



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PESTICID GLYFOSÁT A MOŽNOSTI JEHO STANOVENÍ

PESTICIDE GLYPHOSATE AND POSSIBILITIES OF ITS DETERMINATION

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kristýna Stará

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Veronika Řezáčová, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1586/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Kristýna Stará**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **Ing. Veronika Řezáčová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Pesticid glyfosát a možnosti jeho stanovení

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na téma vlastností a využití vybraného pesticidu – glyfosátu.
2. Shnutí analytických metod využitelných pro stanovení tohoto pesticidu.
3. Experimentální stanovení glyfosátu vybranou dostupnou analytickou metodou.
4. Přehledné zpracování a zhodnocení získaných výsledků.

Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Kristýna Stará
student(ka)

Ing. Veronika Řezáčová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením glyfosátu metodou kapilární zónové izotachoforézy. Teoretická část je věnována pesticidům, jejich rozdělení a použití, vlastnostem a metodám stanovení glyfosátu. Dále také kapilární zónové izotachoforéze a jejímu využití. V praktické části jsou podmínky stanovení glyfosátu pomocí kapilární zónové izotachoforézy, stanovení glyfosátu v komerčních přípravcích a testování sorpce glyfosátu v půdě.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with determination of glyphosate employing capillary isotachopheresis technique. The literature review is devoted to pesticide, their distribution and use, properties and methods for the glyphosate determination, capillary zone isotachopheresis and its use. Experimental part focuses on the application of capillary isotachopheresis for determination of glyphosate, for determination of glyphosate in commercial preparations and testing of glyphosate sorption in soil.

KLÍČOVÁ SLOVA

Izotachoforéza, glyfosát, herbicidy

KEY WORDS

Isotachopheresis, glyphosate, herbicides

STARÁ, Kristýna. *Pesticid glyfosát a možnosti jeho stanovení*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123760>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Veronika Řezáčová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato bakalářská práce byla vypracována samostatně a že všechny použité literární zdroje jsou správně a úplně citovány. Tato práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

Kristýna Stará

Ráda bych poděkovala své vedoucí práce Ing. Veronice Řezáčové, Ph.D. za pomoc, cenné rady a konzultace při zpracování této bakalářské práce.

Dále bych ráda poděkovala své rodině a blízkým za podporu poskytovanou při psaní této práce.

Obsah:

1	Úvod	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Pesticidy	8
2.1.1	Rozdělení.....	8
2.2	Glyfosát	9
2.2.1	Chemické vlastnosti	9
2.2.2	Toxicita a negativní důsledky	11
2.2.3	Legislativa	11
2.3	Metody stanovení glyfosátu	12
2.3.1	Elektrochemické metody	12
2.3.2	Spektrometrické metody	12
2.3.3	Elektromigrační metody	13
2.3.4	Kapalinová chromatografie	14
2.3.5	Plynová chromatografie	14
2.4	Elektromigrační metody	15
2.4.1	Elektroforéza	15
2.4.2	Kapilární izotachoforéza (ITP).....	15
2.4.2.1	Princip	15
2.4.2.2	Instrumentace	16
2.4.2.3	Vyhodnocení	17
2.4.2.4	Využití	18
3	Experimentální část.....	19
3.1	Použité chemikálie	19
3.2	Vzorky	19
3.3	Použité přístroje.....	19
3.4	Příprava roztoků	20

3.4.1	Příprava elektrolytů.....	20
3.4.1.1	Vedoucí elektrolyt.....	20
3.4.1.2	Koncový elektrolyt.....	20
3.4.2	Příprava roztoků pro kalibraci.....	21
3.4.3	Příprava vzorků pro analýzu postřiků.....	21
3.4.4	Příprava vzorků pro test sorpce glyfosátu v půdě.....	21
4	Výsledky a diskuze.....	22
4.1	Výběr elektrolytů.....	22
4.2	Kalibrace a RSH faktor.....	23
4.2.1	Metoda.....	23
4.2.2	Kalibrace metody.....	23
4.2.3	Meze detekce a kvantifikace.....	25
4.3	Analýza postřiků.....	26
4.4	Testy sorpce glyfosátu v půdách.....	28
4.4.1	Typy půd.....	28
4.4.2	Metoda standardního přídavku.....	29
4.4.3	Vlastní stanovení.....	29
5	Závěr.....	32
6	Literatura.....	33

1 ÚVOD

Herbicidey, přípravky na hubení rostlin, jsou v mnoha zemích hojně používány pro usnadnění práce a lepší výnosy v zemědělství. Některé herbicidey však mají špatný dopad na zdraví člověka i živočichů a obecně na životní prostředí. Účinnou látkou často používaných herbicidů je glyfosát. V některých zemích, například v Rakousku a Spojených státech amerických, je používání herbicidů na bázi glyfosátu zakázáno. Důvodem je dopad na životní prostředí i podezření z karcinogenity glyfosátu. Od roku 2020 je použití herbicidů na bázi glyfosátu zakázáno na před sklizňové dosušování plodin i v České republice.

Pro stanovení glyfosátu je možno využít řady analytických metod. Jedna z možností, která je využita v této bakalářské práci, je metoda kapilární izotachografie.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Pesticidy

Pesticidy jsou látky nebo směsi látek, které jsou chemického nebo biologického původu. Používají se k prevenci, hubení nebo regulaci škodlivých organismů. Nejčastější využití nachází v zemědělství, ale i pro ochranu materiálů nebo potravin. Slouží tedy k zajištění dostatečné zemědělské produkci pro výživu lidské populace. Pesticidy mají ale nepříznivý vliv na životní prostředí včetně intoxikace zemědělských produktů a poškození užitečných organismů. Často jsou nebezpečné člověku z důvodu obtížného rozkládání, vytváření nebezpečných reziduí a kumulaci v organismu. Legislativně jsou zavedena ochranná opatření, kterými jsou ochranná lhůta mezi aplikací a sklizní a přípustné množství reziduí v zemědělských produktech. Účinek pesticidů se může časem snižovat z důvodu rezistence organismů. Proto se přípravky průběžně kombinují a obměňují [1].

2.1.1 Rozdělení

Pesticidy se dělí podle způsobu použití nebo podle biologických účinků, dále také podle anorganické nebo organické povahy. Aktivní anorganická složka je například Cu, Hg, As, Pb, F, S. Nejčastěji užívané pesticidy organického charakteru jsou organochlorové a organofosforové pesticidy. Od organochlorových pesticidů se ale v poslední době upouští z důvodu jejich chemické i biochemické stability a následné kontaminaci vody a půdy po dlouhou dobu. Oproti tomu organofosforové jsou dobře rozpustné ve vodě a jsou chemicky a biochemicky labilní [2].

Způsob použití je daný fyzikálními vlastnostmi dané látky. Rozlišujeme postřiky, poprašky, granuláty a enkapsuláty.

Dle biologických účinků rozlišujeme herbicidy, fungicidy a zoocidy. Herbicidy hubí nežádoucí vegetaci, nejčastěji plevel. Jsou to nejčastěji používané pesticidy. Většinou mají selektivní účinky, a proto jsou použitelné jen na určitý typ plevelu a pro ochranu určitých rostlin. Herbicidy se dále dělí podle účinku na kontaktní, které ničí tkáň pouze v místě dotyku a systémové, které se rozvádí po celé rostlině. Speciální skupinou herbicidů jsou defolianty a desikanty, které přerušují vegetaci, a tak způsobují například zasychání nadzemních částí.

Fungicidy jsou určeny pro hubení nižších hub, tedy plísní. Tyto houby jsou zodpovědné za choroby kulturních rostlin, jako jsou vinice. Fungicidy se nejčastěji používají preventivně.

Zoocidy účinkují proti živočišným škůdcům. Jsou to například insekticidy k hubení hmyzu nebo rodenticidy pro hubení hlodavců [1].

2.2 Glyfosát

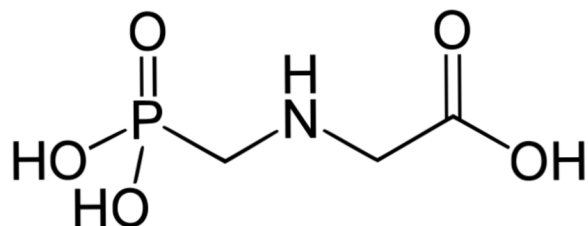
Glyfosát je jedním z herbicidů, které využívají jako aktivní látku derivát fosforu [3]. Konkrétně se jedná o systémový, neselektivní, širokospektrální herbicid. Je nejpoužívanějším pesticidem na zemi. Glyfosát byl poprvé syntetizován v roce 1950. V této době nebyly jeho herbicidní vlastnosti objeveny. V roce 1970 byl glyfosát znovu testován a v následujících letech byly objeveny jeho soli. Na trh byl uveden pod názvem Roundup v roce 1974 firmou Monsanto Company. Dalším prodávaným přípravkem s obsahem glyfosátu je například Rodeo. Používá se pro hubení jednoletých i víceletých plevelů, jako je například pýr, ale může sloužit i jako regulátor růstu. Působí až po vyklíčení semene ve fázi růstu rostliny. Inhibičně působí na enzym 5-enolpyruvyl-šikimát-3-fosfát syntázu, který syntetizuje aromatické aminokyseliny u rostlin [4]. Aplikuje se tedy před zasetím obilovin či jiných rostlin, které chráníme před plevellem, a po několika dnech se v půdě deaktivuje [3]. Aby nedošlo k poškození plodin, je použití glyfosátu v určitých obdobích během roku omezeno. Toto omezení se ale eliminovalo po zavedení geneticky modifikovaných plodin, které jsou vůči glyfosátu rezistentní. Těmito rostlinami jsou například tzv. Roundup Ready plodiny. Tyto plodiny vyšlechtila mimo jiné firma Monsanto. Nejznámější je Roundup Ready sója. Rezistentními se ovšem stávají i některé druhy plevelů, což zemědělce nutí používat přípravek častěji. To ale zvyšuje riziko pro zdraví a pro životní prostředí [4]. Glyfosát se často používá v přípravku spolu s pomocnými látkami, jako jsou povrchově aktivní látky pro dobré rozprostření na listu, kondicionéry vody pro regulaci iontů ve tvrdé vodě nebo hnojiva.

Roundup historicky patří mezi globálně nejpoužívanější herbicidy. Nejčastěji se používá v zemědělství, dále ale i v lesnictví a v péči o městskou zeleň. V roce 2013 byl glyfosát nejpoužívanějším herbicidem na světě. V České republice bylo v téže roce spotřebováno 935 469 kg glyfosátu. Z toho polovina byla použita při pěstování obilovin [5].

