

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko – technologická

Voltametrické stanovení paklobutrazolu pomocí borem dopované diamantové  
elektrody  
Diplomová práce

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Alona Usenko**  
Osobní číslo: **C18511**  
Studijní program: **N2807 Chemické a procesní inženýrství**  
Studijní obor: **Ochrana životního prostředí**  
Téma práce: **Voltametrické stanovení paclobutrazolu pomocí borem dopované diamantové elektrody**  
Zadávající katedra: **Ústav environmentálního a chemického inženýrství**

### Zásady pro vypracování

1. Zpracujte literární rešerši na téma paclobutrazol, jeho vlastnosti, vliv na vegetaci a doposud používané metody stanovení této látky v přípravcích na ochranu rostlin.
2. Vypracujte metodu voltametrického stanovení nízkých koncentrací paclobutrazolu s využitím borem dopované diamantové elektrody. Kriticky zhodnoťte dosažené výsledky.
3. Novou metodu aplikujte při stanovení paclobutrazolu v praktickém vzorku komerčně dostupného přípravku na ochranu rostlin.
4. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 9/2012 „Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu“ v platném znění.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **prof. Ing. Jaromíra Chýlková, CSc.**  
Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2020**  
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**



---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

L.S.



---

**prof. Ing. Petr Mikulášek, CSc.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 5. února 2020

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnici Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 20.06.2020

Bc. Alona Usenko

## Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce paní doc. Ing. Jaromíře Chýlkové, CSc. za úžasné pracovní prostředí, cenné rady, pomoc při zpracování práce a čas, který mi věnovala. Děkuji také celé své rodině za podporu a možnost studovat na této univerzitě. Chci věnovat tuto práci své babičce Ludmilě Chochlově, která vždy byla pro mě příkladem silné ženy, podporovala a inspirovala mě a dodávala sílu jít dál svojí životní cestou.

## ANOTACE

Cílem této diplomové práce byl vývoj voltametrické metody pro stanovení retardantu rostlin paklobutrazolu. Stanovení bylo prováděno v alkalickém základním elektrolytu, kterým byl 0,07 mol.l<sup>-1</sup> NaOH za přítomnosti 33% acetonitrilu, pomocí diferenční pulzní voltametrie za užití BDDE jako indikační elektrody. V rámci experimentální části byla také stanovována doprovodná složka paklobutrazolu v reálném přípravku TOPREX – difenokonazol. Stanovení obou dvou látek bylo nejdříve testováno na modelových vzorcích. Poté byla provedena analýza reálného přípravku. Nalezené hodnoty byly v dobré shodě s deklarovanými obsahy.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Paklobutrazol, retardant růstu rostlin, diferenční pulzní voltametrie, BDDE

## TITLE

Voltammetric determination of paclobutrazol by using a boron doped diamond electrode

## ANNOTATION

The aim of this master thesis was to develop a voltammetric method for determining of plant retardant – paclobutrazole. The analysis was carried out in the alkaline electrolyte with 0,07 mol.l<sup>-1</sup> NaOH in the presence of 33% acetonitrile. Differential pulse voltammetry was applied by using BDDE as an indicator electrode. In the experimental part, there was also definitely a substance accompanying paclobutrazole in the real preparation TOPREX – diphenocconazole. The determination of both substances was first tested on model samples. Then the analysis of the real sample was made. The found values are in good correlation with the declared composition.

## KEYWORDS

Paclobutrazol, plant growth retardant, differential pulse voltammetry, BDDE

# OBSAH

Úvod .....	12
1 Teoretická část .....	14
1.1 Vlastnosti paklobutrazolu .....	14
1.2 Metody stanovení paklobutrazolu .....	17
1.3 Voltametrie .....	19
2 Experimentální část .....	21
2.1 Chemikálie a roztoky .....	21
2.2 Použité přístroje a vybavení .....	22
2.3 Postup voltametrického stanovení paklobutrazolu .....	23
3 Výsledky a diskuze.....	24
3.1 Vliv organického rozpouštědla v základním elektrolytu na analýzu paklobutrazolu .....	24
3.2 Vliv pH na stanovení paklobutrazolu.....	26
3.3 Kvantitativní stanovení paklobutrazolu za nalezených podmínek .....	31
3.4 Voltametrické stanovení difenokonazolu .....	39
3.5 Analýza modelových směsí paklobutrazolu a difenokonazolu .....	46
3.6 Analýzy TOPREXu.....	55
4 Závěr .....	57
5 Použitá literatura .....	59

## SEZNAM OBRAZKŮ

Obrázek 1: Strukturní vzorec paklobutrazolu [4] .....	14
Obrázek 2: Strukturní vzorce (2R,3R) a (2S,3S) enantiomerů paklobutrazolu [15].....	16
Obrázek 3: Snímání proudu při diferenční pulzní voltametrii [22].....	20
Obrázek 4: Proudová odezva při cyklické voltametrii [22].....	20
Obrázek 5: Elektrochemický analyzátor EP 100 propojený s tiskárnou a elektrochemickým článkem.....	22
Obrázek 6: Parametry voltametrického stanovení paklobutrazolu .....	23
Obrázek 7: Píky anodické oxidace paklobutrazolu v kyselém prostředí za přítomnosti 33% acetonitrilu .....	25
Obrázek 8: Křivky anodické oxidace paklobutrazolu v prostředí 0,1 mol.l <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	27
Obrázek 9: Křivky anodické oxidace paklobutrazolu v 0,07 mol.l <sup>-1</sup> octanovém pufru o pH 4,66 .....	28
Obrázek 10: Křivky anodické oxidace paklobutrazolu v 0,07 mol.l <sup>-1</sup> fosfátovém pufru o pH 7,01 .....	29
Obrázek 11: Křivky anodické oxidace paklobutrazolu v prostředí 0,07 mol.l <sup>-1</sup> NaOH.....	30
Obrázek 12: Anodické křivky voltametrického stanovení paklobutrazolu o koncentraci od 0,56 do 4,48 µg/ml .....	32
Obrázek 13: Anodické křivky voltametrického stanovení paklobutrazolu o koncentraci od 0,22 do 1,76 µg/ml .....	33
Obrázek 14: Anodické křivky opakovaného stanovení paklobutrazolu o koncentraci 2,23 µg/ml metodou standardního přídatku.....	34
Obrázek 15: Anodické křivky opakovaného stanovení paklobutrazolu o koncentraci 0,56 µg/ml metodou standardního přídatku.....	36
Obrázek 16: Anodické křivky opakovaného stanovení paklobutrazolu o koncentraci 0,22 µg/ml metodou standardního přídatku.....	38
Obrázek 17: Křivky anodické oxidace difenokonazolu v prostředí 0,07 mol.l <sup>-1</sup> NaOH .....	40
Obrázek 18: Křivky anodické oxidace difenokonazolu v 0,07 mol.l <sup>-1</sup> fosfátovém pufru o pH 7,01 .....	41
Obrázek 19: Křivky anodické oxidace difenokonazolu v 0,07 mol.l <sup>-1</sup> octanovém pufru o pH 4,66.....	42
Obrázek 20: Křivky anodické oxidace difenokonazolu v prostředí 0,1 mol.l <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	43



Obrázek 21: Anodické křivky voltametrického stanovení difenokonazolu o koncentraci od 1,18 do 9,44 $\mu\text{g/ml}$ .....	44
Obrázek 22: Anodické křivky opakovaného stanovení difenokonazolu o koncentraci 1,18 $\mu\text{g/ml}$ metodou standardního přídatku.....	45
Obrázek 23: Křivky anodické oxidace směsi difenokonazolu a paklobutrazolu o koncentraci 2,35 $\mu\text{g/ml}$ DFK a 1,86 $\mu\text{g/ml}$ PBZ.....	47
Obrázek 24: Křivky anodické oxidace směsi difenokonazolu a paklobutrazolu o koncentraci 2,35 $\mu\text{g/ml}$ DFK a 3,72 $\mu\text{g/ml}$ PBZ.....	48
Obrázek 25: Křivky anodické oxidace směsi difenokonazolu a paklobutrazolu o koncentraci 4,7 $\mu\text{g/ml}$ DFK a 1,86 $\mu\text{g/ml}$ PBZ.....	49
Obrázek 26: Křivky anodické oxidace směsi difenokonazolu a paklobutrazolu o koncentraci 2,35 $\mu\text{g/ml}$ DFK a 5,58 $\mu\text{g/ml}$ PBZ.....	50
Obrázek 27: Křivky anodické oxidace směsi difenokonazolu a paklobutrazolu o koncentraci 7,06 $\mu\text{g/ml}$ DFK a 1,86 $\mu\text{g/ml}$ PBZ.....	51
Obrázek 28: Křivky anodické oxidace směsi difenokonazolu a paklobutrazolu o koncentraci 2,35 $\mu\text{g/ml}$ DFK a 9,28 $\mu\text{g/ml}$ PBZ.....	52
Obrázek 29: Křivky anodické oxidace směsi difenokonazolu a paklobutrazolu o koncentraci 11,76 $\mu\text{g/ml}$ DFK a 1,86 $\mu\text{g/ml}$ PBZ.....	53
Obrázek 30: Křivky anodické oxidace přípravku TOPREX .....	56

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Výsledky studie vlivu pH na voltametrické stanovení paklobutrazolu v rozmezí koncentrací od 2,23 do 17,84 $\mu\text{g/ml}$ .....	31
Tabulka 2: Výsledky ověřování linearitu závislosti výšky píků na koncentraci paklobutrazolu v rozmezí od 0,56 do 4,48 $\mu\text{g/ml}$ a od 0,22 do 1,76 $\mu\text{g/ml}$ .....	33
Tabulka 3: Výsledky opakovaného stanovení paklobutrazolu o koncentraci 2,23 $\mu\text{g/ml}$ metodou standardního přídatku.....	35
Tabulka 4: Výsledky opakovaného stanovení paklobutrazolu o koncentraci 0,56 $\mu\text{g/ml}$ metodou standardního přídatku.....	37
Tabulka 5: Výsledky opakovaného stanovení paklobutrazolu o koncentraci 0,22 $\mu\text{g/ml}$ metodou standardního přídatku.....	39
Tabulka 6: Výsledky opakovaného stanovení difenokonazolu o koncentraci 1,18 $\mu\text{g/ml}$ metodou standardního přídatku.....	46
Tabulka 7: Výsledky analýz směsí paklobutrazolu a difenokonazolu o různých poměrech ....	54
Tabulka 8: Výsledky analýz přípravku TOPREX.....	55

## SEZNAM ZKRATEK

PBZ – paklobutrazol

DFK – difenokonazol

DPV – diferenční pulzní voltametrie

BDDE – borem dopovaná diamantová elektroda

## Úvod

Lidská populace naší planety se rozšiřuje velkým tempem, což klade velké nároky na produkci potravin. Důležitou úlohu v této oblasti hraje rostlinná strava. Pěstování rostlin je však spojeno s celou řadou problémů. Škodlivý vliv hmyzu, plísní a nejrůznějších škůdců, je dostatečně vyřešen použitím pesticidů. Existují však i problémy spojené s přírodními jevy a jejich následky. Jedná se zejména o bouřky, kroupy, povodně, silný vítr, nedostatek vody atd. Je třeba, aby rostliny byly více odolné proti těmto jevům. Za tímto účelem se používají nejrůznější regulátory růstu. Tyto látky mají velkou škálu účinků. Mezi ně patří jak stimulování, tak i potlačování růstu stonků a kořenů, regulace tloušťky stonku a kvetení, zabránění opadávání listů a plodů, stimulování tvorby chloroplastu a tak dále.

Regulátory růstu můžeme rozdělit na přírodní (fytohormony a další látky s růstově regulační aktivitou) a syntetické. Mezi fytohormony patří gibereliny, cytokininy, auxiny, kyselina abscisová, etylén, strigolaktony a brassinosteroidy. V závislosti na koncentraci mohou tyto látky jak inhibovat, tak i stimulovat růst a vývoj rostlin [1].

Syntetické regulátory lze, stejně jako přírodní, rozdělit na stimulanty a inhibitory růstu rostlin. Syntetické stimulanty však nemají stejnou povahu jako fytohormony, ale ovlivňují jejich metabolismus nebo transport. Tak například syntetické auxiny jsou používány jako herbicidy. Nejčastěji používanými stimulanty jsou retardanty růstu, které slouží k ovlivňování prodlužování stonků. Účinek těchto látek je většinou založen na inhibici syntézy giberelinu. Retardanty růstu můžeme rozdělit na tři skupiny, podle stupně, ve kterém blokuje biosyntézu giberelinu a tím potlačují účinnost určitých enzymů. Jednou z těchto skupin jsou triazolové sloučeniny, inhibující enzymy patřící do monooxidáz, které oxidují kauren na kaurenovou kyselinu [1,2].

Tato diplomová práce je zaměřena především na vývoj rychlé a citlivé voltametrické metody stanovení paklobutrazolu, který je představitelem triazolových sloučenin. Triazoly se hojně začaly používat v 60. letech 20. století pro kontrolu houbových chorob rostlin a živočichů. Teprve nedávno bylo zjištěno, že triazolové sloučeniny jsou schopné chránit rostliny před podmínkami stresu prostředí, jako je např. sucho, extrémní teplota, plynný oxid siřičitý a plísňové infekce. Triazolová ochrana stresu je často vysvětlována hormonálními

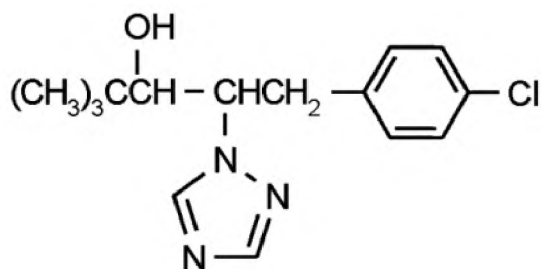
změnami. Biochemické účinky triazolu zahrnují detoxikaci reaktivních forem kyslíku, zvýšení hladiny prolinu, antioxidantů a obsahu chlorofylu [3].

Kvůli širokému použití se paklobutrazol dostává skoro do všech složek životního prostředí. Vzhledem k tomu, že není zcela bezpečný, obzvláště pro živočichy, jeho obsah se musí ve složkách životního prostředí neustále sledovat.

# 1 Teoretická část

## 1.1 Vlastnosti paklobutrazolu

Paklobutrazol [(2RS, 3RS)-1-(4-chlorofenyl)-4,4-dimethyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-pentan-3-ol], dále uváděn jako PBZ, jehož vzorec je znázorněn na obr. 1, je systémovým retardantem růstu rostlin, široce používaným v zemědělství a zahradnictví. Je nepolární sloučeninou a je stabilní v půdním i vodním prostředí. Vykazuje dlouhý poločas rozpadu (v půdě  $DT_{50} = 180 - 360$  dnů, v bazické půdě tento proces probíhá rychleji ( $DT_{50} < 42$  dny)) jak za aerobních, tak za anaerobních podmínek. Je stálý k fotolýze a hydrolýze v kyselém, neutrálním i bazickém prostředí [4].



**Obrázek 1: Strukturní vzorec paklobutrazolu[4]**

V literatuře lze nalézt velké množství prací, které se zabývaly vlastnostmi paklobutrazolu, takže jeho účinky jsou dostatečně známé.

Morfologické působení způsobené paklobutrazolem zahrnuje zmenšení výšky rostlin a velikosti listů, zvětšení tloušťky listu, snížení prodloužení výhonku a délky trichonu, zvýšený epikutikulární vosk, zvětšení chloroplastu a zvýšený růst kořenu. Snížení výšky rostlin je způsobeno tím, že paklobutrazol inhibuje cyt P-450 a tím zpomaluje důležité reakce vedoucí k produkci giberelinů. Giberelin stimuluje prodlužování buněk, takže jeho indukce vede k tomu, že se buňky dělí, ale neprodužují se. Ve výsledku dostáváme kratší rostliny, ale se stejným počtem listů. [5-7].

Díky svým účinkům se paklobutrazol používá na ošetření okrasných rostlin. Jedna studie z Číny se zabývala vlivem PBZ na fotosyntetickou aktivitu u pivoněk a bylo zjištěno, že jeho aplikace výrazně zvyšovala rychlost fotosyntézy a rychlost transpirace. Navíc listy

ošetřených rostlin měly tmavší zelenou barvu se sníženou svítivostí a zvýšeným úhlem odstínů ve srovnání s neošetřenými, což pravděpodobně svědčí o zvýšení obsahu chlorofylu [8].

Další studie z Číny se zabývala vlivem paklobutrazolu na růst melounů a bylo zjištěno, že při aplikaci vyšších koncentrací PBZ se snížila průměrná hmotnost ovoce, kůra se ztenčila a také se mírně snížil obsah rozpustných látek v ovoci [9].

Paklobutrazol také zvyšuje odolnost některých rostlin proti vodnímu stresu. Používá se v oblastech s nedostatkem vody. Touto problematikou se zabývala jedna studie s Thajska a bylo zjištěno, že rostliny ošetřené paklobutrazolem spotřebovávají méně vody a lépe přežívají sucho. To bylo způsobeno hlavně biochemickými změnami, jako jsou zvýšený obsah antioxidantů, snížený únik elektrolytů a také zvýšení hladiny prolinu, který je při vodním stresu syntetizován z kyseliny glutamové, aby udržoval vodní rovnováhu v buňkách a ve vnějším prostředí [10].

Další studie sledovala možný vliv paklobutrazolu na aktivitu oxidačních enzymů v rostlinách rostoucích v zasolené půdě. Bylo dokázáno, že při použití paklobutrazolu negativní účinky zvýšené solnosti půdy byly minimalizovány. Také bylo zjištěno, že u rostlin ošetřených PBZ se projevoval silný antioxidační obranný mechanismus proti reaktivním formám kyslíku (ROS). Došlo ke zvýšené regulaci takových enzymů jako je kataláza (CAT), superoxid dismutáza (SOD) a peroxidáza (POD), známých jako antioxidační enzymy [11, 12].

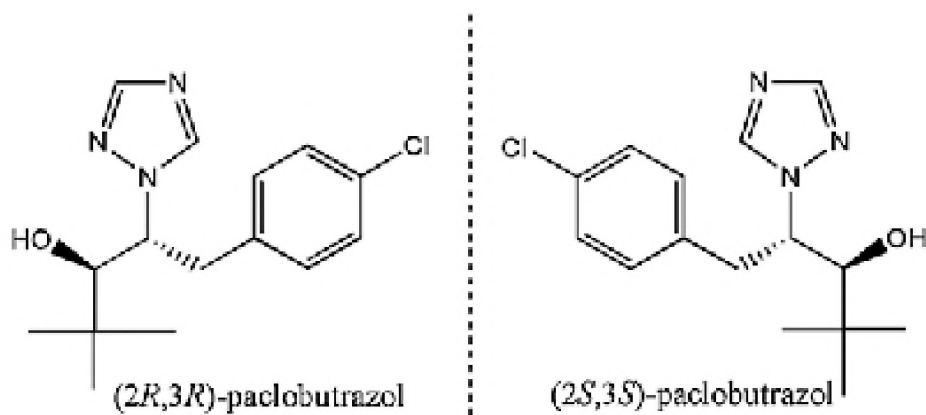
Při toxikologických studiích byly zjištěny účinky paklobutrazolu uvedené níže, které ukazují, že nadměrné úniky paklobutrazolu hlavně do vody škodí rybám, takže je důležité sledovat jeho osud v životním prostředí [4].

- Perorální toxicita pro krysy  $LD_{50} = 1300-2000$  mg/kg
- Dermální toxicita pro krysy a králíky  $LD_{50} > 1000$  mg/kg
- Inhalační toxicita  $LC_{50} = 3,2 - 4,8$  mg/dm<sup>3</sup> vzduchu
- Lehce dráždí pokožku a oči  $LC_{50}$  pro ryby 27,8mg/kg
- Není toxický pro ptáky, včely, dafnie a řasy [4].

Jak již bylo popsáno výše, paklobutrazol je zástupcem skupiny triazolových sloučenin. Velká část triazolových fungicidů jsou chirální látky. Obsahují jedno nebo dvě stereogenní centra. Každý enantiomer má odlišnou biologickou aktivitu vůči cílovým rostlinám.

