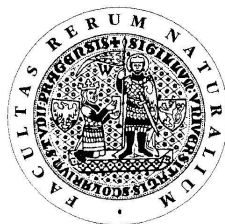


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Analytická chemie



Renáta Norková

Studium komplexů tebukonazolu s ionty kovů
Study of tebuconazole complexes with metal ions

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. PhDr. Ing. Jana Jaklová Dytrtová, Ph.D.

Konzultant: prof. RNDr. František Opekar, CSc.

Praha 2012

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze a Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. je možné pouze po písemném souhlasu těchto institucí.

V Praze dne 12. května 2012.

Abstrakt

Fungicidy jsou velmi často používané látky na ochranu zemědělských plodin, ale mají uplatnění i jinde. V mnoha případech se jedná o látky zdraví škodlivé nebo karcinogenní. Proto je třeba sledovat jejich používání a znát možnosti jejich speciace v životním prostředí.

Cílem této práce je studium komplexů fungicidu tebukonazolu (**1**) s vybranými kovy z hlediska možnosti určení jejich speciace v půdním roztoku. Stechiometrie a stabilita komplexů **1** s Cu, Zn, Cd, Ca Ag byla určena pomocí elektrosprejové ionizace s hmotnostní detekcí (*ESI-MS*) v modelových roztocích. Byla zjištěna vysoká stabilita zejména komplexů s mědí, kdy stabilita komplexu $[\text{Cu}(\mathbf{1})]^+$ byla $224 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (tato energie odpovídá oddisociování molekuly vody z molekuly **1**) oproti hodnotám komplexů s ostatními kovy (cca $150 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Vysoká stabilita $[\text{Cu}(\mathbf{1})]^+$ a zároveň vysoká afinita mědi (oproti ostatním sledovaným kovům) vůči **1** umožnila vyvinout novou analytickou metodu umožňující stanovit **1** ve formě komplexu $[\text{Cu}(\mathbf{1})]^+$. Ionty mědi byly generovány elektrochemicky na měděné elektrodě, která byla umístěna před hmotnostní spektrometr. Komplexy **1** s ostatními kovy v půdním roztoku se rozpadaly a přednostně tvořily komplex $[\text{Cu}(\mathbf{1})]^+$, který byl následně detekován pomocí *ESI-MS*. Určení stechiometrie a stability některých významných komplexů **1**, které se vyskytují v přírodě, může napomoci k pochopení složitých vztahů v půdním prostředí, které ovlivňují stabilitu fungicidů i samotných kovů v půdě, stejně jako jejich příjem rostlinami. Nová analytická metoda aplikovatelná na složitou environmentální matici (půdní roztok) bez předchozí prekoncentrace, či jiné separace, umožňuje stanovit **1** i v koncentraci $2,5\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, čímž se stává vhodnou alternativnou vůči v praxi často používaným chromatografickým metodám.

Klíčová slova

Elektrochemie, fungicidy, hmotnostní spektrometrie, kombinované techniky, kompetice, komplexy, tebukonazol, těžké kovy,

Abstract

Tebuconazole belongs to widely utilized plant fungicides, mostly in vineyards. Its traces are present in plant tissues, wine as well as in soil. The aim of the study was to determine stoichiometries and stabilities of metal (Cu, Zn, Cd, Ca and Ag) complexes with

tebuconazole (**1**) by means of electrospray ionization mass spectrometry (*ESI-MS*). It was found that the complexes of tebuconazole with copper ions are particularly stable ($[\text{Cu}(\mathbf{1})]^+$ has appearance energy $224 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, corresponding with the dissociation of the water molecule from the tebuconazole molecule), while the stability of another tebuconazole complexes is lower, about $150 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. In real environmental samples, the detection of **1** itself is hampered by its spreading into various species. The method involved here is based upon a hyphenation of electrochemistry (amperometry) and electrospray-ionization mass spectrometry (*ESI-MS*). It uses the fact that Cu creates very stable complexes with **1**. We demonstrate that at appropriate potentials (at higher than 500 mV) Cu cations can be generated in an electrochemical cell and subsequently form complexes with **1** present in the sample. The resulting complex $[\text{Cu}(\mathbf{1})]^+$ is detected with *ESI-MS*. The intensity of detected complexes depends on the concentration of **1** and the oxidation level of the electrodes. This finding is useful for the detection of trace amounts of **1** in complicated matrices (e.g. soil solution, wine and others), where **1** is spread among various species.

Key words

Competition, complexes, electrochemistry, fungicides, heavy metals, hyphenated techniques, mass spectrometry, tebuconazole

Poděkování

Děkuji Dr. Janě Jaklové Dytrtové za odborné vedení, podporu, pomoc a cenné rady, které mi poskytovala po celou dobu. Dále děkuji doc. Dr. Detlefu Schröderovi a prof. Dr. Františku Opekarovi za umožnění zabývat se tímto tématem.

Děkuji také svým rodičům a blízkým za podporu a pomoc během studia.

Za finanční podporu ve výzkumné části děkuji grantu GAAV ČR RVO61388963 a projektu European Research Council HORIZOMS.

Obsah:

1	Úvod	10
2	Teoretická část.....	12
2.1	Fungicidy	12
2.1.1	Systémové fungicidy.....	12
2.1.2	Tebukonazol.....	12
2.2	Studované kovy	14
2.2.1	Tvorba komplexů kovů s tebukonazolem.....	16
2.3	Hmotnostní spektrometrie	17
2.3.1	Ionizace elektrosprejem (<i>ESI</i>)	17
2.3.2	Iontová past	18
2.3.3	Kolizně indukovaná disociace (<i>CID</i>).....	18
2.4	Stanovení tebukonazolu	19
2.4.1	Princip	19
2.4.2	Faktory ovlivňující detekci komplexů	20
3	Experimentální část	23
3.1	Přístroje.....	23
3.2	Chemikálie	23
3.3	Příprava roztoků	24
3.4	Určení optimálních parametrů elektrospreje	24
3.4.1	Optimalizace teploty kapiláry	24
3.4.2	Optimalizace <i>CV</i> a <i>TLO</i>	25
3.5	Určení stability komplexů	25
3.6	Afinita tebukonazolu vůči testovaným kovům	26
3.7	Stanovení tebukonazolu	26
3.7.1	Optimalizace průtoku	26

3.7.2	Optimalizace polarizace Cu elektrody	27
3.7.3	Kalibrační závislost	28
3.7.4	Detekce tebukonazolu v půdním roztoku	29
4	Výsledky a diskuse	30
4.1	Určení optimálních parametrů elektrospreje	30
4.2	Určení stability komplexů (kolizně indukovaná disociace, CID)	36
4.3	Afinita tebukonazolu	38
4.4	Stanovení tebukonazolu	41
4.4.1	Optimalizace průtokové rychlosti	42
4.4.2	Optimalizace polarizace Cu elektrody	44
4.4.3	Kalibrační závislost	45
4.4.4	Detekce tebukonazolu v půdním roztoku	46
5	Závěr.....	49
6	Literatura.....	50
7	Přílohy	54
7.1	Příloha 1 - Optimalizace teploty kapiláry.....	55
7.2	Příloha 2 – Optimalizace parametrů CV a TLO.....	57
7.3	Příloha 3 – Určení stability komplexů.....	63
7.4	Seznam publikací.....	67

Použité symboly a zkratky

1	tebukonazol
<i>AcO</i>	acetát
<i>AE</i>	appearance energy (energie potřebná k disociaci)
<i>c</i>	molární koncentrace
<i>CID</i>	kolizí indukovaná disociace
<i>CV</i>	napětí na kapiláře
<i>DPASV</i>	diferenčně pulzní anodická rozpouštěcí voltametrie
<i>E</i>	potenciál
<i>EC</i>	elektrochemická cela
<i>E_{kol}</i>	kolizní energie
<i>ESI-MS</i>	hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem
<i>F</i>	průtoková rychlost
<i>GC</i>	plynová chromatografie
<i>I</i>	proud
<i>K_{ow}</i>	rozdělovací koeficient oktanol/voda
<i>LC</i>	kapalinová chromatografie
<i>LOD</i>	detekční limit
<i>LOQ</i>	limit stanovitelnosti
<i>M</i>	kov
<i>m/z</i>	poměr molární hmotnosti ku náboji iontu
<i>M_r</i>	relativní molekulová hmotnost
<i>MS</i>	hmotnostní spektrometrie
<i>MS/MSⁿ</i>	tandemová hmotnostní spektrometrie
<i>nce</i>	normalizovaná kolizní energie
<i>RE</i>	referentní elektroda
<i>RSD</i>	relativní směrodatná odchylka
<i>S/N</i>	poměr signál/šum
<i>SD</i>	směrodatná odchylka
<i>T</i>	teplota
<i>TLO</i>	tube lense offset

V	objem
WE	pracovní elektroda
β	celková konstanta stability

1 Úvod

Od jejich zavedení v roce 1940 se syntetické pesticidy, heterogenní kategorie biologicky aktivních látek, staly klíčovými, široce používanými zbraněmi proti škůdcům a infekčním chorobám rostlin. Vyznačují se vysokou toxicitou pro cílové organismy, ale také mohou být v různé míře toxické i pro ostatní organismy, včetně člověka [1].

Celosvětově je registrováno přibližně 800 druhů pesticidů, z nichž každý má odlišné chemické, fyzikální a toxikologické vlastnosti. Pro určení rizika spojeného s užíváním pesticidů je třeba uvažovat toxicitu a pravděpodobnost expozice člověka. Krátkodobá expozice vysoce toxickým pesticidům může být mnohem nebezpečnější, než dlouhodobá expozice pesticidům s relativně nízkou toxicitou [2]. Vliv pesticidů na zdraví závisí na typu pesticidu. Některé, jako např. karbamáty a organofosfáty, účinkují na nervový systém. Jiné mohou být dráždivé pro kůži a oči, karcinogenní, teratogenní, nebo mohou mít vliv na hormonální a endokrinní systém v těle apod. [3].

Samotné chování pesticidů v přírodě (mobilita, persistence) může zásadně ovlivnit i jejich výslednou toxicitu pro životní prostředí. Významným aspektem v hodnocení potenciální toxicity daného pesticidu je jeho schopnost vázat se na půdní matrici. Tvorbou těchto komplexů může být zásadně ovlivněna toxicita i stabilita daného pesticidu. Významnou složkou půdy, potažmo půdního roztoku, jsou kationty kovů, které zahrnují jak kationty makroživin (Ca, Mg) a esenciálních prvků (Cu, Zn), tak i rizikové prvky (Cd, Pb, As).

Tato práce se zaměřuje na studium vlastností komplexů tebukonazolu s vybranými kationty. Dále optimalizuje možnosti stanovení tohoto pesticidu v půdním roztoku.

Hypotézy

Přítomnost pesticidů v půdě nepředstavuje jen riziko samo o sobě. Pesticidy tvoří víceméně stabilní komplexy s kationty kovů, a tím mění jejich přístupnost rostlinám z půdního roztoku.

Tvorbu stabilních komplexů lze ale využít k analytickým účelům, kdy se budou v průtokovém systému generovat na kovové elektrodě ionty kovů, které budou ihned vytvářet komplexy s analytem a ty se pak budou detekovat. Podmínkou pro takovéto

stanovení v komplexních vzorcích je vysoká stabilita komplexu s kovem, z něž je vyrobena elektroda, aby stanovení nerušila tvorba stabilnějších komplexů s jinými kovy.

Cíle

- Studovat tvorbu komplexů fungicidu tebukonazolu s ionty kovů pomocí dvou analytických metod: voltametrie a hmotnostní spektrometrie.
- Pomocí hmotnostní spektrometrie odhadnout afinitu tebukonazolu vůči jednotlivým iontům kovů a pevnost koordinační vazby mezi centrálním kovem a ligandem.
- Spojením hmotnostní spektrometrie a elektrochemie vyvinout selektivní analytickou metodu pro detekci tebukonazolu.

2 Teoretická část

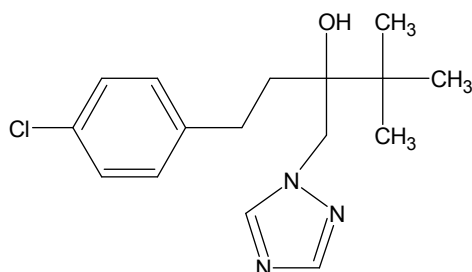
2.1 Fungicidy

Fungicidy patří mezi pesticidy, které se používají k ničení fytopatogenních hub škodících na kulturních rostlinách a látkách organického původu. Podle určení se dělí na zemědělské a průmyslové (součást nátěrových hmot, k ošetření dřeva atd.). Dále se fungicidy dělí z hlediska potřeb praxe na mořidla, postřiky, popraše, fungicidy pro ošetření půdy. Podle chemického složení se dělí na sloučeniny mědi, sloučeniny rtuti, sloučeniny ostatních těžkých kovů, sirné fungicidy, organické fungicidy (mezi něž patří systémové fungicidy). V těchto skupinách se fungicidy dále dělí do dalších podskupin. V této práci se ale dále budeme zabývat pouze systémovými fungicidy.

2.1.1 Systémové fungicidy

Před objevem systémových fungicidů byly fungicidy pouze protektiva zůstávající na povrchu rostliny. Tato protektiva jsou toxická pro mnoho procesů běžných v houbách a rostlinách, ale nevstupují „do rostliny“, a proto nejsou fyto toxické. Systémové fungicidy ale do rostliny proniknou a jsou selektivně toxické pro konkrétní proces uvnitř fytopatogenní houby napadající rostlinu (např. syntéza DNA, RNA, dýchání, syntéza sterolů, tuků apod.). Tato selektivita je tak specifická, že ze stovek hub napadajících rostlinu jsou pouze určité taxonomické skupiny hub citlivé na konkrétní fungicid [4].

2.1.2 Tebukonazol



Obrázek 2-1 Struktura tebukonazolu

Tebukonazol ((*RS*)-1-(4-chlorofenyl)-4,4-dimetyl-3-(1,2,4-triazol-1-ylmetyl)pentan-3-ol; obrázek 2-1) je hojně využívaný systémový fungicid, který je velmi efektivní proti půdou přenášeným a listovým houbovým patogenům. Používá se jak pro ochranu plodin, jako jsou pšenice, ječmen, řepka, vinná réva atd. [5], tak pro ochranu dřevěných povrchů [6].

Tebukonazol patří mezi triazolové fungicidy, které specificky inhibují enzym C-14-demetylázu, který je důležitou součástí biosyntézy sterolů [7-8]. Narušená biosyntéza sterolů způsobuje nestandardní růst hub až jejich smrt [9-10]. Nicméně, stejně jako u všech systémových fungicidů, i zde existuje velká pravděpodobnost získání rezistence, což je dáno právě jeho velkou specifičností, protože jedna jediná změna v metabolismu houby může rezistenci způsobit [10-11].

Fyzikálně chemické vlastnosti

Tebukonazol je bílá krystalická látka charakteristického zápachu. Čistý tebukonazol je bezbarvý prášek bez zápachu. Jeho teplota tání je 106 °C.

Rozpustnost tebukonazolu ve vodě je 0,029 mg·kg⁻¹ při 20 °C a nezávisí na pH. Je velmi dobře rozpustný v organických rozpouštědlech, rozdělovací koeficient oktanol/voda ($\log K_{ow}$) je při teplotách 10°C, 20°C i 30°C roven 3,5.

Literatura udává velmi široké rozpětí poločasu rozkladu tebukonazolu v půdě 9 – 263 dní [12], což může způsobeno různými fyzikálně chemickými vlastnostmi půd. Právě složení i typ půdy velmi ovlivní, jaké komplexy tebukonazolu budou v půdě převažovat.

Toxicita a nebezpečnost

M. Margni *et al.* [13] se zabývali vlivem způsobu intoxikace pesticidy na lidské zdraví. Z výsledků jejich práce vyplynulo, že toxický efekt způsobený intoxikací rezidui pesticidů z potravy byl až 100x vyšší, než tomu bylo v případě konzumace pitné vody nebo inhalace. Protože se tebukonazol používá v emulzi jako postřik, je kromě zasažení celých rostlin též vysoká pravděpodobnost kontaminace půdy během postřiku nebo následně splachem při deštích.

Vliv tebukonazolu na lidské zdraví je poměrně významný. Tebukonazol je podezřelý karcinogen se střední akutní toxicitou, je to endokrinní disruptor [14-15] a má teratogenní účinky [16].

2.2 Studované kovy

Tato práce se zabývá některými kovy, které patří do skupin těžkých kovů. Tento pojem (obvykle zahrnující kovy o hustotě větší než 5 g.cm^{-3}) je často používán v souvislosti s diskusemi o nebezpečných látkách v životním prostředí [17]. Někdy je pojem *těžké kovy* nahrazován termínem obecnějším, z hlediska hodnocení toxicity výstižnějším a uváděným též v české legislativě: *rizikové prvky*. Zatímco většina těžkých kovů má značnou toxicitu, některé prvky, jako např. zinek, železo, měď, chrom a kobalt, jsou nezbytné pro metabolické funkce velké skupiny organismů. Ovšem i tyto kovy mohou být toxické, vše závisí na dávce (ambivalentní charakter většiny prvků).

Nebezpečnost těžkých kovů spočívá v jejich tendenci k bioakumulaci [18]. Jestliže množství některého prvku obsaženého v životním prostředí překročí práh jeho biologické snášenlivosti, začínají představovat riziko [19].

Zdroje kovů v půdě

Půda je zdrojem živin pro organismy v ní žijící. Slouží jako zásobárna živin a minerálů, je to ale také dynamické prostředí pro přechod anorganických i organických látek do vody (půdního roztoku) a do rostlin. Proto je zapotřebí sledovat její kvalitu a množství nebezpečných látek v ní obsažených.

Zdroje těžkých kovů v půdě jsou různé. Jsou to zejména přírodní zdroje (geologické podloží a skály), zemědělské zdroje (organická i anorganická hnojiva), průmyslové zdroje (hornictví, haldy, hutnictví), odpadní vody, imise apod. [20-21].

Kadmium

Kadmium je prvek patřící do skupiny těžkých kovů. Přirozeně se vyskytuje v rudách zinku, zvláště v kalamínu a ve sfaleritu. Čistý kadmium je v přírodě velmi vzácný. Kadmátové sloučeniny jsou chemicky velmi podobné sloučeninám zinečnatým, což může znamenat zejména pro rostlinu značné riziko spojené s příjmem Zn, kdy spolu s esenciálním Zn přijímá i vysoce toxický Cd. Člověk je kadmiumu a jeho sloučeninám vystavován poměrně často. Kuřáci (i pasivní) jsou vystaveni vyšším dávkám Cd než nekuřáci, protože je tento prvek obsažen v tabáku [22-23]. Protože se často vyskytuje v minerálních fosforečných hnojivech v množství

závislém na zdroji přírodního fosfátu a použité úpravě [24], může přecházet i do pěstovaných plodin [25].

Na lidský organismus má kadmium negativní vliv. Díky své podobnosti se zinkem jej může nahrazovat v různých enzimech a poškozovat tak jejich strukturu a blokovat děje katalyzované těmito enzymy. Má karcinogenní účinky [26], je genotoxický [27], způsobuje artrózu a akumuluje se v ledvinách, játrech a sítnici [28].

Měď

Měď patří mezi těžké kovy, ale díky svým vlastnostem patří též mezi biogenní prvky. V přírodě se vyskytuje převážně ve sloučeninách (chalkozin, malachit, chalkopyrit atd.), ryzí měď se vyskytuje jen vzácně. Díky své stabilitě v oxidačních stupních Cu^{II} a Cu^{I} , má důležitou roli v buněčné fyziologii [29]. I pro lidský organismus je měď velmi důležitá. Její nedostatek může způsobovat kardiovaskulární onemocnění, diabetes, smrt embrya atd. [30]. Přestože je její význam nevyvratitelný, vysoké koncentrace mědi působí na buňku cytotoxicky, u celé rostliny způsobují stres a celkově ji poškozují [5, 20].

Zinek

Zinek je biogenní prvek, který se v přírodě nejčastěji vyskytuje ve sloučeninách (např. sfalerit). Nebezpečnost zinku pro lidský organismus je velmi malá, riziko nedostatku zinku je vyšší, než intoxikace zinkem. Dlouhodobě vysoké dávky zinku narušují vstřebávání mědi, proto mnoho z jeho toxických účinků je ve skutečnosti kvůli nedostatku mědi. Naopak nedostatek zinku má nepříznivý vliv na růst a vývoj neuronů a na imunitu [31].

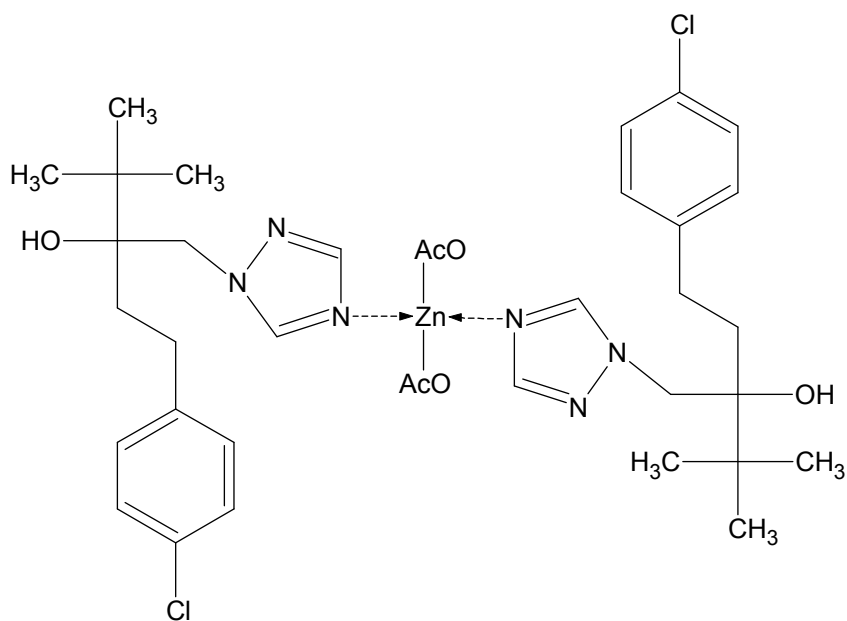
Vápník

Na rozdíl od předchozích kovů vápník nepatří mezi těžké kovy, ale stejně jako např. zinek je vápník prvek esenciální. Díky své vysoké reaktivitě se v přírodě vyskytuje pouze ve sloučeninách, jako je vápenec, dolomit, apatit atd. Pro organismy je nespočetelný. Je základem kostí, zubů, velmi důležitý je pro správnou srdeční činnost [32].

