Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Voltametrické stanovení fungicidu metalaxylu

Diplomová práce

2023 Bc. Aneta Fendrichová

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

Voltammetric determination of fungicide metalaxyl

Master thesis

2023 Bc. Aneta Fendrichová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Bc. Aneta Fendrichová**
Osobní číslo:	**C21496**
Studijní program:	**N0711A130013 Chemické a procesní inženýrství**
Specializace:	**Ochrana životního prostředí**
Téma práce:	**Voltametrické stanovení fungicidu metalaxylu**
Zadávající katedra:	**Ústav environmentálního a chemického inženýrství**

Zásady pro vypracování

1. Popište stručně princip voltametrie a uveďte přehled základních voltametrických metod používaných v elektroanalytické chemii. Zpracujte literární rešerši týkající se fungicidu metalaxylu. Zaměřte se na problematiku jejich stanovení s využitím různých analytických metod.

2. V rámci experimentální části prostudujte voltametrické chování metalaxylu na borem dopované diamantové elektrodě (BDDE). Navrhněte podmínky stanovení fungicidu v modelových roztocích. Ověřte možnost využití nových tištěných senzorů s chemicky deponovanou BDDE pro stanovení fungicidu a případně jejich aplikaci v průtokovém systému.

3. Vyvinutou metodu použijte při analýze praktických vzorků.

4. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 7/2019 „Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací" v platném znění.

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

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Renáta Šelešovská, Ph.D.**
Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Konzultant diplomové práce: **MSc. Oleksandr Matvieiev**
Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Datum zadání diplomové práce: **25. února 2023**
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Anna Krejčová, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 25. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Voltametrické stanovení fungicidu metalaxylu 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 směrnicí 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 5. 5. 2023

Bc. Aneta Fendrichová v. r.

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat doc. Ing. Renátě Šelešovské, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnovala. Také bych ráda poděkovala MSc. Oleksandrovi Matvieievovi za odbornou pomoc s experimentální částí. V neposlední řadě patří obrovské poděkování všem mým blízkým za podporu během studia.

Tato diplomová práce byla vypracována s finanční podporou Grantové agentury České republiky, projekt č. 20-01589S.

ANOTACE

Předmětem této diplomové práce bylo studium voltametrického chování fungicidu metalaxylu a vývoj metody pro jeho stanovení s využitím borem dopované diamantové elektrody a nového tištěného senzoru s touto pracovní elektrodou. Voltametrické chování analytu bylo studováno s využitím cyklické voltametrie. Pro stanovení byly testovány diferenční pulzní a square wave voltametrie. Byly optimalizovány parametry obou metod a na základě získaných výsledků byla vybrána diferenční pulzní voltametrie. Vyvinutá metoda byla aplikována při analýze modelových roztoků metalaxylu a přírodních vod. Vzhledem k nízkým koncentracím pesticidů v povrchových vodách byl navržen postup zakoncentrování vzorku. Na závěr byl tištěný senzor na bázi borem dopovaného diamantu aplikován v průtočné cele při stanovení metalaxylu s využitím injekční průtokové analýzy s elektrochemickou detekcí.

KLÍČOVÁ SLOVA

Metalaxyl, voltametrie, borem dopovaná diamantová elektroda, tištěný senzor, průtoková injekční analýza.

ANNOTATION

The subject of this thesis was the study of the voltammetric behavior of the fungicide metalaxyl and the development of a method for its determination using a boron-doped diamond electrode and a new screen-printed sensor with this working electrode. The voltammetric behavior of the analyte was studied using cyclic voltammetry. Differential pulse and square wave voltammetry were tested for determination. The parameters of both methods were optimized and differential pulse voltammetry was chosen based on the obtained results. The developed method was applied in the analysis of metalaxyl model solutions and natural waters. Due to the low concentrations of pesticides in surface waters, a sample concentration procedure was proposed. Finally, the screen-printed sensor based on the boron-doped diamond was applied in a flow cell in the determination of metalaxyl using flow injection analysis with electrochemical detection.

KEYWORDS

Metalaxyl, voltammetry, boron-doped diamond electrode, screen-printed sensor, flow injection analysis.

Obsah

Obsah 8
Seznam symbolů a zkratek 10
1. Teoretická část 15
1.1. Voltametrie 15
1.1.1. Princip voltametrie 15
1.1.2. Voltametrické metody 17
1.1.3. Pracovní elektrody ve voltametrii 21
1.1.4. Borem dopovaná diamantová elektroda 24
1.1.5. Tištěné senzory 27
1.2. Metalaxyl 29
1.2.1. Fyzikální a chemické vlastnosti 29
1.2.2. Využití 30
1.2.3. Toxicita 31
1.2.4. Stanovení Metalaxylu 31
2. Experimentální část 33
2.1. Chemikálie 33
2.2. Přístrojové vybavení 33
2.3. Pracovní postupy 34
2.3.1. Voltametrické měření 34
2.3.2. Průtoková analýza s elektrochemickou detekcí 36
2.3.3. Analýza přírodních vod 36
3. Výsledky a diskuse 39
3.1. Voltametrické chování metalaxylu 39
3.1.1. Závislost na pH 39
3.1.2. Závislost na rychlosti polarizace 42

3.2. Vývoj voltametrické metody stanovení metalaxylu 44
3.2.1. Optimalizace parametrů DPV 45
3.2.2. Optimalizace parametrů SWV 47
3.2.3. Porovnání DPV a SWV 48
3.2.4. Předúprava povrchu pracovní elektrody 51
3.3. Analýza modelových roztoků metalaxylu 52
3.4. Analýza vzorků přírodních vod 57
3.4.1. Přímá analýza říční vody 57
3.4.2. Analýza říční vody po zakoncentrování 58
3.5. FIA s elektrochemickou detekcí pro stanovení metalaxylu 61
Závěr 68
Literatura 70

Seznam symbolů a zkratek

A	Amplituda [V]
AdSV	Adsorptivní rozpouštěcí voltametrie (Adsorptive stripping voltammetry)
ASV	Anodická rozpouštěcí voltametrie (Anodic stripping voltammetry)
BDD	Borem dopovaný diamant
BDDE	Borem dopovaná diamantová elektroda
c	Koncentrace v roztoku [mol/l]
c^0	Koncentrace u povrchu elektrody [mol/l]
CE	Pomocná elektroda (Counter electrode)
CNT	Uhlíkové nanotrubičky (Carbon nanotubes)
CSV	Katodická rozpouštěcí voltametrie (Cathodic stripping voltammetry)
CV	Cyklická voltametrie (Cyclic voltammetry)
CVD	Chemická depozice par (Chemical vapor deposition)
DCV	Stejnosměrná voltametrie (Direct current voltammetry)
DME	Kapající rtuťová elektroda (Dropping mercury electrode)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic acid)
DPV	Diferenční pulzní voltametrie (Differencial pulse voltammetry)
E	Potenciál detekce [V]
$E_{1/2}$	Půlvlnový potenciál [V]
E_{fin}	Konečný potenciál [V]
E_{in}	Počáteční potenciál [V]
E_{switch}	Potenciál obratu [V]
ELISA	Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay
EPA	Agentura pro ochranu životního prostředí (Environmental Protection Agency)
f	Frekvence [Hz]
F	Faradayova konstanta [C/mol]
F_{m}	Rychlost mobilní fáze [L/min]
FTIR	Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (Fourier transform infrared spectroscopy)
GC	Plynová chromatografie (Gas chromatography)
GCE	Elektroda ze skelného uhlíku (Glassy carbon electrode)

HDME	Visící rtuťová kapková elektroda (Hanging mercury drop electrode)
HFCVD	Chemická depozice par žhavenými vlákny (Hot filament chemical vapor deposition)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-performance liquid chromatography)
I	Proud [A]
I_b	Zpětný proud [A]
I_c	Kapacitní proud [A]
I_d	Difúzní proud [A]
$I_{d,lim}$	Limitní difúzní proud [A]
I_f	Dopředný proud [A]
I_k	Kinetický proud [A]
I_p	Výška pulzu [A]
LA-MWCVD	Lineární anténní systém mikrovlnné chemické depozice par (Linear antenna microwave chemical vapor deposition)
LDR	Využitelná koncentrační rozsah
LOD	Limit detekce
LOQ	Mez detekce
m	Průtoková rychlost [kg]
MFCVD	Chemická depozice par mikrovlnným ohřevem (Microwave chemical vapor depositon)
MFE	Rtuťová filmová elektroda (Mercury filmed electrode)
ML	Metalaxyl
MWCNT	Vícestěnné uhlíkové nanotrubičky (Multi-walled carbon nanotrubes)
n	Počet vyměněných elektronů
NPD	Detektor selektivní pro dusík (Nitorgen-phospohorus detector)
Pt	Platina
RE	Referenční elektroda (Reference electrode)
RNA	Ribonukleová kyselina (Ribonucleic acid)
SAM	Samouspořádané monovrstvy (Self-assemled monolayer)
SMDE	Statická rtuťová kapková elektroda (Static mercury drop electrode)

SP/BDDE	Tištěný senzor s chemicky deponovanou borem dopovanou diamantovou elektrodou
SPE	Tištěný senzor (Screen-printed electrode)
SWCNT	Jednostěnné uhlíkové nanotrubičky (Single walled carbon nanotubes)
SWV	Square-wave voltametrie
t	Čas [s]
v	Rychlost polarizace [V/s]
$v^{1/2}$	Druhá odmocnina z rychlosti polarizace [$(V/s)^{1/2}$]
V	Objem [L]
V_{inj}	Objem dávkovaného vzorku [L]

Úvod

Pesticidy jsou přípravky a prostředky určené k ochraně rostlin, k tlumení chorob rostlin nebo hubení rostlinných a živočišných škůdců. Nadměrné využívání pesticidů může vést k narušení fungujícího ekosystému, znečištění vod až k úhynu zvěře. Pesticidy mají velký vliv na hormonální systém člověka a jeho reprodukci. Jedním z celosvětově používaných pesticidů je metalaxyl.

Metalaxyl patří mezi amidové fungicidy a mechanismus jeho účinku spočívá v regulaci chorob rostlin způsobených houbami řádu *Peronosporales*, které způsobují vadnutí, plísně a hnilobu rostlin. Stejně jako u ostatních pesticidů se aplikací metalaxylu na poškozené rostliny dostávají různá množství této látky do životního prostředí. A protože může mít negativní dopady např. na vodní organismy, ale i na zdraví člověka, je třeba monitorovat hladiny metalaxylu zejména ve vodě, případně rezidua v potravinách (ryby, ovoce, zelenina).

Pro stanovení fungicidů se používá řada instrumentálních analytických metod, mezi nimiž jsou nejčastější vysokoúčinná kapalinová chromatografie nebo plynová chromatografie v kombinaci s různými detekčními systémy. Tyto metody se vyznačují vysokou citlivostí a selektivitou, ale jejich nevýhodou je obvykle složitá příprava vzorků a velká instrumentální a časová náročnost. Jako mnohem rychlejší, levnější a jednodušší metoda se nabízí voltametrie. Další velkou výhodou je možnost snadné miniaturizace, a tedy použitelnost v přenosných analyzátorech a průtokových systémech. Voltametrie byla vyvinuta z polarografie, za jejíž objev získal Jaroslav Heyrovský v roce 1959 Nobelovu cenu. Jedná se o stanovení elektroaktivních látek na základě měření proudové odezvy v závislosti na vkládaném potenciálu. V závislosti na analyzovaných látkách a požadovaných elektrochemických vlastnostech je možné použít různé druhy pracovních elektrod z různých materiálů. Velmi populární je v současné době využití voltametrie v kombinaci s elektrodou z borem dopovaného diamantu, která vykazuje výjimečné elektrochemické vlastnosti a umožňuje analýzu oxidovatelných i redukovatelných látek v širokém rozsahu potenciálů. Jak již bylo zmíněno, jedním z hlavních trendů současné analytické chemie je miniaturizace analytických metod s možností využití v přenosných terénních analyzátorech nebo tzv. point-of-care testovacích systémech určených k analýze „v místě péče“. Za tímto účelem lze s výhodou využít tištené elektrochemické senzory, které lze snadno a levně vyrábět ve velkých množstvích a jsou tak vhodné pro jednorázové využití.

Cílem této diplomové práce je studium voltametrického chování fungicidu metalaxylu a vývoj jednoduché a citlivé metody jeho stanovení s využitím borem dopované diamantové elektrody a tištěného senzoru s touto pracovní elektrodou.

1. Teoretická část

1.1. Voltametrie

Polarografie, resp. voltametrie je elektroanalytická technika založená na měření proudu protékajícího elektrodou ponořenou do roztoku obsahujícího elektroaktivní sloučeniny v závislosti na vkládaném potenciálu [1].

Významný krok pro vynalezení polarografie představovala kapající rtuťová elektroda (DME), která byla při elektrochemických měřeních používána [2]. Již v roce 1873 popsal ve svých experimentech Gabriel Lippmann vzestup rtuti ve vertikální trubici, která byla v kontaktu s vodným roztokem. Lippmannův elektrometr byl vhodný k měření malých potenciálových rozdílů. Následovaly pokusy, ve kterých se rtuť uvolňovala z konce kapilární trubice. Profesor Kučera použil DME pro získání elektrokapilárních křivek a zavedl techniku vážení kapek rtuti spadlých z elektrody. Ke studiu jevů spojených s DME přizval prof. Kučera Jaroslava Heyrovského, který začal pracovat v jeho laboratoři v roce 1918 [3].

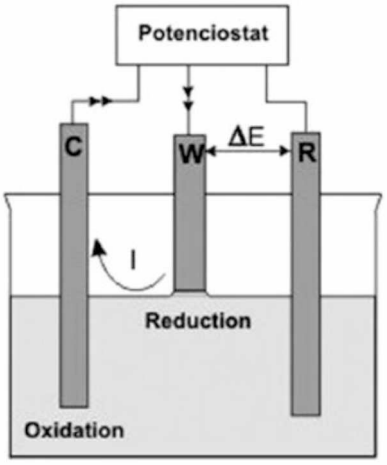
Polarografie se zrodila v roce 1922, ve kterém Heyrovský zaznamenal první vztah mezi proudem protékajícím kapajícími rtuťovými elektrodami a aplikovaným potenciálem. To byl klíčový experiment pro polarografii [4]. V roce 1924 Heyrovský a jeho spolupracovník Shikata sestrojili první přístroj – polarograf, který automaticky zaznamenával křivku odpovídající závislosti proudu na potenciálu (i-E křivka) na kusový fotografický papír [2, 3]. Jedná se pravděpodobně o první popsaný analytický přístroj s automatickým záznamem [3]. Za objev polarografie byla Heyrovskému v roce 1959 udělena Nobelova cena za chemii. Na Obrázku 1 je uvedena fotografie z předávacího ceremoniálu ve Švédsku [2, 5].

1.1.1. Princip voltametrie

Z Polarografie se během let vyvinula voltametrie. Rozdíl mezi oběma metodami je dán použitou pracovní elektrodou. Zatímco polarografie používá jako pracovní elektrodu kapající rtuťovou elektrodu, voltametrie pracuje se stacionárními elektrodami z různých materiálů, např. visící rtuťová kapková elektroda (HMDE), kovové nebo uhlíkové elektrody [6].

Obrázek 1 Jaroslav Heyrovský přijímá Nobelovu cenu za chemii [5].

Voltametrické měření probíhá v tříelektrodovém systému složeném z pracovní elektrody, referenční elektrody (nejčastěji argentchloridová, Ag/AgCl, KCl) a pomocné elektrody (Pt drát). Proud protéká mezi pracovní a pomocnou elektrodou a potenciál je měřen mezi pracovní a referenční elektrodou za bezproudého stavu [7]. Schéma tříelektrodového uspořádání elektrochemického článku je uvedeno na Obrázku 2. Zdrojem napětí je potenciostat umožňující měření protékajícího proudu mezi pracovní a pomocnou elektrodou, a také řídící potenciál aplikovaný na pracovní elektrodu. Případného odstranění rozpuštěného kyslíku z roztoku lze docílit probubláváním roztoku inertním plynem nejčastěji dusíkem nebo argonem [8].



Obrázek 2 Schéma tříelektrodového elektrochemického článku složeného z pomocné elektrody (C), pracovní elektrody (W) a referenční elektrody (R) [9].

1.1.2. Voltametrické metody

1.1.2.1 Stejnosměrná voltametrie

Při DC (direct current) voltametrii (DCV) je na pracovní elektrodu aplikován potenciál lineárně rostoucí nebo klesající v závislosti na čase. Pro vytvoření voltamogramu je proud zaznamenáván jako funkce stejnosměrného potenciálu [10]. Výsledná proudová odezva je tvořena dílčími složkami proudu:

- *Difuzní proud* (I_d) – vzniká při výměně elektronů mezi pracovní elektrodou a analytem. Přenos depolarizátoru (látka, která podléhá redoxní reakci) k povrchu elektrody je řízen difúzí, tedy vyrovnáváním koncentračních rozdílů u povrchu elektrody a v roztoku. Difuze je nejpomalejším dějem v systému, a proto určuje velikost limitního difuzního proudu ($I_{d,lim}$). Ten je zaznamenán, pokud difuze částic dosáhne maximální rychlosti, kdy proud již dále neroste. Vzhledem k tomu, že tato rychlost je úměrná koncentraci látky v roztoku, je i $I_{d,lim}$ úměrný koncentraci [11]. Proud měřený v určitém okamžiku růstu rtuťové kapky u DME lze vyjádřit pomocí Ilkovičkovy rovnice (1):

  $$I_{d,lim} = 0{,}732 \cdot n \cdot F \cdot D^{1/2} \cdot m^{2/3} \cdot t^{1/6}(c - c^0), \quad (1)$$

  kde n je počet vyměněných elektronů, F představuje Faradayovu konstantu, D difuzní koeficient depolarizátoru, m průtokovou rychlost, t je doba kapky, c je koncentrace v roztoku a c^0 koncentrace u povrchu elektrody [12].

- *Kapacitní proud* (I_c) – jinak označovaný jako nabíjecí proud, je nutný k nabití elektrické dvojvrstvy vznikající při polarizaci elektrody na fázovém rozhraní elektroda/roztok. Tento proud lze zaznamenat i v základním elektrolytu bez přítomnosti depolarizátoru [11]. Velikost I_c závisí na použité pracovní elektrodě, potenciálu, složení roztoku apod. Významný je zejména při nízkých koncentracích analyzovaných látek, kdy omezuje možnosti klasických voltametrických metod. Lze jej však eliminovat např. použitím tzv. pulzních technik [12].

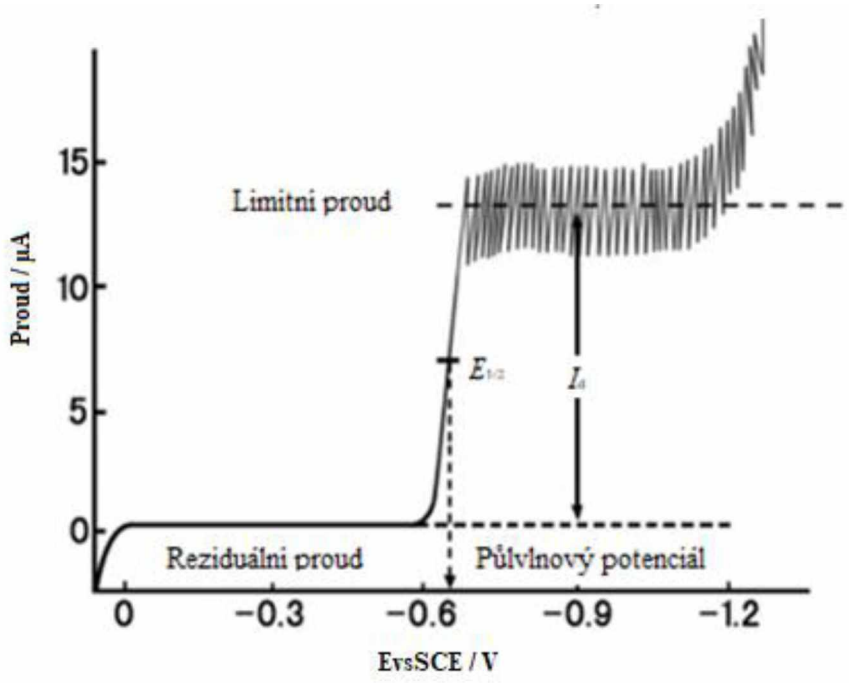
- *Kinetické proudy* (I_k) – vznikají v důsledku chemické reakce předřazené nebo následné k reakci elektrochemické, tzn. že jejich velikost je závislá na rychlosti vzniku depolarizátoru nebo úbytku produktu elektrodové reakce chemickou reakcí [12].

- *Katalytické proudy* – vznikají v přítomnosti látek, které způsobují posun potenciálu redoxní reakce analytu k méně pozitivním (oxidace), resp. negativním (redukce)

hodnotám. Příkladem může být katalytické vylučování vodíku při pozitivnějších potenciálech, kdy vzniká katalytická vlna vodíku [12].

- *Adsorpční proudy* – vznikají jako důsledek adsorpce analytu na povrchu elektrody [11].

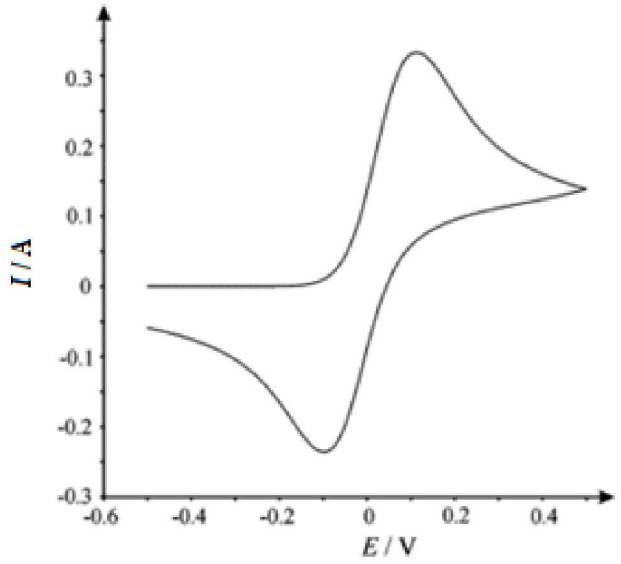
Typická polarografická, resp. voltametrická křivka je esovitého tvaru (Obrázek 3). Na začátku křivky je velmi malý nabíjecí proud. S rostoucím napětím se elektroaktivní látka v roztoku začíná redukovat, resp. oxidovat a vzniká difúzní proud, který v určitém bodě dosáhne mezní hodnoty $I_{d,lim}$, a ten je přímo úměrný koncentraci analytu v roztoku [13]. Půlvlnový potenciál ($E_{1/2}$) je potenciál, při kterém proud dosáhne poloviny své mezní hodnoty. Ten nezávisí na koncentraci analytu, ale je charakteristický pro konkrétní látky [14]. Využívá se k identifikaci složek v roztoku [13, 15]. Výsledný tvar polarogramu, resp. voltamogramu je určen standardními potenciály elektroaktivní látky, efekty transportu hmoty, kinetickým přenosem elektronů a sekundárními chemickými reakcemi [15]. DC umožnuje stanovit elektroaktivní (oxidované nebo redukované) sloučeniny do koncentrací v řádu 10^{-5} mol/l a rozlišit lze látky, které se liší hodnou $E_{1/2}$ minimálně o 200 mV [16].



Obrázek 3 DC polarogram. Převzat ze zdroje [13] a upraven.

1.1.2.2 Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie (CV) je elektrochemická technika používaná ke zkoumání oxidačních a redukčních dějů. Cyklický profil těchto dějů se nazývá cyklický voltamogram, který je zobrazen na Obrázku 4. Na ose x je aplikován potenciál a osa y představuje odezvu neboli prošlý výsledný proud [17]. CV je vhodná při monitorování elektrochemického chování látek. Poskytuje pohled na strukturu, potenciál a charakteristické aktivity dané látky [18]. S použitím CV je možné identifikovat mechanismus elektrochemické reakce, např. usuzovat na reverzibilitu, resp. ireverzibilitu sledované elektrodové reakce [19]. Lze ji použít pro studium elektrochemického chování široké škály organických a anorganických sloučenin, ale pro analytické účely, tedy stanovení koncentrace látek, se v praxi příliš nevyužívá [20]. Výhoda této metody spočívá v jednoduchosti, rychlosti a nízkých nákladech [18].

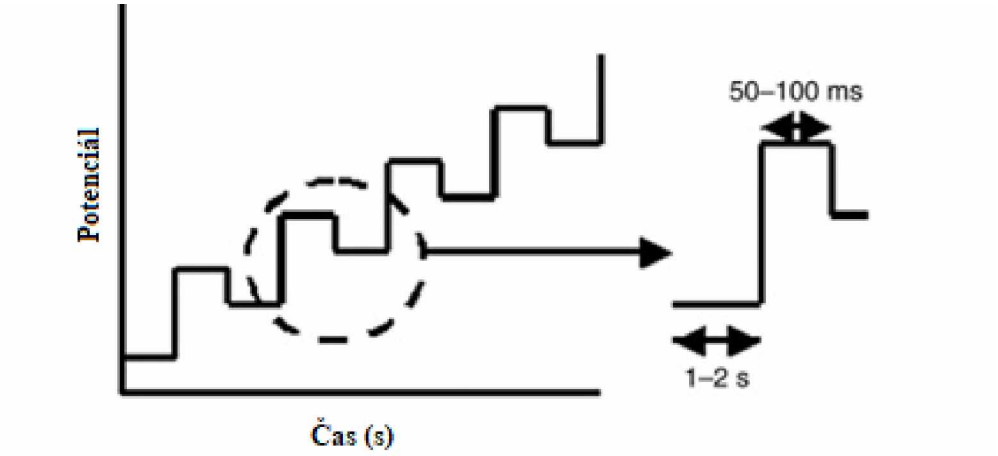


Obrázek 4 Cyklický voltamogram. Převzat ze zdroje [21] a upraven.

1.1.2.3 Diferenční pulzní voltametrie

Metoda diferenční pulzní voltametrie (DPV) využívá aplikaci konstantních potenciálových pulzů na lineárně se měnící potenciál [22]. Proud se měří vždy před aplikací pulzu a na jeho konci. Z těchto hodnot se vypočítá rozdíl, který se vynáší v závislosti na potenciálu [23]. Na obrázku 5 je zobrazen tvar napěťového pulzu při DPV [22]. Výsledný voltamogram má tvar píku s vrcholovým potenciálem E_p, který odpovídá přibližně hodnotě $E_{1/2}$ [14]. Hlavní výhoda DPV spočívá v eliminaci kapacitního proudu, a tedy vysoké citlivosti [23]. Běžně dosahované

meze detekce jsou u této metody v řádech 10^{-7} až 10^{-8} mol/l [14]. Pro rozlišení analytů s podobnými oxidačními potenciály je nutný rozdíl alespoň 50 mV [23, 24]. Pulzní metody mají nejčastější uplatnění při kvantitativní analýze [22].



Obrázek 5 Závislost vkládaného napětí na čase (t). Převzat ze zdroje [22] a upraven.

