

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení fungicidu cyprodinilu s využitím voltametrie a průtokové injekční
analýzy s elektrochemickou detekcí

Diplomová práce

2024

Bc. Lucie Borovská

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Borovská**
Osobní číslo: **C22313**
Studijní program: **N0711A130013 Chemické a procesní inženýrství**
Specializace: **Ochrana životního prostředí**
Téma práce: **Stanovení fungicidu cyprodinilu s využitím voltametrie a průtokové injekční analýzy s elektrochemickou detekcí**
Zadávací katedra: **Ústav environmentálního a chemického inženýrství**

Zásady pro vypracování

1. Popište stručně princip voltametrie, zaměřte se na aplikaci tištěných senzorů a spojení průtokové analýzy s elektrochemickou detekcí. Zpracujte literární rešerši týkající se fungicidu cyprodinilu. Zaměřte se na problematiku jeho stanovení s využitím různých analytických metod včetně voltametrie.
2. V rámci experimentální části prostudujte voltametrické chování fungicidu na borem dopované diamantové elektrodě a navrhnete optimální podmínky jeho stanovení v modelových roztocích. Obdobnou studii zpracujte i pro tištěné senzory s borem dopovanou diamantovou pracovní elektrodou.
3. Ověřte možnost aplikace tištěného senzoru do průtokové cely a otestujte parametry průtokové injekční analýzy s elektrochemickou detekcí pro stanovení cyprodinilu.
4. Vyvinuté metody aplikujte při analýze modelových roztoků a praktických vzorků přírodních vod a pesticidních přípravků.
5. 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: **26. ledna 2024**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

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

V Pardubicích dne 26. ledna 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem *Stanovení fungicidu cyprodinilu s využitím voltametrie a průtokové injekční analýzy s elektrochemickou detekcí* 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 7. 6. 2024

Bc. Lucie Borovská

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala doc. Renátě Šelešovské za odborné vedení této diplomové práce, vstřícný přístup, korektury a připomínky, které mi velmi pomohly při sepisování práce. Vřelé poděkování patří též konzultantovi MSc. Oleksandru Matvieievovi, který mě provedl celou experimentální částí, strávil se mnou měsíce v laboratoři a trpělivě odpovídal na všechny dotazy. Dalšími velmi důležitými osobami jsou mí rodiče, kteří mi po celý můj studentský život byli největší inspirací a oporou a umožnili mi studium na Univerzitě Pardubice. Vážím si všeho, co jste pro mě doposud udělali a věřím, že Vám alespoň malou část toho symbolicky vrátím napsáním této práce a úspěšným dokončením vysokoškolských studií. Kromě mých rodičů bych chtěla poděkovat i partnerovi, přátelům a kolegům za podporu, lásku a plno nezapomenutelných zážitků.

ANOTACE

Předmětem této diplomové práce je studium voltametrického chování fungicidu cyprodinilu a vývoj spolehlivé metody pro jeho stanovení s využitím borem dopované diamantové elektrody a tištěných senzorů s borem dopovanou diamantovou pracovní elektrodou. Chování fungicidu bylo sledováno pomocí cyklické voltametrie. Podmínky stanovení cyprodinilu byly optimalizovány pro metody diferenční pulzní a square wave voltametrie. Navržená metoda byla otestována při analýze modelových roztoků, komerčně dostupných přípravků a přírodní vody. Vyvinutá metoda byla převedena na tištěné senzory, kde byl studován rovněž vliv velikosti plochy pracovní elektrody na parametry stanovení cyprodinilu. Tištěné senzory byly následně zakomponovány do průtočné cely a byly optimalizovány parametry metody stanovení cyprodinilu využívající průtokovou injekční analýzu s elektrochemickou detekcí.

KLÍČOVÁ SLOVA

cyprodinil, voltametrie, průtoková injekční analýza, stanovení, borem dopovaná diamantová elektroda, sítotiskový senzor

TITLE

Determination of fungicide cyprodinil using voltammetry and flow injection analysis with electrochemical detection

ANNOTATION

The subject of this master thesis is the study of voltammetric behavior of the fungicide cyprodinil and the development of a reliable method for its determination using a boron-doped diamond electrode and screen-printed sensors with a boron-doped diamond working electrode. The behavior of the fungicide was monitored using cyclic voltammetry. The conditions for its determination were optimized for differential pulse and square wave voltammetry methods. The proposed method was tested in the analysis of model solutions, commercially available preparations, and natural water. The developed method was transferred to screen-printed sensors, where the effect of the size of the working electrode area on the parameters of the determination of cyprodinil was also studied. The printed sensors were subsequently

incorporated into a flow cell and the parameters of the cyprodinil determination method using flow injection analysis with electrochemical detection were optimized.

KEYWORDS

cyprodinil, voltammetry, flow injection analysis, determination, boron-doped diamond electrode, screen-printed sensor

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	12
ÚVOD.....	15
1 TEORETICKÁ ČÁST	17
1.1 Cyprodinil	17
1.1.1 Anilinopyrimidinové fungicidy	17
1.1.2 Cyprodinil	17
1.2 Metody stanovení cyprodinilu	19
1.2.1 Chromatografické stanovení	19
1.2.2 Imunochemické stanovení	21
1.2.3 Elektrochemické stanovení	21
1.3 Voltametrie	23
1.3.1 Voltametrické metody.....	26
1.3.2 Borem-dopovaná diamantová elektroda	29
1.3.3 Síťotiskové senzory	31
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
2.1 Použité chemikálie.....	34
2.2 Přístrojové vybavení	35
2.3 Pracovní postupy.....	37
2.3.1 Příprava WE před měřením	37
2.3.2 Voltametrická měření	38
2.3.3 Analýza přírodní vody a komerčně dostupných přípravků.....	38
3 VÝSLEDKY A DISKUSE	40
3.1 Studium elektrochemického chování CPD a vývoj metody jeho stanovení s využitím BDDE.....	40
3.1.1 Závislost na pH.....	41
3.1.2 Závislost na rychlosti polarizace.....	43
3.1.3 Optimalizace parametrů DPV	44
3.1.4 Optimalizace parametrů SWV	47
3.1.5 Analytické charakteristiky vyvinuté metody	50
3.1.6 Interferenční studie	53

3.1.7 Analýza modelového roztoku, přírodní vody a pesticidních přípravků.....	55
3.2 Aplikace SP/BDDE s různou velikostí pracovní elektrody pro analýzu a stanovení CPD	56
3.2.1 Porovnání elektrochemického chování CPD na BDDE a SP/BDDE	56
3.2.2 Porovnání analytických parametrů dosažených s využitím BDDE a SP/BDDE.....	62
3.2.3 Analýza modelového roztoku, přírodní vody a pesticidních přípravků.....	63
3.3 Stanovení CPD s využitím průtokové injekční analýzy s elektrochemickou detekcí.....	65
3.3.1 Optimalizace parametrů FIA/ED	65
3.3.2 Analytické charakteristiky vyvinuté metody	67
3.3.3 Analýza modelových roztoků a pesticidních přípravků	68
ZÁVĚR	70
POUŽITÁ LITERATURA	72

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Tabulka 1 Porovnání vlastností používaných SP/BDDE	36
Tabulka 2 Porovnání hodnot RSD opakovaných měření píku CPD pro jednotlivé postupy předúpravy BDDE	47
Tabulka 3 Porovnání hodnot relativních směrodatných odchylek pro jednotlivé úpravy BDDE u SWV	50
Tabulka 4 Porovnání statistických parametrů pro stanovení CPD s využitím DPV a SWV ..	52
Tabulka 5 Vliv jednotlivých interferentů na výšku píku CPD	53
Tabulka 6 Shrnutí výsledků analýzy modelového roztoku a reálných vzorků	55
Tabulka 7 Porovnání parametrů 1. oxidačního píku CPD zaznamenaného na testovaných senzorech	57
Tabulka 8 Parametry závislosti j_p na $v^{1/2}$ a $\log(j_p [\mu\text{A}/\text{mm}^2])$ na $\log(v [\text{V}/\text{s}])$ pro všechny testované senzory	61
Tabulka 9 Porovnání parametrů koncentračních závislostí pro CPD (0,025-1,9 μM) zaznamenaných na BDDE a SP/BDDE	63
Tabulka 10 Výsledky analýzy modelového roztoku a přírodní vody	64
Tabulka 11 Výsledky analýzy pesticidních přípravků BDDE a SP/BDDE	65
Tabulka 12 Porovnání parametrů koncentračních závislostí pro CPD zaznamenaných na SP/BDDE metodou FIA-ED	67
Tabulka 13 Výsledky stanovení CPD v modelovém roztoku a pesticidních přípravcích pomocí FIA-ED	69
Obrázek 1 Strukturální vzorce anilinopyrimidinových fungicidů	17
Obrázek 2 A – Cyklický voltamogram CPD zaznamenaný na MWCNT/CPE v závislosti na rychlosti polarizace a B – Mechanismus elektrochemické oxidace CPD	22
Obrázek 3 Jaroslav Heyrovský, držitel Nobelovy ceny za objev polarografie	24
Obrázek 4 Schéma dvou a tříelektrodevého uspořádání ve voltametrické; W – pracovní, R – referenční, A – pomocná elektroda	25
Obrázek 5 DCV; A – průběh vkládaného potenciálu; B – voltamogram	26
Obrázek 6 CV; A – průběh vkládaného potenciálu; B – cyklický voltamogram	27
Obrázek 7 DPV; A – průběh vkládaného potenciálu; B – voltametrická křivka	28
Obrázek 8 SWV; A – průběh vkládaného potenciálu; B – voltametrická křivka	28
Obrázek 9 A – SPE s tříelektrodeovým elektrochemickým článkem; B – schématické znázornění SPE s různými počty, tvary a uspořádáním elektrod	32
Obrázek 10 Potenciostat Autolab PGSTAT302N v uspořádání pro voltametrickou analýzu v klasickém tříelektrodeovém systému	35
Obrázek 11 Porovnání BDDE a SP-BDDE (A), porovnání velikosti WE u různých SP-BDDE (B)	36
Obrázek 12 Schématické znázornění FIA-ED uspořádání (A), fotografie sestavy FIA-ED použité v rámci diplomové práce (B), detail průtokové cely (C)	37
Obrázek 13 Analyzované fungicidní přípravky Switch (A) a Chorus 50WG (B)	39
Obrázek 14 Cyklické voltamogramy CPD zaznamenané na BDDE v přítomnosti kyslíku ..	40
Obrázek 15 Cyklické voltamogramy CPD zaznamenané na BDDE po odstranění kyslíku ...	41

Obrázek 16 Cyklické voltamogramy CPD zaznamenané na BDDE v prostředí BRB (pH 2,0-12) (A) a různých roztoků kyselin (B).....	42
Obrázek 17 DP voltamogramy CPD zaznamenané na BDDE v prostředí BRB (pH 2-12)....	43
Obrázek 18 Cyklické voltamogramy CPD zaznamenané na BDDE v závislosti na rychlosti polarizace (A) a odpovídající závislosti I_p na v (B), I_p na $v^{1/2}$ (C) a $\log(I_p)$ na $\log(v)$ (D).	44
Obrázek 19 Optimalizace rychlosti polarizace DPV pro stanovení CPD	45
Obrázek 20 Optimalizace výšky pulsu DPV pro stanovení CPD.....	46
Obrázek 21 Optimalizace šířky pulsu DPV pro stanovení CPD	47
Obrázek 22 Optimalizace rychlosti polarizace SWV pro stanovení CPD	48
Obrázek 23 Optimalizace výšky pulsu SWV pro stanovení CPD.....	49
Obrázek 24 Optimalizace frekvence SWV pro stanovení CPD	49
Obrázek 25 DP voltamogramy koncentrační závislosti CPD v rozsahu 0,025-1,9 μ M zaznamenané na BDDE	51
Obrázek 26 SW voltamogramy koncentrační závislosti CPD v rozsahu 0,025-1,9 μ M zaznamenané na BDDE; vložena závislost I_p na c_{CPD}	51
Obrázek 27 Porovnání DP a SW voltamogramů CPD; vložena závislost I_p na c_{CPD} pro obě testované metody	52
Obrázek 28 Vliv vybraných interferentů na výšku píku CPD.....	54
Obrázek 29 Příklady analýzy modelového roztoku (A), přírodní vody (B) a pesticidních přípravků Chorus (C) a Switch (D) metodou standardního přídavku; vložené grafické vyhodnocení metody standardního přídavku.....	56
Obrázek 30 Cyklické voltamogramy CPD zaznamenané na BDDE (A), 1-SP/BDDE (B), 2-SP/BDDE (C) a 3-SP/BDDE (D).....	58
Obrázek 31 Porovnání cyklických voltamogramů CPD zaznamenaných na BDDE a SP/BDDE (A) a totožné záznamy po přepočtu na proudovou hustotu (B).	58
Obrázek 32 Cyklické voltamogramy CPD zaznamenané na BDDE a SP/BDDE a se zapojenou externí referentní a pomocnou elektrodou k SP/BDDE	59
Obrázek 33 Cyklické voltamogramy CPD zaznamenané na BDDE (A), 1-SP/BDDE (B), 2-SP/BDDE (C) a 3-SP/BDDE (D) v závislosti na rychlosti polarizace	60
Obrázek 34 Závislost j_p na v (A), j_p na $v^{1/2}$ (B) a logaritmická závislost j_p na v ($\log(j_p)$ _ $\log(v)$) (C).....	61
Obrázek 35 DP voltamogramy CPD zaznamenané na 1-SP/BDDE (A), 2-SP/BDDE (B) a 3-SP/BDDE (C) v závislosti na koncentraci s vloženými závislostmi I_p na c_{CPD} ; závislosti j_p na c_{CPD} pro všechny senzory (D)	62
Obrázek 36 Příklady analýzy modelového roztoku, přírodní vody a pesticidních přípravků Chorus a Switch metodou standardního přídavku s využitím 1-SP/BDDE (A), 2-SP/BDDE (B) a 3-SP/BDDE (C)	64
Obrázek 37 Optimalizace potenciálu detekce (A) a průtokové rychlosti mobilní fáze(B) pro FIA-ED	66
Obrázek 38 Optimalizace objemu dávkovací smyčky (A) a ověření opakovatelnosti měření při optimalizovaných podmínkách FIE-ED (B).....	66
Obrázek 39 Porovnání koncentračních závislostí CPD po přepočtu na proudové hustoty pro všechny testované senzory získané metodou FIA-ED.....	67
Obrázek 40 Analýza modelového roztoku a přípravků s využitím FIA-ED s 1-SP/BDDE (A), 2-SP/BDDE (B), 3-SP/BDDE (C)	68

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

<i>A</i>	Amplituda [V]
ABS	Polymer akrylonitrilu, butadienu a styrenu
Ag/AgCl (KCl)	Argentchloridová elektroda
BDD	Borem dopovaný diamant
BDDE	Borem dopovaná diamantová elektroda
BRB	Brittonův-Robinsonův pufr
<i>c</i>	Koncentrace [mol/l]
CE	Pomocná elektroda (Counter electrode)
CPD	Cyprodinil
CV	Cyklická voltametrie (Cyclic voltammetry)
CVD	Chemická depozice par (Chemical vapor deposition)
ČR	Česká republika
DCV	Stacionární voltametrie (Direct current voltammetry)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic acid)
DOD	Kapka na vyžádání (Drop on demand)
DPV	Diferenční pulzní voltametrie (Differential pulse voltammetry)
$E_{1/2}$	Půlvlnový potenciál [V]
E_{det}	Potenciál detekce [V]
E_{kon}	Konečný potenciál [V]
E_{obratu}	Potenciál obratu [V]
E_p	Potenciál detekce [V]
$E_{poč}$	Počáteční potenciál [V]
ECD	Detektor elektronového záchytu (Electron capture detector)
ED	Elektrochemická detekce
ELISA	Imunoenzymatický test (Enzyme-linked immunosorbent assay)
EPA	Agentura pro ochranu životního prostředí (Environmental Protection Agency)
EU	Evropská unie
<i>f</i>	Frekvence [Hz]
FIA	Průtoková injekční analýza
FIA-ED	Průtoková injekční analýza s elektrochemickou detekcí
F_m	Rychlost průtoku mobilní fáze [ml/min]

GC	Plynová chromatografie (Gas chromatography)
GCE	Elektroda ze skelného uhlíku (Glassy carbon electrode)
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
H-BDDE	H-terminovaná borem dopovaná diamantová elektroda
HCl	Kyselina chlorovodíková
Hg/Hg ₂ Cl ₂	Kalomelová elektroda
HPG	Osa hypotalamus-hypofýza-gonáda
HPHT	Metoda high-pressure high-temperature
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High-performance liquid chromatography)
HPLC-DAD	Vysokoučinná kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole
HPLC-MS	Vysokoučinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
IL	Iontová kapalina
I_{lim}	Limitní difuzní proud [A]
I_p	Výška pulsu [A]
j_p	Proudová hustota [μ A/mm ²]
k	Konstanta [-]
LA-MWCVD	Velkoplošný lineární anténní systém mikrovlnné chemické depozice par
LDR	Lineární dynamický rozsah
LLE	Extrakce kapalina-kapalina (Liquid-liquid extraction)
LOD	Limit detekce (Limit of detection)
LOQ	Mez stanovitelnosti (Limit of quantification)
MNP	Kovové nanočástice (Metal nanoparticles)
MONP	Nanočástice oxidů kovů
MWCNT	Vícestěnná uhlíková nanotrubička
MWCNT/CPE	Pastová elektroda z MWCNT
NOEL	Nejvyšší dávka, při které není pozorován efekt (No observed effect level)
NPD	Detektor dusík-fosfor (Nitrogen-phosphorus detector)
O-BDDE	O-terminovaná borem dopovaná diamantová elektroda
PDMS	Polydimethylsiloxan
PMT	Pyrimethanil
QuEChERS	Robustní a reprodukovatelná metoda (Quick, easy, cheap, effective, rugged, safe)

RE	Referentní elektroda (Reference electrode)
rGO	Redukovaný oxid grafenu
RSD	Relativní směrodatná odchylka (Relative standard deviation)
SIA	Sekvenční injekční analýza (Sequential enjection analysis)
SP/BDDE	Tištěný senzor s chemicky deponovanou borem dopovanou diamantovou elektrodou
SPE	Tištěný senzor (Screen-printed electrode)
SPME	Mikroextrakce na tuhou fázi (Solid phase micro extraction)
SWV	Square-wave voltametrie
t	Čas [s]
UV	Ultrafialové záření
v	Rychlost [mV/s]
V_{inj}	Objem dávkovací smyčky [μ l]
WE	Pracovní elektroda (Working electrode)
ZE	Základní elektrolyt

ÚVOD

Ochraně plodin důležitých pro obživu člověka věnovali lidé pozornost odjakživa. Již v roce 1763 byl v Anglii používán nikotinový odvar jako postřik proti mšicím. V 19. století se začal vyrábět insekticid pyrethrum, zavedlo se používání síry na ochranu vinné révy proti padlí a svinibrodské zeleně na ochranu brambor proti mandelince bramborové. Největší rozmach zažily pesticidy ve druhé polovině 20. století, kdy se začaly masově používat ve vyspělých částech světa bez ohledu na možná rizika spojená s jejich aplikací. Příčinou tohoto rozmachu bylo mimo jiné i zvyšování lidské populace a nutnost pěstovat stále větší množství plodin v co nejkratším čase. Kvůli narůstající rezistenci škůdců vůči některým hojně užívaným pesticidům, bylo vyvinuto velké množství nových látek, o jejichž možných negativních účincích nebylo známo mnoho. Z toho důvodu byly pesticidy v posledních několika desítkách let podrobeny mnoha výzkumům a jsou jednou z nejvíce prozkoumaných skupin chemických látek vůbec. U pesticidů je nutné věnovat pozornost jejich expozici do různých složek životního prostředí a následnému chování v nich. Některé látky se mohou v daném prostředí akumulovat, jiné jsou mobilní a mají schopnost snadno přecházet do dalších složek prostředí. Některé látky mohou podléhat degradaci pomocí UV záření či působením mikroorganismů za vzniku neškodných produktů, jiné ale mohou reagovat za vzniku toxických látek. Kromě disperze pesticidů a jejich osudu v životním prostředí je nutné zkoumat i jejich toxicitu pro různé živočichy a člověka. U mnoha látek bylo zjištěno, že se mohou chovat jako endokrinní disruptory, karcinogeny či snižovat biodiverzitu a mít fatální dopad na živočišné druhy, které člověk k životu potřebuje. Závěry těchto výzkumů vedou v současnosti ke stále striktnější legislativě spojené s množstvím a způsobem používání pesticidů a zakazování dříve běžně užívaných látek [1–3].

Z celkového množství celosvětově používaných pesticidů zauímají největší část herbicidy – 65 %, na druhém místě stojí fungicidy – 22 %. Jedním ze známých fungicidů je cyprodinil, který se používá k ochraně vinné révy, obilovin, ovoce a zeleniny před onemocněními způsobenými houbami. Podle Eurostatu, statistického úřadu Evropské Unie, patří cyprodinil v současnosti k nejpoužívanějším fungicidům na ochranu ovocných stromů na území států EU. Nejvíce se ho každoročně spotřebuje v Litvě, Lotyšsku a Slovinsku. V ČR se ho ročně aplikuje bezmála 8 tun. Do životního prostředí se cyprodinil kromě samotné aplikace může dostávat i nevhodnou manipulací a likvidací [4, 5].

Fungicidy, respektive pesticidy jsou součástí civilizovaného světa a není možné zcela zabránit jejich pronikání do životního prostředí a potravního řetězce, ale je nutné mít k dispozici

jednoduché a citlivé analytické metody pro jejich sledování. Tyto metody se v praxi využívají k detekci různých typů pesticidních látek v jednotlivých složkách životního prostředí a plodinách, které jsou látkám během postřiků vystaveny, ale rovněž při kontrole kvality komerčně dostupných přípravků. Běžně se pesticidní látky nacházejí v ošetřovaných plodinách, půdě a vodě ve stopovém množství a u vyvíjených analytických metod je kladen důraz na citlivost metody a reprodukovatelnost výsledků [2].

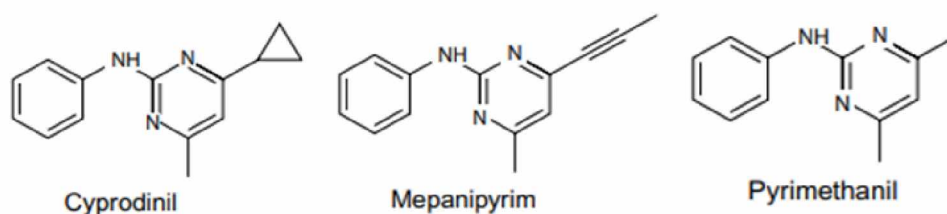
Tato diplomová práce se zaměřuje na stanovení fungicidu cyprodinilu s využitím voltametrie a průtokové injekční analýzy s elektrochemickou detekcí. Cílem práce bylo prostudovat voltametrické chování fungicidu na borem dopované diamantové elektrodě a tištěných senzorech s borem dopovanou diamantovou pracovní elektrodou a navrhnout optimální podmínky jeho voltametrického stanovení. Dalším cílem byla aplikace tištěných senzorů v průtokové cele a vývoj metody stanovení cyprodinilu s využitím průtokové injekční analýzy s elektrochemickou detekcí. Všechny vyvinuté metody by měly být na závěr aplikovány při analýze praktických vzorků přírodní vody a pesticidních přípravků.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Cyprodinil

1.1.1 Anilinopyrimidinové fungicidy

Anilinopyrimidiny jsou chemickou třídou fungicidů, které jsou vysoce účinné proti širokému spektru hub. V současné době jsou na trhu dostupné tři druhy: cyprodinil, mepanipyrim a pyrimethanil. Všechny mají podobnou strukturu a liší se pouze substituentem v poloze 4 pyrimidinového kruhu, jak je vidět na Obrázku 1. Substituentem u cyprodinilu je cyklopropylová skupina, u mepanipyrimu 1-propynylová skupina a methylová skupina u pyrimethanilu [5, 6].



Obrázek 1 Strukturní vzorce anilinopyrimidinových fungicidů [1]

Biologický způsob účinku této skupiny fungicidů zahrnuje inhibici biosyntézy methioninu a sekrece hydrolytických enzymů u hub. Rozsáhlé terénní sledování prokázalo spolehlivou účinnost anilinopyrimidinových přípravků po mnoho let a nebyly zjištěny žádné případy rezistence v komerčních podmínkách u všech klíčových cílových patogenů, včetně plísně šedé a původci strupovitosti *Venturia inaequalis* [5].

1.1.2 Cyprodinil

Cyprodinil (CPD, 4-cyklopropyl-6-metyl-N-fenylpyrimidin-2-amin, CAS: 121552-61-2) je širokospektrální fungicid, který se používá v zemědělství k ochraně ovocných rostlin, vinné révy, obilovin a zeleniny před velkým množstvím patogenů. Aplikuje se na listy rostlin buď v podobě vodných roztoků nebo emulgovatelných koncentrátů, pro moření osiva je využíván tekutý koncentrát. Komerčně dostupný je v podobě přípravků Chorus, Switch, Kayak a Unix. Primární metabolickou drahou CPD je hydroxylace na methylové skupině a fenylovém a pyrimidinovém kruhu. Cyklopropylová část je vůči metabolickým modifikacím odolná [5–7].

CPD je bílá krystalická pevná látka s molární hmotností 225,3 g/mol a bodem tání 75,9 °C. Jeho rozpustnost ve vodě při 25 °C je 20 mg/l (pH 5,0), 13 mg/l (pH 7,0) a 15 mg/l (pH 9,0). Je dobře rozpustný ve většině organických rozpouštědlech. Rozdělovací koeficient (oktanol/voda) $\log K_{ow} = 4$ (pH 5,0-9,0). pK_a CPD má hodnotu 4,44. Působením UV záření se ve vodě rychle rozkládá. V půdě se rozkládá v řádu měsíců nejčastěji pomocí aerobní biotransformace. V různých složkách životního prostředí vykazuje různou perzistenci, silnější perzistenci vykazuje v sedimentech a v systémech sediment/voda, naopak v půdě byla sledována slabší perzistence. Obecně má CPD poměrně silnou sorpční schopnost na půdu, ale následná pohyblivost v ní je nízká [5, 7, 8].

Cyprodinil se dostává do vodního prostředí a půd především prostřednictvím dešťových srážek a je znečišťující látkou životního prostředí, která je kvůli svým potenciálně škodlivým účinkům na zdraví vodních organismů intenzivně zkoumána. V rámci několika studií na zebřičkách bylo zjištěno, že akutní expozice embryí zebřiček vede k vývojové toxicitě embryí, zatímco chronická expozice environmentálně relevantním koncentracím vede k behaviorálním abnormalitám u dospělých zebřiček. Dospělé samice zebřiček vykazovaly sníženou sexuální atraktivitu, snížený podíl primordiálních folikulů ve vaječníku a produkovaly potomstvo se zvýšenou úmrtností a deformacemi. Dále bylo zjištěno, že akutní expozice dospělých zebřiček cyprodinilu po dobu 96 h může narušit genovou expresi na ose hypotalamus-hypofýza-gonády (HPG), což naznačuje, že je cyprodinil potenciálně reprodukčně toxický [9, 10].

EPA, Agentura pro ochranu životního prostředí, se zabývala CPD z hlediska toxicity na zvířatech a jeho možným dopadem na životní prostředí. Podle EPA nese CPD relativně nízké riziko toxicity pro člověka. Bylo prokázáno, že je prakticky netoxický pro ptáky, malé savce, včely a žížaly. Pro ryby je středně toxický, pro sladkovodní a mořské bezobratlé živočichy je vysoce toxický. Z tohoto důvodu je nutno při postřikování plodin v blízkosti vodních oblastí dodržovat předepsaná opatření, např. nepoužívat postřiky do vzdálenosti 22 m od vodních ploch, vynechat postřik při nevhodných povětrnostních podmínkách nebo vynechat postřik během teplotní inverze [8].

CPD byl dále testován na bodovou mutaci, chromozomovou aberaci a opravu DNA. Všechny testy vyšly negativně a bylo prokázáno, že CPD pravděpodobně nezpůsobuje dědičné genetické vady. Dále bylo zjištěno, že nemá teratogenní účinky, tedy nepoškozuje plod v těle matky. V rámci vývojové toxicity byla provedena studie na králíciích, u nichž ani při podávání nejvyšší testované dávky 400 mg/kg nebyla pozorována žádná vývojová toxicita. CPD je klasifikován

jako "Not Likely" karcinogen na základě absence onkogenních účinků u všech testovaných druhů zvířat (králíci, krysy, psi), tzn. není karcinogenní. Referenční dávka pro CPD je 0,0375 mg/kg/den. Tato hodnota je založena na NOEL (koncentrace, při níž nejsou pozorovatelné účinky látky) 3,75 mg/kg/den v chronické studii krmení krys s bezpečnostním faktorem 100. Dále byla provedena analýza chronické expozice pomocí dat o ošetřovaných plodinách pomocí CPD a byl odhadnut maximální teoretický příjem reziduí CPD pro obecnou populaci. Analýza ukázala, že expozice z mandlí, hroznů, plodů peckovin by činila maximálně 5,8 % z referenční dávky [8].

1.2 Metody stanovení cyprodinilu

Jak již bylo zmíněno, CPD se řadí do skupiny anilinopyrimidinových fungicidů. Pro sledování množství těchto látek v životním prostředí, ovoci a zelenině bylo vyvinuto několik spolehlivých analytických metod. Mezi nejčastěji užívané metody patří plynová chromatografie (GC) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) v kombinaci s různými detektory [11–21]. Chromatografické metody jsou obecně hojně využívány při analýze pesticidů, a to jak v jednoduchých, tak i složitých vzorcích, ve kterých se nachází více látek najednou v komplexní matici. Kromě chromatografických metod byly popsány rovněž metody imunoanalytické [22, 23]. Přestože se v současnosti stále větší pozornost upíná k metodám elektroanalytickým, které jsou jednoduché, levné a rychlé, a umožňují využití v přenosných terénních analyzátoch, v literatuře byla popsána pouze jedna voltametrická metoda stanovení CPD [24].

1.2.1 Chromatografické stanovení

Vývojem chromatografických metod pro analýzu anilinopyrimidinů se zabývalo mnoho studií. Před samotnou analýzou je nutno vzorek upravit, tedy extrahovat a zakoncentrovat. Hlavní extrakční techniky zahrnují mikroextrakci tuhou fází (SPME) a extrakci kapalina-kapalina (LLE) s využitím organických rozpouštědel. Tyto předúpravy vzorků jsou často zdlouhavé a zvyšují riziko ztráty vzorku a kontaminace. I přesto je ale popsáno několik spolehlivých a běžně používaných metod [11, 14, 16–19, 21].

