

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

**Voltametrické stanovení vybraných triazolových fungicidů**

Kateřina Krejčová

Bakalářská práce

2020

University of Pardubice  
Faculty of chemical technology

**Voltammetric determination of selected triazole fungicides**

Kateřina Krejčová

Bachelor thesis

2020

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kateřina Krejčová**  
Osobní číslo: **C16408**  
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**  
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**  
Název tématu: **Voltametrické stanovení vybraných triazolových fungicidů**  
Zadávající katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

### Závady pro vypracování:

1. Popište stručně princip voltametrie a uveďte přehled základních voltametrických metod používaných v elektroanalytické chemii.
2. Zpracujte literární rešerši týkající se vybraných triazolových fungicidů difenconazolu a tebuconazolu. Zaměřte se na problematiku jejich voltametrického chování, resp. možnosti stanovení s využitím různých pracovních elektrod.
3. Ověřte možnosti borem dopované diamantové elektrody při analýze a stanovení fungicidů difenconazolu a tebuconazolu na modelových roztocích, navrhněte optimální podmínky jejich stanovení a vyvinuté metody aplikujte při analýze přírodních vod a pesticidních přípravků.
4. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 9/2012 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu".

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tiskem**

Seznam odborné literatury:

**Všechna dostupná chemická literatura.**

Vedoucí bakalářské práce:

**doc. Ing. Renáta Šešlovská, Ph.D.**

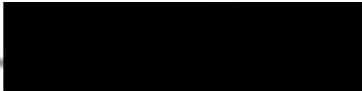
Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

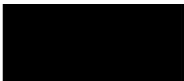
**28. února 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**4. července 2019**

  
prof. Ing. Petr Kalvoda, CSc.  
děkan

L.S.

  
prof. Ing. Václav Šedlák, DrSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019



**Prohlašuji:**

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, 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.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 17. 7. 2020

Kateřina Krejčová

### **Poděkování**

Děkuji doc. Ing. Renátě Šelešovské, PhD. za trpělivost, pomoc a cenné rady během experimentální práce i při zpracování výsledků a psaní této bakalářské práce.

## **Anotace**

Tato bakalářská práce je zaměřena na studium voltametričkého chování fungicidů difenoconazolu a tebuconazolu. Teoretická část stručně pojednává o pesticidech a fungicidech, konkrétně pak o difenoconazolu a tebuconazolu, o jejich vlastnostech a možnostech stanovení. Je uveden základní princip voltametrie, přehled voltametričkových metod a nejčastěji využívaných elektrod. Náplní experimentální části bylo studium elektrochemického chování uvedených fungicidů a vývoj metod jejich stanovení na elektrodě z borem dopovaného diamantu s využitím diferenční pulzní voltametrie. Metody byly úspěšně aplikovány při analýze komerčně dostupných přípravků.

## **Klíčová slova**

Tebuconazol, Difenoconazol, elektroda s borem dopovaným diamantem, voltametrie

## **Annotation**

This bachelor thesis is focused on the study of voltammetric behavior of fungicides difenoconazole and tebuconazole. The theoretical part briefly deals with pesticides and fungicides, namely difenoconazole and tebuconazole, their properties and possibilities of determination. The basic principles of voltammetry, overview of voltammetric methods and the most commonly used electrodes are listed. The experimental work was focused on the electrochemical behavior of mentioned fungicides and the development of methods for their determination on a boron doped diamond electrode using differential pulse voltammetry. Finally, the proposed methods were successfully applied for analysis of commercially available preparations.