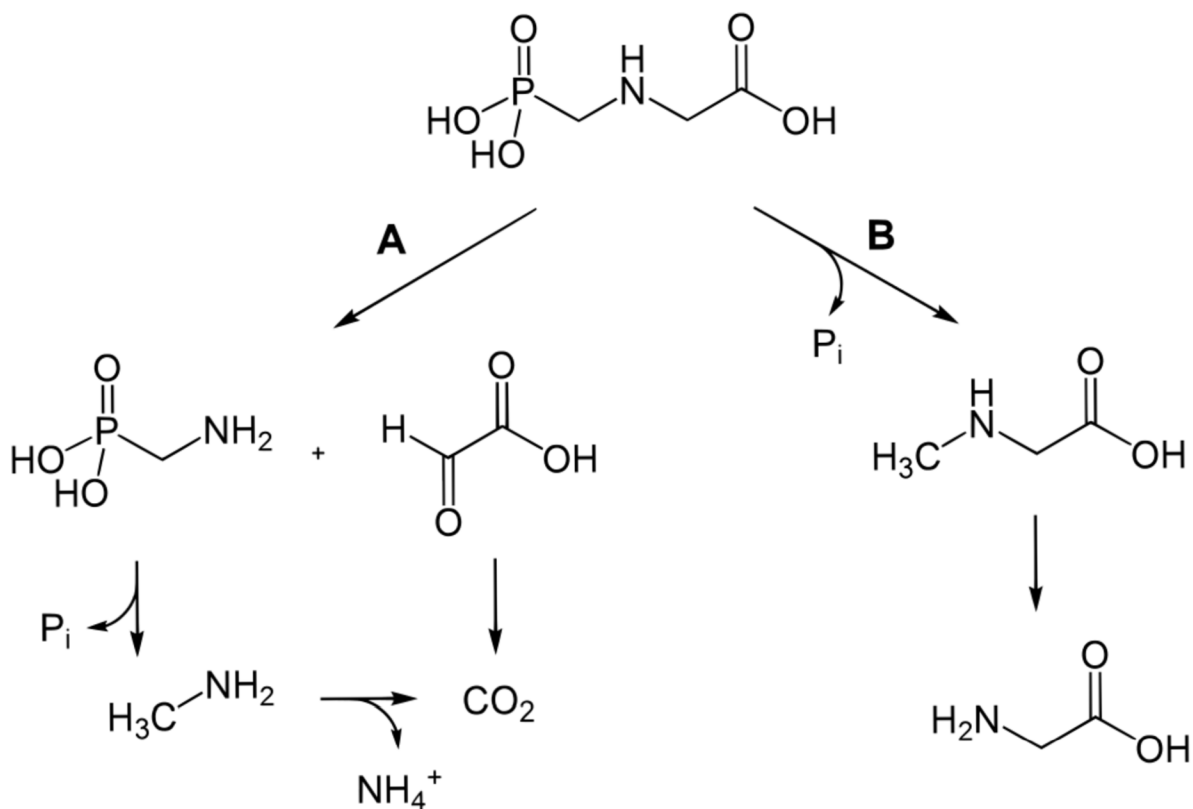
2.2.1 Chemické vlastnosti

Glyfosát, systematickým názvem N-(fosfonomethyl) glycin, má sumární vzorec $C_3H_8NO_5P$. Strukturální vzorec je uveden na Obr. 1. Je to bezbarvý krystalický prášek bez zápachu, který je mírně rozpustný ve vodě a nerozpustný v organických rozpouštědlech. Koroduje železo. Má pevnou vazbu na půdu [6]. Glyfosát je kyselina, která se vyrábí ve formě technické kvality. Toxikologické údaje o této formě však nejsou pro zdraví a životní prostředí relevantní. Ve skutečnosti se glyfosát jako aktivní látka herbicidů používá v jiných formách, které jsou rozpustné ve vodě. Nejčastěji jsou to isopropylaminové, trimethylsulfoniové nebo amonné soli. Tyto soli jsou pak uvolňovány do životního prostředí a jsou zdroji reziduí, které se následně nacházejí v krmivech nebo potravinách. Hlavním reziduem glyfosátu

je kyselina aminomethylfosfonová, dále AMPA. Další metabolity glyfosátu jsou methylamin, amoniak a oxid uhlíčitý. Schéma rozkladu glyfosátu je uvedeno na Obr. 2. Pro srovnání je rozpustnost kyseliny glyfosátu asi $10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ a rozpustnost isopropylaminové soli glyfosátu přes $1000 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ [7].



Obr. 1: Strukturní vzorec glyfosátu [8]



Obr. 2: Schéma rozkladu glyfosátu [9]

2.2.2 Toxicita a negativní důsledky

Podle skupiny expertů z ESFA EU (European Food Safety Authority) není glyfosát karcinogenní hrozbou pro člověka, ačkoli některé přípravky na bázi glyfosátu genotoxické jsou [10]. Nicméně podle závěrů organizace IARC (International Agency for Research on Cancer), prezentovaných v roce 2015, je glyfosát zařazen do 2A kategorie karcinogenity, tedy pravděpodobně karcinogenní pro člověka. Čistý glyfosát je pro člověka mírně toxický. Lidé mohou být glyfosátu vystaveni pozřením, kontaktem nebo vdechnutím [5].

Herbicidey, které jsou bioaktivní, reagují s biomasou a dále se dostávají do vodních a půdních systémů. K tomu může docházet nejčastěji vyluhováním, unášením a sorpcí na půdu. Následkem je, že se glyfosát a jeho rezidua nalézají v podzemních vodách, lidské a zvířecí moči, mateřském mléce a v masě hospodářských zvířat. Tyto nálezy jsou však součástí koktejlu pesticidů, kterým jsou organismy vystavovány [7]. V důsledku chemických vlastností glyfosátu se očekává, že se bude pouze adsorbovat v půdě. Kvůli jeho rozšířenému použití může znečišťovat i povrchové a podzemní vody. Glyfosát degraduje v půdě v rozmezí 3 až 174 dnů, což má spolu se silnou vazbou na půdu za následek relativně nízkou kontaminaci podzemních vod. Ve vodě pak degraduje dvakrát déle, v průměru 95 dnů. Ve většině případů je více toxický výsledný produkt, např. herbicid Roundup, oproti samotné účinné látce glyfosátu. Pro vodní živočichy má pak Roundup nízkou až střední toxicitu [11].

2.2.3 Legislativa

O limitech reziduí v potravinách v současné době pojednává Vyhláška 272/200 Sb., kterou se mění vyhláška č. 381/2007 Sb., o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v potravinách a surovinách. Pro příklad u brambor je maximální limit reziduí glyfosátu $0,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, u pšenice $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a u sójových bobů $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. U mléka a mléčných výrobků je to pak $0,01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a u masa hospodářských zvířat včetně vnitřností a tuků je to $0,05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [12]. Podle WHO vykazují glyfosát i AMPA nízkou toxicitu. Maximální povolená dávka pro člověka je $0,3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ tělesné váhy. Proto přítomnost glyfosátu a AMPA v pitné vodě nepředstavuje za obvyklých podmínek riziko pro lidské zdraví [13]. Dle vyhlášky MŽP a MZE č. 5/2011 Sb. je limit pro podzemní vodu $0,1 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ [14].

V roce 2019 byly herbicidey na bázi glyfosátu zakázány v Rakousku. Rakousko je teď jediným státem Evropské unie se zákazem glyfosátu. V České republice se tento zákon neprosadil, protože glyfosát nebyl čím nahradit [15]. Od roku 2020 bylo však plošné použití glyfosátu zakázáno na předsklizňové dosušení rostlin pro potravinářské účely [16].

2.3 Metody stanovení glyfosátu

Vzhledem k tomu, že je glyfosát hojně používaným herbicidem v mnoha zemích a má nepříznivý vliv na zdraví a životní prostředí, jsou jeho možnosti stanovení stále vyhledávány. Metod je známa a používána celá řada, i přes ne zcela jednoduché podmínky pro stanovení. Proto jsou v následujících odstavcích uvedeny mj. speciální metody stanovení vyvinuté v posledních letech.

2.3.1 Elektrochemické metody

Nejnámější elektrochemickou metodou, využívanou i v rámci stanovení glyfosátu je voltametrie. Často používaná je Cu/GC elektroda pro stanovení glyfosátu ve vodě. V argentinské studii uvádí optimalizaci této elektrody pro detekci herbicidů. Užívají přitom páry Cu^0/Cu^+ a $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$. Nejprve se musí vytvořit povrch elektrody Cu/GC ideálně potenciálem $-0,6$ V. Poté se molekuly glyfosátu adsorbují na elektrodu a tvoří bariéru, která brání difúzi iontů Cu^{2+} směrem k povrchu elektrody. Tím se snižuje aktuální pík. U stanovení v čistém systému a v pitné vodě s rušivými ionty touto metodou byla podobná citlivost i stabilita [17].

Nejnovější elektrochemickou metodou k detekci a stanovení glyfosátu ve vodě je použití molekulárně potišťených polymerů jako materiálu pracovní elektrody. Tato detekce je založena na specifickém rozpoznávání molekul vazebnými místy. Výhodami jsou zejména specifické rozpoznání, stabilita a snadná a nízkonákladová příprava. Polymery se připravují z chitosanu. Chitosan je přírodní polysacharid získaný deacetylací chitinu. Má dobré vlastnosti jako jsou biologická rozložitelnost a kompatibilita. Obsahuje funkční skupiny jako aminoskupiny nebo hydroxylové skupiny, které mu umožňují strukturální modifikace pro přípravu molekulárně potišťených polymerů. Tato metoda je založená na elektrochemickém impedančním spektroskopickém systému, který využívá elektrodopozici chitosanu na zlaté mikroelektrodě. Tato metoda má nízký detekční limit až $0,001 \text{ pg} \cdot \text{cm}^{-3}$ a je vysoce selektivní vůči glyfosátu ve srovnání s jinými příbuznými pesticidy, jako je glufosinát [18].

2.3.2 Spektrometrické metody

Známou spektrometrickou metodou je molekulová absorpční spektrofotometrie, která byla použita pro stanovení glyfosátu ve vzorcích luštěnin. Samotné spektrofotometrii předchází metoda separace a předkoncentrace, tedy disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina. Byla vyvinuta přímo pro stanovení glyfosátových herbicidů. Tato metoda je založena na reakci glyfosátu s CS_2 za vzniku na kyseliny dithiouhličitě. Byl vytvořen komplex s mědí v prostředí amoniaku. Žlutý komplex byl extrahován dichlormethanu a jeho absorbance byla měřena

při vlnové délce 435 nm. Při optimalizaci parametrů, kterými jsou například množství amoniaku a mědi, byla kalibrační křivka lineární v rozmezí 0,5 – 10 mg · dm⁻³. Tato metoda není příliš nákladná a dá se provést v základně vybavených laboratořích [19].

Možností rychlého stanovení glyfosátu ve vzorcích přímo na místě je optický imunosenzor. Tento senzor je citlivý na odraz bílého světla. Umožňuje sledování biomolekulárních interakcí v reálném čase. Sleduje se interferenční spektrum odražené od SiO₂/Si čipu. Toto spektrum je způsobené imunoreakcí na účinnou biomolekulární vrstvu, která probíhá na povrchu čipu. Čip má proteinový konjugát herbicidu a jeho povrch se sleduje optickou reflexní sondou. Před stanovením musí být provedena pro lepší citlivost derivatizace glyfosátu například reakcí s anhydridem kyseliny jantarové. U této metody byl stanoven detekční limit 10 pg · cm⁻³. Použitý čip lze použít alespoň 14krát bez vlivu na přesnost a citlivost [20].

2.3.3 Elektromigrační metody

Už v roce 1996 byl uveřejněn článek o analýze glyfosátu s využitím kapilární elektroforézy s nepřímou detekcí. Stanovoval se glyfosát a AMPA ve vzorcích vody. Byl použit základní elektrolyt, který obsahoval 10 mmol · dm⁻³ ftalát o pH 7,5 a tetradecyltrimethylamonium bromid jako modifikátor elektroosmotického toku. Separace probíhala méně než 4 minuty. Limit detekce pro glyfosát byl 0,8 μg · cm⁻³. Při analýze reálných vzorků se však tato metoda neosvědčila. Nebylo tak dosaženo požadované citlivosti a není tedy rychlou alternativou ke kapalinové nebo plynové chromatografii [21].

