

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Vývoj metod voltametrického stanovení biologicky významných látek

Disertační práce

Prohlašuji:

Práci s názvem „Vývoj metod voltametrického stanovení biologicky významných látek“ 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 20.06.2024

Ing. Alona Jiroutová v. r.

Poděkování

Děkuji svému manželovi, rodičům a celé rodině za obrovskou podporu a povzbuzování během mého studia. Ráda bych také poděkovala paní prof. Ing. Jaromíře Chýlkové, CSc. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost, ochotu a vstřícnost. Děkuji také všem kolegům za skvělou spolupráci v rámci publikování.

ANOTACE

V rámci této disertační práce byly vyvinuty metody voltametrického stanovení regulátorů růstu rostlin, zahrnující paklobutrazol, daminozid a jeho rozkladný produkt *N,N*-dimethylhydrazin, a fungicidů, mezi něž patří mefentriflukonazol, fluxapyroxad a metconazol. Stanovení je založeno na anodické oxidaci na borem dopované diamantové elektrodě metodou diferenční pulzní voltametrie. Voltametrická analýza probíhá v alkalickém prostředí, a to 0,07 mol L⁻¹ NaOH s 33 % acetonitrilu u paklobutrazolu, čistém Britton-Robinsonovém pufru o pH 9 u daminozidu a *N,N*-dimethylhydrazinu a Britton-Robinsonovém pufru o pH 9 s 33 % acetonitrilu u mefentriflukonazolu, fluxapyroxadu a metconazolu. Během kvantitativních analýz studovaných analytů byly vypočteny meze detekce a meze stanovitelnosti které byly 0,083 a 0,277 μmol L⁻¹ pro paklobutrazol, 0,44 a 1,46 μmol L⁻¹ pro daminozid, 0,063 a 0,209 μmol L⁻¹ pro *N,N*-dimethylhydrazin, 10,81 a 36,04 nmol L⁻¹ pro mefentriflukonazol, 13,98 a 46,61 nmol L⁻¹ pro fluxapyroxad a 32 a 107 nmol L⁻¹ pro metconazol. V této práci byl také zkoumán reakční mechanismus všech látek s výjimkou metconazolu. S využitím navržených metod bylo provedeno stanovení studovaných analytů ve vybraných směsích. Vypracované metody byly použity k analýze osmi komerčně dostupných přípravků a čtyř vzorků obohacených vod. Stanovené množství analyzovaných látek, s výjimkou fluxapyroxadu v Libraxu, se shodovalo s deklarovanými obsahy. Tyto výsledky byly rovněž potvrzeny nezávislou metodou s použitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie v kombinaci s detektorem diodového pole.

KLIČOVÁ SLOVA

regulátory růstu rostlin, fungicidy, voltametrické stanovení, diferenční pulzní voltametrie, borem dopovaná diamantová elektroda

TITLE

Development of methods for voltammetric determination of biologically important substances.

ANNOTATION

In this Ph.D. thesis, methods for the voltammetric determination of plant growth regulators, including paclobutrazol, daminozide and its degradation product *N,N*-dimethylhydrazine, and fungicides, including mefentrifluconazole, fluxapyroxad and metconazole were developed. The determination is based on anodic oxidation on a boron-doped diamond electrode by differential pulse voltammetry. The voltammetric analysis is carried out in alkaline medium, namely 0,07 mol L⁻¹ NaOH with 33 % acetonitrile for paclobutrazol, pure Britton-Robinson buffer of pH 9 for daminozide and *N,N*-dimethylhydrazine and Britton-Robinson buffer of pH 9 with 33 % acetonitrile for mefentrifluconazole, fluxapyroxad and metconazole. During the quantitative analyses of the studied analytes, the limit of detection and limit of quantification values were calculated to be 0,083 and 0,277 μmol L⁻¹ for paclobutrazol, 0,44 and 1,46 μmol L⁻¹ for daminozide, 0,063 and 0,209 μmol L⁻¹ for *N,N*-dimethylhydrazine, 10,81 and 36,04 nmol L⁻¹ for mefentrifluconazole, 13,98 and 46,61 nmol L⁻¹ for fluxapyroxad and 32 and 107 nmol L⁻¹ for metconazole. The reaction mechanism of all the compounds except metconazole was also investigated in this work. The determination of the studied analytes in the selected mixtures was carried out using the proposed methods. The developed methods were also used to analyze eight commercially available formulations and four enriched water samples. The determined amounts of the analytes, except fluxapyroxad in Librax, agreed with the declared contents. These results were also confirmed by an independent method using high performance liquid chromatography with diode array detector.

KEYWORDS

plant growth regulators, fungicides, voltammetric determination, differential pulse voltammetry, boron-doped diamond electrode

OBSAH

Seznam zkratk	9
Seznam schémat.....	11
Seznam obrázků.....	12
Seznam tabulek.....	14
Úvod.....	15
1 Teoretická část	17
1.1 Přípravky na ochranu rostlin	17
1.1.1 Regulátory růstu rostlin	17
1.1.2 Fungicidy	19
1.2 Studované látky	21
1.2.1 Paklobutrazol.....	21
1.2.2 Daminozid	23
1.2.3 Mefentriflukonazol	26
1.2.4 Fluxapyroxad.....	29
1.2.5 Metconazol	32
1.3 Voltametrické metody v elektroanalýze.....	35
1.3.1 Diferenční pulzní voltametrie.....	35
1.3.2 Cyklická voltametrie	36
1.3.3 Borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE).....	37
2 Experimentální část.....	39
2.1 Chemikálie	39
2.2. Použité přístroje	40
2.3. Postupy a podmínky realizovaných metod	42
2.3.1. Voltametrická měření	42
2.3.2 Nezávislá HPLC/DAD reálných vzorků PBZ, MFZ, FPX a MCZ.	43
2.3.3. Teoretické výpočty	43

2.3.4. Příprava standardů a izolační postupy	43
2.3.5. Eliminace vlivu UDMH na stanovení DMZ	44
2.3.6. Postup zakoncentrování DMZ a PBZ.....	44
3 Výsledky a diskuse	45
3.1 Voltametrické stanovení regulátoru růstu rostlin PBZ.....	45
3.1.1 Voltametrické chování PBZ	45
3.1.2 Studie závislosti proudové odezvy PBZ na rychlosti polarizace.....	46
3.1.3 Kvantitativní analýza PBZ	47
3.1.4 Mechanismus elektrochemické oxidace PBZ.....	49
3.1.5 Interferenční studie PBZ.....	51
3.1.6 Analýza reálných vzorků PBZ.....	52
3.2 Vývoj metody voltametrického stanovení regulátoru růstu rostlin DMZ a jeho rozkladného produktu UDMH	55
3.2.1 Volba vhodného pH základního elektrolytu.....	55
3.2.2 Voltametrické chování DMZ.....	57
3.2.3 Studie závislosti proudové odezvy DMZ na rychlosti polarizace	57
3.2.4 Mechanismus reakce DMZ.....	59
3.2.5 Kvantitativní stanovení DMZ.....	61
3.2.6 Voltametrické chování a stanovení UDMH	65
3.2.7 Voltametrická analýza směsí DMZ a UDMH	69
3.2.8 Voltametrická analýza reálných vzorků DMZ a UDMH	71
3.3 Vývoj metod voltametrického stanovení fungicidů MFZ, FPX a MCZ	73
3.3.1 Volba základního elektrolytu a hodnoty pH.....	73
3.3.2 Voltametrické chování studovaných fungicidů	81
3.3.3 Studia závislosti proudové odezvy MFZ, FPX a MCZ na rychlosti polarizace	82
3.3.4 Pravděpodobné produkty elektrooxidace MFZ a FPX.....	84
3.3.5 Optimalizace parametrů voltametrického stanovení MFZ, FPX a MCZ metodou DPV	85

3.3.6 Kvantitativní stanovení MFZ, FPX a MCZ v modelových roztocích	86
3.3.7 Voltametrická analýza MFZ, FPX a MCZ v modelových směsích	89
3.3.8 Interferenční studie MFZ, FPX a MCZ	92
3.3.9. Stanovení MFZ, FPX a MCZ v komerčně dostupných přípravcích.....	93
Závěr	98
4 Použitá literatura	100

Seznam zkratek

US EPA	United States Environmental Protection Agency
PBZ	paklobutrazol
DMZ	daminozid
UDMH	<i>N,N</i> -dimethylhydrazin
MFZ	mefentriflukonazol
FPX	fluxapyroxad
MCZ	metconazol
DPV	diferenční pulzní voltametrie
CV	cyklická voltametrie
BDDE	borem dopovaná diamantová elektroda
ACN	acetonitril
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
DAD	detektor diodového pole
E	potenciál
E_p	potenciál píku
E_{in}	počáteční potenciál
E_{fin}	koncový potenciál
$E_{lower\ vertex}$	dolní potenciál obratu
$E_{upper\ vertex}$	horní potenciál obratu
v	rychlost polarizace
I	proud
I_p	proud píku v maximu
A	modulační amplituda

<i>t</i>	modulační čas
<i>c</i>	koncentrace
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
RSD	relativní směrodatná odchylka
DFK	difenokonazol

Seznam schémat

Schéma 1: Strukturní vzorec kyseliny indolyl-3-octové (IAA)	17
Schéma 2: Strukturní vzorce giberelinů	18
Schéma 3: Strukturní vzorce enantiomerů PBZ	21
Schéma 4: Strukturní vzorce daminozidu (a) a <i>N,N</i> -dimethylhydrazinu (b)	23
Schéma 5: Reakce rozkladu DMZ	24
Schéma 6: Strukturní vzorce stereoizomeru MFZ	27
Schéma 7: Strukturní vzorec FPX	29
Schéma 8: Strukturní vzorce stereoizomerů MCZ	32
Schéma 9: Možná místa oxidace, oxidační produkty v neutrálních formách (a, c); vypočtený HOMO orbital PBZ.	50
Schéma 10: Zjednodušený možný mechanismus elektrooxidace PBZ	50
Schéma 11: Možné reakční cesty pro anodickou oxidaci DMZ	59
Schéma 12: Možné struktury produktů vzniklých elektrochemickou oxidací MFZ (a) a lokalizace HOMO orbitalů FPX a MFZ.	84

Seznam obrázků

Obrázek 1: Diferenční pulzní voltametrie	36
Obrázek 2: Cyklický voltamogram základního elektrolytu a DMZ získaný na BDDE	37
Obrázek 3: Borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE).....	38
Obrázek 4: Cyklický voltamogram základního elektrolytu a PBZ	45
Obrázek 5: Závislosti I_p na v (a), I_p na $v^{1/2}$ (b) a $\log(I_p)$ na $\log(v)$ (c) pro PBZ.....	46
Obrázek 6: DP voltamogram koncentrační závislosti PBZ (a) a závislost I_p na c_{PBZ} (b).....	48
Obrázek 7: DP voltamogramy PBZ a triticonazolu (a), bentazonu (b), FPX (c) a terbutrynu (d) v poměru $c_{inf} : c_{PBZ} = 1:1$	52
Obrázek 8: Chromatogram separace PBZ a DFK v komerčním přípravku Toprex	54
Obrázek 9: Anodické křivky oxidace DMZ v závislosti na pH základního elektrolytu (a), závislost I_p na pH (b) a závislost E_p na pH (c).....	56
Obrázek 10: Cyklický voltamogram základního elektrolytu a DMZ.....	57
Obrázek 11: Závislosti I_p na v (a), I_p na $v^{1/2}$ (b) a $\log(I_p)$ na $\log(v)$ (c) pro DMZ	58
Obrázek 12: Porovnání DP voltamogramů oxidace DMZ (a), N',N'-dimethylacetohydrazidu 5 (b) a UDMH (c) po odečtu základního elektrolytu.....	61
Obrázek 13: Závislosti I_p DMZ na testovaných DPV parametrech – v (a), A (b) a t (c).....	62
Obrázek 14: DP voltamogram DMZ v závislosti na koncentraci v rozmezí 21,79-174,32 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (a) a závislost I_p na c_{DMZ} (b)	63
Obrázek 15: DP voltamogram DMZ v závislosti na koncentraci v rozmezí 1,69 – 13,52 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (a) a závislost I_p na c_{DMZ} (b).....	64
Obrázek 16: Cyklický voltamogram základního elektrolytu a UDMH	65
Obrázek 17: Závislosti I_p na v (a), I_p na $v^{1/2}$ (b) a $\log(I_p)$ na $\log(v)$ (c) pro UDMH.....	66
Obrázek 18: DP voltamogram UDMH v závislosti na koncentraci v rozmezí od 50,45 do 403,59 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (a) a závislost I_p na c_{UDMH} (b)	67
Obrázek 19: DP voltamogram UDMH v závislosti na koncentraci v rozmezí od 0,499 do 2,994 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (a) a závislost I_p na c_{UDMH} (b)	68
Obrázek 20: DP voltamogramy stanovení UDMH (a) a DMZ (b) v modelových směsích s poměrem $c_{UDMH}:c_{DMZ} = 0,54:1$ (a) a $c_{UDMH}:c_{DMZ} = 5,29:1$ (b)	69
Obrázek 21: Závislost doby varu na poměru proudových odezev při maximech UDMH a DMZ	70
Obrázek 22: DP voltamogram reálného vzorku B-NINE ^{®SG} (a) a grafická ukázka vyhodnocení metodou standardního přídatku (b).....	71

Obrázek 23: DP voltamogramy MFZ (a, c), MCZ (b, e) a FPX (d) v BR pufru při různém pH	74
Obrázek 24: DP voltamogramy MFZ při různých hodnotách pH (a), závislost I_p na pH (b) a závislost E_p na pH (c).....	75
Obrázek 25: DP voltamogramy FPX při různých hodnotách pH (a), závislost I_p na pH (b) a závislost E_p na pH (c).....	76
Obrázek 26: DP voltamogramy MCZ při různých hodnotách pH (a), závislost I_p na pH (b) a závislost E_p na pH (c).....	77
Obrázek 27: DP voltamogramy MFZ (a), FPX (b) a MCZ (c) v BR pufru při různém pH s 33 % ACN.....	78
Obrázek 28: Cyklické voltamogramy základního elektrolytu a MFZ (a), FPX (b) a MCZ (c)	81
Obrázek 29: Závislosti I_p na v (a-c) I_p na $v^{1/2}$ (d-f) a $\log(I_p)$ na $\log(v)$ (g-i) pro MFZ, FPX a MCZ.....	83
Obrázek 30: Chromatogramy LC-MS pro vybrané ionty reakční směsi získané elektrooxidací MFZ (HESI v pozitivním režimu)	85
Obrázek 31: Závislosti I_p na testovaných DPV parametrech – v (a-c), A (d-f) a t (g-i)	86
Obrázek 32: Závislosti I_p na c_{MFZ} (a) a I_p na c_{FPX} (b).....	87
Obrázek 33: DP voltamogramy koncentračních závislosti MFZ (a), FPX (b) a MCZ (c) a závislosti I_p na c_{MFZ} (a), I_p na c_{FPX} (b), a I_p na c_{MCZ} (c).....	88
Obrázek 34: DP voltamogramy FPX a MFZ získané při analýze modelové směsi s poměrem $c_{FPX}:c_{MFZ} = 0,98:1$	90
Obrázek 35: DP voltamogramy FPX a MCZ získané při analýze modelové směsi s poměrem $c_{FPX}:c_{MCZ} = 2,62:1$ (a) a $c_{FPX}:c_{MCZ} = 0,29:1$ (b)	91
Obrázek 36: DP voltamogramy přípravků Revysol (a), Sercadis (b) a Caramba (c) spolu s ukázkou vyhodnocení analytů metodou standardního přídatku	94
Obrázek 37: DP voltamogramy přípravků Revytrexu (a) a Revystaru XL (b)	95
Obrázek 38: DP voltamogram přípravku Librax (a), anodické křivky MCZ získané po odečtu křivky 1 (b), anodické křivky FPX přípravku Librax (c)	96
Obrázek 39: Chromatogram separace FPX a MCZ v komerčním přípravku Librax	96

Seznam tabulek

Tabulka 1: Výsledky opakovatelných stanovení PBZ v modelových roztocích.....	48
Tabulka 2: Výsledky interferenční studie PBZ.....	51
Tabulka 3: Výsledky analýzy pesticidního přípravku Toprex a říční vody s příměsí PBZ	53
Tabulka 4: Výsledky opakovaných stanovení modelových roztoků DMZ.....	64
Tabulka 5: Výsledky opakovaných analýz modelových roztoků UDMH	68
Tabulka 6: Výsledky stanovení DMZ v modelových směsích DMZ a UDMH před a po eliminaci UDMH.	70
Tabulka 7: Výsledky analýzy DMZ a UDMH v reálných vzorcích	72
Tabulka 8: Závislost proudové odezvy při anodické oxidaci MFZ o koncentrací $c_{MFZ} = 11,46 \mu\text{mol L}^{-1}$ na složení základního elektrolytu pro jednotlivé pH.....	79
Tabulka 9: Závislost proudové odezvy při anodické oxidaci FPX o koncentrací $c_{FPX} = 15,02 \mu\text{mol L}^{-1}$ na složení základního elektrolytu pro jednotlivé pH.....	79
Tabulka 10: Závislost proudové odezvy při anodické oxidaci MCZ o koncentrací $c_{MCZ} = 19,89 \mu\text{mol L}^{-1}$ na složení základního elektrolytu pro jednotlivé pH.....	80
Tabulka 11: Výsledky stanovení různých koncentrací MFZ, FPX a MCZ.	89
Tabulka 12: Výsledky analýz modelových směsí FPX a MFZ	90
Tabulka 13: Výsledky analýz modelových směsí FPX a MCZ	92
Tabulka 14: Výsledky interferenční studie pro MFZ, FPX a MCZ.....	93
Tabulka 15: Výsledky analýz MFZ, FPX a MCZ v komerčních přípravcích.....	97

Úvod

V současné době na naší planetě žije osm miliard lidí. Jedním z nejdůležitějších, a docela náročných úkolů, je tuto velkou populaci a její domestikovaná zvířata uživit. Pro úspěšné zemědělství a zahradnictví je však potřeba čelit různorodým překážkám, jako jsou povodně, sucha, bouřky, kroupy, houbové choroby, škůdci atd. Bojovat s těmito problémy se dá pomocí aplikace regulátorů růstu rostlin a fungicidů. Regulátory růstu rostlin nejenom upravují velikost rostlin, zlepšují vlastnosti a kvalitu plodů, upravují vzhled rostliny, ale i zesilují rostliny proti výše popsaným nepříznivým přírodním jevům. Fungicidy se využívají hlavně k potlačování a regulaci houbových chorob [1-6].

Použití těchto látek je v dnešní době nezbytné, ale vedle pozitivních účinků působí také negativně, zejména díky své vysoké persistenci a mobilitě ve složkách životního prostředí, kde pak mohou působit toxicky na lidi a živočichy atd. Proto je velice důležité sledovat osud těchto látek v životním prostředí a zacházet s těmito přípravky přísně podle platných předpisů.

Tato práce je věnována vývoji voltametrických metod pro stanovení jak vybraných regulátorů růstu rostlin, tak i fungicidů. Představiteli regulátorů růstu rostlin jsou paklobutrazol a daminozid. Paklobutrazol je inhibitorem produkci giberelinů a díky tomu se používá k regulaci růstu rostlin již od osmdesátých let minulého století [7]. Metoda voltametrického stanovení této látky byla podrobně popsána v diplomové práci [8]. V této disertační práci jsou uvedené poznatky, doplňující a rozšiřující již vyvinutou metodu. Daminozid je široce používaný hlavně při pěstování jablek. Kvůli svému rozkladnému produktu *N,N*-dimethylhydrazinu, který je velice nebezpečný a je klasifikován, jako "pravděpodobný karcinogen pro člověka", je daminozid rovněž klasifikován, jako "pravděpodobný karcinogen pro člověka" [9].

Představitelé fungicidů jsou mefentriflukonazol, fluxapyroxad a metconazol. Mefentriflukonazol a metconazol jsou inhibitory demethylací ergosterolu. Slouží k potlačování houbových chorob u zeleniny, ovoce a zemědělských plodin [10-14]. Fluxapyroxad je velmi účinným inhibitorem sukcinátdehydrogenázy, čímž narušuje buněčné dýchání a zpomaluje klíčení spor. Rovněž jako mefentriflukonazol a metconazol se široce používá u zemědělských a ovocných komodit na ochranu proti houbovým chorobám [15,16]. Paklobutrazol, mefentriflukonazol, fluxapyroxad a metconazole jsou klasifikovány jako velmi toxické pro vodní organismy, proto je velice důležité monitorovat jejich množství ve složkách životního prostředí [17-20].

Tato disertační práce popisuje vývoj metod, jak pro individuální voltametrické stanovení paklobutrazolu, daminozidu, *N,N*-dimethylhydrazinu, mefentriplukonazolu, fluxapyroxadu a metconazolu a jejich reálných vzorků, tak i pro směsné přípravky mefentriplukonazolu a fluxapyroxadu, zejména Revytrexu a Revystaru XL a směsný přípravek metconazolu a fluxapyroxadu, a to Libraxu. Dále jsou zde popsány postupy analýz paklobutrazolu a daminozidu v obohacených vzorcích říčních vod a vod z oplachu jablek.

1 Teoretická část

1.1 Přípravky na ochranu rostlin

1.1.1 Regulátory růstu rostlin

Regulátory růstu rostlin se dělí na přírodní a syntetické. Přírodní látky se nazývají fytohormony a jsou produkovány přímo rostlinami. Patří mezi tzv. endogenní regulátory růstu. Naopak syntetické regulátory jsou exogenní a zahrnují umělé syntetizované chemické látky, které v závislosti na koncentraci mohou jak podporovat, tak inhibovat růst a vývoj rostlin, a proto se široce používají v zemědělství a zahradnictví. Tyto syntetické regulátory nejsou příbuzné fytohormonům, ale dokážou v různé míře ovlivňovat jejich metabolismus a transport. Regulátory růstu rostlin se díky svým unikátním vlastnostem v dnešní době široce používají v zemědělství, zahradnictví a vinařství. Jsou zejména používány jak k potlačování, tak i ke stimulaci růstu rostlin, k iniciaci kvetení, ke zlepšení velikosti a kvality plodů a také jejich skladovacích vlastností atd. Tak například látky acetylen a ethylen již ve 30. letech 20. století se používaly ke stimulování kvetení a tvorbě plodů u ananasů. Regulátory růstu rostlin se dále používají k zesílení odolnosti rostlin proti nepříznivým přírodním podmínkám a jevům, jako jsou povodně nebo naopak sucho, silný vítr, bouřky, kroupy a tak dále. Pomocí regulátoru růstu se dá rostlina „upravit“ tak, aby lépe zvládala přírodní podmínky, ve kterých se pěstuje [1-4].

Historie objevů fytohormonů

Díky vývoji rostlinné fyziologie na konci 19. a na začátku 20. století bylo objeveno, že rostliny produkují signální molekuly (hormony), které jsou schopny ve velmi nízkých koncentracích vyvolat velké změny v rostlinném organismu, aniž by byly fytotoxické. První fytohormon byl objeven ve 20. letech minulého století a tímto rostlinným hormonem byla kyselina indolyl-3-octová (IAA), jejíž strukturní vzorec zobrazuje schéma 1. Za její hlavní účinek byla tehdy považována stimulace prodlužování růstu rostlin. Později bylo zjištěno, že také stimuluje růst kořenů, dělení buněk, a rovněž s její pomocí se dá regulovat opadávání plodů a listů [1, 4].

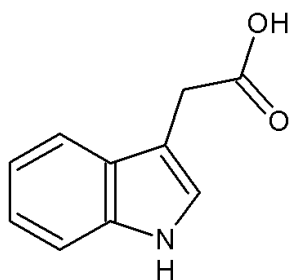


Schéma 1: Strukturní vzorec kyseliny indolyl-3-octové (IAA)

Později byly objeveny další skupiny fytohormonů, zejména gibereliny, cytokininy, kyselina abscisová atd. Kromě fytohormonů regulují růst i jiné látky vyskytující se ve vyšších rostlinách. Zejména se jedná o brassinosteroidy, kyselinu jasmínovou, polyaminy a oligosacharidy. Tyto látky jsou účinné ve vyšších koncentracích než klasické hormony a mohou být fytotoxické [1]. Většina syntetických retardantů růstu rostlin používaných ve světě jsou inhibitory syntézy giberelinů.

Gibereliny

V Japonsku na konci 19. století byla objevena fytopatogenní houba *Giberella fujikuroi*, kvůli které byl pozorován abnormální prodlužovací růst výhonů u rýže. Fermentací této houby byl získán první giberelin, avšak kvůli válkám jeho struktura byla popsána až v 50. letech 20. století v USA. Od té doby bylo objeveno velké množství giberelinů přírodního původu, a také se pracovalo nad vývojem syntetických sloučenin [2].

Dnes je známo cca 140 představitelů giberelinů, vyskytujících se ve vyšších rostlinách anebo houbách produkujících gibereliny. Většina z nich jsou prekurzory nebo katabolity, ale některé mají i přímou biologickou aktivitu. Nejpoužívanějšími gibereliny jsou GA3, resp. kyselina giberelová a směs GA4 a GA7, jejichž strukturní vzorce zobrazuje schéma 2. Tyto gibereliny se vyrábí fermentací fytopatogenní houby *Giberella fujikuroi*. GA3 se nejvíce používá v zahradnictví na zlepšení kvality plodů, zejména hrušek, třešní a citrusů, dále pak ve vinařství a zemědělství [1, 2, 21].

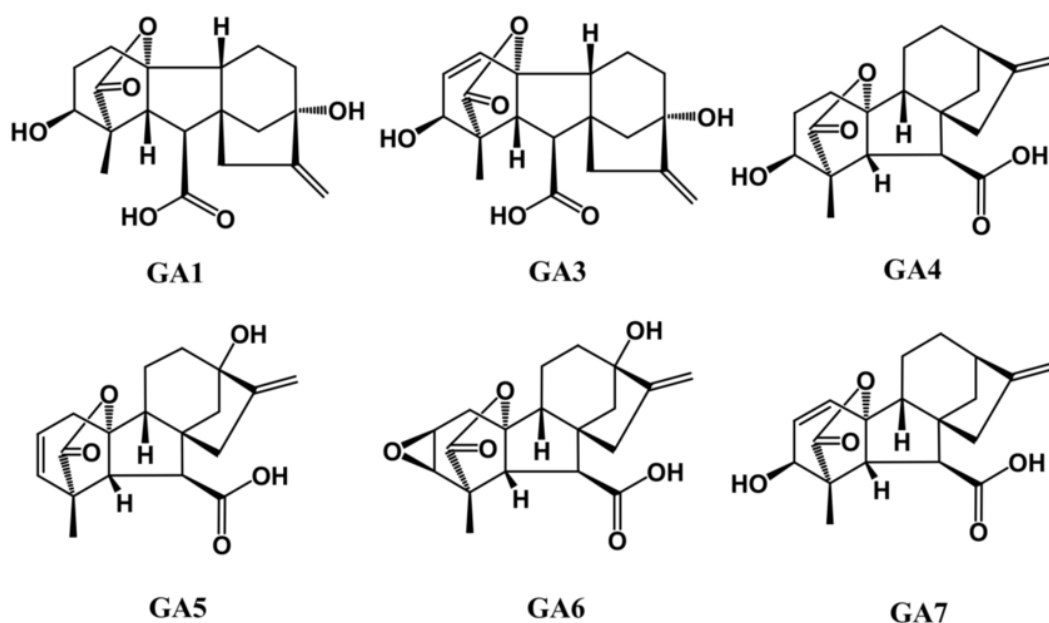


Schéma 2: Strukturní vzorce giberelinů

Široká škála syntetických regulátorů růstů nebo také retardantů růstu rostlin působí tak, že inhibují různé fáze biosyntézy giberelinů a tím ovlivňují růst a vývoj ošetřených rostlin. Tyto látky hrají velmi důležitou roli ve světové produkci potravin a okrasných rostlin. Například, snižují riziko polehávání rostlin při nepříznivých přírodních podmínkách, a proto se široce používají v Asii při pěstování rýží a v Evropě při produkci obilovin a řepky olejné [1, 2].

Jak již bylo zmíněno, gibereliny způsobují prodloužený růst rostlin. Inhibice jejich syntézy zapříčiní, že se růst zpomalí, což vede k nižší výšce okrasných rostlin, kompaktnějším ovocným stromům a sníží se také frekvence stříhání trávníků a živých plotů. Některé látky způsobují jak inhibici dělení buněk, tak i jejich prodlužování, jiné sloučeniny způsobují jenom prodlužovací růst se zachováním procesu dělení buněk. Dostáváme tak kratší rostliny, ale se stejným počtem listů [1-4, 21, 22].

S každým rokem se zvětšuje počet nových přípravků pro regulaci růstu rostlin, avšak aby prošly registrací, musí splňovat spoustu podmínek týkajících se perzistence a mobility v životním prostředí, toxicity pro lidi a živočichy, případně i nebezpečí jejich metabolitů.

Důležitým úkolem je sledovat jejich osud v životním prostředí. Existuje spousta metod pro stanovení těchto přípravků, počínaje nejpoužívanějšími chromatografickými metodami v kombinaci s různými detektory, až po méně užívané metody, jako je například imunoanalytická metoda. Jak již bylo zmíněno, tato práce je zaměřena hlavně na vývoj voltametrických metod pro analýzu těchto přípravků.

1.1.2 Fungicidy

Již od vzniku zemědělství se lidstvo setkávalo s komplikacemi při pěstování a skladování různých druhů plodin. Ztráta úrody mohla vést k hladu a úmrtí celé vesnice. V té daleké minulosti naši předkové ani nemohli doufat, že bude vynalezen účinný způsob, jak s tím bojovat. První fungicidy se začaly používat již před 200 lety k ošetření rostlin proti chorobám a škůdcům. Byly to přípravky na bázi mědi a síry. Dříve se fungicidy používaly převážně k ochraně obilovin a vinné révy, ale s postupem času se počet ošetřovaných plodin rozšiřoval. V dnešní době jsou fungicidy široce používány k ochraně většiny ovocných a zeleninových komodit, zemědělských plodin a průmyslově důležitých plodin, jako je například bavlna atd. [5, 6].

Většina chorob, kvůli kterým vzniká potřeba používat fungicidy je způsobena houbovými patogeny, které napadají rostliny. Mezi tyto patogeny můžeme zařadit představitele různých hub, zejména *Penicillium*, *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Pythium*, *Fusarium*, *Alternaria*,

Phytophthora atd. Obiloviny jsou nejčastěji napadány patogeny rodu *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria* a *Fusarium*, a pro hroznové víno největší nebezpečí představují infekce *Botrytis cinerea*, *Uncinula necator* a *Plasmopara viticola*. Patogeny mohou vést ke skvrnitosti u pšenice, cukrové řepy, špenátu, mangoldu a dalších významných zemědělských plodin. Také vznik plísní v obilovinách způsobuje ztrátu sušiny, degradaci lipidů a bílkovin, nepříjemnou chuť a podobně. Důležité je také připomenout, že rostliny mohou být napadeny těmito patogeny nejenom při samotném pěstování, ale také i při následném skladování [5, 6].

Na rozdíl od starších nesystémových fungicidů, současné fungicidy působí systémově. Pomáhá to lépe kontrolovat a předcházet chorobám rostlin [5, 6].

V dnešní době existuje obrovský počet fungicidních přípravků pro všechny případy rostlinných chorob. Tyto přípravky můžeme rozdělit podle chemické skupiny a způsobu účinku takto: triazoly, benzimidazoly, dikarboximidy, dithiokarbamáty, fenylamidy, ftalimidy, anilinopyrimidiny, fenylpyrroly, fenoxychinoliny, QoI-fungicidy a anorganické sloučeniny [5].

Velkým problémem, se kterým se setkávají zemědělci, je vznik rezistence u patogenu k určitému druhu fungicidu, a ten pak přestává být účinný. Toto se neustále řeší, vyvíjejí se nové přípravky, které by předcházely vzniku této rezistence. Jedním z takových fungicidů je mefentriplukonazol [6, 23].

Fungicidy jsou velmi účinné při kontrole a potlačování houbových chorob, ale zároveň dost často jsou velmi toxické pro životní prostředí, živočichy a lidské zdraví. Proto je důležité kontrolovat jejich obsah, zejména maximální limity reziduí (MLR) ve složkách životního prostředí a potravinách. Také by se měly dodržovat všechny pokyny bezpečnosti práce, aby se předešlo jakékoliv nadměrné expozici přípravku.

1.2 Studované látky

1.2.1 Paklobutrazol

Paklobutrazol, (2*RS*,3*RS*)-1-(4-chlorfenyl)-4,4-dimethyl-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)pentan-3-olu, zkráceně PBZ (schéma 3) je široce používaným retardantem růstu rostlin již od osmdesátých let minulého století [7].

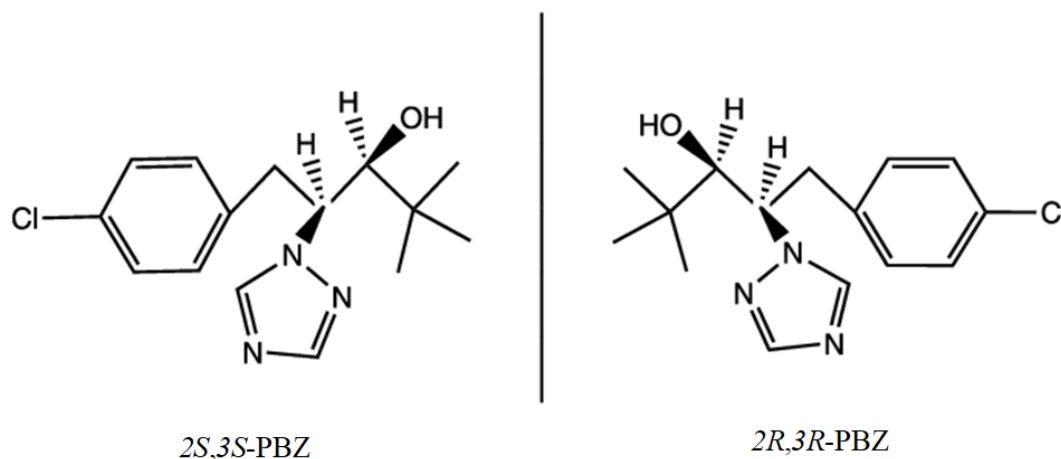


Schéma 3: Strukturní vzorce enantiomerů PBZ

Hlavním účinkem PBZ je inhibice cytochromů P450 (CYP 450), která následně vede k inhibici produkci giberelinů. Za následek to má vliv na výšku ošetřených rostlin, jelikož při indukci giberelinů buňky se stále dělí, ale neprodlužují se, takže rostliny se zmenšují se současným zachováním počtu listů. Tento efekt je velice žádoucí při pěstování okrasných rostlin a rostlin ve sklenicích. Mezi další morfologické účinky PBZ můžeme zařadit zvýšený růst kořenů, zvětšení chloroplastů a tloušťky listů, zvětšení tloušťky epikutikulární voskové vrstvy a snížení prodloužení výhonků a délky trichonu [7, 17, 24-27]. Navíc PBZ zlepšuje velikost a kvalitu plodů, například při mírné aplikaci PBZ na jabloně bylo pozorováno zlepšení jak kvality plodů, tak i jejich skladovacích schopností [28, 29]. Dalším důležitým účinkem PBZ je to, že zvyšuje odolnost rostlin proti polehání tím, že usnadňuje přenos fotosyntetických produktů z listů do kořenů, čímž posiluje kořeny a stonky. Dále také bylo prokázáno, že díky biochemickým změnám způsobeným PBZ, ošetřené rostliny lépe snášely nepříznivé přírodní podmínky jako je sucho nebo zvýšená solnost půdy [30-33].

PBZ je triazolovou, chirální látkou a může existovat ve formě čtyř enantiomerů, ze kterých se každý může lišit toxicitou, bioaktivitou, bioakumulací apod. Avšak komerční přípravek obsahuje pouze 2*R*,3*R*-PBZ a 2*S*,3*S*-PBZ enantiomery jejichž strukturní vzorce

zobrazuje schéma 3. 2*R*,3*R*-PBZ má vysokou fungicidní aktivitu a 2*S*,3*S*-PBZ odpovídá za inhibici giberelinů [34-36].

Toxicita PBZ

Během studie na potkanech a myších a testu in vitro a in vivo bylo zjištěno, že PBZ by neměl být karcinogenní ani genotoxický. U zvířat však vykazoval mírnou orální a inhalační akutní toxicitu a nízkou dermální akutní toxicitu. Navíc PBZ je klasifikován jako podezřelý z reprodukční toxicity (H361) [7, 17].

Osud PBZ v životním prostředí

Ve vodním a půdním prostředí je PBZ považován za environmentálně stabilní sloučeninu s poločasem rozpadu (DT50) v půdě 43-618 dní za anaerobních podmínek. Avšak měly by být přísně sledovány možné úniky PBZ do životního prostředí, obzvláště do vody, jelikož PBZ má akutní (H400) a chronickou (H410) toxicitu pro vodní organismy [7, 17, 37].

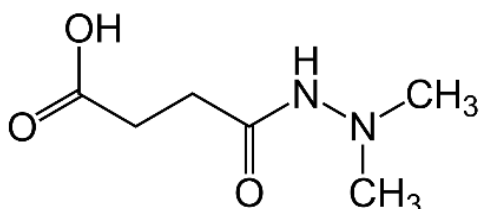
Metody stanovení PBZ

Nejpoužívanější metodou pro stanovení PBZ na úrovni enantiomerů je kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (LC-MS). Většinou, pokud se jedná o složitější matici vzorku, před samotnou analýzou, se používají různé metody pro čištění, prekoncentraci a extrakci vzorku [38-43]. Mezi nechirální metody stanovení PBZ můžeme zařadit plynovou chromatografii (GC), fluruimmunoassay a fluorescenční spektrofotometrii [37, 44, 45]. Za účelem rozšíření poznatku o PBZ a vylepšení již vyvinuté metody voltametrického stanovení této látky, která je podrobně popsána v práci [8] byly provedeny další experimenty, které jsou uvedeny v kapitole Výsledky a diskuse.

1.2.2 Daminozid

Daminozid, kyselina 4-(2,2-dimethylhydrazinyl)-4-oxobutanová, jehož strukturní vzorec uvádí schéma 4a, je jedním z prvních komerčních růstových regulátorů. Poprvé byl použit v USA v roce 1963 na chryzantémy v květináčích [9, 46].

a)



b)

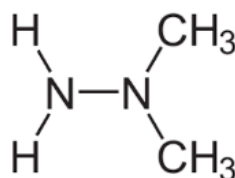


Schéma 4: Strukturní vzorce daminozidu (a) a *N,N*-dimethylhydrazinu (b)

Daminozid, zkráceně DMZ, se používá u řady plodin, a to jak u ovoce a zeleniny např. pro zlepšení kvality sklizně, tak u okrasných rostlin. Pomocí DMZ se například může snižovat intenzita červeného zbarvení u pivoněk. Také se DMZ hodně používá při produkci jablek, a to ke zvýšení vývoje květů, velikosti a barvy plodů, k omezení vegetativního růstu a zlepšení skladovacích vlastností [9, 47-52]. Tyto účinky jsou způsobeny tím, že DMZ inhibuje aktivitu 2-oxoglutarát-dependentní dioxygenázy v dráze biosyntézy giberelinů. Jak již bylo zmíněno, gibereliny jsou velkou skupinou přirozených regulátorů růstu, které v různé míře regulují růst a vývoj rostlin, zejména dělení a prodlužování buněk, klíčení semen, prodlužování výhonů atd [47, 48]. DMZ se aplikuje buď postřikem na listy anebo jako máčení před výsadbou. Dobře se vstřebává listy a rozvádí se po celé rostlině [9].

Toxicita DMZ

Toxicita DMZ byla předmětem diskuse již mnoho let v minulosti. Na základě výzkumu, který prováděla organizace United States Environmental Protection Agency (US EPA) v roce 1983 bylo zjištěno, že DMZ má velmi nízkou akutní a subakutní toxicitu, pro inhalační a orální účinky je zařazen do kategorie toxicity IV, a pro dermální účinky do kategorie toxicity III. Jeho rozkladný produkt *N,N*-dimethylhydrazin, zkráceně UDMH (jehož strukturní vzorec zobrazuje schéma 4b, představuje mnohem větší nebezpečí pro člověka a životní prostředí. Podle US EPA je klasifikován jako "pravděpodobný karcinogen pro člověka" a je zařazen do skupiny B2. Vzhledem k tomu, že přítomnost a množství UDMH jsou přímo závislé na DMZ, jak je ukázáno na schématu 5, byl DMZ rovněž klasifikován jako karcinogen skupiny B2 [9, 52-54]. Kvůli těmto skutečnostem bylo od roku 1989 zakázáno použití DMZ na potravinářské plodiny [55].

Během studií na potkanech bylo zjištěno, že DMZ nezpůsobuje vývojovou ani reprodukční toxicitu, také pro DMZ spolu s UDMH nebyla prokázána mutagenita [9].

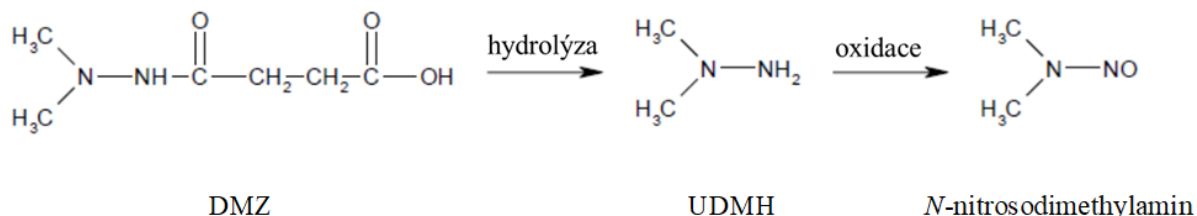


Schéma 5: Reakce rozkladu DMZ

Kvůli již popsaným skutečnostem je nutné dodržování bezpečnostních pravidel během aplikace přípravků obsahujících DMZ. Tak například pracovníci skleníků by měli mít na sobě chemicky odolnou obuv, zástěru, pokrývku hlavy, rukavice atd. Také by se nemělo vstupovat do skleníků dříve než po 24 hodinách po aplikaci přípravku [9].

Osud DMZ v životním prostředí

Vzhledem k tomu, že přípravky obsahující DMZ lze používat pouze ve sklenících, úniky do životního prostředí by měly být minimální. Může se však stát při nevhodném zacházení nebo při chybné aplikaci, že dojde k průsaku do půdy a do vodních toků. Podle US EPA je DMZ stabilní vůči hydrolyze, avšak v půdě se rychle rozkládá. Co se týče vlivu na živé organismy, z hlediska akutní toxicity je DMZ mírně toxický pro vodní bezobratlé a skoro netoxický pro sladkovodní ryby, savce a ptáky [9].

