



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

STANOVENÍ POLÁRNÍCH PESTICIDŮ V ODPADNÍCH A POVRCHOVÝCH VODÁCH

DETERMINATION OF POLAR PESTICIDES IN WASTE AND SURFACE WATERS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Tereza Borůvková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.

BRNO 2016



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0951/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	Bc. Tereza Borůvková	
Studijní program:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)	
Studijní obor:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Stanovení polárních pesticidů v odpadních a povrchových vodách

Zadání diplomové práce:

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na problematiku výskytu polárních pesticidů ve vodním ekosystému a na postupy jejich stanovení.
2. Na základě frekvence využívání a potenciální rizikovosti vyberte vhodnou skupinu pro sledování.
3. Optimalizujte metodu analýzy sledovaných látek a jejich potenciálních metabolitů v odpadních vodách.
4. Pomocí optimalizované metody analyzujte soubor reálných vzorků odebraných z ČOV využívajících různé technologie a z různě zatížených povrchových vod.
5. Získané výsledky porovnejte s publikovanými údaji.

Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Tereza Borůvková
Student(ka)

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá stanovením polárních pesticidů v povrchových a odpadních vodách. V rámci práce byly sledovány analyty Mecoprop-P, MCPA, Dichlorprop-P, 2,4-D a MCPB v různě zatížených povrchových vodách a ve vodách odpadních. Vybrané herbicidy patří do skupiny určené pro posouzení environmentální kvality. Navíc u analytů 2,4-D a MCPA roční spotřeba v ČR převyšuje 30 tun. Ke sledování byly zvoleny tři řeky v okolí města Jaroměř (Labe, Úpa, Metuje), jedna řeka v okolí města Brna (Svratka) a dvě čistírny odpadních vod (ČOV Jaroměř, ČOV Brno – Modřice). Výběr toků pro sledování proběhl na základě pravděpodobnosti výskytu konkrétních herbicidů a průtoku zemědělsky obdělávanými oblastmi. Sledované látky byly z odebraných vzorků izolovány a zakoncentrovány technikou SPE. K vlastnímu stanovení byla použita metoda plynové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (GC/MS/MS). Před vlastní analýzou bylo nutné analyty derivatizovat. Vybrané herbicidy byly detekovány ve všech odebraných vzorcích.

ABSTRACT

This work is focused on the determination of polar pesticides in surface and waste waters. In this study Mecoprop-P, MCPA, Dichlorprop-P, 2,4-D and MCPBA in differently loaded surface waters and communal waters from sewage treatment plants were analyzed. These herbicides are included in the group identified as environmental quality standards. Some of herbicides (2,4-D and MCPA) were selected because their consumption in the Czech Republic exceeds 30 tons a year. Samples were collected from three rivers near town of Jaroměř (Elbe, Úpa and Metuje Rivers), from one river near the town of Brno (Svratka River) and from inflow and outflow of two sewage treatment plants (WWTP Jaroměř, WWTP Brno – Modřice). Particular rivers were chosen for monitoring due to the probability of occurrence of herbicides, because they flow through agriculturally cultivated areas. Solid phase extraction (SPE) was used for the isolation of target compounds and their concentration. Gas chromatography with tandem mass spectrometry (GC/MS/MS) was used for the determination of target analytes in surface and waste waters. Selected herbicides were detected in all collected samples.

KLÍČOVÁ SLOVA

Herbicidy, fenoxycarboxylové kyseliny, extrakce tuhou fází, plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, tandemová hmotnostní spektrometrie, povrchová voda, odpadní voda.

KEYWORDS

Herbicides, phenoxycarboxylic acid, solid phase extraction, gas chromatography, mass spectrometry, surface water, waste water.

BORŮVKOVÁ, T. *Stanovení polárních pesticidů v odpadních a povrchových vodách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 101 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana fakulty FCH VUT.

.....
podpis studentky

Poděkování:

Mé poděkování patří panu doc. Ing. Josefu Čáslavskému, CSc. za velmi cenné rady, připomínky, ochotu při konzultacích a zpracování práce, paní prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. za vstřícnost a podporu při řešení práce, Ing. Tereze Švestkové za morální podporu a pomoc při řešení problémů spojených s měřením.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a nejbližším za neustálou podporu, trpělivost a lásku.

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Pesticidy.....	9
2.1.1	Základní rozdělení.....	9
2.1.2	Vývoj pesticidů.....	10
2.1.3	Osud pesticidů v životním prostředí.....	11
2.1.3.1	Vstup do ekosystému.....	11
2.1.3.2	Perzistence v ekosystému.....	12
2.1.3.3	Distribuce v ekosystému.....	12
2.1.3.4	Degradace v ekosystému.....	13
2.1.3.5	Negativní účinky na živé organismy a průnik pesticidů do organismu člověka.....	15
2.1.4	Problematika výskytu polárních pesticidů ve vodním ekosystému.....	17
2.1.5	Spotřeba pesticidů.....	18
2.1.6	Složení a označení pesticidů.....	22
2.1.7	Bezpečná práce s pesticidy.....	23
2.2	Herbicidy.....	24
2.2.1	Herbicidy na bázi fenoxalkánových kyselin.....	24
2.2.1.1	Vývoj herbicidů.....	26
2.2.1.2	Vlastnosti a mechanismus působení vybraných herbicidů.....	26
2.2.1.3	Adsorpce a desorpce vybraných herbicidů.....	32
2.2.1.4	Degradace vybraných herbicidů.....	32
2.2.1.5	Legislativa.....	33
2.3	Právní předpisy týkající se reziduí pesticidů a jejich metabolitů, ochrana vod.....	35
2.4	Stanovení pesticidů ve vodách.....	37
2.4.1	Město Jaroměř.....	37
2.4.2	Problematika polutantů na ČOV.....	39
2.4.2.1	ČOV Jaroměř.....	39
2.4.2.2	ČOV Modřice.....	40

2.5	Metody stanovení	42
2.5.1	Preanalytická úprava vzorků	42
2.5.1.1	Extrakce tuhou fází (SPE).....	42
2.5.1.2	Extrakce kapalina-kapalina (LLE).....	43
2.5.1.3	Mikroextrakce tuhou fází (SPME).....	43
2.5.2	Derivatizace	44
2.5.2.1	Silylace.....	44
2.5.2.2	Acylace	46
2.5.2.3	Alkylace	46
2.5.2.4	Esterifikace	46
2.6	Plynová chromatografie (GC).....	46
2.6.1	Instrumentace v GC	46
2.6.2	Spojení GC a MS.....	47
2.7	Hmotnostní spektrometrie (MS)	48
2.7.1	Princip a instrumentace v MS.....	48
2.7.1.1	Iontový zdroj	48
2.7.1.2	Kvadrupólový analyzátor.....	49
2.7.1.3	Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS)	49
2.7.1.4	Detekce	50
3	Experimentální část.....	51
3.1	Sledované analyty	51
3.2	Použité přístroje a pomůcky.....	51
3.3	Použité chemikálie	51
3.4	Příprava roztoků standardů	52
3.4.1	Příprava zásobních roztoků analytů (c = 500 µg/ml)	52
3.4.2	Příprava zásobního a pracovního roztoku deuterovaného MCPA.....	53
3.4.3	Příprava směsného standardu (c = 5 µg/ml)	53
3.4.4	Příprava pracovního roztoku (c = 1 µg/ml) a kalibračních roztoků	53
3.5	Odběrová místa	53
3.6	Preanalytická úprava vzorků.....	54
3.6.1	Filtrace, úprava a uchování vzorků.....	54
3.6.2	Zakoncentrování pomocí SPE extrakce.....	55

3.7	GC/MS/MS analýza	55
3.7.1	Chromatografické podmínky	55
3.7.2	Hmotnostně spektrometrická detekce.....	56
3.8	Optimalizace podmínek derivatizace	57
4	Výsledky a diskuze	59
4.1	Optimalizace SPE	59
4.2	Optimalizace GC/MS/MS analýzy	62
4.3	Optimalizace podmínek derivatizace	64
4.3.1	Výběr vhodného derivatizačního činidla	64
4.3.2	Vliv doby působení derivatizačního činidla	64
4.3.3	Vliv přidaného množství derivatizačního činidla	66
4.3.4	Teplota derivatizace.....	67
4.4	Vyhodnocení a kvantifikace sledovaných herbicidů	67
4.5	Reálné vzorky	70
4.5.1	Vliv matrice	70
4.5.2	Výtěžnost SPE extrakce.....	71
4.5.3	ČOV Jaroměř, řeky Labe, Úpa, Metuje; ČOV Brno – Modřice a řeka Svratka.	72
4.5.4	Porovnání výsledků s údaji publikovanými v literatuře	77
5	Závěr.....	80
	Seznam použitých zdrojů.....	81
	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	89
	Seznam příloh	90

1 ÚVOD

Od nepaměti lidstvo používalo přípravky k hubení plevelů a hmyzu, aby uchránili svoji úrodu před škůdci a zabránili tak hladomoru a šíření chorob. Ztráta plodin a hladomor byly významným podnětem pro vývoj a aplikaci pesticidů. První aplikované přípravky byly živočišného nebo přírodního původu, jelikož byly snadno dosažitelné. Se zvyšováním životní úrovně rostly i nároky na kvalitu potravin a tím pádem i nároky na kvalitu a funkčnost pesticidů, a jejich používání se stalo nezbytností.

Je však důležité zmínit, že tyto přípravky, jejich rezidua a degradační produkty znečišťují životní prostředí (zejména povrchové a pitné vody, půdu a ovzduší) a mají nepříznivý dopad na necílové organismy. Tyto sloučeniny mohou být v prostředí vysoce perzistentní a mohou do jisté míry negativně ovlivnit i zdraví člověka.

Cílem této práce je stanovení herbicidů na bázi fenoxycarboxylových kyselin v povrchových a odpadních vodách. Tyto herbicidy jsou v posledních letech hojně aplikovány na zemědělské půdy. Patří mezi růstové herbicidy snižující schopnost rostlin udržet si vyváženou hladinu fytohormonů. Dosud nebylo přesně zjištěno, jak tyto herbicidy působí. Sledované analyty, konkrétně Mecoprop-P, MCPA, Dichlorprop-P, 2,4-D a MCPB patří do skupiny, která je posuzována z hlediska Normy environmentální kvality (NEK). Spotřeba MCPA a 2,4-D převyšuje v ČR 30 tun ročně.

Většina postupů pro stanovení pesticidů ve vodách je založena na přečištění a zakoncentrování vzorku vody pomocí extrakce tuhou fází (SPE) nebo extrakce kapalina – kapalina (LLE) a separaci s využitím kapalinové nebo plynové chromatografie.

V této práci byla optimalizována a následně použita na reálné vzorky technika SPE. Pro analýzu byla použita plynová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (GC/MS/MS). Vzhledem k nižší těkavosti analytů, bylo nutné je před vlastní analýzou derivatizovat.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Pesticidy

Pesticidy jsou látky určené ke kontrole, prevenci, potlačení, odpuzení nebo ničení nežádoucích druhů rostlin, mikroorganismů nebo živočichů. Patří sem i regulátory růstu, defolianty (způsobují opadání listů, používají se před sklizní), desikanty (odstranění vlhkosti), inhibitory růstu a látky aplikované na potraviny před transportem a po něm. Ničení a potlačení škodlivých činitelů je umožněno schopností pesticidů ovlivňovat základní procesy v živých organismech. Použití je nezbytné, pokud výskyt nežádoucích rostlin a škůdců může negativně narušit výrobu, zpracování, skladování, přepravování a prodej potravin, krmiv, zemědělských komodit, dřeva a výrobků z něj. V důsledku narůstajícího množství hmyzu a parazitů docházelo k šíření infekcí a nákazy, což ohrožovalo nejen sklizeň, ale i člověka. Z tohoto důvodu je aplikace pesticidů nezbytná [1,2,9].

Je však důležité zmínit, že tyto sloučeniny a jejich rezidua znečišťují zemi, povrchové vody a stravu. Mezi nejpoužívanější sloučeniny patří organochlorované sloučeniny, organofosfáty a karbamáty. Tyto sloučeniny se vyznačují vysokou perzistencí v prostředí a tím mohou ohrozit zdraví člověka [6,42].

Složitou problematikou se zabývají regionální orgány a orgány státní správy, vzdělávací instituce, neziskové organizace (sdružení spotřebitelů, ekologické skupiny), média a široká veřejnost [1].

2.1.1 Základní rozdělení

Pesticidy lze rozdělit do více než 100 skupin (př. triaziny, organofosfáty, fenoxycyklohexanové pesticidy a další). Další možné rozdělení je dle biologických účinků, chemického složení, způsobu působení na cílový organismus a podle spektra účinků [1,22].

Dle biologických účinků:

- *herbicity* – používají se k hubení plevelů,
- *fungicity* – působí proti chorobám, které vyvolávají houby a plísně, chrání již vzrostlé rostliny,
- *insekticity* – působí proti škodlivému hmyzu a na jeho určitá vývojová stádia,
- *zoocidy* – působí proti živým organismům: bakteriím – *baktericity*, škodlivým hlodavcům – *rodenticidy*, roztočům – *akaricity*, červům – *nematocidy*, škodlivým měkkýšům – *moluskocidy*, škodlivým ptákům – *avicidy*, sinicím a řasám – *algicity* [3,4].

Dle povahy účinné látky (chemického složení):

Pesticidy na bázi:

- *chlorovaných uhlovodíků* (DDT a jeho analogy, lindan, HCH,...),
- *organických sloučenin fosforu* (parathion, chlorpyrifos, trichlorfon,...),
- *karbamátů* (aldikarb, karbaryl,...),
- *pyrethroidů* (cypermethrin, permethrin,...),
- *fenoxycarboxylových kyselin* (2,4-D, MCPB, MCPA,...),
- *substituované močoviny* (linuron, diuron, isoproturon,...),

- *triazinů a diazinů* (cyanazin, atrazin, terbutryn,...),
- *sloučenin kovů* (tributylcín, síran měďnatý, oxychlorid mědi,...),
- *bipyridilů* (paraquat, dikquat),
- *glyfosfátu* [2,38].

Dle způsobu působení na cílový organismus:

- *kontaktní* – účinná látka zůstává na tom místě, na které byla aplikována (neproniká do tkáně rostlin),
- *systémové* – do buněk vstupují kutikulou listů nebo pomocí kořenů, pronikají cévním systémem do celé rostliny, jsou náchylnější ke vzniku rezistence,
- *kombinované* – kombinace kontaktní a systémové látky [2,29].

Dle spektra účinku:

- *totální*
- *selektivní*
- *širokospektré* [2].

2.1.2 Vývoj pesticidů

Již v dávných dobách se lidé snažili si zajistit dostatečné množství potravy a tím zlepšovat své životní podmínky. Bojovali s chorobami a se škůdci, kteří napadali úrodu a způsobovali velké ztráty plodin a hladomor. To bylo výrazným podnětem pro vývoj pesticidů a jejich aplikaci na hospodářské plodiny.

První zaznamenané použití pesticidů je přibližně 4500 let př. n. l., kdy Sumerové (lid asijského původu) použili sirnatou směs k hubení hmyzu. Číňané asi před 3200 lety používali rtuť a arzenové směsi pro hubení vší. Jelikož v té době neexistoval chemický průmysl, musely být výrobky snadno dosažitelné a k dispozici. Používaly se přírodní anorganické sloučeniny nebo látky živočišného původu. Například kouř byl použit proti plísním a nákazám. Principem bylo hoření nějakého materiálu (sláma, ryby, hnůj). Oheň byl rozdělán na místě, kde foukal vítr směrem do sadu nebo vinohradu a unášený kouř „ošetřoval“ plodiny [15].

Začátkem 20. století se začaly používat syntetické anorganické pesticidy a po 2. světové válce byla značná pozornost věnována organickým pesticidům díky jejich výborné účinnosti. Mezi prvními se začaly používat herbicidy ze skupiny fenoxykyselin, které pomohly zvýšit výnosy obilnin. Dále byly používány syntetické insekticidy (organofosfáty, chlorované uhlovodíky,...) a fungicidy. Největší rozvoj fungicidních účinných látek nastal v 70. letech, čímž došlo k vyřešení většiny problémů s houbovými chorobami, které napadaly zemědělské plodiny.

Problémy nastaly při použití látek jako je DDT, lindan aj. z důvodu jejich vedlejších negativních účinků. Byl to nepříznivý dopad na životní prostředí a necílové organismy, výskyt nebezpečných reziduí a jejich distribuce nejen do pitné vody, půdy a vzduchu, ale i do potravin. Mezi další nežádoucí účinky patřily otravy ryb.

V současné době jsou kladeny vysoké nároky na výrobu a používání šetrnějších pesticidních přípravků. Cílem je najít takové účinné látky, aby jejich vedlejší negativní účinky byly co nejmenší. V úvahu přichází i možnost volby alternativního způsobu ochrany (ekologické zemědělství, použití přírodních látek) a vyhledávání účinnějších látek, které mají stejný efekt, jsou méně škodlivé a lze je aplikovat v menších dávkách [8,13,14,16,17].

2.1.3 Osud pesticidů v životním prostředí

Spotřeba pesticidů neustále stoupá. V dnešní době jsou pesticidy aplikovány již na 95 % zemědělské půdy. Způsob aplikace pesticidů závisí na tom, v jaké formě byl přípravek vyroben (postřik, granulát, rozpustný prášek, aerosol, apod.). Z důvodu celosvětové rozsáhlé výroby jsou rezidua pesticidů a jejich metabolity bohatě zastoupeny v potravinách, vodě i půdě [3,42].

2.1.3.1 Vstup do ekosystému

Do životního prostředí se pesticidy mohou dostávat hlavně velkoplošným postřikováním polí a lesů, záměrnou aplikací na vodní hladinu a z odpadních vod vznikajících při výrobě pesticidů. Dále splachováním z půd a erozí. Do vodního prostředí se pesticidy dostávají hlavně vymýváním z půd atmosférickými srážkami, splachy ze zemědělských ploch, vypouštěním odpadních vod a přímou aplikací. Aplikace pesticidů probíhá dle zásad tzv. správné zemědělské praxe (GAP), ale i přesto nelze vyloučit kontaminaci jednotlivých složek životního prostředí a dalších necílových organismů [2,3].

Chování chemických látek v ekologických a biologických systémech je do jisté míry závislé na fyzikálně-chemických vlastnostech dané sloučeniny. Mezi důležité vlastnosti, které se používají při hodnocení chování reziduí pesticidů v životním prostředí, patří [2]:

Rozpustnost ve vodě

- Pesticidy mají velice rozdílné chemické struktury a nejednotné složení. Díky tomuto faktu je značně rozdílná i jejich rozpustnost ve vodě. Obecně platí, že látky dobře rozpustné jsou lépe biodegradovatelné (podléhají hydrolýze, oxidačním reakcím,...) a poměrně dobře se vymývají z povrchu rostlin. Snadno mohou přecházet do vodních toků nebo i do zdrojů pitných vod, odkud se ale díky nižší těkavosti uvolňují jen obtížně [42].
- Organochlorované látky jsou rozpustné minimálně (např. DDT vykazuje hodnoty rozpustnosti od $1,2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ do $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). Výrazně rozpustnější jsou organofosfáty, kde hodnoty rozpustnosti dosahují až $1000 \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ [31].

Tlak nasycených par

- Používá se pro hodnocení možného transportu reziduí atmosférou. Rezidua mající hodnoty tlaku nasycených par nad $1\cdot 10^{-7}$ mPa se nacházejí ve formě par, naopak pod tuto hodnotu jsou transportovány spolu s pevnými částicemi [42].

Rozdělovací koeficient K_{ow} (n-oktanol – voda)

- Tento koeficient vyjadřuje afinitu reziduí k tukům. K_{ow} je poměr koncentrace chemické látky v n-oktanolu k jeho koncentraci ve vodě v rovnovážném stavu dvoufázového systému.
- Čím má látka vyšší hodnotu K_{ow} , tím snáze se kumuluje v tukové tkáni živých organismů, kde se mohou ve zvýšené míře projevit její biologické účinky.

Adsorpční koeficient K_{ad}

- Vyjadřuje míru perzistence rezidua v půdě a schopnost navázat se na půdní částice.
- Adsorpce do jisté míry závisí na organickém podílu v sedimentu či v půdě, proto se někdy hodnota K_{ad} vztahuje na 1 kg organického uhlíku a nazývá se půdní adsorpční koeficient K_{OC} .
- Látky silně vázané (adsorbované nebo absorbované) mají hodnoty K_{OC} vyšší a tím pádem jsou hůře biodegradovatelné, obtížně se vypařují a velmi málo se uvolňují do vodního prostředí.

Biokoncentrační faktor (BCF)

- Tento faktor vyjadřuje poměr rovnovážných koncentrací rezidua v organismu (ve specifické tkáni nebo celém těle) a ve vodě
- Udává se pro hydrofobní pesticidy. Pokud mají hodnotu $BCF > 100$, považují se za rizikové [31,42].

2.1.3.2 Perzistence v ekosystému

Perzistence pesticidu v ekosystému je vyjadřována jako tzv. poločas rozpadu.

Poločas rozpadu - doba, během které klesne obsah látky v prostředí na polovinu. Dle poločasu rozpadu mohou být pesticidy rozděleny do třech skupin:

- *Neperzistentní pesticidy* – jejich poločas rozpadu je méně než 30 dnů (př. dicamba, bipyridyly).
- *Středně perzistentní pesticidy* – rozkládají se nejdéle do období vegetace, poločas rozpadu je 30 – 100 dnů (př. thiokarbamáty).
- *Perzistentní pesticidy* – polovinu své koncentrace rozkládají za více než 100 dnů (prometon) [2,27].

Obecně platí, že látky, jejichž reziduální účinek je delší než 12 měsíců (př. atrazin, simazin), se nazývají *vysoce perzistentní*. Organizace FAO (Food and Agriculture Organisation) definuje reziduum jako látku, která je přítomná v různých složkách (rostlina, krmivo, voda, půda, potravina) v důsledku používání pesticidních přípravků. Pojem reziduum zahrnuje: metabolity; zbytky pesticidů, které jsou aktivní; reakční produkty; produkty degradace, transformace a dekompozice [27].

2.1.3.3 Distribuce v ekosystému

Vstup látky a její distribuce v životním prostředí přímo souvisí s toxikologickými účinky a jejich mechanismem působení [7]. Je odhadováno, že pokud použijeme přípravek na ošetření rostliny, 65 % zasáhne listovou plochu, 25 % zasáhne půdu a 10 % se odpaří již během aplikace do atmosféry. Molekuly pesticidů se ve vzduchu vážou na pevné částice. Adsorbované na pevné částice nebo ve formě par mohou být transportovány na kratší i delší vzdálenosti [2].

Distribuci a akumulaci pesticidů v životním prostředí neovlivňují jen fyzikálně-chemické vlastnosti pesticidních látek, ale i další faktory, mezi které patří okolní teplota, rychlost větru, sluneční svit, množství dešťových srážek, druh půdy, přítomnost aktivní biomasy. Rezidua polárních pesticidů se mohou působením deště dostávat z nadzemních částí rostlin do půdy a odtud mohou být transportovány do povrchových vod, kde mohou být zachyceny v sedimentu, nebo do podzemních vod. Stejně tak pokud je pesticid aplikován přímo do půdy. Obecně mezi potenciální kontaminanty podzemních vod patří látky, které jsou méně adsorbované na půdní částice, mají vysokou mobilitu a jsou v půdě stabilní.

Vysokou tendenci k sorpci mají triazinové pesticidy (atrazin, cynazin), naopak nízký sklon mají fenylmočovinné pesticidy (linuron, chlorbromuron).

Nejlépe jsou pesticidy zachytávány v jílových půdách a půdách s vysokým obsahem organických složek, nejhůře pak v půdách písčitých. Těžké pesticidy jsou nejlépe odstraňovány z písčitých a vlhkých půd. Vytěkání napomáhá i teplé a větrné počasí [2,3,12,42].

2.1.3.4 Degradace v ekosystému

Po aplikaci do ekosystému pesticidy degradují. Neznamená to však, že by došlo k okamžité eliminaci nebezpečí. Naopak z původně aplikovaných sloučenin se mohou stát toxičtější metabolity. Je proto velmi důležité znát osud pesticidů v celém ekosystému. K degradaci dochází působením biologických (mikroorganismy), chemických (redoxní reakce, hydrolýza) a fyzikálních vlivů (teplota, působení světla) [2,37].

Vliv mikroorganismů

Mikroorganismy v prostředí zajišťují degradaci, detoxikaci a deaktivaci vstupujících látek pomocí dvou biotransformačních fází:

1. biotransformační fáze

- probíhá za enzymové katalýzy, dochází k navázání polárnějších skupin ($-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, ...), pesticid získá polární charakter a stává se lépe rozpustným ve vodě,

2. biotransformační fáze

- výsledkem je neaktivní produkt (je vyloučen) vzniklý konjugací polárního metabolitu s glutathionem nebo kyselinou glukuronovou [39,40].

Některé mikroorganismy mají schopnost tento neaktivní produkt mineralizovat a využít například dusík z s-triazinového kruhu [41].

Řada těchto biotransformací vede v konečné fázi k eliminaci pesticidů ze životního prostředí. Například bakterie rodu *Methylosinus* účinně degraduje karbamátový pesticid aldicarb. K účinné degradaci cizorodých látek musí mít mikroorganismy pro svou činnost zajištěny optimální podmínky (vhodné pH a teplota) [42].

Půdní sorpce

- Patří mezi nejdůležitější faktor ovlivňující degradaci pesticidů v prostředí a jejich sorpci na půdní koloidy. Stupeň sorpce je definován adsorpčním koeficientem. Pesticidy sorbované na půdní částice jsou méně dostupné pro rostliny. Skoro nepřístupné jsou mikrobiální degradaci a vyplavování do hlubších vrstev půdy.

- Účinné látky mohou mít charakter kationtů, aniontů, nebo mohou být bez iontového náboje. Tím, že jílové částice a půdní organické látky mají záporný náboj (sorpční komplex), tak dochází fyzikálními silami k silné adsorpci kationtů. Jako příklad může být uveden herbicid glyfosfát, jehož účinná látka je amoniiová báze. Naopak anionty jsou v půdě sorbovány velmi málo (MCPA). Neutrální pesticidy jsou zadržovány v půdních kapilárách působením mechanických sil [2,28,31].

Hydrolyza

- Může probíhat jak ve vodě, tak v půdě. Je ovlivněna hodnotou pH a kvalitou organické hmoty. Ve většině případů tvoří uhlíky z pesticidů zbytková rezidua a rozklad až na volný CO₂ je ojedinělý.
- Hydrolyzou degradují například organofosfáty [28,31].

Fotochemická degradace (fotolýza) – rozklad vlivem slunečního záření

- Nastává pouze na povrchu půdy. Po aplikaci pod půdní povrch je fotolýza prakticky vyloučena.
- Může být buď přímá – termický rozklad (např. degradace karbamátů) nebo nepřímá – působení volných radikálů, které vznikají působením slunečního záření (např. degradace triazinů) [28,31].

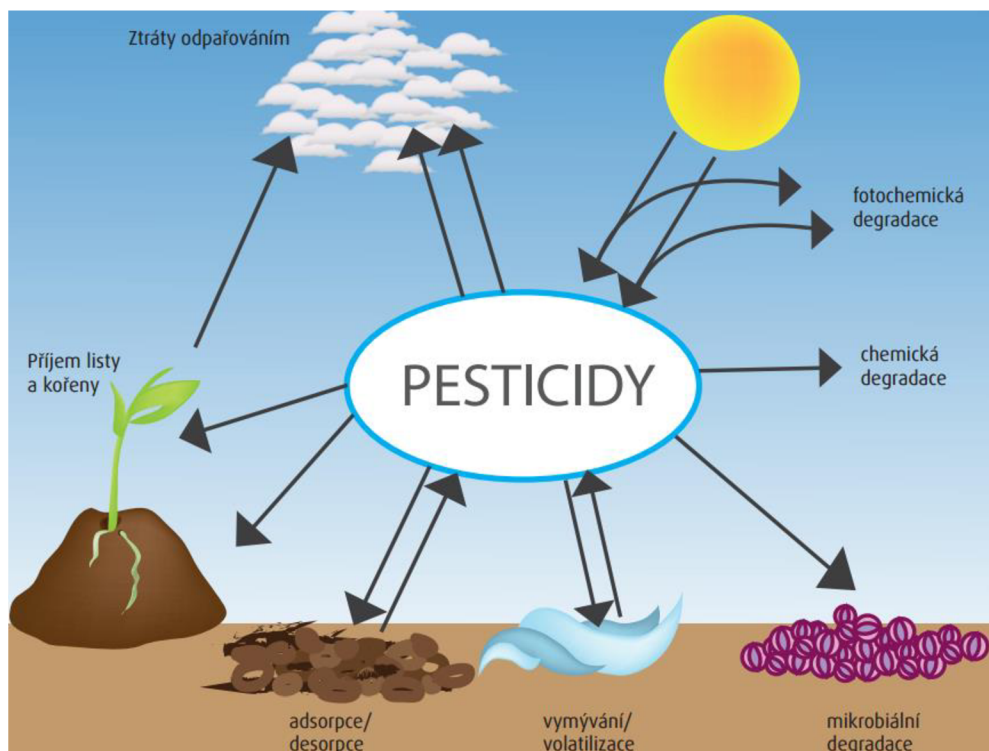
Vyluhování

- Vyluhování je závislé zejména na rozpustnosti pesticidu ve vodě, na množství gravitační vody a podílu nekapilárních pórů. Pesticidy adsorbované na půdní sorpční komplex se vyluhují snadno (např. fenoxykyseliny). Naopak obtížně rozpustné a tím pádem velmi málo vyluhovatelné jsou například triaziny, které jsou v půdě zadržovány a vertikálně se pohybují jen omezeně. Tento fakt se nazývá *aspekt selektivity*. Mechanicky zadržovaná rezidua pesticidů neovlivní semena plodin, která jsou zaseta hluboko v půdě, ale ovlivní klíčící semena plevelů, která se nacházejí v povrchové vrstvě půdy [28,31].

Vytěkání, odpařování

- Vytěkání z půdy se uplatňuje pouze za zvýšené teploty, ale nepůsobí velké ztráty. Poté, co je pesticid aplikován, se může částečně odpařit, ale po zapracování do půdy tato možnost vymizí.
- Větší ztráty mohou nastat při aplikaci postřiků. Záleží však na okolních podmínkách [28,31].

Obecně platí, že anaerobní podmínky, nepřítomnost organismů a nízká teplota vedou ke snížené degradaci pesticidů [28,31]. Osud pesticidů v ekosystému zobrazuje Obrázek 1.



Obrázek 1: Osud pesticidů v prostředí [2]

2.1.3.5 Negativní účinky na živé organismy a průnik pesticidů do organismu člověka

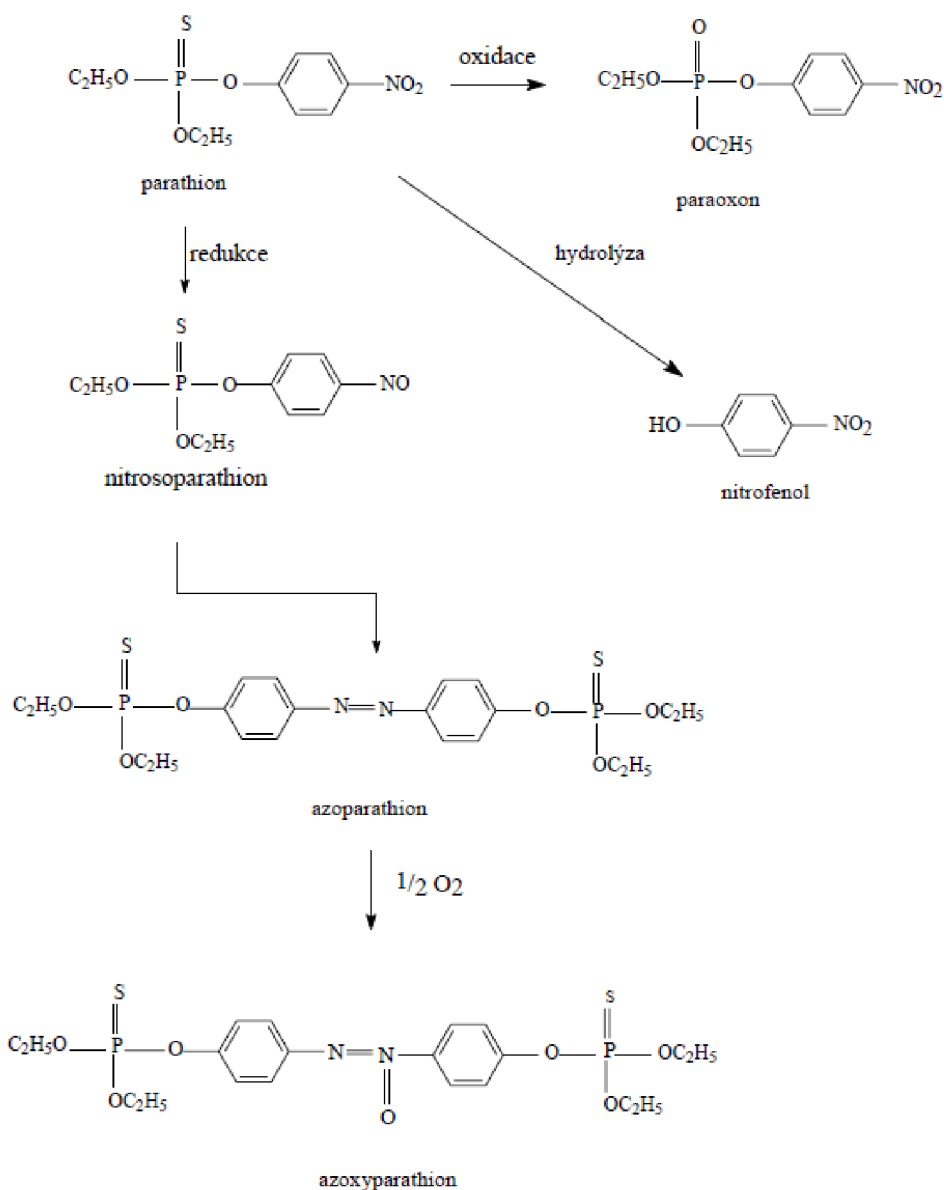
Mezi základní kritérium, které posuzuje negativní vedlejší účinky, je stálost pesticidů. Extrémně dlouhou dobu rozpadu mají chlorované insekticidy, které mohou v půdě setrvávat až desítky let. Patří i mezi nejnebezpečnější, protože působí na centrální nervový systém, mohou poškodit ledviny a játra a způsobit edém plic. Z herbicidů jsou nejstálejší ty, které patří do skupiny s-triazinů. Jejich doba rozpadu je 1–2 roky. Méně stále jsou fenoxycarboxylové kyseliny, které se rozpadají v řádu měsíců, a nejméně stále jsou karbamáty, jejichž doba rozpadu se pohybuje v řádu týdnů.

Rezidua, produkty a meziproducty degradace pesticidů jsou v dnešní době intenzivně sledovány, vzhledem k tomu, že mohou přecházet do potravy a tím ohrozit člověka. Environmentální problémy (bioakumulace a globální transport) způsobují převážně těžké nepolární pesticidy. Nové (polární) skupiny pesticidů jsou termolabilní, méně těžké, lépe se ve vodě rozpouští a méně se vážou na organický materiál (nižší bioakumulace) [7].

Do organismu člověka mohou pesticidy pronikat několika způsoby. Mezi nejčastější patří příjem reziduí z pitné vody nebo potravin. Při používání pesticidů v souladu s GAP jsou stanoveny *maximální limity reziduí (MLR)*, které představují maximální koncentraci rezidua pesticidu (mg/kg), kterou je možno v dané plodině očekávat. Vyšší nároky jsou kladeny na potraviny určené pro dětskou výživu, jelikož zdravotní riziko dietární expozice pesticidům je u dětí mnohem vyšší než u dospělých.

Poté, co cizorodá látka pronikne do organismu, dojde k aktivaci obranných biologických mechanismů, které v mnoha případech vedou k degradaci daného rezidua. V ojedinělých případech může dojít ke vzniku extrémně toxických degradačních produktů (například desulfurace parathionu (organofosfát) vede ke vzniku paraoxonu – Obrázek 2.

Biotransformace obvykle probíhá ve dvou fázích, které jsou popsány v kapitole *Degradace v ekosystému*. Přítomnost xenobiotika v organismu může vyvolat určitá zdravotní rizika. Popisovány jsou účinky neurotoxické, imunotoxické, karcinogenní, poruchy reprodukce aj. [41].



Obrázek 2: Parathion a jeho degradační produkty [41]

Tabulka 1: Hodnoty LD50 (potkan, myš, králík) pro parathion a jeho metabolit paraoxon [52]

		Parathion	Paraoxon
<i>LD 50, potkan</i>	<i>orálně</i>	2 mg/kg	1,8 mg/kg
	<i>intravenózně</i>	3,8 mg/kg	0,24 mg/kg
<i>LD50, myš</i>	<i>orálně</i>	5 mg/kg	0,76 mg/kg
	<i>intravenózně</i>	13 mg/kg	0,53 mg/kg
<i>LD50, králík</i>	<i>dermálně</i>	15 mg/kg	5 mg/kg

2.1.4 Problematika výskytu polárních pesticidů ve vodním ekosystému

Od 20. století dochází k výraznému nárůstu látek, které mohou kontaminovat vodní ekosystém. Je to způsobeno zejména velkým rozvojem v oblasti průmyslových výroby a nárůstem používání širokého spektra chemikálií a přípravků.

Vodní organismy jsou běžně a kontinuálně vystaveny velkému množství chemických stresorů. Nepatrnou část těchto stresorů tvoří tzv. regulované polutanty, což jsou látky, pro které jsou stanoveny nejvyšší přípustné limity. Díky rozvoji analytické chemie a dostupnosti citlivých metod, je v současné době možné sledovat přítomnost i těch polutantů, které dříve sledovány nebyly [37].

Pesticidy patří do skupiny znečišťujících látek, které jsou ve vodním prostředí často detekovatelné. Většina přípravků je ve vodě špatně rozpustná nebo nerozpustná. Jen malé množství tradičních pesticidů zůstává ve vodní fázi, většina se ukládá v sedimentech nebo plaveninách v závislosti na množství organických látek [3,14]. Aby bylo možné pesticidy aplikovat v přijatelné formě, musí se jejich složení upravit přidáním emulgátorů, dispergátorů nebo rozpouštědel. Aplikovaný přípravek je poté směsí vlastní účinné látky a dalších přísad, které mohou být potenciálním kontaminantem prostředí společně s vlastní aktivní látkou [30].

Polární pesticidy (někdy označovány jako moderní) mají převážně středně hydrofobní charakter a patří mezi nové typy pesticidů. Používají se v lesnictví, zemědělství i mnoha jiných oblastech [39]. Jak bylo zmíněno v kapitole *Vstup do ekosystému*, hlavními znečišťujícími zdroji jsou splachy ze zemědělských ploch, transport větrem při leteckém postřiku a v neposlední řadě i odpadní vody z osídlených oblastí, kde se moderní pesticidy hojně využívají k eliminaci nadměrného rozšíření plevelu (golfová hřiště, parky, železnice), ke kontrole růstu plevelu nebo ochraně zdraví (kontrola přemnožení hlodavců nebo hmyzu).

Polární (moderní) pesticidy jsou mnohem méně škodlivé, než jejich předchůdci (organochlorové pesticidy, DDT). Je však důležité sledovat jejich obsah v akvatických ekosystémech, jelikož je mohou v určité míře negativně ovlivňovat. Například použití karbamátů a insekticidních organofosfátových pesticidů vede k inhibici aktivity některých enzymů (zejména acetylcholinesterázy). V důsledku toho jsou tyto přípravky neurotoxické pro necílové organismy včetně ryb [37].