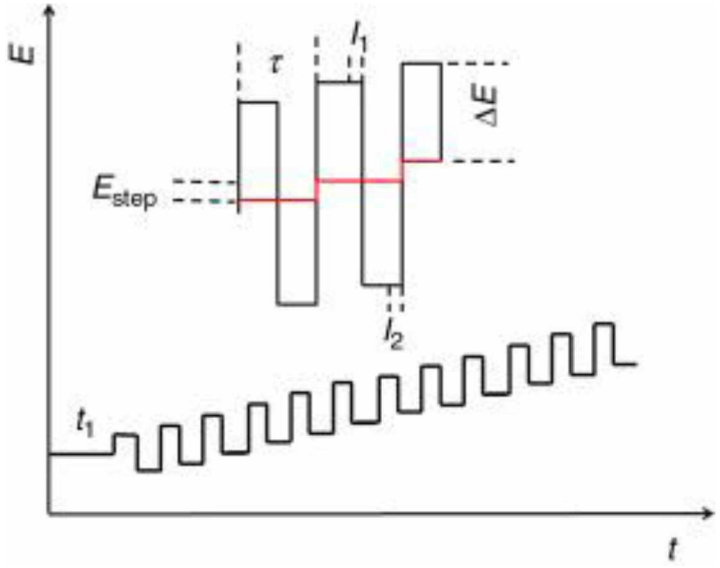
1.1.2.4 Square-wave voltametrie

Square-wave voltametrie (SWV) patří mezi nejrychlejší a nejcitlivější techniky pulzní voltametrie. Podstatou potenciálové rampy (Obrázek 6) je střídavé napětí modulované jako pravoúhlé segmenty. Elektrické proudy jsou měřeny na konci pozitivního segmentu jako dopředný proud (I_f) a na začátku opačně orientovaného segmentu jako zpětný proud (I_b) [22, 25]. Rozdíl mezi naměřenými proudy ($I_d = I_f - I_b$) se vynáší v závislosti na potenciálu [25]. Technika se vyznačuje vynikající citlivostí a odolností vůči kapacitním proudům [22]. Metodu lze použít pro analýzu reverzibilních a ireverzibilních reakcí i pro katalytické reakce [26]. Detekční limity SWV (až 10^{-8} mol/l) jsou srovnatelné s limity chromatografických a spektroskopických technik [22, 25].

1.1.2.5 Rozpouštěcí techniky

Společným krokem charakteristickým pro tyto metody je nahromaděn analytu na povrchu elektrody. Analyt může být řízenou elektrolýzou (redukcí nebo oxidací) akumulován na pracovní elektrodě a následně rozpuštěn zpět do roztoku. Sleduje se proudová odezva odpovídající právě rozpouštění nahromaděného analytu a jedná se o anodickou (ASV) nebo katodickou (CSV) rozpouštěcí voltametrii. Alternativou je adsorptivní (AdSV) rozpouštěcí

voltametrie, při níž dochází k nahromadění látky na povrchu elektrody adsorpcí. Díky zakoncentrování lze stanovit velmi nízké koncentrace látek v řádech 10^{-10}-10^{-12} mol/l [27].



Obrázek 6 Průběh potenciálové rampy u SWV [22].

1.1.3. Pracovní elektrody ve voltametrii

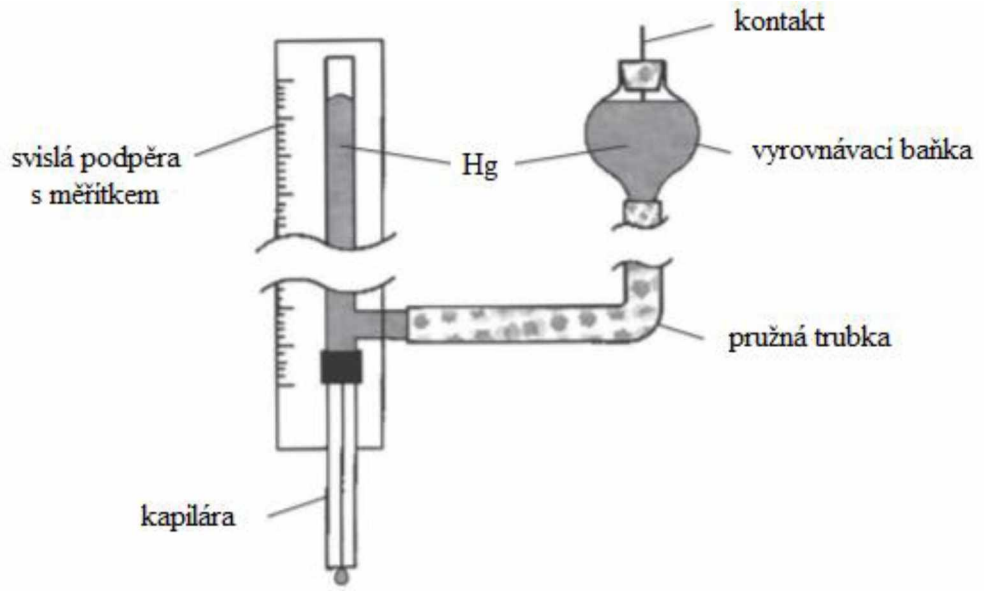
Nejdůležitější část elektrochemického článku tvoří pracovní elektroda. Vhodný výběr materiálu, ze kterého je pracovní elektroda tvořena je rozhodující pro úspěch experimentu. Materiál elektrody nesmí měnit složení analytu, měl by zajistit dostatečně rychlý a reprodukovatelný přenos elektronů, aniž by docházelo k zanášení elektrody, a široký využitelný potenciálový rozsah. U materiálu je důležitá jeho geometrie, toxicita a snadná obnovitelnost povrchu po měření. Mezi nejčastěji používané materiály pracovních elektrod ve voltametrii patří platina, uhlík, zlato a rtuť [8].

1.1.3.1 Rtuťové elektrody

Mezi nejčastěji využívané rtuťové pracovní elektrody se řadí klasická rtuťová kapající elektroda (DME) zobrazena na Obrázku 7, statická rtuťová kapková elektroda (SMDE), visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) a rtuťová filmová elektroda (MFE). První dvě elektrody jsou vhodné zejména pro matrice, u kterých je zvýšené riziko pasivace a poslední dvě elektrody spíše pro docílení nejvyšší možné citlivosti s využitím předběžné akumulace analytu [28].

Rtuť vyniká mezi kovovými elektrodami především kvůli jejímu rozhraní s roztokem, které je atomicky hladké s dobře definovanou plochou. Navíc vykazuje vysoký potenciál pro vývoj

vodíku, má tedy velký využitelný potenciálový rozsah v oblasti negativního potenciálu [3]. Další výhodou je snadná a velmi dobře opakovatelná obnova povrchu. Mezi nejvíce využívané patří statická a visící rtuťová kapková elektroda [28]. Povrch DME se neustále obnovuje i během měření a tím jsou zcela eliminovány problémy s pasivací nebo kontaminací povrchu nečistotami [3]. Nevýhodou samotné rtuti je její toxicita. HMDE má oproti ostatním rtuťovým elektrodám nižší spotřebu rtuti. Další nevýhodou je omezený potenciálový rozsah v oblasti kladných potenciálů kvůli oxidaci rtuti [28].



Obrázek 7 Kapající rtuťová elektroda (DME). Převzat ze zdroje [3] a upraven.

1.1.3.2 Kovové elektrody

Elektrody z různých kovových materiálů mají obvykle menší přepětí vodíku ve srovnání se rtuťovými elektrodami. Navíc pro pevné elektrody obecně platí vyšší riziko pasivace povrchu s nutností jeho elektrochemické nebo mechanické regenerace a čištění. To vede k horší opakovatelnosti měření. Elektrody z platiny jsou elektrochemicky inertní a snadno se vyrábějí v mnoha tvarech. Jejich velkou nevýhodou je omezené potenciálové okno v katodické oblasti v souvislosti s vylučováním vodíku. Další nevýhodou je vysoká cena platiny [8]. Platinové i zlaté elektrody mají také omezenou použitelnost v oblasti kladného potenciálu kvůli oxidaci povrchu. Tato nevýhoda může být ale využita při přípravě zlatých modifikovaných elektrod obsahujících např. tzv. self-assembled (samouspořádané) monovrstvy (SAM). Výhodou zlatých elektrod mohou být také jejich elektrokatalytické účinky [8].

1.1.3.3 Uhlíkové elektrody

Nejběžněji používané uhlíkové elektrody jsou ve formě skelného uhlíku nebo uhlíkové pasty. Jejich velkou výhodou je možnost měření při značně záporných potenciálech, i když ve srovnání se rtuťovými elektrodami je využitelné okno v tomto směru užší. Výhodou je možnost práce v oblasti anodických potenciálů, kde rtuťové elektrody použít nelze. Uhlíkové elektrody se proto přednostně využívají při sledování oxidačních procesů [8]. Skelný uhlík (GC) kombinuje sklovité a keramické vlastnosti grafitu. Mezi jeho vlastnosti patří vysoká teplotní odolnost, extrémní odolnost proti chemickému porušení a nepropustnost kapalin i plynů [29]. Skelný uhlík je poměrně drahý materiál s obtížně obnovitelným povrchem [8]. Vyrábí se řízenou pyrolýzou organického polymeru a představuje nejrozšířenější uhlíkový materiál používaný v elektrochemii [29].

Uhlíková pasta se vyrábí obvykle z jemně granulovaného uhlíku smíchaného s olejovým substrátem (Nujol). Pasta je zabalena v dutině inertního tělesa elektrody. Její velkou nevýhodou je náchylnost k mechanickému poškození, na druhou stranu lze její povrch obnovovat vytlačením a otřením použité pasty, což představuje analogii k odkápnutí kapky rtuti a vede k omezení rizika pasivace elektrody [8]. Další výhodou je možnost modifikace pasty přídavky různých modifikátorů přímo do pasty, tedy do materiálu elektrody.

V současnosti je jedním z trendů ve vývoji nových elektrod a senzorů použití různých uhlíkových nanomateriálů. Povrch elektrod se modifikuje např. uhlíkovými nanotrubičkami (carbon nanotubes, CNT), které se dělí na jednostěnné uhlíkové nanotrubičky (single wall carbon nanotube, SWCNT) a vícestěnné uhlíkové nanotrubičky (multi wall carbon nanotubes, MWCNT). SWCNT obsahují jeden grafenový list svinutý v tubě, zatímco MWCNT obsahuje několik soustředěných trubek se společnou osou. Nanotrubice se vyrábí metodou obloukového výboje při kterém se produkují fullereny C60 a C70 nebo chemickou depozicí par na částicích kovu nejčastěji Fe nebo Ni [30]. Výhodou modifikace elektrod uhlíkovými nanomateriály je zejména významné zvětšení povrchu, což vede ke zvýšení citlivost těchto senzorů [30].

1.1.3.4 Nové trendy v pracovních elektrodách

Voltametrické techniky obvykle vykazují vysokou citlivost, ale jejich hlavním problémem je selektivita, protože existuje velké množství elektroaktivních látek s velmi podobnými hodnotami oxidačních, resp. redukčních potenciálů [31, 32]. Jednou z možností, jak zlepšit selektivitu i citlivost elektrochemických metod je modifikace povrchu pracovní elektrody. Jako

modifikátory lze použít nanočástice kovů a jejich oxidů [33], které mohou mít např. elektrokatalytické účinky. Dále se využívají různé organické látky a polymery [34] nebo výše zmíněné uhlíkové nanomateriály [30].

Samostatnou kapitolu představuje modifikace elektrod různými biomolekulami a vývoj biosenzorů. V biosenzorech se kombinují biologické složky s elektrochemickou detekcí. Biologickou složkou může být např. DNA a další nukleové kyseliny, enzymy, protilátky apod., které nějakým způsobem interagují s analytem nebo jej selektivně váží. Elektrochemický článek pak zajišťuje měření signálu, který vychází právě z interakce analytu s biologickou složkou na povrchu elektrody [35, 36]. Příkladem velmi často využívaného biosenzoru v praxi je osobní biosenzor glukózy používaný pacienty trpícími cukrovkou [32, 37].

1.1.4. Borem dopovaná diamantová elektroda

Diamant vykazuje díky úplné hybridizaci C-sp^3 a tetraedrické vazbě mnoho jedinečných vlastností jako je chemická inertnost, tepelná vodivost, biokompabilita, stabilita v agresivních prostředích a nízký koeficient tření [38, 39]. Vyznačuje se nejvyšší atomovou hustotou a extrémní tvrdostí [38, 40]. Každý atom v čtyřstěnné diamantové mřížce je kovalentně vázán ke svým sousedům a vytváří extrémně robustní strukturu [38, 39]. Diamant je těžko dostupný materiál, jehož příprava je náročná a vyžaduje vysokou teplotu a tlak. Jedná se o izolant, nevede elektrický proud, a proto ho nelze čistý použít jako elektrodový materiál [40]. Vodivým se diamant stává až po dopování vybranými prvky, např. borem [41], dusíkem [42] nebo fosforem [43]. Dopováním borem vzniká p-polovodič, zatímco pokud se použije jako dopant dusík nebo fosfor, vzniká n-polovodič. Síra může být zavedena do diamantu jako dopant pouze v přítomnosti boru a jedná se o n-polovodič. Mísením dopantů dusík/bor nebo síra/bor lze vyrobit tzv. kodopanty [44].

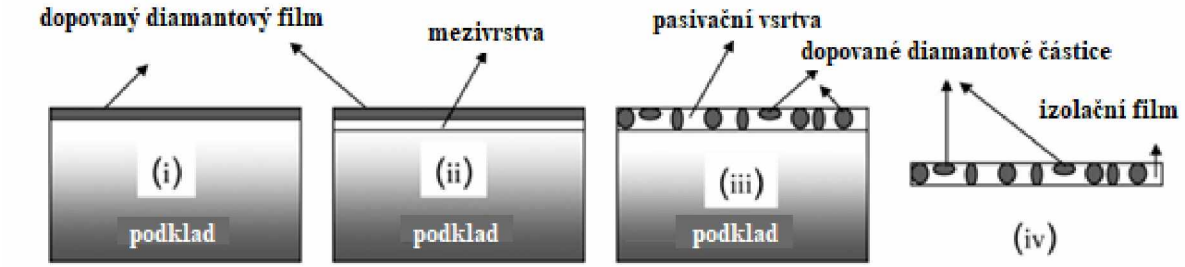
Historie diamantových elektrod sahá do osmdesátých let minulého století [45]. Japonští vědci navrhli iontově implantované diamantové elektrody [31] a Rusové naopak polovodičové diamantové elektrody určené pro fotoelektrochemii [46]. Fujishima a jeho spolupracovníci studovali fotoelektrochemii diamantu na počátku devadesátých let. V roce 1993 Ramesham a Swain využili dopovaný diamant pro analytické aplikace [47].

V současné době se borem dopované diamantové materiály vyrábějí nejčastěji pomocí chemické depozice par (CVD), kdy je dopovaný diamantový film nanesen na vodivý substrát. Potřebná plazma pro depozici (CVD) se aktivuje buď žhavenými vlákny (HFCVD) nebo

mikrovlnným ohřevem (MFCVD). Pro potahování větších substrátů je vhodnější použití žhavených vláken. Plynná fáze se skládá v obou případech z vodíku jako nosného plynu, metanu nebo směsi aceton/metan jako zdroje uhlíku a dalších plynů, které poskytují dopanty boru [44]. Jako zdroje boru se používají např. diboran, trimethylboran, triethylboran, oxid boritý rozpuštěný ve směsi aceton/ethanol/metanol, trichlorid boritý, kyselina boritá, trimethylamin boritý a další v plynné fázi zavedené do CVD [48].

Před nanášením diamantu musí být podklad upraven. Provádí se aktivace povrchu nanočásticemi diamantu, leštění substrátu diamantovým práškem nebo ponoření substrátu do suspenze nanočástic diamantu doprovázené ultrazvukem. Teplota substrátu se během depozice pohybuje okolo 750 až 825 °C. Tloušťka diamantové vrstvy je obvykle 1 až 10 μm. Diamantové vrstvy mohou mít nanokrystalickou nebo mikrokrystalickou strukturu s drsným povrchem. Substráty pro depozici dopovaného diamantového filmu jsou z různých materiálů, např. z křemíku, samopasivujícího se kovu (titan, wolfram, molybden, niob), uhlíkového materiálu (grafit, skelný uhlík) nebo z uhlíkových vláken [44]. Výběr substrátu je velmi důležitý pro syntézu tenkých filmů BDDE. Na křemíkový substrát se velmi dobře dají nanášet rovnoměrné tenké vrstvy, ale křehkost křemíku omezuje jeho použití v některých aplikacích. Pro velkoplošné depozice jsou vhodné kovové substráty [48].

Dosud byly popsány čtyři typy diamantových elektrod, mezi které patří (i) dopovaný diamantový tenký film bez mezivrstvy mezi substrátem a diamantovým filmem, (ii) dopovaný diamantový tenký film s mezivrstvou mezi substrátem a filmem (obvykle z karbidu kovu tvořícího substrát), (iii) elektroda z dopovaných diamantových částic, ve které jsou částice implantovány do vodivého substrátu s pasivovaným povrchem a (iv) elektroda z dopovaných diamantových částic, které jsou imobilizované v izolační vrstvě. Různé typy aktuálně používaných diamantových elektrod jsou zobrazeny na Obrázku 8 [38, 44].



Obrázek 8 Typy diamantových elektrod. Převzat ze zdroje [38] a upraven.

Borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE) se vyznačuje širokým využitelným potenciálovým oknem, nízkým proudem pozadí a mechanickou odolností. Koncentrace boru v diamantu se vyjadřuje různými způsoby. Často využívaný je obsah boru v plynné fázi při depozici BDD filmu, který se pohybuje obvykle mezi 500 až 15 000 ppm, což vede ke konečné koncentraci atomů boru ve filmu 10^{18}-10^{21} cm^{-3} [44]. Koncentrace 10^{20} cm^{-3} odpovídá jednomu atomu boru na tisíc atomů uhlíku. Tato koncentrace představuje přibližnou hranici, kde dochází ke změně vodivosti BDD filmů. Při nižších koncentracích vykazují polovodičový a při vyšších kovový charakter [49].

K terminaci povrchu BDDE je možné použít fyzikální úpravy (mechanické čistění, laserová aktivace, leptání plamenem), chemické čištění a elektrochemické předběžné úpravy (anodická a katodická polarizace). Fyzikální úpravy nejsou vhodné, pokud má povrch BDDE specifickou geometrii (ostré konce nebo porézní strukturu). Při chemickém čištění se elektroda ponoří do směsného roztoku vysoce oxidačních (kyselých nebo zásaditých) činidel, mezi které patří směs kyseliny sírové a dusičné, lučavka královská nebo Fentonův roztok [50]. Elektrochemická úprava BDDE je považována za účinnou metodu, jedná se o katodickou nebo anodickou předúpravu [50, 51]. Povrchové zakončení BDDE přispívá k fyzikálním a chemickým vlastnostem elektrody a má velký význam pro elektrochemickou analýzu. Pro předúpravu BDDE se používají vysoké proudy (±200 mA/cm^2) nebo vysoké potenciály (> ±2 V) [51]. Kyslíkem terminovaného povrchu (O-terminované) BDDE lze, vedle elektrochemické oxidace při značně pozitivních potenciálech, dosáhnout pomocí oxidace v plynné fázi kyslíku, vařením v silné kyselině, oxidačním činidlem nebo dlouhodobým vystavení vzduchu [45]. Povrchy O-BDDE jsou hydrofilní, mají nižší vodivost, zatímco povrchy terminované vodíkem (H-terminované) jsou přesný opak. Hydrogenace povrchu (H-terminované) BDDE je možné docílit pomocí vodíkových radikálů, které vznikají při redukci protonů v kyselém prostředí. Redukce probíhá při záporných potenciálech a může vést ke zlepšení detekce analytu [52]. Sloučeniny s kladným nábojem jsou snadněji oxidovány na O-BDDE než na H-BDDE kvůli elektrostatické přitažlivosti [45].

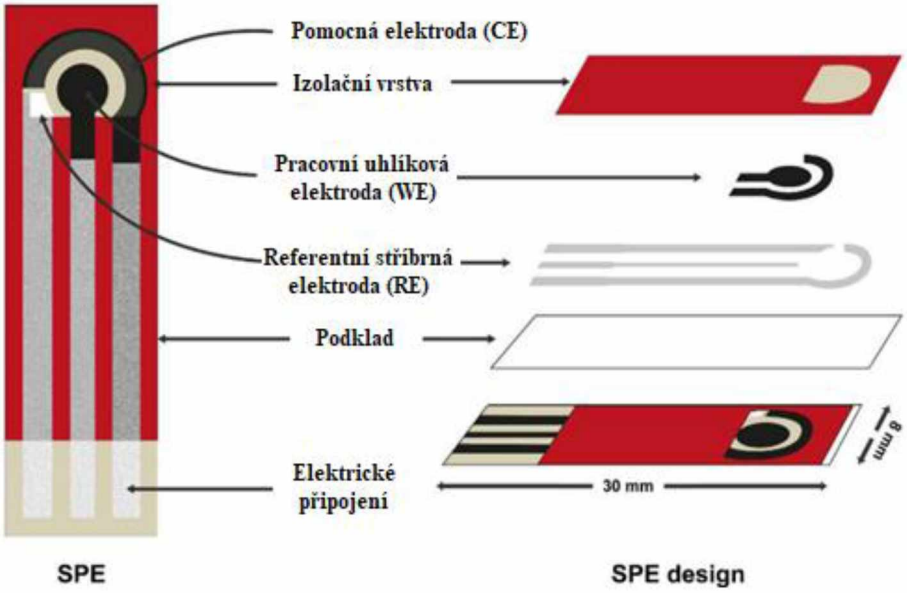
BDDE má díky svým vlastnostem široké uplatnění v kombinaci s elektroanalytickými technikami. Cílovým analytem mohou být anorganické i organické látky. V literatuře byla popsána celá řada aplikací BDDE [38, 53]. Byla použita např. při stanovení karbarylu v přírodních vodách [54], při stanovení fenolických antioxidantů v potravinách [55] nebo při stanovení paracetamolu a kodeinu ve vzorcích léčiv a lidských tělních tekutinách [56]. Vedle

elektroanalýzy byly popsány také možnosti využití BDDE při čištění odpadních vod, kde se využívá elektrochemická oxidace pro degradaci organických znečišťujících látek [57].

1.1.5. Tištěné senzory

Chemický senzor je zařízení, které poskytuje analytické informace o analyzovaném vzorku. Senzory se skládají ze dvou hlavních částí. Jedna slouží k rozpoznávání interakce s analytem a druhá k transdukci (převodu interakce na čitelný signál) [32]. Elektrochemické senzory připravené technikou sítotisku (SPE, screen-printed electrode) představují alternativu ke klasickému tří-elektrodovému uspořádání elektrochemického článku v polarografické nádobce. Výhodou je jednoduchá a levná výroba velkého množství senzorů umožňující jednorázové využití, nebo možnost analýzy malých objemů vzorků. Použitelnost SPE je dána zejména materiálem pracovní elektrody [36].

Schéma SPE je uvedeno na Obrázku 9 [32]. Skládá se z chemicky inertního nevodivého substrátu jako je plast, keramika, hliník nebo sklo [36]. Na jeho povrchu se nachází celý elektrochemický článek, tj. pracovní elektroda (WE), referenční (RE) a pomocná elektroda (CE). Vedle elektrodového systému jsou sítotiskovou technikou naneseny i kontakty a izolační vrstva [36, 58].



Obrázek 9 Znázornění designu sítotiskové elektrody (SPE). Převzat ze zdroje [32] a upraven.

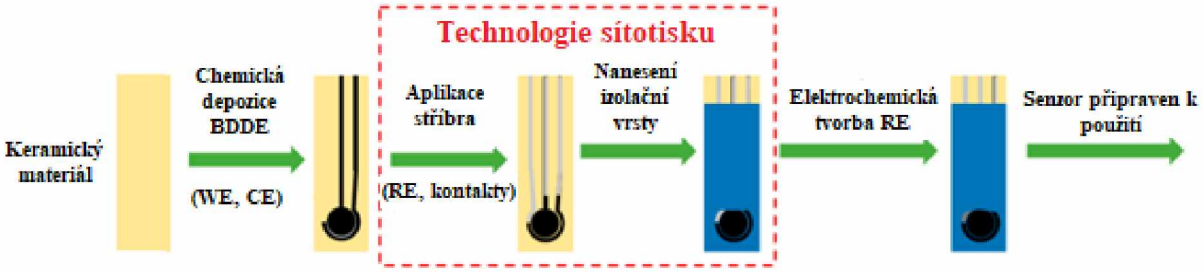
K výrobě SPE se používá technika sítotisku. Původ této techniky sahá až do roku 960 n. l. na území Číny [59]. Princip sítotisku spočívá v protlačování inkoustu přes síto a ukládání na podklad (substrát) [60]. Základními kroky při výrobě SPE jsou výběr a příprava inkoustu, výběr podkladu, tisk, následné sušení a vytvrzování. Sušení a vytvrzování se provádí obvykle v jednom kroku v nízkoteplotním až vysokoteplotním procesu [60-62]. Vzniklé elektrody mají obvykle tloušťku 10 až 20 μm [32]. Inkousty vhodné pro sítotisk by měly mít větší viskozitu a musí být toxotropní povahy (viskozita inkoustu klesá s rostoucí smykovou rychlostí) [59]. WE SPE mohou být tvořené různými kovovými inkousty jako je stříbro, platina nebo paladium [58, 62]. Nejčastěji se ale používají různé uhlíkové materiály (fulleren, grafen, CNT). Pro konstrukci RE se obvykle používají stříbrné nebo Ag/AgCl inkousty. CE se obvykle připravují ze stejných inkoustů jako WE [62]. U komerčně dostupných senzorů je složení inkoustu obchodním tajemstvím výrobce [58]. Materiály síťoviny jsou nylon, polyester, hedvábí, nerezová ocel a chromovaný drát. V některých případech je vhodné, aby síťovina byla odolná proti teplu. Ohřátý inkoust lépe prochází póry a nedochází k jejich ucpání [59].

Výběr substrátu závisí nejen na aplikaci, ale také o něm rozhoduje povaha inkoustu a síťoviny [59]. Hlavní parametry substrátu jsou povrchová afinita, která má vliv na přilnavost inkoustu k substrátu a tepelná stabilita s výhodou při teplotním vytvrzování [59]. Substráty pro výrobu SPE se dělí na neohebné (keramické) a flexibilní (papír, polyestery) [58]. K přilnutí k podkladu se přidávají lepidla jako je acetát celulózy, pryskyřice, cyklohexanon nebo ethylenglykol [62]. Nakonec je SPE potažena izolačním inkoustem nejčastěji dielektrickým nebo polymerním [59].

Předúprava SPE se využívá pro zvýšení jejich citlivosti vůči analytům. Může být provedena elektrochemicky vložením různých aktivačních potenciálů, pomocí plasmy nebo jinými prostředky jako je např. namáčení v různých roztocích [32, 59]. Z elektrochemických metod se nejčastěji využívá CV [59]. Běžně se aplikuje 10 cyklů CV v roztocích např. fosfátového pufru (0,05M) nebo NaOH (3M). Plazmová předúprava O_2 je ekologicky šetrný způsob funkcionalizace povrchu ve srovnání s chemickou modifikací. Umožnuje zavedení mnoha funkčních skupin (hydroxyly, aminy) a je univerzálnější [59].

V rámci této diplomové práce byly použity tištěné senzory vyvinuté a otestované ve spolupráci odborníků ze Slovenské technické univerzity v Bratislavě a Ústavu environmentálního a chemického inženýrství Univerzity Pardubice [36]. Jedná se o tištěný senzor s chemicky deponovanou borem dopovanou diamantovou elektrodou (SP/BDDE), kde je BDDE vyrobena pomocí velkoplošného lineárního anténního systému mikrovlnné chemické depozice par (LA-

MWCVD). Technikou sítotisku byly naneseny stříbrná referentní elektroda, kontakty a izolační vrstva. Schéma výroby SP/BDDE je znázorněno na Obrázku 10. Mezi velké výhody tohoto senzoru patří nízká cena, snadná výroba spolu s vynikajícími elektrochemickými vlastnostmi BDDE a designem na míru. Výsledky dosahované s novými tištěnými senzory jsou srovnatelné s parametry klasické BDDE. Tyto senzory mohou sloužit jako jednorázové nebo opakovaně používané senzory, protože vykazují velmi dobrou opakovatelnost měření a reprodukovatelnost přípravy [36].



