

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

**Fluorescenční detekce metsulfuron methyly v SIA
systému**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph. D.

Vedoucí katedry. Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Hradec Králové 2013

Petra Bolinová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové:

Na úvod své práce bych chtěla poděkovat všem, kteří mi pomáhali a podporovali mě při jejím vypracování, především vedoucí mé diplomové práce Doc. PharmDr. Haně Sklenářové, Ph.D. za podporu, trpělivost a odborné konzultace. Také bych chtěla poděkovat rodičům za jejich podporu při studiu.

Petra Bolinová

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Petra Bolinová

Školitel: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Název diplomové práce: **Fluorescenční stanovení metsulfuron methyly v SIA systému**

Tato diplomová práce se zabývá fluorescenční detekcí chininu a metsulfuronmethyly (MSM) ve vodném prostředí a organických rozpouštědlech metodou sekvenční injekční analýzy. Tato metoda byla zvolena k detekci herbicidu kvůli snadnému zpracování vzorku, jeho nízké spotřebě, rychlému zpracování výsledků a vyšší citlivosti fluorescence ve srovnání se spektrofotometrickou detekcí.

Roztok síranu chininia byl použitý pouze jako modelová látka. Hlavním předmětem sledování byla fluorescenční detekce MSM v různých organických rozpouštědlech. Vzorek MSM byl před stanovením převeden do roztoku pomocí daného rozpouštědla či směsi rozpouštědel (voda, aceton, směs voda:acetonitril, chloroform) a v některých případech byla provedena úprava pH a UV degradace původní látky. Změna pH byla zajištěna přidavkem koncentrované H_2SO_4 na $pH = 2$. K degradaci MSM UV zářením byla použita vlnová délka λ 254 nm nebo 366 nm.

Ze zkoušených organických rozpouštědel se jako nejvýhodnější z hlediska poskytovaného signálu ukázal chloroform. Intenzita signálu MSM v chloroformu přesahovala hodnoty signálu roztoků MSM v ostatních organických rozpouštědlech (aceton, směs $H_2O:ACN$ v různých poměrech) o více než 90%. S chloroformem byla proměřena i kalibrační závislost s lineárním nárůstem fluorescenčního signálu v rozmezí koncentrací 5 – 25 mg/l s korelačním koeficientem 0,999.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of analytical chemistry

Candidate: Petra Bolinová

Supervisor: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: **Fluorescence detection of metsulfuron methyl in the SIA system**

This diploma work deals with fluorescence detection of quinine and metsulfuron methyl (MSM) in aqueous media and organic solvents using sequential injection analysis. This method was chosen to detect herbicide for easy sample application, its low consumption fast results evaluation and higher sensitivity of fluorescence compared to spectrophotometric detection.

Chininium sulphate solution was used only as a model substance. The main subject of monitoring was the fluorescence detection of MSM in various organic solvents. Sample of MSM was dissolved in different solvents or mixture of solvents (water, acetone, a mixture of water: acetonitrile, chloroform) and in some cases pH was adjusted and UV degradation of the parent compound was carried out, pH adjustment was ensured by the addition of concentrated H_2SO_4 to $\text{pH} = 2$. Degradation of MSM was tested with UV at 254 nm and 366 nm.

The most advantageous of the tested organic solvents in terms of a signal provided was chloroform. Signal intensity of MSM in chloroform solutions compared to the signals of MSM in other organic solvents (acetone, a mixture of $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ in different ratios) was increased by more than 90%. Chloroform solutions were measured and calibration curve with a linear increase of the fluorescence signal in the concentration range 5 - 25 mg/l with a $R = 0,999$ was found.

Obsah

Seznam použitých zkratek	8
1. Úvod	10
2. Cíl a popis zadání práce	11
3. Teoretická část	12
3.1. Sekvenční injekční analýza	12
3.1.1. Historie	12
3.1.2. Princip metody	12
3.1.3. Instrumentace SIA	14
3.1.4. Využití SIA při stanovení chininu a MSM	15
3.2. Chinin	15
3.3. Metsulfuron-methyl	15
3.3.1. Chemické vlastnosti a toxicita MSM	15
3.3.2. Možnosti detekce a stanovení MSM	16
3.3.2.1. Průtoková injekční analýza (FIA)	17
3.3.2.2. Kapilární elektroforéza	19
3.3.2.3. Chromatografické metody	19
3.3.2.4. Fluorescenční detekce	23
4. Experimentální část	24
4.1. Materiál	24
4.1.1. Chemikálie	24
4.1.2. Přístroje a software	24
4.2. Pracovní postup	25
4.2.1. Fluorescenční detekce chininu v SIA systému	25
4.2.1.1. Kalibrační závislost	26
4.2.1.2. Vliv organických rozpouštědel na fluorescenční detekci chininu	26
4.2.2. Fluorescenční detekce metsulfuron methyly v organických rozpouštědlech ...	27

4.2.2.1. Příprava zásobního roztoku metsulfuron-methylu	28
4.2.2.2. Fluorescenční detekce MSM	28
4.2.3. Studium rozkladu MSM působením UV záření a následná fluorescenční detekce rozkladných produktů	29
4.2.4. Studium vlivu pH na fluorescenční detekci MSM	30
4.2.5. Kalibrační závislost stanovení MSM v chloroformu.....	30
5. Výsledky a diskuze	31
5.1. Fluorescenční detekce chininu v SIA systému	31
5.1.1. Kalibrační závislost	31
5.1.2. Vliv organických rozpouštědel na fluorescenční detekci chininu	34
5.2. Fluorescenční detekce metsulfuron methylu v organických rozpouštědlech ...	37
5.2.1. Detekce ve vodném prostředí	37
5.2.2. Detekce v prostředí acetonu	39
5.2.3. Detekce MSM ve směsi voda:acetonitril.....	40
5.2.4. Detekce MSM v chloroformu.....	45
5.3. Studium vlivu pH na fluorescenční detekci MSM	47
5.4. Kalibrační závislost pro fluorescenční stanovení MSM v chloroformu.....	50
6. Shrnutí	52
7. Závěr.....	56
8. Seznam literatury.....	57
Seznam obrázků.....	59
Seznam tabulek.....	60

Seznam použitých zkratek

CTAC	Chlorid cetyltrimethylamonný (cetyltrimethylammonium chloride)
DLLME	disperzní kapalinové mikroextrakce (dispersive liquid–liquid microextraction)
DSPE	disperzní extrakce pevnou fází (dispersive solid-phase extraction)
FIA	průtoková injekční analýza (flow injection analysis)
FI-SPS	průtokový systém s pevným spektroskopickým senzorem (flow injection solid-phase)
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (gas chromatography – mass spectrometry)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
IUPAC	mezinárodní unie pro čistou a užitnou chemii (Union of Pure and Applied Chemistry)
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (liquid chromatography – mass spectrometry)
LD₅₀	střední letální dávka (dosis letalis)
LOD	limit detekce (limit of detection)
LOQ	limit kvantifikace (limit of quantitation)
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie (micellar electrokinetic chromatography)
MEPIF	micelární fotochemicky indukovaná fluorescenční detekce (micellar-enhanced photochemically induced fluorescence)
MSM	metsulfuron-methyl
MWCNTs	vícevrstvé uhlíkové nanotrubičky (multiwalled carbon nanotubes)

PIF	fotochemicky indukovaná fluorescence (photochemically induced fluorescence)
PMT	fotonásobič (photomultiplier)
RSD	relativní směrodatná odchylka
SDS	dodecylsulfát sodný (sodium dodecyl sulfate)
SIA	sekvenční injekční analýza
SPE	extrakce na tuhé fázi (solid phase extraction)
UHPLC	ultra-vysoko-účinná kapalinová chromatografie (ultra high performance liquid chromatography)
UV	ultrafialová oblast záření
VIS	viditelná oblast záření

1. Úvod

Stanovení herbicidů je důležité zejména v oblasti životního prostředí a zemědělství. Možnosti detekce a stanovení jsou rozmanité a zahrnují spoustu analytických metod. Příkladem jsou průtokové injekční metody, kapilární elektroforéza či chromatografické metody nejčastěji ve spojení s fotochemicky indukovanou fluorescencí. Citlivost fluorescenční detekce závisí ve velké míře na volbě vhodného fotonásobiče.

2. Cíl a popis zadání práce

Tato diplomová práce se zabývá fluorescenční detekcí chininu a metsulfuronmethylu (MSM) ve vodném prostředí a prostředí organických rozpouštědel metodou sekvenční injekční analýzy. Sekvenční injekční analýza byla zvolena k detekci herbicidu zejména kvůli snadnému zpracování vzorku, jeho nízké spotřebě a rychlému zpracování výsledků.

Roztok síranu chininia byl v této práci použitý pouze jako modelová látka, na které byl sledován vliv organických rozpouštědel na fluorimetrickou detekci v SIA systému. Mezi zkoušená organická rozpouštědla patřil methanol, ethanol a isopropylalkohol.

Hlavním předmětem sledování byla fluorescenční detekce MSM v různých organických rozpouštědlech. Vzorek MSM byl před stanovením převeden do roztoku pomocí daného rozpouštědla či směsi rozpouštědel (voda, aceton, směs voda:acetonitril, chloroform) a v některých případech byla provedena úprava pH a UV degradace původní látky. Změna pH byla zajištěna přidavkem koncentrované H_2SO_4 na $pH = 2$. K degradaci MSM UV zářením byla použita vlnová délka λ 254 nm nebo 366 nm.

3. Teoretická část

3.1. Sekvenční injekční analýza

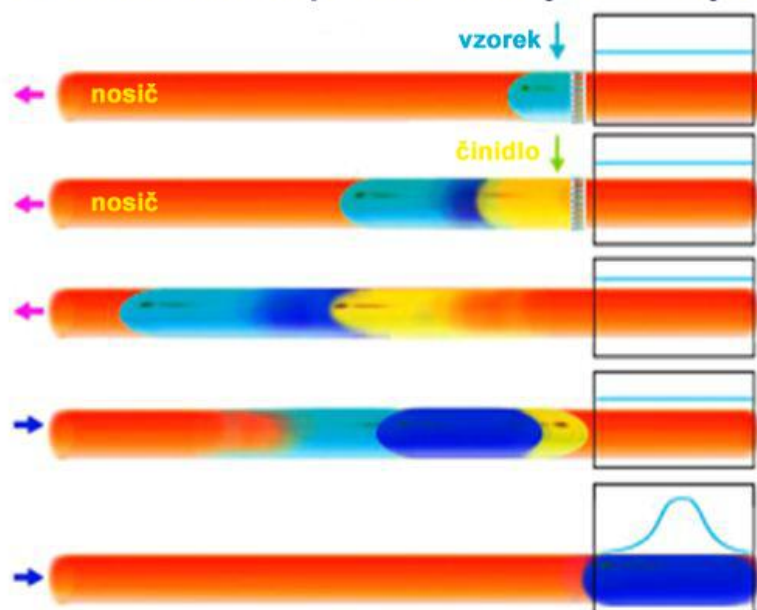
3.1.1. Historie

Metoda průtokové injekční analýzy (FIA) se v oboru analytické chemie rozvíjela už od 70. let 20. století. Jedním z nejvýznamnějších průkopníků této metody je český vědec Jaroslav Růžička. Výhodou této průtokové metody je snadná automatizace, možnost miniaturizace, univerzálnost a snížení nákladů, které spočívají v manipulaci s chemickými činidly. Z metody FIA se od 90. let 20. století vyvinula metoda, fungující na podobném principu, sekvenční injekční analýza (SIA). Tato metoda používá konstrukčně složitější instrumentaci než předchozí FIA, její systém je však univerzálnější a měření je vždy řízeno ovládacím programem. Primárně je určena hlavně pro stanovení různých analytů v rámci monitorování různých procesů¹.

3.1.2. Princip metody

Charakteristickým rysem sekvenční injekční analýzy jsou oddělené měřicí cykly. Nejprve jsou zóny nosného proudu, vzorku a činidla postupně aspirovány do jednonálového systému s využitím selekčního vícecestného ventilu a pístového čerpadla. Poté je pohyb pístu čerpadla obrácen, čímž dojde k promísení zóny vzorku a činidla (obrázek 1). Vzniklý produkt je dopraven do detektoru a tím je jeden cyklus ukončen. V tomto jednoduchém případě je získán výsledný analytický signál ve formě píku podobně jako je tomu u FIA. Jedná o záznam změny koncentračního gradientu reakčního produktu při průchodu jeho zóny detektorem. Rozdíly se projevují v geometrii nosného proudu. FIA využívá přímý konstantní tok, zatímco základem SIA jsou změny přímého a zpětného toku².

Změna směru toku při sekvenční injekční analýze



Obrázek 1: Princip SIA³

Systém SIA pracuje v cyklu naprogramovaných pohybů čerpadla, synchronizovaných s přepínáním pozic selekčního ventilu. V tomto systému je možné provést změny dávkovaného objemu vzorku od jednotek až po stovky μl programováním doby otevření kanálu selekčního ventilu a tím optimalizovat disperzi zóny vzorku a citlivost stanovení. Doba trvání jednoho měřicího cyklu se pohybuje okolo 30 s. Průtokové rychlosti jsou u FIA a SIA techniky téměř shodné a pohybují se okolo $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Získání reprodukovatelného koncentračního gradientu produktu dosáhneme přesnou synchronizací a opakovatelností jednotlivých programových kroků. Z toho vyplývá, že součástí SIA systému musí být i počítač s řídicí kartou a příslušným programovým vybavením, který řídí kroky měřicího cyklu a současně sbírá, uchovává a vyhodnocuje výstupní data³.

Hlavní výhodou SIA je jednoduchá instrumentace (jednokanálové uspořádání s jedním ventilem) a flexibilita, daná snadnou změnou parametrů měření pomocí jednoduchého ovládacího programu³. Mezi další výhody patří efektivní využití chemikálií, minimalizace odpadu a snadná manipulace s rizikovými látkami. Využití má nejen ve farmacii, ale také v potravinářství, zemědělství a ekologii⁴.

3.1.3. Instrumentace SIA

Mezi hlavní součásti SIA systému patří čerpadlo, selekční ventil, mísící cívka, detektor a řídicí systém.

Čerpadlo je v podstatě jednokanálová dvousměrná pístová pumpa ovládaná pomocí počítače. Zajišťuje přesně definovaný a reprodukovatelný tok nosného proudu⁵.

Vícecestný selekční ventil (nejčastěji 6, 8 či 10 cestný) řadí zóny činidel a vzorku v mísící cívce. Ventil musí umožňovat libovolné kombinace nasávání roztoků z jednotlivých pozic. Obráceným pohybem čerpadla poté dochází k dokonalému promísení zón za vzniku reakčního produktu, který je dále detekován. Žádoucí je nulová kontaminace nasávaných roztoků roztoky nasávanými v předchozí fázi experimentu a proto je nutné po každé změně činidel celý systém před dalším měřením důkladně promývat dostatečným množstvím vyměňovaných roztoků³.

Mísící cívky využívané u SIA systému jsou většinou kratší a jednodušší než u metody FIA. Mohou sloužit pouze ke smísení zón nebo mohou být upravené za účelem optimalizace průběhu požadované chemické reakce. Umístění cívky v systému není striktně dáno, ale většinou je umístěna mezi čerpadlem a selekčním ventilem. Některé systémy mají ještě druhou cívku před detektorem, která slouží k dokonalému promísení vzorku a činidla u pomaleji probíhajících reakcí.

Detektory používané k detekci v SIA systému musí být opatřeny průtokovou měřicí celou. V praxi se nejčastěji používají spektrometrické (UV/VIS spektrometrické, fluorescenční, chemiluminiscenční) nebo elektrochemické (amperometrické, vodivostní) detektory⁵.