Při manipulaci s pesticidy v blízkosti povrchových zdrojů pitné vody může dojít k jejich zasažení. Pokud k zasažení dojde, voda se stává nepoužitelnou pro vodárenské účely, jelikož může dojít ke vzniku nebezpečí chronické intoxikace. Do povrchových zdrojů pitné vody se pesticidy nemusí dostávat jenom neopatrnou manipulací, ale i erozí půdy, kdy dojde k prostupu pesticidů skrz zeminu. Riziko kontaminace podzemních zdrojů je podstatně nižší, a to díky menším sorpčním schopnostem půdy. Nelze však vyloučit průnik pesticidů do spodních vrstev půdy. Omezené použití přípravků v „pásmech hygienické ochrany vodních zdrojů (PHO)“ patří mezi hlavní opatření, které zabraňuje znehodnocení vody. Dále je na stránkách ÚKZÚZ (Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský) zveřejněn „Seznam registrovaných prostředků na ochranu rostlin“ ve kterém jsou uvedeny látky, které nesmí být v konkrétním PHO použity [5,28].

Znečištění vodních zdrojů rezidui pesticidů je v dnešní době jeden z významných podnětů pro zachování a udržitelnost životního prostředí. Problematika pesticidů ve vodním ekosystému je aktuální i z hlediska subletální koncentrace pesticidů a jejich metabolitů, které mají negativní vliv na ryby, vodní prostředí a na potravní řetězec. Nejhorší dopady na vodní prostředí a necílové vodní organismy způsobují organofosfáty, triaziny, karbamáty, chlorované uhlovodíky, sloučeniny kovů a pyrethroidy [8,13]. V Tabulce 2 jsou uvedeny jednotlivé typy pesticidů a účinné látky, které jsou ve sladkovodních ekosystémech často detekovatelné.

Tabulka 2: Typy často detekovatelných pesticidů ve sladkovodních ekosystémech [37]

Pesticidy	Hlavní využití	Často detekovatelné látky
Triaziny	Herbicidy	atrazin, simazin, terbutylazin, terbutryn, hexazon
Chloracetanilidy	Herbicidy	acetochlor, metolachlor, alachlor, metazachlor
Organofosfáty	Insekticidy Herbicidy	diazinon, malation, chlorpyrifos, glyfosfát a jeho metabolity AMPA
Kvarterní amoniové soli	Herbicidy	chlormequat, diquat, paraquat
Deriváty kyseliny chlorfenoxyoctové	Herbicidy	MCPA, 2,4-D, bentazon
Karbamáty	Fungicidy	karbaryl, benomyl
Pyrethroidy	Insekticidy	cypermethryn

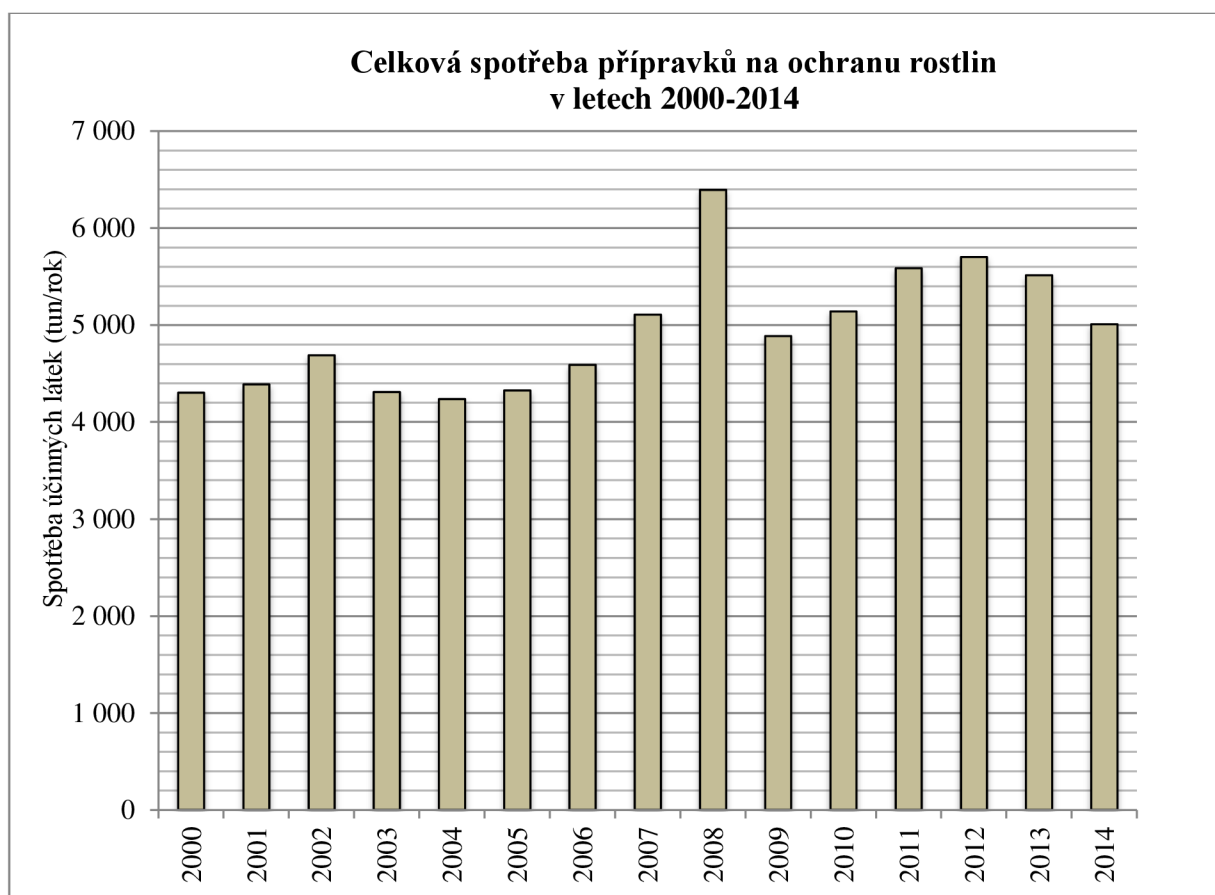
2.1.5 Spotřeba pesticidů

V celosvětovém měřítku je k dispozici více než 800 účinných látek pesticidů, z toho se v České republice každý rok použije přibližně 250 druhů účinných látek. Největší význam mají herbicidy – tvoří 70 % celosvětové produkce, dále insekticidy (20 %) a fungicidy (10 %) [2,29].

Spotřeba účinných látek se v posledních letech pohybuje okolo 5,3 tisíce tun za rok, což je oproti roku 2000, kdy byla spotřeba 4,3 tisíce tun mírný nárůst (Graf 1). Je nutné zmínit, že spotřeba pesticidů v aktuálním roce je ovlivněna výskytem škůdců plodin a chorob, což se mění dle množství srážek a teploty během celého roku.

Od roku 2012 dochází k pozvolnému poklesu spotřeby přípravků na ochranu rostlin, a to díky snaze chránit životní prostředí a snižovat negativní vlivy vzniklé v důsledku používání pesticidů. Snížení mohlo být zapříčiněno i obdobím sucha v měsících, kdy docházelo k růstu plodin a jejich následné sklizni. V roce 2014 činila v České republice celková spotřeba účinných látek 5 008 tun [5,29].

Graf 1: Celková spotřeba přípravků na ochranu rostlin v letech 2000-2014, Česká republika [5]



V Tabulce 3 je znázorněna celková spotřeba přípravků na ochranu rostlin (2010 – 2014, ČR), která je přepočtena na jednotku kilogram nebo litr účinné látky na hektar zemědělské půdy (kg/ha). Tato jednotka se používá pro porovnání spotřeby přípravků [5].

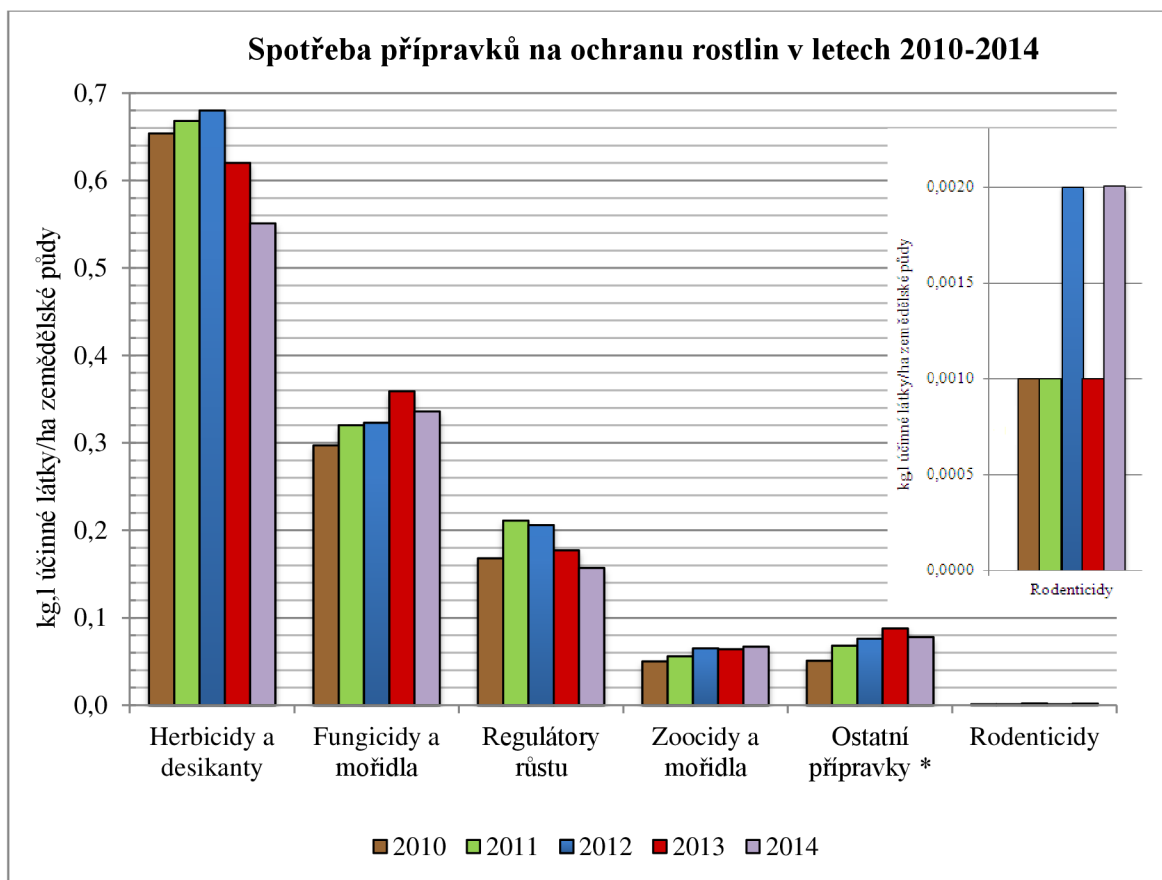
Tabulka 3: Spotřeba přípravků na ochranu rostlin v letech 2000-2014, Česká republika [5]

Rok	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
kg/ha	1,005	1,026	1,097	1,019	0,993	1,018	1,079	1,201

Rok	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
kg/ha	1,282	1,123	1,221	1,323	1,354	1,309	1,191

Následující graf (Graf 2) znázorňuje spotřebu jednotlivých druhů pesticidů. Spotřeba je uvedena v aplikovaném množství (kg, l) na 1 hektar zemědělské půdy. V roce 2014 bylo aplikováno 0,551 kg/ha herbicidů a desikantů což je oproti roku 2013, kdy bylo aplikováno 0,620 kg/ha snížení o 11,1 % [5]. Jak bylo zmíněno výše, spotřeba závisí i na počasí v průběhu roku. Mírné snížení spotřeby pesticidních přípravků je však pozitivní fakt v ohledu na životní prostředí.

Graf 2: Spotřeba přípravků na ochranu rostlin v letech 2010-2014, Česká republika [5,29]



* Pomocné látky, repelenty, minerální oleje aj.

V následujících tabulkách (Tabulka 4 a 5) je uvedeno vždy 15 pesticidů, které byly v roce 2014 nejpoužívanější v Jihomoravském a Králověhradeckém kraji. Dále jsou v tabulce uvedena spotřebovaná množství sledovaných analytů za rok 2014. Pro názornost je uvedena i spotřeba účinné látky v kg (l) za 1 rok. Je zřejmé, že mezi nejpoužívanější pesticidy patřily herbicidy, dále fungicidy a v menší míře insekticidy.

Tabulka byla sestavena ze statistických dat zveřejněných na stránkách ÚKZÚZ [5].

Tabulka 4: Spotřeby nejvíce používaných pesticidů v Jihomoravském kraji v roce 2014 [5]

Účinná látka	Spotřeba (kg, l/rok)	Biologická účinnost	Skupina
1. Glyfosfát	95 518,6	herbicide	organofosfát
2. Síra	48 945,0	fungicide	anorganická sloučenina
3. Folpet	25 261,5	fungicide	ftalimid
4. Pethoxamid	24 220,3	herbicide	amid
5. Prochloraz	23 431,4	fungicide	amid
6. Chlorpyrifos	22 485,5	insekticide	organofosfát
7. Terbuthylazin	20 442,8	herbicide	triazin
8. Tebukonazol	19 593,5	fungicide	konazol
9. Metazachlor	14 114,1	herbicide	anilid
10. Pendimethalin	9 906,5	herbicide	dinitroanilín
11. Dimethenamid-P	8 877,8	herbicide	amid
12. Fosetyl-al	8 294,3	fungicide	fosfát
13. Mankozeb	7 182,0	fungicide	dithiokarbamát
14. 2,4-D	7 157,7	<i>herbicide</i>	<i>fenoxycetová kyselina</i>
15. Metamitron	6 985,7	fungicide	triazinon
<i>MCPA</i>	<i>2 890,5</i>	<i>herbicide*</i>	<i>fenoxycetová kyselina</i>
<i>Dichlorprop-P</i>	<i>541,3</i>		
<i>Mecoprop-P</i>	<i>342,3</i>		
<i>MCPB</i>	<i>105,0</i>		

*Pesticidy sledované v této práci jsou označeny kurzívou.

Tabulka 5: Spotřeby nejvíce používaných pesticidů v Královohradeckém kraji v roce 2014 [5]

Účinná látka	Spotřeba (kg, l/rok)	Biologická účinnost	Skupina
1. Glyfosfát	60 112,9	herbicide	organofosfát
2. Chlormekvát chlorid	40 880,2	regulátor růstu	kvarterní amoniová sůl
3. Tebukonazol	12 159,2	fungicide	konazol
4. Metamitron	11 994,7	fungicide	triazinon
5. Prochloraz	11 987,1	fungicide	amid
6. Chlortoluron	11 614,4	herbicide	močovinový herbicide
7. Chlorpyrifos	8 871,3	insekticide	organofosfát
8. Metazachlor	7 326,6	herbicide	anilid
9. Pendimethalin	7 012,9	herbicide	dinitroanilín
10. Chloridazon	6 907,4	herbicide	pyridazon
11. Terbutylazin	6 052,9	herbicide	triazin
12. Kaptan	5 169,1	herbicide, fungicide	ftalimid
13. Mankozeb	5 138,9	fungicide	dithiokarbamát
14. Fenmedifam	4 758,0	herbicide	karbamát
15. Ethomufesát	4 705,1	herbicide	benzofuranyl mesylát
<hr/>			
<i>MCPA</i>	3 579,3	<i>herbicide*</i>	<i>fenoxyoctová kyselina</i>
<i>2,4-D</i>	2 758,8		
<i>Mecoprop-P</i>	855,74		
<i>Dichlorprop-P</i>	185,5		
<i>MCPB</i>	23,41		

*Pesticidy sledované v této práci jsou označeny kurzívou.

2.1.6 Složení a označení pesticidů

Pesticidy obsahují účinné látky, které je možno formulovat do tzv. přípravku na ochranu rostlin. Přípravek na ochranu rostlin je tvořen z jedné i více biologicky aktivních látek. Součástí jsou ještě inertní přísady, které zlepšují manipulaci a zesilují působení účinných látek. Tato směs tvoří snadno aplikovatelnou formu a její použití je bezpečné.

Každý pesticidní přípravek má svůj obchodní název, pod kterým je zaregistrován a následně distribuován. V České republice je možno používat a prodávat pouze ty pesticidní přípravky, které jsou uvedeny v „Registru přípravků na ochranu rostlin“. Tento registr spravuje a vydává Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský – ÚKZÚZ.

Činnosti v oblasti „přípravků na ochranu rostlin“ vykonává Odbor přípravků na ochranu rostlin. Mezi tyto činnosti patří posouzení, zda jsou splněna kritéria pro povolení přípravku a dalších prostředků na ochranu rostlin, zajišťování hodnocení účinných látek dle nařízení Evropské komise, zajišťování kontrol společně s útvary ÚKZÚZ při uvádění přípravku na trh, spravování úředního registru přípravků na ochranu rostlin a vydávání osvědčení způsobilosti fyzických a právnických osob k provádění zkoušek přípravků dle zásad správné pokusnické praxe [4,5].

2.1.7 Bezpečná práce s pesticidy

Agentura pro ochranu životního prostředí (US EPA) zhodnocuje a minimalizuje rizika používání pesticidů v ohledu na cílové organismy, životní prostředí a lidské zdraví. Zabývá se složením pesticidů, druhem a intenzitou použití a posuzuje, zda může být přípravek použit, či bude vyřazen. Společnost, která chce zaregistrovat přípravek, musí předložit informace o zdravotních rizicích pesticidů včetně karcinogenních, reprodukčních, neurologických efektů, akutních a chronických účinků. Zaregistrované pesticidy jsou z hlediska bezpečnosti pravidelně kontrolovány [18].

Aby bylo použití pesticidů účinné a bezpečné pro osoby, zvířata i životní prostředí, je nutné dodržovat informace uvedené na štítku obalu. Na štítku je zároveň uvedeno i registrační číslo. Registrační číslo mají pouze ty pesticidy, které jsou schválené a vyhovují předepsaným normám. Dále štítek obsahuje informace, k jakému účelu je přípravek schválen, pro koho je určen (běžný uživatel, průmyslový uživatel), zda je nutné při použití používat osobní ochranné pomůcky, jak správně přípravek používat, aby nedošlo k poškození životního prostředí a fauny (např. úhyn ryb). Při použití přípravků a dodržování výše uvedených informací by nemělo dojít ke zdravotním problémům. Pokud ano, je důležité vyhledat lékaře a sdělit mu registrační číslo, název výrobku a účinnou složku [10,31].

Světová zdravotnická organizace WHO (World Health Organization) klasifikuje pesticidní látky na základě jejich akutní toxicity do pěti skupin (Tabulka 6). Toxicita je definována jako škodlivý účinek pesticidů a rozděluje se na akutní nebo chronickou. Akutní toxicita je pro člověka dána tzv. letální dávkou (LD50). LD50 udává množství přijatého toxikantu (mg/kg hmotnosti testovaného jedince), při jehož požití uhynie 50 % testovaných jedinců. Chronická toxicita definuje denní dávku určitého pesticidu (mg), která je přijatelná pro člověka. Před uvedením na trh je nutné, aby byl každý pesticid podroben toxikologickému výzkumu [35].

Tabulka 6: Rozdělení pesticidních látek dle jejich nebezpečnosti [34]

Slovní hodnocení látek	LD50 pro laboratorního potkana [mg/kg]	
	Orálně	Dermálně
Extrémně nebezpečné	<5	<50
Vysoce nebezpečné	5-50	50-200
Středně nebezpečné	50-2000	200-2000
Málo nebezpečné	>2000	>2000
Pravděpodobně bezpečné	>5000	>5000

2.2 Herbicidy

Herbicidy patří mezi fytotoxické látky, které se vyznačují svým selektivním škodlivým účinkem na rostliny a široce se využívají zejména k hubení plevelů [43,45]. Zasahují do fyziologických procesů probíhajících v rostlině a přerušují nebo zpomalují normální vývoj a růst. Biochemismus fyziologických funkcí rostlin řídí rostlinné hormony (auxiny, giberliny). Mají za úkol regulovat růst rostlin, tvorbu a opadávání listů [45].

Základní rozdělení:

- *Selektivní* (výběrové) – vykazují škodlivý účinek jen na určitý druh rostlin, používají se k hubení plevelů v zahradnictví a zemědělství.
- *Totální* (neselektivní) – slouží k úplné likvidaci všech druhů rostlin, používají se k hubení nežádoucí vegetace na nezemědělských plochách [45].

Aplikace herbicidních přípravků je méně nákladná než ostatní možnosti eliminace rostlin a poměrně nenáročná na lidskou práci. Je však nezbytně nutné správně volit dobu aplikace, dodržovat doporučené dávkování a brát v úvahu i meteorologické podmínky. Při nevhodném používání se mohou vyskytnout rizika spojená s poškozením pěstované plodiny, negativní účinky na osoby pracující s přípravky a v určité míře dochází i k zatížení životního prostředí a kumulaci reziduí v potravinách. Z hlediska správného používání herbicidů je důležité znát jejich mechanismus působení [43,45].

2.2.1 Herbicidy na bázi fenoxycarboxylových kyselin

V rámci této diplomové práce byly ke sledování vybrány herbicidy ze skupiny fenoxycarboxylových kyselin, konkrétně:

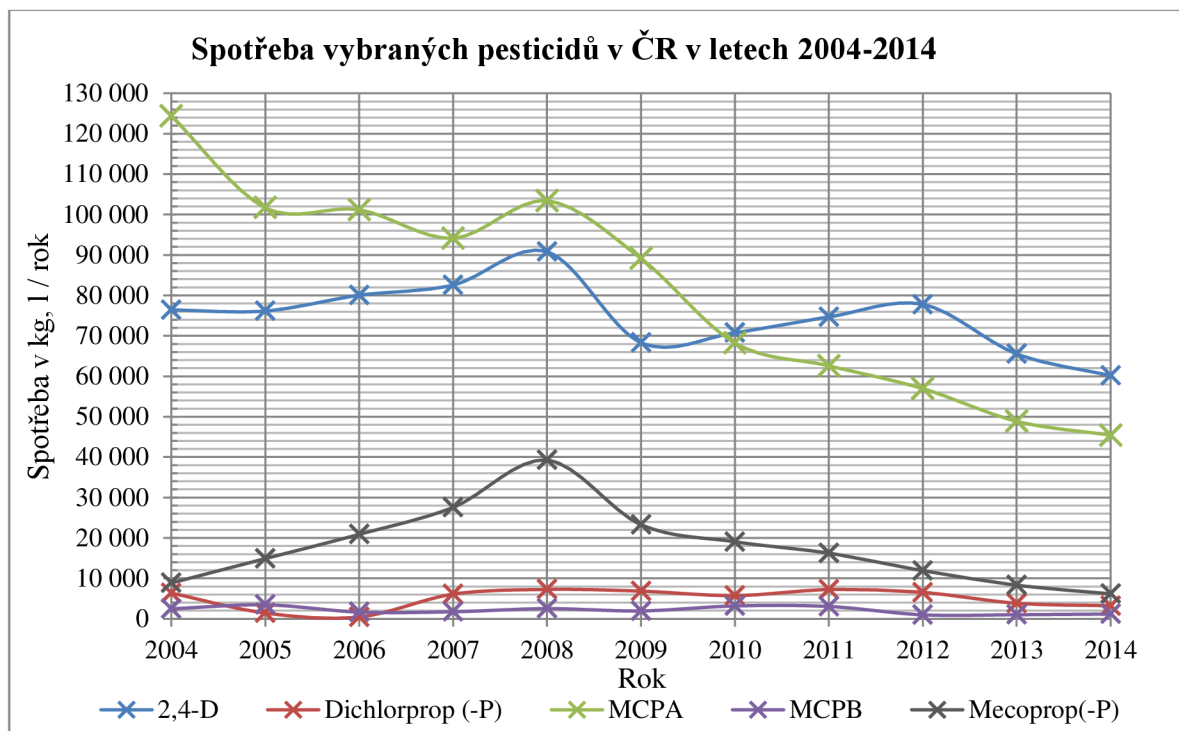
- 2,4-D (obchodní název přípravku: Dicopur D, Mustang, ...),
- Dichlorprop-P (Duplosan DP),
- MCPA (Agritox, Aminex, Boxix, ...),
- MCPB (Tropotox, Butoxene),
- Mecoprop-P (Duplosan KV, Optica, ...).

Vlastnosti látek a důvod výběru jsou podrobněji popsány v kapitole 2.2.1.2. *Vlastnosti a mechanismus působení vybraných herbicidů*. Tyto herbicidy se používají k účinnému hubení dvouděložných plevelů, heřmánku, lopuchu, pampelišek, merlíku, šťovíku a pcháče. V ČR se jich ročně aplikuje v průměru kolem 200 tun. Nejčastěji se používají k ošetření obilovin, pastvin a k úpravě okolí sinic. Působí systémově a mají širokospektrální účinek. Narušují látkovou výměnu, zpomalují růst podzemních i nadzemních částí rostlin a tím rostlina postupně uhyne. Častým projevem jsou různé deformace rostlin, jako je kroucení lodyh a listů [2,74].

Z pohledu chemického složení, jsou tyto herbicidy pevné látky s nízkou těkavostí. V zemědělství se aplikují ve formě solí (převážně Na⁺ nebo K⁺) nebo aminů rozpustných ve vodě. Pro použití v lesnictví jsou převedeny na estery rozpustné v podobném rozpouštědle nebo petroleji [42].

Nejčastěji používané jsou 2,4-D (2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina) a MCPA ((4-chloro-2-methylfenoxy)octová kyselina). Méně používané jsou Mecoprop-P ((R)-2-(4-chloro-2-methylfenoxy)propanová kyselina), Dichlorprop-P ((2R)-2-(2,4-dichlorfenoxy) propanová kyselina) a MCPB (4-(4-chloro-2-methylfenoxy)butanová kyselina). Během posledních deseti let spotřeba pesticidů mírně klesla (Graf 3). Největší pokles činí u přípravku MCPA.

Graf 3: Spotřeba vybraných pesticidů v ČR, 2004-2014 [5]



Z grafu je zřejmé, že v roce 2009 byla u výše zmíněných pesticidů spotřeba výrazně nižší než v roce 2008. Tento fakt mohl být způsoben tím, že od 1. září 2008 byla aplikována nová pravidla (*nařízení č. 396/2005/ES*), která měla za cíl zvýšit bezpečnost potravin v celé EU. V rámci bezpečnosti všech skupin spotřebitelů (např. kojenců, dětí, vegetariánů) byla vypracována databáze, která umožňuje vyhledat MLR (maximální limit reziduí – horní hranice koncentrace reziduí pesticidů legálně přítomných v potravině nebo v krmivu) jakéhokoli pesticidu v kterékoli plodině [35]. Druhým méně výrazným aspektem mohl být pokles způsobený počasím, které se zčásti v daném roce podílí na množství aplikovaných pesticidních přípravků.

2.2.1.1 Vývoj herbicidů

Se zvyšující se intenzitou zemědělství byla v minulých letech věnována značná pozornost problematice v oblasti regulace plevelů. Řešením mělo být zavedení chemických látek označovaných jako herbicidy. Jako první chemická látka (1896) použitá k regulaci plevelů v obilninách byla modrá skalice (síran měďnatý). V dalších letech byly zkoušeny síran železnatý (zelená skalice – dodnes se používá k odstranění mechu ze sportovních trávníků), chlorečnan sodný a kyselina sírová. U těchto látek byla selektivita k obilovinám horší. Navíc byly používány jako selektivní, přitom jejich mechanismus působení selektivní nebyl. Mezi první, lépe degradovatelný organický herbicid patřilo dusíkaté vápno, které se používalo současně i jako hnojivo. V 30. letech 20. století byl objeven dinitro-o-kresol, který ovšem vykazoval silné toxické účinky na živé organismy [43,44].

Velký obrat nastal na začátku 40. let 20. století, kdy byly objeveny herbicidní účinky syntetických auxinů 2,4-D, MCPA a 2,3,5-T. Auxiny patří do skupiny rostlinných hormonů, které již v malých koncentracích podporují prodlužování buněk. Velký podíl na vývoji těchto látek měla 2. světová válka, jelikož tyto přípravky byly vyvinuty tajně, jako možné chemické zbraně. 2,4-D byla totiž jednou z ingrediencí ve směsi nazývané „Agent Orange“ široce používané jako defoliant během války ve Vietnamu. Byly to první velmi účinné a opravdu selektivní herbicidy. V 50. letech 20. století byly objeveny triaziny. Jako první byl na trh uveden simazin a v průběhu dalších let atrazin, terbuthylazin a terbutryn. Ve světě jsou některé triazinové pesticidy používány dodnes. V Evropě je jejich používání postupně omezováno a zakazováno z důvodu zatížení prostředí a jejich vysoké perzistence v ekosystému. Mezi další hojně využívané herbicidy patřily chloracetamidy (alachlor, metolachlor) a herbicidy na bázi substituované močoviny (diuron, chlortoluron). Tyto jsou v Evropě též postupně omezovány z důvodu vysokého zatížení podzemních vod [43,44].

Vývoj nových pesticidů je finančně nákladný proces. Jedná se totiž o dlouhodobou investici. Doba, kdy je objevena herbicidní vlastnost chemické látky a její zavedení na trh může být v rozmezí 8-10 let, přitom patentová ochrana je jen 20 let. Vidina finanční návratnosti během tak krátké doby (10-12 let) je pouze v případě širšího, nejlépe celosvětového uplatnění pesticidu na trhu [43,44].

2.2.1.2 Vlastnosti a mechanismus působení vybraných herbicidů

V rámci této práce mají být sledovány polární pesticidy v povrchových a odpadních vodách. Jako cílová sledovaná skupina byly vybrány herbicidy na bázi fenoxykalkanových kyselin a to z toho důvodu, že vybrané látky mají určeny hodnoty NEK a jsou v povrchových vodách sledovány. V potaz byla brána i doba odběru vzorků (jaro 2016), což je doba, kdy jsou sledované herbicidy aplikovány na zemědělskou půdu (od března), tím pádem by se měly v povrchových a odpadních vodách vyskytovat ve zvýšených koncentracích.

Sledované analyty patří mezi růstové herbicidy, které jsou vyráběny synteticky a fungují jako rostlinné hormony auxoidní povahy. Tyto syntetické auxiny jsou na rozdíl od auxinů přírodního původu v rostlinách špatně degradovány a způsobují, že rostliny nejsou schopny udržet vyváženou fytohormonální hladinu. Dosud není přesně popsáno, jak tyto herbicidy působí. Předpoklad je však takový, že nepůsobí pouze v jednom místě, ale ovlivňují zároveň několik biochemických procesů, které probíhají v rostlinných buňkách.

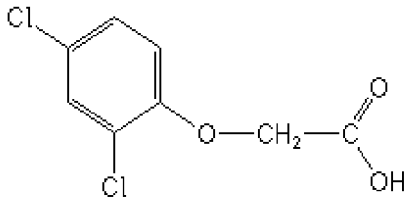

Poškození rostliny probíhá ve třech po sobě jdoucích fázích:

1. Po aplikaci dochází ke stimulaci fotosyntézy a v důsledku zvýšení koncentrace K^+ iontů dojde k otevření průduchů, zvýší se aktivita RNA polymerázy, syntéza proteinů a mRNA.
2. Týden po aplikaci dochází k nekontrolovanému buněčnému dělení a růstu (růst postranních výhonků a kořenů, srůstání). Objevují se deformace stonku a listů.
3. Do deseti dnů po aplikaci herbicidu dochází vlivem destrukce buněčných membrán k nekrotám, ucpávání vodivých pletiv a rostlina postupně odumírá [74].

Vybrané herbicidy mohou negativně ovlivňovat necílové druhy rostlin a organismů již v malých koncentracích. Například široce využívaný 2,4-D působí cytotoxicky, poškozuje strukturu DNA, přerušuje syntézu peptidů a společně s 2,4,5-T vykazují karcinogenní a teratogenní účinky. Jsou dobře rozpustné ve vodě a poměrně rychle se vymývají z půdy. V ekosystému mají většinou relativně krátkou životnost (biologická degradace), pouze MCP-P se degraduje pomaleji [74].

V následujících tabulkách (7-11) je uveden výčet sledovaných analytů společně s jejich obecnými a fyzikálně-chemickými vlastnostmi, v Tabulce 12 pak jejich toxikologické vlastnosti.

Tabulka 7: Obecné a fyzikálně-chemické vlastnosti herbicidu 2,4-D [32,46,56]

<i>Triviální název</i>	2,4-D	<i>Chemický vzorec</i>	
<i>Chemický název</i>	2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina	$C_8H_6Cl_2O_3$	
<i>Číslo CAS</i>	94-75-7	<i>Strukturní vzorec</i>	
<i>Použití</i>	obiloviny, trávy, ovocné stromy		
<i>Účinek</i>	herbicid, regulátor růstu		
<i>Rozpustnost ve vodě</i>	27 600 mg/l (25°C)		
<i>pKa</i>	2,9		
<i>Henryho konstanta</i>	$1,3 \cdot 10^{-5} \text{ Pa} \cdot \text{m}^3/\text{mol}$ (25°C)		
<i>Poločas rozpadu v půdě (dny)</i>	34		
<i>K_{oc}</i>	46		
			<i>Metabolit</i>
			2,4-dichlorfenol

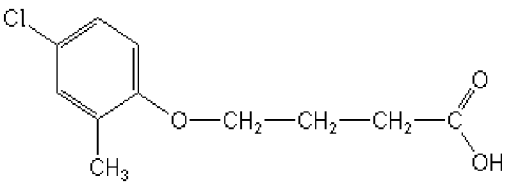
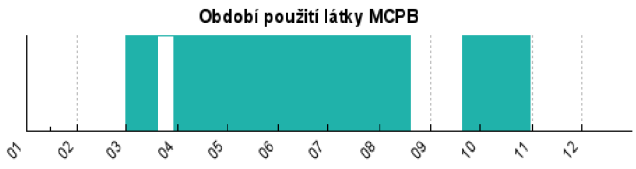
Tabulka 8: Obecné a fyzikálně-chemické vlastnosti herbicidu Dichlorprop-P [32,46,56]

<i>Triviální název</i>	Dichlorprop-P	<i>Chemický vzorec</i>
<i>Chemický název</i>	(2R)-2-(2,4-dichlorfenoxy)propanová kyselina	$C_9H_8Cl_2O_3$
<i>Číslo CAS</i>	15165-67-0	<i>Strukturní vzorec</i>
<i>Použití</i>	obiloviny, trávy	
<i>Účinek</i>	herbicid	
<i>Rozpustnost ve vodě</i>	130 000 mg/l (25°C)	
<i>pKa</i>	2,91	
<i>Henryho konstanta</i>	$5,6 \cdot 10^{-5} \text{ Pa} \cdot \text{m}^3/\text{mol}$ (25 °C)	
<i>Poločas rozpadu v půdě (dny)</i>	14	
<i>K_{oc}</i>	16	
		2,4-dichlorfenol 2,4-dichloranisol

Tabulka 9: Obecné a fyzikálně-chemické vlastnosti herbicidu MCPA [32,46,56]

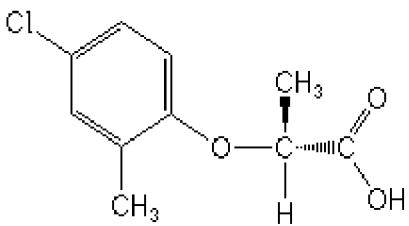
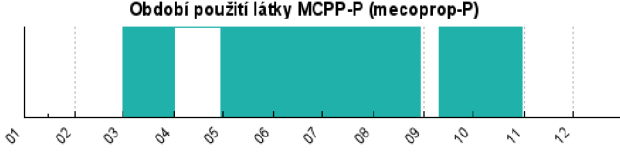
<i>Triviální název</i>	MCPA	<i>Chemický vzorec</i>
<i>Chemický název</i>	(4-chloro-2-methylfenoxy)octová kyselina	$C_9H_9ClO_3$
<i>Číslo CAS</i>	94-74-6	<i>Strukturní vzorec</i>
<i>Použití</i>	obiloviny, trávy, ovocné stromy, vinná réva, luskoviny, železnice	
<i>Účinek</i>	herbicid, regulátor růstu	
<i>Rozpustnost ve vodě</i>	29 390 mg/l (25°C)	
<i>pKa</i>	3,09	
<i>Henryho konstanta</i>	$5,5 \cdot 10^{-5} \text{ Pa} \cdot \text{m}^3/\text{mol}$ (25 °C)	
<i>Poločas rozpadu v půdě (dny)</i>	15	
<i>K_{oc}</i>	74	
		4-chlor-2-methylfenol

Tabulka 10: Obecné a fyzikálně-chemické vlastnosti herbicidu MCPB [32,46,56]

<i>Triviální název</i>	MCPB	<i>Chemický vzorec</i>
<i>Chemický název</i>	4-(4-chloro-2-methylfenoxy)butanová kyselina	$C_{11}H_{13}ClO_3$
<i>Číslo CAS</i>	94-81-5	<i>Strukturní vzorec</i>
<i>Použití</i>	luskoviny, jetel, ječmen	
<i>Účinek</i>	herbicid	
<i>Rozpustnost ve vodě</i>	4 400 mg/l (25°C)	
<i>pKa</i>	4,82	
<i>Henryho konstanta</i>	$3,0 \cdot 10^{-5} \text{ Pa} \cdot \text{m}^3/\text{mol}$ (25 °C)	
<i>Poločas rozpadu v půdě (dny)</i>	7	
<i>K_{oc}</i>	108	
		
		MCPA → 4-chlor-2-methylfenol 4-chlor-2-methylfenol MCPB methyl ester, HMCPA*

*4-chloro-2-hydroxymethylfenoxyoctová kyselina

Tabulka 11: Obecné a fyzikálně-chemické vlastnosti herbicidu Mecoprop-P [32,46,56]

<i>Triviální název</i>	Mecoprop-P (MCP-P)	<i>Chemický vzorec</i>
<i>Chemický název</i>	(R)-2-(4-chloro-2-methylfenoxy)propanová kyselina	$C_{10}H_{11}ClO_3$
<i>Číslo CAS</i>	16484-77-8	<i>Strukturní vzorec</i>
<i>Použití</i>	obiloviny, pícniny, cukrová řepa	
<i>Účinek</i>	herbicid	
<i>Rozpustnost ve vodě</i>	869 mg/l (25°C)	
<i>pKa</i>	3,44	
<i>Henryho konstanta</i>	$5,7 \cdot 10^{-5} \text{ Pa} \cdot \text{m}^3/\text{mol}$ (25 °C)	
<i>Poločas rozpadu v půdě (dny)</i>	20	
<i>K_{oc}</i>	119	
		
		4-chlor-2-methylfenol

Tabulka 12: Toxikologické vlastnosti vybraných herbicidů [32,46,56]

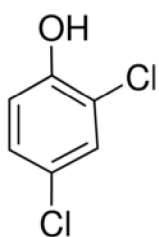
Účinná látka	Zařazení dle WHO	Vyhláška č. 232/2004 Sb.	Karcinogen	Endokrinní disruptor	Kontaminant podzemních vod
2,4-D	mírně nebezpečný	Xn (zdraví škodlivý)	možný	podezření	potenciální
Dichlorprop-P	málo nebezpečný	Xn (zdraví škodlivý)	možný	nevidováno	potenciální
MCPA	málo nebezpečný	Xn (zdraví škodlivý)	možný	nevidováno	nevidováno
MCPB	málo nebezpečný	nevedeno	možný	nevidováno	nevidováno
Mecoprop-P (MCP-P)	málo nebezpečný	nevedeno	možný	nevidováno	potenciální

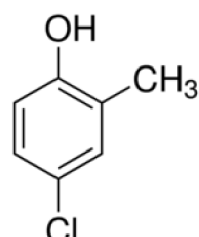
Z hlediska ekotoxikologického, byly při perorálním podání přípravku 2,4-D savcům, pozorovány příznaky závažné otravy, jako je svalová slabost, křeče, poruchy koordinace vedoucí k ochrnutí, a to zejména zadních končetin. Vysoké dávky mohou působit na CNS, zpomalit dýchání, následně kóma a smrt [42]. V Tabulce 13 jsou pro vybrané herbicidy uvedeny hodnoty LD50, v Tabulce 14 pak obecné informace o jejich metabolitech.