Jednou z konkrétních možností stanovení anilinopyrimidinů je mikroextrakce na tuhou fázi a následná analýza pomocí GC. Tato metoda byla vyvinuta v rámci analýzy reziduí CPD a fludioxonilu v borůvkách. Jako sorbent, resp. tuhá fáze, byl vybrán polydimethylsiloxan

(PDMS). Metoda byla selektivní s vysokou přesností a citlivostí. Limit detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) byly 1,2 a 3,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pro CPD [17]. Zástupci anilinopyrimidinů byly analyzovány pomocí GC ve vzorcích bílého vína. Pro extrakci látek z vína byla opět použita SPME, ale byl použit jiný materiál vlákna, a to divinylbenzen-karbox-polydimethylsiloxan. Po extrakci následovala analýza pomocí GC-MS, tedy plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Navržená metoda prokázala dobrou opakovatelnost ($\text{RSD} = 5,0 \%$) s LOD pro CDP 0,1 mg/l. SPME se stala populární při analýze organických sloučenin, protože kombinuje odběr vzorku a zakoncentrování v jediném kroku. Nevyžaduje přítomnost rozpouštědel ani složité přístroje a poskytuje dobré výsledky při širokém rozpětí koncentrací analytů. Navíc desorpce může probíhat přímo v dávkovacím prostoru GC [19].

Další možností stanovení anilinopyrimidinů je extrakce látek do kapaliny a následná analýza pomocí HPLC. Nejčastěji používaná rozpouštědla jsou acetonitril, hexan a dichlormethan, z nichž dichlormethan se jeví jako nejvhodnější pro CPD [18]. Nedávno byla například vyvinuta metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS) pro stanovení více anilinopyrimidinů současně. Stanovovanými látkami byl pyrimetamil, CPD a mepanipyrim v ovoci a zelenině. Pro tyto účely byla optimalizována procedura QuEChERS. Je to metoda disperzní extrakce tuhými fázemi, která byla vyvinuta pro extrakci a předčištění vzorků před analýzou pesticidů v ovoci a zelenině. LOD byly nižší než 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, LOQ nepřesahovaly 1,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pro všechny studované látky. Tato technika má vynikající výsledky v selektivitě a spolehlivosti při výrazném snížení doby analýzy [13].

Kromě vhodné extrakční techniky je nutné zvolit i spolehlivou detekční metodu. Existuje velké množství detektorů používaných v kombinaci s GC a HPLC. Při stanovení reziduí anilinopyrimidinů v ovoci, zelenině a vodě se jich osvědčilo pouze několik. Velmi často používaným je hmotnostní detektor, jež se používá ve spojení s GC i LC [11, 14, 15, 19, 21]. Příkladem je HPLC spřažená s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS/MS) vyvinutá pro stanovení reziduí několika pesticidů najednou v různých matricích. Tato metoda vykazuje výbornou selektivitu a vysokou citlivost pro analýzu anilinopyrimidinů [11]. Na analýzu těchto látek byla použita i HPLC s nejrozšířenějším detektorem diodového pole (HPLC-DAD) [18]. Ve spojení s GC byly použity např. detektor elektronového záchytu (ECD) a detektor dusík-fosfor (NPD). Oba poskytovaly reprodukovatelné výsledky při analýze reziduí pesticidů v ovoci a zelenině [15, 17, 19].

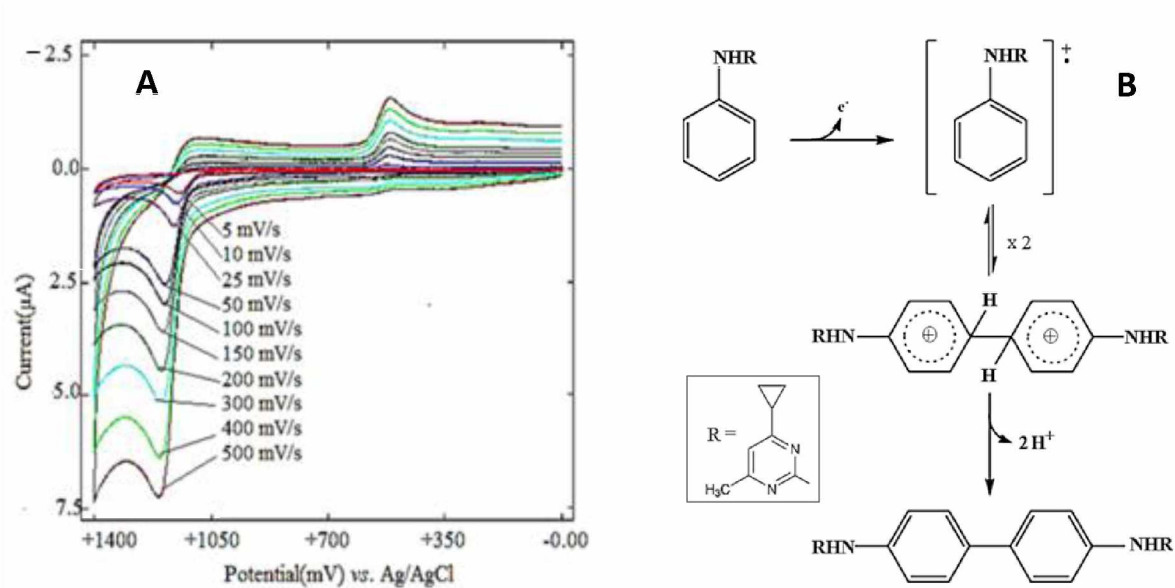
1.2.2 Imunochemické stanovení

Imunochemické metody, jako je enzymový test ELISA (z angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*), se využívají pro rychlou a jednoduchou analýzu některých pesticidů v komplexních potravinových maticích. Imunoanalýza je účinným nástrojem pro rychlé screeniny stovek vzorků pomocí jednoduchého testu [25]. Princip spočívá v imunoenzymatické reakci. Enzym je chemicky (kovalentně) vázán buď na antigen nebo protilátku, čímž vznikne enzymový konjugát. Enzym katalyzuje chemickou přeměnu bezbarvého pevného substrátu (polypropylen, polystyrem, polyvinyl), který je přidán do reakční směsi, na barevný produkt. Intenzita zbarvení je měřena spektrofotometricky a je úměrná koncentraci stanovované látky [26].

Autoři studie [22] vyvinuli vysoce citlivou imunochemickou metodu na stanovení pyrimethanilu, cyprodinilu a mepanipyrimu využívající ELISA test. Metodu testovali na komerčních vzorcích bílého a červeného vína a získali následující základní statistické údaje: LOQ = 1,0 µg/l, relativní směrodatná odchylka (RSD) < 20 %, výtěžnost 93,1-114,4 % [22]. Autoři další studie [23] využili test ELISA na stanovení pesticidu pyrimethanilu ve vzorcích několika druhů ovoce a zeleniny a získali následující statistické údaje: LOD = 0,5 µg/l, RSD < 20 %. Hodnoty LOQ u rajčat a okurek činily 5,0 µg/kg, u jahod 100 µg/kg. Výsledky této imunochemické metody byly porovnány s výsledky získanými pomocí HPLC-MS a bylo dosaženo statisticky srovnatelných hodnot [23].

1.2.3 Elektrochemické stanovení

Elektrochemické chování CPD bylo v literatuře popsáno pouze v jedné práci [24]. Jako pracovní elektroda byla zvolena uhlíková pastová elektroda (CPE) modifikovaná vícestěnnými uhlíkovými nanotrubicemi (MWCNT/CPE). Referentní elektrodou byla argentchloridová elektroda (Ag/AgCl (KCl)) a pomocnou elektrodou platinový drátek. CPD poskytoval oxidační proudovou odezvu zaznamenanou pomocí CV při potenciálu 1160 mV a menší redukční pík při potenciálu 510 mV (obrázek 2A). Dalšími experimenty autoři potvrdili, že redukční pík představuje odezvu odpovídající redukci oxidačního produktu CPD a jedná se tedy o quazi-reverzibilní reakci. V rámci této práce byl rovněž navržen mechanismus elektrochemické oxidace studovaného fungicidu, který je uveden na obrázku 2B. V prvním kroku vzniká kationtový radikál, který podléhá dimerizaci za vzniku benزيدinového derivátu [24].



Obrázek 2 A – Cyklický voltamogram CPD zaznamenaný na MWCNT/CPE v závislosti na rychlosti polarizace (BRB (pH 2,0), $c_{CPD} = 5,0 \mu\text{g/mL}$) a **B** – Mechanismus elektrochemické oxidace CPD, převzato z [24] a upraveno

Pro stanovení CPD autoři využili square wave voltametrii (SWV) s optimalizovanými parametry, pracovali v prostředí BRB (pH 2,0) a získali základní statistické parametry, jako lineární dynamický rozsah (LDR) 0,25-4,0 mg/l, LOD = 0,076 mg/l, LOQ = 0,25 mg/l. Navrženou metodu autoři úspěšně aplikovali při analýze reálných vzorků, kterými byla vodovodní voda a ovocný džus, obojí s přidavkem standardního roztoku CPD na požadovanou koncentraci (1,0-5,0 mg/l). Výtěžnost stanovení se pohybovala od 97 do 101 % a RSD v rozsahu 0,65-6,25 % [24].

Dále byly voltametrické metody použity v několika studiích pro stanovení pyrimethanilu (PMT), který patří do stejné skupiny aniliny-pyrimidinových fungicidů jako CPD. Autoři první studie použili elektrochemický senzor založený na elektrodě ze skelného uhlíku (GCE) modifikované kombinací MWCNT s β -cyklodextrinem vloženým do polyanilinového filmu. Vyvinutou metodu testovali na vzorcích ovoce. Ke zkoumání elektrochemických vlastností PMT byla využita CV. Měření probíhalo v tříelektrodeovém systému: pracovní elektroda (WE) – modifikovaná GCE, referentní elektroda (RE) – Ag/AgCl (KCl), pomocná elektroda (CE) – Pt drátek. Všechny roztoky s PMT byly připraveny v ethanolu. Jako elektrolyt byl používán acetátový pufr o pH 4,0, jelikož v něm PMT poskytoval nejvyšší pík. Proudová odezva odpovídající oxidaci PMT byla zaznamenána při potenciálu 0,95 V, přičemž při zpětném skenu nebyl pozorován žádný redukční pík a jednalo se tedy o reakci ireverzibilní. Po optimalizaci

metody CV získali autoři základní statistické parametry, LDR 10-80 μM , LOD = 1,04 μM , RSD = 2,4 %. Výsledky získané navrženou voltametrickou metodou byly v souladu s těmi získanými pomocí HPLC [27].

Autoři druhé studie použili k analýze GCE modifikovanou MWCNT a iontovou kapalinou 1-butyl-3-methylimidazolhexafluorofosfátem. Vyvinutou metodu testovali na vzorcích ovoce a říční vody. Elektrochemické chování PMT bylo studováno opět pomocí CV a pro jeho stanovení byla použita diferenční pulzní voltmetrie (DPV). Měření probíhala v tříelektrodovém systému jako v předchozí studii, ale RE byla kalomelová. Jako základní elektrolyt byl používán fosfátový pufr o pH 6,0. Opět byl zaznamenán pouze oxidační pík při potenciálu 0,92 V a jednalo se tedy o ireverzibilní reakci. Po optimalizaci parametrů DPV byly získány tyto statistické údaje: LDR 0,1-100 μM , LOD = 0,016 μM , RSD = 4,6 %. Vyvinutá metoda byla otestována na vzorcích ovoce a říční vody a výtěžnost stanovení se pohybovala od 96 do 110 % [28].

Autoři třetí studie použili ke stanovení GCE potaženou speciálním filmem $\text{NiCo}_2\text{O}_4/\text{rGO}/\text{IL}$. Jedná se o kompozitní materiál složený z nanomateriálů z komplexních kovových oxidů (NiCo_2O_4), redukovaného oxidu grafenu (rGO) a iontové kapaliny (IL) [OMIM]PF₆. Měření opět probíhala s využitím referentní Ag/AgCl (KCl) a Pt pomocné elektrody. Jako elektrolyt byl použit pufr (Na_2HPO_4 -kyselina citronová) o pH 4,0. Při optimálních podmínkách DPV byly zaznamenány dva lineární rozsahy 0,1-10 a 20-140 μM , LOD = 0,011 μM , RSD = 4,2 %. Navržená metoda byla úspěšně aplikována při detekci PMT v mořské vodě, říční vodě, ovoci a zelenině s výtěžností v rozmezí od 93 do 105 % [29].

1.3 Voltmetrie

Historicky se elektrochemická metoda zvaná voltmetrie vyvinula díky objevu polarografie v roce 1922 českým chemikem Jaroslavem Heyrovským (Obrázek 3), který za tento objev později získal Nobelovu cenu za chemii. Významných pokroků ve voltametrických metodách bylo dosaženo v 60. a 70. letech 20. století, během kterých došlo ke zlepšení teoretických znalostí, instrumentace i metodiky voltametrie. To následně vedlo ke zvýšení citlivosti a rozšíření repertoáru známých elektroanalytických metod. Díky těmto pokrokům a používání levného instrumentálního vybavení patří voltametrické metody v současné době k hojně se rozvíjejícím analytickým metodám [30, 31].

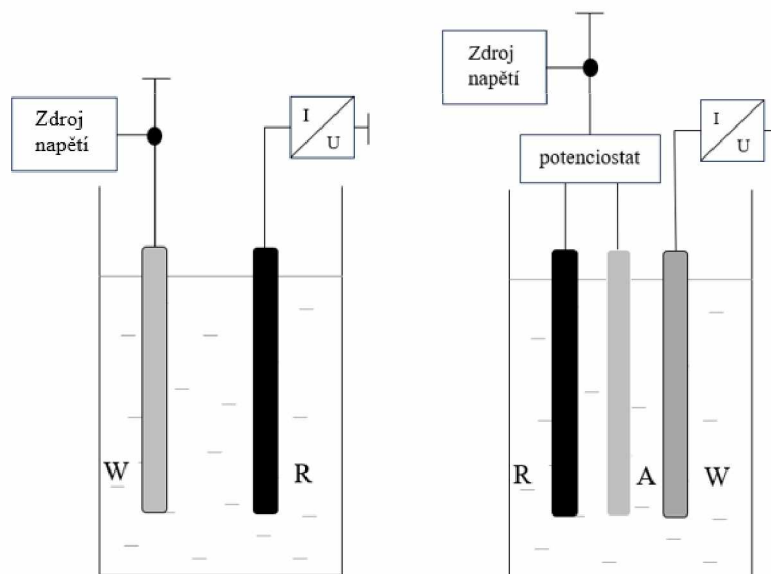


Obrázek 3 Jaroslav Heyrovský, držitel Nobelovy ceny za objev polarografie

Voltametrie je charakteristická tím, že se při ní vkládá potenciál na elektrodu s malým povrchem a měří se výsledný proud protékající elektrochemickým článkem. Tato měřená závislost se znázorňuje voltametrickou (polarografickou) křivkou. Voltametrie je tzv. aktivní metoda, protože vkládaný potenciál vede ke změně koncentrace elektroaktivních látek na povrchu elektrody v důsledku jejich redukce či oxidace. Voltametrický analyzátor je tvořen dvěma nebo třemi elektrodami ponořenými do roztoku elektrolytu. Ve dvou elektrodovém uspořádání se na pracovní elektrodu vkládá potenciál proměnlivý v čase a sleduje se velikost proudu protékajícího mezi elektrodami. Ve tříelektrodovém uspořádání je též na pracovní elektrodu vkládán lineárně rostoucí potenciál, proud protéká mezi pomocnou a pracovní elektrodou a potenciál je měřen mezi pracovní a referenční elektrodou. Schematicky jsou obě uspořádání zobrazena na obrázku 4 [32, 33].

Výběr materiálu pracovních elektrod závisí na potenciálové oblasti, ve které bude probíhat analýza látky, na použitém rozpouštědle a čistotě materiálu. Pracovními elektrodami jsou nejčastěji tuhé elektrody vyrobené z různých kovových materiálů (platina, zlato, stříbro aj.) nebo uhlíku. Uhlíkové elektrody mohou být různého typu, např. ze skelného uhlíku, grafitového nebo pyrolytického uhlíku, z uhlíkových vláken a dalších nanomateriálů, či uhlíkové pasty. Kromě tuhých elektrod se zejména v minulosti hojně využívaly elektrody kapalné, konkrétně rtuťová kapková elektroda, která má typické použití v polarografii. Výhodami rtuti je hladkost

jejího povrchu, silně záporné hodnoty vodíkového přepětí a reprodukovatelnost měření. Avšak kvůli jejím negativním dopadům na životní prostředí se od práce se rtuť ustupuje. Kromě těchto klasických pracovních elektrod se neustále vyvíjejí nové typy elektrod s využitím nových elektrodoých materiálů a jejich modifikace s cílem zvýšit citlivost a selektivitu voltametrické analýzy [30, 33, 34]. Jedním z takových materiálů je diamantový film dopovaný borem, který je součástí tzv. borem dopovaných diamantových elektrod (BDDE). Tyto elektrody vykazují vysokou chemickou a mechanickou stabilitu a poskytují široké potenciálové okno [35].



Obrázek 4 Schéma dvou a tříelektrodového uspořádání ve voltametrii; *W* – pracovní, *R* – referenční, *A* – pomocná elektroda; převzato z [33] a upraveno

Referenční elektrody mají konstantní potenciál, který nezávisí na koncentraci analytu a je k nim vztahován potenciál pracovních elektrod. Obvykle jsou to tzv. elektrody II. druhu, které mají podobu kovu potaženého vrstvou své málo rozpustné soli a ponořené do roztoku aniontů této soli. Mezi nejčastěji používané referenční elektrody patří Ag/AgCl (KCl) a kalomelová elektroda ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ (KCl)). Pomocná elektroda slouží k uzavření elektrického obvodu a k tomu, aby mezi ní a pracovní elektrodou protékal elektrický proud. Pomocné elektrody jsou z inertních materiálů, nejčastěji mají podobu platinového plíšku či drátku [36–38].

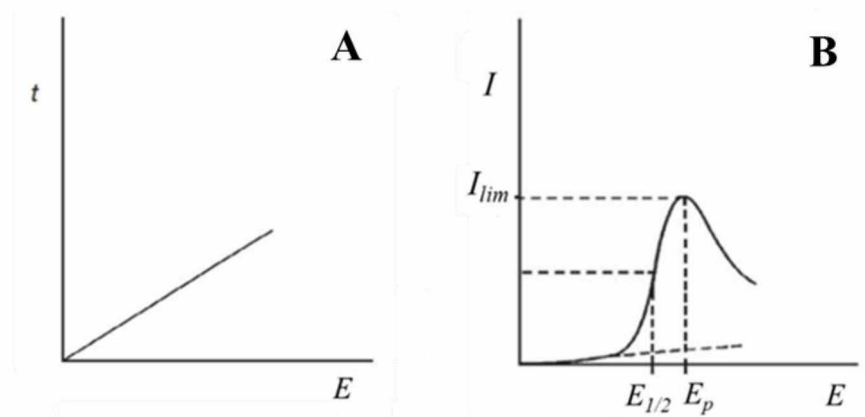
Mezi výhody voltametrických metod patří vysoká citlivost s širokým lineárním rozsahem koncentrací jak pro anorganické, tak organické látky (10^{-12} až 10^{-1} M), velké množství vhodných rozpouštědel a elektrolytů, rychlost analýzy, možnost určení několika analytů současně. Voltametrické metody lze použít při kvantitativním stanovení rozpuštěných

anorganických a organických látek, při sledování oxidačních a redukčních procesů v médiích, adsorpčních procesů na površích elektrod. Dále jsou tyto metody aplikovány při stanovení látek ve farmaceutickém průmyslu a ve spojení s HPLC jsou jako součást elektrochemických detektorů účinnými nástroji pro analýzu komplexních směsí [32, 34, 39].

1.3.1 Voltametrické metody

1.3.1.1 DC voltametrie

Stacionární voltametrie (DCV, z *angl. direct current voltammetry*) je metoda, při níž se potenciál vkládaný na WE mění lineárně s časem, jak je znázorněno na obrázku 5A. DCV je považována za metodu stacionární při konstantním potenciálu, jelikož rychlost změny potenciálu je ve srovnání s rychlostí ustavování rovnováhy malá. Protékající proud je zaznamenáván po celou dobu analýzy a výsledná závislost proudu na potenciálu má typický tvar píku, jak je ukázáno na obrázku 5B, na kterém jsou uvedeny i základní parametry voltametrické analýzy [40, 41].



Obrázek 5 DCV; A – průběh vkládaného potenciálu; B – voltamogram [41]

Poloha vlny na obrázku 5B je charakterizována půlvlnovým potenciálem ($E_{1/2}$), při kterém článkem protéká polovina limitního difuzního proudu (I_{lim}). $E_{1/2}$ je kvalitativním ukazatelem, který slouží k identifikaci analyzovaných látek. Pokud je v analyzované matrici více látek a mají dostatečně odlišné hodnoty $E_{1/2}$, pak je lze stanovit současně v jednom měření a na voltamogramu bude vyobrazeno několik za sebou jdoucích vln. I_{lim} je ukazatelem kvantitativním a je přímo úměrný koncentraci analyzovaných látek [41–43]. Tento vztah je matematicky vyjádřen pomocí zjednodušené Ilkovičovy rovnice (1):

$$I_{lim} = k \cdot c, \quad (1)$$

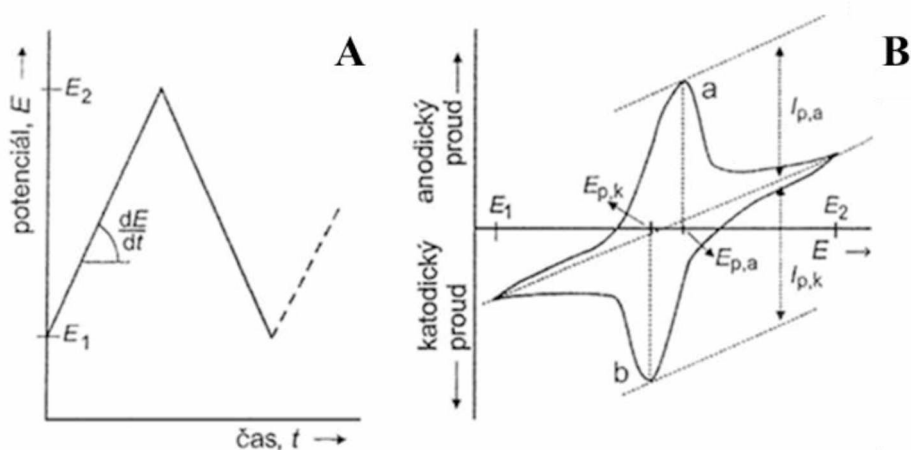
kde:

- I_{lim} limitní difuzní proud [mA],
- k konstanta,
- c koncentrace analytu [M].

Hodnota konstanty závisí na typu pracovní elektrody a způsobu měření voltametrické křivky [41–44].

1.3.1.2 Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie (CV) je metoda používaná pro studium redoxních dějů, jimž podléhají elektrochemicky aktivní látky a má význam především ve vědecké sféře. Díky cyklickým voltamogramům je možné studovat průběh katodických a anodických křivek, ze kterých pak lze usuzovat na reverzibilitu a mechanismus elektrodové reakce. Princip metody spočívá v postupném nárůstu potenciálu na WE od mezní hodnoty E_1 k mezní hodnotě E_2 a zpět do počátečního bodu E_1 . Průběh potenciálu vkládaného v závislosti na čase na pracovní elektrodu a podoba voltametrické křivky typická pro CV jsou znázorněny na obrázku 6 [32, 42].

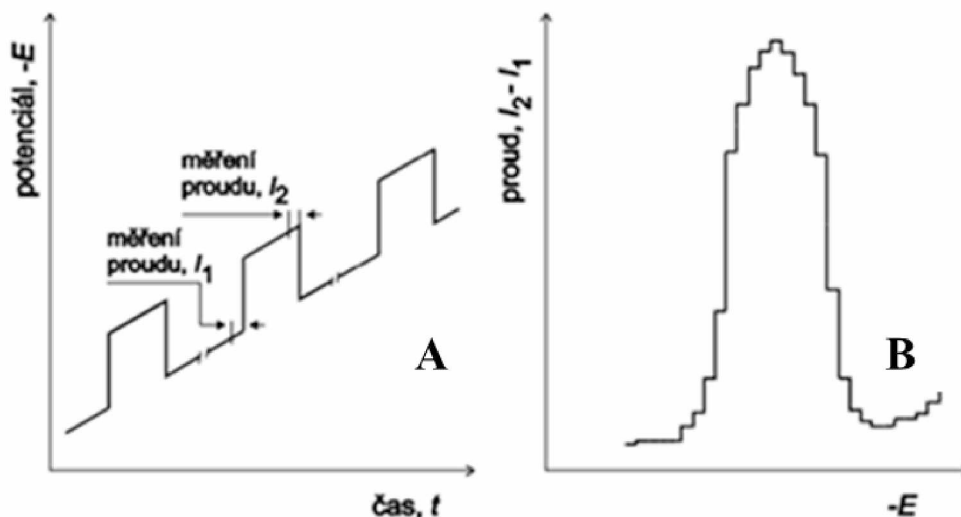


Obrázek 6 CV; A – průběh vkládaného potenciálu; B – cyklický voltamogram [42]

1.3.1.3 Diferenční pulzní voltametrie

Z pulzních metod má pro praxi největší význam diferenčně pulzní voltametrie (DPV), která je z nich i nejpropracovanější. Uplatnění nachází při analýze organických i anorganických látek. Při DPV se na potenciál, který se mění lineárně s časem, vkládají napěťové pulzy o amplitudě 10-100 mV. Jednotlivé pulzy trvají řádově desítky milisekund. Během analýzy je měřen proud pouze v určitých časových úsecích, a to těsně před vložením pulsu a na jeho konci, výsledný proud je získán jako rozdíl (diference) těchto dvou hodnot. Závislost rozdílu těchto dvou proudů na potenciálu má tvar píku, jehož výška závisí na koncentraci stanovované látky [30, 44, 45].

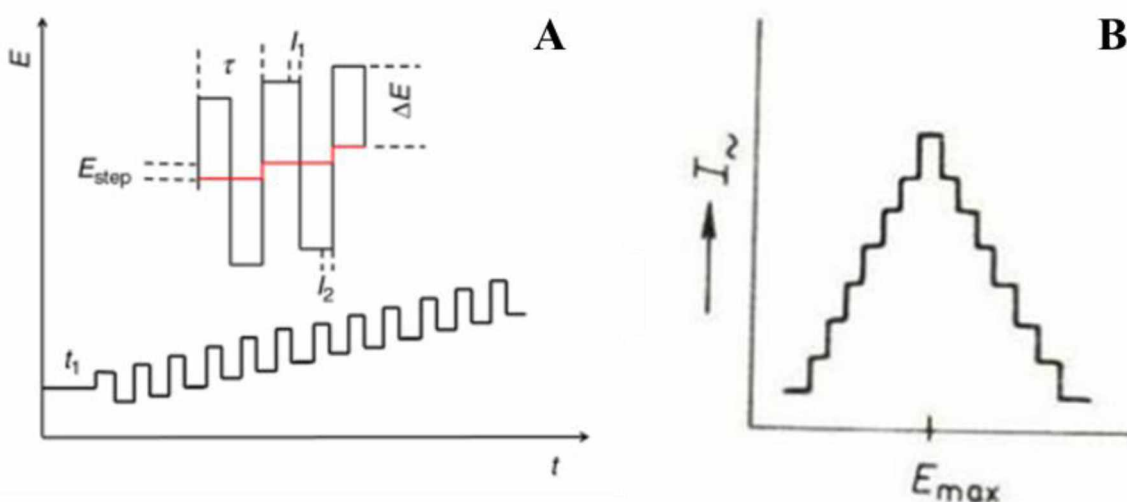
Grafické znázornění průběhu potenciálu vkládaného na WE s označením míst, ve kterých je měřen proud, lze vidět na obrázku 7 spolu s tvarem voltametrické křivky typickým pro DPV.



Obrázek 7 DPV; A – průběh vkládaného potenciálu; B – voltametrická křivka [45]

1.3.1.4 Square wave voltametrie

Square wave voltametrie (SWV) patří k metodám se střídavou složkou potenciálu. Během analýzy se na WE vkládá potenciál, který se lineárně mění s časem a je modulován střídavým napětím pravoúhlého tvaru o amplitudě v desítkách mV. Proud je měřen stejně jako u DPV v krátkém časovém intervalu a v případě SWV je to pouze na konci vkládaného pulsu. Výsledkem analýzy je voltamogram ve tvaru píku zobrazený na obrázku 8 [30, 42].



Obrázek 8 SWV; A – průběh vkládaného potenciálu [46]; B – voltametrická křivka [42]

1.3.2 Borem-dopovaná diamantová elektroda

Diamant je přírodní nerost, který má některé výhodné vlastnosti, jako je vysoká tvrdost a vysoká tepelná vodivost. Diamant je elektrickým izolantem a nelze ho v přírodním stavu použít jako elektrodový materiál, proto se používají různé příměsi, pomocí kterých je diamant dopován a stává se tak vodivým. Mezi používané příměsi patří fosfor a dusík, které po styku s diamantem vytvoří tzv. n-polovodič. Nejčastěji používanou příměsí je bor, díky němuž dojde k vytvoření tzv. p-polovodiče, známého též jako borem-dopovaný diamant (BDD). Bor se do diamantového materiálu zavádí pomocí směsi plynů, jejíž součástí je sloučenina obsahující bor (např. diboran, trimethylboran) [47–49].

Výroba diamantových elektrod je realizována vnášením diamantu na substrát za určitých fyzikálních podmínek. Před depozicí diamantu musí být substrát předzpracován aktivací povrchu pomocí diamantových nanočástic. Tyto nanočástice fungují jako zárodky pro následný růst tenkého diamantového filmu. Tloušťka filmu se pohybuje obvykle mezi 1 a 10 nm. Tepelně stabilním substrátem pro uložení dopovaného diamantového filmu je obvykle křemík nebo kov (titan, tantal, wolfram, molybden, niob). Výhodou křemíku jako substrátu je tvorba dokonalejších filmů bez pórů, zatímco výhoda kovových substrátů tkví v možnosti výroby elektrod velkého plošného rozsahu. Dalšími využívanými substrátovými materiály je grafit a skelný uhlík [50, 51].

