

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav chemie a biochemie



**Agronomická
fakulta**

**Mendelova
univerzita
v Brně**



Diplomová práce

**Stanovení herbicidů
pomocí kapilární elektromigrační techniky**

Vedoucí práce:
Ing. Eliška Glovinová, Ph.D.

Vypracovala:
Bc. Lenka Janštová

Brno 2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Zpracovatelka: **Bc. Lenka Janštová**
Studijní program: Technologie odpadů
Obor: Technologie a management odpadů
Konzultant: Doc.Ing.Jan Pospíchal, CSc.
Název tématu: **Stanovení herbicidů pomocí kapilární elektromigrační techniky**
Rozsah práce: 50 – 60

Zásady pro vypracování:

1. Vypracování řešerše na téma herbicidy v životní prostředí, včetně možností jejich stanovení se zaměřením na stanovení pomocí kapilárních elektromigračních metod.
2. Vypracování přehledu formou řešerše s tématem elektromigrační metody a jejich použití.
3. Vypracování metodiky pro stanovení glyphosátu pomocí kapilární elektromigrační metody, včetně vývoje elektrolytového systému.
4. Praktické zvládnutí přístrojové techniky, konkrétně ITP analyzátoru, výrobce, Spišská Nová Ves, VILLA LABECO.
5. Provádění praktických měření modelových směsí, případně reálných vzorků.
6. Naměření a vyhodnocení získaných dat ve formě tabulek, kalibračních závislostí a grafů.
7. Zpracování diplomové práce pomocí běžných grafických programů.
8. Při textovém zpracování diplomové práce budou respektována pravidla pro zpracování a zápis literatury v souladu s předepsanými zákony a doporučenými pravidly pro psaní diplomových prací.

Seznam odborné literatury:

1. ZBÍROVSKÝ, M. – ZEMÁNEK, J. – MYŠKA, J. *Herbicidy : chemické prostředky proti plevelům*. 1. vyd. Praha: Československá akademie věd, 1960. 300 s.
2. KUŽMA, Š. *Metodická příručka pro ochranu rostlin : zelenina, ovocné plodiny, réva . Herbicidy, regulátory růstu, desikaty. Díl III*. Brno: Státní rostlinolékařská správa, 2002. 268 s.
3. KUŽMA, Š. *Metodická příručka pro ochranu rostlin : zeleniny, ovocné plodiny, réva.. Herbicidy, regulátory růstu rostlin, desikaty. Díl 2*. Praha: MZe ČR, Agrospoj, 1997. 258 s.
4. RŮŽIČKA, J. *Triazinové herbicidy – spektrofotometrické stanovení jejich reziduí*. Diplomová práce. MZLU v Brně, 1997.
5. BOČEK, P. *Analytická kapilární izotachoforéza*. Praha: Academia, 1987. 131 s.
6. POSPÍCHAL, J. – GLOVINOVÁ, E. Analytical Aspects of Carrier Free Isoelectric Focusing. *Journal of Chromatography A*. 2001. sv. 918, č. leden, s. 195–203. ISSN 0021-9673.
7. GLOVINOVÁ, E. – KULHAVÝ, J. *Využití elektromigračních separačních metod u ekologii lesa*. Disertační práce. MZLU v Brně, 2005. 81 s.
8. KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.

Datum zadání diplomové práce: říjen 2014

Termín odevzdání diplomové práce: duben 2016

L. S.


Bc. Lenka Janštvá
Autorka práce




Ing. Eliška Glovinová, Ph.D.
Vedoucí práce


doc. RNDr. Vojtěch Adam, Ph.D.
Vedoucí ústavu


doc. Ing. Pavel Ryant, Ph.D.
Děkan AF MENDELU

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: **Stanovení herbicidů pomocí kapilární elektromigrační techniky** vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:

.....

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat Ing. Elišce Glovinové, Ph.D. a doc. Ing. Janu Pospíchalovi, Csc. za odborné vedení, přátelský přístup a cenné rady po dobu mého studia a psaní diplomové práce.

Také bych ráda poděkovala své rodině, která mi byla oporou po dobu mého studia.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce na téma stanovení herbicidů pomocí kapilární elektromigrační techniky je v první části zaměřena na popis elektromigračních metod, herbicidů a možnosti jejich stanovení pomocí chemických analytických metod.

V další části práce je popsána izotachoforetická analýza a elektrolytový systém využívaný při stanovení glyfosátu. Dále je popsáno stanovení glyfosátu v odpadní vodě pomocí akumulace na asymetrickém účelově vytvořeném neutralizačním rozhraní.

V závěrečné části práce jsou zhodnoceny a okomentovány naměřené výsledky z odebrané vody.

Klíčová slova: glyfosát, izotachoforéza, elektrolytový systém, fokusace.

ABSTRACT

This thesis on the determination of herbicides by capillary electromigration techniques in the first part focuses on the description of electromigration methods, herbicides and possibilities of their determination using chemical analytical methods.

The next section describes the Isotachophoretic analysis and electrolyte system used for the determination of glyphosate. Further described is the determination of glyphosate in effluent using accumulation at the asymmetric neutralization boundary purposefully created in capillary.

The results, obtained from the real sample, are evaluated and discussed in the final part of thesis.

Keywords: glyphosate, isotachoforesis, electrolyte system, focusing.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	CÍL PRÁCE	10
3	TEORETICKÁ ČÁST PRÁCE	11
3.1	ANALYTICKÁ CHEMIE ELEKTROCHEMIE	11
3.1.1	Elektrolyty	11
3.1.1.1	<i>Transportní děje v roztocích elektrolytů</i>	<i>12</i>
3.2	ELEKTROMIGRAČNÍ SEPARAČNÍ METODY	12
3.2.1	Princip elektroforézy	13
3.2.2	Elektroforetická pohyblivost	13
3.2.3	Kapilární elektroforéza.....	14
3.2.3.1	<i>Instrumentace</i>	<i>15</i>
3.2.4	Kapilární izoelektrická fokusace	15
3.2.5	Aminokyseliny	16
3.3	KAPILÁRNÍ IZOTACHOFORÉZA	17
3.3.1	Praktické využití kapilární izotachoforézy.....	18
3.4	HERBICIDY	19
3.4.1	Charakteristika herbicidů	19
3.4.2	Historie používání herbicidů	19
3.4.3	Rozdělení herbicidů	19
3.4.4	Herbicidní přípravky a jejich aplikace	20
3.4.4.1	<i>Jednosložkové herbicidy.....</i>	<i>20</i>
3.4.4.2	<i>Translokační herbicidy.....</i>	<i>20</i>
3.4.5	Osud herbicidů v půdním prostředí	21
3.4.6	Rezistence plevelů vůči herbicidům.....	21
3.5	ROUNDUP	22
3.5.1	Glyfosát	22
3.5.2	Glyfosát a AMPA v odpadních vodách	25
3.6	STANOVENÍ HERBICIDŮ POMOCÍ DALŠÍCH ANALYTICKÝCH METOD.....	26
3.6.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	26
3.6.1.1	<i>Spojení chromatografických technik a hmotnostní spektrometrie ...</i>	<i>27</i>
3.6.2	Polarografie	27
3.6.3	Voltametrie.....	28
3.6.4	Srovnání analytických metod při analýze herbicidů	29
4	PRAKTICKÁ ČÁST	31
4.1	SIMULACE	31
4.2	IZOTACHOFRETICKÁ ANALÝZA.....	31
4.3	VOLBA ELEKTROLYTOVÉHO SYSTÉMU	32
4.3.1	Doporučené elektrolytové systémy	33

4.4	GOODOVY PUFRY	34
4.5	PROVEDENÍ KALIBRACE.....	36
4.6	DETEKČNÍ SYSTÉM	36
4.6.1	Fokusace.....	38
4.6.2	Mobilizace.....	38
4.6.3	Detekce.....	39
4.7	ANALÝZA GLYFOSÁTU VE VODĚ POMOCÍ AKUMULACE NA ASYMETRICKÉM ÚČELOVĚ VYTVOŘENÉM NEUTRALIZAČNÍM ROZHRANÍ (NBR).....	39
4.7.1	Podmínky měření	40
4.7.2	Chemikálie	41
4.7.3	Odběr vzorku.....	41
4.7.4	Postup analýzy	42
5	VÝSLEDKY MĚŘENÍ A DISKUZE	48
6	ZÁVĚR.....	49
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	51
8	SEZNAM ZKRATEK.....	55
9	SEZNAM GRAFŮ.....	56
10	SEZNAM TABULEK	56
11	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	57

1 ÚVOD

Životní prostředí je vše, co vytváří přirozené prostředí pro existenci organismů. Mezi složky životního prostředí řadíme půdu, vodu, ovzduší, horniny, organismy, ekosystémy a energii. Člověk by měl zatěžovat území v takové míře, aby nedocházelo k poškození životního prostředí, a to zejména k poškození jeho složek, funkcí ekosystémů nebo ekologické stability. ^[5]

Ne vždy je kvalita životního prostředí v souladu s požadavky na parametry například zemědělské produkce a následně i potravin. Součástí životního prostředí jsou i látky toxické, jejichž účinek může spočívat v chemických reakcích se složkami živých systémů. Tyto látky mohou působit ve změnách fyzikálně chemických vlastností vnějšího a vnitřního prostředí organismu a mohou způsobovat například zásahy do redoxních pochodů, změny pH nebo blokaci enzymů. Chemické látky v životním prostředí mohou být také příčinou dějů, jako je například bioakumulace. V této souvislosti je závažnou vlastností těchto látek perzistence toxických látek v živých systémech. Je nutné mít informace o pohybu chemických látek jak v abiotickém, tak v biotickém prostředí. Jedině potom lze přerušit či omezit tok škodlivin v potravních řetězcích. ^[7]

Roundup je běžně používaný herbicid, který dosud nebyl považovaný za nebezpečný. Jeho hlavní účinnou složkou je glyfosát neboli N-Phosphonomethylglycin. Výzkumy ovšem v poslední době ukazují, že tento herbicid není tak bezpečný, za jaký ho může veřejnost považovat. V České republice se ročně průměrně použilo více než 900 000 kilogramů glyfosátu a jeho spotřeba se stále zvyšuje.

Vzhledem k tomu, že spotřeba glyfosátu nejen v České republice, ale i v celosvětovém měřítku roste, je třeba sledovat chování této látky a její dopad na životní prostředí a zdraví člověka sledovat intenzivněji. Je nutné sledovat i její množství, které se nachází v životních složkách a také v potravinách.

Jednou z metod, jak lze sledovat množství látky, například ve vodách, je izotachoforetická analýza. Jedná se o elektromigrační chemickou metodu, která nám prostřednictvím vhodného programu může sdělit, zdali se hledaná látka v daném vzorku nachází a také v jakém množství. Tato metoda ovšem není zatím při stanovování glyfosátu tak často využívána. Je stále třeba metodu vyvíjet a hledat vhodné elektrolytové systémy, které by nám umožnily dané analýzy provést v co nejkratším časovém úseku a poskytly nám pravdivé údaje při výstupu z analýzy.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je stanovit glyfosát pomocí elektromigrační kapilární techniky, konkrétně izotachoforézou. Ke stanovení byla vybrána voda z křtinského hřbitova, kde dochází k pravidelným postřikům herbicidem Roundup, který má jako hlavní účinnou složku právě glyfosát.

Vedlejším cílem bylo praktické zvládnutí techniky měření na izotachoforetickém analyzátoru, seznámení se s programem pro simulaci analýz a zvládnutí využití vyhodnocovacího programu Clarity. Jako reálný vzorek byla použita voda ze hřbitova ve Křtinách, kde průběžně docházelo k ošetřování ploch Roundupem, jehož hlavní složka je glyfosát.

První část diplomové práce je zaměřena na literární přehled elektromigračních metod, herbicidů a analytických metod, kterými můžeme herbicidy stanovit. V druhé části práce jsou vyhodnoceny výsledky odebrané vody.

3 TEORETICKÁ ČÁST PRÁCE

3.1 Analytická chemie elektrochemie

Elektrochemie je odvětví fyzikální chemie, které se zabývá rovnovahami a ději v soustavách obsahujících elektricky nabitě částice, tedy látky, které jsou schopné vést elektrický proud.

Analytická chemie je přírodovědecká disciplína, která zkoumá a aplikuje metody, nástroje a strategie, aby získala informace o složení a povaze hmoty v daném prostoru a čase. Analytická chemie není definována pouze používanými prostředky, ale i cílem, kterého má dosáhnout. Vlastní činnost, která má získat požadované informace o látkových systémech, se nazývá chemická analýza.^[1]

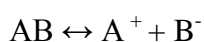
3.1.1 Elektrolyty

Elektrolyty jsou roztoky nabitých částic neboli iontů. Jako roztoky jsou označovány systémy, které jsou makroskopicky homogenní. Jedná se o typické iontové sloučeniny, u kterých je předpokládána existence iontů již v krystalické struktuře, a dále jsou to polární látky, které se v prvním kroku účinkem rozpouštědla polarizují a teprve potom disociují.

Typickým znakem iontových látek je iontová vazba. V tuhém stavu jsou prakticky nevodivé, v tavenině či roztoku, jsou elektrolyty. Většinou jsou ve vodě dobře rozpustné, ale existují i takové, které jsou ve vodě nerozpustné. Tato skupina je zastoupena početnou skupinou solí, například hydroxid sodný.^[7]

Ty elektrolyty, které jsou úplně disociovány při vysokých koncentracích, označujeme jako silné. Pokud probíhá disociace elektrolytu pouze v omezené míře, pokládáme jej za slabý.

Disociace molekul elektrolytu probíhá mechanismem zvrtné reakce. Nakonec se disociační rovnováha ustálí. Disociované ionty jsou v rovnováze s nedisociovanými molekulami.^[20]



Elektrolytická disociace je tedy rozpad elektroneutrálních molekul. Elektrolyty silné jsou v roztoku přítomny výhradně ve formě svých iontů, slabé elektrolyty jsou přítomny ve formě iontů a také molekul. ^[4]

3.1.1.1 Transportní děje v roztocích elektrolytů

Změny v chemické soustavě, která není v rovnováze, závisí na chemických reakcích a také na transportních dějích. Mezi základní transportní děje patří:

Difuze – proces, při kterém dochází ke vzájemnému pronikání rozpuštěných látek z místa o vyšší koncentraci do místa s nižší koncentrací, kdy je příčinou samovolný tepelný pohyb molekul. Difuze má veliký význam především v biologických procesech. Její role je jedna z nejdůležitější při pohybu látek v buňkách a je součástí metabolismu. U rostlin má základní význam pro příjem živin kořenovou soustavou z půdních roztoků a dále při transportu do jejich nadzemní části. ^[15]

Vedení elektrického proudu – elektrické částice migrují vlivem působení elektrického pole.