Je to pátý nejhojnější prvek v zemské kůře, čímž se stává významným kationtem schopným vytvářet komplexní sloučeniny [33].

2.2.1 Tvorba komplexů kovů s tebukonazolem

Stabilita a mobilita fungicidů v půdě závisí na mnoha faktorech, jako je např. koncentrace fungicidu a složení půdy [34-35]. Dalším důležitým faktorem může být i tvorba komplexů s kovy přítomnými v půdě. P. D. Evans [36] se zabýval studiem komplexů tebukonazolu s ionty mědi a zinku pomocí rentgenové krystalografie. Zjistil, že v krystalickém stavu vytváří tebukonazol s těmito ionty (M) v přítomnosti acetátu komplexy typu $[M(OAc)_2(1)_2]$. Tebukonazol (**1**) vytváří s iontem koordinační vazbu přes 4-N triazolového kruhu (obrázek 2-2). [36]



Obrázek 2-2 Komplex tebukonazolu s iontem Zn a acetátovými ionty v krystalu.

Studiem komplexů tebukonazolu s ionty mědi se zabývali M. Jakl *et al.* [37] pomocí diferenčně pulzní anodické rozpouštěcí voltametrie (DPASV), a J. J. Dytrtová *et al.* pomocí hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrospojem [38]. Z těchto prací plyne, že tebukonazol s ionty mědi za podmínek pro ESI-MS vytváří několik komplexů, ale v roztoku tvoří pouze komplex $[CuNO_3(1)_2]^+$ (v tomto případě bylo měření prováděno v roztoku $Cu(NO_3)_2$). Stabilita tohoto komplexu je poměrně velká ($\beta = 7,61$) [37]. S kademnatými ionty tebukonazol vytváří také komplexy. Při porovnání AE těchto komplexů je vidět, že komplexy tebukonazolu s kademnatými ionty jsou méně stabilní [39].

2.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (*MS*) je analytická metoda založená na generování iontů analytu, jejich postupná separace podle poměru molární hmotnosti ku nábojovému číslu (m/z) a detekce. Záznamem je tzv. hmotnostní spektrum, které je grafickým znázorněním (relativní) intenzity tvořených iontů v závislosti na m/z . [40]

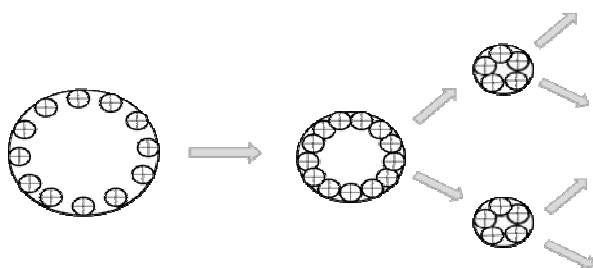
V současné době jsou hmotnostní spektrometry nejčastěji využívány jako detektory. Kromě tohoto jsou velice účinným nástrojem pro studium reakčních mechanismů, struktury molekul a vazeb.

2.3.1 Ionizace elektrosprejem (*ESI*)

Aby bylo možno analyt detekovat, je zapotřebí jej převést na ionty v plynné fázi. K tomu slouží iontové zdroje. Je několik druhů ionizačních technik, které se v zásadě dělí na dvě skupiny: měkké a tvrdé ionizační techniky.

Elektrosprej patří mezi měkké ionizační techniky, což znamená, že nedochází k fragmentaci analytu, ale vznikají protonizované molekuly $[M+H]^+$, adukty s ionty kovů (např. $[M+Na]^+$, nebo deprotonované molekuly $[M-H]^-$) [41]. Díky tomu lze také studovat speciaci analytů v různých matricích [42]. Ve spektru lze také pozorovat více-nabité ionty, díky čemuž je tato ionizační technika vhodná pro studium proteinů, DNA apod.

Principem této metody je tvorba nabitých kapiček, které jsou dále fokusovány do hmotnostního analyzátoru. Nejprve dojde k vytvoření elektroneutrálních kapiček, které jsou následně vlivem silného elektrického pole polarizovány. Tyto již nabité kapičky jsou dále zakoncentrovávány a vlivem narůstajících odpuzivých sil uvnitř (obrázek 2-3) dochází ke Coulombickým explozím, až je aerosol tvořen oddělenými ionty analytů [43]. Efektivita ionizace závisí na průtokové rychlosti vzorku (s rostoucí průtokovou rychlostí efektivita klesá), na teplotě kapiláry, napětí vkládaném na kapiláru, molární hmotnosti analytu (nízká pro nízkomolekulární analyty) atd. [44-46].



Obrázek 2-3 Postupná tvorba elektricky nabitých kapiček, převzato z citace [42]

2.3.2 Iontová past

Další částí hmotnostního spektrometru je analyzátor, v němž dochází k separaci iontů podle náboje. Existuje několik druhů analyzátorů pracujících na různých principech. Liší se také rozlišovací schopností. Iontová past je analyzátor s poměrně malou rozlišovací schopností. Ionty vzniklé v iontovém zdroji jsou zachyceny v elektromagnetickém poli uvnitř iontové pasti, ze které jsou postupně vypuzovány podle jejich m/z [47]. Jeho výhodou je, kromě relativně nízké pořizovací ceny, možnost provádění MS/MS^n analýz. Díky tomu lze pomocí MS studovat např. rozpad komplexních sloučenin, pevnost vazeb apod. K tomuto lze využít kolizí indukovanou disociaci (CID). [48]

2.3.3 Kolizně indukovaná disociace (CID)

K disociaci molekuly dochází z různých důvodů: chemická disociace, disociace nárazem elektronů, fotonů apod. V případě CID se jedná o disociaci iontu s předem určeným m/z (prekurzor), způsobenou nárazem urychlenými molekulami helia (nebo jiného inertního plynu) za podmínek uvnitř hmotnostního spektrometru. To, zda dojde k fragmentaci prekurzoru či nikoliv, závisí na energii srážejících se částic a na pevnosti vazeb. Změřením CID spekter při různých kolizních energiích lze získat energetickou závislost prekurzoru a jeho fragmentů [49]. V průsečíku tečny k sigmoidě vzniklé proložením experimentálně zjištěnými body s osou x lze odečíst hodnotu AE (v %) odpovídající rozpadu prekurzoru. Tuto hodnotu kolizní energie v procentech lze přepočítat na energii v $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ pomocí vztahu:

$$E_{kol} (\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}) = E_{kol} (\%) \cdot (7,3 \pm 0,3) (\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}), \quad (2-1)$$

který byl odvozen pro v této práci použitý hmotnostní spektrometr (iontovou past) [49].

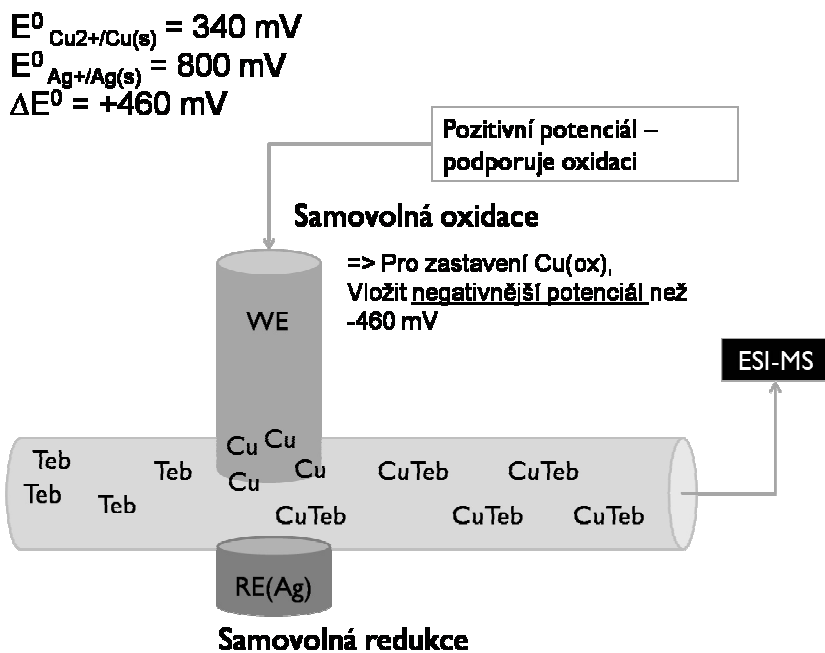
2.4 Stanovení tebukonazolu

Široká oblast použití tebukonazolu (**1**) z něj dělá možný kontaminant životního prostředí, jehož toxicita vzhledem ke kumulativnímu charakteru je významná i ve velmi nízkých množstvích. Pro tyto důvody je zapotřebí vyvíjet co nejcitlivější metody jeho stanovení. V současné době se pro jeho stanovení používají metody jako je *GC a LC (HPLC)* ve spojení s hmotnostní spektrometrií či spektrofotometrií [50]. Další možností využívající vysoké afinity iontů mědi k **1** je jeho stanovení na měděné amalgámové elektrodě [51]. Touto metodou byl také testován stejný půdní roztok kontaminovaný **1** (hodnota stanovená na Cu-amalgamu je srovnatelná s hodnotou zjištěnou pomocí naší metody). Chromatografická stanovení vyžadují zdlouhavé předúpravy vzorků a elektrochemické metody jsou sice vysoce citlivé, ale nedostatečně selektivní pro stanovení **1** ve vzorku obsahujícím více podobných molekul (pesticidů). Spojením elektrochemické metody a hmotnostní spektrometrie jsme se pokusili o další metodu detekce **1**, která je selektivní a nevyžaduje složité předúpravy vzorků.

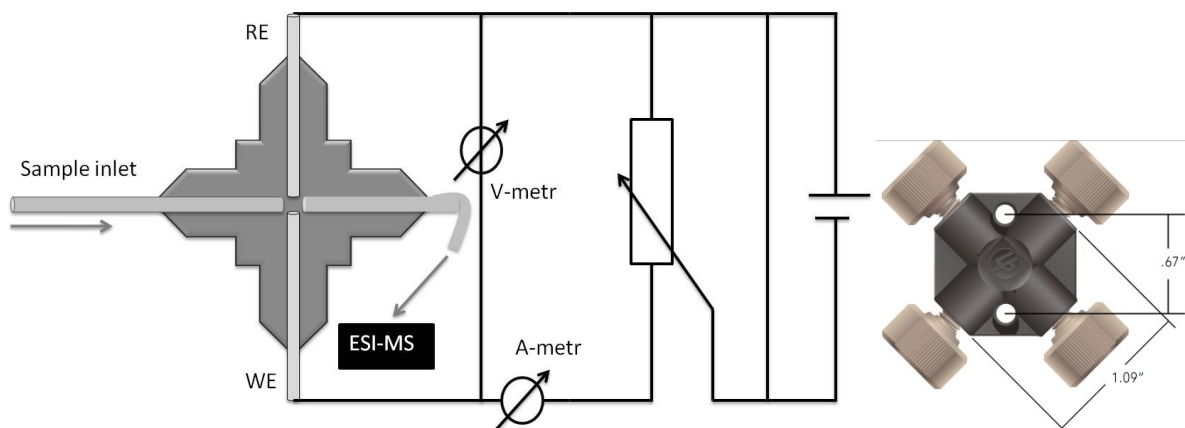
2.4.1 Princip

Metoda vychází ze skutečnosti, že Cu^+ tvoří s tebukonazolem velmi stabilní komplex $[\text{Cu}(\mathbf{1})]^+$, $AE = 224 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Tuto stabilitu podporuje i fakt, že z komplexu nebylo pozorováno odštěpení celé molekuly **1**, ale došlo pouze k odštěpení molekuly vody z molekuly **1**, vazba mědi na triazolový kruh tedy zůstala zachována [38]. Vzhledem k vyšší stabilitě $[\text{Cu}(\mathbf{1})]^+$ než komplexů s ostatními ionty se dá předpokládat, že bude kompetice v tvorbě komplexů *M*/tebukonazol významně posunuta ve prospěch $[\text{Cu}(\mathbf{1})]^+$ komplexů. Tento komplex tedy bude ve vzorku převažovat nad ostatními $[\text{M}^{n+}(\mathbf{1})_x]$ komplexy, protože: (i) koncentrace Cu^+ bude významně vyšší než ostatních kationtů a (ii) stabilita $[\text{Cu}(\mathbf{1})]^+$ je vysoká.

Vzorek analytu protéká elektrochemickou celou, v níž jsou zapojeny dvě elektrody (obrázek 2-5), měděná (během oxidace je elektrodou pracovní, *WE*) a stříbrná (během oxidace je elektrodou referentní, *RE*). Na pracovní elektrodě je vkládán kladný potenciál, čímž dochází ke generování Cu^+ iontů. Při kontaktu analytu s těmito ionty dochází k tvorbě komplexu $[\text{Cu}(\mathbf{1})]^+$ (obrázek 2-4), který je detekován následně pomocí hmotnostního spektrometru.



Obrázek 2-4 Princip tvorby komplexů v elektrochemické celi (vytvořila J. J. Dytrtová.)



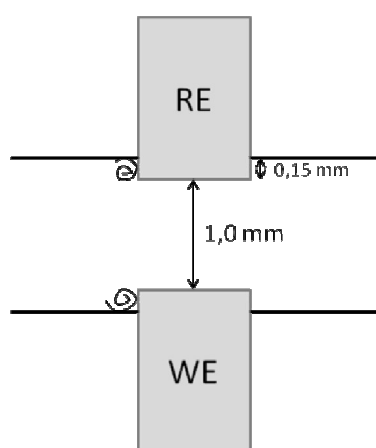
Obrázek 2-5 (a) Schéma zapojení průtokové cely pro generování iontů [52]; (b) Náhled použité cely, převzato z www.idex-hs.com.

2.4.2 Faktory ovlivňující detekci komplexů

K dosažení co nejnižšího limitu detekce je zapotřebí co nejefektivnější tvorba komplexu s ionty generovaného kovu, ale také co nejvyšší citlivost detektoru. Dalším důležitým aspektem je pevnost vazby vytvářeného kationtu s analytem.

Průtoková rychlost

Na efektivitu tvorby komplexu má významný vliv i průtoková rychlost vzorku. Při nízkých průtocích bude doba kontaktu elektrolytu s povrchem elektrody delší, a tudíž bude i větší množství **1** vázáno do komplexu. Na druhou stranu při nižších průtocích bude proudění laminární, tedy na povrchu elektrody nulové. Při nízkých průtocích se také významně uplatní tzv. hydrodynamická hraniční vrstva, která může nabývat i milimetrových rozměrů [53]. Tento problém byl částečně minimalizován použitím elektrod malých průměrů [54] a dále konstrukční úpravou cely, která vedla ke vzniku lokálních turbulencí, které zabezpečovaly míchání roztoku během polarizace elektrod (obrázek 2-6). Turbulentní proudění vzniklé v důsledku překročení hodnoty Reynoldsova čísla pro velmi vysoké průtoky (řádově $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$) nebylo možné využít; je-li proudění příliš rychlé, může se stát, že rychlost spotřebovávání generovaných iontů je vyšší než jejich tvorba, a tudíž komplexace opět nebude efektivní. Proto je potřeba zvolit a experimentálně ověřit jakýsi přechodový průtok.



Obrázek 2-6 Umístění elektrod v cele, vznik turbulencí v místě nerovností [52].

S průtokovou rychlostí je také spojena efektivita ionizace v iontovém zdroji. Obecně platí, že tvorba iontů v elektrospreji je efektivnější, čím je průtok roztoku nižší [45]. Ovšem při velmi nízkých průtocích dochází k ionizaci menšího množství iontů, a přestože je ionizace efektivní, celková intenzita spektra klesá.

Vazba kationtu s analytem

Aby bylo množství komplexu analytu s kationtem generovaným na povrchu elektrody co největší, je, kromě výše zmíněného průtoku, důležitá afinita analytu k danému iontu a pevnost jejich vazby. Bude-li afinita analytu k danému iontu větší než k ostatním iontům přítomným v roztoku, budou se komplexy vytvářet snáze a ve větším množství, a tudíž bude komplexace efektivní.

Pro pevnost vazby platí, že čím bude pevnější, tím více komplexů projde přes iontový zdroj, aniž by došlo k jejich rozpadu.

3 Experimentální část

3.1 Přístroje

Experimenty byly prováděny na hmotnostním spektrometru s iontovou pastí (Thermo Finnigan LCQ Advantage MS System; ThermoFinnigan, USA) se zdrojem elektrospreje s možností polarizace v negativním i pozitivním modu [55]. Nastavení parametrů *ESI*, které nebyly dále optimalizovány pro každý sledovaný kation zvlášť, bylo: průtok pomocného a ochranného plynu: 10–50 arbitrárních jednotek, napětí ve spreji: 5,0 kV.

Vzorek byl dodáván vždy s kontinuálním průtokem ($0,7 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$) z Hamiltonovy stříkačky (Thermo Fisher Scientific, ČR) pomocí lineárního dávkovače (KD Scientific, USA).

Pro elektrochemické generování iontů bylo použito počítačem řízeného polarografického/voltametrického analyzátoru (PC-ETP, Polaro-Sensors, ČR). Ovládací program byl Polar 5.1.

Tělo elektrochemické cely (obrázek 2-5) bylo zhotoveno z fitinkového kříže (P-729 PEEK Cross 0.020" thru-hole with F-300 Fittings, Upchurch Scientific Rheodyne, IDEX Health & Science), jehož efektivní objem byl $0,72 \mu\text{l}$.

Jako elektrody byly použity měděný (průměr 1 mm, Lachema, ČR) a stříbrný (průměr 1 mm, Goodfellow, USA) drát.

3.2 Chemikálie

Methanol (J.T. Barker, HPLC grade)

Deionizovaná voda (Milli Q; $18,2 \text{ M}\Omega$)

Tebukonazol (Pestanal, analytický standard)

AgNO_3 (Aldrich, trace metal basis)

CdCl_2 (Aldrich, trace metal basis)

CuCl_2 (Aldrich, trace metal basis)

ZnCl_2 (Aldrich, trace metal basis)

CaCl_2 (Aldrich, bezvodý, trace metal basis, ampulka 1 g)

Půdní roztok (složení viz tabulka 3-1)

Acetátový pufr (Fluka, $\text{pH} = 4,65$, standardní roztok)

Tabulka 3-1 Množství iontů v půdním roztoku

analyt	Cd	Cu	Pb	Zn	Ca	Mg	K
koncentrace	0,00441	0,0773	0,110	0,196	287	45,4	92,6
	$\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$						

3.3 Příprava roztoků

Z AgNO_3 , CdCl_2 , CuCl_2 , ZnCl_2 byly do odměrných baněk o objemu 50 ml připraveny vodné zásobní roztoky o koncentracích $1\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Z těchto pak byly ředěním připraveny roztoky o koncentracích $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Bezvodý CaCl_2 byl rozpuštěn a kvantitativně převeden do 50 ml odměrné baňky a z něj byl ředěním připraven roztok o koncentraci $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

1 byl rozpuštěn v methanolu a kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 50 ml. Z něj byly postupným ředěním připraveny zásobní roztoky o koncentracích $1\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $1\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

3.4 Určení optimálních parametrů elektrospreje

Optimalizovány byly tyto parametry: teplota kapiláry, napětí vkládané na kapiláru (CV) a tube lense offset (TLO).

Teplota kapiláry byla optimalizována pro jeden druh kationtu (Cd^{2+}) s nejméně stabilními komplexy, ostatní ionty byly měřeny při této hodnotě.

3.4.1 Optimalizace teploty kapiláry

Teplota kapiláry byla optimalizována na ekvimolární směs tebukonazol (**1**) a CdCl_2 , jejichž koncentrace byly $5\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Měření byla provedena ve třech opakováních po třech minutách záznamu pro každou teplotu. Pro vyhodnocení byly použity píky odpovídající komplexům: $[\text{Cd}(\mathbf{1})_4]^{2+}$, $[\text{Cd}(\mathbf{1})_3]^{2+}$, $[\text{Cd}(\mathbf{1})_2]^{2+}$, $[\text{CdCl}(\mathbf{1})_3]^+$, $[\text{CdCl}(\mathbf{1})_2]^+$, $[\text{CdCl}(\mathbf{1})]^+$, $[\text{CdCl}(\mathbf{1})(\mathbf{1-H})]^+$.

Optimální teplota kapiláry byla určena podle vzhledu spektra, tzn. byla určena taková teplota kapiláry, kdy ve spektru nebyly adukty komplexů s rozpouštědlem a relativní

intenzity vybraných komplexů byly co největší (v tomto případě, aby co nejvíce píků mělo relativní intenzitu větší než 25 %).

3.4.2 Optimalizace CV a TLO

Hodnoty CV a TLO byly optimalizovány pro každý sledovaný kation.

Pro každou měřenou kombinaci CV a TLO byl zaznamenán jeden reprezentativní tříminutový záznam, který byl dostačující pro popis průměrného chování konkrétního vzorku, což posloužilo k optimalizaci hodnot CV a TLO.

