

Možnosti stanovení atrazinu ve vodách

Soňa Šťastná

Bakalářská práce
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Soňa ŠTASTNÁ**
Osobní číslo: **T09730**
Studijní program: **B 2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**

Téma práce: **Možnosti stanovení atrazinu ve vodách**

Zásady pro vypracování:

1. Zpracujte literární rešerši o používání atrazinu v zemědělství, jeho dopadech na životní prostředí a jeho vlivu na zdraví člověka.
2. Zpracujte dosud užívané extrakční techniky triazinových herbicidů ze vzorků vod a analytické metody užívané pro jejich stanovení.
3. Zaměřte se rovněž na možnosti stanovení atrazinu pomocí imunochemických metod.
4. Uvedené techniky a metody kriticky zhodnoťte a doporučte vhodnou metodu pro stanovení atrazinu.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

Vědecké databáze (Web os Science, ScienceDirect, PubMed, EBSCO).

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Petra Jančová, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

13. února 2012

Termín odevzdání diplomové práce:

18. května 2012

Ve Zlíně dne 13. února 2012


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: ŠTĚPÁNKA SOUŠA.....

Obor: HTM/ZP.....

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 16. 6. 2022..

.....Št. Souša.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací

(1) Vysoká škola nevyjádřeně zveřejňuje disertační, ústavní, bakalářské a říjorální práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně pasivků opozentů a výsledků obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

²⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odezvané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odezvalním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také zasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, uděje-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

⁴⁾ zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává neplatné.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny pořizovat, aby jim autor školního díla z výdělků jím dosažených v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložil, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídí k výši výdělků dosažených školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 2.

ABSTRAKT

Atrazin je syntetický herbicid, který byl na trh uveden v roce 1950. I přes to, že v zemích Evropské unie je jeho používání od 1. srpna 2005 zakázáno, je stále možné nacházet jeho stopové koncentrace v přírodě. Je proto nutné věnovat náležitou pozornost výběru metod, kterými se atrazin stanovuje.

Aplikované postupy pro stanovení atrazinu se zpravidla provádějí ve třech základních krocích: izolace analytu z matrice, čištění vzorku a vlastní identifikace a kvantifikace. Protože se v analyzovaných vzorcích stanovují stopová až ultrastopová množství tohoto analytu, je potřeba mít k dispozici vhodné, dostatečně citlivé a selektivní metody pro jeho identifikaci a kvantifikaci. Kontrolními laboratořemi jsou používány metody chromatografické ve spojení s citlivými detekčními systémy: plynová chromatografie s hmotnostně-spektrometrickým detektorem (GC/MS) nebo selektivním dusíko-fosforovým detektorem (GC/NPD); vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostně-spektrometrickým detektorem (HPLC/MS). Chromatografické metody vyžadují velmi nákladná přístrojová zařízení a časově náročné mnohastupňové čištění extraktů před vlastní analýzou, a proto se v posledních letech zvýšilo úsilí o vypracování vhodných imunochemických metod. Pro stanovení atrazinu ve vodách jsou vyvinuty imunoenzymatické soupravy, pracující na principu přímé kompetitivní ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), jejichž přednostmi jsou cenová dostupnost, rychlost analýzy a vysoká citlivost. Mezníkem zůstává náročná příprava imunoreagencií a občasná nedostatečná specifická protilátek. Nicméně i přes tyto nedostatky si imunochemické metody nacházejí v oblasti environmentální analýzy vedle chromatografických metod své postavení.

Klíčová slova: Atrazin, herbicid, životní prostředí, imunochemické metody, ELISA, povrchová voda

ABSTRACT

Atrazine is a synthetic herbicide, which was launched to market in 1950. Despite the fact that its use is prohibited in the European Union since 1st of August 2005, it is still possible to find its traces in nature. It is therefore necessary to pay proper attention to the selection of methods by which atrazine is fixed.

Applied methods for the determination of atrazine are usually executed in three basic steps: isolation of the analyte from the matrix, sample deputation and identification and quantification. Because there are trace and ultra trace amounts of this analyte determined in the samples, it is necessary to use suitable, sufficiently sensitive and selective methods for its identification and quantification. There are chromatographic methods combined used in combination with sensitive detection systems in laboratories: gas chromatography with mass spectrometer detector (GC / MS) or a selective nitrogen phosphorous detector (GC / NPD); highly efficient liquid chromatography with mass spectrometer detector (HPLC / MS). Chromatographic methods require very expensive devices and time-consuming multistep extracts deputation prior to analysis itself, therefore there have been increasing efforts in recent years to develop suitable immunochemical methods. There are immunoenzymometric sets developed which enable determination of atrazine in water, working on the principle of direct competitive ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), which bring the advantages of affordability, speed of analysis and high sensitivity. Remaining milestones are difficult preparation of immunoreagent and occasional lack of specificity of antibodies. However, even despite these deficiencies the immunochemical methods have their place next to the chromatographic methods in the field of environmental analysis.

Keywords: Atrazine, Herbicide, Environment, Immunochemical Methods, ELISA, Surface water

Poděkování, motto

Na tomto místě bych ráda poděkovala Mgr. Petře Jančové Ph.D. za cenné připomínky a odborné rady, při vypracovávání této bakalářské práce a také ze její vedení a ochotu, kterou projevovala při mé tvorbě. Také bych chtěla poděkovat své rodině, která mi umožnila mít dostatek volného času na vypracování této práce.

OBSAH

ÚVOD	10
1 HERBICIDY	11
1.1 HISTORIE	11
1.2 ROZDĚLENÍ.....	12
1.2.1 Neselektivní herbicidy	12
1.2.2 Selektivní herbicidy	12
2 ATRAZIN	14
2.1 POUŽITÍ	15
2.2 ZDROJE ÚNIKU.....	15
2.2.1 Dopady na životní prostředí	15
2.2.2 Dopady na zdraví člověka	16
2.3 LEGISLATIVA.....	17
2.3.1 Limitní hodnoty pro vody	17
3 STANOVENÍ ATRAZINU	18
3.1 PŘÍPRAVA VZORKU K ANALÝZE	18
3.2 EXTRAKČNÍ TECHNIKY	18
3.2.1 Extrakce kapalina-kapalina (LLE)	19
3.2.2 Extrakce tuhou fází (SPE).....	21
3.2.3 Mikroextrakce tuhou fází (SPME)	24
3.3 ČIŠTĚNÍ VZORKU (CLEAN-UP).....	26
3.3.1 Gelová permeační chromatografie (GPC).....	26
3.3.2 Adsorpční chromatografie.....	27
3.4 VLASTNÍ STANOVENÍ ATRAZINU	27
3.4.1 Metody chromatografické	28
3.4.1.1 Plynová chromatografie (GC).....	29
3.4.1.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	31
3.4.2 Metody imunochemické.....	34
3.4.2.1 Kompetitivní ELISA.....	36
3.5 STANDARDIZOVANÉ NORMY.....	37
ZÁVĚR	39
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	41
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	48
SEZNAM OBRÁZKŮ	49

ÚVOD

Voda tvoří spolu se vzduchem základní podmínky pro existenci života na Zemi, a proto poutala pozornost vědců již od nejstarších dob. Ještě na počátku 18. století představovala jeden z aristotelských elementů základu hmoty. V roce 1781 Henry Cavendish prokázal, že voda není prvek, ale sloučenina kyslíku s vodíkem. [1]

V současnosti rychle se rozvíjející průmysl a zemědělství nepříznivě ovlivňují čistotu povrchových vod. Velké nebezpečí pro životní prostředí představují splachy pesticidů, jejichž používání se v zemědělství stále zvyšuje. Pesticidy ve vyšších koncentracích mohou porušit biologickou rovnováhu v tocích. Toxicky působí na některé složky vodní biocenózy a v případě proniknutí do pitné vody ohrožují i zdraví člověka. Alarmující jsou také zjištění, že podle oficiálních statistik se v blízkosti zemědělských ploch v Mexiku rodí mnohem více postižených dětí. [2] V zemích Evropy, ve kterých se ve velkém množství používají pesticidy, klesá porodnost a v Tasmánii užívání pesticidů zvýšilo výskyt rakoviny o 200 %. [3]

Organické pesticidy se masivně začaly v zemědělství používat po 2. světové válce. V současné době je v České republice používáno několik stovek schválených látek a organismů s pesticidními účinky. Klasifikace těchto látek je možná z různých hledisek, např. podle jejich chemické struktury, toxických účinků na organismy, chování v prostředí apod. S ohledem k praktickému použití, lze pesticidy nejčastěji rozdělit na: herbicidy (určené proti plevelným rostlinám), fungicidy (proti houbovým chorobám), insekticidy (proti hmyzu), akaricidy (proti roztočům), moluskocidy (proti měkkýšům), nematocidy (proti hádčákům) apod. [4]

Pro získání informací o používaných pesticidech je nutné znát a mít k dispozici analytické metody, které umožňují s dostatečnou přesností stanovit někdy až velmi nízké koncentrace těchto látek.

Cílem této práce je poskytnout přehled o možnostech stanovení atrazinu v povrchových vodách se zaměřením na metody chromatografické a imunochemické, jimž je v současné době věnována velká pozornost.

1 HERBICIDY

Herbicidy jsou chemické sloučeniny určené k potlačení růstu a k hubení plevelných rostlin v zemědělství, lesním hospodářství a zahradnictví. Slouží také k úplnému potlačení růstu všech rostlin na plochách sloužících technickým účelům. [5]

Použití herbicidů je nenáročné na lidskou práci a také bývá málo nákladné. Přesto ale používání herbicidů má určitá rizika. Pokud se herbicidy nepoužívají správně, mohou poškodit pěstované plodiny, také zatěžují životní prostředí a mohou mít negativní vliv na osoby, které přicházejí přímo do kontaktu s nimi. V neposlední řadě je nežádoucím důsledkem také přítomnost jejich reziduí v ošetřovaných produktech a v potravinách. Proto je velice důležité znát mechanismus působení herbicidů. [6]

1.1 Historie

Již od konce 19. století se lidé snaží přijít na způsob, jak nejlépe regulovat plevel v obilovinách. Začaly se používat látky jako např.: síran měďnatý, síran železnatý nebo chlorečnan sodný. Používaly se také organické herbicidy a to konkrétně dusíkaté vápno, dinitrofenol a ve 30. letech 20. století se začal používat dinitro-o-fenol.

Herbicidní účinky triazinů byly objeveny v 50. letech 20. století. Jako první byl na trh uveden simazin, dále atrazin, terbutryn a terbuthylazin. O triazinových herbicidech a zvláště o účincích a stanovování atrazinu se budu ve své práci zabývat později.

Vývoj možných herbicidů pokračuje i v této době. Jejich vývoj je ale finančně velice náročný a také doba uvedení na trh od objevení herbicidních vlastností po uvedení na trh může trvat až 10 let. To je jeden z důvodů, proč se vyvíjí hlavně herbicidy, které celosvětově nacházejí významné uplatnění v řadě plodin jako je pšenice, kukuřice, sója nebo rýže. [6]

Mezi hlavní požadavky, které jsou kladeny na nově zaváděné herbicidy, patří:

- vysoká selektivita k plodině a necílovým organismům
- vysoká a rychlá účinnost
- rychlá a bezpečná degradace v prostředí
- relativně levná syntéza a dostupná nákupní cena. [6]

1.2 Rozdělení

Herbicidy lze rozdělit do dvou hlavních skupin. A to na selektivní herbicidy a na neselektivní herbicidy. Tyto dvě skupiny se od sebe liší podle toho, jakou část rostlin napadají. Neselektivní herbicidy (totální, širokospektré) napadají většinu vegetace, která se na pozemku vyskytuje. Selektivní (výběrové) herbicidy likvidují jen úzkou skupinu rostlin.

1.2.1 Neselektivní herbicidy

Neselektivní herbicidy ničí široké spektrum jednoletých a víceletých plevelů. Můžeme je dále rozdělit na dvě podskupiny podle délky účinků v rostlině a v půdě.

