

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Vývoj voltametrické metody stanovení fungicidu fludioxonilu

Bakalářská práce

2024

Martin Holý

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

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Martin Holý**
Osobní číslo: **C21269**
Studijní program: **B0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Téma práce: **Vývoj voltametrické metody stanovení fungicidu fludioxonilu**
Téma práce anglicky: **Development of a Voltammetric Method for the Determination of the Fungicide Fludioxonil**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Popište stručně princip voltametrie. Zpracujte literární rešerši týkající se fungicidu fludioxonilu. 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 v modelových roztocích.
3. Vyvinutou metodu aplikujte při analýze modelových roztoků a praktických vzorků přírodních vod a pesticidního přípravku.
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: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Renáta Šelešovská, Ph.D.**
Ústav environmentálního a chemického inženýrství
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Pavlína Kelíšková**
Ústav environmentálního a chemického inženýrství
Datum zadání bakalářské práce: **22. prosince 2023**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem *Vývoj voltametrické metody stanovení fungicidu fludioxonilu* 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 25. 6. 2024

Martin Holý v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Velice rád bych poděkoval doc. Renátě Šelešovské za skvělé vedení při sepisování mé bakalářské práce, za všechny rady, připomínky, a hlavně za velkou trpělivost a pozitivní přístup. Dále chci vyjádřit díky Ing. Pavlíně Kelíškové za veškerou pomoc a vedení při experimentální části i při sepisování práce a za všechny čas, který se mnou trávila v laboratoři. Další velké díky patří Oleksandru Matvieievovi, Ph.D. za zodpovězení všech mých otázek, pomoc s vyhodnocením experimentů, všechny opravy přístrojů a pomoc s úpravou bakalářské práce. Všem Vám ještě jednou velice děkuji a doufám, že veškerý Váš věnovaný čas bude kladně zúročen.

ANOTACE

Cílem této bakalářské práce je vytvoření voltametrické metody pro stanovení fungicidu fludioxonilu za pomoci borem dopované diamantové elektrody. Teoretická část práce se zaměřuje zejména na mechanismus účinku fludioxonilu a jeho vliv na životní prostředí, dále pojednává o možnostech stanovení fludioxonilu za pomoci různých analytických metod. Část textu je věnována objasnění základního principu voltametrické metody. V rámci experimentální práce bylo studováno elektrochemické chování fludioxonilu a vyvinuta voltametrická metoda jeho stanovení. Na závěr byla ověřena možnost použití navržené metody pro analýzu přírodních vod.

KLÍČOVÁ SLOVA

fludioxonil, fungicid, voltametrie, borem dopovaná diamantová elektroda

TITLE

Development of a voltammetric method for the determination of the fungicide fludioxonil

ANNOTATION

The aim of this bachelor's thesis is to develop a voltammetric method for determining the fungicide fludioxonil using boron-doped diamond electrode. The theoretical part of the work focuses primarily on the mechanism of fludioxonil's action and its impact on the environment. It also discusses various analytical methods for determining fludioxonil. Part of the text is devoted to explaining the basic principles of voltammetric methods. In the experimental part, the electrochemical behavior of fludioxonil was studied, and a voltammetric method for its determination was developed. Finally, the applicability of the proposed method for the analysis of natural waters was verified.

KEYWORDS

fludioxonil, fungicides, voltammetry, boron doped diamond electrode

Obsah

Seznam ilustrací a tabulek	8
Seznam symbolů a zkratk	10
Úvod.....	12
1 Teoretická část	13
1.1 Pesticidy.....	13
1.1.1 Fenylypyrrolové fungicidy	13
1.1.2 Fludioxonil.....	14
1.1.3 Stanovení fludioxonilu.....	18
1.2 Voltametrie	21
1.2.1 Voltametrická sestava	21
1.2.2 Voltametrické metody.....	25
2 Experimentální část.....	27
2.1 Přístrojové vybavení	27
2.2 Použité chemikálie.....	28
2.3 Pracovní postupy.....	29
2.3.1 Voltametrické měření	29
2.3.2 Analýza přírodní vody	29
3 Výsledky a diskuse	31
3.1 Voltametrické chování fludioxonilu	31
3.1.1 Závislost voltametrického chování FLU na pH.....	31
3.1.2 Závislost voltametrické odezvy signálu na rychlosti polarizace	36
3.2 Vývoj voltametrické metody stanovení fludioxonilu	38
3.2.1 Optimalizace parametrů SWV	38
3.2.2 Optimalizace parametrů DPV	41
3.2.3 Porovnání SWV a DPV	45
3.2.4 Aktivace BDDE	48
3.3 Analýza modelových roztoků	49
3.4 Analýza reálných vzorků	53
4 Závěr	56
Použitá literatura	57

Seznam ilustrací a tabulek

Obrázek 1 Strukturní vzorec fenylpyrrolu (3-fenyl-1H-pyrrol) [4].	14
Obrázek 2 Strukturní vzorec fludioxonilu [6].	14
Obrázek 3 Místa v oblasti elektronového transportního řetězce, kde vzniká superoxidový radikál (jeden z druhů ROS) [8].	15
Obrázek 4 Proces regulace exprese stresových genů a změny propustnosti membránových kanálků, modulovány signálním enzymem Hog1 [9].	17
Obrázek 5 Jednotlivé druhy metody ELISA. Přímá, nepřímá, sendvičová a kompetitivní [26].	19
Obrázek 6 Schéma zapojení 3 elektrodové sestavy pro voltametrické měření [30].	22
Obrázek 7 Uspořádání atomů uhlíku v krystalové mřížce diamantu (a) a grafitu (b) [35].	24
Obrázek 8 Lineární závislost vkládaného napětí na čase [30].	25
Obrázek 9 LSV voltamogram [32].	25
Obrázek 10 Závislost vkládaného napětí na čase pro CV (A) a výsledný cyklický voltamogram (B) [34].	26
Obrázek 11 Použité 3 elektrodové uspořádání (A), potenciostat Autolab PGSTAT302N se zapojeným elektrochemickým článkem ve voltametrické nádobce (B).	27
Obrázek 12 Sestava pro extrakci na tuhé fázi (A) a vakuová odparka (B)	28
Obrázek 13 Cyklický voltamogram FLU zaznamenaný na BDDE.	31
Obrázek 14 Cyklické voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE v prostředí BRB o pH 2,0-12 s vloženými závislostmi I_p a E_p na pH pro první oxidační pík.	32
Obrázek 15 DP voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE v prostředí BRB o pH 2,0-12 (A), závislost I_p a E_p na pH pro první oxidační pík (B), závislost I_p a E_p na pH pro druhý oxidační pík (C).	33
Obrázek 16 SW voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE v prostředí BRB o pH 2,0-12 (A), závislost I_p a E_p na pH pro první oxidační pík (B), závislost I_p a E_p na pH pro druhý oxidační pík (C).	34
Obrázek 17 CV voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE v prostředí různých kyselin.	35
Obrázek 18 SW voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE v prostředí různých kyselin.	35
Obrázek 19 CV voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE při různých hodnotách rychlosti polarizace.	36
Obrázek 20 Závislosti I_p na v (A), I_p na $v^{1/2}$ (B) a $\log(I_p)$ na $\log(v)$ (C) odpovídající měření zaznamenanému na obrázku 19	37
Obrázek 21 SW voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE v závislosti na rychlosti polarizace (A) a odpovídající závislost I_p na v . Vybraná optimální hodnota je vyznačena červeně.	39
Obrázek 22 SW voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE v závislosti na výšce pulzu (A) a odpovídající závislost I_p na výšce pulzu (B). Vybraná optimální hodnota je vyznačena červeně.	40
Obrázek 23 SW voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE v závislosti na frekvenci (A) a odpovídající závislost I_p na frekvenci. Vybraná optimální hodnota je vyznačena červeně.	41
Obrázek 24 DP voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE v závislosti na rychlosti polarizace (A) a odpovídající závislost I_p na v (B). Vybraná optimální hodnota je vyznačena červeně.	42

Obrázek 25 DP voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE v závislosti na výšce pulzu (A) a odpovídající závislost I_p na výšce pulzu (B). Vybraná optimální hodnota je vyznačena červeně.	43
Obrázek 26 DP voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE v závislosti na šířce pulzu (A) a odpovídající závislost I_p na šířce pulzu (B). Vybraná optimální hodnota je vyznačena červeně	44
Obrázek 27 SWV voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE v závislosti na koncentraci (A) a odpovídající závislost I_p na koncentraci (B).....	46
Obrázek 28 DP voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE v závislosti na koncentraci (A) a odpovídající závislost I_p na koncentraci (B).....	47
Obrázek 29 Porovnání SW (červená) a DP (modrá) voltamogramů FLU zaznamenaných na BDDE v závislosti na koncentraci, parametry měření lze nalézt v titulcích Obrázků 27 a 28.	48
Obrázek 30 SW voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE po různém postupu aktivace elektrody.	49
Obrázek 31 SW voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE v závislosti na koncentraci s vloženou závislostí I_p na koncentraci.	50
Obrázek 32 Stanovení FLU metodou standardního přídatku v modelovém roztoku.	51
Obrázek 33 Stanovení FLU metodou standardního přídatku v modelovém roztoku po extrakci.....	52
Obrázek 34 Stanovení FLU metodou standardního přídatku v reálném vzorku říční vody...54	
Obrázek 35 Stanovení FLU metodou standardního přídatku reálném vzorku říční vody po extrakci.....	55
Tabulka 1 Optimalizované parametry SWV	39
Tabulka 2 Optimalizované parametry DPV	45
Tabulka 3 Porovnání analytických parametrů koncentračních závislostí FLU (2,0-10 $\mu\text{mol/l}$) změřených s využitím optimalizované metody SWV a DPV.....	45
Tabulka 4 Hodnoty parametrů RSD a I_p pro opakovaně měřený pík FLU po zařazení jednotlivých postupů aktivace BDDE.....	49
Tabulka 5 <i>Výsledné parametry nové SWV metody vyvinuté pro stanovení FLU</i>	50
Tabulka 6 Výsledky opakovaného stanovení koncentrace FLU v modelových roztocích.	51
Tabulka 7 Výsledky opakovaného stanovení koncentrace FLU ve vzorcích říční vody.	54
Tabulka 8 Výsledky opakovaného stanovení koncentrace FLU ve vzorcích říční vody po extrakci.....	55

Seznam symbolů a zkratek

<i>A</i>	Amplituda [V]
AE	Pomocná elektroda (Auxiliary electrode)
AP	Alkalická fosfatáza (Alkaline phosphatase)
ATP	Adenosintrifosfát (Adenosine triphosphate)
BDD	Borem dopovaný diamant
BDDE	Borem dopovaná diamantová elektroda
BRB	Brittonův–Robinsonův pufr (Britton–Robinson buffer)
BSA	Hovězí sérový albumin (Bovine serum albumin)
C	Cytochrom c
<i>c</i>	Koncentrace [mol/l]
CV	Cyklická voltametrie
DHODH	Dihydroorotát dehydrogenáza
DPV	Diferenčně pulzní voltametrie
E_{kon}	Konečný potenciál [V]
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
E_{obratu}	Potenciál obratu [V]
E_p	Detekční potenciál [V]
$E_{poč}$	Počáteční potenciál [V]
ETF	Elektrony transportující flavoprotein
<i>F</i>	Frekvence [Hz]
FADH ₂	Flavinadenindinukleotid (Flavin adenine dinucleotide)
FID	Plamenový-ionizační detektor (Flame ionization detector)
FLU	Fludioxonil
GC	Plynová chromatografie
Hg(Ag)FE	Stříbrná amalgamová filmová elektroda
HOG	Vysoko osmolaritní glycerol (High osmolarity glycerol)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-performance liquid chromatography)
HRP	Křenuv peroxidáza (Horseradish peroxidase)

I	Komplex I
II	Komplex II
III	Komplex III
I_p	Proudová odezva [A]
IV	Komplex IV
LDR	Lineární dynamický rozsah
LOD	Limit detekce (Limit of detection)
LOQ	Mez stanovitelnosti (Limit of quantification)
LSV	Stejnoseměrná voltametrie (Linear sweep voltammetry)
mGPDH	Mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenáza
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass spectrometry)
NADH	Nikotinamidadenin dinukleotid (Nicotinamide adenine dinucleotide)
NPD	Dusík-fosfor detektor (Nitrogen-phosphorus detector)
OVA	Ovalbumin
PBZ	Paclobutrazol
Q	Koenzym Q
QH ₂	Redukovaný koenzym Q
RE	Referentní elektroda (Reference electrode)
ROS	Reaktivní formy kyslíku (Reactive oxygen species)
RSD	Relativní směrodatná odchylka (Relative standard deviation)
SKE	Saturovaná kalomelová elektroda
SOD1	Superoxid dismutáza
SPME	Mikroextrakce na tuhé fázi (Solid-phase microextraction)
SWV	Square wave voltametrie
T	Doba pulzu [ms]
TBC	Tebuconazol
V	Komplex V
v	Rychlost polarizace [mV/s]
WE	Pracovní elektroda (Working electrode)

Úvod

Fludioxonil patří mezi fenylpyrrolové fungicidy. Jeho molekulární struktura je analogem antifungicidního antibiotika pyrrolnitrinu, které je sekundárním metabolitem některých bakterií z rodu *Pseudomonas* a *Burkholderia*. Jeho hlavní využití je v zemědělství a spočívá v ochraně sklizeného ovoce a zeleniny před jeho napadením plísněmi a dalšími druhy hub během dopravy a skladování. Jelikož se v posledních letech významně rozšiřuje použití tohoto fungicidu, začaly se množit obavy spojené s jeho toxicitou a perzistencí, resp. degradací v prostředí.

Z těchto důvodů je důležité, aby existovaly metody pro rychlé, levné, ale současně citlivé a selektivní stanovení této látky v různorodých vzorcích. Nejčastěji využívané metody pro stanovení fludioxonilu jsou plynová a kapalinová chromatografie za pomoci různých druhů detektorů. Tyto metody jsou sice velice přesné a mohou efektivně analyzovat i složitější vzorky, ale jejich záporem je vysoká pořizovací cena, vyšší nároky na přípravu vzorku, delší doba analýzy, složitější instrumentace a s tím spojená nutnost dostatečně zkušeného pracovníka.

Voltametrické metody nám nabízejí jistou alternativu, jelikož jsou často levnější, rychlejší a nároky na úpravu vzorků před analýzou jsou nižší, přičemž nám stále umožňují velice citlivé a přesné měření. Další výhodou těchto metod je možnost miniaturizace, a tedy i vývoj terénních analyzátorů, které jsou pro efektivní monitorování velice užitečné.

Cílem této bakalářské práce je prostudovat voltametrické chování fludioxonilu a vyvinout metodu pro jeho stanovení za pomoci borem dopované diamantové elektrody.

1 Teoretická část

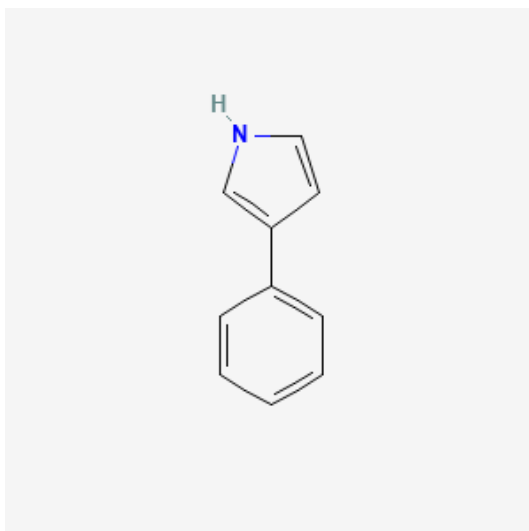
1.1 Pesticidy

Pesticidy jsou látky využívané k hubení či odpuzování různých druhů organismů, které mají negativní vliv na lidskou produkci. Tyto organismy obecně označujeme termínem „škůdce“. Pesticidy pak dělíme do skupin podle účinnosti pro jednotlivé skupiny škůdců. Mezi nejpoužívanější patří insekticidy (hmyz), herbicidy (rostliny), fungicidy (houby) a rodenticidy (hlodavci) [1].

Využití primitivních fungicidů je lidem známo již stovky let. Jako první fungicidy byly využívány jednoduché anorganické sloučeniny jako je kuchyňská sůl, prášková síra nebo třeba síran železnatý. Využití těchto fungicidů přetrvává i do dnešní doby, kdy se stále používá prášková síra pro vysíření například sudů či sklepů. Nebo třeba použití síranu mědnatého jako přísadka do bazénové chemie [2]. Začátkem 40. let 20. století se začaly objevovat organické fungicidy, které fungovaly jako inhibitory, schopné se vázat na široké spektrum látek a zamezit tak jejich správné biologické funkci. Problémem těchto látek byla nízká selektivita a celkem vysoká toxicita pro ošetřované rostliny i ostatní necílové organismy. Jako řešení těchto problémů se začaly vyvíjet nové, moderní fungicidy, které by se specificky vázaly na důležité bílkoviny cílového organismu. Toto vede k selektivnějšímu působení, a tedy většinou k nižší toxicitě pro ostatní organismy. Většina těchto moderních fungicidů je schopná distribuovat se v celé rostlině a působí tak systematicky [2].

1.1.1 Fenylypyrrolové fungicidy

Fenylypyrrolové fungicidy jsou látky, které obsahují ve své molekule fenylypyrrol (Obrázek 1). Tyto látky jsou deriváty přírodního antimykotika pyrrolnitridu, přirozeně se vyskytujícího fungicidu některých druhů půdních bakterií rodu *Pseudomonas*, který je produkován jako sekundární metabolit tryptofanu. Fenylypyrrolové fungicidy jsou schopny inhibovat růst hub ve všech jejich stádiích. Momentálně patří mezi nejpoužívanější fungicidy tohoto typu fenpiclonil a fludioxonil, přičemž fludioxonil je preferovaný díky vyšší stabilitě v prostředí a lepší účinnosti [3].

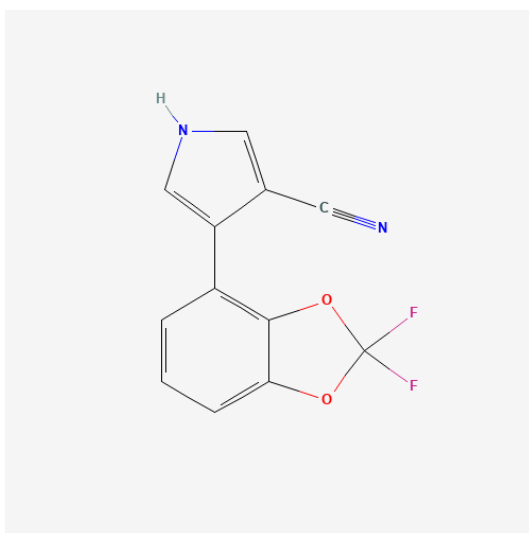


Obrázek 1 Strukturní vzorec fenylpyrrolu (3-fenyl-1H-pyrrol) [4].

1.1.2 Fludioxonil

Fludioxonil (FLU, Obrázek 2, $C_{12}H_6F_2N_2O_2$, IUPAC: 4-(2,2-Difluoro-2H-1,3-benzodioxol-4-yl)-1H-pyrrole-3-carbonitrile, $C_{12}H_6F_2N_2O_2$, CAS: 131341-86-1) je širokospektrální fungicid, používaný především na ochranu uskladněných semen, ovoce, zeleniny a dalších produktů zemědělského sektoru. V posledních letech se zvýšilo použití tohoto fungicidu, a je nyní používán na více jak 900 druhů plodin [5].

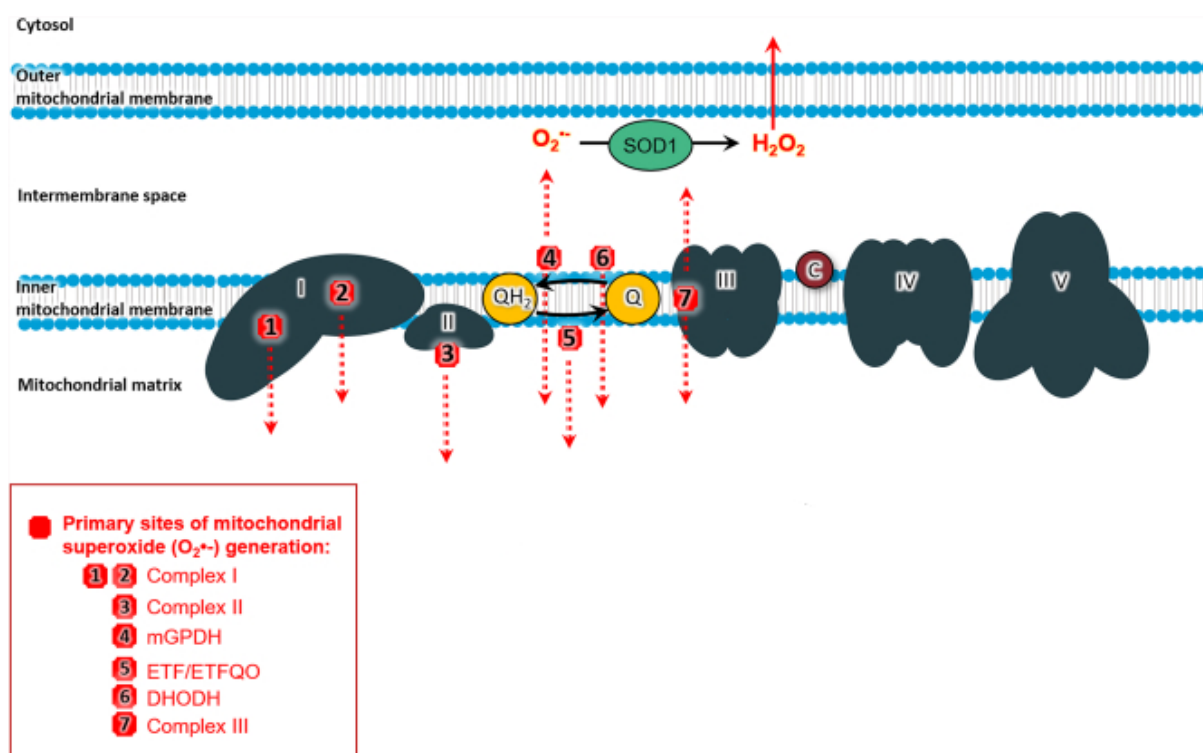
Jedná se o bílý prášek s molekulovou hmotností 248,18 g/mol. Jeho rozpustnost ve vodě je 1,8 mg/l při teplotě 25 °C. Vyšší rozpustnost FLU je v acetonu (190 mg/l při 25 °C) a v ethanolu (44 mg/l při 25 °C). Teplota tání je 199,8 °C [6].



Obrázek 2 Strukturní vzorec fludioxonilu [6].

1.1.2.1 Mechanismus účinku fludioxonilu

Mechanismus účinku FLU je momentálně stále diskutované téma a pravděpodobně je zapojeno více částí buněčného metabolismu, než se doposud předpokládalo. Historicky vycházel první navržený mechanismus účinku FLU z principu působení pyrrolnitridu, jelikož byl FLU vyvinut jako jeho stabilnější a účinnější alternativa. Pyrrolnitrid inhibuje některé funkce v elektronovém transportním řetězci v mitochondriích [5]. Elektronový transportní řetězec (Obrázek 3) je řada bílkovinných komplexů, které se účastní redoxních reakcí za účelem vytvoření elektrochemického gradientu ve formě H^+ iontů. Tento gradient je poté využit komplexem V (ATP syntázou) pro tvorbu adenosintrifosfátu (ATP). Princip vzniku elektrochemického gradientu spočívá v kaskádovité oxidaci redukovaných kofaktorů NADH (nikotinamidadenindinukleotid) a $FADH_2$ (flavinadenindinukleotid) získaných z glykolýzy glukózy a citrátového cyklu. Kofaktor NADH se oxiduje na komplexu I za vzniku 4 H^+ iontů a kofaktor $FADH_2$ na komplexu II za vzniku 2 H^+ iontů, přičemž akceptorem elektronů je koenzym Q (ubichinon).