3.1.4. Využití SIA při stanovení chininu a MSM

SIA systém byl v této diplomové práci použitý pouze k dávkování vzorku (roztok chininu nebo MSM v daném rozpouštědle) a následné detekci pomocí detektoru PMT (photomultiplier tube, fotonásobič). Díky SIA systému byla jednotlivá stanovení poměrně rychlá a získané výsledky budou sloužit jako podklad pro výběr detekční techniky MSM po jeho zakoncentrování extrakcí organickým rozpouštědlem.

3.2. Chinin

Chinin je hlavním alkaloidem z kůry chinovníku a pro své výrazné antimalarické a antipyretické účinky... Roztoky chininu se vyznačují výraznou fluorescencí v UV světle. Obsah chininu se tedy velmi často stanovuje fluorimetricky, přičemž se využívá fluorescence chininu v kyselém prostředí. V této práci byl chinin zvolen jako modelová látka, na které byl sledován vliv organických rozpouštědel na fluorimetrickou detekci v SIA systému.

3.3. Metsulfuron-methyl

Metsulfuron-methyl je herbicid nejčastěji používaný k hubení plevelů, listnatých porostů, křovin a trav. Zastavuje buněčné dělení ve výhoncích a kořenech rostlin. Používá se na plantážích obilnin – pšenice, ječmen, žito, a osetí pastvin.

3.3.1. Chemické vlastnosti a toxicita MSM

Metsulfuron-methyl je herbicid odvozený od sulfonylmočoviny s přesným chemickým názvem (IUPAC) Methyl 2-[3-(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)ureidosulfonyl] benzoate a molekulovou hmotností 381,4. Jedná se o bílou až světle žlutou látku rozpustnou ve vodě i některých organických rozpouštědlech⁶.

Tabulka 1: Rozpustnost MSM ve vodě

Rozpustnost MSM ve vodě při 25°C	
pH	rozpustnost (mg/l)
4,6	270
5,4	1750
7,0	2790
9,0	213000

Tabulka 2: Rozpustnost v organických rozpouštědlech

Rozpustnost MSM v organických rozpouštědlech při 25°C	
Rozpouštědlo	rozpustnost (mg/l)
Aceton	36000
n-hexan	0,79
Metanol	7300
Dichlormethan	121000

MSM má velmi nízkou toxicitu pro savce. Na základě laboratorních testů na potkanech je LD50 při perorálním podání 5000 mg/kg. Byla vyzkoušena i inhalační toxicita se střední letální koncentrací ve vzduchu větší než 5 mg/l vzduchu. Při těchto testech nebyly u testovaných zvířat pozorovány žádné mutagenní, karcinogenní ani teratogenní účinky.

3.3.2. Možnosti detekce a stanovení MSM

Možnosti detekce a stanovení MSM jsou velice rozmanité a zahrnují spoustu metod, z nichž jsou níže zmíněny jen některé. Příkladem jsou průtokové injekční metody, kapilární elektroforéza či chromatografické metody nejčastěji ve spojení s fotochemicky indukovanou fluorescencí.

3.3.2.1. Průtoková injekční analýza (FIA)

a) Citlivé a rychlé FIA stanovení MSM ve vodě s micelární fotochemicky - indukovanou fluorescenční detekcí (MEPIF)⁷

FIA v kombinaci s MEPIF byla vyvinuta pro citlivé a rychlé stanovení herbicidů odvozených od sulfonylmočoviny ve vodě. Využití micelárních roztoků SDS a CTAC jako nosného proudu zvýšilo citlivost stanovení. Parametry FIA, jako je dávkovaný objem (280 – 390 μl), průtoková rychlost (0,67 – 1,0 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$) a vlnové délky excitace a emise, byly optimalizovány pro každou látku zvlášť. Kalibrační grafy byly lineární v rozmezí 1-2 řádů. Relativní standardní odchylka byla v rozmezí od 1,5% do 3,7%. Limit detekce (LOD) byl nalezen v rozmezí od 0,1 do 1 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ podle dané sloučeniny. Rychlost analýzy byla mezi 56 a 80 h^{-1} . Průměrná výtěžnost se pohybovala v rozmezí 90 až 106% pro „spikované“ vzorky říční vody⁷.

b) Stanovení MSM v průtokovém systému s pevným spektroskopickým senzorem založeným na fotochemicky indukované fluorescenci v micelárním médiu⁸

Micely, obsahující silně fluorescenční produkty rozkladu, jsou po UV ozáření herbicidu silně vázány na C18 gelu umístěném v průtokové cele. Výsledný signál je monitorovaný při 378 nm (emisní vlnová délka) po ozáření při 323 nm (excitační vlnová délka). Pevný spektroskopický senzor je snadno vyměnitelný (cca po 500 nástřicích). Tento systém byl kalibrován pro dva dávkované objemy vzorku, 300 a 1000 μl . Detekční limity a relativní směrodatné odchylky byly 0,71 a 0,14 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, 4,5 a 3,3% pro oba zmíněné dávkované objemy. Systém ukazuje velmi vysokou rychlost stanovení, 34 (300 μl) a 36 (1000 μl), analýz za hodinu. Optosensor byl úspěšně použit ke stanovení herbicidů v říčních, studničních a zavlažovacích vodách (výtěžnost se pohybovala v rozmezí 96,0 - 106,0%)⁸.

c) Fluorimetrické stanovení MSM se současným použitím systému FIA s pevným senzorem a fotochemickou derivatizací⁹

Průtokový vícekanálový optosensor v kombinaci s fotochemicky indukovanou fluorescencí (PIF) byl navržen pro současné stanovení binární pesticidové směsi. Snímání signálu bylo založeno na on-line separaci dvou analytů (thiabendazol a metsulfuron-methyl) prostřednictvím jejich časového rozlišení – doby, kdy jsou monitorovány analytické signály fotoproduktů na vhodném pevném senzoru. MSM poskytoval silně fluorescenční fotoprodukt produkovaný on-line v micelárním médiu díky působení UV záření. Rozkladné fotoprodukty dvou herbicidů byly rozděleny ve FIA systému s minikolonou, vyplněnou C18 silikagelem. Sorpce herbicidů na pevném nosiči v průtokové cele poskytovala znatelné zlepšení v citlivosti a selektivitě při srovnání s jejich stanovením v homogenním roztoku. Detekční limity a relativní směrodatné odchylky pro thiabendazol a metsulfuron-methyl byly 2,5 a 3,3 ng.ml⁻¹ a 1,1 a 2,4% .

Mezi hlavní výhody této metody patří selektivita, vysoká citlivost, rychlost, jednoduchost a nízká cena v porovnání se zavedenými chromatografickými metodami. Selektivita byla zajištěna retencí sledovaných herbicidů na pevné fázi fotosenzoru. Metoda je vysoce citlivá, protože sorpce herbicidu byla sledována na malé ploše pevné fáze umístěné v průtokové cele.

Fotochemicky indukovaná fluorescenční metoda použitá pro derivatizaci MSM byla provedena bez použití chemických činidel, která jsou často drahá a/nebo škodlivá, proto je tato metoda šetrná k životnímu prostředí.

Vyvinutá metoda překonává důležitý handicap konvenčních PIF metod:

- 1) rušení stanovení jinými pesticidy, které představují látky s přirozenou fluorescencí
- 2) generování fluorescenčního fotoproduktu pod UV zářením

Provádění této metody představuje velmi atraktivní a přínosnou oblast výzkumu, protože je vhodná jako pre-screeningová metoda umožňující snížení počtu vzorků, které musí být zpracovány prostřednictvím konvenčních chromatografických metod⁹.

3.3.2.2. Kapilární elektroforéza

a) Jednoduchý a rychlý způsob stanovení MSM ve vzorcích vody pomocí vícevrstvých uhlíkových nanotrubic a kapilární elektroforézy¹⁰

Nová metoda pro stanovení MSM v různých vzorcích vody byla založena na extrakci na tuhé fázi (SPE) v kombinaci s kapilární elektroforézou. Tuhou fází tvoří vícevrstvé uhlíkové nanotrubic (MWCNTs).

Vlastnímu stanovení předcházelo zakoncentrování roztoku pomocí FIA systému. Optimalizace FIA systému: Eluční činidlo složené z 250 μl vodného roztoku s obsahem methanolu 50% (v/v) a acetonitrilu 2% (v/v), objem vstříkovaného vzorku byl 10 ml a průtoková rychlost 1,15 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Ve FIA systému byla umístěna extrakční kolona s 6 mg MWCNTs.

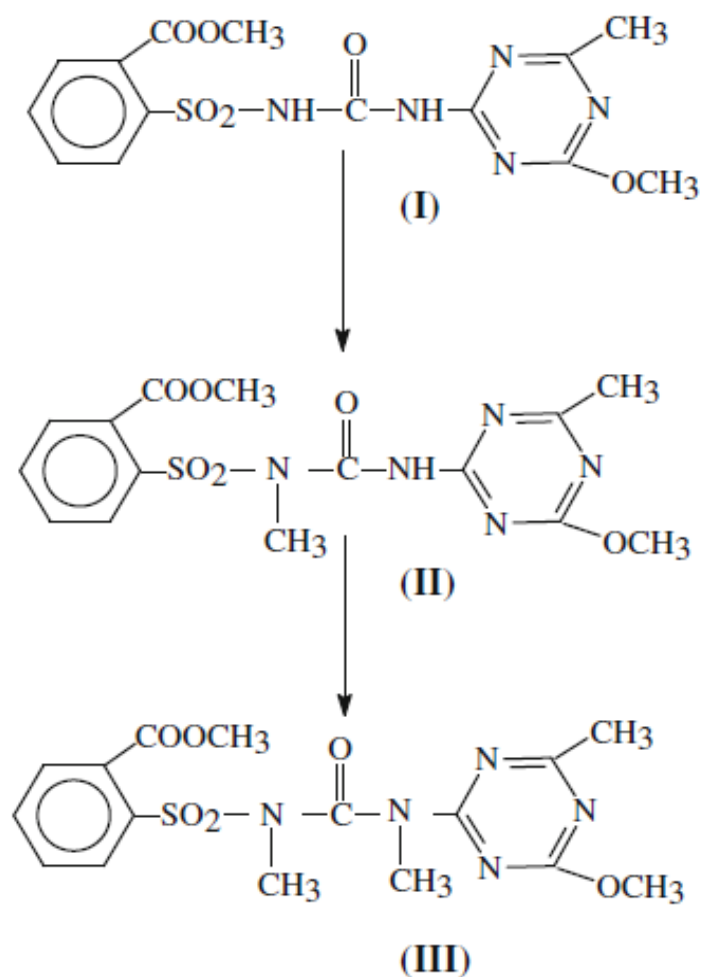
Stanovení pomocí kapilární elektroforézy se ukázalo velice rychlé. Výsledky byly získány v časovém intervalu 9 min pomocí jednoduchého elektroforetického pufru (50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ tetraboritan sodný s 3% methanolem, $\text{pH} = 9,0$). Kalibrační křivky byly lineární mezi 0,5 a 6,0 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ pro MSM s korelačním koeficientem 0,995 a 0,997. Opakovatelnost navrhované metody, vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka (RSD) se pohybovala v rozmezí 4,1% a 5,4% ($n = 10$) a detekční limity byly 0,40 a 0,36 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Výtěžnost se pohybovala v rozmezí 86-108%¹⁰.

3.3.2.3. Chromatografické metody

a) Stanovení MSM z půdy pomocí plynové chromatografie¹¹

Metoda plynové chromatografie byla vyvinuta pro stanovení residuí MSM z půdy. Vzhledem k tepelné nestabilitě MSM a jeho monomethylového derivátu, byl herbicid derivatizován na dimethylový derivát pomocí diazomethanu. Struktura derivatizovaného produktu byla potvrzena GC-MS. Čas pro methylaci byl standardizovaný a jako optimální čas v ethylacetátovém rozpouštědle byla stanovena doba 24 hodin. Limit detekce (LOD) a mez detekce (LOQ) této metody byly 0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a 0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Stanovení MSM není možné provést přímo metodou plynové chromatografie (GC) kvůli jeho tepelné nestabilitě a extrémně nízké těkavosti. GC metoda může být použita pro stanovení močoviny a sulfonyl močoviny pouze po derivatizaci původní sloučeniny, tedy po methylovaní MSM pomocí diazomethanu v ethylacetátu (24hod). Tato technika je citlivá a může být použita i pro mikrostanovení¹¹.



Obrázek 2: Struktura MSM (I), monomethylového derivátu (II) a dimethylového derivátu (III)¹¹

b) Stanovení MSM pomocí extrakce tuhou fází s ultra-vysoko-účinnou kapalinovou chromatografií (UHPLC) ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií¹²

Citlivá a velmi rychlá analytická metoda byla vyvinuta pro stanovení herbicidů odvozených od sulfonylmočoviny v povrchových vodách. Vzorok vody byly okyseleny, a cílové herbicidy byly extrahovány pomocí ProElut C18 extrakčních kazet. Po sušení proudem dusíku, byly kazety eluovány elučními rozpouštědly a eluát byl poté odpařen do sucha, rozpuštěn a analyzován. Mobilní fáze byla tvořena 0,02% kyseliny mravenčí a acetonitrilem (gradientová eluce). Tandemově spojený hmotnostní spektrometr byl triple kvadrupól vybaven elektrosprejovým ionizačním zdrojem. Vzorek byl sledován pomocí protonované molekuly a svých dvou charakteristických fragmentů. Limit detekce (LOD) byl nižší než $1,0 \text{ ng.ml}^{-1}$ a limit kvantifikace (LOQ) byl mezi 1 a 8 ng.ml^{-1} . Vyvinutá metoda je citlivá, vysoce specifická, přesná a relativně rychlá (délka separace 20-60 min). Je určena pro stanovení herbicidu v zemědělských odtokových vodách nebo zdrojů vody z jiných venkovských oblastí¹².

c) Stanovení MSM v půdě kapalinovou mikroextrakcí v kombinaci s micelární elektrokinetickou chromatografií¹³

Nová metoda stanovení herbicidů z půdy vycházela z disperzní extrakce pevnou fází (DSPE), mikroextrakce disperzní kapalinové mikroextrakce (DLLME) a micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC). Metodou DSPE-DLLME, bylo poprvé extrahováno 10 g vzorku půdy s 10 ml acetonitrilu s obsahem 5% kyseliny mravenčí (pH 3,0). Extrakt byl čištěn díky DSPE s pevným sorbentem C18. Poté byl 1 ml výsledného extraktu přidán do centrifugační zkumavky obsahující 5 ml vody o pH 2,0 a 60,0 μl chlorbenzenu (extrakční rozpouštědlo) pro DLLME extrakci. Roztok extraktu organického vzorku byl odpařen do sucha a rozpuštěn ve 20,0 μl $1,0 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 10,0) pro stanovení pomocí micelární elektrokinetické chromatografie.

Linearita metody pro stanovení MSM byla potvrzena v rozmezí od 1,7 do 200 ng.g^{-1} s korelačním koeficientem v rozmezí 0,9965 - 0,9983. Limit detekce (LOD) se pohyboval od 0,5 až $1,0 \text{ ng.g}^{-1}$.

