|------------------------|------|------------------------|------|------------------------|-------|------------------------|------|------------------------|------|
|       | 0,1                    |      | 0,5                    |      | 2                      |       | 5                      |      | 10                     |      |
|       | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'   | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'   | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'    | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'   | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'   |
| AAM   | 5,14                   | 2,84 | 4,77                   | 2,56 | 3,91                   | 1,92  | 3,57                   | 1,66 | -                      | -    |
| KA    | 6,81                   | 4,08 | 6,70                   | 4,00 | 6,52                   | 3,87  | 5,72                   | 3,27 | -                      | -    |
| MBA   | -                      | -    | -                      | -    | 18,64                  | 12,91 | 9,83                   | 6,34 | 4,89                   | 2,65 |



Obrázek 14 - Závislosti kapacitních poměrů AAM, KA a MBA na  $\phi$  (ACN) v mobilní fázi H<sub>2</sub>O-ACN (pH 3)

Tabulka 5 - Retenční charakteristiky AAM, KA a MBA v mobilní fázi H<sub>2</sub>O-MeOH (pH 4)

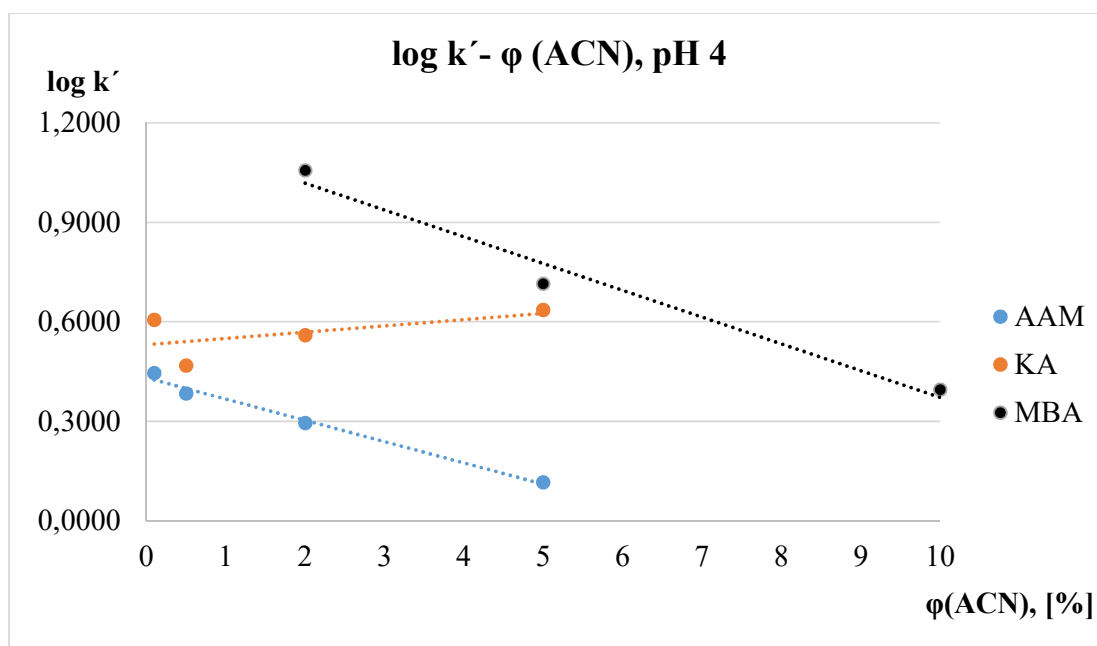
| Látka | φ (MeOH), %            |      |                        |      |                        |       |                        |      |                        |      |                        |      |
|-------|------------------------|------|------------------------|------|------------------------|-------|------------------------|------|------------------------|------|------------------------|------|
|       | 1                      |      | 2                      |      | 5                      |       | 10                     |      | 15                     |      | 20                     |      |
|       | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'   | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'   | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'    | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'   | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'   | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'   |
| AAM   | 4,76                   | 2,55 | 4,47                   | 2,34 | 4,03                   | 2,16  | 3,31                   | 1,47 | -                      | -    | -                      | -    |
| KA    | 5,47                   | 3,08 | 5,23                   | 2,90 | 4,24                   | 2,01  | 4,04                   | 2,01 | -                      | -    | -                      | -    |
| MBA   | -                      | -    | -                      | -    | 19,68                  | 13,69 | 11,26                  | 7,40 | 7,29                   | 4,44 | 5,37                   | 3,01 |



Obrázek 15 - Závislosti kapacitních poměrů AAM, KA a MBA na φ (MeOH) v mobilní fázi H<sub>2</sub>O-MeOH (pH 4)

Tabulka 6 - Retenční charakteristiky AAM, KA a MBA v mobilní fázi H<sub>2</sub>O-ACN (pH 4)

| Látka | $\varphi$ (ACN), %     |      |                        |      |                        |       |                        |      |                        |      |
|-------|------------------------|------|------------------------|------|------------------------|-------|------------------------|------|------------------------|------|
|       | 0,1                    |      | 0,5                    |      | 2                      |       | 5                      |      | 10                     |      |
|       | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'   | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'   | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'    | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'   | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'   |
| AAM   | 5,08                   | 2,79 | 4,58                   | 2,42 | 3,98                   | 1,97  | 3,09                   | 1,31 | -                      | -    |
| KA    | 6,75                   | 4,04 | 5,28                   | 2,94 | 6,20                   | 3,63  | 7,13                   | 4,32 | -                      | -    |
| MBA   | -                      | -    | -                      | -    | 16,60                  | 11,39 | 8,29                   | 5,19 | 4,67                   | 2,49 |

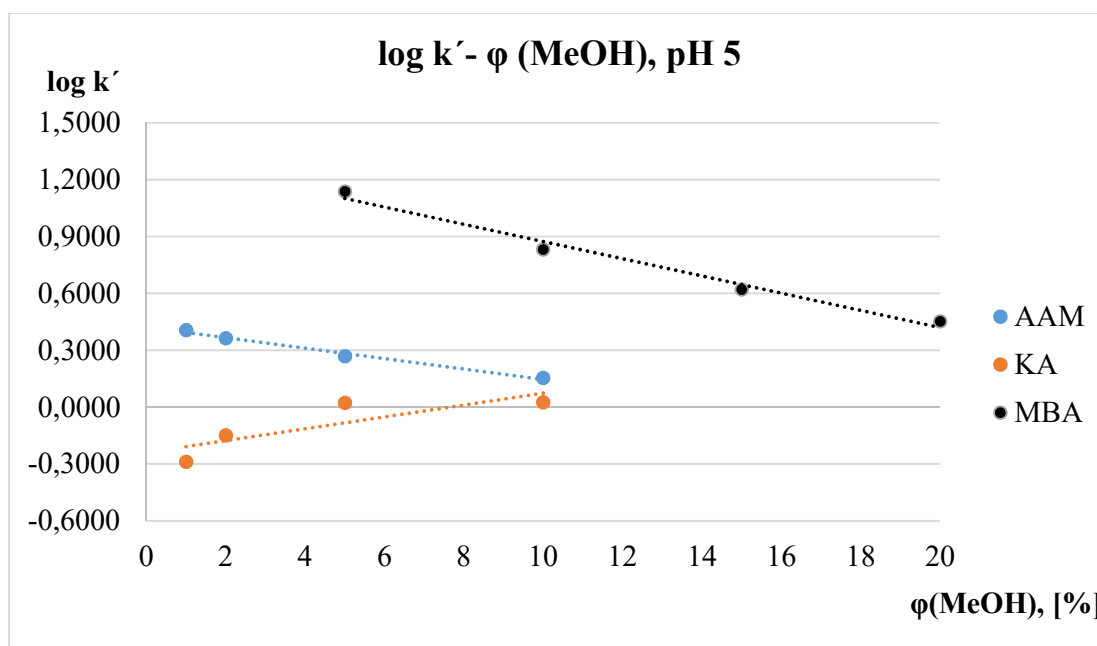


Obrázek 16 - Závislosti kapacitních poměrů AAM, KA a MBA na  $\varphi$  (ACN) v mobilní fázi H<sub>2</sub>O-ACN (pH 4)



