© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Ultracitlivá analýza triazinů a jejich metabolitů v zemědělské půdě pomocí metody UHPLC-MS/MS

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Michal Jágr, Václav Dvořáček, Pavel Čermák,

Edzard Hangen, Bernd Schilling

2022

Ultracitlivá analýza triazinů a jejich metabolitů v zemědělské půdě pomocí metody UHPLC-MS/MS

Autorský tým:

Michal Jágr[a,@]

Václav Dvořáček[a]

Pavel Čermák[a]

Edzard Hangen[b]

Bernd Schilling[b]

[a]Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507/73, 161 06 Praha 6-Ruzyně

[b]Bavarian State Office for the Environment (LfU), Hans-Högn Straße 12, Hof, 950 30, Germany

[@]RNDr. Michal Jágr, Ph.D., jagr@vurv.cz, michaljagr@centrum.cz

Oponenti:

Ing. Jan Bedrníček, Ph.D.

Mgr. Petra Kosubová, Ph.D.

Vydal:

©Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha 2022

ISBN: 978-80-7427-371-4

Financování:

Tato certifikovaná metodika je výsledkem řešení bilaterálního projektu INTERREG V (N° 220) mezi Českou republikou a Bavorskem na téma: „*Dopad zemědělské činnosti na kvalitu půdy a znečištění životního prostředí kontaminanty v česko-bavorském pohraničí*“ řešeného v období 2018-2022.

Certifikace:

Metodice bylo uděleno osvědčení UKZUZ 062038/2022

O uplatnění metodiky je uzavřena smlouva mezi účastníky projektu a Bioanalytika CZ, s.r.o. podle ustanovení § 1746 odst. 2 zákona č. 89/2012 Sb., občanského zákoníku.

Prohlášení:

Předkladatel metodiky prohlašuje, že zpracovaná metodika nezasahuje do práv jiných osob z průmyslového nebo jiného duševního vlastnictví.

Poděkování: Autoři děkují Mgr. Sylvě Číhalové za technickou pomoc.

Ultracitlivá analýza triazinů a jejich metabolitů v zemědělské půdě pomocí metody UHPLC-MS/MS

Anotace: Předkládaná metodika zahrnuje optimalizovaný metodický přístup pro analýzu triazinových pesticidů a jejich metabolitů ve vzorcích zemědělských půd. Použití optimalizovaného QuEChERS postupu pro extrakci pesticidních látek s následnou vysoce citlivou a selektivní metodou UHPLC-MS/MS umožňuje současnou analýzu mnoha triazinů a jejich metabolitů ve vzorcích. UHPLC-MS/MS je moderní technika, která po validaci zaručuje produkci objektivních, rychlých, dostatečně přesných, reprodukovatelných a citlivých výsledků z hlediska požadavků na analýzy pesticidů ve vzorcích. Součástí metodiky je i zhodnocení metody na analýzách reálných vzorků zemědělských půd.

Ultra-sensitive analysis of triazines and their metabolites in agricultural soil by UHPLC-MS/MS method

Annotation: The presented methodology includes an optimized methodological approach for the analysis of triazine pesticides and their metabolites in agricultural soil samples. The use of an optimized QuEChERS procedure for the extraction of pesticide substances followed by the highly sensitive and selective UHPLC-MS/MS method allows simultaneous analysis of many triazines and their metabolites in samples. UHPLC-MS/MS is a modern technique that, after validation, guarantees the production of objective, fast, sufficiently accurate, reproducible and sensitive results in terms of requirements for pesticide analysis in samples. Part of the methodology is also the evaluation of the method on the analysis of real samples of agricultural soils.

Abecední seznam zkratek

APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku

ESI – ionizace elektrosprejem

GC-MS - plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií

HRMS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením

LC-MS - kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií

LD50 – střední smrtelná dávka

LOD – mez detekce

LOQ – mez kvantifikace

MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie

NCE – normalizovaná kolizní energie

QqQ – trojitý kvadrupól

QuEChERS – „Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe“ metoda

PRM – „parallel reaction monitoring“ experiment

RSD – relativní směrodatná odchylka

UHPLC-MS/MS – ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií

OBSAH

I. CÍL METODIKY 6
II. ÚVOD 6
1. **Úvod do problematiky pesticidů** 6
2. **Triaziny – charakteristika, vlastnosti a použití** 8
3. **Systém MS Orbitrap – specifika a výhody z hlediska analýzy pesticidů** 9
III. VLASTNÍ POPIS METODIKY 11
1. **Použité chemikálie** 11
2. **Postup přípravy a zpracování půdních vzorků** 11
3. **Extrakce triazinů z půdních vzorků** 13
4. **Analýza vzorků a zpracování výsledků** 13
5. **Validace metody** 16
6. **Výsledky z praxe a jejich interpretace** 18
IV. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“ 21
V. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY 21
VI. EKONOMICKÉ ASPEKTY 22
VII. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY 24
VIII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE 25

I. CÍL METODIKY

Cílem této práce je poskytnout standardní postup pro odběr vzorků půdy a následnou analýzu přítomných pesticidů triazinového typu a jejich metabolitů pomocí nejmodernější techniky – ultravysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s vysokorozlišovacím tandemovým hmotnostním spektrometrem UHPLC-MS/MS. Tato metoda byla použita k analýze širokého spektra pesticidů triazinového typu v archivních i nových vzorcích půd z Česko-Bavorského pohraničí. Použitá metoda je relativně jednoduchá, robustní a umožňuje spolehlivou detekci a stanovení vybraných pesticidů na úrovni citlivosti sub 1 ng/g.

II. ÚVOD

1. Úvod do problematiky pesticidů

Vývoj této metodiky vycházel z požadavků a cílů bilaterálního projektu INTERREG V (N° 220) mezi Českou republikou a Bavorskem na téma: „Dopad zemědělské činnosti na kvalitu půdy a znečištění životního prostředí kontaminanty v česko-bavorském pohraničí“, které v roce 2018 získalo pracoviště VÚRV, v.v.i. společně se 2 německými partnery, a to konkrétně s Bavorským zemským úřadem pro životní prostředí (Bayerisches Landesamt für Umwelt - LfU) a s Bavorským zemským úřadem pro zemědělství (Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft LfL). Tento projekt navazuje na předchozí dlouhodobou spolupráci s bavorskou stranou zaměřenou na hodnocení kvality půdy s cílem posoudit časovou i prostorovou dynamiku změn vybraných půdních parametrů, které mají dopad na kvalitu půdy a okolní životní prostředí. Jedná se zde tak o vybranou škálu zájmových parametrů, které již byly zkoumány v minulosti (např. obsah rizikových prvků a rizikových látek), s doplněním o stanovení nových látek a sloučenin, které se v průběhu času ukázaly hrozbou nejenom pro kvalitu půdy, ale i celé životního prostředí. Jde např. o reziduální látky z přípravků na ochranu rostlin (pesticidy) a celou škálu dalších kontaminantů, které v průběhu uplynulého období (od doby řešení předchozího projektu) řeší jak evropská, tak i národní legislativy jako látky škodlivé pro životní prostředí. Právě mezi takto škodlivé antropogenní a současně vysoce perzistentní kontaminanty patří i triazinové pesticidy a jejich metabolity.

Od 60. let 20. století stále roste používání chemických přípravků jak v zemědělství, tak v jiných odvětvích hospodářské činnosti např. v udržování prostředí dopravní infrastruktury či v městské zástavbě. Jen na evropském trhu je v současnosti evidováno více jak 500 pesticidních látek (Fava et al. 2007). Společnost ALS zaměřená na komerční analýzy vzorků na přítomnost pesticidů na svých webových stránkách uvádí, že na českém trhu je využíváno zhruba 400 účinných látek pesticidů (https://alsglobal.cz).