První skupinou jsou herbicidy s dlouhým reziduálním účinkem v půdě, které se používají k odstranění veškeré vegetace na hřištích, cestách nebo chodnících. Do této skupiny látek se řadí i triazinové herbicidy. Ty se ale postupně nahrazují herbicidy s kratším poločasem rozpadu. Výhodou používání herbicidů s dlouhým reziduálním účinkem je fakt, že odstranění veškeré zeleně v daném místě je trvalé. Na druhou stranu, nevýhodou je, že se délka účinku reziduí v půdě nedá regulovat.[7]

Druhou skupinou neselektivních herbicidů jsou herbicidy s krátkým reziduálním účinkem v půdě. Jedná se o herbicidy, které většinou pronikají do rostlin pouze nadzemní částí a v půdě ztrácí účinnost. To je důvod, proč je možno použít je cíleně na nežádoucí rostliny. Používají se k ničení plevelu před setím nebo k ošetření cestiček a okolí skleníků.

Herbicidy s krátkým účinkem se dále dělí na dvě podskupiny. A to na herbicidy potlačující pouze nadzemní část rostlin a na herbicidy potlačující nadzemní i podzemní část rostlin.

[7]

1.2.2 Selektivní herbicidy

Selektivita herbicidů je umožněna některými kvalitativními rozdíly mezi plevelem a kulturní rostlinou jako např. tvarem listů a jejich odlišným postavením, ochlupením nebo uložením kořenového systému v půdním profilu. Odolnost určitých rostlin k dané chemické sloučenině je rovněž dána také fyziologickými vlastnostmi a celkovým biochemismem rostliny. U všech druhů herbicidů je důležitým kritériem selektivity správně volená doba aplikace.

Selektivní herbicidy se dělí podle převládajícího účinku na:

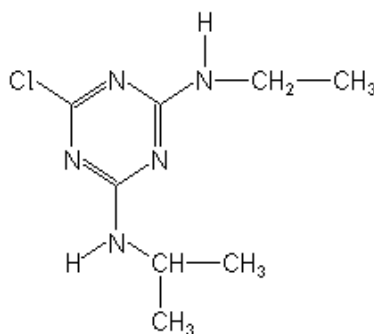
- a) kontaktní (dotykové) – ničí pouze tu část rostliny, která jimi byla zasažena; účinná látka není rozváděna v těle rostliny
- b) systémové herbicidy s převahou přes listy – aplikují se na vzešlé plevelné rostliny; pronikají do rostliny především nadzemními částmi a jsou rozváděny v těle rostliny
- c) systémové herbicidy s převahou účinku přes kořeny – nejčastěji se aplikují před setím nebo po zasetí před vzejitím rostlin; určitou dobu setrvávají v půdě a pronikají do kořenů zpravidla klíčících rostlin. [7]

U novějších herbicidů bývá jejich herbicidní účinek kombinovaný. [6]

2 ATRAZIN

Atrazin je jeden z nejrozšířenějších herbicidů, jehož biologický poločas rozpadu v půdě může být až jeden rok, takže je dlouhodobě detekován v povrchových vodách. Vyrábí jej švýcarská firma Syngenta a hojně se používá v USA a v řadě dalších zemí světa.

Atrazin je syntetická látka, která se řadí mezi triazinové herbicidy. Chemický název atrazinu je 2-chlor-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazin. Jeho strukturní vzorec je znázorněn na obr. 1. Jedná se o totální herbicid, který je přijímán kořeny plevelů. Vyrábí se v různých formách, např.: granule, kapalina, suspenzivní koncentrát, ale také v kombinaci s mnoha ostatními herbicidy. [8] Při nižších koncentracích je poměrně selektivní, při vyšších funguje jako totální herbicid. V obou případech má ale zbytkovou účinnost více než rok. [9]



Obr. 1: Strukturní vzorec atrazinu [9]

Na atrazin je velmi citlivá zelenina, obilniny a brambory. Může být také toxický pro některé druhy vodních rostlin a řas. Mírně toxický je také pro savce.

Od 1. srpna 2005 je zakázáno používat atrazin na základě rozhodnutí Evropské komise 2004/248/EC. Do ČR byl dodáván v přípravku Gesaprim 90 WG od firmy Syngenta. Gesaprim se používal jako postřikový herbicid určený k hubení plevelu v kukuřici. Obsahoval až 90 % atrazinu. V roce 2002 se v ČR spotřebovalo 120 tun tohoto herbicidu. V dnešní době Syngenta doporučuje zemědělcům jiný přípravek, který obsahuje terbuthylazin. Jedná se o pesticid příbuzný atrazinu, který je méně problematický, ale i u něj byly prokázány negativní vlivy na vodní prostředí. [8]

2.1 Použití

Atrazin byl uveden na trh v roce 1950 jako herbicid na dvouděložné plevely. Působí jako inhibitor fotosyntézy. Na rostliny se aplikuje ve formě dispergovaného mikrogranulátu nebo suspenzivního koncentráту. [9]

Nejvíce je používán v USA, kde je jeho roční spotřeba až 34 000 tun. V zemích Evropské unie je od 1. srpna 2005 zakázán, ale v mnoha zemích byl zakázán už dříve. V Itálii bylo používání atrazinu zakázáno v roce 1991, ve Švédsku v roce 1989, v roce 1990 byl zakázán v Norsku. O rok později bylo jeho používání zakázáno v Německu. V Rakousku a Dánsku byl zakázán v roce 1995, ve Francii v roce 2003. Jeho úplný zákaz je v podstatě jedinou možností, jak snížit kontaminaci v přírodě. Tato látka je totiž velmi stabilní, v půdě může vydržet až rok zakonzervovaná a také může být přenášena do vzdálenosti mnoha desítek kilometrů. [10]

I přes známé negativní účinky atrazinu prohlásila v roce 2006 Agentura pro ochranu přírody USA, že vystavení se atrazinu nepředstavuje žádné nebezpečí.

2.2 Zdroje úniku

Mezi hlavní zdroje úniku atrazinu do prostředí patřilo jeho rozprašování na zemědělské plodiny a následný splach z polí, kdy prosakoval do půdy a mohly jím být kontaminovány podzemní vody. [9] V půdě může být atrazin adsorbován na jílové minerály, amorfní oxidy železa a hliníku a organickou hmotu. Možnost adsorpce je závislá na hodnotě pH půdy. Pokud se hodnota pH snižuje, tak adsorpce atrazinu na jílové minerály se zvyšuje kvůli vyššímu počtu atrazinových molekul v protonované formě.

Stále také může docházet k sekundárnímu úniku z kontaminovaných míst, jako jsou např.: bývalá skladiště agrochemikálií, skládky odpadů a kontaminované zeminy. V těchto místech může být atrazin přítomen ještě z doby, kdy byl používán. Atrazin a jeho deriváty nacházejí uplatnění i v dalších průmyslových provozech, jako je tomu například při výrobě barviv nebo výbušnin. Přirozené zdroje úniku atrazinu neexistují, protože se jedná o látku syntetickou. [9]

2.2.1 Dopady na životní prostředí

Pokud je atrazin obsažen v půdě, může vstupovat do rostlin, kde se pomalu rozkládá a odpařuje nebo může být vyplavován do povrchových a podzemních vod. Ve vzduchu se roz-

kládá reakcemi s chemickými látkami, které jsou přítomny v ovzduší. Může se také sorbovat na částičky prachu a sedimentovat.

Ve vodách se může vyskytovat rozpuštěný nebo sorbovaný na nerozpuštěných látkách minerálního nebo organického charakteru. Pokud je atrazin obsažen v kyselých vodách, tak je pomalu rozkládán pomocí hydrolýzy a *n*-dealkylace. Poločas rozpadu je v kyselých vodách při pH 5 a při teplotě 20 °C přibližně 12 týdnů. V neutrálních a zásaditých vodách trvá rozklad atrazinu déle, uvádí se 2 roky a více.

Atrazin je středně toxický pro vodní organismy a některé druhy řas. [9] Ve vodě představuje vážné riziko pro obojživelníky, jako jsou např. žáby. Na afrických žábách bylo prokázáno, že mění u samců tvorbu testosteronu na tvorbu estrogenu. Tím vznikají hermafroditi neschopní rozmnožování. Atrazin je toxický také pro ryby a plazy. [11]

V tělech organismů nedochází k jeho akumulaci. I když má atrazin vysoký poločas rozpadu, není jednoznačně řazen do skupiny perzistentních látek. [9]

2.2.2 Dopady na zdraví člověka

Lidé jsou vystaveni účinkům atrazinu především pitím kontaminované vody. Po perorálním podání se atrazin snadno absorbuje z gastrointestinálního traktu. K expozici atrazinem dochází také u pracovníků, kteří s ním přímo zacházejí. Do organismu může rovněž vstupovat kontaktem s kůží nebo inhalačně.

Mezi hlavní metabolické přeměny atrazinu patří *n*-dealkylace a konjugace s glutathionem [9], tripeptidem, nacházejícím se v buňkách rostlin, živočichů a bakterií.

I když se atrazin řadí mezi herbicidy pro člověka málo toxické, může při vyšších dávkách nepříznivě působit na srdce, plíce, ledviny, poškozovat nadledviny, snižovat krevní tlak nebo vyvolávat svalové křeče. [12] Pokud jsou lidé vystaveni účinkům velkého množství atrazinu, mohou se projevit také symptomy, jako jsou průjem, bolesti žaludku, zvracení, oční nebo kožní dráždění. [9] Atrazin poškozuje hormonální systém (endokrinní disruptor) a může ovlivnit reprodukci. Studie ze státu Missouri potvrzuje, že atrazin snižuje kvalitu spermatu mužů. [8] Úbytek hmotnosti, kardiovaskulární poruchy, degenerace svalů a sítnice nebo nádorová onemocnění jsou spojovány s dlouhodobou expozicí atrazinu. [12] Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC; International Agency for Research on Cancer) řadí atrazin mezi možné lidské karcinogeny s omezenou evidencí u laboratorních zvířat. [9]

2.3 Legislativa

Jak již bylo zmíněno, od 1. srpna 2005 je v zemích Evropské unie zakázáno užívání atrazinu na základě rozhodnutí Evropské komise 2004/248/EC. V rozhodnutí jsou zkoumány vlivy atrazinu na zdraví člověka, zvířat a na životní prostředí. Podle tohoto rozhodnutí atrazin nesplňuje povolené limity koncentrací.

Atrazin je zařazen na seznam Integrovaného registru znečištění a to na základě nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 166/2006 ze dne 18. ledna 2006. Tímto nařízením se zřizuje evropský registr úniku a přenosu znečišťujících látek a mění se jím směrnice Rady 91/689/EHS a 96/61/ES, příloha II. Plyne z něj povinnost pro majitele provozoven informovat veřejnost o úniku látek do ovzduší, půdy a vody. Ohlašovací prahy v kg/rok pro emise do ovzduší nejsou pro atrazin stanoveny. Pro emise do vody, stejně tak pro emise do půdy, je to 1 kg/rok.

2.3.1 Limitní hodnoty pro vody

Limitní hodnoty pro pitnou vodu se řídí vyhláškou 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody vydanou Ministerstvem zemědělství. V této vyhlášce je nejvyšší mezní hodnota pro jednotlivé pesticidní látky, kam řadíme i atrazin, 0,1 $\mu\text{g/l}$ a nejvyšší mezní hodnota pro součet všech pesticidních látek je 0,5 $\mu\text{g/l}$. [13]

Pro balené vody je platná vyhláška Ministerstva zemědělství č. 275/2004 Sb., o požadavcích na jakost a zdravotní nezávadnost balených vod a způsobu jejich úpravy. Limitní hodnota platná pro jednotlivé pesticidní látky je 0,025 $\mu\text{g/l}$. [14]

Limitní hodnoty pro povrchovou vodu se řídí nařízením vlády č. 61/2003 Sb., o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech. Imisní standard pro atrazin je 0,5 $\mu\text{g/l}$. Pokud se jedná o vody pitné, je přípustná hodnota součtu všech pesticidních látek 0,5 $\mu\text{g/l}$. [15] Toto nařízené bylo změněno nařízením vlády č. 23/2011 Sb. Ovšem limitní hodnoty zůstaly stejné.