Vedení tepla – může probíhat buď mezi soustavou a jejím okolím, nebo mezi částicemi uvnitř soustavy, které mají různou teplotu. ^[4]

3.2 Elektromigrační separační metody

Elektromigrační separační metody využívají dvou elektrokinetických jevů, a to elektroosmózy a elektroforézy. V prostředí obsahujícím roztok s nabitými částicemi a pevné povrchy stýkající se s roztokem, které mohou nést elektrické náboje, například stěny kapiláry, se vytvářejí elektrické dvojvrstvy. Časem vzniká určité rovnovážné rozdělení nábojů. Na toto prostředí je připojeno stejnosměrné elektrické pole, které poruší rovnováhu v rozložení nábojů a vyvolá jejich pohyb.

Elektroforéza – po aplikaci napětí se nabité částice pohybují k opačně nabitě elektrodě.

Elektroosmóza – po aplikaci napětí se v křemenné nebo skleněné kapiláře pohybuje voda k záporné elektrodě.

Principem separace složek vzorku je rozdílná rychlost jejich migrace, neboť nabitě částice různých složek se v určitém prostředí liší svou elektroforetickou pohyblivostí.

Elektromigrační separační metody mají celou řadu modifikací. Může se v nich používat jak samotné elektroforézy a její kombinace s elektroosmózou, tak i dalších separačních principů, které doplňují využití elektroforetických pohyblivostí o další rozdíly v chování analytů v daném prostředí. ^[11]

3.2.1 Princip elektroforézy

Elektroforéza spočívá v migraci elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Toto pole se vytváří vkládáním konstantního stejnosměrného napětí mezi elektrody. V zónové elektroforéze je prostředí mezi elektrodami tvořeno základním elektrolytem. Tento elektrolyt zajišťuje dostatečnou elektrickou vodivost v celém systému. Anionty migrují ke kladnému pólu, kationty k zápornému pólu a neutrální molekuly se nepohybují. Vzhledem k tomu, že složky migrují odlišnou rychlostí, dochází v průběhu separace k vytvoření oddělené zóny jednotlivých složek. Velikost nabitých částic může být různá, od jednoduchých iontů až po makromolekuly. ^[11]

3.2.2 Elektroforetická pohyblivost

Elektroforetická pohyblivost určité nabitě částice je rychlost jejího pohybu elektrickém poli o jednotkové intenzitě. Jsou-li na začátku separace částice v jednom místě, dostávají se během separace dopředu nabitě částice, které mají větší pohyblivost a částice s menší pohyblivostí se opožďují. Tím dochází k jejich oddělení. ^[11]

Na nabitou částici o náboji Q působí v elektrickém poli o intenzitě E dvě síly: Síla F_1 , která částici uvádí do pohybu, a odpor viskózního prostředí F_2 , který ji brzdí.

V roztocích slabých elektrolytů jsou vedle sebe disociované neboli nabitě a nedisociované (nenabitě) molekuly. Podíl nabitých částic je určen stupněm disociace α . Takováto molekula vykazuje efektivní elektroforetickou pohyblivost danou součinem

$\alpha \cdot \mu_e$. Disociaci slabých kyselin lze měnit volbou pH prostředí, a tím ovlivňovat separaci těchto látek.

Pokud provádíme zónovou elektroforézu ve volném roztoku, oddělení zón bude mařeno difúzí, kterou se roztok bude snažit vyvažovat v celém objemu koncentrace složek. Proto je třeba složky během separace fixovat a elektroforézu provádět ve vhodné separaci. ^[11]

3.2.3 Kapilární elektroforéza

Kapilára je naplněna základním elektrolytem, který vede proud. Konce kapiláry jsou ponořeny do zásobníků s elektrolytem, společně s elektrodami inertního materiálu, například platiny. Mezi elektrody je vpouštěno vysoké napětí (10 – 30 kV).

Malý objem vzorku se dávkuje do konce kapiláry, ta prochází přes detektor, který je nejčastěji fotometrický. V tomto typu detektoru dochází ke sledování absorpce ultrafialového záření. Záznam závislosti odezvy na čase se nazývá elektroforegram a je podobný chromatogramu. Poloha píků určuje kvalitu, plocha nebo výška píků kvantitu.

Je vypracována řada separačních technik, které doplňují prostou kapilární zónovou elektroforézu o další možnosti. ^[11]

Kapilární zónová elektroforéza (*Capillary Zone Electrophoresis*) neboli kapilární elektroforéza ve volném roztoku (*Free Solution Capillary Electrophoresis – PSCE*) je separace založená na rozdílech v náboji analytu.

Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (*Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography – MECC*) se používá k separaci neutrálních sloučenin a využívá povrchové aktivity micel.

Kapilární gelová elektroforéza (*Capillary Gel Electrophoresis – CGE*) využívá molekulově síťového efektu rozpuštěných látek v prostředí gelu.

Kapilární izoelektrická fokusace (*Capillary IsoElectric Focusing – CIEF*) slouží k separaci analytů v gradientu pH.

Kapilární elektrochromatografie (*Capillary ElectroChromatography – CEC*) využívá k pohybu mobilní fáze elektroosmotického toku. Separace nastává v silikagelu jako stacionární fázi. Separační selektivita v CEC je kombinací elektroforetického a chromatografického procesu. ^[11]

3.2.3.1 Instrumentace

Kapiláry

Jsou vyráběny z taveného křemene. Kapilára je běžně 25 – 100 cm dlouhá a nejčastěji používané vnitřní průměry jsou 50 a 75 μm . Vnitřní povrch kapiláry může být chemicky modifikován kovalentním navázáním různých látek. Úprava povrchu je využívána pro různé účely, např. snížení adsorpce vzorku.

Regulace teploty

Regulací teploty se zajišťují stálé podmínky separace.

Dávkování vzorku

Roztok vzorku se zpravidla dávkuje do konce kapiláry, která je vzdálenější od detektoru. Zóna tvoří asi 1 – 2 % z celkové délky kapiláry.

Detektory

Jelikož je průměr kapiláry malý, musí být detektory velice citlivé. Nejvíce používané detektory jsou založeny na absorpci ultrafialového záření. Další typy detektorů využívají fluorescenci. V poslední době se často využívá spojení kapilární elektroforézy a hmotnostního spektrometru, který se značí zkratkou „MS“, výhodou je, že umožňuje snadnou identifikaci analytu a také poskytne informace o dané struktuře analyzované látky. ^[11]

3.2.4 Kapilární izoelektrická fokusace

Kapilární izoelektrická fokusace, zkráceně CIEF se využívá při separaci amfolytů. Amfolyty jsou látky, které obsahují ve své struktuře kladnou i zápornou skupinu. Molekula amfolytů může existovat ve formě kladné, záporné i neutrální částice. Na to, v jaké podobě se nachází, má vliv pH prostředí. Mezi klasické amfolyty se řadí například aminokyseliny, peptidy a proteiny.

Prostředí, ve kterém je amfolyt v elektricky neutrální formě, má pH, které se rovná izoelektrickému bodu příslušného amfolytu. Izoelektrický bod je taková hodnota pH roztoku, v němž se amfion (ion, který ve své molekule obsahuje negativní i pozitivní náboj, jeho celkový náboj je ovšem neutrální) nepohybuje v elektrickém poli. Pokud je pH prostředí vyšší než izoelektrický bod, převládá záporná forma amfolytu. V opačném

případě, tedy pokud je pH prostředí nižší než izoelektrický bod, převládá kladná forma.^[1]

3.2.5 Aminokyseliny

Odvozují se substitucí vodíku na alifatickém řetězci nebo aromatickém jádře příslušných kyselin aminoskupinou – NH₂. Aminokyseliny jsou většinou bezbarvé krystalické látky, které jsou dobře rozpustné ve vodě. Jejich molekuly obsahují jednu karboxylovou skupinu – COOH, která je kyselá a jednu bazickou skupinu – NH₂. Chovají se tedy jako amfolyty.

Jak již bylo zmíněno, při určité hodnotě pH, která se označuje jako izoelektrický bod (pI), se hodnoty kladného a záporného náboje v molekule vyrovnají. Výsledkem je celkový nulový náboj molekuly. Izoelektrický bod u neutrálních aminokyselin se pohybuje v rozmezí 4,8 – 6,3. U kyselých aminokyselin je hodnota pH 2,7 až 3,2 a u bazických 7,6 – 10,8. V izoelektrickém bodě má aminokyselina nejmenší rozpustnost ve vodě. Jestliže se změní pH přidáním kyseliny nebo zásady, její rozpustnost se zvětší.

Jsou pojmenovány triviálními názvy, ze kterých se odvozují zkratky třípísmenné nebo jednopísmenné. Mezi nejdůležitější aminokyseliny patří:

- *Gly, glycín*, se nejvíce vyskytuje ve skleroproteinech.; jeho N-methylderivát sarkosin získaný ze svalového extraktu a betain;
- *Ala, α-alanin* je součástí pantotenové kyseliny. *B-alanin* tvoří část koenzymu A;
- *Val, valin*;
- *Ile, Isoleucin a Leu, Leucin* jsou štěpnými produkty bílkovin a obsahují hydrofóbní řetězec;
- *Thr, treonin*;
- *Ser, serin* je obsažen například v kaseinu;
- *Cys, cystein* obsahuje reaktivní – SH skupinu, která se podílí na buněčných redoxních pochodech;
- *Met, methionin* je významnou součástí bílkovin;
- *Asp, aspartová kyselina*;
- *Glu, glutamová kyselina*;
- *Lys, lysin* reaguje zásaditě v důsledku dvou – NH₂ skupin v molekule (pI = 9,7);
- *Arg, arginin* reaguje zásaditěji než Lys (pI = 10,8);

- *Phe, fenylalanin*;
- *Tyr, tyrosin* je prakticky stavebním kamenem všech bílkovin;
- *Trp, tryptofan* je stavební složkou řady bílkovin;
- *His, histidin* patří mezi bazické aminokyseliny, protože obsahuje aminoskupiny = NH (pI = 7,6); tvoří součást mnoha bílkovin;
- *Pro, prolin* součást rostlinných bílkovin. ^[15]

3.3 Kapilární izotachoforéza

Při izotachoforetické analýze je vzorek dávkován mezi dva elektrolyty, které se liší mobilitou. Rychlejší elektrolyt je označován jako vedoucí iont (L) a pomalejší jako koncový (T). Obě složky migrují opačným směrem než analyt. Pokud vložíme do systému napětí, migrují složky nadávkovaného vzorku různou rychlostí a uspořádají se podle svých mobilit, dokud nedosáhnou rovnovážného stavu. Poté migrují seřazené ve svých zónách podle svých mobilit od nejrychlejší po nejpomalejší složku. Rozhraní mezi zónami jsou společná pro sousední zóny. Toto rozhraní je trvale ostré a rychlost migrace je konstantní, pokud je do systému vkládán pořad stejný proud.

Méně pohyblivé ionty se ve stacionárním stavu pohybují stejně rychle jako ionty pohyblivější. Je to způsobeno tím, že je v každé zóně jiný gradient potenciálu. Gradient potenciálu je tím vyšší, čím méně pohyblivé ionty se v zóně nacházejí, z tohoto důvodu působí na méně pohyblivé ionty větší hnací síla. ^[11]

Při průchodu zóny, která je v rovnovážném stavu, detektorem, odpovídá doba průchodu množství látky ve vzorku a je kvantitativním parametrem ITP analýzy. Kalibrační křivka závislosti délky vlny na záznamu na nadávkovaném množství analytu musí procházet počátkem. Pokud by došlo k tomu, že počátkem neprochází, může to znamenat, že došlo ke ztrátě analytu v průběhu reakce nebo také, že je v systému přítomna taková složka, která se chová podobně jako analyt.

K získávání výsledků je nutné zvolit vhodný elektrolytový systém, ve kterém bude analýza probíhat a ve kterém bude dosaženo rozdělení sledovaných analytů. Volbou systému lze také ovlivňovat citlivost, rychlost a přesnost vyhodnocení analýz. ^[1]

K základním rozdílům proti elektroforéze patří například práce s konstantním proudem. U elektroforézy se pracuje s konstantním napětím. Rychlost pohybu zón je

proti elektroforéze ve stacionárním stavu konstantní. Dále na sebe zóny v izotachoforéze navazují a nejsou oddělené. ^[11]

3.3.1 Praktické využití kapilární izotachoforézy

Izotachoforéza je vhodná pro kvantitativní analýzu předem zvolených látek a není vhodná pro identifikaci neznámých složek vzorku. Částečně ovšem může napomoci tím, že vyloučí některé z okruhu uvažovaných látek. Dále je vhodná ke stanovení látek, které jsou ionogenní povahy a jsou v daném rozpouštědle, které představuje nejčastěji voda, poměrně snadno ionizovatelné.

Vzorek musí mít takový objem, aby obsahoval dostatečné množství všech analyzovaných látek pro požadovanou citlivost analýzy a aby separace všech analyzovaných složek vzorku proběhla v co nejkratším čase. Vzorky kapalin o dostatečné vodivosti mohou být analyzovány přímo. Je-li vodivost malá, je nutné ke vzorku přidat vedoucí nebo koncový elektrolyt.

Kapilární izotachoforéza s detekcí on-line není schopná analyzovat více vzorků současně. Další vzorek musí být analyzován až po dokončení analýzy a po promytí kapiláry elektrolytem.

Izotachoforézu můžeme využít například při analýze tělních tekutin, kdy se pozornost nejčastěji soustřeďuje na analýzu krevní plazmy a moče.

V potravinářství můžeme izotachoforézu využívat zejména při analýze konzervačních přísad, organických kyselin, ale třeba i toxických látek.

U analýzy složek životního prostředí se stanovují především právě herbicidy. Stanovit můžeme jak kationtové, tak aniontové herbicidy. Mezi herbicidy, které lze izotachoforeticky stanovit patří například glyfosát, aminopyralid, chlormequat chlorid a další.

V povrchové vodě můžeme stanovit chloridy, sírany, dusitany, dusičnany, fluoridy, fosfáty atd. ^[8]

3.4 Herbicidy

3.4.1 Charakteristika herbicidů

Herbicidy jsou sloučeniny s fytotoxickými účinky. Tyto sloučeniny jsou využívány při omezování nežádoucí vegetace. Herbicidy patří mezi pesticidy, tedy chemické látky, které slouží k hubení biologicky škodlivých činitelů pěstovaných rostlin.

Herbicidem je tedy sloučenina, která je nositelem fytotoxických účinků a je považována za účinnou látku. Účinek herbicidů je způsoben poškozením pletiv nebo blokadou některých životně důležitých biochemických pochodů v rostlině. Projevy účinku herbicidů na rostlinu jsou označovány jako herbicidní účinnost. Poškození plodin herbicidem bývá označováno jako fytotoxicita. V herbicidu jsou kromě samotné účinné látky obsaženy i další složky. Jsou to například plnidla, emulgátory, ředitla a případně barviva. Tyto látky zajišťují stabilitu, skladovatelnost a ředitelnost přípravku. Pro účinnost přípravků jsou důležité adjuvanty, tedy ingredience, které zesilují a zlepšují působení účinných látek a zkvalitňují manipulaci s herbicidy.^[2]

3.4.2 Historie používání herbicidů

Hubení plevelů pomocí chemikálií bylo v Evropě aplikováno již před sto lety. K odstranění veškerého rostlinstva z železničních svršků, ploch pro skladování dřeva se např. používala kamenná sůl, drcená arsenová ruda, kyselina sírová a měďnaté soli. V prvních letech 20. století se dosáhlo určitého úspěchu při potlačování širokolistých plevelů v obilninách aplikací rozpustných měďnatých solí a zředěné kyseliny sírové. Prvním významným herbicidem pro hubení plevelů byl 2,4-dinitro-o-kresol (DNOK) zavedený ve Francii roku 1933. Jedná se o kontaktní herbicid, který hubí malé dvouděložné plevele, aniž by poškodil obilninu. DNOK má také insekticidní účinek a u nás se donedávna používal jako prostředek pro zimní postřik ovocných stromů. Významným předělem pro používání herbicidů byl objev účinnosti fenoxycetových kyselin ve 40. letech 20. století.^[2]

3.4.3 Rozdělení herbicidů

Herbicidy rozdělujeme podle selektivity účinku, aplikace, podle působení a také podle mechanismu účinku.