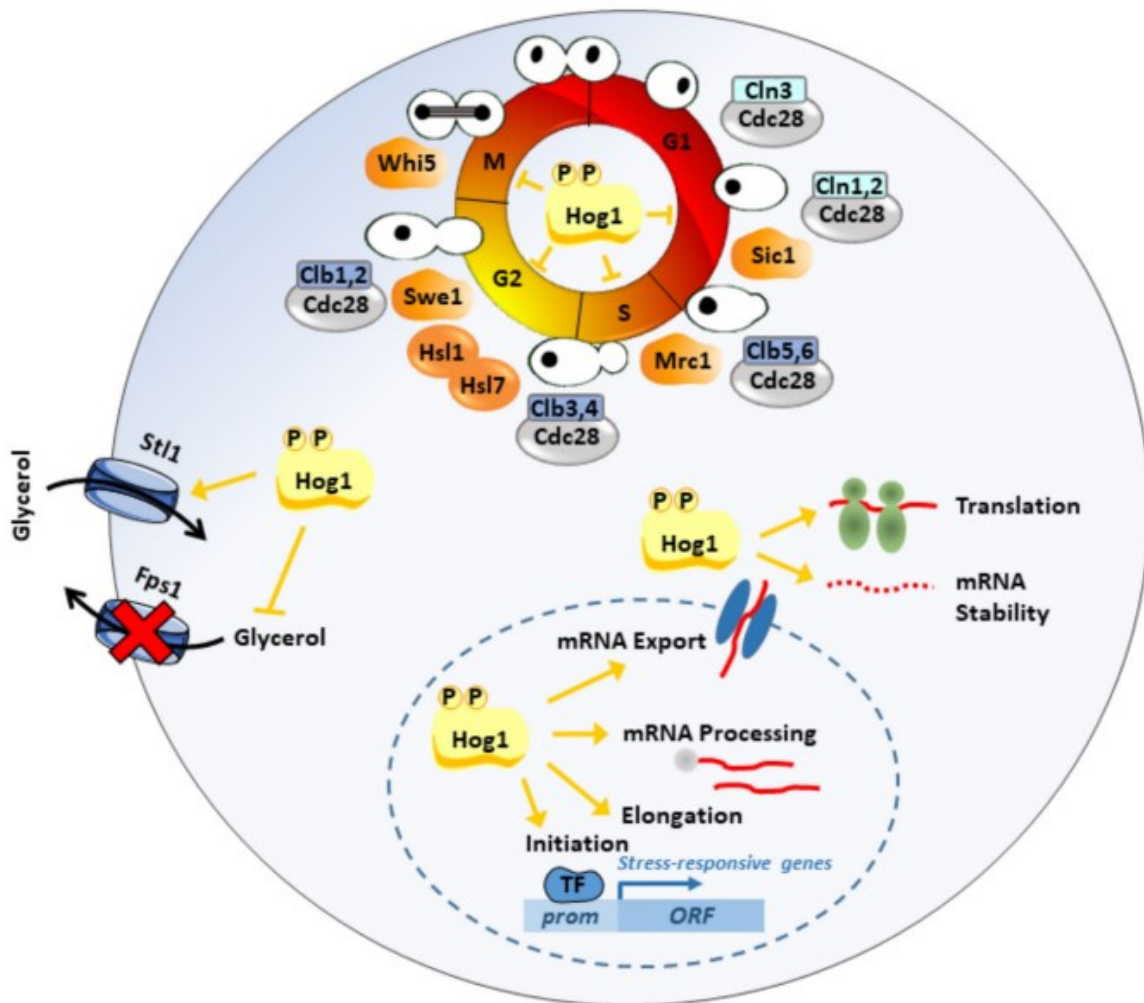
Obrázek 3 Místa v oblasti elektronového transportního řetězce, kde vzniká superoxidový radikál (jeden z druhů ROS) [8].

I – komplex I, II – komplex II, III – komplex III, IV – komplex IV, V – komplex V, Q – koenzym Q, QH₂ – redukovaný koenzym Q, C – cytochrom c, SOD1 – superoxid dismutáza, mGPDH – mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenáza, ETF – elektrony transportující flavoprotein, DHODH – dihydrooorotát dehydrogenáza

Redukovaný koenzym Q je následně zpětně oxidován na komplex III za vzniku dalších 4 H⁺ iontů a redukovaného cytochromu c. Redukovaný cytochrom c je reoxidován na komplexu IV za pomoci kyslíku a výsledným produktem je voda [7]. Výsledkem inhibice je zvýšená koncentrace reaktivních forem kyslíku (ROS – reactive oxygen species) na komplexu I (Obrázek 3) [5]. ROS spadají do skupiny volných radikálů, tedy látek, které obsahují nepárový elektron. V buňce je nutné, aby byly tyto radikály v rovnováze s antioxidanty, jinak dochází k poškození buněčných struktur a jejich funkcí [8]. Důkaz o podobném působení FLU jako samotného pyrrolnitrrinu vychází z narušení rovnováhy koncentrace antioxidantu glutathionu v buňkách [5].

Další účinek FLU spočívá v jeho schopnosti aktivovat dráhu regulace osmotického tlaku zvanou HOG (high-osmolarity glycerol) [5]. Tato dráha slouží některým eukariotám hub (např. kvasinkám) jako regulace intracelulárního osmotického tlaku. Dráha je přirozeně aktivována, když se buňka dostane do prostředí, kde je příliš vysoký osmotický tlak. Buňka v tomto prostředí ztrácí vodu a dochází ke zmenšení jejího objemu. Při aktivaci HOG dochází ke kumulaci aminokyselin, iontů a hlavně glycerolu. Tím dojde ke zvýšení osmolarity buňky, a tedy k adaptaci na nové prostředí. Ke kumulaci dochází snížením propustnosti některých látek skrz membránu a zvýšením syntézy glycerolu. Tyto adaptace jsou způsobeny změnou genové exprese některých stresových genů, ovlivněním jejich post-transkripčních úprav a modulací translace a stability vzniklé mRNA (Obrázek 4) [9].

HOG dráha je inhibována HHK (hybrid histidine kinase), což jsou látky, které blokují fosforylaci Hog1 kinázy [10]. Když FLU nepřímou aktivuje HOG dráhu, buňka zvýší svůj vnitřní osmotický tlak a začne zvětšovat svůj objem, což vede k poškození její cytoplazmatické membrány a dochází tak k nekróze [5].



Obrázek 4 Proces regulace exprese stresových genů a změny propustnosti membránových kanálků, modulovány signálním enzymem Hog1[9].

mRNA – mediátorová RNA, *prom* – promotor, *ORF* – otevřený čtecí rámeček, *HOG1* – kináza, *G1*, *S*, *G2*, *M* – fáze buněčného cyklu, *Mrc1* – Mannose receptor C-type 1, *Sic1*, *Mrc1*, *Hsl1*, *Hsl7*, *Swe1*, *Whi5*, *Cdc28*, *Clb*, 1,2,3,4,5,6, *Cln* 1,2,3 – proteiny kontrolující buněčný cyklus, *Stl1*, *Fps1* – kanálové proteiny

1.1.2.2 Nežádoucí účinky fludioxonilu

Hlavním zdrojem FLU v životním prostředí jsou komerční fungicidy, které jsou dnes hojně využívány k ochraně plodin. FLU má v prostředí nízkou mobilitu a neměl by se tedy dostávat příliš daleko od místa jeho použití. I tak však byly ve vzorcích půdy a říčního sedimentu v okolí aplikace zaznamenány zvýšené koncentrace FLU, konkrétně v řádu desetin až jednotek mg/kg. Tyto vysoké koncentrace jsou následkem pomalé degradace FLU, který má poločas rozpadu v prostředí přibližně 200-300 dní a dochází tedy k jeho kumulaci.

FLU je vysoce stabilní a není nijak významně citlivý na světlo. Hlavní mechanismus jeho degradace v přírodě je založen na působení mikroorganismů, u kterých byla jejich schopnost metabolizovat FLU potvrzena teprve nedávno [11].

FLU má obecně nízkou akutní toxicitu pro většinu organismů s výjimkou hub, vodních živočichů a řas. Například při testování toxicity FLU na modelovém organismu *Danio* pruhované byla zjištěna LC_{50} (Dávka potřebná pro usmrcení 50 % populace) 0,26 mg/l. Dále expozice FLU vedla ke zvýšení oxidačního stresu, ovlivnění endokrinní soustavy a byly pozorovány antiandrogenní účinky [12]. Zmíněné antiandrogenní účinky FLU byly pozorovány i při testech *in vitro* přímo na androgenních receptorech, kdy byla prokázána inhibice receptorů již při nízkých koncentracích FLU. Ovlivnění hormonální rovnováhy je rozšířený problém ve vyspělých zemích, a právě jednou z diskutovaných příčin je rozsáhlé znečištění životního prostředí pesticidy [13].

1.1.3 Stanovení fludioxonilu

V odborné literatuře je nejčastěji popsáno stanovení FLU s využitím chromatografických metod v kombinaci s hmotnostní spektrometrií. Tyto metody vyžadují náročné a drahé vybavení, složitou přípravu vzorků a nelze je provádět v terénu. Z těchto důvodů se jako alternativy vyvíjejí např. elektrochemické nebo imunochemické metody, schopné rychle a levně analyzovat obsah FLU v různých typech vzorků. FLU se nejčastěji stanovuje v ovoci, zelenině, obilovinách a jejich produktech (např. vína, ovocné džusy), kde se využívá k ochraně výchozích plodin, a také ve vzorcích vody a půdy [14].

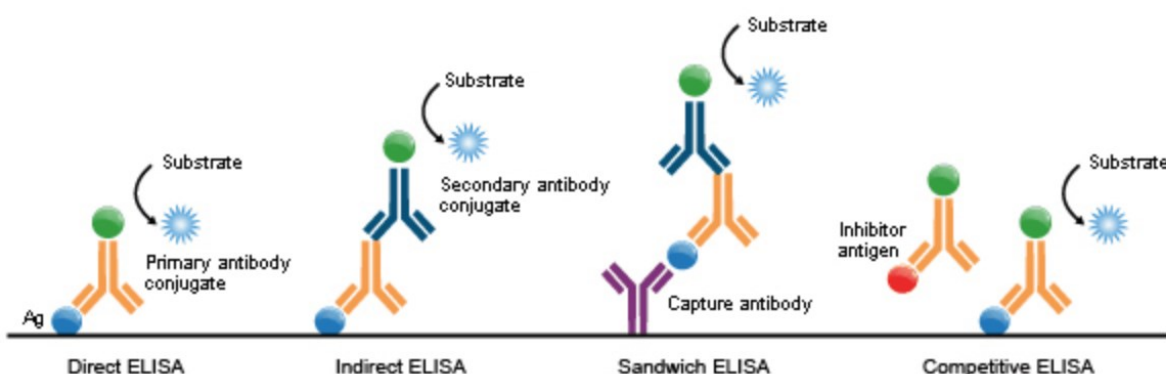
1.1.3.1 Chromatografické stanovení

Jak již bylo uvedeno výše, FLU se obvykle stanovuje pomocí chromatografických metod. Nejčastěji bylo v literatuře popsáno použití plynové chromatografie (GC) ve spojení s hmotnostní detekcí (MS) [15–18], ale používá se i detektor dusík-fosfor (NPD) [15, 19] nebo plamenový-ionizační detektor (FID) [20]. FLU byl stanovován v různých typech vzorků s využitím různých extrakčních technik, např. v hroznech a ledovém salátu pomocí GC-NPD po extrakci z rostlinného materiálu ethyl–acetátem [21]. Vedle extrakce organickým rozpouštědlem [17, 18], se u GC často používá mikroextrakce na tuhou fázi (SPME) [15], jako třeba při stanovení FLU v zelenině a ovoci, kdy po extrakci na tuhou fázi byla použita GC-MS [22].

Při stanovení FLU pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) byly použity opět různé detektory, konkrétně tandemová hmotnostní spektrometrie [23], UV detektor [14], a detektor s diodovým polem (DAD) [25]. Co se týče úpravy a zakoncentrování vzorků, tak se v případě HPLC téměř výhradně používá extrakce organickým rozpouštědlem, kdy např. pro extrakci z rýže byla použita směs acetonu a methanolu v poměru 1:1 [24], při extrakci vína to byl dichlormethan [14].

1.1.3.2 Imunochemické stanovení

Při stanovení FLU imunochemickou cestou se nejčastěji využívá metody ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Princip stanovení pomocí ELISA spočívá ve specifické interakci antigen–protilátka, při které dochází ke vzniku nekovalentní vazby, s následnou spektrofotometrickou detekcí enzymaticky katalyzované přeměny chromogenu na barevný produkt. Metodu ELISA rozdělujeme na 4 primární druhy, přímou, nepřímou, sendvičovou a kompetitivní (Obrázek 5) [26].



Obrázek 5 Jednotlivé druhy metody ELISA. Přímá, nepřímá, sendvičová a kompetitivní [26].

Modré kruhy jsou antigeny, zelené kruhy jsou enzymy kovalentně navázané na detekční protilátku, tvořící tak konjugát (protilátka–enzym)

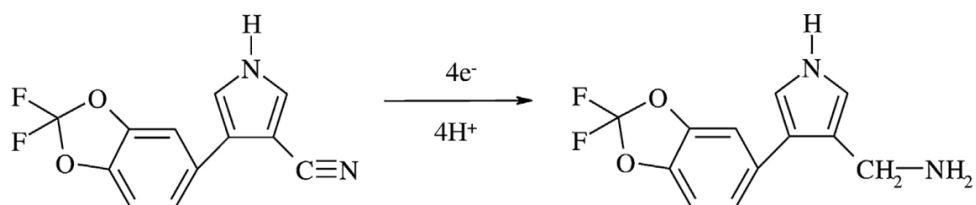
Samotná ELISA probíhá nejčastěji na polystyrenových destičkách s jamkami, které jsou schopné kovalentně vázat bílkoviny. Průběh metody ELISA lze zjednodušit do 4 obecných kroků. Prvním krokem je navázání antigenu nebo protilátky na povrch destičky, dalším krokem je zablokování zbylých povrchů destičky, které by mohly dále vázat bílkoviny. Blokace je velice důležitá pro snížení pravděpodobnosti navázání detekčních protilátek nespecificky, a tedy k zisku falešně pozitivních výsledků. Nejčastěji se blokace provádí přidávkem BSA (hovězí sérový albumin) nebo OVA (ovalbumin), ale lze použít i další zvířecí bílkoviny. Třetím krokem je samotná detekce antigenu protilátkou (tento krok se může skládat z několika reakcí

dle použité metody ELISA), kde dochází k nekovalentní, specifické vazbě antigen-protilátka. Posledním krokem je přidavek substrátu (chromogenu), který je katalyticky přeměněn na barevný produkt a ten pak lze měřit spektrofotometricky. K přeměně substrátu na barevný produkt se nejčastěji používají enzymy HRP (křenová peroxidáza) a AP (alkalická fosfatáza), kovalentně navázané na detekční protilátku a tvořící tzv. konjugát [27].

ELISA byla využita k detekci FLU v jablečném a hroznovém moštu. FLU nemá parametry dostačující na vyvolání imunochemické reakce a vytvoření jeho protilátek, proto byl před stanovením derivatizován (obecně říkáme těmto molekulám hapteny a jsou určeny k navázání na imunogenní objemné molekuly) a následně kovalentně navázán na OVA, BSA a HRP (byly připraveny 3 různé konjugáty). Následná imunizace pak byla provedena BSA konjugátem. Detekce FLU byla provedena přímou i nepřímou metodou a obě byly vyhodnocené spektrofotometricky. Tato metoda dosahuje vysoké citlivosti s limitem detekce (LOD) 0,06 µg/l a mezi stanovitelnosti (LOQ) 5 µg/l [28].

1.1.3.3 Elektrochemické stanovení

Elektrochemické stanovení FLU bylo v dosavadní literatuře popsáno pouze jednou, a to v práci Brycht a kol. [29], kdy byla sledována redukce látky. Autoři využili obnovitelnou stříbrnou amalgamovou filmovou elektrodu (Hg(Ag)FE), která byla vyvinuta jako méně toxická alternativa ke klasickým rtuťovým elektrodám. Použita byla metoda square-wave voltametrie (SWV) v 3 elektrodovém zapojení elektrochemického článku (pracovní elektroda Hg(Ag)FE, referentní nasycená argentchloridová elektroda a platinová pomocná elektroda) v prostředí citrát-fosfátového pufru o pH 3,7. Na elektrodě docházelo dle autorů k redukci nitrilové skupiny FLU (Obrázek 6). V tomto uspořádání byly analyzovány vzorky říční vody (z řeky Varta, Polsko) s přidavkem standardního roztoku FLU. Optimalizovaná metoda dosahuje LOD $5,81 \times 10^{-7}$ mol/l, LOQ $1,94 \times 10^{-6}$ mol/l a LDR $2,0 \times 10^{-6}$ až $2,25 \times 10^{-5}$ mol/l [29].



Obrázek 6 Mechanismus elektrochemické redukce fludioxonilu [29].

1.2 Voltametrie

Samotný pojem voltametrie pochází ze slova voltamperometrie, které naznačuje jistou spojitost měřeného proudu a napětí. Voltametrie je tedy elektroanalytická metoda založena na sledování velikosti protékajícího proudu při potenciálu aplikovaném na elektrodu, který se v čase mění. Samotná podstata vychází z oxidace nebo redukce látek na povrchu elektrody, přičemž velikost procházejícího proudu lze vyjádřit Faradayovým zákonem, kde) [30].

$$Q = zFn, \quad (1)$$

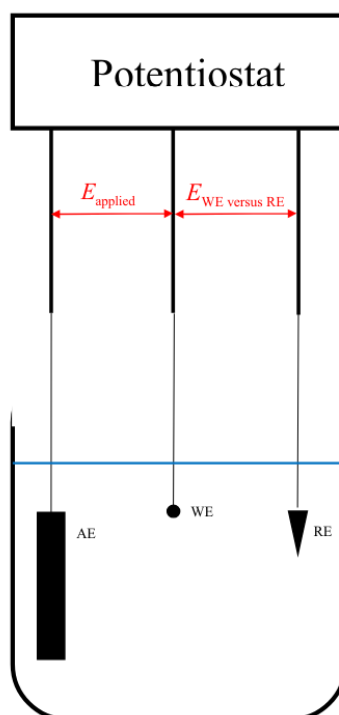
kde Q – prošlý náboj [C], z – počet vyměněných elektronů na reakci, F – Faradayova konstanta [$9,648533 \times 10^4$ C/mol], n – látkové množství [mol] [30].

Voltametrie má svůj prvpočátek v metodě zvané polarografii, která byla objevena v roce 1922 profesorem Jaroslavem Heyrovským. V roce 1959 získal za tento objev Nobelovu cenu [30, 31]. Princip polarografie je identický s principem voltametrie, jediný rozdíl je v pracovní elektrodě použité pro měření, kde v případě polarografie používáme kapající rtuťovou elektrodu.

1.2.1 Voltametrická sestava

Klasická sestava pro voltametrické měření se skládá ze 3 elektrod (Obrázek 6). Referentní elektroda (RE), pracovní elektroda (WE) a pomocná elektroda (AE). Referentní elektroda má stálý potenciál o známé hodnotě, od které se odvíjí potenciál pro pracovní elektrodu. Tento potenciál mezi pracovní a referentní elektrodou lze kontrolovat potenciostatem. Referentní elektrodou by neměl protékat žádný proud, aby nedošlo ke změně potenciálu nebo poškození elektrody.

Pracovní elektroda je nejvýznamnější částí soustavy, jelikož právě na jejím povrchu probíhá reakce analytu a dochází zde tedy k vedení proudu. Problémem u 2 elektrodového systému (pracovní–referentní elektroda) by bylo procházení proudu i skrze referentní elektrodu, která by poté neměla konstantní potenciál. Řešením je zavedení pomocné elektrody, která přemostí tok proudu mezi sebe a pracovní elektrodu a zabrání tak tomuto problému [31–33].



Obrázek 6 Schéma zapojení 3 elektrodové sestavy pro voltametrické měření [30].

WE – pracovní elektroda, RE – referenční elektroda, AE – pomocná elektroda

1.2.1.1 Referenční elektrody

Jak již bylo zmíněno, referenční elektroda má stálý, známý potenciál, který by se neměl během měření měnit. Tento potenciál je popsateľný Nernstovou rovnicí (2). V dnešní době je nejčastěji využívaná nasycená argentschloridová (Ag/AgCl, KCl) elektroda, která vytlačila použití nasycené kalomelové elektrody (SKE), z důvodů jednodušší výroby a lepší využitelnosti v širším tepleném rozmezí.

$$E = E_0 + 2,303 \frac{RT}{zF} \log \frac{c_{Ox}}{c_{Red}}, \quad (2)$$

kde E – potenciál, E_0 – standardní redoxní potenciál, R – univerzální plynová konstanta [8,31 J/K×mol], T – teplota [K], z – počet elektronů přecházejících v reakci, F – Faradayova konstanta [9,648533×10⁴ C/mol], c_{Ox} – koncentrace oxidované formy analytu, c_{Red} – koncentrace redukované formy analytu [33].

1.2.1.2 Pomocné elektrody

Mezi pomocnou a pracovní elektrodou protéká proud. Tato elektroda může být vyrobena z různých materiálů, avšak nejčastěji se jedná o platinový drátek. Hlavním kritériem, které musí pomocná elektroda splňovat je dostatečně velká plocha schopná vést generovaný proud.

1.2.1.3 Pracovní elektrody

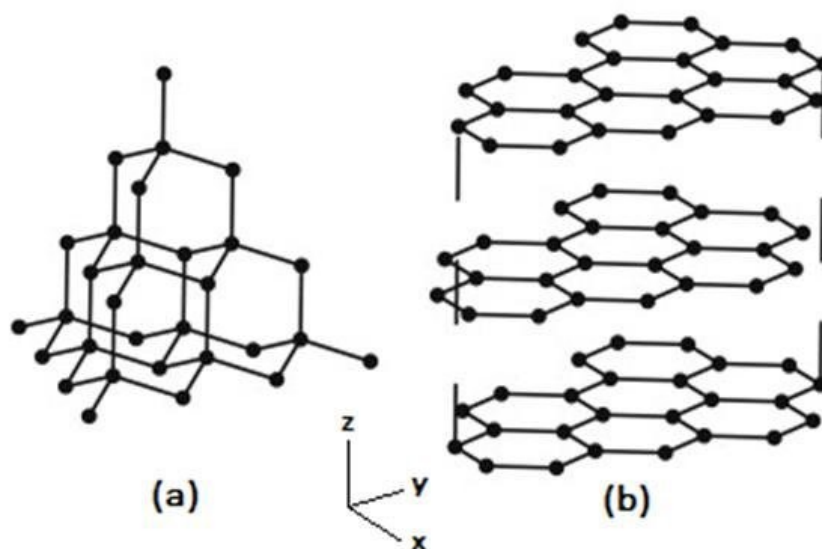
Nejdůležitější a nejrozmanitější částí voltametrické soustavy jsou pracovní elektrody. Vlastnosti pracovních elektrod a materiály ze kterých jsou konstruovány, velice ovlivňují použitelné parametry pro měření (využitelný potenciálový rozsah, interakce s elektrolyty, aj.). Pracovní elektroda by měla vykazovat vysoký poměr signálu vůči šumu s dobře reprodukovatelnými výsledky [33].

