MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ

AGRONOMICKÁ FAKULTA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2017 **Bc. Tomáš Ondračka**

Mendelova univerzita v Brně

Agronomická fakulta

Ústav Chemie a biochemie

Stanovení vybraných iontových herbicidů v povrchových vodách

Diplomová práce

Vedoucí práce:

doc. Ing. Jan Pospíchal, CSc.

Vypracoval:

Bc. Tomáš Ondračka

Brno 2017

Agronomická fakulta

Ústav chemie a biochemie
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Zpracovatel : **Bc. Tomáš Ondračka**

Studijní program: Zemědělská specializace

Obor: Agroekologie

Konzultant: Ing. Eliška Glovinová, Ph.D.

Název tématu: **Stanovení vybraných iontových herbicidů v povrchových vodách**

Rozsah práce: 50-60 stran

Zásady pro vypracování:

1. Základy práce s informacemi.
2. Literární přehled elektromigračních metod.
3. Literární přehled herbicidů.
4. Literární přehled metod stanovení herbicidů.
5. Vyhodnocení a roztřídění informací dle pramenů a metod.
6. Využití grafických možností počítačové techniky.
7. Písemné zpracování literárních pramenů.
8. Zpracování diplomové práce.
9. Vyhodnocení výsledků a jejich porovnání s publikovanými výsledky.
10. Závěr, zhodnocení vypracované metody a posouzení její vhodnosti a aplikovatelnosti v kontrole životního prostředí s přihlédnutím k agroekologii.

Seznam odborné literatury:

1. KUBÁŇ, V. Simultaneous Determination of Small Inorganic and Organic Anions and Alkali, Alkaline Earth and Transition Metal Ions by Capillary Electroiphoresis with a Contactless Conductivity Detector. *Electrophoresis*. 2002. sv. 23, č. leden, s. 3725–3734. ISSN 0173-0835.
2. *Vývoj elektromigračních metod pro stanovení kovů*. Disertační práce. Brno,: MENDELU Brno, 2011. 99.
3. AUDUS, L J. *Herbicides: physiology, biochemistry, ecology*. 2. vyd. London: Academic Press, 1976. 608 s. ISBN 0-12-067701-6.
4. *Detection system for electroseparation analytical methods. Štohl, R., Glovinová,E., Pospíchal,J., in Proceedings of the International Conference CEEPUS Summer School 2005, Brno University of Technology*. Brno: VUT Brno, 2005. ISBN 80-214-2976-3.
5. ŠIŠPEROVÁ, E. – GLOVINOVÁ, E. – BUDILOVÁ, J. – POSPÍCHAL, J. Focusing of alkali earth metals in ligand step gradient. *Journal of Chromatography A*. 2011. sv. 1280, č. 20, s. 3105–3110. ISSN 0021-9673.
6. ŠIŠPEROVÁ, E. – GLOVINOVÁ, E. – POSPÍCHAL, J. Focusing of metals in ligand field step gradient. In *25th International Symposium on Microscale BioSeparations MSB 2010*. 1. vyd. Brno, Czech Republic: Institute of Analytical Chemistry AS CR v.v.i., 2010, s. 96–97. ISBN 978-80-254-6631-5.
7. GLOVINOVÁ, E. – POSPÍCHAL, J. Effective Pre-Concentration and Analysis of Heavy Metals using Ligand Step Gradient Focusing in Combination with Isotachophoresis. *Chromatographia*. 2013. sv. 76, č. 7-8, s. 313–319. ISSN 0009-5893.
8. FÄHNRICH, V. *Chemický rozbor průmyslových vod*.
9. GLOVINOVÁ, E. – POSPÍCHAL, J. – ŠIŠPEROVÁ, E. Use of ligand step gradient focusing in combination with isotachophoresis (LSGF-ITP) for the effective pre-concentration and analysis of heavy metals. In *XI. pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků* . 1. vyd. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2011, s. 78–80. ISBN 978-80-7375-514-0.
10. GLOVINOVÁ, E. – POSPÍCHAL, J. Use of ligand step gradient focusing in combination with isotachophoresis (LSGF-ITP) for the effective pre-concentration and analysis of heavy metals. [online]. s. 155. URL: http://www.hplc2011.com/doc/poster1.pdf.
11. ZBIROVSKÝ, M. – ZEMÁNEK, J. – MYŠKA, J. *Herbicidy: chemické prostředky proti plevelům*. 1. vyd. Praha: Československá akademie věd, 1960. 300 s. Práce ČSAV. Sekce chem.
12. Boček P.: Isotachophoresis,CAS,Brno,1984,s.110

Datum zadání diplomové práce: říjen 2015

Termín odevzdání diplomové práce: duben 2017

Agronomická fakulta
L. S.
Mendelova univerzita v Brně
-6-

Bc. Tomáš Ondračka
Autor práce

doc. Ing. Jan Pospíchal, CSc.
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 na téma **Stanovení vybraných iontových herbicidů v povrchových vodách** vypracoval 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 a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon 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

Tímto bych chtěl velice poděkovat panu doc. Ing. Janu Pospíchalovi, CSc., vedoucímu mé diplomové práce za metodické vedení, konzultace, rady a připomínky v průběhu zpracování této práce a za příjemný a přátelský přístup. Dále bych chtěl poděkovat také konzultantce Ing. Elišce Glovinové, Ph.D., přátelům a rodině za jejich podporu.

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá stanovením vybraných iontových herbicidů v povrchových vodách, přičemž v první části práce jsou popsány herbicidy. Vzhledem k širokému spektru herbicidů se dále práce zabývá především glyfosátem. V další části práce jsou popsány elektromigrační metody a metody, pomocí nichž se herbicidy stanovují. V neposlední řadě je popsán postup vývoje elektrolytového systému spolu s využitím grafických možností počítačové techniky. V závěru práce jsou uvedeny a okomentovány výsledky z měření glyfosátu v povrchových vodách, srovnání se zahraniční literaturou a posouzení vhodnosti metody pro analýzu škodlivin v životním prostředí.

ABSTRACT

The thesis deals with the determination of selected ion herbicides in surface waters and in the first part describes the herbicides. Given the broad spectrum herbicide further work deals mainly with glyphosate. The next section describes the electromigration methods and the methods by which the herbicides were determined. Finally, it describes how the development of an electrolyte system along with the use of graphical possibilities of computer technology. In conclusion are presented and commented on the results of measurements of glyphosate in surface waters, compared with foreign literature and assessing the suitability of methods for the analysis of contaminants in the environment.

Klíčová slova: Glyfosát, AMPA, herbicidy, elektromigrační metody, životní prostředí, půda, voda

Keywords: Glyphosate, AMPA, herbicides, electromigration methods, environment, soil, water

Obsah

1 ÚVOD 9

2 CÍL PRÁCE 10

3 ELEKTROMIGRAČNÍ METODY 11

3.1 Základní elektromigrační metody 11

3.1.1 Zónová elektroforéza (ZE) 11

3.1.2Izotachoforéza (ITP) 12

3.1.3 Izoelektrická fokusace (IEF) 12

3.1.4 Elektroforéza s pohyblivým rozhraním 14

3.2 Varianty elektromigračních metod 14

3.2.1 Gelová elektroforéza (GE) 14

3.2.2 Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) 15

3.2.3 Elektrochromatografie (EC) 16

3.2.4 Afinitní elektroforéza (ACE) 17

3.3 Techniky (prostředí) 17

3.3.1 Papír 17

3.3.2 Gel 17

3.3.3 Kapilára 18

3.4 Jevy v elektroforéze 19

3.4.1 Jouleovo teplo 19

3.4.2 Elektroosmóza 19

3.4.3 Difúze 20

3.4.4 Gravitace 20

3.4.5 Adsorpce v kapilární elektroforéze 21

4 PŮVOD A VÝZNAM HERBICIDŮ 22

4.1 Rozdělení herbicidů 24

5 EKOLOGICKY VÝZNAMNÉ IONTOVÉ HERBICIDY 27

5.1 Triaziny ... 27
5.2 MCPA (kyselina 2-methyl -4 chlorofenoxyloctová) ... 27
5.3 TCA (kyselina trichloroctová) ... 28
5.4 Diuron (dichlorfenyl-1,1-dimethylmočovina) ... 29
5.5 Glyfosát a AMPA ... 29
6 TRANSFER HERBICIDŮ VODNÍM PROSTŘEDÍM ... 31
6.1 Rozdělení vod a druhy mikce ... 31
6.2 Transfer herbicidů mezi jednotlivými složkami životního prostředí ... 33
6.3 Ochrana vod ... 34
7 METODY STANOVENÍ HERBICIDŮ ... 37
7.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) ... 37
7.2 Plynová chromatografie ... 37
7.3 Spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS) ... 38
7.4 Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (LC/MS) ... 39
7.5 Extrakce tuhou látkou ... 39
7.6 Extrakce kapalinou ... 40
8 MATERIÁL A METODIKA ... 41
8.1 Odběr vzorků ... 41
8.2 Simulační model ... 43
8.3 Volba vhodného elektrolytového systému a měření ... 45
9 DOPAD NA ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ A ČLOVĚKA ... 57
10 VÝSLEDKY A DISKUSE ... 64
11 ZÁVĚR ... 66
12 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY ... 68
13 SEZNAM ZKRATEK ... 75
14 SEZNAM OBRÁZKŮ ... 76

1 ÚVOD

Tato práce se dotýká dvou přírodních elementů, které spolu s ostatními mezi sebou interagují, dochází zde k výměně látek a energií, oba jsou nezbytné pro život, samotné jsou biotopem pro mnohé organismy a jejich role na zemi je nezastupitelná. Těmito dvěma elementy jsou voda a půda.

Od doby neolitické revoluce zhruba před 10 000 lety, kdy se společnost lovců a sběračů usadila a začala zemědělsky hospodařit, prošlo zemědělství obrovským pokrokem. Vždy šlo o vyprodukování velkého množství plodin, optimalizaci prací, boj se škůdci, vylepšení postupů a samotných plodin. Postupným vývojem, pozorováním, a výzkumem došlo k mnoha vylepšením a zefektivněním, avšak mnohdy za velmi vysokou cenu, která je do značné míry přehlížena. Postupy, které jsou v zemědělství spíše ke škodě, jako je přílišné hnojení minerálními hnojivy, nadbytečné používání pesticidů, ochuzování půdy o organický materiál, intenzivní zemědělství, špatné uspořádání pozemků a špatný výběr pěstovaných plodin s následnou erozí, přibývají a i přes snahu uplatnění nápravných a preventivních opatření dochází spolu s vlivem přírodních podmínek a změnou klimatu k postupné degradaci zemědělské půdy. K těmto faktorům se však přidal ještě jeden. Jako odpověď vyspělých států na hrozbu přelidnění a nedostatku jídla byly vyvinuty geneticky modifikované organismy, které byly geneticky pozměněny, aby získaly vlastnosti, díky kterým se zvýší výnosy a odolnost těchto plodin vůči vnějším činitelům. Spolu s těmito rostlinami firma Monsanto vyvinula herbicid (roundap) na bázi glyfosátu, který vybraným druhům GMO neublíží, zato eliminuje veškeré ostatní nežádoucí plevele. Tento herbicid se rozšířil nejenom v této oblasti, ale je používaným herbicidem po celém světě v širokém spektru.

Jak je známo, jednotlivé složky životního prostředí nejsou oddělené buňky, nýbrž složitý provázaný komplex. Tento fakt se stal předmětem mnoha studií, které měli za úkol zjistit mobilitu tohoto herbicidu v půdě, jeho možný transfer do vodního prostředí a zjistit míru potenciálního zdravotního rizika. Voda je jedním z nejdůležitějších prvků na zemi, je kolébkou života, podmínkou života, a proto oprávněně předmětem ochrany, která je vzhledem k jejímu znečišťování, špatnému hospodaření a čím dál více zmenšujícím se zásobám pitné vody důležitější. Vzhledem k rozmachu GMO a množstvím aplikovaného herbicidu ve světě, se dostavily následky a obavy o dopadu tohoto herbicidu na životní prostředí, ale i zdraví člověka.

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce je zpracovat literární přehled na téma „Stanovení vybraných iontových herbicidů v povrchových vodách“. Konkrétněji zpracovat literární přehled elektromigračních metod, základní přehled herbicidů a literární přehled metod pro stanovení herbicidů. Dále využití grafických možností počítačové techniky a měření konkrétního vzorku. Na závěr je cílem vyhodnotit získané výsledky, porovnat je s doposud publikovanými výsledky, zhodnotit použitou metodu a její aplikovatelnost v oblasti životního prostředí s přihlédnutím na agroekologii.

3 ELEKTROMIGRAČNÍ METODY

3.1 Základní elektromigrační metody

3.1.1 Zónová elektroforéza (ZE)

Kapilární elektroforéza je populární separační technika pro detekci nabitých molekul. Vzhledem ke krátké detekční optické délce a nanesení vzorku má určitá omezení pokud jde o citlivost, což omezuje jeho použití pro široký rozsah aplikací (XU et al., 2010).

Základním principem elektroforézy jako analytické separační metody je to, že jde o přenos hmoty vyvolaný elektrickým polem, kdy různé látky tvořící i směsnou zónu urazí určitou část migrační dráhy a při tom se směs rozdělí na zóny jednotlivých látek. Jakmile je směs takto rozdělena na zóny jednotlivých látek, může dojít k analytickému vyhodnocení pomocí detekčního zařízení. V kapilární analytické elektroforéze se prakticky výhradně používá detekce v on-line uspořádání. To znamená, že po dosažení separace se nevypíná elektrický proud, ale v elektroforéze se pokračuje. Látky (již separované) migrují kapilárou dále, až všechny postupně projdou určitým místem, kde je detekční cela. Záznam analýzy, tj. elektroforegram, reprezentuje závislost odezvy (určitého signálu) detektoru na čase (CHURÁČEK et al., 1993). Z principu věci samé se při elektromigraci v kapiláře uplatňují ještě další jevy, které ovlivňují průběh separace. Jsou to především: jouleovo teplo, elektroosmóza, difůze, gravitace a sorpce. Tyto jevy mohou v průběhu analýzy často působit velmi negativně tak, že během elektromigrace působí proti separaci látek. Jde vlastně o to, že vznikající individuální zóny látek jsou rušivými efekty rozmývány a promíchávány (MIKEŠ et al., 1980). V praxi je tedy nutné mít uvedené jevy na zřeteli a vhodnou volbou experimentálního uspořádání potlačovat rušivé jevy na přijatelnou míru.

Základní charakteristikou zónové elektroforézy je to, že vzorek migruje v prostředí základního elektrolytu, který vede prakticky veškerý elektrický proud. Přitom platí, že složení základního elektrolytu je konstantní podél celé migrační dráhy a nemění se s časem. Tím je samozřejmě dáno, že specifická vodivost v celé kapiláře před analýzou i během analýzy je prakticky konstantní a při průchodu konstantního elektrického proudu tímto roztokem je intenzita elektrického pole podél kapiláry všude stejná a konstantní. Odchylky vodivosti v místech, kde právě migrují zóny, jsou významné pro

možnost elektrické detekce zón, nikoli však z hlediska migračních rychlostí (CHURÁČEK et al., 1993).

3.1.2Izotachoforéza (ITP)

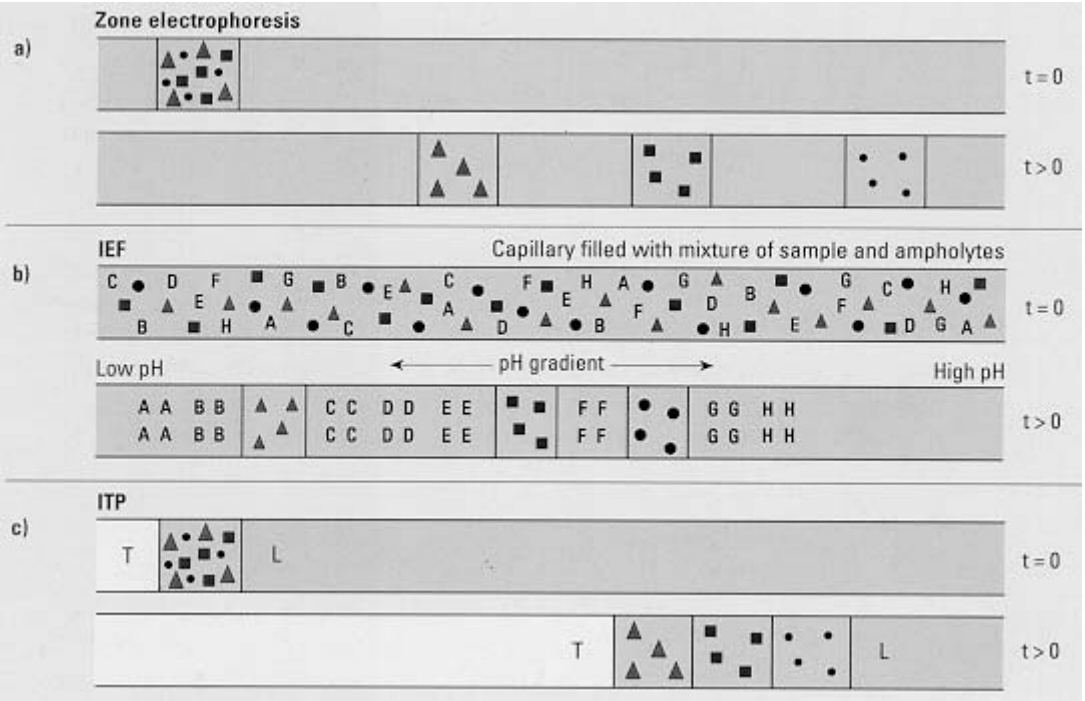
Metodou izotachoforézy lze stanovit jak kationty, tak anionty. Princip izotachoforézy spočívá ve vložení roztoku směsi elektrolytů s intermediárními pohyblivostmi mezi dva elektrolyty, přičemž záleží, zdali stanovujeme kationty nebo anionty. V případě stanovení kationtů bychom do systému nejblíže ke katodě umístili elektrolyt, který má nejvyšší elektroforetickou pohyblivost a nejblíže anody elektrolyt s nejnižší elektroforetickou pohyblivostí. Při průchodu elektrického proudu dojde k izotachoforetickému jevu, kdy se postupně za nejrychlejší vedoucí kationt seřadí kationty od nejrychlejšího po nejpomalejší, přičemž nejpomalejší kationt uzavírá řadu zón a zůstává nejblíže anodě (MIKEŠ et al., 1980). Samotná separace se uskutečňuje v kapiláře spojené dvěma elektrodovými prostory, ty jsou napojeny na stabilizovaný zdroj stejnosměrného proudu. V izotachoforéze se využívají dva druhy elektrolytů a to elektrolyt vodící (leading), který by se měl volit tak, aby měl největší efektivní pohyblivost ze všech separovaných látek, a elektrolyt koncový (terminátor), který by měl mít naopak nejmenší efektivní pohyblivost. Vzorek se pak dávkuje na rozhraní mezi vodící a koncový elektrolyt. Výhodou izotachoforézy je, že nedochází ke snižování koncentrace zředěného vzorku (CHURÁČEK et al., 1990). Velmi specifické je při této metodě i vyhodnocení izotachoforegramů, který má schodovitý průběh, přičemž tyto schody představují rozřazení jednotlivých látek dle vodivostí, výška schodu má kvalitativní charakter a délka zóny kvantitativní tedy koncentrační (PAZOUREK, 2003). Využití izotachoforézy je velmi široké, můžeme stanovovat ionty ve vodách, půdách, hnojivech, biologických materiálech, a dále můžeme tuto metodu využít pro stanovení organických látek za předpokladu, že mají povahu protolytů (JANČÁŘOVÁ a JANČÁŘ, 2008).

.

3.1.3 Izoelektrická fokusace (IEF)

Izoelektrická frakcionace nebo fokusace (IF- Isoelectric Fractionation) je metodou, při které se k separaci používá prostředí s gradientem koncentrace iontů, což má za následek ovlivnění náboje separovaných látek. Tento princip si můžeme ukázat na

bílkovinách. Jednotlivé bílkoviny se od sebe liší hodnotou izoelektrického bodu, tedy velikostí pH, kdy jejich náboj nabývá nulové hodnoty. Dostane-li se bílkovina do oblasti nižšího pH než je její izoelektrický bod, získá kladný náboj a důsledkem toho se v elektrickém poli pohybuje jako kationt, který se snaží dostat do oblasti, kde opět nabude nulové hodnoty (MIKEŠ et al., 1980). Takže dělené látky putují do části separačního prostředí, jehož pH je rovno jejich izoelektrickému bodu, dále je třeba po dosažení ustáleného stavu fokusované zóny mobilizovat, aby mohly být detekovány UV detektorem, který je umístěný na konci kapiláry. Mobilizací dosáhneme několika způsoby a to buď hydrodynamickým tokem, který zabezpečíme přetlakem nebo podtlakem na konci kapiláry nebo elektroelucí vyvolanou při změně složení katalytu nebo analytu (KAŠIČKA, 1997). Tato metoda tedy nachází uplatnění především při separaci látek amfoterního charakteru. Na rozdíl od ostatních metod vytváří izoelektrická fokusace takové podmínky prostředí, kdy rychlost jednotlivých separovaných složek, byla funkcí jejich polohy v koloně (CHURÁČEK et al., 1990).



Obrázek č. 1 Průběh jednotlivých elektromigračních metod, a) zónová elektroforéza b) izoelektrická fokusace c) izotachoforéza (PAZOUREK, 2003).