Jak již bylo zmíněno, DMZ se hodně používá při pěstování jablek. Jeho rezidua v jablkách lze nalézt až jeden rok po aplikaci, mateřská sloučenina je také hlavním reziduem v jablečných výrobcích (např. omáčkách, šťávách) [56]. Dalším nebezpečím je to, že při zahřívání jablečných přípravků se uvolňuje UDMH (2-8 % celkového množství DMZ), který je, jak již bylo uvedeno, nebezpečný pro lidské zdraví [56, 57]. Maximální limity reziduí DMZ a UDMH jsou uvedeny v Nařízení komise (EU) 2017/624 ze dne 30. března 2017, kterým se mění přílohy II a V nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 396/2005 [58].

Metody stanovení DMZ

Většina metod používaných pro stanovení DMZ je založena na jeho alkalické hydrolyze na UDMH, který je následně komplexován nebo derivatizován pomocí různých činidel. Tyto deriváty se pak analyzují spektrofotometricky, plynovou nebo kapalinovou chromatografií za použití různých typů detektorů, zejména dusíko-fosforového detektoru (NPD), detektoru elektronového záchytu (ECD) nebo hmotnostní spektrometrií (MS) [47,51,57,59-61].

Jako alternativa složitým instrumentálním metodám byla vyvinuta metoda založená na využití piezoelektrického krystalového senzoru, kde jako rozpoznávací prvek slouží polymer s molekulárním otiskem DMZ [56].

Z hlediska voltametrického stanovení DMZ, v literatuře lze nalézt pouze jednu práci z roku 1987, která využívá alkalickou hydrolyzu a vzniklý produkt UDMH je pak elektrochemicky oxidován na rtuťové kapkové elektrodě s využitím square-wave voltametrie (SWV) [62]. Přímé voltametrické stanovení DMZ zatím nebylo popsáno.

1.2.3 Mefentriflukonazol

Mefentriflukonazol ((2RS)-2-[4-(4-chlorophenoxy)-2-(trifluoromethyl)phenyl]-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ol) je prvním isopropanol-triazolovým fungicidem používaným k prevenci, kontrole a potlačování houbových chorob u širokého spektra zemědělských plodin, ovoce a zeleniny, zejména obilovin, jablek, rajčat, okurek, paprik, brambor, sóji, citrusů a hroznů [10, 11].

Mefentriflukonazol, zkráceně MFZ, je DMI – fungicidem, což znamená, že je inhibitorem demethylace sterolů, zejména ergosterolu. Snížení hladiny ergosterolu vede ke změně funkce a struktury cytoplazmatické membrány hub, které způsobují choroby rostlin [10, 11]. Tyto fungicidy se přísně regulují EU kvůli podezření narušování endokrinního systému, avšak MFZ na rozdíl od jiných DMI-fungicidů má minimální nežádoucí vedlejší účinky a zároveň vysokou fungicidní aktivitu. Dalším problémem spojeným s použitím DMI-fungicidů je vznik rezistence vůči těmto fungicidům u některých patogenů, například *Cercospora beticola*, kvůli kterému se listy cukrové řepy, mangoldu a špenátu pokrývají skvrnami typu *cercospora*, patogenu *Septoria tritici*, který je příčinou skvrnitosti u pšenice, dále patogenu *Podosphaera xanthii*, způsobujícího moučnatost cukrovky a další [63]. Kvůli této rezistenci se například snížila účinnost epoxikonazolu vůči *Zymoseptoria tritici* o 55 % [64]. Bylo zjištěno, že na rozdíl od jiných DMI-fungicidů, u MFZ v určitých případech se tato rezistence neprojevuje. Tak například MFZ je velice účinný proti velkému počtu triazol-rezistentních izolátů patogenu *Zymoseptoria tritici* a jiným patogenům způsobujícím listové skvrny, moučnivku, plísň nebo rez u spousty plodin [63]. Navíc bylo dokázáno, že mezi MFZ a jinými DMI – fungicidy existuje tzv. zkřížená rezistence, a to díky jeho unikátní struktuře, uvedené na schématu 6 [10, 11, 63, 64].

Většina triazolových fungicidů jsou chirální sloučeniny. MFZ není výjimkou, má jedno chirální centrum, takže může existovat ve dvou stereoizomerních formách, a to *S*-(+)-MFZ a *R*-(-)-MFZ (schéma 6). Tyto enantiomery jedné látky se často liší v bioaktivitě, toxicitě, metabolismu, perzistenci ve složkách životního prostředí a podobně. Je důležité studovat tyto odlišnosti pro každý enantiomer, aby se dalo přesně posoudit nebezpečí určitých přípravků pro zdraví a životní prostředí [11, 64, 65].

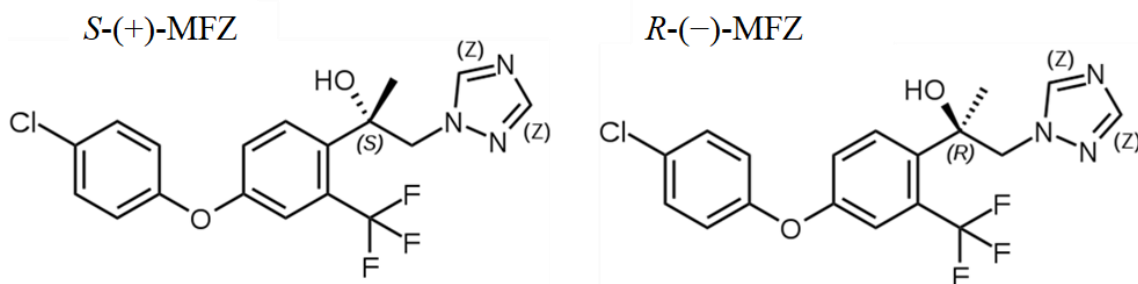


Schéma 6: Strukturní vzorce stereoizomeru MFZ

Během jedné studie zabývající se enantiomery MFZ bylo zjištěno, že z hlediska inhibice biosyntézy ergosterolu je *R*-(-)-MFZ mnohem účinnější než *S*-(+)-MFZ, dále také byly pozorovány přednostní metabolismus a eliminace enantiomerů *S*-(+)-MFZ u potkanů. Podlé této studie měl *R*-(-)-MFZ ve srovnání s *S*-(+)-MFZ 5 až 473krát vyšší bioaktivitu vůči všem testovaným houbovým patogenům [65]. Jiná studie uvádí poněkud odlišné hodnoty, zejména *R*-(-)-MFZ byl 11 až 113 krát účinnější než *S*-(+)-MFZ proti testovaným fytopatogenům. Navíc bylo zjištěno, že použití čistého *R*-(-)-MFZ, místo komerční racemické směsi, obsahující oba enantiomery by mohlo snížit znečištění životního prostředí [66].

Toxicita MFZ

MFZ se snadno absorbuje savci, poté se široce distribuuje a metabolizuje se na velký počet metabolitů. Z hlediska akutní toxicity při inhalačním, dermálním či orálním podání vykazují MFZ a jeho metabolity nízkou toxicitu, avšak byl klasifikován jako senzibilizátor kůže (H317), což znamená, že může vyvolat alergickou kožní reakci. Z hlediska krátkodobé a dlouhodobé expozice MFZ nejčastěji poškozuje játra. Jsou cílovým orgánem pro všechny testované druhy zvířat, zejména pro myši (nejcitlivější), potkany a psy [18, 67-69].

Během studií na myších byla získána hodnota NOAEL (no-observed adverse effect level), která uvádí množství MFZ, při kterém nejsou pozorovány nepříznivé účinky. Pro krátkodobou a dlouhodobou expozici MFZ se tato hodnota rovná 3,5 mg/kg tělesné hmotnosti denně [18, 67-69].

Z hlediska toxicity není MFZ považován za genotoxický, imunotoxický, neurotoxický a teratogenní, také by neměl ohrožovat reprodukční schopnosti a plodnost. Co se týče karcinogenity, pokud se nepřekračovala hodnota 36 mg/kg tělesné hmotnosti na den u myši a 163 mg/kg tělesné hmotnosti na den u potkanů, nebyly pozorovány žádné karcinogenní účinky [70].

Osud MFZ v životním prostředí

V půdním prostředí je MFZ mírně mobilní a vysoce perzistentní s DT50 104 až 477 dní. Ve vodních systémech je MFZ také perzistentní, do povrchových vod se může dostat průsaky z půdy, na kterou je vázán. Pravděpodobnost, že by se MFZ dostal do podzemních vod je velmi nízká, a to kvůli jeho vysoké sorpční schopnosti [68].

Z hlediska toxicity pro životní prostředí je MFZ klasifikován jako „vysoce toxický pro vodní organismy“ (H400) a „vysoce toxický pro vodní organismy při dlouhodobých účincích“ (H410), obzvláště se to týká sladkovodních ryb, z hlediska akutní toxicity. MFZ má také střední až vysokou toxicitu pro savce, mírnou toxicitu pro ptáky a je prakticky netoxický pro dospělé včely a larvy [18, 68, 71, 72].

Metody stanovení MFZ

Vzhledem k tomu, že se MFZ objevil v praxi relativně nedávno, zatím není popsáno mnoho metod na jeho stanovení. Nejčastěji se MFZ stanovuje pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií (UPLC-MS/MS), která se používá ke stanovení enantiomerů MFZ [73, 74]. Tato metoda může být vylepšena použitím speciální extrakční techniky anebo jiného než hmotnostního detektoru. Tak například pro analýzu MFZ ve vzorcích pšenice, prosa, rýže, čiroku a kukuřice byla vyvinuta metoda, používající disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina ve spojení s ultra vysokotlakou kapalinovou chromatografií s detektorem s diodovým polem (UHPLC-DAD) [75]. Dalším příkladem je metoda pro chirální stanovení MFZ ve vzorcích ovocné šťávy, vody a fermentovaného likéru s využitím přepínatelné homogenní mikroextrakce kapalina-kapalina na bázi hlubokého eutektického rozpouštědla (SDES-HLLME) v kombinaci s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s detekcí pomocí diodového pole (HPLC-DAD) [76]. V Číně byla vyvinuta další metoda pro stanovení enantiomerů MFZ v paprice a okurkách (čerstvých a nakládaných) a v rajčatech pomocí nadkritické fluidní chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie (SFC-MS/MS). Díky této metodě byly zjištěny důležité skutečnosti o chování enantiomerů MFZ ve zkoumané zelenině a zpracovaných zeleninových výrobcích, které mohou posloužit k přesnějšímu posouzení rizik [11].

Voltametrické metody pro stanovení této látky dosud nebyly popsány.

1.2.4 Fluxapyroxad

Fluxapyroxad (3-(difluoromethyl)-1-methyl-N-[2-(3,4,5-trifluorophenyl)phenyl]pyrazole-4-carboxamide), zkráceně FPX, jehož strukturní vzorec je zobrazen na schématu 7, je velmi účinným pyrazolem a SDHI-fungicidem široce používaným pro kontrolu a potlačování houbových chorob u bavlny, arašidů, luskovin, obilovin, olejnin, ovocných stromů a zeleniny [15, 16, 77, 78].

Mechanismus účinku SDHI-fungicidů je založen na inhibici sukcinátdehydrogenázy (SDH) v komplexu II mitochondriálního dýchacího řetězce hub. Tím se narušuje buněčné dýchání a zpomaluje se tak klíčení spor, růst mycelia a zárodečných trubic, což ve výsledku celkově zpomaluje růst cílových druhů hub [16, 77-79].

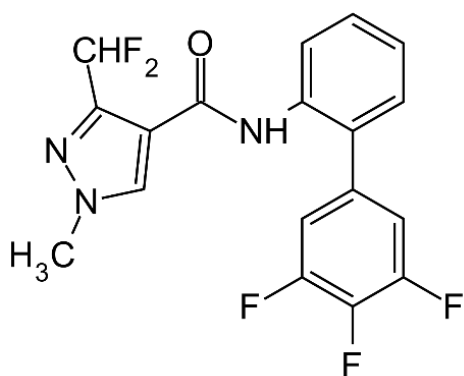


Schéma 7: Strukturní vzorec FPX

Jedním z takových houbových patogenů je *Pyrenophora tritici-repentis*, způsobující „opálenou skvrnitost“ u pšenice (*Triticum aestivum L.*) a tím snižující plochu využitelnou k fotosyntéze. Důsledkem je zhoršení kvality zrna a snížení výnosu pšenice [80, 81].

Během jedné studie bylo zjištěno, že kromě fungicidních účinků má FPX také pozitivní vliv na fyziologické parametry rostlin. Tak například u rostlin ošetřených FPX bylo pozorováno zlepšení rychlosti fotosyntézy, zvýšené ozelenění listů, snížené poškození buněk, zvýšená účinnost využití vody a tak dále. Také FPX, stejně jako MFZ, vykazuje rezistenci vůči určitým patogenům, např. *Corynespora cassiicola*, což snižuje jeho účinnost [80, 82].

Toxicita FPX

Při akutní dávce vykazuje FPX nízkou toxicitu pro všechny expoziční cesty. Cílovým orgánem při chronickém a subchronickém perorálním podání FPX jsou játra, a to u myši, potkanů a psů. U potkanů bylo pozorováno zvýšení hmotnosti jater a hypertrofie jaterních buněk. Také perorální expozice FPX vedla ke změnám v aktivitě jaterních enzymů, což v důsledku způsobovalo změny hormonů štítné žlázy, hypertrofii a hyperplazii folikulů štítné žlázy a tvorbu nádorů štítné žlázy. V případě zvyšování délky expozice nebo dávky FPX byl pozorován vznik nádorů u jater, dále také neoplastické změny jater a hepatocelulární nekróza. Tvorba nádorů jater a štítné žlázy byla objevena jen u potkanů, a to pro játra při dávkách > 11 mg/kg/den pro samce a > 82 mg/kg/den pro samičky a pro štítnou žlázu > 68 mg/kg/den u samců [15, 20]. Pro ostatní organismy, především pro člověka, je FPX klasifikován jako „nepravděpodobný karcinogen“, skupina 4. FPX by neměl být ani neurotoxický, či mutagenní [15, 83, 84]. Při posouzení pracovních rizik bylo zjištěno, že FPX nepředstavuje nebezpečí, a to při krátkodobé i střednědobé expozici [15].

Osud FPX v životním prostředí

Rychlost aerobního a anaerobního rozkladu FPX v půdním a vodním prostředí je nízká, s DT50 od 213 do 1827 dnů pro půdu a s DT50 od 420 do 731 dnů pro vodní systémy. Kromě toho FPX nepodléhá vodní ani půdní fotolýze a při určitých hodnotách pH (zejména 4,5,7 a 9) je stabilní vůči hydrolyze. Z hlediska mobility je FPX považován za středně až mírně mobilní a s pomocí různých mechanismů, jako je vyplavování, eroze či odtok se však může dostat jak do povrchových, tak i do podzemních vod [15, 20, 83-86]. Na rozdíl od mateřské látky, metabolity FPX se považují za vysoce až velmi vysoce mobilní v půdním prostředí [20].

FPX je stejně jako PBZ a MFZ klasifikován jako „vysoce toxický pro vodní organismy“ (H400), a „vysoce toxický pro vodní organismy při dlouhodobých účincích“ (H410). US EPA a European Food Safety Authority (EFSA) uvádějí ve svých zprávách, že FPX má nízkou akutní a chronickou toxicitu jak pro sladkovodní, tak i pro mořské organismy, a to pro ryby, bezobratlé, obojživelníky a rostliny. Jediné riziko hrozí, když se aplikuje přípravek, který kromě FPX obsahuje navíc pyraklostrobin, který je považován za toxičtější než FPX [15, 20, 83-86].

Podle dalších studií má FPX nízkou akutní toxicitu pro savce a je prakticky netoxický pro suchozemské bezobratlé živočichy, pro včely a ptáky při akutní expozici. Nelze vyloučit chronickou toxicitu pro suchozemské plazy, obojživelníky a ptáky, avšak zatím není informace

jednoznačně potvrzující tyto údaje. Podle předběžných informací následkem chronické toxicity u uvedených živočichů byl pozorován mírný nárůst tělesné hmotnosti mláďat [15, 20, 83-86].

Metody stanovení FPX

Většina přípravků na ochranu rostlin se stanovuje pomocí LC-MS/MS, FPX není výjimkou [20]. Jednou z takových metod je QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method) s využitím UHPLC-MS/MS pro stanovení FPX a jeho metabolitů v půdách, sedimentech a kalech [87]. Další podobnou metodou je také UPLC-MS/MS využívající ionizaci elektrosprejem (ESI). Tato metoda byla vyvinuta pro stanovení pěti pyrazolových pesticidů včetně FPX, a to v zelenině, ovoci a obilovinách [88]. Existují také metody, používající kvadrupólový hmotnostní spektrometr k identifikaci a kvantifikaci reziduí FPX [89, 90]. Z hlediska elektrochemického stanovení FPX, byla vyvinuta metoda používající elektrochemický senzor s molekulárně tištěným polymerem (MIP) pro FPX [91]. Stejně jako v případě MFZ, zatím nebyly popsány voltametrické metody pro stanovení FPX.

1.2.5 Metconazol

Metconazol, 5-[(4-chlorophenyl)methyl]-2,2-dimethyl-1-(1H-1,2,4-triazole-1-ylmethyl) cyclopentanol, zkráceně MCZ je dalším představitelem inhibitoru demethylace ergosterolu, tedy patří mezi DMI-fungicidy. [12-14, 92-98]. MCZ byl vyvinut japonskou společností Kureha Corporation v roce 1992 a od té doby je zaregistrován ve více než 40 zemích včetně Evropské Unie, USA, Kanady, Číny a dalších [12, 14, 92, 94, 97-99]. V současné době se MCZ používá pro ochranu širokého spektra plodin, a to pšenice, řepky, obilovin, peckovin, kukuřice, sóji a trávniku [12, 96, 100] proti houbovým patogenům a chorobám, zejména *Fusarium graminearum*, *Exserohilum turcicum*, *Zymoseptoria tritici*, *Puccinia triticina*, *Alternaria triticina*, padlí apod. [12-14, 94, 97, 98, 100].

MCZ je chirální látkou, má dvě chirální uhlíková centra a má dva páry diastereoizomerů a dva páry enantiomerů, a to *rac*-MCZ, *cis-1R,5S*-MCZ, *cis-1S,5R*-MCZ, *trans-1S,5S*-MCZ a *trans-1R,5R*-MCZ, jejichž struktury jsou uvedeny na schématu 8 [13, 14, 92, 93, 99]. Jako většina chirálních fungicidů má MCZ odlišný účinek na určité patogeny v závislosti na struktuře enantiomerů.

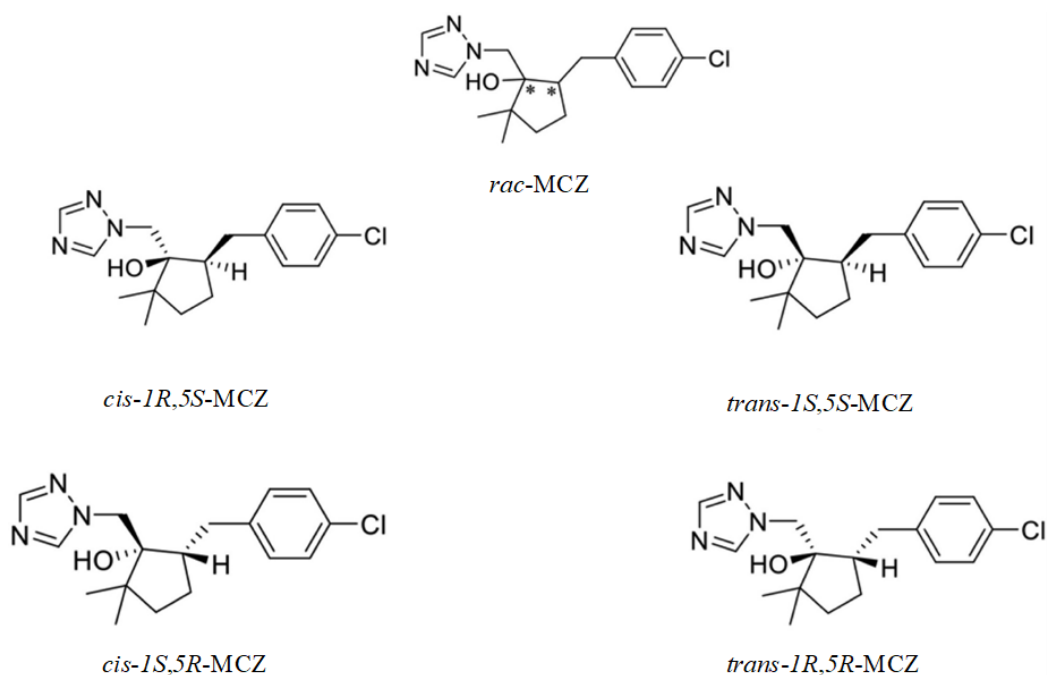


Schéma 8: Strukturní vzorce stereoizomerů MCZ

Tak například během jedné studie bylo zjištěno že bioaktivita MCZ vůči patogenům *Fusarium graminearum* a *Alternaria triticina* klesá v následujícím pořadí *cis-1S,5R*-MCZ > *rac*-MCZ > *trans-1S,5S*-MCZ > *trans-1R,5R*-MCZ > *cis-1R,5S*-MCZ

[13, 14]. Navíc bylo zjištěno, že fungicidní aktivita *cis-1S,5R-MCZ* vůči již zmíněným patogenům byla 13,9-23,4 krát vyšší než *cis-1R,5S-MCZ* [13]. Další studie se zabývala stereoselektivní toxicitou MCZ na sladkovodní řasu *Chlorella pyrenoidosa*. Ukázalo se, že nejvyšší toxicitu projevuje *trans-1S,5S-MCZ*, po jehož ošetření docházelo k závažnému poškození antioxidantního systému a fotosyntézy [92]. Protože hlavní podíl (90 %) komerčních produktů tvoří *cis-MCZ*, jedna studie se zabývala negativními účinky tohoto enantiomeru na zebřičky (*Danio rerio*). Bylo zjištěno že *cis-1R,5S-MCZ* má mnohem silnější schopnost vyvolávat oxidativní stres a endokrinní poruchy štítné žlázy u zebřiček a navíc se bioakumuluje přednostněji než *cis-1S,5R-MCZ*. Akutní toxicita MCZ vůči zebřičkám klesá v následujícím pořadí *cis-1R,5S-MCZ* > směs > *cis-1S,5R-MCZ* [93]. Z výše uvedených skutečností můžeme usoudit, že MCZ je velice účinný proti určitým houbovým patogenům, ale zároveň může způsobovat nežádoucí negativní účinky na necílové organismy, pokud by došlo k jeho úniku do životního prostředí.

Toxicita MCZ

Akutní toxicita MCZ je nízká až minimální, a to pro dermální (kategorie III), orální (kategorie III-IV) a inhalační expozici (kategorie IV). Navíc je minimálně dráždivý pro kůži (kategorie IV; není senzibilizátorem kůže) a mírně dráždivý pro oči (kategorie III). Tak jako v případě FPX, cílovým orgánem při subchronické a chronické expozice MCZ jsou játra. Navíc při studii subchronické toxicity na potkanech, bylo pozorováno zvýšení hmotnosti nejen jater, ale i ledvin a sleziny při koncentrací MCZ 1000 a 3000 ppm. U MCZ nebyla prokázána karcinogenita, mutagenita ani neurotoxicita, ale je zde podezření na reprodukční toxicitu, zejména na poškození plodu v těle matky (H361d). Hodnota NOAEL pro člověka v souvislosti s dietou a jinými, než pracovními činnostmi pro akutní expozici MCZ se rovnala 12 mg/kg/den, a pro chronickou - 4.3 mg/kg/den [19].

Osud MCZ v životním prostředí

Jedinou významnou cestou rozkladu MCZ v životním prostředí je aerobní metabolismus v půdě, hodnoty DT50 se pochybovaly od 192,5 do 660 dnů. Na základě adsorpční/desorpční studie MCZ, která byla provedena na čtyřech půdách s různými hodnotami pH, a to 5,8-7,6 a obsahem organického uhlíku v rozmezí 0,74-2,29 % byly získané hodnoty rozdělovacího koeficientu organický uhlík–voda K_{oc} 1026 až 2723 ml/g, což naznačuje, že MCZ je mírně mobilní. Navíc je MCZ stabilní vůči hydrolyze a středně až mírně rozložitelný vodní fotolýzou, DT50 ve vodě je 1-15 dní, a v sedimentech pak 116-814 dní [19].

Do povrchových vod by se MCZ mohl dostat hlavně prostřednictvím splachů a postřiků, do podzemních vod pak vyluhováním půd. Jeho přítomnost by zde mohla způsobit vážné škody, jelikož MCZ je klasifikován jako „toxický pro vodní organismy s dlouhodobými účinky“ (H411), avšak během terénních studií nebylo prokázáno žádné významné vyluhování MCZ. Pokud by došlo k úniku MCZ do složek životního prostředí, mohlo by to způsobit ohrožení necílových organismů, jako jsou sladkovodní a mořské ryby (chronická toxicita) a bezobratlé (akutní a chronická toxicita), cévnaté a nevaskulární vodní rostliny, ptáci (akutní toxicita) a savci (akutní a chronická toxicita), suchozemské a polovodní rostliny. Proto bylo zavedeno opatření, které by mělo tyto rizika minimalizovat, a zní: „Neaplikujte přímo do vody nebo na místa s výskytem povrchové vody nebo na přílivové oblasti pod hranicí průměrné výšky vodní hladiny. Při likvidaci vody z mytí nebo oplachování zařízení neznečišťujte vodu. Únik a odtok může být nebezpečný pro vodní organismy ve vodě přiléhající k ošetřeným plochám.“ Podle dostupných studií, zabývajících se toxicitou MCZ bylo zjištěno, že z hlediska akutní toxicity MCZ je pro včely medonosné prakticky netoxický, navíc studie kontaktní toxicity MCZ ukazují, že pokud se nepřekračuje koncentrace 95,3 µg/včela, nedochází k žádným účinkům ze strany MCZ [19].

Metody stanovení MCZ

Doposud je napsáno jen málo prací zabývajících se stanovením MCZ. Jedna z nich popisuje metodu pro stereoselektivní kvantifikaci čtyř stereoizomerů MCZ v půdě a moučných matricích na koloně Enantiopak OD s využitím normální fáze HPLC. Předúprava vzorku byla prováděna s využitím metody QuEChERS [12]. Dále jsou popsány metody, které se zabývají současnou analýzou více pesticidů, mezi než patří i MCZ. Tak například byla vyvinuta metoda pro stanovení 22 chirálních pesticidů, včetně MCZ v rajčatech, okurkách, zelí, hroznech, jablkách, hruškách a moruších s využitím LC-MS/MS. Chirální separace probíhala na koloně Chiralpak IG po dobu 47 minut [101]. Další metoda se zabývala stanovením 16 pesticidů, mezi které patřil i MCZ ve vodních vzorcích, jako je voda z řeky, moře, kanálu a dešťová voda. Pro extrakci vzorku byla používána přímá mikroextrakce na pevné fázi (DI-SPME) a kvalitativní a kvantitativní stanovení pesticidů probíhalo s využitím GC-MS [102]. Dále existuje metoda zabývajících se stanovením 23 reziduí pesticidů v tabáku, pomocí ultraúčinné konvergenční chromatografie-tandemové hmotnostní spektrometrie (UPC2-MS/MS). Celková analýza trvá 6 minut a výtěžnost MCZ se pohybovala od 84,2 do 90,9 % [103]. Doposud nebyly popsány metody elektrochemického stanovení MCZ.

1.3 Voltametrické metody v elektroanalýze

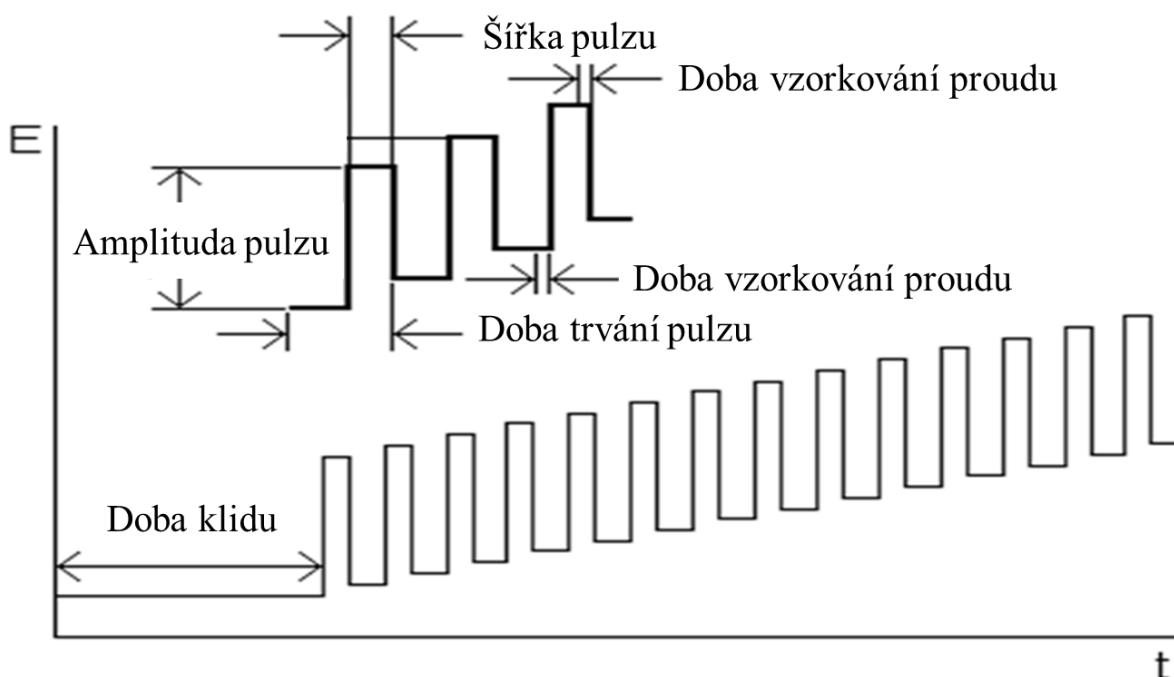
Velice užívanými metodami v elektroanalytické analýze jsou pulzní metody. První pulzní metody byly vyvinuty již v 50. letech minulého století G.C. Barkerem, avšak kvůli nedostatečnému rozvoji elektroniky, první analyzátor, který by mohl poskytovat bezproblémové použití těchto metod se objevil až v 70. letech. Původně pulzní metoda byla vyvinuta pro kapkovou rtuťovou elektrodu (DME), a proto se nazývala pulzní polarografie, avšak s časem se začaly používat i pevné indikační elektrody, například uhlíkové, zlaté, platinové, bismutové a další. Pak se tyto metody nazývaly pulzní voltametrické metody. V poslední době velice užívanou pevnou elektrodou se stává borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE) díky svým unikátním vlastnostem, které budou popsány dále v textu [104-106]. Principem pulzních metod je vkládání potenciálových pulzů a měření proudů na konci každého pulzu. Mezi pulzní metody můžeme zařadit normální pulzní voltametrii/polarografii (NPV/NPP), diferenční pulzní voltametrii/polarografii (DPV/DPP), AC voltametrii/polarografii, Square-Wave voltametrii (SWV) a Staircase voltametrii (StV). Všechny tyto metody se liší způsobem odečtu proudů a tvarem získaného píku nebo vlny. Při použití pulzních metod se eliminuje vliv kapacitního proudu, což velmi zlepšuje detekční limity oproti klasickým polarografickým měřením. Eliminace kapacitního proudu je způsobena tím, že rychlost poklesu tohoto proudu je mnohem rychlejší než u difúzního proudu, a tak na konci pulzu je jeho velikost zanedbatelná ve srovnání s velikostí difúzního proudu [104-110].

1.3.1 Diferenční pulzní voltametrie

Jednou z nejvíce citlivých pulzních metod, a proto široce používanou, je diferenční pulzní voltametrie (DPV). S využitím DPV se dají dosáhnout velmi nízké hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti, proto se tato metoda používá k analýze stopových koncentrací důležitých sloučenin ve složkách životního prostředí.

Principem diferenční pulzní voltametrie je vkládání napěťových pulsů na lineárně se zvyšující potenciál. Na obrázku 1 lze vidět tři důležité parametry pro DPP/DPV měření. Je zde znázorněna amplituda pulzu, která odpovídá výšce aplikovaného pulzu, šířka pulzu, která se rovna době trvání pulzu, a nakonec doba vzorkování proudu, ve které se odečítá proud. V DPP/DPV se odečet proudu provádí dvakrát, jak je ukázáno na obrázku 1, a to před vložením pulzu a na jeho konci. Poté se tyto proudy odečítají podle vzorce $\Delta I = I_2 - I_1$ a získaná hodnota se vynáší do grafu v závislosti na potenciálu. Výstupem DPV měření je voltamogram ve tvaru

píku, výška tohoto píku (resp. velikost proudu) je přímo úměrná koncentraci studovaného analytu. Je obvyklé, že závislost výšky píku na koncentraci je lineární [104-110].

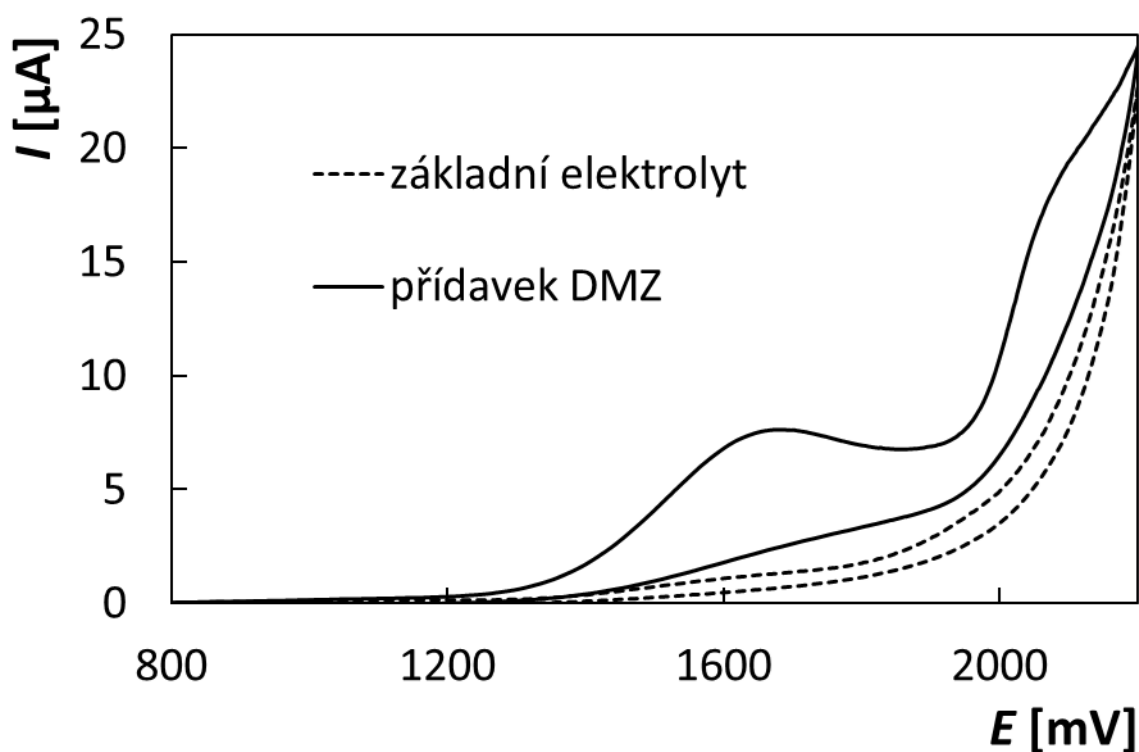


Obrázek 1: Diferenční pulzní voltametrie

1.3.2 Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie (CV) je široce používanou metodou pro studium elektrodoých procesů, obzvláště redoxních reakcí organických a anorganických sloučenin probíhajících na pracovní elektrodě. Je založena na principu kontinuální změny vložených potenciálů na rozhraní elektroda-roztok a měření výsledného proudu. V CV je pozorovaný proud funkcí potenciálu a času, a potenciál pracovní elektrody je lineárně závislý na čase. Ze získaných křivek lze zjistit informaci o termodynamice dané reakce a kinetice přenosu elektronů. Pomocí cyklické voltametrie se dá také určit, zda je probíhající reakce reversibilní, (quasireversibilní) či ireversibilní. Například na obrázku 2 je uveden cyklický voltamogram DMZ. Podle tvaru a umístění křivky je zřejmé, že se jedná o ireversibilní oxidační děj [104,105,107-110].

Důležitým parametrem v cyklické voltametii je rychlost polarizace v (mV/s). S využitím poznatků získaných ze studie závislosti výšky vlny na rychlosti polarizace se dá zjistit podstata řídicího děje elektrochemické reakce (adsorpce, difuze, kinetika).



Obrázek 2: Cyklický voltamogram základního elektrolytu a DMZ získaný na BDDE

(základní elektrolyt – BR pufr (pH 9,1), $c_{\text{DMZ}} = 0,267 \text{ mmol L}^{-1}$, $E_{\text{in}} = E_{\text{fin}} = +600 \text{ mV}$, $E_{\text{lower vertex}} = +500$, $E_{\text{upper vertex}} = +2200 \text{ mV}$, $\nu = 40 \text{ mV s}^{-1}$)

1.3.3 Borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE)

Správná volba pracovní elektrody je velmi důležitá pro úspěch voltametrické analýzy. Záleží to na mnoha faktorech, zejména na rozsahu pracovního potenciálu, na vlastnostech základního elektrolytu a analytu, na podstatě probíhajících elektrochemických reakcí atd. V případě analýzy studovaných přípravků na ochranu rostlin, voltametrická oxidace probíhá při značně pozitivních potenciálech (do +2300 mV), a to při pH = 9 ve vodním nebo ve směsném (vodní + organické) prostředí. Nejlepší volbou pro popsané prostředí se ukázala být právě borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE), zobrazená na obrázku 3 [104, 105, 109, 111-116].



Obrázek 3: Borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE)

Tato elektroda je široce používaná ve voltametrických analýzách díky svým vynikajícím vlastnostem. BDDE má široké potenciálové okno ve vodním a organickém prostředí, je použitelná jak při značně pozitivních, tak i negativních potenciálech, aniž by docházelo k rozkladu základního elektrolytu. Borem dopovaná diamantová elektroda vykazuje také vysokou elektrochemickou stabilitu odezvy, což je nezbytné pro spolehlivou analýzu. Studované látky jsou složité organické sloučeniny, proto je důležité, že BDDE je chemicky inertní. Další výhodou BDDE je to, že například na rozdíl od rtuťových elektrod, je během používání a následné likvidaci zcela bezpečná jak pro zdraví člověka, tak i pro životní prostředí [104,105,109,111-116].

2 Experimentální část

2.1 Chemikálie

Standardní roztoky DMZ o koncentraci $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ byly připraveny navážením vypočteného množství analytického standardu (Sigma-Aldrich, Německo) do 25ml baňky a doplněním po rysku $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH (Ing. Petr Švec-PENTA s.r.o., Česká republika). Standardní roztoky UDMH (98 %, Sigma Aldrich, Německo) o koncentraci $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ byly připraveny rozpuštěním definovaného objemu v roztoku $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ H_2SO_4 (Ing. Petr Švec-PENTA s.r.o., Česká republika).

Fungicidy MFZ, FPX a MCZ vysoké čistoty byly získány izolačním postupem popsáním v kapitole 2.3.4 z příslušných komerčních přípravků: Revysol (BASF s.r.o., Česká republika), Sergadis (AgroBio Opava, s.r.o, Česká republika) a Caramba (BASF s.r.o., Česká republika) respektive. Pro přípravu standardních roztoků MFZ, FPX a MCZ bylo naváženo určité množství příslušné látky, převedeno do 25 ml odměrné baňky a následně doplněno po rysku acetonitrilem (ACN) čistoty p.a. (Ing. Petr Švec-PENTA s.r.o., Česká republika). Koncentrace standardních roztoků se pohybovala od $0,2$ do 4 mmol L^{-1} pro MFZ, od $0,08$ do 4 mmol L^{-1} pro FPX a od $0,3$ do 4 mmol L^{-1} pro MCZ.

Standardní roztoky PBZ a difenokonazolu (DFK) (oba od firmy Sigma-Aldrich, Německo) byly připraveny navážením definovaného množství příslušné látky do 25ml odměrné baňky a doplněním ACN. Koncentrace standardního roztoku PBZ se pohybovala od $4,5$ do $6,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Koncentrace standardního roztoku DFK byla od $4,0$ do $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Roztoky dalších látek pro interferenční studii (azoxystrobin, bentazon, cyproconazol, epoxiconazol, glyfosát, klopyralid, pikloram, terbutryn, triclopyr, tebukonazol, tritikonazol, penconazol; vše od firmy Sigma-Aldrich, Německo) o koncentraci 4 mmol L^{-1} byly připraveny rozpuštěním příslušného množství standardů v ACN. ACN byl rovněž použit jako součást základního elektrolytu.

Brittonův-Robinsonův (BR) pufr, byl připraven smícháním kyselé a zásadité složky s využitím pH-metru pro dosažení požadované hodnoty pH. Kyselá složka se skládala z $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ roztoků H_3PO_4 , H_3BO_3 a CH_3COOH (všechny od firmy Ing. Petr Švec-PENTA s.r.o., Česká republika), zásaditá složka byla $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH. Borátový pufr o koncentraci $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ byl připraven ve 100 ml odměrné baňce zředěním $6,183 \text{ g H}_3\text{BO}_3$ v deionizované vodě. Hodnoty pH 9 bylo dosaženo alkalizací roztokem NaOH o koncentraci $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Roztok $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH, používaný jako složka základního elektrolytu během stanovení

PBZ, byl připraven navážením příslušného množství pevné látky a jeho následným rozpuštěním v destilované vodě.

Roztok komerčně dostupného přípravku DMZ, a to B-NINE^{®SG} (Arysta LifeScience Registrations Great Britain LTD., Velká Británie) byl připraven rozpuštěním 58,1 mg tohoto přípravku v 25 ml deionizované vody.

Roztok reálného vzorku MFZ byl připraven navážením 1,053 g Revysolu do 25ml odměrné baňky a doplněním ACN po značku. Roztok reálného vzorku FPX byl připraven navážením 0,127 g Sergadisů do 25 ml odměrné baňky a rozpuštěním tohoto množství ACN. Roztoky reálných vzorků Revytrexu a Revystaru XL (oba přípravky jsou od společnosti BASF s.r.o., Česká republika) byly připraveny odměřením 0,25 ml Revytrexu, respektive Revystaru XL do 25 ml odměrné baňky a doplněním ACN po rysku. Pro přípravu reálného vzorku MCZ bylo odměřeno 0,5 ml komerčního přípravku Caramba, respektive 0,71 ml Libraxu do 25ml baňky a doplněno ACN po rysku.