Selektivita účinku herbicidů – ničí jen specifickou skupinu rostlin, širokospektrální herbicidy poškozují všechny zasažené rostliny.

Aplikace herbicidů

Předset'ové – použité v době, kdy není na pozemku vyseta hospodářská plodina.

Preemergentní – herbicidy jsou použity v době, než semena hospodářské plodiny již klíčí.

Postemergentní – v době, kdy hospodářská semena již vzklíčila nebo jsou vyseta.^[19]

3.4.4 Herbicidní přípravky a jejich aplikace

U herbicidů rozhoduje o optimálním účinku v praxi složení a úprava přípravků a jejich správná aplikace. Herbicidní látky se používají téměř ve všech případech ve formě vodných postřiků, které se připravují z pevných technických výrobků. Postřiky tvoří většinou pravé roztoky herbicidů. Herbicidy obsahují někdy i látky změkčující tvrdou vodu a zabraňující vzniku méně rozpustných vápenatých a hořečnatých solí herbicidů, a tím jejich vypadávání z roztoku.^[19]

3.4.4.1 Jednosložkové herbicidy

Přípravky, které obsahují jednu účinnou látku, která je určena buď pro hubení širšího spektra plevelných druhů, nebo je cílena proti určité skupině plevelů nebo dominantnímu druhu.^[2]

3.4.4.2 Translokační herbicidy

Většina translokačních účinných látek je na bázi fenoxykyselin. Objev herbicidních účinků fenoxykyselin je spojen s poznáním vlivu auxinu.^[2]

Pronikají do rostliny a jsou rozváděny do jejích částí. Translokace může probíhat z listů do podzemní části rostliny nebo naopak z kořenů do nadzemní části rostliny. Tento typ herbicidů může ničit i vytrvalé druhy plevelů. Rostliny, které jsou zasaženy tímto druhem herbicidu, mají porušenou látkovou výměnu. Zpomaluje se růst nadzemní i podzemní části rostliny a dochází k úhynu.^[25]

3.4.5 Osud herbicidů v půdním prostředí

Pesticidy postupně pronikají do všech složek biosféry. V půdě se pomocí vody přemisťují jak horizontálně, tak vertikálně. Mezi důležité faktory ovlivňující osud pesticidů patří adsorpce na půdní koloidy a jiné formy sorpce, vyplavování z půdy. Mikrobiální a chemická degradace, odbourávání rostlinami. Důležitou otázkou je perzistence nebo-li stálost herbicidů.

Perzistence herbicidu je obvykle vyjadřována termínem „poločas rozpadu“. Neperzistentní herbicidy rozkládají polovinu své koncentrace za méně než 30 dnů. Středně perzistentní herbicidy se rozkládají nejdéle do konce vegetačního období, délka poločasu rozpadu je 30 – 100 dní. Perzistentní herbicidy se rozkládají za více než 100 dní.

Značné problémy způsobují rezidua herbicidů, která jsou přijímána kořeny a mohou být účinná i několik měsíců, při relativně nízké koncentraci. Reziduem je chápána každá látka přítomná v různých substrátech (např. půda, voda, potravina atd.) v důsledku využívání pesticidů. Aktivita reziduí závisí na vlhkostních poměrech. Některé reziduální totální herbicidy jsou méně závislé na půdní vlhkosti a mohou být přijímány v plynné fázi semeny nebo růstovými vrcholy.^[2]

3.4.6 Rezistence plevelů vůči herbicidům

Z pohledu hubení rezistentních populací plevelů je závažná křížová rezistence (cross-rezistence). Rostlina, u níž byla vyvolána rezistence jedním herbicidem, je rezistentní vůči dalším herbicidům se stejným nebo podobným mechanismem účinku. Velmi významná je cross-rezistence plevelů vůči triazinům i vůči jiným herbicidům, ovlivňujícím fotosyntézu.

V našich podmínkách byla cross-rezistence prokázána u merlíku bílého vůči všem triazinům a účinným látkám patřícím mezi uracily a pyridazinony.

Existuje také negativní cross-rezistence, kdy biotop, který je rezistentní vůči určité skupině látek, je hypercitlivý vůči jiné skupině látek.

V souvislosti s touto problematikou souvisí také vícenásobná rezistence. Mechanismy rezistence se k více než jednomu herbicidu rozvinuly v oddělených procesech. Po získání rezistence vůči herbicidu A vyvolá užití herbicidu B rozvoj

rezistence vůči herbicidu B. Rostlina je tedy rezistentní vůči herbicidu A i B na základě dvou procesů.

Vznik a rozvoj populací rezistentních herbicidů je podmíněn nesprávnou aplikací herbicidů. Pro omezení vzniku a šíření rezistentních biotypů je zapotřebí dodržovat osevní postupy a střídavé používání herbicidů s rozdílným mechanismem účinku.^[2]

3.5 Roundup

Roundup je registrovaná ochranná známka pro skupinu totálních herbicidů. Tento herbicid vyrábí americká společnost Monsanto, která na něj roku 1970 získala patent. Od roku 1974 se používá jako totální herbicid k vyhubení nežádoucích plevelů a dřevin na zemědělských plochách i mimo ně.

Účinnou látkou je glyfosát, derivát glycinu. Směsi látek prodávané pod názvem Roundup jsou celosvětově nejpoužívanější herbicidy tohoto století. Zhruba polovina všech prodávaných glyfosátových herbicidů je prodávána firmou Monsanto.

V České republice je ročně využito více než 900 000 kilogramů glyfosátu. Předpokládá se, že v roce 2017 dosáhne jeho používání v celosvětovém měřítku 1,35 milionu tun.

Evropské ekologické organizace zadaly v Německu provedení nezávislých laboratorních analýz celkem v 18 zemích, které analyzovaly rozbory vzorů moče dobrovolníků. Výsledky ve všech zemích prokázaly stopy glyfosátu. V České republice byl glyfosát obsažen v celkem 60 % vzorků.

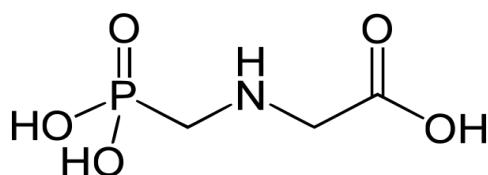
Dalším problémem by mohl být i vliv na ornou půdu. V některých typech půd se totiž glyfosát váže na půdní částice a údajně se tak stává inertním. V jiných půdních typech ovšem zůstává aktivní a jeho rozklad koordinují mikroorganismy. To může ovlivňovat biologické a chemické procesy v okolí rostlin, včetně jejich schopnosti vázat dusík. Důsledkem na takových půdách může být zvýšená potřeba aplikace dusíkatých hnojiv.^[30]

3.5.1 Glyfosát

Neboli N-Phosphonomethylglycin, je hlavní účinnou složkou Roundupu. Glyfosát je širokospektrální herbicid, který se aplikuje na listy rostlin. Je využíván po desetiletí

k regulaci plevelů v zemědělství. Jeho mechanismus spočívá v inhibici enzymu 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate syntázy (EPSPS), zapojeného do šikimátové dráhy. Inhibice EPSPS vede k narůstání koncentrace šikimátu a snížení syntézy aromatických aminokyselin, které jsou nezbytné pro přežití rostlin. ^[16]

Prvotní myšlenka toho, že glyfosát účinkuje pouze na rostliny a jinak je pro životní prostředí bezpečný se v posledních letech nejeví jako zcela pravdivá. Počáteční studie u žab naznačují, že glyfosát může být teratogenní a může mít podstatný vliv na vývoj předního a středního mozku. ^[17]

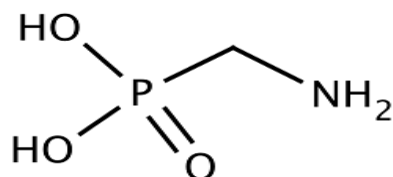


Obr. č. 1: Glyfosát – strukturní vzorec (Zdroj: <http://www.indiamart.com/>)

Navíc studie stále více prokazují, že glyfosát přetrvává ve vodě a půdě déle, než se původně odborníci domnívali. Poločas rozpadu glyfosátu v půdě je klidně až rok a více, záleží na složení půdy. Výzkumy ukazují, že sorpce a degradace glyfosátu v půdě se liší podle chemických, fyzikálních a biologických vlastností půdy. Je důležité lépe poznat vlastnosti glyfosátu a mechanismy jeho působení. Agentura pro ochranu životního prostředí EPA uvádí, že přijatelné množství glyfosátu, které může člověk přijmout denně po delší dobu bez znatelného rizika, je 1,75 mg glyfosátu na 1 kilogram váhy. Ovšem pro Evropu jsou přijatelné dávky značně nižší a představují 0,3 mg na 1 kilogram váhy. ^[18]

Požadavky na množství glyfosátu v povrchových vodách pro naši republiku najdeme v předpisu č. 401/2015 Sb., Nařízení vlády o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech, ve kterém jsou uvedeny specifické znečišťující látky pro útvary povrchových vod a limit pro glyfosát 36 µg/l. ^[32]

Degradace glyfosátu probíhá především mikrobiálně za aerobních podmínek. Za anaerobních podmínek probíhá pomaleji. Při rozkladu jsou štěpeny vazby mezi dusíkem a uhlíkem, za vzniku kyseliny aminomethylfosfonové neboli AMPA, což je hlavní metabolit glyfosátu ve vodě a půdě. AMPA se samostatně komerčně nevyužívá a svým složením je glyfosátu podobná. ^[33]



Obr. č. 2: AMPA – strukturní vzorec (Zdroj: <http://www.indiamart.com/>)

Výzkumy bylo zjištěno, že glyfosát a AMPA se často vyskytují v půdách a sedimentech, v příkopech, kanalizacích, řekách a potocích. Méně často se vyskytují v jezerech, rybnících a mokřadech, půdních a podzemních vodách. ^[22]

Výzkumy dále ukazují, že AMPA se často vyskytuje v lidské moči, zatímco glyfosát najdeme nejvíce v nezměněné formě v mateřském mléce a ve tkáních zvířat. Studie, kterou prováděli Friends of Earth Europe, spočívala v analyzování 182 dobrovolníků v rámci 18 zemí Evropské Unie a zjistili, že 80 dobrovolníků, má ve svém těle glyfosát s průměrem 0,21 µg / l a nejvýše 1,82 µg / l. AMPA byla přítomna v moči u 65 osob s průměrem 0,18 µg / l a nejvýše 2,63 µg / l. Ve spojených státech ukazují vzorky moči 8x vyšší koncentraci látek v moči, než v Evropě. Analýza vzorků mateřského mléka, které bylo testováno od matek po celé Americe, ukázala glyfosát s úrovní v rozmezí od 76 do 166 µg / l. Což představuje 760x až 1600x vyšší hodnotu, než stanovuje směrnice pro glyfosát pro pitnou vodu v Evropské Unii. ^[23]

Ovšem existují i jiné způsoby, než je konzumace potravin, jakými můžeme do svého organismu nechtěně dostat glyfosát nebo jeho metabolit AMPA. Tento problém se týká především žen. V posledním roce se často probírá kontaminace surové bavlny glyfosátem a AMPOU. Například jedna argentinská studie Prostoru socio-environmentální spolupráce (EMISA) University of La Plata, Argentina, předkládá kontrolní výsledky tamponů, hygienických vložek a sterilní gázy pozitivních na přítomnost glyfosátu a AMPY. 85 % všech testovaných vzorků bylo pozitivních

na glyfosát a 62 % na AMPA, ale v případě bavlny a sterilní bavlněné gázy to bylo 100 %. Za zmínku také stojí, že v březnu 2015 změnila Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC), která je součástí WHO, klasifikaci glyfosátu z možného karcinogenu na karcinogen pravděpodobný. ^[24]

3.5.2 Glyfosát a AMPA v odpadních vodách

Vzhledem k polárnímu charakteru, nízké rozpustnosti v organických rozpouštědlech a vysoké rozpustnosti ve vodě je stanovení glyfosátu a AMPA oproti dalším herbicidům, které jsou v zemědělství využívány, poměrně komplikované. Při analytickém stanovení se preferují metody chromatografické, spektrofotometrické a již zmiňované kapilární elektroforetické.

Nicméně na množství a přítomnost AMPY v odpadních vodách byl prováděn výzkum například na dvou čistírnách odpadních vod v Rakousku. Cílem této studie bylo zjistit výskyt AMPY v odpadních vodách, jako možný zdroj znečištění pro povrchové vody. Ve studii došli k závěru, že výskyt AMPY v odpadní vodě byl vysoký a množství samozřejmě záviselo na míře znečištění. ^[28]

V roce 2002 taktéž vědci zkoumali vzorky vypouštěných odpadních vod do řek z 10 čistíren odpadních vod. V tomto případě byly vzorky glyfosátu malé, ale šlo o první výzkum, který poukazoval na to, že glyfosát na výstupu z čistíren odpadních vod může být zdrojem znečištění ve vodních tocích. Vzorky byly odebrány z čistěných odpadních vod, a to jak před vstupem na čistírnu, tak i na výstupu po vyčištění.

V této studii dále vědci došli k závěru, že v odpadních vodách byla v mnohem větší míře detekována kyselina aminomethylfosfonová, tedy metabolit glyfosátu a také v mnohem vyšších koncentracích. Asi 68 % vzorků obsahovalo AMPU a 18 % vzorků obsahovalo glyfosát. ^[29]

Problematika glyfosátu a AMPY na výstupu z čistírny odpadních vod je v současné době nevyřešená. Mnoho výzkumů se touto problematikou nezabývá a i navzdory těmto dvěma výzkumům převládá spíše tvrzení, že glyfosát a AMPA jsou vzhledem ke svému složení na čistírnách odbourány. Rozklad glyfosátu a AMPA na čistírnách odpadních vod byl prodiskutován s odborníkem na čištění odpadních vod z firmy Královopolská Ria a.s., který potvrdil toto tvrzení. Abychom ovšem měli stoprocentní jistotu, museli bychom provést vlastní výzkum.

3.6 Stanovení herbicidů pomocí dalších analytických metod

3.6.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Metoda HPLC je založena na separaci analytů na základě jejich pohyblivosti mezi stacionární a mobilní fází. Během separace dochází k vzájemnému působení mezi mobilní fází a analyty, dále dochází k interakci mezi stacionární a mobilní fází a sorpci analytů na stacionární fázi.