Tato metoda umožňuje selektivně stanovit některé herbicidy ve stopovém množství v komplexních maticích půdy. Ve srovnání s jinými konvenčními metodami přípravy vzorku, tato kombinovaná technika nabízí výhody, jako je jednoduchost, snadnost provedení, nižší spotřeba organických rozpouštědel a vysoká citlivost¹³.

d) Světlem indukovaná fluorescenční detekce MSM ve vodě s využitím HPLC, LC-MS a GC¹⁴

Fotodegradace MSM byla zkoumána ve vodném roztoku při různém pH a vlnových délkách. Účinnost procesu byla hodnocena pomocí kvantových výnosů stanovení. Identifikace fotoproduktů naznačuje, že hlavní fotochemická cesta je zahájena disociací vazby C-S, poté následuje vznik hlavních konečných produktů:

2-hydroxy-methylbenzoát a (4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)aminocarbonylsulfonové kyseliny. Bylo prokázáno odlišné chování ve vodě a v organickém prostředí. V přítomnosti malého množství organického rozpouštědla (směs voda:acetonitril) nedochází přednostně k solvataci, ale jako hlavní produkt vzniká methylbenzoát. Při tomto stanovení MSM byl použitý k degradaci UV-Vis spektrofotometr, k detekci bylo využito chromatografických metod jako je HPLC, LC-MS a GC-MS.

Absorpční spektra byly zaznamenány na UV-Vis spektrofotometru (Perkin Elmer λ 15) a fluorescenční měření bylo provedeno pomocí spektrofluorimetru (Spex Jobin Yvon fluoromax-2). Mezi další instrumentální vybavení patřily chromatografické přístroje pro HPLC, LC-MS a GC.

Fotolýza MSM byla provedena ve vodě o pH 7 a 2, ve směsi voda:acetonitril v poměru 70:30 (v/v) a v 2-propanolu. Ozáření bylo provedeno při laboratorní teplotě (22°C) a dvou odlišných vlnových délkách (254 nm, 280 nm). Koncentrace měřených vzorků se pohybovala v rozmezí 3×10^{-5} M až 5×10^{-4} M. Po ozáření byly vodné roztoky analyzovány pomocí HPLC a identifikace produktů byla provedena GC – MS a LC – MS¹⁴.

Tato diplomová práce byla částečně založena na poznatcích z tohoto experimentálního stanovení MSM.

3.3.2.4. Fluorescenční detekce

Detekce herbicidů s využitím fluorescenční spektroskopie¹⁵

Fluorescenční spektroskopie nabízí několik výhod oproti jiným metodám detekce a kvantifikace chemických sloučenin. Tato technika byla nedostatečně využita při detekci a kvantifikaci herbicidů. Fluorescenční vlastnosti 39 herbicidů představují hlavní možnosti jejich stanovení. Fluorescence analytických standardů byla měřena v acetonitrilu, směsi acetonitrilu a vody či směsi acetonitrilu, vody a silné kyseliny. Čtrnáct z 39 herbicidů fluoreskovalo do určité míry, sedm (bentazon, chloramben, difenzoquat, fluometuron, imazaquin a norflurazon) bylo použito pro další vývoj metody. Technické výhody a nevýhody fluorescenční spektroskopie herbicidů jsou v současné době diskutovány¹⁵.

4. Experimentální část

4.1. Materiál

4.1.1. Chemikálie

Aceton – Penta Chrudim, Česká Republika

Acetonitril – Sigma-Aldrich, Praha, Česká Republika

Dichlormethan – Fluka Chemika, Švýcarsko

Ethanol- Sigma-Aldrich, Praha, Česká Republika

Chloroform – Lachema n. p. Brno, závod Neratovice, Česká Republika

Isopropylalkohol – Penta Chrudim, Česká Republika

Metsulfuronmethyl – Sigma-Aldrich, Praha, Česká Republika

Methanol – Sigma-Aldrich, Praha, Česká Republika

Toluen – Sigma-Aldrich, Praha, Česká Republika

4.1.2. Přístroje a software

FIALab 3000, FIALab instruments, Bellevue, USA

Software FIALab pro Windows, verze 5.9.298, FIALab Instruments, Bellevue, USA

Fluorescenční průtoková cela

Detektor PMT (photomultiplier tube), Fialab Instruments, Bellevue, USA

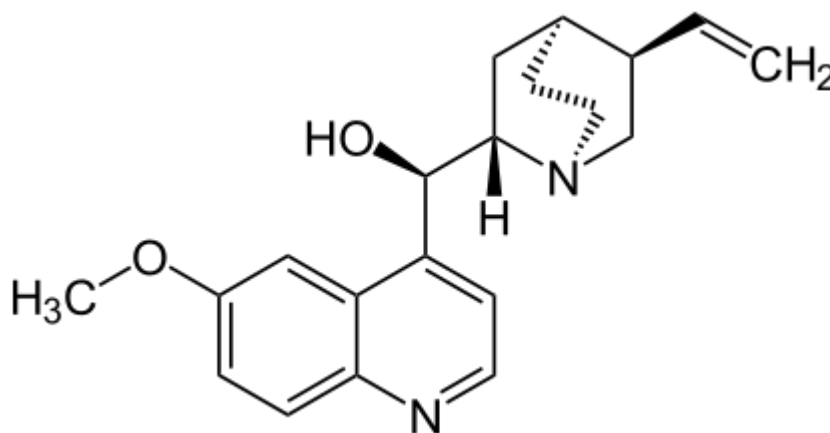
UV lampa s nastavitelnou vlnovou délkou 254 nm a 366 nm

4.2. Pracovní postup

4.2.1. Fluorescenční detekce chininu v SIA systému

„Chinin se vyskytuje v kůře tropických stromů rodu Cinchona. Stále ještě je významným lékem proti malárii. Má výrazně hořkou chuť a je proto přidáván do některých typů nápojů. Oba dusíkové atomy v molekule chininu mohou být protonizovány. Opětná disociace těchto vodíkových iontů je charakterizována disociačními konstantami přibližně $pK_1 = 4,3$ (chinolinový dusík) a $pK_2 = 8,3$ (chinuklidinový dusík). S kyselinami tvoří chinin soli. Bývá dodáván ve formě síranu $(C_20H_{24}N_2O_2)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$ ($Mr = 782,96$), který je ale do určité míry hygroskopický, takže obsah vody v různých preparátech může značně kolísat. Jeho roztoky za určitých podmínek jasně modře fluoreskují.“¹⁶

V této diplomové práci sloužil chinin jako modelová látka, na které byl předběžně vyzkoušen vliv organických rozpouštědel na fluorescenční detekci.



Obrázek 3: Struktura chininu¹⁷

4.2.1.1. Kalibrační závislost

Ze zásobního roztoku s obsahem 25 mg/l síranu chininia v 0,05 M H₂SO₄ byly připraveny (v 25ml odměrných baňkách) roztoky s koncentracemi síranu chininia v rozmezí 1 – 100 mg/l v 0,05 M H₂SO₄ podle tabulky 3.

Tabulka 3: Příprava roztoků

V zásobního roztoku (ml)	1	2	5	7	10	20	50	70	100
c chininia (mg/l)	1	2	5	7	10	20	50	70	100

K vlastnímu ovládní byl použit program FIAlab for Windows 5.9.298. V příslušném řídicím programu byla nastavena průtoková rychlost 80 µl/s a množství aspirovaného vzorku na 50 µl. Nastavení detektoru PMT: integrační čas 100 ms a skenovací rychlost 8 Hz. Po každé výměně rozpouštědel byl systém minimálně 3x promýván novým rozpouštědlem pomocí programu na promývání.

S připravenými kalibračními roztoky byla proměřena kalibrační křivka v daném rozmezí koncentrací. Jako nosný proud i rozpouštědlo byla v SIA systému použita voda. Kalibrace byla vyhodnocena lineární regresí.

4.2.1.2. Vliv organických rozpouštědel na fluorescenční detekci chininu

Cílem dále popsaných experimentů bylo zjistit, jak ovlivní fluorescenční detekci roztoku síranu chininia záměna vodného rozpouštědla za organické.

V rámci experimentální části byly použity dva způsoby:

- a) nosným proudem byla voda a rozpouštědlem standardu organické rozpouštědlo (methanol, isopropylalkohol, ethanol)

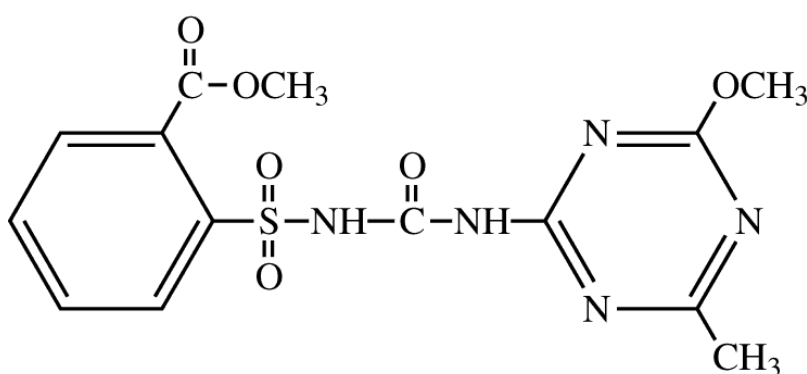
b) nosným proudem i rozpouštědlem standardu bylo organické rozpouštědlo (methanol, isopropylalkohol, ethanol, dichlormethan)

Výsledky byly zaznamenány v názorných grafech, ze kterých lze porovnat, jaký způsob záměny rozpouštědla byl nejvýhodnější a jakým způsobem se změnila základní linie detektoru a fluorescenční signál této modelové látky.

4.2.2. Fluorescenční detekce metsulfuron methyly v organických rozpouštědlech

MSM je herbicid odvozený od sulfonylmočoviny, který se nejčastěji používá k hubení plevelů, křovinatých porostů či trav. Mechanismus účinku spočívá v zástavě buněčného dělení ve výhoncích a kořenech rostlin. Nejčastěji je používán při pěstování obilnin – pšenice, ječmen, žito, a osetí pastvin. K detekci zbytků MSM v půdě a podzemních vodách se prozatím používá chromatografie (hmotnostní spektrometrie, plynová chromatografie) a biologické zkoušky⁶.

V kapitole 5.2. jsou uvedeny poznatky a výsledky detekce v SIA systému za použití různých organických rozpouštědel.



Obrázek 4: Struktura metsulfuron-methyly¹⁸

4.2.2.1. Příprava zásobního roztoku metsulfuron-methylu

Zásobní roztok byl připraven z metsulfuron-methylu od firmy Sigma-Aldrich. Koncentrace zásobního roztoku byla 25 mg/l a byl připraven pomocí vybraných organických rozpouštědel podle způsobu detekce.

Postup:

2,5 mg MSM bylo rozpuštěno ve 100ml odměrné baňce ve vybraném rozpouštědle:

- a) voda
- b) aceton
- c) směs voda:acetonitril
- d) chloroform

4.2.2.2. Fluorescenční detekce MSM

Fluorescenční detekce byla provedena s vybranými organickými rozpouštědly – voda, aceton, směs voda:acetonitril a chloroform. Pro každé rozpouštědlo byla před vlastní detekcí MSM proměřena základní linie. K měření byl vždy odebrán vzorek z předem připraveného zásobního roztoku o koncentraci 25 mg/l. Každé měření bylo provedeno třikrát a k vyhodnocení sloužil průměr těchto tří hodnot.

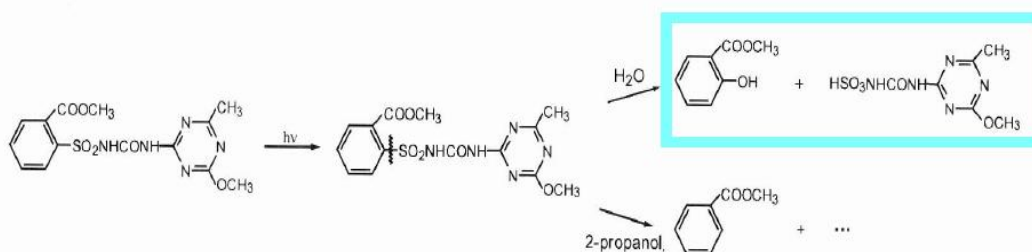
Fluorescenční detekce byla proměřena za různých podmínek – změna pH vzorku, vliv působení UV záření. Výběr podmínek měření byl proveden na základě poznatků čerpaných z odborného článku o degradaci MSM působením UV záření [CASELLI, Monica. Light-induced degradation of metsulfuron-methyl in water]¹⁴.

Výsledné hodnoty byly zaznamenány v tabulkách a grafech v kapitole 5.2., ze kterých lze porovnat, jaký způsob záměny rozpouštědla byl výhodný a jakým způsobem se změnila základní linie detektoru a fluorescenční signál MSM.

4.2.3. Studium rozkladu MSM působením UV záření a následná fluorescenční detekce rozkladných produktů

Cílem této části práce bylo zjistit vliv UV záření na rozklad MSM a následnou fluorescenční detekci rozkladných produktů. UV rozklad v různých rozpouštědlech může vést k různým rozkladným produktům, z nichž některé vykazují vyšší a jiné nižší intenzitu fluorescence.

Měření byla provedena na základě informací z odborného článku o degradaci MSM, ve kterém byly použity vlnové délky 254 nm a 280 nm pomocí nízkotlaké rtuťové obloukové lampy při pH roztoku 7 a 2 ve směsi voda:acetonitril v poměru 7:3. Z výzkumu vyplývá, že ozáření MSM ve vodě má za následek rozštěpení vazby C-S a vznik dvou hlavních produktů, 2-hydroxy-methylbenzoátu a (4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)aminocarbonylsulfonové kyseliny (obrázek 5)¹⁴.



Obrázek 5: Rozklad MSM ve vodě a 2-propanolu

V přítomnosti malého množství organického rozpouštědla nedochází přednostně k solvataci, ale jako hlavní produkt vzniká methylbenzoát¹⁴.

K provedení experimentu v této diplomové práci byla použita vlnová délka 254 nm a 366 nm, vlastní rozklad byl prováděn pomocí UV lampy. Fluorescenční detekce byla měřena zpravidla po 15 min působení UV záření s roztoky bez úpravy pH a

s okyselenými roztoky. Změna pH měřených roztoků byla provedena přidávkem koncentrované kyseliny sírové na výslednou hodnotu $\text{pH} = 2$.

V kapitole 5.2. jsou zaznamenány hodnoty fluorescence za různých podmínek v tabulkách a grafech, které popisují vhodnost působení UV záření v organických rozpouštědlech.

4.2.4. Studium vlivu pH na fluorescenční detekci

MSM

K provedení fluorescenční detekce při různém pH bylo použito stejné nastavení přístroje jako v předchozích experimentech. Byly připraveny zásobní roztoky MSM o koncentraci 25 mg/l, jako rozpouštědlo byla použita v prvním případě směs voda:acetonitril (7:3) a v případě druhém byla použita voda. Ze zásobních roztoků byla připravena řada vzorků v rozmezí pH 1 – 6. K okyselení byla použita H_3PO_4 85% a k získání bazického pH roztok NaOH. Výsledky byly zaznamenány v tabulkách 20, 21 a obrázcích 17 a 18 v kapitole 5.3.

4.2.5. Kalibrační závislost stanovení MSM v chloroformu

K proměření kalibrační závislosti MSM v chloroformu bylo použito stejné nastavení přístroje jako v předchozích experimentech. Nejprve byl připraven zásobní roztok MSM o koncentraci 25 mg/l v chloroformu. Z tohoto zásobního roztoku byly následně připraveny (v 25 ml odměrných baňkách) roztoky s koncentracemi MSM v rozmezí 5 – 25 mg/l. Roztoky nebyly dále upravovány změnou pH ani UV degradací. Výsledky byly zaznamenány v tabulce 22 a obrázku 19 a 20 v kapitole 5.4. Z rovnice kalibrační závislosti byly vypočítány limity detekce a kvantifikace jako trojnásobek a desetinásobek průměrné směrodatné odchylky (vztažené na nejnižší koncentraci měřenou v rámci kalibrace) s přičtenou hodnotou základní linie detektoru.

