

Vysoké učení technické
Fakulta chemická
Ústav chemie a technologie ochrany životního
prostředí

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno 2020

Tomáš Vlach



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ**

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL
PROTECTION

**STUDIUM DEGRADACE PESTICIDŮ POMOCÍ
POKROČILÝCH OXIDAČNÍCH PROCESŮ**

STUDY OF PESTICIDE DEGRADATION USING ADVANCED OXIDATION
PROCESSES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Tomáš Vlach

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Ludmila Mravcová, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1330/2018 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
Student: **Bc. Tomáš Vlach**
Studijní program: Chemie a technologie ochrany životního prostředí
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí
Vedoucí práce: **Ing. Ludmila Mravcová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Studium degradace pesticidů pomocí pokročilých oxidačních procesů

Zadání diplomové práce:

1. Vypracování rešerše na téma výskytu pesticidů ve vodách, možnosti stanovení a jejich degradace pomocí pokročilých oxidačních procesů.
2. Optimalizace metody stanovení vybraných pesticidů pomocí LC/MS.
3. Provedení experimentů degradace pesticidů v modelových vodách s využitím pokročilých oxidačních procesů.
4. Shrnutí dosažených výsledků.

Termín odevzdání diplomové práce: 31.7.2020:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Tomáš Vlach
student(ka)

Ing. Ludmila Mravcová, Ph.D.
vedoucí práce

doc. Ing. Jirí Kučerík, Ph.D.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

V práci jsou vysvětleny a přiblíženy děje a pojmy související s problematikou degradace pesticidů pomocí pokročilých oxidačních procesů a jejich možnosti stanovování. Podstatou experimentální práce bylo vyvinutí a jednoduchá validace vytvořené metody pro vybrané pesticidy. Následné pokusy degradací těchto pesticidů ve vodě za pomoci pokročilých oxidačních metod a jejich stanovení.

Cílem práce bylo porovnání zvolených metod oxidačních degradací a shrnutí výsledků pro navržení nejvhodnější metody pro jejich odstranění.

Klíčová slova

Pesticidy, pokročilé oxidační procesy, vyvinutí metody

Abstract

In the master's thesis are explained and described processes and terms related by problematic degradation of pesticides using advanced oxidation processes and their possibilities of determinations. The essence of the experimental work was development and validate created method for determination of chosen pesticides. Degradation of this pesticides by advanced oxidation processes and their determination after degradation.

The aim of the work was compare chosen oxidation methods and summary of results for design of the most appropriate method.

Key words

Pesticides, advanced oxidation processes, developing a method

Bibliografická citace

VLACH, Tomáš. *Studium degradace pesticidů pomocí pokročilých oxidačních procesů*. Brno, 2020. 92 s. Diplomová práce na Fakultě chemické Vysoké učení technického v Brně, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí. Vedoucí diplomové práce Ing. Ludmila Mravcová, Ph.D.

Prohlášení

Tímto prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma **Studium degradace pesticidů pomocí pokročilých degradačních procesů** vypracoval samostatně pod vedením Ing. Ludmily Mravcové, Ph.D. s využitím níže uvedené literatury.

V Brně dne 31. 7. 2020

.....

Bc. Tomáš Vlach

Úvodem bych chtěl poděkovat Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí VUT Brno, že mi umožnili praktické měření pro diplomovou práci ve svých laboratořích a za poskytnutí kvalitních pracovních podmínek v laboratořích i mimo ně.

Dále vedoucímu mé diplomové práce paní Ing. Ludmile Mravcové, Ph.D. za poskytnutí odborné pomoci při zpracování této práce.

Poděkování patří rovněž Ing. Jiřímu Pryčkovi za odbornou pomoc a seznámení s LC/MS.

Obsah

1	ÚVOD	10
2	TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1	PESTICIDY	11
2.1.1	Historie pesticidů	12
2.2	KLASIFIKACE PESTICIDŮ	12
2.2.1	Klasifikace podle cíle účinku	12
2.2.2	Klasifikace podle způsobu účinku	13
2.2.3	Klasifikace podle chemického složení	13
2.3	CHLORIDAZON	17
2.4	METAZACHLOR	18
2.5	ODSTRAŇOVÁNÍ ZNEČIŠŤUJÍCÍCH LÁTEK A PESTICIDŮ Z VODY	18
2.5.1	Adsorpce	18
2.5.2	Membránové procesy	19
2.5.3	Pokročilé oxidační procesy (AOP)	21
2.6	STANOVOVÁNÍ PESTICIDŮ	25
2.6.1	Předúprava vzorků	25
2.6.2	Kapalinová chromatografie	28
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	41
3.1	POUŽITÉ PESTICIDY A CHEMIKÁLIE	41
3.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE	41
3.3	OPTIMALIZACE METODY LC/MS-MS	42
3.4	METODA PRO LC/MS-MS	42
3.4.1	LC nastavení	42
3.4.2	MS nastavení	42
3.4.3	SRM nastavení	43
3.5	PŘÍPRAVA MOBILNÍ FÁZE	43
3.6	OPTIMALIZACE SRM NASTAVENÍ	44
3.7	OPTIMALIZACE PŘENOSU PESTICIDŮ	44
3.8	OPTIMALIZACE SCAN TIME	45

3.9	PREVALIDACE METODY	45
3.9.1	Zásobní roztoky	45
3.9.2	Kalibrace	45
3.9.3	Opakovatelnost nástřiku	46
3.9.4	Stanovení LOD a LOQ	46
3.10	STABILITA VZORKŮ	46
3.11	STANDARDIZACE ODMĚRNÉHO ROZTOKU 0,02M MANGANISTANU DRASELNÉHO A TITRACE PEROXIDU VODÍKU	46
3.11.1	Standardizace 0,02M KMnO ₄	47
3.11.2	Titrace vzorku H ₂ O ₂	47
3.12	POKUSY DEGRADACE PESTICIDŮ	48
4	VÝSLEDKY	50
4.1	TITRACE H ₂ O ₂	50
4.2	OPTIMALIZACE SCAN TIME	50
4.3	KALIBRAČNÍ ZÁVISLOST	53
4.4	OPAKOVATELNOST NÁSTŘIKU	55
4.5	LOD A LOQ	56
4.6	STABILITA VZORKŮ	56
4.7	DEGRADACE CHLORIDAZONU A METAZACHLORU	57
4.8	MS/MS ANALÝZA – DEGRADAČNÍ PRODUKTY	68
5	ZÁVĚR	72
6	LITERATURA	74
7	PŘÍLOHY	79

Symoly a zkratky

GAP	správná zemědělská praxe
DDT	dichlordifenyltrichlorethan
AOP	pokročilé oxidační procesy
SPE	extrakce na tuhou fázi
SPME	mikroextrakce na tuhou fázi
PC	počítač
SW	software
QqQ	trojitý kvadrupol
ACN	acetonitril
MeOH	methanol
IPA	isopropanol
MS	hmotnostní spektrometrie

1 Úvod

Problematikou reziduí toxických látek v životním prostředí se zabývá lidstvo dlouhá léta, ale v posledních se stalo ožehavým tématem. Jednak díky zhoršujícím se klimatickým podmínkám na platě (tání ledovců, ozonové díry, sucho atd.), ale i zjišťováním, že některé látky dokáží přežít v životním prostředí mnohem déle, než se očekávalo. Proto jsou zaváděny nové nařízení, limity a hledány nové, rychlejší, přesnější a cenově dostupnější aplikace pro zjišťování nežádoucích látek v životním prostředí, mezi které neodmyslitelně patří i pesticidní látky.

Většinou si člověk pod pojmem pesticidy vybaví něco, co pomáhá při ochraně plodin před škůdci a dále neřeší, že se jedná o organické látky, z větší části synteticky připravené, které jsou pro člověka a živočichy nebezpečné až toxické. Proto by měl každý upozornit a být obezřetný při jejich využívání i výrobě. Ano provádí se náhodné inspekce, ale ty nedokáží stoprocentně odhalit všechna pochybení a ani testování nemusí odhalit vše. Z toho vyplývá, že na začátku i na konci je vždy člověk, který vymýšlí a vyrábí tyto látky, ale také pak zjišťuje, že některé látky, v minulosti používané, jsou nebezpečné a perzistentní v různých složkách životního prostředí. Proto se touto tematikou zabývá víc a víc institucí a vývoj nových látek je bedlivě sledován a testován.

Například v roce 2017 v České Republice byly provedeny testy podzemních zdrojů vody na obsah pesticidních látek. Výsledky byly alarmující. Přibližně 75 % sledovaných zdrojů vody je kontaminována pesticidními látkami, byť podlimitním množstvím. U cca 5 % sledovaných pesticidních látek byla překročena limitní hodnota jejich koncentrace (0.1 µg/l) pro pitnou vodu.

Z tohoto důvodu byly pro tuto práci vybrány dvě pesticidní látky, které se v roce 2017 sledovali v podzemních vodách, a byly podrobeny různým druhům degradací za použití pokročilých oxidačních procesů, které jsou pro odstranění těchto látek z vody nejúčinnější a v poslední době velmi využívané. Byla vyvinuta a částečně prevalidována analytická metoda stanovení těchto pesticidů a díky využitému systému (LC/MS-MS) pro jejich analýzu bylo také možné, sledovat jejich degradační produkty.

V následujících kapitolách bude vše vysvětleno a zhodnoceno z hlediska získaných výsledků.

2 Teoretická část

2.1 Pesticidy

Podle vyhlášky z roku 2014 č. 83/2014 Sb., která stanovuje hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah pitné vody jsou pesticidy organické insekticidy, herbicidy, fungicidy, nematocidy, akaricidy, algicidy, rodenticidy, slimicidy, příbuzné produkty (např. regulátory růstu) a jejich metabolity, rozkladné nebo reakční produkty. [24]

V této vyhlášce jsou uvedeny nevyšší mezní limity pro pesticidní látky ve vodě viz *Tab. 1*.

Tab. 1: Mezní limity pro pesticidní látky [24]

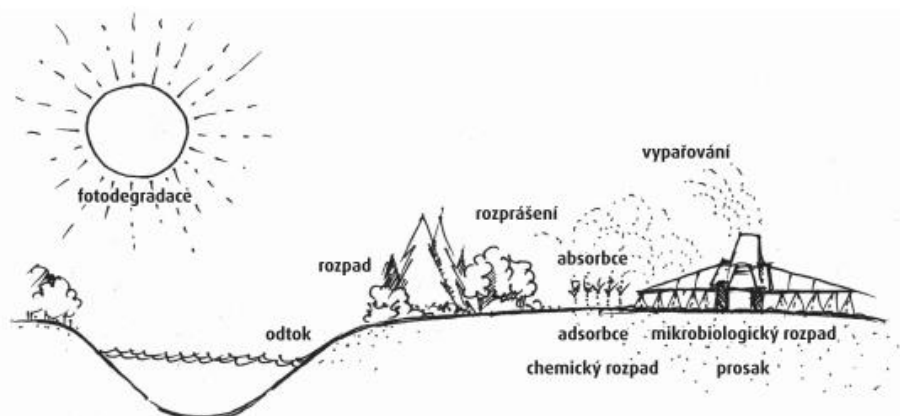
Ukazatel	Limity [$\mu\text{g/l}$]
Pesticidní látky	0,10
Pesticidní látky celkem	0,50

Ze specifikace pesticidů ve vyhlášce č. 83/2014 Sb. můžeme odvodit definici pesticidů jako organické nebo anorganické látky či směsi látek chemické či biologické povahy syntetického původu, které jsou převážně používané v zemědělství pro ochranu rostlin před nežádoucími organismy.

Pesticidy lze rozdělit podle jejich perzistence v prostředí na:

- Neperzistentní pesticidy – poločas rozpadu je menší než 30 dní
- Středně perzistentní pesticidy – poločas rozpadu 30 – 100 dní
- Vysoce perzistentní pesticidy – poločas rozpadu více než 100 dní

Nic není dokonalé a tím bych chtěl říct, že ani aplikace pesticidních přípravků, prováděná podle tzv. správné zemědělské praxe (GAP), nezaručuje stoprocentní zacílení aplikace pesticidů a dochází ke kontaminaci životního prostředí. Odhaduje se, že přibližně 25 % přípravku pesticidního charakteru zasáhne půdu a 10 % se odpaří do ovzduší během aplikace (*Obr. 1*). [18]



Obr. 1: Osud pesticidů v životním prostředí [18]

2.1.1 Historie pesticidů

První generace pesticidů byla na bázi velmi toxických anorganických látek. První se začala používat síra. V průběhu 15. století se začalo experimentovat a využívat látek na bázi arsenu (arsenid vápníku, arsenid olova), rtuti a olova pro hubení škůdců.

V 17. století se jako insekticid používal například nikotin sulfát, který byl získáván extrakcí tabákových listů. V průběhu dalších dekád byly vyvinuty a používány různé směsi látek jako například Bordeaux směs (směs síranu měďnatého, limetky a vody), ale nakonec od jejich používání bylo upuštěno.

V 19. století byly zavedeny do používání dva přírodní pesticidy: pyrethrum a rotenon.

Druhá generace pesticidů se datuje od 20. století, kdy byly poprvé použity syntetické pesticidy. Prvním byl dichlordifenyltrichlorethan (DDT). Tato látka byla syntetizována Rakouským vědcem Othmarem Zeidlerem již v roce 187, ale jeho insekticidní účinky byly objeveny až v roce 1939 Švýcarským vědcem Paulem Hermanem. Tento insekticid byl velmi rychle rozšířen do celého světa díky svým dobrým účinkům na hubení škůdců. V průběhu 2. Světové války bylo DDT používáno armádou proti malárii, tyfusu, vším a moru. Používal se ve formě 5% roztoku v kerosínu pro sprejování nebo v pevné formě. [12]

V roce 1948 dostal Paul Herman Nobelovu cenu za medicínu díky jeho výzkumu a objevu DDT jako kontaktního jedu proti přenašečům mnoha chorob, zejména malárii. Jenže v roce 1962 byla publikována kniha s názvem „Silent Spring“ (Mlčící jaro) od biologky Rachel Carsonové, ve které uváděla, že přítomnost insekticidu DDT má vliv na ptáky a jiné živočichy a ovlivňuje jejich plodnost, vede k degeneracím až k smrti. Deset let po vydání této knihy bylo používání DDT zakázáno v USA a později i v Evropě. [31]

Do dnešní doby se syntetizovalo mnoho pesticidů. Nyní je jich známo více jak 1600 a jsou rozděleny do mnoha skupin uvedených v následující kapitole.

2.2 Klasifikace pesticidů

Pesticidy se dělí podle cíle účinku, způsobu účinku a chemického složení, ale řadíme sem i chemikálie, které stimulují nebo zpomalují růst rostlin nebo škůdců.

2.2.1 Klasifikace podle cíle účinku

Akaricidy – účinky proti roztočům a klíšťatům

Algicidy – na hubení řas a jiné vodní vegetace

Avicidy – účinky proti ptačím škůdcům

Baktericidy – účinky proti bakteriím a bakteriálním onemocněním rostlin

Fungicidy – účinky proti chorobám rostlin a různým houbám

Herbicidy – účinky proti pleveli

Insekticidy – účinky proti hmyzu
Moluskocidy – účinky proti měkkýšům
Nematocidy – účinky proti kroužkovým červům
Rodenticidy – účinky proti hlodavcům [4]

2.2.2 Klasifikace podle způsobu účinku

Aktivátory rostlin – chrání rostliny aktivací jejich obranných mechanismů proti škůdci
Atraktanty – vábí škůdce na určité místo s připravenou pastí
Defolianty – způsobují opadávání listů či lupenů rostlin
Desikanty – podporují a urychlují schnutí živých tkání
Deterenty – brání znechucením hmyzu v příjmu potravy
Fumiganty – látky produkující plyn nebo páru k likvidaci škůdců
Herbicidní prostředky pro bezpečnost úrody – ochraňují úrodu před poškozením herbicidy
Chemosterilanty – látky určené ke sterilizaci hmyzu
Regulátory růstu – látky blokující vývoj hmyzu nebo růst rostlin
Repelenty – látky odpuzující škůdce

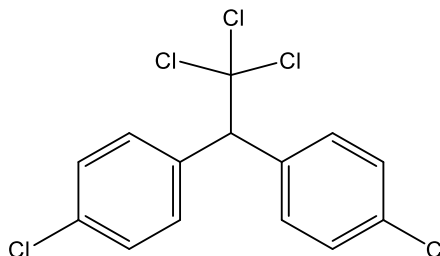
2.2.3 Klasifikace podle chemického složení

Zde si uvedeme rozdělení podle chemického složení pouze pro nejnámější a nejpoužívanější pesticidy, kterými jsou insekticidy, herbicidy a fungicidy.

Insekticidy

- **Organochloridy**

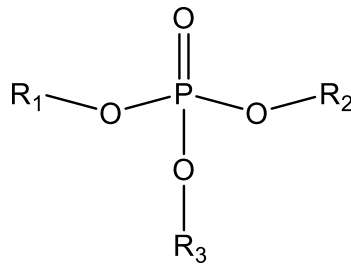
Organické látky se třemi, pěti nebo více atomy chloru, které jsou škodlivé a perzistentní. Hlavními zástupci jsou DDT analogy, isomery benzen hexachloridů a sloučenin cyclodienu. [4]



Obr. 2: Struktura DDT

- **Organofosfáty**

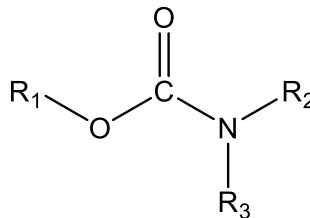
Organické látky s jedním nebo více atomy fosforu, které jsou v moderním zemědělství velmi důležité díky krátké perzistenci a vysoké účinnosti.



Obr. 3: Obecná struktura organofosfátu

- **Karbámaty**

Deriváty kyseliny karbamové viz Obr. 4.

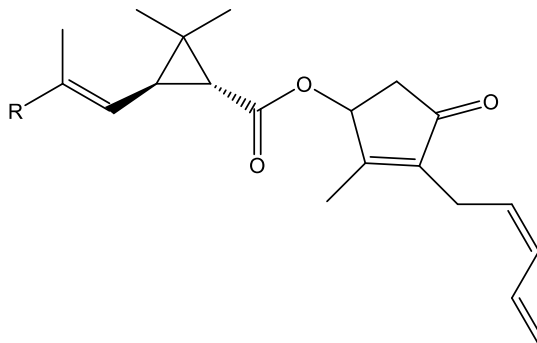


Obr. 4: Obecná struktura karbamátu

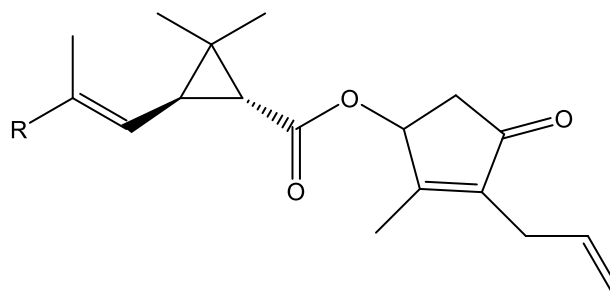
kde R_1 je karboxylová skupina, R_2 je methylová skupina a R_3 je obvykle hydrogen skupina. Některé obsahují atomy síry v molekule.

- **Pyrethroidy**

Syntetické látky podobné přirozeně se vyskytujícím pyrethrinů. První generací těchto insekticidů byl například Allethrin, který má velmi podobnou strukturu jako pyethriny viz Obr. 6.



Obr. 5: Obecná struktura pyrethrinů



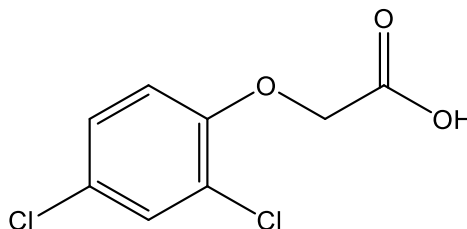
Obr. 6: Strukturní vzorec Allethrinu

V půdě degradují a nemají negativní účinky na půdní mikroflóru. Již ve velmi malých koncentracích jsou toxické pro vodní organismy.

Herbicidy

- **Phenoxy kyseliny**

Chemicky se jedná o karboxylové kyseliny ve formě esteru nebo soli. Nejznámější herbicid z této skupiny byl například kyselina 2,4-dichlorofenoxyoctová (Obr. 7).

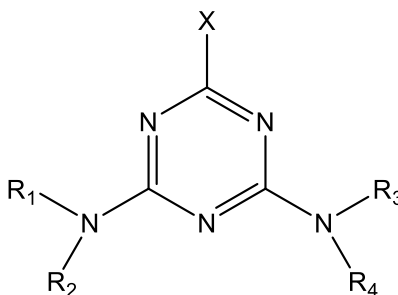


Obr. 7: Strukturní vzorec kyseliny 2,4-dichlorofenoxyoctové

Hojně využívané herbicidy, fungující na principu vyvolání rychlého a nekontrolovaného růstu listnatých rostlin.

- **Triaziny**

Jsou nejstarší a nejpoužívanější herbicidy (až 30% ve světě používaných herbicidů), které mají vyšší perzistenci v půdě [4]. Podskupinami jsou chlorotriaziny, methoxytriaziny, methylthiotriaziny a triazinon herbicidy.



Obr. 8: Obecná struktura triazinů

kde X je Cl, OCH₃ nebo SCH₃ skupina podle, které se řadí do příslušné podskupiny. R₁, R₂ a R₃ je H, nižší alkyl nebo alkenyl skupina a R₄ je nižší alkyl nebo alkenyl skupina.

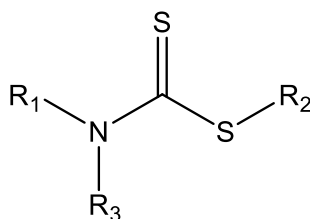
- **Sulfonylmočoviny**

Vyvinuté v poslední době a tvoří je substituovaná močovina. Podskupiny jsou pyrimidinyl sulfonylmočovina a triazinyl sulfonylmočovina. [4]

Fungicidy

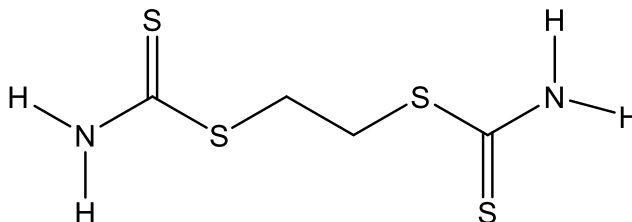
- **Dithiokarbamáty**

Obečným vzorcem viz *Obr. 9*.



Obr. 9: Obečná struktura dithiokarbamátu

Nejvyužívanějším fungicidem tohoto typu je ethylen bisdithiokarbamát viz *Obr. 10*.

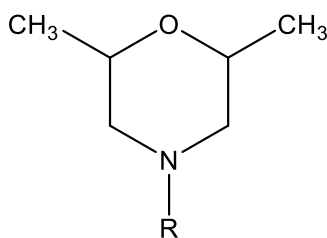


Obr. 10: Strukturní vzorec ethylen bisdithiokarbamátu

Mají velkou škálu využití v zemědělství jak pro postřik listů zeleniny, ovoce tak i pro okrasné rostliny.

- **Morpholiny**

Obečným vzorcem viz *Obr. 11*.



Obr. 11: obečná struktura fungicidů na bázi morpholinu

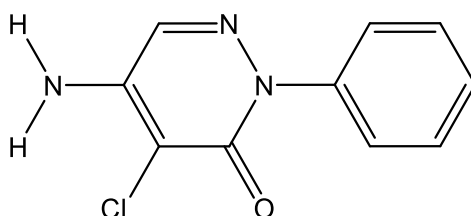
kde R je alkyl nebo aryl skupiny.

Používá se proti plísním a proti nemocím okurek, obilovin a jablek. Při aplikaci na jablka funguje jako emulgátor při procesu voskování ovoce – EU zakázala jeho používání.

Chemikálie stimulující nebo zpomalující růst rostlin nebo škůdců

- **Defolianty** – chemické látky odstraňující listy rostlin
- **Desikanty** – chemické látky vysušující rostliny
- **Repelenty** – chemické látky odpuzující škůdce
- **Atraktanty** – chemické látky lákající škůdce

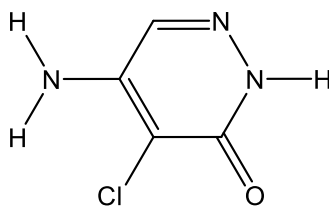
2.3 Chloridazon



Obr. 12: Strukturální vzorec Chloridazonu

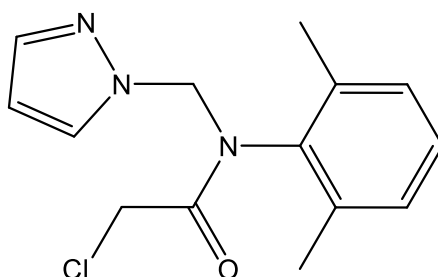
Je to herbicid a používá se především pro ochranu cukrové řepy. Vykazuje nízkou až vysokou perzistenci v životním prostředí kolem 8 až 180 dní, má nízkou akutní toxicitu a nepůsobí mutageně ani teratogeně a je nebezpečný pro vodní prostředí.

Jeho hlavní nevýhodou je vznik degradačního produktu Chloridazon-disfenyl, který je mnohonásobně toxičtější než samotný Chloridazon a proto používání této látky musím sledovat a pro jeho aplikaci platí přísná pravidla. [26]



Obr. 13: Strukturální vzorec Chloridazon-disfenylu

2.4 Metazachlor



Obr. 14: Strukturní vzorec Metazachloru

Je to herbicid, který inhibuje klíčivost a je absorbován zejména kořeny rostlin. Ve srovnání s chloridazonem je skoro dvakrát rozpustnější ve vodě (450 mg/ml při 20 °C). Z tohoto hlediska se snáze dostává do podzemní vody než chloridazon. Vykazuje akutní toxicitu při požití, je karcinogenní a nebezpečný pro vodní prostředí. [29]

2.5 Odstraňování znečišťujících látek a pesticidů z vody

Ročně je v ČR do kanalizace vypuštěno přes 500 mil. m³ odpadní vody, která obsahuje z části syntetické chemické látky, pesticidy a jiné toxické látky a to přináší problém při jejím čištění. Z tohoto hlediska je odstraňování polutantů zdoluhavý a ne vždy účinný proces. Záleží na mnoha parametrech, jako jsou složení odstraňovaného polutantu a jeho množství ve vodě, okolních podmínkách a proto je zásadní zvolení vhodného technologického postupu nebo spojení více procesů pro jejich úplné odstranění.

Z fyzikálně-chemického hlediska existují tři hlavní technologie:

- adsorpce
- membránové procesy
- pokročilé oxidační procesy

2.5.1 Adsorpce

Jedná se o nárůst koncentrace látek v oblasti mezifázového rozhraní, které je doprovázené poklesem povrchové energie.

Adsorbent – pevná látka, na jejímž povrchu dochází k adsorpci (např. aktivní uhlí, zeolity, sorpční hmoty)

Adsorbát – látka adsorbovaná na fázovém rozhraní, její koncentrace při adsorpci v roztoku klesá

Při odstraňování pesticidů z vody se jedná o adsorpci z kapalné fáze na tuhém adsorbentu. Při ní dochází k vázání vrstvy molekul kapaliny tzv. lyosféry na povrchu

adsorbentu. Molekuly kapaliny jsou v této vrstvě vlivem silového pole adsorbentu stlačené, případně i jinak orientované, a tím pádem mají sníženou pohyblivost. Koncentrace adsorbátu v roztoku klesá z původní koncentrace až na hodnotu blížící se rovnovážné koncentraci. V rovnovážném stavu se již rozdělení adsorbované látky mezi kapalinou a pevnou fází nemění.

V praxi se často využívá adsorpce na aktivním uhlí a to z důvodu jeho vysoké sorpční schopnosti. Z vody odstraňuje většinu organických a některé anorganické látky, ale také pachy.

Typy adsorpce

1) Fyzikální adsorpce

- Vzniká na základě přitažlivých sil (van der Waalsových interakcí) působících mezi všemi částicemi
- Vícevrstvá adsorpce a probíhá velmi rychle

2) Chemisorpce

- Vzniká na základě chemických vazeb mezi molekulami adsorbátu a povrchem adsorbentu
- Často probíhá pouze na aktivních centrech (místa s vyšší energií a afinitou k adsorbátu), pomalá

3) Molekulární adsorpce

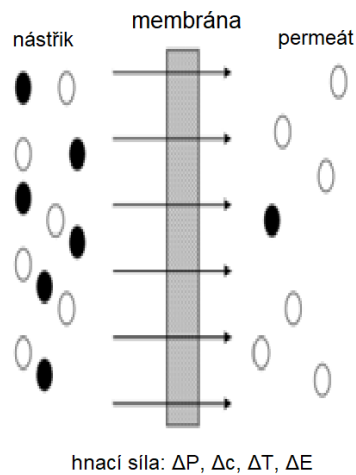
- Na povrchu pevného adsorbentu se adsorbují z roztoku celé molekuly nebo u elektrolytů oba druhy iontů ve stejné míře

4) Iontová adsorpce

- Ionty vzniklé disociací elektrolytu v roztoku se na adsorbentu zachycují různou měrou [68]

2.5.2 Membránové procesy

Separční procesy založené na transportu látek přes membránu. Transport probíhá v důsledku působení hnací síly. Hnací silou může být rozdíl tlaků, koncentrací, teploty nebo energie před a za membránou.