Možné je i zkombinování kapilární elektroforézy a hmotnostní spektroskopie. Tato metoda byla využita pro současné stanovení herbicidů glyfosátu, glufosinátu a jejich metabolitů. Výhoda je v jednoduchém rozhraní elektrospreje. Napětí, které je aplikované na kapiláru elektroforézy, rozhraní využívá k řízení separace a generování elektrospreje. Tímto se zabrání zředění vzorku. Nejlepší reprodukovatelnost poskytla lineárně potažená kapilára polyakrylamidem, ve které nedochází k elektroosmotickému toku. Meze detekce jsou výrazně lepší než u samotné kapilární elektroforézy. Koncentrační limit pro glyfosát je 1 μmol · dm⁻³ a pro extrakt z pšenice 2,5 μmol · l⁻¹ [22].

Na vzorky půdy v Mexiku byla použita metoda kvantových teček CdTe/CdS začleněných do kapilární elektroforézy. Kvantové tečky jsou koloidní nanokrystaly polovodičových materiálů o velikosti 1-10 nm. V těchto rozměrech vykazují materiály dobré fotoluminiscenční vlastnosti. Fluorescenční spektroskopii byla zjištěna interakce mezi tečkami a glyfosátem. Utvořením komplexu glyfosátu s tečkami se zlepšuje emisní signál. Tato metoda má mez detekce 27,5 mg · kg⁻¹ [23].

2.3.4 Kapalinová chromatografie

Mezi prvními chromatografickými metodami byla v roce 1997 provedena separace pomocí katexové a anexové chromatografie. K detekci byla využita elektrogenovaná chemiluminiscence díky tris(2,2'-bipyridyl) rutheniu (II). Zahrnutím ruthenia do mobilní fáze se snížily retenční časy a eluce byla isokratická při aniontoměničové chromatografii. Tato metoda měla dobré limity detekce v alkalickém prostředí a to $0,01 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ [24].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je často využívanou metodou pro stanovení glyfosátu. Je poměrně citlivá a stabilní, ale nevýhodou je nutnost derivatizace vzorku. Limity detekce se liší podle použitých detekčních metod. Pro příklad pro stanovení glyfosátu v půdě a v kalech byla použita fluorescenční detekce a limit detekce byl $0,01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [25]. Dále byla použita UV detekce, aplikovaná při 360 nm, pro stanovení glyfosátu ve vodě. Limit detekce zde byl $0,009 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ [26].

Možná je kombinace vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Tato metoda zahrnuje okyselení a neutralizaci asi 3 ml vzorku, dvou hodinovou derivatizaci a vyčištění dichlormethanem. Kapalinová chromatografie je prováděna v systému reverzních fází. Tato metoda byla použita např. pro analýzu vod v okolí farem v oblasti kolem Argentiny. Výsledky zde ukázaly častý výskyt glyfosátu a jeho metabolitu AMPA ve stopových množstvích v podzemních vodách a otevřených vodních nádržích [27].

Český hydrometeorologický ústav využívá kapalinové chromatografie v kombinaci s hmotnostním spektrometrem jako detekci nebo s fluorescenčním detektorem pro kontrolní analýzu glyfosátu ve vodách, sedimentech a naplaveninách [14].

2.3.5 Plynová chromatografie

Metoda plynové chromatografie byla v roce 1996 využita pro analýzu glyfosátových herbicidů ve vzorcích potravin a životního prostředí. Vzorky bylo nutné předem derivatizovat a extrahovat vodou nebo roztokem hydroxidu sodného na deriváty N-isopropoxykarbonylmethylestrů. Detekce byla provedena plamenovou fotometrií. Celková analýza i s přípravou derivátu netrvala více než 20 minut. Detekční limity a reprodukovatelnost byly dostačující pro kvantitativní stanovení glyfosátu a AMPA ve vzorcích vody, půdy a mrkve bez předešlého očištění. Překážkou nebyly ani další látky, obsažené ve vzorcích, které analýzu nijak nerušily [28].

Pro shrnutí je nejčastější metodou pro stanovení glyfosátu a jeho metabolitu ve vodách či potravinách plynová a kapalinová chromatografie. Tyto metody jsou často kombinovány s hmotnostním spektrometrem. Využívány jsou různé typy detektorů nejčastěji fotometrické detektory. U těchto dvou metod jsou nejnižší meze detekce. Ostatní metody jsou využitelné jak pro přesné, tak pro orientační stanovení.

2.4 Elektromigrační metody

Elektromigrační separační metody využívají elektrokinetických jevů. Základním principem elektromigračních metod je separace složek vzorku na základě jejich rozdílné rychlosti migrace. Prostředí obsahuje roztok s nabitými částicemi a pevné povrchy, které mohou nést elektrický náboj a stýkají se s roztokem. V tomto prostředí se vytváří elektrická dvojvrstva. Náboje v prostředí se rovnoměrně rozdělí a vznikne rovnováha. Připojením prostředí ke stejnosměrnému elektrickému poli se rovnováha poruší a částice se začnou pohybovat. Podle pohybu dělíme elektrokinetické jevy na elektroforézu, kde se částice pohybují k opačně nabitým elektrodám a na elektroosmózu, kde se v kapiláře pohybuje prostředí k záporné elektrodě [29].

2.4.1 Elektroforéza

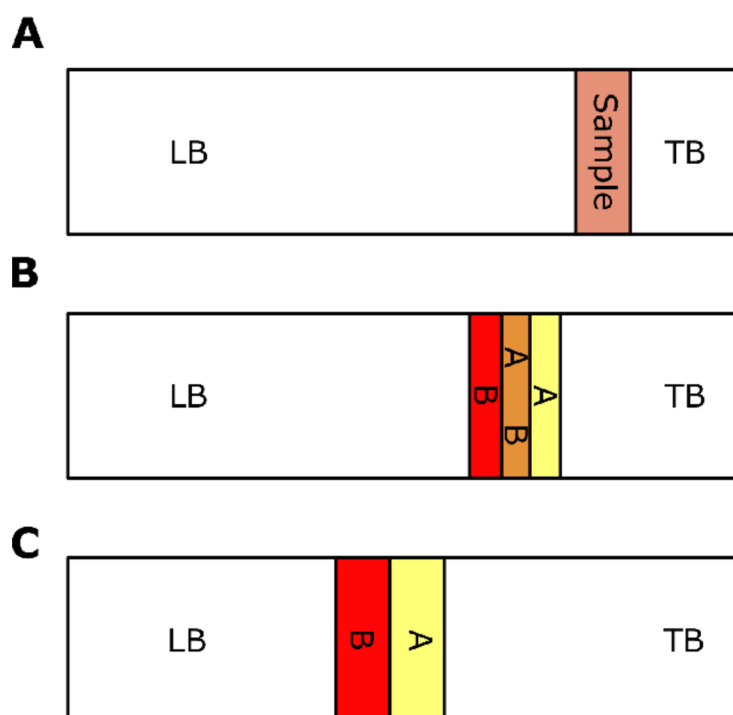
Elektroforéza je orientovaný pohyb nabitých částic v roztoku, který je vynucený stejnosměrným elektrickým polem. Pohyblivost částice je ovlivněna jejím rozměrem, tvarem a nábojem a dále viskozitou prostředí. Základními principy separace jsou rozdílné migrační rychlosti nabitých částic a proměnlivost elektrického pole při konstantní rychlosti migračního pohybu. Elektromigrační metody lze rozdělit dle prostředí, ve kterém separace probíhá na elektroforézu ve volném prostředí, elektroforézu na nosiči a elektroforézu v kapiláře. Kapilární elektroforéza se dělí dle principu separace na kapilární zónovou elektroforézu, kapilární gelovou elektroforézu, kapilární izoelektrickou fokusaci, micelární elektrokinetickou chromatografii a kapilární izotachoforézu.

2.4.2 Kapilární izotachoforéza (ITP)

2.4.2.1 Princip

Je to analytická separační metoda, jejíž název je odvozen od slov *izo* (stejný) a *tacho* (rychlost). V kapilární izotachoforéze lze dělit pouze ionty stejného náboje. Vzorek je po nadávkování separován v diskontinuálním elektrolytovém systému, který je vytvořen vedoucím (leading, LE) a koncovým (terminating, TE) elektrolytem. Vedoucí elektrolyt obsahuje částice s nejvyšší mobilitou a koncový elektrolyt částice s nejmenší mobilitou. Mobility částic ve vzorku by tedy měly být mezi mobilitami částic vedoucího a koncového elektrolytu. Vedoucí elektrolyt ještě musí obsahovat protiionty. Tyto protiionty vytvoří s vedoucími ionty tlumící směs, která udržuje elektroneutralitu zón. Vzorek se vnáší na rozhraní LE a TE [30]. Separace začíná vložением stejnosměrného napětí a dále je řízena vkládaným proudem. Částice se seřadí podle jejich mobilit, tedy nejrychlejší ionty se dostanou až k vedoucímu elektrolytu a pomalé zůstávají před koncovým elektrolytem. V ustáleném stavu částice vytvoří zóny těsně za sebou mezi vedoucím a koncovým

elektrolytem. Zóny jsou seřazeny podle klesajících elektroforetických mobilit. Po ustálení dále putují stejnou rychlostí k dané elektrodě. Průběh separace je znázorněn níže na Obr. 3.



Obr. 3: Schéma separace pomocí izotachoforézy [31]

Částice se pohybují stejnou rychlostí, ale mají odlišnou mobilitu. V jednotlivých zónách je tedy jiný potenciál. Tento potenciál zajistíme různou intenzitou elektrického pole podél kapiláry s roztokem, tedy gradientem pole. Intenzita pole klesá pro zóny s rostoucí pohyblivostí. Projevuje se zde tzv. samozaostřující efekt. Pokud se částice dostane mimo svou zónu, je vrácena zpět vlivem intenzity elektrického pole. Touto metodou lze analyzovat pouze nabitě částice, a tak je výhodou, že ostatní nenabitě látky neruší analýzu [30].