Mnoho z aplikovaných pesticidů jsou sloučeniny, které jsou dobře rozpustné ve vodě a jsou schopny transportu do povrchových vod nebo je lze vyluhovat do zdrojů podzemní vody, čímž se tyto látky dále šíří v prostředí (Klementová a Keltnerová 2015). Jsou tak často detekovány nejen primárně v půdě a vodě, ale i v živých organizmech. O řadě těchto látek dnes již víme, že mají na živé organizmy řadu nežádoucích účinků jako například narušení endokrinního systému, poškození reprodukčních orgánů či jsou potenciálně karcinogenní (Guillon et al. 2019). Velmi nebezpečné jsou v tomto ohledu především perzistentní kontaminanty a jejich metabolity, přetrvávající v ekosystému i řadu let. Mezi tuto skupinu látek lze vzhledem k jejich pomalé biologické i chemické degradaci zařadit i perzistentní triazinové herbicidy.

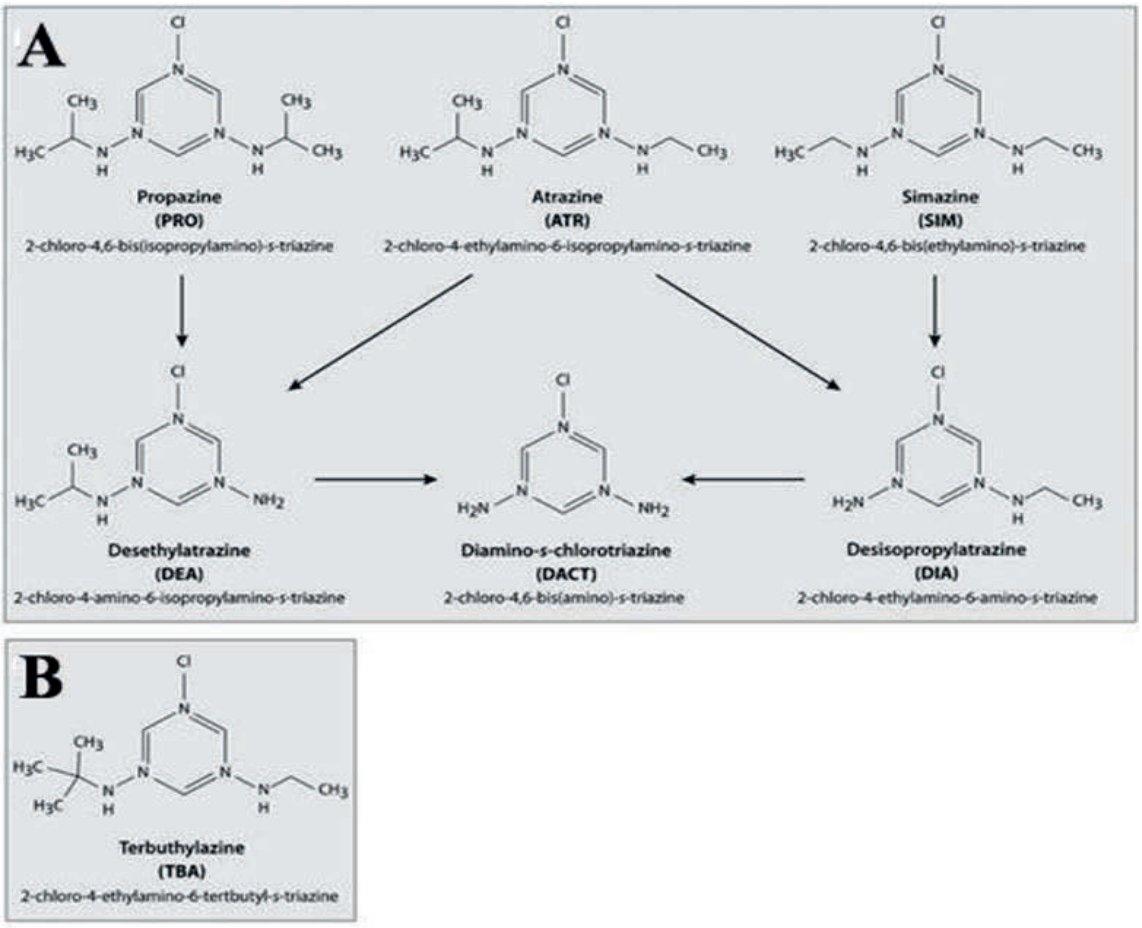
Tuto skutečnost se snaží řešit i Evropská unie a to v rámci vyhlášení tzv. strategie Green Deal. Do ní je zahrnuta i nová zemědělská strategie pod názvem Farm to Fork. V tomto dokumentu vyhlášeném Evropskou komisí se např. počítá s 50 % snížením spotřeby chemických pesticidů a hnojiv v evropském zemědělství a až čtvrtina zemědělské půdy má být v této době v režimu ekologického zemědělství. Lze tak předpokládat významné státní regulace a kontroly z pohledu aplikace pesticidů pro zemědělce. V případě aplikací triazinů takovéto zásadní restrikce jejich používání v Evropské unii nastaly již v roce 2003, a ke kterým se Česká republika se svým vstupem do Evropské unie rovněž přihlásila. Zatímco legislativa a hygienické limity obsahu širokého spektra pesticidů jsou v evropské i naší legislativě detailně zpracovány jak pro pitnou vodu, tak i pro potraviny živočišného a rostlinného původu, hygienické limity obsahu pesticidů v půdách jako jednoho z primárních zdrojů pesticidů uvolňovaných do prostředí doposud chybí. Důvodem je především obtížnější vzorkování i vlastní izolace pesticidů z komplexu velmi heterogenní půdní matrice. Problematiku stanovení jednotného limitu v půdě bude rovněž ztěžovat primární aplikace pesticidů zemědělci se specifickou dynamikou jejich rozkladu a různou mobilitou v půdním profilu ovlivněnou chemicko-fyzikálními i biologickými vlastnostmi půdy. Pro pochopení těchto pochodů především u perzistentních pesticidů je tak zapotřebí vyvíjet velmi citlivé a současně spolehlivé detekční metody umožňující sledovat jak koncentrační dynamiku těchto látek v půdním profilu tak i jejich postupné odbourávání prostřednictvím vzniku jejich metabolitů.

Na tomto projektovém základě tak předložená metodika přináší způsob zahrnující celý postup od odběrů vzorků půdy, přes jeho zpracování až po vysoce citlivou detekci a kvantifikaci perzistentních pesticidů patřících do skupiny triazinů a jejich vybraných metabolitů v reálné zemědělské praxi konvenčního i ekologického zemědělství, otestovaná na podkladě širokého spektra půd a 2 svrchních půdních horizontů.

Naše metodika je určená jak pro analytické útvary kontrolních orgánů státní správy (např. ÚKZÚZ, ČIŽP, apod.) tak i pro privátní laboratoře nebo vědecká pracoviště zaměřená na detekci pesticidů v půdě.

2. Triaziny – charakteristika, vlastnosti a použití

Problematika sledování pesticidů v různých složkách životního prostředí (např. ve vzorcích půd, podzemních vod či potravin) je velmi rozsáhlá. Zvláštní skupinou často sledovaných pesticidů jsou pesticidy triazinového typu. Triaziny jsou herbicidy hojně užívané proti dvouděložným plevelům, přičemž ve vyšších dávkách se stávají totálním herbicidem. Jsou to látky zasahující do metabolismu pyrimidinových bází, které jsou součástí nukleových kyselin. Mechanismus jejich účinku spočívá v inhibici fotosyntézy. Většina z nich přerušuje fotosystém II, kdy se chlorofyl využívá k přeměně krátkých vlnových délek světla na energii. Bez této fáze fotosyntézy nejsou rostliny schopné produkovat potřebnou energii pro svůj růst (Kamrin, 1997). Triaziny se vyznačují přítomností 1,3,5-triazinové funkční skupiny ve své molekule (Obr. 1A a Obr. 1B) (Niessen & Correa, 2017).