Optimalizace CV byla prováděna při hodnotě TLO = 0 V, hodnota parametru CV byla měněna krokově po 10 V v intervalu <-120; 120> V, parametr TLO byl optimalizován při hodnotě parametru CV = 0 V.

Jako optimální byly určeny takové hodnoty CV a TLO, při nichž měl největší počet komplexů relativní intenzitu větší než 25 %.

3.5 Určení stability komplexů

Ekvimolární směs **1** a MCl_2 ($M = Zn, Cd, Ca$), nebo $AgNO_3$ ($c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot l^{-1}$) byla zaváděna lineárním dávkovačem ($F = 0,7 \text{ ml} \cdot h^{-1}$) do iontového zdroje hmotnostního spektrometru.

CID spektra byla měřena v tripletech pro komplexy $[MCl(\mathbf{1})_n]^+$, $n = 1, 2$, $[M(\mathbf{1})_m]^{2+}$, $m = 1 - 4$, $[M(\mathbf{1})(\mathbf{1-H})]^+$, protože právě tyto komplexy by se mohly vyskytovat ve vodných roztocích.

Nastavení iontového zdroje: průtok pomocného a ochranného plynu 10-50 arbitrárních jednotek, napětí ve spreji 5,0 kV, $T = 225 \text{ }^\circ\text{C}$, CV a TLO optimální pro jednotlivé směsi (tabulka 3-4).

Měřený rozsah m/z byl od $\frac{1}{3}m/z$ prekurzoru do 1500.

Z grafických závislostí (Příloha 3 – Určení stability komplexů) byly odečteny hodnoty AE v % (tabulka 3-5 až tabulka 3-8) a ty byly dále přepočteny na AE v $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (tabulka 3-9) podle rovnice (2-1).

3.6 Afinita tebukonazolu vůči testovaným kovům

Do Hamiltonovy stříkačky byla připravena směs tebukonazolu (25 obj. %), MCl_2 ($M = Cd, Ca, Zn$) nebo $AgNO_3$ (25 obj. %), $CuCl_2$ (25 obj. %) a methanolu (25 obj. %).

Tato směs byla lineárním dávkovačem ($F = 0,7 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$) přiváděna do iontového zdroje hmotnostního spektrometru.

Nastavení iontového zdroje: průtok pomocného a ochranného plynu 10-50 arbitrárních jednotek, napětí ve spreji 5,0 kV, $T = 225^\circ\text{C}$, $CV = 0 \text{ V}$, $TLO = 0 \text{ V}$. Nebylo možné nastavit parametry CV a TLO tak, aby vyhovovaly všem nabitým iontům ve směsi. Proto aby nedošlo k upřednostňování komplexů jen s některými ionty, měly parametry CV a TLO nulové hodnoty.

Byla zaznamenávána hmotnostní spektra v rozsahu m/z od 300 do 900 po dobu dvou minut.

Za stejných podmínek byly změřeny i směsi tebukonazolu (25 obj. %), MCl_2 ($M = Cd, Ca, Cu, Zn$) nebo $AgNO_3$ (25 obj. %), H_2O (25 obj. %) a methanolu (25 obj. %).

3.7 Stanovení tebukonazolu

3.7.1 Optimalizace průtoku

Do Hamiltonovy stříkačky byla připravena směs **1** (výchozí konc. $1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) (25 obj. %), acetátový pufr (25 obj. %), deionizovaná voda (25 obj. %) a methanol (25 obj. %).

Tato směs byla přiváděna/odváděna do/z elektrochemické cely kapilárou o vnitřním průměru 0,25 mm. Zapojení potenciostatu bylo dvouelektrodové. Jako pracovní elektroda byl zapojen měděný drát, referentní elektrodou byl stříbrný drát, každý o průměru 1 mm. Měřicí režim odpovídal softwarovému nastavení pro anodickou rozpouštěcí voltametrii, kdy klíčovým krokem, který přímo sloužil ke generování Cu iontů, bylo vkládání konstantního potenciálu na Cu elektrodu.

Na měděnou elektrodu v cele byl vkládán kladný potenciál + 700 mV po dobu 300 s. V této době (asi 1,5 min od začátku – v závislosti na průtoku) byla zaznamenávána jednotlivá hmotnostní spektra. Po skončení vkládání konstantního potenciálu (amperometrická část) byl zaznamenán DP -voltamogram od +700 mV do -850 mV při polarizační rychlosti 50 mV/s (obrázek 3-21), který sloužil jako kontrola elektrochemického procesu (pasivace elektrod

apod.). Poté byl elektrodový povrch regenerován vložением záporného potenciálu (-850 mV) na pracovní elektrodu po dobu 200 s.

Měření byla prováděna ve třech opakováních pro každý průtok, spektra byla zaznamenávána v rozsahu m/z od 300 do 430 po dobu 1,5 min. Nastavení elektrospreje bylo optimální pro detekci komplexu $[\text{Cu}(\mathbf{1})]^+$, tj.: sprejovací napětí 5,0 kV, $CV = 105 \text{ V}$, $TLO = 100 \text{ V}$, $T = 250 \text{ }^\circ\text{C}$.

Byla měřena intenzita píku, jehož m/z je 370 (komplex $[\text{Cu}(\mathbf{1})]^+$) a píku s m/z 350 ($[\text{Na}(\text{AcONa})_4]^+$), při různých průtocích. Hodnota 370 byla normalizována (intenzita $370/(350 + 370)$) a vynesena jako závislost normalizované intenzity na průtokové rychlosti (obrázek 3-20).

3.7.2 Optimalizace polarizace Cu elektrody

Do Hamiltonovy stříkačky byla připravena směs **1** (25 obj. %), acetátový pufr (25 obj. %), methanol (25 obj. %), deionizovaná voda (25 obj. %).

Tato směs byla kontinuálně přiváděna do elektrochemické cely, objemový průtok byl $0,45 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$. Stříbrný drát byl zapojen jako referentní elektroda, měděný drát jako pracovní elektroda.

Na pracovní elektrodu byl vkládán akumulací potenciál po dobu 300 s. V této době (asi 1 min od začátku) byla zaznamenávána hmotnostní spektra. Po skončení akumulace byl povrch elektrod regenerován (viz kapitola Optimalizace průtoku).

Pro každou hodnotu vloženého potenciálu byla zaznamenána tři hmotnostní spektra v rozsahu m/z 300 až 430, po dobu 2 minut.

Nastavení elektrospreje bylo optimální pro detekci komplexu $[\text{Cu}(\mathbf{1})]^+$, tj.: sprejovací napětí 5,0 kV, $CV = 105 \text{ V}$, $TLO = 100 \text{ V}$, $T = 250^\circ\text{C}$ [38].

Byla měřena intenzita píku, jehož m/z je 370 (komplex $[\text{Cu}(\mathbf{1})]^+$), píku s m/z 350 ($[\text{Na}(\text{AcONa})_4]^+$) a m/z 414 ($[\text{Ag}(\mathbf{1})]^+$) při různých akumulacích potenciálech. Intenzita píků náležejícím komplexům $[\text{Cu}(\mathbf{1})]^+$ a $[\text{Ag}(\mathbf{1})]^+$ závisela na hodnotě vloženého potenciálu, oproti tomu pík komplexu pocházejícího ze základního elektrolytu $[\text{Na}(\text{AcONa})_4]^+$ byl nezávislý na hodnotě vloženého potenciálu a sloužil jako referentní hodnota, ke které mohlo být měření vztahováno. Hodnoty intenzit píků 370 a 414 byly normalizovány (intenzita píku/ $350 + 370 +$

414)) a vyneseny jako závislost normalizované intenzity na akumulčním potenciálu (obrázek 3-22).

3.7.3 Kalibrační závislost

Byla připravena série kalibračních roztoků o různých koncentracích tebukonazolu (viz tabulka 3-2).

Tyto roztoky byly postupně přiváděny do elektrochemické cely průtokem $0,45 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$. Na měděnou elektrodu byl vložen akumulční potenciál 700 mV. Doba akumulace byla 300 s, záznam hmotnostních spekter byl spuštěn asi minutu po začátku akumulace. Po každém kalibračním roztoku byl povrch měděné elektrody regenerován akumulací při negativním potenciálu -850 mV.

Hmotnostní spektra byla zaznamenávána v rozsahu m/z od 300 do 430 po dobu dvou minut.

Kalibrační závislostí je logaritmus součtu intenzit $[\text{Cu}(\mathbf{1})]^+$ a $[\text{Cu}(\mathbf{1}-\text{C}_4\text{H}_{10})]^+$ na logaritmu koncentrace tebukonazolu.

Z poměru intenzity píku s m/z 370 a šumu v jeho blízkém okolí (S/N) byl určen limit detekce LOD , kdy $S/N \geq 3$ a limit stanovitelnosti, kdy $S/N \geq 10$.

Tabulka 3-2 Složení kalibračních roztoků

c_{teb} ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	V_{teb} (ml)	c'_{teb} ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	V_{AcNa} (ml)	V_{MeOH} (ml)	$V_{\text{H}_2\text{O}}$ (ml)
$5\cdot 10^{-4}$	0,2	$1\cdot 10^{-2}$	1	1,8	1
$2,5\cdot 10^{-4}$	1	$1\cdot 10^{-3}$	1	1	1
$2,0\cdot 10^{-4}$	0,8	$1\cdot 10^{-3}$	1	1,2	1
$1,25\cdot 10^{-4}$	0,5	$1\cdot 10^{-3}$	1	1,5	1
$5\cdot 10^{-5}$	0,2	$1\cdot 10^{-3}$	1	1,8	1
$2,5\cdot 10^{-5}$	1	$1\cdot 10^{-4}$	1	1	1
$1,25\cdot 10^{-5}$	0,5	$1\cdot 10^{-4}$	1	1,5	1
$5\cdot 10^{-6}$	0,2	$1\cdot 10^{-4}$	1	1,8	1
$2,5\cdot 10^{-6}$	1	$1\cdot 10^{-5}$	1	1	1
$1,25\cdot 10^{-6}$	0,5	$1\cdot 10^{-5}$	1	1,5	1
$5\cdot 10^{-7}$	0,2	$1\cdot 10^{-5}$	1	1,8	1
$2,5\cdot 10^{-7}$	0,1	$1\cdot 10^{-5}$	1	1,9	1

3.7.4 Detekce tebukonazolu v půdním roztoku

Do Hamiltonovy stříkačky byla připravena směs půdního roztoku (25 obj. %), acetátového pufru (25 obj. %), a methanolu (50 obj. %).

Takto připravený roztok byl přiváděn do elektrochemické cely rychlostí $0,45\text{ ml}\cdot\text{hod}^{-1}$. Na měděnou elektrodu byl vkládán potenciál 700 mV. Elektrochemicky generované Cu kationty reagovaly s tebukonazolem přítomným ve vzorku, vytvořené komplexy $[\text{Cu}(\mathbf{1})]^+$ byly následně detekovány pomocí *ESI-MS*.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Určení optimálních parametrů elektrospreje

Nastavení parametrů elektrospreje významně ovlivňuje detekci iontů. Optimalizované parametry byly teplota kapiláry, napětí vkládané na kapiláru a tube lense ofset. Volbou vhodné teploty kapiláry (tabulka 4-1) bylo zajištěno, že ve spektru byly stabilní komplexy a byl minimalizován počet aduktů s rozpouštědlem. Kritériem pro porovnání spekter při jednotlivých teplotách kapiláry byl počet komplexů, jejichž relativní intenzita ve spektru je větší než 25%. Při těchto relativních intenzitách již lze jednotlivé komplexy jednoznačně identifikovat. Teplota kapiláry byla optimalizována pouze pro ekvimolární směs tebukonazol + CdCl₂, jelikož komplexy tohoto kovu jsou ze všech studovaných kovů nejméně stabilní.

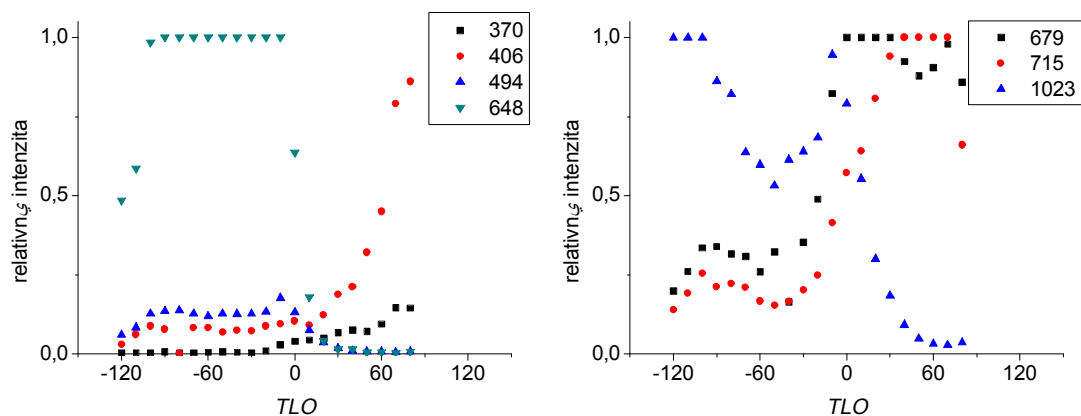
Tabulka 4-1 Relativní intenzity komplexů (v %) při různých teplotách

T (°C)	364	456	517	672	727	763	1069	n
50	57,4	6,3	48,5	67,3	9,7	34,2	100,0	5
75	38,4	5,6	38,3	62,5	9,0	29,4	100,0	5
100	32,1	4,5	36,7	62,1	8,8	27,2	100,0	5
125	20,7	3,6	30,0	63,8	5,1	25,0	100,0	3
150	13,3	3,3	24,1	65,9	7,9	22,5	100,0	2
175	11,7	3,7	24,5	85,7	12,4	28,4	100,0	3
200	7,2	5,6	26,0	100,0	20,5	47,7	96,2	4
225	7,2	12,0	29,6	99,0	34,3	86,2	95,8	5
250	5,2	20,0	22,1	49,7	37,6	100,0	34,3	4
275	4,9	36,1	16,8	26,9	36,2	100,0	6,8	4
300	5,6	57,3	15,0	18,4	52,2	100,0	2,3	3
325	9,0	90,7	14,3	35,4	76,5	99,0	2,1	4

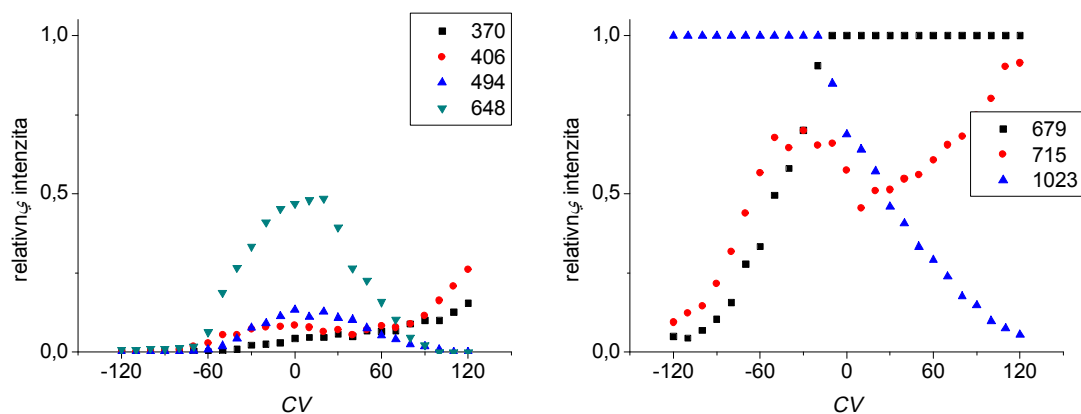
364 – [Cd(1)₂]²⁺, 456 – [CdCl(1)]⁺, 517 – [Cd(1)₃]²⁺, 672 – [Cd(1)₄]²⁺, 727 – [Cd(1)(1-H)]⁺, 763 – [CdCl(1)₂]⁺, 1069 – [CdCl(1)₃]⁺, n – počet komplexů, jejichž relativní intenzita je větší než 25 %.

Grafické závislosti $I_{rel} = f(T)$ a náhledy spekter jsou v Příloze 1 – Optimalizace teploty kapiláry, obrázek 7-1.

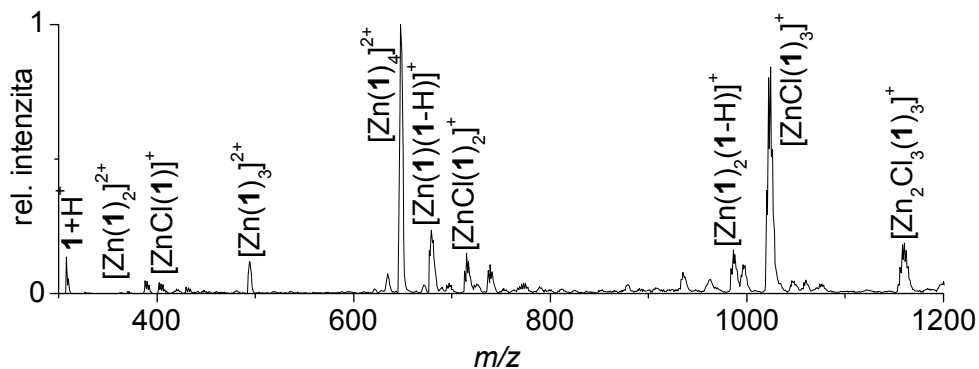
Dalšími parametry bylo CV a TLO, které již byly optimalizovány pro každou směs zvlášť.



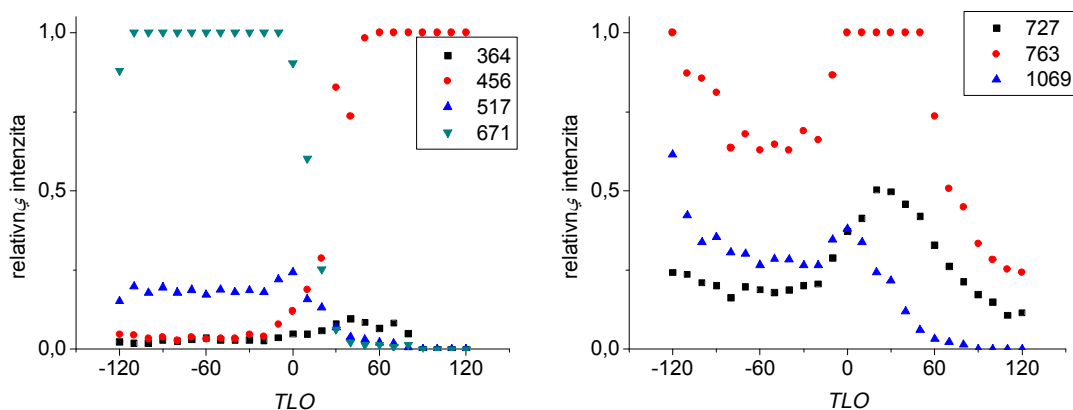
Obrázek 4-1 Závislosti relativních intenzit komplexů na TLO pro směs ZnCl₂ + tebukonazol (**1**); 370 – [Zn(**1**)₂]²⁺, 406 – [ZnCl(**1**)]⁺, 494 – [Zn(**1**)₃]²⁺, 648 – [Zn(**1**)₄]²⁺, 679 – [Zn(**1**)(**1**-H)]⁺, 715 – [ZnCl(**1**)₂]⁺, 1023 – [ZnCl(**1**)₃]⁺, tabulkové vyhodnocení – Příloha 2 – Optimalizace parametrů CV a TLO, tabulka 7-1.



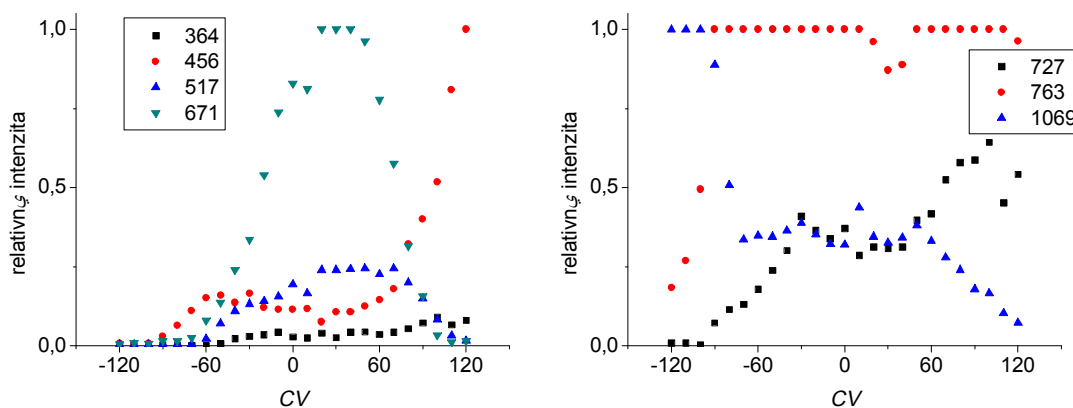
Obrázek 4-2 Závislosti relativních intenzit komplexů na CV pro směs ZnCl₂ + tebukonazol (**1**); 370 – [Zn(**1**)₂]²⁺, 406 – [ZnCl(**1**)]⁺, 494 – [Zn(**1**)₃]²⁺, 648 – [Zn(**1**)₄]²⁺, 679 – [Zn(**1**)(**1**-H)]⁺, 715 – [ZnCl(**1**)₂]⁺, 1023 – [ZnCl(**1**)₃]⁺, tabulkové vyhodnocení – Příloha 2 – Optimalizace parametrů CV a TLO, tabulka 7-2.



