

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Vývoj voltametrické metody stanovení fungicidu benalaxylu
Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Karolína Jemelková**
Osobní číslo: **C22093**
Studijní program: **B0588A130001 Chemie a technologie ochrany životního prostředí**
Téma práce: **Vývoj voltametrické metody stanovení fungicidu benalaxylu**
Zadávací katedra: **Ústav environmentálního a chemického inženýrství**

Zásady pro vypracování

1. Popište stručně princip voltametrie. Zpracujte literární rešerši týkající se fungicidu benalaxylu. Zaměřte se na problematiku jeho působení a zejména nežádoucích účinků na životní prostředí a zdraví organismů. Shrňte možnosti jeho stanovení s využitím různých analytických metod včetně voltametrie.
2. V rámci experimentální části prostudujte voltametrické chování fungicidu na borem dopované diamantové elektrodě a navrhnete optimální podmínky jeho stanovení.
3. Vyvinutou metodu aplikujte při analýze modelových roztoků a praktických vzorků přírodních vod.
4. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací v platném znění.

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

Seznam doporučené literatury:

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

Konzultant bakalářské práce: **Ing. Jakub Vobořil**

Datum zadání bakalářské práce: **5. února 2025**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2025**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

prof. Ing. Liběna Tetřevová, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 5. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem Vývoj voltametrické metody stanovení fungicidu benalaxylu jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen 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. 6. 2025

Karolína Jemelková v.r.

Poděkování

Touto cestou bych chtěla vyjádřit srdečné poděkování doc. Ing. Renátě Šelešovské, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a mimořádně trpělivý a pozitivní přístup, který mi byl během zpracování práce velkou oporou. Dále děkuji Ing. Jakobovi Vobořilovi za pomoc při realizaci experimentální části práce a za užitečné konzultace. V neposlední řadě děkuji své rodině, přátelům, především své dlouholeté kamarádce Lucii, se kterou byla společná studijní léta na univerzitě fenomenální, a také svému partnerovi za jejich nepřetržitou podporu a povzbuzení, které mi pomáhaly překonávat náročné chvíle během celého studia.

ANOTACE

Cílem této bakalářské práce byl vývoj voltametrické metody pro stanovení fungicidu benalaxylu s využitím elektrody z diamantu dopovaného borem. V rámci teoretické části byla pozornost věnována principům voltametrické analýzy a byla zpracována rešerše týkající se benalaxylu, jeho funkce, použití, negativních účinků a zejména možností jeho stanovení. Elektrochemické chování benalaxylu bylo studováno pomocí cyklické voltametrie, zatímco pro stanovení byly testovány diferenční pulzní a square wave voltametrie. Vyvinutá metoda byla aplikována při analýze modelových roztoků benalaxylu a reálných přírodních vod. Vzhledem k nízkým koncentracím pesticidů v povrchových vodách byl navržen postup zakoncentrování vzorku.

KLÍČOVÁ SLOVA

Benalaxyl, fungicidy, borem dopovaná diamantová elektroda, voltametrie, analýza přírodních vod, extrakce na tuhou fázi.

TITLE

Development of a voltametric method for the determination of the fungicide benalaxyl

ANNOTATION

The aim of this bachelor's thesis was to develop a voltametric method for the determination of the fungicide benalaxyl using a boron-doped diamond electrode. In the theoretical part, attention was paid to the principles of voltametric analysis and research was carried out on benalaxyl, its function, uses, negative effects and especially the possibilities of its determination. The electrochemical behavior of benalaxyl was studied by cyclic voltammetry, while differential pulse and square wave voltammetry were tested for its determination. The developed method was applied to the analysis of model solution of benalaxyl and real natural waters. Due to the low concentrations of pesticides in surface waters, a sample concentration procedure was proposed.

KEYWORDS

Benalaxyl, fungicides, boron-doped diamond electrode, voltammetry, natural water analysis, solid phase extraction.

Obsah

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	9
SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	11
ÚVOD.....	14
TEORETICKÁ ČÁST	15
1.1 VOLTAMETRIE	15
1.1.1 Princip voltametrie.....	15
1.1.2 Elektrochemický článek.....	16
1.1.3 Pracovní elektrody	19
1.1.4 Voltametrické metody.....	25
1.2 BENALAXYL.....	30
1.2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti.....	30
1.2.2 Použití/účinek	31
1.2.3 Nežádoucí účinky/toxicita	32
1.2.4 Stanovení	32
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
2.1 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	34
2.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	35
2.3 PRACOVNÍ POSTUPY	35
2.3.1 Voltametrické měření	35
2.3.2 Analýza reálných vzorků	35
3 VÝSLEDKY A DISKUSE	37
3.1 VOLTAMETRICKÉ CHOVÁNÍ BENALAXYLU	37
3.1.1 Závislost na pH a složení základního elektrolytu	38
3.1.2 Závislost na rychlosti polarizace.....	41
3.2 VÝVOJ VOLTAMETRICKÉ METODY STANOVENÍ BENALAXYLU	42
3.2.3 Optimalizace parametrů DPV	42

3.2.4	Optimalizace parametrů SWV	43
3.2.5	Porovnání DPV a SWV	45
3.2.6	Předúprava povrchu BDDE	45
3.3	ANALÝZA MODELOVÝCH VZORKŮ	46
3.4	ANALÝZA PŘÍRODNÍ VODY	48
ZÁVĚR		51
POUŽITÁ LITERATURA		52

Seznam ilustrací a tabulek

Obrázek 1 Dvouelektrodové (A) a tříelektrodové (B) uspořádání elektrochemického článku; převzato a upraveno z [6]. WE- pracovní elektroda, RE – referentní elektroda, CE – pomocná elektroda, i – ampérmetr, V – voltmetr.....	16
Obrázek 2 Praktické uspořádání elektrochemického článku; převzato a upraveno z [7]......	16
Obrázek 3 Rozsahy potenciálů rtuťové, platinové a uhlíkové elektrody v běžných elektrolytech [10], TBAP – tetrabutylamoniumperchlorát, DMF – dimethylformamid, TBABF ₄ – tetrabutylamoniumtetrafluoroboritan, ACN – acetonitril.	18
Obrázek 4 E-I křivka v základním elektrolytu znázorňující využitelný potenciálový rozsah [4]......	18
Obrázek 5 Kapající rtuťová elektroda (DME); převzato a upraveno [6].	20
Obrázek 6 Struktury vybraných alotropů uhlíku; převzato a upraveno z [20].	22
Obrázek 7 Závislost proudu redukce látky A a C na potenciálu [4].	26
Obrázek 8 Závislost vkládaného potenciálu na čase (A) a odpovídající cyklický voltamogram (B); písmena a až g znázorňují fáze cyklických přeměn; převzato a upraveno z [34].	27
Obrázek 9 Změna tvaru cyklického voltamogramu s klesající kinetikou reakce, resp. s klesající reversibilitou systému; převzato a upraveno z [35].	28
Obrázek 10 Průběh vkládaného potenciálu (A) a odpovídající voltamogram (B) při DPV; převzato a upraveno z [41]......	29
Obrázek 11 Průběh vkládaného potenciálu (A) a detail potenciálového cyklu při SWV (B); převzato a upraveno z [44]; E _{sw} – amplituda, τ – doba trvání potenciálového cyklu, ΔE – potenciálový krok.	29
Obrázek 12 Strukturní vzorec dvojice enantiomerů Benalaxyly; převzato a upraveno z [47].	30
Obrázek 13 Strukturní vzorec kyseliny benalaxylové [50].	31
Obrázek 14 Přístroj Visiprep SPE Vakuum Manifold s kolonkami Chromabond C18ec (A) a rotační vakuová odparka (B).....	34
Obrázek 15 Mapa s vyznačeným místem odběru (A) a fotografie místa odběru (B).....	36
Obrázek 16 Cyklické voltamogramy BL v prostředí 0,1 mol L ⁻¹ H ₂ SO ₄ získané na BDDE..	37
Obrázek 17 Cyklické voltamogramy BL v prostředí 0,1 mol L ⁻¹ H ₂ SO ₄ získané na BDDE v závislosti na koncentraci.	38
Obrázek 18 Anodické části cyklických voltamogramů BL získané na BDDE v závislosti na pH základního elektrolytu.....	39
Obrázek 19 DP voltamogramy BL získané na BDDE v závislosti na pH základního elektrolytu.	40
Obrázek 20 Cyklické voltamogramy BL získané na BDDE v závislosti na rychlosti polarizace (A) a odpovídající závislosti I _p na v (B), I _p na v ^{1/2} (C) a log(I _p) na log(v) (D).	41
Obrázek 21 Diferenčně pulzní voltamogramy BL získané na BDDE v závislosti na rychlosti polarizace s odpovídající závislostí I _p na v (A); na výšce pulzu s odpovídající závislostí I _p na A (B); na šířce pulzu s odpovídající závislostí I _p na t (C).	43
Obrázek 22 Square-wave voltamogramy BL získané na BDDE v závislosti na rychlosti polarizace s odpovídající závislostí I _p na v (A); na výšce pulzu s odpovídající závislostí I _p na A (B); na frekvenci s odpovídající závislostí I _p na f (C).	44

Obrázek 23 SW a DP voltamogramy BL zaznamenané na BDEE v závislosti na koncentraci a odpovídající závislost I_p na c_{BL} .	45
Obrázek 24 DP voltamogramy BL zaznamenané na BDDE v závislosti na koncentraci společně se závislostí I_p na c_{BL} .	47
Obrázek 25 DP voltamogramy analýzy modelového roztoku BL zaznamenané na BDDE s grafickým vyhodnocením metody standartního přídávku.	48
Obrázek 26 DP voltamogramy analýzy modelového roztoku BL (A) a říční vody (B) po extrakci a zakoncentrování zaznamenané na BDDE s grafickým vyhodnocením metody standartního přídávku.	50
Tabulka 1 Porovnání opakovatelnosti měření v závislosti na pH a složení elektrolytu	40
Tabulka 2 Shrnutí parametrů pro stanovení ML pomocí BDDE	46
Tabulka 3 Výsledky stanovení BL v modelových roztocích pomocí BDDE	48
Tabulka 4 Shrnutí výsledků analýzy modelového roztoku a říční vody s přídávkem BL po extrakci	49

Seznam symbolů a zkratek

a_O	Aktivita oxidované formy
a_R	Aktivita redukované formy
A	Plocha elektrody [cm^2]
A	Amplituda
AACF	Chirální fungicidy ze skupiny acylaminokyselin
BDD	Borem dopovaný diamant
BDDE	Borem dopovaná diamantová elektroda
BL	Benalaxyl
BRB	Brittonův-Robinsonův pufr
$c(A)$	Koncentrace látky A na povrchu elektrody [mol L^{-1}]
$c(A)^0$	Koncentrace látky v roztoku [mol L^{-1}]
CD	Dichroismová detekce
CE	Pomocná elektroda (Counter electrode)
CFE	Elektroda z uhlíkových vláken (Carbon fiber electrode)
CPE	Uhlíková pastová elektroda (Carbon paste electrode)
CV	Cyklická voltametrie (Cyclic Voltammetry)
CVD	Chemická depozice par (Chemical vapor deposition)
D	Difuzní koeficient [$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$]
DCV	Stejnoseměrná voltametrie (Direct current voltammetry)
DME	Kapající rtuťová elektroda (Dropping mercury electrode)
DPV	Diferenční pulzní voltametrie (Differential pulse voltammetry)
DT_{50}	Poločas rozpadu
E	Redoxní potenciál za standardních podmínek [V]
$E_{1/2}$	Půlvlnový potenciál [V]
E_{fin}	Konečný potenciál [V]
E_{in}	Počáteční potenciál [V]
E_p	Potenciál píku [V]
E_{switch}	Potenciál obratu [V]
E^0	Standardní redoxní potenciál [V]
E_{sw}	Amplituda [V]

ΔE	Potenciálový krok [V]
ELISA	Imunochemická analýza s enzymatickou detekcí (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)
EPA	Agentura pro ochranu životního prostředí (Environmental Protection Agency)
f	Frekvence [V]
F	Faradayova konstanta [$C \text{ mol}^{-1}$]
GCE	Elektroda ze skelného uhlíku (Glassy carbon electrode)
GC-ITMS	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií iontových pastí
HMDE	Visící rtuťová kapková elektroda (Hanging mercury drop electrode)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-performance liquid chromatography)
HPLC-DAD	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem s diodovým polem
I	Faradický proud [A]
$I-E$	Voltametrická křivka
I_{lim}	Limitní difuzní proud
K	Konstanta závislá na typu použité elektrody
K_{oc}	Koeficient adsorpce na organický uhlík
K_{ow}	Koeficient rozdělení oktanol/voda
LDR	Využitelný koncentrační rozsah
LOD	Limit detekce
LOQ	Mez stanovitelnosti
MFE	Rtuťová filmová elektroda (Mercury film electrode)
n	Počet vyměněných elektronů
R	Plynová konstanta [$8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$]
RE	Referenční elektroda (Reference electrode)
RNA	Ribonukleová kyselina (Ribonucleic acid)
RSD	Relativní směrodatná odchylka (Relative standard deviation)
RVC	Síťovaný skelný uhlík
SCE	Nasyčená kalomelová elektroda (Saturated calomel electrode)
SMDE	Statická rtuťová kapková elektroda (Static mercury drop electrode)
SWV	Square-wave voltametrie (Square-wave voltammetry)
t	Čas [s]

T	Teplota [K]
τ	Doba trvání jednoho potenciálového cyklu
v	Rychlost polarizace [$V s^{-1}$]
WE	Pracovní elektroda (Working electrode)
δ	Tloušťka Nernstovy difuzní vrstvy

Úvod

Stále rostoucí světová populace přináší zvyšující se nároky na produkci potravin, a tím i na intenzifikaci zemědělské výroby. Aby bylo možné zabezpečit dostatek zemědělských plodin a minimalizovat ztráty způsobené škůdci a chorobami, dochází k masivnímu využívání pesticidů, mezi které patří mimo jiné fungicidy. Tyto látky jsou používány k ochraně rostlin před houbovými onemocněními. S rostoucím používáním těchto chemických látek však může vzniknout závažný ekologický problém. Zbytky pesticidů se mohou dostávat do životního prostředí, kde přetrvávají a negativně ovlivňují ekosystémy. Povrchové a podzemní vody jsou jejich častým recipientem v důsledku zemědělského odtoku, což může vést k zátěži vodních organismů. Kromě toho mohou rezidua pesticidů přetrvávat také v potravinách, což může způsobit nepříznivé důsledky i na lidské zdraví.

Jedním z často využívaných fungicidů je benalaxyl, který je účinný především proti plísni révové a bramborové. Benalaxyl je přijímán rostlinou a rozváděn do všech jejích částí, což zajišťuje vysokou účinnost, ale zároveň zvyšuje riziko jeho přetrvávání v životním prostředí. Proto je potřeba mít k dispozici metody umožňující jeho monitorování nejen v prostředí, ale i v potravinách.

Běžně se pro stanovení pesticidů v různých typech vzorků využívají chromatografické metody ve spojení s různými detekčními systémy, které jsou ale instrumentálně a cenově náročné. Voltametrické metody nabízejí řadu výhod. Vedle vysoké citlivosti se jedná zejména o nízké náklady, rychlost analýzy a možnost miniaturizace zařízení pro použití přímo v terénu. S využitím vhodné pracovní elektrody, jako je borem dopovaná diamantová elektroda, lze dosáhnout výborné citlivosti, stability a reprodukovatelnosti měření, což z těchto metod činí velmi efektivní nástroj pro detekci nízkých koncentrací pesticidů.

Tato práce je zaměřena na vývoj jednoduché voltametrické metody pro stanovení vybraného fungicidu benalaxylu v přírodních vodách jako nástroje pro ochranu zdraví a životního prostředí.

Teoretická část

1.1. Voltametrie

Polarografie zahájila vývoj moderní elektroanalytické chemie, která se zrodila v únoru roku 1922 díky Jaroslavu Heyrovskému, který ve své laboratoři na Univerzitě Karlově zaznamenal první polarografickou křivku [1]. Když prováděl své experimenty s kapající rtuťovou elektrodou, nebylo jeho cílem vyvinout novou elektroanalytickou metodu. Pouze zkoumal povrchové napětí rtuti kapající do roztoku elektrolytu pomocí měření doby kapky rtuti. Dne 9. února 1922 ho napadlo, že by bylo zajímavé změřit proud protékající rtuť kapající do roztoku elektrolytu [2]. Tak vznikla polarografie, metoda založená na měření proudu protékajícího elektrochemickým článkem v závislosti na vkládaném potenciálu. V následujícím roce Heyrovský navrhl a zároveň nechal zkonstruovat nový přístroj nazvaný polarograf. Tento přístroj byl prvním plně automatickým analytickým zařízením. Praha se díky tomu stala centrem elektrochemie a vzbudila pozornost mnoha chemiků po celém světě. Profesor Jaroslav Heyrovský se narodil v roce 1890 a byl opakovaně nominován na Nobelovu cenu za chemii, kterou nakonec získal v roce 1959. Po druhé světové válce, byla elektrochemie jedním z hlavních proudů chemického výzkumu v Československu [3].

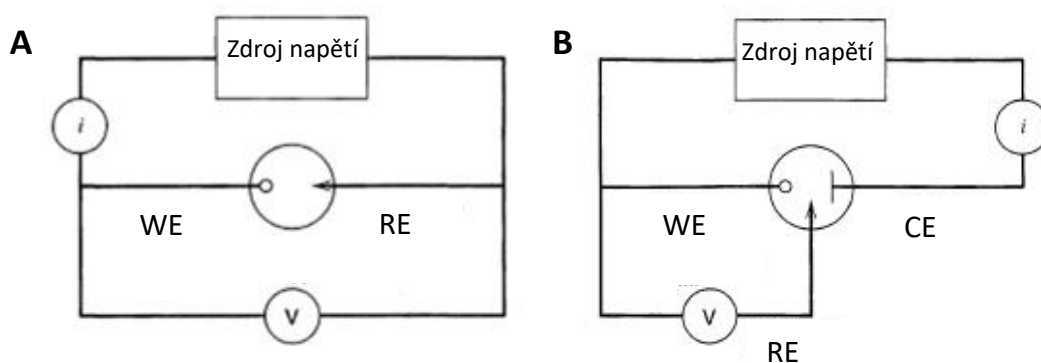
Z polarografie, kterou vynalezl Jaroslav Heyrovský, se postupně vyvinula voltametrie. Rozdíl mezi oběma metodami spočívá v použité pracovní elektrodě. Zatímco polarografie využívá kapající rtuťovou elektrodu, ve voltametii jsou to stacionární elektrody z různých materiálů nejčastěji na bázi kovů nebo různých forem uhlíku [4]. Polarografie se dnes využívá už jen ve výzkumných laboratořích při studiu elektrochemických dějů. Voltametrie je však rozšířená i v současnosti, protože se jedná o elektroanalytickou metodu, která umožňuje spolehlivé stanovení širokého spektra anorganických i organických látek. Navíc v poslední době nachází nová pole uplatnění v souvislosti s miniaturizací analytických technik, vývojem senzorů a biosenzorů, nebo point of care testováním (POCT, tzv. analýza v místě péče).