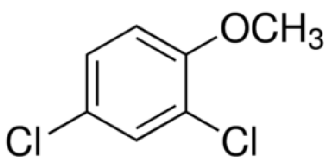
Tabulka 13: Hodnoty LD50 (potkan) vybraných herbicidů [52]

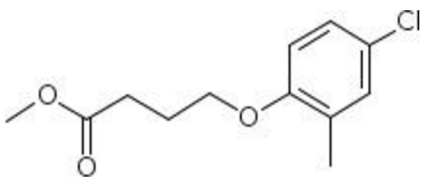
Účinná látka	LD50 (potkan, orálně) [mg/kg]	LD50 (potkan, dermálně) [mg/kg]
2,4-D	375	1500
Dichlorprop-P	825	4000
MCPA	700	1000
MCPB	680	–
Mecoprop-P (MCP-P)	1050	4000

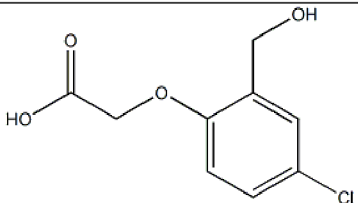
Tabulka 14: Obecné vlastnosti a toxicita metabolitů [32,56]

<i>Chemický název</i>	2,4-dichlorfenol		<i>Strukturní vzorec</i> 
<i>Chemický vzorec</i>	C ₆ H ₄ Cl ₂ O		
<i>Číslo CAS</i>	120-83-2		
<i>Rozpustnost ve vodě</i>	4500 mg/l		
<i>Toxicita</i>	LD50 (myš, orálně)	LD50 (potkan, orálně)	
	1276 mg/kg	47 mg/kg	

<i>Chemický název</i>	4-chlor-2-methylfenol		<i>Strukturní vzorec</i> 
<i>Chemický vzorec</i>	C ₇ H ₇ ClO		
<i>Číslo CAS</i>	1570-64-5		
<i>Rozpustnost ve vodě</i>	4000 mg/l		
<i>Toxicita</i>	LD50 (myš, intravenózně)	LD50 (myš, orálně)	
	56 mg/kg	1320 mg/kg	

<i>Chemický název</i>	2,4-dichloranisol		<i>Strukturní vzorec</i> 
<i>Chemický vzorec</i>	C ₇ H ₆ Cl ₂ O		
<i>Číslo CAS</i>	553-82-2		
<i>Rozpustnost ve vodě</i>	1288 mg/l		
<i>Toxicita</i>	-		

<i>Chemický název</i>	MCPB methyl ester		<i>Strukturní vzorec</i> 
<i>Chemický vzorec</i>	C ₁₃ H ₁₇ ClO ₃		
<i>Číslo CAS</i>	10443-70-6		
<i>Rozpustnost ve vodě</i>	10 mg/l		
<i>Toxicita</i>	LD50 (myš, orálně)	LD50 (potkan, orálně)	
	1160 mg/kg	1420 mg/kg	

<i>Chemický název</i>	HMCPA		<i>Strukturní vzorec</i> 
<i>Chemický vzorec</i>	C ₉ H ₉ ClO ₄		
<i>Číslo CAS</i>	6386-63-6		
<i>Rozpustnost ve vodě</i>	-		
<i>Toxicita</i>	-		

2.2.1.3 Adsorpce a desorpce vybraných herbicidů

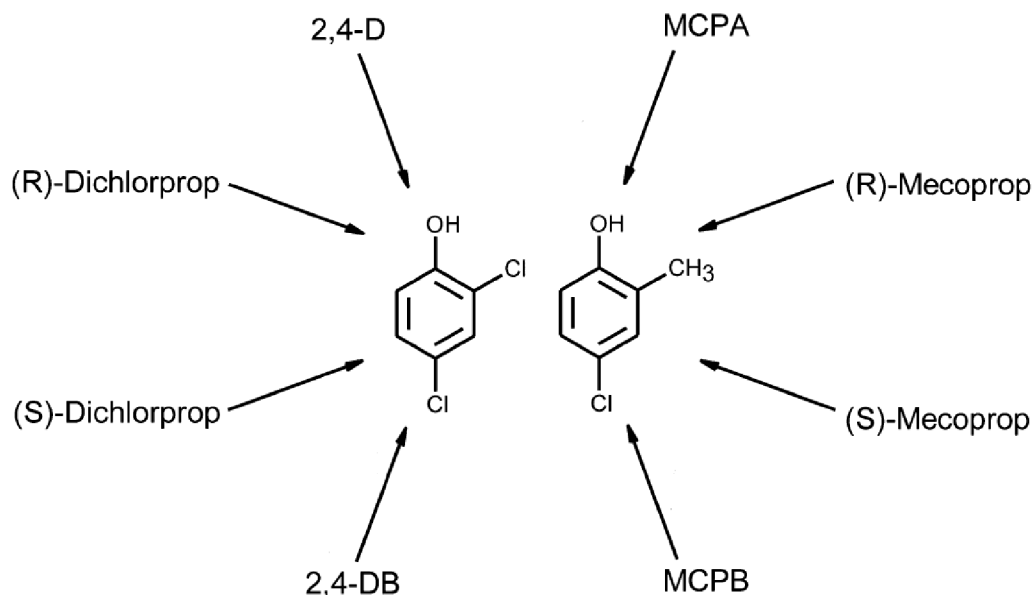
Adsorpce a desorpce patří mezi klíčové procesy, které ovlivňují retenci pesticidů a jejich transport skrze půdní profil do podzemní vody. Ve vlhké půdě, v závislosti na její pH, dochází k hydrolyze solí a esterů fenoxycarboxylových kyselin za vzniku aniontů a neutrálních molekul. Příkladem může být MCPA, které má hodnotu $pK_a = 3,09$. V půdě, která má $pH = 4$, je 89 % sloučeniny zastoupeno ve formě aniontu a zbylých 11 % jako neutrální molekula. MCPB ($pK_a = 4,82$) je v roztoku, který má $pH = 4$ zastoupen z 87 % jako neutrální molekula a z 13 % ve formě aniontu, při $pH = 5$ je 17 % neutrální molekula a 83 % ve formě aniontu a při $pH = 7$ je 100 % sloučeniny zastoupeno ve formě aniontu. Z těchto hodnot vyplývá, že změny pH mohou ovlivňovat míru sorpce a rychlost degradace těchto herbicidů.

Na základě Henryho konstanty je možné určit rychlost vypařování dané sloučeniny. Tyto konstanty jsou pro sledované herbicidy nízké (Tabulky 7-11), tím pádem jsou jen slabě těkavé. V životním prostředí mohou být perzistentní týden až měsíc. Jejich degradace závisí, jak již bylo zmíněno výše, hlavně na pH prostředí. Velmi rychle se rozkládají v přítomnosti kyslíku a snadno podléhají fotodegradaci [56].

2.2.1.4 Degradace vybraných herbicidů

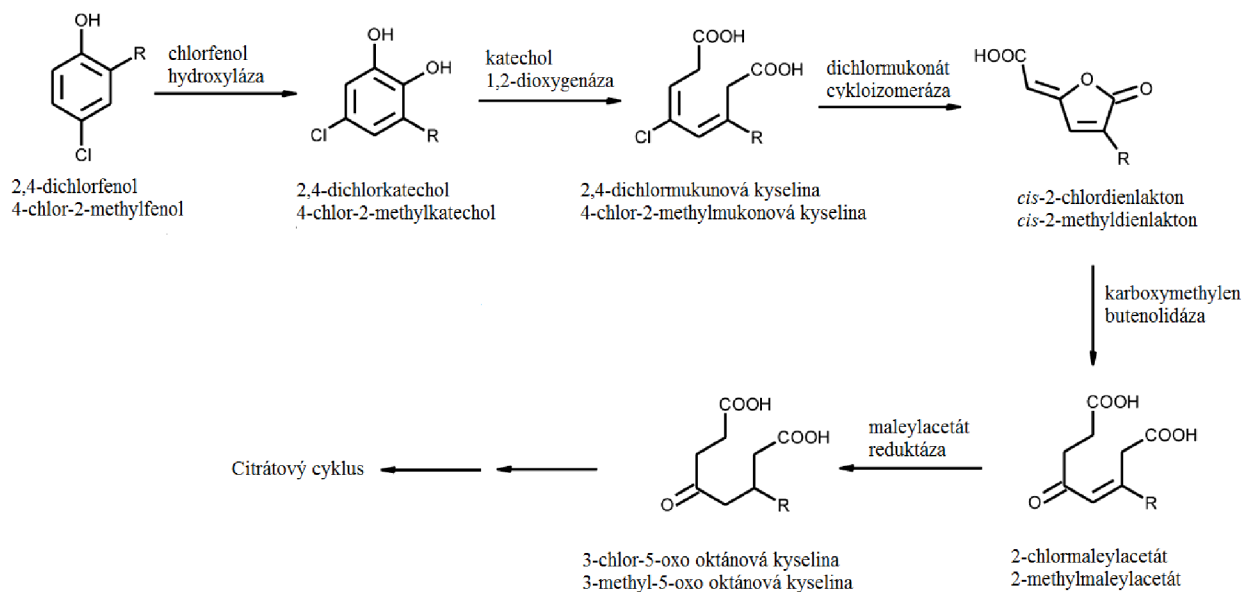
Degradace herbicidů na bázi fenoxycarboxylových kyselin je primárně biologický proces. Bylo pozorováno, že ve sterilizovaných půdách degradace probíhala minimálně nebo vůbec. Rychlost degradace závisí na druhu a množství mikroorganismu v půdě, obsahu organických látek, na obsahu živin a vody, na teplotě, vlhkosti a pH. V kyselých půdách se herbicidy degradují pomaleji. Je to způsobeno tím, že kyselé půdy obsahují méně mikroorganismu (nepříznivé podmínky pro život).

Mikrobiální degradace probíhá v prvním kroku rozštěpením etherové vazby za vzniku degradačních meziproductů 2,4-dichlorfenolu nebo 4-chlor-2-methylfenolu (Obrázek 3) [56].



Obrázek 3: Vznik degradačních meziproductů v důsledku rozštěpení etherové vazby [56]

Následující kroky mikrobiální degradace meziproduktů jsou znázorněny na Obrázku 4. V mnoha případech může být výsledným produktem CO₂ [56].



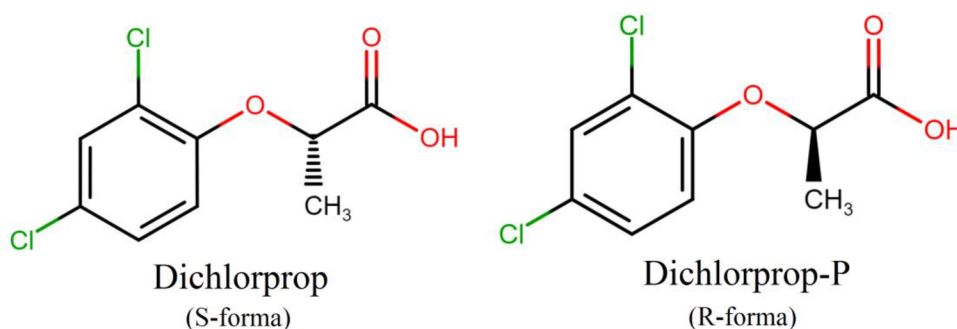
Obrázek 4: Mikrobiální degradace meziproduktů (přeloženo z [56])

2.2.1.5 Legislativa

V rámci používání pesticidních přípravků je nutné dodržovat kromě správné zemědělské praxe (GAP) i přísné předpisy, které mají za cíl chránit jak ekosystémy, tak lidské zdraví.

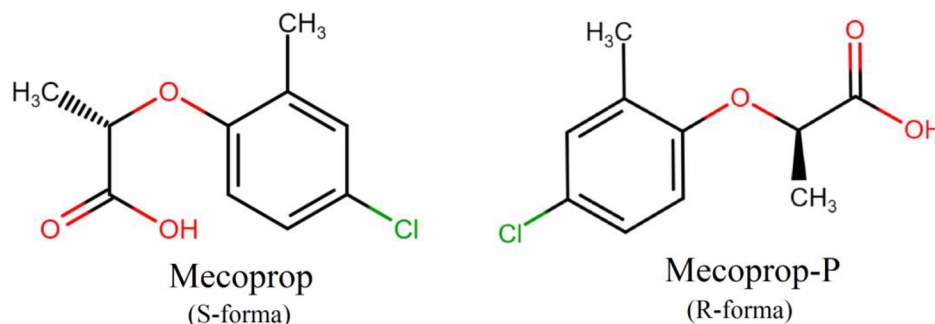
Přípravek **2,4-D** byl povolen a schválen pro použití výhradně jako herbicid 21. září 1995 *Nařízením komise (ES) č. 2230/95* společně s **MCPA**, **Mecopropem** a **Mecopropem-P**. *Prováděcím nařízením komise (EU) 2015/2033* byla platnost použití 2,4-D prodloužena do 31. prosince 2030. Při použití 2,4-D nad 750 g/ha je nutno věnovat zvláštní pozornost riziku pro suchozemské organismy, vodní organismy a spotřebitele [47,48]. *Směrnice komise 2005/57/ES* prodlužuje používání schválených přípravků MCPA a MCPB výhradně jako herbicidů do 30. dubna 2016 [51].

Dichlorprop-P byl uveden na trh 1. června 2007 *Směrnici komise 2006/74/ES*. Před tímto datem byla používána látka Dichlorprop (obsahuje chirální uhlík). Tato látka obsahovala racemát, tzn. levotočivý i pravotočivý enantiomer chirální sloučeniny. Bylo zjištěno, že herbicidní účinky má pouze R-enantiomer (Dichlorprop-P) a S-enantiomer (Dichlorprop) je neaktivní. Strukturální rozdíl těchto dvou přípravků je uveden na Obrázek 5. Přípravek je možné používat pouze jako herbicid a to do 31. května 2017 [49,50].



Obrázek 5: Strukturální vzorce Dichlorpropu a Dichlorpropu-P [52]

Mecoprop je přípravek používaný od 21. září 1995. Do roku 2011 byl tento přípravek používán stejně jako Dichlorprop ve formě racemátu (levotočivý i pravotočivý enantiomer). Od roku 2012 se používá již jen R-enantiomer (Mecoprop-P), jelikož bylo zjištěno, že právě tato forma má herbicidní účinky [47,51]. Na Obrázku 6 jsou znázorněny struktury těchto dvou přípravků. Mecoprop byl *Směrnici evropského parlamentu a rady 2008/105/ES* zařazen mezi látky podléhajícímu přezkumu pro případnou identifikaci jako prioritní látka nebo prioritní nebezpečná látka [20].



Obrázek 6: Strukturální vzorce Mecopropu a Mecopropu-P [52]

K hodnocení ekologického stavu byly *Narižením vlády č. 23/2011* určeny Normy environmentální kvality pro znečišťující látky. Mezi ně patří i sledované herbicidy. Konkrétní hodnoty NEK jsou uvedeny v Tabulce 15 [24].

V rámci Evropské unie se tyto herbicidy používají hlavně k ochraně obilovin a obvykle se aplikují v množství od 0,8 do 1,8 kg aktivní složky na hektar zemědělské půdy [56].

Tabulka 15: Normy environmentální kvality pro vybrané ukazatele určené pouze k hodnocení ekologického stavu/potenciálu [24]

Ukazatel	Číslo CAS	Jednotka	Norma environmentální kvality (NEK-RP*)
2,4-dichlorfenoxycetová kyselina	94-75-7	µg/l	0,1
Dichlorprop-P	15165-67-0	µg/l	0,1
MCPA	94-74-6	µg/l	0,1
MCPB	94-81-5	µg/l	0,1
MCPD	93-65-2	µg/l	0,1

*Průměrná hodnota je roční aritmetický průměr

2.3 Právní předpisy týkající se reziduí pesticidů a jejich metabolitů, ochrana vod

Česká republika vstoupila 1. května 2004 do Evropské Unie a tím ji vznikla povinnost řídit se evropskou legislativou. Evropská unie vydala *Rámcovou směrnici 2000/60/ES Evropského parlamentu a Rady* (novelizována směrnicemi 2013/39/EU a 2008/105/ES), kterou stanovuje rámec činností Společenství v oblasti vodní politiky. Touto směrnicí jsou stanovena „Opatření proti znečišťování vod jednotlivými znečišťujícími látkami nebo jejich skupinami, které představují významné riziko pro vodní prostředí nebo jeho prostřednictvím, a to včetně rizik pro vody využívané k odběru pitné vody [19]“. Dále je zde upřesněna strategie k předcházení a omezování znečištění podzemních vod, kde je cílem dosažení dobrého chemického stavu. Členské státy Evropské Unie jsou povinny všechna nezbytná opatření, která vedou ke snížení znečištění vod, dodržovat [19].

Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2008/105/ES (nabyla platnost 16. prosince 2008) pojednává o účincích na vodní prostředí, jako je například akumulace v ekosystému, bezprostřední a dlouhodobá toxicita pro vodní organismy, úbytek biologické rozmanitosti a ohrožení lidského zdraví. Ze směrnice vyplývá, že je nutností zajistit příčiny znečištění a řešit problematiku emisí přímo u zdroje, a to ekologicky a ekonomicky nejúčinnějším způsobem. V příloze č. 1 této směrnice je uveden seznam *33 prioritních látek* nebo skupin látek, u kterých je nutné přijímat opatření. Z toho *20 látek* bylo označeno za *prioritní nebezpečné látky*, přičemž je žádoucí, aby členské státy provedly nezbytná opatření s cílem postupně zastavit a odstranit jejich vypouštění, emise a úniky [20].

Pro všech 33 prioritních látek jsou určeny *Normy environmentální kvality (NEK)*, které udávají mezní koncentraci dané látky, která by neměla být překročena z důvodu ochrany životního prostředí a lidského zdraví. Mezní koncentrace se určuje ve vodě, sedimentu nebo živém organismu. NEK je stanovena buď jako roční průměrné NEK (RP-NEK) z důvodu ochrany lidského zdraví a životního prostředí při dlouhodobé expozici, nebo jako nejvyšší přípustná koncentrace NEK (NPK-NEK) z důvodu ochrany při krátkodobé expozici. Vybrané pesticidní látky z *přílohy č. 1 2008/105/ES* a jejich hodnoty NEK (z nařízení vlády č. 23/2001 Sb.) jsou uvedeny v Tabulce 16 [20].

Tabulka 16: Normy environmentální kvality pro některé pesticidy [20]

	Název prioritní látky	Číslo CAS	RP-NEK [$\mu\text{g/l}$]	NPK-NEK [$\mu\text{g/l}$]
1	Alachlor	15972-60-8	0,3	0,7
2	Atrazin	1912-24-9	0,6	2,0
3	Chlorfenvinfos	470-90-6	0,1	0,3
4	Chlorpyrifos (Chlorpyrifos-ethyl)	2921-88-2	0,03	0,1
5	Cyklodienové pesticidy: Aldrin* Dieldrin* Endrin* Isodrin*	309-00-2 60-57-1 72-20-8 465-76-6	$\Sigma = 0,01$	nepoužije se ¹

6	para-para-DDT*	50-29-3	0,01	nepoužije se ¹
7	Diuron	330-54-1	0,2	1,8
8	Endosulfan	115-29-7	0,005	0,01
9	Hexachlorbenzen (HCB)	118-74-1	0,01*	0,05
10	Hexachlorcyklohexan (HCH)	608-73-1	0,02	0,04
11	Isoproturon	34123-59-6	0,3	1,0
12	Pentachlorbenzen	608-93-5	0,007	nepoužije se ¹
13	Pentachlorfenol	87-86-5	0,4	1
14	Simazin	122-34-9	1	4
15	Trifluralin	1582-09-8	0,03	nepoužije se ¹
16	Terbutryn	886-50-0	0,065	0,34

¹ Je-li NPK-NEK označena jako „nepoužije se“, pak se hodnoty RP-NEK považují za takové, které chrání také proti krátkodobým maximálním znečištěním v případě trvalých úniků, neboť jsou výrazně nižší než hodnoty odvozené na základě bezprostřední toxicity (převzato ze Směrnice 2008/105/ES)[20].

* Tato látka není látkou prioritní, ale jednou z ostatních znečišťujících látek, pro něž jsou NEK shodné s těmi, jež byly stanoveny v právních předpisech používaných před dnem 13. ledna 2009 (převzato ze Směrnice 2008/105/ES)[20].

Pozn. Látky označené kurzívou jsou identifikovány jako prioritní nebezpečné látky (převzato ze Směrnice 2008/105/ES)[20].

Směrnice Evropského parlamentu a rady 2013/39/EU (nabyla platnost 12. srpna 2013) rozšiřuje dosavadní seznam prioritních látek o dalších 12 [21].

Ochranou vod se zabývá i Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2006/11/ES (nabyla platnost 15. února 2006) o znečišťování některými látkami vypouštěnými do vodního prostředí Společenství. Směrnice stanovuje dva seznamy látek. Seznam I byl určen na základě toxicity, bioakumulace a perzistence vybraných látek ve vodě. Vyjimku tvoří látky, které jsou biologicky neškodné, anebo se v tyto látky rychle přeměňují. V Seznamu II jsou uvedeny látky, které mají škodlivý účinek na vodní prostředí s tím, že tento účinek může být omezen jen na určitou oblast a může záviset na místě výskytu a vlastnostech vod, do nichž je látka vpuštěna [22].

Seznam I i II jsou v rámci české legislativy obsaženy v příloze č. 1 zákona č. 254/2001Sb. O vodách (vodní zákon) [23]. V oblasti ochrany vod ČR je tento zákon hlavním legislativním nařízením.

V České republice jsou látky ze Seznamu I nazývány jako „prioritní nebezpečné látky“ a látky spadající do Seznamu II jako „prioritní látky“. Ukazatele a hodnoty přípustného znečištění prioritních a prioritních nebezpečných látek jsou uvedeny v „nařízení vlády (nabylo platnost 22. prosince 2010) č. 23/2011 Sb. o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech, ve znění nařízení vlády č. 229/2007 Sb. a č. 23/2011 Sb.“ Toto nařízení je součástí vodního zákona (č. 254/2001) [23,24].

Jakost pitných a teplých vod v ČR řídí *Směrnice Rady 98/83/ES* (nabyla platnost 3. listopadu 1998) o jakosti vody určené k lidské spotřebě. Cílem je ochrana lidského zdraví před negativními účinky znečištěných vod, zajištění zdravotně nezávadné a čisté vody určené k lidské spotřebě. V Části B této směrnice jsou mezi chemickými ukazateli uvedeny i limity pro pesticidy (Tabulka 17) [25].

Tabulka 17: Hodnoty maximální povolené koncentrace pesticidů v pitné vodě, *Směrnice Rady 98/83/ES* [25]

Pesticidy	0,10 µg/l	Pesticidy celkem	0,50 µg/l
Hodnota ukazatele platí pro každý jednotlivý pesticid. Vyjimku tvoří aldrin, dieldrin, heptachlor a heptachlorepoxid, kdy je stanovena hodnota ukazatele 0,030 µg/l.		Výrazem „pesticidy celkem“ je myšlen součet všech jednotlivých pesticidů zjištěných a kvantifikovaných při monitorovacím postupu.	

Pozn.: Termín „pesticidy“ zahrnuje: organické insekticidy, herbicidy, fungicidy, nematocidy, akaricidy, algicidy, rodenticidy, slimicidy, příbuzné přípravky (regulátory růstu) a jejich příslušné metabolity, produkty rozkladu a reakční produkty.

Aby v rámci EU docházelo k fungování vnitřního trhu a nebyly kladeny překážky obchodu s produkty v rámci členských států, bylo nutno stanovit maximální limity reziduí (MLR) pesticidů v potravinách a krmivech. Tyto limity jsou uvedeny v „*Narižení Evropského parlamentu a Rady č. 396/2005* (nabyla platnost 23. února 2005) o maximálních limitech reziduí pesticidů v potravinách a krmivech rostlinného a živočišného původu a na jejich povrchu a o změně směrnice Rady 91/414/EHS“. *Směrnice Rady 91/414/EHS* (nabyla platnost 15. července 1991) uvádí, že by měla být dána přednost veřejnému zdraví před použitím přípravků na ochranu rostlin. Je tedy nutné zajistit, aby rezidua představující nepřijatelné riziko pro člověka nebo zvířata nebyla v plodinách přítomna. Hodnoty MLR by měly být v souladu s GAP stanoveny na takové hodnoty, které neohrožují zranitelné skupiny (děti a nenarozené děti) [27].

2.4 Stanovení pesticidů ve vodách

V této práci byla pro analýzu povrchové vody použita voda z řek Královéhradeckého a Jihomoravského kraje. Konkrétně byly odběry provedeny v okolí města Jaroměř, které leží na soutoku tří řek: Úpy, Metuje a Labe. Dále byla analyzována povrchová voda z řeky Svratky před a pod ČOV Modřice. Odběrové mapky a podrobnější popisy místa odběru jsou uvedeny v kapitole 3.5.

Pro analýzu odpadní vody byly použity vzorky z ČOV Jaroměř a ČOV Brno.

2.4.1 Město Jaroměř

Jaroměř se nachází v Královéhradeckém kraji, přibližně 20 km od krajského města Hradec Králové (okres Náchod) v nadmořské výšce 255 m. n. m. Současně zde žije přibližně 13 000 obyvatel. Městem protéká řeka Labe, do které se vlévá nejprve řeka Úpa, následně řeka Metuje.

Labe pramení v Krkonoších na Labské louce v nadmořské výšce 1 384 m. n. m. a patří mezi největší řeku České republiky [70].

Řeka Úpa taktéž pramení v Krkonoších, konkrétně v Úpavské rašelině pod Sněžkou. Z Krkonoš teče převážně jihovýchodním směrem až k České Skalici. Poblíž České Skalice byla vystavěna vodní nádrž Rozkoš, která je napájena právě vodou z řeky Úpy. Od Rozkoše se Úpa klikatí směrem k Jaroměři a na říčním kilometru 179,8 se z levé strany vlévá do Labe (Obrázek 7) [70].



Obrázek 7: Soutok řek Labe a Úpy

Řeka Metuje pramení severně od Adršpachu v blízkosti hranic s Polskem. Odtud teče na jih přes Nové Město nad Metují směrem k Jaroměři, kde se na říčním kilometru 177,3 vlévá zleva (na fotce zprava) do Labe (Obrázek 8) [70].



Obrázek 8: Soutok řek Labe a Metuje

2.4.2 Problematika polutantů na ČOV

Jak již bylo řečeno v kapitole 2.1.3.1, pesticidy mohou do prostředí vstupovat různými cestami. Nicméně mezi významné zdroje pesticidů ve vodním prostředí patří vypouštěné odpadní vody. Na ČOV přitékají nejrůznější směsi látek ze zdravotnictví, průmyslu, domácností, zemědělství atd. Hlavním problémem je, že současné ČOV nebyly ve své době konstruovány na odstraňování nových typů polutantů. Jejich účinnost je proto v mnoha případech nedostatečná. Bylo prokázáno, že během procesu čištění jsou různé látky odbourávány s velkými rozdíly. Některé mohou být odbourávány s účinností bez mála pár procent, jiné naopak s účinností až 99 %.

Bylo pozorováno, že některá léčiva (diklofenak, erytromycin) a pesticidy (diazinon, atrazin) jsou na ČOV odbourávány jen velmi málo (méně než 40 %). V rámci čistírenského procesu mohou z původních polutantů vznikat metabolity nebo může docházet ke štěpení konjugovaných metabolitů, které jsou z organismu vyloučeny, a tím pádem dojde k uvolnění původní látky.

To, v jaké míře jsou polutanty na ČOV odbourávány, závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech (polarita, stabilita, rozpustnost, biodostupnost,...), struktuře látky a na kapacitě, parametrech a konkrétních technologiích používaných na ČOV. Míru odbourávání polutantů ovlivňuje i stáří kalu, roční období, teplota a přítomnost dalších látek. Proces odbourávání je zpravidla účinnější, pokud jsou na ČOV zařazeny pokročilé metody dočištění odpadních vod. Příkladem může být sorpce na aktivní uhlí, membránové procesy, ozonace, reverzní osmóza a nanofiltrace nebo použití bioreaktorů [37,58].

Při vypouštění přečištěné odpadní vody do akvatického ekosystému velmi záleží na poměru objemu odtokových vod k objemu vody (průtoku) v recipientu, tedy na míře naředění. U menších toků je vliv zbytkového znečištění na organismy vyšší. Může docházet i k sezónním rozdílům. Například v zimním období může být koncentrace v povrchových vodách odlišná než v létě. V důsledku nižších teplot jsou biodegradační pochody pomalejší. Roli zde hraje i srážkový úhrn. V období sucha může dojít ke zvýšení koncentrace polutantů v důsledku snížení průtoku v recipientech odpadních vod [37].

2.4.2.1 ČOV Jaroměř

Provozovatelem ČOV Jaroměř (Obrázek 9) je společnost Městské vodovody a kanalizace s.r.o. Jaroměř. V letech 1993-1996 započala samotná výstavba a do trvalého provozu byla ČOV uvedena v roce 1996. Na ČOV jsou jednotnou kanalizací přiváděny průmyslové, splaškové, dešťové a balastní vody. Největším znečišťovatelem je provozovna KSK Bono v Heřmanicích, která se zabývá výrobou krmiv pro psy. Odpadní vody z této provozovny představují polovinu celkového zatížení, přičemž jejich znečištění je větší než znečištění v odpadních vodách přivedených z města, ale je lehce biologicky odbouratelné.

ČOV Jaroměř je řešena jako mechanicko-biologická s dlouhodobou aktivací a s částečnou stabilizací kalu. Hygienizace kalu je prováděna hydrátem vápenatým, což v podstatě nahrazuje úplnou stabilizaci kalu.

Celkový počet obyvatel připojených na kanalizaci činí 12 848, z toho 12 035 je připojených na ČOV. Aktuálně je ČOV Jaroměř dimenzována na 35 000 EO. V současné době je na ČOV přiváděno do 200 t BSK₅/rok, což odpovídá 9 000 EO.

Množství vypouštěných odpadních vod do recipientu (řeka Labe) nepřesahuje 2 000 000 m³/rok. Průměrné množství vypouštěných vod z ČOV činí 69,5 l·s⁻¹, maximální povolené množství je 134 l·s⁻¹ [77].

Tabulka 18: Hodnoty znečištění na přítoku a odtoku z ČOV [77]

Ukazatele	Jednotka	Přítok	Odtok
BSK ₅ (s potlač. nitrifikací)	mg/l	297,1	2,69
CHSK _{Cr}	mg/l	831,5	24,7
NL	mg/l	263,9	12,0
N-NH ₄	mg/l	34,4	0,68
N _{anorg.}	mg/l	35,6	4,26
P _{celk.}	mg/l	8,26	1,9

Znečištění na odtoku je přibližně 5x nižší než projektem předpokládané hodnoty.



Obrázek 9: ČOV Jaroměř

2.4.2.2 ČOV Modřice

Modřická čistírna byla do provozu uvedena v roce 1961. Fungovala v režimu klasické dvoustupňové čistírny s anaerobní stabilizací kalu. S rozvojem města došlo v 80. letech k látkovému a hydraulickému přetížení a bylo nutno ČOV rozšířit. V 90. letech vzrostla poptávka okolních vesnic po napojení na kanalizační systém města Brna a vzniklé přetížení již nebylo možné řešit dalšími dílčími úpravami, proto ČOV v roce 2003 prošla celkovou rekonstrukcí a rozšířením. Následoval jednoletý zkušební provoz a do trvalého provozu byla uvedena 1. 1. 2005. V roce 2009 došlo k optimalizaci provozu a tím i k navýšení kapacity o více než 20 %.

Aktuálně je maximální kapacita ČOV Modřice 515 000 EO. Celkový počet obyvatel, kteří trvale bydlí v obcích nebo v částech obcí odkanalizovaných na ČOV Modřice činil (k 1. 1. 2014) 434 282, z toho bylo 421 152 obyvatel připojených na kanalizaci. Při průměrném znečištění $60 \text{ g BSK}_5 \cdot \text{obyv.}^{-1} \cdot \text{den}^{-1}$ činí počet připojených ekvivalentních obyvatel (EO) 429 998 [53,54].

Do čistírny odpadních vod v Modřicích jsou systémem kanalizačních stok (převládá gravitační způsob odvádění) přiváděny odpadní vody z města Brna, ale i z širokého okolí. Konkrétně jsou na ČOV kromě Brna napojeny ještě města Kuřim a Modřice a obce Česká u Brna, Šlapanice, Šlapanice-Bedřichovice, Želešice, Moravské Knínice, Ostopovice, Lipůvka, Ponětovice, Rozdrojovice a Podolí [53].

Průměrné množství vypouštěných vod z ČOV činí $1\,950 \text{ l} \cdot \text{s}^{-1}$, maximální povolené množství je $4\,222 \text{ l} \cdot \text{s}^{-1}$. Za jeden kalendářní měsíc dojde v průměru k vypuštění $5\,127 \text{ tis. m}^3$. Recipientem je řeka Svatka.

Z vody, která natéká na ČOV Brno-Modřice, jsou odebírány vzorky, ze kterých je po rozboru provedena bilance znečištění na nátoku na ČOV. Tato bilance slouží ke stanovení využití kapacity ČOV (Tabulka 19) [53,54].

Tabulka 19: Hodnoty znečištění na přítoku ČOV a limity vypouštěného znečištění v rámci trvalého provozu ČOV Brno-Modřice [54]

Ukazatele	Jednotka	Přítok	Odtok	Koncentrace na odtoku z ČOV	
				přípustná	maximální
Celkové množství odpadních vod	m^3/den	102 380	-	-	-
○ Splaškové vody	m^3/den	46 512	-	-	-
○ Průmyslové a ostatní vody	m^3/den	22 085	-	-	-
○ Srážkové a balastní vody	m^3/den	33 783	-	-	-
BSK_5	kg/den	25 800	431	15 mg/l	30 mg/l
CHSK_{Cr}	kg/den	66 547	2621	75 mg/l	125 mg/l
NL	kg/den	32 045	884	20 mg/l	40 mg/l
$N_{\text{celk.}}$	kg/den	5 744	743	10 mg/l	20 mg/l
$P_{\text{celk.}}$	kg/den	704	44	1 mg/l	3 mg/l

ČOV Modřice disponuje mechanicko-biologickým stupněm čištění. Blokované schéma je uvedeno v Příloze 1. Na Obrázku 10 je celkový letecký pohled na ČOV.



Obrázek 10: Celkový pohled na ČOV Modřice [53]

2.5 Metody stanovení

2.5.1 Preanalytická úprava vzorků

K úspěšnému stanovení reziduí pesticidů je nutno zvolit vhodnou techniku izolace analytu, jelikož většina reálných vzorků obsahuje látky, které není možné stanovit přímo pomocí chromatografických technik. Úprava vzorků před vlastní analýzou je tedy nezbytná, především kvůli odstranění nežádoucích látek, zakoncentrování sledovaného analytu z matrice, zlepšení chromatografických vlastností analytů a mezí detekce. Mezi nejpoužívanější techniky izolace analytů z kapalných matric patří extrakce tuhou fází (SPE), extrakce kapalina-kapalina (LLE) a mikroextrakce tuhou fází (SPME) [63,66]. Tyto techniky jsou popsány v následujících kapitolách.

2.5.1.1 Extrakce tuhou fází (SPE)

SPE je technika, která je stále více využívána k úpravě vzorku před vlastní analýzou. Výhodou je použití jen malého množství organických rozpouštědel (často toxická a nebezpečná), účinné zakoncentrování analytu i vysoká výtěžnost. SPE je nejčastěji využívána k extrakci středně těkavých nebo netěkavých analytů z kapalných vzorků. Lze ji použít i na vzorky pevné, musí však být před vlastní extrakcí rozpuštěny ve vhodném rozpouštědle.

Další výhodou SPE kolonek je přečištění vzorku (odstranění nežádoucích látek rušících stanovení) a selektivita k různým druhům sledovaných analytů. Na trhu je k dispozici velký výběr různých sorbentů a velikostí kolonek (LC-18, ENVITM-18, ENVI-Florisil, ENVI-Carb, ...). Je totiž důležité vybrat pro danou analýzu ten nejvhodnější produkt [65].

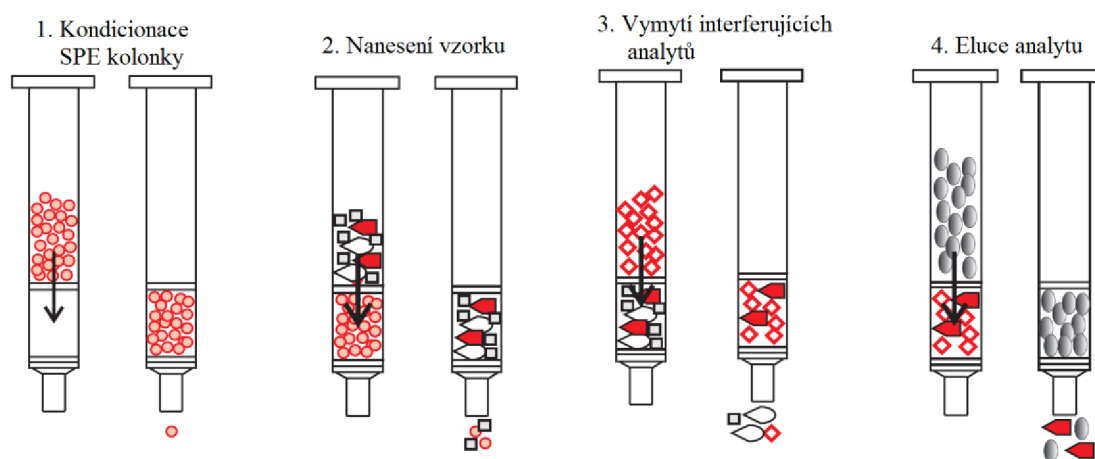
2.5.1.1.1 Princip

Prvním krokem je tzv. kondicionace (nejčastěji promytím methanolem), kdy dojde k aktivaci funkčních skupin sorbentu. Následně je kolonka připravena k použití.

V druhém kroku je postupně nanesen vzorek. Je velmi důležité zvolit optimální rychlost průtoku vzorku kolonkou, kvůli kvantitativnímu zachycení analytu.

Dalším krokem je eluce interferujících látek rozpouštědlem, ve kterém sledovaný analyt není eluován. Pokud je analyt slabě sorbován, může být tento krok vynechán.

V poslední kroku je provedena eluce analytu pomocí rozpouštědla o vhodné eluční cíle. SPE může být realizována manuálně i automatizovaně [8,65].



Obrázek 11: Princip SPE extrakce [65]

2.5.1.2 Extrakce kapalina-kapalina (LLE)

Tato technika je založená na rovnovážné distribuci látky mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze (vodná a organická). Cílem je převést co největší podíl látky A do organické fáze, ze které může být analyt izolován nebo v ní může být stanoven. Rozpouštědlo se volí dle povahy látky. Pro látky nepolární se používá i nepolární rozpouštědlo. Platí zde pravidlo: „Podobné v podobném se rozpouští.“

Herbicidy na bázi fenoxycarboxylových kyselin patří mezi vysoce polární sloučeniny, které jsou dobře rozpustné ve vodě a vodných roztocích, ale málo rozpustné v polárních organických rozpouštědlech (jsou v disociované formě). Před vlastním stanovením těchto herbicidů je vždy nutné okyselit vodnou fázi, aby došlo k přestupu nedisociovaných molekul do organické fáze. Jako vhodná rozpouštědla je možné použít aceton nebo dichlormethan, avšak výsledná výtěžnost extrakce je mnohem menší než technika SPE [72].