Pro výrobu dopovaných diamantových materiálů byly vyvinuty dvě hlavní metody, chemická depozice z plynné fáze (CVD) a metoda „high-pressure high-temperature“ (HPHT). Další ale méně používanou metodou je vakuové žíhání nedopovaného diamantu. Nejvíce využívaná je metoda CVD. Reakce plynné směsi může být aktivována plazmou (mikrovlnná CVD) nebo tepelně (CVD horkým vláknem). Metoda HPHT probíhá za vysokých teplot a tlaků, při nichž dochází k zavedení a imobilizaci diamantových částic (100–200 μm) do vodivých nebo nevodivých substrátů [48, 52].

BDDE mají několik výhodných vlastností v porovnání s konvenčními elektrodoými materiály jako jsou kovy či uhlík. Jednou z nich je vysoká hodnota přepětí ve vodných roztocích pro vznik kyslíku i vodíku. To má za následek velmi široké potenciálové okno 3,0-3,5 V. Dále mají BDDE nízkou kapacitu, vysokou elektrochemickou stabilitu a nedochází na nich k tvorbě povrchových oxidů. BDDE mají také nevýhody a těmi jsou poměrně nízká elektrokatalytická aktivita a selektivita. K odstranění těchto nedostatků se využívá úprav povrchu diamantu pomocí různých modifikací. Nejčastěji používanou modifikací povrchu BDDE je terminace, a

to buď O-terminace, anebo H-terminace. Terminace je dosahováno elektrochemicky vložení kladných (O-) nebo záporných (H-) potenciálů. Tento postup je též nazýván jako anodická, resp. katodická předúprava BDDE. Komerčně vyráběné BDDE jsou obvykle terminovány vodíkem. Povrch H-BDDE je kladně nabitý a zpočátku hydrofobní. O-terminace BDDE lze dosáhnout i jinými způsoby, např. kyslíkovou plazmou, radikálovou oxidací, vařením v silných kyselinách či oxidačních činidlech, ale tyto postupy nejsou tak často využívány jako elektrochemická úprava. Povrch O-BDDE je negativně nabitý, silně hydrofobní a má dlouhodobou stabilitu na vzduchu. Výhodou O-BDDE je širší potenciálové okno a vyšší stabilita povrchu proti zanesení [48, 53–56].

Povrch BDDE lze modifikovat i leštěním elektrody, při němž dojde k vytvoření C-terminovaného povrchu BDDE, ve kterém převažují C-C a C=C skupiny. Takto modifikovaná BDDE má malou náchylnost k zanášení, nízký limit detekce a široké potenciálové okno. Další používanou modifikací povrchu BDDE je jeho úprava kovovými nanočásticemi (MNP). Jedná se o jednoduchý způsob, jak zvýšit rychlost přenosu náboje, podpořit elektrokatalytické vlastnosti a zvětšit aktivní povrch elektrody, zvýšit citlivost a selektivitu. Tato úprava je uskutečňována elektrodepozicí MNP z roztoků solí kovů, fyzikální depozicí nebo implantací iontů. Povrch BDDE může být modifikován též pomocí NP oxidů kovů (MONP). V některých případech je použití MONP upřednostňováno před MNP kvůli lepší stabilitě během anodických procesů. Využívanými modifikátory jsou například oxidy ruthenia a iridia, které jsou nanášeny v podobě roztoku na povrch BDDE a ten je následně podroben tepelné úpravě. Dalšími často používanými modifikátory jsou oxidy zinku, mědi, titanu a železa. Kromě kovových částic se k modifikacím povrchu BDDE mohou využívat i organické sloučeniny, jejich filmy a biomolekuly. Těchto úprav je dosahováno pomocí fyzikální adsorpce či chemisorpce. Díky sorpci vznikne na povrchu BDDE chemický film, který tvoří ideálně jednovrstvý povlak. Takto modifikované BDDE jsou využívány například při stanovení zbytků léčiv, hormonů a fenolických látek. Další možností je modifikace povrchu BDDE uhlíkovými materiály (grafen, uhlíkové nanotrubičky). Uhlíkové materiály přinášejí výhody jako je velký aktivní povrch, vysoká elektrická vodivost, pružnost a mechanická odolnost výsledných BDDE. Grafen je na povrch BDDE nanášen elektrochemicky z roztoku oxidu grafenu. Nanouhlíkové materiály bývají v podobě suspenze, která slouží k namočení povrchu BDDE s následným usušením [57].

Díky svým jedinečným elektrochemickým vlastnostem mají BDDE široké spektrum uplatnění. Intenzivně zkoumanou oblastí aplikace BDDE je úprava a čištění vody znečištěné anorganickými a organickými látkami. Vysoké přepětí kyslíku ve vodných elektrolytech

umožňuje využití BDDE při elektrochemické výrobě silných oxidačních činidel [54, 56, 58]. Obecně hojně využívané jsou BDDE v elektroanalytické chemii při stanovování organických a anorganických látek jakou jsou léčiva, pesticidy, insekticidy, fungicidy, přídavné látky v potravinách, ionty kovů aj. [57, 59, 60].

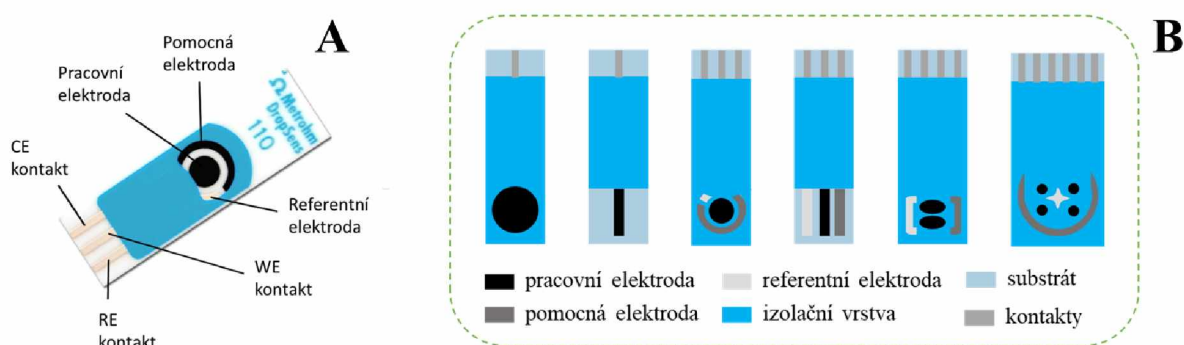
1.3.3 Sítotiskové senzory

Nástup sítotiskových technologií umožnil miniaturizaci klasických běžně užívaných elektrod a hromadnou výrobu sítotiskových elektrod (SPE) s konzistentními chemickými vlastnostmi. Tyto malé a komerčně dostupné elektrody jsou vhodné pro použití elektrochemických technik mimo centralizované laboratoře a umožňují vytvoření zařízení dostupných i pro neškolené pracovníky. Sítotiskové senzory jsou v současné době součástí mnoha analytických přístrojů v environmentálních, potravinářských, farmaceutických a klinických laboratořích. Další velmi důležité uplatnění nacházejí SPE v komerčních „point of care“ zařízeních. Jedná se o zařízení schopná provádět analýzu testů in vitro v místě péče o pacienta. Příkladem jsou glukózové biosenzory, které jsou součástí glukometrů, tedy přístrojů sloužících k měření obsahu glukózy v krvi. Tyto kapesní analyzátoři umožňují diabetikům rychlá domácí měření a úpravu dávek inzulínu podle aktuální glykemie. Rozmach SPE zažívají díky poměrně nízkým nákladům, všestrannosti, jednoduché a rychlé hromadné výrobě, snížení potřebného objemu vzorku na několik mikrolitrů, zmenšení velikosti celého diagnostického systému, možnosti jejich připojení k přenosným analyzátorům a zlepšení dosavadních měřících metod. Dále u SPE s ohledem na jejich jednorázové použití není třeba řešit problémy, které jsou běžné u klasických elektrod, jako jsou paměťové efekty a čisticí procesy [61–65].

Sítotiskem mohou být pro elektrochemické analýzy připravovány jednotlivé elektrody, ale běžnější je kombinace více elektrod a jejich integrace do jednoho tištěného senzoru, tedy tisk celého elektrochemického článku na jeden substrát (obrázek 9A). Nejčastěji využívanou je kombinace tří elektrod (WE, CE a RE) [61, 62, 66]. Velkou výhodou této techniky je značná variabilita připravovaných senzorů, které se mohou lišit počtem, tvarem i uspořádáním elektrod. Příklady různých uspořádání tištěných senzorů je znázorněn na obrázku 9B.

Sítotisk představuje variantu 3D tisku, při níž jsou v prvním kroku na substrát postupně nanášeny jednotlivé silné vrstvy polotekutého materiálu skrze síťku, ve druhém kroku je senzor vybroušen a zbaven přebytečného materiálu a v posledním kroku je materiál vytvrzen fyzikálním procesem (vysoušení, sintrování). Povrch takto vyrobených senzorů může být dále modifikován. Síťka slouží k definici geometrie senzoru. Jako substrát se nejčastěji používají

polymery nebo keramika. Polotekutý materiál je obvykle aplikován ve formě inkoustu (např. uhlíkového, stříbrného, platinového, zlatého). Stříbrný inkoust je tištěn v podobě vodivé stopy, zatímco uhlíkový inkoust slouží k tisku pracovních elektrod. Uhlíkové inkousty jsou rozšířené díky nízké ceně, snadné úpravě a chemické inertnosti. Skládají se z částic grafitu, polymerního pojiva a dalších přísad, které se přidávají kvůli disperzi a přilnavosti směsi. Přesné složení inkoustů je považováno výrobcem za důvěrnou informaci a bylo dokázáno, že rozdíly ve složení inkoustu (např. typ, velikost nebo množství grafitových částic), podmínkách procesu tisku a způsobu vytvrzování mohou silně ovlivnit reaktivitu a celkový analytický výkon uhlíkových senzorů [61–63, 66–68].



Obrázek 9 A – SPE s tříelektrodovým elektrochemickým článkem [69]; B – schématické znázornění SPE s různými počty, tvary a uspořádáním elektrod [70] (převzato a upraveno)

Tištěné senzory se mohou kromě sítotisku vyrábět metodou „inkjet printing“ neboli inkoustového tisku. Tisk probíhá v inkoustové tiskárně, která se skládá z inkoustové komory s inkoustem a kanálku, který spojuje inkoustovou komoru s tryskami. Tryskové vstřikování kapiček inkoustu je řízeno digitálně. Nejvíce využívanými typy inkoustových tiskáren jsou termální a piezoelektrické. Tyto tiskárny fungují na principu Drop-On-Demand (DOD) v překladu „kapka na vyžádání“. To v praxi znamená, že tiskárna dávkuje inkoust pouze v případě potřeby, aby se zabránilo plýtvání drahým materiálem. Výhodou DOD je možnost tvorby menších kapiček inkoustu s vyšší přesností umístění na povrchu substrátu. Termální inkoustová tiskárna je založená na rychlém odporovém zahřívání inkoustu v inkoustové komoře. Při teplotách mezi 300-400 °C dochází k odpařování inkoustu a následnému vytvoření bubliny, která vytlačí inkoust z trysky. Piezoelektrická inkoustová tiskárna je založena na piezoelektrických prvcích, které mohou vlivem napětí deformovat svůj tvar. Tyto prvky jsou spojeny s vibrační destičkou. Do tiskárny se přivádí napětí, při kterém se piezoelektrické prvky smršťují a spolu s nimi i vibrační destička. Tento proces mechanicky generuje inkoust [71–73].

Tištěné senzory mají obecně velmi široké spektrum uplatnění. V biomedicině je to možnost integrace do nositelné elektroniky a použití v personalizované medicíně, což umožňuje cenově dostupné testování „point of care“. V elektrotechnologii jsou součástí solárních článků superkapacitorů. V elektroanalytické chemii se využívají při stanovování organických látek (fenolické sloučeniny, pesticidy, polycyklické aromatické uhlovodíky, rezidua léčiv), iontů těžkých kovů (Pb, Cu, Hg, As, Cd), radioaktivních prvků, plynných polutantů (CO, NO_x, těkavé organické látky) nebo při rutinní analýze kvality vody. Během posledního desetiletí získaly velkou popularitu díky jednoduchému designu, který umožňuje jejich integrování do malých měřicích zařízení, a přijatelné citlivosti na redoxně aktivní látky [63, 66, 67, 70, 74, 75]. Tištěné senzory nachází uplatnění i jako součást průtokových metod jako je průtoková injekční analýza (FIA), sekvenční injekční analýza (SIA), vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) nebo kapilární elektroforéza (CE) [76].

Kromě běžných uhlíkových a kovových pracovních elektrod využívaných v tištěných senzorech existují i elektrody vyrobené z jiných materiálů. Příkladem mohou být SPEs s WE z borem dopovaného diamantu (SP/BDDE), které byly zavedeny do praxe na pracovišti Ústavu environmentálního a chemického inženýrství Univerzity Pardubice ve spolupráci s Ústavem elektroniky a fotoniky Slovenské technické univerzity v Bratislavě [68, 77]. Tyto elektrody byly testovány také v předložené diplomové práci pro stanovení CPD.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité chemikálie

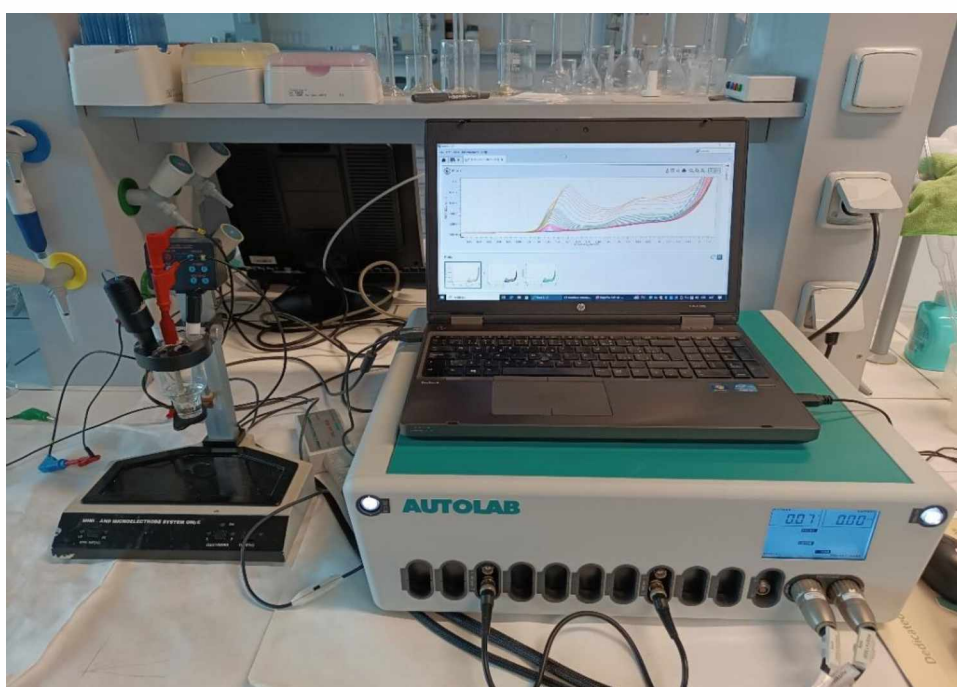
Standardní roztok cyprodinilu o koncentraci $1,0 \times 10^{-3}$ M byl připraven rozpuštěním 22,53 mg pevného CPD (Sigma-Aldrich, Česká republika) ve 100 ml acetonitrilu (Honeywell/Riedel-de Haën, Německo). Pro snadnější rozpuštění byla použita ultrazvuková lázeň a roztok byl dále uchováván v lednici bez přístupu světla. Roztoky CPD o koncentraci $1,0 \times 10^{-4}$ M byly připravovány podle potřeby čerstvé ředěním zásobního roztoku. Používanými základními elektrolyty (ZE) byly CH_3COOH o koncentraci 0,1 M připravená ředěním 99% CH_3COOH (PENTA, Praha) a Brittonův-Robinsonův pufr (BRB) v rozmezí pH 2,0-12, který byl připraven mícháním kyselá a alkalická složky. Kyselá složka BRB byla připravena z 85% H_3PO_4 , 99% CH_3COOH , práškové H_3BO_3 (PENTA, Praha) a doplněním destilovanou vodou. Výsledná koncentrace kyselin byla 0,04 M. Zásaditá složka BRB byla připravena navážením pevného NaOH (PENTA, Praha) a rozpuštěním v destilované vodě. Koncentrace připraveného roztoku NaOH byla 0,2 M. V rámci studia voltametričného chování CPD byly jako potenciální ZE dále testovány zředěné roztoky některých kyselin. Ty byly připraveny ředěním 96% H_2SO_4 , 85% H_3PO_4 , 65% HNO_3 , 70% HClO_4 a 35% HCl (PENTA, Praha).

Interferenční studie byly provedeny s roztoky 14 pesticidů o koncentraci $1,0 \times 10^{-3}$ M. Mezi testované pesticidy patřily benalaxyl, metalaxyl, imidacloprid, glyfosát, cyproconazol, epoxiconazol, triticonazol, difenoconazol, paclobutrazol, tebuconazol, azoxystrobin, dicamba, fludioxonil a folpet (Sigma-Aldrich, Česká republika).

Pro analýzu reálných vzorků byl vybrán komerčně dostupný přípravek CHORUS 50WG s obsahem CPD 500 g/kg (Syngenta Crop Protection AG, Švýcarsko) a směsný přípravek Switch se dvěma účinnými látkami, a to CPD s obsahem 375 g/kg (37,5 hm.%) a fludioxonilem s obsahem 250 g/kg (25 hm.%) (AgroBio, Opava). Roztoky těchto přípravků byly připraveny navážením 45,1 mg CHORUS resp. 60,1 mg Switch a jejich následným rozpuštěním v destilované vodě v 1,0l odměrné baňce s předloženým 1,0 ml CH_3COOH za pomoci ultrazvukové lázně. Výsledná koncentrace CPD v obou roztocích činila $1,0 \times 10^{-4}$ M (vypočteno dle obsahu účinné látky deklarované výrobcem).

2.2 Přístrojové vybavení

Všechna voltametrická měření byla realizována pomocí Potenciostatu Autolab PGSTAT302N (Metrohm, Nizozemsko) se softwarem Nova 2.1.5. Jedna část experimentů byla provedena na klasickém třielektrodovém uspořádání, kde CE byl platinový drát (Monokrystaly, Turnov), RE byla nasycená argentchloridová elektroda (Ag/AgCl (KCl sat.), Monokrystaly, Turnov) a WE byla BDDE (Obrázek 11A-1, BioLogic, Francie). Používaná BDDE měla dle výrobce následující vlastnosti: vnitřní průměr 3,0 mm, velikost pracovního povrchu 7,07 mm², odpor 0,075 Ω a poměr B/C během depozice 1000 ppm. Měřicí systém spolu s voltametrickou nádobkou, míchadlem a potenciostatem je znázorněn na obrázku 10.



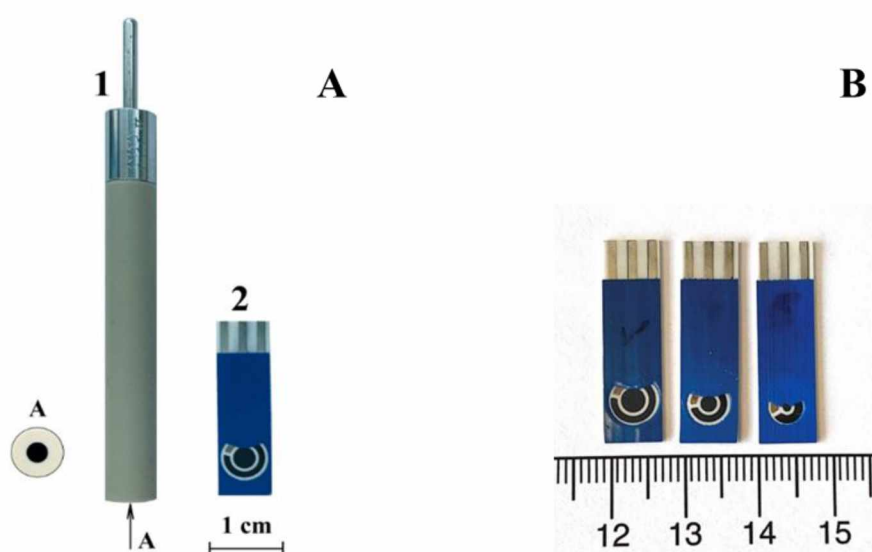
Obrázek 10 Potenciostat Autolab PGSTAT302N v uspořádání pro voltametrickou analýzu v klasickém třielektrodovém systému

Druhá část voltametrických měření byla provedena na třech typech tištěných senzorů s chemicky deponovanou BDDE (SP/BDDE, Dr. Vojs a kol., Slovak Diamond Group). WE a CE z BDD byly deponovány na keramický substrát pomocí velkoplošného lineárního anténního systému mikrovlnné chemické depozice par (LA-MWCVD). Ostatní součásti jako RE, kontakty a izolační vrstvy byly nanášeny technikou síťotisku. RE byla tvořena vrstvou stříbra a elektrochemicky chlorována (Ag/AgCl). Vznikla tak pseudo-referentní elektroda. Podrobně byl postup výroby těchto senzorů popsán v literatuře [68]. Jak již bylo zmíněno, všechny tři senzory měly shodnou WE z BDD, ale lišily se v průměru, a tedy ploše pracovního

povrchu. Parametry jednotlivých senzorů jsou shrnuty v tabulce 1. Vizuální porovnání senzorů s různě velkým povrchem WE lze vidět na obrázku 11B.

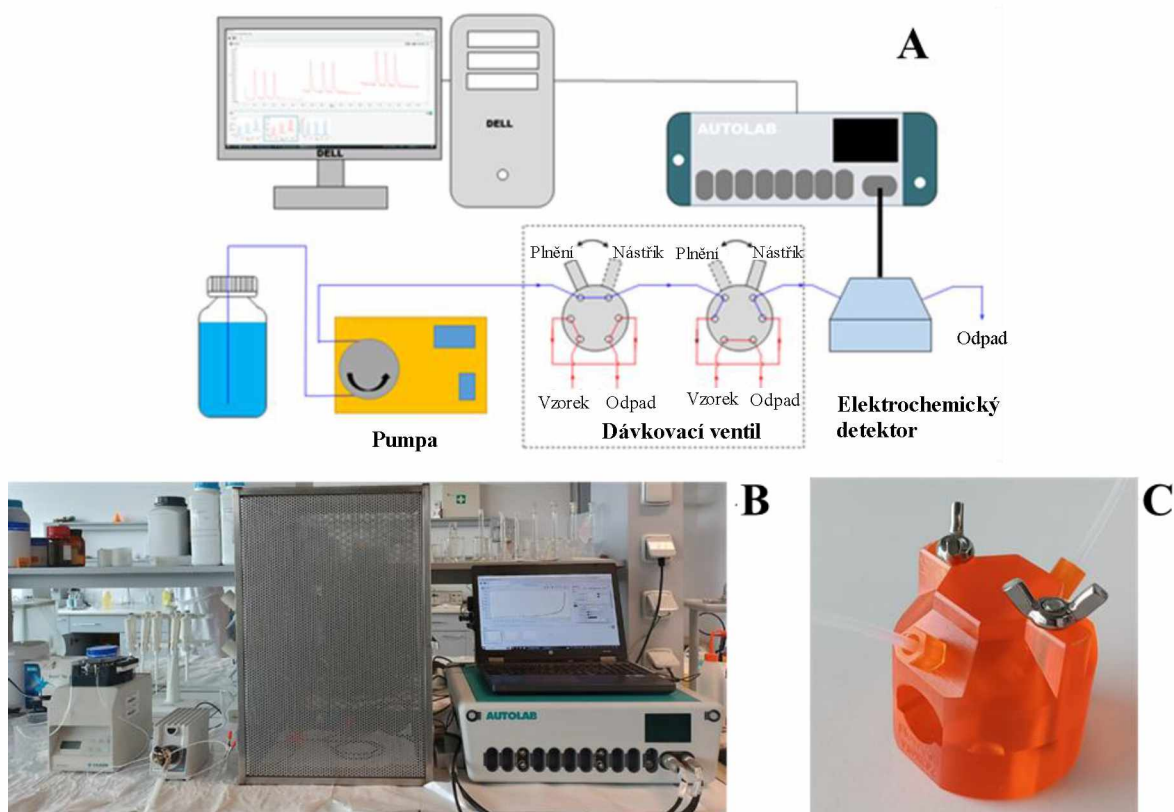
Tabulka 1 Porovnání vlastností používaných SP/BDDE

Označení senzoru	WE	Plocha WE [mm ²]	Průměr WE [mm]	Poměr B/C	Měrný odpor [Ωcm]
1-SP/BDDE	BDD	0,785	1,0	312500	0,017
2-SP/BDDE	BDD	3,14	2,0	312500	0,017
3-SP/BDDE	BDD	7,07	3,0	312500	0,017



Obrázek 11 Porovnání BDDE a SP-BDDE (A), porovnání velikosti WE u různých SP-BDDE (B)

Tištěné senzory znázorněné na obrázku 11 byly používány také při průtokové injekční analýze (FIA) s elektrochemickou detekcí (ED). Systém byl tvořen automatickým dávkovacím ventilem Rheodyne Actuated Switching Valve MXP9900-000 (IDEX Health&Science, LLC, USA), s dávkovacími smyčkami o objemech 5, 25, 50 a 75 μ l. Rovnoměrný průtok elektrolytu byl udržován díky peristaltické pumpě Minipuls 3 (Gilson, USA). SP-BDDE byly vkládány do průtokových cel vytisknutých na 3D tiskárně z materiálu ABS (Dr. Vojs a kol., Slovak Diamond Group). Průtokové elektrochemické cely byly během měření uzavřeny ve Faradayově kleci kvůli zamezení rušivého vlivu vnějšího elektrického pole na výsledky měření. Zařízení FIA-ED se všemi komponenty je schematicky znázorněno na obrázku 12A, fotografie reálně použitého systému je uvedena na obrázku 12B a průtoková cela na obrázku 12C.



Obrázek 12 Schematické znázornění FIA-ED uspořádání (A), fotografie sestavy FIA-ED použité v rámci diplomové práce (B), detail průtokové cely (C)

Vedle elektrochemického analyzátoru a odpovídajícího příslušenství byla použita i další drobná laboratorní technika. Látky v podobě prášku a pecek byly navažovány na analytických vahách (Denver Instrument, USA), a poté rozpouštěny v acetonitrilu či destilované vodě pomocí ultrazvukové lázně (BANDELIN Sonorex, Německo). pH připravených pufrů bylo zjišťováno pomocí pH metru Accumet AB150 (Fisher Scientific, Pardubice). K pipetáži roztoků do voltametrické nádoby a při přípravě některých roztoků byly používány dva druhy automatických pipet (Eppendorf, Česká republika; Fisher Scientific, Pardubice).

2.3 Pracovní postupy

2.3.1 Příprava WE před měřením

Před započítím měření byla BDDE vždy aktivována pomocí CV při 20 opakovaných skenech. Aktivace probíhala v prostředí H_2SO_4 o koncentraci 1,0 M od počátečního potenciálu ($E_{\text{poč}}$) -1500 mV do potenciálu obratu (E_{obratu}) 2500 mV a konečného potenciálu (E_{kon}) 2500 mV při rychlosti polarizace (v) 100 mV/s. Testované tištěné senzory SP/BDDE byly aktivovány

pomocí CV při 10 opakovaných skenech ve stejném prostředí a za stejných podmínek jako BDDE. Před aktivací byly očištěny kontakty gumovou pryží kvůli lepšímu přenosu signálu během měření. Měření na FIA-ED probíhala bez elektrochemické aktivace elektrody.

2.3.2 Voltametrická měření

Voltametrické chování CPD bylo studováno pomocí CV, která byla použita při zjišťování vlivu různých ZE (BRB, roztoky kyselin) na výšku, polohu a tvar píku za následujících podmínek: $E_{\text{poč}} = -1000$ mV, $E_{\text{obratu}} = 2500$ mV, $\nu = 100$ mV/s, $c_{\text{CPD}} = 100$ μM . Obdobná studie vlivu prostředí byla provedena i pomocí DPV a SWV, a to za následujících podmínek: $E_{\text{poč}} = -1000$ mV, $E_{\text{kon}} = 2500$ mV, $\nu = 50$ mV/s, amplituda (A) = 50 mV, doba pulzu (t) = 50 ms (DPV), resp. frekvence (f) = 25 Hz (SWV), $c_{\text{CPD}} = 100$ μM . Po této analýze byla zvolena jako ZE 0,1M CH₃COOH. V tomto prostředí probíhalo měření vlivu rychlosti polarizace na výšku a tvar píku opět pomocí CV. Rychlost polarizace byla měněna v rozsahu 25-200 mV/s a měření probíhalo v rozmezí potenciálu -1000 až 2200 mV.

Po zjištění voltametrického chování CPD byly optimalizovány podmínky metod DPV a SWV. U DPV byla optimalizována rychlost polarizace v rozsahu $\nu = 10$ -100 mV/s, výška pulsu $A = 10$ -100 mV a šířka pulsu $t = 10$ -100 ms, přičemž pro následná měření pomocí DPV byly zvoleny následující optimální parametry: $\nu = 30$ mV/s, $A = 40$ mV, $t = 40$ ms. U SWV byla optimalizována $\nu = 10$ -100 mV/s, $A = 10$ -100 mV a $f = 5$ -50 Hz, přičemž byly zvoleny následující optimální parametry: $\nu = 30$ mV/s, $A = 30$ mV, $f = 30$ Hz. Na základě porovnání obou metod byla pro následnou analýzu interferentů, modelových roztoků, vzorků přírodní vody a komerčně dostupných přípravků použita DPV. Složení ZE bylo upraveno s ohledem na pasivaci elektrody a analýzy probíhaly v prostředí 1,0 M CH₃COOH.

System FIA-ED byl před měřením proplachován 5 minut ZE, kterým byla 1,0 M CH₃COOH, která vzešla opět z testování různých roztoků kyselin jako nejvhodnější. Nejdříve byly optimalizovány parametry měření a jako vhodné byly nastaveny následující podmínky: průtok elektrolytu (F_m) = 1,5 ml/min, dávkovaný objem vzorku (V_{inj}) = 25 μl a potenciál detekce (E_{det}) = 0,9 V. Vzorek byl dávkován pomocí automatického dávkovacího ventilu. Po ukončení měření bylo zařízení promýváno destilovanou vodou.