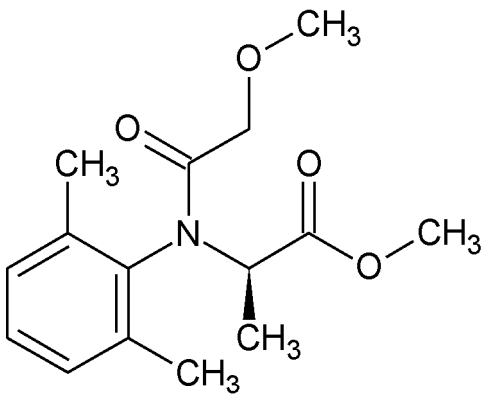
Obrázek 10 Příprava SP-BDDE pomocí sítotisku. Převzat ze zdroje [36] a upraven.

1.2. Metalaxyl

Metalaxyl (ML, methyl-2-(N-(2-methoxyacetyl)-2,6-(dimethylanilino)propanoát, $C_{15}H_{21}NO_4$, CAS: 57837-19-1) se řadí do skupiny systémových fungicidů [63]. Jedná se o derivát alaninu, etheru, metylesteru, karboxamidu a aromatického amidu [64]. ML existuje ve formě dvou enantiomerů R a S, které se liší svými účinky [65]. Prodává se v racemické i enantiomerně čisté R formě pod obchodními názvy např. Mefenoxam nebo Ridomil [66]. Mefenoxam (R-metalaxyl) se používá v zemědělství a jedná se o R-enantiomer, jehož strukturní vzorec je uveden na Obrázku 11. Tato forma je mnohonásobně účinnější než S-enantiomer, ale také je méně biologicky odbouratelný a déle se drží v půdě [65]. ML inhibuje inkorporaci uridinu do ribozomální RNA a RNA polymerázu 1 [63]. Mezi běžně používané amidové fungicidy patří vedle ML např. fenhexamid, benalaxyl nebo tolylfluanid [67].

1.2.1. Fyzikální a chemické vlastnosti

ML se vyskytuje ve formě bělavého prášku. Jeho základní vlastnosti jsou uvedeny v Tabulce 1. Je málo rozpustný ve vodě a dobře rozpustný v organických rozpouštědlech, např. v ethanolu, acetonu nebo toluenu. Při zahřátí uvolňuje toxické výpary oxidů dusíku [64]. Vykazuje stabilitu v širokém rozmezí pH, světla a teploty [66].



Obrázek 11 Strukturní vzorec R-enantiomeru ML [66].

Tabulka 1 Fyzikální a chemické vlastnosti ML [64]

Molekulární hmotnost	279,33 g/mol
Bod varu	295,9 °C
Bod tání	71-72 °C
Rozpustnost ve vodě	8,4 mg/l (22 °C)
Rozpustnost v ethanolu	400 g/l (25 °C)

1.2.2. Využití

ML se používá k regulaci chorob rostlin způsobených houbami řádu *Peronosporales* a třídy *Oomycete* [63]. Houbové patogeny řádu *Peronosporales* způsobují plísně, peronosporu (tj. plísňovou chorobu vinné révy), uvadnutí, hnilobu stonků a plodů rostlin [66]. ML inhibuje růst hub na dřevě, plastech a na jiných materiálech nebo v bazénech [64]. Díky své širokospektrální aktivitě se používá na různé plodiny (ovoce a zeleninu) po celém světě. Fungicidní přípravek se aplikuje ve formě granulí, smáčitelného prášku, popraše anebo emulgovaného koncentrátu. Možnosti aplikace ML jsou různé, lze jej aplikovat na list nebo do půdy. Využívají se povrchové postřiky listů (rozprašování nebo pásový postřik) v kombinaci s dalšími fungicidy ochranného typu (měď nebo folpet), dále pak k moření nebo ošetření osiva [63, 66]. Komerčně dostupné produkty obsahují ML jako jedinou účinnou složku nebo může být využíván v kombinaci s jinými účinnými látkami např. captanem [63].

1.2.3. Toxicita

ML je na rozdíl od ostatních běžně používaných amidových pesticidů mírně nebezpečný. Byly realizovány různé toxikologické studie na zvířatech. Na myších byla pozorována zvýšená mortalita spojená s amyloidózou (chorobný stav, při němž se v různých orgánech začne hromadit bílkovinná sloučenina zvaná amyloid, kterou není tělo schopné odbourávat). U potkanů se projevovaly reprodukční abnormality spojené se sníženým přírůstkem tělesné hmotnosti. Naopak u mláďat se projevila zvýšená hmotnost jater a opožděné kostnatění lebečních kostí. Kosterní odchylky byly objeveny rovněž u králíků [67]. Toxicita pro savce je klasifikována podle EPA třídy III. Je relativně netoxický pro většinu necílových druhů členovců a obratlovců [63].

1.2.4. Stanovení Metalaxylu

V literatuře byly popsány různé metody pro stanovení ML. Převládají chromatografické metody jako je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) ve spojení s detektorem s diodovým polem (DAD), UV detektorem nebo hmotnostním spektrometrem (MS) [68-72]. Použita byla rovněž plynová chromatografie (GC) s detektorem selektivním pro dusík (NPD), detektorem elektronového záchytu (ECD) nebo MS detektorem [72-75]. Dále bylo popsáno využití imunologické metody ELISA (z anglického Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) [76] nebo průtokové analýzy s FTIR (infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací) spektrometrií [77]. Byly popsány metody stanovení ML samostatně nebo ve směsi s jinými pesticidy [70, 76]. Přehled uvedených metod včetně jejich limitů detekce (LOD) a typů analyzovaných vzorků je uveden v Tabulce 2.

Voltametrické, resp. polarografické stanovení ML nebylo v literatuře doposud popsáno. Vzhledem k tomu, že ML je elektrochemicky aktivní látka, nabízí se voltametrie jako alternativa k výše popsaným metodám. Hlavními výhodami této techniky jsou jednoduchost, cenová a časová nenáročnost, snadná obsluha a obvykle také jednoduchá příprava vzorku k analýze. Voltametrické metody současně umožňují miniaturizaci, a tedy využití v terénních analyzátorech a průtokových systémech [26].

Předmětem této diplomové práce tedy bude studium elektrochemického chování ML a zejména pak vývoj jednoduché, rychlé a citlivé voltametrické metody jeho stanovení.

Tabulka 2 Souhrn metod popsaných v literatuře pro stanovení ML

Použitá metoda	LOD [mol/l]	vzorek	citace
ELISA	$2{,}0\times10^{-9}$	Víno	[76]
HPLC-UV	$1{,}8\times10^{-7}$	Mošt, víno	[68]
	$4{,}0\times10^{-9}$	Voda	[69]
	$8{,}2\times10^{-8}$	Rajčata	[70]
GC-MS	$3{,}6\times10^{-8}$	Salát, slunečnice	[73]
GC-NPD	$3{,}6\times10^{-8}$	Salát	[74]
GC-ND	$1{,}8\times10^{-7}$	Rajčata	[75]
FTIR	$5{,}7\times10^{-8}$	Pesticidní přípravek	[77]
LC-MS/MS	$5{,}0\times10^{-9}$	Půda, brambory	[71]
LC-DAD, GC-ECD	$1{,}0\times10^{-9}$	Voda	[72]

Zkratky: HPLC-UV – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detektorem, GC-MS – plynová chromatografie s hmotnostním detektorem, GC-NPD – plynová chromatografie s detektorem dusíku a fosforu, GC-ND – plynová chromatografie s detektorem dusíku, FTIR – infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací, LC-MS/MS – kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií, LC-DAD – kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole, GC-ECD – plynová chromatografie s detektorem elektronového záchytu

2. Experimentální část

2.1. Chemikálie

Standardní roztok metalaxylu (ML, Sigma-Aldrich) o koncentraci $1{,}0\times10^{-3}$ mol/l byl připraven rozpuštěním odpovídající navážky v acetonitrilu a uchován v lednici (4 °C) bez přístupu světla. Brittonův-Robinsonův pufr (BRB, pH 2,0-11) byl připraven mísením alkalické a kyselé složky s využitím pH-metru. Alkalickou složku tvořil roztok 0,2 mol/l NaOH a kyselá složka se skládala z 0,04 mol/l roztoku H_3PO_4, H_3BO_3 a CH_3COOH. Při analýze ML byly dále testovány elektrolyty 0,05 mol/l, 0,1 mol/l, 1,0 mol/l, 2,0 mol/l, 3,0 mol/l H_2SO_4, 0,1 mol/l HNO_3, 0,1 mol/l HCl, 0,1 mol/l $HClO_4$, 0,1 mol/l CH_3COOH a 0,1 mol/l H_3PO_4 (vše Ing. Petr Švec – PENTA Praha) připravené naředěním zásobních roztoků jednotlivých kyselin.

2.2. Přístrojové vybavení

Pro voltametrická měření byl používán potenciostat Autolab PGSTAT 12 (Obrázek 12A) od firmy Metrohm (Nizozemsko) se softwarem Nova 2.1.5. V klasickém tříelektrodovém uspořádání elektrochemického článku byla jako pracovní elektroda (WE) použita elektroda z borem dopovaného diamantu (BDDE, Obrázek 12B) s poměrem B/C během depozice 1000 ppm (BioLogic, Seyssinet-Pariset, Francie, povrch 7,07 mm^2, vnitřní průměr 3 mm, měrný odpor 0,075 Ω cm), nasycená argentchloridová elektroda (Ag/AgCl,KCl(sat.)) sloužila jako referentní (RE) a platinový drátek byl použit jako pomocná elektroda (CE) (obě Monokrystaly, Turnov). Míchání bylo zajištěno pomocí magnetického míchadla v polarografické nádobce. Dále byl používán tištěný senzor s chemicky deponovanou borem dopovanou diamantovou elektrodou (SP/BDDE, Obrázek 12B) (Slovenská technická univerzita (STU) v Bratislavě, Dr. Vojs a kol.) [36], který byl tvořen BDD jako WE (plocha povrchu WE 7,07 mm^2, vnitřní průměr 3 mm, B/C v plynné fázi 312 500, měrný odpor 0,017 Ω cm) i CE a Ag/AgCl RE.

K měření pH byl použit pH-metr Accument AB 150 (Fisher Scientific, Pardubice). Při přípravě roztoků byly používány analytické váhy (Denver Instrument, New York) a ultrazvuková lázeň Bandelin SONOREX (Schalltec GmbH, Německo). K dávkování roztoků byly používány automatické pipety Fisherbrand (Fisher Scientific, Pardubice).

Obrázek 12 Potenciostat Autolab PGSTAT 12 (A) a použité senzory (1 – BDDE, 2- SP/BDDE)

Systém průtokové injekční analýzy s elektrochemickou detekcí (FIA-ED) byl sestaven z programovatelné injekční pumpy (Protea, USA), injekční plastové stříkačky o objemu 50 ml (Steriwund, Polsko), chromatografického šesticestného dávkovacího ventilu s dávkovací smyčkou, hadiček a průtokové cely vytisknuté na 3D tiskárně (STU v Bratislavě, Dr. Vojs a kol.), v níž byl umístěn tištěný senzor SP/BDDE. Vše bylo opět připojeno k potenciostatu Autolab PGSTAT 12 (Metrohm, Nizozemsko) se softwarem NOVA 2.1.5. Dávkovací smyčka byla plněna vzorkem injekční stříkačkou o objemu 5,0 ml. Schéma použitého zařízení pro FIA-ED je uvedeno na Obrázku 13 spolu s detailem průtokové elektrochemické cely.

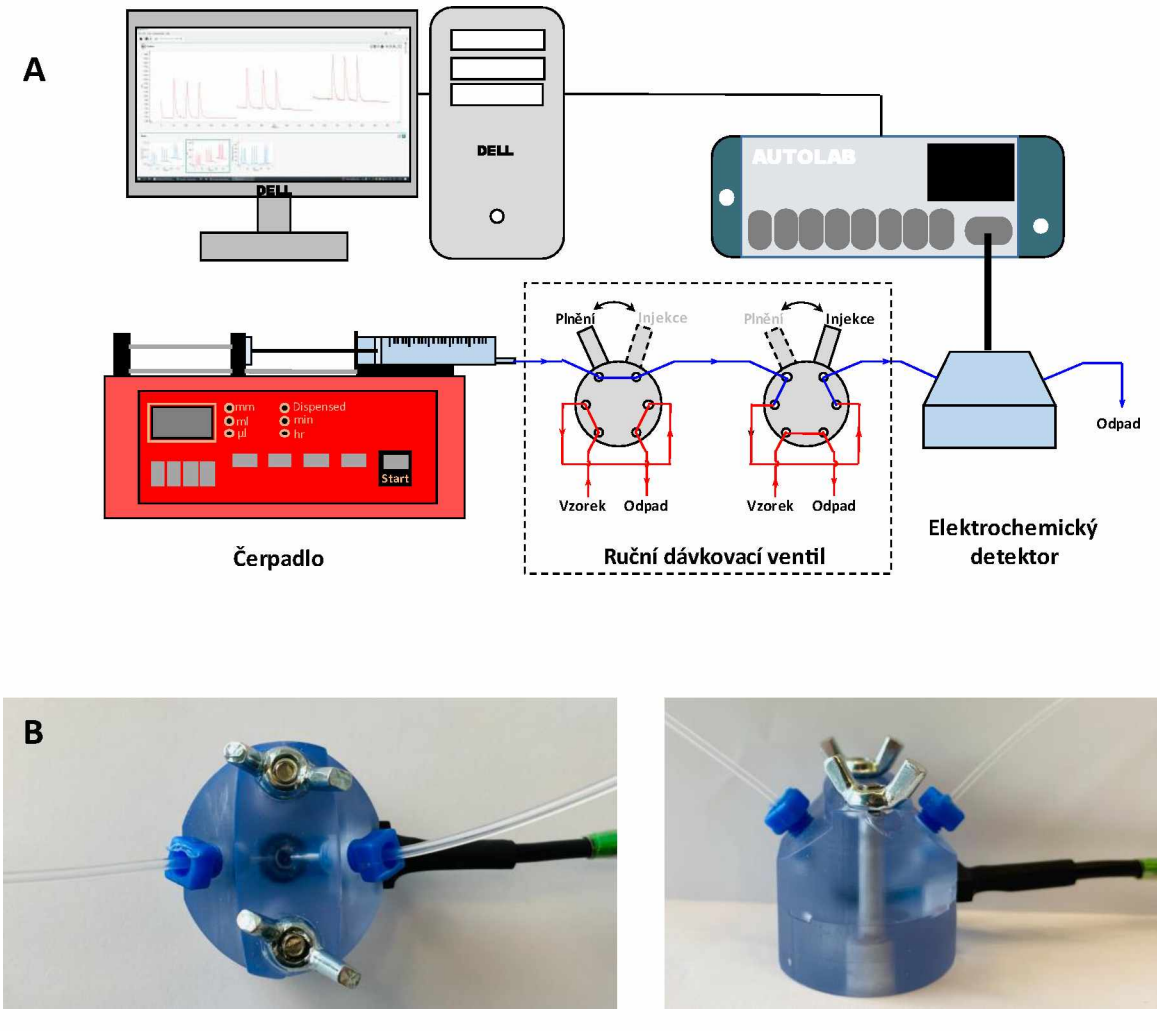
Pro zakoncentrování vzorku byla použita stolní třepačka Unimax 2010 (Heidolph, Německo), vakuová rotační odparka (Heidolph, Německo) a extraktor pro extrakci na tuhé fázi Visiprep SPE Vacuum Manifold (Merck, Německo) s kolonkami Chromabond C18ec (Macherey-Nagel, Německo).

2.3. Pracovní postupy

2.3.1. Voltametrické měření

Před samotným měřením byla vždy provedena aktivace BDDE metodou CV v prostředí 1 mol/l H_2SO_4. Celkem bylo zařazeno 20 cyklických voltamogramů od počátečního potenciálu (E_{in}) +1000 mV k potenciálu obratu (E_{switch}) +2200 mV, konečný potenciál (E_{fin}) byl nastaven na hodnotu +2200 mV a rychlost polarizace (v) 100 mV/s. Při práci s SP/BDDE byly podmínky aktivace shodné, zařazených cyklů bylo jen 10, aby došlo ke stabilizaci odezvy senzoru.

Při studiu voltametrického chování ML byla použita metoda CV a experimenty byly zaměřeny na vliv složení a pH základního elektrolytu a rychlosti polarizace. Parametry CV při těchto měřeních byly následující: E_{in} = –500 mV, E_{switch} = +2500 mV, E_{fin} = +2500 mV a v = 100 mV/s (pro studii vlivu pH), resp. 25-200 mV/s (pro studii vlivu rychlosti polarizace). Pro stanovení ML byly optimalizovány parametry DPV a SWV následujícím způsobem: DPV: v = 40 mV/s, výška pulzu (A, amplituda) = 50 mV a šířka pulzu (t, doba trvání pulzu) = 10 ms; SWV: v = 40 mV/s (BDDE) a 50 mV/s (SP/BDDE), A = 30 mV a frekvence (f) = 20 Hz. Všechna měření probíhala za laboratorní teploty (23±2 °C).



Obrázek 13 Schéma systému použitého pro měření v průtoku – FIA-ED (A) a detail průtočné elektrochemické cely (B).

2.3.2. Průtoková analýza s elektrochemickou detekcí

Aktivace systému FIA-ED před samotným měřením probíhala promytím 50 ml 1 mol/l H_2SO_4 rychlostí 1,5 ml/min. SP/BDDE se aktivoval pomocí deseti cyklů metodou CV v rozmezí potenciálů od –500 mV do +2200 mV. Jako mobilní fáze, resp. základní elektrolyt byl používán roztok 0,1 mol/l H_2SO_4 umístěný v 50 ml injekční stříkačce. Základní parametry měření byly následující: průtok elektrolytu (F_m) = 1,5 ml/min, dávkovaný objem vzorku (V_{inj}) = 50 µl a potenciál detekce (E) = 1,8 V. Vzorkovací smyčka se promývala a plnila vzorkem pomocí 5 ml plastové injekční stříkačky. Po ukončení měření se systém FIA promyl 50 ml destilované vody a ethanolem rychlostí 4 ml/min. Injekční stříkačka na vzorek byla promyta 0,1 mol/l H_2SO_4.

2.3.3. Analýza přírodních vod

Pro analýzu ML v reálných vzorcích byla odebrána voda z řeky Chrudimky ve městě Slatiňany. Vzorek byl odebrán do plastové láhve, která byla nejprve 3× vypláchnuta vzorkovanou vodou. V době před analýzou byl uchován v lednici při teplotě 4 °C a bez přístupu světla. Následně byl zfiltrován přes filtrační papír. Vzhledem k tomu, že tato voda neobsahovala studovaný pesticid, byl vždy přidán vhodný objem standardního roztoku ML tak, aby byla zajištěna potřebná koncentrace. Takto upravený vzorek byl analyzován.

2.3.3.1 Přímá analýza vody

K vodě z řeky Chrudimky byl přidán standardní roztok ML tak, aby výsledná koncentrace byla $1{,}0\times10^{-6}$ mol/l. K analýze bylo pipetováno 9 ml takto upravené vody a byl přidán 1,0 ml základního elektrolytu 0,1 mol/l H_2SO_4. Analýza byla provedena metodou standardního přídavku, kdy byly ke vzorku přidány vždy 2-3 přídavky standardního roztoku ML o objemu 10 µl a koncentraci $1{,}0\times10^{-3}$ mol/l. Analýza probíhala za optimalizovaných podmínek metodou DPV ve spojení s BDDE a byla 5× zopakována. Získané výšky píku byly vyhodnoceny po odečtu základního elektrolytu. Z uvedených měření byly vypočtené statistické parametry jako průměrná koncentrace ML s intervaly spolehlivosti, výtěžnost a relativní směrodatná odchylka.

2.3.3.2 Analýza vody po zakoncentrování

Vzhledem k nízkým koncentracím pesticidů v přírodních vodách bylo nutné zařadit vhodnou koncentrační techniku. V rámci práce byly testovány dvě metody. První byla extrakce tuhou fází (SPE), kdy byly použity kolonky Chromabond C18ec (500 mg sorbentu, ref.730014, Lot.53.246), které jsou dle údajů výrobce vhodné pro separaci nepolárních látek z vodného

prostředí. Tyto kolonky mají objem 6 ml a jsou naplněny 500 mg silikagelu s navázanou fází C18. Kolonka byla napojena na extraktor (Visiprep SPE Vacuum Manifold), který byl přes pojistnou nádobu spojen s membránovou vývěvou, která zajišťovala v systému podtlak. Ten byl kontrolován manometrem a udržován na hodnotě 5 kPa. Zařízení pro SPE je uvedeno na Obrázku 14. Postup extrakce ML ze vzorku vody byl následující. Kolonka byla aktivována promytím 10 ml acetonitrilu a následně 10 ml deionizované vody. Poté byl přes kolonku prosát vzorek vody o objemu 100 ml. Koncentrace ML v modelových vodách byla přídavkem standardního roztoku analytu upravena na hodnotu $5{,}0\times10^{-8}$ mol/l. Celkem bylo k analýze odebráno 500 ml vody a extrakce probíhala s využitím 5 extrakčních kolonek současně. Získáno bylo 100 ml eluátu, který byl následně odpařen do sucha na vakuové rotační odparce (Obrázek 15) při teplotě 45 °C a tlaku 25 kPa. Odparek byl poté rozpuštěn v 1 ml acetonitrilu (zakoncentrováno 500×) a použit pro voltametrickou analýzu.

Obrázek 14 Zařízení Visiprep SPE Vakuum Manifold s kolonkami Chromabond C18ec s pojistnou nádobou a vývěvou.

Druhý postup byl založen na adsorpci na aktivní uhlí a následné eluci. Do Erlenmeyerovy baňky k 500 ml vody s koncentrací ML $5{,}0\times10^{-8}$ mol/l bylo přidáno 0,5 g aktivního uhlí Filtrasorb 400 (velikost částic v rozsahu 0,425-1,7 mm, Chemviron, Feluy, Belgie). Baňka byla umístěna na 2 hodiny do třepačky (Obrázek 15A). Poté byla provedena filtrace, oddělené aktivní uhlí bylo převedeno do baňky se 100 ml acetonitrilu a baňka byla opět na 1 hodinu umístěna do

třepačky. Po eluci ML do acetonitrilu bylo aktivní uhlí odfiltrováno. Následovalo odpaření acetonitrilu do sucha na vakuové rotační odparce a rozpuštění odparku v 1 ml acetonitrilu.

Pro voltametrickou analýzu bylo použito vždy 0,5 ml zakoncentrovaného vzorku a přidáno 4,5 ml základního elektrolytu (0,1 mol/l H_2SO_4). Analýza probíhala metodou DPV v kombinaci s klasickou BDDE za podmínek uvedených výše. K vyhodnocení byla použita metoda standardního přídavku, kdy byly přidány vždy minimálně 2-3 přídavky standardního roztoku ML o objemu 10 µl a koncentraci $1{,}0\times10^{-3}$ mol/l.

Obrázek 15 Stolní třepačka s umístěnými baňkami (A) a vakuová rotační odparka (B).

Všechny grafy byly vytvořeny pomocí softwaru MS Excel 2010 (Microsoft, USA). Parametry kalibračních přímek a intervaly spolehlivosti byly vypočítány pomocí programu OriginPro 9.0 (OriginLab Corporation, USA). Limit detekce (LOD) byl vypočítán jako 3× směrodatná odchylka úseku podělená směrnicí kalibrační přímky a mez stanovitelnosti (LOQ) jako 10× směrodatná odchylka úseku podělená směrnicí kalibrační přímky.

3. Výsledky a diskuse

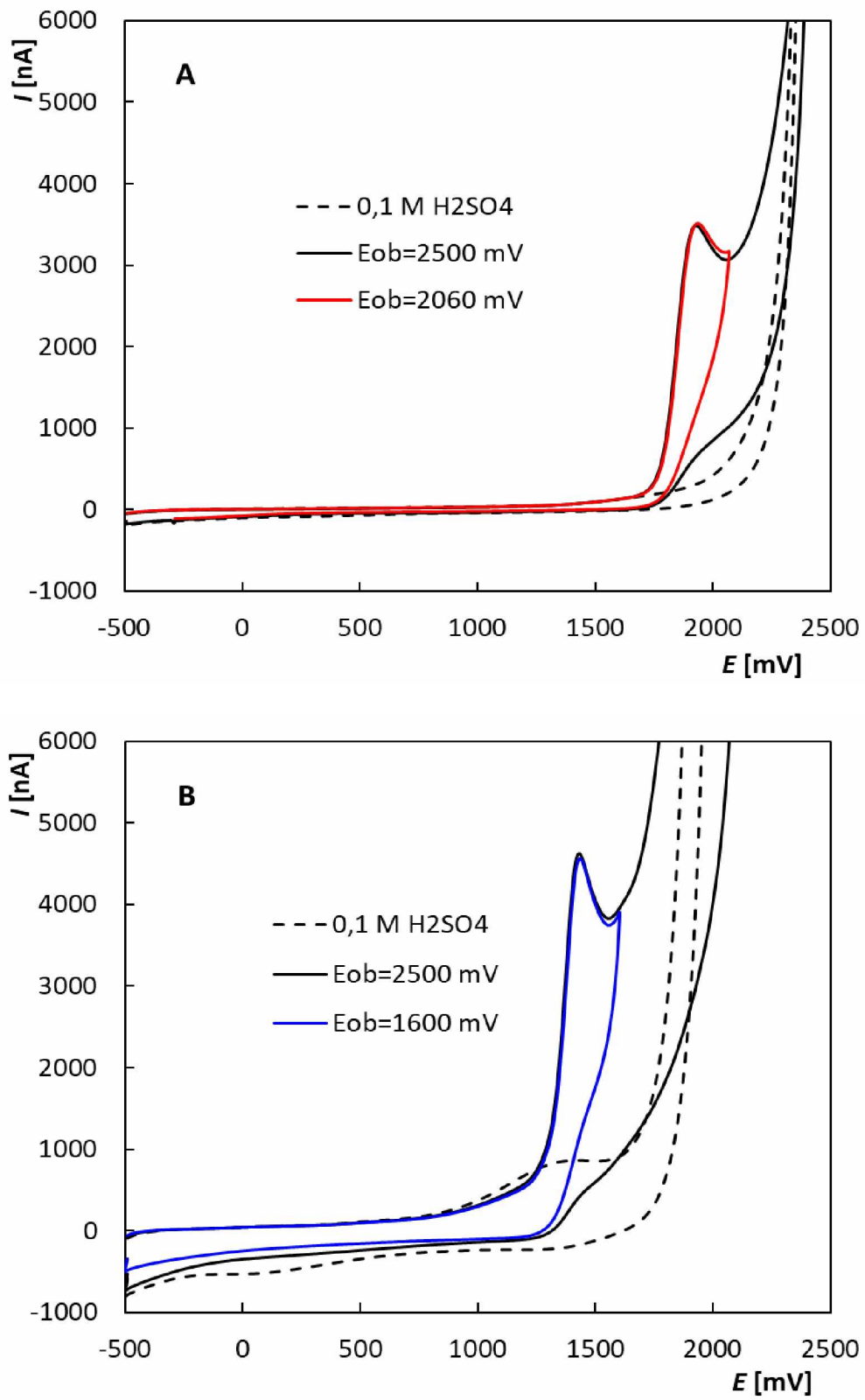
3.1. Voltametrické chování metalaxylu

Na úvod experimentální práce byl změřen cyklický voltamogram ML na BDDE. Tato elektroda byla zvolena vzhledem k širokému potenciálovému rozsahu v anodické oblasti [53]. Měření probíhalo v prostředí H_2SO_4 o koncentraci 0,1 mol/l s následujícími parametry: počáteční potenciál (E_{in}) –1000 mV, potenciál obratu (E_{switch}) +2500 mV, rychlost polarizace (v) +100 mV/s. Koncentrace ML byla $5{,}0\times10^{-5}$ mol/l. Oxidační signál byl pozorován při potenciálu (E_p) +1900 mV, jak je vidět na Obrázku 16A. Na katodické křivce nebyl pozorován žádný redukční pík, což svědčí o ireverzibilním průběhu reakce. Tento závěr byl potvrzen také po posunu E_{switch} těsně za oxidační signál ML na hodnotu +2060 mV, aby bylo zabráněno případným následným oxidačním reakcím.