Například čtyři enantiomery paklobutrazolu také vykazují velké rozdíly v biologické aktivitě a mohou se výrazně lišit v toxicitě. Podobně jejich degradace, transformace a bioakumulace jsou obvykle enantioselektivní. Enantioselektivita hraje důležitou roli při hodnocení nebezpečnosti látky pro organizmy a životní prostředí. V současné době se bohužel při zavádění právních předpisů týkajících se pesticidů zatím neřeší jejich chiralita, přesto, že přibližně 28 % pesticidů jsou chirální sloučeniny [13,14].

Paklobutrazol má dvě stereogenní centra a může tedy existovat ve čtyřech stereoizomerních formách. Komerční látka obsahuje pouze dva enantiomery (2R,3R a 2S,3S), protože mají mnohem vyšší fungicidní a rostlinolékařské účinky. Jejich strukturální vzorce jsou uvedeny na obrázku 2. Isomer (2S,3S) inhibuje biosyntézu giberelinů, které primárně regulují prodloužení výhonů, zatímco látka (2R,3R) má nízkou aktivitu vůči růstu rostlin, ale naopak vysokou fungicidní aktivitu [13,14].



**Obrázek 2: Strukturální vzorce (2R, 3R) a (2S, 3S) enantiomerů paklobutrazolu [15]**

Vzhledem k tomu, že se paklobutrazol široce využívá v zemědělství a zahradnictví, zanechává za sebou stopu v životním prostředí. Jedna studie z Brazílie se zabývala možností biodegradace PBZ pomocí různých půdních bakterií. Během této práce bylo zjištěno, že bakterie *Pseudomonas* jsou schopné paklobutrazol velmi účinně rozkládat [16].



## 1.2 Metody stanovení paklobutrazolu

Paklobutrazol se široce používá v zemědělství a zahradnictví, a proto je nutné kontrolovat jeho emise do životního prostředí, zejména do půdy a vody.

Mezi metody často používané pro stanovení této látky patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC, kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií LC-MS, plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií GC – MS popřípadě imunologický test atd.

### Kapilární plynová chromatografie

Jednou z metod pro stanovení zbytkového množství paklobutrazolu ve vodě, půdě a rostlinách je kapilární plynová chromatografie s termoionizačním detektorem (TID).

Stanovení paklobutrazolu ve vodě se provádí po jeho extrakci směsí hexan – ethylacetát v poměru 8 : 2. Z půdy a zelené hmoty řepky se extrahuje vodním acetonem a ze semen a řepkového oleje pak acetonitrilem. Čištění extraktu probíhá buď v kolonce ze silikagelu anebo reextrakcí v systému nemísitelných rozpouštědel. Identifikace látky se provádí na základě porovnání retenčního času se standardem. Ke kvantitativnímu stanovení se využívá kalibrační křivka. Tato metoda stanovení paklobutrazolu je využívána v Ruské Federaci jako normovaná metoda [4].

### Stereoselektivní metody

Jak již bylo popsáno, paklobutrazol patří do skupiny triazolů a je chirální sloučeninou. Chirální pesticidy se stereoselektivně degradují ve vodě, půdě, rostlinách a sedimentech. Tyto děje mohou vést k obohacení životního prostředí více či méně toxickými isomery, takže je nezbytné sledovat jejich osud, a proto se některé studie zabývaly hlavně vývojem stereoselektivních metod [17].

Dříve k oddělení chirálních pesticidů byly používány metody jako je plynová chromatografie (GC), kapalinová chromatografie (LC) a kapilární elektroforéza (CE).

Nejméně používanou metodou byla kapilární elektroforéza. U GC-MS a LC-MS metod se k separaci isomerů nejčastěji používá chirální stacionární fáze [17,18].

Nejlepších výsledků bylo dosaženo metodou LC-MS díky vyšší citlivosti a širší využitelnosti. Díky rychlému vývoji chirálních stacionárních fází pro kapalinovou chromatografii je enantiomerní separace velmi usnadněna a citlivost i specifita hmotnostní spektrometrie umožňuje simultánní kvantifikaci spousty enantiomerů chirálních sloučenin [17].

Metoda GC-MS je méně univerzální, protože nedokáže analyzovat méně těkavé vzorky, tepelně nestabilní sloučeniny a také látky s vysokou polaritou. V praxi se také používá kapalinová chromatografie ve spojení s trojitým kvadrupolem (LC-MS/MS) [17]

U stereoselektivních metod je rozhodující správný odběr vzorku a jeho uchování, protože zvýšení či snížení teploty nebo změna pH mohou vést k racemizaci nebo i k ztrátě jednotlivých forem pesticidů.

### **LC-MS v kombinaci s SPE a DLLME**

Jednou s dalších enantioselektivních metod je LC-MS využívající při zpracování vzorků postupy SPE a DLLME pro stanovení chirálních pesticidů včetně paklobutrazolu v pastovitých vzorcích, např. v medu. Jak již bylo popsáno výše, kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií se často používá při analýze reziduí pesticidů. Extrakce v pevné fázi (SPE) a disperzní mikroextrakce kapalina – kapalina (DLLME) jsou často používanými technikami ve stopové analýze, ale většinou se používají odděleně. Pro stanovení pesticidů v medu a dalších matricích byly tyto techniky spojené a díky vysoké schopnosti čištění a příznivému obohacení bylo dosaženo velmi dobrých výsledků [17].

### **Využití imunologického testu**

Další metodou pro stanovení paklobutrazolu je imunologický test ELISA. Jedná se o enzymový imunosorbentový test k detekci PBZ na základě monoklonálních protilátek. Jednou s takových protilátek je mAb6H73C9. Obecně je tato metoda založena na vazbě mezi antigenem a příslušnou protilátkou. ELISA se používá k detekci hormonů, toxinů, antigenů a protilátek v mnoha oborech a je jednou z nejpoužívanějších metod v klinických a

biochemických laboratořích. Pro stanovení stopových koncentrací paklobutrazolu však není dostatečně citlivá. Dosud publikované informace se zaměřují pouze na stanovení paklobutrazolu v pšeničných zrnech. Pro analýzu vod a půd nebyl tento test dosud použit [19,20].

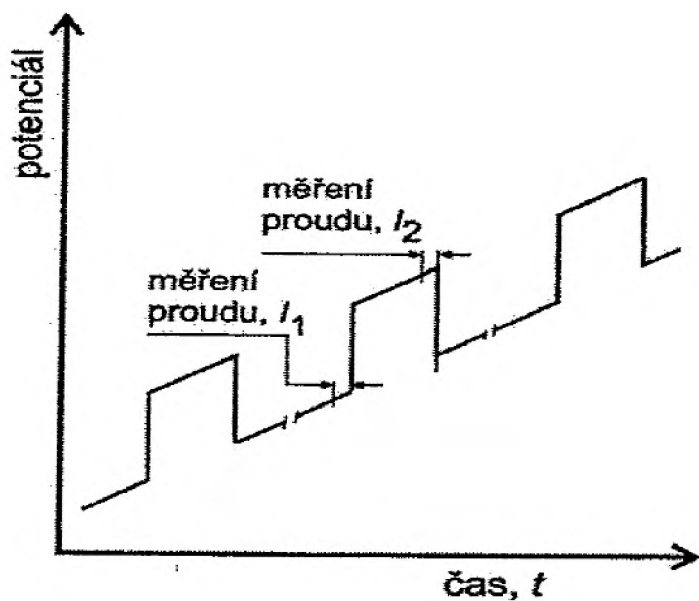
### 1.3 Voltametrie

Elektrochemické metody jsou široce využívány v analýze životního prostředí díky své jednoduchosti, rychlosti a přesnosti. Mezi elektrochemické metody patří voltametrie, polarografie, potenciometrie, konduktometrie, amperometrické a potenciometrické titrace atd.

Hlavní odlišností voltametrie od polarografie je ta, že voltametrie používá pevné elektrody, popřípadě visící rtuťovou kapku, kdežto polarografie pracuje s kapkovou rtuťovou elektrodou s neustále obnovovaným povrchem. V současné době se pro anodické oxidace látek s výhodou používá borem dopovaná diamantová elektroda. Vykazuje široké potenciálové okno, nepodléhá pasivaci. Je mechanicky odolná a vyžaduje minimální ošetřování v průběhu analýz. Metodami často používanými při praktických voltametrických analýzách jsou diferenční pulzní voltametrie (DPV) a cyklická voltametrie [21,22].

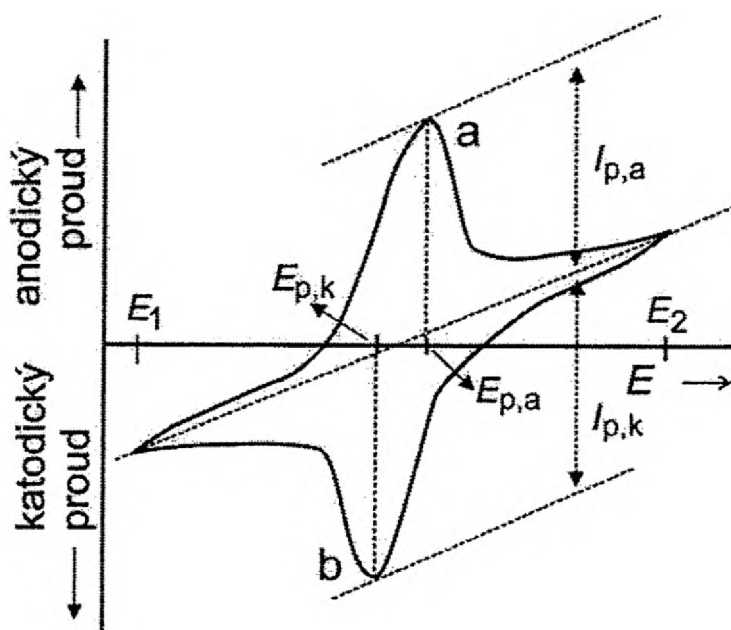
Diferenční pulzní voltametrie je velmi citlivá metoda používaná v praxi a má široké uplatnění ve stopové analýze [21,22]. Při této metodě se na lineárně zvyšující se napětí vkládají napěťové pulzy o vhodné amplitudě a době v řádech desítek ms. Měří se rozdíl proudů těsně před vložením pulzu a na jeho konci. Výsledná závislost rozdílu proudu na potenciálu má tvar píku. Jeho poloha závisí na druhu analytu, výška pak odráží kvantitu.

U DPV se zlepšuje citlivost stanovení se zvětšující se hodnotou  $\Delta E$ , ale zároveň kvůli rozšiřování píků se zhoršuje selektivita. DPV má spoustu výhod ve srovnání s ostatními elektrochemickými metodami, například má podobnou hodnotu citlivosti u reverzibilních a ireverzibilních dějů. Dále DPV umožňuje provádění analýzy ve značně zředěných roztocích s nízkou vodivostí, což snižuje riziko kontaminace vzorku nečistotami při stopové analýze a také při analýzách jak mořských tak i přírodních vod. DPV je často mnohem citlivější než většina chromatografických metod nebo atomová či molekulová spektroskopie [21,22].



Obrázek 3: Snímání proudu při diferenční pulzní voltametrii [22]

Cyklická voltametrie, je stacionární metodou s rychlostí polarizace ve tvaru  $dE/dt$ . Tato metoda není široce využívána pro klasické elektrochemické analýzy. Používá se hlavně při studiu mechanismu elektrodových reakcí, z čehož se následně dá zjistit, zda se jedná o reverzibilní či ireverzibilní děj [21,22].



Obrázek 4: Proudová odezva při cyklické voltametrii [22]

## 2 Experimentální část

### 2.1 Chemikálie a roztoky

Standardní roztoky paklobutrazolu byly připravovány v koncentračním rozmezí od 34,8 do 41,8 mg/25ml acetonitrilu navážením příslušného množství pevného paklobutrazolu (Sigma – Aldrich, PESTANAL™, analytický standard) a rozpuštěním v acetonitrilu. Podobným způsobem byl připravován standardní roztok difenokonazolu navážením 44,1 mg DFK (Sigma – Aldrich, PESTANAL™, analytický standard) do 25ml odměrné baňky a následným doplněním po rysku acetonitrem.

Acetonitril čistoty p.a. od firmy Penta byl používán jako rozpouštědlo a jako složka základního elektrolytu.

Během studia nalezení vhodných hodnot pH pro vlastní stanovení PBZ byly používány tyto zásobní roztoky: 0,1 mol.l<sup>-1</sup> NaOH, 0,1 mol.l<sup>-1</sup> fosfátový pufr o pH 7,01, 0,1 mol.l<sup>-1</sup> octanový pufr o pH 4,6 a roztok 0,1 mol.l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Zásobní roztok 0,1 mol.l<sup>-1</sup> NaOH byl připravován rozpuštěním odpovídajícího množství pevného hydroxidu sodného (firma Lachema Brno o čistotě 98%) v destilované vody. Fosfátový pufr byl připraven navážením příslušného množství hydrogenfosforečnanu sodného p.a. (Lachema Brno, Neratovice) a následným rozpuštěním destilovanou vodou. Úprava pH na 7,01 byla prováděna kyselinou fosforečnou za současného měření nastavované hodnoty pH – metrem. Octanový pufr byl připraven rozpuštěním příslušného množství pevného octanu sodného o čistotě p.a (Lachema Brno) v destilované vodě a následnou úpravou pH na požadovanou hodnotu kyselinou octovou pod pH – metrem. Roztoky 0,1 a 0,6 mol.l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> byly připravovány ředěním kyseliny sírové. (1:1), která byla připravena z koncentrované 96% kyseliny sírové od firmy Penta.

Jako reálný vzorek byl použit přípravek TOPREX od firmy Syngenta Czech s.r.o., obsahující 11,3 % paklobutrazolu a 22,5 % difenokonazolu. 0,5 ml přípravku TOPREX bylo nadávkováno do 50 ml odměrky a doplněno po rysku acetonitrem. K analýze bylo dávkováno 50 µl tohoto zásobního roztoku. Při vyhodnocení byly přidávány standardy PBZ a DFK o koncentraci 34,8 mg/25 ml acetonitrilu a 44,1 mg/25 ml acetonitrilu v množství 20 µl.

## 2.2 Použité přístroje a vybavení

Voltametrické analýzy byly prováděny pomocí elektrochemického zařízení EP 100 (HSC Bratislava). Tento přístroj je ovládán počítačem pomocí software EP100 VA. Měřené záznamy je možné tisknout nebo ukládat do dalšího připojeného počítače. Měrný článek se skládá ze tří elektrod, a to pracovní BDD elektrody, referentní argentchloridové elektrody a pomocné platinové elektrody. Celý využívaný měrný systém je uveden na obrázku 5.



**Obrázek 5: Elektrochemický analyzátor EP 100 propojený s tiskárnou a elektrochemickým článkem**

K vážení látek během přípravy zásobních roztoků, popřípadě pufrů, byly používány analytické váhy Denver Instrument. Pro stanovení a úpravu pH byl použit pH-metr MV 870 (Präcitronic).

### 2.3. Postup voltametrického stanovení paklobutrazolu

Do voltametrické nádoby bylo nadávkováno 15 ml základního elektrolytu o složení 33% acetonitrilu a  $0,07 \text{ mol.l}^{-1}$  NaOH. Před každým měřením byla indikační elektroda ošetřena vloženým potenciálem, a to 2200 mV, - 200 mV a 2200 mV vždy po dobu 10 sekund. Na začátku každého dne bylo třeba tento postup opakovat tak dlouho, až vykazoval měrný článek stejnou odezvu. Poté byl přidán analyt a následná analýza byla realizována za podmínek, které jsou uvedeny na obrázku 6. Tyto hodnoty byly zjištěny experimentálně. Vyhodnocení výsledků se provádělo metodou standardního přídávku nebo pomocí kalibrační křivky.

<b>Elektroda</b>	<b>FE</b>	<b>Technika</b>	<b>DP</b>
Zapojenie	3el	Prúdový rozsah	40 $\mu\text{A}$
Met. merania	DP20	Scan počiatok	1200 mV
Polarizácia 1	-1200 mV	Scan koniec	2200 mV
Doba 1	0 s	Scan rýchlosť	40 mV/s
Miešanie 1	12	Scan krok	5 mV
Polarizácia 2	-1100 mV	Počet cyklov	0
Doba 2	0 s	Polarizácia 4	0 mV
Miešanie 2	0	Doba 4	0 s
Polarizácia 3	0 mV	Miešanie 4	12
Doba 3	0 s	Amplitúda pulzu	30 mV
Miešanie 3	0	Dĺžka pulzu	60 ms

<b>T1 potenciál</b>	<b>2000 mV</b>	<b>GF miešanie</b>	<b>10</b>
T1 doba	10 s	GF potenciál 0	-1150 mV
T1 miešanie	7	GF doba 0	0 s
T2 potenciál	-200 mV	GF elektroda	OFF
T2 doba	10 s	GF pauza	0 s
T2 miešanie	7	GF počet cyklov	4
T3 potenciál	-1000 mV	GF potenciál 1	950 mV
T3 doba	0 s	GF doba 1	0 s
T3 miešanie	7	GF potenciál 2	-50 mV
T1 potenciál 1	-500 mV	GF doba 2	0 s
T1 potenciál 2	400 mV	Bublania 1	600 s
T1 doba	0 s	Bublania 2	60 s
T1 miešanie	15	Elektroda	OFF
Stand by	-300 mV	Miešanie	11

Obrázek 6: Parametry voltametrického stanovení paklobutrazolu

### 3 Výsledky a diskuze

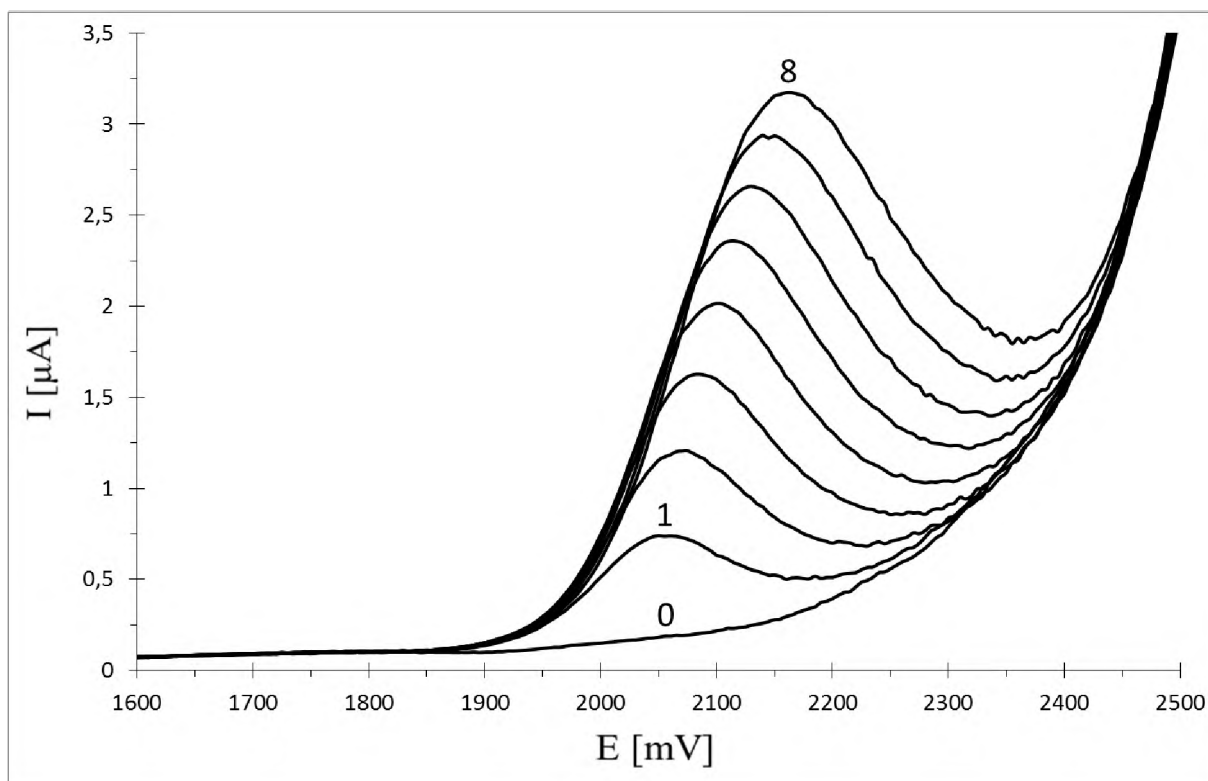
Vzhledem ke struktuře analyzované látky byla k jejímu voltametričkému stanovení zvolena anodická oxidace.