Pro přípravu roztoku reálného vzorku PBZ bylo do 50ml odměrné baňky nadávkováno 0,5 ml přípravku TOPREX (Syngenta Czech s.r.o., Česká republika) a doplněno ACN po rysku.

K izolaci a nakoncentrování DMZ, UDMH a PBZ z vody byla použita silně kyselá iontoměničová pryskyřice Amberlite[®] IRC120 H v H⁺ cyklu (SUPELCO, Sigma Aldrich, Německo, celková objemová kapacita 1,92 mEq ml⁻¹).

2.2. Použité přístroje

Všechny voltametrické analýzy byly prováděny pomocí potenciostatu/galvanostatu Autolab PGSTAT 128N (Metrohm Autolab, Utrecht, Nizozemsko), který byl ovládán pomocí softwaru NOVA 1.11.

Měřicí cela byla složena ze tří elektrod, kde BDDE (Windsor Scientific LTD, aktivní povrch 7,07 mm², vnitřní průměr 3 mm, odpor 0,075 Ω cm s poměrem B/C při depozici 1000 ppm) sloužila jako pracovní elektroda, nasycená Ag|AgCl|KCl elektroda jako referenční a platinová jako pomocná elektroda (obě od firmy Monokrystal, Česká republika).

Oxidační produkty analytů byly generovány při konstantním potenciálu na velkoplošných elektrodách pomocí elektrochemického analyzátoru EP 100 (HSC servis, Slovensko). Měřicí cela obsahovala BDDE (6 mm) jako pracovní elektrodu, Ag|AgCl|KCl jako referenční elektrodu a pomocnou platinovou elektrodu oddělenou fritou.

Pro izolaci a koncentraci DMZ a UDMH z vody byly použity magnetické míchačky Lavat MM4 (Lavat a.s, Česká republika) a Heidolph MR 3002 (Heidolph Instruments, Německo).

K měření pH během přípravy pufových roztoků byl použit pH-metr ORION STAR A221 (Thermo Fisher Scientific, USA).

K vážení pevných látek byly použity analytické váhy Denver TB 124 (Denver Instruments, USA). Homogenizace roztoků byla prováděna pomocí ultrazvukové lázně Bandelin Sonorex (Schalltec GmbH & Co. KG, Německo) při laboratorní teplotě (23 ± 2 °C).

Pro nezávislou analýzu reálných vzorků byl použit HPLC analyzátor Agilent 1260 Infinity II Prime LC System vybavený separační kolonou Macherey - Nagel EC 250/4 Nucleosil 120-5 C18 (délka 250 mm, vnitřní průměr 4 mm a velikost částic 5 μm) s detektorem diodového pole (DAD). Mobilní fázi tvořila směs $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (90/10, v/v).

Reakční mechanismus oxidační reakce byl studován pomocí LC-MS s využitím přístroje složeného z odplyňovače Watrex VD40, autosampleru Spark Optimas, směšovače SunChrom, čerpadel Watrex DeltaChrom a UV-vis detektoru Sikam S3210 za použití kolony Watrex 250 \times 4 mm, Nucleosil 120 C18, 5 μm (Thermo Fisher Scientific, USA). Mobilní fázi byl ACN (Fisher Scientific, HPLC grade) a demineralizovaná voda v poměru 50/50, průtok 0,5 ml min^{-1} . Hmotnostní spektra byla detekována přístrojem Thermo Scientific LCQ Fleet za použití ionizace elektrosprejem (ESI) nebo zdroje chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI) pracujícího v pozitivním i negativním režimu.

Struktura izolovaných sloučenin byla potvrzena z ^1H a ^{19}F NMR spekter zaznamenaných na přístroji Bruker Avance III 400 MHz (pracovní frekvence: 400 MHz pro ^1H ; 376 MHz pro ^{19}F) nebo na přístroji Bruker AscendTM 500 MHz (pracovní frekvence: 500 MHz pro ^1H) v CDCl_3 . Čistota izolovaných sloučenin byla stanovena pomocí GC-MS zařízením Agilent 7890B, Series GC Custom, HP-5MS s délkou kolony 30 m, vnitřním průměrem 0,25 mm, filmem 0,25 μm (Agilent, USA).

2.3. Postupy a podmínky realizovaných metod

2.3.1. Voltametrická měření

Během vývoje metod elektrochemického stanovení analytů byly aplikovány dvě voltametrické metody, a to CV a DPV. CV byla použita především ke zjištění podstaty elektrochemického chování studovaných sloučenin s následujícími parametry:

- Pro PBZ potenciál (E) se pohyboval od počátečního potenciálu (E_{in}) 0 mV do horního potenciálu obratu ($E_{upper\ vertex}$) +2600mV, pak se otáčel do dolního potenciálu obratu ($E_{lower\ vertex}$) -200 mV a končil při potenciálu E_{fin} 0 mV, $\nu = 10-100\text{ mV s}^{-1}$;
- pro DMZ a UDMH: $E_{in} = E_{fin} = +600\text{ mV}$, $E_{lower\ vertex} = +500\text{ mV}$, $E_{upper\ vertex} = +2200\text{ mV}$, $\nu = 20-350\text{ mV s}^{-1}$ pro DMZ a $20-200\text{ mV s}^{-1}$ pro UDMH;
- pro MFZ a FPX: $E_{in} = E_{fin} = 0\text{ mV}$ (resp. +600 mV), $E_{lower\ vertex} = -800\text{ mV}$ (resp. +500 mV), $E_{upper\ vertex} = +2200\text{ mV}$, $\nu = 10-100\text{ mV s}^{-1}$;
- pro MCZ: $E_{in} = E_{fin} = 0\text{ mV}$, $E_{lower\ vertex} = -500\text{ mV}$, $E_{upper\ vertex} = +2300\text{ mV}$, $\nu = 10-100\text{ mV s}^{-1}$.

DPV byla použita pro vývoj metod a vlastní stanovení studovaných látek v jejich komerčně dostupných přípravcích. Nalezené parametry pro DPV měření byly následující:

- Pro DMZ, UDMH, MFZ, FPX a MCZ byla pracovní elektroda polarizována v rozsahu potenciálů od $E_{in} +500\text{ mV}$ do $E_{fin} +2200\text{ mV}$, pro MCZ byl $E_{fin} +2300\text{ mV}$, modulační amplituda (A) se rovnala +50 mV, modulační čas (t) 80 ms a ν 40 mV s⁻¹;
- pro PBZ byla pracovní elektroda polarizována v rozsahu potenciálů od $E_{in} +1200\text{ mV}$ do $E_{fin} +2300\text{ mV}$, $A = +30\text{ mV}$, $t = 60\text{ ms}$, $\nu = 40\text{ mV s}^{-1}$.

Před každým měřením bylo provedeno elektrochemické ošetření povrchu pracovní elektrody, a to přivedením potenciálů o hodnotě +2000 mV, -200 mV a +2000 mV, každý po dobu 10 s. Střídáním hodnot potenciálu bylo zajištěno rozpuštění případných nečistot z povrchu elektrody. Tento postup vedl k reprodukovatelné odezvě BDDE při vlastních analýzách. Vzhledem k ukončení předúpravy při kladné hodnotě potenciálu probíhalo měření na kyslíkem terminovaném povrchu elektrody (O-BDD).

Parametry kalibračních křivek s příslušnými intervaly spolehlivosti byly vypočteny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Mez stanovitelnosti (LOQ), respektive mez detekce (LOD) byla

vypočtena jako desetinásobek, resp. trojnásobek směrodatné odchylky úseku dělený směrnici příslušné lineární závislosti [117].

Oxidační produkty analytů byly generovány po dobu 24 hodin elektrolýzou na velkoplošné elektrodě při konstantní hodnotě potenciálu +2100 mV v prostředí základního elektrolytu v němž jsou dané látky analyzovány. Pomocí LC-MS chromatografie bylo následně analyzováno 0,5 ml reakční směsi před a po elektrooxidaci.

2.3.2 Nezávislá HPLC/DAD reálných vzorků PBZ, MFZ, FPX a MCZ.

Injekční objem pro HPLC analýzu byl 20 μ l, průtok mobilní fáze byl 1 ml min^{-1} a vlnová délka DAD detektoru byla nastavena na 220 nm. Za těchto podmínek analýza trvala 5 min. Ke stanovení koncentrace analytů byla použita vždy metoda kalibrační křivky. Analýzy byly pětkrát opakovány a byly vypočteny příslušné statistické parametry.

V případě PBZ přípravek Toprex byl analyzován po zředění ACN na koncentraci PBZ asi 0,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (vypočteno z obsahu deklarovaného výrobcem).

2.3.3. Teoretické výpočty

Gibbsovy energie klíčových intermediátů spolu s rozložením HOMO orbitalů byly získány pomocí DFT metody B3LYP/6-31+G(d,p) implementované v programu Gaussian 16 rev. A.03 [118, 119].

2.3.4. Příprava standardů a izolační postupy

N,N'-dimethylacetohydrazid byl připraven podle postupu uvedeného v práci [120]. ^1H spektra nukleární magnetické resonance (NMR) byla v souladu s literaturou [120].

Standardní látky MFZ, FPX a MCZ byly izolovány z komerčních přípravků Revysolu, Sercadisu a Caramby. Do Erlenmayerové baňky bylo odměřeno 10 ml přípravku a 100 ml chloroformu. Vzniklá heterogenní směs byla 24 hodin míchána. Poté byla směs přefiltrována přes vrstvu křemeliny. Následně byl filtrát odpařen. Odparek byl podroben preparativní chromatografii použitím mobilní fáze o složení hexan/ethyl–acetát (5 % až 40 % ethyl–acetátu). V případě Sercadisu byl po odpaření získán FPX, jako bílá krystalická látka. Na rozdíl od toho, v případě Revysolu a Caramby byla po odpaření získána směs MFZ, resp. MCZ a uhlovodíků C10-C13 ve formě bílé voskovité látky. Pro odstranění zbytkových uhlovodíků byl surový MFZ a MCZ promyt hexanem na fritě a následně vysušen. Standardy MFZ, FPX, resp. MCZ byly získány jako bílé krystalické látky, které vykazovaly čistotu >99 % dle GC-MS analýzy.

Čistota a identita látek byla nezávisle ověřena pomocí NMR. Získaná spektroskopická data byla ve shodě s literaturou [121–123].

2.3.5. Eliminace vlivu UDMH na stanovení DMZ

Pokud je ve vzorku přítomna směs DMZ a UDMH, a navíc je přítomný UDMH ve znatelném přebytku, lze jej eliminovat varem v prostředí $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH po dobu několika minut.

2.3.6. Postup zakoncentrování DMZ a PBZ

Pro stanovení DMZ v přírodních vodách byla použita koncentrační technika spočívající v izolaci analytu pomocí silně kyselého katexu Amberlite® IRC120 H v H^+ cyklu. Voda byla nejdříve zbavena přítomných kationtů přidávkem EDTA za míchání po dobu 10 min. Následně byl DMZ adsorbován $1,0 \text{ g}$ katexu po dobu 1 h za míchání při 700 ot/min při laboratorní teplotě. Poté byl ionex separován a extrahován 5 ml $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH při $70 \text{ }^\circ\text{C}$ za míchání při 500 ot/min po dobu 20 min. Vhodný objem extraktu byl přenesen do voltametrické nádoby, doplněn základním elektrolytem a podroben voltametrické analýze. Stejný postup lze použít i v případě koncentrace DMZ ze vzorku získaného opláchnutím ovoce.

V případě PBZ z říční vody byl analyt izolován z objemu 250 ml pomocí $0,1 \text{ g}$ katexu Amberlite® IRC120 H v H^+ cyklu. Záchyt probíhal při laboratorní teplotě po dobu 3 hodin za míchání při 700 ot/min . Poté byl ionex separován a následně extrahován směsí $0,5 \text{ ml}$ NaOH o koncentraci 1 mol L^{-1} a 1 ml ACN po dobu 5 min za varu pod zpětným chladičem a míchání při 500 ot/min . Výsledný roztok byl podroben voltametrické analýze.

3 Výsledky a diskuse

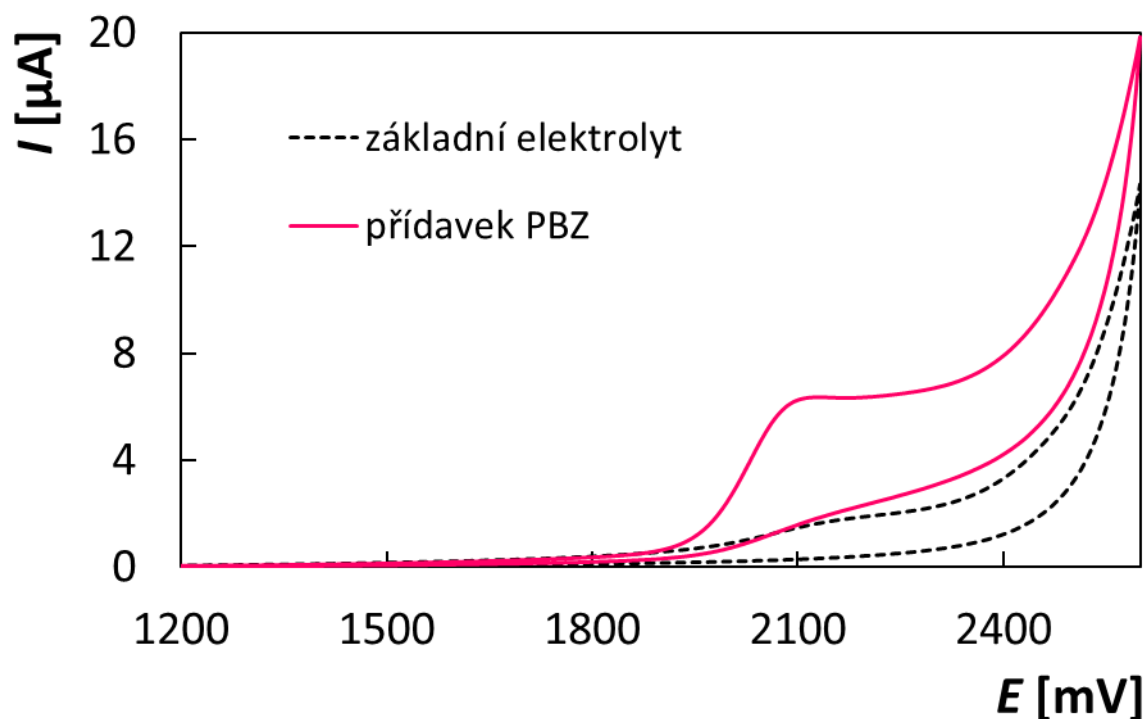
3.1 Voltametrické stanovení regulátoru růstu rostlin PBZ

Nezbytné podmínky, jako volba základního elektrolytu, pH a optimalizované parametry elektrochemického analyzátoru pro voltametrické stanovení PBZ byly nalezeny v rámci diplomové práce [8]. Metoda zde byla úspěšně testována na modelových vzorcích, a nakonec aplikována na reálný vzorek přípravku Toprex.

V této disertační práci byly získány další poznatky týkající se dané problematiky, jako je studie rychlosti polarizace, řešení reakčního mechanismu, interferenční studie, porovnání výsledků PBZ nezávislou metodou HPLC/DAD apod.

3.1.1 Voltametrické chování PBZ

Za účelem zkoumání voltametrického chování PBZ byly na BDDE naměřeny cyklické voltamogramy v prostředí základního elektrolytu, obsahujícího $0,07 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH s 33 % ACN, v rozsahu potenciálů od -200 až $+2600 \text{ mV}$ a při $\nu = 40 \text{ mV s}^{-1}$, viz obrázek 4. Z uvedeného záznamu je vidět, že studovaná látka podléhá anodické oxidaci s maximem píku při $+2090 \text{ mV}$. Podle tvaru zpětné křivky lze soudit, že elektrochemická reakce PBZ je ireversibilní.



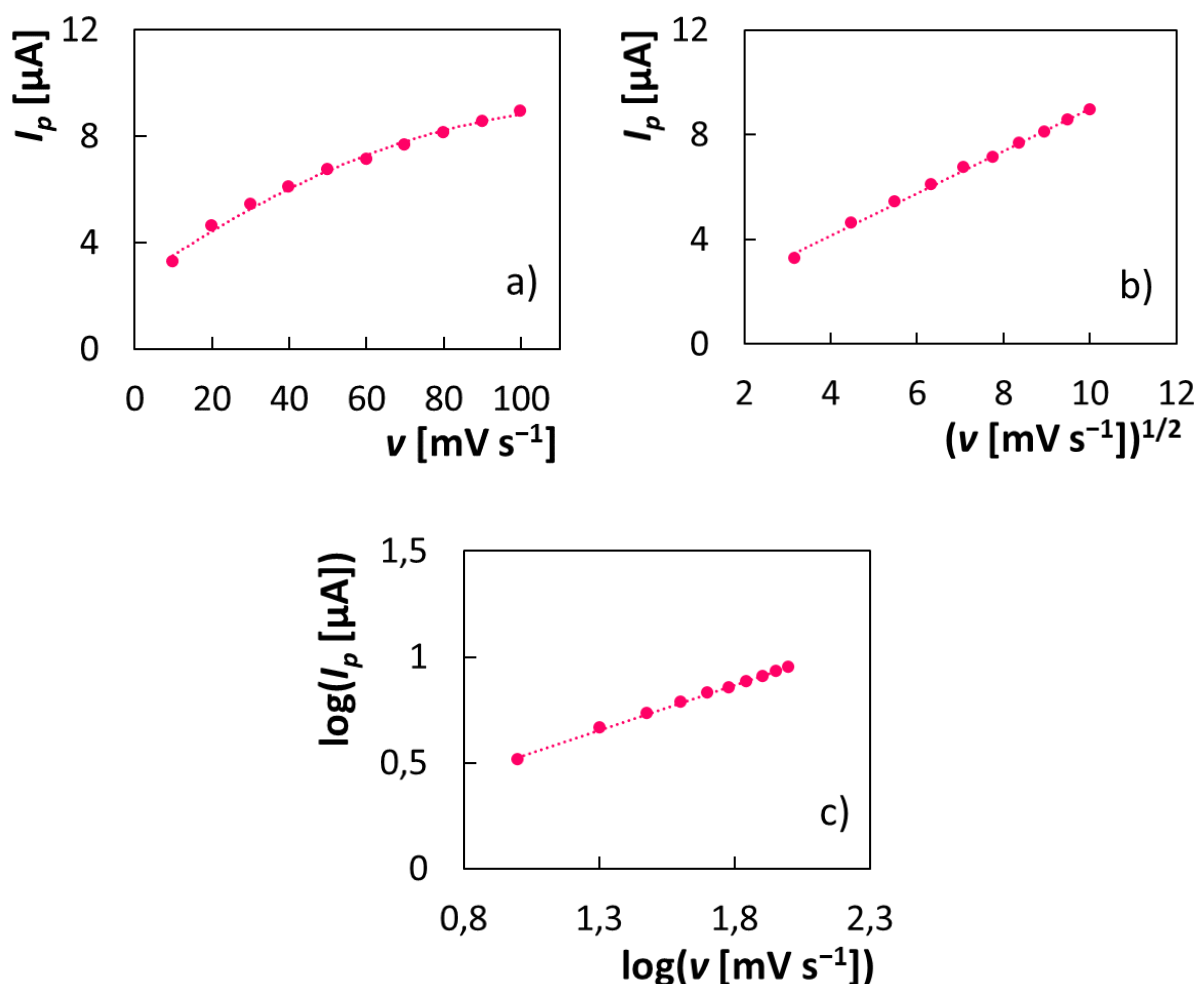
Obrázek 4: Cyklický voltamogram základního elektrolytu a PBZ

(základní elektrolyt – $0,07 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH s 33 % ACN, $c_{\text{PBZ}} = 98,8 \text{ µmol L}^{-1}$, $E_{\text{in}} = E_{\text{fin}} = 0 \text{ mV}$, $E_{\text{lower vertex}} = -200 \text{ mV}$, $E_{\text{upper vertex}} = +2600 \text{ mV}$, $\nu = 40 \text{ mV s}^{-1}$)

3.1.2 Studie závislosti proudové odezvy PBZ na rychlosti polarizace

Za účelem zjištění řídicího procesu elektrodové reakce PBZ, byla s využitím CV provedena studie závislosti proudové odezvy I_p na rychlosti polarizace ν v rozsahu od 10 do 100 mV s^{-1} . Z obrázku 5a je zřejmé, že závislost I_p na ν není lineární, což svědčí o tom, že řídicím procesem není adsorpce. Naopak závislost I_p na $\nu^{1/2}$ uvedená na obrázku 5b je lineární, což odpovídá elektrochemickému procesu řízenému difuzí. Pro potvrzení nebo vyvrácení tohoto závěru byla vynesena také závislost $\log(I_p)$ na $\log(\nu)$, která je znázorněna na obrázku 5c a popsána rovnicí 1. Podle hodnoty směrnice ($0,4274 \pm 0,0070$) lze usoudit, že se jedná o difúzně řízený elektrodový proces s vlivem kinetiky.

$$\log(I_p [\mu\text{A}]) = (0,4274 \pm 0,0070) \log(\nu [\text{mV s}^{-1}]) + (0,099 \pm 0,012), r = 0,9990 \quad (1)$$



Obrázek 5: Závislosti I_p na ν (a), I_p na $\nu^{1/2}$ (b) a $\log(I_p)$ na $\log(\nu)$ (c) pro PBZ

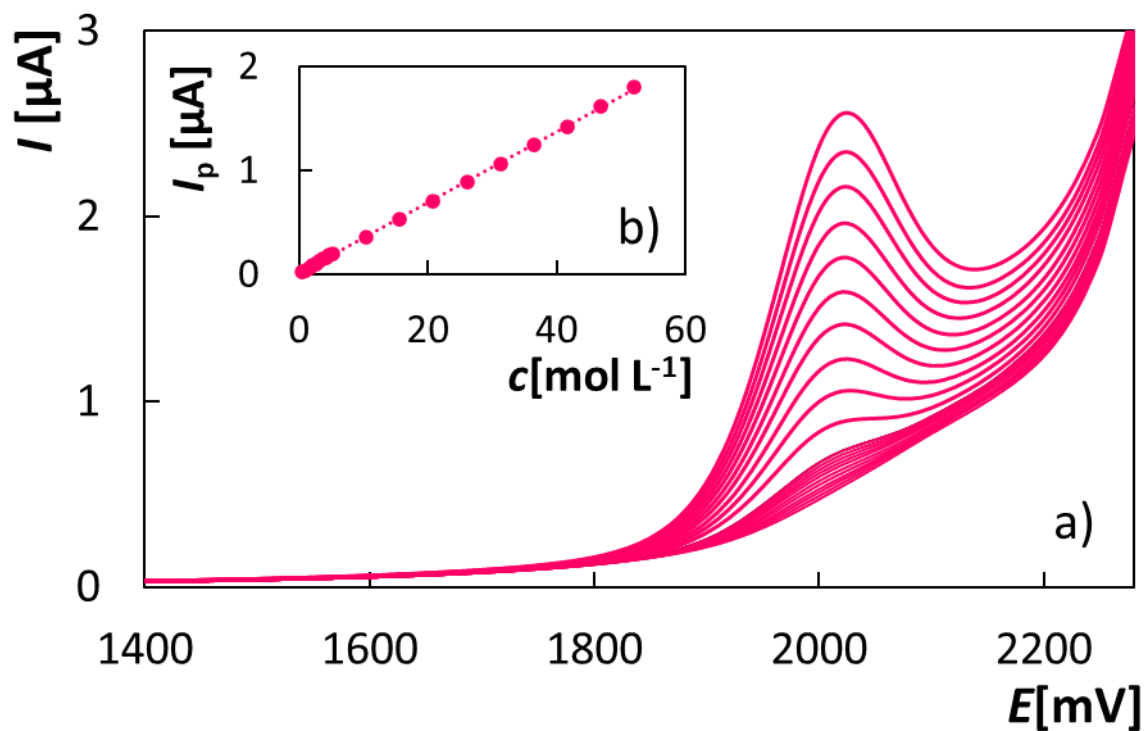
(základní elektrolyt – 0,07 mol L^{-1} NaOH s 33 % ACN, $c_{\text{PBZ}} = 98,8 \mu\text{mol L}^{-1}$, $E_{\text{in}} = E_{\text{fin}} = 0 \text{ mV}$, $E_{\text{lower vertex}} = -200 \text{ mV}$, $E_{\text{upper vertex}} = +2600 \text{ mV}$, $\nu = 10\text{-}100 \text{ mV s}^{-1}$)

3.1.3 Kvantitativní analýza PBZ

Během předchozích studií byl pro stanovení PBZ doporučen vhodný základní elektrolyt (0,07 mol L⁻¹ NaOH s 33 % ACN) a nalezeny optimální parametry DPV ($\nu = 40 \text{ mV s}^{-1}$, $A = +30 \text{ mV}$, $t = 60 \text{ ms}$). Jako pracovní elektroda byla používána BDDE. Nově byly testovány reprodukovatelnost a opakovatelnost proudové odezvy, pro ověření správnosti zvolených parametrů. Reprodukovatelnost měření byla zkoumána tak, že příslušná proudová odezva byla měřena pět po sobě jdoucích dnů a poté byla vypočtena hodnota RSD, která měla hodnotu 2,72 %. Opakovatelnost proudové odezvy byla zjištěna z hodnot I_p deseti opakovaných měření anodických křivek PBZ. Získaná hodnota RSD pak byla 0,75 %. Na základě uvedených hodnot RSD lze konstatovat, že navržená metoda poskytuje velmi dobře opakovatelnou a reprodukovatelnou odezvu při oxidaci analytu. Za navržených podmínek byla naměřena kalibrační závislost PBZ v koncentračním rozmezí od 0,521 do 52,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, uvedená na obrázku 6. Z obrázku je vidět, že I_p lineárně odráží koncentraci v celém testovaném rozsahu, což potvrzuje rovnice 2. Pro koncentrační rozsah od 0,521 do 5,21 $\mu\text{mol L}^{-1}$ byly vypočteny hodnoty LOD = 0,083 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a LOQ = 0,277 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

$$I_p [\mu\text{A}] = (0,03399 \pm 0,00014) (c [\mu\text{mol L}^{-1}]) + (0,0071 \pm 0,0034), r = 0,9999 \quad (2)$$

Spolehlivost navržené metody byla ověřena opakovanými analýzami modelových roztoků se známou koncentrací PBZ, a to 0,75, 1,91 a 7,59 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Pro každou koncentrační hladinu bylo stanovení opakováno pětkrát a výsledky jsou uvedeny v tabulce 1. Na základě těchto hodnot lze konstatovat, že vyvinutá voltametrická metoda poskytuje správné, spolehlivé a opakovatelné výsledky pro stanovení PBZ v rozsahu testovaných koncentrací.



Obrázek 6: DP voltamogram koncentrační závislosti PBZ (a) a závislost I_p na c_{PBZ} (b)

(základní elektrolyt – $0,07 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH s 33 % ACN, $c_{\text{PBZ}} = 0,521 - 52,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, $E_{\text{in}} = +1200 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = +2300 \text{ mV}$, $A = +30 \text{ mV}$, $t = 60 \text{ ms}$, $\nu = 40 \text{ mV s}^{-1}$)

Tabulka 1: Výsledky opakovatelných stanovení PBZ v modelových roztocích

Analyt	Přidáno [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	Stanoveno [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	Výtěžnost [%]	RSD ($n = 5$) [%]
PBZ	7,59	$7,46 \pm 0,23$	92,8-104,0	4,62
	1,91	$1,86 \pm 0,05$	92,9-103,6	4,41
	0,75	$0,72 \pm 0,03$	90,9-104,5	6,15

3.1.4 Mechanismus elektrochemické oxidace PBZ

Dále práce byla zaměřena na analýzu produktu elektrochemické oxidace PBZ a objasnění mechanismu reakce. Reakční směs byla analyzována před a po oxidaci pomocí LC-MS s využitím elektrospreje (ESI) nebo chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Zatímco ESI ukázala pouze ionty s hmotností 294 ($M + H^+$) odpovídající protonovanému PBZ, APCI poskytla více informací. Analýza reakční směsi po oxidaci ukázala v pozitivním módu výskyt slabě zastoupených iontů s m/z 310, 326 a 367 (všechny jsou ionty $M + H^+$). Hmotnost 310 odpovídá formální adici jednoho atomu kyslíku na molekulu a hmotnost 326 adici dvou atomů kyslíku. V zásadě existují tři polohy pro možnou oxidaci (schéma 9a): benzylový uhlík (a); uhlík nesoucí triazolový kruh (b) a alkoholový uhlík (c). Lze tedy zapsat tři isomerní struktury odpovídající hmotnosti m/z 310 (resp. 309). Bohužel se vzhledem k nízké intenzitě iontů nepodařilo určit, který izomer nebo izomery vznikají. Pro lepší pochopení a případné určení místa reaktivity byly provedeny DFT výpočty. S největší pravděpodobností lze očekávat, že na rozdíl od difenokonazolu (DFK) [124] probíhá reakce na benzylovém atomu uhlíku, který je známý svou zvýšenou reaktivitou [125, 126]. Tuto možnost naznačuje nejen rozložení orbitalů HOMO (schéma 9a), ale zejména srovnání relativních energií radikálů vzniklých odštěpením atomů vodíku v různých polohách (schéma 9b). V tomto případě je nejstabilnější radikál vzniklý odštěpením vodíku v benzylové poloze. Situace je analogická v případě iontů s hmotností 326. Jedná se o dvojnásobně oxidované druhy s možnou strukturou uvedenou na schématu 9c. Přiřazení vzorce a struktury iontu m/z 367 je pouze velmi spekulativní. Rozdíl hmotností 73 lze vysvětlit jako jeden acetonitril a dva atomy kyslíku.

Ve všech případech je intenzita detekovaných signálů nízká ve srovnání se zbytkovým píkem PBZ. To naznačuje, že sledované sloučeniny podléhají následné oxidaci. Nepřítomnost iontů s nižší hmotností naznačuje, že vazba uhlík-triazol je přerušena. To znamená, že vzniklé ionty s nižší hmotností neobsahují protonovatelnou skupinu, která by usnadňovala jejich detekci. Výsledky tedy ukazují, že během oxidace dochází k postupnému rozpadu molekuly, přičemž prvním místem reaktivity je s největší pravděpodobností benzylový uhlík (schéma 10).

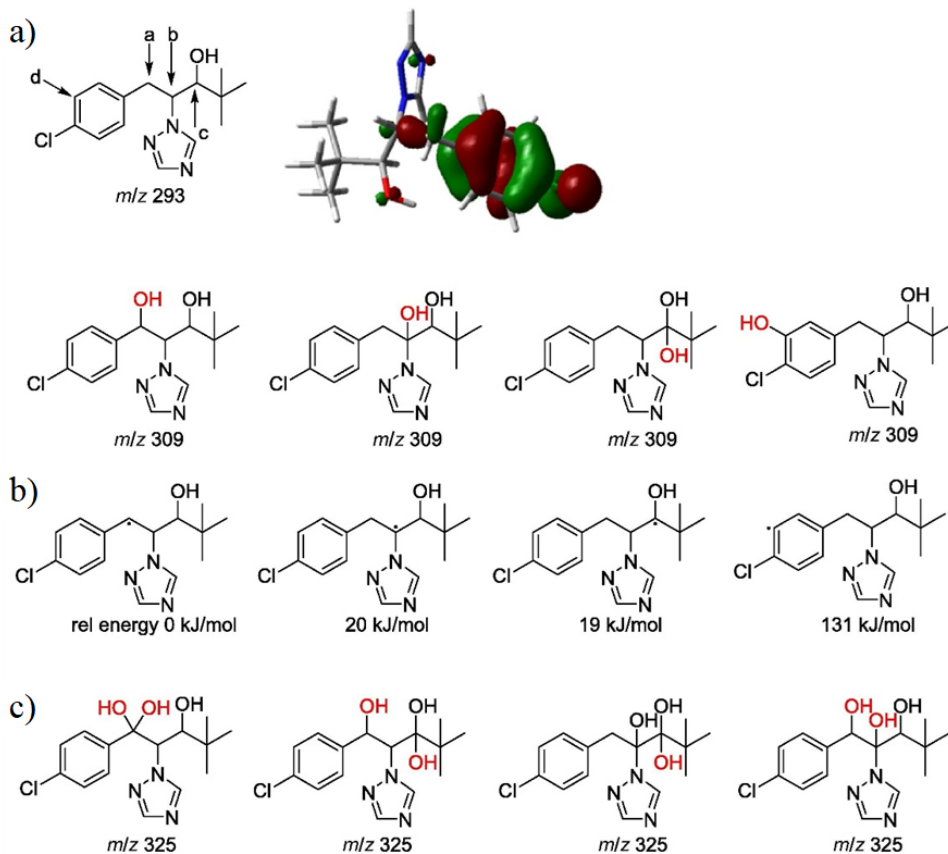


Schéma 9: Možná místa oxidace, oxidační produkty v neutrálních formách (a, c); HOMO orbital PBZ vypočtený pomocí B3LYP/6-31+G (d,p). Relativní hodnoty Gibbsových energií různých radikálů vznikajících z PBZ (b).

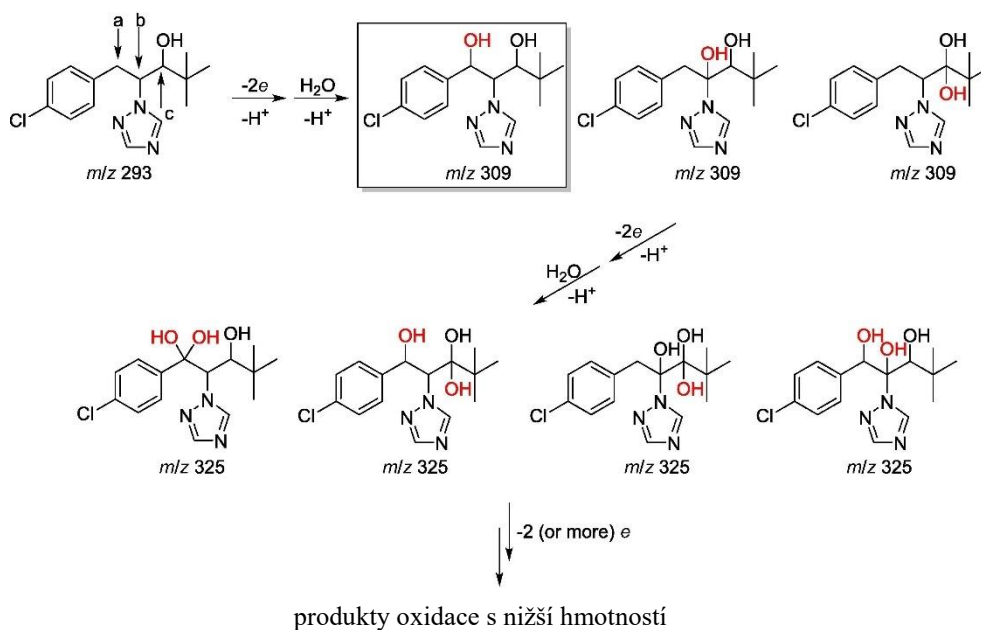


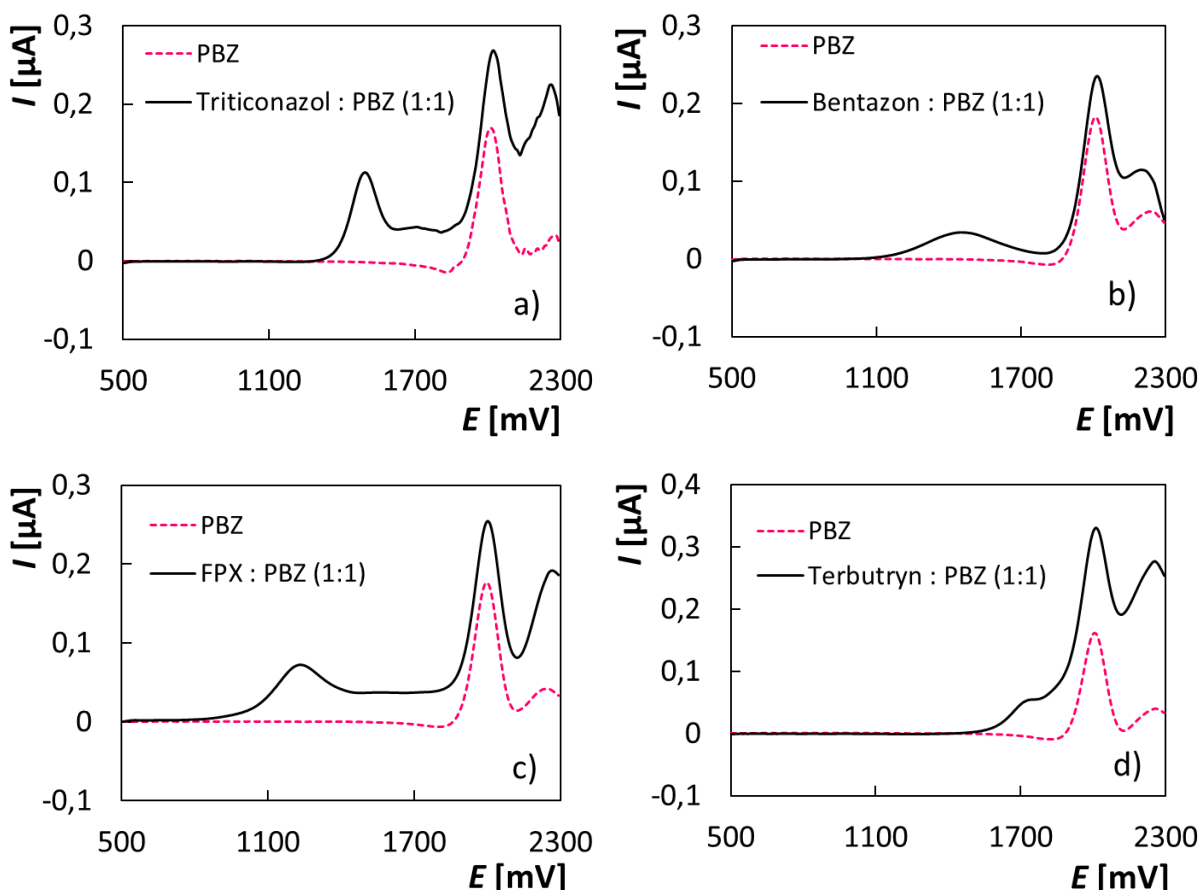
Schéma 10: Zjednodušený možný mechanismus elektrooxidace PBZ

3.1.5 Interferenční studie PBZ

Za účelem rozšíření poznatků o PBZ, byla provedena interferenční studie zaměřená na vliv dalších používaných pesticidních látek, které by se mohly vyskytovat ve stejných vzorcích jako PBZ a rušit jeho stanovení. Vliv interferentů byl studován pro tři koncentrační poměry $c_{inf}:c_{PBZ}$, a to 1:5, 1:1 a 5:1 a byl vyhodnocen jako změna výšky píku PBZ před a po přidavku příslušného interferentu v %. Získané výsledky jsou uvedené v tabulce 2 a vybrané křivky pak znázorňuje obrázek 7. Z nich vyplývá, že pokud se jedná o poměr $c_{inf}:c_{PBZ} = 1:5$, žádný z interferentů nemá na stanovení PBZ vliv. Chyba stanovení nepřesahovala absolutní hodnotu 4,79 %. Některé interferenty, jako tritikonazol (viz obrázek 7a), bentazon (viz obrázek 7b), a klopyralid neovlivňovaly stanovení PBZ ani ve značném přebytku. Tak například, tritikonazol se oxiduje při méně pozitivním potenciálu než PBZ a lze jej stanovovat současně s PBZ (obrázek 7a). Z tabulky je vidět, že picloran, FPX (viz obrázek 7c) a terbutryn (viz obrázek 7d) ovlivňovaly stanovení PBZ již při srovnatelné koncentraci. Při značném nadbytku, a to při $c_{inf}:c_{PBZ} = 5:1$ největší vliv vykazoval terbutryn, jak je vidět z tabulky. Jelikož zatím neexistují přípravky, které obsahují tyto dvě látky, je nepravděpodobné, že by se PBZ ocitl v reálné matici spolu s terbutrynem. Z výše uvedených skutečností lze soudit, že navržená metoda je poměrně selektivní a lze ji použít při analýze reálných vzorků.

Tabulka 2: Výsledky interferenční studie PBZ

Interferent/ $c_{inf}:c_{PBZ}$	Vliv na I_{pPBZ} (%)		
	1:5	1:1	5:1
Glyphosat	+0,54	-2,72	-11,33
Triticonazole	+0,88	+0,69	+1,61
Klopyralid	-1,08	-2,92	-2,92
Bentazon	+3,74	+4,89	+5,94
Azoxystrobin	+4,11	+5,75	+58,28
Picloran	+1,72	+11,23	+52,17
FPX	-4,79	+11,25	-21,94
Terbutryn	+2,21	+14,36	+103,46



Obrázek 7: DP voltamogramy PBZ a triticonazolu (a), bentazonu (b), FPX (c) a terbutrynu (d) v poměru $c_{\text{inf}} : c_{\text{PBZ}} = 1:1$

(základní elektrolyt – $0,07 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ s 33 % ACN, $c_{\text{PBZ}} = c_{\text{inf}} = 7,79 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, $E_{\text{in}} = +500 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = +2300 \text{ mV}$, $A = +30 \text{ mV}$, $t = 60 \text{ ms}$, $\nu = 40 \text{ mV s}^{-1}$)

3.1.6 Analýza reálných vzorků PBZ

Na závěr experimentální práce byla testovaná metoda aplikována na analýzu reálných vzorků. Celkem byly analyzovány dva vzorky, a to komerční pesticidní přípravek Toprex a povrchová voda z Labe s příměsí PBZ. Toprex představuje směsný přípravek k ošetření rostlin, obsahující 125 g L^{-1} PBZ a 250 g L^{-1} DFK. Metoda pro stanovení DFK byla vyvinuta v rámci diplomové práce [8]. Stanovení analyzovaných látek v Toprexu bylo prováděno metodou standardního přídatku a analýza byla vždy pětikrát opakována. Stanovené množství PBZ a DFK odpovídalo deklarovanému obsahu udávanému výrobcem, jak lze vidět z výsledků uvedených v tabulce 3. Nalezené hodnoty byly rovněž potvrzeny nezávislou separační metodou pomocí

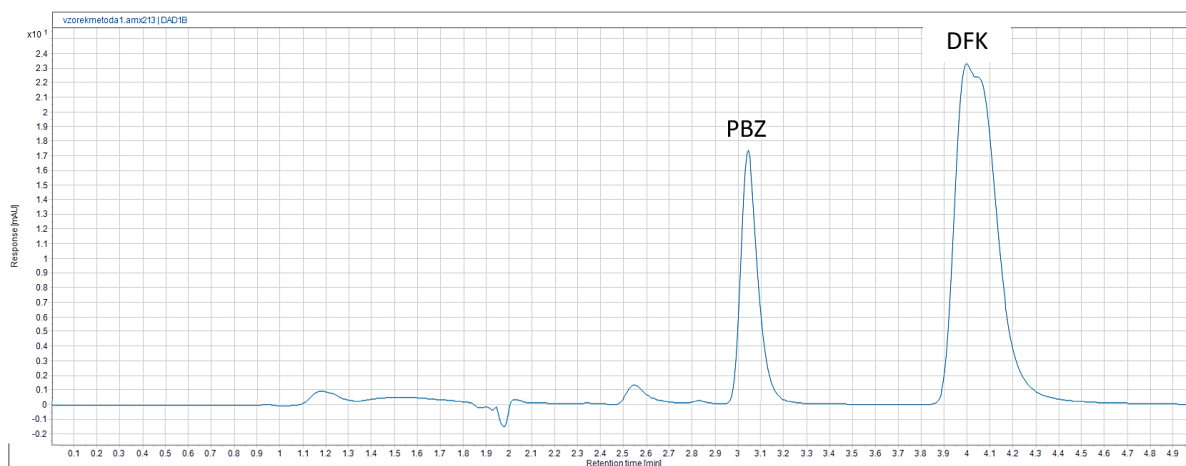
HPLC/DAD. Získaný chromatogram je na obrázku 8 a dokládá, že ve vzorku se žádné další významné organické složky nevyskytují.