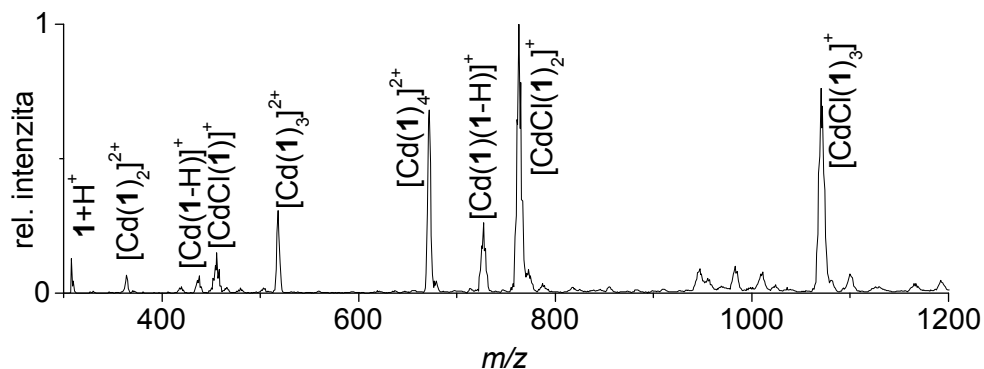
Obrázek 4-3 Hmotnostní spektrum ekvimolární směsi ZnCl_2 + tebukonazol (**1**) ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v rozmezí m/z od 300 do 1200, při optimálním nastavení *ESI*: $T = 225 \text{ }^\circ\text{C}$, $F = 0,7 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$, $CV = 0 \text{ V}$, $TLO = -5 \text{ V}$).



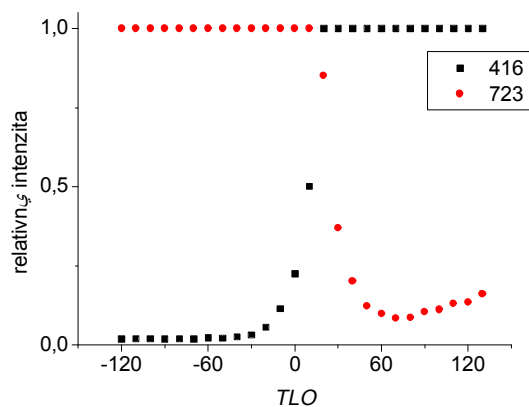
Obrázek 4-4 Závislosti relativních intenzit komplexů na *TLO* pro směs CdCl_2 + tebukonazol (**1**); 364 – $[\text{Cd}(\mathbf{1})_2]^{2+}$, 456 – $[\text{CdCl}(\mathbf{1})]^+$, 517 – $[\text{Cd}(\mathbf{1})_3]^{2+}$, 672 – $[\text{Cd}(\mathbf{1})_4]^{2+}$, 727 – $[\text{Cd}(\mathbf{1})(\mathbf{1}-\text{H})]^+$, 763 – $[\text{CdCl}(\mathbf{1})_2]^+$, 1069 – $[\text{CdCl}(\mathbf{1})_3]^+$; tabulkové vyhodnocení – Příloha 2 – Optimalizace parametrů *CV* a *TLO*, tabulka 7-3.



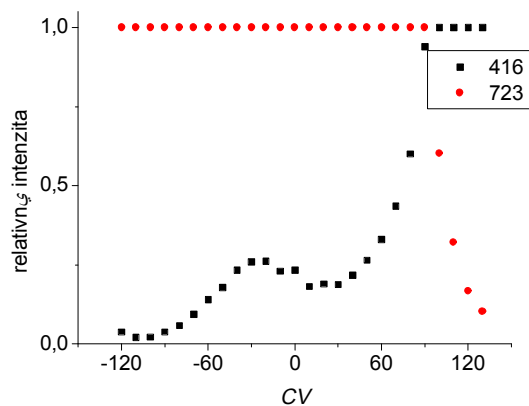
Obrázek 4-5 Závislosti relativních intenzit komplexů na *CV* pro směs CdCl_2 + tebukonazol (**1**); 364 – $[\text{Cd}(\mathbf{1})_2]^{2+}$, 456 – $[\text{CdCl}(\mathbf{1})]^+$, 517 – $[\text{Cd}(\mathbf{1})_3]^{2+}$, 672 – $[\text{Cd}(\mathbf{1})_4]^{2+}$, 727 – $[\text{Cd}(\mathbf{1})(\mathbf{1}-\text{H})]^+$, 763 – $[\text{CdCl}(\mathbf{1})_2]^+$, 1069 – $[\text{CdCl}(\mathbf{1})_3]^+$; tabulkové vyhodnocení – Příloha 2 – Optimalizace parametrů *CV* a *TLO*, tabulka 7-4.



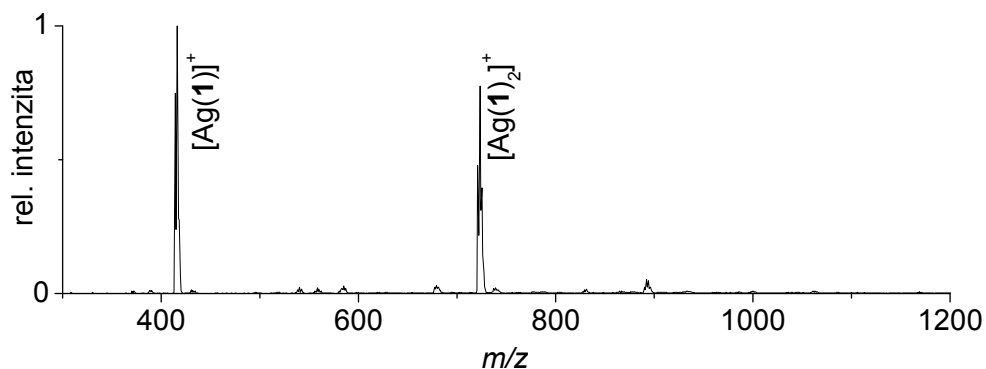
Obrázek 4-6 Hmotnostní spektrum ekvimolární směsi CdCl_2 + tebukonazol (**1**) ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v rozmezí m/z od 300 do 1200, při optimálním nastavení *ESI*: $T = 225 \text{ }^\circ\text{C}$, $F = 0,7 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$, $CV = 10 \text{ V}$, $TLO = 10 \text{ V}$.



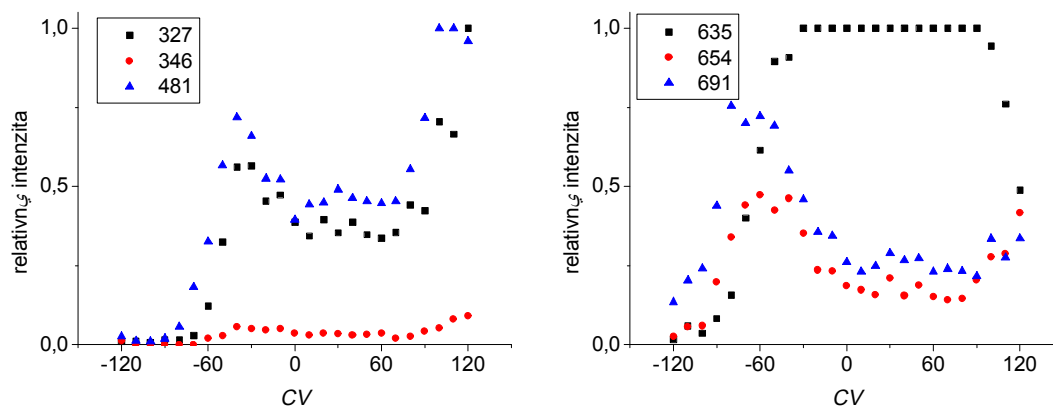
Obrázek 4-7 Závislosti relativních intenzit komplexů na *TLO* pro směs AgNO_3 + tebukonazol (**1**); 416 – $[\text{Ag}(\mathbf{1})]^+$, 723 – $[\text{Ag}(\mathbf{1})_2]^+$



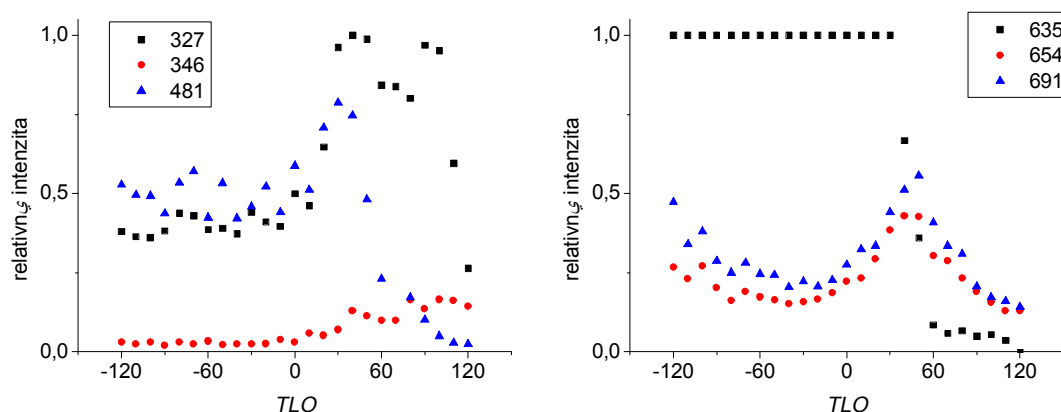
Obrázek 4-8 Závislosti relativních intenzit komplexů na *CV* pro směs AgNO_3 + tebukonazol (**1**); 416 – $[\text{Ag}(\mathbf{1})]^+$, 723 – $[\text{Ag}(\mathbf{1})_2]^+$



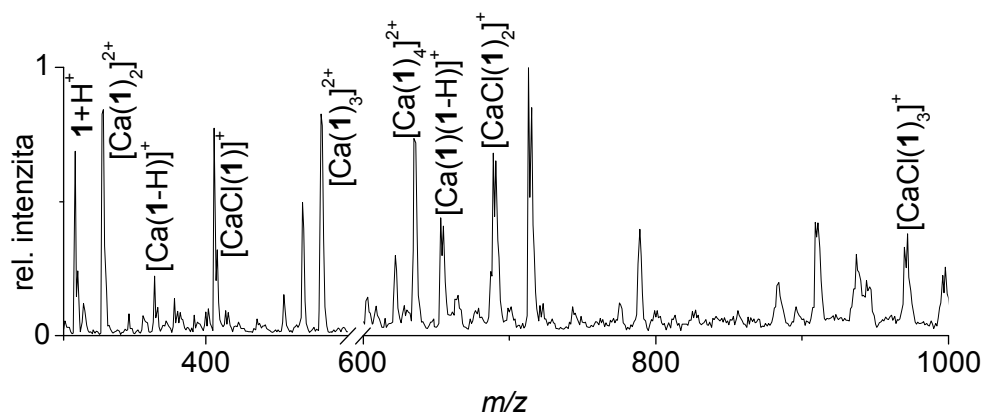
Obrázek 4-9 Hmotnostní spektrum ekvimolární směsi AgNO_3 + tebukonazol (**1**) ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v rozmezí m/z od 300 do 1200, při optimálním nastavení *ESI*: $T = 225 \text{ }^\circ\text{C}$, $F = 0,7 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$, $\text{CV} = 90 \text{ V}$, $\text{TLO} = 10 \text{ V}$).



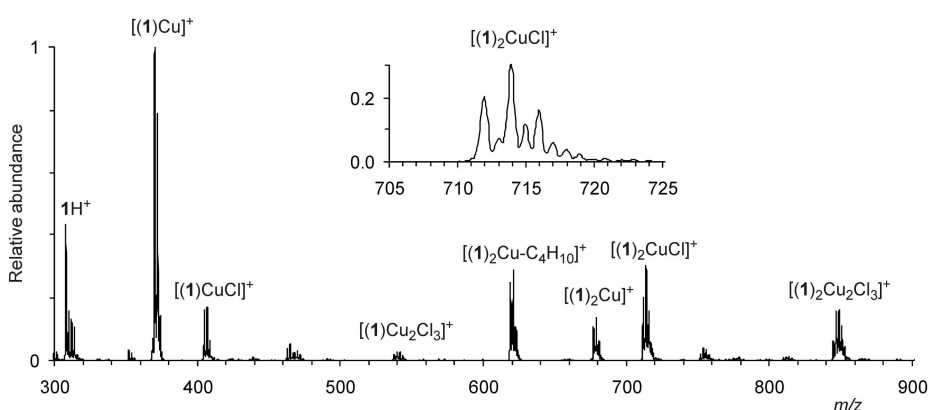
Obrázek 4-10 Závislosti relativních intenzit komplexů na CV pro směs CaCl_2 + tebukonazol (**1**); 327 – $[\text{Ca}(\mathbf{1})_2]^{2+}$, 346 – $[\text{CaCl}(\mathbf{1})]^+$, 481 – $[\text{Ca}(\mathbf{1})_3]^{2+}$, 635 – $[\text{Ca}(\mathbf{1})_4]^{2+}$, 654 – $[\text{Ca}(\mathbf{1})(\mathbf{1}\text{-H})]^+$, 691 – $[\text{CaCl}(\mathbf{1})_2]^+$, tabulkové vyhodnocení – Příloha 2 – Optimalizace parametrů CV a TLO, tabulka 7-5.



Obrázek 4-11 Závislosti relativních intenzit komplexů na TLO pro směs CaCl_2 + tebukonazol (**1**); 327 – $[\text{Ca}(\mathbf{1})_2]^{2+}$, 346 – $[\text{CaCl}(\mathbf{1})]^+$, 481 – $[\text{Ca}(\mathbf{1})_3]^{2+}$, 635 – $[\text{Ca}(\mathbf{1})_4]^{2+}$, 654 – $[\text{Ca}(\mathbf{1})(\mathbf{1}\text{-H})]^+$, 691 – $[\text{CaCl}(\mathbf{1})_2]^+$, tabulkové vyhodnocení – Příloha 2 – Optimalizace parametrů CV a TLO, tabulka 7-6.



Obrázek 4-12 Hmotnostní spektrum ekvimolární směsi CaCl_2 + tebukonazol (**1**) ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v rozmezí m/z od 300 do 1200, při optimálním nastavení *ESI*: $T = 225 \text{ }^\circ\text{C}$, $F = 0,7 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$, $CV = -30\text{V}$, $TLO = 20 \text{ V}$.



Obrázek 4-13 Hmotnostní spektrum ekvimolární směsi CuCl_2 + tebukonazol (**1**) ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v rozmezí m/z od 300 do 900, převzato z Dyrtrtová *et al.* [38]

Tabulka 4-2 Optimalizované parametry *CV* a *TLO* pro jednotlivé směsi

parametr	Ca + (1)	Cd + (1)	Ag + (1)	Zn + (1)
CV (V)	-30	10	90	0
TLO (V)	20	10	10	-5

Stejně jako byla optimalizována teplota byl hlavním kritériem pro porovnávání spekter počet komplexů s relativní intenzitou větší než 25%. Ve většině případů pak tomuto kritériu odpovídalo větší množství nastavení parametrů, proto bylo také přihlédnuto k absolutní intenzitě spektra a zvoleno bylo to, jehož absolutní intenzita byla nejvyšší.

Optimální parametry *CV* a *TLO* pro komplexy **1** s kadmnatými ionty jsou: $CV = 10 \text{ V}$, $TLO = 10 \text{ V}$ (obrázek 4-6), se zinečnatými ionty: $CV = 0 \text{ V}$, $TLO = -5 \text{ V}$ (obrázek 4-3), se

stříbrnými ionty: $CV = 90 \text{ V}$, $TLO = 10 \text{ V}$ (obrázek 4-9), s vápenatými ionty: $CV = -30 \text{ V}$, $TLO = 20 \text{ V}$ (obrázek 4-12).

Z hmotnostních spekter změřených při optimálních nastaveních *ESI* pro jednotlivé směsi je patrné, že **1** vytváří s dvojmocnými kovy podobné komplexy, jejichž obecná struktura je: $[MCl(\mathbf{1})_k]^+$, $k = 1 - 3$, $[M(\mathbf{1})_m]^{2+}$, $m = 1 - 4$, $[M(\mathbf{1})_n(\mathbf{1-H})]^+$, $n = 1, 2$. Ve spektru pro směs **1** s vápenatými ionty (obrázek 4-12) lze pozorovat velké množství dalších komplexů. Jedná se o adukty s rozpouštědlem, které jsou natolik stabilní, že nebyly eliminovány ani vysokou teplotou kapiláry. Tvorbu hydratovaných komplexů $Ca/\mathbf{1}$ lze přisoudit hydrofilní povaze Ca kationtu. Lze je pozorovat také v *CID* spektrech pro jednotlivé komplexy (obrázek 7-5).

4.2 Určení stability komplexů (kolizně indukovaná disociace, *CID*)

Stabilitou komplexů **1** s ionty kovů je v tomto případě myšlena pevnost nejslabší vazby, tedy té, jež bude jako první disociovat. Energie potřebná k disociaci takovéto vazby byla zjištěna změřením *CID* spekter (kapitola 2.3.3) pro vybrané komplexy. Všechna měření byla prováděna ve třech opakováních. Relativní směrodatné odchylky jednotlivých měření jsou v naprosté většině pod 1 % (tabulka 4-3 až tabulka 4-6), lze proto říct, že měření bylo velmi přesné. Porovnáním stabilit komplexů jednotlivých kovů (tabulka 4-7) bylo zjištěno, že:

- nejstabilnější komplexy vytváří **1** s ionty mědi.
- nejstabilnějším typem komplexu je $[M(\mathbf{1})]^+$.

Tabulka 4-3 Vyhodnocení *CID* spekter pro ekvimolární směs $ZnCl_2$ a tebukonazolu (**1**); hodnoty odečtených *AE* jsou uvedeny v %

komplex	měření			medián	<i>SD</i>	<i>RSD</i> (%)
	1	2	3			
$[Zn(\mathbf{1})_2]^{2+}$	15,00	15,90	16,25	15,90	0,53	3,31
$[Zn(\mathbf{1-H})]^+$	29,40	29,55	29,85	29,55	0,19	0,63
$[ZnCl(\mathbf{1})]^+$	14,45	14,60	14,85	14,60	0,16	1,13
$[Zn(\mathbf{1})_3]^{2+}$	17,65	17,40	17,55	17,55	0,10	0,59
$[Zn(\mathbf{1})_4]^{2+}$	18,60	18,40	18,60	18,60	0,09	0,51
$[Zn(\mathbf{1})(\mathbf{1-H})]^+$	29,80	30,05	30,10	30,05	0,13	0,44
$[ZnCl(\mathbf{1})_2]^{1+}$	22,50	22,30	22,30	22,30	0,09	0,42

Tabulka 4-4 Vyhodnocení *CID* spekter pro ekvimolární směs CdCl_2 a tebukonazolu (**1**); hodnoty odečtených *AE* jsou uvedeny v %

komplex	měření			medián	<i>SD</i>	<i>RSD</i> (%)
	1	2	3			
$[\text{Cd}(1)_2]^{2+}$	17,50	17,65	17,50	17,50	0,07	0,40
$[\text{Cd}(1\text{-H})]^+$	27,15	27,40	27,25	27,25	0,10	0,38
$[\text{Cd}(1)_3]^{2+}$	16,15	16,20	16,20	16,20	0,02	0,15
$[\text{Cd}(1)_4]^{2+}$	18,15	18,05	18,30	18,15	0,10	0,57
$[\text{Cd}(1)(1\text{-H})]^+$	25,85	25,65	25,70	25,70	0,08	0,33
$[\text{CdCl}(1)_2]^+$	20,20	20,45	20,40	20,40	0,11	0,53

Tabulka 4-5 Vyhodnocení *CID* spekter pro ekvimolární směs AgNO_3 a tebukonazolu (**1**); hodnoty odečtených *AE* jsou uvedeny v %

komplex	měření			medián	<i>SD</i>	<i>RSD</i> (%)
	1	2	3			
$[\text{Ag}(1)]^+$	29,60	29,60	29,50	29,60	0,05	0,16
$[\text{Ag}(1)_2]^+$	21,10	21,10	21,20	21,10	0,05	0,22

Tabulka 4-6 Vyhodnocení *CID* spekter pro ekvimolární směs CaCl_2 a tebukonazolu (**1**); hodnoty odečtených *AE* jsou uvedeny v %.

komplex	měření			medián	<i>SD</i>	<i>RSD</i> (%)
	1	2	3			
$[\text{Ca}(1)_2]^{2+}$	18,55	18,60	18,55	18,55	0,02	0,13
$[\text{Ca}(1\text{-H})]^+$	21,40	21,20	21,40	21,4	0,09	0,44
$[\text{CaCl}(1)]^+$	21,90	21,75	21,70	21,75	0,08	0,39
$[\text{Ca}(1)_3]^{2+}$	15,60	15,50	15,40	15,5	0,08	0,53
$[\text{Ca}(1)_4]^{2+}$	15,45	15,60	15,50	15,5	0,06	0,40
$[\text{Ca}(1)(1\text{-H})]^+$	21,90	21,90	21,70	21,9	0,09	0,43
$[\text{CaCl}(1)_2]^+$	20,60	20,30	20,30	20,3	0,14	0,70

Tabulka 4-7 Souhrné hodnoty $AE(\pm SD)$ v $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ pro komplexy všech kovů

Komplex/kov (<i>M</i>)	<i>AE</i> ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)				
	Cd	Zn	Ag	Ca	Cu*
$[M(1)]^{n+}$	-	-	216±9	-	224
$[M(1)_2]^{n+}$	128±5	116±6	154±6	135±6	212
$[M(1)_3]^{2+}$	118±5	128±5	-	113±5	-
$[M(1)_4]^{2+}$	133±6	136±6	-	113±5	-
$[MCl(1)]^+$	-	107±5	-	159±7	138
$[MCl(1)_2]^+$	149±6	163±7	-	148±6	137
$[M(1-H)]^+$	199±8	216±9	-	156±7	-
$[M(1)(1-H)]^+$	188±8	219±9	-	160±7	-

n – pro Cd, Ca a Zn, *n* = 2, pro Ag a Cu *n* = 1,

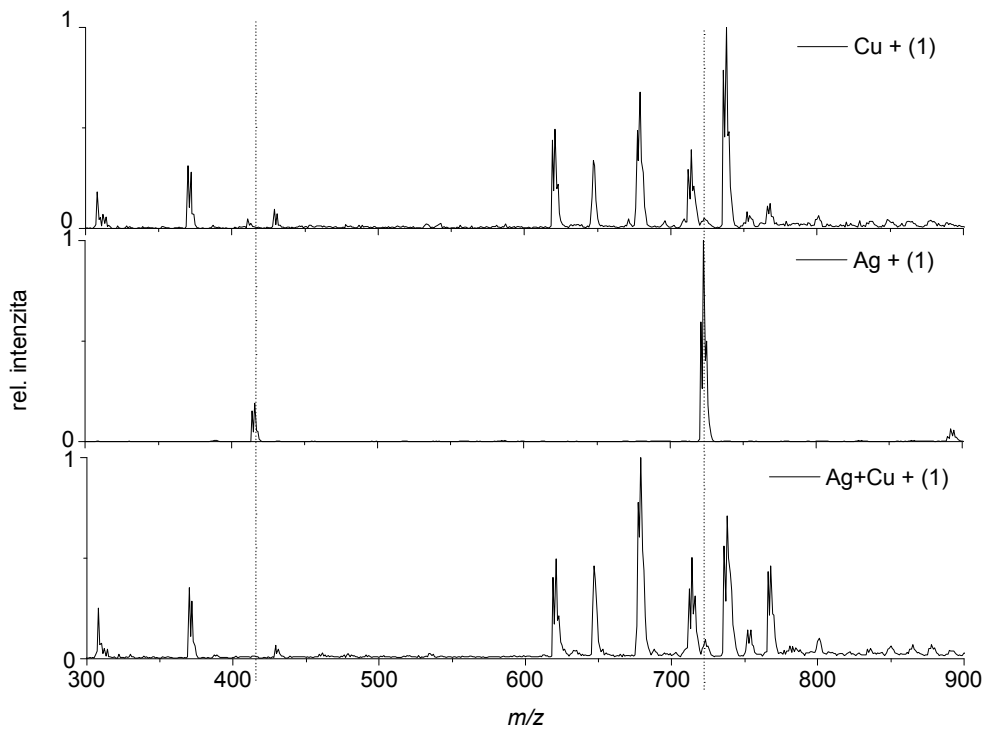
*Převzato z Dytrtová *et al.* 2011 [38]

Z hlediska dalšího využití tvorby komplexů jsou pro nás nejvýznamnější ty nejjednodušší komplexy, které **1** s ionty kovů vytváří, tj. $[M(1-H)]^+$, popř. $[M(1)]^+$. V případě nejstabilnějších komplexů (Ag^+ , Cu^+) dochází při srážkách s vysoce energetickými molekulami pouze k odštěpování vody. U ostatních komplexů již dochází k disociaci vazeb ve struktuře **1** (obrázek 7-3 až obrázek 7-7).

