

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra anorganické technologie

Využití kapalinové chromatografie v agrochemické analýze

Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Jan Kalous**
Osobní číslo: **C20303**
Studijní program: **B0531A130025 Chemie**
Studijní obor: **Chemie**
Téma práce: **Využití kapalinové chromatografie v agrochemické analýze**
Zadávací katedra: **Katedra anorganické technologie**

Zásady pro vypracování

1. Provedte literární rešerši v souvislosti se zadaným tématem. Zaměřte se na popis instrumentace kapalinové chromatografie a vysvětlení principů separace látek. Text vhodně doplňte ilustračním materiálem (obrázky, schémata, tabulky).
2. Popište agrochemikálie, které lze kapalinovou chromatografií analyzovat.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Petra Kalendová, Ph.D.**
Katedra anorganické technologie

Datum zadání bakalářské práce: **26. února 2021**
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

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

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Využití kapalinové chromatografie v agrochemické analýze 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 15. 7. 2021

Jan Kalous

PODĚKOVÁNÍ

Mé největší poděkování za odborné vedení, cenné rady a informace při psaní této bakalářské práce patří paní Ing. Petře Kalendové, Ph.D. Dále bych chtěl tímto poděkovat svým rodičům za podporu po celou dobu studia.

ANOTACE

Bakalářská práce je zaměřena na popis vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Dále jsou zmíněna nejběžněji používaná hnojiva a pesticidy. Cílem literární rešerše bylo přinést souhrn v současnosti používaných typů sestav vysokoúčinné kapalinové chromatografie, která se používá k analýze agrochemikálií a jejich reziduí v potravinách a životním prostředí.

KLÍČOVÁ SLOVA

HPLC, agrochemie, pesticidy, hnojiva

TITLE

The use of liquid chromatography in agrochemical analysis.

ANNOTATION

The Bachelor thesis is focused on the description of the high performance liquid chromatography. The most commonly used fertilizers and pesticides were described. The aim of the literature search is to provide a summary of currently used techniques of high performance liquid chromatography for the analysis of agrochemicals and their residues in food and the environment.

KEYWORDS

HPLC, agrochemistry, pesticides, fertilizers

OBSAH

Úvod.....	10
1. Úvod do chromatografie	11
2. Kapalinová chromatografie.....	12
2.1. Historie.....	12
2.2. Princip kapalinové chromatografie	13
2.3. Chromatografické charakteristiky	14
2.3.1. Chromatogram	14
2.3.2. Retenční (mrtvý) čas a objem	14
2.3.3. Retenční faktor.....	15
2.4. Chromatografické systémy.....	15
2.4.1. Systém s normálními fázemi (NPC)	15
2.4.2. Systém s obrácenými fázemi (RPC)	16
2.4.3. Chromatografie stérické vyluky (SEC).....	16
2.4.4. Iontově výměnná chromatografie (IEC).....	16
2.4.5. Další typy	17
2.5. Instrumentace HPLC	18
2.5.1. Mobilní fáze	18
2.5.2. Vysokotlaká čerpadla.....	19
2.5.3. Dávkování vzorku.....	21
2.5.4. Kolony	22
2.5.5. Detekce	23
3. Agrochemikálie.....	29
3.1. Hnojiva.....	29
3.1.1. Dusíkatá hnojiva	30
3.1.2. Fosforečná hnojiva.....	31
3.1.3. Draselná hnojiva	32
3.2. Pesticidy	33
3.2.1. Insekticidy.....	34
3.2.2. Herbicidy	35
3.2.3. Fungicidy	35
4. Analýza agrochemikálií pomocí HPLC.....	36
4.1. Odběr vzorku.....	36
4.2. Analýza dusičnanů	36
4.3. Analýza reziduí pesticidů	38
ZÁVĚR	42
Použitá literatura	43

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Přibližný vývoj finančních prostředků vynaložených na nákup HPLC zařízení za rok, v miliardách US dolarů [5]	13
Obrázek 2 – Separace směsi dvou složek v chromatografickém systému [2]	13
Obrázek 3 – Chromatogram s jednou analyzovanou látkou; t_M – mrtvý retenční čas, t_R – retenční čas látky [8]	14
Obrázek 4 – Schematické znázornění separačních módů, (a) systém s normálními fázemi (NPC), (b) systém s reverzními fázemi (RPC) [6]	16
Obrázek 5 – Separační módy IEC (vlevo) a SEC (vpravo) [8]	17
Obrázek 6 – Blokové schéma HPLC. (1) Zásobníky mobilních fází, (2) odplyňovač, (3) směšovač, (4) vysokotlaké čerpadlo, (5) dávkovač vzorku, (6) chromatografická kolona, (7) detektor, (8) sběrač frakcí, (9) datová stanice [2]	18
Obrázek 7 – Pístové čerpadlo, 1 – elektromotor, 2 – převodovka, 3 – píst čerpadla, 4 – pracovní prostor válce, 5 – výtlačný ventil, 6 – sací ventil, 7 – mobilní fáze ke koloně, 8 – zásobník, 9 – těsnění pístu [2]	20
Obrázek 8 – Znázornění toku mobilní fáze z pístového čerpadla s jedním pístem, střídání sací a výtlačné fáze [4]	20
Obrázek 9 – Tok ze sériového zapojení dvou pístových čerpadel, eliminace pulzního toku [4]	20
Obrázek 10 – Princip dávkování pomocí vysokotlakého, šesticestného ventilu. A – dávkování s využitím dávkovací smyčky, B – dávkování s využitím vnitřního objemu ventilu; P – čerpadlo, C – kolona, S – vzorek, W – odpad [2]	21
Obrázek 11 – Schéma chromatografické kolony: 1 – plášť, 2 – frit, 3 – stacionární fáze, 4 – ochranný kroužek, 5 – koncová hlavice, 6 – vstup pro kapiláru se závitem [2]	22
Obrázek 12 – Schéma zapojení UV spektrometru s volitelnou vlnovou délkou [14]	24
Obrázek 13 – Schéma zapojení LC/MS/MS [18]	27
Obrázek 14 – Porovnání chromatogramu z UV (A) a MS/MS (B) detektoru při analýze volného kortizolu (cortizol) [19]	27

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

NPC – Normal Phase Chromatography

RPC – Reversed Phase Chromatography

SEC – Size Exclusion Chromatography

IEC – Ion Exchange Chromatography

HILIC – Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography

MS – Mass Spectrometry

CRF – Controlled Release Fertilizers

NPK – Nitrogenium-Phosphorus-Kalium (Dusík-fosfor-draslík)

WHO – World Health Organization

ESA – Ethane Sulfonic Acid

OA – Oxanilic Acid

Úvod

Práce je zaměřena na jednu z nejvyužívanějších analytických separačních metod současné doby, vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). Výhoda, kvůli které našla HPLC tak široké uplatnění je široká oblast použitelnosti pro různé typy látek. V úvodu je popsán obecný princip fungování a separace látek v HPLC. Dále jsou popsány jednotlivé části chromatografů. Mezi nejdůležitější části patří separační kolona a detektor zaznamenávající analyzované látky po separaci. V dalších kapitolách jsou popsány agrochemikálie, jejich rozdělení a v zemědělství nejčastěji využívané typy hnojiv a pesticidů.

Vzhledem k širokému uplatnění této metody je využívána i v oblasti zemědělství. Při neustále narůstající populaci, je efektivita a produktivita zemědělství jednou z klíčových oblastí výzkumu. Té by nebylo možné dosáhnout bez průmyslově vyráběných agrochemikálií. Agrochemikálie slouží k dodání chybějících prvků (živin) do půdy, které pěstovaná rostlina potřebuje ke svému optimálnímu růstu. Tato skupina je nazývána hnojiva. Druhou skupinou agrochemikálií jsou tzv. pesticidy, které slouží jako ochrana rostlin před škůdci. Těmi mohou být plísňe, hmyz, plevely nebo třeba hlodavci. I když jsou v současném průmyslovém zemědělství tyto látky téměř nenahraditelné z důvodu nutnosti dosahovat opakovaných vysokých výnosů pěstovaných plodin, je zde nutné držet se známého přísloví, že všeho moc škodí. Nadbytečné používání hnojiv je nepříznivé nejen pro okolní ekosystém, ale i pro samotnou efektivitu pěstování. Stejně je to i v případě pesticidů, které jsou v mnohých případech oproti hnojivům mnohem toxičtější. Při nepřiměřeném, nadbytečném použití těchto látek dochází k jejím ztrátám, prostupu do okolního prostředí a podzemních nebo povrchových vod, čímž se jejich nepříznivý dopad může rozšířit na širokou oblast. Proto je nutné množství použitých, a především v přírodě vyskytujících se agrochemikálií monitorovat. Nejčastěji jsou takto analyzovány rezidua pesticidů vyskytující se v potravinách a pitné vodě. Množství užitých pesticidů k hubení škůdců kvůli zvýšení výnosů plodiny je v současnosti jedním z nejpřísněji kontrolovaných procesů prováděných v zemědělství. Důvodem je škodlivost některých používaných pesticidů, a jejich reziduí, pro člověka. K tomuto monitoringu se osvědčila právě vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

1. Úvod do chromatografie

Chromatografie je jednou z mnoha analytických metod. Jedná se o metodu separační, tedy metodu, při níž dochází k dělení složek obsažených ve vzorku.

K separaci látek dochází mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi, kterými jsou stacionární a mobilní fáze. Fáze stacionární je nepohyblivá. Jedná se buď o tuhou látku, nebo o kapalinu uchycenou na pevném nosiči. Tato fáze je umístěna v chromatografické koloně, a to ve formě sorbentu. Pomocí mobilní fáze je do systému vnášen analyzovaný vzorek, který je následně dopraven do kolony se stacionární fází. Na základě různé afinity k mobilní a stacionární fázi jsou látky obsažené ve vzorku zadržovány v koloně. Čím je vyšší afinita látky ke stacionární fázi, tím dochází k většímu zdržení v koloně a tím pádem k delší retenci. Do detektoru se tedy nejdříve dostávají látky s nejnižší afinitou [1; 2].

Chromatografie slouží nejen k separaci složitých směsí, ale také k identifikaci a kvantifikaci analytu. Nejen díky tomu nachází uplatnění v mnoha odlišných oborech. Od kontroly čistoty barviv, monitorování látek v životním prostředí, až po zjišťování kvality farmakologických přípravků.

Chromatografii lze dělit dle:

Povahy mobilní fáze:

- Kapalinová chromatografie – mobilní fází je kapalina.
- Plynová chromatografie – mobilní fází je plyn.

Uspořádání stacionární fáze:

- Kolonová chromatografie – stacionární fáze umístěna v koloně.
- Plošná chromatografie:
 - Papírová
 - Tenkovrstvá

Děje, který způsobují separaci:

- Rozdělovací chromatografie
- Adsorpční chromatografie
- Iontově výměnná chromatografie
- Gelová chromatografie
- Afinitní chromatografie [1; 3]

2. Kapalinová chromatografie

Jak již bylo zmíněno dříve v textu, mobilní fází je zde kapalina, která slouží též jako transportní médium pro analyzovaný vzorek.

2.1. Historie

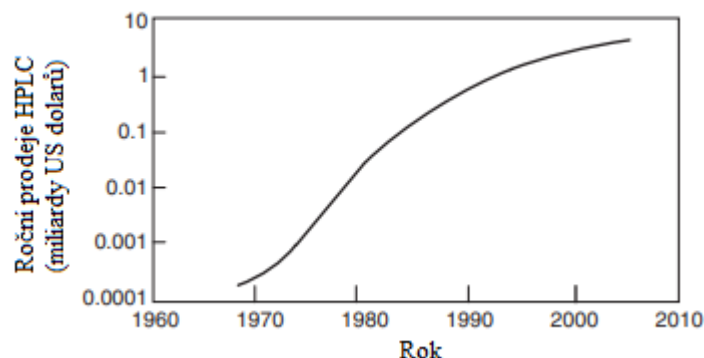
Kapalinová chromatografie jako analytická metoda byla objevena počátkem 20. století. Byla pojmenovaná jako kolonová kapalinová chromatografie, kde do skleněného válce naplněného rozdrčeným práškem, např. křídou byl do horní části nanesen vzorek a přelit kapalným rozpouštědlem. Vlivem gravitační síly docházelo k pohybu analytu skrz zrnitý materiál a jednotlivé složky byly rozděleny vlivem různých afinit k mobilní a stacionární fázi. Původně byly takto analyzovány barevné vzorky, které bylo možné pozorovat uvnitř kolony. Jednotlivé frakce se poté daly odděleně zachytit na dně kolony a po odpaření rozpouštědla je bylo možné kvantitativně analyzovat.

Později došlo k objevení tzv. papírové chromatografie (PC) a následně tenkovrstvé chromatografie (TLC). Princip separace látek je podobný jako u předchozí metody. Liší se pouze hnací síla, kterou v tomto případě jsou páry rozpouštědla, do kterého je ponořen proužek papíru, nebo skleněná destička potažená SiO_2 (v případě TLC). Páry rozpouštědla pak unášejí analyt vzhůru přes materiál na konec hrany. Výhodou této metody byla možnost dělení více vzorků na jedné destičce.

Metoda kapalinová chromatografie byla kvůli pomalé rychlosti dlouho přehlížena v porovnání s plynovou chromatografií. Po vyřešení technologických problémů, a to zejména možnosti separace při vysokých tlacích, bylo sestrojeno zařízení známé jako vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High performance liquid chromatography – HPLC). HPLC je moderní formou kapalinové chromatografie, která k separaci používá kolony s malými částicemi (v průměru 1–5 μm), přes které je pod vysokým tlakem čerpána mobilní fáze [4]. K rozšíření této metody došlo na konci 60. let 20. století a jak je vidět na Obrázku 1, je zřejmé, že od zavedení HPLC dochází k neustálému nárůstu jejího využití, a to zejména kvůli následujícím výhodám:

- možnost použití pro širokou škálu vzorků
- přesnost analýzy
- komerčně dostupná široká nabídka kolon a zařízení.