3 STANOVENÍ ATRAZINU

Výskyt pesticidů zejména v povrchových vodách je dán tím, že se v půdě silně sorbují a jejich pronikání do podzemních vod tak probíhá jen v omezené míře. Prokazatelné v podzemních vodách jsou tehdy, když sorpční kapacita půdy je nedostatečná.

Obecně se pro stanovení pesticidů ve vodách používají metody, které umožňují během jedné analýzy současně stanovit velké množství těchto látek. Aplikované postupy se zpravidla provádějí ve třech základních krocích:

- a) izolace analytů z matrice
- b) čištění vzorku
- c) vlastní identifikace a kvantifikace.

3.1 Příprava vzorku k analýze

Analytický postup přípravy vzorku zahrnuje několik kroků. Jsou jimi vzorkování, konzervace vzorku, doprava vzorku do laboratoře, úprava a následně jeho analýza.

Reprezentativní odběr vzorku je považován za základní část celého analytického procesu. Chyby vzniklé nesprávným odběrem vzorku nebo nesprávným skladováním nelze již obvykle napravit. Vzorky vody se zpravidla odebírají do tmavých skleněných lahví. Láhve je třeba naplnit až po zátku a dále je uchovávat v chladu a na tmavém místě. Během transportu do laboratoře je nutné zamezit degradaci pesticidů a kontaminaci odebraných vzorků. Vzorky vody je vhodné analyzovat v co nejkratší době po odběru. [16]

3.2 Extrakční techniky

Extrakce se řadí mezi separační metody. Při extrakci jsou v kontaktu dvě vzájemně nemísitelné fáze. Látky (analyty) se rozdělují mezi fáze podle různé rozpustnosti v použitých rozpouštědlech. Čím větší je rozdíl mezi rozdělovacími koeficienty látek, tím dokonalejší je jejich oddělení. Cílem extrakce je selektivní až specifické oddělení analytu od ostatních složek nebo naopak oddělení rušivých látek od analytu. [17]

Extrakce lze dělit z několika hledisek, a to podle zúčastněných fází, podle způsobu provedení nebo podle charakteru extrahovaných látek.

Podle zúčastněných fází lze extrakce dále dělit na:

- extrakce plyn-kapalina (GLE, gas-liquid extraction, headspace metoda) – extrakce těkavých látek plynem z kapaliny
- extrakce kapalina-kapalina (LLE, liquid-liquid extraction)
- extrakce tuhá fáze-kapalina (SLE, solid-liquid extraction) – tuhé organické materiály se za tepla extrahují organickými rozpouštědly
- extrakce kapalina-tuhá fáze (SPE, solid-phase extraction) – extrakce pevnou fází.

Podle způsobu provedení lze extrakci rozdělit na jednostupňovou, mnohostupňovou a kontinuální. V případě klasifikace podle charakteru extrahovaných látek se jedná o extrakci organických látek, extrakci kovových látek a extrakci iontových asociátů.

Průběh samotné extrakce závisí hlavně na volbě extrakčního činidla. Jeho doporučené vlastnosti jsou:

1. dobrá selektivita, tj. možnost oddělení pouze té složky směsi, o kterou máme zájem
2. malá viskozita extraktu
3. malá vzájemná mísitelnost rozpouštědel
4. malé mezifázové napětí
5. nízká cena a dobrá dostupnost
6. malá toxicita, nehořlavost, velká stálost. [17]

Pesticidy se ve vodách většinou nacházejí ve stopových až ultrastopových koncentracích, a proto je nutné tyto látky předem zkoncentrovat. K tomuto účelu slouží právě extrakce. Pro extrakci pesticidů z vodného vzorku lze použít extrakci z kapaliny do kapaliny (LLE) nebo extrakci pevnou fází (SPE). V poslední době se uplatňují nové techniky, mezi něž patří především mikroextrakce pevnou fází (SPME).

3.2.1 Extrakce kapalina-kapalina (LLE)

Extrakce z kapaliny do kapaliny je založena na rozdělovací rovnováze dvou navzájem nemísitelných kapalin. Podmínkou je ustanovení rovnováhy mezi těmito kapalinami, tj. výchozím vzorkem s analytem a rozpouštědlem, do kterého se má analyt v co největší míře převést. Organické látky lze vyextrahovat přímo do vhodného organického rozpouštědla.

[18]

Úkolem extrakce je tedy vyextrahovat co nejvíce dané složky a to s co nejmenší spotřebou rozpouštědla a s co nejmenším počtem kroků. Je proto velice důležité, zvolit rozpouštědlo

takové, ve kterém je extrahovaná látka mnohem více rozpustná než v rozpouštědle, ze kterého se extrahuje. [18]

Rozdělení látky mezi dvě heterogenní fáze se řídí Gibbsovým zákonem fází:

$$f + v = s + 2 \quad [19]$$

Tento zákon říká, že extrakce má dvě fáze (plynnou zanedbáváme). Při dělení jedné složky, má systém 1 stupeň volnosti (při konstantním tlaku a teplotě). Pokud určíme koncentraci složky v jedné fázi, je určena její koncentrace i ve fázi druhé. [19]

Účinnost extrakce se udává jako procentuální podíl látky E (%), který se vyextrahoval do organické fáze. Jedná se o tzv. procentuální výtěžek extrakce:

$$E(\%) = \frac{100D_{c,x}}{D_{c,x} + \frac{V_{aq}}{V_{org}}} \quad [19]$$

kde $D_{c,x}$ je koncentrační rozdělovací poměr, V_{aq} je objem vodné fáze a V_{org} je objem organické fáze.

Čím větší je objem organické fáze, tím je extrakce účinnější. Poměr objemů organické a vodné fáze V_{aq}/V_{org} se nazývá fázový poměr β . [19]

Zvětšení účinnosti extrakce lze dosáhnout opakovanou extrakcí vodné fáze s menším množstvím organické fáze a spojením výsledných extraktů. Účinnost n opakovaných extrakcí se poté vypočítá podle vztahu:

$$E_n \% = 100 \cdot \left[1 - \left(\frac{100 - E}{100} \right)^n \right] \quad [19]$$

Tento vztah udává procentový obsah extrahované látky ve spojených extraktech. [16]

Samotná extrakce se provádí v dělicích nálevkách (obr. 2) metodou tzv. vytřepávání. Dělicí nálevky se používají pro extrakci rozpouštědlem těžším než voda. Pokud izolovaná složka přechází do rozpouštědla lehčího než je voda, nepoužívá se dělicí nálevka, ale zkumavka se zabroušenou zátkou vhodné velikosti, u které se po rozdělení fází odsává horní organická fáze pipetou nebo injekční stříkačkou.



Obr. 2: Dělicí nálevka [20]

Extrakce rozpouštědlem umožňuje pesticidy z vody zkoncentrovat a současně provést první hrubé oddělení. Vzorek vody se mírně zalkalizuje na pH 7-8 a přidá se vhodné extrakční rozpouštědlo. Pro triazinové pesticidy se volí dichlormethan, popřípadě chloroform. [21]

U extrakce z kapaliny do kapaliny převažují jisté nevýhody jako např. špatné dělení obou fází s tvorbou emulze nebo špatná opakovatelnost. Mezi další nevýhody lze zařadit také časovou náročnost a velkou spotřebu rozpouštědel. Z těchto důvodů je dnes tato metoda vytlačována extrakcí tuhou fází.

3.2.2 Extrakce tuhou fází (SPE)

Extrakce tuhou fází (*Solid Phase Extraction*) je moderní účinná obohacovací/koncentrační technika odběru vodných vzorků. Podstatou SPE je selektivní zadržování skupiny látek, nejčastěji organických molekul na pevné fázi, která je umístěna ve formě sloupce nebo membrány v krátké kolonce (tzv. cartridge), kterou vzorek protéká. Hlavním cílem SPE je odstranění rušivých složek z matrice, selektivní zakoncentrování a izolace analytu.

Obecně lze SPE použít v těchto následujících případech:

1. selektivní extrakce – jedná se o záchyt analytu, ostatní složky matrice procházejí bez zádrže, následuje eluce analytů
2. selektivní eluce – na sorbent jsou zachyceny jak analyty, tak ostatní složky matrice, následuje eluce analytů
3. selektivní promývání – jsou zachyceny analyty i ostatní složky matrice, poté jsou vymývány interferující látky; následuje eluce analytů
4. odstranění matrice – jedná se o záchyt interferencí, analyt prochází bez zádrže. [22]

SPE kolonky se vyrábí z různých materiálů, nejčastěji skla nebo polypropylénu. Volba velikosti kolonky závisí na celkovém objemu vzorku, matici vzorku a množství analytu.

Sorbenty bývají uloženy v kolonkách, a nebo mohou být slisovány se skleněnými vlákny do disků (obr.3). Sorbenty bývají nejčastěji založeny na bázi chemicky modifikovaných částic silikagelu. O vlastnostech sorbentu rozhodují funkční skupiny různých vlastností, které se chemicky navazují na povrchové silanolové skupiny. K separaci látek dochází na základě odlišných interakcí mezi analytem a sorbentem. Mezi běžně uplatňované interakce patří tyto:

1. van der Waalsovy síly („nepolární“ interakce)
2. vodíkové vazby a dipól-dipólové interakce („polární“ interakce)
3. kation-aniontové interakce (iontové interakce typu elektrostatických přitažlivých sil mezi opačně nabitými ionty).

Volba vhodného sorbentu závisí na vlastnostech analytu, na jeho čistotě, na vlastnostech matrice vzorku a hlavních kontaminantů vzorku a na finálním analytickém postupu. [18]

Atrazin je nepolární látka, proto se k jeho stanovení používají kolonky s nepolárně vázanou fází, které mají hydrofobní vlastnosti. Nepolárně vázaná fáze se využívá pro extrakci nepolárních a středně polárních sloučenin. Pro stanovení triazinových herbicidů se nejčastěji používají C18 sorbenty. Jedná se o polymerně vázaná oktadecylová fáze (18 % C). Tento sorbent má vysoké procento vázaného uhlíku, který zvyšuje sorpční schopnost a tím zaručuje zvýšení výtěžků.



Obr. 3: Kolonky a disky se sorbentem[24]

Obecně se metoda SPE provádí ve 4 – 5 krocích (viz obr. 4). Těmito kroky jsou: kondicionace, aplikace vzorku, promytí, sušení a eluce analytu.

Kondicionace je příprava kolonky, kdy dojde k vymytí nečistot z kolonky a tím se kolonka připraví na reprodukovatelnou interakci složek vzorku s pevnou fází. Ta je umožněna solvatací pevné fáze. Při přípravě kolonky se kolonka propláchne předepsaným rozpouštědlem, tím dojde k aktivaci pevné fáze pro interakce se vzorkem. Kolonka se následně propláchne rozpouštědlem, které se podobá vzorku. Tím se upraví prostředí pro vlastní vzorek.

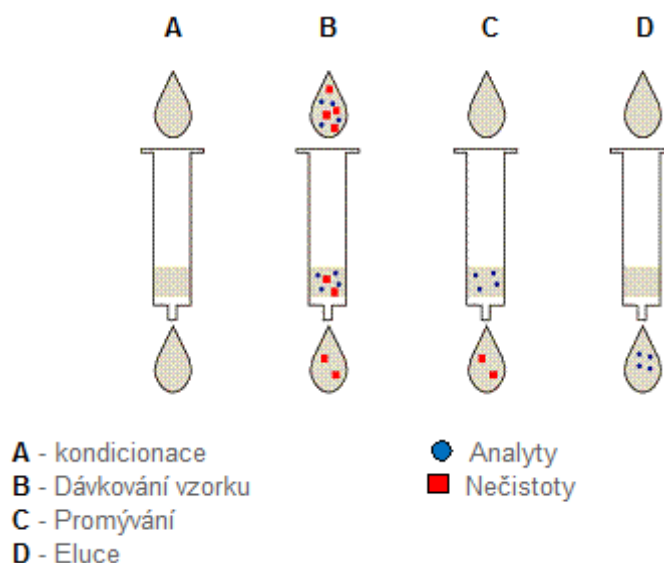
V dalším kroku následuje dávkování vzorku. Před samotnou aplikací vzorku, je nutné vzorek vody upravit. Analyt je potřeba převést do roztoku a je nutné odstranit pevné částice z roztoku, také je nutné snížit rozpustnost analytu ve vzorku a odstranit interference soutěžící o vazebná místa s analytem. U vzorků se provádí i úprava pH, denaturace či srážení.