5. Výsledky a diskuze

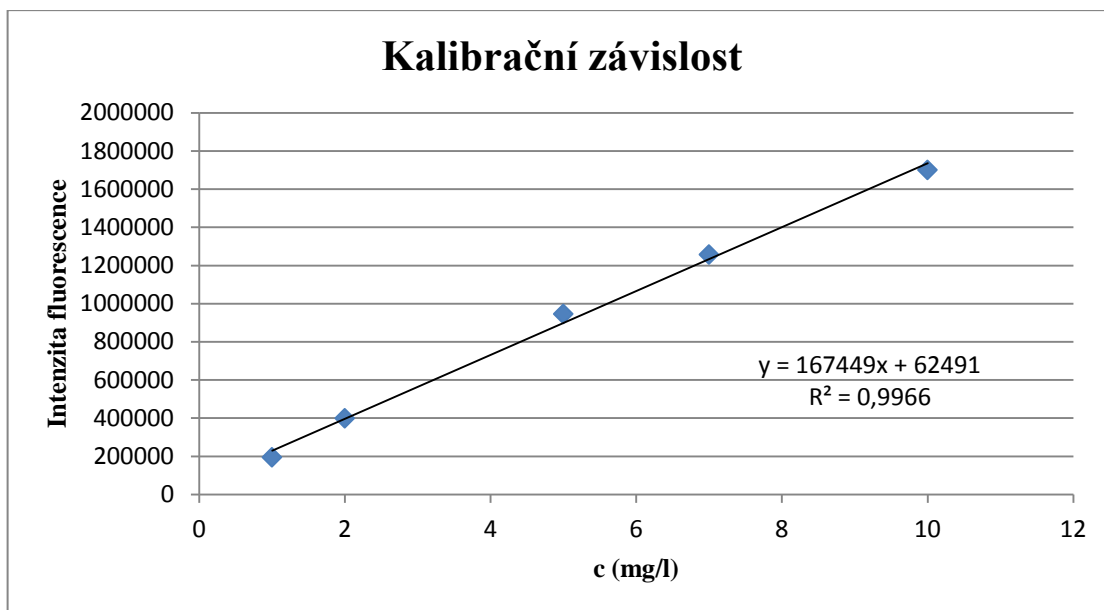
5.1. Fluorescenční detekce chininu v SIA systému

5.1.1. Kalibrační závislost

Proměření kalibrační závislosti bylo provedeno z důvodu prokázání lineární závislosti získaného fluorescenčního signálu v SIA systému na vzrůstající koncentraci standardních roztoků.

Tabulka 4: Kalibrační závislost roztoku síranu chininia v rozmezí koncentrací 1 – 10 mg/l

	c (mg/l)	10	7	5	2	1
intenzita fluorescence (AU)	1	1837612	1386811	1076485	524738	320941
	2	1816957	1378396	1063196	520838	316814
	3	1817093	1376330	1067358	521003	315991
	průměr	1823887	1380512	1069013	522193	317915
	Odečtení základní linie detektoru	1700916	1257541	946042	399222	194944
	RSD	0,53%	0,33%	0,52%	0,34%	0,68%

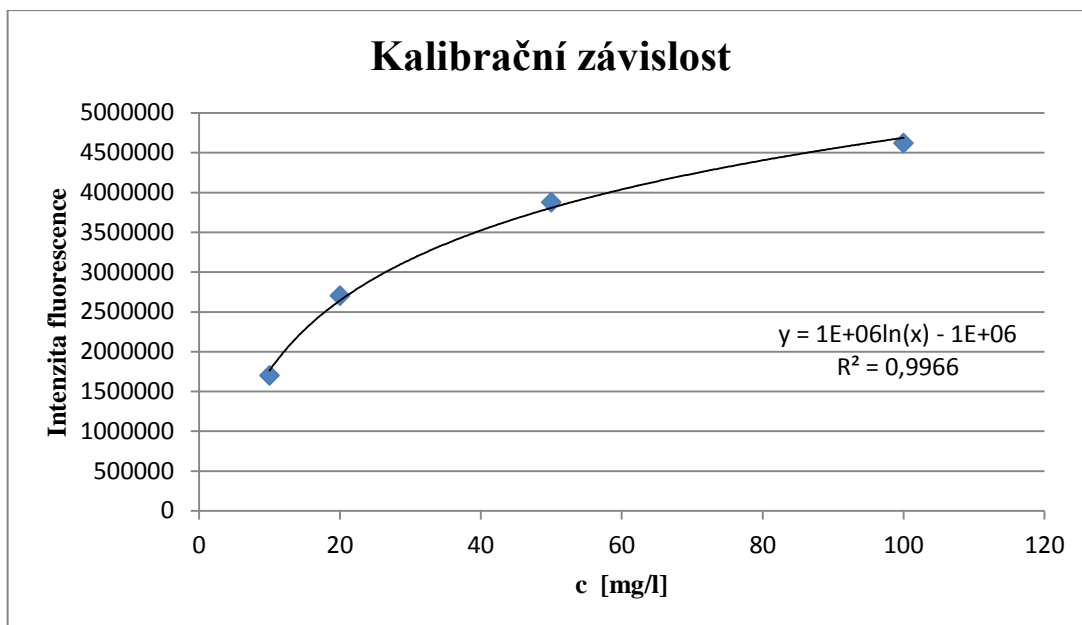


Obrázek 6: Kalibrační závislost sáranu chininia (1 – 10 mg/l)

Graf byl vytvořen z hodnot vyjadřujících rozdíl mezi průměrným naměřeným signálem a základní linií. Kalibrační závislost je v rozmezí koncentrací 1 – 10 mg/l lineární s korelačním koeficientem 0,9966.

Tabulka 5: Získané signály roztoku sáranu chininia v rozmezí koncentrací 10 – 100 mg/l

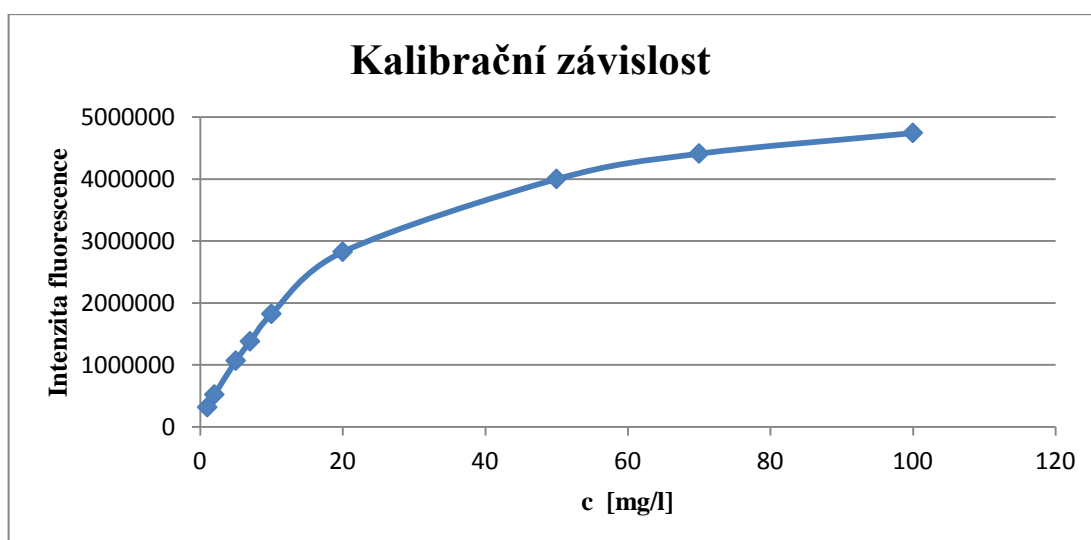
	c (mg/l)	100	50	20	10
intenzita fluorescence (AU)	1	4670948	4065578	2833832	1837612
	2	4654536	3957705	2826106	1816957
	3	4903527	3977517	2817796	1817093
	průměr	4743004	4000267	2825911	1823887
	Odečtení základní linie detektoru	4620033	3877296	2702940	1700916
	RSD	2,40%	1,17%	0,23%	0,53%



Obrázek 7: Kalibrační závislost síranu chininia (10 – 100 mg/l)

Graf byl vytvořen z hodnot vyjadřujících rozdíl mezi průměrným naměřeným signálem a základní linií.

Kalibrační závislost v rozmezí koncentrací 10 – 100 mg/l již vykazuje nelineární průběh, který lze popsat logaritmickou závislostí intenzity fluorescence na koncentraci standardů.



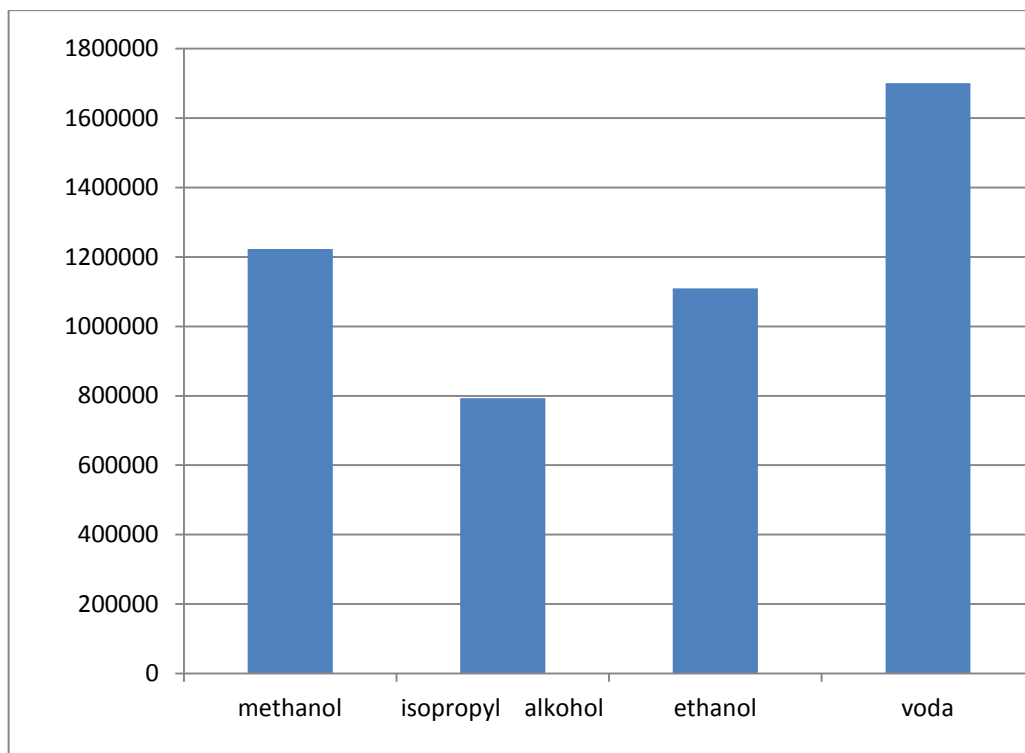
Obrázek 8: Kalibrační závislost síranu chininia v celém měřeném rozsahu (1 – 100 mg/l)

Kalibrační závislost vykazuje charakteristický tvar pro fluorescenční stanovení, ve kterém dochází u nižších koncentrací k lineárnímu nárůstu fluorescenčního signálu, zatímco u vyšších koncentrací se začíná měnit v důsledku zhášení fluorescence v koncentrovaných roztocích.

5.1.2. Vliv organických rozpouštědel na fluorescenční detekci chininu

Tabulka 6: Záměna vodného rozpouštědla za organické

Roztok síranu chininia 10mg/l					
nosný proud		voda			
rozpuštědlo		methanol	isopropyl alkohol	ethanol	voda
intenzita fluorescence (AU)	základní linie	122971			
	1	1467820	836205	1236506	1837612
	2	1448071	1026092	1308578	1816957
	3	1123345	887279	1151809	1817093
	Průměr	1346412	916525	1232298	1823887
	Odečtení základní linie detektoru	1223441	793554	1109327	1700916
	RSD	11,73%	8,75%	5,20%	0,53%

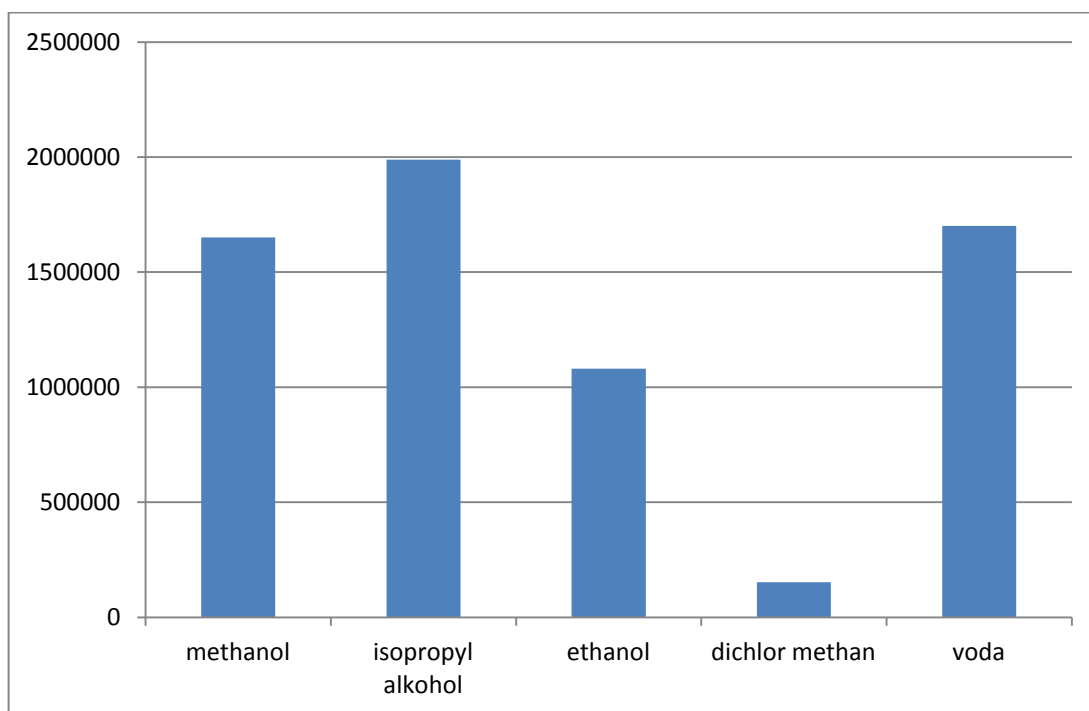


Obrázek 9: Fluorescenční detekce chininu - záměna vodného rozpouštědla za organické

Z uvedené tabulky č.6 a obrázku č.9 vyplývá, že jako nejvhodnější organické rozpouštědlo by se při fluorescenční detekci roztoku síranu chininia uplatnil methanol, který při přípravě standardu poskytl nejvyšší intenzitu fluorescence ze všech testovaných organických rozpouštědel. Ve všech případech ale došlo k poklesu intenzity fluorescence ve srovnání s vodným roztokem. Z níže uvedené tabulky č.7 a obrázku č.10 lze usoudit, že se jako vhodnější jeví nejen změna rozpouštědla pro přípravu standardu, ale současně také výměna vodného nosného proudu za organické rozpouštědlo. V této úpravě nedochází k výraznému ovlivnění základní linie detektoru změnou nosného proudu a matrice měřeného vzorku/standardu.