Tabulka 7 - Retenční charakteristiky AAM, KA a MBA v mobilní fázi H<sub>2</sub>O-MeOH (pH 5)

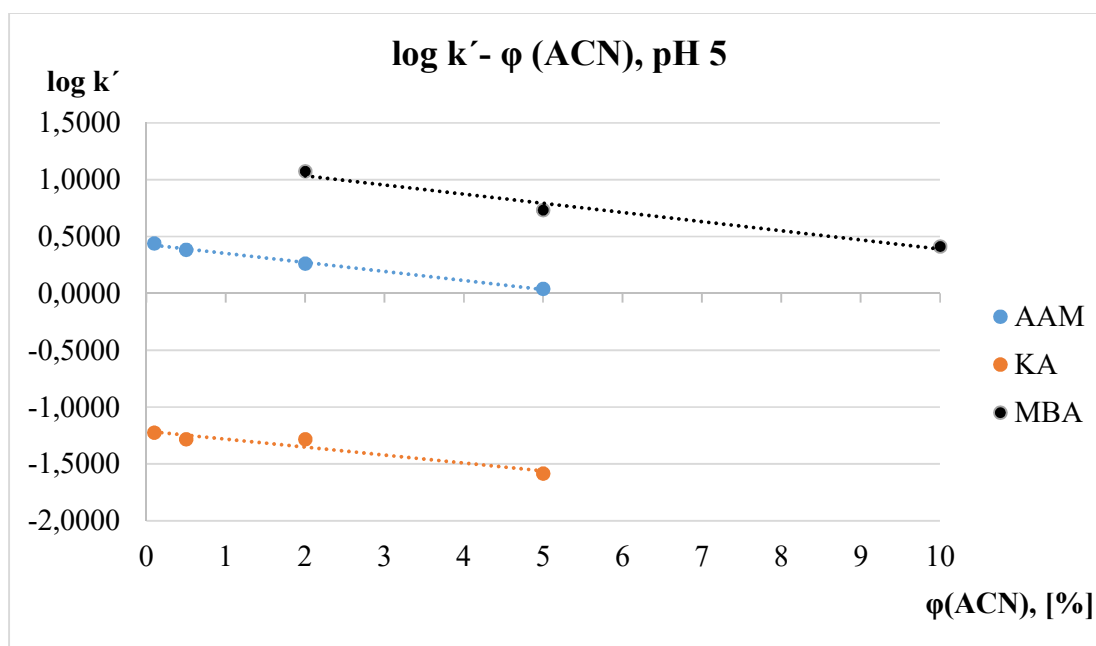
| Látka | φ (MeOH), %            |      |                        |      |                        |       |                        |      |                        |      |                        |      |
|-------|------------------------|------|------------------------|------|------------------------|-------|------------------------|------|------------------------|------|------------------------|------|
|       | 1                      |      | 2                      |      | 5                      |       | 10                     |      | 15                     |      | 20                     |      |
|       | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'   | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'   | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'    | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'   | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'   | V <sub>R</sub><br>[ml] | k'   |
| AAM   | 4,84                   | 2,55 | 8,86                   | 2,31 | 3,86                   | 1,86  | 3,25                   | 1,43 | -                      | -    | -                      | -    |
| KA    | 2,03                   | 0,51 | 2,29                   | 0,71 | 2,75                   | 1,05  | 2,76                   | 1,06 | -                      | -    | -                      | -    |
| MBA   | -                      | -    | -                      | -    | 19,77                  | 13,75 | 10,44                  | 6,79 | 6,93                   | 4,17 | 5,14                   | 2,83 |



Obrázek 17 - Závislosti kapacitních poměrů AAM, KA a MBA na φ (MeOH) v mobilní fázi H<sub>2</sub>O-MeOH (pH 5)

Tabulka 8 - Retenční charakteristiky AAM, KA a MBA v mobilní fázi H<sub>2</sub>O-ACN (pH 5)

| Látka | $\phi$ (ACN), % |      |               |      |               |       |               |      |               |      |
|-------|-----------------|------|---------------|------|---------------|-------|---------------|------|---------------|------|
|       | 0,1             |      | 0,5           |      | 2             |       | 5             |      | 10            |      |
|       | $V_R$<br>[ml]   | $k'$ | $V_R$<br>[ml] | $k'$ | $V_R$<br>[ml] | $k'$  | $V_R$<br>[ml] | $k'$ | $V_R$<br>[ml] | $k'$ |
| AAM   | 5,03            | 2,75 | 4,58          | 2,42 | 3,79          | 1,83  | 2,81          | 1,10 | -             | -    |
| KA    | 2,84            | 0,06 | 2,75          | 0,05 | 1,43          | 0,05  | 1,42          | 0,03 | -             | -    |
| MBA   | -               | -    | -             | -    | 17,18         | 11,82 | 8,56          | 5,40 | 4,81          | 2,59 |



Obrázek 18 - Závislosti kapacitních poměrů AAM, KA a MBA na  $\phi$  (ACN) v mobilní fázi H<sub>2</sub>O-ACN (pH 5)

### 3.1.2 Vliv pH mobilní fáze na retenci sledovaných látek

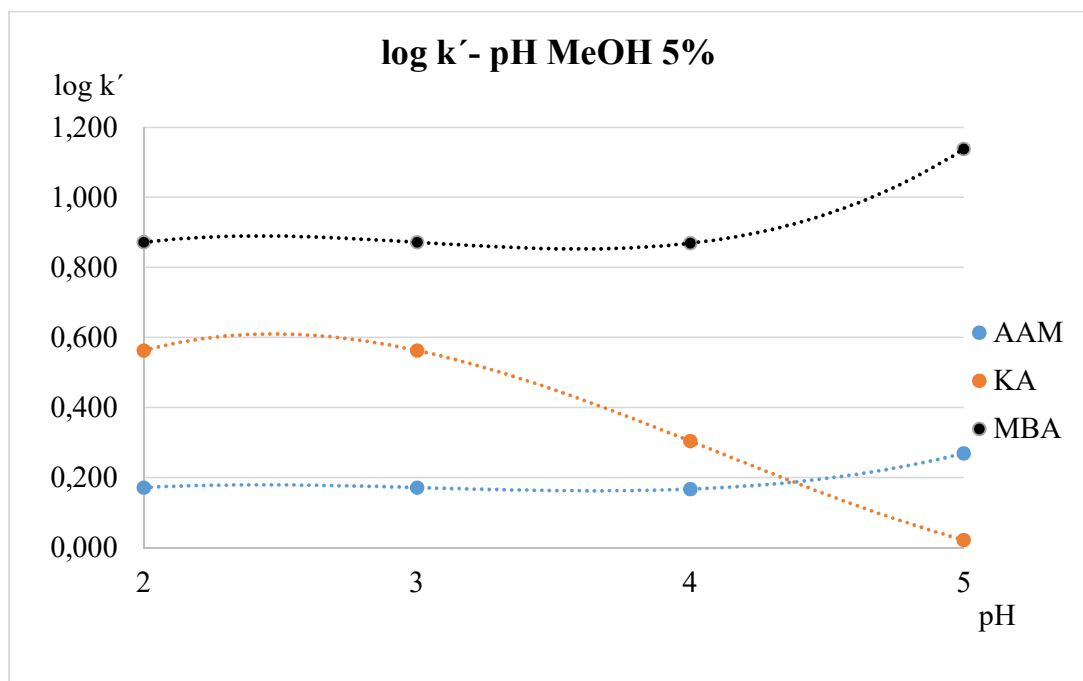
Jak již bylo zmíněno v závěru kap. 3.1.1, u kyseliny akrylové byla prokázána závislost její retence, tj. hodnot retenčních faktorů, na pH eluentu, což je dáno její schopností disociace ve vodných roztocích. Jak je vidět z číselných hodnot retenčních faktorů (Tabulka 9 a Tabulka 10) a z grafických závislostí  $\log k' - \text{pH}$  (Obrázek 19 a Obrázek 20), dochází při pH mobilní fáze vyšším než 4 k prudkému poklesu retence KA na nepolárním sorbentu bez ohledu na organickou složku eluentu, při pH 5 se na koloně již prakticky nezadržuje a vychází z ní s mrtvým objemem.