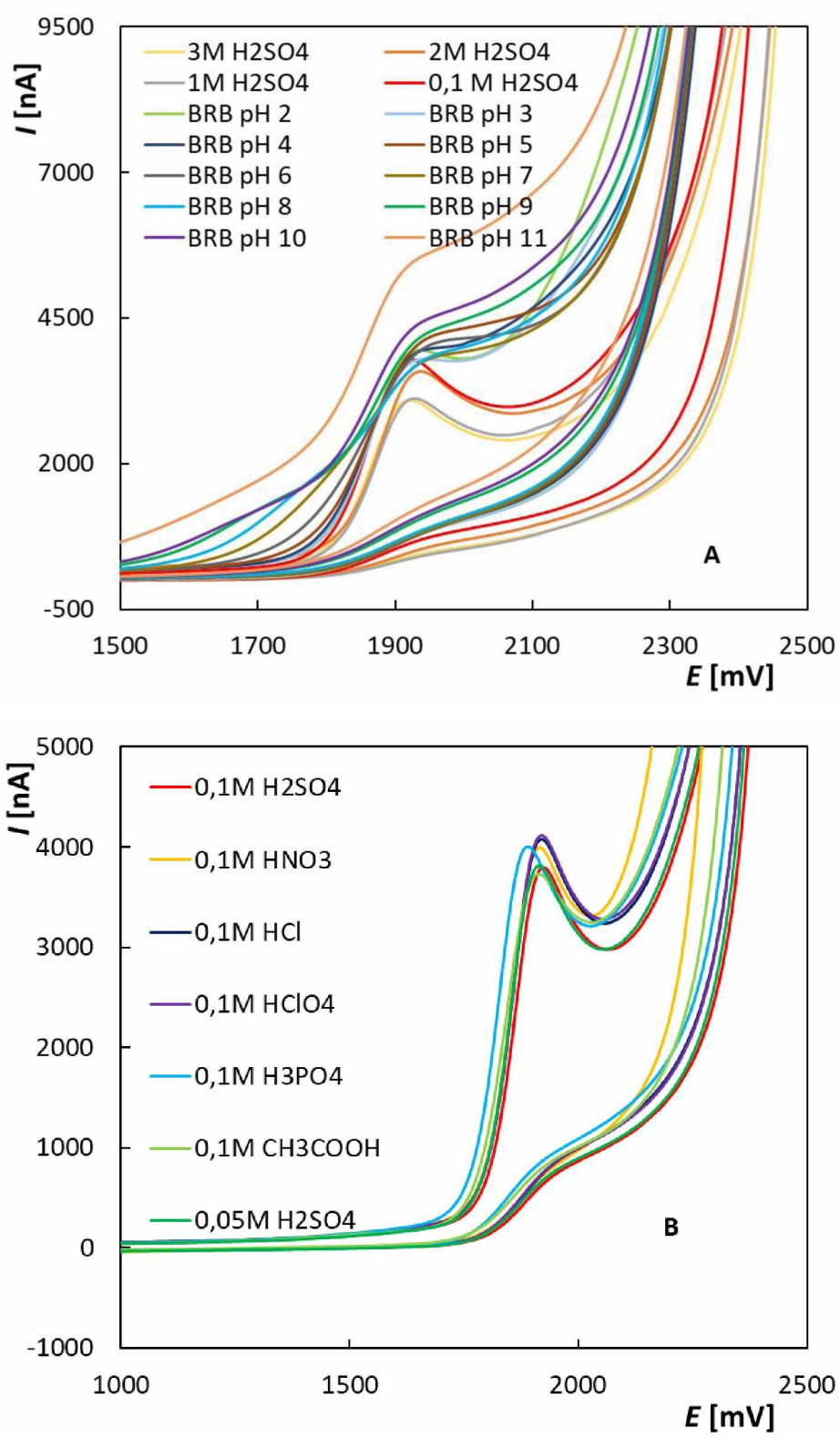
Současně s klasickou BDDE v tříelektrodovém uspořádání byly použity tištěné senzory s BDDE jako pracovní elektrodou (SP/BDDE), které byly zavedeny do praxe na našem pracovišti [36]. Oxidační pík ML je vidět při potenciálu +1500 mV (Obrázek 16B), což představuje významný posun k méně pozitivním potenciálům. Zaznamenaný signál byl také vyšší než v případě BDDE. Opět byl potvrzen ireverzibilní průběh reakce, a to i při posunu E_{switch} na hodnotu +1600 mV. V práci [36] bylo prokázáno, že posun potenciálů na SP/BDDE je způsoben použitou pseudo-referentní elektrodou. Pokud byla k systému připojena externí Ag/AgCl/KCl(sat.), potenciály píků použitých redoxních markerů byly stejné, jako v klasickém tříelektrodovém uspořádání s BDDE.

3.1.1. Závislost na pH

Voltametrické chování jednotlivých látek je ovlivněno složením základního elektrolytu, zejména hodnotou jeho pH. Ke studiu závislosti voltametrického chování ML na pH bylo nejprve použito několik roztoků H_2SO_4 o různých koncentracích (0,05 mol/l, 0,1 mol/l, 1,0 mol/l, 2,0 mol/l, 3,0 mol/l) pro zajištění kyselého prostředí a BRB o pH 2,0-11. Měření na BDDE probíhalo rychlostí 100 mV/s v rozsahu potenciálu –500 až +2500 mV. Byla použita metoda CV a koncentrace ML v polarografické nádobce byla $5{,}0\times10^{-5}$ mol/l. Z Obrázku 17A, kde jsou zobrazeny cyklické voltamogramy ML, vyplývá, že nejvyšší a nejlépe vyvinutý pík byl zaznamenán v kyselém prostředí, konkrétně v 0,1 mol/l H_2SO_4.



Obrázek 16 Cyklické voltamogramy ML zaznamenané BDDE (A) a SP/BDDE (B) v prostředí 0,1 mol/l H_2SO_4. Parametry: E_{in} = –500 mV, E_{switch} = +2500 mV (+2060 mV / BDDE, +1600 mV / SP/BDDE), v = 100 mV/s, c_{ML} = 5,0×10^{-5} mol/l.



Obrázek 17 Cyklické voltamogramy ML zaznamenané na BDDE v závislosti na pH a složení základního elektrolytu. Parametry: základní elektrolyt: H_2SO_4 (0,05 mol/l, 0,1 mol/l, 1,0 mol/l, 2,0 mol/l, 3,0 mol/l) a BRB (pH 2-11) (A), HNO_3, HCl, $HClO_4$, H_3PO_4 a CH_3COOH (všechny 0,1 mol/l), E_{in} = –500 mV/s, E_{switch} = +2500 mV, v = 100 mV/s, c_{ML} = $5{,}0\times10^{-5}$ mol/l.

V dalším kroku byly porovnány cyklické voltamogramy zaznamenané v prostředí různých kyselin. Vedle H_2SO_4 o koncentraci 0,05 mol/l a 0,1 mol/l jsou na Obrázku 17B uvedeny křivky získané v základních elektrolytech tvořených roztoky HNO_3, $HClO_4$, H_3PO_4 a CH_3COOH vždy o koncentraci 0,1 mol/l. Ukázalo se, že změna kyseliny nemá příliš velký vliv na výšku ani tvar oxidačního píku ML. Pro následující měření na BDDE i SP/BDDE byla jako základní elektrolyt používána H_2SO_4 o koncentraci 0,1 mol/l.

3.1.2. Závislost na rychlosti polarizace

Vliv rychlosti polarizace na výšku a polohu anodického píku ML byl studován rovněž pomocí CV, a to v prostředí 0,1 mol/l H_2SO_4 v rozsahu potenciálů –500 mV až +2500 mV. Rychlost polarizace se pohybovala od 25 do 200 mV/s a zvyšovala se po 25 mV/s. Koncentrace ML byla $1{,}0\times10^{-5}$ mol/l. Zaznamenané voltamogramy jsou zobrazeny na Obrázku 18A. Z těch je patrné, že pík se posouvá s rostoucí rychlostí ke kladnějším hodnotám potenciálu, což odpovídá ireverzibilní reakci. Z vloženého Obrázku 18B je patrné, že závislost výšky píku (I_p) na rychlosti polarizace není lineární a nejedná se tedy o adsorpcí řízenou reakci. Naopak průběh závislosti I_p na $v^{1/2}$ se blíží lineárnímu (Obrázek 18C), což svědčí o difúzně řízené reakci. Tato závislost může být popsán rovnicí (2) s příslušným korelačním koeficientem (r). Difuzi jako řídící proces potvrzuje také hodnota směrnice logaritmické závislosti (log(I_p)_log(v)) uvedené na Obrázku 18D a popsané rovnicí (3), která se blíží teoretické hodnotě 0,5 pro difuzně řízenou reakci.

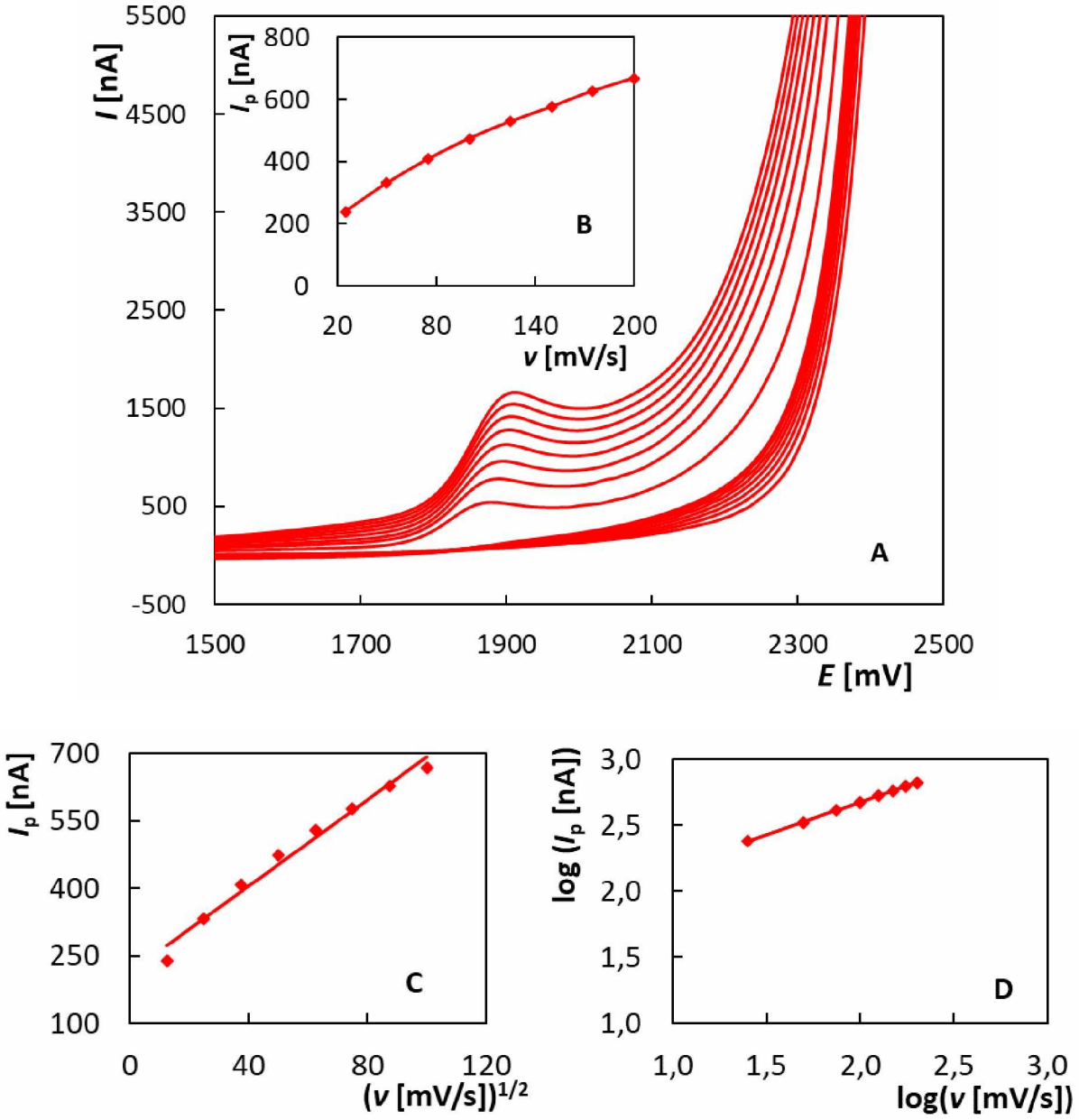
$$I_p[\mathrm{nA}] = (4{,}80 \pm 0{,}26)\, v^{1/2}\left[(\mathrm{mV/s})^{1/2}\right] + (211 \pm 16), r = 0{,}9911 \qquad (2)$$

$$\log(I_p[\mathrm{nA}]) = (0{,}4970 \pm 0{,}0038)\log(v[\mathrm{mV/s}]) + (1{,}6807 \pm 0{,}0075), r = 0{,}9998 \qquad (3)$$

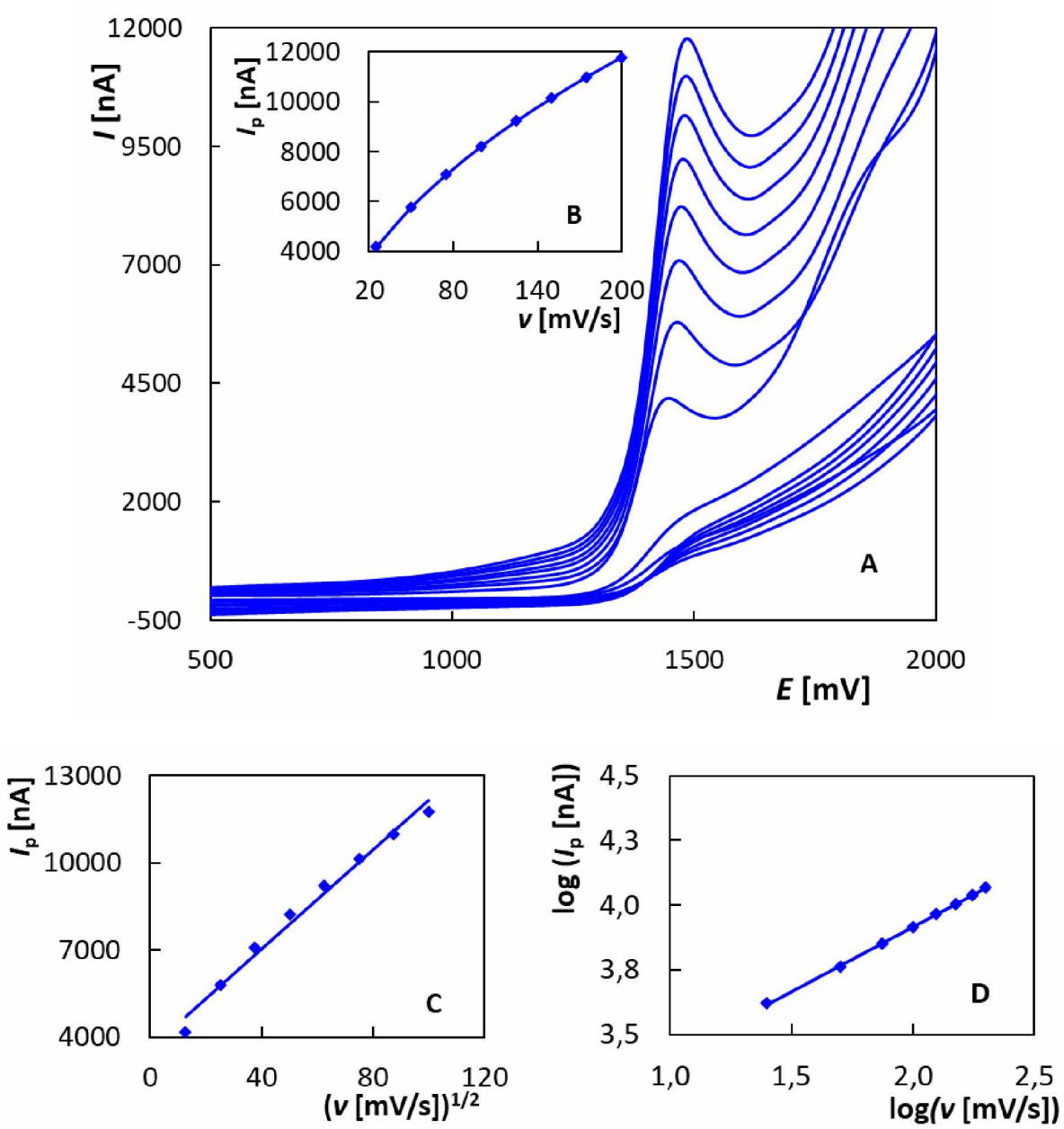
Stejný experiment byl realizován i v případě SP/BDDE, kdy byly nastaveny stejné parametry měření jako pro BDDE. Koncentrace ML byla $5{,}0\times10^{-5}$ mol/l. Získaný cyklický voltamogram je uveden na Obrázku 19A. Ze závislosti I_p na v (Obrázek 19B) je patrné, že se nejedná o lineární průběh a reakce tedy není řízena absorpcí. Dále byla vynesena závislost I_p na $v^{1/2}$ (Obrázek 19C) popsaná rovnicí (4) s příslušným korelačním koeficientem (r), která rovněž nevykazuje zcela lineární průběh (r = 0,9930) a nelze tedy s jistotou určit řídící děj sledované reakce. Proto byla vynesena ještě logaritmická závislost log(I_p)_log(v) na Obrázku 19D popsaná rovnicí (5) s hodnotou směrnice (0,4999 ± 0,0051), která odpovídá teoretické hodnotě pro difúzně řízené reakce.

$$I_p[\mathrm{nA}] = (85{,}0 \pm 4{,}1)\, v^{1/2}\left[(\mathrm{mV/s})^{1/2}\right] + (3641 \pm 260), r = 0{,}9930 \qquad (4)$$

$$\log(I_p[\mathrm{nA}]) = (0{,}4999 \pm 0{,}0051)\log(v[\mathrm{mV/s}]) + (2{,}9174 \pm 0{,}0101), r = 0{,}9997 \quad (5)$$



Obrázek 18 Cyklické voltamogramy ML zaznamenané na BDDE v závislosti na rychlosti polarizace (A) a závislosti I_p na v (B), I_p na $v^{1/2}$ (C) a log(I_p) na log(v) (D). Parametry: základní elektrolyt: H_2SO_4 (0,1 mol/l), E_{in} = –500 mV/s, E_{switch} = +2500 mV, v = 25-200 mV/s, c_{ML} = 1,0×10^{-5} mol/l.



Obrázek 19 Cyklické voltamogramy ML zaznamenané na SP/BDDE v závislosti na rychlosti polarizace (A) a závislosti I_p na v (B), I_p na $v^{1/2}$ (C) a log(I_p) na log(v) (D). Parametry: základní elektrolyt H_2SO_4 (0,1 mol/l), E_{in} = –500 mV/s, E_{switch} = +2500 mV, v = 25-200 mV/s, c_{ML} = $5{,}0\times10^{-5}$ mol/l.

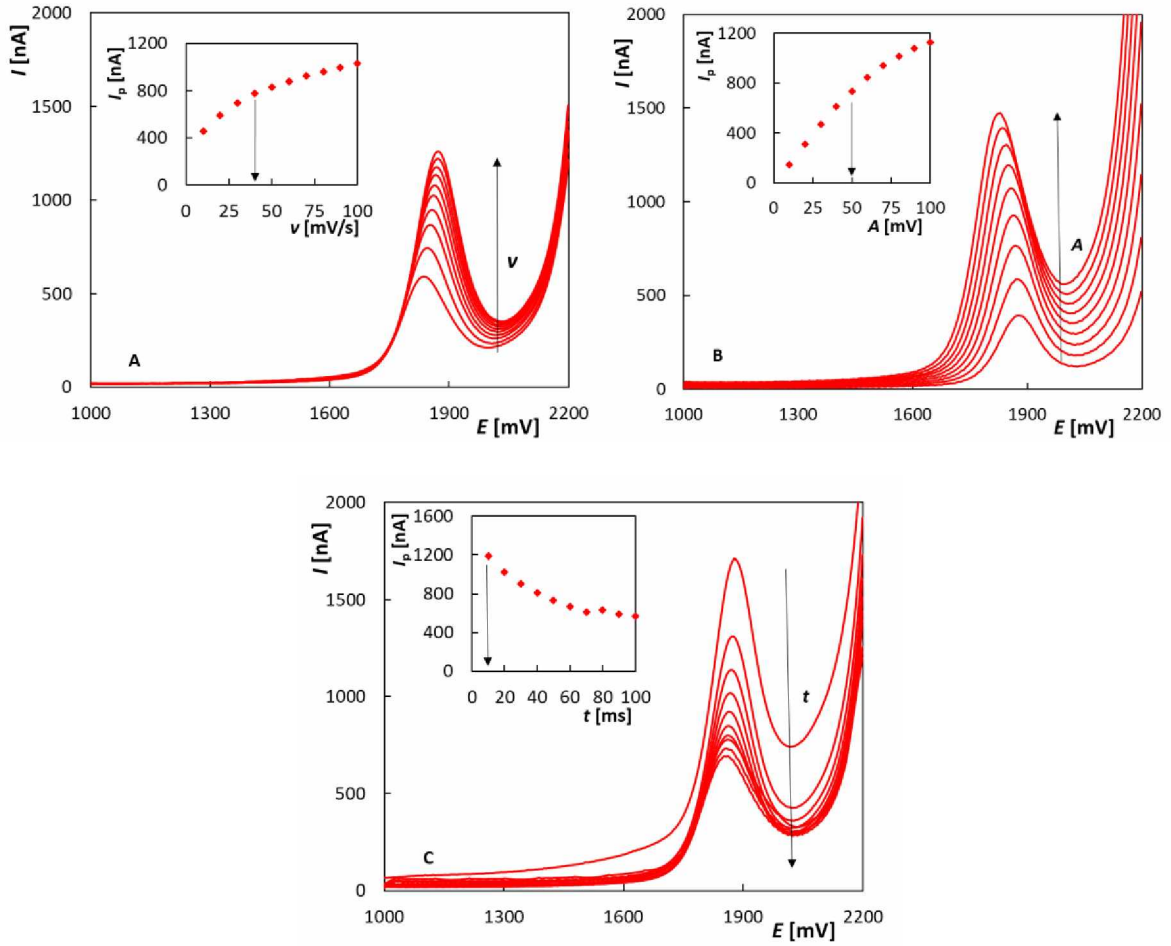
3.2. Vývoj voltametrické metody stanovení metalaxylu

Pro vývoj metody stanovení ML byly místo CV, která se využívá zejména pro studium voltametrického chování látek, testovány DPV a SWV. Jedná se o pulzní techniky, které umožňují obvykle stanovení mnohem nižších koncentrací analyzovaných látek. Nejprve byly

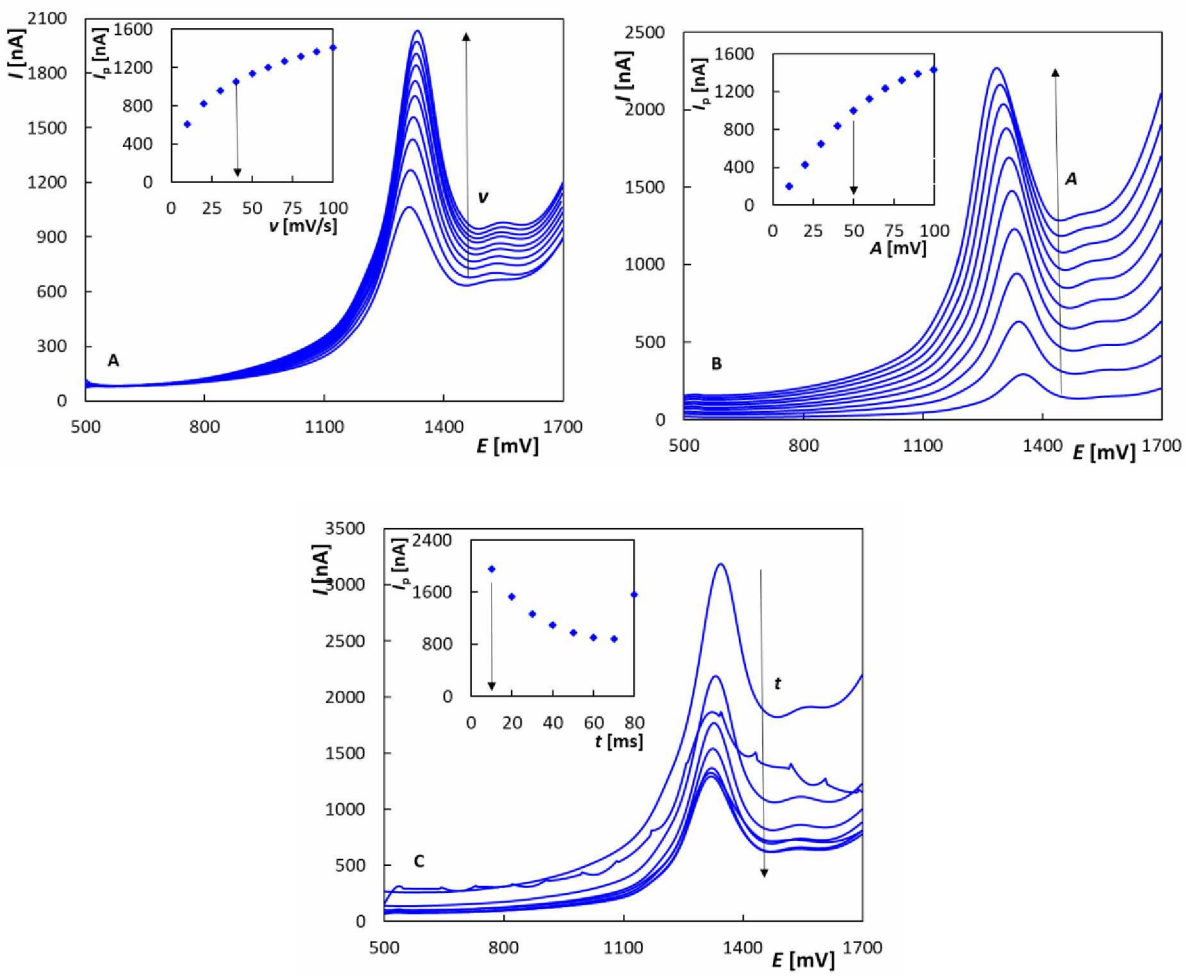
optimalizovány parametry obou metod a na základě změřených koncentračních závislostí pak byla vybrána metoda, která byla dále využívána pro stanovení ML v modelových a praktických vzorcích.

3.2.1. Optimalizace parametrů DPV

Pro DPV probíhaly optimalizační experimenty v prostředí 0,1 mol/l H_2SO_4 a koncentrace ML byla $2{,}0\times10^{-5}$ mol/l pro BDDE i SP/BDDE. Studován byl vliv následujících parametrů: rychlost polarizace (v), výška pulzu (A, amplituda) a šířka pulzu (t, doba trvání pulzu). Získané voltametrické křivky včetně odpovídajících závislostí I_p na příslušných parametrech jsou uvedeny na Obrázcích 20 (BDDE) a 21 (SP/BDDE).