Jedna z prvních pracovních elektrod byla rtuťová kapková elektroda. Tato elektroda byla schopna pracovat i při velmi nízkých potenciálech (až -2.0 V vs SKE) a díky fyzikálním vlastnostem rtuti jde velmi jednoduše regenerovat povrch elektrody pravidelným odkapáváním rtuti. Hlavními zápory této elektrody jsou nízký maximální kladný potenciál, při kterém může elektroda pracovat (oxidace rtuti), a vysoká toxicita rtuti pro životní prostředí [33].

Postupem času byla rtuťová elektroda z velké míry nahrazena elektrodami s pevným povrchem. Tyto elektrody jsou mechanicky stabilnější a mají vyšší využitelné anodické potenciály. Hlavním problémem je nesnadná kontrola kvality jejich povrchu a zajištění regenerace povrchu tak, aby byla rychlá, jednoduchá a výsledky po regeneraci reprodukovatelné. Existuje mnoho metod pro regeneraci povrchu elektrod, například mechanické leštění, potenciálové cyklování, chemické rozpuštění nebo třeba tepelné a mechanické šoky. Za základní pevné elektrody lze považovat elektrody z ušlechtilých kovů. Nejčastěji se jedná o zlato, platinu nebo stříbro, ale používají se i bismut, rhodium a paladium. Tyto elektrody poskytují nízké hodnoty šumu a velmi dobrou reprodukovatelnost. Často ale mají nižší využitelný katodický potenciál, a proto je jejich použití ve vodných roztocích limitováno [33]. Za další velkou skupinu pevných elektrod se dají považovat elektrody uhlíkové. Tyto elektrody mají často široký rozsah využitelného potenciálu, stabilní povrch, nízkou hodnotu šumu, a hlavně nižší pořizovací cenu než elektrody z ušlechtilých kovů. Jedním z problémů je jejich vysoká povrchová aktivita, která má za následek náchylnost ke tvorbě vazeb s organickými látkami. To poté vede k znehodnocení povrchu elektrody, které se nazývá pasivací nebo otravou. Forma uhlíku má na vlastnosti elektrody významný vliv. Nejčastější formy uhlíku, které se používají jsou skelný uhlík, grafit, fullereny, uhlíkové nanotrubičky a diamant [33].

1.2.1.4 Borem dopovaná diamantová elektroda

Borem dopovaná diamantová elektroda byla použita v rámci této bakalářské práce, a proto jí i v teoretické části bude věnována větší pozornost. Diamant je vysoce stabilní a tvrdá krystalická forma uhlíku, kde je každý atom uhlíku vázán na 4 okolní atomy s orbitalovou hybridizací elektronů sp^3 (Obrázek 7). Díky tomuto uspořádání, kde jsou atomy uhlíku vázány kovalentně ve všech 3 dimenzích, má diamant podstatně rozdílné vlastnosti od grafitu. Jeho vysoká tvrdost a chemická netečnost se dá využít pro konstrukci elektrod, schopných odolat i extrémním podmínkám [33, 35].



Obrázek 7 Uspořádání atomů uhlíku v krystalové mřížce diamantu (a) a grafitu (b) [35].

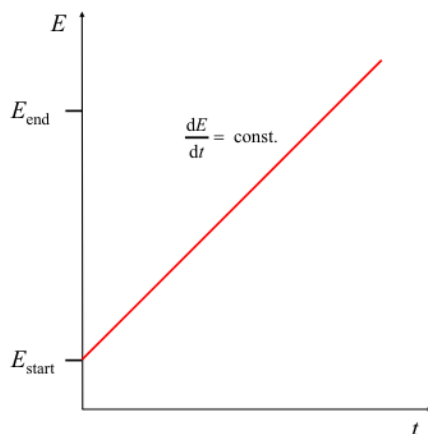
Samotný diamant je elektricky nevodivý, a proto je nutné ho nejdříve chemicky upravit. BDD se vyrábí chemickou depozicí par a během výroby se dopuje různými prvky. Nejčastější variantou je borem dopovaný diamant (BDD). Elektrody z BDD mají prakticky všechny vlastnosti diamantu (tvrdost, chemickou stabilitu, vysokou tepelnou vodivost aj.). Zároveň se stávají vodivými (vodivost roste s rostoucím obsahem boru v diamantu), dosahují dobrého poměru signál–šum a mají široký využitelný potenciálový rozsah jak v katodické, tak v anodické oblasti [33]. Díky svým výjimečným vlastnostem se BDDE používají při analýze anorganických i organických látek, látek významných z hlediska kontaminace životního prostředí i lidského zdraví [36–41].

1.2.2 Voltametrické metody

Podle způsobu, kterým je aplikován potenciál na pracovní elektrodu, se jednotlivé voltametrické metody liší. Nejčastěji využívané metody jsou cyklická voltametrie (CV), stejnosměrná voltametrie (LSV, linear sweep voltammetry) a pulzní techniky jako diferenční pulzní (DP) a square-wave (SW) voltametrie [32, 33].

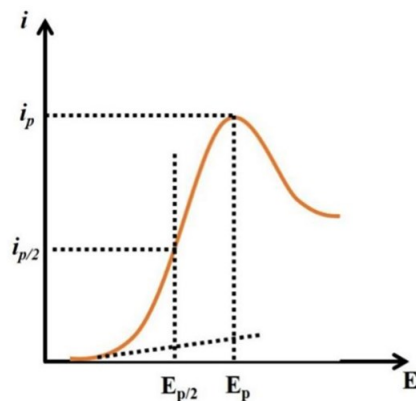
1.2.2.1 LS voltametrie

LSV je metoda, kdy se na pracovní elektrodu vkládá napětí, které lineárně roste s časem (Obrázek 8). Výsledkem měření touto metodou je závislost proudu na potenciálu, která má tvar vlny (Obrázek 9). Z voltamogramu lze odečíst analytické informace jako koncentraci, která je úměrná hodnotě výšky píku (I_p), z hodnoty tzv. půlvlnového potenciálu ($E_{p/2}$) lze usuzovat na přítomnost konkrétních látek ve vzorku [30, 33].



Obrázek 8 Lineární závislost vkládaného napětí na čase [30].

E – napětí, t – čas, dE/dt – derivace hodnoty napětí na čase (konstantní hodnota značí lineární přírůstek napětí)

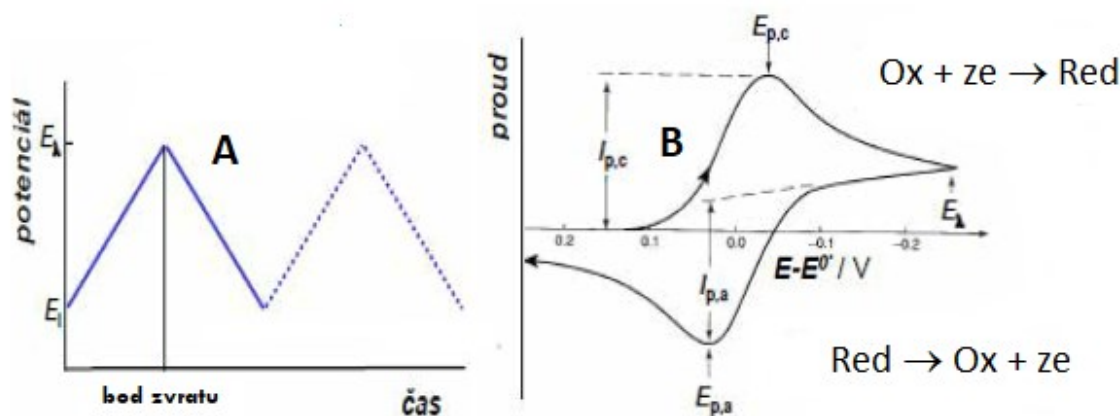


Obrázek 9 LSV voltamogram [32].

i – proud, i_p – limitní proud, E_p – vlnový potenciál, $E_{p/2}$ – půlvlnový potenciál

1.2.2.2 Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie je podobná LSV, jelikož vkládané napětí také nejdříve roste lineárně s časem, ale po dosažení námi zvolené hodnoty se proces obrátí a napětí lineárně klesá až do počáteční hodnoty. Výsledný tvar závislosti vkládaného potenciálu na čase je podobný trojúhelníku a výsledný voltamogram je tvořen katodickou (redukce) a anodickou (oxidace) částí křivky s odpovídajícími proudovými odezvami (Obrázek 10 A). CV je extrémně užitečná metoda, která je schopna podat informace o kinetice a termodynamice probíhající reakce (např. reverzibilita reakce) [32, 33].



Obrázek 10 Závislost vkládaného napětí na čase pro CV (A) a výsledný cyklický voltamogram (B) [34].

E_i – počáteční potenciál, E_λ – potenciál obratu, $E - E^0$ – potenciál vztahovaný ke standardnímu potenciálu, $E_{p,c}$ – potenciál oxidačního píku, $E_{p,a}$ – potenciál redukčního píku, $I_{p,c}$ – proud redukčního píku, $I_{p,a}$ – proud oxidačního píku, Ox – oxidovaná forma analytu, Red – redukovaná forma analytu, ze – počet elektronů přecházejících v reakci

1.2.2.3 Diferenční pulzní a square-wave voltametrie

Postupem času byly objeveny citlivější voltametrické metody, založené na malých krátkých napěťových pulzech. Mezi nejvýznamnější pulzní metody patří DPV a SWV. Princip DPV spočívá na vkládání lineárně rostoucího napětí, s pravidelnými potenciálovými pulzy o amplitudě 10-100 mV. Proud je měřen vždy před začátkem pulzu a na jeho konci a tyto hodnoty jsou následně odečteny. Výsledný zaznamenaný proud tedy není absolutní, ale jedná se o rozdíl mezi těmito dvěma proudy. Výsledný voltamogram pak připomíná 1. derivaci LSV voltamogramu (charakter píku) [42]. U SWV se na pracovní elektrodu vkládá potenciál, který se opět lineárně mění s časem a je modulován střídavým napětím pravoúhlého tvaru o amplitudě v desítkách mV. Proud se měří opět v krátkém časovém intervalu, a to na konci vkládaného pulsu. Výsledkem je znovu voltamogram ve tvaru píku [34].

2 Experimentální část

2.1 Přístrojové vybavení

Pro voltametrické měření bylo zvoleno 3 elektrodové uspořádání (Obrázek 11A), skládající se z pracovní BDDE (BioLogic, FRA), referentní nasycené Ag/AgCl, KCl (Monokrystaly, Turnov, CZE) a pomocné platinové elektrody (Monokrystaly, Turnov, CZE). Pracovní elektroda měla deklarované tyto vlastnosti: vnitřní průměr 3,0 mm, pracovní povrch 7,07 mm², odpor 0,075 Ω, a míru dopování 1000 ppm B/C. Elektrody byly zapojeny k potenciostatu Autolab PGSTAT302N (Obrázek 11B, Metrohm, NLD) a voltametrické měření bylo zaznamenáváno softwarem Nova 2.1.5.



Obrázek 11 Použitě 3 elektrodové uspořádání (A), potenciostat Autolab PGSTAT302N se zapojeným elektrochemickým článkem ve voltametrické nádobce (B).

Pro zakoncentrování roztoků byla využita sestava pro extrakci na tuhé fázi Visiprep SPE Vacuum Manifold (Merck, DEU, Obrázek 12A) s kolonkami Chromabond C18ec (Macherey-Nagel, DEU). Pro tvorbu podtlaku byla použita membránová vývěva (KNF Laboport, CHE). Pro odpařování eluátů byla využita rotační vakuová odparka Laborota 4001 (Heidolph, DEU, Obrázek 12B).

K pipetáži roztoků byly využity automatické pipety (Eppendorf, CZE, Fisher Scientific, CZE). Pro navažování látek byly využity analytické váhy (Denver Instrument, USA). K odplynění roztoků, regeneraci elektrody a rozpouštění některých látek byla využita ultrazvuková lázeň (BANDELIN Sonorex, DEU). Pro měření pH roztoků byl použit pH metrem Accumet AB150 (Fisher Scientific, CZE).



Obrázek 12 Sestava pro extrakci na tuhé fázi (A) a vakuová odparka (B)

2.2 Použité chemikálie

Pro analýzu byl připraven standardní roztok FLU o koncentraci $1,0 \times 10^{-3}$ mol/l, navážením 24,8 mg čistého FLU (Sigma-Aldrich, CZE) na 100 ml acetonitrilu (Honeywell/Riedel-de Haën, DEU). Takto připravený roztok byl využit ke všem následným experimentům a k přípravě zředěnějších roztoků FLU. Standardní roztok byl uchováván v lednici (4 °C) bez přístupu světla. Před každým použitím byl vložen na 15 min do ultrazvukové lázně a vytemperován na laboratorní teplotu.

BRB pufr použitý pro měření při různých hodnotách pH, byl připraven smícháním různých poměrů kyselá a alkalické složky pro dosažení požadovaného pH. Kyselá složka se skládala z 2,7 ml 99% CH_3COOH (PENTA, Praha, CZE), 2,7 ml 85% H_3PO_4 (PENTA, Praha, CZE) a 2,485 g práškové H_3BO_3 (PENTA, Praha, CZE) v objemu 1,0 l destilované vody. Alkalická složka pufru byla připraveny rozpuštěním 8,0 g pevného NaOH (PENTA, Praha, CZE) v 1,0 l destilované vody. Jako základní elektrolyt byl používán také roztok H_3PO_4 o koncentraci 0,1 mol/l, který byl připraven odměřením 6,74 ml 85% H_3PO_4 do 1,0 l odměrné baňky a následným doplněním destilovanou vodou po rysku. Pro testování voltametrického chování FLU byly využity i další kyseliny. Zředěné roztoky o koncentraci 0,1 mol/l byly připraveny zředěním 96% H_2SO_4 (PENTA, Praha, CZE), 35% HCl (PENTA, Praha, CZE), 70% HClO_4 (PENTA, Praha, CZE), 65% HNO_3 (PENTA, Praha, CZE). Zředěný roztok H_3PO_4 (1,0 mol/l) sloužil i ke každodenní regeneraci elektrody.

2.3 Pracovní postupy

2.3.1 Voltametrické měření

Pro voltametrické měření byla vybrána BDDE. Ta byla vždy před začátkem experimentů aktivována v roztoku H_3PO_4 o koncentraci 0,1 mol/l za pomoci CV. Rozsah potenciálů byl od -1500 mV do $+2500$ mV s rychlostí polarizace 100 mV/s. Vždy bylo vloženo 20 cyklů. Při práci s vyššími koncentracemi FLU docházelo občas ke zhoršení vlastností BDDE, a tedy ke zhoršení odezvy. Elektrochemická regenerace s využitím CV neměla v takovém případě dostatečný účinek. Proto byla pracovní elektroda ponořena do kádinky s acetonitrilem v ultrazvukové lázni na dobu 2 minut. Po této proceduře byla elektroda opláchnuta destilovanou vodou a aktivována. Voltametrická nádobka a elektrody byly před každým měřením 3× opláchnuty destilovanou vodou.

Pro studium elektrochemického chování FLU byla použita CV s následujícími parametry: počáteční potenciál ($E_{\text{poč}}$) = -1000 mV, potenciál obratu (E_{obratu}) = $+2500$ mV, konečný potenciál (E_{kon}) = -1000 mV, rychlost polarizace (v) = 100 mV/s (25-200 mV/s). Pro stanovení FLU byly použity metody DPV a SWV s následujícími parametry: DPV – $E_{\text{poč}} = -1000$ mV, $E_{\text{kon}} = +2500$ mV, $v = 50$ mV/s, amplituda (A) = 50 mV, doba pulzu (t) = 20 ms; SWV – $E_{\text{poč}} = -1000$ mV, $E_{\text{kon}} = +2500$ mV, $v = 50$ mV/s, amplituda (A) = 50 V, frekvence (f) = 10 Hz. Měření probíhala za laboratorní teploty (23 ± 2 °C).

2.3.2 Analýza přírodní vody

2.3.2.1 Zakoncentrování vzorku

Analyzovaná byla říční voda odebraná z řeky Loučná v okolí Dašic (Pardubický kraj, ČR) dne 10. 11. 2023. Před analýzou byla voda filtrovaná. Modelové vzorky připravené v destilované vodě přidavkem standardního roztoku FLU stejně jako vzorky říční vody po přidavku standardu na požadovanou koncentraci ($1,0 \times 10^{-8}$ mol/l) byly upraveny stejným postupem. K analýze bylo odměřeno vždy 0,5 l vzorku, který byl extrahován na 5 SPE kolonkách s pevnou fází C18. Eluce proběhla proplachem každé kolonky 20 ml acetonitrilu. Výsledný eluát byl odpařen do sucha v rotační vakuové odparce a odparek byl rozpuštěn v 1,0 ml acetonitrilu. K acetonitrilu bylo přidáno 9,0 ml H_3PO_4 (0,1 mol/l), kdy při 100% výtěžku by výsledná koncentrace takto upraveného vzorku byla $5,0 \times 10^{-7}$ mol/l.

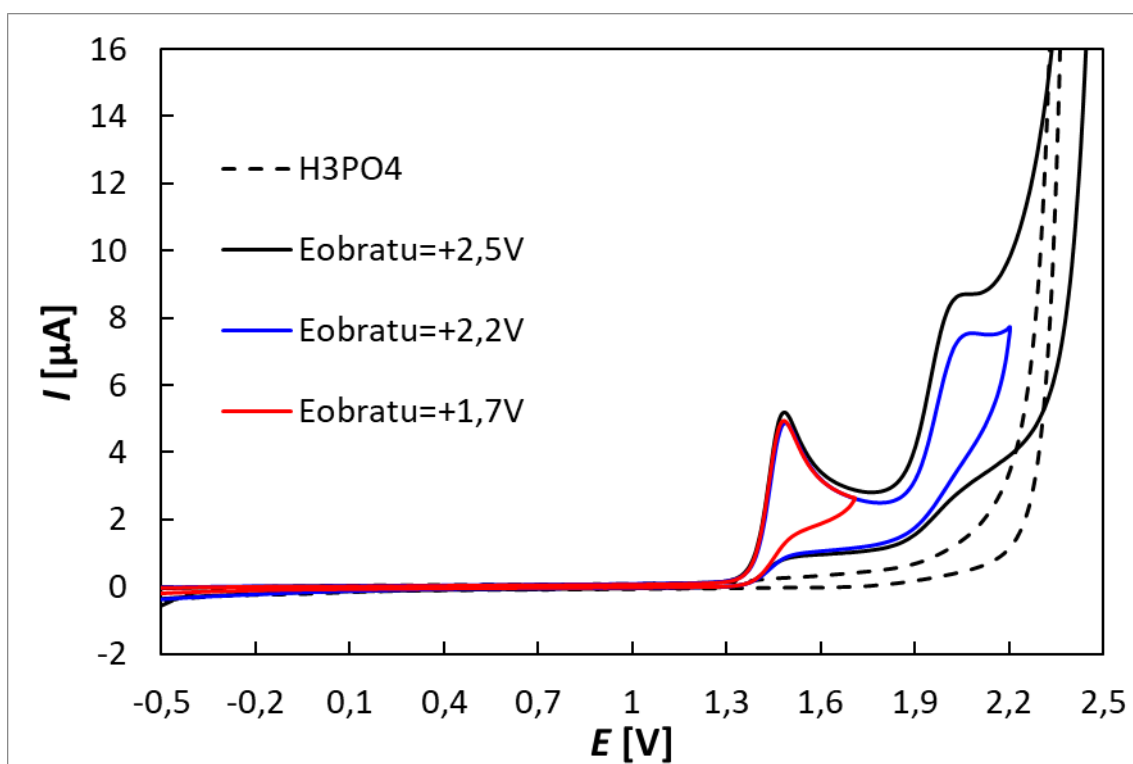
2.3.2.2 Stanovení fludioxonilu

Zakoncentrovaný vzorek byl podroben analýze optimalizovanou metodou SWV. Na začátku byl vždy několikrát proměřen základní elektrolyt (1,0 ml acetonitrilu s 9,0 ml H₃PO₄ (0,1 mol/l)). Poté byl analyzován upravený vzorek. Pro vyhodnocení byla použita metoda standardního přídávku, kdy byly přidány vždy minimálně 2 přídávky o objemu 5,0 µl standardního roztoku FLU o koncentraci 1,0×10⁻³ mol/l. Stanovení bylo vždy 5× zopakováno a byly vypočteny statistické parametry, jako průměrná koncentrace s odpovídajícím intervalem spolehlivosti, výtěžnost a relativní směrodatná odchylka opakovaného stanovení.

3 Výsledky a diskuse

3.1 Voltametrické chování fludioxonilu

Jako první bylo studováno voltametrické chování FLU. V prostředí 0,1 mol/l H_3PO_4 byl změřen cyklický voltamogram FLU ($1,0 \times 10^{-4}$ mol/l) s rozsahem potenciálu -1000 až $+2500$ mV, s rychlostí polarizace 100 mV/s. Na voltamogramu na Obrázku 13 jsou vidět 2 oxidační píky, první kolem potenciálu $+1500$ mV a druhý kolem potenciálu $+2050$ mV. V katodické části křivky se žádné redukční píky nenacházejí a můžeme tedy zhodnotit, že se jedná o ireverzibilní reakci. Tento závěr byl potvrzen i po změnách potenciálu obratu, který byl posunut postupně za jednotlivé oxidační píky FLU.



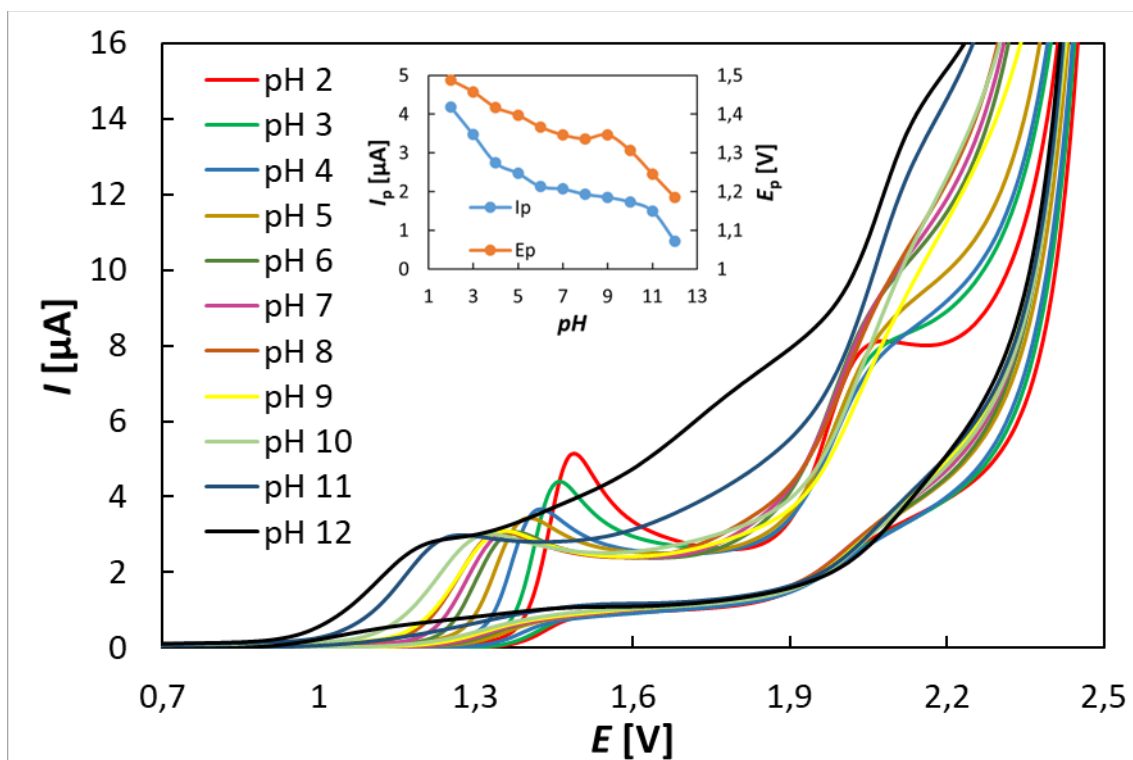
Obrázek 13 Cyklický voltamogram FLU zaznamenaný na BDDE.

