

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STANOVENÍ REZIDUÍ VYBRANÝCH PESTICIDNÍCH ÚČINNÝCH LÁTEK
VE VÍNĚ METODOU GC/MS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

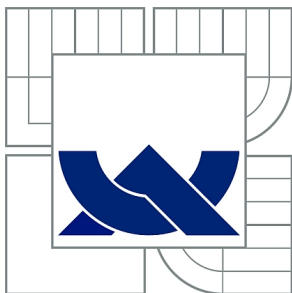
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

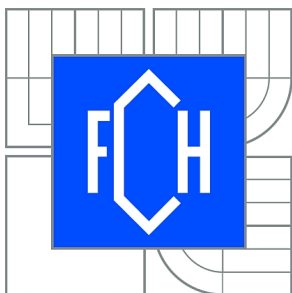
AUTHOR

Bc. MARTINA EHRENBARGEROVÁ

BRNO 2010



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STANOVENÍ REZIDUÍ VYBRANÝCH PESTICIDNÍCH ÚČINNÝCH LÁTEK VE VÍNĚ METODOU GC/MS

DETERMINATION OF RESIDUES OF THE SELECTED PESTICIDE EFFECTIVE SUBSTANCES
IN WINE USING THE GC/MS METHOD

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. MARTINA EHRENBARGEROVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

RNDr. RENATA MIKULÍKOVÁ

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0350/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Martina Ehrenbergerová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	RNDr. Renata Mikulíková	
Konzultanti:	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.	

Název diplomové práce:

Stanovení reziduí vybraných pesticidních účinných látek ve víně metodou GC/MS

Zadání diplomové práce:

1. Zpracování literární rešerše zaměřené na:
 - a) Hospodářsky významné houbové choroby a živočišné škůdce révy
 - b) Ochranu révy proti hlavním houbovým chorobám a živočišným škůdcům
 - c) Výběr účinných látek pro analytické stanovení
 - d) Možnosti stanovení vybraných účinných látek ve víně.
2. Příprava kontaminovaných vzorků vín vybranými účinnými látkami
3. Optimalizace extrakce vybraných účinných látek ve víně
4. Optimalizace stanovení vybraných účinných látek ve víně metodou GC/MS.

Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2010

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Martina Ehrenbergerová
Student(ka)

RNDr. Renata Mikulíková
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Hrozno patrí medzi najstaršie kultúrne plodiny. Možno ho konzumovať v surovom stave ako ovocie, alebo použiť ho ako surovinu na prípravu kompótov, štiav, či ušľachtileho nápoja - vína. Celé generácie vinárov sa snažia zlepšovať nielen pestovateľské podmienky viniča, ale aj kvalitu vína. Významnými faktormi, ktoré môžu nepriaznivo ovplyvniť kvalitu úrody je rada škodlivých činiteľov, ako živočíšny škodcovia, choroby a buriny. K regulácii ich výskytu sú v systéme integrovanej ochrany využívané agrotechnické opatrenia, odolné odrody a pesticídy. S narastajúcimi požiadavkami na kvalitu produkcie taktiež narastá množstvo a spektrum použitých pesticídov. Avšak zvyšujúci rozsah používaných pesticídov so sebou prináša aj isté riziká, ako pre vnútornú kvalitu produkcie, tak aj pre životné prostredie. Táto skutočnosť vytvára potrebu sledovať nepriaznivé vplyvy vrátane obsahu rezíduí pesticídov v hrozne. Moja diplomová práca sa zaoberá štúdiou a experimentálnym stanovením vybraných rezíduí pesticídov vo vzorkách rôznych vín.

ABSTRACT

The grape is one of the oldest cultivated plants. It can be consumed as a fruit or it can be used as a raw material for making stews, juices or the cultivated drink – wine. Generations of wine-makers have been striving to improve both the cultivating conditions of vineyards and the quality of wine. Many harmful elements, such as herbivorous pests, diseases and storms are important factors that can have a negative impact on crop quality. To regulate the effects of these factors, an integrated protection system is used, incorporating agronomical measures, resistant varieties and a wide spectrum of pesticides. However, increasing the usage of pesticides brings certain dangers to both the production quality and the environment. This necessitates the monitoring of the negative effects, including the content of pesticide residues in the grapes. My thesis studies and experimentally assesses selected pesticide residues in certain wine samples.

KLÚČOVÉ SLOVÁ:

Víno, pesticídy, insekticídy, fungicídy, herbicídy, extrakcia, SPE, GPC, GC, GC-MS.

KEYWORDS:

Wine, pesticides, insecticides, fungicides, herbicides, extraction, SPE, GPC, GC, GC-MS.

EHRENBERGEROVÁ, M. *Stanovení reziduí vybraných pesticidních účinných látek ve víně metodou GC/MS*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 90 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Renata Mikulíková.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

Pod'akovanie:

Ďakujem vedúcej mojej diplomovej práce RNDr. Renate Mikulíkovej za odborné vedenie, prínosné konzultácie a pripomienky pri písaní diplomovej práci a pánovi Ing. Zdenkovi Svobodovi za ochotu a pomoc pri riešení praktickej časti diplomovej práce. Ich prístup mi bol veľmi nápomocný a viedol ma správnym smerom.

Obsah

1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČASŤ	8
2.1 RÉVA VINNÁ	8
2.1.1 Pôvod révy.....	8
2.1.2 Botanické zatriedenie viniča	8
2.1.3 Zloženie hrozna	9
2.1.4 Geologické, klimatické a pôdne faktory	9
2.1.5 Zdravá surovina - zdravé víno	10
2.1.6 Choroby vína	10
2.1.7 Ochrana viniča	13
2.1.8 Spôsoby ochrany	14
2.2 PESTICÍDY	14
2.2.1 Všeobecná charakteristika	14
2.2.2 Vývoj pesticídov.....	15
2.2.3 Rozdelenie pesticídov	15
2.2.3.1 Insekticídy.....	16
2.2.3.2 Fungicídy.....	17
2.2.3.3 Herbicídy	19
2.2.4 Legislatíva o využití pesticídov	20
2.2.5 Nariadenie o uvádzaní pesticídov na trh.....	21
2.2.6 Prenikanie, účinky a metabolizmus pesticídov.....	22
2.2.7 Zásady pri práci s pesticídmi	22
2.2.8 Pesticídy a ich rezíduá v rastlinných produktoch	22
2.2.9 Maximálne limity rezíduí pesticídov (MLR).....	23
2.3 STANOVENIE PESTICÍDOV VO VÍNE.....	24
2.3.1 Metódy izolácie rezíduí pesticídov vo víne a čistenie extraktov.....	24
2.3.1.1 Extrakcia	24
2.3.1.2 Extrakcia nadkritickou kvapalinou (SFE).....	24
2.3.1.3 Gélková permeačná chromatografia (GPC).....	25
2.3.1.4 Extrakcia kvapalina – kvapalina	25
2.3.1.5 Extrakcia tuhou fázou (SPE)	25
2.3.2 Chromatografické stanovenia pesticídov	33
2.3.3 Plynová chromatografia (GC)	34
2.3.3.1 Princíp GC	34
2.3.3.2 Kvalitatívne veličiny v plynovej chromatografii	35
2.3.3.3 Kvantitatívne veličiny v plynovej chromatografii	36
2.3.3.4 Inštrumentácia v plynovej chromatografii	36
2.3.3.5 Nosný plyn	38
2.3.3.6 Kolóny	39
2.3.3.7 Detektory	40
2.3.3.8 Vplyv teploty v plynovej chromatografii	42
2.3.3.9 Kvalitatívna analýza GC	42
2.3.4.0 Kvantitatívna analýza GC	42
2.3.4 Plynová chromatografia – hmotnostná spektrometria (GC–MS)	43
2.3.4.1 Princíp GC - MS.....	44

2.3.4.2 Experimentálne usporiadanie	44
2.3.4.3 Chromatografický vstup	45
2.3.4.4 Ionizácia	46
2.3.4.5 Hmotnostné separátory	48
2.3.4.6 Záznamy z analýz GC – MS.....	53
3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	54
3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, ROZTOKY A ŠTANDARDY	54
3.2 POUŽITÉ LABORATORNE POMÔCKY, VYBAVENIE A PRÍSTROJE	54
3.3 VZORKY VÍN	56
3.4 POSTUP PRÍPRAVY A ANALÝZY VZORIEK	57
3.4.1. Príprava, zakoncentrovanie a analýza vzoriek	57
3.4.1.1 Extrakcia tuhou fázou (SPE)	57
3.4.1.2 SPE kolónky.....	58
3.4.2 GC–MS analýza.....	60
3.4.2.1 Chromatografická kolóna	60
3.4.2.2 Podmienky GC-MS analýzy.....	61
3.5 VALIDÁCIA METÓDY	61
3.5.1 Zhodnosť.....	61
3.5.3 Medza detekcie a medza stanoviteľnosti	62
4 VÝSLEDKY A DISKUSIA	63
4.1 ŠTANDARDY	63
4.2 KALIBRAČNÁ KRIVKA.....	63
4.3 OPTIMALIZÁCIA SPE	69
4.4 OPTIMALIZÁCIA GC-MS	72
4.5 VALIDÁCIA METÓDY	73
4.5.1 Medza detekcia a medza stanoviteľnosti	73
4.5.2 Relatívna opakovateľnosť (RSD).....	73
4.5 NAMERANÉ HODNOTY	74
5 ZÁVER.....	78
6 POUŽITÁ LITERATÚRA	80
7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV	83
8 ZOZNAM POUŽITÝCH PRÍLOH.....	85
9 PRÍLOHY	86

1 ÚVOD

Už od pradávna získaval človek tekutiny samokvasením sladkých plodov. Bola to práve šťava révy vinnej, ktorej kvasením vznikol nápoj, čo sprevádza ľudstvo od samého počiatku jeho existencie. Možno teda tvrdiť, že pestovaním vinnej révy sa ľudstvo zaoberá už niekoľko storočí.

K výrobe kvalitných vín je nevyhnutné zdravé a dobre vyzreté hrozno, a práve preto sa používanie účinných látok proti rôznym škodcom stalo bežnou praxou aj vo viniciach. Doposiaľ sa ako najúčinnější metóda na reguláciu škodlivých činiteľov javí využívanie chemických prípravkov tzv. pesticídov [1,6,8]. Pesticídy predstavujú špecifickú skupinu chemikálií, ktoré sa vyvíjajú a vyrábajú za účelom ochrany poľnohospodárskych plodín pred vznikom chorôb, napadnutím škodcami či rastom burín. Nesprávne použitie týchto chemických látok môže mať za následok prítomnosť ich rezíduí v hrozne, alebo v spracovaných výrobkoch ako je víno a tým ohrozovať bezpečnosť výrobku. Z tohto dôvodu je v posledných rokoch stanoveniu rezíduí pesticídov v potravinách alebo v surovinách použitých na výrobu potravín venovaná veľká pozornosť. V záujme ochrany zdravia spotrebiteľov boli v rôznych krajinách stanovené maximálne limity rezíduí (MLR) v strapcoch na medzinárodnej úrovni *Codex Alimentarius* [21].

Cieľom tejto práce je poskytnúť prehľad o použitých pesticídoch, možnostiach ich stanovenia a zároveň si overiť možnosti týchto analýz na vybraných pesticídoch vo víne.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Réva vinná

2.1.1 Pôvod révy

Nie je možné presne určiť vek vinnej révy, ale archeologické nálezy dokazujú, že bola na svete skôr ako človek. Stopy po nej sa našli na brehoch Kaspického mora, v Grónsku, v Severnej Amerike, v Malej Ázii. Vtedy išlo o divoko rastúcu révu.

Vedci sa domnievajú, že **VITIS VINIFERA**, botanický názov pre vinič hroznorodý, pochádza z údolia riek Eufrat a Tigris, kde sa už pred tisíckami rokov vyrábalo hroznové víno. Trvalo však veľmi dlho, kým sa vinič rozšíril po celom svete. Pred viac ako 3500 rokmi pred n. l. pestovali Egyptania kultúrne vinnú révu a vyrábali z jej hrozien vzácny nápoj. Už v tej dobe bolo vinárstvo na vysokej úrovni a to nielen v Egypte, ale aj Sýrii či Babylone.

Gréci pestovali a starali sa o vinič podobne ako Egyptania. Víno ctili ako "dar bohov". Už tam sa začalo remeslo degustátora, pretože práve Gréci porovnávali vodu z rôznych prameňov.

Rímanom tiež patrí veľká chvála. Pri rozširovaní rimanskej ríše zároveň rozširovali aj pestovanie vinnej révy po celej Európe. Svoje vinohrady zakladali len na tých najvhodnejších miestach.

V roku 892 kráľ Svätopluk zaslal priesady viniča do Prahy vojvodovi Bořivojovi a Ľudmile, ktorá ich nechala vysadiť v okolí Mělníka.

Bohužiaľ, nie sú správy o tom, ako sa pred toľkými storočiami hrozno zberalo, ošetrovalo, a taktiež ako sa vyrábalo víno [3].

2.1.2 Botanické zatriedenie viniča

Vitis vinifera sa systematicky radí do čeľade *Vitaceae*, ktorá má cca 600 druhov. Čeľaď *Vitaceae* sa delí na dve podčeľade, a to podčeľaď *Leeoidae*, ktorá má jeden rod *Leea* a podčeľaď *Vitoidae*, ktorá má 10 rodov: *Cissus*, *Ampelocissus*, *Pterisanthes*, *Clematicissus*, *Tetrastigma*, *Landucia*, *Parthenocissus*, *Ampelopsis*, *Rhoicissus* a *Vitis*. Najrozšírenejší je rod *Cissus* a má využitie ako dekoratívna rastlina. Rod *Ampelocissus* je najvýznamnejší po rode *Vitis* a rozšírený predovšetkým v tropických krajinách.

Rod *Vitis* je rozšírený hlavne na severnej pologuli a podľa klasifikácie Planchona sa delí na dva podrody: *Muscadiana* s druhom *Vitis rotundifolia* a *Vitis Munsoniana* a podrod *Euvitis* so skupinami druhov: *Vitis labrusca*, *Vitis aestivalis*, *Vitis cinerascens*, *Vitis rupestris*, *Vitis ripariae*, *Vitis labruscoideae*, *Vitis incertae* a *Vitis viniferae*.

Vplyvom rozdielnych ekologických podmienok má podrod *Euvitis* tri geografické skupiny:

- **Vinič európsky a západoázijský** – jediný druh patriaci do tejto skupiny je vinič hroznorodý, ktorý zahrňuje všetky pestované odrody európskeho viniča od najzápadnejšej časti Európy po strednú Áziu. Delí sa na poddruh vinič hroznorodý lesný – *Vitis vinifera ssp. silvestris* a vinič hroznorodý – *Vitis vinifera ssp. sativa*.
- **Vinič východoázijský** – do tejto skupiny patria odrody viniča pestované vo východnej Ázii. Zahŕňa 42 druhov s menej vhodnými hospodárskymi vlastnosťami, využitie majú predovšetkým ako okrasné rastliny. Výnimkou je vinič amurský, ktorý sa využíva na šľachtenie viniča na mrazuvzdornosť.
- **Vinič americký** – zahŕňa 28 druhov, z ktorých je väčšina odolná voči hubovým chorobám [2].

2.1.3 Zloženie hrozna

Víno sa vyrába z najkvalitnejšieho dostupného hrozna. Dnes už majú výrobcovia vín rovnaký vplyv na pestovanie ako sami vinohradníci.

Hrozno vinnej révy sa skladá z bobúľ - dužina, šupka, semená a stopiek. Všetky tieto časti hrozna majú pomerne veľký vplyv na kvalitu budúceho vína. Ich zastúpenie v hrozne je rôzne a závisí od odrody hrozna, stupňa zrelosti a ekologických podmienok. Hrozno obsahuje cukry, kyseliny, vodu, triesloviny, tuky, dusíkaté látky, minerálne látky, farbivá a aromatické látky [4,5].

Dužina je zastúpená v najväčšom množstve, tvorí v priemere 85 – 89% z hmotnosti hrozna. Jej chemické zloženie a chuťové vlastnosti závisia najmä od odrody hrozna. Hlavnými zložkami sú cukry - glukóza, fruktóza a organické kyseliny, najmä vinná a jablčná, ktoré sú voľné a čiastočne viazané vo forme solí. Okrem toho dužina obsahuje aj dusíkaté látky, enzýmy, vitamíny a minerálne látky. Farbivá, triesloviny a aromatické látky sa v dužine nachádzajú iba v stopových množstvách [4,5].

Šupka hrozna tvorí 9 – 11% z celkového množstva hrozna. Látky vyskytujúce sa v šupkách majú najväčší vplyv na chuť, vôňu a charakter odrody budúceho vína. V šupkách bielych odrôd sa nachádzajú žltozelené farbivá – flavanoly a chlorofyl. V červených a modrých odrodách sú to červené farbivá – anthokyany. Dôležitou súčasťou šupiek sú vosky, ktoré vytvárajú voskový povlak čím chránia bobulu pred mechanickým poškodením a nadmerným vyparovaním [4,5].

Semená sa vyskytujú v bobuliach hrozna. Hlavnými zložkami sú triesloviny a oleje. Triesloviny prechádzajú pri nakvasovaní mláta do muštu. Pri výrobe červených vín sa podporuje ich vylúhovanie, pretože si vyžadujú vyšší obsah trieslovín. Pri bielych aromatických odrodách sa ponechávajú na mláte maximálne 2 dni, pretože vyšší obsah trieslovín je v tomto prípade nežiaduci [4,5].

Stopky tvoria 3 - 5% hmotnosti bobúľ. Ich chemické zloženie závisí od odrody hrozna, klimatických podmienok a stupňa zrelosti. Zo začiatku sú sfarbené do zelena a majú vyšší obsah vody. Dozrievaním hrozna hnednú a drevnatejú. Stopky obsahujú aj veľmi malé množstvo cukru, kyselinu vínnu a jablčnú, triesloviny, dusíkaté a minerálne látky [4,5].

2.1.4 Geologické, klimatické a pôdne faktory

Pestovanie vinnej révy a kvalita vína sú závislé na rade činiteľov, predovšetkým na geologických pomeroch, klimatických podmienkach a odrodovej skladbe. Vinič ako viacročnú kultúru možno vysadiť iba do polôh, v ktorých sú z hľadiska ekológie viniča preštudované klimatické podmienky. Na komplexné posúdenie vhodnosti stanovištných podmienok nestačí iba krátkodobé sledovanie komponentov klímy, ale je potrebné ich zhodnotiť za dlhoročné obdobie.

V českej vinárskej oblasti sa vinná réva vysádza hlavne na svahoch. Tieto vinice netrpia toľko hubovými chorobami ani neskoršími jarnými mrazíkmi a dávajú najkvalitnejšie vína. Na zakladanie viníc nie sú vhodné mrazové kotliny, údolia, v ktorých sa udržiava chladný vzduch, uzavreté miesta, kde réva trpí chorobami a mrazom či miesta u riek, kde sa vytvára hmľa podporujúca hubové ochorenia.

Vinič hroznorodý je citlivá rastlina. V miernom klimatickom pásme produkuje kvalitné zrelé hrozno v komerčne dostatočnom množstve. Vyžaduje si veľa vlhky a slnečného svitu.

Dôležitým faktorom je dostatočne dlhé a teplé leto, nie veľmi chladná jar a mierna zima bez veľkých mrazov. Dobrý výsledok pri pestovaní hrozna značne závisí aj od slnečnej energie, ktorá vplýva na celkový rast, vývoj a plodnosť viniča.

Vinič má na rozdiel od iných kultúrnych rastlín menšie nároky na kvalitu pôdy. Ak je vinič v „strese“ pociťuje potrebu reprodukcie, a teda rodí viac hrozna. Preto sú niektoré z najlepších svetových viníc založené na kamenitej, štrkovitej, bridlicovej či ílovitej pôde. Kamenité pôdy dávajú akostné vína. Štrkovité pôdy obsahujú viac živín, preto je u nich úrodnosť vyššia. Piesčité pôdy sú veľmi vhodné na pestovanie vinnej révy, lebo dobre prepúšťajú vodu a ľahko sa obrábajú. Ťažké a studené hlinité pôdy sa na pestovanie révy nehodia.

Nemenší význam pre pestovanie vinnej révy má aj chemické zloženie pôdy. Ovplyvňuje rast révy i kvalitu vína. Chemické zloženie pôdy závisí od matičnej horniny, z ktorej pôda vznikla [3,4,5].

2.1.5 Zdravá surovina - zdravé víno

Zdravou surovinou na výrobu révového vína je zdravé a dobre vyzreté hrozno, ktoré sa zbiera iba zo zdravých kerov révy vinnej. Ker musí byť chránený pred roztočmi a hlavne pred nebezpečnými hubovými chorobami. Proti nim sa vinice preventívne chránia mednatými a sírnatými postrekmi, ktoré zabráňujú vzniku nežiaducej infekcii. Hrozná z viníc poškodené chorobami zasychajú alebo nezrejú, ľahko zahynú a plesnivujú. Ich cukornatosť je veľmi nízka a hodnota podpriemerná. Vína z nich sú nízkej kvality a určené skôr k destilácii. Zdravé hrozná možno ponechať na vinici vyzrievať dlhšiu dobu, hlavne ak je teplé a suché počasie a nehrozí ich hnilie [1].

2.1.6 Choroby vína

Vinárstvo a výroba vína zohrávajú na celom svete zásadnú úlohu v sociálno-ekonomických podmienkach. Podľa organizácie OIV (*Internationale de la Vigne et du Vin*) celosvetovo vinice zaberajú plochy o rozlohe ôsmich miliónov hektárov a približne 80% produkcie hrozna sa používa na výrobu vína. Taliansko, Francúzsko a Španielsko produkujú asi 50% svetových vín. Ďalšími dôležitými producentmi sú aj USA, Argentína, Austrália, Čína, Nemecko, Južná Afrika, Čile a Portugalsko.

Na zvýšenie výnosov poľnohospodárskych plodín sa stalo používanie pesticídov proti škodcom bežnou praxou aj vo viniciach. Avšak, tieto chemikálie sa môžu dostať do rastlinných tkanív, takže ich zvyšky môžu byť detekované v hrozne či v spracovaných výrobkoch ako je víno.

Okrem klimatických či pôdných podmienok aj odroda má dôležitú úlohu v odolnosti alebo citlivosti k rôznym škodcom a predovšetkým tým hubového pôvodu. Všetky choroby a škodcovia narušujú fyziológiu viniča a tým môžu do určitej miery ohroziť výnos a kvalitu ovocia. Najväčší vplyv na kvalitu plodov majú škodlivé činitele, ktoré priamo napadajú bobule. Medzi tri z hlavných hubových patogénov viniča patria *Botrytis cinerea*, *Plasmopara viticola* a *Uncinula necator* [9,21,37].

Pleseň sivá Botryotinia fuckeliana – konídiové štádium Botrytis cinerea

Jedná sa o rozšírené a veľmi škodlivé ochorenie vinnej révy. Najväčšie škody vznikajú pri napadnutí zrejúcich a zreých bobulí. V tomto období za priaznivých podmienok dochádza

najmä u náchylných odrôd k rýchlemu šíreniu tejto infekcie, čo má za následok podstatné zníženie množstva a kvality zberu [7].

Príznaky

Pleseň šedá napadá všetky nadzemné časti révového kra, mladé letorasty, listy, nezrelé, zrejúce i zrelé hrozno. Na letorastoch vznikajú rôzne veľké vodnaté škvrny a vädnú. Pri napadnutí listov možno pozorovať rozširujúce a od stredu zasychajúce škvrny, v prípade napadnutia mladého hrozna dochádza k jeho zasychaniu. Na stopkách vznikajú drobné hnedozelené až šedohnedé škvrny, ktoré sa rozširujú a nekrotizujú. Na zrejúcich a zrelých bobuliach vznikajú hnilobné škvrny.

Za priaznivého počasia sa na postihnutých častiach vytvárajú typické šedé porasty konidioforov.

Ekológia

Pleseň šedá sa dobre šíri za vlhkého daždivého počasia. Nároky na teplotu nie sú vyhradené, pohybujú sa v rozsahu 1 – 30 °C a optimum je 15 – 25 °C, nevyhnutná je vysoká vzdušná vlhkosť (viac ako 85%).

O stupni napadnutia rozhoduje predovšetkým počasia, mikroklima lokality, výsadby, náchylnosť odrôd a prípadné poranenia bobulí (krúpy, obalovač), ktoré uľahčujú infekciu.

Ochrana

Nepriama ochrana – preventívne pestovateľské opatrenia, ktoré obmedzia či zabránia poškodeniu hrozna (výber lokality, zabezpečiť vzdušnosť porastu a kra, súlad odrody a stanoviska, vyrovnaná výživa, neprehnojenie dusíkom...).

Priama ochrana – základom racionálnej chemickej ochrany je výberové ošetrenie. Ošetrojú sa predovšetkým plochy s pravidelným výskytom za vhodných podmienok pre šírenie ochorenia. V prípade prípravkov zo skupiny dicarboximidov bola lokálne preukázaná znížená účinnosť – nástup rezistencie. Vzhľadom k preukázanej rezistencii v ČR sa doporučuje použiť maximálne 1x v priebehu vegetácie [7].

Botrytis cinerea je klasifikovaný ako vysoko rizikový patogén. Medzi významné botryticídy patria anilinopyrimidiny (pyrimethanil, cyprodinil, mepanipyrim), phenylpyrrol (fludioxonil) a hydroxyanilid (fenhexamid). Biochemické štúdie preukazujú, že anilinopyrimidiny inhibujú biosyntézu methionínu blokovaním cystathionin- β lyázy. Fludioxonil je širokospektrálny kontaktný fungicíd, ktorý inhibuje klíčenie konídií, rast mycélia huby *B. cinerea*, a teda dostatočne pôsobí ako inhibítor prenosu signálov ovplyvňujúcich proteinkinázu. Fenhexamid patrí do skupiny hydroxyanilodov, pri použití sa časť účinnej látky naviaže na voskový povrch rastlinných častí a vytvára stabilný ochranný povlak. Inhibuje klíčenie *B. cinerea* len pri relatívne vysokých koncentráciách [41].

Pleseň viničová *Plasmopara viticola*

Mimoriadne škodlivé ochorenie révy vinnej a za priaznivých podmienok dochádza k epidemickému šíreniu. Pri napadnutí mladého hrozna dochádza k priamemu ohrozeniu úrody, pri poškodení listov je nepriaznivo ovplyvnené množstvo, kvalita zberu a súčasne aj vyzretie révy, čím sa zvyšuje riziko poškodenia pri prezimovaní [7].

Príznaky

Pleseň révová najskôr napadá plne vyvinuté a najmä staršie listy. Na napadnutých listoch sa objavujú žltozelené až žlté rôzne veľké škvrny. V neskorších fázach vegetácie sa na starších listoch objavujú drobné, žilkami ohraničené škvrny a len výnimočne dochádza k zažltnutiu celých listov. Postihnuté miesta nekrotizujú, silne napadnuté listy predčasne odpadávajú. Na napadnutom mladom hrozne sa tvoria povlaky sporangioforov a sporangií a dochádza k hnednutiu a zasychaniu. Napadnuté bobule sa sfarbujú do šedohneda, postihnuté pletivá sa prepadajú a na priereze je možné pozorovať nápadnú hnedú mechovitú nekrózu dužiny a zasychanie. Pri napadnutí staršieho hrozna sa porasty huby vytvárajú na stopkách bobúľ.

Ekológia

Plasmopara viticola - obligátne ektotrofný parazit.

K vyklíčeniu zoospor je nevyhnutný dážď (cca 10 mm za 24 hod.), minimálna teplota nad 8 °C a priemerná teplota nad 13 °C. Pre sporuláciu je potrebné zvlhčenie či vysoká relatívna vlhkosť, vhodná teplota (optimum 15 – 20 °C) a tma. Za priaznivých podmienok dôjde k sporulácii za 4 hodiny. Na klíčenie sporangií a infekciu je rovnako nevyhnutné zvlhčenie listov a vhodná teplota (optimum 22 – 25 °C). Inkubačná doba je najkratšia pri teplotách 22 – 26 °C (3,5 - 4 dni) a infekčná perióda (sporulácia, klíčenie sporangií a infekcia) môže prebehnúť za vhodných podmienok za 8 - 10 hodín.

Ochrana

Nepriama ochrana – všetky preventívne opatrenia, ktoré zaisťujú vzdušnosť porastu a kra, čím redukovujú vhodnosť podmienok pre šírenie ochorenia. V súčasnosti sa testujú tzv. *interspecifické odrody* s toleranciou až rezistenciou k plesni révovej a vyššou odolnosťou k mrazu.

Priama ochrana – významným faktorom je vymedziť obdobie, kedy je nevyhnutné porasty chemicky ošetriť. Dôležitým predpokladom racionálnej ochrany je sledovanie vhodnosti podmienok pre výskyt a šírenie ochorenia. Prvý výskyt révovej plesni je nutné najskôr laboratórne overiť.

Spravidla sa porasty ošetrujú preventívne. Pri prvom ošetrení sú vhodné kontaktné, preventívne pôsobiace fungicídy. Za veľmi vhodných podmienok šírenia sa uplatňujú kombinované fungicídy – kontaktné + systémové a pri poslednom ošetrení sú to mednaté fungicídy.

Pri rozhodovaní o použití mednatého fungicídu by malo byť zohľadnené maximálne využitie účinnosti na plesň révy a ich vedľajší vplyv na spevnenie pletív, čo môže zlepšiť vyzrievanie a tak zvýšiť odolnosť k mrazu. V integrálnej produkcii je nutné dodržať stanovený limit množstva medi (2 kg/ha/rok) [7].

Padlí révové *Uncinula necator*

Patrí medzi hospodársky najškodlivejšie ochorenie révy vinnej. Pri napadnutí hrozna dochádza k výraznému zníženiu množstva i kvality zberu – nižšia cukornatosť, menej aromatických látok [7].

Príznaky

Padlí révové napadá všetky zelené časti kra, letorasty, listy a predovšetkým nezrelé hrozno. Napadnuté časti prerastá biele až bielošedé podhubie. Postihnuté časti sa sfarbujú do šeda v dôsledku poškodenia a odumierania povrchových pletív. Dochádza k redukcii rastu a deformáciám, na listoch vznikajú svetlé matné škvrny, malé bobule zasychajú v dôsledku nadmernej straty vody a väčšie bobule praskajú. Príčinou praskania je okrem poškodenia povrchových buniek najmä náhly príjem vody. Na letorastoch vznikajú rôzne škvrny, ktoré pri vyzrievaní tmavnú až černejú.

Ekológia

Padlí révové sa šíri za teplého počasia a za vyššej alebo striedavej vzdušnej vlhkosti. Vhodná teplota sa pohybuje v rozmedzí 6 – 35 °C, optimum 26 - 28 °C. Výskyt tejto choroby podporujú prehánky, hmly, rosa a naopak obmedzuje trvalo daždivé počasie, nízke teploty a dlhšie teplé obdobia, keď dochádza k zníženiu relatívnej vzdušnej vlhkosti (pokles pod 45 %).

Ochrana

Nepriama ochrana - preventívne pestovateľské opatrenia, ktoré zaisťujú vzdušnosť porastu a znižujú vnímavosť k napadnutiu (výber vhodných lokalít, vyrovnaná výživa, včasné a úplne prevedenie zelených prác a iné). Vyhýbať sa výsadbe náchylných odrôd na rizikových lokalitách.

Priama ochrana - chemické ošetrenie (použitie vhodných pesticídnych prípravkov). U lokálne systémových fungicídov zo skupiny inhibítorov demethylácie bol zaznamenaný pokles účinnosti (nástup rezistencie). Vzhľadom k zníženej citlivosti sa v podmienkach ČR doporučuje použiť DMI fungicídy maximálne 3x a po 2 ošetreniach použiť prípravok s iným mechanizmom pôsobenia [7].

K ochrane proti *Uncinula necator* sa používajú fungicídy zo skupiny triazolov – triadimefon, penconazol, flusilazol či tebuconazol, ktorý v kombinácii s tolylfuanidom je účinný proti všetkým trom spomínaným patogénom. Triazoly patria medzi najrozsiahlejšiu skupinu organických fungicídov. Z rady strobilurínov sú to látky kresoxim-methyl a azoxystrobin, ktorý je taktiež účinný proti všetkým spomínaným patogénom. Kresoxym-methyl sa po aplikácii mení na plyn a vytvára okolo pletív ochrannú vrstvu, ktorá bráni klíčeniu konídií. Z pyrimidinov je to fenarimol [11].

Hrozno napadnuté živočíšnymi škodcami

Medzi chybné hrozno sa radí aj to, ktoré bolo poškodené škodcami ako hálkovec révový, vlnovník révový, sviluška ovocná či obaľovač jednopasý a mramorovaný [7].

2.1.7 Ochrana viniča

Keďže výrobné náklady na pestovanie hrozna sú vysoké, je potrebné počas roka zabezpečiť starostlivú ochranu proti zničeniu chorobami alebo škodcami. Vo veľkovýrobe hrá ochrana veľmi významnú úlohu. Za zlého počasia, najmä v daždivom období, musia byť využité všetky možnosti, vrátane leteckého postrekovania či poprašovania, aby bola ochrana vykonaná včas. Veľký význam má preventívna ochrana, ktorá zabráňuje prvotnému výskytu chorôb a škodcov. Podstatou úspešnej ochrany je organizácia, včasnosť, využitie vhodných

prípravkov a starostlivé postrekovanie a taktiež si vyžaduje základné vedomosti biológie, chorôb a škodcov, príznaky, ich pôsobenie a škodlivé účinky [23,46].

2.1.8 Spôsoby ochrany

Jeden z významných faktorov v rastlinnej výrobe je ochrana kultúrnych rastlín proti rôznym chorobám, škodcom či burinám. V poslednom období sa zvýšená pozornosť venuje integrovanej ochrane. Tento spôsob ochrany využíva všetky metódy (agrotechnická, biologická, fyzikálna, chemická ochrana a odolné odrody), ktoré smerujú k zníženiu rizika pre ekosystémy (biocenózy), zdravia ľudí a zvierat.

Spôsoby ochrany:

- **biologické:** ochranné opatrenia, pri ktorých sa používa jeden živý organizmus proti druhému, pričom užitočný organizmus použitý na ochranu má schopnosť ďalej sa rozmnožovať (biopreparáty – víry, baktérie, huby a bioagens – členovci).
- **fyzikálne:** spôsoby ochrany, ktoré na ničenie škodcov využívajú fyzikálne deje. Škodcovia sú ničení priamo, alebo sa zhoršujú podmienky pre ich vývin a menia sa ich životné podmienky (mechanické zásahy, tepelné zmeny, elektrický prúd, infračervené žiarenie).
- **chemické:** ochrana pomocou chemických prípravkov (pesticídov). Táto metóda sa doposiaľ javí ako najúčinnnejšia k regulácii škodlivých činiteľov, čo naznačuje aj jej dominantný charakter v budúcnosti [11].

2.2 Pesticídy

2.2.1 Všeobecná charakteristika

Pesticídy sú biologicky aktívne látky predstavujúce jednoduché alebo kombinované prípravky určené proti škodlivým organizmom kultúrnych rastlín. Je to taktiež súhrnné označenie pre výrobky používané na ochranu úžitkových organizmov, materiálov i potravín pred organizmami, ktoré sa premnožili alebo sa vyskytujú v miestach, kde nám škodia.

Pesticídy našli mnohostranné využitie v poľnohospodárstve, lesníctve, sladovníctve, či v zdravotníctve (komunálna hygiena). Cieľom ich používania je kvantitatívne a kvalitatívne zlepšenie kvality potravín, krmív, priemyselných výrobkov a zároveň zabezpečiť ich ochranu pred škodcami a chorobami v čase uskladňovania. Ochranou pred škodlivými činiteľmi sa sleduje predovšetkým stabilizácia úrod, znižovanie podielu ručnej práce a zvýšenie kvality finálnej produkcie.

Vo väčšine prípadov sú pesticídy pre človeka a zvieratá toxické látky. Ich biologická aktivita je determinovaná charakterom vlastnej účinnej látky a rovnako aj pomocnými látkami, ktoré sú v prípravku obsiahnuté. Pri súčasnom používaní viacerých druhov pesticídov sa môže ich účinok vzájomne potenciovat', čím sa ich riziko a škodlivosť zvyšuje. Z tohto dôvodu je nutná znalosť účinkov, ako aj dôsledok ich vedľajšieho pôsobenia, čím sa zabráni aplikovaniu nevhodných pesticídov do praxe, alebo sa obmedzí rozsah ich použitia. Táto znalosť tiež umožňuje stanoviť prístupné tolerancie pesticídov a praktické reziduálne limity najmä v potravinách.