Obrázek 1A a 1B: Znázornění chemické struktury některých nejběžnějších triazinů a jejich typických metabolitů.

Triaziny mají poměrně vysokou rozpustnost ve vodě (například rozpustnost atrazinu při 20 °C je 30 mg/l) a tendenci neadsorbovat se v půdě, proto se mohou tyto kontaminanty skrze půdu dostat do spodních vod. Některé triaziny jsou ve vodě relativně stabilní, jejich rozpustnost se snižuje se zvyšujícím se pH (Kamrin, 1997).

V případě, že se tyto pesticidy dostanou do půdy, je rostliny absorbují přes kořenový systém, a tím pádem mohou být transportovány po celé rostlině. Vzhledem k perzistentním vlastnostem triazinových pesticidů a jejich metabolitů dochází k pomalému odbourávání těchto látek a jejich hromadění v životním prostředí, např. v podzemních vodách (Mikulka & Kneifelová, 2021).

Triaziny mají relativně nízkou akutní toxicitu pro savce. Například atrazin a simazin vykazují při testování na pokusných krysách hodnotu LD50 3000 mg/kg, což indikuje, že jde o mírně toxické látky. Mezi typické symptomy akutní otravy lze uvést například podráždění kůže a očí, zvracení, průjmy či svalová slabost (Mikulka & Kneifelová, 2021). V některých zemích je používání triazinových herbicidů v současné době zakázáno, případně se značně omezuje. Na základě rozhodnutí Evropské komise 2004/247/EC; 2004/248/EC platí zákaz distribuce a užívání atrazinu a simazinu v rámci Evropské unie od 1. srpna 2005 (EC, 2022).

Triaziny lze analyzovat různými analytickými metodami, např. GC-MS, ale v poslední době se dává přednost analýzám triazinů metodou LC-MS, kvůli jednodušší přípravě vzorků. LC-MS navíc umožňuje i analýzu polárnějších metabolitů triazinů (Scherr et al., 2017). V metodě LC-MS se používá pozitivní ionizace triazinů v módu ESI nebo APCI. Struktura triazinů se studuje pomocí nastavení vhodné kolizní energie (NCE), přičemž triaziny ochotně ztrácejí vedlejší alkylované řetězce za vzniku příslušných typických fragmentů, které jsou změřeny v MS spektru. Triaziny lze roztřídit do tří hlavních skupin: chlorotriaziny, methylthiotriaziny a methoxytriaziny. Do první skupiny patří většina nejznámějších triazinových pesticidů, které se v minulosti používaly či stále používají, a jejichž analýza je součástí i této metodiky: atrazin, simazin, propazin a terbuthylazin. Mezi methylthiotriaziny patří např. ametryn, prometryn, terbutryn. Do poslední skupiny patří atraton, prometon, či sem lze zařadit i námi studovaný metamitron.

3. Systém MS Orbitrap – specifika a výhody z hlediska analýzy pesticidů

Tandemový HRMS/MS systém založený na kombinaci kvadrupólu jako prvním hmotnostním analyzátoru a Orbitrapu (Obr. 2) jako druhém (koncovém) hmotnostním analyzátoru nabízí lepší způsobilost k identifikacím neznámých látek než konvenčnější MS/MS systémy založené na triple-quad (QqQ) detektorech (Tsipi et al., 2015). Identifikace látek je obvykle založena na shodě retenčního času a hmotnostního spektra změřené neznámé látky se standardy. Podle obecně platných kritérií pro validaci metod je vyžadována spolehlivá detekce alespoň dvou a více fragmentů

analyzované látky, a to včetně mateřského iontu a hmota iontu by měla být změřena s přesností <5ppm (Tsipi et al., 2015). Toho je v našem HRMS/MS systému velmi snadno dosaženo díky vysokému rozlišení měřených hmot v Orbitrapu, dosahujícímu hodnot až 140 000 FWHM i více a vysoké přesnosti měřených hmot (obvykle <1ppm) (Obr. 2).

Obrázek 2: Použitá analytická sestava UHPLC-Q-Orbitrap

Další velkou výhodou HRMS/MS systémů s Orbitrapem je i možnost necíleného screeningu vzorků na možnost výskytu neznámé látky nebo jejího metabolitu a to i v případě, že není k dispozici žádný analytický standard této látky. Identifikace neznámé látky pak probíhá s pomocí porovnání změřených spekter s veřejně přístupnými databázemi (MZCloud, PubChem) nebo je díky použití umělé inteligence v komerčně dostupném programu Compound Discoverer či Mass Hunter navržena pravděpodobná struktura látky. Takového přístupu ke vzorkům nejsou běžněji dostupné QqQ systémy vůbec schopny. Další velkou výhodou HRMS/MS systému Orbitrap je i možnost provedení multi-reziduálních screeningových analýz vzorků na přítomnost několika set pesticidů (i více než 800 látek) (Cotton et al., 2016; Dzuman et al., 2015; Wang et al, 2019). Tyto široce

zaměřené multi-reziduální metody ale mají relativně nižší citlivost ve srovnání s cílenými metodami analýz zaměřenými na detekci max. několika desítek pesticidů během jedné analýzy. Snad jedinou nevýhodou hmotnostního spektrometru typu kvadrupól-Orbitrap (Obr. 2) je nutnost relativně vyšší počáteční investice na pořízení přístroje, která je ale později více než vyvážená vysokou produktivitou a univerzálním zaměřením přístroje.

III. VLASTNÍ POPIS METODIKY

1. Použité chemikálie

Standardy triazinů: atrazin, atrazin-2-hydroxy, atrazin-desethyl, atrazin-desisopropyl, metamitron, propazin, simazin, simazin-2-hydroxy, terbuthylazin, terbuthylazin-2-hydroxy, terbuthylazin-desethyl, terbuthylazin-desethyl-2-hydroxy a atrazin-*d5* + simazin-*d10* jako deuterované vnitřní standardy byly nakoupeny od fy. Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Od téže firmy pocházel i mravenčan amonný, octan sodný, síran hořečnatý. Methanol a acetonitril (LC-MS grade, ≥99,9 %) byl nakoupen od Riedel de Haën (Seelze, Německo). Kyselina mravenčí a kyselina octová (LC-MS grade, 99%) byly od VWR (Leuven, Belgie). Ultračistá voda byla vyrobena v Milli-Q deionizačním systému (Millipore, Bedford, MA, USA).

2. Postup přípravy a zpracování půdních vzorků

Na vybraném monitorovacím bodě se pomocí GPS zařízení označí místo (podle uvedených souřadnicových koordinát), kde bude kopána půdní sonda. Ve vzdálenosti cca do 10 – 20 m od místa kopané půdní sondy se provede tyčovou sondou na třech samostatných sondách kontrola půdního profilu zatlučením sondovací tyče do hloubky cca 1 m. Pokud bude půdní profil (tj. jednotlivé vrstvy půdních horizontů) ve výřezu sondovací tyče ve všech třech případech kontrolního odběru shodný, jedná se o reprezentativní bod a je možné pokračovat s dalšími pracemi. V půdním profilu se nesmí objevovat známky lidské činnosti (zlomky cihel apod.) – v opačném případě se musí monitorovací stanoviště posunout na jiné místo, případně jej z tohoto sledování vyloučit a vybrat si jiné monitorovací stanoviště, nacházející se na zemědělské půdě.

Po dosažení shody (půdních horizontů/půdního profilu) vzorkované lokality se v místě provedení kontrolních sond vymezí střed a pak se podle světových stran ve dvou soustředných kruzích (3,8 a 6,6 m) kolem středu označí tzv. satelitní body – tj. 4 satelitní body ve vzdálenosti 3,8 m a 4 satelitní body ve vzdálenosti 6,6 m od středu plochy. Při vytyčování těchto satelitních bodů se používá šňůra s vyznačením vzdáleností, aby bylo možné přesně stanovit polohu odběrových satelitních bodů. Na těchto bodech se následně odebírají vzorky, které reprezentují danou plochu.