3.1.4 Elektroforéza s pohyblivým rozhraním

V této metodě je principem roztok analyzované směsi se základním elektrolytem rozptýlen v koloně, přičemž při tak malé délce kolony nemůže dojít k úplné separaci. Při spuštění stejnosměrného proudu do systému dojde k separaci smíšených zón, přičemž je první zóna tvořena směsí základního elektrolytu a látky s největší pohyblivostí a na konci kolony se budou separovat látky nejpomalejší (CHURÁČEK et al., 1993). Takže při průchodu elektrického proudu dojde k separaci, kdy látky aniontové povahy budou migrovat směrem k anodě, a po určité době dojde k částečné separaci na dvě série směsných zón. V přední části původní zóny došlo k separaci zón A a A+B, za touto původní oblastí došlo k separaci zón B+C a C. Anionty migrují směrem k anodě, přičemž vzorek obsahující anionty nemůže nikdy projít přes anionty obsažené ve vedoucím elektrolytu, protože jejich efektivní mobilita je vyšší. Při elektroforéze s pohyblivým rozhraním je většinou obsaženo v zónách více iontových druhů ze vzorku. Složení vzorku hraje důležitou roli při stanovení koncentrace, hodnoty pH a vodivosti různých zón. Tato situace je v rozporu s údaji známé při izotachoforéze, kde všechny tyto veličiny jsou nezávislé na kvantitativním složení vzorku (EVERAERTS et al., 1976)

3.2 Varianty elektromigračních metod

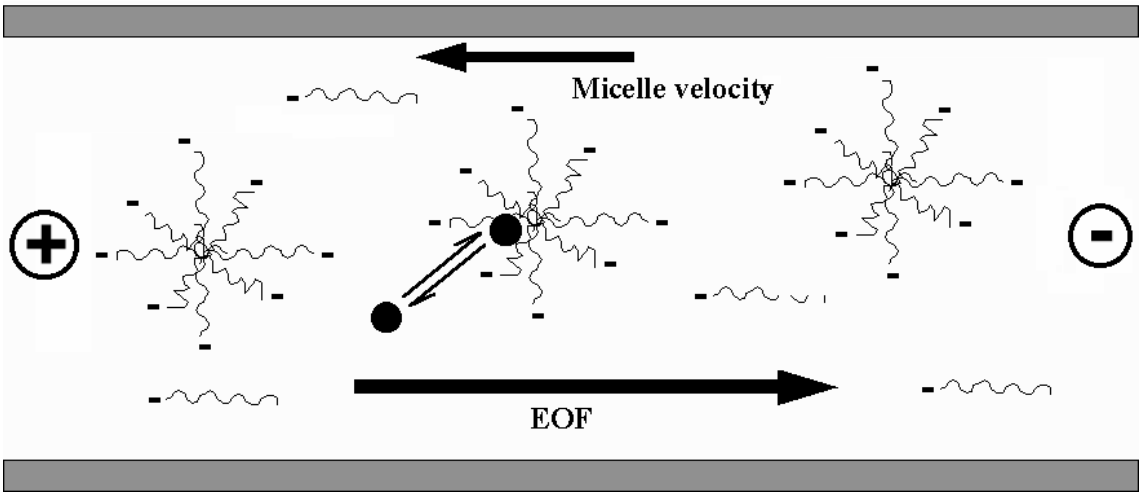
3.2.1 Gelová elektroforéza (GE)

Gelové prostředí, které mělo zabezpečit stabilizaci zón, bylo používáno již od počátku rozvoje elektroforézy. Tehdy se používaly silikagely a agarové gely, které se používají do dnes. Při použití gelu v elektroforéze dochází zároveň k jevu molekulového síta, jak tomu bylo u použití škrobového gelu. Nevýhodou použití gelu je, že dochází ke kontaminaci polysacharidy uvolněnými z gelové matrice. Jiné gely jako silikagely a agarové gely obsahují ionogenní skupiny, které vytvářejí výrazný osmotický tok, jenž má za následek posun zón a zkresluje tak výsledky analýzy. Použití některých gelů bylo zejména významné pro imunoelektroforézu. Ukázalo se, že nejlepší vlastnosti měl gel polyakrylamidový. Polyakrylamidový gel se ukázal jako nejméně chemicky reaktivní, málo afinitní vůči barvivům což umožnilo lehkou detekci barvením u biopolymerů, zejména bílkovin, nukleových kyselin a peptidů (MIKEŠ et al., 1980).

Další výhodou tohoto gelu je téměř zanedbatelný elektroosmotický efekt, mimo již zmíněné látky se touto metodou dále dají stanovit také štěpy DNA a RNA (PAZOUREK, 2003).

3.2.2 Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)

V podstatě se jedná o druh elektroforézy, což je separační technika založená na migraci analytu v roztoku pod vlivem elektrického pole. Dříve než byla vyvinuta micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) v roce 1984. Byly neutrální molekuly považovány za nerozseparovatelné. Myšlenka použití iontových micel v elektroforéze byla navrhnuta Nakagawem v roce 1981. Neutrální analyt získá zdánlivou elektroforetickou pohyblivost ve chvíli, kdy je začleněn do iontové micely a přejdou na stejnou rychlost jako micely za elektroforetických podmínek. Vzhledem k rychlému a rovnovážnému rozložení analytu mezi micely a okolní vodné fáze, je zřejmé, že elektroforetická mobilita a migrační rychlost je v přímém vztahu k distribučnímu koeficientu (LANDERS, 2007). MEKC byla vyvinuta na základě neschopnosti CZE dělit nenabité částice (SIMÓ et al., 2003). Princip spočívá přidáním surfaktantu (nejčastěji se používá sodiumdodecyl sulfát-SDS) do elektrolytu v koncentraci vyšší než je kritická micelární koncentrace, takže se jeho molekuly začnou samovolně agregovat. Tím dojde k rozseparování mezi fázi elektrolytu a micelární v závislosti na afinitě. Platí zde pravidlo, čím je interakce silnější, tím déle se analyt zdrží v micelách, a tím více se změní migrační čas. Důležité vlastnosti výše zmíněného surfaktantu jsou hydrofilní vnější povrch a hydrofobní jádro, do něhož se může analyt rozdělovat. Jelikož mají micely negativní náboj, migrují proti elektroosmotickému toku, který je obvykle vyšší a tak micely dosáhnou úrovně detektoru. Látky, které silně interagují s micelami, jsou nejpomalejší, naopak omezeně interagující látky budou rychlejší. Přesto, že se jedná v podstatě o chromatografickou techniku, dosahujeme selektivity jak rozdělováním mezi dvě fáze, tak i elektroforetickou mobilitou (PAZOUREK, 2003).



Obrázek č. 2 Interakce a pohyb neutrálního analytu s micelami (PAZOUREK, 2003).

3.2.3 Elektrochromatografie (EC)

Kapilární elektrochromatografie je hybrid mezi kapilární elektroforézou (CE) a kapilární vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). Metoda jako taková, byla charakterizována některými jako to nejlepší z obou technologií a ostatními jako kompozit z nejhorších vlastností, realita však leží někde mezi těmito extrémy (LANDERS, 2007). Účinnost této techniky je vyšší než se dříve vůbec očekávalo, což přispělo k rozšíření této techniky a zájmem o ni. Existují různé způsoby provádění separací pomocí techniky CEC. Jedním z nich je znehybnění chirálního selektoru na stěně potažením nebo chemickou vazbou. Mobilní fáze je pak přepravována přes kapiláry (jedná-li se o variantu prováděnou v kapiláře) pomocí EOF (GUBITZ a SCHMID, 1997). Je to technika srovnatelná s kapilární HPLC, kdy je obdobně separační prostor tvořen kapilárou, uvnitř které je stacionární fáze. Rozdílem mezi HPLC a elektrochromatografií je v pohybu mobilní fáze, která je v případě HPLC uskutečňována hydrodynamickým tokem, kdežto u CEC je pohyb zapříčiněn elektroosmotickým tokem, který způsobuje stejnosměrné elektrické pole. Zdroj energie je připojený ke koncům kolony, jejíž konce jsou ponořeny do elektrodových nádob s roztokem mobilní fáze. Hlavní předností je pravoúhlý směr elektroosmotického toku na rozdíl od parabolického hydrodynamického toku. Také lze v CEC využít menší částice sorbentu, čímž se zvýší účinnost separace, což je možné pouze díky absenci zpětného tlaku kolony (KAŠIČKA, 1997). V případě použití kapilár při této metodě se naplní kapilára částicemi oxidu křemičitého, který má funkci stacionární fáze a pufr,

který se následkem elektrického pole pohybuje, slouží jako mobilní fáze, jehož rychlost je úměrná elektroosmotickému toku (SIMÓ et al., 2003).

3.2.4 Afinitní elektroforéza (ACE)

Základ metody ACE spočívá v rozpouštění jednoho komponentu z analyzovaného páru ligandu a analytu v promývacím pufru a měření jeho změny mobility v závislosti na koncentraci. Tímto způsobem je možné odhadnout vazebné konstanty mezi analytem a ligandem. Tato metoda nám tedy dovoluje studovat nekovalentní molekulární interakce mezi daným analytem (léčivo v DDS) a ligandem (polymer použitý pro řízení výdaje léčiva s DDS). Výhodou této metody je vysoká rychlost a přesná kvantifikace (SIMÓ et al., 2003). Tato metoda se zaměřuje na stanovování vazebných konstant, interakcemi různých léčiv s proteiny, dále také s antigeny a protilátkami, k chirálním separacím a mnohým dalším (ALTRIA, 1999).

3.3 Techniky (prostředí)

3.3.1 Papír

Papír jako prostředí pro elektromigrační metody byl používán již od počátku těchto metoda a to zejména z důvodu nízké ceny a laboratorně již používaný pro papírovou chromatografii. Jedna z dalších výhod je, že papír nenese žádné náboje a tudíž při analýze nedochází k nepříznivému ovlivňování, tedy interakci s analyzovaným vzorkem. Na papír, který leží na chladící desce a jehož konce jsou ponořeny do nádob s elektrolytem, kde jsou mimo jiné ponořeny i konce elektrod, naneseme zkoumaný vzorek, který je aplikován spolu s ionizovanými barvivy a standardy pro sledování migrace. Velikost použitého napětí je větší v porovnání s gely, což je dáno větším odporem papíru. Nevýhodou této metody je její nízká citlivost, což je způsobeno velikostí a kvalitou pórů papíru, kterou nemůžeme nijak ovlivnit (PAZOUREK, 2003).

3.3.2 Gel

V případě použití gelu jako prostředí pro elektromigrační metody využíváme efektu omezené difúze. Efekt difúze, který vede k rozmývání zón je způsobem vlivem

průchodu elektrického proudu, který kapalinu zahřívá, což vede k narušení analýzy, popřípadě i k výše zmíněnému rozmytí zón. Pro tyto účely se používá buď gel agarosový (polysacharid z mořských řas), nebo uměle syntetizovaný polyakrylamid (CH2=CHCONH2) (PAZOUREK, 2003).

3.3.2.1 Agarosa

Agarosové gely se nejčastěji používají pro separaci velkých molekul, což se využívá pro analýzu velkých bílkovin a DNA. Tyto ředěné gely jsou dostatečně rigidní a jednoduché pro přípravu v nízkých koncentracích. Jak už bylo zmíněno, agar je polysacharid, který se extrahuje z mořské řasy rodu Rhodophycae. Je tvořen dvěma složkami a to agarosou a agaropektinem. Vzhledem k tomu, že je agarosa téměř bez náboje je vhodnou elektroforetickou matricí. Výhodou tohoto gelu je, že agarosa je levná, netoxická a ke své úpravě nepotřebuje žádné další látky potřebné pro polymerizace (PAZOUREK, 2003).

3.3.2.2 Polyakrylamid

Na rozdíl od agarosy se tímto gelem separují především menší molekuly jako nukleové kyseliny, ale i proteiny a menší oligonukleotidy. Polyakrylamidové gely se skládají z monomeru akrylamidu (CH_2=$CHCONH_2$), který je do dlouhých řetězců svázán tzv. crosslinkerem (síťováním), což je proces při kterém dochází ke spojení dvou nebo více molekul kovalentní vazbou. Nejpoužívanější crosslinker je N,N'-methylenbisakrylamid [$(CH_2$=$CHCONH)_2CH_2$]. Rozsah molekulových hmotností, při kterých bude gel účinný (velikost pórů), můžeme nastavit procentuálním obsahem síťovadla ve směsi. Akrylamid na rozdíl od agarósy potřebuje ke své polymeraci aditiva ve formě peroxodisulfátu amonného $(NH_4)_2S_2O_8$ a tetramethylendiaminu (TEMED), který funguje jako katalyzátor (PAZOUREK, 2003).

3.3.3 Kapilára

V této technice se využívají tenké křemenné kapiláry o průměru 20-200 µm, které jsou naplněny elektrolytem nebo gelem. Křemenná kapilára na rozdíl od skla neobsahuje kationty, které by měly za následek absorpci světla v UV oblasti, jedná se

tedy prakticky o čistý oxid křemičitý. Výhodou této techniky spočívá v relativně velkém poměru povrchu vůči objemu, což nabízí možnost chlazení kapiláry, ať už okolním vzduchem nebo chladicí kapalinou z vnější strany kapiláry, při vzniku jouleova tepla při průchodu elektrické energie elektrolytem. Na druhé straně nevýhodou této techniky je, že rozměry systému doprovázejí problémy s dávkováním, kdy vzhledem k objemu kapiláry musí být dávkovány velmi malé objemy a detekční zařízení pak musí být uzpůsobeny, aby dokázaly malé koncentrace detekovat. Další problém nastává při čistění kapiláry, jelikož není na jedno použití a pro další analýzu je nutná čistota vnitřní strany kapiláry. Využití kapilárních elektromigračních metod k analýze vzorků je velmi široké. Můžeme analyzovat jak látky organické, tak látky anorganické, aminokyseliny, proteiny, lipidy, sacharidy, vedle ionogenních látek mohou být detekovány i látky neionogenní, syntetické molekuly, viry, bakterie a mnohé další (PAZOUREK, 2003).

3.4 Jevy v elektroforéze

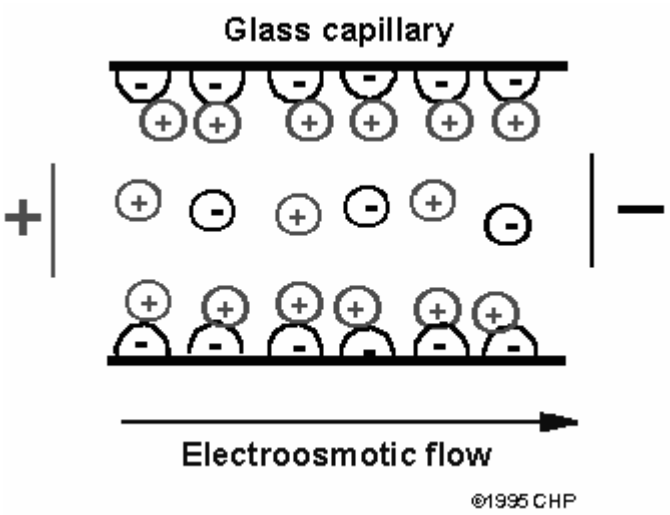
3.4.1 Jouleovo teplo

Jouleovo teplo je produkováno při průchodu elektrického proudu sloupcem elektrolytu o daném průřezu S a měrné vodivosti χ. Při snaze urychlit průběh analýzy zvýšíme proud. Při dvojnásobnému zvýšení proudu dosáhneme dvounásobné rychlosti analýzy, ale tepelný výkon stoupne čtyřnásobně. Právě elektrický ohřev je limitujícím faktorem, který může zapříčinit efektivní mobilitu migrujících látek, destrukci termolabilních látek nebo rozmývání zón (CHURÁČEK et al., 1993). Míra množství odvedeného tepla ze systému tedy definuje množství použitého napětí, které můžeme aplikovat, aniž by došlo ke ztrátě separační účinnosti (PAZOUREK, 2003).

3.4.2 Elektroosmóza

Častým transportním jevem uskutečňujícím se v procesu elektromigračních metod je tak zvaný elektroosmotický tok, který vzniká působením elektrického stejnosměrného pole na difuzní část elektrické dvojvrstvy na rozhraní pevné a kapalné fáze na vnitřní straně kapiláry (KAŠIČKA, 1997). Povrch křemenné kapiláry obsahuje negativně nabité funkční skupiny, ty přitahují pozitivně nabité protiionty. Pozitivně nabité ionty migrují k negativní elektrodě a unáší sebou molekuly rozpouštědla stejným směrem. Při

separaci dochází k pohybu neutrálních molekul stejným směrem jako elektroosmotický tok. Positivně nabité ionty jsou elektroosmotickým tokem urychlovány, negativně nabité naopak zpomalovány (PAZOUREK, 2003). Vzhledem k závislosti pH roztoku na disociaci ionogenních silanolových skupin na vnitřní straně kapilár, je pH roztoku důležitým faktorem ovlivňující elektroosmotický jev při procesech elektromigračních metod (KAŠIČKA, 1997).



Obrázek č. 3 Uspořádání iontů v kapiláře při elektroosmotickém toku (PAZOUREK, 2003)

3.4.3 Difúze

Po separaci nadávkované analyzované látky je vytvořeno ostré rozhraní, které se po čase (pokud nepůsobí jiná síla proti) rozmývá difůzí. V počáteční fázi analýzy je tedy charakter koncentrace obdélníkového tvaru, který časem dostane podobu gaučovského tvaru (CHURÁČEK et al., 1993). Tato difůze je pro největší molekuly nejmenší vzhledem k nízkému difuznímu koeficientu (PAZOUREK, 2003).

3.4.4 Gravitace

V případě elektroforézy může docházet k přirozené konvekci související s hustotní diferenciací, kdy zóny s větší hustotou jsou umístěny nad zónami s nižší hustotou a tak dochází k rozmývání (CHURÁČEK et al., 1993).

3.4.5 Adsorpce v kapilární elektroforéze

Vlivem integrace iontů separovaných látek se stěnou separační kapiláry, dochází ke změnám migračního chování separovaných zón. Problém adsorpce spočívá ve vytváření ionizovaných skupin na stěnách kapilár, které mají opačný náboj, ty se zde hromadí a působí vůči separovaným iontům jako ionex, což má za následek zvýšenou sorpci. Tento jev nastává zvláště u makromolekul s malými difúzními koeficienty. Následkem výše popsané sorpce je rozmývání separovaných zón, které se projeví na výstupu jako chvostování zadního rozhraní. Dalšími problémy jsou například tak silná sorpce, kdy sorbovanou látku z kapiláry nelze vymýt, dále také mohou zapříčinit změny rozložení náboje podél stěn kapiláry, které se projeví na lokální změně elektroosmotického toku, v nejzazším případě může vlivem tohoto faktoru dojít až k znemožnění provedení analýzy (CHURÁČEK et al., 1993).

4 PŮVOD A VÝZNAM HERBICIDŮ

Herbicidy jsou v užším slova smyslu aktivní chemické látky, v širším smyslu pak obchodní přípravky k ničení nežádoucí vegetace (OBENBERGER a TROJAN, 1971).

V současné době zpřísněných požadavků na ochranu přírody vystupují do popředí snahy uplatnit mechanické, případně biologické regulační systémy. Přesto herbicidy stále zůstávají nezbytnou součástí technologie pěstování některých plodin s menší konkurenční schopností, jako je cukrovka, kukuřice, len apod. V zemědělské výrobě nám jde v podstatě o regulaci (nikoliv úplné vyhubení) plevelů do takové míry, aby byly neškodné pro cílovou plodinu. Stanovit tuto hranici škodlivosti, zvláště na začátku vegetace, je někdy obtížné (ÚKZÚZ., 1996).

Jednou z hlavních příčin stojící v cestě za dosažením optimálně vysokých a trvalých výnosů pěstovaných plodin jsou škody působené plevely. Kirchhoff definuje plevel jako každou rostlinu, jež se vyskytuje na poli proti vůli pěstitelově vedle určité plodiny pěstované. Škodlivost plevelů je otázkou mnoha faktorů. Potlačují v růstu užitkové rostliny, tak že jim zabírají prostor, odnímají kulturním rostlinám světlo, neboť jim stíní. Dále jim odebírají z půdy živiny a vláhu pro svou vlastní, mnohdy několikrát větší potřebu. Snižují půdní teplotu průměrně o 1,5 – 3 °C, což je zapříčiněno větší transpirací plevelů. Narušují vývoj a zrání užitkových rostlin, zaplevelené kultury nestejnoměrně dozrávají. Plevely zanášejí půdu svými oddenky a výběžky, zaplevelená půda je neobyčejně kompaktní a velmi těžce se zpracovává. Plevely ztěžují i ošetřování porostů za doby vegetace a při provedení sklizně. Některé plevele podporují vývoj a šíření různých škodlivých činitelů (virů, bakterií, hub, a živočišných škůdců). Mnohé plevely znehodnocují rostlinné produkty a mohou ohrozit zdraví domácích zvířat. Škody působené plevely v polních plodinách jsou často i při normálním agrotechnickém ošetřování pozemků velké (ZBIROVSKÝ et al., 1960).

Plevely tvoří velmi rozsáhlou skupinu rostlin. Jednotlivé druhy se od sebe značně liší vlastnostmi biologickými, škodlivostí, způsobem hubení a mnoha dalšími znaky. V zemědělské praxi se zažilo a nejlépe osvědčilo třídění plevelů podle biologických vlastností, hlavně podle způsobu rozmnožování a vytrvalosti. Na základě tohoto kritéria lze rozdělit běžné druhy našich plevelů do následujících základních skupin (ZBIROVSKÝ et al., 1960).

.

1. Plevely rozmnožující se zcela nebo převážně plody či semeny (generativně):

a) Jednoleté
b) Jednoleté ozimé a přezimující
c) Poloparazitické
d) Parazitické
e) Dvouleté a víceleté (vytrvalé)

2. Plevely (víceleté) rozmnožující se semeny a plody (generativně) a vegetativními orgány (vegetativně):

A. Mělce kořenící plevely, rozmnožující se

a) plazivými lodyhami,
b) pevnými a tuhými výběžky,
c) křehkými a měkkými výběžky,
d) cibulkami,
e) hlízkami.

B. Hluboko kořenící plevely, rozmnožující se

a) osními výběžky (oddenky),
b) kořenovými výběžky.

Z praktického hlediska chemického hubení plevelů je obvyklé dělení plevelů do dvou tříd:

1. Plevely dvouděložné, jejichž semena mají dvě dělohy, které jsou při klíčení vyneseny nad povrch půdy, kde zezelenají a změní se ve dva nepravé listy, tzv. děložní. Tyto listy vykonávají funkci asimilačních orgánů do doby, než se vytvoří pravé listy z pupenu uloženého mezi děložními listy, následně pak zanikají (ZBIROVSKÝ et al., 1960).

2. Plevely jednoděložné, jejichž semena mají jen jednu dělohu, která při klíčení zůstává v zemi. Z ní vyráží na povrch půdy klíček, z něhož se vyvinou přímo listy pravé, kterými teprve rostlina asimiluje (ZBIROVSKÝ et al., 1960).

Rozdělení plevelů na tyto dvě skupiny je výhodné vzhledem k tomu, že proti každé z nich jsou obvykle účinné jiné typy herbicidů.