Při přechodu analytu A z fáze mobilní do fáze stacionární se chromatografický systém přiblíží k rovnovážnému stavu. Tento jev mezi oběma fázemi můžeme popsat distribuční konstantou K_D .

$$K_D = \frac{[A]_s}{[A]_m},$$

$[A]_s$ – rovnovážná c analytu ve stacionární fázi

$[A]_m$ – rovnovážná c analytu v mobilní fázi

Na základě rozlišnosti této konstanty jsou analyty v koloně zadržovány různě. Jejich retence je tedy rozdílná a je porovnávána pomocí retenčních faktorů.

$$k = \frac{(t_R - t_M)}{t_M},$$

t_R – retenční čas analytu neboli čas od doby, kdy je vzorek nadávkován a detektor zaznamená maximum píku

t_M – mrtvý čas analytu, doba, kdy látka neinteraguje se stacionární fází

V chromatogramech využíváme píky, abychom určili mrtvý čas potřebný pro výpočet retenčního faktoru, podle kterého poté určíme daný analyt v systému. Píky mohou vznikat tehdy, pokud mobilní fáze obsahuje více než jednu složku.

Tato metoda je vhodná pro stanovení netěkavých a polárních látek. Lze s ní stanovovat například s-triazinové herbicidy. ^[12]

3.6.1.1 Spojení chromatografických technik a hmotnostní spektrometrie

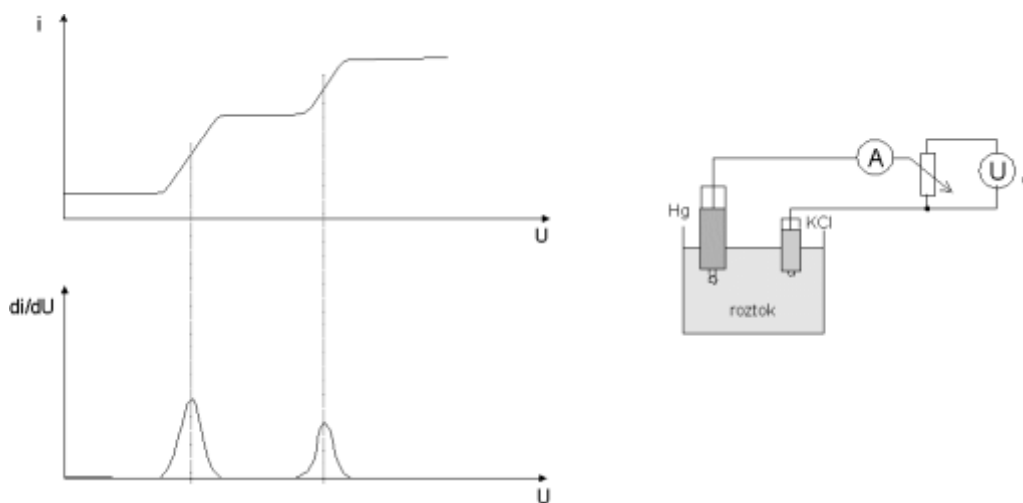
Tato metoda představuje velmi účinnou a významnou analytickou techniku pro stanovení organických látek, které se nacházejí i v komplikovaných směsích ve velmi rozdílném zastoupení. Spojení těchto dvou metod v podstatě eliminuje slabinu chromatografických technik, kterou je spolehlivost identifikace založená na porovnání retenčního času neznámé látky v analyzovaném vzorku se standardem. Zde je ovšem jediná jistota v tom, že pokud se retenční chování liší, nejsou standard a neznámá látka totožné. Jistota separace ovšem závisí na konkrétních podmínkách separace.

Naproti tomu analýza organických směsí pomocí hmotnostní spektrometrie s elektronovou ionizací zpravidla nevede k smysluplnému výsledku, neboť je nemožné přiřadit fragmenty příslušné složce směsi. Avšak vlastnost hmotnostní spektrometrie dovoluje sejmout dostatečně kvalitní spektra i z množství sloučenin, která jsou kompatibilní se separačními technologiemi. ^[1]

3.6.2 Polarografie

Tato metoda se zabývá elektrolýzou roztoků oxidujících a redukujících látek mezi polarizovatelnou elektrodou, nejčastěji používanou rtuťovou kapkovou elektrodou (DME) a referenční elektrodou (RE). Tuto metodu objevil Jaroslav Heyrovský, který za ni dostal roku 1922 Nobelovu cenu. ^[14]

Velkou výhodou polarografie je, že v ní mohou být analyzovány vzorky, které jsou v koncentraci 10^{-8} a také lze manipulovat se vzorky v množství 0,05 ml. Poloha vlny v polarogramu podél osy udává potenciální identifikaci látky, velikost proudu udává obraz o kolísání koncentrace materiálu. ^[10]



Obr. č. 3: Polarografické vlny a schéma polarografu (Zdroj: <http://canov.jergym.cz/>)

Analýza funguje tím způsobem, že se na povrchu kapky rtuti vytvoří elektrická dvojvrstva. Při zvyšování potenciálu mezi anodou a katodou se uvolňují příslušné ionty na katodě a dochází k nárůstu proudu, který je ovlivňován množstvím iontů, které mohou ke katodě z roztoku přicházet. Proud přestane růst v momentě, kdy se množství vylučujících iontů rovná počtu přicházejících iontů. Hodnota půlvlnového potenciálu určuje danou látku. Do roztoku je také přidávána silná kyselina, aby došlo ke zvýšení vodivosti roztoku.

Z výsledné křivky stanovíme podle jednotlivých poloh píků, které látky roztok obsahuje. Koncentraci dané látky můžeme určit například metodou standardního přídatku. Měření se provede vícekrát a do roztoku je přidáváno známé množství látky. Srovnáním původního roztoku a roztoku po přidání daného množství látky lze určit, jaký nárůst proudu odpovídá tomuto množství, a z výšky původního píku vypočítat odpovídající koncentraci. ^[10]

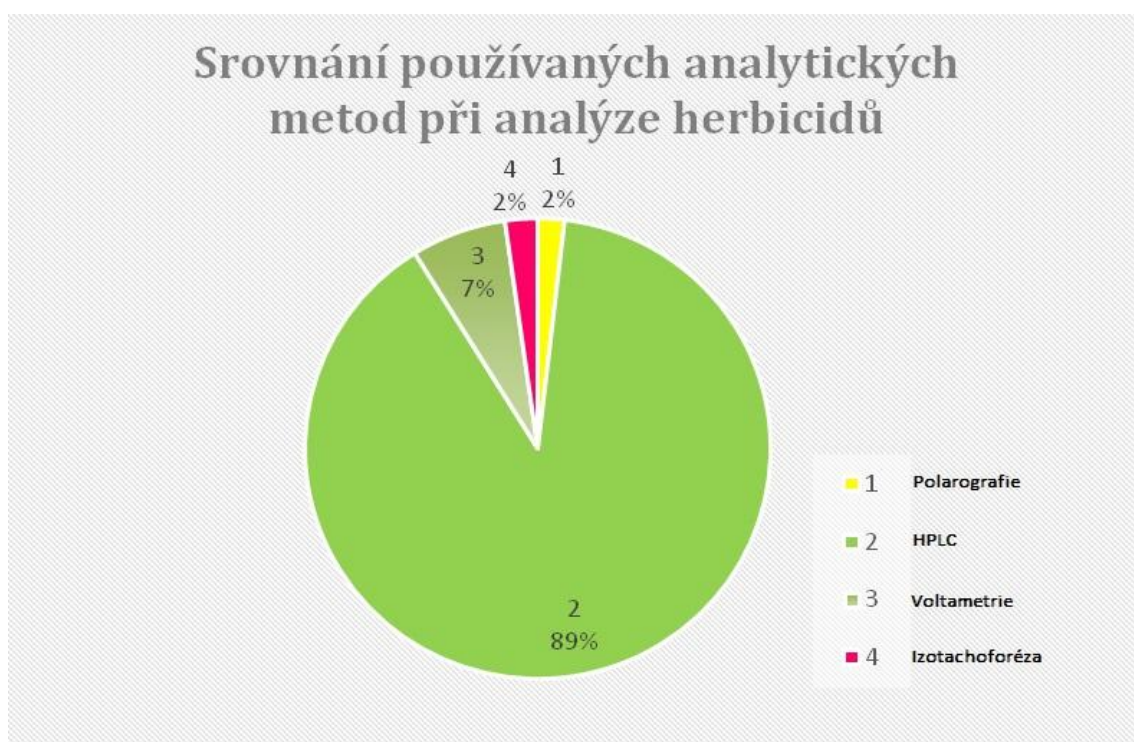
3.6.3 Voltametrie

Voltametrie je metoda vhodná k detekci neznámých látek a k určování jejich koncentrace. Principem je měření intenzity elektrického proudu procházejícího pracovní elektrodou v závislosti na měnícím se elektrickém napětí.

System se skládá ze tří elektrod, a to z pracovní elektrody, která je součástí elektrického článku, srovnávací elektrody, kterou neprochází proud a nedochází tedy k polarizaci, a elektrody pomocné. Za těchto podmínek má referentní neboli srovnávací elektroda konstantní potenciál. Se změnou vloženého napětí se mění elektrický potenciál elektrody pracovní vůči elektrodě referentní. Velikosti proudu protékající pracovní elektrodou se měří proti pomocné elektrodě, která bývá většinou platinová nebo uhlíková. [9]

Stanovení glyfosátu pomocí voltametrie bylo zkoumáno na Univerzitě Karlově v Praze. Studium prokázalo, že by metoda mohla být vhodná pro rutinní analýzy glyfosátu v půdách během studie jeho vlivu na půdní organismy. [3]

3.6.4 Srovnání analytických metod při analýze herbicidů



Graf č. 1: Procentuální srovnání analytických metod

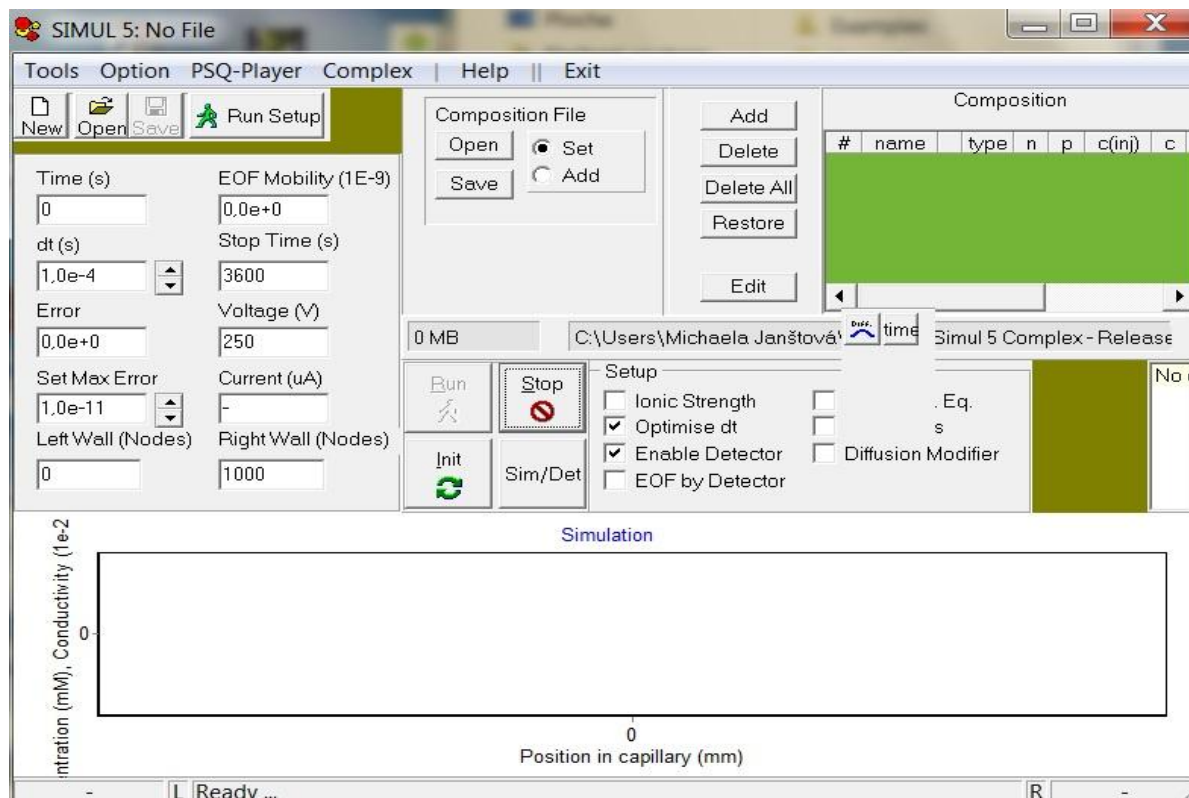
Z grafu je vidět procentuální srovnání používaných analytických metod při analýze herbicidů. Nejvíce se herbicidy v současné době stanovují pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Izotachoforéza je v současné době jedna z méně využívaných metod, ovšem význam stanovení podle této metody dává možnost srovnání výsledků s ostatními analytickými stanoveními a také dochází k rozšíření aplikačního pole metod.

Ne všechny herbicidy lze pomocí elektromigračních metod, mezi něž se řadí i izotachofórze, stanovit. Elektromigračními metodami můžeme stanovit pouze iontové látky. Herbicidy ovšem většinou iontové nejsou. Proto jsme k naší následné analýze museli zvolit herbicid, který tuto vlastnost má. I to je samozřejmě důvod toho, že je izotachofórze využívána méně, než výše uvedená HLPC.

4 PRAKTICKÁ ČÁST

4.1 Simulace

Počítačovou simulaci je možné provést v programu Simul 5 Complex. Tento program provádí simulaci pohybu iontů v kapalných roztocích v elektrickém poli.



Obr. č. 4: Simulační program Simul 5 Complex

Program lze využít, pokud potřebujeme zkontrolovat nebo vysvětlit jevy, které pozorujeme v experimentech. Pozorovat můžeme například systémové píky, neboli zóny, jejich výšku a tvar.

Simul 5 complex obsahuje databázi na základě tabulek Takešihio Hirokawy. Tabulky obsahují data s mnoha ionty. ^[21]

4.2 Izotachoforetická analýza

Izotachoforetická analýza je ta část analýzy, která zahrnuje nástřik vzorku, separaci a detekci. Po nástřiku se analyzované ionty pohybují v elektrickém poli. Nejdříve dochází k separaci a poté jsou výsledné separované zóny detekovány pomocí detektoru. V separačním kroku je cílem úplná vzájemná separace všech sledovaných složek až

dojde k vytvoření izotachoforetických zón individuálních látek. V druhém kroku je cílem detekce analyzovaných látek. Záznam musí být dobře kvalitativně i kvantitativně vyhodnotitelný.

Výhodný je ten stav, kdy lze provést separaci i detekci v co nejkratším čase s minimálním množstvím vzorku. V praxi je tedy snaha pracovat s takovým minimem vzorku, které ještě postačuje pro dosažení požadované přesnosti analýzy.