Díky těmto výhodám je v dnešní době téměř každá laboratoř vybavena právě HPLC a při analýze neznámé směsi se často využívá jako první volba [5].



Obrázek 1 – Přibližný vývoj finančních prostředků vynaložených na nákup HPLC zařízení za rok, v miliardách US dolarů [5]

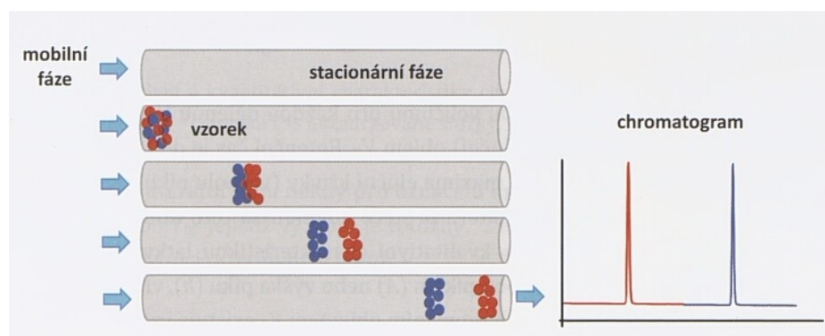
2.2. Princip kapalinové chromatografie

Pro umožnění distribuce mezi mobilní a stacionární fází, je nezbytný vznik fázového rozhraní. Při průchodu vzorku přes stacionární fázi dochází k opakovanému ustalování rovnováhy dělených látek mezi oběma fázemi. Tento děj je znázorněn na Obrázku 2 [2]. Distribuci látek mezi fázemi je možné popsat rovnicí pro rovnovážnou konstantu:

$$K_D = \frac{[X_s]}{[X_m]} \quad (1)$$

kde $[X_m]$ a $[X_s]$ jsou rovnovážné koncentrace látky X v mobilní (m) a stacionární fázi (s) [6].

Hodnota distribuční konstanty udává míru zadržení látky v koloně, čím je její hodnota vyšší, tím je i vyšší retence látky. Z toho vyplývá, že pro dělení jednotlivých látek kapalinovou chromatografií je nutné, aby složky měly různé hodnoty distribuční konstanty. Hodnota K_D závisí nejen na povaze dané látky, důležité jsou také vlastnosti stacionární a mobilní fáze. Hodnoty K_D pro stejnou analyzovanou látku se tedy můžou lišit pro různé stacionární a mobilní fáze [2].



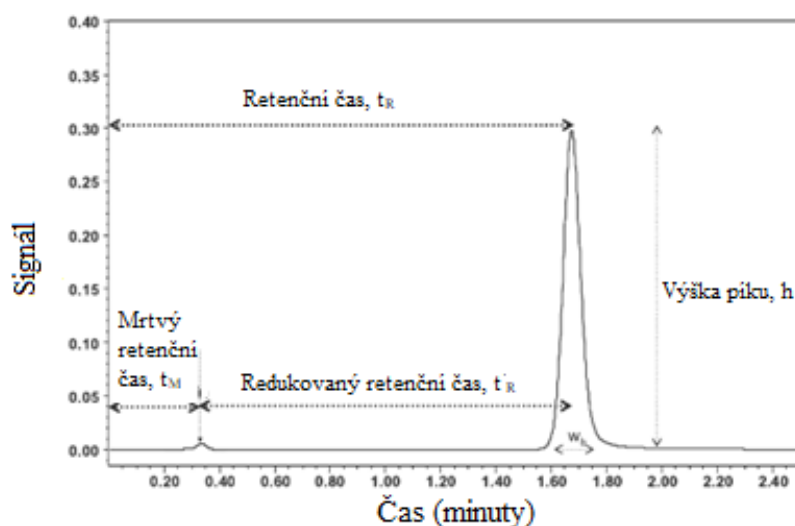
Obrázek 2 – Separace směsi dvou složek v chromatografickém systému [2]

2.3. Chromatografické charakteristiky

Všechny rovnice uvedené v následujících kapitolách jsou platné pouze pro isokratickou eluci. Isokratická eluce je eluce neboli vymývání analytu z kolony, které je způsobeno mobilní fází o konstantním složení. Eluční síla je tedy konstantní. Druhý případ může nastat, pokud se eluční síla mobilní fáze v průběhu eluce mění. V takovémto případě se jedná o gradientovou eluci. Isokratická eluce nachází uplatnění při analýze látek s podobně fyzikálně-chemickými vlastnostmi (podobná hodnota K_D). Pokud se látky výrazněji liší, využívá se spíše gradientová eluce, z důvodu časové náročnosti isokratické eluce [2].

2.3.1. Chromatogram

Chromatogram nebo eluční křivka je výstup z chromatografického měření. Tato křivka ukazuje koncentrační profil analytu v zóně. Analyt v chromatogramu analyzovaný detektorem je znázorněn jako pík [1]. Chromatogram se vynáší jako závislost signálu měřené veličiny (závisí na použitém detektoru) na čase nebo objemu.



Obrázek 3 – Chromatogram s jednou analyzovanou látkou; t_M – mrtvý retenční čas, t_R – retenční čas látky [8]

2.3.2. Retenční (mrtvý) čas a objem

Retenční a mrtvý retenční čas je znázorněn v chromatogramu (Obrázek 3) jako t_R a t_M . Retenční čas (t_R) a retenční objem (V_R) jsou charakteristickými veličinami pro každou dělenou látku. V_R je objem mobilní fáze, který je potřebný k posunu analytu kolonou při daném průtoku F_m . Zatímco t_R je doba od nástřiku analytu do dosažení maxima eluční křivky. Retenční objem je přímo závislý na průtoku a retenčním čase viz rovnice (2):

$$V_R = F_m \cdot t_R \quad (2)$$

kde F_m je objemový průtok mobilní fáze, t_R retenční čas, V_R retenční objem.

Podobně pak pro mrtvý objem (3), závislost mezi mrtvým retenčním časem, mrtvým retenčním objemem a průtokem:

$$V_M = F_m \cdot t_M \quad (3)$$

kde t_M je mrtvý retenční čas a V_M mrtvý retenční objem [6].

Mrtvý retenční čas (t_M) je hodnota času složky, u které nedochází k zdržení na stacionární fázi a pohybuje se tedy stejnou rychlostí jako mobilní fáze. Jedná se tedy o látku k stacionární fázi inertní [2].

2.3.3. Retenční faktor

Z předchozích hodnot lze získat retenční faktor, který udává stupeň retence dělených látek v koloně. Je dán časem, který látka stráví ve stacionární fázi (t_R') dělený časem, který látka stráví v mobilní fázi (mrtvým retenčním časem). Výpočet retenčního faktoru:

$$k = \frac{t_R'}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (4)$$

Redukovaný retenční čas (t_R') jako rozdíl retenčního a mrtvého času udává časové zdržení analytu na stacionární fázi [6]. Retenční faktor k může být popsán s využitím rovnovážné konstanty a objemů fází:

$$k = \frac{\text{moly látky } X \text{ ve stacionární fázi}}{\text{moly látky } X \text{ v mobilní fázi}} = \frac{[X_S] V_S}{[X_M] V_M} = K_D \frac{V_S}{V_M} \quad (5)$$

kde V_S je objem stacionární a V_M objem mobilní fáze v koloně.

2.4. Chromatografické systémy

Základní módy používané v chromatografii se dělí do několika skupin podle druhu náplně chromatografické kolony, použité mobilní fázi nebo interakcí částic vedoucí k výsledné separaci [4].

2.4.1. Systém s normálními fázemi (NPC)

Separční mód založený na adsorpci/desorpci analytu na stacionární fázi, která je polární. Nejčastěji se využívá silikagel, nebo chemicky vázané polární fáze na silikagelu.

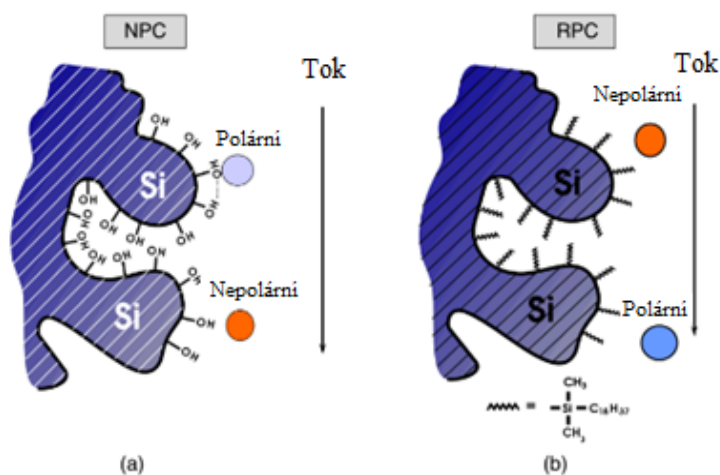
Mobilní fáze má v tomto uspořádání nižší polaritu než fáze stacionární. Používá se pro separace látek polární povahy. Na Obrázku 4a je schematicky znázorněn systém s normálními fázemi. Jako mobilní, nepolární fáze může být použit např. hexan, dichlormethan nebo tetrahydrofuran. Retence látek na chromatografické koloně je dána soutěží analyzované látky a mobilní fáze o lokalizovaná adsorpční centra na povrchu stacionární fáze a roste s větší polaritou analytů [4; 2; 6].

Teoreticky lze téměř všechny organické sloučeniny rozpustné v n-hexanu, ethylacetátu nebo isopropanolu analyzovat pomocí HPLC s normální fází [7].

2.4.2. Systém s obrácenými fázemi (RPC)

K separaci dochází na základě rozdělovacího koeficientu analytu mezi polární mobilní a nepolární stacionární fázi [6]. Jako mobilní fáze se využívají nejčastěji vodné roztoky polárních organických rozpouštědel (alkoholy, acetonitril, isopropanol) [2; 4].

Nejčastěji používaná nepolární stacionární fáze je silikagel s chemicky vázaným alifatickým uhlovodíkem (C8 nebo častěji C18). Toto uspořádání fází je schematicky zobrazeno na Obrázku 4b. Používá se například k separaci vzorků po extrakci do organického rozpouštědla [1; 4].



Obrázek 4 – Schematické znázornění separačních módů, (a) systém s normálními fázemi (NPC), (b) systém s reverzními fázemi (RPC) [6]

2.4.3. Chromatografie sterickej výluky (SEC)

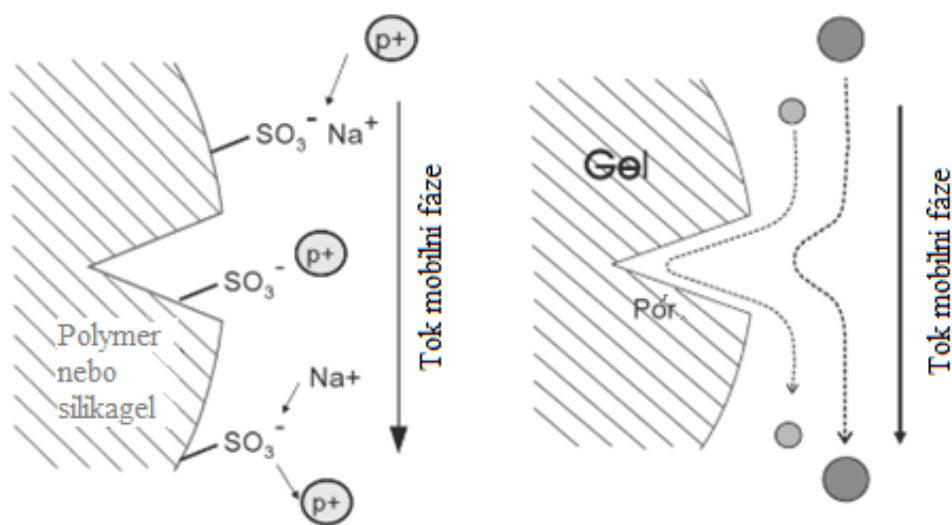
SEC, nebo také gelově permeační chromatografie využívá pórovité částice k separaci molekul. Jako stacionární fáze se využívá polymerní gel. Délka retence závisí na velikosti molekul. Princip separace je znázorněn na Obrázku 5 vpravo. U velkých molekul nedochází k jejich prostupu do pórů, nezdržují se a kolonou procházejí rychleji než molekuly menší. To by měl být jediný princip retence, nemělo by docházet k jiným interakcím mezi analytem a stacionární fází [4; 8].

2.4.4. Ionově výměnná chromatografie (IEC)

K separaci dochází na měničích iontů, kde dochází k elektrostatické interakci mezi stacionární fází, kde jsou přítomny ionizované funkční skupiny měniče iontů, s ionty v okolním roztoku s opačným nábojem (Obrázek 5 vlevo). Separace se řídí selektivitou sorpce iontů k měniči, kterou lze popsat rovnovážnou konstantou iontové výměny (koeficientem

selektivity). Ionty se z kolony eluují při zvyšování koncentrace mobilní fáze. Nejdříve dochází k vymývání iontů s nejnižší afinitou.

Stacionární fáze se dělí na dva typy podle výměnné funkční skupiny. Pokud dochází k výměně kationtů, jedná se o silný nebo slabý katex. Slabý nebo silný anex naopak vyměňuje s okolím anionty. Katexy (anexy) jsou tvořeny nerozpustnými polymerními polyvalentními kyselinami (bázemi) [2]. Jako silné katexy se využívají látky obsahující sulfoskupinu. Pro slabě kyselý katex se využívají sloučeniny s karboxylovou skupinou. Jako iontoměničové skupiny vyměňující anionty (anexy) se využívají terciální nebo kvartérní aminy [9].