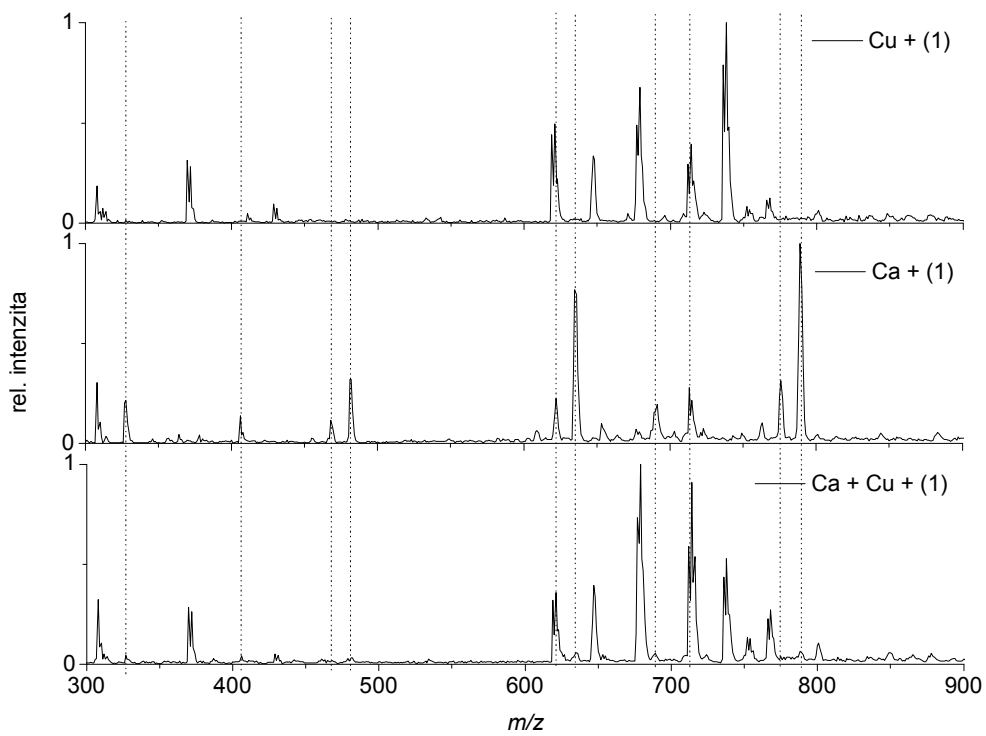
U komplexů s větším počtem ligandů již nedochází k disociaci vazeb ve struktuře **1**, ale dochází k disociaci vazby mezi centrálním atomem a **1**, za současného odštěpení protonu ze zbylého ligandu.

4.3 Afinita tebukonazolu

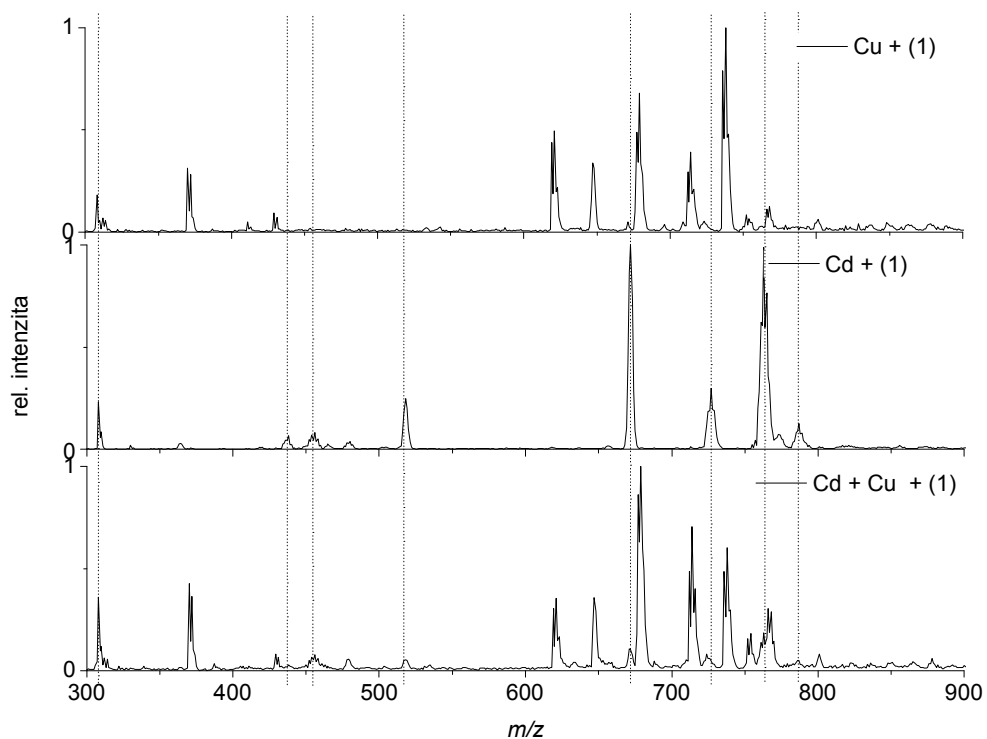
Jednou z podmínek pro stanovení **1** metodou popsanou v kapitole 2.4, byla největší afinita **1** ke generovaným kationtům. A protože nejstabilnější komplexy (další podmínka) tvoří **1** s ionty mědi, byla porovnávána afinita **1** s ionty mědi s ostatními studovanými ionty. Aby bylo možno spektra co nejobektivněji porovnat a nedocházelo k upřednostňování některých komplexů, bylo zvoleno jednotné nastavení parametrů *ESI* ($CV = 0 \text{ V}$, $TLO = 0 \text{ V}$), při kterém byly proměřeny všechny směsi. Při porovnání spekter směsí **1** + Cu^{2+} + M^{n+} , **1** + Cu^{2+} , **1** + M^{n+} (obrázek 4-14 až obrázek 4-17) je jasně vidět, že největší afinitu má **1** k iontům mědi. Ve všech případech ve spektru směsí významně převládají komplexy **1** s mědí.



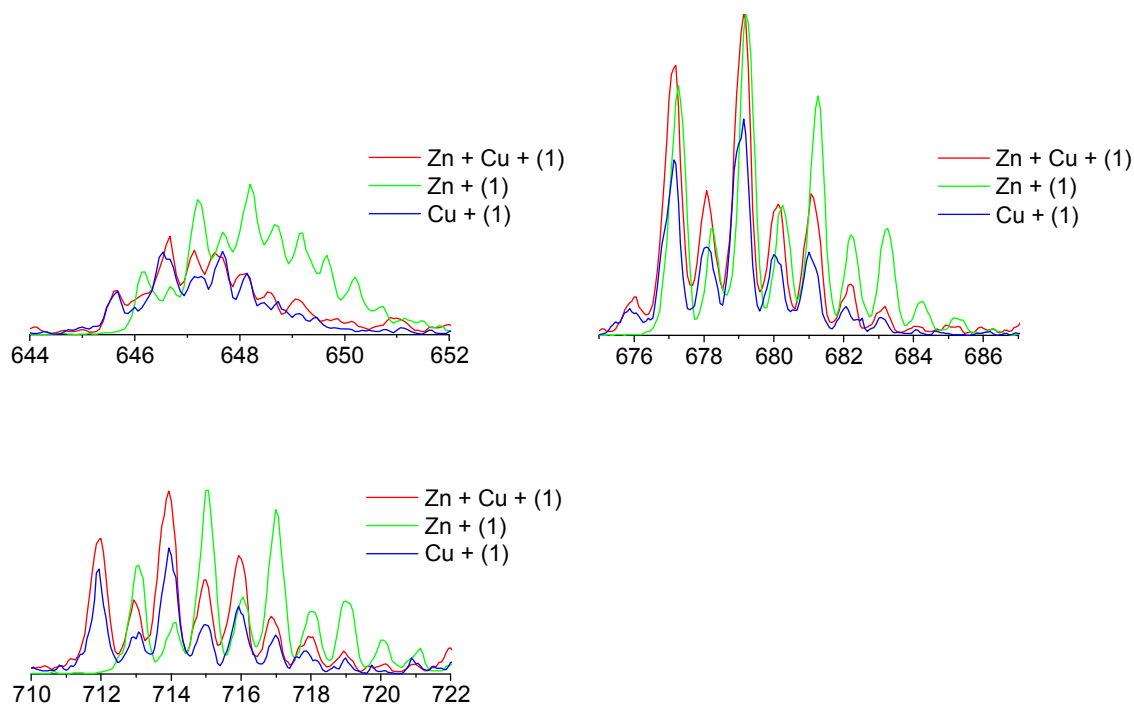
Obrázek 4-14 Hmotnostní spektra ekvimolárních směsí ($c = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) tebukonazolu (**1**), AgNO_3 a CuCl_2 (viz popisky).



Obrázek 4-15 Hmotnostní spektra ekvimolárních směsí ($c = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) tebukonazolu (**1**), CaCl_2 a CuCl_2 (viz popisky).



Pro směs $\text{Cu}^{2+} + \text{Zn}^{2+} + \mathbf{1}$ je potřeba podrobnějšího rozboru izotopového paternu některých komplexů, protože komplexy $[\text{Zn}(\mathbf{1})_4]^{2+}$ a $[\text{Cu}(\mathbf{1})_4]^+$, $[\text{Zn}(\mathbf{1})(\mathbf{1}-\text{H})]^+$ a $[\text{Cu}(\mathbf{1})_2]^+$, $[\text{ZnCl}(\mathbf{1})_2]^+$ a $[\text{CuCl}(\mathbf{1})_2]^+$ mají blízké m/z (obrázek 4-18). Po podrobnějším prozkoumání je vidět, že i v této směsi dochází přednostně k tvorbě komplexů tebukonazolu s ionty mědi, paterny ze smíšeného záznamu (tj. $\text{Zn} + \text{Cu} + \mathbf{1}$) jsou identické s paterny ze záznamu pouze s mědí (tj. $\text{Cu} + \mathbf{1}$).



Obrázek 4-18 Izotopové paterny komplexů s blízkým m/z ve směsi $\text{Cu}^{2+} + \text{Zn}^{2+} + \text{tebukonazol}(\mathbf{1})$

Díky těmto výsledkům lze říci, že byl ověřen základní předpoklady pro nově navrhovanou a testovanou metodu stanovení $\mathbf{1}$, tj.:

- vysoké afinity Cu k $\mathbf{1}$,
- vysoké stability Cu + $\mathbf{1}$ komplexů.

4.4 Stanovení tebukonazolu

V matrici půdního roztoku není možné stanovovat přímo rozpuštěný $\mathbf{1}$, protože tvoří s kationty více, či méně stabilní komplexy. Tímto je celkové množství $\mathbf{1}$ rozptýleno mezi jeho jednotlivé specie, což znemožňuje jeho přímé stanovení. Pro stanovení $\mathbf{1}$ je proto dále

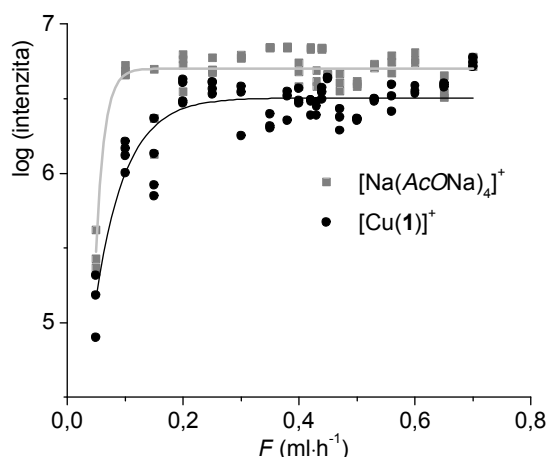
využito zjištěné skutečnosti, že má zvýšenou afinitu k Cu (oproti jiným běžně se vyskytujícím kationtům) a tvoří s ní velmi stabilní komplexy.

Pro stanovení metodou přímého vzorkování s detekcí komplexů **1** s amperometricky generovanými ionty mědi byl optimalizován potenciál vkládaný na elektrodu generující ionty. Dále pak byla optimalizována průtoková rychlost [52]. Proměřením kalibrační závislosti byl určen lineární dynamický rozsah, limit detekce (*LOD*) a limit stanovitelnosti (*LOQ*).

4.4.1 Optimalizace průtokové rychlosti

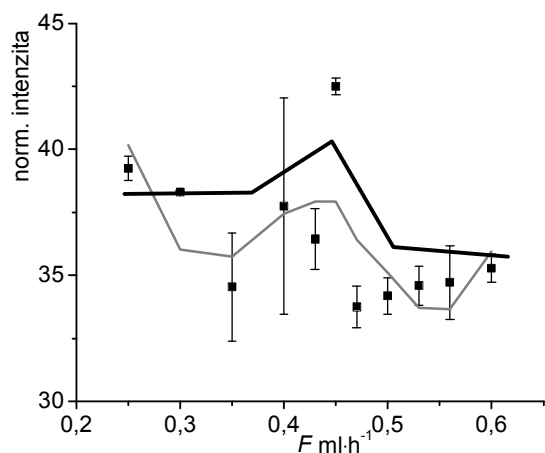
Na množství vzniklých komplexů má významný vliv průtoková rychlost (kapitola 2.4.2). Ve spojení s hmotnostním spektrometrem je jí potřeba optimalizovat, protože při nízkých průtocích je efektivita tvorby komplexů nízká, jakož i při příliš vysokých rychlostech. Ionizace analytu v iontovém zdroji je neúčinnější při nízkých průtocích [45].

Obrázek 4-19 ukazuje závislost logaritmu intenzity $[\text{Cu}(\mathbf{1})]^+$, jehož velikost je závislá na efektivitě elektrodové reakce ($\text{Cu}^0 \rightarrow \text{Cu}^{2+}$) a přítomném množství $[\text{Na}(\text{AcONa})_4]^+$, který pochází ze základního elektrolytu a není závislý na průběhu elektrodové reakce. Z obrázku 4-19 je patrné, že již průtok $0,2 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$ poskytuje signál dostatečné intenzity. Nejvyšší intenzita $[\text{Cu}(\mathbf{1})]^+$ vztažená k intenzitě $[\text{Na}(\text{AcONa})_4]^+$ byla získána pro průtok $0,45 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$. Proto se tato hodnota zdála být optimální.

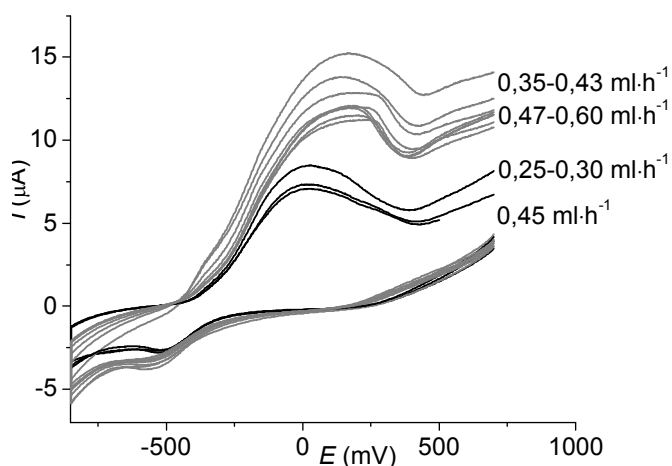


Obrázek 4-19 Závislost logaritmu intenzity $[\text{Cu}(\mathbf{1})]^+$ a intenzity $[\text{Na}(\text{CH}_3\text{AcONa})_4]^+$ na rychlosti průtoku vzorku.

Výsledný signál $[\text{Cu}(\mathbf{1})]^+$ je tedy ovlivněn zejména (i) efektivitou elektrodové reakce, která je vyšší při nízkých průtocích, a (ii) množstvím prošlého vzorku; s vyšším průtokem stoupá i intenzita. Tento trend je patrný i z obrázku 4-20.



Obrázek 4-20 Závislost normalizované intenzity $[\text{Cu}(\mathbf{1})]^+$ na průtoku vzorku.



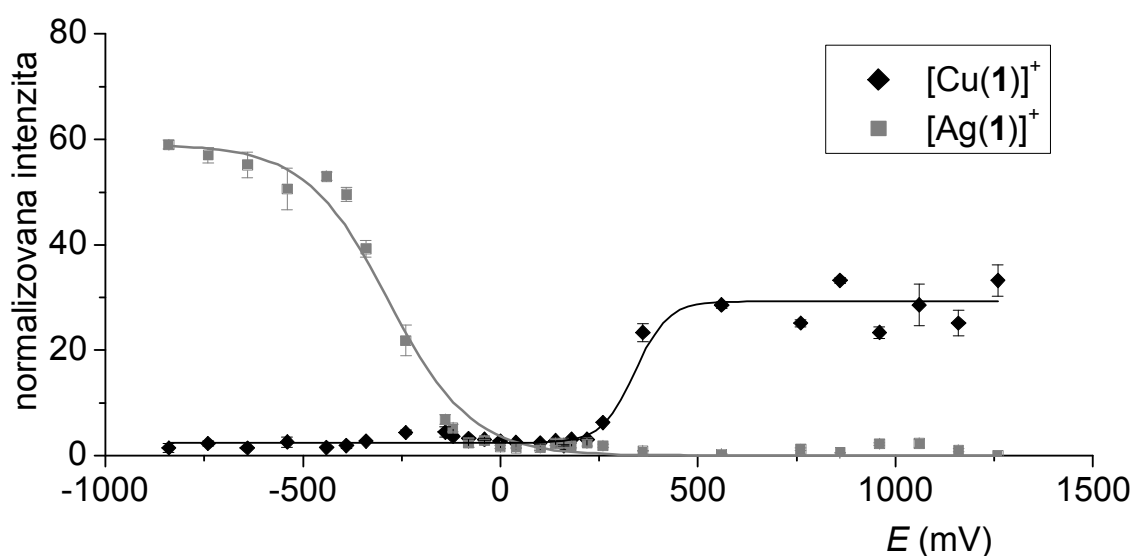
Obrázek 4-21 Voltamogramy 700 až -850 mV pořízené při různých průtocích vzorku. Polarizační rychlost 50 mV s^{-1} .

Na získaných voltamogramech (obrázek 4-21) je patrné, že se zvyšujícím se průtokem vzorku klesá redukční pík (při -500 mV), což potvrzuje předpoklad (i). Oproti tomu situace během oxidace není na první pohled jednoznačná. Při průtocích do $0,3 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$ je okolo potenciálu 0 mV patrný pík. Se zvyšujícím se průtokem (nad $0,35 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$) tento pík narůstá, mění svůj tvar (zdá se, že obsahuje více než jeden pík) a posouvá se ke kladnějším potenciálům. Pro průtok $0,45 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$ se tvar oxidačního píku blíží tvaru píku získaného při nízkých průtocích. Tímto tedy byla ověřena experimentálně vhodnost průtoku $0,45 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$.