#### 3.1 Vliv organického rozpouštědla v základním elektrolytu na analýzu paklobutrazolu

Při vývoji voltametričké metody ke stanovení paklobutrazolu, bylo velmi důležité nejdříve nalézt vhodné prostředí, ve kterém by byla analyzovaná látka rozpustná a stabilní. Vzhledem k její poměrně složité struktuře bylo jasné, že vodní prostředí nebude vyhovovat. Na základě celé řady experimentů, kdy byla přidávána do základního elektrolytu různá rozpouštědla (sulfolan, acetonitril, isopropanol a další), bylo zjištěno, že výše vytýčeným požadavkům nejvíce vyhovuje acetonitril. Analyt byl za přítomnosti tohoto rozpouštědla dokonale rozpuštěn a stabilní.

Další experimenty byly zaměřeny na studium vlivu přítomnosti acetonitrilu na vlastní stanovení PBZ. Tato studie probíhala v kyselém základním elektrolytu, kterým byla  $0,6 \text{ mol.l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ , koncentrace acetonitrilu se měnila v rozmezí od 20 do 47 % a koncentrace analytu se měnila v rozmezí od 5,57 do 44,56  $\mu\text{g/ml}$ . Bylo zjištěno, že se zvyšující se koncentrací acetonitrilu v základním elektrolytu se píky PBZ mírně posouvají k pozitivnějším potenciálům a to od 2020 do 2190 mV. Citlivost stanovení se významně neměnila. Jak je vidět z obrázku 7, závislost výšky píků na koncentraci je v daném základním elektrolytu nelineární a maxima píků se posouvají se zvyšující se koncentrací analytu k pozitivním potenciálům, které se nachází nad 2000 mV. V další práci byl používán 33 %-ní acetonitril.





**Obrázek 7: Píky anodické oxidace paklobutrazolu v kyselém prostředí za přítomnosti 33% acetonitrilu**

Jednotlivé křivky: 0 – odezva základního elektrolytu, 1 až 8 – přídavky paklobutrazolu

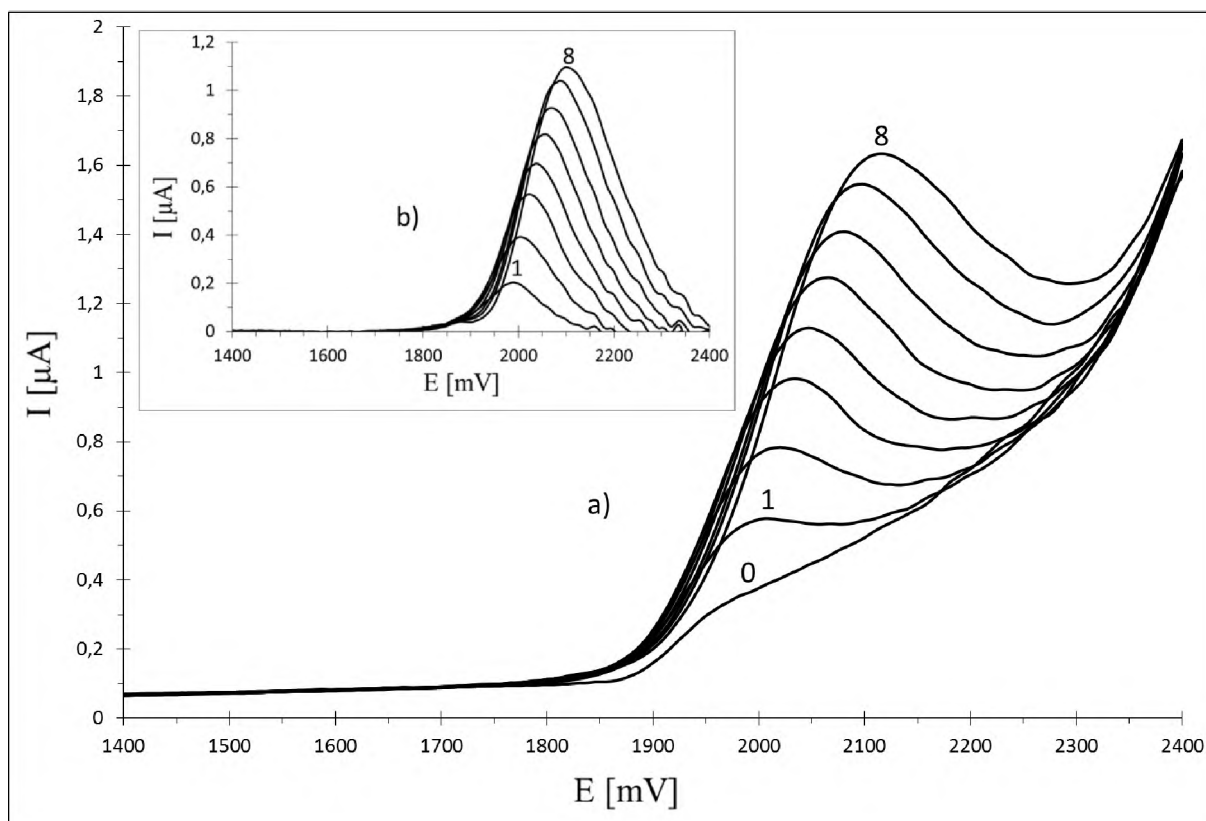
Základní elektrolyt:  $0,6 \text{ mol.l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$  a 33 % acetonitril, koncentrace PBZ od 5,57 do 44,56  $\mu\text{g/ml}$

Parametry stanovení: počáteční potenciál 500 mV, konečný potenciál 2500 mV, rychlost nárůstu potenciálu 40 mV/s, proudový rozsah 40  $\mu\text{A}$

### 3.2 Vliv pH na stanovení paklobutrazolu

Významný parametr, který ovlivňuje elektrochemické reakce využívané ke stanovení látek je hodnota pH. V této práci byla voltametrická oxidace paklobutrazolu zkoumána ve čtyřech základních elektrolytech, a to v  $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ , představující kyselé prostředí, v  $0,07 \text{ mol.l}^{-1}$  octanovém pufru o pH 4,66, dále v  $0,07 \text{ mol.l}^{-1}$  fosfátovém pufru o pH 7,01 a nakonec v  $0,07 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$ , který reprezentoval alkalické prostředí. Naměřené voltametrické křivky v rozsahu koncentrací PBZ od 2,23 do 17,84  $\mu\text{g/ml}$  jsou uvedeny na obrázcích 8 – 11. Tyto obrázky dokumentují jak původní naměřené záznamy, tak křivky po odečtení pozadí základního elektrolytu. Z obrázků je vidět, že stanovení PBZ lze provádět v širokém rozmezí pH. V kyselém prostředí (viz obr. 8) se maxima píků oxidace analytu pohybují v závislosti na koncentraci v rozmezí 1990 až 2100 mV. Závislost výšky píků na koncentraci je zřetelně nelineární. Mez stanovitelnosti vyhodnocená programem Nelin [23] je 0,88  $\mu\text{g/ml}$ . Provádí-li se stanovení PBZ v octanovém pufru (viz obr. 9), tak opět dochází k posunu maxim píků v závislosti na zvyšující se koncentraci, a to od 2005 do 2055 mV. Závislost výšky píků na koncentraci je rovněž nelineární, mez stanovitelnosti je 0,59  $\mu\text{g/ml}$ . Pro křivky anodické oxidace PBZ získané ve fosfátovém pufru (viz obr.10) platí, že maximum píků se mírně posouvá se vzrůstající koncentrací analytu směrem k pozitivnějším potenciálům, a to od 2005 do 2045 mV. Závislost výšky píků na koncentraci je lineární, mez stanovitelnosti je srovnatelná s předešlými výsledky a je 0,36  $\mu\text{g/ml}$ . Křivky získané při stanovení paklobutrazolu v alkalickém prostředí (viz obr. 11) vykazují nejmenší posun polohy v závislosti na koncentraci, a to pro maximum od 1970 do 1985 mV rozsahu testovaných koncentrací. Výšky píků se zvyšují v závislosti na koncentraci lineárně a mez stanovitelnosti je 0,30  $\mu\text{g/ml}$ .

Získané poznatky této studie jsou shrnuty v tabulce 1. Vedle již uvedených skutečností jsou zde dokumentovány také rovnice kalibračních závislostí a meze detekce. Vše bylo vyhodnoceno programem Nelin [23]. Na základě těchto výsledků byl pro další práci zvolen alkalický základní elektrolyt  $0,07 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$  za přítomnosti 33 % acetonitrilu.



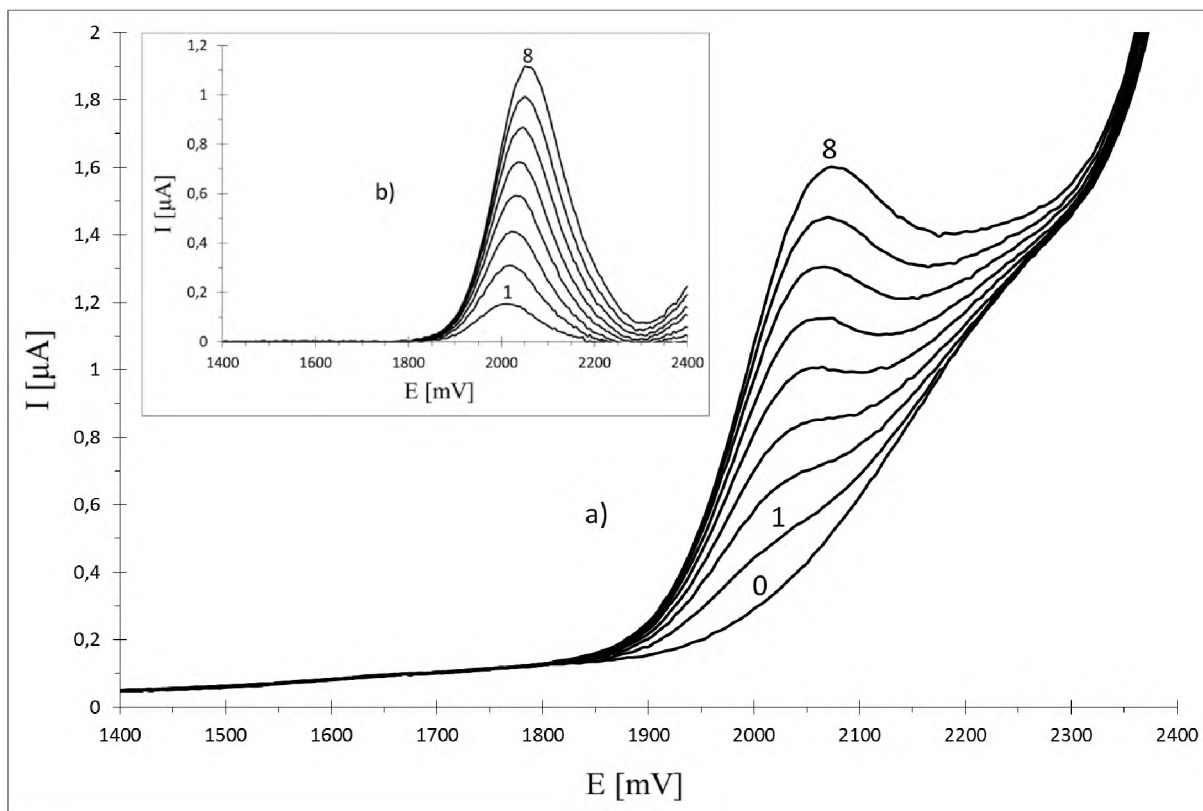
**Obrázek 8: Křivky anodické oxidace paklobutrazolu v prostředí  $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$**

a) původní naměřené píky, b) píky po odečtení odezvy základního elektrolytu

Jednotlivé křivky: 0 – odezva základního elektrolytu, 1 až 8 – přídavky paklobutrazolu

Základní elektrolyt:  $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$  a 33 % acetonitril, koncentrace PBZ od 2,23 do 17,84  $\mu\text{g/ml}$

Parametry stanovení: počáteční potenciál 500 mV, konečný potenciál 2400 mV, rychlost nárůstu potenciálu 40 mV/s, proudový rozsah 40  $\mu\text{A}$



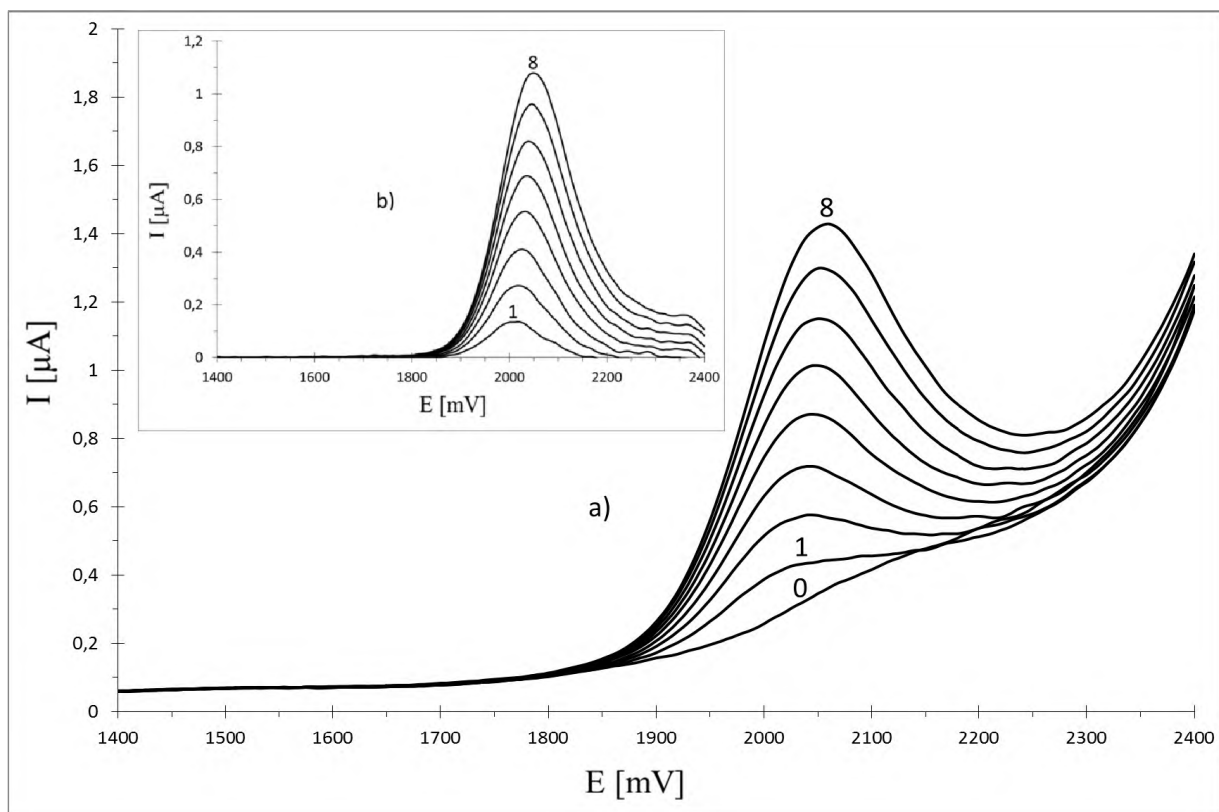
**Obrázek 9: Křivky anodické oxidace paklobutrazolu v  $0,07 \text{ mol.l}^{-1}$  octanovém pufru o pH 4,66**

a) původní naměřené píky, b) píky po odečtení odezvy základního elektrolytu

Jednotlivé křivky: 0 – odezva základního elektrolytu, 1 až 8 – přídavky paklobutrazolu

Základní elektrolyt:  $0,07 \text{ mol.l}^{-1}$  octanový pufr o pH 4,66 a 33 % acetonitril, koncentrace PBZ od 2,23 do 17,84  $\mu\text{g/ml}$

Parametry stanovení: počáteční potenciál 500 mV, konečný potenciál 2400 mV, rychlost nárůstu potenciálu 40 mV/s, proudový rozsah 40  $\mu\text{A}$



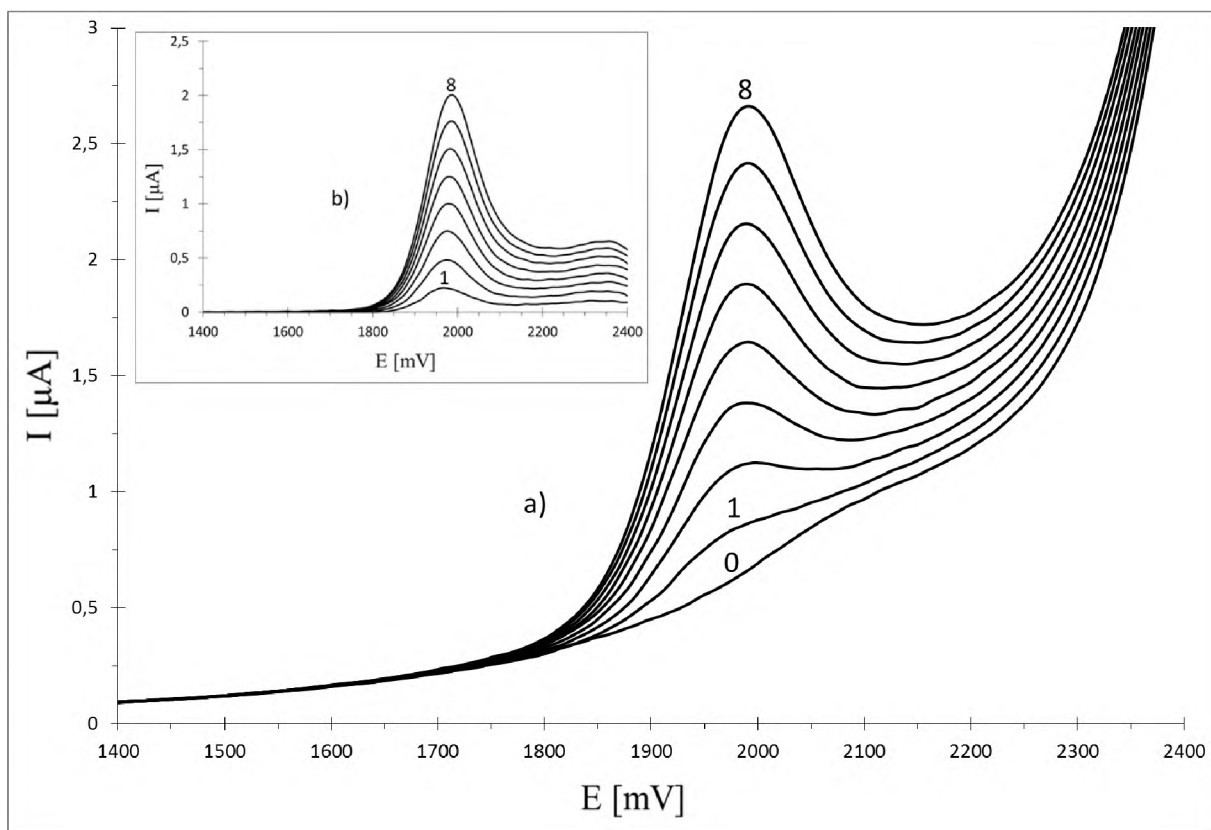
**Obrázek 10: Křivky anodické oxidace paklobutrazolu v  $0,07 \text{ mol.l}^{-1}$  fosfátovém pufru o pH 7,01**

a) původní naměřené píky, b) píky po odečtení odezvy základního elektrolytu

Jednotlivé křivky: 0 – odezva základního elektrolytu, 1 až 8 – přídavky paklobutrazolu

Základní elektrolyt:  $0,07 \text{ mol.l}^{-1}$  fosfátový pufr o pH 7,01 a 33 % acetonitril, koncentrace PBZ od 2,23 do 17,84  $\mu\text{g/ml}$

Parametry stanovení: počáteční potenciál 500 mV, konečný potenciál 2400 mV, rychlost nárůstu potenciálu 40 mV/s, proudový rozsah 40  $\mu\text{A}$



**Obrázek 11: Křivky anodické oxidace paklobutrazolu v prostředí  $0,07 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$**

a) původní naměřené píky, b) píky po odečtení odezvy základního elektrolytu

Jednotlivé křivky: 0 – odezva základního elektrolytu, 1 až 8 – přídavky paklobutrazolu

Základní elektrolyt:  $0,07 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$  a 33 % acetonitril, koncentrace PBZ od 2,23 do 17,84  $\mu\text{g/ml}$