4.1 Rozdělení herbicidů

Podle perzistence můžeme herbicidy rozdělit na:

1) **Herbicidy s dlouhou perzistencí v půdě**- používají se k odstranění veškeré vegetace na delší dobu. Výhodou těchto herbicidů je trvalejší účinek ničením vzcházejících semen a rašících vegetativních orgánů. Nevýhodou je, že délka reziduí v půdě se nedá přesně stanovit vzhledem k půdnímu druhu, vlhkosti, teplotě atd. U látek méně rozpustných ve vodě dochází při větších srážkách k jejich splavení do níže položených míst, kde se hromadí voda a mohou tak pronikat do spodních vod nebo vodních toků (ÚKZÚZ., 1996).

2) **Herbicidy s krátkou perzistencí v půdě**- pronikají do rostlin většinou pouze nadzemní částí a v půdě jsou rychle inaktivovány. Používají se u bodových aplikací nebo plošně při ničení plevelů v meziporostním období či podlistové aplikaci (ÚKZÚZ., 1996).

Herbicidy lze rozdělit z hlediska praktického na dvě velké skupiny:

I. **Selektivní herbicidy**- obecně je jako selektivní herbicid označována látka, která je toxičtější pro jeden druh rostlin více než pro jiný druh rostlin. Většinou se však používá tohoto pojmu v tom smyslu, že za selektivní pokládáme sloučeniny, kterými jsou při vhodném použití zpravidla ničeny určité druhy plevelů, aniž byla podstatně poškozena kulturní rostlina nacházející se v porostu, kde byl herbicid aplikován (ZBIROVSKÝ et al., 1960). Rozhodujícími selekčními činiteli jsou: použitá dávka (koncentrace) herbicidu na jednotku plochy, morfologie, stáří a vývojová fáze rostlin, hloubka kořenů plevelů a kulturní rostliny, nadzemních částí, klimatické poměry-teplota, sluneční svit, relativní vlhkost, apod.), fyzikální vlastnosti herbicidního přípravku (přilnavost, smáčivost) a způsob jeho aplikace (postřik, granulát, popraš apod.) (OBENBERGER a TROJAN, 1971). U novějších herbicidů jde o druhovou

odolnost určitých rostlin k dané chemické sloučenině, která je podmíněna fyziologickými vlastnostmi a celkovým biochemismem rostlin (ÚKZÚZ., 1996).

II. Neselektivní herbicidy (totální)- ničí všechny rostliny bez rozdílu, a proto se používá výhradně k hubení veškeré vegetace. Přitom hranice mezi oběma skupinami je většinou plynulá a je často otázkou pouze množství dávky a způsobu aplikace (ZBIROVSKÝ et al., 1960). Tyto látky se používají k ničení porostu na cestách, silnicích, železničních tratích, hřištích apod. Neselektivní herbicidy lze dále dělit na defolianty (tj. odlisťovací herbicidy), totální (extinkční) herbicidy a sterilizátory půdy s dlouhodobým nebo krátkodobým účinkem (OBENBERGER a TROJAN, 1971).

Dělení herbicidů podle převažujícího způsobu účinku

1. **Kontaktní herbicidy**- působící dotykem s rostlinným pletivem. Zasažené rostlinné pletivo odumře, takže herbicid nemůže být dále rozváděn v rostlině. Jsou zničeny jen ty části rostliny, které byly herbicidem zasaženy. Tyto herbicidy ničí dokonale pouze jednoleté plevely, u vytrvalých plevelů ničí jen nadzemní části, takže rostliny mohou regenerovat (ZBIROVSKÝ et al., 1960). Kontaktní herbicidy jsou leptavé látky, které srážejí bílkoviny a působí jako plazmatické jedy. Dále některé z nich působí i dehydratačně, tj. po zachycení na listech a proniknutí do rostliny odnímají vodu, což vede k úplnému vysušení rostliny, čímž ji ničí. Jejich účinek je rychlý a méně závislý na klimatických poměrech než u systémových herbicidů (OBENBERGER a TROJAN, 1971). Nejúčinnější aplikace těchto herbicidů je na plevele ve fázi děložních listů až šesti pravých listů, pokud plodiny nebo plevele netvoří příliš hustý zápoj (ÚKZÚZ., 1996).

2. **Translokační neboli systémové herbicidy**- jsou rostlinou absorbovány, a poté rozváděny do té části rostliny, které nebyly přímo zasaženy. Může jít jak o translokaci floémem (z listu do podzemních částí), tak i translokaci xylémem (z kořenů do nadzemních částí rostlin). Tyto herbicidy ničí i vytrvalé plevely (ZBIROVSKÝ et al., 1960). Patří do skupiny tzv. regulátorů růstu, přičemž jde o látky, jejichž účinek se projevuje změnou růstových pochodů. Účinek těchto látek je nevratný, zasažená rostlina dříve nebo později odumírá (OBENBERGER a TROJAN, 1971). Aplikují se na vzešlé

rostliny. Přestože hubí lépe rostliny v rané růstové fázi, mohou jimi být účinně zasaženy i dospělejší rostliny v plné metabolitické aktivitě a díky translokaci i podzemní orgány vytrvalých plevelů (ÚKZÚZ., 1996).

3. **Herbicidy sterilizující půdu**- působící proti všem rostlinám na půdě se vyskytujícím. Podle toho, jak dlouho trvá jejich účinek, rozeznáváme krátkodobé a trvalé herbicidy (ZBIROVSKÝ et al., 1960).

Dělení herbicidů podle místa aplikace na rostlinu

A. Listová aplikace- postřik rostlin během vegetace. Patří sem většina kontaktních herbicidů, dále defolianty (látky určené k odlistění rostlin, k ničení nati bramborové apod.) (ZBIROVSKÝ et al., 1960). Tento herbicid ničí listy přímo, nebo působí po proniknutí do listů, popř. jiných nadzemních orgánů rostlin (OBENBERGER a TROJAN, 1971).

B. Kořenová aplikace- zálivkou nebo mechanickým zapravením do půdy. Herbicidy jsou přijímány především kořeny rostlin a působí jejich prostřednictvím (ZBIROVSKÝ et al., 1960). Ničí nadzemní i podzemní části rostlin. Do této skupiny patří většina moderních herbicidů (OBENBERGER a TROJAN, 1971).

Dělení podle doby aplikace

a) Předseťová aplikace- herbicidem se ošetří připravená nebo i nepřipravená půda před setím nebo sázením kulturní rostliny.

b) Preemergentní aplikace- tj. po zasetí, ale před vzejitím kulturní rostliny. V tomto případě jde o:

α) Kontaktní preemergentní aplikace- provádí se po vzejití plevelů (herbicid se musí v půdě rychle rozkládat, aby později nepoškodil při vzcházení kulturní rostlinu).

β) Residuální preemergentní aplikace)- prováděna před vzejitím plevelů (herbicid musí setrvat v půdě dostatečně dlouho, aby zasáhl vzcházející rostlinky plevelů, do doby vzcházení kulturní rostliny se však musí rovněž rozložit) (ZBIROVSKÝ et al., 1960).

5 EKOLOGICKY VÝZNAMNÉ IONTOVÉ HERBICIDY

5.1 Triaziny

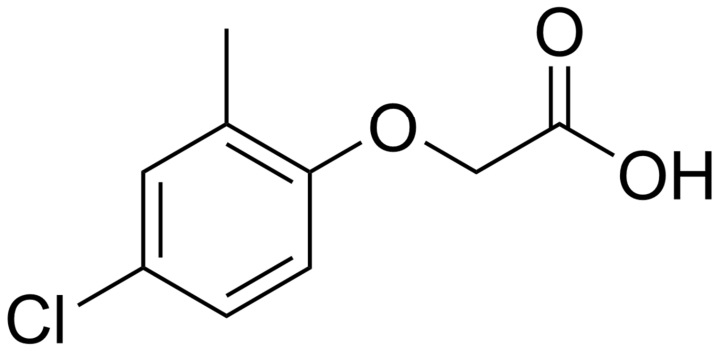
Triazinové herbicidy představují významnou skupinu pesticidů. Seznam sta prioritních herbicidů a jejich rozkladných produktů EPA zahrnuje ametryn, atrazin, DEA, prometryn, propazin, simazin a terbutryn. Evropská studie doporučila, aby byly do seznamu 38 prioritních pesticidů přidány triaziny (atrazin, cyanazin, metribuzin, propazin, simazin, terbuthylazin , terbutryn a degradační produkty). Dva nejběžněji studované triaziny, které byly zjištěné v přírodních vodách, jsou atrazin a simazin, přičemž hydroxyatrazin je hlavní abioticky degradovaný produkt ve vodě a půdě. Zahrnutí produktů degradace triazinu jako cílové sloučeniny v analytických postupech je velmi důležité, protože některé z těchto produktů rozkladu, jsou toxické stejně, nebo dokonce více, než jejich původní sloučeniny. Například, DEA, který je považován za stejně toxický jako atrazin jak pro zvířata, tak pro člověka, byl detekován v podzemní vodě v koncentraci mezi 0,01 a 1,0 $g.l^{-1}$ (MARTÍNÉZ et al., 2006).

Obrázek č. 4 Strukturální vzorec triazinu (WIKIPEDIA.ORG , 2017)

5.2 MCPA (kyselina 2 - methyl - 4 chlorofenoxyloctová)

Kyselina 2 - methyl - 4 chlorofenoxyloctová známá pod zkratkou MCPA, byla zavedena v Anglii po roce 1945. Způsoby výroby jsou založeny na kondenzaci 4 - chlor-o-kresolátu sodného s chloritanem sodným v alkalickém vodném prostředí. Přípravek se používá ve formě solí, které jsou dobře rozpustné ve vodě, nebo ve formě esterů, které se dobře rozpouštějí v běžných organických rozpouštědlech nebo v minerálních olejích. MCPA se používá k hubení především širokolistých dvouděložných rostlin. Analytické stanovení MCPA ve směsi můžeme provést několika

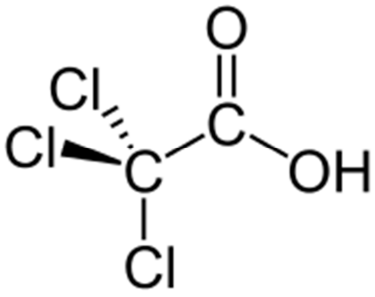
metodami, například pomocí ultrafialové a infračervené spektrofotometrie, chromatograficky, diferenční refraktometrií nebo izotopovou zřeďovací analýzou (ZBIROVSKÝ et al., 1960).



Obrázek č. 5 Strukturální vzorec MCPA (WIKIPEDIA.ORG , 2017)

5.3 TCA (kyselina trichloroctová)

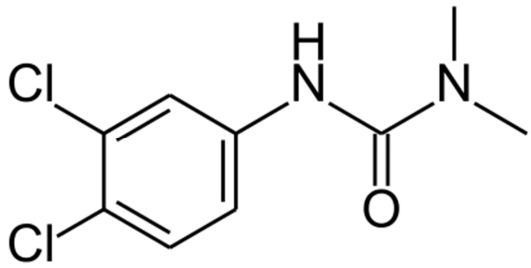
Tato kyselina byla poprvé použita již v roce 1946 v USA. Tento herbicid byl v minulosti jedním z nejpoužívanějších herbicidů proti jednoděložným plevelům, zejména víceletým trávám. TCA se aplikoval ve formě sodných solí. Nejčastěji se tento herbicid vyrábí oxidací chloralu účinkem kyseliny dusičné. TCA působí také jako dočasný půdní sterilizátor, a proto je také aplikován zejména mimo vegetační dobu.
Tento herbicid můžeme stanovit například detekcí s anilinem v silně zásaditém prostředí, přičemž výsledkem bude silný zápach. Dalšími metodami jsou stanovení kolorimetricky (ZBIROVSKÝ et al., 1960).



Obrázek č. 6 Strukturální vzorec TCA (WIKIPEDIA.ORG , 2017)

5.4 Diuron (dichlorfenyl - 1, 1 - dimethylmočovina)

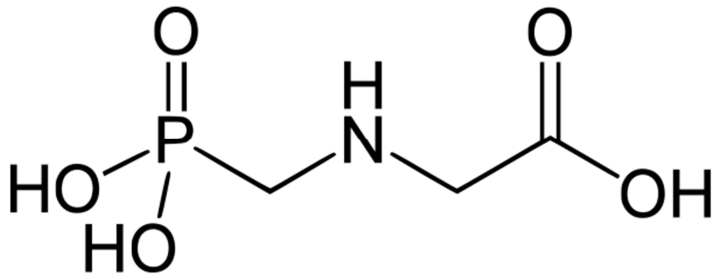
Tento herbicid byl zaveden roku 1955 v USA. Je to bílá krystalická látka bez zápachu, je málo rozpustná ve vodě. Diuron se osvědčil při hubení všech plevelů na nezemědělských půdách, a dále působí, jako selektivní herbicid ve vinicích při pěstování bavlníku a rajských jablíčkách. Účinnost diuronu je silně závislá na druhu půdy. Analytické stanovení je založeno na hydrolýze (ZBIROVSKÝ et al., 1960).



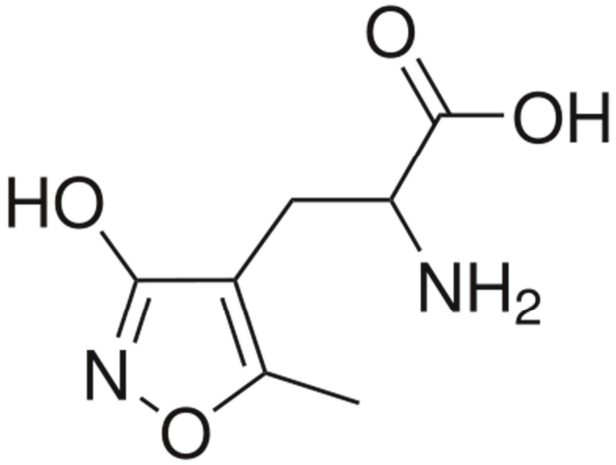
Obrázek č. 7 Strukturální vzorec diuronu (WIKIPEDIA.ORG , 2017)

5.5 Glyfosát a AMPA

Tento herbicid byl uveden na trh v roce 1974 společností Monsanto Co., pod názvem roundup. Glyfosát (N - [fosfonomethyl] glycin) je širokospektrální herbicid, který se používá neselektivně v zemědělství pro regulaci plevelů a bylin. Působí tak, že inhibuje enzym 3 – enol – pyruvylshikimate – 5 - fosfát syntázu (EPSP syntázu), který se nachází v chloroplastu, zasahuje tak do biosyntézy aromatických aminokyselin používaných při syntéze proteinů (ROBERTS et al., 1998). EPSP syntáza je enzym, který tvoří součást metabolizmu kyseliny shikimic. Jedná se o proces, který se vyskytuje pouze v rostlinách, bakteriích a houbách a neexistuje u zvířat. Vzhledem k této skutečnosti je akutní toxicita u zvířat nízká. Nicméně, některé studie uvádějí, nepříznivé účinky na vodní a suchozemské druhy a vzhledem k širokému využívání a velkého množství se obrátila pozornost také k potenciálním dopadům na životní prostředí (CONTARDO-JARA et al., 2009). Hlavním dceřiným produktem rozkladu glyfosátu je AMPA (kyselina aminomethylfosfonová), která se nachází v životním prostředí ve velkých koncentracích a její toxicita a negativní dopad je dokonce vyšší než u glyfosátu.



Obrázek č. 8 Strukturální vzorec glyfosátu (WIKIPEDIA.ORG , 2017)



Obrázek č. 9 Strukturální vzorec AMPA (WIKIPEDIA.ORG , 2017)

6 TRANSFER HERBICIDŮ VODNÍM PROSTŘEDÍM

Voda je nejen kolébkou života, ale i podmínkou pro život samotný, je obsažena ve všech organismech a její role na zemi je nezastupitelná, ať už hovoříme o životním prostředí, životodárné tekutině nebo prvku, jenž vstupuje do mnoha interakcí, které by jinak nebyly možné. Množství vody na zemi je neměnné, nelze vyčerpat, a proto patří voda mezi obnovitelné zdroje energie. Většina vody se na zemském povrchu vyskytuje v podobě vody slané v oceánech, což činí 97%, voda sladká pak zaujímá pouhé 3% z čehož 2,15 % sladké vody je uloženo v ledovcích, v podzemní vodě je zastoupena v 0,62% a pouhých 0,017% zaujímají vody povrchové, kdy z tohoto množství zaujímají 84% jezera, z 11% bažiny a močály a pouhé 2% voda v řekách (STŘEDOVÁ, 2014; RUDA, 2017)

6.1 Rozdělení vod a druhy mikce

1. Vody podle původu

a) vody přírodní
b) vody odpadní

2. Vody podle výskytu

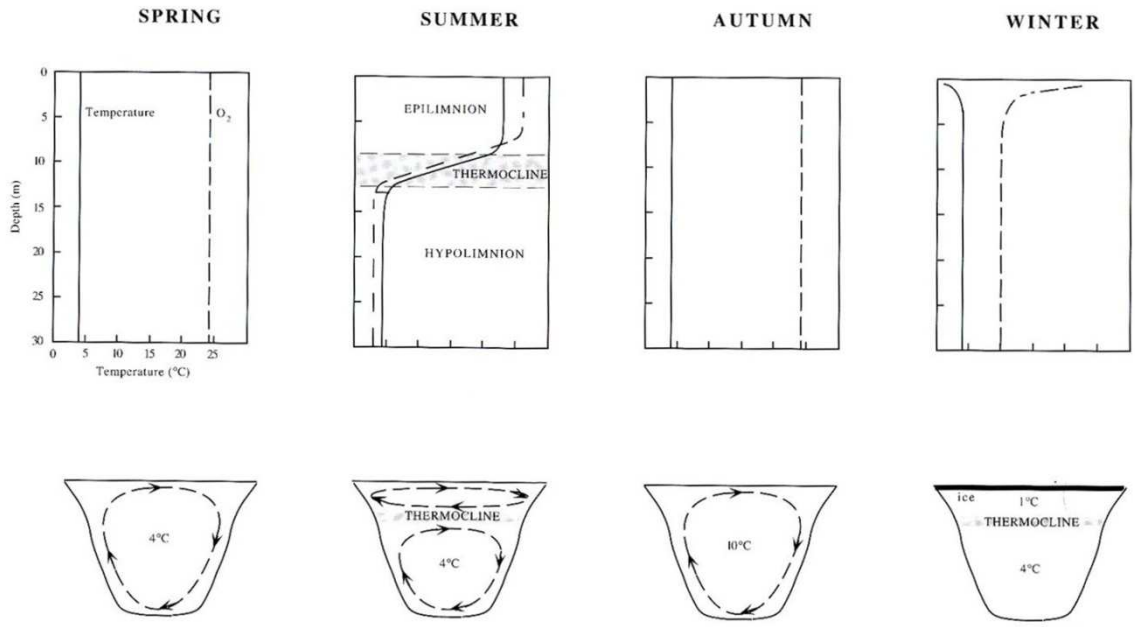
a) vody atmosférické
b) vody podzemní
c) vody povrchové

3. Vody podle použití

a) vody pitné
b) vody užitkové
c) vody provozní
d) vody odpadní

Voda prochází uzavřeným koloběhem a to velkým a malým, kdy neustále dochází k výparu, transferu a kondenzaci vodní páry zpět na povrch. Díky těmto jevům krom jiného dochází k pohybu vodní masy spolu s látkami v ní obsažené. Kromě těchto cyklů je voda promíchávána samotným prouděním vody, ke kterému dochází při toku vody v řekách a bystřinách. U vod stojatých dochází k promíchávání nádrže cirkulací a stratifikací. V našich podmínkách mírného pásma

hovoříme o dimiktických nádržích, kde dochází k promíchávání dvakrát za rok. Nádrže pak můžeme rozdělit podle toho, zda jsou promíchávány celé (holomiktiké) nebo jen jejich svrchní vrstva a profundál zůstává stabilní (meromiktická).



Obrázek č. 10 Stratifikace a mikce v jednotlivých ročních obdobích (vsb.cz, 2017)

Při stratifikaci dochází k pohybu vodní masy, vzhledem k její hustotě, jenž je způsoben rozdílnými teplotami. V našich podmínkách můžeme rozlišit čtyři období:

období jarní cirkulace - dochází k tání pokrývky ledu, promíchávání vodní masy větrem a nastává vyrovnání teploty ve vodním sloupci. Toto období je krátké a brzy nastupuje letní stratifikace.

období letní stratifikace – vlivem oteplování dojde k rozvrstvení vodní masy v nádrži. Vrchní část vody se dopadajícím slunečním zářením ohřívá a ta vlivem hustoty zůstává ve vrchních částech, kde vytváří vrstvu epilimnionu, kdežto voda studená, která má nejvyšší hustotu (4°C) zůstává ve spodní části, kterou nazýváme hypolimniem. Tyto dvě vrstvy jsou odděleny skočnou vrstvou metalimnionem, ve kterém se nachází termoklima.

období podzimní cirkulace – při poklesu teploty, dochází k ochlazování svrchní vrstvy, kdy se postupně metalimnion dostává do nižších částí nádrže a dojde k postupnému vyrovnání teploty v nádrži.

období zimní stagnace – při vysokých teplotách pod bodem mrazu dochází k zamrznutí vrchní vrstvy a dojde tak i k zamezení míchání vody větrem. Vzhledem k výše popsané vlastnosti, kdy nejvyšší hustota vody nastává za teploty 3,96 °C, klesá ke dnu a umožňuje tak přežití vodních organismů.

6.2 Transfer herbicidů mezi jednotlivými složkami životního prostředí

Glyfosát je aplikován na půdu ve formě postřiku, takže pokud opomineme odnos kapiček vlivem větru při postřiku, jeho transfer bude uskutečňován zejména prostřednictvím půdy, popřípadě následně vody.

Glyfosát na bázi solí je velmi dobře rozpustný ve vodě, ale je také silně zachován v půdní matrici. Konkrétněji, glyfosát - fosfonová skupina je zodpovědná za adsorpci glyfosátu na oxidy a zvláště na chudé krystalické frakce (SHEALS et al., 2002). Adsorpce glyfosátu na půdní částice závisí zejména na obsahu a druhu jílů v půdách, jejich kationové výměnné kapacity, obsahu bivalentních kationtů, obsahu železa a amorfních hydroxidů hliníku (PICCOLO et al, 1994).