Separace je závislá na mnoha podmínkách, závisí na složení vedoucího elektrolytu, na hodnotě hnacího proudu, na množství dávkovaného vzorku, čímž spolu souvisí separace a následná detekce. ^[8]

4.3 Volba elektrolytového systému

Při výběru je třeba dbát na výběr chemikálií. Ne všechny chemikálie jsou vhodné a někdy je třeba je před použitím v samotné analýze upravit. Je nutné brát v potaz rozpustnost látek, které budou sloužit jako elektrolytový systém.

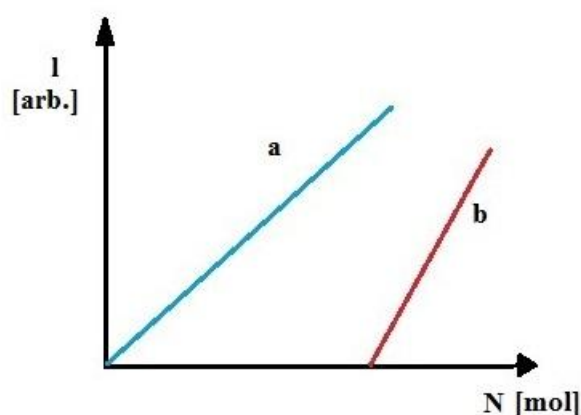
Dále je třeba uvážit chemickou stabilitu daných látek. Při volbě je nutné brát v úvahu oxidační či redukční vlastnosti, které budou působit na analyzované látky, a je nutné brát zřetel na srážlivost daného roztoku.

Dalším faktorem ovlivňujícím stabilitu je ionizace látek, které jsou analyzovány. K separaci těchto látek je třeba, aby byly alespoň částečně disociovány a jejich pohyblivost tedy byla dostatečná.

Zóna je dostatečně stabilní, pokud obsahuje stále konstantní množství analyzované látky. Stabilitu zón předpokládáme v situaci, kdy se všechny rovnováhy zahrnující analyzovanou látku ustalují velmi rychle. Fyzikálně-chemické uspořádání látek je takové, že nedochází k rozpadu komplexů během migrace a dále rozhraní zón vykazují samozaostřující efekt.

Stabilitu zón můžeme ověřit pomocí kalibračního grafu, který nám vyobrazí závislost délky zóny na dávkovaném množství analyzovaného roztoku.

Pokud je zóna stabilní, kalibrační přímka prochází počátkem a kalibrační křivka je ve tvaru přímky. V případě, že je zóna nestabilní v kalibračním grafu neprochází počátkem. Pro další průběh analýzy je tedy vhodné hledat jiné řešení. ^[8]



Obr. č. 5: Přímka a zobrazuje stabilní zónu, naopak b zónu nestabilní (Zdroj: BOČEK, Petr. Analytická kapilární izotachoforéza. Praha, 1987)

4.3.1 Doporučené elektrolytové systémy

Při výběru vhodného elektrolytového systému se používají kromě fyzikálně chemických pravidel a výpočtů také určitá konkrétní doporučení. Jako vedoucí iont je zpravidla vhodný rychlý iont plně disociované látky. Jako terminátor je nutno uvážit H^+ , resp. OH^- ionty, které musí vždy vytvořit poslední zónu systému. Obecně lze použít jako terminátor takovou slabou kyselinu nebo bázi, jejíž pohyblivost je nižší než pohyblivost separovaných látek. Hodnota pK_a musí být nižší v případě kationtů a vyšší v případě aniontů, než hodnoty pK_a separovaných látek. ^[8]

Tabulka č. 1: Základní pravidla pro volbu elektrolytového systému (Zdroj: BOČEK, Petr. Analytická kapilární izotachoforéza. Praha, 1987)

	Kationtová ITP	Aniontová ITP
vhodný vedoucí iont	K^+ , NH_4^+	Cl^-
terminátor	H^+	OH^-
jiný vhodný terminátor	slabá báze	slabá kyselina
protiiont	slabá kyselina	slabá báze
podmínka ionizace analyzovaných látek	$pH \leq pK_{BH} + 1$	$pH \geq pK_{HA} - 1$

4.4 Goodovy pufrý

Pufrý jsou obvykle směsi slabých kyselin a jejich konjugovaných zásad. Nebo směsi slabých zásad a jejich konjugovaných kyselin. Hodnota pH pufru závisí na vzájemném poměru koncentrací obou složek a disociační konstantě, která vyjadřuje ochotu k disociaci.

Dané pH roztoku se odvíjí od koncentrace vodíkových (H^+) a hydroxylových (OH^-) iontů. Pokud je koncentrace obou iontů stejná, jedná se o roztok neutrální. Pokud koncentrace vodíkových iontů převýší koncentraci iontů hydroxylových, je roztok kyselý. Pokud v roztoku převyšuje koncentrace hydroxylových iontů, pH je zásadité.

Kyselinu definujeme jako donor (dárce) vodíkových iontů, zásadu jako akceptor (příjemce) vodíkových iontů. Pufrý jsou schopny uvolňovat nebo naopak vázat vodíkové ionty, proto jsou využívány k udržování pH roztoku.

Schopnost pufru udržovat pH vyplývá z dostatečné koncentrace obou složek konjugovaného páru. Kyselina pufru zabrání zvýšení pH, pokud do roztoku přidáme zásadu, naopak zásada pufru zabrání snížení pH, pokud přidáme kyselinu. ^[26]

V tabulce je uveden výčet Goodových pufrů, které jsou často využívány především v oblasti biochemie a biologie. Splňují požadavky, které jsou v této výzkumné oblasti třeba, a to konkrétně hodnotu pK_a mezi 6 až 8, disponují vysokou rozpustností. Dále jsou netoxické, mají velice omezený vliv působení na biochemické reakce, jejich absorbance je v rozmezí od 240 nm do 700 nm. Vykazují omezenou interakci s kationty. ^[27]

Tabulka č. 2: Tabulka Goodových pufrů (Zdroj:Wikipedie.cz)

Pufr	Název	pKa při 20 °C
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid	6.15
ADA	Sodium 2-((2-amino-2-oxoethyl)(carboxymethyl)amino)acetate	6.62
PIPES	piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)	6.82
ACES	N-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid	6.88
MOPSO	β-Hydroxy-4-morpholinepropanesulfonic acid	6.95
Cholamine Chloride	Cholamine Chloride	7.10
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid	7.15
BES	2-[Bis(2-Hydroxyethyl)amino]ethanesulfonic acid	7.17
TES	2-[[1,3-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl]amino]ethanesulfonic acid	7.5
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	7.55
DIPSO	3-(Bis(2-hydroxyethyl)amino)-2-hydroxypropane-1-sulfonic acid	7.6
Acetamidoglycine	Acetamidoglycine	7.7
TAPSO	3-[[1,3-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl]amino]-2-hydroxypropane-1-sulfonic acid	7.7
POPSO	Piperazine-1,4-bis(2-hydroxypropanesulfonic acid)	7.85
HEPPSO	2-Hydroxy-3-(4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl)propane-1-sulfonic acid	7.9
HEPPS	3-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propane-1-sulfonic acid	8.1
Tricine	N-(2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)glycine	8.15
Glycinamide	Glycinamide	8.2
Bicine	2-(Bis(2-hydroxyethyl)amino)acetic acid	8.35
TAPS	3-[[1,3-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl]amino]propane-1-sulfonic acid	8.55

4.5 Provedení kalibrace

Účelem kalibrace je nalézt závislost mezi stanovovanými složkami x a měřenými veličinami y tak, aby výsledky měření nebyly zatíženy soustavnými chybami. Vlivem kalibrace by výsledky stanovení měly mít větší náhodný rozptyl, než jaké má měření hodnoty y .

Výhodou kalibrace je, že je možné ji provést s nevelkým vynaložením času, práce a nákladů.

Kalibrační závislost je vždy určena z konečného počtu m_E měření v oblasti x_{\min} až x_{\max} a platí vždy pro tuto oblast.

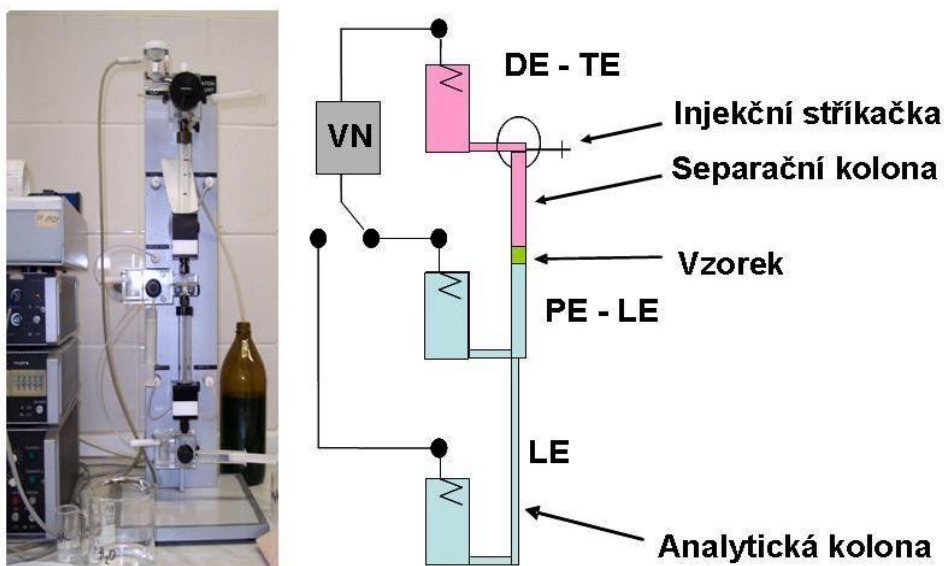
U některých fyzikálních analytických metod je průběh kalibrace ovlivňován přítomností ostatních složek, tomuto jevu se také říká matriční efekt. Pokud se analyzuje pouze pár vzorků, může se jako výhodnější metoda stanovení jevit metoda standardního přídatku, než zjišťování kalibrační funkce.

Konstanty kalibrační funkce se mohou měnit s časem, je tedy nutné kontrolovat kalibrační funkci v pravidelných časových odstupech. Počet k tomuto potřebných vzorků odpovídá počtu konstant kalibrační závislosti.

U standardních vzorků je kalibrace poměrně snadná. Lze použít čisté roztoky nebo uměle připravené směsi. Standardní roztoky se připravují zředováním základního roztoku a je tedy třeba pipetovat velký objem a doplňovat jej rozpouštědlem v baňce větší velikosti, aby se omezily chyby zředování. Zředování je nutné, protože silně zředěné roztoky je obtížné připravit přímým navážením a rozpuštěním.^[8]

4.6 Detekční systém

Výrobce izotachoretického analyzátoru, na kterém jsem měření stanovovala, je Villa Labeco, Spišská Nová Ves, Chrapčiakova 1, Slovenská republika. Použitá elektroforetická jednotka je složena z terminátorového bloku (T) s dávkovacím kohoutem a septem pro nástřik vzorku stříkačkou. Dále ze separační kapiláry, která má průměr 0,8 mm, detekční cely pomocného detektoru (D1), rozvětovacího bloku s pomocnou elektrodou, analytické kapiláry s průměrem 0,3 mm, další detekční cely (D2) a cílové elektrody s dalším vstupem pro elektrolyt.

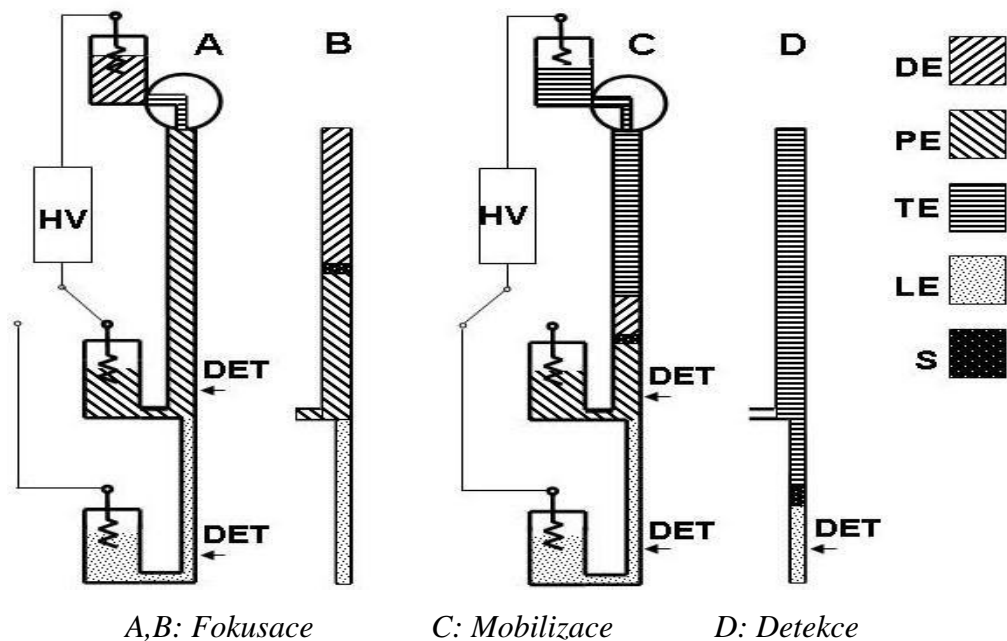


Obr. č. 6: Přístroj pro izotachoforetickou analýzu a jeho popis (Zdroj: Archiv Glovinová)

K předseparaci stanovovaného vzorku, fokusaci a mobilizaci dochází průchodem elektrického proudu v teflonové separační kapiláře, která má délku 160 mm a průměr 0,8 mm. Tato kapilára je umístěna v separační koloně. Tato je dále napojena na analytickou kolonu obsahující teflonovou analytickou kapiláru o délce 160 mm a průměru 0,3 mm. Konce kapilár jsou připojeny k elektrodovým komůrkám, které obsahují platinové elektrody připojené na zdroj vysokého napětí. Zdroj VN dodává konstantní stejnosměrný proud. V místě, kde jsou spojené kapiláry a elektrodové komůrky, se nachází semipermeabilní membrána, která zabraňuje nežádoucímu proudění elektrolytu.

Po nadávkování vzorku je dávkovací neboli DE elektrolyt vyměněn za koncový TE elektrolyt. Zóny se stanou opět nabitě a putují do analytické kolony směrem k detektoru, kde jsou v běžném izotachoforetickém módu detekovány.