1.1.1. Princip voltametrie

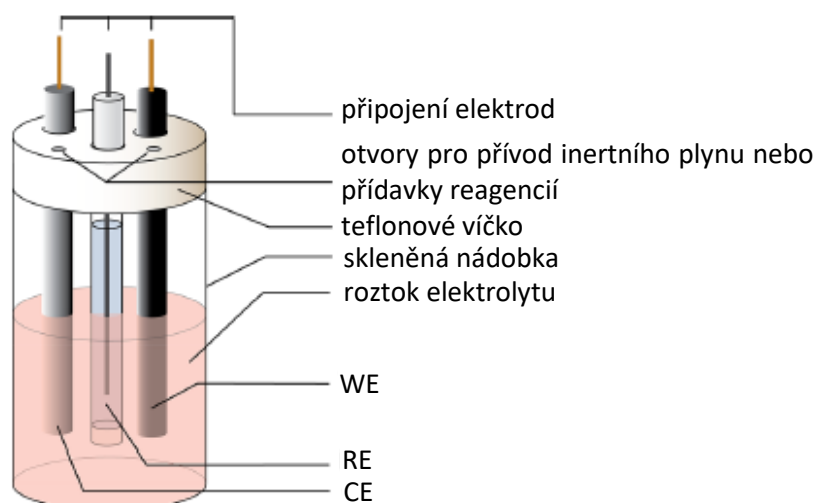
Voltametrie je obecný termín pro všechny techniky, ve kterých se měří proud jako funkce potenciálu vkládaného na elektrody. Je to metoda vhodná zejména pro stanovení látek, které je možné elektrochemicky oxidovat nebo redukovat. Výsledkem je tzv. *I-E* křivka, tedy závislost proudu na potenciálu, která se označuje jako voltamogram [4].

1.1.2. Elektrochemický článek

Základem voltametrie je elektrochemický článek, který může mít dvouelektrodové nebo tříelektrodové uspořádání, jak je uvedeno na Obr. 1. V současnosti se obvykle používají tříelektrodové elektrochemické články tvořené pracovní (WE), referentní (RE) a pomocnou (CE) elektrodou. Výhodou tohoto uspořádání je, že proud prochází mezi WE a CE a napětí je měřeno mezi WE a RE za bezproudého stavu, takže nedochází ke ztrátám na odporu elektrolytu a je přesně známé. Článek je umístěn nejčastěji ve skleněné nádobce s plastovým vrškem v roztoku základního elektrolytu. Tento vršek obsahuje otvory, které umožní vložení elektrod a případně míchadla nebo přívodu inertního plynu [5]. Praktické uspořádání elektrochemické nádoby pro voltametrickou analýzu je uvedeno na Obr. 2.



Obrázek 1 Dvouelektrodové (A) a tříelektrodové (B) uspořádání elektrochemického článku; převzato a upraveno z [6]. WE- pracovní elektroda, RE – referentní elektroda, CE – pomocná elektroda, i – ampérmetr, V – voltmetr.



Obrázek 2 Praktické uspořádání elektrochemického článku; převzato a upraveno z [7].

Jak již bylo zmíněno, elektrody jsou ponořeny v roztoku základního elektrolytu, jenž zajišťuje vodivé prostředí. Elektrolyt se volí tak, aby nedocházelo k oxidaci nebo redukci jeho složek v co největších potenciálových rozpětích, aby proudové odezvy elektrolytu neinterferovaly s píky zkoumaných látek. Současně by neměly reagovat s materiálem elektrody a analyty přítomnými v roztoku. Správným výběrem základního elektrolytu, jeho složení a zejména hodnoty pH, lze ovlivnit šířku využitelného potenciálového okna, potenciál probíhajících redoxních reakcí i oddělit dva píky, které by se v jiném prostředí překrývaly. Při přípravě elektrolytu je důležitá také volba rozpouštědla. Obvykle se používají vodné roztoky, ale u organických látek nebo komplexů těžkých kovů, které mohou mít nižší rozpustnost ve vodném prostředí, je nutností použít přídavek organického rozpouštědla (např. ethanol, acetonitril) nebo pracovat zcela v nevodném prostředí (např. dimethylsulfoxid, dimethylformamid) s přídavkem solí (LiClO_4 , NaClO_4 apod.) pro zajištění vodivosti [8].

Ve vodě rozpuštěný kyslík se také redukuje a dochází k tvorbě dvou vln, které mohou překrývat vlnu analytu. Jedna z možností odstranění kyslíku je probublávání obsahu nádoby pomocí inertního plynu, např. dusíku nebo argonu, kdy kyslík je odstraněn do několika minut [9]. Pokud použitý plyn obsahuje nečistoty, je vhodné zařadit do systému promývačky [8].

Pokud u povrchu pracovní elektrody není přítomna látka schopná oxidace či redukce, nedochází k elektrodové reakci a elektroda se polarizuje, přičemž jí prochází pouze kapacitní (nabíjecí) proud. V přítomnosti látky, která se může oxidovat nebo redukovat (depolarizátoru), nastává depolarizace elektrody a vzniká elektrolytický (faradaický) proud. Jeho velikost odpovídá koncentraci daného depolarizátoru, přičemž v elektroanalytických metodách tuto roli obvykle zastávají stanovované látky – analyty [4].

Pracovní elektroda (WE) Na pracovní elektrodě dochází k elektrochemické reakci, která je podstatou voltametrické analýzy. Pomocí potenciostatu se mění potenciál této elektrody. WE byly v minulosti nejčastěji rtuťové a v současnosti se používají různé tuhé materiály na bázi kovů nebo uhlíku [7]. Rozsah analyticky využitelných potenciálů závisí na materiálu WE, druhu rozpouštědla a složení základního elektrolytu. Obrázek 3 uvádí příklady potenciálových rozsahů pro elektrody z různých materiálů v různých prostředích. Potenciálové okno je v katodické oblasti omezeno vylučováním vodíku (tzv. přepětí vodíku), zatímco v anodické oblasti to může být rozklad vody spojený s vylučováním kyslíku nebo oxidace materiálu elektrody (Obr. 4) [4].

udržovala stejný potenciál bez ohledu na složení roztoku, ve kterém se nachází [11]. Jedná se o tzv. elektrody II. druhu. Mezi dvě nepoužívanější patří nasycená kalomelová (SCE) a argentschloridová elektroda (Ag/AgCl) [12]. SCE jsou nevhodné pro měření s Pt elektrodou, protože obsahují rtuť, která by znehodnotila povrch platiny. Také jsou nevhodné pro systémy citlivé na chloridové ionty. SCE by se neměla používat ani při teplotách nad 50 °C, protože rozklad Hg_2Cl_2 způsobí nestabilní hodnoty. Naopak vhodné použití SCE je ve vodných roztocích a potenciál této elektrody je určen koncentrací Cl^- [5]. Pokud je vnitřním roztokem SCE nasycený KCl, je potenciál této elektrody +0,241 V při 25 °C oproti standardní vodíkové elektrodě [11]. Díky své snadné výrobě a většímu teplotnímu rozsahu jsou více využívány Ag/AgCl [5]. Tato elektroda je tvořena stříbrným drátkem, který je potažen tenkou vrstvou chloridu stříbrného. Pokud je elektroda umístěna v nasyceném roztoku KCl je její potenciál +0,196 V při 25 °C oproti standardní vodíkové elektrodě [11]. Potenciál elektrody zůstává konstantní do doby, kdy koncentrace chloridů je konstantní. KCl je nepoužívanější elektrolyt, protože naruší měření pH a pohyblivost iontů K^+ a Cl^- je téměř stejná [5].

Pomocná elektroda (CE) Rozdíl mezi dvouelektrodovým a tříelektrodovým uspořádáním je určen přítomností CE v článku. Jak již bylo uvedeno výše, proud protéká mezi WE a CE. Na povrchu této elektrody neprobíhají žádné důležité procesy [12]. Volba materiálu, ze kterého má být elektroda vyrobena, není tak důležitá jako u WE, důraz se klade na velký povrch, kdy CE by měla být na rozdíl od WE nepolarizovatelná. Pomocné elektrody jsou nejčastěji tvořeny platinovým drátkem nebo plíškem a od analyzovaného roztoku mohou být odděleny solným můstkem. Tato elektroda nevyžaduje elektrochemickou předúpravu ani leštění [5].

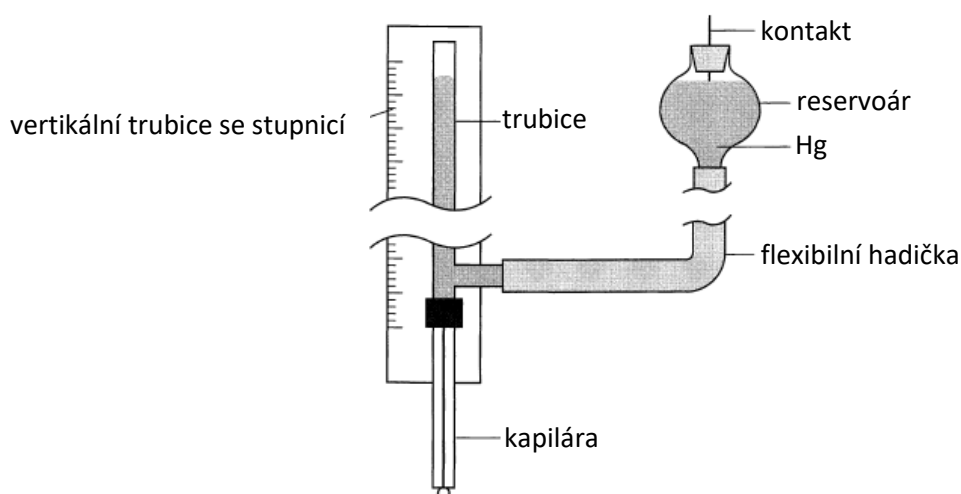
1.1.3. Pracovní elektrody

1.1.3.1 Rtuťové elektrody

Rtuť je, resp. byla široce používána v elektroanalytické chemii jako elektrodový materiál. Díky vývoji vodíku při značně vysokých záporných hodnotách potenciálu poskytuje výrazně širší katodický rozsah (-1,0 (1M H_2SO_4) až -2 V (1M NaOH)) ve srovnání s pevnými elektrodami a je proto vhodná zejména pro sledování redukčních reakcí látek. Omezení použití těchto elektrod je dáno snadnou oxidací rtuti. Nelze je použít při kladnějších potenciálech než -0,3 až -0,4 V vs. SCE v závislosti na složení základního elektrolytu. Rtuťové elektrody poskytují reprodukovatelné výsledky, protože mají snadno obnovitelný a dokonale hladký povrch [13].

Rtuť je těžký kov a vyskytuje se v několika formách, které mají toxické účinky. Proto se dnes její použití výrazně snížilo [14]. Vznikla např. mezinárodní dohoda nazvaná Minamatská úmluva o rtuti, jejímž cílem je chránit lidské zdraví a životní prostředí před škodlivými účinky rtuti. Zavazuje smluvní strany k postupnému omezení využívání rtuti ve výrobcích a technologiích [15].

Kapající rtuťová elektroda (DME) Tento typ elektrody se skládá z 12 až 20 cm dlouhé kapiláry spojené se zásobníkem rtuti (Obr. 5). Nastavením výšky rtuťového sloupce lze měnit rychlost odkapávání [16]. Kapky rtuti padají v pravidelných intervalech [17]. Reprodukovatelné podmínky zajišťuje nosný elektrolyt, výška rtuťového sloupce a potenciál. Zpočátku bylo odkapávání rtuti řízeno gravitací, dnes jej lze regulovat automaticky pomocí klepadla. Výhodou DME je eliminace kontaminace povrchu elektrody a problémů s pasivací, což vede k vynikající reprodukovatelnosti výsledků [5]. Vzhledem k velké spotřebě rtuti se již tato elektroda příliš nepoužívá.



Obrázek 5 Kapající rtuťová elektroda (DME); převzato a upraveno [6].

Visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) Principem je mechanické vytlačení rtuti ze zásobníku přes kapiláru. Celé měření probíhá na jedné kapce rtuti, která je následně mechanicky odklepnuta [18]. Spotřeba rtuti je tak oproti DME nižší. Díky pevné a přesné konstrukci lze pomocí mikrometrického šroubu zašroubovat nerezový drát do rtuťového rezervoáru, což umožňuje přesné dávkování rtuťových kapek s regulovatelnou velikostí. Jedná se o oblíbenou volbu pro studium kinetiky a elektrochemických reakcí pomocí cyklické voltametrie.

Umožňuje aplikaci rozpouštěcích technik, zejména anodické rozpouštěcí voltametrie pro stanovení kovů s využitím tvorby amalgámů. Ve srovnání s DME zajišťuje HMDE lepší reprodukovatelnost výsledků [5].

Statická rtuťová kapková elektroda (SMDE) Skládá se ze stejných prvků jako DME, ale velikost a doba kapky jsou řízeny automaticky. Rtuťová kapka se nechá dorůst do určité velikosti a poté se její růst zastaví. Jakmile k tomu dojde, začne měření proudu. SMDE reguluje tok rtuti pomocí zástrčky ovládané elektromagnetem [5]. Velikost kapky je dána dobou aktivace solenoidu, při jeho deaktivaci dojde k tomu, že tok rtuti se zastaví a vznikne statická kapka. SMDE představuje automatické vylepšení DME [19].

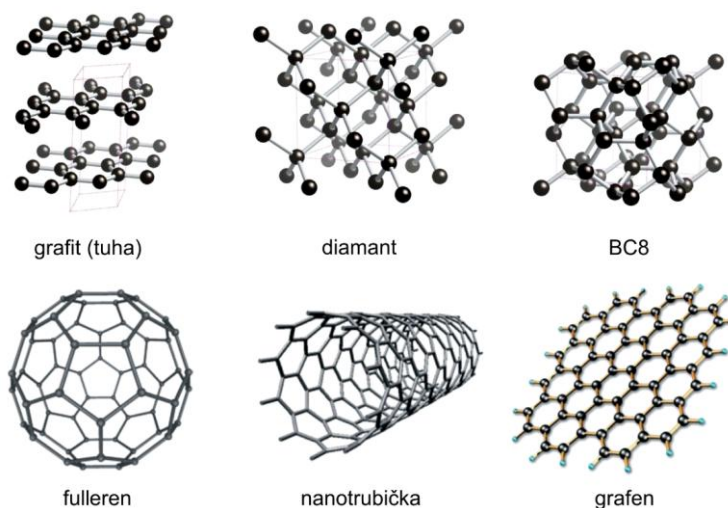
Rtuťová filmová elektroda (MFE) Vyrábí se pokrytím vodivého, inertního a ušlechtilého podkladu tenkou vrstvou rtuti. Homogenní rtuťové vrstvy lze vytvořit na kovových podkladech, jako jsou zlato, stříbro, platina nebo měď, stejně jako na uhlíkových materiálech, např. skelný uhlík nebo uhlíková pasta. Rtuť představuje vhodné médium pro akumulaci kovových iontů, protože po jejich redukci dochází ke vzniku amalgámu, který se snadno oxiduje pomocí anodické rozpouštěcí voltametrie. Uhlíkové podklady nejsou rtuťí smáčeny, díky tomu se rtuťové filmy skládají z mnoha drobných kapek rtuti, jejichž rozložení není možné regulovat. Výhodou MFE s uhlíkovým podkladem je, že rtuťový film zůstává neznečištěný atomy podkladového materiálu. Pokud se jako podklad použije zlato nebo platina, jejich vlastnosti se můžou mírně změnit, protože se do určité míry rozpouští ve rtuti. Mezi ušlechtilými kovy se jako nejvhodnější podklad osvědčilo iridium, které má nízkou rozpustnost ve rtuti. Tloušťka MFE hraje klíčovou roli při zajištění reprodukovatelných výsledků. Příliš silné nebo naopak tenké MFE mohou vést k nepřesným výsledkům. Jako podklad pro rtuťový film se běžně používají uhlíkové elektrody ve tvaru disku. MFE se uplatní při vysokých záporných potenciálech [5].

1.1.3.2 Pevné elektrody

Rtuťové elektrody mají omezený rozsah anodického potenciálu, proto je nelze použít pro oxidovatelné sloučeniny. Díky tomu se začaly hojně využívat pevné elektrody, které mají rozšířený anodický potenciál [17]. Nejčastějším materiálem těchto elektrod je uhlík, platina a zlato. Specifické aplikace vyžadují i použití stříbra, niklu nebo mědi. Při použití pevných elektrod hraje významnou roli jejich povrch, protože ovlivňuje výslednou odezvu a nelze jej tak snadno obnovit, jako v případě rtuti. Z tohoto důvodu je nezbytné elektrody před použitím

důkladně upravit a vyleštit, aby se dosáhlo opakovatelných výsledků. Mechanické leštění pro dosažení hladkého povrchu a elektrochemická aktivace při vhodném potenciálu jsou běžnými postupy při úpravě, aktivaci a regeneraci pevných elektrod. Na rozdíl od rtuťových elektrod mají pevné elektrody heterogenní povrch a z mikroskopického měřítka jsou drsné. Tato povrchová heterogenita způsobuje odchylky od typického homogenního chování na povrchu elektrod [16]. Nevýhodou pevných elektrod je zvýšené riziko pasivace a horší opakovatelnost měření [9]. Obvykle jsou pevné elektrody tvořeny krátkou válcovou tyčí z elektrodového materiálu, která je vnesena do těsně přiléhající izolační trubice. Mohou se vyskytovat i v podobě rovinné diskové konfigurace, a to ve stacionárním nebo rotujícím uspořádání [16].

Uhlíkové elektrody Pevné elektrody na bázi uhlíku jsou v současnosti hodně využívány v elektroanalýze především díky jejich širokému potenciálovému oknu, nízkému proudu pozadí, nízké ceně, chemické inertnosti a vysoké citlivosti. Uhlíkové povrchy často vykazují nižší rychlost přenosu elektronů oproti kovovým elektrodám. Tento přenos elektronů je ovlivněn strukturou uhlíkového povrchu. Přenos elektronů je možné zrychlit pomocí postupů předběžných úprav povrchu elektrod. Mezi nejvyužívanější materiály uhlíkových elektrod se řadí uhlíková pasta a skelný uhlík, ale dostupné jsou např. grafitové elektrody, elektrody z uhlíkových nanomateriálů apod. [16]. Různé formy uhlíku jsou znázorněny na Obr. 6.



Obrázek 6 Struktury vybraných alotropů uhlíku; převzato a upraveno z [20].

Elektrody ze skelného uhlíku (GCE) Tyto elektrody jsou ceněné pro své mechanické i chemické vlastnosti, široký využitelný rozsah potenciálu a chemickou odolnost vůči různým

rozpouštědlům. Je to uhlík, který má vlastnosti grafitu a zároveň se blíží svými vlastnostmi sklu a keramice. Skelný uhlík má strukturu složenou z tenkých propletených pásků zesíťovaných grafitových listů. Předúprava elektrody se provádí leštěním pomocí aluminy do lesklého zrcátkového vzhledu, kdy se postupně zmenšuje velikost použitých částic oxidu hlinitého. Před použitím se elektroda opláchne deionizovanou vodou. Mezi další aktivační kroky se řadí elektrochemické, chemické, tepelné nebo laserové ošetření. Lepší schopnost přenosu elektronů je spojována s eliminací nečistot na povrchu a s tím spojeným vznikem nových uhlíkových hran. Podobný, ale vysoce porézní materiál ze skelného uhlíku je síťovaný skelný uhlík (RVC). Jedná se o materiál s otevřenými póry, který kombinuje vlastnosti elektrochemické a hydrodynamické. RVC našel uplatnění v průtokové analýze a spektroelektrochemii [21].