Tabulka 7: Záměna vodného nosného proudu a rozpouštědla za organické

Roztok síranu chininia 10mg/l						
nosný proud		methanol	isopropyl alkohol	ethanol	dichlor methan	voda
rozpuštědlo		methanol	isopropyl alkohol	ethanol	dichlor methan	voda
intenzita fluorescence (AU)	základní linie	187482	163111	412815	239136	122970
	1	1826214	2144863	1528341	399888	1837612
	2	1814161	2154863	1435447	394002	1816957
	3	1874949	2154043	1514911	378982	1817093
	průměr	1838441	2151256	1492900	390957	1823887
	Odečtení základní linie detektoru	1650959	1988145	1080085	151821	1700917
	RSD	1,43%	0,21%	2,75%	2,25%	0,53%



Obrázek 10: Fluorescenční detekce chininu – záměna vodného nosného proudu a rozpouštědla za organické

Záměnou nosného proudu i rozpouštědla se jako nejvýhodnější jevil isopropylalkohol. Získaný signál byl v porovnání s detekcí za použití vodného nosného proudu a rozpouštědla výrazně vyšší.

5.2. Fluorescenční detekce metsulfuron methyly v organických rozpouštědlech

5.2.1. Detekce ve vodném prostředí

Nejdříve byla změřena základní linie a teprve poté byl detekován vodný roztok MSM o koncentraci 25 mg/l. Nosným proudem zde byla voda.

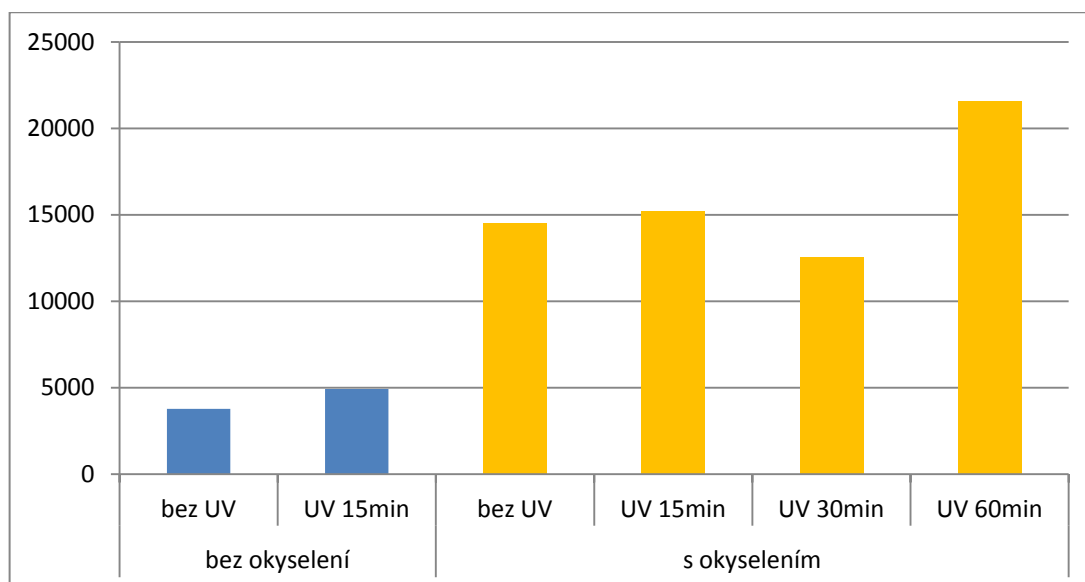
Tabulka 8: Základní linie

intenzita fluorescence (AU)	1	112022
	2	109968
	3	109405
	průměr	110465
	RSD	1,02%

Při zpracování výsledků byly zahrnuty určité změny podmínek měření např. změna pH a použití UV záření před danou detekcí. Změna pH byla zajištěna přidávkem koncentrované H_2SO_4 na $pH = 2$. K degradaci MSM UV zářením byla použita vlnová délka λ 254 nm.

Tabulka 9: Detekce ve vodném prostředí za různých podmínek

	λ 254	bez okyselení		s okyselením			
	voda	bez UV	UV 15min	bez UV	UV 15min	UV 30min	UV 60min
intenzita fluorescence (AU)	1	117627	115674	125912	127157	122675	145255
	2	113315	115316	125305	125351	123057	128275
	3	111763	115192	123795	124613	123366	122643
	průměr	114235	115394	125004	125707	123033	132058
	Odečtení základní linie detektoru	3770	4929	14539	15242	12568	21593
	RSD	2,17%	0,18%	0,71%	0,85%	0,23%	7,28%



Obrázek 11: Hodnocení vlivu změny pH a rozkladu vlivem UV záření na fluorescenční detekci MSM ve vodných roztocích

Z uvedených hodnot vyplývá, že roztok vykazuje vyšší intenzitu fluorescence v kyselém pH s předchozí degradací UV zářením o vlnové délce λ 254 nm. Intenzita fluorescence v roztoku s kyselým pH po 60 min degradaci UV zářením byla o 473% vyšší než v roztoku s nezměněným pH a bez použití UV záření.

5.2.2. Detekce v prostředí acetonu

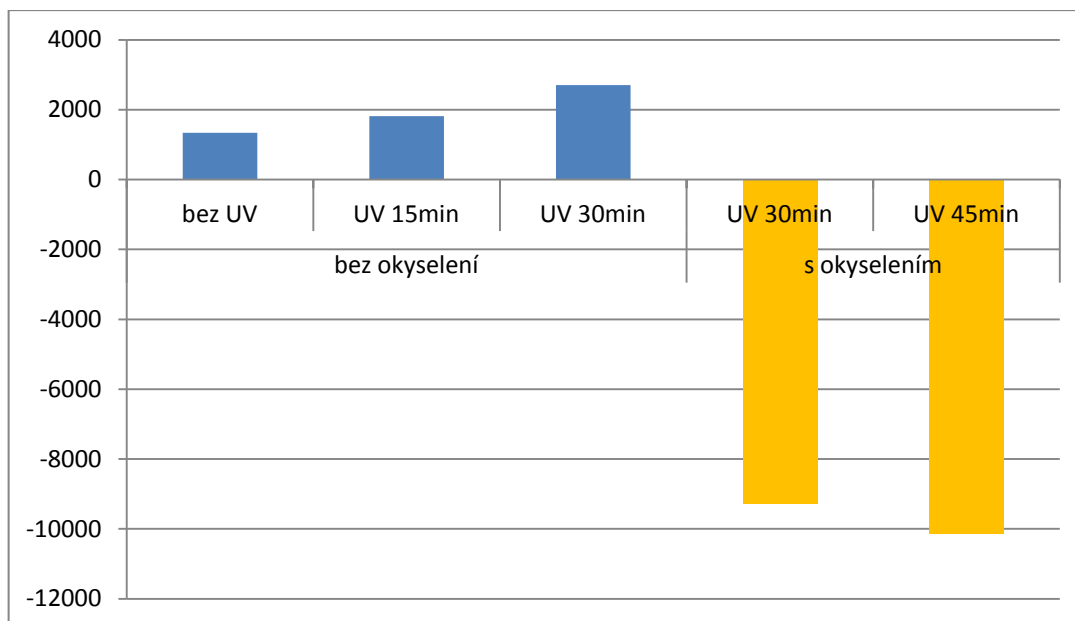
Nejdříve byla změřena základní linie a teprve poté byl měřen roztok MSM v acetonu o koncentraci 25 mg/l. Nosným proudem zde byla voda. Vzorek byl měřen za různých podmínek pH a rozkladu UV zářením stejně jako v předchozím experimentu.

Tabulka 10: Základní linie

intenzita fluorescence (AU)	1	316342
	2	313795
	3	317442
	Průměr	315860
	RSD	0,48%

Tabulka 11: Detekce v prostředí acetonu za různých podmínek

		λ 254	bez okyselení			s okyselením	
		aceton	bez UV	UV 15min	UV 30min	UV 30min	UV 45min
intenzita fluorescence (AU)	1	317204	315318	326914	307112	306005	
	2	317924	320108	314544	307963	305022	
	3	316471	317586	314224	304726	306189	
	průměr	317200	317671	318561	306600	305739	
	Odečtení základní linie detektoru	1340	1811	2701	-9260	-10121	
	RSD	0,19%	0,62%	1,85%	0,45%	0,17%	



Obrázek 12: Hodnocení vlivu změny pH a rozkladu vlivem UV záření na fluorescenční detekci MSM v acetonu

Z uvedených hodnot lze usoudit, že při detekci v prostředí acetonu není potřeba okyselení roztoků, protože při změně pH dochází ke snížení intenzity fluorescence. Avšak použití UV degradace se zdá být výhodnější než v předchozím případě při detekci ve vodném prostředí, protože se vlivem působení UV záření měřený signál postupně zvětšuje. Intenzita fluorescence byla po 60 min působení UV záření o 102% vyšší než bez jeho působení.

5.2.3. Detekce MSM ve směsi voda:acetonitril

Nejdříve byla opět změřena základní linie a teprve poté byl detekován roztok MSM ve směsi rozpouštědel v různých poměrech.

Byly použity tyto roztoky:

- a) MSM ve směsi voda:acetonitril v poměru 7:3
koncentrace měřeného roztoku: $10 \text{ mg/l} = 2,62 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
nosný proud: voda

- b) MSM ve směsi voda:acetonitril v poměru 7:3
koncentrace měřeného roztoku: $25 \text{ mg/l} = 6,55 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
nosný proud: voda
- c) MSM ve směsi voda:acetonitril v poměru 3:5
koncentrace měřeného roztoku: $25 \text{ mg/l} = 6,55 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
nosný proud: voda
- d) MSM ve směsi voda:acetonitril v poměru 5:5
koncentrace měřeného roztoku: $25 \text{ mg/l} = 6,55 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
nosný proud: voda
- e) MSM ve směsi voda:acetonitril v poměru 1:9
koncentrace měřeného roztoku: $25 \text{ mg/l} = 6,55 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
nosný proud: voda

Výsledné hodnoty získané měřením roztoků a, b, byly zaznamenány v níže uvedených tabulkách a grafech.

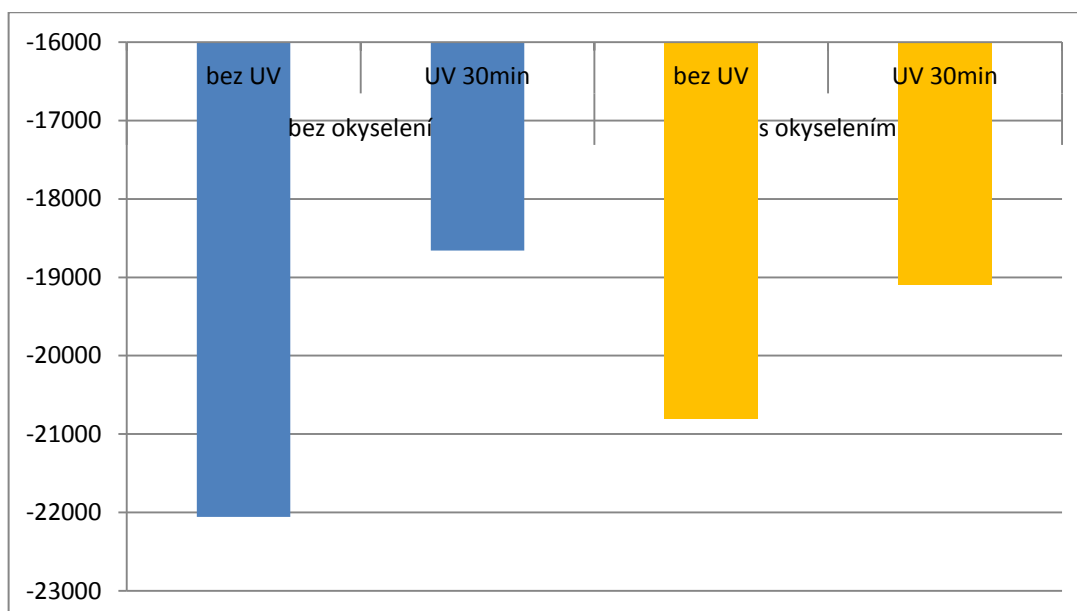
Tabulka 12: Základní linie

intenzita fluorescence (AU)	1	136734
	2	134379
	3	132374
	průměr	134496
	RSD	1,32%

a)

Tabulka 13: Detekce ve směsi voda:acetonitril v poměru 7:3; Koncentrace měřeného roztoku: 10 mg/l

	λ 254	bez okyselení		s okyselením	
	H ₂ O:ACN	bez UV	UV 30min	bez UV	UV 30min
intenzita fluorescence (AU)	1	111076	114557	111682	116350
	2	118508	113396	111993	113233
	3	110319	113714	111575	113282
	průměr	113301	113889	111750	114288
	Odečtení základní linie detektoru	-22055	-18660	-20799	-19092
RSD	3,26%	0,43%	0,16%	1,28%	



Obrázek 13: Hodnocení vlivu změny pH a rozkladu vlivem UV záření na fluorescenční detekci MSM ve směsi voda:acetonitril (7:3)

Z uvedených hodnot vyplývá, že směs voda:acetonitril připravená podle poznatků z odborného článku o světelné degradaci MSM¹⁴ není k detekci MSM příliš vhodná, protože po odečtení základní linie od naměřeného signálu byly všechny hodnoty záporné bez ohledu na to, jaké podmínky měření byly použity.

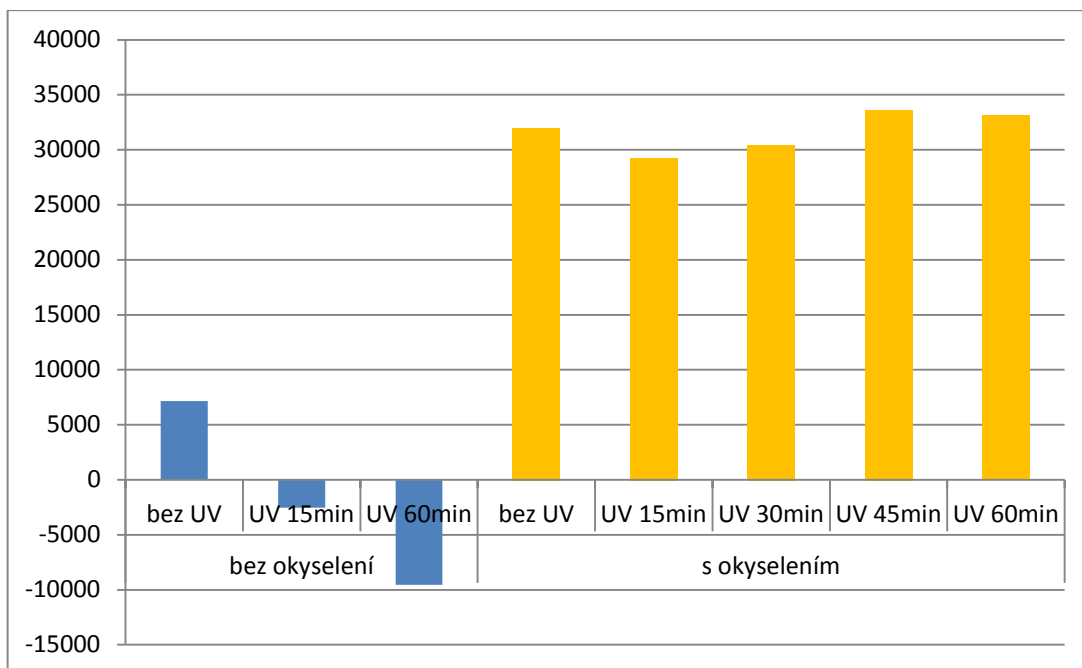
b)

Tabulka 14: Detekce ve směsi voda:acetonitril v poměru 7:3 bez okyselení;
Koncentrace měřeného roztoku: 25 mg/l, λ 254

		λ 254	bez okyselení		
		H ₂ O:ACN	bez UV	UV 15min	UV 60min
intenzita fluorescence (AU)	1	141960	141960	134518	124656
	2	141790	141790	131041	126805
	3	141176	141176	130330	123358
	průměr	141642	141642	131963	124940
	Odečtení základní linie detektoru	7146	7146	-2533	-9556
	RSD	0,24%	0,24%	1,39%	1,14%