Metody se tedy skládají ze tří částí, a to fokusace, mobilizace a detekce. Jsou znázorněné na obr. č. 7. ^[31]



Obr. č. 7: Izotachoforetické módy (Zdroj: ŠIŠPEROVÁ, Eliška. Vývoj elektromigračních metod pro stanovení kovů. Brno, 2011. Disertační práce)

4.6.1 Fokusace

Nejprve je třeba do systému vložit stejnosměrné napětí. Působením elektrického proudu poté do systému putuje dávkovací elektrolyt směrem ke katodě. Poté, co se ustálí rovnováha mezi toky iontů H^+ dávkovacího elektrolytu a OH^- primárního elektrolytu, stane se neutralizační rozhraní stacionární v závislosti na čase a dále už se nepohybuje. Fokusace látek vzorku probíhá na tomto stojícím rozhraní.^[31]

4.6.2 Mobilizace

Poté co jsou látky vzorku dostatečně nadávkovány, je dávkovací elektrolyt DE vyměněn za koncový mobilizační TE. Fokusované ionty v zónách (separát) S, získají opět náboj a zvolna putují ve formě ostrých zón do separační kapiláry. V okamžiku, kdy prochází přes první detektor DET umístěný v separační koloně, přepne se proud do druhé kolony a zóny putují dál analytickou kolonou k druhému detektoru.^[31]

4.6.3 Detekce

V analytické kapiláře se mobilizační elektrolyt stává terminačním a zóny postupují dále v ITP módu směrem k detektoru běžnou izotachoforetickou analýzou. Zóny jsou detekovány konduktometrickým detektorem. Získaná data jsou následně zaznamenána v počítači a vyhodnocena pomocí programu CLARITY. ^[31]

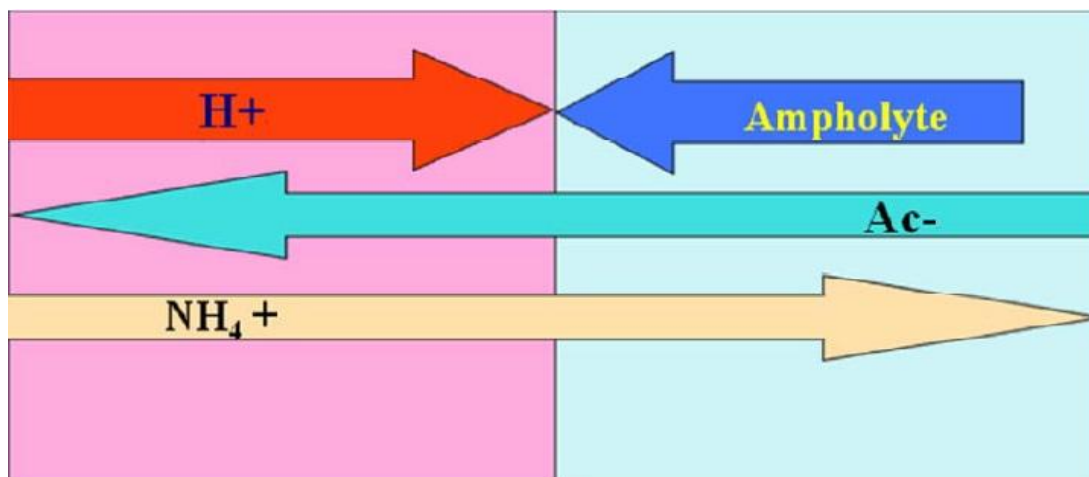
4.7 Analýza glyfosátu ve vodě pomocí akumulace na asymetrickém účelově vytvořeném neutralizačním rozhraní (NBR)

Vyšší citlivosti v analytické chemii je možno dosáhnout pomocí vhodné předseparační nebo předkoncentrační metody. Výběr metody závisí na charakteru analytu a na cíli analýzy a také na tom, zda separujeme vzorek celý nebo pouze jeho část.

Pro předseparaci, selektivní předkoncentraci, byl vyvinut třífázový proces. V prvním kroku separace jsou látky předkoncentrovány, v druhém kroku jsou separovány a ve třetím následně analyzovány. Všechny kroky probíhají on-line v průběhu jedné analytické procedury. Tyto kroky využívají různé elektromigrační principy a také na sebe navazují.

V prvním kroku je využito principu stojícího neutralizačního reakčního rozhraní, v případě stanovení glyfosátu, tedy asymetrické neutralizační rozhraní. Ve druhém kroku je nahromaděný analyt mobilizován, separován a dopraven do analytické kolony. Tento krok probíhá bez snížení koncentrace naakumulovaného vzorku. V závěrečném kroku je rozseparovaný analyt detekován.

Asymetrické neutralizační rozhraní je vytvořeno z jednoduchého NBR nahrazením kyselého nebo alkalického elektrolytu vhodným amfolytem. Výsledkem je poté konstantní pH na jedné straně rozhraní. Rozhraní umožňuje zvýšit selektivitu při dávkování nebo na jedné straně použít extrémní hodnotu pH. Ta může být využita například při akumulaci kyselin. ^[13]



Obr. č. 8: Schéma toků na asymetrickém NBR (Zdroj: Archiv Glovinová)

Experimentální uspořádání

Pro analýzy byl použit ITP přístroj (CS Isotachophoretic Analyzer, Villa Labeco, Slovenská republika) ve dvoukolonovém uspořádání vybavený konduktivní detekcí.

Elektrolytový systém pro asymetrické neutralizační rozhraní

Alkalický dávkovací elektrolyt: 0,02M Histidin pH=pI

Kyselý (fokusační) elektrolyt: 0,02M HCl + 0,005M Histidin pH=1,7

4.7.1 Podmínky měření

Proud: 250 μ A

Teplota: Separace probíhala za pokojové teploty, při 25 °C

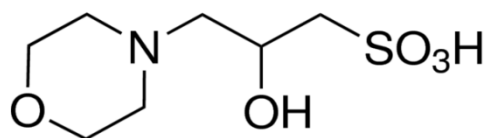
Délka měření bez fokusace: 1500 sekund

Délka měření s fokusací: 1000 sekund

Množství nastříkovaného vzorku: 30 μ l

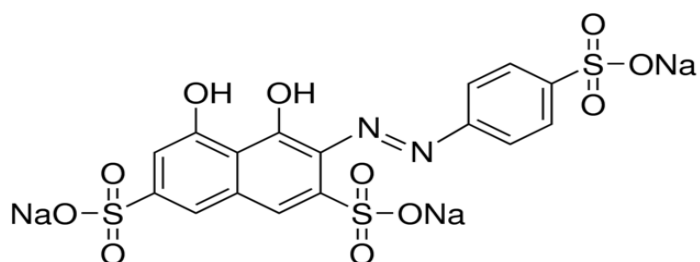
4.7.2 Chemikálie

MOPSO (β -Hydroxy-4-morpholinepropanesulfonická kyselina, 3-Morpholino-2-hydroxypropanesulfonická kyselina): pH – 6,2-7,6, pK_a – 6,9



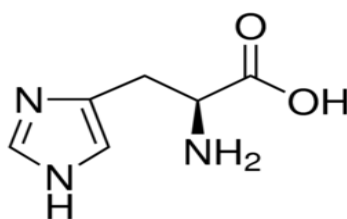
Obr. č. 9: MOPSO – strukturní vzorec (Zdroj: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

SPADNS (1,8-dihydroxy-2-(4-sulfofenyl azo) naftalen-3,6-disulfonová kyselina trisodná sůl)



Obr. č. 10: SPADNS – strukturní vzorec (Zdroj: <http://www.sigmaaldrich.com/>)

hist (histidin): pK_a – 6



Obr. č. 11: hist – strukturní vzorec (Zdroj: <http://www.sigmaaldrich.com/>)

4.7.3 Odběr vzorku

Odběr vzorku proběhl v průběhu vegetačního období, bezprostředně po postřiku, ve Křtinách. Křtiny se nachází v Moravském krasu, asi 16 kilometrů severně od centra města Brna. Jako místo odběru byl zvolen křtinský hřbitov, z důvodu využívání herbicidu Roundup při ošetřování hřbitovních cest proti nežádoucí vegetaci. Cesty jsou tímto

herbicidem pravidelně ošetřovány. Tato voda byla použita místo destilované vody jako TE a DE.



Obr. č. 12: Místo odběru vzorku

4.7.4 Postup analýzy

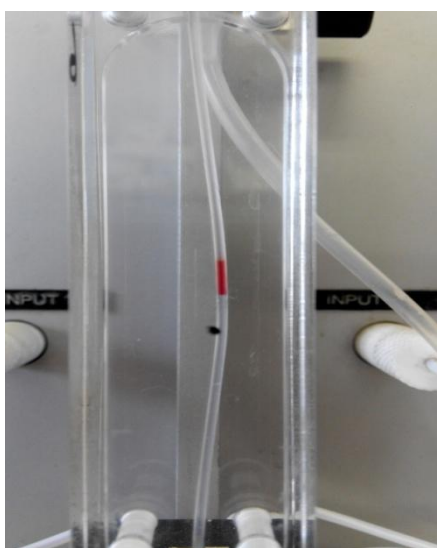
Při analýze byla kolona naplněna příslušnými elektrolyty. Horní terminátorová komůrka byla naplněna dávkovacím elektrolytem, který obsahoval vzorek. Separační komora spolu se spodní elektrolytovou komůrkou byly naplněny primárním – fokusačním elektrolytem. Analytická kapilára s příslušnou komůrkou byla naplněna vedoucím elektrolytem.

Průchodem elektrického proudu se na rozhraní elektrolytů (kyselého a zásaditého fokusačního) vytvoří ostré skokové rozhraní o rozdílném pH a ionty vzorku jsou nepřetržitě dávkovány do rozhraní. Zde se zadržují a dále vytváří ostrou zónu se samozaostřujícím efektem v případě amfolytů, nebo jejich pohyblivost klesá k nule, a to v případě separace kyselin. Tento jev probíhá kromě amfolytů také u kovů. Po určitém čase a naakumulování dostatečného množství vzorku se vymění dávkovací elektrolyt za terminační elektrolyt. Tímto dojde k mobilizaci nadávkovaných zón, které takto doputují do analytické kolony, kde jsou následně analyzovány. ^[13]

Před měřením reálného vzorku, bylo třeba najít vhodný elektrolytový systém pro detekci glyfosátu. Vzorek byl dávkován manuálně injekční stříkačkou do kohoutu ve vrchní části přístroje. Objem dávkovaného vzorku byl 30 μl . Pro elektrolytový systém byl nastaven konstantní proud 250 μA . Napětí v systému se pohybovalo v rozmezí 0,5 – 2 kV. Separace probíhala v izotachforetickém analyzátoru složeném z jedné kolony, nástřikového zařízení, dělicího bloku a vodivostního detektoru.

Po zvolení vhodného elektrolytu byla zahájena separace. Do zásobníku pro TE a do místa nástřiku byla aplikována směs 0,02 M MOPSO a SPADNS v různých koncentracích. Jako LE byl použit roztok o složení 10:9,5 Cl/hist. Při tomto měření se jednalo pouze o samotnou izotachoforézu bez fokusace, abychom zjistili detekční limit, pro SPADNS.

Jak lze zjistit z grafu č. 2, detekční limit pro stanovení SPADNS byl v případě použití izotachoforézy bez fokusace $10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$.



Obr. č. 13: Migrace zóny glyfosátu v kapiláře

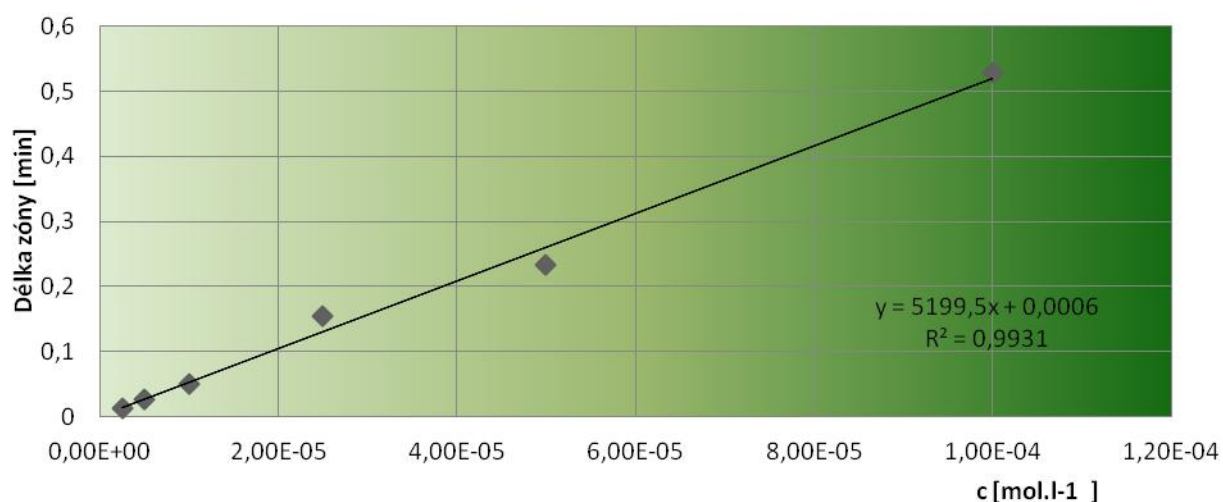
Na obrázku č. 13 je vyfocena migrace zóny glyfosátu v kapiláře. Červené zbarvení zóny způsobuje SPADNS.

Při stanovení detekčního limitu pro glyfosát jsme postupovali obdobně. Do zásobníku pro TE a do místa nástřiku byla aplikována směs 0,02 M MOPSO (β -Hydroxy-4-morpholinepropanesulfonická kyselina, 3-Morpholino-2-hydroxypropane sulfonická kyselina) a glyfosát v různých koncentracích. Jako LE byl použit roztok o složení 10:9,5 Cl/hist. Při tomto měření se jednalo o pouze samotnou izotachoforézu

bez fokusace, během separace se zóna zvětšovala a bylo třeba zjistit koncentrační limit, který jsme schopni detekovat.

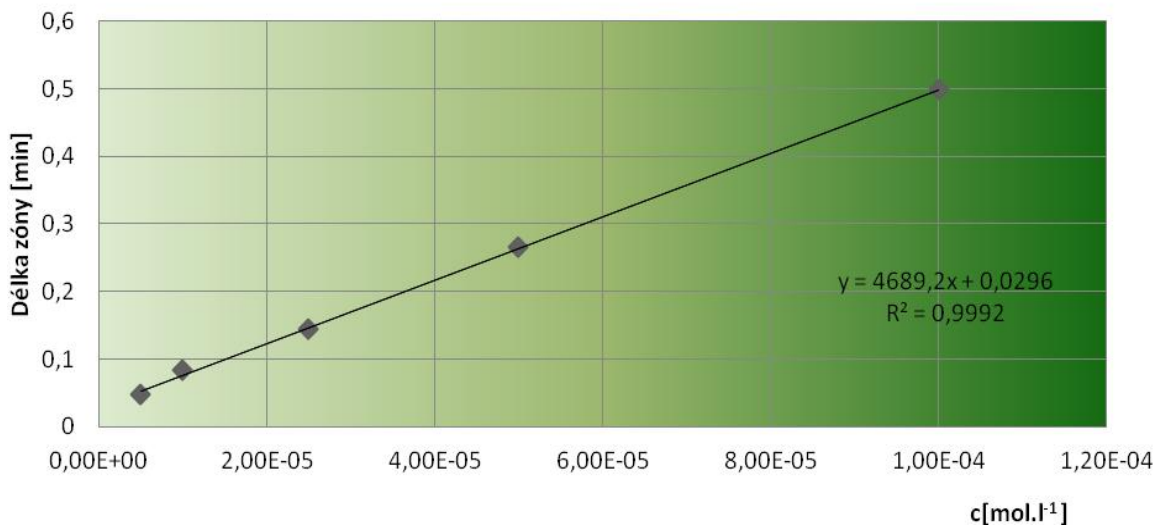
Jak lze zjistit z grafů č. 2 a 3, detekční limit pro stanovení glyfosátu byl v případě použití izotachofórze bez fokusace $10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$.