Ve studii zaměřené na transferu a přetrvání glyfosátu v půdě byla po aplikaci naměřena dvaceti násobně vyšší koncentrace glyfosátu a AMPA ve svrchní části půdy (0-5 cm) než v průběhu období před aplikací. Převaha AMPA (80%) byla naměřena u vzorku, kde proběhla již dřívější aplikace herbicidem. Koncentrace GLY a AMPA se snižuje s hloubkou a silně závisí na obsahu organického uhlíku a pH. Mírné zvýšení koncentrace pesticidů bylo také naměřeno v hlubších vrstvách (25-35 cm). I přes poměrně krátký poločas přetrvání glyfosátu v půdě, byl výskyt GLY a AMPA registrován v téměř všech matricích půdy v různých časech odběru vzorků (před a po aplikaci). Chování těchto znečišťujících látek v životním prostředí určují fyzikálně-chemické vlastnosti (obsah organického uhlíku, textura, pH) a struktura půdy a sediment a to vše závisí na době, která uplynula od aplikace (LUPI et al., 2015).

Vertikální pohyblivost glyfosátu souvisí především s preferenčním prouděním a částicemi usnadňující transport v dobře strukturované půdě (KJAER et al., 2011). Přestože je glyfosát aplikován přímo na povrch půdy, experimenty založené na loužení ukázaly, že až 50% částic ve výluhu pochází z vrchních 0,5 cm půdy (STYCZEŃ et al., 2011).

SHUSHKOVA et al. (2010) prokázali v experimentálních podmínkách, že se glyfosát může vylouhovat až do 30 cm hloubky. Autoři také zjistili, že po aplikaci glyfosátu a následné simulaci deště, se asi 14 až 18% přesunula z ornice do nižších 10 - 20 cm vrstvy a 6-8% se promyje až do 20 - 30 cm vrstvy. Toto chování mělo za následek obohacení nižších horizontů glyfosátem, které se vyznačují nepřítomnosti (nebo nízkou úrovní) biodegradovatelných procesů.

Tyto poznatky vedou k závěru, že je velká pravděpodobnost migrace glyfosátu a AMPA půdním profilem s možností dosažení podzemních vod (LUPI et al., 2015).

6.3 Ochrana vod

Voda je jednou z nejdůležitějších látek na planetě, která interaguje mezi jednotlivými částmi životního prostředí, ovlivňuje je a ony ovlivňují zpětně ji. Ačkoliv je voda nevyčerpatelným zdrojem, pokud dojde k její kontaminaci, dojde k jejímu znehodnocení a následně ke znehodnocení všeho s čím se dostane do kontaktu. Takže její kvalita ovlivňuje nejen životní prostředí, ale i vše živé v něm včetně člověka. V dnešní moderní době průmyslu a nových technologií vzniká spoustu odpadu a odpadních vod, které jsou znečištěny, stejně tak je vypouštěno do ovzduší spousty škodlivin, které jsou pak strhávány ve formě dešťových kapek na zemi. Tyto látky (kontaminanty) mají mnohdy toxický, teratogenní, karcinogenní účinek nebo jinak negativně ovlivňují zdraví. Z těchto důvodů je třeba zajistit ochranu vod popřípadě jejich čištění.

Ochranu vod u nás v ČR zaštituje zákon o vodách č. 254/2001 Sb., jenž uvádí: „ (1) *Účelem tohoto zákona je chránit povrchové a podzemní vody, stanovit podmínky pro hospodárné využívání vodních zdrojů a pro zachování i zlepšení jakosti povrchových a podzemních vod, vytvořit podmínky pro snižování nepříznivých účinků povodní a sucha a zajistit bezpečnost vodních děl v souladu s právem Evropských společenství. Účelem tohoto zákona je též přispívat k zajištění zásobování obyvatelstva pitnou vodou a k ochraně vodních ekosystémů a na nich přímo závisejících suchozemských ekosystémů.* “

„(2) *Zákon upravuje právní vztahy k povrchovým a podzemním vodám, vztahy fyzických a právnických osob k využívání povrchových a podzemních vod, jakož i vztahy k*

pozemkům a stavbám, s nimiž výskyt těchto vod přímo souvisí, a to v zájmu zajištění trvale udržitelného užívání těchto vod, bezpečnosti vodních děl a ochrany před účinky povodní a sucha. V rámci vztahů upravených tímto zákonem se bere v úvahu zásada návratnosti nákladů na vodohospodářské služby, včetně nákladů na související ochranu životního prostředí a nákladů na využívané zdroje, v souladu se zásadou, že znečišťovatel platí.“

Ochranu vod můžeme také rozdělit z hlediska právnického, ekonomického, technického a praktického na:

1. **Obecnou ochranu vod**

Z podstatné části vyplývá ze současného zákona o vodách spolu s jeho prováděcími předpisy, ale také z několika dalších předpisů chránících životní prostředí. U obecné ochrany platí, že je povinností každého ji dodržovat a konat tak, aby nijak neznehodnocoval její kvalitu, nesnižoval její množství, nedocházelo ke snížení retenčních vlastností půdy a nezhoršovaly se odtokové vlastnosti v povodí a to vše bez nároku na finanční kompenzaci (HUBAČÍKOVÁ a OPPELTOVÁ, 2008).

2. **Zvláštní ochranu vod**

Jak už napovídá název, zvláštní ochrana je vyšší stupeň ochrany než ochrana obecná, tedy, že chráněný prvek má vyšší význam a musí splňovat přísnější ochranu. Tento druh ochrany je stanoven zákonem, v tomto případě zákonem vodním. Mezi oblasti spadající pod tento druh ochrany jsou například chráněné oblasti přirozené akumulace vod, citlivé oblasti a zranitelné oblasti (HUBAČÍKOVÁ a OPPELTOVÁ, 2008).

3. **Speciální ochranu vod**

Do speciální ochrany vod řadíme ochranná pásma (PO), tedy pásma hygienické ochrany vod (PHO). Tato ochranná pásma byla zřizována ve spolupráci s orgány hygienické služby a označovala se jako PHO. Byly rozděleny do tří stupňů, přičemž první stupeň musel splňovat nejpřísnější kriteria. Tento systém platil až do roku 1989.

Nové pojetí zavádí vodní zákon č. 254/2001 Sb. v platném znění, které stanovilo ochranu zonální na rozdíl od ochrany plošné (HUBAČÍKOVÁ a OPPELTOVÁ, 2008).

7 METODY STANOVENÍ HERBICIDŮ

7.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Je souborem metod, při kterých dochází k různým rozdílným metodám separace daného vzorku, přičemž se používá kapalné mobilní fáze, vysokotlakých čerpadel a kolon. Tato metoda je rychlá a účinná, abychom dosáhli tohoto efektu, musíme zabezpečit velký a konstantní průtok mobilní fáze pomocí vysokotlakých čerpadel. Abychom mohli použít takto vysoký tlak, musí být kapiláry zhotoveny z takových materiálů, které tyto podmínky vydrží. Kapiláry jsou zpravidla dimenzovány na tlak až 60 MPa, jsou zhotoveny z antikorozní oceli nebo z borosilikátového tvrzeného skla. Velikostně se pohybují mezi 5 až 50 cm délky a vnitřním průměru 2-4 mm. Tyto kolony jsou naplněné velmi malými částicemi (3-15µm). K detekci se pak používají buď detektory optické, nebo elektrochemické (JANČÁŘOVÁ a JANČÁŘ, 2003).

Principem této metody je rozdělení látek mezi stacionární fázi, kterou je naplněná kolona a mezi fázi mobilní, která je vháněna do kapiláry pod vysokým tlakem pomocí vysokotlakých čerpadel. Z toho vyplývá, že účinnost této metody závisí na velikosti částic stacionární fáze. Vzhledem k možnosti využití vratných dvoufázových separačních mechanismů jako je adsorpce, rozdělování, iontová výměna, sítový efekt gelu, je možné najít selektivní a účinný systém pro separaci daných látek například organických látek rozpuštěných ve vodě, zředěných kyselinách nebo organických rozpouštědel (KARLÍČEK et al., 2013).

7.2 Plynová chromatografie

Je to separační metoda, která k separaci plynů a par využívá dvě heterogenní fáze. Fázi mobilní (inertní plyn) a fázi stacionární (kapalina na inertním nosiči, povrchově aktivní adsorbent). Tato metoda prošla od roku 1952 velkým vývojem a stala se jednou z nejdůležitějších v analytické chemii. Má veliký rozsah použití jako například v organické chemii, biochemii, petrochemickém a potravinářském průmyslu, při analýze znečištění jednotlivých složek životního prostředí a mnohé další. Velkou výhodou v plynové chromatografii je použití plynu jako mobilní fáze, jenž neinteraguje s molekulami tak jako by tomu bylo v případě kapaliny (CHURÁČEK et al., 1990).

Plynovou chromatografii můžeme dle typu techniky rozdělit na frontální, vytěsňovací a eluční, přičemž většina analýz plynové chromatografie je prováděna

právě technikou eluční. Při této technice vneseme malé množství analyzované směsi na počátek kolony, po separaci její jednotlivé složky odcházejí z kolony odděleně. Zaznamenávaná koncentrace složek v detektoru by se měla podobat píku a měl by se co nejvíce blížit Gaussově křivce s nejmenší dosažitelnou šířkou (MIKEŠ et al., 1980).

7.3 Spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS)

Hmotnostní spektrometrie se používá pro identifikace a řešení analytických problémů v mnoha oblastech chemie jako v chemii organické, biochemii a při analýze anorganických materiálů. Spojením plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GS/MS) dalo vzniknout jednomu z nejefektivnějších způsobů analýzy složitých organických směsí. Pokud stanovované látky splňují dané parametry a projdou chromatografickou kolonou, můžeme touto metodou stanovit i směsi organokovové a anorganické. Spojením těchto dvou technik dosahujeme možnosti stanovit látky ve složitých směsích, které převedeme do plynného stavu a s použitím kapilární plynové chromatografie rozdělíme směs na jednotlivé složky, které pak můžeme s vysokou specifičností charakterizovat pomocí hmotnostního spektrometru (CHURÁČEK et al., 1990). Největším problémem bylo spojení výstupu chromatografické kolony s iontovým zdrojem hmotnostního spektrometru. Problém se vyřešil propojením přes tzv. molekulové separátory, které tlakově oddělují výstup kolony a iontový zdroj a současně v nich dochází k obohacování vzorku, což zahrnuje odstranění nosného plynu ze směsi nosného plynu a analyzovaného vzorku. Molekulové separátory jsou založeny na principu rozdílných velikostí molekul nosného plynu a analyzovaného vzorku (MIKEŠ et al., 1980).

Technika GC/MS se nejvíce uplatňuje při stanovení organických látek, dále pro detekci léků, drog a jejich metabolitů a v neposlední řadě v oblasti životního prostředí při stanovení ropných znečištěních ve vodách, k určení chlorovaných pesticidů v tkáních zvířat a při ekologických katastrofách způsobených dibenzodioxiny a dibenzofurany (CHURÁČEK et al., 1990).

7.4 Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (LC/MS)

Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem podobně jako u GC/MS umožňuje toto spojení snímat hmotnostní spektra separovaných látek v průběhu eluce, což umožňuje identifikace jednotlivých látek ve složitých směsích a pro strukturní analýzu. Vzhledem ke značným technickým problémům není ani zdaleka LC/MS tak rozšířenou jako GC/MS. Přímé spojení LC/MS je výhodné především z hlediska vysoké citlivosti, rychlosti při získávání hmotnostních spekter a informacích o struktuře separovaných látek (CHURÁČEK et al., 1990). Toto spojení však není ani zdaleka tak jednoduché jako právě u GC/MS, přesto bylo vynalezeno několik technických možností jako pohybující se pás, přímý vstup (DLI), vyhřívaný pneumatický rozprašovač (nebulizér) a termosprej (CHURÁČEK et al., 1993).

7.5 Extrakce tuhou látkou

Extrakce tuhou látkou je metoda s dlouholetou tradicí využívající sorbent. Tento sorbent se používá k zachycování, zkoncentrování určité látky, k její úpravě před analýzou nebo k jejímu přímému stanovení. Sorbenty se dělí podle následujících parametrů: zrnění, specifický povrch, hydrofilní či hydrofobní vlastnosti, polarita a především schopnost zpětného uvolnění zachycené látky (CHURÁČEK et al., 1990). Některé látky ve směsném vzorku můžou interagovat silněji se sorbentem než s daným rozpouštědlem a tak zůstanou vázány na sorbentu (JANČÁŘOVÁ a JANČÁŘ, 2008). V praxi se využívá dvou postupů a to nahromadění stopových složek přímo v chromatografické koloně nebo v předkoloně. Při technice obohacování přímo na koloně se na kolonu nastříkne za nízké teploty velké množství plynného vzorku, který se následně vyhodnotí spuštěním teplotního programu. Při druhé možné technice, tedy technice v předkoloně využíváme principu desorpce nahromaděných stopových prvků, které se buď zahřejí a poté se koncentrát vypláchne do chromatografické kolony nebo extrakcí kapalinou následovanou analýzou extraktu v koloně. Tyto sorpční techniky se dají využít pro zkoncentrování sledovaných látek nebo pro zachycení emisí z ovzduší (CHURÁČEK et al., 1990).

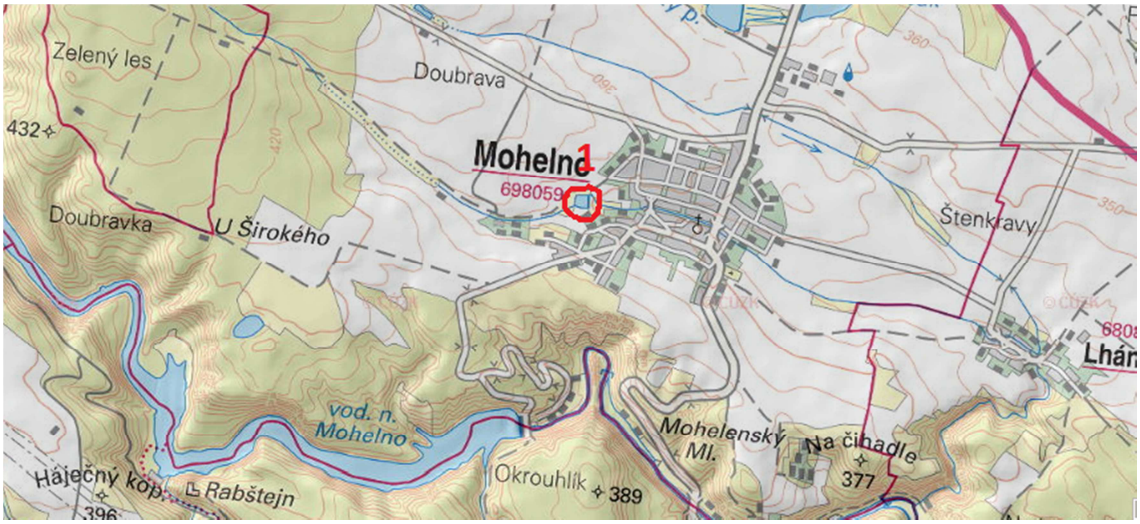
7.6 Extrakce kapalinou

Při extrakci kapalinou se využívá vlastnosti rozpouštědla schopných rozpustit jednotlivé složky v analyzovaném vzorku, takže může dojít k jejich zkoncentrování a to jak látek plynných tak kapalných. Pokud extrahujeme látku z vodného roztoku, provádíme to takzvaně vytřepáváním. Jde-li o roztok plynný, provádí se absorpce látek do kapaliny známé pod pojmem odlučování (tramping). Aby byla extrakce efektivní a uskutečnitelná, je podmínkou dobrá rozpustnost analyzovaných látek v rozpouštědle a znalost distribučních konstant v systému. Jednou z možných variant této metody je použití extrakčně-destilační metody, která se využívá k izolaci a zkoncentrování málo těkavých polárních i nepolárních látek. Extrakty se ve finální fázi analyzují plynovou nebo kapalinovou chromatografií (CHURÁČEK et al., 1990). Nejčastěji se jako organická rozpouštědla používají chloroform, benzen, butanol, isoamylalkohol a jiné (JANČÁŘOVÁ a JANČÁŘ, 2008).

8 MATERIÁL A METODIKA

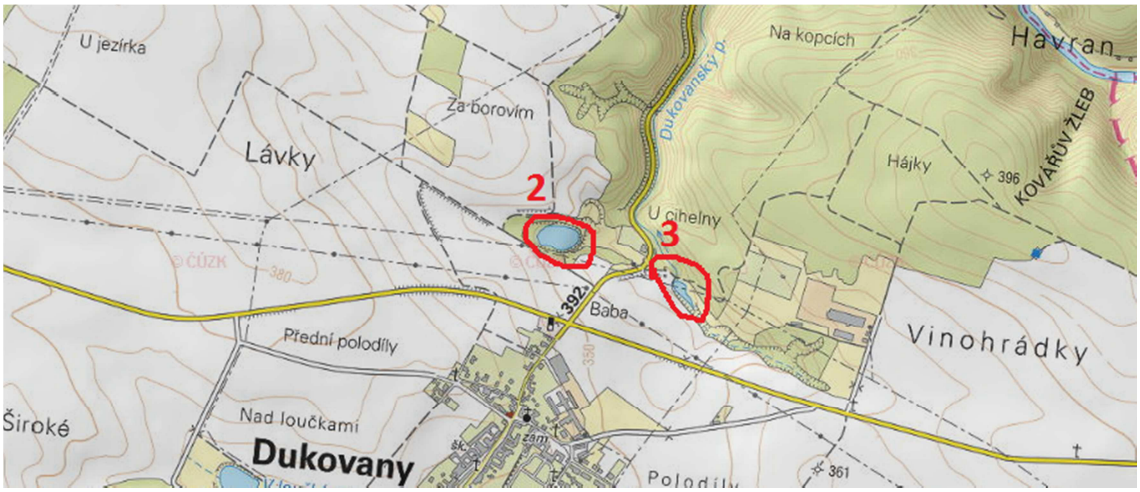
8.1 Odběr vzorků

Odběr vzorků probíhal tak, aby co nejvíce splňoval předepsanou metodiku ČSN 757051 část 4: Pokyny pro odběr vzorků z vodních nádrží. Pro samotný odběr vzorků byly vytipovány 3 malé vodní nádrže nepřesahující rozlohu 1 ha, které se nachází na katastrálním území Dukovan a Mohelna. Podmínkou výběru těchto nádrží byla aplikace herbicidů v nejbližším okolí. Všechny 3 nádrže jsou nádrže vybudované na přítoku 3 různých potoků. Tyto rybníky jsou v soukromém vlastnictví a nejsou součástí moravského rybářského svazu. Pouze na jednom z uvedených rybníků se hospodaří a je pravidelně zarybňován a udržován. Ve zbylých dvou rybnících se z důvodu nevyřešených vlastnických poměrů nehospodaří, ale rybníky slouží pro rybářskou rekreaci místních lidí.

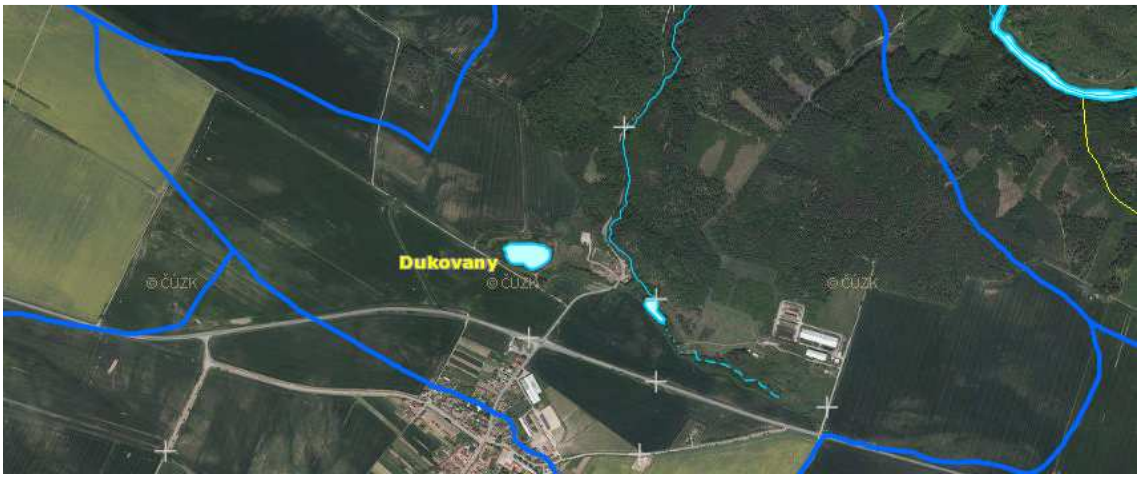


Obrázek č. 11 Mapa s označením polohy rybníku číslo 1 (GEOPORTAL.GOV.CZ, 2017)

Obrázek č. 12 Hydrologická mapa rybníku číslo 1 (GEOPORTAL.GOV.CZ, 2017)



Obrázek č. 13 Mapa s označením polohy rybníků číslo 2 a 3 (GEOPORTAL.GOV.CZ, 2017)



Obrázek č. 14 Hydrologická mapa rybníku číslo 2 a 3 (GEOPORTAL.GOV.CZ, 2017)

Z těchto tří rybníků byly jednorázově odebrány směsné (slévané) vzorky. Tyto vzorky byly odebrány jak z povrchu (10 cm pod hladinou), tak i z hloubky pomocí Mayerovi láhve. Objem těchto vzorků byl 1 litr. Vzorky byly naplněny do plastových láhví, předem vyčištěných a popsaných. Při odběru je nutné zabezpečit, aby nedošlo ke znečištění rozvířeným sedimentem nebo plovoucími nečistotami na hladině. Odebrané vzorky by se měli co nejrychleji analyzovat. Vzhledem k charakteru analýzy nemůžeme analýzu provést na místě a tak musíme co nejvíce minimalizovat čas mezi odebráním a analýzou. Odebraná voda byla uložena do termotašky, aby nedošlo k zahřátí vody a změnám parametrů. Následně po dopravení byly vzorky vloženy do lednice, aby byla zachována teplota vody. Před samotnou analýzou byly vzorky vyndány, aby dosáhly pokojové teploty a nedošlo ke zkreslení analýzy vlivem teploty.

8.2 Simulační model

Matematické modely a z nich odvozené počítačové simulace pro elektromigrační metody můžeme rozdělit do dvou skupin a to na metody jednoduší a na metody složitější a exaktnější.