## **Key words**

Tebuconazole, Difenoconazole, boron doped diamond electrode, voltammetry

## Obsah

<b>1. Úvod.....</b>	<b>10</b>
<b>2. Teoretická část.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1. Pesticidy, fungicidy .....</b>	<b>11</b>
2.1.1. Triazolové fungicidy.....	11
2.1.2. Difenconazol.....	12
2.1.3. Tebuconazol.....	13
<b>2.2. Voltametrie .....</b>	<b>14</b>
2.2.1. Úvod do polarografie, voltametrie.....	15
<b>3. Experimentální část .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1. Přístrojové vybavení .....</b>	<b>21</b>
<b>3.2. Použité chemikálie.....</b>	<b>21</b>
<b>3.3. Pracovní postupy.....</b>	<b>22</b>
3.3.1. Voltametrické měření .....	22
3.3.2. Analýza říční vody a pesticidních přípravků.....	23
<b>4. Výsledky a diskuse .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1. Studium voltametrického chování DFC a TBC .....</b>	<b>26</b>
4.1.1. Závislost voltametrického chování fungicidů na pH.....	27
4.1.2. Závislost voltametrického chování fungicidů na rychlosti polarizace .....	29
<b>4.2. Vývoj metody stanovení.....</b>	<b>33</b>
4.2.1. Optimalizace parametrů DPV.....	33
4.2.2. Předúprava BDDE .....	36
<b>4.3. Analýza modelových roztoků.....</b>	<b>39</b>
4.3.1. Koncentrační závislosti v modelových roztocích a v říční vodě.....	39
4.3.2. Opakované stanovení DFC a TBC .....	41
<b>4.4. Interferenční studie.....</b>	<b>44</b>
<b>4.5. Analýza praktického vzorku .....</b>	<b>46</b>
<b>5. Závěr.....</b>	<b>49</b>
<b>Seznam literatury .....</b>	<b>50</b>

## Seznam symbolů a zkratek

AXS	Azoxystrobin
BDDE	Elektroda z borem dopovaného diamantu
BRB	Brittonův-Robinsonův pufr
$c$	Molární koncentrace [mol/l]
CV	Cyklická voltametrie
DCV	Stejnoseměrná voltametrie (direct current voltammetry)
DDT	Dichlordifenyltrichlorethan
DFC	Difenoconazol
DME	Kapající rtuťová elektroda (dropping mercury electrode)
DPP	Diferenční puzní polarografie
DPV	Diferenčně pulzní voltametrie
$E$	Potenciál [mV]
$E_{1/2}$	Půlvlnový potenciál [mV]
$E_{in}$	Počáteční potenciál [mV]
$E_{obratu}$	Potenciál obratu [mV]
GC	Plynová chromatografie
HDME	Visící kapková elektroda (hanging mercury drop electrode)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
$I$	Proud [A]
$I_{lim}$	Limitní proud [A]
$I_p$	Výška píku [A]
LC-MS/MS	Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LOD	Limit detekce
LOQ	Mez stanovitelnosti
RSD	Relativní směrodatná odchylka
SPR	Spektroskopie povrchové plasmové resonance
TBC	Tebuconazol
$v$	Rychlost polarizace [mV/s]
$V$	Objem [l]
$v^{1/2}$	Druhá odmocnina z rychlosti polarizace [(mV/s) <sup>1/2</sup> ]

# 1. Úvod

Pesticidní přípravky difenoconazol a tebuconazol jsou hojně využívané fungicidní látky v zemědělství. Využívají se na ochranu ovoce, zeleniny a jiných zemědělských plodin a rostlin. Patří do skupiny triazolů. To jsou látky obsahující ve své struktuře triazolový kruh. Kromě žádoucích účinků mohou mít i negativní dopady, jsou toxické zejména pro vodní organismy. Do vody se dostávají z půdy. Je velmi důležité umět tyto látky co nejjednodušeji a nejlevněji stanovit, a to jak v jednotlivých složkách životního prostředí, tak v komerčně dostupných pesticidních přípravcích při kontrole jejich složení. Nejčastěji využívaným způsobem stanovení je kapalinová chromatografie. Tato metoda je ale velmi instrumentálně i časově náročná, komplikovaná bývá rovněž příprava vzorku. Přestože difenoconazol i tebuconazol jsou látky elektrochemicky aktivní, nebylo doposud v literatuře popsáno jejich voltametrické chování. Proto se tato práce zaměřuje na možnost voltametrického stanovení těchto fungicidů, a to s využitím elektrody s borem dopovaným diamantem.