2.5.1.3 Mikroextrakce tuhou fází (SPME)

SPME (Solid Phase Microextraction) je účinná sorpčně/desorpční technika izolace analytu z různých matric. Výhodou je jednoduchost použití (eliminace potřeby použití organických rozpouštědel), operativnost (žádné komplikované aparatury), snadná reprodukovatelnost a krátký čas potřebný pro izolaci analytu.

Principem je sorpce vzorku na vhodné vlákno pokryté polymerem. Vlákno je ukryto v duté ocelové jehle SPME držáku. Vlastní sorpce analytu probíhá do dosažení rovnovážného stavu, který je ovlivněn tloušťkou a typem polymeru, jež pokrývá křemenné vlákno. Semivolatilní látky se lépe sorbují na tenčí vrstvu polymeru, těkavé naopak na vrstvu silnější. Tato metoda je použitelná v kombinaci s plynovou i kapalinovou chromatografií. Před vlastní analýzou je nutné optimalizovat podmínky izolace (typ vlákna, polarita vlákna, přídavek soli a pH, extrakční mód,...).

Na trhu je v dnešní době dostupná přibližně desítky typů SPME vláken s různou sběrnou fází a tloušťkou vrstvy. Analyty je možné vzorkovat buď extrakcí na vlákno z rovnovážné plynné fáze, nebo ponořením vlákna přímo do vzorku [63].

2.5.2 Derivatizace

Aby bylo možné vzorky analyzovat s co nejvyšší přesností, je nutné vybrat vhodnou analytickou metodu. V této práci byla použita analýza pomocí GC-MS/MS. Kyselé herbicidy nejsou těkavé, proto je nutné jejich těkavost před vlastní GC analýzou zvýšit, a to pomocí derivatizace.

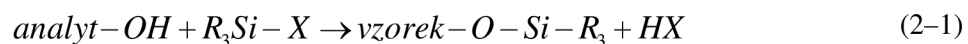
Derivatizace se obvykle provádí až po zakoncentrování a přečištění vzorku. Cílem je zvýšit těkavost, termostabilitu a analytickou odezvu analytů. Dle povahy sledovaného analytu je nutné zvolit vhodnou derivatizační techniku a činidlo. Derivatizační činidlo je tvořeno ze dvou částí. Organická část určuje vlastnosti výsledného produktu a reaktivní skupina zajišťuje navázání organického řetězce na analyt.

Kyselé herbicidy bývají z vody nejčastěji extrahovány organickými rozpouštědly a teprve potom derivatizovány. Nejčastěji se při analýze těchto sloučenin pomocí GC používají tyto derivatizační reakce: silylace, acylace, alkylace a esterifikace [68].

2.5.2.1 Silylace

Principem je nahrazení kyselého vodíku –OH, –SH nebo –NH skupiny silyl derivátem. Tento druh reakce se využívá pro polární analyty o nízké těkavosti (např. analyty s fenolovou skupinou). Výsledkem jsou teplotně stálé, méně polární a těkavé deriváty. Zavedení silylové skupiny do struktury polárních analytů zlepšuje přesnost, reprodukovatelnost, citlivost a rozlišení analýzy. Volba silylačního činidla závisí na jeho reaktivitě, selektivitě ke konkrétním analytům a stabilitě derivátů.

Níže zmíněná reakce (2–1) naznačuje nukleofilní atak silyl donorové skupiny na atom kyslíku.

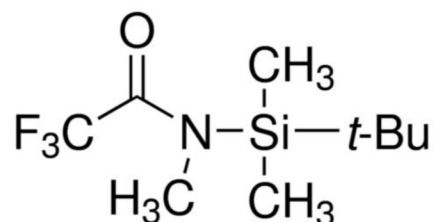


Silylové deriváty jsou velmi citlivé na přítomnost vlhkosti ve vzorku. Při kontaktu s vodou dochází k rozpadu TMS činidla i derivátu. Tyto problémy je možno minimalizovat nadbytkem rozpouštědla nebo derivatizačního činidla.

Doba derivatizace je závislá na konkrétní sloučenině, která má být derivatizována. Aby byla derivatizace co nejefektivnější, je nutno zajistit vhodné podmínky derivatizace. Mezi parametry, které je nutno optimalizovat, patří: správný výběr a objem derivatizačního činidla, vhodné rozpouštědlo, teplota a reakční doba derivatizace [69].

2.5.2.1.1 MTBSTFA (*N*-*tert*-butyldimethylsilyl-*N*-methyl trifluoroacetamid)

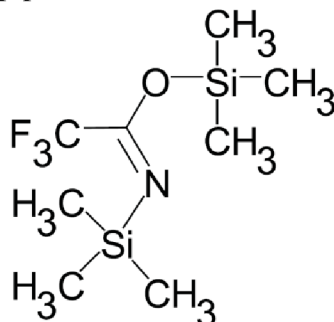
Derivatizační činidlo MTBSTFA (Obrázek 12) produkuje při reakci s kyselým vodíkem analytu stabilní *t*-BDMS (*tert*-butyldimethylsilyl) deriváty. Používá se k derivatizaci primárních a sekundárních aminů a sloučenin, které mají –OH, –COOH nebo –SH skupinu. Deriváty MTBSTFA jsou více než 100x stabilnější a odolnější proti vlhkosti než deriváty TMS [69].



Obrázek 12: Strukturální vzorec MTBSTFA [69]

2.5.2.1.2 BSTFA, BSA, BSTFA + TMCS (99:1)

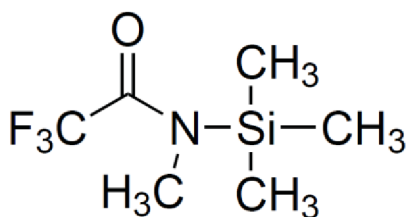
BSTFA (N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid) (Obrázek 13) společně s BSA (N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid) jsou široce používaná derivatizační činidla. Při jejich reakci s analytem dochází k navázání TMS (trimethylsilyl) skupiny na místo kyselého vodíku. Používají se samostatně nebo v přítomnosti katalyzátoru TMCS (trimethylchlorsilan), TFA (trifluoroacetamid), pyridinu nebo piperidinu [69].



Obrázek 13: Strukturální vzorec BSTFA [69]

2.5.2.1.3 MSTFA (*N*-methyl-*N*-trimethylsilyl)trifluoroacetamid)

Struktura MSTFA (Obrázek 14) je považována za derivát trifluoroacetamidu, kde jsou dva vodíkové atomy v –NH₂ skupině nahrazeny methylovou a trimethylsilylovou skupinou. Má podobnou silylační sílu jako BSTFA a BSA, jen je mnohem více těkavý. Používá se k přípravě těkavých a tepelně stálých derivátů v GC i MS analýze [69].



Obrázek 14: Struktura MSTFA [69]

2.5.2.2 Acylace

Acylace je reakce, při které dochází k přeměně sloučenin obsahující aktivní vodík ($-OH$, $-SH$ a $-NH$ skupiny) na estery, thioestery a amidy. Patří mezi důležité derivatizační techniky. Acylační činidla lze rozdělit do dvou skupin, a to anhydridy fluorokyselin a fluoroacylimidazoly. Fluoroacylimidazoly velmi rychle reagují s hydroxylovou skupinou, sekundárními a terciálními aminy a vytváří acylderiváty. Anhydridy jsou těkavější a mohou se snadno vypařovat. Stejně jako silylace se acylace používá ke zvýšení těkavosti a stability analytů. Mezi nejčastější aplikace patří zavedení perfluoroacyl- skupiny do struktury analytu, čímž dochází při GC analýze ke zvýšení odezvy na ECD (electron capture detector) detektoru [69].

2.5.2.3 Alkylace

Při alkylaci dochází k nahrazení aktivního vodíku alifatickou nebo aromatickou (benzyl) skupinou. Používá se pro modifikaci sloučenin obsahující kyselý vodík (karboxylové kyseliny, fenoly). Principem je přeměna organických kyselin na estery, které jsou lépe stanovitelné než jejich volné kyseliny. Čím je vodík méně kyselý, tím silnější alkylační činidlo je nutné použít. Výhodou oproti silylaci je to, že alkyl deriváty je možné uchovávat neomezeně dlouho, kdežto TMS deriváty jsou jen omezeně stálé [69].

2.5.2.4 Esterifikace

Esterifikace byla použita jako první derivatizační technika při analýze pomocí GC. Principem je reakce karboxylové kyseliny nebo jejího derivátu s alkoholem za vzniku esteru a vody [69].

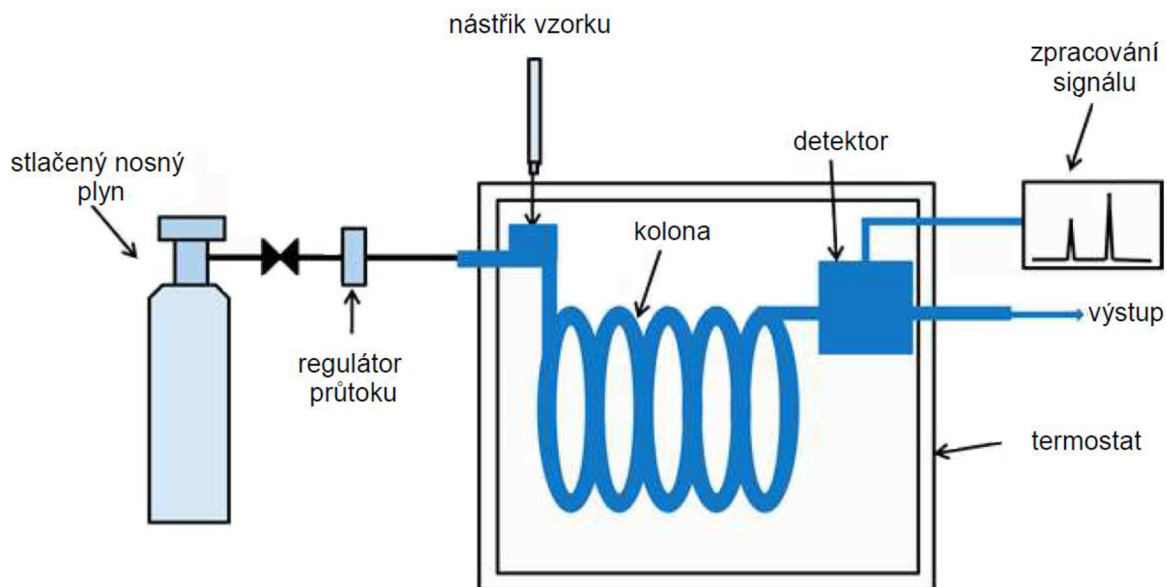
2.6 Plynová chromatografie (GC)

Plynová chromatografie je separační metoda, jejímž principem je rovnovážné rozdělení analytu mezi fázi *stacionární* (tuhá látka nebo kapalina) a fázi *mobilní* (nosný plyn). Nosný plyn zajišťuje pouze přenos analytů kolonou a neúčastní se separačního procesu. Nejčastěji se využívají permanentní plyny jako je N_2 , He, H_2 , Ar. Aby byl zajištěn optimální průtok plynu kolonou, je nutné, aby tlak na začátku kolony byl vyšší než na konci.

Interakce mezi stacionární fází a molekulou plynu je dána působením intermolekulárních sil (adsorpce, rozpouštění) a difúzí. Aby mohl být vzorek pomocí plynové chromatografie analyzován, měl by být stabilní a těkavý. V případě méně těkavých analytů je možné těkavost zvýšit pomocí derivatizace (viz. kapitola 2.5.2) [59,64].

2.6.1 Instrumentace v GC

Obrázek 15 znázorňuje základní schéma plynového chromatografu. Mezi základní části patří: *tlaková lahev* (zdroj nosného plynu), zařízení sloužící k *měření a regulaci průtoku* plynu, *injektor*, kde dochází k nástřiku vzorku, *chromatografická kolona*, která je stejně jako *detektor* a injektor umístěna v termostatu, a *počítač* sloužící k řízení chromatografického systému a k ukládání a vyhodnocení naměřených dat [64].



Obrázek 15: Plynový chromatograf (přeloženo z [75])

V dnešní době se používají nejčastěji kapilární kolony. Tyto tenkostěnné kolony jsou vyráběny z velmi čistého SiO_2 , který je potažený vrstvou polyimidu (zabránění oxidaci – křehnutí SiO_2). Uvnitř kolony je chemicky navázaná a imobilizovaná stacionární fáze. Pro nepolární látky se používá stacionární fáze na bázi polydimethylsiloxanů nebo silarylenů, pro polární látky pak polyethylenglykoly.

Hlavním úkolem detektoru je poskytnout odlišný signál při průchodu nosného plynu obsahujícího eluovanou složku a samotného nosného plynu. Detektor by měl poskytovat maximální rychlost odezvy, stabilní signál, co nejnižší meze detekce, selektivitu a citlivost. Mezi základní typy detektorů patří plamenový ionizační detektor (FID), detektor elektronového záchytu (ECD), plamenový fotometrický detektor (FPD), fotoionizační detektor (PID), termoionizační detektor (AFID) a hmotnostní spektrometr (MS) [64].

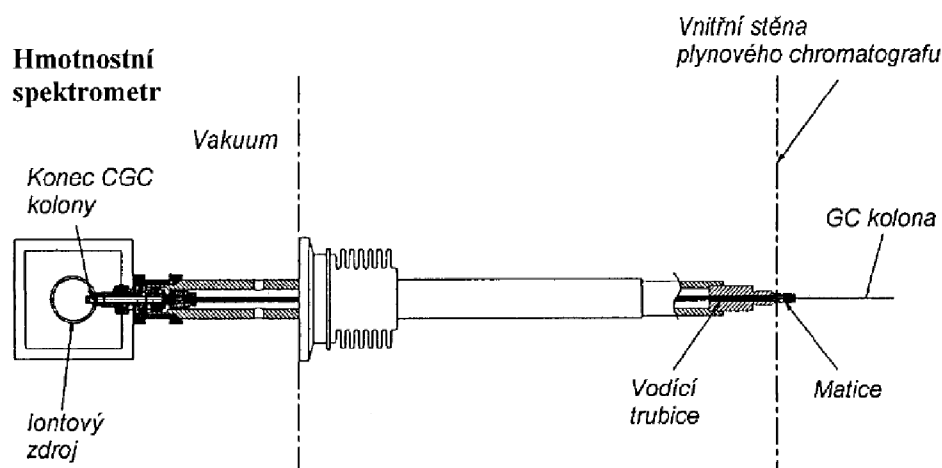
2.6.2 Spojení GC a MS

Mezi nejčastější metody stanovení pesticidů ve vodách patří kombinace kapalinové nebo plynové chromatografie s vhodným detektorem. Spojení GC a MS má vysokou separační účinnost a analýzy jsou rychlé. Podmínkou však je, aby analyzované látky byly těkavé a při vypařování se nerozkládaly. Pokud tato podmínka není splněna, je nutné analyty vhodným způsobem derivatizovat (viz. kapitola 2.5.2). Pesticidy na bázi fenoxycarboxylových kyselin patří do skupiny pesticidů, které nelze analyzovat přímo (došlo by k rozkladu při nástřiku) a je nutné je převést na těkavější deriváty.

Výhodou spojení GC/MS a GC/MS/MS je, že při analýze složitějších vzorků, kde se provádí identifikace neznámých složek, je možné pro každou tuto složku získat hmotnostní spektrum, které nám umožní jednotlivé složky identifikovat a porovnat s knihovnou spekter [4,59].

Ke spojení plynového chromatografu s hmotnostním spektrometrem se nejčastěji používá přímé spojení (Direct Interface) znázorněné na Obrázku 16. Kapilární kolona je protažená až do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Jako detektor se používá nejčastěji 3-D iontová past, průletový nebo kvadrupólový analyzátor [76].

– přímé spojení (Direct Interface)



Obrázek 16: Spojení GC a MS – přímé spojení [76]

2.7 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie je metoda založená na interakci iontů a polí (elektrického a magnetického). Výstupem je tzv. hmotnostní spektrum, což je záznam, který popisuje závislost intenzity signálu (osa y) na poměru m/z (hmotnost/náboj) [60].

2.7.1 Princip a instrumentace v MS

Mezi základní části hmotnostního spektrometru patří *iontový zdroj*, *analyzátor*, *detektor* a *vakuový systém*. V iontovém zdroji dochází k převedení neutrálních molekul analytu na ionty (nabité částice), které prochází iontovou optikou (tvořena elektrickými poli) do analyzátoru, kde jsou ve vakuu separovány dle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Ionty o specifickém m/z dopadají na detektor (fotonásobič, elektronásobič), který převede intenzitu iontového toku na měřitelný signál [60].

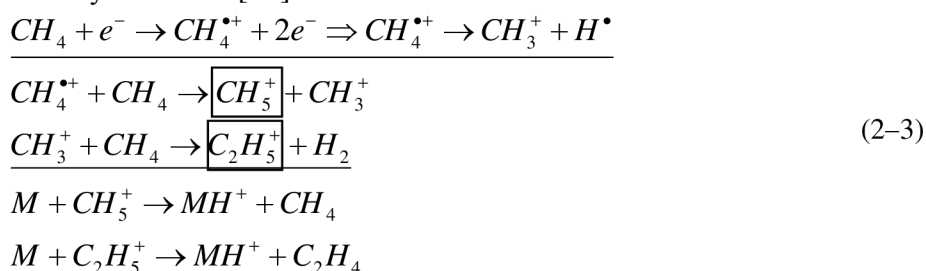
2.7.1.1 Iontový zdroj

V závislosti na použité ionizační technice se liší konstrukce iontového zdroje. Vhodná ionizační technika je volena podle vlastností analytů (těkavost, molekulová hmotnost, polarita a tepelná stabilita). Ve spojení s GC se nejčastěji používá technika elektronové ionizace (EI) nebo chemické ionizace (CI).

Elektronová ionizace patří mezi tvrdé ionizační techniky. Molekule analytu je dodán přebytek vnitřní energie (70 eV), což má za následek ionizaci molekuly za vzniku molekulových iontů (radikálkationtů $M^{\bullet+}$), které nesou informaci o molekulové hmotnosti dané sloučeniny. Přebytek energie způsobí následnou fragmentaci radikálkationtu (nejslabší vazby ve struktuře prasknou) a vznik fragmentů (F_1^+), ve kterých je skryta strukturní informace, a neutrálních ztrát (N_1^{\bullet}), které ve spektru nevidíme (2–2). Tato ionizační technika produkuje pouze kationty (M^+). Je nutné pracovat ve vakuu ($10^{-3} - 10^{-5}$ Pa), výhodou je možnost tvorby knihoven hmotnostních spekter [60].



Chemická ionizace je označována jako měkká ionizační technika, při které nedochází k tak rozsáhlé fragmentaci jako u EI. K ionizaci se používá tzv. reakční plyn (CH_4). CI probíhá dvoustupňovým mechanismem. Nejprve dochází k interakci reakčního plynu s elektrony za vzniku reaktivních specií (CH_5^+ , C_2H_5^+), které následně ionizují molekuly analytu. Při této technice nevzniká přímo molekulární iont, ale struktura o jednotku těžší nebo lehčí (než je původní iont) tzv. kvazimolekulární iont $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}-\text{H}]^-$, který nese informaci o molekulové hmotnosti analytu. Nelze tvořit knihovny spekter, jelikož standardizace podmínek chemické ionizace je obtížná a prakticky nemožná [60].

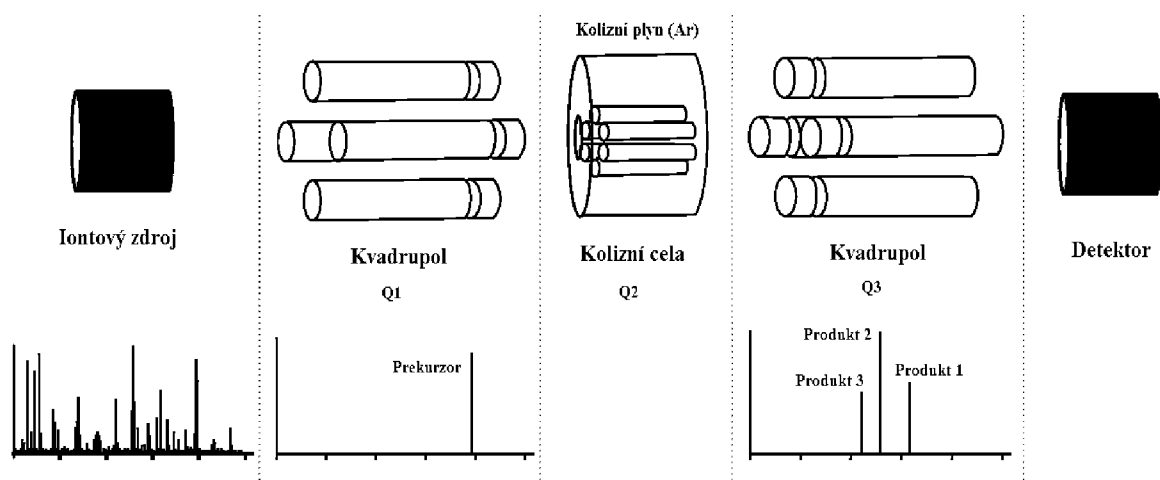


2.7.1.2 Kvadrupólový analyzátor

Kvadrupólový analyzátor je tzv. „laditelný hmotnostní filtr“. Je tvořen čtyřmi tyčemi kruhového průřezu (vždy 2 a 2 protilehlé jsou vodivě spojeny), mezi které vlétají ionty. Na tyče se vkládá střídavé napětí a k němu je přidávána stejnosměrná složka. Ionty z iontového zdroje vlétou mezi tyče a začnou opisovat trajektorie. Velikostí amplitudy střídavého a stejnosměrného napětí se určuje, které prolétnou a které ne [61].

2.7.1.3 Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS)

Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) je v podstatě spojení sil dvou analyzátorů. Hlavním přínosem je snížení nebo odstranění chemického šumu a podstatně nižší meze stanovitelnosti a meze detekce. Při MS/MS je mezi dva analyzátoři vložena tzv. reakční oblast, kde je iontům dodávána energie (nejčastěji srážkami s molekulami kolizního plynu tzv. kolizně indukovaná disociace, CID), která vyvolá jejich fragmentaci. Produkty fragmentace jsou následně zpracovány druhým analyzátořem [76]. V této práci byl použit jako analyzátor trojitý kvadrupól (Obrázek 17).



Obrázek 17: Tandemová hmotnostní spektrometrie - schéma trojitého kvadrupólu (přeloženo z [71])

Mezi základní MS/MS experimenty patří:

- *Sken produktů*
 - Analyzátor 1. stupně vybírá *prekurzor*, kterému je v reakční oblasti dodána energie (kolizí s terčovým plynem – Argon) a sledují (=skenují) se *produkty* fragmentace.
- *Sken prekurzorů*
 - Druhý analyzátor je pevně nastavený a sleduje jen určitý iont, první analyzátor skenuje.
- *Sken neutrálních ztrát*
 - Oba analyzátory skenují, ale s konstantním rozdílem.
- *SRM (Selected reaction monitoring)*
 - Sledování vybrané reakce. Oba analyzátory jsou nastavené na určité m/z a neskenují. Probíhá pouze 1 fragmentace. V tomto módu je možné dosáhnout velice nízkých mezí detekce a je vhodný pro cílenou, stopovou a ultrastopovou analýzu.
- *MRM (Multiple reaction monitoring)*
 - Probíhá více fragmentací, používá se pro kvantifikaci a ultrastopovou analýzu [76].

2.7.1.4 Detekce

Nejčastěji se k zesílení signálu používá elektronásobič. Ionty dopadnou na konverzní dynodu a vyrazí z ní elektron, který je následně přitažen k protilehlé dynodě, ta vyrazí 2 elektrony atd. Data jsou zpracována pomocí výkonného počítače [61].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Sledované analyty

Sledované analyty byly vybrány dle požadavků nařízení vlády č. 23/2011. Nařízení je součástí vodního zákona č. 254/2001 a patří mezi nejdůležitější prováděcí předpisy zahrnující informace o vypouštění odpadních vod, které obsahují prioritní látky [23,24]. Konkrétně Mecoprop navíc dle Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2008/105 podléhá přezkumu pro případnou identifikaci jako prioritní látka nebo prioritní nebezpečná látka [20]. Informace o výběru sledovaných analytů jsou shrnuty v Tabulce 20.

Tabulka 20: Vybrané analyty

Analyt	Důvod výběru	Registrované k použití v ČR (leden 2016)
2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina	NEK (nařízení č. 23/2011) roční spotřeba v ČR (více než 30 tun)	ano
Dichlorprop-P	NEK (nařízení č. 23/2011)	ano
MCPA	NEK (nařízení č. 23/2011) roční spotřeba v ČR (více než 30 tun)	ano
MCPB	NEK (nařízení č. 23/2011)	ano
Mecoprop-P	NEK (nařízení č. 23/2011) Směrnice 2008/105 (přezkoumání jako možná prioritní látka)	ano

3.2 Použité přístroje a pomůcky

- plynový chromatograf Bruker EVOQ™ GC Triple Quadrupole (TQ) s MS detekcí a autosamplerem CP-8400
- kolona SLB™ – 5 ms (60 m × 0,25 mm × 0,25 μm), (Supelco, USA)
- technické plyny:
 - Helium čistoty 6.0 (SIAD Czech, s.r.o.) – nosný plyn
 - Argon čistoty 5.0 (SIAD Czech, s.r.o.) – kolizní (terčový) plyn
 - Dusík čistoty 4.7 (SIAD Czech, s.r.o.)
- SPE kolonky:
 - Supelclean ENVI-18, 1 g, 6 ml (Supelco, USA)
 - OASIS HLB, 60 mg, 3 ml (Waters, USA)
- stříkačkové filtry:
 - Cronus filter, průměr 13 mm, velikost pórů: 0,45 μm
- přístroj pro sušení pod dusíkem EVATERM (Labicom s.r.o., ČR)

3.3 Použité chemikálie

- aceton pro chromatografii, kvality LiCHroSolv, čistota ≥ 99,8 %, CAS: 67-64-1 (Merck, Německo)
- methanol, Chromasolv® for HPLC, čistota ≥ 99,7 %, CAS: 67-56-1 (Sigma-Aldrich®, Francie)

- acetonitril, Chromasolv[®] for HPLC, čistota $\geq 99,7\%$, CAS: 75-05-8 (Sigma-Aldrich[®], Francie)
- ethylacetát, Chromasolv[®] for HPLC, čistota $\geq 99,7\%$, CAS: 9002-89-5 (Sigma-Aldrich[®], Francie)
- kyselina chlorovodíková 35 %, kvalita p. a., CAS: 7647-01-0, (Penta, Chrudim – ČR)
- Milli-Q voda, Millipore

Standardy:

- 2,4-D Pestanal[®], $M_w = 221,04$ g/mol, číslo produktu: 31518, CAS: 94-75-7 (Sigma-Aldrich[®], Francie)
- MCPA Pestanal[®], $M_w = 200,62$ g/mol, číslo produktu: 45555, CAS: 94-74-6 (Sigma-Aldrich[®], Francie)
- Dichlorprop-P Pestanal[®], $M_w = 235,06$ g/mol, číslo produktu: 31237, CAS: 15165-67-0 (Sigma-Aldrich[®], Francie)
- MCPB Pestanal[®], $M_w = 228,67$ g/mol, číslo produktu: 36145, CAS: 94-81-5 (Sigma-Aldrich[®], Francie)
- Mecoprop-P Pestanal[®], $M_w = 214,65$ g/mol, číslo produktu: 36773, CAS: 16484-77-8 (Sigma-Aldrich[®], Francie)

Vnitřní standard:

- MCPA-(*methyl-d*₃), $M_w = 203,64$ g/mol, číslo produktu: 68405, (Sigma-Aldrich[®], Francie)

Derivatizační činidla:

- MTBSTFA, *N-tert*-butyldimethylsilyl-*N*-methyltrifluoroacetamid, CAS: 77377-52-7 (Sigma-Aldrich[®], Francie)
- BSTFA, *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid, CAS: 25561-30-2 (Sigma-Aldrich[®], Francie)
- MSTFA, *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid, CAS: 24589-78-4 (Sigma-Aldrich[®], Francie)
- BSTFA+TMCS (trimethylchlorsilan) (99:1), CAS BSTFA: 25561-30-2, CAS TMCS: 75-77-4, (Sigma-Aldrich[®], Francie)

3.4 Příprava roztoků standardů

3.4.1 Příprava zásobních roztoků analytů ($c = 500$ $\mu\text{g/ml}$)

Na analytických vahách bylo naváženo s přesností na čtyři desetinná místa 0,005 0 g analytu. Následně bylo navážené množství převedeno do 10 ml odměrné baňky a doplněno acetonem po rysku. Obsah odměrné baňky byl důkladně promíchán. Postup byl zopakován pro všechny analyty.

3.4.2 Příprava zásobního a pracovního roztoku deuterovaného MCPA

Obsah zásobní lahvičky (10 mg) byl převeden do 10 ml odměrné baňky a doplněn acetonem po rysku. Z tohoto zásobního roztoku o koncentraci 1000 $\mu\text{g/ml}$ bylo pipetováno 2,5 ml do 5ml odměrné baňky, aby byl po doplnění po rysku acetonem vytvořen pracovní roztok o koncentraci 500 $\mu\text{g/ml}$.

3.4.3 Příprava směsného standardu ($c = 5 \mu\text{g/ml}$)

Na přípravu směsného standardu o koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$ bylo třeba do 10 ml odměrné baňky napipetovat 100 μl každého analytu. Baňka byla doplněna acetonem po rysku a obsah byl důkladně promíchán.

3.4.4 Příprava pracovního roztoku ($c = 1 \mu\text{g/ml}$) a kalibračních roztoků

Pracovní roztok byl připraven napipetováním 2 ml směsného standardu do 10ml odměrné baňky, která byla následně doplněna acetonem po rysku a důkladně promíchána.

Jednotlivé kalibrační roztoky byly připravovány postupným ředěním pracovního roztoku o koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$. Byly připraveny kalibrační roztoky 250; 100; 20; 1; 0,2; 0,1 ng/ml .

3.5 Odběrová místa

Na každé z řek byla vytipována dvě odběrová místa (most, pochůzná lávka). Konkrétně Labe bylo vzorkováno v Brodu nad Labem a v Heřmanicích, kde byl odebrán bodový vzorek ze středu proudnice, Úpa ve Zvoli a u Železného mostu, Metuje v Šestajovicích a pod Rychnovkem. Dále byly odebrány vzorky za soutokem Labe a Úpy, Labe a Metuje a na přítoku a odtoku z ČOV Jaroměř. Odběrová místa jsou vyznačena na souhrnném Obrázku 18.

Podrobnější mapky jsou uvedeny v Příloze 2. Odběry byly provedeny celkem dvakrát, v týdenním intervalu (11. a 18. dubna 2016).



Obrázek 18: Odběrová místa v okolí Jaroměře [67]

Vzorky z řeky Svratky byly odebrány přibližně 1 km před a 1 km pod ČOV Modřice současně s odtokem z ČOV Modřice. Přítok na ČOV byl odebrán vždy den před těmito odběry. Odběrová místa jsou znázorněny na Obrázku 19. Vzorky byly odebrány v termínech uvedených v Tabulce 21.

Tabulka 21: Termíny odběrů

	1. den sledování	2. den sledování
přítok	<i>úterý</i> 19. 4. 2016	<i>čtvrtek</i> 21. 4. 2016
odtok, před a pod ČOV	<i>středa</i> 20. 4 2016	<i>pátek</i> 22. 4. 2016



Obrázek 19: Odběrová místa na řece Svatce [67]

3.6 Preanalytická úprava vzorků

3.6.1 Filtrace, úprava a uchování vzorků

Vzorky povrchové a odpadní vody byly ihned po dopravení do laboratoře zfiltrány přes papírový filtr pro kvantitativní analýzu KA4. Po přefiltrování byly upraveny pomocí HCl (0,1 M) na hodnotu pH = 2 a uchovány v lednici při 4 °C až do dalšího zpracování.

3.6.2 Zakoncentrování pomocí SPE extrakce

V rámci optimalizace SPE byly vyzkoušeny dva různé typy kolonek a několik typů extrakce s různými objemy a typy kondičionálních a elučních činidel. Jako optimální pro analýzu reálných vzorků byla vybrána extrakce na kolonkách Supelclean ENVI-18 (1 g, 6 ml) s kondicionací methanolem, Milli-Q vodou o pH = 2 a elucí acetonem a acetonitrilem kvality pro chromatografii.

Tabulka 22: Optimalizované podmínky SPE extrakce

kondicionace	2x2 ml methanolu 2x3 ml Milli-Q vody okyselené na pH = 2 (pomocí HCl)
nanesení vzorku	200 ml přefiltrované povrchové a odpadní vody okyselené na pH = 2 (pomocí HCl)
sušení	30 min vzduchem
eluce	3 ml acetonu 3 ml acetonitrilu
odpaření	do sucha, pod dusíkem
rozpuštění odparku	1 ml acetonu



Obrázek 20: Zařízení pro SPE extrakci Supelco

3.7 GC/MS/MS analýza

3.7.1 Chromatografické podmínky

K vlastnímu měření byl použit přístroj Bruker EVOQ™ GC Triple Quadrupole (TQ) s MS detekcí, autosamplerem CP-8400 a kolona SLB™ – 5 ms (60 m × 0,25 mm × 0,25 μm).

Tabulka 23: Podmínky analýzy

nástrík	1 μ l
průtok kolonou	1 ml/min
teplotní program	50°C, izoterma 1 min do 280°C po 15°C/min 280°C, izoterma 5 minut
dobra trvání analýzy	26,33 minut

Při podmínkách analýzy uvedených v Tabulce 23 tvoří MCPA a MCPA-d₃ společný pík, což při MS detekci nevádí, jelikož při vyhodnocení je možné vybrat jen konkrétní hmotu. Podmínky byly částečně převzaty z článku o stanovení herbicidů na bázi fenoxycarboxylových kyselin ve vodách [73].

3.7.2 Hmotnostně spektrometrická detekce

Všech pět sledovaných analytů bylo stanoveno pomocí MS/MS detekce. Nejprve byl proměřen každý analyt zvlášť. Na základě hmotnostního spektra byl vybrán vhodný prekurzor a následně produkt fragmentace. Konkrétní vybrané prekurzory a produkty společně s retenčními časy jsou uvedeny v Tabulce 24. Stejnou metodou byl proměřen směsný roztok, kde byly úspěšně identifikovány všechny sledované analyty.

Při měření bylo vycházeno z nastavených výchozích podmínek analýzy, konkrétně kolizní tlak terčového plynu byl nastaven na 0,1 mTorr. Při tomto tlaku byly postupně zvyšovány kolizní energie jednotlivých analytů. Bylo zjištěno, že tento tlak byl nedostatečný (nedostatečná fragmentace), proto došlo k jeho zvýšení na 1,5 mTorr. Optimalizované kolizní energie pro jednotlivé analyty jsou uvedeny v Tabulce 24.

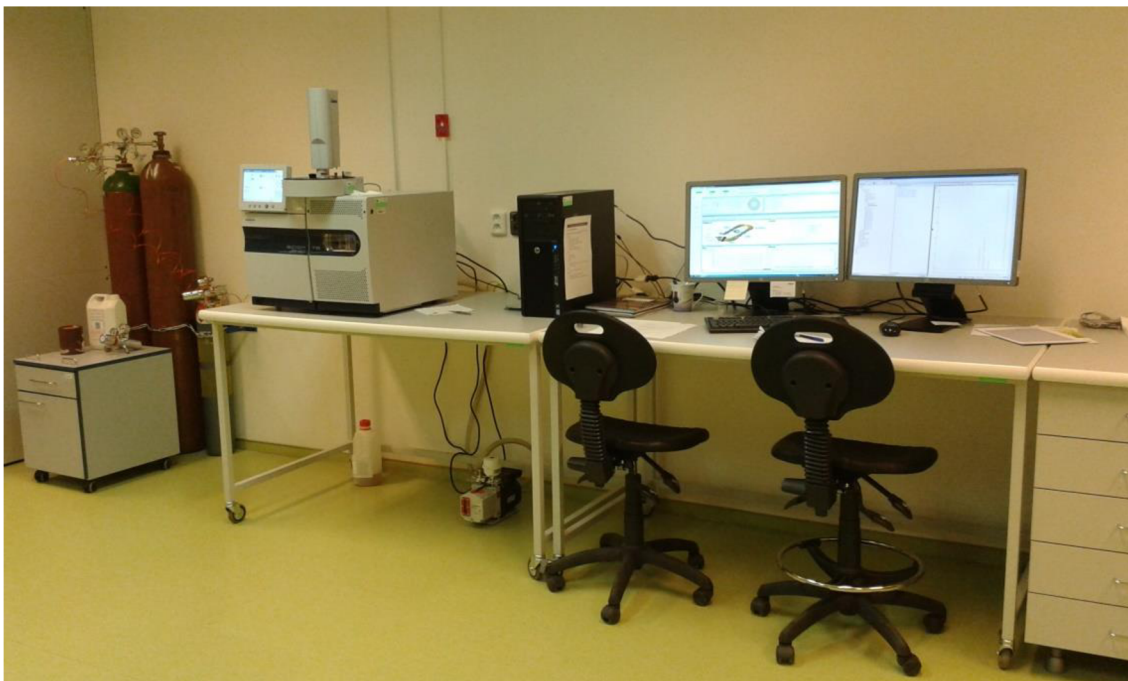
Tabulka 24: Parametry MRM

Sledovaný analyt	M _w (g/mol)*	Retenční čas (min)	MRM	Kolizní E
MCP-P	327,6	17,2	271→225	15 eV
MCPA	313,6	17,5	257→211	10 eV
MCPA-d ₃	316,6	17,5	260→214	10 eV
DP-P	348,1	17,7	291→245	10 eV
2,4-D	334,0	18,1	277→213	10 eV
MCPB	341,6	19,4	199→125	15 eV

*Molekulová hmotnost *terc-butyldimethylsilyl* derivátu.

Tabulka 25: Další parametry MS

mód	MRM, pozitivní polarita
kolizní (terčový) plyn	argon 5.0
nosný plyn	helium 6.0
optimalizovaný kolizní tlak	1,5 mTorr
rozsah skenovaných hmot (m/z)	100 – 400



Obrázek 21: Přístroj Bruker EVOQ™ GC Triple Quadrupole (TQ) s MS detekcí a autosamplérem CP-8400

3.8 Optimalizace podmínek derivatizace

Aby bylo možné sledované analyty stanovit pomocí GC, bylo nutné je převést na těkavější deriváty a to pomocí derivatizace. V rámci optimalizace derivatizace bylo nejprve vybráno vhodné derivatizační činidlo, následně byla proměřena různá doba působení, objem derivatizačního činidla a teplota, při které je nejvhodnější derivatizaci provádět.

Výběr vhodného derivatizačního činidla

Byla ověřena čtyři různá derivatizační činidla, konkrétně MTBSTFA, BSTFA, BSTFA+TMCS (99:1) a MSTFA. Do vialky s obsahem 1 ml směsného standardního roztoku bylo přidáno 20 μ l derivatizačního činidla. Následovala analýza pomocí GC/MS. Postup byl zopakován pro všechna derivatizační činidla.

Vliv doby působení derivatizačního činidla

Doba působení byla testována pro derivatizační činidlo MTBSTFA. V časech $t_0 = 5$ min, $t_1 = 30$ min, $t_2 = 4$ hod a $t_3 = 24$ hod byl proměřen standardní roztok o objemu 1 ml s přídatkem 20 μ l derivatizačního činidla MTBSTFA. Dále byly v čase $t_2 = 4$ hod a $t_3 = 24$ hod proměřena i zbylá tři derivatizační činidla, aby byl vyloučen fakt, že derivatizační reakce s analyty probíhá pomaleji.