Parametry stanovení: počáteční potenciál 500 mV, konečný potenciál 2400 mV, rychlost nárůstu potenciálu 40 mV/s, proudový rozsah 40  $\mu\text{A}$

**Tabulka 1: Výsledky studie vlivu pH na voltametrické stanovení paklobutrazolu v rozmezí koncentrací od 2,23 do 17,84 µg/ml**

Základní elektrolyt	Poloha maxima [mV]	Kalibrační závislost	Mez stanovitelnosti [µA]	Mez detekce [µA]
0,1 mol.l <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 33%-ní acetonitril	1990 - 2100	$I = - 0,0018c^2 + 0,094c - 0,0075$	0,88	0,26
0,07 mol.l <sup>-1</sup> octanový pufr o pH 4,66, 33%-ní acetonitril	2005 - 2055	$I = - 0,0004c^2 + 0,07c - 0,00009$	0,59	0,18
0,07 mol.l <sup>-1</sup> fosfátový pufr o pH 7,01 , 33%-ní acetonitril	2005 - 2045	$I = 0,062c - 0,01$	0,36	0,11
0,07 mol.l <sup>-1</sup> NaOH, 33%-ní acetonitril	1970 - 1985	$I = 0,115c - 0,033$	0,30	0,09

Vysvětlivky k tabulce 1:

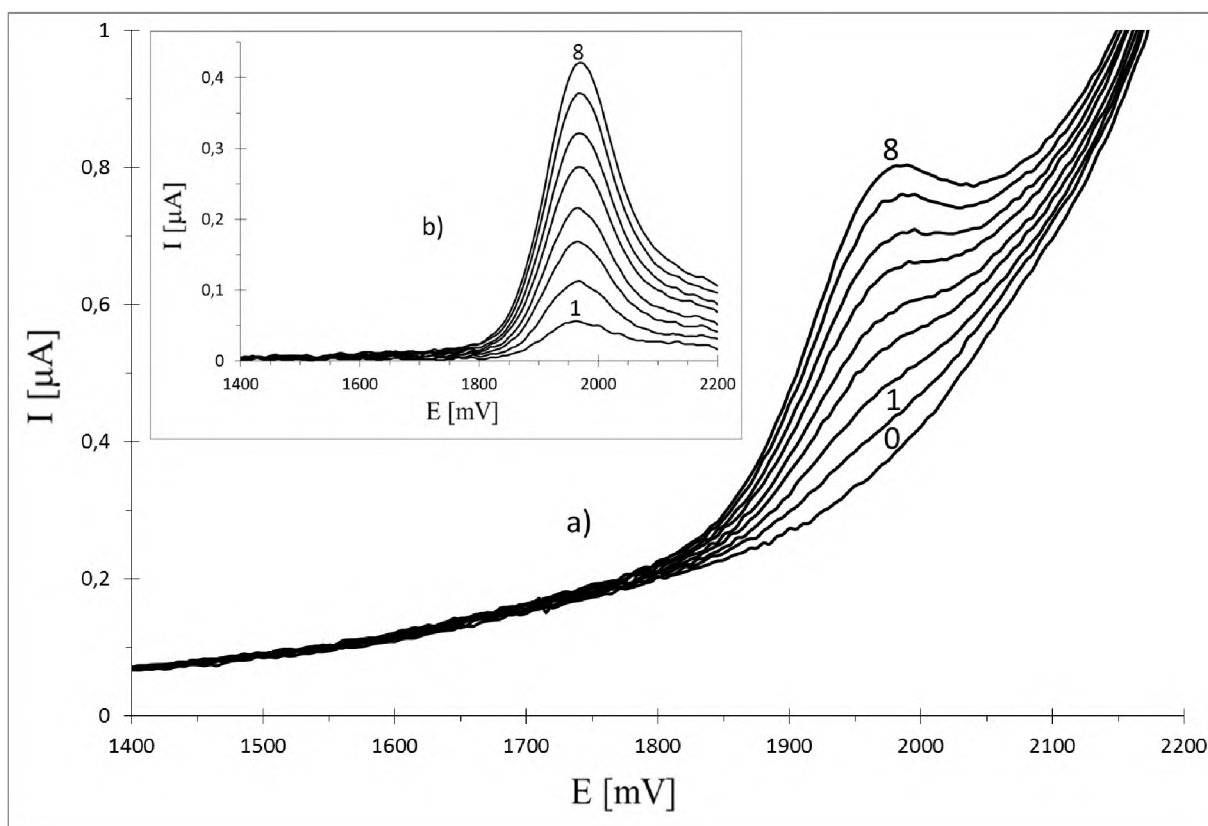
I – proud v µA

c – koncentrace PBZ v µg/ml

### 3.3 Kvantitativní stanovení paklobutrazolu za nalezených podmínek

Další pozornost byla zaměřena na testování reprodukovatelnosti a správnosti voltametrického stanovení paklobutrazolu za navržených podmínek.

Nejdříve však byla ověřována linearita závislosti výšky píků na koncentraci v rozsahu nižších koncentrací, a to od 0,56 až do 4,48  $\mu\text{g/ml}$  a od 0,22 do 1,76  $\mu\text{g/ml}$ . Naměřené křivky přináší obrázky 12 a 13. Vyhodnocením programem Nelin byla linearita potvrzena. Rovnice kalibračních křivek jsou uvedeny v tabulce 2 spolu s mezemi stanovitelnosti a detekce.



**Obrázek 12: Anodické křivky voltametrického stanovení paklobutrazolu o koncentracích od 0,56 do 4,48  $\mu\text{g/ml}$**

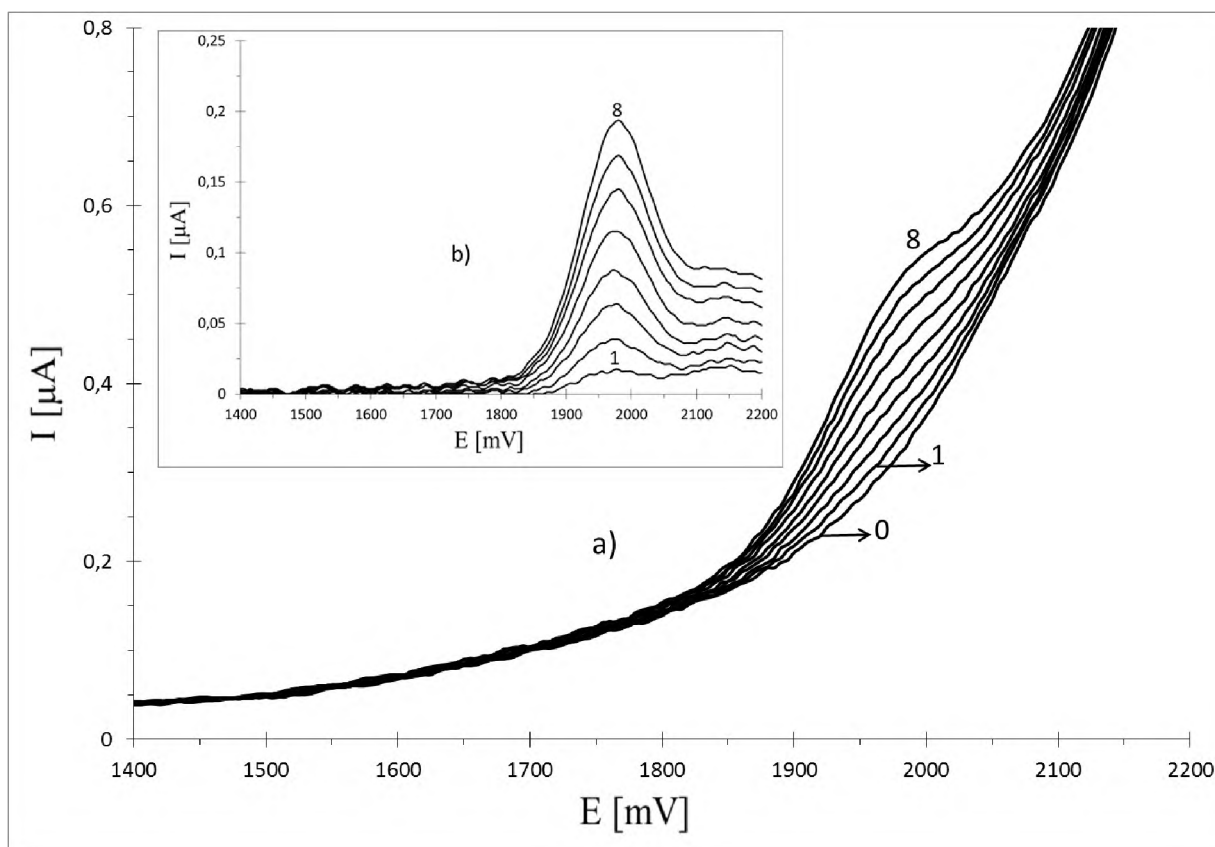
a) původní naměřené píky, b) píky po odečtení odezvy základního elektrolytu

Jednotlivé křivky: 0 – odezva základního elektrolytu, 1 až 8 – přídavky paklobutrazolu

Základní elektrolyt: 0,07 mol.l<sup>-1</sup> NaOH a 33 % acetonitril, koncentrace PBZ od 0,56 až do 4,48  $\mu\text{g/ml}$

Parametry stanovení: počáteční potenciál 1200 mV, konečný potenciál 2200 mV, rychlost nárůstu potenciálu 40 mV/s, proudový rozsah 40  $\mu\text{A}$





**Obrázek 13: Anodické křivky voltametrického stanovení paklobutrazolu o koncentracích od 0,22 do 1,76  $\mu\text{g/ml}$**

a) původní naměřené píky, b) píky po odečtení odezvy základního elektrolytu

Jednotlivé křivky: 0 – odezva základního elektrolytu, 1 až 8 – přídavky paklobutrazolu

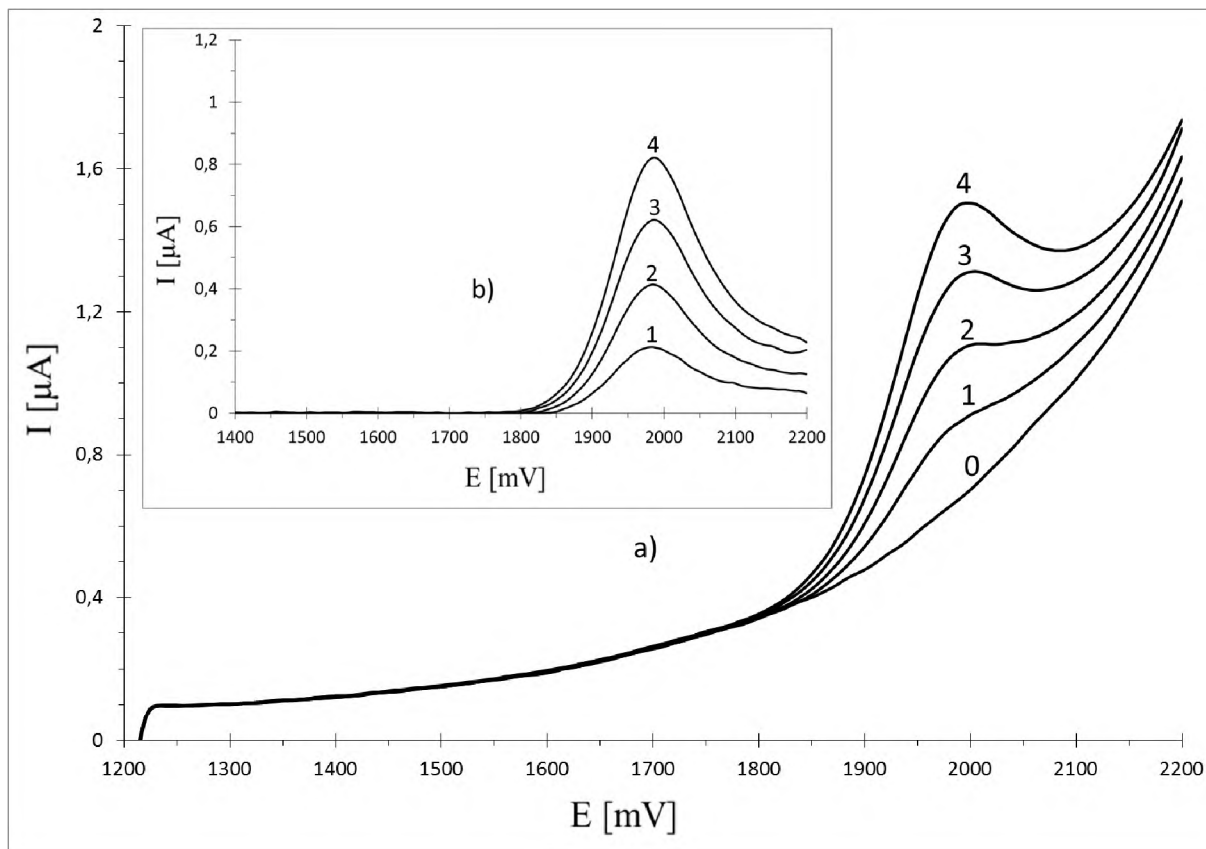
Základní elektrolyt:  $0,07 \text{ mol.l}^{-1}$  NaOH a 33 % acetonitril, koncentrace PBZ od 0,22 do 1,76  $\mu\text{g/ml}$

Parametry stanovení: počáteční potenciál 1200 mV, konečný potenciál 2200 mV, rychlost nárůstu potenciálu 40 mV/s, proudový rozsah 40  $\mu\text{A}$

**Tabulka 2: Výsledky ověřování linearitu závislosti výšky píků na koncentraci paklobutrazolu v rozmezí od 0,56 do 4,48  $\mu\text{g/ml}$  a od 0,22 do 1,76  $\mu\text{g/ml}$**

Koncentrační rozmezí [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Kalibrační závislost	Mez stanovitelnosti [ $\mu\text{A}$ ]	Mez detekce [ $\mu\text{A}$ ]
0,56 – 4,48	$I = 0,095c + 0,006$	0,35	0,10
0,22 – 1,76	$I = 0,114c - 0,011$	0,15	0,05

Následovalo opakované stanovení modelových roztoků o třech koncentracích, a to 2,23  $\mu\text{g/ml}$ , 0,56  $\mu\text{g/ml}$  a 0,22  $\mu\text{g/ml}$ . Výsledky byly zjišťovány pomocí tří přidavků standardu PBZ a statisticky hodnoceny programem Excel. Příklady naměřených křivek pro jednotlivé koncentrační hladiny jsou znázorněny na obr. 14 až 16. Výsledky stanovení jsou pak shrnuty v tabulkách 3 až 5.



**Obrázek 14: Anodické křivky opakovaného stanovení paklobutrazolu o koncentraci 2,23  $\mu\text{g/ml}$  metodou standardního přidavku**

a) původní naměřené píky, b) píky po odečtení odezvy základního elektrolytu

Jednotlivé křivky: 0 – odezva základního elektrolytu, 1 – přidavek modelového vzorku paklobutrazolu o koncentraci PBZ 2,23  $\mu\text{g/ml}$ , 2 až 4 – standardní přidavky paklobutrazolu o definované koncentraci

Základní elektrolyt: 0,07  $\text{mol.l}^{-1}$  NaOH a 33 % acetonitril, koncentrace PBZ od 2,23 do 8,92  $\mu\text{g/ml}$

Parametry stanovení: počáteční potenciál 1200 mV, konečný potenciál 2200 mV, rychlost nárůstu potenciálu 40 mV/s, proudový rozsah 40  $\mu\text{A}$

**Tabulka 3: Výsledky opakovaného stanovení paklobutrazolu o koncentraci 2,23 µg/ml metodou standardního přídatku**

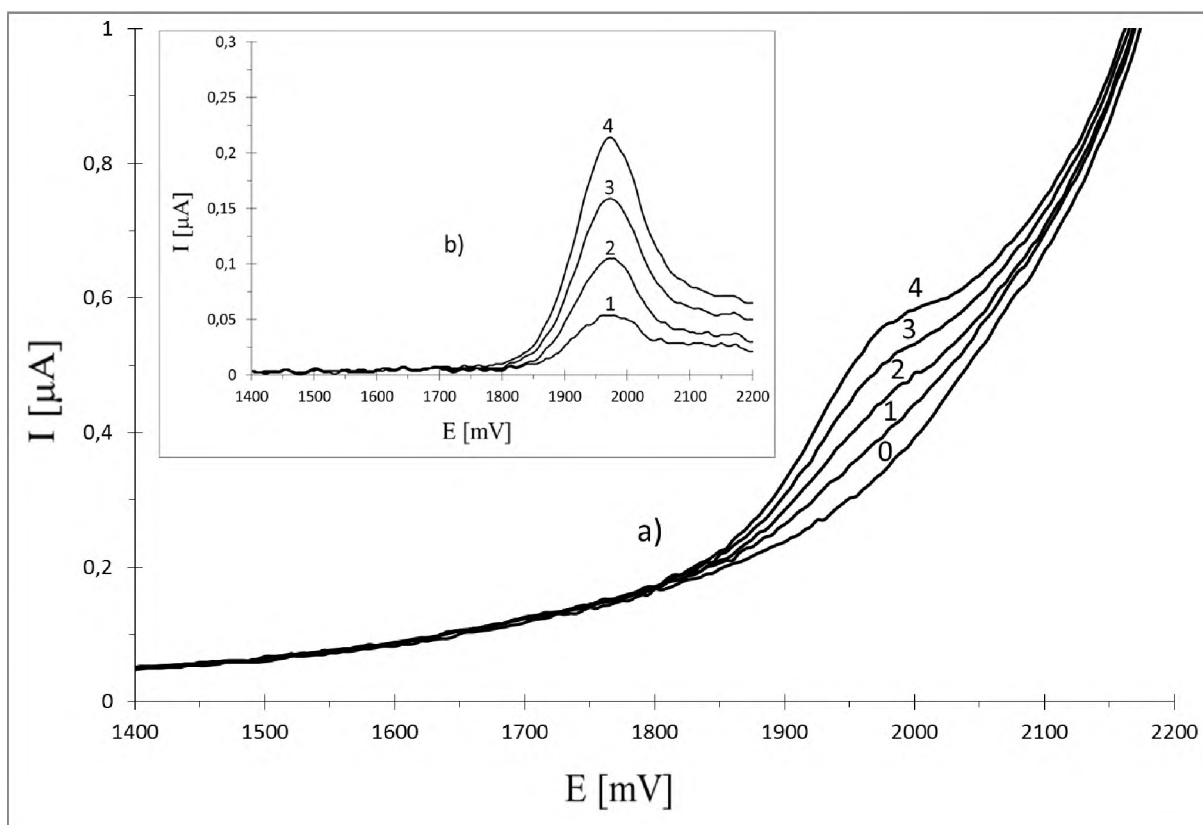
Číslo měření	Stanovené množství [µg/ml]	Δ [µg/ml]	Δ [%]
1	2,27	0,04	1,8
2	2,14	-0,09	-4,04
3	2,06	-0,17	-7,6
4	2,07	-0,16	-7,2
5	2,36	0,13	5,8

Střední hodnota: 2,18 µg/ml

Směrodatná odchylka: 0,13 µg/ml

Interval spolehlivosti: 2,18 ± 0,09 µg/ml

Z uvedených hodnot je vidět, že při stanovení 2,23 µg/ml se celková chyba pohybovala od - 7,6 do 5,8 %. Střední hodnota se rovnala 2,18 µg/ml, což je o 2,2 % méně, než stanovovaná hodnota. Směrodatná odchylka se rovnala 0,13 µg/ml, což svědčí o dostatečné spolehlivosti metody.