2.3.3 Analýza přírodní vody a komerčně dostupných přípravků

2.3.3.1 Přírodní voda

Vzorek přírodní vody o objemu 2 l byl odebrán ze studny ve městě Slatiňany do polyethylenové lahve a byl převezen do laboratoře. Uchovávan byl v lednici bez přístupu světla. Před analýzou

byla voda přefiltrována přes papírový filtr. Vzorek neobsahoval takové množství CPD, které by mohlo být detekováno pomocí vyvinuté metody, a proto do něj bylo nutno před analýzou přidat standardní roztok CPD. Výsledná koncentrace CPD po obohacení vzorku vody byla 0,05 μM . Experiment byl proveden metodou standardního přidavku tak, že do polarografické nádoby bylo odměřeno 10 ml vzorku přírodní vody s přidavkem CPD a přidáno 1,63 ml konc. CH_3COOH (výsledná koncentrace ZE 1,0 M) a byla změřena křivka vzorku. Poté byly přidány 3 přidavky standardního roztoku CPD ($V = 5,0 \mu\text{l}$, $c_{\text{CPD}} = 0,0001 \text{ M}$). Měření bylo opakováno 5 \times a ze získaných výsledků byly vypočteny statistické parametry.

2.3.3.2 Komerčně dostupné pesticidní přípravky

Optimalizované metody DPV a FIA-ED byly aplikovány při analýze dvou fungicidních přípravků, a to Chorus 50WG (obrázek 13A) a Switch (obrázek 13B). Roztok Chorusu byl připraven rozpuštěním 45,1 mg přípravku v 1,0 l destilované vody s přidavkem 1,0 ml 99% CH_3COOH . Výsledný roztok měl koncentraci okolo $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ (počítáno podle obsahu CPD deklarovaného výrobcem). Analýza metodou DPV probíhala v prostředí 1,0 M CH_3COOH metodou standardního přidavku. Do voltametrické nádoby bylo odměřeno 10 ml ZE a provedeno měření křivky základního elektrolytu. Poté bylo přidáno 5 μl roztoku Chorusu a následně 3 přidavky standardního roztoku CPD ($V = 5,0 \mu\text{l}$, $c_{\text{CPD}} = 0,0001 \text{ M}$). Roztok fungicidu Switch byl připraven rozpuštěním 60,1 mg přípravku v 1,0 l destilované vody s přidavkem 1,0 ml 99% CH_3COOH . Výsledný roztok měl koncentraci přibližně $1 \times 10^{-4} \text{ M}$. Analýza tohoto přípravku probíhala stejným způsobem jako u přípravku CHORUS. Analýza obou přípravků metodou FIA-ED probíhala v prostředí 1,0 M CH_3COOH metodou kalibrační přímky. Byly analyzovány kalibrační roztoky o koncentraci 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 a 10 μM a byla vynesena kalibrační přímka. Každý roztok byl proměřen 3 \times . Poté byly analyzovány zředěné roztoky přípravků Chorus a Switch a výsledky vyhodnoceny metodou kalibrační přímky.

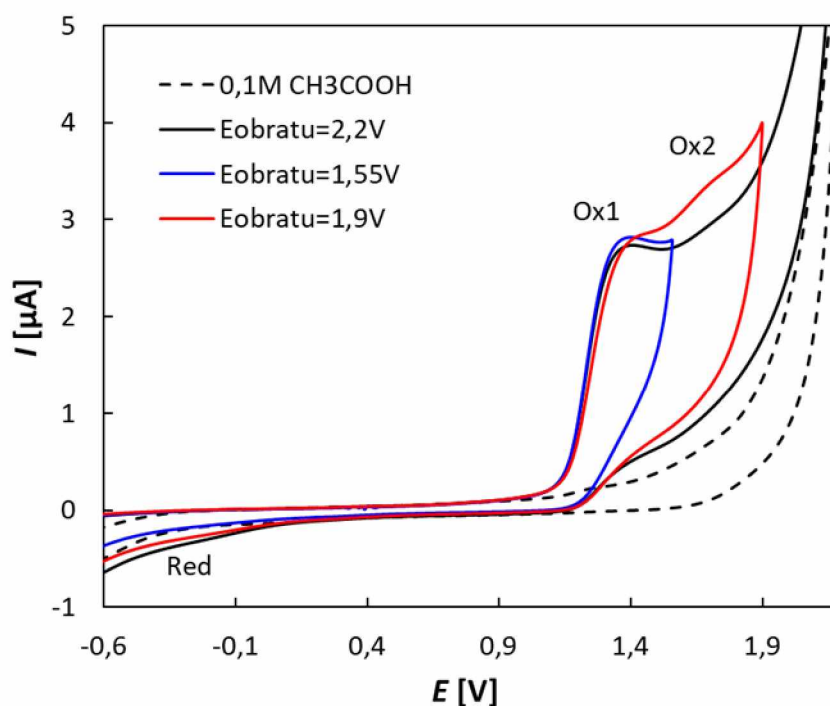


Obrázek 13 Analyzované fungicidní přípravky Switch (A) a Chorus 50WG (B)

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Studium elektrochemického chování CPD a vývoj metody jeho stanovení s využitím BDDE

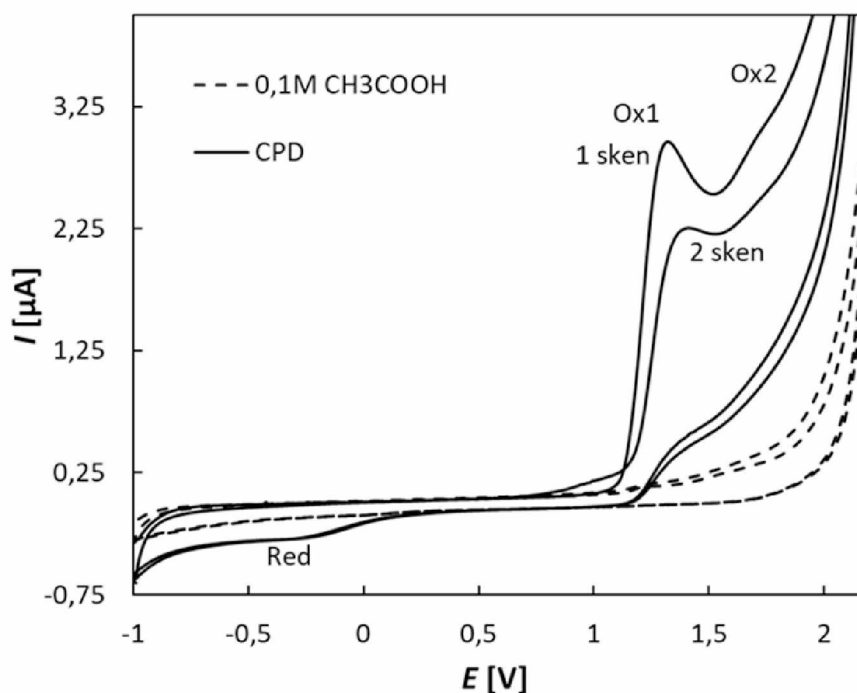
Na úvod práce bylo provedeno studium elektrochemického chování CPD. Byly naměřeny základní cyklické voltamogramy v 0,1 M CH_3COOH při $\nu = 100 \text{ mV/s}$ v rozmezí potenciálů $E_{\text{poč}} = -1,0 \text{ V}$, $E_{\text{obratu}} = 1,55, 1,9$ a $2,2 \text{ V}$. Koncentrace CPD v roztoku byla $100 \mu\text{M}$. Aplikace různých E_{obratu} poskytla informace o reverzibilitě redoxní reakce. První měření probíhalo bez odstranění kyslíku z roztoku a získané křivky jsou uvedeny na obrázku 14. Na anodické křivce lze pozorovat dva oxidační píky, první výraznější při potenciálu $E_p = 1,4 \text{ V}$ a druhý téměř nepatrný při $E_p = 1,7 \text{ V}$. Na katodické křivce lze pozorovat náznak jednoho redukčního píku ($E_p = -0,2 \text{ V}$), který svědčí o tom, že se může jednat o quazi-reverzibilní reakci. Tento redukční signál byl pozorován pouze při vyšších hodnotách E_{obratu} . Pokud byl sken obrácen již po prvním oxidačním píku ($E_{\text{obratu}} = 1,55 \text{ V}$, modrá křivka), redukční pík pozorován nebyl. To by znamenalo, že první oxidační reakce je ireverzibilní.



Obrázek 14 Cyklické voltamogramy CPD zaznamenané na BDDE v přítomnosti kyslíku. ZE – 0,1 M CH_3COOH , $E_{\text{poč}} = -1,0 \text{ V}$, $E_{\text{obratu}} = 2,2, 1,9$ a $1,55 \text{ V}$, $\nu = 100 \text{ mV/s}$, $c_{\text{CPD}} = 100 \mu\text{M}$

Pro ověření, zda redukční pík opravdu odpovídá redukci oxidačního produktu CPD a nejedná se o redukci kyslíku, bylo provedeno druhé měření, před kterým byl roztok probubláván 5 minut

dušíkem. Po vypuzení kyslíku byly změřeny dva skeny CV za sebou bez míchání roztoku. Výsledný voltamogram je znázorněn na obrázku 15 a lze na něm vidět, že po odstranění kyslíku došlo k zvýraznění redukčního píku při potenciálu $E = -0,2$ V. Lze tedy konstatovat, že 2. oxidační krok CPD je quasi-reverzibilní.



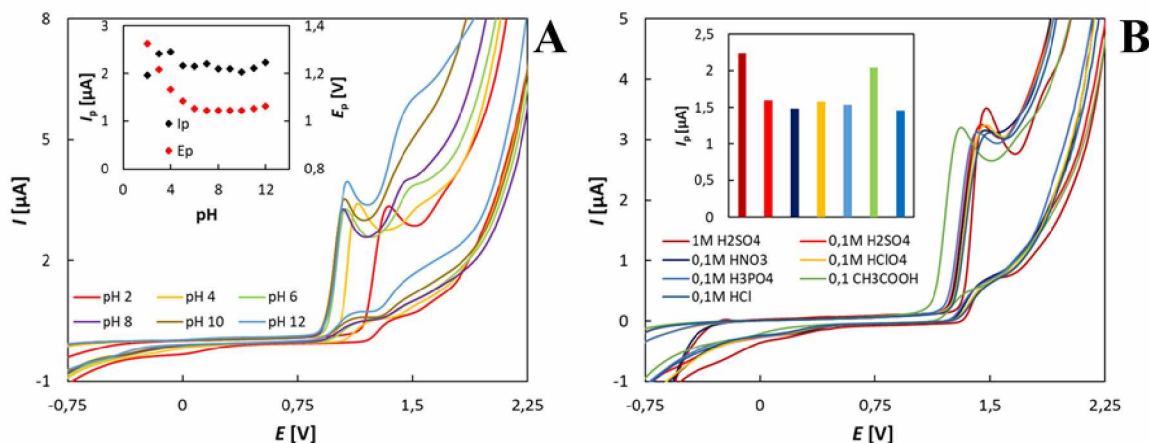
Obrázek 15 Cyklické voltamogramy CPD zaznamenané na BDDE po odstranění kyslíku. ZE – 0,1 M CH_3COOH , $E_{\text{poč}} = -1,0$ V, $E_{\text{obratu}} = 2,2$ V (B), $v = 100$ mV/s, $c_{\text{CPD}} = 100$ μM

3.1.1 Závislost na pH

Další experimenty byly zaměřeny na elektrochemické chování CPD v ZE o různém složení a pH. Měření probíhala pomocí CV, DPV a SWV. Voltamogramy zaznamenané pomocí CV v prostředí BRB o různém pH (2,0-12), resp. zředěných kyselin, jsou znázorněny na obrázku 16. Na obrázku 16A je vidět, že zejména poloha prvního oxidačního píku je silně závislá na hodnotě pH a jeho výška (I_p) se příliš nemění. S růstem pH se na záznamu objevuje významnější 2. oxidační pík, což zhoršuje vyhodnotitelnost první odezvy. Proto bylo kyselé prostředí vybráno jako vhodnější a jako ZE byly otestovány i roztoky různých kyselin (obrázek 16B). Nejvyšší odezva byla získána v prostředí 1,0 M H_2SO_4 a 0,1 M CH_3COOH . Obecně není vhodné pracovat s příliš koncentrovanými kyselinami kvůli bezpečnosti práce, velké spotřebě chemikálií, možnosti rozpouštění některých nežádoucích látek a jejich korozivním vlastnostem. Proto byla jako základní elektrolyt zvolena 0,1 M CH_3COOH , v níž byl naměřený první oxidační pík CPD nejvyšší ze všech méně koncentrovaných roztoků kyselin a zároveň byl

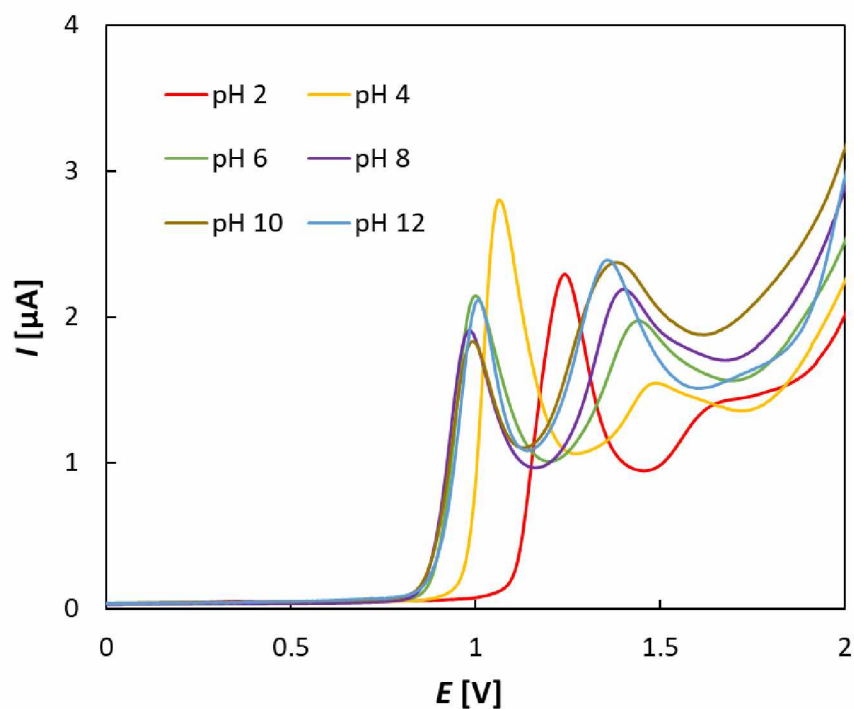
posunutý k negativnějšímu potenciálu, čímž se zlepšila jeho vyhodnotitelnost. V rozsahu pH 2,0-6 (v kyselém prostředí) byl pozorován významný posun E_p k méně pozitivním hodnotám. Závislost E_p na pH v tomto rozsahu může být popsána rovnicí (2), kdy hodnota směrnice se blíží teoretické hodnotě 59 mV. To vypovídá o významném podílu protonů na sledované reakci, konkrétně o stejném počtu protonů a elektronů.

$$E_p[\text{V}] = -(0,0675 \pm 0,0094) \text{ pH} + (1,433 \pm 0,040), r = 0,9723 \quad (2)$$



Obrázek 16 Cyklické voltamogramy CPD zaznamenané na BDDE v prostředí BRB (pH 2,0-12) (A) a různých roztoků kyselin (B). $E_{poč} = -1,0 \text{ V}$, $E_{obratu} = 2,5 \text{ V}$, $\nu = 100 \text{ mV/s}$, $c_{CPD} = 100 \mu\text{M}$

Vliv pH na výšku a polohu píku CPD byl studován též pomocí DPV a SWV při použití následujících parametrů metod: $E_{poč} = -1,0 \text{ V}$, $E_{kon} = 2,5 \text{ V}$, $\nu = 50 \text{ mV/s}$, $A = 50 \text{ mV}$, $t = 50 \text{ ms}$ (DPV), $f = 25 \text{ Hz}$ (SWV). Byly tak použity citlivější metody než CV, které odečítají kapacitní proud. Měření probíhalo v prostředí BRB (pH 2,0-12) a několika kyselinách stejně jako u CV. Z obrázku 17 pro DPV vyplývá, že I_p se se změnou pH příliš nemění (s výjimkou pH 4,0 na rozdíl od CV). Největší změnou je mnohem lépe viditelný i druhý oxidační pík projevující se výrazněji v neutrálním a zejména alkalickém prostředí. Z různých testovaných kyselin poskytoval CPD nejvyšší odezvu opět v prostředí 1,0 M H₂SO₄ a 0,1 M CH₃COOH. S využitím SWV bylo dosaženo stejných výsledků. Kvůli nižší koncentraci byla jako základní elektrolyt opět zvolena 0,1 M CH₃COOH, která poskytovala dobře vyhodnotitelný pík posunutý k méně pozitivnímu potenciálu.



Obrázek 17 DP voltamogramy CPD zaznamenané na BDDE v prostředí BRB (pH 2-12). $E_{poč} = -1,0$ V, $E_{kon} = 2,5$ V, $v = 50$ mV/s, $A = 50$ mV, $t = 50$ ms, $c_{CPD} = 100$ μ M

3.1.2 Závislost na rychlosti polarizace

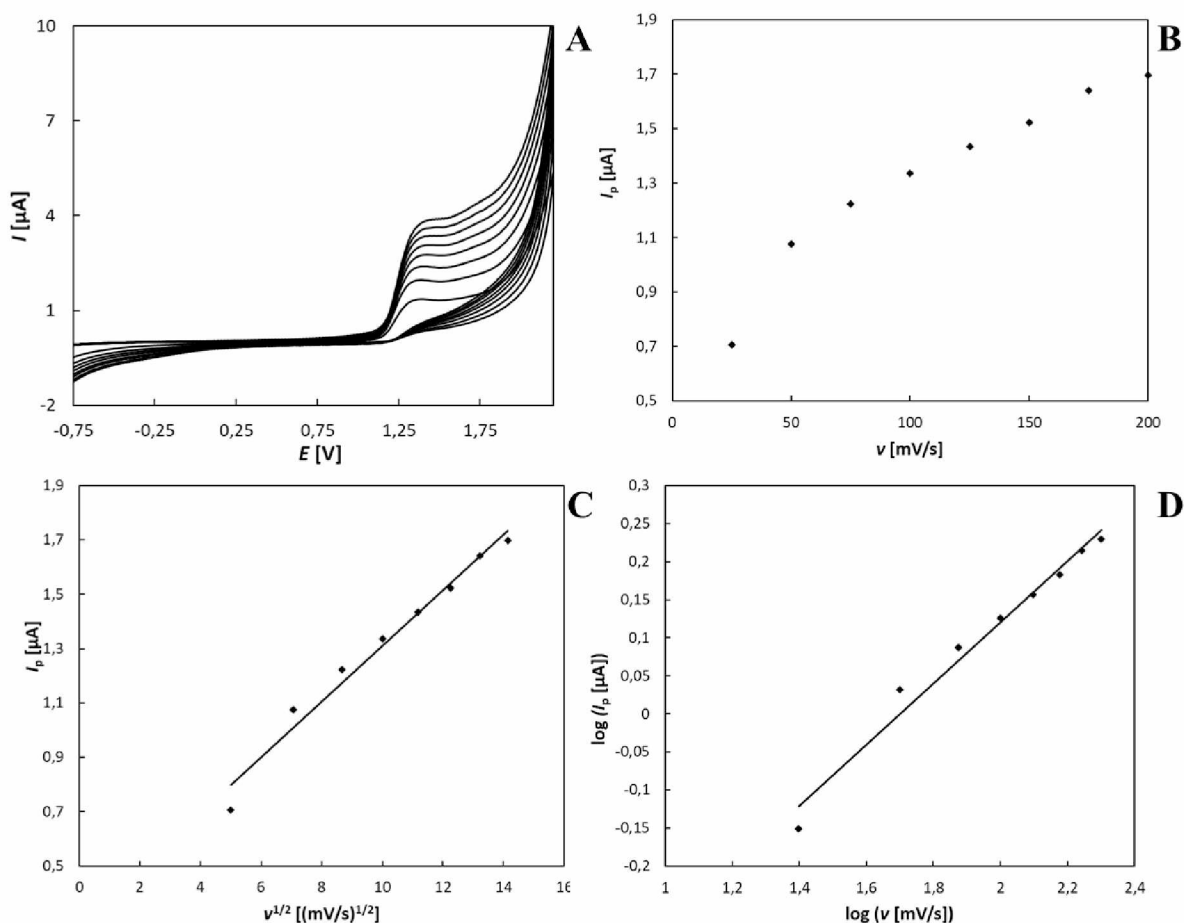
Závislost na rychlosti polarizace byla další charakteristikou sledovanou při studiu voltametrického chování CPD. Stejně jako ZE i různé rychlosti polarizace ovlivňují výšku, šířku a polohu oxidačního píku. Tento experiment probíhal pomocí CV v prostředí 0,1 M CH_3COOH v rozsahu potenciálů $-1,0$ až $2,2$ V. Rychlost polarizace byla měněna od 25 do 200 mV/s a koncentrace CPD činila 100 μ M. Vyhodnocován byl pouze první dobře vyvinutý oxidační pík CPD. Po ukončení experimentu byla vynesena závislost proudové odezvy na rychlosti polarizace, na druhé odmocnině z rychlosti polarizace a logaritmická závislost proudové odezvy na rychlosti polarizace. Tyto závislosti byly vyneseny proto, aby bylo možné určit řídicí děj probíhající elektrodové reakce (difuze, kinetika, adsorpce) a jsou zobrazeny na obrázku 18 spolu se změřenými voltamogramy.

Na obrázku 18A lze pozorovat, že výška píku roste se zvyšující se rychlostí polarizace a současně dochází k posunu maxima píku k pozitivnějším potenciálům, což odpovídá ireverzibilnímu průběhu 1. oxidační reakce CPD, jak bylo uvedeno výše. Ze závislosti I_p na v lze vidět, že I_p neroste lineárně a probíhající reakce tedy není řízena adsorpcí. Z třetí vynesené závislosti I_p na $v^{1/2}$ (obrázek 18C) vyplývá, že závislost je lineární, a to znamená, že se jedná o děj řízený difuzí nebo kinetikou. Poslední vynesenu závislostí byla logaritmická závislost I_p

na v (obrázek 18D). Vynesené body byly proloženy přímkou a byla získána následující rovnice (3):

$$\log I_p [\mu\text{A}] = (0,402 \pm 0,025) \log v [\text{mV/s}] - (0,683 \pm 0,051), r = 0,99942 \quad (3)$$

Hodnota směrnice ($0,402 \pm 0,025$) je blízká teoretické hodnotě 0,5 značící difuzně řízenou reakci. Na druhou stranu ale tato hodnota neleží v uvedeném intervalu spolehlivosti, který je 0,377-0,427 a lze tedy usuzovat na vliv kinetiky předřazené nebo následné chemické reakce.

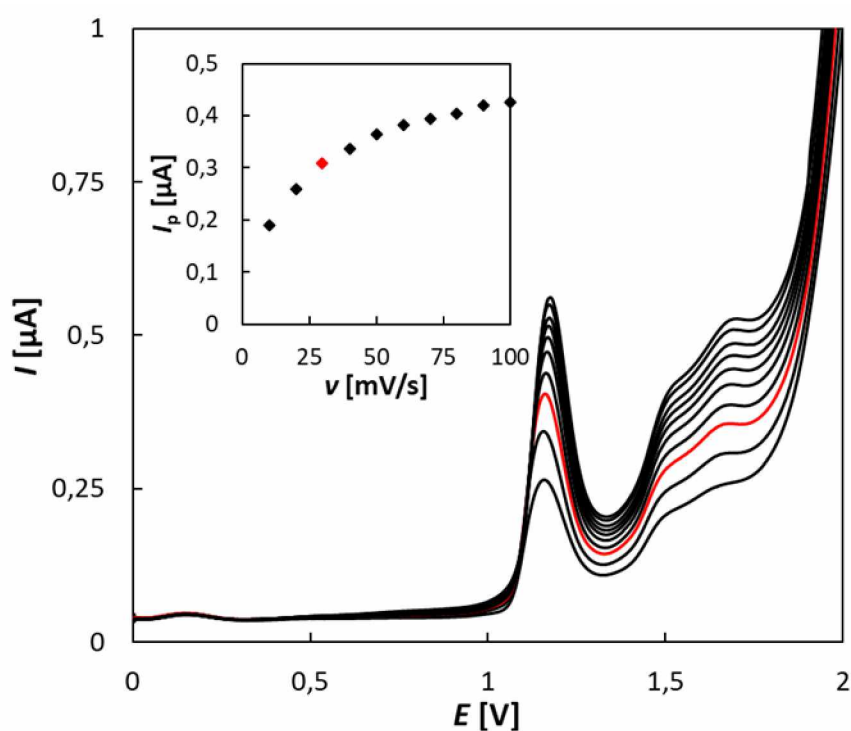


Obrázek 18 Cyklické voltamogramy CPD zaznamenané na BDDE v závislosti na rychlosti polarizace (A) a odpovídající závislosti I_p na v (B), I_p na $v^{1/2}$ (C) a $\log(I_p)$ na $\log(v)$ (D). $E_{poč} = -1,0 \text{ V}$, $E_{obratu} = 2,2 \text{ V}$, $v = 25\text{-}200 \text{ mV/s}$, $c_{CPD} = 100 \mu\text{M}$

3.1.3 Optimalizace parametrů DPV

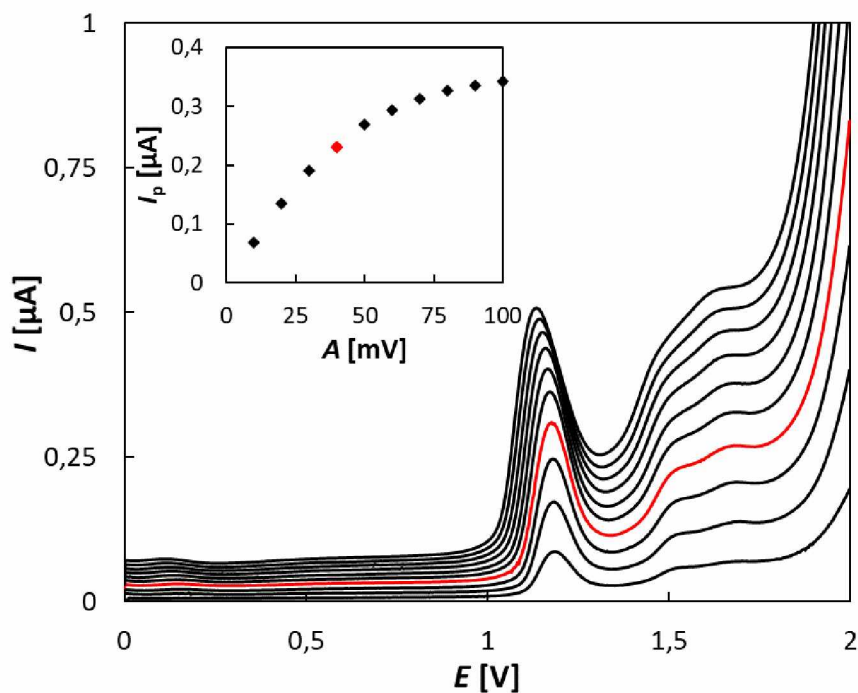
Po studiu voltametrického chování CPD byl dalším úkolem vývoj metody jeho stanovení. Vybrány byly metody DPV a SWV, které obvykle umožňují stanovení mnohem nižších koncentrací než doposud používaná CV. Prvním krokem byla optimalizace parametrů metody DPV. Pro analytickou aplikaci byl vybrán první oxidační pík CPD, který byl dobře

vyhodnotitelný. Optimalizovanými parametry byly rychlost polarizace, výška pulsu, šířka pulsu a předúprava povrchu BDDE. Všechny tyto experimenty probíhaly v prostředí 0,1 M CH_3COOH při koncentraci CPD 10 μM . Rychlost polarizace byla testována v rozsahu 10-100 mV/s s krokem 10 mV/s, výška pulsu v rozsahu 10-100 mV a šířka pulsu v rozsahu 10-100 ms. Prvním optimalizovaným parametrem byla rychlost polarizace a další dva parametry byly udržovány konstantní ($A = 50$ mV, $t = 50$ ms). Na obrázku 19 lze vidět zaznamenané voltametrické křivky i vynesenu závislost I_p na v , ze které je vidět významný nárůst I_p do $v = 30$ mV/s (křivka označená červeně). Následné přírůstky proudu byly menší, a proto byla pro další měření zvolena jako optimální rychlost 30 mV/s.



Obrázek 19 Optimalizace rychlosti polarizace DPV pro stanovení CPD. ZE – 0,1 M CH_3COOH , $v = 10$ -100 mV/s, $A = 50$ mV, $t = 50$ ms, $c_{\text{CPD}} = 10$ μM

Druhým optimalizovaným parametrem byla výška neboli amplituda pulsu ($v = 30$ mV/s, $t = 50$ ms). Na obrázku 20 jsou uvedeny naměřené voltametrické křivky s odpovídající závislostí I_p na A , ze které je patrné, že proudová odezva narůstá lineárně přibližně do $A = 40$ mV (červená křivka) a poté se velikost přírůstku proudu zmenšuje. Pro další měření byla proto zvolena hodnota výšky pulsu 40 mV.