Při provádění všech pedologických prací (vytyčování plochy, následně pak zejména odběr vzorků tyčovými a šroubovacími sondami, následná manipulace se vzorky, atd.) se nekouří, ani v její blízkosti v okruhu 10 m, nepoužívají se krémy, přípravky odpuzující hmyz atd. z důvodů možné kontaminace vzorku. Je třeba dbát na to, aby se při vzorkování používalo jen čisté nářadí zhotovené z vhodných materiálů (nerez ocel).

Doporučuje se vzorkovací nářadí firmy Eijkelkamp:

a) pro kontrolní odběry zatloukací sondovací tyč (Obr. 3)

b) pro odběry Edelmanův vrták (doporučuje se průměr 5 cm vzorkovací koncovky) – (Obr. 4)

Obrázek 3: zatloukací sondovací tyč

Obrázek 4: Edelmanův vrták

Po odběru vzorku z jednoho horizontu se zásadně musí všechno nářadí očistit a přizpůsobit materiálu z dalšího odebíraného horizontu (tj. „zamaže“ se materiálem z nového horizontu). Po ukončení odběrů vzorků na stanovišti se musí všechno nářadí, které přišlo do kontaktu se vzorky, důkladně omýt pitnou (nebo destilovanou) vodou. Vzorky dotyčného půdního horizontu musí být

odebrány z jeho celkové mocnosti a se shodnými podíly objemu. U horizontů s vyšším než 40% podílem skeletu se kameny větší než 2 cm mohou před uložením vzorku oddělit, což se musí zdůraznit v odběrovém protokolu. Oddělí se také živé části rostlin a případně i půdní makro edafon (např. žížaly). Vzorky ornice se získávají vždy brzo na jaře, ideálně před první aplikací přípravků na ochranu rostlin v dané vegetační sezóně.

Odebrané vzorky se podle horizontů promíchají vhodným nářadím v čisté misce z nerez oceli. Následně se z každého tohoto zhomogenizovaného vzorku odebere pro rozbory do čistých mikrotenových sáčků cca 2 – 2,5 kg půdy. Takto předpřipravené vzorky se dodají co nejdříve do laboratoře, kde se vzorky buď zamrazí, nebo se hned vysouší na vzduchu za postupného rozmělňování hrud, prosévají přes 2 mm síto a opět uloží do mrazáku pro potřeby následných analýz.

3. Extrakce triazinů z půdních vzorků

Procedura použitá pro extrakci příslušných triazinů a jejich metabolitů z půdních vzorků byla založena na tzv. QuEChERS postupu (Hvězdová M. et al., 2018). Metoda QuEChERS je v současnosti s výhodou používána k extrakci pesticidů z různých složitých matric (potraviny, voda, apod.) včetně půdních vzorků (Scherr et al., 2017; Bruzzoniti et al., 2014; Feng et al., 2015). Jedná se o moderní efektivní, spolehlivou, ekologickou a snadno opakovatelnou metodu.

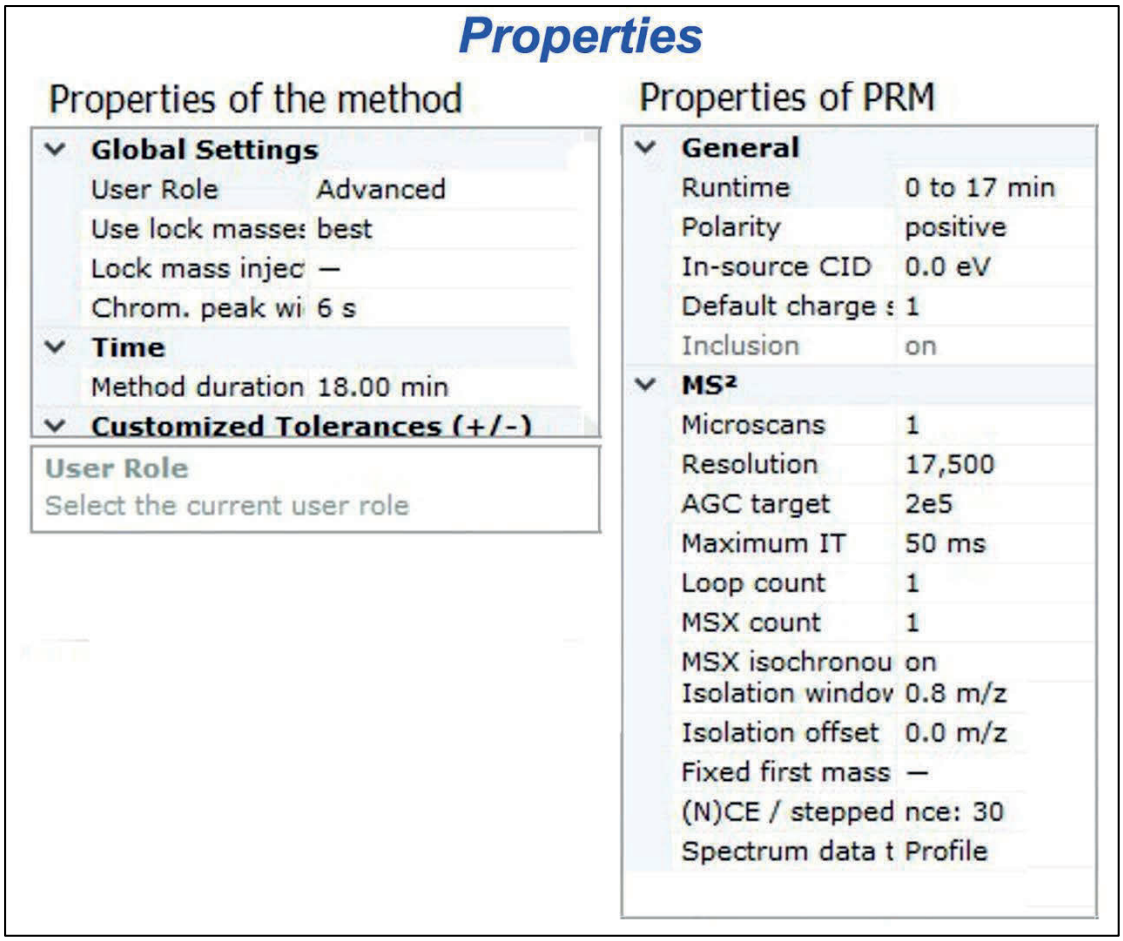
Vzorek půdy o váze 5 g byl homogenizován a odvážen do polypropylénových tub o objemu 50 ml. Poté bylo do tuby přidáno 14,9 ml směsi acetonitrilu s deionizovanou H_2O okyselené na 1 % kyselinou octovou (2:1; v/v). Do tuby bylo zároveň přidáno 100 µl roztoku deuterovaných vnitřních standardů (směs standardů: atrazin-*d5* a simazin-*d10*, každý standard o koncentraci 10 µg/ml). Tuba byla pořádně protřepána (1 min na vortexu) a pak do ní bylo přidáno 1 g octanu sodného a 4 g síranu hořečnatého. Poté byla tuba opět pořádně protřepána na vortexu a sonikována ve vodní lázni za laboratorní teploty po dobu 5 min. Poté byly tuby centrifugovány (10 min při 3500 rpm). Po rozdělení kapalných fází bylo odebráno 0,5 ml horní organické fáze, smícháno s 250 µl acetonitrilu a 250 µl H_2O (1 % kys. octová). Nakonec byl vzorek přefiltrován přes 0,22 µm nylonový filtr (Thermo Scientific, Rockwood, TN, USA) do inzertu a ihned zanalyzován na UHPLC-MS/MS.