Metoda – CV, elektrolyt – 0,1 mol/l H_3PO_4 , $c_{FLU} = 1,0 \times 10^{-4}$ mol/l, $E_{poč} = -1000$ mV, $E_{obratu} = +2500$ mV, $v = 100$ mV/s

3.1.1 Závislost voltametrického chování FLU na pH

Při zjišťování voltametrického chování látek hraje významnou roli pH základního elektrolytu, jelikož může zásadně změnit velikost proudové odezvy (I_p) i hodnotu potenciálu (E_p), při kterém se bude látka oxidovat nebo redukovat. Pro měření byl nejprve jako základní elektrolyt použit roztok BRB. Voltametrické chování bylo sledováno při pH v rozmezí 2,0-12. Měření

probíhalo při koncentraci FLU $1,0 \times 10^{-4}$ mol/l. Měření odezvy FLU bylo provedeno metodou CV (Obrázek 14), DPV (Obrázek 15) a SWV (Obrázek 16). Vzhledem ke špatné vyhodnotitelnosti 2. oxidačního píku, zejména v alkalickém prostředí, byl v případě CV vyhodnocován pouze 1. anodický signál FLU.

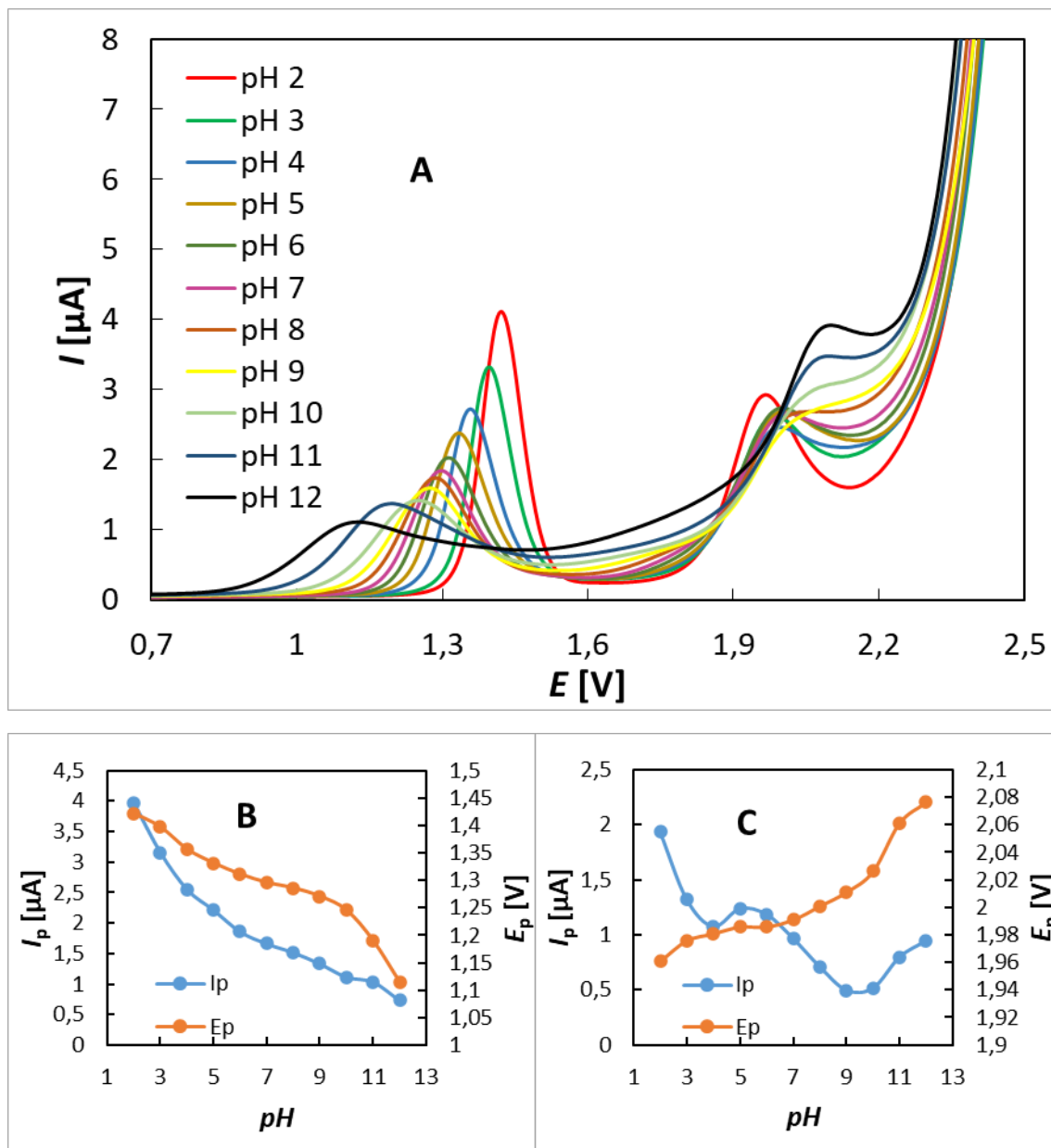


Obrázek 14 Cyklické voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE v prostředí BRB o pH 2,0-12 s vloženými závislostmi I_p a E_p na pH pro první oxidační pík.

Metoda – CV, elektrolyt – BRB (pH 2,0-12), $c_{\text{FLU}} = 1,0 \times 10^{-4}$ mol/l, $E_{\text{poč}} = -1000$ mV, $E_{\text{obratu}} = +2500$ mV, $v = 100$ mV/s

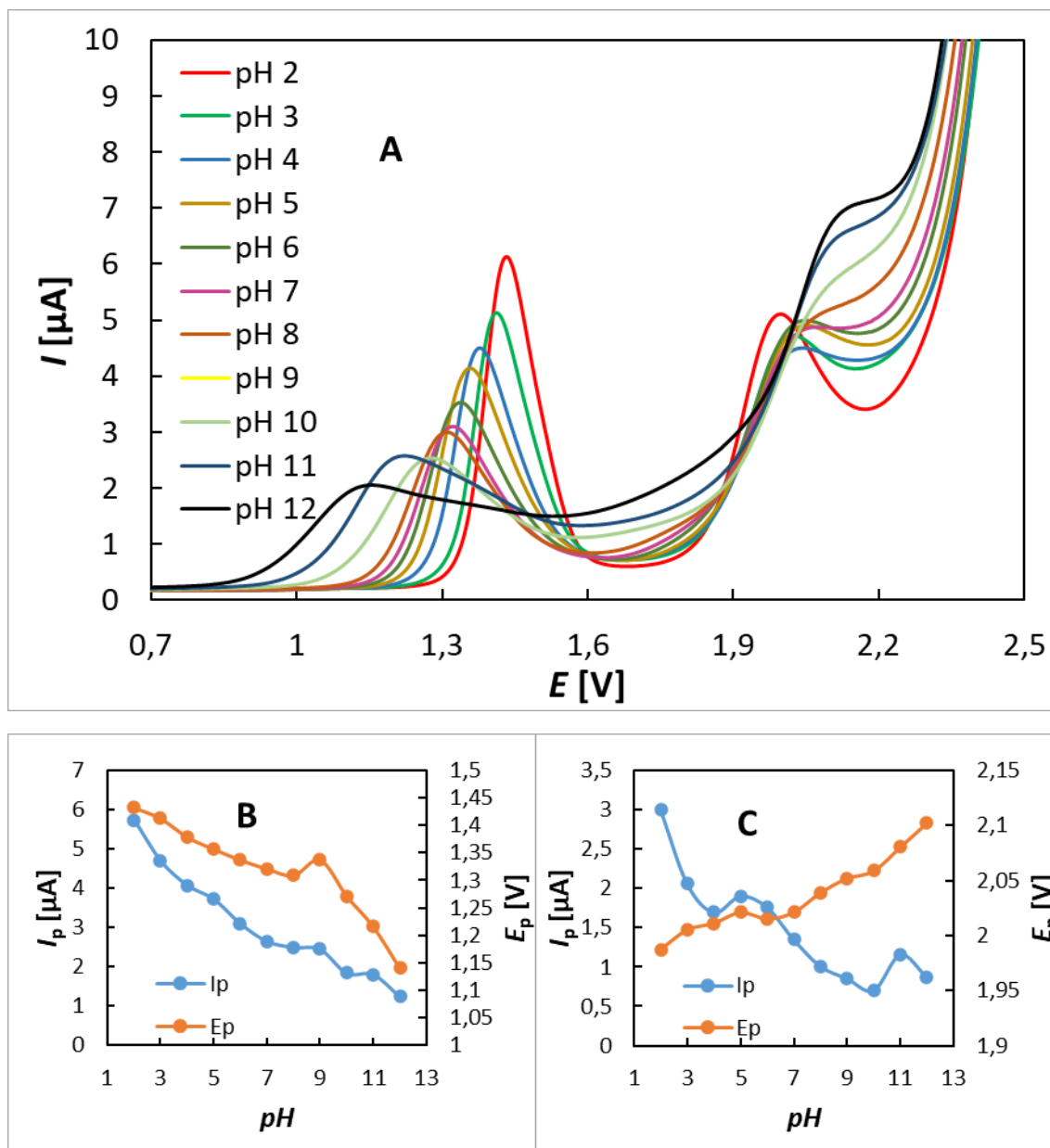
Z naměřených voltamogramů (obrázky 14–16) je evidentní, že intenzita signálu roste se snižujícím se pH základního elektrolytu a dosahuje maxima při hodnotě pH 2,0. Dále dochází v případě 1. oxidačního píku k posunu ke kladnějšímu potenciálu a k zaostření (zúžení) píků. Pík se tak stává zejména v případě CV lépe vyhodnotitelným. V případě DPV a SWV byl vyhodnocen i 2. oxidační pík (Obrázek 15C a Obrázek 16C). Vyhodnotitelnost těchto píků je podstatně horší a se snižujícím se pH dochází k posunu k zápornějšímu potenciálu a opět k zaostření píků. I 2. oxidační pík byl nejvyšší v prostředí BRB (pH 2,0). Díky méně pozitivnímu potenciálu, vyšší proudové odezvě a lepší vyhodnotitelnosti byl 1. oxidační pík zvolen pro vývoj metody stanovení FLU. Jako vhodný základní elektrolyt bylo zvoleno kyselé

prostředí a vedle BRB byly ještě v následujících experimentech testovány roztoky zředěných kyselin.



Obrázek 15 DP voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE v prostředí BRB o pH 2,0-12 (A), závislost I_p a E_p na pH pro první oxidační pík (B), závislost I_p a E_p na pH pro druhý oxidační pík (C).

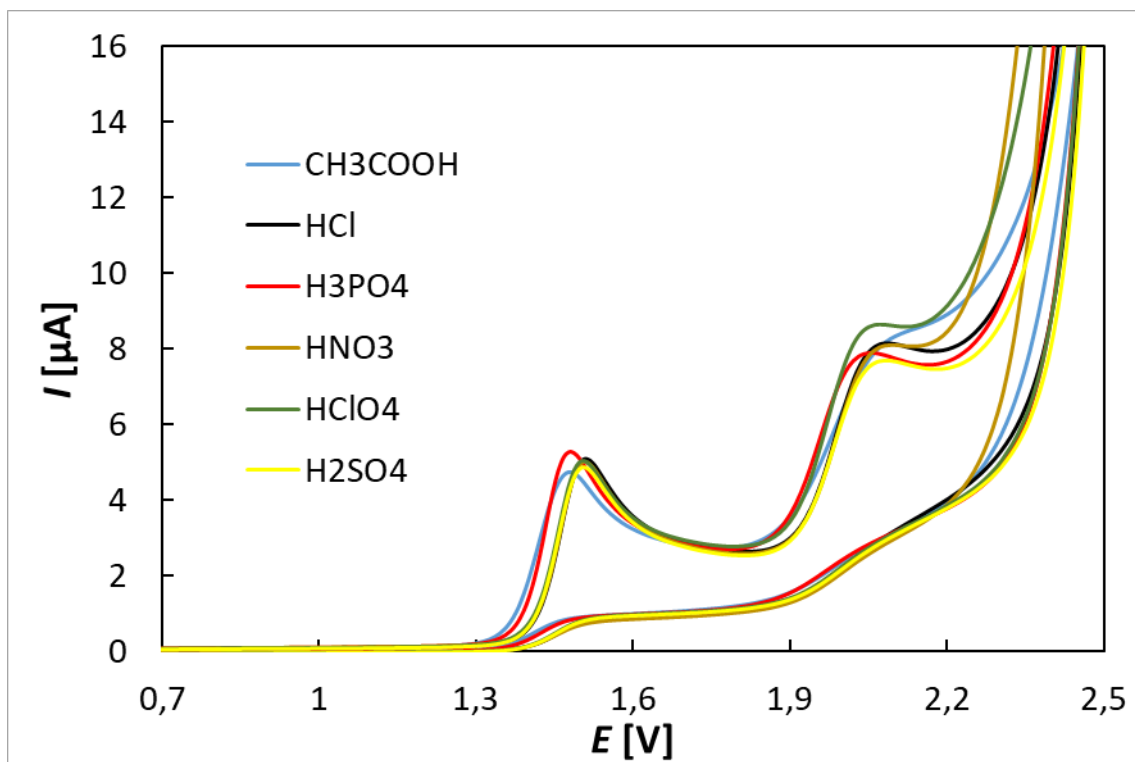
Metoda – DPV, elektrolyt – BRB (pH 2,0-12), $c_{FLU} = 1,0 \times 10^{-4}$ mol/l, $E_{poč} = -1000$ mV, $E_{kon} = +2500$ mV, $v = 50$ mV/s, $A = 50$ mV, $t = 50$ ms



Obrázek 16 SW voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE v prostředí BRB o pH 2,0-12 (A), závislost I_p a E_p na pH pro první oxidační pík (B), závislost I_p a E_p na pH pro druhý oxidační pík (C).

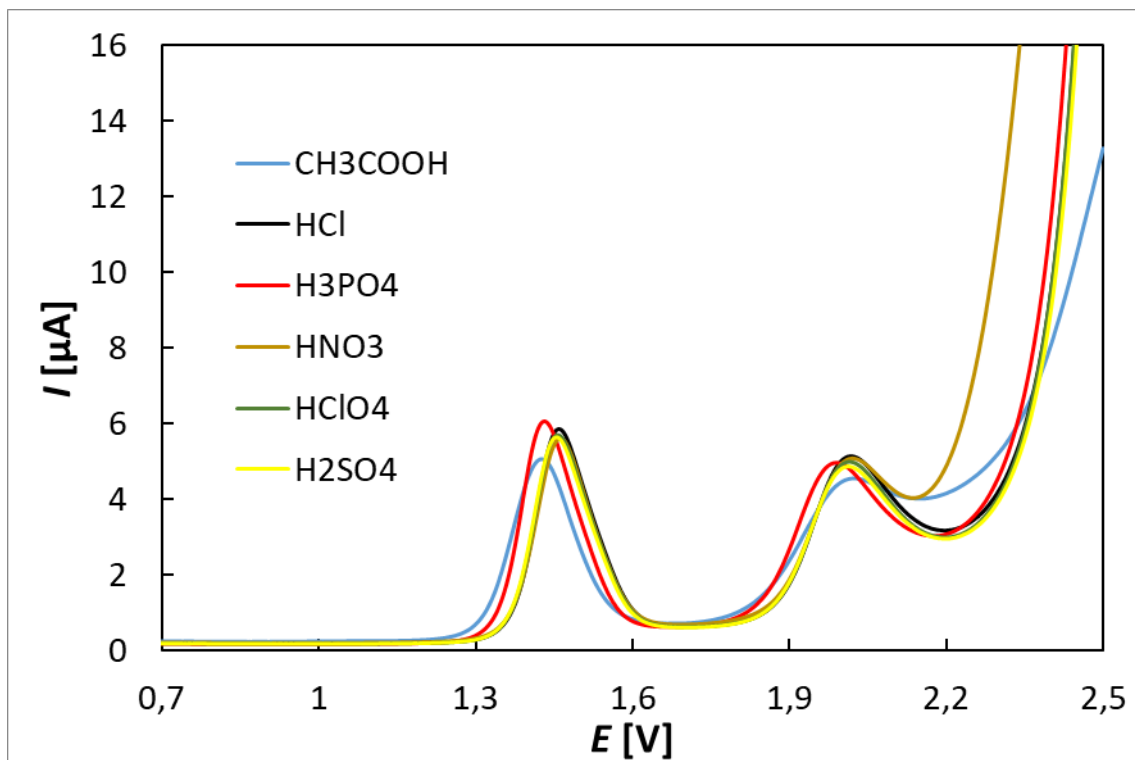
Metoda – SWV, elektrolyt – BRB (pH 2,0-12), $c_{FLU} = 1,0 \times 10^{-4}$ mol/l, $E_{poč} = -1000$ mV, $E_{kon} = +2500$ mV, $v = 50$ mV/s, $A = 50$ mV, $f = 25$ Hz.

Proudová odezva analytu není závislá pouze na pH elektrolytu ale také na jeho složení. V předchozích experimentech se ukázalo, že nejvyšší píky poskytuje FLU v kyselém prostředí. Z tohoto důvodu byly vedle BRB otestovány i roztoky různých kyselin, konkrétně HCl, H₂SO₄, HClO₄, HNO₃, H₃PO₄ a CH₃COOH. Použité kyseliny vždy měly stejnou koncentraci 0,1 mol/l. Měření bylo provedeno metodou CV, DPV a SWV. Jelikož výsledky DPV a SWV byly totožné, na obrázcích 17 a 18 jsou uvedeny pouze voltamogramy pro CV a SWV.



Obrázek 17 CV voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE v prostředí různých kyselin.

Metoda – CV, elektrolyt – HCl, H₂SO₄, HClO₄, HNO₃, H₃PO₄ a CH₃COOH (0,1 mol/l), $c_{FLU} = 1,0 \times 10^{-4}$ mol/l, $E_{poč} = -1000$ mV, $E_{obratu} = +2500$ mV, $v = 100$ mV/s

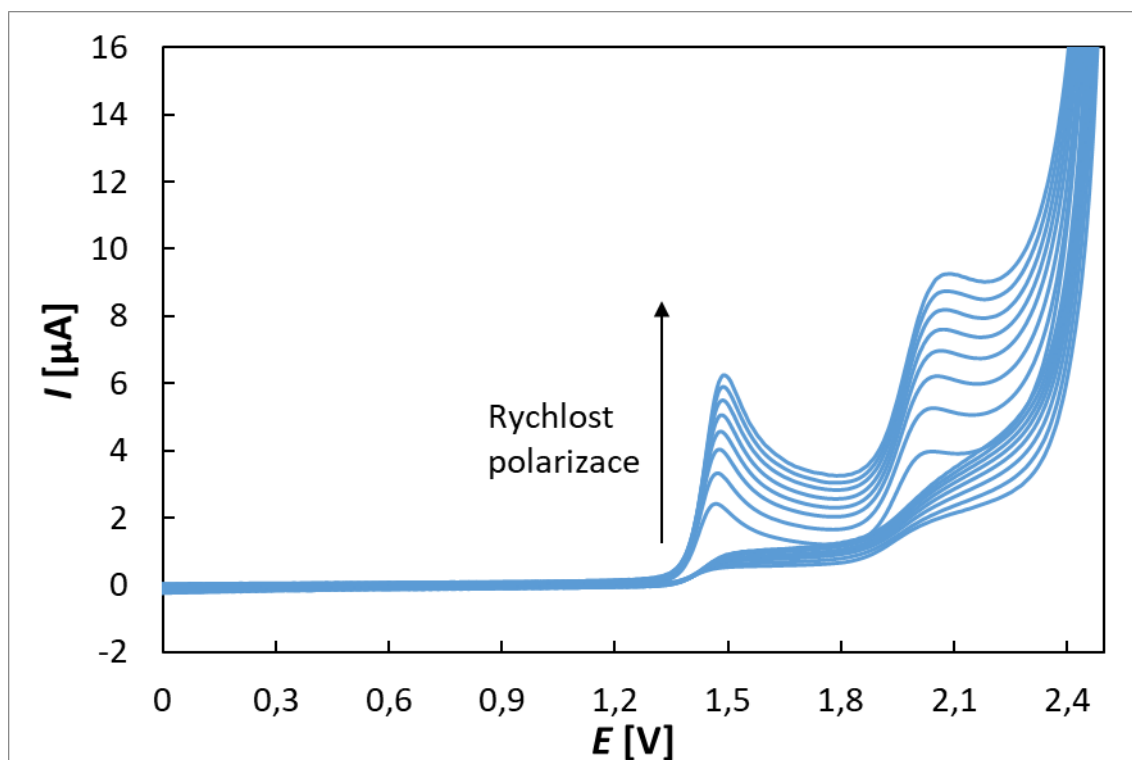


Obrázek 18 SW voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE v prostředí různých kyselin. Metoda – SWV, elektrolyt – HCl, H₂SO₄, HClO₄, HNO₃, H₃PO₄ a CH₃COOH (0,1 mol/l), $c_{FLU} = 1,0 \times 10^{-4}$ mol/l, $E_{poč} = -1000$ mV, $E_{kon} = +2500$ mV, $v = 50$ mV/s, $A = 50$ mV, $f = 25$ Hz

Z obrázku je patrné že se nejvyšší 1. oxidační signál FLU byl získán v prostředí H_3PO_4 . Ostatní anorganické kyseliny dosahují velice podobných výsledků a kyselina octová vykazuje nejhorší proudovou odezvu. Jelikož nejlepší odezva v podstatě totožná s BRB (pH 2,0) je pozorována při použití H_3PO_4 , byla tato kyselina vybrána jako základní elektrolyt k následným experimentům.