Vliv přidaného množství derivatizačního činidla

Byl proměřen 1 ml standardního roztoku s šesti různými přídatky derivatizačního činidla MTBSTFA, a to 20, 40, 60, 80 a 100 μ l.

Teplota derivatizace

Po přidání 80 μ l derivatizačního činidla MTBSTFA k 1 ml standardního roztoku byla vialka protřepána a ponechána 30 min při konkrétní teplotě (23, 40, 60 a 70°C). Následně byl roztok analyzován pomocí GC/MS.

Všechny získané výsledky jsou interpretovány v kapitole 4.3. *Optimalizace podmínek derivatizace*.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Optimalizace SPE

Optimalizace extrakce na tuhé fázi byla prováděna na uměle kontaminované Milli-Q vodě okyselené na pH = 2. Do 200 ml okyselené Milli-Q vody bylo přidáno 100 µl směšného roztoku o koncentraci 100 ng/ml. Výsledný eluát byl pod dusíkem odpařen do sucha a odparek byl rozpuštěn v 1000 µl acetonu. Teoretická koncentrace všech analytů v roztoku činila 10 ng/ml.

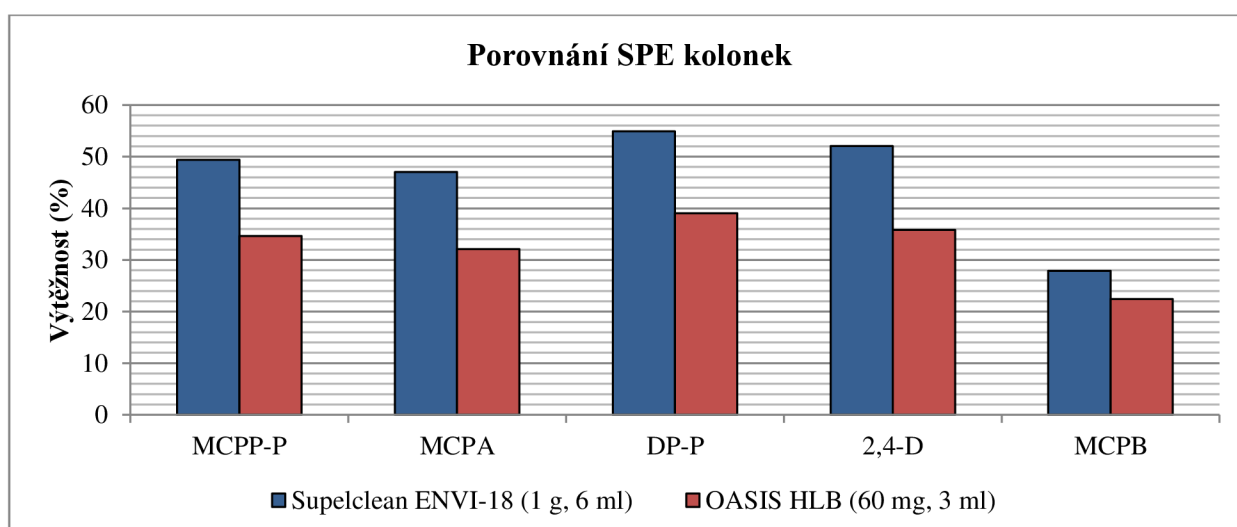
Naměřená koncentrace byla přepočítána na výtěžnost (%) a dle výsledných hodnot byla vybrána optimální extrakce. Výchozí podmínky SPE extrakce byly částečně převzaty z článku o stanovení herbicidů na bázi fenoxycarboxylových kyselin ve vodách [73].

Tabulka 26: Výchozí podmínky SPE extrakce

kondicionace	3 ml ethylacetátu 3 ml methanolu 3 ml Milli-Q vody okyselené na pH = 2
nanesení vzorku	200 ml přefiltrované povrchové a odpadní vody okyselené na pH = 2 (pomocí HCl)
sušení	30 min vzduchem
eluce	3 ml methanolu
odpaření	do sucha, pod dusíkem
rozpuštění odparku	1000 µl ethylacetátu

Výše uvedená SPE extrakce byla vyzkoušena na kolonkách Supelclean ENVI-18 (1 g, 6 ml) a OASIS HLB (60 mg, 3 ml). Bylo zjištěno, že výtěžnosti na obou kolonkách jsou poměrně malé (Graf 4), proto bylo nezbytné tuto extrakci dále optimalizovat. Výtěžnost byla vyšší na kolonkách Supelclean ENVI-18 (1 g, 6 ml), proto byly použity k dalším krokům optimalizace SPE.

Graf 4: Porovnání SPE kolonek

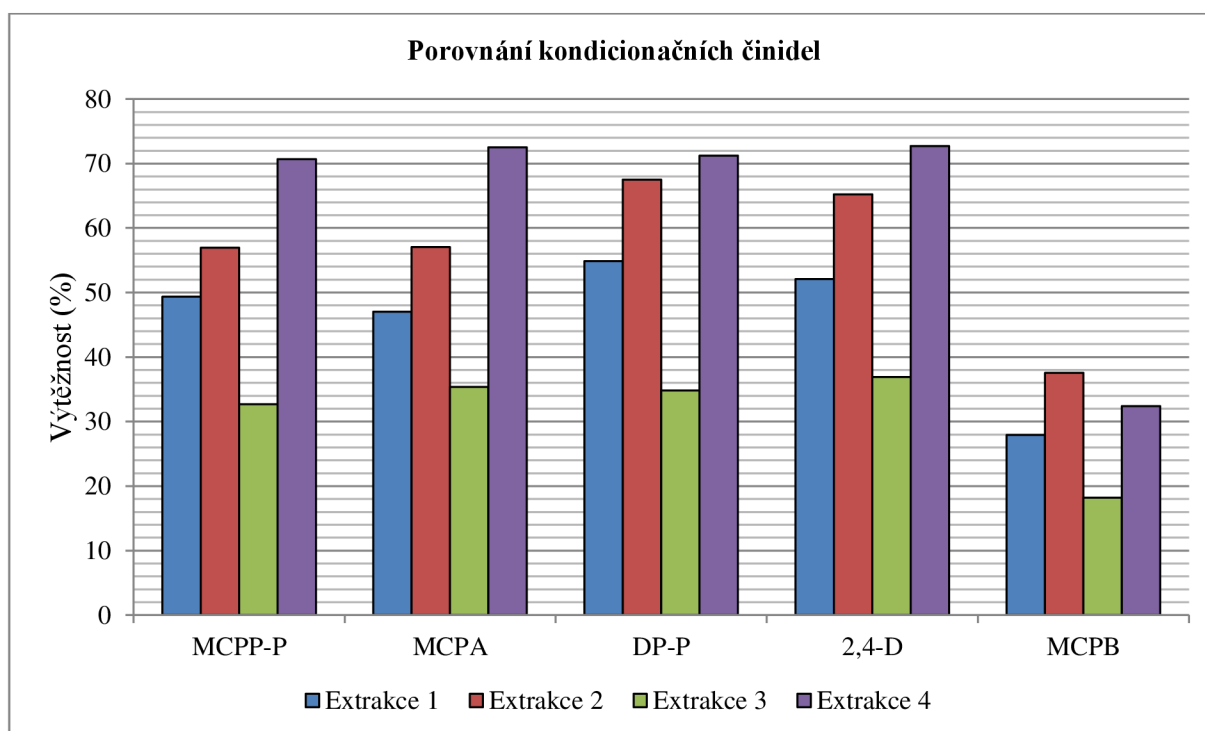


Jako další byl optimalizován kondicionační krok. V Tabulce 27 jsou shrnuta testovaná kondicionační činidla a jejich objemy.

Tabulka 27: Optimalizace kondicionace

	Extrakce 1	Extrakce 2	Extrakce 3	Extrakce 4
kondicionace	1 ml ethylacetátu 1 ml methanolu 3 ml Milli-Q vody (pH = 2)	1 ml acetonu 1 ml methanolu 3 ml Milli-Q vody (pH = 2)	1 ml acetonitrilu 1 ml methanolu 3 ml Milli-Q vody (pH = 2)	2 ml methanolu 3 ml Milli-Q vody (pH = 2)
objem vzorku	200 ml, pH = 2	200 ml, pH = 2	200 ml, pH = 2	200 ml, pH = 2
sušení	30 min vzduchem	30 min vzduchem	30 min vzduchem	30 min vzduchem
eluce	3 ml methanolu	3 ml methanolu	3 ml methanolu	3 ml methanolu
odpaření	do sucha, pod N ₂	do sucha, pod N ₂	do sucha, pod N ₂	do sucha, pod N ₂
rozpuštění odparku	1000 µl ethylacetátu	1000 µl ethylacetátu	1000 µl ethylacetátu	1000 µl ethylacetátu

Graf 5: Porovnání výtěžností při použití různých kondicionačních činidel

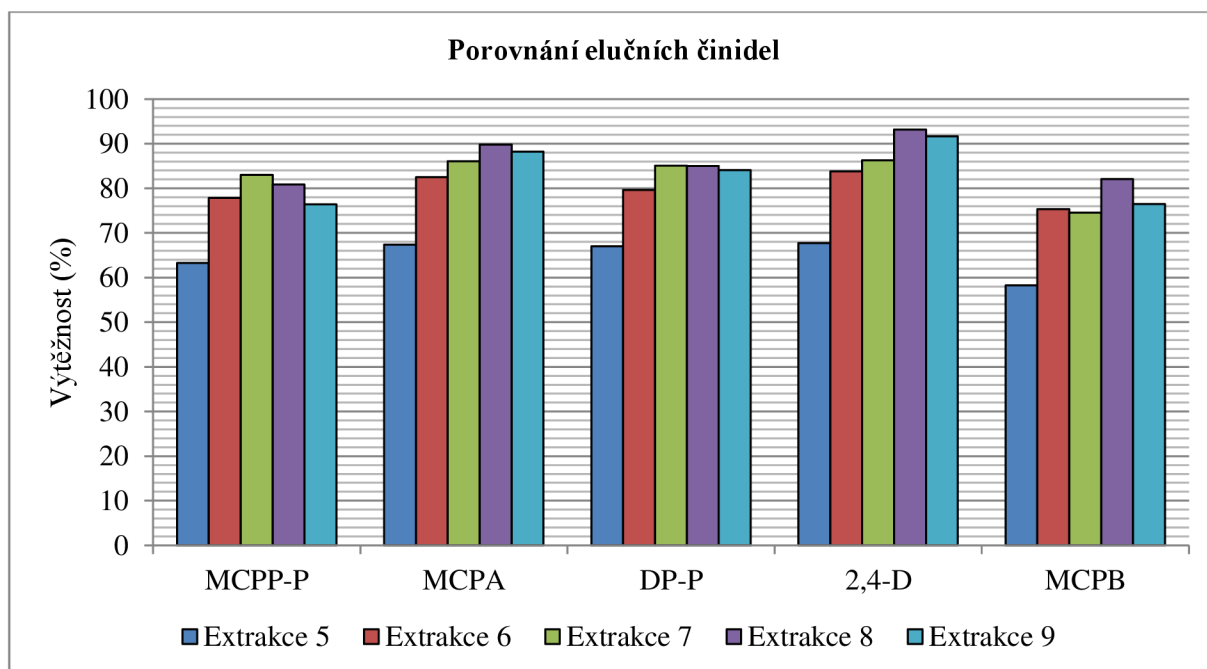


Z Grafu 5 vyplývá, že pro další stanovení je nejvhodnější Extrakce 4. Nicméně pro analyt MCPB byla vhodnější Extrakce 2, kde byl kromě methanolu ke kondicionaci použit i aceton. V dalším kroku byla vyzkoušena různá eluční činidla. Konkrétně methanol, aceton, acetonitril, kombinace acetonu a acetonitrilu a kombinace methanolu a acetonu. V následující Tabulce 28 jsou shrnuty konkrétní použitá činidla a objemy. Jako optimální kondicionační krok bylo použito 2 ml methanolu a 3 ml Milli-Q (pH = 2). Navíc bylo změněno rozpouštědlo, ve kterém byl po odpaření odparek rozpuštěn, jelikož na vialce ulpívaly zbytky analytů. Odparek byl rozpuštěn v 1 ml acetonu.

Tabulka 28: Optimalizace elučního činidla

	Extrakce 5	Extrakce 6	Extrakce 7	Extrakce 8	Extrakce 9
kondicionace	2 ml methanolu 3 ml Milli-Q (pH = 2)	2 ml methanolu 3 ml Milli-Q (pH = 2)	2 ml methanolu 3 ml Milli-Q (pH = 2)	2 ml methanolu 3 ml Milli-Q (pH = 2)	2 ml methanolu 3 ml Milli-Q (pH = 2)
objem vzorku	200 ml, pH = 2	200 ml, pH = 2	200 ml, pH = 2	200 ml, pH = 2	200 ml, pH = 2
sušení	30 min vzduchem	30 min vzduchem	30 min vzduchem	30 min vzduchem	30 min vzduchem
eluce	2x3 ml methanolu	2x3 ml acetonu	2x3 ml acetonitrilu	3 ml acetonu 3 ml acetonitrilu	3 ml methanolu 3 ml acetonu
odpaření	do sucha, pod N ₂	do sucha, pod N ₂	do sucha, pod N ₂	do sucha, pod N ₂	do sucha, pod N ₂
rozpuštění odparku	1000 µl acetonu	1000 µl acetonu	1000 µl acetonu	1000 µl acetonu	1000 µl acetonu

Graf 6: Porovnání elučních činidel



Jako nejlepší byla zvolena Extrakce 8, kde bylo dosaženo u čtyř analytů nejvyšší výtěžnosti. V Tabulce 29 jsou shrnuty optimalizované podmínky SPE extrakce, které byly použity pro měření reálných vzorků povrchové a odpadní vody.

Tabulka 29: Optimalizované podmínky SPE extrakce

kondicionace	2x2 ml methanolu 2x3 ml Milli-Q vody (pH = 2)
nanesení vzorku	200 ml přefiltrované povrchové a odpadní vody okyselené na pH = 2 (pomocí HCl)
sušení	30 min vzduchem
eluce	3 ml acetonu 3 ml acetonitrilu
odpaření	do sucha, pod N ₂
rozpuštění odparku	1000 µl acetonu

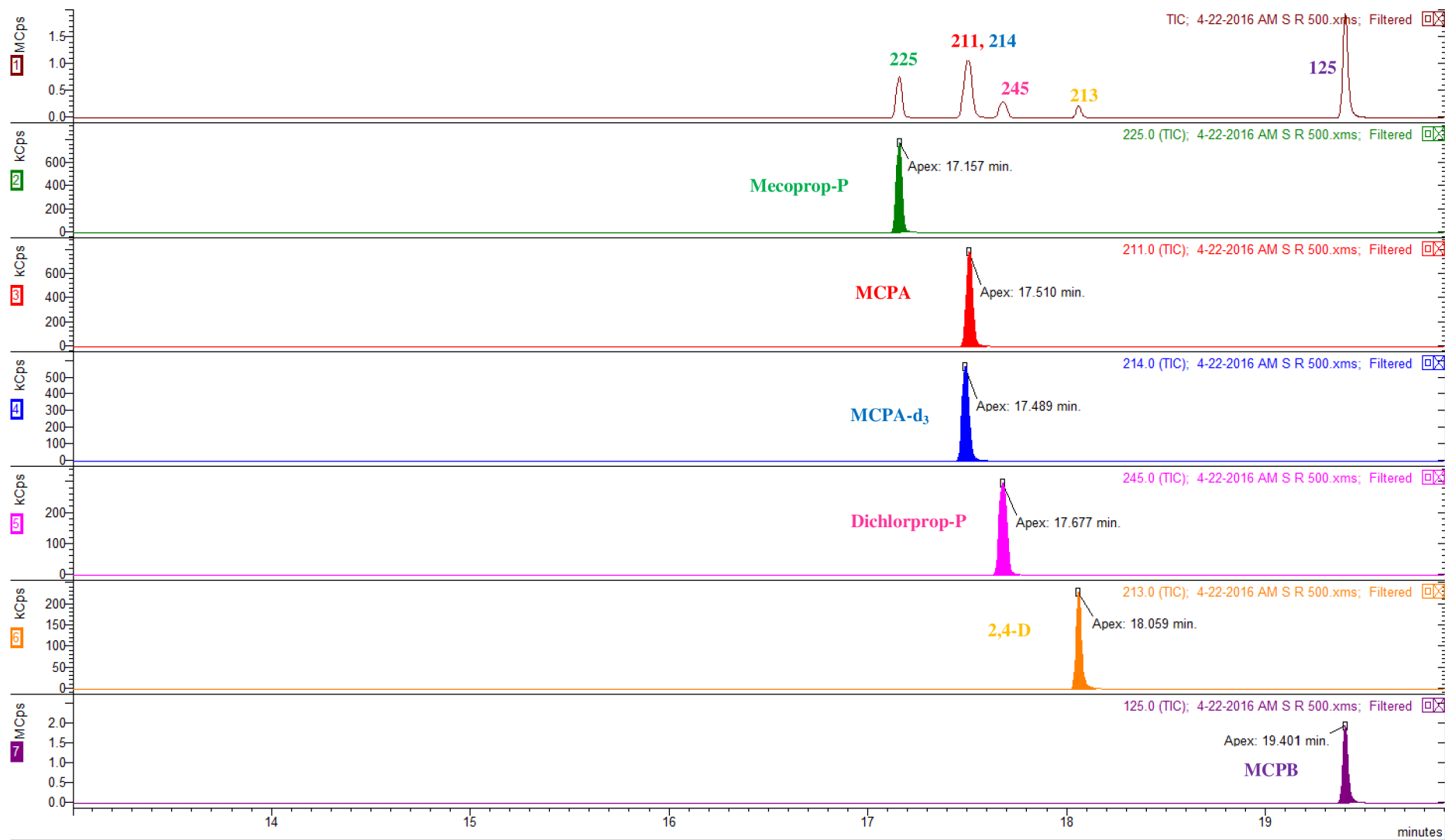
4.2 Optimalizace GC/MS/MS analýzy

Podmínky MS/MS analýzy, konkrétně kolizní energie a tlak kolizního plynu, byly optimalizovány. Na Obrázku 22 je naměřený celkový proud (TIC) při optimalizovaném MRM měření směsného roztoku a vybrané jednotlivé produkty fragmentace. V Tabulce 30 jsou uvedeny údaje z hmotnostních spekter. V Příloze 3 jsou uvedena hmotnostní spektra a fragmentace jednotlivých analytů.

Tabulka 30: Retenční časy a údaje z MS spekter

Sledovaný analyt	M _w (g/mol)*	Retenční čas	MRM	Základní pík (m/z) Kvantifikační ionty	Fragmentové píky (m/z)
MCPP-P	327,6	17,2	271→225	271-273	225-227
MCPA	313,6	17,5	257→211	257-259	229-231, 211-213
MCPA-d ₃	316,6	17,5	260→214	260-262	213-215
DP-P	348,1	17,7	291→245	291-293	245-247, 129
2,4-D	334,0	18,1	277→213	277-279	249-251, 213-215
MCPB	341,6	19,4	199→125	199-201	285-287, 243-245, 125

*Molekulová hmotnost *terc*-butyldimethylsilyl derivátu.



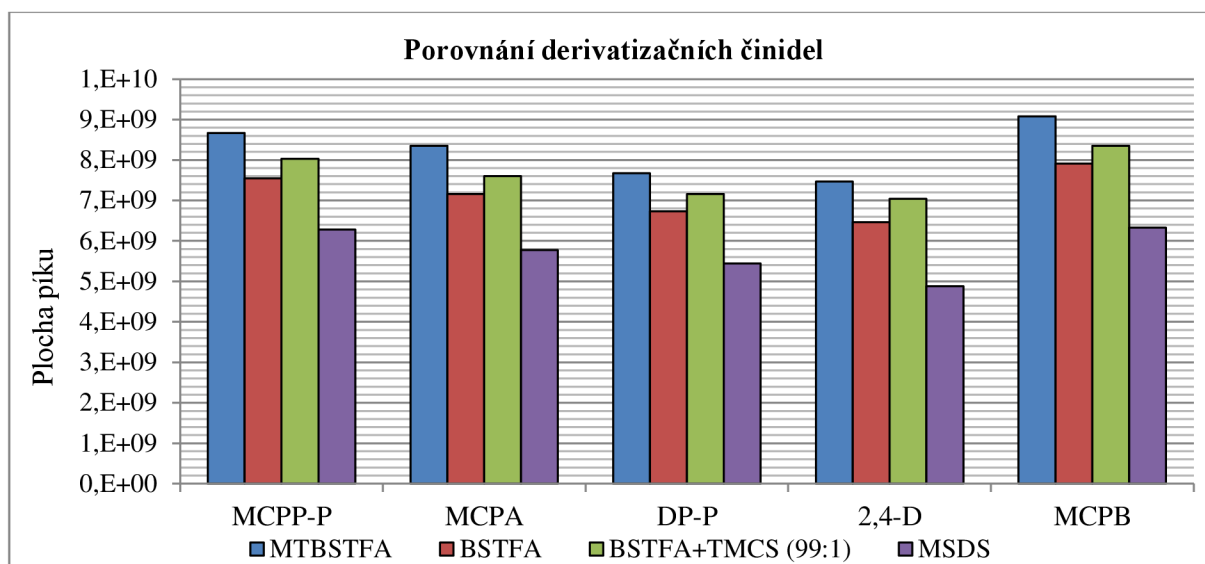
Obrázek 22: Chromatogram směšného roztoku o koncentraci 500 ng/ml

4.3 Optimalizace podmínek derivatizace

4.3.1 Výběr vhodného derivatizačního činidla

V Grafu 7 jsou uvedeny naměřené plochy píků pro jednotlivá testovaná derivatizační činidla. Je zřejmé, že jako nejvhodnější se jeví derivatizační činidlo MTBSTFA.

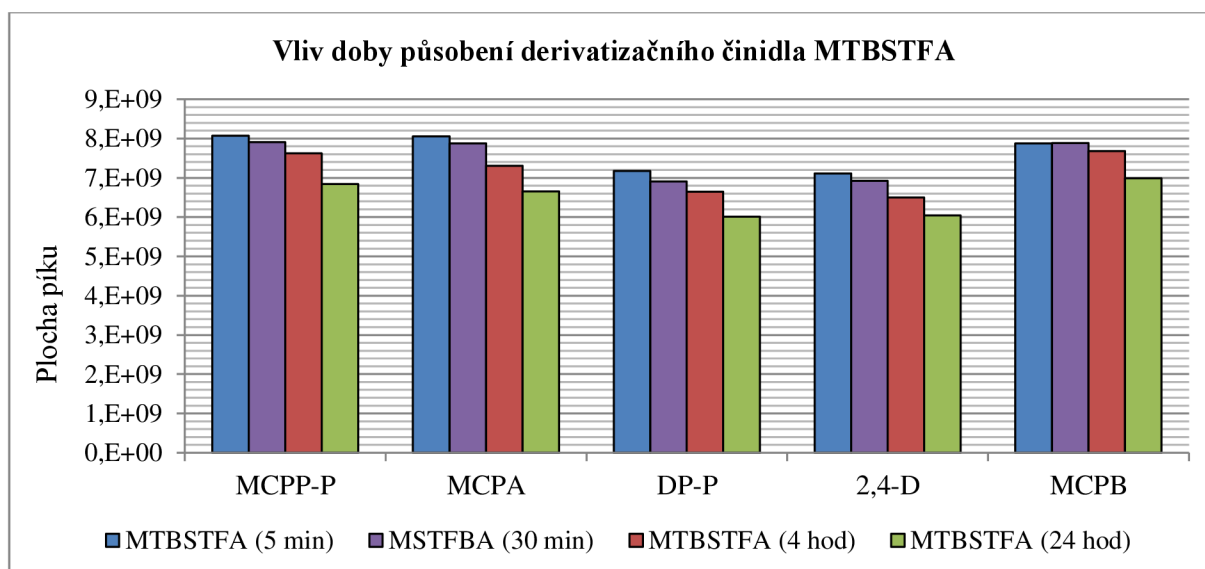
Graf 7: Porovnání jednotlivých derivatizačních činidel



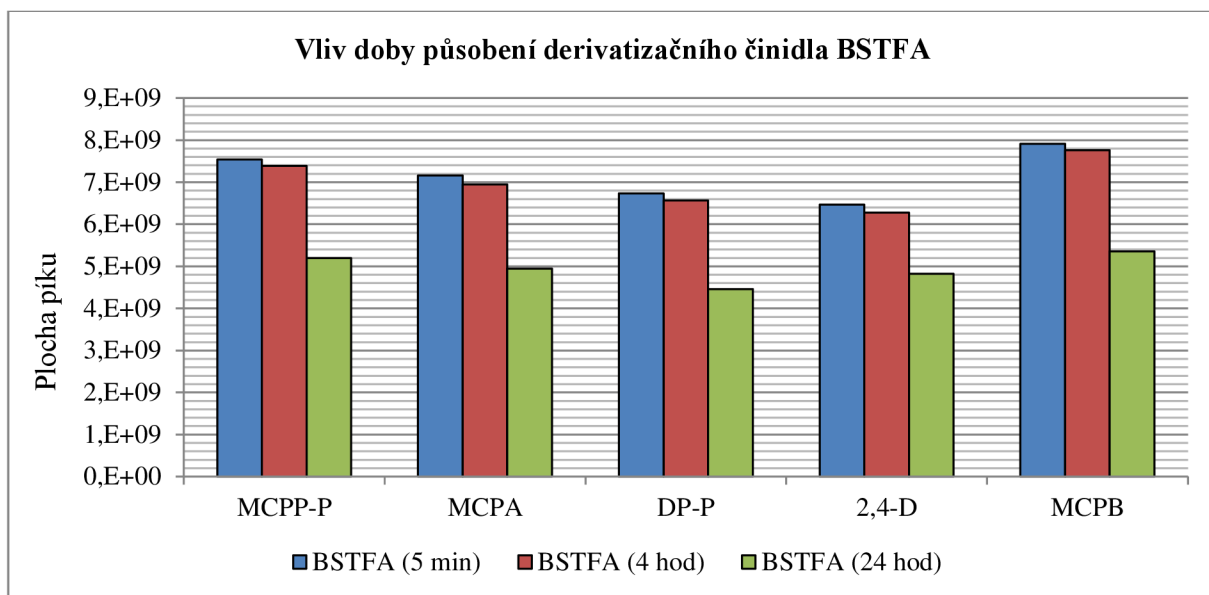
4.3.2 Vliv doby působení derivatizačního činidla

Dalším optimalizovaným parametrem byla doba působení derivatizačního činidla. Je důležité zjistit, jak dlouho reakce trvá, aby bylo dosaženo co nejpřesnějších výsledků při měření. V následujících Grafech (8-11) je pro každé derivatizační činidlo optimalizována doba působení. Byly proměřeny tři různé časy pro všechna derivatizační činidla, aby nedošlo k tomu, že nějaké derivatizační činidlo začne působit až za delší čas. Pro MTBSTFA byly proměřeny časy čtyři.

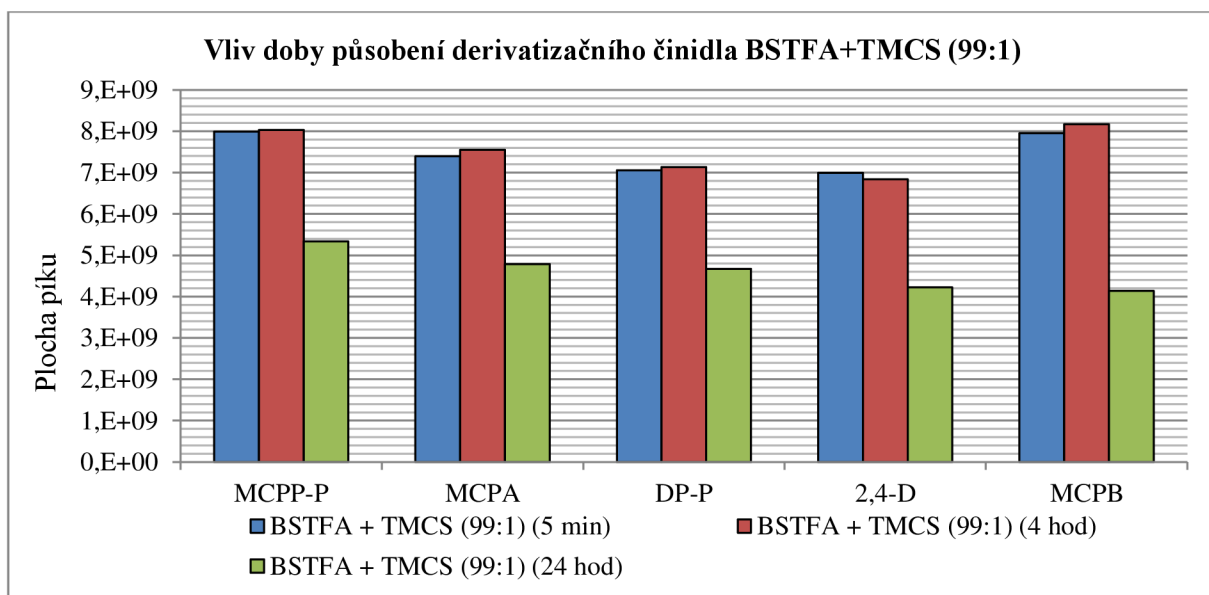
Graf 8: Optimalizace doby působení – MTBSTFA



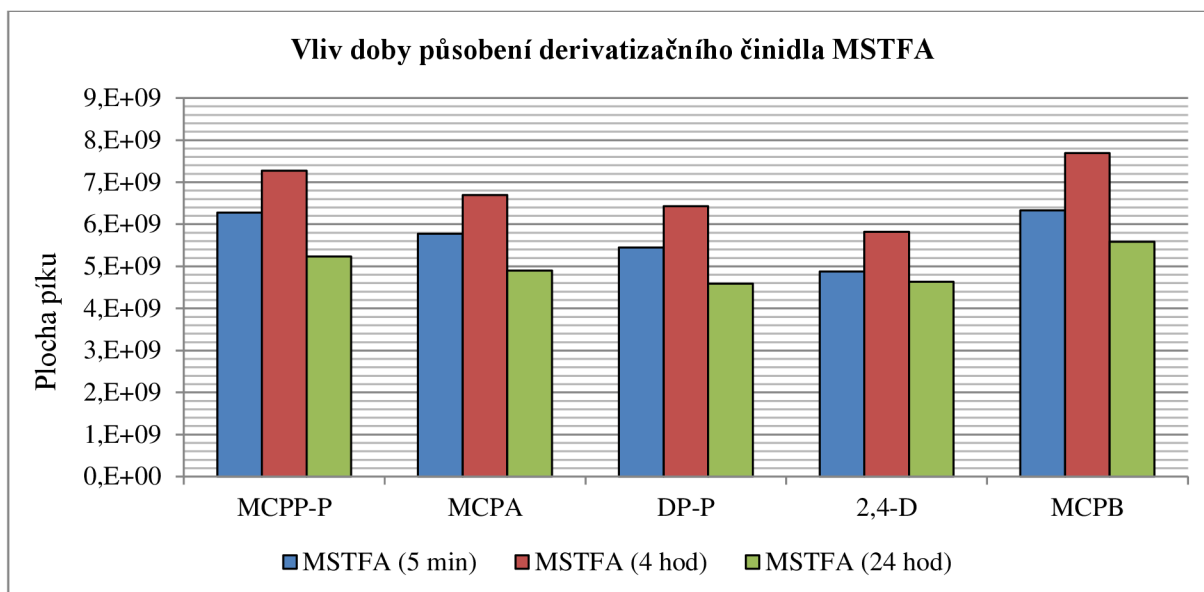
Graf 9: Optimalizace doby působení – BSTFA



Graf 10: Optimalizace doby působení – BSTFA+TMCS (99:1)



Graf 11: Optimalizace doby působení – MSTFA

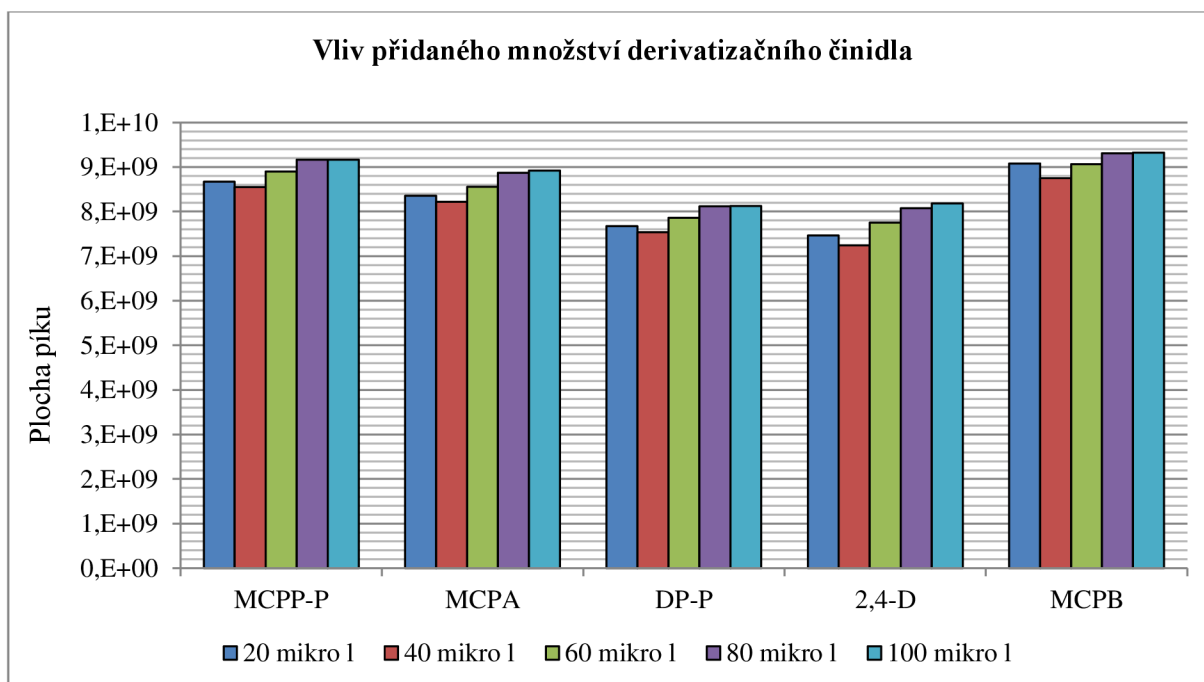


Nejlepší výsledky byly dosaženy při použití derivatizačního činidla MTBSTFA a při 5 minutách derivatizace.

4.3.3 Vliv přidaného množství derivatizačního činidla

Předposledním optimalizovaným parametrem derivatizace bylo množství derivatizačního činidla. K směsnému roztoku bylo přidáno 20, 40, 60, 80 a 100 μ l derivatizačního činidla MTBSTFA a jednotlivé vzorky byly proměřeny. Z Grafu 12 vyplývá, že pro analyt MCPP-P, MCPB a DP-P nemá vliv větší množství činidla než 80 μ l. U analytů MCPA a 2,4-D došlo ke zvětšení plochy píku v závislosti na vyšším přídávku činidla. Nicméně pro další měření bylo bráno 80 μ l jako optimální.

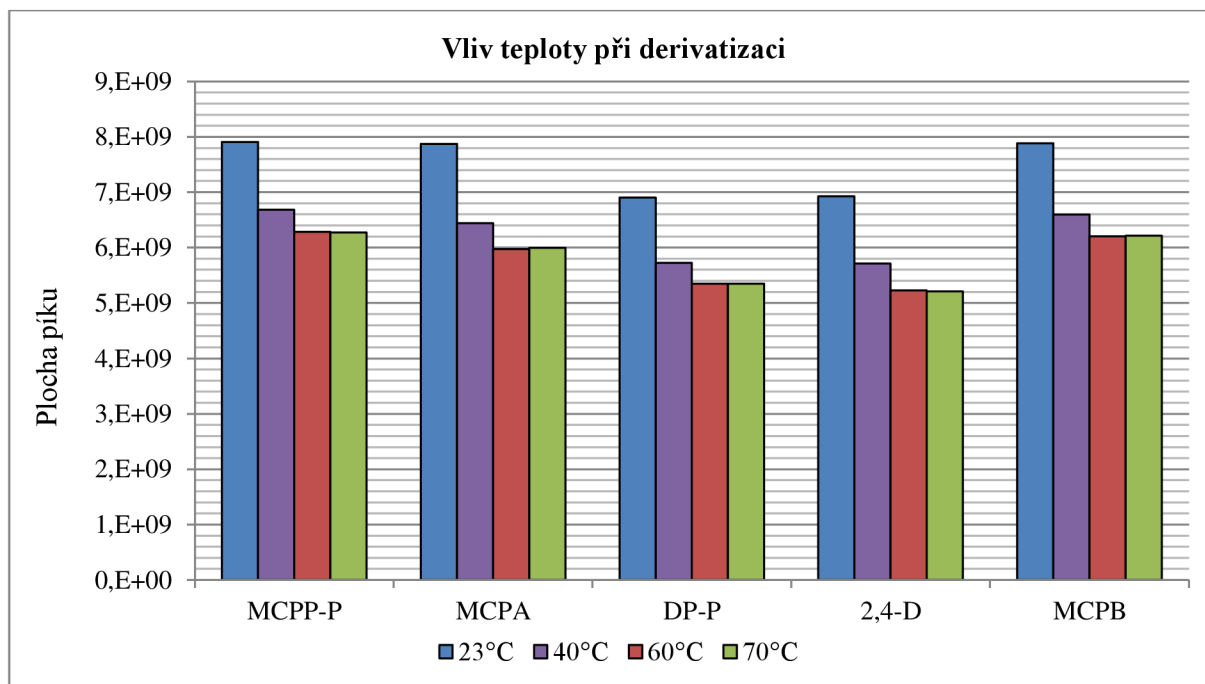
Graf 12: Optimalizace přidaného množství derivatizačního činidla MTBSTFA



4.3.4 Teplota derivatizace

Nakonec byl proměřen směsný roztok s přidavkem 80 µl derivatizačního činidla MTBSTFA při laboratorní teplotě a dále při 40 °C, 60 °C a 70 °C. Bylo zjištěno, že nejlepší je derivatizovat při teplotě laboratoře (Graf 13).

Graf 13: Optimalizace teploty derivatizace



V Tabulce 31 jsou shrnuty všechny optimalizované parametry, které byly následně použity při analýze reálných vzorků.