Objem vzorku je závislý na velikosti a typu kolonky, na koncentraci analytu a na množství rušivých složek. Optimální průtok vzorku přes kolonky se pohybuje v rozmezí od 2 do 4 ml/min.

Při promývání dochází k propláchnutí kolonky vhodným rozpouštědlem a tím dojde k vymytí zbytků matrice vzorku z kolonky. Žádané látky přitom zůstávají nasorbovány na pevné fázi. K odstranění nečistot z kolonky se používá rozpouštědlo o stejné nebo o trochu větší síle než jakou má rozpouštědlo vzorku. [22]

Pokud se eluční rozpouštědlo výrazně liší od promývacího roztoku, je třeba kolonku vysušit proudem inertního plynu, nejčastěji dusíku.

Při eluci dochází k promývání kolonky elučním rozpouštědlem. Promytím dojde k selektivní desorpci žádaných látek z pevné fáze a k jejich následnému vymytí z kolonky. Vzniklý eluát se může dále upravovat pro další analýzy, např.: chromatografii. [22]

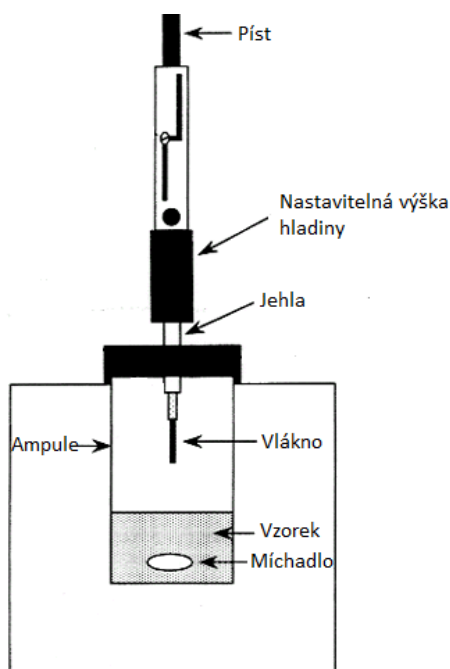


Obr. 4: Provedení SPE[23]

Oproti dříve často používané extrakci kapalina-kapalina má SPE mnoho výhod, a to zejména dobrou selektivitu a úsporu organických rozpouštědel, možnost automatizace a úsporu času. V některých případech lze provést extrakci tuhou fází přímo v terénu při odběru. Naopak nevýhodou může být cena kolonek a dále také fakt, že pro některé izolující se látky stále nejsou na trhu SPE kolonky s vyhovující tuhou fází.

3.2.3 Mikroextrakce tuhou fází (SPME)

Mikroextrakce tuhou fází (obr.5) je jednoduchá a účinná technika, která se používá k zakonzentrování analytu, v našem případě tedy atrazinu. Mikroextrakce na tuhou fází využívá k extrakci analytů z roztoku nebo z plynné fáze nad kapalným či pevným vzorkem křemenné vlákno, potažené stacionární fází. Extrakce analytů se provádí buď ponořením vlákna do kapalného vzorku nebo umístěním vlákna nad kapalnou vzorek do prostředí nasyceného těkavými analyty. U techniky SPME jsou analyty sorbovány na vláknech a to do té doby, dokud není dosaženo rovnováhy. Výběrem vhodného vlákna lze dosáhnout reprodukovatelných výsledků i pro nízké koncentrace analytů. [26]



Obr. 5: SPME [25]

Technika SPME je tedy adsorpčně/desorpční technika. Sorbent je nanesen na krátkém úseku povrchu křemenné kapiláry ve formě tenkého filmu. Povrch kapiláry je chráněn ocelovou jehlou, do které může vlákno se sorbentem zajíždět.

Stacionární fáze se od sebe liší polaritou a sorpčními vlastnostmi; lze je rozdělit do dvou skupin a to na homogenní čisté polymery-adsorbenty, a nebo na porézní částice suspendované v polymeru-adsorbenty. Analyt se na vlákne zachytí na základě absorpce v případě čistých polymerů, a nebo na základě adsorpce v případě fází s porézními suspendovanými částicemi. Rovnovážný stav, kterého se chce u této techniky dosáhnout, závisí na tloušťce a na typu polymeru, který pokrývá křemenné vlákno, a na koncentraci analytu. [26]

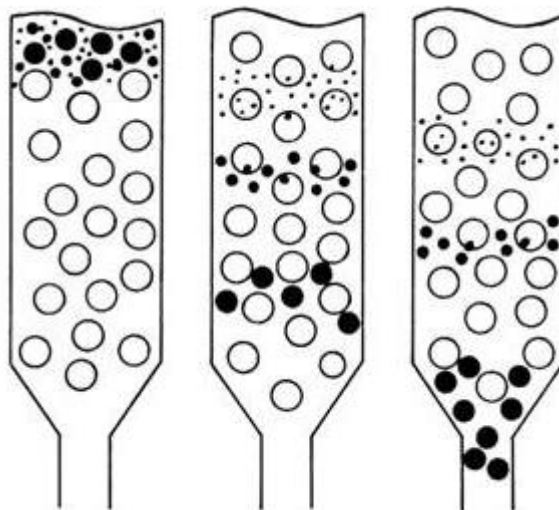
SPME techniku lze použít ve spojení s plynovou i kapalinovou chromatografií. Analyty jsou po extrakci desorbovány teplem v nástřikovém prostoru plynového chromatografu, v případě spojení s kapalinovou chromatografií dochází k desorpci pomocí mobilní fáze. Sloučeniny jsou pak separovány na analytické koloně a detekovány příslušnými detektory. Vhodnou volbou stacionární fáze lze dosáhnout selektivní extrakce bez nežádoucích příměsí. Zautomatizováním celého systému lze spojit přípravu vzorku i analýzu do jednoho kroku.

3.3 Čištění vzorku (clean-up)

Čištění vzorku je velmi důležitým krokem, protože vzorky vody nejsou homogenní, ale obsahují více částic. Proto je důležité vzorky přečistit a tím odstranit látky, které by mohly negativně ovlivnit stanovovaný analyt. Mezi nejčastější používané metody čištění vzorku se používají gelová permeační chromatografie (GPC) nebo adsorpční chromatografie. Při adsorpční chromatografii se jako adsorbenty užívají silikagel, alumina nebo florisil.

3.3.1 Gelová permeační chromatografie (GPC)

Gelová chromatografie je představitelkou nejjednoduššího separačního principu, mechanické separace na základě rozdílů ve velikosti molekul dělených složek. Stacionární fáze jsou malé kulovité částice (10 μm), které obsahují značné množství pórů o definované velikosti (4 – 250 nm). Stacionární fáze se složkami v ideálním případě neinteraguje. V případě GPC se jako stacionární fáze nejčastěji používá hydrofóbní gel a mobilní fází jsou roztoky anorganických solí nebo organická rozpouštědla. Tato metoda využívá rozdílných velikostí molekul látek a to tak, že látky s větší hmotností se pohybují rychleji (viz Obr.6).



Obr. 6: Mechanismus GPC [28]

Gelová permeační chromatografie se používá nejen rozdělení směsí podle molárních hmotností, ale také na odstranění lipidů, bílkovin, přírodních pryskyřic a dalších vysokomolekulárních látek.

3.3.2 Adsorpční chromatografie

Adsorpční chromatografie je metoda založena na rozdílné adsorpci látek na povrchu sorbentu, který tvoří stacionární fázi. Látky jsou na sorbent vázány van der Waalsovými silami. Rychlost adsorpční rovnováhy je závislá na povrchu adsorbentu. Na hladkém povrchu se adsorpční rovnováhy dosáhne rychleji než na povrchu pórovitým. Doba přečištění extraktu se pohybuje v sekundách, popř. v minutách, a proto má adsorpce při chromatografii největší význam. [29]

Pro dobrou adsorpci je nutný velký povrch adsorbentů. Nejběžněji používanými adsorbenty jsou silikagel, alumina a nebo florisil.

Silikagel se připravuje rozkladem vodního skla kyselinami a lze ho připravit ve velmi čisté formě s různými fyzikálními vlastnostmi. [29] Na povrchu silikagelu jsou hydroxylové resp. silanolové skupiny Si-OH, které jsou aktivními centry. Existuje několik typů silanolových skupin a to jednoduchá, izolovaná, dvojitě nebo vzájemně vázána vodíkovým můstkem. Rozmístění skupin na povrchu silikagelu závisí na jeho zpracování. Pokud se silikagel zpracovává při vysokých teplotách, tak dochází k odstranění dvojitých skupin a skupin vázaných vodíkovým můstkem a dochází tak k ustálení vazeb jednoduchých a izolovaných. Při teplotě nad 200 °C dochází na povrchu silikagelu k ireverzibilním změnám. Pokud je teplota vyšší jak 500 °C, tak dochází k odštěpení volných hydroxylových skupin a silikagel lze použít jako nepolární absorbent. [30]

Dalším možným adsorbentem je oxid hlinitý nebo-li alumina, Oxid hlinitý je krystalický a hydroxylové skupiny se aktivují při teplotě 200 °C. Pokud je teplota vyšší jak 900 °C, tak ztrácí oxid hlinitý aktivitu. Po adsorpci látek na absorbent alumina, se nejdříve eluují ty látky, které jsou méně polární. Alumina se používá pro separaci látek různé polaritě nebo pro odstranění interferujících složek z extraktu. [30]

Florisil je látka, která vznikla spojením dvou sloučenin a to z oxidu hořečnatého a oxidu křemičitého.

3.4 Vlastní stanovení atrazinu

Pro samotné stanovení atrazinu ve vodách se nejčastěji využívají metody chromatografické. Používá se hlavně dvou chromatografických metod a to plynové a vysokoúčinné kapalinové chromatografie. V dnešní době se čím dál častěji používají pro stanovení pesticidů také metody imunochemické. Imunochemie je obor, který se zabývá protilátkami a jejich

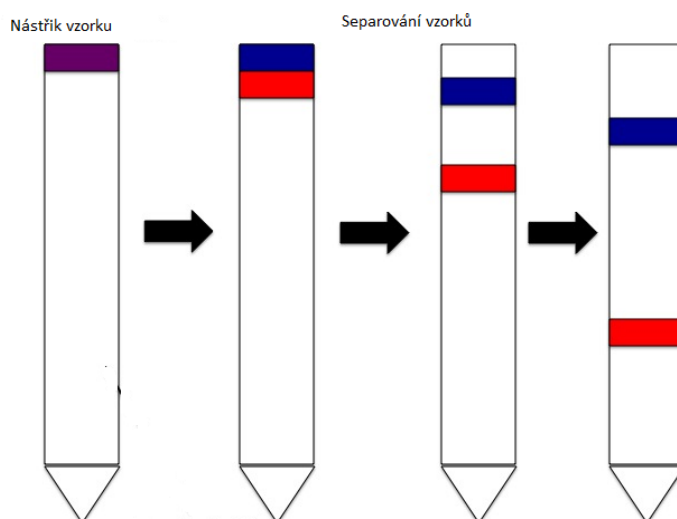
interakcemi s antigeny především za účelem vypracování a aplikace bioanalytických metod, které umožňují citlivě a specificky stanovit nejrůznější látky.

3.4.1 Metody chromatografické

Chromatografie je jedna z nejvýznamnějších analytických separačních metod, která byla poprvé použita v roce 1903 ruských chemikem Michailem Semjenovičem Cvěttem. V dnešní době je chromatografie neobyčejně rozšířená a nabízí nové možnosti hlavně díky tomu, že ji lze kombinovat s dalšími metodami.