**Obrázek 15: Anodické křivky opakovaného stanovení paklobutrazolu o koncentrací 0,56  $\mu\text{g/ml}$  metodou standardního přídatku**

a) původní naměřené píky, b) píky po odečtení odezvy základního elektrolytu

Jednotlivé křivky: 0 – odezva základního elektrolytu, 1 – přídatek modelového vzorku paklobutrazolu o koncentrací 0,56  $\mu\text{g/ml}$ , 2 až 4 – standardní přídatky paklobutrazolu o definované koncentraci

Základní elektrolyt: 0,07  $\text{mol.l}^{-1}$  NaOH a 33 % acetonitril, koncentrace PBZ od 0,56 do 2,24  $\mu\text{g/ml}$

Parametry stanovení: počáteční potenciál 1200 mV, konečný potenciál 2200 mV, rychlost nárůstu potenciálu 40 mV/s, proudový rozsah 40  $\mu\text{A}$

**Tabulka 4: Výsledky opakovaného stanovení paklobutrazolu o koncentraci 0,56 µg/ml metodou standardního přídatku**

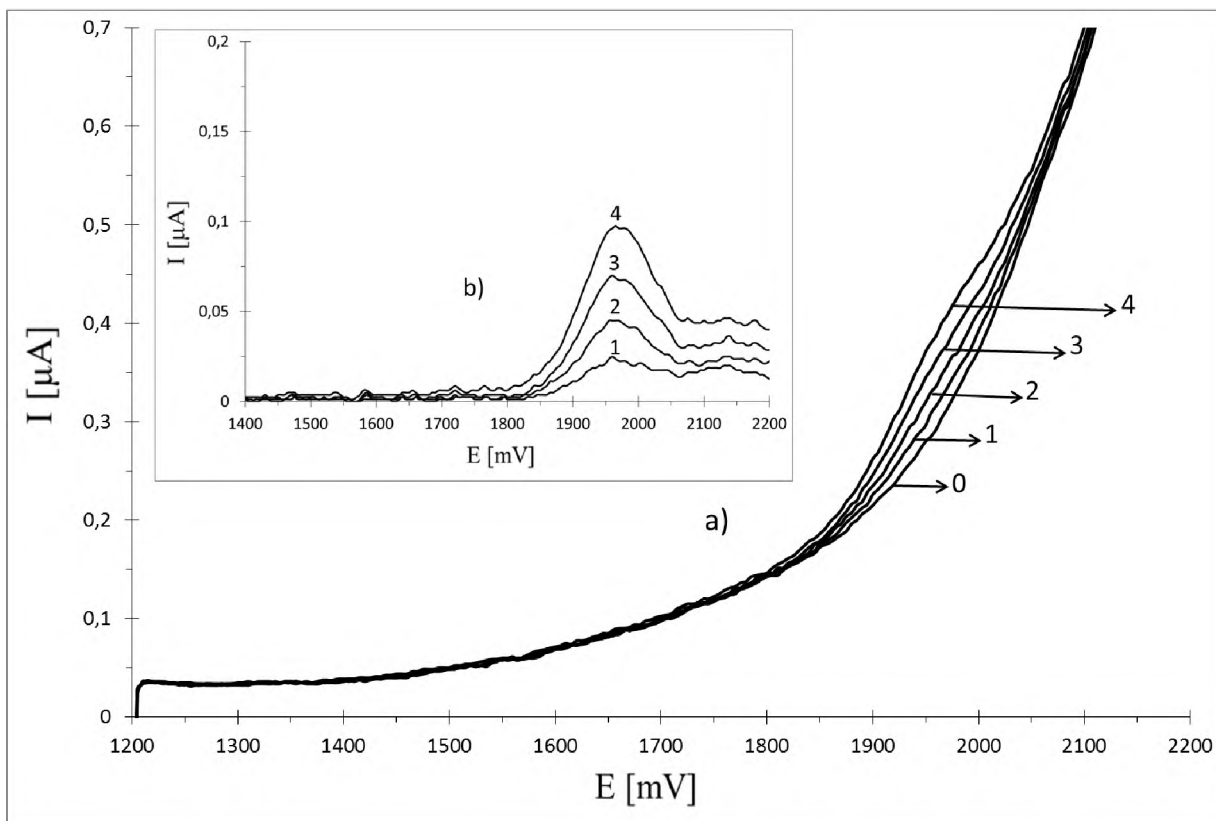
Číslo měření	Stanovené množství [µg/ml]	Δ [µg/ml]	Δ [%]
1	0,54	-0,02	-3,6
2	0,56	0	0
3	0,57	0,01	1,8
4	0,52	-0,04	-7,1
5	0,52	-0,04	-7,1

Střední hodnota: 0,542 µg/ml

Směrodatná odchylka: 0,023 µg/ml

Interval spolehlivosti: 0,542 ± 0,015 µg/ml

Při zkoumání reprodukovatelnosti stanovení 0,56 µg/ml se průměr lišil od reálné hodnoty o 0,018 µg/ml, což činí 3,2 %, absolutní chyba se pak rovnala 7,1 %. Směrodatná odchylka byla 0,023 µg/ml, což ukazuje, že i při tak malých koncentracích dává metoda vyhovující výsledky.



**Obrázek 16: Anodické křivky opakovaného stanovení paklobutrazolu o koncentraci 0,22  $\mu\text{g/ml}$  metodou standardního přídávku**

a) původní naměřené píky, b) píky po odečtení odezvy základního elektrolytu

Jednotlivé křivky: 0 – odezva základního elektrolytu, 1 – přídavek modelového vzorku paklobutrazolu o koncentraci 0,22  $\mu\text{g/ml}$ , 2 až 4 – standardní přídávky paklobutrazolu o definované koncentraci

Základní elektrolyt: 0,07  $\text{mol.l}^{-1}$  NaOH a 33 % acetonitril, koncentrace PBZ od 0,22 do 0,88  $\mu\text{g/ml}$

Parametry stanovení: počáteční potenciál 1200 mV, konečný potenciál 2200 mV, rychlost nárůstu potenciálu 40 mV/s, proudový rozsah 40  $\mu\text{A}$

Z tabulky 5 je vidět, že při opakovatelném stanovení 0,22  $\mu\text{g/ml}$  se směrodatná odchylka rovnala 0,013  $\mu\text{g/ml}$ , což ukazuje, že tato metoda dává uspokojivé výsledky i při velmi nízkých koncentracích analytu. Ve srovnání s předešlými experimenty se chyby stanovení o něco zvýšily, nacházely se v rozmezí od – 9,1 do 4,5 %. Interval spolehlivosti  $0,212 \pm 0,009 \mu\text{g/ml}$ , vypovídá o dobré přesnosti metody.

**Tabulka 5: Výsledky opakovaného stanovení paklobutrazolu o koncentraci 0,22 µg/ml metodou standardního přídávku**

Číslo měření	Stanovené množství [µg/ml]	Δ [µg/ml]	Δ [%]
1	0,23	0,01	4,5
2	0,20	-0,02	-9,1
3	0,21	-0,01	-4,5
4	0,22	0	0
5	0,20	-0,02	-9,1

Střední hodnota: 0,212 µg/ml

Směrodatná odchylka: 0,013 µg/ml

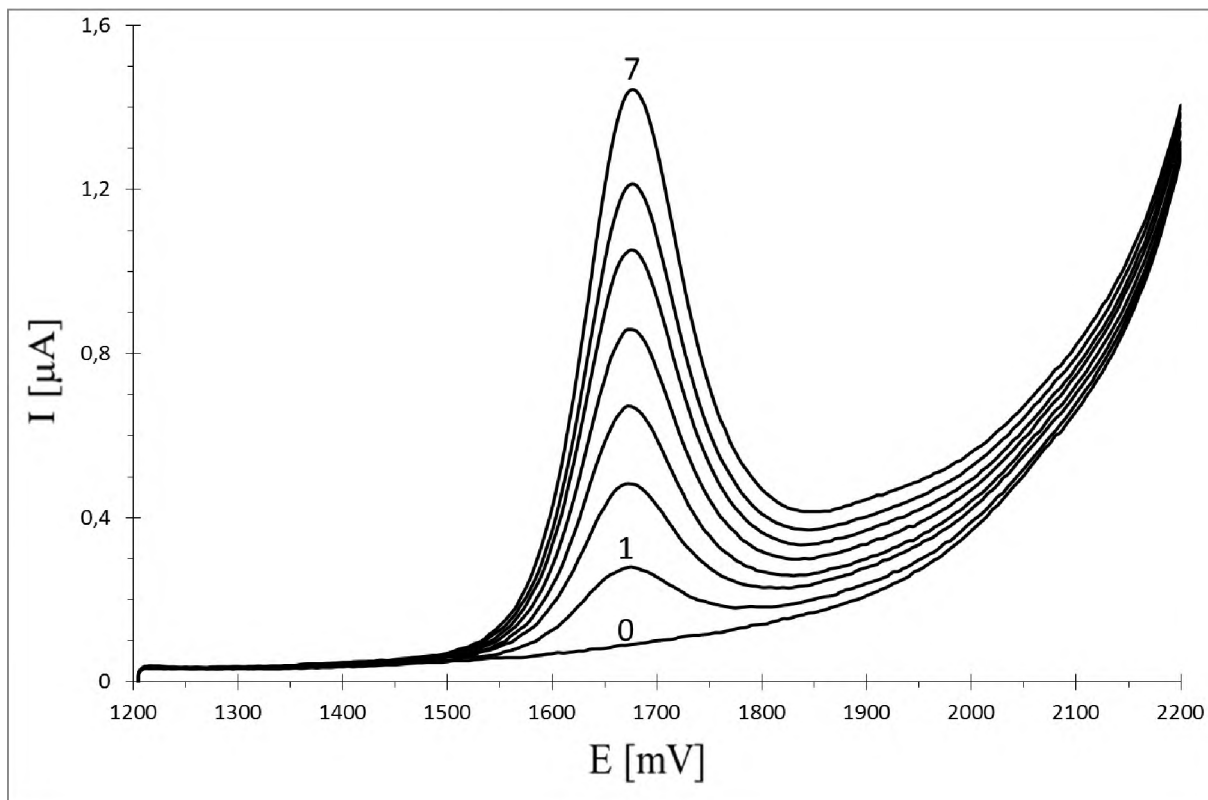
Interval spolehlivosti: 0,212 ± 0,009 µg/ml

### 3.4 Voltametrické stanovení difenokonazolu

Vzhledem k tomu, že součástí jediného dostupného přípravku v ČR obsahujícího paklobutrazol – TOPREX se nachází jako doprovodná složka difenokonazol, a to ve významném množství, bylo třeba se nad rámec zadaného diplomového úkolu zaměřit také na voltametrickou analýzu této látky.

Studie pH prokázala, že DFK lze s využitím diamantové elektrody BDDE oxidovat v širokém rozmezí pH, a to od kyselého prostředí, po neutrální a také v alkalickém základním elektrolytu. Naměřené křivky jsou dokumentovány na obrázcích 17 až 20. Z obrázků je vidět, že v kyselém a neutrálním prostředí se nachází maxima voltametrických píků oxidace v rozsahu potenciálů od 1775 do 1915 mV, přičemž zvyšující se koncentrací analytu se poloha maxima píků posunuje k pozitivnějším potenciálům. Citlivost odezvy je srovnatelná. Provádí-li se stanovení v alkalickém roztoku (viz. Obr. 17), nachází se píky při nižších pozitivních potenciálech (leží mezi 1500 až 1850 mV) s maximem při hodnotě 1675 nebo 1670 podle aktuálního stavu měrného článku. Poloha tohoto maxima v závislosti na zvyšující se koncentrací analytu se nemění. Výšky píků jsou ve srovnání s předešlými diskutovanými analýzami cca 2x vyšší.

Na základě zjištěných skutečností lze konstatovat, že experimentální podmínky doporučené pro stanovení paklobutrazolu, zejména alkalický základní elektrolyt za přítomnosti acetonitrilu, vyhovují také pro stanovení doprovodné látky- difenokonazolu.



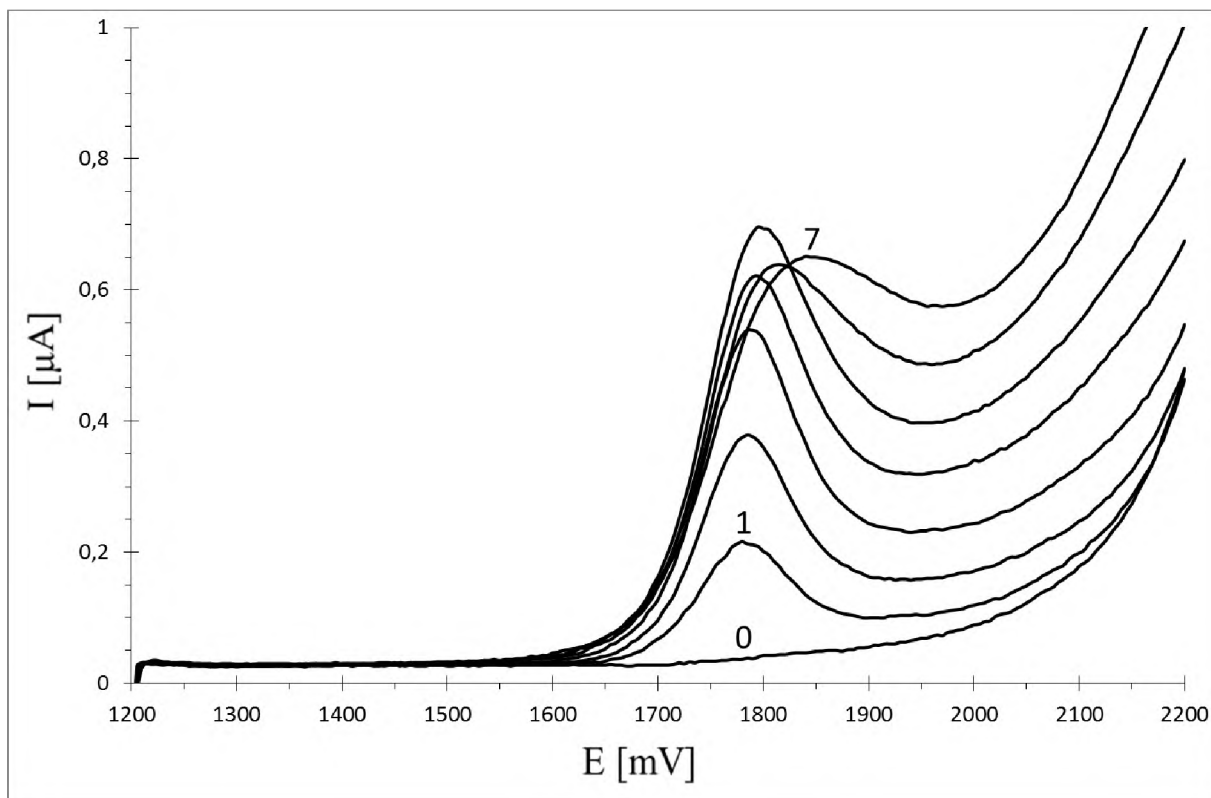
**Obrázek 17: Křivky anodické oxidace difenokonazolu v prostředí 0,07 mol.l<sup>-1</sup> NaOH**

Jednotlivé křivky: 0 – odezva základního elektrolytu, 1 až 7 – přídavky difenokonazolu

Základní elektrolyt: 0,07 mol.l<sup>-1</sup> NaOH a 33 % acetonitril, koncentrace DFK od 1,18 do 8,26 μg/ml

Parametry stanovení: počáteční potenciál 1200 mV, konečný potenciál 2200 mV, rychlost nárůstu potenciálu 40 mV/s, proudový rozsah 40 μA



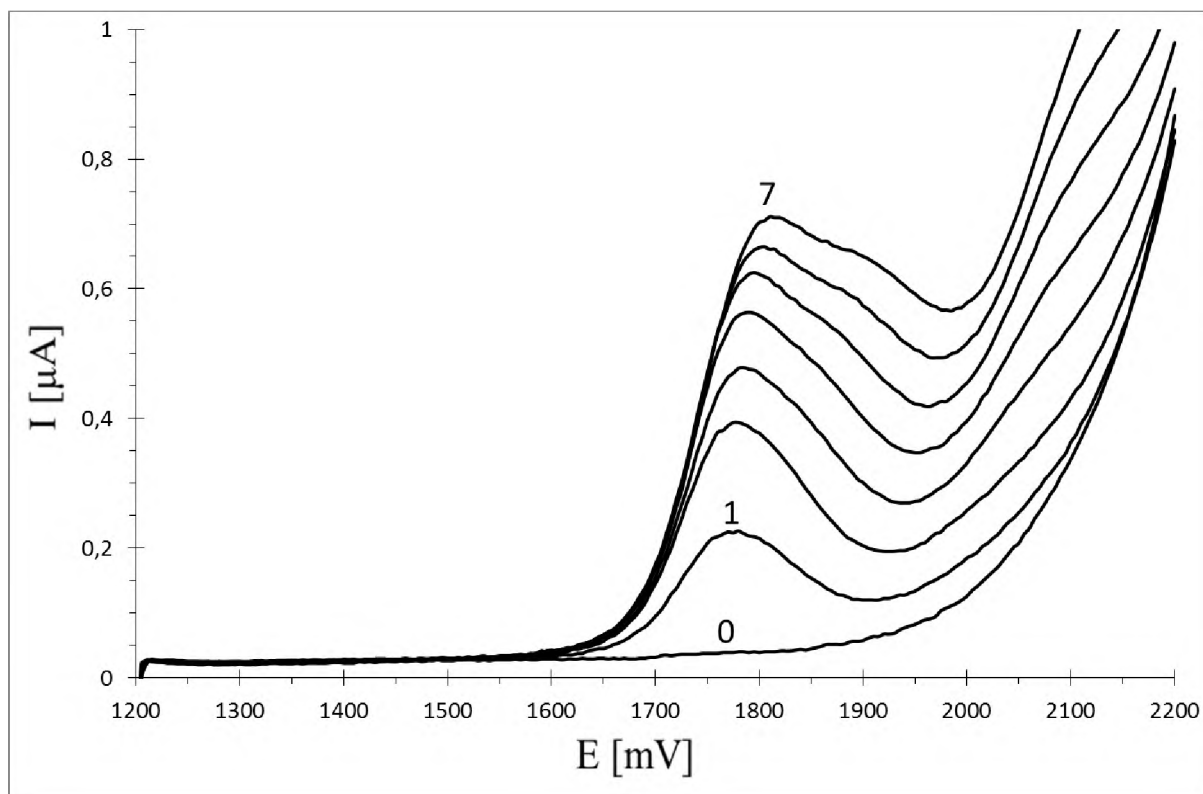


**Obrázek 18: Křivky anodické oxidace difenokonazolu v  $0,07 \text{ mol.l}^{-1}$  fosfátovém pufru o pH 7,01**

Jednotlivé křivky: 0 – odezva základního elektrolytu, 1 až 7 – přídavky difenokonazolu

Základní elektrolyt:  $0,07 \text{ mol.l}^{-1}$  fosfátový pufr o pH 7,01 a 33 % acetonitril, koncentrace DFK od 1,18 do 8,26  $\mu\text{g/ml}$

Parametry stanovení: počáteční potenciál 1200 mV, konečný potenciál 2200 mV, rychlost nárůstu potenciálu 40 mV/s, proudový rozsah 40  $\mu\text{A}$

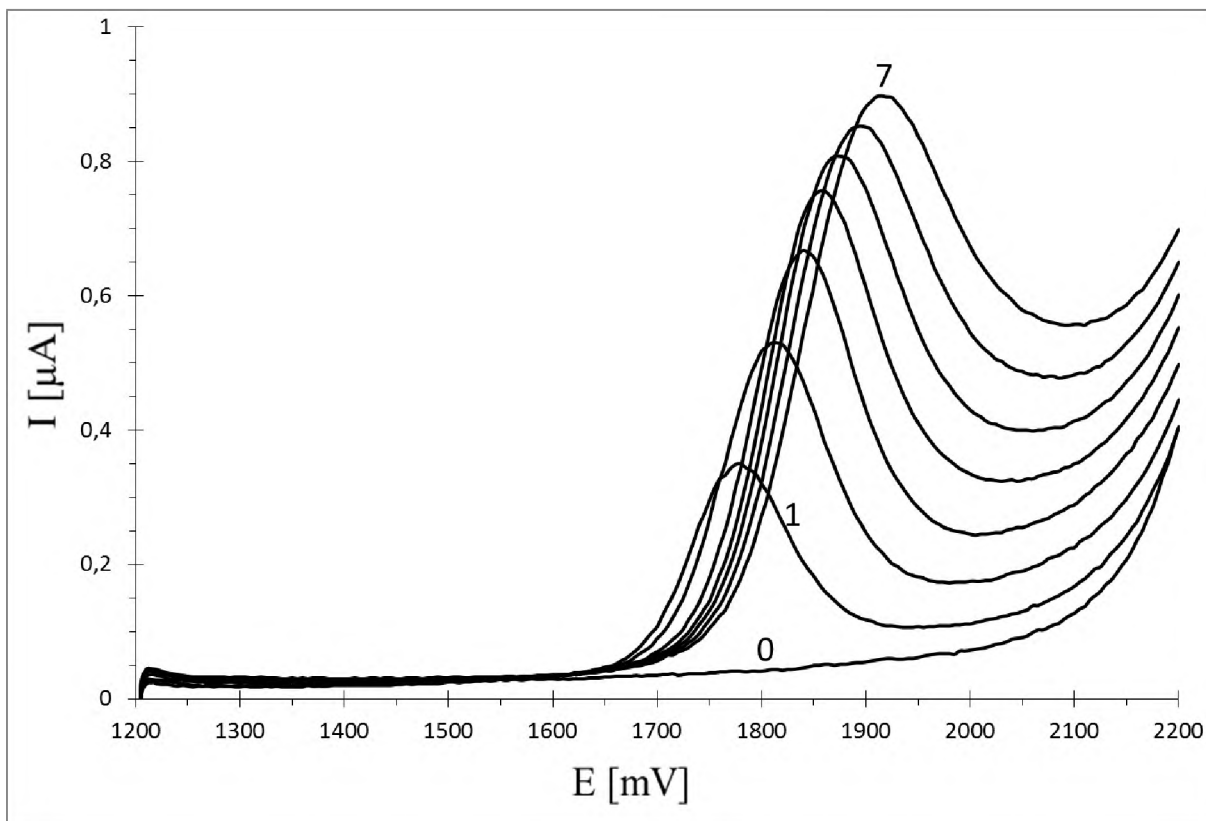


**Obrázek 19: Křivky anodické oxidace difenokonazolu v 0,07 mol.l<sup>-1</sup> octanovém pufru o pH 4,66**

Jednotlivé křivky: 0 – odezva základního elektrolytu, 1 až 7 – přídavky difenokonazolu