Dále byl PBZ stanovován ve dvou vzorcích vody z řeky Labe, které byly obohaceny PBZ na koncentrace $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$. Po zakoncentrování analytu postupem uvedeným v experimentální části (kapitola 2.3.6) byly vzorky opakovaně analyzovány metodou standardního přídávku. Z výsledků uvedených v tabulce 3 lze konstatovat, že navržená metoda spolu s vypracovaným postupem nakoncentrování analytu, poskytuje správné a opakovatelné výsledky v případě stanovení PBZ ve vzorku říční vody. Výtěžnost této metody se pohybovala od 91,7 % do 100,0 %, což je vzhledem k takto nízkým koncentracím a poměrně složitému procesu izolace analytu přijatelné. Velkou výhodou této prekoncentrační techniky je značné zvýšení koncentrace analytu (v tomto konkrétním případě 166×), a tím získání dobře vyhodnotitelné proudové odezvy, vedoucí ke spolehlivým výsledkům.

Tabulka 3: Výsledky analýzy pesticidního přípravku Toprex a říční vody s příměsí PBZ

Toprex	Metoda	Deklarováno [g L ⁻¹]	Stanoveno [g L ⁻¹]	Výtěžnost [%]	RSD (n = 5) [%]
DFK	DPV	250	247,1±8,7	95,5-104,9*	5,3
	HPLC/DAD		250,2±5,6	96,7-103,7*	3,3
PBZ	DPV	125	123,9±5,8	94,4-106,2*	6,3
	HPLC/DAD		127,6±3,7	97,8-106,7*	3,0
Říční voda s přídavkem	Metoda	Přidáno [μmol L ⁻¹]	Stanoveno [μmol L ⁻¹]	Výtěžnost [%]	RSD (n = 5) [%]
PBZ	DPV	20,0	19,40±0,45	93,2-100,0**	3,5
		0,40	0,38±0,01	91,7-98,7**	4,3

* Vztahuje se k deklarované hodnotě. ** Vztahuje se k přidané hodnotě.



Obrázek 8: Chromatogram separace PBZ a DFK v komerčním přípravku Toprex

(kolona C18 (250 × 4 mm, velikost částic 5 μm), $T = 25\text{ °C}$, mobilní fáze - acetonitril/H₂O (90/10, v/v), injekční objem - 20 μl, průtok = 1 ml min⁻¹, vlnová délka detektoru DAD = 220 nm, $t_m(\text{PBZ}) = 3,05\text{ min}$, $t_m(\text{DFK}) = 4,01\text{ min}$)

3.2 Vývoj metody voltametrického stanovení regulátoru růstu rostlin DMZ a jeho rozkladného produktu UDMH

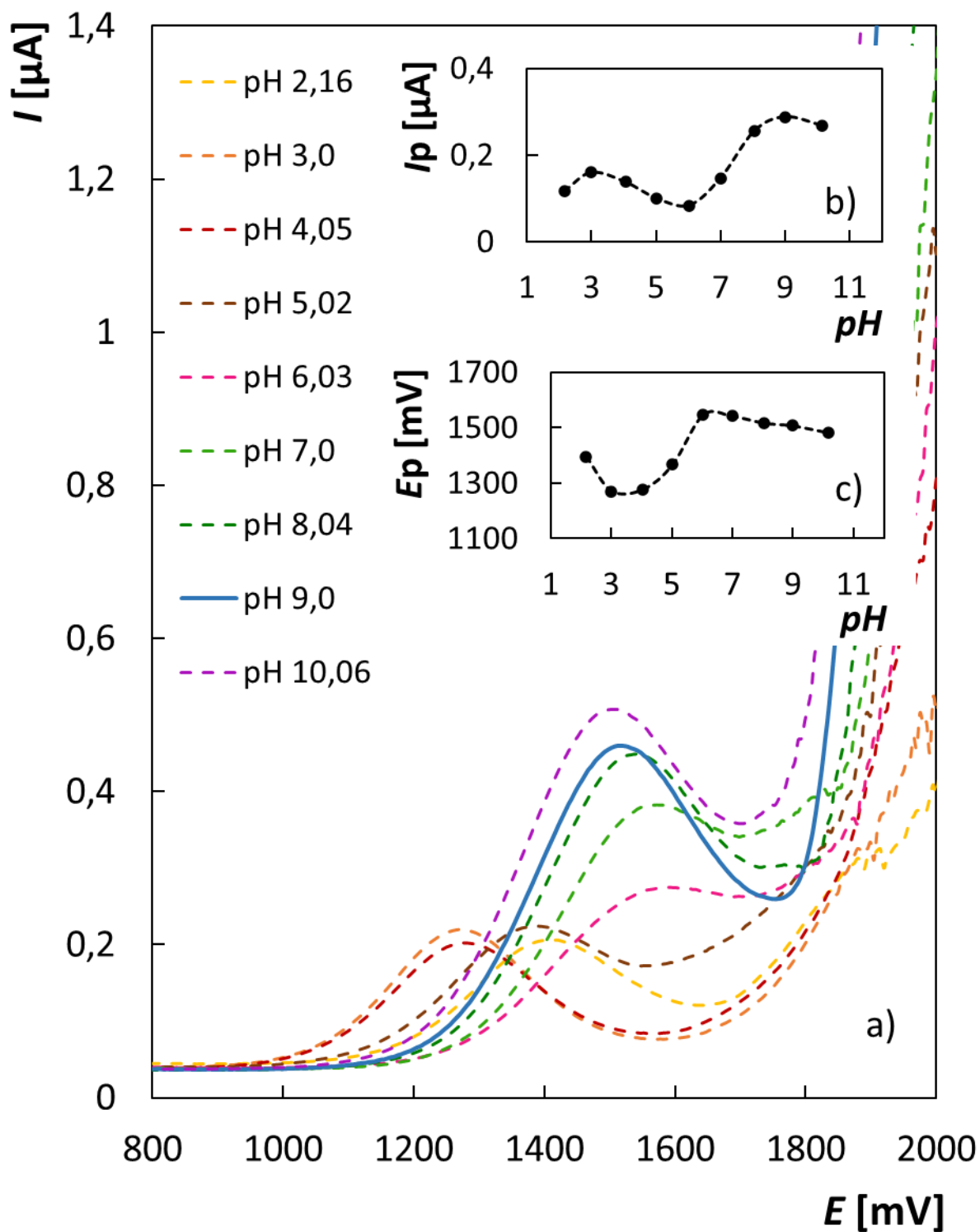
3.2.1 Volba vhodného pH základního elektrolytu

Jelikož hodnota pH základního elektrolytu je hlavním parametrem, ovlivňujícím průběh reakcí na povrchu elektrody a následně elektrochemickou proudovou odezvou, je velice důležité zvolit takové pH, které by nejvíce vyhovovalo stanovení konkrétní látky.

Studie pH probíhala s využitím metody DPV a BDDE, jako pracovní elektrody. Pro DMZ bylo pH testováno v rozmezí od 2,16 do 10,06. Příslušné hodnoty byly nastavovány pomocí BR pufru. Během této studie bylo zjištěno, že DMZ poskytuje dva anodické píky v celém testovaném rozsahu pH. Druhý pík se nacházel při hodně pozitivních potenciálech (+1800 až +2100 mV) a jeho tvar závisel na hodnotě pH. Zřetelný byl pouze v alkalickém prostředí. Proto pro analytické účely byl vybrán první pík DMZ a další pozornost byla zaměřena na to, jak pH ovlivňuje tvar a polohu tohoto píku. Jak uvádí obrázek 9a, pozorovaný pík je zřetelný a dobře vyhodnotitelný v celém rozsahu testovaného pH, navíc byl méně ovlivňován rozkladem základního elektrolytu. Se závislosti I_p na pH uvedené na obrázku 9b lze konstatovat, že největší citlivosti odezvy je dosahováno při pH 9. Nejnižší citlivost odezvy byla pak pozorovaná při pH 6.

Z obrázku 9c je patrné, že poloha prvního píku výrazně závisí na hodnotě pH. Tak například v kyselém prostředí, zejména při pH 3,0 se maximum píku nachází při potenciálu +1270 mV. Se zvyšujícím se pH se poloha píku posouvá ke kladnějším hodnotám, zejména při pH 9 leží maximum při +1507 mV.

Jelikož v alkalickém prostředí byla pozorovaná nejvyšší citlivost odezvy a také první pík DMZ měl nejvíce vyhovující tvar z hlediska vyhodnotitelnosti, byla pro voltametrickou analýzu DMZ zvolena hodnota pH 9 a BR pufr jako základní elektrolyt. Jako pracovní elektroda pro analýzu DMZ byla vybrána BDDE, díky své stabilní odezvě a širokému potenciálovému oknu.

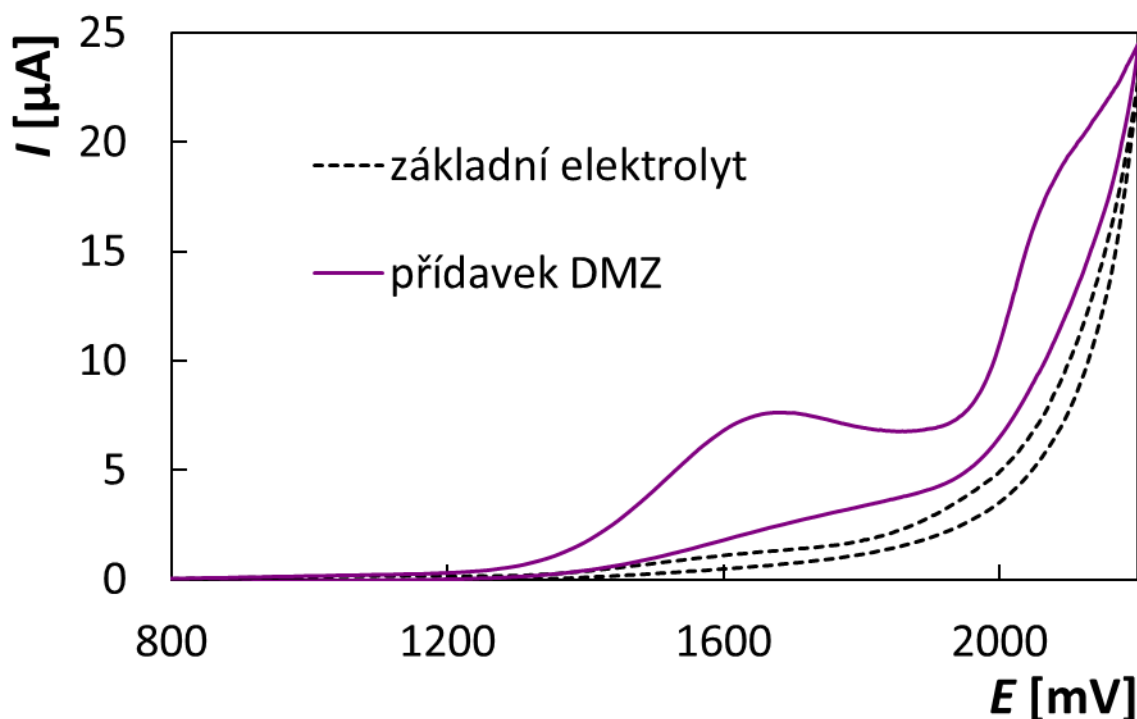


Obrázek 9: Anodické křivky oxidace DMZ v závislosti na pH základního elektrolytu (a), závislost I_p na pH (b) a závislost E_p na pH (c)

(základní elektrolyt – BR pufr (pH 2,16–10,06), $c_{\text{DMZ}} = 72,59 \mu\text{mol L}^{-1}$, $E_{\text{in}} = +500 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = +2200 \text{ mV}$, $\nu = 40 \text{ mV s}^{-1}$, $A = +50 \text{ mV}$, $t = 80 \text{ ms}$)

3.2.2 Voltametrické chování DMZ

Dalším krokem ve vývoji metody pro stanovení DMZ bylo zkoumání jeho voltametrického chování pomocí CV. S ohledem na strukturu DMZ, bylo předpokládáno, že bude podléhat anodické oxidaci, což se potvrdilo během studie pH. Pro lepší pochopení podstaty probíhajících dějů byly pro DMZ v prostředí BR pufru s pH 9 naměřeny křivky znázorněné na obrázku 10. Z cyklického voltamogramu je patrné, že DMZ poskytuje dva anodické oxidační píky, a to při potenciálech +1680 mV a +2080 mV. Vzhledem ke tvaru zpětné křivky lze konstatovat, že pro DMZ se jedná o ireversibilní děj.



Obrázek 10: Cyklický voltamogram základního elektrolytu a DMZ

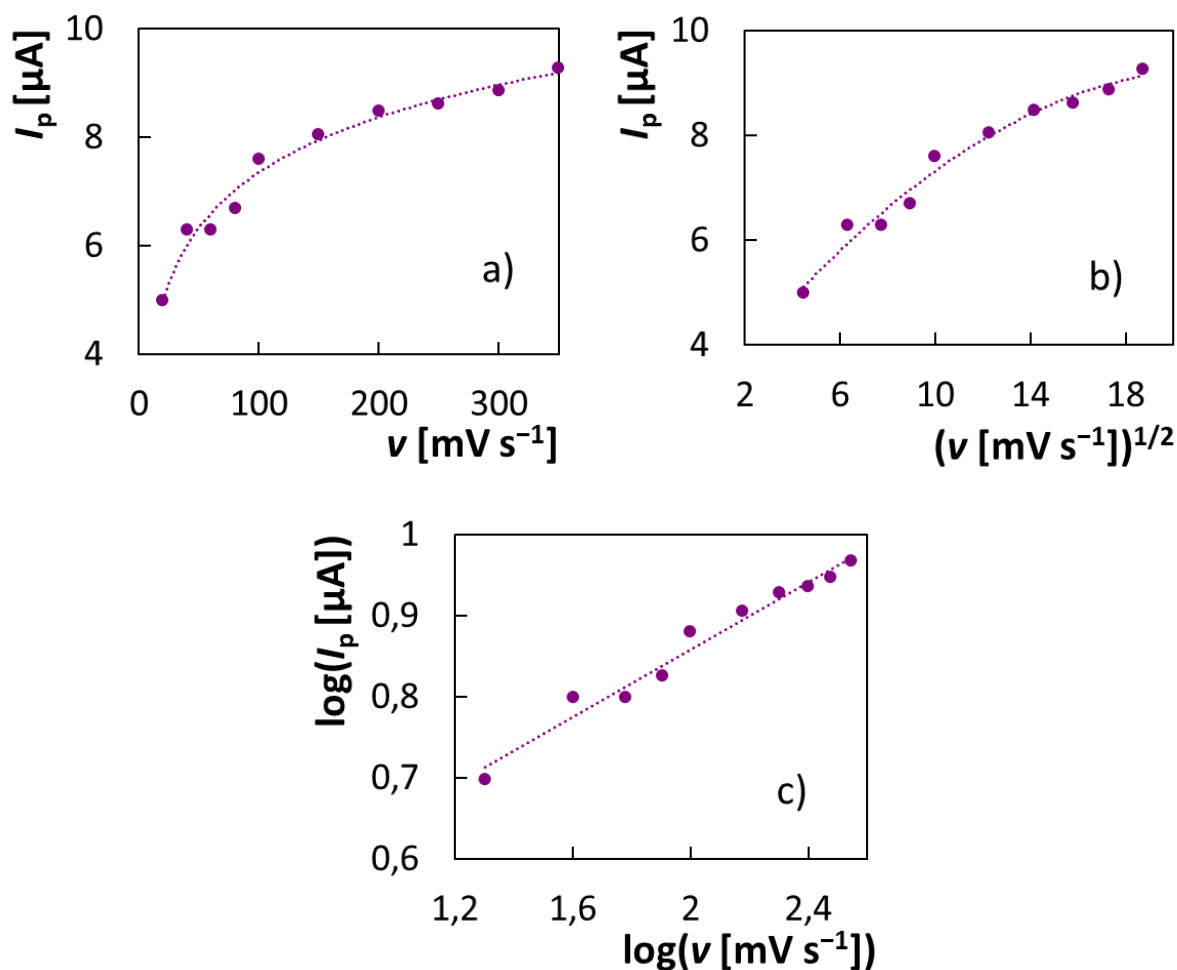
(základní elektrolyt – BR pufr (pH 9), $c_{\text{DMZ}} = 0,267 \text{ mmol L}^{-1}$, $E_{\text{in}} = E_{\text{fin}} = +600 \text{ mV}$, $E_{\text{lower vertex}} = +500 \text{ mV}$, $E_{\text{upper vertex}} = +2200 \text{ mV}$, $\nu = 40 \text{ mV s}^{-1}$)

3.2.3 Studie závislosti proudové odezvy DMZ na rychlosti polarizace

Studium proudové odezvy oxidačního píku (I_p) v závislosti na rychlosti polarizace (ν) je důležitým krokem při zkoumání elektrochemické reakce, zejména pro stanovení jejího řídicího procesu. Pro DMZ byla tato závislost měřena v rozsahu ν od 20 do 350 mV s^{-1} s využitím metody CV. Naměřené cyklické voltamogramy byly vyhodnoceny a získané hodnoty I_p byly vyneseny do grafu v závislosti na ν , $\nu^{1/2}$ a $\log(I_p)$ na $\log(\nu)$, jež uvádí obrázek 11. Z obrázku 11a je zřejmé, že se I_p v závislosti na ν zvyšuje nelineárně, což svědčí o

tom, že řídicím procesem není adsorpce. Jelikož závislost I_p na $v^{1/2}$ rovněž není lineární (obrázek 11b), řídicím procesem není ani difúze. Vzhledem k těmto skutečnostem byla vynesena další závislost $\log(I_p)$ na $\log(v)$, popsaná rovnicí 3, která se ukázala být lineární, jak je vidět z obrázku 11c. Z hodnoty směrnice ($0,208 \pm 0,013$) této závislosti lze usoudit, že na průběh elektrodové reakce DMZ má významný vliv kinetika.

$$\log(I_p [\mu\text{A}]) = (0,208 \pm 0,013) \log(v [\text{mV s}^{-1}]) + (0,442 \pm 0,026), r = 0,9855 \quad (3)$$



Obrázek 11: Závislosti I_p na v (a), I_p na $v^{1/2}$ (b) a $\log(I_p)$ na $\log(v)$ (c) pro DMZ

(základní elektrolyt – BR pufr (pH 9), $c_{\text{DMZ}} = 0,267 \text{ mmol L}^{-1}$, $E_{\text{in}} = E_{\text{fin}} = +600 \text{ mV}$, $E_{\text{lower vertex}} = +500 \text{ mV}$, $E_{\text{upper vertex}} = +2200 \text{ mV}$, $v = 20\text{-}350 \text{ mV s}^{-1}$)

3.2.4 Mechanismus reakce DMZ

Vzhledem k hodnotě pH prostředí při analýze (~ 9) lze očekávat, že DMZ **1** je přítomný ve formě soli **1a** (schéma 11). Molekula tedy obsahuje dvě vzájemně oddělené funkční skupiny vhodné pro elektrochemickou oxidaci. První z nich je karboxylátová skupina. Ta, jak známo, podléhá Kolbeho oxidační dekarboxylaci za vzniku alkylových radikálů, které dále dimerizují na stabilní produkty. V případě DMZ **1** to bude konkrétně N^1, N^1, N^6, N^6 -tetramethyladipohydrazid **2** (schéma 11). Kolbeho reakce obvykle probíhá při potenciálech vyšších než +2000 mV [127]. Druhou je N,N -dimethylhydrazidová skupina. Nonaka a spol. ukázali, že N -acyl- N', N' -dimethylhydraziny podléhají oxidaci na atomu dusíku na radikál-kation **4**, který v acetonitrilu dimerizuje na 1,1,4,4-tetramethyl-2,3-diacyltetraazany [128]. V případě DMZ **1** to bude konkrétně 4,40-(1,1,4,4-tetramethyltetraazan-2,3-diyl)bis(4-oxobutanoát) **3** (schéma 11). K této oxidaci dochází při méně kladných potenciálech. Nelze však vyloučit, že z radikálového kationtu **4** vznikají další reakční produkty, neboť je známo, že radikály odvozené od hydrazinů jsou velmi reaktivní [129].

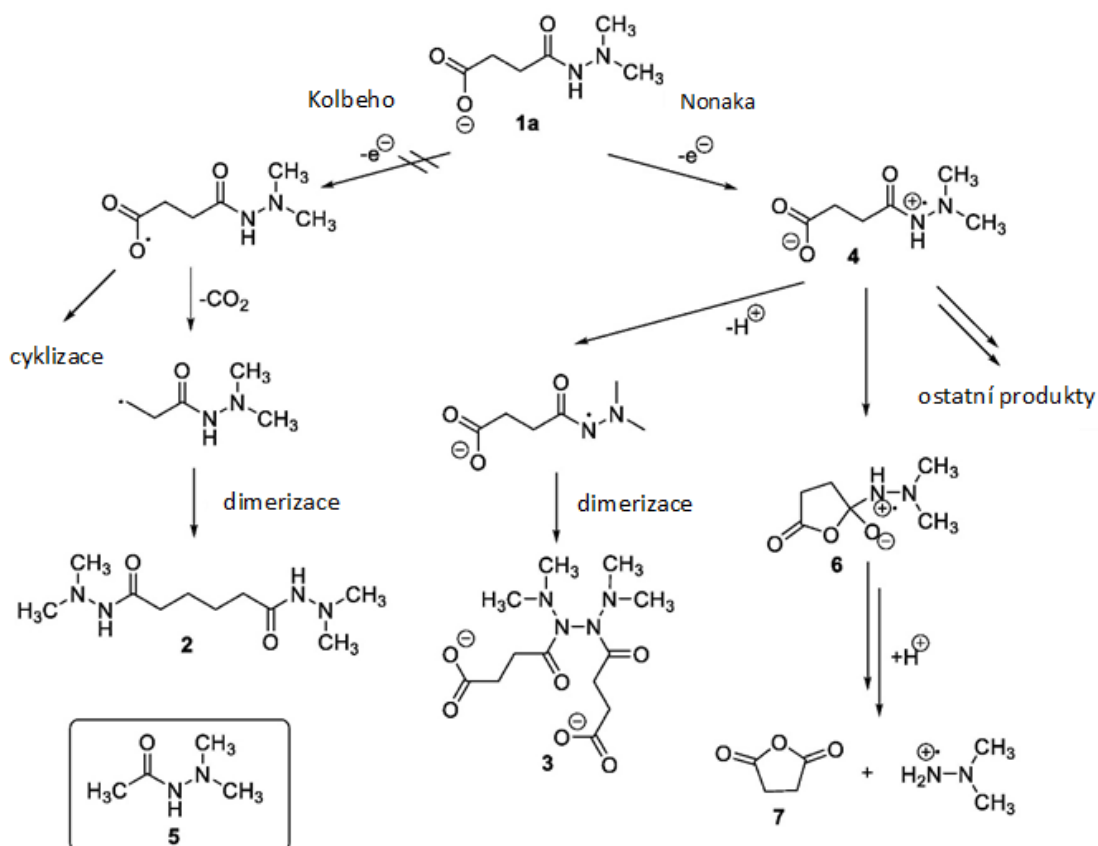
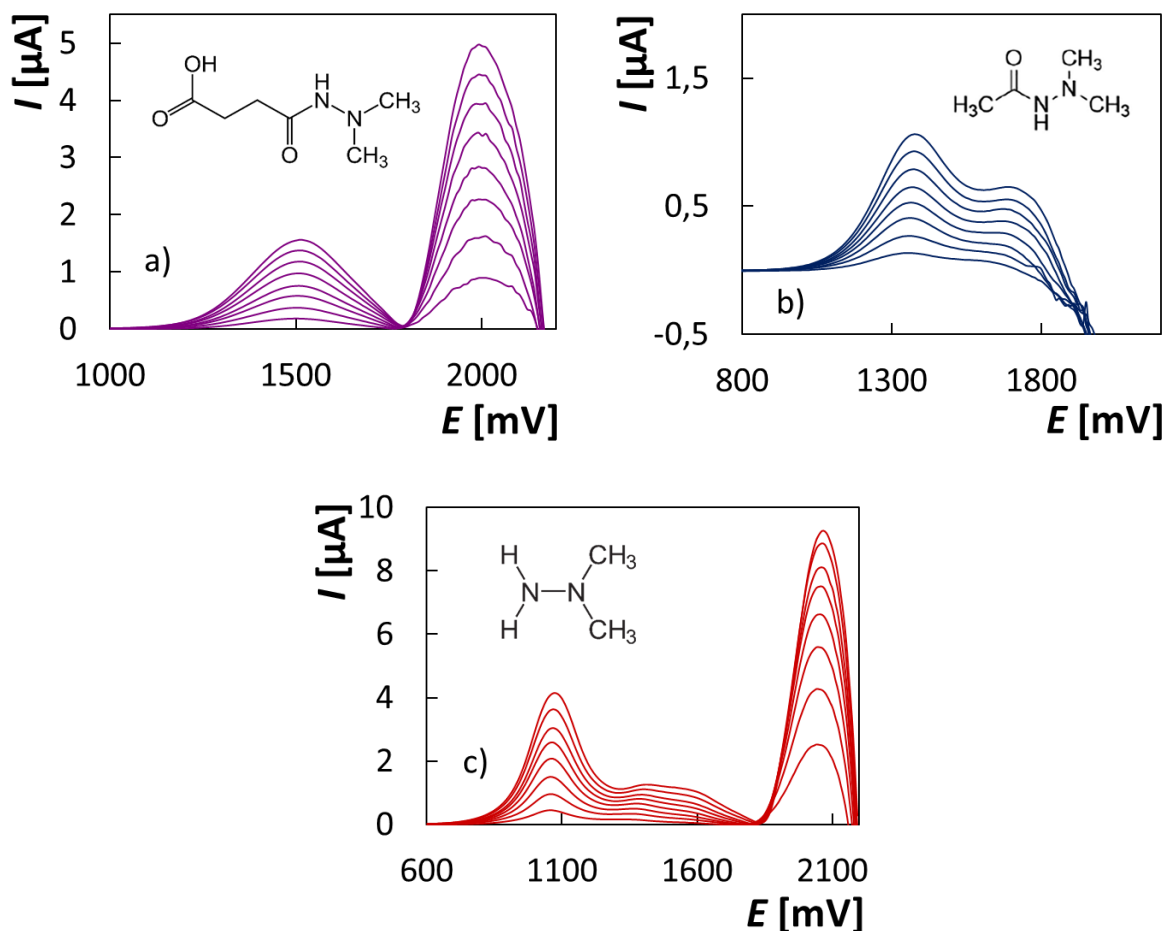


Schéma 11: Možné reakční cesty pro anodickou oxidaci DMZ

Aby se tyto dvě cesty odlišily, byl jako modelový substrát syntetizován *N,N'*-dimethylacetohydrazid **5** (schéma 11) a bylo zkoumáno jeho elektrochemické chování za identických podmínek jako u DMZ.

Tato sloučenina obsahuje pouze *N,N*-dimethylhydrazidovou skupinu, a proto se může probíhat pouze o oxidaci na atomu dusíku.

Dále byl za stejných podmínek oxidován čistý UDMH. Srovnání získaných DP voltamogramů je znázorněno na obrázku 12. Pro rozlišení obou navrhovaných cest je nejdůležitější poloha prvního oxidačního píku. Z obrázku 12 jasně vyplývá, že jeho poloha je velmi blízká u DMZ (+1500 mV) a *N,N'*-dimethylacetohydrazidu **5** (+1400 mV). Tyto hodnoty jsou na vyšších potenciálech ve srovnání s prostým UDMH (+1100 mV), což je v souladu s prací Nonaky. K první oxidaci tedy dochází na atomu dusíku a v prvním kroku vzniká radikál-kationt **4**. Jednoelektronová povaha tohoto prvního děje byla potvrzena potenciálově řízenou exhaustivní elektrolýzou. Pro DMZ elektrolyzovaný 140 min při potenciálu +1700 mV oproti ref. byla zjištěna spotřeba $1e^-$. Dále porovnání následujících částí voltamogramů DMZ a *N,N'*-dimethylacetohydrazidu **5** vykazuje odlišné vlastnosti. Lze tedy očekávat, že se na následných procesech podílí karboxylátová skupina. Jedním z možných vysvětlení je intramolekulární hydrolýza radikál-kationtu **4** probíhající přes pětičlenný meziprodukt **6** za vzniku jantarového anhydridu **7** a *N,N*-dimethylhydrazinového radikál-kationtu. Uvolnění *N,N*-dimethylhydrazinového radikál-kationtu by mohlo vysvětlovat druhý oxidační pík při 2,0 V, který se zdá být identický v případě DMZ a UDMH (obrázek 12a, c). Protože se v analytických experimentech používá pouze první oxidační pík odpovídající jednoelektronové oxidaci DMZ na radikál-kationt **4**, nebyla podrobně zkoumána povaha dalších vznikajících produktů.

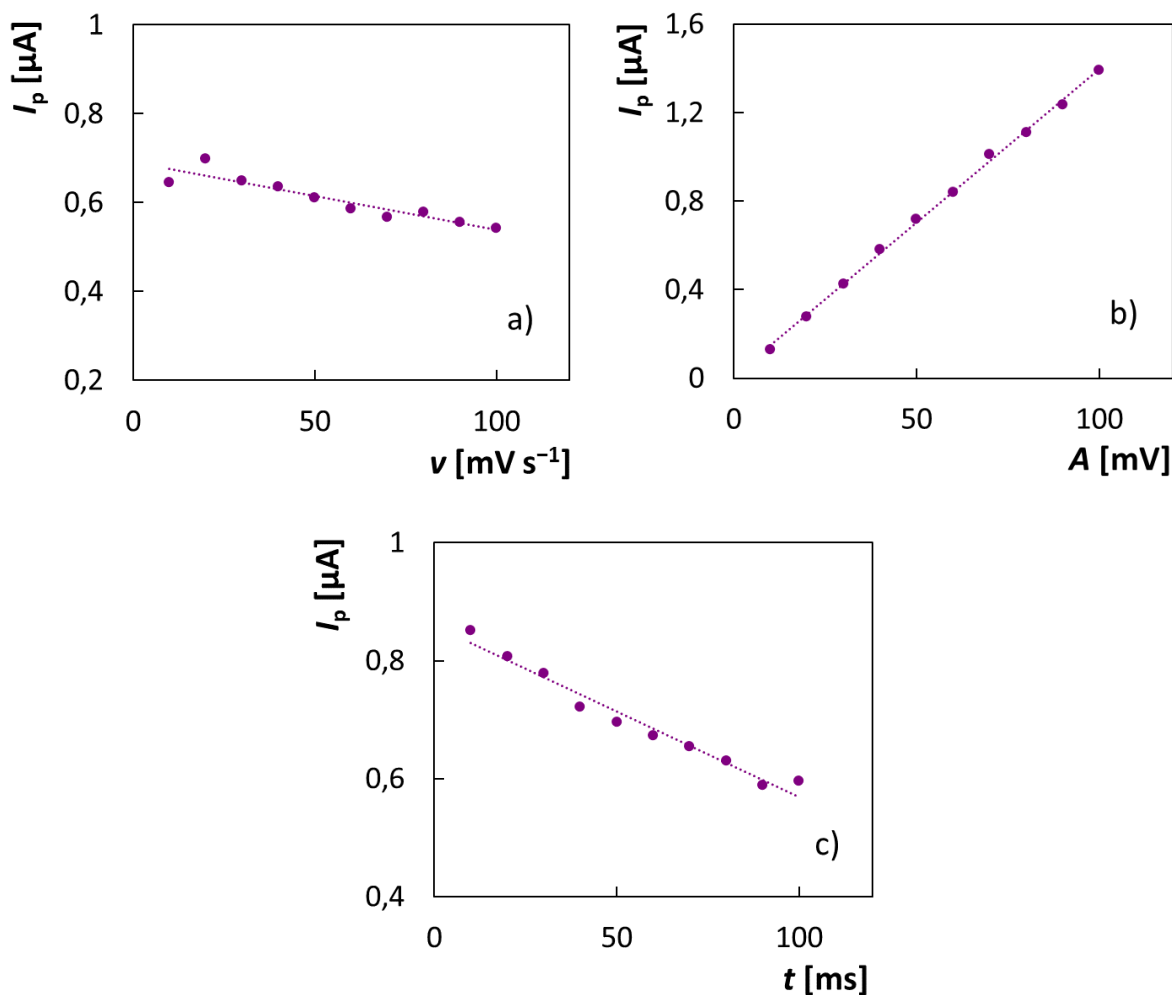


Obrázek 12: Porovnání DP voltamogramů oxidace DMZ (a), *N,N'*-dimethylacetohydrazidu (b) a UDMH (c) po odečtu základního elektrolytu

(základní elektrolyt – BR pufr (pH 9), $c_{\text{DMZ}} = 21,79\text{-}174,32 \mu\text{mol L}^{-1}$, $c_{\text{DAH}} = 24\text{-}193 \mu\text{mol L}^{-1}$, $c_{\text{UDMH}} = 50,4\text{-}404 \mu\text{mol L}^{-1}$, $E_{\text{in}} = +500 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = +2200 \text{ mV}$, $\nu = 40 \text{ mV s}^{-1}$, $A = +50 \text{ mV}$, $t = 80 \text{ ms}$)

3.2.5 Kvantitativní stanovení DMZ

Pro kvantitativní stanovení DMZ byla použita metoda DPV ve spojení s BDDE jako pracovní elektrodou. Za účelem nalezení optimálních parametrů DPV pro stanovení DMZ byly studovány vlivy rychlosti polarizace (ν), modulační amplitudy (A) a modulačního času (t). Získané závislosti I_p DMZ na jednotlivých testovaných parametrech jsou uvedeny na obrázku 13. Po jejich vyhodnocení byly vybrány následující parametry: $\nu = 40 \text{ mV s}^{-1}$, $A = +50 \text{ mV}$ a $t = 80 \text{ ms}$. Tyto hodnoty byly zvoleny na základě posouzení výšek naměřených píků, jejich vyhodnotitelnosti a opakovatelnosti.



Obrázek 13: Závislosti I_p DMZ na testovaných DPV parametrech – ν (a), A (b) a t (c)

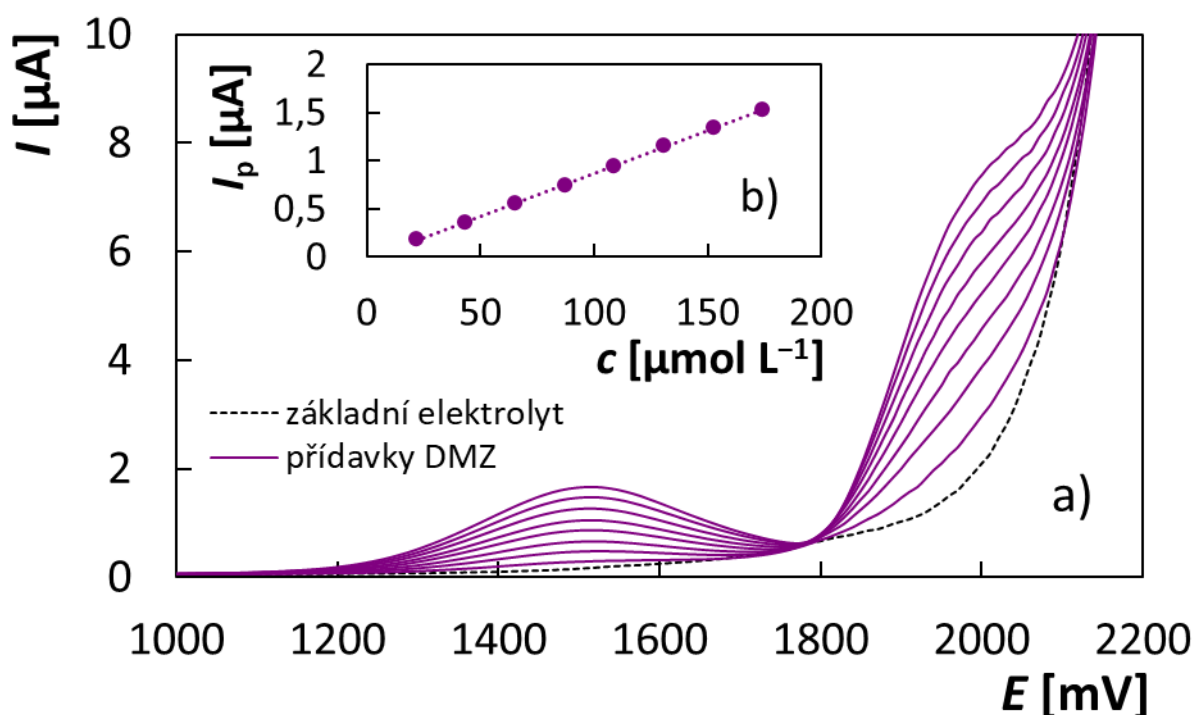
(základní elektrolyt – BR pufr (pH 9), $c_{DMZ} = 50 \mu\text{mol L}^{-1}$, $E_{in} = +500 \text{ mV}$, $E_{fin} = +2200 \text{ mV}$, $\nu = 10\text{-}100 \text{ mV s}^{-1}$ (a) a 20 mV s^{-1} (b, c), $A = +10\text{-}100 \text{ mV}$ (b) a $+50 \text{ mV}$ (a, c), $t = 10\text{-}100 \text{ ms}$ (c) a 80 ms (a, b))

Jako podklad pro kvantitativní analýzu DMZ byly naměřeny ve zvoleném základním elektrolytu křivky anodické oxidace v rozsahu koncentrací od $21,79$ do $174,32 \mu\text{mol L}^{-1}$ (viz. obrázek 14). Z obrázku je zřejmé, že výška prvního píku, který byl navržen pro stanovení, se lineárně zvyšuje v závislosti na zvyšující se koncentraci analytu, což zároveň potvrzuje rovnice 4. Pro tuto koncentrační závislost byly vypočteny hodnoty LOD a LOQ, které jsou $2,18$ a $7,28 \mu\text{mol L}^{-1}$. Po proměření nižšího koncentračního rozsahu, a to v rozmezí od $1,69$ do $13,52 \mu\text{mol L}^{-1}$ (viz. obrázek 15, rovnice 5) se hodnoty LOD a LOQ snížily díky použití přesnějšího dávkovacího postupu na $0,44$ a $1,46 \mu\text{mol L}^{-1}$.

$$I_p [\mu\text{A}] = (0,008952 \pm 0,000059) c [\mu\text{mol L}^{-1}] - (0,0285 \pm 0,0065), r = 0,9999 \quad (4)$$

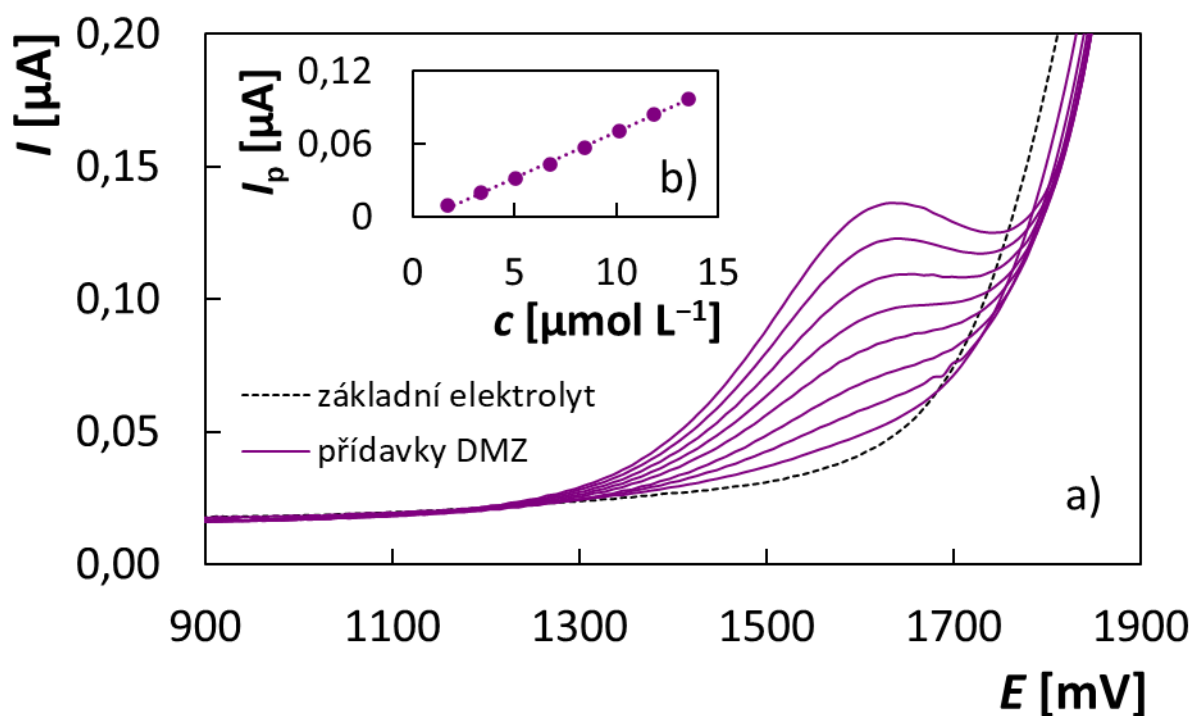
$$I_p [\mu\text{A}] = (0,00752 \pm 0,00013) c [\mu\text{mol L}^{-1}] - (0,0056 \pm 0,0011), r = 0,9992 \quad (5)$$

Spolehlivost a přesnost navržené metody byla testována opakovaným stanovením DMZ pro dvě koncentrační hladiny, a to 7,24 a 21,79 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Analýza pro každou koncentraci byla opakovaná pětkrát a získané výsledky jsou shrnuty v tabulce 4. Lze konstatovat, že metoda poskytuje správné, dobře reprodukovatelné a spolehlivé výsledky. V rozsahu testovaných koncentrací se nejvyšší hodnota RSD rovnala 4,33 %.