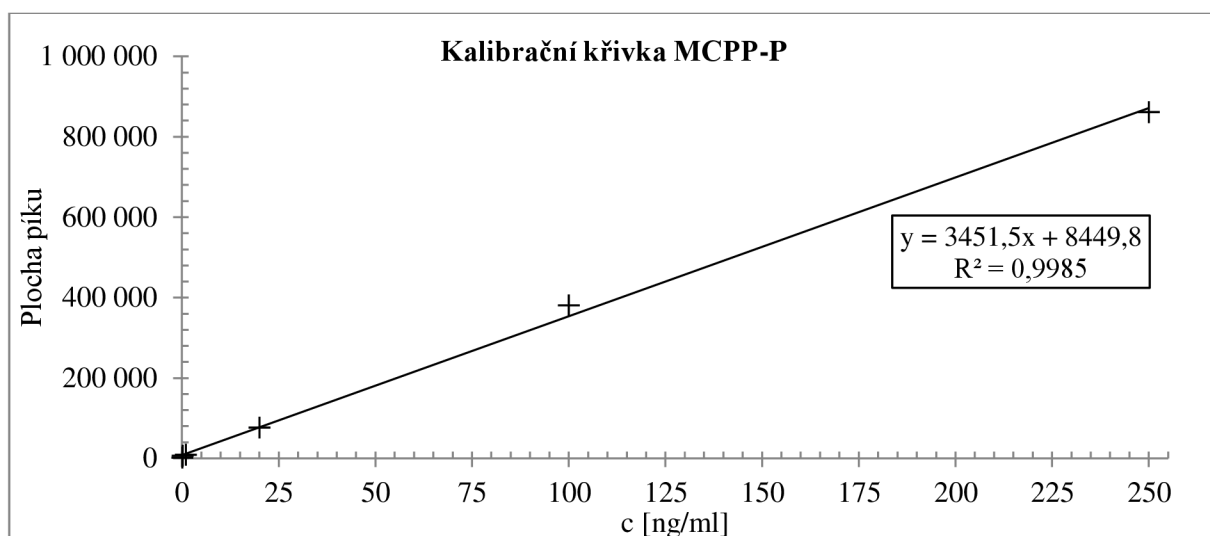
Tabulka 31: Optimalizované podmínky derivatizace

derivatizační činidlo	MTBSTFA
doba působení	5 minut
množství činidla	80 µl
teplota derivatizace	pokojevá teplota

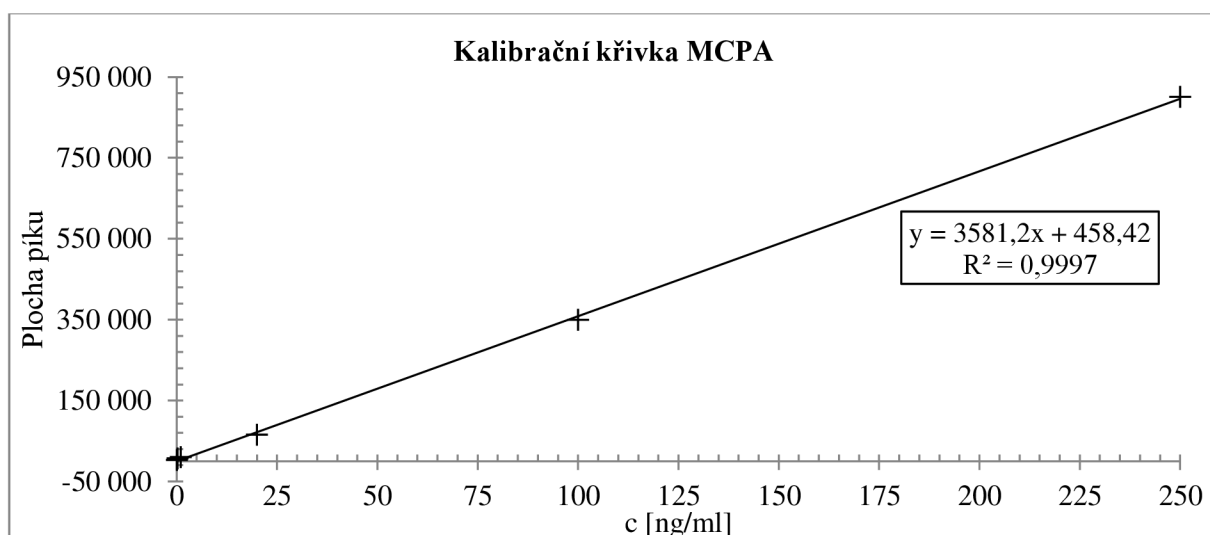
4.4 Vyhodnocení a kvantifikace sledovaných herbicidů

Pro stanovení reálných vzorků herbicidů v povrchových a odpadních vodách byly sestaveny kalibrační grafy závislosti plochy píku na koncentraci analytu. Jednotlivé kalibrační roztoky byly připraveny ředěním pracovního roztoku (kapitola 3. 4. 4). Konkrétně byly připraveny roztoky o koncentracích 250; 100; 20; 1; 0,2; 0,1 ng/l. Kalibrační závislosti jednotlivých analytů, rovnice regrese a koeficient R^2 jsou uvedeny v následujících Grafech 14 – 19. Na Obrázku 23 je znázorněn chromatogram kalibračního roztoku o koncentraci 0,1 ng/ml.

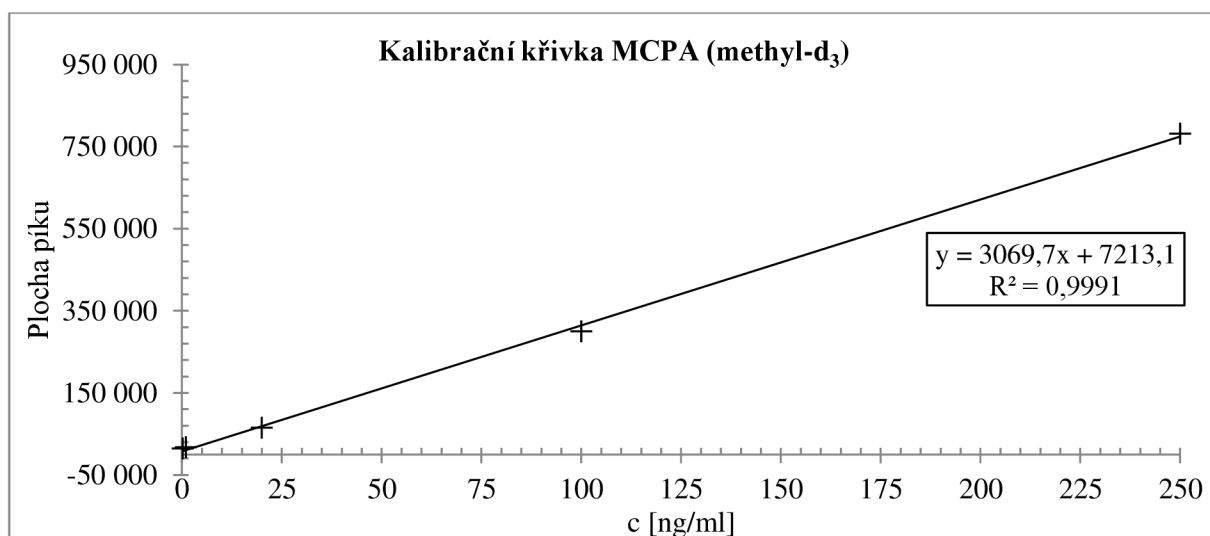
Graf 14: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci – MCP-P



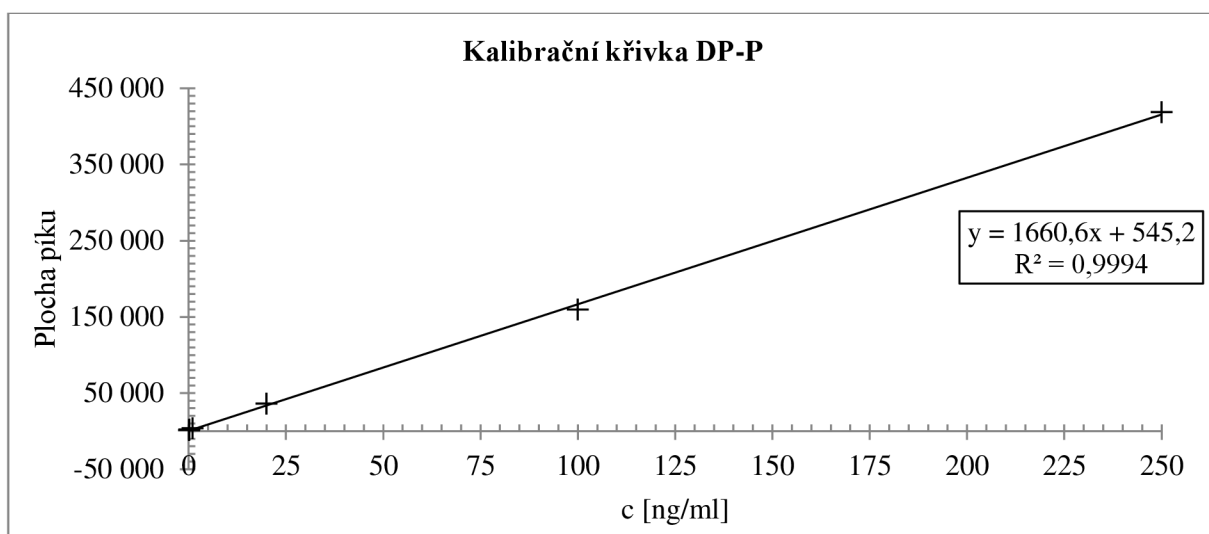
Graf 15: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci – MCPA



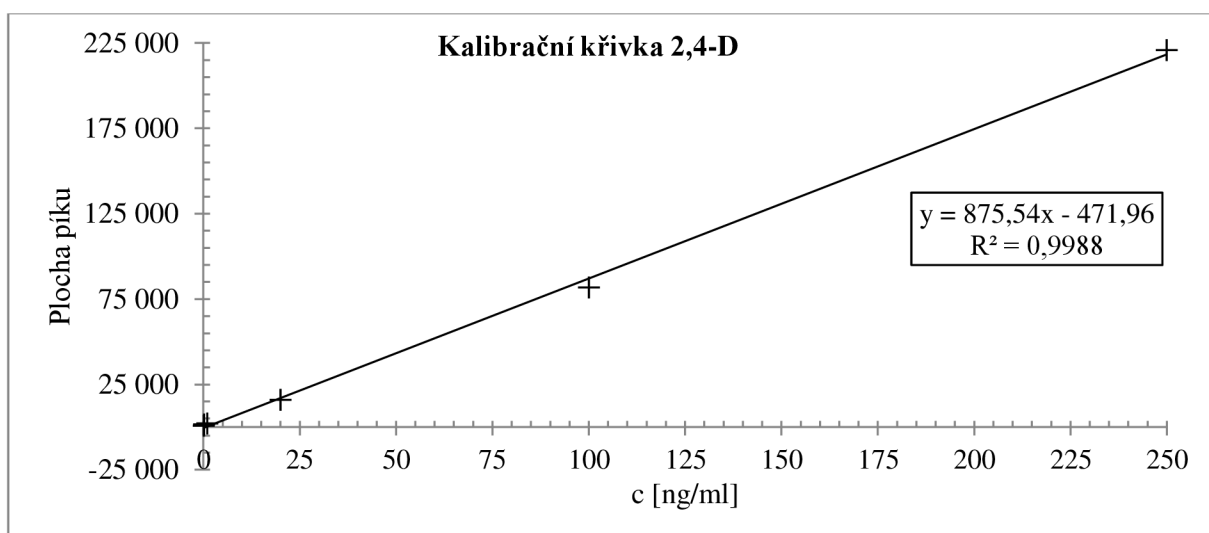
Graf 16: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci – MCPA-d₃



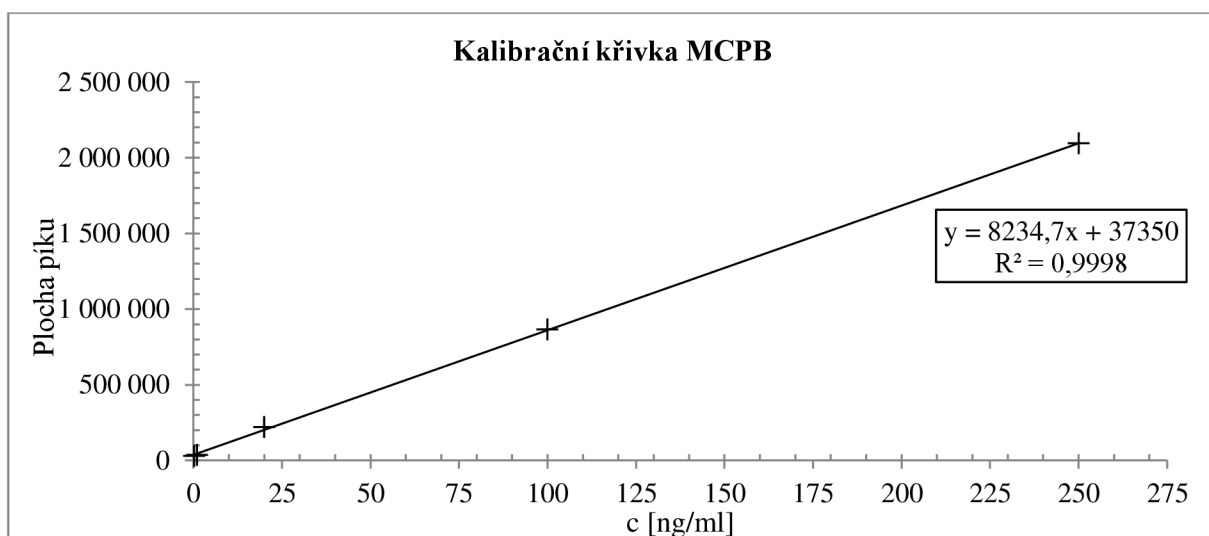
Graf 17: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci – DP-P



Graf 18: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci – 2,4-D



Graf 19: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci – MCPB



Dále byla stanovena pro každý sledovaný analyt mez stanovitelnosti (LOQ – Limit of Quantification) a mez detekce (LOD – Limit of Detection). Tyto hodnoty (Tabulka 32) byly vypočteny dle vztahů (4-1) a (4-2). Veličiny se stanovují odečtením výšky píku každého analytu z nejnižšího bodu kalibrace (S) a vybráním 15 píků ze šumu základní linie (N = průměr) [78]. Hodnoty S/N byly vypočteny vyhodnocovacím programem.

$$LOQ = \frac{10 \cdot c}{\frac{S}{N}} \quad (4-1)$$

$$LOD = \frac{3 \cdot c}{\frac{S}{N}} \quad (4-2)$$

Tabulka 32: Limity detekce a kvantifikace pro sledované analyty

	LOD [ng/l]	LOQ [ng/l]
MCP-P	0,465 8	1,552 8
MCPA	0,038 9	0,129 5
MCPA-d₃	0,105 6	0,352 1
DP-P	1,098 9	3,663 0
2,4-D	0,168 9	0,563 0
MCPB	0,211 1	0,703 7

4.5 Reálné vzorky

V této práci byly sledovány herbicidy na bázi fenoxycarboxylových kyselin, a to v povrchových vodách z řek v okolí města Jaroměř, dále odpadní vody z přítoku a odtoku dvou ČOV, konkrétně ČOV Jaroměř a ČOV Modřice. V rámci sledování na ČOV Modřice byla odebrána povrchová voda z řeky Svratky, která je recipientem, ve vzdálenosti cca 1 km před a pod ČOV.

Vzorky odpadní vody byly odebírány pracovníky ČOV jako 24hodinové sléváné. Po dopravení do laboratoře byla odpadní i povrchová voda zfiltrována. Po filtraci bylo upraveno pH na hodnotu 2 a vzorky byly ponechány v lednici až do započítání SPE. Vzorky byly zpracovány pomocí optimalizované metody SPE, následně derivatizovány a analyzovány pomocí optimalizované metody GC/MS/MS.

4.5.1 Vliv matrice

Výpočtem matričního efektu byl zjištěn vliv matrice na sledované herbicidy. Matriční efekt se vypočítá porovnáním plochy píku sledovaného analytu u reálného vzorku s plochou píku analytu z modelového stanovení (4-3) [78].

$$ME\% = \frac{\text{plocha píku (reálný vzorek)}}{\text{plocha píku (modelové stanovení)}} \cdot 100\% \quad (4-3)$$

Matriční efekt byl zjištěn nejprve pro vodu povrchovou a následně pro vodu odpadní, přítok a odtok zvlášť. Do vzorku odpadní a povrchové vody byl přidán směsný roztok o koncentraci 20 µg/ml, stejně tak i do Milli-Q vody (modelové stanovení). V případě, že není zjištěn žádný matriční efekt, hodnota ME je rovna 100 %.

V Tabulce 33 jsou uvedeny průměrné hodnoty matričních efektů pro sledované analyty. Byl zjištěn rozdílný vliv matrice v povrchové a odpadní vodě a taky na přítoku a odtoku z ČOV. U povrchové vody byl zjištěn nízký vliv matrice u všech sledovaných analytů. Naopak na přítoku do ČOV byl naměřen střední vliv matrice. Na odtoku z ČOV byl vyšší vliv matrice pouze u analytu 2,4-D. U ostatních byl střední až nízký.

Tabulka 33: Průměrné hodnoty matričních efektů pro sledované herbicidy

	Povrchová voda	Přítok ČOV	Odtok ČOV
MCPP-P	76,8 %	57,8 %	67,6 %
MCPA	77,1 %	51,0 %	71,7 %
DP-P	87,9 %	66,6 %	68,6 %
2,4-D	77,7 %	55,2 %	40,5 %
MCPB	75,7 %	62,5 %	58,0 %

4.5.2 Výtěžnost SPE extrakce

V Tabulce 34 je uvedena průměrná výtěžnost SPE extrakce. Tyto hodnoty byly získány na základě 6 shodných měření za použití Milli-Q vody s přidavkem sledovaných analytů.

Tabulka 34: Výtěžnost SPE extrakce

	1	2	3	4	5	6	průměr
MCPP-P	80,8 %	77,1 %	83,3 %	79,6 %	80,7 %	79,8 %	80,2 %
MCPA	89,8 %	85,3 %	88,7 %	90,8 %	88,6 %	89,4 %	88,8 %
DP-P	85,0 %	79,8 %	84,7 %	84,7 %	84,3 %	82,6 %	83,5 %
2,4-D	93,2 %	87,0 %	93,0 %	93,4 %	91,2 %	92,4 %	91,7 %
MCPB	82,1 %	78,6 %	81,7 %	81,5 %	81,2 %	80,7 %	81,0 %

4.5.3 ČOV Jaroměř, řeky Labe, Úpa, Metuje; ČOV Brno – Modřice a řeka Svratka

Koncentrace sledovaných analytů v reálných vzorcích povrchové a odpadní vody byla vyhodnocena na základě kalibračních závislostí.

Tabulka 35: Stanovené koncentrace v reálných vzorcích povrchové a odpadní vody (11. 4. 2016)

11. 4. 2016 - pondělí	Koncentrace analytů (ng/l)				
	MCPP-P	MCPA	DP-P	2,4-D	MCPB
<i>Labe</i>					
• Brod n/L	5,55	20,87	6,61	96,8	<LOD
• Heřmanice	13,94	21,55	5,38	87,84	0,53
<i>Úpa</i>					
• Zvole	9,94	16,16	3,39	76,87	1,01
• Železný most	8,53	15,22	4,56	65,62	1,29
<i>Metuje</i>					
• Šestajovice	0,72	13,07	1,73	11,71	<LOD
• Pod Rychnovkem	2,47	16,79	5,04	17,21	0,46
<i>Soutok Labe-Úpa</i>	11,82	23,24	13,12	98,19	0,54
<i>Soutok Labe-Metuje</i>	9,60	21,50	5,80	88,90	1,20
<i>ČOV Jaroměř</i>					
• přítok	–	–	–	–	–
• odtok	4,93	24,81	5,16	14,75	0,22

Tabulka 36: Stanovené koncentrace v reálných vzorcích povrchové a odpadní vody (18. 4. 2016)

18. 4. 2016 - pondělí	Koncentrace analytů (ng/l)				
	MCPP-P	MCPA	DP-P	2,4-D	MCPB
<i>Labe</i>					
• Brod n/L	3,76	17,53	4,03	85,89	0,24
• Heřmanice	11,49	18,84	4,18	72,19	0,62
<i>Úpa</i>					
• Zvole	1,23	11,53	4,75	63,40	0,48
• Železný most	3,39	13,94	9,04	42,92	0,34
<i>Metuje</i>					
• Šestajovice	0,48	15,71	1,34	10,25	<LOD
• Pod Rychnovkem	1,27	13,46	3,91	20,14	0,37
<i>Soutok Labe-Úpa</i>	12,56	22,55	10,97	58,09	1,05
<i>Soutok Labe-Metuje</i>	14,02	22,62	6,69	30,51	0,84
<i>ČOV Jaroměř</i>					
• přítok	15,49	49,28	17,93	34,76	0,84
• odtok	9,35	27,80	6,08	19,13	0,73

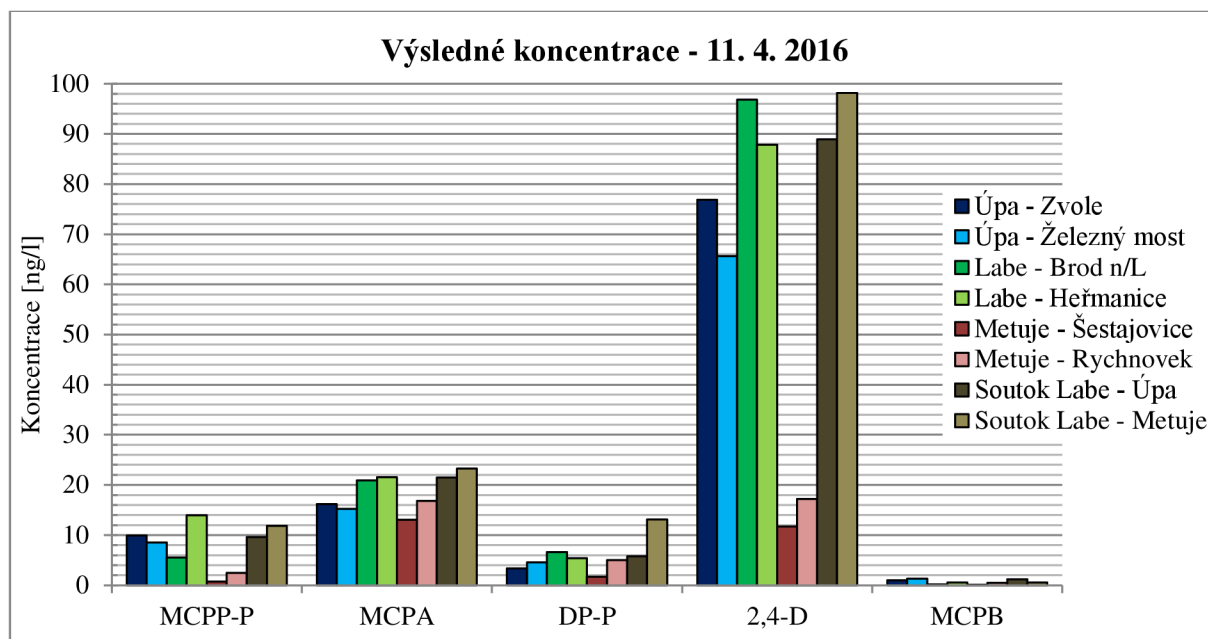
Tabulka 37: Stanovené koncentrace v reálných vzorcích povrchové a odpadní vody

1. sledování (19. 4. – 20. 4. 2016)	Koncentrace analytů (ng/l)				
	MCPPP-P	MCPA	DP-P	2,4-D	MCPB
<i>ČOV Modřice</i>					
• přítok (19. 4.)	6,27	22,18	6,34	24,56	2,52
• odtok (20. 4.)	3,50	8,54	3,48	13,10	0,47
• před ČOV (20. 4.)	10,05	26,44	9,09	30,65	1,76
• pod ČOV (20. 4.)	11,03	28,51	7,02	27,42	2,28
2. sledování (21. 4. – 22. 4. 2016)	Koncentrace analytů (ng/l)				
	MCPPP-P	MCPA	DP-P	2,4-D	MCPB
<i>ČOV Modřice</i>					
• přítok (19. 4.)	3,54	17,82	3,96	16,92	1,06
• odtok (20. 4.)	0,76	13,10	2,26	12,75	<LOD
• před ČOV (20. 4.)	4,04	9,25	4,57	18,99	1,13
• pod ČOV (20. 4.)	6,36	22,45	7,17	22,89	1,34

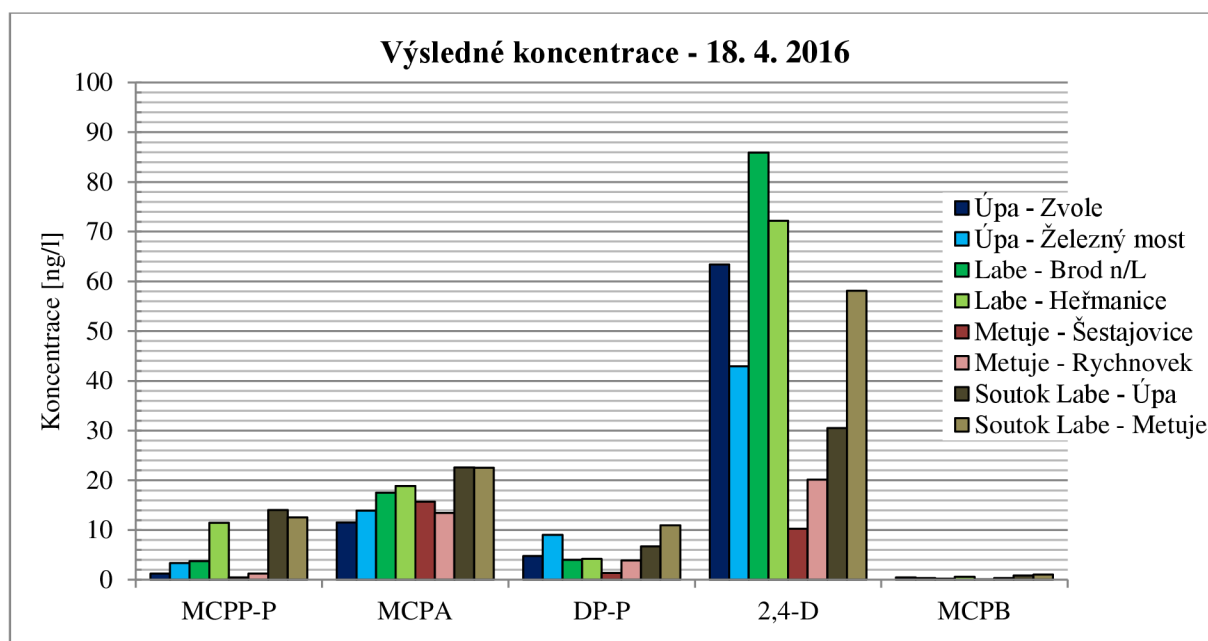
V Tabulkách 35 – 37 jsou uvedeny výsledné koncentrace jednotlivých analytů. Naměřené koncentrace se pro jednotlivé toky různí. Nelze s určitostí říct, že by nějaký tok byl ovlivněn více či méně zemědělsky obdělávanou půdou. Zvýšené koncentrace analytů (MCPA, 2,4-D) v řekách v okolí Jaroměře mohly být způsobeny faktem, že v době odběrů i před nimi intenzivně přšelo a došlo ke splachům z polí.

V nízkých koncentracích byly ve vzorcích kvantifikovány MCPPP-P, DP-P a MCPB. V nejvyšší koncentraci (98,19 ng/l) byl stanoven 2,4-D 11. 4. 2016 ve vzorku, který byl odebraný za soutokem Labe a Úpy, v nejnižší koncentraci (0,22 ng/l) MCPB na odtoku z ČOV Jaromeř. V Labi byly analyty prokázány v nejvyšších koncentracích, v Metuji naopak v nejnižších. Naměřená data jsou znázorněna v Grafech 20 a 21.

Graf 20: Výsledné koncentrace; řeky v okolí Jaroměře, 11. 4. 2016

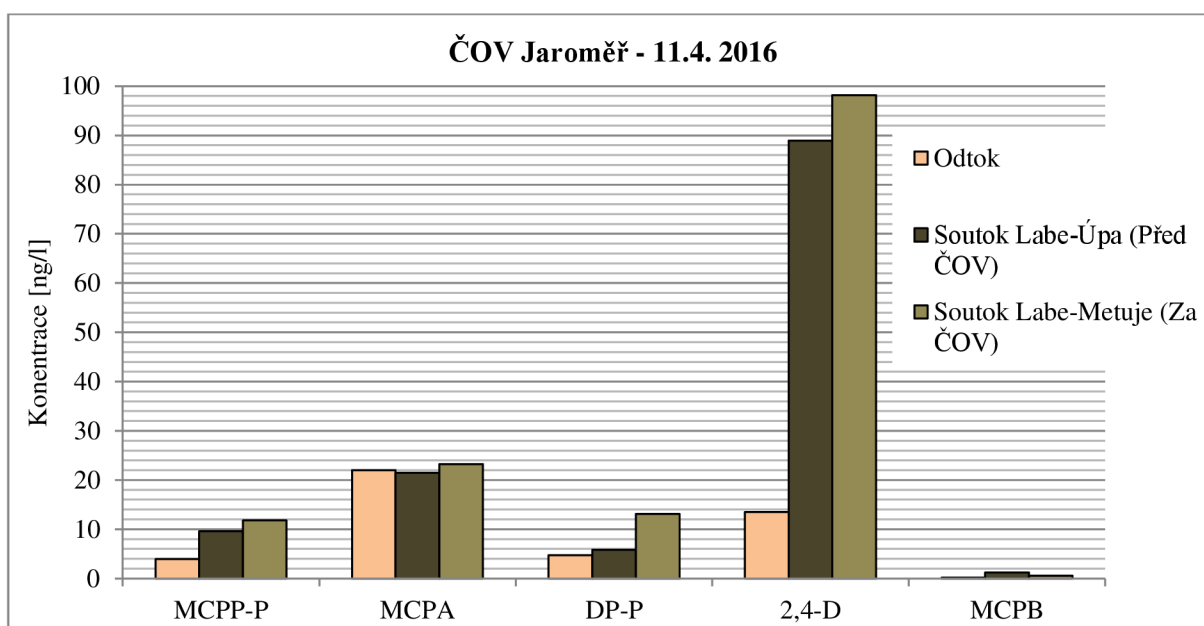


Graf 21: Výsledné koncentrace; řeky v okolí Jaroměře, 18. 4. 2016

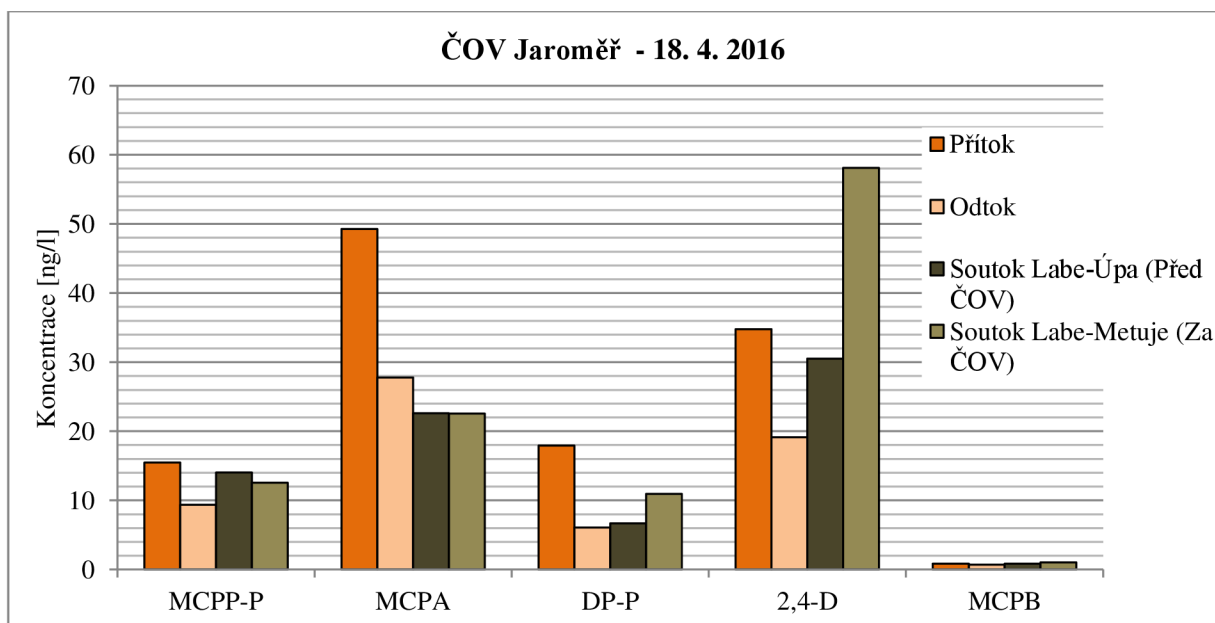


Na přítoku a odtoku ČOV Jaroměř byly zaznamenány vyšší koncentrace než na ČOV Brno – Modřice. Vzhledem k deštivým dnům, kdy byly vzorky odebrány, mohlo dojít k vymytí většího množství aplikovaných přípravků. Z grafů 22 – 24 je zřejmé, že v rámci procesu čištění došlo k částečnému odstranění a jen malá část byla vypuštěna do recipientu. K úplnému odstranění nedošlo zřejmě díky tomu, že sledovaná skupina patří mezi látky, které nepřechází do kalu a mají velmi dobrou rozpustnost ve vodě. Jak vyplývá z výsledků, všechny sledované analyty byly v odpadní vodě detekovány v nižších koncentracích, než jaké byly prokázány ve vzorcích povrchové vody odebíraných před a pod ČOV. Výjimkou je analyt MCPA, který byl na odtoku z ČOV Jaroměř detekován 18. 4. 2016 ve vyšší koncentraci než byla koncentrace povrchové vody. Neúplně vyčištěná voda nemá tedy zásadní vliv na zvýšení kontaminace povrchových vod.

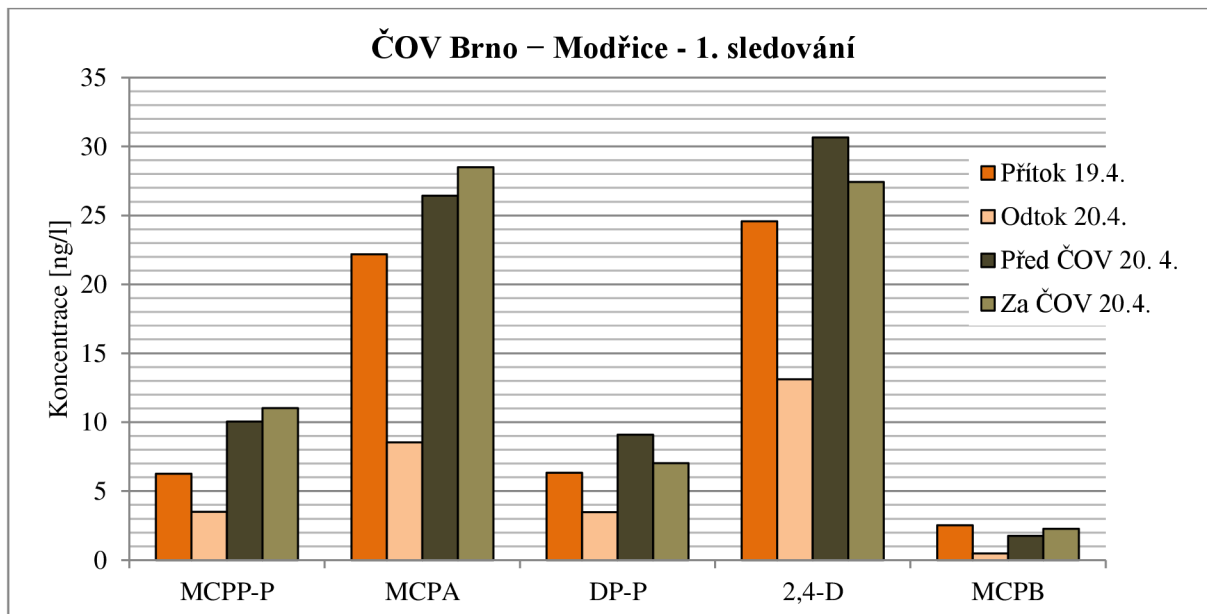
Graf 22: ČOV Jaroměř, sledování 11. 4. 2016



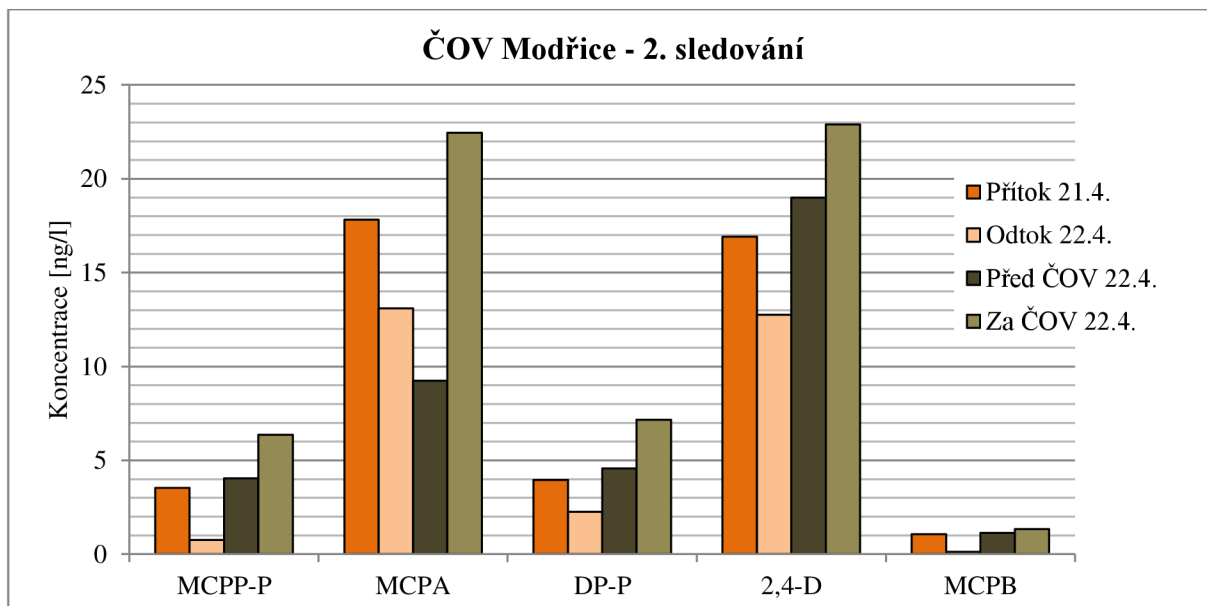
Graf 23: ČOV Jaroměř, sledování 18. 4. 2016



Graf 24: ČOV Brno - Modřice, 1. sledování (19. – 20. 4. 2016)



Graf 25: ČOV Brno - Modřice, 2. sledování (21. – 22. 4. 2016)



4.5.4 Porovnání výsledků s údaji publikovanými v literatuře

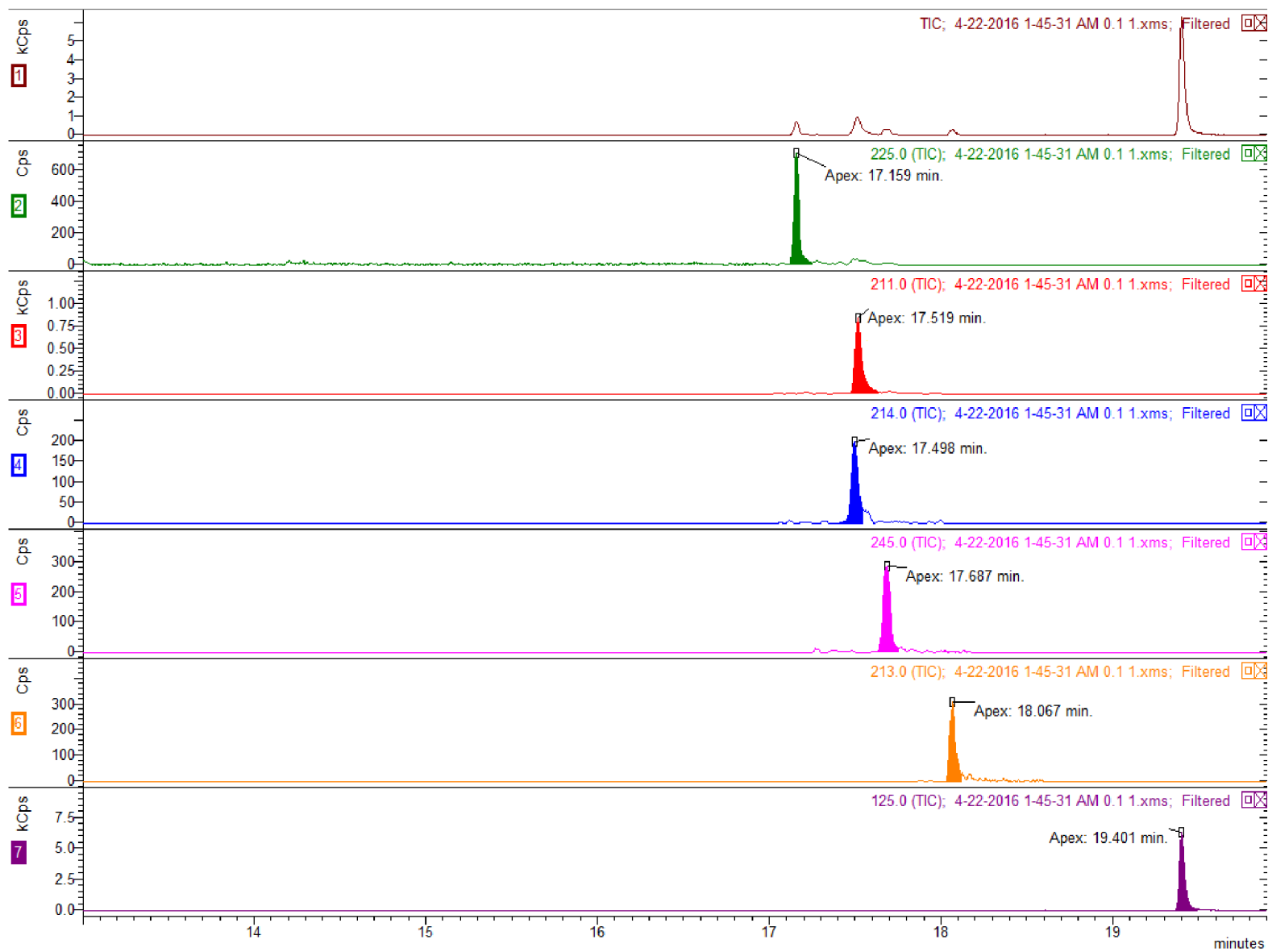
Literatura zabývající se stanovením herbicidů v povrchových vodách je většinou zaměřena na sledování více skupin s rozdílným chemickým složením. Byl dohledán článek, kde byly stanovovány 2,4-D, MCPA, 2,4-DP, MCPB, MCPP a 2,4,5,-T ve vzorcích vody metodou GC/MS [73]. Sledování bylo zaměřeno na řeky a umělá jezera ve městě Santiago de Compostela (Španělsko). Publikované údaje jsou relativně porovnatelné s údaji v této práci. V řekách a jezerech byly kvantifikovány všechny analyty v koncentračním rozpětí 79,2 – 122 ng/l.