Základní elektrolyt: 0,07 mol.l<sup>-1</sup> octanový pufr o pH 4,66 a 33 % acetonitril, koncentrace DFK od 1,18 do 8,26 μg/ml

Parametry stanovení: počáteční potenciál 1200 mV, konečný potenciál 2200 mV, rychlost nárůstu potenciálu 40 mV/s, proudový rozsah 40 μA



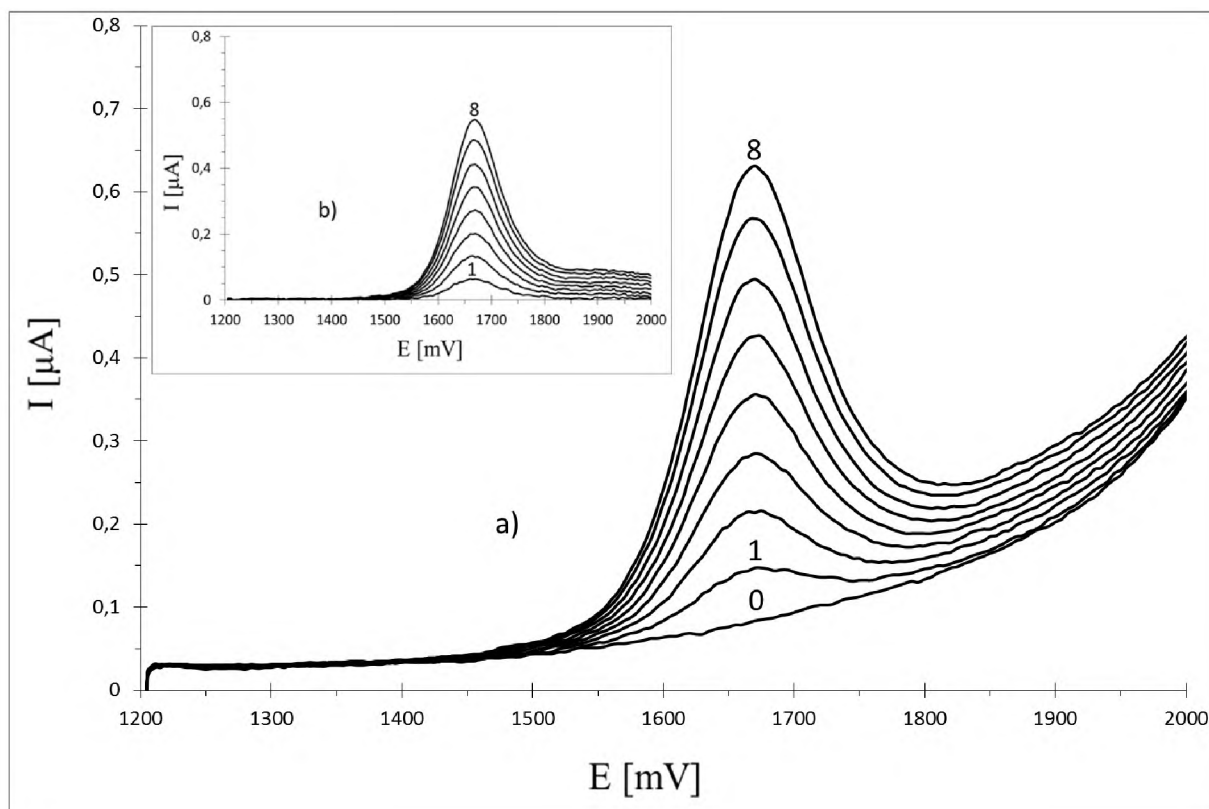
**Obrázek 20: Křivky anodické oxidace difenokonazolu v prostředí  $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$**

Jednotlivé křivky: 0 – odezva základního elektrolytu, 1 až 7 – přídavky difenokonazolu

Základní elektrolyt:  $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$  a 33 % acetonitril, koncentrace DFK od 1,18 do 8,26  $\mu\text{g/ml}$

Parametry stanovení: počáteční potenciál 1200 mV, konečný potenciál 2200 mV, rychlost nárůstu potenciálu 40 mV/s, proudový rozsah 40  $\mu\text{A}$

Kvantitativní stanovení difenokonazolu bylo testováno v rozsahu koncentrací od 1,18 do 9,44  $\mu\text{g/ml}$ . Bylo zjištěno, že jak ukazuje obr. 21, výšky píků lineárně odráží stanovené množství. Toto potvrdilo i statistické zpracování programem Nelin, kdy byla vypočtena rovnice přímky ve tvaru  $I = 0,059c - 0,007$ , kde  $I$  je v  $\mu\text{A}$  a  $c$  je v  $\mu\text{g/ml}$ . Mez stanovitelnosti je za použitých podmínek 0,28  $\mu\text{g/ml}$  a mez detekce 0,08  $\mu\text{g/ml}$ .



**Obrázek 21: Anodické křivky voltametrického stanovení difenokonazolu o koncentraci od 1,18 do 9,44  $\mu\text{g/ml}$**

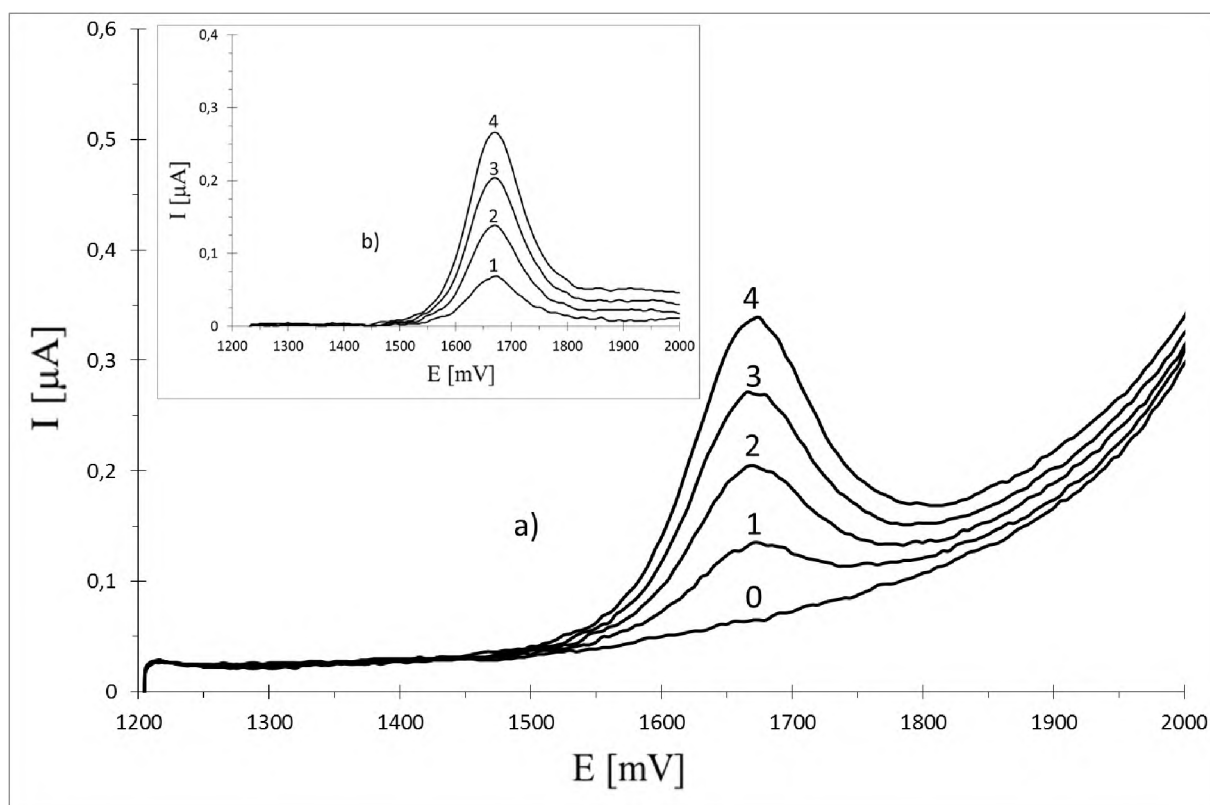
a) původní naměřené píky, b) píky po odečtení odezvy základního elektrolytu

Jednotlivé křivky: 0 – odezva základního elektrolytu, 1 až 8 – přídavky difenokonazolu

Základní elektrolyt:  $0,07 \text{ mol.l}^{-1}$  NaOH a 33 % acetonitril, koncentrace DFK od 1,18 do 9,44  $\mu\text{g/ml}$

Parametry stanovení: počáteční potenciál 1200 mV, konečný potenciál 2200 mV, rychlost nárůstu potenciálu 40 mV/s, proudový rozsah 40  $\mu\text{A}$

Reprodukovatelnost voltametrické analýzy difenokonazolu byla testována opakovaným stanovením modelového vzorku o koncentraci 1,18  $\mu\text{g/ml}$ . Příklad naměřených křivek vzorku a tři následných přidavků standardu přináší obr. 22. Dosažené výsledky uvádí tabulka 6. Je vidět, že absolutní chyba stanovení nepřesahuje 5,1 %. Vypočtený průměr je o 1 % vyšší než reálná koncentrace analytu. Dobrou přesnost metody potvrzuje i směrodatná odchylka o hodnotě 0,043  $\mu\text{g/ml}$ . Tyto výsledky ukazují, že difenokonazol by neměl žádným způsobem zhoršovat výsledky stanovení při analýze reálného vzorku.



**Obrázek 22: Anodické křivky opakovaného stanovení difenokonazolu o koncentraci 1,18  $\mu\text{g/ml}$  metodou standardního přidavku**

a) původní naměřené píky, b) píky po odečtení odezvy základního elektrolytu

Jednotlivé křivky: 0 – odezva základního elektrolytu, 1 – přidavek modelového vzorku difenokonazolu o koncentraci 1,18  $\mu\text{g/ml}$ , 2 až 4 – standardní přidavky difenokonazolu o definované koncentraci

Základní elektrolyt: 0,07  $\text{mol.l}^{-1}$  NaOH a 33 % acetonitril, koncentrace DFK od 1,18 do 4,72  $\mu\text{g/ml}$

Parametry stanovení: počáteční potenciál 1200 mV, konečný potenciál 2200 mV, rychlost nárůstu potenciálu 40 mV/s, proudový rozsah 40  $\mu\text{A}$

**Tabulka 6: Výsledky opakovaného stanovení difenokonazolu o koncentrací 1,18 µg/ml metodou standardního přídatku**

Číslo měření	Stanovené množství [µg/ml]	Δ [µg/ml]	Δ [%]
1	1,17	-0,01	-0,8
2	1,24	0,06	5,1
3	1,13	-0,05	-4,2
4	1,22	0,04	3,4
5	1,20	0,02	1,7

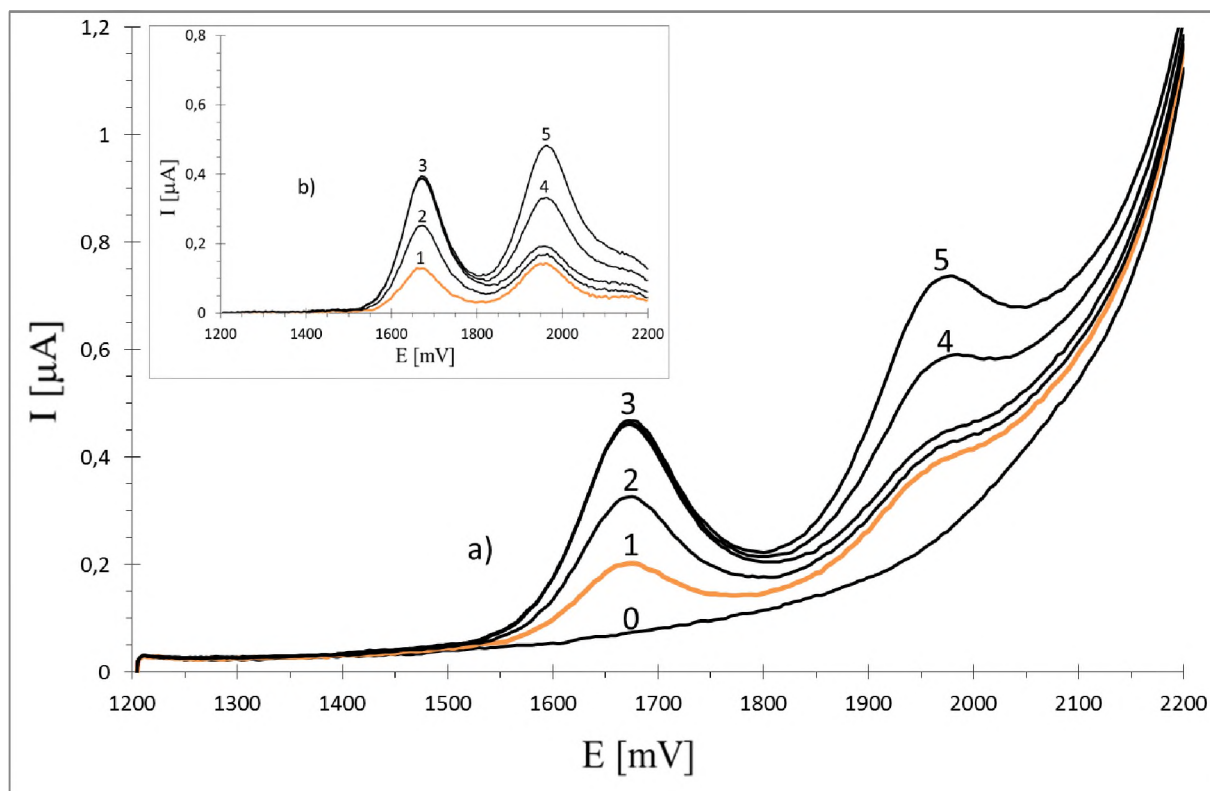
Střední hodnota: 1,192 µg/ml

Směrodatná odchylka: 0,043 µg/ml

Interval spolehlivosti: 1,192 ± 0,029 µg/ml

### **3.5 Analýza modelových směsí paklobutrazolu a difenokonazolu**

V dalších experimentech byla studována možnost stanovení obou testovaných látek vedle sebe. Byly připraveny modelové směsi o různých poměrech. Následné analýzy za doporučených podmínek, které původně vyhovovaly jak paklobutrazolu, tak difenokonazolu ukázaly, že lze stanovení vyhodnotit metodou standardního přídatku pro oba dva analyty. Naměřené křivky pro jednotlivé poměry jsou uvedeny na obr. 23 až 29. Po analýze vzorku byl nejdříve přidáván difenokonazol, po té pak paklobutrazol. Z obrázků je vidět, že přidávaný DFK odezvu PBZ jen posunuje, nijak však nemění její výšku. Přídavek PBZ do směsi pík difenokonazolu neovlivňuje. Toto tvrzení je dokumentováno na obr. 23 v části b), kdy byl odečten záznam základního elektrolytu. Výsledky analýz těchto směsí uvádí tabulka 7. Je vidět, že nalezené hodnoty odpovídají stanovovaným koncentracím.



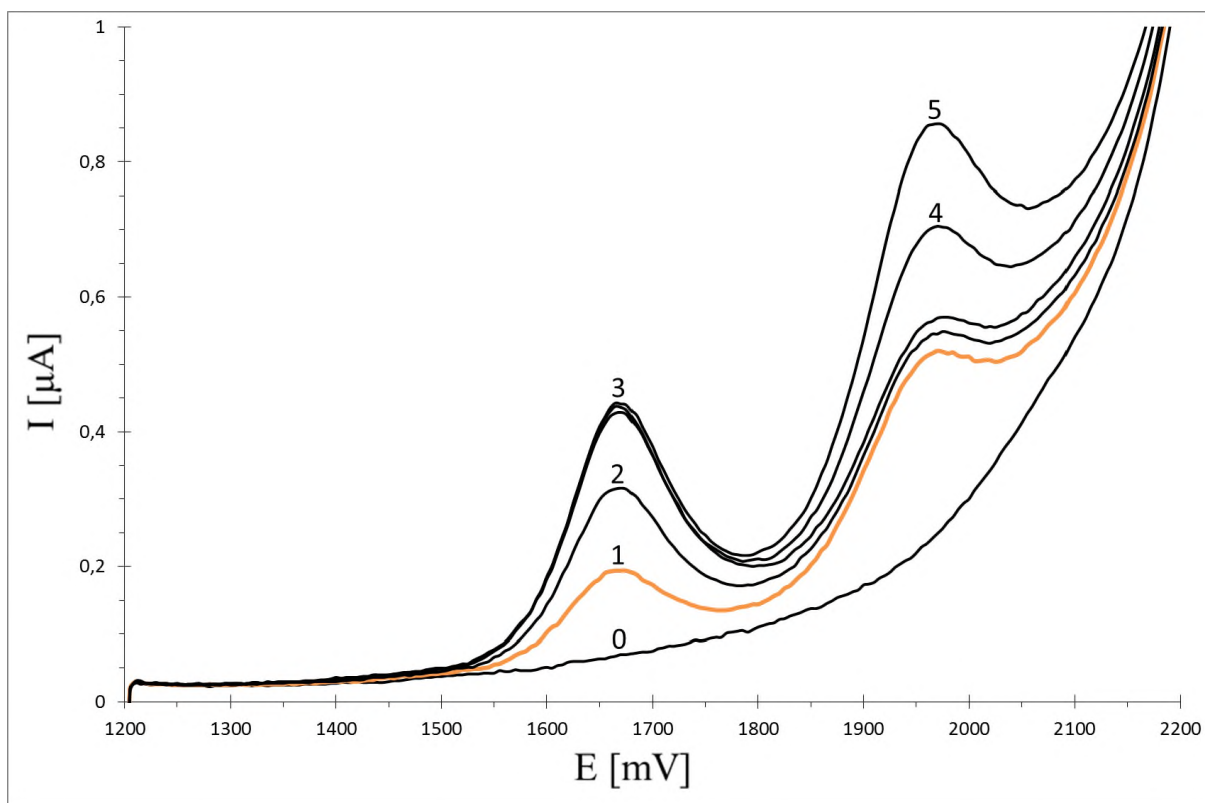
**Obrázek 23: Křivky anodické oxidace směsi difenokonazolu a paklobutrazolu o koncentraci 2,35  $\mu\text{g/ml}$  DFK a 1,86  $\mu\text{g/ml}$  PBZ**

a) původní naměřené píky, b) píky po odečtení odezvy základního elektrolytu

Jednotlivé křivky: 0 – odezva základního elektrolytu, 1 – přidavek modelového vzorku směsi paklobutrazolu a difenokonazolu, 2 a 3 – standardní přidavky difenokonazolu, 4 a 5 – standardní přidavky paklobutrazolu