Závislost délky zóny SPADNS na koncentraci



Graf č 2: Závislost délky zóny SPADNS (1,8-dihydroxy-2- (4-sulfofenyl azo) naftalen 3,6-disulfonová kyselina trisodná sůl) na koncentraci. TE: 0,02 M MOPSO, SPADNS, LE: 10:9,5 Cl/hist, $I = 250 \mu\text{A}$, $U = 0,5-2 \text{ kV}$, výsledný detekční limit $10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$

Závislost délky zóny glyfosátu na koncentraci



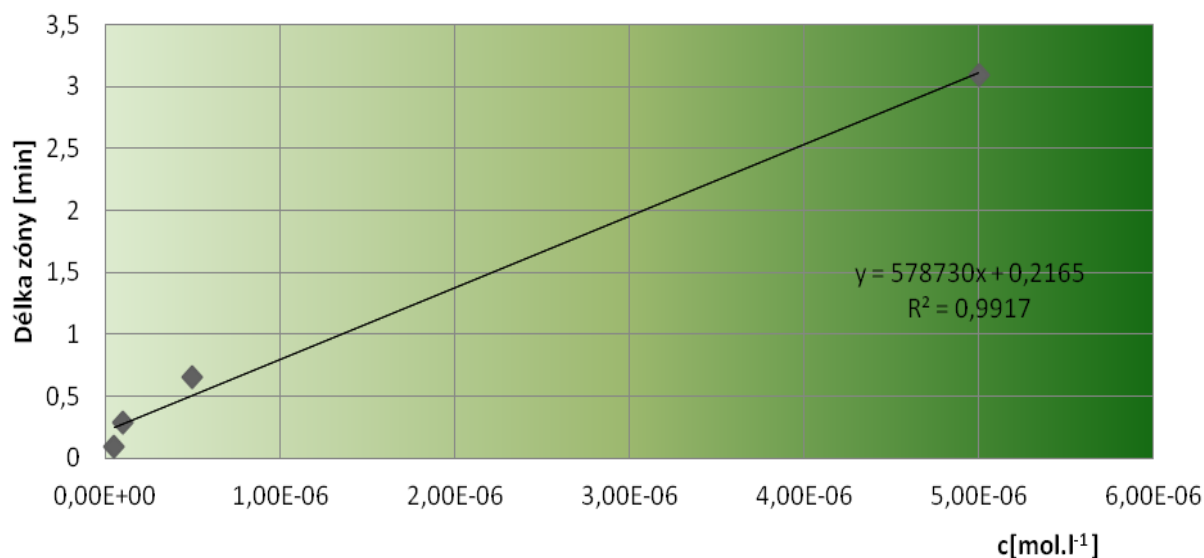
Graf č 3: Závislost délky zóny glyfosátu na koncentraci. TE: 0,02 M MOPSO, Glyfosát, SPADNS, LE: 10:9,5 Cl/hist, $I = 250 \mu A$, $U = 0,5-2 kV$, výsledný detekční limit glyfosátu $10^{-4} mol.l^{-1}$

Při stanovení SPADNS a glyfosátu izotachoforézou s fokusací probíhalo měření s tím rozdílem, že byl v prvních 1000 sekundách měření do systému vložen dávkovací elektrolyt (DE) 50 ml H₂O + 5 ml 0,2 hist + 5.10⁻³ GAS, poté se do systému vložil TE.

Do zásobníku pro TE a do místa nástřiku byla aplikována směs 0,02 M MOPSO a SPADNS. Jako LE byl použit roztok o složení 10:9,5 Cl/hist. Při tomto měření se jednalo o izotachoforézu s fokusací, abychom byli schopni snížit detekční limit pro glyfosát. Během separace docházelo k akumulaci SPADNS, který postupně ztratil náboj a byl imobilizován. Samotný glyfosát je amfolyt a chová se v terminátoru jako kyselina a je kontinuálně dávkován do systému, čímž došlo ke snížení detekčního limitu.

Jak lze zjistit z grafu č. 4, detekční limit pro stanovení SPADNS byl v případě použití izotachoforézy s fokusací $9.10^{-7} mol.l^{-1}$. Na grafech je zobrazena závislost délky zóny SPANDS (1,8-dihydroxy-2-(4-sulfofenyl azo) naftalen-3,6-disulfonová kyselina trisodná sůl) na koncentraci.

Závislost délky zóny SPADNS na fokusaci



Graf č 4: Závislost délky zóny SPADNS (1,8-dihydroxy-2- (4-sulfofenyl azo) naftalen 3,6-disulfonyl kyselina trisodná sůl) na koncentraci. TE: 0,02 M MOPSO, GAS, SPADNS, LE: 10:9,5 Cl/hist., DE: 50 ml H₂O + 5 ml 0,2 HIS + 5.10⁻³ GAS I = 250 μ A, U = 0,5-2 kV, výsledný detekční limit s fokusací 9.10⁻⁷

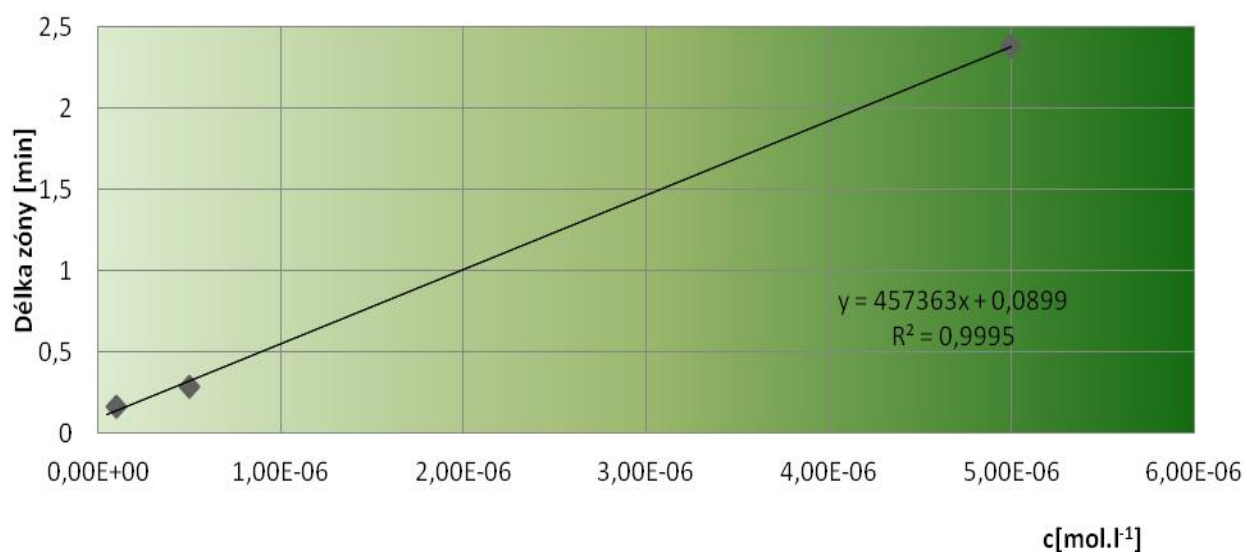
Při stanovení glyfosátu byl postup stejný, jako při stanovení SPADNS, čili prvních 1000 s byl v systému DE 50 ml H₂O + 5 ml 0,2 HIS + 5.10⁻³ GAS a poté se do systému vložil TE.

Do zásobníku pro TE a do místa nástřiku byla aplikována směs 0,02 M MOPSO a glyfosát. Jako LE byl použit roztok o složení 10:9,5 Cl/hist.

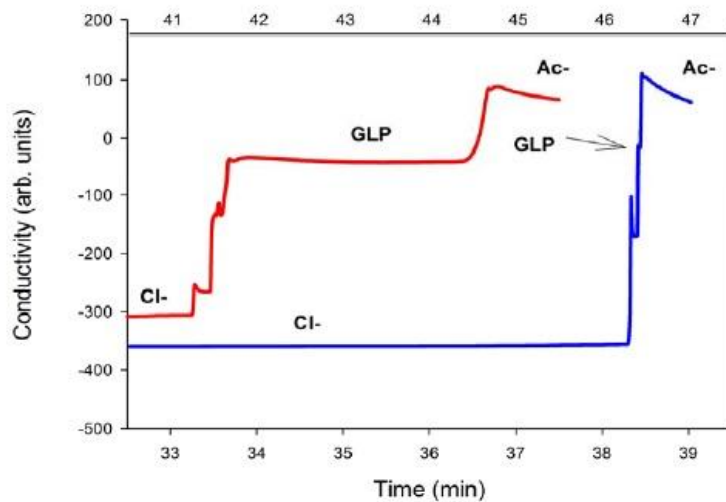
Jak lze zjistit z grafu č. 5, detekční limit pro stanovení glyfosátu byl v případě použití izotachoforézy s fokusací 9.10⁻⁷ mol.l⁻¹. Na grafech je zobrazena závislost délky zóny glyfosátu na koncentraci. Po přepočítání koncentrace jsme zjistili, že množství glyfosátu ve vodě je minimálně 153 μ g/l.

Z Obr. č. 4 lze vypočítat, že se délka zóny zvýšila oproti běžné izotachoforéze 180x.

Závislost délky zóny glyfosátu na fokusaci



Graf č 5: Závislost délky zóny glyfosátu na koncentraci. TE: 0,02 M MOPSO, glyfosát, SPADNS, LE: 10:9, 5 Cl/hist, DE: 50 ml H₂O + 5 ml 0,2 HIS + 5.10⁻³ GAS I = 250 μ A, U = 0,5-2 kV, výsledný detekční limit pro glyfosát s fokusací 9.10⁻⁷



Obr. č. 14: Analýza glyfosátu 1.10⁻⁵Mol/l s 1500sec akumulací – červená křivka a bez akumulace – modrá křivka (Zdroj: POSPÍCHAL, Jan a GLOVINOVÁ, Eliška. Analytical Methods and Human Health. Bratislava: Department of analytical chemistry, Faculty of natural Sciences, 2015)

5 VÝSLEDKY MĚŘENÍ A DISKUZE

Z naměřených výsledků lze říci, že se podařilo najít vhodný elektrolytový systém pro stanovení glyfosátu.

Dále se pomocí fokusace podařilo posunout detekční limit pro glyfosát z $5 \cdot 10^{-4}$ na $9 \cdot 10^{-7}$ mol/l, čímž jsme dosáhli snížení detekčního limitu o dva řády oproti běžné izotachoforéze.

Jako vhodný elektrolyt byl využit 10:9,5 Cl/hist a při fokusaci dále dávkovací elektrolyt 50 ml H₂O + 5 ml 0,2 hist + $5 \cdot 10^{-3}$ GAS, který byl do systému dávkován po dobu 1000 sekund. Proud, při kterém jsem měřila, byl 250 μ A. Na Obr. č. 4 lze vidět zónu glyfosátu při migraci v kapiláře do detektoru.

Pro analýzu byla použita voda z křtinského hřbitova. Výsledky analýzy ukázaly, že voda obsahuje glyfosát. Analýza byla provedena pomocí asymetrického účelově vytvořeného rozhraní. Jako amfolyt pro NBR v tomto případě posloužila aminokyselina histidin, která byla při analýze použita v koncentraci 0,02 M v terminační komůrce spolu se stanovovaným vzorkem. Jako vedoucí elektrolyt byl zvolený 0,02M HCl + 0,005M histidin.

Výsledek nám ukázal přítomnost glyfosátu ve vodě o minimální koncentraci 153 μ g/l. Vzorek jsme 180x zafokusovali, kdybychom použili jen běžnou izotachoforetickou analýzu, nebylo by možné vzorek stanovit, protože koncentrace byla na hranici detekčního limitu.

Z tohoto důvodu bylo nutné vyvinout elektrolytové systémy a použít jiný mód metody, což bylo využití předkoncentrace (fokusace) na asymetrickém neutralizačním rozhraní.

6 ZÁVĚR

Úkolem diplomové práce bylo stanovení herbicidů pomocí kapilární elektromigrační techniky, kde byla konkrétně použita izotachoforéza. Jako herbicid byl zvolen Roundup, jehož účinnou složkou je glyfosát. Roundup jsme zvolili z toho důvodu, že patří v současné době celosvětově i u nás k nejvíce používaným herbicidům. Výše uvedený herbicid jsme vybrali také proto, že má iontový charakter, což je nezbytnou podmínkou izotachoforetické analýzy.

Nejprve bylo nutné vyvinout elektrolytový systém pro stanovení glyfosátu. Jako nejvhodnější elektrolyt byla stanovena kyselina chlorovodíková spolu s amfolytem, aminokyselinou histidin. Tato aminokyselina je vhodná jako amfolyt z toho důvodu, že má pI hodnotu v rozsahu intervalu pH potřebnou pro separaci.

Pro stanovení glyfosátu jsme vybrali vodu z křtinského hřbitova, která slouží lidem jako zdroj pro zalévání porostu na hřbitově. Odběr vody, s ohledem na možnost stanovení, proběhl bezprostředně po postřiku vegetace herbicidem Roundupem. Podařilo se nám pomocí fokusační metody stanovit množství glyfosátu v odebraném vzorku. Vzorek nebylo možné stanovit klasickou izotachoforetickou analýzou, protože jeho koncentrace byla na hranici detekčního limitu a nepodařilo se nám tedy koncentraci glyfosátu touto cestou stanovit.

Výsledky z grafu vypovídají o tom, že odebraná voda přesahuje povolenou koncentraci pro povrchovou vodu minimálně čtyřnásobně. Jelikož se křtinský hřbitov nachází v kopci, můžeme předpokládat, že by takto znečištěná voda mohla stékat a prosakovat do okolní vegetace a povrchových vod, kde by mohla narušovat ekosystém. Abychom ovšem opravdu mohli tuto vodu hodnotit jako závadnou či dokonce nebezpečnou pro životní prostředí, museli bychom dělat odběry vzorků po celé vegetační období.

Pokud by koncentrace odebíraných vzorků stále přesahovaly povolené limity, mohli bychom na základě toho doporučit, aby tento herbicid již nebyl nadále používán. Dalším možným doporučením by bylo zajistit, aby takto znečištěná voda byla zachycena a odvedena na čistírnu odpadních vod, kde by měla být vyčištěna. Vzhledem k tomu, že v současné době není mnoho výzkumů na problematiku glyfosátu na čistírnách odpadních vod orientováno, bylo by vhodné provést testování na přítomnost glyfosátu na výstupu z čistírny odpadních vod a také zjistit, zdali glyfosát nemůže mít inhibiční vlastnosti na bakterie v aktivační nádrži.