Obrázek 14: DP voltamogram DMZ v závislosti na koncentraci v rozmezí 21,79-174,32 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (a) a závislost I_p na c_{DMZ} (b)

(základní elektrolyt – BR pufr (pH 9,1), $c_{\text{DMZ}} = 21,79\text{-}174,32 \mu\text{mol L}^{-1}$, $E_{\text{in}} = +500 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = +2200 \text{ mV}$, $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$, $A = +50 \text{ mV}$, $t = 80 \text{ ms}$)



Obrázek 15: DP voltamogram DMZ v závislosti na koncentraci v rozmezí $1,69 - 13,52 \mu\text{mol L}^{-1}$ (a) a závislost I_p na c_{DMZ} (b)

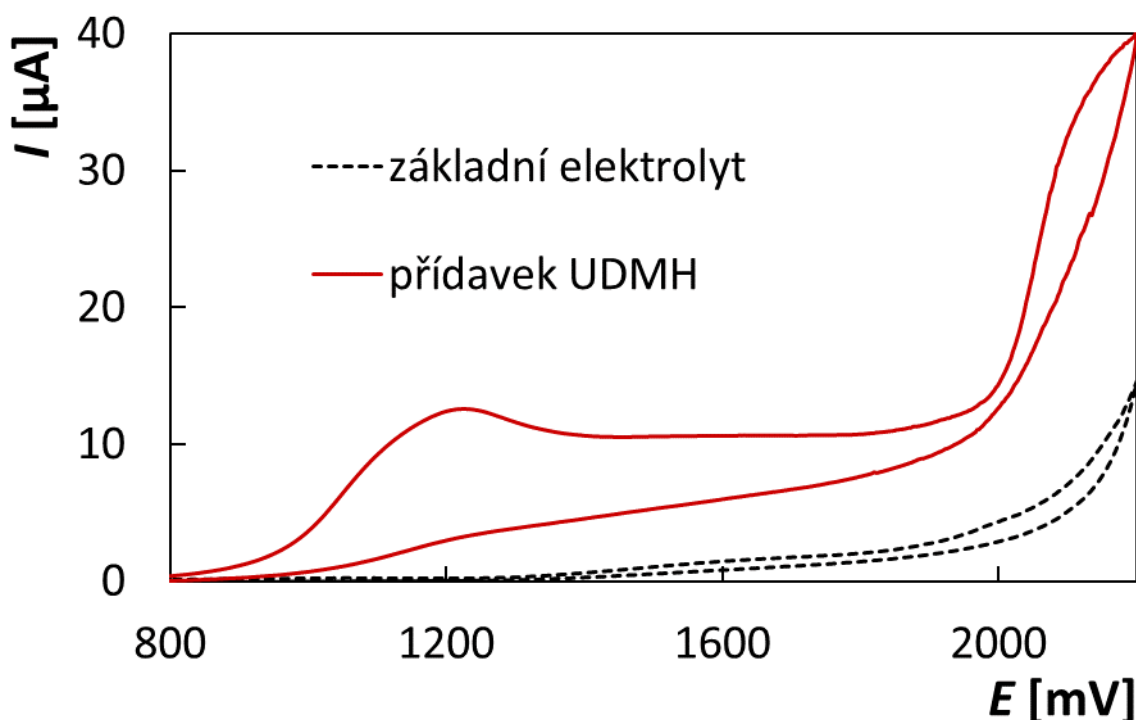
(základní elektrolyt – BR pufr (pH 9,1), $c_{\text{DMZ}} = 1,69-13,52 \mu\text{mol L}^{-1}$, $E_{\text{in}} = +500 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = +2200 \text{ mV}$, $\nu = 40 \text{ mV s}^{-1}$, $A = +50 \text{ mV}$, $t = 80 \text{ ms}$)

Tabulka 4: Výsledky opakovaných stanovení modelových roztoků DMZ

Analyt	Přidáno [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	Stanoveno [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	Výtěžnost [%]	RSD ($n = 5$) [%]
DMZ	21,79	$21,83 \pm 0,94$	96,3-105,9	4,33
	7,24	$7,13 \pm 0,26$	94,2-101,7	3,62

3.2.6 Voltametrické chování a stanovení UDMH

Vzhledem k tomu, že DMZ se rozkládá na toxický UDMH, byla v další části práce zaměřena pozornost na stanovení této látky. Během předběžných analýz bylo zjištěno, že UDMH poskytuje proudovou odezvu při anodické oxidaci za stejných podmínek jako byly doporučeny pro DMZ, zejména je možné pracovat v BR pufru o pH 9. Jak je vidět z cyklického voltamogramu na obrázku 16, UDMH poskytuje dva anodické píky s maximy při potenciálech +1230 a +2120 mV. Podle tvaru zpětné křivky lze soudit, že oxidační proces je rovněž ireversibilní.

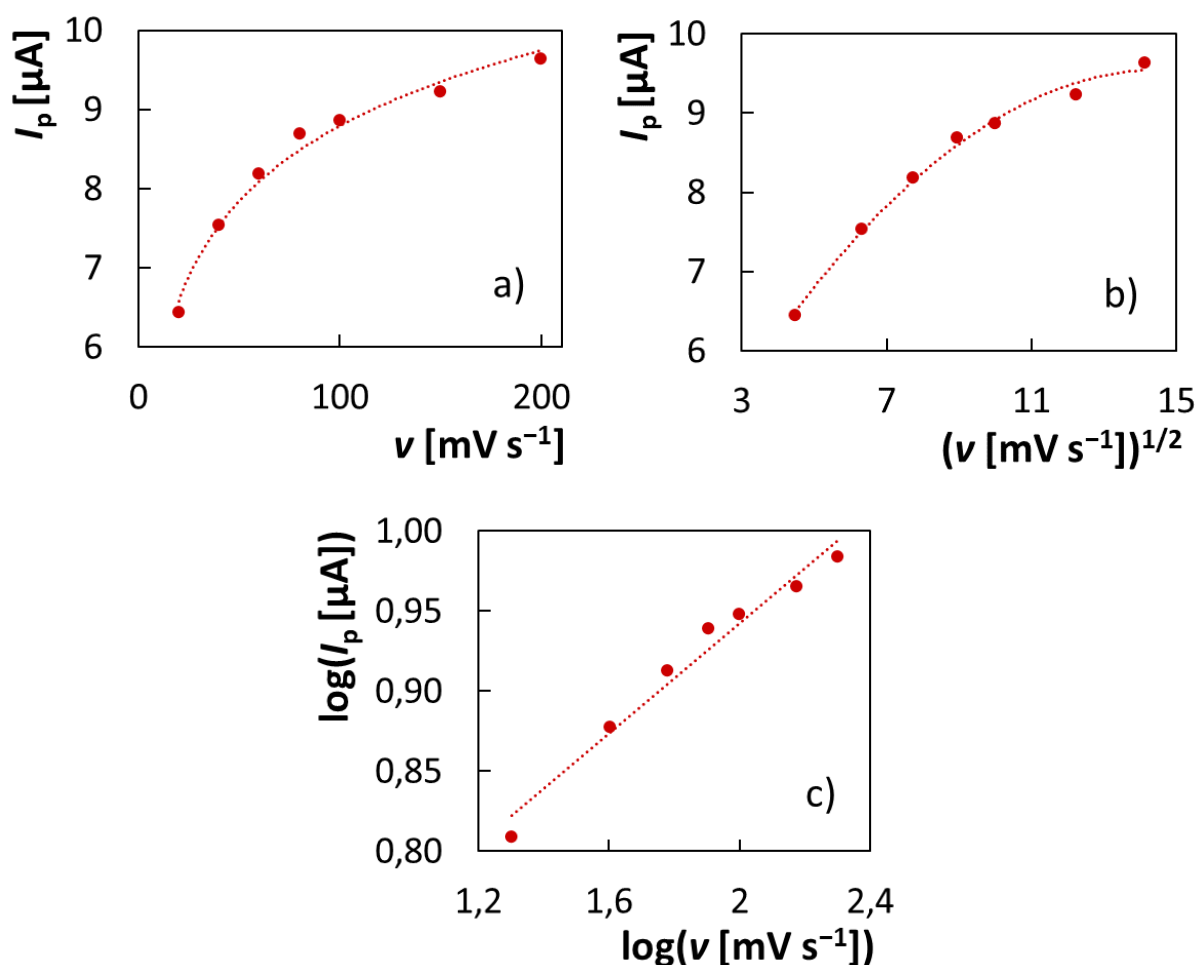


Obrázek 16: Cyklický voltamogram základního elektrolytu a UDMH

(základní elektrolyt – BR pufr (pH 9,1), $c_{\text{UDMH}} = 0,46 \text{ mmol L}^{-1}$, $E_{\text{in}} = E_{\text{fin}} = +600 \text{ mV}$, $E_{\text{lower vertex}} = +500 \text{ mV}$, $E_{\text{upper vertex}} = +2200 \text{ mV}$, $\nu = 40 \text{ mV s}^{-1}$)

Během studie závislosti I_p na ν byly naměřeny cyklické voltamogramy v rozsahu ν od 20 do 200 mV s^{-1} , jejichž vyhodnocení je uvedeno na obrázku 17. Jelikož závislosti I_p na ν (obrázek 17a) a I_p na $\nu^{1/2}$ (obrázek 17b) nejsou lineární, lze vyvodit závěr, že řídicím procesem není adsorpce, ani difuze. Z logaritmické závislosti, uvedené na obrázku 17c a popsané rovnicí 6, vychází hodnota směrnice ($0,172 \pm 0,013$), což potvrzuje, že řídicím procesem elektrochemické oxidace je kinetika.

$$\log(I_p [\mu\text{A}]) = (0,172 \pm 0,013) \log(v [\text{mV s}^{-1}]) + (0,598 \pm 0,025), r = 0,9853 \quad (6)$$



Obrázek 17: Závislosti I_p na v (a), I_p na $v^{1/2}$ (b) a $\log(I_p)$ na $\log(v)$ (c) pro UDMH

(základní elektrolyt – BR pufr (pH 9), $c_{\text{UDMH}} = 0,46 \text{ mmol L}^{-1}$, $E_{\text{in}} = E_{\text{fin}} = +600 \text{ mV}$, $E_{\text{lower vertex}} = +500 \text{ mV}$, $E_{\text{upper vertex}} = +2200 \text{ mV}$, $v = 20\text{-}200 \text{ mV s}^{-1}$)

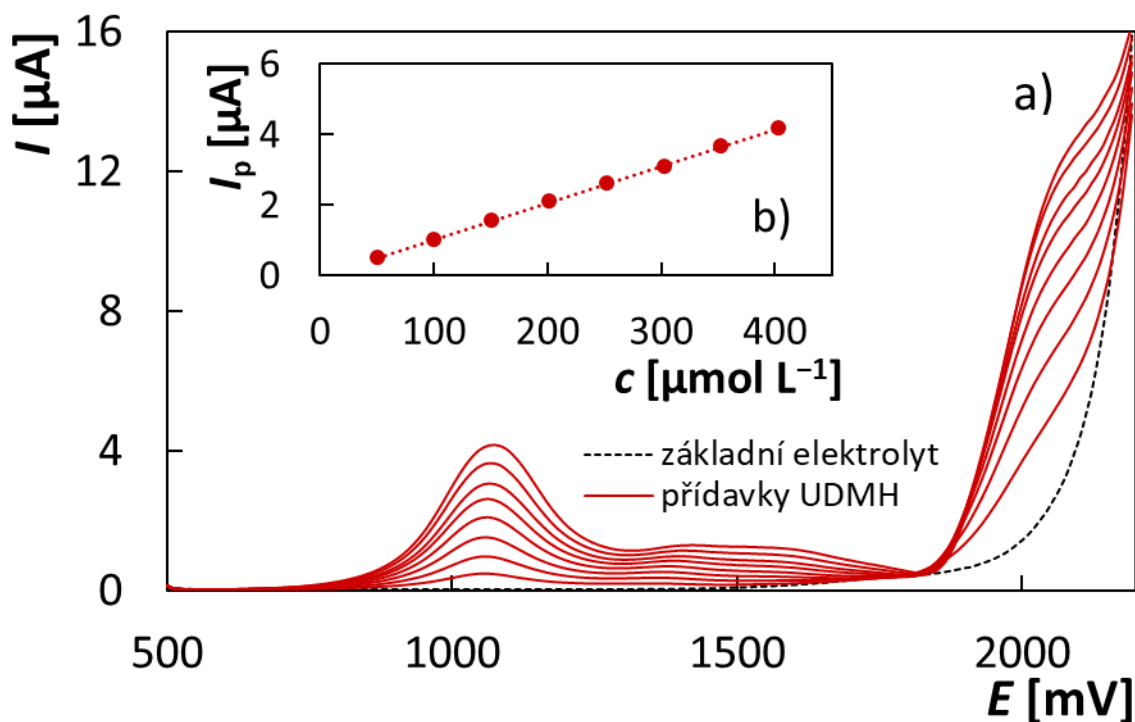
Dále byly pro UDMH s využitím DPV změřeny anodické oxidační křivky v koncentračním rozmezí od 50,45 do 403,59 $\mu\text{mol L}^{-1}$, které jsou uvedeny na obrázku 18. Proudová odezva obsahuje dva píky s maximy při potenciálech od +1050 mV do +1070 mV a od +1900 mV do +2100 mV. Výška prvního píku se zvyšuje lineárně v závislosti na koncentraci (rovnice 7), navíc je tento pík dobře vyhodnotitelný a leží při méně pozitivních potenciálech. Byl proto vybrán pro analytické účely. Závislost I_p na c_{UDMH} druhého píku byla nelineární, a navíc jeho záznam byl ovlivňován křivkou rozkladu základního elektrolytu. Pro výše uvedené koncentrační rozsah byly vypočteny hodnoty $\text{LOD} = 5,01 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $\text{LOQ} = 16,71 \mu\text{mol L}^{-1}$. Pro nižší koncentrační rozsah, konkrétně od 0,499 do 2,994 $\mu\text{mol L}^{-1}$ při současném zlepšení

dávkování analytu byla získána lineární kalibrační závislost popsaná rovnicí 8 a zobrazená na obrázku 19. Došlo také k významnému zlepšení citlivosti metody, a to na LOD a LOQ ve výši 0,063 a 0,209 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

$$I_p [\mu\text{A}] = (0,010449 \pm 0,000069) c [\mu\text{mol L}^{-1}] - (0,038 \pm 0,017), r = 0,9999 \quad (7)$$

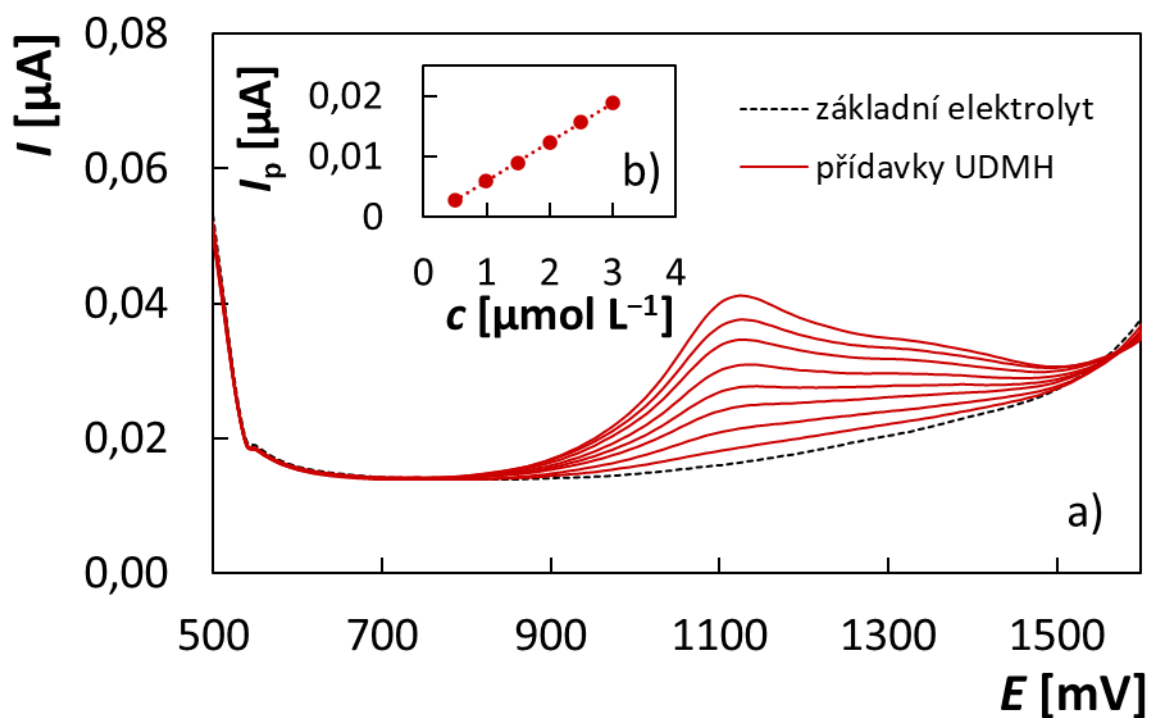
$$I_p [\mu\text{A}] = (0,006457 \pm 0,000069) c [\mu\text{mol L}^{-1}] - (0,00050 \pm 0,00013), r = 0,9998 \quad (8)$$

Stejně jako v případě DMZ byla provedena opakovaná stanovení UDMH v modelových roztocích o dvou různých koncentracích, a to 50,45 a 16,82 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Pro každou koncentraci bylo stanovení opakováno pětkrát a získané výsledky jsou shrnuty v tabulce 5. Z uvedených hodnot lze konstatovat, že navrhovaná metoda poskytuje spolehlivé a dobře opakovatelné výsledky jak pro nižší, tak i pro vyšší koncentraci UDMH, maximální hodnota RSD se rovnala 5,71 %.



Obrázek 18: DP voltamogram UDMH v závislosti na koncentraci v rozmezí od 50,45 do 403,59 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (a) a závislost I_p na c_{UDMH} (b)

(základní elektrolyt – BR pufr (pH 9), $c_{\text{UDMH}} = 50,45\text{-}403,59 \mu\text{mol L}^{-1}$, $E_{\text{in}} = +500 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = +2200 \text{ mV}$, $\nu = 40 \text{ mV s}^{-1}$, $A = +50 \text{ mV}$, $t = 80 \text{ ms}$)



Obrázek 19: DP voltamogram UDMH v závislosti na koncentraci v rozmezí od 0,499 do 2,994 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (a) a závislost I_p na c_{UDMH} (b)

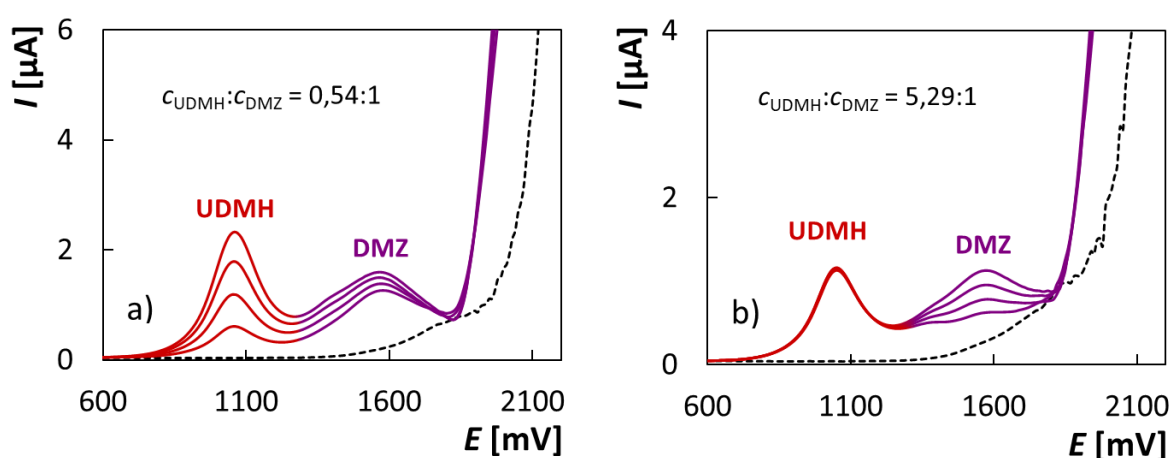
(základní elektrolyt – BR pufr (pH 9,1), $c_{\text{UDMH}} = 0,499\text{--}2,994 \mu\text{mol L}^{-1}$, $E_{\text{in}} = +500 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = +2200 \text{ mV}$, $\nu = 40 \text{ mV s}^{-1}$, $A = +50 \text{ mV}$, $t = 80 \text{ ms}$)

Tabulka 5: Výsledky opakovaných analýz modelových roztoků UDMH

Analyt	Přidáno [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	Stanoveno [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	Výtěžnost [%]	RSD ($n = 5$) [%]
UDMH	50,45	50,12±0,82	97,8-101,7	1,63
	16,82	16,94±0,96	93,0-107,8	5,71

3.2.7 Voltametrická analýza směsí DMZ a UDMH

Kvůli rozkladu DMZ je nutné předpokládat, že reálné vzorky obsahující DMZ, budou rovněž obsahovat i UDMH. Za účelem zjištění možnosti stanovení látek ve směsi byly analyzovány modelové vzorky s různým zastoupením obou analytů vyjádřeným poměrem molárních koncentrací $c_{\text{UDMH}}:c_{\text{DMZ}}$. Pro UDMH tento poměr byl v rozmezí od 0,29 do 2,92. Bylo zjištěno, že stanovení UDMH není nijak rušeno přítomností DMZ, jak lze vidět z obrázku 20a. Výsledky stanovení UDMH se pohybovaly v rozmezí 94,92 až 102,26 %. V případě analýzy DMZ je jeho výška píku za určitých podmínek ovlivněna tvarem voltametrické odezvy UDMH, obzvlášť při vyšším nadbytku, jak je vidět z obrázku 20b.



Obrázek 20: DP voltamogramy stanovení UDMH (a) a DMZ (b) v modelových směsích s poměrem $c_{\text{UDMH}}:c_{\text{DMZ}} = 0,54:1$ (a) a $c_{\text{UDMH}}:c_{\text{DMZ}} = 5,29:1$ (b)

(základní elektrolyt ($V = 15 \text{ mL}$) – BR pufr (pH 9), $c_{\text{UDMH}} = 58,9$ (a) a $110 \mu\text{mol L}^{-1}$ (b), $c_{\text{DMZ}} = 108,95$ a $20,79 \mu\text{mol L}^{-1}$ (b); a) standardní přídavky UDMH: $V = 30 \mu\text{L}$, $c = 0,025 \text{ mol L}^{-1}$, b) standardní přídavky DMZ: $V = 30 \mu\text{L}$, $c = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$), $E_{\text{in}} = +500 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = +2200 \text{ mV}$, $A = +50 \text{ mV}$, $t = 80 \text{ ms}$, $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$)

Na základě řady experimentů bylo zjištěno, že tento vliv závisí na poměru množství přítomných látek. Na rozdíl od modelových vzorků směsí, kde poměr analytu byl definován jako poměr molárních koncentrací $c_{\text{UDMH}}:c_{\text{DMZ}}$, pro případ analýzy neznámých vzorků byl definován poměr proudových odezev při maximech obou analyzovaných látek, $I_{\text{max,UDMH}}:I_{\text{max,DMZ}}$, a je zřejmé, že proudová odezva DMZ je ovlivněna přítomností UDMH. Tabulka 6 ukazuje, jak různé nadbytečné množství UDMH ovlivňuje výsledek stanovení DMZ. Testovaný přebytek UDMH se v modelových směsích pohyboval v rozmezí poměru koncentrací od 1,15 do 15,33. Výsledky stanovení DMZ se s rostoucím poměrem pohybují od 106,7 do 333,3 %.

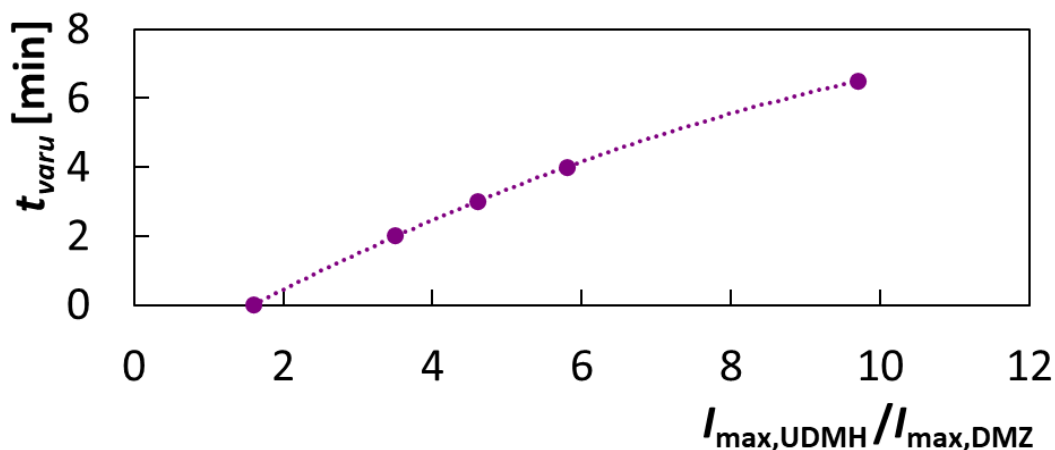
Tabulka 6: Výsledky stanovení DMZ v modelových směsích DMZ a UDMH před a po eliminaci UDMH.

UDMH: DMZ	Výtěžnost DMZ [%]	Výtěžnost DMZ po odstranění UDMH [%]
1,15	106,7	101,3
3,45	160,0	93,3
6,66	222,2	100,0
15,33	333,3	107,4

Z výše uvedených skutečností vyplývá, že bez předúpravy vzorku lze DMZ spolehlivě stanovit v přítomnosti UDMH pouze do koncentračního poměru přibližně 1. Při vyšším přebytku této látky je již výsledek stanovení DMZ výrazně ovlivněn. Problém byl vyřešen odstraněním UDMH ze směsného vzorku. Látku lze vytěsnit z alkalického roztoku krátkým varem (bod varu UDMH je 68,1 °C). Optimální doba varu závisí na poměru koncentrací UDMH a DMZ a pohybuje se v minutách. Probíhá-li eliminace v roztoku 1 mol L⁻¹ NaOH, závislost mezi potřebnou dobou varu použitou k eliminaci UDMH z roztoku a poměrem proudů $I_{\max,UDMH} : I_{\max,DMZ}$ byla zjištěna experimentálně a lze ji popsat rovnicí 9:

$$t \text{ [min]} = -0,0388 x^2 + 1,2397x - 1,8788, \quad (9)$$

kde x představuje $I_{\max,UDMH} : I_{\max,DMZ}$ a t je doba varu. Grafické znázornění této rovnice je uvedeno na obrázku 21.

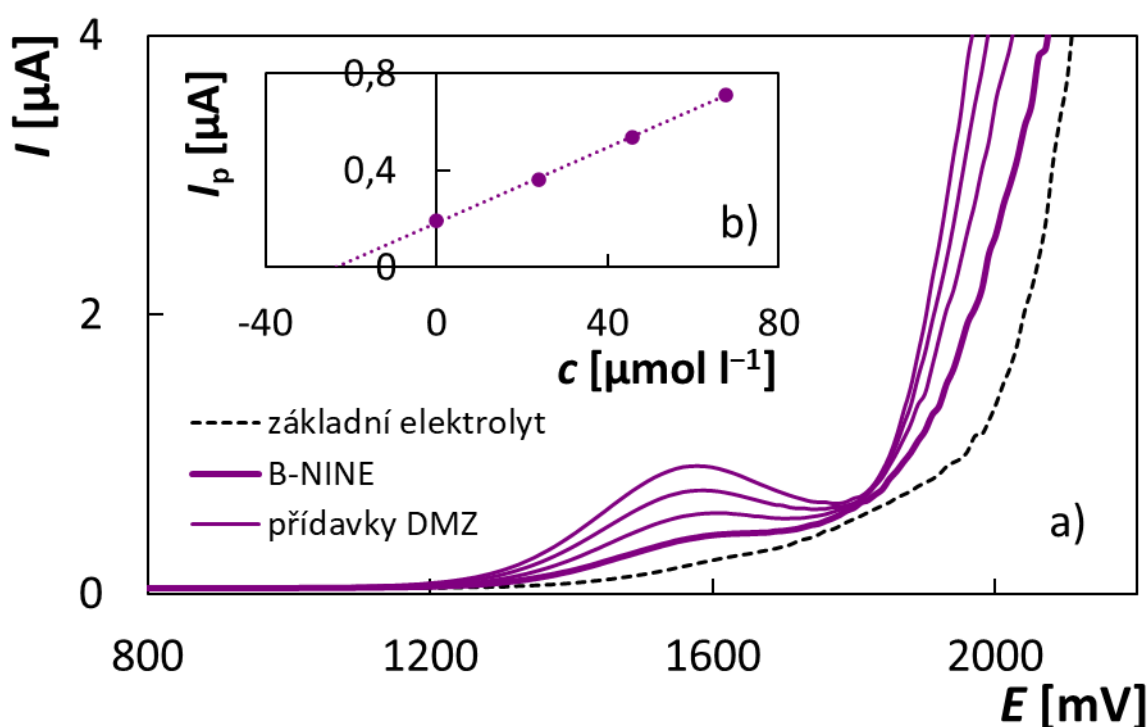


Obrázek 21: Závislost doby varu na poměru proudových odezev při maximech UDMH a DMZ

Tento vztah lze použít při analýze neznámých vzorků směsí a vede ke správným hodnotám koncentrací DMZ. Výsledky stanovení DMZ po odstranění UDMH ze směsného vzorku jsou uvedené v tabulce 6. Je zde vidět, že navržený eliminační postup vede ke správným hodnotám.

3.2.8 Voltametrická analýza reálných vzorků DMZ a UDMH

Vypracované metody ke stanovení DMZ a UDMH byly aplikovány na tři typy reálných vzorků, a to na komerčně dostupný přípravek na ochranu rostlin B-NINE^{®SG}, na vodu po umytí jablek a na povrchovou vodu z řeky Chrudimky. Do vod bylo přidáno malé množství analytů. DMZ byl stanovován ve všech třech vzorcích a UDMH pouze ve vodě z oplachů jablek. Postup zakoncentrování DMZ z říční vody je popsán v experimentální části (kapitola 2.3.6). Stanovení bylo opakováno pětkrát pro každý reálný vzorek. Na obrázku 22 je uveden voltamogram vzorku B-NINE^{®SG}, včetně křivek po standardních přidavcích. Z obrázku je patrné, že stanovení není rušeno žádnými jinými látkami, což je v souladu s údaji poskytnutými výrobcem.



Obrázek 22: DP voltamogram reálného vzorku B-NINE^{®SG} (a) a grafická ukázka vyhodnocení metodou standardního přidavku (b)

(základní elektrolyt ($V = 15 \text{ mL}$) – BR pufr (pH 9,1), $E_{in} = +500 \text{ mV}$, $E_{fin} = +2200 \text{ mV}$, $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$, $A = +50 \text{ mV}$, $t = 80 \text{ ms}$; $V_{B-NINE} = 30 \text{ μL}$; $V_{DMZ} = 30 \text{ μL}$, $c = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$)

Hodnoty uvedené v tabulce 7 ukazují, že navržená metoda poskytuje spolehlivé a správné výsledky při analýze reálných vzorků. Stanovené množství DMZ v přípravku B-NINE^{®SG} se shoduje s údaji poskytnutými výrobcem. Rovněž koncentrace stanovené v říční a oplachové vodě s přidavkem DMZ odpovídaly skutečným hodnotám.

Tabulka 7: Výsledky analýzy DMZ a UDMH v reálných vzorcích

Vzorek	Analyt	Deklarováno [mg kg ⁻¹]	Stanoveno [mg kg ⁻¹]	Výtěžnost [%]	RSD (<i>n</i> = 5) [%]
B-NINE ^{®SG}	DMZ	850	831 ± 27	93,5–105,9*	4,82

Vzorek	Analyt	Přidáno [μmol L ⁻¹]	Stanoveno [μmol L ⁻¹]	Výtěžnost [%]	RSD (<i>n</i> = 5) [%]
Říční voda	DMZ	4,0	4,06 ± 0,13	95,0–106,2**	4,91
Oplachová voda 1	DMZ	2,0	2,04 ± 0,05	97,0–106,0**	3,93
Oplachová voda 2	UDMH	19,6	19,48 ± 0,21	97,9–102,0**	1,64

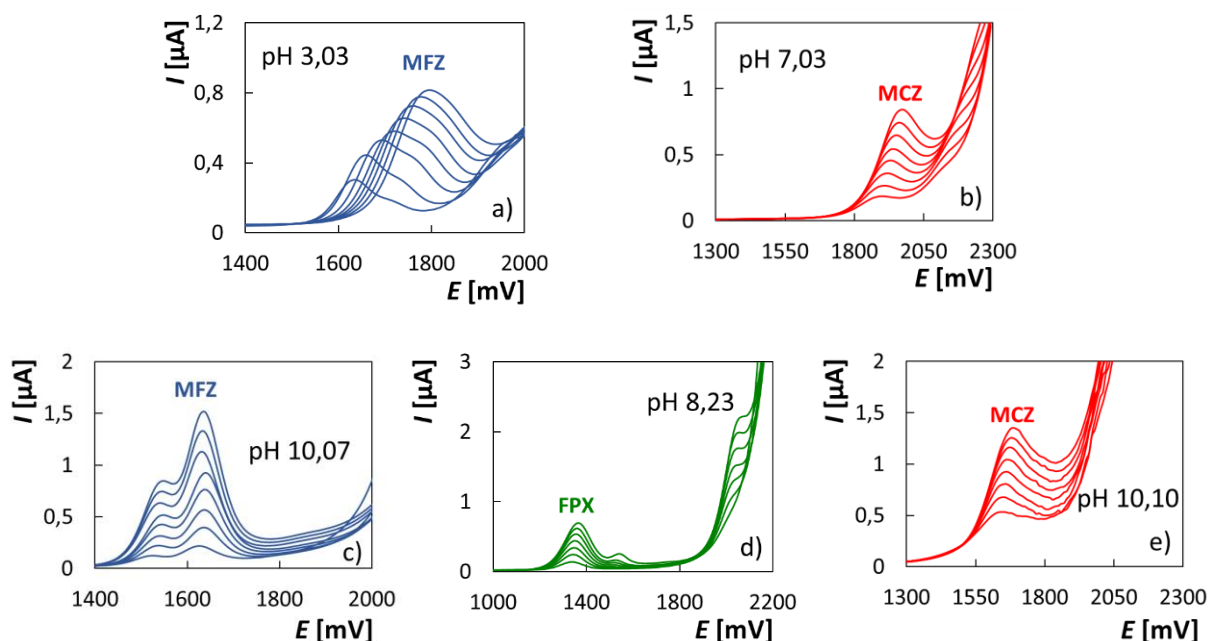
* Vztahuje se k deklarované hodnotě. ** Vztahuje se k přidané hodnotě.

3.3 Vývoj metod voltametrického stanovení fungicidů MFZ, FPX a MCZ

3.3.1 Volba základního elektrolytu a hodnoty pH

Vývoj metod pro stanovení MFZ, FPX a MCZ začal hledáním vhodného základního elektrolytu a hodnoty pH. Za tímto účelem byly provedeny experimenty ve třech různých složeních základních elektrolytů, a to v čistém BR pufru, v BR pufru s 33 % ACN a v BR pufru s 67 % ACN. Hodnoty pH BR pufru se pohybovaly od 2,1 do 11,19 pro MFZ, od 2,03 do 11,02 pro FPX a od 2,06 do 10,10 pro MCZ. Tato studie byla prováděna s použitím DPV v kombinaci s BDDE.

Nejdříve bylo zkoumáno samotné vodné prostředí. Bylo zjištěno, že v kyselém až slabě kyselém prostředí (pro MFZ) a v kyselém až neutrálním (pro MCZ) se poloha píků výrazně posouvá směrem k pozitivnějším potenciálům se zvyšující se koncentrací analytu. Například pro MFZ při pH 3,03 se potenciál maxima píku E_{pMFZ} posouval od +1628 mV do +1789 mV, viz obrázek 23a, pro MCZ pak při pH 3,08 se E_{pMCZ} posouval od +1630 mV do +1950 mV, jak je uvedeno na obrázku 23b. Se zvyšující se hodnotou pH se tento posun snižoval až v alkalickém prostředí byl minimální pro oba analyty. Na obrázku 23c jsou uvedeny křivky oxidace MFZ v prostředí základního elektrolytu o pH 10,07. Z obrázku je vidět, že proces běží ve dvou krocích, což se projevilo dvěma píky. Tato skutečnost byla patrná od pH 9,06 a vyšším. Pokud se ve vodném prostředí prováděla analýza FPX, byly pozorovány v celém rozsahu testovaného pH tři píky, viz obrázek 23d. V rozmezí pH 2,03–6,0 byla proudová odezva nestabilní především při vyšších koncentracích. Pokles píků pravděpodobně způsobilo zhoršení rozpustnosti analytu. Dále lze konstatovat, že ve studovaném rozsahu pH ve vodném základním elektrolytu byla pozorována nelineární závislost mezi I_p a analyzovanou koncentrací, a to pro všechny studované analyty. Jako příklad jsou na obrázku 23e uvedeny křivky oxidace MCZ při pH 10,10. Na základě výše uvedených skutečností lze konstatovat, že vodné prostředí je pro stanovení MFZ, FPX a MCZ nevhodné.



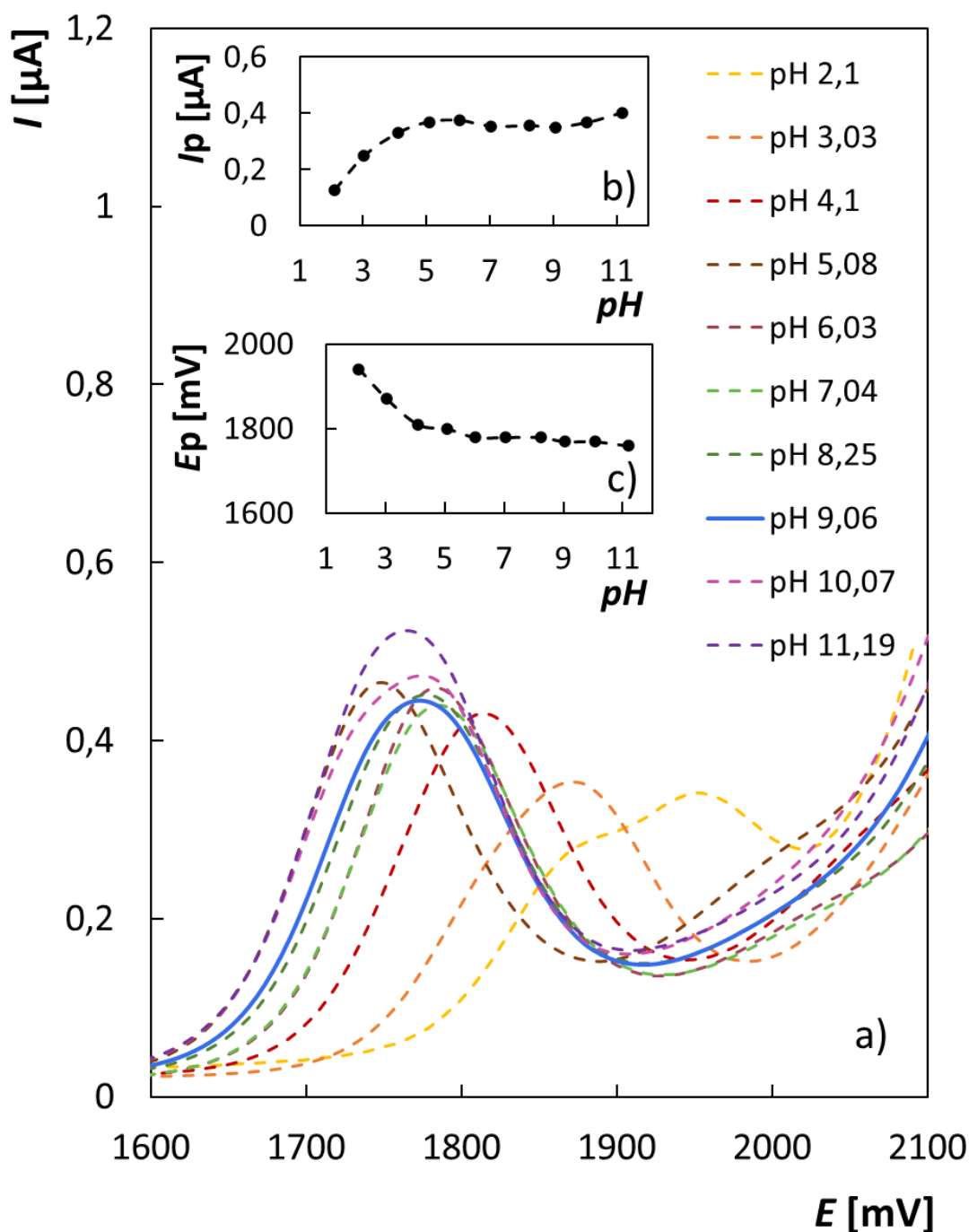
Obrázek 23: DP voltamogramy MFZ (a, c), MCZ (b, e) a FPX (d) v BR pufru při různém pH

(základní elektrolyt – BR pufr, $c_{MFZ} = 3,82-30,56 \mu\text{mol L}^{-1}$, $c_{MCZ} = 6,63-53,04 \mu\text{mol L}^{-1}$, $c_{FPX} = 7,51-52,57 \mu\text{mol L}^{-1}$, $E_{in} = +500 \text{ mV}$, $E_{fin} = +2200 \text{ mV}$, resp. $+2300 \text{ mV}$ pro MCZ, $A = +50 \text{ mV}$, $t = 80 \text{ ms}$, $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$)

Dále byl zkoumán vliv pH na stanovení výše uvedených analytů ve vodně-organickém prostředí, a to v BR pufru s 33 % ACN. Dosažené výsledky přináší obrázky 24, 25 a 26. Z obrázků 24c a 26c, lze pro MFZ a MCZ konstatovat, že v kyselém prostředí se zvyšujícím se pH se E_p posouvají k méně pozitivním potenciálům. V mírně kyselém, neutrálním a alkalickém roztoku se hodnota E_p téměř nemění. Z hlediska citlivosti stanovení je z obrázků 24b a 26b zřejmé, že pro MFZ a MCZ I_p se zvyšujícím se pH mírně zvyšuje. V alkalickém prostředí pak bylo dosaženo nejvyšších hodnot I_p . Pro FPX jsou hodnoty E_p a I_p celkem srovnatelné v celém studovaném rozsahu pH, viz obrázek 25b, c.