Chromatografie využívá dělení složek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je mobilní a druhá stacionární. Jedná se o postupné, opakující se vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi těmito dvěma fázemi. Mobilní fáze je pohyblivá a je to buď kapalina a nebo plyn. Fáze stacionární je nepohyblivá a může být v různých formách, např.: částičky tuhé fáze, tenká vrstvička kapaliny nanesená na tuhých částicích nebo film kapaliny na vnitřní straně kapiláry. Stacionární fáze je tedy sorbent, na který se sorbují stanovovaná částice, které jsou unášeny pohyblivou, mobilní fází. [33]

Princip chromatografie je znázorněn na obrázku 7. Přes kolonu, které je naplněna sorbentem, postupuje určitou rychlostí mobilní fáze. Na začátek kolony je umístěn vzorek, který je pohyblivou fází unášen. Vzorky postupují kolonou různou rychlostí a na výstupu z kolony vycházejí složky odděleně.



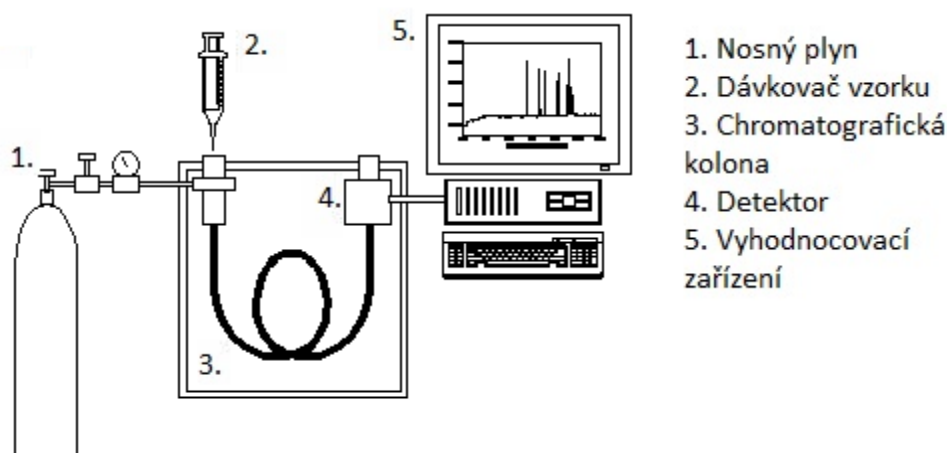
Obr. 7: Princip chromatografie [36]

3.4.1.1 Plynová chromatografie (GC)

Tato technika zaujímá přední místo při analýze pesticidů. Jako její hlavní přednosti jsou uváděny rychlost, flexibilita, dobrá reprodukovatelnost, nejvyšší separační účinnost a hlavně možnost použití selektivních detektorů.

Mobilní fázi je zpravidla inertní plyn a stacionární fázi je nejčastěji kapalina, méně často povrchově aktivní adsorbent. [33]

Plynový chromatograf se skládá z několika částí, které jsou dobře patrné z obr. 8.



Obr. 8: Schéma GC [35]

- Tlaková láhev s nosným plynem bývá opatřena regulátorem tlaku a průtoku. Nosný plyn pouze unáší složky vzorku, nesmí se vzorkem reagovat. Volba vhodného plynu je ovlivněna řadou faktorů, mezi které patří typ používaného detektoru, inertnost, hustota plynu, jeho čistota nebo viskozita. Nejčastěji používanými nosnými plyny jsou dusík, vodík, helium nebo argon. [33]
- Úlohou dávkoč je rychle a reprodukovatelně vpravit vzorek do kolony. Plynné nebo kapalné vzorky se vstříkují injekční stříkačkou do vyhřátého dávkočacího prostoru, kde dojde ke zplynění vzorku. Pokud chceme analyzovat kapalný vzorek, je potřeba ho převést do plynné fáze; teplota nástřiku se volí o 50 °C větší, než je bod varu dané složky. Při dávkování vzorku je nutné vpravit vzorek v co nejkratším čase a je třeba zajistit, aby nedošlo ke změnám teploty a tlaku v koloně.[33]
- V koloně je umístěna stacionární fáze a probíhá zde separace složek. Pro analýzu pesticidů se používají křemenné kapilární kolony. Vnitřní průměr kolon obvykle bývá menší jak 0,5 mm, jejich délka se pohybuje řádově v desítkách metů. Volba stacionární fáze závisí na polaritě separovaných složek.

- Detektory jsou zařízení, které detekují v nosném plynu složky, které opouští chromatografickou kolonu. Při stanovení pesticidu ve vodách je stanovuje pouze stopové množství analytu, a proto je volba vhodného detektoru velmi důležitá.

Atrazin je nejčastěji detekován hmotnostně-spektrometrickým detektorem. Velmi často nacházejí využití také dusíko-fosforový detektorem, a nebo detektor elektronového záchytu. [37]

Hmotnostně-spektrometrický detektor (MS) je univerzální a velmi citlivý, je ale také velmi drahý a destruktivní detektor. Analyt (atrazin) je tedy separován na GC a detekován hmotnostní spektrometrií. Jako ionizační techniky se používá elektronové (EI) nebo chemické ionizace (CI). [38] Elektronová ionizace je nejstarším typem ionizace. Způsob ionizace je možno vyjádřit rovnicí: $M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$. Přiblížením emitujícího elektronu k valenčním elektronům molekuly dojde k ovlivnění jejich magnetických polí, což může vést k uvolnění valenčního elektronu a tím vzniku radikalkationtu M^+ . Tato technika bývá označována jako „tvrdá“ ionizační technika, kdy molekula získá velký přebytek vnitřní energie, který se projeví fragmentací molekulárního iontu. EI se využívá se pro látky dostatečně těkavé za podmínek ionizace. Při chemické ionizaci je ve zdroji přítomný reakční plyn, který je v nadbytku oproti vzorku. Ionizují se nejdříve molekuly reakčního plynu, které následně ion-molekulovými reakcemi ionizují molekuly analytu. [39] Narozdíl od EI je CI „měkká“ ionizační technika a fragmentace primárně vzniklého iontu je malá. Jako analyzátor se využívá iontová past (IT; ion trap). [40]

Dusíko-fosforový detektor (NPD, AFID) pracuje na podobném principu jako plamenově-ionizační detektor (FID). Modifikací je to, že se v prostoru hořáčku umístí perličky nebo prsteneček chloridu rubidia nebo cesia. Detekce je založena na ionizaci alkalického kovu spaliny organické látky. [41] Detektor je možno použít pro selektivní důkaz a stanovení organických látek, které obsahují P, As, S, halogeny a N, což je případ i atrazinu. [33]

Detektor elektronového záchytu (ECD) je detektor velmi citlivý na halogenované sloučeniny. Zdrojem ionizace je ^{63}Ni , který vyzařuje β -záření. Nosný plyn je tímto zářením ionizován a vzniká tak konstantní proud pomalých elektronů. Elektronegativní atomy (atomy halogenů) zachytávají elektrony, tím dochází ke snížení ionizačního proudu. Toto snížení je měřítkem koncentrace daných elektronegativních atomů. [42]

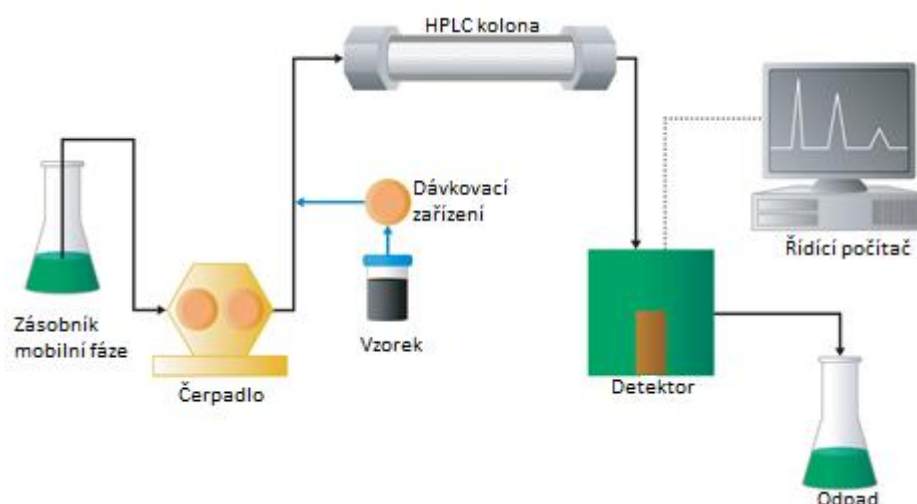
Detekční limity se liší podle druhu použité techniky extrakce a podle metody stanovení atrazinu. Při použití SPME a GC/NPD je detekční limit 7,4 ng/l. Při použití extrakční

techniky SPE a plynové chromatografie s dusíko-fosforovým, hmotnostně spektrometrickým nebo s detektorem elektronového záchytu je detekční limit pro atrazin 2 ng/l. Pokud se použije jako extrakční techniky LLE a GC/NPD je detekční limit 0,4 ng/l. Tomuto detekčními limitu je se blíží i detekční limit při použití LLE popř. SPE ve spojení s HPLC. Tato hodnota je poté 0,6 ng/l. Při zjišťování koncentrace pesticidu ve vodách za využití SPME a GC/MS je detekční limit 40 ng/l. [43]

3.4.1.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je soubor metod, které jsou založeny na různém mechanismu separace. Jejich společným znakem je použití kapalné mobilní fáze, vysokotlaké techniky a účinných kolon pro rychlou analýzu. Jedná se o vylepšenou metodu kolonové chromatografie, která probíhá za zvýšeného tlaku a to až 40 MPa. Kvůli tomu je stanovení touto metodou rychlejší. Výhoda této metody je, že je velmi citlivá. HPLC je také možno automatizovat. [48]

Z hlediska uspořádání se HPLC nejčastěji dělí na normální a reverzní HPLC. Při využití normální fáze je jako stacionární fáze použit polární sorbent (nejčastěji jím bývá silikagel) a jako mobilní fáze se uplatňuje nepolární rozpouštědlo, například hexan. Naproti tomu u reverzní fáze jsou ve stacionární fázi vázány nepolární alifatické zbytky (podle délky se potom označují jako C8, C18, atd.). Jako mobilní fáze se využívají polární rozpouštědla (metanol, acetonitril, atd.). [48]



Obr. 9: Schéma HPLC [44]

Schéma HPCL je znázorněno na obrázku č. 9.

- Zásobník mobilní fáze bývá nejčastěji skleněná nádoba, která je opatřena ryskami a uzavěrem z inertního plastu s předvrtanými otvory pro hadičku. Mobilní fáze je čerpána přes filtry, které odstraňují mechanické nečistoty. Na přípravu mobilní fáze se používají vždy rozpouštědla co nejvyšší čistoty (HPLC grade).
- Dávkování vzorku může významně ovlivnit účinnost separace. Při nedokonalém dávkování může docházet k rozšiřování elučních zón. Jsou možné tři způsoby dávkování vzorku:
 1. Přímý nástřik vzorku injekční stříkačkou na sorbent v koloně – použitelný do tlaku 10 MPa pokud se použije septum. Bez použití septa je nutné přerušení toku mobilní fáze. Obě tyto metody mají špatnou reprodukovatelnost dávkovaných objemů vzorků a nehodí se tedy pro kvantitativní analýzu.
 2. Dávkování vzorku dávkovacím ventilem se smyčkou – není nutné přerušení toku mobilní fáze.
 3. Automatický dávkovač – není nutná obsluha. Dávkovač je složený ze zásobníku s malými nádobkami (vialkami) obsahujícími vzorky, které se před každým nástřikem posunují pod injekční stříkačku dávkovače. Dnes je to nejvíce používaný typ dávkovače.