4. Analýza vzorků a zpracování výsledků

Použitý chromatografický systém (Dionex UltiMate 3000 UHPLC system, Dionex Softron GmbH, Germany) se skládal z pumpy (HPG-3400RS), autosampleru (WPS-3000RS), odplyňovače mobilní fáze (SRD-3400) a kolonového termostatu (TCC-3000RS). Detekce byla provedena v tandemovém hmotnostním spektrometru typu kvadrupól-Orbitrap (QExactive, Themo Fisher

Scientific, San Jose, CA, USA). Analýza byla provedena na koloně Kinetex Polar C18 (2,1 × 100 mm, 2,6 µm) od výrobce Phenomenex (Torrance, CA, USA). UHPLC-MS/MS systém byl vybaven vyhřívaným elektrosprejem (HESI-II). Separace látek byla provedena za pomoci gradientové eluce dvou rozpouštedel: A a B. Voda s přídavkem 0,125% kys. mravenčí a 10 mM mravenčanu amonného byla použita jako rozpouštědlo A a směs methanol/voda (95:5, v/v) s přídavkem 0,125% kys. mravenčí a 10 mM mravenčanu amonného byla použita jako rozpouštědlo B. Použitý gradient: 0-0,5 min: 99% A + 1% B izokraticky, pak lineární gradient během 14,5 min na 5% A + 95% B. Kolona byla poté promyta 100% B po dobu 1,5 min. a nakonec ekvilibrována zpět na 99% A + 1% B během 2 min. Celková doba analýzy činila 18 min. Kolona byla temperována na 40°C, průtok mobilní fáze činil 0,35 ml.min^{-1}. ESI ionizace pracovala v pozitivním módu. PRM (parallel reaction monitoring) experiment byl použit pro kvantitativní analýzu cílových látek. Souhrn nastavení příslušných parametrů pro dosažení vhodné citlivosti měření v módu PRM je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1: Souhrn nastavení hlavních parametrů přístroje QExactive pro PRM analýzy.



Normalizovaná kolizní energie (NCE) pro MS/MS analýzy byla předem optimalizována pro každou látku zvlášť (Tab. 2). Sprejovací napětí činilo 3,5 kV v pozitivním módu. Přístroj byl kalibrován za pomoci referenčních standardních roztoků od Thermo Fisher Scientific. Data byla zpracována softwarem Xcalibur, verze 4.0. V tabulce 2 jsou shrnuta hlavní data potřebná pro detekci jednotlivých triazinů, jejich metabolitů a izotopicky značených vnitřních standardů.

Tabulka 2: Shrnutí hlavních parametrů analyzovaných látek: název stanovované látky, elementární složení, retenční čas, NCE (normalizovaná kolizní energie), hodnoty prekurzorového a dvou kvantifikačních iontů dané látky v m/z.

Látka	Elementární složení	Retenční čas (min)	NCE	Prekurzorový ion *(m/z)*	Kvantifikační ion 1 *(m/z)*	Kvantifikační ion 2 *(m/z)*
Atrazin	C8H14ClN5	8,75	40	216,1011	174,0540	146,0226
Atrazin-2-hydroxy	C8H15N5O	5,20	45	198,1349	156,0880	128,0818
Atrazin-desethyl	C6H10ClN5	6,67	45	188,0698	146,0228	104,0011
Atrazin-desisopropyl	C5H8ClN5	5,53	60	174,0541	132,0323	146,0227
Metamitron	C10H10N4O	6,06	50	203,0927	175,0978	104,0498
Propazin	C9H16ClN5	10,40	45	230,1167	188,0695	104,0011
Simazin	C7H12ClN5	7,94	50	202,0854	132,0323	124.0869
Simazin-2-hydroxy	C7H13N5O	4,41	45	184,1193	114,0663	97,0400
Terbuthylazin	C9H16ClN5	8,16	35	230,1167	174,0541	132,0322
Terbuthylazin-2-hydroxy	C9H17N5O	9,58	32	212,1506	156,0880	114,0663
Terbuthylazin-desethyl	C7H12ClN5	6,04	35	202,0854	146,0229	104,0011
Terbuthylazin-desethyl-2-hydroxy	C7H13N5O	3,83	30	184,1193	128,0567	86,0354
Atrazin -*d5*	C8H9D5ClN5	8,75	40	221,1324	179,0854	137,0635
Simazin-*d10*	C7H2D10ClN5	7,94	50	212,1482	137,0636	180,0917

5. Validace metody

Metoda analýzy UHPLC-MS/MS byla validována dle obecně uznávaných požadavků autorit pro validaci analytických metod (FDA, 2018; ICH, 2005). Validace znamená, že pro použitou analytickou metodu byly stanoveny parametry citlivosti (LOD-mez detekce, LOQ-mez kvantifikace), též byla stanovena extrakční výtěžnost a krátkodobá i dlouhodobá přesnost na dvou či třech koncentračních hladinách (nižší – 5ng/g, střední – 50 ng/g a vyšší – 500 ng/g) (Tabulka 3). Krátkodobá přesnost byla stanovena v jednom dni, kdežto dlouhodobá přesnost byla stanovena pro zpracování vzorků a měření ve dvou po sobě následujících dnech. Kalibrační přímky pro jednotlivé standardy triazinů byly provedeny ve třech opakováních. Všechny analýzy pro validační měření byly provedeny šestkrát. Výsledky byly na základě podobnosti chemické struktury a blízkosti retenčních časů korigovány přes dva použité izotopicky značené vnitřní standardy: atrazin-*d5* a simazin-*d10*. Triaziny a jejich metabolity byly identifikovány díky porovnání retenčních časů a MS/MS spekter s autentickými standardy a s daty dostupnými z literatury (Klementová & Keltnerová, 2015; Scherr et al., 2017). Kalibrační přímky byly sestrojeny vynesením plochy píku referenčního standardu o příslušné koncentraci (po zkorigování na příslušný vnitřní standard). Statistická analýza dat byla provedena za pomocí software Statistica 64 (TIBCO software, Palo Alto, CA, USA). Linearita metody byla zkoumána pro koncentrace analytů v rozmezí od 0 do 1 µg/g (Tabulka 4).

Tabulka 3: Shrnutí validačních parametrů: mez detekce, mez stanovitelnosti, extrakční výtěžnost, krátkodobá a dlouhodobá přesnost (v % relativní směrodatné odchylky: RSD).

Látka	Mez detekce (pg/g)	Mez stanovitelnosti (pg/g)	Extrakční výtěžnost (%)		Krátkodobá přesnost RSD (%)*			Dlouhodobá přesnost RSD (%)*		
			5 ng/g	50 ng/g	5 ng/g	50 ng/g	500 ng/g	5 ng/g	50 ng/g	500 ng/g
Atrazin	0,5	2	104,7	109,5	3,0	7,0	5,0	13,4	8,9	7,4
Atrazin-2-hydroxy	0,7	2,5	83,1	115,2	3,8	6,5	6,3	12,4	7,9	10,9
Atrazin-desethyl	3	10	75,2	106,4	5,3	3,5	4,2	11,4	3,7	7,9
Atrazin-desisopropyl	5	20	100,7	107,0	3,4	4,2	7,3	9,4	5,8	8,8
Metamitron	40	420	79,5	96,1	3,4	3,0	5,0	11,8	5,9	7,1
Propazin	2	8	68,3	73,8	2,3	2,3	2,7	8,1	4,4	5,3
Simazin	1,5	6	73,2	80,7	2,4	1,6	2,5	9,1	4,3	2,6
Simazin-2-hydroxy	1	4	95,3	113,8	3,3	5,4	6,9	10,6	11,9	8,4
Terbuthylazin	0,4	2	72,6	74,5	4,9	2,4	3,6	8,7	5,7	6,1
Terbuthylazin-2-hydroxy	1	4	77,4	95,1	7,1	3,8	8,3	6,1	4,2	9,8
Terbuthylazin-desethyl	1	4	70,4	84,6	3,5	3,9	2,7	4,5	4,4	2,6
Terbuthylazin-desethyl-2-hydroxy	2	8	92,5	108,3	10,3	8,1	11,0	11,9	7,0	11,4

RSD = relativní směrodatná odchylka; *přesnost je vyjádřena v % jako rel. směrodatná odchylka měření

Jak je vidět z tabulky 3, validační kritéria námi prezentované analytické metody vyhovují obecně platným parametrům pro akceptaci validovaných analytických metod (extrakční výtěžnost má být v rozmezí 60-120 % a RSD ≤ 15 %) (Nováková et al., 2021).

