

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Keemia instituut

Analüütilise keemia õppetool

Emili Aus

**Glüfosaadi määramine kineetilisel-katalüütilisel meetodil paber-
analüütilise seadmega**

Bakalaureusetöö (6 EAP)

Keemia

Juhendaja: Hanno Evard, PhD

Tartu 2020

Infoleht

Glüfosaadi määramine kineetilisel-katalüütilisel meetodil paber-analüütilise seadmega

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli paber-analüütilisel seadmel näidata võimalust glüfosaadi määramiseks. Reaktsiooni lahuses uurimine andis andmed, millest saab järeldada glüfosaadi olulist mõju värvusreaktsioonile ja see annab eelduse, et seda reaktsiooni saab glüfosaadi määramiseks kasutada. Glüfosaadi määramine paberil näitas kõrgetel glüfosaadi kontsentratsioonidel küll värvuse intensiivsuse erinevust, kuid antud meetodiga on keeruline määrata glüfosaadi madalaid kontsentratsioone (vahemikus $2,3 \cdot 10^{-3}$ M kuni $2,3 \cdot 10^{-5}$ M). Paber-analüütilise seadmega oli näha selle seadme toimimist, sest erinevatel ajahetkedel tekkisid värvimuutused, kuid vajalik on esmalt lahendada probleemid paberil, mis võimaldaks madalaid glüfosaadi kontsentratsioone määrata.

Märksõnad: glüfosaat, kineetiline-katalüütiline meetod, paber-analüütiline seade, sõelumismeetod

Teadusala: Analüütiline keemia

CERCS kood: P300

Glyphosate detection with kinetic-catalytic method using paper-analytical device

In this work, the purpose was to show a possibility of glyphosate detection on a paper-analytical device. Research of the reaction to determine glyphosate in solution gave results about glyphosate impact on this reaction and it shows that this reaction can be used to detect glyphosate. Detecting glyphosate on a paper showed a difference between colour intensity on higher glyphosate concentration. However, with this method, it is difficult to detect low glyphosate concentrations (from $2,3 \cdot 10^{-3}$ M to $2,3 \cdot 10^{-5}$ M). Testing paper-analytical system showed promise because the device is shown to function as assumed. Nevertheless, it is necessary to primarily solve problems on a paper that will enable detecting low glyphosate concentrations.

Keywords: glyphosate, kinetic-catalytic method, paper-analytical device, screening method

Field of research: Analytical chemistry

CERCS code: P300

Sisukord

Infoleht	2
Kasutatud lühendid	5
1 Sissejuhatus.....	6
2 Kirjanduse ülevaade	7
2.1 Glüfosaat.....	7
2.1.1 Glüfosaadi määramine	8
2.1.2. Sõelumismeetod.....	9
2.2 Paber-analüütilised seadmed.....	10
2.2.1 Paber-analüütiliste seadmete põhimõtted.....	10
2.2.2 Kolorimeetriline meetod μ PAD-iga.....	12
2.2.3 Skanneri kasutamine μ PADiga.....	12
2.3 Kineetilised-katalüütilised meetodid	13
2.3.1 KK meetodid μ PAD-idel.....	13
2.3.3 UV-Vis spektroskoopia.....	14
3 Eksperimentaalne osa.....	16
3.1 Kasutatavad reagentid, materjalid ja lahuste valmistamine	16
3.2 Katsetes kasutatud eksperimentaalsed meetodid	16
3.2.1 Reaktsiooni toimimise uurimine lahuses UV-Vis spektrometriga	17
3.2.2 Reaktsiooni toimimise uurimine paberil kasutades skannerit.....	17
3.2.3 Katsed paber-seadmega	18
4 Tulemused ja analüüs	20
4.1 UV-Vis tulemused lahuses.....	20
4.2 Paberil glüfosaadi määramine.....	22

4.3 Paber-seadmel glüfosaadi määramine	25
5 Kokkuvõte	27
6 Summary.....	28
7 Tänuavaldused	29
8 Kasutatud kirjandus.....	30

Kasutatud lühendid

GS – glüfosaat

μPAD – paber-analüütiline seade

AMPA – aminometüülfosfoonhape

TMB – 3,3',5,5'-tetrametüülbensidiin

HPLC – kõrgsurvevedelikkromatograafia

UV-Vis – ultravioletne-nähtav spektroskoopia

TsOH – toluuensulfohape

MQ – milliQ-vesi

KK – kineetiline-katalüütiline meetod

1 Sissejuhatus

Glüfosaat on laialdaselt kasutuses olev umbrohumürk (herbitsiid) nii Eestis kui ka maailmas. Glüfosaati kasutatakse nii põllumajanduses kui ka majapidamises ning viimaste aastate jooksul on selle kasutamine kasvanud. Glüfosaadi võimalikust mõjust loomadele ja inimestele on tehtud palju uuringuid ning see on liigitatud tõenäoliselt vähki tekitavate ühendite alla. Glüfosaadi mõju keskkonnale on samuti rohkesti uuritud ning on leitud, et glüfosaat avaldab negatiivset mõju taimedele, mullale ja pinnaseveele. Nendel põhjustel on oluline, et glüfosaadi sisaldus keskkonnas oleks laialdaselt kontrollitud.

Hetkel on glüfosaadi määramine aeganõudev ning kallis protsess ning seetõttu on tarvis meetodit, millega saaks glüfosaati määrata kiiremini ja odavamalt. Sellist meetodit on võimalik kasutada sõelumismeetodina, mis aitab otsustada, millistele proovidele on vaja teostada täpsemaid laboratoorseid analüüse. Nii on võimalik aega ja raha kokku hoida ning saada terviklikum pilt glüfosaadi sisaldusest keskkonnas.

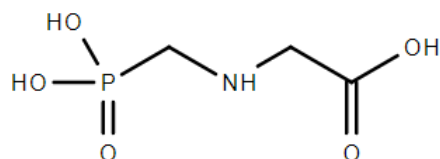
Viimase kümne aasta jooksul on populaarsust kogunud paber-analüütilised seadmed (*microfluidic paper-based analytical devices*), milles nähakse võimalust teostada keerukaid analüüse lihtsalt ja odavalt. Need põhinevad paberi omadusel iseeneslikult veega märguda ning erinevatel viisidel, kuidas märgumist juhtida, näiteks moodustades paberist kanalid. Paber-analüütiliste seadmete puhul on tihti aga probleemiks tundlikkus. Selles töös kasutatakse glüfosaadi määramiseks katalüütilist meetodit: analüüt mõjutab katalüütilist reaktsiooni, mille käigus tekib värvuse muutus. Selliste meetodite puhul on näidatud kõrget tundlikkust.

Käesoleva töö eesmärgiks on näidata, et paber-analüütilisel seadmel on võimalik määrata glüfosaadi olemasolu proovis kasutades katalüütilist meetodit. Töös kasutatakse katalüütilist meetodit, mis võimaldab värvi muutuse põhjal glüfosaadi määramist. Glüfosaadi määramiseks on võimalik ära kasutada selle kompleksimoodustamise omadusi. Kasutatakse Cu^{2+} poolt katalüüsivat värvusreaktsiooni, kus glüfosaadi olemasolu korral reaktsioon inhibeeritakse.

2 Kirjanduse ülevaade

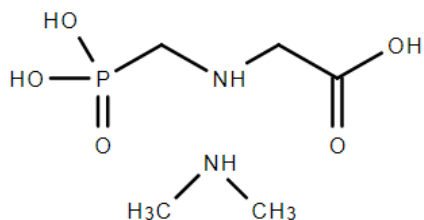
2.1 Glüfosaat

Glüfosaat (GS), keemilise nimetusega N-(fosfometüül)glütsiin, koosneb aminohappest glütsiin ja fosfometüül rühmast [1]. GS on vees lahustuv orgaaniline hape, millel on omadus moodustada kompleksühendeid metalliioonidega (Joonis 1) [2]. GS ja Cu^{2+} kompleksi püsivuskonstant on 11,92 (ioontugevus = 0,1; temperatuur 25°C) [3].



Joonis 1. GS-i molekulstruktuur

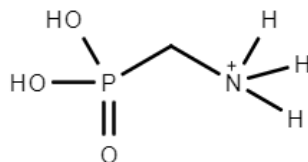
GS takistab taimedes fenoolset rühma sisaldavate aminohapete (trüptofaan, fenüülalaniin ja türosiin) sünteesimist ning selle protsessi kaudu peatub kogu taimne valgusüstees [4]. GS on 5-enoolpüruvüülisikimaat-3-fosfaadi süntaasi inhibiitor, mis on põhiliseks ensüümiks aromaatsete ühendite biosünteesis taimedes ja mikroorganismides [5]. Herbitsiidsetes toodetes on GS soola kujul (enamasti isopropüülamiini soolana) (Joonis 2). GS-i sisaldava segu koostisele on lisatud abiaineid ning pindaktiivseid aineid, mis vähendavad pindpinevust ning mille olemasolu lihtsustab GS-i imendumist taimedes ja muudab GS-i toimet tugevamaks. [2]



Joonis 2. GS isopropüülamiini vormina

GS-i lagunemine toimub peamiselt mullas mikroorganismide abil nii aeroobsetes kui ka anaeroobsetes tingimustes. GS laguneb kas aminometüülfosfoonhappeks (AMPA) ja glüoksülaadiks või sarkosiiniks ja glütsiiniks [2]. GS-i põhiline laguprodukt hüdrolüüsi käigus on

AMPA (Joonis 3) [6]. GS-i poolestusaeg pinnases on 3-130 päeva. AMPA on GS-iga võrreldes pinnases stabiilsem ning keskkonda analüüsidest nähakse pigem AMPA olemasolu kui GS-i. [7]



Joonis 3. AMPA molekul

GS-il on võimalik mõju loomade ja inimeste tervisele: Maailma Terviseorganisatsiooni alarühm IARC (*International Agency for Research on Cancer*) klassifitseeris GS-i kui tõenäoliselt vähki tekitavaks ühendiks [8]. Samas on mitmed erinevad üksteisest sõltumatud uurimisrühmad ümber lükanud IARCI väited, sest tulemuseks on saadud, et GS ei esita märkimisväärset genotoksilist riski inimese tervisele [1]. GS-i omaduste tõttu moodustada kompleksühendeid arvatakse, et GS seob endaga ka taimedes sisalduvaid mineraale. Seetõttu väheneb taimedes elutähtsate bioloogiliste protsesside jaoks vajalike mineraalide osakaal, mis võib mõjutada organisme, kes neid taimi tarbivad ning samuti mõjutada taime suutlikkust haigustele vastu panna [2].