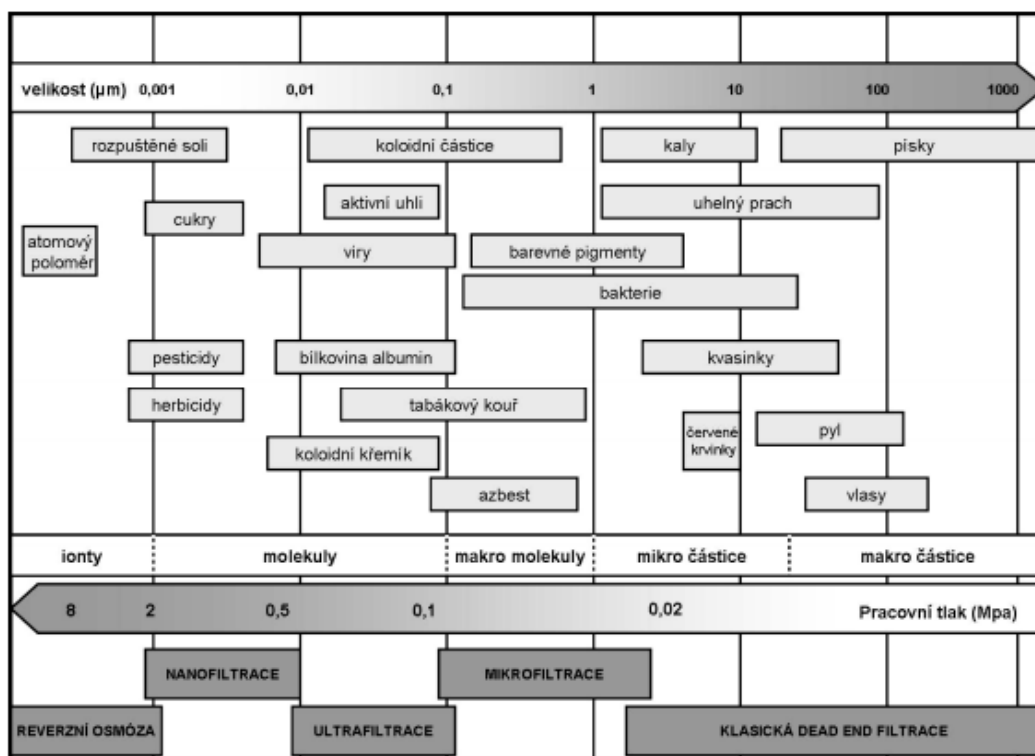
Obr. 15: Princip membránových separačních procesů

Membrána je selektivně propustná (polopropustná) přepážka dovolující transport určitých částic ze vstupního proudu do produktu.

Rozdělení podle hnací síly transportu:

- Rozdíl hydrostatických tlaků – mikro-, ultra-, nanofiltrace, reverzní osmóza
- Rozdíl tlaků par – pervaporace, membránová destilace
- Rozdíl koncentrací - dialýza
- Rozdíl elektrických potenciálů - elektrodialýza

Pro úpravu vody se používají membránové procesy, kde hnací silou je rozdíl tlaků. Například pro odstranění pesticidů je využívána reverzní osmóza nebo nanofiltrace, která ale nedokáže odstranit všechny pesticidní látky (Obr. 16). Tyto procesy nejsou stoprocentně účinné proti všem chemickým, biologickým a jiným znečištěním, a proto se pro úpravu vody spojují s dalšími procesy.



Obr. 16: Použití membránových procesů na základě velikosti separovaných látek [22]

2.5.3 Pokročilé oxidační procesy (AOP)

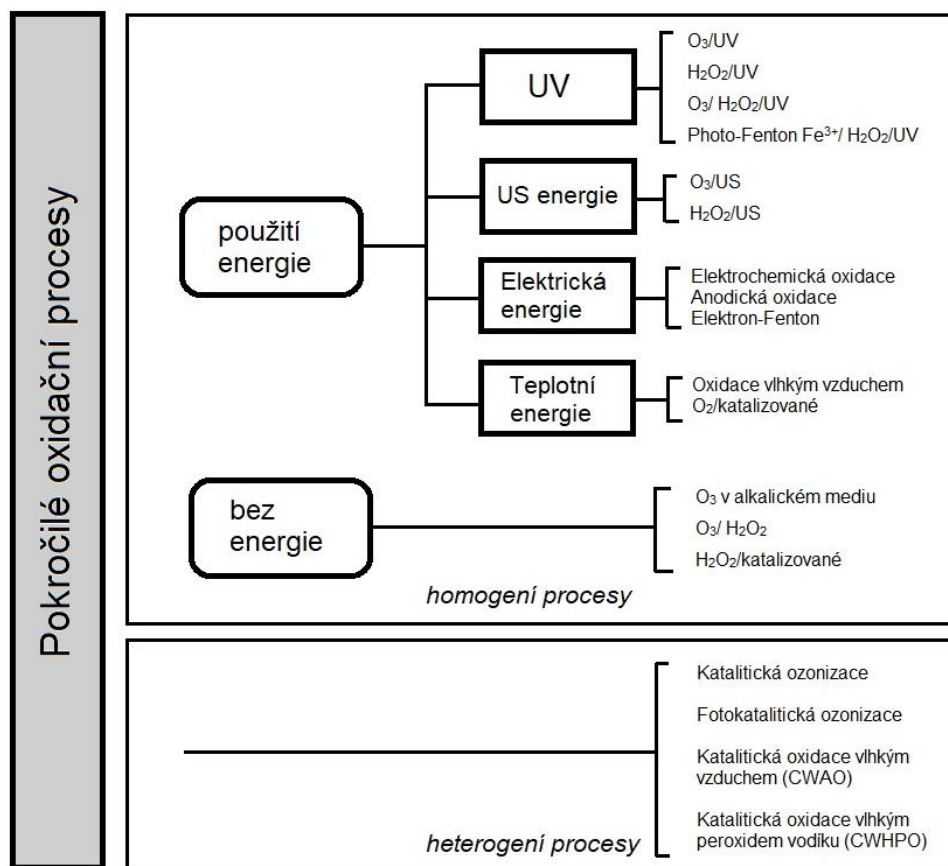
Tyto procesy jsou velmi rozšířené a to hlavně díky jejich vysoké účinnosti při odstraňování pesticidů z vody. Jak se vyvíjí požadavky na maximální limity znečištění vody a energetickou náročnost procesů, tak se musí i tyto procesy zdokonalovat a vylepšovat a proto vznikají nové a nové postupy jako např. použití pevných katalyzátorů.

AOP jsou schopné účinně degradovat a odstraňovat specifické znečišťující látky, které by jinak byly obtížně eliminovány konvenčními procesy, protože nejsou biologicky rozložitelné. [20]

Principem AOP metod je oxidace polutantů organického charakteru a jejich úplná mineralizace (přeměna na CO_2) a jsou založeny na tvorbě a reakci hydroxylových radikálů.

AOP procesy dělíme na (Obr. 17):

- Homogenní - využívající energii
 - využívající energii
 - nevyužívající energii
- Heterogenní



Obr. 17: Dělení pokročilých oxidačních procesů [6]

Jedny z nejpoužívanějších AOP procesů jsou s využitím UV záření a přidavkem H_2O_2 , O_3 nebo jejich kombinace a tím pádem se pohybujeme v procesech homogenních využívajících energie.

Pro procesy využívající energii byly zavedeny dva parametry:

- 1) EED (*electrical energy dose*)

Vyjadřuje specifickou spotřebu elektrické energie na 1m^3 upravované vody. [21]

(1)

$$EED [\text{kWh}/\text{m}^3] = \frac{P}{Q}$$

kde P je spotřeba elektrické energie [kW] a Q je průtok vody [m^3/h].

- 2) EEO (*electrical energy order*)

Definuje spotřebu elektrické energie na 1m^3 vody pro dosažení 90% redukce ve sledovaném ukazateli. [21]

(2)

$$EEO [\text{kWh}/\text{m}^3] = \frac{EED}{\left(\log \frac{c_0}{c_e}\right)}$$

kde c_0 je počáteční koncentrace polutantu a c_e je výsledná koncentrace polutantu.

Tyto parametry slouží k porovnání AOP metod pro danou aplikaci a následně jako jeden z ukazatelů výběru nejvhodnější technologie pro úpravu.

2.5.3.1 H₂O₂/UV

Proces založen na homolytické fotokatalýze peroxidu vodíku za vzniku dvou radikálů OH[•].



Oproti procesům s O₃ je metoda s peroxidem vodíku vhodnější pro vody s vysokou koncentrací znečišťujících látek a to vzhledem k rozpustnosti peroxidu ve vodě. Ale i tato metoda má své nevýhody, kterými jsou:

- částečná rekombinace dvou OH radikálů vzniklých fotolyticky z peroxidu
- H₂O₂ absorbuje pouze pod 280nm

Pro efektivní absorpci UV záření, při použití této metody, je zapotřebí vysoká koncentrace H₂O₂ nebo využití pH, protože v alkalickém prostředí je fotolýza s H₂O₂ rychlejší díky vzniku HOO[•] radikálů, které mají vyšší absorpční koeficient. [6]

2.5.3.2 O₃/UV

Proces založen na fotolytické reakci vody a ozonu za vzniku dvou OH[•] radikálů a uvolnění kyslíku.



Absorpce UV záření ozonem při 254nm je o dva řády větší než u peroxidu vodíku, a i když je ozon méně rozpustný ve vodě než H₂O₂, tak tento typ procesu je velmi účinný pro odstranění nízkých koncentrací těžko odstranitelných chemických látek, ale také bakteriálního znečištění.

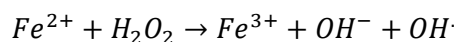
Účinnost i rychlost degradace při použití H₂O₂/UV i O₃/UV jsou ovlivněny intenzitou UV záření, poměrem dávky oxidantu/UV, koncentrací znečišťujících látek a konstrukcí reaktoru. Důležitým parametrem pro výběr metody degradace je v dnešní době i cena. Porovnání cen nákladů na provoz je uveden v Tab. 2.

Tab. 2: Porovnání cen nákladů při použití AOP procesů na úpravu 1 m³ vody [6]

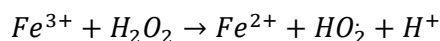
AOP proces	Cena [\$/m ³]
H ₂ O ₂ /UV	4,6
O ₃	5,3
O ₃ /UV	8,7
O ₃ /H ₂ O ₂ /UV	11,2

2.5.3.3 Fentonova oxidace

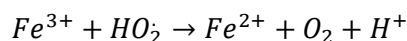
Tento proces degradace pracuje s Fe^{2+} ionty a jejich reakcí ve vodném prostředí s peroxidem vodíku za vzniku OH^\cdot a oxidace Fe^{2+} na Fe^{3+} podle rovnice. [6]



Vzniklé Fe^{3+} ionty mohou dále reagovat s peroxidem vodíku za tvorby hyperoxylových radikálů HO_2^\cdot .



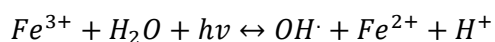
Následně tento radikál HO_2^\cdot může redukovat Fe^{3+} ionty podle reakce



Pro tuto metodu je optimální pohybovat se v kyselém pH prostředí.

2.5.3.4 Foto-Fentonova oxidace

Na rozdíl od samotné Fentonovy oxidace je foto-Fentonova oxidace rychlejší a to díky působení UV záření. Dochází k fotolýze Fe^{3+} iontů za vzniku Fe^{2+} a OH^\cdot radikálu. [10]



Pro tento typ oxidace se používá UV světlo o vlnové délce v rozmezí 180 až 290nm, což nám zajišťuje rychlejší oxidaci a zajišťuje hydrolyzu H_2O_2 na OH^\cdot radikály. Foto-Fentonova metoda oproti „obyčejné“ Fentonově oxidaci má nižší spotřebu železnatých iontů díky použití UV záření.

Bylo provedeno mnoho srovnání účinností AOP metod a například ze studie použití různých fotochemických oxidačních procesů pro biodegradaci odpadní vody z výroby papíru vyplynulo, že ve srovnání UV, H_2O_2/UV , Fentonovy oxidace a foto-Fentonovy oxidace byla nejúčinnější metodou poslední zmíněná nejenom zvýšením biodegradace, ale také odstraněním organických a ostatních suspendovaných látek viz Tab. 3. [20]

Tab. 3: Účinnost rozdílných AOP metod pro čištění odpadní vody papírní [6]

AOP	počátek	UV	H_2O_2/UV	Fentonova oxidace	foto-Fentonova oxidace
Organické znečištění CHSK [mg O_2/l]	10300	-	9270	5870	1960
Biodegradace $BSK_5/CHSK$ poměr	0,21	0,25	0,45	0,55	0,70
Suspendované látky [mg/l]	5950	-	600	250	200

CHSK = chemická spotřeba kyslíku

BSK_5 = biologická spotřeba kyslíku za 5 dní

Žádná metoda nemůže být dokonalá a proto ani Fentonovy metody nejsou výjimka. Nevýhodu při použití těchto metod je:

- 1) vytváření vysoké koncentrace aniontů v upravované vodě
- 2) velké množství kalu z použitých solí železa

Proto jsou tyto metody dále ve výzkumu a jednou z alternativ nahrazení Fe^{2+} iontů ve formě solí je jejich nahrazení pevnou formou železa – nanočástice železa. Tím by se mohlo zamezit vzniku kalů i vytváření aniontů v upravené vodě.

2.6 Stanovování pesticidů

V dnešní době existuje více než 1600 látek pesticidní povahy, které mohou být rozděleny podle jejich funkce nebo struktury. Pro tyto látky jsou zákonem povolené limity obsahu v nejrůznějších složkách přírody (půdy, vody). Analytické laboratoře jsou proto nuceny detekovat, identifikovat a kvantifikovat stovky různých matic. Analýza pesticidů představuje velkou výzvu pro obsluhu i instrumentaci. Cílem je analyzovat maximální množství pesticidů v co nejkratším čase s mezí detekce pod maximálním residuálním levem. Proto analytici většinou používají kapalinovou nebo plynovou chromatografii (separační metody) spojenou s hmotnostní detekcí společně s několika samostatnými metodami, které jsou specifické pro jednotlivé pesticidy nebo malé skupiny látek s podobnými vlastnostmi.

V následujících kapitolách se pouze okrajově zmíním o plynové chromatografii a zaměřím se hlavně na kapalinovou chromatografii spojenou s hmotnostní spektrometrií.

2.6.1 Předúprava vzorků

Pro reálné vzorky je jejich předúprava před samotným stanovením nezanedbatelným krokem k úspěšné analýze. Důvodem je složitost vzorků, přítomnost nečistot, slabá absorpce v UV oblasti nebo malá koncentrace analytu ve vzorku. To vše ovlivňuje výslednou přesnost a správnost stanovení.

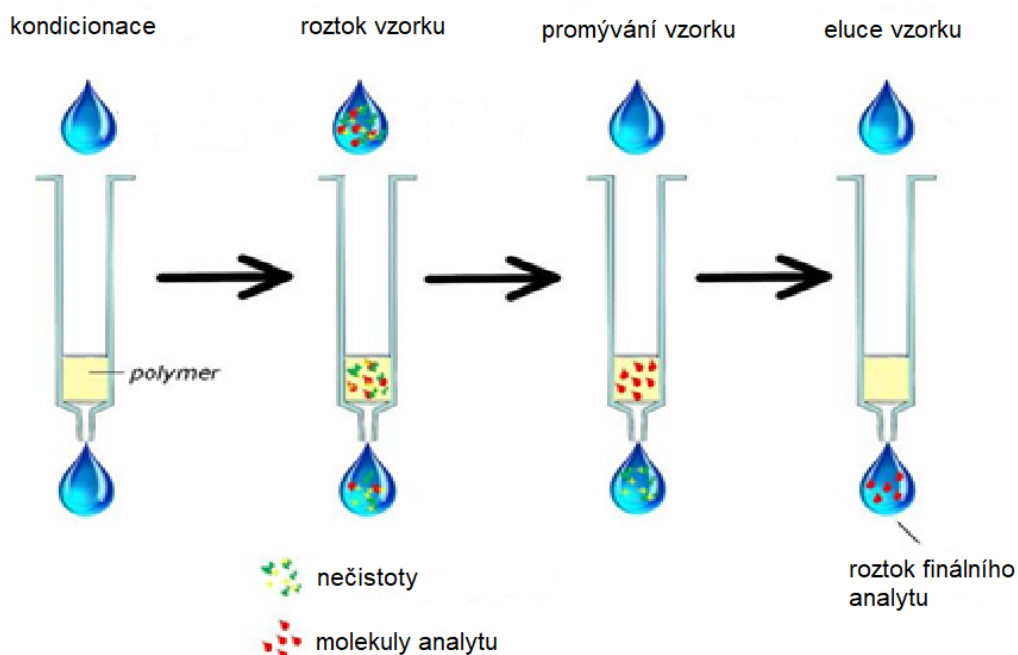
Existuje celá řada metod pro úpravu vzorků v chromatografii. Nejvyužívanějšími metodami jsou:

- Extrakce na tuhou fázi
- Mikroextrakce na tuhou fázi
- Derivatizace
- Filtrace

2.6.1.1 Extrakce na tuhou fázi (SPE)

Jedna z dominantních metod úpravy vzorku zajišťující velkou výtěžnost, účinné za koncentrování analytu lepší možnosti automatizace a nižší spotřebu rozpouštědel.

Principem této metody je zachycení analytu na tuhé fázi SPE kolony v důsledku jeho vyšší afinity k této fázi než k matici vzorku a následně jeho eluce vhodným rozpouštědlem z tuhé fáze *Obr. 18*.

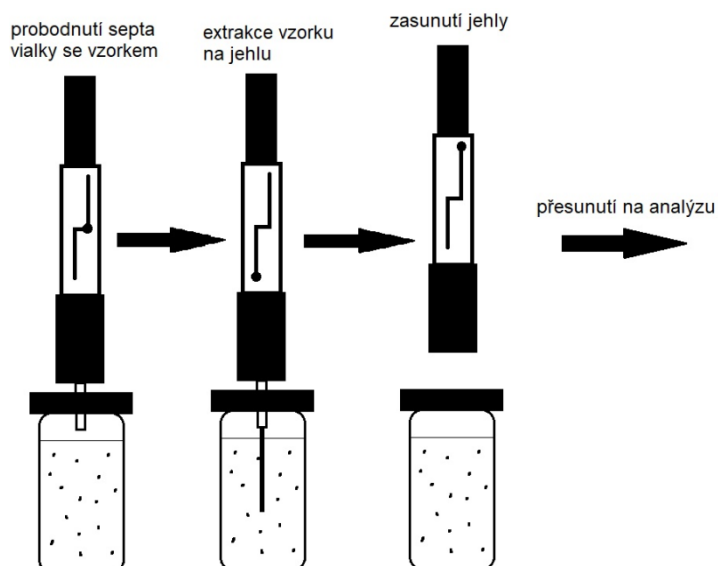


Obr. 18: Postup extrakce na tuhou fázi [27]

Z tohoto hlediska je velmi důležité výběr správné stacionární fáze náplně SPE kolonek, kterých je dostupná velká škála a jsou tyto sorbenty obdobné sorbentům použitých v kolonách pro kapalinou chromatografii.

2.6.1.2 Mikroextrakce na tuhou fázi (SPME)

Principem je adsorpce analytů na polymerem pokryté vlákno SPME a následná desorpce analytů nejčastěji zvýšenou teplotou *Obr. 19*. Adsorpce analytů je zdlouhavý proces vyžadující čas.



Obr. 19: Postup mikroextrakce na tuhou fázi

Využívá se především v environmentálních aplikacích se spojením s plynovou chromatografií.

2.6.1.3 Derivatizace

Jedná se o metodu převodu látek s malou absorpcí v UV oblasti na deriváty UV absorbující pomocí správně vybraného činidla.

Derivatizaci můžeme provádět před kolonou (předkolonová derivatizace), za kolonou (postkolonová derivatizace) a přímo na koloně. [2]

Použití činidla se liší podle složení převáděného analytu. Například pro karboxilové kyseliny používáme alkoholy a tím pádem provádíme esterifikaci a analyty s $-OH$ skupinou můžeme převést acylací.

2.6.1.4 Filtrace

I obyčejná filtrace vzorku nám poskytne spolehlivější analýzu. Vzorky totiž často obsahují pevné nečistoty, které mohou ucpat kapiláry v chromatografu nebo rovnou kolonu a proto je i tato předúprava velmi důležitá.

Vzhledem k malému množství vzorku se používají pro filtraci stříkačkové filtry, které se jednoduše nasadí na stříkačku o objemu 1 – 5 ml a vzorek se protlačí skrz tento filtr (Obr. 20). Podle typu vzorku musíme vždy vybrat vhodný typ membrány (nylonová, PTFE a další).



Obr. 20: Stříkačkový filtr pro filtrování vzorku [62]

Uvedené metody úpravy vzorků, při jejich správném provedení, zajišťují bezchybné, bezproblémové a přesné stanovení analytu chromatografickými metodami.

2.6.2 Kapalinová chromatografie

Jedná se o separační metodu založenou na rozdělování sloučenin mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Jedna z fází je kapalina (mobilní) proudící přes nepohyblivou fázi (stacionární). V kapalinové chromatografii probíhá rozdělování sloučenin podle různých retenčních mechanismů, kterými jsou:

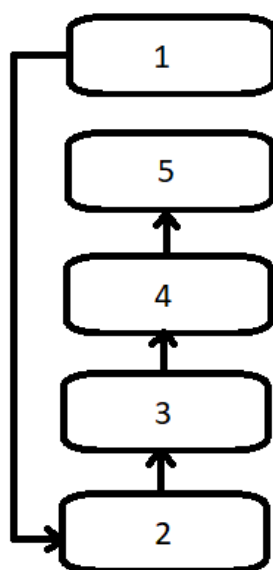
- *Adsorpční* – separace sloučenin na základě různé schopnosti adsorpce na stacionární fázi
- *Rozdělovací* – separace sloučenin na základě jejich rozdílné rozpustnosti ve dvou různých kapalinách
- *Gelová permeační* – separace sloučenin na základě jejich velikosti při průchodu pórovitým polymerním gelem (stacionární fáze)
- *Iontová* – separace sloučenin na základě jejich silných elektrostatických interakcí mezi stacionární fází a opačně nabitými ionty v mobilní fázi
- *Afinní* – separace sloučenin na základě jejich specifických interakcí (antigen-protilátka, receptor-hormon)
- *HILIC* – separace založená na základě polarit analytu a mobilní fáze (retence klesá s rostoucím podílem vody)

2.6.2.1 Instrumentace

Kapalinový chromatograf se skládá:

- 1) Zásobník mobilní fáze a promývacích roztoků
- 2) Vysokotlaké čerpadlo
- 3) Dávkování vzorku (autosampler a dávkovací ventily)
- 4) Separace látek (termostat kolony)
- 5) Detektor
- 6) Vyhodnocovací zařízení (PC s příslušným SW)

Jednotlivé části kapalinového chromatografu jsou sofistikovaná a samostatná zařízení, se kterými bez předešlého proškolení není vhodné pracovat.



Obr. 21: Jednoduché schéma kapalinového chromatografu, 1 zásobní mobilní fáze, 2 čerpadla, 3 autosampler, 4 termostat s kolonou a 5 detektor

Zařízení pro odplynění mobilní fáze je u většiny kapalinových chromatografů vloženo v jednotce s vysokotlakými čerpadly. Uvádí se, že až 70 % problémů vyskytujících se v chromatografickém systému souvisí s mobilní fází [2]. Odplynění mobilní fáze je jedním ze základních způsobů eliminace následujících problémů:

- nestabilní základní linie (baseline) – snížení citlivosti detekce
- neopakovatelné retenční časy
- špatná opakovatelnost dávkovaného objemu vzorku
- nestabilita provozu čerpadel

V současné době jsou používány dva způsoby odplynění mobilní fáze – probublávání heliem nebo vakuový degaser.[2]

Hlavní požadavky na vysokotlaká čerpadla jsou stabilní průtok mobilní fáze, bez pulsní, průtok musí být možný v širokém rozmezí (0,1 ml až 10,0 ml), schopné dosáhnou vysokých tlaků až 100MPa a být odolné vůči korozi s malým vnitřním objemem.

Čerpadla instalovaná do chromatografů pracují při konstantním tlaku nebo konstantním objemovém průtoku. V dnešní době jsou nejvíce používané pístová čerpadla zapojená do série (existují binární nebo kvartérní systémy tzn. 2 nebo 4 pístová). Existuje další řada čerpadel, jako jsou membránová čerpadla, pneumatická čerpadla, ale tyto druhy jsou v dnešní době prakticky nevyužívána a to z důvodu dosažení malých maximálních tlaku nebo konstrukční náročnosti.

Separace látek probíhá na kolonách, které musí odolávat nejen vysokým tlakům až do 100MPa, ale musí být i chemicky odolné. Proto jsou konstruovány z oceli a naplněny sorbentem – stacionární fází o různé velikosti částic a to od 1 až do 5 μm . Nejčastěji používané kolony mají vnitřní průměr od 1,7 do 5 mm a délce 50 až 300 mm. Kolona je do systému zapojena přes kovové nebo polyetheretherketonové (PEEK) kapiláry se šroubem.

Vhodným výběrem typu kolony a to nejen z hlediska velikosti kolony a částic sorbentu, ale hlavně jeho typem jsme následně schopni kvalitativně a kvantitativně analyzovat jednotlivé analyty ve vzorku. Výběr správného typu kolony hraje v analýze významnou roli.

Detektory slouží k zaznamenávání rozdílu signálu čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující separované analyty po průchodu kolonou. Dělíme je na [2]:

- Koncentrační – reagují na změnu hmotnostní koncentrace složky v eluentu dm/dV nezávisle na rychlosti přívodu složky do detektoru
- Hmotnostní – reagují na změnu hmotnostního toku složky v eluentu dm/dt do detektoru
- Nedestrukční – nedochází k chemické změně detekované komponenty
- Destrukční – dochází k ireverzibilní změně detekované komponenty

Detektory by měly mít ideálně následující vlastnosti, které samozřejmě, žádný detektor nemá a ani mít všechny nemůže. [2]

- Vysoká citlivost a předvídatelná odezva
- Odezva pro všechny analyty – univerzálnost
- Specificita
- Linearita (široký lineární dynamický rozsah)
- Spolehlivost a snadnost použití
- Nulový příspěvek k mimokolonovému rozmývání elučních zón
- Nedestruktivnost

- Signál nezávislý na složení mobilní fáze (gradientová eluce)
- Signál nezávislý na změně teploty a průtoku
- Kvalitativní informace pro detekované píky

Obtížné je zejména kombinace specifity a zároveň univerzálnosti.

Využití detektorů pro kapalinovou chromatografii se odvíjí od principu detektoru, jeho citlivosti a vlastností popsaných výše. Do nedávna byla nejvyužívanější detekční technikou UV-VIS detekce, ale v dnešní době je nahrazována hmotnostní spektrometrií a to z důvodu jeho větší univerzálnosti a citlivosti než u UV-VIS detekce.

Odezva detektoru

Koncentrační detektory mají nejčastěji lineární závislost mezi koncentrací složky v eluentu c_M a intenzitou analytického signálu R (odezva detektoru).

(11)

$$R = k_1 \times c_M$$

kde k_1 je konstanta úměrnosti, která zde vystupuje jako **citlivost**.

Plocha signálu y_A představuje časově závislou intenzitu signálu:

(12)

$$y_A = \int_{t_1}^{t_2} R dt$$

Odvozením z předešlých dvou rovnic dostaneme konečný výraz:

(13)

$$y_A = \frac{k_1 m}{F_m}$$

Plocha píku y_A je přímo úměrná celkové hmotnosti eluované komponenty a přímo úměrná objemové rychlosti toku mobilní fáze. Z toho vyplývá požadavek, kterým je konstantní průtok mobilní fáze při kvantitativním vyhodnocení.

Hmotnostní detektory reagují na změnu hmotnostního toku složky v mobilní fázi dm/dt a platí rovnice:

(14)

$$R = k_2 \left(\frac{dm}{dt} \right)$$

Pro plochu píku pak platí vztah:

(15)

$$y_A = k_2 m$$

Plocha píku je úměrná celkové hmotnosti eluované komponenty a je nezávislá na objemové rychlosti toku mobilní fáze. [2]

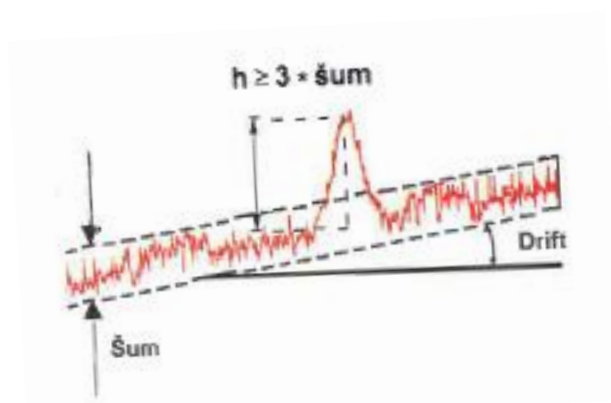
Šum

Je amplituda základní linie vyjádřená v příslušných jednotkách, která zahrnuje všechny nepravidelné změny signálu detektoru a je způsoben změnou elektrického signálu, nestabilitou lampy detektoru, vlastností detekční cely, teplotními fluktuacemi a dalšími faktory.

Šum je zjednodušeně kolísání odezvy detektoru a je měřen od píku k píku nebo integrací šumu v blanku na pozici píku látky. Šum je důležitým parametrem pro vyhodnocení meze detekce a kvantifikace stanovované látky (Obr. 22).

Mez detekce – výška píku stanovované látky musí být trojnásobek šumu

Mez kvantifikace – výška píku musí být desetinásobek šumu



Obr. 22: Šum a drift [2]

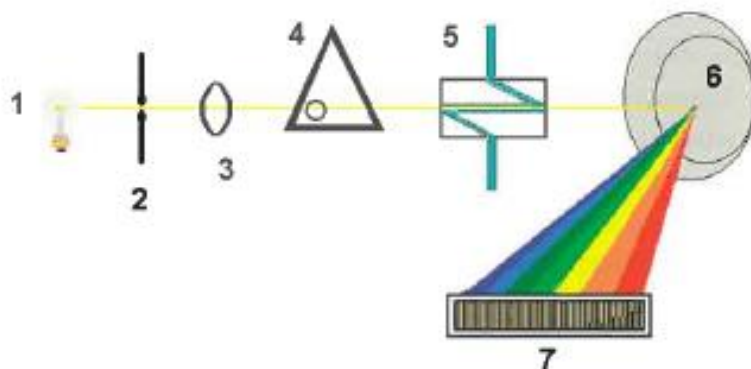
Drift

Ukazuje dlouhodobou nestabilitu základní linie a je vyjadřován jako průměrný sklon šumu v příslušných jednotkách za hodinu. Je obvykle spojován se změnou teploty detektoru nebo při gradientové eluci. [2]

2.6.2.2 Spektrofotometrické detektory

Založeny na absorpci záření v oblasti vlnových délek od 190 do 800nm. Kvantitativní vyhodnocení je na základě Lambert-Beerova zákonu. Vyjadřující vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy l , koncentrací složky c a absorbancí A .