Zoznam povolených prípravkov vydáva každoročne Štátna rastlinolekárska správa, pričom tento zoznam obsahuje obchodný názov, účinnú látku, jej obsah v prípravku, dávkovanie a ochrannú lehotu [28].

2.2.2 Vývoj pesticídov

Pojem pesticíd nie je nič nové. Možno tvrdiť, že v priebehu rozvoja metód anorganickej i organickej chémie bolo nasyntetizovaných a otestovaných ohromné množstvo zlúčenín, ktorých počet neustále narastá. Priemerne však len jedna látka na 7 - 10 tis. zlúčenín prechádza screeningom ako využiteľná v praktickej ochrane rastlín. A tak v priebehu chemických modifikácií a syntéz boli získané určité typy potenciálnych chemických pesticídov.

Od všetkých typov pesticídov sa vyvíjajú ďalšie deriváty v snahe zachovať alebo zlepšiť účinok a významne obmedziť vedľajšie negatívne účinky.

Najzávažnejšia fáza vo výskume pesticídov nastáva pri hodnotení účinnosti a vedľajších účinkov účinnej látky. Tieto úlohy sú jednoznačne spojené s ekológiou a zabráňujú, aby sa do praxe dostali látky, síce aktívne, ale pre svoje vedľajšie účinky škodlivé pre ekosystém. Jedná sa o pomerne dlhodobý, vzájomne previazaný systém laboratórnych testov, ktoré s konečnou platnosťou uzatvárajú poľné overovacie pokusy [11,14].

2.2.3 Rozdelenie pesticídov

Pesticídne prípravky predstavujú širokú škálu látok, ktoré rozdelujeme podľa rozličných hľadísk. Pre praktickú potrebu je dôležitá forma aplikácie a spôsob pôsobenia účinnej látky v súvislosti s chemickým zložením – pôsobenie proti rozmanitým škodlivým organizmom.

Podľa účelu použitia sa pesticídy rozdeľujú do rôznych skupín.

1, Rozdelenie podľa konzistencie:

- *tuhé* – práškové, granulované prípravky, návnady
- *kvapalné* – pravé roztoky, suspenzie, emulzie, koloidné roztoky
- *plynné* – plyny, výpary prchavých látok
- *aerosóly* – hmly, dym, studený aerosól

2, Rozdelenie podľa účinnosti na škodlivé organizmy:

- *zoocídy* – prípravky určené proti živočíšnym škodcom
 - a) *insekticídy* – účinkujú proti hmyzu, možno ich deliť podľa skupín škodlivých organizmov napr. na *aficídy* - proti voškám, alebo podľa vývojových štádií škodcov, na ktoré pôsobia napr. *larvicídy*, *ovicídy* – likvidácia vajíčok atď..
 - b) *akaricídy* – účinkujú proti roztočom a pavúkom
 - c) *rodenticídy* - účinkujú proti hlodavcom
 - d) *nematocídy* - účinkujú proti hád'atkám
 - e) *moluskocídy* – účinkujú proti mäkkýšom
 - f) *repelenty* – odpudzujú škodlivé organizmy
 - g) *atraktanty* – lákajú hmyz
- *fungicídy* – prípravky proti fytopatogénnym hubám
 - a) anorganické – síra, polysulfidy
 - b) organické – kontaktné a systémové
 - c) antibiotiká
- *herbicídy* – prípravky proti burine
 - a) selektívne – ničia len určitý druh buriny
 - b) neselektívne – ničia všetky, alebo skoro všetky rastliny [12,14]

3, Rozdelenie podľa spôsobu účinku:

- *kontaktné*
- *kvázi - systémové*
- *systémové*
- *kombinované*
- *mesosystemické [28]*

4, Rozdelenie podľa pôvodu:

- *prírodné látky*
- *syntetické látky*
- *biopreparáty*

5, ďalšie spôsoby rozdelenia:

- Rozdelenie podľa formulácie
- Rozdelenie podľa toxicity
- Rozdelenie podľa stupňa toxicity a iné [12,14].

2.2.3.1 Insekticídy

Chemické prípravky určené na ničenie škodlivého hmyzu v jeho rôznych vývojových stupňoch. Insekticídy sa používajú v poľnohospodárstve, k ochrane zásob i v oblasti hygieny. Sú to látky, ktoré zasahujú najmä nervový systém hmyzu, a to dýchacími orgánmi, pri požití a taktiež kontaktom s telom hmyzu [11].

Rozdelenie podľa účinku na vývinové štádia hmyzu, ktoré ničia:

- *ovicídy* (ničia vajíčka)
- *larvicídy* (ničia larvy)
- *imagocídy* (usmrcujú dospelý hmyz)

Rozdelenie podľa fyziologického účinku na organizmus hmyzu:

- *plazmatické jedy*
- *leptavé jedy*
- *nervové jedy*
- *dýchacie jedy*
- *hormonálne prípravky*

Pirimiphos-methyl

Patrí do skupiny organofosfátov. Je to kontaktný insekticíd a akaricíd, ktorý má fumigantný a hĺbkový účinok proti škodcom s bodavo-cicavými aj hryzavými ústnymi orgánmi. Na povrchu rastlín sa odparí v priebehu 2 - 3 dni. Je málo toxický pre človeka. Pirimiphos-methyl pôsobí ako dotykový, požeravý a dýchací jed s výrazným hĺbkovým účinkom [11].

Chlorpyrifos

Taktiež patrí do skupiny organofosfátov. Je to insekticíd a akaricíd s kontaktným účinkom a pomerne dlhou dobou účinnosti. Má široké spektrum účinku a je toxický aj pre včely. Granulárna formácia sa používa proti drôtovcom v kukurici a v cukrovej a krmnej repe.

Ďalšie formulácie sa využívajú na ochranu proti obal'ovačom na viniči, kohútikom a hrbáčovi obilnému na obilninách, obal'ovačom révy a pod. [11].

2.2.3.2 Fungicídy

Fungicídy sú zvláštnou skupinou pesticídov, ktoré likvidujú alebo obmedzujú vývoj húb poškodzujúcich rastliny, drevo, kožu, papier a iné organické látky. Väčšinou sa používajú preventívne. V prípade obmedzovania rastu húb hovoríme o fungistatickom účinku, v prípade likvidácie o fungicídnom účinku. Niektoré druhy sa vyznačujú i bakteriostatickým účinkom, takže za určitých okolností spomaľujú vývoj baktérií. Fungicídy pôsobia na huby tak, že zabráňujú klíčeniu spór, alebo likvidujú, poprípade obmedzujú vývoj mycélia [11,14].

Podľa účinnej látky fungicídy rozdeľujeme na:

- **anorganické**
 - a) meďnaté
 - b) sírnaté
 - c) ortuťnaté (dlhodobo nepoužívané – zakázané)
 - d) cín (dlhodobo nepoužívané – zakázané)
- **organické**
 - a) dithiokarbamáty
 - b) MBC fungicídy
 - c) CAA fungicídy
 - d) SBI fungicídy, najmä DMI fungicídy
 - e) ftalimidy
 - f) ostatné syntetické organické látky
- **antibiotiká (v ČR nie sú povolené)**

Azoxystrobin

Unikátnou vlastnosťou azoxystrobinu je jeho systemický a širokospektrý účinok. Ako jediný zástupca zo skupiny strobilurinov je táto účinná látka plne systemická a v rastlinách akropetálne rozvádzaná. Aplikuje sa vždy preventívne, to znamená, že prípravok musí byť použitý ešte pred alebo tesne na počiatku infekcie choroby.

Je účinný proti *Blumeria graminis*, *Plasmopara viticola*, *Uncinula necator*, *Botrytis cinerea* atď. [28].

Kresoxim-methyl

Ako samostatná účinná látka (s kvázi systémovým účinkom) je účinná proti *Podosphaera leucotricha*, *Uncinula necator*, *Plasmopara viticola*, *Venturia inaequalis*. Kresoxim-methyl sa po aplikácii mení na plynnú formu a vytvára okolo pletív ochrannú vrstvu, ktorá bráni klíčeniu konídií [11].

Picoxystrobin

Širokospektrálna účinná látka zo skupiny strobilurínov, ktorá ako inhibítor mitochondriálnej respirácie pôsobí ako protektant s krátkodobou kuratívnu účinnosťou proti širokému spektru hubových chorôb. V rastlinách sa šíri systemicky a translaminárne. Pôsobí dlhodobo.

Trifloxystrobin

Trifloxystrobin sa vyznačuje tzv. mesostemickým účinkom, spočívajúcim v ukladaní účinnej látky do voskovej vrstvičky a následnou redistribúciou aj na časti rastlín, ktoré neboli striekajúcou kvapalinou priamo zasiahnuté. Trifloxystrobin zvlášť účinne bráni klíčeniu spór a rastu mycélia húb na povrchu rastlín. Inhibuje tiež vývoj patogénov v povrchových vrstvách rastlinných pletív. Pôsobí proti veľmi širokému spektru hubových chorôb.

Flusilazole

Flusilazol je triazol patriaci do skupiny inhibítorov biosyntézy ergosterolu, pôsobí na široké spektrum hubových chorôb obilnín a niektorých technických plodín. Flusilazole ničí klíčiace spóry a tiež hýfy, ktoré už následne prerastajú listom. Zabraňuje tvorbe nových konídií a tým ďalšej infekcii. Účinná látka je rovnomerne a plne systémovo rozvádzaná cievnyimi zväzkami i do nových prírastkov.

Vo forme postreku účinkuje proti *Podosphaera leucotricha*, *Venturia inaequalis*, *Uncinula necator*.

Penconazol

Systémový triazol s účinnosťou na *Uncinula necator*. Účinná látka preniká do rastliny prostredníctvom listov a stoniek relatívne rýchlo. Fungicídna účinnosť penconazolu spočíva v tom, že brzdí syntézu ergosterolu a tým blokuje funkciu bunečných membrán.

Používa sa aj v kombinácii s captanom alebo difenoconazolom.

Tebuconazole

Po niekoľko ročnom testovaní rôznych prípravkov bolo zistené, že relatívne dobrú účinnosť vykazujú fungicídy, ktoré ako účinnú látku obsahujú tebuconazol. Na rozdiel od ostatných triazolov, ktoré sa po určitej dobe kumulujú v špičkách listov, je tebuconazol vždy rovnomerne rozdelený po celej ploche listov a zaisťuje tak spoľahlivú a dlhodobú ochranu, čo je mimoriadne dôležité. Tebuconazol narušuje biosyntézu ergosterolu na viacerých miestach, čím sa podstatne zvyšuje spoľahlivosť zásahu.

Má veľmi dobrú účinnosť proti širokému spektru hubových patogénov a dlhú dobu trvania účinku [22].

Triadimefon

Jedná sa o starší triazolový systémový fungicíd. Účinnosť vo forme postreku je registrovaná proti *Rhynchosporium secalis*, *Puccinia hordei*, *Blumeria graminis*, *Puccinia glumarum*, *Uncinula necator*. Používa sa aj v kombinácii s tebuconazolom [11].

Fenarimol

Fenarimol pôsobí systémovo. Inhibuje biosyntézu ergosterolu fytopatogénnych húb, predovšetkým u klíčiacych spór. V dôsledku blokovania tvorby ergosterolu klíčiace spóry patogennej huby nevytvárajú bunkové steny a odumierajú.

Fenarimol sa vyznačuje sa účinnosťou proti *Venturia spp.*, *Podosphaera leucotricha*, *Erysiphe spp.*, *Uncinula necator*, *Blumeriella jaapi*.

Captan

Radí sa medzi kontaktný fungicíd, ktorý je základom pre moridlá a postrekové fungicídy. V posledných rokoch sa považuje za toxikologicky rizikový látka. V súčasnosti tvorí súčasť širokého spektra fungicídov na jadrovinách. Captan sa vyznačuje protektívnym účinkom potláčajúci rast mycélia a sporuláciu hubových patogénov rastlín. Využíva sa aj v kombinácii s penconazolom s účinnosťou proti *Venturia inaequalis* a *Podosphaera leucotricha*.

Dimethomorph

Dimethomorph je systémová morpholínová fungicídna látka. Ničí široké spektrum húb triedy *Oomycetes*. Dimethomorph u ošetrovaných citlivých druhov húb spôsobuje morfogenézovú zmenu na bunenej stene, ktorá má za následok prerušenie vývoja huby. V sólo formulácii sa nevyskytuje. Je registrovaný v kombinácii s mancozebom. Mancozeb je kontaktná širokospektrálna látka, ktorá blokuje rast patogénnych húb na molekulárnej úrovni, blokuje fázu Krebsovho cyklu [11,51].

Dinocap

Dinocap kontaktný fungicíd zo skupiny dinitrifenylov. Jedná sa o kontaktnú zložku „protimúčnatkového“ prípravku s účinnosťou proti *Erysiphe cichoracearum*, *Erysiphe spp.*, *Uncinula necator*, *Podosphaera leucotricha* [11].

Vinclozolin

Kontaktný fungicíd zo skupiny dikarboximidov. Narušuje metabolizmus lipidov a syntézu nukleových kyselín. Vyznačuje sa účinnosťou proti *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria spp.*. Využíva sa aj v kombinácii s carbendazimom.

Folpet

Účinná látka folpet sa vyznačuje kontaktným pôsobením, posilňuje účinnosť prípravku proti peronospóre viniča a bielej hnilobe. Účinnosť je registrovaná proti *Plasmopara viticola*, *Venturia spp.*, *Phytophthora infestans*. Používa sa v kombinácii s triadimenolom a iprovalicarbom.

Pyrimethanil

Pyrimethanil patrí medzi významné botryticídy zo skupiny anilinopyrimidínov. Inhibuje vylučovanie enzýmov húb, ktoré sa podieľajú na vzniku a rozvoji infekcie rastlín, čím sa inhibuje a prerušuje infekčný proces. Pyrimethanil je preventívny fungicíd s kontaktným, translaminárnym a fumigačným účinkom [51].

2.2.3.3 Herbicídy

Herbicídy sú chemické prípravky určené na ničenie nežiaducich rastlín.

Rozdelenie podľa ich účinku:

- **selektívne (výberové)** - pri vhodnom použití ničia niektoré buriny, pričom nepoškodia pestované rastliny
- **neselektívne (totálne)** - ničia všetky rastliny

Rozdelenie podľa spôsobu, akým na rastlinu účinkujú:

- **dotykové (kontaktné)** - ničia len zasiahnuté časti rastlín
- **systémové (translokačné)** - cievnymi zväzkami sa rozvádzajú do celého organizmu rastliny, t.j. do tých častí, ktoré neboli priamo zasiahnuté postrekovou látkou
- **pôdne** - pôsobia cez pôdu (predovšetkým koreňmi), spravidla pri klíčení a vchádzaní burín

Rozdelenie podľa chemického zloženia:

- **anorganické**
- **organické**

Anorganické herbicídy

Neselektívne herbicídy určené na odburiňovanie nepoľnohospodárskej pôdy a iných plôch. Postupne ich vytláčajú moderné organické herbicídy.

Organické herbicídy

V posledných rokoch sa počet organických látok používaných ako herbicídy výrazne zvýšil a tento rozvoj stále pokračuje. Organické herbicídy rozdeľujeme do týchto hlavných skupín:

- **deriváty fenolov a herbicídnych olejov** - pôsobia kontaktne a ničia jednoročné buriny v porastoch miřikovitých rastlín a obilnínach.
- **Deriváty triazínu** - koreňové systémové herbicídy, ich účinok sa obyčajne vysvetľuje tým, že rušivo zasahujú do fotosyntézy, čím sa porušuje normálna asimilácia a tvorba zásobného škrobu. Zasiahnuté buriny majú žlté listy, ktoré na okrajoch zosychajú.
- **Deriváty močoviny** - na ich účinok má veľký vplyv vlhkosť pôdy.
- **Karbamáty a tiokarbamáty** - prijímajú hlavne klíčiace semená rastlín. Ich účinok spočíva v tom, že porušujú delenie buniek.
- **Chlorované mastné kyseliny** - herbicídy tejto skupiny sa používajú na ničenie burinných tráv. Spôsobujú ťažké fyziologické poruchy rastlín, pôsobia translokačne.
- **Deriváty kyseliny benzoovej** - väčšina zlúčenín tejto skupiny sa používa ako listový herbicíd so systémovým účinkom. Niektoré sú pôdnymi herbicídmi.
- **Substituované benzonitrily a amidy** - účinné proti jednoklíčnolistovým a dvojklíčnolistovým burinám.
- **Deriváty fenoxycetových kyselín** - systémové herbicídy, ktoré rastlina prijíma listami a koreňmi. V rastlinách sú premiestňované a ničia tak nadzemnú i podzemnú časť burín. V nízkych koncentráciách stimulujú rast rastlín a vo vyšších dávkach brzdia rast tým, že spôsobujú ťažké fyziologické poruchy a narúšajú látkovú premenu. Patria k nim prípravky napr. na báze MCPA.
- **Kvartérne amóniové soli** - pôsobia predovšetkým kontaktne i ako desikanty.
- **Ostatné organické herbicídy** - patria sem rozličné herbicídne látky, ktoré nemožno zaradiť do žiadnej z predchádzajúcich skupín [11].

2.2.4 Legislatíva o využití pesticídov

Štátna rastlinolekárska správa (SRS) v súlade s § 39 odst. 3 zákona č. 326/ 2004 Zb., o rastlinolekárskej starostlivosti a o zmene niektorých súvisiacich zákonov v platnom znení, vydáva Zoznam registrovaných prípravkov na ochranu rastlín. Zoznam informuje

o aktuálnom stave registrovaných prípravkov, ktoré možno uvádzať na trh a používať. Poskytuje len obmedzené informácie o bezpečnom spôsobe zachádzania s nimi. Touto formou je verejnosť oboznámená o prípravkoch na ochranu rastlín, ktoré na základe príslušných rozhodnutí o ich registrácii, sú povolené k uvádzaniu na trh a použitie (§ 31 odst. 1 zákona č. 326/ 2004 Zb., v platnom znení).

Rozhodnutie o registrácii prípravkov na ochranu rastlín je udeľované na základe zhodnotenia SRS (§ 72 zákona č. 326/ 2004 Zb., o rastlinolekárskej starostlivosti, v platnom znení) a na základe posudku Ministerstva zdravotníctva ČR (§ 33 odst. 4 zákona č. 326/ 2004 Zb., v platnom znení). U prípravkov, ktorých platná registrácia skončila, je obecné dovolené, pokiaľ nebolo rozhodnuté inak, spotrebovať ich v súlade s návodom na použitie uvedenom na etikete, po dobu výrobcom garantovanej použiteľnosti.

Užívatelia nesmú použiť prípravky v rozpore s údajmi, ktorými sú označené. Pri aplikácii prípravku nesmie užívateľ prekročiť najvyššiu dávku a krátiť uvedené bezpečnostné lehoty, musí dodržiavať pokyny pre bezpečnosť zdravia ľudí a zvierat, vôd, včiel, zvery, vodných a pôdných organizmov uvedených v návode k použitiu.

Orgány kontrolujúce činnosť užívateľov prípravku, musia posúdiť, či pri používaní prípravku je dodržaný návod a splnenie všetkých podmienok správneho použitia uvedených na obale prípravku alebo v pribalenej dokumentácii.

Pesticídy umožňujú dosiahnuť maximálne poľnohospodárske výnosy a vyhovieť požiadavkám na ochranu rastlín, no niektoré v nich prítomné látky majú súčasne nepriaznivý dopad na imunitný a endokrinný systém a môžu spôsobovať rakovinu. Obzvlášť zraniteľnými skupinami sú staršie osoby, tehotné ženy a malé, ako aj ešte nenarodené deti, či ľudia s oslabenou imunitou. Európsky parlament preto schválil balík legislatívnych správ, ktorých cieľom je regulovať využívanie pesticídov a znížiť ich škodlivý dopad na zdravie človeka a životné prostredie. To všetko pri súčasnom zachovaní konkurencieschopnosti poľnohospodárstva [38,29].

2.2.5 Nariadenie o uvádzaní pesticídov na trh

Nariadenie o uvádzaní pesticídov na trh si kladie za cieľ aktualizovať súčasné európske predpisy v tejto oblasti a prináša podmienku povinného procesu schvaľovania licencií, ktorému budú podliehať nové pesticídy zo strany členských štátov.

Základom sa stane zoznam aktívnych látok (hlavných účinných látok obsiahnutých v pesticídoch), ktorý bude schvaľovaný na úrovni EÚ. Následne na jeho základe budú produkty na ochranu rastlín (pesticídy) schvaľované na národnej úrovni jednotlivých členských krajín. Dôležitú úlohu v tomto procese bude zohrávať Európska agentúra pre bezpečnosť potravín.

Chemické látky majú byť schvaľované na rôzne časové obdobia, v závislosti od ich toxicity. Pokiaľ sa preukáže, že k niektorým výrobkom existujú bezpečnejšie alternatívy, tieto výrobky budú nahradzované. Európsky parlament presadil, aby bola doba nahrádzania skrátená z 5 na 3 roky s cieľom umožniť, čo najrýchlejšie nahradenie nebezpečných výrobkov bezpečnejšími alternatívami.

Členské krajiny budú pesticídy schvaľovať na základe vnútroštátnych postupov, alebo na základe systému povinného vzájomného uznávania. Pre účely posudzovania v rámci tohto nariadenia bude EÚ rozdelená do 3 geografických zón (sever, stred a juh) [29].

2.2.6 Prenikanie, účinky a metabolizmus pesticídov

Do vnútra rastlín zväčša prenikajú iba systémovo pôsobiace pesticídy, kontaktné fungicídy spravidla ostávajú lokalizované iba na povrchu rastlín.

Niekedy pesticídy prenikajú aj z pôdy do rastlín vo forme rezíduí. V tomto prípade má hlavný význam perzistencia, koncentrácia pesticídu a druh pôdy, ktorý má veľký vplyv na odbúravanie rezíduí. Do rastlín v piesočnatých pôdach ľahšie prenikajú pesticídne prípravky pevného skupenstva, kvôli príbuznosti s humusom. Platí však zásada, čím je väčšia vlhkosť pôdy, tým rýchlejšie z nej rastliny prijímajú pesticídy.

Pôsobením rastlinných a mikrobiálnych enzýmov podliehajú účinné látky a ich rezíduá v rastlinách biotransformácii. Vo všeobecnosti sa metabolity v rastlinách málo odlišujú od metabolitov, ktoré vznikajú v telách živočíchov. Odlišnosti majú zväčša kvantitatívny, nie však kvalitatívny charakter. Pri súčasnom množstve využívaných pesticídov sa vynára možné riziko ich vzájomného pôsobenia a interakcie, čo môže mať za následok produkciu zlúčenín s vyššou perzistenciou alebo toxicitou [11].

2.2.7 Zásady pri práci s pesticídmi

- Osoby pracujúce alebo prichádzajúce do styku s pesticídmi musia byť náležito poučené.
- Používať sa môžu iba prípravky, ktoré prešli registráciou podľa platných predpisov a sú uvedené v platnom zozname povolených prípravkov.
- Prípravky musia byť skladované podľa predpisov, aby nedošlo k ich zámene, zneužitiu, znehodnoteniu, alebo k inej manipulácii, ako na určený účel.
- Pred aplikáciou konkrétneho pesticídu je najskôr potrebné sa dokonale oboznámiť s návodom na použitie a postupovať v zmysle návodu a platných metodických príručiek.
- Pri práci používať predpísané ochranné pomôcky.
- Pri práci s pesticídmi je zakázané jesť, piť a fajčiť.
- Pred aplikáciou je potrebné preskúšať funkčnosť mechanizačných prostriedkov (pracovný tlak, dávkovanie a pod.).
- Pri práci dbať na to, aby nedošlo k zasiahnutiu neošetrovaných plôch.
- Po skončení práce s pesticídmi je potrebná dôkladná očista a dodržanie hygienických zásad.
- Mechanizačné prostriedky je potrebné po aplikácii dôkladne vyčistiť a nakonzervovať.
- Zvyšky prípravkov či postrekovej kvapaliny sa likvidujú podľa návodu. Pri zvyškoch zarobenej postrekovej kvapaliny sa vytvorí na suchom mieste ošetrovanej parcely plochá ryha, do ktorej sa prípravok vyleje a zakryje zeminou. Takúto likvidáciu možno aplikovať iba na takých miestach, kde nehrozí kontaminácia podzemných vôd.
- Pri zasiahnutí prípravkom treba podať postihnutému prvú pomoc podľa návodu na etikete prípravku a rýchlo zabezpečiť lekárske ošetrovanie [11].

2.2.8 Pesticídy a ich rezíduá v rastlinných produktoch

Aplikácia pesticídov na kultúrne rastliny sa môže prejaviť nielen hromadením ich rezíduí, ktoré možno zistiť iba analytickými metódami, ale aj zmenou organoleptických vlastností produktov. Hromadenie rezíduí však väčšinou nie je spojené so zmenou organoleptických vlastností, ale ich obsah predovšetkým závisí od typu účinnej látky, dávky, času aplikácie,

doby zberu a spôsoby spracovania. V minulosti patrili k najfrekvencovanejším rezíduám látky zo skupiny chlórovaných uhlíkovodíkov (DDT – dnes už zakázaný).

Znížiť rezíduá možno nasledujúcimi spôsobmi:

- Umývanie surovín – stará, ale často podceňovaná hygienická zásada znižuje hladinu rezíduí v závislosti od ich povrchu. Takýmto spôsobom sa odstraňujú rezíduá prítomné na povrchu, alebo vo voskovej vrstve. To platí najmä pre kontaktné pôsobiace pesticídy, systematicky pôsobiace metabolity nemožno odstrániť týmto spôsobom.
- Šúpanie produktov má obdobný efekt ako umývanie, ale povrchové kontaktné zložky sú takmer úplne odstránené.
- Účinnosť pasterizácie, sterilizácie a sušenia závisí od druhu pesticídu. Vo väčšine prípadov pasterizácia a sterilizácia málo znižujú množstvo rezíduí, ale u niektorých účinných látok môžu naopak podporovať ich degradáciu.
- Skladovanie je z hľadiska zmien obsahu rezíduí preskúmané veľmi málo. Je známe, že pri chemicky stálejších zlúčeninách sa ich obsah podstatne nemení. Ich perzistencia závisí od teploty, doby skladovania, druhu pesticídu a plodiny.
- Konzervovanie minimálne znižuje obsah rezíduí v závislosti od druhu plodiny a pesticídu.
- Tepelné úpravy opäť ovplyvňujú obsah rezíduí v závislosti od druhu plodiny a pesticídu.
- Kvasenie a jeho vplyv na obsah rezíduí závisí od druhu účinnej látky a typu kvasenia. Opačný efekt na kvasenie môžu mať najmä rezíduá fungicídov, ktoré potláčajú rozvoj kvasiniek, čím dochádza k retardácii kvasného procesu. Preto sú pri niektorých pesticídoch používaných na viniči diferencované ochranné lehoty pre hrozno na konzum a kvasenie, predovšetkým pri prípravkoch s výrazným inhibičným účinkom na kvasinky [11].

2.2.9 Maximálne limity rezíduí pesticídov (MLR)

Za posledné roky sa venuje stanoveniu pesticídov v potravinách, a teda aj vo víne zvýšená pozornosť. Nesprávne použitie týchto chemických látok určených na ochranu plodín môže mať za následok prítomnosť ich rezíduí v hrozne, alebo v spracovaných výrobkoch ako je víno a tým ohrozovať bezpečnosť výrobku. Aby sa zabránilo vzniku nežiadúcich účinkov je potrebné dodržiavať správne použitie pesticídov, najmä pokiaľ ide o dávkovanie. Za dodržania podmienok uvádzaných výrobcom sa dosiahne výsledku, kedy výsledná hladina pesticídov vo víne je natoľko nízka, že nedôjde k žiadnym negatívnym zmenám vína či dokonca k ohrozovaniu zdraviu spotrebiteľa [20,21].

V záujme ochrany zdravia spotrebiteľov boli v rôznych krajinách stanovené maximálne limity rezíduí (MLR) v strapcoch na medzinárodnej úrovni *Codex Alimentarius*. Európska únia stanovuje maximálne limity rezíduí (MLR) pre rezíduá pesticídov vyskytujúcich sa v hrozne v rozmedzí 0,001 – 10 mg/kg v závislosti na konkrétnych pesticídoch. Aj krajiny mimo EÚ si majú zakladať vlastné MLR pre hrozno. Avšak MLR nie je uplatnený na spracované výrobky, ako sú mušty alebo vína. Európska únia taktiež navrhuje harmonizovať MLR namiesto národných MLR [21]. Všeobecný prístup prijatý Európskou úniou pre spracovanie potravinárskych komodít je, že maximálne limity rezíduí v surovom tovare (hrozno) sa uplatňujú na spracovanie komodít (napr. víno) s prihliadnutím k zmenám v koncentrácii rezíduí (buď riedenie alebo obohatenie) počas spracovania. V prípade vína,

spravidla koncentrácia rezíduí počas výroby vína klesá, aj keď proces vinifikácie zahŕňa veľa rôznych technológií, ktoré menia koncentrácie rezíduí pesticídov. Nedávne štúdie však ukazujú, že existuje potenciálny problém kontaminácie vína rôznymi pesticídmi. V dôsledku toho, metódy detekcie a kvantifikácie rezíduí pesticídov vo víne, musia byť veľmi citlivé a rovnako aj selektívne [13].

2.3 Stanovenie pesticídov vo víne

Analýza pesticídov v víne je nevyhnutná predovšetkým z hľadiska bezpečnosti a zdravotnej nezávadnosti, keďže tieto látky a ich rezíduá znamenajú pre spotrebiteľa potenciálne riziko.

Monitorovanie nízkych koncentrácií rezíduí pesticídov v matrici si vyžaduje veľmi citlivú a selektívnu metódu. V dôsledku toho sa príprava vzoriek stáva kľúčovým krokom analytického postupu. V posledných rokoch dochádza k rozvoju nových techník prípravy vzorky, ktoré šetria čas, prácu a znižujú spotreby rozpúšťadiel. Vlastná analýza spočíva vo využití chromatografických techník, ako je plynová či vysokoúčinná kvapalinová chromatografia [20,42].

2.3.1 Metódy izolácie rezíduí pesticídov vo víne a čistenie extraktov

Analýzy vzoriek na obsah rezíduí vybraného organického analytu vyžadujú správny výber metódy izolácie analytu z matrice, čistenia surového extraktu matrice a vhodnej metódy na identifikáciu a stanovenie analytu. Spôsob izolácie analytu z matrice a spôsob čistenia surového extraktu závisí od mnohých parametrov, z ktorých najvýznamnejšie sú povaha a obsah analytu v matrici, charakter matrice, medza dôkazu a medza stanovenia použitej analytickej metódy a prítomné koextrakty [17,18].

Izolačné a čistiacie techniky využívané v analýze rezíduí pesticídov a ich degradačných produktov sú extrakčné metódy ako extrakcia nadkritickou kvapalinou (SFE), extrakcia kvapalina-kvapalina, extrakcia tuhú fázou (SPE) a gélová chromatografia (GPC) [16].

2.3.1.1 Extrakcia

Extrakcia je separačná metóda založená na prechode sledovanej zložky z tuhej alebo kvapalnej látky do rozpúšťadla, ktoré nie je miešateľné so vzorkou. Extrakčné metódy sa využívajú na separáciu, zakoncentrovanie alebo vyčistenie požadovanej zložky od nežiadúcich prímiesí. Zložky možno extrahovať z tuhej fázy (extrakcia tuhej fázy kvapalinou) alebo roztoku (extrakcia kvapalina – kvapalina) [31,32].

2.3.1.2 Extrakcia nadkritickou kvapalinou (SFE)

Extrakciu analytu nadkritickou kvapalinou charakterizuje vysoký izolačný a čistiaci efekt. Výhodou tejto metódy je, že nadkritická kvapalina výborne preniká do matrice a tým pozitívne vplýva na selektivitu extrakcie analytu, vysokú čistotu extraktu a na schopnosť účinne izolovať termolabilné analyty z matrice. Technika SFE je vhodná najmä pre izoláciu analytu zo suchej vzorky. Obsah vody vo vzorke vplýva na výťažnosť extrakcie analytu, a preto mokré vzorky musia byť vysušené prídavkom inertného desikantu. Nevýhodou SFE je požiadavka na vysokú čistotu extrakčného média a vysoké vstupné náklady na zariadenie [16].

2.3.1.3 Gélová permeačná chromatografia (GPC)

Najjednoduchší separačný princíp mechanickej separácie na základe rozdielnej veľkosti a tvaru molekúl delenej zložky. Základom metódy je penetrácia separovaných molekúl do kvapalnej fázy, ktorá je v póroch gélu a ich nasledovné vymytie do mobilnej fázy.

Stacionárna fáza je tvorená malými guľovitými časticami, ktoré obsahujú značné množstvo pórov o definovanom priemere. Póry a celý zvyšný priestor medzi časticami je vyplnený mobilnou fázou, ktorej úlohou je transportovanie zložky kolónou. Mechanizmus delenia na géloch je obdobou "molekulárneho sita". Zložky na základe svojho priemeru buď vstupujú do pórov, alebo sa pre svoju veľkosť do pórov nedostanú a postupujú kolónou rovnakou rýchlosťou ako mobilná fáza. Molekuly, ktoré prenikajú do pórov gélu, môžu v závislosti na svojom priemere využívať väčšiu alebo menšiu časť objemu pórov. Najdlhšiu dráhu pri prechode kolónou prekonávajú najmenšie molekuly, a teda sa eluujú s najväčším elučným časom. Najrýchlejšie sa kolónou pohybujú najväčšie molekuly, eluujú sa ako prvé a dochádza u nich k tzv. totálnej exklúzii.

Voľba gélu na analýzu závisí od veľkosti separovaných molekúl a taktiež od ich chemických vlastností. Každý typ gélu je špecifický na separáciu molekúl s určitými molekulovými hmotnosťami.

Gélová chromatografia je bezproblémová, vyhovujúca, mnohostranná a rýchla separačná technika vhodná na čistenie extraktu matrice [19,32].

2.3.1.4 Extrakcia kvapalina – kvapalina

Pri tomto type extrakcie sa zložky z roztoku extrahujú extrahovadlom. Jedná sa o jednoduchú metódu, ktorú možno využiť nielen na analýzu hlavných zložiek, ale aj zložiek, ktoré sú vo vzorke prítomné v stopových koncentráciách. Požadovaná extrakcia sa získa úpravou experimentálnych podmienok pri extrakcii (zmena pH roztoku, výber extrahovadla a iné) [32].

Pokiaľ je afinita rozpúšťadla k jednej zo zložiek v analyzovanej kvapalnej vzorke väčšia, ako afinita vzorky, táto zložka sa ľahko extrahuje. Afinitu možno kvalitatívne posúdiť podľa empirického pravidla: „Podobné sa rozpúšťa v podobnom“. Na extrakciu polárnych zložiek sa teda používajú polárne extrahovadlá a na extrakciu nepolárnych zložiek nepolárne rozpúšťadlá.

Rozpúšťadlá vhodné na extrakciu musia okrem vysokej afinity k separovaným zložkám spĺňať aj schopnosť nezmiešavať sa s analyzovanou vzorkou.

Na extrakciu z kvapaliny do kvapaliny sa najčastejšie používajú oddeľovacie lieviky. Tvar a veľkosť lievika závisí od objemov kvapalných fáz, pričom jeho veľkosť sa volí tak, aby objem oboch kvapalín nepresahoval 70% objemu lievika [31].

2.3.1.5 Extrakcia tuhou fázou (SPE)

Princíp

Extrakcia pevnou fázou (Solid Phase Extraction - SPE) je alternatívou klasickej organickej extrakcie, ktorá predstavuje jeden z novších spôsobov úpravy vzoriek pred nástrekom. Jedná sa o extrakciu žiadanej látky z kvapalnej vzorky, alebo oddelenie látky od rušivej matrice, pričom získaný extrakt má vyššiu čistotu a koncentráciu žiadanej látky. Okrem spracovania kvapalných vzoriek, najmä pre extrakciu stredne prchavých a neprchavých analytov sa SPE metodika môže použiť aj na pevné vzorky, ktoré je nutné previesť do roztoku. Takto získaný extrakt je vhodný pre analýzu chromatografickou technikou.

Extrakcia látok na tuhej fáze sa prevádza organickými rozpúšťadlami s rôznou polaritou, alebo priamo mobilnou fázou. Takto získané extrakty sú prečistené tuhhou fázou, alebo sú priamo použité ako nástrek na analytickú kolónu.