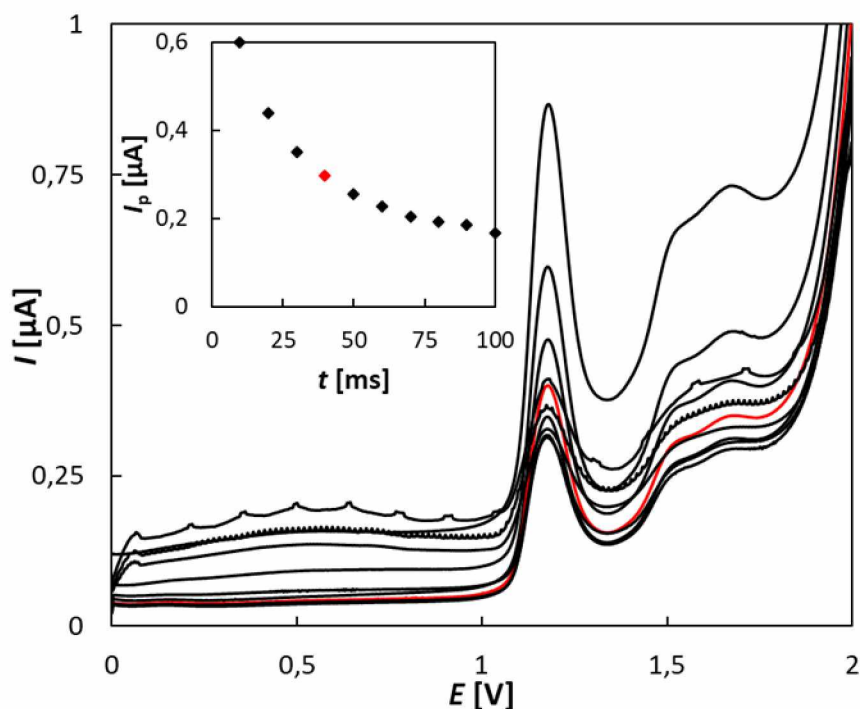


Obrázek 20 Optimalizace výšky pulsu DPV pro stanovení CPD. ZE – 0,1 M CH_3COOH , $v = 30$ mV/s, $A = 10$ -100 mV, $t = 50$ ms, $c_{CPD} = 10$ μM

Třetím optimalizovaným parametrem byla šířka pulsu ($v = 30$ mV/s, $A = 40$ mV). Na obrázku 21 jsou opět vidět zaznamenané voltamogramy CPD a vynesená závislost I_p na t , ze které je patrné, že se zvětšující se šířkou pulsu se snižovala proudová odezva, ale současně docházelo ke zlepšení tvaru křivky, odstranění nežádoucího šumu a stabilizaci signálu. Byla provedena zkouška opakovatelnosti měření při různých šířkách pulsu a bylo zjištěno, že nejlepší opakovatelnost vykazuje měření při šířce pulsu 40 ms, takže tato hodnota byla nastavena pro všechna následující měření.

Posledním krokem optimalizace DPV byl výběr vhodného postupu předúpravy BDDE, která je důležitá kvůli zlepšení elektrochemických vlastností WE. Testováno bylo pět typů předúprav, a to mechanické leštění na podložce s aluminou ($t = 2$ min), cyklování (vlození 20 cyklických voltamogramů v rozsahu potenciálů $E_{poč} = -1,5$ V, $E_{obratu} = 2,2$ V, $E_{kon} = 2,2$ V, $v = 100$ mV/s), pulzní předúprava (100 pulzů, $E_1 = -1,5$ V, $t_1 = 1$ s, $E_2 = 2,2$ V, $t_2 = 1$ s), katodická ($E = -1,5$ V, $t = 300$ s) a anodická ($E = 2,2$ V, $t = 300$ s) předúprava. Po zařazení předúpravy bylo vždy měřeno 11 opakovaných křivek CPD o koncentraci 10 μM v prostředí 0,1 M CH_3COOH při optimalizovaných podmínkách DPV. Po dokončení měření byly vyhodnoceny hodnoty I_p a z nich spočítána relativní směrodatná odchylka (RSD). Hodnoty RSD pro jednotlivé postupy jsou uvedeny v tabulce 2 a charakterizují opakovatelnost za sebou naměřených piků.

Výška píků se v závislosti na použité proceduře příliš neměnila. Z testovaných forem předúpravy poskytlo nejspolehlivější výsledky cyklování, u něhož byla hodnota RSD nejnižší a činila 1,9 %. Cyklování bylo zvoleno jako předúprava WE před všemi následujícími experimenty. Zařazeno bylo vždy na začátku práce.



Obrázek 21 Optimalizace šířky pulsu DPV pro stanovení CPD. ZE – 0,1 M CH_3COOH , $v = 30$ mV/s, $A = 40$ mV, $t = 10-100$ ms, $c_{CPD} = 10$ μM

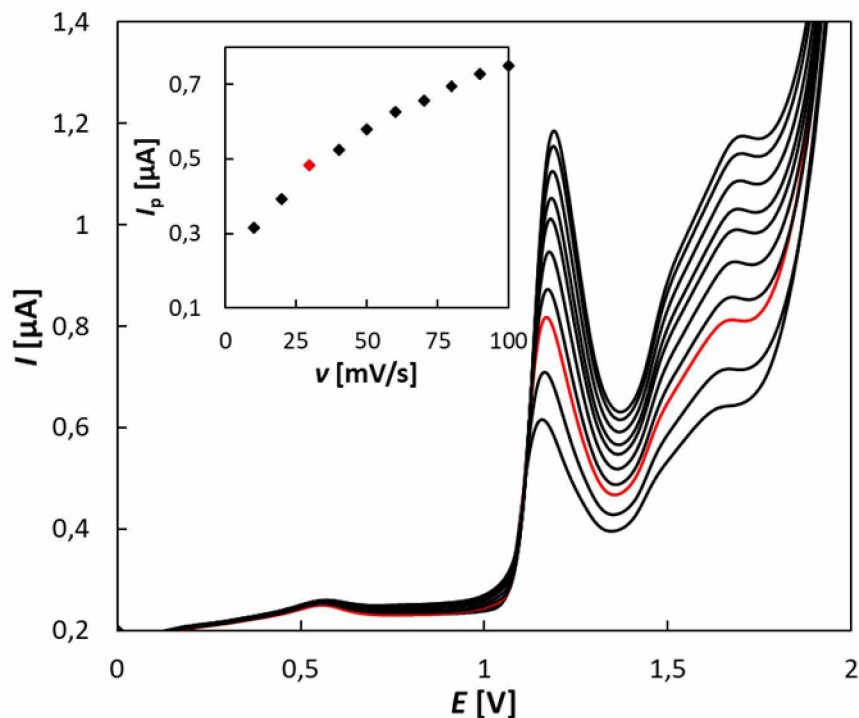
Tabulka 2 Porovnání hodnot RSD opakovaných měření piku CPD pro jednotlivé postupy předúpravy BDDE

	Cyklování	Katodická předúprava	Anodická předúprava	Leštění	Pulzní předúprava
RSD [%]	1,90	15,70	3,82	24,50	3,55

3.1.4 Optimalizace parametrů SWV

Optimalizace parametrů SWV probíhala podobně jako u DPV. Optimalizovanými parametry byly v , A , f , a nakonec opět předúprava BDDE. Experimenty probíhaly v prostředí 0,1 M CH_3COOH při koncentraci CPD 10 μM . Rychlost polarizace byla testována v rozsahu 10-100 mV/s, výška pulsu 10-100 mV a frekvence 5-50 Hz. Prvním optimalizovaným parametrem byla rychlost polarizace ($f = 25$ Hz, $A = 50$ mV). Na obrázku 22 jsou zobrazeny získané voltamogramy s odpovídající závislostí I_p na v , ze které je patrné, že 1. pík CPD rostl, ale

současně se zvyšovala i následná proudová odezva, což zhoršovalo vyhodnotitelnost píku. Pro další měření SWV byla proto zvolena rychlost polarizace 30 mV/s.

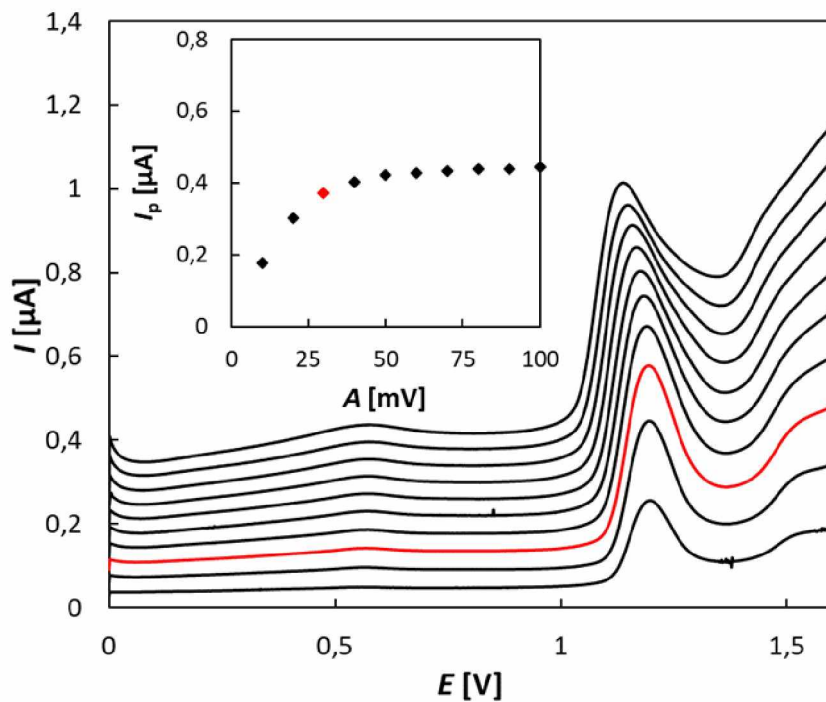


Obrázek 22 Optimalizace rychlosti polarizace SWV pro stanovení CPD. ZE – 0,1 M CH_3COOH , $v = 10$ -100 mV/s, $A = 50$ mV, $f = 25$ Hz, $c_{CPD} = 10$ μ M

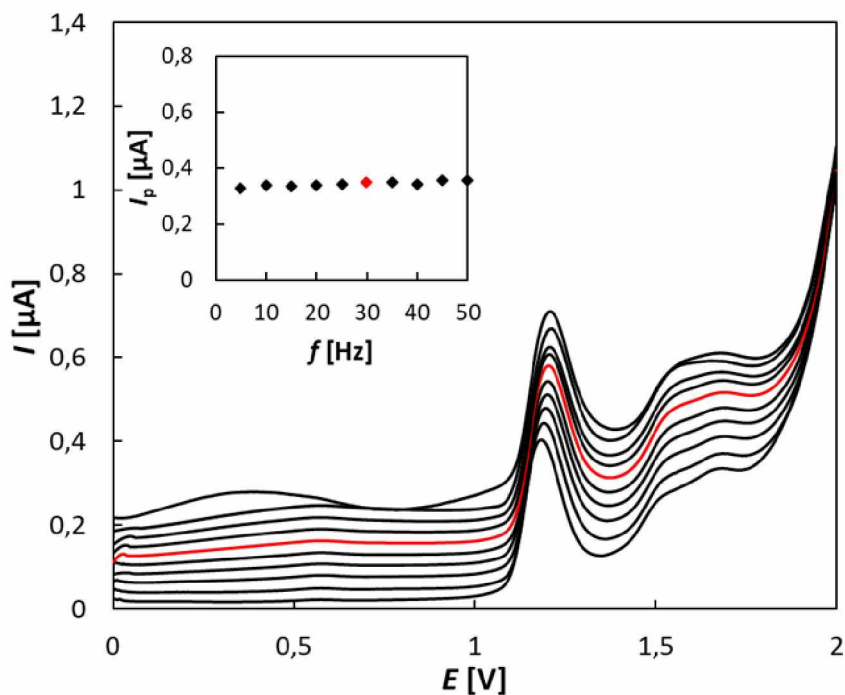
Druhým optimalizovaným parametrem byla výška pulsu ($v = 30$ mV/s, $f = 25$ Hz). Na obrázku 23 jsou vidět naměřené voltametrické křivky a vynesená závislost I_p na A , ze které je patrné, že poslední větší nárůst proudové odezvy I_p byl zaznamenán při amplitudě 30 mV (červeně označená křivka) a poté již pík v podstatě nerostl, ale rozšiřoval se. Pro další měření byla zvolena hodnota výšky pulsu 30 mV. Třetím optimalizovaným parametrem byla frekvence ($v = 30$ mV/s, $A = 30$ mV). Na obrázku 24 lze vidět jak naměřené křivky, tak vynesenou závislost I_p na f , ze které je patrné, že výška píku nebyla ovlivněna hodnotou frekvence. Kvůli dobré opakovatelnosti píku byla pro další měření zvolena frekvence 30 Hz (červeně označená křivka).

Po optimalizaci parametrů SWV byl opět proveden výběr vhodného postupu předúpravy BDDE. Byly testovány stejné procedury se stejnými parametry jako v případě DPV a následovalo opakované měření píku CPD s využitím SWV s optimalizovanými parametry. Spočítané hodnoty RSD pro jednotlivé procedury jsou uvedeny v tabulce 3. Z výsledků vyplývá, že opakovatelnost měření s využitím SWV byla výrazně horší než pro DPV (RSD > 6,0 %). Nejnížší a velice podobné hodnoty byly získány po úpravách BDDE pomocí

cyklování, anodické předúpravy a pulzní předúpravy. Nejvyšší I_p bylo dosaženo během měření po úpravě pomocí cyklování.



Obrázek 23 Optimalizace výšky pulsu SWV pro stanovení CPD. ZE – 0,1 M CH_3COOH , $\nu = 30$ mV/s, $A = 10\text{--}100$ mV, $f = 25$ Hz, $c_{\text{CPD}} = 10$ μM



Obrázek 24 Optimalizace frekvence SWV pro stanovení CPD. ZE – 0,1 M CH_3COOH , $\nu = 30$ mV/s, $A = 30$ mV, $f = 5\text{--}50$ Hz, $c_{\text{CPD}} = 10$ μM

Tabulka 3 Porovnání hodnot relativních směrodatných odchylek pro jednotlivé úpravy BDDE u SWV

	Cyklování	Katodická předúprava	Anodická předúprava	Leštění	Pulzní předúprava
RSD [%]	6,27	11,42	6,04	8,56	6,16

3.1.5 Analytické charakteristiky vyvinuté metody

Byla provedena optimalizace parametrů metod SWV a DPV, aby následně mohla být vybrána citlivější a spolehlivější metoda stanovení CPD v modelových roztocích a zejména v reálných vzorcích přírodních vod a pesticidních přípravků. Byly proměřeny koncentrační závislosti CPD s využitím obou vyvinutých metod v různých rozsazích koncentrací v rozmezí 0,025-50 μM v prostředí 0,1 M CH_3COOH . Ukázalo se ale, že I_p nerostla lineárně v závislosti na c_{CPD} v žádné části z testovaného rozmezí. Proto byly v této fázi opět testovány různé ZE použité již v předchozích kapitolách, ale v žádném z nich nebyla zaznamenána lineární závislost výšky proudové odezvy CPD na koncentraci. Jako řešení se pak ukázalo zvýšení koncentrace CH_3COOH z 0,1 M na 1,0 M. Toto chování lze vysvětlit tím, že probíhající elektrochemická reakce potřebovala více protonů, a proto byla všechna další měření uskutečněna v prostředí 1,0 M CH_3COOH . Výsledné voltametrické křivky zaznamenané v tomto prostředí jsou znázorněny na obrázku 25, z vloženého grafu je patrné, že závislost byla v prostředí koncentrovanější kyseliny lineární, a to v rozsahu 0,025-1,9 μM . Popisuje ji rovnice (3). Tento rozsah představuje tzv. lineární dynamický rozsah (LDR) nové metody stanovení CPD.

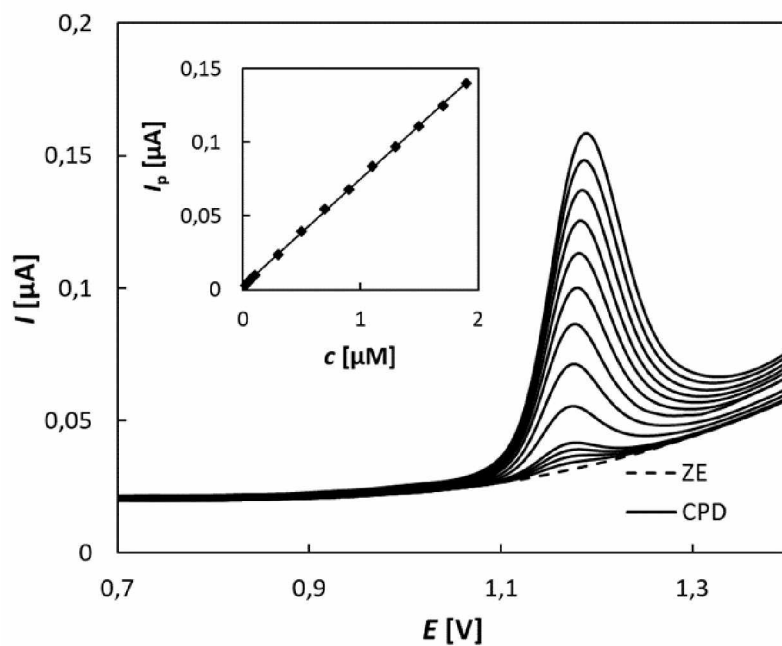
$$I_p [\mu\text{A}] = (0,0726 \pm 0,0005) c [\mu\text{M}] + (0,0024 \pm 0,0005), r = 0,9996 \quad (3)$$

Měření koncentračních závislostí pomocí optimalizované SWV probíhalo také nejdříve v prostředí 0,1 M CH_3COOH v různých rozsazích koncentrací v rozmezí 0,025-50 μM . Získané závislosti ale ani v tomto případě nebyly lineární. Proto byla i pro SWV zvýšena koncentrace kyseliny použité jako ZE a znovu byla změřena koncentrační závislost v rozsahu 0,025-1,9 μM v prostředí 1,0 M CH_3COOH (obrázek 26), která již byla lineární stejně jako v případě DPV. Charakterizuje ji rovnice (4). LDR obou metod byl tedy stejný, a to 0,025-1,9 μM .

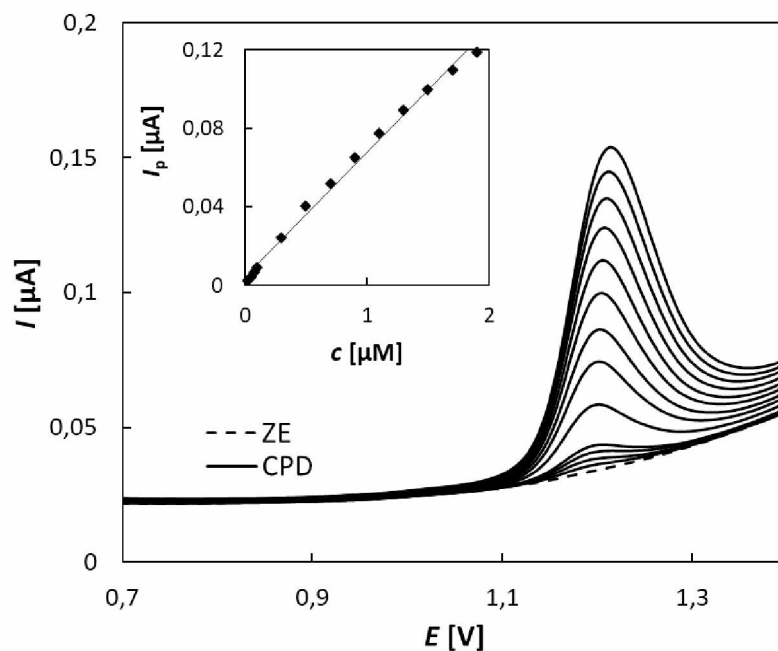
$$I_p [\mu\text{A}] = (0,0633 \pm 0,0015) c [\mu\text{M}] + (0,0044 \pm 0,0015), r = 0,9939 \quad (4)$$

Na obrázku 27 je uvedeno porovnání LDR pro obě testované metody. Je zřejmé, že I_p naměřené pomocí SWV (modrá barva) byly téměř stejné jako pro DPV (červená barva), ale E_p byl posunut k vyššímu potenciálu. Současně byly SW voltametrické píky o něco širší. Z rovnic (3) a (4)

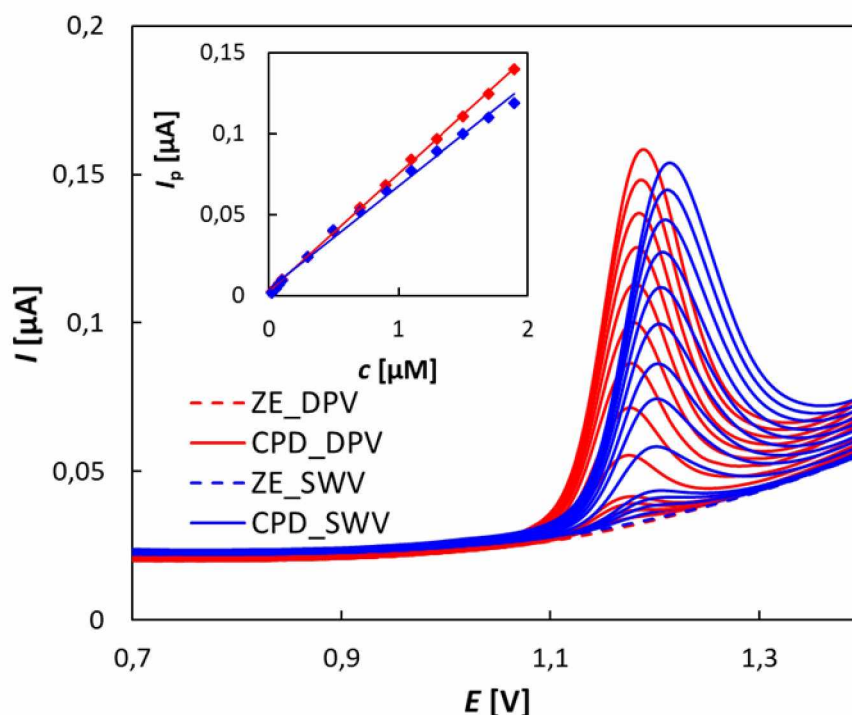
také vyplývá, že směrnice přímky u DPV má vyšší hodnotu, což znamená vyšší citlivost než metoda SWV.



Obrázek 25 DP voltamogramy koncentrační závislosti CPD v rozsahu 0,025-1,9 μ M zaznamenané na BDDE. ZE – 1,0 M CH_3COOH , $v = 30$ mV/s, $A = 40$ mV, $t = 40$ ms; vložena závislost I_p na c_{CPD}



Obrázek 26 SW voltamogramy koncentrační závislosti CPD v rozsahu 0,025-1,9 μ M zaznamenané na BDDE. ZE – 1,0 M CH_3COOH , $v = 30$ mV/s, $A = 30$ mV, $f = 30$ Hz; vložena závislost I_p na c_{CPD}



Obrázek 27 Porovnání DP a SW voltamogramů CPD. ZE – 1,0 M CH_3COOH , $v = 30 \text{ mV/s}$, $A = 40 \text{ mV}$ (DPV), 30 mV (SWV), $f = 30 \text{ Hz}$ (SWV), $t = 40 \text{ ms}$ (DPV), $c_{\text{CPD}} = 0,025 - 1,9 \mu\text{M}$; vložena závislost I_p na c_{CPD} pro obě testované metody

Z rovnic (3) a (4) byly rovněž vypočteny hodnoty LOD a LOQ, které jsou uvedeny v Tabulce 4. Nižší hodnoty byly získány pro DPV, což je dáno i lepší linearitou koncentrační závislosti ($r = 0,9996$) získané pro tuto metodu. Současně jsou v tabulce uvedeny i hodnoty RSD z předchozí kapitoly, které svědčí o výrazně lepší opakovatelnosti měření v případě DPV. Po zhodnocení všech získaných výsledků bylo rozhodnuto, že pro všechna následná měření bude použita metoda DPV s optimalizovanými parametry v prostředí 1,0 M CH_3COOH .

Tabulka 4 Porovnání statistických parametrů pro stanovení CPD s využitím DPV a SWV

	LOD [nM] [*]	LOQ [nM] [*]	LDR [μM] ^{**}	RSD [%] ^{***}
DPV	10,6	35,2	0,025-1,9	1,90
SWV	71,1	236,9	0,025-1,9	6,27

* Hodnoty LOD a LOQ byly vypočteny z koncentrační závislosti v rozsahu 0,025 až 0,1 μM jako $3 \times$ a $10 \times$ směrodatná odchylka úseku podělená směrnici

** LDR byl stanoven experimentálně na základě proměřených koncentračních závislostí

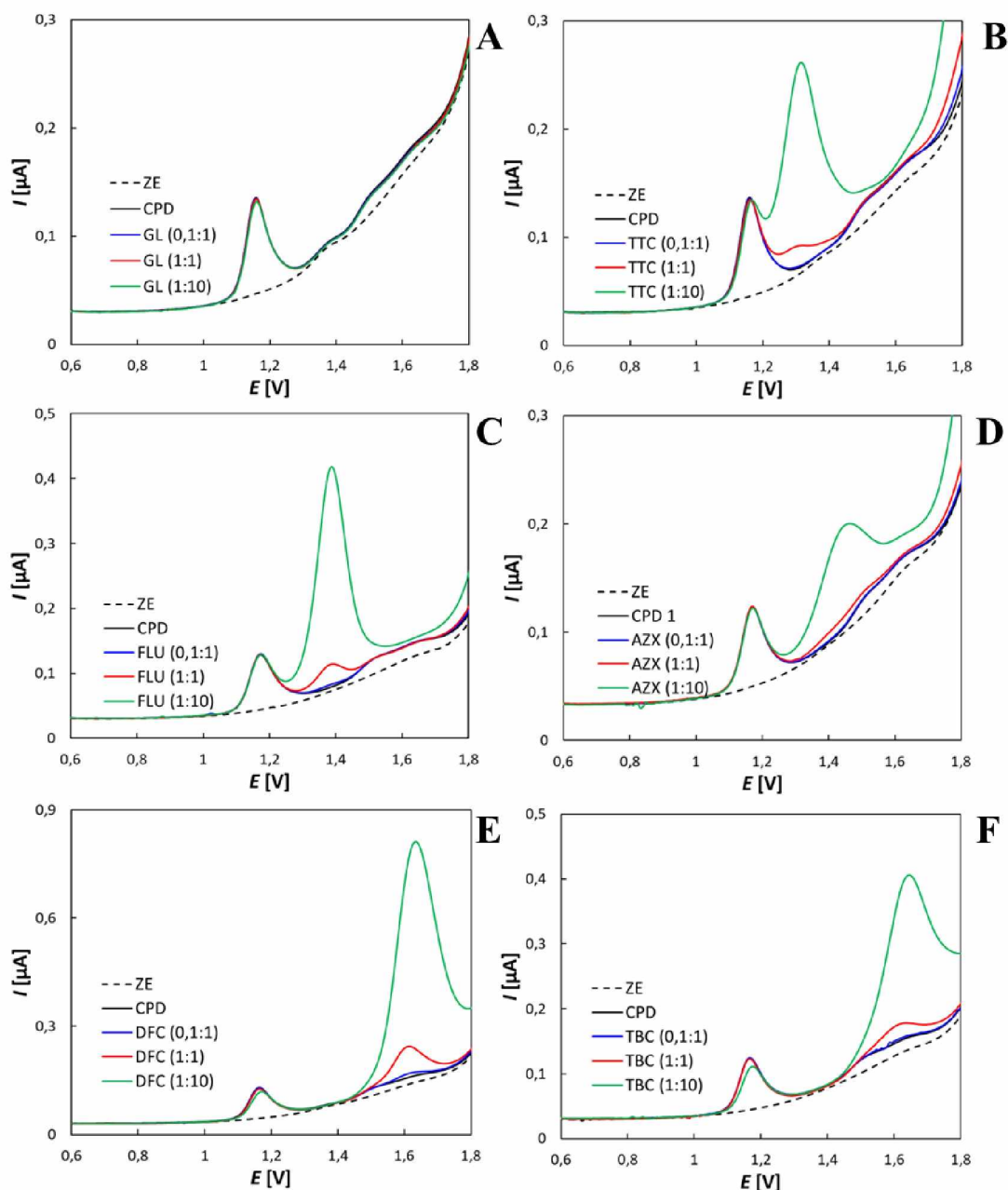
*** Vypočteno z 11 opakovaných měření při koncentraci CPD 10 μM

3.1.6 Interferenční studie

Další část práce byla věnována studiu vlivu možných interferentů na stanovení CPD. Tato studie je důležitá kvůli zjištění, zda látky, které by se mohly vyskytovat v reálných vzorcích spolu s CPD, ovlivňují jeho stanovení. V rámci experimentu bylo testováno 14 běžně používaných pesticidů, a to benalaxyl, metalaxyl, imidacloprid, glyfosát, cyproconazol, epoxiconazol, triticonazol, difenoconazol, paclobutrazol, tebuconazol, azoxystrobin, dicamba, folpet a fludioxonil. Experiment byl proveden tak, že byla změřena křivka ZE ($V = 10$ ml), následně bylo přidáno 10 μ l 0,001M roztoku CPD na výslednou koncentraci 1,0 μ M a byl zaznamenán pík. Následovaly přídavky interferentu na výslednou koncentraci 0,1, 1,0 a 10 μ M, aby poměr interferentu a CPD byl 1:10, 1:1 a 10:1 a byla opět změřena voltametrická křivka. Vliv přídavků interferentů na I_p CPD je shrnut v tabulce 5. Příklady voltametrických křivek pro některé z nich je uveden na obrázku 28. Za významný byl interferent považován, pokud došlo ke změně I_p CPD o více než 5 % a vyhodnocována byla vždy jen náběžná strana píku CPD.

Tabulka 5 Vliv jednotlivých interferentů na výšku píku CPD

Interferent	Vliv na výšku píku CPD [%]		
	$c_{CPD}:c_{int}$		
	10:1	1:1	1:10
Cyproconazole (CPZ)	8,9	7,4	2,8
Benalaxyl (BL)	10,6	8,8	6,3
Metalaxyl (ML)	1,7	2,7	-0,1
Imidacloprid (IMI)	-1,0	-2,3	-4,5
Glyfosat (GF)	-0,4	-0,8	-4,3
Epoxiconazole (EPZ)	2,1	0,8	-6,2
Triticonazol (TTC)	-1,0	-2,4	-3,7
Difenoconazol (DFC)	1,0	-2,7	-14,3
Azoxystrobin (AZX)	-0,1	-0,9	-3,3
Paclobutrazol (PBZ)	0,0	0,2	-7,2
Tebukonazol (TBC)	1,0	-1,7	-11,3
Dicamba (DCB)	2,5	1,7	-2,2
Fludioxonil (FLU)	0,8	0,8	2,8
Folpet (FPT)	0,4	-0,5	-3,8



Obrázek 28 Vliv vybraných interferentů na výšku píku CPD. Metoda – DPV, ZE – 1,0 M CH_3COOH , $v = 30\text{ mV/s}$, $A = 40\text{ mV}$, $t = 40\text{ ms}$, $c_{CPD} = 1,0\text{ }\mu\text{M}$

Většina testovaných pesticidů neovlivňuje výšku píku CPD ani v desetinásobném nadbytku. Příkladem může být glyfosát, který neposkytuje v daném rozsahu potenciálů žádnou proudovou odezvu (obrázek 28A), nebo azoxystrobin, který se sice oxiduje, ale při pozitivnějších hodnotách potenciálu a výšku maxima píku CPD neovlivňuje (obrázek 28D). Největší vliv na výšku píku CPD byl zaznamenán u difenoconazolu a tebuconazolu v přítomnosti jejich desetinásobného nadbytku, u kterých byl vliv větší než 10 %, ale jak je vidět z obrázků 28E a F, vyhodnotitelnost píku CPD nebyla nijak ovlivněna, protože jejich oxidace probíhala při

mnohem pozitivnějších potenciálech a píky jsou dobře oddělené. Důležité je také to, že lze rozlišit píky CPD a fludioxonilu (obrázek 28C), které se vyskytují ve směsi v pesticidních přípravcích. Obecně lze říci, že vliv testovaných interferujících látek byl malý a v žádném případě neznemožnil vyhodnocení píku CPD.