Výhodou tohoto způsobu stanovení je nízká cena, rychlost a jednoduchost analýzy a vysoká citlivost. Voltametrie se vyvinula z polarografie, kterou v roce 1922 objevil český vědec Jaroslav Heyrovský. Za tento objev mu později byla udělena Nobelova cena. První polarografická měření probíhala na rtuťových elektrodách s odkapávající rtuťovou kapkou. Později se ukázalo, že tyto elektrody nejsou příliš praktické a postupně byly nahrazovány stacionárními rtuťovými elektrodami a tuhými elektrodami kovovými nebo uhlíkovými. V současnosti je vývoj nových elektrodových materiálů jedním z hlavních trendů v elektroanalytickém výzkumu. Jedním z perspektivních materiálů s velice specifickými vlastnostmi je borem dopovaný diamant, který byl využit v této bakalářské práci.

Předmětem této práce je studium voltametrického chování difenoconazolu a tebuconazolu s cílem vyvinout voltametrické metody jejich stanovení pomocí elektrody z borem dopovaného diamantu.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Pesticidy, fungicidy

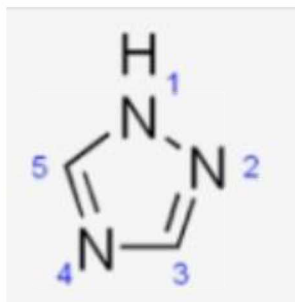
Pesticidy jsou dnes hojně využívané látky k ochraně ovoce, zeleniny, obilovin a rostlin proti nemocem a škůdcům, a také k ničení nežádoucího plevelu [1]. Dělí se podle použití do skupin, z nichž nejznámější a nejrozšířenější jsou insekticidy (proti hmyzu), herbicidy (proti plevelu) a fungicidy (proti plísním). O použití pesticidů je v literatuře zmínka již z roku 1000 př.n.l., kdy byla proti plísním a hmyzu použita síra. V období před Kristem bylo také popsáno mnoho dnes již známých rostlinných chorob. Od roku 79 n.l. se začal používat arsen jako ochrana proti hmyzu a v 19. století byl popsán antifungální účinek síranu měďnatého [2].

V roce 1882 se síran měďnatý používal jako fungicid ve směsi s vápnem a vodou na ochranu vinné révy. O 15 let později byl prokázán antifungální účinek u formaldehydu. Ve 30. letech 20. století začala nová éra chemických pesticidů, kdy byly použity první organické fungicidy na bázi dithiokarbamátu. Na konci 60. let 20. století vznikají nové účinnější fungicidy se systémovým účinkem. Byly vyvinuty některé hlavní třídy systémových fungicidů, a to oxathiiny, benzimidazoly, thiofanáty a pyrimidiny. Další účinné fungicidní přípravky, které se používají dodnes jsou sloučeniny organofosfátů a triazoly [2].

Používání pesticidních přípravků, jak se později ukázalo, s sebou přineslo i negativní dopady na životní prostředí. V roce 1962 Rachel Louise Carsonová, americká biologka, vydala knihu Tiché jaro, kde popisuje toxický vliv pesticidů na životní prostředí. Jako příklad lze uvést látku DDT (dichlordifenyiltrichlorethan) jenž svými negativními účinky způsobila mimo jiné snížení plodnosti vodních ptáků. Tato látka ovlivňovala ukládání vápníku ve vaječnicích ptáků. Tím došlo k tomu, že skořápka vajec byla příliš křehká a vejce nemělo šanci přežít [2].

#### 2.1.1. Triazolové fungicidy

Triazolové fungicidy patří do skupiny látek obsahujících ve své struktuře azolový kruh (obrázek 1), jedná se o tzv. 1,2,4-azoly, resp. konazoly. Konazoly jsou hojně využívány jak v zemědělství k ochraně ovoce, zeleniny a jiných zemědělských plodin, tak i ve farmacii k léčbě mykotických infekcí [3].



**Obrázek 1** Struktura azolového kruhu [4]

Mechanismus účinku triazolových antifungálních látek spočívá v inhibici enzymu ze skupiny cytochromu P 450, CYP51 (lanosterol 14a-demethyláza). Tento enzym je zodpovědný za tvorbu ergosterolu, který je velice důležitou součástí pro tvorbu buněčné membrány hub [5]. Inhibicí CYP51 dochází k hromadění sterolových meziproductů, které jsou pro houbové buňky toxické. Tím dochází k narušení membrány hub a k zastavení jejich růstu [6].