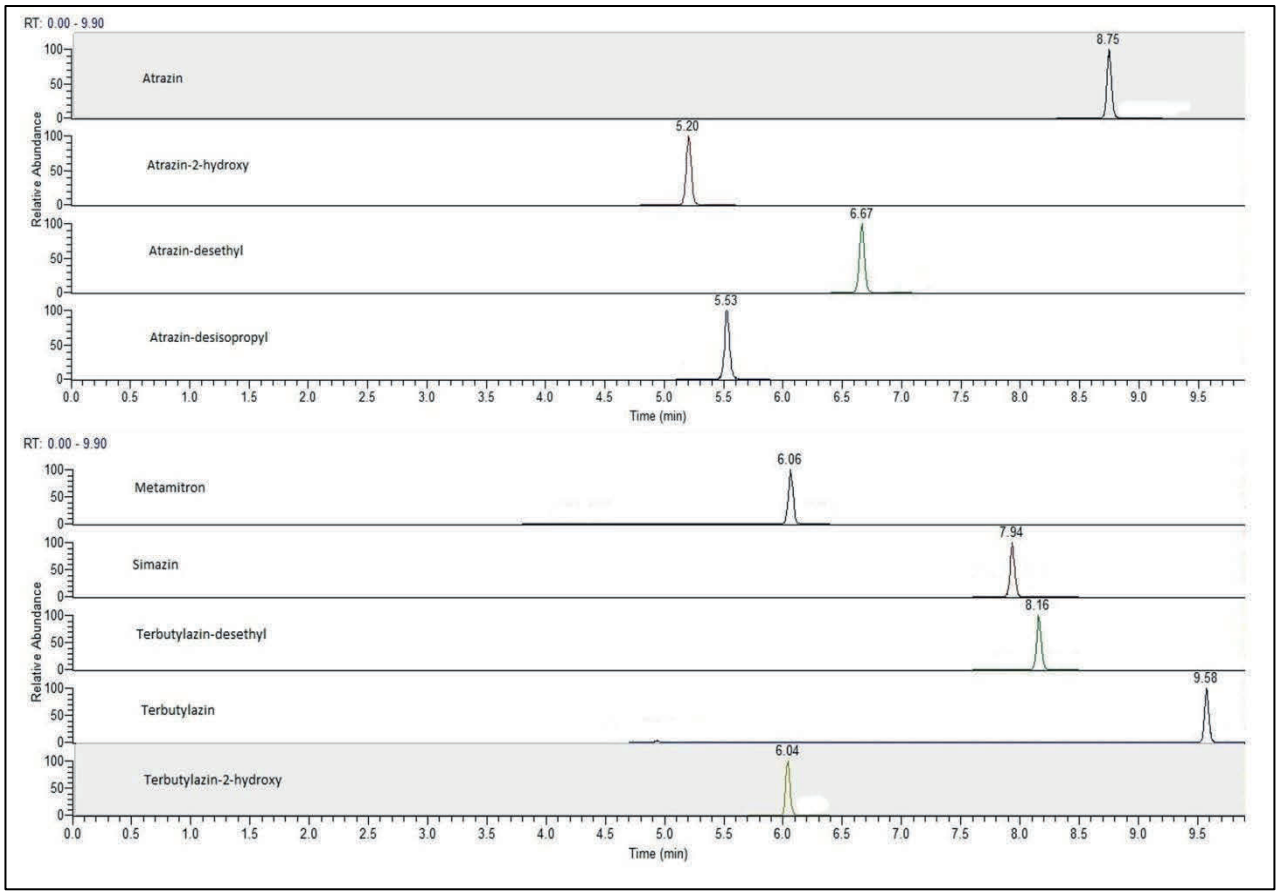
Tabulka 4: Shrnutí základních parametrů kalibrační křivky: rovnice lineární závislosti, korelačníkoeficient (R^2), rozmezí lineární závislosti kalibrační přímky

Látka	Rovnice lineární závislosti	Korelační koeficient R^2	Lineární dynamický rozsah kalibrační přímky (ng/g)
Atrazin	y = 0,0031825x	0,9992	0,01 – 1000
Atrazin-2-hydroxy	y = 0,00250791x	0,9991	0,1 – 1000
Atrazin-desethyl	y = 0,00214725x	0,9995	0,1 – 1000
Atrazin-desisopropyl	y = 0,000535883x	0,9998	0,1 – 1000
Metamitron	y = 0,000871335x	0,9991	0,1 – 1000
Propazin	y = 0,00213937x	0,9995	0,1 – 1000
Simazin	y = 0,00189901x	0,9996	0,1 – 1000
Simazin-2-hydroxy	y = 0,00283075x	0,9999	0,01 – 1000
Terbuthylazin	y = 0,00312381x	0,9998	0,01 – 1000
Terbuthylazin-2-hydroxy	y = 0,00380512x	0,9994	0,1 – 1000
Terbuthylazin-desethyl	y = 0,00204448x	0,9999	0,01 – 1000
Terbuthylazin-desethyl-2-hydroxy	y = 0,00222103x	0,9997	0,1 – 1000

Z tabulky 4 je patrné, že naměřené korelační koeficienty (R^2) vyhovují ve všech případech podmínce $R^2 \geq 0,9990$ a lineární dynamický rozsah kalibračních přímek pro zkoumané analyty leží v rozmezí 0,01–1000 (nebo 0,1–1000) ng/g.

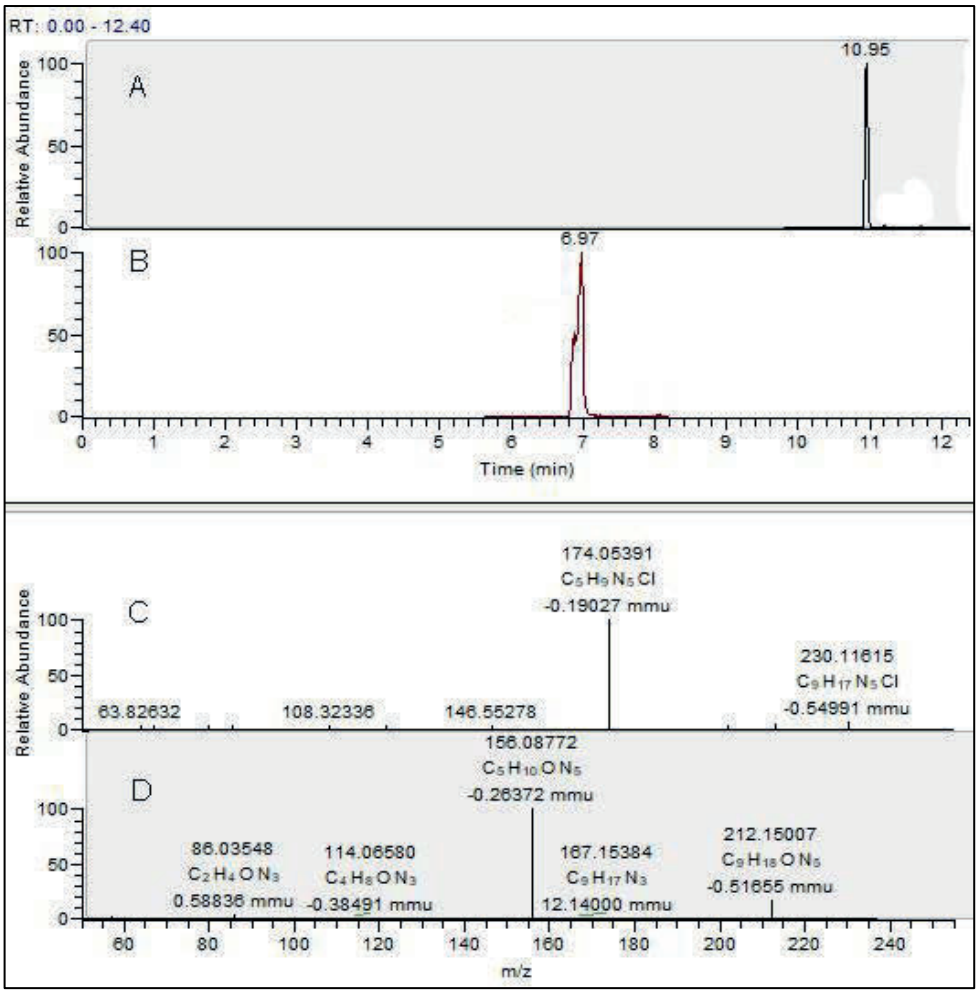
6. Výsledky z praxe a jejich interpretace