Toto chování KA odpovídá její disociační konstantě, která má hodnotu  $\text{pK}_a = 4,25$ . Pro separaci KA od AAM je proto nutné volit eluent dostatečně kyselý, aby v něm byla disociace kyseliny akrylové potlačena a KA byla na koloně zadržována, což je pro její identifikaci a kvantitativní stanovení nezbytné.

V mobilní fázi voda-methanol (95:5) se retence AAM a MBA v rozmezí  $\text{pH} = 2-4$  prakticky nemění, při pH 5 dochází u obou látek k jejímu malému zvýšení (Obrázek 17) Ve 2% vodném ACN je rovněž retence těchto sloučenin v rozmezí  $\text{pH} = 2-4$  téměř konstantní, při pH 5 se však AAM téměř nezadržuje (Obrázek 18).

Tabulka 9 - Závislost kapacitních poměrů na pH mobilní fáze MeOH

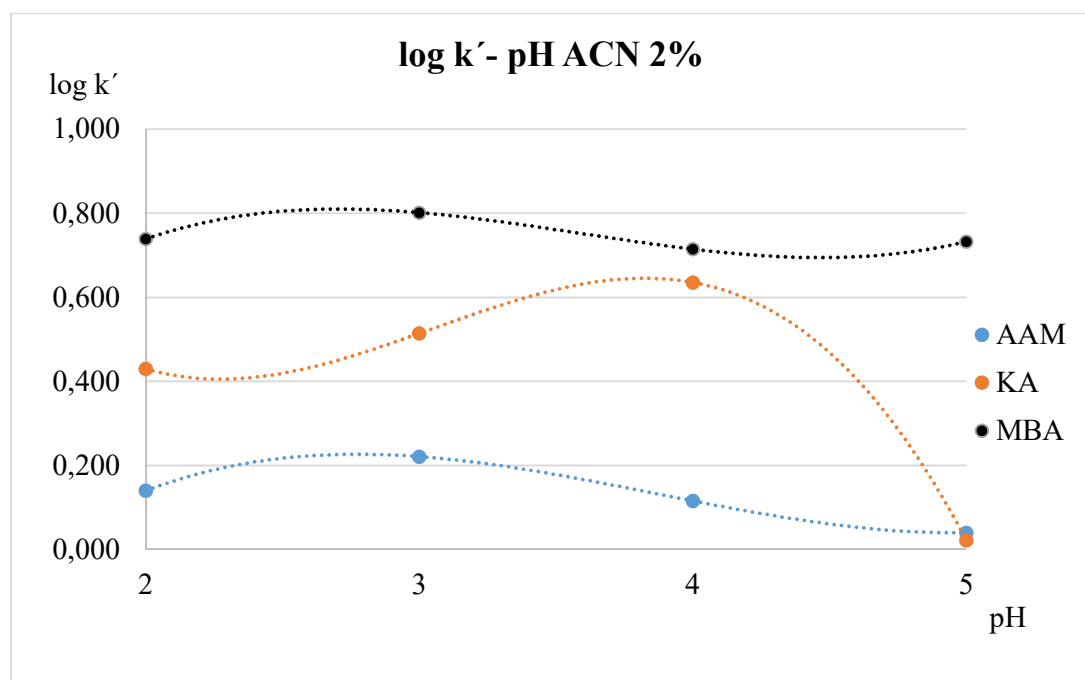
| Látka | $\phi$ (MeOH), 5% |      |            |      |            |      |            |       |
|-------|-------------------|------|------------|------|------------|------|------------|-------|
|       | 2                 |      | 3          |      | 4          |      | 5          |       |
|       | $V_R$ [ml]        | $k'$ | $V_R$ [ml] | $k'$ | $V_R$ [ml] | $k'$ | $V_R$ [ml] | $k'$  |
| AAM   | 3,58              | 1,49 | 4,03       | 1,49 | 4,03       | 1,47 | 3,86       | 1,86  |
| KA    | 4,97              | 3,66 | 4,49       | 3,66 | 4,24       | 2,01 | 2,75       | 1,05  |
| MBA   | 23,63             | 7,45 | 23,83      | 7,45 | 19,68      | 7,40 | 19,77      | 13,75 |



Obrázek 19 - Závislost kapacitních poměrů AAM, KA a MBA na pH mobilní fáze pro  $\phi$  MeOH = 5%

Tabulka 10 - Závislost kapacitních poměrů na pH mobilní fáze ACN

| Látka | $\phi$ (ACN), 2% |      |            |      |            |      |            |      |
|-------|------------------|------|------------|------|------------|------|------------|------|
|       | 2                |      | 3          |      | 4          |      | 5          |      |
|       | $V_R$ [ml]       | $k'$ | $V_R$ [ml] | $k'$ | $V_R$ [ml] | $k'$ | $V_R$ [ml] | $k'$ |
| AAM   | 3,87             | 1,38 | 3,91       | 1,66 | 3,98       | 1,31 | 3,79       | 1,10 |
| KA    | 6,30             | 2,69 | 6,52       | 3,27 | 6,20       | 4,32 | 1,43       | 1,05 |
| MBA   | 35,7             | 5,49 | 18,64      | 6,34 | 16,60      | 5,19 | 17,18      | 5,40 |



Obrázek 20 - Závislost kapacitních poměrů AAM, KA a MBA na pH mobilní fáze pro  $\phi$  ACN = 2%

### 3.1.3 Volba optimálního složení mobilní fáze pro současné stanovení sledovaných látek

Na základě závěrů kap. 3.1.1 a 3.1.2 lze jako optimální chromatografické podmínky pro separaci a kvantitativní stanovení AAM, KA a MBA v použitém systému s obrácenou fází navrhnout mobilní fázi voda-MeOH o koncentraci alkoholu  $\varphi(\text{MeOH}) = 5\%$ , případně směs voda-ACN o koncentraci organické složky  $\varphi(\text{ACN}) = 2\%$ . pH eluentu musí být nižší nežli pH 4, aby byla potlačena disociace kyseliny akrylové a tato látka se na koloně zadržovala. S ohledem na stabilitu chemicky vázané oktadecylové stacionární fáze v rozmezí pH 2–5 se jako nejvhodnější nabízí pH 3.