Samotné vzorky musí být dokonale rozpuštěny a to nejlépe v rozpouštědle, které má stejné složení jako mobilní fáze. Pokud vzorek obsahuje po rozpuštění tuhé částičky, je nutné vzorek přefiltrovat. [33]

- Kolony pro vysokoúčinnou chromatografii jsou hladké trubice, které mají hladký povrch. Jsou zhotoveny z takového materiálu, který musí odolávat vysokým tlakům a také chemickému působení mobilní fáze a separovaných složek. Také na separované látky nesmí působit katalyticky, aby nedošlo k rozložení vzorku v průběhu analýzy. Jako materiál se používá antikorozi ocel s leštěným vnitřním povrchem, sklo nebo plast. [31]
- Kolony jsou naplněny stacionární fází, kterou mohou být polární nebo nepolární sorbenty. Mezi polárními sorbenty zaujímá dominantní postavení mikroparticulární silikagel. Byl připraven začátkem sedmdesátých let minulého století a brzy poté byly připraveny i jeho první chemicky modifikované formy, včetně reverzních fází (nepolárních). Reverzní fáze na bázi silikagelu představují stále nejrozšířenější typ sorbentů v HPLC, zejména pak oktadecylové (C18) modifikace. V současné době jsou na trh uváděny stále pokročilejší materiály s lepšími vlastnostmi.

Mezi současné trendy v oblasti HPLC patří zkracování kolon a zmenšování velikosti částic sorbentu, používání tzv. mikro a kapilárních kolon (kolon s menším vnitřním průměrem), celková miniaturizace celých separačních systémů. Důraz je také kladen na automatizaci analýz, využití ultrazvukových tlaků (až 100 MPa) v chromatografii a stále rostoucí význam techniky HPLC/MS. [32]

- Mezi detektory nejčastěji využívané v HPLC patří: detektor fotometrický (UV), fluorimetrický, elektrochemický nebo hmotnostně-spektrometrický (MS). [33] Při identifikaci a stanovení atrazinu ve vodách nachází uplatnění především citlivý MS detektor. [34]

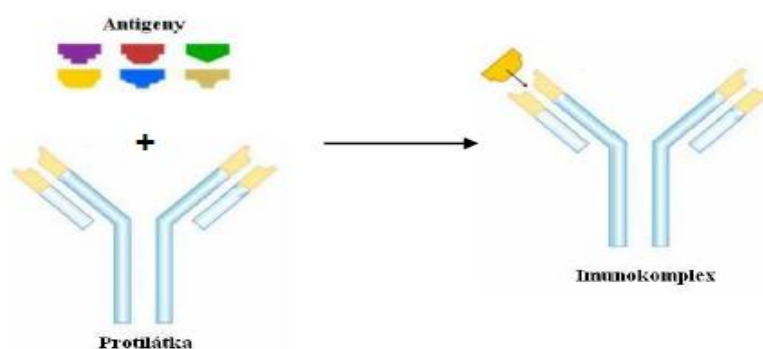
Hmotnostní detektor ale pracuje za vysokého vakua, zatímco látka na výstupu z kapalinového chromatografu je nesena za atmosférického tlaku. Do dnešní doby bylo vyvinuto mnoho technických řešení, které by řešily problém z rozdílu tlaků na vstupu do detektoru. V posledních letech se využívají speciální ionizační techniky pro spojení hmotnostní spektrometrie s HPLC, mezi takové speciální techniky patří termosprej, elektrosprej nebo chemická ionizace za atmosférického tlaku. Jedná se o tzv. měkké ionizační techniky, kdy dodaná energie stačí většinou pouze na vytvoření iontu z neutrální molekuly.[49] Použití ionizačních technik je výhodné pro určení molárních hmotností u neznámých vzorků.[49] Při stanovení atrazinu bývá nejčastěji používanou ionizační technikou chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). [34] Princip APCI je podobný jako u chemické ionizace (CI), ale ionizace zde probíhá za zvýšeného tlaku. Na výbojové elektrodě je vloženo vysoké napětí, tím vzniká koronový výboj. Koronovým výbojem se nejdříve ionizují molekuly mobilní fáze a následně až jsou ionizovány molekuly analytu. [49] Významné uplatnění má také ionizace elektrosprejem (ESI). [50] Analyt, který je rozpuštěn ve vhodném eluentu, je přiveden kovovou kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí do iontového zdroje. Přivádí se k němu dusík a vzniká jemný aerosol. Vznikající kapičky nesou na povrchu velké množství nábojů a odpařováním rozpouštědla dochází ke zvýšení hustoty povrchového náboje. Při dosažení kritické hodnoty dochází k tzv. Coulombické explozi. Následuje transport iontů z atmosférické oblasti zdroje do vakua a hmotnostního analyzátoru. [51]

Chromatografické metody ve spojení s vhodným detektorem jsou používány kontrolními laboratořemi, avšak vyžadují velmi nákladné přístrojové zařízení a časově náročné mnohastupňové čištění extraktů před vlastní analýzou. To je jeden z důvodů, proč se v posledních letech zvyšuje úsilí o vypracování vhodných imunochemických metod pro stanovení pesticidů.

3.4.2 Metody imunochemické

Imunochemie je obor, který se zabývá protilátkami a jejich interakcemi s antigeny především za účelem vypracování a aplikace bioanalytických metod, které umožňují citlivě a specificky stanovit celou řadu nejrůznějších cizorodých látek, např. farmak, toxinů nebo polutantů. Mezi oblasti využívající imunometody patří: humánní a veterinární lékařství, toxikologie, analýza polutantů v životním prostředí, potravinářství, mikrobiologie nebo kontrola výroby léčiv nebo pesticidů. Imunochemické metody jsou jednoduché, finančně méně náročné a rychlé metody pro kontrolu organických sloučenin.

První popsanou imunochemickou metodou byla kompetitivní radioimunoanalýza (RIA), jejíž princip byl popsán v 50. letech minulého století. Rosalyn Yalow a Solomon Berson popsali metodu, která je založena na soutěži antigenu značeného izotopem a neznačeného antigenu o vazebná místa na protilátce. V roce 1977 byla R. Yalow udělena Nobelova cena za vývoj RIA pro peptidové hormony. [52]



Obr. 10: Reakce antigenu s protilátkou [53]

Jako antigen je obecně označována látka, která je rozpoznávána imunitním systémem člověka nebo zvířete. Imunitní systém tyto látky rozpoznává a poté na ně reaguje tvorbou specifických protilátek. Nejčastějšími antigeny jsou cizorodé látky z vnějšího prostředí, např.: mikroorganismy a jejich produkty nebo alergeny. Mezi nejvýznamnější antigeny řadíme proteiny, komplexní polysacharidy nebo také lipidy a lipoproteiny. [54]

Protilátky (imunoglobuliny) jsou proteiny, které se vyskytují v krevní plazmě a mají schopnost se vázat na antigen. Reakce antigenu s protilátkou je vysoce specifická, vzniká tzv. imunokomplex, jehož tvorba je znázorněna na obrázku č. 10.

Důležitou součástí souprav pro imunochemická stanovení (imunoesejí) jsou specifické monoklonální nebo polyklonální protilátky.

Polyklonální protilátky se připravují imunizací laboratorních zvířat vhodným antigenem (Ag). Krevní sérum imunizovaného zvířete, které obsahuje protilátky proti Ag použitému k imunizaci, se označuje jako antisérum. Vzniklé antisérum obsahuje směs protilátek různých izotypů proti všem antigenním determinantám použitého Ag.[54] Pesticidy mají obvykle malou molekulovou hmotnost a nejsou schopny vyvolat specifickou imunitní odpověď (jsou to tzv. hapteny – nekompletní antigeny). Aby toho byly schopny, je nutné je nejprve navázat na vysokomolekulární nosič, kterým je nejčastěji protein. Protein na sebe naváže 3 až 6 atomů pesticidů kovalentní vazbou. Je možné se při přípravě řídit následujícími doporučeními, které vyplývají z dosud provedených experimentů:

- a) Místo na pesticidu, na kterém se má vytvořit vazba s proteinem by mělo být co nejdale proti místu, ze kterého chceme vytvořit specifický protein.
- b) Pesticid by se měl navázat přes uhlík a ne přes heteroatom. Pokud by se navázal přes heteroatom, tak by mohlo dojít ke změně polaritě a tím i k jiné odezvě imunitního systému. [56]

Při imunizaci zvířete, např.: králíka je zvířeti podán antigen, při stanovení atrazinu tedy atrazin, navázaný na vhodný nosič. Imunitní systém králíka začne poté tvořit protilátky proti atrazinu. Ty se následně izolují z krve, přečistí se a poté se stávají součástí imunochemických kitů. Pomocí těchto souprav poté lze stanovit atrazin ve vzorcích vody, protože ten bude s protilátkou, které je v kitu přítomna, biospecificky interagovat. [56]

Monoklonální protilátky jsou narušeny od polyklonálních protilátek namířené proti jedné antigenní determinantě určitého Ag, a proto představují identické kopie. Protilátky se vyznačují výraznou specifitou. Monoklonální protilátky se v laboratorních podmínkách připravují tzv. hybridomovou technologií, jejíž podstatou je buněčná fúze nádorových buněk s lymfocyty sleziny imunizovaných myší. [54]

Typické kroky ve vývoji imunoesejí pro environmentální polutanty (pesticidy) by se daly shrnout v několika následujících bodech:

- 1) výběr vhodného antigenu (haptenu)
- 2) výběr vysokomolekulárního nosiče a jeho konjugace s haptenem
- 3) imunizace zvířete (získání antiséra nebo monoklonálních protilátek)

- 4) vývoj a optimalizace imunoeseje (koncentrace antigenu, koncentrace protilátky, pH, iontová síla, skřížená reaktivita) – rychlost analýzy, detekční limit [57]

Při stanovení pesticidů se nejčastěji využívá dvou imunochemických stanovení.[55] Prvním systémem je radioimunoanalýza (RIA), která se využívá pro imunoreaktanty značené radioaktivními izotopy. Hlavním problémem této metody je možné ozářením radioaktivním prvkem a také vysoké náklady. Tato metoda je vysoká citlivost a možná automatizace.[52]

Ke značení imunoreaktantů (antigenů či protilátek) se v dnešní době využívá zejména enzymů. Enzymoimunoanalýza (EIA) je technika, kdy se pomocí imunochemické reakce s detekcí enzymatické aktivity stanovuje koncentrace analytu ve vzorku. Tato metoda se u nás i ve světě používá na stanovení atrazinu ve vodách. [52][55]

Metoda značeného enzymu byla v životním prostředí použita poprvé v 80-tých letech. Mezi nejpoužívanější metody enzymoimunoanalýzy patří metoda ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Metoda ELISA existuje ve dvou uspořádáních a to kompetitivní a nekompetitivní.

3.4.2.1 Kompetitivní ELISA

Pro stanovení pesticidů a tedy i atrazinu se nejčastěji používá přímá metoda v kompetitivním uspořádání, jejíž princip je znázorněn na obrázku č. 11.



Obr. 11: Přímá kompetitivní ELISA

Při přímém stanovení se v jamkách mikrotitrační destičky, která je potažena protilátkou, inkubují neznámé vzorky. Tyto vzorky obsahují antigen (Ag; atrazin) a komerční antigen (Ag*; konjugát - atrazin značený enzymem). Oba dva tyto antigeny soutěží o omezený počet vazebných míst na protilátce. Po inkubaci se jamky promyjí a tím se odstraní nena-

vázaný konjugát. Do jamek se poté přidá chromogenní substrát, který je enzymem, nejčastěji peroxidasou, rozložen. Tím dojde k barevné změně a intenzita vzniklého napětí se poté změří na destičkovém spektrofotometru. Intenzita vzniklého zabarvení je nepřímo úměrná koncentraci antigenu, tedy atrazinu, ve vzorku. [56]

Metoda ELISA je velmi citlivá a umožňuje tedy stanovení pesticidů při velmi nízkých koncentracích (1 ng/l – 1 µg/l). [56] Technické uspořádání ELISA závisí na účelu a na rozsahu prováděných stanovení. Při screeningu většího počtu vzorků se používají velké série malých reakčních prostorů mikrotitrační destičky. Je zde možná automatická aplikace vzorků. Při menším počtu vzorků se často používají ke stanovení zkumavky.