UHPLC-MS/MS (ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem) představuje vzhledem ke koncentračním hladinám, ve kterých se sledované látky v analyzovaných matricích (např. vzorky půd) vyskytují, ideální nástroj pro jejich přesné, citlivé a rychlé stanovení. Na obr. 5 je uvedena ukázka analýzy směsi standardů triazinů a jejich metabolitů v rámci použité metody.



Obrázek 5: Ukázka PRM chromatogramů UHPLC-MS/MS analýzy směsi standardů triazinových pesticidů. Koncentrace standardů: 0,1 µg/ml, dávkovaný objem vzorku: 1 µl.

Díky vyvinuté metodě jsme byli schopni v reálných vzorcích zkoumaných půd odebraných v lokalitách Česko-Bavorského pohraničí detekovat celkem 10 pesticidů včetně jejich metabolitů ze zkoumané skupiny triazinových pesticidů, jmenovitě: atrazin, propazin, simazin, terbuthylazin, a jejich metabolity: atrazin-2-OH, atrazin-desethyl, simazin-2-OH, terbuthylazin-2-OH, terbuthylazin-desethyl a terbuthylazin-desethyl-2-OH. Látkami s nejvyššími pozorovanými hladinami byly vesměs hydroxy-triaziny (atrazin-2-OH, atrazin-desethyl, simazin-2-OH, terbuthylazin-2-OH), což je v souladu s jinou podobnou studií (Hvězdová et al., 2018). Odpovídá to zřejmě silné sorpci a významné perzistenci těchto metabolitů v půdě. Nižší pozorovaný výskyt desalkylovaných triazinů korespondoval opět s jejich vlastnostmi, které podmiňují jejich preferenci k vymývání do podzemní vody.



Obrázek 6: Detekce terbuthylazinu (A) a jeho metabolitu terbuthylazinu-2-hydroxy (B) v reálném vzorku orné půdy. MS/MS spektra terbuthylazinu (C) a terbuthylazinu-2-hydroxy (D) jsou shodná se spektry identických standardů.

V některých zkoumaných vzorcích půd byla překročena pozorovaná hladina 0,01 mg.kg^{-1} pro sumu metabolitů triazinových pesticidů. Maximální množství triazinových metabolitů v jednom vzorku dosahovalo hladiny 0,06 mg.kg^{-1}, což je vysoko nad uznávanou hladinou 0,01 mg.kg^{-1} pro jednotlivé pesticidy (Hvězdová et al., 2018). Je třeba si ale uvědomit, že zde se jedná o součet všech zjištěných pesticidních látek. Na obr. 6 je uveden příklad detekce triazinu a jeho 2-hydroxy derivátu v reálném vzorku zkoumané orné půdy. Obě látky byly identifikovány díky shodě retenčních časů a MS/MS spekter s autentickými standardy.

Transformační produkty atrazinu a simazinu, které se v EU nepoužívají od zákazu v roce 2005 (tj. cca 15 let před odběry půd v současnosti), byly ve studovaných recentních půdách (odebraných v letech 2020 a 2021) nacházeny překvapivě často. Atrazin a simazin jsou látky významně toxické pro vodní prostředí, jsou to prioritní látky vodní politiky EU, či podezřelé karcinogeny a endokrinní

disruptory. Navzdory výše zmíněnému zákazu jsou atrazin a simazin, či jejich transformační produkty obecně často nacházeny i v současnosti jako kontaminanty evropských vod i půd. Přestože se nebezpečnost transformačních produktů může lišit od mateřských molekul, námi hladiny nalezené v českých orných půdách mohou být problematické, protože významně překračovaly dostupné limity: limity US EPA pro ochranu podzemní vody (0,0002 a 0,0003 mg/kg pro atrazin respektive simazin) (Hvězdová et al., 2018).

IV. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

Předložená metodika „Ultracitlivá analýza triazinů a jejich metabolitů v zemědělské půdě“ popisuje podrobný pracovní postup laboratorního přístupu k hodnocení obsahu triazinů ve vzorcích zemědělské půdy. Výhodou této metodiky oproti jiným publikovaným postupům, je zejména její velmi vysoká citlivost umožňující analýzu a detekci ultrastopových množství zkoumaných látek. Další výhodou metodiky je i její komplexní širší zaměření nejen na mateřské látky triazinů, ale i na jejich metabolity. V metodice je počítáno s využitím nejmodernějších analytických přístupů, což je také v souladu s legislativou EU spojené se schvalováním účinných látek. Za hlavní výhodu zde prezentovaného moderního analytického přístupu lze považovat to, že je díky němu možné ověřit distribuci mnoha desítek i stovek pesticidů jak v matricích, tak i metabolický osud sledovaných látek. Po drobných úpravách spočívajících zejména ve zpracování vzorků může být tato metodika, resp. její analytická koncovka, využita i pro analýzy vzorků jiného typu, např. potravin, ovoce, zeleniny nebo i podzemních vod na přítomnost triazinů. Při hodnocení této metodiky je také nutné brát v úvahu i neustálý technologický a vědecký pokrok v oboru analytické chemie.

V. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika pro hodnocení obsahu triazinů a jejich metabolitů v zemědělských půdách bude poskytnuta široké odborné veřejnosti, která se touto problematikou zabývá. Budoucími uživateli metodiky jsou univerzity, orgány státní kontroly, výzkumné i komerční týmy. Metodika je určena zejména pro odborné pracovníky zaměřené na ekologické hodnocení rizik pesticidů. Metodika je výstupem řešení projektu č. 220: “*Dopad zemědělské činnosti na kvalitu půdy a znečištění životního prostředí kontaminanty v česko-bavorském pohraničí“* podpořeného na základě finanční podpory Programu přeshraniční spolupráce Česká republika – Svobodný stát Bavorsko: Cíl - Evropská územní spolupráce 2014-2020“. Bezprostřední uplatnění zde popsané metody může být na

pracovištích zabývajících se kontrolou životního prostředí i bezpečností výroby potravin. Uplatněním metodiky budou získané poznatky rovněž využitelné v oblastech aplikovaného i základního výzkumu, pro studenty a pedagogy středních i vysokých škol.

Metodika bude v písemné formě šířena na pořádaných odborných prezentacích a seminářích. V elektronické podobě bude zveřejněna na webových stránkách Výzkumného ústavu pro rostlinnou výrobu, v.v.i. (www.vurv.cz).

VI. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Významným ekonomickým aspektem této aplikované metodiky je přínos nové analytické metody využívající nejmodernější analytické přístroje k hodnocení kontaminací zemědělských půd pesticidy, v tomto případě perzistentními triaziny a jejich metabolity. Sledování zamoření zemědělských půd (ale i dalších složek přírody, jako jsou podzemní vody nebo zemědělské produkty) pesticidy je v současné době velmi aktuálním tématem, zejména vzhledem k nárůstu civilizačních chorob či nádorových onemocnění. Proto v současné době stoupá společenská snaha ústící v poptávku po čistém životním prostředí včetně produkce ekologicky čistých potravin.