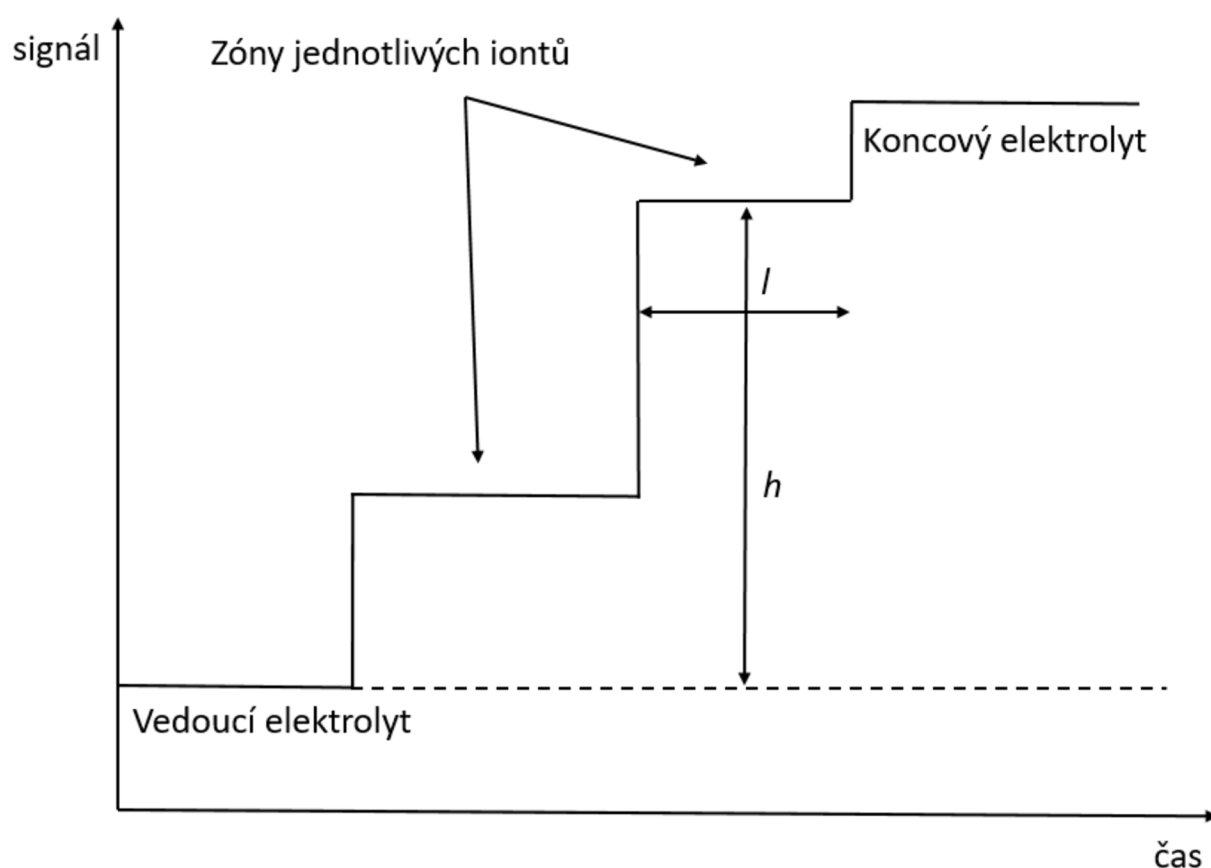
2.4.2.2 Instrumentace

ITP se provádí ve skleněné nebo teflonové kapiláře o průměrech 0,5-1 mm. Kromě kapiláry obsahuje zařízení ještě nádoby na vedoucí a koncový elektrolyt, elektrody a detektor. Používají se platinové elektrody. Elektroforetická pohyblivost prakticky není ovlivněna dalšími jevy. Detektor je umístěn na konci separační kapiláry. Časový záznam závisí na typu detektoru. Pro izotachoforézu jsou používány dva typy detektorů. Prvním jsou univerzální detektory, jejichž odezva je určena pohyblivostí iontů v zóně. Jsou to vodivostní detektory, které měří vodivost zóny. Tato zóna prochází přes detektor, a teplotní detektory, které měří

teplotu v určitém místě kapiláry. Druhým typem jsou specifické detektory, jejichž odezva je určena jinými vlastnostmi látky v zóně než pohyblivostí. Tímto typem může být fotometrický detektor, který sleduje absorpci v oblastech UV nebo VIS.

2.4.2.3 Vyhodnocení

Výstupem získaným použitím izotachografie je izotachogram. Může být schodovitý (integrální) nebo v podobě píků (diferenciální). Udává závislost intenzity signálu detektoru na čase. Kvalitativní charakteristikou analytu je v případě integrálního záznamu výška schodu a kvantitativní charakteristikou je délka schodu. Integrální izotachogram je na Obr. 4. Je zde vyznačena výška schodu (h) a délka schodu (l). U kvalitativního vyhodnocení se určuje relativní výška schodu (RSH) vzhledem k poloze vedoucího a koncového elektrolytu [32].



Obr. 4: Schéma izotachogramu

2.4.2.4 Využití

Izotachoforézu lze použít pouze pro nabité částice a při jedné analýze pouze pro kladně nebo záporně nabitě částice. Výhodou tedy je, že nenabitě částice analýzu neruší. Analýza má jednoduše zjistitelné kvalitativní i kvantitativní informace.

Tato metoda se často využívá pro analýzu vod a potravin. Také se užívá pro separaci jednoduchých organických sloučenin nebo iontů prvků. Často se kombinuje s jinou elektromigrační metodou. Nejčastěji je to kapilární zónová elektroforéza [30].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

Při stanovení glyfosátu byly testovány dva elektrolytické systémy. Pro vytvoření kalibrační křivky byl použit standard glyfosátu. Výčet použitých chemikálií je uveden v následující tabulce 1. Při přípravě roztoků byla používána Milli-Q voda.

Tabulka 1: Seznam použitých chemikálií

Název	Vzorec	Výrobce
MES hydrát	$C_6H_{13}NO_4S \cdot xH_2O$	Sigma Aldrich
Kyselina chlorovodíková	HCl	Lachema
Histidin	$C_6H_9N_3O_2$	Sigma Aldrich
(Hydroxypropyl)methyl celulóza	-	Fluka
N-(fosfonomethyl)glycin	$(HO)_2P(O)CH_2NHCH_2CO_2H$	Sigma Aldrich

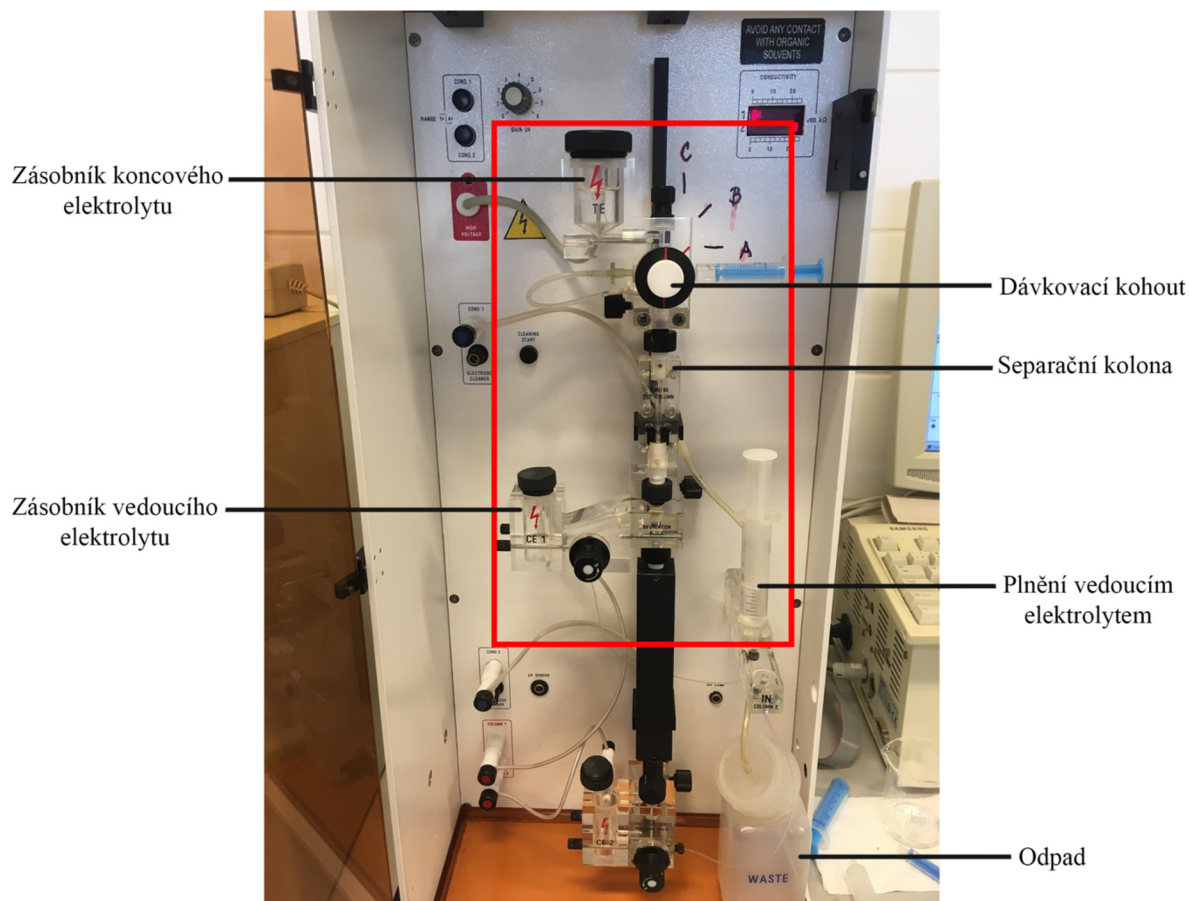
3.2 Vzorky

Pro stanovení obsahu glyfosátu v komerčních herbicidech a dále pro zjištění sorpce glyfosátu v půdách byly vybrány následující volně prodejné herbicidy:

- Roundup Klasik, výrobce Monsanto
- Glyfo Klasik Strong, výrobce Agro CS a.s.

3.3 Použité přístroje

Analýza byla prováděna elektroforetickým přístrojem, firmy Villa Labeco 100, SR. Tento přístroj je zobrazený na Obr. 5. Červeným rámečkem je vyznačená používaná část izotachoforézy. Druhá kolona elektroforézy nebyla používána. Pro navážení látek v pevném skupenství byly použity analytické váhy Scaltec a pro navážení vzorků půdy byly použity předvážky Scaltec. Voda pro přípravu roztoků byla upravena přístrojem Milli-Q Academic (Millipore, USA).



Obr. 5: Elektroforetický analyzátor Villa Labeco 100

3.4 Příprava roztoků

3.4.1 Příprava elektrolytů

3.4.1.1 Vedoucí elektrolyt

Pro přípravu 250 ml vedoucího elektrolytu bylo vypočteno potřebné množství kyseliny chlorovodíkové, histidinu a (hydroxypropyl)methyl celulosy. Na analytických vahách bylo naváženo 0,2503 g 0,1% (hydroxypropyl)methyl celulosy. Toto množství bylo rozmícháno v kádince, obsahující asi 150 ml destilované vody. Směs byla přefiltrována a kvantitativně převedena do odměrné baňky na 250 ml. Bylo naváženo 0,7760 g histidinu a kvantitativně převedeno do odměrné baňky. Dále bylo napipetováno 0,22 ml 35% kyseliny chlorovodíkové. Baňka byla doplněna destilovanou vodou.

3.4.1.2 Koncový elektrolyt

Pro přípravu 250 ml koncového elektrolytu bylo naváženo 0,4855 g MES. Toto množství bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky na 250 ml a doplněno destilovanou vodou.

3.4.2 Příprava roztoků pro kalibraci

Pro přípravu standardního roztoku glyfosátu o koncentraci $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ bylo naváženo 0,169 g N-(fosfonomethyl)glycinu. Navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky na 100 ml a doplněna destilovanou vodou. Veškerá práce s glyfosátem byla prováděna v plastových nádobách, aby se zamezilo pravděpodobné sorpci glyfosátu na sklo. Následně byl standardní roztok ředěn destilovanou vodou do zkumavek o celkovém objemu 10 ml a koncentracích 0,05; 0,075; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,75; 0,9; 1 a $1,5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

3.4.3 Příprava vzorků pro analýzu postřiků

Pro vzorek Roundupu i Glyfo klasik byl použit stejný postup. Z obalu byla zjištěna koncentrace v jednotkách $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ a přepočtena na jednotky $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Aby se koncentrace pohybovala na odpovídající kalibrační křivce, musel být vzorek zředěn 10 000x. Do plastové zkumavky byl napipetován 1 ml vzorku a doplněno 9 ml destilované vody. Z této zkumavky byl pipetován opět 1 ml roztoku do plastové zkumavky a doplněno 9 ml destilované vody. Nakonec bylo z této zkumavky pipetováno 0,1 ml roztoku do plastové zkumavky a bylo doplněno 9,9 ml destilované vody. Od obou komerčních produktů byly vytvořeny dva paralelní vzorky. Každý vzorek byl proměřen 3krát a z výsledků byl vytvořen průměr.