GS-i pideval kasutamisel, võib see pinnases akumulieruda ning muutuda nii mulla kui pinnasevee saasteallikaks. Pikaajaline GS-i kasutamine võib mulla tervist ja viljakust ohustada ning selle kaudu mõjutab negatiivselt saagi tootlikkust [9]. GS-il on võimalik liikuda õhu kaudu ja säilida lumes ning lisaks on GS-i seostatud rohkem kui 30 taime haigusega [6].

Läbi on viidud uuring, kus analüüsiti Saksamaal 20-29 aasta vanuste inimeste seas nende GS-i sisaldust uriinis 14 aasta vältel. Analüüsitud 399 proovist 127 proovi seas oli GS-i sisaldus uriinis kas piirnormati lähedal või oli ületanud piirnormati (0,1 µg/L). GS-i laguprodukti AMPA sisaldus oli piiripeal või ületatud 160 proovi seas. [10]

2.1.1 Glüfosaadi määramine

Võttes arvesse GS-i mahukat kasutamist, ei ole määramise meetodid ideaalsed, sest ei ole olemas meetodit, millega saaks kiirelt ja odavalt analüüsida GS-i sisaldust pinnases ja vees.

GS-i ja tema laguprodukte iseloomustab selle väga hea lahustuvus vees, suur polaarsus, suur metalli-iooni sidumisvõime [11]. Lisaks iseloomustab GS-i selle halb lahustuvus orgaanilistes solventides ning kõrge keemistemperatuur ja madal molekulmass. Need omadused muudavad GS-i määramise tavakasutuses olevate analüütiliste meetoditega keeruliseks. [6]

GS-i määramiseks kasutatakse erinevaid meetodeid, millest levinuim on kõrgsurvedelikkromatograafia (HPLC). HPLC detektorina kasutatakse GS-i määramiseks kõige enam massispektromeetrit (HPLC-MS). Selle meetodi eeliseks on kõrge tundlikkus, selektiivsus ning hea korratavus. Samal ajal on HPLC-MS ajamahukas ja nõuab kalli masina olemasolu ning GS-i eelnevat derivatiseerimist, et suurendada oluliselt GS-is ionisatsiooni efektiivsust ja seega meetodi tundlikkust. Avastamiskiirid sellel meetodil jäävad vahemikku 20 ja 35 ppb. [12]

Juhul, kui HPLC juures kasutatakse UV-Vis detektorit, on eelisteks kõrge tundlikkus ja täpsus, kuid on samal ajal aeganõudev ning vajalik on kromofoorse rühma olemasolu ning seega nõuab see meetod samuti GS-i derivatiseerimist. Avastuskiir selle meetodi puhul 2,0 ng/mL [6]. Elektrokeemilise detektoriga on võimalik joogiveest ilma eeltötluseta GS-i määrata, kuid meetodi avastamiskiir oli üsna kõrge. Selleks kasutati amperomeetrilist mõõtmist ning mõõtmine põhineb GS-i oksüdeerumisel kullast elektroodi pinnal. Avastamiskiir on selle meetodiga 2 µM. [13]

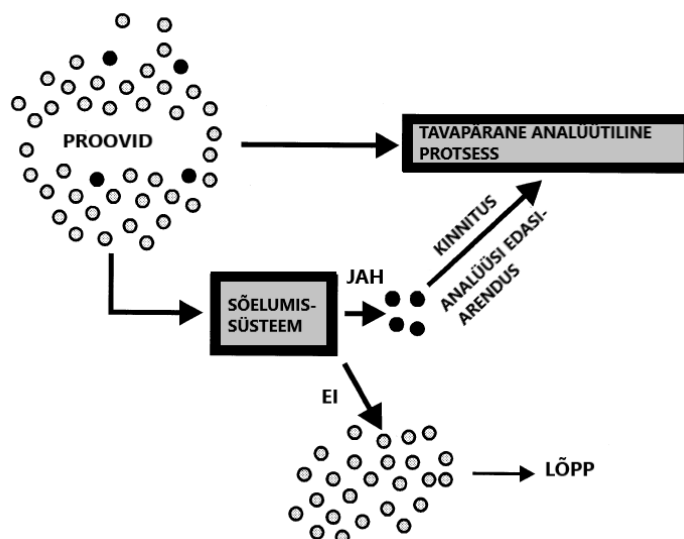
Kuigi eelnimetatud meetodite puhul on küll võimalik määrata GS-i sisaldust proovist, siis ei ole olemas ühest head meetodit, millega saaks mõõtmist teostada lihtsalt ja odavalt, et saaks kiirelt teada GS-i umbkaudse sisalduse. Sellist meetodit saaks ära kasutada sõelumismeetodina, kus võetakse paljudest erinevatest piirkondadest proovid ning saadakse teada just see piirkond, mille proove peab tundlike laborimeetoditega edasi analüüsima.

2.1.2. Sõelumismeetod

Sõelumismeetod on analüüsimeetod, millega määratakse, kas analüüdi sisaldus proovis on piirnormist üleval- või allpool. Selline meetod on: (1) pigem kvalitatiivne kui kvantitatiivne, (2) proovi ettevalmistuse etappi ei toimu või on minimaalne, (3) meetod ning saadav tulemus on kiire, (4) enamasti on see eelnevaks etapiks mõnele täpsemale ja tundlikumale analüütilisele meetodile. [14]

Sõelumismeetodi eesmärgiks on valida proovikogumist välja alamproovid, mille tulemused on üle piirmäära. Positiivse vastuse andnud proove analüüsitakse edasi mõne täpsema

analüüsimeetodiga, et kinnitada sõelumismeetodi tulemust ning saamaks täiendavat infot proovi kohta (Joonis. 4). [15]



Joonis 4. Sõelumismeetodi proovide käsitus. [15]

Sõelumismeetodit on kasutatud uuringutes, mille eesmärgiks on laialdaselt jälgida inimeste vere hüübimist, merevee metallisisaldust ning loomadel ja lindudel leviva haiguse koktsidoosi ravimi sisalduse hindamiseks. [14, 16, 17]

Võttes arvesse GS-i laialdast kasutamist ja kalleid analüüsimeetodeid, oleks mõistlik kasutada sõelumismeetodit GS-i sisalduse hindamiseks erinevates piirkondades. Selline tegutsemisviis hoiaks kokku nii aega kui raha ning annaks laiema ülevaate GS-i mõjuulatusest.

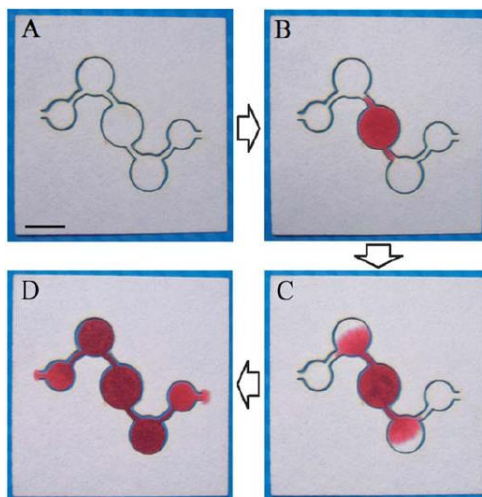
2.2 Paber-analüütilised seadmed

2.2.1 Paber-analüütiliste seadmete põhimõtted

Analüütilises keemias on paberit kasutatud alusmaterjalina juba väga pikka aega näiteks pH määramiseks kasutatavate indikaatorpaberitena [18]. Ilmselt kõige tuntum paberile sarnasel materjalil põhinev analüütiline test on rasedustest, mis leiutati 1980ndatel. Sarnaseid immuunokromatograafia teste kasutatakse tänapäeval laialdaselt meditsiinis, veterinaarias ja toidutööstuses [19]. Need paberipõhised testid suudavad aga läbi viia ainult väga lihtsaid analüüse, kuna puudub võimalus teostada mitut järjestikust sammu analüüsi läbi viimiseks. Näiteks puudub

võimalus viia läbi immunoensüümmeetodit, mis nõuab mitme reagenti lisamist immobiliseeritud antikehadega tsooni.

Viimase 10 aasta jooksul on arendatud mikrofluidika uut haru – paber-analüütilised seadmed (μ PAD)[20]. Sellistes seadmetes tehakse paberisse kanalid, mille abil saab vedeliku liikumist paberil kontrollida (Joonis 5) [21]. On näidatud, et sellised μ PAD-id suudavad saavutada automaatselt (ilma kasutaja sekkumiseta) järjestikus toimuvaid etappe, mis on analüüsi jaoks vajalikud [22].