Konstrukce průtočné cely musí eliminovat mísení separovaných elučních zón, čímž docílíme správné činnosti detektoru (Obr. 23).



Obr. 23: Schéma spektrofotometrického detektoru [2]

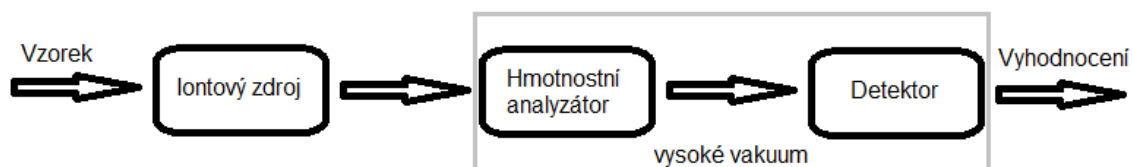
Podle konstrukčního uspořádání můžeme tento typ detektoru dělit na čtyři typy:

- Detektory s fixní vlnovou délkou – zdroj záření nízkotlaká rtuťová výbojka
- Detektory s měnitelnou vlnovou délkou – pouze s předem danými vlnovými délkami
- Detektory s programovatelnou vlnovou délkou – nastavitelná v rozmezí od 190 do 700nm, měnitelná během analýzy.
- Detektory s diodovým polem – snímají celé spektrum v rozsahu od 190 do 800nm v reálném čase. [2]

2.6.2.3 Hmotnostní spektrometrická detekce

Základním principem hmotnostní spektrometrie je generování iontů z anorganických nebo organických složek analytu pomocí vhodných metod, následná separace těchto iontů podle jejich m/z (*mass-to-charge ratio*) a jejich kvalitativní a kvantitativní detekce v závislosti m/z na intenzitě (abundance). [5]

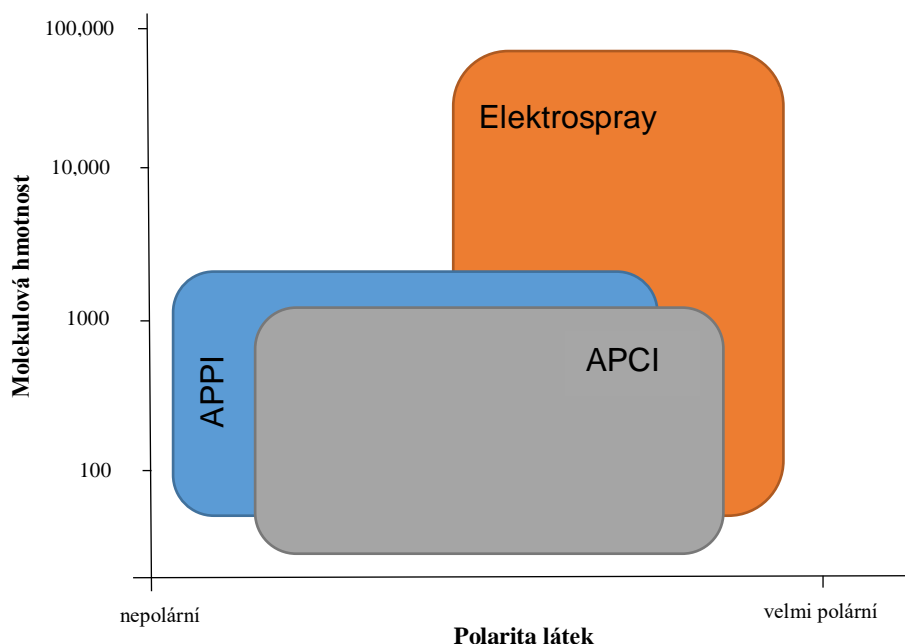
Hmotnostní spektrometr se skládá z ionizačního zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Hmotnostní analyzátor a detektor pracují pod vysokým vakuem (Obr. 24).



Obr. 24: Jednoduché schéma MS

Ionizační techniky

Nejdůležitějším článkem pro správnou analýzu anorganických a organických látek je správně zvolená ionizační metoda, protože žádná z nich není naprosto univerzální. Volba je ovlivněna těkavostí látky, její tepelnou stabilitou, molekulovou hmotností a polaritou látky (Obr. 25).



Obr. 25: Aplikace ionizačních technik

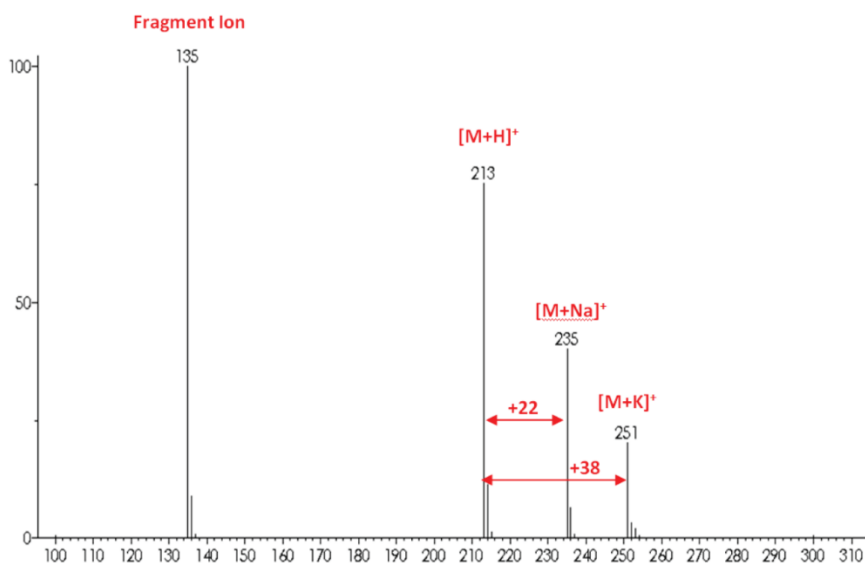
Těchto metod ve spojení s LC je celá řada: [5]

- Elektrosprej (ESI)
- Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)
- Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)
- Matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace (MALDI)
- Ionizace polem (FI)
- Desorpce polem (FD)
- Bombardování urychlenými atomy (FAB)
- Přímá chemická ionizace (DCI)

a proto si přiblížíme pouze nejdůležitější a nejvyužívanější metody pro analýzu pesticidů. Těmito metodami jsou ESI a APCI, které jak je patrné z Obr 25. dokáží ionizovat většinu látek od málo polárních až po velmi polární a od malých molekul až po velké do 100,000 molekulové hmotnosti.

Všechny výše uvedené metody ionizace patří mezi tzv. měkké ionizační techniky. To znamená, že při ionizaci vznikají protonované molekuly nebo aduktů $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ a

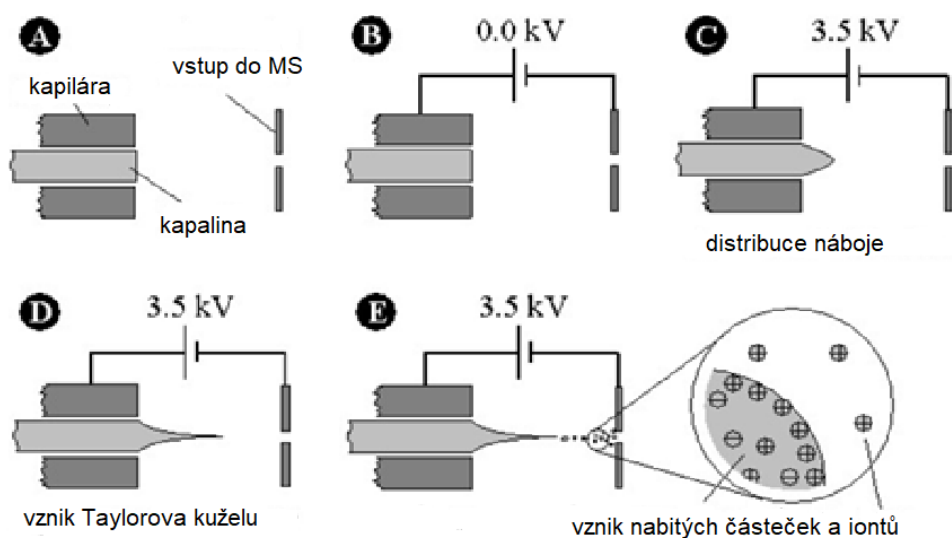
$[M+K]^+$ v kladném modu (*positive mode*) a $[M+H]^+$, $[M+OAc]^-$ a $[M+Cl]^-$ v záporném modu (*negative mode*) a nedochází k tak rozsáhlé fragmentaci jako u tvrdých ionizačních technik. Poté můžeme pozorovat ve výsledku záznam podobný záznamu na (Obr. 26).



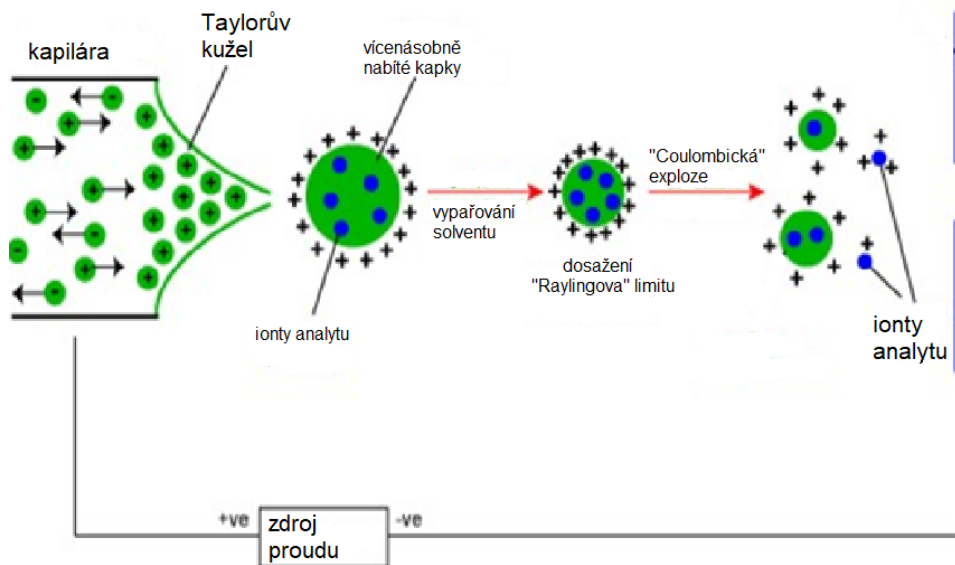
Obr. 26: Hmotnostní spektrum s adukty analytu [67]

Elektrosprej

Jedná se o techniku převodu iontů z kapalně do plynné fáze. Princip této techniky je znázorněn na (Obr. 27), kde jsou nejprve nastaveny parametry ionizace a poté je přiváděna kapalina (mobilní fáze a analyt) do zmlžovací kapiláry bod A, kde v bodě C jsou redistribuovány náboje kapaliny v důsledku přivádění napětí na kapiláru a tím vzniká Taylorův kužel bod D a následně se z kužele začínají uvolňovat nabitě kapičky a dochází poté k četným Coulombickým explozím v důsledku vypařování mobilní fáze viz Obr. 28.



Obr. 27: Tvorba iontů u elektrospreje [64]



Obr. 28: Proces Coulombické exploze [65]

Vznikají ionty, které vstupují do vakua a jsou unášeny k hmotnostnímu analyzátoru a detektoru. Při vstupu iontů do vakua dochází k jejich ochlazení, což má nežádoucí vliv a proto byly zavedeny dvě opatření:

- Prostor iontového zdroje je vyhříván na 250 – 350 °C
- Při vstupu iontů do vakua je protiproudě přiváděn sušící plyn – dusík

V průběhu let byla konfigurace elektrospreje mnohokrát upravována a zdokonalována. Problémem byla například kontaminace nebo použití elektrospreje pouze pro velmi malé průtoky. Zvýšení odolnosti elektrospreje proti kontaminaci vedlo k jeho vychýlení z přímé osy se vstupem do prostoru hmotnostního analyzátoru nebo dalšími úpravami.

Problém s použitím malých průtoků při zmlžování byl vyřešen zavedením zmlžovacího plynu nebo kapaliny, proudící kolem zmlžovací kapiláry.

ESI je vhodné pro látky s vysokou molekulovou hmotností a polaritou.

Chemická ionizace za atmosférického tlaku

Princip je obdobný jako u chemické ionizace uvedené výše, ale probíhá za atmosférického tlaku. Eluát prochází kapilárou a je zmlžen do vaporizéru s teplotou 350 – 550 °C, kde je rychle odpařen. Vzniklé molekuly mobilní fáze jsou poté ionizovány koronovým výbojem vznikajícím vložením vysokého napětí (3 – 4kV) na výbojovou jehlu. Molekuly analytu jsou následně ionizovány ion-molekulárními reakcemi s ionizovanými

molekulami mobilní fáze. Poté jsou ionty unášeny do analyzátoru. Stejně jako u elektrospreje byly z důvodu ochlazování iontů zavedeny dvě opatření:

- Prostor iontového zdroje je vyhříván na 250 – 350°C
- Při vstupu iontů do vakua je protiproudě přiváděn sušící plyn – dusík

APCI

APCI je vhodná metoda pro látky se střední molekulovou hmotností a polaritou, sloučeniny neobsahující kyselé nebo bazické skupiny a sloučeniny vykazující slabou odezvu na elektrospreji.

Hmotnostní analyzátory

Analyzátory slouží k separaci iontů na základě jejich poměru hmotnosti a náboje (m/z).

Při výběru analyzátoru jsou důležité následující parametry: [2]

- Hmotnostní rozsah
- Rozlišení
- Účinnost
- Správnost hmoty
- Lineární dynamický rozsah
- Rychlost
- Citlivost

Základní typy používaných hmotnostních spektrometrů jsou uvedeny v tabulce (*Tab. 4*).

Tab. 4: Typy hmotnostních spektrometrů a jejich principy [5]

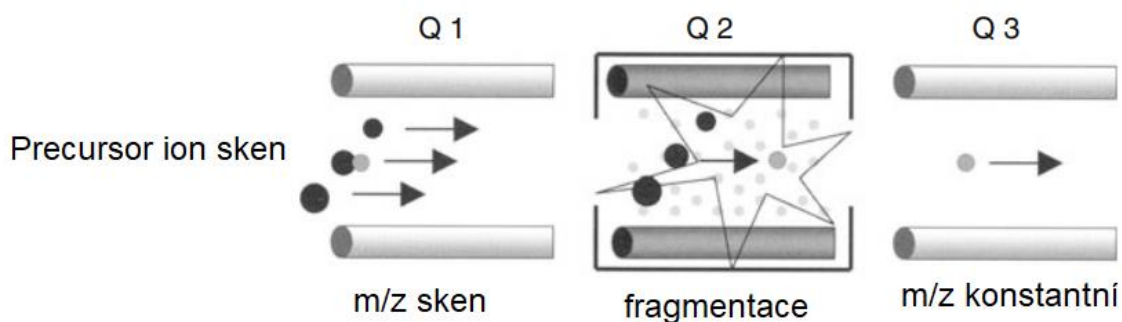
Typ	Zkratka	Princip
Analyzátor doby letu	TOF	Separace na základě doby letu iontů v prostoru
Magnetický sektor	B	Separace na základě vychýlení trajektorie iontů magnetickým polem
Kvadrupól	Q	Separace iontů na základě různých oscilací v dvojrozměrné kombinaci stejnosměrného a RF napětí
Lineární iontová past	LIT	Separace iontů na základě různých oscilací v dvojrozměrné kombinaci stejnosměrného a RF napětí
Kvadrupólová iontová past	QIT	Separace iontů na základě různých oscilací v trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a RF napětí
Iontová cyklotronová resonance s Fourierovou transformací	FT-ICR	Separace iontů v magnetickém poli na základě rozdílných cyklotronových frekvencí
Orbitrap	Orbitrap	Separace iontů na základě rozdílných axiálních oscilací v elektrickém poli

Při analyzování vybraných pesticidů v mé diplomové práci jsem pracoval na LC-MS/MS a to konkrétně s hmotnostním analyzátozem typu trojitého kvadrupolu (QqQ). Proto se zaměřím hlavně na tento typ analyzátoru.

Trojité kvadrupól

Jedná se o hmotnostní analyzátor (tzv. tandemový hmotnostní analyzátor) složený ze tří kvadrupólů umístěných za sebou, což nám dává možnost měřit MS/MS spektra a poskytuje vyšší citlivost a rozlišovací schopnost.

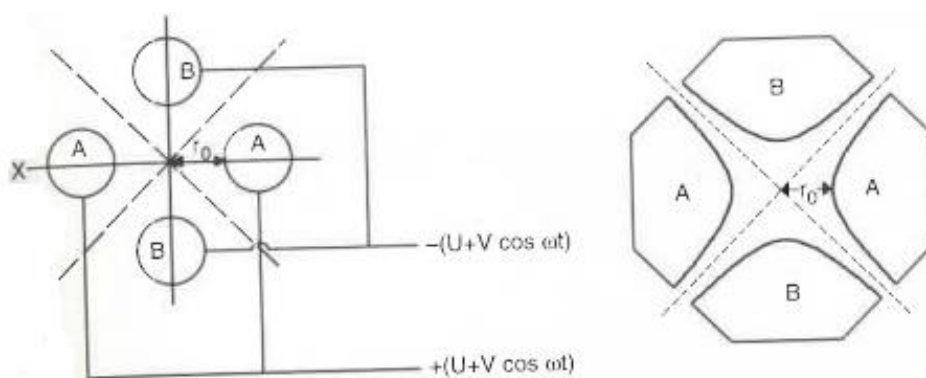
Při tandemové hmotnostní spektrometrii provádí první kvadrupól výběr prekursoru (nastaven na měření MS1). Vybraný ion podléhá kolizní indukované disociaci (CID) a dochází k jeho fragmentaci v druhém kvadrupólu. Vzniklé produktové ionty se analyzují ve třetím kvadrupólu (nastaven na měření MS2) a poté jsou detekovány na detektoru (*Obr. 29*).



Obr. 29: Rozdělení funkce jednotlivých kvadrupólů [5]

Hlavní uplatnění tandemové hmotnostní spektrometrie spočívá v identifikaci látek v komplexních směsích, v objasnění fragmentačních procesů a v možnosti kvantifikace látek ve složitých vzorcích.

Kvadrupólový analyzátor je složen ze čtyř tyčí válcového nebo hyperbolického tvaru, na které se přivádí kladné nebo záporné RF napětí. Vždy na dvě protilehlé tyče RF napětí se stejným znaménkem (Obr. 30).



Obr. 30: Rozložení napětí na kvadrupolu a ukázka hyperbol. tyčí kvadrupolu [5]

Separace iontů

Přiváděný ion vstupuje do prostoru tyčí a po aplikaci napětí je odpuzován tyčemi se stejným nábojem a přitahován k nejbližší tyči s opačným nábojem. Následně se změní náboj na protilehlých tyčích a iont začíná vykonávat oscilační pohyb ve směru nejbližší tyče s opačným znaménkem. Abychom dostali na detektor pouze ionty zvoleného m/z, dochází v průběhu ke změně napětí a amplitudy.

Detektory

Detektory používané pro hmotnostní spektrometrii pracují na bázi zesílení signálu a to principem mnohonásobného odrazu elektronů dopadajících na dynody. Indukuje se proud, který je zaznamenán. Tento princip se využívá u těchto typů detektorů:

- Elektronový násobič – lineární nebo zakřivený

- Kanálový elektronový násobič
- Mikrokanálový násobič
- Faradayova klec

Dalším používaným detektorem je fotonásobič, který pracuje na principu uvolňování elektronů dopadem iontu na konverzní dynodu a následným dopadem elektronů na fosforovou destičku se uvolní fotony, které se zesílí na fotonásobiči. [5]

3 Experimentální část

3.1 Použité pesticidy a chemikálie

Tab. 5: Použité pesticidy

Pesticidy	Chloridazon	Metazachlor
Dodavatel	Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich
Katalogové číslo	45385	36155
Lot.	BCCB0521	BCBW2741

Tab. 6: Použité chemikálie

Chemikálie	Dodavatel	Katalogové číslo	Lot.
Acetonitril	Merck	45385	BCCB0521
Mravenčan amonný	Sigma-Aldrich	36155	BCBW2741
Kyselina mravenčí	Sigma-Aldrich	695075	
Peroxid vodíku	Penta	23980	2011161118

3.2 Použité přístroje

- Aparatura s UV lampou (254nm)
- Aparatura s UV lampou a generátorem ozonu
- ThermoFisher Scientific LC systém Ultima 3000
- ThermoFisher Scientific MS systém TSQ Endura (QqQ)
- Filtrační aparatura s vývěvou
- Metrohm Titrátor 794 Basic Titrino
- Nicolet IR spektrometr

3.3 Optimalizace metody LC/MS-MS

Při vytváření metody bylo vycházeno z metody uvedené v odborném článku uvedeném v Journal of Chromatography A 1435 z roku 2016 strana 100-114 od autorů T. Kiljanek, A. Niewiadowska a S. Semeniuk s názvem Multi-residue method for the determination of pesticides and pesticide metabolites in honeybees by liquid and gas spektrography coupled with tandem mass spektrometry. [33]

Nejprve byl proveden test této metody jen s částečně pozmeněnými parametry MS detekce. Poté se přikročilo k upravování gradientu z důvodu stanovování pouze dvou látek na místo uvedených 15 pesticidů, které se touto metodou stanovovali. Průběh změn je uveden v tabulkách.

3.4 Metoda pro LC/MS-MS

3.4.1 LC nastavení

Kolona: Phenomenex Kinetex Phenyl-Hexyl 2,6 μm 100x2,1 mm

Mobilní fáze A: 100% ACN

Mobilní fáze B: 5 mM mravenčan amonný pH 6,0

Promývací roztok pístů: 10% MeOH

Tab. 7: Nastavení gradientu ve finální metodě

t [min]	Průtok [ml/min]	A%	B%
0	0,4	10	90
1	0,4	10	90
7	0,4	90	10
8	0,4	90	10
8,5	0,4	10	90
10	0,4	10	90

Teplota kolony: 40 °C

Teplota autosampleru: 25 °C

Objem nástřiku: 20 μl

Promytí nástřikové jehly: 200 μl 100% acetonitrilu

3.4.2 MS nastavení

Typ ionizace: ESI

Sprej napětí: static

Positiv ion napětí: 3500V

Negativ ion napětí: 2500V

Sheat gas: 50 Arb

Aux gas: 10 Arb

Sweep gas: 1 Arb

Teplota transfer trubice: 325 °C

Vaporizační teplota: 350 °C

Scan time: 0,8 sekund

Tab. 8: Nastavení ventilu

odpad	0-2 min
MS	2-6 min
odpad	6-10 min

3.4.3 SRM nastavení:

Tab. 9: Nastavení SRM pro Chloridazon a Metazachlor

Látka	t _R [min]	Polarita	Prekursor [m/z]	Produkt ion [m/z]	Kolísání energie [V]	RF [V]
Chloridazon	3	Positive	222	77	33	133
Chloridazon	3	Positive	222	92	26	133
Chloridazon	3	Positive	222	104	23	133
Metazachlor	4,5	Positive	278,1	134	22	78
Metazachlor	4,5	Positive	278,1	210	10	78

3.5 Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze B byla připravena rozpuštěním 0,32 g mravenčanu amonného v 1 l MilliQ vody. Následně bylo pH upraveno kyselinou mravenčí na pH 6,0 a mobilní fáze byla přefiltrována přes Nylonovou membránu s pórovitostí 0,2 µm (Obr. 31) a odplyněna pomocí ultrazvukové vany.



Obr. 31: Filtrační aparatura

3.6 Optimalizace SRM nastavení

První krok po optimalizaci metody a nastavení finálních parametrů na LC byla optimalizace MS.

Ta byla provedena tak, že roztok standardu Chloridazonu a Metazachloru o koncentraci 50 µg/ml byl nabrán do Hamiltonovi stříkačky o objemu 2,5 ml a byl přímo přes kapiláru zvoleným průtokem 50 µl/min tlačěn pístem do MS detektoru přes ESI s nastavenými parametry viz bod 3.4.2.

Výsledkem byly přesné parametry kolizních energií, RF napětí pro jednotlivé produktové ionty [m/z] Chloridazonu a Metazachloru. Tyto parametry jsou uvedeny v *Tab. 9*.

3.7 Optimalizace přenosu pesticidů

V průběhu optimalizace metody byl zjištěn přenos Chloridazonu i Metazachloru na následující nástřík.

- Prvním testem byl důkladný proplach kolony, z důvodu úvahy špatné eluce Chloridazonu a jeho záchytu na koloně, směsí Milli-Q vody, ACN, MeOH, IPA s 1 ml kyseliny mravenčí v poměru 1:1:1:1. **Nepomohlo.**
- Druhým testem byl nástřík většího počtu blanků (1 kapka MeOH v 1 ml Milli-Q vody) a směsi 1 ml Milli-Q vody s 1 kapkou kyseliny mravenčí. Záměr bylo odstranění

předpokládaného přenosu na jehle. **Pomohlo pro Metazachlor, ale ne pro Chloridazon. Zařazení blanku mezi měření.**

- Třetím testem bylo prohození mobilních fází. ACN do pozice mobilní fáze A, z důvodu napojení mobilní fáze A na oplach jehly, a následné zvýšení frekvence oplachu jehly na 200 μl . **Částečně pomohlo.**
- Posledním testem bylo zvýšení nástřiku z 5 μl na 20 μl . **Pomohlo, ale zvýšil jsem tím šum na baselině.** [55]

3.8 Optimalizace scan time

Byl proveden pokus se scan time (rychlostí záznamu dat). V metodě byly postupně nastaveny hodnoty 0,8 sekundy, 0,5 sekundy a 0,3 sekundy. S těmito nastaveními byl změřen standard obou pesticidů o koncentraci 100 ng/ml.

3.9 Prevalidace metody

3.9.1 Zásobní roztoky

Byl navážen přibližně 1 mg standardu Metazachloru/Chloridazonu do 20 ml odměrné baňky a rozpuštěn v 10 ml acetonitrilu. Po rozpuštění byly baňky doplněny po rysku acetonitrilem (koncentrace 50 ng/ml).

3.9.2 Kalibrace

Ze zásobních roztoků byly připraveny první tři koncentrace kalibrační řady (200, 100 a 50 ng/ml) odebráním uvedeného množství roztoku Hamilton stříkačkami viz *Tab. 11* a následně doplněn po rysku baňky vodou.

Tab. 10: Příprava kalibrační řady o koncentraci 200, 100 a 50 ng/ml

Koncentrace [ng/ml]	V [μl] zásobního roztoku	V [ml] baňky
200	100	25
100	40	20
50	20	10

Pro přípravu zbývajících koncentrací byl odebrán objem podle tabulky z roztoku o koncentraci 100 ng/ml. Následně doplněn po rysku baňky vodou.

Tab. 11: Příprava kalibrační řady o koncentraci 10 a 1,0 ng/ml

Koncentrace [ng/ml]	V [μL] roztoku 100 ng/ml	V [ml] baňky
10	500	5
1,0	50	5

3.9.3 Opakovatelnost nástřiku

Pro měření opakovatelnosti nástřiku byl vybrán vzorek o koncentraci 100ng/mL Chloridazonu i Metazachloru. Vzorek byl 5krát za sebou nastříknut a proměřen podle metody. Odchylka těchto měření by neměla překročit 15% RSD.

3.9.4 Stanovení LOD a LOQ

Pro stanovení LOD a LOQ byly použity vzorce (17) a (18) s tím, že šum byl vypočten z integrace dvou blanků na pozici píku příslušného pesticidu a zprůměrovány.

$$LOD = 3 \times \text{šum} \quad (17)$$

$$LOQ = 10 \times \text{šum} \quad (18)$$

3.10 Stabilita vzorků

Byla provedena i stabilita vzorků za různých podmínek skladování. Pro tento test byl použit vzorek o koncentraci 50 ng/ml Chloridazonu i Metazachloru. Vzorky byly odebrány do 2 ml vialek a následně skladovány při -10 °C, 10 °C a při laboratorní teplotě ve tmě a na světle po dobu 5 dní.

Následně byly tyto vzorky proměřeny podle metody a porovnány s naměřenými hodnotami připravených standardů o koncentraci 50 ng/ml.

3.11 Standardizace odměrného roztoku 0,02M manganistanu draselného a titrace peroxidu vodíku

Standardizace odměrného roztoku 0,02M KMnO₄ a titrace H₂O₂ byly provedeny pomocí potenciometrické titrace s použitím Pt elektrody na titrátoru 794 Basic Titrino od firmy Methrom viz Obr. 32.



Obr. 32: Titrátor 794 Basic Titrino

3.11.1 Standardizace 0,02M KMnO₄

Do 100 ml kádinky bylo naváženo 50 mg kyseliny šťavelové (m_{oxalic}), přidáno 30 ml horké Milli-Q vody (60°C) a 20 ml 20% H₂SO₄. Následně titrováno odměrným roztokem 0,02M KMnO₄ do zaznamenání bodu ekvivalence (V_{EQ}). Ze vzorce (17) byla následně vypočítána koncentrace odměrného roztoku.