3.4.4 Příprava vzorků pro test sorpce glyfosátu v půdě.

Pro testy sorpce glyfosátu v půdě byl jako glyfosátový herbicid vybrán Glyfo Klasik Strong. Dále byly použity 3 různé vzorky půdy. Do 6 plastových kelímků bylo odváženo na předvážkách po 10 g půdy. Každý vzorek tedy byl ve dvou kelímcích. Dále byl zředěn vzorek postřiku na koncentraci odpovídající reálné aplikaci herbicidu. Do odměrné baňky o objemu 50 ml byly pipetovány 2 ml postřiku a po rysku doplněno destilovanou vodou. Do každého vzorku půdy byly pipetovány 2 ml zředěného postřiku. Do vzorku č. 1 bylo ihned přidáno 25 ml destilované vody, do vzorku č. 2 10 ml destilované vody a do vzorku č. 3 20 ml destilované vody. Takto připravené vzorky byly po dobu 1 hodiny promíchávány. Po 1 hodině byla voda odlita do centrifugačních zkumavek a obsah byl na centrifuze odstředěn. Odstředěná kapalina byla odebrána stříkačkou s filtrem. Z takto vyčištěného vzorku byl pipetován 1 ml do zkumavky a přidáno 9 ml destilované vody. Takto připravený vzorek byl změřen na izotachoforéze. Dále byl do zkumavky pipetován 1 ml vzorku a přidáno 0,5 ml standardu glyfosátu o koncentraci $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pro vyhodnocení metodou standardního přídatku a opět změřeno pomocí izotachoforézy.

Zbylé 3 kelímky se vzorky hlíny byly nechány v klidu po dobu 10 dní. Po 10 dnech bylo do vzorku č. 1 přidáno 25 ml destilované vody, do vzorku č. 2 10 ml destilované vody a do vzorku č. 3 20 ml destilované vody. Dále bylo postupováno jako v předchozím případě stanovení vzorků.

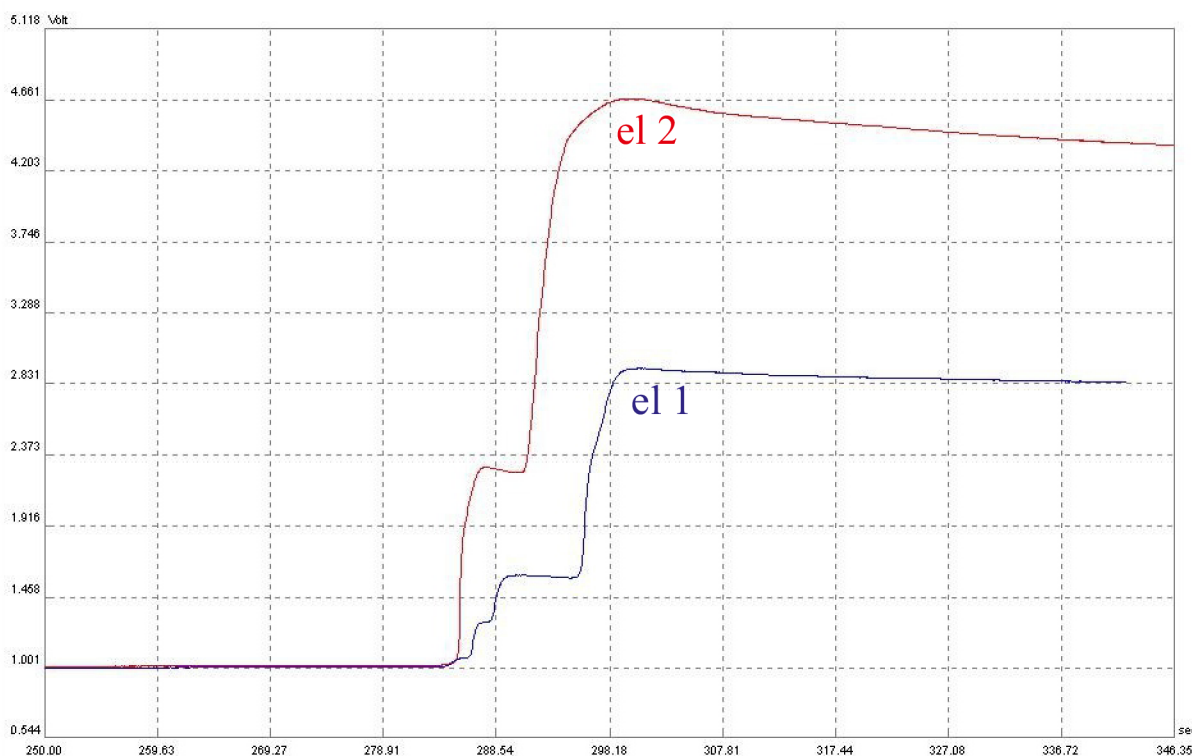
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Výběr elektrolytů

Pro analýzu byly vybrány dvě kombinace elektrolytů. První kombinace byla zjištěna z článku z roku 2001, kde je popsána separace glyfosátu, glufosinátu, AMPA a MPP pomocí izotachoforézy [33]. Vedoucí elektrolyt se skládá z kyseliny chlorovodíkové, histidinu a (hydroxypropyl)methyl celulosy. Koncový elektrolyt pouze z MES.

Druhá kombinace elektrolytů byla převzata z analýzy kyselin ve víně. Vedoucí elektrolyt obsahoval kyselinu chlorovodíkovou, kyselinu ϵ -aminokapronovou a (hydroxypropyl)methyl celulosu. Koncový elektrolyt se skládal z kyseliny kapronové a histidinu.

Porovnání izotachoforegramu elektrolytů se standardem glyfosátu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ je na Obr. 6, kde modrý izotachoforegram přísluší systému elektrolytů ze článku uvedeného výše [33] (el 1) a červený záznam pak systému elektrolytů obvykle využívaným při stanovení organických kyselin ve víně (el 2).



Obr. 6: Izotachoforegramy dvou systémů elektrolytů se standardem glyfosátu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

Bylo zjištěno, že pro další analýzy je vhodnější dvojice vedoucího a koncového elektrolytu uvedená v článku [33]. Tento elektrolytový systém je vhodnější především proto, že prodlužuje zónu určovaných iontů a má tedy lepší odezvu. Na obrázku výše je vidět, že je odezva glyfosátu pro první kombinaci elektrolytů delší pro stejnou koncentraci glyfosátu. Důvodem bylo odlišné pH vedoucích elektrolytů. Efektivní pohyblivost nabitých částic při analýze je totiž ovlivněna hodnotou pH. U prvního (el 1) je LE tvořen kyselinou chlorovodíkovou s histidinem o pH 5,2, u druhého systému je zde kyselina chlorovodíková a kyselina ϵ -aminokapronová o pH 4-5.

4.2 Kalibrace a RSH faktor

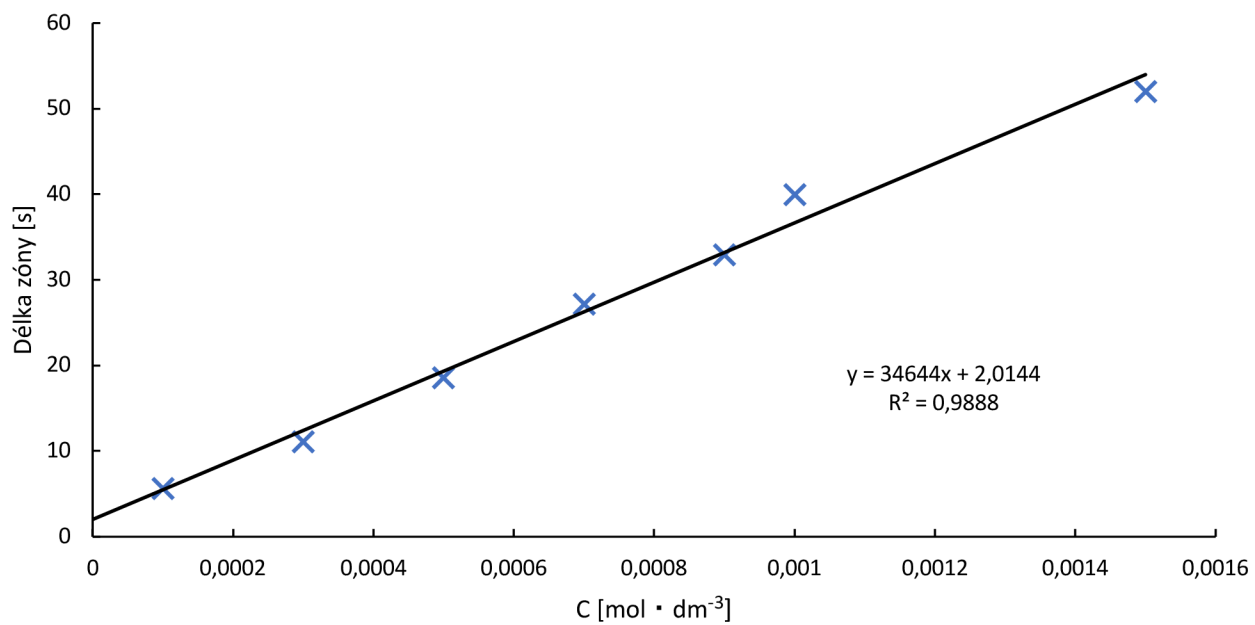
4.2.1 Metoda

Pro analýzu byly použity dvě metody. U obou metod byl na začátek analýzy použit proud 300 μA , tento proud byl nastaven pro prvních 180 s. Tento krok nebyl zaznamenáván do izotachoforegramu. Druhý krok už byl zaznamenáván a u obou metod se lišil. V první metodě byl po 180 s proud změněn na 250 μA . Tato metoda (dále M1) byla použita pro koncentrace glyfosátu od 0,1 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do 1,5 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Dále byla použita pro testování sorpce glyfosátu v půdách.

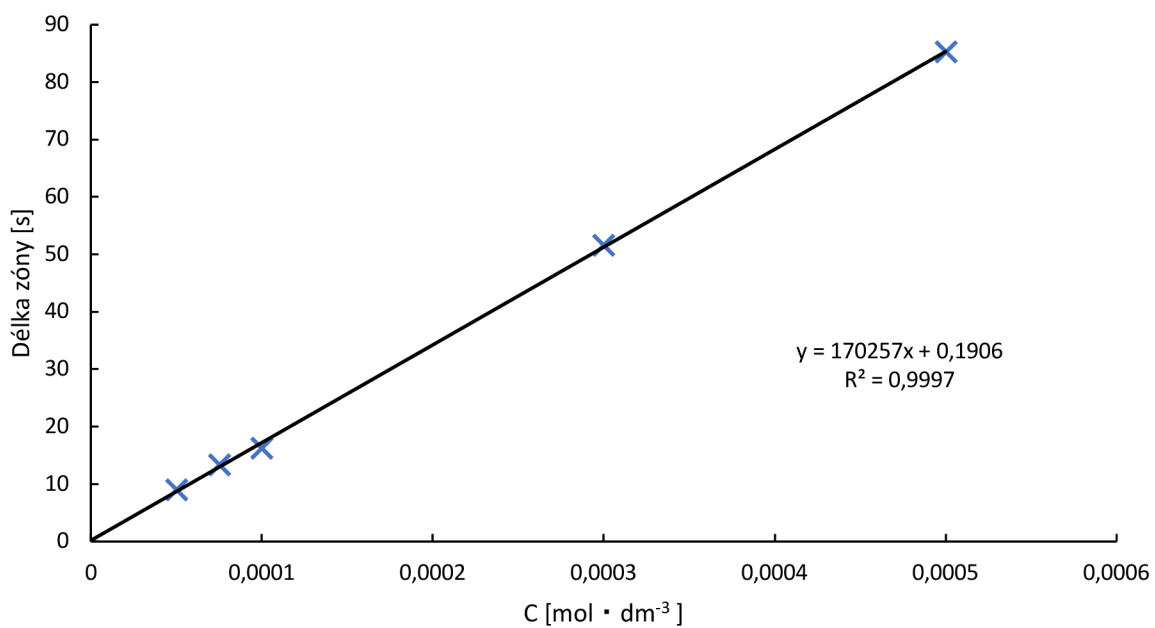
U druhé metody (dále M2) byl po 180 s změněn proud na 50 μA po dobu 200 s. Touto metodou bylo možné analyzovat nižší koncentrace glyfosátu, protože byl proud nižší a krok byl tak detailnější. Metoda byla použita pro koncentrace glyfosátu od 0,05 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do 0,5 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a dále pro stanovení obsahu glyfosátu v komerčních herbicidech.