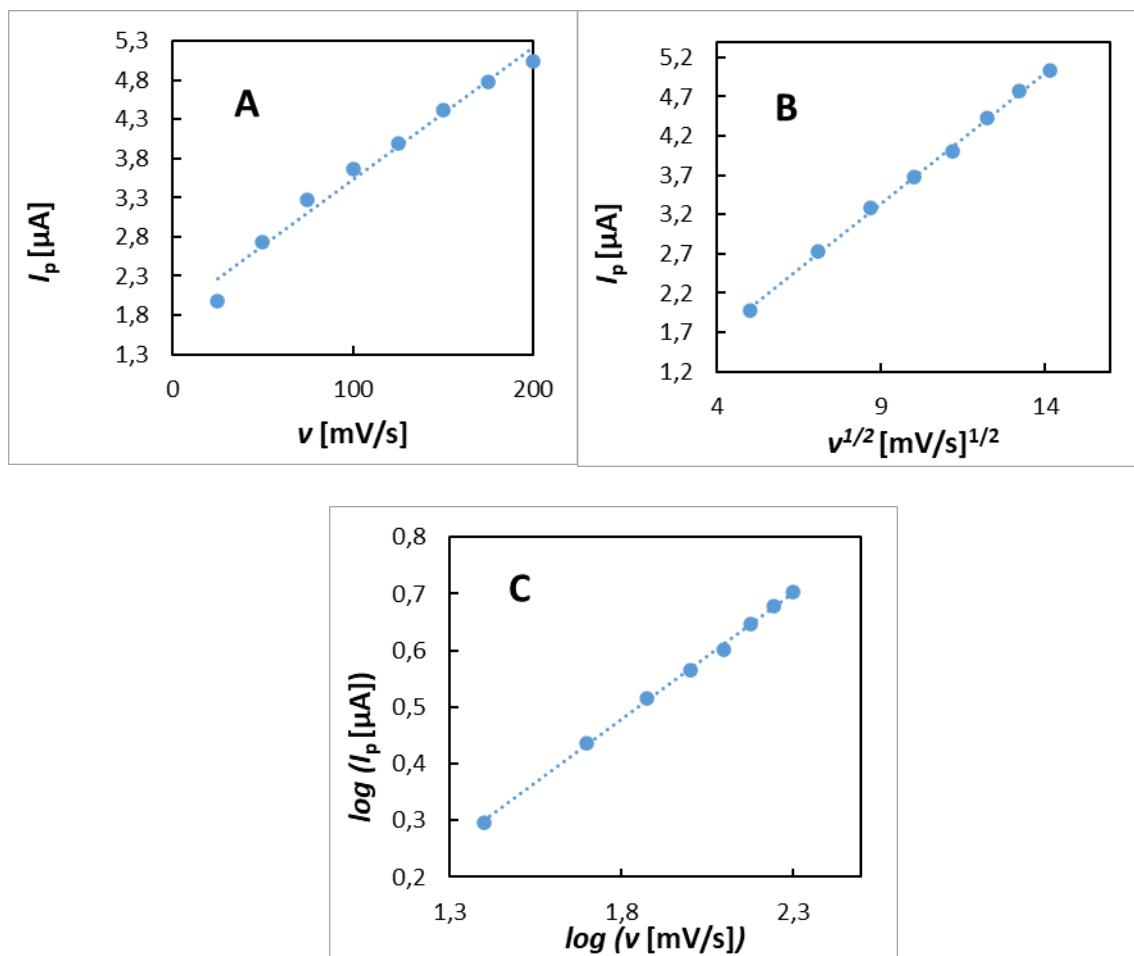
3.1.2 Závislost voltametrické odezvy signálu na rychlosti polarizace

Pro lepší pochopení probíhajícího elektrochemického děje byla studována závislost velikosti proudu na rychlosti polarizace elektrody. Měření probíhalo metodou CV s rozsahem rychlosti polarizace 25 až 200 mV/s, kdy se rychlost měnila po 25 mV/s. Experiment probíhal v prostředí H_3PO_4 (0,1 mol/l) a s koncentrací FLU $1,0 \times 10^{-4}$ mol/l. Získané cyklické voltamogramy jsou uvedeny na obrázku 19, závislosti I_p na v , I_p na $v^{1/2}$ a $\log(I_p)$ na $\log(v)$ jsou vyneseny na obrázku 20 a mohou být popsány rovnicemi (3-5).



Obrázek 19 CV voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE při různých hodnotách rychlosti polarizace.

Metoda – CV, elektrolyt – H_3PO_4 (0,1 mol/l), $c_{FLU} = 1,0 \times 10^{-4}$ mol/l, $E_{poč} = -1000$ mV, $E_{obratu} = +2500$ mV, $v = 25-200$ mV/s



Obrázek 20 Závislosti I_p na v (A), I_p na $v^{1/2}$ (B) a $\log(I_p)$ na $\log(v)$ (C) odpovídající měření zaznamenanému na obrázku 19

Jak je vidět na voltametričtém záznamu (Obrázek 19), proudová odezva narůstá s rychlostí polarizace. Průběh těchto závislostí nám poskytuje jistou informaci o řídicím ději reakce probíhající na elektrodě. Závislost I_p na v se blíží lineárnímu průběhu (rovnice (3)), což by svědčilo o reakci řízené, a závislost I_p na $v^{1/2}$ je rovněž lineární (rovnice (4)), což vypovídá o difúzně řízené reakci. Rozhodující je proto hodnota směrnice závislosti logaritmu proudové odezvy na logaritmu rychlosti polarizace (rovnice (5)). Pokud se hodnota směrnice pohybuje v okolí 0,5, jedná se o difúzně řízenou reakci, pokud se hodnota pohybuje v okolí 1,0, jedná se o adsorpčně řízenou reakci a pokud je hodnota v blízkosti 0 jedná se o kineticky řízenou reakci. V našem případě se hodnota směrnice ($0,4453 \pm 0,0056$) blíží teoretické hodnotě 0,5 a pravděpodobně se tedy jedná majoritně o difúzně řízenou reakci.

$$I_p[\mu A] = (0,0168 \pm 0,0010) v[mV/s] + (1,8429 \pm 0,1309), r^2 = 0,9778 \quad (3)$$

$$I_p[\mu A] = (0,3316 \pm 0,0049) v^{1/2}[mV/s]^{1/2} + (0,3573 \pm 0,0520), r^2 = 0,9987 \quad (4)$$

$$\log(I_p[\mu A]) = (0,4453 \pm 0,0056)\log(v[mV/s]) - (0,3236 \pm 0,0111), r^2 = 0,9991 \quad (5)$$

3.2 Vývoj voltametrické metody stanovení fludioxonilu

Po základní voltametrické analýze chování FLU a určení prostředí, ve kterém budou následné experimenty probíhat, je dalším krokem vývoj voltametrické metody stanovení FLU. Jelikož metody DPV i SWV vykazují standardně velice dobrou citlivost, byla provedena optimalizace parametrů obou metod a na základě porovnání výsledků následných analýz byla vybrána vhodná metoda pro stanovení pesticidu.

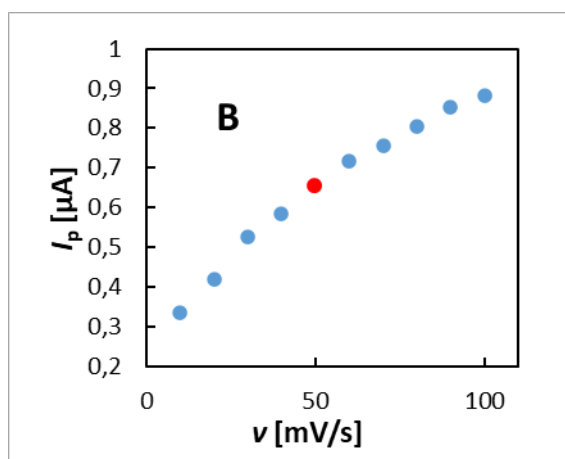
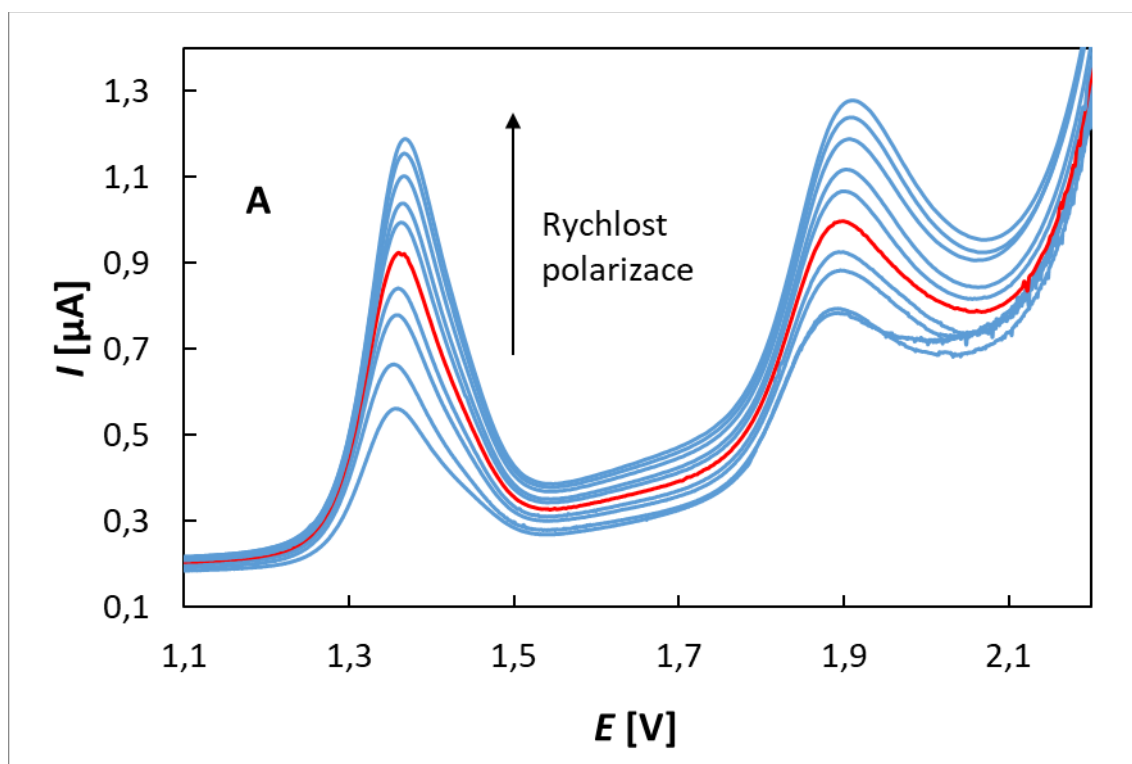
3.2.1 Optimalizace parametrů SWV

Optimalizace parametrů SWV pro stanovení FLU byla provedena testováním proudové odezvy analytu v závislosti na změně jednotlivých parametrů, konkrétně rychlosti polarizace, výšky pulzu (A) a frekvence (f). Rychlost polarizace byla testována v rozmezí 10-100 mV/s se změnou po 10 mV/s. Výška pulzu byla testována v rozmezí 10-100 mV s rozdílem 10 mV a frekvence se měnila v rozmezí 5-50 Hz s rozdílem 5 Hz na měření. Vždy byl jeden parametr měněn a ostatní udržovány na konstantní hodnotě. Koncentrace FLU byla při těchto experimentech 10 $\mu\text{mol/l}$.

Z měření při různých rychlostech polarizace (Obrázek 21 A) je patrné, že se zvyšující se rychlostí polarizace roste proudová odezva systému. Velikost nárůstu odezvy se postupně snižuje (Obrázek 21 B). Pro tento parametr byla zvolena hodnota 50 mV/s. Z měření při různých výškách pulzu (Obrázek 22 A) je vidět zvyšující se proudová, ale pouze k hodnotě přibližně 50 mV (Obrázek 22 B). Další zvyšování pulzu již nevede k prakticky žádnému navýšení odezvy a dochází k posuvu píků k záporným hodnotám a jejich výrazné deformaci. Pro tento parametr byla vybrána hodnota 50 mV. Posledním optimalizovaným parametrem byla frekvence. Jak je možné vidět na voltamogramech (Obrázek 23 A), s rostoucí frekvencí roste i proudová odezva přibližně k hodnotě 10 Hz. Následná modulace frekvence má na velikost proudu malý vliv a dochází spíše k posuvu celé křivky. Pro tento parametr byla vybrána hodnota 10 Hz. Optimalizované parametry jsou uvedeny v Tabulce 1.

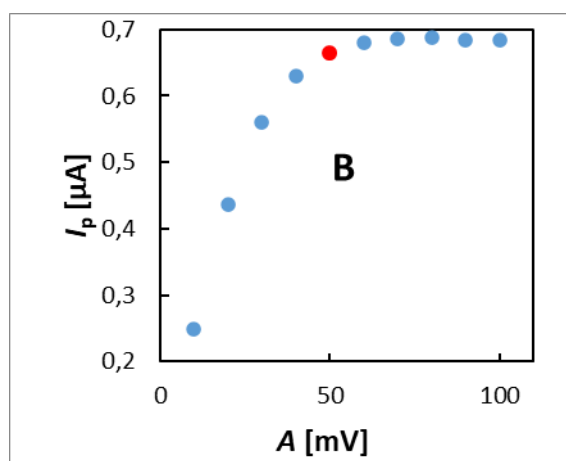
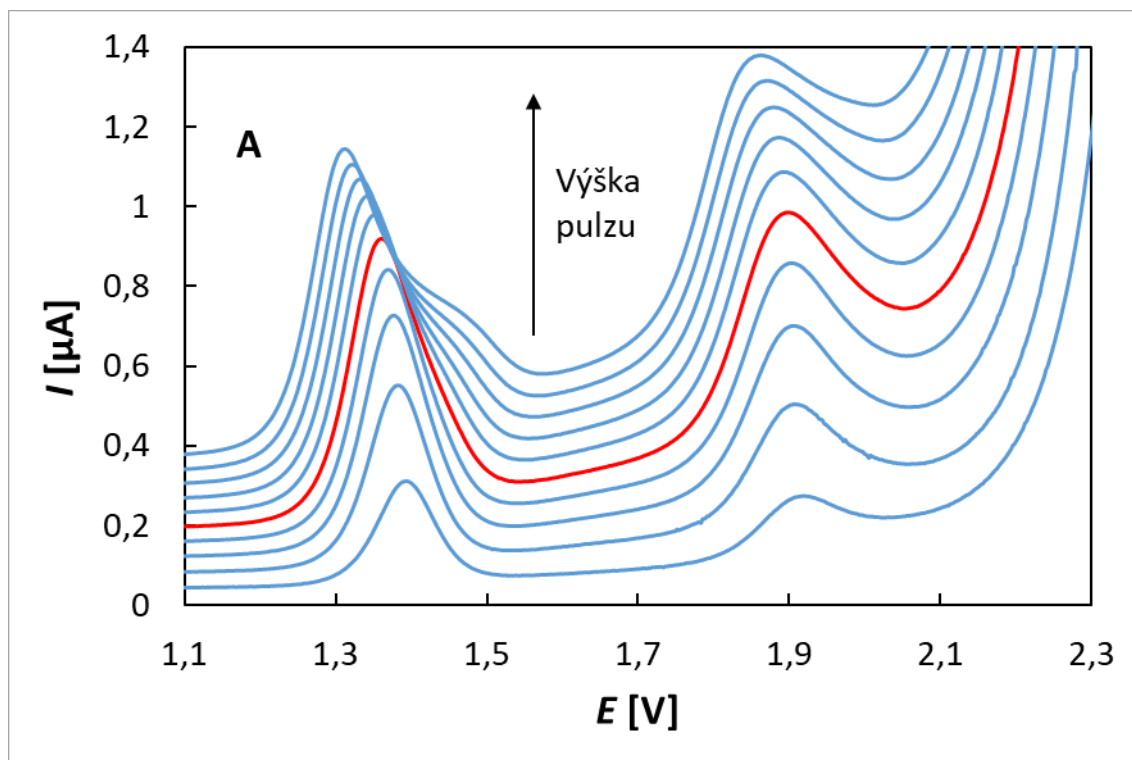
Tabulka 1 Optimalizované parametry SWV

Parametr	Optimalizovaná hodnota
Rychlost polarizace [mV/s]	50
Výška pulzu [mV]	50
Frekvence [Hz]	10



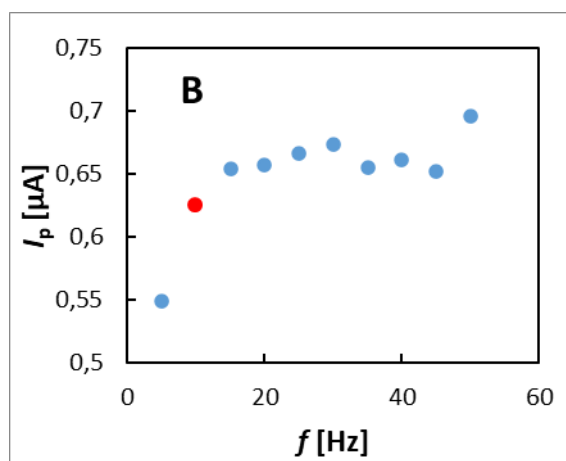
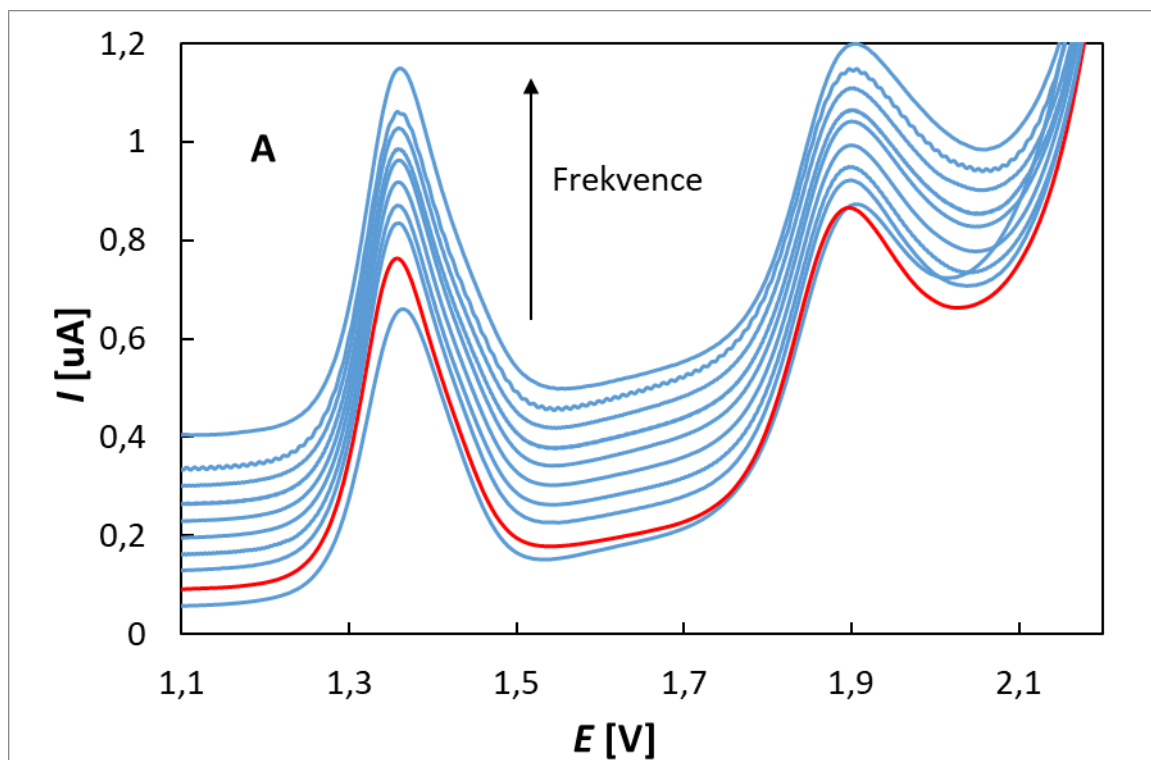
Obrázek 21 SW voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE v závislosti na rychlosti polarizace (A) a odpovídající závislost I_p na v . Vybraná optimální hodnota je vyznačena červeně.

Metoda – SWV, elektrolyt – H_3PO_4 (0,1 mol/l), $c_{\text{FLU}} = 10 \mu\text{mol/l}$, $E_{\text{poč}} = -1000 \text{ mV}$, $E_{\text{kon}} = +2500 \text{ mV}$, $v = 10\text{-}100 \text{ mV/s}$, $A = 50 \text{ mV}$, $f = 25\text{Hz}$



Obrázek 22 SW voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE v závislosti na výšce pulzu (A) a odpovídající závislost I_p na výšce pulzu (B). Vybraná optimální hodnota je vyznačena červeně.

Metoda – SWV, elektrolyt – H_3PO_4 (0,1 mol/l), $c_{FLU} = 10 \mu\text{mol/l}$, $E_{poč} = -1000 \text{ mV}$, $E_{kon} = +2500 \text{ mV}$, $v = 50 \text{ mV/s}$, $A = 10\text{-}100 \text{ mV}$, $f = 25 \text{ Hz}$

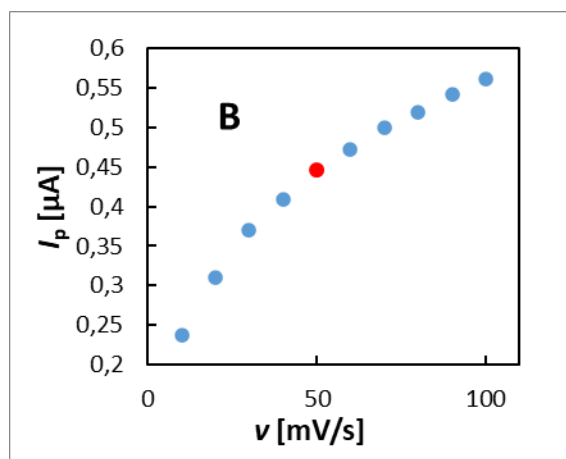
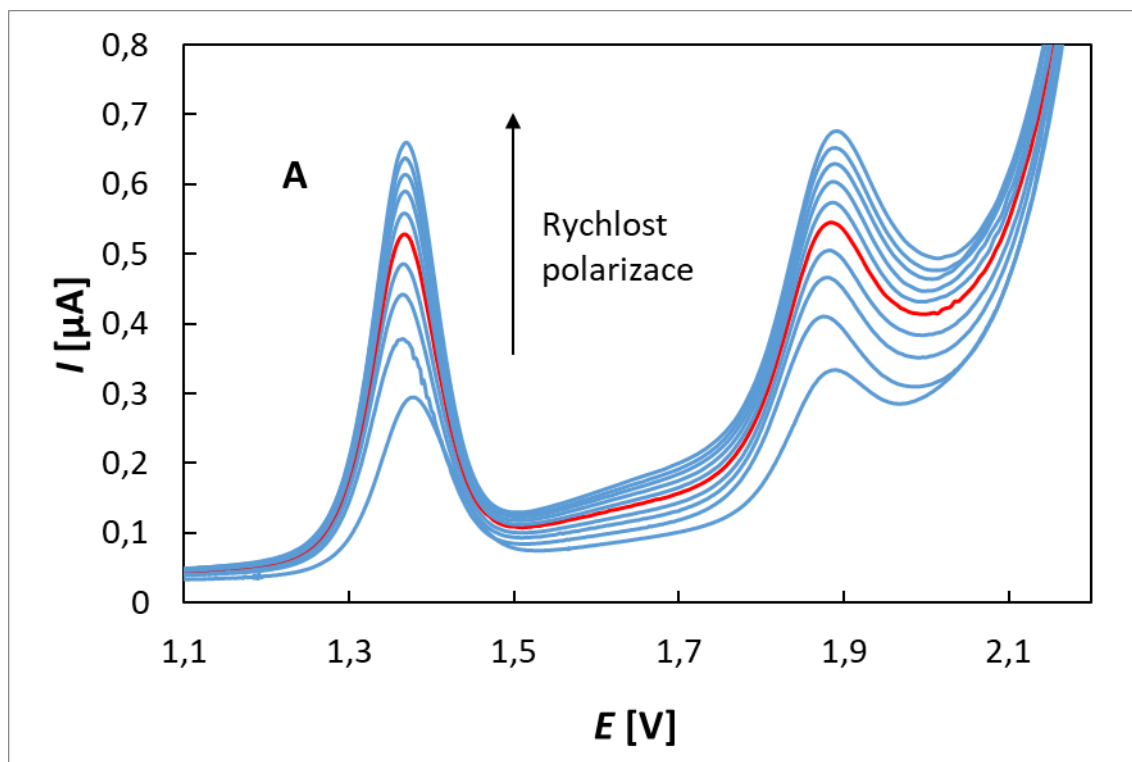


Obrázek 23 SW voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE v závislosti na frekvenci (A) a odpovídající závislost I_p na frekvenci. Vybraná optimální hodnota je vyznačena červeně.