Obrázek 5 – Separační módy IEC (vlevo) a SEC (vpravo) [8]

2.4.5. Další typy

Mezi další používané chromatografické systémy se řadí:

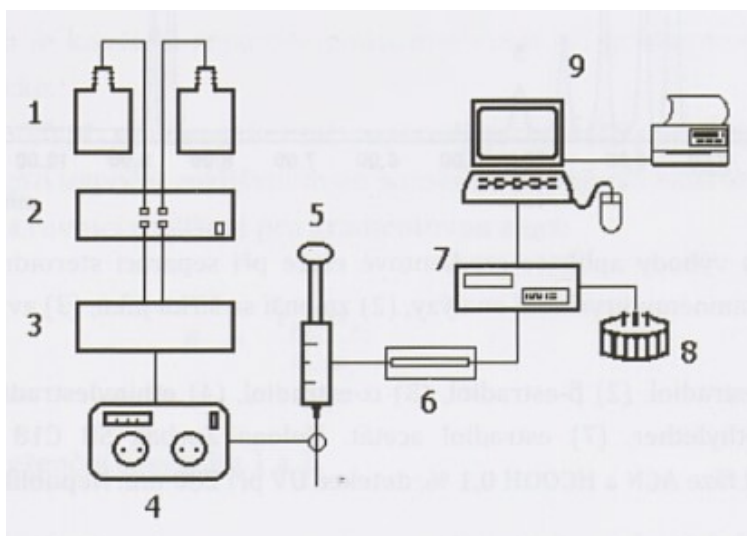
- HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) – podobná NPC (použití polárních stacionárních fází), mobilní fáze obsahuje vodnou složku, která funguje jakožto silné eluční činidlo.
- Afinitní chromatografie – založená na vazbě ligandu (pevně uchyceném na inertní matici) a receptoru analyzované látky s dostatečnou afinitou, při které imobilizované ligandy (enzymy, hormony) separují látky ze směsi.
- Chirální chromatografie – pro separace enantiomerů¹ použitím speciální chirální stacionární fáze [6; 2; 8].

¹ Látky se shodným sumárním a konstitučním vzorcem. Liší se prostorovou konfigurací na chirálních uhlících, na kterých mají opačnou konfiguraci (zrcadlově obrácené) [2].

2.5. Instrumentace HPLC

Vysokoučinná kapalinová chromatografie se skládá z několika základních částí, které se mohou v jednotlivých sestavách lišit. První nedílnou součástí jsou **zásobníky** pro uchování mobilní fáze, která je požívána pro chromatografickou analýzu. Mobilní fáze je čerpána pomocí **vysokotlakých čerpadel** skrz kolonu naplněnou malými pórovitými částicemi. Do proudící mobilní fáze je pomocí **dávkovačů** vložen malý objem rozpuštěné analyzované látky, který přechází přes **chromatografickou kolonu** se stacionární fází. Tím, jak mobilní fáze proudí, tak vymyté analyzované látky mohou být na konci kolony detekovány pomocí mnoha druhů **detektorů** (viz 2.5.5), které jsou schopny danou látku detekovat. Takto získaný signál je zpracován softwarem a grafickým výstupem je chromatogram (viz 2.3.1) [4].

Obecné schéma sestavení kapalinového chromatografu je znázorněno na Obrázku 6. Toto sestavení může mít řadu obměn v závislosti na typu analýzy [2].



Obrázek 6 – Blokové schéma HPLC. (1) Zásobníky mobilních fází, (2) odplyňovač, (3) směšovač, (4) vysokotlaké čerpadlo, (5) dávkovač vzorku, (6) chromatografická kolona, (7) detektor, (8) sběrač frakcí, (9) datová stanice [2]

2.5.1. Mobilní fáze

V kapalinové chromatografii je mobilní fáze kapalina unášející analyzované látky přes stacionární fázi. Volba jejích vlastností určuje dobu retence látek v koloně. Většina problémů, které se mohou vyskytnout v chromatografických systémech jsou často spojeny právě s mobilní fází. Proto je velice důležitá její správná příprava. Mezi nejčastější problémy způsobené špatnou přípravou mohou být např. zavzdušněná hlava čerpadla, vzduchové bublinky v cele detektoru nebo zanesení kapilár, frit a filtrů nečistotami v mobilní fází.

Některým z těchto problémů se dá předejít používáním rozpouštědel a aditiv nejvyšší čistoty. Přítomnost vzduchových bublinek se řeší odplyněním [10].

Odplynění mobilní fáze

Odplynění mobilní fáze je jedním ze základních a nejdůležitějších úkolů při chromatografickém stanovení. Odplyněním se předchází problémům s:

- nestabilitou základní linie (baseline) – průtok mobilní fáze musí být konstantní
- snížením citlivosti detekce u detektorů citlivých na přítomnost plynů
- nestabilitou provozu čerpadel [2; 10].

V současnosti je mobilní fáze nejčastěji odplyňována dvěma způsoby. Jako jedna z variant se používá vakuový odplyňovač (tzv. degaser), kde mobilní fáze prochází přes polopropustnou kapiláru umístěnou ve vakuové komoře. Skrz stěny kapiláry odchází z mobilní fáze pouze plyn. Druhou variantou je probublávání mobilní fáze heliem [10; 4; 2].

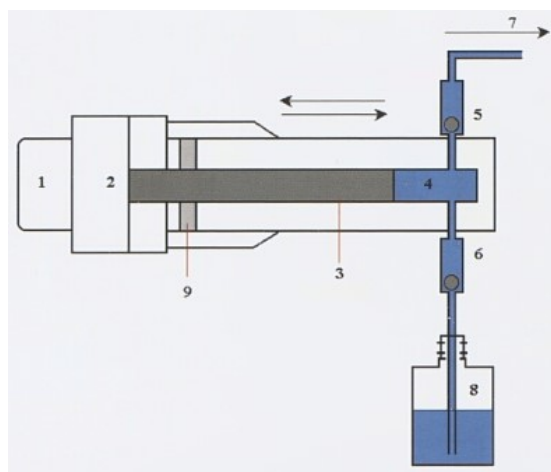
2.5.2. Vysokotlaká čerpadla

Čerpání mobilní fáze do kolony zajišťují čerpadla. K tomuto účelu se používají nejčastěji pístová nebo membránová čerpadla [1].

Na čerpadla jsou kladeny vysoké nároky. Hlavní čerpací systém musí zajišťovat konstantní průtok mobilní fáze přes dávkovač, chromatografickou kolonu i detektor. Dalším požadavkem na čerpadlo je práce za vysokého tlaku, který je potřeba pro překonání odporu toku v chromatografické koloně. Vysokotlaká čerpadla u komerčně dostupných HPLC systémů jsou schopna mít průtok v rozmezí mezi 0,1–10 ml/min kapaliny a pracovat při tlaku až 40 MPa. Pro metody využívající menší částice v koloně jsou tyto tlaky ještě vyšší, až 100 MPa. V takovémto případě se však už jedná o metodu U-HPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) [4].

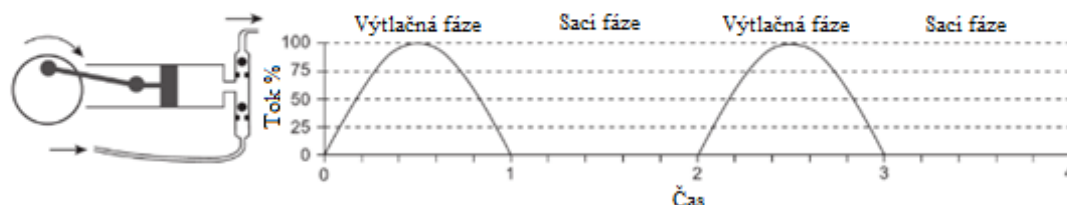
Druhy čerpadel:

1. *Pístové čerpadlo* – Pro tento typ čerpadla, je typická pulsní charakteristika tlaku. Princip transportu mobilní fáze čerpadlem je znázorněn na Obrázku 7. Hlava pístového pulsního čerpadla má 2 ventily. První slouží k nasávání mobilní fáze a jedná se o sací ventil. Druhým výtlačným ventilem je nasátá mobilní fáze vytlačena do kolony. Pohyb pístu je zajištěn krokovým elektromotorem.

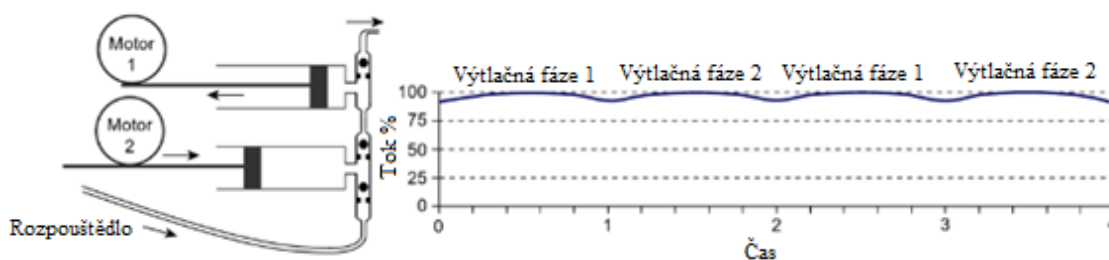


Obrázek 7 – Pístové čerpadlo, 1 – elektromotor, 2 – převodovka, 3 – píst čerpadla, 4 – pracovní prostor válce, 5 – výtlačný ventil, 6 – sací ventil, 7 – mobilní fáze ke koloně, 8 – zásobník, 9 – těsnění pístu [2]

Stabilní průtok mobilní fáze je pro funkci chromatografu zásadní. Při nekonstantním objemovém průtoku (Obrázek 8) jsou kvantitativní měření nepřesná, protože dochází ke kolísání retenčních časů a zvyšování šumu u některých typů detektorů [2]. Proto se používá zapojení dvou čerpadel za sebe, aby se tyto problémy odstranily. Tento typ sériového zapojení obsahuje 2 písty a 3 ventily (v případě paralelního zapojení jsou 4 ventily), které zajišťují lepší kontinuální tok a eliminuje pulzní tok mobilní fáze (Obrázek 9).



Obrázek 8 – Znárodnění toku mobilní fáze z pístového čerpadla s jedním pístem, střídání sací a výtlačné fáze [4]



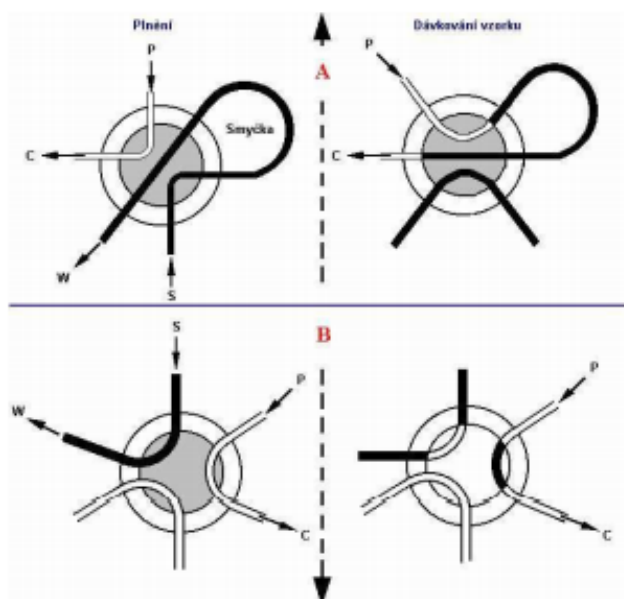
Obrázek 9 – Tok ze sériového zapojení dvou pístových čerpadel, eliminace pulzního toku [4]

Dalším způsobem, kterým se brání vzniku kolísání (fluktuaace) toku z čerpacího zařízení je instalace **tlumičů tlakových pulsů**. Tlumení pulsů se provádí například průchodem kapaliny skrz celu s membránou, která tlumí tlakové výkyvy [4].

2. *Membránové čerpadlo* – princip se podobá pístovým čerpadlům [2]. Liší se pouze tím, že v prostoru pístu je umístěna membrána, která zajišťuje sání a vytlačení kapaliny z čerpadla. Nejčastěji se zapojují dvě čerpadla vedle sebe, aby byl zajištěn kontinuální průtok mobilní fáze chromatografickým systémem a vyhlazení tlakových pulsů [1].

2.5.3. Dávkování vzorku

Úkolem dávkovačů vzorku je vnést do mobilní fáze přesný objem roztoku se vzorkem (v rozmezí 1–100 μl). Objem vzorku se volí podle použité instrumentace, citlivosti detektoru nebo kapacitě kolony [4]. V současné době jsou k dávkování vzorku používány nejčastěji automatické dávkovače. Ty mají oproti manuálním smyčkovým dávkovačům, jejichž princip je znázorněn na Obrázku 10, výhodu zejména v jejich automatizaci. Dávkování může také výrazně ovlivnit samotnou analýzu vzorku, protože může docházet i k významnému rozmývání píků [2].



Obrázek 10 – Princip dávkování pomocí vysokotlakého, šesticestného ventilu. A – dávkování s využitím dávkovací smyčky, B – dávkování s využitím vnitřního objemu ventilu; P – čerpadlo, C – kolona, S – vzorek, W – odpad [2]

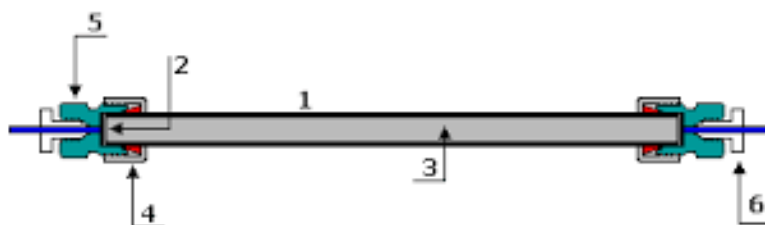
2.5.4. Kolony

Pro separaci látek jsou využívány kolony plněné pórovitými částicemi; stacionární fází, která je chemicky vázaná na pevném nosiči, nejčastěji silikagelu [11]. Částice tvořící náplň mohou mít různou velikost, která hraje důležitou roli při účinnosti separace a pracovním tlaku. Tradiční HPLC pracují při tlaku do 30–40 MPa. Účinnost separace se zvyšuje se snižujícím se průměrem částic. Nejčastěji jsou používány částice se středním průměrem 5 μm .