Příkladem triazolových látek využívaných v zemědělství jsou např.: difenoconazol, tebuconazol, epoxiconazol, cyproconazol a další. Pro farmaceutické účely se používají přípravky obsahující látky flukoconazol a ketoconazol, které se dobře vstřebávají perorálním i intravenózním podáním na rozdíl od nejstarších antimykotických látek patřících do skupiny imidazolů, např. klotrimazolu a mikonazolu. Tyto látky se již dnes používají pouze k lokální aplikaci na kůži [7].

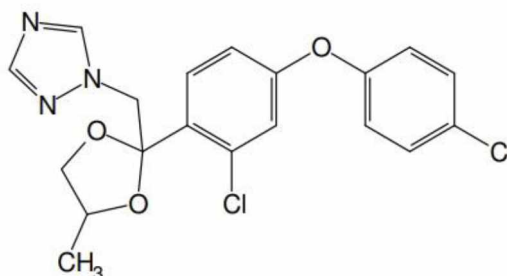
### **2.1.2. Difenoconazol**

Difenoconazol (DFC, obrázek 2), jehož název podle systému IUPAC je 1-[2-[2-chloro-4-(4-chloro-fenoxy)-fenyl]-4-methyl[1,3]dioxolan-2-ylmethyl]-1H-1,2,4-triazole, představuje širokospektrální fungicidní přípravek na ochranu ovoce, zeleniny, obilovin a jiných polních plodin. Je to jemný, bílý krystalický prášek bez zápachu. Jeho molekulová hmotnost je 406,3 g/mol a bod tání se pohybuje v rozmezí 82 až 83 °C. Rozpustnost ve vodě při 25 °C je 15 mg/l. V organických rozpouštědlech je jeho rozpustnost mnohem vyšší, řádově v jednotkách až stovkách g/l [8].

Fungální účinek DFC je popsán v předchozí kapitole 1.1.1. *Triazolové fungicidy*. Bylo zjištěno, že DFC je toxický pro vodní organismy. Svými účinky vyvolává u ryb oxidativní



stres, zpomaluje růst ryb a má teratogenní účinky. Dále je zodpovědný za buněčnou apoptózu a zánětlivé procesy u ryb. Některé z těchto negativních dopadů byly pozorovány již při expozici 50 µg DFC na litr vody [9].



*Obrázek 2 Chemická struktura DFC [8]*

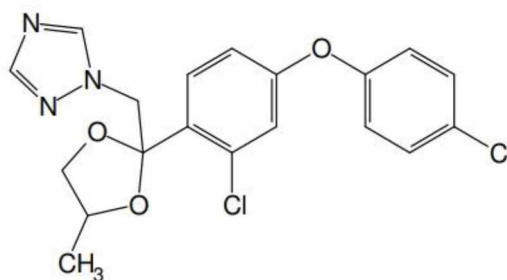
DFC lze dobře stanovit pomocí chromatografických metod. Jedním z příkladů může být plynová chromatografie (GC), která používá kombinaci dvou kolon za sebou. To umožňuje separaci DFC ze směsi až osmi různých pesticidů [10]. Dalším příkladem je použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), která umožňuje stanovení i látek, které jsou tepelně stábe, nejsou těkavé [10]. Použita byla i HPLC ve spojení s hmotnostním spektrometrem jako detektorem (HPLC-MS) [11].

Voltametrické stanovení DFC doposud nebylo v odborné literatuře popsáno.

### **2.1.3. Tebuconazol**

Tebuconazol (TBC, obrázek 3), který má podle systému IUPAC název (RS)-1-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol, je triazolový fungicid využívaný na ochranu ovoce, zeleniny a dalších zemědělských plodin. Je zařazen mezi prvních 10 fungicidů nejvíce využívaných v Evropě [12]. Je to bezbarvá krystalická látka s molární hmotností 307,82 g/mol. Bod tání této látky je 104,7 °C a rozpustnost ve vodě 0,032 g/l. V organických rozpouštědlech je rozpustnost větší stejně jako u DFC [13].

TBC má stejné účinky jako DFC. Je rovněž toxický pro vodní organismy. Svými účinky na ryby ovlivňuje jejich metabolismus lipidů a uhlohydrátů. Také poškozují larvy ryb a má negativní neurochemické účinky na dospělé ryby [14].