4.2.2 Kalibrace metody

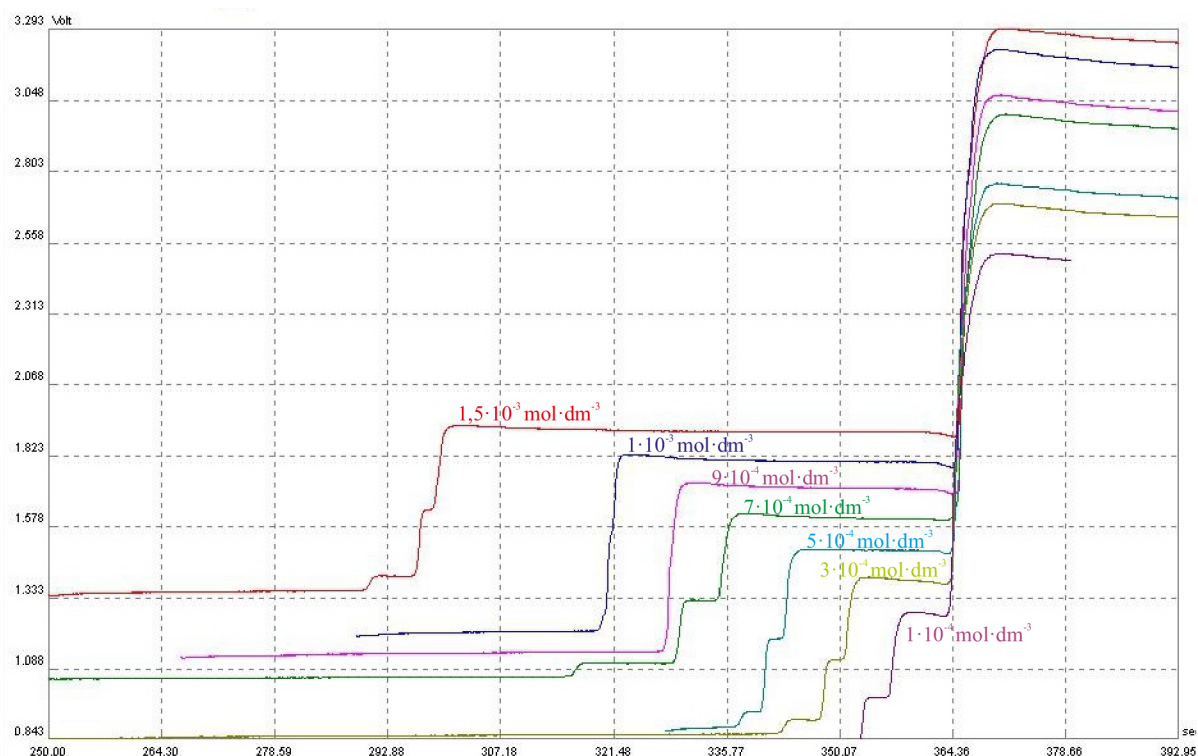
Pro kalibraci byla zvolena metoda kalibrační křivky. Všechny kalibrační roztoky byly proměřeny třikrát. Kalibrační křivky pro M1 i M2 jsou vidět na Obr. 7 a 8. Kalibrační křivka pro M2, tj. pro nižší koncentrační rozsah, má lepší hodnotu parametru R^2 . Při větších koncentracích se ale proud 50 μA neosvědčil, protože po čase začalo klesat napětí a stanovení bylo nepřesné. Příklad kalibrační řady pro M1 ve formě izotachoforegramu je na Obr. 9.



Obr. 7: Kalibrační křivka pro M1 (tj. 50 μA)



Obr. 8: Kalibrační křivka pro M2 (tj. 250 μA)



Obr. 9: Soubor izotachogramů pro kalibraci

4.2.3 Meze detekce a kvantifikace

Mez detekce LOD (limit of detection) i mez kvantifikace LOQ (limit of quantification) byl vyhodnocen pro každou metodu zvlášť. Pro výpočet meze detekce byla použita rovnice č. 1. Její hodnota udává nejnižší možnou koncentraci analytu, která ještě poskytne analytický signál rozpoznatelný od ostatních vlivů. Pro první metodu bylo LOD vypočítáno na $4,55 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pro druhou metodu $1,04 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Nižší meze detekce je dosaženo využitím M2.

$$LOD = \frac{3 \cdot S - q}{k}, \quad (1)$$

kde S je chyba střední hodnoty, která byla získána v programu Microsoft Excel pomocí funkce analýza dat, q a k jsou konstanty, získané z regresní rovnice přímky ve tvaru rovnice č. 2.

$$y = k \cdot x + q, \quad (2)$$

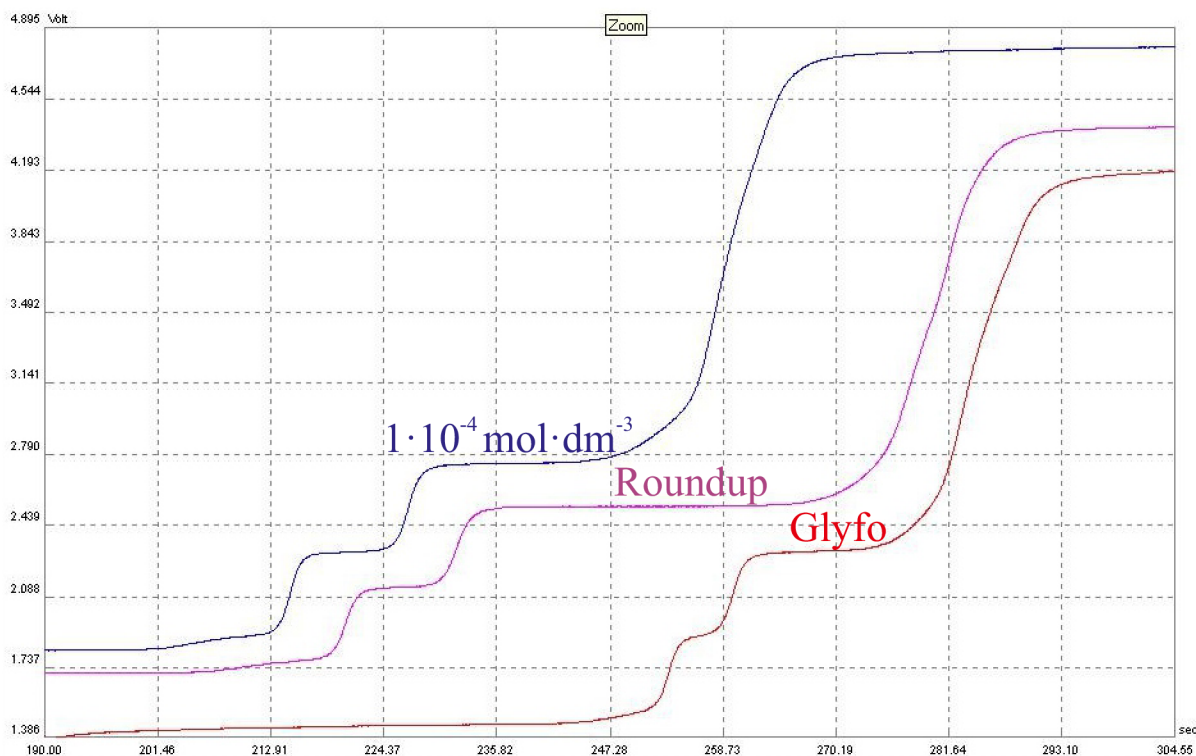
pro mez kvantifikace byla použita rovnice č. 3. Její hodnota udává nejnižší koncentraci analytu, kterou lze kvantitativně vyhodnotit. Pro první metodu bylo LOQ vypočteno na $1,30 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pro druhou metodu na $3,71 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

$$LOQ = \frac{10 \cdot S - q}{k} \quad (3)$$

Z porovnání obou metod byl vynesena následující závěru. Metoda M1 trvala v porovnání s M2, která měla při druhém kroku proud $50 \mu\text{A}$, kratší dobu pro stejné koncentrace. Tato metoda měla však horší mez detekce i kvantifikace a také nižší hodnotu regresního koeficientu u kalibrace. M2 byla vhodnější, ale jen pro menší koncentrace. Při stanovení vyšších koncentrací docházelo k poklesu schodových záznamů, které nešlo spolehlivě vyhodnotit. Proto byla M1 použita pro testy sorpce glyfosátu v půdách, kde byly zobrazovány i záznamy odpovídající dalším iontům, které byly vyšších koncentrací a metodou M2 analýzu nebylo možno provést. Naopak pro analýzu postřiků mohla být při vhodném ředění použita i M2.

4.3 Analýza postřiků

Pro analýzu komerčních herbicidů byla použita M2 s proudem ve druhém kroku $50 \mu\text{A}$. Výpočet koncentrací byl tedy proveden z regresní rovnice přímky uvedené na Obr. 8. Podle údaje na obalu Roundup klasik byl obsah glyfosátu v postřiku $360 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Porovnání izotachoforegramu vzorků postřiku a standardu glyfosátu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ je na Obr. 10.



Obr. 10: Srovnání izotachogramu vzorků komerčních herbicidů a standardu glyfosátu

Po přepočtu na požadované jednotky je koncentrace $2,13 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Obsah glyfosátu v Glyfo Klasik Strong byl 490 g/l tedy $2,90 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. V následující Tabulce 2 jsou uvedeny výsledky výpočtů koncentrace ve vzorcích.

Tabulka 2: Výsledky pro komerční vzorky Roundup klasik a Glyfo Klasik Strong

Vzorek	Délka zóny [s]	Koncentrace [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]
Roundup 1	31,4	1,83
Roundup 2	30,1	1,76
Glyfo 1	16,5	0,96
Glyfo 2	11,6	0,67

Jak je vidět v tabulce výše, naměřené koncentrace se liší od těch uvedených na obalu výrobku. Rozdíl může být způsobena formou glyfosátu, který výrobek obsahuje. Ve výrobku je glyfosát ve formě soli. Jako standard byl použit čistý glyfosát. Dále byly použité komerční

přípravky vyrobené před asi 5 a déle otevřené, takže část glyfosátu mohla degradovat. Možný je i lidský faktor, kdy mohla odchylka nastat při ředění výrobku. Postřik byl před zředěním více viskózní.

4.4 Testy sorpce glyfosátu v půdách

Toto testování bylo provedeno kvůli možné kontaminaci podzemní vody po srážkách, které by následovaly ihned nebo 10 dní od aplikace postřiku.