Další vlastností náplně kolony je její pórovitost. Existují náplně s kontrolovanou povrchovou pórovitostí. Na nepórovitém jádru je nanášena tenká, aktivní, pórovitá vrstva stacionární fáze. Druhým typem náplně jsou náplně tvořené plně pórovitými částicemi. K separacím biopolymerů se používá třetí typ pórovitých částic obsahujících kromě difúzních pórů (stejně u všech typů) také široké průtočné póry, které procházejí celou částicí [12].

Chromatografické kolony komerčně dostupné na trhu mají délku 50, 75, 100, 125, 150, 250 a 300 mm a jejich vnitřní průměr je v rozmezí od 2 do 5 mm [10]. Pro nejvyšší odolnost vůči vysokému tlaku jsou HPLC kolony obvykle vyrobeny z nerezové oceli [7].

HPLC kolony se skládají z několika částí (Obrázek 11). Kovového pláště, který je uzavřen porézní kovovou fritou, která umožňuje plynulý tok mobilní fáze a zároveň zabraňuje úniku stacionární fáze z kolony. Na obou koncích kolony jsou ochranné kroužky a koncové hlavice. V koncových hlavicích je navrtán vstup pro kapiláru se závitem [2].



Obrázek 11 – Schéma chromatografické kolony: 1 – plášť, 2 – frity, 3 – stacionární fáze, 4 – ochranný kroužek, 5 – koncová hlavice, 6 – vstup pro kapiláru se závitem [2]

Volba použité kolony je důležitá pro úspěšnou analýzu látky. Nejčastěji se volí kompromis mezi několika parametry:

1. typ stacionární fáze (RP, HILIC, SEC, IEC)
2. typ náplně kolony (pórovité částice, monolity)
3. fyzikální vlastnosti stacionární fáze (pórovitost, rozměry částic)
4. rozměry kolony (délka, průměr) [4].

2.5.5. Detekce

Mobilní fáze, ve které se nacházejí analyzované látky, prochází přes kolonu na detektor. Detekce látek probíhá na základě odlišných fyzikálně-chemických vlastností analyzovaných molekul od čisté mobilní fáze [13].

Spektrofotometrické detektory

Spektrofotometrie je absorpční metoda, při které se měří množství absorbovaného záření při určité vlnové délce. Platí Lambert-Beerův zákon:

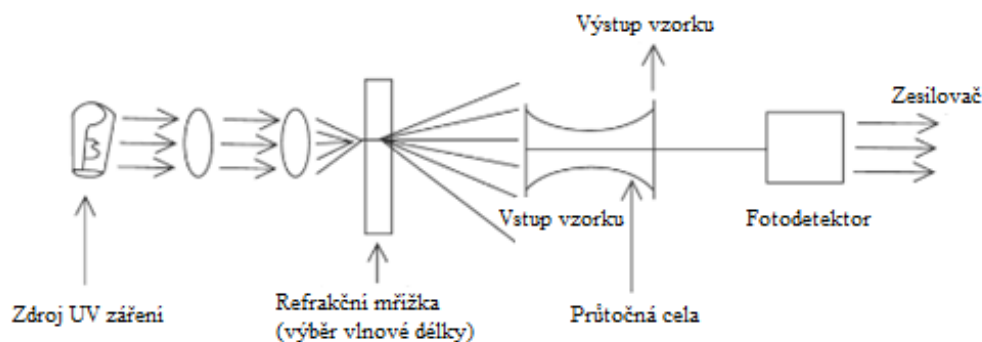
$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot c_x \cdot l \quad (6)$$

kde ε_{λ} je molární absorpční koeficient (při dané vlnové délce), který je pro každou látku charakteristický, c_x je koncentrace absorbující složky a l tloušťka absorbující vrstvy.

Jelikož absorbance přímo závisí na koncentraci, využívá se tato metoda ke kvantitativnímu stanovení dané látky [13]. Pro detekci analytů pomocí UV/VIS spektrofotometru jsou k dispozici tři typy detektorů.

- Detektor se stálou vlnovou délkou, který k detekci používá jednu vlnovou délku. Ta může být změněna pouze výměnou za jiný filtr nebo lampu (zdroj záření). Nejčastěji používaná vlnová délka je 254 nm, kterou generuje rtuťová výbojka [1].
- Detektory s variabilní vlnovou délkou (známé jako UV-VIS detektory), nastavovanou pomocí monochromátoru. Vlnovou délku je možné měnit během analýzy. Jsou finančně nákladnější, ale dokážou pokrýt rozmezí záření od 195 do 650 nm vlnové délky. Jako zdroje záření používají deuteriové (pro UV – ultrafialové záření) a wolframové (VIS – viditelné záření) výbojky [14].
- Detektory s diodovým polem (DAD nebo PDA), které měří spektrum v celé šíři přímo při chromatografické separaci. Záření prošlé skrz detekční celou je spektrálně rozloženo pomocí holografické mřížky a následně míří na fotodiody. Na každou fotodiodu dopadá záření o dané vlnové délce, které je zeslabeno absorpcí záření v celé detektoru [2].

Princip spektrofotometrické detekce je znázorněn na Obrázku 12. Zdroj UV záření produkuje paprsek, který následně prochází soustavu optických čoček. Na refrakční mřížce dochází k lomu a dělení světelného paprsku a nastavení požadované vlnové délky záření [14].



Obrázek 12 – Schéma zapojení UV spektrometru s volitelnou vlnovou délkou [14]

Fluorescenční detektory

Po absorbování primárního záření látkou dochází k excitaci jejích elektronů. Absorbovaná energie může být vyzářena, emitována, jako sekundární záření. To může mít stejnou, ale častěji vyšší vlnovou délku. Tento děj je znám jako fluorescence [2]. Fluorescenční detektor je vždy umístěn kolmo k vstupujícímu záření. Detekce látky je možná už od 10^{-14} g vzorku [1].

Elektrochemické detektory

Pomocí elektrochemických detektorů můžeme měřit proud (ampérometrické), potenciál (potenciometrické), vodivost (konduktometrické) a náboj (coulometrické) eluátu. K měření dochází v průtokové cele, kde jsou umístěny 2 nebo 3 elektrody (měrné a referentní) o určitém pracovním napětí, kde dochází k nezbytné elektrochemické reakci. Změřený signál roste se zvyšujícím se látkovým množstvím analyzované látky. Sledujeme tedy závislost mezi sledovanou měřenou veličinou a koncentrací analyzované látky [2]. Nejvíce používanými typy elektrochemických detektorů jsou detektory konduktometrické, ampérometrické a coulometrické. Výhodou těchto detektorů je jejich vysoká citlivost [4].

- Konduktometrické detektory – slouží k měření koncentrací elektrolytů ve vodných roztocích. Nejvyužívanější detektor v kombinaci se separací v iontově výměnné chromatografii (IEC) [4].
- Ampérometrické detektory – pracují při konstantním potenciálu mezi dvěma elektrodami. Při průchodu oxidované nebo redukované látky průtokovou celou detektoru dochází k vzniku proudu měřeného elektrodami [13].
- Coulometrické detektory – měří náboj, který je potřeba k oxidaci nebo redukci celkového množství látky.

Pro použití elektrochemických detektorů je nezbytné použití vodivé mobilní fáze. Důležitou roli hraje její čistota a odplynění, neboť přítomný kyslík by zvyšoval pozadí a šum základní linie [2].

Hmotnostní detektor

Základním principem hmotnostního spektrometru (MS – Mass spektrometry) je generování iontů z organických nebo anorganických sloučenin, které jsou následně separovány a detekovány na základě jejich poměru hmotnosti k náboji (m/z) [15]. Tímto způsobem je možné získat jak kvantitativní (podle jejich četnosti), tak i kvalitativní (poměr m/z) hodnoty [13].

Zařízení MS se skládá z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Analyzátor slouží k separaci iontů podle jejich poměru m/z . Detektor poté zaznamenává množství iontů s poměrem m/z . Výstupem z MS je hmotnostní spektrum, jako závislost m/z na četnosti zastoupení daného poměru. Zavedení vzorku se provádí buď přímou infúzí nebo pomocí jiného separačního zařízení, kterým může být právě HPLC [16]. Ionizace vzorku se provádí několika způsoby, které se volí v závislosti na typu látky. Důležité při volbě ionizační techniky je její tepelná stabilita, těkavost, molekulová hmotnost a polarita. Nejběžněji se pro HPLC používají tzv. měkké ionizační techniky, jako je ionizace elektrosprejem (ESI), či chemická ionizace (APCI) a fotoionizace (APPI) za atmosférického tlaku [2].

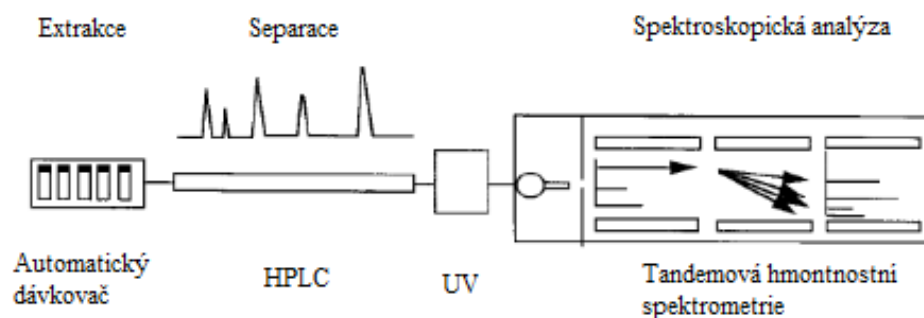
Vzniklé ionty jsou separovány v hmotnostním analyzátoru. Dělení iontů na základě jejich hmotnosti se provádí statickými magnetickými poli, časově proměnnými elektrickými poli nebo metodami měřící dobu průletu iontů o stejné energii. Statická elektrická pole nedělí ionty podle jejich hmotnosti, ale podle jejich energie. Fungují tak jako energetický filtr [17]. Přes analyzátor procházejí ionty z ionizátoru do detektoru. Mezi jeho nejdůležitější vlastnosti patří rozsah hmotností schopných detekovat, citlivost (nejmenší potřebné množství vzorku), množství iontů prošlých skrz analyzátor na detektor a hmotnostní rozlišení (poměr hmotnosti sloučeniny ku nejmenšímu měřitelnému rozdílu hmotností na analyzátoru) [16].

- Analyzátor doby letu (TOF – Time of Flight) – Rozděluje ionty o stejné kinetické energii dodané elektrickým polem podle jejich rychlosti závislé na hmotnosti iontů. Výhodami jsou rychlost provedení měření a schopnost zobrazení celého spektra. Nevýhodou je nízká přesnost signálu a špatné rozlišení [17], ke kterému dochází vlivem různé vzdálenosti od elektrod dodávající kinetickou energii iontů [16].
- Kvadrupólový analyzátor (Quadrupole) – Tyto analyzátor pracují na principu různé stability trajektorie iontů v kombinaci vysokofrekvenčního střídavého

a stejnosměrného napětí. Skládají se ze čtyř paralelně umístěných tyčí, na které se ve dvojici aplikuje stejnosměrné a vysokofrekvenční napětí. Kombinace těchto dvou napětí určuje hmotnost iontů, které projdou na detektor. Ionty s nesprávnou hmotností ztratí na prutech svůj náboj. Stejnosemřné napětí se používá nejčastěji v hodnotách 0–50 V. Při použití nulového stejnosměrného napětí, dochází k prostupu iontů přes kvadrupól v širokém rozsahu hmotností. Naopak při nedodání vysokofrekvenčního napětí dochází k zabránění průchodu všech iontů, které se vybijí na prutech s opačnou polaritou. Vysokofrekvenční napětí se obecně pohybuje v hodnotách několika kV.

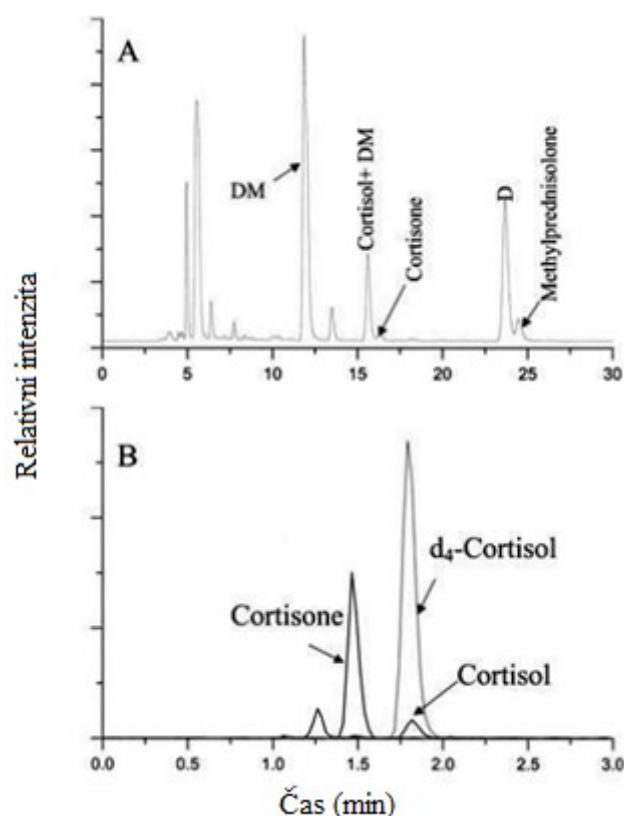
- Orbitrap – Elektrostatická past skládající se z vnější válcovité elektrody, rozdělené na dvě oddělené části, a vnitřní elektrody, mezi kterými je stejnosměrné napětí několika kV. Vstupující ionty začínají rotovat kolem centrální elektrody a současně oscilovat kolem horizontální osy, rovnoběžné s elektrodou. Frekvence harmonických oscilací závisí na poměru m/z iontů. Oscilace generují proud mezi dvěma rozdělenými válcovitými elektrodami, který je zesilován a převáděn na frekvenci. Dalšími přepočty na intenzitu pro každou frekvenci pomocí Fourierovy transformace a následně na poměr m/z , které slouží pro získání hmotnostního spektra [16].