Princíp sorbcie a desorpcie je podobný ako u kvapalinovej chromatografie. Jedná sa o extrakčný postup, v ktorom sa uplatňuje rovnováha medzi tuhhou a kvapalnou fázou. Cieľové analyty aj interferujúce látky v kvapalnej fáze sú zadržiavané na tuhom sorbente, ktorý je uložený v špeciálnych SPE kolónkach alebo diskoch.

K extrakcii tuhým sorbentom možno použiť ako usporiadanie statické aj usporiadanie dynamické. Statické usporiadanie predstavuje miešanie roztoku analytu so sorbentom a následné prefiltrovanie sorbentu. V dynamickom prevedení preteká cez sorpčnú kolónku malých rozmerov roztok vzorky, ktorá obsahuje rádovo miligramy až gramy vhodného sorbentu. Prietok vzorky je umožnený gravitáciou, pozitívnym tlakom (čerpadlo, injekčná striekačka) alebo negatívnym tlakom (prostredníctvom pripojeného vákuu).

Metóda SPE je rýchla, presná, reprodukovateľná a umožňuje súčasné spracovanie 12, 24 a 96 vzoriek. Výhody použitia SPE spočívajú v jednoduchom postupe, dostupnej metóde, nízkej spotrebe rozpúšťadiel, vysoký výťažok, úspora času pri príprave vzorky a zisk eluátu bez emulzií.

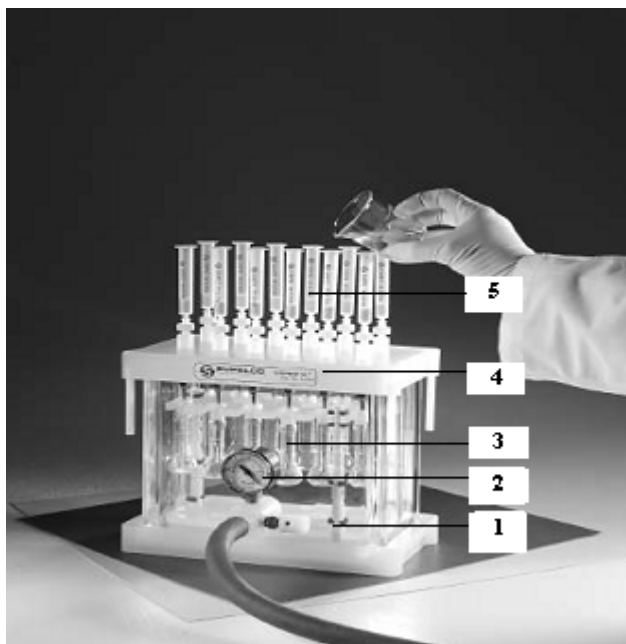
Pri použití SPE metodiky sa dá ľahko vyhnúť problémom, ktoré so sebou prináša iný typ metódy prípravy vzoriek extrakcia kvapalina – kvapalina. V porovnaní s extrakciou kvapalina – kvapalina je SPE účinnejšia, rýchlejšia, môže byť automatizovaná a naviazat' na ďalšie inštrumentálne metódy. Taktiež odpadá vysoká spotreba organických rozpúšťadiel, ktoré sú často zaradované medzi jedovaté látky, látky ničiace ozónovú vrstvu alebo látky inak nebezpečné, odpadá dlhá extrakčná doba a pojem nemiešateľnosť použitých kvapalín, ktorým je limitovaná extrakcia kvapalina – kvapalina [15,30,33,34,39].

Využitie metódy:

- izolácia stopových množstiev
- selektívna prekoncentrácia vzorky
- odstránenie rušivých zložiek matrice
- výmena rozpúšťadla vzorky [34].

Inštrumentácia

Ide o priehľadný a vakuovo pracujúci prístroj vyrobený zo skla, ktorý sa môže použiť na prípravu 12 vzoriek súčasne. Pozostáva z manometra - umiestnený na prednej strane nádoby a slúži k kontrole vákuu, ventilu - individuálne a jednoduché nastavenie rôznych prietokov, sklenená nádoba, stojan a štandardné príslušenstvo vyrobené z inertného a ľahko čistiteľného materiálu (*Obr.1*) [33].



Popis obrázku (Obr.1):

- 1, sklenená nádoba
- 2, manometer na meranie vákua
- 3, zberné nádoby
- 4, viečko so závitovými ventilmi kontrolujúcimi prietok
- 5, SPE kolónky

Obr.1: SPE prístroj [33]

Sorbenty

Voľba správneho sorbentu je najdôležitejším krokom. Na trhu je ich ponuka veľmi široká. Mechanizmus retencie v SPE je rovnaký ako u kvapalinovej chromatografii, a preto aj používané sorbenty (stacionárne fázy) sú veľmi podobné. Sorbent má však väčšiu zrnnosť ako pri kvapalinovej chromatografii, takže je možné pracovať pri nízkom podtlaku, či pretlaku.

Použitie pevnej fázy ako predseparácie extraktu má dve výhody – možnosť zbaviť extrakt nežiadúcich látok, ktoré by mohli narušiť stanovenia danej látky (matrix efekt), alebo látok s veľkým retenčným objemom a týmto je možné extrakt ďalej zakoncentrovať.

Pri separácii sa využívajú rôzne mechanizmy zachytávania látok, ktoré spočívajú v odlišných molekulárnych interakciách medzi analytom a povrchom stacionárnej fázy. Medzi bežne uplatňované interakcie patria Van der Waalsove sily (hydrofóbne, „nepolárne“), vodíkové väzby a dipól-dipólové interakcie („polárne“) a kation-anionové interakcie (iontové interakcie). Každý sorbent poskytuje špecifickú zmes týchto vlastností.

Používajú sa klasické sorbenty s fázami od úplne nepolárnych typov ako sú C8, C18 až po

- sorbenty vysoko polárne
- sorbenty ionexového typu
- sorbenty špecifického polymérneho typu
- špeciálne sorbenty pre analýzu drog a liečiv.

Sorbent so stacionárnou fázou je umiestnený v kolónkach z polypropylénu alebo zo skla (Obr.2) nad fritou, alebo sklenenou vatou, alebo je zlisovaný so sklenenými vláknami do diskov. (Obr.3).



Obr.2: SPE kolónky [33]



Obr.3: SPE disky [33]

Kolónky – jednorazový spotrebný materiál v tvare injekčnej striekačky bez pohyblivého piestu, plnené modifikovanými sorbentami s rôznou veľkosťou častíc. Rozdeľujú sa podľa typu stacionárnej fázy, objemu (zvyčajne 1 – 10 ml), kapacity sorbentu, max. prietokovej rýchlosti, min. elučného objemu a materiálu (sklo, PP).

Extrakčné disky - moderná forma SPE, ktorá predstavuje kompozitné tenké membrány z teflónu a príslušného modifikovaného sorbentu (90 hmot.%). Veľká hustota disku umožňuje použitie vákua. Membrány sú umiestnené v SPE kolónkach s predradeným sedem vrstvovým filtrom. Výhodou diskov je neobmedzená prietoková rýchlosť, zakoncentrovanie vzorky vo veľmi úzkej zóne membrány a k eluácii stačí rádovo 1 μ l rozpúšťadla, čím odpadá odparovanie nadbytočného rozpúšťadla pred chromatografickou analýzou.

Súčasným použitím niekoľkých (desiatok) SPE kolóniek, alebo diskov sa skracaie čas potrebný na prípravu vzoriek [15,33,34].

Výber vhodného SPE sorbentu

Pred výberom vhodného sorbentu je potrebné získať čo najviac informácií o vzorke, teda zvážiť vlastnosti matrice a analytu a na základe týchto znalostí následne zvoliť typ fázy a veľkosť kolónky [33].

Špeciálne sorbenty

Do tejto skupiny sorbentov nezaraďujeme fázy založené na silikagélu, ale využívajú sa iné typy báz ako napr. aluminy (oxid hlinitý). Pri extrakcii látok na alumine môžu nastať tri príklady. Prvý súvisí s hliníkovým atómom, ktorý sa môže uplatniť ako centrálny atóm vznikajúceho komplexu, druhým je možnosť tvorby vodíkovej väzby s hydroxylovou skupinou, ktorá sa vďaka vlhkosti nachádza na povrchu častíc aluminy a poslednou možnosťou je iónovo – výmenná reakcia. Povrch aluminu je vopred upravovaný alkalickými, bazickými či neutrálnymi roztokmi.

Ďalším príkladom špeciálneho sorbentu je aj gél oxidu horečnatého a kremičitého tzv. Florisil® [15].

Nepolárne viazané fázy

Vyznačujú sa hydrofóbnymi vlastnosťami. Využívajú sa na extrakciu stredne polárnych až nepolárnych zlúčenín. Selektivita pre bazické zlúčeniny sa zvýši, ak sa u neuzavretých sorbentoch uplatnia silanolové skupiny.

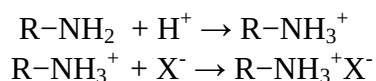
Tab.1: Nepolárne sorbenty [15]

Označenie	Funkčná skupina	- R
C18	oktadecyl	-C ₁₈ H ₃₇
C8	oktyl	-C ₈ H ₁₇
C2	ethyl	-C ₂ H ₅
CH	cyklohexyl	
PH	fenyl	
CN	kyanopropyl	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CN

Polárne viazané fázy

Vyznačujú sa selektivitou pre polárne zlúčeniny. Používané polárne sorbenty sú uvedené v Tab.2. V prípade silanolu a aminopropylu ako funkčných skupín sa sekundárne uplatňuje iónová výmena, pretože silanolová skupina je slabokyslá a vymieňa kationy, aminopropylová skupina je slabozásaditá a teda vymieňa anióny. Kolónky s aktívnymi silanolovými skupinami sa musia uchovávať v suchom prostredí nakoľko ochotne zachycujú vzdušnú vlhkosť.

Aminopropyl zachytáva z nepolárnych rozpúšťadiel molekuly obsahujúce -OH, -NH₂, alebo -SH skupiny. Spomínaná iónová výmena môže prebehnúť vo vodnom roztoku pri pH = 7,8 až nižšom, pretože dochádza k hydronizácii aminoskupiny a tým dochádza k púťaniu aniónov:



Kyanopropylové skupiny zachytávajú polárne aj nepolárne rozpúšťadlá, ktoré môžu extrahovať z vodných roztokov. Polárne molekuly môžu byť zachycované aj z menej polárnych rozpúšťadiel prostredníctvom dipól – dipólovej interakcie medzi kyanoskupinou a polárnou skupinou analytu. Rovnako aj pomocou (2,3 – dihydroxypropoxy)propylvej skupiny možno zachytávať polárne a nepolárne molekuly, no najčastejšie sa využívajú pri extrakcii polárnych molekúl z relatívne nepolárnych rozpúšťadiel za tvorby vodíkových väzieb.

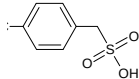
Tab.2: Polárne sorbenty [15]

Označenie	Funkčná skupina	- R
Silica	silanol	-OH
NH ₂	aminopropyl	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂
DIOL	3-(2,3-dihydroxypropoxy)propyl	-(CH ₂) ₃ OCH ₂ CH(OH)CH ₂ (OH)
CN	kyanopropyl	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CN

Iónovo – výmenné viazané fázy

Do tohto typu fázy patria aj aminopropylové skupiny, ktoré sú už uvádzané v polárnych sorbentoch. Silným iónomeničom je trimethylamoniumpropyl – chloridová fáza, ktorá z vodných alebo nevodných roztokov vymieňa anión náhradou za svoj chloridový anión. Na výmenu kationov sú silnými iónomeničmi benzénsulfonová a propánsulfonová kyselina, pričom benzénsulfonová kyselina sekundárne vykazuje aj silné nepolárne interakcie. Slabým iónomeničom typu katex je karboxypropylová skupina, ktorá sa využíva k extrakcii alkalických zlúčenín z roztoku o pH = 6,8 a vyššom, kedy karboxy skupina disociuje. Všetky sú uvedené v Tab.3.

Tab.3: Iónovo - výmenné sorbenty [15]

Označenie	Funkčná skupina	- R
NH ₂	aminopropyl	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂
SAX	trimethylamoniumpropyl (kvartérny amín)	-(CH ₂) ₃ N ⁺ (CH ₃) ₃ Cl ⁻
CBA	karboxypropyl	-(CH ₂) ₃ COOH
SCX	benzénsulfonová kyselina (4 – sulfofenyl)	
PRS	propánsulfonová kyselina (3 – sulfopropyl)	-(CH ₂) ₃ SO ₃ H

Funkcie kolónky pre SPE

Skoncentrovanie analytu

Zväčša nie je problém zvýšiť koncentráciu analytu o niekoľko rádov. Vhodné pre záchyt nepolárnych a málo polárnych látok z vodných roztokov na hydrofóbnom sorbente.

Čistenie vzoriek

Použitím hydrofóbných sorbentov sa dosahuje iba čiastočné vyčistenie, preto je výhodnejšie používať iónomeničové sorbenty, ktorými sú zabezpečené lepšie výsledky.

Uchovávanie vzoriek

Vhodné pre odber vzoriek z terénu, keď sa znižuje hmotnosť materiálu transportovaného do laboratória. Zväčša dochádza k zníženiu biologického nebezpečenstva, alebo je zabránené inej degradácii vzorky.

Predkolónka

V „on-line“ zapojení chráni drahú analytickú kolónku pred kontamináciou.

Derivatizácia vzorky

Impregnovaný sorbent môže slúžiť ako nosič derivatizačného činidla [39].

Výber vhodnej SPE kolónky

Typ fázy a veľkosť kolónky sa vyberá na základe vlastností analytu a matrice.

Výber množstva sorbentu:

Množstvo sorbentu, ktoré je potrebné použiť sa riadi pomerne jednoduchými pravidlami:

- a) obrátené a normálne fázy, adsorbenty – obsah zachytených analytov, by nemal byť väčší ako 5 % hmotnosti sorbentu
- b) iónomeniče – treba počítať s iónovo – výmennou kapacitou sorbentu [34].

Tab.4: Voľba veľkosti kolónky a priemeru disku [34]

Množstvo vzorky	Veľkosť kolónky/ d disku	Množstvo sorbentu
< 1ml	1 ml	50 mg / 100 mg
1 ml – 250 ml, pomalá rýchlosť extrakcie	3 ml	500 mg
1 ml – 250 ml, rýchle extrakcie	6, 8 ml	500 mg
10 ml – 250 ml, veľká kapacita sorbentu	6, 8, 15, 19, 45 ml	1,2,10 g
< 1 l	6, 8, 19, 45, 70 ml	1,2,10 g
100 ml – 1 l	47 mm disk	-
> 1 l, veľká kapacita sorbentu	90 mm disk	-

Postup SPE

Úspešnosť SPE kolóniek závisí na dôkladnom prevedení všetkých krokov extrakcie. Základným cieľom predúpravy vzorky je vytvoriť také chemické zloženie, ktoré podporuje retenciu analytov na vybranej extrakčnej kolónke. Pred samotnou SPE sa vzorka fyzikálne a chemicky upravuje. Pod chemickou prípravou vzorky sa rozumie napr. pridanie pufru, alebo zmena pH vzorky. V prípade pevných vzoriek je nutné previesť vzorku do kvapalnej fázy, pretože extrakcia tuhou fázou účinne pracuje len u kvapalných vzoriek. Tuhé vzorky musia byť zhomogenizované, extrahované do rozpúšťadla, prefiltrované, alebo scentrifugované. Niektoré kvapalné vzorky je vhodné pred aplikáciou na SPE kolónkach prefiltrovať.

Počas extrakcie tuhou fázou nesmie vzorka ani rozpúšťadlo prechádzať kolónkou príliš rýchlo, najmä nie u iónovo - výmenných extrakcií. V prípade, že vzorka obsahuje častice, na ktoré by sa mohli adsorbovať analyty, je nevyhnuté tieto častice najskôr odstrániť (napr. filtráciou). Pokiaľ sú analyty vo vzorke viazané na veľké molekuly, pre dosiahnutie vysokej účinnosti extrakcie, musí dôjsť k porušeniu tejto väzby.

Typický SPE postup pozostáva zo 4 krokov:

- 1) Zmäčanie (kondicionovanie) SPE kolónky a zrovnováženie (ekvilibrácia)
- 2) Aplikácia vzorky na SPE kolónku
- 3) Premytie kolónky (eluácia interferujúcich látok)
- 4) Vymývanie analytov z SPE kolónky

1, Kondicionovanie SPE kolónky a ekvilibrácia

Ak má byť sorbent v SPE kolónke účinný a zadržiavať analyty, je nevyhnutné najskôr kolónku zmäčať a vytvoriť tak na pevnej fáze vrstvičku kvapaliny. Tento solvatačný proces je zvyčajne prvým krokom extrakcie a zahŕňa premytie kolónky metanolom, acetonitrilom alebo inými organickými rozpúšťadlami. Tieto rozpúšťadlá zabezpečujú solvatáciu sorbentu, a tým aj interakciu s maticou vzorky.

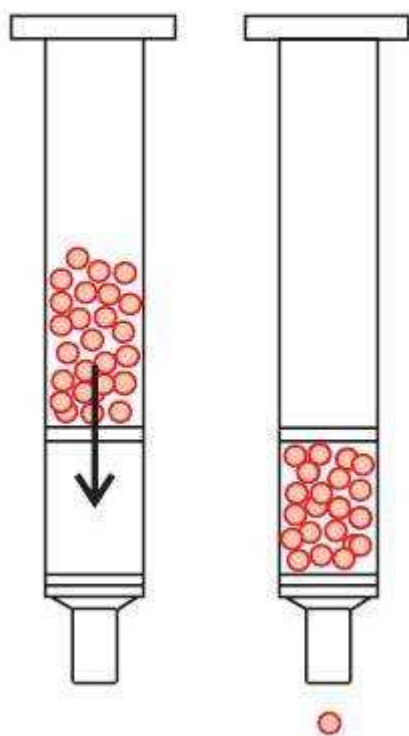
Ekvilibrácia prebieha pomocou rozpúšťadla, ktoré je svojou chemickou povahou vhodné pre danú vzorku. Pokiaľ je extrakt vzorky v organickom rozpúšťadle, môže byť kolónka

uvodená do rovnováhy rovnakým organickým rozpúšťadlom. Zrovnováženie môže zvyšovať retenciu analytov. Typický objem na ekvilibráciu je 2-3 ml vhodného rozpúšťadla na 100 mg sorbentu (Obr.4).

2, Aplikácia vzorky na kolónku

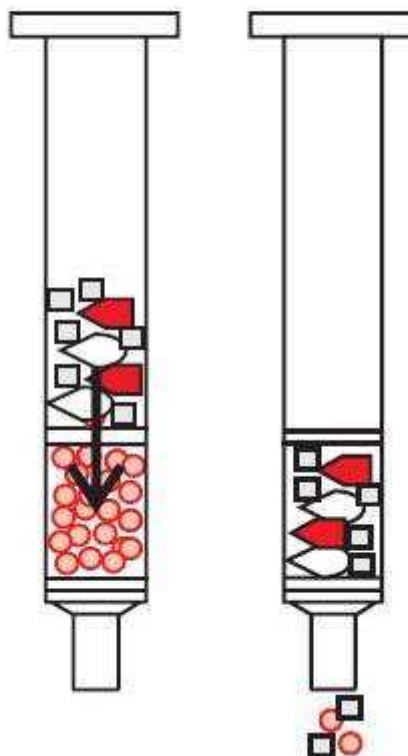
Roztok vzorky je za pôsobenia vákua či tlaku nútený prechádzať cez kondiciovanú extrakčnú kolónu. Príliš rýchly prietok vzorky kolónkou môže mať za následok zníženie výťažnosti, a preto je nevyhnutné zachovať dostatočne dlhú dobu kontaktu vzorky so sorbentom. V ideálnom prípade všetky matricové komponenty prejdú do odpadu, a teda sa neadsorbujú na sorbente (Obr.5).

Kondicionovanie SPE kolónky



Obr.4: Schéma kroku 1 [35]

Pridavok vzorky



Obr.5: Schéma kroku 2 [35]

3, Premýtie SPE kolónky

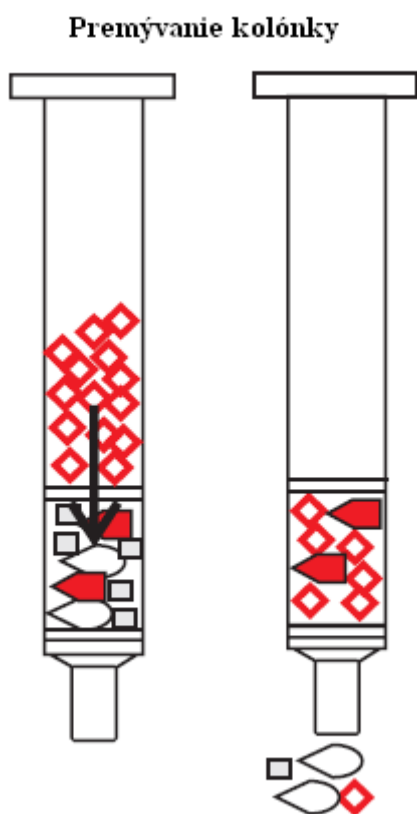
Po aplikácii vzorky musí byť kolónka premytá rozpúšťadlom. Cieľom tohto kroku je selektívne eluovanie nežiadúcich zlúčenín zo sorbentu tak, aby neboli vyplavované sledované analyty. Pre tento účel sú najvhodnejšie také rozpúšťadlá, v ktorých nie sú analyty rozpustné. Dôležitou súčasťou premytia kolónky je kontrola prietoku, pretože príliš vysoký prietok môže zapríčiniť, že výsledný extrakt nebude dosahovať požadovanú čistotu (Obr.6).

4, Vymývanie analytov z SPE kolónky

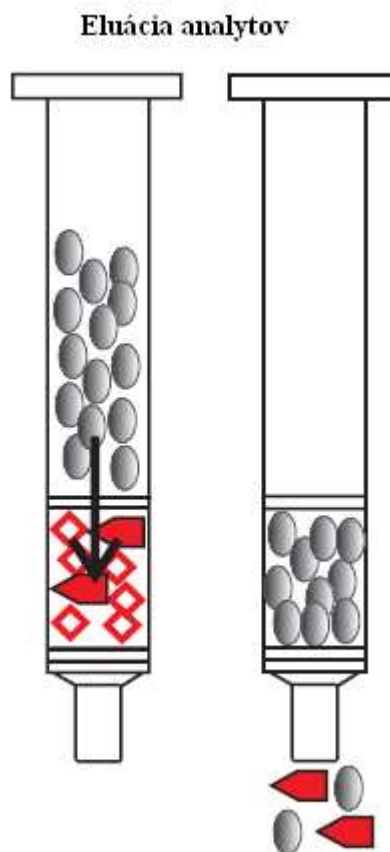
Eluácia analytov za použitia vhodného rozpúšťadla do zbernej nádoby je posledným krokom SPE. Požiadavkám na elučné rozpúšťadlo môže zodpovedať viacero rozpúšťadiel. Výber vhodného rozpúšťadla je ovplyvnený jeho odpariteľnosťou a konečnou analytickou

technikou. Rovnako ako v predchádzajúcom kroku je dôležitá kontrola prietoku, nakoľko príliš vysoký prietok má za následok zníženú výťažnosť analytov.

Po extrakcii na tuhú fázu je stanovovaný analyt v roztoku, obsahuje minimum interferujúcich látok a je v dostatočnej koncentrácii (Obr.7) [33,36].



Obr.6: Schéma kroku 3 [35]



Obr.7: Schéma kroku 4 [35]

2.3.2 Chromatografické stanovenia pesticídov

Chromatografia sa radí medzi významné separačné metódy, ktoré našli uplatnenie vo všetkých vedeckých odvetviach. Využíva sa na separáciu jednej alebo viacerých zložiek zo zmesi, čistenie látok od rôznych prímiesí, rozdelenie zmesi na chemicky čisté látky a ich identifikáciu.

Spoločným znakom všetkých chromatografických metód je kontinuálna separácia zložiek medzi nepohyblivú – stacionárnu fázu a pohyblivú – mobilnú fázu. Stacionárna fáza môže byť kvapalina alebo tuhá látka a mobilnou fázou kvapalina alebo plyn. Separácia vzorky je dosiahnutá pohybom jednotlivých zložiek chromatografickým systémom rôznymi rýchlosťami, ktoré závisia od interakcií zložiek s mobilnou a stacionárnou fázou. Prienik zložiek chromatografickým systémom je sprostredkovaný mobilnou fázou. Zložka, ktorej interakcie so stacionárnou fázou sú najsilnejšie, bude najdlhšie zdržovaná v stacionárnej fáze, a preto bude prechádzať systémom pomalšie ako zložky, ktoré sa prednostne zdržujú v mobilnej fáze [15,31].

Rozdelenie chromatografických metód

- podľa skupenstva mobilnej fázy
 - *Plynová chromatografia (GC)* – mobilná fáza je plyn
 - *Kvapalinová chromatografia (LC)* – mobilná fáza je kvapalina
- podľa usporiadania stacionárnej fázy
 - *Kolónová chromatografia* – stacionárna fáza je umiestnená v trubici
 - Plošné techniky:
 - Papierová chromatografia (PC)* – stacionárna fáza je súčasťou chromatografického papiera
 - Tenkovrstvá chromatografia (TLC)* – stacionárna vrstva je umiestnená na pevnom plochom podklade
- podľa povahy deja, ktorý prevláda pri separácií
 - *Rozdeľovacia chromatografia* – o separácií rozhoduje odlišná rozpustnosť zložiek vzorky v stacionárnej fázy (kvapalina) a mobilnej (kvapalina alebo plyn)
 - *Adsorpčná chromatografia* – o separácií rozhoduje rôzna schopnosť zložiek pútať sa na povrch stacionárnej fázy (tuhá látka)
 - *Iónovo-výmenná chromatografia* – o separácií rozhodujú rôzne veľké elektrostatické príťažlivé sily medzi funkčnými skupinami stacionárnej fázy a iónmi vzorky
 - *Gélová chromatografia* – zložky sa separujú podľa veľkosti na pórovitej stacionárnej fáze (gélu), menšie molekuly vzorky sa v gély zdržiavajú dlhšie
 - *Afinitná chromatografia* – stacionárna fáza je schopná viazať zo vzorky práve tie zložky, ku ktorým má úzky selektívny vzťah [15,31].

2.3.3 Plynová chromatografia (GC)

Princípom tejto separačnej metódy je rovnovážna distribúcia zložiek medzi dve fázy: mobilnú fázu - plyn a stacionárnu – kvapalina alebo tuhá látka. K separácii zložiek dochádza vždy v plynnej fáze. Pokiaľ dochádza k stanoveniu zložiek zmesi metódou plynovej chromatografie, musia byť jednotlivé zložky vyparené definovaným spôsobom. Podmienkou je, aby sa látky pri vyparovaní nerozkladali. GC je vhodná aj pre stanovenie anorganických látok, ktoré spĺňajú podmienku prchavosti. V niektorých prípadoch môže dochádzať aj k analýze neprchavých zlúčenín, ale až po ich prevedení na prchavejšie deriváty.

Podľa typu stacionárnej fázy použitej v GC rozlišujeme plynovú adsorpčnú chromatografiu (GSC) – adsorpcia zložky z plynnej fázy na povrch tuhého adsorbentu a plynovú rozdeľovaciu chromatografiu (GLC) – distribúcia zložky medzi mobilnou (plyn) a stacionárnou fázou (kvapalina) [19].

2.3.3.1 Princíp GC

Podmienkou pre separáciu zložiek zmesi pomocou plynovej chromatografie je, že analyzovaná zmes musí byť plynná, alebo ľahko odpariteľná kvapalná (teplota varu do 300 °C). Vzorka sa dávkuje do prúdu plynu, ktorý ju ďalej unáša kolónou. Mobilná fáza sa preto nazýva aj nosný plyn. Na to, aby mohla byť vzorka transportovaná, sa musí okamžite premeniť na plyn. V kolóne potom dochádza k separácii zložiek na základe rôznej schopnosti pútať sa na stacionárnu fázu. Stacionárnou fázou je buď kvapalina alebo povrchovo aktívny

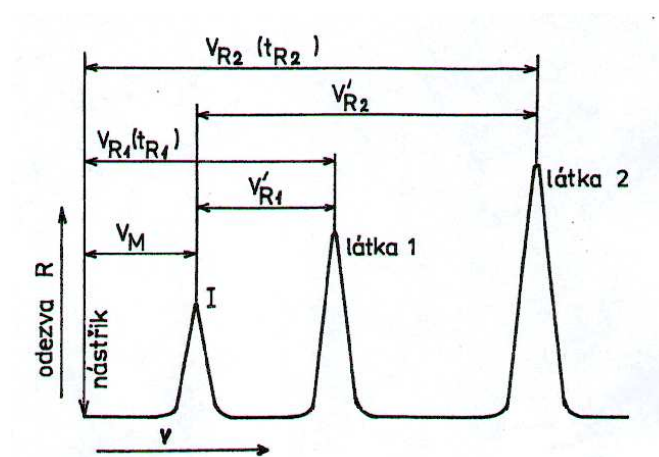
adsorbent, podľa čoho potom rozlišujeme chromatografiu plyn – kvapalina a plyn – pevná látka. Zložky opúšťajúce kolónu indikuje detektor. Nakoniec sa vyhodnocuje signál z detektoru a z intenzity píku sa určí druh a kvantitatívne zastúpenie zložiek.

Z dôvodu nutnosti premeny analytov na plyn možno v plyne separovať také látky, ktoré majú relatívnu molekulovú hmotnosť menšiu ako 1000, sú tepelne stabilné a majú dostatočný tlak sýtej pary [15].

2.3.3.2 Kvalitatívne veličiny v plynovej chromatografii

Chromatogram je záznam vychádzajúci z detektoru predstavujúci závislosť odozvy detektoru I na čase $I = (t)$. Každá látka v tomto zázname sa prejaví ako pík, teda lokálne maximum. Čas v ktorom sa získa maximum píku danej látky je nezávislý na látkovom množstve a teda charakterizuje látku kvalitatívne.

Vzorový chromatogram



Obr.8: Ukážka chromatogramu delenia dvojzložkovej zmesi [22]

Retenčný čas – doba, ktorá uplynie od nadávkovania vzorky až po objavení píku na chromatograme. Vyjadruje ho vzťah (1):

$$t_R = t_M + t_{R'} \quad (1)$$

kde t_R je retenčný čas, t_M – mŕtvy retenčný čas a $t_{R'}$ - redukovaný retenčný čas.

Mŕtvy retenčný čas - retenčný čas analyzovanej látky, ktorá sa vôbec nezachycuje na stacionárne fázy a teda prechádza kolónou rovnakou rýchlosťou ako mobilná fáza.

Redukovaný retenčný čas – doba, ktorú príslušná vzorka strávi v stacionárnej fáze.

Poloha píku v chromatograme (retenčný čas analyzovanej látky) závisí na kvalitatívnych vlastnostiach analyzovanej látky. Plocha píku nesie informácie o kvantitatívnych vlastnostiach.

Retenčný faktor - vyjadruje mieru interakcie analytu s materiálom kolóny (2):

$$k = \frac{t_R + t_M}{t_M} \quad (2)$$

Miera účinnosti separačnej kolóny – vyjadruje počet teoretických poschodí (3):

$$n = 5,545 \cdot \left[\frac{t_R}{w_{1/2}} \right]^2 \quad (3)$$

Výškový ekvivalent teoretického poschodia – možno ho vypočítať pomocou retenčného času, platí : čím menší, tým lepší (4):

$$H = \frac{L}{n} \quad (4)$$

kde **L** je celková dĺžka separačnej kolóny, **n** je počet teoretických poschodí

w_{1/2} - šírka píku v polovici jeho výšky

R₁, R₂ - rozlíšenie dvoch píkov je mierou vzájomnej separácie dvoch analytov (5):

$$R_{1,2} = \frac{2 \cdot (t_{R,2} - t_{R,1})}{w_1 + w_2} \quad (5)$$

A - plocha symetrického Gaussovského píku (6):

$$A = 1,064h \cdot w_{1,2} \quad (6)$$

Závislosť výšky poschodia **H** na rýchlosti nosného plynu **u** vyjadruje teoria formulovaná van Deemterom (7):

$$H = A + B/u + Cu \quad (7)$$

Kde **A**, **B**, **C** sú konštanty pre určitý chromatografický systém a **u** je priemerná lineárna rýchlosť plynu v kolóne [19,22].

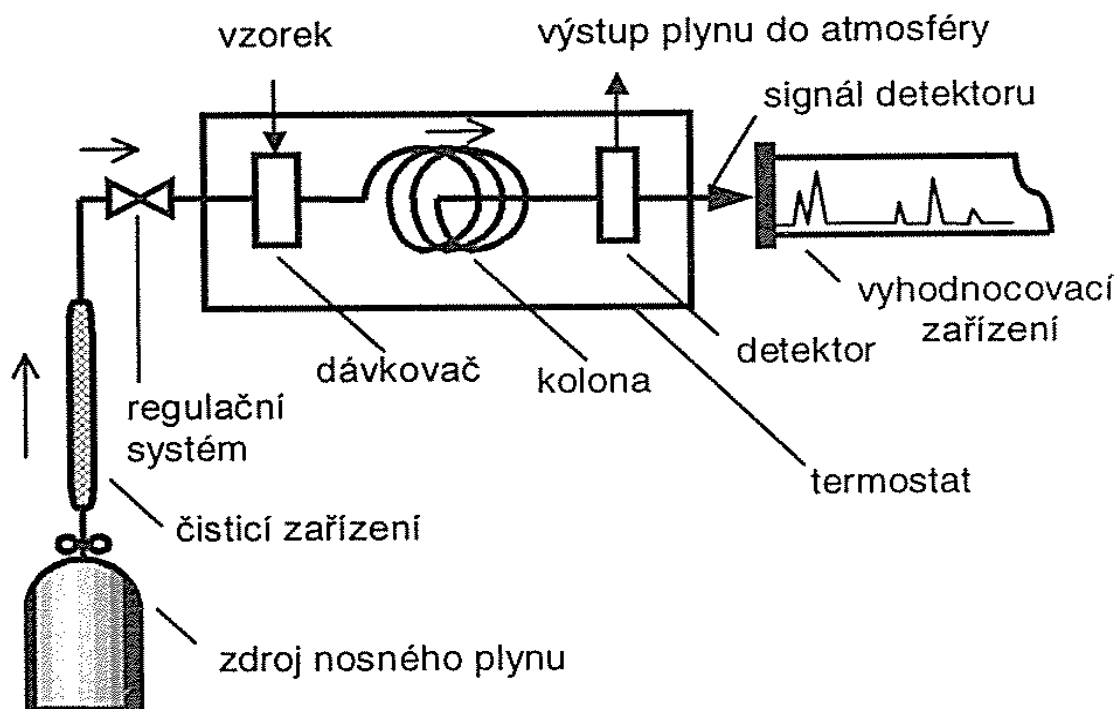
2.3.3.3 Kvantitatívne veličiny v plynovej chromatografii

S kvantitou danej látky úzko súvisí plocha píku. Väčšie množstvo analytu v danom čase poskytuje väčší signál. Súčet signálu na kontinuum času musí byť úmerné množstvu danej látky vo vzorke. Súčet signálu cez časové kontinuum predstavuje integrál odozvy detektoru cez čas. $A = \int I(t) dt$ – kde medze integrálu vymedzujú dobu, kedy bola daná látka vymývaná, teda od doby a do doby b [15,22].

2.3.3.4 Inštrumentácia v plynovej chromatografii

Plynový chromatograf je schematicky zobrazený na Obr.9 a pozostáva z týchto základných častí: zdroj nosného plynu, zariadenie pre reguláciu a meranie prietoku nosného plynu, nástreková komôrka, chromatografická kolóna, termostat, detektor a zariadenie pre zosilnenie signálu, záznam a vyhodnotenie signálu detektoru [19].

Plynový chromatograf



Obr.9: Schéma plynového chromatografu [15]

Ako **zdroj nosného plynu** slúži tlaková fľaša plnená peramentným plynom - vodíkom, dusíkom, héliom alebo argónom. Úloha nosného plynu je pomerne jednoduchá. Nosný plyn unáša kolónou vzorku a musí sa správať voči jej zložkám inertne. Nosný plyn má byť vysokej čistoty, bez vlhkosti a neobsahovať kyslík. Preto sa do potrubia nosného plynu zavádzajú sušičky a absorbéry kyslíku. Prietok nosného plynu sa reguluje jemnými ihlovými ventilmi a tlak plynu sa meria pomocou manometru alebo tenzometrickým čidlom. Občas sa prevádza presné meranie prietoku plynu pomocou bublinkového prietokometru, ktorý sa umiestňuje za detektor.