3.1.7 Analýza modelového roztoku, přírodní vody a pesticidních přípravků

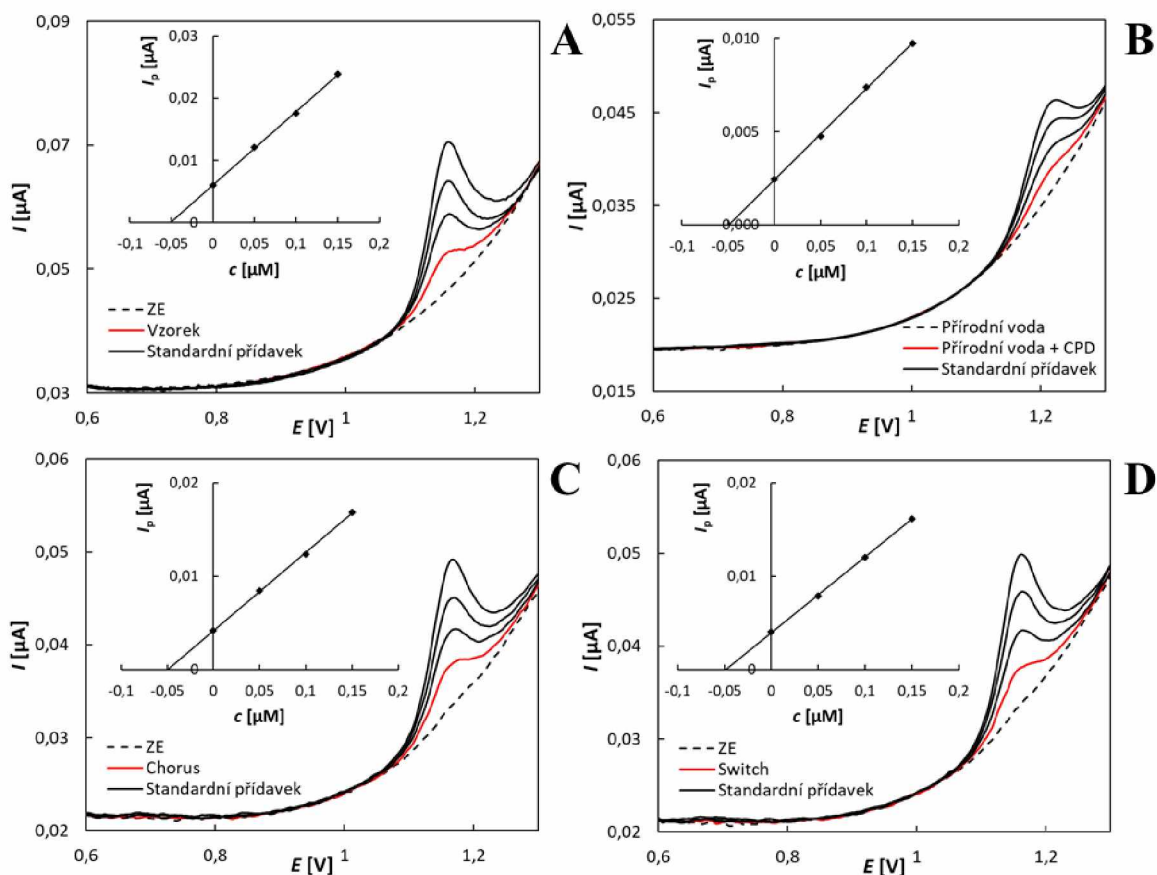
Vyvinutá metoda stanovení CPD s využitím DPV ve spojení s BDDE byla aplikována při analýze modelových roztoků, vzorků přírodní vody a pesticidních přípravků Switch a Chorus. Analýza modelového roztoku CPD o koncentraci 50 nM byla provedena metodou standardního přídatku a stanovení bylo 5× zopakováno. Podrobně je postup popsán v Experimentální části práce a příklad analýzy je uveden na obrázku 29A. Z výsledků uvedených v tabulce 6 vyplývá, že výsledek stanovení je správný a stanovení velmi dobře opakovatelné (RSD = 3,9 %). Vzorky přírodní vody byly analyzovány též metodou standardního přídatku. Přídatkem standardního roztoku CPD byla voda obohacena opět na koncentraci 50 nM a provedena analýza (obrázek 29B). Z výsledků v tabulce 6 je zřejmé, že metoda je vhodná i pro analýzu přírodních vod bez předchozí úpravy vzorků s výjimkou filtrace.

Popis přípravy vzorků a postupu analýzy přípravků Chorus a Switch je popsán v Experimentální části a příklady jednotlivých analýz s využitím metody standardního přídatku jsou uvedeny na obrázku 29C a D. Vyhodnocené výsledky a vypočtené statistické údaje shrnuté v tabulce 6 svědčí o tom, že vyvinutá metoda poskytla dobře opakovatelné výsledky, které se shodovaly s údaji o obsahu účinných látek v přípravcích deklarovanými výrobcem. Navíc se ukázalo, že metoda je vhodná i pro analýzu vícesložkových produktů, jako je přípravek Switch.

Tabulka 6 Shrnutí výsledků analýzy modelového roztoku a reálných vzorků

Elektroda	Vzorek	Přidáno [nM]	Stanovení [nM]	Výtěžnost [%]	RSD [%]
	Modelový roztok	50	(50,8±2,0)	95,3-104,3	3,9
	Přírodní voda	50	(50,2±1,6)	96,2-104,7	3,1
BDDE		Deklarováno [g/kg]	Stanovení [g/kg]	Výtěžnost* [%]	RSD [%]
	CHORUS	500	(502,6±17,9)	95,5-105,4	3,6
	Switch	375	(372,6±15,8)	95,6-107,2	4,3

* Výtěžnost byla vztažena k obsahu CPD v přípravku deklarovanému výrobcem



Obrázek 29 Příklady analýzy modelového roztoku (A), přírodní vody (B) a pesticidních přípravků Chorus (C) a Switch (D) metodou standardního přidavku. Metoda – DPV, ZE – 1,0 M CH_3COOH , $v = 30 \text{ mV/s}$, $A = 40 \text{ mV}$, $t = 40 \text{ ms}$; vložené grafické vyhodnocení metody standardního přidavku

3.2 Aplikace SP/BDDE s různou velikostí pracovní elektrody pro analýzu a stanovení CPD

Kromě klasického tříelektrodového uspořádání elektrochemického článku s BDDE bylo testováno stanovení CPD na SP/BDDE. Měření byla provedena na třech senzorech s různě velkou pracovní elektrodou. Parametry použitých SPE jsou popsány v Experimentální části. Stejně jako u klasického uspořádání bylo pomocí SPE nejdříve sledováno elektrochemické chování CPD a výsledky byly porovnány s výsledky na BDDE. Poté byly změřeny koncentrační závislosti na SP/BDDE a byly porovnány analytické parametry dosažené s využitím BDDE a SP/BDDE. V poslední části této kapitoly bude popsána aplikace SP/BDDE při analýze modelových roztoků, přírodní vody a pesticidních přípravků.

3.2.1 Porovnání elektrochemického chování CPD na BDDE a SP/BDDE

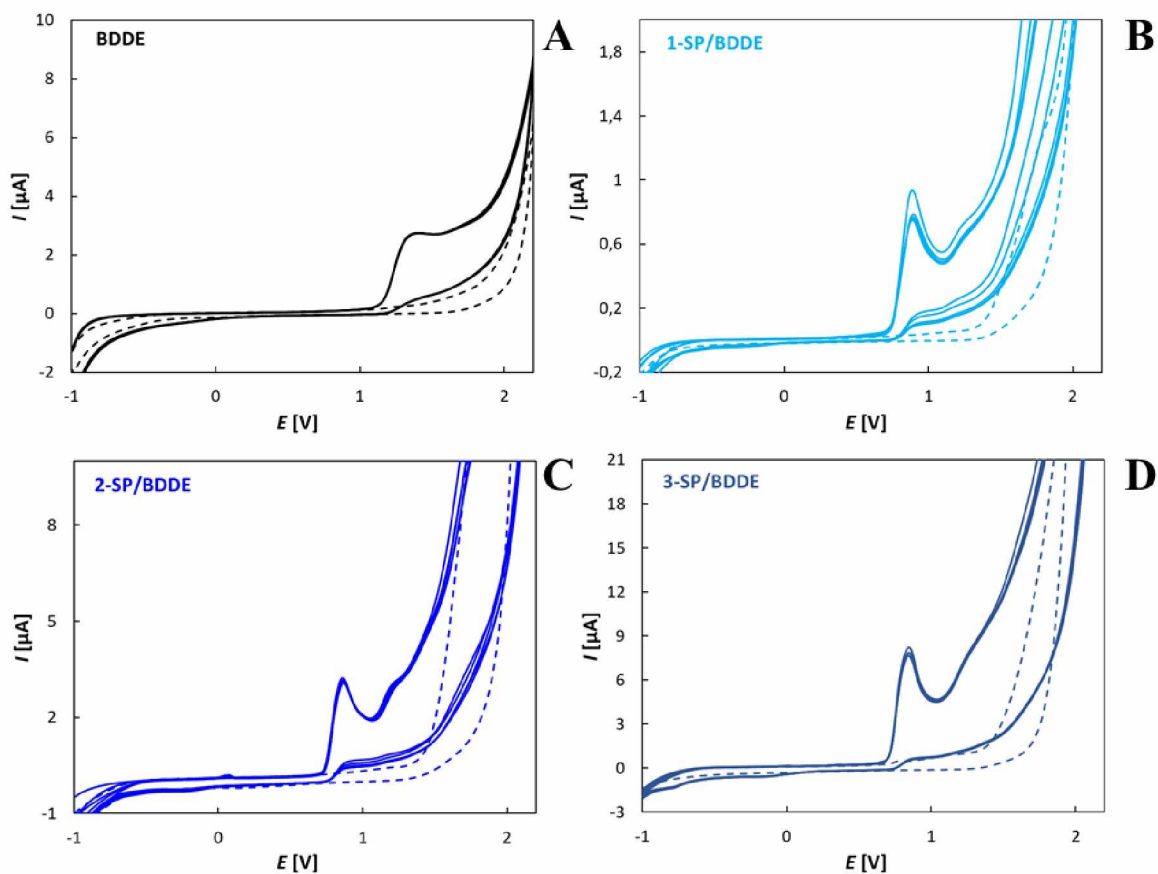
Elektrochemické chování CPD na SP/BDDE bylo zkoumáno pomocí CV při stejných podmínkách jako na BDDE v prostředí 0,1 M CH_3COOH ($E_{\text{poč}} = -1,0 \text{ V}$, $E_{\text{obratu}} = 2,2 \text{ V}$,

$v = 100 \text{ mV/s}$, $c_{\text{CPD}} = 100 \text{ }\mu\text{M}$). Nejdříve bylo změřeno 5 opakovaných skenů za sebou za účelem zjištění opakovatelnosti měření, počtu, výšky a tvaru oxidačních a redukčních píků CPD (obrázek 30). Jednotlivým sensorům byly pro přehlednost přiděleny konkrétní barvy, které budou nadále dodržovány ve všech následujících obrázcích. Parametry oxidačních píků naměřených na BDDE a SP/BDDDE jsou uvedeny v tabulce 7. Na všech SP/BDDDE byly zaznamenány dva oxidační píky ($E_{\text{ox1}} = 0,9 \text{ V}$, $E_{\text{ox2}} = 1,2 \text{ V}$) a náznak redukčního píku ($E_{\text{red}} = -0,16 \text{ V}$), stejně jako na BDDE. Hodnoty RSD byly vypočteny z hodnot I_p opakovaných měření a ve všech případech byly $< 5 \%$. Současně lze říci, že v případě SPE klesala hodnota RSD s rostoucí plochou WE. Nejnižších hodnot bylo dosaženo na BDDE a 3-SP/BDDDE.

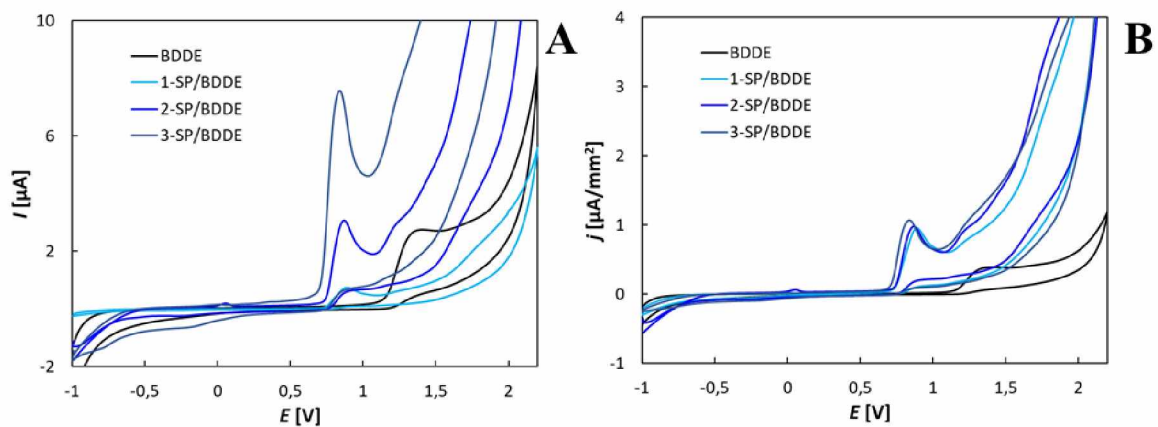
Tabulka 7 Porovnání parametrů 1. oxidačního píku CPD zaznamenaného na testovaných senzorech

Elektroda	Plocha [mm^2]	RSD [%]	E_p [V]	I_p [μA]	j_p [$\mu\text{A mm}^{-2}$]
BDDE	7,07	0,8	1,326	1,249	0,177
1-SP/BDDDE	0,785	4,9	0,883	0,535	0,682
2-SP/BDDDE	3,14	2,0	0,863	2,193	0,698
3-SP/BDDDE	7,07	1,3	0,823	5,405	0,764

Pro lepší porovnání křivek změřených na BDDE a SP/BDDDE byly vždy 5. skeny pro všechny senzory vloženy do jednoho obrázku 31A, z něhož je patrné, že nejvyšší 1. oxidační pík poskytl CPD na 3-SP/BDDDE. Hodnota I_p je ale významně ovlivněna velikostí plochy pracovní elektrody. Aby byly získané proudové odezvy porovnatelné, byly hodnoty proudu v obrázku 31B přepočteny na proudovou hustotu (j) a výšky píku (j_p) jsou spolu s dalšími parametry uvedeny rovněž v tabulce 7. Z tabulky a obrázku vyplývá, že po zohlednění plochy WE byly dosaženy v podstatě stejné hodnoty j_p pro všechny SP/BDDDE. Pík CPD zaznamenaný na BDDE byl $4\times$ menší. Navíc je evidentní, že sledovaný pík CPD byl na tištěných senzorech zaznamenan při potenciálu o přibližně $0,46 \text{ V}$ méně pozitivním ve srovnání s BDDE. Tento jev byl popsán v literatuře [68], kde autoři uvádějí, že potenciálový posun je způsoben použitou referenční elektrodou. Zatímco u BDDE byla použita klasická Ag/AgCl (KCl sat.), v případě SP/BDDDE to byla pseudo-RE (Ag/AgCl).

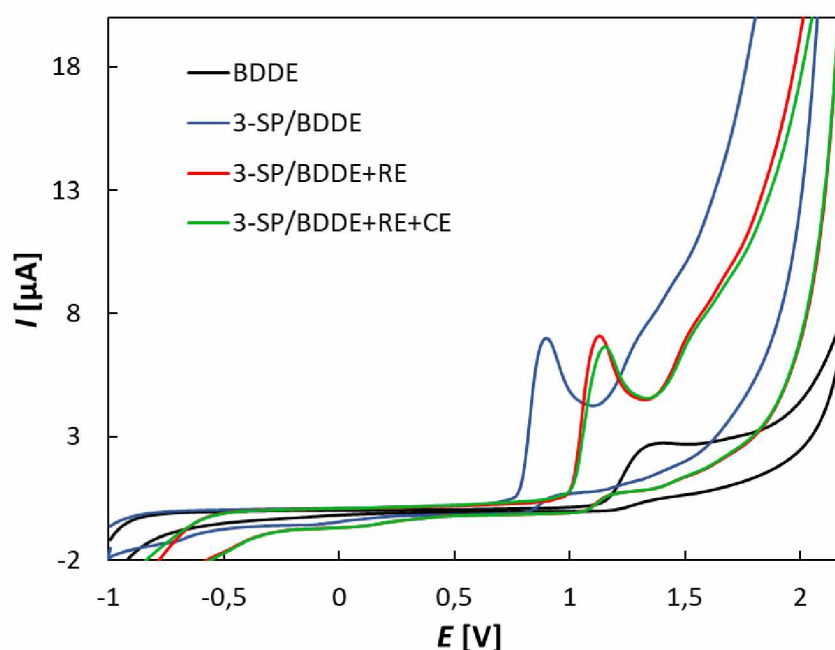


Obrázek 30 Cyklické voltamogramy CPD zaznamenané na BDDE (A), 1-SP/BDDE (B), 2-SP/BDDE (C) a 3-SP/BDDE (D). ZE – 0,1 M CH_3COOH , $E_{\text{poč}} = -1,0 \text{ V}$, $E_{\text{obratu}} = 2,2 \text{ V}$, $\nu = 100 \text{ mV/s}$, $c_{\text{CPD}} = 100 \text{ }\mu\text{M}$.



Obrázek 31 Porovnání cyklických voltamogramů CPD zaznamenaných na BDDE a SP/BDDE (A) a totožné záznamy po přepočtu na proudovou hustotu (B). ZE – 0,1 M CH_3COOH , $E_{\text{poč}} = -1,0 \text{ V}$, $E_{\text{obratu}} = 2,2 \text{ V}$, $\nu = 100 \text{ mV/s}$, $c_{\text{CPD}} = 100 \text{ }\mu\text{M}$.

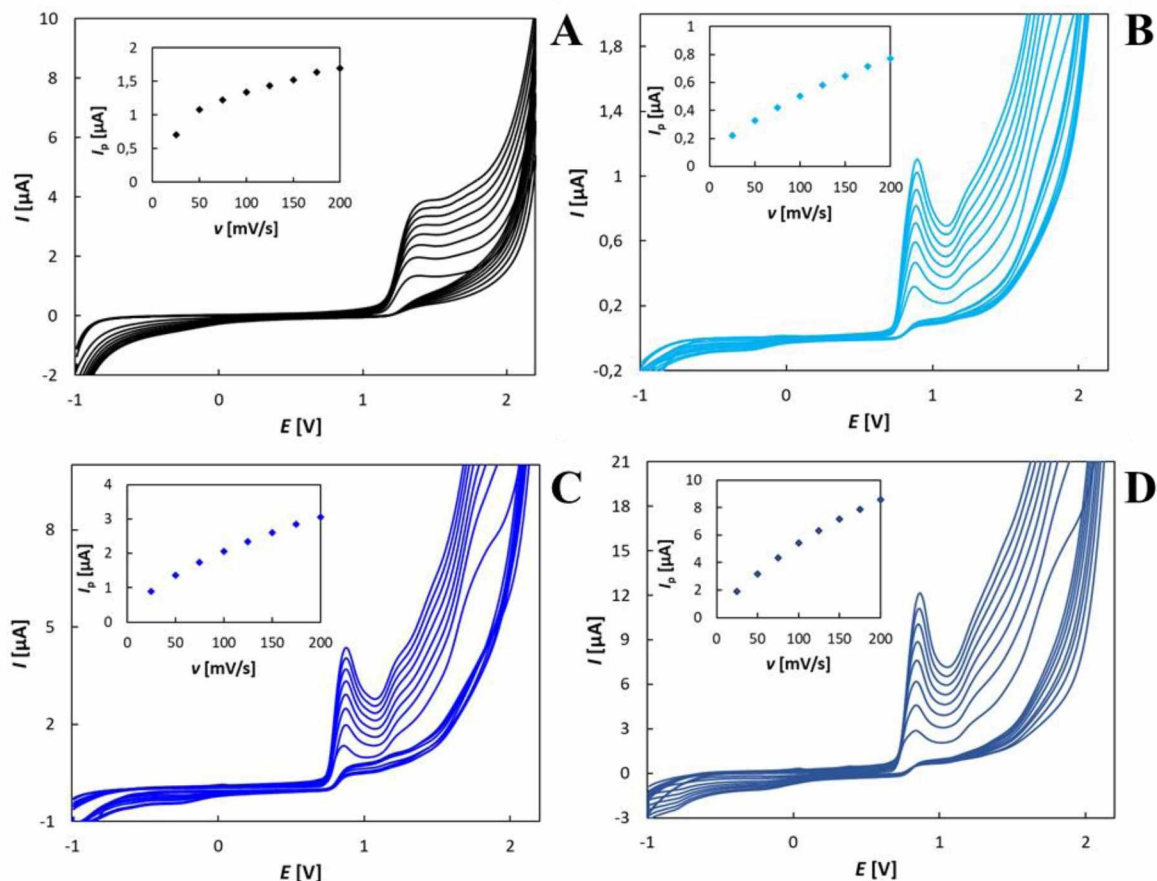
Vliv použité RE a CE na výšku a polohu píku CPD byl ověřen s pomocí 3-SP/BDDE a je ilustrován na obrázku 32. Nejdříve byla změřena křivka na BDDE v klasickém uspořádání článku (černá), následně křivka na SP/BDDE (modrá). Poté byla místo pseudo-RE senzoru připojena externí Ag/AgCl (KCl sat.) a změřena křivka (červená). Nakonec byla zapojena i externí CE (zelená křivka). Zatímco I_p se téměř neměnila, po zapojení externí RE k 3-SP/BDDE se pík CPD posunul ke kladnějším potenciálům a přiblížil se potenciálu pro BDDE. Po zapojení CE se již potenciál píku nezměnil. Dalším faktorem, který může ovlivňovat potenciál píku je geometrie elektrochemického článku, která se opět mezi uspořádáním BDDE a SP/BDDE liší.



Obrázek 32 Cyklické voltamogramy CPD zaznamenané na BDDE a SP/BDDE a se zapojenou externí referenční a pomocnou elektrodou k SP/BDDE. $ZE - 0,1 M CH_3COOH$, $E_{poč} = -1,0 V$, $E_{obratu} = 2,2 V$, $v = 100 mV/s$, $c_{CPD} = 100 Mm$

Pro potvrzení difuze jako řídicího děje sledované oxidační reakce pro 1. oxidační pík CPD na SP-BDDE bylo zopakováno studium vlivu rychlosti polarizace na proudovou odezvu fungicidu stejně jako v případě BDDE. Měření byla provedena v prostředí $0,1 M CH_3COOH$ a rychlost polarizace se měnila od 25 do 200 mV/s s krokem 25 mV/s. Naměřené cyklické voltamogramy a odpovídající závislosti I_p na v jsou uvedeny na obrázku 33. Je vidět, že pík rostl ve všech případech s rostoucí rychlostí, ale tento nárůst nebyl lineární, což vylučuje adsorpci jako řídicí děj. Aby bylo možné výsledky porovnat, byly naměřené hodnoty I_p přepočteny na j_p a vyneseny závislosti na v , $v^{1/2}$ a logaritmická závislost $\log(j_p)_{\log(v)}$, které jsou uvedeny na obrázku 34.

Parametry závislostí $j_p v^{1/2}$ a $\log(j_p)_{\log(v)}$ jsou shrnuty v tabulce 8. Ze všech tří závislostí je patrné, že SP/BDDE poskytovaly signály s mnohem vyšší hodnotou j_p než BDDE. Při porovnání jednotlivých SP/BDDE nejvyšší proudovou hustotu poskytl senzor 3-SP/BDDE.



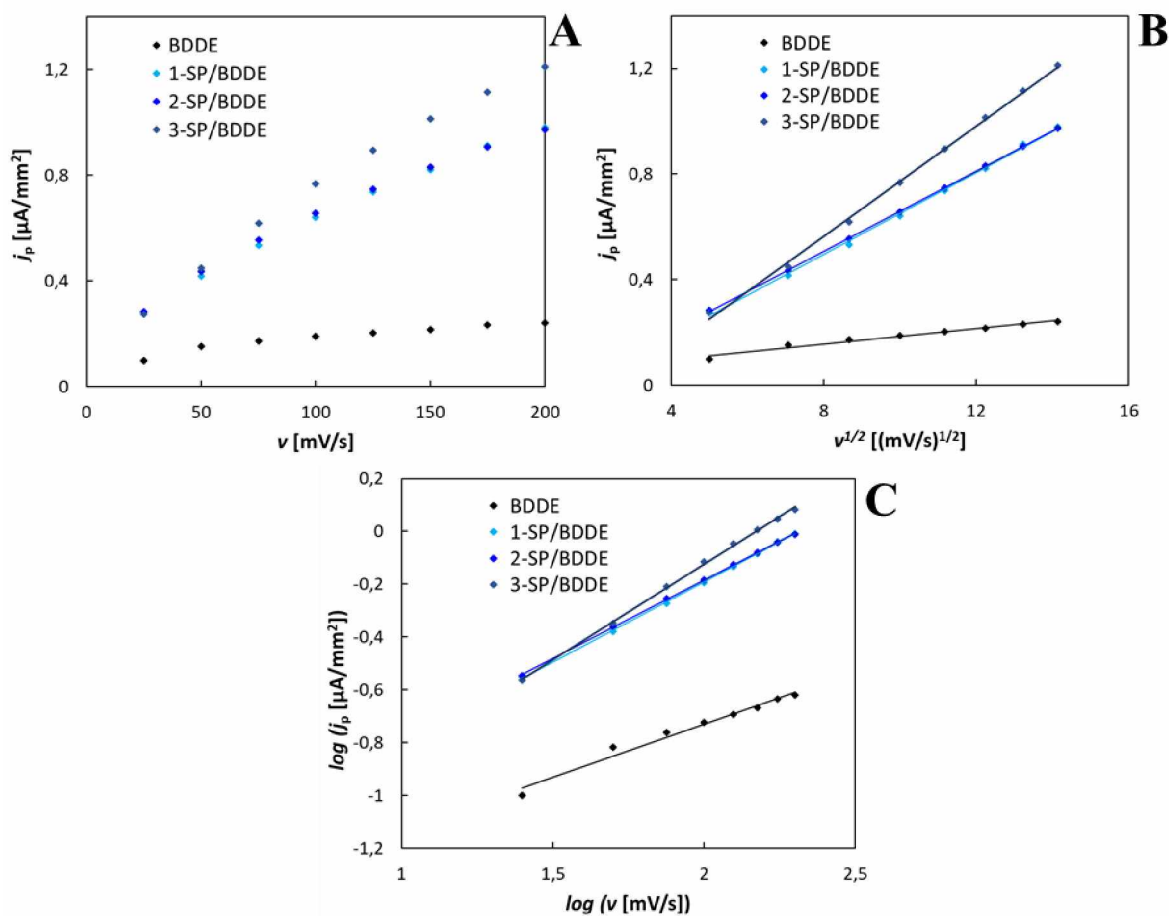
Obrázek 33 Cyklické voltamogramy CPD zaznamenané na BDDE (A), 1-SP/BDDE (B), 2-SP/BDDE (C) a 3-SP/BDDE (D) v závislosti na rychlosti polarizace. $ZE = 0,1 \text{ M CH}_3\text{COOH}$, $E_{\text{poč}} = -1,0\text{V}$, $E_{\text{obratu}} = 2,2\text{V}$, $v = 25\text{-}200 \text{ mV/s}$, $c_{\text{CPD}} = 100 \mu\text{M}$

Hodnoty směrnic logaritmičeských závislostí pro tištěné senzory se stejně jako v případě BDDE blíží teoretické hodnotě pro difuzně řízenou reakci. Zatímco pro BDDE ale byla hodnota $< 0,5$, což vypovídalo o možném vlivu kinetiky, v případě SP/BDDE je směrnice ve všech případech $> 0,5$ ($0,592\text{-}0,724$), což svědčí o možném vlivu adsorpce. Nejvyšší hodnota ($0,724 \pm 0,009$) byla zaznamenána pro 3-SP/BDDE.