Za těchto podmínek izokratické eluce dochází k dokonalé separaci všech tří sledovaných látek v co možná nejkratším čase (nezbytném pro oddělení AAM od KA), píky nezasahují do mrtvého objemu, ani se nepřekrývají. Oddělení AAM od KA trvá v methanolové i acetonitrilové mobilní fázi při průtokové rychlosti eluentu 0,5 ml/min cca 8 minut, MBA se v 5% MeOH kvantitativně eluuje v čase 26 minut, v 2% ACN za 21 minut. Pro zkrácení doby eluce MBA při současném zachování dokonalé separace AAM a KA by bylo nutné použít gradientovou eluci.

Na následujících obrázcích jsou zobrazeny chromatogramy AAM, KA a MBA v 5% MeOH (Obrázek 21) a v 2% ACN (Obrázek 22) vytvořené složením dílčích chromatografických křivek jednotlivých složek. Osa x = čas [min]; y = intenzita signálu [mV].



Obrázek 21 - Stanovení AAM (4,03 min), KA (6,59 min) a MBA (23,83min) v 5% MeOH



Obrázek 22 - Stanovení AAM (1,96 min), KA (3,26 min) a MBA (18,64 min) v 2% ACN

## 3.2 Vlastnosti připraveného kopolymerního škrobového hydrogelu

### 3.2.1 Bobtnací poměr hydrogelu

Dle postupu a výpočtu popsaného v kapitole 2.3.2.2 byla stanovena hodnota bobtnacího poměru syntetizovaného hydrogelu. Nezesítný hydrogel vykazoval hodnotu BP 498 g vody / g sušiny s relativní směrodatnou odchylkou 6,33 %. Zesítný hydrogel poté hodnotu BP 187 g vody / g sušiny s relativní směrodatnou odchylkou 5,27 %. Tyto hodnoty odpovídají hodnotám z diplomové práce Ing. Jana Hrocha a potvrzují jeho výsledky.

### 3.2.2 Vyluhovatelnost hydrogelů

Komerční i syntetizované hydrogely byly podrobeny vyluhování v ethanolu a methanolu, rozpouštědlech, ve kterých se monomerní látky (AAM, KA a MBA) velmi dobře rozpouští, na rozdíl od škrobu, event. samotného hydrogelu. Vyextrahované vzorky připravených škrobových hydrogelů byly vysušeny a z hmotnostního úbytku bylo usuzováno na obsah nezreagovaných složek (AAM a KA, případně i MBA, pokud byl k syntéze použit).

U každého hydrogelu byly provedeny tři výluhy. Extrakty komerčních i připravených hydrogelů pak byly analyzovány metodou HPLC na přítomnost jednotlivých monomerů. Výsledky stanovení hmotnostních úbytků komerčních hydrogelů obsahuje tabulka 11, úbytky syntetizovaných hydrogelů obsahují tabulka 12 (nezesítný) a tabulka 13 (zesítný).

V případě komerčních hydrogelů byl hmotnostní úbytek vypočítán z obsahů AAM a KA v methanolovém extraktu zjištěných metodou HPLC, nikoliv z úbytku hmotnosti hydrogelů před a po extrakci.

Tabulka 11 - Stanovení obsahu monomerů ve výluzích komerčních hydrogelů

| Hydrogel            | AAM<br>[mg/50 ml výluhu] | KA<br>[mg/50 ml výluhu] | úbytek hydrogelu<br>[%] |
|---------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Stockosorb – Micro  | -                        | 2,907                   | 0,291                   |
| Stockosorb – Medium | 0,765                    | 12,606                  | 1,337                   |
| Floria              | -                        | -                       | 0                       |
| Agrisorb            | -                        | -                       | 0                       |



Jak je z hodnot uvedených v Tabulce 11 patrné. AAM byl nalezen pouze v jednom komerčním výrobku Stoskosorb – Medium, z něhož se methanolem vyluhovalo i určité množství kyseliny akrylové. Ta byla nalezena i v extraktu Stockosorbu – Micro. V hydrogelech Floria a Agrisorb nebyly AAM ani KA nalezeny. Takto stanovené hmotnostní úbytky těchto produktů byly velmi nízké, 0,3 resp. 1,3 %. U syntetizovaných hydrogelů činil úbytek jejich hmotnosti po extrakci methanolem i ethanolem přibližně 3 % (viz Tabulka 12 a Tabulka 13), přičemž výchozí hydrogel obsahoval také 19 % vzdušné vlhkosti..

Tabulka 12 - Úbytek nezesítěného hydrogelu po výluhu (PSA)

| Extrahovadlo  | Ethanol    |            |            | Methanol   |            |            |
|---------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Experiment č. | 1.         | 2.         | 3.         | 4.         | 5.         | 6.         |
| Navážka [g]   | 0,990      | 0,990      | 1,005      | 0,991      | 0,992      | 0,990      |
| Vyvážka [g]   | 0,957      | 0,943      | 0,972      | 0,958      | 0,947      | 0,927      |
| Ztráta [%]    | <b>3,3</b> | <b>4,7</b> | <b>3,3</b> | <b>3,3</b> | <b>4,5</b> | <b>3,3</b> |

Tabulka 13 - Úbytek zesítěného hydrogelu po výluhu (PSA + MBA)

| Extrahovadlo  | Ethanol    |            |            | Methanol   |            |            |
|---------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Experiment č. | 1.         | 2.         | 3.         | 4.         | 5.         | 6.         |
| Navážka [g]   | 0,990      | 0,992      | 0,997      | 1,004      | 0,990      | 0,992      |
| Vyvážka [g]   | 0,963      | 0,957      | 0,964      | 0,959      | 0,945      | 0,955      |
| Ztráta [%]    | <b>2,7</b> | <b>3,5</b> | <b>3,3</b> | <b>4,5</b> | <b>4,5</b> | <b>3,7</b> |

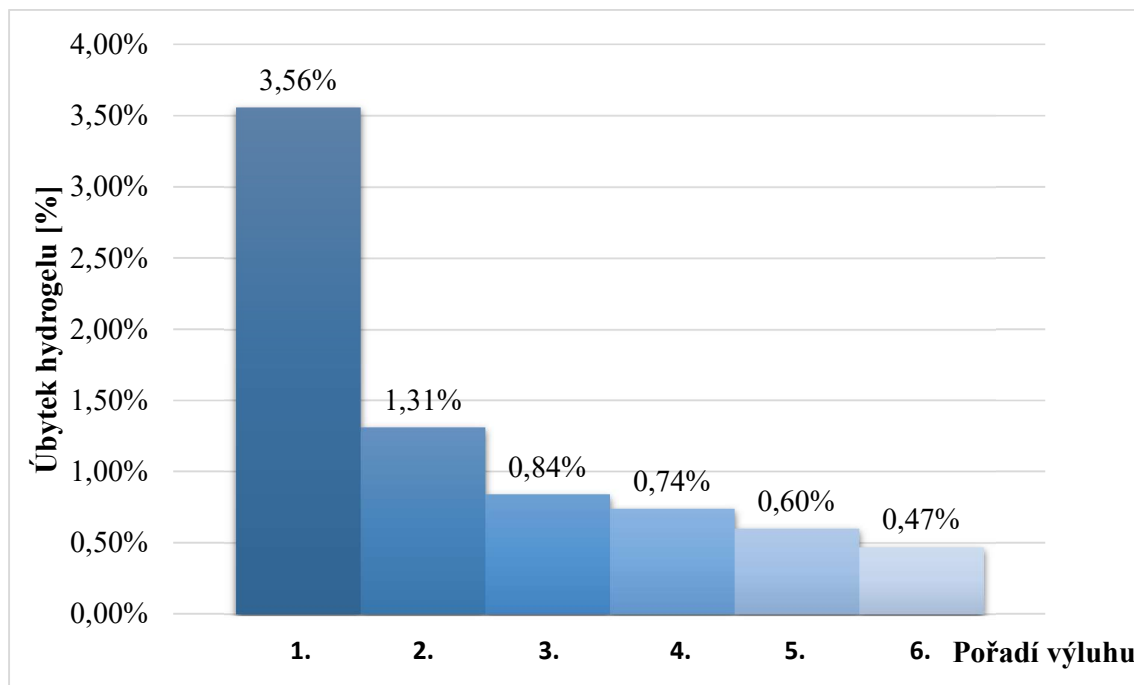
### 3.2.3 Obsah zbytkových monomerů ve výluhu hydrogelu