Čistiace zariadenie - zachycuje vlhkosť, nečistoty, zbavuje nosný plyn nežiaducich stop ostatných plynov. Odstraňuje stopy reaktívneho kyslíku, ktorý nevratne poškodzuje stacionárnu fázu.

Regulačný systém - zaisťuje stály alebo programovo sa meniaci prietok nosného plynu. Pri zmenách teploty počas separácie je možné elektronickou reguláciou docieľiť stanoveného prietoku.

Nástreková komôrka (dávkořač) slúži k zavedeniu vzorky do prúdu nosného plynu, dávkovanie musí byť rýchle, vzorka v roztoku sa musí okamžite odpariť. Nástreková komôrka je pripojená k vstupu chromatografickej kolóny.

Má vlastné regulované kúrenie (cca 350 °C) a je preplachovaná nosným plynom. Komôrku z vrchu uzatvára septum zo špeciálnej pryže, ktoré odoláva vysokým teplotám. Kvapalné vzorky sa dávkujú do mikrostriekačiek a po prepichnutí septa sa nástrekne objem vzorky (0,1 – 5 µl), ktorý je okamžite odparený v nástrekovej komôrke. Teplota komôrky má byť vyššia než je teplota varu najmenej prchavej zložky vzorky. Následne sú pary vzorky unášané nosným plynom do kolóny.

Kolóna – umiestnená v peci, ktorej súčasťou je stacionárna fáza. Dochádza tam k separácii zložiek. Kolóny menšieho vnútorného priemeru poskytujú vyššiu účinnosť separácie, naopak

kolóny väčšieho priemeru majú vyššiu kapacitu, teda sú schopné separovať väčšie množstvo vzorky.

Detektor - slúži k detekcii látok v nosnom plyne, signalizuje ich prítomnosť.

Vyhodnocovacie zariadenie - spracúva signál z detektoru, zakresľuje chromatografickú krivku (chromatogram) a vyhodnocuje ju.

Termostat - zaisťuje dostatočne vysokú teplotu dávkovača, kolóny a detektoru, aby bola vzorka udržiavaná v plynnom stave. Teplotu možno programovo meniť. Na termostaty sa kladú veľké nároky. Aby bolo možné reprodukovat' elučné charakteristiky, je potrebné udržiavať teplotu v termostate na určitom intervale. Spoločnou črtou všetkých termostatov je regulovaný prítok tepla do okolia chromatografických kolón [15,19,32].

2.3.3.5 Nosný plyn

Mobilná fáza v plynovej chromatografii je označovaná ako nosný plyn, ktorého úloha je pomerne jednoduchá. Nosný plyn zabezpečuje transportovanie zložiek cez kolónu, pričom sám sa nezúčastňuje separačného procesu. Najčastejšie využívané mobilné fázy sú permanentné plyny ako hélium, dusík, vodík, argón a výnimočne aj iné. Možno predpokladať, že sa tieto plyny v kvapalnej stacionárnej fáze takmer nerozpúšťajú. Nosný plyn musí byť zbavený vodných pár, prípadne iných nečistôt. Na jeho sušenie sa najčastejšie využíva silikagél a vhodné molekulové sitá. Od prietoku nosného plynu závisí chromatografická analýza, a preto je potrebné zabezpečiť jeho konštantnosť. Vo väčšine komerčných chromatografov sú zabudované ihlové ventily, respektíve manostaty s ihlovými ventilmi. Prietok nosného plynu je meraný rotametrami, alebo bublinkovými prietokomerami.

Nosný plyn, má však jednu vlastnosť, ktorá môže do určitej miery ovplyvniť separačný proces a výpočty základných parametrov v GC. Jedná sa o stlačiteľnosť plynov. K tomu, aby plyn prúdil kolónou, ktorá predstavuje určitý odpor, je potrebné, aby tlak na začiatku kolóny bol vyšší ako na jej konci. Pri vyššom tlaku sa znižuje objem plynu. Pokiaľ má chromatografická kolóna, ktorou prechádza nosný plyn rovnaký priemer, je na začiatku kolóny menšia lineárna rýchlosť plynu, než v mieste odkiaľ vychádza plyn z kolóny. Túto skutočnosť vystihuje modifikovaný Boylov zákon (8):

$$p_i u_i = p_0 u_0 \quad (8)$$

kde p_i a p_0 sú tlaky na vstupe a výstupe chromatografickej kolóny, u_i a u_0 sú odpovedajúce lineárne rýchlosti.

Premenlivé hodnoty tlaku v chromatografickej kolóne spôsobujú, že nie je možné jednoducho spočítať objemový prietok a elučný objem. Možno však zmerať retenčný čas zložky $t_{R,A}$, objemový prietok na výstupe z kolóny F_m a vstupný tlak p_i . Výstupný tlak p_0 je spravidla totožný s atmosferickým tlakom. Bez korekcie na tlak je možné vypočítať redukovaný retenčný objem (9):

$$V_{R',A} = (t_{R,A} + t_M) F_m \quad (9)$$

kde t_M je retenčný čas nezadržovanej zložky.

Pri bežných výpočtoch možno počítať s priemernou lineárnou rýchlosťou nosného plynu aj s jeho priemernou objemovou rýchlosťou. K korekcii sa používa kompresibilitný faktor j vypočítaný zo vstupného a výstupného tlaku (10):

$$j = \frac{3(p_i / p_0)^2 - 1}{2(p_i / p_0)^3 - 1} \quad (10)$$

Pomocou kompresibilitného faktoru j sa v GC koriguje vplyv tlakového spádu v kolóne a aj hodnota redukovaného retenčného objemu. Získa sa tak čistý retenčný objem (11):

$$V_{N,A} = jV_{R',A} \quad (11)$$

Čistý elučný objem $V_{N,A}$ treba používať s určitou rezervou, pretože objemový prietok F_m sa meria za kolónou pri teplote okolia, pričom samotná kolóna pracuje pri značne vyšších teplotách. Rovnako dôležité je aj správne určenie mŕtveho retenčného času t_M [19,32].

2.3.3.6 Kolóny

Najdôležitejšou časťou chromatografického zariadenia, v ktorej sa nachádza stacionárna fáza. Od jej vlastností najčastejšie závisí úspech analýzy. V plynovej chromatografii sa využívajú dva typy kolón: *náplňové* a *kapilárne*.

Náplňové kolóny sú trubice zo skla či nerezovej ocele naplnené granulovaným materiálom. Vzhľadom k vyššej účinnosti sa častejšie využívajú kapilárne kolóny.

Kapilárne kolóny sú otvorené kapiláry, kde funkciu nosiča zastávajú vnútorné steny kapilár, ktoré sú pokryté stacionárnou kvapalnou fázou. Naleptaním vnútorných stien možno dosiahnuť zvýšenie obsahu stacionárnej fázy a na takto upravenú kolónu dávkovať väčšie množstvo vzorky. Tieto typy kolón sa najčastejšie zhotovujú z taveného kremeňa, ktorých povrch je potiahnutý polyimidovou vrstvičkou. Táto vrstvička zabezpečuje pružnosť kolóny. Menej časté je zhotovenie kolón zo skla, ktorých nevýhodou je krehkosť. Kapilárne kolóny bývajú dlhšie než náplňové, v rozmedzí do 10 – 200 m s vnútorným priemerom 50 μm – 1 mm.

Podľa spôsobu uloženia stacionárnej fázy rozlišujeme tri typy kapilárnych kolón: *WCOT*, *PLOT* a *SCOT*.

WCOT (Wall Coated Open Tubular) – kolóna s tenkým filmom stacionárnej fázy priamo nanesej na vnútornej stene kolóny (hrúbka filmu 0,1 – 1 μm , vnútorný priemer a hrúbka steny kapiláry sa pohybuje v stovkách μm).

PLOT (Porous Layer Open Tubular) – kolóna, kde na vnútornej stene kapiláry je nanesená (popríklad chemicky vytvorená z materiálu steny) pórovitá vrstva o hrúbke 10 μm i viac.

SCOT (Support Coated Open Tubular) – kolóna so zakotvenou kvapalinou na nosiči, zachytenou na vnútorných stranách kapiláry.

Popri mechanicky naneseným fázam rozoznávame aj kolóny s viazanou stacionárnou fázou. Stacionárna fáza je chemicky viazaná na vnútorný povrch kapiláry, alebo je spolymerizovaná do takej miery, že ju nie je možné odstrániť rozpúšťadlom.

Úlohou stacionárnej fázy v GC je zadržanie jednotlivých zložiek v závislosti na ich distribučných konštantách. Volí sa podľa charakteru vzorky a rozsahu teplôt varu. Obecne by mala byť podobného typu ako analyzovaná vzorka. U stacionárnej fázy býva uvádzaná dolná

a horná hranica použiteľnosti. Dolná hranica je daná teplotou topenia stacionárnej fázy a horná takou tenziou pár, ktoré sa prejaví ako rušenie na chromatograme [19,40].

Existuje množstvo stacionárnych fáz, no najčastejšie sa využívajú fázy na báze polysiloxanov. Pri klasifikácii stacionárnych fáz sa používajú rôzne kritéria. Podľa interakcií so separovanými látkami ich možno rozdeliť na:

- *polárne fázy* – do tejto skupiny sa radia zlúčeniny, ktorých interakcie so separovanými látkami majú charakter vodíkových väzieb ako napr. polyethylenglykoly, cukry a pod.
- *semipolárne fázy* – do tejto skupiny možno zahrnúť zlúčeniny, ktorých interakcie s rozdeľovacími látkami ovplyvňujú permanentné a indukované dipóly ako napr. halogenderiváty uhl'ovodíkov, estery karboxylových kyselín, étery, nitrily a iné.
- *nepolárne fázy* – do tejto skupiny patria nasýtené alifatické uhl'ovodíky (parafínové oleje, skvalán...), ktorých interakcie so separovanými látkami sú väčšinou nepolárne (Van der Waalsove sily) [19,32].

Tab.5: Stacionárne fázy na báze polysiloxanov [19]

Substituenty	Polarita	Použitie
R ₁ = methyl R ₂ = methyl	Nepolárne	Uhl'ovodíky Rozpúšťadlá
R ₁ = methyl R ₂ = fenyl (50%) R ₁ = methyl R ₂ = fenyl (75%)	stredne polárne	Fenoly chlórované pesticídy estery
R ₁ = methyl (25%) R ₂ = CH ₂ CH ₂ CN R ₁ = CH=CHCN R ₂ = CH=CHCN	silne polárne	Alkoholy Aldehydy

2.3.3.7 Detektory

Detektor je zariadenie, ktoré zaznamenáva výstup rozdelených zložiek z kolóny. Z detektoru vychádza elektrický signál, ktorý je následne spracovaný počítačom. Konečným výstupom je chromatogram, ktorý pozostáva z píkov prislúchajúcim jednotlivým zložkám zmesi. Poloha píku na časovej osi chromatografu (os x) predstavuje mieru kvality zložky – identifikácia. Výška teda plocha píku je mierou kvantity zložky – koľko je danej zložky v zmesi.

Predpokladom každej úspešnej detekcie je dobre rozdelenie analyzovanej zmesi na kolóne. Charakteristikou dobrého detektoru je dobrá stabilita signálu, veľká citlivosť a rýchla reakcia na zmenu v zložení prechádzajúceho eluentu [19,22,32].

Typy detektorov

Tepelne vodivostný detektor (TCD) je typom univerzálneho detektoru, teda dáva odozvu na všetky látky a niekedy je nazývaným aj katarometer. Nosný plyn prúdi cez vlákno žeravené stálym elektrickým prúdom a ochladzuje ho na určitú teplotu. Prítomnosť zložky sa prejaví zmenou tepelnej vodivosti prostredia v okolí žeravého vlákna, a tým zmení jeho teplotu a elektrický odpor. Obyčajne sa pracuje s dvomi vláknami, kde cez jedno prúdi čistý nosný plyn a cez druhé prúdi plyn z kolóny. Ich elektrické odpory sa porovnávajú vo

Wheatstonovom mostíku. Prítomnosť zložky sa prejaví jeho rozladením. Pre tento detektor je vhodný nosný plyn s vysokou tepelnou vodivosťou, ako napr. vodík alebo hélium. Tento detektor sa používa pri analýzach anorganických plynov a nízkomolekulárnych organických látok. Jeho citlivosť je menšia, detekčné limity sú v mikrogramoch analytu.

Ionizačné detektory sú založené na vedení elektriny v plynách. Základom aparatury je izolovaná nádoba, ktorá je tvorená dvomi kovovými doskami (elektrodami), medzi ktorými je elektrické pole. Pomedzi tieto dve elektródy prúdi plyn.

- **Plameňový ionizačný detektor (FID)** – funguje na princípe ionizácie molekúl plynu v kyslíko-vodíkovom plameni, pričom tieto molekuly zároveň vedú ionizačný prúd medzi elektrodami. Nosný plyn sa pred vstupom do horáku miesi s vodíkom a vzduch sa privádza z vonku. Prítomnosť zložky sa prejaví zvýšením ionizácie a zároveň aj zväčšením elektrického prúdu. Jednotlivé konštrukcie detektorov sa od seba líšia úpravou a geometriou elektrod. Mechanizmus ionizácie u FID nie je doposiaľ jednoznačne vysvetlený. Predpokladá sa, že v redukčnej zóne plameňa dochádza k hydrogenácii a vytvoreniu CH_3 radikálov, ktoré s kyslíkom produkujú ióny schopné prenosu elektrického prúdu. Teda iba hydrogenovateľný uhlík podlieha ionizácii v podmienkach FID, a preto veľkosť jeho odozvy je úmerný počtu efektívnych uhlíkových atómov. Tento detektor je veľmi citlivý a využíva sa prakticky všade s výnimkou anorganických pár a plynov.

- **Plameňový ionizačný detektor s alkalickým kovom (AFID)** obsahuje v účinnom priestore soľ alkalického kovu. Teplom plameňa sa ióny alkalického kovu dostávajú do plynnej fázy. Ióny ochotne reagujú s heteroarómami organických látok, hlavne s fosforom a dusíkom.

- **Bezplameňový detektor s alkalickým kovom (TID)** – zdrojom iónov je elektricky vyhrievaná soľ alkalického kovu. Na jej povrchu dochádza k spaľovaniu vodíka účinkom vysokej teploty. Energia pri spaľovaní stačí na špecifické reakcie s fragmentami obsahujúcimi fosfor a dusík.

- **Fotoionizačný detektor (PID)** – účinkom ultrafialového žiarenia dochádza k ionizácii látok. Selektivitu tohto typu detektoru možno ovplyvniť voľbou vlnovej dĺžky. Ionizované sú organické látky, kyslík, amoniak, sulfán. Neionizujú sa niektoré anorganické plyny, dusík, hélium a voda. Je nesmierne citlivý (100krát viac než FID).

- **Detektor elektrónového záchytu (ECD)**. Podstatnou časťou tohto detektoru sú dve elektródy. Emitor, kde sa ako zdroj mäkkého rádioaktívneho žiarenia používa izotop ^{63}Ni a druhou elektródou je kolektor. Medzi elektrodami je vkladané napätie zo zdroja. Vlastným žiarením β , rádioaktívny žiarič ionizuje molekuly dusíku ako nosného plynu a vyvoláva ionizačný prúd. Dochádza tak k uvoľňovaniu pomalých elektrónov, ktoré zachytávajú elektronegatívne atómy zložiek, a tým znižujú ionizačný prúd. Toto zníženie je zaznamenané po zosilnení. Tento detektor je veľmi citlivý na halogenované zlúčeniny a zlúčeniny obsahujúce fosfor, kyslík, síru, olovo, nitrozlúčeniny a arény, čo ho činí vhodným detektorom na stanovenie pesticídov. Naopak má malú citlivosť k uhl'ovodíkom, alkoholom a ketónom.

- **Plameňový fotometrický detektor (FPD)** - citlivý na látky obsahujúce síru a fosfor. Je založený na meraní intenzity chemiluminiscencie. Meria sa

emisie žiarenia pri spaľovaní zložiek vo vodíkovom plameni. Svetelné kvantá sú zaznamenávané fotoelektrickým násobičom, pred ktorým je predradený interferenčný filter prepúšťajúci žiarenie určitej vlnovej dĺžky. Maximum emisie pre fosfor je pri 525 a 565 nm a pre síru 390 nm.

Najvhodnejším typom detekcie pre stanovenie stopových množstiev pesticídov je spojenie **plynového chromatografu s hmotnostným spektrometrom (GC-MS)**. GC-MS analýza umožňuje na základe retenčných časov a hmotnostných spektier identifikovať neznámu látku.

Kombinácia GC-MS v dnešnej dobe patrí k najprogresívnejším analytickým technikám, ktoré slúžia k identifikácii množstva neznámych zložiek zmesi [15,19,24,25].

2.3.3.8 Vplyv teploty v plynovej chromatografii

Teplota chromatografickej kolóny ovplyvňuje retenčný objem eluovaných komponentov. Všeobecne platí, že s rastúcou teplotou kolóny sa skracujú retenčné časy jednotlivých zložiek. Pokiaľ sa zmes analyzovaných zložiek líši v teplote varu o viac než 100 K, potom sa pri teplote kolóny eluujú menej prchavé zložky v tvare širokých píkov s dlhými retenčnými časmi, pričom prchavé komponenty sa neseparujú. Tento problém je u väčšiny chromatografických prístrojov vyriešený programovanou teplotou termostatu. Ide o zmenu teploty kolóny počas analýzy. Využíva sa pri separácii látok s rozdielnou teplotou varu [19].

2.3.3.9 Kvalitatívna analýza GC

V plynovej chromatografii je identifikácia látok založená na porovnávaní retenčného času alebo objemu neznámej zložky s retenčným časom alebo objemom štandardu za rovnakých podmienok chromatografickej separácie. Porovnávajú sa údaje získané z meraní najmenej na dvoch kolónach s rôznou polaritou stacionárnej fázy. Pokiaľ sú retenčné dáta niektorej z analyzovanej zložiek zmesi totožné s elučnými dátami štandardu, možno predpokladať, že látka je totožná so štandardnou látkou. Pre porovnanie nameraných výsledkov sa používa niekoľko spôsobov vyjadrenia retenčných dát:

- a) *pomocou špecifických retenčných objemov* – predstavujú čistý retenčný objem vzťahnutý na 1 g stacionárnej fázy a korigovaný na 273 K. Jedná sa o teoreticky exaktné hodnoty.
- b) *pomocou relatívnej retencie* – názornejšie je vyjadrenie elučných dát pomocou relatívnych retenčných hodnôt. Údaje sa vzťahujú na retenčný čas alebo objem látky zvolenej ako štandard. Nevýhodou je, že nie je možné použiť iba jeden štandard na analýzu všetkých látok. Relatívne retenčné časy sa získajú z podielu redukovaných retenčných časov všetkých zložiek s redukovaným retenčným časom zložky zvolenej ako štandard.
- c) *pomocou retenčných indexov* – vyjadrujú retenčné chovanie sledovanej látky v jednotnej stupnici, v ktorej za pevné základné body boli zvolené retenčné hodnoty nerozvetvených alkánov. Retenčný index nerozvetvených alkánov bol definovaný ako stonásobok počtu uhlíkov [19].

2.3.4.0 Kvantitatívna analýza GC

Kvantitatívnej analýze predchádza meranie plochy píku, prostredníctvom digitálnych integrátorov. Po zmeraní možno pristúpiť k vlastnej kvantitatívnej analýze prostredníctvom niektorej z nasledujúcich metód.

Metóda vnútornej normalizácie

Touto metódou sa zisťuje pomerné zastúpenie jednotlivých zložiek vo vzorke. Percentové zloženie zmesi sa vypočíta na základe zmeraných plôch všetkých pík $A_1, A_2, \dots, A_n$. Takže v danej zmesi je x % zložky A, y % zložky B atď.

K analýze postačí jeden nástreč, pričom nie je potrebné poznať jeho objem.

Metóda absolútnej kalibrácie

Často je táto metóda označovaná aj ako metóda vonkajšieho štandardu a spočíva v dávkovaní známeho množstva analyzovanej vzorky a štandardu za rovnakých podmienok. Vyhodnocuje sa porovnaním nameraných plôch alebo výšiek pík. Touto metódou sa stanovuje absolútna koncentrácia alebo množstvo látky na základe kalibračnej krivky. Správnosť absolútnej kalibrácie závisí na dobrej reprodukovateľnosti dávkovaných objemov.

Metóda vnútorného štandardu

Metóda je taktiež známa ako relatívna alebo nepriama metóda. Spočíva v pridaní určitého množstva známej látky (vnútorný štandard) do vzorky. Tento pridávaný štandard nesmie interferovať s ostatnými píkmi vzorky, rovnako nesmie byť prítomný v pôvodnej vzorke a musí tvoriť samostatný pík v blízkosti píku stanovovanej látky. Výhodou metódy je, že nie je potrebné poznať presné množstvo vzorky dávkovanej do chromatografu, ale musia byť zistené odozovové faktory, ktoré sú rôzne pre zložky i štandard.

Metóda štandardného prídavku

Metóda štandardného prídavku spočíva v pridávaní známeho množstva analyzovanej zložky (štandard) k známemu množstvu vzorky. Zväčšenie plochy píku je priamo úmerné pridanému množstvu štandardu. V závislosti na komponentoch môže mať pridávaná látka charakter čistej látky alebo roztoku danej látky vo vhodnom rozpúšťadle. Pre výpočet koncentrácie vzorky je potrebné poznať objemy nástrekov a taktiež objemy miešanej vzorky a štandardného prídavku [15,19,41].

2.3.4 Plynová chromatografia – hmotnostná spektrometria (GC–MS)

Hmotnostná spektrometria patrí medzi účinné identifikačné techniky. Táto fyzikálno-chemická metóda slúži k určovaniu hmotností atómov, molekúl a ich častí po prevedení na kladné alebo záporné ióny. Našla široké uplatnenie v riešení analytických problémov v organickej chémii, biochémií, pri analýze anorganických materiálov a povrchov tuhých látok.

K rozšíreniu techniky hmotnostnej spektrometrie do oblasti aplikovaného analytického výskumu výrazne prispievajú nasledujúce faktory:

- kombinácia MS s bežným stolným počítačom a vývoj užívateľsky prijateľného programového vybavenia
- komerčná dostupnosť hmotnostných spektrometrov nízkeho i vyššieho rozlíšenia
- komerčná dostupnosť nových typov iónových zdrojov
- spojenie MS so separačnými metódami (GC, LC)
- prijateľné ceny malých hmotnostných spektrometrov nízkeho rozlíšenia

Ako už bolo spomínané, spojenie plynovej chromatografie s hmotnostným spektrometrom výrazne prispelo k rozvoju metódy hmotnostnej spektrometrie a tým bola vytvorená doposiaľ najefektívnejšia známa technika určená na analýzu zložitých zmesí organických zlúčenín. Technika GC–MS zároveň umožňuje analýzu organokovových a anorganických zmesí, ktoré spĺňajú podmienku, že budú prechádzať chromatografickou kolónou ako pary.

Výhody oboch metód sa využívajú v ich kombinácii. Ako nosný plyn sa musí používať veľmi čisté hélium – čistota 99,999% a tým sa zabráni vplyvu mobilnej fázy na ionizačný prúd pri detekcii látok vystupujúcich z chromatografu.

Výhody GC – MS analýzy:

- kombinácia GC-MS umožňuje efektívnu analýzu zložitých mnohozložkových sústav
- na vyhodnotenie veľkého počtu GC a MS údajov možno použiť počítač, ktorý nielen zaznamenáva a vyhodnocuje údaje, ale môže riadiť celý experiment
- meranie celkového iónového prúdu (TIC – Total Ion Chromatogram)
- hmotnostné spektrá možno vyhodnotiť z ľubovoľného miesta chromatogramu

Výhody spojenia oboch metód sa využívajú predovšetkým v organických syntézach, na kontrolu životného prostredia, antidopingová kontrola, alebo kontrola technologických procesov [19,43,45].

2.3.4.1 Princíp GC - MS

GC-MS analýza umožňuje identifikovať neznámu látku na základe retenčných časov a hmotnostných spektier. K tomuto účelu slúži aj monitorovanie dvoch iónov, ktoré sú pre danú látku charakteristické a v niektorých prípadoch aj monitorovanie molekulového iónu, ktorý je taktiež cenný pre zhodnotenie typu a množstva prítomného metabolitu. Spektrá analyzovanej látky sa porovnávajú s databázou knižníc spektier.

Táto chromatografická technika sa veľmi často využíva v analytickej chémii vďaka svojej citlivosti, či širokému rozsahu použiteľnosti. Kombinácia GC-MS v dnešnej dobe patrí k najprogressívnejším analytickým technikám, ktoré slúžia k identifikácii množstva neznámych zložiek zmesi [15,25].

2.3.4.2 Experimentálne usporiadanie

Bežný hmotnostný spektrometer pozostáva z nasledujúcich častí: vstup, iónový zdroj, separátor, detektor so zosilňovačom a záznamových zariadením, vákuový systém.

Vstup je miesto, kam sa zavádza vzorka. Bežný je vstup cez zásobník (objem 1 – 2 l), kde sa nastreknutá vzorka vyparí za tlaku niekoľko Pa. Malým otvorom sa potom napúšťa do iónového zdroja. Pre málo prchavé látky je ďalšou možnosťou tzv. priamy vstup, kedy sa vzorka nadáva priamo do iónového zdroja. Pre spojenie GC–MS slúži chromatografický vstup - interfejs.

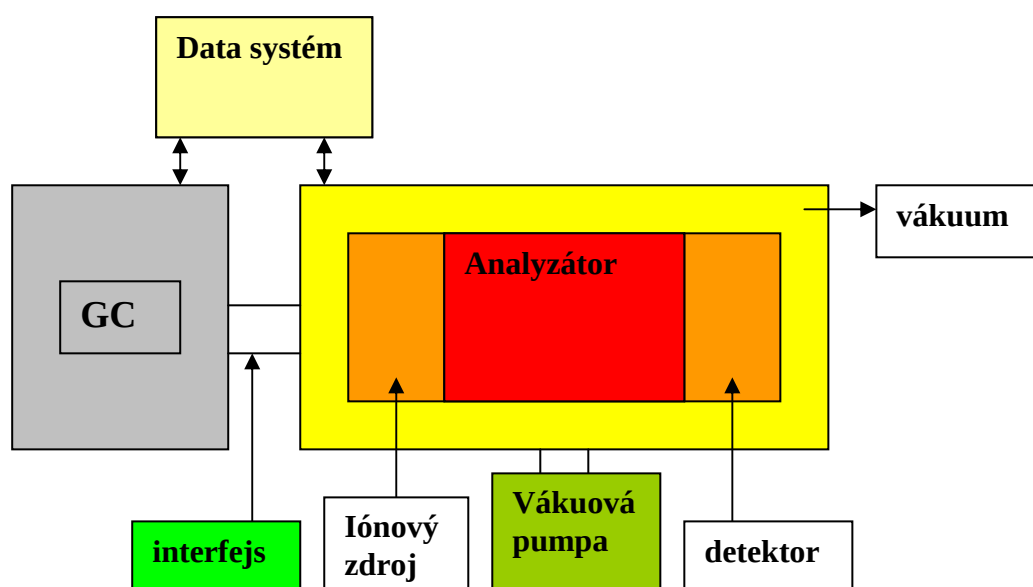
Iónový zdroj slúži k prevedeniu analyzovanej látky do ionizovaného stavu. V tomto priestore dochádza k väčšine fragmentačných reakcií, ktoré vedú k deštrukcii chemických väzieb vzniknutého iónu. Pre spojenie GC-MS sú bežné dva spôsoby ionizácie vzorky: ionizácia nárazom elektrónov a chemická ionizácia.

Hmotnostný analyzátor slúži ako disperzný prvok, ktorý umožňuje v priestore alebo čase separovať zmes iónov o rôznych hmotnostiach produkovaných v iónovom zdroji. Ióny sú delené podľa pomeru m/z , kde m je hmotnosť iónu a z je počet elementárnych nábojov, ktoré

nesie ión. Pre spojenie GC-MS sa najčastejšie používajú tri typy separátorov: sektorový – delí ióny v magnetickom poli, kvadrupólový separátor a iónová past – využívajú vysokofrekvenčné pole.

Detektor poskytuje analógový signál úmerný počtu dopadajúcich iónov. Signál je po digitalizácii prevedení do počítača a vhodným programovým vybavením spracovaný do formy hmotnostného spektra. Počítač zaisťuje okrem zberu dát a ich spracovanie aj ďalšie riadiace a kontrolné funkcie súvisiace s chodom prístroja a optimalizáciou prevádzkových parametrov.

Vákuový systém je nevyhnutnou súčasťou hmotnostného spektrometra, ktorý zabezpečuje udržať dostatočne nízky tlak. Pri spojení GC-MS je nevyhnutné, aby mal vákuový systém aj potrebný výkon. V súčasnosti sa v spojení plynového chromatografu s hmotnostným spektrometrom používajú kapilárne kolóny. Náplňové kolóny, ktoré dosahujú podstatne vyššie prietoky mobilnej fázy, ale menšiu účinnosť sa nepoužívajú [19,40,43].



Obr.10: Blokové schéma hmotnostnej spektrometrie s plynovou chromatografiou [45]

2.3.4.3 Chromatografický vstup

Chromatografický vstup predstavuje prepojenie plynovej chromatografie s hmotnostným spektrometrom. Z pravidla nie je možné priame zavedenie výstupu chromatografickej kolóny do iónového zdroja, pretože veľké množstvo nosného plynu by mohlo narušiť vákuum v hmotnostnom spektrometri, čo by mohlo viesť k rade problémov. Najjednoduchším spojením je delič, ktorý je umiestnený na výstupe z kolóny a delí prúd mobilnej fázy na dve vetvy. Jedna vetva vstupuje do použitého detektoru a druhá privádza nosný plyn aj s analyzovanými zložkami do iónového zdroja. Pokiaľ má vákuový systém dostatočný výkon, postačí, keď sú prúdy delené v pomere 1 : 1 (pre prietok nosného plynu 1 – 2 ml/min). Pomer je však možné vhodne upravovať priemerom a dĺžkou restriktnej kapiláry, ktorá spája delič s hmotnostným spektrometrom.

V súčasnosti sa predovšetkým využívajú kapilárne kolóny, ktoré sú cez vyhrievaciu restriktnú kapiláru priamo spojené s hmotnostným spektrometrom [19].

2.3.4.4 Ionizácia

Ionizácia analyzovanej látky je nevyhnutným predpokladom analýzy a jej energetická náročnosť závisí od typu vzorky.

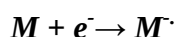
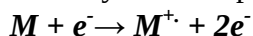
Podľa množstva dodanej energie rozlišuje mäkké a tvrdé ionizačné techniky. Mäkké ionizačné techniky predstavujú malý energetický prebytok dodaný ionizovanej molekule a pravdepodobnosť fragmentácie je nízka. U tvrdých ionizačných techník dodaná energia postačuje k rozsiahlejšej fragmentácii primárne vzniknutého iónu.

Ďalším triediacim kritériom je skupenstvo vzorky pri ionizácii. Najbežnejšie techniky ionizácie sú z plynného skupenstva, kedy je analyzovaná vzorka vopred odparená do vákuu. Nutným predpokladom aplikovateľnosti je dostatočná prchavosť vzoriek. Na analýzu neprchavých zložiek sú vhodné techniky ionizácie z kondenzovanej fázy, kedy dochádza k tvorbe iónov priamo v kvapalnej alebo pevnej fáze [43,44].

Ionizácia nárazom elektrónov (EI – Electron impact ionization)

Príklad tvrdej ionizačnej techniky z plynnej fázy. V súčasnosti sa radí medzi najbežnejšie a najlepšie prepracovaný pracovný spôsob ionizácie.

Energetický proces, ktorý vedie k tvorbe iónov spočíva v interakcii analyzovanej látky s prúdom urýchlených elektrónov, za vzniku radikalkationtu ($M^{+\cdot}$) alebo radikalaniontu ($M^{\cdot-}$). Z hľadiska energetickej stabilizácie vzniknutého iónu je preferovaný dej, vedúci k tvorbe radikalkationtu, oproti rezonančnému elektrónovému záchyту vedúceho k tvorbe radikalaniontu. Iba prítomnosť vysoko elektronegatívneho prvku (napr. halogen) v štruktúre vzorky môže zvýšiť populáciu negatívne nabitých iónov pri EI.



Ako zdroj elektrónov sa najčastejšie využíva elektricky žhavené vlákno z rhénia alebo wolfrámu. Veľkosť žhaviaceho prúdu určuje množstvo emitovaných elektrónov. Prúd elektrónov smeruje priestorom iónového zdroja k anóde. Energia elektrónov prichádzajúcich do kontaktu s ionizovanou vzorkou je určená potenciálovým rozdielom medzi vláknom a anódou. Za štandardný je považovaný rýchly zväzok elektrónov s energiou 70 eV, ktorý vo väčšine prípadov zaisťuje vznik maximálneho počtu iónov a ich fragmentáciu. Niekedy je na zvýšenie pravdepodobnosti interakcie s molekulou, dráha elektrónov zakrivená polom malého permanentného magnetu v ionizačnej komôrke. Vzniknuté ióny sú z priestoru ionizačnej komôrky vytlačované elektrostatickým polom pomocnej elektródy (repeler) s vhodným potenciálom. Sústava akceleračných a fokusačných elektród urýchľuje a smeruje prúd iónov z ionizačného zdroja.

Efektívnosť EI je $\sim 10^{-5}$, väčšina molekúl zo vzorky je odstránených z iónového zdroja a hmotnostného analyzátoru prostredníctvom kontinuálne vákuových púmp [43,44].

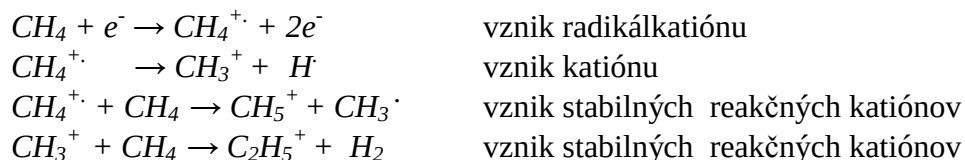
Chemická ionizácia (Chemical ionization – CI)

Jedná sa o bežný príklad mäkkej ionizácie z plynnej fázy. Rovnako ako v predošlom prípade je primárnym zdrojom, prúd urýchlených elektrónov. Ich energia však nie je priamo prenášaná na analyzovanú molekulu, ale prostredníctvom reakčného média. Reakčné médium sa nachádza v ionizačnej komôrke relatívne pod veľkým tlakom (65 – 130 Pa). Najčastejšie ide o plyn alebo pary nízko-vriacej kvapaliny. Vyšší tlak v zdroji výrazne zvyšuje pravdepodobnosť medzimolekulárnych a medziiónových interakcií. Najčastejšie používané reakčné plyny sú uvedené v Tab.6.

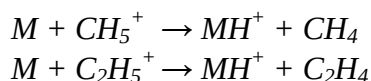
Tab.6: Prehľad reakčných plynov používaných v CI [45]

Reakčný plyn	Protónová afinita	Reakčný ión	Ión skúmanej látky
CH ₄	536	CH ₅ ⁺	MH ⁺
H ₂ O	724	H ₃ O ⁺	MH ⁺ , MH ₃ O ⁺
(CH ₃) ₃ CH ₃	828	(CH ₃) ₃ C ⁺	MH ⁺
NH ₃	858	NH ₄ ⁺	MH ⁺ , MNH ₄ ⁺

Mechanizmus reakcií CI



Po vnesení analytu do tohto prostredia dôjde k prenosu protónu z reakčných katiónov na neutrálnu molekulu za vzniku katiónu MH^+ a odštiepeniu neutrálnej molekuly metanu alebo ethylenu.



Výber reakčného média pre CI ovplyvňuje množstvo predanej energia v procese chemickej ionizácie a tým aj rozsah možných fragmentácií. Exotermicita reakcie prenosu protónu je daná ochotou reakčného katiónu odštiepiť protón (kyslosť) a afinitou ionizovanej látky (bazicita).