**Obrázek 3** Chemická struktura TBC [15]

Stejně jako DFC i TBC lze stanovit HPLC-MS, nebo kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) [16]. Byla použita i spektroskopie povrchové plasmové resonance (SPR) a plynová chromatografie [17].

Přestože na rozdíl od DFC již byla voltametrie pro stanovení TBC použita, jeho přímá oxidace nebyla v literatuře doposud popsána. TBC byl stanovován na měděné pevné amalgámové elektrodě (CuSAE), kdy bylo využito tvorby komplexu TBC s mědí z materiálu elektrody [17]. Další autoři využili tzv. MIP (molecularly imprinted polymer) modifikované elektrochemické senzory [18]. Vedle analytických účelů lze elektrochemii použít rovněž pro degradaci (rozklad) kontaminantů například při čištění odpadních vod. V případě TBC byly pro jeho elektrodegradaci v literatuře popsány postupy využívající bismutem dopované elektrody z oxidu olovičitého (PbO<sub>2</sub>) [19] nebo zlaté elektrody [20].

## 2.2. Voltametrie

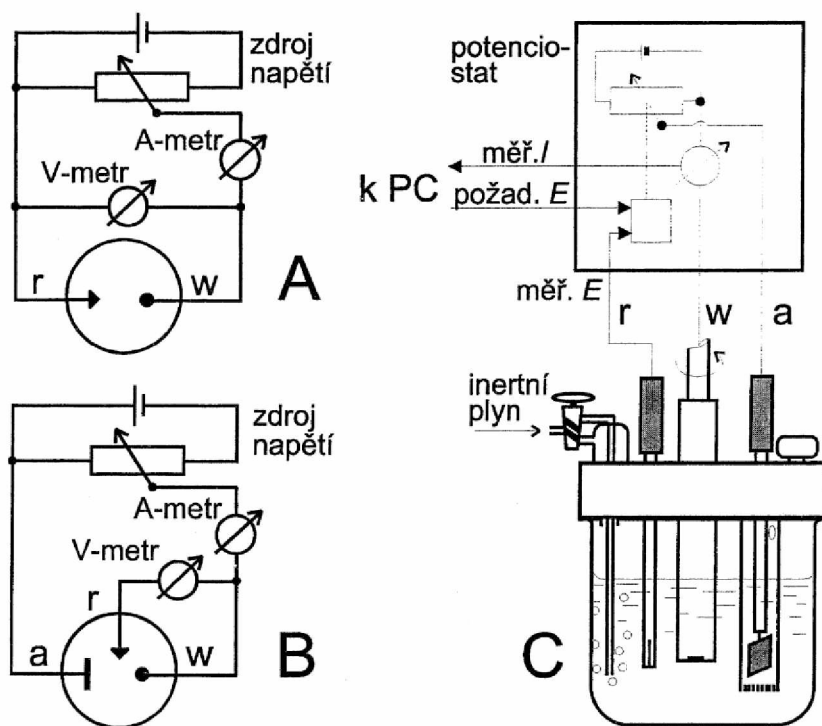
Voltametrie je elektroanalytická metoda, která sleduje závislost protékajícího elektrického proudu pracovní elektrodou na jejím potenciálu, který se s časem mění. Tato elektroda je ponořena do analyzovaného roztoku. Aby byla získána proudová odezva, musí analyzovaný roztok obsahovat látku, která se bude oxidovat nebo redukovat (tzv. depolarizátor). Dojde k depolarizaci elektrody a bude jí procházet elektrický proud, který je přímo úměrný koncentraci elektroaktivní látky [21].

Na tomto principu pracuje i metoda nazvaná polarografie. Polarografii v roce 1922 objevil český akademik Jaroslav Heyrovský [22]. Za tento objev obdržel 26. října 1959 Nobelovu cenu. Tato metoda je dnes nazývána jako klasická polarografie [23].