Základní elektrolyt: 0,07  $\text{mol.l}^{-1}$  NaOH a 33 % acetonitril, koncentrace DFK od 2,35 do 7,05  $\mu\text{g/ml}$ , koncentrace PBZ od 1,86 do 5,58  $\mu\text{g/ml}$

Parametry stanovení: počáteční potenciál 1200 mV, konečný potenciál 2200 mV, rychlost nárůstu potenciálu 40 mV/s, proudový rozsah 40  $\mu\text{A}$



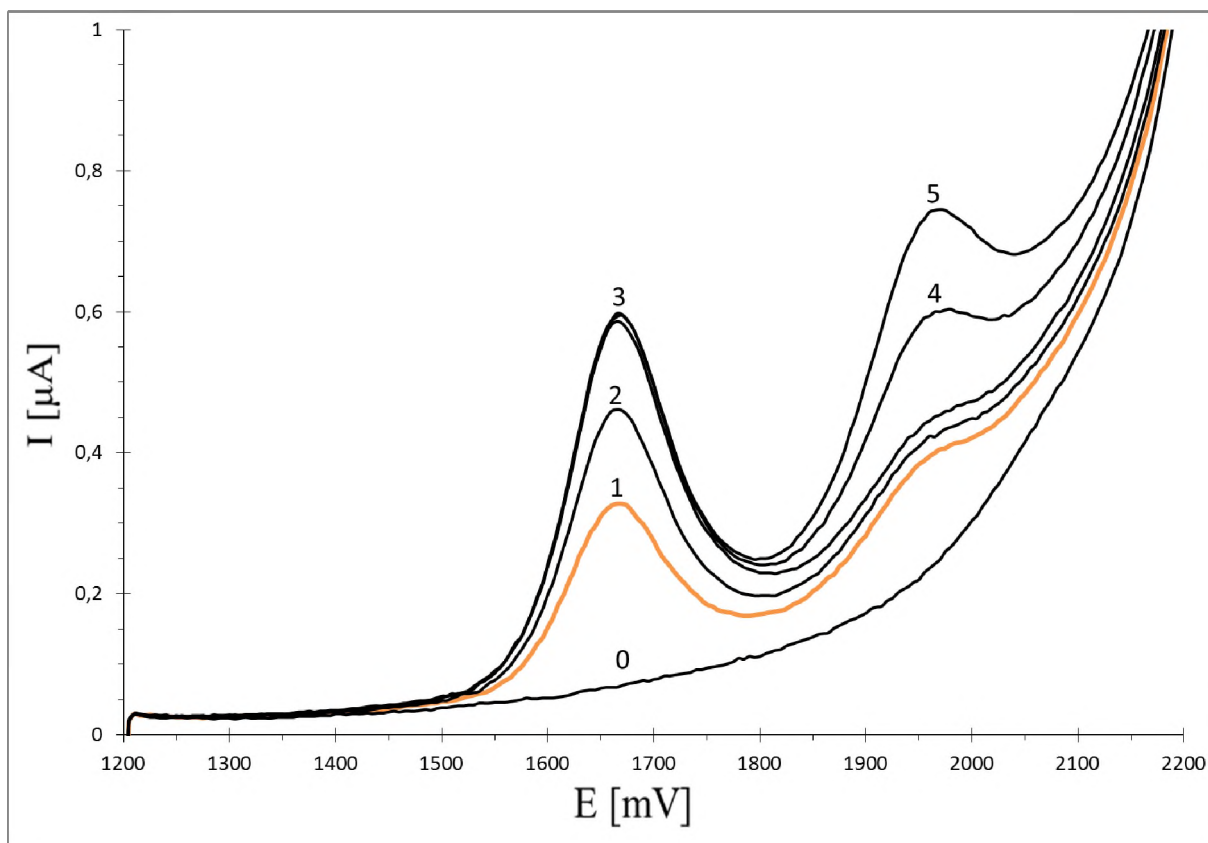
**Obrázek 24: Křivky anodické oxidace směsi difenokonazolu a paklobutrazolu o koncentraci 2,35  $\mu\text{g/ml}$  DFK a 3,72  $\mu\text{g/ml}$  PBZ**

Jednotlivé křivky: 0 – odezva základního elektrolytu, 1 – přidavek modelového vzorku směsi paklobutrazolu a difenokonazolu, 2 a 3 – standardní přidavky difenokonazolu, 4 a 5 – standardní přidavky paklobutrazolu

Základní elektrolyt: 0,07  $\text{mol.l}^{-1}$  NaOH a 33 % acetonitril, koncentrace DFK od 2,35 do 7,05  $\mu\text{g/ml}$ , koncentrace PBZ od 3,72 do 7,44  $\mu\text{g/ml}$

Parametry stanovení: počáteční potenciál 1200 mV, konečný potenciál 2200 mV, rychlost nárůstu potenciálu 40 mV/s, proudový rozsah 40  $\mu\text{A}$



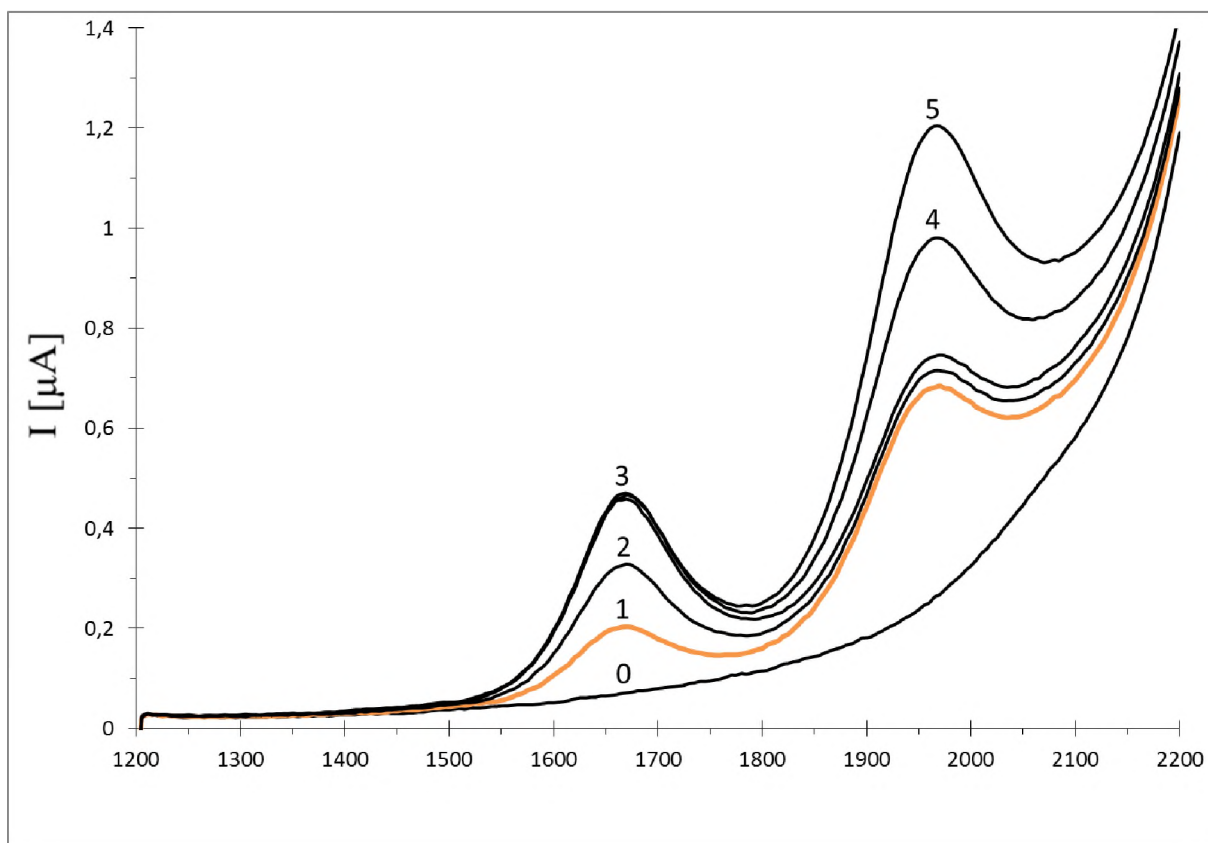


**Obrázek 25: Křivky anodické oxidace směsi difenokonazolu a paklobutrazolu o koncentraci 4,7  $\mu\text{g/ml}$  DFK a 1,86  $\mu\text{g/ml}$  PBZ**

Jednotlivé křivky: 0 – odezva základního elektrolytu, 1 – přidavek modelového vzorku směsi paklobutrazolu a difenokonazolu, 2 a 3 – standardní přídavky difenokonazolu, 4 a 5 – standardní přídavky paklobutrazolu

Základní elektrolyt: 0,07 mol.l<sup>-1</sup> NaOH a 33 % acetonitril, koncentrace DFK od 4,7 do 9,4  $\mu\text{g/ml}$ , koncentrace PBZ od 1,86 do 5,58  $\mu\text{g/ml}$

Parametry stanovení: počáteční potenciál 1200 mV, konečný potenciál 2200 mV, rychlost nárůstu potenciálu 40 mV/s, proudový rozsah 40  $\mu\text{A}$

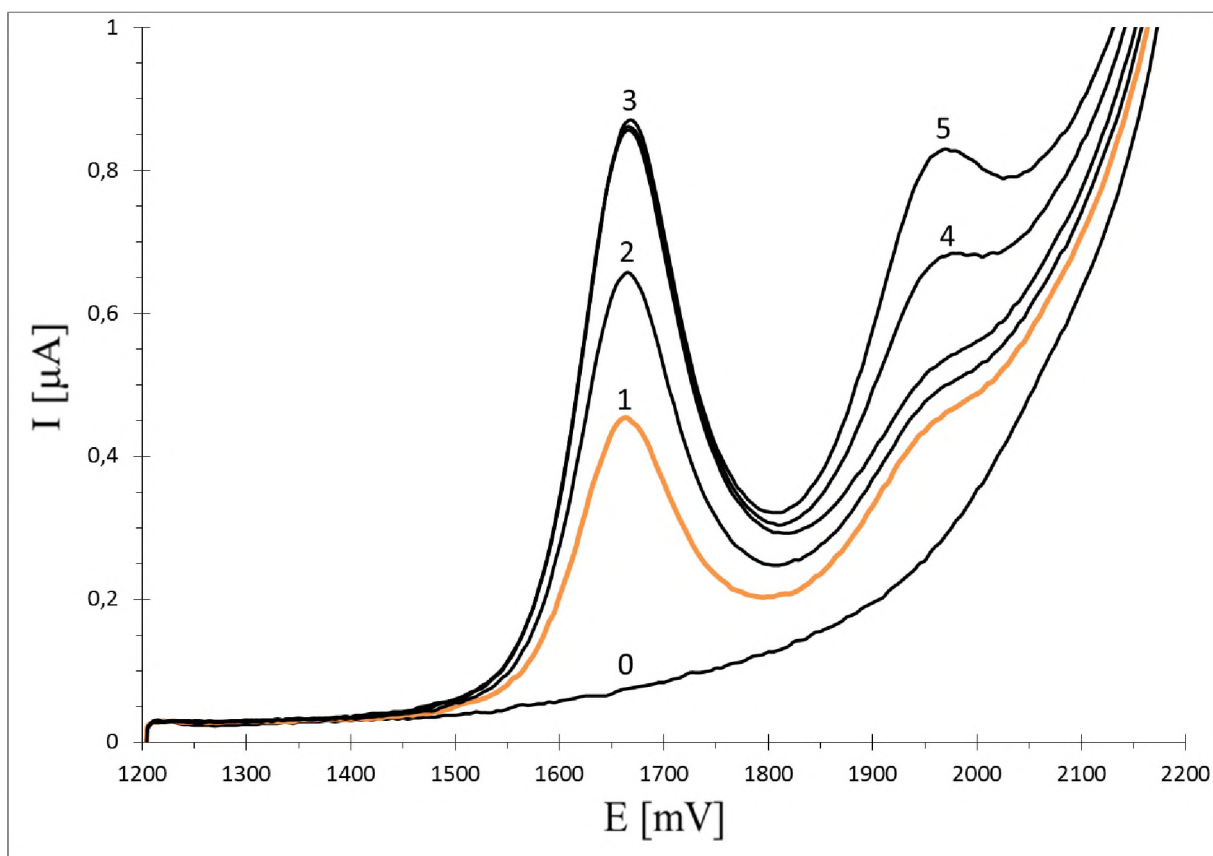


**Obrázek 26: Křivky anodické oxidace směsi difenokonazolu a paklobutrazolu o koncentraci 2,35  $\mu\text{g/ml}$  DFK a 5,58  $\mu\text{g/ml}$  PBZ**

Jednotlivé křivky: 0 – odezva základního elektrolytu, 1 – přídavek modelového vzorku směsi paklobutrazolu a difenokonazolu, 2 a 3 – standardní přídavky difenokonazolu, 4 a 5 – standardní přídavky paklobutrazolu

Základní elektrolyt: 0,07  $\text{mol.l}^{-1}$  NaOH a 33 % acetonitril, koncentrace DFK od 2,35 do 7,05  $\mu\text{g/ml}$ , koncentrace PBZ od 5,58 do 11,16  $\mu\text{g/ml}$

Parametry stanovení: počáteční potenciál 1200 mV, konečný potenciál 2200 mV, rychlost nárůstu potenciálu 40 mV/s, proudový rozsah 40  $\mu\text{A}$

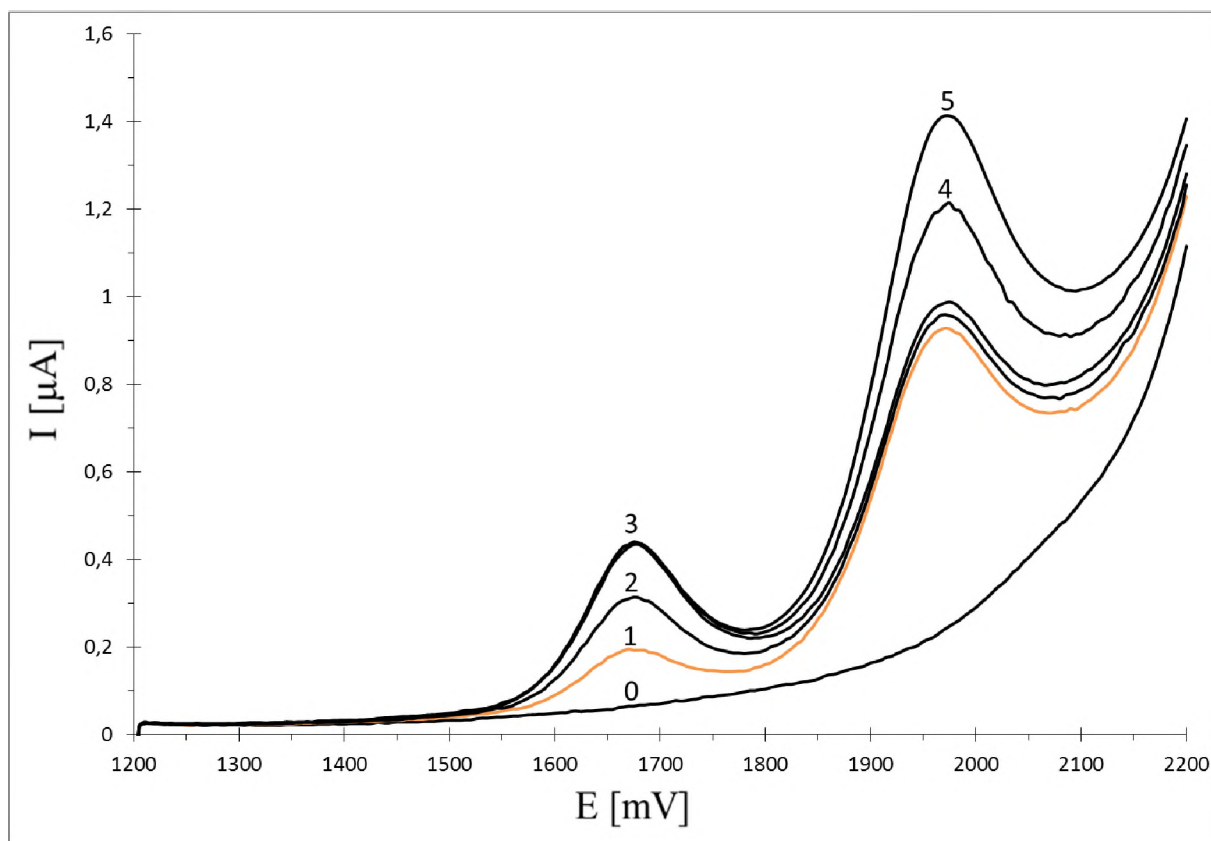


**Obrázek 27: Křivky anodické oxidace směsi difenokonazolu a paklobutrazolu o koncentraci 7,06  $\mu\text{g/ml}$  DFK a 1,86  $\mu\text{g/ml}$  PBZ**

Jednotlivé křivky: 0 – odezva základního elektrolytu, 1 – přidavek modelového vzorku směsi paklobutrazolu a difenokonazolu, 2 a 3 – standardní přídavky difenokonazolu, 4 a 5 – standardní přídavky paklobutrazolu

Základní elektrolyt: 0,07  $\text{mol.l}^{-1}$  NaOH a 33 % acetonitril, koncentrace DFK od 7,06 do 14,12  $\mu\text{g/ml}$ , koncentrace PBZ od 1,86 do 5,58  $\mu\text{g/ml}$

Parametry stanovení: počáteční potenciál 1200 mV, konečný potenciál 2200 mV, rychlost nárůstu potenciálu 40 mV/s, proudový rozsah 40  $\mu\text{A}$

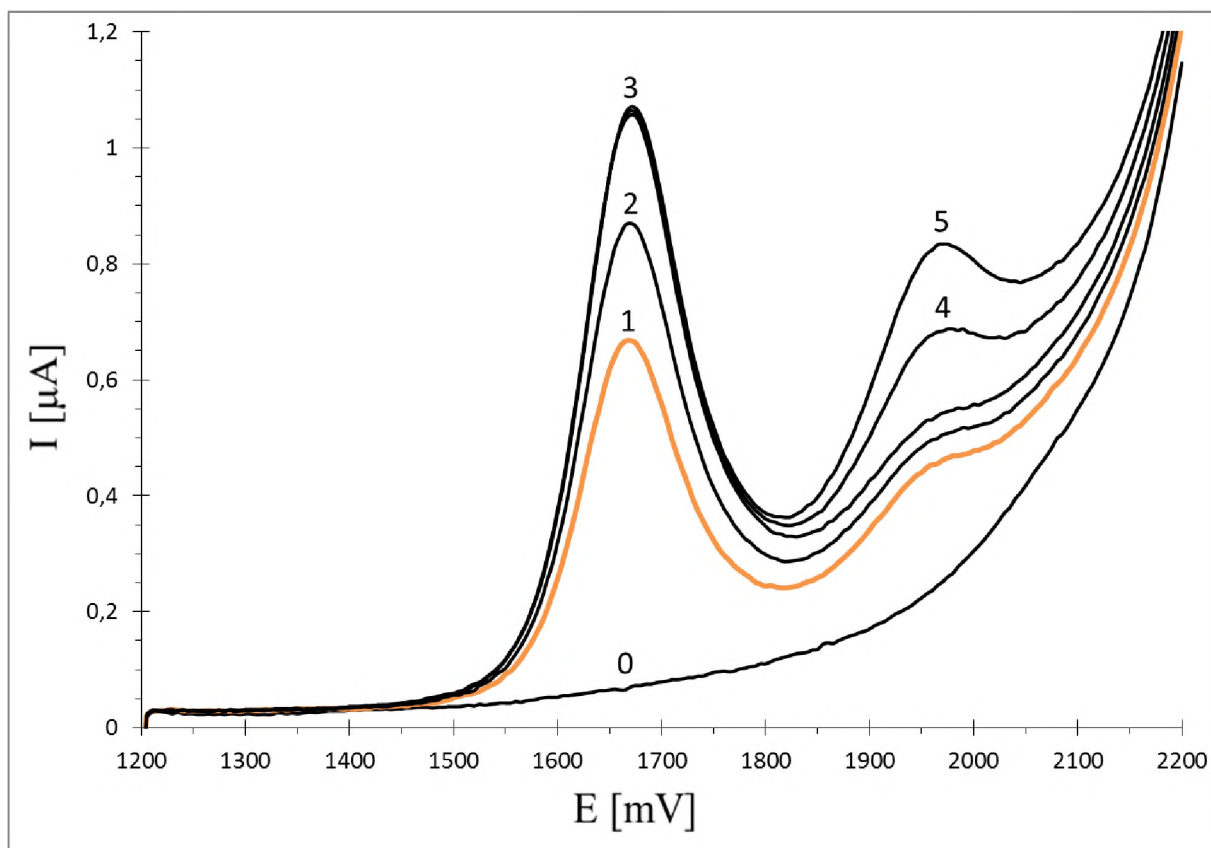


**Obrázek 28: Křivky anodické oxidace směsi difenokonazolu a paklobutrazolu o koncentraci 2,35  $\mu\text{g/ml}$  DFK a 9,28  $\mu\text{g/ml}$  PBZ**