(19)

$$t[\text{mol/L}] = \frac{m_{\text{oxalic}}}{V_{\text{EQ}} \times 126,03} \times \frac{2}{5}$$

3.11.2 Titrace vzorku H₂O₂

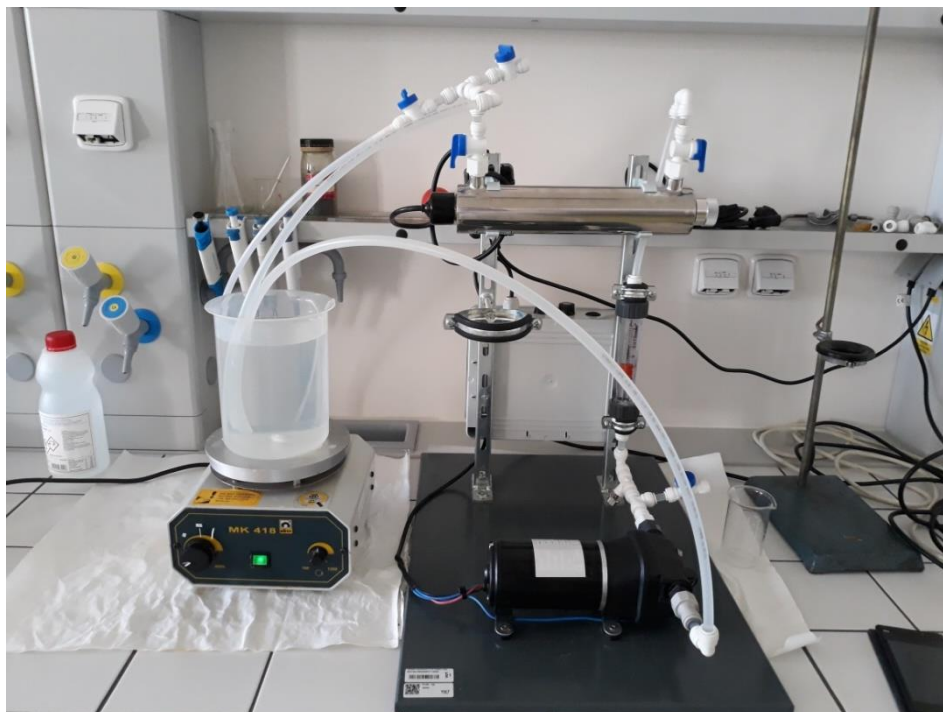
Do 100 ml kádinky bylo předloženo 20 ml Milli-Q vody a následně naváženo 50 mg H₂O₂ ($m_{\text{H}_2\text{O}_2}$). Poté bylo přidáno ještě 30 ml Milli-Q vody a 20 ml 20% H₂SO₄. Takto připravený vzorek byl titrován odměrným roztokem 0,02M KMnO₄ a ze vzorce (18) byla vypočítána koncentrace vzorku.

(20)

$$c[\%] = \frac{V_{\text{EQ}} \times t \times 34,015}{m_{\text{H}_2\text{O}_2}} \times \frac{5}{2} \times 100$$

3.12 Pokusy degradace pesticidů

Byly provedeny pokusy degradace Chloridazonu a Metazachloru za použití aparatury složené z čerpadla, průtokoměru, zdroje UV o vlnové délce 254nm a míchačky s kádinkou viz Obr. 33.



Obr. 33: Aparatura pro pokusy degradace UV a UV/H₂O₂



Obr. 34: Aparatura pro pokusy degradace UV/O₃

Provedené pokusy jsou uvedeny v tabulce (Tab. 13) a byly provedeny vždy dvě opakovatelnosti těchto pokusů, pouze pro pokusy s vypnutým UV a bez přídavku peroxidu vodíku byl proveden jeden pokus, z důvodu viditelné neměnnosti koncentrace pesticidů.

Tab. 12: Provedené pokusy degradace

Pokus s destilovanou vodou	Pokus s normální vodou
UV off, průtok 200 l/hod	UV off, průtok 200 l/hod
UV off, průtok 300 l/hod	UV off, průtok 300 l/hod
UV on, průtok 200 l/hod	UV on, průtok 200 l/hod
UV on, průtok 300 l/hod	UV on, průtok 300 l/hod
UV on + 0,1 ml H ₂ O ₂ , průtok 200 l/hod	UV on + 0,1 ml H ₂ O ₂ , průtok 200 l/hod
UV on + 0,5 ml H ₂ O ₂ , průtok 200 l/hod	UV on + 0,5 ml H ₂ O ₂ , průtok 200 l/hod
UV on + 1,0 ml H ₂ O ₂ , průtok 200 l/hod	UV on + 1,0 ml H ₂ O ₂ , průtok 200 l/hod
UV on + 100 mg/hod O ₃ , 100 l/hod	-----

4 Výsledky

4.1 Titrace H_2O_2

Dodavatel používaného peroxidu specifikuje v certifikátu koncentraci v rozmezí 29-32 % a pro naše účely jsme potřebovali vědět přesnou koncentraci. Titračně jsme po stanovení titru odměrného roztoku 0,02M $KMnO_4$ zjistili přesnou hodnotu koncentrace peroxidu, která nakonec byla 29,36 %. Z toho vyplívá, že koncentrace peroxidu u provedených pokusů byly u 0,1 ml 0,0006 mol/l, u 0,5 ml 0,0032 mol/l a u 1,0 ml 0,0063 mol/l.

Tab. 13: Výsledky standardizace odměrného roztoku 0,02M $KMnO_4$

Alikvota	m_{oxalic} [mg]	V_{EQ} [ml]	t [mol/l]
1	46,7	7,367	0,0201
2	51,3	8,094	0,0201
Průměr			0,0201
RSD			0,01 %

Tab. 14: Výsledky stanovení koncentrace použitého H_2O_2

Alikvota	$M_{H_2O_2}$ [mg]	V_{EQ} [ml]	c [%]
1	53,3	9,032	28,99
2	43,3	7,524	29,73
Průměr			29,36
RSD			1,78 %

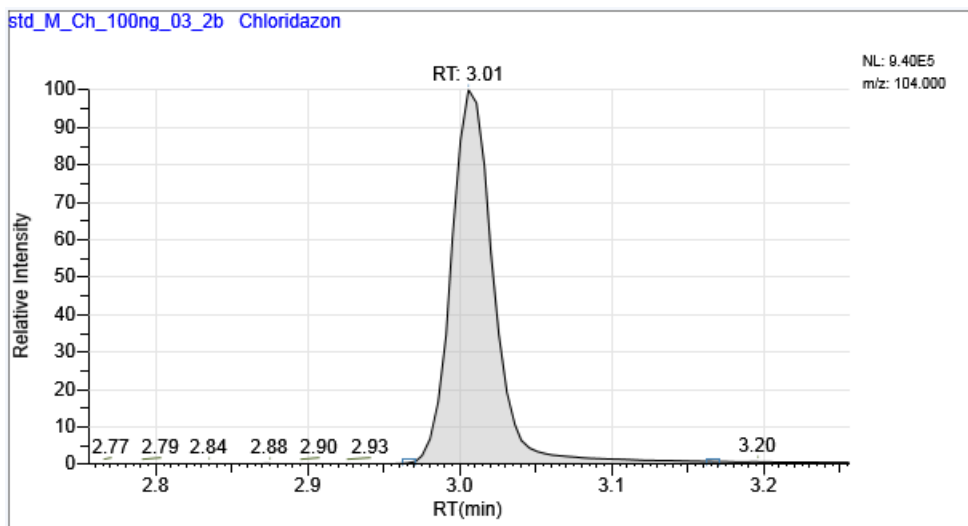
4.2 Optimalizace scan time

Hodnoty ploch chloridazonu i metazachloru při různých rychlostech skenu byly velmi podobné a chybová odchylka mezi jejich hodnotami byla nízká. Proto hlavním parametrem pro výběr skenovací rychlosti byl vzhled píku. Při 0,3 sekundách byl tvar píku vyhlazený, ale já jsem nakonec vybral 0,5 sekund, který byl také v pořádku. Hlavním důvodem byl fakt, že při vyšší skenovací rychlosti se zhoršuje šum a mohlo by to mít neblahé následky na výsledky měření.

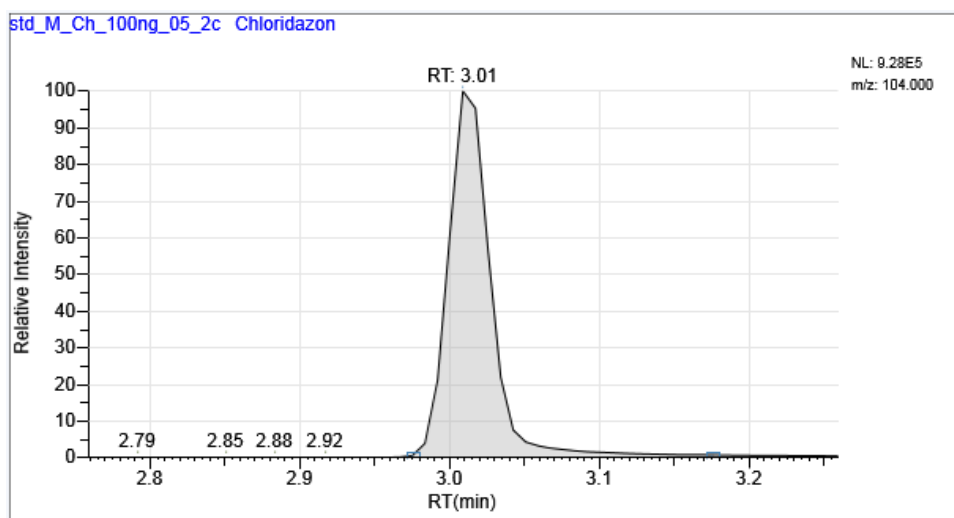
Zvolenou hodnotu jsem zapsal do metody, jenže se nedopatřením nepropsala do mnou vytvořené master metody a systém používal primární nastavení 0,8 sekund.

Tab. 15: Plochy píku Chloridazonu při různé rychlosti skenu

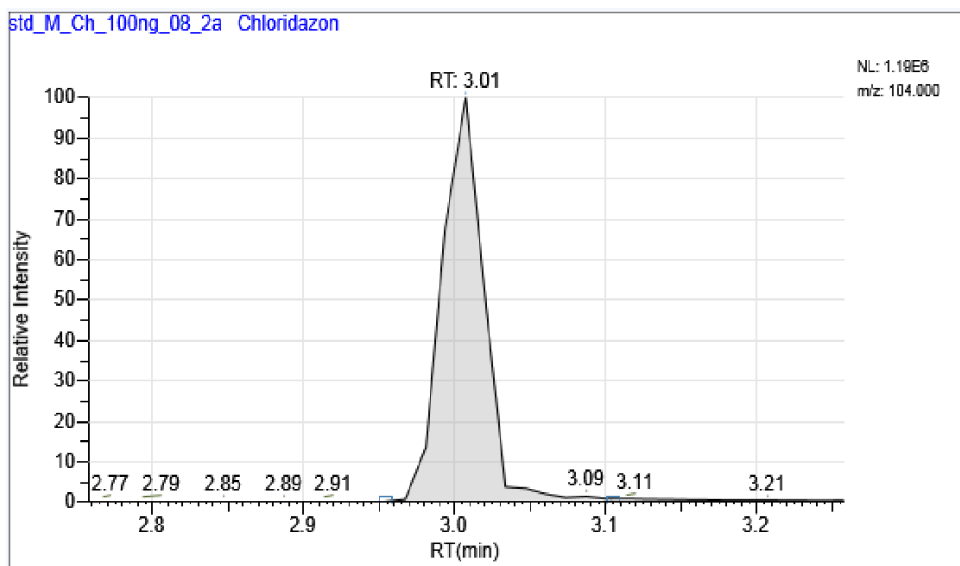
Pokus	Plocha [A]
Standard Chloridazon 100 ng/ml_scan 0,3sec	1809340
Standard Chloridazon 100 ng/ml_scan 0,5sec	1802315
Standard Chloridazon 100 ng/ml_scan 0,8sec	1810085



Obr. 35: Pík Chloridazonu při scan time 0,3 sekundy



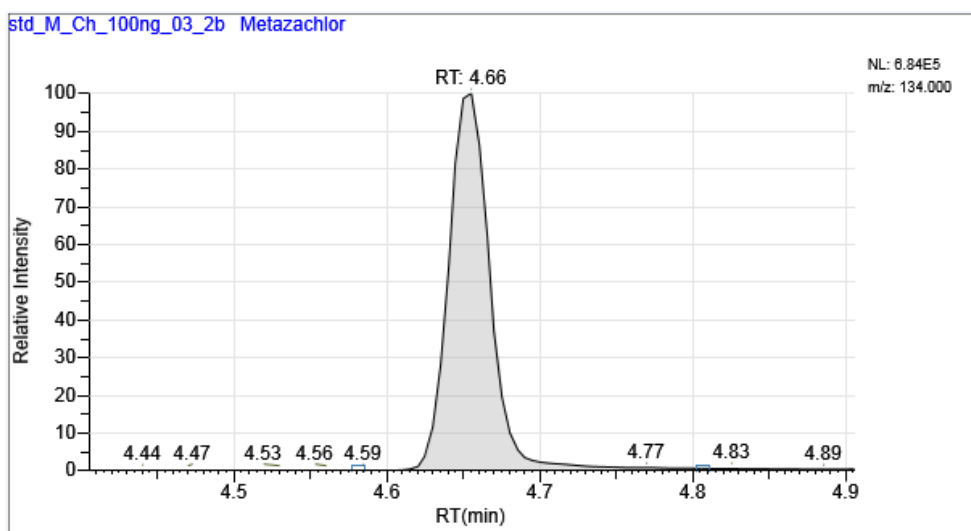
Obr. 36: Pík Chloridazonu při scan time 0,5 sekundy



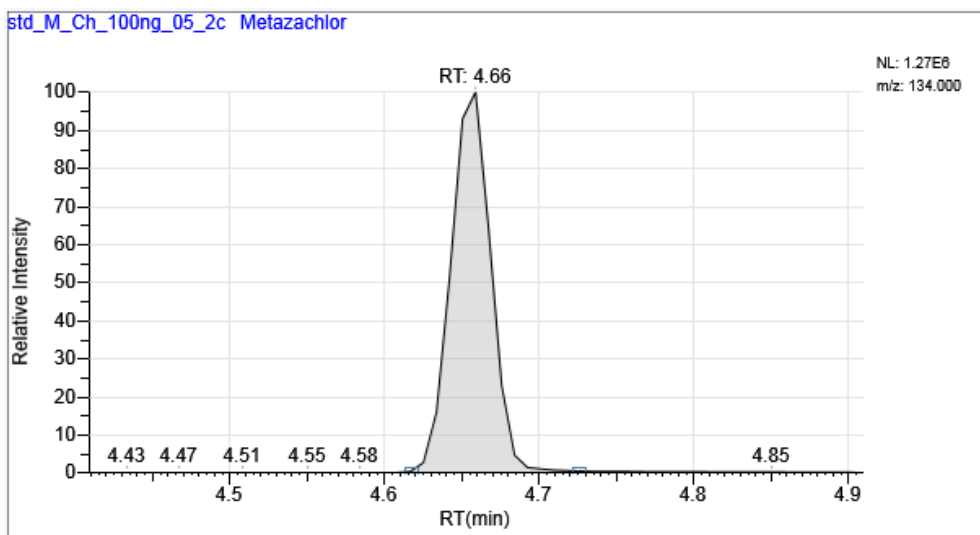
Obr. 37: Pík Chloridazonu při scan time 0,8 sekundy

Tab. 16: Plochy píku Metazachloru při různé rychlosti skenu

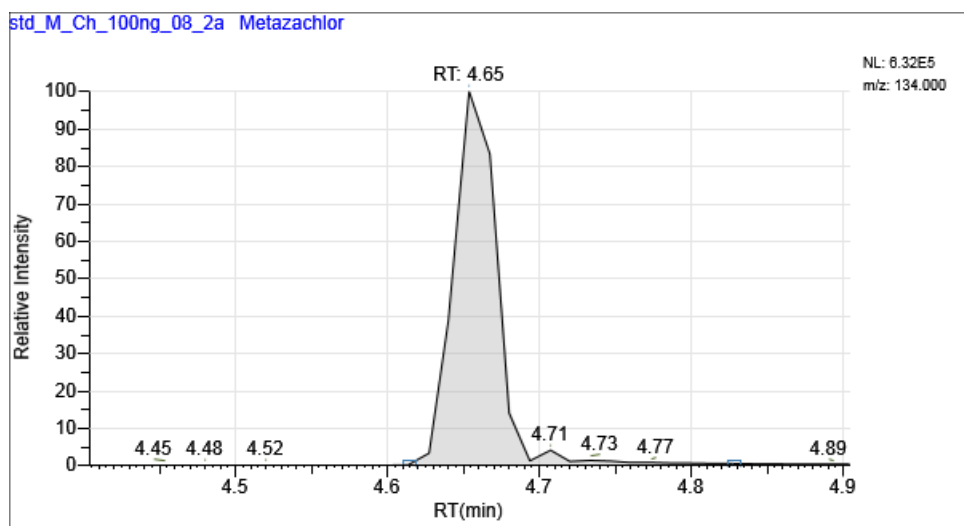
Pokus	Plocha [A]
Standard Metazachloru 100 ng/ml_scan 0,3sec	1283123
Standard Metazachloru 100 ng/ml_scan 0,5sec	1352018
Standard Metazachloru 100 ng/ml_scan 0,8sec	1269531



Obr. 38: Pík Metazachloru při scan time 0,3 sekundy



Obr. 39: Pík Metazachloru při scan time 0,5 sekundy



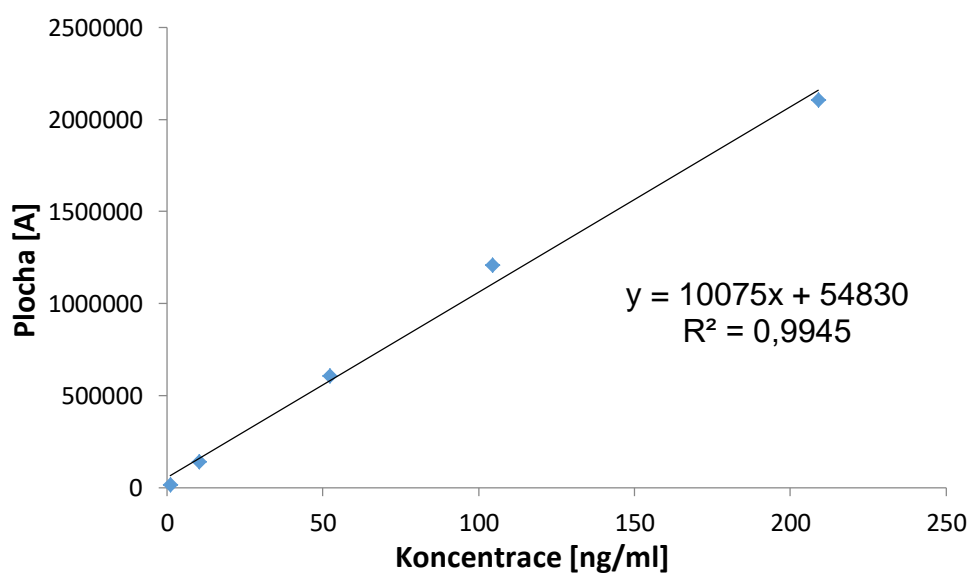
Obr. 40: Pík Metazachloru při scan time 0,8 sekundy

4.3 Kalibrační závislost

Po proměření připravených koncentrací pro Chloridazon a Metazachlor byla sestrojena kalibrační křivka v závislosti přesné koncentrace na ploše. Přesnou koncentraci jsem vypočítal z navážek standardů. Navážka Chloridazonua činila 1,045 mg a Metazachloru 1,110 mg. Pro Chloridazon byla správnost kalibrační závislosti na hodnotě 99,45 % a pro Metazachlor 99,76 %.

Tab. 17: Hodnoty ploch kalibrační závislosti Chloridazonu

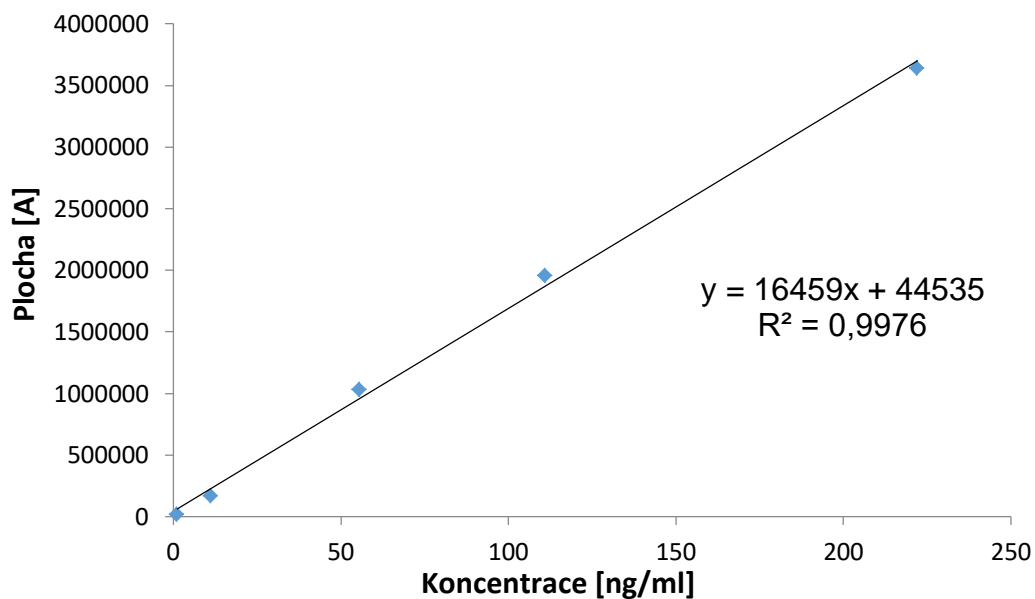
Koncentrace [ng/ml]	Přesná koncentrace [ng/ml]	Plocha [A]
200	209,0	2105917
100	104,5	1206289
50	52,25	607601
10	10,45	140202
1	1,045	14970



Grf. 1: Graf kalibrační závislosti Chloridazonu

Tab. 18: Hodnoty ploch kalibrační závislosti Metazachloru

Koncentrace [ng/ml]	Přesná koncentrace [ng/ml]	Plocha [A]
200	222,0	3641332
100	111,0	1954889
50	55,5	1032177
10	11,1	168160
1	1,11	21379



Grf. 2: Graf kalibrační závislosti Metazachloru

4.4 Opakovatelnost nástřiku

Opakovatelnost nástřiku pro oba pesticidy splnila dané limity (limit 15 %) pro odchylku jednotlivých nástřiků, i když pro Chloridazon se odchylka velmi blížila mezní hranici. To bylo zapříčiněno, jak jsem již uvedl nepropsáním skenovací rychlosti 0,5sekund do používané master metody.

Tab. 19: Hodnoty ploch opakovatelnosti nástřiku Chloridazonu

Nástřik	Plocha [A]
1	1220229
2	1210727
3	1217848
4	1545733
5	1226159
Průměr	1284139
RSD	11,40 %

Tab. 20: Hodnoty ploch opakovatelnosti nástřiku Metazachloru

Nástřik	Plocha [A]
1	1976689
2	1954889
3	1906686
4	1673553
5	2045064
Průměr	1895048
RSD	8,36 %

4.5 LOD a LOQ

LOD a LOQ byly vypočteny z šumu v blanku na pozici píku jednotlivých pesticidů a hodnoty nejnižší možné koncentrace, která je ještě možná stanovit.

Metazachlor vykazoval nižší mez detekce a kvantifikace než Chloridazon viz Tab. 23. Při optimalizaci metody byly tyto parametry lepší pro Chloridazon, ale po zásahu a údržbě servisního technika se citlivost pro oba pesticidy zlepšila a především pro Metazachlor.

Tab. 21: Hodnoty ploch šumu u blanků na pozici píků pesticidů

Blank	Šum (Chloridazon)	Šum (Metazachlor)
1	1258	307
2	1226	469
Průměr	1242	388

Tab. 22: LOD a LOQ pro stanovované pesticidy

	C _{chloridazon} [ng/ml]	C _{metazachlor} [ng/ml]
LOD	0,26	0,06
LOQ	0,87	0,20

4.6 Stabilita vzorků

V čase t_0 byla navážka pro Chloridazon 1,12 mg a Metazachloru 1,20 mg. V čase t_5 byl připraven nový standard a proměřen s navážkou Chloridazonu 1,02 mg a Metazachloru 1,09 mg.

Z naměřených dat je patrné, že ve vodě nejsou tyto pesticidy stabilní viz Tab. 24 a již po 5 dnech za určitých podmínek jejich koncentrace klesá. Výrazné snížení koncentrace bylo pozorováno u Metazachloru a nezáleželo na podmínkách skladování. Za to Chloridazon

vykazoval vyšší stabilitu při uskladnění při 10 °C a -10 °C oproti normální laboratorní teplotě 25 °C, kdy jeho koncentrace oproti t_0 klesla až o 8 %. Stabilita obou pesticidů je vyšší při rozpuštění a uchovávání v MeOH než ve vodě.

Tab. 23: Plochy standardu o koncentraci 50 ng/ml v čase t_0

Nástřík std.	Chloridazon	Metazachlor
1	3195146	9393
2	3223787	9090
3	3187776	9149
4	3179610	9065
5	3215446	9293

Tab. 24: Plochy standardu o koncentraci 50 ng/ml v čase t_5 (5 dní) při určitých podmínkách

Stabilita	Chloridazon			Metazachlor		
	Plocha	C_{t5}	C_{t5}/C_{t0}	Plocha	C_{t5}	C_{t5}/C_{t0}
světlo, 25°C	2880940	45,06	80,46%	2771	35,53	59,21%
tma, 25°C	2850041	44,57	79,59%	2617	33,55	55,92%
10°C	3125957	48,89	87,30%	2801	35,91	59,85%
-10°C	3140806	49,12	87,71%	2721	34,88	58,14%

4.7 Degradace Chloridazonu a Metazachloru

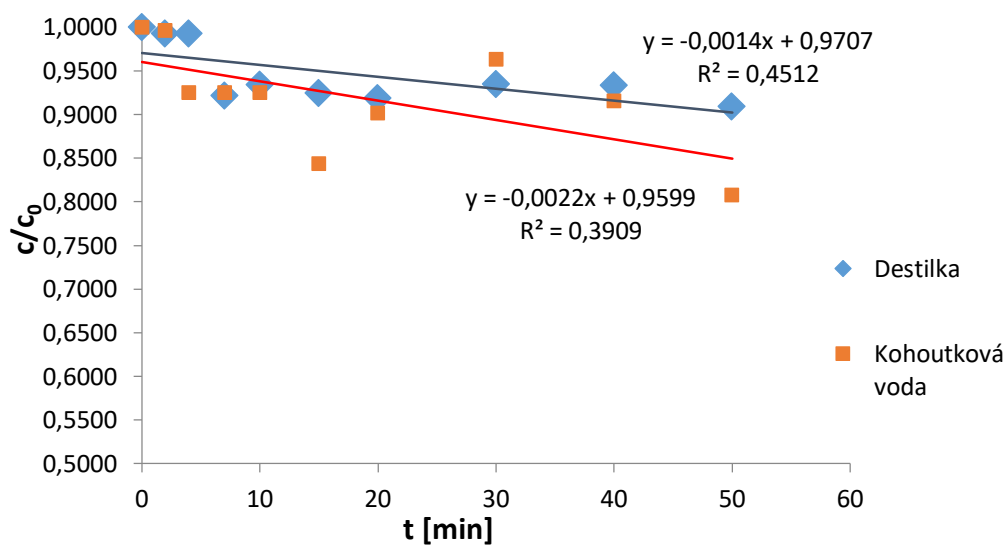
Před provedením samotných pokusů degradace bylo nutné provést pokus, zdali se oba pesticidy budou degradovat pouhou cirkulací v používané jednotce. Na *Grf. 3 a 4*, pro tento pokus, je vidět, že dochází pouze k nepatrnému snížení koncentrace.

Následně jsem provedl modelové pokusy degradace Chloridazonu a Metazachloru s využitím UV a UV s přídavkem H_2O_2 v destilované vodě a kohoutkové vodě a použitým průtokem 200 l/hodinu, protože průběh degradace při průtoku 300 l/hodinu byl podobný a vůbec se nelišili. Další důvod byl, že nastavení průtoku 300 l/hodinu bylo problematické a tvořilo se v průtokoměru velké množství bublin, což mělo negativní vliv na přesné určení hodnoty.

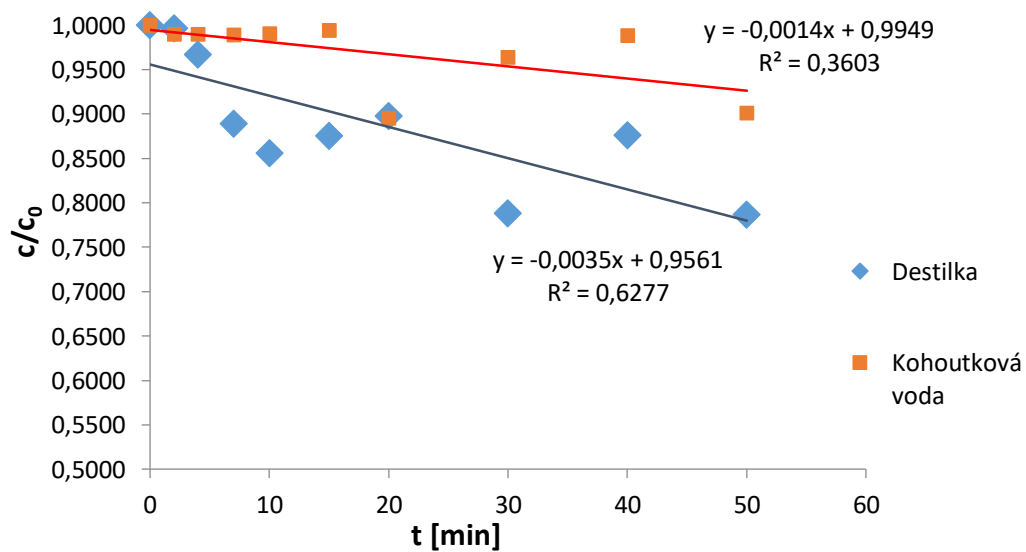
Z naměřených výsledků je patrné, že degradace Metazachloru je účinnější než degradace Chloridazonu a záleží i na použité vodě, kdy degradace probíhá lépe v destilované vodě. Pro odstranění obou pesticidů se zdálo nejlepší použití UV s přídavkem 1 ml H_2O_2 (tj. koncentrace 0,0063 mol/l) viz *Grf. 15 - 18*. Touto degradací jsem, ale nedosáhl maximálních limitů pro pesticidní látky ve vodě podle vyhlášky z roku 2014 č. 83/2014 Sb..