Nejpohodlnější provedení ELISA je v podobě tyčinek, a nebo kartiček s aktivními deskami. Po aplikaci vzorku a imunoreaktantů se vzniklý odstín zbarvené aktivní zóny porovnává se standardní stupnicí. [56]

U této metody je velkou výhodou nejen její vysoká citlivost, která je srovnatelná s citlivostí chromatografických metod, ale také to, že v jednom kitu je možné stanovení až 40 vzorků a doba zpracování se pohybuje kolem dvou hodin. Oproti chromatografii má tato metoda jednoduchou přípravu vzorku a nižší cenové náklady. I zde je možná automatizace. Nevýhodou této metody je možnost zkřížených reakcí, kdy můžeme získat falešně pozitivní výsledky. I když je tato metoda velice citlivá a přesná, jedná se „pouze“ o orientační metodu. To znamená, že pokud je vzorek pozitivní, je nutné potvrdit pozitivní výsledek jinou metodou, a to nejlépe chromatografickou s hmotnostně-spektrometrickou detekcí.

Detekční limit pro atrazin za využití metody ELISA se pohybuje řádově v desetinách µg/l. [43] [45]

3.5 Standardizované normy

Pro stanovení atrazinu ve vodách je ustanovena mezinárodní norma ČSN EN ISO 10695 (75 7576) Jakost vody – Stanovení vybraných sloučenin s organicky vázaným dusíkem a fosforem – Metody plynové chromatografie. Tato norma vyšla v dubnu roku 2001.

Tato norma popisuje metodu založenou na extrakci kapalina/kapalina, kterou lze použít pro všechny druhy vod, pokud koncentrace nerozpuštěných látek nepřesáhne hodnotu 0,05 g/l. Pokud se atrazin stanovuje touto technikou, tak se atrazin separuje extrakcí do chlormethanu. Poté se extrakty vzorku analyzují na GC/NPD. Extrakce z kapaliny tuhou fází (SPE) je podle této normy použitelná na čisté vody, ne na vody odpadní. I u této techniky se po ad-

sorpci a eluci rozpouštědlem použije plynová chromatografie s dusíko-fosforovým detektorem. Chromatogram se poté porovnává s chromatogramem standardu a výsledek se uvádí v $\mu\text{g/l}$. Pro atrazin je mez detekce $0,5 \mu\text{g/l}$. [58]

Pro stanovení triazinových pesticidů je k dispozici také norma U.S.EPA 619 The Determination of Triazine Pesticides in Municipal and Industrial Wastewater. [59] Tato norma se zabývá stanovením triazinových herbicidů. I v této normě se atrazin separuje extrakcí do 15 % chlormethanu. Extrakt se vysuší a analyzuje na plynovém chromatografu. I podle této normy se nejčastěji využívá NPD detektor. [59]

ZÁVĚR

Překládaná bakalářská práce teoretického charakteru se zabývá problematikou výskytu herbicidu atrazinu ve vodách a jeho stanovením.

První část práce je zaměřena na definici herbicidů a jejich dělení; dále pak na charakteristiku atrazinu, jeho vlastnosti, toxicitu a jeho dopady na životní prostředí.

Podstatná část této práce je zaměřena na prezentaci jednotlivých analytických metod používaných pro stanovení atrazinu ve vodách, zejména povrchových, kam se atrazin mohl snadno dostávat např.: splachem z polí.

Před samotnou analýzou je nutný správný odběr reprezentativního vzorku. Po odběru vzorku následuje jeho extrakce k zkoncentrování analytu.. Vzorek vody je nejprve mírně zalkalizován na pH 7-8. Triazinové pesticidy (atrazin) jsou extrahovány nejčastěji dichlormethanem. [21] V současné době je extrakce kapalina – kapalina (LLE) vytlačována extrakcí tuhou fází (SPE). Pro extrakci atrazinu se používá SPE kolonek s nepolárně vázanou fází (nejčastěji C18 sorbenty). [60] Tato technika má oproti LLE řadu výhod, jsou jimi zejména úspora času i rozpouštědla či dobrá selektivita. Techniku SPE lze v některých případech použít i v terénu. K izolaci atrazinu je možno také použít mikroextrakci pevnou fází (SPME) [27], kde nejsou potřeba téměř žádná rozpouštědla a lze provést přímou desorpci extrahovaných analytů do plynové nebo kapalinové kolony.

Pokud je potřeba extrakt přečistit, volí se technika adsorpční chromatografie (na sloupci Florisilu, Aluminy nebo Silikagelu) nebo gelová permeační chromatografie.

Při samotné identifikaci a kvantifikaci je nutné vybrat správnou analytickou koncovku. Metody plynové i kapalinové chromatografie (HPLC) jsou všeobecně velmi citlivé, rychlé a je u nich možnost automatizace. Výběrem správného detektoru se jejich citlivost ještě zvyšuje a to hlavně když se použije detektor hmotnostně-spektrometrický nebo selektivní dusíko-fosforový detektor. Mezi nevýhody chromatografických metod patří složitější příprava vzorku před vlastní analýzou, kdy je nutné až několikanásobné čištění extraktů. Chromatografické detektory bohužel také nepatří k nejlevnějším, a proto je cena přístroje další nevýhodou chromatografických metod.

Stále častější je snaha o vypracování vhodných imunochemických metod, kterými by se stanovovaly koncentrace pesticidů v prostředí. Imunochemické metody mají citlivost stanovení srovnatelnou s metodami chromatografickými. Metoda ELISA umožňuje stanovení

pesticidů řádově v koncentracích menších jak jednotky $\mu\text{g/l}$ v závislosti na kvalitě protilátky.[43][45] [56] U chromatografických metod se detekční limity pohybují podle použité metody v $\text{ng} - \mu\text{g/l}$.[43][58]

Pro stanovení atrazinu ve vodách jsou na našem i světovém trhu dostupné zejména imunoenzymatické soupravy, pracující na principu přímé kompetitivní ELISA. Cena těchto souprav není tak vysoká a příprava vzorků je jednodušší, ve většině případů se nevyžaduje žádný extrakční ani přečišťovací krok. Také u imunochemických metod a rovněž také u metody ELISA je možná automatizace, rychlost analýzy se pohybuje v rozmezí dvou hodin, což jsou další výhody této metody. Nevýhodou těchto metod je ale časově náročná příprava imunoreagencií, občas nedostatečná specifita, která může vést ke zkříženým reakcím a tím falešně pozitivním výsledkům. I když je přímá kompetitivní ELISA vysoce citlivá a rychlá metoda, je nutné pozitivní výsledek testu potvrdit jinou metodou. Nejlepší je potvrdit tento výsledek chromatografickou metodou a to nejlépe s hmotnostně-spektrometrickým detektorem.

Imunochemické metody jsou stále relativně mladou analytickou metodou, a proto se dá předpokládat, že postupem času a objevováním stále nových možností stanovení se i tato metoda stane samostatnou metodou používanou kontrolními laboratořemi jako je tomu u chromatografických metod.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SEITZ, F. Henry Cavendish: The Catalyst for the Chemical Revolution. To the Memory of Glenn T. Seaborg (1912–1999). *PROCEEDINGS OF THE AMERICAN PHILOSOPHICAL SOCIETY* 2004; 148(2): 151-179.
- [2] GUILLETTE, E.A., M. M. MEZA, M. G. AQUILAR, A.D., SOTO a I.E. GARCIA. An anthropological approach to the evaluation of preschool children exposed to pesticides in Mexico. *Environmental health perspectives* [online]. 1998 [cit. 2012-04-07]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1533004/>
- [3] ROSSE, Brenda J.. Australia: Health in Tasmania gravely affected by pesticide use in tree monocultures. *World rainfores movement* [online]. Srpen, 2005 [cit. 2012-04-07]. Dostupné z: <http://www.wrm.org.uy/bulletin/97/Australia.html>
- [4] VLČEK, V., M. POHANKA. Environmentální aspekty užití organofosforových a karbamátových pesticidů schválených k užití v České republice *Chem. Listy* 2011, 105: 908 – 912.
- [5] FUSEK, J., V. MĚRKA. Nebezpečné herbicidy. *VOJENSKÉ ZDRAVOTNICKÉ LISTY* 2003, 72(6): 262 – 272.
- [6] JURŠÍK, M., SOUKUP J. a HOLEC J. Mechanizmy účinku herbicidů a projevy jejich působení na rostliny: Úvod do problematiky mechanismu působení herbicidů: Herbicide mode of actions and symptoms of plant injury by herbicides: Introduction to herbicide mode of action problems. [online]. 2010, č. 1, s.1-3 [cit. 2012-03-10].
- [7] Herbicidy a jejich využití. In: [online]. [cit. 2012-03-11]. Dostupné z: http://www.agrokrom.cz/texty/metodiky/radce_hospodare/radce_herbicidy_a_jejich_vyuziti.pdf
- [8] REPEŠ, K. a PETRLÍK J. Arnika: Atrazin. [online]. [cit. 2012-03-11]. Dostupné z: <http://arnika.org/atrazin>
- [9] Integrovaný registr znečištění: Atrazin. [online]. [cit. 2012-03-11]. Dostupné z: <http://www.irz.cz/node/14>
- [10] *Organizované znečišťování životního prostředí: Atrazin- velký byznys-někde zá- kazy, jinde hojně užívání* [online]. 2010 [cit. 2012-03-11]. Dostupné z:

<http://www.stvoreni.cz/clovek-a-priroda-dnes/organizovane-znecistovani-zivotniho-prostredi/>

- [11] HAYES, T.B., COLLINS, A., LEE, M., MENDOZA M., NORIEGA, N., STUART, A.A. a VONK, A. Hermaphroditic, demasculinized frogs after *exposure* to the herbicide *atrazine* at low ecologically relevant doses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(8):5476-80.
- [12] GRAZIANO, N., MCGUIRE, M.J., ROBERSON, A., ADAMS, C., JIANG, H., BLUTE, N. 2004 National Atrazine Occurrence Monitoring Program using *the* Abraxis ELISA method. *Environ Sci Technol.* 2006 ;40(4):1163-71.
- [13] Česká republika. Vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody. In: *Sbírka zákonů*. 2004. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/chronologicky-prehled/Legislativa-ostatni_puvodni-zneni_vyhlaska-2004-252-potr.html
- [14] Česká republika. Vyhláška č. 275/2004 Sb., o požadavcích na jakost a zdravotní nezávadnost balených vod a o způsobu jejich úpravy. In: *Sbírka zákonů*. 2004. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/chronologicky-prehled/Legislativa-ostatni_puvodni-zneni_vyhlaska-2004-275-potr.html
- [15] Česká republika. Nařízení vlády č. 61/2003 Sb., o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech. In: *Sbírka zákonů*. 2003. Dostupné z: <http://www.mzp.cz/www/platnalegislativa.nsf/d79c09c54250df0dc1256e8900296e32/ea92dcbcb98365b0c1256d64003e24f0?OpenDocument>
- [16] HORÁKOVÁ, M. a kol.: *Analytika vody*. 2. vyd. Praha: VŠCHT, 2007. 335 s. ISBN 978-80-7080-620-6.
- [17] Extrakce a vyluhování. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. [cit.2012-04-08]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/uchi/ped/chi/chi.ii.text.k20.extrakce.vyluhovani.pdf>
- [18] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 2003, 43 - 48. ISBN 80-86369-07-2.