V dnešní době dochází k zavádění tzv. tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS nebo MS^2), viz Obrázek 13. Jedná se o spojení dvou hmotnostních analyzátorů. V prvním analyzátoru dochází k výběru iontu (prekursoru), který je dále fragmentován. V druhém MS analyzátoru dochází k analýze nově vzniklých iontů. Tento typ analýzy se provádí zejména kvůli nedostatečné strukturní informaci poskytované měkkými ionizačními technikami [2].



Obrázek 13 – Schéma zapojení LC/MS/MS [18]

Tandemové MS zapojení našlo široké uplatnění v klinických laboratořích, vzhledem ke kombinaci vysoké citlivosti a specifčnosti. Využívá se k analýze mnoha biologických látek. Jako příklad je na Obrázku 14 ukázka 2 chromatogramů získaných použitím 2 různých detektorů. Jedná se o analýzu stejného vzorku moči. Zatímco u chromatogramu A získaného pomocí HPLC-UV je několik potencionálně interferujících píků a jeden z metabolitů karbamazepinu koeluje s kortizolem čímž dělá pík kortizonu těžce oddělitelný. Naopak při použití LC-MS/MS (chromatogram B) jsou píky kortizolu a kortizonu dobře rozlišitelné a rychlost měření je místo 30 minut v případě HPLC-UV pouze 3 minuty [18].



Obrázek 14 – Porovnání chromatogramu z UV (A) a MS/MS (B) detektoru při analýze volného kortizolu (cortizol) [19]

Vodivostní detektor

Vodivostní detektory využívají elektrické vodivosti eluátu vycházejícího z kolony. Ta je měřena v průtokové cele pomocí dvou elektrod, na které je vkládáno střídavé napětí. Pro vysokou citlivost je důležité mít co nejméně vodivou mobilní fázi [2].

Refraktometrický detektor

Detektory založené na měření změny směru paprsku procházející přes dvě média s různými indexy lomu. Změna směru závisí na rozdílu indexů lomu mezi médii. Prvním médiem je eluát vycházející z kolony, druhým pak mobilní fáze jako referenční médium. Citlivost detektoru se zvyšuje s rostoucím rozdílem indexů lomu obou roztoků. Z důvodu malých rozdílů indexů lomu se jedná o poměrně málo citlivé detektory [4].

3. Agrochemikálie

Agrochemikálie lze dělit na dvě základní skupiny. Látky používané k ochraně plodin před škůdci, které zabraňují ztrátě výnosu aplikované před nebo po sklizni, se nazývají pesticidy. Druhou skupinou agrochemikálií jsou hnojiva, která zvyšující výnos plodin. Zvyšování produkce v rostlinné výrobě je vzhledem k rostoucí populaci a nedostatku půdy pro pěstování důležitou oblastí výzkumu [19; 20].

Zemědělství je primárním zdrojem potravin (95 % celkové produkce potravin). K zemědělství se využívá okolo jedné třetiny pevného povrchu planety [21]. Cílem do budoucna je vzhledem k využívání zemědělské půdy k pěstování nejen plodin určeným pro výrobu potravin (např. pro výrobu biopaliva), produkovat jídlo s využitím menší hospodářské plochy, nižší potřebou vody a energie [20].

3.1. Hnojiva

Nejdůležitějšími prvky pro rostlinu jsou uhlík, vodík, kyslík, dusík, fosfor a draslík (makroprvky). První tři jmenované prvky rostlinám dodávat nemusíme, neboť jsou v dostatečné míře přítomny ve sloučeninách v půdě, vodě a vzduchu (O_2 , CO_2 a H_2O), ze kterých je rostliny dokážou využít. U zbylých může dojít k nedostatku, vlivem nešetrného hospodaření nebo druhem půdy. Proto je důležité, pro vysoké výnosy, tyto prvky dodávat ve formě průmyslově vyráběných hnojiv [22].

Mezi další, takzvané sekundární makroprvky jsou řazeny síra, vápník a hořčík. Síra je pro rostliny důležitá především jako nezbytný prvek při syntéze chlorofylu, který je potřebný pro fotosyntetický proces [23].

Typy hnojiv se dají dělit podle několika kritérií. Mimo průmyslově vyráběná hnojiva, existují hnojiva organická, která se skládají z využitelných odpadů z rostlin a zvířat. Tyto odpady mohou, ale nemusí být předem upraveny pomocí kompostování nebo anaerobní fermentací. Jejich povaha nedovoluje použití jako hnojiva s řízeným uvolňováním. Nelze však zapomenout na to, že navzdory nedostatečnému množství živin pro současné intenzivní zemědělství mají organická hnojiva velkou přednost v tom, že zachovávají přírodní zdroje i koloběh živin prostřednictvím systematické recyklace. Důležité ovšem je, že jako hnojiva se dají použít pouze takové odpadní materiály, které nepředstavují žádné zdravotní riziko [24].

Další dělení průmyslových (minerálních) hnojiv může být podle skupenství, na pevné nebo kapalné. Dále pak podle způsobu aplikace, na půdní a aplikovaná na list. Nejdůležitější je pro správné použití dělení hnojiv podle prvků, které mají do půdy dodávat [21].

- Jednosložková – dodávají rostlinám pouze jeden primární prvek (N – dusíkatá, P – fosforečná, K – draselná hnojiva)
- Vícesložková – obsahují několik primárních prvků (např. NPK – dusík, fosfor, draslík) a mohou obsahovat i některé mikroprvky.
- Mikroprvková – obsahující živiny, které rostliny vyžadují v malém množství (1–500 g/ha).

V dnešní době jsou velmi využívána pevná hnojiva, například dusíkatá. Pevná hnojiva mohou být ve formě granulí s jedním nebo více prvky. Předností pevných hnojiv je nízká výrobní cena i vysoký obsah živin. K nejběžnějším pevným hnojivům je možné zařadit močovinu, fosforečnany i dusičnany (draselné a vápenaté), chlorid draselný, uhličitan (vápenatý, hořečnatý). Mezi běžná hnojiva patří sloučeniny nebo směsi sloučenin dusíku, draslíku i fosforu. Pro tato tříslložková hnojiva se také užívá výraz NPK, přičemž jejich největší předností je schopnost dodat více živin prostřednictvím jedné dávky [24].

Kapalná hnojiva jsou především roztoky anorganických solí. V zemědělství se jejich využití rozmohlo hlavně díky poklesu jejich výrobní ceny, a to v první řadě u koncentrovaných výrobků. V porovnání s pevnými hnojivy je jejich použití z důvodu homogenity jednodušší, a navíc díky injektorům je snadnější kontrolovat jejich přesné dávkování do půdy. Jako další výhodu lze uvést i velmi jednoduché přimíchávání mikroprvků nebo pesticidů (herbicidů a insekticidů) do roztoků. Nevýhodou naopak představuje nákladnost výroby v porovnání s pevnými hnojivy a také obsah živin je zpravidla nižší anebo mohou podléhat krystalizaci [25].

Spojením pevného a kapalného hnojiva vznikají tzv. suspenzní hnojiva. Výhodou je, že lze využít levné fosfáty nerozpustné ve vodě. Mezi zápory suspenzních hnojiv patří komplikovanější a nákladnější skladování i užití, a to kvůli sedimentaci částic [24].

3.1.1. Dusíkatá hnojiva

Dusík je součástí všech živých buněk a je nezbytný při syntéze proteinů, proto je pro normální vývoj rostlin potřebné jeho dostatečné množství. Problém s nedostatkem dusíku nastává nejdříve v suchých oblastech, protože v půdách v oblastech s nízkými srážkami, je nižší obsah organické hmoty, která je hlavním zdrojem půdního dusíku [25]. Pro absorpci dusíku do rostliny je důležité, aby byl ve formě dusičnanového (NO_3^-) nebo amonného (NH_4^+) iontu. Proto je důležité, aby byl dusík dodáván pomocí hnojiv právě v těchto formách. Až po absorpci se v rostlinách přeměňuje do komplexních sloučenin a proteinů [22].

Amoniak

Kapalný amoniak je dusíkaté hnojivo s přímou aplikací, jehož výhoda je zejména v možnosti velkotonážní výroby za nízkou cenu [24]. Bezvodý amoniak se vyznačuje nejvyšší koncentrací dusíku (82 %), ale kvůli jeho vysoké tenzi par musí být skladován a transportován pod tlakem. K aplikaci se používá speciální zařízení, kterým se amoniak vstříkuje 5–15 cm pod povrch země v závislosti na teplotě a složení půdy [25; 24].

Bezvodý amoniak je možné rozpustit ve vodě. Takto vzniklý vodný amoniak je méně korozivní a snadnější je i jeho uskladnění a manipulace s ním (vzhledem k nižší tenzi par). Nevýhodou ovšem je nižší obsah dusíku (kolem 20 %) [25].

Močovina

Její vzorec je $[\text{CO}(\text{NH}_2)_2]$ obsahuje okolo 45 % dusíku. Jedná se tak o nejvíce koncentrované pevné dusíkaté hnojivo [25].

Amonné a dusičnanové soli

Nejvýznamnější amonná sůl jakožto hnojivo je dusičnan amonný, těž známý jako ledek amonný (NH_4NO_3). Ze vzorce je patrné, že obsahuje obě formy rostlinami využitelného dusíku [26]. Dostupný je jak v kapalné (19–21 % N), tak pevné formě (33–34 % N).

Dalšími hnojivy jsou síran amonný ($(\text{NH}_4)\text{SO}_4$), dusičnan vápenatý ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) a dusičnan draselný (KNO_3) [22]. Jejichž výhoda je, že kromě dusíku do půdy dodávají další, pro rostlinu důležité prvky (S, Ca, K) [22].

Na celkových antropogenních emisích N_2O se zemědělství podílí asi z 58 % a důsledkem zvýšeného používání dusíkatých hnojiv se předpokládá další nárůst. Hlavním zdrojem (> 60 %) globálních troposférických emisí NO_x (oxidů dusíku) je spalování fosilních paliv, zatímco emise z půdy dosahuje přibližně 10 % [27].

Problémy s narůstajícími emisemi oxidů dusíku by mohli vyřešit hnojiva s řízeným uvolňováním. Jedná se o hnojiva, která uvolňují aktivní hnojivé živiny kontrolovaným způsobem podle potřeb rostlin, takže poskytují zvýšenou účinnost využití živin spolu se zvýšenými výnosy a zároveň snižují znečištění životního prostředí emisemi (NH_3 , N_2O atd.) [28].

3.1.2. Fosforečná hnojiva

Fosfor je pro vývoj rostliny také nezbytným prvkem. Nepostradatelný je při fotosyntéze, dýchání, skladování a přenosu energie. Rostlinami je nejvíce přijímán ve formě dihydrogenfosforečných ionů. V současnosti se fosforečná hnojiva vyrábí téměř výhradně z fosfátových hornin rozkladem kyselinami (sírovou – H_2SO_4 nebo fosforečnou – H_3PO_4) [22].

Superfosfát

Typ pevného (granulovaného nebo práškového) hnojiva vyráběného rozkladem apatitů kyselinami. Existuje více typů superfosfátů. Nejvyužívanějšími jsou superfosfát jednoduchý ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O} + \text{CaSO}_4$) vyráběný rozkladem kyselinou sírovou a superfosfát obohacený ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) vyráběný rozkladem směsí kyselin sírové a fosforečné [22]. Třetí typ je tzv. trojitý superfosfát vyráběný rozkladem přírodních fosfátů kyselinou fosforečnou. Tento typ superfosfátu obsahuje největší množství fosforu (21 % P) a naopak neobsahuje žádný síran vápenatý (CaSO_4) vznikající při výrobě jednoduchého a obohaceného superfosfátu. Trojitý superfosfát v práškové podobě se využívá k přípravám vícesložkových granulovaných hnojiv [29].

Amofos

Granulované hnojivo vyráběné z apatitového koncentrátu neutralizací kyseliny fosforečné amoniakem. Jedná se o směs dihydrogenfosforečnanu a hydrogenfosforečnanu amonného. Toto hnojivo tak dodává dusík i fosfor využitelný rostlinami [30].

NP hnojivo

Typ kapalného fosforečného hnojiva dodávající rostlinám fosfor s dusíkem. Vyrábí se neutralizací kyseliny fosforečné amoniakem, kdy vzniká vodný roztok dihydrogenfosforečnanu a hydrogenfosforečnanu amonného [24].

3.1.3. Draselná hnojiva

Pro rostliny je draslík po dusíku a fosforu třetí životně důležitý prvek. Důležitý je zejména při fotosyntéze. Při jeho nedostatku se fotosyntéza rostlin snižuje na úkor dýchání. Zdroji pro výrobu draselných hnojiv používaných v zemědělství jsou přírodní minerály obsahující draslík, které se při výrobě pouze upravují. Nejčastěji používaný minerál je chlorid draselný (KCl). Další zdroje draslíku používané v zemědělství jsou síran draselný (K_2SO_4), síran draselný-hořečnatý ($\text{K}_2\text{SO}_4 \cdot \text{MgSO}_4$) nebo hydroxid draselný (KOH) [22].

Kombinovaná hnojiva dodávají do půdy více prvků najednou. Nejčastěji jsou jimi v různém poměru dusík, fosfor a draslík (NPK). Tyto hnojiva mohou obsahovat také mikroprvky.