Další práci zaměřenou na analýzu herbicidů v povrchových vodách je dizertační práce Ing. Jitky Burešové [4]. V práci byly kromě léčiv stanovovány i vybrané pesticidy, konkrétně Mecoprop, MCPA, Dichlorprop, MCPB a 2,4-D. Analyty byly sledovány po dobu 2 let na vybraných profilech v oblasti povodí Moravy. Vzorky byly odebírány jednou měsíčně. V roce 2012 byl v řece Svatce stanoven Mecoprop v koncentračním rozpětí 5,7 – 19 ng/l, MCPA 6,2 – 31,8 ng/l, Dichlorprop <5 ng/l, MCPB 5 – 10 ng/l a 2,4-D 5,2 – 15,9 ng/l. V roce 2013 Mecoprop 6,2 – 20,7 ng/l, MCPA 5,2 – 729 ng/l, Dichlorprop 10,1 – 16,3 ng/l. MCPB <5 ng/l a 2,4-D 10,1-15,9 ng/l.

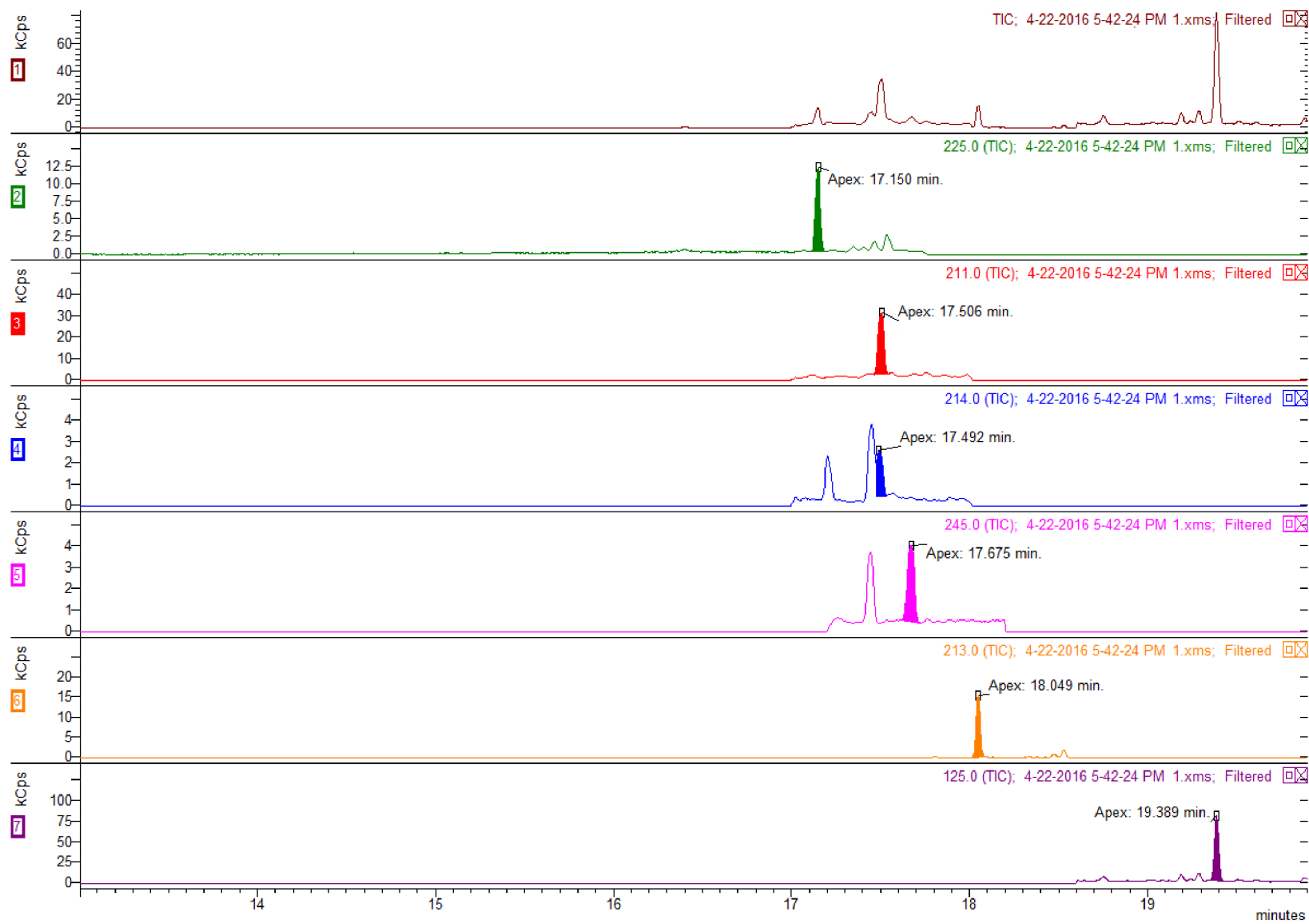
Martyna Rompa a kol. [68] ve své práci publikují výsledky získané analýzou vzorků vody v polské zátocě Gdaňsk (Gdynia, Gdansk, Kieźmark, Vistula estuary). Publikovaná data jsou v Tabulce 38.

Tabulka 38: Publikované výsledky, převzato z [68]

Herbicide	Sampling Site	Brzeźno	Gdynia Orłowo	Vistula estuary	Kieźmark
	Analyte content [μg/l]				
MCPP		0.12	0.13	0.09	0.05
MCPA		0.05	0.16	0.11	0.02
2,4-D		< 0.02	0.16	0.17	< 0.02
PCP		< 0.02	0.10	< 0.02	< 0.02
2,4,5-T		0.07	0.22	0.14	0.088



Obrázek 23: Nejnižší bod kalibrace, koncentrace 0,1 ng/ml – ukázkový chromatogram



Obrázek 24: Reálný vzorek povrchové vody, soutok Labe a Metuje – ukázkový chromatogram

5 ZÁVĚR

Diplomová práce je zaměřena na stanovení polárních pesticidů v různě zatížených povrchových a odpadních vodách. Pesticidy jsou látky hojně využívané k hubení plevelu a hmyzu. Lidé je od nepaměti používali, aby uchránili svoji úrodu před škůdci, a zabránili tak hladomoru a šíření nálezů. S rozvojem průmyslu a zvyšujícími se nároky na kvalitu pesticidů, začaly být místo přípravků živočišného a přírodního původu aplikovány látky syntetické. Používání přípravku ve velké míře má za následek průnik reziduí do životního prostředí, (zejména do povrchové a pitné vody, půdy a ovzduší) a v neposlední řadě negativní dopad na necílové organismy.

Cílem práce bylo vybrat skupinu analytů ke sledování, optimalizovat vhodný postup pro stanovení vybraných herbicidů ze skupiny fenoxycarboxylových kyselin (Mecoprop-P, MCPA, Dichlorprop-P, 2,4-D a MCPB) a postup aplikovat na reálné vzorky povrchové a odpadní vody. Pro izolaci konkrétních analytů byla použita metoda SPE (extrakce tuhou fází), pro identifikaci a kvantifikaci plynová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

Vzorky povrchové vody byly odebírány ze tří toků v okolí Jaroměře (Labe, Úpa, Metuje) a z jednoho toku v okolí Brna (Svratka). Vzorky odpadní vody byly odebrány z ČOV Jaroměř a ČOV Brno – Modřice jako 24 hodinové slévané vzorky, vždy na přítoku a odtoku z ČOV. Vzorky povrchové vody byly odebrány jako jednorázové bodové ze středu toku.

Naměřené koncentrace se v povrchových vodách pohybovaly v rozmezí 0,24 – 98,19 ng/l, v odpadních vodách v rozmezí 0,22 – 49,28 ng/ml. Nejvyšších koncentrací v povrchových i odpadních vodách dosahovaly 2,4-D a MCPA. V rámci sledování tří řek Královéhradeckého kraje bylo zjištěno, že nejvyšší koncentrace herbicidů byly nalezeny v Labi (98,19 ng/l) a nejnižší v Úpě a Metuji. V rámci sledování odpadní vody na přítoku a odtoku ČOV Brno – Modřice (ČOV Jaroměř) bylo zjišťováno, zda odpadní voda, která je vypouštěna do řeky Svratky (do Labe), tuto vodu kontaminuje. Z výsledků vyplývá, že všechny analyty kromě MCPA byly v odpadní vodě na odtoku z ČOV detekovány v nižších koncentracích, než jaké byly prokázány ve vzorcích povrchové vody odebrané před a za ČOV. Voda vypouštěná z ČOV tedy nemá zásadní vliv na zvýšení kontaminace povrchových vod.

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Glossary of terms relating to pesticides [online]. [cit. 2015-11-02]. *Pure Applied Chemistry*. 2006, vol. 78, s. 2075-2154. Dostupný z: <http://www.iupac.org/publications/pac/2006/pdf/7811x2075.pdf>
- [2] ALS Pesticidy. *ALS Czech Republic* [online]. [cit. 2015-11-22]. Dostupné z: <http://alsglobal.cz/website/var/assets/media-cz/pdf/als-pesticidy.pdf>
- [3] HOLOUBEK, Ivan. *Chemie životního prostředí III, Pedosféra: zemědělství a pesticidy*. In: *Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí* [online]. Brno, ČR: Masaryk University, 2015 [cit. 2015-11-25]. Dostupné z: <http://www.recetox.muni.cz/res/file/prednasky/holoubek/chzp-iii/chzp-iii-pedosfera-08-zemedelstvi-a-pesticidy.pdf>
- [4] BUREŠOVÁ, Jitka. *Využití separačních metod pro studium vybraných léčiv a pesticidů ve vodách*. Brno, 2015. Dizertační práce. VUT v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
- [5] *Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský* [online]. Ministerstvo zemědělství, 2015 [cit. 2015-12-02]. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal>
- [6] BALLESTEROS, E a M. J PARRADO. *Continuous solid-phase extraction and gas chromatographic determination of organophosphorus pesticides in natural and drinking waters*. DOI: 10.1016/j.chroma.2003.12.009. ISBN 10.1016/j.chroma.2003.12.009. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967303022611>
- [7] FLORIÁN, Miroslav. *Pesticidy v zemědělství - fakta a souvislosti*. In: *Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský* [online]. Ministerstvo zemědělství [cit. 2016-02-06]. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/359823/Prezentace_Florian.pdf
- [8] POPL, Milan a Jan FÄHNRIK. *Analytická chemie životního prostředí*. Vyd. 4., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1999. ISBN 80-708-0336-3.
- [9] BUKÁČKOVÁ, Monika. *Stanovení vybraných pesticidů pomocí plynové chromatografie*. Brno, 2012. Diplomová práce. VUT Brno. Vedoucí práce Prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

- [10] *Bezpečná práce s pesticidy* [online]. 1999 [cit. 2016-02-06]. Dostupné z: <http://osha.europa.eu/fop/czech-republic/cs/topics/files/pesticides.pdf>
- [11] KODEŠOVÁ, Radka. *Odborný seminář "Pesticidy v životním prostředí": Pesticidy v půdním prostředí* [online]. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2015 [cit. 2016-02-06]. Dostupné z: http://www.rostlinolekari.cz/pages/sbornik_pesticidy_2015.pdf
- [12] NIKLÍČEK, Ladislav. *Odborný seminář "Pesticidy v životním prostředí": Chemická ochrana rostlin - Je bezpečná?* [online]. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2015 [cit. 2016-03-21]. Dostupné z: http://www.rostlinolekari.cz/pages/sbornik_pesticidy_2015.pdf
- [13] STARÁ, Alžběta. *Odborný seminář "Pesticidy v životním prostředí": Pesticidy ve vodním prostředí a jejich vliv na vodní organismy* [online]. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2015 [cit. 2016-03-21]. Dostupné z: http://www.rostlinolekari.cz/pages/sbornik_pesticidy_2015.pdf
- [14] UNSWORTH, John. History of pesticide use. In: *International Union of Pure and Applied Chemistry* [online]. 2010 [cit. 2016-03-21]. Dostupné z: http://agrochemicals.iupac.org/index.php?option=com_sobi2&sobi2Task=sobi2Details&catid=3&sobi2Id=31
- [15] SALEMI, Amir, Elham SHAFIEI a Maryam VOSOUGH. Optimization of matrix solid phase dispersion coupled with gas chromatography electron capture detection for determination of chlorinated pesticides in soil. *International Union of Pure and Applied Chemistry* [online]. *Talanta*, 2010, 15 (101), 504-509. DOI: 10.1016/j.talanta.2012.10.009. ISBN 10.1016/j.talanta.2012.10.009. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914012008296>
- [16] ZHAO, Congcong, HuiJun XIE, Jian ZHANG, Jingtao XU a Shuang LIANG. Spatial distribution of organochlorine pesticides (OCPs) and effect of soil characters: A case study of a pesticide producing factory. *Chemosphere*. 2013, 9(90), 2381-2387. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.10.029. ISBN 10.1016/j.chemosphere.2012.10.029. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653512012684>
- [17] *Látky v IRZ. Integrovaný registr znečišťování* [online]. Praha: Ministerstvo životního prostředí [cit. 2016-04-05]. Dostupné z: <http://www.irz.cz/node/20>
- [18] Pesticides. EPA: *United States Environmental Protection Agency* [online]. 2016 [cit. 2016-04-05]. Dostupné z: <https://www.epa.gov/pesticides>

- [19] *Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/60/ES ze dne 23. října 2000, kterou se stanoví rámec pro činnost Společenství v oblasti vodní politiky.* In: Lucemburk: Evropská Unie, 2004, s.1–73, Úř. věst. L 327. Dostupné také z: <http://data.europa.eu/eli/dir/2000/60/oj>
- [20] *Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2008/105/ES ze dne 16. prosince 2008 o normách environmentální kvality v oblasti vodní politiky, změně a následném zrušení směrnic Rady 82/176/EHS, 83/513/EHS, 84/156/EHS, 84/491/EHS a 86/280/EHS a změně směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/60/ES.* In: Štrasburk: Evropský Parlament a Rada Evropské unie, 2008, s. 84–97, Úř. věst. L 348. Dostupné také z: <http://data.europa.eu/eli/dir/2008/105/oj>
- [21] *Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2013/39/EU ze dne 12. srpna 2013, kterou se mění směrnice 2000/60/ES a 2008/105/ES, pokud jde o prioritní látky v oblasti vodní politiky Text s významem pro EHP.* In: Brusel: Evropský parlament a Rada Evropské unie, 2013, Úř. věst. L 226, s. 1–17. Dostupné také z: <http://data.europa.eu/eli/dir/2013/39/oj>
- [22] *Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2006/11/ES ze dne 15. února 2006 o znečišťování některými nebezpečnými látkami vypouštěnými do vodního prostředí Společenství (kodifikované znění) (Text s významem pro EHP).* In: Štrasburk: Evropský parlament a Rada Evropské unie, 2006, Úř. věst. L 64, s. 52–59. Dostupné také z: <http://data.europa.eu/eli/dir/2006/11/oj>
- [23] *Zákon č. 254/2001 Sb., o vodách a o změně některých zákonů (vodní zákon).* In: Ministerstvo životního prostředí, 2001. Dostupné také z: <http://www.mzp.cz/www/platnalegislativa.nsf/2a434831dcbe8c3fc12564e900675b1b/20f9c15060cad3aec1256ae30038d05c?OpenDocument>
- [24] *Nářízení Komise (EU) č. 23/2011 ze dne 13. ledna 2011 o stanovení paušálních dovozních hodnot pro určení vstupní ceny některých druhů ovoce a zeleniny.* In: Brusel: Evropská komise, 2011, Úř. věst. L 10, s. 1–2. Dostupné také z: <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/23/oj>
- [25] *Směrnice Rady 98/83/ES ze dne 3. listopadu 1998 o jakosti vody určené k lidské spotřebě.* In: Brusel: Rada Evropské unie, 1998, Úř. věst. L 330, s. 32–54. Dostupné také z: <http://data.europa.eu/eli/dir/1998/83/oj>
- [26] *Nářízení Evropského parlamentu a Rady (ES) C. 396/2005 ze dne 23. února 2005 o maximálních limitech reziduí pesticidů v potravinách a krmivech rostlinného a živočišného původu a na jejich povrchu a o změně směrnice Rady 91/414/EHS (Text s významem pro EHP).* In: Štrasburk: Evropský parlament a Rada Evropské unie, 2005, Úř. věst. L 70, s. 1–16. Dostupné také z: <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/396/oj>
- [27] DVOŘÁK, Jiří a Vladimír SMUTNÝ. *Herbologie - Integrovaná ochrana proti polním plevelům.* V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 978-80-7157-732-4.

- [28] WRIGHT, David A. a Pamela WELBOURN. *Environmental toxicology*. New York: Cambridge University Press, 2002. Cambridge environmental chemistry series, 11. ISBN 05-215-8860-X.
- [29] ISSaR - *Informační systém statistiky a reportingu pro MŽP* [online]. [cit. 2016-04-05]. Dostupné z: <http://issar.cenia.cz/>
- [30] PITTER, Pavel. *Hydrochemie*. 3. přeprac. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 1999. ISBN 80-708-0340-1.
- [31] *Zákon č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů*. In: Parlament České republiky, 2000. Dostupné také z: http://www.mzcr.cz/Legislativa/dokumenty/zakon-c267/2015-sb-kterym-se-meni-zakon-c258/2000-sb-o-ochrane-verejneho_10910_11.html
- [32] *Český hydrometeorologický ústav: Pasporty* [online]. [cit. 2016-04-05]. Dostupné z: <http://hydro.chmi.cz/pasporty/>
- [33] VLČEK, Vítězslav a Miroslav POHANKA. ENVIRONMENTÁLNÍ ASPEKTY UŽITÍ ORGANOFOSFOROVÝCH A KARBAMÁTOVÝCH PESTICIDŮ SCHVÁLENÝCH K UŽITÍ V ČESKÉ REPUBLICE. *Chem. Listy* [online]. 2011, (105), 908 - 912 [cit. 2016-04-05]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_12_908-912.pdf
- [34] KIZLINK, Juraj. *Technologie chemických látek: chemický průmysl, koroze, konstrukční materiály, technické plyny, anorganické a organické produkty, dřevo, zpracování uhlí, výroba paliv, petrochemie, pesticidy, tenzidy, plasty a kaučuk, různé přísady, katalyzátory, výbušniny, biotechnologie, doprava*. Vyd. 3., přeprac. a dopl. Brno: Vysoké učení technické v Brně, 2005. ISBN 80-214-2913-5.
- [35] Potraviny: Bezpečnost potravin. In: *eAgri* [online]. Ministerstvo zemědělství, 2015 [cit. 2016-04-05]. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/mze/potraviny/bezpecnost-potravin/>
- [36] LEBARON, Homer M., Janis E. MCFARLAND a Orvin. BURNSIDE. *The triazine herbicides: 50 years revolutionizing agriculture*. Boston: Elsevier, 2008. ISBN 04-445-1167-9.
- [37] KOPP, Radovan, Klára HILSCHEROVÁ a Eva POŠTULKOVÁ. *Základy vodní ekotoxikologie*. Vydání: první. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2015. ISBN 978-80-7509-334-9.

- [38] BARRA CARACCILO, Anna, Carmen FAJARDO, Paola GRENNI, Maria Ludovica SACCÀ, Stefano AMALFITANO, Roberto CICCOLI, Margarita MARTIN a Alicia GIBELLO. The role of a groundwater bacterial community in the degradation of the herbicide terbuthylazine. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. 2010, **71**(1), 127-136 [cit. 2016-04-05]. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2009.00787.x. ISSN 01686496. Dostupné z: <http://femsec.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1111/j.1574-6941.2009.00787.x>
- [39] KVASNIČKOVÁ, Eva. *Xenobiochemie*. Praha: Karolinum, 1995. ISBN 80-706-6993-4.
- [40] KOMANG RALEBITSO, T., Eric SENIOR a Henk W. VAN VERSEVELD. *Biodegradation* [online]. **13**(1), 11-19 [cit. 2016-04-05]. DOI: 10.1023/A:1016329628618. ISSN 09239820. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1016329628618>
- [41] HAJŠLOVÁ, Jana a Vladimír KOCOUREK. Osud prostředků pro ochranu rostlin v potravním řetězci člověka. *Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí* [online]. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2004, 1 - 42 [cit. 2016-04-05]. Dostupné z: <http://www.phytopsanitary.org/projekty/2003/vvf-05-03.pdf>
- [42] KOLMODIN-HEDMAN, Birgitta. Chapter 13 Phenoxyacetates. *Toxicology* [online]. 1994, **91**(1), 87-91 [cit. 2016-04-05]. DOI: 10.1016/0300-483X(94)90246-1. ISSN 0300483x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0300483X94902461>
- [43] JURSIK, Miroslav, Josef SOUKUP a Josef HOLEC. Mechanizmy účinku herbicidů a projevy jejich působení na rostliny: Úvod do problematiky mechanismu působení herbicidů. *Listy cukrovarnické a řepařské* [online]. 2010, (126), 14 - 16 [cit. 2016-04-05]. Dostupné z: http://www.cukr-listy.cz/on_line/2010/PDF/14-16.PDF
- [44] NAYLOR, Robert E. L. *Weed management handbook*. 9th ed. Malden, MA: Published for the British Crop Protection Council by Blackwell Science, 2002. ISBN 06-320-5732-7.
- [45] PATOČKA, Jiří. *Vojenská toxikologie*. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0608-3.
- [46] PAN Pesticide Database [online]. [cit. 2016-04-17]. Dostupné z: <http://www.pesticideinfo.org/>
- [47] Nařízení Komise (ES) č. 2230/95 ze dne 21. září 1995, kterým se mění nařízení (ES) č. 933/94, kterým se stanoví účinné látky přípravků na ochranu rostlin a jmenují členské státy zpravodajové pro provádění nařízení Komise (EHS) č. 3600/92. In: Brusel: Evropská komise, 1995, Úř. věst. L 225, s. 1-3. Dostupné také z: <http://data.europa.eu/eli/reg/1995/2230/oj>

- [48] *Prováděcí nařízení Komise (EU) 2015/2033 ze dne 13. listopadu 2015, kterým se v souladu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh obnovuje schválení účinné látky 2,4-D a mění příloha prováděcího nařízení Komise (EU) č. 540/2011 (Text s významem pro EHP)*. In: Brusel: Evropská komise, 2015, Úř. věst. L 298, s. 8–11. Dostupné také z: http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2015/2033/oj
- [49] *Směrnice Komise 2006/74/ES ze dne 21. srpna 2006, kterou se mění směrnice Rady 91/414/EHS za účelem zařazení účinných látek dichlorpropu-P, metconazolu, pyrimethanilu a triklopyru (Text s významem pro EHP)*. In: Brusel: Evropská komise, 2006, Úř. věst. L 235, s. 17–22. Dostupné také z: <http://data.europa.eu/eli/dir/2006/74/o>
- [50] ULRICH, Elin M., Candice N. MORRISON, Michael R. GOLDSMITH a William T. FOREMAN. *Chiral Pesticides: Identification, Description, and Environmental Implications* [online], [cit. 2016-04-17]. DOI: 10.1007/978-1-4614-2329-4_1. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-2329-4_1
- [51] *Směrnice Komise 2007/27/ES ze dne 15. května 2007, kterou se mění některé přílohy směrnic Rady 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS, pokud jde o maximální limity reziduí pro etoxazol, indoxakarb, mesosulfuron, 1-methylcyklopropen, MCPA a MCPB, tolylfluamid a tritikonazol (Text s významem pro EHP)*. In: Brusel: Evropská komise, 2007, Úř. věst. L 128, s. 31–42. Dostupné také z: <http://data.europa.eu/eli/dir/2007/27/oj>
- [52] Toxicology data network. *U.S. national Library of Medicine: Toxnet Home* [online]. National Institutes of Health [cit. 2016-04-19]. Dostupné z: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>
- [53] *Brněnské vodovody a kanalizace a. s.: O společnosti* [online]. 2016 [cit. 2016-04-19]. Dostupné z: <http://www.bvk.cz/o-spolecnosti/>
- [54] *Kanalizační řád pro statutární město Brno, město Kuřim, město Modřice, obce Česká a Želešice*. Brno. Brněnské vodovody a kanalizace a.s., 2010.
- [55] *Chemical Book: 2,4-Dichloranisol* [online]. In: 2016 [cit. 2016-04-19]. Dostupné z: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_DE_CB8228349.htm
- [56] PASZKO, Tadeusz, Paweł MUSZYŃSKI, Małgorzata MATERSKA, Monika BOJANOWSKA, Małgorzata KOSTECKA a Izabella JACKOWSKA. Adsorption and degradation of phenoxyalkanoic acid herbicides in soils: A review. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online]. 2016, **35**(2), 271-286 [cit. 2016-04-19]. DOI: 10.1002/etc.3212. ISSN 07307268. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/etc.3212>
- [57] Runoff of pesticides from rice fields in the Ile de Camargue (Rhône river delta, France): field study and modeling. *Environ Pollut.* [online]. PubMed, 2008, **151**(3), 86-93 [cit. 2016-04-19]. PMID: 17562351.

- [58] LUO, Yunlong, Wenshan GUO, Huu Hao NGO, Long Duc NGHIEM, Faisal Ibney HAI, Jian ZHANG, Shuang LIANG a Xiaochang C. WANG. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of The Total Environment* [online]. 2014, **473-474**, 619-641 [cit. 2016-04-19]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.12.065. ISSN 00489697. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969713015465>
- [59] VOLKA, Karel. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995. ISBN 80-708-0227-8.
- [60] ČÁSLAVSKÝ, Josef. *Hmotnostní spektrometrie: Přednáška č. 2 – Ionizace*. FCH VUT Brno, 2016
- [61] ČÁSLAVSKÝ, Josef. *Hmotnostní spektrometrie: Přednáška č. 3 – Analyzátory*. FCH VUT Brno, 2016
- [62] *Journal of Chromatography A* [online]. 2008, **1184**(1-2) [cit. 2016-04-19]. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967307017700>
- [63] *Solid Phase Microextraction: Theory and Optimization of Conditions: Bulletin 923* [online]. In: Supelco [cit. 2016-05-01]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4547.pdf>
- [64] ČÁSLAVSKÝ, Josef. *Analytická chemie II: Přednáška č. 8 – Plynová chromatografie*. FCH VUT Brno, 2013
- [65] *Guide to Solid Phase Extraction: Bulletin 910* [online]. In: Supelco [cit. 2016-05-01]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>
- [66] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [67] *Mapy.cz* [online]. [cit. 2016-05-01]. Dostupné z: <https://mapy.cz/zakladni?x=15.9241380&y=50.3440980&z=11>
- [68] ROMPA, Martyna, Ewa KREMER a Bogdan ZYGMUNT. Derivatization in gas chromatographic determination of acidic herbicides in aqueous environmental samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2003-10-1, **377**(4), 590-599 [cit. 2016-05-01]. DOI: 10.1007/s00216-003-2117-5. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-003-2117-5>
- [69] *Derivatization Reagents: For Selective Response and Detection in Complex Matrices* [online]. In: [cit. 2016-05-01]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/migrationresource4/Derivatization%20Rgts%20brochure.pdf>

- [70] *Nezávislý informační server Jaroměř* [online]. In: 2016 [cit. 2016-05-01]. Dostupné z: <http://www.jaromer.cz/encyklopedie/objekty1.phtml?id=681>
- [71] *Trace-level sensitivity now well within your reach* [online]. [cit. 2016-05-01]. Dostupný z: <http://bercaniaga.com/Final7000AGC.pdf>
- [72] WELLS, Martha J. M a Lan Zhou YU. Solid-phase extraction of acidic herbicides. *Journal of Chromatography A* [online]. 2000, **885**(1-2), 237-250 [cit. 2016-05-01]. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00206-5. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300002065>
- [73] RODRÍGUEZ PEREIRO, I., R. GONZÁLEZ IRIMIA, E. RUBÍ CANO a R. CELA TORRIJOS. Optimisation of a gas chromatographic–mass spectrometric method for the determination of phenoxy acid herbicides in water samples as silyl derivatives. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2004, **524**(1-2), 249-256 [cit. 2016-05-01]. DOI: 10.1016/j.aca.2004.03.091. ISSN 00032670. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267004004234>
- [74] JURSIK, Miroslav, Josef SOUKUP, Josef HOLEC, Jiří ANDR, Mechanizmy účinku herbicidů a projevy jejich působení na rostliny: Růstové herbicidy (syntetické auxiny). *Listy cukrovarnické a řepařské* [online]. Praha: Česká zemědělská univerzita, **127**(3) [cit. 2016-05-01].
- [75] *MedicinesComplete* [online]. Royal Pharmaceutical Society. [cit. 2016-05-01]. Dostupné z: <https://www.medicinescomplete.com>
- [76] ČÁSLAVSKÝ, Josef. *Hmotnostní spektrometrie: Přednáška č. 4 – Tandemové techniky*. FCH VUT Brno, 2016
- [77] *Kanalizační řád pro statutární město Jaroměř*, Městské vodovody a kanalizace s.r.o., Jaroměř, 2006, Dostupné z: <http://mevakjar.cz/>
- [78] DVOŘÁKOVÁ, P. *Využití kapalinové chromatografie pro stanovení reziduí léčiv*. Brno, 2012. 140 s. Dizertační práce. VUT v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

<i>Zkratka</i>	<i>Význam</i>
2,4-D	Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová
BAF	Bioakumulační faktor
BCF	Biokoncentrační faktor
ČOV	Čistírna odpadních vod
DDT	Dichlordifenyltrichlorethan
DP-P	Dichlorprop-P, kyselina (2R)-2-(2,4-dichlorfenoxy)propanová
FAO	Food and Agriculture Organisation
GAP	Správná zemědělská praxe (Good Agriculture Practice)
HCB	Hexachlorbenzen
HCH	1,2,3,4,5,6-hexachlorcyklohexan
HMCPA	Kyselina 4-chloro-2-hydroxymetylfenoxyoctová
GC	Plynová chromatografie
MCPA	Kyselina (4-chloro-2-methylfenoxy)octová
MCPB	Kyselina 4-(4-chloro-2-methylfenoxy)butanová
MCPP-P	Mecoprop-P, kyselina 2-(4-chloro-2-methylfenoxy)propanová
MLR	Maximální limit reziduí - horní hranice koncentrace reziduí pesticidů legálně přítomná v potravině nebo v krmivu
MS	Hmotnostní spektrometrie
NPK-NEK	Nejvyšší přípustná koncentrace – norma environmentální kvality
PHO	Pásmo hygienické ochrany vodních zdrojů
POPs	Perzistentní organické polutanty
RP-NEK	Roční průměr – norma environmentální kvality
US EPA	Agentura pro ochranu životního prostředí Spojených států amerických (United States Environmental Protection Agency)
ÚKZÚZ	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
VOCs	Těkavé organické látky
WHO	Světová zdravotnická organizace

SEZNAM PŘÍLOH

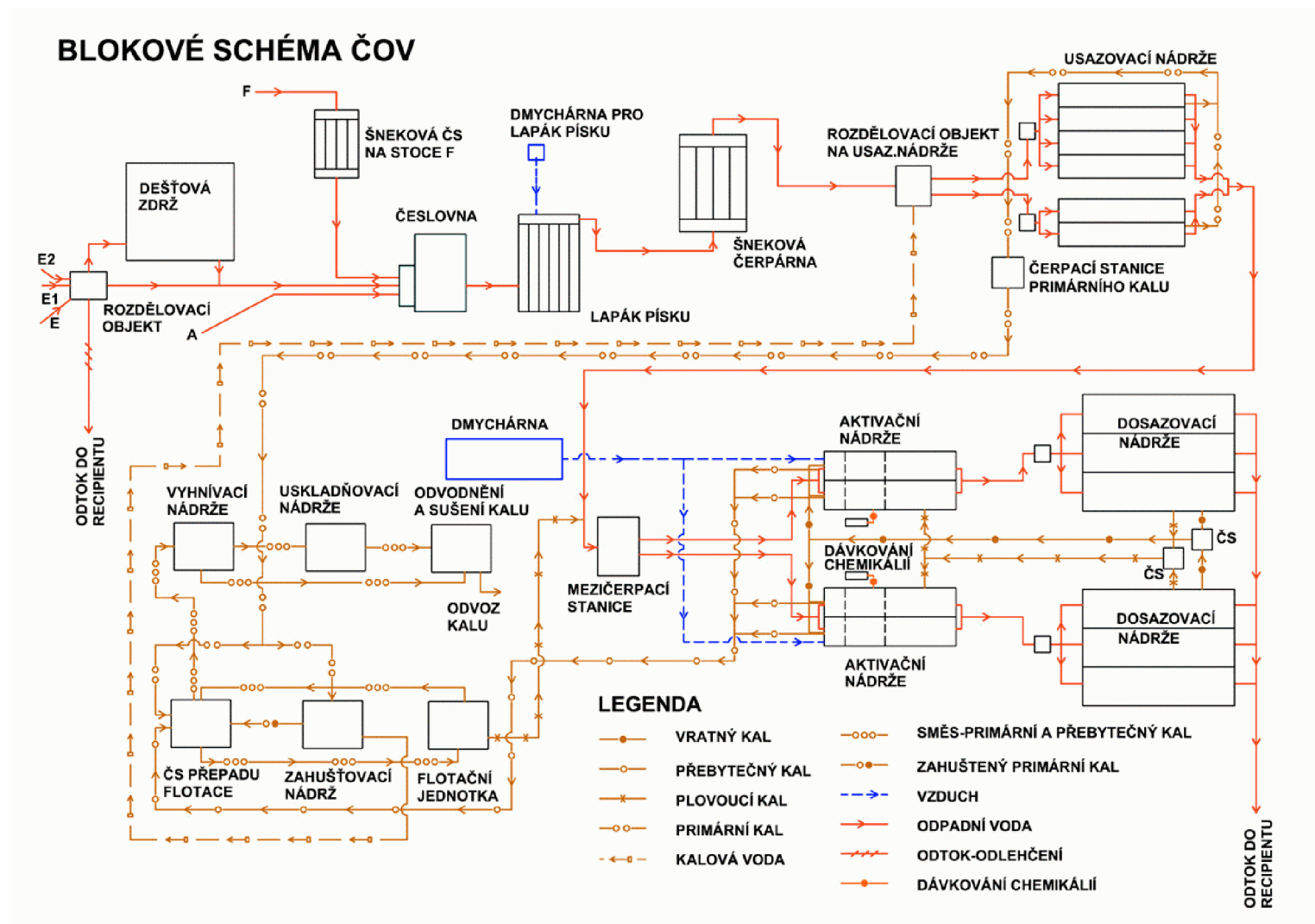
Příloha 1: Blokové schéma ČOV Modřice

Příloha 2: Odběrová místa na jednotlivých tocích

Příloha 3: Hmotnostní spektra

- *Fragmentace MCPP-P*
- *Fragmentace MCPA*
- *Fragmentace DP-P*
- *Fragmentace 2,4-D*
- *Fragmentace MCPB*

Příloha 1: ČOV Modřice



Obrázek 25: Blokové schéma ČOV Brno – Modřice [53]

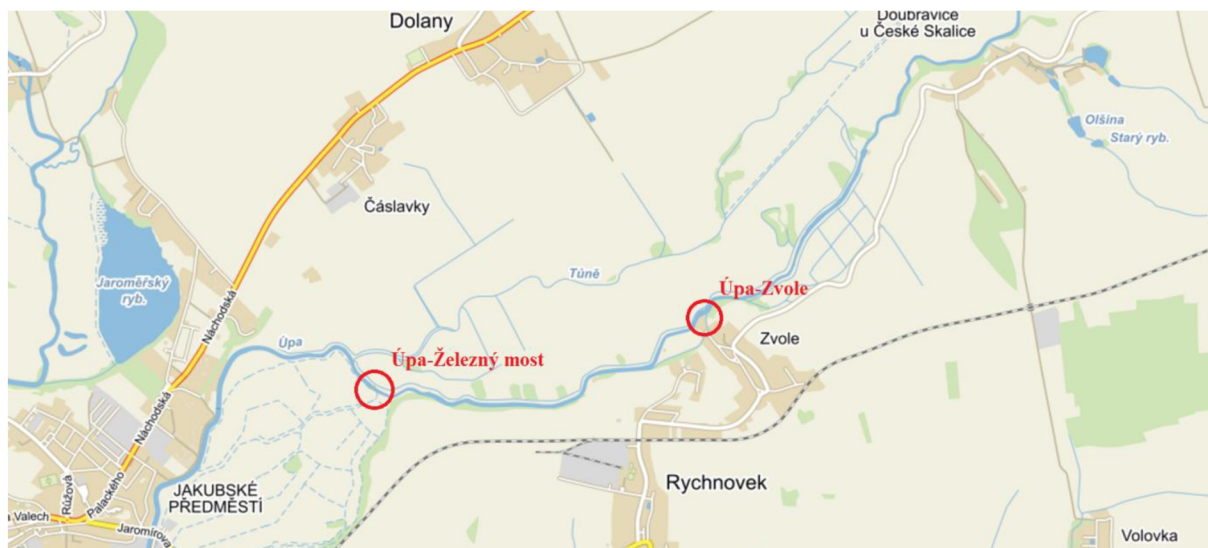
Příloha 2: Odběrová místa na jednotlivých tocích