Dále by bylo přínosné pro srovnání stanovit kyselinu aminomethylfosfonovou neboli AMPA, hlavní metabolit glyfosátu, která je svými vlastnostmi glyfosátu velice podobná a podle výzkumů se v samotných vodách vyskytuje ještě ve větší míře než samotný glyfosát. Pro stanovení tohoto rezidua ovšem nemáme prozatím vyvinut elektrolytový systém, proto ho nejsme schopni v současné době izotachforeticky stanovit. To však již nebylo účelem této diplomové práce.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Elektroanalytické metody: sborník přednášek z kurzu. 1. vyd. Český Těšín: 2 Theta, 2001, 316 s. Analytical standards and equipment. ISBN 80-86380-07-6.
- [2] DVOŘÁK, Jiří a Vladimír SMUTNÝ. *Herbologie – Integrovaná ochrana proti polním plevelům*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003, 186 s. ISBN 80-7157-732-4.
- [3] DAŇHEL, Aleš. *STŘÍBRNÉ AMALGAMOVÉ ELEKTRODY V ELEKTROANALÝZE VYBRANÝCH AGROCHEMIKÁLIÍ*. Praha, 2012. Autoreferát disertační práce. Univerzita Karlova v Praze. Vedoucí práce Prof. RNDr. Jiří Barek, CSc.
- [4] DVOŘÁK, Jiří, Jiří KORYTA a Vlasta BOHÁČKOVÁ. *Elektrochemie*. 2. doplněné vydání. Praha: ACADEMIA, 1975. ISBN 21-033-75.
- [5] Zákon o životním prostředí. [Http://www.mzp.cz/](http://www.mzp.cz/) [online]. 1991 [cit. 2016-02-06]. Dostupné z:
http://www.mzp.cz/www/platnalegislativa.nsf/5B17DD457274213EC12572F3002827DE/%24file/Z%2017_1992.pdf
- [6] DOERFFEL, Klaus, Karel ECKSCHLAGER. *Optimální postup chemické analýzy*. Praha: Nakladatelství technické literatury, n. p., 1985. ISBN L16-B3-IV-41f/62048.
- [7] KOUTNÍK, Vilém. *Chemie: (systematika prvků)*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1996, vii, 117 s. ISBN 80-7157-202-0.
- [8] BOČEK, Petr, Mirko DEML, Petr GEBAUER a Vladislav DOLNÍK. *Analytická kapilární izotachoforéza*. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 1987.
- [9] *Elektrochemické metody nejčastěji používané k analýze DNA: Voltametrie* [online]. [cit. 2016-02-17]. Dostupné z: <http://lib.convdocs.org/docs/index-269079.html?page=5>
- [10] Polarografie. [Canov.jergym.cz](http://www.canov.jergym.cz) [online]. [cit. 2016-02-17]. Dostupné z: http://aldebaran.feld.cvut.cz/vyuka/ekologie_a_ekotechnika/lab/pol/
- [11] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [12] VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE [online]. In: . s. 6 [cit. 2016-02-17]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~tesarove/hplc.pdf>

- [13] Klasifikace a využití různých typů reakčních rozhraní pro předkoncentraci analytů. *Analytical Methods and Human Health*. Bratislava: Department of analytical chemistry, Faculty of natural Sciences, 2015, s. 63-68. ISBN 978-80-971179-5-5.
- [14] *Polarography* [online]. [cit. 2016-02-17]. Dostupné z: http://www.husseinfahmy.com/hmf/hf_book.pdf
- [15] KOUTNÍK, Vilém. *Chemie*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1995. ISBN 80-7157-143-1.
- [16] NEWMAN, Mollie M., Nicola LORENZ, Nigel HOILETT, Nathan R. LEE, Richard P. DICK, Mark R. LILES, Cliff RAMSIER a Joseph W. KLOEPPER. Changes in rhizosphere bacterial gene expression following glyphosate treatment. *Science of The Total Environment* [online]. 2016, 553, 32-41 [cit. 2016-02-23]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.02.078. ISSN 00489697. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969716302881>
- [17] ROY, Nicole M., Bruno CARNEIRO a Jeremy OCHS. Glyphosate induces neurotoxicity in zebrafish. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. 2016, 42, 45-54 [cit. 2016-02-23]. DOI: 10.1016/j.etap.2016.01.003. ISSN 13826689. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1382668916300035>
- [18] Glyphosate persistence raises questions. *Chemistryworld* [online]. London: Royal Society of Chemistry 2016. Registered charity number 207890, 2016 [cit. 2016-02-27]. Dostupné z: <http://www.rsc.org/chemistryworld/2016/02/glyphosate-gbh-weedkiller-herbicide-persistence-environment-health>
- [19] ZBIROVSKÝ, Miroslav, Jiří ZEMÁNEK a Jaromír MYŠKA. *Herbicidy: chemické prostředky proti plevelům*. 1. vyd. Praha: Československá akademie věd, 1960.
- [20] KOS, Jiří. *Chemie: (pro sadovnický a krajinářský obor)*. 1. vyd. Brno: VŠZ, 1990.
- [21] *Group of electromigration separation processes* [online]. 2007 [cit. 2016-02-28]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/gas/>
- [22] BATTAGLIN, W. A., M. T. MEYER, K. M. KUIVILA a J. E. DIETZE. Glyphosate and Its Degradation Product AMPA Occur Frequently and Widely in U.S. Soils, Surface Water, Groundwater, and Precipitation. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association* [online]. 2014, 50(2), 275-290 [cit. 2016-03-01]. DOI: 10.1111/jawr.12159. ISSN 1093474x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jawr.12159>

- [23] Glyphosate is Carcinogenic. *Institute of Science in Society* [online]. United Kingdom: The Institute of Science in Society, 2015 [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: http://www.i-sis.org.uk/Glyphosate_is_Carcinogenic.php
- [24] Argentinian Study: Tampons, Sanitary Pads and Sterile Gauze Contaminated with Probable Carcinogen Glyphosate. *The detox project* [online]. USA, 2015 [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: <http://detoxproject.org/argentinian-study-tampons-sanitary-pads-and-sterile-gauze-contaminated-with-probable-carcinogen-glyphosate>
- [25] Rizika kontaminace potravin a pitné vody herbicidy. *Vědecký výbor fytoosanitární a životního prostředí* [online]. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 PRAHA 6 - Ruzyně: VÚRV; Envicho, s.r.o, 2003 [cit. 2016-03-07]. Dostupné z: <http://www.phytosanitary.org/projekty/2003/vvf-12-03.pdf>
- [26] Pufry a pH: Průvodce laboratoří. *LABGuide* [online]. 2014 [cit. 2016-03-12]. Dostupné z: <http://labguide.cz/>
- [27] Good's Buffers. *Teknova science matters* [online]. Canada: Teknova, 2016 [cit. 2016-03-14]. Dostupné z: <http://www.teknova.com>
- [28] *Waste Water as a Source of Aminomethylphosphonic acid (AMPA) in Austrian Rivers* [online]. Umweltinstitut des Landes Vorarlberg, 2003 [cit. 2016-03-14]. Dostupné z: http://www.vorarlberg.at/publikationen/umwelt_und_lebensmittel/ual/WV/EMEC_4_Poster.pdf
- [29] KOLPIN, Dana W., E. Michael THURMAN, Edward A. LEE, Michael T. MEYER, Edward T. FURLONG a Susan T. GLASSMEYER. Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. *Science of The Total Environment* [online]. 2006, 354(2-3), 191-197 [cit. 2016-03-17]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2005.01.028. ISSN 00489697. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969705000690>
- [30] Kolem nás: Proč bychom se měli vyhnout zbytečnému nadužívání glyfosátu. *Www.hnutiduha.cz* [online]. Brno: Hnutí DUHA a Centrum pro životní, 2013 [cit. 2016-03-22]. Dostupné z: <http://www.hnutiduha.cz/sites/default/files/publikace/2013/07/roundup.pdf>

- [31] ŠIŠPEROVÁ, Eliška. *Vývoj elektromigračních metod pro stanovení kovů*. Brno, 2011. Disertační práce. Mendelova Univerzita Brno. Vedoucí práce Doc. Ing. Jan Pospíchal, CSc.
- [32] Předpis č. 401/2015 Sb.: Nařízení vlády o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech. *Zákonny pro lidi.cz* [online]. 2015 [cit. 2016-04-05]. Dostupné z:
<http://www.zakonyprolidi.cz/cs/2015-401>
- [33] SVOBODOVÁ, Alena a Hana DONÁTOVÁ. Stanovení glyfosátu a AMPA ve vodách metodou HPLC s fluorescenční detekcí. In: *DOCPLAYER* [online]. Praha: VÚV TGM, 2009 [cit. 2016-03-22]. Dostupné z:
<http://docplayer.cz/11885732-Stanoveni-glyfosatu-a-ampa-ve-vodach-metodou-hplc-s-fluorescencni-detekci-ing-alena-svobodova-hana-donatova.html>

8 SEZNAM ZKRATEK

ITP – izotachoforéza

DNOK – 2,4-dinitro-o-kresol

AMPA – kyselina aminomethylfosfonová

IARC – mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny

NBR – asymetrické účelově vytvořené neutralizační rozhraní

MOPSO – β -Hydroxy-4-morpholinepropanesulfonická kyselina, 3-Morpholino-2-hydroxypropanesulfonická kyselina

ČOV – čistírna odpadních vod

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

GAS – směs glyfosátu AMPY a SPADNSU

CIEF – izoelektrická fokusace

DE – vedoucí elektrolyt

TE – terminační elektrolyt

hist – histidin

SPADNS – (1,8-dihydroxy-2-(4-sulfofenyl azo) naftalen-3,6-disulfonová kyselina tri-sodná sůl)

VN – vysoké napětí

9 SEZNAM GRAFŮ

GRAF Č. 1: PROCENTUÁLNÍ SROVNÁNÍ ANALYTICKÝCH METOD	29
GRAF Č 2: ZÁVISLOST DÉLKY ZÓNY SPADNS (1,8-DIHYDROXY-2- (4-SULFOFENYL AZO) NAFTALEN 3,6-DISULFONOVÁ KYSELINA TRISODNÁ SŮL) NA KONCENTRACI. TE: 0,02 M MOPSO, SPADNS, LE: 10:9,5 CL/HIST, I=250 MA, U= 0,5-2 KV, VÝSLEDNÝ DETEKČNÍ LIMIT 10^{-4} MOL.L ⁻¹	44
GRAF Č 3: ZÁVISLOST DÉLKY ZÓNY GLYFOSÁTU (1,8-DIHYDROXY-2- (4-SULFOFENYL AZO) NAFTALEN 3,6-DISULFONOVÁ KYSELINA TRISODNÁ SŮL) NA KONCENTRACI. TE: 0,02 M MOPSO, GAS, SPADNS, LE: 10:9,5 CL/HIST, I=250 MA, U= 0,5-2 KV, VÝSLEDNÝ DETEKČNÍ LIMIT GLYFOSÁTU 10^{-4} MOL.L ⁻¹	45
GRAF Č 4: ZÁVISLOST DÉLKY ZÓNY SPADNS (1,8-DIHYDROXY-2- (4-SULFOFENYL AZO) NAFTALEN 3,6-DISULFONOVÁ KYSELINA TRISODNÁ SŮL) NA KONCENTRACI. TE: 0,02 M MOPSO, GAS, SPADNS, LE: 10:9,5 CL/HIST., DE: 50 ML H ₂ O + 5 ML 0,2 HIS + $5 \cdot 10^{-3}$ GAS I=250 MA, U= 0,5-2 KV, VÝSLEDNÝ DETEKČNÍ LIMIT S FOKUSACÍ $9 \cdot 10^{-7}$	46
GRAF Č 5: ZÁVISLOST DÉLKY ZÓNY GLYFOSÁTU (1,8-DIHYDROXY-2- (4-SULFOFENYL AZO) NAFTALEN 3,6-DISULFONOVÁ KYSELINA TRISODNÁ SŮL) NA KONCENTRACI. TE: 0,02 M MOPSO, GAS, SPADNS, LE: 10:9, 5 CL/HIST, DE: 50 ML H ₂ O + 5 ML 0,2 HIS + $5 \cdot 10^{-3}$ GAS I=250 MA, U= 0,5-2 KV, VÝSLEDNÝ DETEKČNÍ LIMIT PRO GLYFOSÁT S FOKUSACÍ $9 \cdot 10^{-7}$	47

10 SEZNAM TABULEK

TABULKA Č. 1: ZÁKLADNÍ PRAVIDLA PRO VOLBU ELEKTROLYTOVÉHO SYSTÉMU	33
TABULKA Č. 2: TABULKA GOODOVÝCH PUFRŮ (ZDROJ: WIKIPEDIE.CZ)	35

11 SEZNAM OBRÁZKŮ

OBR. Č. 1: GLYFOSÁT – STRUKTURNÍ VZOREC (ZDROJ: HTTP://WWW.INDIAMART.COM/)	23
OBR. Č. 2: AMPA – STRUKTURNÍ VZOREC (ZDROJ: HTTP://WWW.INDIAMART.COM/)	24
OBR. Č. 3: POLAROGRAFICKÉ VLNY A SCHÉMA POLAROGRAFU (ZDROJ: HTTP://CANOV.JERGM.CZ/)	28
OBR. Č. 4: SIMULAČNÍ PROGRAM SIMUL 5 COMPLEX (ZDROJ: AUTORKA)	31
OBR. Č. 5: PŘÍMKA A ZOBRAZUJE STABILNÍ ZÓNU, NAOPAK B ZÓNU NESTABILNÍ	33
OBR. Č. 6: PŘÍSTROJ PRO IZOTACHOFRETICKOU ANALÝZU A JEHO POPIS (ZDROJ: ARCHIV GLOVINOVÁ)	37
OBR. Č. 7: IZOTACHOFRETICKÉ MODY (ZDROJ: ŠÍŠPEROVÁ, ELIŠKA. VÝVOJ ELEKTROMIGRAČNÍCH METOD PRO STANOVENÍ KOVŮ. BRNO, 2011. DISERTAČNÍ PRÁCE)	38
OBR. Č. 8: SCHÉMA TOKŮ NA ASYMETRICKÉM NBR (ZDROJ: ARCHIV GLOVINOVÁ)	40
OBR. Č. 9: MOPSO – STRUKTURNÍ VZOREC (ZDROJ: HTTP://PUBCHEM.NCBI.NLM.NIH.GOV/)	41
OBR. Č. 10: SPADNS – STRUKTURNÍ VZOREC (ZDROJ: HTTP://WWW.SIGMAALDRICH.COM/)	41
OBR. Č. 11: HIST – STRUKTURNÍ VZOREC (ZDROJ: HTTP://WWW.SIGMAALDRICH.COM/)	41
OBR. Č. 12: MÍSTO ODBĚRU VZORKU	42
OBR. Č. 13: MIGRACE ZÓNY GLYFOSÁTU V KAPILÁŘE	43
OBR. Č. 14: ANALÝZA GLYFOSÁTU 1.10-5MOL/L S 1500SEC AKUMULACÍ – ČERVENÁ KŘIVKA A BEZ AKUMULACE – MODRÁ KŘIVKA	47