Hnojiva NPK musí obsahovat alespoň 3 % N, 5 % P_2O_5 a 5 % K_2O a minimálně 20 % celkového množství živin. Nejčastěji používané koncentrace (N- P_2O_5 - K_2O , v hm.%) jsou buď ve stejném poměru všech 3 živin (např. 15-15-15) nebo takové, kdy je jedna komponenta v nadbytku (20-10-10). Posledním případem jsou směsná hnojiva se sníženým obsahem jednoho prvku, nejčastěji NPK s nízkým obsahem fosforu (15-5-20) [24].

3.2. Pesticidy

V České republice je používáno přes 400 schválených pesticidů. Pesticidy se mohou dělit podle několika hledisek. Jedním z parametrů může být akutní toxicita. Podle ní WHO² dělí pesticidy na extrémně, vysoce, středně, málo nebezpečné a pravděpodobně bezpečné, jak je popsáno v Tabulce 1: [31]

Tabulka 1 – Rozdělení pesticidů podle jejich akutní toxicity [32]

		LD₅₀³ pro potkany (mg/kg váhy těla)	
Třída		orálně	dermálně
Ia	Extrémně nebezpečné	<5	<50
Ib	Vysoce nebezpečné	5–50	50–200
II	Středně nebezpečné	50–2000	200–2000
III	Málo nebezpečné	> 2000	> 2000
U	Pravděpodobně bezpečné	5000 a více	

Nejvyužívanější dělení je podle jejich praktického využití, cíle, proti kterému působí, což je také nejzákladnější a nejobsáhlejší dělení, které rozděluje pesticidy na látky proti mikrobiálním škůdcům (mikrobicidy), proti zvířecím škůdcům (zoocidy) a proti plevelům (herbicidy) [32]. Mezi nejčastěji používané patří právě herbicidy, dále insekticidy a fungicidy [33]. V Tabulce 2 je ukázáno množství použitých pesticidů v České republice za rok 2019. Největší využití mají herbicidy spolu s fungicidy.

Zoocidy je souhrnné označení pro přípravky určené k hubení živočišných škůdců. Nejčastěji používaným zoocidem jsou insekticidy proti hmyzu. Dalšími zástupci jsou např. rodenticidy (proti hlodavcům) a akaricidy (proti roztočům).

Fungicidy se využívají k likvidaci původců houbových onemocnění, které jsou nebezpečné tvorbou mykotoxinů. Dalším a v České republice nejvyužívanějším druhem pesticidů jsou herbicidy určené k likvidaci, potlačení plevelů nebo invazivních rostlin [34].

² WHO – World Health Organization, agentura Organizace spojených národů sídlící ve Švýcarské Ženevě. Cílem je působit jako autorita v otázkách mezinárodního zdraví [65].

³ LD₅₀ je způsob jakým se vyjadřuje akutní toxicita látek. Smrtná dávka (Lethal dose), číslo 50 značí, že po podání dané dávky zemřelo 50 % ze skupiny testovaných zvířat [66].

Tabulka 2 – spotřeba přípravků na ochranu rostlin v České republice za rok 2019 [36]

Kategorie pesticidů	Množství (kg, l)
Zoocidy, mořidla	1 023 723
Herbicidy a desikanty ⁴	5 078 194
Fungicidy	3 850 985
Regulátory růstu	1 059 740
Rodenticidy	202 485
Ostatní pomocné prostř. na ochranu rostlin (repelenty, minerální oleje)	332 751
Celkem	11 547 878

3.2.1. Insekticidy

Insekticidy jsou určeny proti hmyzu. Základní dělení insekticidů je podle chemické příslušnosti na přírodní a syntetické [35]. Prvními moderními syntetickými organickými látkami s insekticidními účinky byly DDT (dichlordifenyltrichlorethan), HCH (hexachlorcyklohexan) a estery kyseliny fosforečné (organofosfáty). Insekticidy účinkují především na nervový systém hmyzu. Prostředky proti hmyzu se dělí podle způsobu působení. Nejdůležitějšími jsou regulátory růstu hmyzu, atraktanty (feromony), prostředky způsobující neschopnost krmít se [32], dále jsou to chemosterilanty neboli látky způsobující sterilitu nebo neschopnost vývoje v dospělou fázi schopnou rozmnožovat se [36]. Hlavní skupiny syntetických látek používaných jako insekticidy jsou chlorované uhlovodíky, organofosfáty a karbamáty.

- **Chlorované uhlovodíky** – známý insekticid DDT používaný jako účinná zbraň proti malárii, dalšími zástupci HCH, hepatachlor nebo chlordan. Některé z těchto látek jsou poměrně stabilní s dlouhodobým reziduálním účinkem (dlouhodobá ochrana). Jejich toxické působení je založeno na narušení nervového systému. Kvůli škodlivým účinkům a dlouhodobé stabilitě je pro některé státy jejich používání zakázáno.
- **Organofosfáty** – do rostlin se dostávají buď postřikem na list nebo aplikací roztoku do půdy. Většinou mají krátkodobý reziduální účinek, ale obecně jsou toxičtější než chlorované uhlovodíky. Hmyz zneškodňují inhibicí enzymů cholinesterázy, nezbytných pro fungování nervového systému. Zástupci jsou např. parathion a malathion.
- **Karbamáty** – na hmyz mají podobný účinek jako organofosfáty, inhibují acetylcholinesterázu. Řadí se mezi ně látky jako karbofuran a karbaryl [35].

⁴ Desikační látky (desikanty) způsobují předčasné usychání listů nebo jejich nadzemních částí. Využívají se k urychlení dozrání nebo zabránění šíření listových chorob [67].

3.2.2. Herbicidy

Tyto prostředky slouží k inhibici růstu nebo likvidaci nežádoucích rostlin, kterými jsou zemědělské plevely a invazivní druhy. Před používáním herbicidů se tyto nežádoucí rostliny odstraňovali mechanicky. Použití herbicidů má ale výhodu ve snadné aplikaci, která šetří náklady spojené s odstraňováním. Herbicidy nejsou většinou toxické pro zvířata ani lidi. Riziko je při použití neselektivního prostředku, působícího na více druhů rostlin, na které nebyla aplikace mířena, a v důsledku toho i likvidaci hmyzu na nich závislých, což může značně poškodit ekosystém v daném místě. Mimo neselektivních herbicidů existují i herbicidy selektivní, působící pouze na některé druhy rostlin. K likvidaci plevelů pomocí herbicidů se využívají plodiny geneticky upravované tak, aby byly schopny odolávat aplikovaným herbicidům. Na ploše s použitým herbicidem tak přežijí pouze plodiny rezistentní na herbicidy [37].

3.2.3. Fungicidy

Nejvyužívanějším zástupcem mikrobicidů jsou fungicidy působící proti původcům houbových onemocnění [38]. Aplikují se buď přímo na plodiny, nebo na semena před klíčením, kde působí jako ochranný obal. Tento typ je účinný proti půdním patogenům a mohou mít systémový účinek, protože prostupem do rostlinných tkání poskytují ochranu nebo odstraňují stávající onemocnění. Aplikace na plodiny se často provádí preventivně, před napadení houbovým patogenem [39], nebo až po napadení rostliny kde způsobují inhibici růstu nebo ničení hub. Fungicidy ničí patogenní nebo parazitické houby narušením jejich kritických buněčných procesů.

Nadměrné používání fungicidů, herbicidů a insekticidů vede k vývoji rezistence u některých druhů organismů. Obzvláště fungicidní rezistence, při které populace hub vykazuje sníženou citlivost na daný fungicid, se může objevit rychle, protože jediná houba je schopna produkovat miliony spor [40].

4. Analýza agrochemikálií pomocí HPLC

Při analýze vzorků z přírody je nutné vzorek převést do formy, kterou je možno analyzovat pomocí analytické instrumentace. V tomto případě vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

4.1. Odběr vzorku

Chyba stanovení může být způsobena nesprávným odběrem vzorku. Špatný odběr může znamenat až 30 % celkové chyby analýzy.

Důležitou vlastností odebraného vzorku je jeho homogenita a reprezentativnost. Pro analýzu ho musíme mít dostatečné množství. Dalším faktorem je správné skladování, kterým zajistíme stabilitu analyzovaného prvku nebo sloučeniny a tím zabráníme nežádoucím chemickým změnám. Vzorků rozlišujeme několik druhů. Základní rozdělení je na organické, včetně biologických, a anorganické. Dále se dělí na pevné, polotuhé (gely, suspenze, koloidní systémy), kapalné a plynné. Pro plynné vzorky platí, že jejich analýza je častější pomocí plynové chromatografie. Ovšem pokud jsou plynné vzorky teplotně nestabilní nebo náchylné k absorpci na kovový povrch, může být analýza pomocí HPLC lepší variantou. V tomto případě je ovšem nutné plynný vzorek zachytit. Buď dochází k prostupu plynu přes pevný nosič, a následně jeho eluci se solubilizační kapalinou nebo je plynný vzorek vháněn do kapaliny, ve které je absorbován [41].

Pro HPLC je potřeba k vlastnímu měření převést odebraný vzorek do kapalné podoby. K analýze různých biologických, geologických nebo zemědělských materiálů musí být tedy zkoumaný prvek nebo sloučenina kvantitativně převedena do roztoku [42].

4.2. Analýza dusičnanů

Vodní zdroje

Při nadměrném používání dusíkatých hnojiv je riziko prostupu dusičnanů až do podzemních vod. Pro velkou část venkovského obyvatelstva je voda ze soukromých studní stále důležitým zdrojem užitkové i pitné vody [43]. Hodnoty nad 10 mg/l dusičnanů jsou již považovány za zvýšené [44]. Dusičnany představují veliké nebezpečí zejména pro kojence, tím že způsobují nemoc zvanou methemoglobinémií projevující se zmodráním kůže s rizikem následné smrti [45].

Výzkum zabývající se problematikou výskytu dusičnanů v podzemních vodách byl proveden ve Finsku. Analýza vody ze studní byla provedena pomocí kapalinové chromatografie se stericou výlukou (HPLC–SEC) s UV detekcí při vlnové délce 224 nm.

Pro separaci byla použita kolona TSK-GEL-G3000SW naplněná chemicky vázaným silikagelem s hydrofilními skupinami. Jako eluční činidlo byl použit octan sodný o koncentraci 0,01 mol/l při průtoku 1 ml/min [46].

Analýzou vzorků z 267 soukromých studen ve Finsku pomocí HPLC–SEC bylo zjištěno, že obsah dusičnanových iontů v podzemních vodách se pohybuje nad 10 mg/l (u 39 % mělkých a u 33,8 % hlubokých vrtů). Více jak 50 mg/l, což je maximální doporučená hodnota stanovená WHO z roku 2004, bylo stanoveno u 6,7 % mělkých a u 6,8 % hlubokých vrtů [46].

Potraviny

Pokud dochází ke kumulaci, nárůstu hodnot koncentrace dusičnanových iontů v podzemních vodách je riziko, že plodiny pěstované na těchto půdách budou též kontaminovány. Kumulace NO_3^- v půdách je způsobena víceletým používáním dusíkatých hnojiv, které jsou uvolňovány do podzemních vod, což způsobuje i vyšší výskyt NO_3^- v plodinách. Plodiny jsou schopny využít 40–60 % aplikovaného dusíku a zbytek je začleněn do půdní organické masy a v průběhu let vyplavován ve formě dusičnanů do podzemních vod [47].

Pomocí RP/HPLC s UV detektorem byla měřena hodnota dusičnanů v bramborech pěstovaných v oblasti Dravsko polje ve Slovinsku, která je po dlouhé roky zatížena intenzivním zemědělstvím s použitím průmyslových hnojiv.

Analýza dusičnanů byla provedena pomocí HPLC na koloně s reverzní fází (C18) s isokratickou elucí v mobilní fázi oktylammonium ortofosfát o koncentraci 0,010 mol/l a průtokem 0,5 ml/min. Detekce byla provedena na UV detektoru při vlnové délce 213 nm.

Výsledky měření pro brambory pěstované s průmyslovými hnojivy byly porovnány s bio bramborami pěstovanými pouze s využitím přírodních hnojiv. Průměrný obsah NO_3^- v bramborách pěstovaných v přítomnosti hnojiv byl 157 mg/kg (s rozmezím 18–429 mg/kg NO_3^-). To znamená, že 18 % všech vzorků překročilo doporučovanou hodnotu obsahu dusičnanů. Naproti tomu obsah u bio brambor se vyskytoval v rozmezí 14–156 mg/kg NO_3^- . Rozdíl je zejména v maximálním zjištěném obsahu dusičnanů u průmyslově pěstovaných brambor, kde téměř pětina vzorků překročila doporučenou hodnotu obsahu NO_3^- [48].

Souběžná analýza NO_3^- a NO_2^-

Dalším typem instrumentace, pomocí kterého je možné analyzovat dusičnany je použití iontově výměnné chromatografie (HPLC–IEC) s UV spektrofotometrem jako detektorem s vlnovou délkou 210 nm. Iontoměničem je silný aniont. Při tomto stanovení je možné analyzovat zároveň dusičnany a dusitaný ve vzorku [49]. Současné stanovení NO_3^- a NO_2^- pomocí HPLC-IEC je možné pouze pro vzorky s vysokým obsahem dusitanů. Detekce obou aniontů

je obtížná. Problém je zejména v složité detekci dusitanů, jejichž obsah v biologických materiálech je vůči dusičnanům asi stokrát nižší a často dochází k překrývání dusitanového píku jinými látkami ve vzorku. Instrumentací schopných analyzovat tyto anionty v současném stanovení je více, buď ale narážejí na interferenci a rušení stanovení jinými anionty (v případě HPLC-IEC s vodivostním detektorem) nebo je analýza složitá z důvodu náročné přípravy vzorku a zdlouhavému měření (GC–MS).