Komentář k obsahu AAM a KA v komerčních syntetických hydrogelech byl uveden v kap. 3.2.2 se závěrem, že testované výrobky neobsahují žádné monomerní zbytky AAM a KA, nebo jen ve velmi nízkých hodnotách, které jsou povolené a vyhovují příslušným normám. Syntetizovaný nezesítěný hydrogel byl podroben výluhu v ethanolu a methanolu. U každého hydrogelu byly provedeny tři vzorky výluhů. Největší podíl ztrát byl zaznamenán ve výluhu č.1, kdy ztráta dosáhla 3,56 % z celkové navážky hydrogelu. Následné další výluhy měly na celkovou ztrátu již menší vliv. Celková hodnota ztrát byla 54,22 mg kyseliny akrylové a 20,96 mg akrylamidu na 50 ml výluhu.

Tabulka 14 - Stanovení obsahu monomerů ve výluzích nezesítěného syntetického hydrogelu

| Hydrogel                   | AAM<br>[mg/50 ml výluhu] | KA<br>[mg/50 ml výluhu] |
|----------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 1. výluh                   | 9,91                     | 25,64                   |
| 2. výluh                   | 3,64                     | 9,42                    |
| 3. výluh                   | 2,35                     | 6,08                    |
| 4. výluh                   | 2,07                     | 5,35                    |
| 5. výluh                   | 1,68                     | 4,34                    |
| 6. výluh                   | 1,31                     | 3,38                    |
| $\Sigma$                   | <b>20,96</b>             | <b>54,22</b>            |
| $\Sigma_{\text{monomerů}}$ | <b>75,18</b>             |                         |

Největší podíl ztrát byl zaznamenán v prvním výluhu, jak dokazuje tabulka výše i přiložený graf. Detekční limit deklarovaný výrobcem je  $1 \times 10^{-5}$  AU – absorpčních jednotek (V) [46].



Obrázek 23 - Úbytek syntetizovaného hydrogelu v průběhu série výluhů

Po provedení série výluhů, byla konečná změna hmotnosti 0,1 g z navážky 1 g, přičemž bylo prokázáno, že 54,22 % těchto ztrát, tvořila kyselina akrylová a 20,96 % bylo tvořeno akrylamidem. Zbývající ztráty tvoří vlhkost, kterou hydrogel obsahoval, a která se z něj díky extrakci odstranila.

### 3.3 Studium vlastností půdy po aplikaci hydrogelu

#### 3.3.1 Plná vodní kapacita půdy

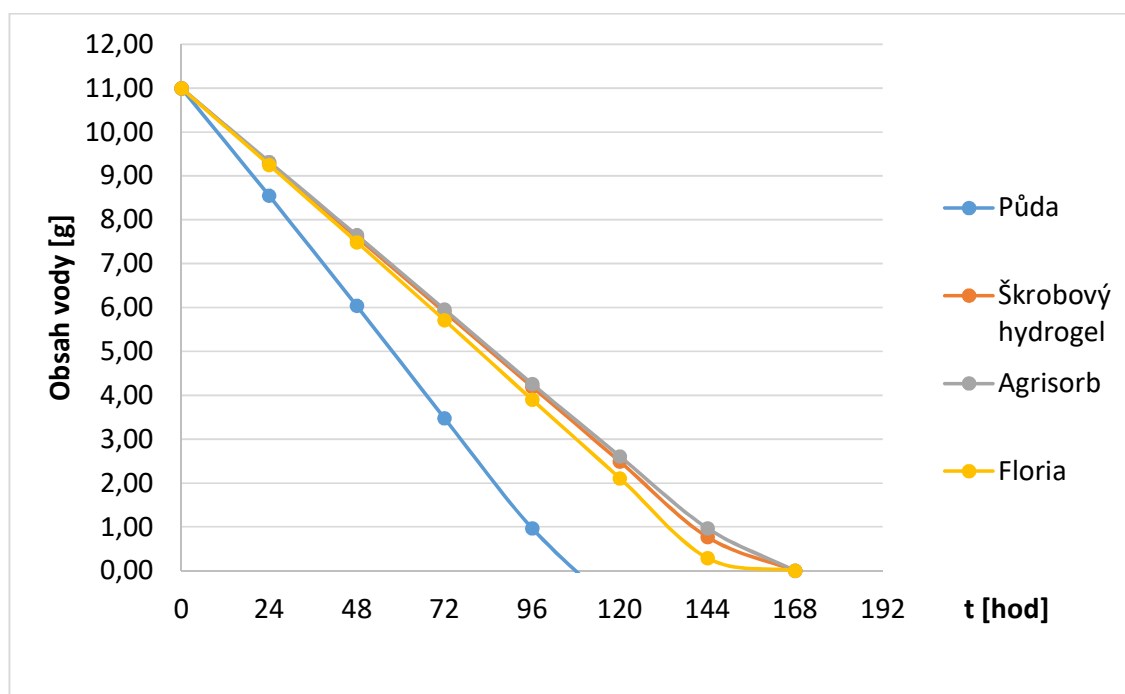
Dle postupu uvedeného v kapitole 2.3.3.2 byla z rozdílu celkového množství vody vnesené do kolony (25 ml) a objemu vody, po jehož vypuštění dosáhla hladina vody právě horní úroveň sloupce půdy v koloně byla (14,2 ml) vypočítána plná vodní kapacita, která činila 10,8 g vody na 100 g půdy, tj.  $30,17 \pm 0,64$  %. Tato hodnota je aritmetický průměr ze tří stanovení.

### **3.3.2 Maximální kapilární vodní kapacita**

Dle postupu uvedeného v kapitole 2.3.3.3 byla rozdílu celkového množství vody vnesené do kolony (25 ml) a objemu vody, který z kolony s půdou vytekl během 24 hodin (16,4 ml), vypočítána maximální kapilární vodní kapacita půdy, která činila 8,4 g vody na 100 g půdy, tj.  $25,15 \pm 1,26$  %. Stejný postup byl proveden i pro půdu obsahující 1% hmot. nezesíťného hydrogelu. V tomto případě dosahovala maximální kapilární vodní kapacita půdy hodnoty  $87,35 \pm 4,39$  %. Uvedené hodnoty jsou aritmetickými průměry ze tří stanovení.

### 3.3.3 Rychlost vysychání

Samotná půda a půda s třemi různými typy hydrogelů byly ponechány volně schnout při průměrné teplotě místnosti 18 °C po dobu 168 hodin (ukončeno po dosažení nulové hodnoty, resp. dosažení hodnoty odpovídající obsahu vzdušné vlhkosti v půdě). Výsledkem bylo, že půda, která neobsahovala hydrogel, byla suchá za 108 hodin tedy 4 a půl dne. Oproti tomu směsi obsahující hydrogely, vykazovaly v průměru o 60 hodin delší dobu zadržení vody. Tato hodnota je více než uspokojivá, vzhledem k nízkému procentu použití hydrogelu, a i malému množství půdy použitému k experimentu. Průběh vysychání je uveden v následujícím grafu.