Joonis 5. Näide paber-analüütilisest seadmest. Punase värvainega vesilahus liigub paberil kapillaarsete jõudude abil ning on piiratud hüdrofoobse barjääriga [23].

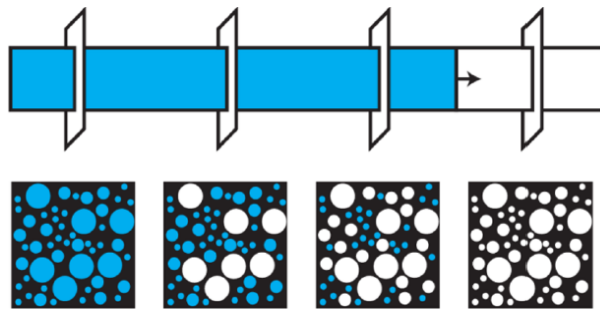
μ PAD tehnoloogia rakendusi on demonstreeritud väga mitmetes erinevates valdkondades – meditiinis, veterinaarias, toidutööstuses ja keskkonna uuringutes [24].

Paberi kasutamisel analüütilise seadmena on palju erinevaid kasulikke aspekte:

- a. odav hind;
- b. võimalus muuta paberi kuju, kerge lõigata;
- c. erineva poorsusega pabereid leidub palju;
- d. paberi põletamise võimalus ei tee seda keskkonnale koormavaks;
- e. kapillaarsuse tõttu on võimalik ilma väliste vahenditeta vedelikku seadmes liikuma panna;
- f. valge värvus võimaldab kolorimeetrilisi teste läbi viia;

g. võimalik filtreerida ja eraldada mikroskoopilisi osakesi.[21]

Vedelik liigub paberil kapillaarsete jõudude tõttu. Need jõud viivad vedeliku mööda paberit edasi, kus seda tõmmatakse paberi suunas, mis pole veel märgunud. Kapillaarsed jõud on määratud puutenurgast vedeliku ja paberi vahel, poori sisemisest raadiusest ja vedeliku pindpinevusest (Joonis 6). [25]



Joonis 6. Kujutatud on vedeliku paberil liikumise mudel [25].

2.2.2 Kolorimeetriline meetod μ PAD-iga

Kolorimeetriline meetod on üks kõige levinum analüüsimeetod μ PAD-i puhul, sest see võimaldab keemilise signaali mõõtmist keerukamate vahenditeta [26]. Kolorimeetrilise meetodi puhul on võimalik läbi viia kvalitatiivset, poolkvantitatiivset ja kvantitatiivset analüüsi. Analüüs toimub paberi värvi muutuse põhjal, mis saadakse keemilise reaktsiooni abil. [27] Levinud analüüsimeetod μ PAD-idel lisaks kolorimeetrilisele on elektrokeemiline määramine ning samuti kemoluminestsentsi ja elektrokemoluminestsentsi analüüsi meetodid [26].

2.2.3 Skanneri kasutamine μ PADiga

Kvantitatiivse analüüsi teostamiseks kolorimeetrilisel meetodil μ PAD-iga on võimalik kasutada peegeldusmeetodit (*reflectance detection*), mis põhineb paberseadmelt peegeldunud valguse mõõtmisel [21]. Värvu tugevust on võimalik hinnata ja mõõta silma, kaamera ja skanneriga ning samuti mõne spetsiaalselt ehitatud seadmega (näiteks läbilaskvuse analüüsil peegelduse asemel). Skannerid põhinevad hajus-peegeldus spektroskoopiaal ning kasutavad 3-4 filtrit (mitte prismat või difraktsioonvõrega monokromaatorit), et eristada erinevaid lainepikkuse vahemikke. [27] Skannerite kasutamise eeliseks lisaks madalale maksumusele, lihtsale transportimisele ja kättesaadavusele, on valgusallika konstantne kaugus proovist, valgusallika konstantne intensiivsus, pilt on fookuses ning skannerid on kõrge resolutsiooniga [26].

2.3 Kineetilised-katalüütilised meetodid

Kineetilised-katalüütilised (KK) meetodid põhinevad analüüdi võimel mõjutada katalüütilist reaktsiooni (olla ise katalüsaatoriks, inhibiitoriks või mõjutada katalüsaatori katalüüsivõimet), mis omakorda toob kaasa kolorimeetrilise, fluorestsentse või kemoluminescentse signaali [28]. KK meetodite puhul jälgitakse signaali muutust ajas, sest kasutatud reaktsioonid ei ole tasakaalus [29]. Seetõttu on KK meetodite puhul aja mõõtmine oluline parameeter, mis mõjutab tulemust. See on oluliselt erinev tavalisest analüütilisest keemiast, kus enamasti kasutatakse reaktsioone, mis on tasakaalu saavutanud ning seega pole aeg oluline parameeter. KK meetodid on väga tundlikud ja võimaldavad väga madalat avastuspiiri, kuna ka madalate katalüsaatori kontsentratsioonide juures on võimalik saavutada detektoriga mõõdetav analüütiline signaal [30].

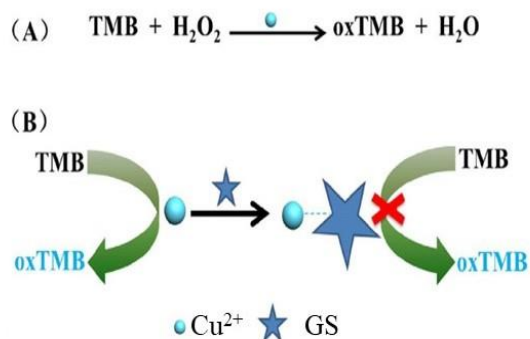
KK meetodite korral on enamasti analüütideks siirdemetallid, orgaanilised ühendid ja mittemetallilised anioonid. KK meetodite puhul on levinud voogsisestusanalüüs (*flow injection analysis*) põhinevate seadmete kasutamine, et automatiseerida KK meetodit. [28]

2.3.1 KK meetodid μ PAD-idel

KK meetodeid on kasutatud ka μ PAD-idel. Nendega on määratud metallide (Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+}) sisaldust proovis. Nendel juhtudel on analüüdid ise katalüsaatoriks ja analüütide määramine toimub kolorimeetrilise signaali kaudu [31–33]. Samuti on μ PAD-idel kasutatud ensümaatilisi KK meetodeid, kus määratakse organofosfaatseid ja karbamaadi pestitsiide, kasutades ära pestitsiidi omadust inhibeerida ensüümi atsetüülkoliinesteraas [34–36].

2.3.2 Cu^{2+} katalüüsib H_2O_2 ja 3,3,5,5-tetrametüülbensidiini reaktsiooni

Antud töös katalüüsib Cu^{2+} 3,3,5,5-tetrametüülbensidiini (TMB) oksüdatsiooni H_2O_2 poolt (Joonis 7). TMB oksüdeeritud vorm on pH 4 juures sinine. [37] GS- Cu^{2+} kompleks vähendab Cu^{2+} katalüütilist aktiivsust [38]. Seega, GS-i olemasolu lahuses inhibeerib TMB oksüdatsiooni. Lahuse sinise värvuse intensiivsus on seega sõltuvuses GS-i kontsentratsiooniga lahuses. [38]



Joonis 7. (A) Kolorimeetriline reaktsioon TMB, H_2O_2 ja Cu^{2+} vahel; (B) GS-i kolorimeetriline määramine, kus Cu^{2+} -GS vorm ei oksüdeeri TMB-d [38].

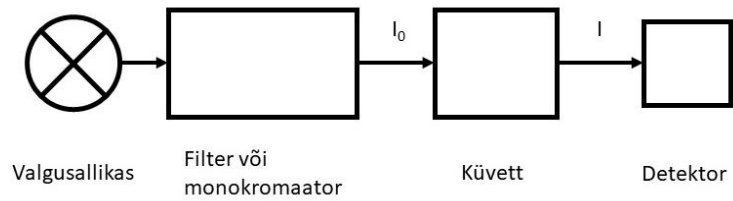
Antud reaktsiooni toimimist on eelnevalt näidatud lahuses [38], kuid selle toimimist ei ole uuritud paberil. Lisaks ei ole varem μPAD -idel kasutatud mitte-ensümaatilist meetodit pestitsiidide määramiseks. Seega on selle töö eesmärgiks näidata antud reaktsiooni toimimist paberil ning uurida võimalusi μPAD -i kasutamiseks, et automaatselt (ilma kasutaja sekkumiseta) kontrollida reaktsiooni aega. Lisaks kasutatakse antud töös võimalust reaktsioon peatada kindlal ajahetkel lisades tugevat hapet [27]. Happe lisamine peatab oksüdatsiooni reaktsiooni ning muudab oksüdeerunud TMB neeldumisspektrit nii, et lahus võtab kollase värvuse.

2.3.3 UV-Vis spektroskoopia

Antud töös viiakse läbi katseid UV-Vis spektromeetriga. Katsete eesmärk on korrata Chang *et al.* [38] saadud tulemusi ja näidata, et madalamal GS-i kontsentratsioonil on mõõdetavad neelduvused kõrgemad.