V současné době existuje spousta metod zabývajících se analýzou zemědělských půd i produktů na přítomnost pesticidů, včetně triazinů. Jedná se jak o vědecké, tak i o komerčně dostupné metody. Cena těchto metod je v řádu min. několika tisíců Kč za jeden vzorek, přičemž je možno vyjednat množstevní slevu. Všechny výše zmíněné metody mají jedno společné, a to je využití hmotnostní spektrometrie jako univerzálního detektoru na přítomnost pesticidů. Separace analytů probíhá většinou za pomocí kapalinové chromatografie (LC, HPLC), méně často za pomocí plynové chromatografie (GC). Hmotnostní spektrometrie, zejména v její tandemové verzi (MS/MS) je velmi sofistikovanou a nákladnou metodou, náročnou jak na přístrojové vybavení, tak i na potřebu specializované a erudované obsluhy. Na druhou stranu, použití levnějšího analytického vybavení, např. kapalinové chromatografie ve spojení s UV detekcí zde není prakticky možné pro jeho nízkou citlivost a malou specificitu. Pro analýzu pesticidů ve vzorcích se složitou matricí, jako je např. půda, potraviny, apod. tedy v současnosti neexistuje žádná jiná podobná alternativa, než je využití kapalinového chromatografu (či plynového chromatografu) ve spojení s hmotnostní detekcí. Navíc v současné době stále probíhá rozvoj hmotnostní spektrometrie ve směru dosažení ještě větší specificity, citlivosti či zvyšování rychlosti analýz, a to i při relativním zachování nákladů na analýzu jednoho vzorku.

V tabulce 5 jsou shrnuty kalkulované náklady na analýzu triazinů zde publikovanou metodou. Snížení nákladů je možno dosáhnout zpracováním a analýzou většího souboru vzorků najednou,

kdy dochází k relativním úsporám času věnovaného zpracování, analýze a vyhodnocení dat vztaženého na jeden vzorek. Dalšího snížení nákladů by bylo možno dosáhnout použitím kratší kolony (5 cm místo standardních 10 cm). Tím by bylo dosaženo rychlejší analýzy (do 10 min místo dosavadních 18 min) a tím i schopnosti zanalyzovat ještě více vzorků za jednotku času. Menších nákladů na materiál je možno dosáhnout i použitím jiných látek jako vnitřních standardů (namísto drahých, isotopicky značených standardů, lze použít levnější vnitřní standard, např. verapamil). Náklady na přístrojové vybavení je možno částečně snížit i použitím levnějšího typu tandemového hmotnostního spektrometru, používajícího detektor triple kvadrupól (QqQ) místo zde uvedeného detektoru typu Q-Orbitrap.

Tabulka 5: Informativní porovnání nákladů na analýzu triazinů a jejich metabolitů metodou UHPLC-MS/MS. V nákladech není zahrnuta amortizace přístrojů ani náklady na režii pracoviště.

Metodický krok	Přímé náklady na 1 vzorek (Kč bez DPH)	Přímé náklady na 10 vzorků (Kč bez DPH)
Odběr vzorku (bez započítání cestovních nákladů)	100	500
Zpracování vzorku pro analýzy (kombinovaná extrakce)	500	2500
Analýza vzorku	2000	10000
Celková mzda	1600 (8 hod á 200 Kč/hod)	8000 (40 hod á 200 Kč/hod)
Náklady na 1 vzorek (Kč bez DPH)	4200	2100

VII. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

Cotton J., Leroux F., Broudin S., Poirel M., Corman B., Junot Ch., Ducruix C. (2016) Development and validation of a multiresidue method for the analysis of more than 500 pesticides and drugs in water based on on-line and liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. *Water Research*, 104, 20-27.

European Commission. *Health and consumers.* (Citace: 2. 2. 2022) http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/legal_en.htm.

Fava L., Orrù M. A., Scardala S., Funari E. (2007) Leaching potential of carbamates and their metabolites and comparison with triazines. *Microchemical Journal*, 86(2), 204-208.

FDA (2018) U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Guidance for industry, Bioanalytical method validation.

Dzuman Z., Zachariasova M., Veprikova Z., Godula M., Hajslova J. (2015) Multi-analyte high performance liquid chromatography coupled to high resolution tandem mass spectrometry method for control of pesticide residues, mycotoxins, and pyrrolizidine alkaloids. *Analytica Chimica Acta*, 863, 29-40.

Guillon A., Videloup C., Leroux C., Bertin H., Philibert M., Baudin I., Esperanza M. (2019) Occurrence and fate of 27 triazines and metabolites within French drinking water treatment plants. *Water Supply*, 19(2), 463-471.

Hvězdová M., Kosubová P., Košíková M., Scherr :E., Šimek Z., Brodský L., Šudoma M., Škulcová L., Sáňka M., Svobodová M., Krkošková L., Vašíčková J., Neuwirthová N., Bielská L., Hofman J. (2018) Currently and recently used pesticides in Central European arable soils. *Science of the Total Environment*, 613-614, 361-370.

ICH (2005) Harmonised tripartite guideline, Q2B validation of analytical procedures: text and methodology, p 9.

Kamrin, A. (1997) *Pesticides profiles (toxicity, enviromental impact, and fate)*. Lewis Publishers. ISBN 1-56670-190-2.

Klementova S. & Keltnerova L. (2015) Triazine herbicides in the environment. *Herbicides, Physiology of Action, and Safety*, 71-96.

Mikulka J., Kneifelová M. Rizika kontaminace potravin a pitné vody herbicidy. (Online, citace 30.12.2021) http://www.phytosanitary.org/projekty/2003/vvf-12-03.pdf

Niessen W.M.A. & Correa C.R.A. (2017) *Interpretation of MS-MS mass spectra of drugs and pesticides.* Wiley series on mass spectrometry. (John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey).

Nováková L., Douša M. a kol. (2021) *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Vydavatel: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek. 2. upravené vydání. ISBN 978-80-270-8560-6.

Scherr K.E., Bielská L., Kosubová P., Dinisová P., Hvězdová M., Šimek z., Hofman J. (2017) Occurrence of chlorotriazine herbicides and their transformation products in arable soils. *Environmental Pollution* 222, 283-293.

Tsipi D., Botitsi H., Economou A. (2015) *Mass spectrometry for the analysis of pesticide residues and their metabolites.* Wiley series on mass spectrometry. (John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey).

Wang J., Chow W., Wong J.W., Leung D., Chang J., Li M. (2019) Non-target data acquisition for target analysis (nDATA) of 845 pesticide residues in fruits and vegetables using UHPLC/ESI Q-Orbitrap. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 411, 1421-1431.

VIII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Jágr M., Dvořáček V., Čermák P. (2019): Vývoj metody UHPLC-MS/MS analýzy pesticidů triazinového a neonikotinoidového typu. Pedologické dny, září 2019, Srní, Česká republika.

Jágr M., Dvořáček V., Kotrbová Kozak A, Čermák P., Kunzová E., Hlisnikovský L., Menšík L., Schilling B., Hangen E. (2021) Analysis of triazine and neonicotinoid pesticides in soil samples by UHPLC-Q-Orbitrap. In: Ninth Annual Conference of the Czech Society for Mass Spectrometry. Prague, Czech Republic, 11.-12.10.2021. Book of Abstracts, str. 39.

Jágr M., Dvořáček V., Čermák P., Schilling B., Hangen E. (2021) Stanovení pesticidů triazinového a neonikotinoidového typu ve vzorcích archivních a recentních půd metodou UHPLC-MS/MS. Úroda 12/2021, vědecká příloha: 411-418.

978-80-7427-371-4

ISBN: 978-80-7427-371-4