Proto jsem hledal i jiné způsoby odstranění. V odborných člancích se uvádí, že pro degradaci organických látek je účinnější použití UV/O₃. Proto jsem otestoval i tento způsob degradace, při kterém jsem zjistil, že v prvních minutách působení UV/O₃ se oba pesticidy výrazně degradují, ale následný průběh je pomalý viz *Grf. 19 a 20 a Příloha 25* a předpokládal bych, že by bylo zapotřebí k úplné degradaci obou pesticidů použití i přídatku H₂O₂. Toto zjištění bylo z pohledu mého očekávání velmi překvapující, nýbrž proto, že jsem očekával výraznější snížení koncentrace obou pesticidů. To mohlo být zapříčiněno malým kontinuálním přídatkem O₃ do systému nebo špatnou funkcí systému. Systém to byl nový a málo odzkoušený.

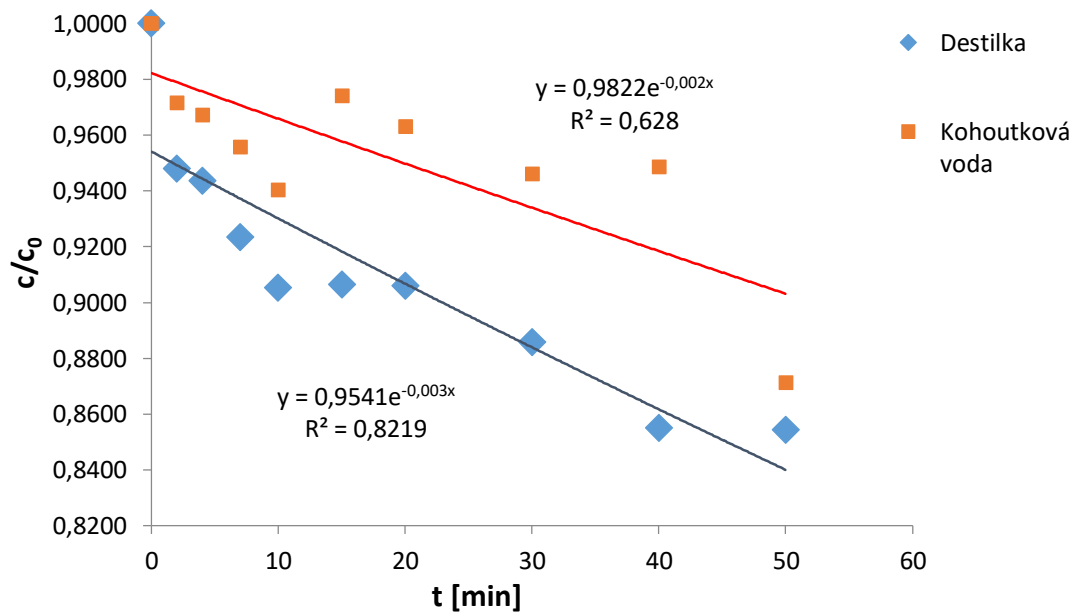
Pro grafy bez použití UV jsem použil lineární regresi z důvodu předpokládané neměnné koncentrace a pro ostatní grafy jsem využil exponenciální závislosti z důvodu velkého snížení koncentrace v prvních minutách degradace a následném pozvolnějším snižování. Tyto grafy jsou závislostí poklesu koncentrace na čase degradace.



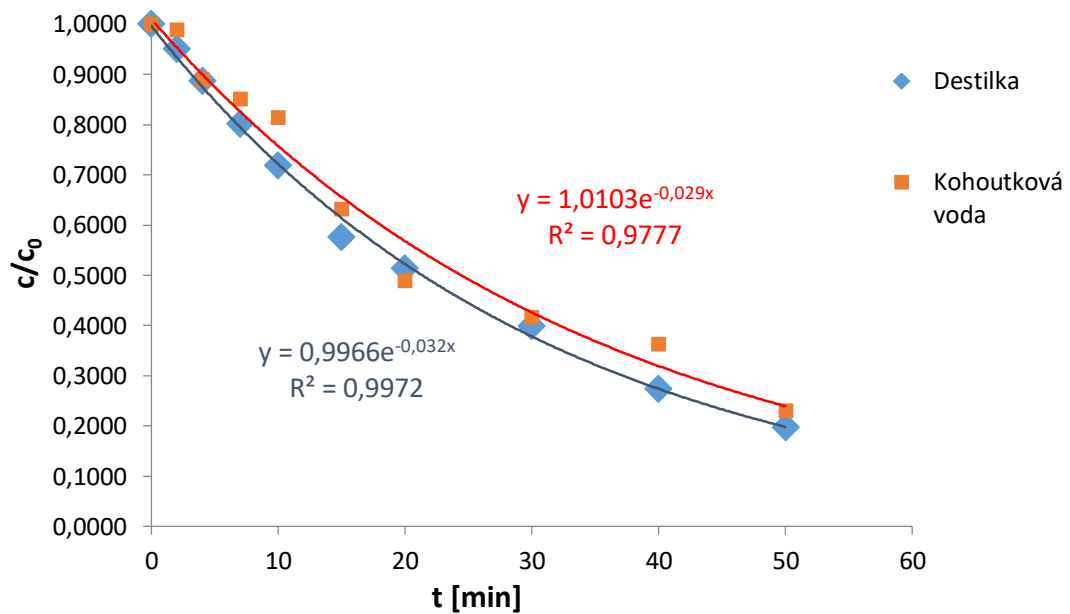
Grf. 3: Graf závislosti poklesu koncentrace na čase pro pokus bez UV, 200 l/hod. průtok, Chloridazon



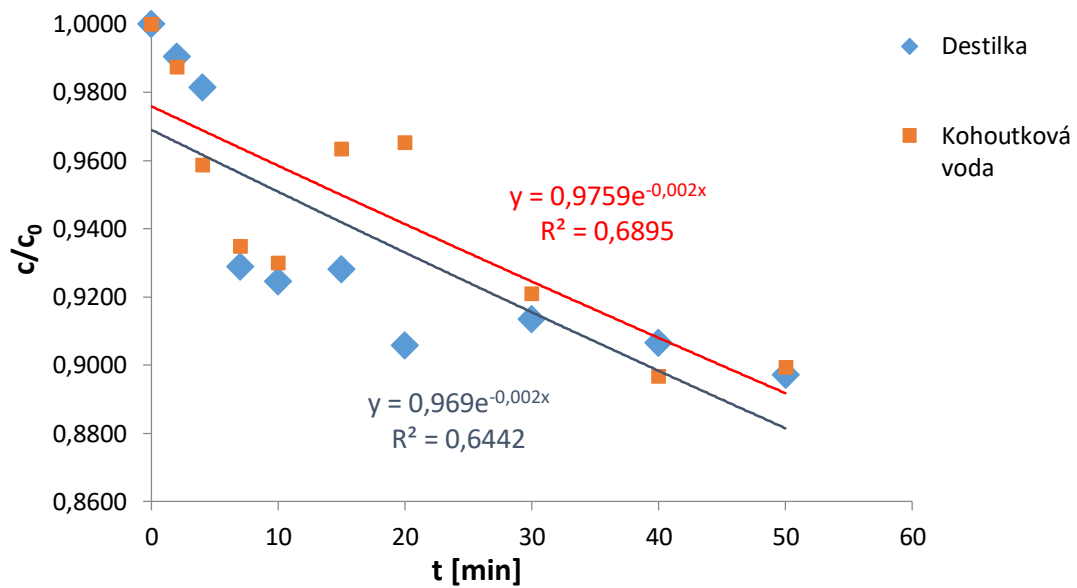
Grf. 4: Graf závislosti poklesu koncentrace na čase pro pokus bez UV, 200 l/hod. průtok, Metazachlor



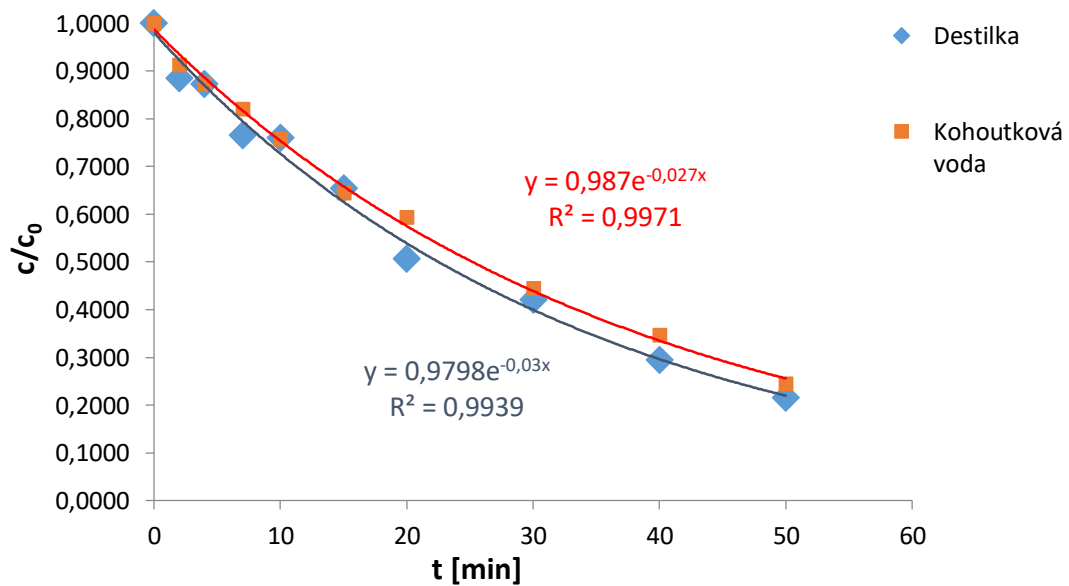
Grf. 5: Graf závislosti poklesu koncentrace na čase pro pokus s UV, 200 l/hod. průtok, Chloridazon



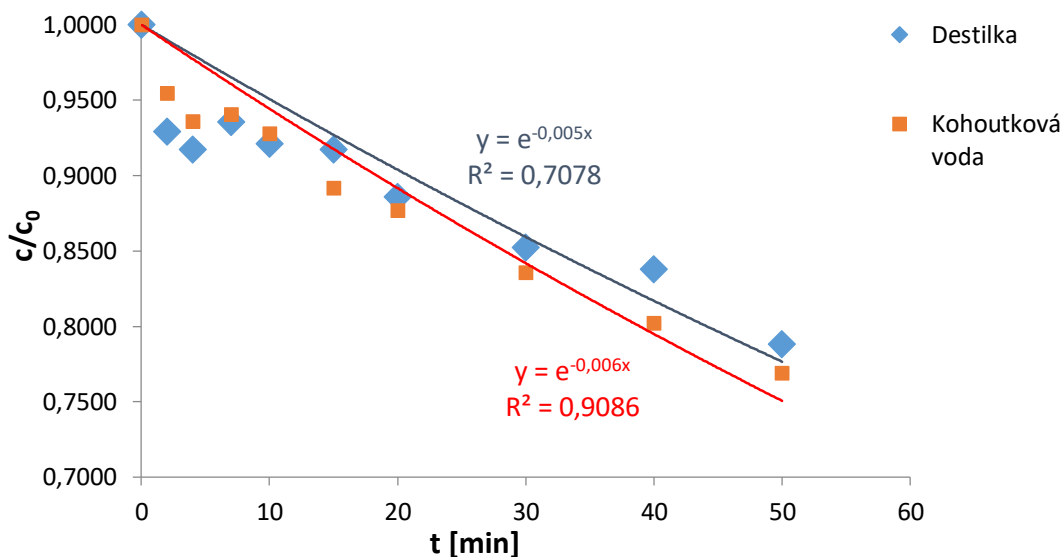
Grf. 6: Graf závislosti poklesu koncentrace na čase pro pokus s UV, 200 l/hod. průtok, Metazachlor



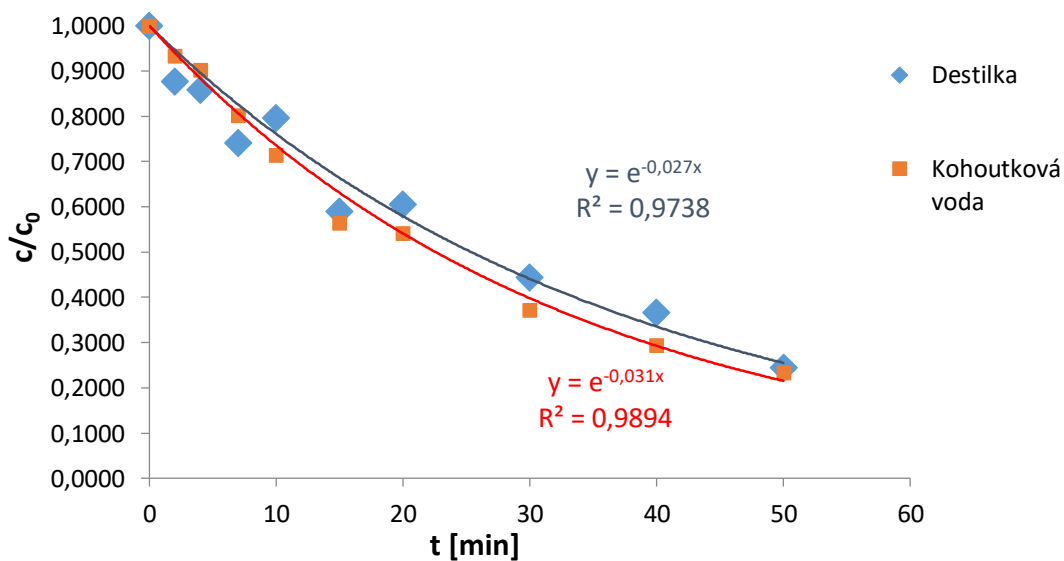
Grf. 7: Graf závislosti poklesu koncentrace na čase pro pokus s UV, 300 l/hod. průtok, Chloridazon



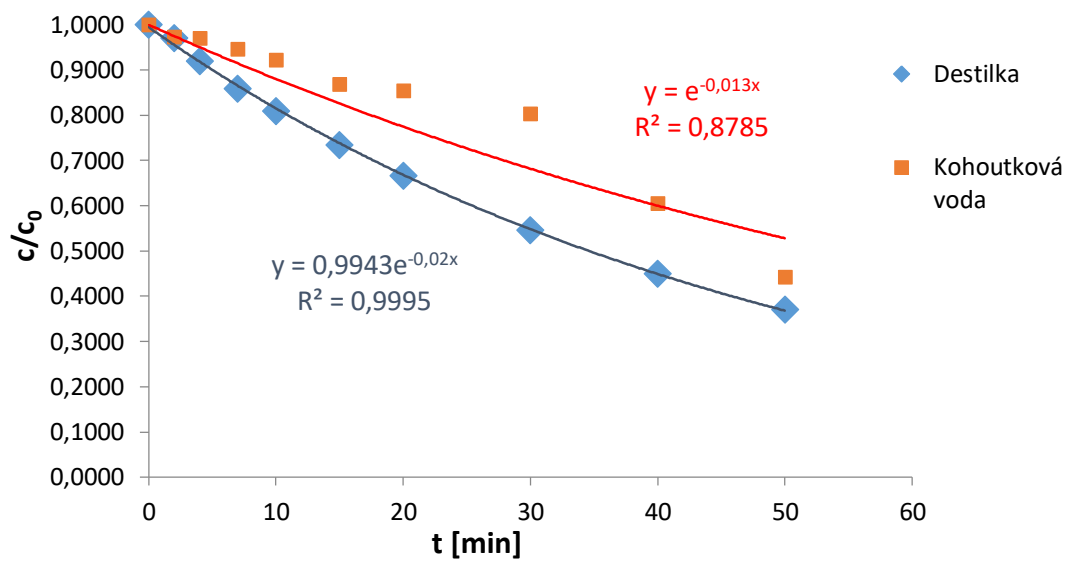
Grf. 8: Graf závislosti poklesu koncentrace na čase pro pokus s UV, 300 l/hod. průtok, Metazachlor



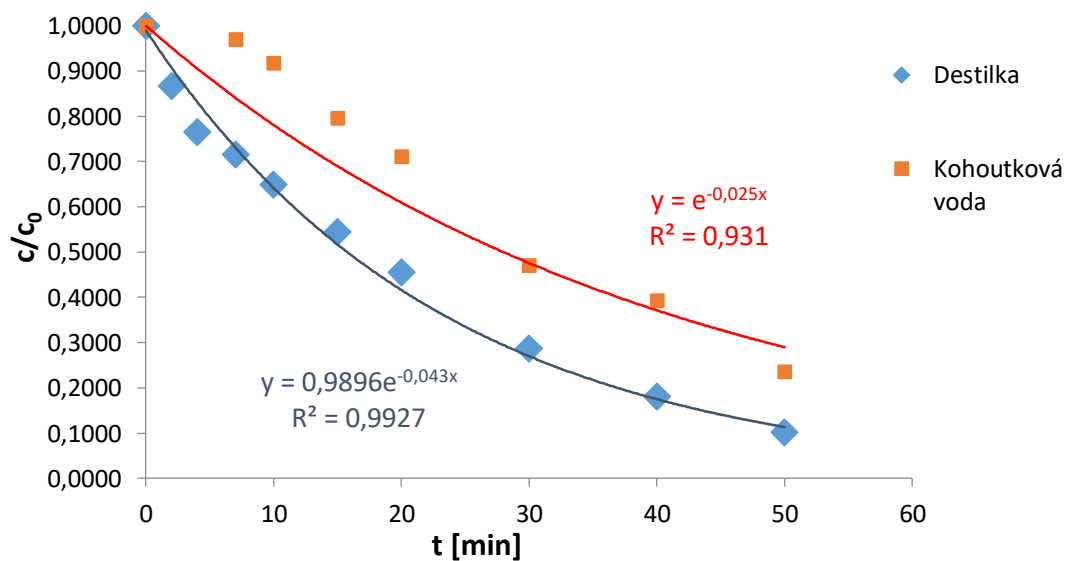
Grf. 9: Graf závislosti poklesu koncentrace na čase pro pokus s UV + 0,1 ml H₂O₂,
200 l/hod. průtok, Chloridazon



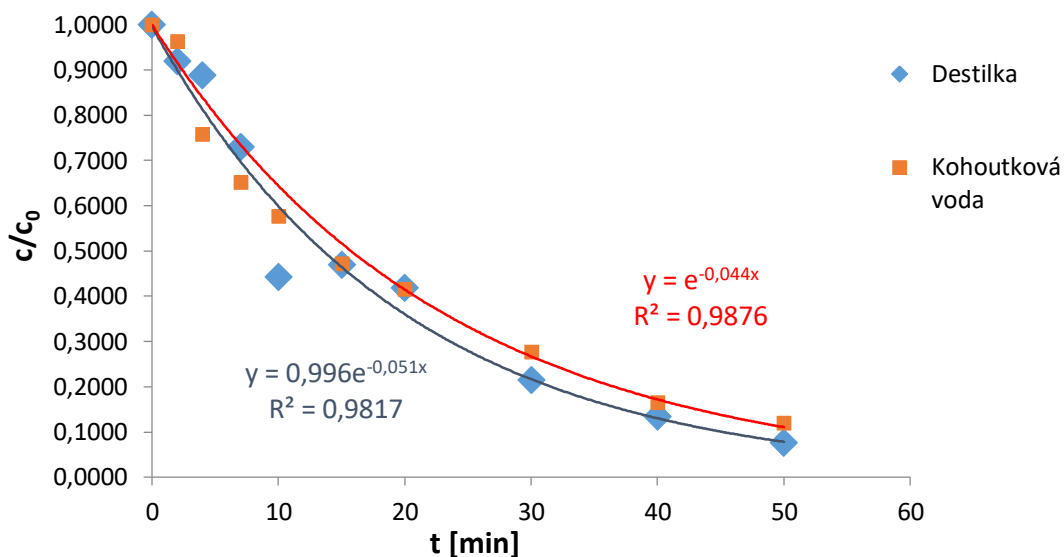
Grf. 10: Graf závislosti poklesu koncentrace na čase pro pokus s UV + 0,1 ml H₂O₂,
200 l/hod. průtok, Metazachlor



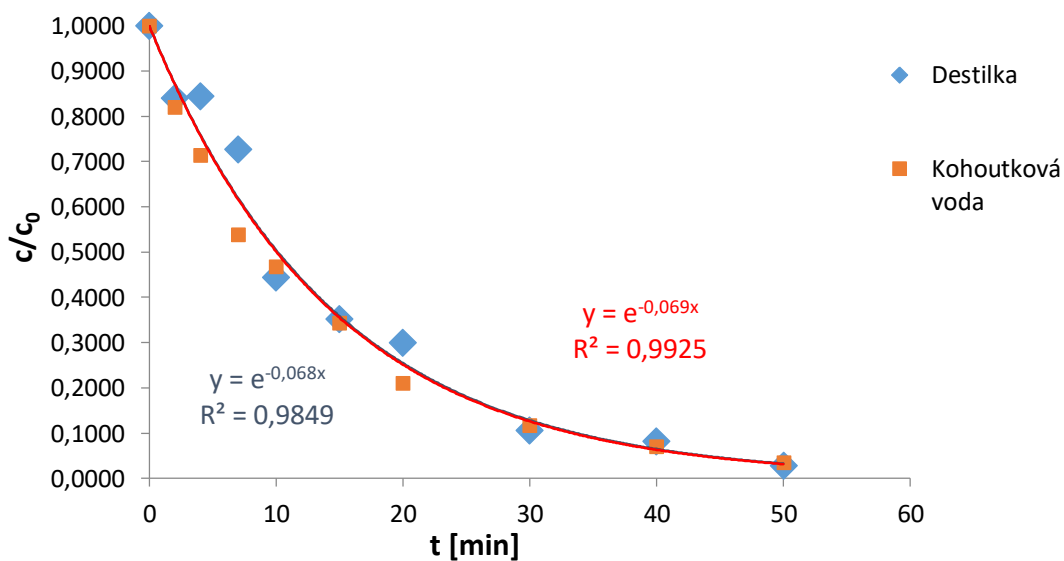
Grf. 11: Graf závislosti poklesu koncentrace na čase pro pokus s UV + 0,5 ml H₂O₂, 200 l/hod. průtok, Chloridazon



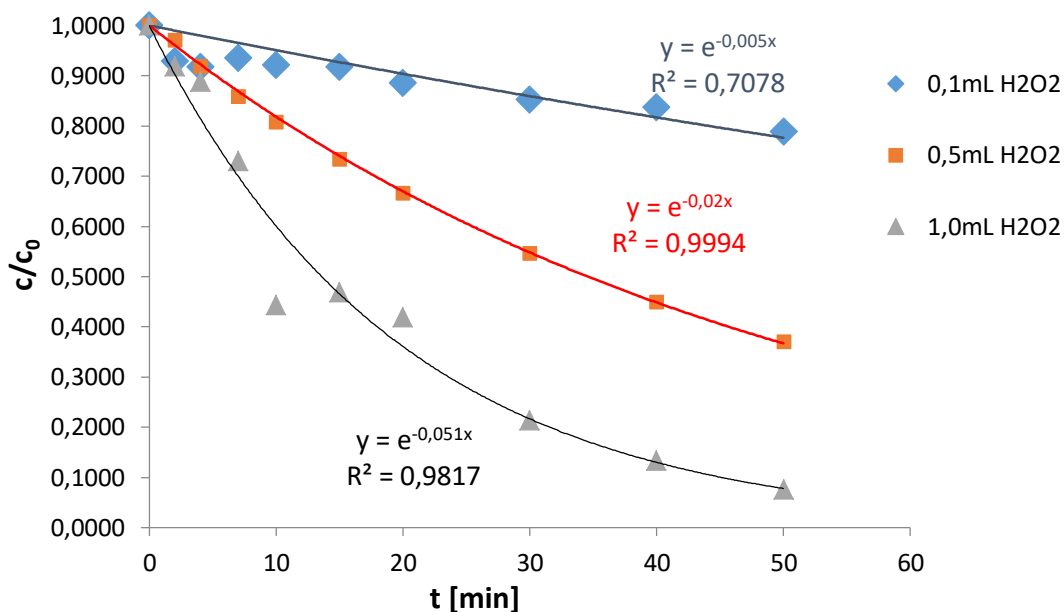
Grf. 12: Graf závislosti poklesu koncentrace na čase pro pokus s UV + 0,5 ml H₂O₂, 200 l/hod. průtok, Metazachlor



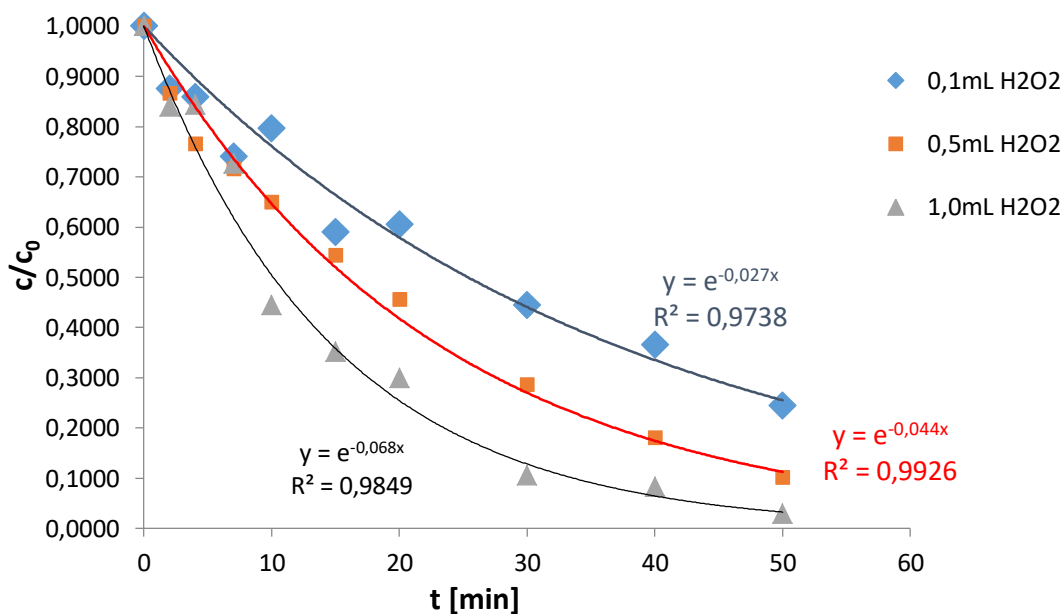
Grf. 13: Graf závislosti poklesu koncentrace na čase pro pokus s UV + 1,0 ml H₂O₂, 200 l/hod. průtok, Chloridazon



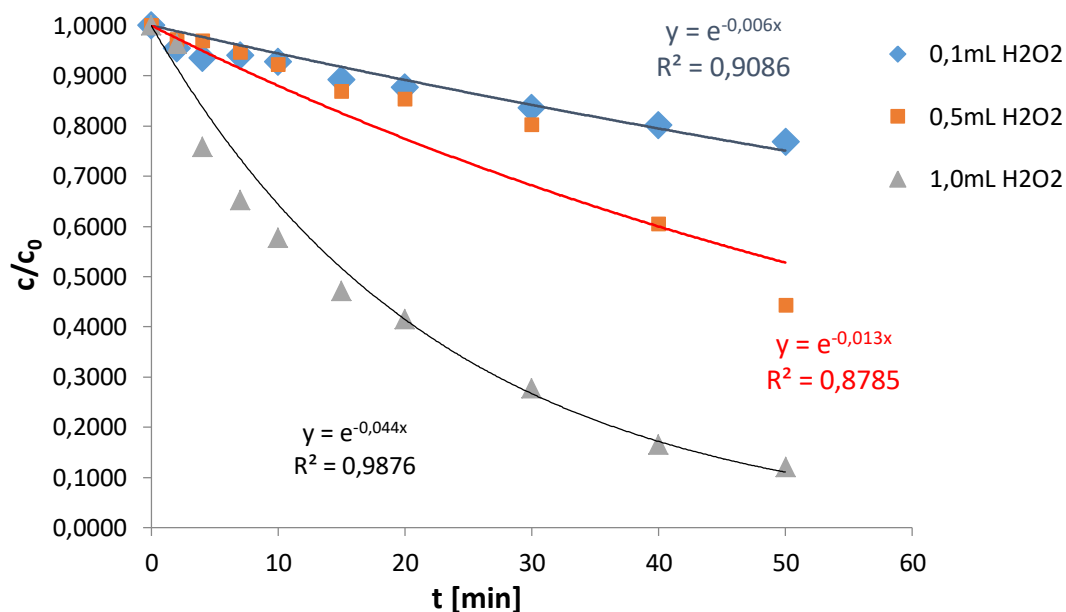
Grf. 14: Graf závislosti poklesu koncentrace na čase pro pokus s UV + 1,0 ml H₂O₂, 200 l/hod. průtok, Metazachlor



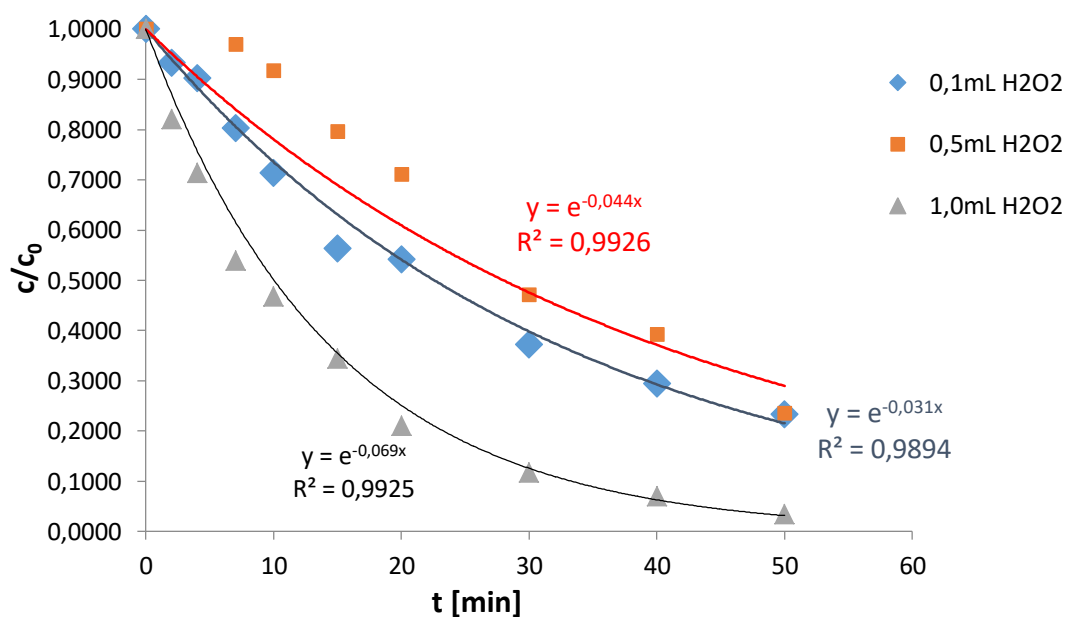
Grf. 15: Porovnání poklesu koncentrace na čase v závislosti na přidavku H₂O₂ + UV v destilované vodě, Chloridazon



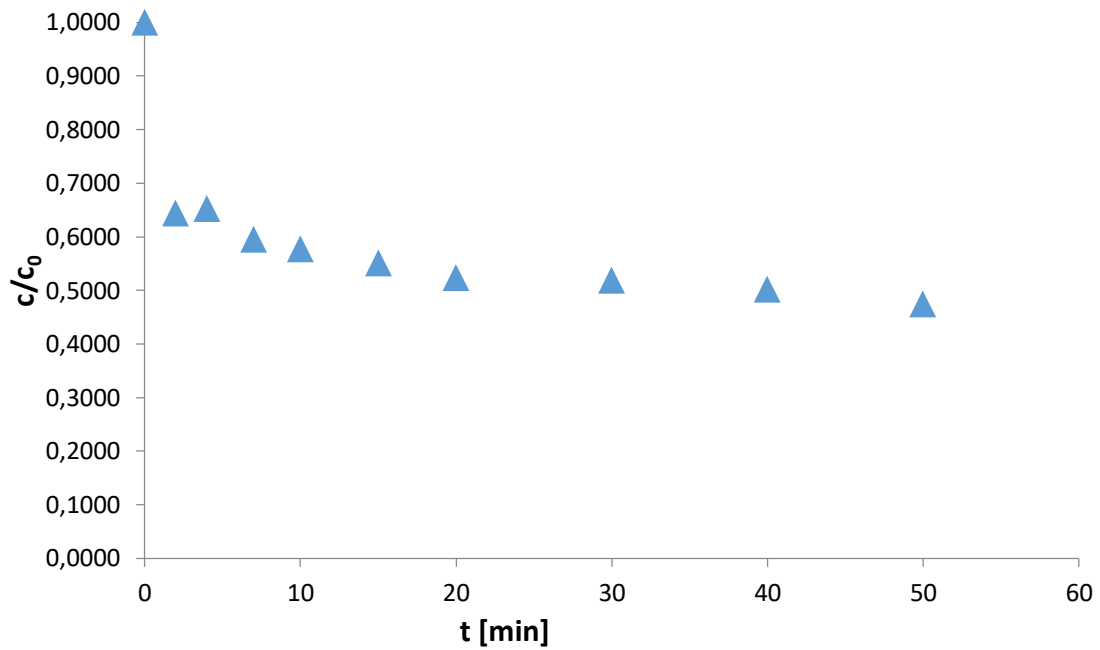
Grf. 16: Porovnání poklesu koncentrace na čase v závislosti na přidavku H₂O₂ + UV v destilované vodě, Metazachlor



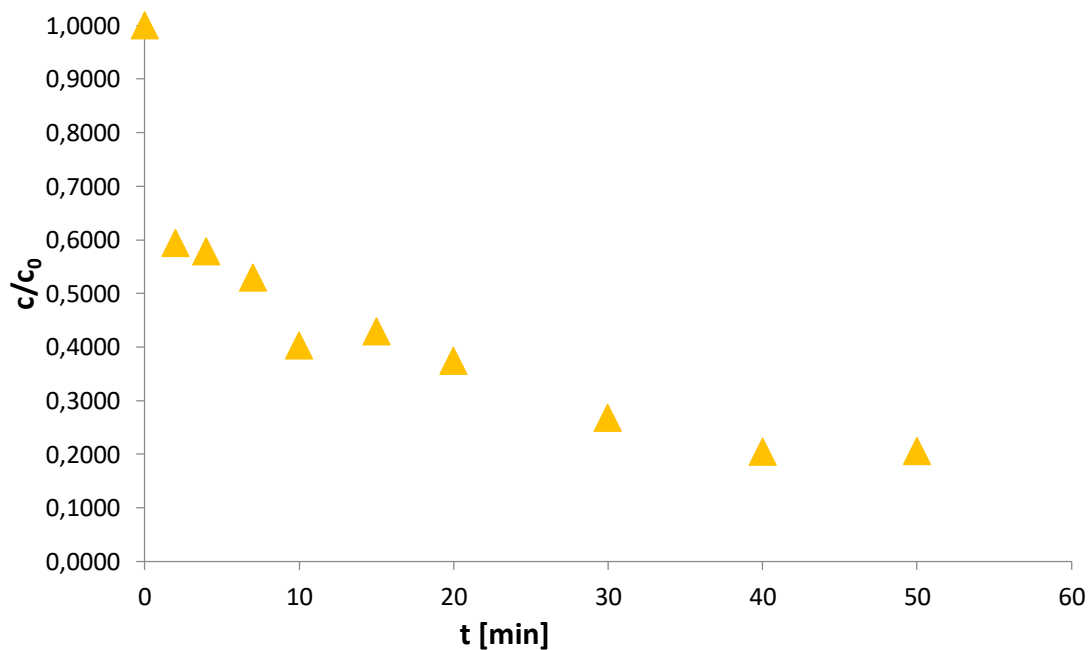
Grf. 17: Porovnání poklesu koncentrace na čase v závislosti na přidavku H₂O₂ + UV v kohoutkové vodě, Chloridazon



Grf. 18: Porovnání poklesu koncentrace na čase v závislosti na přidavku H₂O₂ + UV v kohoutkové vodě, Metazachlor



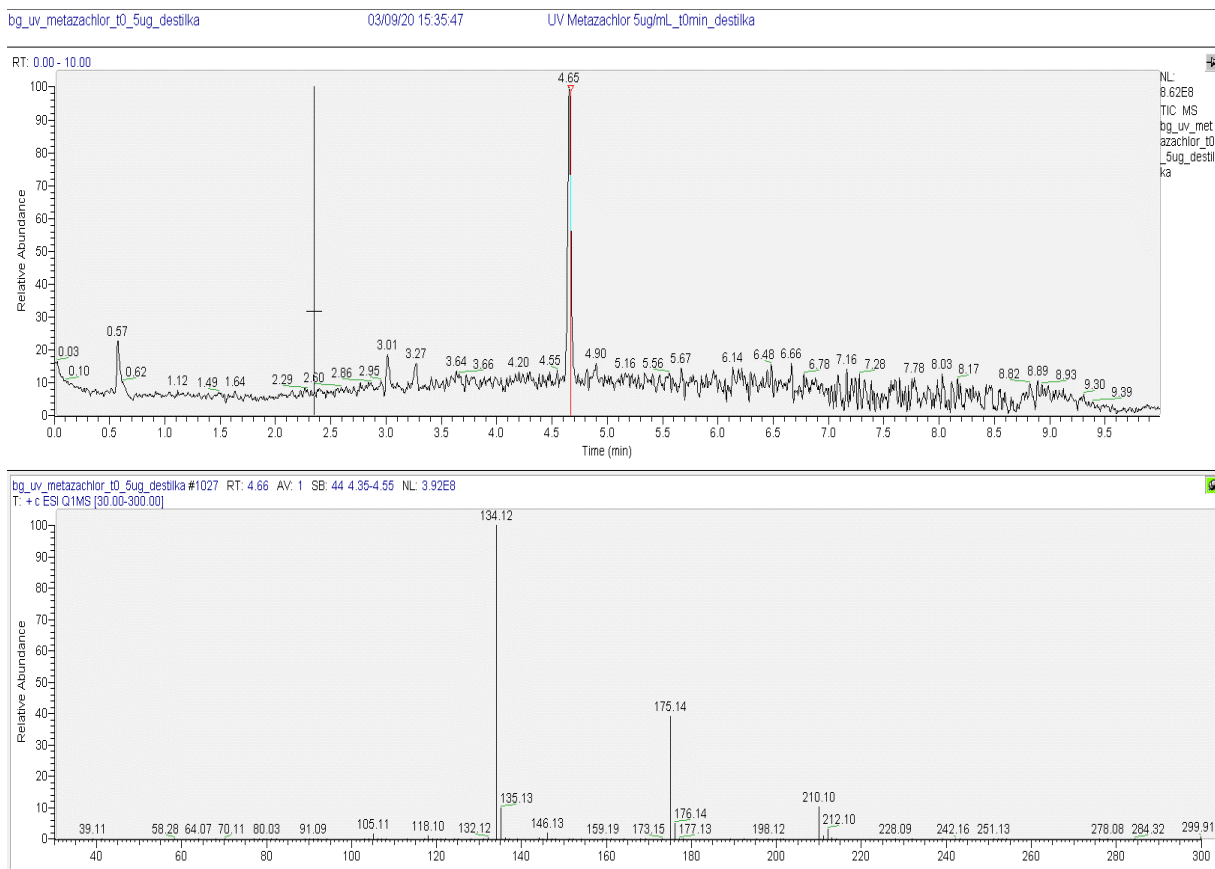
Grf. 19: Graf poklesu koncentrace na čase při využití UV s kontinuálním přidáváním O_3 v destilované vodě, Chloridazon



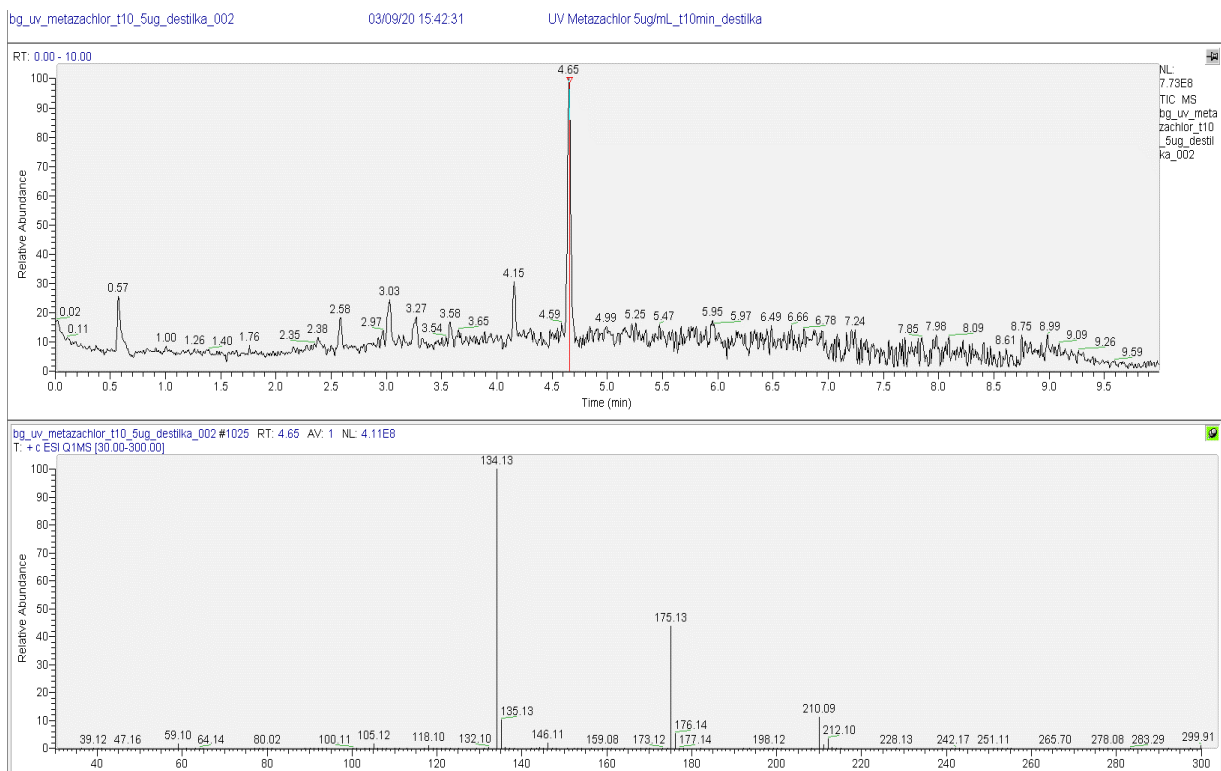
Grf. 20: Graf poklesu koncentrace na čase při využití UV s kontinuálním přidáváním O_3 v destilované vodě, Metazachlor

4.8 MS/MS analýza – degradační produkty

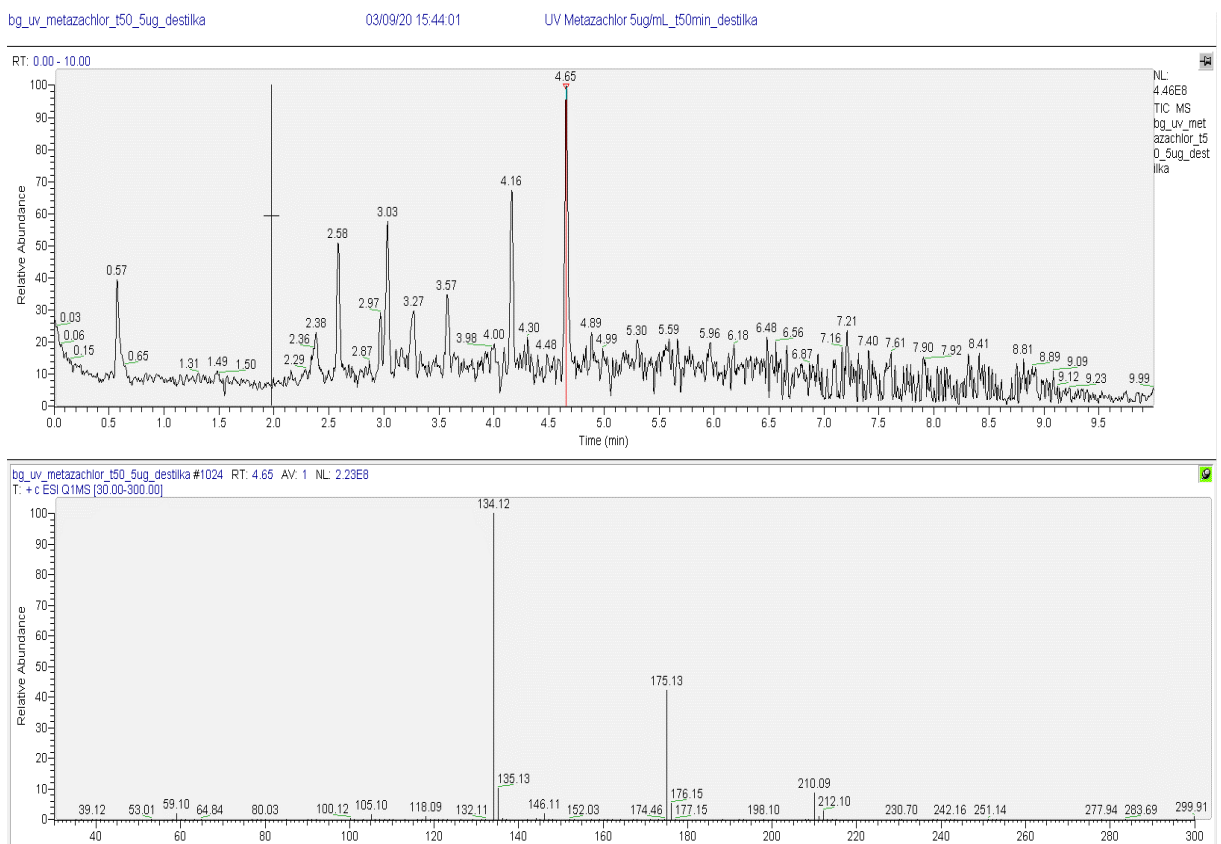
Provedl jsem i MS/MS analýzu pro zjištění degradačních produktů pro oba pesticidy. U Metazachloru bylo viditelných 5 degradačních produktů po 50 minutách degradace za použití UV viz *Příloha 17 – 21*. U Chloridazonu nebyly viditelné žádné degradační produkty z důvodu vysoké polaritě degradačních produktů Chloridazonu a pro jejich analýzu by bylo zapotřebí vyzkoušet HILIC separaci.



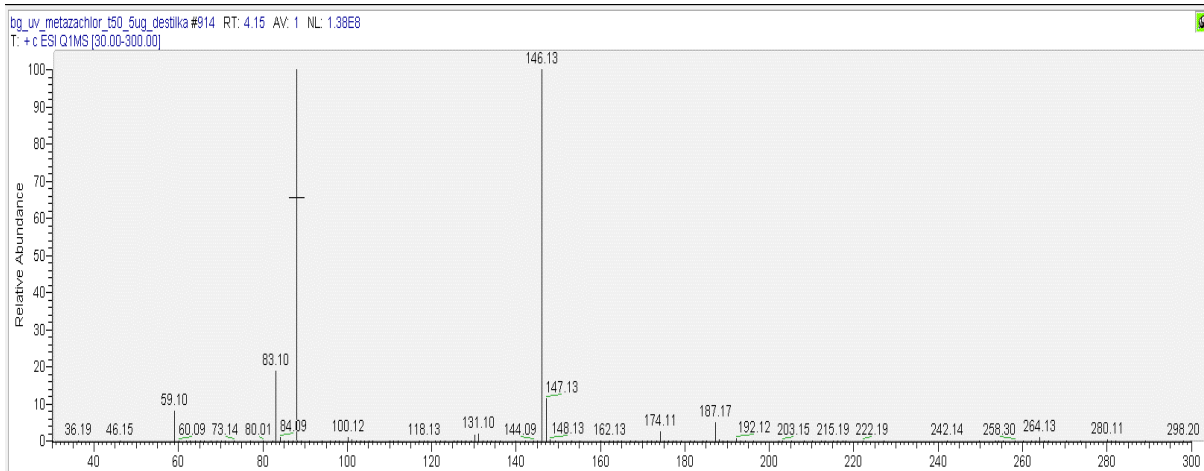
Obr. 41: Chromatogram Metazachloru v čase $t=0$ min a MS spektrum píku Metazachloru



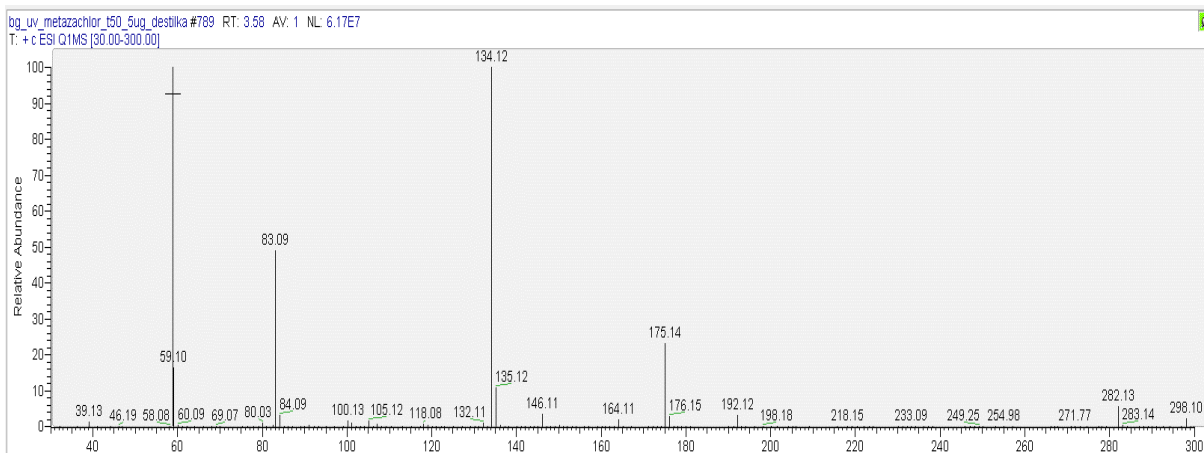
Obr. 42: Chromatogram Metazachloru v čase $t=10$ min a MS spektrum píku Metazachloru



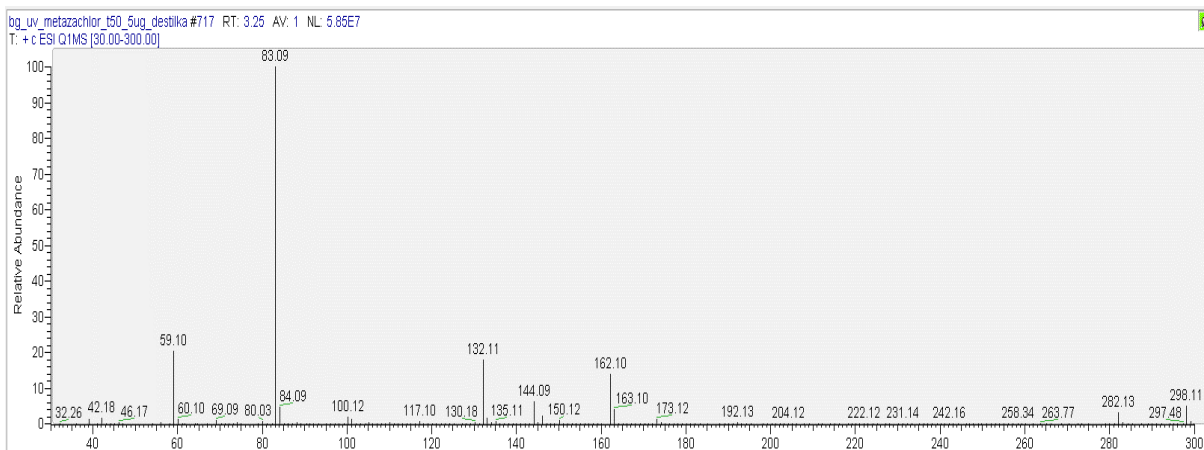
Obr. 43: Chromatogram Metazachloru v čase $t=50$ min a MS spektrum píku Metazachloru



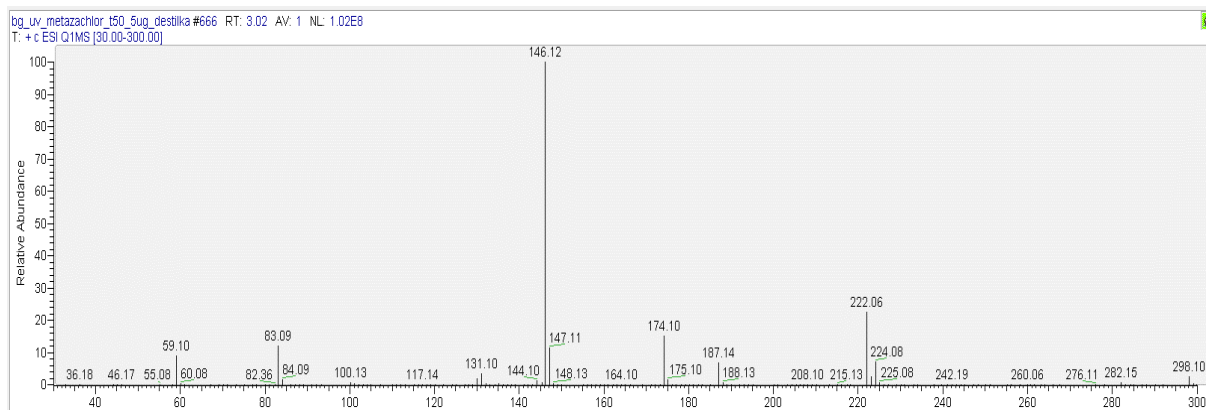
Obr. 44: MS spektrum piku s RT 4,15 min



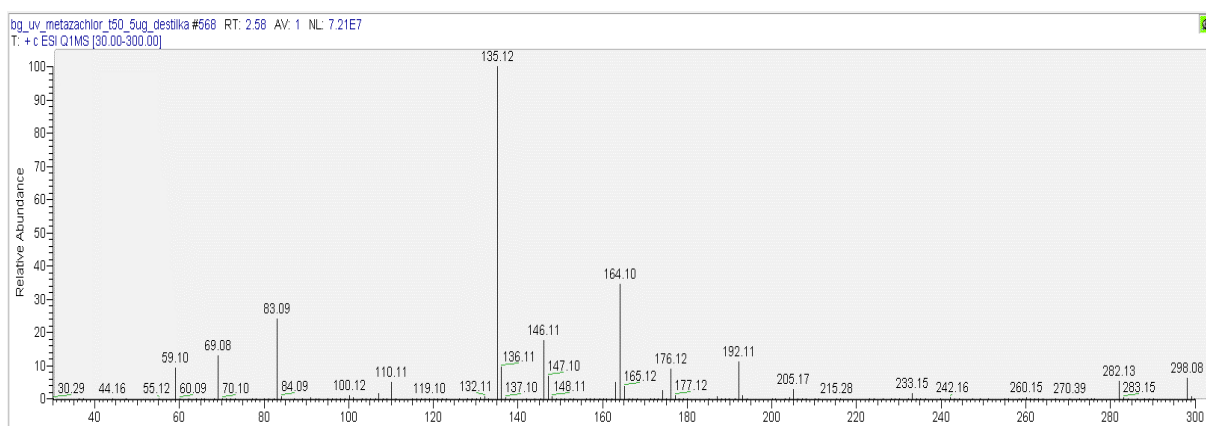
Obr. 45: MS spektrum piku s RT 3,58 min



Obr. 46: MS spektrum piku s RT 3,25 min



Obr. 47: MS spektrum píku s RT 3,02 min



Obr. 48: MS spektrum píku s RT 2,58 min

5 Závěr

Převzatá metoda, viz kapitola 3.3, jsem upravil a optimalizoval pro použití vybraných pesticidů (Chloridazon, Metazachlor). Tato část (vývoj metody) zabere vždy největší díl času a není správné ji zanedbat.

V metodě jsem změnil pro naše použití délku měření, gradient metody, teplota na koloně a samotnou kolonu.

LC/MS systémy nejsou kompatibilní a proto pro použití SRM modu jsem musel optimalizovat nastavení fragmentace pro jednotlivé pesticidy. Poslední úpravou bylo nastavení skenovací rychlosti.

Takto připravenou metodu jsem následně musel prevalidovat. Prevalidace obsahoval proměření kalibrační závislosti pěti koncentrací roztoků standardu, opakovatelnost nástřiku a stanovení meze detekce a kvantifikace.

Touto jednoduchou prevalidací jsem si prověřil, že metoda je vhodná pro následné měření reálných vzorků vybraných pokusů degradace. Prevalidaci jsem v průběhu měření pokusů prováděl s určitou pravidelností, abych si ověřil správnost a neměnnost parametrů.

Z dat provedených degradací se jeví jako nejúčinnější pro odstranění obou pesticidů postup UV s přídávkem H_2O_2 o koncentraci 0,015 % (tj. 1 ml, 0,0063 mol/l) viz srovnání všech tří přídávku peroxidu v *Grf. 15 – 18 a Příloha 23 a 24*. Účinnost odstranění pesticidů v destilované vodě byla pro Chloridazon 92,40% a Metazachlor 97,14%. U pokusu s kohoutkovou vodou byla účinnost o trošku menší. Chloridazon 87,96% účinnost odstranění a Metazachlor 96,56%. Pro docílení maximálních limitů pro pesticidní látky ve vodě stanovené zákonem by bylo zapotřebí buď větší koncentrace H_2O_2 nebo delší doba cirkulace s využitím tohoto systému. Z ekonomického hlediska je výhodnější větší koncentrace peroxidu než delší doba provozu degradační jednotky.

Pro systém O_3 /UV s přídávkem 100mg O_3 /hodina byla účinnost odstranění Chloridazonu 52,56% a Metazachloru 79,37% viz *Příloha 25*. Tyto hodnoty mne překvapili, protože jsem očekával lepší degradaci obou pesticidů a výsledky srovnatelné s přídávkem 1ml peroxidu s UV. Degradace obou pesticidů, jak je patrné viz *Grf. 19 a 20*, byla v prvních minutách velmi razantní ve srovnání s pokusy s H_2O_2 /UV, ale s delším časem začala výrazně stagnovat. Je to hlavně viditelné u Chloridazonu, který se v celkovém srovnání oproti Metazachloru méně degradoval. V systému O_3 /UV byl využit průtok pouze 100 l/hodinu. Protože při vyšších hodnotách kolem 200L/hodinu docházelo k přerušování dávkování ozonu do jednotky.

V porovnání naměřených výsledků s pokusy z odborných článků např. [60], kde testovali degradaci Chloridazonu za použití UV/ TiO_2 jsem při provedených pokusech dosáhl lepší účinnosti při odstranění Chloridazonu s využitím UV/ H_2O_2 za kratší dobu degradace. V tomto

člátku totiž dosáhl 62% účinnosti za 60 minut. V tomto článku testoval i vliv pH roztoku na degradaci, což jsem uvažoval při provádění mých pokusů, že pH na degradaci bude mít vliv stejně jako teplota.

Pro Metazachlor z odborných článků např. [54], kde prováděli degradaci Metazachloru UV a UV/H₂O₂ a zjistili, že neúčinnější odstraňování Metazachloru je při použití UV a H₂O₂ v rozmezí koncentrace peroxidu 2,0 mmol/l až 20 mmol/l a při nižším pH. Při vyšším pH pozorovali menší zvýšení degradace ale pouze do 2,0 mmol/l koncentrace peroxidu. Tento závěr je podobný s mými naměřenými výsledky, kdy jsem dosáhl nejlepší účinnosti při koncentraci kolem 6,3 mmol/l peroxidu. Opět zde prováděli testování vlivu pH na degradaci.

V roce 2017 byly provedeny po celé ČR odběry vzorků vody a bylo zjištěno, že námi stanovované látky, správněji některé jejich metabolity, překročili zákonem daný limit pro obsah pesticidních látek ve vodě (limit 0,1 µg/l). Příkladem metazachlor OA (55x), metazachlor ESA (23x), chloridazon-desphenyl (16x), chloridazon-methyl-desphenyl (10x) překročili limit. Při mých pokusech jsem při použití 1 ml peroxidu a UV docílil po padesáti minutách degradace v destilované vodě koncentrace (průměr z obou alikvót) Chloridazonu 4,13 µg/l a Metazachloru 1,64 µg/l. U kohoutkové vody koncentrace Chloridazonu 6,05 µg/l a Metazachloru 1,765 µg/l. Z toho plyne, že pro dosažení degradace na povolené limity by bylo zapotřebí například zvýšit koncentraci peroxidu, prodloužit dobu degradace nebo předřadit některou z dalších předúprav před tuto aparaturu. Možností je i využití degradace O₃/H₂O₂/UV.

Z výše uvedených výsledků a informací z odborných článků by mohl být dalším námětem pro rozšíření tohoto tématu prověření vlivu pH použité vody a její teploty na účinnost odstranění těchto dvou pesticidů. Následně pokusy s koncentrací O₃ nebo využití inhibitorů jako je oxidy železa (Fentonovy degradace) nebo TiO₂. Možností je i otestování vlivu ultrazvuku na degradaci, která byla pro Metazachlor testována v článku s názvem: *Sonolytic degradation of pesticide metazachlor in water: The role of dissolved oxygen and ferric sludge in the proces intensification*. [57]

6 Literatura

- [1] F. W. McLafferty, F. Tureček, *Interpretation of mass spektra*, 4th. edition, (1993) University Science Books, ISBN 978-0-935702-25-5
- [2] L. Nováková, M. Douša a kolektiv, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.*, Praha, (2013) Europrint a.s., ISBN 978-80-260-423-3
- [3] L. Nováková, M. Douša a kolektiv, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II.*, Praha, (2013) Europrint a.s., ISBN 978-80-260-4244-0
- [4] T. Tuzimski, J. Sherma, *High Performance Liquid Chromatography in Pesticide Residue Analysis*, (2015) CRC Press Taylor & Francis Group, ISBN 978-1-4665-6881-5
- [5] J. H. Gross, *Mass Spectrometry, A Textbook*, 3rd. edition, (2017) Springer, ISBN 978-3-319-54397-0
- [6] D. Duprez, F. Cavani, *Advanced processes in oxidation catalysis From Laboratory to Industry*, (2014) Imperial College Press, ISBN 978-1-84816-750-6
- [7] A. S. Y. Chau, B.K. Afghan, J. W. Robinson, *Analysis of Pesticides in Water*, (2018) CRC Press Taylor & Francis Group, ISBN 0-8493-5210-X
- [8] L. M. L. Nollet, *Handbook of Water Analysis*, 2nd. Edition, (2007) CRC Press Taylor & Francis Group, ISBN 978-0-8493-7033-5
- [9] H. Börner, *Pesticides in Ground and Surface Water*, (1994) Springer, ISBN 978-3-642-79106-2
- [10] A. Gil, L. A. Galeano, M. Á. Vicente, *Applications of Advanced Oxidation Processes (AOPs) in Drinking Water Treatment*, (2019) Springer, ISBN 978-3-319-76881-6
- [11] R.T. Meijers, E. J. Oderwald-Muller, P. A. N. M. Nuhn, J. C. Kruithof, *Degradation of pesticides by ozonation and advanced oxidation*, Ozone Science & Engineering vol. 17, pp. 673-686, (1995) Internation Ozone Association
- [12] G. A. Matthews, *A History of Pesticides*, (2018) CABI, ISBN 978-1-78639-487-3
- [13] M. H. Pérez, G. Peñuela, M. I. Maldonado, O. Malato, P. Fernández-Ibáñez, I. Oller, E. Gernjak, S. Malto, *Degradation of pesticides in water using solar advanced oxidation processes*, Environmental 64 (2006) 272-281, Science direct, ELSEVIER
- [14] F. P. Bourguine, J. I. Chapman, H. Kerai, J. L. Duval, J. G. Green, D. Hamilton, *The Degradation of Atrazine and Other by Photolysis*, (1995)
- [15] L. Muszkat, L. Feigelson, L. Bir, K. A. Muszkat, *Photocatalytic degradation of pesticides and bio-molecules in water*, Pest Management Science 58: 1143-1148, (2002)
- [16] J. McMurry, *Organická chemie*, Praha, (2015) VUTIUM, ISBN 978-80-214-4769-1
- [17] D. Tsipi, H. Botitsi, A. Economou, *Mass Spectrometry for the Analysis of Pesticide Residues and their Metabolites*, Hoboken, New Jersey, (2015) John Wiley & Sons, Inc., ISBN 978-1-118-50017-0

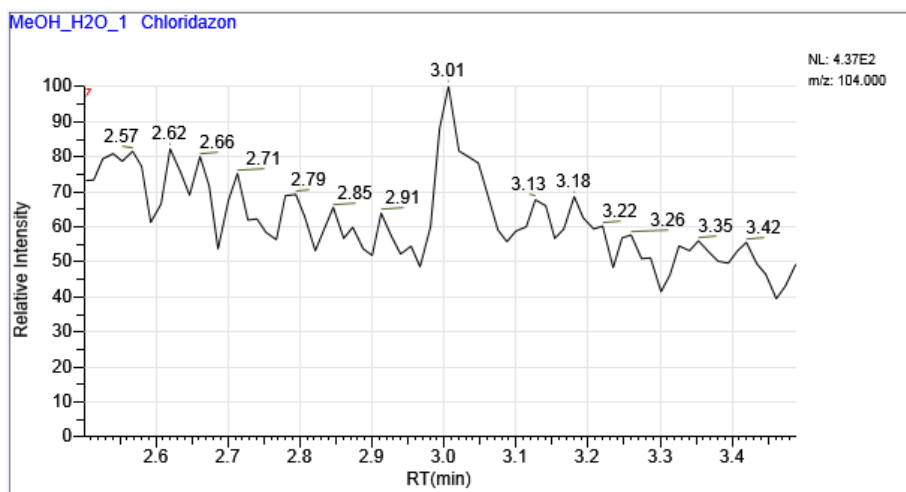
- [18] ALS Pesticidy, (2015) ALS Czech Republic s.r.o., <http://www.alsglobal.cz/media-cz/pdf/pesticidy-2015.pdf>
- [19] H. Hansson, F. Kaczala, M. Marques, W. Hogland, *Photo-Fenton and Fenton Oxidation of Recalcitrant Industrial Wastewater Using Nanoscale Zero-Valent Iron*, *Advanced Oxidation Processes for Wastewater Treatment*, Volume (2012), Article ID 531076
- [20] E. Neyens, J. Baeyens, *A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique*, *Journal of Hazardous Materials B98* (2003) 33-50, 2002 ELSEVIER
- [21] J. Beneš, *Pokročilé oxidační procesy – AOP*, Sborník konference Pitná voda (2008), s. 135-140, ISBN 978-80-254-2034-8
- [22] Z. Honzajková, E. Podholová, T. Patočka, M. Podhola, *Využití nanofiltrace a ultrafiltrace k úpravě vody na vodu pitnou*, Sborník konference Pitná voda (2010), s. 107-112, Č. Budějovice, ISBN 978-80-254-6854-8
- [23] P. Kořínková, *Stanovení vybraných pesticidů a jejich metabolitů technikou LC/MS*, Diplomová práce ID 100590, (2011) Přírodovědecká fakulta (PřF), Katedra fyzikální a makromol. Chemie
- [24] <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2014-83>
- [25] <http://vodnihospodarstvi.cz/pesticidy-a%E2%80%AFjejich-metabolity-pitne-vode/>
- [26] http://www.life2water.cz/znecistení_chemicals.html
- [27] https://www.researchgate.net/figure/General-steps-for-solid-phase-extraction-SPE_fig2_320024643
- [28] <https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4547.pdf>
- [29] http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/metazach.pdf
- [30] https://web.vscht.cz/~koplikr/%c4%8c%c3%a1stA6_3.pdf
- [31] <http://www.fao.org/3/w2598e/w2598e07.htm#historical%20development%20of%20pesticides>
- [32] EFSA *Scientific Report* (2007) 108, 1-82, *Conclusion on the peer review of chloridazon*
- [33] T. Kiljanek, A. Niewiadowska a S. Semeniuk, *Multi-residue method for the determination of pesticides and pesticide metabolites in honeybees by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry*, *Journal of chromatography A* 1435, 100-114, (2016)
- [34] A. M. Ramos, M. J. Whelan a kolektiv, *A multi-component method to determine pesticides in surface water by liquid-chromatography tandem quadrupole mass spectrometry*, *Water and Environmental Journal*, volume 31, 380-387, (2017)

- [35] M. Bagheri, M. Mohseni, *A study of enhanced performance of VUV/UV proces for the degradation of micropollutants from contaminated water*, Journal of Hazardous Materials 294, (2015)
- [36] G. Imoberdorf, M. Mohseni, *Modeling and experimental evaluation of vacuum-UV photoreactors for water treatment*, Chemical Engineering Science 66, (2011)
- [37] D. Tsipi, H. Botitsi, A. Economou, *Mass spektrometry for the analysis of pesticide residues and their metabolites*, John Wiley & Sons, (2015), ISBN 978-1-118-50017-0
- [38] W. M. A. Niessen, P. Manini, R. Andreoli, *Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography-mass spektrometry*, Mass Spectrometry Reviews 25, (2006)
- [39] J. Kos, *Pesticidy v pitných vodách*, přednáška
- [40] K. Elatmani, N. Ben oujji, G. Plantara, V. Goetz, I. Ait ichou, *3D Photocatalytic media for decontamination of water from pesticides*, Materials Research Bulletin 101, (2018)
- [41] Ch. K. Remucal, *The role of indirect photochemical degradation in the environmental fate of pesticides*, Environmental Science: Processes Impacts 16, (2014)
- [42] Carmalin Sophia A., Eder C. Lima, *Removal of emerging contaminants from the environment by adsorption*, Ecotoxicology and Environmental Safety 150, (2018)
- [43] T. Matsushita, A. Morimoto, T. Kuriyama, E. Matsumoto, Y. Matsui, N. Shirasaki, T. Kondo, H. Takanashi, T. Kameya, *Removals of pesticides and pesticide transformation products during drinking watertreatment processes and their impact on mutagen formation potential after chlorination*, Water Research 138, (2018)
- [44] M. Hadi Dehghani, S. Kamalian, M. Shayeghi, M. Yousefi, Z. Heidarinejad, S. Agarwal, V. Kumar Gupta, *High-performance removal of diazinon pesticide from water using multiwalled carbon nanotubes*, Microchemical Joimal 145, (2019)
- [45] L. Ghimici, I. Adrian Dinu, *Removal on some commercial pesticides from aqueous dispersions using as flocculant a thymine-containing chitosan derivative*, Separation and Purification Technology 209, (2019)
- [46] L. Yang, M. Li, Y. Jiang, Z. Qiang, *Bench- and pilot-scale studies on removal of pesticides from water by VUV/UV proces*, Chemical Engineering Journal 342, (2018)
- [47] Nilsum H. Ince, *Ultrasound-assisted advanced oxidation processes for water*. Ultrasonics-Sonochemistry 40, (2018)
- [48] O. M. Rodriguez-Narvaez, J. M. Peralta-Hernandez, A. Goonetilleke, E. R. Bandala, *Treatment technologies for emerging contaminants in water*, Chemical Engineering Journal 323, (2017)
- [49] P. Thi Thuy, K. Moons, J. C. van Dijk, Nguyen Viet Anh, B. Van der Bruggen, *To what extent are pesticides removed from surface water during coagulation-flocculation?*, Water and Environment Journal 22, 2008

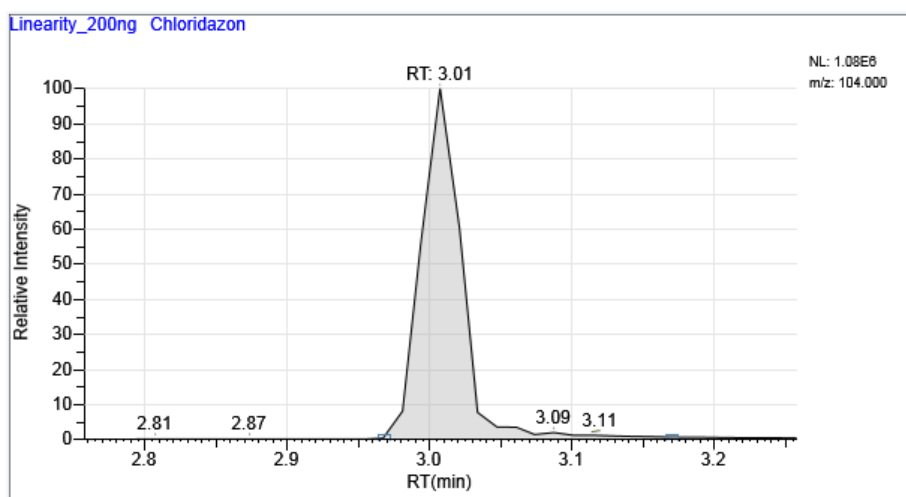
- [50] B. Giubert-López, J. F. García-Reyes, C. Meyer, A. Michels, J. Franzke, A. Molina-Díaz, H. Hayen, *Simultaneous testing of multiclass organic contaminants in food and environment by liquid chromatography/dielectric barrier discharge ionization-mass spectrometry*, The Royal Society of Chemistry, Analysts 137, (2012)
- [51] J. Hajšlová, V. Kocourek, *Osud prostředků pro ochranu rostlin v potravním řetězci člověka*, Vědecký výbor fotosanitární a životního prostředí, Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha, (2004)
- [52] Q. Chang, Ch. Fan, H. Chen, J. Kang, M. Wang, G. Pang, *Determination of 187 pesticide residues in edible fungi by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, The Royal Society of Chemistry, Analytical Methods 6, (2014)
- [53] I. Chandra Yadav, N. Linthoingambi Devi, *Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment*, Environ. Sci. & Engg. vol. 6, (2017)
- [54] D.P. Hessler, V. Gorenflo, F. H. Frimmel, *Degradation of Aqueous Atrazine and Metazachlor Solution by UV and UV/H₂O₂ – Influence of pH and Herbicide Concentration*, Acta. Hydrochim. Hydrobiol. 21 (1993)
- [55] <https://chromforum.org>
- [56] R. Allen, A. Walker, *Effects of Microbial Inhibitors on the Degradation Rates of Metamitron, Metazachlor and Metribuzin in Soil*, Pestic. Sci. 22, (1988)
- [57] M. Kask, M. Krichevskaya, J. Bolobajev, *Sonolytic degradation of pesticide metazachlor in water: The role of dissolved oxygen and ferric sludge in the proces intensification*, Journal of Environmental Chemical Engineering 7, (2019)
- [58] I. D. Kodranov, M. V. Pergal, V. V. Avdin, D. D. Manojlović, *Examination of degradation and ecotoxicology of pethoxamid and matazachlor after chlorine dioxide treatment*, Environ Monit Assess (2020) 192:422
- [59] G. Buttiglieri, M. Peschka, T. Frömel, J. Müller, F. Malpei, P. Seel, T. P. Knepper, *Environmental occurrence and degradation of the herbicide n-chloridazon*, Water research 43, (2009)
- [60] A. Khan, N. A. Mir, M. Faisal, M. Muneer, *Titanium Dioxide-Mediated Photocatalysed Degradation of Two Herbicide Derivatives Chloridazon and Metribuzin in Aqueous Suspensions*, International Journal of Chemical Engineering vol. 2012, (2012)
- [61] Lloyd R. Snyder, Joseph J. Kirkland, Joseph L. Glajch, *Practical HPLC method development* 2nd edition, John Wiley & Sons, (1997), ISBN 0-471-00703-X
- [62] https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/Millex-Syringe-Filter-Nylon-HPF-Non-sterile,MM_NF-SLHNM25NK?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F&bd=1
- [63] Marvin C. McMaster, *LC/MS a practical user's guide*, John Wiley & Sons, (2005), ISBN 0-471-65531-7

- [64] <https://www.uni-bielefeld.de/chemie/analytik/ms/esi.html>
- [65] https://www.researchgate.net/figure/A-schematic-of-electrospray-ionisation-A-general-overview-of-the-interface-B_fig11_261508458
- [66] T. Oppenländer, *Photochemical purification of water and air*, John Wiley & Sons, (2003), ISBN 3-527-30563-7
- [67] <https://blog.sepscience.com/massspectrometry/ms-solutions-3-dealing-with-metal-adduct-ions-in-electrospray-part-1>
- [68] http://www.pivokonsky.wz.cz/UV/uprava_vod_8.pdf

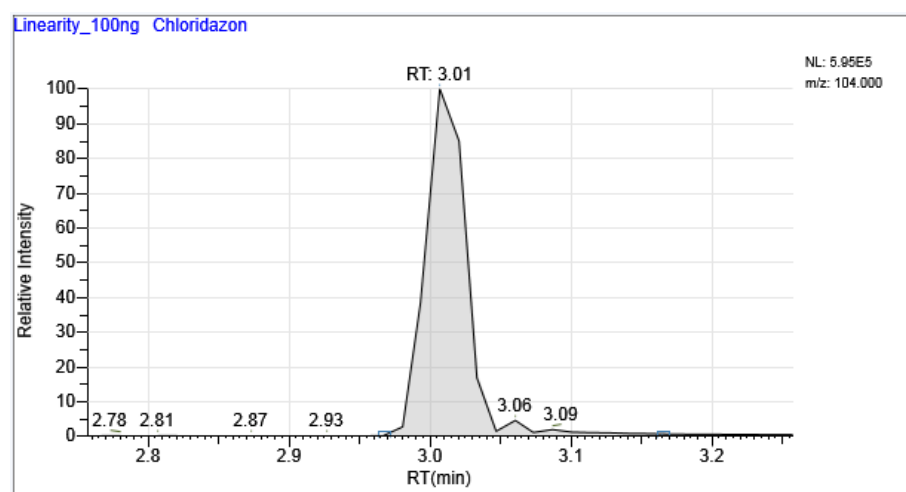
7 Přílohy



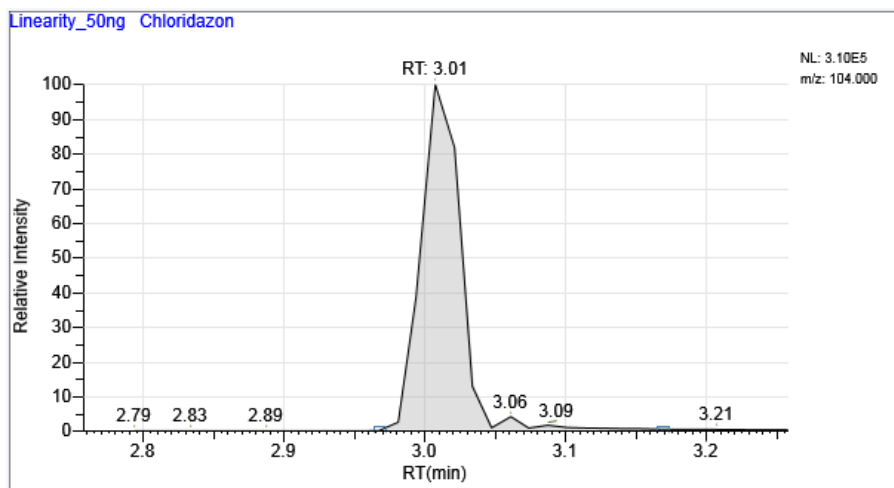
Příloha 1: SRM chromatogram Blanku na pozici Chloridazonu



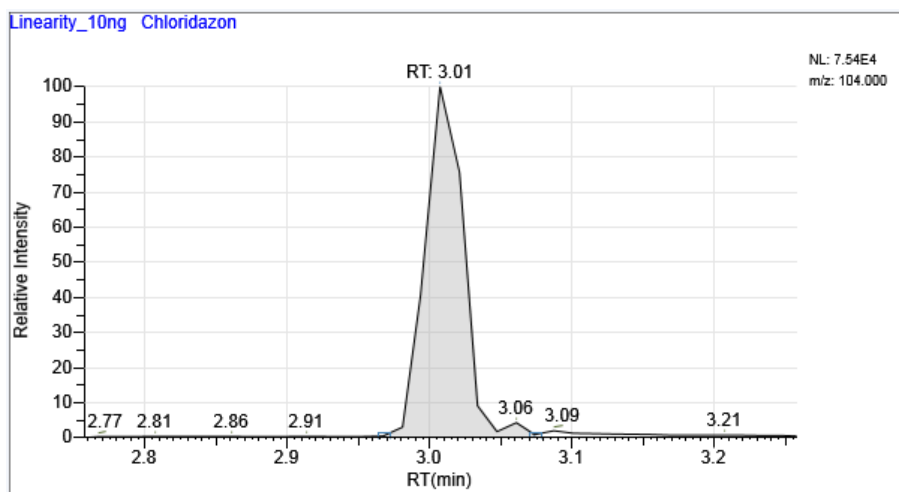
Příloha 2: SRM chromatogram Chloridazonu o koncentraci 200 ng/ml



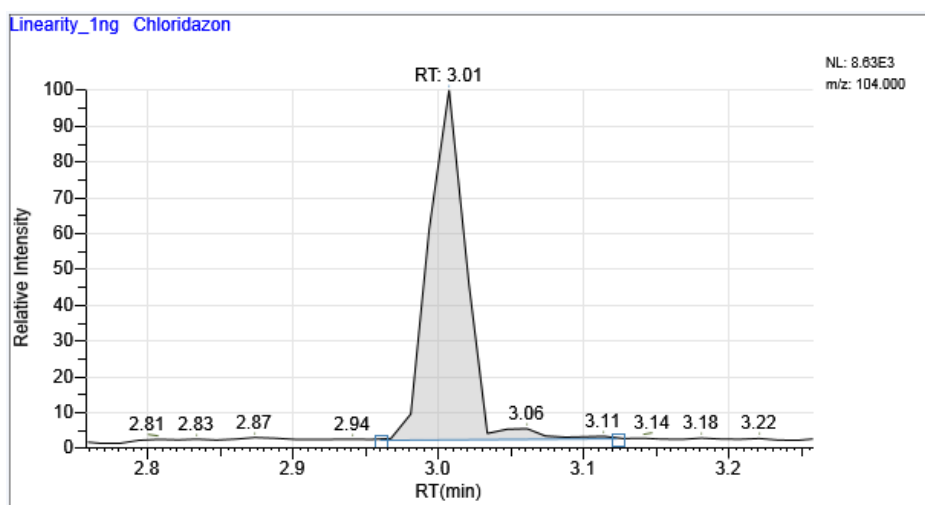
Příloha 3: SRM chromatogram Chloridazonu o koncentraci 100 ng/ml



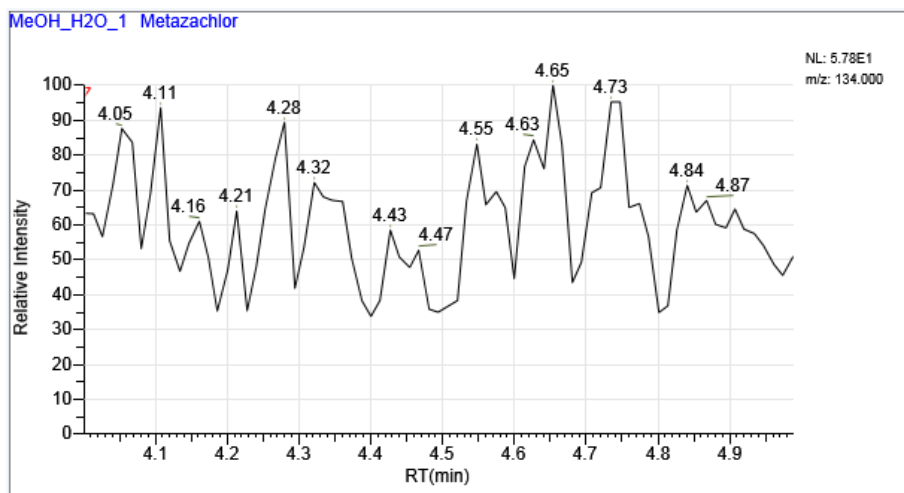
Příloha 4: SRM chromatogram Chloridazonu o koncentraci 50 ng/ml



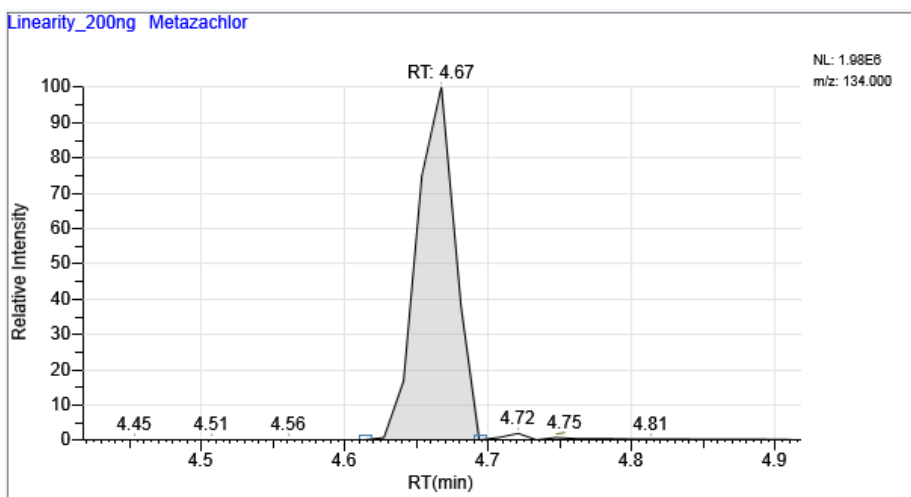
Příloha 5: SRM chromatogram Chloridazonu o koncentraci 10 ng/ml



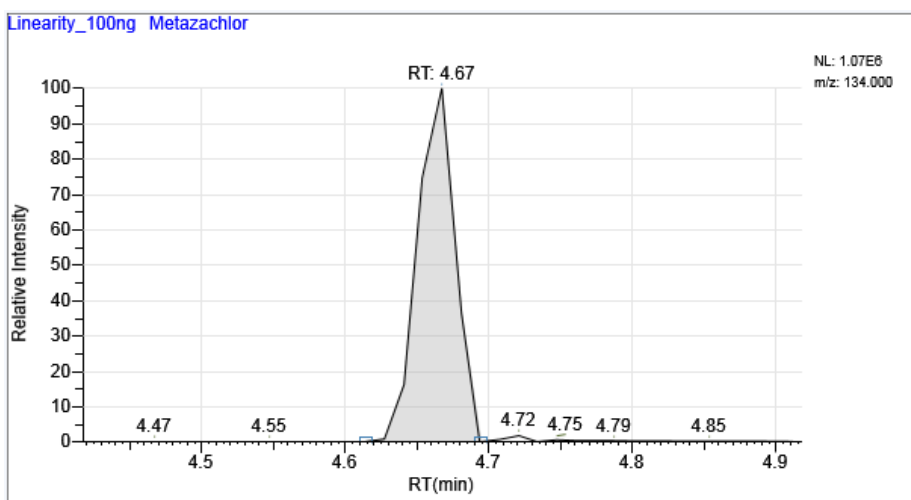
Příloha 6: SRM chromatogram Chloridazonu o koncentraci 1 ng/ml



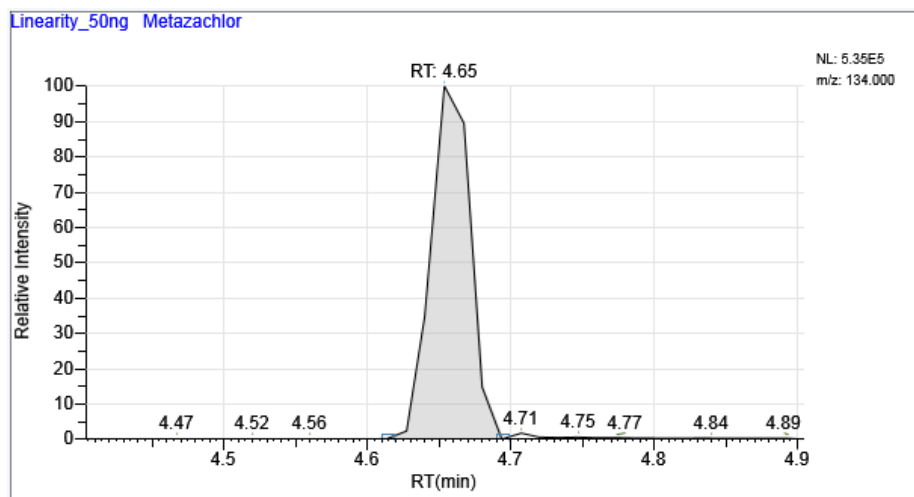
Příloha 7: SRM chromatogram Blanku na pozici Metazachloru



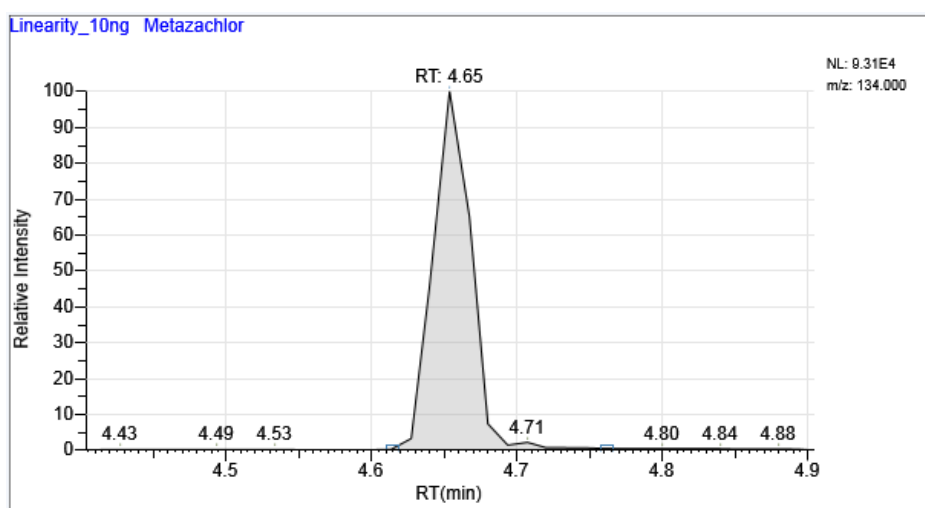
Příloha 8: SRM chromatogram Metazachloru o koncentraci 200 ng/ml