Tabulka 8 Parametry závislosti j_p na $v^{1/2}$ a $\log(j_p [\mu\text{A}/\text{mm}^2])$ na $\log(v [V/\text{s}])$ pro všechny testované senzory

Elektroda	Směrnice	Úsek	r
$j_p = f(v^{1/2})$	$[\mu\text{A s}^{1/2} / \text{mm}^2 \text{ V}^{1/2}]$	$[\mu\text{A}]$	
BDDE	(0,459±0,029)	(0,040±0,010)	0,9881
1-SP/BDDE	(2,452±0,046)	-(0,125±0,016)	0,9989
2-SP/BDDE	(2,396±0,010)	-(0,099±0,003)	0,9999
3-SP/BDDE	(3,310±0,054)	-(0,274±0,018)	0,9992

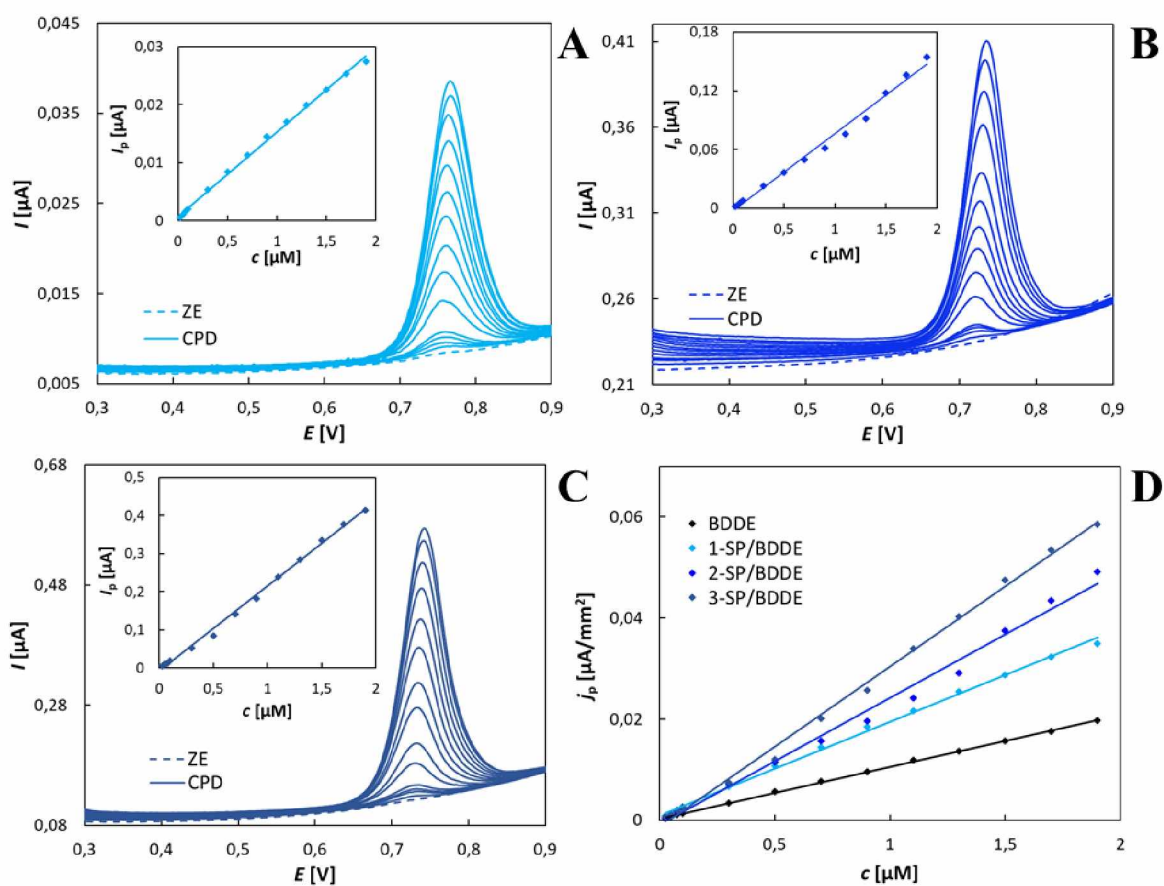
Elektroda	Směrnice	Úsek	r
$\log(j_p) = f(\log(v))$	$[-]$	$[-]$	
BDDE	(0,402±0,025)	-(0,327±0,026)	0,9885
1-SP/BDDE	(0,606±0,006)	-(0,414±0,0059)	0,9997
2-SP/BDDE	(0,592±0,004)	-(0,407±0,0046)	0,9998
3-SP/BDDE	(0,724±0,009)	-(0,600±0,0099)	0,9995



Obrázek 34 Závislost j_p na v (A), j_p na $v^{1/2}$ (B) a logaritmičká závislost j_p na $\log v$ (C). Metoda – CV, ZE – 0,1 M CH_3COOH , $E_{\text{poč}} = -1,0\text{V}$, $E_{\text{obratu}} = 2,2\text{V}$, $v = 25\text{--}200 \text{ mV/s}$, $c_{\text{CPD}} = 100 \mu\text{M}$

3.2.2 Porovnání analytických parametrů dosažených s využitím BDDE a SP/BDDE

V rámci této kapitoly byla metoda stanovení CPD vyvinutá pomocí BDDE převedena na SP/BDDE a za výše optimalizovaných podmínek byly proměřeny koncentrační závislosti na jednotlivých senzorech. Jak již bylo uvedeno, měření probíhala pomocí DPV v prostředí 1,0 M CH_3COOH při následujících parametrech: $\nu = 30 \text{ mV/s}$, $A = 40 \text{ mV}$ a $t = 40 \text{ ms}$. Koncentrace CPD se pohybovala v širokém rozsahu, ale výsledný LDR byl stejně jako v případě BDDE 0,025 až 1,9 μM pro všechny testované SPE. Voltamogramy s vynesnými závislostmi I_p na c_{CPD} jsou uvedeny na obrázcích 35A-C. Na obrázku 35D jsou uvedeny stejné koncentrační závislosti po přepočtu na j_p pro jednotlivé SP/BDDE v porovnání s BDDE. Parametry těchto závislostí včetně vypočtených hodnot LOD a LOQ jsou uvedeny v tabulce 9.



Obrázek 35 DP voltamogramy CPD zaznamenané na 1-SP/BDDE (A), 2-SP/BDDE (B) a 3-SP/BDDE (C) v závislosti na koncentraci s vloženými závislostmi I_p na c_{CPD} ; závislosti j_p na c_{CPD} pro všechny senzory (D). ZE – 1,0 M CH_3COOH , $\nu = 30 \text{ mV/s}$, $A = 40 \text{ mV}$, $t = 40 \text{ ms}$, 0,025-1,9 μM

Tabulka 9 Porovnání parametrů koncentračních závislostí pro CPD (0,025-1,9 μM) zaznamenaných na BDDE a SP/BDDE

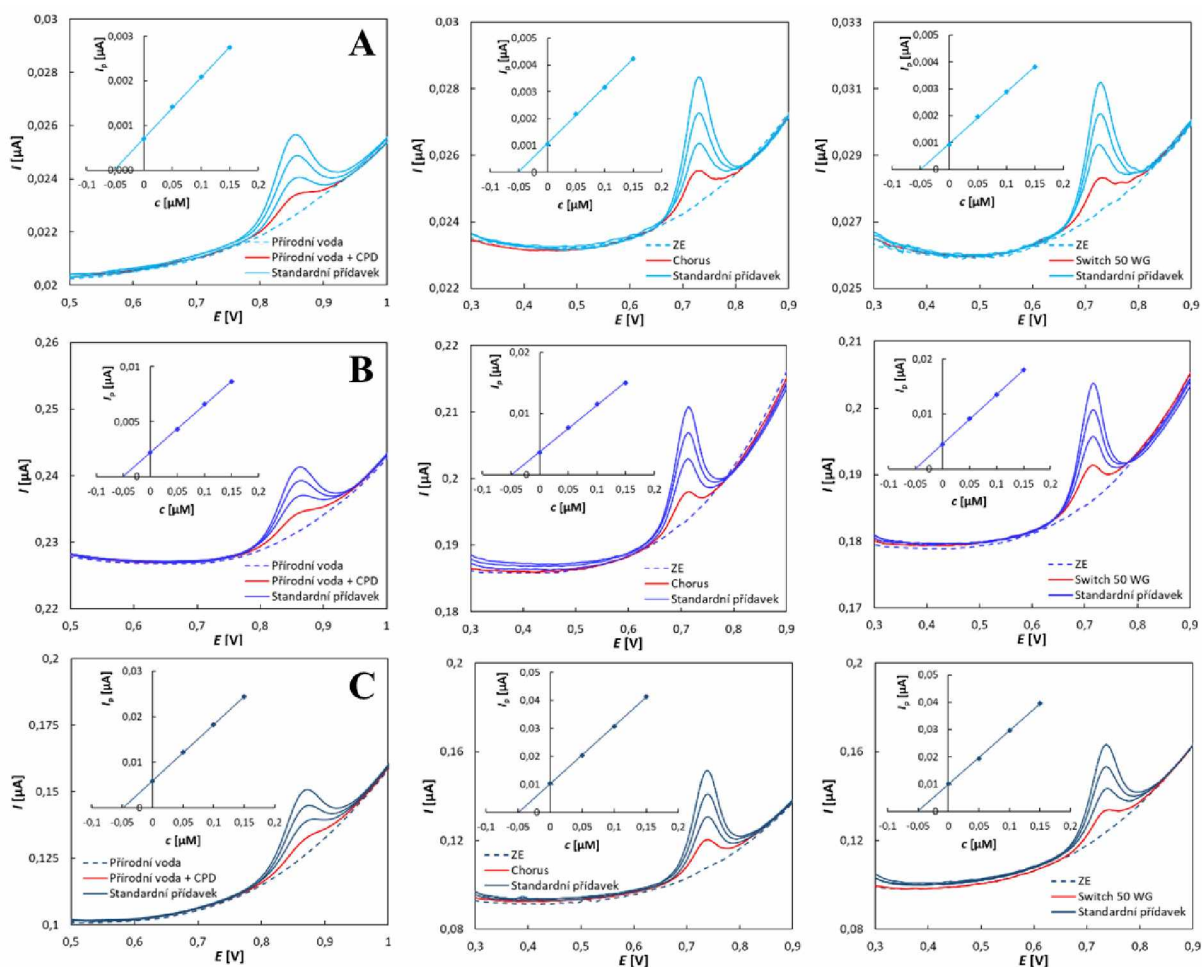
Elektroda	Směrnice [$\mu\text{A} / \text{mm}^2 \mu\text{M}$]	Úsek [μA]	LOD* [nM]	LOQ* [nM]	<i>r</i>
BDDE	(0,010 \pm 0,001)	(0,001 \pm 0,001)	10,6	35,2	0,9968
1-SP/BDDE	(0,018 \pm 0,001)	(0,001 \pm 0,001)	9,9	33,0	0,9991
2-SP/BDDE	(0,025 \pm 0,002)	(0,001 \pm 0,001)	5,4	18,0	0,9959
3-SP/BDDE	(0,032 \pm 0,001)	(0,001 \pm 0,001)	2,8	9,4	0,9984

* Hodnoty LOD a LOQ byly vypočteny z koncentrační závislosti v rozsahu 0,025 až 0,1 μM jako $3 \times$ a $10 \times$ směrodatná odchylka úseku podělená směrnici

Z obrázku 35D a údajů uvedených v tabulce 9 je patrné, že nejnižší směrnici vykazovala závislost zaznamenaná pomocí BDDE. V případě SP/BDDE pak rostla citlivost s rostoucí plochou WE senzoru, nejvyšší citlivost a současně nejnižší hodnoty LOD a LOQ byly dosaženy na 3-SP/BDDE. Oproti BDDE byla citlivost $3 \times$ vyšší a hodnota LOD $3,8 \times$ nižší.

3.2.3 Analýza modelového roztoku, přírodní vody a pesticidních přípravků

Stejně jako v případě BDDE byla DPV s SP/BDDE senzory aplikována při analýze modelového roztoku ($c_{\text{CPD}} = 50 \text{ nM}$), přírodní vody s přídavkem CPD ($c_{\text{CPD}} = 50 \text{ nM}$) a pesticidních přípravků Chorus ($c_{\text{CPD}} = 500 \text{ g/kg}$) a Switch ($c_{\text{CPD}} = 375 \text{ g/kg}$). K vyhodnocení byla použita metoda standardního přídavku. Příklady záznamů konkrétních analýz jsou uvedeny na obrázku 36 a všechny dosažené výsledky jsou uvedeny v tabulkách 10 a 11. Z nich vyplývá, že všechna testovaná uspořádání prokázala, že jsou vhodná pro stanovení CPD v modelových i reálných vzorcích s komplexní maticí s RSD menší než 5 %. Ve všech případech ležela správná koncentrace uvnitř stanoveného intervalu spolehlivosti.



Obrázek 36 Příklady analýzy modelového roztoku, přírodní vody a pesticidních přípravků Chorus a Switch metodou standardního přídávku s využitím 1-SP/BDDE (A), 2-SP/BDDE (B) a 3-SP/BDDE (C). Metoda – DPV, ZE – 1,0 M CH_3COOH , $v = 30 \text{ mV/s}$, $A = 40 \text{ mV}$, $t = 40 \text{ ms}$

Tabulka 10 Výsledky analýzy modelového roztoku a přírodní vody

Elektroda	Vzorek	Přidáno [nM]	Stanoveno [nM]	Výtěžnost [%]	RSD ₅ [%]
BDDE	Modelový roztok	50	(50,8±2,0)	95,3-104,3	3,9
1-SP/BDDE			(48,5±2,3)	94,0-102,4	4,7
2-SP/BDDE			(50,2±1,9)	96,3-104,2	3,7
3-SP/BDDE			(50,9±1,9)	97,2-106,0	3,8
BDDE	Přírodní voda	50	(50,2±1,6)	96,2-104,7	3,1
1-SP/BDDE			(50,7±1,7)	95,8-105,1	3,4
2-SP/BDDE			(49,9±1,5)	96,0-104,8	3,1
3-SP/BDDE			(50,8±2,0)	96,2-105,9	3,9

Tabulka 11 Výsledky analýzy pesticidních přípravků BDDE a SP/BDDE

		Deklarováno	Stanoveno	Výtěžnost*	RSD _s
	Vzorek	[g/kg]	[g/kg]	[%]	[%]
BDDE			(502,6±17,9)	95,5-105,4	3,6
1-SP/BDDE	Chorus	500	(502,2±16,0)	96,8-105,8	3,2
2-SP/BDDE			(493,9±18,2)	94,5-104,7	3,7
3-SP/BDDE			(504,9±13,5)	96,8-103,9	2,7
BDDE			(372,6±15,8)	95,6-107,2	4,3
1-SP/BDDE	Switch 50	375	(375,2±14,8)	94,1-104,2	3,9
2-SP/BDDE	WG		(373,8±11,1)	96,5-103,6	3,0
3-SP/BDDE			(374,4±10,8)	94,4-102,2	2,9

* Výtěžnost byla vztažena k obsahu CPD v přípravku deklarovanému výrobcem

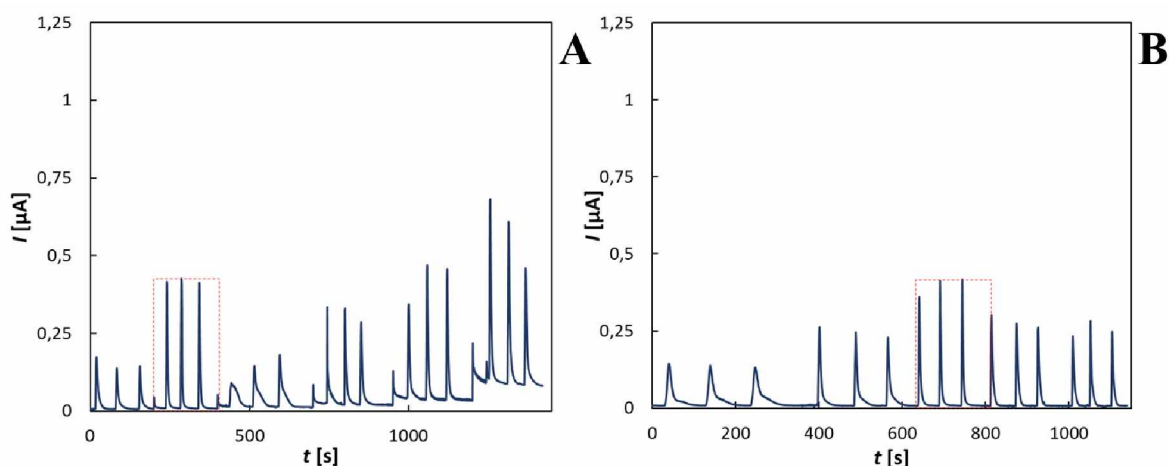
3.3 Stanovení CPD s využitím průtokové injekční analýzy

s elektrochemickou detekcí

Poslední část diplomové práce byla věnována aplikaci FIA-ED s inkorporovanými SP/BDDE senzory při stanovení CPD. Stejně jako u předchozích uspořádání byly nejdříve optimalizovány parametry metody, získány základní statistické parametry a následně byla provedena analýza modelových a reálných vzorků.

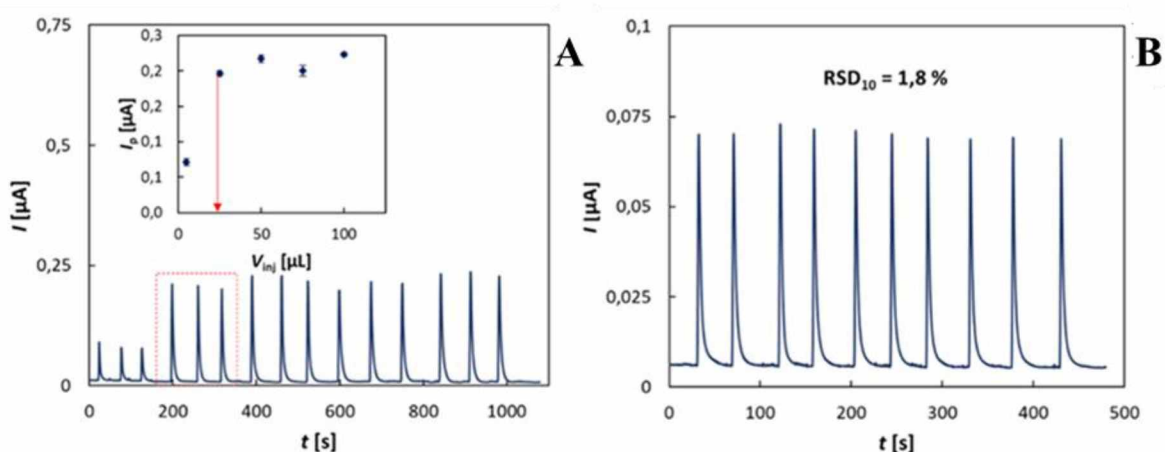
3.3.1 Optimalizace parametrů FIA/ED

Optimalizace parametrů byla provedena pomocí senzoru 3-SP/BDDE, který vykazoval nejlepší výsledky v předchozích experimentech. Stejně podmínky byly následně použity i při aplikaci 1-SP/BDDE a 2-SP/BDDE. Základním elektrolytem, resp. mobilní fází, byla 1,0 M CH₃COOH, koncentrace CPD byla 20 μM a měření bylo vždy 3× zopakováno. Prvním optimalizovaným parametrem byl potenciál detekce (E_{det}), tzn. potenciál, při kterém bude probíhat oxidace analytu v průtokové elektrochemické cele. Byly testovány potenciály v rozmezí 0,8 až 1,3 V ($F_m = 1,0$ ml/min, $V_{inj} = 50$ μl). Získané záznamy jsou uvedeny na obrázku 37A. Nejvyšší proudová odezva a současně nejlepší opakovatelnost byla sledována u píků při $E_{det} = 0,9$ V. Při tomto potenciálu byla provedena všechna následující měření s využitím FIA-ED. Dalším optimalizovaným parametrem byla rychlost průtoku (F_m) mobilní fáze. Byly testovány rychlosti od 0,5 do 2,5 ml/min s krokem 0,5 ml/min ($E_{det} = 0,9$ V, $V_{inj} = 50$ μl). Z obrázku 37B je patrné, že nejvyšší píky byly naměřeny při $F_m = 1,5$ ml/min. Při této rychlosti byla provedena všechna následující měření.



Obrázek 37 Optimalizace potenciálu detekce (A) a průtokové rychlosti mobilní fáze (B) pro FIA-ED. ZE – 1,0 M CH_3COOH , $E_{det} = 0,8-1,3$ V (A) a 0,9 V (B), $F_m = 1$ ml/min (A) a 0,5-2,5 ml/min, $V_{inj} = 50$ μ l, $c_{CPD} = 20$ μ M

Třetím optimalizovaným parametrem byl objem dávkovací smyčky (V_{inj}). Byly použity smyčky o objemech 5,0, 25, 50, 75 a 100 μ l ($E_{det} = 0,9$ V, $F_m = 1,0$ ml/min). Získané záznamy jsou uvedeny na obrázku 38. Výška píky se v rozsahu 25-100 μ l neměnila, nejlepší opakovatelnost byla pozorována se smyčkou o objemu 25 μ l. Tato smyčka byla používána při následujících měřeních. Po optimalizaci parametrů byla otestována opakovatelnost měření, která měla ověřit, zda parametry metody byly nastaveny správně. Pík CPD ($c_{CPD} = 5$ μ M) byl za daných podmínek změřen 10 \times a získané píky jsou zobrazeny na obrázku 38B. Byly vyhodnoceny výšky všech 10 píků a byla vypočtena hodnota RSD = 1,8 %, která vypovídá o velice dobré opakovatelnosti měření, a tedy o správně nastavených parametrech metody pro stanovení CPD.



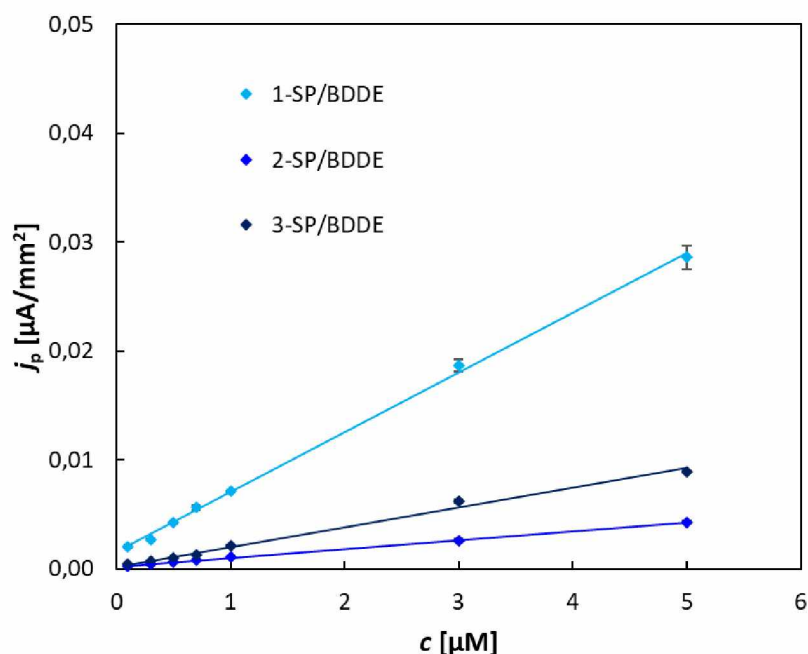
Obrázek 38 Optimalizace objemu dávkovací smyčky (A) a ověření opakovatelnosti měření při optimalizovaných podmínkách FIA-ED (B). ZE – 1,0 M CH_3COOH , $E_{det} = 0,9$ V, $F_m = 1,5$ ml/min, $V_{inj} = 5-100$ μ l (A), $V_{inj} = 25$ μ l (B), $c_{CPD} = 20$ μ M (A) 5 μ M (B)

3.3.2 Analytické charakteristiky vyvinuté metody

Po optimalizaci parametrů FIA-ED bylo provedeno měření koncentračních závislostí a byl stanoven LDR. Na obrázku 39 je uvedeno srovnání závislostí v rozsahu od 0,1 do 5 μM pro všechny 3 testované senzory. Každá koncentrace byla změřena 3 \times , výšky píků byly zprůměrovány. Hodnoty proudu byly přepočteny na proudovou hustotu a byla vynesena závislost j_p na c_{CPD} . Parametry těchto závislostí spolu s vypočítanými hodnotami LOD a LOQ jsou shrnuty v tabulce 12. Nejvyšší hodnoty j_p i nejvyšší hodnota směrnice koncentrační závislosti ($0,0055 \pm 0,0001$) byly získány pro 1-SP/BDDE, tedy senzor s nejmenší plochou WE.

Tabulka 12 Porovnání parametrů koncentračních závislostí pro CPD zaznamenaných na SP/BDDE metodou FIA-ED

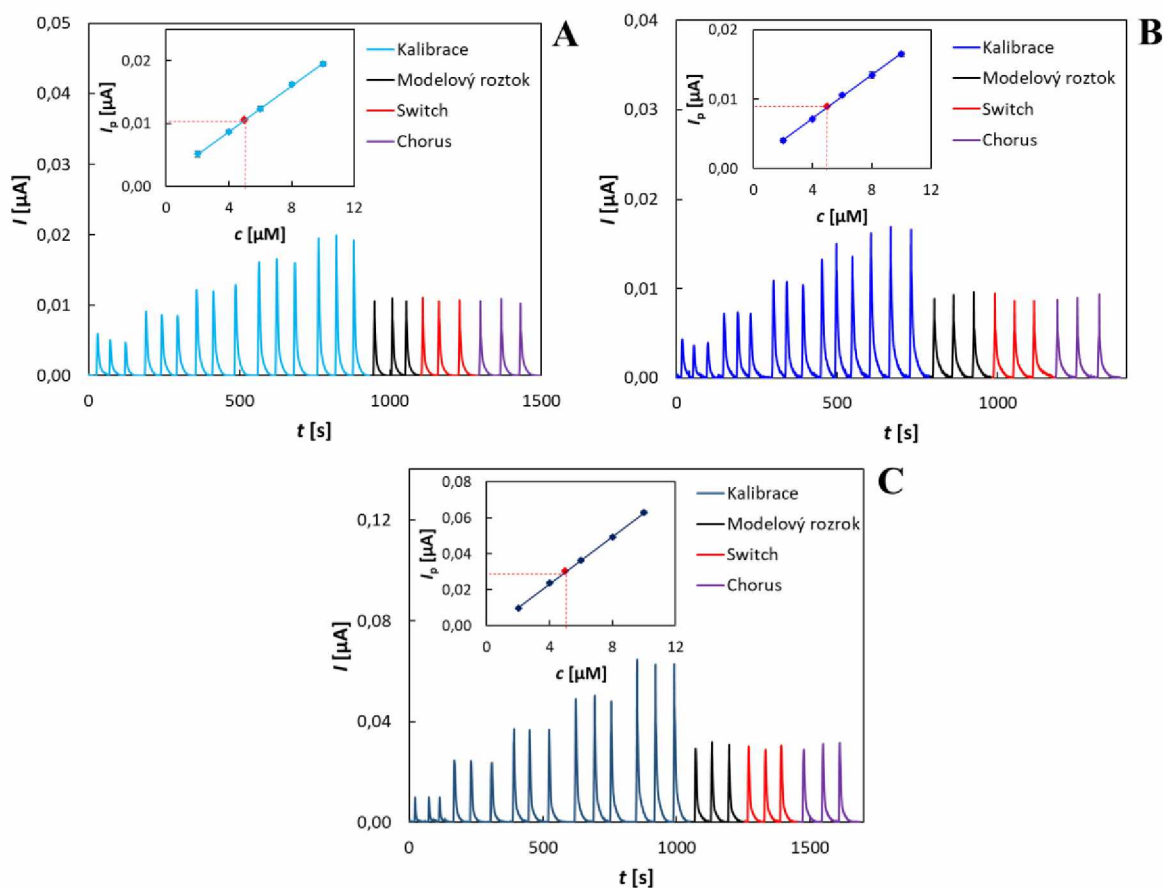
Elektroda	Směrnice [$\mu\text{A} / \text{mm}^2 \mu\text{M}$]	Úsek [μA]	LOD [nM]	LOQ [nM]	r
1SP/BDDE	($0,0055 \pm 0,0001$)	($0,0016 \pm 0,0002$)	117	389	0,9985
2SP/BDDE	($0,0008 \pm 0,0000$)	($0,0003 \pm 0,0000$)	92	305	0,9991
3SP/BDDE	($0,0018 \pm 0,0001$)	($0,0002 \pm 0,0002$)	278	927	0,9917



Obrázek 39 Porovnání koncentračních závislostí CPD po přepočtu na proudové hustoty pro všechny testované senzory získané metodou FIA-ED. ZE – 1,0 M CH_3COOH , $E_{\text{det}} = 0,9 \text{ V}$, $F_m = 1,5 \text{ ml/min}$, $V_{\text{inj}} = 25 \mu\text{l}$, $c_{\text{CPD}} = 0,1-5,0 \mu\text{M}$.

3.3.3 Analýza modelových roztoků a pesticidních přípravků

Na závěr byla stejně jako na BDDE a SP/BDDE s využitím DPV provedena analýza modelových roztoků a pesticidních přípravků novou vyvinutou metodou FIA-ED. Přírodní vody nebyly analyzovány, protože citlivost metody nebyla pro tyto vzorky dostatečná. Vyhodnocení bylo nejdříve provedeno metodou standardního přidavku, která byla použita i v předchozích uspořádáních, ale při analýze modelových roztoků o známé koncentraci CPD se ukázalo, že pro FIA-ED není vhodná a neposkytuje správné výsledky. Vyhodnocení tedy bylo provedeno metodou kalibrační přímky. S využitím každého senzoru byla nejdříve změřena kalibrační závislost v rozsahu 2,0 až 10 μM a získané body byly vyneseny do grafu. Poté byly analyzovány modelové roztoky o koncentraci 5,0 μM a vzorky pesticidních přípravků Switch a Chorus. Záznamy zahrnující změřené kalibrační závislosti i vzorky jsou uvedeny na obrázku 40 a výsledky spolu s odpovídajícími statistickými parametry jsou uvedeny v tabulce 13.



Obrázek 40 Analýza modelového roztoku a přípravků s využitím FIA-ED s 1-SP/BDDE (A), 2-SP/BDDE (B), 3-SP/BDDE (C). $ZE = 1,0 M CH_3COOH$, $E_{det} = 0,9 V$, $F_m = 1,5 ml/min$, $V_{inj} = 25 \mu l$

Tabulka 13 Výsledky stanovení CPD v modelovém roztoku a pesticidních přípravcích pomocí FIA-ED

Elektroda	Vzorek	Přidáno [μM]	Stanoveno [μM]	Výtěžnost [%]	RSD_s [%]
1-SP/BDDE	Modelový roztok	5	(5,018 \pm 0,134)	96,1-104,6	2,7
2-SP/BDDE			(5,046 \pm 0,145)	96,5-105,1	2,9
3-SP/BDDE			(5,125 \pm 0,173)	95,6-106,1	3,7
Elektroda	Vzorek	Deklarováno [g/kg]	Stanoveno [g/kg]	Výtěžnost [%]	RSD_s [%]
1-SP/BDDE	Chorus	500	(504,6 \pm 13,9)	96,5-105,3	2,7
2-SP/BDDE			(498,9 \pm 14,8)	96,5-105,1	3,0
3-SP/BDDE			(510,5 \pm 14,5)	96,6-105,0	2,9
1-SP/BDDE	Switch 50 WG	375	(377,0 \pm 13,9)	96,5-105,3	2,7
2-SP/BDDE			(373,8 \pm 11,1)	95,6-106,1	3,7
3-SP/BDDE			(380,5 \pm 11,7)	96,9-106,7	3,1

Z tabulky vyplývá, že vyvinutá metoda FIA-ED umožňuje stanovení CPD nejen v modelových roztocích, ale i v pesticidních přípravcích, které představují složitou matici. Správné výsledky odpovídající koncentraci CPD deklarované výrobcí byla stanovena i ve směsném přípravku Switch, což je dáno správným nastavením potenciálu detekce. Stanovení bylo navíc velmi dobře opakovatelné, všechny testované senzory poskytly RSD < 4,0 %.