Obrázek 20 DP voltamogramy ML získané na BDDE v závislosti na rychlosti polarizace s odpovídající závislostí I_p na v (A); na výšce pulzu se závislostí I_p na A (B); a na šířce pulzu se závislostí I_p na t (C). Parametry: základní elektrolyt H_2SO_4 (0,1 mol/l), E_{in} = +1000 mV, E_{fin} = +2200 mV, v = 10-100 mV/s (A) a 40 mV/s (B, C), A = 50 mV (A, C) a 10-100 mV (B), t = 50 ms (A, B) a 10-100 ms (C), $c_{ML} = 2{,}0\times10^{-5}$ mol/l.



Obrázek 21 DP voltamogramy ML získané na SP/BDDE v závislosti na rychlosti polarizace s odpovídající závislostí I_p na v (A); na výšce pulzu se závislostí I_p na A (B); a na šířce pulzu se závislostí I_p na t (C). Parametry: základní elektrolyt H_2SO_4 (0,1 mol/l), E_{in} = +500 mV, E_{fin} = +2000 mV, v = 10-100 mV/s (A) a 40 mV/s (B, C), A = 50 mV (A, C) a 10-100 mV (B), t = 50 ms (A, B) a 10-80 ms (C), $c_{ML} = 2{,}0\times10^{-5}$ mol/l.

Všechny experimenty probíhaly tak, že byl jeden parametr měněn ve zvoleném rozsahu a další byly udržovány konstantní. Jako první byla vždy optimalizována rychlost polarizace, která se měnila v rozmezí od 10 do 100 mV/s (A = 50 mV, t = 50 ms). Z vložených Obrázků 20A a 21A je vidět, že výška píku s rostoucí rychlostí rostla, ale při určitých hodnotách se nárůst proudové odezvy zpomalil. Jako optimální byla pro oba senzory vybrána rychlost polarizace 40 mV/s, která představovala kompromis mezi výškou píku a jeho tvarem, resp., vyhodnotitelností. Dalšími optimalizovanými parametry byly amplituda, která se měnila v rozsahu od 10 do 100 mV (v = 40 mV/s, t = 50 ms, Obrázek 20B a 21B), a šířka pulzu rostoucí od 10 do 100 ms

v případě BDDE (Obrázek 20C) a do 80 ms pro SP/BDDE (Obrázek 21C). Výsledné parametry DPV zvolené pro oba senzory jsou shrnuté v Tabulce 3.

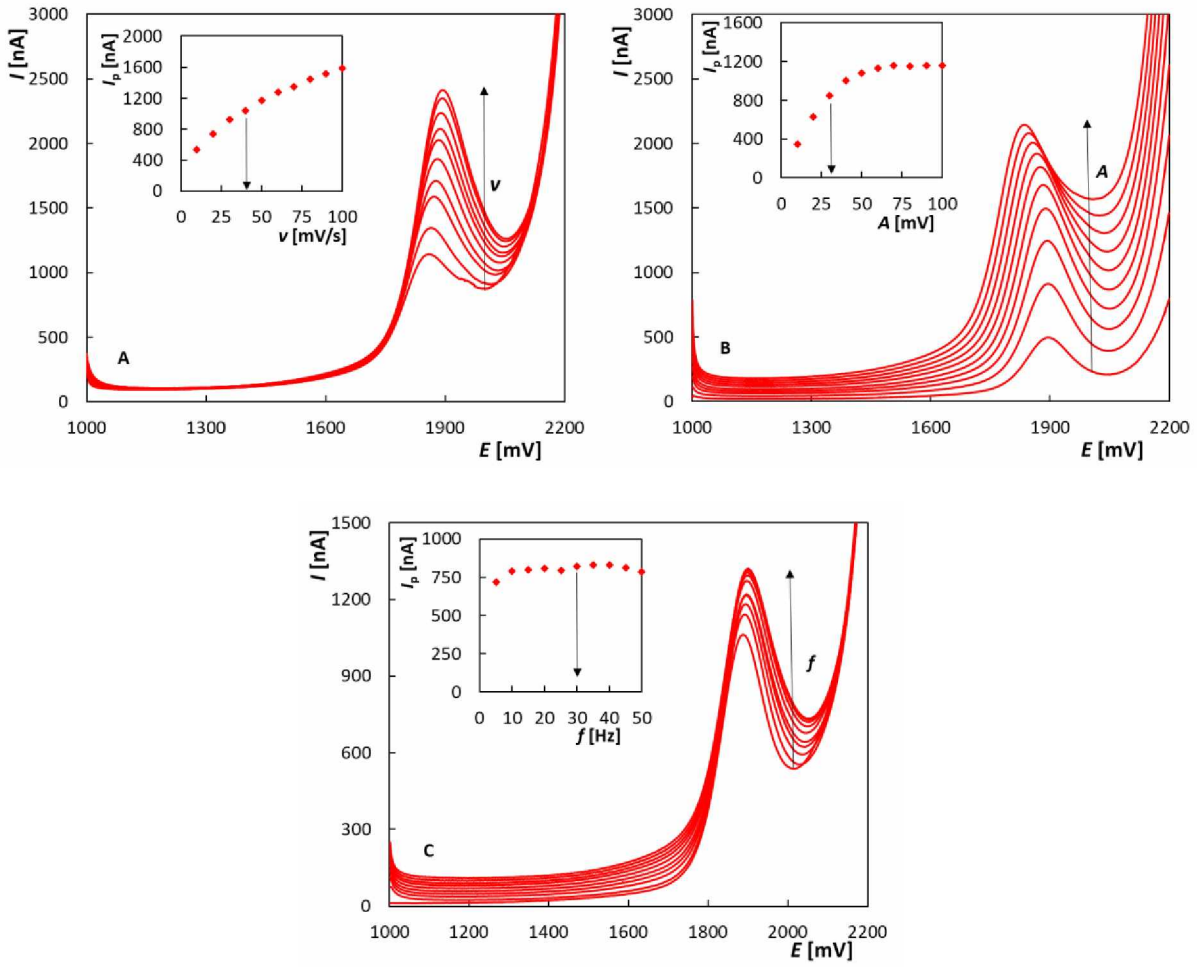
Tabulka 3 Optimalizované parametry DPV a SWV pro stanovení ML s využitím BDDE i SP/BDDE.

DPV	Elektroda	v [mV/s]	A [mV]	t^* [ms]
	BDDE	40	50	10
	SP/BDDE	40	50	10
SWV	Elektroda	v [mV/s]	A [mV]	f [Hz]
	BDDE	40	30	30
	SP/BDDE	50	30	30

* 10 ms představuje dobu trvání pulzu před vzorkováním proudu, které trvá dalších 20 ms.

3.2.2. Optimalizace parametrů SWV

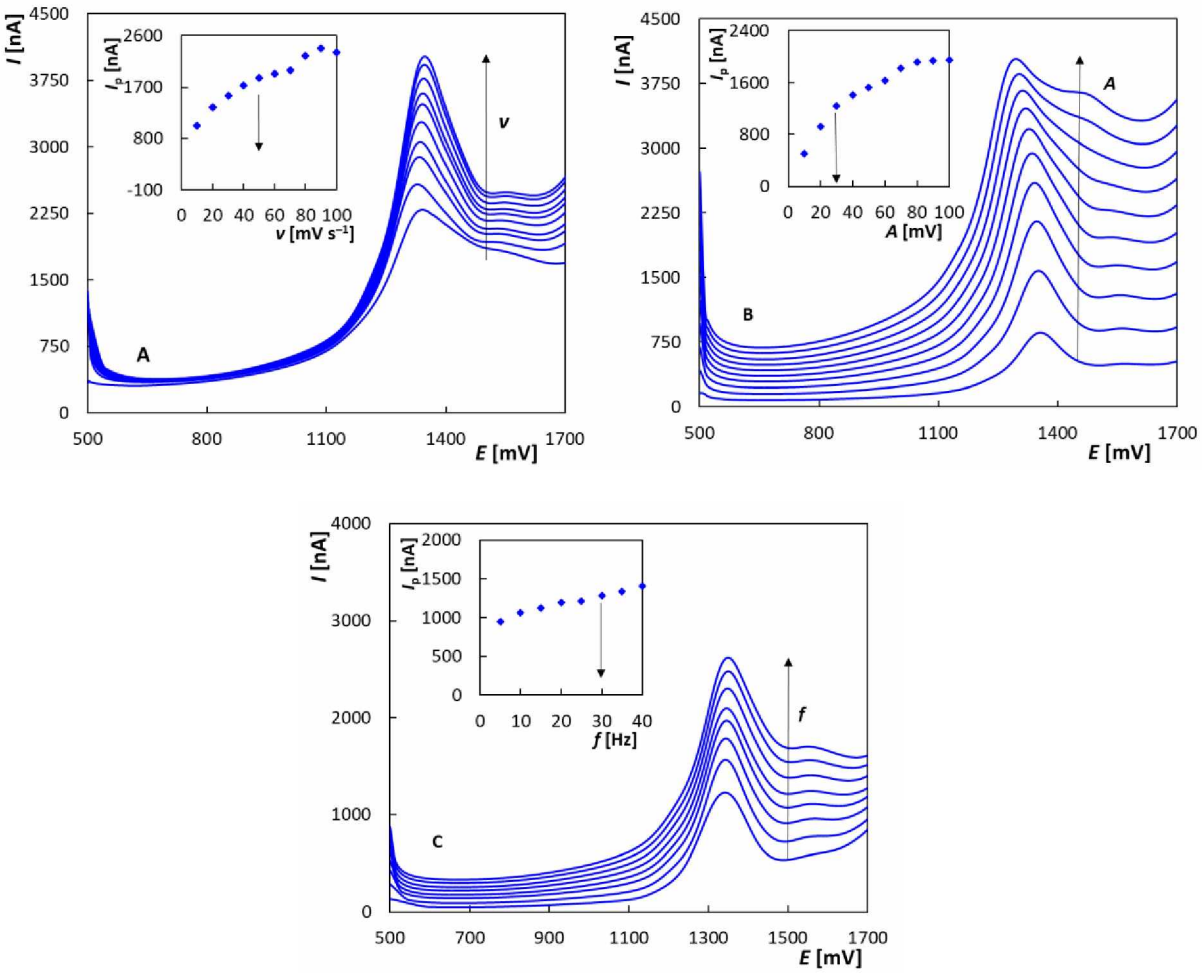
Druhou metodou, jejíž parametry byly optimalizovány pro stanovení ML, byla SWV. V tomto případě se jednalo o rychlost polarizace, amplitudu a frekvenci (f). Koncentrace analytu byla opět $2{,}0\times10^{-5}$ mol/l pro BDDE i SP/BDDE a měření probíhala v prostředí 0,1 mol/l H_2SO_4. Výsledné SW voltamogramy s vloženými odpovídajícími závislostmi jsou uvedeny na Obrázcích 22 (BDDE) a 23 (SP/BDDE). Prvním testovaným parametrem byla rychlost polarizace, která byla měněna v rozsahu 10-100 mV/s při konstantních dalších parametrech (A = 50 mV, f = 50 Hz). Z voltamogramů na Obrázku 22A a 23A je patrné, že docházelo k významnému nárůstu proudové odezvy s rostoucí rychlostí. Pro následující měření byla použita hodnota rychlosti polarizace 40 mV/s pro BDDE a 50 mV/s pro SP/BDDE. Druhým zkoušeným parametrem byla amplituda v rozsahu 10 až 100 mV. Na Obrázcích 22B a 23B jsou uvedeny SW voltamogramy a vložené závislosti I_p na A. S rostoucí amplitudou rostla výška píku přibližně do 50 mV, současně ale docházelo k deformaci a rozšiřování píků s posunem maxima k méně pozitivním hodnotám potenciálu. Pro obě uspořádání byla vybrána amplituda 30 mV. Frekvence byla měněna po 5 Hz a testována v rozsahu 5 až 50 Hz. Naměřené SW voltamogramy jsou zobrazeny na Obrázcích 22C a 23C. Bylo zjištěno, že frekvence nemá příliš velký vliv na I_p, ale při vyšších hodnotách dochází zejména u SP/BDDE k deformaci tvaru píku. Proto byla pro další měření vybrána pro oba senzory hodnota 30 Hz. Optimalizované parametry jsou shrnuty v Tabulce 3.



Obrázek 22 SW voltamogramy ML získané na BDDE v závislosti na v s odpovídající závislostí I_p na v (A); na A se závislostí I_p na A (B); na f se závislostí I_p na f (C). Parametry: základní elektrolyt H_2SO_4 (0,1 mol/l), E_{in} = +1000 mV, E_{fin} = +2200 mV, v = 10-100 mV/s (A) a 40 mV/s (B, C), A = 50 mV (A), 10-100 mV (B) a 30 mV (C), f = 50 Hz (A, B) a 5-50 Hz (C), c_{ML} = $2{,}0\times10^{-5}$ mol/l.

3.2.3. Porovnání DPV a SWV

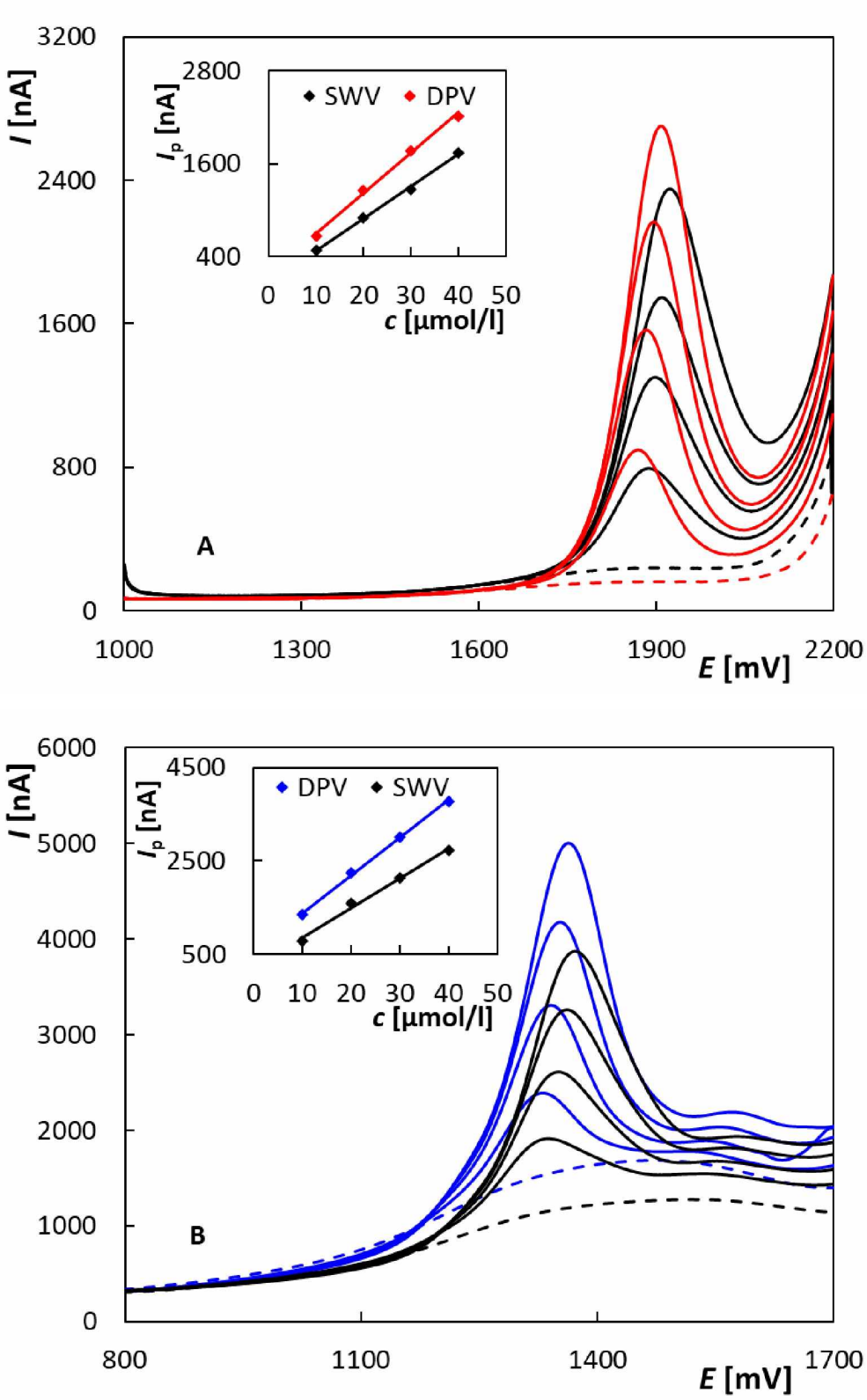
Po optimalizaci podmínek obou testovaných metod následovala měření závislosti výšky píku na koncentraci ML (10-40 mol/l) v prostředí 0,1 mol/ H_2SO_4 s využitím DPV i SWV na BDDE i SP/BDDE, kdy byly použity parametry uvedené v Tabulce 3. Na Obrázku 24 jsou uvedeny získané voltamogramy pro BDDE (A) i SP/BDDE (B) i s vloženými závislostmi I_p na c. Je zřejmé, že DPV poskytovala větší proudové odezvy, které byly posunuty k méně pozitivním potenciálům oproti SWV. V Tabulce 4 jsou shrnuty parametry rovnic popisujících změřené závislosti, z nichž vyplývá, že jak pro BDDE, a tak pro SP/BDDE byly dosaženy vyšší hodnoty směrnice v případě využití DPV. Tato metoda byla vybrána jako vhodnější pro stanovení ML.



Obrázek 23 SW voltamogramy ML získané na SP/BDDE v závislosti na v s odpovídající závislostí I_p na v (A); na A se závislostí I_p na A (B); na f se závislostí I_p na f (C). Parametry: základní elektrolyt H_2SO_4 (0,1 mol/l), E_{in} = +500 mV, E_{fin} = +2200 mV, v = 10-100 mV/s (A) a 40 mV/s (B, C), A = 50 mV (A), 10-100 mV (B) a 30 mV (C), f = 50 Hz (A, B) a 5-50 Hz (C), c_{ML} = 2,0×10^{-5} mol/l.

Tabulka 4 Parametry závislostí I_p na c_{ML} získané s využitím DPV a SWV na BDDE a SP/BDDE

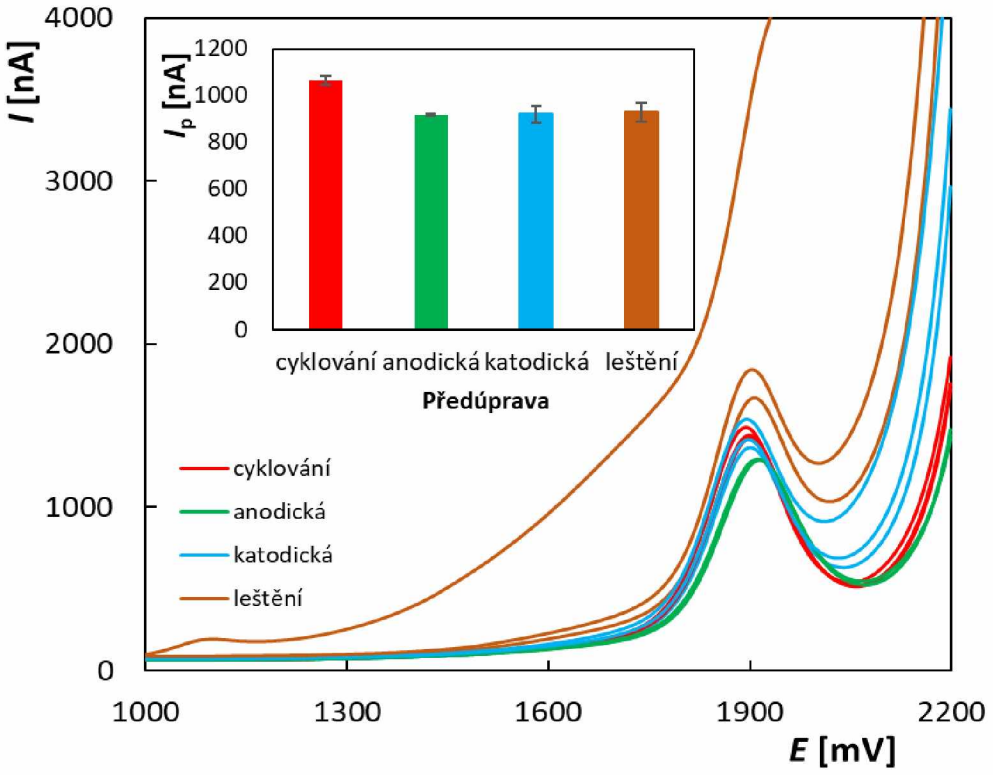
Elektroda	Metoda	Směrnice [nA L/µmol]	Úsek [nA]	r
BDDE	DPV	(51,9±2,3)	(177±62)	0,9981
	SWV	(41,5±1,5)	(64±42)	0,9987
SP/BDDE	DPV	(80,3±2,2)	(587±59)	0,9993
	SWV	(63,3±3,9)	(224±106)	0,9962



Obrázek 24 DP a SW voltamogramy ML zaznamenané na BDDE (A) a na SP/BDDE (B) v závislosti na koncentraci ML a odpovídající závislostí I_p na c. Parametry: základní elektrolyt H_2SO_4 (0,1 mol/l), E_{in} = +1000 mV (A) a +500 mV (B), E_{fin} = +2200 mV, SWV: v = 40 mV/s, A = 30 mV, f = 25 Hz, DPV: v = 40 mV/s, A = 50 mV, t = 10 ms, c_{ML} = 10-40 µmol/l.

3.2.4. Předúprava povrchu pracovní elektrody

Elektrochemické vlastnosti BDDE mohou být ovlivněny procesem předúpravy jejího povrchu, která se provádí zejména za účelem zvýšení citlivosti pro studovaný analyt. V této práci byly testovány čtyři různé předúpravy jako je anodická předúprava za vzniku O-terminovaného povrchu (E = +2200 mV, t = 300 s), katodická předúprava za vzniku H-terminovaného povrchu (E = −1000 mV, t = 300 s), cyklování (20 cyklický voltamogramů, E_{in} = +1000 mV, E_{switch} = +2200 mV, E_{fin} = +2200 mV) a mechanické leštění pomocí aluminy. Následně byl studován jejich vliv na anodický signál ML. Nejprve byla zařazena konkrétní úprava povrchu a následně změřen pík ML o koncentraci $2{,}0\times10^{-5}$ mol/l. Měření probíhalo metodou DPV s dříve optimalizovanými parametry a bylo 11× opakováno. Získané voltamogramy (pro každou proceduru vždy 1., 5. a 11 sken) jsou zobrazeny na Obrázku 25. Ve vloženém grafu jsou uvedeny průměrné výšky píku pro jednotlivé procedury spolu se směrodatnými odchylkami.



Obrázek 25 DP voltamogramy ML (1., 5. a 11. sken) zaznamenané na BDDE v závislosti na jednotlivých postupech předúpravy (A) s odpovídající závislostí I_p na *procesu předúpravy* (B). Parametry: základní elektrolyt H_2SO_4 (0,1 mol/l), E_{in} = +1000 mV, E_{fin} = +2200 mV, v = 40 mV/s, A = 50 ms, t = 10 ms, c_{ML} = $2{,}0\times10^{-5}$ mol/l.

V případě cyklování a anodické předúpravy byly získány velmi dobře opakovatelné signály (RSD < 2 %). Nejvyšší proudová odezva pak byla zaznamenána po cyklování. V případě leštění a katodické předúpravy byl výsledný pík srovnatelný s anodickou, ale opakovatelnost byla horší, protože trvalo několik měření, než došlo k ustálení odezvy. V případě leštění nebylo možné první měření vyhodnotit vůbec a výsledky jsou počítány z 2.-11. křivky. Pro další měření byl zvolen postup aktivace/předúpravy povrchu BDDE pomocí cyklování. Povrch elektrody pro následující měření byl O-terminovaný vzhledem ke kladné hodnotě E_{fin}. V případě SP/BDDE byla převzata tato procedura, ale bylo vždy aplikováno jen 10 cyklů potřebných pro ustálení odezvy senzoru.

3.3. Analýza modelových roztoků metalaxylu

Navržená metoda byla aplikována při analýze modelových roztoků ML. Nejprve byl zjišťován využitelný koncentrační rozsah (LDR) metody stanovení fungicidu pro oba typy senzorů. Byla proměřena celá řada závislostí v různých rozsazích koncentrací analytu. Příklad DP voltamogramů jedné koncentrační závislosti ($2{,}5\times10^{-8}$-$1{,}5\times10^{-5}$ mol/l) zaznamenané na BDDE je uveden na Obrázku 26 i s vloženou odpovídající závislostí I_p na c. Z té je patrné, že výška píku s koncentrací roste lineárně. Závislost popisuje rovnice (6), z níž byly vypočteny parametry LOD a LOQ, které jsou uvedeny v Tabulce 5. Ze všech proměřených závislostí vyplývá, že navržená metoda s využitím BDDE umožňuje stanovení ML v širokém koncentračním rozsahu.

$$I_p[\text{nA}] = (237{,}9 \pm 2{,}9)\, c\ [\mu\text{mol/l}] + (-3{,}2 \pm 1{,}3), r = 0{,}9999 \qquad (6)$$

Tabulka 5 Shrnutí statistických parametrů pro stanovení ML s využitím BDDE i SP/BDDE

Elektroda	Elektrolyt	LOD [mol/l]	LOQ [mol/l]	LDR* [mol/l]
BDDE	0,1 mol/l H_2SO_4	$1{,}6\times10^{-8}$	$5{,}5\times10^{-8}$	$2{,}5\times10^{-8}$-$4{,}0\times10^{-5}$
SP/BDDE	0,1 mol/l H_2SO_4	$3{,}5\times10^{-7}$	$1{,}2\times10^{-6}$	$5{,}0\times10^{-7}$-$4{,}0\times10^{-5}$
	BRB (pH 9)	$7{,}7\times10^{-7}$	$2{,}6\times10^{-6}$	$5{,}0\times10^{-7}$-$6{,}1\times10^{-5}$

* Experimentálně zjištěné hodnoty vyplývající ze změřených koncentračních závislostí

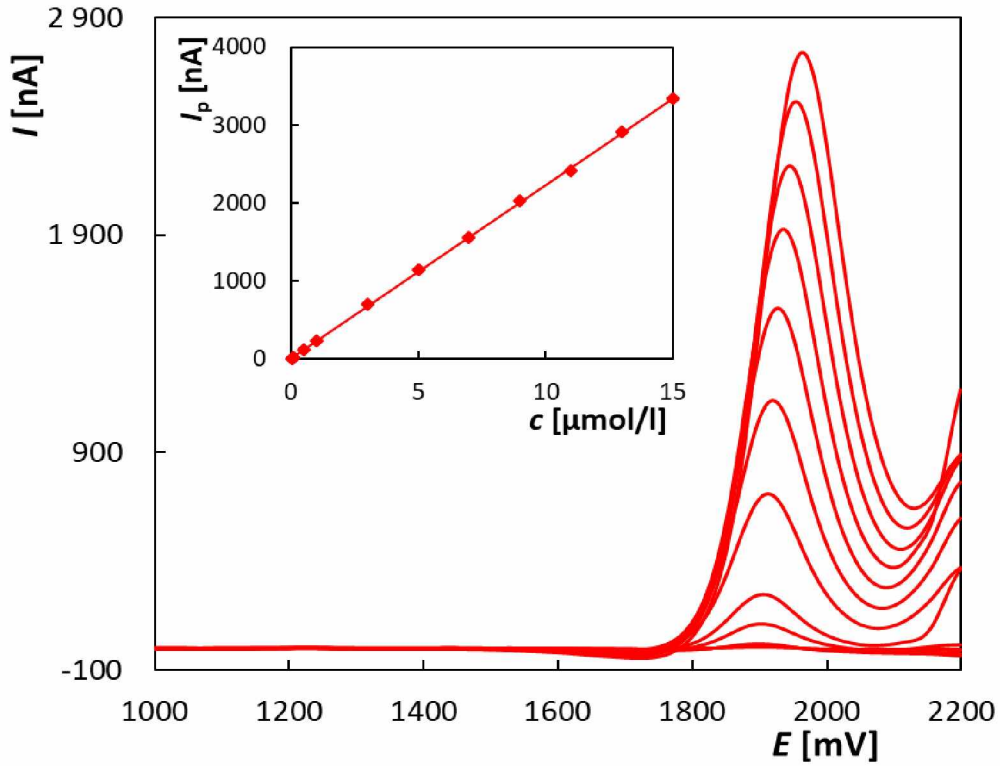
Měření koncentračních závislostí v modelových roztocích analytu proběhlo i s využitím SP/BDDE. Příklad DP voltamogramů ML v koncentračním rozsahu $1{,}0\times10^{-6}$-$1{,}5\times10^{-5}$ mol/l zaznamenaných na SP/BDDE v prostředí 0,1 mol/l H_2SO_4 při optimalizovaných podmínkách

je uveden na Obrázku 27A, a to včetně vložené závislosti I_p na c, kterou popisuje rovnice (7). Ukázalo se, že s použitím tištěného senzoru není možné za daných podmínek analyzovat tak nízké koncentrace, jako v případě klasické BDDE. Vypočtené hodnoty LOD a LOQ jsou opět uvedeny v Tabulce 5 a jsou podstatně vyšší než pro BDDE.