UV-Vis molekulaarne absorptsiooni spektromeetria põhineb lahuses oleva analüüdi neelduvuse (A) (valguse intensiivsuste – I_0 ja I – sõltuvus) mõõtmisel läbipaistvas küvetis, mille teepikkus on (b) ja aine molaarne neeldumistegur on (ϵ). Analüüdi kontsentratsioon (c) on lineaarses sõltuvuses neelduvusega (Joonis 7) [39]:

$$A_\lambda = \log(I_0/I) = \epsilon_\lambda \cdot b \cdot c$$



Joonis 7. Lihtsustatud UV-Vis seadme skeem.

3 Eksperimentaalne osa

3.1 Kasutatavad reagensid, materjalid ja lahuste valmistamine

Töös olid kasutuses järgnevad reagensid: GS (SB Technology, Hiina); CuSO₄ (Reakhim, USSR); 3,3,5,5-tetrametüülbensidiin (Sigma-Aldrich, Saksamaa); 30% H₂O₂ lahus (Lach:ner, Tšehhi Vabariik); naatrium atsetaat (Reakhim, USSR); äädikhape (Lach:ner, Tšehhi Vabariik); 60% fosforhape (Lach:ner, Tšehhi Vabariik); tolueensulfohape-4-monohüdraat (Merck, USA); metanool (Merck, USA).

Paberina kasutati Whatman nr 1 kromatograafia paberit.

Lahuste valmistamiseks kasutati MilliQ-vett (MQ), mis valmistati Millipore Q-POD MilliQ seadmega (vee puhtusenäitajad: 18,2 MΩ·cm, 2 ppb TOC). Valmistati erinevate kontsentratsioonidega GS-i lahused (9019 mg/L; 1803,8 mg/L; 901,9 mg/L; 180,4 mg/L; 90,2 mg/L; 18,0 mg/L; 9,0 mg/L; 1,8 mg/L; 0,9 mg/L), kus kõige kontsentreerituma lahuse jaoks kaaluti 90,19 mg GS-i ning lahuse ruumala oli 10 ml ning järgnevad lahused valmistati kõrgema kontsentratsiooniga lahuse lahjendamisel. 0,04 M CuSO₄ valmistati 0,1 M lahuse (kaaluti 1,2403 g CuSO₄·5H₂O) lahjendamisel. 2500 mg/L kontsentratsiooniga TMB lahus valmistati kasutades ~5 mg TMB ning lahustiks kasutati 2 ml metanooli. TMB lahus valmistati korra kahe nädala jooksul. 1 M H₂O₂ lahus valmistati 30% H₂O₂ lahjendamisel. 0,01 M atsetaatpuhver valmistati lahustades umbes 80 mL vees naatrium atsetaat (0,0336 g) ja lisati 30 µL äädikhapet. Seejärel mõõdeti lahuse pH-d pH-meetriga ning vajadusel lisati väike kogus äädikhapet, et lahuse pH oleks 4. Seejärel viidi lahuse ruumala 100 mL-ni. Puhverlahust säilitati külmkapis. 4 M H₃PO₄ valmistati kontsentreeritud H₃PO₄ lahuse (60%) lahjendamisel. Valmistati 2,8 M tolueensulfohappe (TsOH) lahus, mille jaoks kaaluti 2,1279 mg TsOH ja lisati 4 mL vett.

3.2 Katsetes kasutatud eksperimentaalsed meetodid

Antud töös tehti katsed kolmes etapis: (1) uuriti reaktsiooni toimimist ning võimalust mõõta GS-i lahuses, kasutades UV-Vis spektromeetrit; (2) uuriti reaktsiooni toimimist ning võimalust mõõta GS-i paberil; (3) uuriti võimalust kasutada paberit kui µPAD seadet, et kontrollida reaktsiooni aega ilma, et analüüsi läbiviija peaks mõõtma ise aega ning õigeaegselt hapet lisama reaktsiooni peatamiseks.

3.2.1 Reaktsiooni toimimise uurimine lahuses UV-Vis spektromeetriga

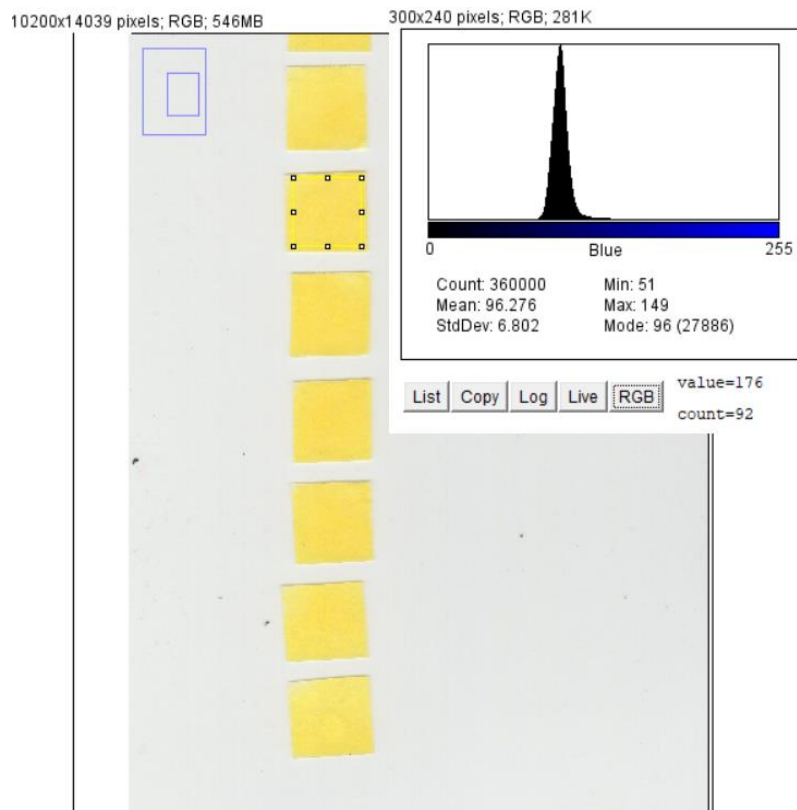
Kasutati 5 erineva GS-i kontsentratsiooniga lahust ($3,88 \cdot 10^{-3}$ M; $3,88 \cdot 10^{-4}$ M; $3,88 \cdot 10^{-5}$ M; $3,88 \cdot 10^{-6}$ M; $3,88 \cdot 10^{-7}$ M) ning ühte lahust, kus GS-i asemel lisati MQ-d. Viaali lisati 600 μ L puhverlahust, 200 μ L CuSO₄ lahust (lõppkontsentratsiooniga $2,9 \cdot 10^{-6}$ M), 100 μ L H₂O₂ lahust (lõppkontsentratsiooniga 0,036 M), 200 μ L GS-i lahust või MQ-d. Reagendid segati omavahel ning viimasena lisati 50 μ L TMB lahust. Alates TMB lisamisest, hakkas lahus siniseks värvuma. 10 sekundit pärast TMB lisamist lisati 100 μ L H₃PO₄ lahust, mis tekitas püsiva kollase värvuse. Lahustele lisati 1,5 mL MQ vett, et lahuste ruumala oleks mõõtmiste teostamiseks piisav. Lahuste neelduvus mõõdeti UV-Vis spektromeetriga. Neelduvuse väärtused mõõdeti 451 nm peal.

Töös kasutati UV-Vis spektromeetrit EVO 300-UV-Vis. Neeldumisspekter mõõdeti lainepikkuste vahemikus 250 nm kuni 600 nm ning pilulaiusega 2,0 nm. Kõigepealt mõõdeti baasijoon ning seejärel mõõdeti valmistatud kuue lahuse spektrid.

3.2.2 Reaktsiooni toimimise uurimine paberil kasutades skannerit

Paberist lõigati välja ruudud mõõtmetega 1,5 x 1,5 cm. Paberile lisati 40 μ L TMB lahust ja lasti kuivada. Valmistati lahus, kuhu lisati 600 μ L puhverlahust, 200 μ L CuSO₄ lahust, 100 μ L H₂O₂ lahust, 200 μ L GS-i lahust (kõik erinevad kontsentratsioonid). Ühe lahuse puhul lisati GS-i lahuse asemel 200 μ L MQ-d. Paberile lisati 50 μ L valmistatud lahust. Lisades lahust hakkab paberi värvus muutuma siniseks. Reaktsiooni peatamiseks katsetati erinevaid happe (100 μ L H₃PO₄ lahuse) lisamise aegu: 1 minut ja 20 sekundit. Pärast happelahuse lisamist kuivatati paberid üleöö toatemperatuuril ja skanneeriti.

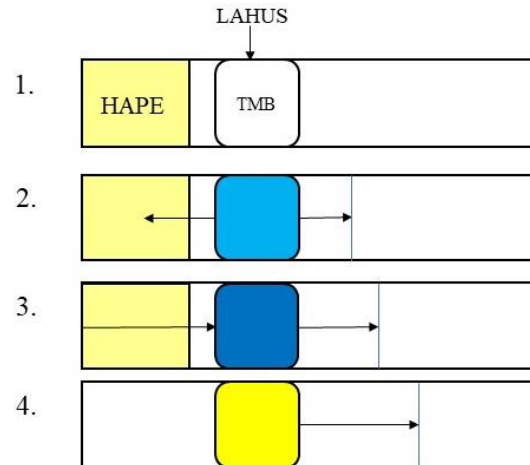
Pildi analüüsimiseks kasutatakse ImageJ programmi. Programmis valitakse analüüsimiseks kogu paberi piirkond ning mõõdetakse keskmine pikslite sinise värvuse väärtus, mida kasutatakse analüütilise signaalina (Joonis 8).



Joonis 8. Näide proovi mõõtmisest kasutades ImageJ programmi – valitud on proov ja näidatud on selle histogramm.