ZÁVĚR

Jedním z cílů této diplomové práce bylo studium voltametrického chování fungicidu cyprodinilu na BDDE a SP/BDDE a návržení optimálních podmínek jeho voltametrického stanovení. Dalším cílem byla aplikace SP/BDDE v průtokové cele a vývoj metody stanovení cyprodinilu pomocí FIA-ED. Na závěr byly vyvinuté metody aplikovány při analýze praktických vzorků přírodní vody a komerčně dostupných pesticidních přípravků.

Voltametrické chování CPD bylo sledováno pomocí CV ve spojení s BDDE. Byly zjištěny 2 oxidační píky, výraznější při 1,4 V a malý při 1,7 V, a náznak redukčního píku při -0,2 V. Pro další studium byl zvolen první oxidační pík CPD. Byl studován vliv pH na výšku a polohu píku. Nejvyšší odezva a pík posunutý k negativnějšímu potenciálu byly zaznamenány v 0,1 M CH_3COOH , proto byla zvolena jako ZE. Tato volba byla potvrzena též pomocí DPV a SWV. Dále bylo zjištěno, že řídicím dějem elektrodové reakce je difuze s možným vlivem kinetiky předřazené či následné chemické reakce. Potom byla provedena optimalizace DPV a SWV pro stanovení CPD u obou metod a byly zjištěny analytické charakteristiky. V průběhu experimentů se ukázalo, že výška píku v 0,1 M CH_3COOH nerostla lineárně v závislosti na c_{CPD} , což bylo vyřešeno zvýšením koncentrace kyseliny na 1,0 M CH_3COOH . LDR obou metod byl shodný 0,025-1,9 μM . DPV vykazovala v porovnání se SWV vyšší citlivost, poskytovala užší píky posunuté k negativnějšímu potenciálu, hodnoty LOD (10,6 nM) a LOQ (35,2 nM) byly nižší a opakovatelnost měření (RSD = 1,9 %) 3× lepší. S využitím DPV byla proměřena interferenční studie, kdy bylo testováno 14 běžně používaných pesticidů, z nichž většina neovlivňovala odezvu CPD ani v desetinásobném přebytku. Vliv větší než 10 % byl pozorován u tebuconazolu a difenoconazolu v desetinásobném přebytku, ale pík CPD byl stále dobře vyhodnotitelný kvůli rozdílnému potenciálu oxidace. Poté byla vyvinutá metoda DPV otestována při analýze modelových roztoků, dvou pesticidních přípravků a přírodní vody. Metoda poskytla u obou pesticidních přípravků, jednosložkového i vícesložkového, výsledky (RSD = 3,9 %) odpovídající údajům výrobců o obsahu účinné látky. Správných výsledků bylo dosaženo i při analýze přírodní vody bez předchozí úpravy (RSD = 3,1 %).

Kromě klasického tříelektrodového uspořádání s BDDE byly testovány SP/BDDE s různou velikostí plochy WE. Nejdříve bylo studováno chování CPD pomocí CV, přičemž byly stejně jako na BDDE sledovány 2 oxidační píky a náznak jednoho redukčního píku. Co se týče 1. oxidační odezvy, tištěné senzory v porovnání s BDDE poskytly po přepočtu na proudovou hustotu 4× vyšší píky posunuté k výrazně negativnějším potenciálům. Tento potenciálový

posun byl způsoben použitou pseudo-RE u SP/BDDE. Ze studia vlivu rychlosti polarizace na probíhající elektrodové reakce bylo zjištěno, že se jedná opět o difuzně řízený děj, tentokrát s možným vlivem adsorpce. Stejně jako u BDDE byl jako ZE použit roztok 1,0 M CH₃COOH a byl zjištěn shodný LDR v rozmezí 0,025-1,9 μM na všech typech senzorů. Citlivost stanovení rostla s rostoucí plochou WE senzoru. Nejvyšší citlivost a zároveň nejnižší LOD (2,8 nM) a LOQ (9,4 nM) byly pozorovány u 3-SP/BDDE. Při porovnání s BDDE vykazovaly SPE 3× vyšší citlivost a 3,8× nižší LOD. Vyvinutá metoda na SP/BDDE byla úspěšně otestována na modelových roztocích a reálných vzorcích vody i přípravků. Bylo zjištěno, že metoda je vhodná pro stanovení CPD i ve vzorcích se složitější maticí. RSD na všech typech SPE byla < 5 %.

Závěrečná experimentální část byla věnována použití SP/BDDE v FIA-ED. Nosným médiem byla zvolena 1,0 M CH₃COOH, která se osvědčila již v případě voltametrického stanovení. Nejdříve byly optimalizovány podmínky metody, a to F_m , E_{det} , V_{inj} , a ověřena opakovatelnost měření (RSD = 1,8 %). LDR pro tuto FIA-ED byl 0,1-5,0 μM. Nejvyšší proudová hustota a nejvyšší citlivost byly zaznamenány na 1-SP/BDDE, tedy senzoru s nejmenší plochou WE. Nejnižší hodnoty LOD (92 nM) a LOQ (305 nM) byly vypočteny pro 2-SP/BDDE, což lze vysvětlit nejlepší linearitou změřené koncentrační závislosti ($r = 0,9991$). Kvůli vyšší LOQ nebyla analyzována pomocí FIA-ED přírodní voda, ale analýza modelových roztoků a pesticidních přípravků byla úspěšně provedena s vyhodnocením metodou kalibrační přímky. FIA-ED tedy není vhodná pro analýzu přírodních vod bez předchozího zakoncentrování vzorku, ale může být použita pro sériové analýzy v oblasti kontroly výroby nebo kvality produktů.

Na závěr lze tedy konstatovat, že cíle této diplomové práce byly splněny. Byly vyvinuty spolehlivé voltametrické metody pro stanovení CPD s využitím BDDE a SP/BDDE a bylo ověřeno, že SP/BDDE mohou být úspěšně zapojeny do průtokové cely FIA-ED, kde umožňují rychlou a jednoduchou analýzu větších sérií vzorků.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] PROKINOVÁ, Evženie. *Pesticidy: použití, přínosy, rizika*. 1. vydání. Praha: Ministerstvo zemědělství, 2022. ISBN 978-80-7434-639-2.
- [2] DVORŽÁKOVÁ, Miluše. *Fakta o pesticidech, aneb, Co o nich asi nevíte...* 1. vydání. Praha: Potravinářská komora České republiky, Česká technologická platforma pro potraviny, 2020. ISBN 978-80-88019-42-8.
- [3] KAUR, Harsimran a Harsh GARG. Pesticides: Environmental Impacts and Management Strategies. In: Sonia SOLONESKI, ed. *Pesticides - Toxic Aspects* [online]. B.m.: InTech, 2014 [vid. 2024-03-28]. ISBN 978-953-51-1217-4. Dostupné z: doi:10.5772/57399
- [4] *The use of plant protection products in the European Union, data 1992-2003*. 2007 ed. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2007. ISBN 978-92-79-03890-7.
- [5] WAECHTER, Felix, Edgar WEBER, Thomas HERTNER a Ursula MAY-HERTL. Cyprodinil. In: *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* [online]. B.m.: Elsevier, 2010 [vid. 2023-11-09], s. 1903–1913. ISBN 978-0-12-374367-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374367-1.00089-6
- [6] FANG, Chien-Chung, Fei-Yun CHEN, Chang-Rong CHEN, Chien-Chiang LIU, Liang-Chi WONG, Yi-Wen LIU a Jyan-Gwo Joseph SU. Cyprodinil as an activator of aryl hydrocarbon receptor. *Toxicology* [online]. 2013, **304**, 32–40. ISSN 0300483X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tox.2012.11.018
- [7] ROBERTS, Terence Robert. *Metabolic pathways of agrochemicals*. Cambridge: The Royal society of chemistry, 1998. ISBN 978-0-85404-499-3.
- [8] UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. *EPA Pesticide Fact Sheet -Cyprodinil* [online]. 6. duben 1998. Dostupné z: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-288202_06-Apr-98.pdf
- [9] TANG, Chen, Chao SHEN, Kongyang ZHU, Yixi ZHOU, Yung-Jen CHUANG, Chengyong HE a Zhenghong ZUO. Exposure to the AhR agonist cyprodinil impacts the cardiac development and function of zebrafish larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2020, **201**, 110808. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2020.110808

- [10] TANG, Chen, Yue ZHU, Chunyan YANG, Chengyong HE a Zhenghong ZUO. Reproductive toxicity of long-term exposure to environmental relevant concentrations of cyprodinil in female zebrafish (*Danio rerio*). *Science of The Total Environment* [online]. 2022, **846**, 157504. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2022.157504
- [11] NAVALÓN, Alberto, Avismelsi PRIETO, Lilia ARAUJO a José Luis VÍLCHEZ. Determination of pyrimethanil and kresoxim-methyl in green groceries by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2002, **975**(2), 355–360. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(02)01220-7
- [12] PSOMA, A. K., I. N. PASIAS, A. A. BLETSOU a N. S. THOMAIDIS. Development and Validation of a Multi-residue Method for the Determination of Pesticides in Chios Mastic Gum by QuEChERS and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods* [online]. 2015, **8**(3), 624–634. ISSN 1936-9751, 1936-976X. Dostupné z: doi:10.1007/s12161-014-9930-7
- [13] LIANG, Xuyang, Xingang LIU, Fengshou DONG, Jun XU, Dongmei QIN, Yuanbo LI, Yingying TIAN, Ying ZHANG, Yongtao HAN a Yongquan ZHENG. Simultaneous determination of pyrimethanil, cyprodinil, mepanipyrim and its metabolite in fresh and home-processed fruit and vegetables by a QuEChERS method coupled with UPLC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A* [online]. 2013, **30**(4), 713–721. ISSN 1944-0049, 1944-0057. Dostupné z: doi:10.1080/19440049.2013.768777
- [14] SILVA FILHO, Clóvis F, Elissandro S EMÍDIO a Haroldo S DÓREA. Solid-phase microextraction for determination of anilino-pyrimidine, dimethylcarbamate and thiadiazine pesticides in irrigation project surface water. *Journal of the Brazilian Chemical Society* [online]. 2011, **22**(7), 1371–1378. ISSN 0103-5053. Dostupné z: doi:10.1590/S0103-50532011000700024
- [15] NAVARRO, M, Y PICÓ, R MARÍN a J MAÑES. Application of matrix solid-phase dispersion to the determination of a new generation of fungicides in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A* [online]. 2002, **968**(1–2), 201–209. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(02)00846-4
- [16] FONTANA, A.R., I. RODRÍGUEZ, M. RAMIL, J.C. ALTAMIRANO a R. CELA. Solid-phase extraction followed by liquid chromatography quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry for the selective determination of fungicides in wine samples. *Journal of Chromatography A* [online]. 2011, **1218**(16), 2165–2175. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2011.02.025

- [17] MUNITZ, Martín S., Silvia L. RESNIK a María I.T. MONTTI. Method development and validation for cyprodinil and fludioxonil in blueberries by solid-phase microextraction gas chromatography, and their degradation kinetics. *Food Additives & Contaminants: Part A* [online]. 2013, **30**(7), 1299–1307. ISSN 1944-0049, 1944-0057. Dostupné z: doi:10.1080/19440049.2013.801085
- [18] VAQUERO-FERNÁNDEZ, Luis, Ana SÁENZ-HERNÁNDEZ, Jesús SANZ-ASENSIO, Purificación FERNÁNDEZ-ZURBANO, Miguel SAINZ-RAMÍREZ, Begoña PONS-JUBERA, Miguel LÓPEZ-ALONSO, Sara-Isabel EPIFANIO-FERNÁNDEZ a María-Teresa MARTÍNEZ-SORIA. Determination of cyprodinil and fludioxonil in the fermentative process of must by high-performance liquid chromatography–diode array detection. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2008, **88**(11), 1943–1948. ISSN 0022-5142, 1097-0010. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.3301
- [19] RIAL OTERO, R, C YAGÜE RUIZ, B CANCHO GRANDE a J SIMAL GÁNDARA. Solid-phase microextraction–gas chromatographic–mass spectrometric method for the determination of the fungicides cyprodinil and fludioxonil in white wines. *Journal of Chromatography A* [online]. 2002, **942**(1–2), 41–52. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(01)01352-8
- [20] MOLINA-MAYO, Carlos, Javier HERNÁNDEZ-BORGES, Teresa M. BORGES-MIQUEL a Miguel Ángel RODRÍGUEZ-DELGADO. Determination of pesticides in wine using micellar electrokinetic chromatography with UV detection and sample stacking. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, **1150**(1–2), 348–355. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2006.06.071
- [21] GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, Rosa Ma., Raquel RIAL-OTERO, Beatriz CANCHO-GRANDE a Jesús SIMAL-GÁNDARA. Determination of 23 pesticide residues in leafy vegetables using gas chromatography–ion trap mass spectrometry and analyte protectants. *Journal of Chromatography A* [online]. 2008, **1196–1197**, 100–109. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2008.02.087
- [22] ESTEVE-TURRILLAS, F. A., J. V. MERCADER, C. AGULLÓ, A. ABAD-SOMOVILLA a A. ABAD-FUENTES. A class-selective immunoassay for simultaneous analysis of anilinopyrimidine fungicides using a rationally designed hapten. *The Analyst* [online]. 2017, **142**(20), 3975–3985. ISSN 0003-2654, 1364-5528. Dostupné z: doi:10.1039/C7AN01138E
- [23] ESTEVE-TURRILLAS, Francesc A., Josep V. MERCADER, Consuelo AGULLÓ, Antonio ABAD-SOMOVILLA a Antonio ABAD-FUENTES. Site-heterologous haptens

- and competitive monoclonal antibody-based immunoassays for pyrimethanil residue analysis in foodstuffs. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2015, **63**(1), 604–611. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2015.03.074
- [24] AYHAN, Ezgi Adak a Recai İNAM. Square wave stripping voltammetric determination of cyprodinil fungicide in food samples by nanostructured multi walled carbon nanotube paste electrode. *Journal of Food Measurement and Characterization* [online]. 2020, **14**(3), 1333–1343. ISSN 2193-4126, 2193-4134. Dostupné z: doi:10.1007/s11694-020-00381-9
- [25] MOROZOVA, V. S., A. I. LEVASHOVA a S. A. EREMIN. Determination of pesticides by enzyme immunoassay. *Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2005, **60**(3), 202–217. ISSN 1061-9348, 1608-3199. Dostupné z: doi:10.1007/s10809-005-0075-0
- [26] AYDIN, Suleyman. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* [online]. 2015, **72**, 4–15. ISSN 01969781. Dostupné z: doi:10.1016/j.peptides.2015.04.012
- [27] GARRIDO, J.M.P.J., V. RAHEMI, F. BORGES, C.M.A. BRETT a E.M.P.J. GARRIDO. Carbon nanotube β -cyclodextrin modified electrode as enhanced sensing platform for the determination of fungicide pyrimethanil. *Food Control* [online]. 2016, **60**, 7–11. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2015.07.001
- [28] YANG, Jichun, Qiong WANG, Minhui ZHANG, Shuming ZHANG a Lei ZHANG. An electrochemical fungicide pyrimethanil sensor based on carbon nanotubes/ionic-liquid construction modified electrode. *Food Chemistry* [online]. 2015, **187**, 1–6. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2015.04.009
- [29] YANG, Lijun, Yandong HU, Qiong WANG, Yuanyuan DONG a Lei ZHANG. Ionic liquid-assisted electrochemical determination of pyrimethanil using reduced graphene oxide conjugated to flower-like NiCo₂O₄. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2016, **935**, 104–112. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2016.07.012
- [30] GÜNZLER, Helmut a Alex WILLIAMS, ed. *Handbook of analytical techniques*. Weinheim: Wiley-VCH, 2001. ISBN 978-3-527-30165-2.
- [31] REZAEI, Behzad a Neda IRANNEJAD. Electrochemical detection techniques in biosensor applications. In: *Electrochemical Biosensors* [online]. B.m.: Elsevier, 2019 [vid. 2024-02-12], s. 11–43. ISBN 978-0-12-816491-4. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816491-4.00002-4

- [32] MANJUNATHA, Jamballi G., ed. *Electrochemical sensors based on carbon composite materials: fabrication, properties and applications*. Bristol: IOP Publishing, 2022. ISBN 978-0-7503-5127-0.
- [33] ZÁRUBA, Kamil. *Analytická chemie*. Vydání první. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-950-1.
- [34] HOLZBECHER, Závěš a Jaroslav CHURÁČEK. *Analytická chemie*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1987.
- [35] MUSILOVÁ, Jana. Použití diamantových filmových elektrod dopovaných borem pro stanovení organických látek. *Chem. Listy*. 2009, 10.
- [36] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr.dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 978-80-86369-07-5.
- [37] WANG, Joseph. *Analytical electrochemistry*. 2nd ed. New York: Wiley-VCH, 2000. ISBN 978-0-471-28272-3.
- [38] KRÍŽENECKÁ, Sylvie a Václav SYNEK. *Základy analytické chemie*. Vyd. 1. Ústí nad Labem: Univerzita J.E. Purkyně v Ústí nad Labem, Fakulta životního prostředí, 2014. ISBN 978-80-7414-804-0.
- [39] SVANCARA, Ivan, Kurt KALCHER, Alain WALCARIUS a Karel VYTRAS. *Electroanalysis with Carbon Paste Electrodes* [online]. 0 vyd. B.m.: CRC Press, 2012 [vid. 2024-02-12]. ISBN 978-0-429-15207-8. Dostupné z: doi:10.1201/b11478
- [40] ZOSKI, Cynthia G., ed. *Handbook of electrochemistry*. 1st ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier, 2007. ISBN 978-0-444-51958-0.
- [41] BONTEMPELLI, Gino, Nicolò DOSSI a Rosanna TONIOLO. Polarography/Voltammetry. In: *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* [online]. B.m.: Elsevier, 2018 [vid. 2024-03-18], s. B9780124095472143264. ISBN 978-0-12-409547-2. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.14326-4
- [42] BAREK, Jiří, Frantisek OPEKAR a Karel ŠTULÍK. *Elektroanalytická chemie*. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 978-80-246-1146-4.
- [43] KOTRLÝ, Stanislav a Jaroslav CHURÁČEK. *Analytická chemie III: elektroanalytické metody*. Pardubice: Vysoká škola chemicko-technologická, nedatováno.
- [44] GARAJ, Ján, Dušan BUSTIN a Zdeněk HLADKÝ. *Analytická chemia*. Praha: SNTL, 1987.

- [45] OPEKAR, František. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2010. ISBN 978-80-246-1775-6.
- [46] SIMÕES, F.R. a M.G. XAVIER. Electrochemical Sensors. In: *Nanoscience and its Applications* [online]. B.m.: Elsevier, 2017 [vid. 2024-03-18], s. 155–178. ISBN 978-0-323-49780-0. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-49780-0.00006-5
- [47] VYSKOČIL, Vlastimil, Aleš DAŇHEL a Jan FISCHER. KRÁSA A UŽITEČNOST NOVÝCH ELEKTRODOVÝCH MATERIÁLŮ. *Chemické listy*. nedatováno, **2010**(103), 1181–1195.
- [48] COBB, Samuel J., Zoe J. AYRES a Julie V. MACPHERSON. Boron Doped Diamond: A Designer Electrode Material for the Twenty-First Century. *Annual Review of Analytical Chemistry* [online]. 2018, **11**(1), 463–484. ISSN 1936-1327, 1936-1335. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-anchem-061417-010107
- [49] PLESKOV, Yu. V. Electrochemistry of Diamond: A Review. *Russian Journal of Electrochemistry*. nedatováno, **2002**(38), 1275–1291.
- [50] BOGDANOWICZ, Robert a Jacek RYL. Structural and electrochemical heterogeneities of boron-doped diamond surfaces. *Current Opinion in Electrochemistry* [online]. 2022, **31**, 100876. ISSN 24519103. Dostupné z: doi:10.1016/j.coelec.2021.100876
- [51] LUONG, John H. T., Keith B. MALE a Jeremy D. GLENNON. Boron-doped diamond electrode: synthesis, characterization, functionalization and analytical applications. *The Analyst* [online]. 2009, **134**(10), 1965. ISSN 0003-2654, 1364-5528. Dostupné z: doi:10.1039/b910206j
- [52] KRAFT, Alexander. Doped Diamond: A Compact Review on a New, Versatile Electrode Material. *International Journal of Electrochemical Science*. nedatováno, **2007**(2), 355–385.
- [53] PECKOVÁ, Karolina, Jana MUSILOVÁ a Jiří BAREK. Boron-Doped Diamond Film Electrodes—New Tool for Voltammetric Determination of Organic Substances. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* [online]. 2009, **39**(3), 148–172. ISSN 1040-8347, 1547-6510. Dostupné z: doi:10.1080/10408340903011812
- [54] BALUCHOVÁ, Simona, Aleš DAŇHEL, Hana DEJMKOVÁ, Veronika OSTATNÁ, Miroslav FOJTA a Karolina SCHWARZOVÁ-PECKOVÁ. Recent progress in the applications of boron doped diamond electrodes in electroanalysis of organic compounds and biomolecules – A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2019, **1077**, 30–66. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2019.05.041

- [55] SWAIN, Greg M. a Rajeshuni. RAMESHAM. The electrochemical activity of boron-doped polycrystalline diamond thin film electrodes. *Analytical Chemistry* [online]. 1993, **65**(4), 345–351. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/ac00052a007
- [56] REHACEK, V., I. HOTOVY, M. MARTON, M. MIKOLASEK, P. MICHNIAK, A. VINCZE, A. KROMKA a M. VOJS. Voltammetric characterization of boron-doped diamond electrodes for electroanalytical applications. *Journal of Electroanalytical Chemistry* [online]. 2020, **862**, 114020. ISSN 15726657. Dostupné z: doi:10.1016/j.jelechem.2020.114020
- [57] HRDLIČKA, Vojtěch, Oleksandr MATVIEIEV, Tomáš NAVRÁTIL a Renáta ŠELEŠOVSKÁ. Recent advances in modified boron-doped diamond electrodes: A review. *Electrochimica Acta* [online]. 2023, **456**, 142435. ISSN 00134686. Dostupné z: doi:10.1016/j.electacta.2023.142435
- [58] CVAČKA, Josef, Veronika QUAISEROVA a Yoshiyuki SHOW. Boron-Doped Diamond Microelectrodes for Use in Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection. *Analytical Chemistry*. nedatováno, **2003**(75), 2678–2687.
- [59] RANA, Azeem, Nadeem BAIG a Tawfik A. SALEH. Electrochemically pretreated carbon electrodes and their electroanalytical applications – A review. *Journal of Electroanalytical Chemistry* [online]. 2019, **833**, 313–332. ISSN 15726657. Dostupné z: doi:10.1016/j.jelechem.2018.12.019
- [60] LOURENCAO, Bruna C., Ricardo F. BROCCENSCHI, Roberta A. MEDEIROS, Orlando FATIBELLO-FILHO a Romeu C. ROCHA-FILHO. Analytical Applications of Electrochemically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrodes. *ChemElectroChem* [online]. 2020, **7**(6), 1291–1311. ISSN 2196-0216, 2196-0216. Dostupné z: doi:10.1002/celc.202000050
- [61] POHANKA, Miroslav. Screen Printed Electrodes in Biosensors and Bioassays. A Review. *International Journal of Electrochemical Science* [online]. 2020, 11024–11035. ISSN 14523981. Dostupné z: doi:10.20964/2020.11.19
- [62] TALEAT, Zahra, Alireza KHOSHROO a Mohammad MAZLOUM-ARDAKANI. Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008–2013). *Microchimica Acta* [online]. 2014, **181**(9–10), 865–891. ISSN 0026-3672, 1436-5073. Dostupné z: doi:10.1007/s00604-014-1181-1
- [63] LI, Meng, Yuan-Ting LI, Da-Wei LI a Yi-Tao LONG. Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays—A review. *Analytica*

- Chimica Acta* [online]. 2012, **734**, 31–44. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2012.05.018
- [64] ĐURĐIĆ, Slađana, Filip VLAHOVIĆ, Milan MARKIĆEVIĆ, Jelena MUTIĆ, Dragan MANOJLOVIĆ, Vesna STANKOVIĆ, Lubomír ŠVORC a Dalibor STANKOVIĆ. Application of Screen Printed Diamond Electrode, Coupled with “Point-of-Care” Platform, for Nanomolar Quantification of Phytonutrient Pterostilbene in Dietary Supplements: An Experimental Study Supported by Theory. *Chemosensors* [online]. 2023, **11**(1), 15. ISSN 2227-9040. Dostupné z: doi:10.3390/chemosensors11010015
- [65] ANTUÑA-JIMÉNEZ, Daniel, María Begoña GONZÁLEZ-GARCÍA, David HERNÁNDEZ-SANTOS a Pablo FANJUL-BOLADO. Screen-Printed Electrodes Modified with Metal Nanoparticles for Small Molecule Sensing. *Biosensors* [online]. 2020, **10**(2), 9. ISSN 2079-6374. Dostupné z: doi:10.3390/bios10020009
- [66] LIANG, Gang, Zhaoying HE, Jianhui ZHEN, Hao TIAN, Lianfeng AI, Ligang PAN a Wenwen GONG. Development of the screen-printed electrodes: A mini review on the application for pesticide detection. *Environmental Technology & Innovation* [online]. 2022, **28**, 102922. ISSN 23521864. Dostupné z: doi:10.1016/j.eti.2022.102922
- [67] ROCHA, Raquel G., Isabella C.O.F. SILVA, Luciano C. ARANTES, Jéssica S. STEFANO, Camila D. LIMA, Larissa M.A. MELO, Rodrigo A.A. MUNOZ, Wallans T.P. DOS SANTOS a Eduardo M. RICHTER. Simple and rapid electrochemical detection of 1-benzylpiperazine on carbon screen-printed electrode. *Microchemical Journal* [online]. 2021, **167**, 106282. ISSN 0026265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2021.106282
- [68] MATVIEIEV, Oleksandr, Renáta ŠELEŠOVSKÁ, Marian VOJS, Marián MARTON, Pavol MICHNIAK, Vojtěch HRDLIČKA, Michal HATALA, Lenka JANÍKOVÁ, Jaromíra CHÝLKOVÁ, Jana SKOPALOVÁ, Petr CANKAŘ a Tomáš NAVRÁTIL. Novel Screen-Printed Sensor with Chemically Deposited Boron-Doped Diamond Electrode: Preparation, Characterization, and Application. *Biosensors* [online]. 2022, **12**(4), 241. ISSN 2079-6374. Dostupné z: doi:10.3390/bios12040241
- [69] METROHM, DropSens. *Screen-printed electrodes* [online]. 2024. Dostupné z: https://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html
- [70] KELÍŠKOVÁ, Pavlína, Oleksandr MATVIEIEV, Lenka JANÍKOVÁ a Renáta ŠELEŠOVSKÁ. Recent advances in the use of screen-printed electrodes in drug analysis: A review. *Current Opinion in Electrochemistry* [online]. 2023, **42**, 101408. ISSN 24519103. Dostupné z: doi:10.1016/j.coelec.2023.101408

- [71] HUSSAIN, Arif, Naseem ABBAS a Ahsan ALI. Inkjet Printing: A Viable Technology for Biosensor Fabrication. *Chemosensors* [online]. 2022, **10**(3), 103. ISSN 2227-9040. Dostupné z: doi:10.3390/chemosensors10030103
- [72] WANG, Xuepei, Mengjie ZHANG, Luwei ZHANG, Jinchao XU, Xinqing XIAO a Xiaoshuan ZHANG. Inkjet-printed flexible sensors: From function materials, manufacture process, and applications perspective. *Materials Today Communications* [online]. 2022, **31**, 103263. ISSN 23524928. Dostupné z: doi:10.1016/j.mtcomm.2022.103263
- [73] HUSSIN, Hanim, Norhayati SOIN, Sharifah Fatmadiana WAN MUHAMAD HATTA, Fazliyatul Azwa MD REZALI a Yasmin ABDUL WAHAB. Review—Recent Progress in the Diversity of Inkjet-Printed Flexible Sensor Structures in Biomedical Engineering Applications. *Journal of The Electrochemical Society* [online]. 2021, **168**(7), 077508. ISSN 0013-4651, 1945-7111. Dostupné z: doi:10.1149/1945-7111/ac0e4b
- [74] BEITOLLAHI, Hadi, Sayed Zia MOHAMMADI, Mohadeseh SAFAEI a Somayeh TAJIK. Applications of electrochemical sensors and biosensors based on modified screen-printed electrodes: a review. *Analytical Methods* [online]. 2020, **12**(12), 1547–1560. ISSN 1759-9660, 1759-9679. Dostupné z: doi:10.1039/C9AY02598G
- [75] CLARES, Paula, Clara PÉREZ-RÀFOLS, Núria SERRANO a José Manuel DÍAZ-CRUZ. Voltammetric Determination of Active Pharmaceutical Ingredients Using Screen-Printed Electrodes. *Chemosensors* [online]. 2022, **10**(3), 95. ISSN 2227-9040. Dostupné z: doi:10.3390/chemosensors10030095
- [76] SQUISSATO, André L., Rodrigo A. A. MUNOZ, Craig E. BANKS a Eduardo M. RICHTER. An Overview of Recent Electroanalytical Applications Utilizing Screen-Printed Electrodes Within Flow Systems. *ChemElectroChem* [online]. 2020, **7**(10), 2211–2221. ISSN 2196-0216, 2196-0216. Dostupné z: doi:10.1002/celc.202000175
- [77] ŠELEŠOVSKÁ, Renáta, Tomáš NAVRÁTIL, Vojtěch HRDLIČKA, Pavol MICHNIAK, Michal HATALA, Marian VOJS, Marián MARTON, Oleksandr MATVIEIEV, Lenka JANÍKOVÁ a Jaromíra CHÝLKOVÁ. Novel screen-printed sensors with chemically deposited boron-doped diamond and their use for voltammetric determination of attention deficit hyperactivity disorder medication atomoxetine. *Electrochimica Acta* [online]. 2022, **403**, 139642. ISSN 00134686. Dostupné z: doi:10.1016/j.electacta.2021.139642