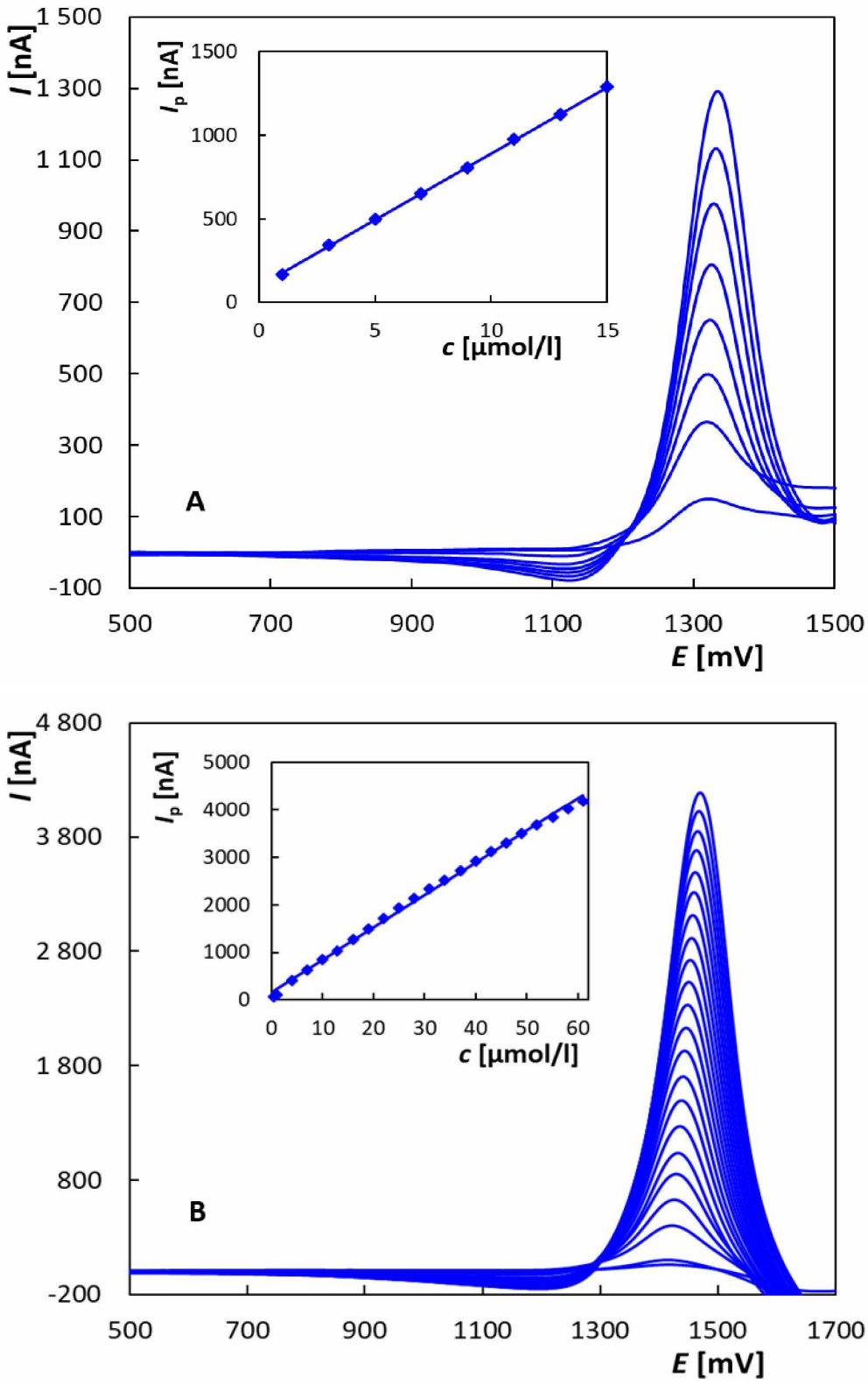
$$I_p[\text{nA}] = (78{,}9 \pm 1{,}0)\ c\ [\mu\text{mol/l}] + (103{,}6 \pm 9{,}2), r = 0{,}9992 \quad (7)$$

Vzhledem k tomu, že vliv pH na voltametrický signál ML byl v úvodu práce sledován pouze s využitím BDDE a výsledky byly aplikovány i pro SP/BDDE, byla v této fázi práce proměřena zkrácená studie i pro SP/BDDE. Bylo zjištěno, že v širokém rozsahu pH se výška ani tvar píku ML příliš nemění. Proto byly měřeny také koncentrační závislosti v prostředí BRB o pH 9. Ukázka získaných křivek v rozsahu koncentrací ML $5{,}0\times10^{-7}$ – $6{,}1\times10^{-5}$ mol/l je uvedena na obrázku 27B. Z vložené závislosti je zřejmé, že výška píku rostla lineárně s koncentrací (rovnice (8)), využitelný koncentrační rozsah byl širší, ale ke zlepšení hodnot LOD a LOQ v alkalickém prostředí nedošlo.

$$I_p[\text{nA}] = (77{,}4 \pm 2{,}2)\ c\ [\mu\text{mol/l}] + (52 \pm 20), r = 0{,}9989 \quad (8)$$

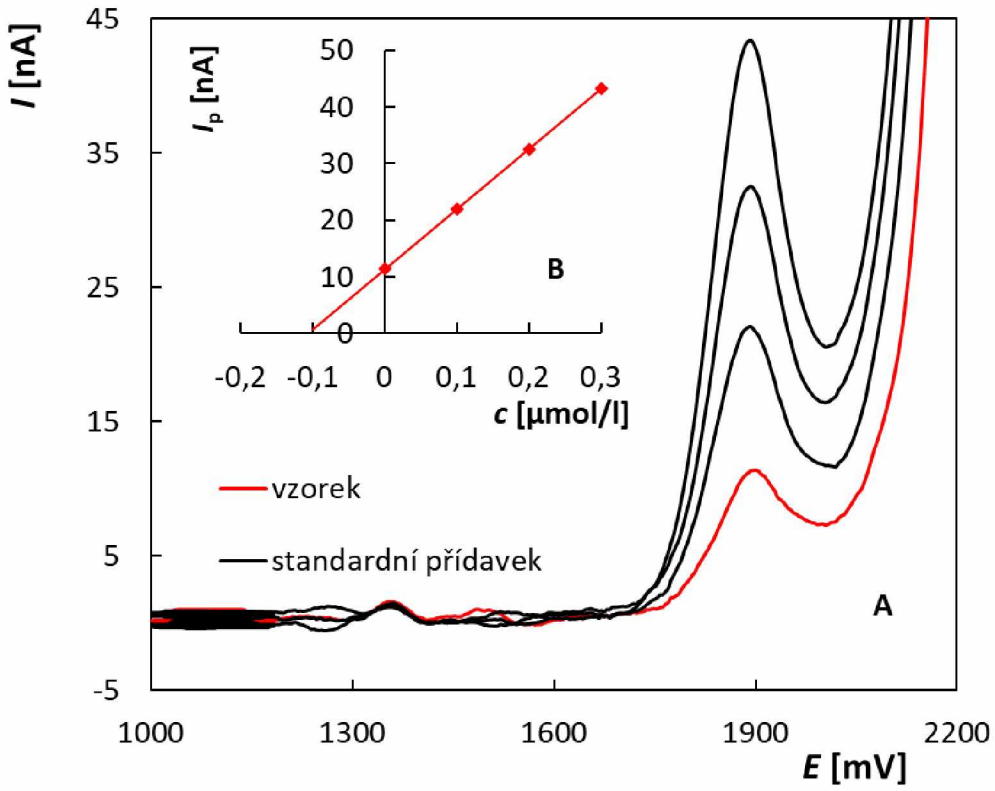


Obrázek 26 DP voltamogramy zaznamenané na BDDE v závislosti na koncentraci ML s odpovídající závislostí I_p na c. Parametry: základní elektrolyt H_2SO_4 (0,1 mol/l), E_{in} = +1000 mV, E_{fin} = +2200 mV, v = 40 mV/s, A = 50 ms, t = 10 ms, c_{ML} = $2{,}5\times10^{-8}$-$1{,}5\times10^{-5}$ mol/l; křivky po odečtu elektrolytu.

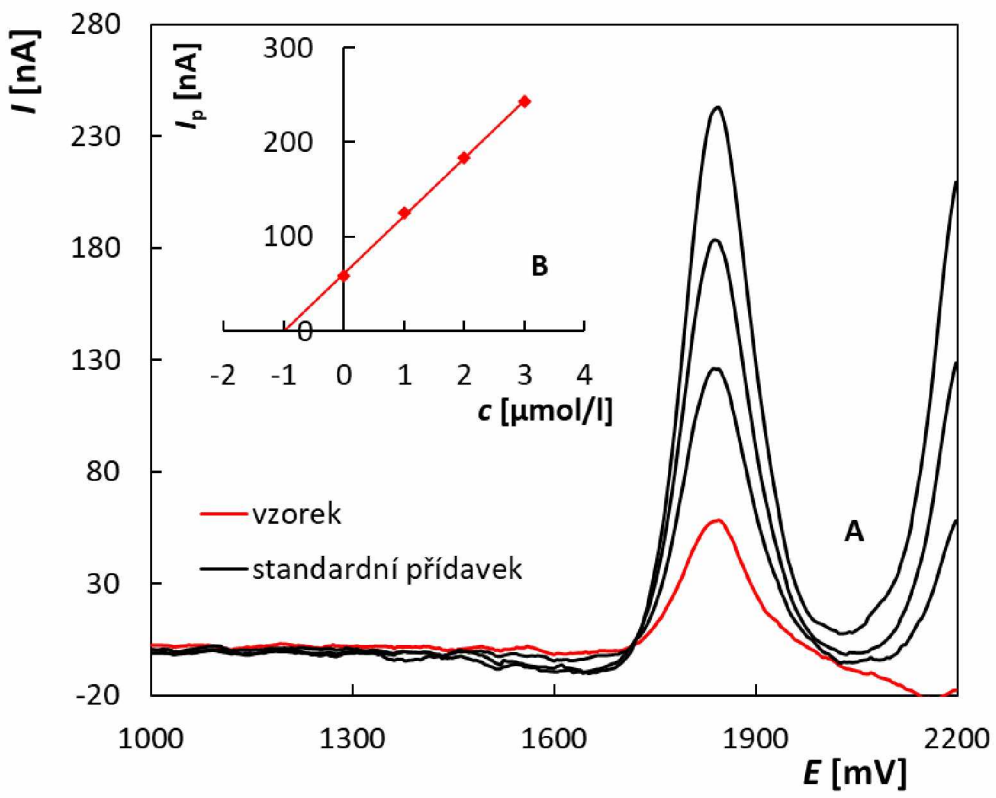


Obrázek 27 DP voltamogramy zaznamenané na SP/BDDE v závislosti na koncentraci ML v prostředí 0,1 mol/l H_2SO_4 (A) a BRB (pH 9) (B) s odpovídajícími závislostmi I_p na c. Parametry: E_{in} = +500 mV, E_{fin} = +2200 mV, v = 40 mV/s, A = 50 ms, t = 10 ms, c_{ML} = $1{,}0\times10^{-6}$-$1{,}5\times10^{-5}$ mol/l (A) a $5{,}0\times10^{-7}$-$6{,}1\times10^{-5}$ mol/l (B); křivky po odečtu základního elektrolytu.

Nejlepších výsledků bylo dosaženo s použitím BDDE v klasickém tříelektrodovém uspořádání elektrochemického článku. Proto se tato elektroda jevila jako vhodnější alternativa pro analýzu reálných vzorků. Tento předpoklad byl nejprve ověřen při opakovaném stanovení obsahu ML v modelových roztocích. Byly vybrány dvě různé koncentrace analytu $1{,}0\times10^{-7}$ a $1{,}0\times10^{-6}$ mol/l a obsah ML byl vyhodnocován metodou standardního přídavku, kdy k 10 ml vzorku v polarografické nádobce byly přidány tři přídavky standardního roztoku ML o koncentraci $1{,}0\times10^{-3}$ mol/l. Stanovení bylo vždy 5× zopakováno a byla vypočtena průměrná stanovená koncentrace s odpovídajícím intervalem spolehlivosti, výtěžnost a relativní směrodatná odchylka opakovaného stanovení (RSD). Na Obrázcích 28 a 29 jsou uvedeny příklady DP voltamogramů získaných při analýze modelových roztoků pro obě testované koncentrace analytu včetně vloženého grafického vyhodnocení metody standardního přídavku. Z výsledků shrnutých v Tabulce 6 vyplývá, že vyvinutá metoda poskytuje správné a velmi dobře opakovatelné výsledky.



Obrázek 28 DP voltamogramy analýzy modelového roztoku ML ($1{,}0\times10^{-7}$ mol/l) zaznamenané na BDDE (A) a grafické vyhodnocení metody standardního přídavku (B). Parametry: základní elektrolyt H_2SO_4 (0,1 mol/l), E_{in} = +1000 mV, E_{fin} = +2200 mV, v = 40 mV/s, A = 50 ms, t = 10 ms; vzorek: V = 10 ml, standardní přídavek: V = 10 µl, c_{ML} = $1{,}0\times10^{-4}$ mol/l; křivky po odečtu základního elektrolytu.

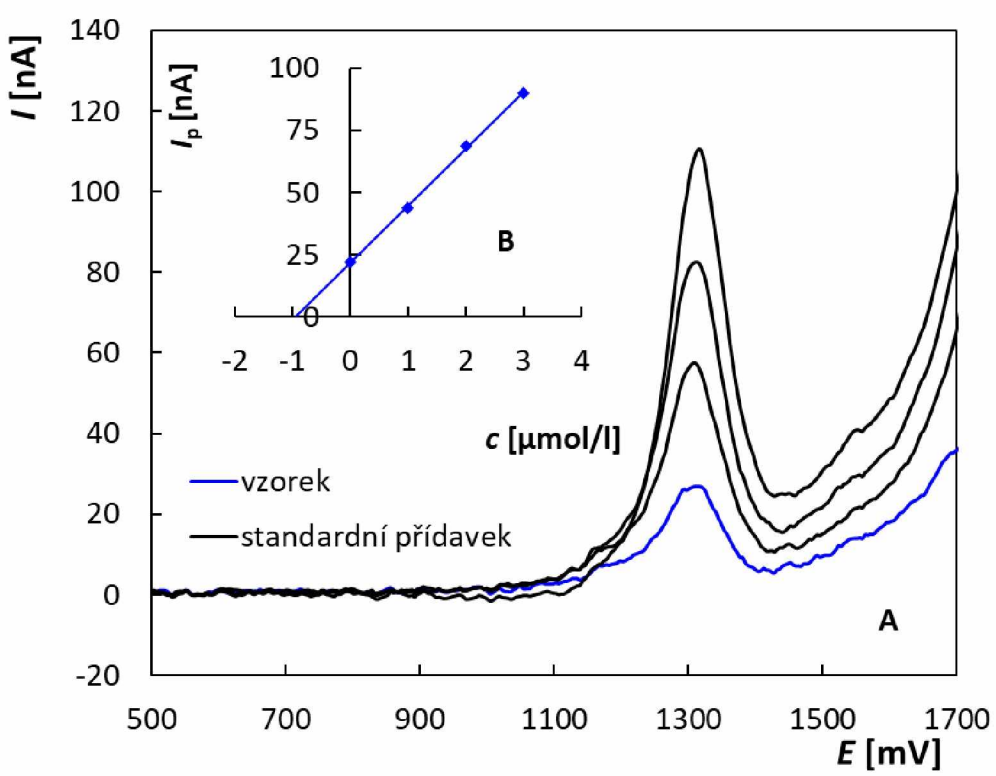


Obrázek 29 DP voltamogramy analýzy modelového roztoku ML ($1{,}0\times10^{-6}$ mol/l) zaznamenané na BDDE (A) a grafické vyhodnocení metody standardního přídavku (B). Parametry: základní elektrolyt H_2SO_4 (0,1 mol/l), E_{in} = +1000 mV, E_{fin} = +2200 mV, v = 40 mV/s, A = 50 ms, t = 10 ms; vzorek: V = 10 ml, standardní přídavek: V = 10 µl, c_{ML} = $1{,}0\times10^{-3}$ mol/l; křivky po odečtu základního elektrolytu.

Tabulka 6 Výsledky opakovaného stanovení ML v modelových roztocích s využitím DPV v kombinaci s BDDE a SP/BDDE

Elektroda	Koncentrace [mol/l]	Stanoveno [mol/l]	Výtěžnost [%]	RSD [%]
BDDE	$1{,}0\times10^{-7}$	$(0{,}102\pm0{,}005)\times10^{-7}$	93,2-107	4,99
	$1{,}0\times10^{-6}$	$(0{,}994\pm0{,}034)\times10^{-6}$	93,4-104	3,40
SP/BDDE	$1{,}0\times10^{-6}$	$(0{,}997\pm0{,}045)\times10^{-6}$	94,4-107	4,50

Metoda využívající SP/BDDE byla aplikována pouze pro analýzu modelového roztoku o vyšší koncentraci ML. Příklad analýzy je uveden na Obrázku 30 a výsledky jsou opět shrnuty v Tabulce 6. Je zřejmé, že tištěný senzor umožňuje dosažení správných a dobře opakovatelných výsledků, ale nelze jej použít při analýze nižších koncentrací. Proto byla v následující kapitole při analýze vzorků přírodních vod použita pouze metoda s klasickou BDDE.

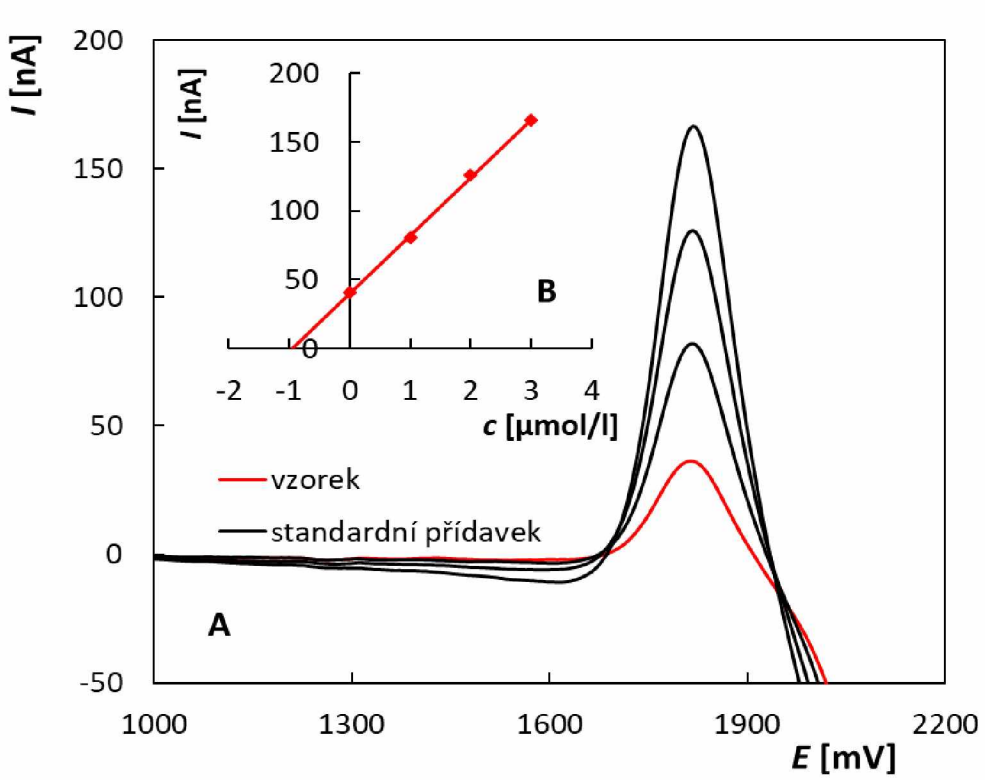


Obrázek 30 DP voltamogramy analýzy modelového roztoku ML ($1{,}0\times10^{-6}$ mol/l) zaznamenané na SP/BDDE (A) a grafické vyhodnocení metody standardního přídavku (B). Parametry: E_{in} = +500 mV, E_{fin} = +2200 mV, v = 40 mV/s, A = 50 ms, t = 10 ms, vzorek: V = 10 ml, standardní přídavek: V = 10 µl, c_{ML} = $1{,}0\times10^{-3}$ mol/l; křivky po odečtu základního elektrolytu.

3.4. Analýza vzorků přírodních vod

3.4.1. Přímá analýza říční vody

Jako reálný vzorek byla analyzována voda z řeky Chrudimky, která byla odebrána do 3× vypláchnuté plastové lahve a uchovávána v lednici při 4 °C bez přístupu světla. Vzhledem k tomu, že tato voda neobsahovala studovaný analyt, byl přidán vhodný objem standardního roztoku ML tak, aby jeho koncentrace byla $1{,}0\times10^{-6}$ mol/l. V takto upravené vodě byl stanoven obsah pesticidu s využitím vyvinuté voltametrické metody s BDDE. Stejně jako v případě modelových roztoků byla použita metoda standardního přídavku a analýza byla 5× zopakována. Příklad voltamogramů spolu s grafickým vyhodnocením je na Obrázku 31. Z výsledků shrnutých v Tabulce 7 vyplývá, že byla stanovena správná koncentrace ML a výsledky byly velmi dobře opakovatelné (RSD < 5,0 %). Na druhou stranu se ukázalo, že v prostředí říční vody nelze analyzovat srovnatelně nízké koncentrace, jako tomu bylo v modelových roztocích.



Obrázek 31 DP voltamogramy analýzy přírodní vody s přídavkem standardního roztoku ML ($1{,}0\times10^{-6}$ mol/l) zaznamenané na BDDE (A) a grafické vyhodnocení metody standardního přídavku (B). Parametry: základní elektrolyt H_2SO_4 (0,1 mol/l), E_{in} = +1000 mV, E_{fin} = +2200 mV, v = 40 mV/s, A = 50 ms, t = 10 ms; vzorek: V = 10 ml (9 ml modelový roztok + 1 ml elektrolyt), standardní přídavek: V = 10 µl, c_{ML} = $1{,}0\times10^{-3}$ mol/l; křivky po odečtu základního elektrolytu.

Tabulka 7 Výsledky opakovaného stanovení ML v přírodní vodě obohacené přídavkem standardního roztoku ML s využitím DPV v kombinaci s BDDE

Elektroda	Koncentrace [mol/l]	Stanoveno [mol/l]	Výtěžnost [%]	RSD [%]
BDDE	$1{,}0\times10^{-6}$	$(1{,}026\pm0{,}048)\times10^{-6}$	96,7-106,3	4,64

3.4.2. Analýza říční vody po zakoncentrování

Koncentrace ML stanovitelná ve vzorku říční vody bez jakékoli úpravy je příliš vysoká na to, aby mohla být metoda používána v praxi při analýze přírodních vod. Vyhláška č. 252/2004 Sb. [78], kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody, udává jako mezní hodnotu pro obsah pesticidů v pitných vodách 0,1 µg/l. Situace je ale jiná v případě přírodních vod zejména v souvislosti s aplikací pesticidů na větší

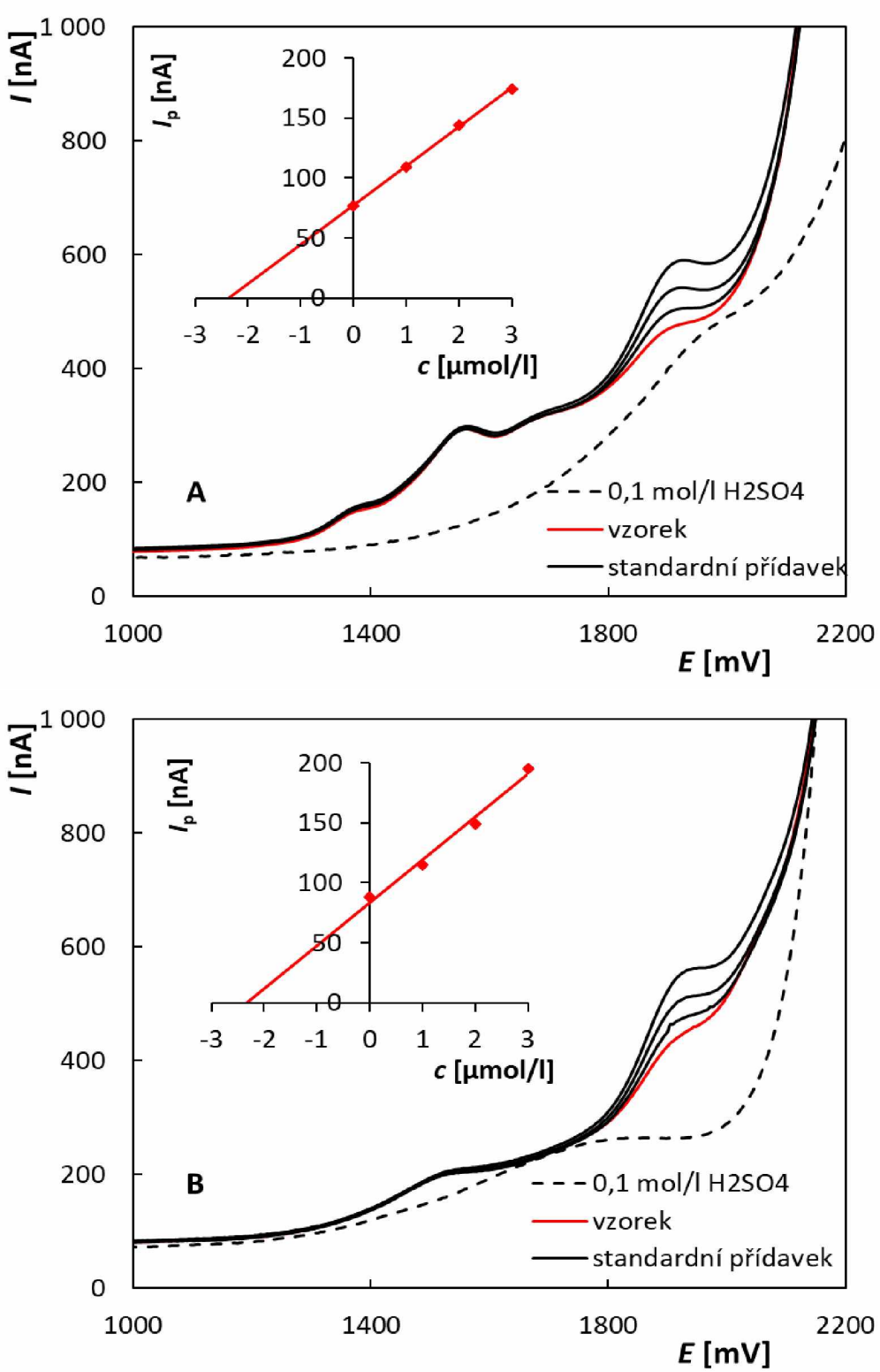
zemědělské plochy. V takovém případě mohou být nalezeny koncentrace v řádu jednotek až stovek μg/l (10 μg/l ~ $3,6\times10^{-8}$ mol/l) [79, 80]. Aby mohly být tyto koncentrace stanoveny s využitím vyvinuté metody, bylo třeba zařadit vhodnou metodu pro zakoncentrování vzorku.