3.2.3 Katsed paber-seadmega

Paberist lõigati välja ristküliku kujulised tükid mõõtmetega 1,2 x 6,8 cm. Paberi vasakusse äärde lisati 20 μL koguste kaupa (kokku 80 μL) TsOH lahust lastes iga pipeteerimise järel paberil kuivada. Seejärel lisati paberi vasakust äärest 2,5 cm kaugusele 15 μL koguste kaupa TMB-d (kokku 30 μL) lastes pipeteerimise järel paber kuivada. Valmistati lahus, kuhu lisati 600 μL puhverlahust, 200 μL CuSO_4 lahust, 100 μL H_2O_2 lahust, 200 μL GS-i lahust (kontsentratsiooniga 0,053 M). Valmistatud lahust võeti 100 μL ja lisati indikaatori laigu peale (Joonis 9).



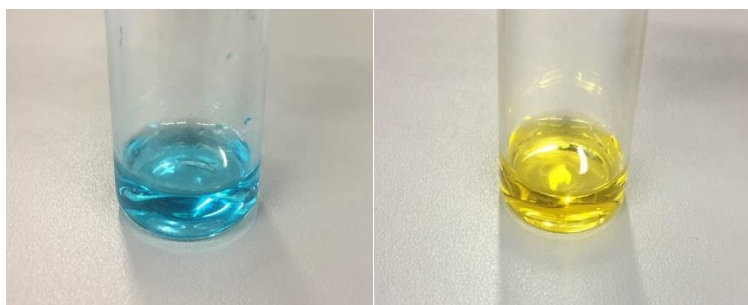
Joonis 9. Reagentide asetus paber-seadmehel ning seadme toimimise etapid.

Puhverlahust, glüfosaati, CuSO_4 , ja H_2O_2 sisaldav lahus pipeteeriti paberile sama koha peale, kus oli lisatud TMB (etapp 1, Joonis 9). Redoksreaktsioon hakkab toimuma ning paberil ilmub sinine värvus (etapp 2, Joonis 9). Lisaks hakkab vedelik paberil liikuma mõlemas suunas pipeteerimise asukohast eemale (nii paremale kui ka vasakule poole paberil). Lahus märgab vasakpoolse otsa, kus asub ka hape, täielikult enne, kui paremalt poolt jõuab lahus kogu paberit märguda. Seetõttu kantakse nüüd lahustunud happega vedelik paberil tagasi paremale poole (etapp 3, Joonis 9). Seega jõuab happeline lahus TMB laiguni ning reaktsioon peatub (etapp 4, Joonis 9).

4 Tulemused ja anaiiis

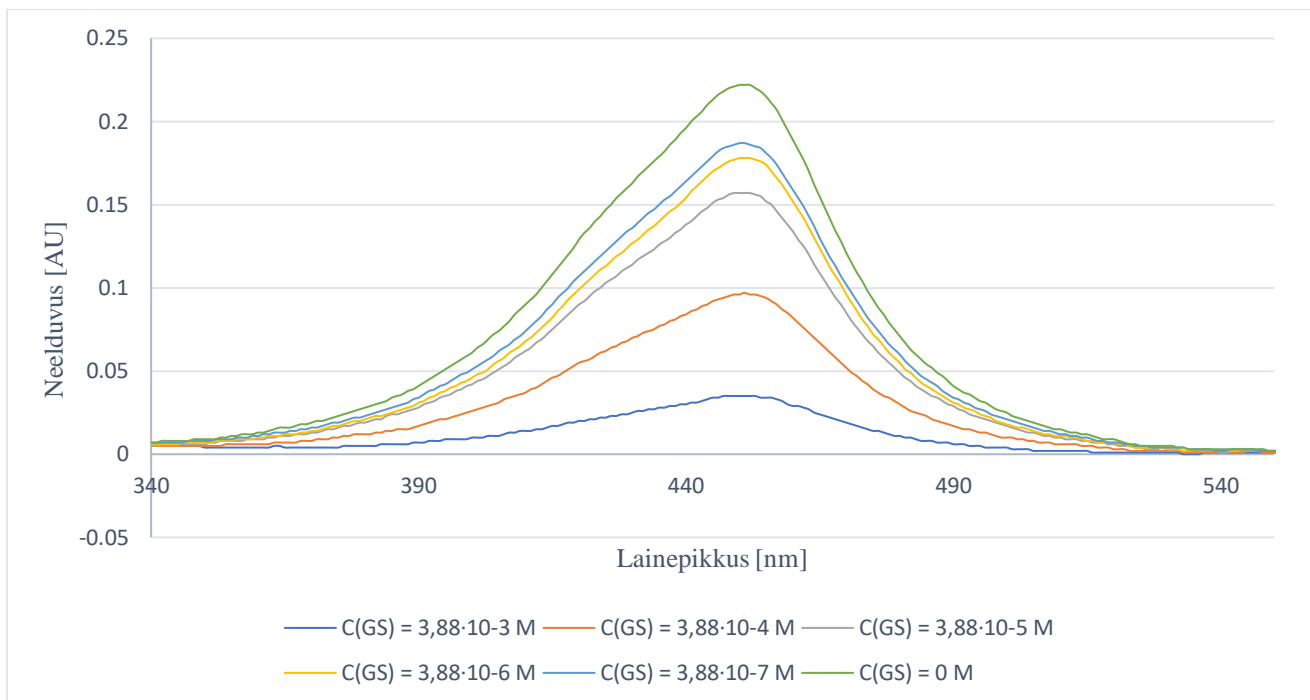
4.1 UV-Vis tulemused lahuses

Esmastes katsetes jälgiti reaktsiooni toimumist ja värvi muutusi visuaalselt. Katsetes on näha, et reaktsioon toimub – lahus võtab pärast TMB lisamist ajapikku sinise värvuse (Joonis 10). Seejärel katsetati oksüdatsiooni peatamiseks happena 4 M H_3PO_4 . Pärast happe lisamist läks eelnevalt sinise värvusega lahus sekundi jooksul kollaseks (Joonis 10). TsOH lahuse kasutamise puhul reaktsiooni peatamiseks tekkis lahusesse sade. Seetõttu edasistes mõõtmistes lahustega ei kasutatud TsOH-d.

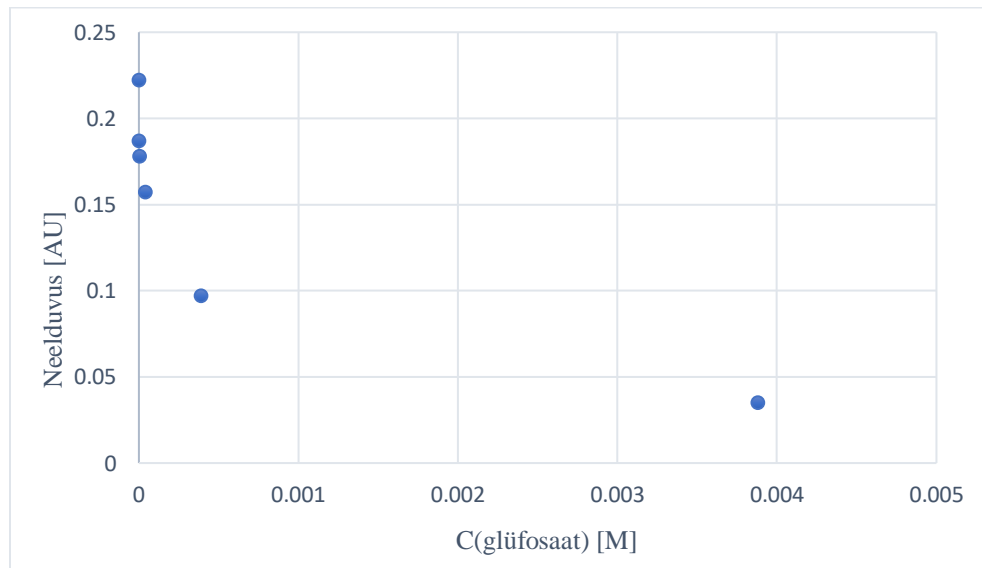


Joonis 10. TMB, Cu^{2+} , H_2O_2 sisaldav lahus enne happe lisamist ligikaudu 30 sekundit peale reaktsiooni algust (vasakul). Pärast happe lisamist muutub lahuse värvus kollaseks (paremal).

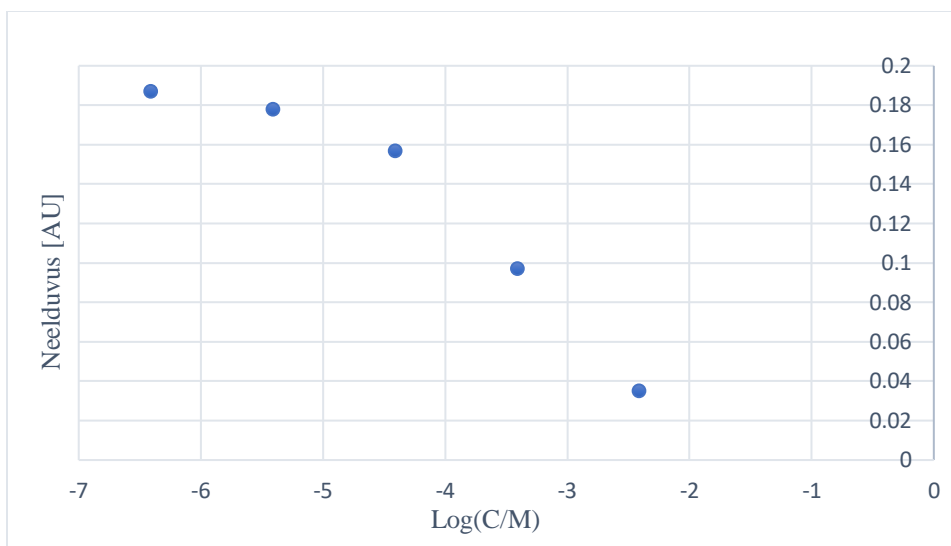
Järgnevalt valmistati lahused, et jälgida GS kontsentratsiooni mõju reaktsioonile ning teostati mõõtmised UV-Vis spektromeetriga. Saadud spektrite põhjal on näha sõltuvust GS-i kontsentratsiooni ja neelduvuse vahel lahustes (Joonis 11). Mida kõrgem on GS-i kontsentratsioon lahuses, seda madalam on neelduvus (Joonis 12 ja Joonis 13).