Výhody CI

- metóda MS – CI umožňuje analýzu optických a priestorových izomérov
- veľký výtťažok protonizovaných iónov MH^+ pri malom výtťažku štiepných iónov
- ióny OH^- a CH_3O^- vznikajú vo veľkom množstve bombardovaním zodpovedajúcich zmesí N_2O s CH_4 , alebo $(\text{CH}_3)_3\text{CH}_3$, H_2O a N_2O s CH_3OH
- často je táto metóda citlivejšia ako ionizácia nárazom elektrónov, pretože všetky elektróny, ktoré sú prítomné v ionizačnej komôrke sa využijú na ionizáciu [43,44,45].

Ďalšie spôsoby ionizácie

V hmotnostnej spektrometrii sa využívajú aj iné spôsoby ionizácie, respektíve uvedenie analyzovanej látky do plynného stavu.

Ionizácia elektrickým polom (FI -Field Ionization) – ide o typ mäkkej ionizácie z plynnej fázy, kde v dôsledku pôsobenia nehomogenného elektrického pola vytvoreného medzi ostrým hrotom dochádza k vytrhnutiu valenčného elektrónu z ionizovanej molekuly. Podmienkou úspešnosti je dostatočne vysoká intenzita pola v okolí pracovnej elektródy (10^7 V/cm a viac).

Desorpcia elektrickým polom (FD – Field Desorption) – využíva sa k ionizácii neprchavých látok, ktoré nie je možné odpariť do vákuu. U tejto ionizačnej techniky sa analyzovaná látka priamo naniesie na povrch pracovnej elektródy.

Desorpcia bombardovaním rýchlymi atómami a iónmi (FAB - Fast Atom Bombardement) – k ionizácii sa využívajú urýchlené atómy vzácnych plynov, najčastejšie argónu a xenómu. Jedná sa o mäkkú ionizačnú techniku z kondenzovanej fázy.

Ionizácia rýchlymi iónmi (SIMS - Secondary Ion Mass Spectrometry) – príbuzná technika k FAB, kde sa najčastejšie pracuje s urýchlenými Cs^+ iónmi. FAB a SIMS sa využívajú k analýze teplotne nestálych neprchavých látok.

Plazmová desorpcia (PD - Plasma Desorption) – radí sa medzi mäkké ionizačné techniky z kondenzovanej fázy, kde sa k ionizácii najčastejšie využívajú štepené produkty izotopu ^{252}Cf . PD našla uplatnenie pri analýzach teplotne nestabilných makromolekulárnych látok.

Matricou asistovaná laserová desorpčná ionizácia (MALDI – Matrix Assisted Laser Desorption) – tento typ desorpčnej fotoionizácie sa v spojení s preletovým separátorom využíva na analýzu biopolymérov. Radí sa medzi ionizácie z kondenzovanej fázy.

Sprejové ionizácie – mäkká ionizačná technika z kvapalnej fázy. Rozlišuje sa varianta termospej (TS) a elektrosprej (ES), ktoré sa od seba líšia spôsobom rozprašovania kvapalnej fázy so vzorkou. U oboch sprejových techník je dosiahnutý prevod iónov z kvapaliny priamo do vákua prostredníctvom rýchleho vysušenia mikrokvapôčiek spreja.

Iné typy ionizačných techník :

Ionizácia pri atmosferickom tlaku (Atmospheric Pressure Ionisation, API)

Povrchová ionizácia (Surface Ionisation, SI)

Desorpčná ionizácia (Desorption Ionisation, DI)

Desorpcia laserom (Laser Ablation, LA)

Multifotónová ionizácia (MultiPhoton Ionisation, MPI)

Fotoionizácia (Photoionisation, PI)

Ionizácia v tlejúcom výboji

Ionizácia v iskrovom výboji

Ionizácia v indukčne viazanej plazme (Inductively – Coupled Plasma, ICP)

Každá z týchto metód má určité výhody aj nevýhody a obvykle je jej využitie limitované práve jej výhodou [43,45].

2.3.4.5 Hmotnostné separátory

Hmotnostné analyzátory slúžia k separácii zväzkov iónov vychádzajúcich z iónového zdroja. Zväzok iónov možno separovať podľa zodpovedajúcich hmotností iónov za využitia rôznych techník. V skutočnosti to však prebieha podľa m/z – jedná sa o pomer hmotnosti k počtu príslušných nábojov, ktorý je známy aj pod označením „Thomson“.

Kvadrupólový analyzátor

Tento typ separátoru býva súčasťou hmotnostných spektrometrov spojených s plynovou alebo kvapalinovou chromatografiou.

Pole analyzátoru je tvorené kvadrupólovým kondenzátorom (tzv. kvadrupól), ktoré pozostáva zo štyroch tyčí okrúhleho, štvorcového alebo hyperbolického prierezu. Tieto vodivé tyče sú umiestnené symetricky vzhľadom na centrálnu os a paralelne s ňou. Protiľahlé tyče sú spojené do dvoch párov, ku ktorým sa privádza jednosmerné a vysokofrekvenčné striedavé napätie. Ióny z iónového zdroja sú privádzané do analyzátoru pozdĺž osi kvadrupólu, kde axiálne driftujú okolo vodivostných tyčí. V kvadrupólovom spektrometre prebieha separácia iónov v priečnom elektrickom poli s hyperbolickou distribúciou potenciálu. Pri fixovaných hodnotách frekvencie ω a amplitúdy striedavého napätia U_0 iba u iónov s určitou

hodnotou m/z , amplitúda odklonu driftu v smere kolmom na os separátora, neprevyšuje vzdialenosť medzi tyčami. Tieto ióny vďaka svojej zotrvačnosti prechádzajú analyzátorom, vystupujú z neho cez štrbiny a sú registrované po dopade na kolektor iónov (detektor).

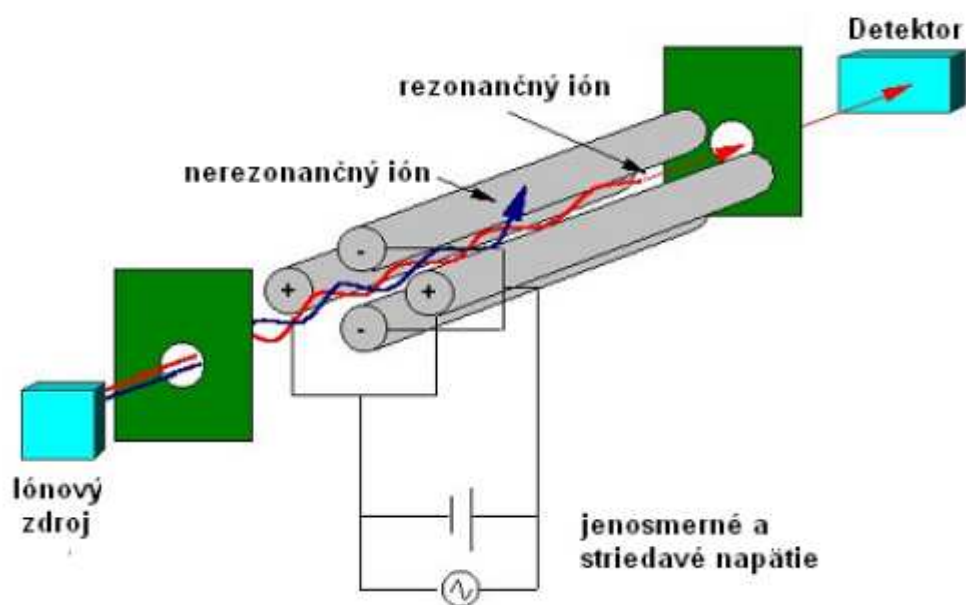
Kvadrupólom prechádzajú iba ióny, ktoré vyhovujú vzťahu (12):

$$m = a \frac{aU_0}{\omega^2} \quad (12)$$

kde a – konštanta prístroja, ω – frekvencia, U_0 - amplitúda striedavého napätia.

Výhody:

- lepšie rozlíšenie sa dosahuje použitím ôsmich (oktapól) alebo dvanástich tyčí (dodekapól)
- niektoré spektrometre môžu obsahovať kombináciu dvoch alebo troch kvadrupólov
- dosahuje sa rozlíšenie od 10^3 do 10^4 [43,45].



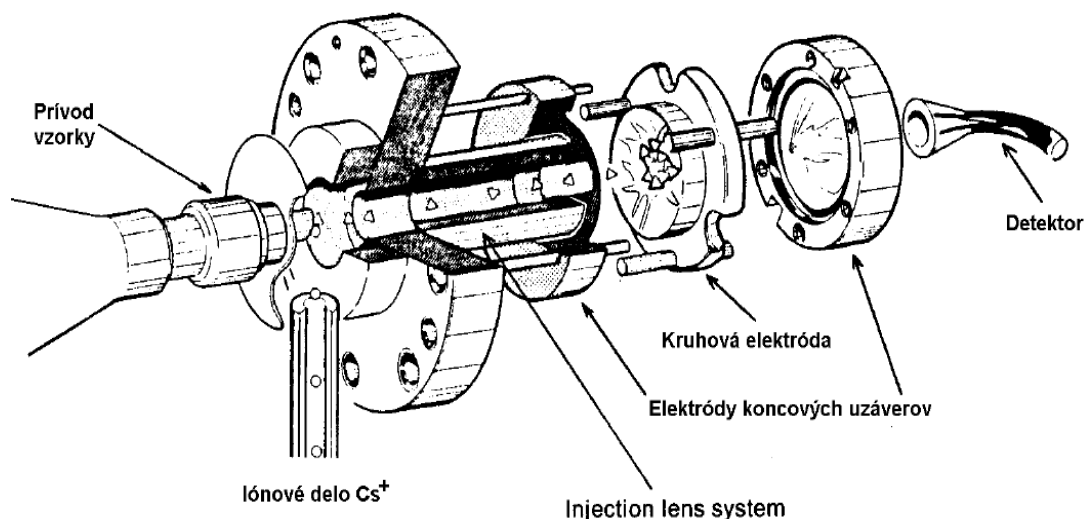
Obr. 11: Schéma kvadrupolového analyzátoru [45]

Iónová pasť

Jedná sa o trojdimenziálnu analógiu kvadrupólu. Výhodou iónovej pasce pred magnetickým separátorom je, že polia potrebné k fokusácii jednotlivých hmotností môžu byť zmenené veľmi rýchlo, čo je dôležité pre počítačom riadené merania, predovšetkým v pracovnom mode SIM – Selected Ion Monitoring.

Iónová pasť je zariadenie, ktoré umožňuje prostredníctvom elektrického pola uzavrieť ióny v ohraničenom priestore. Pozostáva zo vstupnej a výstupnej kruhovej elektródy a prstencovej

stredovej elektródy. Obe krajné elektródy sú uzemnené a na prstencovú elektródu je privádzané vysokofrekvenčné napätie s premennou amplitúdou. Ióny, ktoré preniknú do vnútorného priestoru pasce sú nútené pohybovať sa po uzavretých kruhových dráhach. S narastajúcou amplitúdou vkladaneho napätia sa postupne ióny s rastúcim m/z dostávajú do nestabilnej trajektórie, opúšťajú vnútorný priestor pasce a smerujú do detektoru [43,45].



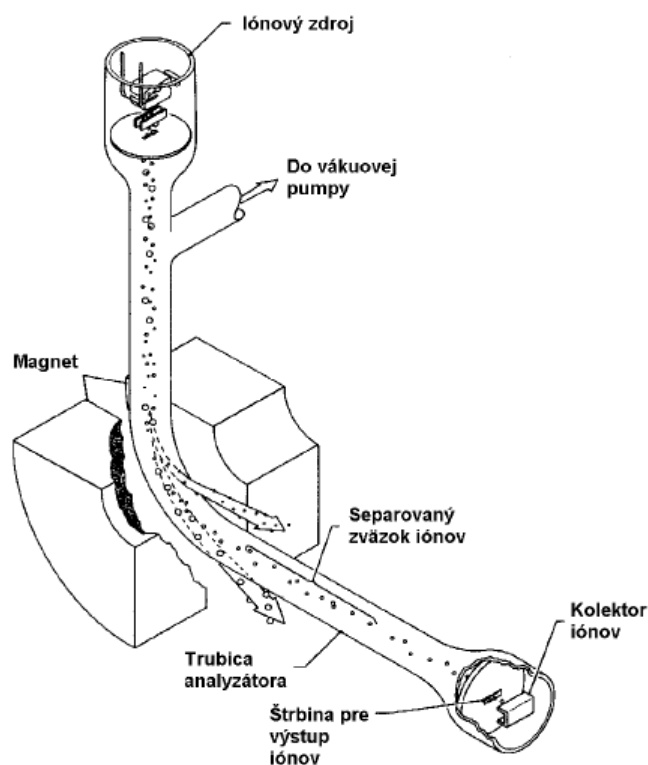
Obr.12: Iónová past' [45]

Magnetický hmotnostný separátor

Jednofokusujúci hmotnostný spektrometer využíva veľký rozdiel v napätí medzi urýchľujúcimi elektródami. Malé potenciály aplikované na „vytláčacie“ a „ión – fokusujúce“ elektródy sú nastavené na maximalizáciu iónového prúdu vychádzajúceho zo štrbiny iónového zdroja. Táto štrbina predstavuje vstupný ohniskový bod systému iónovej optiky separátora hmôt. Umožňuje fokusáciu výstupného zväzku iónov s rovnakým pomerom hmotnosti k náboju (m/z) na výstupnej štrbine analyzátora [45].

Princíp magnetického analyzátora spočíva v tom, že vytvorené magnetické pole pôsobí ako analyzátor hmotností. Hodnota iónov m/z v Thomsonoch, ktoré môžu vychádzať cez výstupnú štrbinu závisí od polomeru r (cm) dráhy iónov v magnetickom poli s intenzitou poľa B (v gaussoch) a ión - urýchľujúceho potenciálu V (volt), je definovaná fundamentálnou empirickou rovnicou (Beynon, 1960) (13):

$$m / z = 4,82 \cdot 10^{-5} \frac{B^2 r^2}{V} \quad (13)$$



Obr.13: Hmotnostný spektrometer s jednou fokusáciou za použitia magnetického sektoru [45]

Časovo – preletový analyzátor (TOF – Time of flight)

Ide o najjednoduchší hmotnostný analyzátor, kde sa využívajú časové rozdiely, počas ktorých ióny prechádzajú cez separačné pole, pričom dochádza k ich separácii podľa hmotnosti. K časovému rozdeleniu iónov s rôznymi m/z dochádza na základe ich odlišnej doby letu z iónového zdroja do detektoru. Pracuje sa v pulznom móde, a preto ióny musia vzniknúť, alebo byť extrahované z iónového zdroja v pulznom režime. Všetky ióny sú dôsledkom elektrického poľa urýchľované do bezpólovej oblasti driftovania s kinetickou energiou zV , kde z je náboj iónu a V je aplikované napätie. Keďže kinetická energia iónu je $0,5mv^2$, ľahšie ióny majú väčšiu rýchlosť, a teda dosahujú detektor na konci oblasti driftovania skôr ako ťažšie ióny. Rýchlosť pohybujúcich iónov je úmerná druhej odmocnine pomeru ich dvojnásobku kinetickej energie a hmotnosti iónu (14):

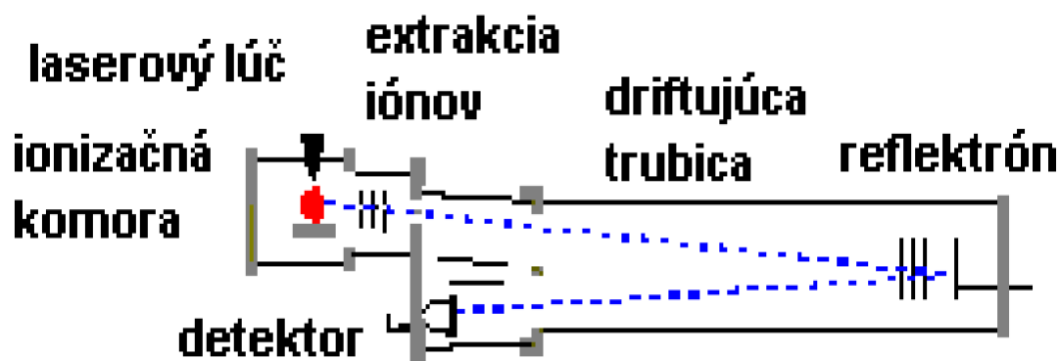
$$v = \sqrt{\frac{2 zV}{m}} \quad (14)$$

Doba preletu t cez driftujúcu trubicu je L/v , kde L je dĺžka driftujúcej trubice (15):

$$t = \frac{L}{\sqrt{\frac{2V}{m/z}}} \quad (15)$$

Aby zariadenie nebolo príliš rozmerné, je často konštruované s reflektrom. Ide o elektrostatické zrkadlo, ktoré kompenzuje rozdiely v kinetických energiách iónov

prechádzajúcich cez oblasť driftovania a tým zlepšuje aj rozlíšenie prístroja a predlžuje dráhu letu v obmedzených miestach spektrometra. Výstup detektora je zobrazený na osciloskope ako časová funkcia a tým vzniká hmotnostné spektrum [43,45].

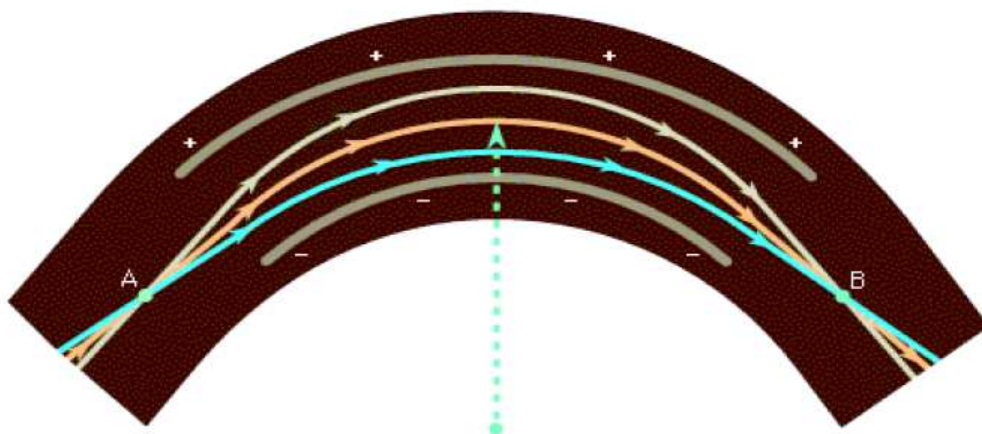


Obr.14: Schéma TOF analyzátora [45]

Analýza elektrostatickým polom

Elektrický analyzátor umožňuje zjednotiť prúd iónov vychádzajúcich z iónového zdroja nezávisle na ich hodnotách m/z . Pôsobením elektrostatického pola sú ióny priťahované k spoločnému centru, t.j. radiálne pole sa bude taktiež snažiť fokusujúco pôsobiť na divergujúci zväzok iónov. Radiálna sila elektrostatického pol'a pôsobiaca na ióny bude zE , čo predstavuje výsledok interakcie pol'a E a náboja iónu z , je rovná dostredivej sile (mv^2/r) častice s hmotnosťou m , pohybujúcej sa rýchlosťou v okolo polomeru r [43,45] (16):

$$zE = \frac{mv^2}{r} \quad (16)$$



Obr.15: Fokusujúce pôsobenie radiálneho elektrostatického pol'a na monoenergetický zväzok iónov. Ióny divergujúce z bodu A sú privádzané do ohniska v bode B [45]

2.3.4.6 Záznamy z analýz GC – MS

Ako už bolo spomínané, prednosťou spojenia týchto dvoch techník je ich vysoká separačná a identifikačná schopnosť. Pri analýze vzoriek metódou GC–MS sa získavajú dva druhy záznamov. Jedným je chromatogram, ktorý zhruba informuje o počte zložiek prítomných vo vzorke a druhým je hmotnostné spektrum jednotlivých pík, z ktorých sa usudzuje kvalita zložiek, poprípade možno preukázať súčasnú eluáciu viacerých zložiek v jednom píku. Existuje ešte zvláštny typ záznamu, ktorý do istej miery spája obidva druhy informácií [19].

Hmotnostné spektrum v technike GC-MS

Hmotnostné spektrá vyjadrujú závislosť počtu iónov na ich hodnote m/z . V technike GC-MS ostáva ich podstata nezmenená, no napriek tomu, existujú isté faktory, ktoré treba brať do úvahy. Najdôležitejší je časový faktor. Súvisí s tým, že hmotnostné spektrá, ktoré sa vyskytujú v knižnici spektier boli merané za podmienok, kedy boli pary analyzovanej látky zo zásobníku napúšťané do iónového zdroja molekulárnym tokom, kde ich parciálny tlak bol dlhodobo stály. Pri technike GC-MS je spravidla k dispozícii doba $10^0 - 10^1$ s, za ktorú sa eluuje pík a koncentrácia látky v nosnom plyne sa mení. Z toho vyplýva, aby doba záznamu hmotnostného spektra bola čo najkratšia. To však odporuje požiadavke na citlivosť, pretože v kratšom časovom intervale dopadne na detektor menej iónov a tým súčasne klesá aj rozlišovacia schopnosť hmotnostného spektrometra. Kompromisným riešením je, že bežne používané doby záznamu sú 1 – 5 s.

Záznam spektier je možno riadiť manuálne, kedy operátor sleduje chromatogram a v okamžiku, kedy eluuje pík zaznamenáva spektrum, alebo cyklicky. S rozvojom výpočtovej techniky sa v praxi upustilo od manuálneho riadenia hmotnostných spektier.

Cyklický záznam spočíva v pravidelne opakovanom snímaní hmotnostných spektier. Na začiatku si operátor navolí čas potrebný k záznamu jedného spektra a k tomuto času pridá aj dobu potrebnú k preladeniu iónového analyzátora do vychádzajúcej polohy. Cyklický záznam sa spravidla púšťa až po elúcii rozpúšťadla, v ktorom je daná vzorka rozpustená. Tým sa zabezpečí zníženie počtu zaznamenaných spektier. Cyklický záznam sa využíva u prístrojov napojených na počítač, kde sa následne digitálne ukladajú všetky namerané spektrá. Na konci analýzy počítač zrekonštruje chromatogram na základe celkového iónového prúdu a operátor vyberie čísla zo záznamu hmotnostných spektier, ktoré sú určené k ďalšiemu spracovaniu [19].

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Použité chemikálie, roztoky a štandardy

Chemikálie:

- Deionizovaná voda
- Methanol, M = 32,04 g/mol, CAS No: 67-56-1 [Fluka]
- Acetonitril, M = 41,05 g/mol, CAS No: 75-05-8 [Sigma-aldrich]

Roztoky:

- 2M hydroxid sodný
- Zriedená kyselina chlorovodiková
- 10 % ethanol
- extrakčný roztok : methanol : ethylacetát (1:1)

Štandardy:

- Azoxystrobin, M = 403,39 g/mol, CAS No: 131860-33-8 [Fluka], Fungicíd
- Captan, M = 300,59 g/mol, CAS No: 133-06-2 [Fluka], Fungicíd
- Fenarimol, M = 331,20 g/mol, CAS No: 60168-88-9 [Fluka], Fungicíd
- Flusilazole, M = 315,39 g/mol, CAS No: 85509-19-9 [Fluka], Fungicíd
- Folpet, M = 296,56 g/mol, CAS No: 133-07-3 [Supelco], Fungicíd
- Kresoxim – methyl, M = 313,35 g/mol, CAS No: 143390-89-0 [Fluka], Fungicíd
- Penconazol, M = 284,18 g/mol, CAS No: 66246-88-6 [Fluka], Fungicíd
- Picoxystrobin, M = 307,32 g/mol, CAS No: 117428-22-5 [Fluka], Fungicíd
- Trifloxystrobin, M = 408,37 g/mol, CAS No: 141517-21-7 [Fluka], Fungicíd
- Pyrimethanil, M = 199,25 g/mol, CAS No: 53112-28-0 [Fluka], Fungicíd
- Tebuconazol, M = 307,82 g/mol, CAS No: 107534-96-3 [Fluka], Fungicíd
- Triadimefon, M = 293,75 g/mol, CAS No: 43121-43-3 [Fluka], Fungicíd
- Vinclozolin, M = 286,11 g/mol, CAS No: 50471-44-8 [Fluka], Fungicíd
- Dimethomorph, M = 387,86 g/mol, CAS No: 110488-70-5 [Fluka], Fungicíd
- Dinocap, M = 364,39 g/mol, CAS No: 39300-45-3 [Fluka], Fungicíd
- Pirimiphos – methyl, M = 305,34 g/mol, CAS No: 29232-93-7 [Fluka], Insekticíd
- Chlorpyrifos, M = 350,59 g/mol, CAS No: 2921-88-2 [Supelco], Insekticíd

3.2 Použité laboratórne pomôcky, vybavenie a prístroje

Laboratórne pomôcky:

- Automatická pipeta, TRANSFERPETTE, BRAND (0,5 – 5 ml)
- Sklenené pipety (1 ml, 5 ml, 10 ml)
- Srdcové banky (25 ml)
- Sklenený válec (100 ml)
- Sklenený nádstavec (100 ml)
- Odmerné banky (10 ml, 25 ml)
- Pasterove pipety

- Kadičky
- Ependorfky
- Vialky
- Kliešte pre uzatváranie a otváranie vialok pre head - space

Laboratórne vybavenie a prístroje:

- Analytické váhy (Metlet Toledo)
- Ultrazvukový kúpeľ (TESLA)
- Rotačná vákuová odparka (IKA.RV 10 digital)
- Vákuový SPE prístroj (SUPELCO Visiprep)
- SPE kolónky – LiChrolut, EnviCarbII
- Chladiaci prístroj (ARDO)
- Tlaková flaša He, N₂
- Plynový chromatograf, TRACE GC ULTRA, FINNIGAN
- Hmotnostný spektrometer, MS TRACE DSQ, FINNIGAN
- GPC kolóna, DB - 5MS
- Automatický dávkovač pre 100 vzoriek, AS 3000

3.3 Vzorky vín

K analýze pesticídov bolo celkovo použitých 28 rôznych vzoriek vín, z čoho prevahu mali biele vína, ktorých bolo 16 druhov, červených 9 a ružových 3 druhy. Jednalo sa o vína získané z lokalít Moravy, Francúzska, Grécka, Španielska, Portugalska, Chile, Maďarska, Slovinska, Rakúska a tri boli označené ako zmes EU.

Všetky analyzované vzorky vín boli zakúpené v obchodných reťazcoch.

Tab.7: Použité vzorky vín

Označenie	Značka	Druh	Pôvod
1	Stolné víno	stolné biele víno	zmes EU
2	Stolné víno	stolné víno biele	Morava
3	Gruner Veltliner	-	Rakúsko
4	Veltínske zelené	moravské zemské víno	Morava
6	Ryzlink vlašský	moravské zemské víno	Morava
7	Ryzlink vlašský	odrodové akostné víno	Morava
9	Müller Thurgau	moravské zemské víno	Morava
10	Müller Thurgau	moravské zemské víno	Morava
11	Chardonnay	moravské zemské víno	Morava
12	Pinot Gris	kvalitné víno	Maďarsko
13	Pinot Gris	biele víno	Slovinsko
14	Pálava	moravské zemské víno	Morava
15	Tramín červený	moravské zemské víno	Morava
17	Stolné víno	stolné víno červené	Morava
18	Stolné víno	stolné víno červené	zmes EU
19	Modrý portugal	moravské zemské víno	Morava
20	Modrý portugal	moravské zemské víno	Morava
414	MATEUS ROSÉ	polosuché ružové víno	Portugalsko
421	Tsantali - Imiglygos	červené polosladké stolové víno	Grécko
422	Torre De Rejas Tempranillo	známkové révové červené víno	Španielsko
425	Limnio & Merlot	ovocné červené víno	Grécko
426	Cuvée Du Bailly Rosé	ružové víno	Francúzsko
430	Rosé D` Anjou	ovocné červené víno	Francúzsko
TP	Cabernet Sauvignon	červené víno	Čile
S	Sauvignon	víno s prívlastkom, neskorý zber, suché	Morava

3.4 Postup prípravy a analýzy vzoriek

3.4.1. Príprava, zakoncentrovanie a analýza vzoriek

Stanovenie rezíduí pesticídov vo víne spočíva z niekoľkých po sebe idúcich krokov. Ako prvé je potrebné vyizolovať analyty z matrice za dosiahnutia maximálnej výťažnosti a zároveň minimalizovať izolovanie matricových súčastí. Následne sa získaný extrakt prečisťuje, aby sa zbavil maximálneho množstva koextrahovaných látok zo surového extraktu a zároveň sa minimalizovali straty pesticídov. V treťom kroku dochádza k identifikácii a stanoveniu príslušných analytov za použitia vhodnej chromatografickej metódy so selektívnym detektorom. A na koniec sa potvrdzuje správnosť výsledkov.

K vyizolovaniu rezíduí pesticídov vo víne možno použiť metódu SPE (Extrakcia tuhou fázou), alebo extrakcia kvapalina – kvapalina, ktorá sa však v tomto prípade javí ako menej účinná, z dôvodu veľkej spotreby organických rozpúšťadiel či pracnosti.

K samotnej analýze vyizolovaných a zakoncentrovaných analytov sa využila metóda GC-MS, teda plynová chromatografia s detekciou hmotnostného spektrometra [47].

3.4.1.1 Extrakcia tuhou fázou (SPE)

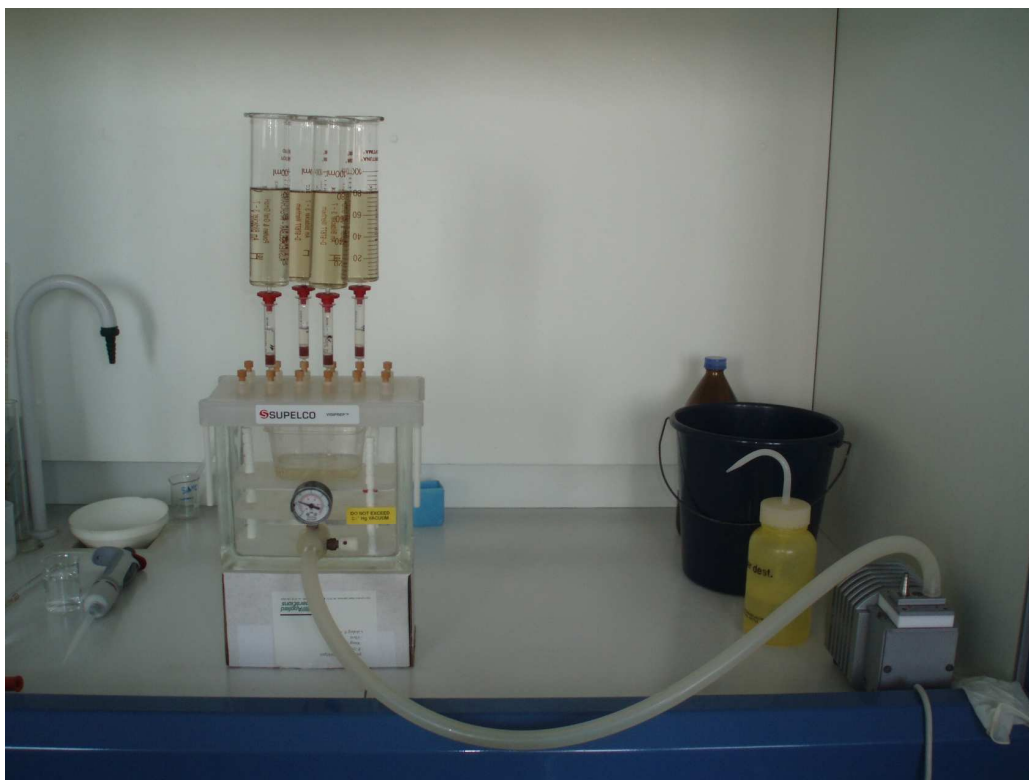
Izolácia maximálneho množstva analytov zo vzorky je najdôležitejším krokom celej analýzy, preto je potrebné jej venovať veľkú pozornosť, aby nedošlo k prípadu, kedy je spolu s analytom vyextrahované aj veľké množstvo interferujúcich látok, ktoré by neskôr mohli skomplikovať analýzu. Metóda SPE za použitia vhodnej kolónky predurčuje vysokú výťažnosť analytov.

Neupravené vzorky sú väčšinou nevhodné pre ďalšie chromatografické analýzy, pričom príčinami môžu byť nízke koncentrácie analytov, interferujúce nečistoty, nezlúčiteľnosť vlastnej matrice vzorky s chromatografickým systémom, alebo jej nebezpečnosť.

K izolácii rezíduí pesticídov z vín som použila kolónky LiChrolut, ktoré boli špeciálne vyvinuté a testované pre aplikácie z oblasti životného prostredia. Pracovala som podľa návodu, ktorý určil výrobca [33].

Postup SPE za použitia kolón LiChrolut

- V prípade kolón *LiChrolut* je nutné pri stanovení pesticídov upraviť pH vzoriek na hodnotu 5,5 – 6,0 za pomoci 2M NaOH.
- Kolóny *LiChrolut* sa aktivovali kondicionovaním 3 ml methanolu a 3 ml vody, pričom kolóny nesmeli vyschnúť, teda objem sa nevypustil celý!
- Po aktivácii kolón sa aplikovali vzorky. Opäť kolóny nesmeli vyschnúť!
- Premytie kolón 1ml vody a úplne vypustenie.
- Sušenie kolón v atmosfére dusíku počas 10 minút.
- Eluácia adsorbovaných analytov 2 x 3ml roztokom methanolu : ethylacetátu (1:1).
- Získaný eluát sa vysušil do sucha pomocou vákuovej odparky.
- K získanému vysušenému eluátu sa pridal 1ml methanolu.
- Prostredníctvom ultrazvuku sa vzorka sonifikovala cca 1minútu.
- Na záver sa prečistená a zakoncentrovaná vzorka s jednotlivými analytmi prepipetovala do vialky, ktorá bola príslušne označená, vložená do boxu a uschovaná v chlade [36].



Obr.16: Obrázok extrakcie tuhou fázou u vzoriek bielych vín za použitia kolón LiChrolut

3.4.1.2 SPE kolónky

V súčasnosti je na trhu široká škála SPE kolón, ktoré sú určené na aplikácie z rôznych oblastí, či už to je farmácia, analýza potravín, biochémia, životné prostredie a iné. Typ fázy a veľkosť kolónky sa volí na základe znalostí vlastností matrice a analytu [33].

Kolónka LiChrolut®

LiChrolut kolóny sú určené na rýchlu a spoľahlivú extrakciu tuhou fázou. K extrakcii dochádza v dôsledku silných, ale reverzibilných interakcií medzi analytom a povrchom stacionárnej fázy. Rôzne povrchové úpravy umožňujú priebeh nepolárnych extrakcií (LiChrolut® RP-18 a RP-18), polárne extrakcie (LiChrolut® Si a LiChrolut® KN), kation výmenné extrakcie (LiChrolut® SCX). Kombinácia režimu extrakcie (LiChrolut® TSC) a nepolárnej extrakcie polymérnych fáz (LiChrolut® SK) je vhodná na extrakciu pesticídov a fenolov vo vode alebo drog v telesných tekutinách [35].

Výhoda SPE za použitia LiChrolut® :

- rýchla príprava vzoriek
- vyššia hodnota výtlačnosti bez tvorby emulzie
- vysoká precíznosť analytických výsledkov za použitia príslušných kartridžov
- úspora rozpúšťadla, zníženie materiálových nákladov a nákladov na likvidáciu
- možnosť automatizácie celého procesu
- optimalizovaná, validovaná a certifikovaná výroba [36].

Charakteristika LiChrolut®

Kapacita kolóny je zmeraná v mg analytu/ g sorbentu, čo znamená, že za rovnakých podmienok kondicionovania, dochádza k rôznej adsorbcii a desorbcii rovnakým množstvom vzorky.

Multi–stupňový purifikačný proces uskutočnený prostredníctvom kolón LiChrolut® sa stáva obzvlášť cenný, pokiaľ sa jedná o stopové analýzy. Podiel eluovaných komponentov je zanedbateľne malý, čo má za následok vyššie čisté výťažky.

Kolóny LiChrolut® podliehajú prísnyh kontrolám kvality, ktoré sa začínajú už pri výbere materiálu. Práve špeciálne vyvinuté, overené a certifikované výrobné procesy zabezpečujú vysoký stupeň čistoty LiChrolut® sorbentu.