Metoda – SWV, elektrolyt – H_3PO_4 (0,1 mol/l), $c_{FLU} = 10 \mu\text{mol/l}$, $E_{poč} = -1000 \text{ mV}$, $E_{kon} = +2500 \text{ mV}$, $v = 50 \text{ mV/s}$, $A = 50 \text{ mV}$, $f = 5\text{-}50 \text{ Hz}$

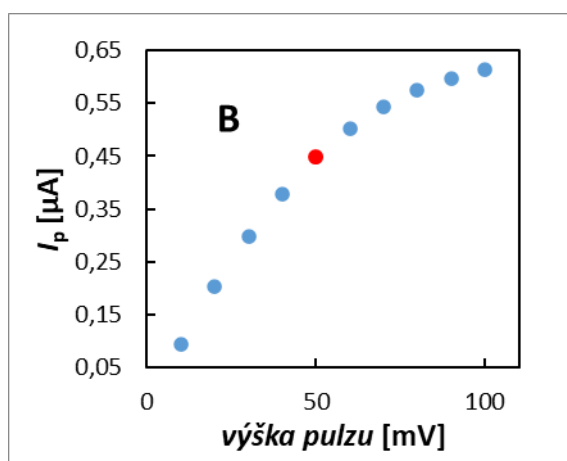
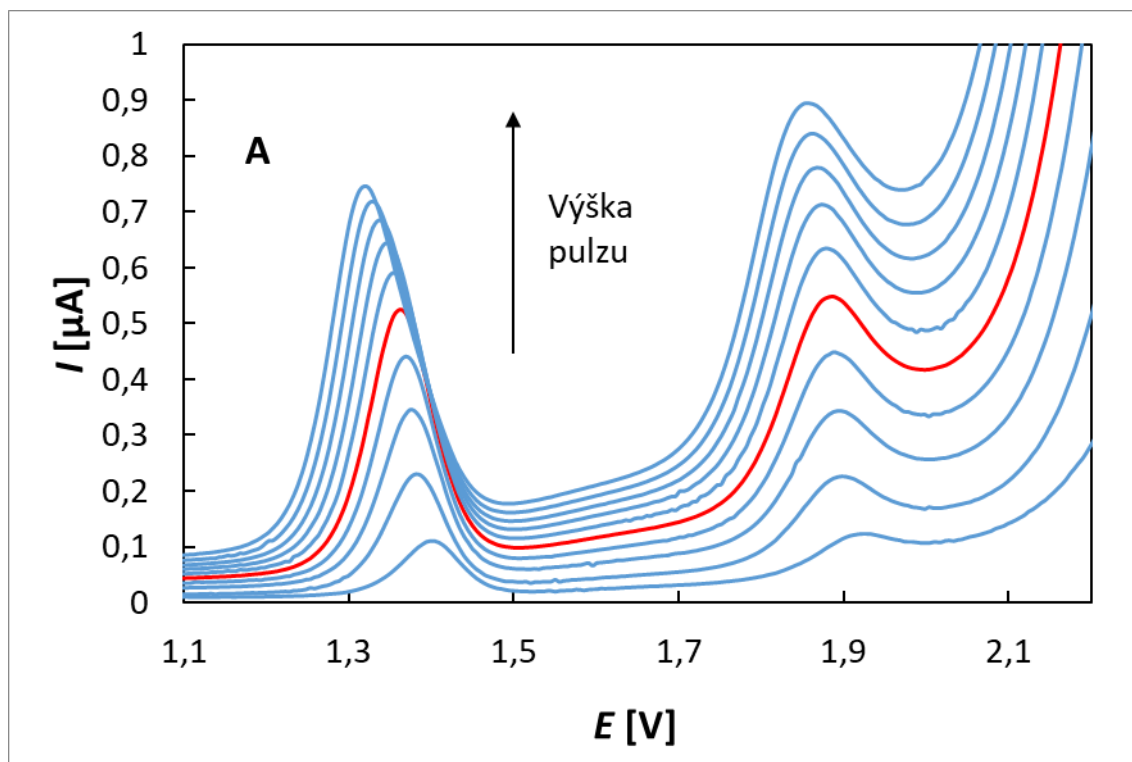
3.2.2 Optimalizace parametrů DPV

Při optimalizaci parametrů DPV pro stanovení FLU byla testována rychlost polarizace, výška pulzu a šířka pulzu (t). Rychlost polarizace byla stejně jako u předchozí metody testována v rozmezí 10-100 mV/s s rozdílem 10 mV/s mezi měřeními. Výška pulzu byla testována v rozmezí 10-100 mV s rozdílem 10 mV a šířka pulzu v rozmezí 10-100 ms s rozdílem 10 ms. Koncentrace FLU byla opět 10 $\mu\text{mol/l}$ a výsledky jsou prezentovány v obrázcích 24-26.



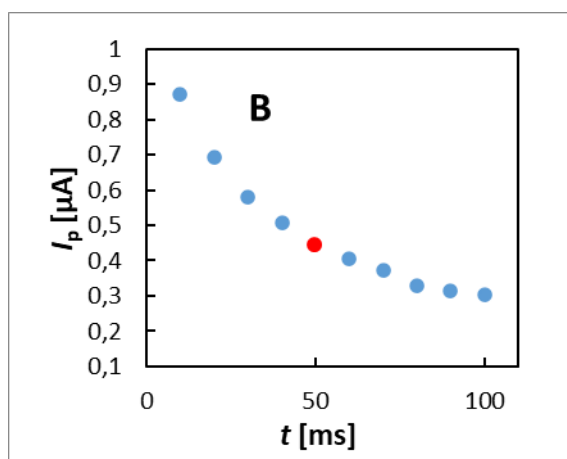
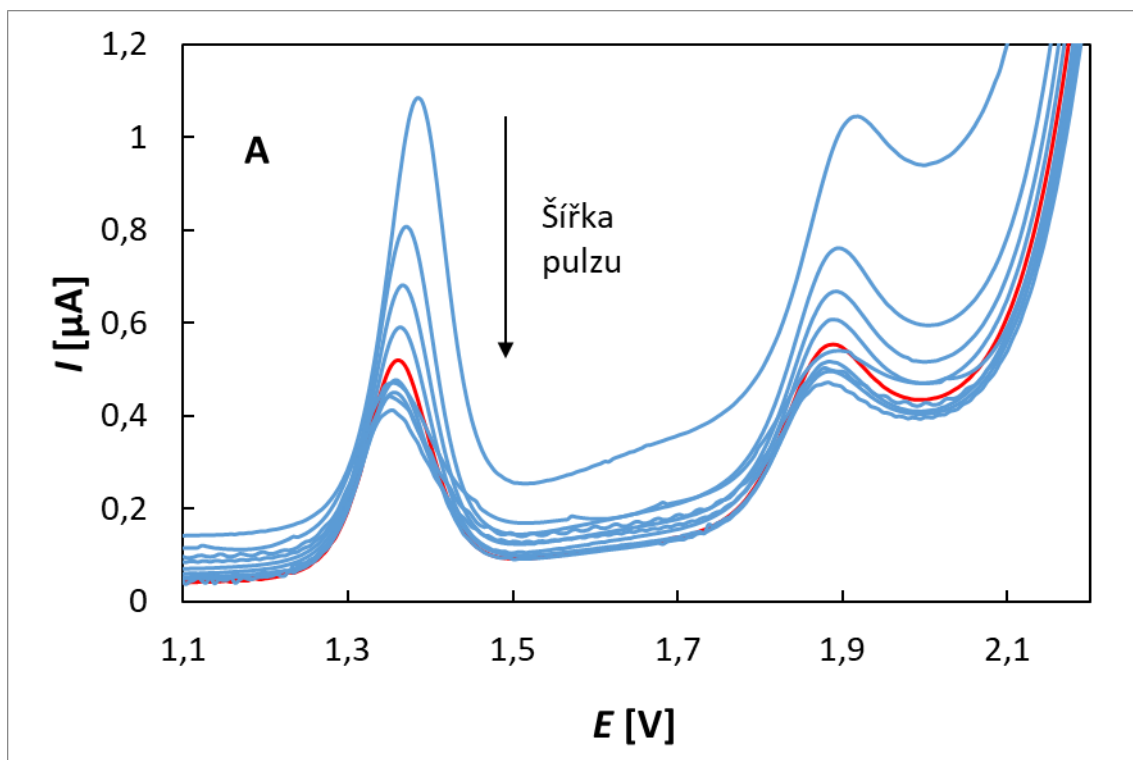
Obrázek 24 DP voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE v závislosti na rychlosti polarizace (A) a odpovídající závislost I_p na v (B). Vybraná optimální hodnota je vyznačena červeně.

Metoda – DPV, elektrolyt – H_3PO_4 (0,1 mol/l), $c_{FLU} = 10 \mu\text{mol/l}$, $E_{poč} = -1000 \text{ mV}$, $E_{kon} = +2500 \text{ mV}$, $v = 10\text{-}100 \text{ mV/s}$, $A = 50 \text{ mV}$, $t = 50 \text{ ms}$



Obrázek 25 DP voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE v závislosti na výšce pulzu (A) a odpovídající závislost I_p na výšce pulzu (B). Vybraná optimální hodnota je vyznačena červeně.

Metoda – DPV, elektrolyt – H_3PO_4 (0,1 mol/l), $c_{FLU} = 10 \mu\text{mol/l}$, $E_{poč} = -1000 \text{ mV}$, $E_{kon} = +2500 \text{ mV}$, $v = 50 \text{ mV/s}$, $A = 10\text{-}100 \text{ mV}$, $t = 50 \text{ ms}$



Obrázek 26 DP voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE v závislosti na šířce pulzu (A) a odpovídající závislost I_p na šířce pulzu (B). Vybraná optimální hodnota je vyznačena červeně

Metoda – DPV, elektrolyt – H_3PO_4 (0,1 mol/l), $c_{FLU} = 10 \mu mol/l$, $E_{poč} = -1000 mV$, $E_{kon} = +2500 mV$, $v = 50 mV/s$, $A = 50 mV$, $t = 10-100 ms$

Na Obrázku 24 lze pozorovat nárůst proudové odezvy s rostoucí rychlostí polarizace. Nárůst není lineární a kolem hodnoty 50 mV/s se zpomaluje. Pro tento parametr byla tedy zvolena hodnota 50 mV/s. Další optimalizovaný parametr byla výška pulzu (Obrázek 25), kde s rostoucí výškou opět dochází k růstu proudové odezvy. Tento trend se zpomaluje přibližně u hodnoty 50 mV a následné zvyšování pulzu vede k rozšíření a deformaci píku a současně dochází k posunu píků k záporným hodnotám potenciálu. Pro tento parametr byla zvolena hodnota

50 mV. Posledním parametrem k optimalizaci byla šířka pulzu. Jak je vidět na voltamogramu (Obrázek 26), s rostoucí šířkou pulzu klesá proudová odezva systému. Problém s kratší šířkou pulzu je ve tvaru a zejména stabilitě proudové odezvy měření. Proto byla zvolena kompromisní hodnota 50 ms. Optimalizované parametry lze vidět v Tabulce 2.

Tabulka 2 Optimalizované parametry DPV

Parametr	Optimalizovaná hodnota
Rychlost polarizace [mV/s]	50
Výška pulzu [mV]	50
Šířka pulzu [ms]	50

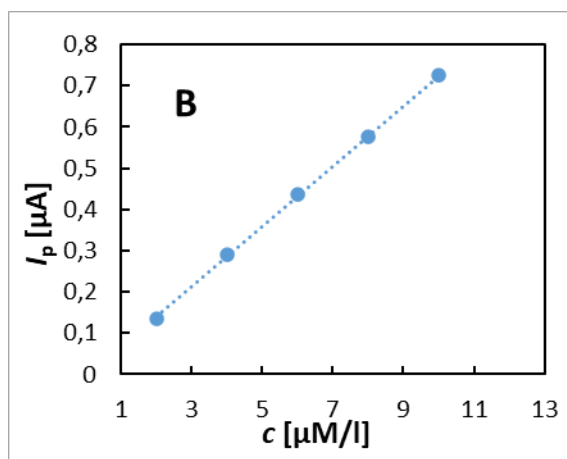
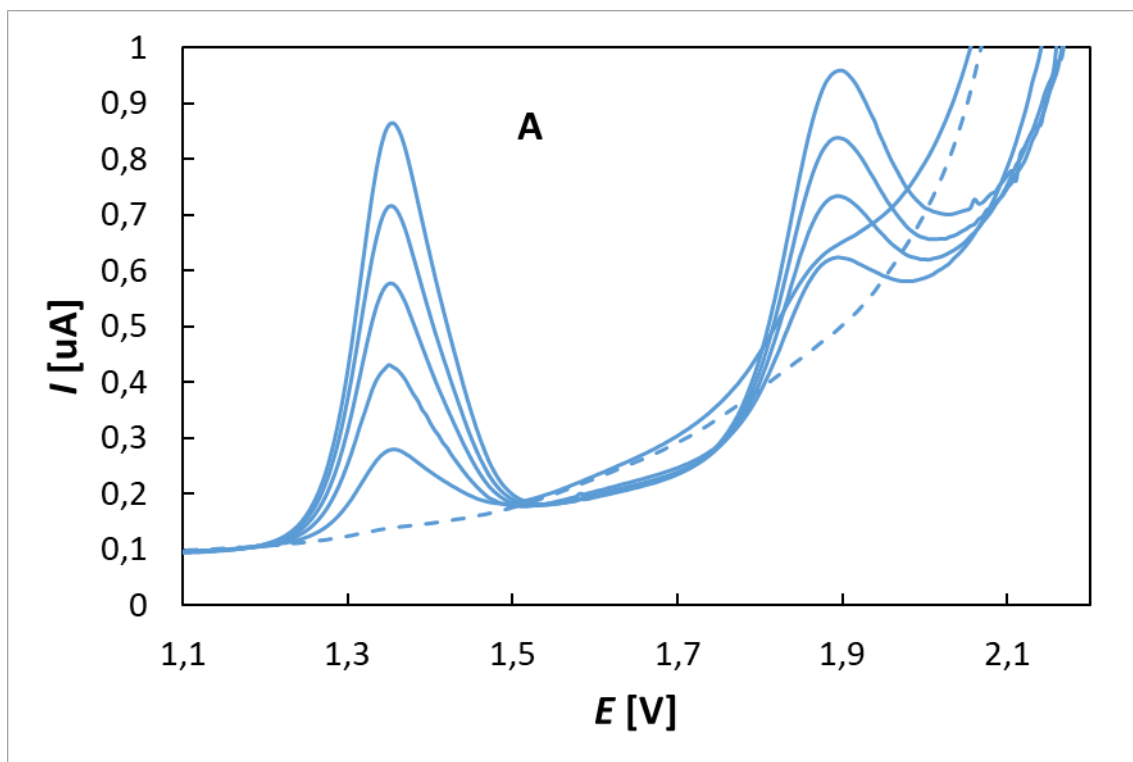
3.2.3 Porovnání SWV a DPV

Aby bylo možné porovnat optimalizované metody SWV a DPV, byla nejprve testována opakovatelnost měření, kde bylo provedeno opakované (12×) měření píku FLU ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/l) a byla vypočtena průměrná výška píku a relativní směrodatná odchylka opakovaného měření (RSD). Následně byly proměřené koncentrační závislosti v rozsahu 2,0-10 μ mol/l FLU, které jsou uvedeny na obrázcích 27 a 28 včetně vynesných závislostí I_p na c . Jak lze vidět v Tabulce 3, metoda SWV vykazuje nižší hodnotu RSD a o něco vyšší proudovou odezvu, což dokládá i Obrázek 29. Z parametrů rovnic kalibračních přímek vyplývá (Tabulka 3), že obě metody poskytují lineární závislosti s koeficientem determinace (r^2) vyšším jak 0,999. Nepatrně vyšší citlivost ($0,0733 \pm 0,0009$) [μ A/mol \times l $^{-1}$] byla získána opět pro SWV, která byla proto vybrána pro budoucí experimenty jako vhodnější pro stanovení FLU.

Tabulka 3 Porovnání analytických parametrů koncentračních závislostí FLU (2,0-10 μ mol/l) změřených s využitím optimalizované metody SWV a DPV

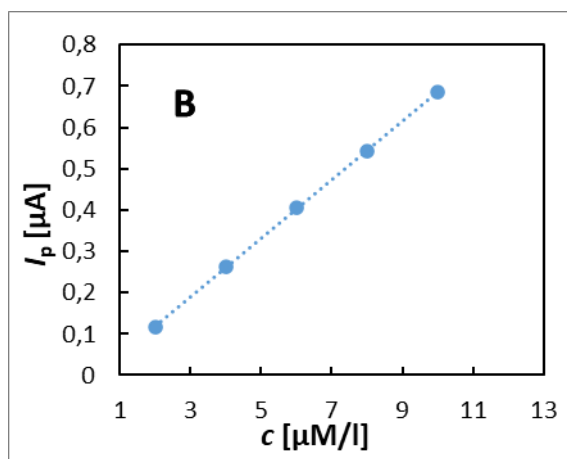
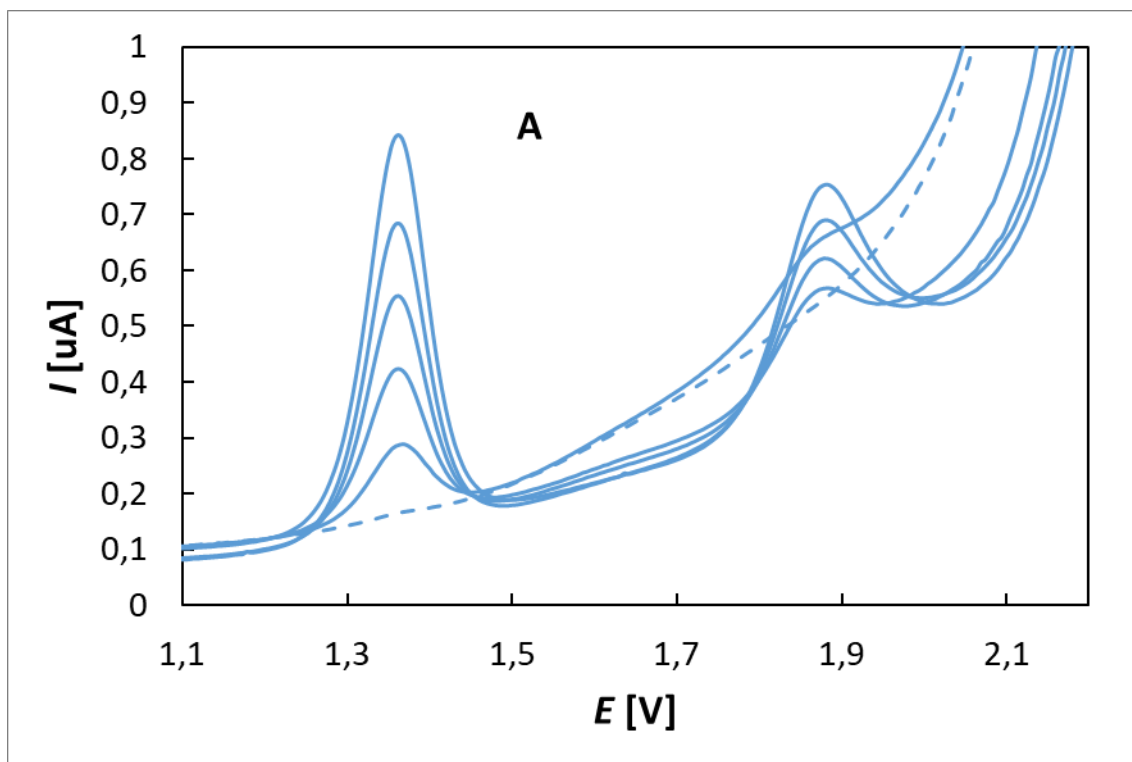
Metoda	I_p^* [μ A]	RSD ₁₂ [*] [%]	Směrnice [μ A/mol \times l $^{-1}$]	Úsek [μ A]	r^2
SWV	$0,68 \pm 0,0074$	1,1	$(0,0733 \pm 0,0009)$	$(-0,0077 \pm 0,0060)$	0,9995
DPV	$0,65 \pm 0,0130$	2,0	$(0,0711 \pm 0,0004)$	$(-0,0237 \pm 0,0027)$	0,9999

* Průměrná výška píku a RSD₁₂ pro koncentraci FLU 1×10^{-5} mol/l



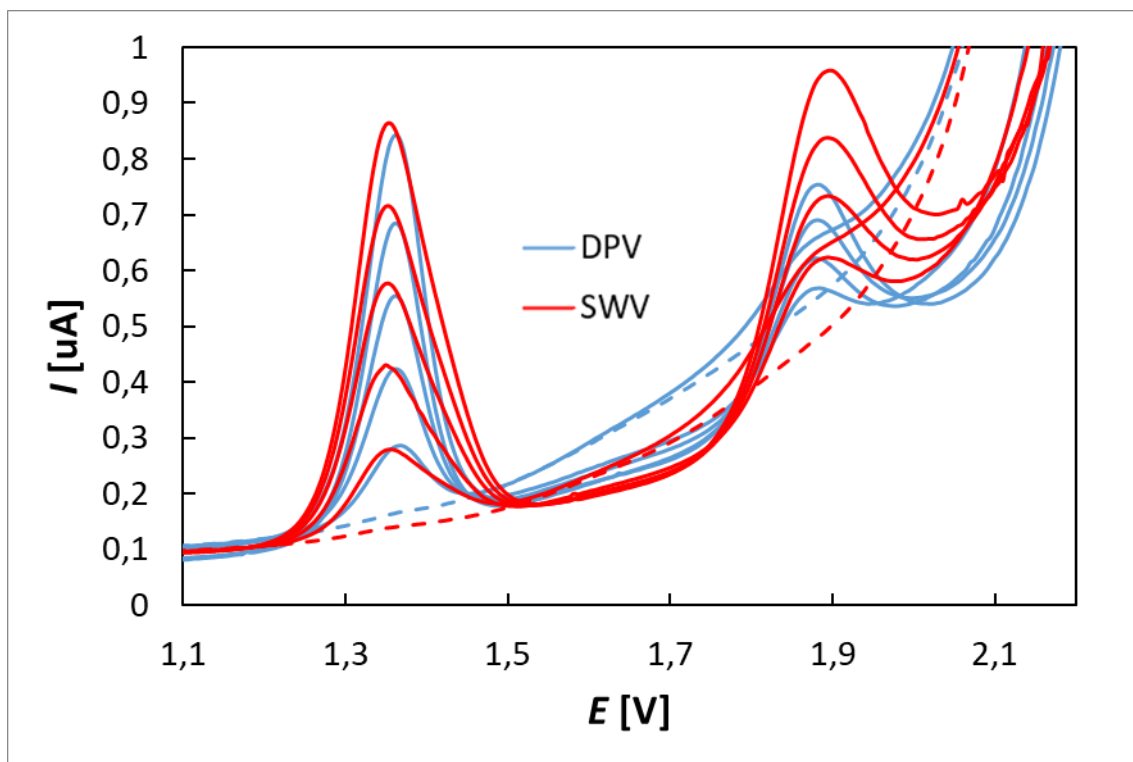
Obrázek 27 SWV voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE v závislosti na koncentraci (A) a odpovídající závislost I_p na koncentraci (B)

Metoda – SWV, elektrolyt – H_3PO_4 (0,1 mol/l), $c_{\text{FLU}} = 2,0\text{--}10 \mu\text{mol/l}$, $E_{\text{poč}} = -1000 \text{ mV}$, $E_{\text{kon}} = +2500 \text{ mV}$, $v = 50 \text{ mV/s}$, $A = 50 \text{ mV}$, $f = 10 \text{ Hz}$



Obrázek 28 DP voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE v závislosti na koncentraci (A) a odpovídající závislost I_p na koncentraci (B)

Metoda – DPV, elektrolyt – H_3PO_4 (0,1 mol/l), $c_{\text{FLU}} = 2,0\text{--}10 \mu\text{mol/l}$, $E_{\text{poč}} = -1000 \text{ mV}$, $E_{\text{kon}} = +2500 \text{ mV}$, $v = 50 \text{ mV/s}$, $A = 50 \text{ mV}$, $t = 50 \text{ ms}$



Obrázek 29 Porovnání SW (červená) a DP (modrá) voltamogramů FLU zaznamenaných na BDDE v závislosti na koncentraci, parametry měření lze nalézt v titulcích Obrázku 27 a Obrázku 28.