Obrázek 24 - Rychlost vysychání půdy v závislosti na přítomnosti hydrogelu

## 4 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo navrhnout metodiku HPLC stanovení akrylamidu, kyseliny akrylové a N, N'-metylen-bisakrylamidu použitých k syntéze kopolymerního škrobového hydrogelu, připravit tento hydrogel dle postupu navrženého v diplomové práci J. Hrocha a zbytkové monomery v něm stanovit. Dalším úkolem aplikační povahy bylo u připravených hydrogelů posoudit jejich vliv na retenční vodní kapacitu půdy a rychlost jejího vysychání.

Teoretická část diplomové práce byla zaměřena na rozdělení, obecný popis a využití hydrogelů. Dále byla důkladně popsána metoda kapalinové chromatografie a v neposlední řadě i základní charakteristiky vlastností půdy.

Byl studován vliv koncentrace methanolu a acetonitrilu ve vodné mobilní fázi na hodnotu retenčního faktoru AAM, KA a MBA na koloně s chemicky vázanou nepolární fází C18 za účelem nalezení optimálních podmínek pro jejich vzájemnou separaci. Z výsledků je zřejmé, že se zvyšujícím se obsahem MeOH či ACN v mobilní fázi retence sledovaných látek na koloně s fází C18 klesá, což je v souladu s principy RP HPLC. Pro odchylky v chování kyseliny akrylové v mobilních fázích s ACN při pH 4 a s MeOH při pH 5 je nesnadné nalézt vysvětlení, vzhledem k poměrně značnému rozptylu hodnot  $\log k'$  je jejich proložení přímkou dosti násilné. Prozatím, pokud nebudou provedeny další ověřovací experimenty, nelze vyvozovat jednoznačné závěry.

V ostatních případech byl mechanismus chromatografie s obrácenou fází lineárními závislostmi logaritmu retenčních faktorů na koncentraci organické složky mobilní fáze potvrzen a odpovídá předpokladu. To také umožňuje predikci retence sledovaných analytů v různě koncentrovaných mobilních fázích a volbu podmínek pro dosažení jejich účinné separace.

Při studiu vlivu pH na retenční charakteristiky byla u kyseliny akrylové prokázána závislost hodnot retenčních faktorů, na pH eluentu, což je dáno její schopností disociace ve vodných roztocích. V mobilní fázi voda-methanol (95:5) se retence AAM a MBA v rozmezí pH = 2–4 prakticky nemění, při pH 5 dochází u obou látek k jejímu malému zvýšení. Ve 2% vodném ACN je rovněž retence těchto sloučenin v rozmezí pH = 2–4 téměř konstantní, při pH 5 se však AAM téměř nezadržuje.

Na základě výsledků lze jako optimální chromatografické podmínky pro separaci a kvantitativní stanovení AAM, KA a MBA v použitém systému s obrácenou fází navrhnout mobilní fázi voda-MeOH o koncentraci alkoholu  $\varphi(\text{MeOH}) = 5\%$ , případně směs voda-ACN o koncentraci organické složky  $\varphi(\text{ACN}) = 2\%$ . pH eluentu musí být nižší nežli pH 4, aby byla potlačena disociace kyseliny akrylové a tato látka se na koloně zadržovala. S ohledem na stabilitu chemicky vázané oktadecylové stacionární fáze v rozmezí pH 2–5 se jako nejvhodnější nabízí pH 3.

Za těchto podmínek izokratické eluce dochází k dokonalé separaci všech tří studovaných látek v co možná nejkratším čase (nezbytném pro oddělení AAM od KA), píky nezasahují do mrtvého objemu, ani se nepřekrývají. Oddělení AAM od KA trvá v methanolvé i acetonitrilové mobilní fázi ideální čas, aby byly naplněny podmínky správné separace. Pro zkrácení doby eluce MBA při současném zachování dokonalé separace AAM a KA by bylo nutné použít gradientovou eluci.

U připraveného syntetického hydrogelu byla stanovena hodnota bobtnacího poměru. Nezesítný hydrogel vykazoval hodnotu BP 498 g vody / g sušiny s relativní směrodatnou odchylkou 6,33 %. Zesítný hydrogel poté hodnotu BP 187 g vody / g sušiny s relativní směrodatnou odchylkou 5,27 %. Tyto hodnoty potvrzují výsledky dosažené v diplomové práci Ing. Hrocha.

Při studiu vyluhovatelnosti monomerů v hydrogelech byl AAM nalezen pouze v jednom komerčním výrobku Stoskosorb – Medium, z něhož se methanolem vyluhovalo i určité množství kyseliny akrylové. Ta byla nalezena i v extraktu Stockosorbu – Micro. V hydrogelech Floria a Agrisorb nebyly AAM ani KA nalezeny. Takto stanovené hmotnostní úbytky těchto produktů byly velmi nízké, 0,3 resp. 1,3%. U syntetizovaných hydrogelů činil úbytek jejich hmotnosti po extrakci methanolem i ethanolem přibližně 3 %, což poukazuje na vysokou strukturní stabilitu připravených hydrogelů.

Provedením chromatografické analýzy u výluhu nezesítného hydrogelu bylo prokázáno, že největší podíl ztrát byl zaznamenán ve výluhu č.1, kdy ztráta dosáhla 3,56 % z celkové navážky hydrogelu. Následné další výluhy měly na celkovou ztrátu již menší vliv. Celková hodnota ztrát byla 54,22 mg kyseliny akrylové a 20,96 mg akrylamidu na 50 ml výluhu. Tyto hodnoty je tedy možno snižovat extrakcí pomocí alkoholů s nejvyšším účinkem u prvního výluhu.

Při studiu půdních vlastností byla stanovena plná vodní kapacita, která činila 10,8 g vody na 100 g půdy, tj.  $30,17 \pm 0,64$  %. Druhým parametrem byla maximální kapilární vodní kapacita půdy, která činila 8,4 g vody na 100 g půdy, tj.  $25,15 \pm 1,26$  %.

Následně byla stanovena i maximální kapilární vodní kapacita pro půdu, ke které bylo přidáno 1 hmot. % nezesítného hydrogelu. V tomto případě dosahovala maximální kapilární vodní kapacita půdy hodnoty  $87,35 \pm 4,39$  %. Uvedené hodnoty jsou aritmetickými průměry ze tří stanovení. V tomto případě se jednalo značný nárůst vodní kapacity půdy a potvrzení hlavní výhody hydrogelu, schopného pojmout velké množství vody následně potvrzeného i prodlouženou dobou vysychání v řádech několika dnů.