LiChrolut®EN

Tento typ kolóny zabezpečuje najvyššiu kapacitu pre SPE. LiChrolut®EN boli špeciálne vyvinuté pre použitie v analýze životného prostredia. Využívajú sa na stanovenia vysoko kontaminovaných látok alebo veľmi polárnych organických komponentov. Vyznačujú sa výbornou adsorbčnou kapacitou na polárne organické rozpúšťadla (anilín, triazin, fenol a iné), čo spôsobuje veľký merný povrch. V porovnaní s LiChrolut®RP-18 (nepolárne) má LiChrolut®EN desaťnásobne vyššiu kapacitu. Už 200 mg sorbentu je dostatočné na reprodukovateľnú extrakciu a vysokú výťažnosť.

Výhody LiChrolut®EN

- použitie bežných organických rozpúšťadiel, tlmivých roztokov, kyselín a zásad v celom rozsahu pH
- úspora rozpúšťadiel – malé množstvá potrebné na kondicionovanie a eluáciu kolóny
- úspora času
- zlepšené analýzy – menšie množstvá rozpúšťadiel potrebných na eluáciu, čo vedie k nižším stupňom znečistenia a zvýšeniu citlivosti detekcie [36].

Tab.8:Špecifikácia LiChrolut®EN [36]

Typ sorbentu	Ethyl vinyl benzén, divinyl benzénový polymer
Tvar častíc	Neusporiadaný
Veľkosť častíc	40 – 120 µm
Špecifický povrch	1200 m ² /g
Objem pórov	0,75 ml/g
Stabilita	pH 1 – 13
Kapacita	500 mg kafeínu /g sorbentu (polárne analýzy), 500 mg DIDP/g sorbentu (nepolárna analýza)

3.4.2 GC–MS analýza

Táto metóda bola využitá k stanoveniu 17 pesticídov vo vzorkách vína. GC-MS bolo napojené na počítač prostredníctvom ktorého sa riadil celý proces analýzy za použitia programu **Xcalibur**.

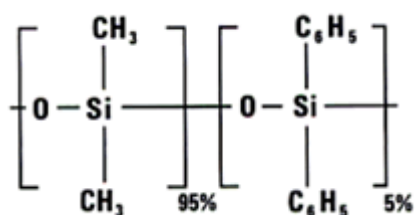


Obr.17: Plynový chromatograf s MS detektorom

3.4.2.1 Chromatografická kolóna

Voľba stacionárnej fázy je určovaná predovšetkým potrebným rozlíšením, aby došlo k dokonalkej separácii jednotlivých komponentov. Plynová chromatografia za využitia kapilárnych kolón patrí medzi najvýkonnejšie metódy, ktoré slúžia predovšetkým k analýze mnohozložkových a izomérnych zmesí. Najvýznamnejšia skupina stacionárnych fáz sú polysiloxány s rôznymi postrannými reťazcami. V súčasnosti sú preferované najmä siloxánové stacionárne fázy s funkčnými polárnymi alebo nepolárnymi skupinami.

K separácii pesticídov vo víne som použila kolónu *DB – 5MS*. Ide o kapilárnu kolónu s chemicky viazanou nepolárnou fázou (Obr.18), ktorá vykazuje vynikajúcu inertnosť voči aktívnym zložkám. Je vhodná pre amíny, narkotiká, fenoly, pesticídy či barbituráty. Jej základné parametre sú uvedené v Tab9.



Obr.18: Fenyl-arylenová (95%) ekvivalentná fáza (5% Phenol) – methylpolysiloxan [48]

Tab.9: Charakteristika kolóny DB – 5MS

Dĺžka kolóny	60 m
Vnútorň priemer	0,25 mm
Hrúbka	0,25 µm
Teplotný limit	60 – 325 (350) °C

3.4.2.2 Podmienky GC-MS analýzy

Chromatografická kolóna: Kapilárna kolóna DB – 5MS

Nástrek: 1 µl

Doba analýzy: 73 min

Teplotný program: Začiatková teplota 70 °C, Hold Time 1 min

Rampa: Rate 5 °C/min., teplota 280 °C, Hold Time 30min

Pec: max 330°C

Regulovaný prietok nosného plynu:

Začiatkový prietok 1,5 ml/min, Hold Time 1 min

Rampa: Rate 0,1 ml/min/min, Prietok 3 ml/min, Hold Time 7 min

Splitless režim: Split flow – 50 ml/min

Split time – 0,80 min

Inlet temperature – 280 °C

Zvolený spektrometrický režim: Full scan (50 - 450)

Scan SIM (Selective Ion Monitoring) – výber pre jednotlivé analyty

Hmotnostný analyzátor: Kvadrupól

3.5 Validácia metódy

Validácia analytickej metódy slúži k overovaniu vhodnosti, správnosti a spoľahlivosti danej metódy. Cieľom validácie je preukázať, či je vypracovaná metóda vhodná k danej analýze.

Validácia analytickej metódy vyžaduje stanovenie nasledujúcich validačných charakteristík metódy:

- Zhodnosť (Opakovateľnosť)
- Medza detekcie a medza stanoviteľnosti [49]

3.5.1 Zhodnosť

Opakovateľnosť charakterizuje relatívna smerodajná odchýlka s_R (17), ktorá sa vypočíta zo smerodajnej odchýlky s a aritmetického priemeru $\bar{x}$ v sérii meraní v podmienkach opakovateľnosti. Je definovaná ako miera tesnosti zhody medzi vzájomne nezávislými výsledkami skúšok získaných tou istou metódou na identických skúšaných materiáloch, v tom istom laboratóriu, tým istým operátorom, za použitia toho istého vybavenia počas krátkeho časového rozpätia.

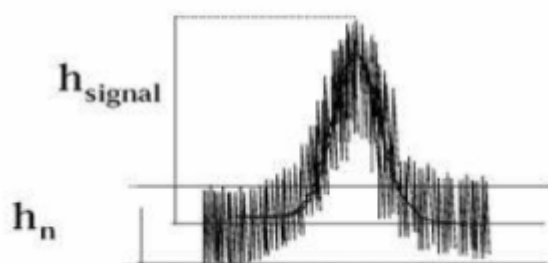
$$s_R = \frac{s}{\bar{x}} 100\% \quad (17)$$

3.5.3 Medza detekcie a medza stanoviteľnosti

Medza detekcie (LOD – Limit Of Detection) individuálneho analytického postupu vo všeobecnosti predstavuje najnižšie množstvo analytu vo vzorke, ktoré sme schopní detekovať. Pod touto koncentráciou teda nie je možné s dostatočnou pravdepodobnosťou rozhodnúť o prítomnosti daného analytu.

Medza stanoviteľnosti (LOQ – Limit Of Quantification) individuálneho analytického postupu vo všeobecnosti predstavuje najnižšie množstvo analytu vo vzorke, ktorú sme schopní stanoviť s prijateľným stupňom správnosti a presnosti.

Medza detekcie a medza stanoviteľnosti je viazaná ku koncentrácii analytu vo vzorke, ktorý v použítom detekčnom systéme vykazuje pomer signálu k šumu 3 (LOD) a 10 (LOQ) [49].



$$\text{LOD} = 3 \cdot h_n / m$$

$$\text{LOQ} = 10 \cdot h_n / m$$

h_n šum na základnej línii

m smernica kalibračnej krivky

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Všetky vzorky boli prečistené metódou SPE a následne analyzované technikou GC-MS, kde boli analyty stanovené na základe retenčných časov a hmotnostných spektier. GC-MS umožňuje kvalitatívnu a rovnako aj kvantitatívnu analýzu.

Kvalitatívna analýza bola uskutočnená prostredníctvom programu **Xcalibur** za použitia *Quality Browser*, kde boli jednotlivé analyty vyhodnotené pomocou hmotnostných spektier, ktoré boli porovnávané s databázou spektier v počítači. Štandardy boli nastreknuté jednotlivo, ale aj vo forme zmesného štandardu.

Kvantitatívna analýza bola vyhodnotená pomocou *Quantity Browser* programu **Xcalibur**.

4.1 Štandardy

Nasledujúca tabuľka obsahuje prehľad základných parametrov jednotlivých analytov získaných GC-MS analýzou za použitia kapilárnej kolóny *DB – 5MS*. Ukážky chromatogramov a hmotnostných spektier sú uvedené v prílohe.

Tab.10: Prehľad analytov

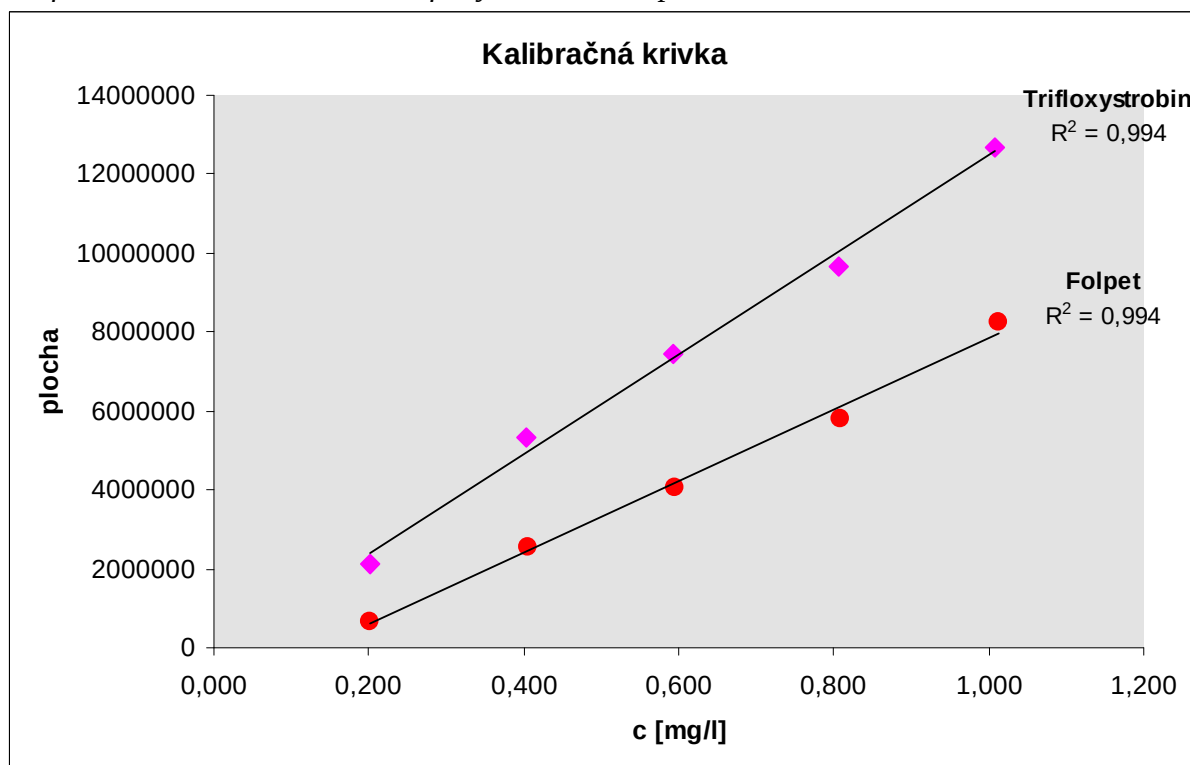
	účinná látka	Skratka	M [g/mol]	Rt čas [min]	Hmoty použité pre SIM m/z
1	Pyrimethanil	Py	199,25	27,36	77, 198, 200, 211, 272
2	Vinclozolin	Vi	286,11	29,20	53, 124, 187, 198, 212
3	Pirimiphos-methyl	P-M	305,34	30,18	233, 262, 276, 290, 305
4	Chlorpyrifos	ChP	350,59	30,90	97, 197, 258, 314
5	Triadimefon	TDM	293,75	31,35	57, 85, 128, 181, 208
6	Penconazol	PA	284,18	32,46	159, 161, 186, 245, 248
7	Captan	C	300,59	32,97	77, 79, 117, 149, 264
8	Folpet	F	296,56	33,19	76, 104, 117, 130, 260
9	Picoxystrobin	PS	307,32	33,92	145, 173, 204, 303, 335
10	Flusilazol	FIA	315,39	35,03	123, 206, 220, 234, 315
11	Kresoxim-methyl	K-M	313,35	35,09	89, 116, 131, 206, 233
12	Trifloxystrobin	TS	408,37	37,41	116, 131, 146, 186, 206
13	Tebuconazol	TA	307,82	38,32	70, 83, 125, 250, 252
14	Dinocap 1	D1	364,39	38,18	69, 150, 207, 281
	Dinocap 2	D2	364,39	38,67	69, 150, 207, 282
14	Dinocap 3	D3	364,39	39,15	69, 150, 207, 283
14	Dinocap 4	D4	364,39	39,60	69, 150, 207, 284
14	Dinocap 5	D5	364,39	40,56	69, 150, 207, 285
15	Fenarimol	FA	331,20	41,93	107, 139, 219, 251, 330
16	Azoxystrobin	AS	403,39	50,80	207, 344, 345, 388, 403
17	Dimethomorph 1	DM1	387,86	51,26	165, 301, 303, 387
17	Dimethomorph 2	DM2	387,86	52,59	165, 301, 303, 388

4.2 Kalibračná krivka

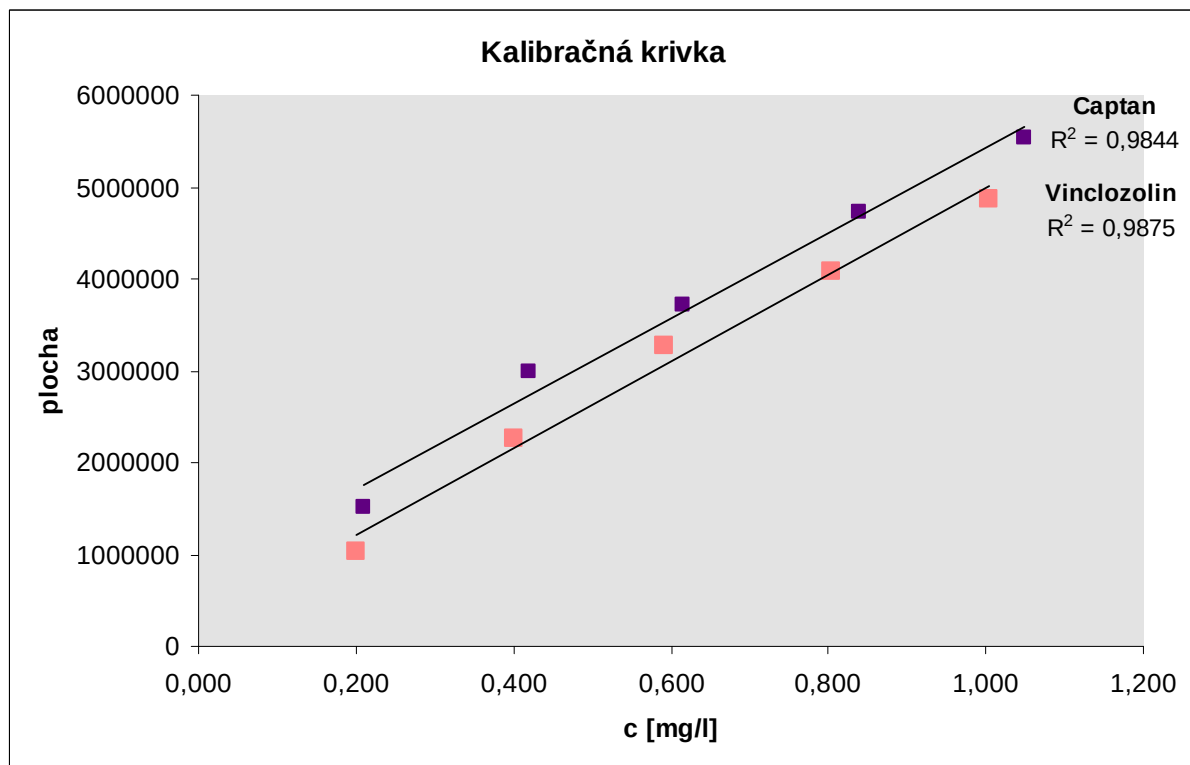
Na získanie kalibračnej krivky bola použitá päť bodová kalibrácia s postupne vzrastajúcou koncentráciou zmesného štandardu. Hodnoty koncentrácií sa pohybovali v rozmedzí 0,02 – 2

mg/l. Kalibračná krivka bola zostrojená ako grafická závislosť plochy píku na koncentrácii analytu v jednotlivých štandardoch.

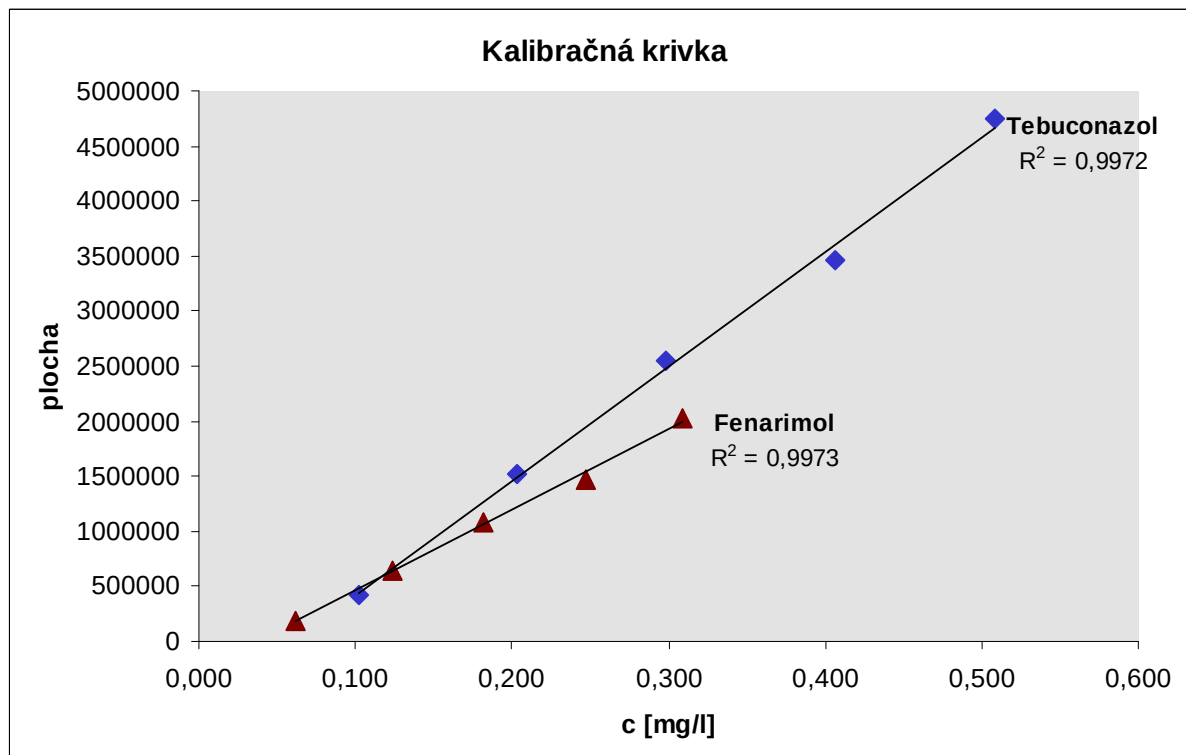
Graf č.1: Kalibračná krivka – Trifloxystrobin a Folpet



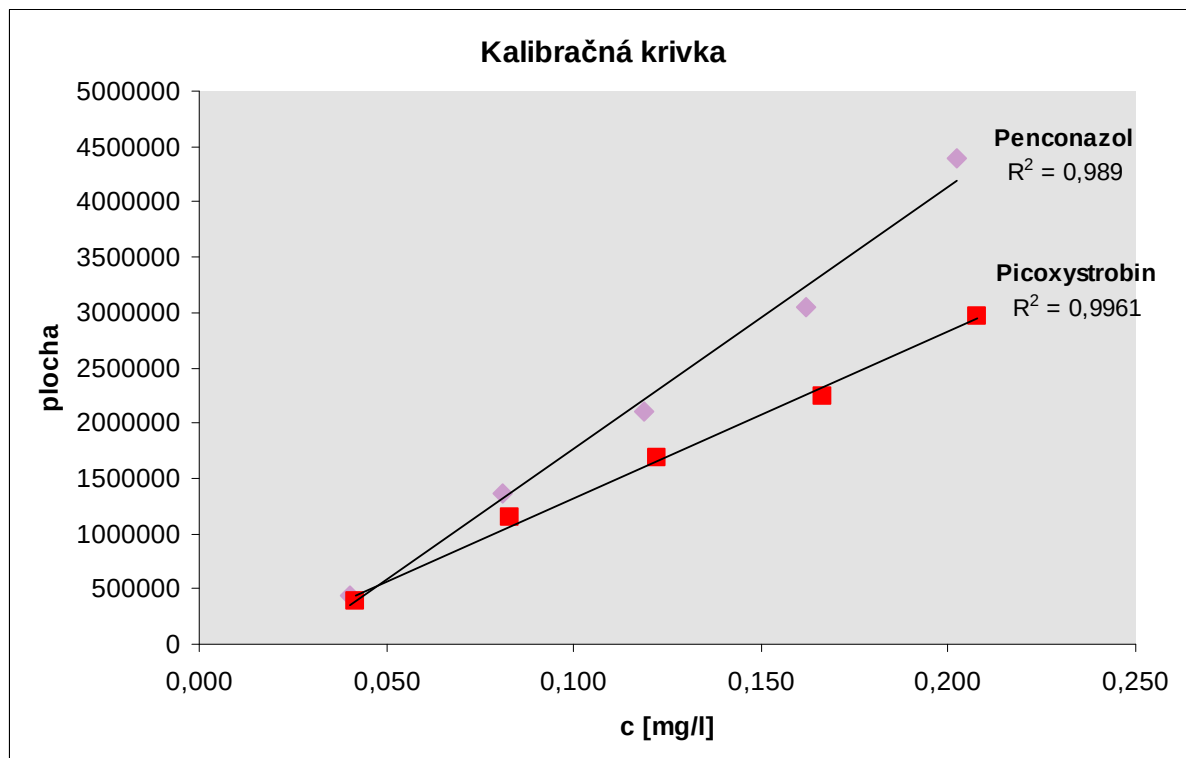
Graf č. 2: Kalibračná krivka – Captan a Vinclozolin



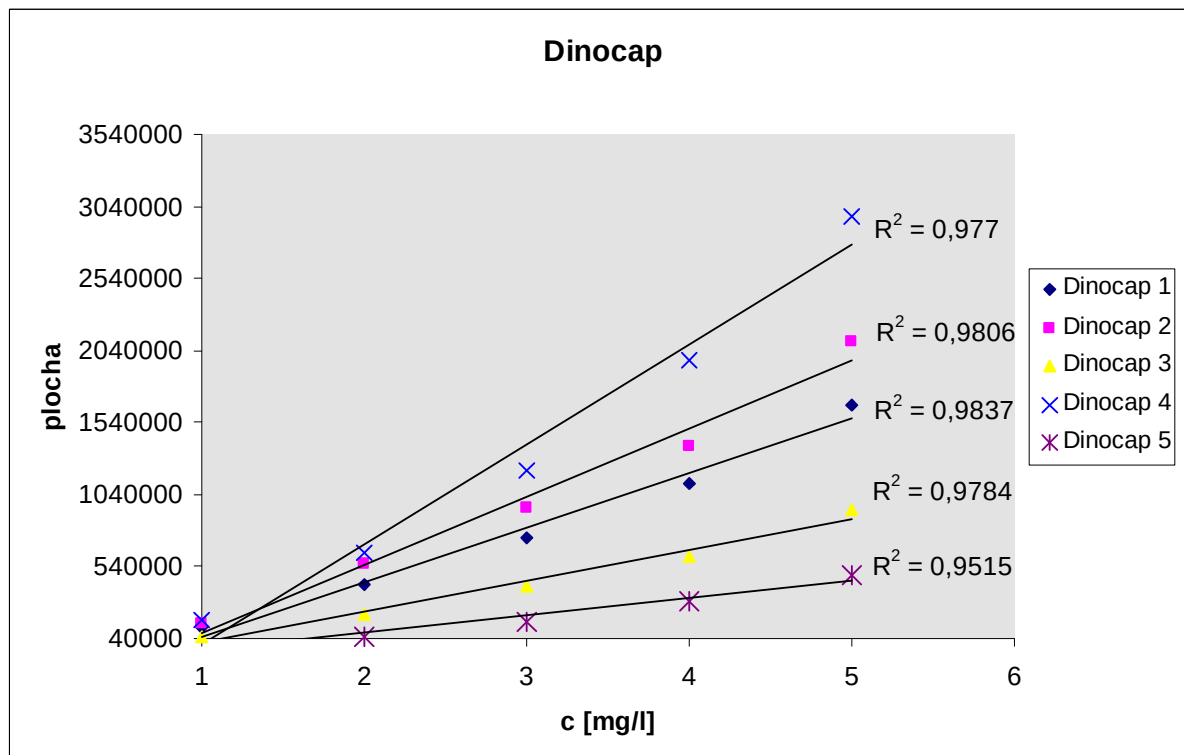
Graf č.3: Kalibrační krivka –Tebuconazol a Fenarimol



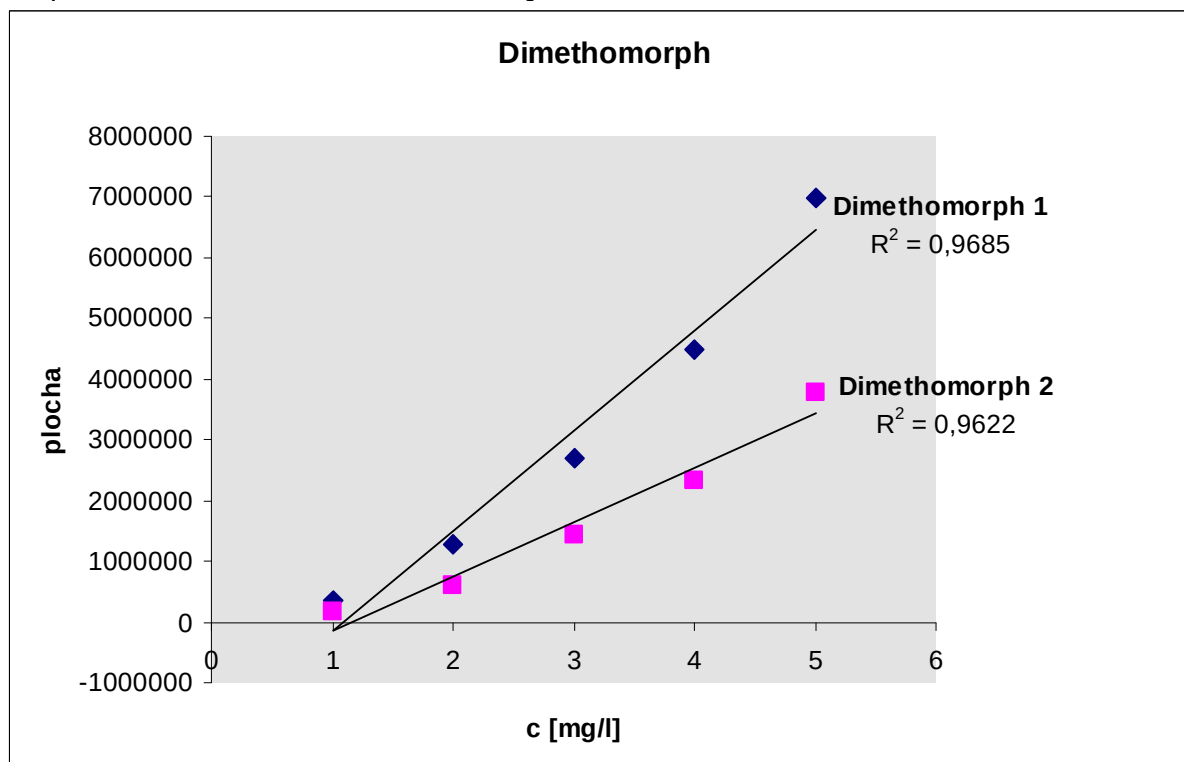
Graf č.4: Kalibrační krivka – Penconazol a Picoxystrobin



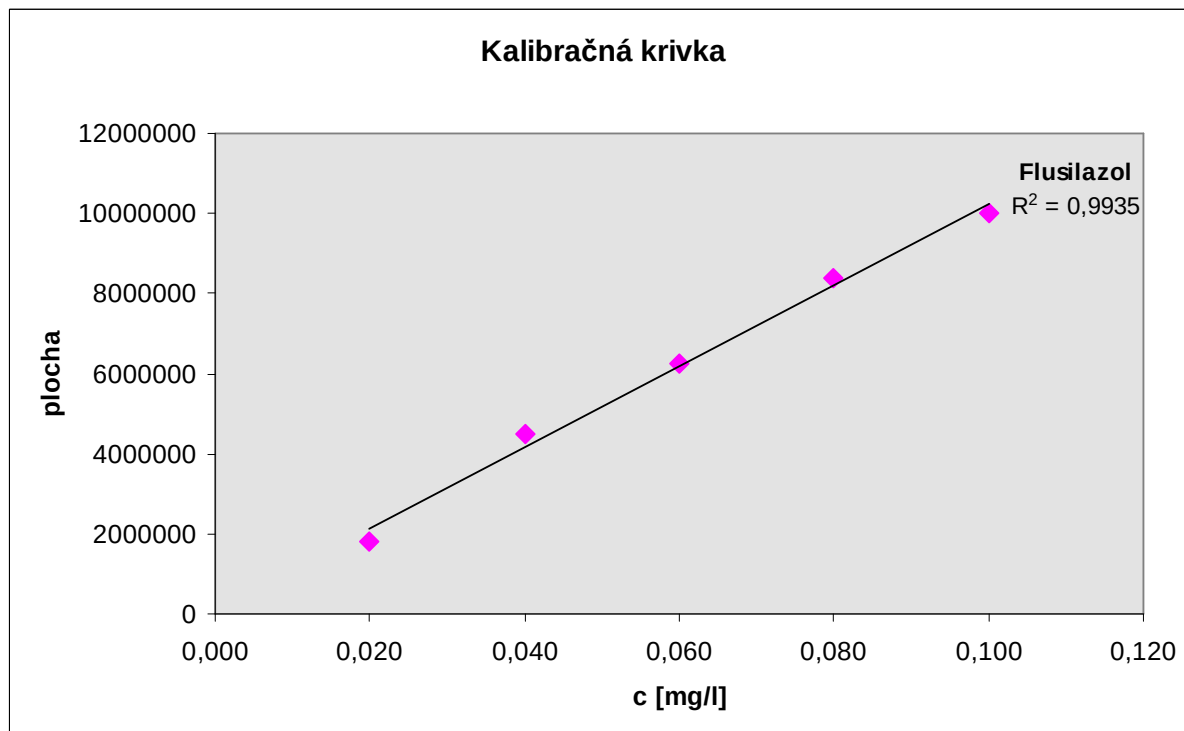
Graf č.5: Kalibrační krivka Dinocap



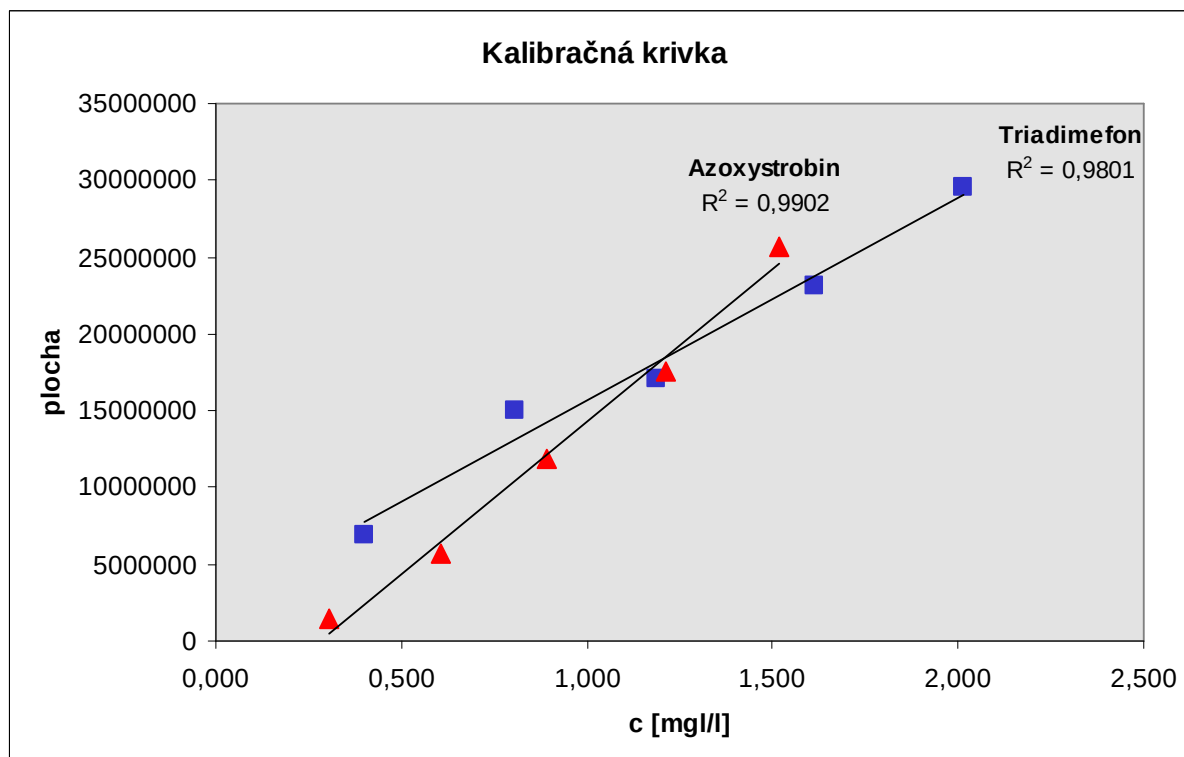
Graf č.6: Kalibrační krivka Dimethomorph