Jednoduší přístup vychází z popisu jevů řekněme v ideálním prostředí, tedy nezahrnující jiné doprovodné jevy. I přes řadu zjednodušení a nebraní v potaz některých doprovodných jevů jsou tyto metody velmi užitečné a poskytují nám mnoho informací, které nám mou pomoci při vývoji nebo optimalizaci experimentálních podmínek při elektromigrační analýze. Například počítačový simulátor kapilární zónové elektroforézy

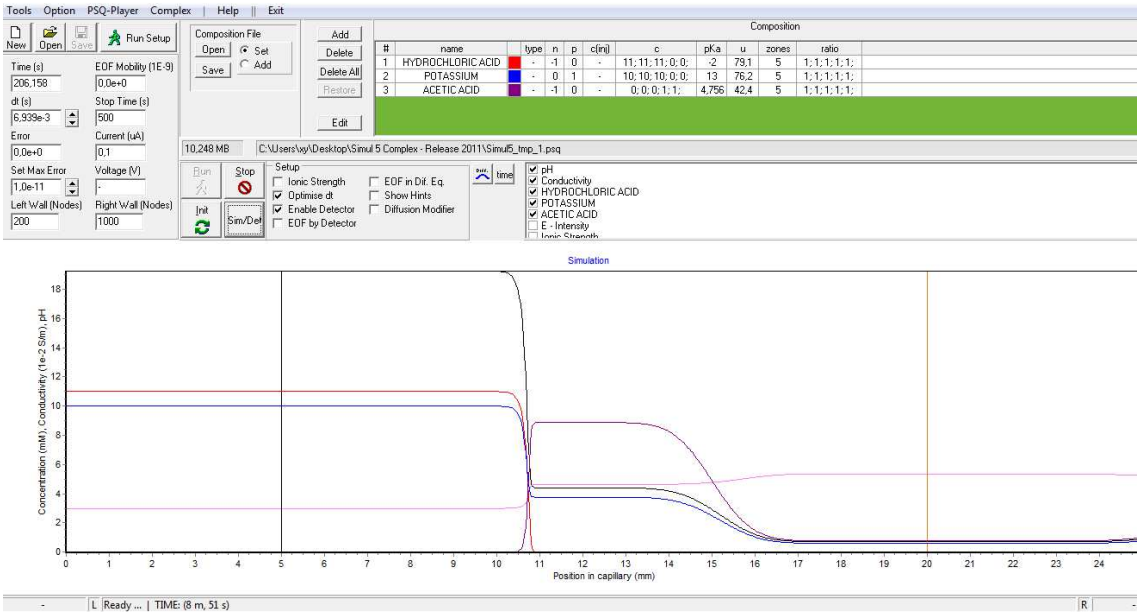
nám umožňuje simulovat separaci iontů v závislosti na některých experimentálních podmínkách jako složení nosného elektrolytu, napětí, množství roztoku, materiál a rozměry kapiláry, pohyblivost a disociační konstanty jeho složek, teplota, chlazení a jiné (KAŠIČKA, 1997).

Druhý, tedy ten složitější zahrnuje matematický popis obecných zákonitostí jednotlivých doprovodných transportních dějů jako elektroosmózu, elektromigraci, difuzi, konvekci a termokonvekci. Tyto modely také zahrnují do svých simulací chemické rovnováhy, závislost na iontové síle a teplotě. Velkou výhodou je přístup těchto modelů již od počátku připojení elektrického pole, což nám poskytuje důležité informace a pomáhá nám pochopit hlouběji fungování a zákonitosti elektromigračních metod (KAŠIČKA, 1997).

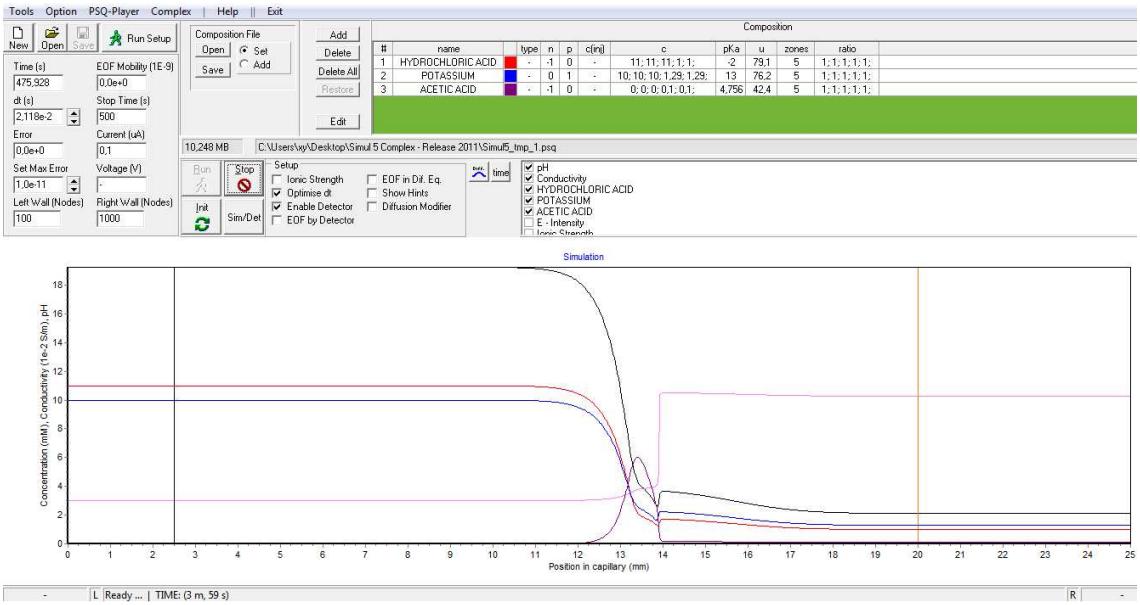
Já jsem měl k dispozici simulační model Simul 5 Complex, který provádí simulaci pohybu iontů v kapalných roztocích v elektrickém poli. Řeší sady nelineárních parciálních diferenciálních rovnic a nelineárních algebraických rovnic popisujících kontinuitu iontových pohybů a acidobazické rovnováhy. Simul je vhodný pro simulaci elektromigračních separačních metod, jako kapilární elektroforézy a izotachoforézy (GAŠ et al., 2007).

Tento program mimo jiné provádí simulaci experimentálního průběhu analýzy a k optimalizaci separačních podmínek, které se využívají v zónové elektroforéze, kapilární izotachoforéze nebo v izoelektrické fokusaci. Dále pro kontrolu nebo vysvětlení neobvyklých jevů pozorovaných v experimentech: systémové píky (zóny), překmit, zkreslení špičky. Také chcete-li kontrolovat zakoncentrování analytu, rezonanční jevy nebo jen ukázat studentům, průběh elektroforetického děje (GAŠ et al., 2007).

Pomocí tohoto modelu byl například nasimulován dokonalý průběh izotachoforézy nebo fokusace kyseliny octové.



Obrázek č. 15 Zachycení průběhu simulovaného izotachoforetického děje



Obrázek č. 16 Zachycení průběhu simulované fokusace kyseliny octové

8.3 Volba vhodného elektrolytového systému a měření

Například v izotachoforéze mohou být iontové druhy odděleny tehdy, pokud se dostatečně liší jejich efektivní mobility. Efektivní mobilita je definována jako

$$m_{eff} = \sum \alpha_i \gamma_i m_i$$

Stupeň disociace α_i závisí především na hodnotě pK, teploty a pH v zónách. Hodnota γ_i, je korekční faktor pro snižující se účinky mobility relaxačních a elektroforetických účinků popsaných Onsagerem, závisí především na iontových koncentracích. Hodnota m_i závisí na několika faktorech, jako je solvatace, poloměr a náboj iontů a na dielektrické konstantě a viskozitě rozpouštědel. Všechny tyto parametry ovlivňují účinnou mobilitu a je dobré je zohlednit při výběru elektrolytového systému, aby byla zabezpečena dobrá separace. Použití různých rozpouštědel (vliv dielektrické konstanty a solvatace) nebo různých pufrů (změny pH a vliv tvorby komplexu) umožňuje řadu možností. Separace iontů se může provádět různými způsoby, a to následovně (EVERAERTS et al., 1976).

Za prvé mohou být pro separaci iontů použity rozdíly v absolutních iontových mobilitách. Konkrétní pH pufrovaného systému se volí tak, aby všechny druhy iontů byly téměř úplně disociovány. Tento druh separace můžeme označit jako "separace podle mobilit" (CHURÁČEK et al., 1990).

Základní hodnota pH se volí tak, aby většina druhů iontů nebyla zcela disociována, zvláště když mnohé druhy iontů mají přibližně stejnou iontovou mobilitu. Hodnota pH se tedy zvolí na základě maximálních rozdílů v efektivních mobilitách. Tyto separace můžeme nazývat "separace v souladu s hodnotami "pK" (EVERAERTS et al., 1976).

Dále se mohou použít různá rozpouštědla, aby se dosáhlo úplné separace. Tato technika může být použita v případě, že stanovované druhy iontů mají přibližně stejnou iontovou mobilitu i hodnoty pK a nebo jsou jen málo rozpustné v určitém rozpouštědle. Rozdíly v hodnotách pK těchto iontů mohou být použity pro separaci. Při volbě elektrolytového systému mohou být využívány i další faktory jako tvorba komplexů, srážení a jiné specifické interakce (CHURÁČEK et al., 1990).

Do těchto faktorů zde nebudeme nahlížet příliš hluboko, přestože automaticky ovlivňují efektivní mobilitu iontů. Jak už tedy víme, při výběru vhodného elektrolytového systém, hraje roli několik faktorů. Obecně platí, že nejdůležitějším požadavkem je, že systém musí být zvolen takovým způsobem, aby druhy iontů, které mají být odděleny, by měly mít maximální rozdíly v efektivních mobilitách, aby se dosáhlo rychlé a úplné separace. Vzhledem k variabilitě a různým podmínkám stanovení vzorku není vždy možné se řídit tímto obecným pravidlem, také můžeme být omezeni přístrojovou aparaturou, kterou máme k dispozici. Volba vhodného elektrolytového systému tak bude často záviset na základě zkušenosti, porovnání výhod

a nevýhod daného systému oproti jiným. V některých případech, vhodný elektrolytový systém může být určen pouze experimentálně. Mezi důležité faktory při výběru elektrolytového systému, které jsou popsány, jsou tedy: volba rozpouštědla, volba pH vedoucího elektrolytu, výběr z hlavních iontových druhů, výběr koncových iontů, dodatky, délka separační kolony, stabilizátory, povrchově aktivní látky a referenční sloučenin pro identifikaci a kalibrační koncentraci (EVERAERTS et al., 1976).

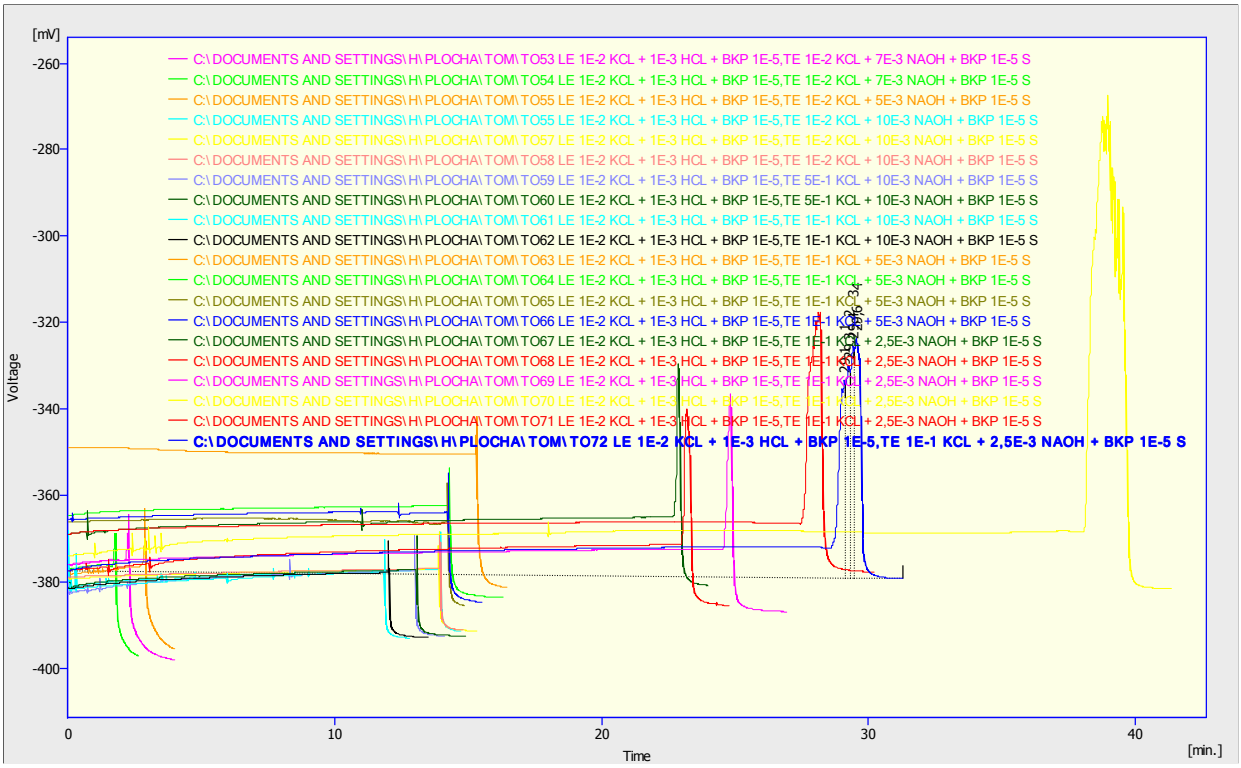
S ohledem na tyto znalosti byl zvolen elektrolytový systém, tak aby v jeho rozmezí bylo možné stanovit hledanou látku. Elektrolytový systém byl navržen tak, aby působením proudu došlo k vytvoření neutralizačního rozhraní se skokovou změnou pH a definovanou rychlostí pohybu. Na tomto rozhraní očekáváme zakoncentrování hledaných analytů.

Tento systém, vzhledem ke své komplexnosti, byl nejprve odzkoušen na simulačním modelu a následně ověřen experimentálně.

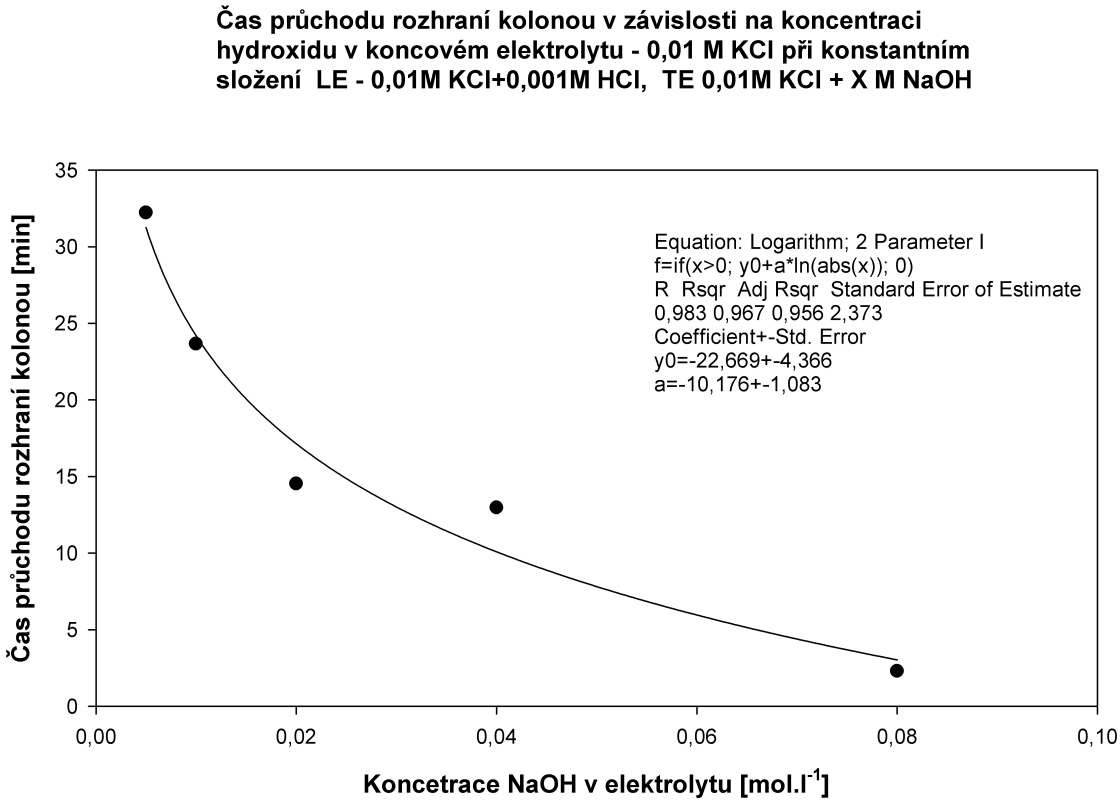
Prvním navrženým elektrolytem splňující výše uvedené vlastnosti byl systém, kde jako vedoucí elektrolyt (leading) byl použit kyselý vodný roztok KCl a jako koncový (terminační) alkalický roztok KCl. Pro vizuální detekci rychlosti pohybu rozhraní byl použit do elektrolytů přídavek acidobazického indikátoru – BKP, který je v kyselém prostředí žlutý a v alkalickém prostředí fialový. Složení roztoků bylo následující: vedoucí elektrolyt 1×10^{-2} KCl+1×10^{-3} HCl+1×10^{-5} BKP a koncový elektrolyt 1×10^{-2} KCl + 1×10^{-x} NaOH+1×10^{-5} BKP.

V první fázi bylo použito silně kyselé barvivo SPADNS, to se však ukázalo jako nevhodné vzhledem k rozmývání zóny a nemožnosti sledovat přesně pohyb rozhraní. Tento problém vyřešilo barvivo BKP, toto barvivo je slabou kyselinou, v kyselém prostředí klesá jeho pohyblivost, tudíž se nerozmývá.

Dalším velkým problémem byly uhličitany, které se absorbovaly do roztoku a způsobovaly přehřátí a znehodnocení analýzy. Uhličitany mají v alkalickém prostředí vyšší mobilitu, a tudíž se dostanou jako první na konec kolony, do zóny s nízkým pH, kde interagují za vzniku bublin, které sníží vodivost a zvýší teplotu. Tento jev jsem se pokusil eliminovat použitím bezkarbonátového nasyceného roztoku NaOH k přípravě elektrolytů. Dalším opatřením bylo i vyvaření uhličitanů z destilované vody před vlastní přípravou elektrolytů. Bohužel, i přes tuto snahu docházelo k vázání uhličitanů a k znehodnocení výsledků. Navíc se ukázalo, že při vysokých koncentracích je měření v tomto elektrolytu nereprodukovatelné.



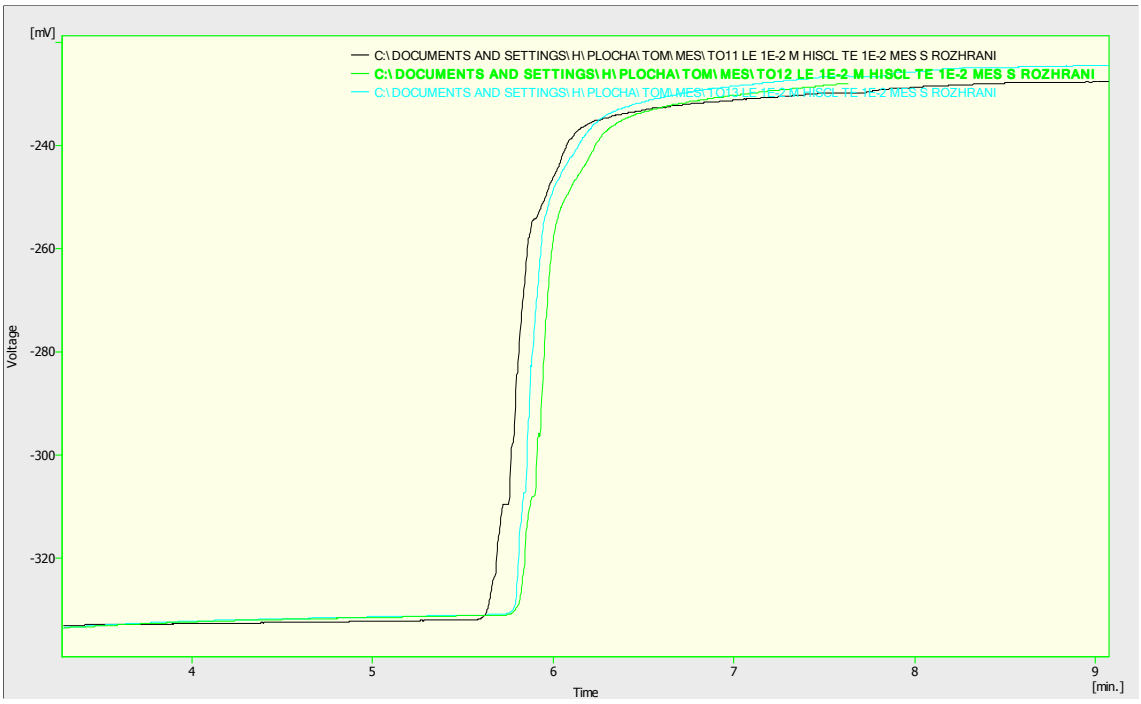
Obrázek č. 17 Elektroferogram ukazující závislost koncentrace NaOH na čase



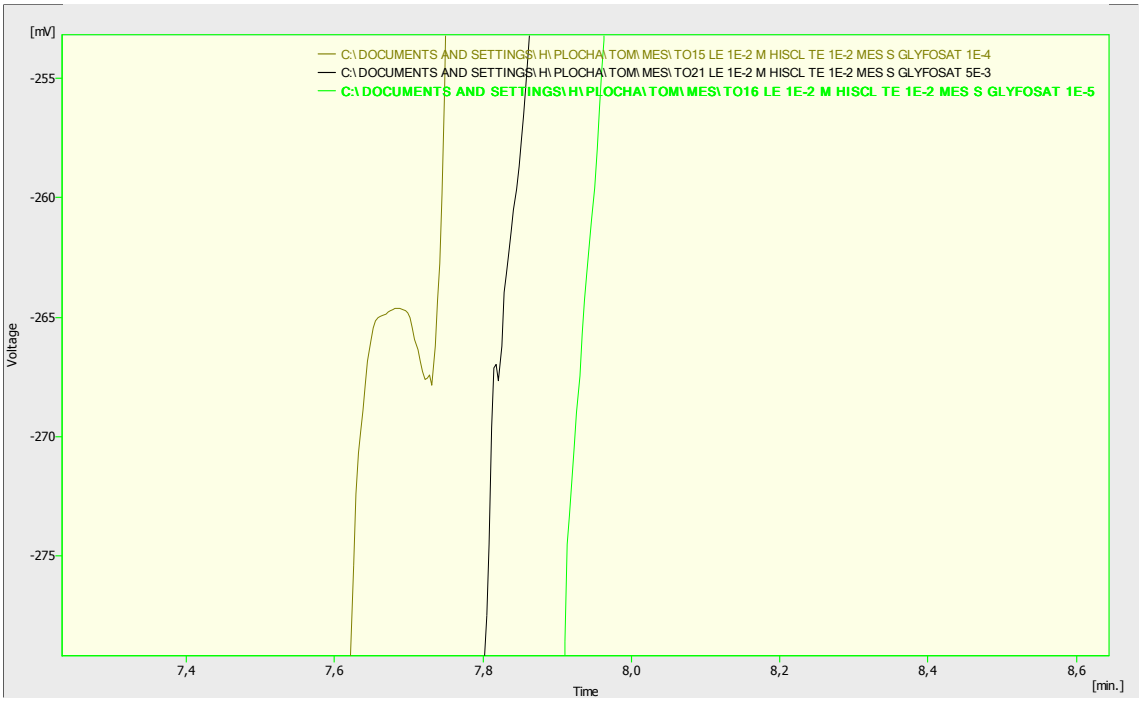
Jak je vidět na obrázku č. 17 na začátku byla analýza jen s menšími odchylkami, a ačkoliv by se zdála kalibrační křivka za reprodukovatelnou, můžeme vidět, že u vyšších koncentrací jsou velmi rozdílné měření a je pouhou shodou náhod, že jejich zprůměrování vykazuje na kalibrační křivce pozitivní výsledek. Teoreticky je tento navržený systém vhodný, ale prakticky se stává díky přítomnosti uhličitanů nepoužitelný.