3.2.4 Aktivace BDDE

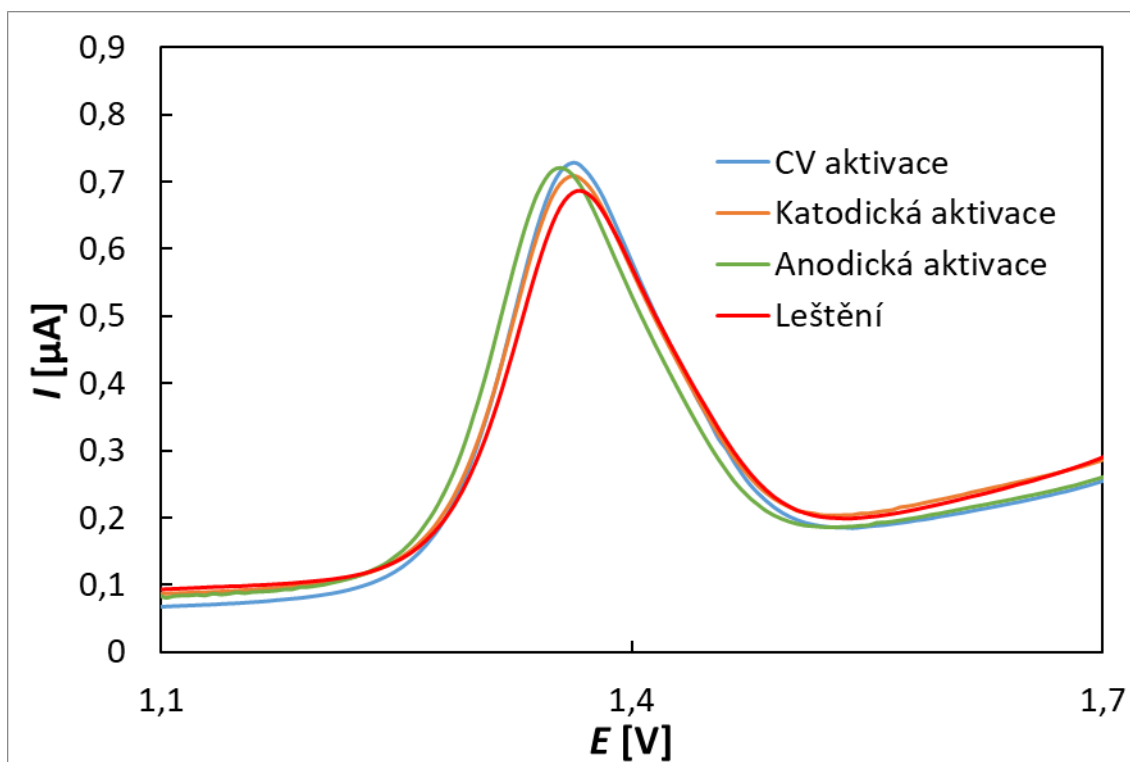
Před samotným měřením se často povrch elektrod nejprve aktivuje. Různé metody aktivace mohou mít rozmanitý dopad na citlivost a opakovatelnost měření. Testovány byly 4 různé postupy úpravy, konkrétně cyklování, anodická aktivace, katodická aktivace a mechanické leštění. Elektrochemické aktivace probíhaly v prostředí 0,1 mol/l H_3PO_4 . Po každé aktivaci byl 12× naměřen voltamogram FLU o koncentraci 1×10^{-5} mol/l optimalizovanou metodou SWV a vypočtena hodnota RSD. Aktivace cyklováním byla provedena 20 měřeními CV v rozsahu potenciálu -1500 až $+2500$ mV s rychlostí polarizace 100 mV/s. Anodická aktivace probíhala při konstantním potenciálu $+2500$ mV po dobu 300 s. Katodická aktivace probíhala při konstantním potenciálu -2500 mV po dobu 300 s. Elektroda byla mechanicky leštěna na alumině a následně ponořena na 2 minuty do ultrazvukové vany s acetonitrilem.

Z výsledných hodnot I_p a RSD (Tabulka 4) a získaných voltamogramů na obrázku 32 je vidět, že vliv aktivace není příliš velký, nicméně nejlepších výsledků dosahuje aktivace cyklováním, která má nejnižší hodnotu RSD a nejvyšší proudovou odezvu. Z tohoto důvodu byla cyklická aktivace vybrána jako nejvhodnější metoda aktivace elektrody pro další experimenty. Aktivace byla zařazena vždy jen na začátku práce a mezi jednotlivými měřeními nebylo třeba povrch

elektrody nijak regenerovat. Výjimkou byly analýzy vysokých koncentrací FLU, kdy bylo nutné pracovní elektrodu vyčistit v ultrazvukové lázni a znova aktivovat, jak je uvedeno v experimentální části.

Tabulka 4 Hodnoty parametrů RSD a I_p pro opakovaně měřený pík FLU po zařazení jednotlivých postupů aktivace BDDE

Parametr	Aktivace cyklováním	Anodická aktivace	Katodická aktivace	Aktivace leštěním
RSD [%]	1,036	1,244	2,339	1,327
I_p [μ A]	0,594 \pm 0,0062	0,572 \pm 0,0071	0,552 \pm 0,1291	0,533 \pm 0,0071



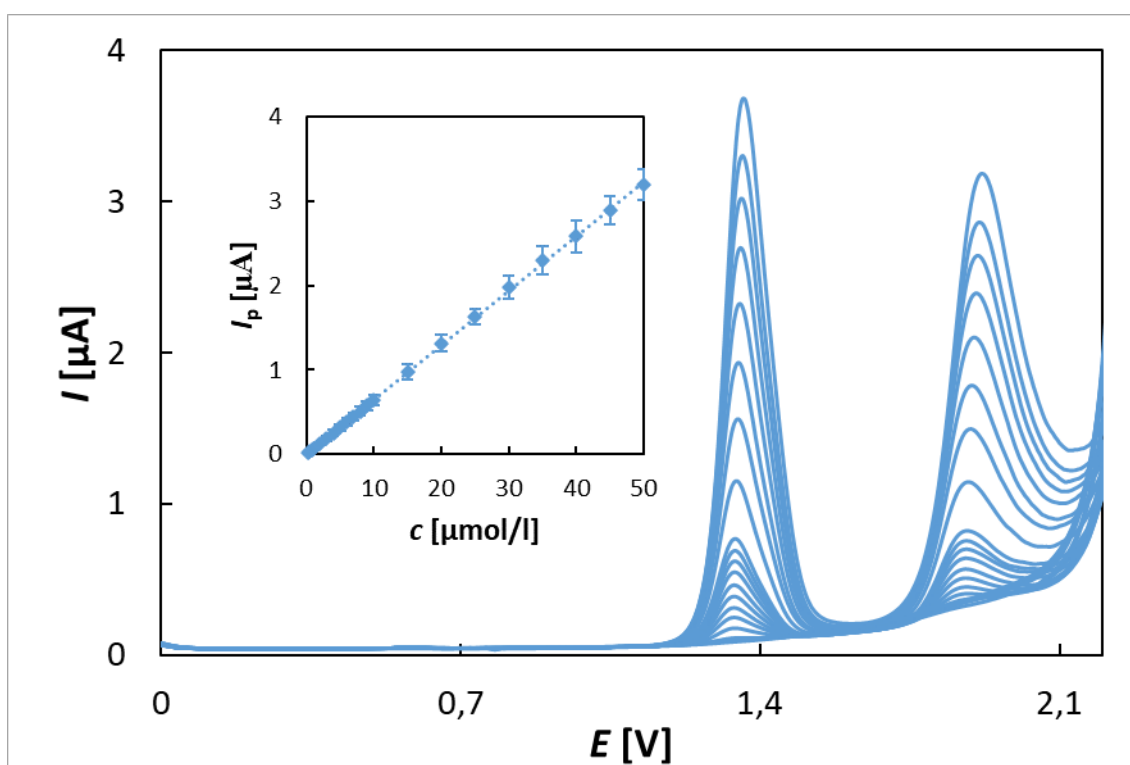
Obrázek 30 SW voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE po různém postupu aktivace elektrody.

Metoda – SWV, elektrolyt – H_3PO_4 (0,1 mol/l), $c_{FLU} = 10 \mu\text{mol/l}$, $E_{poč} = -1000 \text{ mV}$, $E_{kon} = +2500 \text{ mV}$, $v = 50 \text{ mV/s}$, $A = 50 \text{ mV}$, $f = 10 \text{ Hz}$

3.3 Analýza modelových roztoků

Po dokončení optimalizace metody stanovení FLU bylo dalším krokem ověření využitelnosti této metody při analýze modelových roztoků o známém složení. Pro určení využitelného

koncentračního rozsahu (LDR) metody byly měřeny různé koncentrační závislosti. Bylo zjištěno, že I_p roste lineárně v závislosti na koncentraci FLU v rozmezí od 0,25 do 50 $\mu\text{mol/l}$. Na obrázku 31 je uveden příklad získaných SW voltamogramů v celém rozsahu LDR. Závislost byla naměřena 3 \times , hodnoty I_p pro každou koncentraci byly zprůměrovány a výsledná kalibrační křivka je rovněž uvedena na obrázku 31. Z rovnice (6) kalibrační závislosti byly vypočteny hodnoty LOD a LOQ pro použitou metodu. Výsledky jsou zapsány v Tabulce 5.



Obrázek 31 SW voltamogramy FLU zaznamenané na BDDE v závislosti na koncentraci s vloženou závislostí I_p na koncentraci.

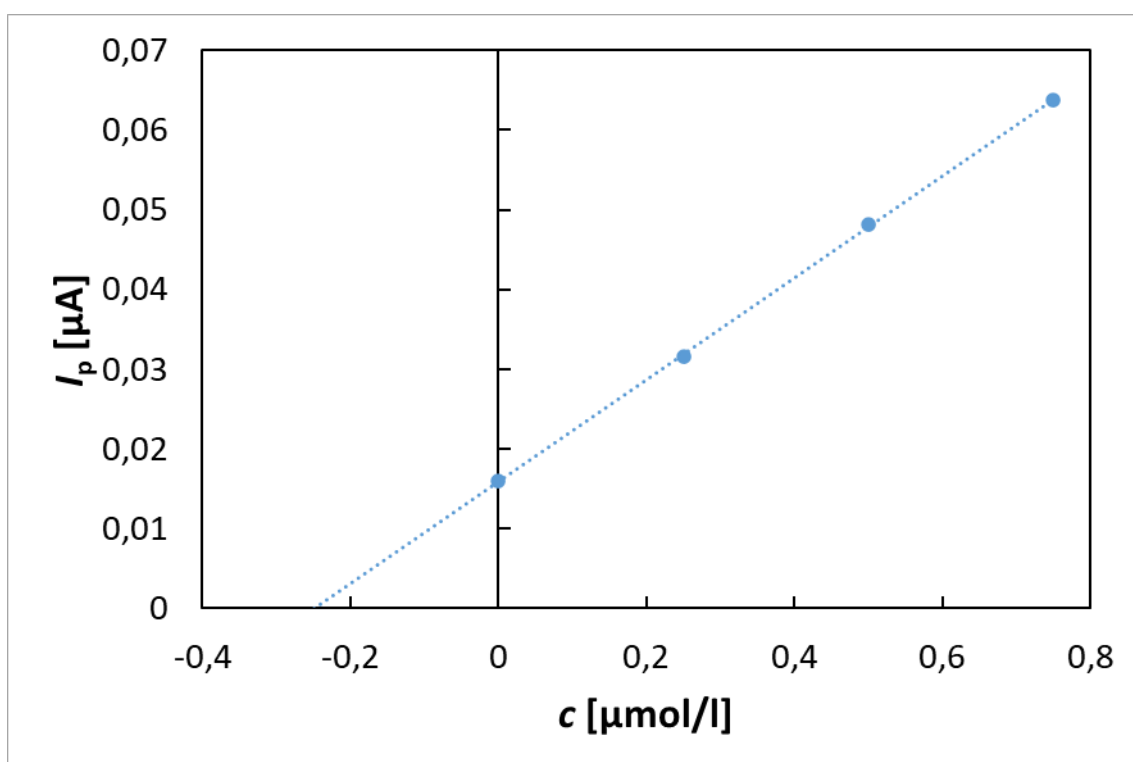
Metoda – SWV, elektrolyt – H_3PO_4 (0,1 mol/l), $c_{\text{FLU}} = 0,25\text{--}50 \mu\text{mol/l}$, $E_{\text{poč}} = -1000 \text{ mV}$, $E_{\text{kon}} = +2500 \text{ mV}$, $\nu = 50 \text{ mV/s}$, $A = 50 \text{ mV}$, $f = 10 \text{ Hz}$

$$I_p[\mu\text{A}] = (0,0648 \pm 0,0002) c[\mu\text{mol/l}] - (0,0040 \pm 0,0050), r^2 = 0,9998 \quad (6)$$

Tabulka 5 Výsledné parametry nové SWV metody vyvinuté pro stanovení FLU

LOD [mol/l]	$2,3 \times 10^{-7}$
LOQ [mol/l]	$7,7 \times 10^{-7}$
LDR [mol/l]	$2,5 \times 10^{-7}\text{--}5,0 \times 10^{-5}$

Dalším parametrem, který byl testován, byla opakovatelnost stanovení známé koncentrace FLU v modelovém roztoku. Vybrané koncentrace FLU byly 0,25 a 1,0 $\mu\text{mol/l}$. Tyto koncentrace pak byly stanovovány metodou standardního přídávku, kdy byly přidány vždy 3 přídávky standardního roztoku FLU o koncentraci 1×10^{-4} mol/l. Pro ukázkou je jedna z analýz uvedena na Obrázku 32. Pro každý modelový roztok bylo stanovení provedeno $5 \times$ a byly následně vypočítané statistické parametry (Tabulka 6). Z parametrů lze usoudit, že výsledky měření jsou správné a dobře opakovatelné. Měření při nižší koncentraci FLU (0,25 $\mu\text{mol/l}$) je méně opakovatelné, jelikož se pohybuje v okolí meze detekce metody.



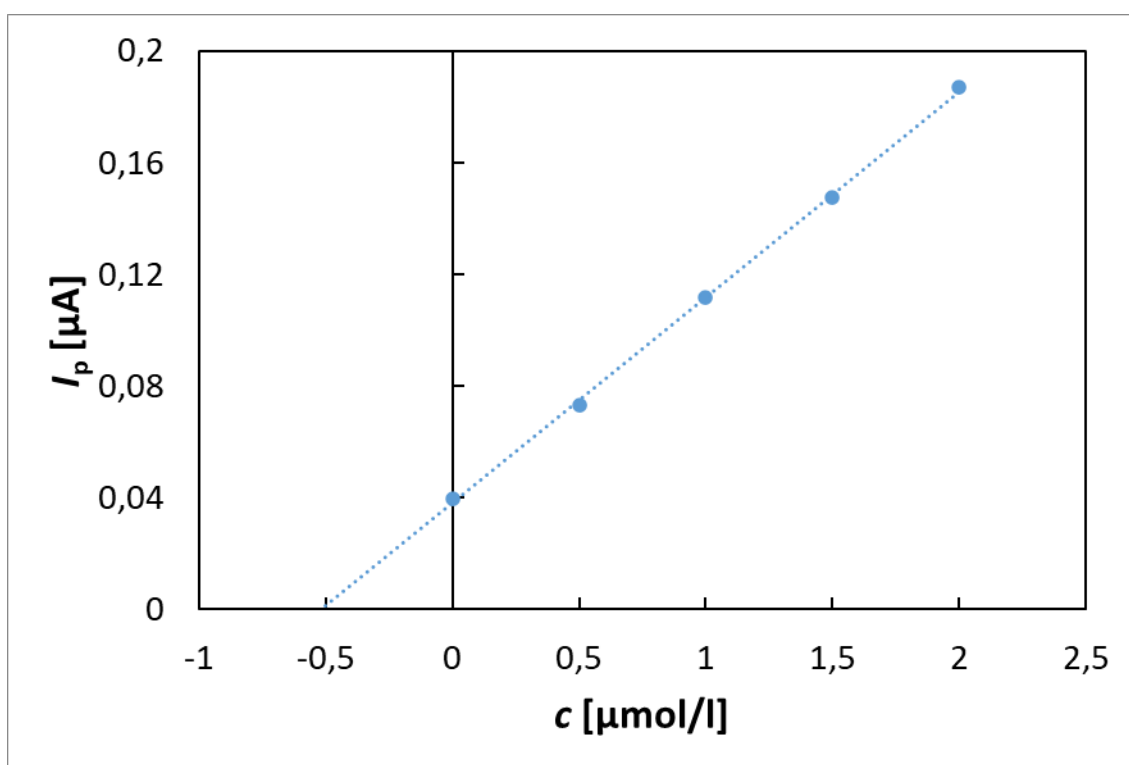
Obrázek 32 Stanovení FLU metodou standardního přídávku v modelovém roztoku.

Metoda – SWV, elektrolyt – H_3PO_4 (0,1 mol/l), $E_{\text{poč}} = -1000$ mV, $E_{\text{kon}} = +2500$ mV, $v = 50$ mV/s, $A = 50$ mV, $f = 10$ Hz, vzorek: $V = 10$ ml, $c_{\text{FLU}} = 0,25$ $\mu\text{mol/l}$, standardní přídavek: $V = 25$ μl , $c_{\text{FLU}} = 1,0 \times 10^{-4}$ $\mu\text{mol/l}$

Tabulka 6 Výsledky opakovaného stanovení koncentrace FLU v modelových roztocích.

Dáno [$\mu\text{mol/l}$]	Stanoveno [$\mu\text{mol/l}$]	Výtěžnost [%]	RSD [%]
0,25	0,252 \pm 0,013	95,0-110,3	5,1
1,0	0,994 \pm 0,012	101,5-104,9	1,2

S ohledem na aplikovatelnost vyvinuté metody na analýzu přírodních vod bylo třeba zařadit vhodnou metodu zakoncentrování vzorku. Byla použita metoda extrakce na tuhou fázi (SPE), která byla testována na modelovém roztoku vody o koncentraci FLU $1,0 \times 10^{-8}$ mol/l dle postupu popsaného v experimentální části v kapitole 2.3.2.1. Vzorek byl po úpravě 50× koncentrovanější, tedy o teoretické koncentraci FLU 0,5 μ mol/l. Analýza byla provedena metodou standardního přídávku (kapitola 2.3.2.2). K extrakci byly původně použity 3 vzorky modelového roztoku s přídávkem FLU na požadovanou koncentraci, bohužel v rámci optimalizace SPE procedury došlo u 2 roztoků ke špatné adsorpci na tuhé fázi z důvodu příliš rychlého průtoku vzorku skrze kolonky s tuhou fází. Výsledek pro 3. vzorek se správně nastavenými parametry extrakce, kdy byla stanovena koncentrace FLU v modelovém roztoku $1,03 \times 10^{-8}$ mol/l (výťažnost 102,9 %), lze považovat za dostatečný, aby byla metoda aplikovatelná na přírodní vody. Z časového důvodu již nebyla možnost opakovat tento experiment, a bylo by tedy vhodné ještě v budoucnu podmínky extrakce lépe ověřit.



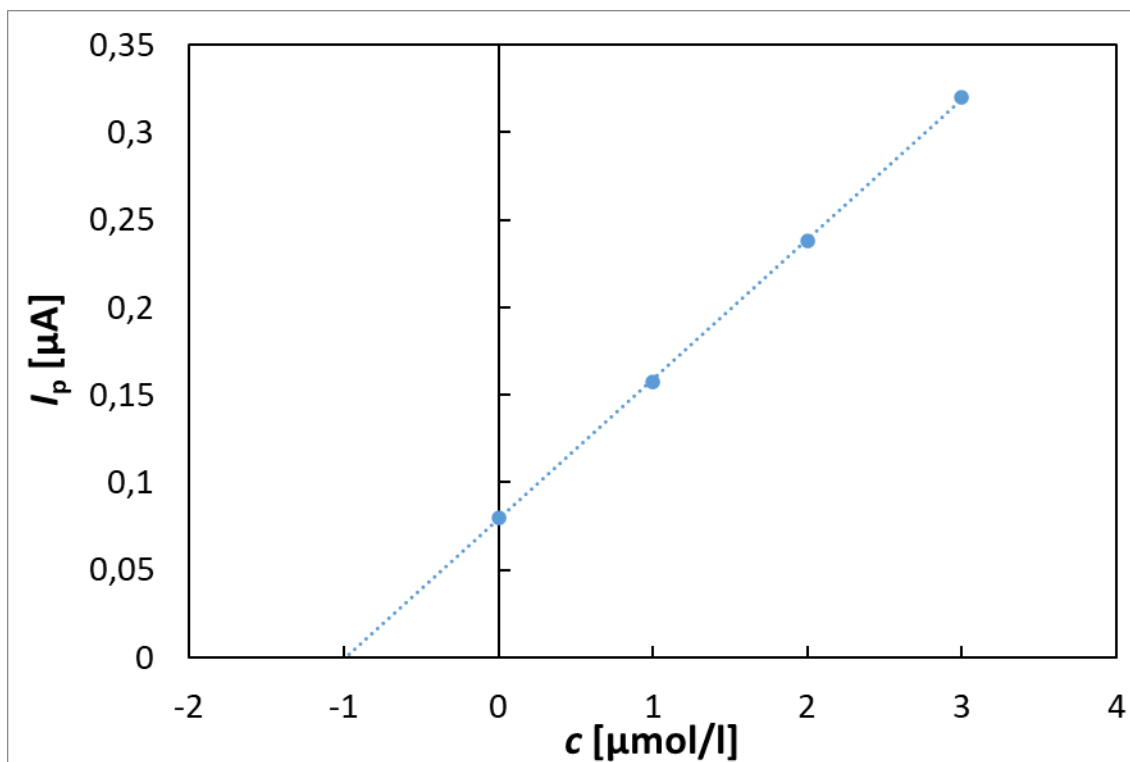
Obrázek 33 Stanovení FLU metodou standardního přídávku v modelovém roztoku po extrakci.