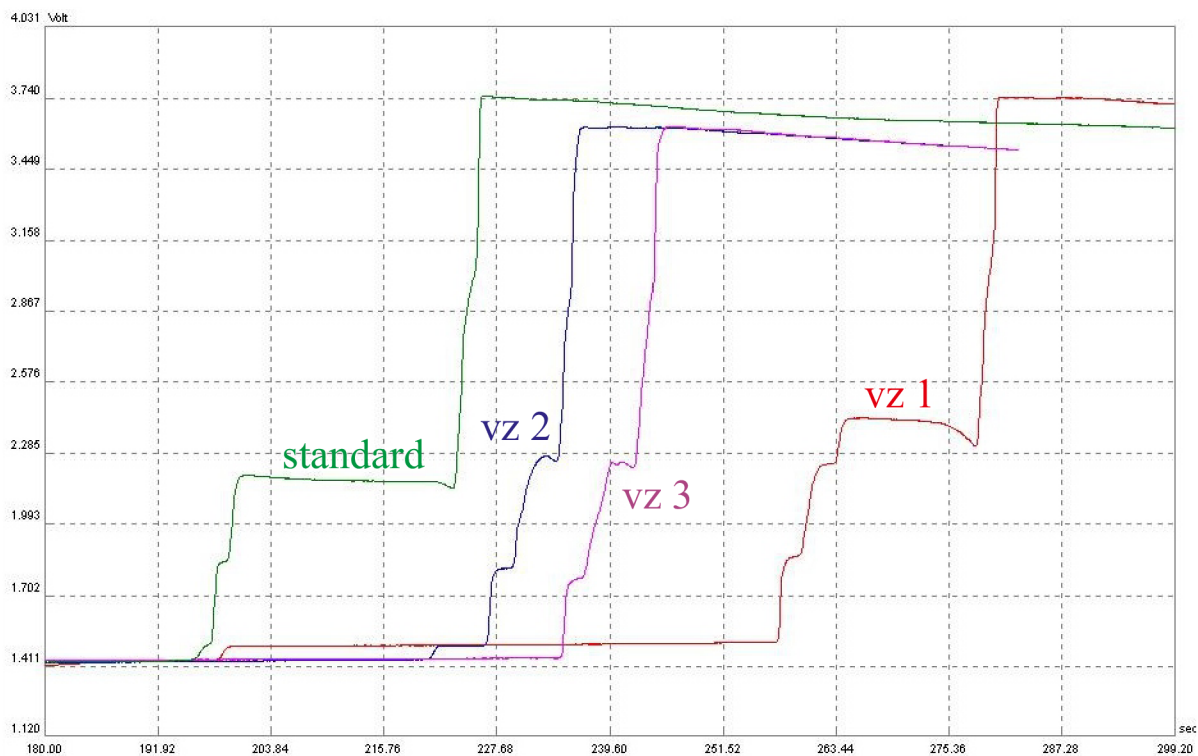
4.4.1 Typy půd

Pro test sorpce glyfosátu byly vybrány 3 typy půd a postřik Glyfo Klasik strong. První půda (vzorek č.1) byla komerčně určená pro sázení muškátů. Měla tmavě hnědou barvu a byla odlehčená a nadýchaná. Byla spíše organického původu a obsahovala kousky dřeva a dřevnatých vláken. Byla suchá, takže se velké množství přidané vody vsáklo. S nevsáknutou vodou tvořila spíše suspenzi s většími pevnými částicemi.

Druhá půda (vzorek č. 2) byla odebrána ze zahrady v obci Moravany. Tato půda byla spíše jílovitá s jemnými kamínky, tedy spíše anorganické složení. Měla světle hnědou barvu a v porovnání s předchozími dvěma vzorky byla těžší a více vlhká. Po přidání vody tvořila jemnou suspenzi s téměř neviditelnými pevnými částicemi.

Třetí půda (vzorek č. 3) byla komerčně dodávaný zahradnický substrát. Svými vlastnostmi a podobou byla velmi podobná vzorku č. 1.

Na Obr. 11 jsou izotachoforegramy po extrakci vzorků půd vodou. Je zde zobrazena také křivka získaná analýzou standardu glyfosátu. Z obrázku je patrné, že u žádné z půd nebyla zaznamenána odezva příslušející glyfosátu. Na záznamu lze ale vidět jiné odezvy. Tyto jsou způsobeny jinými ionty, které se vyextrahovaly z půdy.



Obr. 11: Izotachoforegramy vzorků půdy a porovnání se standardem glyfosátu

4.4.2 Metoda standardního přídavku

Ke stanovení glyfosátu ve vodných výluzech z půd po aplikaci herbicidu byla použita metoda standardního přídavku. Ke vzorku vody byl přidán standard glyfosátu o koncentraci $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Rovnice č. 4 byla použita pro stanovení koncentrace glyfosátu ve vodě.

$$\frac{x}{\frac{V_{př} \cdot c_{př}}{\Sigma V} + x \cdot \frac{V_{pův}}{\Sigma V}} = \frac{t_{pův}}{t_{př}}, \quad (4)$$

kde x je zjišťovaná koncentrace, $V_{př}$ je objem přidaného standardu a $c_{př}$ jeho koncentrace. $V_{pův}$ je objem vzorku a ΣV je součet objemu vzorku a standardu. $t_{pův}$ je délka signálu při analýze vzorku a $t_{př}$ je délka signálu po přidání standardu.

4.4.3 Vlastní stanovení

Pro analýzu vzorků byla použita M1, kde byl proud ve druhém kroku $250 \mu\text{A}$. Byl zde třeba rychlejší krok kvůli látkám, které se vylouhovaly z půdy a měly při M2 příliš dlouhou odezvu.

Herbicid byl zředěn podle návodu pro aplikaci. Byl zvolen nejvíce koncentrovaný roztok, který je dle návodu možné použít. Každý vzorek byl změřen dvakrát a určen průměr naměřených hodnot. V následujících dvou tabulkách jsou uvedeny naměřené hodnoty

pro přidání vody ihned po aplikaci postřiku (Tabulka 3) a pro přidání vody po 10 dnech od aplikace postřiku (Tabulka 4).

Tabulka 3: Přidání vody ihned po aplikaci postřiku

Číslo vzorku	Délka zóny [s]	Délka zóny se standardním přídatkem [s]	Koncentrace [mmol · dm ⁻³]
1	5,6	10,5	0,545
2	11,6	16,3	0,902
3	7,6	11,9	0,729

Tabulka 4: Přidání vody po 10 dnech od aplikace postřiku

Číslo vzorku	Délka zóny [s]	Délka zóny se standardním přídatkem [s]	Koncentrace [mmol · dm ⁻³]
1	2,0	8,8	0,176
2	6,0	10,5	0,611
3	2,2	8,1	0,214

Jelikož bylo ke každému vzorku hlíny přidáno jiné množství vody, bylo toto nutné vzít v úvahu pro další vyhodnocení. V následujících Tabulkách 5 a 6 je vyjádřeno absolutní množství glyfosátu, nalezené ve vodě. Je zde také vidět, kolik glyfosátu půda zadržela nebo kolik mohlo být rozloženo. Do jednotlivých vzorků půdy bylo aplikováno 39,19 mg glyfosátu.

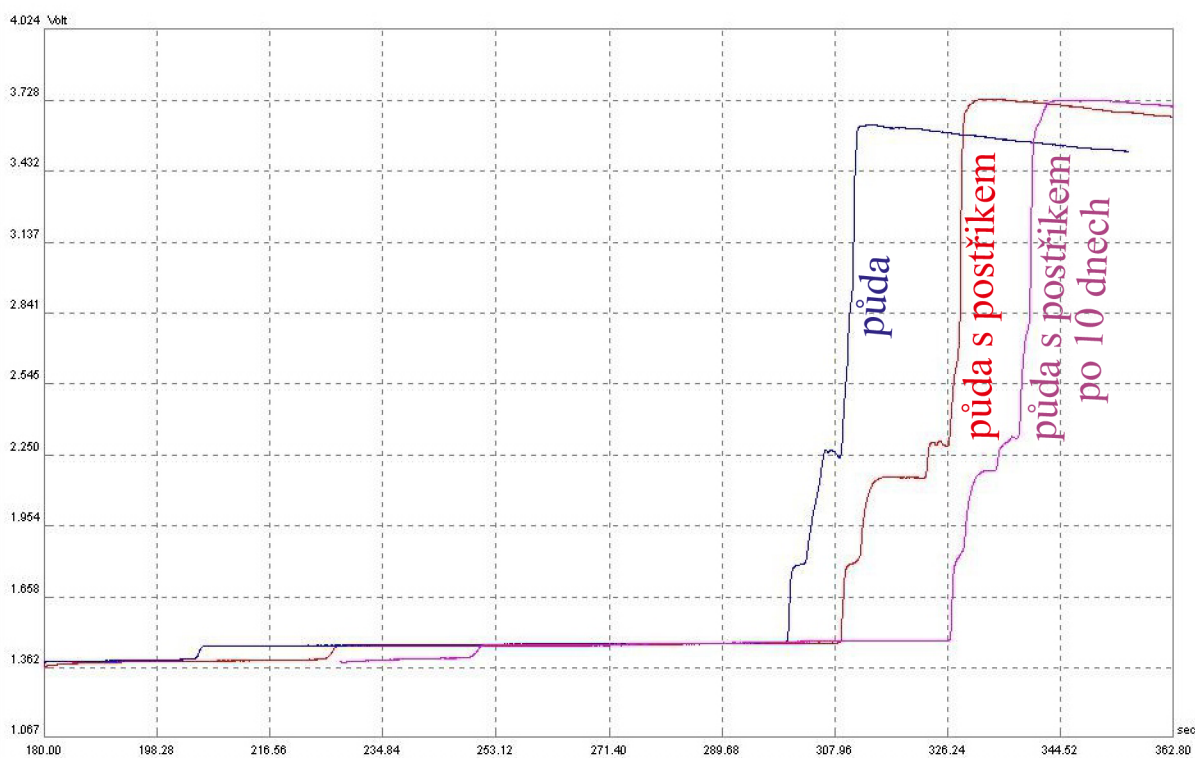
Tabulka 5: Obsah glyfosátu v půdě při přidání vody ihned po postřiku

Číslo vzorku	Množství glyfosátu [mg]	Sorpce na půdu, degradace [%]
1	4,60	88,25
2	3,05	92,22
3	4,93	87,42

Tabulka 6: Obsah glyfosátu v půdě při přidání vody po 10 dnech od aplikace postřiku

Číslo vzorku	Množství glyfosátu [mg]	Sorpce na půdu, degradace [%]
1	1,49	96,20
2	2,07	94,73
3	1,45	96,30

Na Obr. 12 jsou vidět 3 izotachforetické záznamy. První je záznam pouze půdního extraktu, druhý je záznam analýzy 1 hodinu po přidání postřiku a třetí záznam odpovídá výsledku stanovení glyfosátu ve vodném extraktu půdy po 10 dnech, a to pro vzorek půdy č. 3.



Obr. 12: Izotachforegramy analýzy vodných výluhů půdy

Z výše uvedených výsledků je patrné, že většina glyfosátu je v půdě sorbována v krátké době po aplikaci postřiku. Při případném dešti po aplikaci je možné, že by mohlo být přibližně 10 % spláchnuto dešťovými srážkami. S časem se toto množství snižuje, pravděpodobně nejen díky sorpci, ale i degradaci glyfosátu.