## 2.2.1. Úvod do polarografie, voltametrie

Rozdíl mezi voltametrií a polarografií spočívá pouze v pracovní elektrodě. V případě voltametrie se používá pracovní elektroda s konstantním povrchem (stacionární) zatímco v polarografii se používá elektroda s odkapávající rtuťovou kapkou (nestacionární), čímž je zajištěna neustálá obnova povrchu pracovní elektrody [24].

Ve voltametrii lze použít dvou nebo tří elektrodové zapojení elektrochemického článku. Nejdůležitější elektrodou je elektroda pracovní neboli měrná. Další elektroda je elektroda srovnávací (referentní). Na tyto elektrody je vkládáno napětí ze zdroje. Vzhledem k tomu, že potenciál referentní elektrody je konstantní, mění se změnou vloženého napětí pouze napětí pracovní elektrody. Přesný potenciál pracovní elektrody ale není známý, protože se část napětí ztratí při průchodu proudu na odporu analyzovaného roztoku. Proto se používá tří elektrodové zapojení, kde navíc figuruje elektroda pomocná. Proud pak teče mezi elektrodou pracovní a pomocnou, zatímco potenciál pracovní elektrody se měří mezi elektrodami pracovní a referentní bez průchodu proudu, a tedy beze ztrát. Schéma aparatury a zapojení obvodu pro voltametrická měření je uvedeno na obrázku 4 [25].



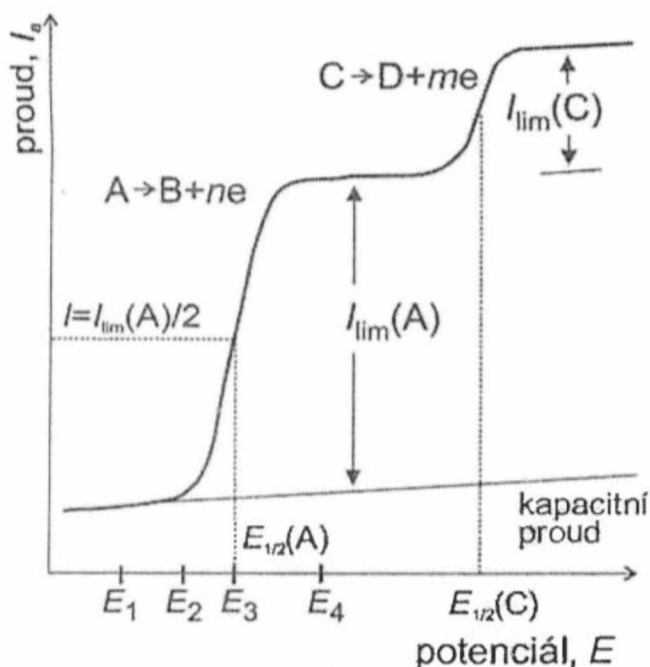
**Obrázek 4** Dvouelektrodové zapojení (A), tříelektrodové zapojení (B) elektrochemického článku, schéma aparatury použité ve voltametrii (C) [25]

*r – referentní elektroda, w – pracovní elektroda, a – pomocná elektroda*

### 2.2.1.1 Rozdělení voltametrických metod

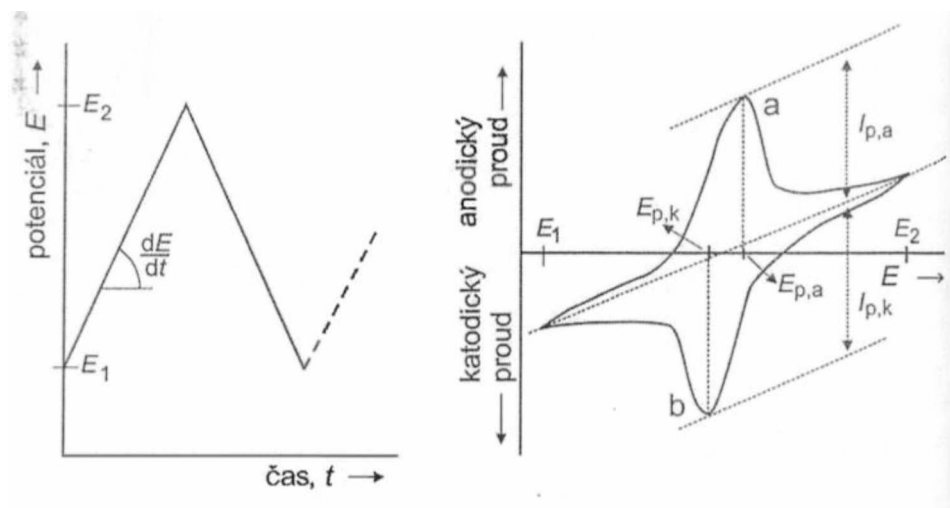
V závislosti na způsobu vkládání napětí na pracovní elektrodu, nebo na způsobu zpracování analytu v roztoku lze rozlišit řadu voltametrických metod.