Přičemž toto je hodnota z intervalu vypočítaného optimálního průtoku pro daný objem cely. (Převzato z Dyrťová *et al.* [52])

4.4.2 Optimalizace polarizace Cu elektrody

Dalším faktorem ovlivňujícím množství vzniklých komplexů **1** s generovanými ionty je množství vygenerovaných iontů. Toto úzce souvisí s potenciálem vloženým na generující elektrodu. V systému dvou elektrod – měděné a stříbrné dochází i při nulovém vloženém potenciálu k spontánní oxidaci měděné elektrody. Je nutno podotknout, že Ag-elektroda není ideální referentní elektrodou (není nepolarizovatelná), proto hodnota vkládaného potenciálu nemusí být plně totožná s potenciálem skutečným. Z tohoto důvodu byl zvolen potenciál kladnější než 500 mV. Při nižších potenciálech dochází k oxidaci stříbrné elektrody. Obrázek 4-22 zobrazuje závislost normalizovaných intenzit komplexů tebukonazolu s generovanými ionty na vloženém potenciálu. Lze z něj usoudit, že by pro detekci a stanovení byly vhodnější komplexy se stříbrnými ionty. Je potřeba si ovšem uvědomit, že **1** má výrazně větší afinitu k iontům mědi, které se běžně vyskytují ve většině roztoků. V případě generování stříbrných iontů by nedošlo k vyvážení analytu z jeho specií s mědí (v půdním roztoku běžné přítomné) ve prospěch žádaných produktů a metoda by nebyla plně aplikovatelná. Tedy přestože intenzita komplexů se stříbrnými ionty je vyšší (což souvisí s větší $M_r(\text{Ag})$), pro detekci jsou vhodnější komplexy s ionty mědi.

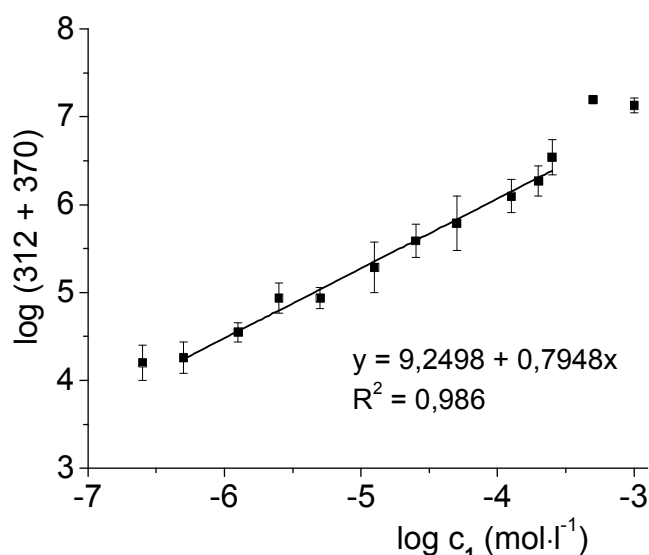


Obrázek 4-22 Závislost normalizované intenzity tebukonazolu (**1**) na potenciálu vkládaném na elektrody

Z průběhu závislosti normalizované intenzity $[\text{Cu}(\mathbf{1})]^+$ na vloženém polarizačním potenciálu je vidět, že vhodný potenciál je od 500 mV a výše. Jako optimální potenciál byl vybrán potenciál +700 mV.

4.4.3 Kalibrační závislost

Aby byla navržená metoda (kapitola 2.4) použitelná pro stanovení koncentrace $\mathbf{1}$, je zapotřebí lineární koncentrační odezva. Protože se ve spektru pro komplexy $\mathbf{1}$ s generovanými ionty mědi vyskytují dva takovéto komplexy ($[\text{Cu}(\mathbf{1})]^+$ a $[\text{Cu}(\mathbf{1}-\text{C}_4\text{H}_{10})]^+$), byla kalibrační závislost pro stanovení $\mathbf{1}$ vynesena jako logaritmus součtu intenzit těchto dvou komplexů. Druhý komplex ($[\text{Cu}(\mathbf{1}-\text{C}_4\text{H}_{10})]^+$) je pravděpodobně fragment vzniklý při kontaktu $\mathbf{1}$ s elektrodou, protože se v CID spektru Cu a $\mathbf{1}$ nevyskytuje [38].

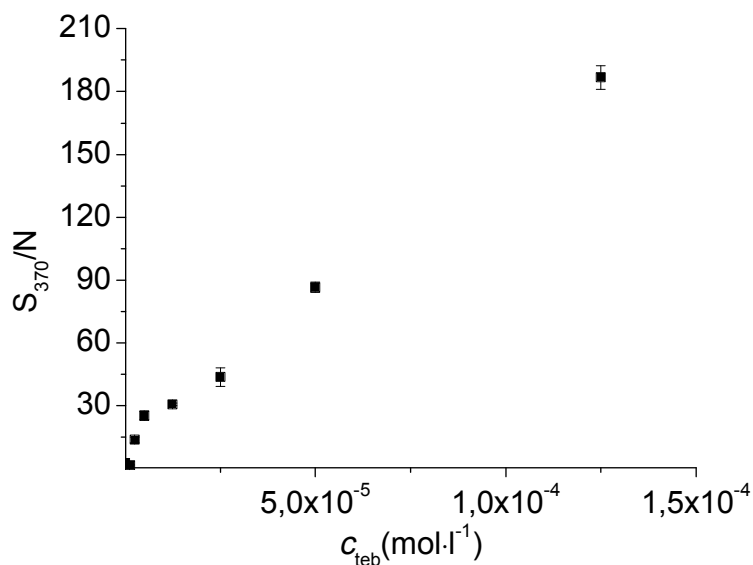


Obrázek 4-23 Kalibrační závislost tebukonazolu ($\mathbf{1}$), převzato z [56].

Lineární oblast v koncentrační závislosti umožňuje kvantifikaci analytu v rozsahu koncentrací $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ až $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Limit stanovitelnosti této metody je $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ($S_{370}/N = 13$, obrázek 4-24). Detekční limit je $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Tyto limity lze ovšem ještě snížit delší dobou záznamu hmotnostního spektra.

Limit detekce této metody je obdobný jako jsou limity detekce dnes běžně používaných metod stanovení $\mathbf{1}$. Nicméně předností tohoto postupu oproti

chromatografickým [57] metodám je (i) nižší pořizovací cena elektrochemické cely, (ii) nižší čas nutný pro analýzu a (iii) nižší mez detekce.



Obrázek 4-24 Koncentrační závislost poměru signálu píku 370 k šumu v jeho okolí (S_{370}/N)

4.4.4 Detekce tebukonazolu v půdním roztoku

Představená metoda má být využitelná především pro detekci **1** (komplexu tebukonazolu s mědí) ve velmi komplexních matricích, jako je půdní roztok. Pro měření tebukonazolu v půdním roztoku byl použit půdní roztok odebraný pomocí půdních sond [58] z nádobového pokusu s penízkem modravým (*Thlaspi caerulescens* J. et C. Presl, obrázek 4-25), který byl preventivně ošetřen proti napadení plísňovým onemocněním suspenzí tebukonazolu (přípravek HORIZON 250,

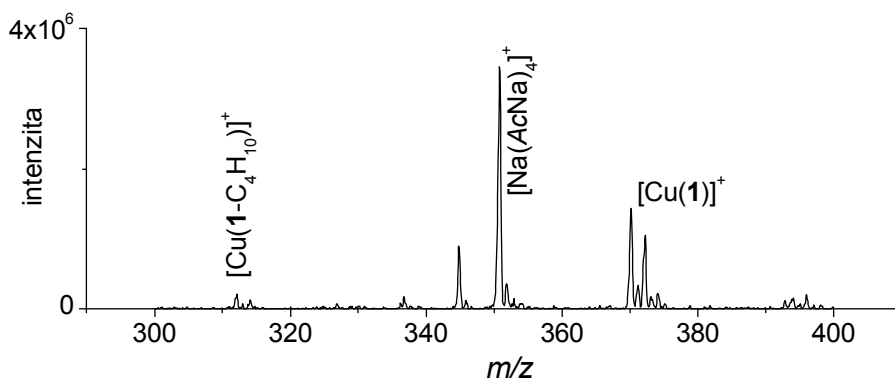
<http://www.agromanual.cz/cz/pripravky/fungicidy/fungicid/horizon-250-ew.html>).

Půdní roztok byl odebírán 24 h po aplikaci postřiku.



Obrázek 4-25 Nádobový pokus s penízem modravým (foto M. Jakl)

K odebranému půdnímu vzorku byl přidán methanol a acetátový pufr (viz kapitola Praktická část - Stanovení tebukonazolu) a bylo změřeno hmotnostní spektrum. Přestože půdní roztok je velice komplikovaná matrice, hmotnostní spektrum je ve sledovaném rozsahu velice přehledné a hledané komplexy jsou jednoznačně identifikovatelné. Identifikace komplexu $[\text{Cu}(\mathbf{1})]^+$ byla ověřena také *MS/MS* měřením.



Obrázek 4-26 Hmotnostní spektrum směsi půdního vzorku (25 obj. %), acetátového pufru (25 obj. %), a methanolu (50 obj. %). Půdní roztok byl kontaminován tebukonazolem (**1**), který byl vázán do komplexu s ionty mědi. Tento komplex byl detekován.

Tabulka 4-10 Koncentrace tebukonazolu v půdním roztoku

Koncentrace 1 ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)			medián	SD	RSD (%)
1	2	3			
$7,73\cdot 10^{-4}$	$7,30\cdot 10^{-4}$	$7,14\cdot 10^{-4}$	$7,30\cdot 10^{-4}$	$0,30\cdot 10^{-4}$	4,16

Koncentrace **1** stanovená pomocí *EC-ESI-MS* je $(7,30 \pm 0,30) \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, což bylo určeno výpočtem z kalibrační přímky (obrázek 4-23). Relativní směrodatná odchylka tohoto stanovení byla 4,2 %. Ve stejném půdním roztoku byl též stanovován obsah **1** na rtuťovém meniskem modifikované měděné amalgamové elektrodě [51] a byla naměřena hodnota $(7,21 \pm 0,41) \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (*RSD* = 4,6 %). Vzhledem k tomu, že se intervaly spolehlivosti výsledků získaných pomocí obou metod překrývají (na hladině významnosti $\alpha = 0,05$), lze konstatovat, že výsledky získané těmito metodami jsou rovnocenné (stejně jako v případě modelových vzorků) a získaná *RSD* leží pod 5 %.

5 Závěr

Pro studium komplexů tebukonazolu s ionty kadmia, stříbra, vápníku a zinku bylo optimalizováno nastavení iontového zdroje pro každou směs zvlášť. Při optimálním nastavení byly změřeny energetické závislosti jednotlivých komplexů (*CID*) a byla určena jejich stabilita. Tyto hodnoty byly porovnány a byl vybrán ion kovu nejvhodnější pro stanovení a detekci tebukonazolu metodou, při níž je tebukonazol vyvazován ze svých specií v roztoku a je vázán do komplexu s ionty generovanými na kovové elektrodě (*EC-ESI-MS*). Jako nejvhodnější ionty se jevily ionty mědi. Pro potvrzení vhodnosti tohoto kovu pro stanovení byla porovnávána afinita tebukonazolu k iontům mědi a afinitou tebukonazolu vůči ostatním iontům, aby bylo patrné, že přítomnost těchto iontů v roztoku nebude rušit stanovení. Byla potvrzena vhodnost iontů mědi k tomuto stanovení, jelikož afinita tebukonazolu vůči těmto iontům byla výrazně vyšší, než afinita tebukonazolu vůči ostatním iontům.

Pro samotné stanovení tebukonazolu v roztoku metodou *EC-ESI-MS* bylo zapotřebí optimalizovat průtokovou rychlost vzorku a polarizační potenciál vkládaný na Cu-elektrodu. Optimální průtoková rychlost je $0,45 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$, optimální polarizační potenciál je $+700 \text{ mV}$. Byla změřena kalibrační závislost, z níž je patrný lineární dynamický rozsah metody ($5\cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ až $2,5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Detekční limit ($5\cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a limit stanovitelnosti ($2,5\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) byl určen z poměru intenzity signálu komplexu $[\text{Cu}(\mathbf{1})]^+(m/z = 370)$ ku intenzitě šumu v jeho okolí (S_{370}/N). Hodnoty těchto detekčních limitů lze ještě dále snížit prodloužením doby záznamu hmotnostních spekter.

Použitelnost metody byla ověřena stanovením tebukonazolu v komplikované matici – půdním roztoku. Metodou *EC-ESI-MS* a kalibrační přímkou byla v půdním roztoku stanovena koncentrace tebukonazolu $(7,30 \pm 0,30)\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro porovnání byl tentýž vzorek analyzován na měděné amalgámové elektrodě. Touto metodou byla stanovena koncentrace tebukonazolu $(7,21 \pm 0,41)\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Intervaly spolehlivosti těchto metod se překrývají, lze tedy říci, že metoda *EC-ESI-MS* je vhodnou analytickou metodou pro stanovení tebukonazolu v původní matici.

EC-ESI-MS lze také po patřičné úpravě využít k identifikaci produktů elektrodoých reakcí, což může usnadnit chápání některých elektrodoých dějů.

6 Literatura

1. Bolognesi, C.; Merlo, F. D.: Pesticides: Human Health Effects. In *Encyclopedia of Environmental Health*, Vol. Editor-in-Chief: Jerome, O. N., Ed. Burlington, Elsevier 2011.
2. Parsons, J. T.; Surgeoner, G. A.: Effect of exposure time on the acute toxicities of permethrin, fenitrothion, carbaryl and carbofuran to mosquito larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry* **10** (9), 1219-1227 (1991).
3. Dennis D, W.: Human health effects of agrichemical use. *Human Pathology* **24** (6), 571-576 (1993).
4. L. V. Edgington, R. A. M., G. C. Bruin, and I. M. Parsons: Systemic Fungicides: A Perspective After 10 Years. *Plant and disease* **61**, 19-23 (1980).
5. Komárek, M.; Čadková, E.; Chrastný, V.; Bordas, F.; Bollinger, J.-C.: Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. *Environment International* **36** (1), 138-151 (2010).
6. Clausen, C. A.; Yang, V.: Protecting wood from mould, decay, and termites with multi-component biocide systems. *International Biodeterioration & Biodegradation* **59** (1), 20-24 (2007).
7. Kang, Z.; Huang, L.; Krieg, U.; Mauler-Machnik, A.; Buchenauer, H.: Effects of tebuconazole on morphology, structure, cell wall components and trichothecene production of *Fusarium culmorum* in vitro. *Pest Management Science* **57** (6), 491-500 (2001).
8. Buchenauer, H.: Mechanism of action of triazolyl fungicides and related compounds. In *Modern selective fungicides: properties, applications, mechanisms of action*, Vol. Lyr, H., Ed. New York, Wiley 1987.
9. Jürg A Zarn, B. J. B., and Josef R Schlatter: Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 alpha-demethylase and aromatase. *Environmental health perspectives* **111** (3), 255-263 (2003).
10. Mueller, D.: Fungicides: Triazoles. In *Integrated crop management*, 2006.
11. Akallal, R.; Debieu, D.; Lanen, C.; Daboussi, M.-J.; Fritz, R.; Malosse, C.; Bach, J.; Leroux, P.: Inheritance and Mechanisms of Resistance to Tebuconazole, a Sterol C14-Demethylation Inhibitor, in *Nectria haematococca*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **60** (3), 147-166 (1998).
12. Muñoz-Leoz, B.; Ruiz-Romera, E.; Antigüedad, I.; Garbisu, C.: Tebuconazole application decreases soil microbial biomass and activity. *Soil Biology and Biochemistry* **43** (10), 2176-2183 (2011).
13. Margni, M.; Rossier, D.; Crettaz, P.; Jolliet, O.: Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **93** (1-3), 379-392 (2002).
14. Kegley, S. E., Hill, B.R., Orme S., Choi A.H.: Tebuconazole. In *PAN Pesticide Database*, Pesticide Action Network: San Francisco, 2010.
15. Taxvig, C.; Hass, U.; Axelstad, M.; Dalgaard, M.; Boberg, J.; Andeasen, H. R.; Vinggaard, A. M.: Endocrine-Disrupting Activities In Vivo of the Fungicides Tebuconazole and Epoxiconazole. *TOXICOLOGICAL SCIENCES* **100** (2), 464-473 (2007).
16. Di Renzo, F.; Menegola, E.; Broccia, M. L.; Giavini, E.: Tebuconazole teratogenesis in rat embryos cultured in vitro. *Reproductive Toxicology* **30** (2), 236 (2010).
17. Kafka, Z.; Punčochářová, J.: Toxicity of Heavy Metals in Nature. *Chemické Listy* **96** (7), 611-617 (2002).

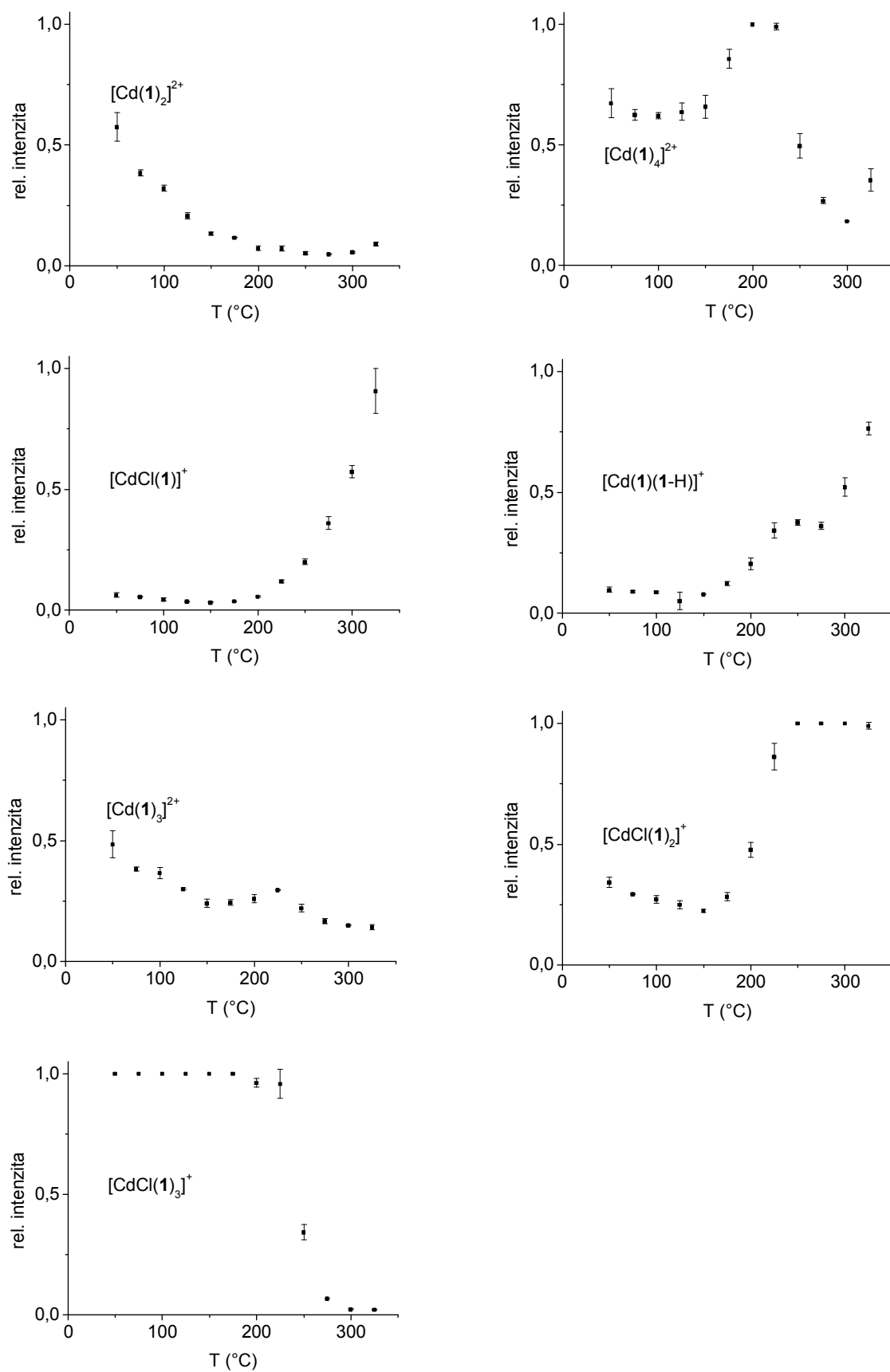
18. Pyatt, F. B.; Pyatt, A. J.; Walker, C.; Sheen, T.; Grattan, J. P.: The heavy metal content of skeletons from an ancient metalliferous polluted area in southern Jordan with particular reference to bioaccumulation and human health. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **60** (3), 295-300 (2005).
19. Procházka S.: *Fyziologie rostlin*. Praha, Academia 1998.
20. Nagajyoti, P.; Lee, K.; Sreekanth, T.: Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters* **8** (3), 199-216 (2010).
21. Ali, F.-A.: Contamination of environment with heavy metals emitted from automotives. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **8** (2), 152-161 (1984).
22. Tsutsumi, R.; Hiroi, H.; Momoeda, M.; Hosokawa, Y.; Nakazawa, F.; Yano, T.; Tsutsumi, O.; Taketani, Y.: Induction of early decidualization by cadmium, a major contaminant of cigarette smoke. *Fertility and Sterility* **91** (4, Supplement), 1614-1617 (2009).
23. Nandi, M.; Jick, H.; Slone, D.; Shapiro, S.; Lewis, G.: CADMIUM CONTENT OF CIGARETTES. *The Lancet* **294** (7634), 1329-1330 (1969).
24. Lambert, R.; Grant, C.; Sauvé, S.: Cadmium and zinc in soil solution extracts following the application of phosphate fertilizers. *Science of The Total Environment* **378** (3), 293-305 (2007).
25. George J, W.: Accumulation of Cadmium in Crop Plants And Its Consequences to Human Health. In *Advances in Agronomy*, Vol. Volume 51, Donald, L. S., Ed. Academic Press 1993.
26. Michael P, W.: Cadmium carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **533** (1–2), 107-120 (2003).
27. Bertin, G.; Averbeck, D.: Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* **88** (11), 1549-1559 (2006).
28. Wills, N. K.; Ramanujam, V. M. S.; Chang, J.; Kalariya, N.; Lewis, J. R.; Weng, T. X.; van Kuijk, F. J. G. M.: Cadmium accumulation in the human retina: Effects of age, gender, and cellular toxicity. *Experimental Eye Research* **86** (1), 41-51 (2008).
29. Tapiero, H.; Townsend, D. M.; Tew, K. D.: Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **57** (9), 386-398 (2003).
30. Uriu-Adams, J. Y.; Keen, C. L.: Copper, oxidative stress, and human health. *Molecular Aspects of Medicine* **26** (4–5), 268-298 (2005).
31. Plum, L. M.; Rink, L.; Haase, H.: The Essential Toxin: Impact of Zinc on Human Health. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **7** (4), 1342-1365 (2010).
32. Carafoli, E.: The homeostasis of calcium in heart cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **17** (3), 203-212 (1985).
33. Tipping, E.; Backes, C. A.; Hurley, M. A.: The complexation of protons, aluminium and calcium by aquatic humic substances: A model incorporating binding-site heterogeneity and macroionic effects. *Water Research* **22** (5), 597-611 (1988).
34. Arias-Estévez, M.; López-Periago, E.; Martínez-Carballo, E.; Simal-Gándara, J.; Mejuto, J.-C.; García-Río, L.: The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **123** (4), 247-260 (2008).
35. Fogg, P.; Boxall, A. B. A.; Walker, A.: Degradation of Pesticides in Biobeds: The Effect of Concentration and Pesticide Mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51** (18), 5344-5349 (2003).