Na tomto elektrolytu ale bylo ověřeno, že rychlost rozhraní je možno ovlivnit pomocí pH tak, aby na něm došlo k žádoucí fokusaci analytů.

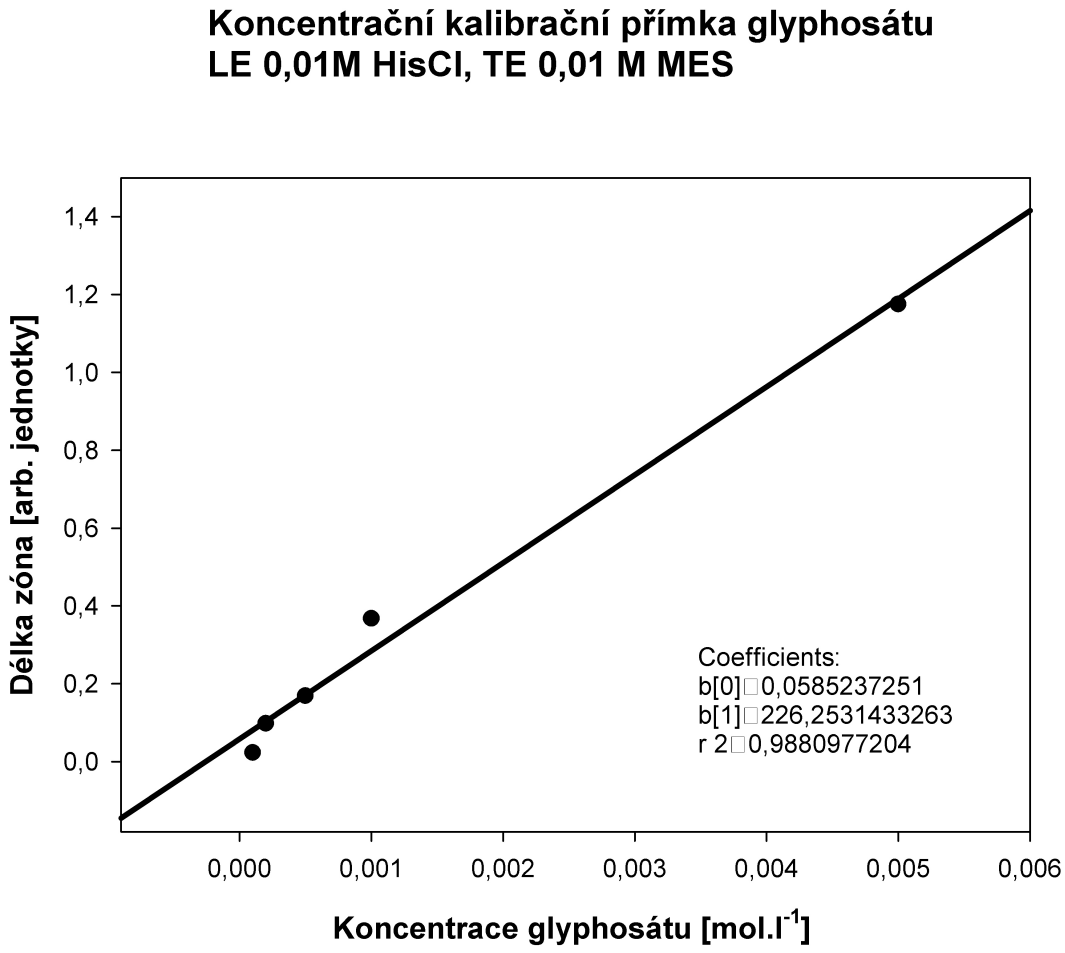
Dalším zkoušeným elektrolytovým systémem byl elektrolyt, ve kterém by se dal detekovat i produkt přeměny glyfosátu, tedy AMPA. Vedoucí elektrolyt byl složen z 1×10^{-2} HisCl a koncový z 1×10^{-2} MES. Tento elektrolytový systém se ukázal jako nevhodný z důvodu rozmývání zón. Dále se ukázalo, že výška píku glyfosátu je stejná jako u fosforečnanů, takže se nedalo určit, o jakou látku se jedná.



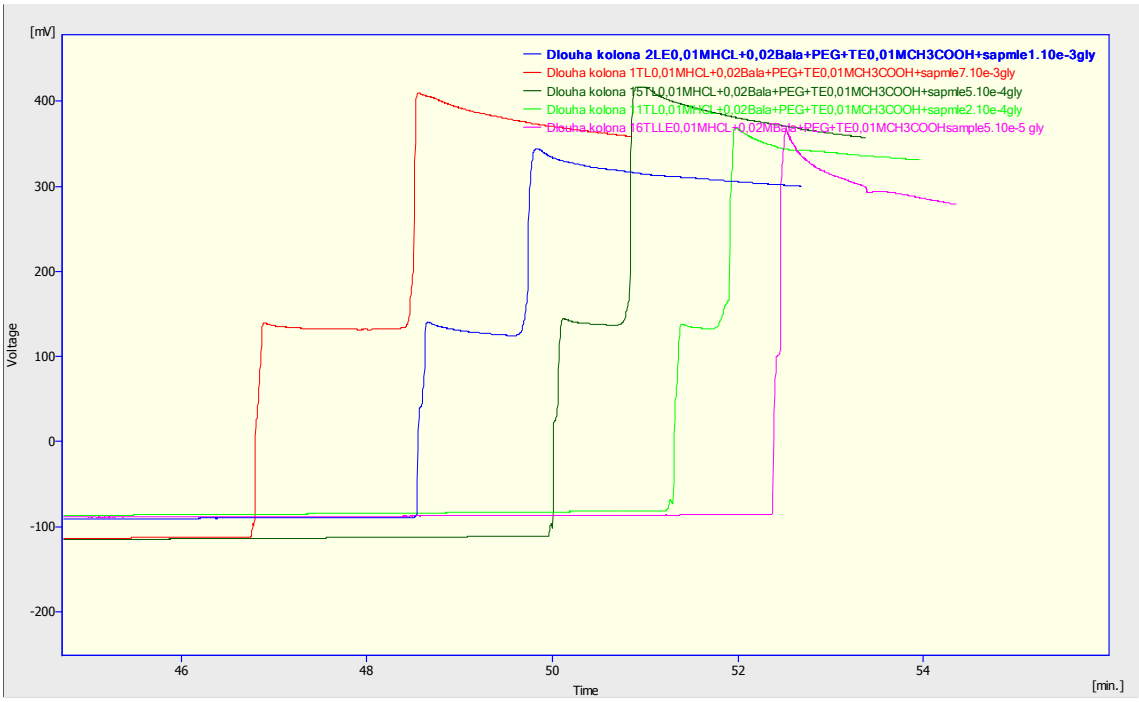
Obrázek č. 18 Izotachoforegram rozhraní MES a HisCl



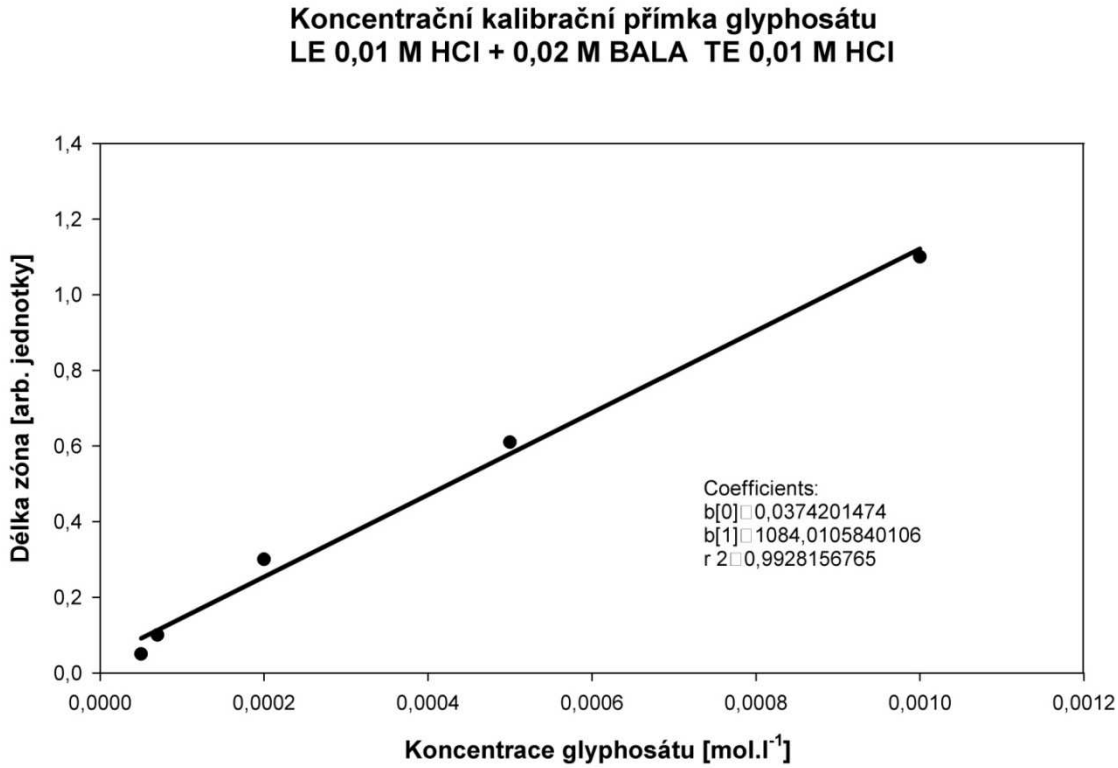
Obrázek č. 19 Elektroferogram závislosti délky zóny na koncentrace nastříknutého glyfosátu



Protože fosforečnany jsou běžnou součástí vod, byl i tento elektrolyt zavržen, navíc u tohoto elektrolytu nedocházelo k úplné separaci glyfosátu a nečistot. Proto jsme přistoupily ke změně elektrolytu a kolony. Použili jsme delší předseparační kolonu, aby se prodloužila dráha a čas analýzy a došlo k lepšímu rozseparování zón. Na základě simulací byl dále změněn elektrolytový systém, který je nyní tvořen vedoucím elektrolytem 0,01 M HCl + 0,02 BALA + PEG pH 3,55 a koncovým 0,01 M CH3COOH + BALA. Po předchozím odzkoušení podobného systému elektrolytů jsem do roztoku vzorku přidal látku BALA, která ve vedoucím elektrolytu slouží jako protiion, a zároveň jako pufr, v koncovém elektrolytu a vzorku nastaví pH tak, aby nedocházelo k absorpci uhličitanů ze vzduchu. Tato aminokyselina v izoelektrickém bodě není téměř disociovaná a nepřispívá k vodivosti elektrolytu, což zvyšuje rychlost dávkování.

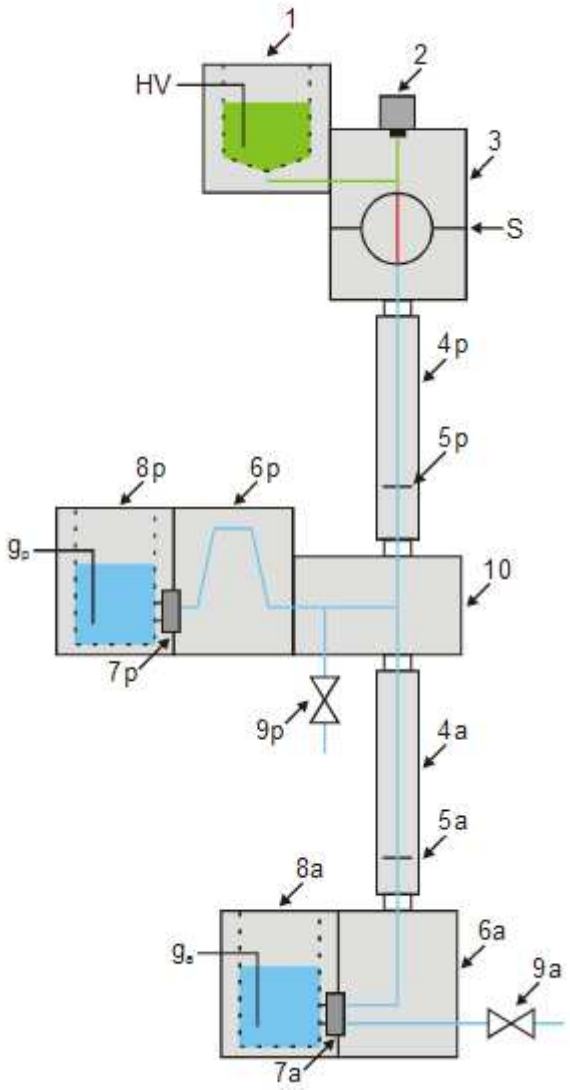


Obrázek č. 20 Izotachoforegram závislosti délky zóny na koncentraci nastříknutého glyfosátu



Ve chvíli, kdy jsem měl optimální elektrolytový systém, ve kterém se dal stanovit glyfosát a provedl jsem změření kalibrační závislosti, abych ověřil reprodukovatelnost výsledků, byla nyní na řadě samotná analýza odebraných vzorků. Celá analýza stejně jako testování jednotlivých elektrolytových systémů probíhala na přístroji izotachoforetický analyzátor s technikou spájení kolon ZKI-01. Je realizován spojením dvou kapilár různého vnitřního průměru. Předseparační kolona má průměr kapiláry 0,8 mm, analytická kolona má průměr kapiláry 0,3 mm, její detekční limit je až 10^{-11} molu. Větší vnitřní průměr předseparační kapiláry umožňuje použití proudu až 500μA, čím se v krátkém čase dosáhne značný separační výkon. Obě kolony mají kontaktní vodivostní detektor. Dávkování vzorku je možné pomocí dávkovacího kohoutu o objemu cca 30μl nebo mikrostříkačkou.

Obrázek č. 21 Izotachoforetický analyzátor s technikou spájení kolon ZKI-01

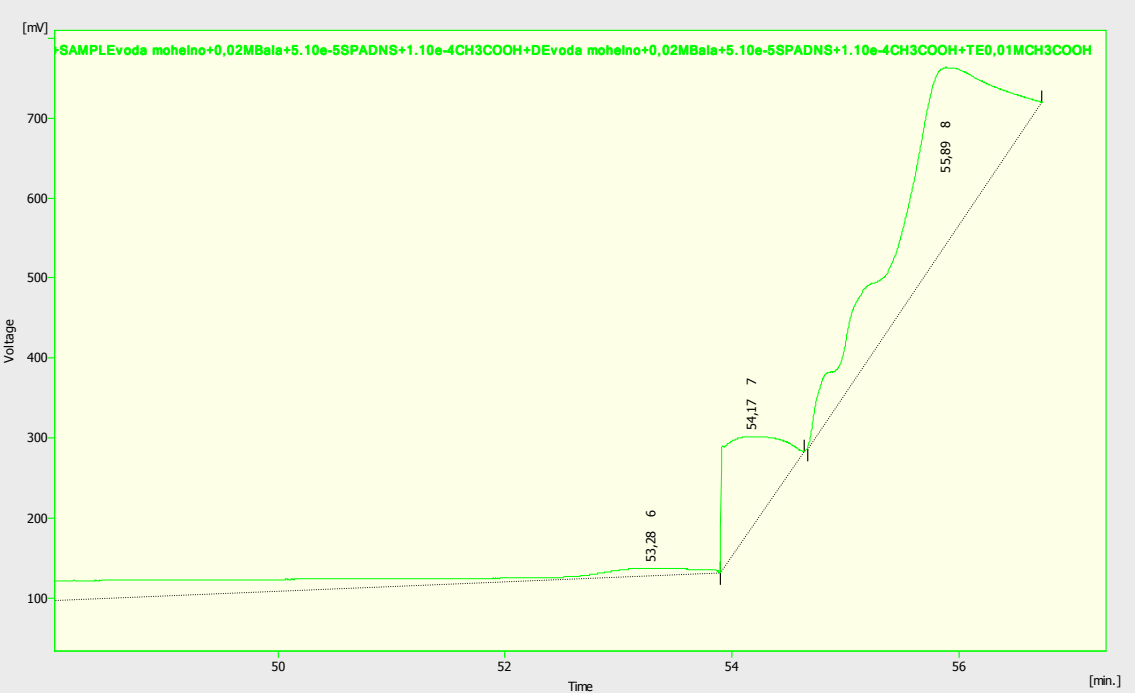


Obrázek č. 22 Schéma Izotachoforetického analyzátoru s technikou spájení kolon ZKI-01(ANALYTIKA. SK, 2017)

1- rezervoár roztoku zakončujícího elektrolytu; 2- septum pro dávkování vzorku mikrostříkačkou; 3- dávkovač; 4a, 4p- analytická a předseparační kapilára; 5a, 5p-čidla detekčních systémů; 6a, 6p-plnící bloky; 7a, 7p- membrány; 8a, 8p- rezervoáry roztoku vodícího elektrolytu; 9a, 9p- jehlové ventily; 10- blok spojování kolon elektroda, ke které se připojuje vysokonapěťový pól zdroje o požadované polaritě; gp, ga- protielektrody, ke kterým se připojuje druhý pól zdroje hnacího proudu; S-místo pro dávkování vzorku (ANALYTIKA. SK, 2017)

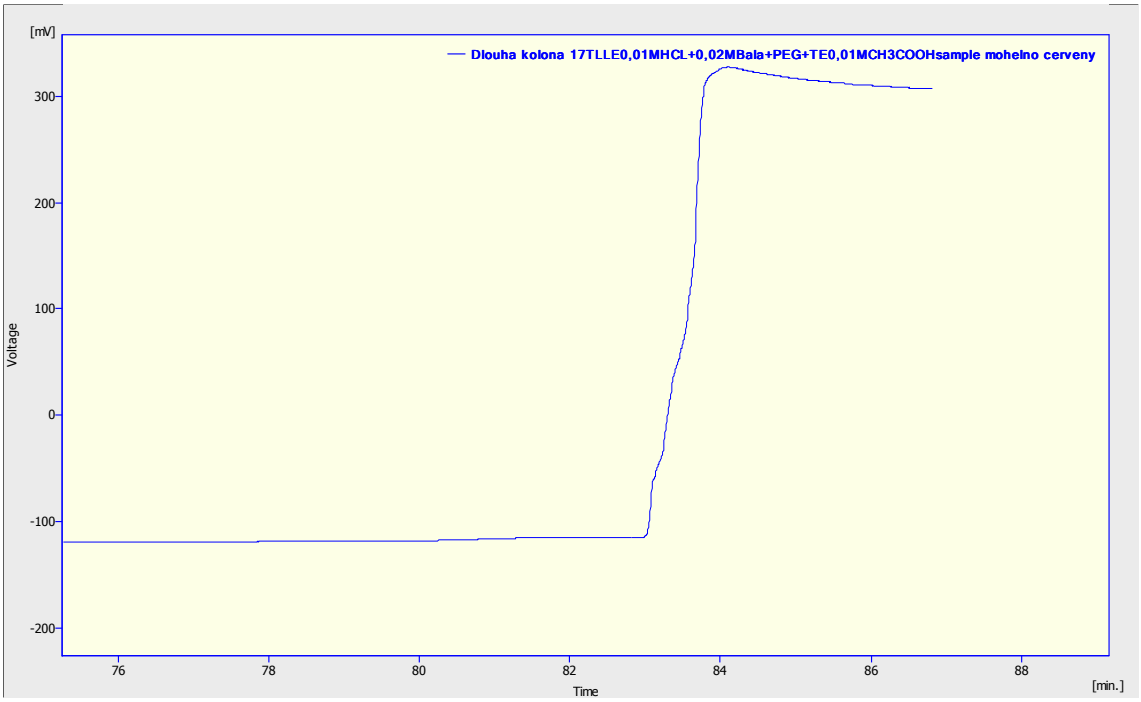
Nejprve jsem nechal pozvolna ohřát odebrané vzorky, které byly umístěny v chladícím zařízení na pokojovou teplotu, aby nedošlo ke zkreslení měření vlivem teploty. Mezitím jsem zapnul analyzátor a počítač kam se přes detektor přenášely

výsledky a přes program CLARITY vyhodnocovaly v podobě grafu a odkud se spouštělo měření analýzy. Vzhledem k tomu, že jsem nemohl příliš urychlit ohřátí vzorku na požadovanou teplotu, měl jsem čas na přípravu roztoku elektrolytů. Po namíchání jsem elektrolyt naplnil do komor a nastříknul již rozehřátý reálný vzorek. Tento vzorek pochází z jedné ze tří sledovaných vodních nádrží a to z rybníku č. 1 nacházející se v Mohelně.