Základní voltametrickou metodou je *DC voltametrie* (direct current voltammetry, stejnosměrná voltametrie). Pokud pracovní elektrodou protéká katodický proud, potenciál elektrody roste lineárně od pozitivních do negativních hodnot v závislosti na čase. Látky obsažené v měřeném roztoku se redukuje. Pokud elektrodou protéká proud anodický, potenciál vkládaný na elektrody roste lineárně ve směru od záporných ke kladným hodnotám a látky se oxidují. Výsledkem měření je polarizační křivka. Na obrázku 5 je uvedena polarizační křivka pro redukci dvou látek (A a C) v analyzovaném roztoku. Je vynesena závislost proudu ( $I$ ) na potenciálu ( $E$ ). Křivka má tvar vlny a je charakterizována hodnotou limitního difúzního proudu ( $I_{\text{lim}}$ ) a hodnotou půlvlnového potenciálu  $E_{1/2}$ .  $I_{\text{lim}}$  je přímo úměrný koncentraci analytu v roztoku, zatím co  $E_{1/2}$  udává charakter analytu, resp. kvalitu. Touto metodou lze stanovit anorganické i organické látky. Pokud je v analyzovaném roztoku přítomno více látek, které je třeba stanovit, musí mít každá z obsažených látek jinou hodnotu  $E_{1/2}$ , aby bylo možné tyto látky stanovit vedle sebe [25]. Metoda umožňuje stanovení látek v koncentračním řádu  $10^{-5}$  mol/l. Rozlišit lze látky, které se liší hodnotou  $E_{1/2}$  o 200 mV.



Obrázek 5 IE křivka pro redukci látek A a C při použití DCV [25]

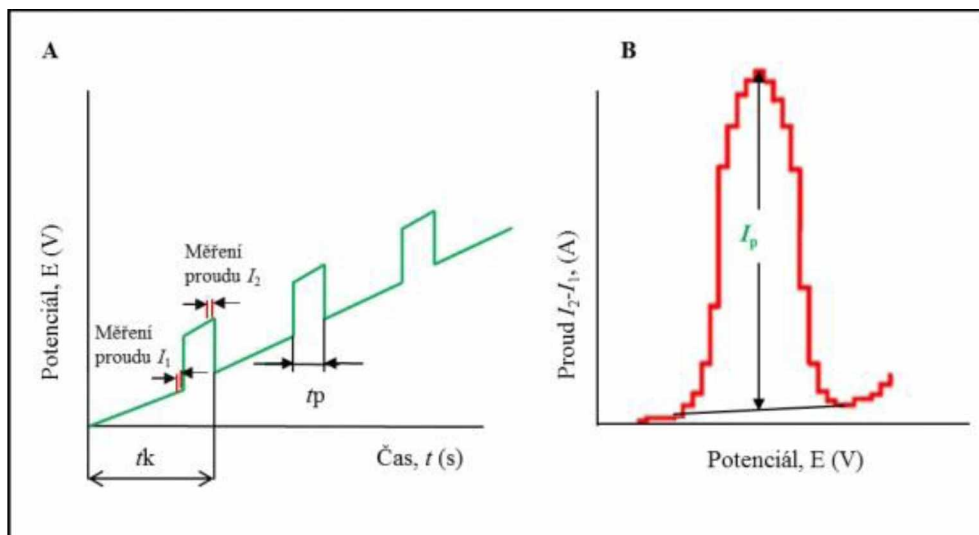
Další významnou metodou je *cyklická voltametrie (CV)*, která je založena na vkládání potenciálu trojúhelníkového charakteru na pracovní elektrodu. Křivky znázorňující závislost vkládaného potenciálu na čase a odpovídající cyklický voltamogram jsou uvedeny na obrázku 6. Analytické využití této metody je poměrně malé. Využívá se především pro studium voltametrického chování látek, reverzibility elektrodových reakcí apod. [23].