Řeka Labe



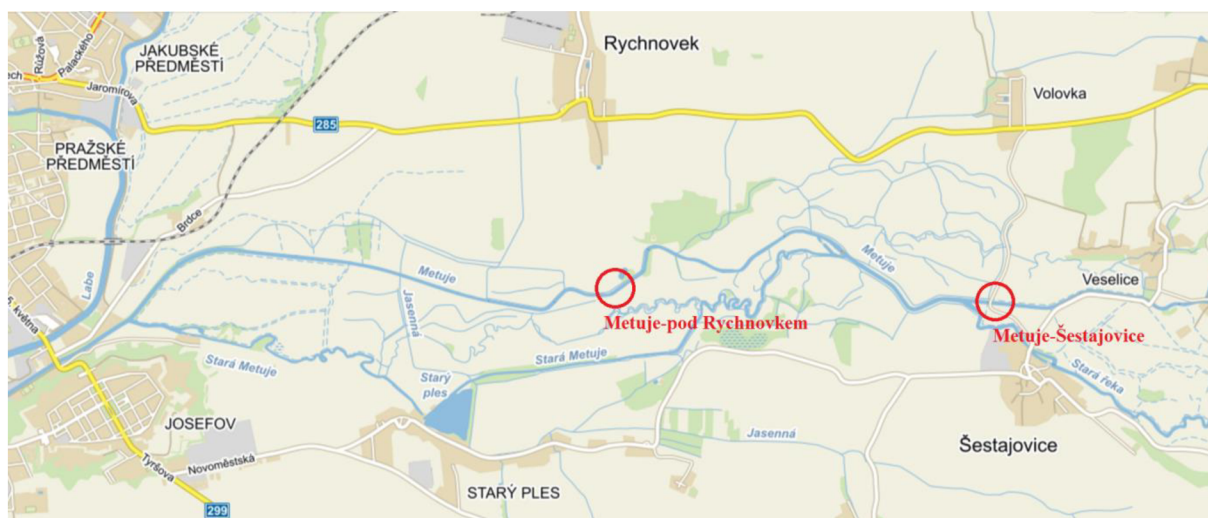
Obrázek 26: Odběrová místa - řeka Labe [67]

Řeka Úpa



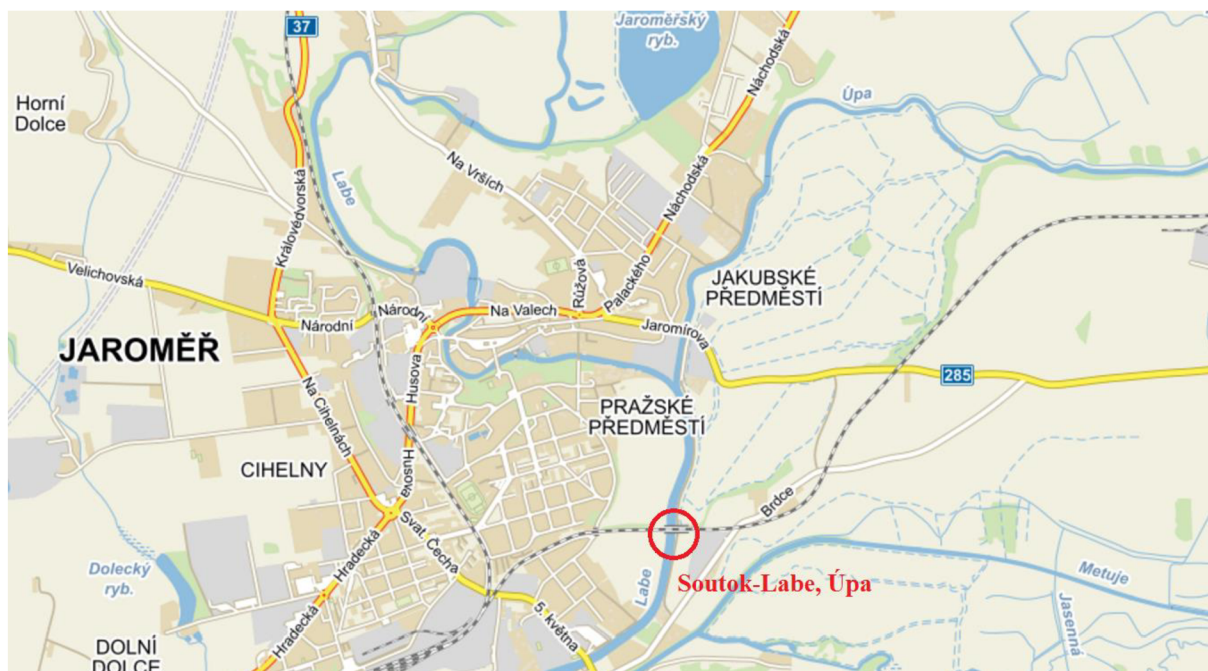
Obrázek 27: Odběrová místa - řeka Úpa [67]

Řeka Metuje



Obrázek 28: Odběrová místa - řeka Metuje [67]

Soutok Labe, Úpa



Obrázek 29: Odběrové místo - soutok Labe a Úpy [67]

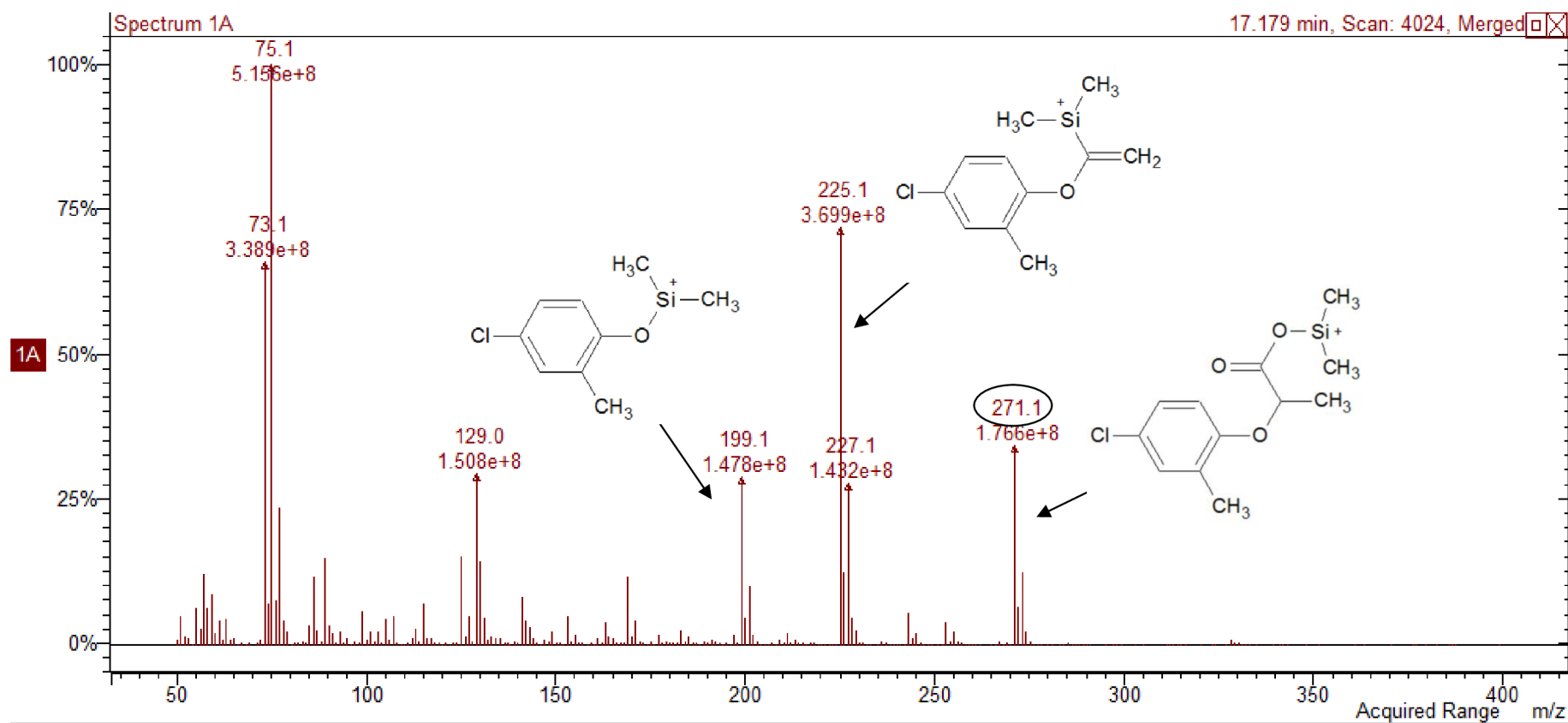
Soutok Labe, Metuje, ČOV Jaroměř



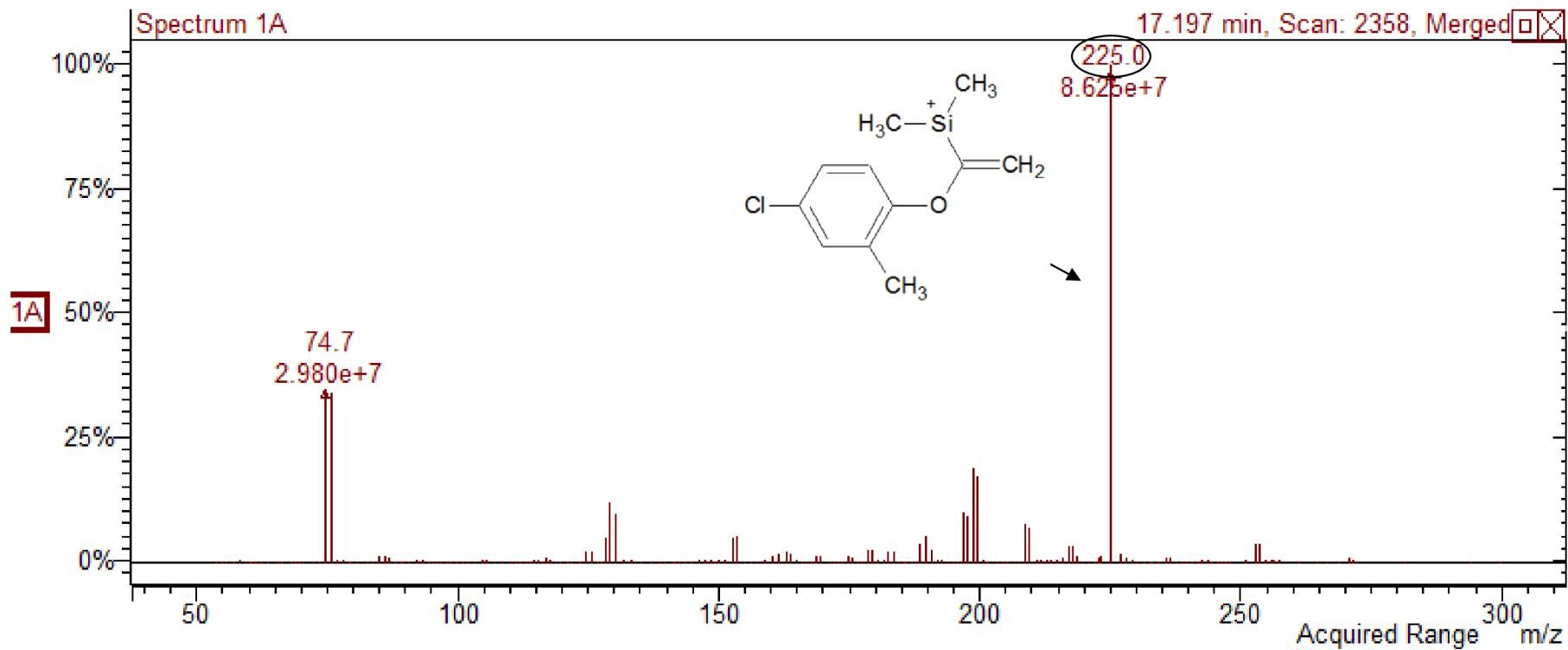
Obrázek 30: Odběrová místa - soutok Labe a Metuje, ČOV Jaroměř [67]

Příloha 3: Hmotnostní spektra

Fragmentace MCPP-P

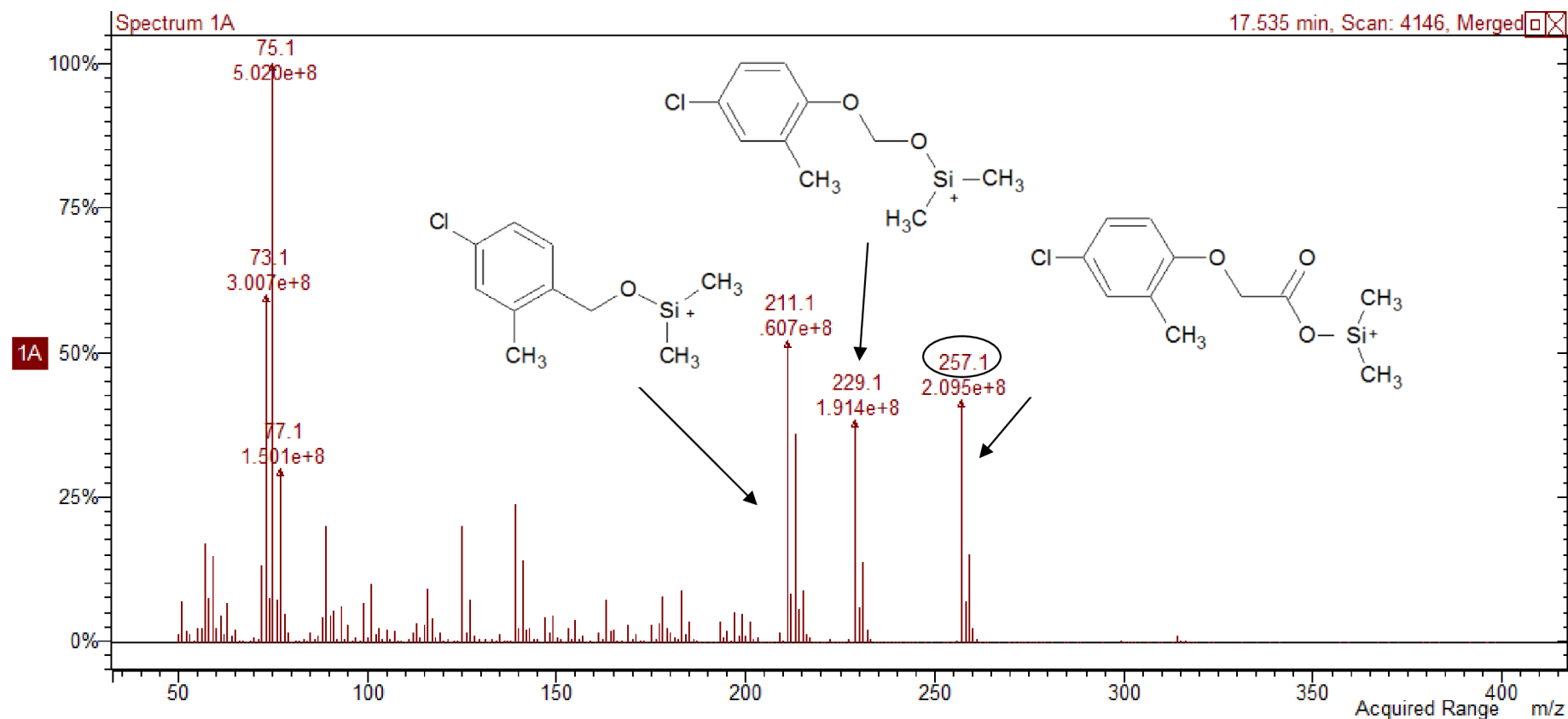


Obrázek 31: Mecoprop-P MS (271)

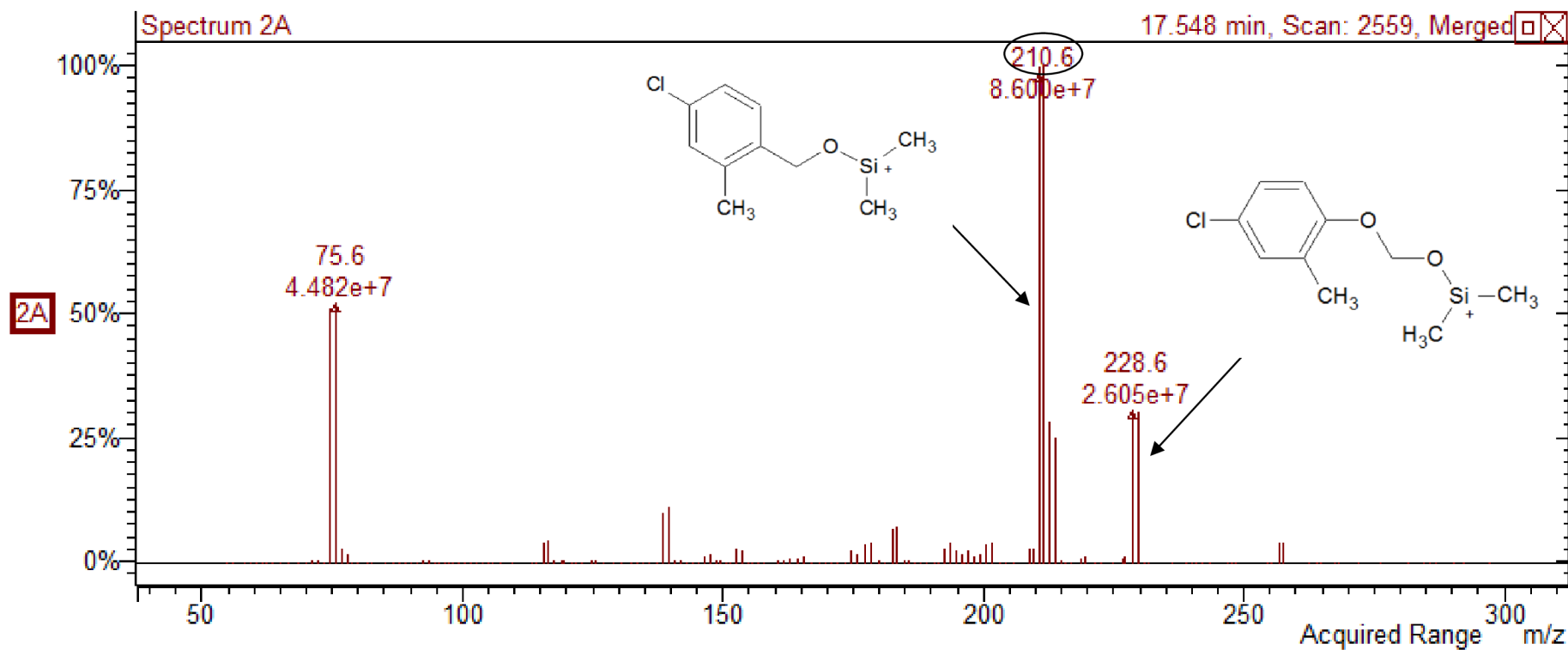


Obrázek 32: Mecoprop-P MS² (271→225), EI (15 eV; 1,5 mTorr)

Fragmentace MCPA

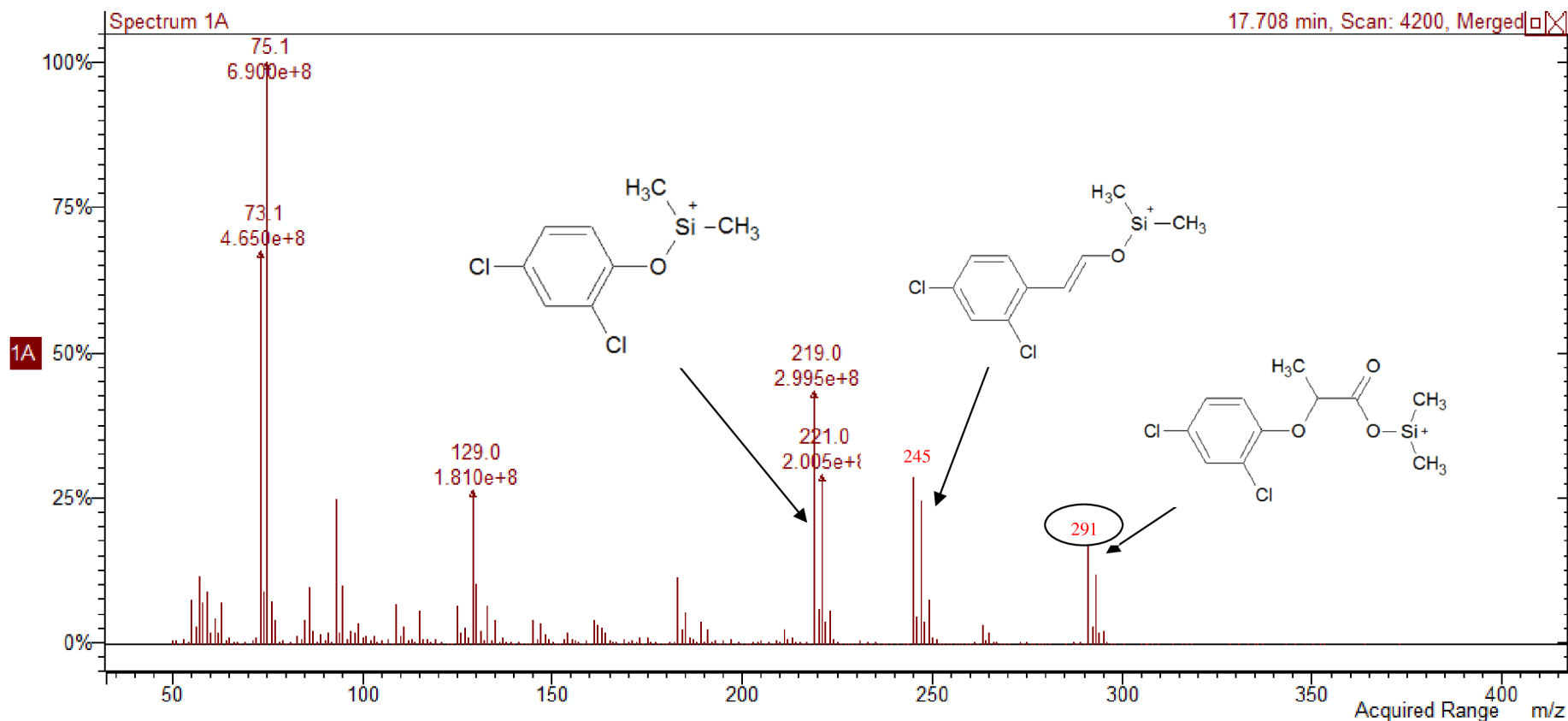


Obrázek 33: MCPA MS (257)

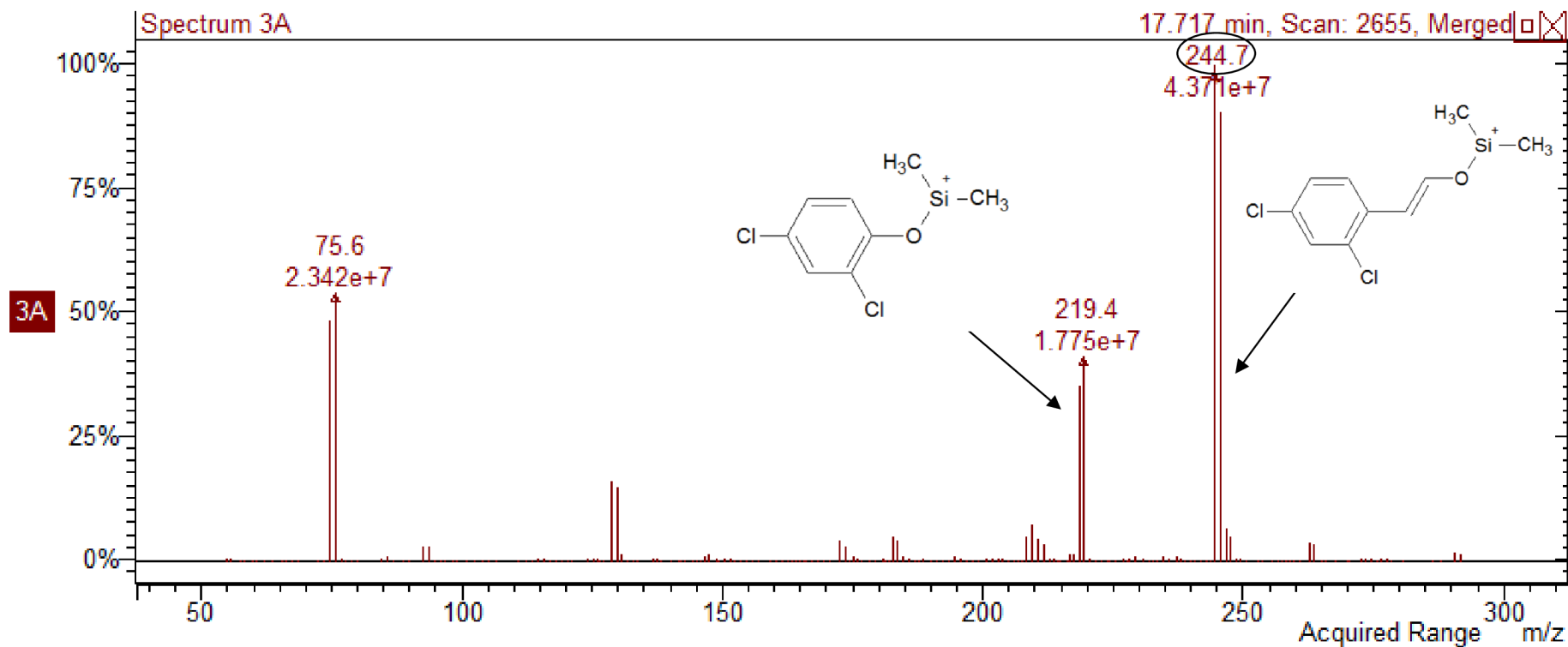


Obrázek 34: MCPA MS² (257→211), EI (10 eV; 1,5 mTorr)

Fragmentace Dichlorpropu-P

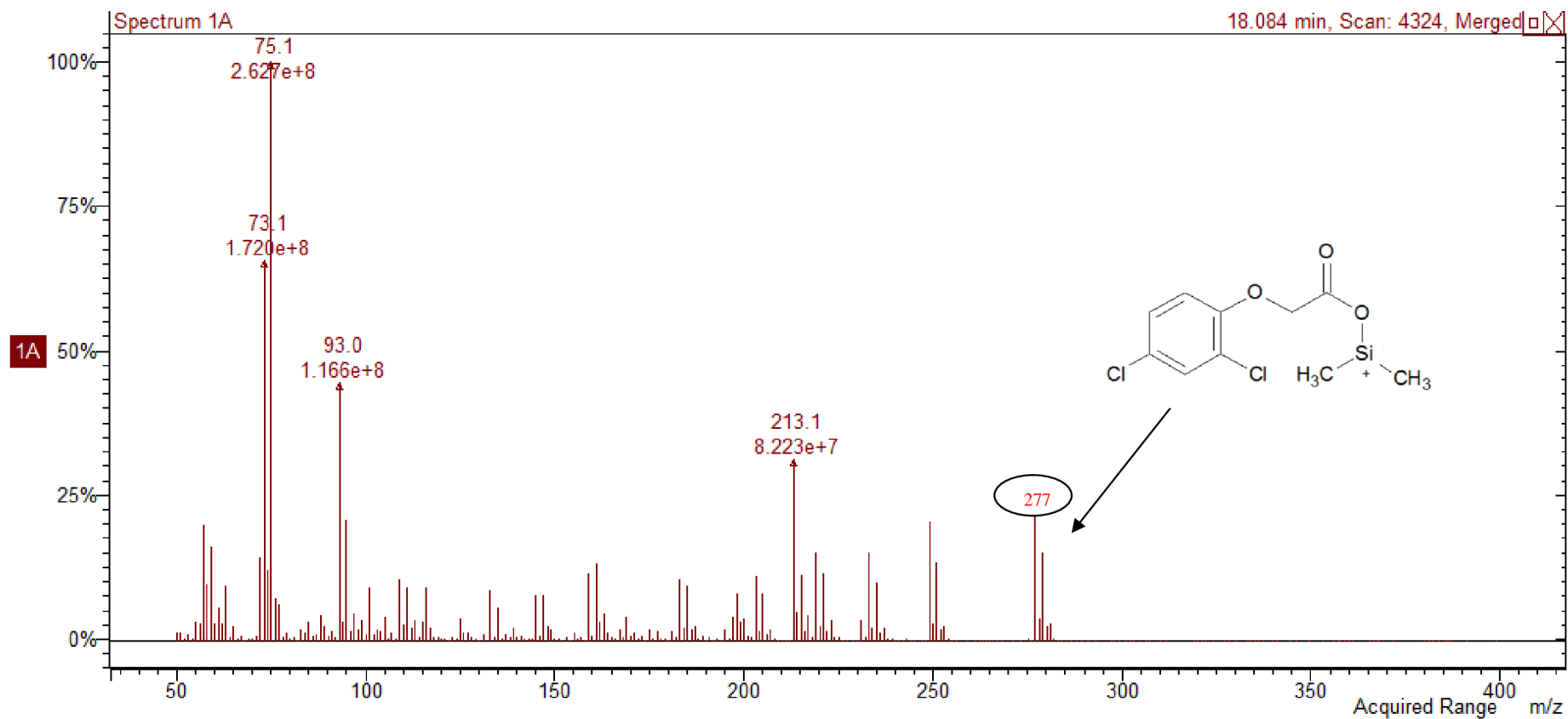


Obrázek 35: Dichlorpropu-P MS (291)

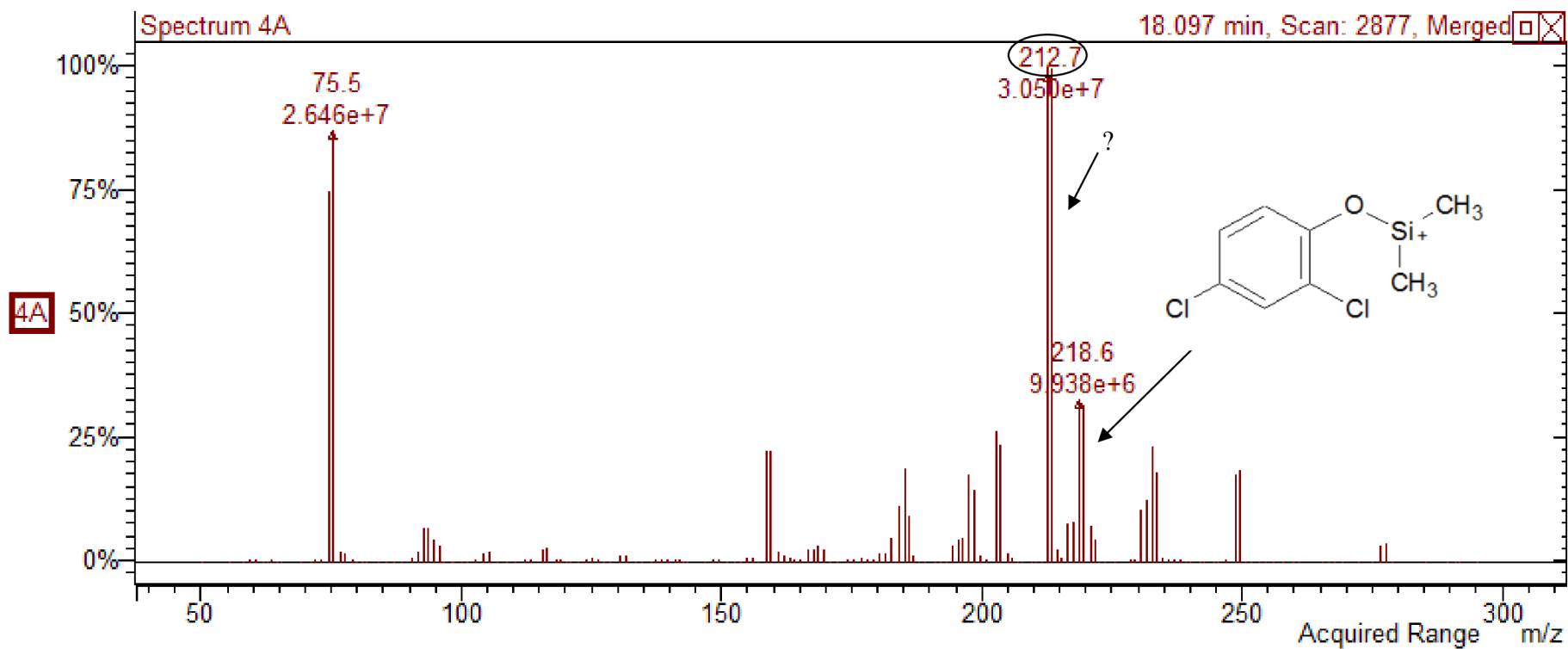


Obrázek 36: Dichlorprop-P MS² (291→245), EI (10 eV; 1,5 mTorr)

Fragmentace 2,4-D



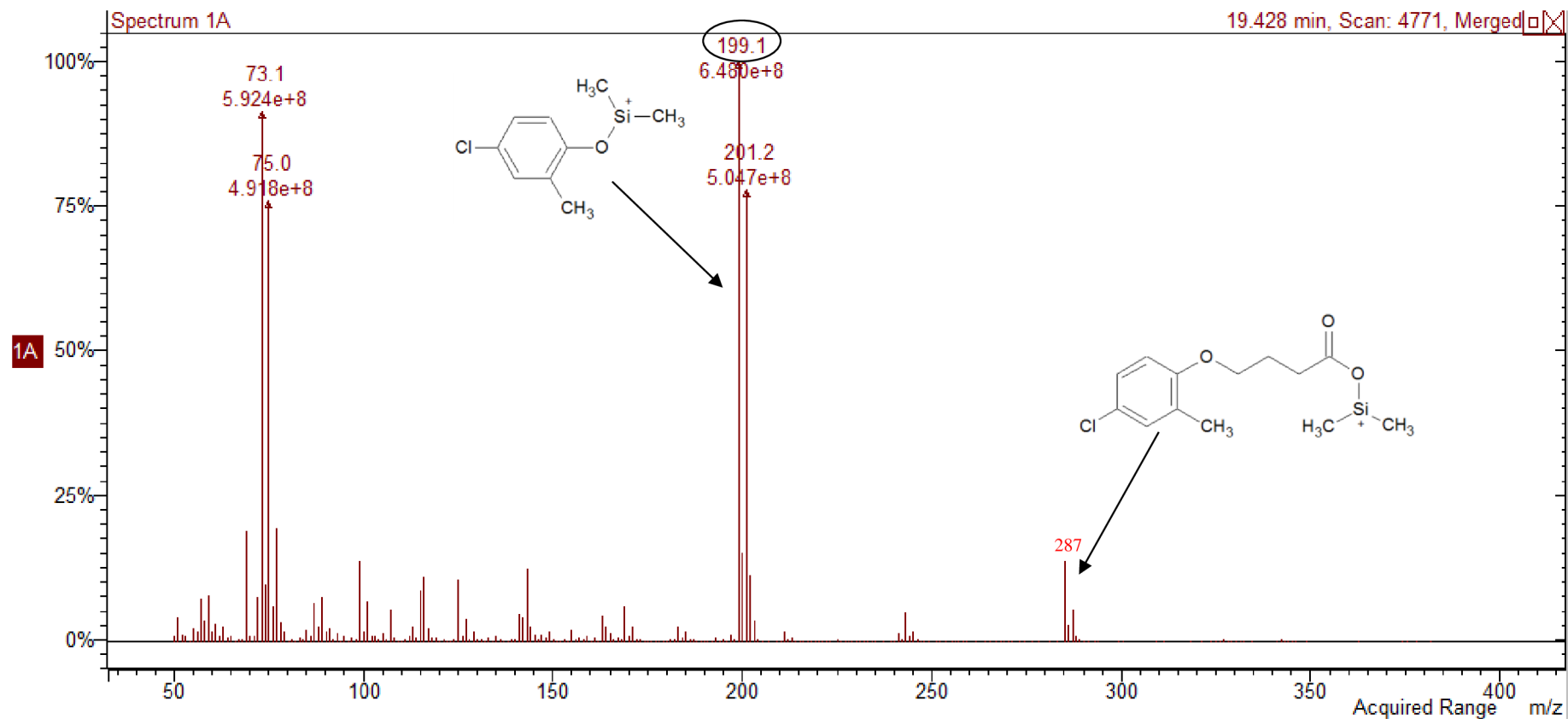
Obrázek 37: 2,4-D MS (277)



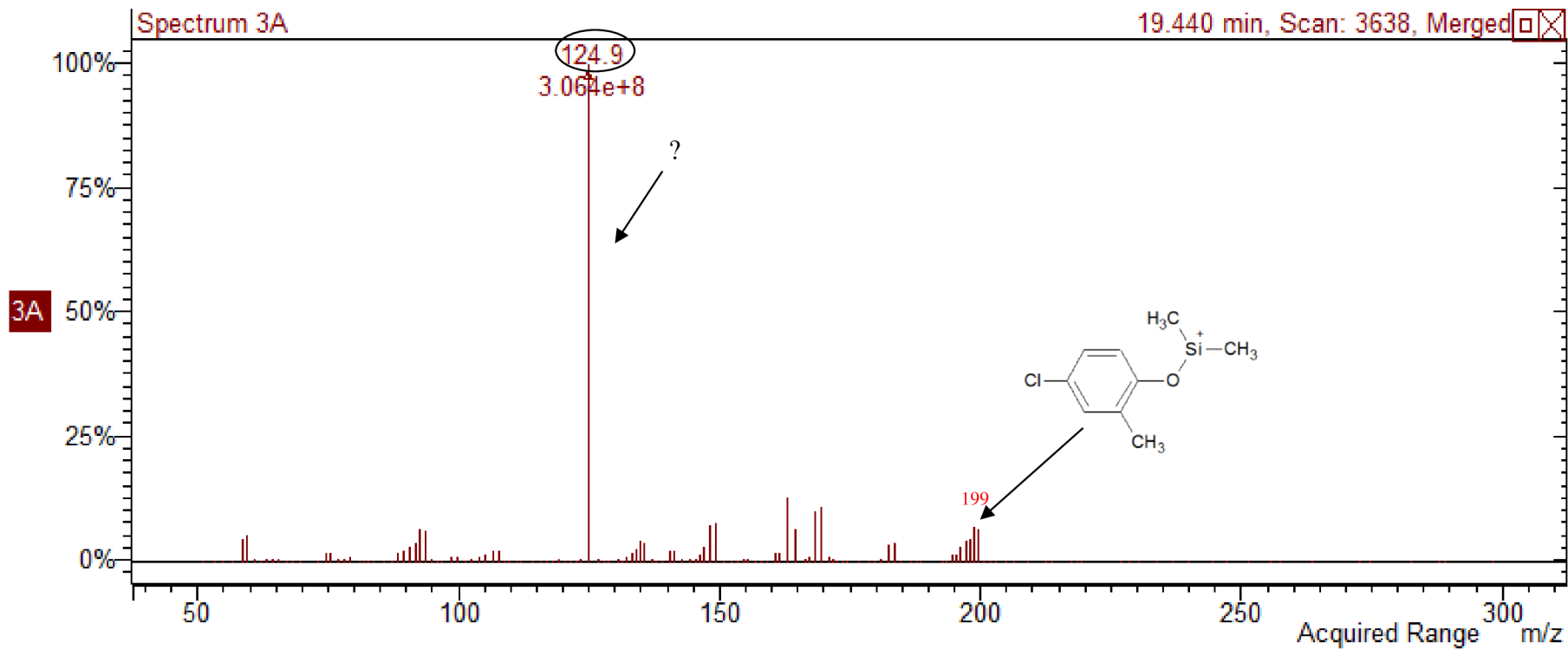
Obrázek 38: 2,4-D MS² (277→213), EI (10 eV; 1,5 mTorr)

? Struktura neobjasněna

Fragmentace MCPB



Obrázek 39: MCPB MS (199)



Obrázek 40: MCPB MS² (199→125), EI (15 eV; 1,5 mTorr)

? Struktura neobjasněna