V rámci předběžných studií byly testovány dva postupy zakoncentrování vzorků, jejichž provedení je popsáno v experimentální části. První postup (I) byl založen na adsorpci ML na aktivní uhlí s následnou elucí acetonitrilem. Vzorek byl odpařen do sucha pomocí vakuové rotační odparky a opět rozpuštěn v malém objemu acetonitrilu. Takto upravený vzorek byl poté analyzován voltametricky a byl stanoven obsah ML. V druhém postupu (II) byla využita extrakce tuhou fází (SPE), kdy byly použity kolonky obsahující 500 mg sorbentu, které byly napojeny na extraktor s vývěvou zajišťující podtlak. Přes aktivovanou kolonku byl prokapán vzorek vody a zachycený ML byl eluován acetonitrilem, který byl následně odpařen ve vakuové rotační odparce do sucha. Odparek byl rozpuštěn v acetonitrilu a použit k analýze.

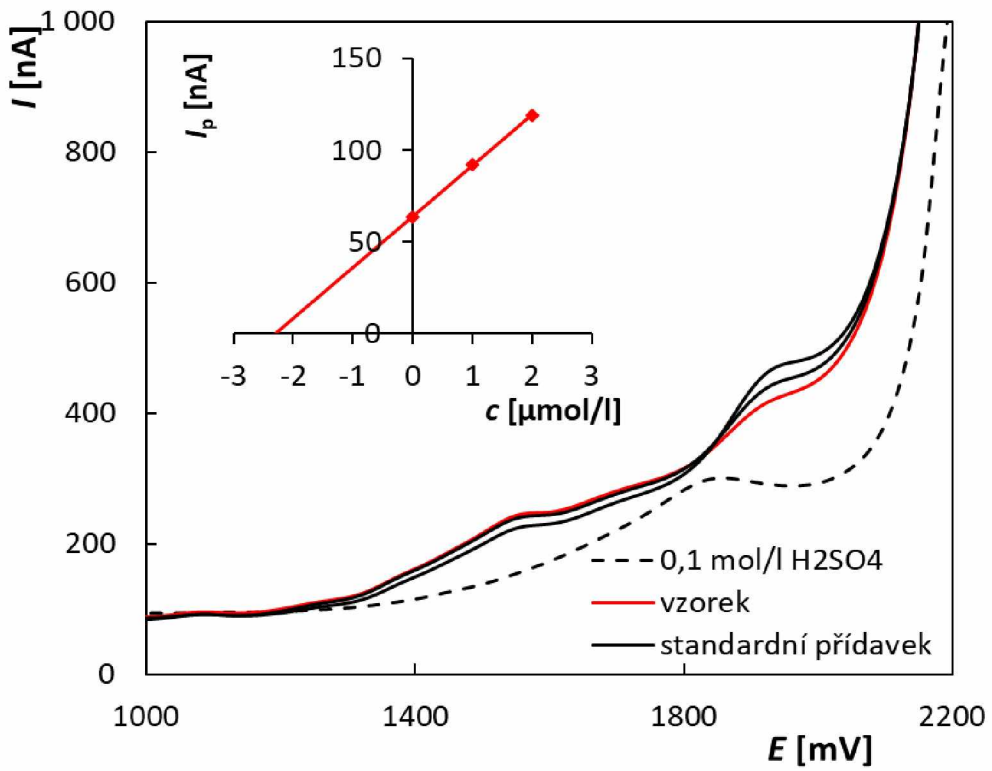
Uvedené postupy zakoncentrování byly testovány na modelových roztocích destilované vody o koncentraci ML $5,0\times10^{-8}$ mol/l. Pro analýzu bylo použito vždy 500 ml vody a výsledný objem po zakoncentrování byl 1,0 ml. K analýze bylo odebráno vždy 0,5 ml a doplněno základním elektrolytem na objem 5,0 ml. Na obrázku 32 jsou uvedeny DP voltamogramy zaznamenané během analýzy vzorků metodou standardního přídavku i s grafickým vyhodnocením. Hodnoty vypočtených koncentrací jsou uvedeny v Tabulce 8. Ukázalo se, že oba postupy jsou vhodné a umožňují dosažení velmi dobré výtěžnosti (cca 93 %). V dalším kroku byla analyzována říční voda obohacená přídavkem roztoku ML opět na koncentraci $5,0\times10^{-8}$ mol/l. Pro zakoncentrování byl použit postup I s aktivním uhlím a k analýze bylo odebráno 500 ml vzorku. Postup byl shodný s výše popsaným pro modelové roztoky. Záznam analýzy je uveden na obrázku 33 a výsledky v Tabulce 8. Bylo potvrzeno, že navržený postup zakoncentrování vzorku může být úspěšně aplikován i při analýze reálných vzorků (výtěžnost 92 %).

Tabulka 8 Výsledky stanovení ML ($5,0\times10^{-8}$ mol/l) v modelových vzorcích a říční vodě po zakoncentrování vzorků.

Typ vzorku	Postup	Stanoveno [mol/l]	Výtěžnost [%]
Modelový roztok	I	$4,69\times10^{-8}$	93,7
	II	$4,66\times10^{-8}$	93,2
Říční voda	I	$4,59\times10^{-8}$	91,8



Obrázek 32 DP voltamogramy analýzy modelového vzorku obsahujícího ML ($5{,}0\times10^{-8}$ mol/l) po zakoncentrování postupem I (A) a II (B) zaznamenané na BDDE s grafickým vyhodnocením. Parametry: základní elektrolyt H_2SO_4 (0,1 mol/l), E_{in} = +1000 mV, E_{fin} = +2200 mV, v = 40 mV/s, A = 50 ms, t = 10 ms; vzorek: V = 5,0 ml (0,5 ml vzorek + 4,5 ml elektrolyt), standardní přídavek: V = 10 µl, c_{ML} = $1{,}0\times10^{-3}$ mol/l.



Obrázek 33 DP voltamogramy analýzy říční vody obsahující ML ($5{,}0\times10^{-8}$ mol/l) po zakoncentrování postupem I zaznamenané na BDDE s grafickým vyhodnocením. Parametry: základní elektrolyt H_2SO_4 (0,1 mol/l), E_{in} = +1000 mV, E_{fin} = +2200 mV, v = 40 mV/s, A = 50 ms, t = 10 ms; vzorek: V = 5,0 ml (0,5 ml vzorek + 4,5 ml elektrolyt), standardní přídavek: V = 10 µl, c_{ML} = $1{,}0\times10^{-3}$ mol/l.

Závěrem této kapitoly je možné říct, že oba testované postupy zakoncentrování vzorku fungují s velice dobrou výtěžností. Bylo rovněž potvrzeno, že je lze aplikovat i v případě přírodních vod. Další snížení detekovatelných koncentrací je možné např. při zpracování větších objemů vzorků. V rámci této diplomové práce již nebylo možné z časových důvodů optimalizovat podmínky koncentračních technik ani provést dostatečné množství analýz, aby bylo možné dopočítat potřebné statistické parametry. Tyto experimenty budou předmětem dalších studií. Již nyní však lze říci, že s využitím navržených postupů lze stanovit koncentrace ML, které se reálně mohou vyskytovat v přírodních vodách v oblastech, kde se ve větší míře tento pesticid aplikuje.

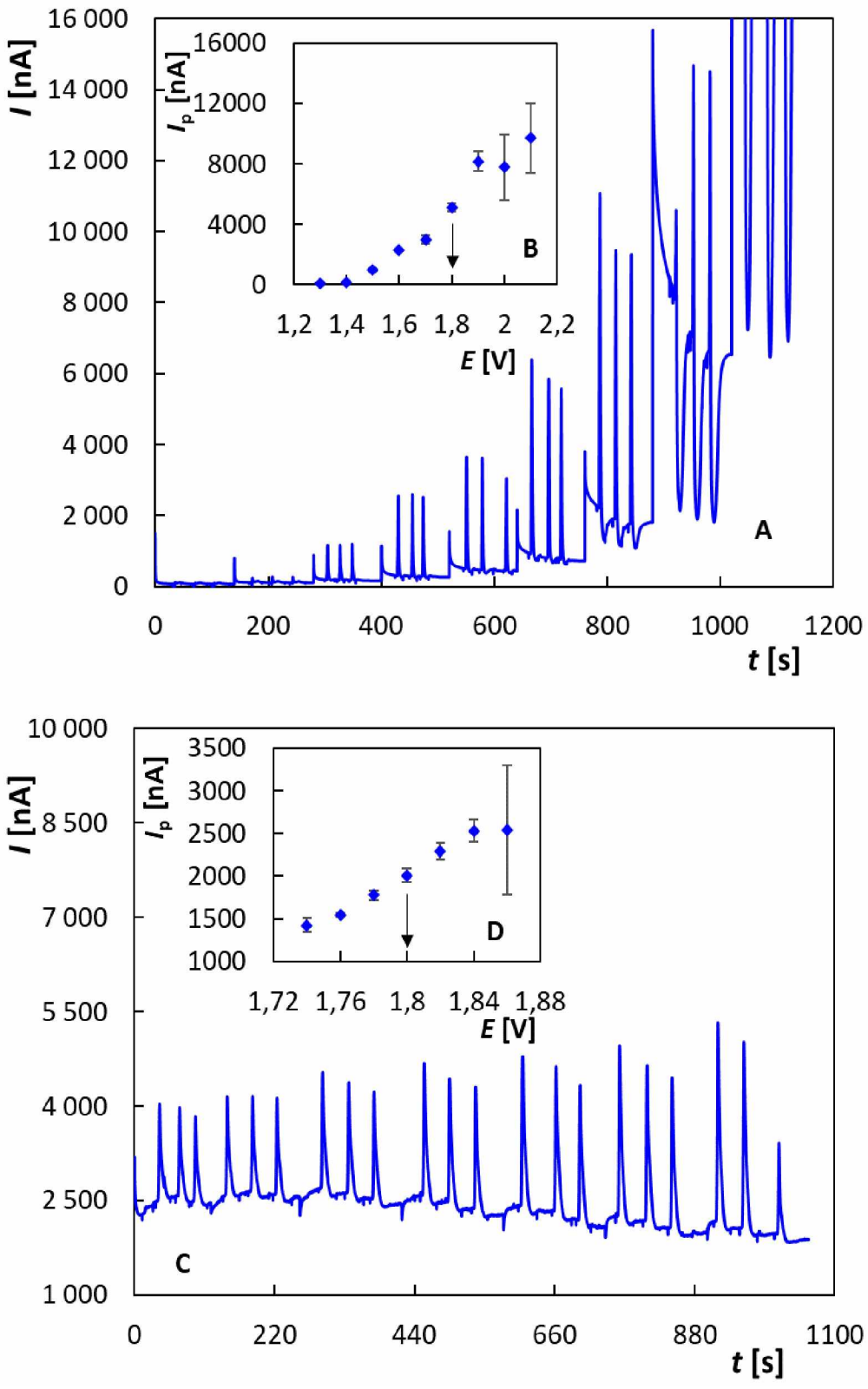
3.5. FIA s elektrochemickou detekcí pro stanovení metalaxylu

V současné době je jedním z trendů v elektroanalytické chemii zapojení elektrochemických detektorů (ED) do průtokových systému. Může se jednat o propojení se separačními technikami

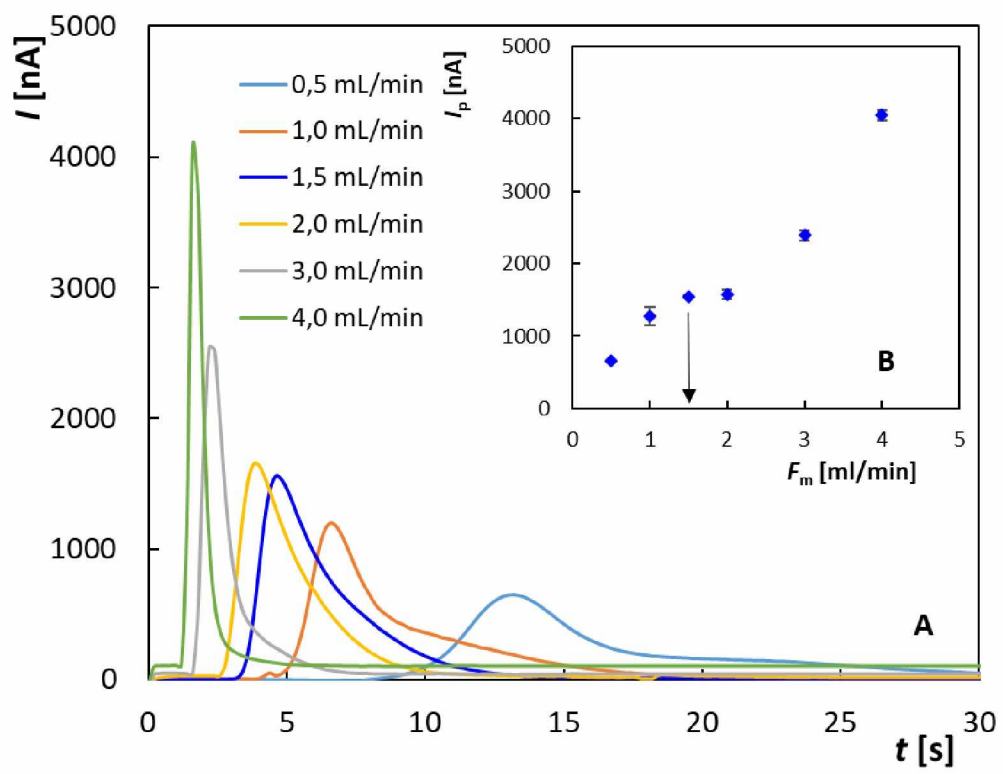
nebo s průtokovou injekční analýzou (FIA, flow injection analysis). Tady se jeví jako velmi výhodné využití tištěných senzorů s miniaturizovaným elektrochemickým článkem, které mohou být velmi dobře implementovány do průtočné cely. Proto byla i v rámci této diplomové práce testována možnost stanovení ML s využitím FIA-ED. Uspořádání použitého průtočného systému je podrobně popsáno v experimentální části.

Jako u každé analytické metody bylo potřeba nejprve optimalizovat parametry. V případě FIA-ED se jednalo o potenciál oxidace analytu (E), průtok mobilní fáze (F_m) a objem dávkovaného vzorku (V_{inj}). Stejně jako při klasické voltametrii byla jako elektrolyt, resp. mobilní fáze, použita H_2SO_4 o koncentraci 0,1 mol/l. Prvním optimalizovaným parametrem byl potenciál detekce, který se vzhledem k potenciálu oxidace ML na SP/BDDE měnil v rozmezí od 1,3 do 2,1 V a navyšoval se po 0,1 V. Ostatní parametry byly udržovány na konstantní hodnotě (F_m = 1 ml/min, V_{inj} = 50 µl). Měření při daném potenciálu bylo vždy třikrát opakováno. Koncentrace ML byla $2{,}0\times10^{-5}$ mol/l. Získaný záznam z FIA-ED je uveden na Obrázku 34A. Vložený Obrázek 34B znázorňuje závislost výšky píku na potenciálu detekce včetně chybových úseček. Z něho je patrné, že s rostoucí hodnotou potenciálu se významně zvyšuje výška píku. Současně se ale od hodnoty 1,9 V zhoršuje pozadí a deformuje se tvar píků, což vede k významnému zhoršení opakovatelnosti signálu. Jako vhodný pro detekci ML se jeví potenciál 1,8 V. Tato volba byla ověřena při podrobnější studii v rozsahu potenciálů 1,74-1,86 V (Obrázek 34C, D). Ukázalo se, že i v tomto rozsahu výška píku roste s rostoucím potenciálem a při vyšších hodnotách se zhoršuje opakovatelnost. Proto byl vybrán potenciál detekce pro ML 1,8 V pro všechny následující analýzy.

Druhým optimalizovaným parametrem byla rychlost průtoku mobilní fáze (F_m), jejíž vliv se testoval v rozsahu od 0,5 do 4 ml/min (E = 1,8 V, V_{inj} = 50 µl). Výsledné píky jsou zaznamenané na Obrázku 35. Každé měření bylo opět třikrát opakováno, ale pro lepší grafické znázornění je uveden jeden pík pro každou hodnotu průtoku. Je vidět, že výška píku rostla s rostoucím F_m v celém testovaném rozsahu a současně docházelo k jeho zužování. Pro následující měření byl vybrán průtok mobilní fáze s hodnotou 1,5 ml/min, a to zejména s ohledem na spotřebu základního elektrolytu, která by při vyšších hodnotách F_m byla příliš velká.

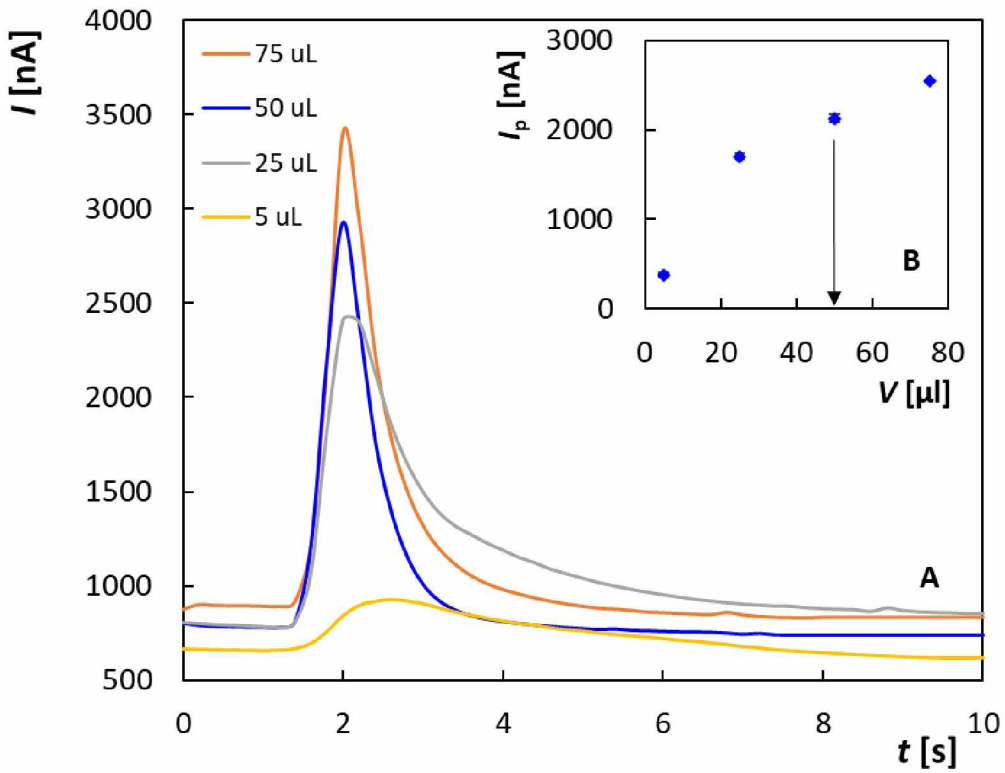


Obrázek 34 Časový průběh proudu zaznamenaný pomocí FIA-ED s SP/BDDE v závislosti na potenciálu detekce (A, C) s odpovídajícími závislostmi I_p na E (B, D). Parametry: základní elektrolyt 0,1 mol/l H_2SO_4, E = 1,3-2,1 V (A, B) a 1,74-1,86 V (C, D), F_m = 1 ml/min, V_{inj} = 50 µl, c_{ML} = $2{,}0\times10^{-5}$ mol/l.

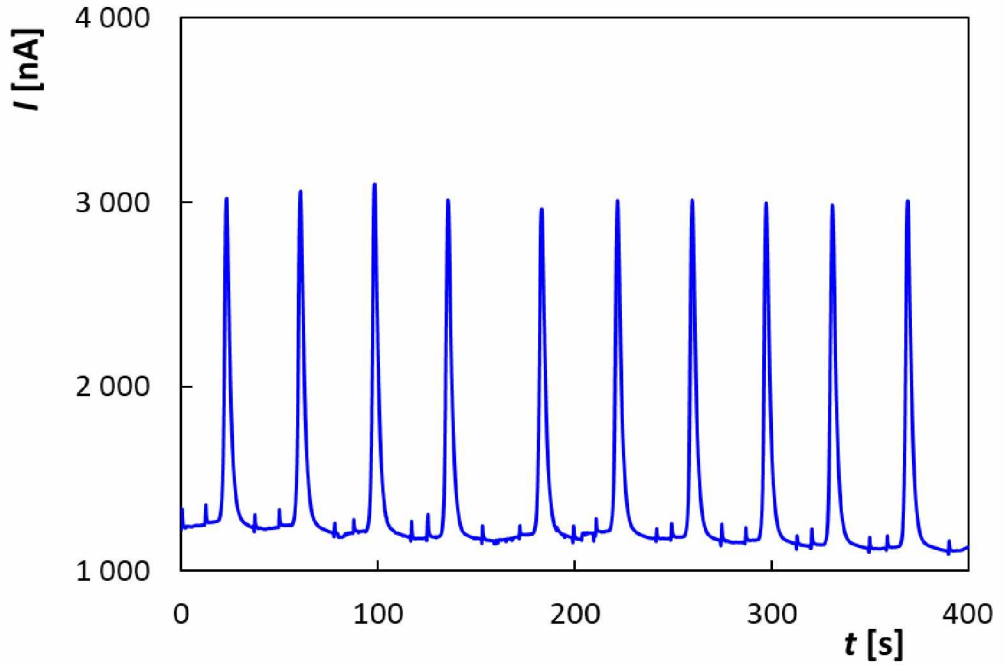


Obrázek 35 Časový průběh proudu zaznamenaný pomocí FIA-ED s SP/BDDE v závislosti na průtoku mobilní fáze (A) s odpovídající závislostí I_p na F_m (B). Parametry: základní elektrolyt 0,1 mol/l H_2SO_4, E = 1,8 V, F_m = 0,5-4 ml/min, V_{inj} = 50 µl, c_{ML} = $2{,}0\times10^{-5}$ mol/l.

Posledním optimalizovaným parametrem byl objem dávkovaného vzorku (V_{inj}). S ohledem na dávkovací smyčky, které byly v laboratoři k dispozici, byly testovány objemy nástřiku 5, 25, 50 a 75 µl (E = 1,8 V, F_m = 1,5 ml/min). Získané FIA-ED záznamy jsou zobrazeny na Obrázku 36A. Je zřejmé, že s objemem injekce docházelo k nárůstu proudové odezvy (Obrázek 36B). Jako nejvhodnější objem vzhledem k tvaru a výšce píku bylo pro další experimenty zvoleno 50 µl. Na závěr této části tedy lze shrnout používané podmínky pro FIA-ED jako následující: základní elektrolyt: 0,1 mol/l H_2SO_4, E = 1,8 V, F_m = 1,5 ml/min, V_{inj} = 50 µl. Opakovatelnost měření s využitím navržené metody byla ověřena změřením 10 píků ML pro koncentraci $2{,}0\times10^{-5}$ mol/l. Na Obrázku 37 je uveden záznam měření, z něhož vyplývá, že výška píku je velmi dobře opakovatelná (I_p = 1814±37 nA, RSD = 2,05 %).



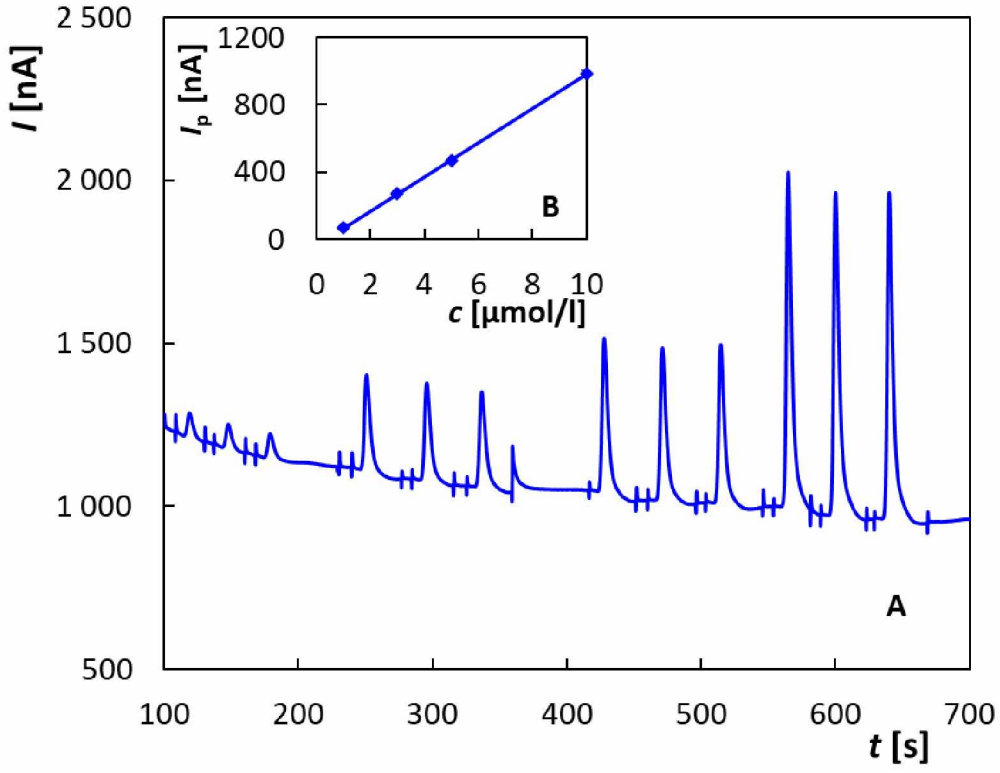
Obrázek 36 Časový průběh proudu zaznamenaný pomocí FIA-ED s SP/BDDE v závislosti na objemu dávkovaného vzorku (A) s odpovídající závislostí I_p na V_{inj} (B). Parametry: základní elektrolyt 0,1 mol/l H_2SO_4, E = 1,8 V, F_m = 1,5 ml/min, V_{inj} = 5, 25, 50 a 75 µl, c_{ML} = $2{,}0\times10^{-5}$ mol/l.