Jednotlivé křivky: 0 – odezva základního elektrolytu, 1 – přídavek modelového vzorku směsi paklobutrazolu a difenokonazolu, 2 a 3 – standardní přídavky difenokonazolu, 4 a 5 – standardní přídavky paklobutrazolu

Základní elektrolyt: 0,07  $\text{mol.l}^{-1}$  NaOH a 33 % acetonitril, koncentrace DFK od 2,35 do 7,05  $\mu\text{g/ml}$ , koncentrace PBZ od 9,28 do 14,86  $\mu\text{g/ml}$

Parametry stanovení: počáteční potenciál 1200 mV, konečný potenciál 2200 mV, rychlost nárůstu potenciálu 40 mV/s, proudový rozsah 40  $\mu\text{A}$



**Obrázek 29: Křivky anodické oxidace směsi difenokonazolu a paklobutrazolu o koncentraci 11,76  $\mu\text{g/ml}$  DFK a 1,86  $\mu\text{g/ml}$  PBZ**

Jednotlivé křivky: 0 – odezva základního elektrolytu, 1 – přidavek modelového vzorku směsi paklobutrazolu a difenokonazolu, 2 a 3 – standardní přídavky difenokonazolu, 4 a 5 – standardní přídavky paklobutrazolu

Základní elektrolyt: 0,07  $\text{mol.l}^{-1}$  NaOH a 33 % acetonitril, koncentrace DFK od 11,76 do 18,82  $\mu\text{g/ml}$ , koncentrace PBZ od 1,86 do 5,58  $\mu\text{g/ml}$

Parametry stanovení: počáteční potenciál 1200 mV, konečný potenciál 2200 mV, rychlost nárůstu potenciálu 40 mV/s, proudový rozsah 40  $\mu\text{A}$

**Tabulka 7: Výsledky analýz směsí paklobutrazolu a difenokonazolu o různých poměrech**

Dáno [ $\mu\text{g/ml}$ ]		Stanovené množství [ $\mu\text{g/ml}$ ]		$\Delta$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]		$\Delta$ [%]	
DFC	PBZ	DFC	PBZ	DFC	PBZ	DFC	PBZ
2,35	1,86	2,34	1,81	-0,01	-0,05	-0,4	-2,7
2,35	3,72	2,41	3,49	0,06	-0,23	2,6	-6,2
4,70	1,86	4,60	1,76	-0,10	-0,10	-2,1	-5,4
2,35	5,58	2,43	5,92	0,08	0,34	3,4	6,1
7,06	1,86	6,67	1,78	-0,39	-0,08	-5,5	-4,3
2,35	9,28	2,57	8,85	0,22	-0,43	9,4	-4,6
11,76	1,86	10,89	1,76	-0,87	-0,10	-7,4	-5,4

### 3.6 Analýzy TOPREXu

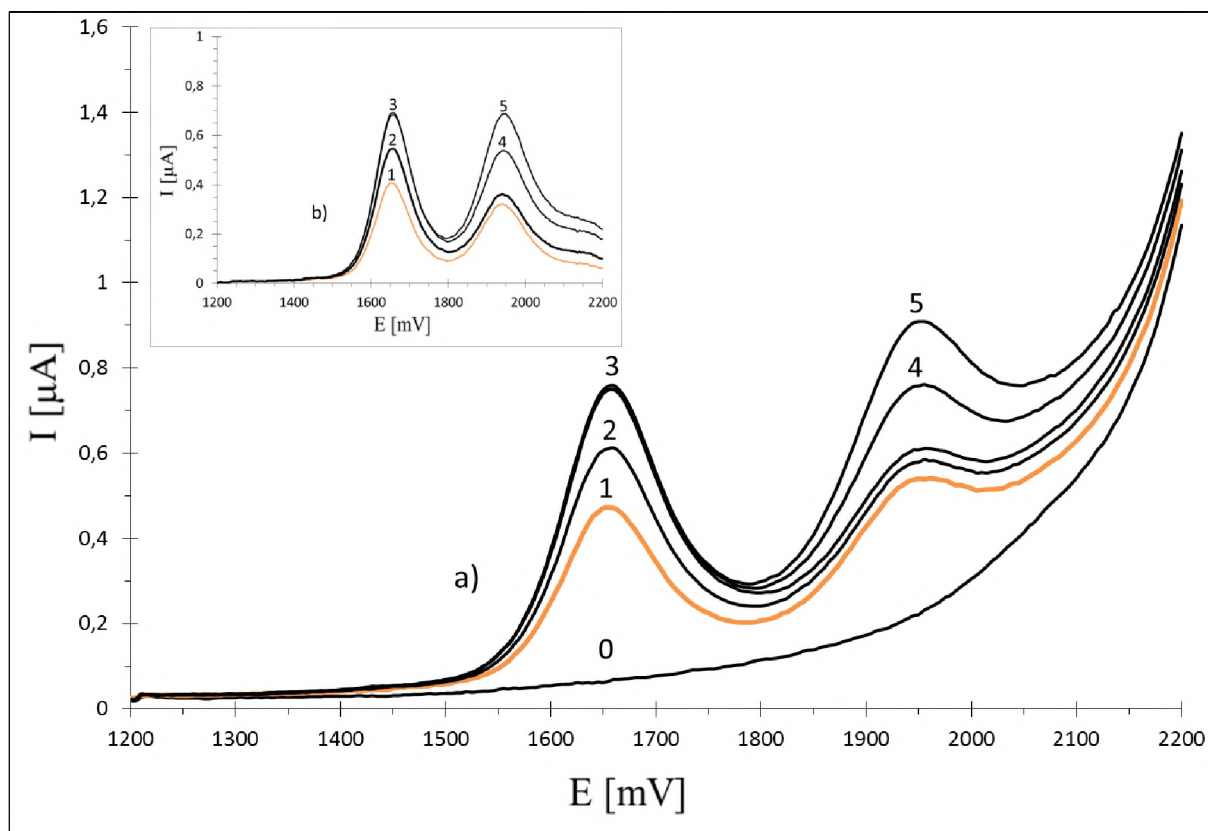
Na závěr experimentální práce bylo přistoupeno k analýze praktického vzorku, kterým byl přípravek TOPREX.

Příprava zásobního roztoku a podmínky analýzy jsou uvedeny v experimentální části této práce. Analýza byla prováděna třikrát. Příklad naměřených voltametrických křivek odpovídajících analýze vzorku a následných přidavků obou standardů je uveden na obrázku 30. Je zde vidět, že záznam se nijak neliší od křivek získaných analýzou modelových čistých standardů. V praktickém přípravku se tedy nenachází rušivá složka. Vyhodnocením bylo zjištěno, že nalezený obsah obou látek – viz tabulka 8, odpovídá deklarovaným hodnotám.

**Tabulka 8: Výsledky analýz přípravku TOPREX**

Číslo měření	Stanovené množství [g/l]		$\Delta_{\text{od deklarované hodnoty}} [\%]$	
	DFC	PBZ	DFC	PBZ
1	240,3	134,7	-3,9	7,8
2	262,2	116,7	4,9	-6,6
3	238,8	117,3	-4,5	-6,2

Vypočtené hodnoty ukazují, že jak v případě paklobutrazolu, tak i v případě difenokonazolu vypracovaná metoda dává spolehlivé výsledky i při analýze reálného vzorku. Je vidět že stanovené množství PBZ a DFK se liší od deklarovaných hodnot, které byly 125 g/l pro paklobutrazol a 250 g/l pro difenakonazol , velmi málo a přípravek TOPREX tedy obsahuje to, co má. V případě PBZ se chyba stanovení pohybovala od -6,6 do 7,8 % a u DFK od -4,5 do 4,9 %.



**Obrázek 30: Křivky anodické oxidace přípravku TOPREX**

a) původní naměřené píky, b) píky po odečtení odezvy základního elektrolytu

Jednotlivé křivky: 0 – odezva základního elektrolytu, 1 – přídavek vzorku TOPREXu, 2 a 3 – standardní přídavky difenokonazolu, 4 a 5 – standardní přídavky paklobutrazolu

Základní elektrolyt:  $0,07 \text{ mol.l}^{-1}$  NaOH a 33 % acetonitril, koncentrace přídavku DFK od 2,35 do 4,7  $\mu\text{g/ml}$ , koncentrace přídavku PKB od 1,86 do 3,72  $\mu\text{g/ml}$

Parametry stanovení: počáteční potenciál 1200 mV, konečný potenciál 2200 mV, rychlost nárůstu potenciálu 40 mV/s, proudový rozsah 40  $\mu\text{A}$



## 4 Závěr

Cílem této diplomové práce byl vývoj voltametrické metody pro stanovení retardantu růstu rostlin – paklobutrazolu. Jako indikační elektroda sloužila borem dopovaná diamantová elektroda, metoda měření byla diferenční pulzní voltametrie. Na začátku bylo zjišťováno nejvhodnější prostředí pro provedení analýzy, zejména byla hledána vyhovující koncentrace acetonitrilu v základním elektrolytu. Byly vyzkoušeny koncentrace od 20 do 47% acetonitrilu a pro další analýzu byla zvolena koncentrace 33%.

Dalším krokem bylo hledání vhodného pH. Pro tento účel bylo testováno stanovení paklobutrazolu v rozsahu koncentrací od 2,23 do 17,84  $\mu\text{g/ml}$  ve čtyřech základních elektrolytech, a to v 0,1  $\text{mol.l}^{-1}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$ , představující kyselé prostředí, v 0,07  $\text{mol.l}^{-1}$  octanovém pufru o pH 4,66, dále v 0,07  $\text{mol.l}^{-1}$  fosfátovém pufru o pH 7,01 a nakonec v 0,07  $\text{mol.l}^{-1}$  NaOH, který reprezentoval alkalické prostředí. Při analýze v kyselině sírové a octanovém pufru docházelo k zřetelnému posunu polohy píků v závislosti na zvyšující se koncentraci, rovněž závislost výšky píků na koncentraci byla nelineární. Na rozdíl od toho alkalické prostředí vykazovalo lineární závislost výšky píků na koncentraci a minimální posun maxim píků, který se rovnal 1970 – 1985 mV. Pro voltametrické stanovení paklobutrazolu bylo pak zvolené alkalické prostředí.

Dále následovalo testování reprodukovatelnosti a správnosti voltametrického stanovení paklobutrazolu za navržených podmínek. Nejdříve byla ověřována linearita závislosti výšky píků na koncentraci v rozsahu nižších koncentrací, a to od 0,56 až do 4,46  $\mu\text{g/ml}$  a od 0,22 do 1,78  $\mu\text{g/ml}$ . Poté bylo provedeno opakované stanovení modelových roztoků o třech koncentracích, a to 2,23  $\mu\text{g/ml}$ , 0,56  $\mu\text{g/ml}$  a 0,22  $\mu\text{g/ml}$ . Výsledky byly zjišťovány pomocí tří přídavek standardu PBZ a statisticky hodnoceny programem Excel. Obdržené hodnoty ukázaly, že absolutní chyba stanovení nepřesahovala 9,1 %. Hodnoty směrodatných odchylek byly velice uspokojivé a rovnaly se 0,13  $\mu\text{g/ml}$  pro koncentraci 2,23  $\mu\text{g/ml}$ , 0,023  $\mu\text{g/ml}$  pro 0,56  $\mu\text{g/ml}$  a 0,013  $\mu\text{g/ml}$  pro 0,22  $\mu\text{g/ml}$ .

Vzhledem k tomu, že součástí jediného dostupného přípravku v ČR obsahujícího paklobutrazol – TOPREX je jako doprovodná složka difenokonazol, a to ve významném množství, bylo třeba se nad rámec zadaného diplomového úkolu zaměřit také na voltametrickou analýzu této látky. Nejdříve byly testovány různé základní elektrolyty za účelem nalezení nejvhodnější hodnoty pH pro stanovení difenokonazolu. Stejně jako v případě paklobutrazolu, pro další analýzu bylo vybráno alkalické prostředí, kterým byl 0,07

mol.l<sup>-1</sup> NaOH. Kvantitativní stanovení difenokonazolu bylo testováno v rozsahu koncentrací od 1,18 do 9,41 µg/ml. Bylo zjištěno, že výšky píků lineárně odráží stanovované množství. Mez stanovitelnosti je za použitých podmínek 0,28 µg/ml a mez detekce 0,08 µg/ml. Dále bylo také provedeno opakovatelné stanovení modelového vzorku DFK o koncentraci 1,18 µg/ml. Absolutní chyba se rovnala 5,1 % a směrodatná odchylka 0,043 µg/ml.

Dále byly zkoumány analýzy směsí paklobutrazolu a difenokonazolu v různých poměrech. Bylo zjištěno, že za doporučených podmínek, které původně vyhovovaly jak paklobutrazolu, tak difenokonazolu, lze stanovení vyhodnotit metodou standardního přídatku pro oba dva analyty, a to v rámci jednoho experimentu. Po tomto zjištění bylo možné přistoupit k analýze reálného vzorku, kterým byl přípravek TOPREX. Analýza byla opakována třikrát. Jako přídatky byly použity standardní roztoky PBZ a DFK o koncentraci 34,8 resp. 44,1 mg/ml. Získané hodnoty ukázaly, že stanovené množství PBZ a DFK se liší od deklarovaných hodnot velmi málo a přípravek TOPREX obsahuje to, co má.

Na základě předložených výsledků lze konstatovat, že vypracovaná metoda dává spolehlivé výsledky v širokém rozmezí koncentrací paklobutrazolu. Je využitelná při analýze praktických vzorků. Ve srovnání s ostatními metodami používanými na stanovení PBZ, diferenční pulzní voltametrie je cenově dostupnou, rychlou, jednoduchou a časově nenáročnou metodou.

## 5 Použitá literatura

- [1] - PROCHÁZKA, Stanislav, Ivana MACHÁČKOVÁ, Jan KREKULE a Jiří ŠEBÁNEK. *Fiziologie rostlin*. Praha: Akademie věd České republiky, 1998. ISBN 80-200-0586-2.
- [2] - RADEMACHER, Wilhelm. *GROWTH RETARDANTS: Effects on Gibberellin Biosynthesis and Other Metabolic Pathways*. 2000.
- [3] - BEROVA, Malgorzata, Zlatko ZLATEV a Nevena STOEVA. Effect of paclobutrazol on wheat seedlings under low temperature stress. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*. 2002, 75-84.
- [4] - ДУБОВАЯ, Л. В. а А. М. МАКЕЕВ. *Определение остаточных количеств пестицидов в пищевых продуктах, сельскохозяйственном сырье и объектах окружающей среды: Определение остаточных количеств паклобутразола в воде, почве, зеленой массе, семенах и масле рапса методом капиллярной газожидкостной хроматографии*. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2011.
- [5] - KISHORE, Kundan, Hari Shankar SINGH a R.M. KURIAN. Paclobutrazol use in perennial fruit crops and its residual effects: A review. *Indian Journal of Agricultural Sciences*. Central Horticultural Experiment Station (IIHR), Aiginia, Bhubaneswar, Odisha, 2015, 863-72.
- [6] - SOUMYA, P.R., Pramod KUMAR a Madan PAL. Paclobutrazol: a novel plant growth regulator and multi-stress ameliorant. *Indian Society for Plant Physiology*. New Delhi, India, 2017.
- [7] - KYSELÁKOVÁ, Jolana a Marie BENEDÍKOVÁ. Možnost urychlení indukce a diferenciacie kvetení dubů paclobutrazolem a vláhovým deficitem. *Zprávy lesnického výzkumu*. 2011, (2), 101-106.
- [8] - XING, Xia, Yuhan TANG, Mengran WEI a Damqiu ZHAO. Effect of Paclobutrazol Application on Plant Photosynthetic Performance and Leaf Greenness of Herbaceous Peony. *Horticulturae*. Jiangsu Key Laboratory of Crop Genetics and Physiology, College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, China, 2018.

- [9] - HUANG, H., W.S. YIN a G.F. ZHENG. The effect of paclobutrazol on watermelon growth. *Scientia Horticulturae*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1989, , 9-14.
- [10] - JUNGKLANG, Jarunee a Kobkiat SAENGNIL. Effect of paclobutrazol on patumma cv. Chiang Mai Pink under water stress. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*. 2012, (34(4)), 361-366.
- [11] - SRIVASTAV, Manish, Arun KISHOR, Anil DAHUJA a R.R. SHARMA. Effect of paclobutrazol and salinity on ion leakage, proline content and activities of antioxidant enzymes in mango (*Mangifera indica* L.). *Scientia Horticulturae*. 2010, (125), 785–788.
- [12] - SANKAR, B., C.Abdul JALEEL, P. MANIVANNA, , A. KISHOREKUMAR a R. SOMASUNDARAM. Effect of paclobutrazol on water stress amelioration through antioxidants and free radical scavenging enzymes in *Arachis hypogaea* L. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2007, (60), 229–235.
- [13] - CHUNXIAO, Liu, Liu SHANGZHONG a Diao JINLING. Enantioselective growth inhibition of the green algae (*Chlorella vulgaris*) induced by two paclobutrazol enantiomers. *Environmental Pollution* 250 (2019) 610-617. 2019, (250), 610-617.
- [14] - YE, Xiu, Shuping MA, Lianjun ZHANG, Pengfei ZHAO, Xiaohong ZHAO, Longshan LONGSHAN a Ning ZHAO. Trace enantioselective determination of triazole fungicides in honey by a sensitive and efficient method. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2018, (74), 62-70.
- [15] - WU, Shu-Chun, Miao YU, Heng ZHANG, Jianzhong HAN a Ming-rong QIAN. *Enantioselective Degradation of (2RS, 3RS)-Paclobutrazol in Rat Liver Microsomes*. 2015.
- [16] - VAZ, Fernanda, Ednaldo SANTOS-FILHO, SUZYANE SILVA, Andrea BANDEIRA, Ana Cristina BRASILEIRO-VIDAL, Newton Pereira STAMFORD, Maria Aparecida MOUCO a Ester GOUVEIA. *Biodegradation of Paclobutrazol — A Plant Growth Regulator Used in Irrigated Mango Orchard Soil*. 2015. DOI: 10.5772/60818.
- [17] - PETRIE, Bruce, Maria Dolores Camacho MUNOZ a Julia MARTÍN. Stereoselective LC-MS/MS methodologies for environmental analysis of chiral pesticides. *Trends in Analytical Chemistry*. 2019, (110), 249-258.
- [18] - WU, Zecai, David M. GOODALL a David K. LLOYD. Determination of enantiomeric purity of paclobutrazol and fluazifop-P-butyl using a diode-laser-based

- polarimetric highperformance liquid chromatography detector. *Journal of Chromatography*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1990, , 209-218.
- [19] - LIU, Zhenjiang, Xi WEI, Kewei REN, Gangbing ZHU, Zhen ZHANG, Jiagao WANG a Daolin DU. Highly efficient detection of paclobutrazol in environmental water and soil samples by time-resolved fluoroimmunoassay. *Science of the Total Environment*. 2016, (569–570), 1629–1634.
- [20] - ALHAJJ, Mandy a Aisha Farhana FARHANA. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. StatPearls Publishing, 2020.
- [21] - BARD, Allen J. a Larry R. FAULKNER. *Electrochemical methods, Fundamentals and Applications*. 2nd ed. Department of Chemistry and Biochemistry University of Texas at Austin: John Wiley & Sons, 2001. ISBN 0-471-04372-9.
- [22] - BAREK, Jiří, František OPEKAR a Karel ŠTULÍK. *Elektroanalitická chemie*. Univerzita Karlova v Praze: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-1146-5.
- [23] - JEHLIČKA, Vladimír. Program *Nlinear*. osobní sdělení. 2020.