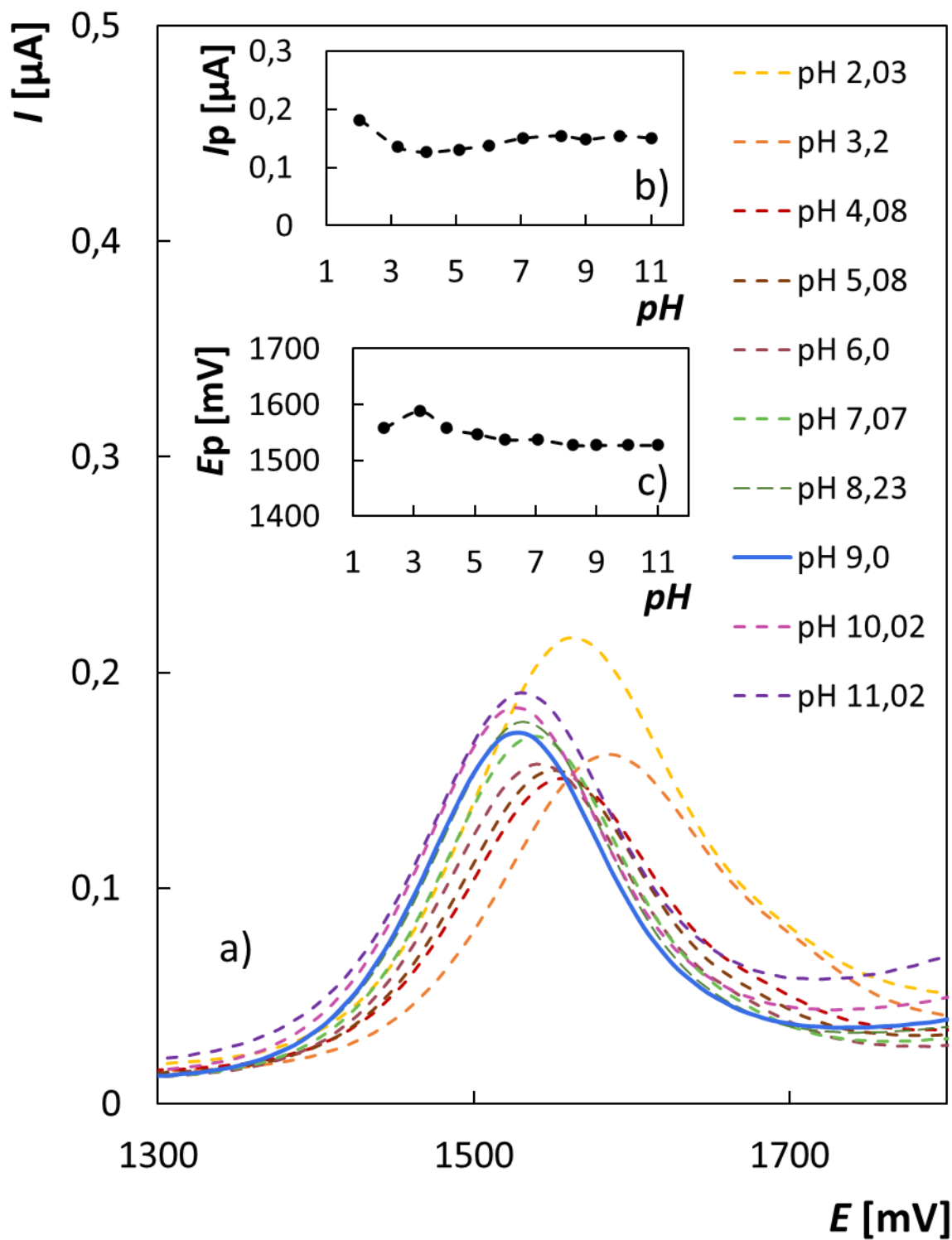
Pokud se hodnotí vliv pH na měřené anodické křivky v závislosti na zvyšující se koncentraci analytů, byl pozorován u MFZ a FPX v kyselém až slabě kyselém prostředí posun polohy píků k pozitivnějším potenciálům. Pro MCZ pak nastával tento posun v celém rozmezí pH. Tyto změny však byly méně zřetelné oproti vodnému prostředí. Proudová odezva byla ve studovaném prostředí v závislosti na pH a koncentraci pro MFZ a MCZ stabilní. Pro FPX byl v rozmezí pH 2,03–6,0 pozorován pokles píků, od pH 7,07 se odezva rovněž stabilizovala. Od pH 8 a výš bylo dosaženo pro všechny analyty lineární závislosti mezi I_p a c , jak je uvedeno na

obrázku 27. Na základě zjištěných poznatků lze studovaný základní elektrolyt s 33 % ACN v alkalickém prostředí použít ke stanovení zájmových analytů.



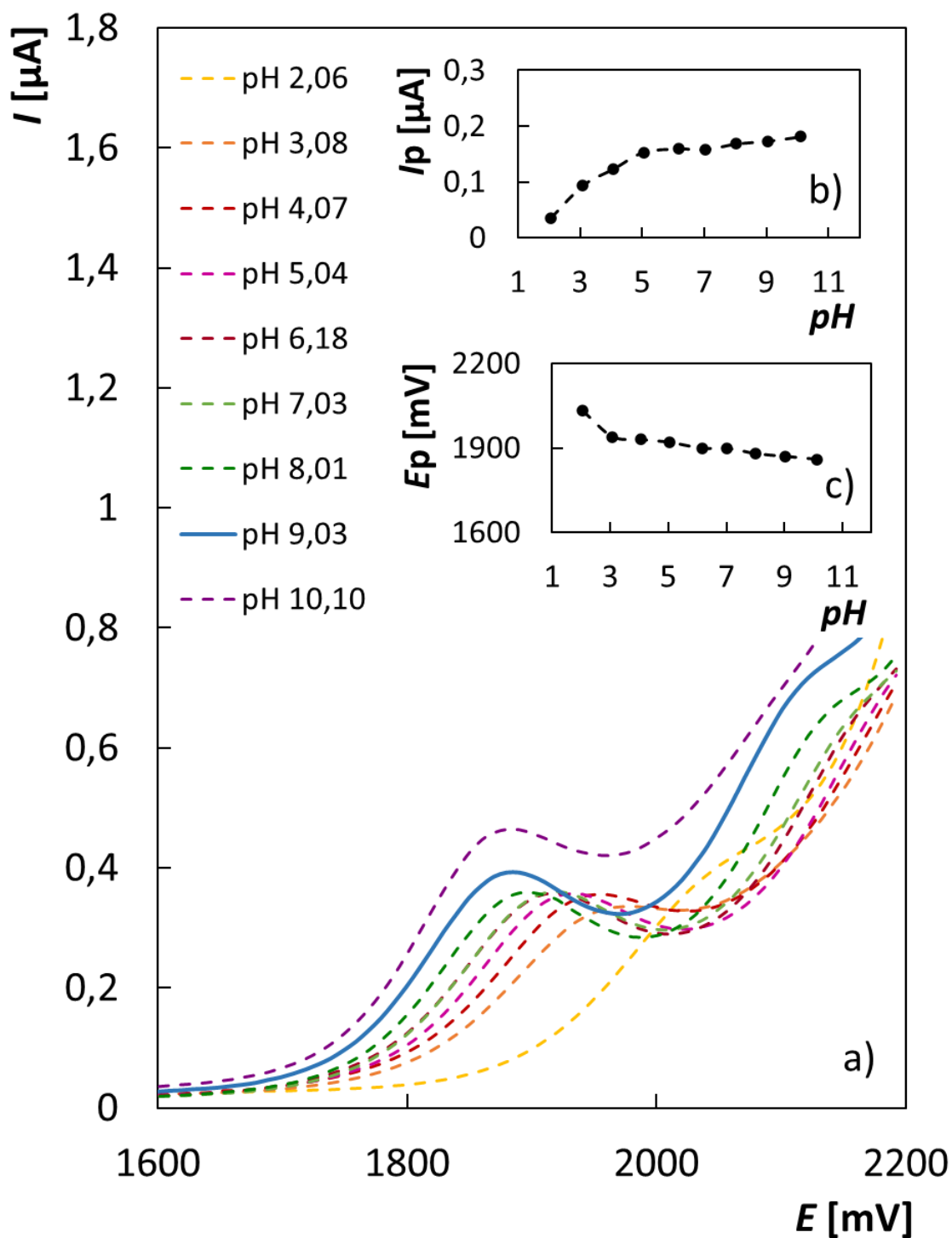
Obrázek 24: DP voltamogramy MFZ při různých hodnotách pH (a), závislost I_p na pH (b) a závislost E_p na pH (c)

(základní elektrolyt – BR pufr (pH od 2,1 do 11,19) s 33 % ACN, $c_{\text{MFZ}} = 11,46 \mu\text{mol L}^{-1}$, $E_{\text{in}} = +500 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = +2200 \text{ mV}$, $A = +50 \text{ mV}$, $t = 80 \text{ ms}$, $\nu = 40 \text{ mV s}^{-1}$)



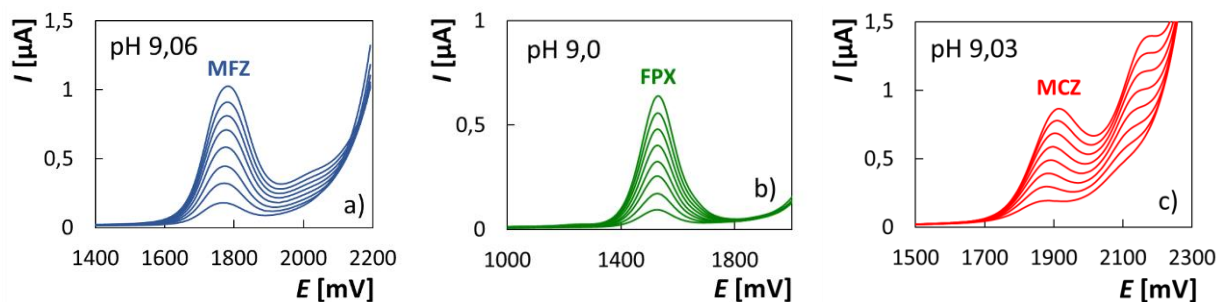
Obrázek 25: DP voltamogramy FPX při různých hodnotách pH (a), závislost I_p na pH (b) a závislost E_p na pH (c)

(základní elektrolyt – BR pufr (pH od 2,03 do 11,02) s 33 % ACN, $c_{\text{FPX}} = 15,02 \mu\text{mol L}^{-1}$, $E_{\text{in}} = +500 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = +2200 \text{ mV}$, $A = +50 \text{ mV}$, $t = 80 \text{ ms}$, $\nu = 40 \text{ mV s}^{-1}$)



Obrázek 26: DP voltamogramy MCZ při různých hodnotách pH (a), závislost I_p na pH (b) a závislost E_p na pH (c)

(základní elektrolyt – BR pufr (pH od 2,06 do 10,10) s 33 % ACN, $c_{\text{MCZ}} = 19,89 \mu\text{mol L}^{-1}$, $E_{\text{in}} = +500 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = +2300 \text{ mV}$, $A = +50 \text{ mV}$, $t = 80 \text{ ms}$, $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$)



Obrázek 27: DP voltamogramy MFZ (a), FPX (b) a MCZ (c) v BR pufru při různém pH s 33 % ACN

(základní elektrolyt – BR pufr s 33 % ACN, $c_{MFZ} = 3,82-30,56 \mu\text{mol L}^{-1}$, $c_{FPX} = 7,51-60,08 \mu\text{mol L}^{-1}$, $c_{MCZ} = 6,63-53,04 \mu\text{mol L}^{-1}$, $E_{in} = +500 \text{ mV}$, $E_{fin} = +2200 \text{ mV}$, resp. $+2300 \text{ mV}$ pro MCZ, $A = +50 \text{ mV}$, $t = 80 \text{ ms}$, $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$)

Na závěr této studie byla ověřována možnost stanovení testovaných fungicidů v prostředí obsahujícím BR pufr a 67 % ACN. Zvýšení podílu organického rozpouštědla v základním elektrolytu vedlo k tomu, že naměřené křivky v celém rozsahu pH se nacházely při značně pozitivních potenciálech. Pro MFZ byla zaznamenána výrazná nelinearita I_p v závislosti na c . U FPX pak v kyselém prostředí byla pozorována nestabilita proudové odezvy.

Na základě provedených experimentů lze shrnout, že s rostoucím podílem ACN v základním elektrolytu se u všech analytů posouvají píky k pozitivnějším potenciálům. Například v případě FPX pro pH 6,0 se E_p pohyboval od +1346 mV do +1376 mV ve vodném prostředí, od +1537 mV do +1568 mV v přítomnosti 33 % ACN a od +1709 mV do +1739 mV v přítomnosti 67 % ACN. Vliv pH jednotlivých základních elektrolytu na I_p je shrnut v tabulkách 8, 9 a 10.

Po vyhodnocení všech výše uvedených skutečností byl vybrán jako základní elektrolyt pro voltametričnou analýzu MFZ, FPX a MCZ BR pufr s pH 9 a 33 % ACN. Ve zvoleném prostředí poskytovaly látky dobře vyhodnotitelné oxidační křivky, které byly dostatečně citlivé, stabilní a závislost I_p na c byla lineární. Další výhodou vybraného prostředí je to, že za těchto podmínek jsou maxima píky MFZ a FPX a také FPX a MCZ dostatečně odděleny, což umožňuje jejich současnou analýzu ve směsných komerčních přípravcích.

Tabulka 8: Závislost proudové odezvy při anodické oxidaci MFZ o koncentrací $c_{MFZ} = 11,46 \mu\text{mol L}^{-1}$ na složení základního elektrolytu pro jednotlivé pH

Základní elektrolyt	pH	2,1	3,03	4,1	5,08	6,03	7,04	8,25	9,06	10,07	11,19
BR pufr		0,313	0,390	0,400	0,516	0,526	0,537	0,470	0,420	0,469	0,494
BR pufr s 33 % ACN	I_p [μA]	0,127	0,249	0,333	0,369	0,374	0,353	0,355	0,35	0,366	0,482
BR pufr s 67 % ACN		0,139	0,196	0,261	0,254	0,253	0,254	-	-	-	-

Tabulka 9: Závislost proudové odezvy při anodické oxidaci FPX o koncentrací $c_{FPX} = 15,02 \mu\text{mol L}^{-1}$ na složení základního elektrolytu pro jednotlivé pH

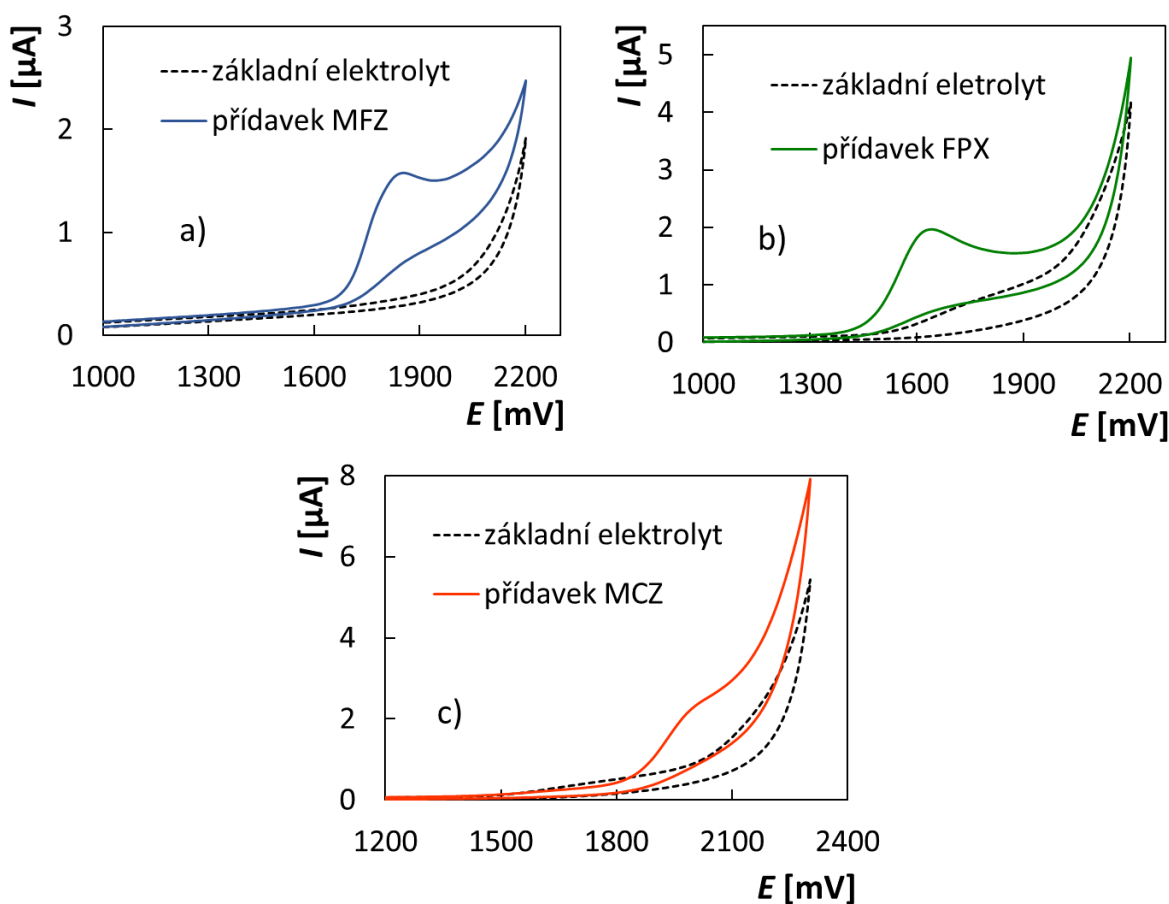
Základní elektrolyt	pH	2,03	3,2	4,08	5,08	6	7,07	8,23	9	10,02	11,02
BR pufr		0,305	0,278	0,277	0,232	0,175	0,191	0,209	0,193	0,144	0,065
BR pufr s 33 % ACN	I_p [μA]	0,182	0,135	0,126	0,131	0,138	0,151	0,154	0,148	0,154	0,152
BR pufr s 67 % ACN		0,102	0,079	0,079	0,077	0,087	0,099	-	-	-	-

Tabulka 10: Závislost proudové odezvy při anodické oxidaci MCZ o koncentrací $c_{MCZ} = 19,89 \mu\text{mol L}^{-1}$ na složení základního elektrolytu pro jednotlivé pH

Základní elektrolyt	pH	2,06	3,08	4,07	5,04	6,18	7,03	8,01	9,03	10,10	-
BR pufr		0,199	0,321	0,297	0,298	0,337	0,339	0,313	0,367	0,440	-
BR pufr s 33 % ACN	I_p [μA]	0,035	0,093	0,123	0,153	0,159	0,158	0,168	0,173	0,181	-
BR pufr s 67 % ACN		0,102	0,080	0,076	0,079	0,077	0,085	-	-	-	-

3.3.2 Voltametrické chování studovaných fungicidů

Dalším krokem ve vývoji analytických metod bylo zkoumání voltametrického chování studovaných látek pomocí CV. Experimenty byly prováděny v základním elektrolytu, obsahujícím BR pufr (pH 9) s 33 % ACN, hodnoty potenciálu se pohybovaly od -800 mV do $+2200$ mV pro MFZ a FPX a od -2000 mV do $+2300$ mV pro MCZ. Rychlost nárůstu potenciálu ν se rovnala 40 mV s^{-1} . Z cyklických voltamogramů uvedených na obrázku 28 lze soudit, že všechny analyty podléhají anodické oxidaci a byl pozorován vždy jeden pík při potenciálech $+1860$ mV pro MFZ, $+1640$ mV pro FPX a $+2007$ mV pro MCZ. V celém studovaném rozsahu potenciálů nebyl zaznamenán žádný redukční signál příslušící analyzovaným látkám, takže lze konstatovat, že probíhající děje měly ireverzibilní průběh.



Obrázek 28: Cyklické voltamogramy základního elektrolytu a MFZ (a), FPX (b) a MCZ (c)

(základní elektrolyt – BR pufr (pH 9) s 33 % ACN, $c_{\text{MFZ}} = 12,74 \mu\text{mol L}^{-1}$, $c_{\text{FPX}} = 74,06 \mu\text{mol L}^{-1}$, $c_{\text{MCZ}} = 66,29 \mu\text{mol L}^{-1}$; pro MFZ a FPX: $E_{\text{in}} = E_{\text{fin}} = 0 \text{ mV}$, $E_{\text{lower vertex}} = -800 \text{ mV}$, $E_{\text{upper vertex}} = +2200 \text{ mV}$; pro MCZ: $E_{\text{in}} = E_{\text{fin}} = 0 \text{ mV}$, $E_{\text{lower vertex}} = -500 \text{ mV}$, $E_{\text{upper vertex}} = +2300 \text{ mV}$; $\nu = 40 \text{ mV s}^{-1}$)

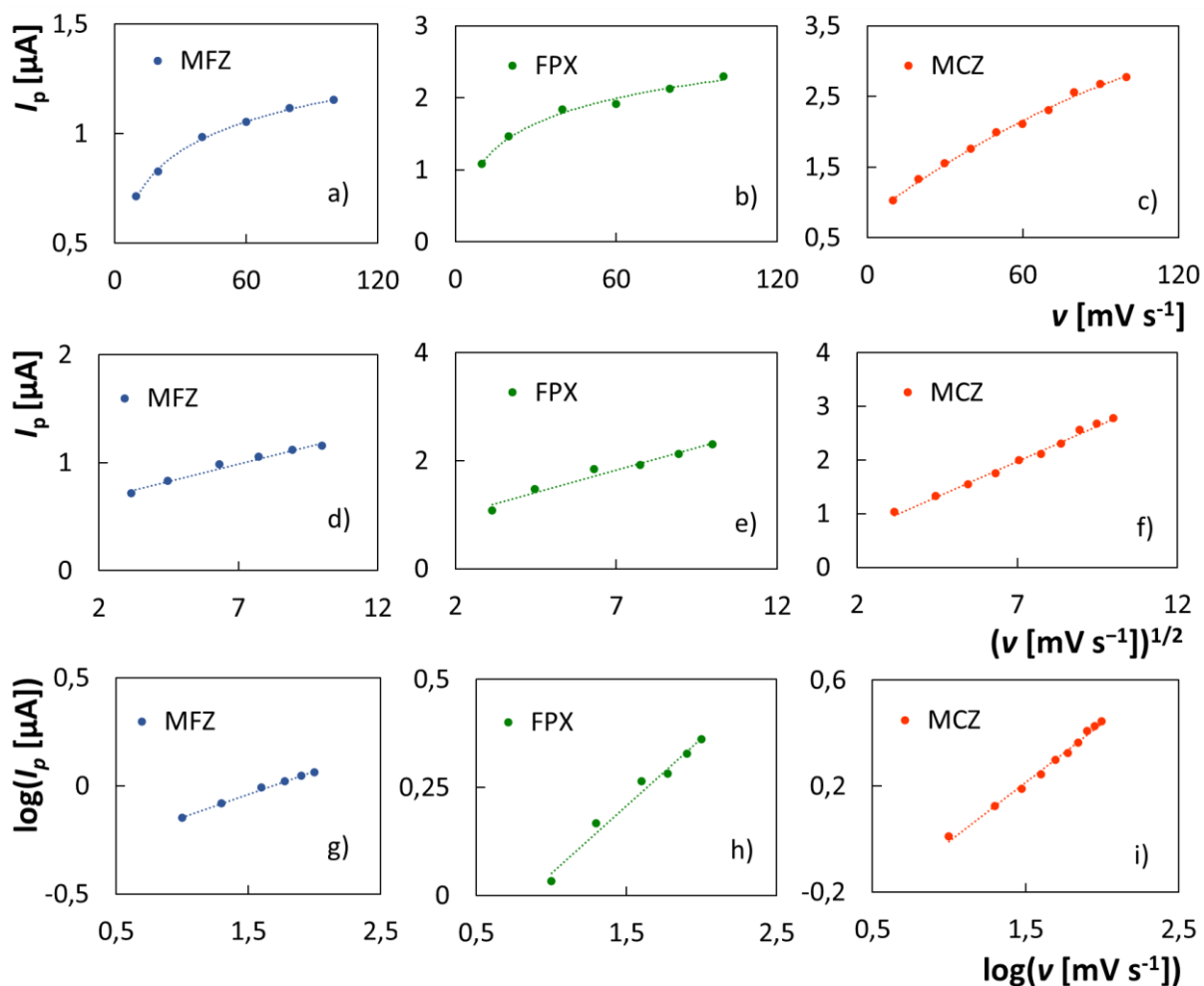
3.3.3 Studia závislosti proudové odezvy MFZ, FPX a MCZ na rychlosti polarizace

Za účelem zjištění řídicího procesu elektrodové reakce MFZ, FPX a MCZ na BDD elektrodě, s pomocí CV byly provedeny studie závislosti I_p na v v rozsahu od 10 do 100 mV s^{-1} . Po vyhodnocení naměřených křivek byly vyneseny závislosti I_p na v , I_p na $v^{1/2}$ a $\log(I_p)$ na $\log(v)$, uvedené na obrázku 29. Pro všechny studované analyty závislost I_p na v vykazovala nelineární průběh, jak je uvedeno na obrázku 29a,b,c což znamená že řídicím procesem není adsorpce. Ze závislostí I_p na $v^{1/2}$, které měly lineární průběh pro všechny zkoumané látky (viz obrázek 29d,e,f), lze usuzovat, že se jedná o difuzně řízenou elektrodovou reakci. Pro potvrzení anebo vyvrácení těchto závěrů byly vyneseny také závislosti $\log(I_p)$ na $\log(v)$, které jsou uvedené na obrázku 29g,h,i, a popsané rovnicemi (10), (11) a (12). Směrnice logaritmické závislosti byly $(0,2126 \pm 0,0070)$ pro MFZ, $(0,311 \pm 0,023)$ pro FPX a $(0,444 \pm 0,014)$ pro MCZ, což naznačuje, že elektrochemické oxidační reakce těchto látek jsou komplikovanější s významným vlivem difuze a kinetiky.

$$\log(I_p [\mu\text{A}]) = (0,2126 \pm 0,0070) \log(v [\text{mV s}^{-1}]) - (0,358 \pm 0,011), r = 0,9978 \quad (10)$$

$$\log(I_p [\mu\text{A}]) = (0,311 \pm 0,023) \log(v [\text{mV s}^{-1}]) - (0,259 \pm 0,038), r = 0,9891 \quad (11)$$

$$\log(I_p [\mu\text{A}]) = (0,444 \pm 0,014) \log(v [\text{mV s}^{-1}]) - (0,452 \pm 0,023), r = 0,9962 \quad (12)$$



Obrázek 29: Závislosti I_p na v (a-c) I_p na $v^{1/2}$ (d-f) a $\log(I_p)$ na $\log(v)$ (g-i) pro MFZ, FPX a MCZ

(základní elektrolyt – BR pufr (pH 9) s 33 % ACN, $c_{\text{MFZ}} = 12,74 \mu\text{mol L}^{-1}$, $c_{\text{FPX}} = 74,06 \mu\text{mol L}^{-1}$, $c_{\text{MCZ}} = 66,29 \mu\text{mol L}^{-1}$; pro MFZ a FPX: $E_{\text{in}} = E_{\text{fin}} = +600 \text{ mV}$, $E_{\text{lower vertex}} = +500 \text{ mV}$, $E_{\text{upper vertex}} = +2200 \text{ mV}$; pro MCZ: $E_{\text{in}} = E_{\text{fin}} = 0 \text{ mV}$, $E_{\text{lower vertex}} = -500 \text{ mV}$, $E_{\text{upper vertex}} = +2300 \text{ mV}$; $v = 10\text{-}100 \text{ mV s}^{-1}$)

3.3.4 Pravděpodobné produkty elektrooxidace MFZ a FPX

Pro lepší představu o elektrochemickém oxidačním procesu MFZ bylo vypočteno rozložení HOMO orbitalů (schéma 12b) a oxidační produkty byly analyzovány pomocí LC-MS. Vedle píku s m/z 398 odpovídajícího protonovanému výchozímu MFZ byly detekovány ionty s m/z 288, 304 a 315 (obrázek 30). Izotopový vzorec iontu 315 ukázal přítomnost atomu chloru v molekule, zatímco u 288 a 304 nikoli. Možné struktury těchto iontů nebo jejich izomerů jsou znázorněny na schématu 12a. Přítomnost těchto iontů naznačuje nejméně dvě nezávislé oxidační cesty: 1) zahrnující štěpení vazby C-C vedle alkoholové skupiny a její oxidaci na keto-skupinu a 2) oxidaci aromatického kruhu a rozpad éterové skupiny. Nelze však vyloučit ani další a následné degradační cesty.

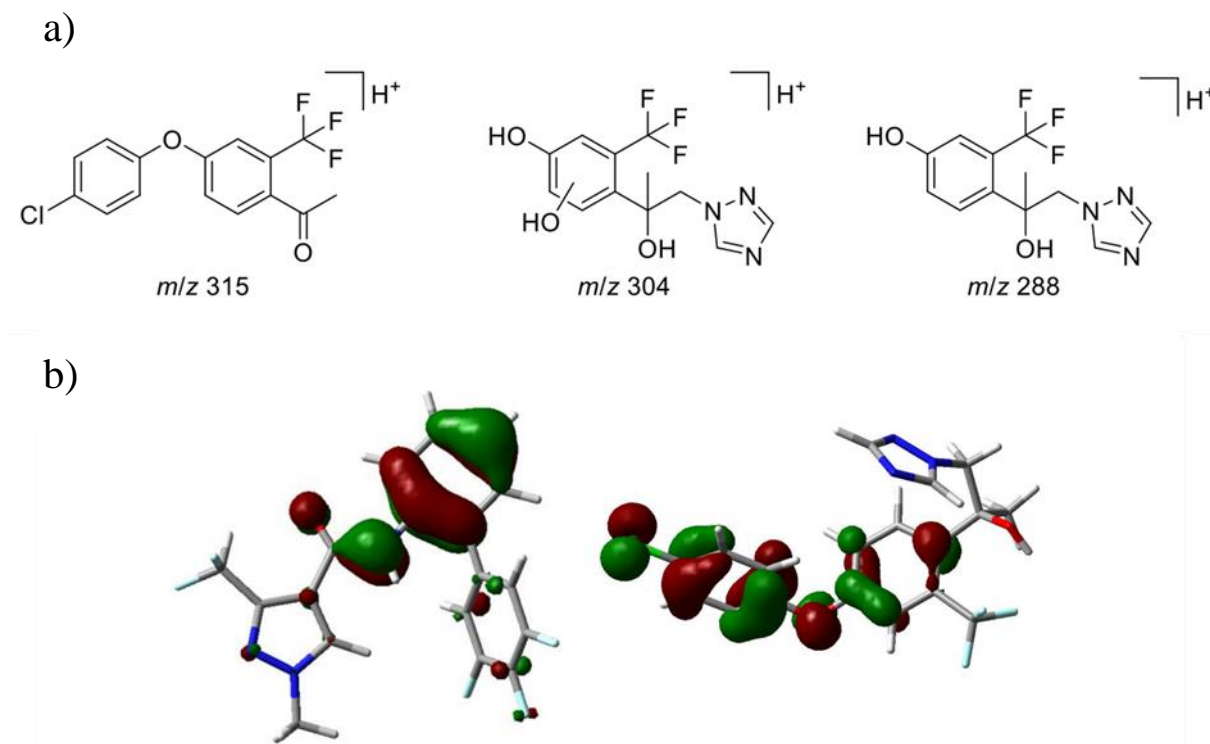
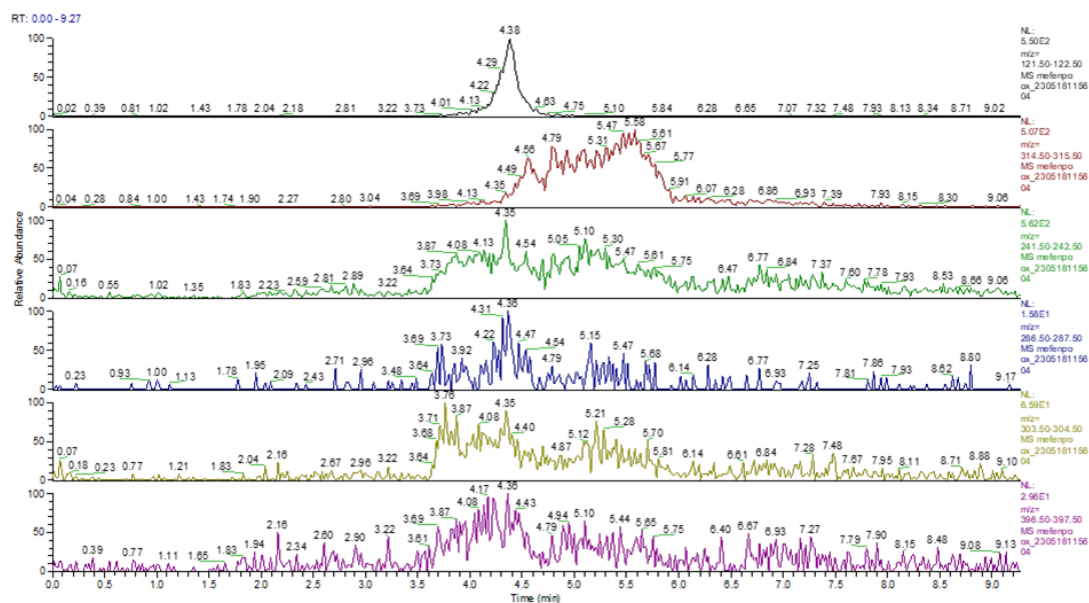


Schéma 12: Možné struktury produktů vzniklých elektrochemickou oxidací MFZ (a) a lokalizace HOMO orbitalů FPX (vlevo) a MFZ (vpravo) vypočtené pomocí B3LYP/6-31+G (d, p)(b)

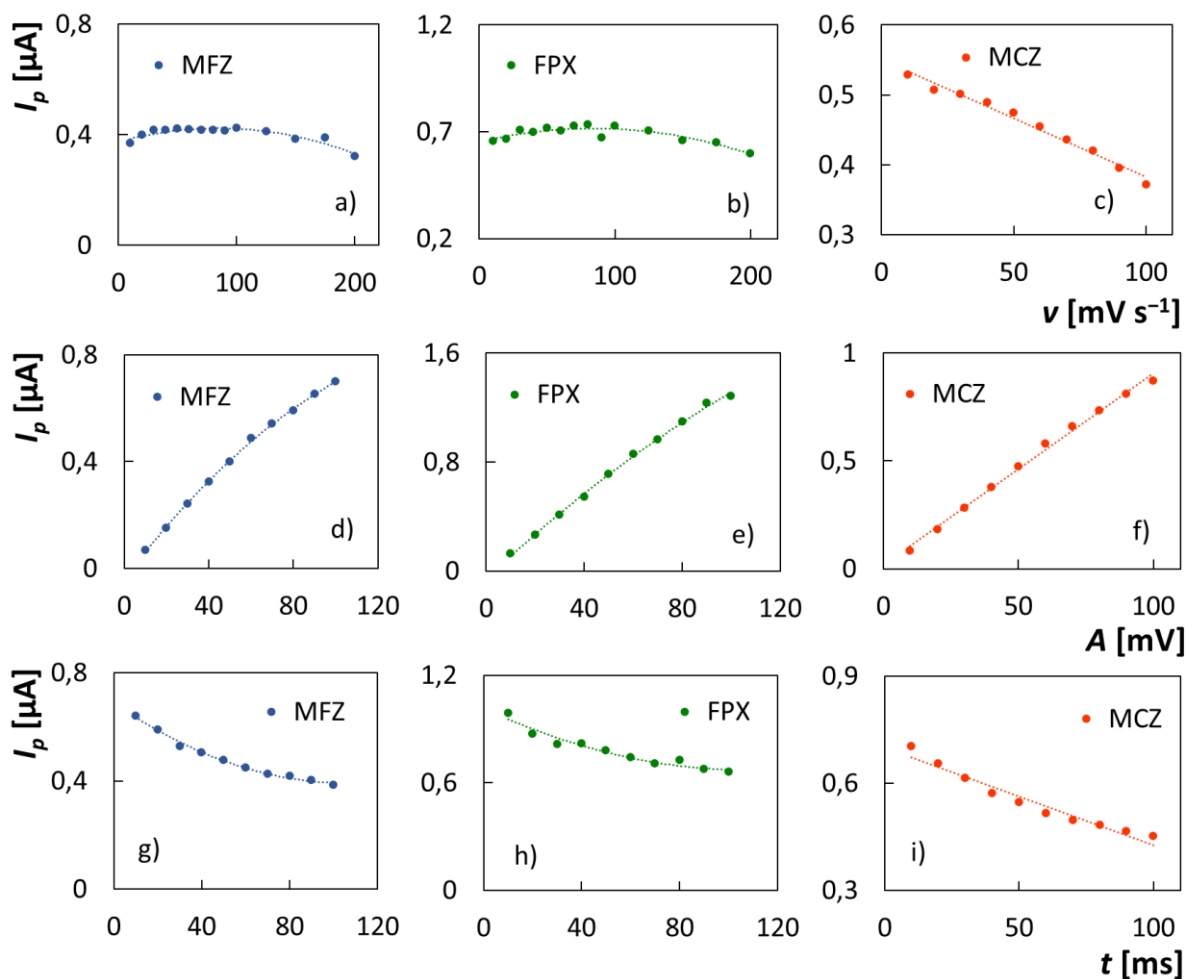
Jako místo první jednoelektronové oxidace FPX lze navrhnout sekundární amidickou skupinu [130]. Konkrétně se jedná o sloučeninu obsahující acetanilidovou část [131]. Proto lze očekávat analogickou reaktivitu, tedy dimerizace či hydroxylace. To naznačuje i vypočtená lokalizace HOMO orbitalu, který je distribuován v této části molekuly (Schéma 12b). Reakční mechanismus MCZ zatím nebyl studován.



Obrázek 30: Chromatogramy LC-MS pro vybrané ionty reakční směsi získané elektrooxidací MFZ (HESI v pozitivním režimu)

3.3.5 Optimalizace parametrů voltametrického stanovení MFZ, FPX a MCZ metodou DPV

Pro úspěšnou DPV analýzu je potřeba nalézt optimální parametry, které by vyhovovaly citlivému stanovení konkrétní látky. Za tímto účelem byly provedeny pro všechny zájmové analyty experimenty optimalizace DPV parametrů, a to pro v v rozsahu od 10 do 200 mV s^{-1} (do 100 mV s^{-1} pro MCZ), pro A v rozsahu od +10 do +100 mV a pro t v rozsahu od 10 do 100 ms. Z naměřených voltamogramů byly vyneseny závislosti, uvedené na obrázku 31. Po jejich vyhodnocení byly vybrány optimální hodnoty testovaných parametrů, které byly stejné pro všechny analyty, a to $A = +50 \text{ mV}$, $t = 80 \text{ ms}$ a $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$.



Obrázek 31: Závislosti I_p na testovaných DPV parametrech – v (a-c), A (d-f) a t (g-i)

(základní elektrolyt – BR pufr (pH 9) s 33 % ACN, $c_{MFZ} = 12,74 \mu\text{mol L}^{-1}$, $c_{FPX} = 74,06 \mu\text{mol L}^{-1}$, $c_{MCZ} = 66,29 \mu\text{mol L}^{-1}$, $E_{in} = +500 \text{ mV}$, $E_{fin} = +2200 \text{ mV}$ pro MFZ a FPX a $+2300 \text{ mV}$ pro MCZ, $v = 10\text{-}200 \text{ mV s}^{-1}$ (a,b), $10\text{-}100 \text{ mV s}^{-1}$ (c) a 40 mV s^{-1} (d-i), $A = +10\text{-}100 \text{ mV}$ (d-f) a $+50 \text{ mV}$ (a-c, g-i), $t = 10\text{-}100 \text{ ms}$ (g-i) a 80 ms (a-f))

3.3.6 Kvantitativní stanovení MFZ, FPX a MCZ v modelových roztocích

Další experimenty byly zaměřeny na kvantitativní analýzu studovaných analytů ve zvoleném základním elektrolytu při optimalizovaných parametrech DPV.

Pro MFZ byla získána závislost I_p na c_{MFZ} v rozmezí od $0,051$ do $12,75 \mu\text{mol L}^{-1}$, která je uvedena na obrázku 32a. Je zde vidět, že v celém rozsahu je závislost lineární a lze ji popsat rovnicí 13. Jako příklad jsou na obrázku 33a uvedeny anodické křivky MFZ naměřené v užším rozsahu koncentrací, a to od $0,0679$ do $6,79 \mu\text{mol L}^{-1}$. Vypočtené hodnoty LOD a LOQ byly $10,81$ a $36,04 \text{ nmol L}^{-1}$, a to pro koncentrační rozsah MFZ od $0,051$ do $2,55 \mu\text{mol L}^{-1}$.