36. Evans, P. D.; Schmalzl, K. J.; Forsyth, C. M.; Fallon, G. D.; Schmid, S.; Bendixen, B.; Heimdal, S.: Formation and Structure of Metal Complexes with the Fungicides Tebuconazole and Propiconazole. *Journal of Wood Chemistry and Technology* **27** (3-4), 243-256 (2007).
37. Jakl, M.; Dyrtrtová, J. J.; Čadková, E. *An Electrochemical Approach to Study Bis-coordinated Copper/Tebuconazole Complexes*, Jetřichovice, Czech Republic, 2011.
38. Dyrtrtová, J. J.; Jakl, M.; Schröder, D.; Čadková, E.; Komárek, M.: Complexation between the fungicide tebuconazole and copper(II) probed by electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **25** (8), 1037-1042 (2011).
39. Norková, R.; Dyrtrtová, J.; Jakl, M.; Schröder, D.: Formation of Tebuconazole Complexes with Cadmium(II) Investigated by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Water, Air, & Soil Pollution*, 1-8.
40. R. Kellner, J.-M. M., M. Otto, M. Valcárcel, H.M. Widmer: *Analytical chemistry : a modern approach to analytical science*. 2nd ed. Weinheim, Wiley-VCH 2004.
41. Tang, K.; Page, J. S.; Kelly, R. T.; Marginean, I.: Electrospray Ionization in Mass Spectrometry. In *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Second Edition)*, Vol. Editor-in-Chief: John, L., Ed. Oxford, Academic Press 2010.
42. Stewart, I. I.: Electrospray mass spectrometry: a tool for elemental speciation. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **54** (12), 1649-1695 (1999).
43. Zeleny, J.: Instability of Electrified Liquid Surfaces. *Physical Review* **10** (1), 1-6 (1917).
44. Bruins, A. P.: Mechanistic aspects of electrospray ionization. *Journal of Chromatography A* **794** (1-2), 345-357 (1998).
45. Page, J. S.; Kelly, R. T.; Tang, K.; Smith, R. D.: Ionization and Transmission Efficiency in an Electrospray Ionization–Mass Spectrometry Interface. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **18** (9), 1582-1590 (2007).
46. Zook, D. R.; Grimsrud, E. P.: Detection mass bias in atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2** (3), 232-239 (1991).
47. March, R. E.: Ion trap mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **118–119** (0), 71-135 (1992).
48. Starke, I.; Kammer, S.; Grunwald, N.; Schilde, U.; Holdt, H.-J.; Kleinpeter, E.: Complexation of diazaperylene and bisisoquinoline with transition metal ions in the gas phase studied by electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **22** (5), 665-671 (2008).
49. Zins, E.-L.; Pepe, C.; Schröder, D.: Energy-dependent dissociation of benzylpyridinium ions in an ion-trap mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry* **45** (11), 1253-1260 (2010).
50. Šťávková, J.; Sedgeman, C. A.; Smith, Z. T.; Frink, L. A.; Hart, J. A.; Niri, V. H.; Kubátová, A.: Method development for the determination of wood preservatives in commercially treated wood using gas chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **702** (2), 205-212 (2011).
51. Nováková, K.; Navrátil, T.; Dyrtrtová, J. J.; Chýlková, J.: Application of Copper Solid Amalgam Electrode for Determination of Fungicide Tebuconazole. *Analytica Chimica Acta*, (2012).
52. Dyrtrtová, J. J.; Jakl, M.; Norková, R.; Navrátil, T.: In *Optimization of a Flow Rate for a Hyphenation of Voltammetry with Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, Moderní elektrochemické metody, Jetřichovice, Tomáš Navrátil, M. F., Ed. BEST Servis, Ústí nad Labem: Jetřichovice, 2012; pp 54-57.

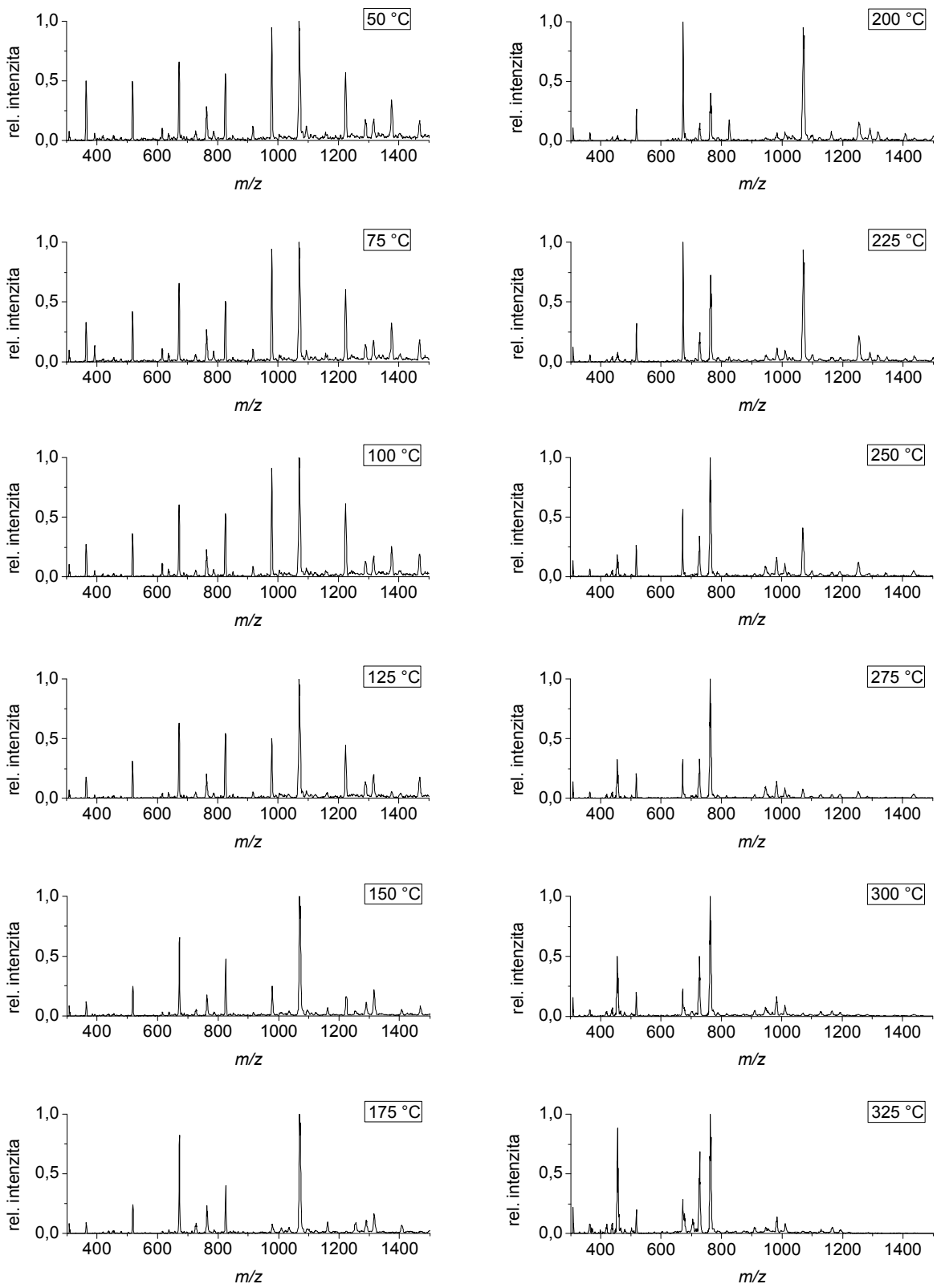
53. Gunasingham, H.; Fleet, B.: Wall-jet electrode in continuous monitoring voltammetry. *Analytical Chemistry* **55** (8), 1409-1414 (1983).
54. Gunasingham, H.: Large-volume wall-jet cells as electrochemical detectors for high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* **159** (0), 139-147 (1984).
55. Tintaru, A.; Roithová, J.; Schröder, D.; Charles, L.; Jušinski, I.; Glasovac, Z.; Eckert-Maksić, M.: Generation and Dissociation Pathways of Singly and Doubly Protonated Bisguanidines in the Gas Phase. *The Journal of Physical Chemistry A* **112** (47), 12097-12103 (2008).
56. Dyrťová, J. J.; Jakl, M.; Schröder, D.; Norková, R.: Electrochemically generated copper and silver cations as tool for tebuconazole detection. *Analytical chemistry* (submitted to press), (2012).
57. Carpinteiro, I.; Ramil, M.; Rodríguez, I.; Cela, R.: Determination of fungicides in wine by mixed-mode solid phase extraction and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1217** (48), 7484-7492 (2010).
58. Dyrťová, J. J.; Šestáková, I.; Jakl, M.; Száková, J.; Miholová, D.; Tlustoš, P.: The use of differential pulse anodic stripping voltammetry and diffusive gradient in thin films for heavy metals speciation in soil solution. *Central European Journal of Chemistry* **6** (1), 71-79 (2008).

7 Přílohy

7.1 Příloha 1 - Optimalizace teploty kapiláry



Obrázek 7-1 Závislosti $I_{rel} = f(T)$ pro jednotlivé komplexy



Obrázek 7-2 Náhledy hmotnostních spekter při různých teplotách

7.2 Příloha 2 – Optimalizace parametrů CV a TLO

Tabulka 7-1 Optimalizace parametru TLO pro směs ZnCl₂ + Tebukonazol (1)

TLO	370	406	494	648	679	715	1023	n
-120	0,3	3,0	6,0	48,6	19,9	14,0	100,0	2
-110	0,4	6,2	8,4	58,7	26,1	19,2	100,0	3
-100	0,5	8,8	12,8	98,4	33,6	25,5	100,0	4
-90	0,8	7,8	13,5	100,0	34,0	21,3	86,2	3
-80	0,4	0,1	13,7	100,0	31,6	22,3	82,1	3
-70	0,4	8,2	12,8	100,0	30,9	21,0	63,7	3
-60	0,7	8,3	12,0	100,0	26,0	16,7	59,8	3
-50	0,7	6,9	12,8	100,0	32,2	15,4	53,2	3
-40	0,6	7,5	12,7	100,0	16,5	16,5	61,4	2
-30	0,4	7,2	12,9	100,0	35,3	20,2	64,0	3
-20	1,0	8,8	13,3	100,0	48,9	24,9	68,4	3
-10	2,9	9,5	17,7	100,0	82,4	41,4	94,6	4
0	4,0	10,4	13,2	63,6	100,0	57,2	79,1	4
10	4,4	9,1	7,6	17,9	100,0	64,0	55,3	3
20	5,0	12,3	3,7	4,1	100,0	80,8	30,0	3
30	6,7	18,8	1,8	1,7	100,0	94,0	18,3	2
40	7,6	21,3	1,1	1,7	92,4	100,0	9,2	2
50	7,2	32,0	0,9	0,5	87,8	100,0	4,8	3
60	9,5	45,0	0,8	0,5	90,4	100,0	3,2	3
70	14,7	79,1	0,6	0,4	97,9	100,0	2,8	3
80	14,6	86,1	0,7	0,8	85,8	66,1	3,6	3

370 – [Zn(1)₂]²⁺, 406 – [ZnCl(1)]⁺, 494 – [Zn(1)₃]²⁺, 648 – [Zn(1)₄]²⁺, 679 – [Zn(1)(1-H)]⁺, 715 – [ZnCl(1)₂]⁺, 1023 – [ZnCl(1)₃]⁺, n – počet komplexů, jejichž relativní intenzita je větší než 25%.

Tabulka 7-2 Optimalizace parametru CV pro směs ZnCl₂ + Tebukonazol (**1**)

CV	370,0	406,0	494,0	648,0	679,0	715,0	1023,0	n
-120	0,1	0,4	0,0	0,8	5,0	9,4	100,0	1
-110	0,1	0,0	0,0	0,9	4,4	12,4	100,0	1
-100	0,2	0,4	0,0	1,2	6,9	14,6	100,0	1
-80	0,2	0,7	0,0	1,3	15,7	31,7	100,0	2
-70	0,4	1,9	0,4	1,8	27,7	43,9	100,0	3
-90	0,3	0,3	0,3	1,1	10,4	21,6	100,0	1
-60	0,2	2,9	0,9	6,3	33,4	56,6	100,0	3
-50	0,4	5,6	1,9	18,8	49,5	67,7	100,0	3
-40	0,8	5,5	4,3	26,6	58,0	64,5	100,0	4
-30	2,2	7,4	7,7	33,4	70,1	70,1	100,0	4
-20	2,6	7,8	9,1	41,0	90,5	65,4	100,0	4
-10	2,9	8,1	11,4	45,3	100,0	66,0	84,9	4
0	4,4	8,5	13,3	46,8	100,0	57,4	68,8	4
10	4,7	7,8	11,2	48,0	100,0	45,4	64,1	4
20	4,6	6,4	12,7	48,5	100,0	50,9	57,2	4
30	5,6	7,2	10,9	39,4	100,0	51,3	46,0	4
40	5,0	5,5	10,3	26,5	100,0	54,7	40,7	4
50	6,8	7,1	7,6	22,6	100,0	55,9	33,3	3
60	6,6	8,3	5,3	15,8	100,0	60,7	29,2	3
70	6,7	7,8	4,0	10,2	100,0	65,4	23,9	2
80	8,9	8,9	2,5	4,6	100,0	68,1	17,6	2
90	10,0	11,5	1,8	2,2	100,0	74,9	14,9	2
100	10,0	16,3	0,9	0,0	100,0	80,1	9,8	2
110	12,6	20,8	0,0	0,0	100,0	90,1	7,5	2
120	15,5	26,1	0,0	0,0	100,0	91,3	5,5	3

370 – [Zn(**1**)₂]²⁺, 406 – [ZnCl(**1**)]⁺, 494 – [Zn(**1**)₃]²⁺, 648 – [Zn(**1**)₄]²⁺, 679 – [Zn(**1**)(**1**-H)]⁺, 715 – [ZnCl(**1**)₂]⁺, 1023 – [ZnCl(**1**)₃]⁺, n – počet komplexů, jejichž relativní intenzita je větší než 25%.

Tabulka 7-3 Optimalizace parametru *TLO* pro směs CdCl₂ + Tebukonazol (**1**)

TLO	364	456	517	671	727	763	1069	n
-120	2,3	4,6	15,2	88,0	24,2	100,0	61,5	3
-110	1,9	4,4	19,9	100,0	23,6	87,1	42,2	3
-100	1,9	3,3	17,8	100,0	21,0	85,6	33,8	3
-90	2,9	3,8	19,5	100,0	20,1	81,0	35,4	3
-80	2,5	2,7	18,0	100,0	16,2	63,6	30,6	3
-70	3,1	3,8	18,7	100,0	19,7	67,9	30,1	3
-60	3,5	3,2	17,3	100,0	18,8	62,9	26,6	3
-50	2,9	3,4	18,8	100,0	17,9	64,8	28,6	3
-40	2,9	3,3	18,0	100,0	18,7	62,8	28,3	3
-30	2,9	4,7	18,7	100,0	20,1	68,9	26,5	3
-20	2,8	4,0	18,1	100,0	20,6	66,1	26,5	3
-10	3,7	7,9	22,0	100,0	28,7	86,5	34,5	4
0	4,9	12,0	24,4	90,4	37,2	100,0	38,0	4
10	4,7	18,8	15,8	60,3	41,3	100,0	33,8	4
20	5,8	28,7	13,1	25,2	50,3	100,0	24,3	4
30	8,0	82,8	7,0	6,2	49,7	100,0	21,7	3
40	9,6	73,6	3,9	2,1	45,7	100,0	11,9	3
50	8,6	98,3	3,0	1,4	41,9	100,0	6,0	3
60	6,6	100,0	2,2	1,5	32,9	73,6	3,2	3
70	8,3	100,0	1,9	0,9	26,2	50,7	2,2	3
80	5,0	100,0	0,7	1,4	21,3	44,8	1,4	2
90	0,0	100,0	0,0	0,0	17,3	33,3	0,0	2
100	0,0	100,0	0,0	0,0	14,8	28,2	0,0	2
110	0,0	100,0	0,0	0,0	10,7	25,3	0,0	2
120	0,0	100,0	0,0	0,0	11,5	24,2	0,0	1

364 – [Cd(**1**)₂]²⁺, 456 – [CdCl(**1**)]⁺, 517 – [Cd(**1**)₃]²⁺, 672 – [Cd(**1**)₄]²⁺, 727 – [Cd(**1**)(**1**-H)]⁺, 763 – [CdCl(**1**)₂]⁺, 1069 – [CdCl(**1**)₃]⁺, n – počet komplexů, jejichž relativní intenzita je větší než 25 %.

Tabulka 7-4 Optimalizace parametru CV pro směs CdCl₂ + Tebukonazol (1)

CV	364	456	517	671	727	763	1069	n
-120	0,1	0,8	0,4	0,7	0,9	18,4	100,0	1
-110	0,2	0,5	0,5	1,0	0,9	26,9	100,0	2
-100	0,2	0,9	0,5	0,8	0,3	49,5	100,0	2
-90	0,3	3,1	0,6	1,5	7,3	100,0	88,8	2
-80	0,1	6,5	0,6	1,7	11,5	100,0	50,8	2
-70	0,0	11,1	0,5	2,6	13,1	100,0	33,5	2
-60	0,2	15,1	2,2	8,0	17,9	100,0	34,9	2
-50	0,7	16,0	7,0	13,7	23,9	100,0	34,5	2
-40	2,3	13,6	11,0	24,1	30,2	100,0	36,5	3
-30	3,1	16,6	13,2	33,5	40,9	100,0	38,9	4
-20	3,5	12,1	14,1	54,0	36,5	100,0	35,3	4
-10	4,4	11,6	15,7	73,9	33,8	100,0	32,2	4
0	2,8	11,5	19,4	83,0	37,1	100,0	32,0	4
10	2,6	11,7	16,6	81,2	28,6	100,0	43,8	4
20	4,0	7,6	24,0	100,0	31,2	96,1	34,5	4
30	2,7	10,8	24,0	100,0	30,8	87,0	32,5	4
40	4,3	10,7	24,3	100,0	31,2	88,8	34,2	4
50	4,5	12,5	24,4	96,3	39,8	100,0	38,1	4
60	3,6	14,6	22,7	77,7	41,8	100,0	33,2	4
70	4,3	18,1	24,4	57,6	52,4	100,0	28,0	4
80	5,5	32,2	20,0	31,5	58,0	100,0	24,0	4
90	7,3	40,1	15,0	15,7	58,8	100,0	17,9	3
100	9,0	51,9	8,4	3,4	64,3	100,0	16,7	3
110	6,6	80,9	3,2	1,2	45,2	100,0	10,3	3
120	8,1	100,0	1,6	1,6	54,2	96,3	7,3	3

364 – [Cd(1)₂]²⁺, 456 – [CdCl(1)]⁺, 517 – [Cd(1)₃]²⁺, 672 – [Cd(1)₄]²⁺, 727 – [Cd(1)(1-H)]⁺, 763 – [CdCl(1)₂]⁺, 1069 – [CdCl(1)₃]⁺, n – počet komplexů, jejichž relativní intenzita je větší než 25 %.