Tabulka 15: Detekce ve směsi voda:acetonitril v poměru 7:3 s okyselením;
Koncentrace měřeného roztoku: 25 mg/l, λ 254

		λ 254	s okyselením				
		H ₂ O:ACN	bez UV	UV 15min	UV 30min	UV 45min	UV 60min
intenzita fluorescence (AU)	1	170760	170760	162149	165609	170094	165497
	2	165503	165503	163156	164329	166373	169446
	3	163177	163177	165914	164857	167848	168000
	průměr	166480	166480	163740	164932	168105	167648
	Odečtení základní linie detektoru	31984	31984	29244	30436	33609	33152
	RSD	1,91%	1,91%	0,97%	0,32%	0,91%	0,97%

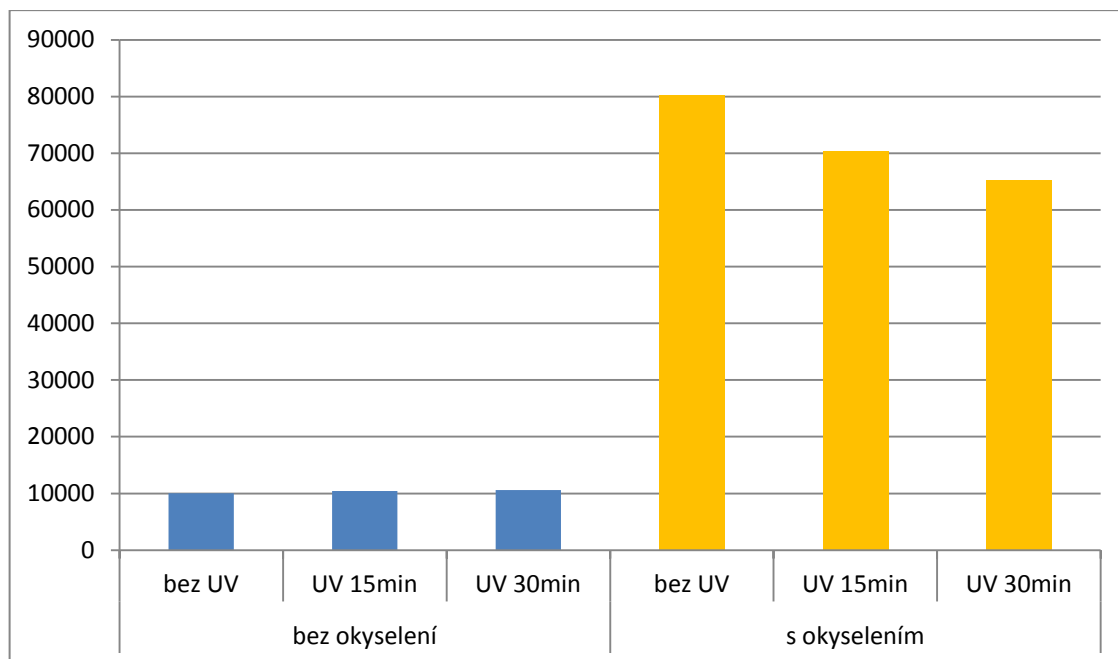


Obrázek 14: Hodnocení vlivu změny pH a rozkladu vlivem UV záření na fluorescenční detekci MSM ve směsi voda:acetonitril (7:3), $\lambda = 254 \text{ nm}$

Z uvedených hodnot v tabulkách a grafu vyplývá, že při změně pH na kyselou stranu se signály měřených roztoků výrazně zvýší (přibližně 4,5-krát). Použití UV záření za daných podmínek nemá prakticky žádný význam a nijak neovlivňuje výsledky měření.

Tabulka 16: Detekce ve směsi voda:acetonitril v poměru 7:3; Koncentrace měřeného roztoku: 25 mg/l, $\lambda 366$

	$\lambda 366$	bez okyselení			s okyselením		
	H ₂ O:ACN	bez UV	UV 15min	UV 30min	bez UV	UV 15min	UV 30min
intenzita fluorescence (AU)	1	150683	152418	145836	214002	205807	204746
	2	141196	147680	142648	215428	198985	195777
	3	141726	134654	146821	214694	209656	198698
	průměr	144535	144917,33	145101,67	214708	204816	199740,33
	Odečtení základní linie detektoru	10039	10422	10606	80212	70320	65245
	RSD	3,01%	5,18%	1,23%	0,27%	2,15%	1,87%



Obrázek 15: Hodnocení vlivu změny pH a rozkladu vlivem UV záření na fluorescenční detekci MSM ve směsi voda:acetonitril (7:3), $\lambda = 366 \text{ nm}$

Při změně vlnové délky UV záření na $\lambda = 366 \text{ nm}$ byly získané výsledky dost podobné jako v předchozím případě, vliv rozkladu UV zářením zde není podstatný. Výrazné zvýšení naměřených hodnot způsobila hlavně změna pH měřených roztoků a tím pádem ionizace molekuly (v tomto případě byl získán 8-krát vyšší signál).

c), d), e)

Při použití daných poměrů MSM ve směsi voda:acetonitril v poměru 3:5, 5:5 a 1:9 nebyl naměřen v porovnání se základní linií téměř žádný signál. Výsledky získané v těchto experimentech nebyly zpracovány ve formě tabulek a grafů.

5.2.4. Detekce MSM v chloroformu

Nejprve byla změřena základní linie a teprve poté byl detekován roztok MSM v chloroformu o koncentraci 25 mg/l. Nosným proudem zde byl také chloroform. Vzorek byl měřen za různých podmínek pH a UV záření stejně jako v předchozích experimentech.

Tabulka 17: Základní linie

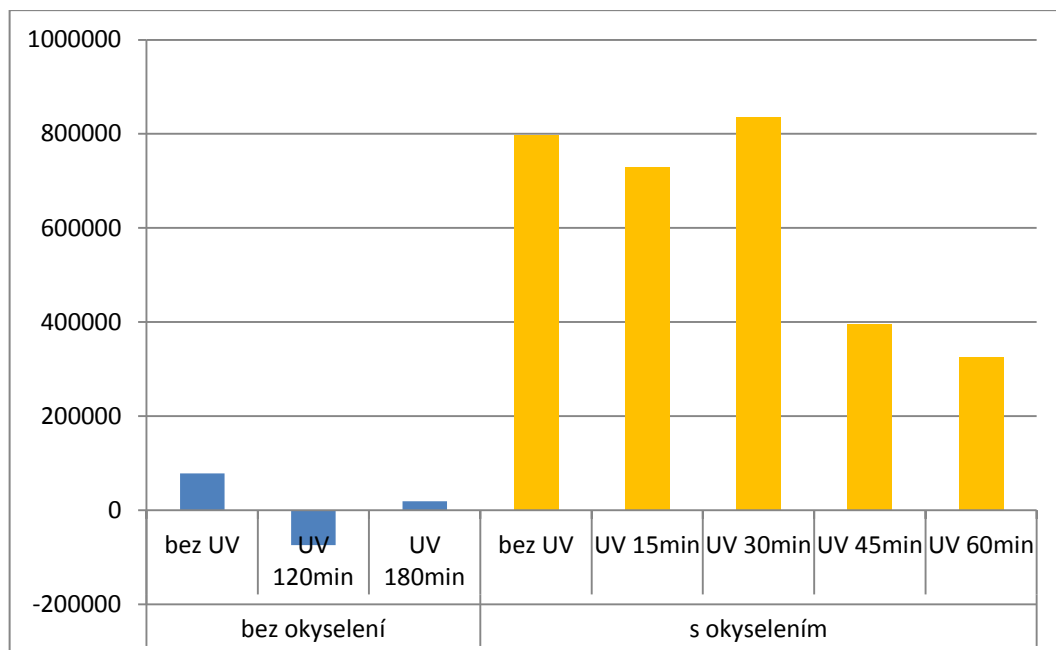
intenzita fluorescence (AU)	1	233091
	2	234784
	3	239232
	průměr	235702
	RSD	1,10%

Tabulka 18: Detekce v chloroformu bez okyselení;
Koncentrace měřeného roztoku: 25 mg/l, λ 254

		λ 254	bez okyselení		
		CHCl ₃	bez UV	UV 120min	UV 180min
intenzita fluorescence (AU)	1	317825	174777	266961	
	2	308227	160099	254419	
	3	315723	149926	243169	
	průměr	313925	161601	254850	
	Odečtení základní linie detektoru	78223	-74102	19147	
	RSD	1,31%	6,31%	3,81%	

Tabulka 19: Detekce v chloroformu s okyselením;
Koncentrace měřeného roztoku: 25 mg/l, λ 254

		λ 254	s okyselením				
		CHCl ₃	bez UV	UV 15min	UV 30min	UV 45min	UV 60min
intenzita fluorescence (AU)	1	1022307	967681	1138761	622443	594630	
	2	1037496	986145	1057654	661538	544422	
	3	1041665	944888	1018676	612254	544245	
	průměr	1033823	966238	1071697	632078	561099	
	Odečtení základní linie detektoru	798120	730536	835995	396376	325397	
	RSD	0,80%	1,75%	4,67%	3,36%	4,23%	



Obrázek 16: Hodnocení vlivu změny pH a rozkladu vlivem UV záření na fluorescenční detekci MSM v chloroformu, $\lambda = 254 \text{ nm}$

Z výsledků získaných při tomto pokusu je jasné, že použití chloroformu jako rozpouštědla a zároveň nosného proudu při kyselém pH roztoku MSM je ze všech vyzkoušených možností nejvýhodnější (tentokrát došlo k 10-ti násobnému zvýšení signálu v porovnání s roztokem bez úpravy pH). V porovnání s použitím vody, acetonu nebo směsi voda:acetonitril v různých poměrech vykazují roztoky v chloroformu nejvyšší fluorescenční signály, které byly v této experimentální práci zaznamenány. Změna UV záření zde opět neměla na výsledky výrazný dopad, naopak při delším působení UV záření na chloroformový roztok docházelo ke snížení intenzity fluorescence.

5.3. Studium vlivu pH na fluorescenční detekci MSM

Vliv pH na fluorescenční detekci MSM byl zkoumán ve dvou různých prostředích a podmínkách měření:

- MSM ve směsi voda:acetonitril v poměru 7:3

koncentrace měřeného roztoku: 25 mg/l = $6,55 \cdot 10^{-5}$ M

nosný proud: voda

b) MSM ve vodě

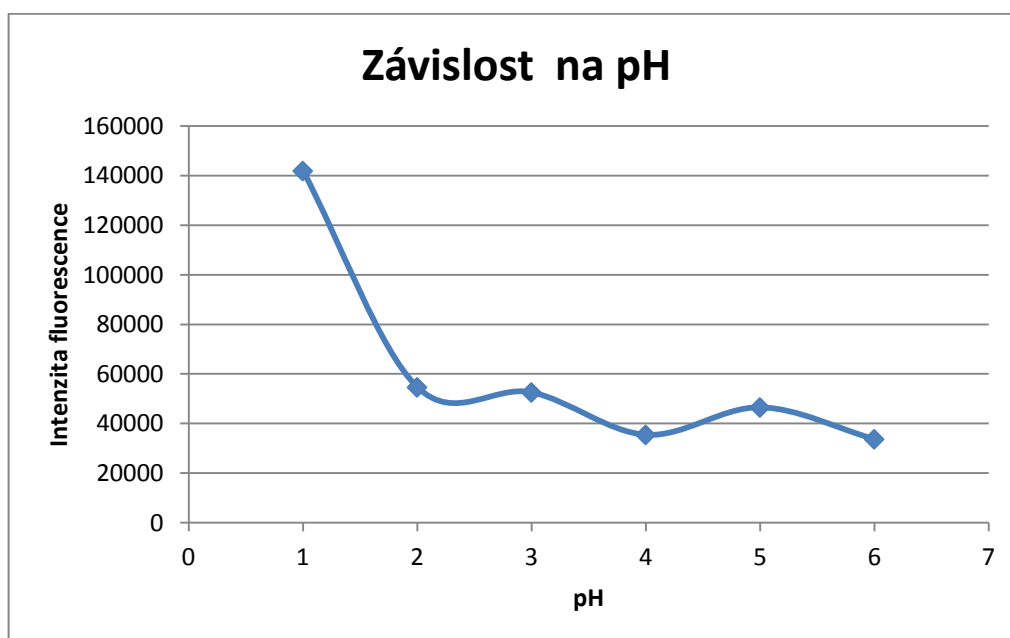
koncentrace měřeného roztoku: 25 mg/l = $6,55 \cdot 10^{-5}$ M

nosný proud: voda

a)

Tabulka 20: Vliv pH na fluorescenční detekci MSM ve směsi voda:acetonitril (7:3)

pH		1	2	3	4	5	6
intenzita fluorescence (AU)	základní linie	134496					
	1	271254	192446	185313	176603	179878	168531
	2	273110	187959	189609	169024	183980	167458
	3	284674	186988	186243	164246	179149	168599
	průměr	276346	189131	187055	169958	181002	168196
	Odečtení základní linie detektoru	141850	54635	52559	35462	46506	33700
	RSD	2,15%	1,26%	0,99%	2,99%	1,17%	0,31%



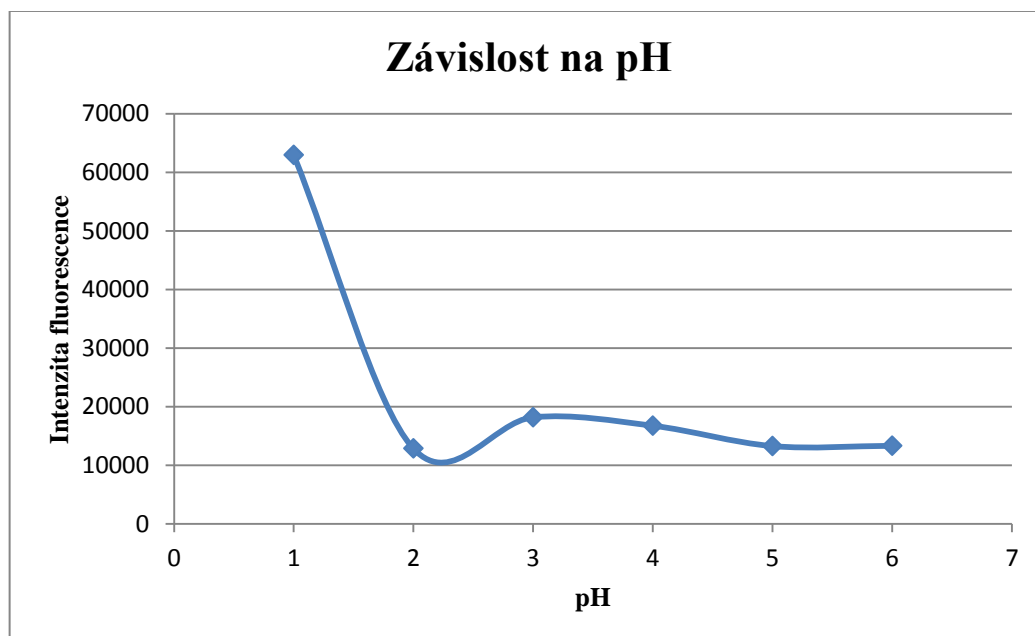
Obrázek 17: Závislost intenzity fluorescence na pH roztoku MSM ve směsi voda:acetonitril (7:3)

Z obrázku 17 vyplývá, že intenzita fluorescence roztoku MSM je nejvyšší při značně nízkém pH. Čím vyšší bylo pH tím nižší byla intenzita fluorescence. Pro stanovení intenzity fluorescence se zdá být výhodné okyselení roztoku MSM před jeho vlastním měření. Při posunu k nižšímu pH pravděpodobně dochází rychleji k rozkladu molekuly MSM na produkty vykazující vyšší intenzitu fluorescence. Při stanovení MSM v roztoku voda:acetonitril (7:3) je okyselení na hodnotu pH = 1 nejvýhodnější.