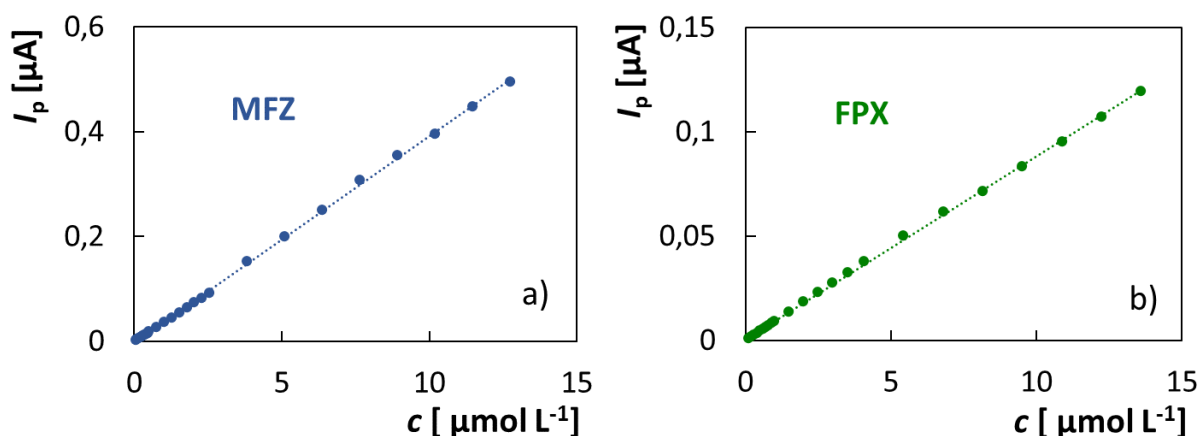
Pro FPX byly analyzovány koncentrace v rozsahu 0,1-13,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Z obrázku 32b je vidět, že závislost I_p na c_{FPX} je lineární a lze ji popsat rovnicí 14. Pro koncentrační rozsah 0,1-4,08 $\mu\text{mol L}^{-1}$ byly vypočteny hodnoty $\text{LOD} = 13,98 \text{ nmol L}^{-1}$ a $\text{LOQ} = 46,61 \text{ nmol L}^{-1}$. Na obrázku 33b je příklad anodických křivek FPX naměřených v koncentračním rozsahu od 0,136 do 13,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Při testování kvantitativní analýzy MCZ v rozsahu koncentrací od 0,44 do 44,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ byly naměřeny anodické křivky uvedené na obrázku 33c. Hodnoty proudu MCZ se zvyšovaly lineárně se zvyšující se koncentrací, což potvrzuje závislost uvedená na obrázku 33c a rovnice 15. Pro koncentrační rozsah od 0,44 do 4,41 $\mu\text{mol L}^{-1}$ byly vypočteny hodnoty $\text{LOD} = 32 \text{ nmol L}^{-1}$ a $\text{LOQ} = 107 \text{ nmol L}^{-1}$.

$$I_p [\mu\text{A}] = (0,03941 \pm 0,00018)(c [\mu\text{mol L}^{-1}]) - (0,00289 \pm 0,00090), r = 0,9998 \quad (13)$$

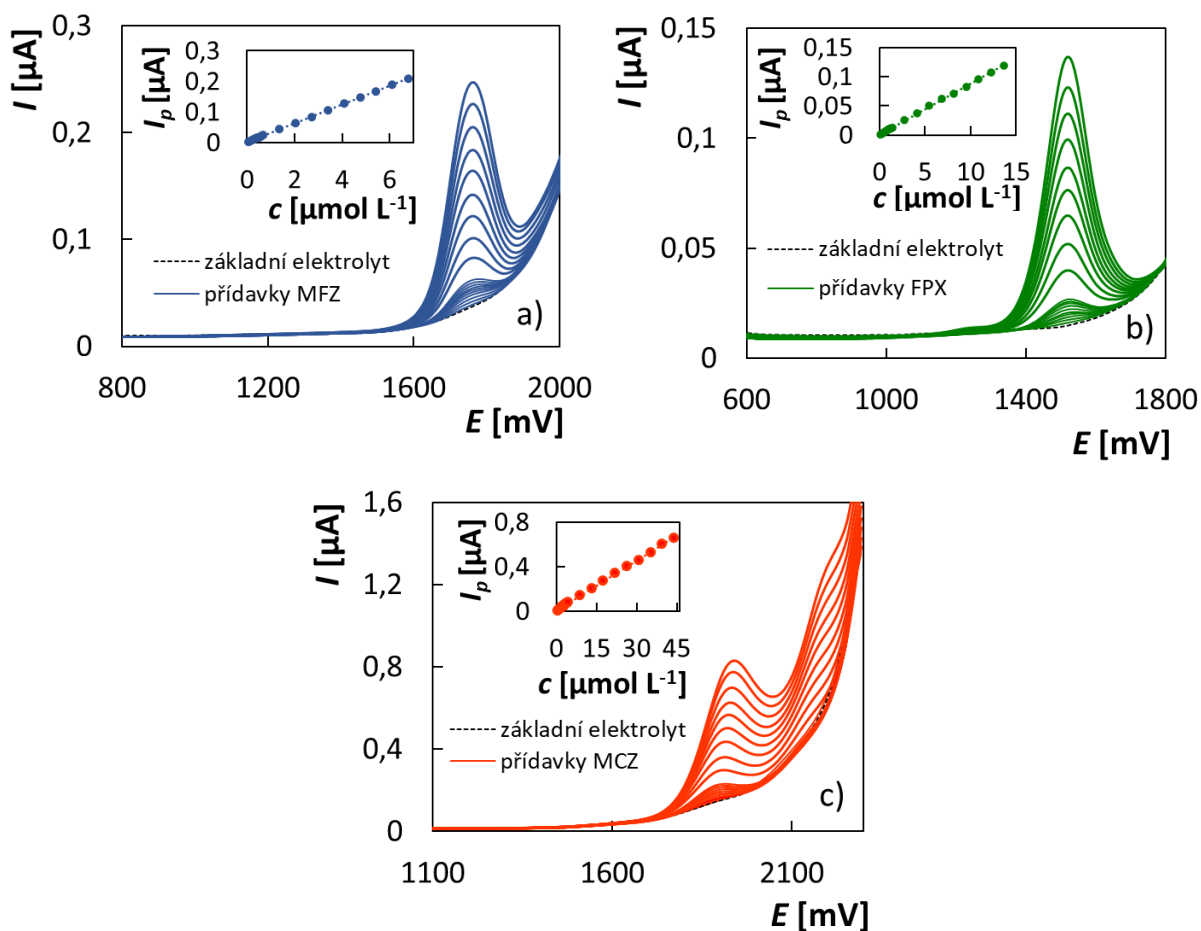
$$I_p [\mu\text{A}] = (0,008769 \pm 0,000042)(c [\mu\text{mol L}^{-1}]) + (0,00053 \pm 0,00024), r = 0,9998 \quad (14)$$

$$I_p [\mu\text{A}] = (0,014817 \pm 0,000084)(c [\mu\text{mol L}^{-1}]) + (0,0084 \pm 0,0017), r = 0,9997 \quad (15)$$



Obrázek 32: Závislosti I_p na c_{MFZ} (a) a I_p na c_{FPX} (b)

(základní elektrolyt – BR pufr (pH 9) s 33 % ACN, $c_{\text{MFZ}} = 0,051\text{-}12,75 \mu\text{mol L}^{-1}$, $c_{\text{FPX}} = 0,1\text{-}13,6 \mu\text{mol L}^{-1}$, $E_{\text{in}} = +500 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = +2200 \text{ mV}$, $A = +50 \text{ mV}$, $t = 80 \text{ ms}$, $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$)



Obrázek 33: DP voltamogramy koncentračních závislosti MFZ (a), FPX (b) a MCZ (c) a závislosti I_p na c_{MFZ} (a), I_p na c_{FPX} (b), a I_p na c_{MCZ} (c)

(základní elektrolyt – BR pufr (pH 9) s 33 % ACN, $c_{\text{MFZ}} = 0,0679\text{--}6,79 \mu\text{mol L}^{-1}$, $c_{\text{FPX}} = 0,136\text{--}13,6 \mu\text{mol L}^{-1}$, $c_{\text{MCZ}} = 0,44\text{--}44,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, $E_{\text{in}} = +500 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = +2200 \text{ mV}$ pro MFZ a FPX a $+2300 \text{ mV}$ pro MCZ, $A = +50 \text{ mV}$, $t = 80 \text{ ms}$, $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$)

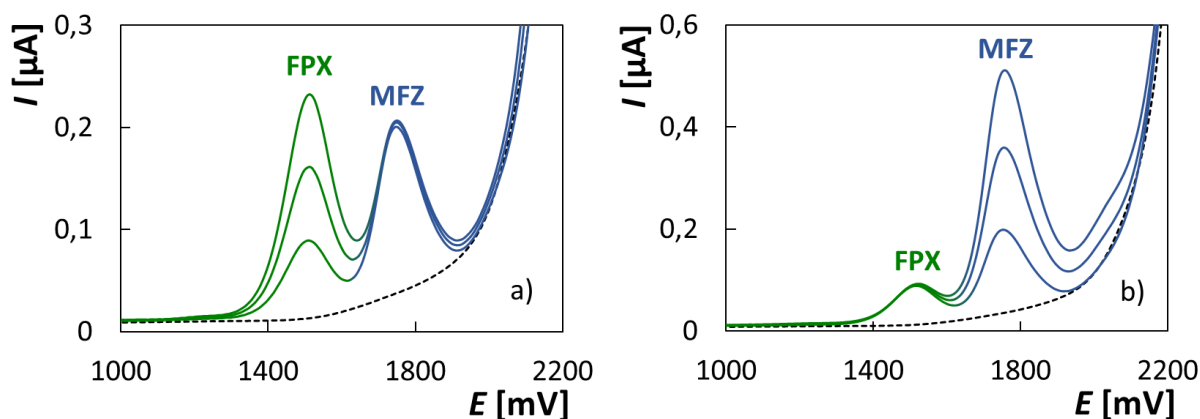
Za účelem ověření spolehlivosti a přesnosti navrhovaných metod byly provedeny opakovatelné stanovení různých koncentrací MFZ, FPX a MCZ. Kvantitativní stanovení se prováděly metodou standardního přírůvku a byly opakovány pětkrát pro každou testovanou koncentrací, které jsou spolu s výsledky uvedeny v tabulce 11. Z prezentovaných údajů je vidět, že navrhované metody stanovení studovaných fungicidů poskytují spolehlivé a opakovatelné výsledky ($\text{RSD} \leq 4,15 \%$) v celém rozsahu testovaných koncentrací.

Tabulka 11: Výsledky stanovení různých koncentrací MFZ, FPX a MCZ

Analyt	Přidáno [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	Stanoveno [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	Výtěžnost [%]	RSD (n = 5) [%]
MFZ	1,275	1,266±0,038	95,6-102,3	3,02
	0,255	0,248±0,009	93,7-102,7	3,78
	0,051	0,050±0,002	94,1-103,9	4,15
FPX	0,501	0,498±0,020	95,4-105,8	4,06
	0,100	0,102±0,003	99,2-106,2	2,73
MCZ	4,41	4,27±0,10	94,3-100,2	2,38
	0,44	0,45±0,02	96,6-105,9	3,82

3.3.7 Voltametrická analýza MFZ, FPX a MCZ v modelových směsích

Jelikož studované analyty jsou hlavními složky několika směsných fungicidních přípravků, bylo zapotřebí před samotnou analýzou těchto reálných vzorků provést analýzu směsných modelových vzorku obsahujících tyto látky, za účelem zjištění jejich chování ve směsi. Celkem bylo analyzováno deset modelových směsí zejména pět směsí s různými koncentračními poměry MFZ a FPX a pět směsí s různými koncentračními poměry FPX a MCZ. V případě analýzy směsí obsahujících MFZ a FPX velkou výhodou bylo to, že píky analytů se nacházely při různých potenciálech, což umožňovalo jejich současné stanovení. Konkrétně leží maxima FPX u +1527 mV a pro MFZ u +1769 mV. Jako příklad, na obrázku 34 je znázorněno stanovení FPX (a) a MFZ (b) ve směsi s koncentračním poměrem $c_{\text{FPX}}:c_{\text{MFZ}} = 0,98:1$. Bylo pozorováno, že přítomnost jedné látky neovlivňuje výšku, polohu ani tvar píku signálu druhé látky, což platí i pro trojnásobný přebytek, jak lze usoudit z hodnot uvedených v tabulce 12. Na základě prezentovaných výsledků lze konstatovat, že navrhovaná metoda poskytuje dostatečně přesné, správné a opakovatelné výsledky ($\text{RSD} \leq 3,67 \%$).



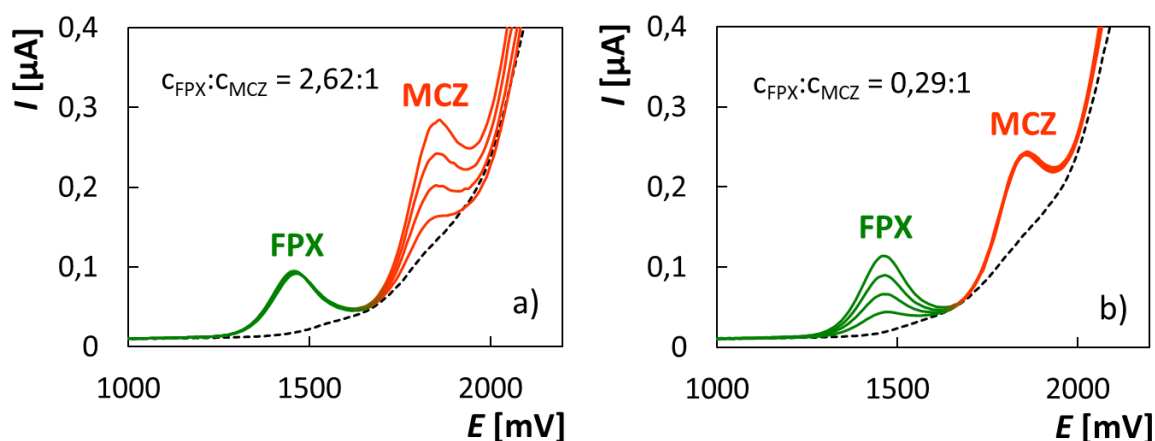
Obrázek 34: DP voltamogramy FPX a MFZ získané při analýze modelové směsi s poměrem $c_{\text{FPX}}:c_{\text{MFZ}} = 0,98:1$

(základní elektrolyt ($V = 15 \text{ mL}$) – BR pufr (pH 9) s 33 % ACN, $c_{\text{MFZ}} = 6,41 \mu\text{mol L}^{-1}$, $c_{\text{FPX}} = 6,27 \mu\text{mol L}^{-1}$; a) standardní přídavky FPX: $V = 25 \mu\text{L}$, $c = 4 \text{ mmol L}^{-1}$, b) standardní přídavky MFZ: $V = 30 \mu\text{L}$, $c = 3,2 \text{ mmol L}^{-1}$; $E_{\text{in}} = +500 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = +2200 \text{ mV}$, $A = +50 \text{ mV}$, $t = 80 \text{ ms}$, $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$)

Tabulka 12: Výsledky analýz modelových směsí FPX a MFZ

$c_{\text{FPX}}:c_{\text{MFZ}}$	Analyt	Přidáno [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	Stanoveno [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	Výtěžnost [%]	RSD ($n = 5$) [%]
0,98:1	FPX	6,27	6,48±0,21	100,0-106,7	3,25
	MFZ	6,41	6,54±0,18	99,6-104,7	2,52
1,96:1	FPX	12,54	12,72±0,45	97,3-104,2	3,59
	MFZ	6,41	6,41±0,08	98,4-100,8	1,26
0,53:1	FPX	5,01	5,14±0,05	101,6-103,7	1,06
	MFZ	9,53	9,84±0,35	97,9-105,3	3,67
3,18:1	FPX	7,50	7,42±0,24	95,5-101,4	3,14
	MFZ	2,36	2,24±0,08	91,5-96,8	3,23
0,35:1	FPX	2,49	2,54±0,03	101,1-103,2	1,19
	MFZ	7,14	7,39±0,13	102,1-105,3	1,53

Dále byly analyzovány modelové směsi obsahující FPX a MCZ. Píky těchto látek se rovněž nacházely v dostatečné vzdálenosti, což je nutný předpoklad pro jejich současnou analýzu. Maxima píků FPX byla u +1467 mV a MCZ u +1860 mV. Následující experimenty ukázaly, že správné výsledky byly dosahovány nejen pro srovnatelné koncentrace, ale i pro malý nadbytek jedné, či druhé složky. Na obrázku 35 jsou křivky anodické oxidace směsi o poměru $c_{\text{FPX}}:c_{\text{MCZ}} = 2,62:1$ a $0,29:1$. Tabulka 13 pak přináší výsledky analýz jednotlivých látek u pěti modelových směsí. Z těchto údajů lze soudit, že navrhovaná metoda umožňuje spolehlivou analýzu studovaných fungicidů FPX a MCZ ($\text{RSD} \leq 4,84 \%$).



Obrázek 35: DP voltamogramy FPX a MCZ získané při analýze modelové směsi s poměrem $c_{\text{FPX}}:c_{\text{MCZ}} = 2,62:1$ (a) a $c_{\text{FPX}}:c_{\text{MCZ}} = 0,29:1$ (b)

(základní elektrolyt ($V = 15 \text{ mL}$) – BR pufr (pH 9) s 33 % ACN, $c_{\text{FPX}} = 7,19 \mu\text{mol L}^{-1}$ (a) a $2,39 \mu\text{mol L}^{-1}$ (b), $c_{\text{MCZ}} = 2,74 \mu\text{mol L}^{-1}$ (a) a $8,22 \mu\text{mol L}^{-1}$ (b); a) standardní přídavky MCZ: $V = 10 \mu\text{L}$, $c = 4 \text{ mmol L}^{-1}$, b) standardní přídavky FPX: $V = 10 \mu\text{L}$, $c = 3,6 \text{ mmol L}^{-1}$; $E_{\text{in}} = +500 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = +2200 \text{ mV}$, $A = +50 \text{ mV}$, $t = 80 \text{ ms}$, $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$)

Tabulka 13: Výsledky analýz modelových směsí FPX a MCZ

$C_{\text{FPX}}:C_{\text{MCZ}}$	Přidáno [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	Stanoveno [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	Výtěžnost [%]	RSD ($n = 5$) [%]	
0,88:1	FPX	4,80	4,73±0,10	96,3-100,2	2,05
	MCZ	5,47	5,67±0,25	98,9-107,9	4,34
1,74:1	FPX	7,19	7,29±0,17	99,2-103,9	2,35
	MCZ	4,13	4,13±0,11	97,1-102,2	2,62
0,44:1	FPX	3,59	3,65±0,15	96,9-103,6	4,05
	MCZ	8,22	8,30±0,19	98,5-103,9	2,34
2,62:1	FPX	7,19	7,11±0,34	95,3-104,3	4,84
	MCZ	2,74	2,82±0,07	100,7-105,5	2,36
0,29:1	FPX	2,39	2,51±0,02	104,2-105,4	0,69
	MCZ	8,22	7,95±0,33	97,0-104,3	3,95

3.3.8 Interferenční studie MFZ, FPX a MCZ

V reálné matrici se mohou vyskytovat spolu se studovanými analyty i jiné fungicidy. Rušivý vliv vybraných látek na stanovení MFZ, FPX a MCZ byl zkoumán v rámci interferenční studie. Celkem bylo testováno devět běžně používaných fungicidů, jejichž názvy jsou uvedeny v tabulce 14, a to ve třech koncentračních poměrech, zejména 1:10, 1:1 a 10:1. Vliv těchto interferentů byl definován jako změna proudové odezvy analytu před a po přidavku příslušného interferentu v %. Z výsledků, uvedených rovněž v tabulce 14 lze usoudit, že pokud se koncentrační poměr rovná 1:10 a 1:1, většina interferentů ovlivňuje stanovení jen nepatrně a chyba nepřevyšuje doporučenou hodnotu 5 %. Dokonce i při desetinásobném nadbytku chyba stanovení byla menší než 5 % a to během zkoumání vlivu clopyralidu a glyphosatu pro všechny analyty, penconazolu pro FPX a bentazonu pro MCZ. Ve většině případů však při velkém nadbytku, zejména $C_{\text{inf}}:C_{\text{analytu}} = 10:1$, chyba stanovení přesahovala hodnotu 10 %. Tak například, největší vliv na stanovení FPX měl bentazon. V případě MFZ, interferenční vliv byl často způsoben tím, že píky obou látek se nacházely velmi blízko sebe, a tak se vzájemně překrývaly, jako v případě cyproconazolu, triclopyru a epoxiconazolu. Pro MCZ největšími interferenty byly triticonazol a penconazol které ovlivňovaly stanovení MCZ již při koncentračním poměru 1:1, chyba stanovení byla -35,21 % a -30,72 % resp. Je potřeba také uvést, že pokud byl studován rušivý vliv MFZ anebo FPX při velkém nadbytku, a to 10:1, byla pozorována značná chyba stanovení. Avšak zatím není známý žádný komerční přípravek, ve

kterém by tyto látky byly v tak velkém nadbytku. Stejně jako je nepravděpodobné, že by takový přebytek byl v reálných matricích.

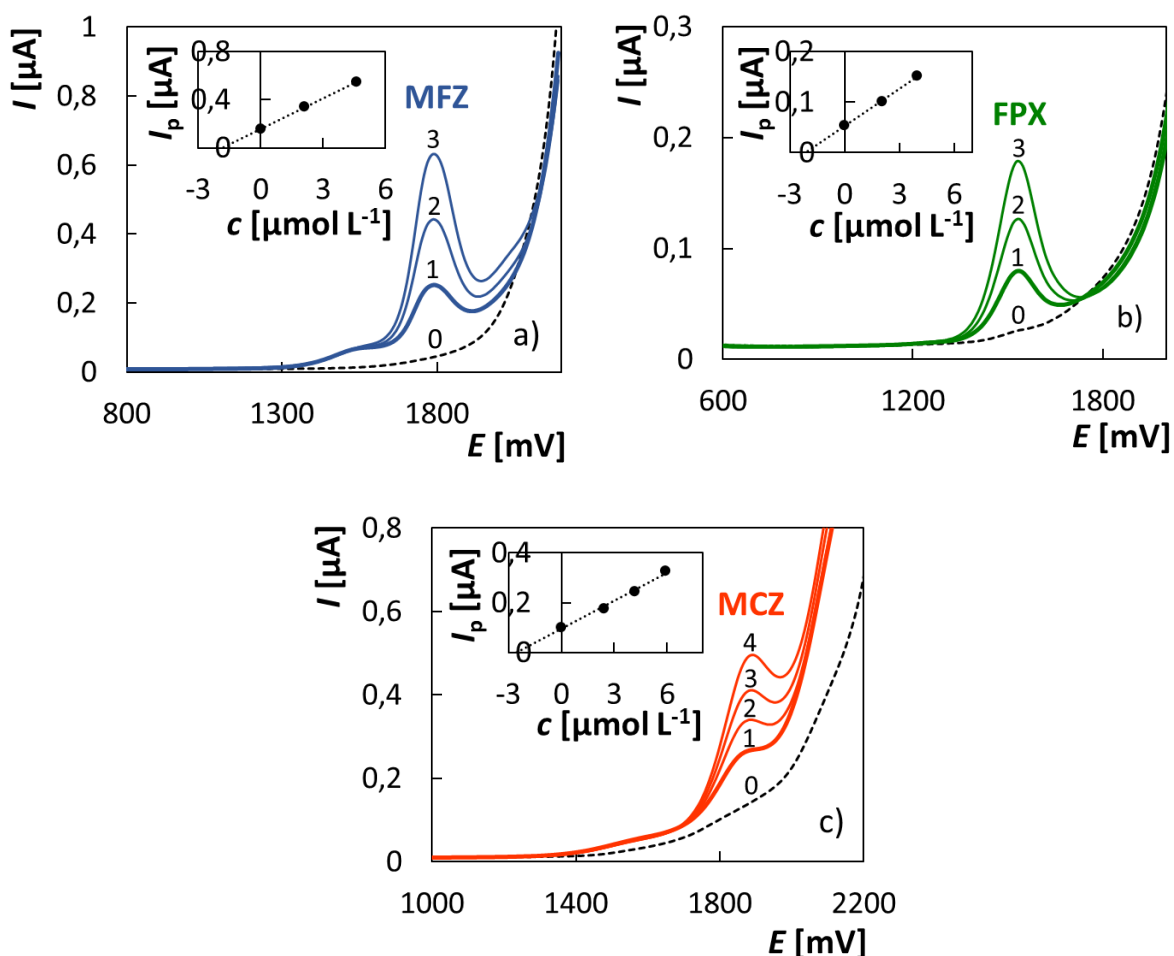
Tabulka 14: Výsledky interferenční studie pro MFZ, FPX a MCZ

Interferent	Vliv na $I_{p(MFZ)}$ (%)			Vliv na $I_{p(FPX)}$ (%)			Vliv na $I_{p(MCZ)}$ (%)		
	$C_{inf} : C_{MFZ} / C_{FPX}$	1:10	1:1	10:1	1:10	1:1	10:1	1:10	1:1
Picloram	+0,47	+0,22	-14,13	-1,83	-1,18	-10,67	+2,21	-3,18	-52,41
Clopyralid	+2,35	+1,04	+1,77	-0,39	-0,15	+1,25	+2,85	-4,98	-0,76
Glyphosate	+3,31	-0,36	+4,39	+2,89	+4,82	+3,16	+4,98	+4,72	+4,66
Triclopyr	-0,97	-2,6	-34,09	+4,41	+1,01	-11,23	-	-	-
Triticonazol	-	-	-	-	-	-	+0,73	-35,21	-
Epoxiconazol	+0,65	-3,84	-23,02	+1,32	+3,27	+12,97	-	-	-
Penconazol	+3,94	+3,95	-12,48	+3,40	+2,86	-0,72	+0,46	-30,72	-95,22
Cyproconazol	+1,94	-5,34	-31,60	+1,81	+8,81	+20,07	-	-	-
Bentazon	+0,91	+1,11	+23,54	+4,52	+30,99	+141,31	+1,17	+0,53	+3,80
Fluxapyroxad	-0,26	-4,83	-44,21	-	-	-	+2,31	-2,38	-32,49
Mefentrifluconazol	-	-	-	-1,02	+3,53	+31,01	-	-	-

3.3.9. Stanovení MFZ, FPX a MCZ v komerčně dostupných přípravcích

S využitím poznatků, získaných během analýz modelových směsí, byla další práce zaměřena na analýzu reálných fungicidních přípravků. Celkem bylo analyzováno šest komerčně dostupných preparátů, a to Revysol, obsahující 75 g L^{-1} MFZ, Sercadis, obsahující 300 g L^{-1} FPX, Caramba, obsahující 60 g L^{-1} MCZ, Revytrex, obsahující $66,7 \text{ g L}^{-1}$ MFZ a $66,7 \text{ g L}^{-1}$ FPX, Revystar XL, obsahující 100 g L^{-1} MFZ a 50 g L^{-1} FPX a Librax, obsahující 42 g L^{-1} MCZ a $62,5 \text{ g L}^{-1}$ FPX. Analýza každého přípravku byla opakována třikrát s použitím metody standardního přídatku. Jako první byly analyzovány vzorky, obsahující pouze jednu látku. Záznamy těchto analýz jsou uvedeny na obrázku 36. V případě analýzy Revysolu lze z obrázku 36a soudit, že kromě čistého MFZ, je zde patrně přítomna nějaká příměs, projevující se malým píkem před křivkou MFZ. Přes tuto skutečnost se podařilo najít vhodný způsob vyhodnocování získaných křivek a spolehlivě stanovit obsah MFZ. Během stanovení FPX v přípravku Sercadis, žádný rušivý vliv nebyl pozorován (viz. obrázek 36b). V případě analýzy Caramby byla

zaznamenána kromě píku MCZ přítomnost další látky, jak je patrné z obrázku 36c, na stanovení zájmového analytu to však nemělo žádný vliv. Stanovené množství všech analytů odpovídalo deklarovaným hodnotám uváděných výrobcem, jak dokumentuje tabulka 15.



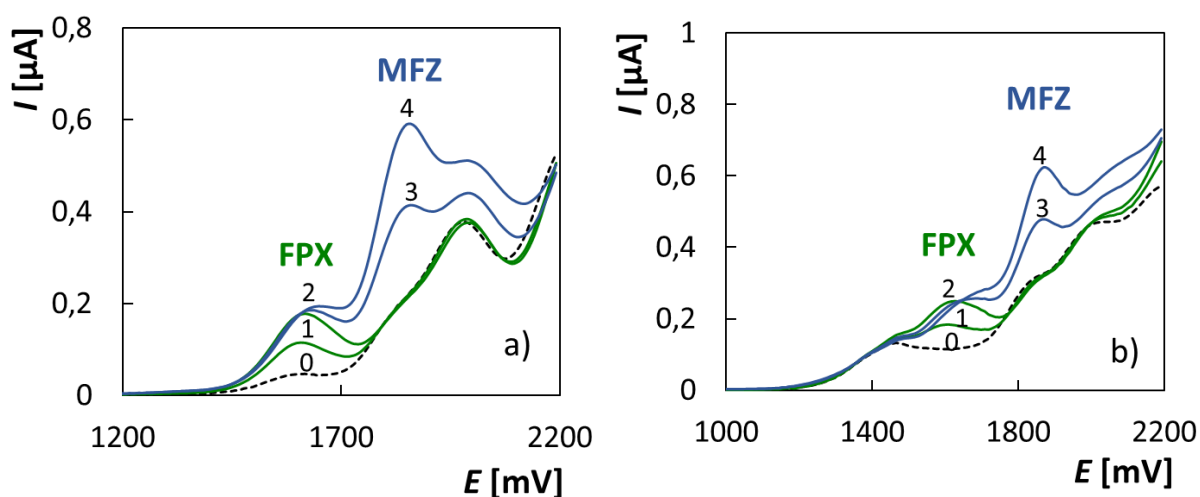
Obrázek 36: DP voltamogramy přípravků Revysol (a), Sercadis (b) a Caramba (c) spolu s ukázkou vyhodnocení analytů metodou standardního přídavku

(základní elektrolyt ($V = 15 \text{ mL}$) – BR pufr (pH 9) s 33 % ACN, $E_{\text{in}} = +500 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = +2200 \text{ mV}$, $A = +50 \text{ mV}$, $t = 80 \text{ ms}$, $\nu = 40 \text{ mV s}^{-1}$) křivky: 0 – základní elektrolyt, 1 – přídavek komerčního přípravku ($V_{\text{Revysol}} = 10 \mu\text{L}$, $V_{\text{Sercadis}} = 20 \mu\text{L}$, $V_{\text{Caramba}} = 30 \mu\text{L}$), 2, 3 resp. 4 – standardní přídavky analytu: ($V_{\text{MFZ}} = 30 \mu\text{L}$, $V_{\text{FPX}} = 20 \mu\text{L}$, $V_{\text{MCZ}} = 20 \mu\text{L}$), $c = 4 \text{ mmol L}^{-1}$)

Analýzy Revytrexu, Revystaru XL a Libraxu byly komplikovanější z důvodu složitější matrice. Obsahovaly pravděpodobně nějaké další příměsi, což ovlivňovalo záznam při oxidaci vzorku viz. obrázky 37 a 38. Díky zkušenostem z předešlých experimentů se ve většině případů

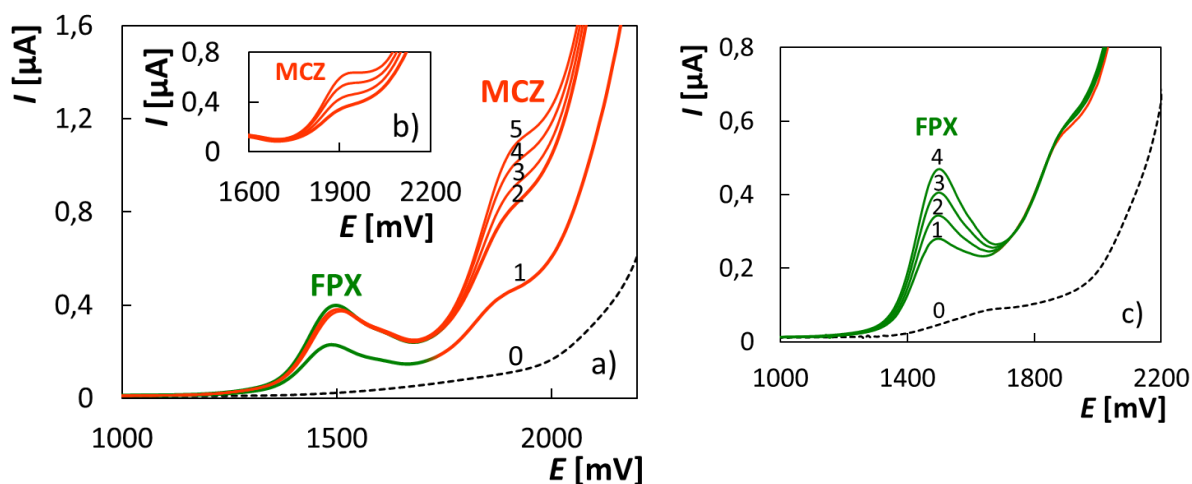
pořadí píky MFZ, FPX a MCZ spolehlivě vyhodnotit, a tak dosáhnout věrohodných výsledků, které přináší tabulka 15. Jediný problém nastal při stanovení FPX v Libraxu. Z obrázku 38 je vidět, že pík FPX je ovlivňován další látkou, což způsobuje velkou pozitivní chybu, viz. tabulka. Tato skutečnost byla potvrzena nezávislou analýzou pomocí HPLC/DAD. Bylo zjištěno, že kromě dvou hlavních složek (MCZ a FPX) se na chromatogramu vyskytují další dva píky viz obrázek 39. Navíc chromatografická analýza FPX v Libraxu stanovila nižší hodnotu, než byla deklarovaná výrobcem, takže by se mohlo jednat o jeho rozkladné produkty.

Všechny výše uvedené přípravky byly rovněž analyzovány nezávislou metodou HPLC/DAD. Získané výsledky jsou shrnuty v tabulce 15. Je zde vidět, že hodnoty zjištěné pomocí nově vyvinutých voltametrických metod se až na jednu výjimku (FPX v Libraxu) shodují s těmi, které zjistila srovnávací metoda HPLC/DAD. Navíc byly potvrzeny deklarované obsahy studovaných fungicidů v komerčních přípravcích. Závěrem lze konstatovat, že navržená metoda poskytuje spolehlivé a opakovatelné výsledky při analýze reálných vzorků.



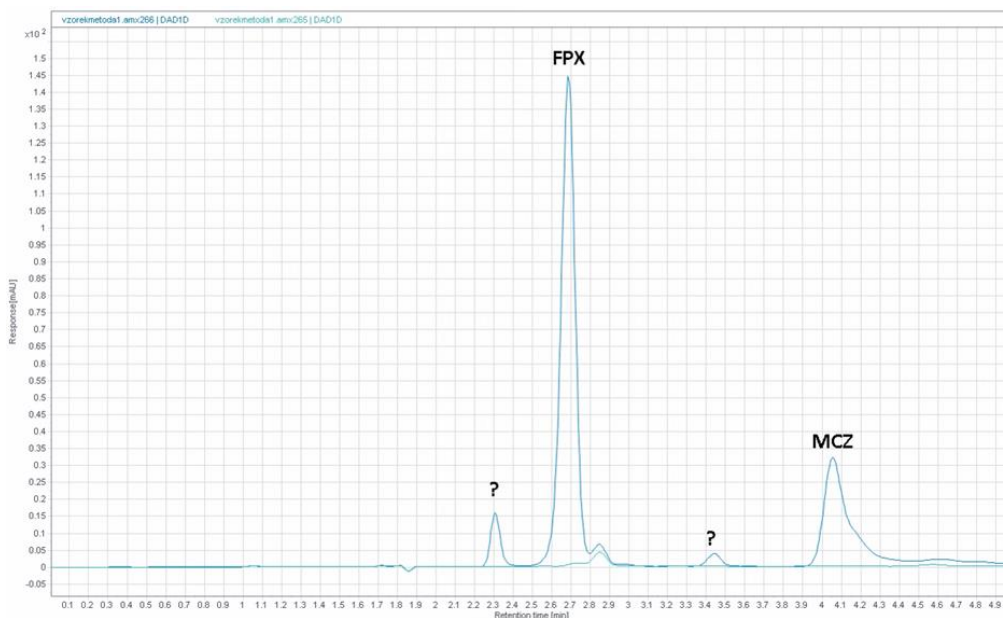
Obrázek 37: DP voltamogramy přípravků Revytrexu (a) a Revystaru XL (b)

(základní elektrolyt ($V = 15 \text{ mL}$) – BR pufr (pH 9) s 33 % ACN, $E_{\text{in}} = +500 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = +2200 \text{ mV}$, $A = +50 \text{ mV}$, $t = 80 \text{ ms}$, $\nu = 40 \text{ mV s}^{-1}$) křivky po odečtu základního elektrolytu: 0 – přídavek Revytrexu (a) ($V = 30 \mu\text{L}$), resp. Revystaru XL (b) ($V = 30 \mu\text{L}$); 1,2 – standardní přídavek FPX: $V = 30 \mu\text{L}$, $c = 3,8 \text{ mmol L}^{-1}$; 3,4 – standardní přídavek MFZ: $V = 30 \mu\text{L}$, $c = 3,7 \text{ mmol L}^{-1}$)



Obrázek 38: DP voltamogram přípravku Librax (a), anodické křivky MCZ získané po odečtu křivky 1 (b), anodické křivky FPX přípravku Librax (c)

(základní elektrolyt ($V = 15 \text{ mL}$) – BR pufr (pH 9) s 33 % ACN, $E_{in} = +500 \text{ mV}$, $E_{fin} = +2200 \text{ mV}$, $A = +50 \text{ mV}$, $t = 80 \text{ ms}$, $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$) a): křivky: 0 – základní elektrolyt, 1,2 – přídavky Libraxu ($V = 30 \text{ μL}$), 3–5 – standardní přídavky MCZ: $V = 30 \text{ μL}$, $c = 4 \text{ mmol L}^{-1}$; c): křivky: 0 – základní elektrolyt, 1 – přídavek Libraxu ($V = 30 \text{ μL}$), 2–4 – standardní přídavky FPX: $V = 30 \text{ μL}$, $c = 4 \text{ mmol L}^{-1}$)



Obrázek 39: Chromatogram separace FPX a MCZ v komerčním přípravku Librax

(kolona C18 ($250 \times 4 \text{ mm}$, velikost částic 5 μm), $T = 25 \text{ °C}$, mobilní fáze - acetonitril/H₂O (80/20, v/v), injekční objem - 20 μl , průtok = 1 ml min^{-1} , vlnová délka detektoru DAD = 225 nm , $t_m(\text{FPX}) = 2,69 \text{ min}$, $t_m(\text{MCZ}) = 4,06 \text{ min}$)

Tabulka 15: Výsledky analýz MFZ, FPX a MCZ v komerčních přípravcích

Komerční přípravek	Metoda	Analyt	Deklarováno [g L ⁻¹]	Stanoveno [g L ⁻¹]	Výtěžnost [%]	RSD (n = 3) [%]
Revysol	DPV	MFZ	75	75,05±1,48	98,5-103,2	1,97
	HPLC/DAD			75,83±1,72	97,6-103,2	2,27
Sercadis	DPV	FPX	300	302,30±3,39	99,5-101,7	1,12
	HPLC/DAD			301,62±4,60	98,1-102,1	1,52
Caramba	DPV	MCZ	60	61,58±1,84	99,2-105,0	2,99
Revytrex	DPV	MFZ	66,7	66,67±3,44	96,5-105,6	5,16
		FPX		65,25±2,64	94,5-104,6	4,04
	HPLC/DAD	MFZ		66,90±2,65	95,4-104,8	3,95
		FPX		66,82±2,45	97,2-105,8	3,67
Revystar XL	DPV	MFZ	100	99,88±2,58	97,5-104,0	2,58
		FPX	50	50,8±2,26	97,1-106,0	4,44
	HPLC/DAD	MFZ	100	102,18±3,47	97,7-106,5	3,40
		FPX	50	50,61±1,53	98,5-105,6	3,02
LIBRAX	DPV	MCZ	45	43,79±2,03	94,2-101,6	4,63
		FPX	62,5	113,39±4,43	176,5-188,6	3,84
	HPLC/DAD	MCZ	45	45,18 ± 1,19	97,8-105,2	2,63
		FPX	62,5	54,95 ± 0,90	86,8-90,5	1,63

Závěr

V této disertační práci je podrobně popsán vývoj metod voltametrického stanovení šesti biologicky významných látek. Jedná se o PBZ, DMZ a jeho rozkladný produkt UDMH, které patří do skupiny regulátoru růstu rostlin, dále také MFZ, FPX a MCZ které jsou široce používanými fungicidy.

Pro stanovení výše uvedených látek byla používána elektrochemická metoda DPV, pracovní elektrodou byla BDDE.

Nejdříve bylo hledáno vhodné složení základního elektrolytu a hodnota pH. PBZ lze stanovovat v alkalickém roztoku $0,07 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH s 33 % ACN, což bylo doporučeno v rámci diplomové práce [8]. Pro DMZ a jeho rozkladný produkt UDMH byl jako základní elektrolyt vybrán čistý BR pufr o pH 9. Pro MFZ, FPX a MCZ byl zvolen BR pufr s 33 % ACN o pH 9. V uvedených základních elektrolytech poskytovaly studované látky dobře vyhodnotitelnou, citlivou a stabilní proudovou odezvu, která navíc lineárně odrážela stanovované množství.

Dále s využitím CV bylo zjištěno, že všechny studované analyty podléhají ireversibilní anodické oxidaci. Na základě studie závislosti proudové odezvy na rychlosti polarizace bylo nalezeno, že řídicím procesem elektrodové reakce DMZ a UDMH je kinetika a pro PBZ, MFZ, FPX a MCZ se jedná o difuzi s vlivem kinetiky. Pozornost byla také zaměřena na studium reakčního mechanismu v průběhu oxidace všech látek s výjimkou MCZ.

Během kvantitativních analýz zájmových látek byly vypočteny hodnoty LOD a LOQ, které byly $0,083$ a $0,277 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ pro PBZ, $0,44$ a $1,46 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ pro DMZ, $0,063$ a $0,209 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ pro UDMH, $10,81$ a $36,04 \text{ nmol L}^{-1}$ pro MFZ, $13,98$ a $46,61 \text{ nmol L}^{-1}$ pro FPX a 32 a 107 nmol L^{-1} pro MCZ. Pro ověření spolehlivosti a správnosti navrhovaných metod byly provedeny opakovatelné stanovení různých koncentrací studovaných analytů. Po vyhodnocení výsledků, bylo zjištěno že doporučované postupy voltametrického stanovení jak regulátorů růstu, tak i fungicidů poskytují správné a dobře opakovatelné výsledky. Pro většinu analyzovaných látek RSD nepřesahovala hodnotu 5 %.

Navrhované metody lze s úspěchem využít i pro analýzu směsí vybraných analytů, a to DMZ spolu s UDMH, MFZ spolu s FPX a FPX spolu s MCZ. Během stanovení DMZ ve směsi s UDMH, bylo zjištěno že UDMH výrazně ovlivňuje výsledek DMZ již při koncentračním poměru vyšším než 1:1. Proto byl navržen postup eliminace UDMH, který spočívá v krátkém

povaření vzorku v prostředí 1 mol L⁻¹ NaOH. Během analýzy všech uvedených směsí byly dosaženy opakovatelné a spolehlivé výsledky.