Uhlíkové pastové elektrody (CPE) Skládají se z grafitového prášku smíchaného s různými organickými pojivy nemísitelnými s vodou [16]. Vzniknou tzv. uhlíkové pasty, které se naplní do teflonového těla elektrody a jsou vytlačovány pístem. CPE poskytují obnovitelný povrch obdobně jako HMDE, kdy se použitá pasta vytlačí a otre filtračním papírem. Jejich složení lze modifikovat pomocí různých příměsí přímo při míchání pasty [21]. Mezi nejpoužívanější pastové kapaliny patří Nujol a další parafinové a minerální oleje, silikonové mazivo a bromoftalein. Složení pasty ovlivňuje reaktivitu elektrody. Čím větší obsah pastové kapaliny, tím menší rychlost přenosu elektronů. Tendence organického pojiva se rozpouštět v roztocích obsahující podíl organického rozpouštědla je jedna z nevýhod uhlíkových past [16].

Elektrody z uhlíkových vláken (CFE) Zvyšující se zájem o ultramikroelektrody podpořil rozšířené využití uhlíkových vláken v elektroanalýze [21]. Tyto materiály vznikají vysokoteplotní pyrolýzou polymerních textilií nebo katalytickou chemickou depozicí. Různé výrobní postupy vedou k odlišným mikrostrukturám uhlíkových vláken. Dělí se na nízké, střední a vysoké moduly. Vlákná s vysokým modulem jsou pro elektrochemické aplikace nejvhodnější, protože mají dobře uspořádanou grafitovou strukturu a nízkou pórovitost. Zlepšení elektronového přenosu lze opět dosáhnout předúpravou elektrod, a to tepelným zpracováním nebo elektrochemickou aktivací. Velikost průměru použitých vláken je 5-20 μm . Tato vlákna se upevňují pomocí epoxidového lepidla na špičku kapiláry a používají se v diskových nebo válcových konfiguracích. Důležité je dbát na to, aby povrch uhlíku nebyl kontaminovaný epoxidovou pryskyřicí [5, 21].

Borem dopované diamantové elektrody (BDDE) Tého elektrode bude v teoretické části věnována větší pozornost, protože byla použita v rámci experimentální práce pro vývoj metody stanovení studovaného pesticidu benalaxylu. Díky svým jedinečným vlastnostem je diamant mimořádně atraktivním materiálem se širokým spektrem možných aplikací. Jeho chemická stabilita, vysoká tvrdost, optické vlastnosti i chemická inertnost jej činí velmi zajímavým. Ačkoli je diamant za běžných podmínek elektrický izolant, BDD filmy vykazují elektrickou vodivost a nachází tak uplatnění v náročných prostředích jako například ve velmi kyselých nebo biologicky aktivních roztocích. Struktura diamantu je tvořena čtyřstěnným uspořádáním atomů uhlíku, které jsou uspořádány do diamantové krychlové mřížky (Obr. 6). Každý atom uhlíku je sp^3 hybridizovaný a navázaný na čtyři další atomy, se kterými vytváří trojrozměrnou síť, která se liší od dvojrozměrné struktury grafitu. Elektrody z BDD představují vynikající materiál pro elektroanalytické aplikace. Nabízejí široké elektrochemické potenciálové okno ve vodných i organických rozpouštědlech, výbornou elektrochemickou stabilitu a nízkou kapacitní odezvu. Na rozdíl od tradičních uhlíkových materiálů jako je skelný uhlík, nevyžadují BDDE časté regenerační ošetření, protože jejich povrch zůstává stabilní i při dlouhodobém použití. Jejich výhodou je vysoká morfologická a mikrostrukturní stabilita při vysokých teplotách a proudových hustotách, nízký poměr signál šum a vynikající mechanická odolnost [22].

Přípravu BDD vrstev lze zajistit zavedením stopových množství bóru do plynné fáze během procesu chemické depolarizace z par (CVD). Dopování bórem nejen přemění diamant na polovodič, ale také zvyšuje jeho morfologii, krystalinitu a zvyšuje jeho rychlost růstu, což zlepšuje jeho elektrochemické vlastnosti. Obsah boru v BDD filmu významně ovlivňuje elektrochemické vlastnosti elektrody [23]. Povrch BDD je málo citlivý na vývoj kyslíku a umožňuje tak aplikaci vysokých anodických i katodických potenciálů bez rozkladu elektrolytu, což z něj činí vhodnou alternativu ke rtuti. Nevýhodou těchto elektrod může být relativně nízká elektrokatalytická aktivita a selektivita. K jejich zlepšení je možné využít modifikaci povrchu, například anodickou oxidací za vzniku O-terminovaného povrchu, vložením katodického potenciálu za vzniku H-terminovaného povrchu [24] nebo depozicí nanočástic kovů [25]. Diamantové elektrody představují perspektivní řešení pro aplikace v extrémních podmínkách, jako mohou být velmi vysoké anodické potenciály, polarizace v kyselém prostředí nebo působení výkonného ultrazvuku. Dosavadní výsledky získané s elektrodami na bázi diamantu potvrzují mimořádné uplatnění jak v oblasti elektroanalytické chemie [26,27] tak při elektrochemické degradaci kontaminantů ve vodách [28-30].

Kovové elektrody Přestože je k dispozici široká škála ušlechtilých kovů, platina a zlato patří mezi nejčastěji používané materiály pro kovové elektrody. Jejich výhodou je příznivá kinetika přenosu elektronů a široký rozsah anodického potenciálu [16]. Katodický potenciálový rozsah je však omezen nízkým přepětím vodíku na těchto elektrodách. Obvykle se pohybuje okolo $-0,2$ až $-0,5$ V, a to v závislosti na pH. Nevýhodou jsou i vysoké hodnoty pozadí způsobené tvorbou povrchových oxidů nebo adsorbovaných vrstev vodíku, které mohou negativně ovlivnit kinetiku elektrodových reakcí a vést zároveň ke špatné reprodukovatelnosti měření. Řešení těchto problémů spočívá v použití pulzního potenciálu pro čištění a reaktivaci elektrod nebo použití vhodné chemické předúpravy. V nevodných prostředích je problém povrchových vrstev méně závažný, proto je zde ideální volba ušlechtilých kovů [21].

1.1.4. Voltametrické metody

1.1.4.1 DC voltametrie

Stejnosměrná voltametrie (DC, direct current voltammetry) je založena na měření závislosti proudu na vloženém lineárně rostoucím nebo klesajícím potenciálu. Základními charakteristikami jsou limitní difúzní proud (I_{lim}) a půlvlnový potenciál ($E_{1/2}$). Rychlost elektrochemických reakcí, jako je redukce nebo oxidace, se mění v závislosti na vkládaném potenciálu. Rychlost redukce narůstá se zápornějším potenciálem, zatímco rychlost oxidace se zvyšuje s kladnějším potenciálem [31]. Redukce látky A na elektrodě vede ke vzniku faradaického proudu, jehož velikost je určena velikostí koncentračního gradientu. Tento vztah lze vyjádřit rovnicí (1):

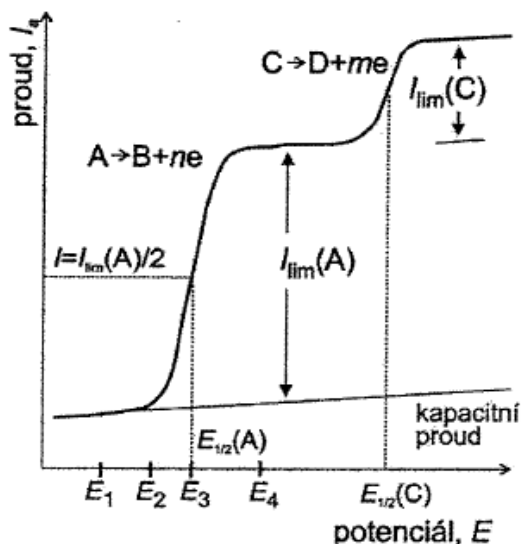
$$I = nFAD \frac{\Delta c(A)}{\Delta x} = nFAD \frac{c(A) - c(A)^0}{\delta}, \quad (1)$$

kde n je počet vyměněných elektronů v konkrétní elektrodové reakci, F je Faradayova konstanta [$96\,485 \text{ C mol}^{-1}$], A plocha elektrody [cm^2] a D je difúzní koeficient látky A [$\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$], δ je tloušťka Nernstovy difúzní vrstvy, I je faradický proud [A], $c(A)$ je koncentrace látky A na povrchu elektrody a $c(A)^0$ koncentrace látky A v roztoku [mol L^{-1}]. Se zvyšujícím se katodickým potenciálem roste rychlost elektrodové reakce, tím se látka A více redukuje, zvětšuje se koncentrační gradient a podle rovnice (1) roste proud. Při určité hodnotě potenciálu (Obr. 7, E_4) je reakce tak rychlá, že veškerá látka A, která se difúzí dostane k elektrodě je zredukována, takže její koncentrace na povrchu elektrody $c(A)^0 = 0$, tudíž proud se zvyšujícím se potenciálem již nemůže dále růst. Dosahuje své limitní hodnoty v difúzní vrstvě, která se

označuje jako limitní difúzní proud [12], kde z rovnice (1) lze pro něj odvodit rovnici (2):

$$I_{lim} = \frac{nFAD}{\delta} c(A) = Kc(A). \quad (2)$$

Důležité je, aby I_{lim} byl přímo úměrný koncentraci analytu v roztoku. Konstanta K závisí na použitém typu pracovní elektrody.



Obrázek 7 Závislost proudu redukce látky A a C na potenciálu [4].

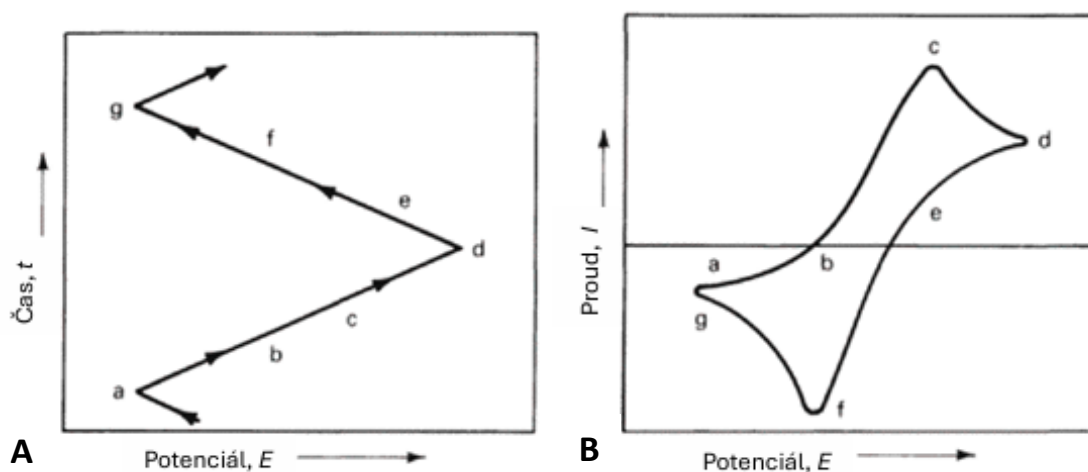
Z Obr. 6 lze vidět, že voltametrická vlna je charakterizována velikostí I_{lim} , což je kvantitativní údaj, a zároveň hodnotou $E_{1/2}$, který se nachází v bodě, kdy $I = I_{lim}/2$. V tomto bodě je látka právě z poloviny zredukována, její poměr koncentrace oxidované a redukované formy je roven jedné. $E_{1/2}$ představuje kvalitativní údaj [12]. Výhodou DC voltametrie je reprodukovatelnost křivek a zobrazení limitních proudů, které závisí pouze na koncentraci elektroaktivní látky. Na rozdíl od jiných elektroanalytických metod nezávisí I_{lim} na rychlosti elektrodového děje [32].

1.1.4.2 Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie (CV) slouží ke zjištění podmínek, za kterých probíhá oxidační nebo redukční reakce analyzovaných látek a zároveň pomáhá určit její mechanismus [33]. Potenciál pracovní elektrody se mění lineárně v čase. Proud, který v elektrochemickém článku vzniká, se měří během celé sekvence přímých a zpětných změn napětí. Měření začíná zvoleným počátečním potenciálem, který se postupně zvyšuje až na hodnotu stanovenou Nernstovou

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_O}{a_R}, \quad (3)$$

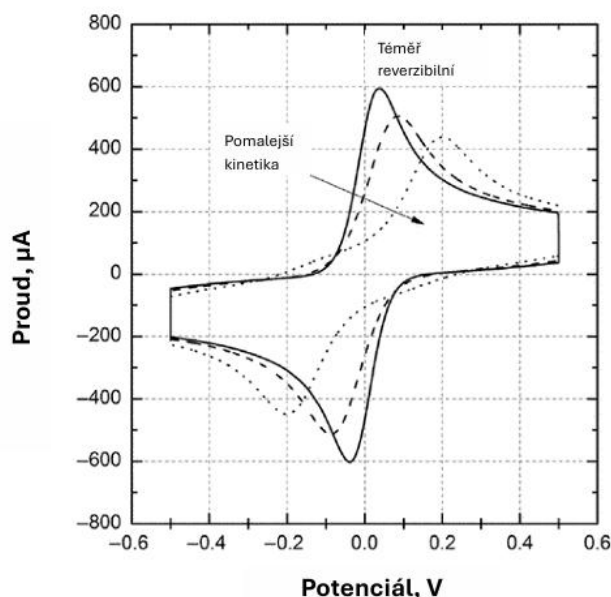
kde E je redoxní potenciál za standardních podmínek [V], E^0 je standardní redoxní potenciál [V], R je plynová konstanta [8,314 J mol⁻¹ K⁻¹], T je teplota [K], n počet vyměněných elektronů v redoxní reakci, F Faradayova konstanta [96 485 C mol⁻¹], a_O aktivita oxidované formy, a_R aktivita redukované formy. Tato rovnice vyjadřuje potenciál elektrochemického článku a umožňuje popsat jeho chování v závislosti na aktivitách zúčastněných složek, teplotě a počtu vyměněných elektronů [34]. Jakmile je dosaženo zadaného koncového potenciálu, směr změny napětí se obrátí a potenciál se vrací k výchozí hodnotě, jak je znázorněno na Obr. 8A [35]. Změna potenciálu v kladném směru se nazývá anodické skenování, v záporném směru jde o katodické skenování. Tímto postupem vzniká jeden celý cyklus, který lze opakovat. Výsledkem měření je křivka znázorňující závislost proudu na přiloženém napětí (Obr. 8B).



Obrázek 8 Závislost vkládaného potenciálu na čase (A) a odpovídající cyklický voltamogram (B); písmena a až g znázorňují fáze cyklických přeměn; převzato a upraveno z [34].

Tvar vln na cyklickém voltamogramu často odráží rychlost a energetickou náročnost probíhajících elektrochemických reakcí. Na základě těchto charakteristik se reakce klasifikují jako reverzibilní, kvazireverzibilní nebo ireverzibilní z hlediska své kinetiky. Na Obr. 9 jsou zobrazeny tři CV pro reakce, u kterých se zpomaluje kinetika. S postupným zpomalováním dochází k poklesu proudových maxim. S klesající rychlostí reakce se potenciály pík od sebe vzdalují. Pro reverzibilní elektrochemickou reakci platí, že potenciály anodického a katodického píku na cyklickém voltamogramu jsou při teplotě 25 °C od sebe vzdáleny přibližně $59/n$ mV. Při symetrickém skenu vůči tomuto potenciálu mají píky stejnou výšku a voltamogram je asymetrický a periodický. S klesající reverzibilitou reakce se píky od sebe

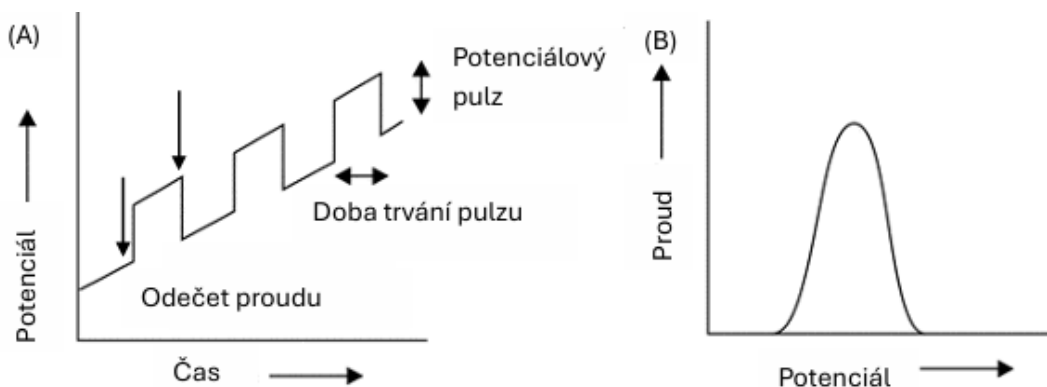
vzdalují. Pokud je zaznamenán pík pouze v jednom směru, jedná se o ireverzibilní reakci [36,37]. CV slouží k pochopení mechanismů sledovaných elektrochemických reakcí, včetně tvorby meziproductů a rychlosti redoxních reakcí [38, 39].



Obrázek 9 Změna tvaru cyklického voltamogramu s klesající kinetikou reakce, resp. s klesající reversibilitou systému; převzato a upraveno z [35].

1.1.4.3 Diferenční pulzní voltametrie

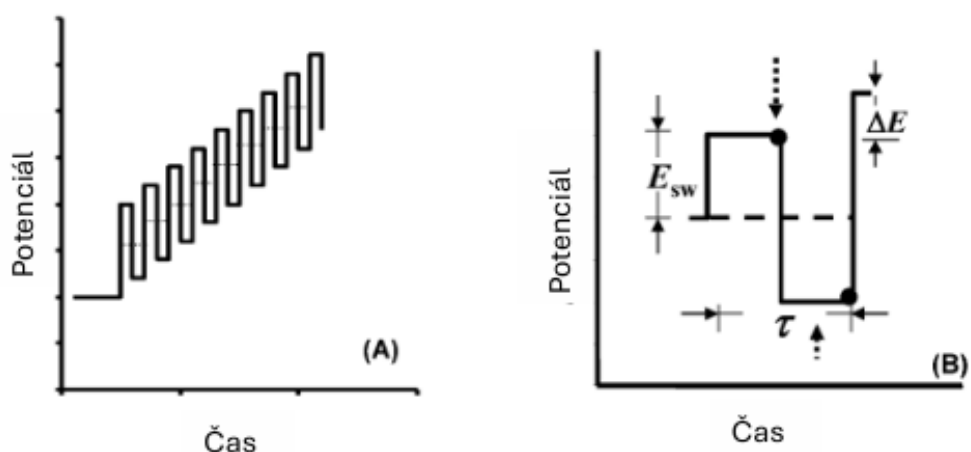
Pulzní elektrochemické techniky byly původně vyvinuty ke zvýšení citlivosti klasické polarografie, resp. voltametrie, protože umožňují eliminaci nežádoucího vlivu nabíjecího proudu. Při diferenční pulzní voltametii (DPV) se na elektrodu vkládá lineárně rostoucí potenciál, který je doplněn konstantními napěťovými pulzy s definovanou výškou a dobou trvání (Obr. 10A). Proud se snímá těsně před začátkem a koncem pulzu. Rozdíl mezi těmito dvěma hodnotami se následně zobrazí jako funkce potenciálu, výsledný voltamogram má tvar píku (Obr. 10B) [40]. Při měření diferenciálního proudu bude jeho hodnota stoupat s tím, jak se bude současně zvyšovat rychlost redoxního proudu, ale později bude opět klesat do momentu, kdy se proud přiblíží k ustálené hodnotě. Potenciál vrcholu proudového píku u DPV odpovídá středu voltametrické redoxní vlny, tedy hodnotě půlvlnového potenciálu. Tato metoda je vhodná pro analytické aplikace, jelikož umožňuje dosažení velmi nízkých detekčních limitů na úrovni 10^{-6} - 10^{-9} mol L⁻¹ v závislosti na analyzovaných látkách [40, 41].