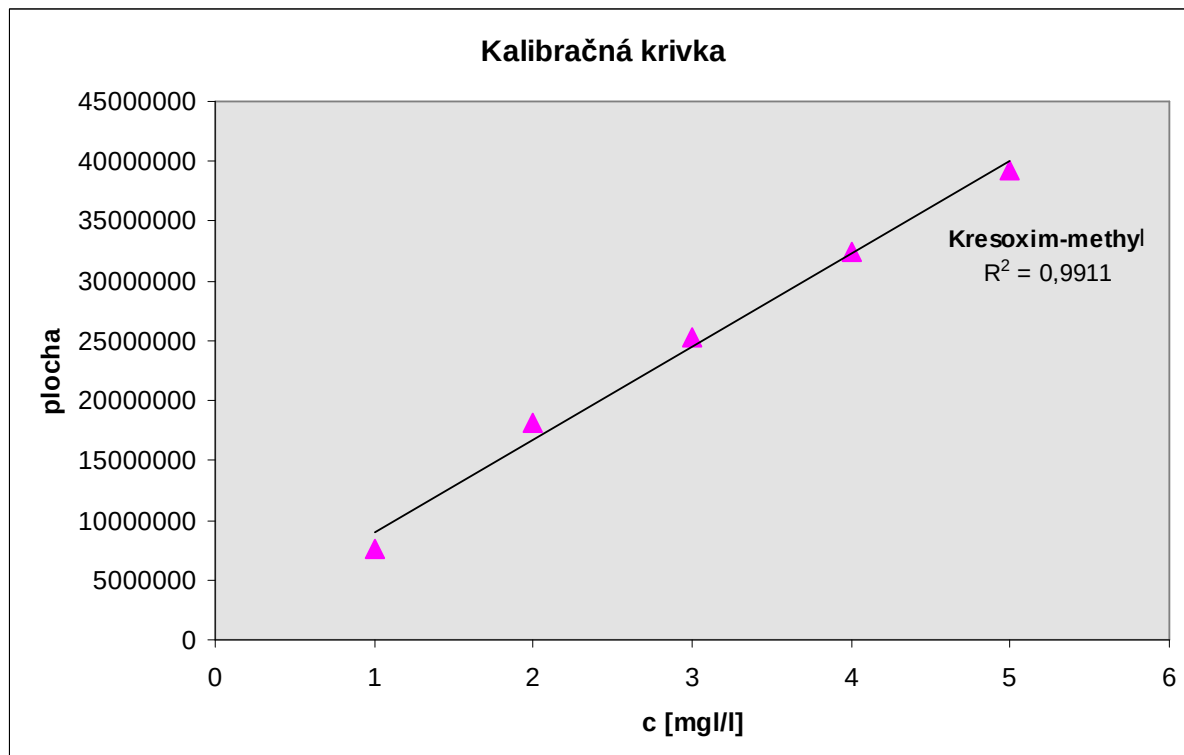
Graf č.7: Kalibrační krivka Flusilazol



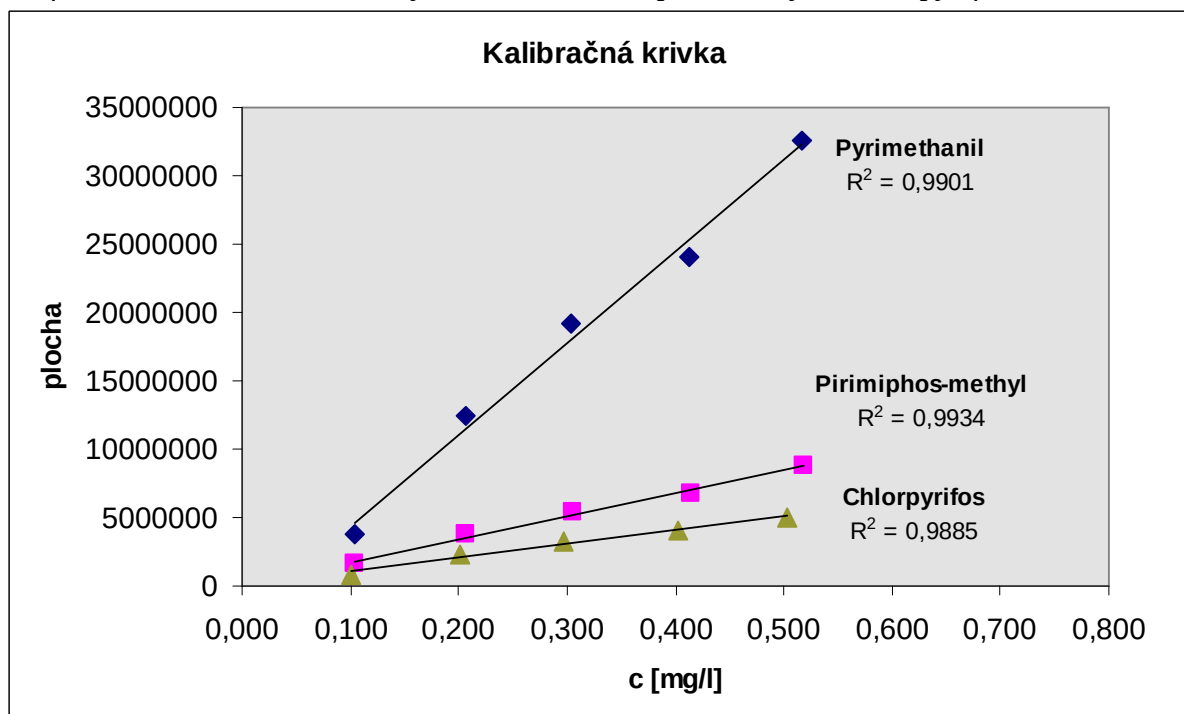
Graf č.8: Kalibrační krivka: Azoxystrobin a Triadimefon



Graf č.9: Kalibrační krivka Kresoxim-methyl



Graf č.10: Kalibrační krivka: Pyrimethanil, Pirimiphos-methyl a Chlorpyrifos



4.3 Optimalizácia SPE

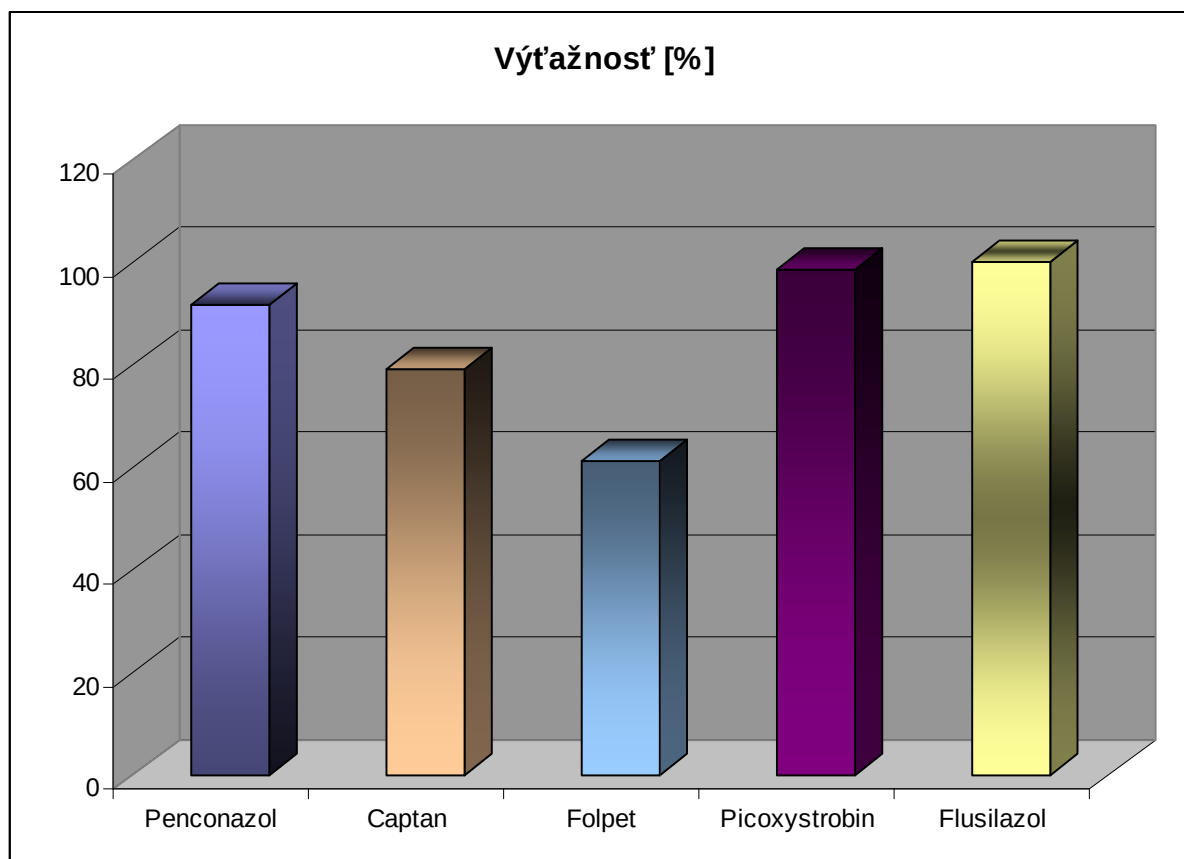
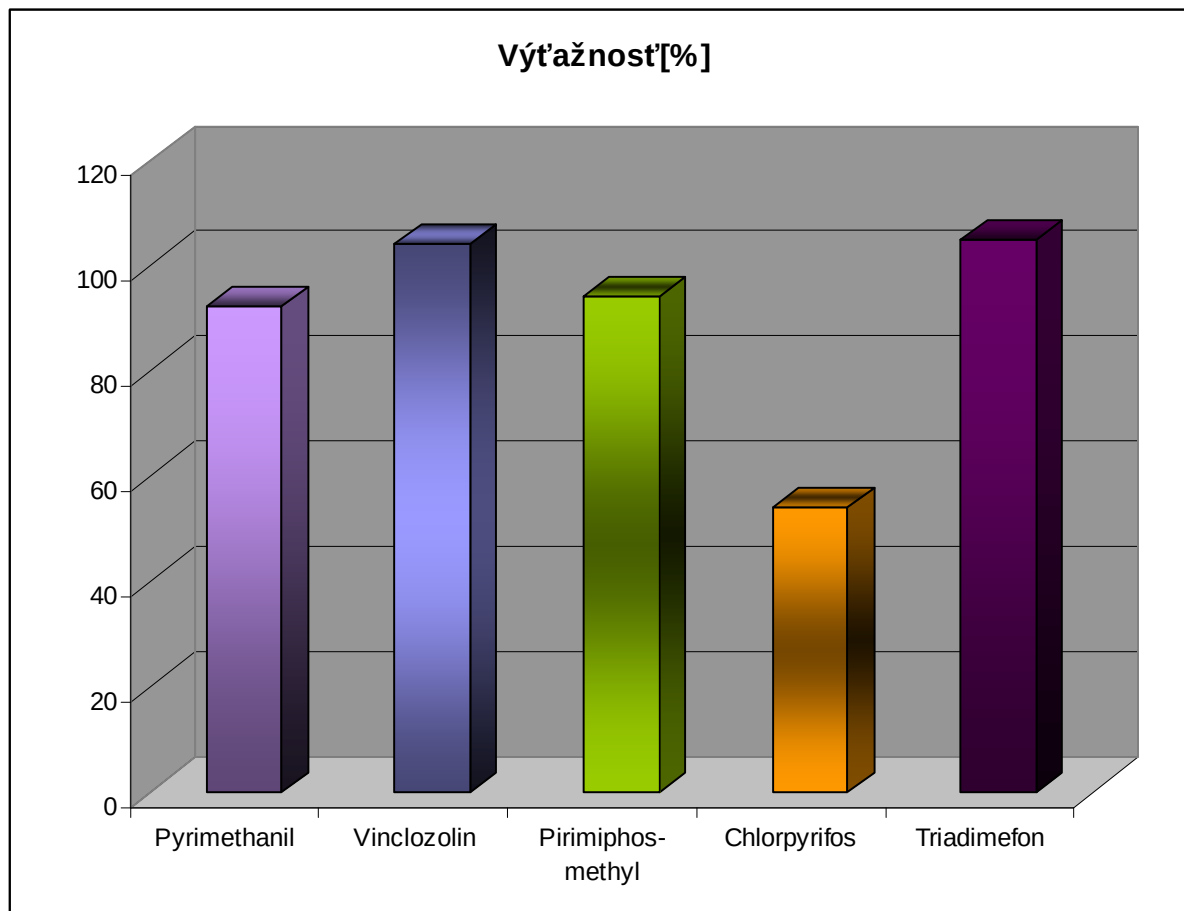
Izolácia a čistenie požadovaných analytov zo vzorky je najdôležitejším krokom celej analýzy, pretože je potrebné zabrániť prenikaniu ďalších nežiaducich komponentov, ktoré by mohli skomplikovať analýzu. V mojej práci som sa zamerala na izoláciu a zároveň aj čistenie jednotlivých účinných látok pomocou metódy SPE za použitia kolón *LiChrolut*, ktoré boli špeciálne určené na environmentálne analýzy. SPE umožňuje použitie aj iných kolón s touto špecifikáciou (napr. ENVI CARB-II/PSA), ktoré však v mojom prípade nevykazujú takú účinnosť ako už spomínané kolónky *LiChrolut*, u ktorých výrobca určil presný návod na analýzu pesticídov.

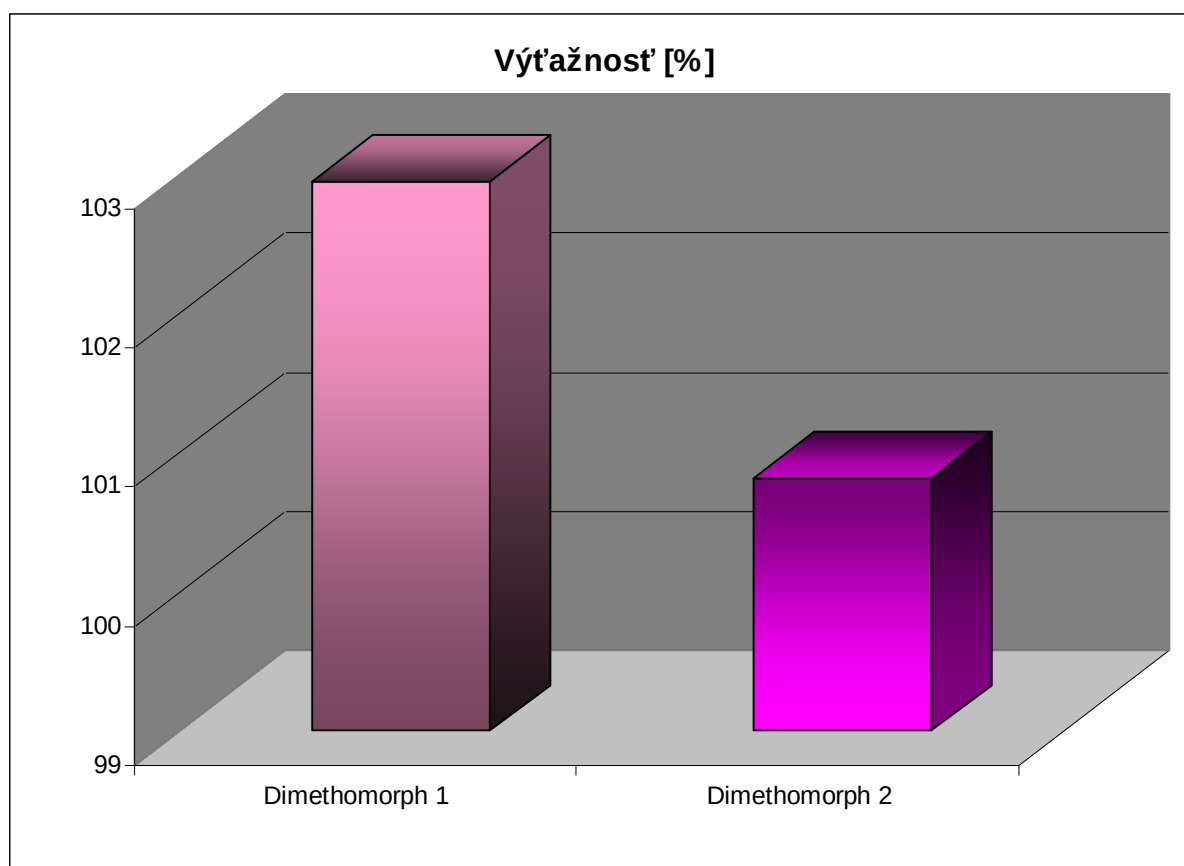
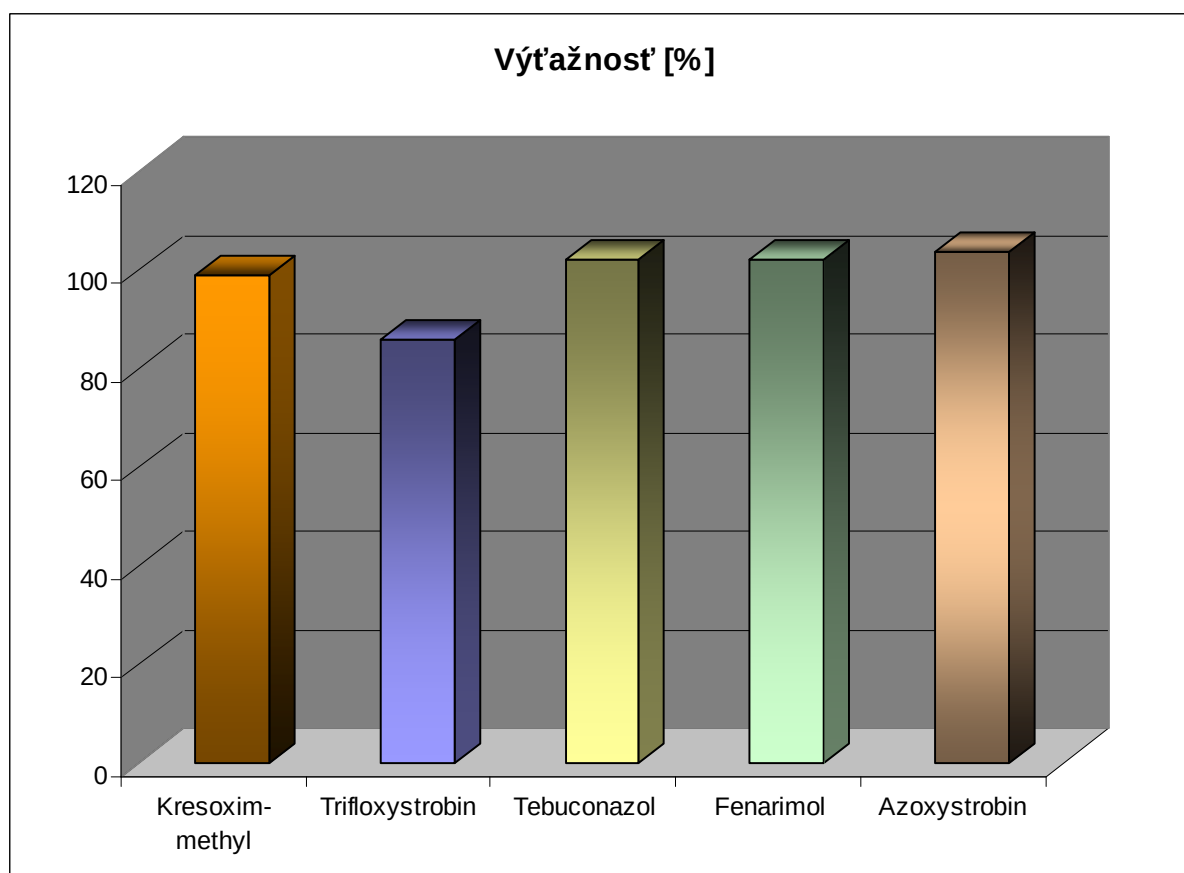
Výtlačnosti jednotlivých analytov vo vzoriek vína za použitia kolóniek *Lichrolut* sú uvedené v príslušnej tabuľke (Tab.11) a následne sú vyjadrené aj graficky (*Graf č.11*).

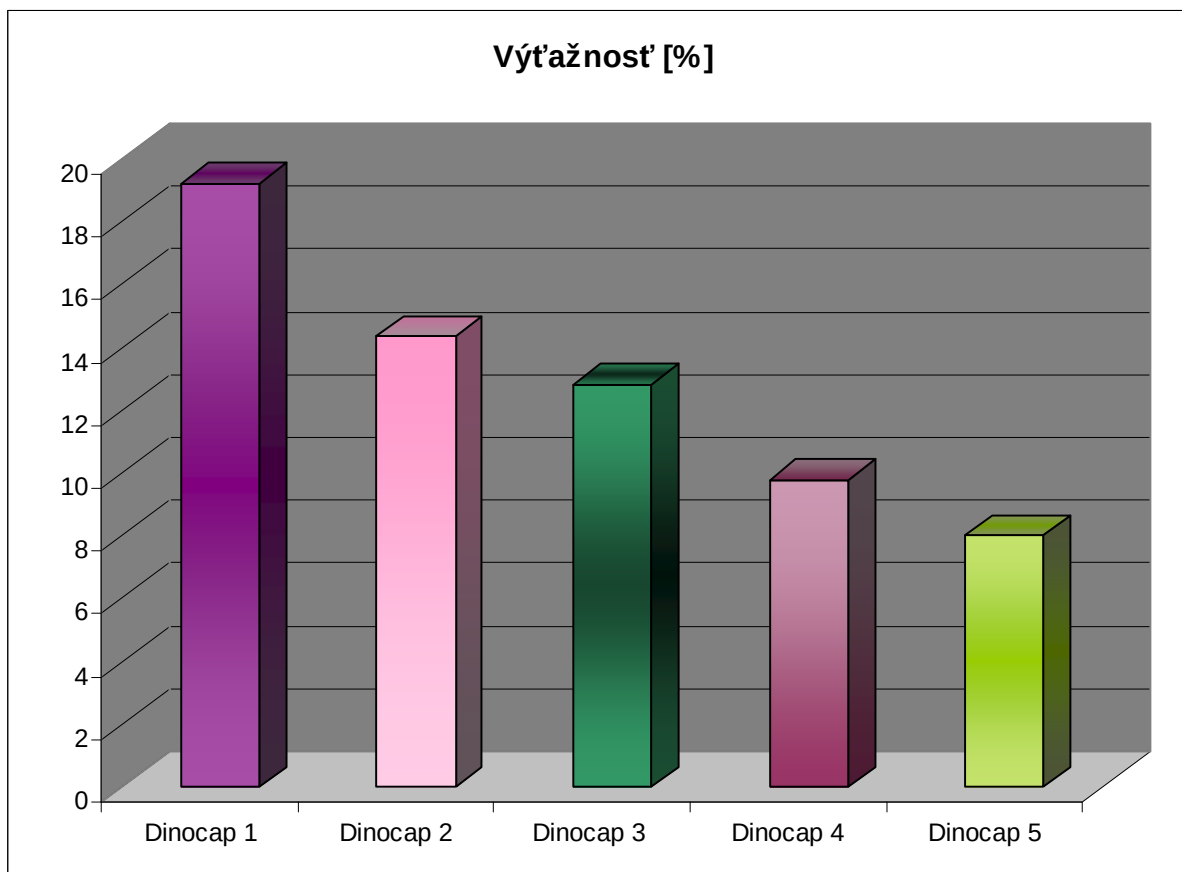
Tab.11: Výtlačnosť

Analyt	Výtlačnosť [%]
Pyrimethanil	92,25
Vinclozolin	104,24
Pirimiphos-methyl	94,24
Chlorpyrifos	54,23
Triadimefon	104,81
Penconazol	91,79
Captan	79,30
Folpet	61,28
Picoxystrobin	98,59
Flusilazol	100,22
Kresoxim-methyl	98,86
Trifloxystrobin	85,62
Tebuconazol	101,96
Dinocap 1	19,22
Dinocap 2	14,36
Dinocap 3	12,82
Dinocap 4	9,77
Dinocap 5	8,02
Fenarimol	101,91
Azoxystrobin	103,65
Dimethomorph 1	102,95
Dimethomorph 2	100,82

Graf č.11: Výťažnosti daných analytov za použitia kolónky LiChrolut







4.4 Optimalizácia GC-MS

K zabezpečeniu úspešnej detekcie jednotlivých rezíduí účinných látok, bolo potrebné optimalizovať použitú metódu stanovenia - plynovú chromatografiu s MS detektorom. Tento krok zahŕňoval výber vhodnej kolóny, optimalizáciu metódy plynovej chromatografie a hmotnostného spektrometra.

Výber kolóny

Výber vhodnej kolóny je nevyhnutný pre zabezpečenie dostatočnej separácie analytov. Použitá kapilárna kolóna DB – 5MS vykázala inertnosť voči analyzovaným účinným látkam a umožnila ich výborné rozdelenie.

Optimalizácia metódy plynovej chromatografie

Voľba vhodného teplotného režimu, ktorý zabezpečil dostatočnú separáciu analytov, a teda aj dostatočné rozlíšenie pík. Za štartovaciu teplotu sa stanovilo 70 °C. Po prvej minúte sa začala zvyšovať teplota o 5 °C za minútu až do dosiahnutia maximálnej teploty 280 °C.

Taktiež voľba vhodného prietoku nosného plynu je dôležitým ukazovateľom úspešnej separácie a eluácie analytu.

Optimalizácia metódy hmotnostného spektrometra

Súvisí s voľbou SIM režimu, kedy sa do systému zadávali hmoty (m/z) charakteristické pre jednotlivé vybrané účinné látky a tým sa získalo hmotnostné spektrum s príslušnými analytmi.

4.5 Validácia metódy

Validácia metód je nevyhnutná k tomu, aby sme preukázali, že je vypracovaná metóda vhodná k danej analýze.

4.5.1 Medza detekcia a medza stanoviteľnosti

Medza detekcia (LOD) a medza stanoviteľnosti (LOQ) boli vypočítané pomocou programu **Xcalibur** pomerom signál šum.

Tab.12: Validáčn é parametre

validačné parametre		LOD [mg/l]	LOQ [mg/l]
účinná látka			
1	Pyrimethanil	0,002	0,007
2	Vinclozolin	0,0005	0,002
3	Pirimiphos-methyl	0,000001	0,000003
4	Chlorpyrifos	0,001	0,002
5	Triadimefon	0,006	0,020
6	Penconazol	0,0004	0,001
7	Captan	0,017	0,057
8	Folpet	0,008	0,027
9	Picoxystrobin	0,001	0,002
10	Flusilazol	0,001	0,002
11	Kresoxim-methyl	0,004	0,015
12	Trifloxystrobin	0,004	0,013
13	Tebuconazol	0,004	0,014
14	Dinocap 1	0,001	0,003
14	Dinocap 2	0,002	0,006
14	Dinocap 3	0,002	0,006
14	Dinocap 4	0,002	0,006
14	Dinocap 5	0,001	0,004
15	Fenarimol	0,001	0,003
16	Azoxystrobin	0,003	0,01
17	Dimethomorph 1	0,007	0,023
17	Dimethomorph 2	0,002	0,006

4.5.2 Relatívna opakovateľnosť (RSD)

Dáta na vyhodnotenie relatívnej opakovateľnosti boli namerané za podmienok merania opakovateľnosti, t.j. v tom istom laboratóriu, tým istým pracovníkom, za použitia toho istého vybavenia počas krátkeho časového intervalu. RSD u jednotlivých analytov bola získaná z výpočtov relatívnej smerodajnej odchýlky, ktorá sa pohybovala od 10 – 20. Presné hodnoty sú uvedené v nasledujúcej tabuľke (Tab.13).

Tab.13: Opakovateľnosť metódy

Analyt	RSD [%]
Pyrimethanil	11,87
Vinclozolin	11,29
Pirimiphos-methyl	10,34
Chlorpyrifos	12,46
Triadimefon	13,48
Penconazol	13,35
Captan	13,11
Folpet	11,54
Picoxystrobin	12,87
Flusilazol	15,27
Kresoxim-methyl	11,62
Trifloxystrobin	11,78
Tebuconazol	13,80
Dinocap 1	14,51
Dinocap 2	14,89
Dinocap 3	14,59
Dinocap 4	14,35
Dinocap 5	15,82
Fenarimol	14,06
Azoxystrobin	16,23
Dimethomorph 1	17,16
Dimethomorph 2	19,98

4.5 Namerané hodnoty

V 28 vzorkách vín bolo stanovovaných 17 druhov pesticídov, z ktorých Dinocap mal 5 a Dimethomorph 2 druhy izomérov. K analýze týchto látok, ktoré sa vo vzorkách vyskytujú v stopových množstvách bolo použitá vysoko citlivá a selektívna metóda, ktorá sa často uvádza v odbornej literatúre. Išlo o plynovú chromatografiu s detekciou hmotnostného spektrometra. Skutočné hodnoty analytov boli získané pomocou programu **Xcalibur** za použitia *Quantity Browser*, prepočítané na použité objemy vzoriek a následne na výťažnosť.

Z výsledkov analýz je zrejmé, že žiadna z účinných látok sa nevyskytovala vo vzorkách vín vo väčšom množstve ako je povolený limit (Tab.14). Niektoré druhy analytov sa vo vzorkách vôbec nevyskytovali, o čom vypovedá označenie N, iné sa nachádzali pod medzou stanoviteľnosti, čo je charakteristické značením < LOQ. Všetky získané hodnoty sú uvedené v Tab.15 a Tab.16.

Na MLR sa vzťahuje vyhláška č.381/2007 o stanovení maximálních limitů reziduí pesticídů v potravinách a surovinách. Táto vyhláška bola novelizovaná na č. 387/2008.

Vyhláška č. 381/2007

§2

Členenie potravín, názvy a definícia rezíduí pesticídov a ich množstvá

„Potraviny rastlinného pôvodu môžu obsahovať vyšší obsah rezíduí pesticídov iba v prípade, že potravina nie je určená k priamej konzumácii spotrebiteľom a za podmienky, kedy spôsob spracovania preukázateľne zníži obsah rezíduí pesticídov v nich alebo na nich obsiahnutých tak, aby výsledné množstvo rezíduí pesticídov v potravine neprekročilo maximálne limity rezíduí pesticídov upravené v prílohe č. 2 k tejto vyhláške. Takto upravené potraviny nemožno použiť k výrobe potravín pre výživu kojencov a malých detí.“ [50].

Tab.14: Limity jednotlivých analytov v potravinách [50]

Účinná látka	MLR [mg/l]
Pyrimethanil	2
Vinclozolin	5
Pyrmiphos-methyl	2
Chlorpyrifos	0,5
Triadimefon	2
Penconazol	0,1
Captan	10
Folpet	10
Picoxystrobin	0,05
Flusilazol	0,1
Kresoxim-methyl	1
Trifloxystrobin	3
Tebuconazol	0,5
Dinocap	0,1
Fenarimol	0,3
Azoxystrobin	2
Dimethomorph	0,2

Tab.15: Namerané hodnoty analytov vo víne

Analyt [mg/l]	Py	Vi	P-M	ChP	TDM	PA	C	F	PS
vzorky vín									
1	0,054	0,060	N	N	< 0,020	0,049	< 0,057	N	0,025
2	0,054	0,068	N	N	< 0,020	0,049	< 0,057	N	N
3	0,054	0,055	N	N	< 0,020	N	< 0,057	N	0,025
4	0,054	N	N	N	< 0,020	N	< 0,057	N	N
5	0,019	0,076	0,019	0,071	< 0,020	0,046	0,002	N	0,021
6	N	N	N	N	< 0,020	N	0,008	N	0,021
7	0,020	0,079	N	N	< 0,020	N	0,004	N	0,021
8	0,019	0,079	N	N	< 0,020	0,046	0,011	N	0,021
9	0,019	0,079	N	N	< 0,020	N	0,013	N	0,021
10	0,029	N	0,028	N	< 0,020	N	0,185	N	0,030
11	0,020	N	N	N	< 0,020	N	0,119	N	0,020
12	0,019	N	N	N	< 0,020	0,036	0,127	N	0,020
13	0,024	N	N	N	< 0,020	0,036	0,119	N	N
14	0,019	N	N	N	< 0,020	0,036	0,117	N	N
15	0,045	0,097	0,032	N	< 0,020	N	0,004	N	0,002
16	< 0,007	< 0,002	N	N	< 0,020	N	< 0,057	N	N
17	0,074	0,072	N	N	< 0,020	0,005	0,099	N	0,010
18	< 0,007	< 0,002	N	N	< 0,020	< 0,001	< 0,057	N	< 0,002
19	0,071	0,071	N	N	< 0,020	0,003	0,106	N	0,009
20	0,075	0,065	N	N	< 0,020	0,003	0,076	N	0,008
414	0,029	0,056	0,029	N	< 0,020	N	N	N	0,001
421	0,033	< 0,002	<3.10 ⁻⁶	N	< 0,020	< 0,001	< 0,057	N	< 0,002
422	< 0,007	< 0,002	<3.10 ⁻⁶	N	< 0,020	< 0,001	< 0,057	N	< 0,002
425	0,029	N	N	N	< 0,020	0,008	N	N	0,001
426	0,029	N	0,029	N	N	0,008	N	N	N
430	0,032	N	N	N	< 0,020	N	N	N	0,001
S	0,050	0,050	N	N	< 0,020	N	< 0,057	N	0,023
TP	< 0,007	N	N	N	< 0,020	< 0,001	< 0,057	N	< 0,002

Tab.16: Namerané hodnoty analytov vo víne

analyt [mg/l]	FIA	K-M	TS	TA	D	FA	AS	DM1	DM2
vzorky vín									
1	N	0,103	0,040	0,150	N	0,080	0,456	0,081	0,098
2	N	0,103	0,040	0,132	N	0,077	0,454	0,081	0,077
3	N	0,103	0,040	0,144	N	0,075	0,454	0,080	0,091
4	N	0,103	0,040	0,145	N	0,077	0,454	0,080	0,091
5	0,025	0,089	0,025	0,104	N	0,041	0,335	0,076	0,088
6	N	0,086	0,025	0,096	N	0,041	N	0,076	0,088
7	N	0,086	0,025	0,097	N	0,040	0,336	N	0,088
8	N	0,087	0,025	0,128	N	0,040	N	0,076	0,088
9	N	0,086	0,025	0,131	N	0,040	N	0,076	0,088
10	N	0,132	< 0,013	0,146	N	0,027	N	N	0,042
11	N	0,087	< 0,013	0,088	N	0,023	N	N	0,042
12	N	N	N	0,085	N	0,017	N	N	0,043
13	N	N	N	0,080	N	0,017	N	N	0,042
14	N	N	N	0,082	N	0,017	N	N	0,043
15	N	0,067	< 0,013	0,065	N	0,001	N	0,080	0,087
16	N	N	N	0,002	N	N	N	N	N
17	N	0,089	< 0,013	0,053	N	0,020	N	0,033	0,070
18	< 0,002	< 0,015	< 0,013	0,020	N	N	N	N	N
19	N	0,086	< 0,013	0,052	N	0,023	N	N	N
20	N	0,084	< 0,013	0,047	N	N	N	N	N
414	N	0,058	< 0,013	0,106	N	0,002	N	N	0,099
421	< 0,002	< 0,015	< 0,013	0,127	N	< 0,003	N	0,053	0,086
422	< 0,002	< 0,015	< 0,013	0,097	N	< 0,003	N	N	N
425	N	0,058	< 0,013	0,122	N	0,003	N	N	0,099
426	N	N	< 0,013	0,176	N	0,006	N	N	0,099
430	N	N	< 0,013	0,054	N	N	N	N	0,099
S	0,014	0,093	0,036	0,112	N	0,070	<0,01	0,065	0,090
TP	< 0,002	< 0,015	< 0,013	0,007	N	< 0,003	N	N	N

5 ZÁVER

Táto diplomová práca sa zaoberá multireziduálnym stanovením vybraných pesticídnych látok vo víne metódou GC-MS.

V teoretickej časti som sa predovšetkým zamerala na extrakčné techniky a analytické metódy využívajúce k analýze pesticídov. V úvode je spomínané hrozno – ako základná surovina na výrobu vína, jeho botanický pôvod, vhodné klimatické a geografické podmienky, zaoberala som sa jeho poruchami, poškodením a následne aj jeho ochranou. Všeobecne pod ochranou možno rozumieť súbor opatrení, ktorými v pestovaných plodinách vytvárame priaznivé podmienky pre ich rast, ale nepriaznivé pre rozvoj škodlivých faktorov. Veľký význam v ochrane viniča má preventívna ochrana, ktorá zabráňuje prvotnému výskytu chorôb a škodcov. Podstatou úspešnej ochrany je organizácia, včasnosť, využitie vhodných prípravkov a starostlivé postrekovanie. Rovnako sa zvýšení dôraz kladie na základné vedomosti z biológie, chorôb a dôkladné poznanie patogénov, príznaky, ich pôsobenie, príčiny premnoženia a škodlivé účinky.

V dnešnej dobe pesticídy zohrávajú dôležitú úlohu pri zabezpečovaní efektívnej a trvalo udržateľnej konkurencieschopnosti poľnohospodárskej výroby. Využitie majú nielen v poľnohospodárstve, ale aj na riadenie rastu rastlín na nepoľnohospodárskych plochách. V súčasnosti si každý štát môže stanoviť vlastné národné limity pesticídov. Možno tvrdiť, že vývoj v oblasti chemickej ochrany zaznamenáva za posledné roky dynamický rozvoj, ktorý sa odzrkadľuje v kvalite používaných pesticídov, na ktoré sa kladú stále vyššie nároky. Avšak, okrem želaných efektov pri ochrane rastlín, tieto látky môžu ohroziť ľudské zdravie a životné prostredie. Práve preto je nevyhnutné tieto účinné látky ustavične sledovať. Pre rýchle a flexibilné monitorovanie hladín rezíduí pesticídov sa využívajú multireziduálne metódy. Presnosť týchto analýz musí odpovedať všeobecným regulačným požiadavkám a vyhovovať aj vedeckým účelom. Multireziduálne metódy sa vyvíjajú 30 rokov a ich zmeny sú závislé na vývoji a vylepšovaní inštrumentálnych techník a rastúcom množstve registrovaných pesticídov s rôznymi fyzikálno-chemickými vlastnosťami. Bežne tieto metódy pozostávajú z nasledujúcich krokov: izolácia, prečistenie a detekcia [23,29,46].

V experimentálnej časti je okrem použitého vybavenia, pomôcok a chemikálií kompletne popísaná metóda izolácie a čistenia - SPE a detekcie pomocou GC-MS. Celkovo bolo analyzovaných 28 vzoriek vín, v ktorých sa stanovovalo 17 druhov vybraných účinných látok. K izolácii a prečisteniu analytov bola využitá extrakcia tuhú fázou, ktorá v porovnaní s GPC a extrakciou kvapalina - kvapalina, ktoré možno taktiež využiť k čisteniu analytov, vykazuje vyššiu výťažnosť i účinnosť. V prípade extrakcie kvapalina - kvapalina je nevýhodou dodržanie podmienky nemiešateľnosti kvapalín a vysoká spotreba rozpúšťadiel. Po prečistení vzorky došlo k samotnej analýze. K stanoveniu pesticídov vo víne sa využívajú chromatografické analýzy. V mojom prípade išlo o plynovú chromatografiu v spojení s hmotnostným spektrometrom ako detektorom, ktorá sa používa k analýze kontaminantov životného prostredia. Táto metóda sa vyznačuje vysokou citlivosťou a rozlišovacou schopnosťou, čo ju zároveň predurčuje na stanovenia veľmi nízkych obsahov škodlivých látok (látky s toxickými a karcinogénnymi účinkami a iné). GC-MS analýza umožňuje identifikovať neznámu látku na základe retenčných časov a hmotnostných spektier. Rovnako možno k analýze využiť aj spojenie HPLC-MS, ktoré sa predovšetkým využíva pri stanoveniach látok, ktoré nie sme schopní určiť metódou GC-MS z dôvodu ich fyzikálno-chemických vlastností.