Součástí předložené práce je také interferenční studie, která zkoumá rušivý vliv jiných běžně používaných pesticidních látek na stanovení zájmových analytů, a to PBZ, MFZ, FPX a MCZ.

Na závěr byly navržené metody aplikovány na reálné vzorky. Celkem bylo analyzováno osm komerčně dostupných přípravků a čtyři vzorky obohacených vod. Stanovené množství analyzovaných látek, s výjimkou FPX v Libraxu, se shodovalo s deklarovanými obsahy. Tyto výsledky byly rovněž potvrzeny nezávislou metodou HPLC/DAD.

Na základě výše uvedených skutečností lze konstatovat že vypracované metody poskytují spolehlivé výsledky při analýze samotných analytů, jejich směsí i při analýze reálných komerčních přípravků.

4 Použitá literatura

- [1] PROCHÁZKA, Stanislav; Ivana MACHÁČKOVÁ; Jan KREKULE a Jiří ŠEBÁNEK. *Fyziologie rostlin*. Praha: Akademie věd České republiky, 1998. ISBN 80-200-0586-2.
- [2] RADEMACHER, Wilhelm. *Plant Growth Regulators: Backgrounds and Uses in Plant Production*. Online. *Journal of Plant Growth Regulation*, vol. 34 (2015), s. 845-872. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9541-6>, [citováno 2024-06-17].
- [3] RADEMACHER, Wilhelm a Lutz BRAHM. *Plant Growth Regulators*. Online. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. WILEY-VCH, 2010. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/14356007.a20_415.pub2, [citováno 2024-06-17].
- [4] WU, Qiang-Sheng a De-Jian ZHANG. *Plant Growth Regulators (PGRs): Types, Uses and Safety*. Online. NOVA Science Publisher, 2020. ISBN 978-0-323-91005-7. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/C2020-0-02798-2>, [citováno 2024-06-17].
- [5] CORREIA, Manuela; Manuela RODRIGUES; Paula PAÍGA a Cristina DELERUE-MATOS. *Fungicides*. Online. In: CABALLERO, Benjamin, Paul M. FINGLAS a Fidel TOLDRÁ. *The Encyclopedia of Food and Health*. 3rd ed. Oxford: Academic Press, vol. 3 (2016), s. 169-176. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00342-1>, [citováno 2024-06-17].
- [6] CARIDDE, Odile. *Fungicides*. Online. InTech, 2010. ISBN 978-953-307-266-1. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/555>, [citováno 2024-06-17].
- [7] MDAR [Massachusetts Department of Agricultural Resources]. *Paclobutrazol, Review Conducted by MDAR and MassDEP for Use in Sensitive Areas of Rights-of-Way in Massachusetts*. Online. 2012. Dostupné z: <https://www.mass.gov/doc/paclobutrazol-review-jan-2012pdf/download>, [citováno 2024-02-15].
- [8] USENKO, Alona. *Voltametrické stanovení paklobutrazolu pomocí borem dopované diamantové elektrody*. Diplomová práce. prof. Ing. Jaromíra CHÝLKOVÁ, CSc. (školitel). Pardubice: Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. 2020.
- [9] US EPA [United States Environmental Protection Agency]. *R.E.D Facts: Daminozid*. Online. 1993. EPA-738-F-93-007. Dostupné z: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/red_PC-035101_1-Sep-93.pdf, [citováno 2024-06-17].

- [10] LI, Tongtong; Haolin LI; Tingting LIU; Jiamei ZHU; Lanyun ZHANG et al. *Evaluation of the antifungal and biochemical activities of mefenftrifluconazole against Botrytis cinerea*. Online. Pesticide Biochemistry and Physiology, vol. 173 (2021), 104784. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104784>, [citováno 2024-06-17].
- [11] AN, Xiaokang; Xinglu PAN; Runan LI; Duoduo JIANG; Fengshou DONG et al. *Enantioselective monitoring chiral fungicide mefenftrifluconazole in tomato, cucumber, pepper and its pickled products by supercritical fluid chromatography tandem mass spektrometry*. Online. Food Chemistry, vol. 376 (2022), 131883. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131883>, [citováno 2024-06-17].
- [12] HE, Rujian; Jun FAN; Qi TAN; Yecai LAI; Xiaodong CHEN et al. *Enantioselective determination of metconazole in multi matrices by high-performance liquid chromatography*. Online. Talanta, vol. 178 (2019), s. 980-986. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.045>, [citováno 2024-06-17].
- [13] HE, Rujian; Dong GUO; Zhan HUANG; Yuan KONG; Chenyang JI et al. *Systematic investigation of stereochemistry, stereoselective bioactivity, and antifungal mechanism of chiral triazole fungicide metconazole*. Online. Science of the Total Environment, vol. 784 (2021), 147194. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147194>, [citováno 2024-06-17].
- [14] LI, Chaofeng; Shuai FAN; Yirong ZHANG; Xiangyu ZHANG; Jianjun LUO et al. *Toxicity, bioactivity of triazole fungicide metconazole and its effect on mycotoxin production by Fusarium verticillioides: New perspective from an enantiomeric level*. Online. Science of the Total Environment, vol. 828 (2022), 154432. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154432>, [citováno 2024-06-17].
- [15] US EPA. *Pesticide Fact Sheet: Fluxapyroxad*. Online. 2012. Dostupné z: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-138009_02-May-12.pdf, [citováno 2024-06-17].
- [16] LIN, Hai; Fangrui LIN; Jing YUAN; Feng CUI a Jie CHEN. *Toxic effects and potential mechanisms of Fluxapyroxad to zebrafish (Danio rerio) embryos*. Online. Science of the Total Environment, vol. 769 (2021), 144519. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144519>, [citováno 2024-06-17].

- [17] EFSA [European Food Safety Authority]. *Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance paclobutrazol*. Online. EFSA Journal, vol. 8 (2010), no. 11, 1876. Dostupné z: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1876>, [citováno 2024-06-17].
- [18] ECHA [European Chemicals Agency]. *Opinion of the committee for risk assessment on a dossier proposing harmonised classification and labelling at EU level of (2RS)-2-[4-(4-chlorophenoxy)-2-(trifluoromethyl)phenyl]-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ol; mefentrifluconazole*. Online. 2018. CLH-O-0000001412-86-199/F. Dostupné z: <https://echa.europa.eu/documents/10162/abe75587-5888-be99-01a5-3eda285359b1>, [citováno 2024-06-17].
- [19] US EPA. *Pesticide Fact Sheet: Metconazole*. Online. 2007. Dostupné z: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-125619_01-Sep-07.pdf, [citováno 2024-06-17].
- [20] EFSA. *Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fluxapyroxad (BAS 700 F)¹*. Online. EFSA Journal, vol. 10 (2012), no. 1, 2522. Dostupné z: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2522>, [citováno 2024-06-17].
- [21] RADEMACHER, Wilhelm. *GROWTH RETARDANTS: Effects on Gibberellin Biosynthesis and Other Metabolic Pathways*. Online. Annual review of plant biology, vol. 51 (2000), s. 501-531. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.501>, [citováno 2024-06-17].
- [22] KUMAR, Shailesh a Sweta MISHRA. *Recent Advances in Molecular Biology and Plant Physiology*. 2nd ed. Online. AkiNik Publications, 2021. ISBN 978-93-91538-81-1. Dostupné z: <https://doi.org/10.22271/ed.book.1362>, [citováno 2024-06-17].
- [23] REBOLLAR-ALVITER, Angel a Mizuho NITA. Optimizing Fungicide Applications for Plant Disease Management: Case Studies on Strawberry and Grape. Online. In: THAJUDDIN, Nooruddin. *Fungicides Beneficial and Harmful Aspects*. 2011. ISBN 978-953-307-451-1. Dostupné z <https://doi.org/10.5772/2308>, [citováno 2024-06-17].
- [24] SOUMYA, P.R.; Pramod KUMAR a Madan PAL. *Paclobutrazol: a novel plant growth regulator and multi-stress ameliorant*. Online. Indian Society for Plant Physiology, vol. 22 (2017), s. 267-278. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40502-017-0316-x>, [citováno 2024-06-17].

- [25] KISHORE, Kundan; Hari Shankar SINGH a R.M. KURIAN. *Paclobutrazol use in perennial fruit crops and its residual effects: A review*. Online. Indian Journal of Agricultural Sciences, vol. 85 (2015), no. 7, s. 863-872. Dostupné z: <https://doi.org/10.56093/ijas.v85i7.50091>, [citováno 2024-06-17].
- [26] XIA, Xing; Yuhan TANG; Mengran WEI a Danqiu ZHAO. *Effect of Paclobutrazol Application on Plant Photosynthetic Performance and Leaf Greenness of Herbaceous Peony*. Online. Horticulturae, vol. 4 (2018), no. 1. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/horticulturae4010005>, [citováno 2024-06-17].
- [27] UPRETI, Kuashal K.; Y. T. N. REDDY; S. R. Shivu PRASAD; G. V. BINDU; H. L. JAYARAM et al. *Hormonal changes in response to paclobutrazol induced early flowering in mango cv. Totapuri*. Online. Scientia Horticulturae, vol. 150 (2013), s. 414-418. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.11.030>, [citováno 2024-06-17].
- [28] OPIO, Peter; Hiroyuki TOMIYAMA; Takanori SAITO; Katsuya OHKAWA; Hitoshi OHARA et al. *Paclobutrazol elevates auxin and abscisic acid, reduces gibberellins and zeatin and modulates their transporter genes in Marubakaido apple (Malus prunifolia Borkh. var. ringo Asami) rootstocks*. Online. Plant Physiology and Biochemistry, vol. 155 (2020), s. 502-511. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.08.003>, [citováno 2024-06-17].
- [29] SHA, Jianchuan; Shunfeng GE; Zhanling ZHU; Xin DU; Xin ZHANG et al. *Paclobutrazol regulates hormone and carbon-nitrogen nutrition of autumn branches, improves fruit quality and enhances storage nutrition in 'Fuji' apple*. Online. Scientia Horticulturae, vol. 282 (2021), 110022. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110022>, [citováno 2024-06-17].
- [30] JUNGKLANG, Jarunee a Kobkiat SAENGNIL. *Effect of paclobutrazol on patumma cv. Chiang Mai Pink under water stress*. Online. Songklanakarin Journal of Science and Technology, vol. 34 (2012), no. 4, s. 361-366. Dostupné z: <https://sjst.psu.ac.th/journal/34-4/0353-3345-34-4-361-366.pdf>, [citováno 2024-06-17].
- [31] SRIVASTAV, Manish; Arun KISHOR; Anil DAHUJA a R.R. SHARMA. *Effect of paclobutrazol and salinity on ion leakage, proline content and activities of antioxidant enzymes in mango (Mangifera indica L.)*. Online. Scientia Horticulturae, vol. 125 (2010), no. 4, s. 785-788. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.05.023>, [citováno 2024-06-17].

- [32] SANKAR, B.; C. Abdul JALEEL; P. MANIVANNA; A. KISHOREKUMAR a R. SOMASUNDARAM. *Effect of paclobutrazol on water stress amelioration through antioxidants and free radical scavenging enzymes in Arachis hypogaea L.* Online. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 60 (2007), no. 2, s. 229-235. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.06.016>, [citováno 2024-06-17].
- [33] KUAI, Jie; Xiao-yong LI; Yang YANG a Guang-sheng ZHOU. *Effects of paclobutrazol on biomass production in relation to resistance to lodging and pod shattering in Brassica napus L.* Online. *Journal of Integrative Agriculture*, vol. 16 (2017), no. 11, s. 2470-2481. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61674-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61674-5), [citováno 2024-06-17].
- [34] LIU, Chunxiao; Shangzhong LIU a Jinling DIAO. *Enantioselective growth inhibition of the green algae (Chlorella vulgaris) induced by two paclobutrazol enantiomers.* Online. *Environmental Pollution*, vol. 250 (2019), s. 610-617. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.027>, [citováno 2024-06-17].
- [35] YE, Xiu; Shuping MA; Lianjun ZHANG; Pengfei ZHAO; Xiaohong ZHAO et al. *Trace enantioselective determination of triazole fungicides in honey by a sensitive and efficient method.* Online. *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 74 (2018), s. 62-70. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.09.005>, [citováno 2024-06-17].
- [36] WU, ShuChun; Miao YU; Hu ZHANG; Jianzhong HAN a Mingrong QIAN. *Enantioselective Degradation of (2RS, 3RS)-Paclobutrazol in Rat Liver Microsomes.* Online. *Chirality*, vol. 27 (2015), no. 5, s. 344-348. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/chir.22440>, [citováno 2024-06-17].
- [37] KUMAR, Govind; Shatrohan LAL; Pankaj BHATT; R. A. RAM a A. K. BHATTACHERJEE. *Mechanisms and kinetics for the degradation of paclobutrazol and biocontrol action of a novel Pseudomonas putida strain T7.* Online. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 175 (2021), 104846. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104846>, [citováno 2024-06-17].
- [38] PETRIE, Bruce; Maria Dolores Camacho MUNOZ a Julia MARTÍN. *Stereoselective LC-MS/MS methodologies for environmental analysis of chiral pesticides.* Online. *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 110 (2019), s. 249-258. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.010>, [citováno 2024-06-17].

- [39] WU, Zecai; David M. GOODALL a David K. LLOYD. *Determination of enantiomeric purity of paclobutrazol and fluazifop-P-butyl using a diode-laser-based polarimetric high-performance liquid chromatography detector*. Online. Journal of Chromatography, vol. 513 (1990), s. 209-218. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)89437-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)89437-1), [citováno 2024-06-17].
- [40] ZHAO, Pengfei; Jing ZHAO; Shuo LEI; Xingjie GUO a Longshan ZHAO. *Simultaneous enantiomeric analysis of eight pesticides in soils and river sediments by chiral liquid chromatography-tandem mass spektrometry*. Online. Chemosphere, vol. 204 (2018), s. 210-219. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.204>, [citováno 2024-06-17].
- [41] LI, Yuanbo; Fengshou DONG; Xingang LIU; Jun XU; Jing LI et al. *Simultaneous enantioselective determination of triazole fungicides in soil and water by chiral liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Online. Journal of Chromatography A, vol. 1224 (2012), s. 51-60. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.044>, [citováno 2024-06-17].
- [42] ZHEN, Yan; Nie JIYUN; Xu GUOFENG; Li HAIFEI; Li JING et al. *Simultaneous Determination of Plant Growth Regulators in Fruits Using a Modified QuEChERS Procedure and UPLC–MS/MS*. Online. Horticultural Plant Journal, vol. 2 (2016), no. 4, s. 203-208. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2016.07.002>, [citováno 2024-06-17].
- [43] ZENG, Huiyun; Xiujuan XIE; Yejing HUANG; Jieming CHEN; Yingtao LIU et al. *Enantioseparation and determination of triazole fungicides in vegetables and fruits by aqueous two-phase extraction coupled with online heart-cutting two-dimensional liquid chromatography*. Online. Food Chemistry, vol. 301 (2019), 125265. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125265>, [citováno 2024-06-17].
- [44] LIU, Zhenjiang; Xi WEI; Kewei REN; Gangbing ZHU; Zhen ZHANG et al. *Highly efficient detection of paclobutrazol in environmental water and soil samples by time-resolved fluoroimmunoassay*. Online. Science of the Total Environment, vol. 569-570 (2016), s. 1629-1634. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.089>, [citováno 2024-06-17].

- [45] YU, Yinshan; Yan QU; Mingkun ZHANG; Xinru GUO a Hongyun ZHANG. *Fluorescence detection of paclobutrazol pesticide residues in apple juice*. Online. *Optik*, vol. 224 (2020), 165542. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2020.165542>, [citováno 2024-06-17].
- [46] PARAFOTIOU, Maria a Argyro VAGENA. *Cotton gin trash compost in the substrate reduces the daminozide spray dose needed to produce compact potted chrysanthemum*. Online. *Scientia Horticulturae*, vol. 143 (2012), s. 102-108. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.06.004>, [citováno 2024-06-17].
- [47] MOL, Hans G. J.; Ruud C. J. van DAM; Rob J. VREEKEN a Odile M. STEIJGER. *Determination of daminozide in apples and apple leaves by liquid chromatography-mass spectrometry*. Online. *Journal of Chromatography A*, vol. 833 (1999), s. 53-60. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00915-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00915-7), [citováno 2024-06-19].
- [48] SCHMIDERER, Corinna; Sabine GRAUSGRUBER-GROGER; Paolo GRASSI; Ralf STEINBORN a Johannes NOVAK. *Influence of gibberellin and daminozide on the expression of terpene synthases and on monoterpenes in common sage (Salvia officinalis)*. Online. *Journal of Plant Physiology*, vol. 167 (2010), s. 779-786. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.12.009>, [citováno 2024-06-17].
- [49] ROY, Sohini Singha a Sunjay GHOSH. *Genes regulating wing patterning in Drosophila melanogaster show reduced expression under exposure of Daminozide, the fruit ripening retardant*. Online. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 75 (2020), 10322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103322>, [citováno 2024-06-17].
- [50] FAN, Anna M. a Richard J. JACKSON. *Pesticides and food safety*. Online. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, vol. 9 (1989), no. 2, s. 158-174. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0273-2300\(89\)90033-0](https://doi.org/10.1016/0273-2300(89)90033-0), [citováno 2024-06-17].
- [51] BRINKMAN, Jan Henk W.; Anton G. van DIJK; Rolf WAGENAAR a Jan K. QUIRIJNS. *Determination of daminozide residues in apples using gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection*. Online. *Journal of Chromatography A*, vol. 723 (1996), s. 355-360. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00845-4](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00845-4), [citováno 2024-06-17].

- [52] DRAKE, Stephen R.; Thomas A. EISELE a John D. BARANOWSKI. *Daminozide residue present in apple after long and short term exposure*. Online. Journal of Food Safety, vol. 11 (1991), no. 4, s. 247-253. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.1991.tb00056.x>, [citováno 2024-06-17].
- [53] SAGELSDORFF, Peter; Werner K. LUTZ a Christian SCHLATTER. *DNA Methylation in Rat Liver by Daminozide, 1,1 -Dimethylhydrazine, and Dimethylnitrosamine*. Online. Fundamental and Applied Toxicology, vol. 11 (1988), no. 4, s. 723-730. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0272-0590\(88\)90135-2](https://doi.org/10.1016/0272-0590(88)90135-2), [citováno 2024-06-17].
- [54] POHANISH, Richard P. *Sittigs Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens*. 7th ed., vol. 1: A-D. William Andrew: Applied Science Publishers, 2017. ISBN 978-0-323-38968-6.
- [55] Food and Agriculture Organisation. *Daminozid*. Online. 1989. Dostupné z: https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/IPM_Pesticide/JMPR/Evaluations/1989/Daminozide.pdf, [citováno 2024-02-27].
- [56] YAN, Shoulei; Yanjun FANG a Zhixian GAO. *Quartz crystal microbalance for the determination of daminozide using molecularly imprinted polymers as recognition element*. Online. Biosensors and Bioelectronics, vol. 22 (2007), s. 1087-1091. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.03.007>, [citováno 2024-06-17].
- [57] NEWSOME, William H. *Determination of daminozide residues on foods and its degradation to 1,1- dimethylhydrazine by cooking*. Online. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 28 (1980), no. 2, s. 319-321. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf60228a042>, [citováno 2024-06-17].
- [58] Nařízení Komise (EU) 2017/624 ze dne 30. března 2017, kterým se mění přílohy II a V nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 396/2005, pokud jde o maximální limity reziduí pro bifenazát, daminozid a tolylfluanid v některých produktech a na jejich povrchu.
- [59] ZHAO, Xiangsheng; Yan MU a Meihua YANG. *A simple multi-residue method for determination of plant growth retardants in Ophiopogon japonicus and soil using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Online. Chemosphere, vol. 207 (2018), s. 329-336. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.105>, [citováno 2024-06-17].

- [60] DANEZIS, Georgias; C. J. ANAGNOSTOPOULOS, K. LIAPIS a M. A. KOUPPARIS. *Multi-residue analysis of pesticides, plant hormones, veterinary drugs and mycotoxines using HILIC chromatography – MS/MS in various food matrices*. Online. *Analytica Chimica Acta*, vol. 942 (2016), s. 121-138. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.09.011>, [citováno 2024-06-17].
- [61] PICÓ, Y.; G. FONT; J. C. MOLTO a J. MANES. *Pesticide residue determination in fruit and vegetables by liquid chromatography-mass spektrometry*. Online. *Journal of Chromatography A*, vol. 882 (2000), no. 1-2, s. 153-173. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00294-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00294-6), [citováno 2024-06-17].
- [62] IANNIELLO, Robert M. *Square-wave voltammetric determination of daminozide*. Online. *Analytica Chimica Acta*, vol. 193 (1987), s. 81-86. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)86140-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)86140-1), [citováno 2024-06-17].
- [63] ISHII, Hideo; Patricia Karen BRYSON; Miyuki KAYAMORI; Takuya MIYAMOTO; Yuichi YAMAOKA et al. *Cross-resistance to the new fungicide mefentrifluconazole in DMI-resistant fungal pathogens*. Online. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 171 (2021), 104737. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104737>, [citováno 2024-06-17].
- [64] LIU, Ziqi; Youpu CHENG; Longfei YUAN; Xin REN; Xianjun LIAO et al. *Enantiomeric profiling of mefentrifluconazole in watermelon across China: Enantiochemistry, environmental fate, storage stability, and comparative dietary risk assessment*. Online. *Journal of Hazardous Materials*, vol. 417 (2021), 125985. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125985>, [citováno 2024-06-17].
- [65] LI, Lianshan; Xiaofang SUN; Xuejun ZHAO; Yudie XIONG; Beibei GAO et al. *Absolute Configuration, Enantioselective Bioactivity, and Degradation of the Novel Chiral Triazole Fungicide Mefentrifluconazole*. Online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 69 (2021), s. 4960-4967. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07947>, [citováno 2024-06-17].
- [66] XU, Shiji; Fan SHEN; Jialu SONG; Yingnan WANG; Sumei YU et al. *Enantioselectivity of new chiral triazole fungicide mefentrifluconazole: Bioactivity against phytopathogen, and acute toxicity and bioaccumulation in earthworm (Eisenia fetida)*. Online. *Science of the Total Environment*, vol.815 (2022), 152937. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.152937>, [citováno 2024-06-17].

- [67] EFSA. *Modification and setting of maximum residue levels for mefentrifluconazole in various crops*. Online. EFSA Journal, vol. 18 (2020), no. 7, 6193. Dostupné z: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6193>, [citováno 2024-06-17].
- [68] EFSA. *Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance BAS 750 F (mefentrifluconazole)*. Online. EFSA Journal, vol. 16 (2018), no. 7, 5379. Dostupné z: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5379>, [citováno 2024-06-17].
- [69] CHL report for mefentrifluconazole. United Kingdom. Online. 2017. Dostupné z: <https://echa.europa.eu/documents/10162/15f51d28-35a6-a77c-e546-e2261a03d5db>, [citováno 2024-06-17].
- [70] TESH, Sheila A.; John M. TESH; Ivana FEGERT; Roland BUESEN; Steffen SCHNEIDER et al. *Innovative selection approach for a new antifungal agent mefentrifluconazole (Revysol®) and the impact upon its toxicity profile*. Online. Regulatory Toxicology and Pharmacology, vol. 106 (2019), s. 152-168. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.04.009>, [citováno 2024-06-17].
- [71] CUI, Feng; Tingting CHAI; Shanshan DI; Peipei QI a Xinquan WANG. *Toxicity of mefentrifluconazole enantiomers on multiple stages of zebrafish (Danio rerio)*. Online. Journal of Environmental Chemical Engineering, vol. 10 (2022), 107653. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107653>, [citováno 2024-06-17].
- [72] Minnesota Department of Agriculture. *Mefentrifluconazole*. Online. 2019. Dostupné z: https://www.mda.state.mn.us/sites/default/files/2019-07/mefentrifluconazole_0.pdf, [citováno 2024-06-17].
- [73] LI, Jing; Chao DONG; Wenjin AN; Yaohai ZHANG; Qiyang ZHAO et al. *Simultaneous Enantioselective Determination of Two New Isopropanol-Triazole Fungicides in Plant-Origin Foods Using Multiwalled Carbon Nanotubes in Reversed-Dispersive Solid-Phase Extraction and Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry*. Online. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 68 (2020), no. 21, s. 5969-5979. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01385>, [citováno 2024-06-17].
- [74] ZHANG, Ying; Xiaohu WU; Xianbin LI; Tingting DUAN; Jun XU et al. *A fast and sensitive ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determining mefentrifluconazole in plant- and animal-derived foods*. Online. Food Additives & Contaminants: Part A, vol 36 (2019), no. 9, s. 1348-1357. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1628361>, [citováno 2024-06-17].

- [75] JING, Xu; Haoyue XUE; Xiaoyan SANG; Xiaowen WANG a Liyan JIA. *Magnetic deep eutectic solvent-based dispersive liquid–liquid microextraction for enantioselectively determining chiral mefentrifluconazole in cereal samples via ultra-high-performance liquid chromatography*. Online. Food Chemistry, vol. 391 (2022), 133220. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133220>, [citováno 2024-06-17].
- [76] JIANG, Haijuan; Xin HUANG; Haoyue XUE; Min WANG; Yanli QI et al. *Switchable deep eutectic solvent-based homogenous liquid–liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography–diode-array detection for the determination of the chiral fungicide mefentrifluconazole in water, fruit juice, and fermented liquor*. Online. Chirality, vol. 34 (2022), s. 968-976. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/chir.23445>, [citováno 2024-06-17].
- [77] BI, Lianyu; Jinke XU; Qi WANG; Tao LI; Jianxin WANG et al. *Baseline sensitivity and resistance risk assessment of *Stemphylium solani* to fluxapyroxad*. Online. Crop Protection, vol. 156 (2022), 105944. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2022.105944>, [citováno 2024-06-17].
- [78] WU, Xiao-hu; Jun XU; Yong-zhuo LIU; Feng-shou DONG; Xin-gang LIU et al. *Impact of fluxapyroxad on the microbial community structure and functional diversity in the silty-loam soil*. Oline. Journal of Integrative Agriculture, vol. 14 (2015), no. 1, s. 114-124. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60746-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60746-2), [citováno 2024-06-17].
- [79] ZHANG, Aigui; Jingya ZHOU; Ke TAO; Taiping HOU a Hong JIN. *Design, synthesis and antifungal evaluation of novel pyrazole carboxamides with diarylamines scaffold as potent succinate dehydrogenase inhibitors*. Online. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, vol. 28 (2018), no. 18, s. 3042-3045. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.08.001>, [citováno 2024-06-17].
- [80] FLEITAS, María Constanza; Matías SCHIERENBECK; Guillermo Sebastián GERARD; Juan Ignacio DIETZ; Silvina Inés GOLIK, et al. *Breadmaking quality and yield response to the green leaf area duration caused by fluxapyroxad under three nitrogen rates in wheat affected with tan spot*. Online. Crop Protection, vol. 106 (2018), s. 201-209. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.01.004>, [citováno 2024-06-17].

- [81] ZHU, Jiamei; Jin LI; Dicheng MA; Yangyang GAO; Jiagao CHENG et al. *SDH mutations confer complex cross-resistance patterns to SDHIs in *Corynespora cassicola**. Online. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 186 (2022), 105157. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105157>, [citováno 2024-06-17].
- [82] SMITH, J.; M. GRIMMER; S. WATERHOUSE a N. PAVELEY. Quantifying the non-fungicidal effects of foliar applications of fluxapyroxad (Xemium) on stomatal conductance, water use efficiency and yield in winter wheat. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, vol. 78 (2013), no. 3, s. 523-535. PMID: 25151827.
- [83] LI, Wenhua; Yaqin WU; Mingrui YUAN a Xuan LIU. *Fluxapyroxad induces developmental delay in zebrafish (*Danio rerio*)*. Online. *Chemosphere*, vol. 256 (2020), 127037. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127037>, [citováno 2024-06-17].
- [84] YU, Huilin; Junhui ZHANG; Yinghong CHEN; Juan CHEN; Yang QIU et al. *The adverse effects of fluxapyroxad on the neurodevelopment of zebrafish embryos*. Online. *Chemosphere*, vol. 307 (2022), 135751. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135751>, [citováno 2024-06-17].
- [85] QIU, Tiantong; Xin CHEN; Peng XIAO; Liqiang WANG a Wenhua LI. *Effects of embryonic exposure to fluxapyroxad on zebrafish (*Danio rerio*) ocular development*. Online. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 181 (2022), 105018. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.105018>, [citováno 2024-06-17].
- [86] Minnesota Department of Agriculture. *Fluxapyroxad*. Online. 2012. Dostupné z: <https://www.mda.state.mn.us/sites/default/files/inline-files/nair-fluxapyroxad.pdf>, [citováno 2024-03-04].
- [87] LI, Shasha; Xingang LIU; Yulong ZHU; Fengshou DONG; Jun XU et al. *A statistical approach to determine fluxapyroxad and its threemetabolites in soils, sediment and sludge based on a combination of chemometric tools and a modified quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method*. Online. *Journal of Chromatography A*, vol. 1358 (2014), s. 46-51. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.06.088>, [citováno 2024-06-17].

- [88] DONG, Fengshou; Xiu CHEN; Xingang LIU; Jun XU; Yuanbo LI et al. *Simultaneous determination of five pyrazole fungicides in cereals, vegetables and fruits using liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Online. *Journal of Chromatography A*, vol. 1262 (2012), s. 98-106. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.08.100>, [citováno 2024-06-17].
- [89] GAN, Jinhua; Lei LV; Jie PENG; Jinping LI; Zhiting XIONG et al. *Multi-residue method for the determination of organofluorine pesticides in fish tissue by liquid chromatography triple quadrupole tandem mass spectrometry*. Online. *Food Chemistry*, vol. 207 (2016), s. 195-204. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.098>, [citováno 2024-06-17].
- [90] ZHOU, Heng; Yi-Min CAO; Shui MIAO; Lan LAN; Ming CHEN et al. *Qualitative screening and quantitative determination of 569 pesticide residues in honeysuckle using ultrahigh-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-Orbitrap high resolution mass spectrometry*. Online. *Journal of Chromatography A*, vol. 1606 (2019), 460374. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460374>, [citováno 2024-06-17].
- [91] SHI, Ling; Jie DUAN; Shufang XU; Hongping YANG a Guangming YANG. *One-step Synthesis of Ultrasmall Platinum Nanoparticles Supported on Amino-Functionalized Graphene to Create an Electrochemical Molecularly Imprinted Polymer Sensor for Fluxapyroxad*. Online. *International Journal of Electrochemical Science*, vol. 16 (2021), no. 7, 210767. Dostupné z: <https://doi.org/10.20964/2021.07.19>, [citováno 2024-06-17].
- [92] DENG, Yue; Wenjun ZHANG; Yinan QIN; Rui LIU; Luyao ZHANG et al. *Stereoselective toxicity of metconazole to the antioxidant defenses and the photosynthesis system of *Chlorella pyrenoidosa**. Online. *Aquatic Toxicology*, vol. 210 (2019), s. 129-138. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.02.017>, [citováno 2024-06-17].
- [93] HE, Rujian; Dong GUO; Chun LIN; Wei-guang ZHANG a Jun FAN. *Enantioselective bioaccumulation, oxidative stress, and thyroid disruption assessment of cis-metconazole enantiomers in zebrafish (*Danio rerio*)*. Online. *Aquatic Toxicology*, vol. 248 (2022), 106205. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106205>, [citováno 2024-06-17].

- [94] LIU, Xin; Shuang WANG; Zhongyue FAN; Jiawen WU; Liwen WANG et al. *Antifungal activities of metconazole against the emerging wheat pathogen Fusarium pseudograminearum*. Online. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 190 (2023), 105298. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105298>, [citováno 2024-06-17].
- [95] BUDNY, Marcin; Joanna WŁODARCZYK; Tadeusz MUZIOŁ; Mariusz Jan BOSIAK a Andrzej WOLAN. *Stereoselective synthesis of two potential metabolites of cis-metconazole*. Online. *Tetrahedron Letters*, vol. 58 (2017), s. 4285-4288. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.09.087>, [citováno 2024-06-17].
- [96] JUNG, Da-Woon; Da-Hyun JEONG; Uk-Jin KIM a Hee-Seok LEE. *The triazole fungicide metconazole inhibits the homodimerization of human androgen receptors to suppress androgen-induced transcriptional activation*. Online. *Chemico-Biological Interactions*, vol. 378 (2023), 110489. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110489>, [citováno 2024-06-17].
- [97] ZHU, Jiamei; Lingyan ZHANG; Tongtong LI; Dicheng MA; Yangyang GAO et al. *Baseline sensitivity of Corynespora cassiicola to metconazole and efficacy of this fungicide*. Online. *Crop Protection*, vol. 130 (2020), 105056. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.105056>, [citováno 2024-06-17].
- [98] DUAN, Yabing; Meixia LI; Huahua ZHAO; Fei LU; Jianxin WANG et al. *Molecular and biological characteristics of laboratory metconazole-resistant mutants in Fusarium graminearum*. Online. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 152 (2018), s. 55-61. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.08.011>, [citováno 2024-06-17].
- [99] DENG, Yue; Rui LIU; Zikang WANG; Luyao ZHANG; Simin YU et al. *The stereoselectivity of metconazole on wheat grain filling and harvested seeds germination: Implication for the application of triazole chiral pesticides*. Online. *Journal of Hazardous Materials*, vol. 416 (2021), 125911. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125911>, [citováno 2024-06-17].
- [100] LI, Ling; Peiling HUANG a Junjie LI. *Enantioselective effects of the fungicide metconazole on photosynthetic activity in Microcystis flos-aquae*. Online. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 211 (2021), 111894. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.111894>, [citováno 2024-06-17].

- [101] ZHAO, Pengfei; Zhaokun WANG; Xun GAO; Xingjie GUO a Longshan ZHAO. *Simultaneous enantioselective determination of 22 chiral pesticides in fruits and vegetables using chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*. Online. Food Chemistry, vol. 277 (2019), s. 298-306. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.128>, [citováno 2024-06-17].
- [102] TANKIEWICZ, Maciej; Calum MORRISON a Marek BIZIUK. *Multi-residue method for the determination of 16 recently used pesticides from various chemical groups in aqueous samples by using DI-SPME coupled with GC-MS*. Online. Talanta, vol. 107 (2013), s. 1-10. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.12.052>, [citováno 2024-06-17].
- [103] YANG, Fei; Gangling TANG; Changwen YE; Ying WANG a Meijuan FAN. *Simultaneous determination of fungicides and carbamates in tobacco by ultra performance convergence chromatography-tandem mass spectrometry coupled with modified QuEChERS*. Online. Microchemical Journal, vol. 171 (2021), 106849. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106849>, [citováno 2024-06-17].
- [104] OZKAN, Sibel. A. *Electroanalytical methods in pharmaceutical analysis and their validation*. New York: HNB Publishing, 2012. ISBN 978-0-9664286-7-4.
- [105] SCHOLZ, Fritz. *Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications*. BERLIN: Springer Berlin, Heidelberg, 2002. ISBN 978-3-662-04757-6.
- [106] OSTERYOUNG, R. A. a Janet OSTERYOUNG. *Pulse voltammetric methods of analysis*. Online. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences, vol. 302 (1981), s. 315-326. Dostupné z: <https://doi.org/10.1098/rsta.1981.0170>, [citováno 2024-06-17].
- [107] WANG, Joseph. *Analytical Electrochemistry*. 2-nd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001. ISBN 0-471-22823-0. ISBN 0-471-28272-3.
- [108] HAMANN, Carl H.; Andrew HAMNETT a Wolf VIELSTICH. *Electrochemistry: 2nd, Completely Revised and Updated Edition*. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. ISBN 978-3-527-31069-2.
- [109] BARD, Allen J. a Larry R. FAULKNER. *Electrochemical methods: Fundamentals and applications*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001. ISBN-13 978-0-471-04372-0.
- [110] MONK, Paul. *Fundamentals of Electroanalytical Chemistry*. Online. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2001. ISBN 9780471880363. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9780470511329>, [citováno 2024-06-17].

- [111] KONDO, Takeshi. *Recent electroanalytical applications of boron-doped diamond electrodes*. Online. *Current Opinion in Electrochemistry*, vol. 32 (2022), 100891. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2021.100891>, [citováno 2024-06-17].
- [112] KARIM, Ansaf V.; Puthiya Veetil NIDHEESH a Mehmet A. OTURAN. *Boron-doped diamond electrodes for the mineralization of organic pollutants in the real wastewater*. Online. *Current Opinion in Electrochemistry*, vol. 30 (2021), 100855. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2021.100855>, [citováno 2024-06-17].
- [113] BANSAL, Rishabh; Rafael VERDUZCO; Michael S. WONG; Paul WESTERHOFF a Sergi GARCIA-SEGURA. *Development of nano boron-doped diamond electrodes for environmental applications*. Online. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 907 (2022), 116028. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2022.116028>, [citováno 2024-06-17].
- [114] JOSHI, Pratik; Parand RILEY; K. Yugender GOUD; Rupesh K. MISHRA a Roger NARAYAN. *Recent advances of boron-doped diamond electrochemical sensors toward environmental applications*. Online. *Current Opinion in Electrochemistry*, vol. 32 (2022), 100920. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2021.100920>, [citováno 2024-06-17].
- [115] NIDHEESH, Puthiya Veetil; G. DIVYAPRIYA; Nihal OTURAN; Clément TRELLU a Mehmet A. OTURAN. *Environmental Applications of Boron-Doped Diamond Electrodes: 1. Applications in Water and Wastewater Treatment*. Online. *ChemElectroChem*, vol. 6 (2019), no. 8, s. 2124-2142. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/celc.201801876>, [citováno 2024-06-17].
- [116] TRELLU, Clément; Shampa CHAKRABORTY; Puthiya Veetil NIDHEESH a Mehmet A. OTURAN. *Environmental Applications of Boron-Doped Diamond Electrodes: 2. Soil Remediation and Sensing Applications*. Online. *ChemElectroChem*, vol. 6 (2019), no. 8, s. 2143-2156. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/celc.201801877>, [citováno 2024-06-17].
- [117] *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (ICH Q2(R1))*, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human (ICH). Online. 2023. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline>, [citováno 2024-02-16].

- [118] Gaussian 16, Revision A.03, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
- [119] LEE, Chengten; Weitao YANG a Robert G. PARR. *Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density*. Online. Physical Review B, vol. 37 (1988). Dostupné z: <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.37.785>, [citováno 2024-06-17].
- [120] GLOAGUEN, Eric; Valerie BRENNER; Mohammad ALAUDDIN; Benjamin TARDIVEL; Michel MONS et al. *Direct Spectroscopic Evidence of Hyperconjugation Unveils the Conformational Landscape of Hydrazides*. Online. Angewandte Chemie International Edition, vol. 53 (2014), no. 50, s. 13756-13759. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/anie.201407801>, [citováno 2024-06-17].
- [121] Process for the preparation of substituted oxiranes and triazoles (patent no. WO 2014/108286). Online. 2014. Dostupné z: <https://patentimages.storage.googleapis.com/9e/8e/f8/ac84ad3de4dd0e/WO2014108286A1.pdf>, [citováno 2024-02-23].
- [122] NIGGLI, Nadja E.; Tobias VOLGRAFF; Christian WINTER; Desislava SLAVCHEVA PETKOVA; Stefan BENSON et al. *Synthesis of Anilides by Aminolysis of Unactivated Esters using MnCl₂ in Combination with strong Bases as Catalyst*. Online. Advanced Synthesis & Catalysis, vol. 365 (2023), no. 11, s. 1794-1800. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/adsc.202300285>, [citováno 2024-06-17].

- [123] CHEN, Shusheng; Muxing ZHOU; Zhenfeng ZHANG a Wanbin ZHANG. *New and convenient approach for synthesis of metconazole*. Online. *Research on Chemical Intermediates*, vol. 43 (2017), s. 6293-6298. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11164-017-2989-1>, [citováno 2024-06-17].
- [124] ŠELEŠOVSKÁ, Renata; Karolina SCHWARZOVÁ-PECKOVÁ; Romana SOKOLOVÁ; Kateřina KREJČOVÁ a Pavlína MARTINKOVÁ-KELÍŠKOVÁ. *The first study of triazole fungicide difenoconazole oxidation and its voltammetric and flow amperometric detection on boron doped diamond electrode*. Online. *Electrochimica Acta*, vol. 381 (2021), 138260. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2021.138260>, [citováno 2024-06-17].
- [125] CHENG, Shuk Kei. *Anodic Oxidative Functionalization of Toluene Derivatives*. Bakalářská práce. Albert Fry (školitel). Middletown, Connecticut: Wesleyan University. 2009
- [126] WANG, Fei a Shannon S. STAHL. *Electrochemical Oxidation of Organic Molecules at Lower Overpotential: Accessing Broader Functional Group Compatibility with Electron-Proton Transfer Mediators*. Online. *Accounts of Chemical Research*, vol. 53 (2020), no. 3, s. 561-574. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00544>, [citováno 2024-06-17].
- [127] SCHAFER, Hans. Oxidative Coupling. In: HAMMERICH, Ole; Bernd SPEISER *Organic Electrochemistry*. 5th ed. CRC Press, 2015, s. 705-773. ISBN 9781420084016. Dostupné z: <https://doi.org/10.1201/b19122-23>, [citováno 2024-06-17].
- [128] FUCHIGAMI, Toshio; Takashi SATO a Tsutomu NONAKA. *Electrochemical generation of reactive nitrogen species: Part 141. Anodic oxidation of N-acyl-N',N'-dimethylhydrazines*. Online. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, vol. 291 (1990), no. 1-2, s. 141-145. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(90\)87182-J](https://doi.org/10.1016/0022-0728(90)87182-J), [citováno 2024-06-17].
- [129] ULYANOVSKII N. V.; D. S. KOSYAKOV; I. I. PIKOVSKOI a Yu. G. KHABAROV. *Characterisation of oxidation products of 1,1-dimethylhydrazine by high-resolution orbitrap mass spectrometry*. Online. *Chemosphere*, vol. 174 (2017), s. 66-75. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.118>, [citováno 2024-06-17].
- [130] GARRIDO, E. M.; J. L. F. C. LIMA; C. DELERUE-MATOS; F. BORGES; A. M. S. SILVA et al. *Electrochemical oxidation of propanil and related N-substituted amides*. Online. *Analytica Chimica Acta*, vol. 434 (2001), no. 1, s. 35-41. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)00817-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)00817-0), [citováno 2024-06-17].

- [131] GARRIDO, E. M.; J. L. F. C. LIMA; C. DELERUE–MATOS; F. BORGES; A. M. S. SILVA et al. *Electrochemical and Spectroscopic Studies of the Oxidation Mechanism of the Herbicide Propanil*. Online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51 (2003), no. 4, s. 876-879. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf025957v>, [citováno 2024-06-17].