## 5 Seznam použité literatury

1. **Hroch, J.** *Syntéza a charakterizace hydrogelu na bázi roubovaného kopolymeru škrobu, kyseliny akrylové a akrylamidu*. Pardubice : autor neznámý, 2018.
2. **Ahmed, E., M.** *Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review*. Journal of Advanced Research. 2015, 6.
3. *Hydrogel*. ScienceDirect. [Online] 2016. [Citace: 6. 5 2019.] <https://www.sciencedirect.com/topics/materials-science/hydrogel>.
4. **Burkert S., Schmidt T., Gohs U., Dorschner H., Karl-Friedrich A.** *Cross-linking of poly(N-vinyl pyrrolidone) films by electron beam irradiation*. Radiat Phys Chem. 76, 2007.
5. **Wen Z., Xing J., Yang C., Yuying L., Jun F.** *Degradable natural polymer hydrogels for articular cartilage tissue engineering*. J Chem Technol Biotechnol. 3, 2013, Sv. 327-39.
6. **Takashi L, Htsumi T, Makoto M, Takashi I, Taekho G, Shuji S.** *Synthesis of porous poly(N-isopropylacrylamide) gel beads by sedimentation polymerization and their polymerization and their porphology*. J Appl Polym Sci. 104, 2007, 810.
7. **Yang L., Chu J.S., Fix J.A.** *Colon-specific drug delivery: new approaches and in vitro/in vivo evaluation*. Int J Pharm. 235, 2002, 1-15.
8. **Jun, L., a další.** *The swelling behaviour of radiation prepares semi-interpenetrating polymer networks composed of polyNIPAAm and hydrophilic polymers*. 397-400, 2000.
9. **Hacker M.C. a Mikos A.G.**, *Synthetic polymers, principles of regenerative medicine*, 2011
10. **Kabiri, K.** *Advances in non-hygienic applications of superabsorbent hydrogel materials*. Journal of Materials Science. 2010, s. 5711-5735.
11. **Kyle, R. A. a Steensman, P.** *Otto Wichterle - Inventor of the First Soft Contact Lenses*. Mayo Clinic Proceedings. 2016, Sv. 91, 3.
12. *Léčivý polymerní gel a hydrogel ve zdravotnictví*. [Online] Centrum polymerních systémů. [Citace: 6. 5 2019.] [https://www.technickytydenik.cz/rubriky/archiv-medicinska-technika/lecivy-polymerni-gel-a-hydrogel-ve-zdravotnictvi\\_26028.html](https://www.technickytydenik.cz/rubriky/archiv-medicinska-technika/lecivy-polymerni-gel-a-hydrogel-ve-zdravotnictvi_26028.html).
13. **Kodet, J., Šotolová, O., Štěrba, S.** *Plnicí, zahušťovací, gelotvorné a stabilizační látky pro potraviny*. Praha: Středisko potravinářských informací, 1993. ISBN 80-85120-32-1.
14. **Kalia, S. a Sabaa, M.W.** *Polysaccharide based graft copolymers*. Heidelberg: Springer, 2013. ISBN 978-3-642-36566-9.

15. **Zhang, Y., Lin, Z. and Chen, Y.** *Synthesis and Characterization of Starch-g-Poly(acrylic acid)/Organo-Zeolite 4A Superabsorbent Composites With Respect to Their Water-Holding Capacities and Nutrient-Release Behavior.* Polymer composites. str. 1838-1848, 2017, Sv. 38, 9.
16. Pub chem – Acrylamide [Online] [Citace: 9. 5. 2019.] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6579#section=Safety-and-Hazards>
17. **Rice, J. M.** *Acrylamide: Genetic Toxicity and Exposure Assessment: The carcinogenicity of acrylamide.* Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. [Online] [Citace: 19. 1. 2019.] <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383571804003031>.
18. Uspěšná léčba. *Akrylamid a jeho zdravotní rizika.* [Online] [Citace: 5. 5. 2019.] <https://www.uspesna-lecba.cz/strava/akrylamid-a-jeho-zdravotni-rizika/>.
19. Informační centrum bezpečnosti potravin. *Bezpečnost potravin.* [Online] [Citace: 8. 5. 2019.] <https://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/EFSA/Akrylamid.pdf>.
20. **Hashimoto K., Sakamoto J., Tanii H.** *Neurotoxicity of acrylamide and related compounds and their effects on male gonads in mice.* Arch Toxicol, 1981, 47:179-189.
21. **Daotong L., Pengpu W., Yanbing L., Xiasong H., Fang Ch.,** *Metabolism of Acrylamide: Interindividual and Interspecies Differences as Well as the Application as Biomarkers,* Current Drug Metabolism, 17. 2016
22. Pub chem – N, N'- Metylen-bis-acrylamide [Online] [Citace: 9. 5. 2019.] [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/n\\_n\\_methylenebisacrylamide#section=ATR-IR-Spectra](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/n_n_methylenebisacrylamide#section=ATR-IR-Spectra)
23. *N,N'-Methylenebis-Acrylamide.* Datasteets. [Online] [Citace: 5. 5. 2019.] <http://datasheets.scbt.com/sc-361828.pdf>.
24. *Acrylic acid.* PubChem - Open chemistry database. [Online] [Citace: 3. 5. 2019.] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6581>
25. Acrylic Acid, Toxicology Data Network. TOXNET. [Online] [Citace: 5. 5. 2019.] <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+1421>.
26. Coufal, P. *HPLC.* [Online] [Citace: 19. 1. 2019.] <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>.
27. **Nováková, L., Douša, M. a kol.,** *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.* Praha: 2013. s. 3-32, ISBN 978-80-260-4243-3
28. **Oliver, R. W.** *HPLC of macromolecules: a practical approach.* Oxford : autor neznámý, 1998. 0-19-963570-6.

29. **Jandera, P. a Churáček, J..** *Kapalinová chromatografie s programovaným složením mobilní fáze*. Praha : Academia, 1984.
30. **Ibsen.** *High Pressure Liquid Chromatography*. [Online] [Citace: 5. 5. 2019.] <https://ibsen.com/applications/spectroscopy/high-pressure-liquid-chromatography/>.
31. **TUdelft.** *High-performance liquid chromatography (HPLC)*. [Online] [Citace: 5. 5. 2019.] <https://www.tudelft.nl/citg/over-faculteit/afdelingen/watermanagement/research/waterlab/equipment/high-performance-liquid-chromatography-hplc/>
32. **Patonay, G.** *HPLC detection newer methods*. New York : 1992. 0-89573-327-7.
33. **Bidlingmeyer, B. M.** *Practical HPLC methodology and applications*. New York : John Wiley, 1992. 0-471-57246-2.
34. *Residual Acrylic Acid and Acrylamide Monomers in Polyacrylic Acid/Polyacrylamide Polymers*. Lubrizol. 2010
35. **Krishna V.N., Meyyanathan S, N., Karthik Y., Hemnath E., Satiesh Kumar R. a Usha K.** *A simple and validated RP HPLC method for the estimation of acrylamide in potato chips* WORLD JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES, 2014. s. 1467-1476
36. **Wenfeng Z., Zhifeng D., Wenjie Z. a další.** *Determination of Trace Acrylamide in Starchy Foodstuffs by HPLC Using a Novel Mixed-Mode Functionalized Calixarene Sorbent for Solid-Phase Extraction Cleanup*, Journal of agricultural and food chemistry. 2014, 62, 6100–6107
37. **Paleologos E.K., Kontominas M.G.** *Determination of acrylamide and methacrylamide by normal phase high performance liquid chromatography and UV detection*. Journal of Chromatography A, 2005, 128-135
38. **Ver Vers L. M.** *Determination of Acrylamide Monomer in Polyacrylamide Degradation Studies by High-Performance Liquid Chromatography* Journal of Chromatographic Science. 1999, 37, 486-494
39. **Gökmen V., Senyuvab Z. H., Acar J., Sarioglu K.** *Determination of acrylamide in potato chips and crisps by high-performance liquid Chromatography* Journal of Chromatography A, 2004, 193-199
40. *Půdní vlastnosti a jejich význam ve výživě rostlin*. [Online] [Citace: 5. 5. 2019.] [https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz\\_cast.pl?cast=71347](https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=71347).
41. **Uhlíř, Z. a Socha, J.** *Agrochemie*. Pardubice, 1992
42. *Návod k použití - Hydrogel*. Hydrogel - šetří vodu. [Online] [Citace: 3. 5. 2019.] [http://hydrogel.cz/download/Hydrogel\\_navod\\_k\\_pouziti\\_CZ2017-etiketa.pdf](http://hydrogel.cz/download/Hydrogel_navod_k_pouziti_CZ2017-etiketa.pdf).