Proto byla vyvinuta nová metoda měření dusitanů a dusičnanů v rostlinných materiálech a zvířecí krvi, která pracovala při dvou různých vlnových délkách s použitím DAD detektoru, kdy byly dusitany pomocí Griessova činidla převedeny na azobarviva pro zvýšení citlivosti. Ty byly následně analyzovány. K separaci byla využita stacionární fáze C18. Mobilní fáze byl hydroxid tetrabutylamonný o koncentraci 5 mmol/l, jehož pH bylo upraveno na pH 2,5 pomocí kyseliny sírové, acetonitrilu a methanolu. Separace byla provedena s gradientovou elucí. Detekce dusičnanů probíhala v UV oblasti a detekce dusitanů (jejich azobarviva) ve viditelné oblasti. Limity kvantifikace pro vzorky v zelenině byly 6 ng/ml pro dusičnany a 200 ng/ml pro dusitany. Výhodou a přínosem této metody je právě dosažení lepších detekčních limitů, jedná se o 2 až 3 řády vyšší citlivost a snazší přípravu vzorku pro analýzu. Oba anionty jsou toxické pro člověka, proto je tato metoda důležitá pro stanovování obsahu v potravinách [50].

4.3. Analýza reziduí pesticidů

Rezidua pesticidů jsou látky schopné přetrvávat v přírodě po aplikaci látek určených k ochraně rostlin. Rezidua mohou být metabolity nebo rozkladné a reakční produkty původních forem pesticidů. Největší riziko pro člověka představuje výskyt reziduí v potravinách nebo pitné vodě, kam se mohou dostávat několika způsoby. Přímou cestou, kdy přecházejí z plodin ošetřených pesticidy do potravin. Nepřímá cesta je kontaminace potravin přes vodu, vzduch nebo půdu [51].

Rezidua pesticidů představují zásadní problém bezpečnosti potravin. S cílem regulovat množství těchto kontaminujících látek a ochránit tak spotřebitele před jejich nepříznivými účinky jsou stanoveny maximální limity reziduí (MRL – Maximum residue limit) v potravinách [52]. Nejprísnější MRL jsou pro průmyslově vyráběné dětské potraviny, pro které platí maximální množství pesticidů do 0,01 mg/kg [53].

Rezidua insekticidů se v přírodě vyskytují ve velmi malém množství, proto je pro jejich chromatografickou analýzu důležité snížit detekční limity a eliminovat většinu interferujících látek [54]. Pro analýzu nejen insekticidů, ale obecně pesticidů se ukázalo jako vhodné několik typů instrumentace HPLC. Pesticidy jsou pravděpodobně jednou z nejvíce hlídaných

a regulovaných skupin chemikálií. Pro takto velké množství kontrolovaný sloučenin, reziduí, je potřeba mít vyvinuté metody, pomocí kterých lze množství reziduí pesticidů účinně kontrolovat. Tyto metody jsou nazývány tzv. multireziduální (MRMs – Multi-residue methods) [55], které byly schopny detekovat 10–50 sloučenin v jedné analýze pomocí LC-MS. To ovšem není při současném obchodu s potravinami a odlišnými předpisy pro používání pesticidů v různých zemích dostatečné množství. Proto je díky výzkumu v této oblasti dnes možné zkoumat až mezi 100–300 sloučenin v jedné analýze [56].

Tyto metody jsou vyvíjeny pro oba typy chromatografů, jak pro kapalinový, tak i pro plynový s MS detekcí [55]. Vzhledem k používání nových polárnějších pesticidů dochází k většímu využití kapalinové chromatografie [56].

Analýza pesticidů pomocí LC–MS

Spojení HPLC s MS se ukazuje jako jedna z nejčastěji využívaných variant při analýze reálných vzorků pesticidů. U těchto komplexních vzorků je zastoupeno velké množství komponent. Současná separace a určení identity látky pomocí HPLC a MS zabraňuje několika problémům, mezi které se řadí odhalení koeluce píků pomocí MS detekce. Některé problémy při detekci pomocí MS jsou odstraněny díky separaci látek v HPLC koloně. [56]. Nejvíce se v dnešní době spoléhá při těchto analýzách na kapalinovou chromatografii ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem (LC-MS²) s ionizací za atmosférického tlaku (API – zejména ESI) [57].

Jako analyzátor v MS se při analýze pesticidů v potravinách používá trojitý kvadrupólový analyzátor (QqQ) [58]. Dalším typem analyzátoru je analyzátor doby let (TOF), jehož předností jsou hlavně možnosti zkoumat vzorek s obsahem teoreticky neomezeným počtem pesticidů v jednom měření [59; 60].

Při analýze a kvantifikaci látek ve vzorku s množstvím zkoumaných pesticidů do 100 sloučenin je spojení LC-QqQ-MS² nejlepší možnou metodou. Limity detekce se pohybují mezi 1–10 µg/kg. Stacionární fáze používané při těchto analýzách jsou C18 nebo C8 pro oba typy analyzátorů [56].

Příkladem použití spojení HPLC–MS je analýza reziduí pesticidů v olivovém oleji. Pro analýzu bylo potřeba extrahovat pesticidy ze surového oleje.

Nejprve byla provedena separace látek pomocí HPLC-SEC tak, aby byla oddělena olejová fáze. Následně bylo separováno 20 pesticidů pomocí GC-MS a nakonec zbývajících 11 látek bylo analyzováno pomocí HPLC-MS. Pro oddělení olejové fáze byly použity dvě kolony zapojeny za sebou: TSK-GEL-G2000HXL a TSK-GEL-G1000HXL, které byly následně spojeny s HPLC-MS. Separace probíhala na koloně C18 s gradientovou elucí

a mobilní fázi, kterou byla směs vody a acetonitrilu. Identifikace jednotlivých zástupců reziduí byla provedena na základě porovnání se standartními roztoky.

Cílem tohoto výzkumu bylo vyvinout spolehlivý postup pro extrakci pesticidů a následnou analýzu pomocí plynové a kapalinové chromatografie. Analýza pomocí HPLC-SEC poskytla zejména pro netěkavé pesticidy dostatečné výtěžky. Nižší výtěžky byly získány pro těkavé pesticidy, u kterých docházelo ke ztrátám vlivem odpaření při zakoncentrování [61].

Stejně jako dusičnany, tak i rezidua pesticidů se při nadměrném užívání dostávají do povrchových i podzemních vod a kontaminují okolní prostředí. Nejpoužívanějšími herbicidy na území USA jsou herbicidy triazinové a chloracetanilidové. Analýzou reziduí chloracetanilidových herbicidů byl zjišťován obsah reziduí ve vodách, protože sledování množství reziduí je důležité pro určování kvality vody [62]. K těmto analýzám se také využívá kombinace HPLC-MS s ionizací vzorku elektrosprejem (ESI) [63] a kolonou naplněnou stacionární fází C18. Jako mobilní fáze byla k analýze použita směs methanolu (24 %), vody (35,7 %), acetonitrilu (40 %) a kyseliny octové (0,3 %) při gradientové eluci a průtoku 0,3 ml/l.

Ve vzorcích z povrchových a podzemních vod odebraných na území Iowy a Topeky byly zjištěny rezidua acetochloru, alachloru a metolachloru. Kvantifikace rezidua acetochloru ESA (ethane sulfonic acid – kyselina ethansulfonová) nemohla být provedena z důvodu koeluce s alachlorem ESA. Kvantifikace těchto reziduí je ale možná pomocí HPLC-UV s detektorem DAD. Kvantifikována byla rezidua: acetochlor OA (oxanilic acid – kyselina oxalanilová), alachlor OA, metolachlor OA a metolachlor ESA. Množství acetochloru OA ve vzorcích bylo v porovnání s ostatními rezidui nejmenší (maximální naměřené množství v povrchových vodách bylo 0,15 µg/l, a podzemních vodách 0,17 µg/l). To bylo zapříčiněno podstatně nižším používáním pesticidu acetochloru v době měření. Mezi množstvím použitého pesticidu a jeho výskytem v povrchových a podzemních vodách byla prokázána závislost již dříve. Maximální obsahy dalších reziduí byly v povrchových a podzemních vodách: pro alachlor OA (0,21 µg/l a 1,66 µg/l), metolachlor OA (0,29 µg/l a 0,91 µg/l) a metolachlor ESA (1,82 µg/l a 1,83 µg/l) [62].

Analýza pesticidů pomocí LC–UV/VIS

Dalším typem instrumentace, který se používá k analýze pesticidů je spojení UV/VIS detektoru s HPLC. Tato metoda byla použita k analýze fungicidu karbendazimu a insekticidu oxymatrinu. Karbendazim je zástupce systémových fungicidů. Jeho hlavní nevýhoda je v dlouhé době přerývání v půdě (6–12 měsíců). Patří do skupiny benzimidazolů. Oxymatrin je kontaktní insekticid účinkující na trávicí trakt patřící do skupiny tetracyklocholinolizidinových

alkaloidů. Množství těchto pesticidů bylo stanoveno ze vzorků půdy získaných z území Iráku. Vzorek pro separaci pomocí HPLC byl připraven extrakcí pomocí dichlormethanu v Soxhletově extraktoru po dobu 24 hodin. Samotná separace probíhala na stacionární fázi C18 s použitím směsi acetonitrilu s vodou jako mobilní fáze při isokratické eluci a průtoku 0,5 ml/min. Vlnová délka UV/VIS detektoru byla 254 nm. Rezidua karbendazimu byly stanoveny a vyskytovali se ve všech měřených vzorcích (od 0,446 mg/kg do 3,051 mg/kg). Hodnoty naměřené pro insekticid oxymatrin byly 0,0002–1,895 mg/kg [64].

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo popsat základní princip metody a instrumentaci HPLC. V další kapitole byly popsány agrochemikálie (hnojiva a pesticidy), které jsou využívány pro ochranu rostlin a zvýšení produkce plodin. Hnojiva byla rozdělena podle prvku dodávajícího do půdy, což je nejdůležitější kritérium v zemědělství. V každé skupině byly popsány nejznámější a nejpoužívanější zástupci. Pesticidy byly rozděleny podle druhu organismu, proti kterému působí. V poslední kapitole je popsáno konkrétní využití HPLC k analýze agrochemikálií.

V souvislosti s používáním průmyslových hnojiv je nejčastěji hlídána koncentrace dusičnanů a dusitanů. Ke kumulaci dusitanů a dusičnanů v půdě nebo vodách dochází vlivem nadměrného a neefektivního aplikování dusíkatých hnojiv, které pěstované plodiny nevyužijí. Současné stanovení obou aniontů je vzhledem k řadově nižším obsahům dusitanů náročné a je předmětem dalších výzkumů. Analýza dusičnanů se v současné době úspěšně provádí pomocí HPLC ve spojení s UV detektorem.

Druhou skupinou látek používaných v zemědělství, jejichž obsah v životním prostředí a potravinách je nutné kontrolovat, jsou pesticidy. Jedná se o látky často velice toxické nejen pro okolní prostředí, ale i pro člověka. Proto dochází často k nahrazování ekologičtější variantou daného pesticidu, nebo k úplnému zamezení použití, jako např. při pěstování biopotravin. V případě nemožnosti nahrazení nebezpečné látky pro kvalitní produkci je nutné množství použité dávky co nejvíce snížit a koncentraci v potravinách a prostředí monitorovat. U některých pesticidů je větší nebezpečí a vyšší toxicita až u vznikajících reziduí. Nejvýhodnější metodou pro analýzu pesticidů a jejich reziduí se ukázalo spojení HPLC-MS. Pesticidy jsou látky rozdílných struktur a vlastností, a proto je obtížná jejich analýza v jednom kroku. Současná kontrola koncentrací pesticidů v potravinách, kde jsou stanoveny přesné limity pro širokou škálu látek, vedla k vytvoření metod, které jsou schopny v jedné analýze určit a kvantifikovat až 300 pesticidů.

Vzhledem k současnému trendu bude do budoucna nejspíše potřeba pro efektivnější zemědělství využívat stále nové typy hnojiv a pesticidů. Vzhledem k úspěšnému využití HPLC v zemědělské oblasti bude mít tato instrumentace nejspíše i nadále jednu z primárních rolí.