Výsledky analýz sú zhrnuté v časti „Namerané hodnoty“. V tejto stati sú uvedené hodnoty výťažnosti dosiahnuté použitím kolónky *LiChrolut* vrátane grafického vyjadrenia a taktiež namerané hodnoty jednotlivých pesticídov.

Metóda bola validovaná, určili sa validačné parametre ako medza detekcie, medza stanoviteľnosti a zhodnosť, ktorých hodnoty sú uvedené v tabuľkách.

Z experimentálnych výsledkov GC-MS analýzy u všetkých vzoriek vín možno tvrdiť, že žiadna zo vzoriek neprekročila stanovený limit rezíduí účinných látok v potravinách. Tento výsledok bol očakávaný, keďže sa látky s pesticídnymi účinkami dávajú tak, aby bola spoľahlivo zaistená inhibícia či eliminácia nežiadúcich činiteľov a zároveň ich obsah rezíduí v ošetrovanom produkte neprekročil maximálny reziduálny limit (MLR). Niektoré pesticídy sa vyskytovali vo vzorkách pod medzou stanoviteľnosti, a teda je pochopiteľné, že sa nedali zmerať. Žiadna zo vzoriek sa nepriblížila maximálnemu limitu rezíduí určených právnym predpisom pre tieto analyty.

6 POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] Pátek, J.: *NOVÁ VINAŘSKÁ ABECEDA*. vyd. Brno: Blok, 1995. 183s., ISBN 80-7029-095-1.
- [2] Vereš, A. a kol.: *Rez a vedenie viniča*. vyd. Bratislava: Príroda, 1980, 273s., ISBN 64-087-80.
- [3] Hauft, J.: *Nový brevír o víně*. vyd. Praha: Svépomoc, 1989. 336s., ISBN 38-042-89.
- [4] Forrest, T.: *Všetko, čo potrebujete vedieť o víne*. vyd. Praha: OTTOVO NAKLADATELSTVÍ, s.r.o., 2004. 400s., ISBN 80-7360-153-2.
- [5] Farkaš, J.: *BIOTECHNOLÓGIA VÍNA*. vyd. Bratislava: ALFA, 1983. 978s., ISBN 63-076-83.
- [6] TAFERNEEROVA, Jana: *Význam pestovania viniča a jeho ekonomika* [Diplomová práca] Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Fakulta ekonomiky a menežmentu, Katedra ekonomiky. Školiteľ: Ing. Lauková. Rok obhajoby: 2007
- [7] Státní rastlinolekářská správa. [cit. 2010-05-25]. Dostupné na www.srs.cz
- [8] Voldřich, R.: *Technologie šumivých vín*. vyd. Praha: SNTL – NAKLADATELSTVÍ TECHNICKÉ LITERATURY, 1984. 238s., ISBN 04-845-84.
- [9] Ricardo C. Calhelha, João V. Andrade, Isabel C. Ferreira and Letícia M. Estevinho: *Toxicity effects of fungicide residues on the wine producing process*. Food Microbiology, 2006, pp. 393-398.
- [10] Kosař, K., Prochádzka, S. a kol.: *Technológie výroby sladu a piva*. vyd. Praha: Výskumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., 2000. 393s., ISBN 80-902658-6-3.
- [11] Cagáň, Ľ., Hudec, K.: *Chemická ochrana rastlín proti chorobám a škodcom*. vyd. Nitra: SPU, 2003. 130s., ISBN 80-8069-177-0.
- [12] Kráľovič, J. a kol.: *Ochrana poľnohospodárskych plodín*. vyd. Bratislava: Príroda, 1975. 596s., ISBN 64-038-75.
- [13] Economou, A., Botitsi, H., Antoniou, S., Tsipi, D.: *Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2009, pp. 5856-5867.
- [14] Nikonorow, M. a kol.: *Pesticídy a toxicita prostredia*. vyd. Bratislava: Príroda, 1983. 203s..
- [15] Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. vyd Ostrava: PAVEL KLOUDA, 2003. 132s., ISBN 80-86369-07-2.
- [16] *Kontaminanty a ďalší rizikové látky v potravinách a ekosystémech*. vyd. Praha: 2001. 259s., ISBN 80-7080-472-6.
- [17] Beyer, A., Biziuk, M.: *Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food*. Journal of Chromatography A, 2007, pp. 669-680.
- [18] Tatarkovičová, V. a kol.: *Možnosti extrakce a čištění extraktů při analýzách organických polutantů, Analýza organických látek, Sborník přednášek z kurzu*, 1.vydání. vyd. Český Těšín: Ing. Václav Helán, 1999, ISBN 80-902432-9-0.
- [19] Volka, K. a kol.: *Analytická chemie II*. vyd. Praha: VŠCHT, 1995. 236s., ISBN 80-7080-227-8.
- [20] Correia, M., Delerue-Matos, C., Alves, A.: *Multiresidue methodology for pesticide screening in wines*. Journal of Chromatography A, 2000, pp. 59-67.
- [21] Cunha, S.C., Fernandes, J.O., Alves, A., Oliveira, M.B.P.P.: *Fast low-pressure gas chromatography–mass spectrometry method for the determination of multiple*

- pesticides in grapes, musts and wines*. Journal of Chromatography A, 2009, pp. 119-126.
- [22] Soják, L. a kolektív: *Separačné metódy v organickej chémii*. Univerzita Komenského v Bratislave, 1989, 240s.
- [23] Hurňák, A a kol.: *Ochrana rastlín*. vyd. Bratislava: Príroda, 1986, 394s., ISBN 64-013-86.
- [24] Štulík, K. a kol.: *Analytické separační metódy*. vyd. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2004, 385s., ISBN 80-246-0852-9.
- [25] Churáček, J., Kotrlý, S.: *Analytická chemie II*. vyd. Pardubice: VŠCHT, 1983. 189s., ISBN 55-717-82.
- [26] Hurňák, A. a kol.: *Ochrana rastlín*. vyd. Bratislava: Príroda, 1986. 394s., ISBN 64-013-86.
- [27] Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. vyd Ostrava: PAVEL KLOUDA, 1996. 203s., ISBN 80-902155-0-5.
- [28] *Pesticídy v ochrane rastlín*. [cit. 2010-20-02]. Dostupné z: <http://www.agroporadenstvo.sk>
- [29] *EP prijal legislatívu o využívaní pesticídov*. [cit. 2010-20-02]. Dostupné z: http://www.europarl.europa.eu/news/public/default_sk.htm
- [30] *Guide to solid phase extraction*. [cit. 2010-05-03]. Dostupné na <http://www.sigmaaldrich.com>
- [31] Garaj, J., Bustin, D., Hladký, Z.: *Analytická chémia*. vyd. Bratislava: ALFA, 1987. 718s., ISBN 063-553-87.
- [32] Čakrt, M. a spol.: *Praktikum z analytickej chémie*. vyd. Bratislava: ALFA, 1989. 631s., ISBN 80-05-00000-X.
- [33] *Firemný materiál spoločnosti Lambda*
- [34] *Extrakcia tuhou fázou*. [cit. 2010-05-03]. Dostupné z: <http://www.eurolambda.sk>
- [35] Bulletin 910, SUPELCO (USA), 1998
- [36] Katalóg ChromBook 06/07, Merck (Ge), 2006/07
- [37] Navarro, S., Barba, A., Navarro, G., Vela, N., Oliva, J.: *Multiresidue method for the rapid determination – in grape, must and wine – of fungicides frequently used on vineyards*. Journal of Chromatography A, 2000, pp. 221-229.
- [38] Kolektív autorov SRS: *Vestník státní rastlinolékařské správy*. vyd. Praha: SRS prostřednictvím České společnosti rostlinolekářské, 2007, 302s.
- [39] Popl, M., Fährnich, J.: *Analytická chemie životného prostredí*. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 199, 218s., ISBN 80-7080-336-3
- [40] Clemens, R.E.: *Gas chromatography*. vyd. Canada: John Wiley&sons, 1990, 385s., ISBN 0-47101048-0.
- [41] Hans-Juergen Rosslenbroich, Dietrich Stuebler: *Botrytis cinerea — history of chemical control and novel fungicides for its management*. Crop protection, 2000, pp. 557-561.
- [42] Thanh Dong Nguyen, Ji Eun Yu, Dae Myung Lee, Gae-Ho Lee: *A multiresidue method for the determination of 107 pesticides in cabbage and radish using QuEChERS sample preparation method and gas chromatography mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2008, pp. 207-213.
- [43] Němcová, I. a kol.: *Spektrometrické analytické metódy II*. vyd. Praha: Karolinum, 1998, 162s., ISBN 80-7184-586-8.

- [44] Barker, J.: *Mass spectrometry*. Vyd. England: John Wiley&sons, 1999, 509s., ISBN 0-471-96764-5.
- [45] Kuruc, J.: *Hmotnostná spektrometria (prednášky)*. Vyd. Bratislava: OMEGA INFO, 2007, CD, ISBN 978-80-969290-7-8
- [46] Jaša, B. a kol.: *Vinohradníctvo*. vyd. Bratislava: Príroda, 1969, 279s., ISBN 64-031-69.
- [47] Húšková, R., Kirchner, M., Matisová, E.: *MATRICOVÉ EFEKTY A ICH ELIMINÁCIA PRI ANALÝZE REZÍDUÍ PESTICÍDOV V POTRAVINÁCH PLYNOVOU CHROMATOGRAFIOU*. [online] [cit. 2010-15-03]. Chemické listy 101 (207), s. 1020 – 1027.
- [48] DB – 5MS. [cit. 2010-15-03]. Dostupné z:
http://www.daichem.co.jp/eng/products/capillary_c/db_5ms_en.html
- [49] Suchánek, M.: *Validace analytických metod*. vyd. Praha: Eurochem-ČR, 1997, 137s., ISBN 80-9018682-3.
- [50] SBÍRKA ZÁKONŮ: *Vyhláška č. 381/2007*. [online]. Dostupné na
<http://www.sagit.cz/anotace/sb07381a.htm>
- [51] BASF Ochrana rastlín. [online]. Dostupné www.agro.basf.sk/sk/Welcome.do

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

a i.	a iné.
a pod.	a podobne
atď	a tak ďalej
AS	azoxystrobin
C	captan
ChP	chlorpyrifos
CAS NO	registračné číslo látky
CO ₂	oxid uhličitý
č.	číslo
ČR	Česká republika
D	dinocap
DM	dimethomorph
DDT	dichlórdifenyltrichlóretán
DIDP	diisodecylftalát
EP	Európsky parlament
EÚ	Európska únia
F	folpet
FA	fenarimol
FlA	flusilazol
Full scan	celé hmotnostné spektrum
GPC	gélová chromatografia
GC	plynová chromatografia
GC-MS	plynová chromatografia v spojení s hmotnostným spektrometrom
hmot. %	hmotnostné percento
K	Kelvin
K-M	kresoxim-methyl
l	liter
LC	kvapalinová chromatografia
LOD	medza detekcie
LOQ	medza stanoviteľnosti
min.	minimálne
min	minúta
MeOH	metanol
MLR	maximálny limit rezíduí
MO	mikroorganizmy
NaCl	chlorid sodný
napr.	napríklad
nm	nanometer
ods.	odstavec
Pa	Pascal
PA	penconazol
P-M	pyrimiphos-methyl
PP	polypropylen
PS	picoxystrobin
PY	pyrimethanil

RSD	relatívna opakovateľnosť
pred n. l.	pred našim letopočtom
SPE	extrakcia tuhou fázou
SIM	hmotnostné spektrum vymedzené na určité hmotnosti
SRS	Štátna rastlinolekárska správa
TA	tebuconazol
TDM	triadimefon
TS	trifloxystrobin
tzv.	takzvané
Vi	vinclozolin
μl	mikroliter
μm	mikrometer
Zb.	zbierka
zmes.stan	zmesný štandard
°C	Celziov stupeň

8 ZOZNAM POUŽITÝCH PRÍLOH

PRÍLOHA Č. 1: Chromatogram zmesného štandardu Full scan

PRÍLOHA Č. 2: Chromatogram zmesného štandardu Full scan a Scan SIM – Pyrimethanil(PY), Vinclozolin(Vi), Pyrimiphos-methyl(P-M), Chlorpyrifos(ChP), Triadimefon(TDM)

PRÍLOHA Č. 3: Chromatogram zmesného štandardu Full scan a Scan SIM – Penconazol(PA), Captan(C), Folpet(F), Picoxystrobin(PS), Kresoxim-methyl(K-M), Trifloxystrobin(TS)

PRÍLOHA Č. 4: Chromatogram zmesného štandardu Full scan a Scan SIM – Dinocap 1(D1), Tebuconazol(TA), Dinocap 2(D2), Dinocap 3(D3), Dinocap 4(D4), Dinocap 5(D5)

PRÍLOHA Č. 5: Chromatogram zmesného štandardu Full scan a Scan SIM – Fenarimol(FA), Azoxystrobin(AS), Dimethomorph 1(DM1), Dimethomorph 2(DM2)

PRÍLOHA Č. 6: Chromatogram zmesného štandardu Full scan, vzorky Sauvignon Full scan a scan SIM – Azoxystrobin(AS), Dimethomorph 1(DM1)

PRÍLOHA Č. 7: Hmotnostné spektrum pre dimethomorph

PRÍLOHA Č. 8: Hmotnostné spektrum pre capatan

PRÍLOHA Č. 9: Hmotnostné spektrum pre tebuconazol

PRÍLOHA Č. 10: Hmotnostné spektrum pre vinclozolin

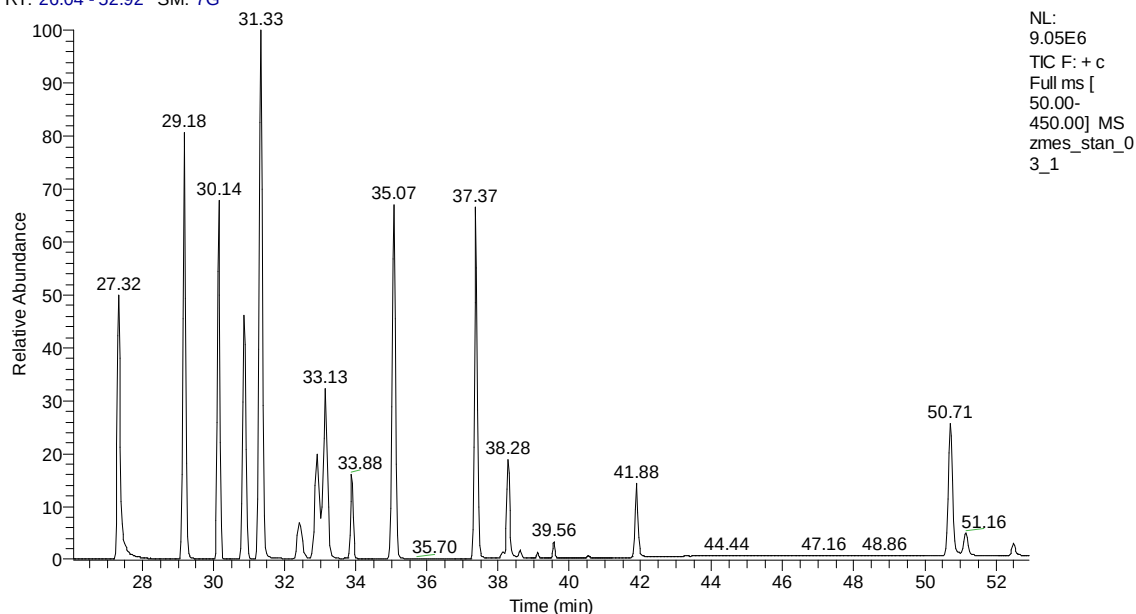
9 PRÍLOHY

Príloha č.1:

C:\Renata\...\24.03.2010\zmes_stan_03_1
zmes.standard

3/24/2010 10:38:17 AM

RT: 26.04 - 52.92 SM: 7G

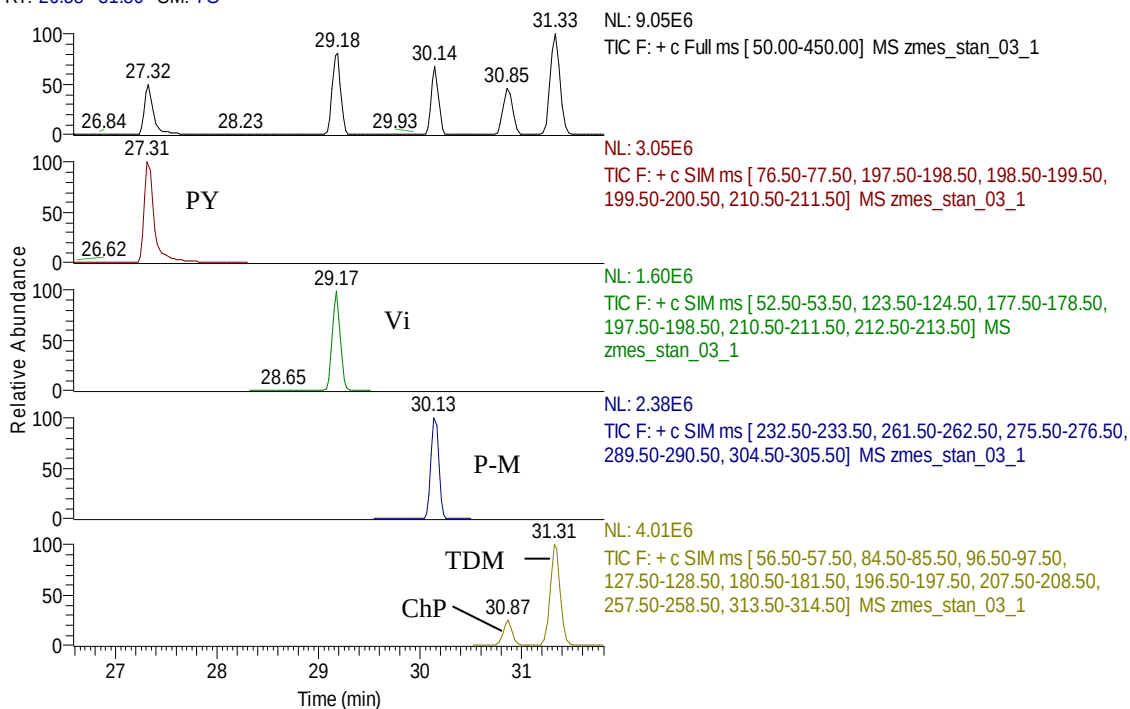


Príloha č.2:

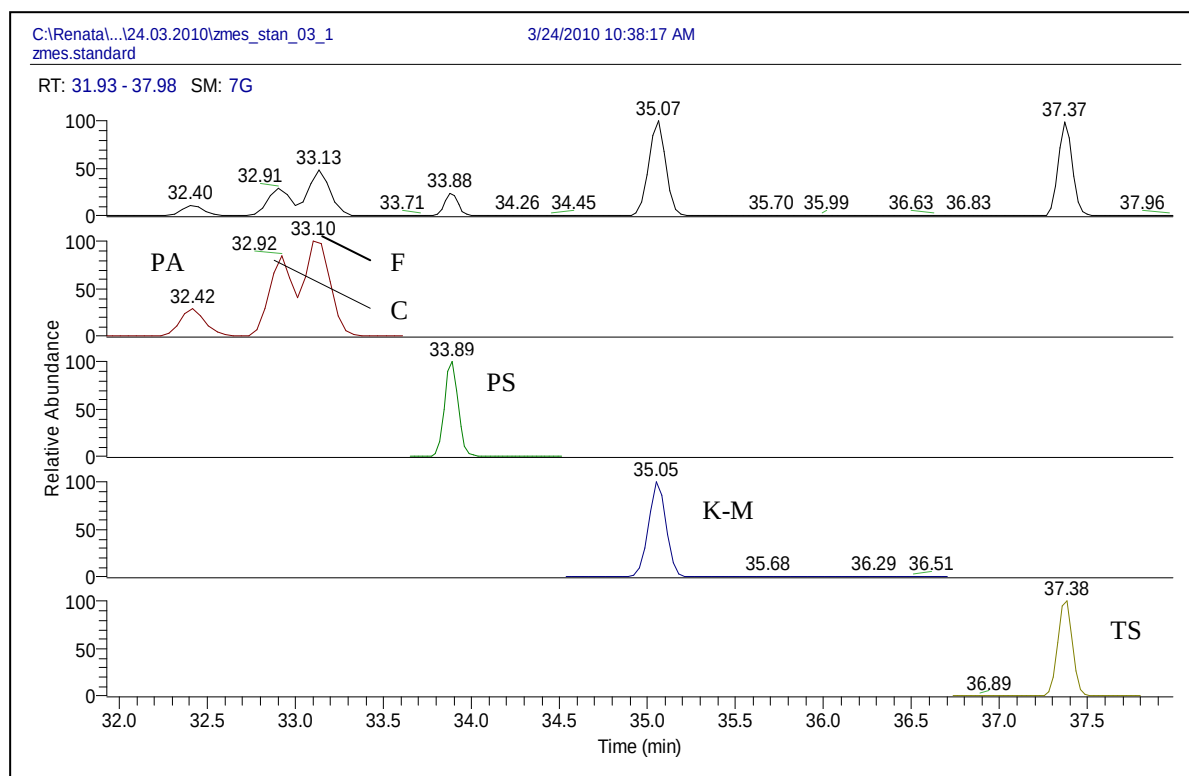
C:\Renata\...\24.03.2010\zmes_stan_03_1
zmes.standard

3/24/2010 10:38:17 AM

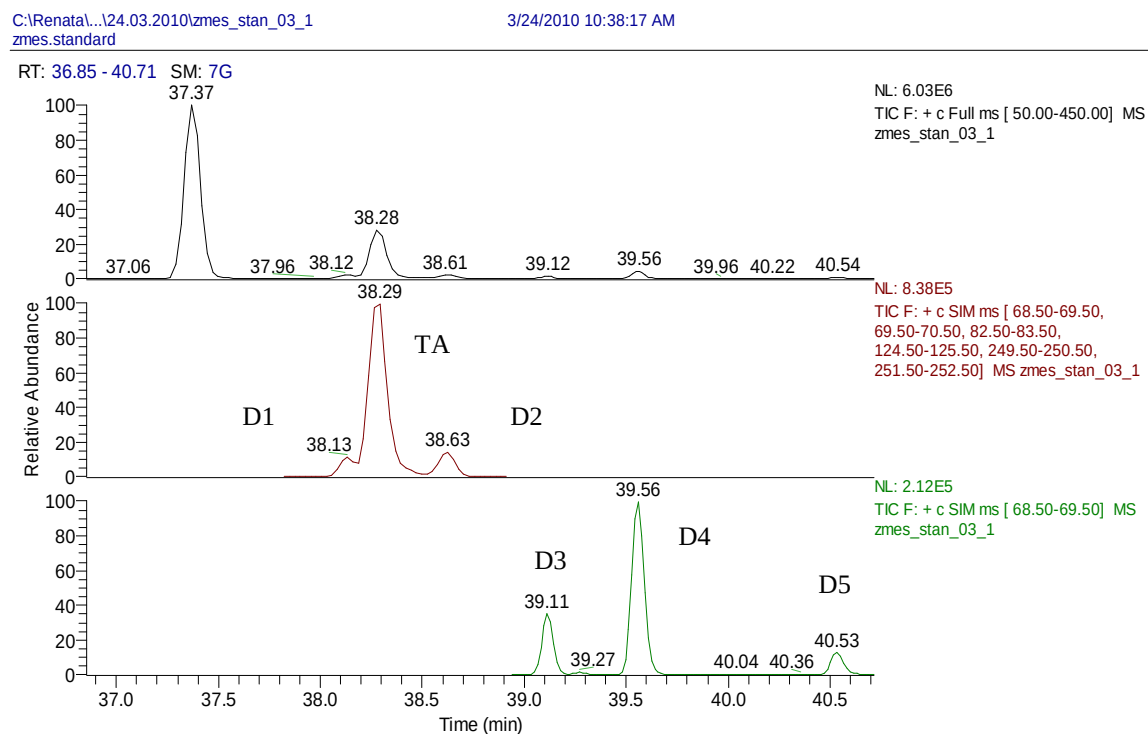
RT: 26.58 - 31.80 SM: 7G



Príloha č.3:



Príloha č.4:

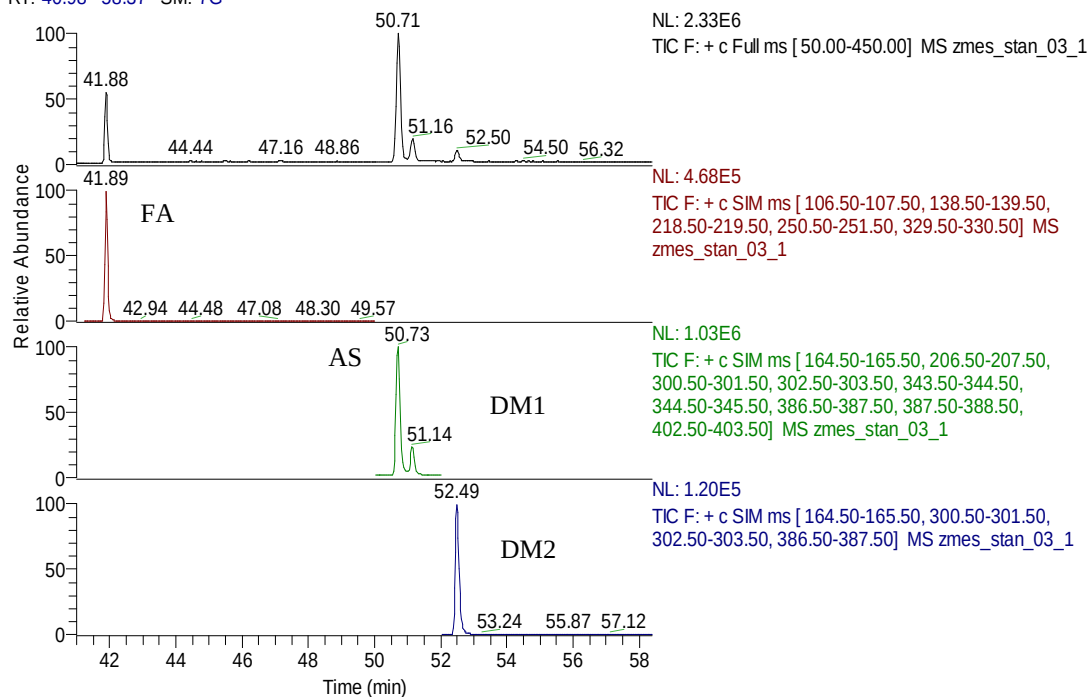


Príloha č.5:

C:\Renata\...\24.03.2010\zmes_stan_03_1
zmes.standard

3/24/2010 10:38:17 AM

RT: 40.98 - 58.37 SM: 7G

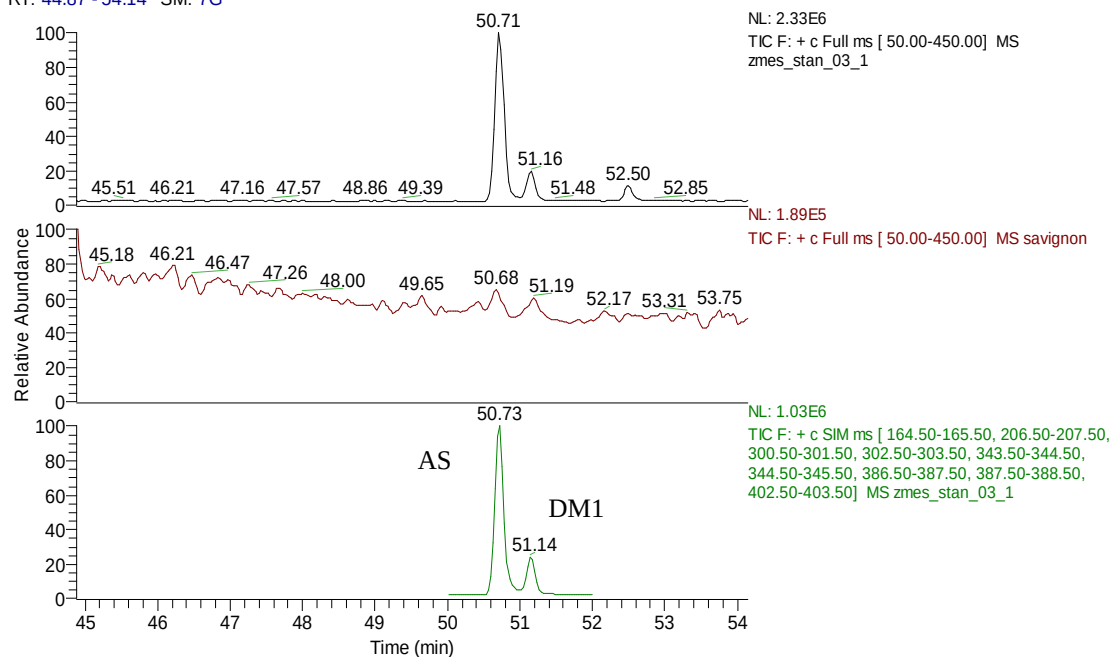


Príloha č.6:

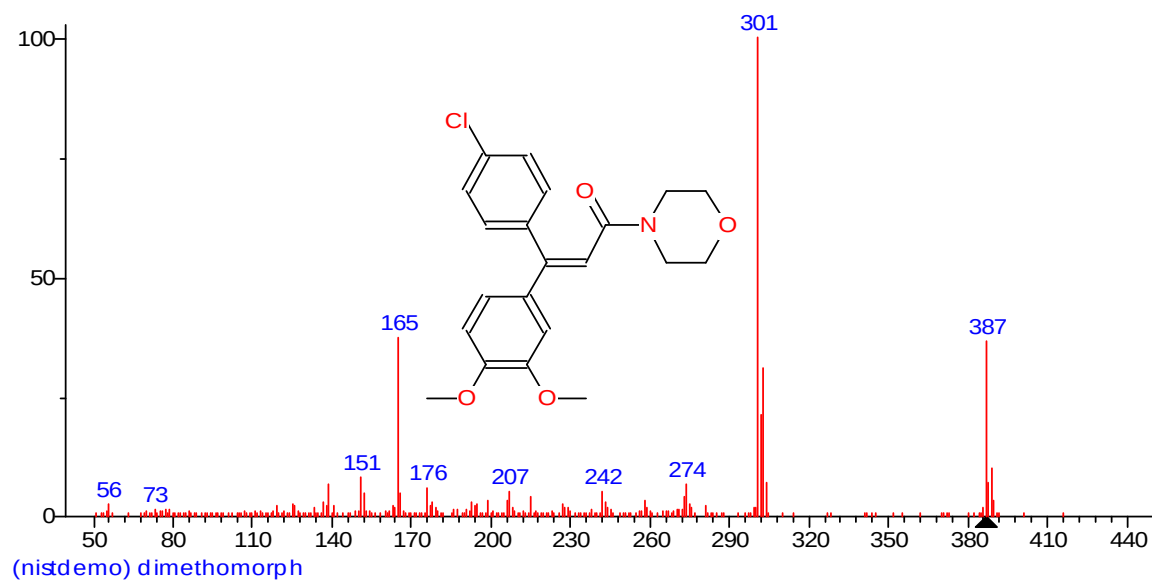
C:\Renata\...\24.03.2010\zmes_stan_03_1
zmes.standard

3/24/2010 10:38:17 AM

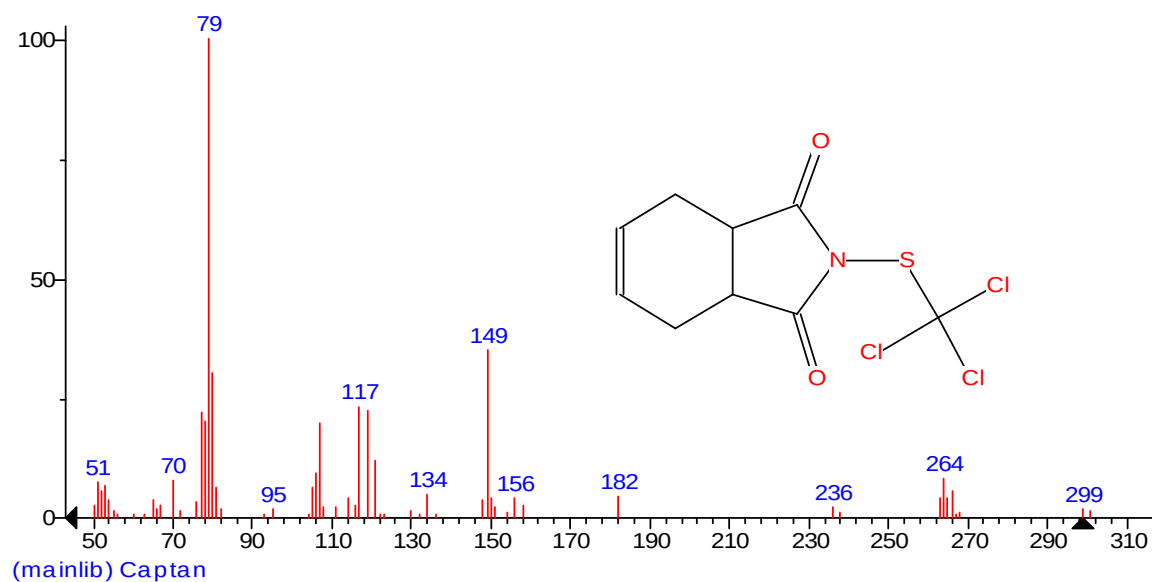
RT: 44.87 - 54.14 SM: 7G



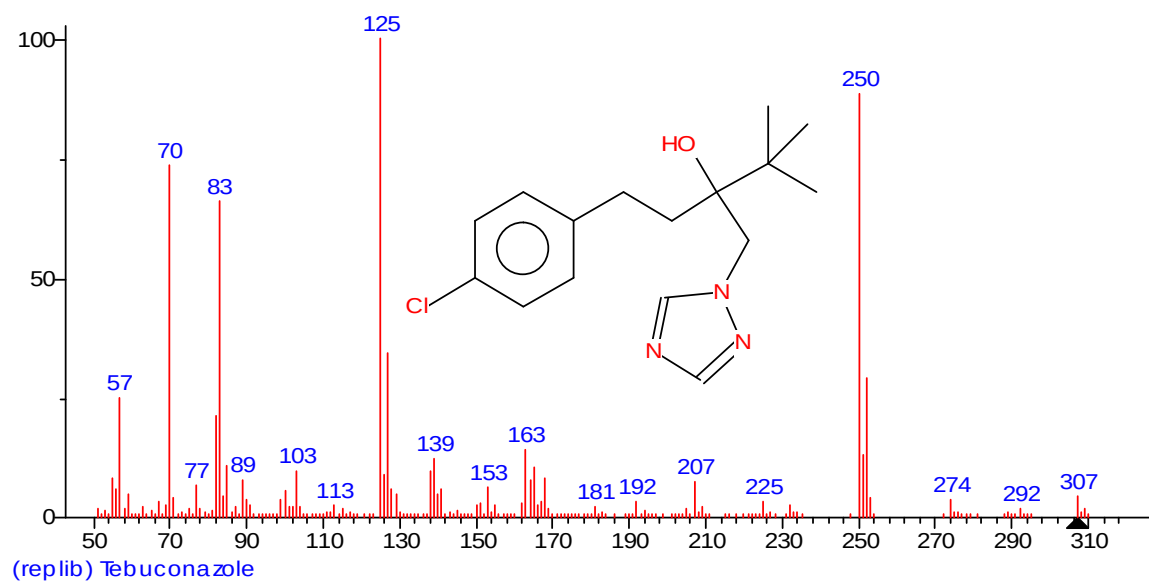
Príloha č.7:



Príloha č.8:



Príloha č.9:



Príloha č.10:

