

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Fakulta přírodovědecká
Katedra fyzikální chemie**



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Olomouc 2012

Pavína Ciesárová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra fyzikální chemie

**VÝVOJ A VALIDACE METODY PRO
STANOVENÍ BORU V ROSTLINNÝCH
MATERIÁLECH**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce:

Pavína Cieslarová

Studijní obor:

Aplikovaná chemie

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. David Milde, Ph.D.

Olomouc 2012

PALACKÝ UNIVERSITY IN OLOMOUČ

Faculty of Science

Department of Physical Chemistry

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF
METHOD FOR THE DETERMINATION OF
BORON IN PLANT MATERIAL**

BACHELOR THESIS

Author:

Pavĺína Cieslárová

Major:

Applied chemistry

Supervisor:

Ing. David Milde, Ph.D.

Olomouc 2012

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry fyzikální chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....
Vlastnoruční podpis

Děkuji svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Davidu Mildemu, Ph.D. za pomoc, cenné rady a čas, který věnoval mé práci.

Můj velký dík patří také mým rodičům a příteli, za jejich podporu v průběhu celého studia.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Pavčina Cieslárová
Název práce:	Vývoj a validace metody pro stanovení boru v rostlinném materiálu
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	Ing. David Milde, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2012
Klíčová slova:	bor, azomethin-H, UV/VIS spektrometrie, ICP-MS
Počet stran:	50
Počet příloh:	1 CD ROM
Jazyk:	čeština
Abstrakt:	

Cílem práce bylo získat spolehlivou metodu pro stanovení koncentrace boru v rostlinném materiálu. Pro stanovení byly vybrány dvě metody. Molekulová absorpční spektrometrie ve viditelné oblasti spektra, která ke stanovení využívá kondenzační reakce salicylaldehydu s 8-amino-naft-1-ol-3,6-disulfonovou kyselinou za vytvoření žlutého komplexu s borem. Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, metoda, která je svým principem pro prvkovou analýzu často používaná.

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Pavlína Cieslárová

Title: Development and validation of method for the determination of boron in plant material

Department: Department of Physical Chemistry

Type of thesis: Bachelor

Supervisor: Ing. David Milde, Ph.D

The year of presentation: 2012

Keywords: boron, azomethine-H, UV/VIS spectrometry, ICP-MS

Number of pages: 50

Number of appendices: 1 CD ROM

Language: Czech

Abstract:

The aim of this thesis was to obtain reliable method for determine the concentration of boron in plant material. To determination were chosen two methods. Molecular absorbtion spectroscopy in visible range, which used the reaction of salicylaldehyde with 8-amino-1-naph-1-ol-3,6-disulfonic acid which gives yellow complex with boron. Second method was used Mass spectroscopy with inductively coupled plasma as method, which is often using for elemental analysis.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	2
2.1 Bor.....	2
2.1.1 Funkce	2
2.2 Rozklad vzorku	5
2.2.1 Metody rozkladu na suché cestě.....	5
2.2.2 Metody rozkladu na mokré cestě.....	6
2.2.3 Ostatní metody rozkladu.....	7
2.3 Metody	8
2.4 Molekulová absorpční spektrometrie ve viditelné oblasti spektra.....	9
2.4.1 Princip absorpční UV/VIS spektrometrie.....	9
2.4.2 Základní vztahy a vzorce	10
2.4.3 Elektronová absorpční spektra	11
2.4.4 Instrumentace	14
2.4.5 Měření boru	17
2.5 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem	19
2.5.1 Princip ICP-MS	19
2.5.2 Instrumentace ICP-MS	20
2.5.3 Interference v ICP-MS	22
2.5.4 Měření boru	23
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1 Rozklad vzorků	24
3.1.1 Chemikálie.....	24
3.1.2 Přístrojové vybavení.....	24
3.1.3 Optimalizace rozkladu.....	25
3.1.4 Rozklad vzorků pro spektrometrické měření	25
3.1.5 Rozklad vzorků pro ICP-MS	25

3.2 Spektrofotometrické měření	26
3.2.1 Chemikálie.....	26
3.2.2 Přístrojové vybavení	27
3.2.3 Příprava roztoků	27
3.2.4 Optimalizace metody.....	28
3.2.5 Pracovní postup	28
3.3 ICP-MS měření	29
3.3.1 Chemikálie.....	29
3.3.2 Přístrojové vybavení	29
3.3.3 Příprava roztoků	29
3.3.4 Pracovní postup	30
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	31
4.1 Rozklad vzorků	31
4.1.1 Optimalizace.....	31
4.2 Stanovení pomocí spektrofotometrické metody.....	31
4.2.1 Optimalizace.....	31
4.2.2 Souhrn naměřených dat	32
4.3 ICP-MS	34
4.3.1 Souhrn naměřených výsledků.....	34
4.4 Porovnání metod	36
5. ZÁVĚR	37
6. SUMMARY	38
7. POUŽITÉ ZKRATKY	39
8. LITERATURA.....	40

1. Úvod

Zmíníme-li se o boru (B), jako první se nám vybaví polokovový prvek III. A skupiny se specifickou třístředovou vazbou. Navzdory nízkému výskytu B v přírodě jsou jeho biologické funkce neméně zajímavé a významné. Již od roku 1923 je B znám jako stopový prvek nezbytný pro rostliny a zájem o pochopení jeho drah v rostlinách roste^{1,2}. B ovlivňuje kvalitu rostlin, ve formě kyseliny borité se podílí na tvorbě buněčných stěn a jiných metabolických drahách. Množství B ovlivňuje vzrůst a vývoj rostlin, přemíra B však působí na rostliny toxicky³.

Při sledování funkce a výskytu B v rostlinách je důležité rozumět základům práce s biologickými materiály. Ať už se jedná o přípravu rostlinných materiálů ke stanovení, nebo volbu a optimalizaci metody. Příprava vzorků zahrnuje rozklad biologických materiálů a jejich převedení do kapalného stavu. Volbu metody ovlivňují především přístrojové možnosti. A ačkoliv pro stanovení B bylo využito a popsáno mnoho metod, mezi nejběžněji používané patří molekulová absorpční spektrometrie ve viditelné oblasti spektra a dnes velmi oblíbená metoda ICP-MS, neboli hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem⁴.

Cílem této práce je zmínit hlavní funkce B v rostlinách, ale především práce s biologickým materiálem. Zahrnuje možnosti rozkladu vzorků a základní princip a instrumentaci molekulové absorpční spektrometrie ve viditelné oblasti spektra a ICP-MS. Na teoretickou část bakalářské práce navazuje praktické použití obou metod při stanovení B v rostlinných materiálech.

2. Teoretická část

2.1 Bor

Bor ${}^5\text{B}$ je prvek III. A skupiny. Označujeme jej za polokov, avšak svým chemickým chováním patří mezi nekovy. Základní elektronová konfigurace valenčních sféry atomů B je $2s^2 2p^1$.

Poměrně velká hodnota elektronegativity (2,0) nepřipouští skutečné odtržení všech valenčních elektronů a vznik kationtu B^{3+} , ani dosažení elektronové konfigurace neonu ($2s^2 2p^6$) není pravděpodobné. B proto vystupuje v kovalentních vazbách. Počet elektronů a elektronegativita způsobují vznik polycentrického a delokalizovaného charakteru určitých vazeb. U B se jedná o třístředové vazby.

Chemie B se dosti podobá chemii uhlíku, především v řetězení atomů a vytváření sloučenin s vodíkem. Chemie kyslíkatých sloučenin je podobná chemii sloučenin křemíku.

Vyskytuje se ve dvou izotopech ${}^{11}\text{B}$ (80,1 %) a ${}^{10}\text{B}$ (19,9 %). Je dokázáno, že B je nezbytný mikrobiogenní prvek pro život rostlin, zvířat i člověka. Rostliny jej přijímají ve formě nedisociované kyseliny borité (H_3BO_3). Nyní se však plně zaměříme na jeho funkci a stanovení v rostlinách⁵.

2.1.1 Funkce

Skutečná role B v rostlinách zůstává neprozkoumána, v posledních letech však výzkum pokročil a je možné prokázat zapojení B do tří hlavních aspektů fyziologie rostlin. Těmito aspekty jsou míněny role B ve struktuře buněčných stěn, role B v membránových funkcích a zapojení B do činností metabolitu. Přiměřená výživa B je rozhodující nejen pro výnosy, ale také pro kvalitu plodin. Jeho nedostatek má negativní vliv na anatomické, fyziologické a biochemické změny rostlin³.

B je základní živina pro normální růst vyšších rostlin jeho dostupnost v půdě a závlahové vodě je důležitým činitelem zemědělské produkce. Citlivost jednotlivých druhů rostlin je k B různá⁵.

Mobilita bóru a doprava do molekuly

Příjem B se děje hlavně přes kořeny při optimálním pH 5-6. V cévnatých rostlinách se bór pohybuje od kořenů s transpirací proudu a hromadí se v místech rostoucích listů a stonků. Předpokládá se, že B je transportován hlavně xylémem. U ovocných stromů byl pozorován na podzim zvýšený transport B z listů do kůry a na jaře jeho následovný přesun z kůry do listů a květů⁵.

Role obsahu boru ve struktuře buněčné stěny

S OH⁻ skupinami cukrů vytváří polyhydroxylové sloučeniny, které stabilizují buněčné stěny. Také je prokázán vliv B na růst meristematických tkání. V nepřítomnosti B vznikají abnormální deformace tkání⁶.

Zapojení B v činnosti metabolitů

Významná je úloha B v metabolismu cukrů, kdy se vytvoří estery s alkoholy a cukry, které mohou v této formě snadněji procházet přes buněčné membrány než samotné vysoce polární molekuly cukrů. Při optimální výživě B se zvyšuje translokační gradient cukrů a naopak při jeho nedostatku se translokace snižuje. Bylo prokázáno, že cukerný roztok B zvyšuje jeho příjem více než čistý roztok B.

B v komplexu 6-fosfoglutamátu moduluje aktivitu enzymu, regulujícího pentosofosfátový cyklus. Při deficienci B je tato cesta blokována a indikuje se akumulace fenolických sloučenin, charakteristických pro deficienci B.

B je důležitý pro syntézu nukleových kyselin. Snížení obsahu RNA předchází deficienci B. Z toho bylo prokázáno, že B hraje významnou roli při utilizaci N bází do RNA a tím ovlivňuje i proteinovou syntézu. Rostliny vyživované B stimulovaly redukci nitrátu a syntézu aminokyselin. B rovněž ovlivnil příjem P a jeho inkorporaci do nukleotidů^{5,6}.

Symptomy nedostatku a nadbytku B

Příznaky nedostatku B se objevují častěji než deficiencie jiných mikroprvků. Řada symptomů deficiencie B se kryje s deficiencí Ca. V první řadě je zasažen meristém: odumírá růstový vrchol a kořenová špička. Je pozorován intenzivnější růst bočních stonků, které brzy odumírají. Často vzniká na horních listech chloróza. Rostliny slabě kvetou, květy opadávají, semeno se slabě tvoří nebo je deformované.

Pro většinu rostlin je vysoká koncentrace B toxická. Příznaky toxicity se objevují na starších listech, kde vznikají zlatožluté zabarvení. A postupným hromaděním B se chlorotické zabarvení rozlišuje a okraje listů odumírají⁵.

2.2 Rozklad vzorku

Příprava vzorku k měření je významnou součástí analytických operací. Většina používaných metod vyžaduje vzorek v kapalně formě. Smyslem úpravy vzorku je zvýšení homogenity vzorku, uvolnění analytu z různých vazeb a odstranění interferujících složek. Požadavky na úpravu vzorku se u jednotlivých metod značně liší. U některých stačí pouze odstranit vodu, u jiných si měřicí přístroj upravuje vzorek sám.

Metody lze rozdělit na destruktivní a nedestruktivní, podle toho jestli při měření vzorek spotřebovávají nebo jej nechají v původním stavu a dále použitelný. Příkladem nedestruktivní techniky je neutronová aktivační analýza (NAA), za destruktivní techniky můžeme uvést atomovou absorpční spektrometrii (AAS).

Metody rozkladu biologického materiálu se dnes dělí na tři základní skupiny. Metody rozkladu na suché cestě, metody rozkladu na mokré cestě a ostatní metody rozkladu. Volba vhodného postupu rozkladu je závislá na řadě faktorů, jako například jakou techniku máme k dispozici, typ vzorku, koncentraci analytu.

2.2.1 Metody rozkladu na suché cestě

Metody rozkladu na suché cestě patří mezi nejstarší používané techniky rozkladu organických materiálů. Definicí klasického suchého rozkladu je rozklad v otevřeném systému na vzduchu za atmosférického tlaku. Suchý rozklad lze rozdělit do dvou částí. Za prvé, vysokoteplotní suchý rozklad jako například muflová pec nebo proud plynu při vysokém tlaku a teplotě, za druhé nízkoteplotní suchý rozklad, jehož příkladem jsou radiofrekvenční plazma, mikrovlnná plazma a spojení nízké teploty a vysokého tlaku. Celý postup zahrnuje čtyři kroky, které mohou být opakovány či doplněny o pomocná činidla. Těmito základními kroky jsou: sušení, zuhelnění, zpopelnění loužení popela.

Sušení není nijak náročná metoda, lze k němu použít klasické laboratorní horkovzdušné sušárny nebo topné desky.

Pro *zuhelnatění* je potřeba vzorek vystavit teplotám mezi 200 °C a 400 °C. Jedná se o nejkritičtější krok suchého rozkladu. Při této fázi je vhodné použít muflové pece.

Při *zpopelňování* biologických materiálů jsou použity teploty 450 °C až 500 °C maximálně však 550 °C. K nárůstu teploty dochází pomalu a proces obvykle trvá 10 až 16 hodin.

Vzniklý popel *loužíme* jeho vystavením zředěným minerálním kyselinám, jako HCl a HNO₃. Účinnost loužení můžeme podpořit zahříváním, mícháním, nebo ponořením směsi do ultrazvukové lázně¹⁰.

2.2.2 Metody rozkladu na mokré cestě

Klasický mokrý rozklad je definován jako rozklad ve směsi koncentrovaných minerálních kyselin za atmosférického tlaku při zvýšené teplotě. Organický materiál je příslušnými činidly oxidován a probíhající chemické reakce nejprve naruší strukturu matrice pomocí kyselé hydrolýzy a následně jsou meziprodukty oxidovány. Rozklad lze urychlit zvýšením teploty nebo přidáním katalyzátoru. Maximální použitelná teplota při mokrému rozkladu je závislá na teplotě varu oxidačních činidel či jejich směsí. Příkladem oxidačního činidla je samotná kyselina dusičná (HNO₃) nebo směsi kyselin, například HNO₃/H₂O₂, HNO₃/H₂SO₄, HNO₃/HClO₄/H₂SO₄¹⁰.

Mokrý rozklad může probíhat v otevřeném nebo uzavřeném systému. Pro mokrý rozklad v otevřeném systému se používají klasické nádoby (kádinky, baňky). Nevýhodou otevřeného systému je velká spotřeba reakčních činidel. Mokrý rozklad v uzavřeném systému má menší spotřebu reakčních činidel, nedochází ke ztrátám těkavých prvků a významně omezuje kontaminaci z vnějších zdrojů. Pro oba systémy se používá konvenční (topné desky, lázně) nebo mikrovlnný ohřev²⁵.

Mikrovlnný ohřev pracuje na základě absorpce elektromagnetického záření v mikrovlnné oblasti (300 MHz – 300 GHz) vzorkem. V analytické chemii se používá pracovní frekvence 2450 MHz, která je optimální z hlediska absorpce energie v materiálech o různém chemickém složení. Specifické vlastnosti mikrovlnného ohřevu zajišťují vzrůst teploty pouze rozkladné směsi a vzorku. K dalším výhodám patří zkrácení doby rozkladu, úspore kyselin a energie potřebné k rozkladu²⁵.

2.2.3 Ostatní metody rozkladu

Mezi tyto metody patří netradiční způsoby, které mají své nezanedbatelné místo mezi rozklady. Příkladem lze uvést oxidační tavení, oxidace parami, redukční rozklad, rozklad halogeny, enzymový rozklad či rozklad zářením¹⁰.

2.3 Metody

Stanovení funkce a formy B vyskytujícího se v rostlinách vyžaduje přesné měření jeho koncentrace a izotopového zastoupení. Proto schopnost stanovit izotopické zastoupení a malé množství B je pro výzkum nezbytné. Ke stanovení B byla použita již řada technik od jednoduché potenciometrie až po metody využívající jaderný reaktor. Vývoj metodiky stanovení B sleduje pokrok analytické přístrojové techniky a přizpůsobuje se mu.

Nejvíce využívanými metodami stanovení B jsou, barev využívajících spektrometrie ve viditelné oblasti spektra (neboli spektrofotometrie) a v omezené míře i fluorimetrie. Věk atomové spektrometrie zahájil vývoj plamenové atomové emisní spektrometrie (OES) a atomové absorpční spektrometrie (AAS), paralelně s těmito metodami došlo k vývoji i v použití neutronové aktivační analýzy (NAA), která má zvláštní význam vzhledem ke stanovení B v neporušených biologických materiálech. Další krok a výrazné zlepšení přineslo zavedení plazmy jako ionizačního zdroje a s ním vyplývající rozvoj indukčně vázaným plazmatem (ICP) a optické emisní spektrometrie (OES). Další zlepšení úrovně detekce a přesnosti přineslo spojení kvadrupólového hmotnostního spektrometru (MS), jako detektoru, a plazmatem (ICP), jako ionizačního zdroje, do nového přístroje, ICP-MS⁴.

2.4 Molekulová absorpční spektrometrie ve viditelné oblasti spektra

Jedná se o fyzikální metodu založenou na interakci elektromagnetického záření se vzorkem. Spektrometrie patří mezi spektrální metody, což znamená, že mezi vzorkem a zářením dochází k výměně energie, v tomto případě dochází k absorpci záření. Molekulová absorpční spektrometrie ve viditelné oblasti spektra operuje v oblasti vlnových délek 380 – 800 nm^{11,13}.

2.4.1 Princip absorpční UV/VIS spektrometrie

Spektrofotometrie je metoda, pracující na principu absorpce energie záření vzorkem. Při UV/VIS spektrometrii dochází k absorpci ultrafialového a viditelného světla tzn. v oblasti 200 až 800 nm, ve vzorku dochází k excitaci valenčních elektronů molekul. Energie potřebná k excitaci valenčních elektronů se projeví jako chybějící část světelného spektra¹³.

Celkovou energii molekuly v základním stavu E_0 , ve kterém se molekula za normálních podmínek nachází, lze znázornit pomocí tří energetických sčítanců: energie elektronů E_e , energie vibrační E_v a energie rotační E_r .

$$E_0 = E_e + E_v + E_r \quad (1)$$

Dojde-li k pohlcení fotonu elektromagnetického záření v ultrafialové či viditelné oblasti přechází molekula do excitovaného stavu o energii E_1 . Tento energetický stav je nestabilní a proto molekula přechází deexcitačními procesy zpět do základního stavu. Množství potřebné energie je možno vyjádřit energií ΔE , která je rovna rozdílu energií excitovaného stavu E_1 a základního stavu E_0 .

$$\Delta E = E_1 - E_0 \quad (2)$$

Energii ΔE lze také vyjádřit pomocí energie pohlcených fotonů elektromagnetického záření, o kterých víme, že jsou vyzařovány po kvantech a jejich energii lze vyjádřit použitím Planckovy konstanty.

$$\Delta E = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda \quad (3)$$

Kde h je Planckova konstanta ($h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$), ν je frekvence, c rychlost světla ve vakuu ($c = 3 \cdot 10^8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$) a λ je vlnová délka¹².

Při interakci molekuly a viditelného záření dochází k přechodům valenčních elektronů mezi vazebnými a antivazebnými orbitály molekuly. Vazebné a antivazebné molekulové orbitály vznikají při tvorbě molekuly, lineární kombinací orbitalů původních atomů. Je zřejmé, že vazebné orbitály molekuly mají nižší energii než původní atomové orbitály a antivazebné molekulové orbitály mají energii vyšší. V molekulách mohou být také přítomny i nevazebné molekulové orbitály. Tyto nevazebné orbitály obsahují volné elektronové páry¹⁴.

2.4.2 Základní vztahy a vzorce

Transmittance a absorbance

Zeslabení elektromagnetického záření při průchodu vzorkem je kvantitativně popsáno dvěma samostatnými, ale souvisejícími jednotkami transmittancí a absorbancí.

Transmittance (propustnost)

Transmittance (T) je definována jako poměr toku elektromagnetického záření prošlého vzorkem Φ a toku záření vstupujícího do vzorku Φ_0 .

$$T = \Phi / \Phi_0 \quad (4)$$

Transmittance je bezrozměrná veličina, uvádí se v procentech. Pokud je absorpce záření nulová poté je transmittance jednotková, neboli 100%.

Absorbance

Absorbance (A) udává množství elektromagnetického záření, které bylo pohlceno vzorkem. Lze vyjádřit jako záporný dekadický logaritmus transmittance.

$$A = -\log T = \log(\Phi_0 / \Phi) \quad (5)$$

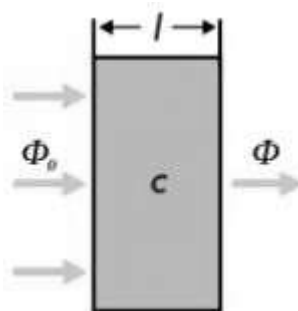
Nedochází-li k absorpci záření, to znamená, je-li absorpce nulová, je nulová i absorbance. Absorbance je bezrozměrná veličina^{11,12,13}.

Lambert-Beerův zákon

Pokud monochromatické elektromagnetické záření prochází tenkou vrstvou vzorku, dochází k úbytku záření. Snížení intenzity záření je přímo úměrné tloušťce vzorku l a koncentraci c látky absorbující elektromagnetické záření.

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c \quad (6)$$

ϵ je molární absorpční koeficient, popisující prostředí^{12,13,14}.



Obr.2 Vyjádření Lambert – Beerova zákona¹⁹.

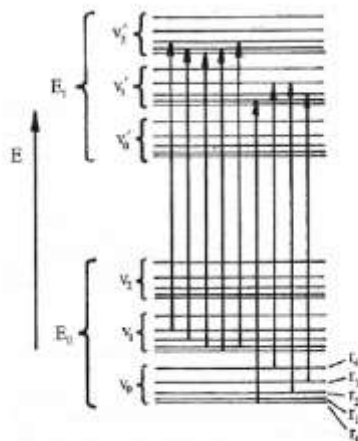
2.4.3 Elektronová absorpční spektra

Elektronové absorpční spektrum je vyjádřeno jako závislost absorbance A (či transmittance T) na vlnové délce λ (možno také použít vlnčet a frekvenci ν). Díky existenci vztahu mezi absorbancí a koncentrací lze také elektronové absorpční spektrum vyjádřit v závislosti logaritmu molárního absorpčního koeficientu na vlnové délce¹³.

Vznik elektronových absorpčních spekter

Elektronová absorpční spektra vznikají při pohlcení části energie elektromagnetického záření vzorkem. Viditelné a ultrafialové záření má dostatečnou energii pro vybuzení elektronů molekuly ze základního stavu do různých vibračních ($\nu_1, \nu_2, \nu_3, \dots$) a rotačních ($r_1, r_2, r_3, \dots$) hladin stavu excitovaného, jak je to vidět na obr.3.

Při absorpci fotonu záření dochází ke vzniku čárového spektra, v molekule je mnoho možných přechodů mezi vibračními a rotačními hladinami (každý přechod poskytuje čárové spektrum). Protože jsou tyto energetické stavy (mezi vibračními a rotačními hladinami) velmi blízké, jeví se absorpční spektrum jako pásové, při měření v plynném stavu a za nízké teploty lze někdy v absorpčním spektru pozorovat jemnou strukturu vibračních i rotačních hladin. Typ elektronového přechodu ovlivňuje polohu absorpčního pásu¹².

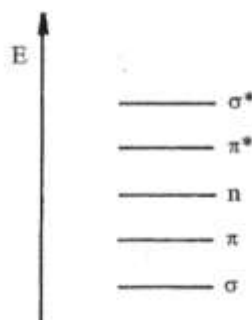


Obr.3 Schéma energetických hladin a elektronového přechodu v diatomické molekule¹².

Typy energetických přechodů v molekule

Chromogen, neboli látka absorbující záření v ultrafialové a viditelné oblasti, obsahuje funkční skupiny, nazývané chromofory, které jsou vybaveny elektrony schopné excitace. Chromogeny mívají často více chromoforů, které navzájem ovlivňují polohu a intenzitu absorpčního pásu.

Elektrony absorbující viditelné či ultrafialové záření pocházejí z vazebných molekulových orbitalů σ a π popřípadě z nevazebných orbitalů n . Při absorpci přecházejí tyto elektrony do orbitalů antivazebných σ^* a π^* (podle LCAO Hückelovy teorie). Na obrázku 4 je znázorněno pořadí molekulových orbitalů dle vzrůstající energie¹².



Obr.4 Znáznornění energetických hladin jednotlivých typů elektronů¹².

Přechody $\sigma - \sigma^*$

Těchto přechodů jsou schopné molekuly bez chromoforů, obsahující pouze jednoduché vazby C-C a C-H. Tyto vazby potřebují pro svou excitaci tak vysokou energii, že je lze pozorovat jen ve vzdálené UV oblasti. Látky s tímto typem přechodů se často používají jako rozpouštědla pro měření absorpčních spekter jiných látek.

Přechody $n - \sigma^*$

Do skupiny s tímto typem přechod spadají nasycené sloučeniny obsahující heteroatom s volným elektronovým párem (O, S, N, halogeny). Heteroatom ovlivňuje energii přechodu, ale i polohu absorpčního pásu, která závisí na elektronegativitě heteroatomu. Vyšší elektronegativita způsobuje posun absorpčního maxima ke kratším vlnovým délkám. Tyto přechody sledujeme v blízké UV oblasti.

Přechody $\pi - \pi^*$

Odpovídají molekulám obsahujícím násobné vazby např. C=C. Pokud jsou násobné vazby v konjugaci s dalšími násobnými vazbami, dochází ke konjugačnímu efektu, neboli mění se energie molekulových orbitalů a to tak, že energie nejvyššího obsazeného orbitalu se zvýší a energie nejnižšího neobsazeného orbitalu se sníží. Zároveň při konjugaci dochází k posunu maxima absorpčního pásu k delším vlnovým délkám. To je nazýváno bathochromní posun (opačný proces se nazývá hypsochromní posun). Zároveň dochází i ke zvýšení jeho intenzity – hyperchromní posun (opakem je hypochromní posun). Díky těmto posunům se absorpční pásy látek s těmito přechody projeví až ve viditelné oblasti.

Přechody $n - \pi^*$

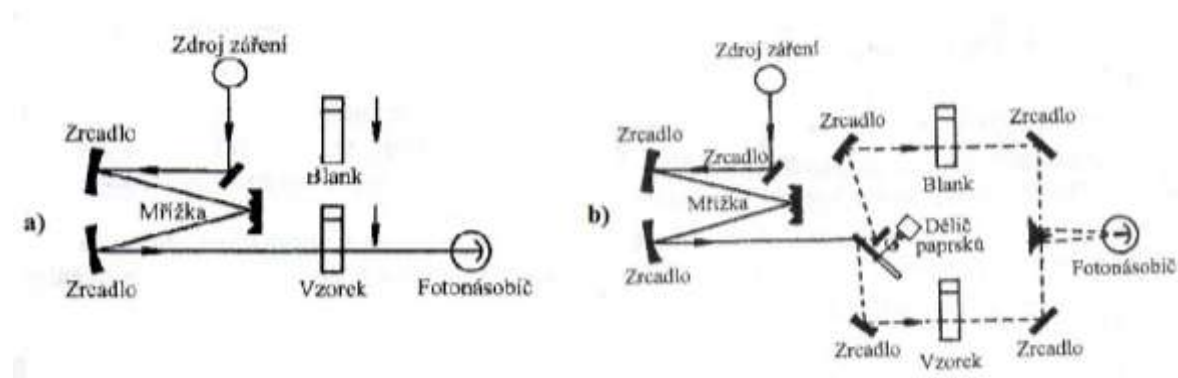
Pokud jsou v molekule přítomny nejen násobné vazby, ale i atomy s volným elektronovým párem podílející se na násobných vazbách, například $C=O$, $C=S$, $N=S$, apod. dochází k $n - \pi^*$ přechodům, kde jsou poloha absorpčního pásu a hodnota ϵ značně ovlivňovány přítomností a druhem atomu s volným elektronovým párem. V porovnání s $\pi - \pi^*$ jsou $n - \pi^*$ přechody méně intenzivní^{12,13}.

2.4.4 Instrumentace

Spektrometry používané pro molekulovou absorpční UV/VIS spektrometrii obsahují základní části, které jsou pro většinu spektrometrických metod podobné a mají obdobný účel. Takovými částmi jsou zdroj záření, disperzní soustava, pomocné optické prvky, zařízení pro umístění vzorku, detektor záření a výstupní zpracování signálu (nejčastěji PC).

Další možnou specifikací pro UV/VIS spektrometry je nabídka dvojího uspořádání konstrukce. Jedná se o jednopaprskové či dvoupaprskové uspořádání. Obě tyto varianty můžeme vidět na obrázku 5.

Dvoupaprskové uspořádání je efektivnější z hlediska možnosti neustálého porovnávání vzorku s blankem, neboli matricí vzorku (to jsou všechny složky vzorku bez měřeného analytu)^{11,12,13}.



Obr.5 Schématické znázornění a) jednopaprskového a b) dvoupaprskového uspořádání přístroje¹².

Zdroj záření

Jedná se o část přístrojového zařízení, které emituje časově stálé a dostatečně intenzivní záření. Toto záření umožňuje excitaci vzorku. V UV/VIS spektrometrii lze využít tři typy těchto zdrojů. Rozžhavené tuhé látky (žárovky), výbojky a lasery. Každý zdroj záření má své výhody i protiklady.

Mezi *žárovky* použitelné pro viditelnou oblast patří wolframová žárovka (320 – 2400 nm) s drátem rozžhaveným na $T \approx 2500$ K, lze použít halogenové žárovky. Oba tato zdroje vydávají spojité spektrum.

Principem *výbojek* je emise záření z atomů plynů, které jsou excitovány proudem elektronů mezi dvěma elektrodami. Nejčastěji se pro viditelnou oblast používají vysokotlaké výbojky naplněné inertním plynem (Xe, Ar), nebo nízkotlaká intenzivní rtuťová výbojka, poskytující čárové spektrum.

Zajímavým, ale již méně používaným zdrojem záření jsou lasery, které využívají vynucené emise fotonů atomy a molekulami^{12,13}.

Disperzní soustava a pomocná optika

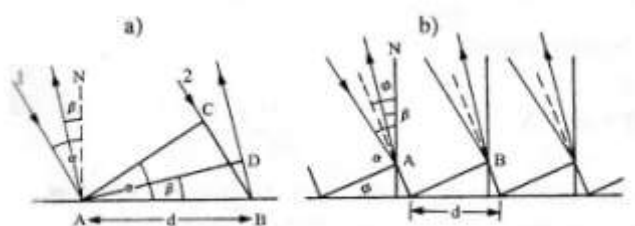
Disperzní soustava zahrnuje optickou část přístrojů, která slouží k separaci požadované vlnové délky. Mezi tato optická zařízení řadíme filtry a monochromátory.

Filtry jsou nejjednodušší zařízení vhodná pro výběr úzkého rozsahu vlnové délky. Filtry lze řadit do dvou skupin dle využívajících vlastností.

Častěji se pro výběr vlnové délky používají *monochromátory*. Zařízení, která pomocí vstupní štěrby, disperzního prvku a výstupní štěrby mohou být efektivně použita pro výběr jedné vlnové délky, ale také pro měření širokého rozsahu spektra. Jako disperzní prvky jsou využívány hranoly a mřížky nebo jejich spojení.

Dnes již méně používané *hranoly* rozkládají polychromatické záření na monochromatické paprsky na principu lomu světla při jeho průchodem hranolem. Sledovaná oblast vlnových délek určuje nejvhodnější materiál použitý pro hranol. Pro oblast 360 – 2200 nm je vhodné korundové, flintové sklo nebo chlorid sodný pro spektrální oblast 200 – 2500 nm^{11,12,13}.

Difrakční odrazová *mřížka* je destička nebo zrcadlo rovnoměrně pokryté řadou rovnoběžných vrypů. Počet vrypů na mřížce se stanovuje podle spektrální oblasti, pro kterou je mřížka určena. Pro viditelnou oblast se počet vrypů pohybuje mezi 600 až 2400 vrypů na 1 mm mřížky. Principem výběru vlnové délky je odraz a ohyb paprsků.



Obr. 6 Mřížky a) difrakce na mřížce b) odrazová mřížka¹².

Pomocná optika je souhrnný název pro jiné optické komponenty, které slouží k vedení či zaostřování paprsku. Jako příklad zde můžeme uvést různé typy čoček, zrcadel, odrazových hranolů apod¹².

Umístění vzorku

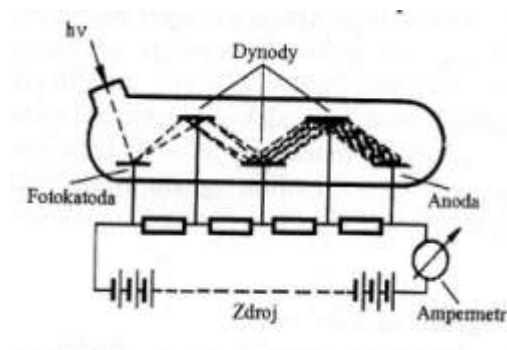
Absorbující prostředí či *kyvetový prostor* jsou názvy pro část spektrometru určenou pro umístění vzorku. Vzorek je umístěn do kyvet, které se následně vkládají do určeného prostoru.

Kyvety mají standardní vnitřní tloušťku absorbující vrstvy od 0,1 do 10 cm. Pro běžná měření se nejčastěji užívá kyveta o tloušťce 1 cm. Rozhodující pro výběr kyvety je materiál, z kterého je vyrobena. Kyvety nesmí absorbovat v sledovaném vlnovém rozsahu. Pro viditelnou oblast jsou dostačující kyvety ze skla nebo plastu¹².

Detektor elektromagnetického záření

Detektory elektromagnetického záření slouží k zachycení intenzity záření. Obsahují čidlo, které zachycuje a převádí energii záření na jinou formu energie, nejčastěji elektrickou. Detektory jsou také doplněny zesilovači a jinými přístroji na úpravu signálu. Ve viditelné oblasti spektra jsou nejvíce používanými detektory fotoelektrické články, jako jsou fotonka, fotonásobič a fotodiody. Fotoelektrické články pracují na principu vnějšího i vnitřního fotoelektrického jevu.

Fotonásobič je zástupcem detektoru pracujícího na principu vnějšího fotoelektrického jevu. Fotony dopadají na fotokatodu v evakuované baňce a vyřazují z ní elektrony, které putují přes soustavu dynod k anodě. Elektrony jsou urychleny vloženým elektrickým polem a násobeny dopadem na dynodu, ze které urychlený elektron vyrazí několik sekundárních elektronů. Tímto způsobem je počet elektronů znásoben o 6 – 7 řádů^{11,12,13}.



Obr.7 Fotonásobič¹².

Polovodičové fotoelektrické články neboli *fotodiody* jsou příkladem detektoru, který využívá vnitřní fotoelektrický jev. Vnitřní fotoelektrický jev je obdobou vnějšího fotoelektrického jevu s rozdílem, že dopadající záření uvolňuje elektrony, které zůstávají uvnitř materiálu polovodiče. Volné elektrony v polovodiči umožňují vést elektrický proud, který je následně měřený¹².

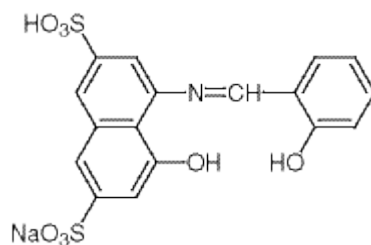
Diodové pole je seskupení stovek až tisíců jednoduchých fotodiod. Jsou schopny snímat celé spektrum v reálném čase¹³.

2.4.5 Měření boru

Spektrometrická metoda využívá specifické reakce B se sloučeninami, při kterých dochází k vytvoření barevné sloučeniny. K tomuto účelu se používá více organických barviv, jako kurkumin, karmín, nejpoužívanějším je však azomethin-H^{4,16}.

Metoda s použitím azomethinu-H

Při kondenzační reakci kyseliny 8-amino-naft-1-ol-3,6-disulfonové (H-kyseliny) a salicylaldehydu vzniká, za přítomnosti boritanů, produkt azomethin-H. Tento žlutý komplex je vhodný pro použití k spektroskopickému měření s absorpčním maximem v rozsahu vlnových délek mezi 410 a 420 nm¹⁶.



Obr.8 Struktura azomethinu-H²⁰.

Při stanovení B pomocí použití azomethinu-H je pH důležitá hodnota pro formování azomethinu-H a s tím související barevný vývoj. Stanovení ve vodných roztocích projevovaly tendenci, se zvyšujícím se pH klesající dobu potřebnou ke kvantitativní reakci a vývoji azomethinu-H. Použitelná pH se pohybují v rozmezí mezi 4,3 a 7,8. K těmto hodnotám se vztahuje rozmezí reakční doby od 2 minut po 2 hodiny.

Dalším významným efektem při měření se stala teplota vzorku, která ovlivňuje citlivost reakce. Ideální teplotou je rozmezí mezi 20 a 25 °C. Při zvýšení teploty vzorku na 40 °C klesá citlivost metody o 22 %.

Nejvyšší interferenční vliv přítomnosti jiných iontů ve vzorku byl prokázán za přítomnosti Cu²⁺, Zn²⁺ a Fe²⁺. Tento vliv je však snadno redukován přidáním EDTA. Pro redukci dalších iontů, jako jsou chloridy a bromidy, používané pro dezinfekci vody, lze ke vzorku přidat malé množství redukčního činidla, například thiosíran¹⁵.

2.5 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

ICP-MS je technika využívající spojení dvou moderních metod. Vysokoteplotní ICP (indukčně vázané plazma), které zajišťuje odpaření a ionizaci vzorku a hmotnostní spektrometrie, pomocí které jsou ionty v plynné fázi separovány podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Toto spojení činí tuto techniku ideální pro rychlé stanovování velmi nízkých koncentrací většiny prvků, přesněji jejich izotopů.

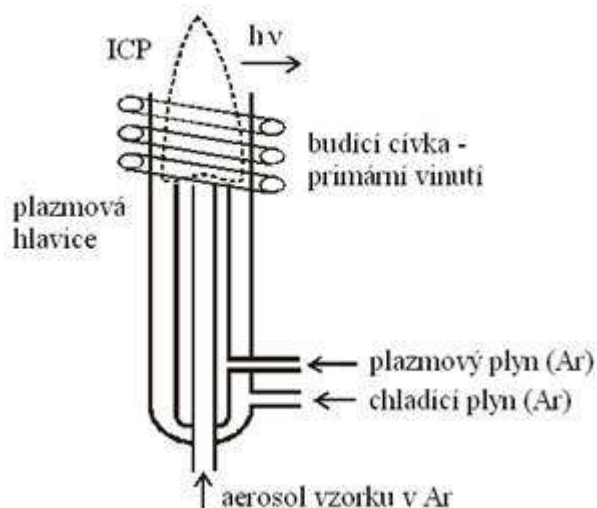
2.5.1 Princip ICP-MS

Odpařený pevný vzorek nebo kapalný vzorek ve formě aerosolu je vpraven do plazmatu, kde je atomizován a ionizován. Ionty dále postupují přes prostor s iontovou optikou do analyzátoru, kde jsou děleny dle poměru hmotnosti iontu ku náboji iontu (m/z). Ionty o vybraném poměru m/z míří k detektoru, kde vybudí signál, který je zesílen a elektronicky zpracován²².

Princip ICP výboje

V definici je plazma popisováno jako ionizovaný, makroskopický neutrální plyn, ve kterém volné elektrony a ionty vykazují „kolektivní“ chování. Do této charakteristiky jsou zahrnovány pohyby částic, které závisí nejen na místních podmínkách, ale i na podmínkách plazmatu v odlehlých oblastech.

K vytvoření a udržení ICP výboje je potřeba dodávat energii z vnějšího zdroje, kterým bývá vysokofrekvenční elektromagnetické pole indukční cívky plazmového generátoru. K iniciaci výboje je používán vysokofrekvenční jiskrový výboj z Teslova transformátoru. Vzniklé elektrony jsou urychlovány pomocí vysokofrekvenčního elektromagnetického pole a mají-li dostatečnou kinetickou energii, způsobují další, lavinovitou ionizaci pracovního plynu. Plazma je ohraničeno plazmovou hlavicí (viz. Obr. 9), skrz kterou proudí tři toky pracovního plynu. Jako pracovní plyn se nejčastěji používá argon²¹.



Obr. 9 Plazmová hlavice²⁶.

2.5.2 Instrumentace ICP-MS

I přes název a zařazení nepatří hmotnostní spektrometrie mezi optické metody, protože v principu nevyužívá interakce mezi vzorkem a elektromagnetickým zářením. Je založena na separaci iontů vzorku podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Proto zde nenalezneme žádnou instrumentální podobnost s již zmíněnou molekulovou absorpční spektrometrií ve viditelné oblasti spektra²².

Základními činnostmi ICP-MS přístroje jsou: dávkování vzorku, odpaření vzorku, ionizace, separace iontů a detekce iontů¹³.

Dávkování vzorku

Přidruženou funkcí dávkovacího systému je vytváření z kapalného vzorku jemný aerosol. Tvorba aerosolu je zajištěna pomocí zmlžovače, následnou selekci kapek provádí mlžná komora. Principem *zmlžovače* je využití kontaktu kapaliny s rychle proudícím pracovním plynem, díky němuž je kapalina roztržena na drobné kapičky. Funkcí *mlžné komory* je odstranění velkých kapek. Asi jen 2% z původního objemu vzorku jsou přivedeny do ICP.

ICP

V prostoru indukčně vázaného plazmatu dochází k odpaření, atomizaci a ionizaci vzorku.

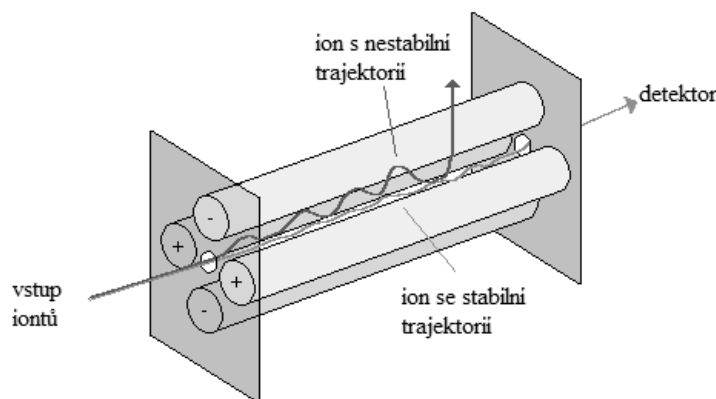
Meziprostor ICP-MS

Propojení mezi plazmatem s atmosférickým tlakem a prostorem s vysokým vakuem ve spektrometru je tvořeno expanzní komorou s dvěma kónusy s velmi malými otvory, pro postupné vyrovnávání tlaku.

Analyzátor iontů

Pro separaci jednotlivých iontů existuje několik typů analyzátorů. Na příklad průletové (TOF-MS) a statické sektorové (SF-MS, HR-MS) analyzátory s vysokým rozlišením. Nejčastěji je však používán kvadrupólový analyzátor (Q-MS) s nižší rozlišovací schopností.

Kvadrupólový analyzátor tvoří čtyři kovové tyče, které oscilací elektromagnetického pole umožňují pohyb iontů směrem k detektoru. Kvadrupól pracuje jako filtr, který propouští jen ionty o určitém poměru m/z . Výběr m/z iontů propuštěných přes kvadrupól je lineárně závislý na elektrickém potenciálu elektrod²².



Obr.10 Princip funkce kvadrupólového analyzátoru²³.

Detektor

V oblasti volby detektoru existuje velký výběr. Nejčastěji je však používaným detektorem vícekanálový elektronový násobič. Dopadem měřených iontů poskytuje signál, který je schopen 10^4 až 10^8 krát znásobit. Zesilování signálu je způsobováno vypuzováním sekundárních elektronů na elektrodě²².

2.5.3 Interference v ICP-MS

Základním předpokladem prvkové analýzy pomocí ICP-MS je zajištění stanovení pouze iontů požadovaného prvku. To je však ztíženo existencí spektrálních a nespektrálních interferencí.

Spektrální interference

Spektrální interference jsou způsobeny výskytem iontů, které mají velmi podobnou hmotnost jako analyt. Spektrální interference se vyskytují jako izobarické překryvy a polyatomické (molekulové) částice.

Izobarické interference se vyskytují, jsou-li přítomny částice o stejném m/z jako má analyt, příkladem mohou být izotopy některých kovů.

Častější je výskyt *polyatomických částic*, kdy dochází ke kombinaci různých atomů (z rozpouštědla, matrice, ...) a vzniku částice s hmotností stejnou jako u analytu.

Nespektrální interference

Zahrnují vliv matrice na chování analytu. Příkladem jsou ovlivnění transportu a zmlžování vzorku, efekty ovlivňující ionizaci či matricí vyvolané změny při stanovení.

Eliminace interferencí

K eliminaci nespektrálních interferencí se nejčastěji používá metoda vnitřního standardu. Vnitřní standard se volí podle hmotnosti co nejbližší k hmotnosti analytu. U spektrálních interferencí se k jejich eliminaci nejčastěji používají matematické korekce (u izobarických interferencí) nebo kolizní/reakční cely (při vzniku polyatomických částic).

Kolizní cely ke snížení interferencí využívají principu přítomnosti inertního plynu (He, Ne, Ar), který pomocí kolizí s interferujícími molekulami snižuje jejich kinetickou energii. Interferující částice většinou mají větší velikost než analyt, proto jsou u nich kolize pravděpodobnější.

Reakční cely pracuje s velmi reaktivními plyny (H_2 , CH_4 , NH_3 , ...), které reagují s interferujícími částicemi a tím vznikají částice s odlišnou hmotností od analytu nebo částice neutrální.

2.5.4 Měření boru

Výhodou ICP-MS metody jsou vyšší citlivost, nižší detekční limity a schopnost současně měřit koncentraci jednotlivých izotopů B (^{10}B , ^{11}B)²⁴.

3. Experimentální část

3.1 Rozklad vzorků

3.1.1 Chemikálie

Stanovení B v rostlinném materiálu bylo prováděno ve vzorcích sušeného *Arabidopsis thaliana* (huseníčku rolního), které poskytla Laboratoř růstových regulátorů UP Olomouc.

Chemikálie pro rozklad vzorků

- kyselina dusičná (67%) - HNO_3
(čistota analpure, Analytika, spol. s.r.o., Praha, ČR)
- peroxid vodíku (30%) - H_2O_2
(čistota p.a., Analytika, spol. s.r.o., Praha, ČR)

3.1.2 Přístrojové vybavení

Všechny chemikálie a vzorky byly váženy na elektronických analytických vahách značky KERN 770/GS/GJ, Max 220 g, $d=0,0001$ g (Kern & Sohn GmbH, Německo).

Pro rozklady vzorků byly použity následující mikrovlnné mineralizátory. Jednomístný Uniclever II (Plazmatronika, Polsko) a šestimístný MLS 1200 Mega (Milsestone, Itálie). U mikrovlnných mineralizátorů byly použity následující mineralizační programy, které byly zvoleny podle návodu výrobce pro rostlinné materiály.

Uniclever II:

- | | | |
|----|---------|-------|
| 1. | 2 min. | 70 % |
| | 30s | 0 % |
| 2. | 2 min. | 90 % |
| | 30s | 0 % |
| 3. | 10 min. | 100 % |

MLS 1200 Mega:

- | | | |
|----|--------|------|
| 1. | 1 min. | 250W |
| 2. | 2 min. | 0W |
| 3. | 5 min. | 250W |
| 4. | 5 min. | 400W |
| 5. | 1 min. | 0W |
| 6. | 7 min. | 600W |

3.1.3 Optimalizace rozkladu

Optimalizace rozkladu

Před zahájením mikrovlnných rozkladů, byl na základě doporučení z literatury odzkoušen rozklad pouze za přítomnosti kyseliny HNO_3 a směsi kyselin HNO_3 a H_2O_2 v poměru 3:1. Takto připravené směsi byly ponechány v digestoři po 24 hodin.

Optimalizace rozkladné směsi

Při rozkladech byla použita směs $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$, nebo samotná HNO_3 . Při měření byly zkoumány rozdíly mezi vzorky rozkládanými jednou či druhou směsí.

3.1.4 Rozklad vzorků pro spektrometrické měření

Sušené rostlinky byly nejdříve homogenizovány v třecí misce. Homogenizovaná hmota byla navážena do připravených teflonových rozkladných kelímků. Navážky se pohybovaly okolo 0,25 g vzorku. Při rozkladech byl také připravován slepý vzorek (blank) a roztok CRM, jehož navážky se pohybovaly okolo 0,15 g. Minerální rozklad vzorků, blanku a CRM byl prováděn se 4 ml směsi HNO_3 a H_2O_2 v poměru 3:1. Při rozkladech byl použit mikrovlnný mineralizátor Uniclever II. Po rozkladu byly vzorky kvantitativně převedeny do polypropylenových odměrných baněk o objemu 25 ml. Mezi jednotlivými rozklady byl vždy proveden čistící krok teflonových kelímků.

3.1.5 Rozklad vzorků pro ICP-MS

Sušené rostlinky byly dodávány po jednotlivých vzorcích o hmotnostech mezi 0,1 – 0,01g. Vzorky byly jednorázově rozkládány v šestimístném mikrovlnném mineralizátoru MLS 1200 Mega. Do mineralizátoru byly umístěny čtyři vzorky, jeden slepý vzorek a jeden CRM BCR – 679 o hmotnosti okolo 0,15 g. Ke každému vzorku byly přidány 4 ml HNO_3 . Po rozkladu byly vzorky kvantitativně převedeny do polypropylenových odměrných baněk. Mezi jednotlivými rozklady vzorků, byl pokaždé proveden čistící krok.

3.2 Spektrofotometrické měření

3.2.1 Chemikálie

Chemikálie pro přípravu tlumivých roztoků

- octan amonný – $\text{CH}_3\text{COONH}_4$
(LACH – NER, Neratovice, ČR)
- kyselina octová (99 %) – CH_3COOH
(čistota p.a., LACH – NER, Neratovice, ČR)
- kyselina etylendiamintetraoctová – EDTA
(LACH – NER, Neratovice, ČR)
- kyselina fosforečná (85 %) – H_3PO_4
(čistota p.a., LACH – NER, Neratovice, ČR)
- hydroxid sodný – NaOH
(čistota p.a., LACH – NER, Neratovice, ČR)

Reakční roztok azomethinu-H

- azomethin-H
(čistota p.a., MERCK, Germany)
- kyselina askorbová
(LACH – NER, Neratovice, ČR)

Chemikálie pro přípravu standardů

- certifikovaný referenční materiál – vodný kalibrační roztok bor
(koncentrace 1g/l, Analytika, spol. s.r.o., Praha, ČR)

Chemikálie pro ověřování správnosti měření

- CRM BCR – 679 zelí bílé
(IRMM, Belgie)

3.2.2 Přístrojové vybavení

Všechny chemikálie a vzorky byly váženy na elektronických analytických vahách značky KERN 770/GS/GJ, Max 220 g, d=0,0001 g (Kern & Sohn GmbH, Německo).

Při přípravě tlumivých roztoků byl použit pH-metr inoLab 720 s kombinovanou skleněnou elektrodou SenTix 21 (WTW, Německo).

Spektrofotometrické měření stanovení koncentrace boru, bylo prováděno při 420 nm, na UV/VIS spektrometru Lambda 25 (Perkin Elmer, USA) v plastových kyvetách o tloušťce 1 cm. Naměřená data byla zpracována pomocí software UV Winlab a následně byl použit program MS Excel.

3.2.3 Příprava roztoků

Tlumivé roztoky

Pro přípravu acetátového pufru o pH = 6, které bylo stanoveno na pH metru, bylo smíseno 25 g octanu amonného, 1,5 g EDTA, 12,5 ml kyseliny octové a 40 ml destilované vody.

Příprava fosfátového tlumivého roztoku o pH = 7 probíhala pomocí titrace, kdy 0,1 mol/l kyselina fosforečná byla titrována 50 % roztokem hydroxidu sodného na pH metru.

Následným dotitrováním tlumivého roztoku o pH = 7 byl připraven i fosfátový tlumivý roztok o pH = 9.

Pracovní roztok azomethinu-H

Pracovní roztok azomethinu-H byl připraven rozpuštěním 0,45 g azomethinu-H v 100 ml 1 % kyselině askorbové.

Příprava kalibrační křivky

Pro přípravu kalibrační křivky byly připraveny standardní roztoky o koncentracích 0,5; 1; 2; 3; 5; 10 mg/l. Tyto standardní roztoky byly připravovány ze standardního roztoku H_3BO_3 o koncentraci B 1 g/l. Při postupném ředění byla použita destilovaná voda.

3.2.4 Optimalizace metody

Volba vhodného pH^{7, 19}

Před samotným měřením bylo potřeba dostatečně upravit pH vzorků, které byly po rozkladu značně kyselé (pH = 2,5). Proto bylo použito několik tlumivých roztoků, pomocí kterých bylo pH vzorku zvýšeno. Optimalizace hodnoty pH byla kontrolována měřením CRM pomocí UV/VIS spektrometru a následným výpočtem koncentrace.

Optimalizace měřené vlnové délky

Pro získání správných dat z měření bylo potřeba zjistit vhodnou vlnovou délku pro spektrofotometrické měření. To bylo provedeno proměřením absorpčních spekter v rozsahu 390 až 500 nm.

3.2.5 Pracovní postup

Příprava měřícího roztoku

Před zahájením vlastního měření je důležitá příprava měřícího roztoku, který byl připravován přímo v kyvetách. V kyvetě bylo smícháno 1 ml acetátového pufru, 1 ml roztoku azomethinu-H a 0,5 ml rozloženého vzorku. Pro dostatečný průběh reakce byla směs v kyvetách ponechána za občasného promíchání 30 minut.

Postup měření

Po uplynutí reakční doby byly vzorky postupně proměřovány na UV/VIS spektrometru při 420 nm. Poskytované hodnoty absorbancí byly vyhodnocovány pomocí metody kalibrační křivky. Nejprve byla proměřována kalibrace, podle které byla následně naměřená data vyhodnocována. Následně byly proměřovány připravené vzorky se slepým vzorkem pro odstranění šumu.

3.3 ICP-MS měření

3.3.1 Chemikálie

Chemikálie pro přípravu standardů

- certifikovaný referenční materiál – vodný kalibrační roztok bor (koncentrace 1g/l, Analytika, spol. s.r.o., Praha, ČR)

Kalibrační roztok pro ICP – MS

- INT – MIX 1: Bi, In, Sc, Th, Y (koncentrace každého $10 \pm 0,1$ mg/l, Analytika, spol. s.r.o., Praha, ČR)

Chemikálie pro ověřování správnosti měření

- CRM BCR – 679 zelí bílé (IRMM, Belgie)

3.3.2 Přístrojové vybavení

Všechny chemikálie a vzorky byly váženy na elektronických analytických vahách značky KERN 770/GS/GJ, Max 220 g, $d=0,0001$ g (Kern & Sohn GmbH, Německo).

Měření bylo prováděno na ICP-MS spektrometru Agilent 7700x Series (Agilent, USA) vybaveným mikrokoncentrickým zmlžovačem GE Micromist, chlazenou Scottovou mlžnou komorou, niklovými kónusy a kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem.

3.3.3 Příprava roztoků

Standardní kalibrační roztoky

Standardní roztok kyseliny borité o koncentraci B 1 g/l byl použit pro přípravu kalibrační řady o koncentracích 0,01; 0,1; 1; 10 mg/l. Roztoky kalibrační řady byly získány postupným ředěním destilovanou vodou.

3.3.4 Pracovní postup

Jelikož se jedná o metodu stanovování prvků pomocí atomizace, není před měřením potřeba upravovat pH vzorku, ani jiné vlastnosti vzorku.

Po nastavení ICP-MS přístroje byly do přístroje dle návodu vloženy kalibrační roztoky a vzorky. Měření bylo nastaveno na měření izotopu ^{10}B a ^{11}B s vnitřním standardem ^{45}Sc .

4. Výsledky a diskuze

4.1 Rozklad vzorků

4.1.1 Optimalizace

Při ponechání vzorků se směsí kyselin po 24 hodin nedošlo k dostatečnému rozkladu a v roztoku zůstaly kousky nerozloženého biologického materiálu, proto byl tento postup zamítnut. Tento postup byl vyzkoušen na základě doporučení dostupné literatury k podobnému tématu.

Při použití mikrovlnného mineralizátoru nebyla mezi použitím HNO_3 a směsí $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ pozorována odlišnost. Odlišnost se neprojevila ani při proměrování vzorků.

4.2 Stanovení pomocí spektrofotometrické metody

4.2.1 Optimalizace

Optimalizace výběru pH

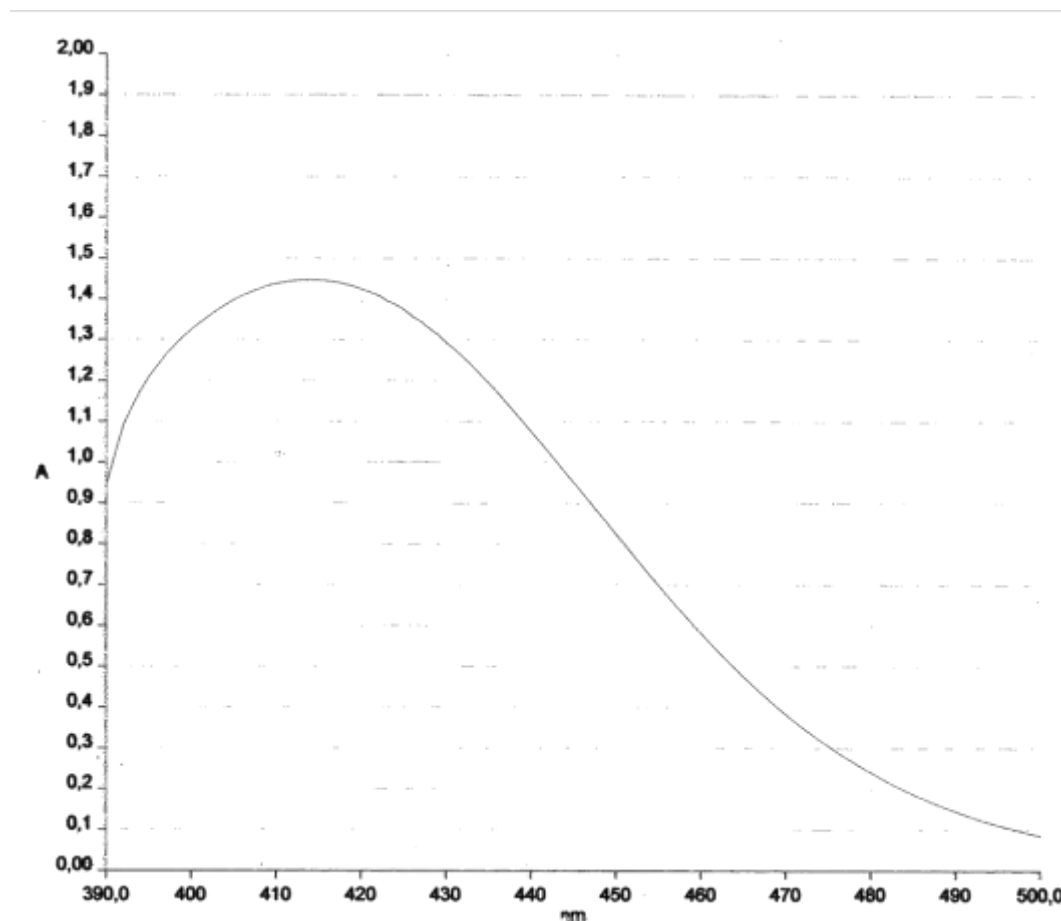
Z hodnot spektrofotometrického měření absorbancí CRM vyplývá, že při přílišném zvýšení pH se ztrácí intenzita sledovaného absorpčního maxima a vypočtené koncentrace CRM se snižují. Respektive pro 30 minutovou reakční dobu je nejvhodnější u těchto vzorků použití acetátového tlumivého roztoku. Proto se vyloučilo další použití fosfátových tlumivých roztoků.

pH pufru	Vzorek	Navážka (g)	Absorbance	Koncentrace (mg/kg)
6	CRM	0,5090	0,1446	28,49
		0,4253	0,1249	26,00
7	CRM	0,4085	0,0608	23,50
		0,5420	0,1004	21,06
9	CRM	0,5420	0,0827	14,07
		0,4122	0,0583	13,65

Tabulka 1. Výběr vhodného tlumivého roztoku.

Optimalizace měřené vlnové délky

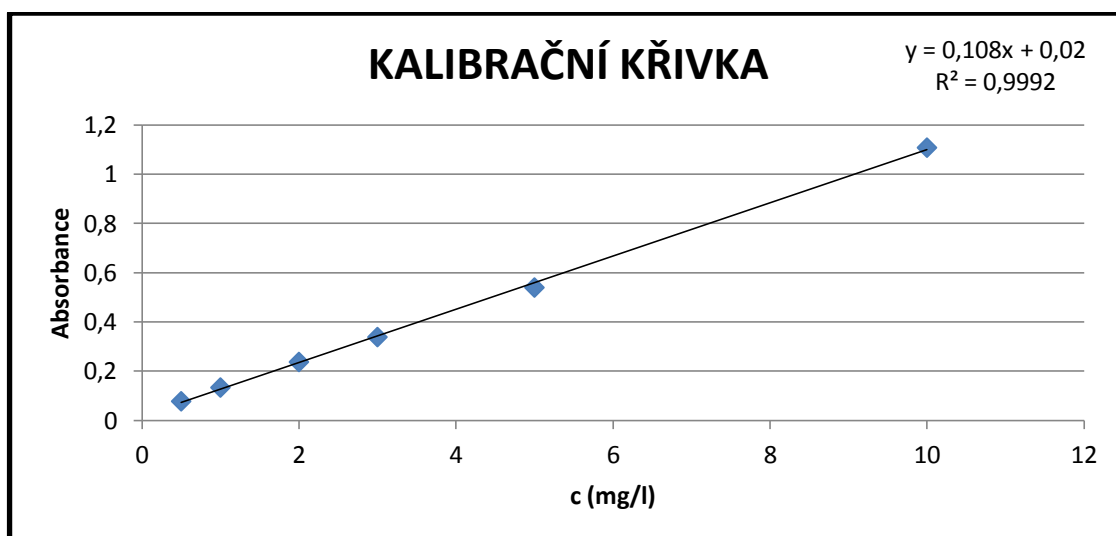
Pro výběr nejvhodnější vlnové délky použité při měření bylo změřeno absorpční spektrum v oblasti 390 až 500 nm, kde se absorpční maximum nalézá v 420 nm.



Obr. 11. Absorpční spektrum komplexu s B.

4.2.2 Souhrn naměřených dat

Naměřená data byla vyhodnocována metodou kalibrační křivky. Tato kalibrační křivka byla použita pro vyhodnocování dat CRM.



Obr. 12 Příklad kalibrační křivky standardních roztoků.

Data získána spektrofotometrií byla přepočítána na koncentraci B v rostlinném materiálu a jsou v tabulce 2. Koncentrace v mg/l byla vypočítána z kalibrační křivky a výpočtem zahrnujícím ředění a navážku byla získána koncentrace B v mg/kg.

Vzorek	Navážka (g)	Koncentrace (mg/l)	Koncentrace (mg/kg)
1	0,154	0,668	43,62
	0,147	0,859	58,66
	0,436	2,091	47,99
	0,302	1,537	51,06
2	0,112	0,613	135,92
	0,163	2,236	137,59
3	0,233	0,277	10,72
	0,164	0,445	13,70
4	0,147	2,444	49,59
	0,201	0,995	49,83
	0,142	0,927	44,43
	0,157	0,731	46,59
CRM	0,202	1,325	24,81
	0,117	0,429	36,26
	0,230	1,085	26,09
	0,263	0,355	31,36
	0,501	1,769	23,77
	0,259	0,571	33,72

Tabulka 2. Souhrn výsledků ze spektrofotometrické metody.

V tabulce 3 jsou uvedeny průměrné hodnoty koncentrací boru v jednotlivých vzorcích a jejich směrodatné odchylky.

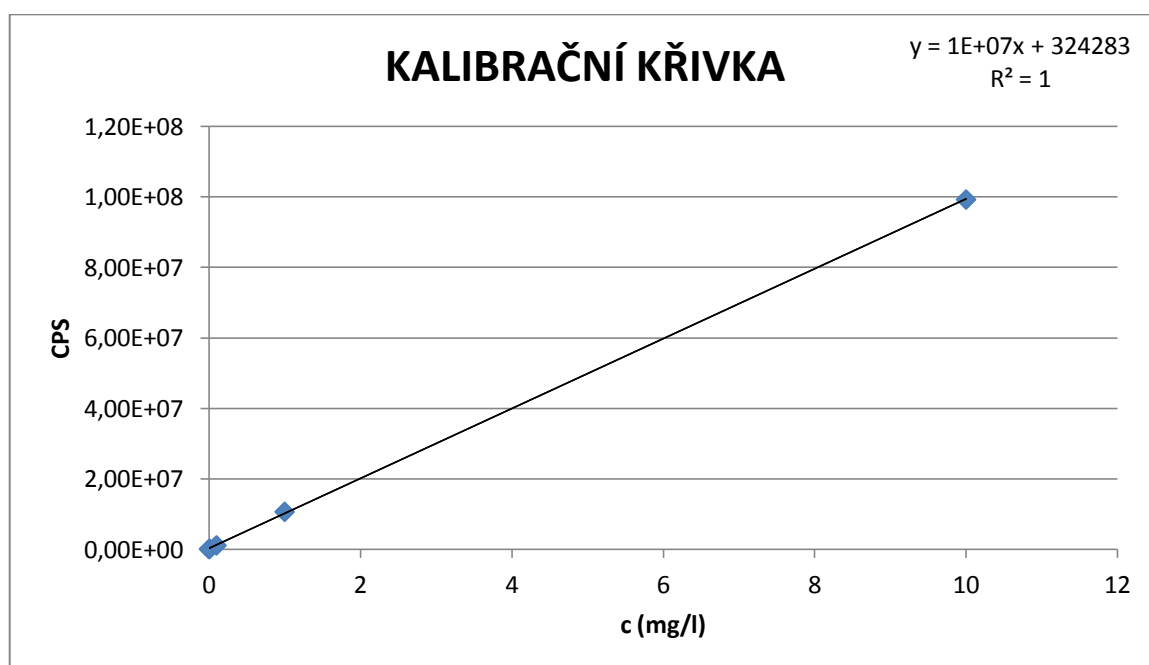
Vzorek	$\bar{x}$ (mg/kg)	s (mg/kg)
1	50,33	6,34
2	136,76	1,18
3	12,21	2,11
4	47,61	2,58
CRM	29,33	5,16

Tabulka 3. Průměrné hodnoty koncentrací vzorků a jejich směrodatné odchylky.

4.3 ICP-MS

4.3.1 Souhrn naměřených výsledků

Naměřená data pomocí ICP-MS byl vyhodnocována metodou kalibrační křivky. Kalibrační křivka je závislost počtu dopadených částic na detektor za sekundu (CPS) a koncentrace standardů. Příklad kalibrační křivky je uveden na obrázku 12.



Obr. 13 Kalibrační křivka pro měření na ICP-MS.

V tabulce 4 jsou shrnuta data poskytnuta ICP–MS pro izotop ^{11}B a hodnoty koncentrace B v mg na kg rostlinného materiálu z nich vypočítané. Při výpočtu koncentrace B v mg/kg bylo postupováno obdobně jako u spektrofotometrické metody. Vzorky byly proměřovány ve třech opakováních, ze kterých byly získány hodnoty RSD.

Vzorek	Navážka (g)	Koncentrace (mg/l)	RSD (%)	Koncentrace (mg/kg)
1	0,077	0,037	1,5	4,76
2	0,118	0,172	1,1	15,14
3	0,057	1,039	1,0	181,72
4	0,071	0,897	0,8	126,56
5	0,135	16,277	1,2	1202,16
6	0,094	11,388	0,4	1212,80
7	0,070	0,884	1,3	126,32
8	0,052	0,694	1,8	134,55
9	0,046	3,972	1,1	882,63
10	0,101	0,908	0,7	89,85
11	0,099	0,886	0,7	89,48
12	0,059	27,745	1,1	4678,76
13	0,039	13,874	1,2	3584,92
14	0,014	0,967	1,2	1726,79
15	0,053	6,824	4	1297,28
16	0,033	10,559	1,1	3219,06
17	0,050	0,145	3,5	72,50
18	0,062	0,212	1,1	85,48
19	0,036	1,547	1,3	1074,31
20	0,019	2,290	0,5	3013,16
21	0,011	2,425	1,2	5511,36
22	0,016	2,574	1,3	4021,88
23	0,024	3,724	1,5	3873,17
CRM	0,161	0,169	1,4	26,24
	0,185	0,206	1,2	27,83
	0,158	0,152	1,7	24,05
	0,204	0,687	1,4	33,67

Tabulka 4. Souhrn ICP-MS výsledků.

4.4 Porovnání metod

Tabulka 5 uvádí vybrané validační parametry obou použitých metod, které vycházejí z opakovaných stanovení B v CRM BCR – 679 s certifikovanou koncentrací $27,7 \pm 1,9$ mg/kg.

Validační parametr	Spektrofotometr	ICP - MS
Pravdivost ($\bar{x}_{\text{CRM}}$, mg/kg)	29,3	27,9
Vychýlení (%)	5,5	0,7
Preciznost (opakovatelnost, RSD, %)	18	14
Mez detekce („3s“, mg/kg)	3	0,4

Tabulka 5. Srovnání validačních parametrů pro jednotlivé metody.

5. Závěr

V předložené práci jsou shrnuty základní funkce B v rostlinném materiálu jeho vliv na vývoj rostliny, ale především je poskytnut náhled do metodiky stanovení B s podrobným přehledem principu a instrumentace dvou metod, molekulové absorpční spektrometrie ve viditelné oblasti spektra a hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. Tyto metody byly použity pro měření dodaných rostlinných vzorků a CRM BCR – 679 zelí bílé. Naměřené hodnoty byly převedeny na jednotnou veličinu vyjádřenou v obsahu B v mg na kg rostlinné hmoty.

6. Summary

The aim of this thesis was to obtain reliable method to determine the concentration of boron in plant material.

Boron is an important microelement for plant growth and development. Plants receive boron in the form of boric acid. Compounds of boron and boron complexes are involved in cell wall structure and metabolic pathways of carbohydrates. Lack of boron in the plant is visible at first sight (plant is dying), but the excessive abundance of boron is toxic to plants.

For the measurement I have available samples in the form of dried plants (*Arabidopsis thaliana*). Before measurement the samples must first be prepared into measurable form by the decomposition in the presence of nitric acid in the microwave oven. CRM BCR 679 white cabbage is also prepared with samples for accuracy check.

UV / VIS spectroscopy is based on the interaction of electromagnetic radiation with matter. The measurement is based on a colored complex of boron. Multiple colors are used. For our measurements was chosen yellow azomethine-H, which results from salicylaldehyde and 8-amino-1-naphthol-3,6-disulfonic acid (H-acid) in the presence of boron. The absorbance of azomethine-H at 420 nm is measured. The measurement is dependent on pH. Optimal pH is between 6 to 7. The presence of foreign ions, which can cause interference, is important for the measurement. Such ions are Cu^{2+} , Zn^{2+} and Fe ions. This interference can be eliminated simply by adding EDTA.

ICP-MS is a combination of two very popular methods of mass spectrometry and inductively coupled plasma. ICP is used to obtain the ions in the gas phase. Mass spectrometry separates ionized particles by of weight to charges ratio. By using this method, we obtain $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ isotopic representation. Sc was used as an internal standard. Because the method uses atomization and ionization of the sample, there is no further need to prepare reagents and solutions.

Finally, it is possible for both methods of the determination of boron to be compared. CRM with the certified value of 27.7 mg / kg boron was used for the measurement. Obtained values was 29.35 mg / kg by using spectrophotometric method and 27.90 mg / kg by using ICP-MS.

7. Použité zkratky

ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
NAA	Neutronová aktivační analýza
AAS	Atomová absorpční spektrometrie
OES	Optická emisní spektrometrie
UV/VIS	Ultrafialová a viditelná oblast spektra
LCAO	Lineární kombinace atomových orbitalů
CRM	Certifikovaný referenční materiál

8. Literatura

1. Klikorka J., Hájek B., Votinský J., Obecná a anorganická chemie. STNL, Praha 1989.
2. Brown P. H., Bellaloui N., Wimmer M. A., Bassil E. S., Ruiz J., Hu H., Pfeffer H., Dannel F., Römheld V., Plant biology. **4**, 205 - 223 (2002).
3. Camacho-Cristóbal J. J., Rexach J., González-Fontes A., Journal of Integrative Plant biology **50**, 1247 - 1255 (2008).
4. Sah R. N., Brown P. H., Plant and Soil **193**, 15 – 33 (1997).
5. http://www.agrokrom.cz/texty/HNOJENI/skripta_Richter/VR_bor.pdf, staženo 26.3.2012.
6. Blevins D. G., Lukaszewski K. M., Plant Physiology Plant Biology **49**, 481 – 500 (1998).
7. Bolaños L., Lukaszewski K., Bonilla I., Blevins D., Plant Physiology and Biochemistry **42**, 907 – 912 (2004).
8. Kocábek T., Svoboda Z., Al-Zwi A. M., Rolfe S. A., Fellner M., Enviromental and Experimental Botany **67**, 101 - 111 (2009).
9. Procházka S., Macháčová I., Krekule J., Šebánek J. a kol., Fyziologie rostlin, Academia Praha, Praha (1998).
10. Mader P., Čurdová E., Chemické listy **91**, 227 – 236 (1997).
11. Harvey D.: Modern analytic chemistry. 1st Ed., De Pauw Universtity, Greencastle (2000).
12. Němcová I., Čermáková L., Rychlovský P.: Spektrometrické analytické metody I. UK, Praha (2004).
13. Klouda P.: Moderní analytické metody. Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava (2003).
14. Volka K. a kolektiv: Analytická chemie I. VŠCHT, Praha (1995).
15. Harp D. L., Analytica Chimia Acta **346**, 373 – 379 (1997).
16. ČSN EN ISO 9390: Jakost vod - Stanovení boritanů. ČNI, Praha 1996
17. Ebdon L., Evans E. H., Fisher A., Hill S. J.: An Introduction to analytical atomic spectrometry. WILEY, University of Plymouth (1998).
18. Volka K. a kolektiv: Analytická chemie II. VŠCHT, Praha (1995).
19. <http://leccos.com/index.php/clanky/absorbance>, staženo 10.3. 2012.
20. <http://www.tcieurope.eu/en/catalog/A5016.html>, staženo 29.3.2012.

21. Otruba V., Kanický V., Spektrometrie s indukčně vázaným plazmetem, Spektroskopická spol. Jana Marka Marci, Praha (1997).
22. Zámečník J.: Diplomová práce, MU Brno, Brno (2006).
23. http://www.vias.org/tmanalytic_gem/img/er_abb165.png, staženo 22.3.2012.
24. Vanderpool R. A., Hoff D., Johnson P. E., Environmental Health Perspectives **102**, 13 – 20 (1994).
25. http://www.eurochem.cz/polavolt/anorg/priprava_vzorku/mader_curdova.htm, staženo 20.3.2012
26. http://users.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/spektraa.htm, staženo 1.5.2012