- [19] Extrakce. *Univerzita Karlova v Praze: Přírodovědecká fakulta* [online]. [cit. 2012-04-08]. Dostupné z: [http:// web.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf](http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf)
- [20] *ECHO: Analytická chemie* [online]. Vydavatelství VŠCHT Praha, Laboratoř informatiky a chemie [cit. 2012-05-09]. Dostupné z: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/echo/analytika/sklo/separatory.html>
- [21] POPL, M., FÄHNRIK, J.: *Analytická chemie životního prostředí*. 4. přeprac. vyd. Praha: VŠCHT, 1999. 218 s. ISBN 80-7080-336-3.
- [22] Extrakce na tuhou fázi SPE. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. [cit. 2012-04-08]. Dostupné z: http://web.vscht.cz/poustkaj/ISM_SPE_99.pdf
- [23] *Labicom s.r.o.: SPE kolonky* [online]. Olomouc [cit. 2012-05-09]. Dostupné z: <http://www.labicom.cz/spe-kolonky-81/>
- [24] Extrakce na tuhou fázi. In: *Sigma-aldrich* [online]. [cit. 2012-04-08]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/13080/01.pdf>
- [25] SPME Technik. *Ernst-Abbe-Fachhochschule Jena: Hochschule für angewandte Wissenschaften* [online]. [cit. 2012-05-13]. Dostupné z: <http://www.fh-jena.de/~feller/spme.htm>
- [26] PROCHÁZKOVÁ, D. Mikroextrakce tuhou fází a stanovení obsahu analytů. *Chemické listy* [online]. 2002, roč. 33, č. 4 [cit. 2012-04-28]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://chemicke-listy.cz/Bulletin/bulletin334/bulletin334.pdf>
- [27] DJUROVIC, R., J. GAJIC-UMILJENDIC a T. DJORDJEVIC. Determination of atrazine, acetochlor, clomazone, pendimethalin and oxyfluorfen in soil by a solid phase microextraction method. *Pesticidi i fitomedicina* [online]. 2008, roč. 23, č. 4, s. 265-271 [cit. 2012-05-12]. ISSN 1820-3949. DOI: 10.2298/PIF0804265D. Dostupné z: <http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=1820-39490804265D>
- [28] VÁVROVÁ, J. *Datový standard MZ ČR: Gelová permeační chromatografie* [online]. 2006 [cit. 2012-05-09]. Dostupné z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200620/hypertext/AJAZG.htm>
- [29] *Chromatografie: Theoretický úvod do adsorpční chromatografie*. Praha: Přírodovědecké vydavatelství, 1952.
- [30] DOUŠA, M. Adsorbenty a chemicky vázané fáze. In: [online]. [cit. 2012-04-29]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/Teorie/adsorbent.html>

- [31] DOUŠA, M. Chromatografická kolona. In: [online]. [cit. 2012-0511]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
- [32] SÝKORA, D., E. TESAŘOVÁ, M. VOSMANSKÁ a M. ZVOLÁNKOVÁ. Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC. *Chemické listy* [online]. 2007, roč. 101, č. 3 [cit. 2012-05-12]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007_03_190-199.pdf
- [33] CHURÁČEK, J. *Analytická separace látek*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1990, 384 s. ISBN 80-030-0569-8.
- [34] REN, J. a K. JIANG. Atrazine and its degradation products in surface and ground waters in Zhangjiakou District, China. *Chinese Science Bulletin* [online]. 2002, roč. 47, č. 19 [cit. 2012-05-12]. ISSN 1861-9541. DOI: 10.1007/BF03184108. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF03184108>
- [35] COUFAL, P. *Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta: Gas Chromatography, GC* [online]. 2004 [cit. 2012-05-09]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/gc.html>
- [36] BETANCOUR, J. a S. GOTTLIEB. *ChemWiki: The Dynamic Chemistry Textbook: Liquid Chromatography* [online]. 2010 [cit. 2012-05-09]. Dostupné z: http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Chromatography/Liquid_Chromatography
- [37] DREVENKAR, V., G. MENDAŠ, S. FINGLER, S. STIPIČEVIČ a L. ZUPANČIČ-KRALJ. Trace Analysis of Triazine Compounds in Water, Soil and Urine by Gas and High Performance Liquid Chromatography with Selective Detection. *Institute for Medical Research and Occupational Health: Faculty of Chemistry and Chemical Technology*, [online]. 2002 [cit. 2012-05-10]. Dostupné z: http://abra.fkkt.uni-lj.si/fkktstrlic/chrom02/pdf/IL/drev_IL.pdf
- [38] STAN, H. -J. a A. BOCKHORN. Determination of triazine herbicides with GC/MS under EI, methane CI and ammonia CI conditions detecting positive and negative ions. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* [online]. 1991, roč. 339, č. 3 [cit. 2012-05-10]. DOI: 10.1007/BF00324403. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF00324403>

- [39] Mass Spectrometry Introduction. In: *University of Pittsburg: Department od Chemistry* [online]. [cit. 2012-05-10]. Dostupné z: <http://www.chem.pitt.edu/facilities/mass-spectrometry/introduction>
- [40] CARDEAL, Z. L., A. G. SOUZA a L. C. A. AMORIM. Analytical Methods for Performing Pesticide Degradation Studies in Environmental Samples. *Pesticides Formulations, Effects* [online]. [cit. 2012-05-14]. DOI: 10.5772/14148. Dostupné z: http://cdn.intechopen.com/pdfs/13028/InTech-Analytical_methods_for_performing_pesticide_degradation_studies_in_environmental_samples.pdf
- [41] SCOTT, R.P.W. Gas Chromatography Detectors. [online]. [cit. 2012-05-03]. Dostupné z: <http://www.chromatography-online.org/GC-Detectors/Nitrogen-Phosphorus-Detector-%28NPD%29/rs46.html>
- [42] *Application Note Categories: GC/ECD* [online]. [cit. 2012-05-10]. Dostupné z: <http://www.chromatography-online.org/directory/methdcat-16/page.html>
- [43] Analytical methods: Atrazine. In: *Agency for Toxic Substances & Disease Registry* [online]. [cit. 2012-05-14]. Dostupné z: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp153-c7.pdf>
- [44] *Waters, the science of what's possible.: How Does High Performance Liquid Chromatography Work?* [online]. 2011 [cit. 2012-05-09]. Dostupné z: http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10049055&locale=en_CZ
- [45] STÖCKLEIN, W. F.M, M. ROHDE, G. SCHARTE, O. BEHRING, A. WARSINKE, B. MICHEEL a F. W. SCHELLER. Sensitive detection of triazine and phenylurea pesticides in pure organic solvent by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): stabilities, solubilities and sensitivities. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2000, roč. 405, 1-2 [cit. 2012-05-14]. DOI: 10.1016/S0003-2670(99)00685-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267099006856>
- [46] DOUGLAS, F. *GC/MS Analysis* [online]. [cit. 2012-05-03]. Dostupné z: <http://www.scientific.org/tutorials/articles/gcms.html>

- [47] Antigen. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 11 April 2012 [cit. 2012-05-09]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Antigen>
- [48] CLARK, J. *High Performance Liquid Chromatography- HPLC* [online]. 2007 [cit. 2012-05-03]. Dostupné z: <http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html>
- [49] HOLČAPEK, M. a JANDERA, P. Spojení kapalinové a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). *Chemické listy* [online]. 1998, roč. 92, č. 4 [cit. 2012-05-03]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1998_04_278-286.pdf
- [50] ARNOLD, S. M., R. E. TALAAT, W. J. HICKEY a R. F. HARRIS. Identification of Fenton's reagent-generated atrazine degradation products by high-performance liquid chromatography and megafLOW electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* [online]. 1995, roč. 30, č. 3, s. 452-460 [cit. 2012-05-12]. ISSN 1076-5174. DOI: 10.1002/jms.1190300309. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jms.1190300309>
- [51] VÁVROVÁ, J. Ionizace elektrosprejem (ESI). *AeskuLab a. s., Zdravotnická laboratoř*. Dostupné z: <http://www.okbpavlin.cz/prirucka/JVAXG.htm>
- [52] PLAZA, G., ULFIG K. a TIEN A.J. Immunoassays and Environmental Studies. *Polish journal of environmental studies* [online]. 2000, roč. 9, č. 4 [cit. 2012-05-04]. ISSN 1230-1485. Dostupné z: <http://www.pjoes.com/abstracts/2000/Vol09/No04/01.html>
- [53] Antigen. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2012-05-15]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Antigen>
- [54] HOŘEJŠÍ, V. aj. BARTUŇKOVÁ. *Základy imunologie*. 2. vyd. Praha: Triton, 2002, 260 s. ISBN 80-725-4215-X.
- [55] MEULENBERG, E. P., W. H. MULDER a P. G. STOKS. Immunoassays for Pesticides. *Environmental Science* [online]. 1995, roč. 29, č. 3, s. 553-561 [cit. 2012-05-11]. ISSN 0013-936x. DOI: 10.1021/es00003a001. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es00003a001>

- [56] MIČKOVÁ, B., RAUCH, P. a FUKAL, L. Možnosti imunochemického stanovení organochlorových a karbamátových pesticidů. *Chemické listy* [online]. 2004, roč. 98, č. 11 [cit. 2012-05-04]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_11_02.pdf
- [57] GIRAUDI, G. a C. BAGGIANI. Immunochemical methods for environmental monitoring. *Nuclear Medicine and Biology* [online]. 1994, roč. 21, č. 3 [cit. 2012-05-12]. DOI: 10.1016/0969-8051(94)90077-9. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0969805194900779>
- [58] Integrovaný registr znečištění: Atrazin. [online]. [cit. 2012-05-04]. Dostupné z: <http://www.irz.cz/node/119>
- [59] U.S.EPA 619. *The Determination of Triazine Pesticides in Municipal and Industrial Wastewater*. 21.02.2007. USA, 2007. Dostupné z: http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/bioindicators/upload/2007_11_06_methods_method_619.pdf
- [60] BÁEZ, M. E., M. RODRIGUEZ, O. LASTRA a P. CONTRERAS. Solid phase extraction of organophosphorus, triazine, and triazole-derived pesticides from water samples. A critical study. *Journal of High Resolution Chromatography* [online]. 1997, roč. 20, č. 11, s. 591-596 [cit. 2012-05-12]. ISSN 0935-6304. DOI: 10.1002/jhrc.1240201105. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jhrc.1240201105>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

GLE	Extrakce plyn – kapalina (Gas Liquid Extraction)
LLE	Extrakce kapalina – kapalina (Liquid-Liquid Extraction)
SLE	Extrakce tuhá fáze – kapalina (Solid-Liquid Extraction)
SPE	Extrakce tuhou fází (Solid Phase Extraction)
SPME	Mikroextrakce tuhou fází (Solid Phase Extraction)
GPC	Gelová permeační chromatografie
GC	Plynová chromatografie
NPD	Dusíko-fosforový detektor
FID	Plamenově-ionizační detektor
MS	Hmotnostně spektrometrický detektor
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
RIA	Radioimunoanalýza
EIA	Enzymoimunoanalýza
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Ag	Antigen
Ag*	Antigen značený enzymem, konjugát
CI	Chemická ionizace
EI	Elektronová ionizace
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
ESI	Ionizace elektrosprejem
IT	Iontová past
ECD	Detektor elektronového záchytu
AFID	Termoionizační detektor

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1: Strukturní vzorec atrazinu [9]</i>	14
<i>Obr. 2: Dělicí nálevka [20]</i>	21
<i>Obr. 3: Kolonky a disky se sorbentem[24]</i>	22
<i>Obr. 4: Provedení SPE[23]</i>	24
<i>Obr. 5: SPME[25]</i>	25
<i>Obr. 6: Mechanismus GPC [28]</i>	26
<i>Obr. 7: Princip chromatografie [36]</i>	28
<i>Obr. 8: Schéma GC [35]</i>	29
<i>Obr. 9: Schéma HPLC [44]</i>	31
<i>Obr. 10: Reakce antigenu s protilátkou [53]</i>	34
<i>Obr. 11: Přímá kompetitivní ELISA</i>	36

EVIDENČNÍ LIST BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Sigla (místo uložení bakalářské práce)	Univerzitní knihovna UTB ve Zlíně
Název bakalářské práce	Možnosti stanovení atrazinu ve vodách
Autor bakalářské práce	Soňa Šťastná
Vedoucí bakalářské práce	Mgr. Petra Jančová, Ph.D.
Vysoká škola	Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Adresa vysoké školy	Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01, Zlín
Fakulta (adresa, pokud je adresa jiná než adresa VŠ)	Fakulta technologická, nám. T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín
Katedra (adresa, pokud je adresa jiná než adresa VŠ)	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
Rok obhájení BP	2012
Počet stran	49
Počet svazků	3
Vybavení (obrázky, tabulky...)	10, 0
Klíčová slova	Atrazin, herbicid, životní prostředí, imunochemické metody, ELISA, povrchová voda