Obrázek č. 23 Elektroferogram reálného vzorku z rybníku číslo 1

Na obrázku č. 23 můžeme vidět několik zón, které odpovídají jednotlivým látkám vyskytující se v odebraném vzorku vody. První zóna reprezentuje téměř všude vyskytující se siřičitany. Další zóna je zóna SPADNS, který byl do roztoku přidán jako barvivo, díky kterému můžeme pozorovat pohyb elektrolytů v kapiláře. Následující zóna detekuje výskyt fosforečnanů a v pořadí čtvrtá zóna představuje hledanou zónu glyfosátu. V této podobě se změří délka zóny a určí se její koncentrace. Vzhledem k tomu, že byl pokus prováděn metodou standardního přídavku, kdy byl do reálného vzorku přidán glyfosát o známé koncentraci, musíme porovnat délky zón a odečíst tuto koncentraci abychom vypočítaly koncentraci skutečnou.



Obrázek č. 24 Elektroferogram reálného vzorku z rybníku číslo 2

Na obrázku č. 24 můžeme vidět výsledek analýzy vzorku z rybníku č. 2 nacházejícího se na katastrálním území Dukovan. Na grafu je vidět zóna SPADNS, který byl do vzorku přidán jako barevný indikátor, dále zde máme zónu fosforečnanů, ale žádnou zónu glyfosátu.

Vzorek č. 3 nebylo možné změřit, bylo provedeno několik pokusů, ale všechny dopadly neúspěšně. Vzhledem k tomu, že při daném postupu v předešlých případech se podařilo odstranit uhličitany vyvařením vzorku, je pravděpodobné, že v tomto případě bylo ve vzorku něco, co znemožňovalo analýzu. Tento fakt bude předmětem dalšího zkoumání.

9 DOPAD NA ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ A ČLOVĚKA

Spotřeba herbicidu na bázi glyfosátu se vzhledem k zavádění geneticky modifikovaných organismů v roce 1995 zvýšila. Například v Argentině vzrostla spotřeba tohoto herbicidu v roce 2012 a to na 197 milionů kg (APARICIO et al., 2013).

Přípravky na bázi glyfosát jsou používány po celém světě k ochraně zemědělských a zahradnických plodin. Evropská komise plánovala ověřit toxicitu glyfosátu v roce 2012, ale na konci roku 2010 rozhodla, že provedení tohoto ověření neproběhne až do roku 2015. Navíc, vzhledem k nařízení Evropského parlamentu a Rady 1107/2009 / ES ze dne 21. října 2009, je nutné identifikovat metabolity a nečistoty přítomny v technickém pesticidu a provádět toxikologické výzkumy týkající se těchto látek. Kromě toho analýza škodlivých účinků metabolitů a nečistot pesticidů je velmi důležitá pro vyhodnocení toxikologického rizika způsobeným těmito sloučeninami. Existují důkazy, že metabolity a nečistoty pesticidů vykazují silnější toxicitu než jejich mateřské sloučeniny (BUKOWSKA et al., 2007).

Podíl transportovaného glyfosátu do životního prostředí je velmi důležitý pro vývoj agronomické strategie, řízení a pro minimalizaci jeho dopadu. Kromě toho, analýza úrovně znečištění a identifikace míst, kde se tento herbicid akumuluje, může přispět při vedení ekotoxikologických studií. I přes současný trend optimalizací výrobních postupů, intenzifikaci zemědělství by nemělo být příčinou k akumulaci molekul jako je glyfosát a AMPA v životním prostředí (APARICIO et al., 2013).

Je známo, že některé metabolity a nečistoty z pesticidů mohou být toxičtější než základní sloučeniny, ale nejsou k dispozici žádné experimentální údaje o toxicitě derivátů glyfosátu (s výjimkou jeho hlavního primárního metabolitu - kyseliny aminomethylfosfonové). Právě analýza molekulárních mechanismů působených glyfosátem a jeho metabolity: aminomethylfosfonové kyseliny, kyseliny methylfosfonové a nečistot: N- (fosfonomethyl) iminodioctové kyseliny, N-methylglyfosátu, kyseliny hydroxymethylfosfonové a bis (fosfonomethyl) aminu může přispět k přesnějším účinkům a vyhodnocení toxicity pro lidský organismus (KWIATKOWSKA et al., 2014).

Ve studiích zabývajících se retencí glyfosátu bylo stanoveno několik významných půdních vlastností, které značně tento proces ovlivňují (organické látky, jílové minerály, pH, kationtová výměnná kapacita). Výsledky ukazují, že procesy jsou složité a

multifaktoriální (agronomické podmínky, místní zemědělsko-meteorologické podmínky, mineralogie a půdní podmínky) a je obtížné stanovit relativní váhu každého faktoru. Kromě toho, vzhledem k reverzibilitě tohoto procesu, může být glyfosát desorbován a potom degradován na AMPA, která se hromadí v půdě. Oba produkty mohou mít další environmentální osud a zvyšují riziko ovlivnění rostlin, mikroorganismů, teplokrevných a studenokrevných živočichů (GÓMEZ et al., 2009).

Po adsorpci do půdy je glyfosát biodegradován na AMPA, tomuto procesu často předchází odnos půdních částic ve kterých je glyfosát vázán a jejich pozdější sedimentace v nižších polohách území či ve vodních tocích a nádržích. Poločas rozpadu tohoto herbicidu může být v prostředí prodloužen v důsledku tvorby komplexů kovů s vysoce chelatačními kationty (Cu^{+2} a Fe^{+2}), které výrazně snižují dostupnost glyfosátu pro mikrobiální rozklad. AMPA také podléhá postupné degradaci ve vodním prostředí a v půdě, ale v míře, která je výrazně nižší než u glyfosátu. Tento jev je přisuzován jeho silnější absorpcí na částice a v důsledku nižší prostupnosti do buněčných membrán. Koncentrace AMPA se v sedimentu může měnit v závislosti na její rychlosti degradace a poměru k degradaci glyfosátu (APARICIO et al., 2013).

I když je glyfosát adsorbován do půdy je chráněn před biologickým rozkladem, v důsledku dynamického procesu adsorpce a desorpce, kdy dochází k transferu glyfosátu do půdního roztoku, může být v přítomnosti mikroorganismů degradován na hlavní degradační produkt, AMPA (VEREECKEN, 2005).

Mikrobiální degradace je považována za jeden z nejdůležitějších procesů transformace pro stanovení přetrvávání herbicidů v půdě (APARICIO et al., 2013). Tento proces se odehrává jak v aerobních tak v anaerobních podmínkách dle mikroflóry nalezené v půdě. Primární metabolity glyfosátu jsou glyoxylát a kyselina aminomethylfosfonová (AMPA), která se odbourává na vodu, oxid uhličitý, amoniak a fosfát (DICK a QUINN, 1995). Přítomnost glyfosátu může způsobit změny v mikrobiální populaci a nabourat jejich aktivitu v půdě. Existují různé výsledky v literatuře, což ukazuje účinky, které mohou být minimální nebo přechodné s ohledem na mikrobiální biomasu a její činnost (HANEY et al., 2002) nebo jsou konstantní v čase v závislosti na historii aplikací (ARAÚJO et al., 2003). Je známo, že glyfosát je adsorbován na minerální jíly a organickou hmotu a je uvolněn z těchto míst dojde-li k nahrazení anorganickými fosfáty se kterými je glyfosát v kompetici (PRATA et al., 2003). S ohledem na tento poslední aspekt, lze připsat zvýšené aplikaci tohoto herbicidu

ochuzení půdy o fosfor. Na druhé straně, publikované informace o mechanismech pohybu a osudu glyfosátu a AMPA v životním prostředí jsou vzácné a hodně z těchto informací pochází z kontrolovaných laboratorních studií (BORGGAARD a GIMSING, 2008). V poslední době se studie zabývající transferem glyfosátu a AMPA v tocích nacházejících se ve spojených státech ukazují, že glyfosát a AMPA byly často detekovány v povrchových vodách zemědělských povodí, jejich koncentrace byla ovlivněna zdrojem kontaminace, hydrologií a pohybem vody v povodí (COUPE et al., 2012).

Degradace glyfosátu v půdě souvisí především s mikrobiální aktivitou, STENROD et al. (2006) také zjistil, snížení obsahu mikrobiální biomasy a aktivity v závislosti na hloubce. Produkt rozkladu vykazuje vyšší perzistenci v přirozených podmínkách než jeho mateřská látka. V některých studiích bylo zjištěno, že obě sloučeniny byly nalezeny několik let po aplikaci herbicidu (KJAER et al., 2005). CANDELA et al. (2010) naměřil koncentraci glyfosátu a AMPA u hrubých písčitých půd v Barceloně v hloubce 1,9 m, kde hrozilo riziko kontaminace podzemních vod.

Jedna studie, kde byly odebrány vzorky pro rozbor a stanovení některých škodlivých látek a bakterií prokázala nadlimitní výskyt glyfosátu v řece San Antonio, kde byla stanovena koncentrace 1600 $\mu g.l^{-1}$. Řeka je ovlivněna splavem glyfosátu při přívalových deštích z polí, kde se pěstuje sója. Tato skutečnost není jediným případem, stejnou situaci můžeme pozorovat ve státě Paraná, kde byly hlášeny koncentrace glyfosátu v hodnotách až 2024 $\mu g.l^{-1}$. Glyfosát je málo toxický a při běžných podmínkách není jeho obsah v pitné vodě zdraví škodlivý. Z tohoto důvodu se WHO domnívá, že není nutné stanovovat hranici koncentračního limitu pro tuto látku. USEPA předepsala limitní hodnotu na 700 $\mu g.l^{-1}$pro pitnou vodu nebo 0,1 µg.1/ kg tělesné hmotnosti za den. Úroveň doporučená ANGHC je 300 $\mu g.l^{-1}$. Podle těchto zásad koncentrace nalezená ve vzorku odebraného z řeky San Antonio přesahuje doporučené limity pro pitnou vodu. Z těchto koncentrací vyplývá, že pro dospělého člověka by denní příjem vody s takovouto koncentrací glyfosátu neměl mít žádný významný vliv. Avšak pro dítě by to už představovalo značné zdravotní riziko. Navíc v poslední době, Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC, Lyon, Francie) vyhodnotila glyfosát za karcinogenní a u lidí vyvolává pozitivní trend ve výskytu vzácného nádoru. Z tohoto důvodu tuto látku klasifikovaly za pravděpodobně karcinogenní. Proto je nutné

monitorovat hladiny glyfosátu, aby bylo zajištěno zdraví obyvatel (AVIGLIANO a SCHENONE, 2015).

Glyfosát a jeho hlavní metabolit AMPA byly naměřeny v půdách zemědělské pánve v koncentracích v rozmezí od 35 do 1502 pro glyfosát a 299 až 2256 $\mu g.kg^{-1}$ pro AMPA. Takto vysoké hodnoty byly naměřeny v závislosti na půdní erozi, která způsobila odnos půdních částic, na jejichž povrchu byl adsorbovaný glyfosát. Tyto erodované částice skončily v povrchových tocích, kde byl glyfosát desorbován, biologicky rozložen a naakumulován ve spodním sedimentu (APARICIO et al., 2013).

Dále studie na širokém geografickém regionu ve Spojených státech, dospěla k závěru, že glyfosát a jeho hlavní metabolit (AMPA) jsou mobilní a došlo k široké kontaminaci životního prostředí, kdy byl tento herbicid detekován v řekách, dešťové vodě a podzemní vodě (BATTAGLIN et al., 2014). Spotřeba herbicidu na bázi glyfosátu se vzhledem k zavádění geneticky modifikovaných organismů v roce 1995 do Argentiny zvýšila a to na 197 milionů kg v roce 2012. Argentina je nejvyšší exportérem sójového oleje a sojového jídla ve světovém vývozním trhu, a třetím největším vývozcem sóji. Navzdory rostoucímu významu produkce sojových bobů v Argentině a širokému použití glyfosátu, zde bylo provedeno pouze pár studií zabývajících se chováním glyfosátu a AMPA v zemědělských povodí. APARICIO et al., (2013) zjistili zvýšené hladiny pesticidů na povrchu půd v provincii Buenos Aires, které patří mezi nejdůležitější výrobní sojové oblasti, v rozmezí 0,035 až 1,502 µg/g a 0,299 - 2,256 µg/g glyfosátu a AMPA.

V jiné studii se zaměřily na přetrvání a degradaci glyfosátu v mořské vodě. Byla zde provedena simulace ke kvantifikaci a biodegradaci glyfosátu za použití standardní " simulace " s rodilými bakteriálními populacemi a pobřežní mořské vody z Velkého bariérového útesu. Poločas rozpadu pro glyfosát při teplotě 25°C za zhoršených světelných podmínek byl 47 dnů, naopak ve tmě při stejné teplotě 25°C se tento čas zvýšil na 267 dní a při zvýšení teploty na 31°C došlo ke zvýšení času biodegradace na 315 dnů, což je vůbec nejdelší hlášený poločas rozpadu tohoto herbicidu. AMPA, dceřiný produkt glyfosátu, byl detekován za všech podmínek, což potvrzuje, že degradace byla zprostředkována nativní mikrobiální komunitou. Tato studie ukazuje, že je glyfosát mírně perzistentní v mořské vodě za zhoršených světelných podmínek a je vysoce perzistentní ve tmě (MERCURIO et la., 2014).

Byly analyzovány dva metabolity glyfosátu: kyselina aminomethylfosfonová (AMPA) a kyselina methylfosfonová. AMPA je primární metabolit glyfosátu, který je vytvořen působením enzymů (KUDZIN et al., 2002). Při výrobě glyfosátu mohou vznikat různé nečistoty, jejichž počet a typ závisí na typu výrobní technologie. Tyto nečistoty zahrnují N- (fosfonomethyl) kyseliny iminodioctové (PMIDA), která je klíčovým substrátem v nezbytné fázi získávání glyfosátu ve výrobní technologii firmy Monsanto. Druhý zkoumaný produkt vznikající při výrobě glyfosátu (PMIDA oxidační fáze glyfosátu) se řadí mezi významné nečistoty - N-methylglyfosát. Některé studie také ukazují, že N-methylglyfosát je uznávaný jako metabolit glyfosátu. Dále byla také studována kyselina hydroxymethylfosfonová a bis (fosfonomethyl) amin jako potenciální nečistota glyfosátu (PINEL et al., 1999). Herbicidní prostředky obsahují řadu látek, které nazýváme látkami pomocnými a povrchově aktivními, tyto látky zvyšují účinek herbicidu. Vynikající povrchově aktivní látka je polyoxyethylenamin (POEA), který usnadňuje adsorpci a zvyšuje účinnost penetrace prostředku do rostlinné tkáně. Bohužel, přídavné látky, jsou často toxičtější než samotný glyfosát. Bylo prokázáno, že jako nejvíce toxické povrchově aktivní látky pro lidské jaterní buňky (HepG2), embryonální (HEK293) a placenty (JEG3) buněčné linie jsou polyoxyethylenamin a polyethoxylovaný lojový amin. Právě tyto látky jsou považovány za zdroj toxicity glyfosátu (MARTINI et al., 2012). Bylo také prokázáno, že komerční přípravky na bázi glyfosátu vykazují vyšší toxicitu než samotné účinné látky. Jak již bylo zmíněno, herbicidní prostředky, jako je roundup jsou toxičtější než samotný glyfosát. Hlavním důvodem tohoto jevu jsou povrchově aktivní látky, které mění vlastnosti herbicidu. U roundupu byla zjištěna toxicita vůči rybám 17 až 32 krát vyšší, než pro mateřskou sloučeninu, pravděpodobně právě z důvodu přítomnosti aminové soli nebo jejích povrchově aktivních látek. Dále byla také pozorována silnější hemolýza a peroxidace lipidů u lidských erytrocytů inkubovaných s roundupem než u samotného glyfosát (PIENIAZEK et al., 2004). Bylo zjištěno, že herbicidní prostředky způsobují silnější oxidační poškození ve srovnání se samotným glyfosátem. Navíc LC50 pro lidské jaterní buňky HepG2 byla v případě pesticidních přípravků obsahujících glyfosát výrazně nižší, než u samotného glyfosátu. Bylo také prokázáno, že glyfosátové přípravky se mohou chovat jako typické hormonální modulátory. Podle literárních zdrojů mohou přípravky na bázi glyfosátu způsobit smrt lidských pupečníkových, embryonálních a placentových buněk. Nedávné studie poukazují, na souvislosti mezi

vystavením účinku glyfosátu a výskytem určitých typů rakoviny (DE ROOS et al., 2005).

Další studie naznačuje, že Glyfosát by mohl být toxický i pod nejnižšími stanovenými regulačními hodnotami, kdy byly pozorovány nepříznivé chronické účinky toxicity. To zahrnuje teratogenní, tumorigenní a hepatorenální účinky. Pozorován byl také endokrinní rozvrat a oxidační stres, což způsobuje metabolické změny, v závislosti na čase, dávce a expozici. Některé účinky byly zjištěny v rozmezí přijatelné denní dávce. Toxické účinky komerčních forem glyfosátu lze připsat do značné míry pomocným látkám, které jsou sami o sobě toxické, ale také zvyšují toxicitu vůči glyfosátu. Neurotoxické, reprodukční a transgenerační účinky glyfosátu musí být přezkoumány, neboť narůstající množství poznatků naznačuje narušení vnitřních mechanismů způsobených životnímu prostředí (MESNAGE et al., 2015).

Dnes se kontaminace glyfosátu v životním prostředí neustále zvyšuje a lidé jsou tak trvale vystaveny jeho účinkům. Nejhorší možný scénář v následujících letech je ještě desetinásobné zvýšení používaného glyfosát. Vzhledem k rozsáhlému a častému používání glyfosátu po celém světě, je aktuální posuzování rizika velmi důležité, protože expozice se bude týkat nejen uživatelů přípravků obsahujících glyfosát, ale i těch, kteří nemají přímý kontakt s tímto herbicidem. Je velmi důležité posouzení schopnosti indukce oxidativního stresu a snížení hodnoty antioxidačních obranných mechanismů glyfosátem, jeho metabolity a nečistotami. Rozsáhlé globální používání glyfosátu podtrhuje význam těchto zjištění. Glyfosát je přítomen v kontaminované půdě i ve vodě a jeho dlouhodobá expozice a to i při nízkých koncentracích, může vést ke zdravotním problémům. Přípravky na bázi glyfosátu mohou podporovat hematologické a jaterní změny, které mohou být spojeny s tvorbou reaktivního kyslíku (poškození jater, anémie) (JASPER et al., 2012). Předchozí studie ukázaly, že expozice vůči glyfosátu je případně spojena s Parkinsonovou chorobou, ale základní mechanismus zůstává nejasný. Dále bylo prokázáno, že glyfosát indukuje buněčné smrti prostřednictvím autofagie a vede k aktivaci apoptózy. Dále způsobuje nerovnováhu v lidských erytrocytech, což může vést ke zvýšeným hladinám MetHb, které mohou vážně ovlivnit životnost erytrocytů. Oxidační stres také přispívá ke změnám tvaru červených krvinek a změny v životaschopnosti erytrocytů. Důsledkem těchto procesů je předčasné odstranění erytrocytů z oběhu, to vede k povinnému morfologickému testu po požití některých léků (chemoterapeutiky, sulfonamidy). Nadměrná hemolýza doprovází

vývoj mnoha nemocí, to znamená, chorob spojených se snížením glukóza-6-fosfát dehydrogenázy (GUI et al., 2012).

Informace o možnosti nebezpečí glyfosátu jako karcinogenní látky ohrožující lidské zdraví byly publikovány DE ROOS et al., (2005) a PAGANELLI et al., (2010). Nedávno byl glyfosát klasifikován Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC, 2015) jako toxický a pravděpodobně karcinogenní pro člověka (skupina 2A), což dokazuje nutnost provádět studie zaměřené na chování glyfosátu, jeho interakci s životním prostředím a zabezpečit tak ochranu lidského zdraví. Poznatky o možnosti migrace glyfosátu do spodní vody jsou nezbytné a naléhavé, abychom mohli vytvořit preventivní politiky a zamezit tak transferu glyfosátu nejen mezi jednotlivými složkami životního prostředí, ale také ke člověku. Několik studií ukázalo, že herbicidní prostředky na bázi glyfosátu mají vliv na změnu struktury a kvality sladkovodních ekosystémů a vodních společenstev (SANDRINI et al., 2013 a VĚRA et al., 2010). Proto znalosti o perzistenci, degradaci a transportu glyfosátu a AMPA v půdním profilu jsou nezbytné k vyhodnocení chování těchto sloučenin s cílem nalézt možné strategie pro prevenci nebo zmírnění kontaminace povodí (LUPI et al., 2015).

10 VÝSLEDKY A DISKUSE

Po nasimulování v simulačním programu a experimentálním prokázání se podařilo vytvořit elektrolytový systém vhodný pro stanovení iontových herbicidů metodou kapilární elektroforézy s pohyblivým rozhraním. Aby bylo dosaženo zvýšení detekčního limitu, byla použita metoda fokusace pro zkoncentrování dané látky ze vzorku. Díky této fokusaci bylo dosaženo zvýšení detekčního limitu až o dva řády oproti běžné analýze bez fokusace.

Ověřený elektrolytový systém se skládal s elektrolytu vedoucího, který byl složen z 0,01 M HCl + 0,02 BALA + PEG pH=3,55 a elektrolytu koncového, jenž obsahoval 0,01 M CH3COOH + BALA. Do nastřikovaného vzorku byl přidán SPADNS, který sloužil k vytvoření barevné zóny, což umožnilo sledovat pohyb zóny kapilárou.

Vzhledem ke stále větší spotřebě roundapu nejen republikové, ale zejména celosvětové se právě účinná látka tohoto herbicidu (glyfosát), stala hlavním předmětem této práce. Díky iontové povaze tohoto herbicidu je možné stanovit jeho koncentraci ve vodním prostředí pomocí kapilární elektroforézy s pohyblivým rozhraním. Jako reálný vzorek posloužila voda z malých vodních nádrží, v okolí Dukovan a Mohelna. Tyto nádrže slouží především k rekreačnímu rybolovu.