Obrázek 10 Průběh vkládaného potenciálu (A) a odpovídající voltamogram (B) při DPV; převzato a upraveno z [41].

1.1.4.4 Square-wave voltametrie

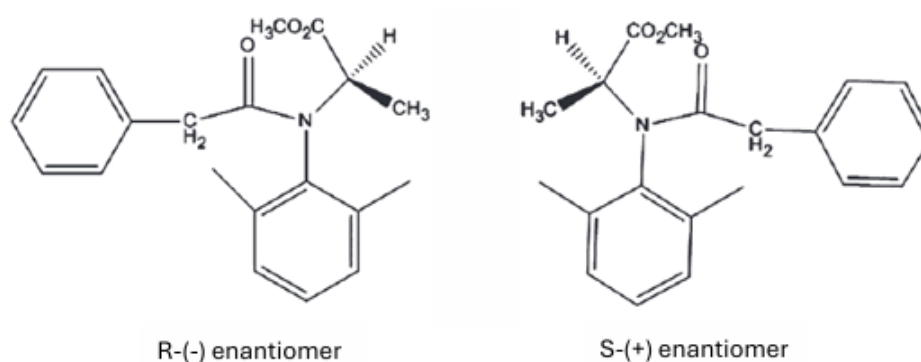
Square-wave voltametrie (SWV) představuje specifickou variantu oblíbené diferenční pulzní voltametrie, patří mezi nejvyspělejší metody v rámci pulzních voltametrických technik. SWV je navržena, aby umožnila analytická měření s vysokou citlivostí a rychlostí. Na elektrodu se vkládá střídavé napětí ve tvaru opačně orientovaných pravoúhlých pulzů, které jsou charakterizovány amplitudou, resp. výškou pulzu a frekvencí (Obr. 11A) [42]. Proud se vzorkuje na konci pozitivního segmentu jako tzv. dopředný proud a na začátku následujícího, opačně orientovaného segmentu jako tzv. zpětný proud. Následně se provede diference a získaný konečný proudový signál se zaznamenává v závislosti na potenciálu. Voltamogram má opět tvar píku. Výhodou metody je opět vysoká citlivost srovnatelná s DPV [43].



Obrázek 11 Průběh vkládaného potenciálu (A) a detail potenciálového cyklu při SWV (B); převzato a upraveno z [44]; E_{sw} – amplituda, τ – doba trvání potenciálového cyklu, ΔE – potenciálový krok.

1.2. Benalaxyl

Benalaxyl (BL, methyl-N-(2,6-dimethylfenyl)-N-fenylacetyl-DL-alaninát, CAS: 71626-11-4) byl poprvé uveden na trh v roce 1981 italskou společností Farmoplant (součást koncernu Montedison) pod obchodními názvy Galben a Tairel. Tento fungicid se rychle rozšířil díky své systémové účinnosti a schopnosti inhibovat syntézu RNA u patogenních hub [45]. Jedná se o široce používaný acetanilidový fungicid vhodný k použití na hroznech, rajčatech, paprikách, bramborách, cibuli a tabáku. BL obsahuje v alkylové části chirální uhlík, který tvoří dvojici enantiomerů podle (Obr. 12) [46].



Obrázek 12 Strukturní vzorec dvojice enantiomerů Benalaxylu; převzato a upraveno z [47].

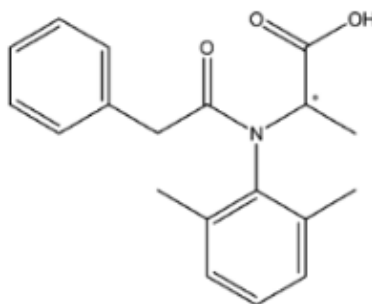
Důležitou roli hraje R-enantiomer vykazující fungicidní aktivitu. Pesticidy se převážně aplikují přímo na cílová místa plodin. V důsledku oplachu např. dešťovou vodou mohou tyto aktivní látky kontaminovat vodu a okolní půdu. Ze studií environmentálního chování vyplynulo, že S-benalaxyl pravděpodobněji zůstane v půdě než R-benalaxyl [46].

1.2.1. Fyzikálně-chemické vlastnosti

Vzhled:	bělavá mikrokrytalická pevná látka
Molekulární vzorec:	$C_{20}H_{23}NO_3$
Molekulová hmotnost:	325,4
Bod tání:	76,8 °C
Rozklad:	250 °C
Relativní hustota při 20 °C:	1,18 kg l ⁻¹
Rozpustnost ve vodě při 20 °C:	28,6 mg l ⁻¹

Tlak par při 25 °C:	$6,6 \times 10^{-5}$ Pa
Koeficient adsorpce na organický uhlík (K_{oc}):	2728-7173
Koeficient rozdělení oktanol/voda ($\text{Log } K_{ow}$):	3,54
DT ₅₀ při pH 9 a 25 °C původní látky:	86 dní
DT ₅₀ v půdě původní látky:	20-71 dní

BL je ve vodném prostředí stabilní v širokém rozsahu pH a ve vodném roztoku je odolný proti slunečnímu záření. V koncentrovaných alkáliích hydrolyzuje. V průběhu degradace vznikají kyselé metabolity, přičemž jedním z produktů je karboxylová kyselina [48,49]. Primárním metabolitem, který je ve vodě rozpustnější je kyselina benalaxylová. Tato kyselina znázorněná na (Obr. 13) je rezistentnější než BL a může být škodlivější pro vodní organismus [50].



Obrázek 13 Strukturální vzorec kyseliny benalaxylové [50].

1.2.2. Použití/účinek

Chirální fungicidy ze skupiny acylaminokyselin (AACF) se běžně používají k ochraně zemědělských plodin proti chorobám způsobeným patogeny z kmene Oomycota. Mezi nejznámější zástupce této skupiny patří benalaxyl, metalaxyl a furalaxyl [51]. BL prokazuje výbornou léčebnou a ochrannou účinnost proti houbám řádu *Peronosporales*, které způsobují řadu závažných onemocnění hospodářsky důležitých plodin. V některých zemích se používá rac-benalaxyl. Jedná se o směs enantiomerů 1:1, která snižuje potenciální poškození životního prostředí. Metabolismus a biodegradace racemického benalaxylu ve vodním prostředí, půdě a v různých rostlinách byly důkladně prozkoumány a bylo zjištěno, že jeho degradace v půdě je mikrobiologicky probíhající proces [52]. BL ovlivňuje RNA polymerázu 1, čímž narušuje syntézu ribozomální RNA. Díky lipofilní rozpustnosti snadno proniká do rostlinných pletiv a

následně je v rostlině akropetálně rozváděn pomocí xylému. BL zabraňuje klíčení spor, tvorbě klíčivých trubic, omezují růst mycelia i tvorbu spor [53].

1.2.3. Nežádoucí účinky/toxicita

Pesticidy významně přispívají ke zvýšení zemědělských výnosů, avšak mají zároveň řadu negativních dopadů na lidské zdraví a životní prostředí. Alespoň 30 % běžně používaných pesticidů na světě vykazuje chirální strukturu a většina z nich se prodává ve formě racemátu. Pro správné posouzení zdravotních a ekologických rizik pesticidů je nezbytné studium jednotlivých enantiomerů. Benalaxyl je regulovaná látka, jejíž výskyt v potravinách je kontrolován limity např. 0,02 mg kg⁻¹ pro brambory a 0,5 mg kg⁻¹ pro rajčata. Zároveň americká Agentura pro ochranu životního prostředí (EPA) určila limity reziduí R-Benalaxylu ve výši 3,0 a 0,2 mg kg⁻¹ v hroznech a rajčatech nebo na jejich povrchu [54]. AACF látky existují ve formě páru enantiomerů s konfigurací R a S, zároveň vykazují nízkou akutní toxicitu. Navíc nebyly u těchto látek prokázány karcinogenní, teratogenní ani vývojové toxické účinky u laboratorních zvířat [51]. Ve studiích akutní toxicity neprokázal BL dráždivé účinky na kůži ani na oči. Nevykazoval ani kožní senzibilizační potenciál. Jelikož sloučenina nepohlcuje elektromagnetické záření v oblasti 290-700 nm, není potřeba provádět další testy na fytotoxicitu a fotomutagenitu. Po perorálním podání se BL rychle a ve značné rozsahu vstřebává a následně se vylučuje především stolicí, což naznačuje významné zapojení žlučové exkrece a v menší míře také močí. V organismu dochází k jeho široké distribuci a rozsáhlému metabolizování, především prostřednictvím oxidačních procesů. Při opakovaném podání nedochází k jeho hromadění v těle. *In vitro* srovnávací studie metabolismu s využitím hepatocytů člověka, potkana a psa ukázala kvalitativně podobné metabolické profily bez přítomnosti významného metabolitu u lidských hepatocytů [55]. V souvislosti s nežádoucími účinky BL byla provedena rovněž studie, ve které byl BL podáván perorálně po dobu 30 dní myším. Podání vyvolalo významný oxidační stres, a to v játrech i ledvinách, který zapříčinil jejich histopatologické poškození. Analýza metabolomiky moči ukázala, že benalaxyl způsobuje poruchy v energetickém metabolismu [56].

1.2.4. Stanovení

Vzhledem k možným nežádoucím účinkům pesticidů v prostředí je třeba mít k dispozici citlivé metody pro jejich monitorování. Existuje několik publikovaných prací zaměřených na

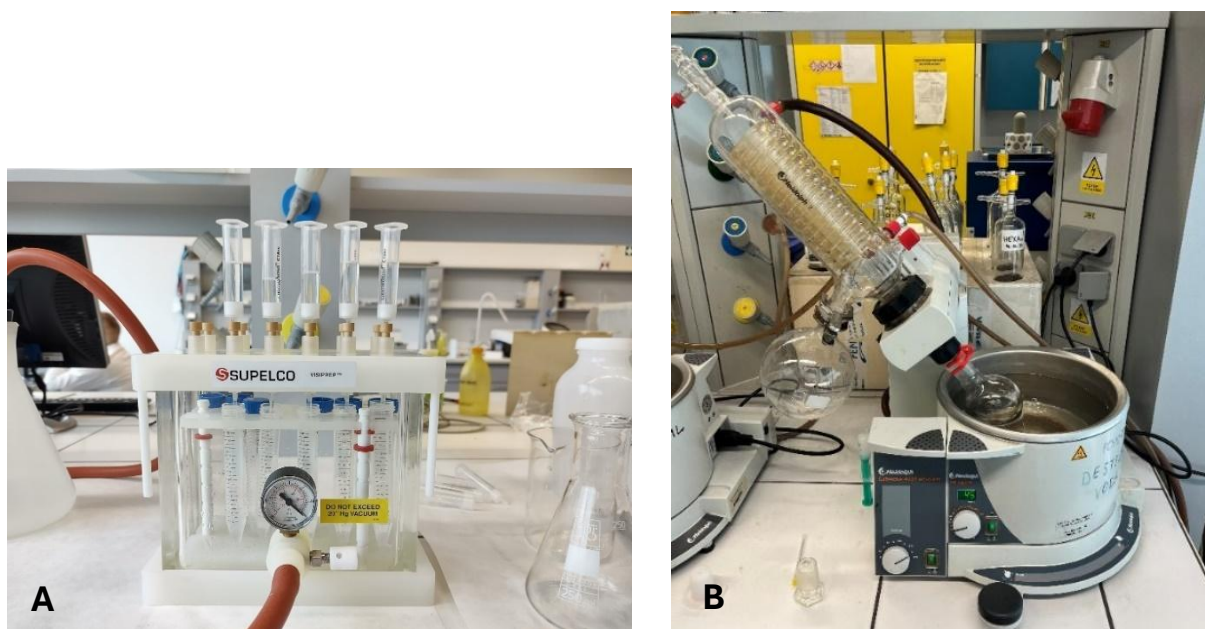
stanovení BL. Mezi nejčastěji používané metody patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). K rozlišení enantiomerů BL se využívá např. ve spojení s ultrafialovou (UV) detekcí nebo detektorem cirkulárního dichroismu (CD) [57, 58]. Dále je pro tyto účely hojně využívaná HPLC v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) [59, 60] nebo s detektorem diodového pole (DAD) [61, 62]. Mezi další využívané metody lze zařadit plynovou chromatografii (GC) např. ve spojení s detektorem dusík-fosfor [63], s hmotností spektrometrií iontových pastí (ITMS) [64], nebo MS [65] a MS/MS detekcí [66]. Chromatografické metody poskytují vysokou citlivost a selektivitu stanovení. Instrumentální náročnost a často komplikované postupy přípravy vzorků pro analýzu však nejsou vždy nejvhodnější pro rychlé orientační monitorování kontaminace prostředí nebo potravin rezidui pesticidů. Jako alternativa byla v literatuře popsána rovněž imunoanalytická metoda, tzv. (ELISA), která slouží k detekci a kvantifikaci konkrétních látek pomocí specifické vazby antigen–protilátka a enzymové reakce [67, 68].

Cílem této bakalářské práce je vyvinout voltametrickou metodu pro stanovení fungicidu benalaxylu, jehož voltametrické chování dosud nebylo popsáno. Práce se zaměřuje na charakterizaci elektrochemických vlastností benalaxylu a optimalizaci podmínek jeho stanovení s využitím různých voltametrických technik. Výsledkem by měla být jednoduchá, rychlá a citlivá metoda, která by mohla být vhodnou alternativou k výše popsaným chromatografickým metodám.

2. Experimentální část

2.1. Přístrojové vybavení

Voltametrická analýza byla realizována pomocí přístroje Autolab PGSTAT204 (Metrohm Autolab, NL) řízeného softwarem Nova verze 2.1.5. Experimenty probíhali v konfiguraci se třemi elektrodami. Jako pracovní elektroda byla použita BDDE (BioLogic, FR o geometrické ploše $7,07 \text{ mm}^2$ a s poměrem B/C při depozici v rozmezí 500-100 ppm). Referenční elektrodu tvořila nasycená argentchloridová elektroda (Ag/AgCl/KCl, sat.) a platinový drátek sloužil jako pomocná elektroda (Monokrystaly, CZ). Pro zajištění homogenity roztoku během měření bylo využito magnetické míchání v rámci polarografické nádoby. Roztoky byly připravovány s využitím analytických vah (Denver Instrument, NY) a ultrazvukového zařízení Bandelin SONOREX (Schalltec GmbH, DE). Roztoky byly dávkovány pomocí automatických pipet Fisherbrand (Fisher Scientific, Pardubice). K zajištění přesného pH byl využit pH-metr Accument AB 150 (Fisher Scientific, Pardubice). Pro zakoncentrování vzorku byla použita extrakce tuhou fází pomocí zařízení Visiprep SPE Vakuum Manifold (Obr. 14A, Merck, DE) s kolonkami Chromabond C18ec (Macherey-Nagel, DE) a rotační vakuová odparka (Obr. 14B, Heidolph, DE).



Obrázek 14 Přístroj Visiprep SPE Vakuum Manifold s kolonkami Chromabond C18ec (A) a rotační vakuová odparka (B).

2.2. Použité chemikálie

Zásobní roztok Benalaxyly (BL, Sigma-Aldrich, CZ) o koncentraci $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním přesně odváženého množství prášku v acetonitrilu (Honeywell/Riedel-de Haën, DEU). Takto připravený roztok byl uchován v lednici při teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Brittonův-Robinsonův pufr (BRB) byl připraven jako směs kyselé a zásadité složky pomocí pH metru. Kyselá složka obsahovala $0,04 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$, CH_3COOH a H_3BO_3 (PENTA, Ing. Petr Švec, CZ). Alkalická složka obsahovala $0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ (Lachema, CZ). Při analýze BL byl testován jako elektrolyt rovněž $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ roztok H_2SO_4 připravený naředěním 96% zásobního roztoku (PENTA, Ing. Petr Švec, CZ).

2.3. Pracovní postupy

2.3.1. Voltametrické měření

Před každým pracovním dnem byla BDDE aktivována pomocí CV v prostředí $1,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$, aby byla zajištěna její optimální elektrochemická odezva. Aktivace elektrody zahrnovala 20 cyklů v rozsahu od počátečního potenciálu (E_{in}) $-1,0 \text{ V}$ k potenciálu obratu (E_{switch}) $+2,5 \text{ V}$ do konečného potenciálu (E_{fin}) $+2,5 \text{ V}$ s rychlostí polarizace (ν) 100 mV s^{-1} .

Pro studium elektrochemického chování BL byla použita CV s následujícími parametry: $E_{\text{in}} = -0,5 \text{ V}$, $E_{\text{switch}} = +2,5 \text{ V}$, $E_{\text{fin}} = +2,5 \text{ V}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$. Pro stanovení BL byly optimalizovány parametry DPV a SWV. DPV: $\nu = 40 \text{ mV s}^{-1}$, šířka pulzu (t , doba trvání pulzu) = 20 ms a výška pulzu (A , amplituda) = 50 mV ; SWV: $\nu = 40 \text{ mV s}^{-1}$, $A = 30 \text{ mV}$, frekvence (f) = 10 Hz . Veškerá měření byla prováděna při laboratorní teplotě ($21 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$).

2.3.2. Analýza reálných vzorků

Pro analýzu reálného vzorku byla odebrána voda z řeky Labe, nedaleko sportovního parku v Pardubicích. Místo odběru je vyznačeno na mapě na Obr. 15A a zachyceno na fotografii na Obr. 15B. Vzorek byl odebrán do plastové lahve, která měla objem 2 litry. Ta byla nejprve vypláchnuta odebíranou vodou a poté byla naplněna vzorkem. Do doby zpracování byla láhev skladována v lednici. S ohledem na nepřítomnost cílového fungicidu ve vzorku bylo nutné přidat přesně definovaný objem standartního roztoku BL, aby byla dosažena požadovaná koncentrace analytu ($5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$). Takto připravený vzorek byl následně analyzován. Následující postup byl optimalizován pomocí modelových vzorků.

Zakoncentrování bylo provedeno s využitím extrakce na tuhou fázi s 5 kolonkami Chromabond C18ec o objemu 6 mL obsahujících po 500 mg sorbentu. Ty byly napojeny na extraktor (Visiprep SPE Vacuum Manifold). Extrakční zařízení obsahovalo pojistnou nádobu a vakuovou vývěvu vytvářející podtlak kontrolovaný manometrem. Kolonky byly před samotnou extrakcí aktivované promytím 10 mL acetonitrilu a následným proplachem 10 mL deionizované vody. K analýze bylo odměřeno 500 mL vody obohacené přídavkem standardního roztoku BL. Přes každou kolonku bylo prokapáno 100 mL vzorku vody. K eluci byl použit acetonitril, kdy každá kolonka byla prolita 20 mL rozpouštědla. Po extrakci bylo získáno 100 mL eluátu, který byl dále zpracován odpařením do sucha na rotační vakuové odparce pracující při teplotě 45 °C a tlaku kolem 150-190 torrů. Po odpaření byl vzorek rozpuštěn v 1,0 mL acetonitrilu a následně použit k voltametrické analýze.