Tabulka 7-5 Optimalizace parametru *TLO* pro směs CaCl₂ + Tebukonazol (**1**)

TLO	327	346	481	635	654	691	n
-120	38,0	3,0	52,9	100,0	26,7	47,3	5
-110	36,4	2,4	49,6	100,0	23,1	34,0	4
-100	36,1	3,0	49,3	100,0	27,1	38,0	5
-90	38,2	2,1	43,7	100,0	20,2	28,8	4
-80	43,8	2,9	53,4	100,0	16,1	25,0	4
-70	43,0	2,5	57,0	100,0	19,0	28,1	4
-60	38,6	3,3	42,4	100,0	17,3	24,6	3
-50	39,0	2,2	53,3	100,0	16,4	24,3	3
-40	37,3	2,4	42,2	100,0	15,1	20,5	3
-30	44,2	2,4	45,9	100,0	15,8	22,2	3
-20	41,0	2,5	52,1	100,0	16,6	20,6	3
-10	39,6	3,8	44,2	100,0	18,5	22,6	3
0	49,9	2,9	58,8	100,0	22,3	27,6	4
10	46,2	5,8	51,2	100,0	23,2	32,4	4
20	64,7	5,1	70,8	100,0	29,3	33,5	5
30	96,2	7,0	78,7	100,0	38,4	44,1	5
40	100,0	13,0	74,6	66,7	42,9	51,2	5
50	98,8	11,4	48,2	36,0	42,6	55,6	5
60	84,3	9,9	23,1	8,5	30,4	40,9	3
70	83,8	10,0	141,3	5,9	28,7	33,5	4
80	80,1	16,4	17,3	6,7	23,3	31,0	2
90	96,9	13,5	10,2	5,0	19,0	20,6	1
100	95,2	16,5	5,0	5,5	15,7	17,3	1
110	59,6	16,2	2,8	3,6	13,0	16,0	1
120	26,4	14,3	2,5	0,0	12,9	14,2	1

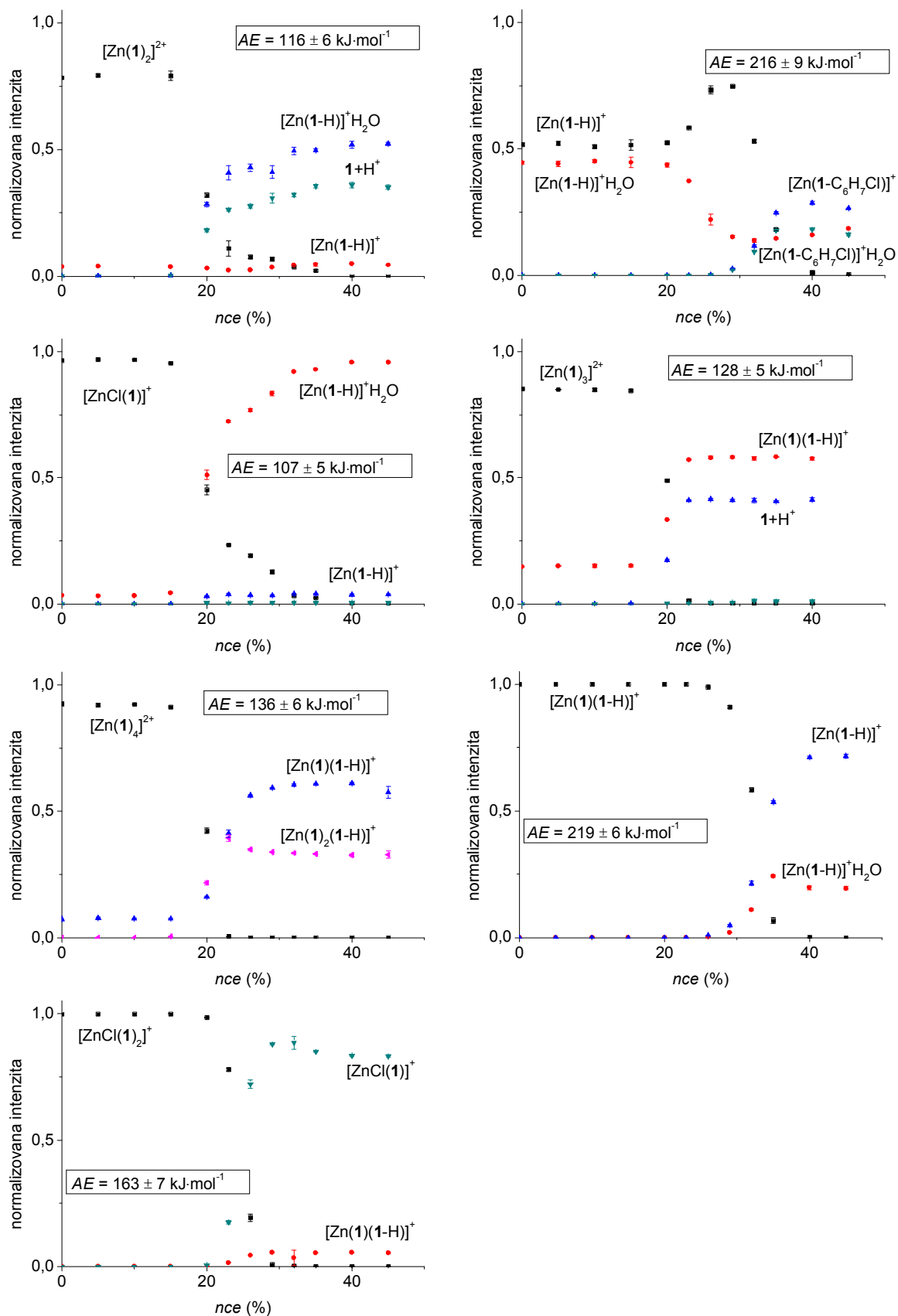
327 – [Ca(1)₂]²⁺, 346 – [CaCl(1)]⁺, 481 – [Ca(1)₃]²⁺, 635 – [Ca(1)₄]²⁺, 654 – [Ca(1)(1-H)]⁺, 691 – [CaCl(1)₂]⁺, n – počet komplexů, jejichž relativní intenzita je větší než 25%.

Tabulka 7-6 Optimalizace parametru CV pro směs CaCl₂ + Tebukonazol (1)

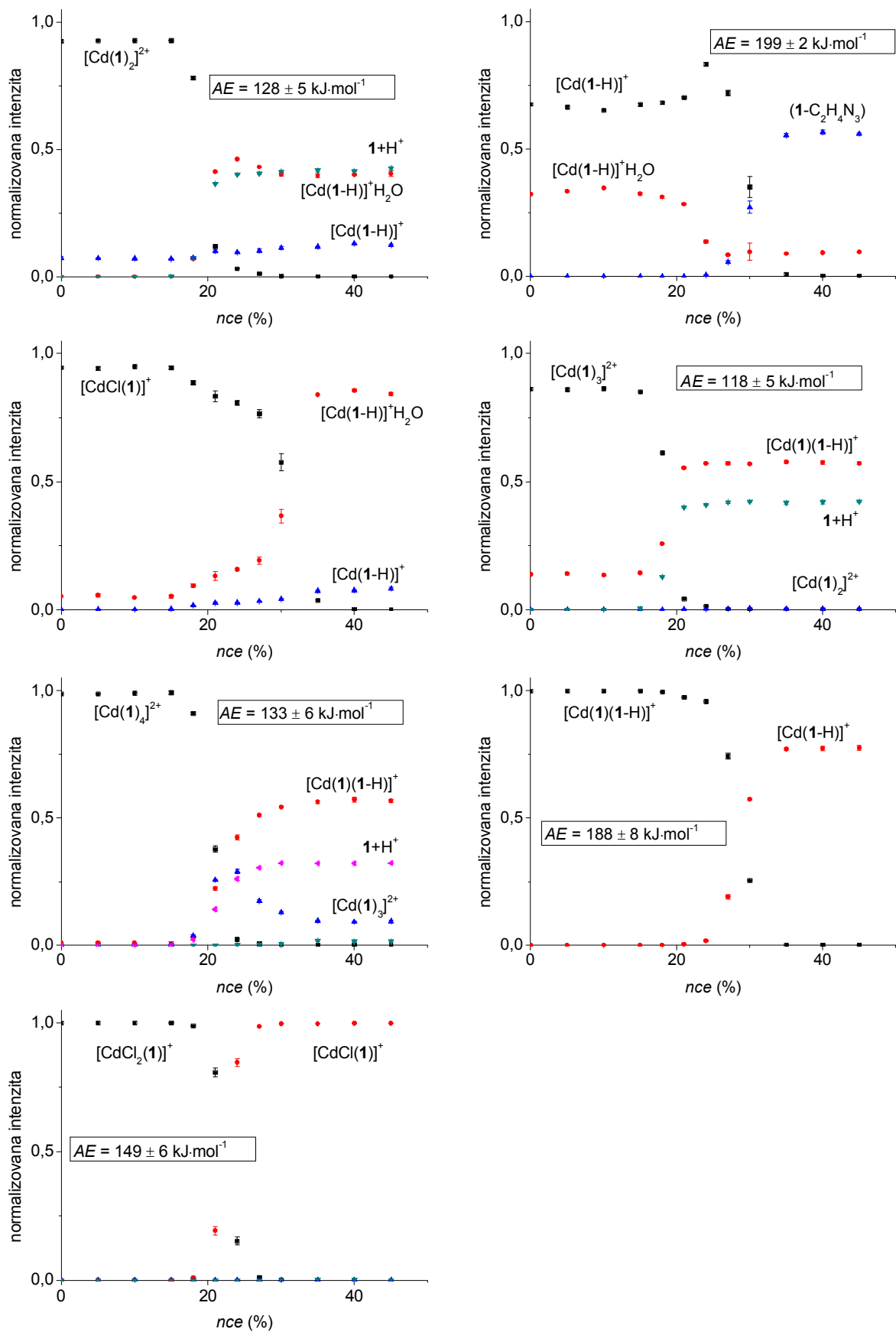
CV	327	346	481	635	654	691	n
-120	1,0	1,2	2,6	1,7	2,6	13,5	0
-110	1,2	0,0	1,3	6,0	5,7	20,4	0
-100	0,8	0,0	0,9	3,7	5,9	24,1	0
-90	1,5	0,0	1,9	8,3	19,8	44,0	1
-80	1,5	0,0	5,8	15,6	34,0	75,5	2
-70	2,9	0,0	18,3	40,0	44,0	70,1	3
-60	12,2	2,1	32,6	61,5	47,3	72,1	4
-50	32,4	2,8	56,7	89,5	42,5	69,2	5
-40	56,1	5,6	71,8	90,8	46,2	55,0	5
-30	56,6	5,1	66,0	100,0	35,2	46,0	5
-20	45,4	4,6	52,5	100,0	23,6	35,7	4
-10	47,3	5,0	52,1	100,0	23,3	34,5	4
0	38,7	3,6	39,4	100,0	18,6	26,1	4
10	34,4	3,0	44,2	100,0	17,3	23,0	3
20	39,5	3,6	44,9	100,0	15,8	24,8	3
30	35,4	3,4	49,1	100,0	21,1	29,0	4
40	38,7	3,1	46,3	100,0	15,5	26,8	4
50	34,8	3,3	45,3	100,0	18,8	27,3	4
60	33,7	3,6	44,7	100,0	15,1	23,0	3
70	35,5	2,1	45,3	100,0	14,2	24,0	3
80	44,2	2,7	55,4	100,0	14,6	23,2	3
90	42,4	4,2	71,6	100,0	20,5	21,7	3
100	70,5	5,2	100,0	94,3	27,7	33,5	5
110	66,5	8,2	100,0	76,1	28,8	27,5	5
120	100,0	9,2	95,9	48,9	41,7	33,6	5

327 – [Ca(1)₂]²⁺, 346 – [CaCl(1)]⁺, 481– [Ca(1)₃]²⁺, 635 – [Ca(1)₄]²⁺, 654 – [Ca(1)(1-H)]⁺, 691 – [CaCl(1)₂]⁺, n – počet komplexů, jejichž relativní intenzita je větší než 25%.

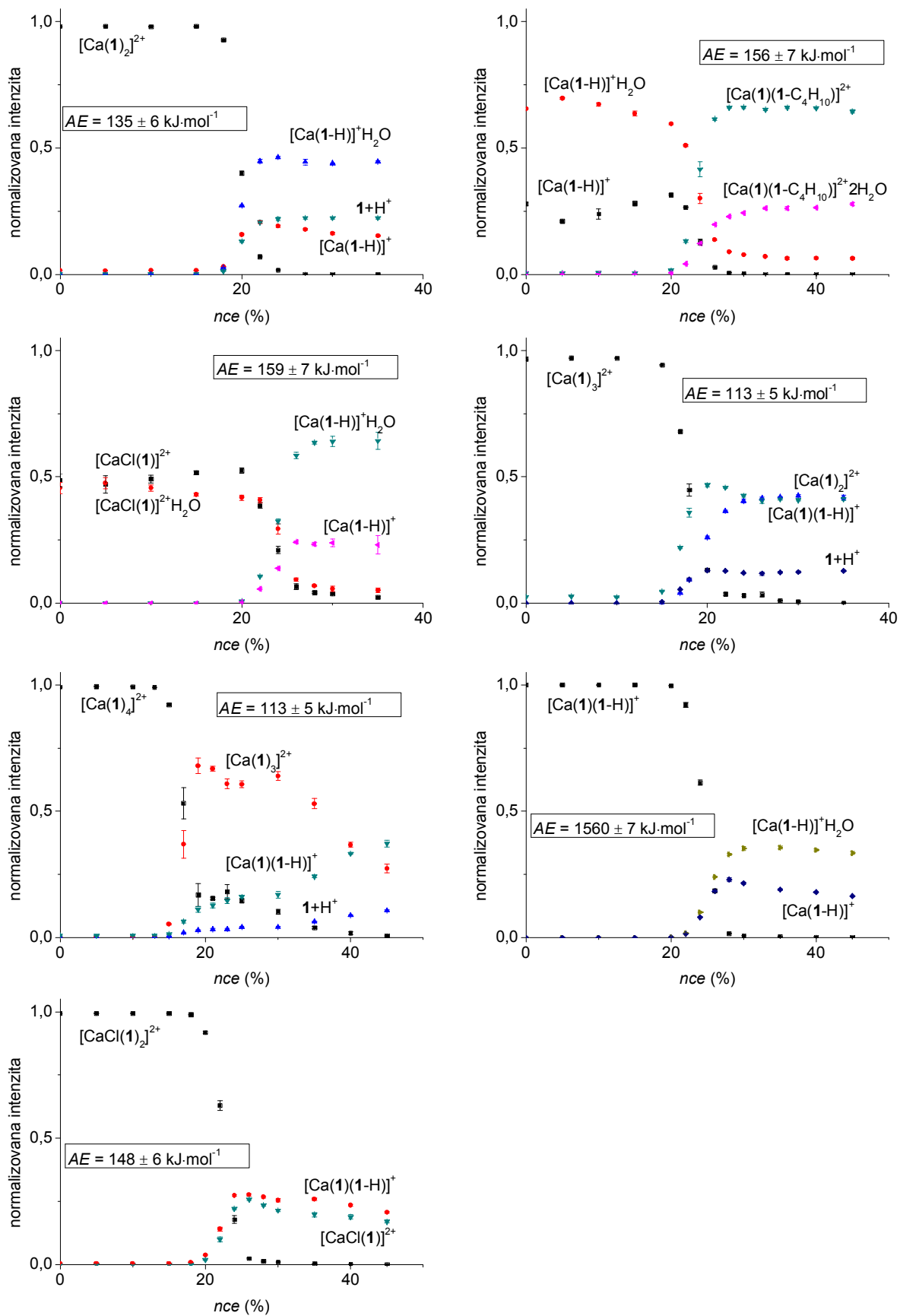
7.3 Příloha 3 – Určení stability komplexů



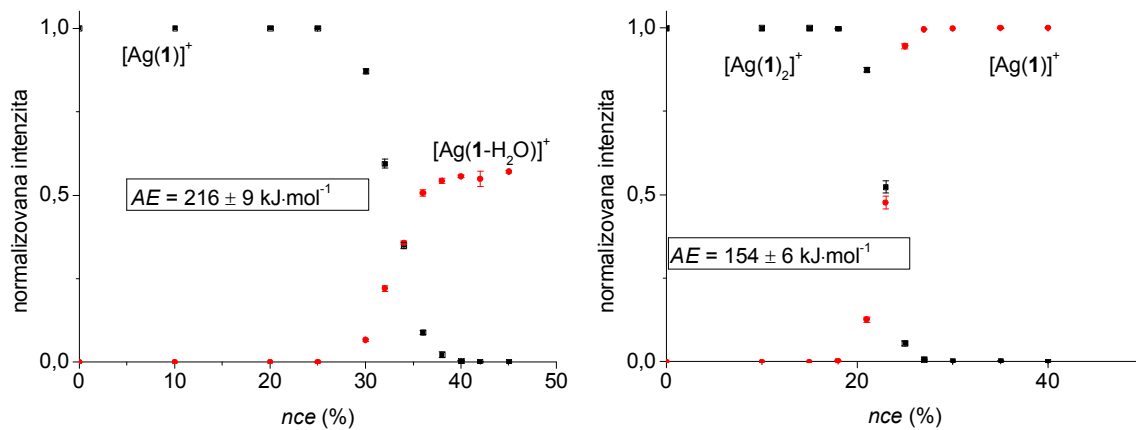
Obrázek 7-3 Vyhodnocení energetických závislostí z CID spekter pro ekvimolární směs ZnCl₂ + tebukonazol (1)



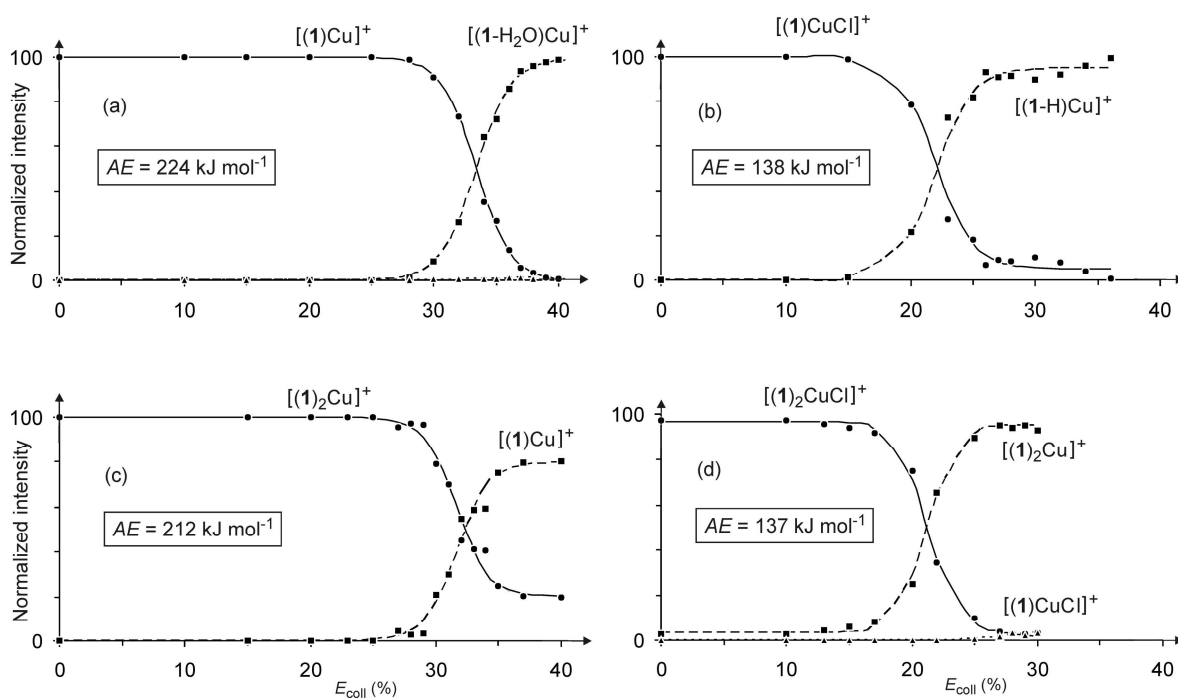
Obrázek 7-4 Vyhodnocení energetických závislostí z CID spekter pro ekvimolární směs CdCl_2 + tebukonazol (**1**)



Obrázek 7-5 Vyhodnocení energetických závislostí z CID spekter pro ekvimolární směs CaCl₂ + tebukonazol (1)



Obrázek 7-6 Vyhodnocení energetických závislostí z *CID* spekter pro ekvimolární směs $AgNO_3$ + tebukonazol (1)



Obrázek 7-7 Vyhodnocení energetických závislostí z *CID* spekter pro ekvimolární směs $CuCl_2$ + tebukonazol (1) ($c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), převzato z Dytrtová *et al.* [38]

7.4 Seznam publikací

Renáta Norková, Jana Jaklová Dytrtová, Michal Jakl, Detlef Schröder, Ivan Kuneš; Fungicide tebuconazole complexes in forest soil solution after liming, conference Euroanalysis, Bělehrad 2011

Renáta Norková, Jana Jaklová Dytrtová, Michal Jakl, Detlef Schröder; Formation of Tebuconazole Complexes with Cadmium(II) Investigated by Electrospray Ionization Mass Spectrometry, Water, Air, & Soil Pollution 2012 (v tisku)

Renáta Norková, Jana Jaklová Dytrtová, Detlef Schröder, Michal Jakl; Complex formation of the fungicide tebuconazole with zinc and cadmium ions, Joint conference of Polish Mass Spectrometry Society and German Mass Spectrometry Society, Poznań 2012

Jana Jaklová Dytrtová, Michal Jakl, **Renáta Norková**, and Tomáš Navrátil; Optimization of aFlow Rate for a Hyphenation of Voltammetry with Electrospray Ionization Mass Spectrometry, Jetřichovice 2012 (v tisku)

Michal Jakl, **Renáta Norková**, Tomáš Navrátil, Jana Jaklová Dytrtová, and Jiř Balk; Investigation of Complexes of Tebuconazole with Zinc, Jetřichovice 2012 (v tisku)

Renáta Norková, Jana Jaklová Dytrtová, Michal Jakl; Complexation of Tebuconazole with Cadmium Ions Proved using Difference Pulse Anodic Stripping Voltammetry, Heyrovského diskuse, Brno 2012 (v tisku)