5 ZÁVĚR

Bakalářská práce byla zpracována na téma „glyfosát“, který je v poslední době často probíraným tématem v rámci herbicidů používaných v zemědělství. V teoretické části jsou shrnuty základní informace o dané látce, jakož i možné metody stanovení. V této bakalářské práci byla pro stanovení glyfosátu využita metoda kapilární izotachoforézy.

V rámci experimentální práce byly vyzkoušeny dvě dvojice elektrolytů. Vhodnější systém byl dále používán při stanovení ve dvou metodách, které se lišily proudem v detekčním kroku. Optimální podmínky byly využity pro analýzu dvou dostupných herbicidů. Těmito herbicidy byl nejznámější Roundup Klasik a méně známý Glyfo Klasik Strong. U obou vzorků bylo naměřené množství glyfosátu nižší než výrobcem udávané množství. To bylo pravděpodobně způsobeno stářím výrobku, tedy možnou degradací.

Dále proběhl test sorpce glyfosátu na půdní vzorky. V tomto testu byl simulován déšť 1 hodinu po aplikaci postřiku a 10 dní po aplikaci. U obou testů byl ve vodném výluhu z půd glyfosát v malém množství nalezen. Za daných podmínek zůstalo volných 8-13 % z aplikovaného množství, po 10 dnech bylo nalezeno přibližně 5 % původního aplikovaného množství v závislosti na typu půdy.

Metoda kapilární izotachoforézy byla jednoduchá na přípravu vzorku, rychlá a relativně levná. Analýza probíhala v řádu jednotek minut. Tato metoda by mohla být použita jako rychlá a poměrně levná varianta pro stanovení glyfosátu v řádech $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

6 LITERATURA

- [1] KIZLINK, Juraj. Technologie chemických látek II.: zpracování ropy, paliva a petrochemie, chemické speciality, pesticidy, dezinfekční látky, tenzidy, plasty a kaučuk, aditiva a pomocné chemikálie, výbušniny, biotechnologie, organizace pro chemii. Brno: Vysoké učení technické, 2001. ISBN 80-214-2013-8.
- [2] PITTER, Pavel. Hydrochemie. 4., aktualiz. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2009. ISBN 978-80-7080-701-9.
- [3] MACHÁČEK, Vladimír, Miroslav VEČEŘA a Josef PANCHARTEK. Organická chemie. Vyd. 2. opr. Pardubice: Univerzita Pardubice, 1996. ISBN 80-719-4124-7.
- [4] SOUMIS, Nicolas. Le glyphosate: The World's Most Widely Used Herbicide [online]. Primer. Montreal: Équiterre, 2018 [cit. 2020-02-12]. Dostupné z: <https://www.deslibris.ca/ID/10098593>
- [5] VÁLEK, Petr. Glyfosát. In: Arnika [online]. [cit. 2020-04-23]. Dostupné z: <https://arnika.org/glyfosat>
- [6] POHANISH, Richard P. a Marshall SITTIG. Sittig's handbook of toxic and hazardous chemicals and carcinogens [online]. 4th ed. Norwich, N.Y., U.S.A.: Noyes Publications, c2002 [cit. 2020-02-12]. ISBN 978-0-8155-1459-6. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpSHTHCCE1/viewerType:toc//root_slug:viewerType%3Aatoc/url_slug:root_slug%3Asittigs-handbook-toxic?kpromoter=federation&hierarchy=kn0LCGCVBM
- [7] MESNAGE, Robin a Gilles Eric SERALINI. Toxicity of Pesticides on Health and Environment. Frontiers Media, 2018. ISBN 9782889456444.
- [8] Strukturní vzorec glyfosátu. In: Wikiwand [online]. [cit. 2020-03-16]. Dostupné z: <https://www.wikiwand.com/cs/Glyfosát>
- [9] Rozklad glyfosátu v půdě. In: Wikiwand [online]. [cit. 2020-03-16]. Dostupné z: <https://www.wikiwand.com/cs/Glyfosát>
- [10] EFSA explains risk assessment glyphosate [online]. EFSA. Parma, 2015 [cit. 2020-02-12]. ISBN 9789291997589. Dostupné z: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/763c9dd0-0070-11e6-b713-01aa75ed71a1/language-en>

- [11] The Herbicide Handbook: Guidance on the use of herbicides on nature conservation sites [online]. English Nature, 2003 [cit. 2020-03-05]. ISBN 1 85716 746 5. Dostupné z: www.english-nature.org.uk
- [12] Vyhláška č. 272/2008 Sb. Vyhláška, kterou se mění vyhláška č. 381/2007 Sb., o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v potravinách a surovinách. In: . Ministerstvo vnitra, 2008, ročník 2008, číslo 272.
- [13] Guidelines for Drinking-water Quality. 3rd ed. Geneva: World Health Organization, 2004. ISBN 92 4 154638 7.
- [14] Pasport látky glyfosát. Český hydrometeorologický ústav [online]. ČHMÚ, 2020 [cit. 2020-03-18]. Dostupné z: <http://hydro.chmi.cz/pasporty/pasport.php?seq=3287644&mf=10>
- [15] ŠUSTR, Ladislav. Rakousko zcela zakázalo nebezpečný glyfosát. V Česku se podobný krok neplánuje. In: Echo24.cz [online]. 2019 [cit. 2020-07-05]. Dostupné z: <https://echo24.cz/a/SZDLv/rakousko-zcela-zakazalo-nebezpecny-glyfosat-v-cesku-se-podobny-krok-neplanuje>
- [16] Letos poprvé nesmí zemědělci používat glyfosát, zaplatí víc za sušení úrody. In: Česká televize [online]. 2020 [cit. 2020-07-05]. Dostupné z: <https://ct24.ceskatelevize.cz/domaci/3124463-letos-poprve-nesmi-zemedelci-pouzivat-glyfosat-zaplati-vic-za-suseni-urody>
- [17] AGUIRRE, María del Carmen, Silvia E. URRETA a César G. GOMEZ. A Cu²⁺-Cu/glassy carbon system for glyphosate determination. Sensors and Actuators B: Chemical [online]. 2019, 2019(284), 675-683 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.1016/j.snb.2018.12.124. ISSN 0925-4005. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400518322433>
- [18] ZOUAOUI, Fares, Saliha BOUROUINA-BACHA, Mustapha BOUROUINA, et al. Electrochemical impedance spectroscopy determination of glyphosate using a molecularly imprinted chitosan. Sensors and Actuators B: Chemical [online]. 2020, 2020(309) [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.1016. ISSN 0925-4005. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400520301003>
- [19] ÇETIN, Emine, Serkan ŞAHAN, Ahmet ÜLGEN a Uğur ŞAHİN. DLLME-spectrophotometric determination of glyphosate residue in legumes. Food Chemistry [online]. 2017, 230, 567-571 [cit. 2020-03-15]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.03.063. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814617304454>
- [20] STAVRA, Eleftheria, Panagiota S. PETROU, Georgios KOUKOUVINOS, Anastasios ECONOMOU, Dimitris GOUSTOURIDIS,

- Konstantinos MISIAKOS, Ioannis RAPTIS a Sotirios E. KAKABAKOS. Fast, sensitive and selective determination of herbicide glyphosate in water samples with a White Light Reflectance Spectroscopy immunosensor. *Talanta* [online]. 2020, 2020(214) [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.1016/j.talanta.2020.120854. ISSN 0039-9140. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914020301454>
- [21] CIKALO, Maria G., David M. GOODALL a Wendy MATTHEWS. Analysis of glyphosate using capillary electrophoresis with indirect detection. *Journal of Chromatography A* [online]. 1996, 745(1-2), 189-200 [cit. 2020-03-16]. DOI: 10.1016/0021-9673(96)00265-8. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0021967396002658>
- [22] GOODWIN, Lee, James R. STARTIN, Brendan J. KEELY a David M. GOODALL. Analysis of glyphosate and glufosinate by capillary electrophoresis–mass spectrometry utilising a sheathless microelectrospray interface. *Journal of Chromatography A* [online]. 2003, 1004(1-2), 107-119 [cit. 2020-03-18]. DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00572-7. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967303005727>
- [23] MUÑOZ, Raybel, Alfredo GUEVARA-LARA, Joao L. M. SANTOS, Jose M. MIRANDA a Jose A. RODRIGUEZ. Determination of glyphosate in soil samples using CdTe/CdS quantum dots in capillary electrophoresis. *Microchemical Journal* [online]. 2019, 2019(146), 582-587 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.1016/j.microc.2019.01.059. ISSN 0026-265X. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X18309147>
- [24] RIDLEN, Jennifer S., Gary J. KLOPF a Timothy A. NIEMAN. Determination of glyphosate and related compounds using HPLC with tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) electrogenerated chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta* [online]. 1997, 341(2-3), 195-204 [cit. 2020-03-16]. DOI: 10.1016/S0003-2670(96)00493-X. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000326709600493X>
- [25] SUN, Lisi, Deyang KONG, Weidong GU, Xinyan GUO, Wenqi TAO, Zhengjun SHAN, Ying WANG a Na WANG. Determination of glyphosate in soil/sludge by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2017, 1502, 8-13 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.04.018. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196731730571X>

- [26] QIAN, Kun, Tao TANG, Tianyu SHI, Fang WANG, Jianqiang LI a Yongsong CAO. Residue determination of glyphosate in environmental water samples with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2009, 635(2), 222-226 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1016/j.aca.2009.01.022. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267009000956>
- [27] DEMONTE, Luisina Delma, Nicolás MICHLIG, Monica GAGGIOTTI, Claudia Guadalupe ADAM, Horacio Ramón BELDOMÉNICO a Maria Rosa REPETTI. Determination of glyphosate, AMPA and glufosinate in dairy farm water from Argentina using a simplified UHPLC-MS/MS method. *Science of The Total Environment* [online]. 2018, 645, 34-43 [cit. 2020-03-16]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.340. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969718324161>
- [28] KATAOKA, Hiroyuki, Sunhi RYU, Norihisa SAKIYAMA a Masami MAKITA. Simple and rapid determination of the herbicides glyphosate and glufosinate in river water, soil and carrot samples by gas chromatography with flame photometric detection. *Journal of Chromatography A* [online]. 1996, 726(1-2), 253-258 [cit. 2020-03-16]. DOI: 10.1016/0021-9673(95)01071-8. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0021967395010718>
- [29] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody. Třetí, upravené vydání.* Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko, 2016. ISBN 978-80-86369-22-8.
- [30] CHURÁČEK, Jaroslav a kolektiv. *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod.* Praha: Academia, 1993. ISBN 80-200-0010-0.
- [31] An Isotachophoretic Separation. (A) Before Applying electric field (B) Separation Commenced (C) Steady state. In: *Semantic scholar* [online]. [cit. 2020-03-17]. Dostupné z: [https://www.semanticscholar.org/paper/A-free-flow-isotachophoresis-\(FFITP\)-device-with-a-Park/8e7bd4e06f5b9da8ca6db4100d77f0b14b968f49/figure/6](https://www.semanticscholar.org/paper/A-free-flow-isotachophoresis-(FFITP)-device-with-a-Park/8e7bd4e06f5b9da8ca6db4100d77f0b14b968f49/figure/6)
- [32] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie II.* Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214-1742-0.
- [33] GOODWIN, Lee, Melissa HANNA, James R. STARTIN, Brendan J. KEELY a David M. GOODALL. Isotachophoretic separation of glyphosate, glufosinate, AMPA and MPP with contactless conductivity detection. *The*

Analyst [online]. 127(2), 204-206 [cit. 2020-06-05]. DOI: 10.1039/b110665c.
ISSN 00032654. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b110665c>