Joonis 11. Lahuste UV-Vis spektrid. Kõrgemate GS-i kontsentratsioonidega lahuste puhul on neelduvus madalam.



Joonis 12. GS-i kontsentratsiooni ja neelduvuse sõltuvus.



Joonis 13. GS-i kontsentratsiooni logaritmi ja neelduvuse sõltuvus.

Seega saab nendest andmetest järeldada, et GS-il on oluline mõju reaktsioonile ning seda reaktsiooni saab kasutada GS kontsentratsiooni määramiseks. Lisaks on siit võimalik näha, et madalatel kontsentratsioonidel ($3,88 \cdot 10^{-6}$ M ja $3,88 \cdot 10^{-7}$ M) on neelduvuse muutus suhteliselt väike (vastavalt 0,187 ja 0,178). Seetõttu võib järeldada, et hetkel kasutatud meetod nõuab olulist arendamist ja optimeerimist, et saavutada vajalikud madalad avastamispäärid ($0,1 \mu\text{g/L}$ ehk $\sim 6 \cdot 10^{-10}$ M). Kõrgema tundlikkuse saavutamise võib olla võimalik kasutades madalamaid Cu^{2+} kontsentratsioone ning pikemaid reaktsiooni aegu. Sellisel juhul ka madalama GS kontsentratsiooni juures seotakse katalüsaatorit piisavalt, et reaktsiooni oluliselt inhibeerida (nagu hetkel kõrgetel GS kontsentratsioonidel) ning samal ajal pikemat reaktsiooni aega kasutades on võimalik tugev värvimuutus ka madalate katalüsaatori kontsentratsioonide juures saavutada.

4.2 Paberil glüfosaadi määramine

Antud katse puhul optimeeriti esiteks paberi suurust ja paberile pipeteeritavaid vedelike koguseid. Optimeerimine viidi läbi nii, leiti paberi suurusele vastav vedeliku kogus, mis märgaks kogu paberi, kuid ei ujutaks paberit liigselt üle (leitud optimaalsed suurused on kirjas peatükis 3 ning kasutatakse edasistes katsetes).

Samuti optimeeriti paberile lisatavate TMB ja CuSO_4 kontsentratsioone. Leiti, et TMB liiga madal kontsentratsioon ($8,2 \text{ mg/L}$) ei andnud piisavalt intensiivset värvi. Kontsentratsioonil 2500 mg/L oli värvi muutus selgelt silmaga eristatav. Samuti oli madala CuSO_4 lahuse

kontsentratsiooni ($2,5 \cdot 10^{-6}$ M) korral tekkinud värvi intensiivsus nõrk. Leiti, et 0,04 M kontsentratsiooni kasutades oli värvi muutus selgelt silmaga eristatav. Lisaks hinnati ka TsOH kasutamist reaktsiooni peatamiseks H_3PO_4 asemel, kuid pärast TsOH lahuse lisamist tekkis paberile ebahomogeene värvus ja seetõttu ei olnud võimalik tulemust värvuse intensiivsusi skaneerimise põhjal analüüsida. Seetõttu edasistes katsetes paberil kasutati reaktsiooni peatamiseks H_3PO_4 lahust.

Järgnevalt tehti katse, et kontrollida, kas GS-i kontsentratsiooni muutudes paberil tekkiva värvuse intensiivsus muutub oluliselt. Tulemused on näha Joonisel 14. Pärast happe lahuse lisamist reaktsiooni peatamiseks, on kõrgema GS-i kontsentratsiooni puhul paberi kollane värvus selgelt nõrgem kui madalamatel kontsentratsioonidel. Seega võib järeldada, et GS omab paberil sarnast mõju reaktsioonile nagu lahuses.

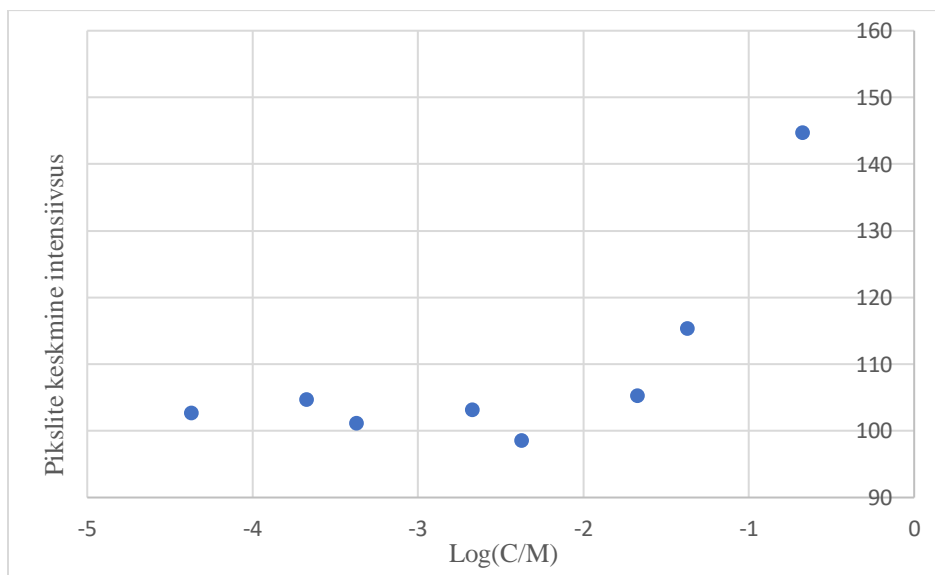


Joonis 14. Enne paberiruutude kuivamist tehtud pilt. Hapet on lisatud pärast 1 minutit. Kasutatud GS kontsentratsioonid kasvavad ülevalt allapoole liikudes. Pildilt on näha, et kõige kõrgema kontsentratsiooniga lahuse puhul ei ole paberil kollast värvust.

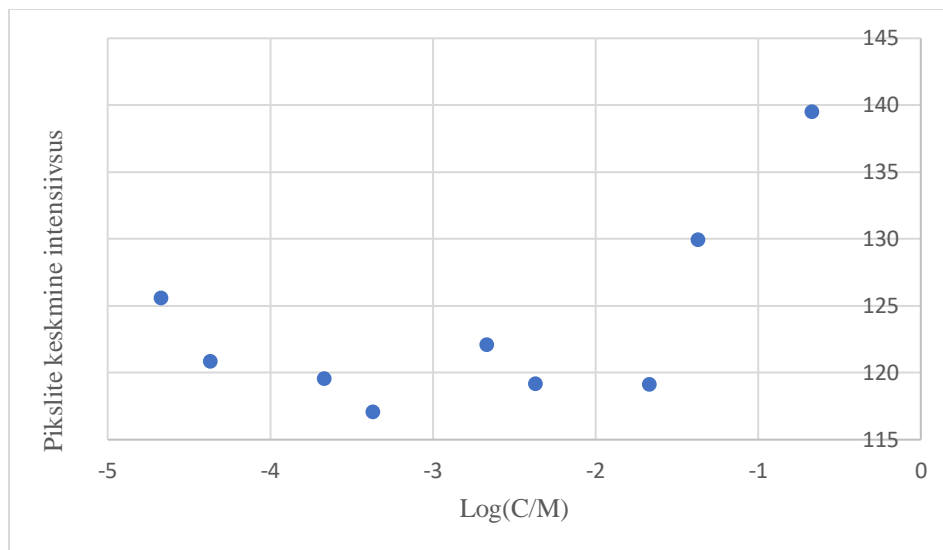
Paberitel lasti seejärel kuivada, et oleks võimalus tulemused skaneerida. Lisaks teostati ka sama katse, kus reaktsiooni peatamise aeg oli 1 minuti asemel 20 sekundit. Katsete tulemused on näha Joonisel 15. Paberitükkide skaneerimisel saadud tulemused on näha Joonisel 16 ja 17.



Joonis 15. Skaneeritud paberitükid. Vasakpoolsel pildil on reaktsiooni peatamise lahus lisatud pärast 1 minutit ning parempoolsel pildil pärast 20 sekundit. GS-i kontsentratsioon tõuseb paberiruutudel ülevalt allapoole liikudes.



Joonis 16. Reaktsioon peatatud 1 minuti juures – GS-i kontsentratsiooni logaritmi ja pikslite keskmine peegeldunud sinise värvuse intensiivsus (RGB skaalas, kus maksimum on 255).



Joonis 17. Reaktsioon peatatud 20-sekundi juures – GS-i kontsentratsiooni logaritmi ja pikslite keskmine peegeldunud sinise värvuse intensiivsus (RGB skaalas, kus maksimum on 255).