b)

Tabulka 21: Vliv pH na fluorescenční detekci MSM ve vodě

pH		1	2	3	4	5	6
intenzita fluorescence (AU)	základní linie	110465					
	1	174225	125129	132620	132038	124857	125462
	2	174458	122563	132072	125692	124923	123077
	3	171624	122312	121253	123902	121426	122816
	průměr	173436	123335	128648	127211	123735	123785
	Odečtení základní linie detektoru	62971	12870	18183	16746	13270	13320
	RSD	0,74%	1,03%	4,07%	2,74%	1,32%	0,96%



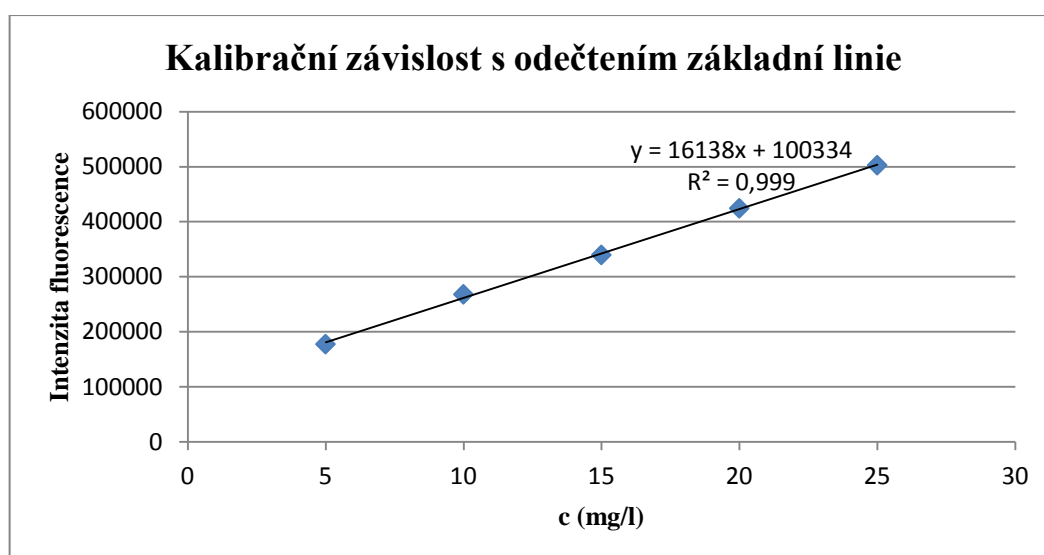
Obrázek 18: Závislost intenzity fluorescence na pH roztoku MSM ve vodě

Vliv pH na intenzitu fluorescence MSM ve vodném prostředí (obrázek 18) je prakticky stejný jako ve směsi voda:acetonitril (7:3). Rozdíl je pouze v tom, že ve vodném prostředí je signál intenzity fluorescence při stejném pH = 1 téměř o 125% nižší než ve směsi voda:acetonitril (7:3). V předešlých kapitolách byla použita úprava vzorků na pH = 2, ale z této závislosti vyplývá, že by bylo lepší použít úpravu na pH = 1 alespoň v případě vody a směsi voda:acetonitril (7:3). U ostatních rozpouštědel (kromě acetonu) je vidět výrazný rozdíl mezi roztoky s okyselením i bez něj i při úpravě na pH = 2.

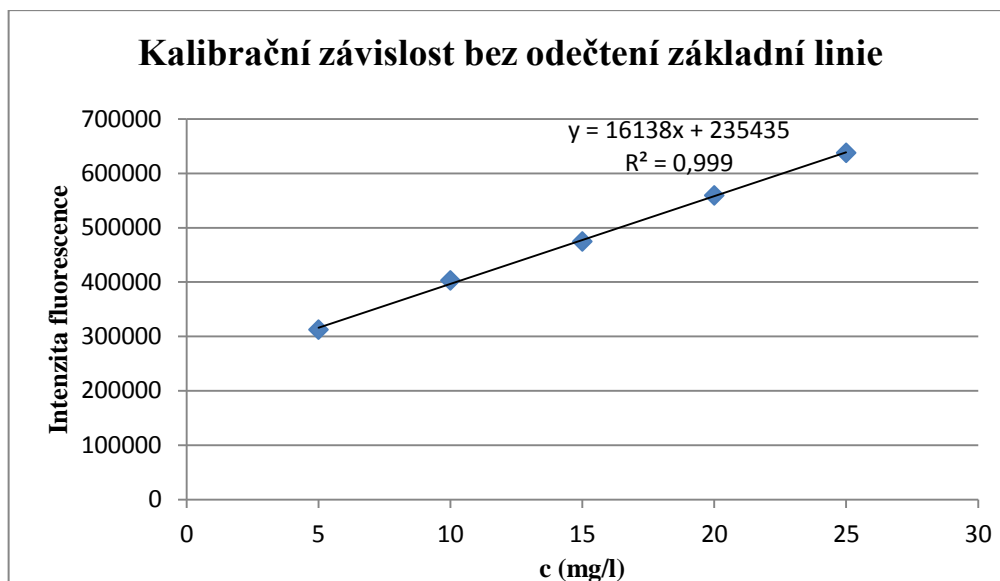
5.4. Kalibrační závislost pro fluorescenční stanovení MSM v chloroformu

Tabulka 22: Kalibrační závislost MSM v chloroformu

c (mg/l)	5	10	15	20	25
intenzita fluorescence	312520	403079	474696	559405	637797
intenzita fluorescence po odečtení základní linie detektoru	177419	267978	339595	424304	502696
RSD	0,50%	4,06%	1,69%	3,05%	4,01%



Obrázek 19: Kalibrační závislost roztoku MSM v chloroformu v rozsahu koncentrací 5 – 25 mg/l (intenzita fluorescence s odečtenou základní linií)



Obrázek 20: Kalibrační závislost roztoku MSM v chloroformu v rozsahu koncentrací 5 – 25 mg/l (intenzita fluorescence bez odečtení základní linie)

Kalibrační závislost vykazuje charakteristický tvar pro fluorescenční stanovení, ve kterém dochází k lineárnímu nárůstu fluorescenčního signálu. Kalibrační závislost je v rozmezí koncentrací 5 – 25 mg/l lineární s korelačním koeficientem 0,999. Ze závislosti bez odečtení základní linie byly vypočítány LOD (1,52 mg/l) a LOQ (5,13 mg/l).

6. Shrnutí

Tato diplomová práce se zabývá fluorescenční detekcí v organických rozpouštědlech, popisuje fluorescenční stanovení chininu a metsulfuron-methylu metodou sekvenční injekční analýzy. Stanovované látky byly před vlastní detekcí převedeny do roztoků o různé koncentraci a složení. V některých případech byla provedena změna pH a UV degradace původní látky.

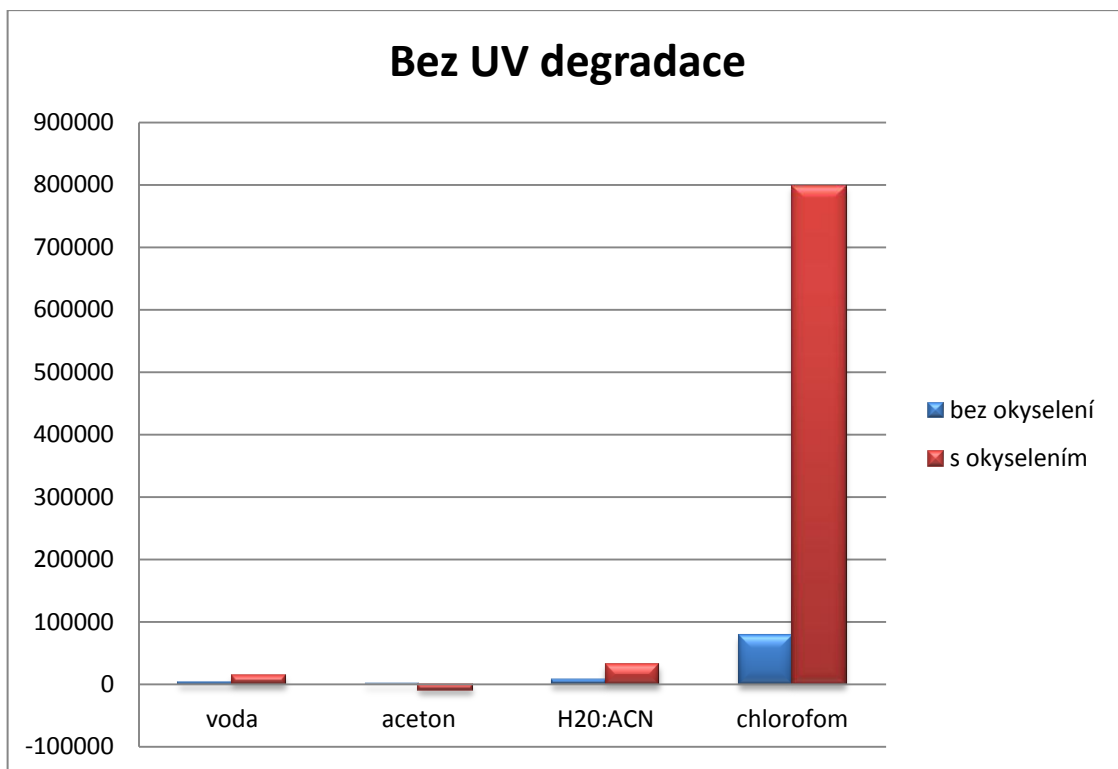
Nejprve bylo provedeno ověření podmínek fluorescenční detekce chininu v kyselém prostředí v SIA systému. Testoval se vliv záměny vodného rozpouštědla za organické. Jako nejvhodnější organické rozpouštědlo se projevil methanol, který vykazoval o 10% vyšší signál než ethanol a o 54% vyšší než izopropylalkohol. Ve všech případech však došlo ve srovnání s vodným roztokem k poklesu intenzity signálu.

Následně byla zkoumána fluorescenční detekce MSM ve vodném prostředí i v organických rozpouštědlech. Byl testován vliv záměny rozpouštědla bez předchozí úpravy nebo po UV degradaci a změně pH roztoku MSM.

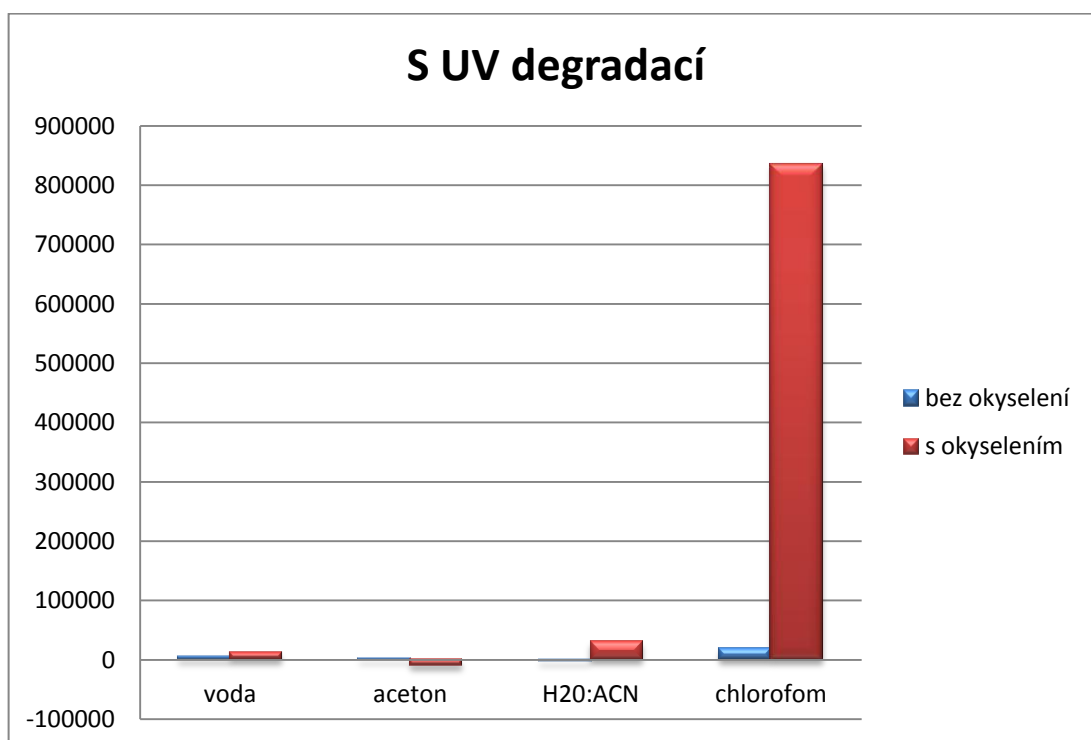
Při testování různých podmínek a prostředí se jako nejvhodnější ukázalo fluorescenční stanovení MSM v chloroformu po okyselení a UV degradaci ($\lambda = 254$, 30 min). Tyto podmínky vykazovaly sice vyšší intenzitu fluorescence, ale protože nebyl výrazný rozdíl mezi roztoky s UV rozkladem a bez něj, tak UV rozklad do přípravy roztoků pro kalibrační stanovení zahrnut nebyl (výrazně by se zvýšila doba přípravy roztoků).