Metoda – SWV, elektrolyt – H_3PO_4 (0,1 mol/l), $E_{poč} = -1000$ mV, $E_{kon} = +2500$ mV, $v = 50$ mV/s, $A = 50$ mV, $f = 10$ Hz, vzorek: $V = 10$ ml, $c_{FLU} \sim 0,5$ μ mol/l, standardní přídavek: $V = 5,0$ μ l, $c_{FLU} = 1,0 \times 10^{-3}$ μ mol/l

3.4 Analýza reálných vzorků

Po dokončení experimentů na modelových roztocích, byla metoda podrobena testům v reálném vzorku říční vody, aby bylo možné posoudit využitelnost při reálných podmínkách. Jako první byla testována opakovatelnost stanovení FLU v prostředí říční vody bez předchozí úpravy vzorku, kdy bylo k přefiltrované říční vodě přidáno známé množství FLU. Takto byly připraveny roztoky o koncentraci 0,5 a 1,0 $\mu\text{mol/l}$ FLU. Následně proběhlo vždy 5 stanovení metodou standardního přídávku pro oba roztoky. Ukázka analýzy je uvedena na Obrázku 34. Vypočtené parametry jsou zapsány v tabulce 7. Poslední experiment spočíval v zakoncentrování říční vody s přídávkem FLU s následným stanovením jeho koncentrace metodou standardního přídávku. Postup zakoncentrování i samotné analýzy je detailněji popsán v experimentální části (kapitola 2.3.2). Připravený vzorek přírodní vody měl koncentraci FLU $1,0 \times 10^{-8}$ mol/l. Jak lze vidět z příkladu analýzy (Obrázek 35), na voltamogramu se objevují i další píky způsobené komplexností vodní matrice, které ale stanovení FLU neruší. Výsledky analýzy jsou shrnuty v Tabulce 8 a jsou správné, s dostatečnou výtěžností a opakovatelností.

Z výsledků lze usuzovat, že je použití metody v reálných vzorcích je možné a vede k dosažení správných výsledků. Stanovené koncentrace jsou však pro přírodní vody příliš vysoké a pro nižší je třeba zařadit výše navrženou metodu zakoncentrování.



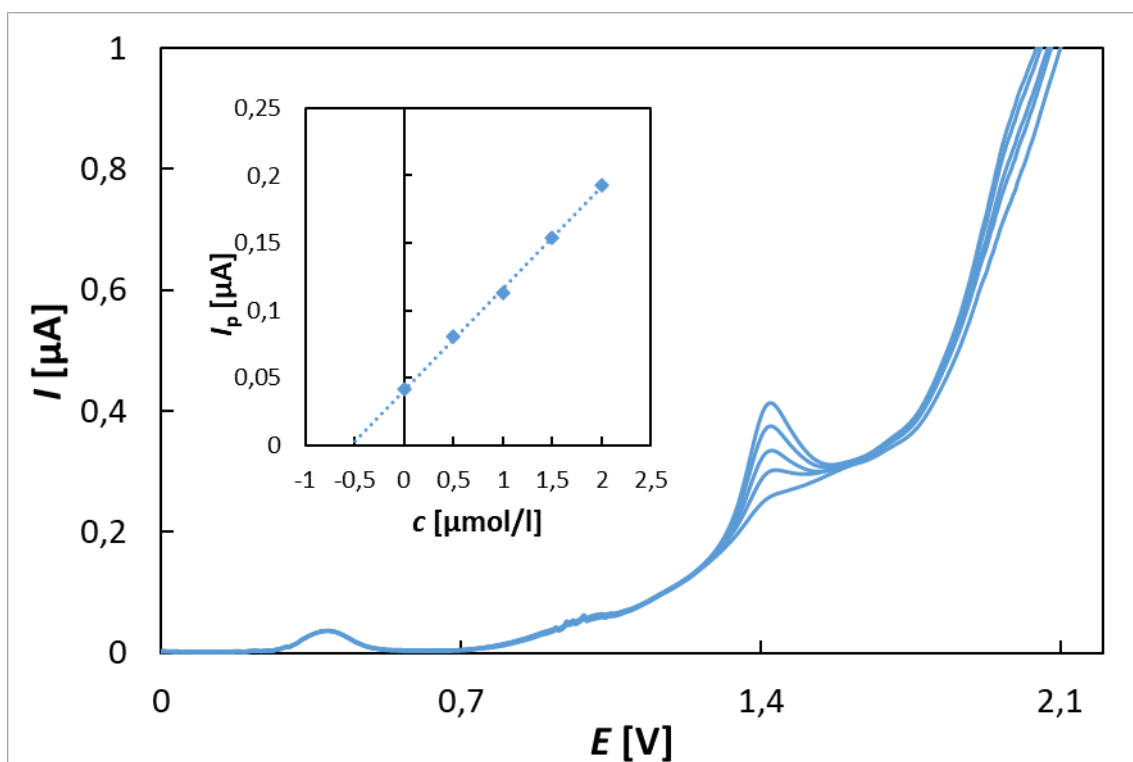
Obrázek 34 Stanovení FLU metodou standardního přidavku v reálném vzorku říční vody.

Metoda – SWV, elektrolyt – H_3PO_4 (0,1 mol/l), $E_{\text{poč}} = -1000$ mV, $E_{\text{kon}} = +2500$ mV, $v = 50$ mV/s, $A = 50$ mV, $f = 10$ Hz, vzorek: $V = 10$ ml, $c_{\text{FLU}} = 1,0$ $\mu\text{mol/l}$, standardní přidavek: $V = 10$ μl , $c_{\text{FLU}} = 1,0 \times 10^{-3}$ $\mu\text{mol/l}$

Poslední experiment spočíval v zakoncentrování říční vody s přidavkem FLU s následným stanovením jeho koncentrace metodou standardního přidavku. Postup zakoncentrování i samotné analýzy je detailněji popsán v experimentální části (kapitola 2.3.2). Připravený vzorek přírodní vody měl koncentraci FLU $1,0 \times 10^{-8}$ mol/l. Jak lze vidět z příkladu analýzy (Obrázek 35), na voltamogramu se objevují i další píky způsobené komplexností vodní matrice, které ale stanovení FLU neruší. Výsledky analýzy jsou shrnuty v Tabulce 8 a jsou správné, s dostatečnou výtěžností a opakovatelností.

Tabulka 7 Výsledky opakovaného stanovení koncentrace FLU ve vzorcích říční vody.

Dáno [$\mu\text{mol/l}$]	Stanoveno [$\mu\text{mol/l}$]	Výtěžnost [%]	RSD [%]
0,5	0,476 \pm 0,020	90,2-102,0	4,2
1,0	0,970 \pm 0,020	93,8-99,6	2,0



Obrázek 35 Stanovení FLU metodou standardního přidavku reálném vzorku říční vody po extrakci.

Metoda – SWV, elektrolyt – H_3PO_4 (0,1 mol/l), $E_{poč} = -1000$ mV, $E_{kon} = +2500$ mV, $v = 50$ mV/s, $A = 50$ mV, $f = 10$ Hz, vzorek: $V = 10$ ml, $c_{FLU} \sim 0,5$ $\mu\text{mol/l}$, standardní přidavek: $V = 5,0$ μl , $c_{FLU} = 1,0 \times 10^{-3}$ $\mu\text{mol/l}$

Tabulka 8 Výsledky opakovaného stanovení koncentrace FLU ve vzorcích říční vody po extrakci.

Dáno [mol/l]	Stanoveno [mol/l]	Výtěžnost [%]	RSD [%]
$1,0 \times 10^{-8}$	$1,05 \pm 0,048 \times 10^{-8}$	95,0-110,3	4,6

4 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo vyvinout jednoduchou a citlivou voltametrickou metodu pro stanovení fludioxonilu na borem dopované diamantové elektrodě.

Pro studium voltametrického chování FLU byla využita CV, která ukázala 2 oxidační píky při potenciálu +1500 a +2050 mV. Byl sledován vliv pH na proudovou odezvu s využitím CV, DPV a SWV. Ukázalo se, že snižující se pH mělo pozitivní vliv na výšku i tvar oxidačních píků FLU. Vedle BRB byly testovány i různé kyseliny a nejlepších parametrů dosahovala H_3PO_4 o koncentraci 0,1 mol/l, která byla následně využívána jako elektrolyt pro vývoj metody stanovení pesticidu.

Následně byly optimalizovány parametry DPV a SWV metod pro stanovení FLU a obě metody byly porovnány. Z výsledků bylo patrné, že SWV vykazuje nepatrně vyšší citlivost a lepší opakovatelnost měření. Proto byla tato metoda vybrána jako vhodnější pro stanovení FLU. Dále byla testována aktivace povrchu BDDE. Nejlepších výsledků bylo dosaženo po aktivaci cyklováním v určitém rozsahu potenciálů. Regenerace mezi jednotlivými měřeními nebyla nutná, protože nedocházelo k pasivaci povrchu elektrody. Následně byly stanoveny základní statistické parametry jako LOD $2,3 \times 10^{-7}$ mol/l, LOQ $7,7 \times 10^{-7}$ mol/l a LDR $2,5 \times 10^{-7}$ - $5,0 \times 10^{-5}$ mol/l.

Nová metoda byla úspěšně aplikována na analýzu modelových roztoků a říční vody s přídavkem standardního roztoku FLU, kde byly dosaženy správné a dobře opakovatelné výsledky. S ohledem na reálné koncentrace pesticidů v přírodních vodách byla testována metoda zakoncentrování s využitím extrakce na tuhou fázi, konkrétně adsorpcí na kolony s pevnou fází C18, následnou elucí acetonitrilem a odpařením. Na závěr byl analyzován vzorek říční vody s přídavkem FLU na koncentraci $1,0 \times 10^{-8}$ mol/l. Po extrakci a zakoncentrování proběhla analýza metodou standardního přídavku a byla stanovena správná koncentrace FLU. Lze tedy konstatovat, že výtěžnost extrakce se blížila 100 % a použitá pevná fáze C18 je vhodná pro adsorpci FLU.

Závěrem lze říci, že cíl této bakalářské práce byl splněn a byla vyvinuta robustní a přesná voltametrická metoda stanovení FLU na BDDE.

Použitá literatura

- [1] BRITISH COLUMBIA MINISTRY OF AGRICULTURE. About Pesticides: Types, Names and Formulations. BRITISH COLUMBIA MINISTRY OF AGRICULTURE. *Gov.bc.ca* [online]. 2017 [cit. 2023-11-05]. Dostupné z: <https://www2.gov.bc.ca/assets/gov/farming-natural-resources-and-industry/agriculture-and-seafood/animal-and-crops/plant-health/about-pesticides.pdf>
- [2] HAHN, Matthias. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: Botrytis as a case study. Online. *Journal of Chemical Biology*. Roč. 2014, č. 7, s. 133–141. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12154-014-0113-1>. [cit. 2024-06-20].
- [3] KILANI, Jaafar a FILLINGER, Sabine. Phenylpyrroles: 30 Years, Two Molecules and (Nearly) No Resistance. Online. *Frontiers in Microbiology*. Roč. 2016, č. 7. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02014>. [cit. 2024-06-20].
- [4] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 5324110, 3-phenyl-1H-pyrrole. [cit. 2024-04-27]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3-phenyl-1H-pyrrole>.
- [5] BRANDHORST, T. Tristan a KLEIN, Bruce S. Uncertainty surrounding the mechanism and safety of the post-harvest fungicide fludioxonil. Online. *Food and Chemical Toxicology*. Roč. 2019, č. 123, s. 561-565. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.037>. [cit. 2024-06-20].
- [6] NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. COMPOUND SUMMARY Fludioxonil. *Pubchem* [online]. [cit. 2024-02-12]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fludioxonil>
- [7] AHMAD M, WOLBERG A, KAHWAJI CI. Biochemistry, Electron Transport Chain. *National Library of Medicine* [online]. [cit. 2024-04-27]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526105/>
- [8] BRAGANZA, Andrea, Sruti BRAGANZA a Deirdre NOLFI-DONEGAN. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *National Library of Medicine* [online]. 2020, Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7767752/>. [cit. 2024-02-09].
- [9] DE NADAL, Eulàlia a POSAS, Francesc. The HOG pathway and the regulation of osmoadaptive responses in yeast. Online. *FEMS Yeast Research*. 2022, roč. 2022, č. 22, s. 1-7. Dostupné z: <https://doi.org/DOI: 10.1093/femsyr/foac013>. [cit. 2024-02-09].
- [10] M. LAWRY, Stephanie; TEBBETS, Brad; KEAN, Iain; STEWART, Douglas; HETELLE, Joel et al. Fludioxonil Induces Drk1, a Fungal Group III Hybrid Histidine Kinase, To Dephosphorylate Its Downstream Target, Ypd1. Online. *ASM Journals*. 2017, roč. 2017, č. 61, s. 2-3. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/aac.01414-16>. [cit. 2024-02-09].
- [11] A.M. ALEXANDRINO, Diogo; P. MUCHA, Ana; R. ALMEIDA, C. Marisa a F. CARVALHO, Maria. Microbial degradation of two highly persistent fluorinated fungicides - epoxiconazole and fludioxonil. Online. *Journal of Hazardous Materials*. Roč. 2020. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122545>. [cit. 2024-05-10].

- [12] WANG, Yanhua; XU, Chao; WANG, Dou; WENG, Hongbiao; YANG, Guiling et al. Combined toxic effects of fludioxonil and triadimefon on embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). Online. *Environmental Pollution*. Roč. 2020. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114105>. [cit. 2024-05-10].
- [13] ORTON, Frances; ROSIVATZ, Erika; SCHOLZE, Martin a KORTENKAMP, Andreas. Widely Used Pesticides with Previously Unknown Endocrine Activity Revealed as in Vitro Antiandrogens. Online. *Environmental Health Perspectives*. 2011, roč. 2011, č. 119, s. 794-800. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1289/ehp.100289>. [cit. 2024-05-16].
- [14] KHALID, Aneeqa; NADIR ALI, Saeeda; QAYOOM, Amtul; IQBAL, Sajid; ANSARI, Sadia et al. High performance liquid chromatography Ultraviolet method for the determination of fludioxonil fungicide residues: Application on rice grains cultivated in Pakistan. Online. *Arabian Journal of Chemistry*. Roč. 2022, č. 15. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103692>. [cit. 2024-05-16].
- [15] CABRAS, P; ANGIONI, A; GARAU, V L a MINELLI, E V. Gas chromatographic determination of cyprodinil, fludioxonil, pyrimethanil, and tebuconazole in grapes, must, and wine. Online. *Journal of AOAC International*. Roč. 1997, č. 80, s. 867-870. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9241848/>. [cit. 2024-06-17].
- [16] RIAL OTERO, R; YAGÜE RUIZ, C; CANCHO GRANDE, B a SIMAL GÁNDARA, J. Solid-phase microextraction–gas chromatographic–mass spectrometric method for the determination of the fungicides cyprodinil and fludioxonil in white wines. Online. *Journal of Chromatography A*. Roč. 2002, č. 942, s. 41-52. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01352-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01352-8). [cit. 2024-06-17].
- [17] ZHAN, Haizhen; ZHANG, A'wei; HUANG, Min; YU, Weiwei; LI, Zhurui et al. Simultaneous determination of boscalid and fludioxonil in grape and soil under field conditions by gas chromatography/tandem triple quadrupole mass spectrometry. Online. *Biomedical Chromatography*. Roč. 2018, č. 32, s. 51-56. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bmc.4091>. [cit. 2024-06-17].
- [18] EVRIM BULGURCUOĞLU, Ayşe; YILMAZ DURAK, Büşra; SELALI CHORMEY, Dotse a BAKIRDERE, Sezgin. Development of a switchable solvent liquid phase extraction method for the determination of chlorthiamid, ethyl parathion, penconazole and fludioxonil pesticides in well, tap and lake water samples by gas chromatography mass spectrometry. Online. *Microchemical Journal*. Roč. 2021, č. 168. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106381>. [cit. 2024-06-17].
- [19] ZHANG, Wen; CHEN, Hongyu; HAN, Xinwei; YANG, Zaihui; TANG, Mingming et al. Determination and analysis of the dissipation and residue of cyprodinil and fludioxonil in grape and soil using a modified QuEChERS method. Online. *Environmental Monitoring and Assessment*. Roč. 2015, č. 187, article 414, s. 414. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4661-9>. [cit. 2024-06-17].
- [20] S. MAKARCHUK, Iryna; O. KLOVAK, Viktoriia; M. LEVCHYK, Valentyna a O. DOROSCHUK, Volodymyr. Cloud point extraction coupled with ultrasonic-assisted back-extraction for the determination of metalaxyl, fludioxonil and fenarimol

- in fruits by gas chromatography with flame ionization detection. Online. *Chemical Papers*. Roč. 2022, č. 76, s. 7575–7584. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11696-022-02431-6>. [cit. 2024-06-17].
- [21] MARÍN, Antonio; OLIVA, José; GARCIA, Carlos; NAVARRO, Simón a BARBA, Alberto. Dissipation Rates of Cyprodinil and Fludioxonil in Lettuce and Table Grape in the Field and under Cold Storage Conditions. Online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Roč. 2003, č. 51, s. 4708-4711. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf021222e>. [cit. 2024-05-19].
- [22] CAMINO-SÁNCHEZ, F.J.; ZAFRA-GÓME, A.; RUIZGARCÍA, J.; BERMÚDEZ-PEINADO, R; BALLESTEROS, O. et al. UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 accredited method for the determination of 121 pesticide residues in fruits and vegetables by gas chromatography–tandem mass spectrometry. Online. *Journal of Food Composition and Analysis*. Roč. 2011, č. 24, s. 427-440. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.11.009>. [cit. 2024-05-20].
- [23] SANNINO, Anna a BANDINI, Mirella. Determination of fludioxonil and famoxadone in processed fruits and vegetables by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. Online. *Journal of AOAC International*. Roč. 2005, č. 88, s. 1822-1826. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16526467/>. [cit. 2024-06-17].
- [24] KHALID, Aneeqa; NADIR ALI, Saeeda; QAYOOM, Amtul; IQBAL, Sajid; ANSARI, Sadia et al. High performance liquid chromatography Ultraviolet method for the determination of fludioxonil fungicide residues: Application on rice grains cultivated in Pakistan. Online. *Arabian Journal of Chemistry*. Roč. 2022, č. 15, article 103692. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103692>. [cit. 2024-06-25].
- [25] VAQUERO-FERNÁNDEZ, Luis; SÁENZ-HERNÁNDEZ, Ana; SANZ-ASENSIO, Jesús; FERNÁNDEZ-ZURBANO, Purificación; SAINZ-RAMÍREZ, Miguel et al. Determination of cyprodinil and fludioxonil in the fermentative process of must by high-performance liquid chromatography–diode array detection. Online. *Science of Food and Agriculture*. Roč. 2008, č. 88, s. 1943-1948. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jsfa.3301>. [cit. 2024-06-17].
- [26] *ELISA type*. Online. In: Wikimedia Commons. 2020. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ELISA_types.png. [cit. 2024-05-28].
- [27] *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*. Online. National Library of Medicine. 2023. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>. [cit. 2024-05-29].
- [28] V. MERCADER, Josep; ABAD-FUENTE, Antonio; AGULLÓ, Consuelo; ABAD-SOMOVILLA, Antonio a A. ESTEVE-TURRILLAS, Francesc. Development of a sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of fludioxonil residues in fruit juices. Online. *Analytical Methods*. Roč. 2014, č. 6, s. 8924-8929. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C4AY01756K>. [cit. 2024-05-31].
- [29] BRYCHT, Mariola; BURNAT, Barbara; SKRZYPEK, Sławomira; GUZSVÁNY, Valéria; GUTOWSKA, Natalia et al. Voltammetric and corrosion studies of the fungicide fludioxonil. Online. *Electrochimica Acta*. Roč. 2015, č. 158, s. 287-

297. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.01.130>. [cit. 2024-05-31].
- [30] SCHOLZ, Fritz. Voltammetric techniques of analysis: the essentials. Online. *ChemTexts*. Roč. 2015, č. 1, s. 17. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40828-015-0016-y>. [cit. 2024-06-01].
- [31] HANÁČEK, Jan a JÁCHIMOVÁ, Pavlína. *One hundred years of polarography*. Online. Czech Academy of Sciences. 2022. Dostupné z: <https://www.avcr.cz/en/news-archive/One-hundred-years-of-polarography/>. [cit. 2024-06-01].
- [32] PARHI, Sulagna; DASH, Nilakantha; PRAHARAJ, Swetapadma a ROUT, Dibyaranjan. An overview of voltammetric techniques to the present era. Online. In: *An overview of voltammetric techniques to the present era*. 2022. IOP Publishing, s. 1-24. Dostupné z: <https://iopscience.iop.org/book/edit/978-0-7503-5127-0/chapter/bk978-0-7503-5127-0ch1>. [cit. 2024-06-03].
- [33] A. OZKAN, Sibel. *Electroanalytical Methods in Pharmaceutical Analysis and Their Validation*. HNB Publishing, 2022. ISBN 978-0-9664286-7-4.
- [34] ŠVANCARA, Ivan. *Elektroanalýza. Vybrané kapitoly (učební text)*. Online. 2019. Univerzita Pardubice, 2019. ISBN 978-80-7560-247-3. Dostupné z: <https://eshop.upce.cz/epub/9005536/elektroanalýza-vybrane-kapitoly-ucebni-text>. [cit. 2024-06-18].
- [35] BAKHTIARI, Afshin; BERBERASHVILI, Tamar a KERVALISHVILI, P. Preparation of Graphene Structures by Continuous Wavelength Laser Deposition Method. Online. *American Journal of Condensed Matter Physics*. Roč. 2022, č. 12, s. 1-5. Dostupné z: <https://doi.org/10.5923/j.ajcmp.20221201.01>. [cit. 2024-06-03].
- [36] J. COBB, Samuel; J. AYRES, Zoe a V. MACPHERSON, Julie. Boron Doped Diamond: A Designer Electrode Material for the Twenty-First Century. Online. *ANNUAL REVIEW OF ANALYTICAL CHEMISTRY*. Roč. 2018, č. 11, s. 463-484. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061417-010107>. [cit. 2024-06-18].
- [37] H. T. LUONG, John; B. MALEB, Keith a D. GLENNONA, Jeremy. Boron-doped diamond electrode: synthesis, characterization, functionalization and analytical applications. Online. *Analyst*. Roč. 2009, č. 134, s. 1965-1979. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/B910206J>. [cit. 2024-06-18].
- [38] PECKOVÁ, Karolina; MUSILOVÁ, Jana a BAREK, Jiří. Altimetric Original Articles Boron-Doped Diamond Film Electrodes—New Tool for Voltammetric Determination of Organic Substances. Online. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. Roč. 2009, č. 39, s. 148-172. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10408340903011812>. [cit. 2024-06-18].
- [39] BALUCHOVÁ, Simona; DAŇHEL, Aleš; DEJMKOVÁ, Hana; OSTATNÁ, Veronika; FOJTA, Miroslav; Schwarzová-Pecková, Karolina. Recent progress in the applications of boron doped diamond electrodes in electroanalysis of organic compounds and biomolecules – A review. Online. *Analytica Chimica Acta*. roč. 2019, č. 24, s. 30-66. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.05.041>. [cit. 2024-06-18].

- [40] HRDLIČKA, Vojtěch; MATVIEIEV, Oleksandr; NAVRÁTIL, Tomáš a ŠELEŠOVSKÁ, Renáta. Recent advances in modified boron-doped diamond electrodes: A review. Online. *Electrochimica Acta*. Roč. 2023, č. 456, s. 142435. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2023.142435>. [cit. 2024-06-18].
- [41] C. LOURENCAO, Dr. Bruna; F. BROSCENSCHI, Prof. Ricardo; A. MEDEIROS, Prof. Roberta; FATIBELLO-FILHO, Prof. Orlando a C. ROCHA-FILHO, Prof. Romeu. Analytical Applications of Electrochemically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrodes. Online. *CHEMELECTROCHEM*. Roč. 2020, č. 7, s. 1291-1311. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/celec.202000050>. [cit. 2024-06-18].
- [42] PALMSENS. *Interval time Obtained current Differential Pulse Voltammetry (DPV)*. Online. Knowledge base. 2024. Dostupné z: <https://www.palmsens.com/knowledgebase-article/differential-pulse-voltammetry-dpv/>. [cit. 2024-06-20].