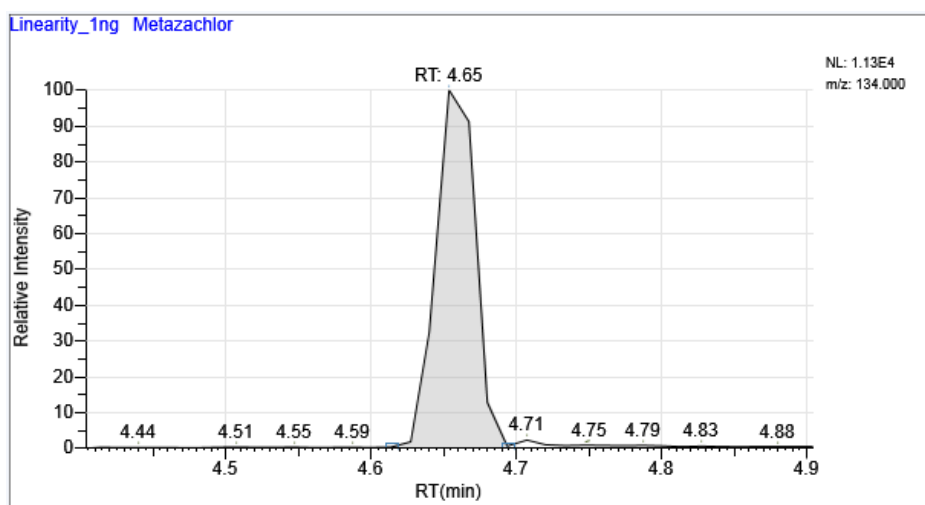
Příloha 9: SRM chromatogram Metazachloru o koncentraci 100 ng/ml



Příloha 10: SRM chromatogram Metazachloru o koncentraci 50 ng/ml



Příloha 11: SRM chromatogram Metazachloru o koncentraci 10 ng/ml



Příloha 12: SRM chromatogram Metazachloru o koncentraci 1 ng/ml

Příloha 13: Pokusy s destilovanou vodou, bez UV a průtokem 200 l/hodinu

Čas [min]	Chloridazon		Metazachlor	
	Plocha [A]	C [ng/ml]	Plocha [A]	C [ng/ml]
0	4143864	76,85	6876	71,38
2	4115310	76,32	6854	71,15
4	4114247	76,31	6651	69,04
7	3818275	70,82	6114	63,47
10	3870796	71,79	5883	61,07
15	3832771	71,08	6018	62,47
20	3807030	70,61	6175	64,1
30	3875073	71,87	5420	56,26
40	3866768	71,72	6022	62,51
50	3768469	69,89	5407	56,13

Příloha 14: Pokusy s kohoutkovou vodou, bez UV a průtokem 200 l/hodinu

Čas [min]	Chloridazon		Metazachlor	
	Plocha [A]	C [ng/ml]	Plocha [A]	C [ng/ml]
0	4669518	72,95	15873	82,39
2	4653633	72,7	15719	81,59
4	4321248	67,51	15715	81,57
7	4320709	67,5	15705	81,52
10	4320882	67,51	15721	81,6
15	3942415	61,59	15781	81,91
20	4211329	65,79	14220	73,81
30	4497545	70,27	15306	79,45
40	4275596	66,8	15695	81,46
50	3774602	58,97	14305	74,25

Příloha 15: Pokusy s destilovanou vodou, UV a průtokem 200 l/hodin

Čas [min]	Pokus č. 1						Pokus č. 2					
	Chloridazon		Metazachlor		Chloridazon		Metazachlor		Chloridazon		Metazachlor	
	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]
0	4180176	68,5	6417	56,9	1066688	50,69	196251	51,42				
2	3758732	61,6	6146	54,5	1063190	50,53	185033	48,48				
4	3769358	61,77	5630	49,92	1051043	49,95	175987	46,11				
7	3730184	61,13	5096	45,19	1017903	48,38	158765	41,6				
10	3656270	59,92	4868	43,17	998203	47,44	133251	34,91				
15	3691659	60,5	3655	32,41	991412	47,12	114443	29,98				
20	3652741	59,86	3344	29,65	1000572	47,55	99024	25,94				
30	3582946	58,72	2794	24,78	975553	46,36	70785	18,55				
40	3486212	57,13	1919	17,02	934145	44,4	48808	12,79				
50	3492311	57,23	1293	11,47	931498	44,27	37859	9,92				

Příloha 16: Pokusy s kohoutkovou vodou, UV a průtokem 200 l/hodin

Čas [min]	Pokus č. 1						Pokus č. 2					
	Chloridazon		Metazachlor		Chloridazon		Metazachlor		Chloridazon		Metazachlor	
	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]
0	1328192	62,05	16860	87,51	3890124	60,78	747931	46,45				
2	1317440	61,54	16603	86,18	3702048	57,84	743280	46,16				
4	1306891	61,05	15470	80,3	3699022	57,79	644961	40,06				
7	1251824	58,48	14827	76,96	3769829	58,9	615884	38,25				
10	1217719	56,89	14083	73,1	3750237	58,59	593463	36,86				
15	1320651	61,69	12870	66,8	3711892	57,99	374624	23,27				
20	1303966	60,91	9266	48,1	3674157	57,4	321545	19,97				
30	1305399	60,98	8050	41,78	3538693	55,29	266709	16,56				
40	1286285	60,09	6351	32,96	3614070	56,46	261606	16,25				
50	1234061	57,65	4586	23,8	3166042	49,46	141483	8,79				

Příloha 17: Pokusy s destilovanou vodou, UV a průtokem 300 l/hodinu

Čas [min]	Pokus č. 1						Pokus č. 2					
	Chloridazon		Metazachlor		Chloridazon		Metazachlor		Chloridazon		Metazachlor	
	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]
0	4165750	68,27	7653	67,86	1294662	60,48	631915	39,25				
2	4122086	67,55	6391	56,67	1283694	59,97	590472	36,67				
4	4025824	65,98	6485	57,51	1289918	60,26	567194	35,23				
7	3621722	59,35	5472	48,52	1279438	59,77	516329	32,07				
10	3644017	59,72	5734	50,85	1261356	58,92	487588	30,28				
15	3637295	59,61	5061	44,88	1272097	59,46	408820	25,39				
20	3601838	59,03	3537	31,36	1225694	57,26	347932	21,61				
30	3555247	58,26	3197	28,35	1260413	58,88	267467	16,61				
40	3578715	58,65	2388	21,18	1235175	57,7	175639	10,91				
50	3556740	58,29	1681	14,91	1217497	56,87	134400	8,35				

Příloha 18: Pokusy s kohoutkovou vodou, UV a průtokem 300 l/hodinu

Čas [min]	Pokus č. 1						Pokus č. 2					
	Chloridazon		Metazachlor		Chloridazon		Metazachlor		Chloridazon		Metazachlor	
	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]
0	4365013	68,2	17017	88,33	1447887	67,64	705037	43,79				
2	4296583	67,13	15820	82,11	1434262	67	631107	39,2				
4	4119579	64,36	15014	77,93	1409762	65,86	609046	37,83				
7	3993284	62,39	14648	76,03	1382569	64,59	550644	34,2				
10	3987300	62,29	13383	69,46	1370961	64,04	513002	31,86				
15	4218410	65,91	11376	59,05	1390368	64,95	438039	27,2				
20	4216278	65,87	11614	60,28	1397056	65,26	356665	22,15				
30	3918626	61,22	8878	46,08	1367363	63,88	259102	16,09				
40	3796831	59,32	7218	37,46	1337501	62,48	190582	11,84				
50	3699486	57,8	5209	27,04	1377420	64,35	130603	8,11				

Příloha 19: Pokusy s destilovanou vodou, UV + 0,1 ml H₂O₂ a průtokem 200 l/hodinu

Čas [min]	Pokus č. 1						Pokus č. 2					
	Chloridazon		Metazachlor		Chloridazon		Metazachlor		Chloridazon		Metazachlor	
	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]
0	4676590	73,06	17434	90,49	3811556	46,53	4106	48,23				
2	4069518	63,58	16515	85,72	3764915	45,96	3304	38,81				
4	4016539	62,75	16079	83,46	3717112	45,38	3266	38,36				
7	4129038	64,51	12337	64,04	3764689	45,96	3174	37,28				
10	4042831	63,16	14328	74,37	3724564	45,47	3163	37,15				
15	3946965	61,66	11471	59,54	3775189	46,09	2143	25,17				
20	3751990	58,62	11294	58,62	3695466	45,11	2313	27,17				
30	3609612	56,39	7614	39,52	3554514	43,39	1853	21,77				
40	3493250	54,58	6399	33,21	3537814	43,19	1495	17,56				
50	3276859	51,2	4397	22,82	3338167	40,75	973	11,43				

Příloha 20: Pokusy s kohoutkovou vodou, UV + 0,1 ml H₂O₂ a průtokem 200 l/hodinu

Čas [min]	Pokus č. 1						Pokus č. 2					
	Chloridazon		Metazachlor		Chloridazon		Metazachlor		Chloridazon		Metazachlor	
	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]
0	4997342	61,01	322187	44,89	3028616	53,59	3949	46,39				
2	4582303	55,94	293266	40,86	3005539	53,18	3771	44,3				
4	4657932	56,86	269485	37,55	2845302	50,35	3826	44,94				
7	4705949	57,45	244899	34,12	2843709	50,32	3334	39,16				
10	4682365	57,16	225873	31,47	2782163	49,23	2867	33,68				
15	4347685	53,08	185582	25,86	2767432	48,97	2176	25,56				
20	4217170	51,48	163091	22,72	2755085	48,75	2276	26,74				
30	4077494	49,78	100558	14,01	2590742	45,84	1702	19,99				
40	3813900	46,56	84388	11,76	2546893	45,07	1289	15,14				
50	3626374	44,27	61303	8,54	2460160	43,53	1087	12,77				

Příloha 21: Pokusy s destilovanou vodou, UV + 0,5 ml H₂O₂ a průtokem 200 l/hodinu

Čas [min]	Pokus č. 1						Pokus č. 2					
	Chloridazon		Metazachlor		Chloridazon		Metazachlor		Chloridazon		Metazachlor	
	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]
0	3774383	66,79	2290	53,8	3778131	46,12	4046	47,53				
2	3756732	66,47	1803	42,36	3573805	43,63	3828	44,97				
4	3522241	62,32	1615	37,94	3417487	41,72	3339	39,22				
7	3406235	60,27	1604	37,68	3075498	37,55	2956	34,72				
10	3208468	56,77	1446	33,97	2896739	35,36	2700	31,72				
15	3003812	53,15	1357	31,88	2539138	31	2003	23,53				
20	2793167	49,42	1027	24,13	2234236	27,28	1871	21,98				
30	2395296	42,38	639	15,01	1728812	21,11	1187	13,94				
40	2061327	36,47	407	9,56	1331584	16,26	748	8,79				
50	1729769	30,61	221	5,19	1071589	13,08	437	5,13				

Příloha 22: Pokusy s kohoutkovou vodou, UV + 0,5 ml H₂O₂ a průtokem 200 l/hodinu

Čas [min]	Pokus č. 1						Pokus č. 2					
	Chloridazon		Metazachlor		Chloridazon		Metazachlor		Chloridazon		Metazachlor	
	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]
0	1404499	66,75	203872	53,42	2938403	51,99	1907	44,8				
2	1393755	66,24	226263	59,28	2801333	49,57	1904	44,73				
4	1386056	65,87	206851	54,2	2797469	49,5	1880	44,17				
7	1357165	64,5	210236	55,08	2721870	48,16	1734	40,74				
10	1385600	65,85	188580	49,41	2521772	44,62	1735	40,76				
15	1306614	62,1	156877	41,1	2372246	41,98	1571	36,91				
20	1309386	62,23	160600	42,08	2279810	40,34	1209	28,4				
30	1311204	62,32	88154	23,1	1977603	34,99	973	22,86				
40	853469	40,56	83356	21,84	1771922	31,35	719	16,89				
50	533728	25,37	43970	11,52	1486596	26,3	486	11,42				

Příloha 23: Pokusy s destilovanou vodou, UV + 1,0 ml H₂O₂ a průtokem 200 l/hodinu

Čas [min]	Pokus č. 1						Pokus č. 2					
	Chloridazon		Metazachlor		Chloridazon		Metazachlor		Chloridazon		Metazachlor	
	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]
0	3482189	64,58	5680	58,96	3574620	43,64	4451	52,28				
2	3218869	59,7	5452	56,6	3261561	39,82	3207	37,67				
4	3212389	59,58	5521	57,31	3052021	37,26	3187	37,44				
7	2558668	47,45	4625	48,01	2594121	31,67	2846	33,43				
10	1266018	23,48	2216	23	1866270	22,78	2216	26,03				
15	1538403	28,53	2025	21,02	1773904	21,66	1543	18,13				
20	1586740	29,43	1897	19,69	1362822	16,64	1180	13,86				
30	704650	13,07	427	4,43	808020	9,86	602	7,07				
40	478537	8,88	612	6,35	467147	5,7	250	2,94				
50	271305	5,03	246	2,55	264898	3,23	62	0,73				

Příloha 24: Pokusy s kohoutkovou vodou, UV + 1,0 ml H₂O₂ a průtokem 200 l/hodinu

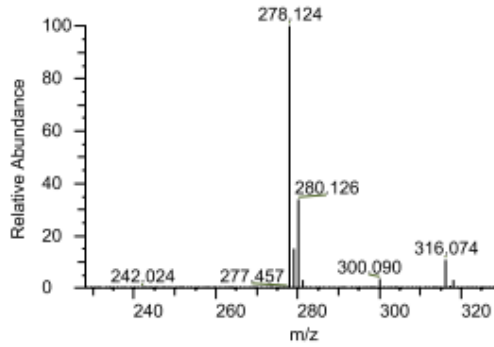
Čas [min]	Pokus č. 1						Pokus č. 2					
	Chloridazon		Metazachlor		Chloridazon		Metazachlor		Chloridazon		Metazachlor	
	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]	Plocha [A]	c [ng/ml]
0	1240159	58,94	247318	64,8	2529892	44,77	4103	48,2				
2	1199333	57	193405	50,67	2428027	42,96	3527	41,43				
4	708053	33,65	169328	44,36	2389128	42,27	3050	35,83				
7	620847	29,51	96669	25,33	2031807	35,95	2820	33,13				
10	535615	25,46	79591	20,85	1826114	32,31	2519	29,59				
15	411897	19,58	52145	13,66	1546841	27,37	1954	22,95				
20	401448	19,08	35453	9,29	1284645	22,73	1135	13,33				
30	251156	11,94	17143	4,49	889323	15,74	672	7,89				
40	129920	6,17	11272	2,95	569240	10,07	388	4,56				
50	115096	5,47	3239	0,85	374425	6,63	228	2,68				

Příloha 25: Pokusy s destilovanou vodou, UV + 100mg O₃/hodinu a průtokem 100 l/hodinu

Čas [min]	Pokus č. 1						Pokus č. 2					
	Chloridazon			Metazachlor			Chloridazon			Metazachlor		
	Plocha [A]	c [ng/ml]		Plocha [A]	c [ng/ml]		Plocha [A]	c [ng/ml]		Plocha [A]	c [ng/ml]	
0	656858	81,09		240801	82,53		706520	87,22		196160	67,23	
2	408941	50,48		139297	47,74		471038	58,15		119794	41,06	
4	436393	53,87		133746	45,84		452346	55,84		117845	40,39	
7	376789	46,51		121980	41,81		436555	53,89		108400	37,15	
10	357103	44,08		100292	34,38		430924	53,20		76348	26,17	
15	343732	42,43		91753	31,45		409567	50,56		93408	32,02	
20	325074	40,13		74430	25,51		390741	48,24		86178	29,54	
30	342587	42,29		58188	19,94		365356	45,10		57681	19,77	
40	346358	42,76		45015	15,43		336662	41,56		43559	14,93	
50	323604	39,95		34511	11,83		322206	39,78		52797	18,10	

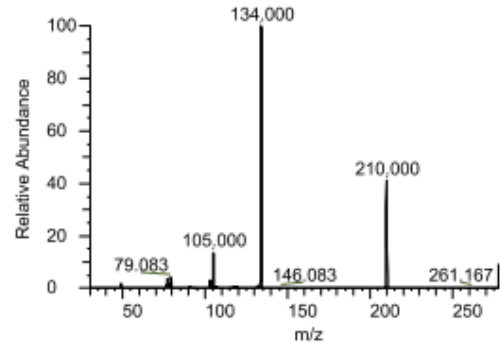
Precursor Ion Spectrum

Averaged Spectrum - Q3MS [228.012-328.013] Max Intensity: 9.34E+006



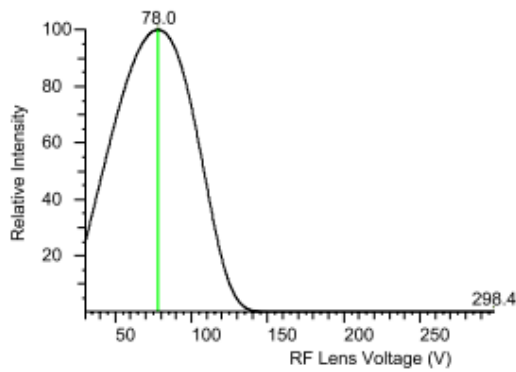
Product Spectrum

Averaged Spectrum - Full MS2 Max Intensity: 4.61E+005



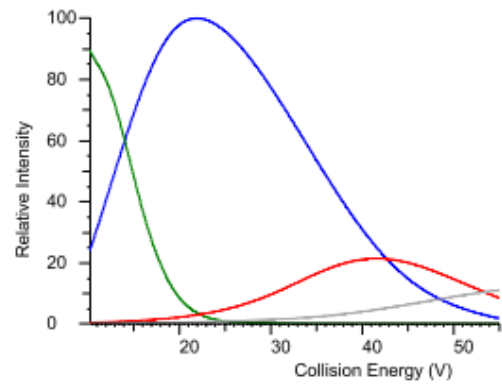
Optimizing RF Lens of Ion 278.100 in Q1MS (+)

Optimal Value: 78 V; Optimal Intensity: 6.59E+007



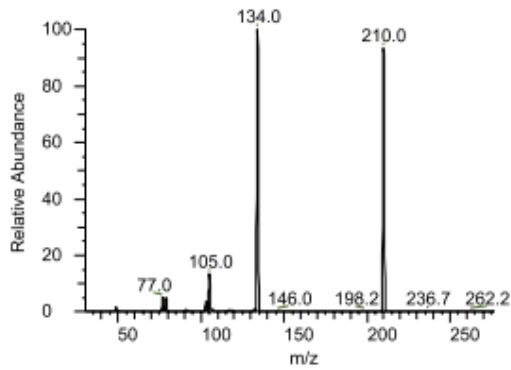
Breakdown Curve of Ion 278.012 m/z at 1.5 mTorr (+)

Max Intensity: 1.56E+006



Product Scan of Ion 278.012 m/z (+)

Max Intensity: 8.17E+005

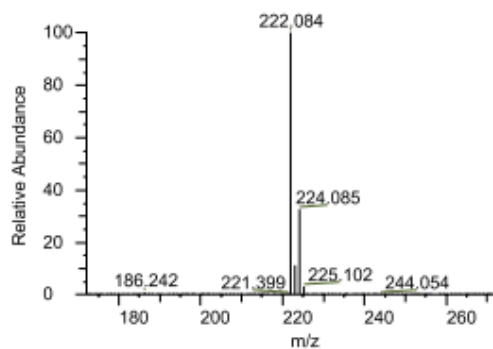


Product ions	Col. Energy
134 m/z	22 V
210 m/z	10 V
105 m/z	42 V
77 m/z	55 V

Příloha 26: Protokol optimalizace Metazachloru

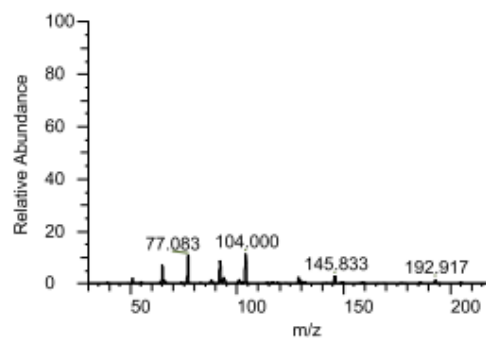
Precursor Ion Spectrum

Averaged Spectrum - Q3MS [171.950-271.950] Max Intensity: 2.89E+007



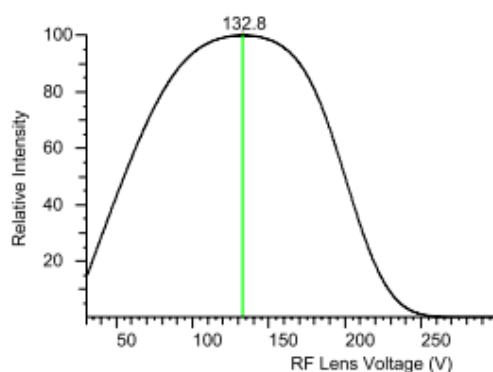
Product Spectrum

Averaged Spectrum - Full MS2 Max Intensity: 4.24E+005



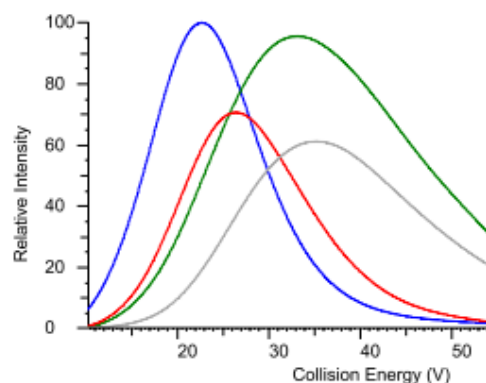
Optimizing RF Lens of Ion 222.000 in Q1MS (+)

Optimal Value: 133 V; Optimal Intensity: 8.03E+007



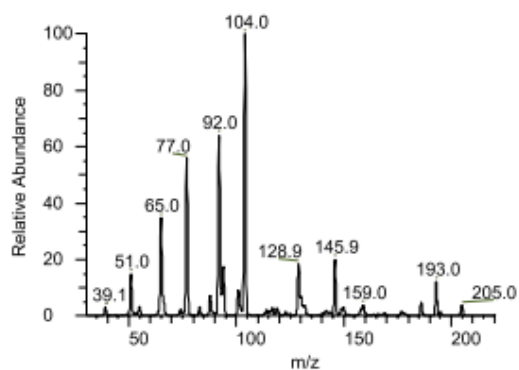
Breakdown Curve of Ion 221.950 m/z at 1.5 mTorr (+)

Max Intensity: 2.62E+005



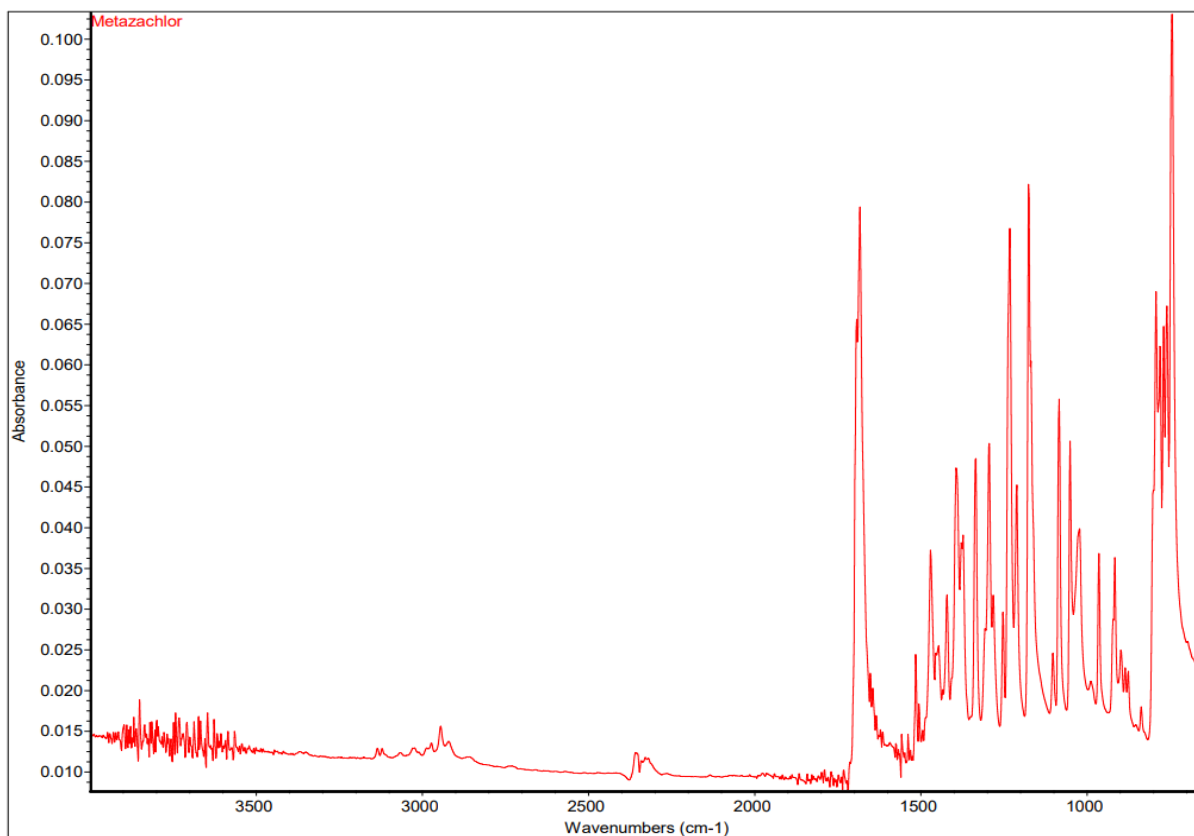
Product Scan of Ion 221.950 m/z (+)

Max Intensity: 1.25E+005

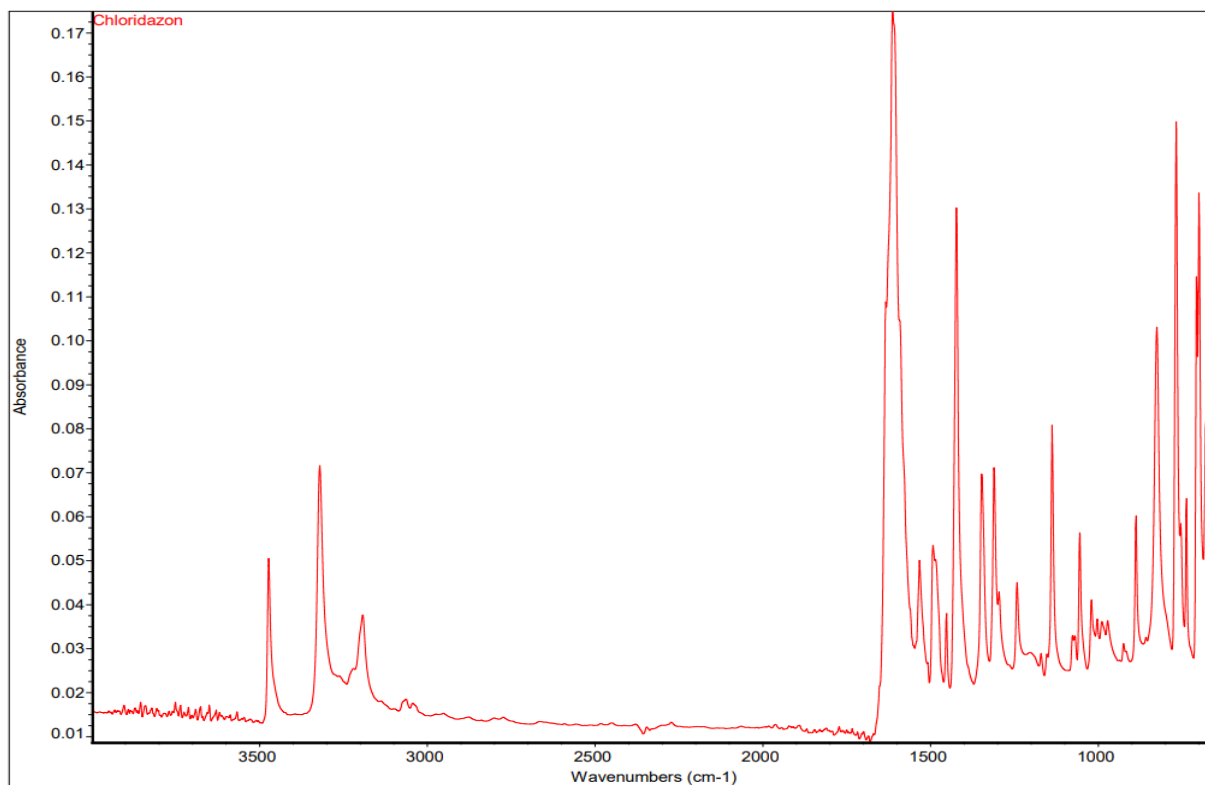


Productions	Col. Energy
104 m/z	23 V
77 m/z	33 V
92 m/z	26 V
65 m/z	35 V

Příloha 27: Protokol optimalizace Chloridazonu



Příloha 28: IR spektrum std. Metazachloru, b.BCBW2741, Sigma



Příloha 29: IR spektrum std. Chloridazonu, b.BCCC6437, Sigma