Pro každou voltametrickou analýzu byl použit 1,0 mL zakoncentrovaného vzorku v acetonitrilu s přidáním 9,0 mL základního elektrolytu. Stanovení proběhlo s využitím metody DPV s optimalizovanými parametry. Při vyhodnocení byla uplatněna metoda standardního přídavku, přičemž byly přidány tři přídavky standardního roztoku BL o objemu 25 μL a koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

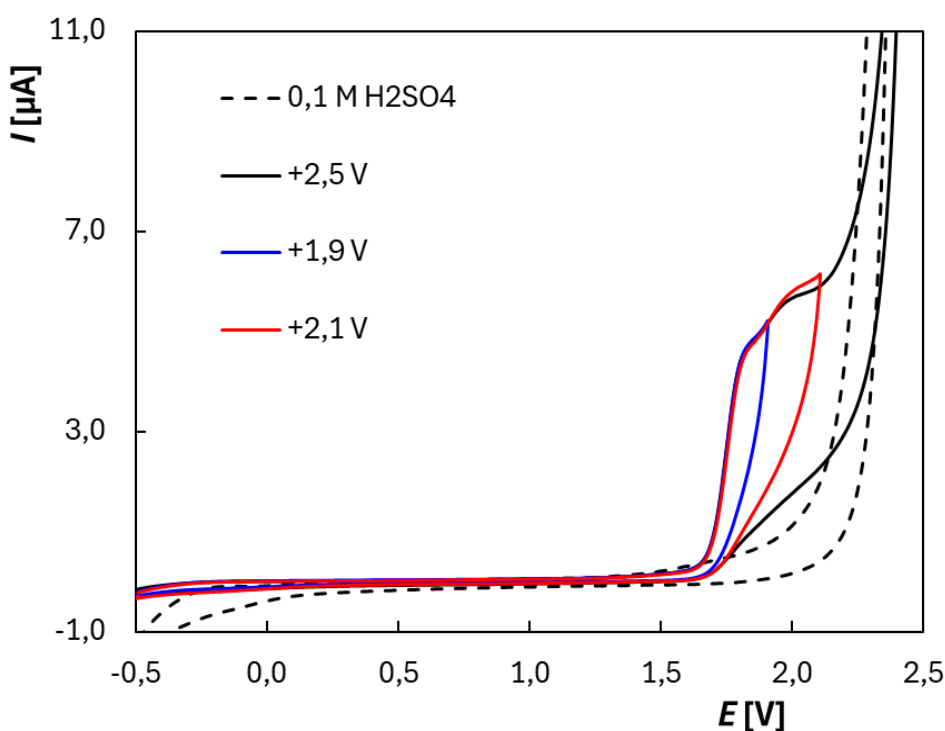


Obrázek 15 Mapa s vyznačeným místem odběru (A) a fotografie místa odběru (B).

3. Výsledky a diskuse

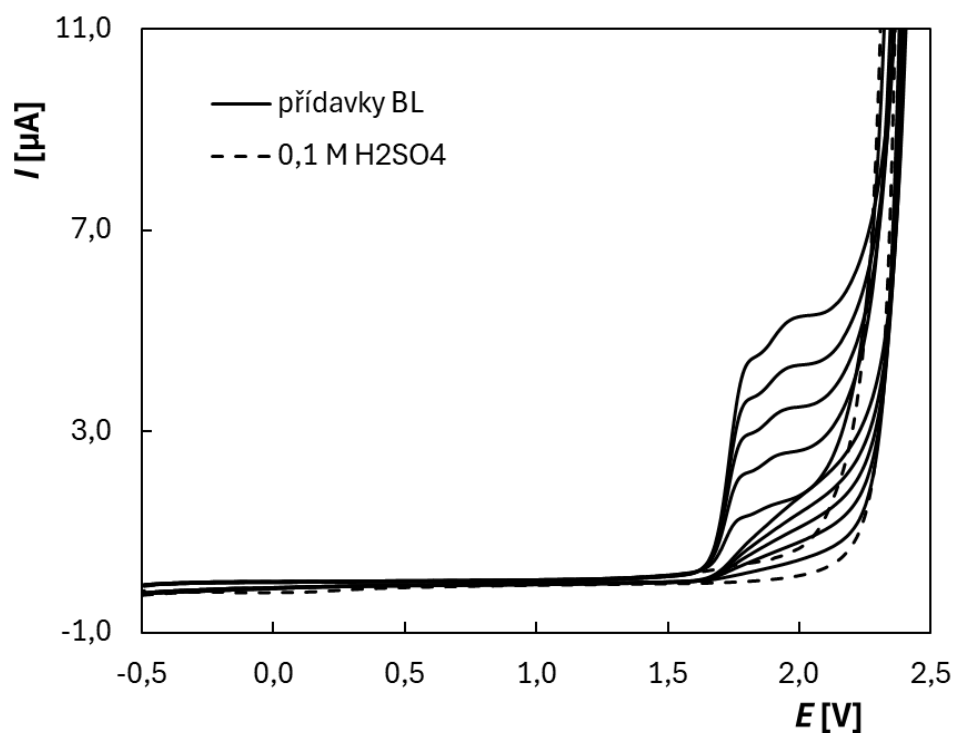
3.1. Voltametrické chování benalaxylu

Na úvod práce byl změřen cyklický voltamogram BL, aby bylo zjištěno, zda podléhá redoxním reakcím a při jakých potenciálech. K měření byl použit jako základní elektrolyt roztok H_2SO_4 o koncentraci $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a koncentrace BL byla $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Byly nastaveny následující parametry CV: $E_{\text{in}} = -0,5 \text{ V}$, $E_{\text{switch}} = +2,5 \text{ V}$, $E_{\text{fin}} = +2,5 \text{ V}$, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. Z Obr. 16 lze vidět, že BL se oxiduje ve dvou krocích. První proudové maximum bylo zaznamenáno kolem potenciálu (E_p) $+1,8 \text{ V}$, druhé při E_p kolem $+2,0 \text{ V}$. Na katodickém úseku voltamogramu nebyl pozorován žádný redukční pík, což svědčí o elektrochemicky ireverzibilním průběhu reakce. Poté byly změřeny cyklické voltamogramy s E_{switch} nastaveným za první ($+1,9 \text{ V}$) a druhý ($+2,1 \text{ V}$) oxidační pík BL, aby byl eliminován vliv případných následných reakcí na reversibilitu systému. I za těchto podmínek bylo potvrzeno, že se jedná o ireverzibilní reakci. Z Obr. 17 vyplývá, že výška píku (I_p) BL narůstá s koncentrací, což je podmínkou elektroanalytické aplikace.



Obrázek 16 Cyklické voltamogramy BL v prostředí $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ získané na BDDE. Parametry:

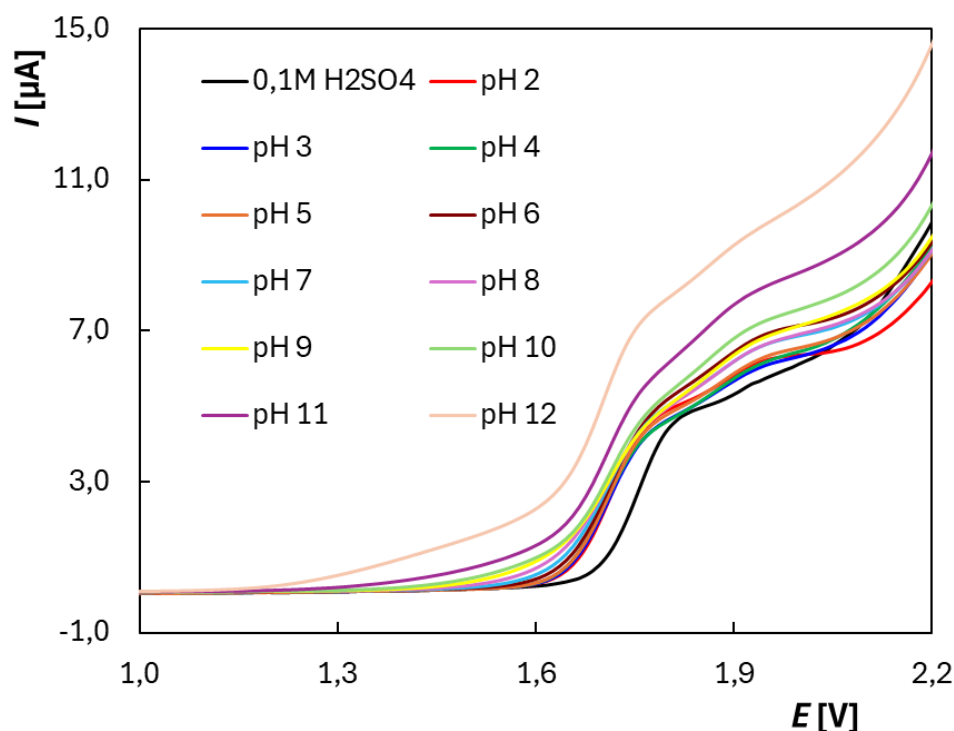
$$E_{\text{in}} = +2,5 \text{ V}, E_{\text{switch}} = +1,9; +2,1; +2,5 \text{ V}, E_{\text{fin}} = +2,5 \text{ V}, v = 100 \text{ mV s}^{-1}, c_{\text{BL}} = 50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}.$$



Obrázek 17 Cyklické voltamogramy BL v prostředí $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ získané na BDDE v závislosti na koncentraci. Parametry: $E_{in} = +2,5 \text{ V}$, $E_{switch} = +2,5 \text{ V}$, $E_{fin} = +2,5 \text{ V}$, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, $c_{BL} = 10\text{-}50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

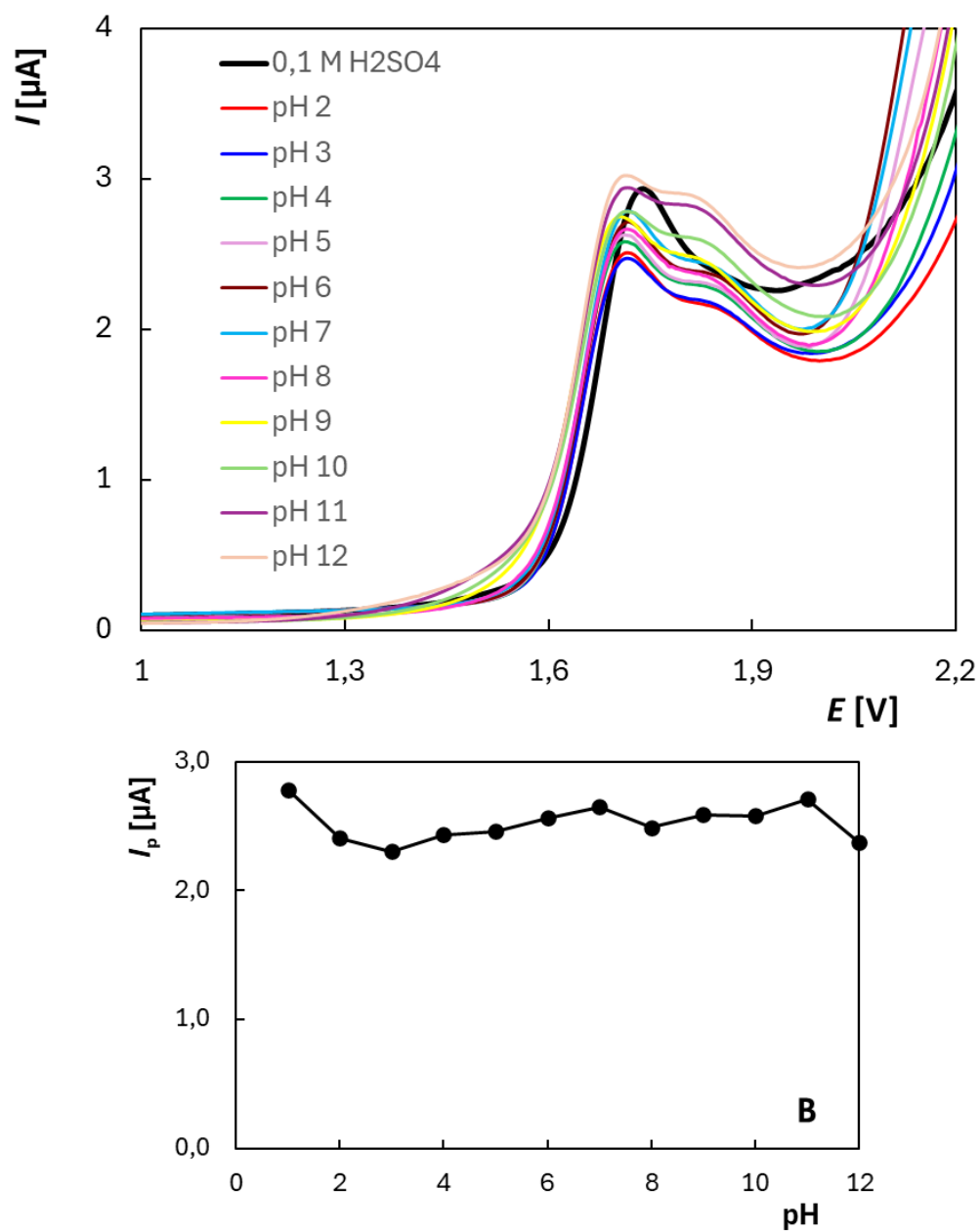
3.1.1. Závislost na pH a složení základního elektrolytu

Složení základního elektrolytu, a zejména jeho pH, významně ovlivňuje voltametrické chování analyzovaných látek. K hodnocení závislosti elektrochemické odezvy BL na pH byl nejprve využit roztok H_2SO_4 o koncentraci $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pro dosažení kyselého prostředí a BRB o pH 2,0-11. Nejprve byla použita metoda CV, kdy koncentrace BL v polarografické nádobě byla $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Na Obr. 18 jsou z důvodu lepší přehlednosti uvedeny pouze anodické části cyklických voltamogramů. 2 oxidační píky BL byly pozorovány v celém studovaném rozsahu pH, pouze v alkalickém prostředí se zhoršovala jejich vyhodnotitelnost, protože byl signál částečně překryt vylučováním kyslíku. V prostředí zředěné H_2SO_4 byla 2. oxidační vlna téměř nezatelná. Potenciál píků BL se v závislosti na pH neměnil. Výjimkou bylo prostředí kyseliny sírové, kde se ale neměnilo pouze pH roztoku, ale rovněž jeho složení a iontová síla. Konstantní hodnota E_p svědčí o tom, že se na sledovaných redoxních reakcích nepodílejí protony, tedy že redoxní proces není ovlivněn protonačním stavem molekuly.



Obrázek 18 Anodické části cyklických voltamogramů BL získané na BDDE v závislosti na pH základního elektrolytu. Parametry: $E_{in} = +2,5 V$, $E_{switch} = +2,5 V$, $E_{fin} = +2,5 V$, $v = 100 mV s^{-1}$, $c_{BL} = 50 \mu mol L^{-1}$.

Z křivek uvedených na Obr. 18 nebylo možné zvolit vhodné pH základního elektrolytu pro stanovení BL. Proto byla jako druhá metoda použita DPV. Koncentrace BL v tomto případě byla $10 \mu mol L^{-1}$. Výsledné voltamogramy jsou uvedeny na Obr. 19A. Z obrázku je zřejmé, že opět byla zaznamenána velice podobná odezva BL v celém rozsahu pH v BRB, ale s rostoucí hodnotou pH se zhoršovala separace druhého píku a tím se zhoršovala i jeho vyhodnotitelnost. Jako vhodnější se proto jeví prostředí $0,1 mol L^{-1} H_2SO_4$, kde nebyla 2. odezva téměř patrná (černá křivka na Obr. 19A). Z příložené závislosti I_p na pH na Obr. 19B vyplývá, že v tomto prostředí byla rovněž zaznamenána nejvyšší hodnota I_p . Výška píku byla vyhodnocována spuštěním kolmice z maxima píku ke spojnici minima před a za píkem. Obě odezvy byly vyhodnocovány jako jeden pík a jako maximum byl brán vrchol odpovídající prvnímu oxidačnímu kroku. Pro další experimenty byl jako základní elektrolyt zvolen roztok $0,1 mol L^{-1} H_2SO_4$. Jak vyplývá z Tab. 1, v tomto prostředí byla získána nejvyšší proudová odezva a současně bylo měření velice dobře opakovatelné.



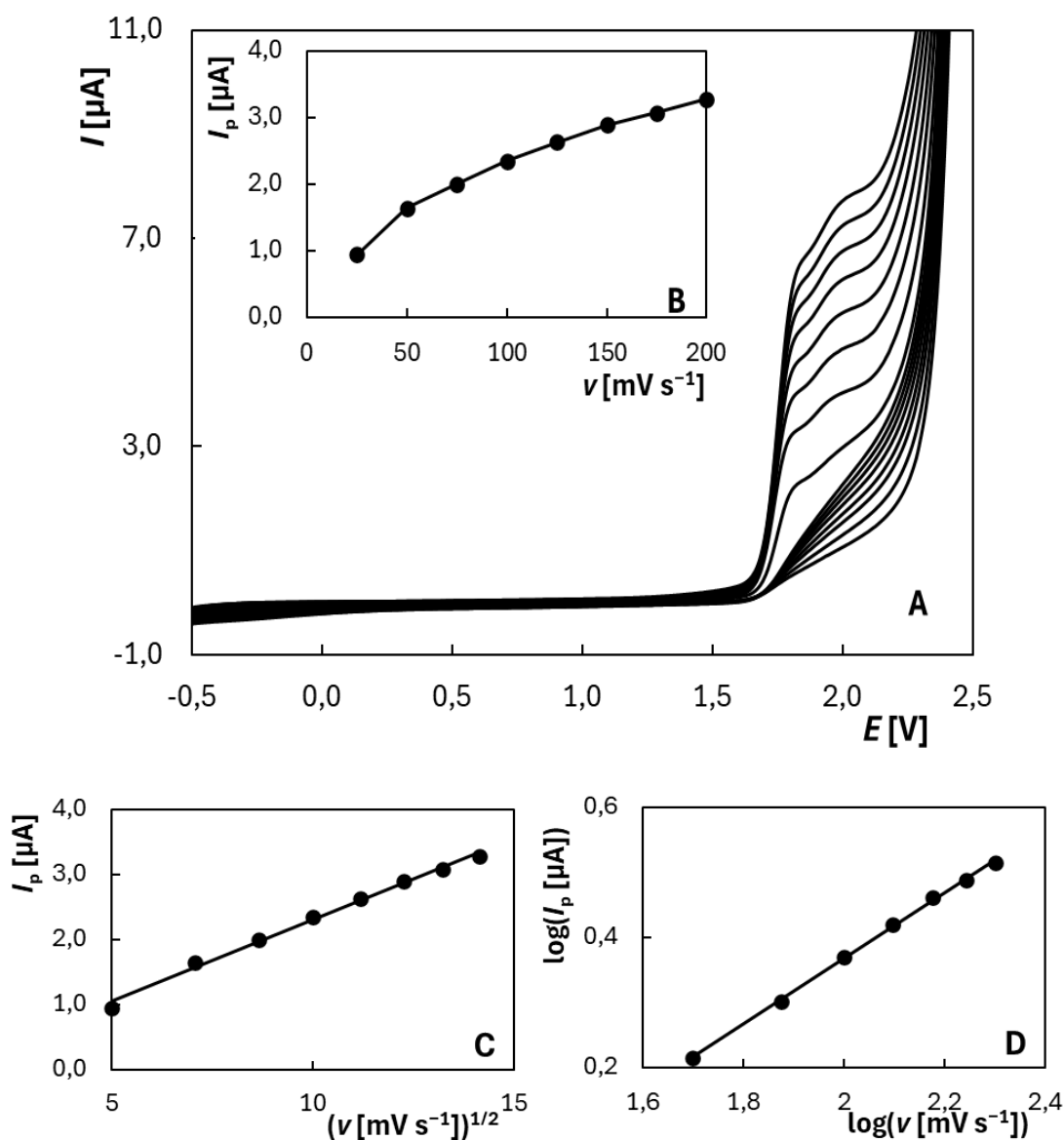
Obrázek 19 DP voltamogramy BL získané na BDDE v závislosti na pH základního elektrolytu.
 Parametry: $E_{in} = 0 \text{ V}$, $E_{fin} = +2,5 \text{ V}$, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $A = +50 \text{ mV}$, $t = 50 \text{ ms}$, $c_{BL} = 50 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Tabulka 1 Porovnání opakovatelnosti měření v závislosti na pH a složení elektrolytu

Elektrolyt	I_p [μA]	RSD (n = 5) [%]
0,1 H_2SO_4	2,78	0,62
pH 3	2,31	1,17
pH 5	2,45	0,60

3.1.2. Závislost na rychlosti polarizace

Za účelem hlubšího porozumění elektrochemickému mechanismu byla studována závislost voltametrické odezvy na rychlosti polarizace pracovní elektrody. Měření byla prováděna metodou CV s BL o koncentraci $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ v prostředí $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$. Polarizační rychlost byla postupně zvyšována z 25 do 200 mV s^{-1} po jednotlivých krocích o velikosti 25 mV s^{-1} . Odpovídající voltamogramy jsou uvedeny na Obr. 20A, z něhož vyplývá, že výška píku rostla s rostoucí rychlostí.