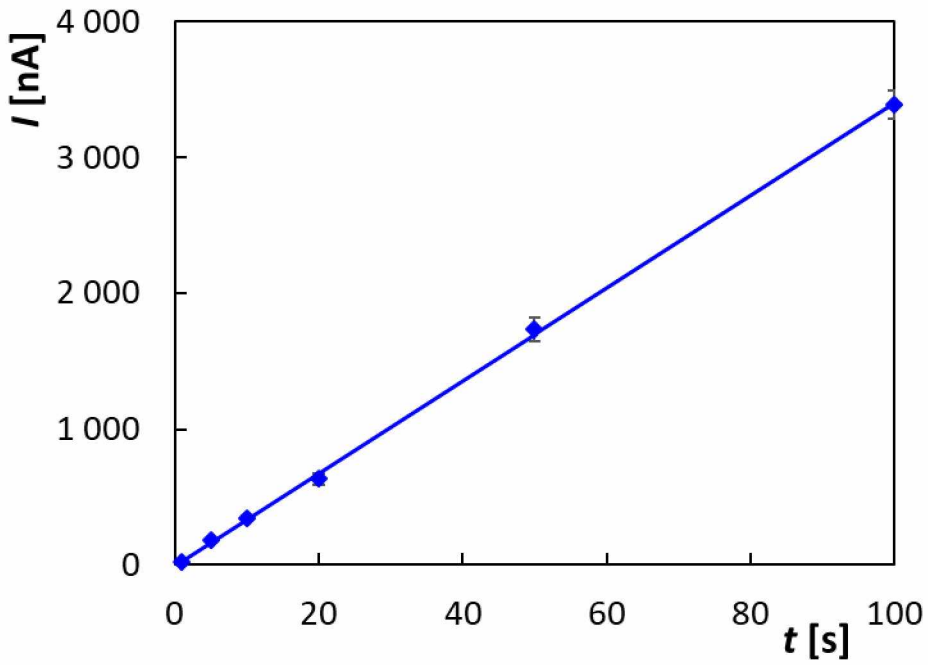
Obrázek 37 Časový průběh proudu zaznamenaný pomocí FIA-ED s SP/BDDE při opakovaném měření ML o koncentraci $2{,}0\times10^{-5}$ mol/l (A). Parametry: základní elektrolyt 0,1 mol/l H_2SO_4, E = 1,8 V, F_m = 1,5 ml/min, V_{inj} = 50 µl.

Metoda FIA-ED využívající SP/BDDE jako elektrochemický senzor byla použita pro měření řady koncentračních závislostí. Na Obrázku 38 je uveden příklad v rozsahu koncentrací ML $1{,}0\times10^{-6}$-$1{,}0\times10^{-5}$ mol/l. Z vložené závislosti I_p na c (rovnice (9)) je vidět, že výška píku roste s koncentrací lineárně. Vypočítané hodnoty LOD, resp. LOQ jsou $1{,}8\times10^{-7}$, resp. $6{,}1\times10^{-7}$ mol/l a jsou o něco nižší v porovnání s klasickou DPV využívající SP/BDDE popsanou v předchozích kapitolách. Výhodou metody může být široký rozsah koncentrací ($1{,}0\times10^{-6}$-$1{,}0\times10^{-4}$ mol/l), ve kterém roste výška píku lineárně (Obrázek 39). Na závěr práce tedy bylo ověřeno, že pro stanovení ML lze využít i amperometrickou detekci v průtokových systémech.

$$I_p[\text{nA}] = (101{,}65 \pm 1{,}076)\ c\ [\mu\text{mol/l}] + (-34{,}019 \pm 6{,}25), r = 0{,}9999 \qquad (9)$$



Obrázek 38 Časový průběh proudu zaznamenaný pomocí FIA-ED s SP/BDDE v závislosti na koncentraci ML (A) a závislost I_p na c_{ML} (B). Parametry: základní elektrolyt 0,1 mol/l H_2SO_4, E = 1,8 V, F_m = 1,5 ml/min, V_{inj} = 50 µl, c_{ML} = $1{,}0\times10^{-6}$-$1{,}0\times10^{-5}$ mol/l.



Obrázek 38 Závislost I_p na c_{ML} získaná s využitím FIA-ED s SP/BDDE. Parametry: základní elektrolyt 0,1 mol/l H_2SO_4, E = 1,8 V, F_m = 1,5 ml/min, V_{inj} = 50 µl, c_{ML} = $1{,}0\times10^{-6}$-$1{,}0\times10^{-4}$ mol/l.

Závěr

Cílem diplomové práce bylo studium voltametrického chování metalaxylu a vývoj jednoduché a rychlé metody pro jeho stanovení s využitím borem dopované diamantové elektrody a tištěného senzoru s chemicky deponovanou borem dopovanou diamantovou elektrodou. V neposlední řadě bylo cílem rovněž ověření možnosti aplikace průtokové injekční analýzy s elektrochemickou detekcí.

První část experimentální práce byla věnována studiu voltametrického chování ML s využitím BDDE i SP/BDDE. Pomocí CV bylo zjištěno, že ML poskytuje 1 oxidační pík při potenciálu +1950 mV (BDDE), resp. +1600 mV (SP/BDDE). Tento pík byl zaznamenán v širokém rozsahu pH, ale vzhledem k tvaru křivky a výšce proudové odezvy bylo pro analýzu ML zvoleno kyselé prostředí a jako základní elektrolyt byla vybrána 0,1 mol/l H_2SO_4. Na základě studií vlivu rychlosti polarizace na výšku píku ML bylo zjištěno, že řídícím dějem probíhající oxidační reakce je difúze.

Druhá část byla zaměřena na vývoj voltametrické metody stanovení ML. Vzhledem k vyšší citlivosti byly testovány metody DPV a SWV. Pro obě elektrody byly optimalizovány základní parametry obou metod, a nakonec byla vzhledem k lepším dosaženým statistickým parametrům pro stanovení ML vybrána DPV. Následně byly testovány možnosti předúpravy povrchu BDDE. Jako nejlepší se ukázala předúprava pomocí cyklické voltametrie, která byla zařazena vždy pouze na začátku práce s oběma typy senzorů. Bylo zjištěno, že k pasivaci povrchu BDDE při analýze ML nedochází (RSD < 2,0 %), a proto nebylo nutné povrch elektrody mezi měřeními žádným způsobem regenerovat. Z proměřených koncentračních závislostí s využitím DPV s optimalizovanými parametry v modelových roztocích byly vypočteny hodnoty LOD $1{,}6\times10^{-8}$ mol/l (BDDE) a $7{,}7\times10^{-7}$ mol/l (SP/BDDE). Použitelnost metody byla ověřena při analýze modelových roztoků o různých koncentracích ML, kdy bylo dosaženo správných a velmi dobře opakovatelných výsledků (RSD < 5).

Poté následovala analýza reálných vzorků přírodních vod z řeky Chrudimky. S ohledem na nižší hodnotu LOD byla pro tyto účely použita BDDE. Protože přírodní vody mohou obsahovat velice nízké koncentrace ML, které nelze stanovit s využitím vyvinuté voltametrické metody, bylo nutné zařadit vhodnou metodu pro zakoncentrování vzorku. Byly testovány 2 postupy jednak s využitím adsorpce na aktivní uhlí s následnou elucí acetonitrilem a odpařením rozpouštědla, a také extrakce na tuhou fázi s využitím kolonek naplněných silikagelem

modifikovaným fází C18 opět s elucí acetonitrilem a odpařením. Ukázalo se, že obě metody umožňují dostatečné zakoncentrování vzorku s výtěžností následné analýzy kolem 93 %. Metody byly úspěšně aplikovány rovněž při analýze přírodních vod.

Poslední kapitola byla věnována průtokové injekční analýze s elektrochemickou detekcí s využitím SP/BDDE. I pro tuto metodu byly optimalizovány základní parametry, poté byly proměřeny koncentrační závislosti v různých koncentračních rozsazích a byl vypočítán LOD $1{,}8\times10^{-7}$ mol/l. Velkou výhodou amperometrické detekce ML v průtokových systémech je široký využitelný koncentrační rozsah metody.

Na závěr je možné říci, že zadání diplomové práce, resp. její cíle byly splněny. Bylo poprvé prostudováno voltametrické chování ML s využitím elektrody z borem dopovaného diamantu a byla vyvinuta jednoduchá a rychlá metoda umožňující stanovení ML nejen v modelových vzorcích, ale i v přírodních vodách.

Literatura

[1] SHAH, Nasrullah, ARAIN, Muhammad B., SOYLAK, Mustafa. Historical background: milestones in the field od development of analytical Instrumentation In: Seperation and Precomcentration of Organic and Inorganic species, Elsevier, 2020, s. 45-73, ISBN: 978-0-12-818569-8.

[2] BAREK, Jiří, ZIMA, Jiří. Eighty Years of Polarography – History and Future. *Electroanalysis*, 2003, 15 (5-6), s. 467-472.

[3] BARD, Allen J. The Rise of Voltammetry: From Polarography to the Scanning Electrochemical Microscope. *Journal of Chemical Education*, 2007, 84 (4), s. 644-650.

[4] SAITO, Yuki, KIKUCHI, Takumi. Voltammetry: Theory, Types and Applications. New York: Nova Publishers, 2013, ISBN: 1-62948-058-4.

[5] POKORNÝ, Jiří, DVOŘÁČEK, Bořivoj, SLÁNSKÁ, Marie. Polarografie – významný příspěvek Jaroslava Heyrovského pro intenzivní péči. *Anesteziologie a intenzivní medicína,* 2009, 20 (3), s. 165-167.

[6] MAXAKATO, Nobanathi W., GWEBU, Sandile S., MHLONGO, Gugu H. Voltammetry, London: IntechOpen, 2019, ISBN: 978-1-78985-323-0.

[7] CRESPI, Francesco. Differencial Pulse Voltammetry: Evolution of an In Vivo Methodology and New Chemical Entries, A Short Review. *Journal of New Developments in Chemistry,* 2020, 2 (4), s. 20-28.

[8] KELLY, Richard S. Analytical Electrochemistry: The Basic Concepts, 2020.

[9] RICO, Yvette, BIDEGAIN, Julen C., ELSNER, Carina I. Synthetic and natural Iron oxide characterization though microparticle voltammetry. *Geofísica Internacional,* 2009, 48 (2), s. 221-236.

[10] GUNDRY, Luke, GUO, Si-Xuan, KENNEDY, Gareth. Recent advances and future perspectives for automated parameterisation, Bayesian inference and machine learning in voltammetry. *Chemical Communications*, 2021, 57, s. 1855-1870.

[11] HEYROVSKÝ, Jaroslav, ZUMAN, Petr. Úvod do praktické polarografie. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 1964, s. 224.

[12] BAREK, Jiří et al.: Elektroanalytická chemie. Praha: Karolinum, 2005, s. 188. ISBN 80-246-1146-5.

[13] EFSTATHIOS, Constantinos E. Polarography: Organic Applications, Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition), Amsterdam: Elsevier, 2005, ISBN: 978-0127641003.

[14] KUMAR, Yogesh, PANDEY, Rajayashree. A Review of Polarographic Techniques. *International Journal of Creative Research Thoughts,* 2018, 6 (1), s. 2320-2882.

[15] OBERACHER, Robert, PITTERL, Florian, ERB, Robert, PLATTNER, Sabine. Mass spectrometric methods for monitoring redox processes in electrochemical cells. *Mass Spectrometry Reviews,* 2015, 34 (1), s. 64-92.

[16] SCHOLZ, Fritz. Voltammetric techniques of analysis: the essentials. *The Textbook* Journal of Chemistry, 2015, 1 (17), s. 1-24.

[17] ELGRISHI, Noémie, ROUNTREE, Kelley J., MCCARTHY, Brian D., ROUNTREE, Eric S., EISENHART, Thomas T., DEMSEY, Jilian L. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education,* 2018, 95, s. 197-206.

[19] BARD, Allen J., FAULKNER, Larry R. Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications. 2nd edition. New York: John Wiley and Sons, 2001.

[18] SHUANG, Li, ARNE, Thomas. Emerged carbon nanomaterials from metal-organic precursors for electrochemical catalysis in energy conversion In: *Advanced Nanomaterials for Electrochemical-Based Energy Conversion and Storage,* Amsterdam: Elsevier, 2019, s. 393-423, ISBN: 978-0-12-814558-6.

[20] RUSLING, James F., SUIB, Steven L. Characterizing Materials with Cyclic Voltammetry. *Advanced Materials*, 1994, 6 (12), s. 922-930.

[21] DAVIES, Trevor J., MOORE, Ryan R., BANKS, Craig E., COMPTON, Richard G. The cyclic voltammetric response of electrochemically heterogeneous surfaces. *Journal of Electroanalytic Chemistry,* 2004, 574 (1), s. 123-152.

[22] SIMOES, Fábio R., XAVIER, M. G. Electrochemical Sensors, Micro and Nano Technologies In: *Nanoscience and its Applications*, Norwich: William Andrew Publishing, 2017, s. 155-178, ISBN: 9780323497800.

[23] VENTON, Jill B., DISCENZA, Dana J. Chapter 3: Voltammetry, *Electrochemical for Bioanalysis*, Amsterdam: Elsevier, 2020, s. 27-50, ISBN: 9780128212035.

[24] PINGARRON, José M., LABUDA, Jiří, BAREK, Jiří, BRETT, Christopher M. A., CAMOES, Maria F., FOJTA, Miroslav, HIBBERT, Brynn D. Terminology of electrochemical methods of analysis (IUPAC Recommendations 2019*). Pure and Applied Chemistry*, 2020, 92 (4), s. 641-694.

[25] ŠVANCARA, Ivan. Elektroanalýza, 2019. ISBN 978-80-7560-247-3.

[26] CHEN, Aicheng, SHAH, Badal. Electrochemical sensing and biosensing based on square wave voltammetry. *Analytical Methods,* 2013, 5, s. 2158-2173.

[27] PROTTI, Pierpaolo. Introduction to modern voltammetric and polarographic analysis techniques. AMEL srl, IV. edition, 2001, s. 1-37.

[28] BAREK, Jiří. Postavení polarografie a voltametrie na rtuťových kapkových elektrodách v moderní analytické chemii. *Chemické listy,* 1997, 91, s. 1038-1042.

[29] HASSLER, Marco. Other commonly used biomedical coastings: pyrolytic carbon coatings. In: *Coatings for Biomedical Applications*, Cambridge: Woodhead Publishing, 2012, s. 75-105, ISBN: 978-1-84569-568-2.

[30] MCCEERY, Richard L. Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry. *Chemical Reviews,* 2008, 108, s. 2646-2687.

[31] IWAKI, Masaya, SATO, Susumo, TAKAHASHI, Katsuo, SAKAIRI, Hideo. Electrical conductivity of nitrogen and argon implanted diamond. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research*, 1983, 209, s. 1129–1133.

[32] MUSA, Auwal M., KIELY, Janice, LUXTON, Richard, HONEYCHURCH, Kevin C. Recent progress in screen-printed electrochemical sensors and biosensors for the detection of estrogens. *Trends in Analytical Chemistry,* 2021, 139, s. 1-17.

[33] SALIMI, Abdollah, HYDE, Michael E., BANKS, Craig E., COMPTON, Richard G. Boron doped diamond electrode modified with iridium oxide for amperometric detection of ultra trace amounts of arsenic(III). *Analyst,* 2004, 129, s. 9-14.

[34] NIEDZIALKOWSKI, Pawel, OSSOWSKI, Tadeusz, ZIEBA, Agata, CIROCKA, Anna, ROCHOWSKI, Pawel, POGORZELSKI, Andrzej, RYL, Jacek, SOBASZEK, Michal, BOGDANOWICZ. Poly-L-lysine-modified boron-doped diamond electrodes for the amperometric detection of nucleic acid bases. *Journal of Electroanalytical Chemistry,* 756, 2015, s. 84-93.

[35] LIU, Jingjing, XU, Yifei, LIU, Shikun, YU, Shixin, YU, Zhirun, LOW, Szeshin. Applications and Progress of Chemometrics inVoltammetric Biosensing. *Biosensors,* 2022, 12 (7), s. 494.

[36] MATVIEIEV, Oleksandr, ŠELEŠOVSKÁ, Renáta, VOJS, Marian, MARTON, Marián, MICHNIAK, Pavol, HRDLIČKA, Vojtěch, HATALA, Michal, JANÍKOVÁ, Lenka, CHÝLKOVÁ, Jaromíra, SKOPALOVÁ, Jana, CANKAŘ, Petr, NAVRÁTIL, Tomáš. Novel screen-printed sensor with chemically deposited boron-doped diamond electrode: preparation, characterazition and application. *Biosensors,* 2022, 12, s. 241.

[37] METTERS, Jonathan P., KADARA, Rashid O., BANKS, Craig E. New directions in screen printed electroanalytical sensors: an overview of recent developments. *Analyst,* 2011, 136, s. 1067-1076.

[38] LUONG, John H. T., MALE, Keith B., GLENNON, Jeremy D. Boron-doped diamond electrode: synthesis, characterization, functionalization and analytical applications. *Analyst,* 2009, 134 (10), s. 1965-1979.

[39] BOGDANOWICZ, Robert, RYL, Jacek. Structural and electrochemical heterogeneities of boron-doped diamond surfaces. *Current Opinion in Electrochemistry*, 2022, 31, s. 1-10.

[40] PLESKOV, Yu V. Electrochemistry of Diamond: A review. *Russian Journal of Electrochemistry,* 2002, 38 (12), s. 1275-1291.

[41] LUONG, John H. T., MALE, Keith B., GLENNON, Jeremy. Boron-doped diamond electrode: Synthesis, characterization, functionalization and analytic applications. *The Analyst*, 2009, 134 (10), s. 1965-1979.

[42] ZHANG, Qing, LIU, Yanming, CHEN, Shuo, QUAN, Xie, YU, Hongtao. Nitrogen-doped diamond electrode shows high performance for electrochemical reduction of nitrobenzene. *Journal of Hazardous Materials,* 2014, 265, s. 185-190.

[43] KALISH, Rafi. Doping of diamond. *Carbon,* 1999, 37 (5), s. 781-785.

[44] KRAFT, Alexander. Doped Diamond: A Compact Review on a New, Versatile Electrode Material. *Internation Journal of Electrochemical Science,* 2007, 2, s. 355-385.

[45] PECKOVÁ, Karolina, MUSILOVÁ, Jana, BAREK, Jiří. Boron-Doped Diamond Film Electrodes-New Tool for Voltammetric Determination of Organic Substances. *Critical Reviews in Analytical Chemistry,* 2009, 39 (3), s. 148-172.

[46] PLESKOV, Yu V., SAKHAROVA, Alla Y., KROTOVA, M. D., BOUILOV, Leonid L., SPITSYN, Boris V. Photoelectrochemical properties of semiconductor diamond. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1987, 228, s. 19–27.

[47] RAO, Tata N., FUJISHIMA, Akira, ANGUS, John C. Historical Survey of Diamond Electrodes In: *Diamond Electrochemistry*, UK: Elsevier Science, 2005, s. 3-4, ISBN: 978-0444519085.

[48] SRIKANTH, Vadali V. S. S., KUMAR, Sampath P., KUMAR, Vijay B. A Brief Review on the In Situ Synthesis of Boron-Doped Diamond Thin Films. *International Journal of Electrochemistry,* 2012, s. 1-7.

[49] HOLD, Katherine B., BARD, Allen J., SHOW, Yoshiyuki, SWAIN, Greg M. Scanning Electrochemical Microscopy and Conductive Probe Atomic Force Microscopy Studies of Hydrogen – Terminated Boron-Doped Diamond Electrodes with Different Doping Levels. *Journal of Physical Chemistry B,* 2004, 108 (39), s. 15117-15127.

[50] DENG, Zejun, ZHU, Ruitong, MA, Li, ZHOU, Kechao, YU, Zhiming, WEI, Quiping. Diamond for antifouling applications: A review. *Carbon*, 2022, 196, s. 923-939.

[51] FREITAS, Jhonys M., OLIVEIRA, Thiago da C., MUNOZ, Rodrigo A., RICHTER, Eduardo M. Boron Doped Diamond Electrodes in Flow-Based Systems. *Frontiers in Chemistry*, 2019, 7 (190), s. 1-21.

[52] FREITAS, Jhonys M., WACHTER, Naihara, ROCHA-FILHO, Romeu C. Determination of bisphenol S, simultaneously to bisphenol A in different matrices or solely in electrolyzed solutions, using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. *Talanta,* 2020, 217, s. 1-9.

[53] BALUCHOVÁ, Simona, DAŇHEL, Aleš, DEJMKOVÁ, Hana, OSTATNÁ, Veronika, FOJTA, Miroslav, SCHWARZOVÁ-PECKOVÁ, Karolina. Recent progress in the applications of boron doped diamond electrodes in electroanalysis of organic compounds and biomolecules – A review. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1077, s. 30-66.

[54] CODOGNOTO, Lucia, TANIMOTO, Sonia T., PEDROSA, Valber A., SUFFREDINI, Hugo B., MACHADO, Sergio A. S., AVACA, Luis A. Electroanalytical Determination of Carbaryl in Natural Waters on Boron Doped Diamond Electrode. *Electroanalysis,* 2006, 18 (3), s. 253-258.

[55] MEDEIROS, Roberta A., ROCHA-FILHO, Romeu C., FATIBELLO-FILHO, Orlando. Simultaneous voltammetric determination of phenolic antioxidations in food using a boron-doped diamond electrode. *Food Chemistry,* 2010, 123 (3), s. 886-891.

[56] SANTOS, Anderson M., VICENTINI, Fernando C., DEROCO, Patricia B., ROCHA-FILHO, Romeu C., FATIBELLO-FILHO, Orlando. Square-Wave Voltammetric Determination of Paracetamol and Codeine in Pharmaceutical and Human Body Fluid Samples Using a Cathodically Preatreated Boron-Doped Diamond Electrode. *Journal of the Brazilian Chemical Society,* 2015, 26 (10), s. 2159-2168.

[57] BECHTOLD, Thomas, TURCANU, Aurora, SCHROTT, Wolfgang. Electrochemical decolourisation of dispersed indigo on boron-doped diamond anodes. *Diamond and Related Materials,* 2006, 15 (10), s. 1513-1519.

[58] SINGH, Sima, WANG, Joseph, CINTI, Stefano. Review – An Overview on Recent Progress in Screen – Printed Electroanalytical (Bio) Sensors. *ECS Sensors Plus*, 2022, 1, s. 1-7.

[59] SURESH, Raghavv R., LAKSHMANAKUMAR, Muthaiyan, JAYALATHA, Arockia J. B. B., RAJAN, K. S., SETHURAMAN, Swaminathan, KRISHNAN, Uma M., RAYAPPAN, John B. B. Fabrication of screen-printed electrodes: opportunities and challenges. *Journal of Materials Science,* 2021, 56, s. 8951-9006.

[60] DAGO, Angela, NAVARRO, Javier, ARINO, Cristina, DIAZ-CRUZ, José M., ESTEBAN, Miquel. Carbon nanotubes and graphene modified SPCE as sensitive sensors for the determination of phytochelatins in plants using liquid chromatography with amperometric detection. *Journal of Chromatography A*, 2015, 1409, s. 210-217.

[61] NASCIMENTO, Bruno. B., ANGNES, Lucio., Eletrodos Fabricados por "Silk-Screen". *Química Nova,* 1998, 21, s. 5.

[62] PAIMARD, Giti, GHASALI, Ehsan, BAEZA, Mireia. Screen-Printed Electrodes: Fabrication, Modification, and Biosensing Applications. *Chemosensors,* 2023, 11 (2), s. 1-37.

[63] SUKUL, Premasis., SPITELLER, Michael. Metalaxyl: persistence, degradation, metabolism, and analytical methods. *Reviews of environmental contamination and toxicity,* 2000, 164 (1), s. 1-26.

[64] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 11150163, Metalaxyl-M. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Metalaxyl-M. Citováno: 13. 11. 2022.

[65] PÁNEK, Matěj, ALI, Asad, HELMER, Štěpán. Use of metalaxyl against some soil plant pathogens of the class Peronosporomycetes – A review and two case studies. *Plant Protection Science,* 2022, 58 (2), s. 92-109.

[66] MONKIEDJE, Adolphe, SPITELLER, Michael. Degradation of Metalaxyl and Mefenoxam and Effects on the Microbiological Properties of Tropical and Temperate Soils. *International Journal of Enviromental Research and Public Health,* 2005, 2 (2), s. 272-285.

[67] GUPTA, Pawan K. Herbicides and fungicides In: Reproductive and Developmental Toxicology, Elsevier: Academic Press, 2011, s. 503-521, ISBN: 978-0-12-382032-7.

[68] LOPEZ, Luis F., LOPEZ, Antonio G., RIBA, Milán V. HPLC method for simultaneous determination of fungicides: carbendazim, metalaxyl, folpet, and propiconazole in must and wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 1989, 37 (3), s. 684-687.

[69] YU, Sheng, HUANG, Ke-Jing, YU, Meng, WEI, Cai-Yun. Determination of Tebuconazole, Diethofencarb, Myclobutanil, Metalaxyl, and Prometryn Pesticide Residue in Water Sample Based on Solid Phase Extraction Coupled with High Performance Liquid Chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2013, 40 (7), s. 1065-1070.

[70] JANKULOVSKA, Mirjana S., VELKOSKA-MARKOVSKA, Lenche, PETANOVSKA-ILIEVSKA, Biljana, ILIEVSKI, Ugrin. Application of High Performance Liquid Chromatography for Determination of Metalaxyl, Acetamiprid and Azoxystrobine in Tomato Samples. *Journal of Analytical Chemistry*, 2019, 74 (4), s. 339-344.

[71] YU, Weiwei, LUO, Xiaoshuang, QIN, Xinxian, HUANG, Min, LI, Jian, ZENG, Song, ZHANG, Kankan, HU, Deyu. Simultaneous determination and risk assessment of metalaxyl and azoxystrobin in potato by liquid chromatography with tandem mass spektrometry. *Environmental Monitoring and Assessment,* 2018, 190 (335), s. 1-11.

[72] SALAU, Jaume S., ALONSO, Rosi, BATLLO, Gloria, BARCELO, Damia. Application of solid-phase disk extraction followed by gas and liquid chromatography for the simultaneous determination of the fungicides: captan, captafol, carbendazim, chlorothalonil, ethirimol, folpet,

metalaxyl and vinclozolin in enviromental waters. *Analytica Chimica Acta,* 1994, 293 (1-2), s. 109-117.

[73] BUSINELLI, Mario, PATUMI, Maurizio, MARUCCHINI, Cesare. Identification and determination of some metalaxyl degradation products in lettuce and sunflower. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 1984, 32 (3), s. 644-647.

[74] VUIK, Johan, BROUWER, Wim, KRISHNADATH, Garry J. N., VAN de LAGEMAAT, Dick. Gas chromatographic determination of metalaxyl in lettuce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 1989, 37 (1), s. 88-90.

[75] WALISZEWSKI, Stefan. M., SZYMCZYNSKI, G. A. Economical method for the determination of metalaxyl in tomatoes. *Fresenius Zeitschrift fur analytische Chemie,* 1983, 316, s. 322-324.

[76] BUSHWAY, Rodney J., THOME, Ernesto. Determination of metalaxyl in wine by ELISA. *Food and Agricultural Immunology,* 1998, 10 (1), s. 23-28.

[77] QUINTAS, Guillermo, ARMENTA, Sergio, MORALES-NOÉ, Asuncion, GARRIGUES, Salvador, DE LA GUARDIA, Miguel. Simultaneous determination of Folpet and Metalaxyl in pesticide formulations by flow injection Fourier transform infrared spectrometry. *Analytica Chimica Acta,* 2003, 480 (1), s. 11-21.

[78] Vyhláška č. 254/2004 Sb. Vyhláška, kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody. In: *Zákony pro lidi* [online]. AION CS, 2010-2023 [cit. 2023-04-19]. Dostupné z: https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2004-252

[79] Proposed Registration Decision Tebuconazole, Kanada: Health Canada Pest Management Regulatory Agency, 2016, s. 1-52, ISSN: 1925-0878.

[80] STRUGER, John, GRABUSKI, Josey, CAGAMPAN, Steve, SVERKO, Ed, MARVIN, Chris. Occurrence and Distribution of Carbamate Pesticides and Metalaxyl in Southern Ontario Surface Waters 2007-2010. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology,* 2016, 96, s. 423-431.