Joonistelt 16 ja 17 on näha, et TMB oksüdatsiooni reaktsioon on paberil toimunud. Samuti on näha, et alles väga kõrgetel GS-i kontsentratsioonidel on valguse peegeldumise intensiivsus oluliselt tõusnud ja eristatav madalamatest kontsentratsioonidest. Selle põhjus võib seisneda asjaolus, et happe lisamine ei peata täielikult reaktsiooni. Seega reaktsioon jätkub sel ajal kui paber kuivab. Seda hüpoteesi toetab tähelepanek, et enne, kui paberid on kuivanud, on paberite värvused oluliselt nõrgemad. Näiteks Jooniselt 14 on selgelt aru saada, et kõige kõrgema GS kontsentratsiooni puhul ei ole paberil kollast värvust. Reaktsiooni mittetäieliku peatumise põhjus võib olla näiteks see, et kasutatud filterpaber sisaldab metallide ioone, mis samuti katalüüsivad TMB oksüdatsiooni reaktsiooni, kuid mille kompleksi stabiilsus GS-ga on madal.

Arvestades eelnevalt kirjeldatud aspekte, on madalatel kontsentratsioonidel GS-i määramine antud meetodiga keeruline, sest meetod ei näita üles piisavat tundlikkust, mida GS-i määramine vajaks. Vajalik oleks meetodi edasine arendus, selleks võiks olla näiteks muude paberite kasutamine või mõne muu materjali kasutamine paberi asemel. Lisaks oleks vajalik optimeerida katalüsaatori kontsentratsioon ja reaktsiooni aeg, et saavutada kõrgemaid tundlikkusi.

4.3 Paber-seadmeh glüfoosadi määramine

Paber-seadmehiga tehtud katsete tulemustest on näha, et vastav paber-analüütiline seade toimib: pärast proovi lisamist kohale, kus asub TMB, tekib paberil sinine värvus ning seejärel

paberil toimuva iseenesliku vooluga kantakse selle koha peale hape. Seadme toimimist on selgelt näha aja jooksul tekkivate värvide tõttu (Joonis 17).

Esmaste katsete käigus kasutati reaktsiooni peatamiseks H_3PO_4 lahust. Leiti, et H_3PO_4 kasutamisel ei tekkinud ühtlast kollakat värvust TMB alal, kollase värvi intensiivsus oli nõrk, ebahomogeene ning sinine värvus ei muutunud igal pool kollaseks (Joonis 16). Seetõttu kasutati edaspidi reaktsiooni peatamiseks TsOH-d, mis andis visuaalsel vaatlusel paremad tulemused (Joonis 17).



Joonis 16. H_3PO_4 kasutamine TsOH asemel.



Joonis 17. Piltidel on näha vedeliku liikumine paberil. Pildid tehtud 30-sekundiliste vahedega. Esimene (vasakpoolseim) pilt on tehtud enne glüfosaadiga lahuse lisamist. Viimane (parempoolseim) pilt on tehtud 21 minutit hiljem, kui enam värvi muutust ega vedeliku liikumist ei toimunud.

Siiski on Jooniselt 17 näha, et tekkiv kollane värv on ebahomogeene ning hape ei jõua kogu oksüdeerunud TMB-ni (sinine värv jääb mõnevõrra alles).

Võimalikud edasiarendused võiksid olla näiteks mõne teise happe kasutamine TsOH asemel, mis on olemas ka tahkel kujul, ning erinevate oluliste paber-seadme parameetrite optimeerimine (paberi suuruse, lisatud reagentide ruumala, happe ja TMB kaugus üksteisest, paberi mõõtmed). Enne paber-seadme optimeerimist on vajalik arendada meetodit tundlikumaks lahuses ja seejärel paberil.

5 Kokkuvõte

Glüfosaat on väga levinud umbrohumürk nii Eestis kui mujal maailmas ning seetõttu on oluline, et selle sisaldus keskkonnas oleks kontrollitav. Hetkel on glüfosaadi määramine kallis ja aeganõudev ning oleks vaja sõelumismeetodit, mis võimaldaks odavamalt ja kiiremat määramist.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli paber-analüütilisel seadmel näidata võimalust glüfosaadi määramiseks. Selleks kasutati kineetilist-katalüütilist meetodit, kus Cu^{2+} katalüüsib 3,3,5,5-tetrametüülbensidiini oksüdatsiooni H_2O_2 poolt. Glüfosaadi olemasolu korral on tekkinud värvusreaktsiooni intensiivsus nõrgem kui glüfosaadita reaktsiooni puhul.

Reaktsiooni lahuses uurimine andis andmed, millest saab järeldada glüfosaadi olulist mõju reaktsioonile ja see annab eelduse, et seda reaktsiooni saab glüfosaadi määramiseks kasutada. Glüfosaadi määramine paberil näitas kõrgetel glüfosaadi kontsentratsioonidel küll värvuse intensiivsuse erinevust, kuid antud meetodiga on keeruline määrata glüfosaadi madalaid kontsentratsioone (vahemikus $2,3 \cdot 10^{-3}$ M kuni $2,3 \cdot 10^{-5}$ M). Paber-analüütilise seadmega oli näha selle seadme toimimist, sest erinevatel ajahetkedel tekkisid värvimuutused, kuid vajalik on esmalt lahendada probleemid paberil, mis võimaldaks madalaid glüfosaadi kontsentratsioone määrata.

Kokkuvõtteks on selle töö eesmärgid saavutatud, sest tulemuste põhjal on näha, et antud meetod toimib glüfosaadi määramiseks. Töö tulemusena on ka näha, millised on probleemid hetkel kasutatud meetodil ning kuidas meetodit edasi arendada. Edasine arendustöö ning optimeerimine peab esiteks keskenduma lahuses tehtavate mõõtmiste tundlikkuse tõstmisele. Seda võib olla võimalik saavutada komponentide kontsentratsioonide ja reaktsiooni aja optimeerimise abil. Seejärel tuleb lahustes tehtud mõõtmiste arendustöö üle viia paberile ning leida lahendused seal tekkinud tundlikkuse probleemidele. Näiteks võib lahenduseks olla muu paberi kasutamine, mis oleks võimalikult puhas ja lisandite vaba. Viimase etapina on võimalik viia tundlik meetod üle paber-seadmele ning optimeerida seadme vajalikud parameetrid

6 Summary

Glyphosate is a widely used pesticide in Estonia and around the world and because of that reason it is important that its content in the environment is controlled. Right now, the detection of glyphosate is expensive and time-consuming and it needs a screening system that can provide cheaper and faster detection.

In this work, the purpose was to show a possibility of glyphosate detection on a paper-analytical device. For this, kinetic-catalytic method was used, where Cu^{2+} catalyses the oxidation of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine by H_2O_2 . In presence of glyphosate in this reaction the color intensity is weaker than without glyphosate.

Research of the reaction to determine glyphosate in solution gave results about glyphosate impact on this reaction and it shows that this reaction can be used to detect glyphosate. Detecting glyphosate on a paper showed a difference between colour intensity on higher glyphosate concentration. However, with this method, it is difficult to detect low glyphosate concentrations (from $2,3 \cdot 10^{-3}$ M to $2,3 \cdot 10^{-5}$ M). Testing paper-analytical system showed promise because the device is shown to function as assumed. Nevertheless, it is necessary to primarily solve problems on a paper that will enable detecting low glyphosate concentrations.

In conclusion, the purpose of this thesis has been achieved because based on the results, it can be seen that this method works for glyphosate detection. Current problems with this method and possibilities to develop it can also be seen. Further research and optimization has to focus on raising the sensitivity of the measurements in solution. That can be possible to achieve with optimizing the concentration of the components and reaction time. After that the research of measurements in solution should be taken onto paper and find the solution there to the sensitivity problems. For example, solution can be found in the usage of another paper that is pure and without additives. The last step would be to use found sensitive method on a paper device and optimize needed parameters.

7 Tänuavaldused

Käesoleva töö autor soovib avaldada suurt tänu oma juhendajale Hanno Evardile, kes oli suureks abiks antud töö valmimisel ning kes jagas väärtuslikke nõuandeid, oma aega ning kannatlikkust suhtumist.