Obrázek 20 Cyklické voltamogramy BL získané na BDDE v závislosti na rychlosti polarizace (A) a odpovídající závislosti I_p na v (B), I_p na $v^{1/2}$ (C) a $\log(I_p)$ na $\log(v)$ (D). Parametry: základní elektrolyt $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$, $E_{in} = -0,75 \text{ V}$, $E_{switch} = +2,5 \text{ V}$, $E_{fin} = +2,5 \text{ V}$, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $c_{BL} = 50 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Následně byly vyneseny jednotlivé závislosti. Zatímco závislost I_p na v (Obr. 20B) není lineární, závislost I_p na $v^{1/2}$ (Obr. 20C) vykazuje lineární průběh a může být popsána rovnicí (4) s odpovídajícím korelačním koeficientem. To svědčí o difuzi jako řídicím ději sledované elektrodové reakce. Tento závěr byl potvrzen také logaritmicou závislostí $\log(I_p)$ na $\log(v)$, kterou popisuje rovnice (5). V tomto případě je důležitá hodnota směrnice ($0,504 \pm 0,007$), která odpovídá teoretické hodnotě 0,5 pro difuzně řízenou reakci.

$$I_p [\mu\text{A}] = (0,250 \pm 0,008)v^{1/2}[(\text{mV s}^{-1})^{1/2}] + (-0,20 \pm 0,12), r = 0,997 \quad (5)$$

$$\log(I_p [\mu\text{A}]) = (0,504 \pm 0,007)\log(v[\text{V s}^{-1}]) - (0,640 \pm 0,014), r = 0,993 \quad (6)$$

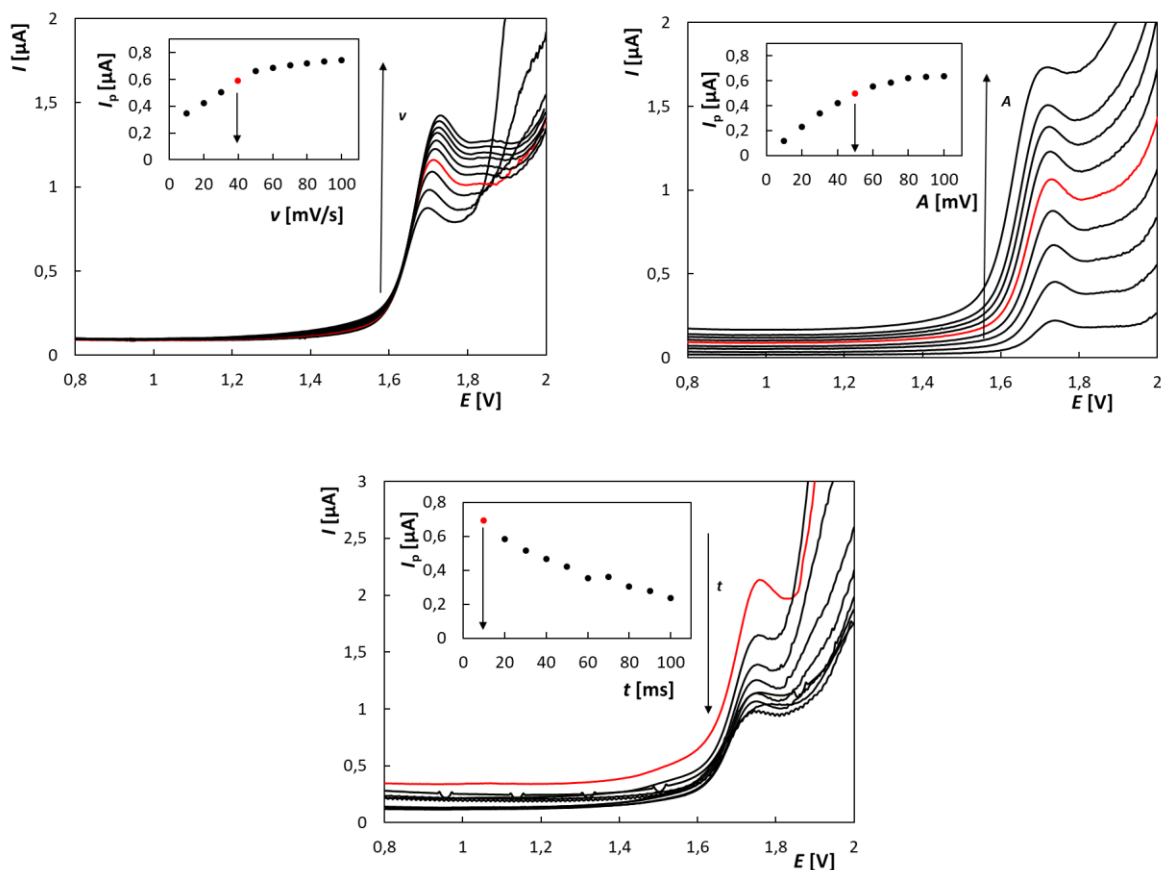
3.2. Vývoj voltametrické metody stanovení benalaxylu

Po úvodní charakterizaci voltametrického chování BL a výběru vhodného prostředí pro další měření následoval vývoj specifické voltametrické metody pro jeho kvantitativní stanovení. Vzhledem k tomu, že metody SWV a DPV obecně vykazují vysokou citlivost, byla provedena jejich optimalizace. Na základě srovnání byla zvolena nejvhodnější technika pro detekci daného fungicidu.

3.2.3. Optimalizace parametrů DPV

Parametry DPV byly optimalizovány v prostředí $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ a BL o koncentraci $20 \mu\text{mol L}^{-1}$. Vždy byl jeden parametr měněn a další byly konstantní. Voltametrické křivky s příslušnými závislostmi jsou uvedeny na Obr. 21 spolu s konkrétními parametry měření. Prvním parametrem byla rychlost polarizace měněná v intervalu od 10 do 100 mV s^{-1} , vybraná hodnota byla 40 mV s^{-1} . Tato hodnota je na Obr. 21A zvýrazněná červeně. Při vyšších rychlostech sice dochází k dalšímu zvýšení proudové odezvy, avšak současně jsou zaznamenány projevy deformace píků a zhoršuje se jeho vyhodnotitelnost v souvislosti s blízkostí konce potenciálového okna. Naopak při nižších rychlostech je odezva nižší, což by mohlo negativně ovlivnit detekovatelné koncentrace. Závislosti I_p na rychlosti polarizace vykazuje v počátečním rozsahu lineární průběh, přičemž zvolená hodnota odpovídá právě poslednímu bodu z této lineární oblasti. Výška pulzu (A) byla testována v intervalu od 10 do 100 mV a následně byla vybrána hodnota 50 mV . Tato hodnota opět leží ještě v oblasti relativně lineárního nárůstu I_p v závislosti na A (Obr. 21B). Poté roste pík pomaleji a opět je ovlivněn

přepětím kyslíku. Posledním parametrem byla šířka pulzu (t), která byla testována v intervalu od 10 do 100 ms. Postupně se zvyšující se dobou trvání pulzu se pík zmenšuje (Obr. 21C), proto byla vybraná hodnota 10 ms.

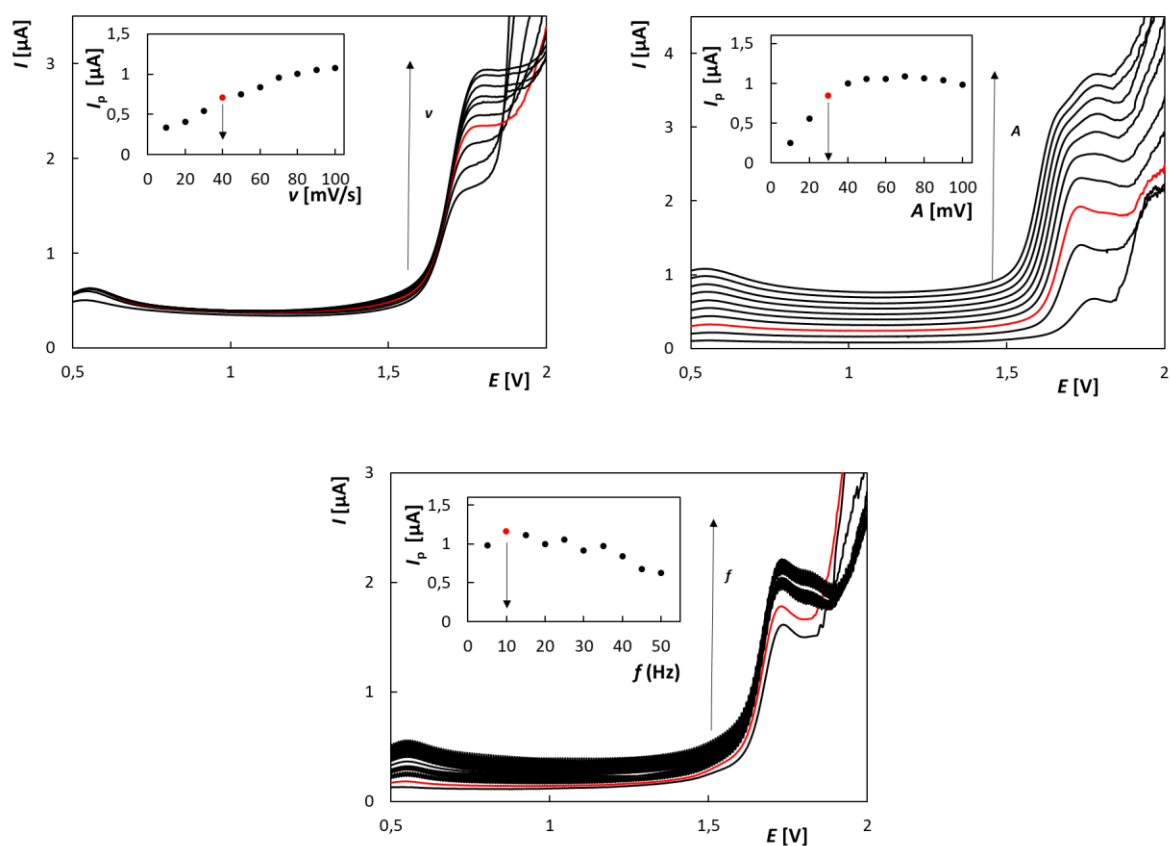


Obrázek 21 Diferenčně pulzní voltamogramy BL získané na BDDE v závislosti na rychlosti polarizace s odpovídající závislostí I_p na v (A); na výšce pulzu s odpovídající závislostí I_p na A (B); na šířce pulzu s odpovídající závislostí I_p na t (C). Parametry: základní elektrolyt $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$, $E_{in} = +0 \text{ V}$, $E_{fin} = +2,5 \text{ V}$, $v = 10\text{-}100$ (A) a 40 mV s^{-1} (B a C), $A = 50$ (A a C) a $10\text{-}100 \text{ mV}$ (B), $t = 50$ (A a B) a $10\text{-}100 \text{ ms}$ (C), $c_{BL} = 20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

3.2.4. Optimalizace parametrů SWV

Optimalizované parametry pro SWV při stanovení BL zahrnovaly rychlost polarizace, amplitudu a frekvenci. Koncentrace BL byla $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ a analýza probíhala v prostředí $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$. Výsledné voltamogramy spolu s příslušnými závislostmi jsou zobrazeny na Obr. 22. Prvním optimalizovaným parametrem byla rychlost polarizace, která byla stejně jako

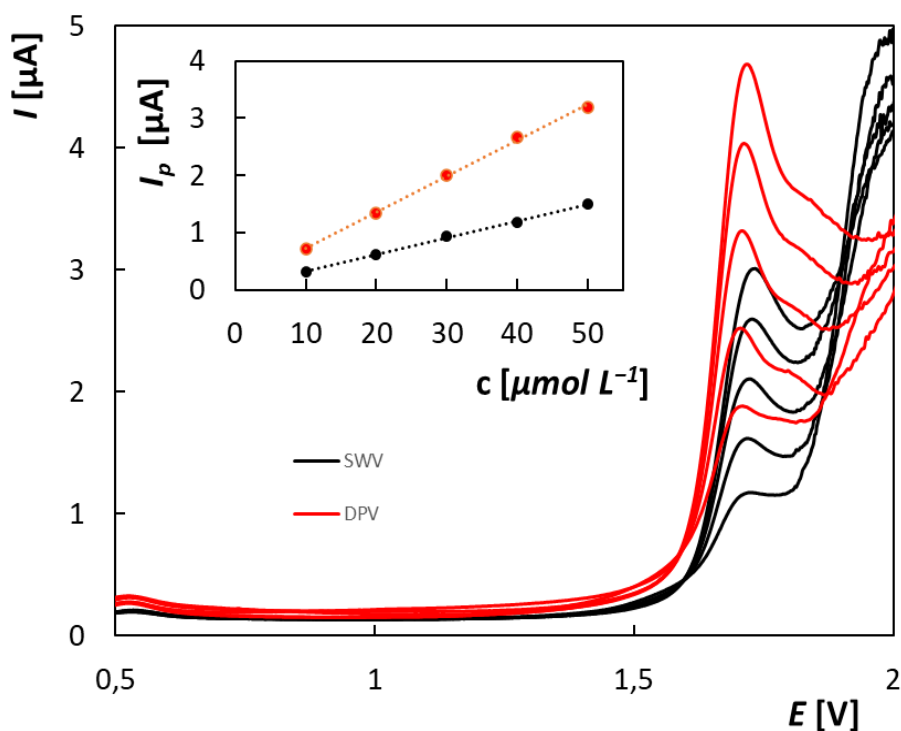
u DPV testována v intervalu od 10 do 100 mV s^{-1} . Závislost I_p na rychlosti polarizace (Obr. 22A) představuje v první fázi lineární nárůst voltametrické odezvy až do hodnoty 70 mV. Současně se ale zvedá konec píku a zhoršuje se jeho vyhodnotitelnost. Proto pro další měření byla vybrána $\nu = 40 \text{ mV s}^{-1}$, která představovala kompromis mezi výškou a tvarem píku. Dalším parametrem byla amplituda v intervalu od 10 do 100 mV s^{-1} . S rostoucí amplitudou docházelo k významnému nárůstu píku BL do hodnoty 40 mV, ale současně i k deformaci tvaru píků (Obr. 22B). Proto byla vybrána hodnota amplitudy 30 mV. Posledním parametrem byla frekvence, která byla testována v intervalu od 5 do 50 Hz. I když při vyšších frekvencích zůstává výška píků podobná, dochází k výraznému zkreslení jeho tvaru a zašumění celé křivky, což ztěžuje vyhodnocení (Obr. 22C). Proto byla vybrána pro další měření hodnota $f = 10 \text{ Hz}$.



Obrázek 22 Square-wave voltamogramy BL získané na BDDE v závislosti na rychlosti polarizace s odpovídající závislostí I_p na ν (A); na výšce pulzu s odpovídající závislostí I_p na A (B); na frekvenci s odpovídající závislostí I_p na f (C). Parametry: základní elektrolyt $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$, $E_{\text{in}} = 0 \text{ V}$, $E_{\text{fin}} = +2,4 \text{ V}$, $\nu = 10\text{-}100$ (A) a 40 mV s^{-1} (B a C), $A = 50$ (A), $10\text{-}100$ (B) a 30 mV (C), $f = 25$ (A a B) a $5\text{-}50 \text{ Hz}$ (C).

3.2.5. Porovnání DPV a SWV

Po provedené optimalizaci experimentálních podmínek obou testovaných technik DPV i SWV následovalo měření krátkých koncentračních závislostí pro BL v rozsahu od 10 do 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ v prostředí 0,1 mol L^{-1} H_2SO_4 . Získané voltamogramy spolu se závislostmi I_p na c jsou uvedeny na Obr. 23. DPV vykazovala vyšší proudové odezvy a současně i dvojnásobnou citlivost ($0,0627 \pm 0,0014$) pro BL v porovnání se SWV ($0,02958 \pm 0,00067$). Proto také byla DPV vybrána jako vhodnější metoda ke stanovení BL.



Obrázek 23 SW a DP voltamogramy BL zaznamenané na BDEE v závislosti na koncentraci a odpovídající závislost I_p na c_{BL} . Parametry: základní elektrolyt 0,1 mol L^{-1} H_2SO_4 , $E_{in} = -0,75 \text{ V}$, $E_{fin} = +2,4 \text{ V}$, DPV: $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$, $A = 50 \text{ mV}$, $t = 10 \text{ ms}$, SWV: $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$, $A = 30 \text{ mV}$, $f = 10 \text{ Hz}$, $c_{BL} = 10\text{-}50 \mu\text{mol L}^{-1}$.