43. Škarka, P.. *Laboratorní výuka z výživy rostlin*. [Online] 26. 1 2010. [Citace: 5. 5 2019.]
44. *Floria*. Floria. [Online] [Citace: 3. 5. 2019.] <http://www.floria.cz/hydrogel/>.
45. *Agrisorb*. Agroprotect. [Online] [Citace: 3. 5. 2019.] <https://agromanualshop.cz/cz-detail-776-agrisorb-micro-5kg.html>.
46. *Shimadzu. SPD-20A/20AV UV-Vis Detector*. [Online] Shimadzu Corporation. [Citace: 3. 5. 2019.] [https://www.ssi.shimadzu.com/sites/ssi.shimadzu.com/files/Products/literature/hplc/Prominence\\_SPD-20.pdf](https://www.ssi.shimadzu.com/sites/ssi.shimadzu.com/files/Products/literature/hplc/Prominence_SPD-20.pdf).

## Seznam ilustrací

|  |    |
|--|----|
| Obrázek 1 - Schéma vzniku kopolymeru škrobu a kyseliny akrylové zesítěného N, N'-metylen-bisakrylamidem .....              | 17 |
| Obrázek 2 - Metabolismus akrylamidu .....  | 19 |
| Obrázek 3 - Separace dvousložkové směsi v chromatografické koloně .....  | 20 |
| Obrázek 4 - Kvantitativní a kvalitativní charakteristiky chromatografického procesu .....                                  | 23 |
| Obrázek 5 - Ukázka separační účinnosti kolony.....   | 24 |
| Obrázek 6 - Blokové schéma kapalinového chromatografu.....   | 26 |
| Obrázek 7 - Chromatogram stanovení AAM.....  | 29 |
| Obrázek 8 - Chromatogram stanovení AAM.....  | 30 |
| Obrázek 9 – Chromatogram stanovení AAM.....  | 31 |
| Obrázek 10 - Chromatogram stanovení AAM.....   | 32 |
| Obrázek 11 - Závislosti kapacitních poměrů AAM, KA a MBA na $\phi$ (MeOH) v mobilní fázi H <sub>2</sub> O-MeOH (pH 2)..... | 43 |
| Obrázek 12 - Závislosti kapacitních poměrů AAM, KA a MBA na $\phi$ (MeOH) v mobilní fázi H <sub>2</sub> O-ACN (pH 2) ..... | 44 |
| Obrázek 13 - Závislosti kapacitních poměrů AAM, KA a MBA na $\phi$ (MeOH) v mobilní fázi H <sub>2</sub> O-MeOH (pH 3)..... | 45 |
| Obrázek 14 - Závislosti kapacitních poměrů AAM, KA a MBA na $\phi$ (ACN) v mobilní fázi H <sub>2</sub> O-ACN (pH 3) .....  | 46 |
| Obrázek 15 - Závislosti kapacitních poměrů AAM, KA a MBA na $\phi$ (MeOH) v mobilní fázi H <sub>2</sub> O-MeOH (pH 4)..... | 47 |
| Obrázek 16 - Závislosti kapacitních poměrů AAM, KA a MBA na $\phi$ (ACN) v mobilní fázi H <sub>2</sub> O-ACN (pH 4) .....  | 48 |
| Obrázek 17 - Závislosti kapacitních poměrů AAM, KA a MBA na $\phi$ (MeOH) v mobilní fázi H <sub>2</sub> O-MeOH (pH 5)..... | 49 |
| Obrázek 18 - Závislosti kapacitních poměrů AAM, KA a MBA na $\phi$ (ACN) v mobilní fázi H <sub>2</sub> O-ACN (pH 5) .....  | 50 |
| Obrázek 19 - Závislost kapacitních poměrů AAM, KA a MBA na pH mobilní fáze pro $\phi$ MeOH = 5% .....                      | 52 |
| Obrázek 20 - Závislost kapacitních poměrů AAM, KA a MBA na pH mobilní fáze pro $\phi$ ACN = 2% .....                       | 53 |
| Obrázek 21 - Stanovení AAM (4,03 min), KA (6,59 min) a MBA (23,83min) v 5% MeOH .....                                      | 55 |

|  |    |
|--|----|
| Obrázek 22 - Stanovení AAM (1,96 min), KA (3,26 min) a MBA (18,64 min) v 2% ACN... | 55 |
| Obrázek 23 - Úbytek syntetizovaného hydrogelu v průběhu série výluhů.....          | 59 |
| Obrázek 24 - Rychlost vysychání půdy v závislosti na přítomnosti hydrogelu.....    | 61 |

## Seznam tabulek

|   |    |
|---|----|
| Tabulka 1 - Retenční charakteristiky AAM, KA a MBA v mobilní fázi H <sub>2</sub> O-MeOH (pH 2) .  | 43 |
| Tabulka 2 - Retenční charakteristiky AAM, KA a MBA v mobilní fázi H <sub>2</sub> O-ACN (pH 2).... | 44 |
| Tabulka 3 - Retenční charakteristiky AAM, KA a MBA v mobilní fázi H <sub>2</sub> O-MeOH (pH 3) .  | 45 |
| Tabulka 4 - Retenční charakteristiky AAM, KA a MBA v mobilní fázi H <sub>2</sub> O-ACN (pH 3).... | 46 |
| Tabulka 5 - Retenční charakteristiky AAM, KA a MBA v mobilní fázi H <sub>2</sub> O-MeOH (pH 4) .  | 47 |
| Tabulka 6 - Retenční charakteristiky AAM, KA a MBA v mobilní fázi H <sub>2</sub> O-ACN (pH 4).... | 48 |
| Tabulka 7 - Retenční charakteristiky AAM, KA a MBA v mobilní fázi H <sub>2</sub> O-MeOH (pH 5) .  | 49 |
| Tabulka 8 - Retenční charakteristiky AAM, KA a MBA v mobilní fázi H <sub>2</sub> O-ACN (pH 5).... | 50 |
| Tabulka 9 - Závislost kapacitních poměrů na pH mobilní fáze MeOH .....                            | 52 |
| Tabulka 10 - Závislost kapacitních poměrů na pH mobilní fáze ACN.....                             | 53 |
| Tabulka 11 - Stanovení obsahu monomerů ve výluzech komerčních hydrogelů.....                      | 56 |
| Tabulka 12 - Úbytek nezesítěného hydrogelu po výluhu (PSA) .....                                  | 57 |
| Tabulka 13 - Úbytek zesítěného hydrogelu po výluhu (PSA + MBA).....                               | 57 |
| Tabulka 15 - Stanovení obsahu monomerů ve výluzech nezesítěného syntetického hydrogelu .....      | 58 |

## Seznam rovnic

|  |    |
|--|----|
| Rovnice 1 - Distribuční konstanta $K_D$ .....  | 21 |
| Rovnice 2 - Závislost retenčního faktoru na koncentraci méně polární složky mobilní fáze v systému s obrácenou fází..... | 22 |
| Rovnice 3 - Výpočet retenčního objemu .....  | 22 |
| Rovnice 4 - Výpočet retenčního faktoru.....  | 23 |
| Rovnice 5 - Výpočet redukovaného retenčního času .....   | 23 |
| Rovnice 6 - Výpočet počtu teoretických pater.....  | 23 |
| Rovnice 7 - Praktický výpočet počtu teoretických pater.....  | 25 |
| Rovnice 8 - Výpočet výškového ekvivalentu teoretického patra.....  | 25 |
| Rovnice 9 - Výpočet bobtnacího poměru .....  | 39 |