V jedné nádrži se prokázala přítomnost glyfosátu, která může pocházet z blízkých polí, ošetřování cest či sportovního areálu nebo ze zahrádkářských kolonií. Ačkoliv jsme naměřily určitou hodnotu koncentrace, skutečná výše koncentrace ve vodě se může měnit vzhledem k mnoha faktorům, které ji ovlivňují. Jedny z nejdůležitějších faktorů jsou klimatické podmínky, roční období, erozní podmínky v území, půdní druh a intenzita hnojení. Dalším podstatným faktorem jak už prokázaly mnohé zahraniční studie je, že se glyfosát zachycuje v sedimentu a zde může přetrvávat déle než za jaký čas by se přeměnil v půdě díky mikrobiální aktivitě. Právě mikrobiální aktivita stojí za přeměnou glyfosátu na AMPA. Bohužel zatím nemáme takový elektrolytový systém, pomocí kterého bychom mohli změřit koncentraci AMPA, která je hlavní produkt přeměny glyfosátu a jenž bývá v životním prostředí v mnohem větší koncentraci než samotný glyfosát.

V druhé nádrži, která se nachází vedle zemědělských ploch, se koncentrace glyfosátu neprokázala. Tento fakt přisuzuji možné adsorpci na sedimenty, přeměnou

glyfosátu na její dceřiný produkt AMPA, nebo je zde možnost výskyt glyfosátu v množstvím pod detekčními limity metody.

V porovnání se zahraničními studiemi přirozeně dosahujeme nižších koncentrací, vzhledem k obrovské intenzitě aplikace herbicidu roundap s jakou v jiných státech hospodaří a na velikosti území zejména v Argentině. Dále je zde čím dál širší spektrum pěstovaných plodin s označení roundap ready, což ještě více zvyšuje množství aplikovaných postřiků tohoto herbicidu. Například v řece San Antonio, byla stanovena koncentrace 1600 $\mu g.l^{-1}$ glyfosátu, ve státě Paraná, byly hlášeny koncentrace glyfosátu v hodnotách až 2024 $\mu g.l^{-1}$(AVIGLIANO a SCHENONE, 2015), v jiné studii byly hlášeny koncentrace glyfosátu a jeho hlavního metabolitu AMPA v rozmezí od 35 do 1502 a 299 až 2256 $\mu g.kg^{-1}$ půdy (APARICIO et al., 2013).

Vzhledem k tomu, že dnes už víme o transferu glyfosátu životním prostředím, do jisté míry známe podmínky a procesy degradace a v posledních letech odhalujeme možné zdravotní rizika a interakce, vyvstává velká otázka, znečištění povrchových, ale i podzemních vod, vliv na zdraví člověka a dopad na životní prostředí.

11 ZÁVĚR

Úkolem této diplomové práce bylo stanovení vybraných iontových herbicidů v povrchových vodách. Pro tento úkol byla zvolena elektromigrační metoda elektroforéza s pohyblivým rozhraním. Vzhledem k množství aplikovaného herbicidu nejen na naše, ale zejména na zahraniční zemědělské oblasti a mnohým neobjasněným faktům a velké hrozbě, byl jako předmět studie zvolen herbicid glyfosát, jakožto hlavní účinná složka roundapu.

Abych mohl tento herbicid stanovit v reálném vzorku, nejprve jsem musel vyvinout elektrolytový systém. Navržení tohoto elektrolytového systému probíhalo tak, že se nejprve nasimuloval v programu Simul komplex 5 a poté byl experimentálně odzkoušen. Jako nejvhodnější elektrolytový systém byl složen z vedoucího elektrolytu 0,01 M HCl + 0,02 BALA + PEG a koncového 0,01 M CH3COOH + BALA. Tento elektrolytový systém splňoval všechny potřebné parametry a po provedení kalibrace a vyhodnocení kalibrační křivky se ukázalo, že změřené hodnoty jsou reprodukovatelné.

Vzhledem k tomu, že mé téma je zaměřeno na povrchové vody, zvolil jsem si pro odběr reálných vzorků tři malé vodní nádrže vyskytující se v blízkosti zemědělských ploch, popřípadě v místech, kde dochází k aplikaci herbicidu. V jedné ze tří nádrží byl detekován glyfosát a to v koncentraci 50,7 µg/l. Maximální povolená koncentrace tohoto herbicidu v povrchových vodách daná legislativou není, pouze zde mluvíme o tzv. normě environmentální kvality, která je pro tuto látku stanovena na hodnotu 36 µg/l. Vzhledem k výše uvedenému limitu došlo v této nádrži k překročení stanovených hodnot a přesto, že je koncentrace tohoto herbicidu nad danými limity, přesné určení by bylo možné pouze při pravidelném analyzování vzorků v jednotlivých částech roku a to nejen vzorků vody, ale i sedimentu, ve kterém dochází k akumulaci tohoto herbicidu. Dále musíme brát v potaz poločas přeměny glyfosátu na její dceřiný produkt AMPA, který bývá obvykle ve více, jak dvoj násobné koncentraci než samotný glyfosát. Tato látka se ukázala jako toxičtější než glyfosát, dále může způsobit genetické a hormonální poruchy v určitých stádiích lidského vývoje. Bohužel se zatím nepodařilo vyvinout takový elektrolytový systém pro tuto metodu, aby bylo možné koncentraci AMPA změřit. Velké nebezpečí a případná toxicita pochází také z přidaných aditiv, které mají zabezpečit větší účinnost herbicidu, ale jsou mnohdy nebezpečnější než samotný glyfosát.

Měření tedy prokázalo migraci tohoto herbicidu v půdě a její následný transfer do vodního prostředí, případný odnos erodovaných částic půdy vodou, na kterých byl glyfosát sorbován s následným transferem do vodního prostředí. Vzhledem k tomu, že účinky glyfosátu nebyly zcela objasněny, dnes již víme, že se jedná o látku toxickou, karcinogenní a látku ovlivňující biologické pochody. Jako doporučení bych zavedl monitoring nejen tohoto herbicidu, ale i snížení jeho koncentrace v povrchových vodách na čistírnách odpadních vod například metodou mikrosítové filtrace/UVzáření, sonolýzou ozónu, ultrafiltrací nebo elektrochemickou oxidací MnO2. Dále bych zavedl maximální povolenou koncentraci glyfosátu ve vodách danou legislativně a snížil bych množství aplikovaného herbicidu nejen na zemědělských plochách.

Elektromigrační metoda, která byla použita pro analýzu vzorků, se prokázala jako velmi účinná a spolehlivá. Hodně záleží na dobře zvoleném elektrolytovém systému, popřípadě na odstranění látek znehodnocující analýzu. Pokud použijeme fokusaci, dokážeme zvýšit citlivost a posunout tak detekční limit i o 2 až 3 řády. I přes značný trend a univerzálnost použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie nebo kombinace plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem se tato metoda ukázala jako velmi vhodná a pro účely detekce škodlivin v životním prostředí více než dostačující.

Množství spotřeby glyfosátu se každým rokem zvyšuje. Výzkum dlouhodobých účinků glyfosátu je finančně náročný a tak jediné informace drží v tajnosti korporace. Přestože u nás nedosahujeme tak závažných hodnot jako například v zahraničí, tento problém vnášení nebezpečných látek do životního prostředí a jejich zařazování do potravních řetězců je vážný a bude mít širokosáhlé následky nejen na životním prostředí, ale i na zdraví člověka.

12 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ALTRIA K, D., 1999: Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, 856: 443–463.

APARICIO, V. C., GERÓNIMO E. D., MARINO D., PRIMOSTJ., CARRIQUIRIBORDEP., COSTAJ. L., 2013: Environmental fate of glyphosate and aminomethyl phosponic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere*, 93: 1866–1873.

ARAÚJO A. S., MONTEIRO, R. T., ABARKELI R. B., 2003: Effect of glyphosate on the microbial aktivity of two Brazilian soils. *Chemosphere*,52: 799–804.

AVIGLIANO E., SCHENONE N, F., 2015: Human health risk assessment and environmental distribution of trace elements, glyphosate, fial coliform and total coliform in Atlantic Rainforest mountain rivers (South America). *Microchemical Journal*, 122: 149–158.

BATTAGLIN W. A., MEYER M. T., KUIVILA K. M., DIETZE J. E., 2014: Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in U. S. soils, surface water, groundwater, and precipitation. *J. Am. Water Resour. Assoc*., 50: 275–290.

BORGGAARD O. K., GIMSING A. L., 2008: Fate of glyphosate in soil and the posibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest. Manage. Sci.,* 64: 441–456.

BUKOWSKA B., MICHALOWICZ J., KROKOSZ A., SICINSKA P., 2007: Comparison of the effect of phenol and its derivatives on protein and free radiál formation in human erythrocytes (in vitro). *Blood Cells Mol. Dis*., 39: 238–244.

CANDELA L., CABALLERO J., RONEN D., 2010: Glyphosate transport through weathered granite soils under irrigated and non-irrigated conditions Barcelona, Spain. *Sci. Total Environ.,* 408: 2509–2516.

CONTARDO-JARA V., KLINGELMANN E., WIEGAND C., 2009: Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in Lumbriculus variegatus and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. *Environmental Pollution,* 157: 57–63.

COUPE R. H., KALKHOFF S. J., CAPL P., GREGOIRE C., 2012: Fate and transport of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins. *Pest. Manage. Sci.*, 68: 16–30.

DE ROOS A. J., BLAIRA., RUSIECKIJ.A., HOPPINJ.A.,SVECM., DOSEMECIM., SANDLERD.P., ALAVANJAM.C., 2005: Cancer incidence among glyphosate-exposed pesticide applicators in the agricultural health study.*Environ. Health Perspect*, 113: 49–54.

DICK R. E., QUINN J. P., 1995: glyphosate degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43: 545–550.

EVERAERTS F. M., BECKERS J. L., VERHEGGEN Th. P. E. M., 1976: Izotachophoresis theory, instrumentation and applications. *Journal of Chromatography Library*, 6 :1–418.

GAŠ B., TESAŘOVÁ E., ZUSKOVÁ I., VČELÁKOVÁ K., 2007: Stability constants of amino acids, peptides, proteins, and other biomolecules determined by CE and related methods: Recapitulation of published data. *Electrophoresis*, 28: 2145-2152.

GEOPORTÁL.GOV.CZ, 2017: *Mapy.* Databáze online [cit. 2017-12-03]. Dostupné na: https://geoportal.gov.cz/web/guest/map

GÓMEZ E., FERRERAS L., LOVOTTI L., FERNÁNDEZ E., 2009: Impact of glyphosate application on microbial biomass and metabolicactivity in a Vertic Arguidoll from Argentina. *Eur. J. Soil Biol*., 45, 163–167.

GUBITZ G., SCHMID M, G., 1997: Chiral separation principles in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A,* 792: 179–225.

GUIY X., FANX N., WANGH M., WANG G., CHENS D., 2012: Glyphosate induced cell dech through apoptotic and autophagic mechanisms. *Neurotoxicol. Teratol.,* 34 (3): 344–349.

HANEY R. L., SENSEMAN S. A., HONS F. M., 2002: Effect of roundup ultra on microbial activity and biomass from selected soils. *J. Environ. Qual.*, 31: 730–735.

HUBAČÍKOVÁ V., OPPELTOVÁ P., 2008: *Úpravy vodních toků a ochrana vodních zdrojů*. Mendelu, Brno, 131s.

CHURÁČEK J., A KOLEKTIV, 1990: *Analytická separace látek*. Praha, 384s.

CHURÁČEK J., A KOLEKTIV, 1993: *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. Praha, 387s.

International Agency for Research on Cancer (IARC), World Health Organization, 2015: *IARC Monographs Volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides.* Databáze online [cit. 2017-15-02]. Dostupné na: http://www.iarc.fr/en/media-centre/iarcnews/pdf/MonographVolume112.pdf

JANČÁŘOVÁ I., JANČÁŘ L., 2003: *Analytická chemie*. Mendelu, Brno, 195s.

JANČÁŘOVÁ I., JANČÁŘ L., 2008: *Analytická chemie*. Mendelu, Brno, 195s.

JASPER R., LOCATELLIG.O., PILATI C., LOCATELLI C., 2012: Evaluation of biochemical, hematological and oxidative parameters in miceexposed to the herbicide glyphosate-Roundup. *Interdiscip. Toxicol*., 5 (3): 133–140.

KARLÍČEK R., POLÁŠEK M., POSPÍŠILOVÁ M., SOLICH P., 2013: *Analytická chemie pro farmaceuty*. Karolinum, Praha, 281s.

KAŠIČKA V., 1997: Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické listy*, 91:320–329.

KJAER J., ERNSTEN V., JACOBSEN O. H., HANSEN N., DE JONGE, L. W., OLSEN P., 2011: Transport modes and pathways of the strongly sorbing pesticides

glyphosate and pendimethalin through structured drained soils. *Chemosphere,* 84: 471–479.

KUDZINZ H., GRALAKD K., DRABOWICZ J., LUCZAK J., 2002: Novel approach for the simultaneousanalysis ofg lyphosate and its metabolites. *J. Chromatogr. A,* 947(1): 129–141.

LANDERS J. P., 2007: *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques, Third Edition*. CRC Press, 1592s.

MARTÍNÉZ R. C., GONZALO E. R., CRUZ E. M., ÁLVAREZ J. D., MÉNDEZ J. D., 2006: Comparison of a non-aqueous capillary electrophoresis method with high performance liquid chromatogramy for the determinativ of herbicides and metabolites in water samples. *Journal of Chromatography A,* 1122 :194–201.

MARTINIC N., GABRIELLIM., VILAG del C., 2012: A commercial formulation of glyphosate inhibits proliferation and differentiation to adipocytes and induces apoptosis in 3T3-L1 fibroblasts. *Toxicol. In Vitro*, 26: 1007–1013.

MERCURIO P., FLORES F., MUELLER J. F., CARTER S., NEGRI A. P., 2014: Glyphosate persistence in seawater. *Marine Pollution Bulletin*, 85: 385–390.

MESNAGE R., DEFARGE N., SPIROUX DE VENDOMOIS J., SÉRALINI G. E., 2015: Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food and Chemical Toxicology,* 84: 133–153.

MIKEŠ O., A KOLEKTIV, 1980: *Laboratorní chromatografické metody*. Praha, 673s.

OBENBERGER J., TROJAN V., 1971: *Příručka chemické ochrany rostlin*. Praha, 246s.

PAGANELLI A., GNAZZO V., ACOSTA H., LÓPEZ S. L., CARRASCO A. E., 2010: Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chem. Res. Toxicol.*, 23: 1586–1595.

PAZOUREK J., 2003:*Moderní elektroforetické analytické metody*. Brno, 88s.

PICCOLO A., CELANO G., ARIENZO M., MIRABELL A., 1994: Adsorption and desorption of glyphosate in some European soils. *J. Environ. Sci. Health Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 29: 1105–1115.

PIENIAZEK D., BUKOWSKA B., DUDA W., 2004: Comparison of the effect of Roundup Ultra360 SL pesticide and its aktive compound glyphosate on human erythrocytes. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 79: 58–63.

PINELC., LANDRIVONE., LINIH., GALLEZOTP., 1999: Effect of the nature of carbon catalysts on glyphosate synthesis. *J. Catal.*, 182 (2): 515–519.

PRATA F., CAMPONEZ V., LAVORENTY A., TORNISIELO V. L., BORGES J., 2003: Glyphosate sorption and desorption in soils with distinct phosphorus levels. *Sci. Agric.*, 60: 175–180.

ROBERTS T. R., HUTSON D. H., LEE P. W., NICHOLLS P. H., PLIMMER J. R., 1998: Metabolic pathways of agrochemicals. Part 1: Herbicides and plant growth regulators, firsted. *The Royal Society of Chemistry*, 386–400.

RUDA A, 2017: *Voda na zemi*. Databáze online [cit. 2017-12-03]. Dostupné na: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/pedf/ps14/fyz_geogr/web/pages/07-voda.html

SANDRINI J. Z., ROLA R. C., LOPES F. M., BUFFON H. F., FREITAS M. M., MARTINS C. D. M. G., DA ROSA C. E., 2013: Effects of glyphosate on cholinesterase activity of the mussel Perna perna and the fish Danio rerio and Jenynsia multidentata: In vitro studies. *Aquat. Toxicol.*, 130: 171–173.

SHEALS J., SJÖBERG S., PERSSON P., 2002: Adsorption of glyphosate on goethite: molecular characterization of surface complexes. *Environ. Sci. Technol.*, 36: 3090–3095.

SHUSHKOVA T., ERMAKOVA I., LEONTIEVSKY A., 2010: Glyphosate bioavailability in soil. *Biodegradation*, 21: 403–410.

SIMÓ C., CIFUENTES A., GALLARDO A., 2003: Drug delivery systems: polymers and drugs monitored by capillary electromigration methods. *Journal of Chromatography B*, 797: 37–49.

STENROD M., CHARNAY M. P., BENOIT P., EKLO O. M., 2006: Spatial variability of glyphosate mineralization and soil microbial characteristics in two Norwegian sandy loam soils as affected by surface topographical features. *Soil Biol. Biochem.*, 38: 962–971.

STŘEDOVÁ H., 2014: *Environmentalistika*. Brno, 64s.

STYCZEN M., PETERSEN C. T., KOCH C. B., GJETTERMANN B., 2011: Macroscopic evidence of sources of particles for facilitated transport during intensive rain. *Vadose Zone J*., 10: 1151–1161.

ÚKZÚZ., 1996: *Metodická příručka pro ochranu rostlin*. Ministerstvo zemědělství ČR, 495s.

VERA M. S., LAGOMARSINO L., SYLVESTER M., PÉREZ G. L., RODRÍGUEZ P., MUGNI H., SINISTRO R., FERRARO M., BONETTO C., ZAGARESE H., PIZARRO H., 2010: New evidences of Roundup (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology*, 19: 710–721.

VEREECKEN H., 2005: Mobility and leasing of glyphosate: a review. *Pest. Manage. Sci.*, 61: 1139–1151.

WIKIPEDIE, 2017: *AMPA*. Encyklopedie online [cit. 2017-03-25]. Dostupné na: https://en.wikipedia.org/wiki/AMPA

WIKIPEDIE, 2017: *DCMU*. Encyklopedie online [cit. 2017-03-25]. Dostupné na: https://en.wikipedia.org/wiki/DCMU

WIKIPEDIE, 2017: *Glyphosate*. Encyklopedie online [cit. 2017-03-25]. Dostupné na: https://en.wikipedia.org/wiki/Glyphosate

WIKIPEDIE, 2017: *Kyselina trichloroctová*. Encyklopedie online [cit. 2017-03-25]. https://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_trichloroctov%C3%A1

WIKIPEDIE, 2017: *MCPA*. Encyklopedie online [cit. 2017-03-25]. Dostupné na: https://en.wikipedia.org/wiki/MCPA

WIKIPEDIE, 2017: *Triazin*. Encyklopedie online [cit. 2017-03-25]. Dostupné na: https://cs.wikipedia.org/wiki/Triazin

XU. L., BASHEER CH., LEE H. K., 2010: Solvent-bar microextraction of herbicides combined with non-aqueous field-amplified sample injection capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1217 :6036–6043.

Zákon č. 254/2001 Sb., O vodách A o změně některých zákonů (vodní zákon), ve znění pozdějších předpisů.

ZBIROVSKÝ M., MYŠKA J., ZEMÁNEK J., 1960: *Herbicidy*. Praha, 281s.

13 SEZNAM ZKRATEK

ACE – affinity capillary electrophoresis = afinitní kapilární elektroforéza

CE – capillary electrophoresis = kapilární elektroforéza

CEC – capillary electrochromatography = kapilární elektrochromatografie

CGE – capillary gel electrophoresis = kapilární gelová elektroforéza

CIEF – capillary isoelectric focusing = kapilární izoelektrická fokusace

CITP – capillary isotachophoresis = kapilární izotachoforéza

CZE – capillary zone electrophoresis = kapilární zónová elektroforéza

EC – electrochromatography = elketrochromatografie

HPCE – high performance capillary electrophoresis = vysoko účinná kapilární elektroforéza

MEKC – micellar electrokinetic chromatogramy = micelární elektrokinetická chromatografie

GC/MS – gas chromatography/ mass spektrometry = plynová chromatografie/ hmotnostní spektrometrie

LC/MS – liquid chromatography/ mass spektrometry = kapalinová chromatografie/ hmotnostní spektrometrie

AMPA – kyselina aminomethylfosfonová

SPADNS – 1,8-dihydroxy-2-(p-sulfofenylazo)-3,6-naftalendisulfonové kyseliny

MES – 2- (N-morfolino) ethansulfonová kyselina

BALA – beta-alanin

PEG – polyethylenglycol

BKP – bromkresolový purpur

14 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1 Průběh jednotlivých elektromigračních metod, a) zónová elektroforéza b) izoelektrická fokusace c) izotachoforéza 13
Obrázek č. 2 Interakce a pohyb neutrálního analytu s micelami 16
Obrázek č. 3 Uspořádání iontů v kapiláře při elektroosmotickém toku 20
Obrázek č. 4 Strukturální vzorec triazinu 27
Obrázek č. 5 Strukturální vzorec MCPA 28
Obrázek č. 6 Strukturální vzorec TCA 28
Obrázek č. 7 Strukturální vzorec diuronu 29
Obrázek č. 8 Strukturální vzorec glyfosátu 30
Obrázek č. 9 Strukturální vzorec AMPA 30
Obrázek č. 10 Stratifikace a mikce v jednotlivých ročních obdobích 32
Obrázek č. 11 Mapa s označením polohy rybníku číslo 1 41
Obrázek č. 12 Hydrologická mapa rybníku číslo 1 42
Obrázek č. 13 Mapa s označením polohy rybníků číslo 2 a 3 42
Obrázek č. 14 Hydrologická mapa rybníku číslo 2 a 3 43
Obrázek č. 15 Zachycení průběhu simulovaného izotachoforetického děje 45
Obrázek č. 16 Zachycení průběhu simulované fokusace kyseliny octové 45
Obrázek č. 17 Elektroferogram ukazující závislost koncentrace NaOH na čase 48
Obrázek č. 18 Elektroferogram rozhraní MES a HisCl 49
Obrázek č. 19 Elektroferogram závislosti koncentrace glyfosátu na velikosti zóny 50
Obrázek č. 20 Elektroferogram závislosti koncentrace glyfosátu na velikosti zóny 51
Obrázek č. 21 Izotachoforetický analyzátor s technikou spájení kolon ZKI-01 53
Obrázek č. 22 Schéma Izotachoforetického analyzátoru s technikou spájení kolon ZKI-01 54
Obrázek č. 23 Elektroferogram reálného vzorku z rybníku číslo 1 55
Obrázek č. 24 Elektroferogram reálného vzorku z rybníku číslo 2 56