3.2.6. Předúprava povrchu BDDE

Povrchová úprava pracovní elektrody je důležitým krokem, který může významně ovlivnit její elektrochemické chování, zejména citlivost a opakovatelnost měření. V rámci této práce byly testovány čtyři různé metody aktivace povrchu BDDE s cílem optimalizovat její odezvu vůči BL. Konkrétně se jednalo o elektrochemické cyklování s 20 opakujícími se cykly CV s

následujícími parametry: $E_{in} = -1,0$ V, $E_{switch} = +2,5$ V, $E_{fin} = +2,5$ V, $v = 100$ mV s⁻¹. Dalšími postupy byly anodická aktivace při $E = +2,5$ V po dobu 300 s a katodická aktivace při $E = -2,5$ V po dobu 300 s. Poslední procedurou bylo mechanické leštění na lešticí podložce pomocí aluminy. Po každém způsobu aktivace elektrody bylo následně provedeno jedenáct opakovaných voltamogramů BL o koncentraci $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ s využitím DPV s dříve optimalizovanými parametry. Všechny metody aktivace vedly k podobným proudovým odezvám, které se příliš nelišily výškou ani tvarem. Rozdíl se však projevil v opakovatelnosti měření. Nejstabilnější a nejreprodukovatelnější výsledky poskytla metoda cyklování, u které byla zaznamenána stabilní proudová odezva již během prvních měření, zatímco po dalších procedurách bylo vždy třeba několik opakování měření, kdy odezva postupně klesala, než se signál stabilizoval. Cyklování bylo proto vybráno jako nejvhodnější metoda aktivace BDDE pro následné měření.

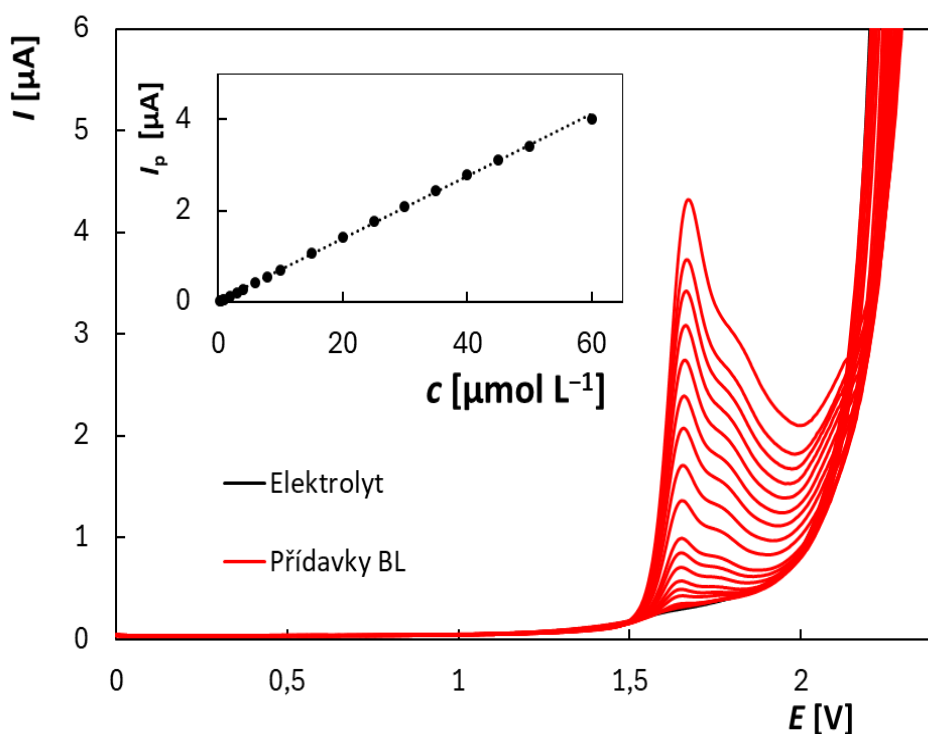
3.3. Analýza modelových vzorků

Navržená metoda pro stanovení BL byla aplikována při měření koncentračních závislostí v různých rozsazích. Na Obr. 24 je uveden příklad voltamogramů a odpovídající závislost I_p na koncentraci BL v rozsahu od 0,25 do $60 \mu\text{mol L}^{-1}$. Tento rozsah představuje lineární dynamický rozsah (LDR) metody. Tato závislost může být popsána rovnicí (7) s příslušným korelačním koeficientem. Z uvedené závislosti byly vypočteny hodnoty limitu detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) uvedené v Tab. 2. LOD byl vypočten jako trojnásobek směrodatné odchylky úseku podělený hodnotou směrnice a LOQ jako desetinásobek směrodatné odchylky úseku podělený hodnotou směrnice. LDR byl stanoven v rozmezí $0,25-60 \mu\text{mol L}^{-1}$ experimentálně na základě skutečně naměřených a vyhodnocených dat.

$$I_p [\mu\text{A}] = (0,0699 \pm 0,0005) c [\mu\text{mol l}^{-1}] - (0,0083 \pm 0,0025), r = 0,9997 \quad (7)$$

Tabulka 2 Shrnutí parametrů pro stanovení ML pomocí BDDE

Elektrolyt	LOD [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	LOQ [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	LDR [$\mu\text{mol L}^{-1}$]
0,1 H ₂ SO ₄	0,11	0,37	0,25-60

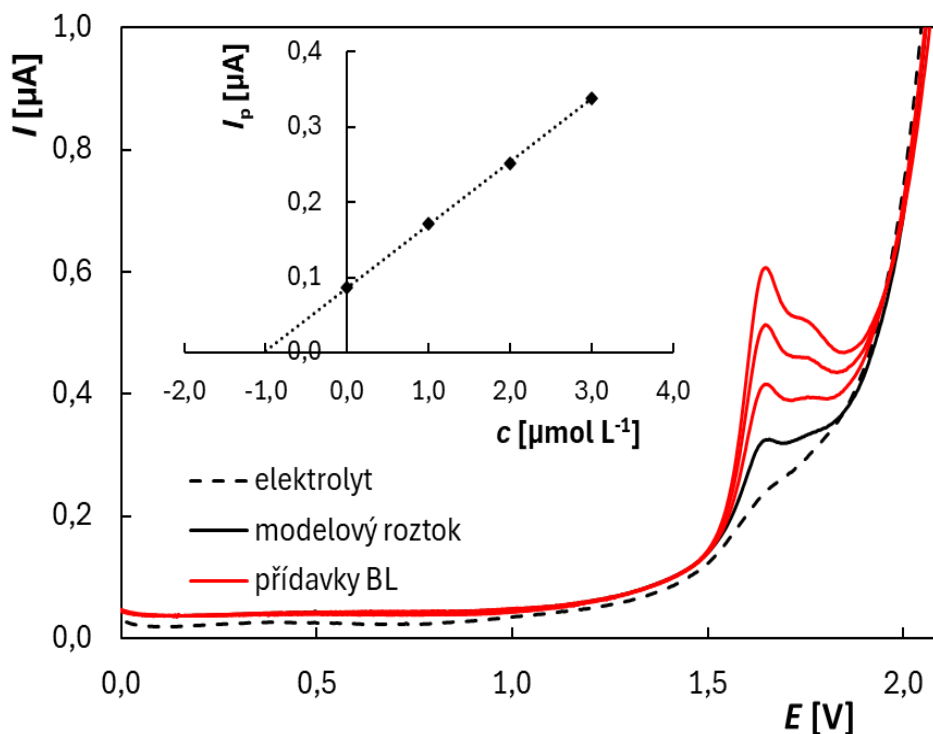


Obrázek 24 DP voltamogramy BL zaznamenané na BDDE v závislosti na koncentraci společně se závislostí I_p na c_{BL} . Parametry: základní elektrolyt $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$, $E_{in} = +0 \text{ V}$, $E_{fin} = +2,4 \text{ V}$, $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$, $A = 50 \text{ mV}$, $t = 10 \text{ ms}$, $c_{BL} = \mu\text{mol L}^{-1}$, hodnoty I_p byly vyhodnoceny po odečtu základního elektrolytu.

Následovalo ověření nové metody při analýze modelových roztoků o známé koncentraci BL. Pro vyhodnocení byla použita metoda standardního přidavku. Do polarografické nádoby bylo odměřeno 10 mL modelového roztoku BL o koncentraci $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ v základním elektrolytu ($0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$), ke kterému byly následně přidány tři přidavky standardního roztoku BL o objemu $10 \mu\text{L}$ a koncentraci $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Analýza byla provedena $5 \times$ vždy za stejných experimentálních podmínek. Na Obr. 25 je uveden příklad DP voltamogramů získaných při analýze modelového roztoku doplněný grafickým vyhodnocením metody standardního přidavku. Z výsledků shrnutých v Tab. 3 vyplývá, že vyvinutá metoda poskytuje správné a velmi dobře reprodukovatelné výsledky.

Tabulka 3 Výsledky stanovení BL v modelových roztocích pomocí BDDE

Koncentrace [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	Stanoveno [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	Výtěžnost [%]	RSD [%]
1,0	$0,996 \pm 0,032$	94,1-103,8	3,23



Obrázek 25 DP voltamogramy analýzy modelového roztoku BL zaznamenané na BDDE s grafickým vyhodnocením metody standardního přídávku. Parametry: základní elektrolyt $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$, $E_{in} = +0 \text{ V}$, $E_{fin} = +2,4 \text{ V}$, $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$, $A = 50 \text{ mV}$, $t = 10 \text{ ms}$, modelový roztok: $V = 10 \text{ ml}$, $c_{BL} = 1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, přídavky standardního roztoku BL: $V = 10 \mu\text{L}$, $c_{BL} = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; hodnoty I_p byly vyhodnoceny po odečtu základního elektrolytu.

3.4. Analýza přírodní vody

Pesticidy se v současné době běžně detekují v přírodních a povrchových vodách ve velmi nízkých koncentracích, běžně v řádu 10^{-8} - $10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$. Z tohoto důvodu je nezbytné vyvíjet a používat citlivé analytické metody, které umožní spolehlivé stanovení pesticidů i v takto nízkých koncentracích. V tomto případě koncentrace spadají pod hodnotu LOD vyvinuté metody. Aby bylo možné dosáhnout potřebné citlivosti a získat kvantifikovatelné výsledky, je

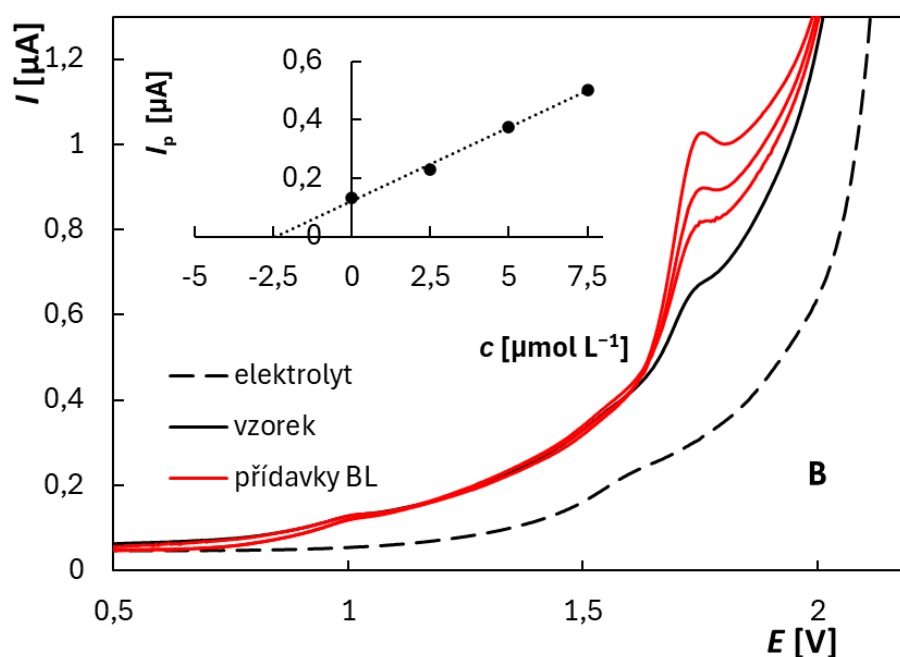
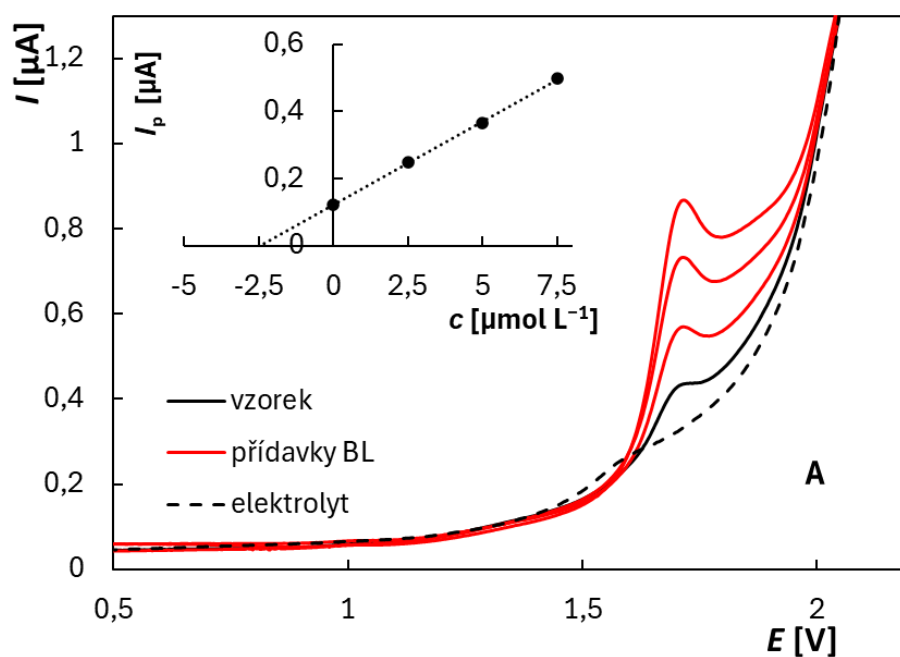
nutné zvýšit koncentraci BL ve vzorku pomocí zakoncentrování [69]. Pro zakoncentrování vzorku byla využita extrakce pomocí tuhé fáze s kolonkami, které obsahovaly 500 mg sorbentu C18ec. Kolonky byly napojeny na extraktor, kde podtlak zajišťovala vývěva. Vzorek kapal přes kolonky a následně byl zachycený BL eluován pomocí acetonitrilu a odpařen pomocí rotační vakuové odparky. Před analýzou byl odparek rozpuštěn v acetonitrilu. Podrobné podmínky extrakce byly popsány v experimentální části.

Proces extrakce a zakoncentrování vzorku byl nejprve testován na modelových roztocích připravených z destilované vody s koncentrací BL $0,05 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$). Pro každou analýzu bylo použito vždy 500 ml vody. Po extrakci a zakoncentrování byl výsledný objem 1,0 mL vzorku v acetonitrilu. Pro analýzu bylo k takto upravenému vzorku přidáno 9,0 mL základního elektrolytu a byla provedena analýza. Následně byly přidány tři přídavky standardního roztoku BL o objemu 25 μL a koncentraci $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Vzhledem k časové náročnosti byl proces zakoncentrování s následnou analýzou opakován pouze 3 \times . Stejný postup byl aplikován i při analýze vzorku říční vody, která byla obohacena přídavkem standardního roztoku BL opět na koncentraci $0,05 \mu\text{mol L}^{-1}$. Analýza říční vody byla také zopakována 3 \times . Výsledné voltamogramy analýzy modelového i přírodního vzorku jsou zobrazené na Obr. 25 a výsledky jsou shrnuté v Tab.4. Výsledky dokazují, že zvolená extrakční metoda poskytuje velice dobrou výtěžnost (> 96,5 %) jak pro modelový roztok, tak pro vzorek říční vody, a stanovené koncentrace odpovídají hodnotám koncentrací BL, na které byly oba typy vzorků upraveny přídavkem standardního roztoku.

Závěrem lze konstatovat, že vyvinutou voltametrickou metodu ve spojení s použitou extrakční a koncentrační technikou lze úspěšně aplikovat při analýze přírodních vod. Citlivost lze dále zvýšit např. použitím většího objemu vzorku vody.

Tabulka 4 Shrnutí výsledků analýzy modelového roztoku a říční vody s přídavkem BL po extrakci.

Typ vzorku	Stanoveno [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	Výtěžnost [%]	RSD [%]
Modelový roztok	$0,0489 \pm 0,0003$	97,4-98,4	0,5
Říční voda	$0,0486 \pm 0,0002$	96,8-97,6	0,4



Obrázek 26 DP voltamogramy analýzy modelového roztoku BL (A) a říční vody (B) po extrakci a zakoncentrování zaznamenané na BDDE s grafickým vyhodnocením metody standartního přidavku.

Parametry: základní elektrolyt $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$, $E_{in} = +0 \text{ V}$, $E_{fin} = +2,4 \text{ V}$, $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$, $A = 50 \text{ mV}$, $t = 10 \text{ ms}$, modelový roztok a říční voda: $V = 10 \text{ mL}$ (1,0 mL eluátu + 9,0 mL elektrolytu), přidavky standardního roztoku BL: $V = 25 \text{ µL}$, $c_{BL} = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; hodnoty I_p byly vyhodnoceny po odečtu základního elektrolytu.

Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo vyvinout voltametričnou metodu pro stanovení fungicidu BL s využitím borem dopované diamantové elektrody.

Nejprve byla použita CV, která poskytla základní informace o elektrochemickém chování benalaxylu a umožnila návrh vhodných pracovních podmínek. Bylo zjištěno, že BL poskytuje 2 oxidační odezvy při potenciálech +1,8 a +2,0 V. Jednalo se o ireverzibilní reakce řízené difuzí. Bylo testováno vhodné prostředí pro analýzu, kde byl porovnáván BRB o pH 2-12 a roztok 0,1 mol L⁻¹ H₂SO₄. Na základě intenzity a tvaru píky byla jako nejvhodnější elektrolyt zvolena 0,1 mol L⁻¹ H₂SO₄, neboť při nízkém pH vykazovaly voltamogramy ostřejší a lépe vyhodnotitelné píky.

Následoval vývoj metody stanovení BL za použití DPV a SWV, přičemž byly optimalizovány klíčové parametry obou metod a postup aktivace pracovní elektrody. Na základě citlivosti a stability signálu byla zvolena DPV. Ze změřených koncentračních závislostí byly pro tuto metodu zjištěny následující statistické parametry: LOD = 0,11 μmol L⁻¹, LOQ = 0,37 μmol L⁻¹ a LDR = 0,25-60 μmol L⁻¹. Vyvinutá metoda byla úspěšně aplikována při analýze modelových roztoků benalaxylu i vzorku říční vody, která byla před samotnou voltametričnou analýzou zakoncentrována pomocí extrakce na tuhé fázi. Výsledky analýzy potvrdily, že navržený postup umožňuje spolehlivě detekovat BL i ve stopových koncentracích ve vzorcích s komplexní maticí.

Na závěr lze tedy konstatovat, že cíl práce byl splněn a navržená voltametričká metoda může představovat efektivní nástroj pro stanovení BL v přírodní vodě.