Tabulka 23: Porovnání detekce MSM v organických rozpouštědlech za různých podmínek

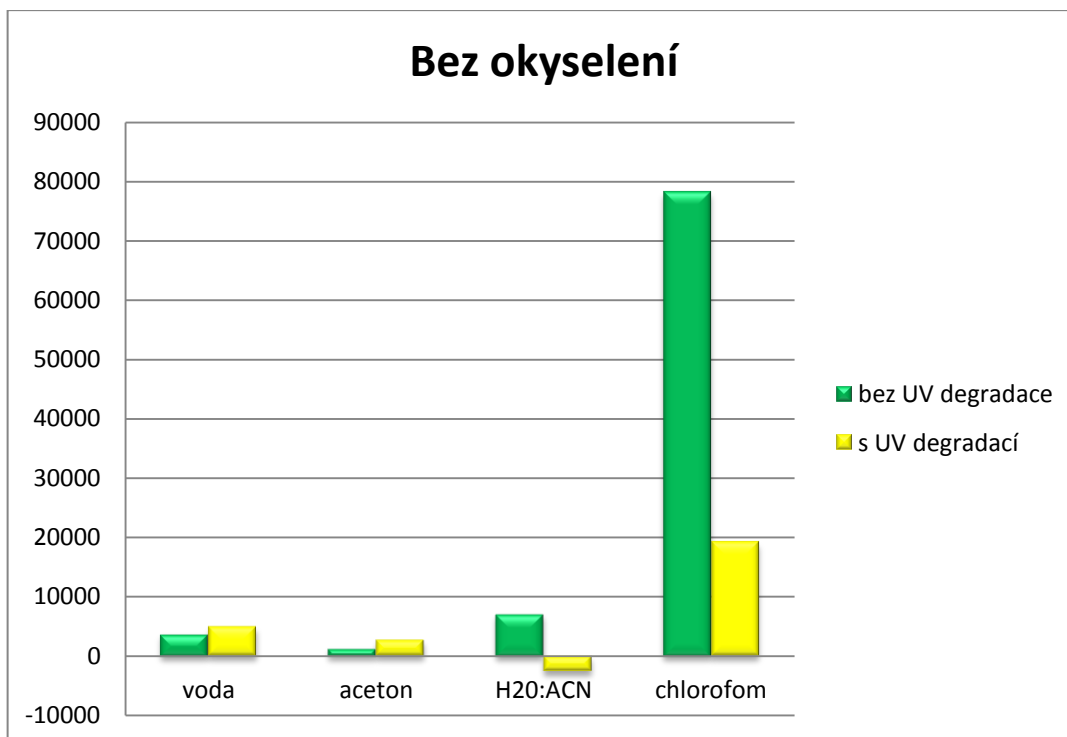
MSM 25 mg/l	bez UV degradace		s UV degradací	
	bez okyselení	s okyselením	bez okyselení	s okyselením
Voda	3770	14539	4929	12568
Aceton	1340	-9260	2701	-10121
H₂O:ACN	7146	31984	-2533	30436
Chloroform	78223	798120	19247	835995



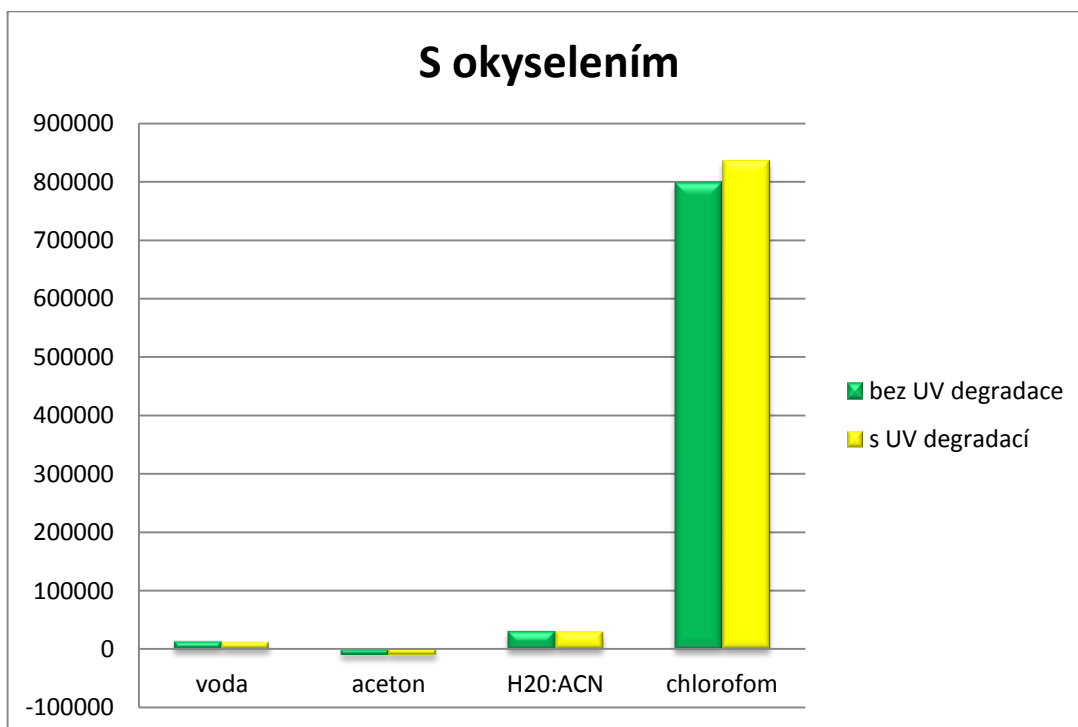
Obrázek 21: Stanovení MSM bez UV degradace v organických rozpouštědlech s úpravou pH i bez ní



Obrázek 22: Stanovení MSM s UV degradací v organických rozpouštědlech s úpravou pH i bez ní



Obrázek 23: Stanovení MSM bez okyselení v organických rozpouštědlech s UV degradací i bez ní



Obrázek 24: Stanovení MSM s okyselením v organických rozpouštědlech s UV degradací i bez ní

Z předchozích grafů vyplývá, že stanovení MSM v roztoku chloroformu je z vyzkoušených možností jednoznačně nejvýhodnější. Daná stanovení lze porovnat z několika úhlů pohledu a daných podmínek.

Při stanovení MSM bez UV degradace bez okyselení byla intenzita signálu MSM v chloroformu 20× vyšší než ve vodě za stejných podmínek.

Při stanovení MSM bez UV degradace s okyselením byla intenzita signálu roztoku MSM v chloroformu 54× vyšší než ve vodě za stejných podmínek.

Při stanovení MSM s UV degradací bez okyselení byla intenzita signálu roztoku MSM v chloroformu 3× vyšší než ve vodě za stejných podmínek.

Při stanovení MSM s UV degradací s okyselením byla intenzita signálu roztoku MSM v chloroformu 66× vyšší než ve vodě za stejných podmínek

7. Závěr

Jedním z požadavků práce bylo ověření podmínek fluorescenční detekce chininu v kyselém prostředí v SIA systému a testování vlivu záměny vodného roztoku za organická rozpouštědla. Podmínky byly ověřeny stanovením kalibrační závislosti roztoku síranu chininia v rozmezí koncentrací 1 – 10 mg/l. Byla prokázána lineární závislost získaného fluorescenčního signálu v SIA systému na vzrůstající koncentraci standardních roztoků. Záměnou vodného roztoku za organická rozpouštědla nebylo v případě metanolu, isopropylalkoholu ani ethanolu dosaženo vyššího fluorescenčního signálu. Ve všech případech došlo k poklesu intenzity fluorescence ve srovnání se stanovením ve vodném roztoku. Při stanovení v methanolu byl pokles intenzity signálu o 28%, v izopropylalkoholu o 53% a v ethanolu o 34%. Jakmile se, ale zaměnil i nosný proud v systému, vykazoval nejvyšší signál vzorek chininia v isopropylalkoholu.

Hlavním cílem práce bylo testování fluorescenční detekce MSM v různých organických rozpouštědlech s předchozí úpravou podmínek či bez úpravy – změna pH, UV degradace. Ze zkoušených organických rozpouštědel se jako nejvýhodnější z hlediska poskytovaného signálu ukázal chloroform. Intenzita signálu MSM v chloroformu přesahovala hodnoty signálu roztoků MSM v ostatních organických rozpouštědlech (aceton, směs H₂O:ACN v různých poměrech). S chloroformem byla nakonec také proměřena kalibrační závislost s lineárním nárůstem fluorescenčního signálu v rozmezí koncentrací 5 – 25 mg/l s korelačním koeficientem 0,999. Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) této metody byly 1,52 mg/l a 5,13 mg/l.

8. Seznam literatury

- ¹ Průtoková injekční analýza – metoda využitelná pro nanotechnologie [online]. [cit. 2013 - 1 - 10] Dostupné z: <http://www.umel.feec.vutbr.cz/nanoteam/03.php?det=46>
- ² Hana Paseková, Miroslav Polášek a Petr Solich. Sekvenční injekční analýza. Sekvenční injekční analýza [online]. Chemické Listy 93, 1999, 354-359. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/1999_06_354-359.pdf
- ³ Sekvenční injekční analýza [online]. [cit. 2013 - 1 - 12] Dostupné z: http://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/sia_dus.pdf
- ⁴ Neseparační průtokové metody [online]. [cit. 2013 - 1 - 15] Dostupné z: <https://docs.faf.cuni.cz/Special/Search/?searchtext=nesepara%C4%8Dn%C3%AD+pr%C5%AFtokov%C3%A9+metody&searchmode=anyword>
- ⁵ Barbora Fialová (2011): Využití SIA systému pro stanovení hliníku. Diplomová práce. Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, str. 12
- ⁶ Informační profil pesticidu – Metsulfuron methyl [online]. [cit. 2012 - 10 - 20] Dostupné z: <http://extoxnet.orst.edu/pips/metsulfu.htm>
- ⁷ Atanasse Coly, Jean - Jacques Aaron. Sensitive and rapid flow injection analysis of sulfonylurea herbicides in water with micellar-enhanced photochemically induced fluorescence detection. Analytica Chimica Acta 392, 1999, 255 - 264.
- ⁸ Javier López Flores, M. Luisa Fernández de Córdova, Antonio Molina Díaz. Flow-through optosensing device implemented with photochemically-induced fluorescence for the rapid and simple screening of metsulfuron methyl in environmental waters. Journal of Environmental Monitoring 11, 2009, 1080 - 1085.
- ⁹ Javier López Flores, M. Luisa Fernández de Córdova, Antonio Molina Díaz. Simultaneous Flow-Injection Solid-Phase Fluorometric Determination of Thiabendazole and Metsulfuron Methyl Using Photochemical Derivatization. Analytical Sciences 25, 2009, 681 - 686.

- ¹⁰ Valeria H. Springer, Adriana G. Lista. A simple and fast method for chlorsulfuron and metsulfuron methyl determination in water samples using multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) and capillary electrophoresis. *Talanta* 83, 2010, 126 - 129.
- ¹¹ Shashi Bala Singh, Rupak Paul. Gas Chromatographic Method for Residue Analysis of Metsulfuron Methyl from Soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 86, 2011, 149 - 151.
- ¹² Cuimin Yana, Beibei Zhangb, Wenyuan Liua, C. Feng Fengd, Yonggang Zhaob, Hui Dua. Rapid determination of sixteen sulfonylurea herbicides in surface water by solid phase extraction cleanup and ultra-high-pressure liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 879, 2011, 3484 - 3489.
- ¹³ Shuaihua Zhang, Xiaofang Yin, Qian Yang, Chun Wang, Zhi Wang. Determination of some sulfonylurea herbicides in soil by a novel liquid-phase microextraction combined with sweeping micellar electrokinetic chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401, 2011, 1071 - 1081.
- ¹⁴ Monica Caselli. Light-induced degradation of metsulfuron-methyl in water. [online]. *Chemosphere* 59, 2005, 1137-1143. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653504011610>
- ¹⁵ Thomas C. Mueller, Thomas B. Moorman, Martin A. Locke. Detection of herbicides using fluorescence spectroscopy. [online]. *Weed Science*, Volume 40, 1992, 270 - 274. Dostupné z: <http://www.jstor.org/discover/10.2307/4045341?uid=3737856&uid=2&uid=4&sid=21101701969633>
- ¹⁶ Fluorimetrie – Jan Fähnrich [online]. [cit. 2013 - 1 - 28] Dostupné z: <http://www.vscht.cz/anl/lach2/FLUORO.pdf>
- ¹⁷ Vzorec Chininu [online]. [cit. 2013 - 1 - 28] Dostupné z: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f8/Chinin.svg>
- ¹⁸ Vzorec Metsulfuron methyly [online]. [cit. 2013 - 1 - 28] Dostupné z: <http://www.heydchem.com/METSULFURON-METHYL.ASP>

Seznam obrázků

Obrázek 1: Princip SIA ³	13
Obrázek 2: Struktura MSM (I), monomethylového derivátu (II) a dimethylového derivátu (III) ¹¹	20
Obrázek 3: Struktura chininu ¹⁷	25
Obrázek 4: Struktura metsulfuron-methylu ¹⁸	27
Obrázek 5: Rozklad MSM ve vodě a 2-propanolu.....	29
Obrázek 6: Kalibrační závislost síranu chininia (1 – 10 mg/l).....	32
Obrázek 7: Kalibrační závislost síranu chininia (10 – 100 mg/l).....	33
Obrázek 8: Kalibrační závislost síranu chininia v celém měřeném rozsahu (1 – 100 mg/l).....	33
Obrázek 9: Fluorescenční detekce chininu - záměna vodného rozpouštědla za organické.....	35
Obrázek 10: Fluorescenční detekce chininu – záměna vodného nosného proudu a rozpouštědla za organické.....	36
Obrázek 11: Hodnocení vlivu změny pH a rozkladu vlivem UV záření na fluorescenční detekci MSM ve vodných roztocích	38
Obrázek 12: Hodnocení vlivu změny pH a rozkladu vlivem UV záření na fluorescenční detekci MSM v acetonu	40
Obrázek 13: Hodnocení vlivu změny pH a rozkladu vlivem UV záření na fluorescenční detekci MSM ve směsi voda:acetonitril (7:3).....	42
Obrázek 14: Hodnocení vlivu změny pH a rozkladu vlivem UV záření na fluorescenční detekci MSM ve směsi voda:acetonitril (7:3), $\lambda = 254$ nm	44
Obrázek 15: Hodnocení vlivu změny pH a rozkladu vlivem UV záření na fluorescenční detekci MSM ve směsi voda:acetonitril (7:3), $\lambda = 366$ nm	45
Obrázek 16: Hodnocení vlivu změny pH a rozkladu vlivem UV záření na fluorescenční detekci MSM v chloroformu, $\lambda = 254$ nm	47
Obrázek 17: Závislost intenzity fluorescence na pH roztoku MSM ve směsi voda:acetonitril (7:3).....	48
Obrázek 18: Závislost intenzity fluorescence na pH roztoku MSM ve vodě.....	49
Obrázek 19: Kalibrační závislost roztoku MSM v chloroformu v rozsahu koncentrací 5 – 25 mg/l (intenzita fluorescence s odečtenou základní linií)	50

Obrázek 20: Kalibrační závislost roztoku MSM v chloroformu v rozsahu koncentrací 5 – 25 mg/l (intenzita fluorescence bez odečtení základní linie).....	51
Obrázek 21: Stanovení MSM bez UV degradace v organických rozpouštědlech s úpravou pH i bez ní.....	53
Obrázek 22: Stanovení MSM s UV degradací v organických rozpouštědlech s úpravou pH i bez ní.....	53
Obrázek 23: Stanovení MSM bez okyselení v organických rozpouštědlech s UV degradací i bez ní	54
Obrázek 24: Stanovení MSM s okyselením v organických rozpouštědlech s UV degradací i bez ní	54

Seznam tabulek

Tabulka 1: Rozpustnost MSM ve vodě	16
Tabulka 2: Rozpustnost v organických rozpouštědlech	16
Tabulka 3: Příprava roztoků	26
Tabulka 4: Kalibrační závislost roztoku síranu chininia v rozmezí koncentrací 1 – 10 mg/l	31
Tabulka 5: Získané signály roztoku síranu chininia v rozmezí koncentrací 10 – 100 mg/l	32
Tabulka 6: Záměna vodného rozpouštědla za organické	34
Tabulka 7: Záměna vodného nosného proudu a rozpouštědla za organické.....	36
Tabulka 8: Základní linie	37
Tabulka 9: Detekce ve vodném prostředí za různých podmínek	38
Tabulka 10: Základní linie	39
Tabulka 11: Detekce v prostředí acetonu za různých podmínek	39
Tabulka 12: Základní linie	41
Tabulka 13: Detekce ve směsi voda:acetonitril v poměru 7:3; Koncentrace měřeného roztoku: 10 mg/l.....	42
Tabulka 14: Detekce ve směsi voda:acetonitril v poměru 7:3 bez okyselení; Koncentrace měřeného roztoku: 25 mg/l, λ 254.....	43

Tabulka 15: Detekce ve směsi voda:acetonitril v poměru 7:3 s okyselením; Koncentrace měřeného roztoku: 25 mg/l, λ 254.....	43
Tabulka 16: Detekce ve směsi voda:acetonitril v poměru 7:3; Koncentrace měřeného roztoku: 25 mg/l, λ 366.....	44
Tabulka 17: Základní linie	46
Tabulka 18: Detekce v chloroformu bez okyselení; Koncentrace měřeného roztoku: 25 mg/l, λ 254	46
Tabulka 19: Detekce v chloroformu s okyselením; Koncentrace měřeného roztoku: 25 mg/l, λ 254	46
Tabulka 20: Vliv pH na fluorescenční detekci MSM ve směsi voda:acetonitril (7:3)..	48
Tabulka 21: Vliv pH na fluorescenční detekci MSM ve vodě.....	49
Tabulka 22: Kalibrační závislost MSM v chloroformu	50
Tabulka 23: Porovnání detekce MSM v organických rozpouštědlech za různých podmínek	52