8 Kasutatud kirjandus

- [1] Kier, L. D.; Kirkland, D. J. Review of Genotoxicity Studies of Glyphosate and Glyphosate-Based Formulations. *Critical Reviews in Toxicology*, **2013**, *43* (4), 283–315. <https://doi.org/10.3109/10408444.2013.770820>.
- [2] Mertens, M.; Höss, S.; Neumann, G.; Afzal, J.; Reichenbecher, W. Glyphosate, a Chelating Agent—Relevant for Ecological Risk Assessment? *Environmental Science and Pollution Research*, **2018**, *25* (6), 5298–5317. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1080-1>.
- [3] Stability Constants of Copper(II), Zinc, Manganese(II), Calcium, and Magnesium Complexes of N-(Phosphonomethyl)Glycine (Glyphosate).
- [4] Borggaard, O. K.; Gimsing, A. L. Fate of Glyphosate in Soil and the Possibility of Leaching to Ground and Surface Waters: A Review. *Pest. Manag. Sci.*, **2008**, *64* (4), 441–456. <https://doi.org/10.1002/ps.1512>.
- [5] Sviridov, A. V.; Shushkova, T. V.; Ermakova, I. T.; Ivanova, E. V.; Epiktetov, D. O.; Leontievsky, A. A. Microbial Degradation of Glyphosate Herbicides (Review). *Appl Biochem Microbiol*, **2015**, *51* (2), 188–195. <https://doi.org/10.1134/S0003683815020209>.
- [6] Valle, A. L.; Mello, F. C. C.; Alves-Balvedi, R. P.; Rodrigues, L. P.; Goulart, L. R. Glyphosate Detection: Methods, Needs and Challenges. *Environ Chem Lett*, **2019**, *17* (1), 291–317. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0789-5>.
- [7] Uuring Pestitsiidide Koormuse Allikate Ja Päritolu Selgitamiseks Nitraaditundlikul Alal, Estonian Environmental Research Centre. Estonian Environmental Research Centre 2017.
- [8] IARC Monographs Volume 112: Evaluation Of. 2.
- [9] Myers, J. P.; Antoniou, M. N.; Blumberg, B.; Carroll, L.; Colborn, T.; Everett, L. G.; Hansen, M.; Landrigan, P. J.; Lanphear, B. P.; Mesnage, R.; et al. Concerns over Use of Glyphosate-Based Herbicides and Risks Associated with Exposures: A Consensus Statement. *Environ Health*, **2016**, *15* (1), 19. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0117-0>.
- [10] Conrad, A.; Schröter-Kermani, C.; Hoppe, H.-W.; Rüter, M.; Pieper, S.; Kolossa-Gehring, M. Glyphosate in German Adults – Time Trend (2001 to 2015) of Human Exposure to a Widely Used Herbicide. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **2017**, *220* (1), 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.09.016>.
- [11] Lynch, B.; Technologies, A. Direct Analysis of Glyphosate, AMPA, and Other Polar Pesticides in Food. 8.
- [12] Pires Rosa, P. C. Brief Review Analytical Methods for the Determination of Glyphosate. *MOJT*, **2018**, *4* (1). <https://doi.org/10.15406/mojt.2018.04.00088>.
- [13] Noori, J.; Dimaki, M.; Mortensen, J.; Svendsen, W. Detection of Glyphosate in Drinking Water: A Fast and Direct Detection Method without Sample Pretreatment. *Sensors*, **2018**, *18* (9), 2961. <https://doi.org/10.3390/s18092961>.
- [14] Muñoz-Olivas, R. Screening Analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2004**, *23* (3), 203–216. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(04\)00318-8](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(04)00318-8).
- [15] Valcarcel, M.; Cardenas, S.; Gallego, M. Sample Screening Systems in Analytical Chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, **1999**, *18* (11), 685–693.
- [16] Huet, A.-C.; Bienenmann-Ploum, M.; Vincent, U.; Delahaut, P. Screening Methods and Recent Developments in the Detection of Anticoccidials. *Anal Bioanal Chem*, **2013**, *405* (24), 7733–7751. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7035-6>.

- [17] Li, H.; Han, D.; Pauletti, G. M.; Steckl, A. J. Blood Coagulation Screening Using a Paper-Based Microfluidic Lateral Flow Device. *Lab Chip*, **2014**, *14* (20), 4035–4041. <https://doi.org/10.1039/C4LC00716F>.
- [18] Abdollahi-Aghdam, A.; Majidi, M. R.; Omid, Y. Microfluidic Paper-Based Analytical Devices (MPADs) for Fast and Ultrasensitive Sensing of Biomarkers and Monitoring of Diseases. *Bioimpacts*, **2018**, *8* (4), 237–240. <https://doi.org/10.15171/bi.2018.26>.
- [19] Sajid, M.; Kawde, A.-N.; Daud, M. Designs, Formats and Applications of Lateral Flow Assay: A Literature Review. *Journal of Saudi Chemical Society*, **2015**, *19* (6), 689–705. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2014.09.001>.
- [20] Martinez, A. W.; Phillips, S. T.; Butte, M. J.; Whitesides, G. M. Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46* (8), 1318–1320. <https://doi.org/10.1002/anie.200603817>.
- [21] Martinez, A. W.; Phillips, S. T.; Whitesides, G. M.; Carrilho, E. Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. *Anal. Chem.*, **2010**, *82* (1), 3–10. <https://doi.org/10.1021/ac9013989>.
- [22] Apilux, A.; Ukita, Y.; Chikae, M.; Chailapakul, O.; Takamura, Y. Development of Automated Paper-Based Devices for Sequential Multistep Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Using Inkjet Printing. *Lab Chip*, **2013**, *13* (1), 126–135. <https://doi.org/10.1039/C2LC40690J>.
- [23] Nie, J.; Liang, Y.; Zhang, Y.; Le, S.; Li, D.; Zhang, S. One-Step Patterning of Hollow Microstructures in Paper by Laser Cutting to Create Microfluidic Analytical Devices. *Analyst*, **2013**, *138* (2), 671–676. <https://doi.org/10.1039/C2AN36219H>.
- [24] Liu, B.; Du, D.; Hua, X.; Yu, X.-Y.; Lin, Y. Paper-Based Electrochemical Biosensors: From Test Strips to Paper-Based Microfluidics. *Electroanalysis*, **2014**, *26* (6), 1214–1223. <https://doi.org/10.1002/elan.201400036>.
- [25] Cummins, B. M.; Chinthapatta, R.; Ligler, F. S.; Walker, G. M. Time-Dependent Model for Fluid Flow in Porous Materials with Multiple Pore Sizes. *Anal. Chem.*, **2017**, *89* (8), 4377–4381. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04717>.
- [26] Yang, Y.; Noviana, E.; Nguyen, M. P.; Geiss, B. J.; Dandy, D. S.; Henry, C. S. Paper-Based Microfluidic Devices: Emerging Themes and Applications. *Anal. Chem.*, **2017**, *89* (1), 71–91. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04581>.
- [27] Morbioli, G. G.; Mazzu-Nascimento, T.; Stockton, A. M.; Carrilho, E. Technical Aspects and Challenges of Colorimetric Detection with Microfluidic Paper-Based Analytical Devices (MPADs) - A Review. *Analytica Chimica Acta*, **2017**, *970*, 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.03.037>.
- [28] Henríquez, C.; Maya, F.; Phansi, P.; Abouhiat, F. Z.; Danchana, K.; Cerdà, V. Automatic Flow Kinetic-Catalytic Methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2016**, *85*, 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.08.009>.
- [29] Kawashima, T.; Teshima, N.; Nakano, S. Catalytic Kinetic Determinations: Nonenzymatic. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; Meyers, R. A., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2000; p a5702. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a5702>.
- [30] Cerdà, V.; González, A.; Danchana, K. From Thermometric to Spectrophotometric Kinetic-Catalytic Methods of Analysis. A Review. *Talanta*, **2017**, *167*, 733–746. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.02.004>.

- [31] Chen, W.; Fang, X.; Li, H.; Cao, H.; Kong, J. A Simple Paper-Based Colorimetric Device for Rapid Mercury(II) Assay. *Scientific Reports*, **2016**, *6* (1). <https://doi.org/10.1038/srep31948>.
- [32] Chaiyo, S.; Siangproh, W.; Apilux, A.; Chailapakul, O. Highly Selective and Sensitive Paper-Based Colorimetric Sensor Using Thiosulfate Catalytic Etching of Silver Nanoplates for Trace Determination of Copper Ions. *Analytica Chimica Acta*, **2015**, *866*, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.01.042>.
- [33] Lee, Y.-F.; Huang, C.-C. Colorimetric Assay of Lead Ions in Biological Samples Using a Nanogold-Based Membrane. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **2011**, *3* (7), 2747–2754. <https://doi.org/10.1021/am200535s>.
- [34] Sicard, C.; Glen, C.; Aubie, B.; Wallace, D.; Jahanshahi-Anbuhi, S.; Pennings, K.; Daigger, G. T.; Pelton, R.; Brennan, J. D.; Filipe, C. D. M. Tools for Water Quality Monitoring and Mapping Using Paper-Based Sensors and Cell Phones. *Water Research*, **2015**, *70*, 360–369. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.12.005>.
- [35] Nouanthavong, S.; Nacapricha, D.; Henry, C. S.; Sameenoi, Y. Pesticide Analysis Using Nanoceria-Coated Paper-Based Devices as a Detection Platform. *Analyst*, **2016**, *141* (5), 1837–1846. <https://doi.org/10.1039/C5AN02403J>.
- [36] Apilux, A.; Isarankura-Na-Ayudhya, C.; Prachayasittikul, V. Paper-Based Acetylcholinesterase Inhibition Assay Combining a Wet System for Organophosphate and Carbamate Pesticides Detection. *EXCLI Journal*; *14:Doc307*; *ISSN 1611-2156*, **2015**. <https://doi.org/10.17179/excli2014-684>.
- [37] Bally, R. W.; Gribnau, T. C. J. Some Aspects of the Chromogen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine as Hydrogen Donor in a Horseradish Peroxidase Assay. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, **1989**, *27* (10). <https://doi.org/10.1515/cclm.1989.27.10.791>.
- [38] Chang, Y.; Zhang, Z.; Hao, J.; Yang, W.; Tang, J. A Simple Label Free Colorimetric Method for Glyphosate Detection Based on the Inhibition of Peroxidase-like Activity of Cu(II). *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2016**, *228*, 410–415. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.01.048>.
- [39] Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. *Principles of Instrumental Analysis*, Fifth Edition.; Saunders Golden Sunburst Series; 1998.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Emili Aus,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Glüfosaadi määramine kineetilisel-katalüütilisel meetodil paber-analüütilise seadmega“,

mille juhendaja on Hanno Evard,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Emili Aus

28.05.2020