Použitá literatura

1. BAREK, Jiří; MEJKAL, Petr. Teaching of elektroanalytical chemistry and its impact on the position of electroanalytical methods in practical laboratories. *Journal of solid state elektrochemistry*. **2023**, 28 (3-4), 643-657. DOI: 10.1007/s10008-023-05693-6.
2. HEYROVSKÝ, Jaroslav. Elektrolysa se rtuťovou kapkovou katodou. *Chemické Listy*. **1922**, 16, 256-264.
3. LUDVÍK, Jiří. Jaroslav Heyrovský and elektrochemistry Czechoslovakia after the WWII. *Journal of solid State Elektrochemistry*. **2023**, 27 (7), 1741-1745. DOI: 10.1007/s10008-023-05486-x.
4. BAREK, Jiří; OPEKAR, František; ŠTULÍK, Karel. Elektroanalytická chemie. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 978-80-246-1146-4.
5. OZKAN, Sibel A. *Electroanalytical methods in pharmaceutical analysis and their validation*. New York: HNB Publ, 2012. ISBN: 978-0-9664286-7-4.
6. BARD, J. Allen; FAULKNER, R. Larry. *Electrochemical methods: Fundamentals and Application*. 2nd ed. New York: Wiley, 2001. ISBN 978-0-471-04372-0.
7. ELGRISHI, Noémie; ROUNTREE, Kelley J.; MCCARTHY, Eric S.; EISENHART, Thomas T.; DEMPSEY, Jilian L. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education*. **2018**, 95 (2), 197-206. DOI: 10.1021/acs.jchemed.7b00361.
8. HEYROVSKÝ, Jaroslav; ZUMAN, Petr. *Úvod do praktické polarografie*. Vydání 3. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 1964. ISBN jsem nenašla.
9. BRETT, Christopher M. A. a BRETT, Ana Maria Oliveira. *Electrochemistry - Principles, Methods, and Applications*. Online. Oxford: Oxford University Press, 1993. eISBN 978-1-62198-482-5.
10. BRETT, M. A. Christopher; BRETT, Ana Maria Oliveira. *Electroanalysis*. New York: Oxford university press, 1998. ISBN 978-0-19-854816-4.
11. PEABODY, A.W., BIANCHETTI, Ronald L. (ed.). *Peabody's control of pipeline corrosion*. Online. Third edition. Houston, TX: NACE International, 2018. eISBN 978-1-5231-3063-4.
12. OPEKAR, František; JELÍNEK, Ivan; RYCHLOVSKÝ, Petr; PLZÁK, Zbyněk. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 978-80-246-0553-1.
13. BAREK, Jiří. Position of polarography and voltammetry on mercury drop electrodes in modern analytical chemistry. *Chemické listy*, **1997**, 91 (12), 1038-1042. ISSN 0009-2770.
14. SPENCER, Mark a SPENCER, Leah. *Water Quality Instrumentation*. Online. Chicago: Water Environment Federation, 2022. ISBN 978-1-5231-4724-3.
15. GAO, Jun; HE, Bin; CHEN, Baowei; YIN, Yongguang; SHI, Jianbo; ZHENG, Minghui; HU, Ligang; JIANG, Guibin. Can Mercury Influence Carbon Dioxide Levels? Implications for the Implementation of the *Minamata Convention on Mercury*. *Environmental Science & Technology*. **2024**, 58 (14), 6077-6082. DOI: 10.1021/acs.est.3c09420.

16. WANG, Joseph. *Analytical electrochemistry*. Online. Fourth edition. Hoboken, NJ, USA: Wiley, 2023. eISBN 978-1-119-78770-9 978-1-119-78769-3.
17. BRUNO, Thomas J.; DEACON, Ryan; JANSEN, Jeffrey A; MAGDEFRAU, Neal; MUELLER, Erik et al. *ASM Handbook, Volume 10 - Materials Characterization*. Online. Ohio: ASM International, 2019. eISBN 978-1-5231-3480-9.
18. BANICA, Florinel Gabriel. A simple Hanging Mercury Drop Electrode. *Journal of Chemical Education*. **2000**, 77 (1), 98. DOI: 10.1021/ed077p98.
19. PEDROTTI, Jairo; ANGNES, Lucio; GUTZ, G. R. Ivano. Automatic mercury drop electrode with double solenoid activated valve. *Electroanalysis*. **1992**, 4 (6), 635-642. DOI: 10.1002/elan.1140040606.
20. OGANOV, A. R.; HEMLEY, R. J.; HAZEN, R. M.; JONES, A.P. Structure Bonding and Mineralogy of Carbon at Extreme Conditions. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*. 2013, 75, 47-77. DOI: 10.2138/rmg.2013.75.3.
21. WANG, Joseph. *Analytical elektrochemistry*. New York: VCH, 1994. ISBN 1-56081-575-2.
22. YANG, N.J.; YU, S.Y.; MACPHERSON, J. V.; EINAGA, Y.; ZHAO, G. H.; SWAIN, G. M.; JIANG, X. Conductive diamond: synthesis, properties, and electrochemical applications. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, 48, 157-204.
23. ŠELEŠOVSKÁ, Renáta; KRÄNKOVÁ, Barbora; ŠTĚPÁNKOVÁ, Michaela; MARTINKOVÁ, Pavlína; JANÍKOVÁ, Lenka; CHÝLKOVÁ, Jaromíra; VOJS, Marian. Influence of boron content on electrochemical properties of boron-doped diamond electrodes and their utilization for leucovorin determination. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **2018**, 821, 2-9. DOI: 10.1016/j.jelechem.2018.02.007.
24. LOURENCAO, C. Bruna.; BROCCENSCHI, F. Ricardo; MEDEIROS, A. ROBERTA; FATIBELLO-FILHO, Orlando; ROCHA-FILHO, C. Romeu. Analytical Applications of Electrochemically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrodes. *ChemElectroChem*. **2020**, 7 (6), 1291-1311. DOI: 10.1002/celec.202000050.
25. MATVIEIEV, Oleksandr; ŠELEŠOVSKÁ, Renáta; MARTON, Marián; HATALA, Michal; METELKA, Radovan; WEIS, Martin; VOJS, Marian. Effect of different modification by gold nanoparticles on the electrochemical performance of screen-printed sensors with boron-doped diamond electrode. *Scientific Reports*. **2023**, 13, 21525. DOI: 10.1038/s41598-023-48834-7.
26. BALUCHOVÁ, Simona; DAŇHEL, Aleš; DEJMLOVÁ, Hana; OSTATNÁ, Veronika; FOJTA, Miroslav; SCHWARZOVÁ-PECKOVÁ, Karolína. Recent progress in the applications of boron doped diamond electrodes in electroanalysis of organic compounds and biomolecules – a review. *Analytica Chimica Acta*. **2019**, 1077, 30-66. DOI: 10.1016/j.aca.2019.05.041.
27. SOUSA, P. Camila; RIBEIRO, W. P. Francisco; OLIVEIRA, M. B. F. Thiago; SALAZAR-BANDA, R. Giancarlo; DE LIMA- NETO, Pedro; MORAIS, Simone; CORREIA, N. Adriana. Electroanalysis of Pharmaceuticals on Boron-Doped Diamond

- Electrodes: A Review. *ChemElectroChem*. **2019**, *6* (9), 2350-2378. DOI: 10.1002/celec.201801742.
28. DE OLIVEIRA SILVA, Karyn Nathallye; DOS SANTOS, Elisama Vieira. Electrochemical treatment of soil-washing effluent with boron-doped diamond electrodes: A review. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. **2021**, *25* (6), 100962. DOI: 10.1016/j.cossms.2021.100962.
 29. BROSLER, Priscilla; GIRÃO, Ana Violeta; SILVA, F. Rui; TEDIM, João; OLIVEIRA, J. Filipe. In-house vs. Commercial boron-doped diamond electrodes for electrochemical degradation of water pollutants: A critical review. *Frontiers in Materials*. **2023**, *10*, 1020649. DOI: 10.3389/fmats.2023.1020649.
 30. MCBEATH, T. Sean; WILKINSON, P. David; GRAHAM, J. D. Nigel. Application of boron-doped diamond electrodes for the anodic oxidation of pesticide micropollutants in a water treatment process: s critical review. *Environmental Science: Water Research & Technology*. **2019**, *5* (12), 2090-2107. DOI: 10.1039/C9EW00589G.
 31. ZUMAN, Petr. What Can DC Polarography Offer Today. *Acta chimica Slovenica*. **2009**, *56* (1), 18-29.
 32. ZUMAN, Petr. Current examples of practical and fundamental applications of DC polarography. *Journal of Solid State Electrochemistry*. **2006**, *10* (10), 841-851. DOI: 10.1007/s10008-006-0177-0.
 33. SADDOW, Stephen E (ed.). *Silicon Carbide Biotechnology - a Biocompatible Semiconductor for Advanced Biomedical Devices and Applications*. 2nd ed. Amsterdam Boston Heidelberg London New York Oxford Paris San Diego San Francisco Singapore Sydney Tokyo: Elsevier, 2016. ISBN 978-0-12-802993-0.
 34. ZOSKI, G. Cynthia (ed.). *Handbook of Electrochemistry*. Amsterdam: Elsevier Science, 2007. ISBN 978-0-08-046930-0.
 35. BRUNO, Thomas J.; DEACON, Ryan; JANSEN, Jeffrey A.; MAGDEFRAU, Neal; MUELLER, Erik; VANDER VOORT, George F.; YANG, Dehua. *Materials characterization*. Vol. 10. Ohio: ASM International, 2019. ISBN 978-1-5231-3480-9.
 36. FULLER, Thomas Francis; HARB, John Naim. *Electrochemical engineering*. Hoboken (NJ): Wiley, 2018. ISBN 978-1-119-44658-3.
 37. OLDHAM, B. Keith. Ultimate cyclic voltammetry: an analytical examination of the reversible case. *Journal of Solid State Electrochemistry*. **2013**, *17* (11), 2749-2756. DOI: 10.1007/s10008-013-2176-2.
 38. KHALID, Mohammad; DHARASKAR, Swapnil A.; SILLANPÄÄ, Mika; SIDDIQUI, Humaira (ed.). *Emerging carbon capture technologies: towards a sustainable future*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2022. ISBN 978-0-323-88569-0.
 39. KISSINGER, Peter T.; HEINEMAN, William R. Cyclic voltammetry. *Journal of chemical education*, **1983**, *60* (9), 702. DOI: 10.1021/ed060p702.
 40. MOORE, H. John; SPENCER, D. Nikolas (ed.). *Encyclopedia of Chemical Physics and Physical Chemistry* . Online. Vol. 1-3. Boca Raton: CRC Press, 2001. eISBN 978-1-59124-312-0.

41. HIGSON, Séamus. *Analytical chemistry*. Online. Oxford: Oxford university Press, 2006. eISBN 978-1-61583-964-3.
42. MIRCESKI, Valentin; GUZIEJEWSKI, Dariusz; STOJANOV, Leon; GULABOSKI, Rubin. Differential Square-Wave Voltammetry. *Analytical Chemistry*. **2019**, *91* (23), 14904-14910. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b03035.
43. ŠVANCARA, Ivan. Elektroanalýza: Vybrané kapitoly (učební text). Online. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2019. ISBN 978-80-7560-247-3.
44. MIRCESKI, Valentin; GULABOSKI, Rubin; LOVRIC, Milivoj; BOGESKI, Ivan; KAPPL, Reinhard; HOTH, Markus. Square-Wave Voltammetry: A Review on the Recent Progress. *Electroanalysis*. **2013**, *25* (11), 2411-2422. DOI: 10.1002/elan.201300369.
45. UNGER, A. Thomas. Pesticide synthesis handbook. Park Ridge, N.J.: Noyes Publications, 1996. ISBN 978-0-8155-1401-5.
46. JING, Xu; YAO, Guojun; LIU, Donghui; LIANG, Yiran; LUO, Mai; ZHOU, Zhiqiang; WANG, Peng. Effects of wastewater irrigation and sewage sludge application on soil residues of chiral fungicide benalaxyl. *Environmental Pollution*. **2017**, *224*, 1-6. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.03.004.
47. XU, Peng; LIU, Donghui; DIAO, Jinling; LU, Dahai; ZHOU, Zhiqiang. Enantioselective Acute Toxicity and Bioaccumulation of Benalaxyl in Earthworm (*Eisenia fedtia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2009**, *57* (18), 8545-8549. DOI: 10.1021/jf902420a.
48. VERSCHUEREN, Karel. Handbook of environmental data on organic chemicals. 5th ed. Hoboken, NJ.: John Wiley & Sons, 2009. eISBN 978-1-60119-835-8.
49. ROBERTS, R. Terry; HUTSON, H. David; JEWESS, J. Philip; LEE, W. Philip; NICHOLLS, H. Peter; PLIMMER R. Jack. Metabolic Pathway of Agrochemicals, Part 2 – Insecticides and Fungicides. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1999. eISBN 978-1-84755-137-5.
50. LIU, Mingke; LIU, Donghui; XU, Yangguang; JING, Xu; ZHOU, Zhiqiang; WANG, Peng. Fate and Stereoselective Behavior of Benalaxyl in a Water-Sediment Microcosm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2015**, *63* (21), 5205-5211. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b01448.
51. YIN, Jing; ZHU, Feilong; HAO, Weiyu; XU, Qi; CHANG, Jin; WANG, Huili; GUO, Baoyuan. Acylamino acid chiral fungicides on toxic epigenetics in lambda DNA methylation. *Food and Chemical Toxicology*. **2017**, *109*, 735-745. DOI: 10.1016/j.fct.2017.04.038.
52. WANG, Xinquan; JIA, Guifang; QIU, Jing; DIAO, Jinling; ZHU, Wentao; LV, Chunguang; ZHOU, Zhiqiang. Stereoselective degradation of fungicide benalaxyl in soils and cucumber plants. *Chirality*. **2007**, *19* (4), 300-306. DOI: 10.1002/chir.20381.
53. VIRET, Olivier; GINDRO, Katia. Science of fungi in grapevine. Cham: Springer International Publishing, 2025. eISBN 978-3-031-68663-4.
54. YANG, Fei; TANG, Gangling; LI, Zhonghao; FAN, Ziyan; WANG, Ying; LIU, Shanshan; BIAN, Zhaoyang; DENG, Huimin. An environmentally friendly method for the enantioseparation and determination of benalaxyl in tobacco and soil by ultra-performance

- convergence chromatography with tandem mass spektrometry. *Journal of Separation Science*. **2018**, *41* (22), 4233-4240. DOI: 10.1002/jssc.201800861.
55. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA); ANASTASSIADOU, Maria; ARENA, Maria; AUTERI, Domenica; BRANCATO, Alba; BURA, Laszlo; CARRASCO CABRERA, Luis a kol. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance benalaxyl. *EFSA Journal*. **2020**, *18* (1). DOI: 10.2903/j.efsa.2020.5985.
 56. WANG, Xinru; WANG, Dezhen; ZHOU, Zhiqiang; ZHU, Wentao. Subacute oral toxicity assessment of benalaxyl in mice based on metabolomics methods. *Chemosphere*. **2018**, *191*, 373-380. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.10.085.
 57. LIU, Donghui; WANG, Peng; ZHOU, Wenfeng; GU, Xu; CHEN, Zhenshan; ZHOU, Zhiqiang. Direct chiral resolution and its application to the determination of fungicide benalaxyl in soil and water by high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*. **2006**, *555* (2), 210-216. DOI: 10.1016/j.aca.2005.09.022.
 58. PÉREZ-FERNÁNDEZ, Virginia; GARCÍA, María Ángeles; MARINA, María Luisa. Chiral separation of metalaxyl and benalaxyl fungicides by electrokinetic chromatography and determination of enantiomeric impurities. *Journal of Chromatography A*. **2011**, *1218* (30), 4877-4885. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.12.116.
 59. ZHANG, Hu; WANG, Xinquan; JIN, Lixia; QIAN, Mingrong; WANG, Xiangyun; XU, Hao; QI, Peipei; WANG, Qiang a kol. Enantioselective determination of acylamino acid fungicides in vegetables and fruits by chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spektrometry. *Journal of Separation Science*. **2012**, *35* (15), 1869-1876. DOI: 10.1002/jssc.201200063.
 60. YANG, Fei; TANG, Gangling; LI, Zhonghao; FAN, Ziyang; WANG, Ying; LIU, Shanshan; BIAN, Zhaoyang; DENG, Huimin. An environmentally friendly method for the enantioseparation and determination of benalaxyl in tobacco and soil by ultraperformance convergence chromatography with tandem mass spektrometry. *Journal of Separation Science*. **2018**, *41* (22), 4233-4240. DOI: 10.1002/jssc.201800861.
 61. NEGUSSIE, Bezuayehu Tadesse; DUBE, Simiso; NINDI, Mathew Muzi; MORILLO, José (ed.). Multiclass pesticide Residue analysis in Fruit and Vegetable samples by Combining acetone-Based Salting-Out Assisted Extraction with Dispersive liquid-Liquid Microextraction. *Journal of Chemistry*. **2021**, *2021*, 1-12. DOI: 10.1155/2021/6417093.
 62. QIU, Jing; WANG, Qiuxia; ZHU, Wentao; JIA, Guifang; WANG, Xinquan; ZHOU, Zhiqiang. Stereoselective determination of benalaxyl in plasma by chiral high-performance liquid chromatography with diode array detector and application to pharmacokinetic study in rabbits. *Chirality*. **2007**, *19* (1), 51-55. DOI: 10.1002/chir.20341.
 63. CRISIPPI, T.; ZINI, G.; FABBRINI, R. Chromatographic determination of benalaxyl residues in different crops and water. *Journal of AOAC international*. **1993**, *76*, 650-656.
 64. GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, R.M.; CANCHO-GRANDE, Beatriz; SIMAL-GÁNDARA, Jesús. Multiresidue determination of 11 new fungicides in grapes and wines by liquid-liquid extraction/clean-up and programmable temperature vaporization injection with

- analyte protectants/gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2009**, 1216 (32), 6033-6042. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.06.046.
65. LIANG, Yan; LEI, Chunni; WANG, Bo; ZHANG, Huan; WANG, Xinchao; ZHOU, Xiaoping; QI, Zhenzhen; ZHU, Mengchen. Determination of 222 pesticide residues in olive oil by fully automatic QuEChERS pre-treatment instrument coupled with gas chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography*. **2024**, 42 (4), 368-379, DOI: 10.3724/SP.J.1123.2023.09010.
66. CELEIRO, Maria; VAZQUEZ, Lua; NURERK, Piyaluk; KABIR, Abuzar; FURTON, Kenneth G.; DAGNAC, Thierry; LLOMPART, Maria. Fabric phase sorptive extraction for the determination of 17 multiclass fungicides in environmental water by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*. **2020**, 43 (9-10), 1817-1829. DOI: 10.1002/jssc.201901232.
67. GIRAUDI, Gianfranco; ROSSO, Ilaria; BAGGIANI, Claudio; GIOVANNOLI, Cristina; VANNI, Adriano; GRASSI, Giampaolo. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for benalaxyl and its application to the analysis of water and wine. *Analytical Chimica Acta*. **1999**, 392 (1), 85-94. DOI: 10.1016/S0003-2670(98)00858-7.
68. ROSSO, Ilaria; GIRAUDI, Gianfranco; GAMBERINI, Roberta; BAGGIANI, Claudio; VANNI, Adriano. Application of an ELISA to the Determination of Benalaxyl in Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2000**, 48 (1), 33-36. DOI: 10.1021/jf9901183.
69. THOMATOU, Anna-Akrivi; ZACHARIAS, Lerotheos; HELA, Dimitra; KONSTANTINOU, Ioannis. Determination and risk assessment of pesticide residues in lake Amvrakia (W. Greece) after agricultural land use changes in the lake's drainage basin. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. **2013**, 93 (7), 780-799. DOI: 10.1080/03067319.2012.656099.