Použitá literatura

- [1] PERTILE, E. a V. ČABLÍK. *Instrumentální metody analýzy*. 1. Ostrava: VŠB - Technická univerzita Ostrava, 2006. ISBN 80-248-1049-2.
- [2] NOVÁKOVÁ, L. a M. DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi 1*. 1. Klatovy: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [3] KLOUDA, P.. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [4] MOLDOVEANU, S. a V. DAVID. *Essentials in Modern HPLC Separations*. 1. Waltham: Newnes, 2012. ISBN 978-0-12-385013-3.
- [5] SNYDER, L. R., J. J. KIRKLAND a J. W. DOLAN. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 3rd ed. New Jersey: Wiley, 2010, s. 1-4. ISBN 978-1-118-21039-0.
- [6] DONG, M. W. *HPLC and UHPLC for Practicing Scientists*. 2nd ed. Hoboken: Wiley, 2019. ISBN 9781119313762.
- [7] Hawach Scientific. *Hawach Scientific* [online]. Xi'an City: Hawach Scientific, 2019 [cit. 2021-05-07]. Dostupné z: <https://www.hawachhplccolumn.com/five-classifications-of-hplc-column/>
- [8] DONG, M. W. *Modern HPLC for Practicing Scientists*. 1. Hoboken: Wiley, 2006. ISBN 978-0-471-72789-7.
- [9] NORDBORG, A. a E. F. HILDER. Recent advances in polymer monoliths for ion-exchange chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2009, **394**(1), 71-84 [cit. 2021-06-07]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-009-2636-9
- [10] NOVÁKOVÁ, L. a M. DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi 2*. 1. Klatovy: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [11] NEUE, U. D. *HPLC Columns: Theory, Technology, and Practice*. 1. New York: Wiley, 1997. ISBN 978-0-471-19037-0.
- [12] JANDERA, P. Netradiční kolonové formáty v HPLC. *Chemagazín*. 2020, **30**(2), 8.
- [13] MOLDOVEANU, S. a V. DAVID. *Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis*. 1. Amsterdam: Elsevier, 2016. ISBN 978-0-12-803684-6.
- [14] MCMASTER, M. C. *HPLC: A Practical User's Guide*. 2nd ed. Hoboken: Wiley, 2007. ISBN 978-0-471-75401-5.
- [15] GROSS, J. H. *Mass Spectrometry: A Textbook*. 1. Berlin: Springer, 2004. ISBN 978-3-642-07388-5.
- [16] HOFFMANN, E. de. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 5th ed. Wiley, 2001. ISBN 9780471484943.
- [17] BEYNON, J. H. a L. BROWN. Mass spectrometry. *Encyclopedia Britannica* [online]. 2020 [cit. 2021-05-23]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/mass-spectrometry>
- [18] LEE, M. S. a E. H. KERNS. LC/MS applications in drug development. *Mass Spectrometry Reviews* [online]. Wiley, 1999, (18), 187-279 [cit. 2021-05-16]. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1098-2787(1999)18:3/4<187::AID-MAS2>3.0.CO;2-K
- [19] GREBE, S. a R. J. SINGH. LC-MS/MS in the Clinical Laboratory – Where to From Here?. *Clin Biochem Rev*. 2011, **32**(1), 5-31. PMID: PMC3052391.
- [20] DEVENDAR, P. a G.-F. YANG. Sulfur-Containing Agrochemicals. *Topics in Current Chemistry* [online]. 2017, **375**(6), 1-5 [cit. 2021-05-15]. ISSN 2365-0869. Dostupné z: doi:10.1007/s41061-017-0169-9

- [21] POPP, J., K. PETŐ aj. NAGY. Pesticide productivity and food security. A review. *Agronomy for Sustainable Development* [online]. 2013, **33**(1), 243-255 [cit. 2021-05-15]. ISSN 1774-0746. Dostupné z: doi:10.1007/s13593-012-0105-x
- [22] CRAMER, H.-H. *Crop Protection. Ullmann's Agrochemicals, Vol. 2*. 1. Weinheim: Wiley, 2007, s. 517-538. ISBN 978-3-527-31604-5.
- [23] HERZ, W. C. a H. L. VROOMEN. Fertilizers. *Industrial Minerals and Rocks - Commodities, Markets, and Uses: Fertilizers*. 7th ed. Colorado: Society for Mining, Metallurgy, and Exploration, 2006, s. 1269-1278. ISBN 978-0-87335-283-3.
- [24] STIPANUK, M. H. Metabolism of Sulfur-Containing Amino Acids. *Annual Review of Nutrition* [online]. 1986, **6**(1), 179-209 [cit. 2021-05-15]. ISSN 0199-9885. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.nu.06.070186.001143
- [25] SCHERER, H., M. KONRAD a H. DITTMAR. *Ullmann's Agrochemicals, Vol. 1: Fertilizers*. 1. Weinheim: Wiley, 2007. ISBN 978-3-527-31604-5.
- [26] HAGIN, J. a B. TUCKER. *Liquid Fertilizers. Fertilization of Dryland and Irrigated Soils*. 1. Berlin: Heidelberg: Springer-Verlag, 1982. ISBN 978-3-642-68329-9.
- [27] Dusičnan amonný (34 % N). *Hokr* [online]. Pardubice: eStudio, 2020 [cit. 2021-07-09]. Dostupné z: <https://www.hokr.cz/agro/prumyslova-hnojiva/dusikata-hnojiva/dusicnan-amonny>
- [28] NELISSEN, V., B. K. SAHA, Greet RUYSSCHAERT a Pascal BOECKX. Effect of different biochar and fertilizer types on N₂O and NO emissions. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 2014, **70**, 244-255 [cit. 2021-05-16]. ISSN 00380717. Dostupné z: doi:10.1016/j.soilbio.2013.12.026
- [29] SHAVIV, Avi. Advances in controlled-release fertilizers. *Advances in Agronomy*. 2001, (71), 1-49.
- [30] MINERÁLNÍ HNOJIVA - FOSFOREČNÁ. *Mendelova Univerzita v Brně* [online]. Brno: MZLU, 2004 [cit. 2021-06-05]. Dostupné z: https://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/hnojiva/mineralni/pvoda.htm
- [31] Amofos. *Agropodnik Hradec Králové* [online]. Hradec Králové: Agropodnik [cit. 2021-06-05]. Dostupné z: <http://www.agropodnikhk.cz/amofos.html>
- [32] *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard: and Guidelines to Classification*. 1. Ženeva: World Health Organization, 2019, s. 6. ISBN 978-92-4-000567-9.
- [33] MATOLCSY, G., M. NÁDASY a V. ANDRISKA. *Pesticide Chemistry*. 1. New York: Elsevier, 1989, s. 16-17. ISBN 9780080874913.
- [34] VLČEK, V. a M. POHANKA. Enviromentální aspekty užití organofosorových a karbamátových pesticidů schválených k užití v České republice. *Chemické listy*. 2011, (105), 908-912.
- [35] DVOŘÁKOVÁ, M.. *Fakta o pesticidech: aneb co o nich asi nevíte*. 1. Praha: Potravinářská komora České republiky, 2020, s. 19-23. ISBN 978-80-88019-42-8.
- [36] BRITANNICA. Insecticide. *Encyclopedia Britannica* [online]. 2019 [cit. 2021-05-23]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/technology/insecticide>
- [37] BRITANNICA. Chemosterilant. *Encyclopedia Britannica* [online]. 2019, (20) [cit. 2021-05-20]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/technology/chemosterilant>
- [38] BRITANNICA. Herbicide. *Encyclopedia Britannica* [online]. 2019 [cit. 2021-05-23]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/herbicide>

- [39] MORTON, V. a T. STAUB. A Short History of Fungicides. *APSnet Feature Articles* [online]. 2008 [cit. 2021-05-23]. ISSN 2153-0297. Dostupné z: doi:10.1094/APSnetFeature-2008-0308
- [40] ZUBROD, J. P., M. BUNDSCHUH, Gertie ARTS et al. Fungicides: An Overlooked Pesticide Class?. *Environ. Sci. Technol.* [online]. 2019, **53**(7), 3347-3365 [cit. 2021-05-23]. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.8b04392
- [41] BRITANNICA. Fungicide. *Encyclopedia Britannica* [online]. 2019 [cit. 2021-05-23]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/fungicide>
- [42] SNYDER, L. R., J. J. KIRKLAND a J. L. GLAJCH. *Participal HPLC Method Development*. 2nd ed. Danvers: A John Wiley & Sons, Inc., Publication, 1997. ISBN 0-471-00703-X.
- [43] SZÁKOVÁ, J.. *Použití instrumentálních analytických technik pro stanovení rizikových prvků*. 1. Praha: Česká zemědělská univerzita, 2005. ISBN 80-213-1407-9.
- [44] KORKKA-NIEMI, K.. *Cumulative geological, regional and site-specific factors affecting groundwater quality in domestic wells in Finland*. 1. Helsinki: Finnish Environment Institute, 2001. ISBN 952-11-0942-4.
- [45] GELBERG, K. H., L. CHURCH, G. CASEY, M. LONDON, D. S. ROERIG, J. BOYD a M. HILL. Nitrate Levels in Drinking Water in Rural New York State. *Environmental Research* [online]. 1999, **80**(1), 34-40 [cit. 2021-05-18]. ISSN 00139351. Dostupné z: doi:10.1006/enrs.1998.3881
- [46] KNOBELOCH, L, B SALNA, A HOGAN, J POSTLE a H ANDERSON. Blue babies and nitrate-contaminated well water. *Environmental Health Perspectives* [online]. 2000, **108**(7), 675-678 [cit. 2021-05-18]. ISSN 0091-6765. Dostupné z: doi:10.1289/ehp.00108675
- [47] SZABO, H. M. a T. TUHKANEN. The application of HPLC–SEC for the simultaneous characterization of NOM and nitrate in well waters. *Chemosphere* [online]. 2010, **80**(7), 779-786 [cit. 2021-05-17]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2010.05.007
- [48] SEBILO, M., B. MAYER, B. NICOLARDOT, G. PINAY a A. MARIOTTI. Long-term fate of nitrate fertilizer in agricultural soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2013, **110**(45), 18185-18189 [cit. 2021-05-19]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1305372110
- [49] GORENJAK, A. H., D. URIH, T. LANGERHOLC a J. KRISTL. Nitrate Content in Potatoes Cultivated in Contaminated Groundwater Areas. *Journal of Food Research* [online]. 2013, **3**(1), 18-27 [cit. 2021-05-18]. ISSN 1927-0895. Dostupné z: doi:10.5539/jfr.v3n1p18
- [50] THAYER, J.R. a R.C. HUFFAKER. Determination of nitrate and nitrite by high-pressure liquid chromatography: Comparison with other methods for nitrate determination. *Analytical Biochemistry* [online]. 1980, **102**(1), 110-119 [cit. 2021-06-07]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/0003-2697(80)90325-5
- [51] CROITORU, M. D.. Nitrite and nitrate can be accurately measured in samples of vegetal and animal origin using an HPLC-UV/VIS technique. *Journal of Chromatography B* [online]. 2012, **911**, 154-161 [cit. 2021-06-07]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2012.11.006
- [52] PEPPERŇY, K.. Rezidua pesticidů v potravinách – zdravotní rizika a aktuální stav. *Státní Zdravotní Ústav* [online]. Praha: SZÚ, 2015 [cit. 2021-05-19]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/rezidua-pesticidu-v-potravinach-zdravotni-rizika-a-aktualni>

- [53] EUROPEAN COMMISSION. Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on the maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC. *Official Journal of the European Union*. 2005, (70), 1-16.
- [54] EUROPEAN COMMISSION. Commission Directive 2003/13/EC of 10 February 2003 amending Directive 96/5/EC on processed cereal-based foods and baby foods for infants and young children. *Official Journal of the European Union*. 2003, (4133).
- [55] MATSUMURA, F. *Toxicology of Insecticides*. 1. New York: Springer, 1975, s. 36. ISBN 9781461344100.
- [56] FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. *Chromatographic-mass spectrometric food analysis for trace determination of pesticide residues*. 1. Amsterdam: Elsevier, 2004. ISBN 9780080454405.
- [57] FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. a J. F. GARCÍA-REYES. Large-scale multi-residue methods for pesticides and their degradation products in food by advanced LC-MS. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2008, **27**(11), 973-990 [cit. 2021-05-19]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2008.09.009
- [58] PICÓ, Y., C. BLASCO a G. FONT. Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: An overview. *Mass Spectrometry Reviews* [online]. 2004, **23**(1), 45-85 [cit. 2021-05-26]. ISSN 02777037. Dostupné z: doi:10.1002/mas.10071
- [59] SOLER, C. a Y. PICÓ. Recent trends in liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine pesticides and their metabolites in food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2007, **26**(2), 103-115 [cit. 2021-05-21]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2006.08.005
- [60] GARCÍA-REYES, J. F., M. D. HERNANDO, C. FERRER, A. MOLINA-DÍAZ a A. R. FERNÁNDEZ-ALBA. Large Scale Pesticide Multiresidue Methods in Food Combining Liquid Chromatography– Time-of-Flight Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* [online]. 2007, **79**(19), 7308-7323 [cit. 2021-05-25]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac070855v
- [61] GARCÍA-REYES, J. F., M. D. HERNANDO, A. MOLINA-DÍAZ a A. R. FERNÁNDEZ-ALBA. Comprehensive screening of target, non-target and unknown pesticides in food by LC-TOF-MS. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2007, **26**(8), 828-841 [cit. 2021-05-25]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2007.06.006
- [62] BARREK, S., O. PAISSE a M.-F. GRENIER-LOUSTALOT. Determination of residual pesticides in olive oil by GC–MS and HPLC–MS after extraction by size-exclusion chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2003, **376**(3), 355-359 [cit. 2021-05-19]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-003-1917-y
- [63] FERRER, I., E. M. THURMAN a D. BARCELÓ. Identification of Ionic Chloroacetanilide–Herbicide Metabolites in Surface Water and Groundwater by HPLC/MS Using Negative Ion Spray. *Analytical Chemistry* [online]. 1997, **69**(22), 4547-4553 [cit. 2021-06-07]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac9704671
- [64] GIOUMOUXOUZIS, C. I., M. G. KOUSKOURA a C. K. MARKOPOULOU. Negative electrospray ionization mode in mass spectrometry: A new perspective via modeling. *Journal of Chromatography B* [online]. 2015, **998-999**, 97-105 [cit. 2021-06-07]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2015.06.009
- [65] RAHEEM, S. S., M. A. AL-DOSSARY a H. T. AL-SAAD. Determination of Carbendazim Fungicide and Oxymatrine Insecticide Residues in the Soils of Four Agriculture Stations in

- Basrah Governorate by HPLC. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. 2017, 7(22), 10-16.
- [66] The U.S. Government and the World Health Organization. *KFF* [online]. San Francisco: KFF, 2021 [cit. 2021-05-15]. Dostupné z: <https://www.kff.org/global-health-policy/fact-sheet/the-u-s-government-and-the-world-health-organization/>
- [67] OSH Answers Fact Sheets. *Canadian Centre for Occupational Health & Safety* [online]. Hamilton: Canadian Centre for Occupational Health & Safety, 2021 [cit. 2021-05-15]. Dostupné z: <https://www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/ld50.html>
- [68] Ukončování vegetace u hlavních plodin. *Zemědělec* [online]. Praha: Profi Press, 2012 [cit. 2021-07-09]. Dostupné z: <https://www.zemedelec.cz/ukoncovani-vegetace-u-hlavnich-plodin/>