**Obrázek 6** Závislost vkládaného potenciálu na čase a odpovídající cyklický voltamogram [21]

Citlivější metodou je *diferenčně pulzní voltametrie (DPV)*. Tato pulzní metoda spočívá ve vkládání lineárně se měnícího napětí překládaného napětíovými pulzy. V závislosti na potenciálu se potom vynáší rozdíl proudů změřených před vložením pulzu a na jeho konci, jak znázorňuje obrázek 7A. Tato závislost má tvar píku (obrázek 7B), kdy jeho výška udává koncentraci analytu (kvantitu) a poloha na ose x udává kvalitu. Tato metoda umožňuje stanovení látek o koncentracích na úrovni  $10^{-8}$  mol/l a rozlišení látek, jejichž  $E_{1/2}$  se liší nejméně o 50 mV [25].

Speciální voltametrickou metodou umožňující další snížení detekčních limitů je *elektrochemická rozpouštěcí analýza*. Nejprve se na elektrodě, nejčastěji rtuťové, při konstantním vloženém napětí nahromadí sledovaný kov (redukce), který se po ukončení elektrolýzy rozpustí zpět do roztoku (oxidace). V tomto případě jde o anodickou rozpouštěcí voltametrii. Pokud nahromadění analytu probíhá oxidací a rozpouštění redukcí, jedná se o katodickou rozpouštěcí voltametrii. Při analýze organických látek lze využít tzv. adsorptivní rozpouštěcí voltametrii, při které dochází k akumulaci organické látky na povrchu elektrody adsorpcí [26].



**Obrázek 7** Průběh potenciálu v závislosti na čase (A) a polarizační křivka při DPV (B) [27]

### 2.2.1.2 Nejčastěji používané pracovní elektrody

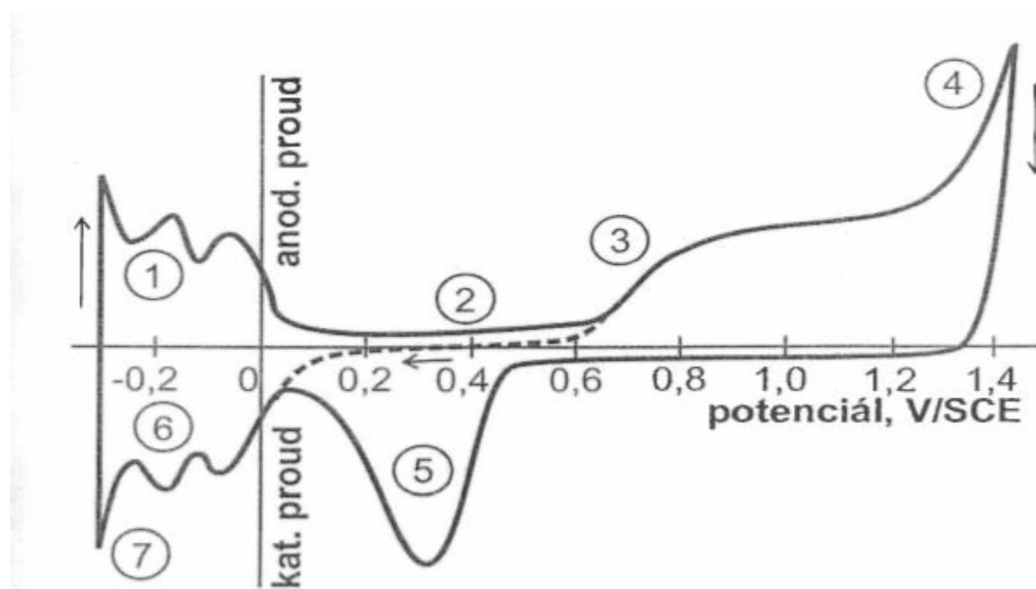
V polarografii se jako pracovní elektroda používala kapající rtuťová elektroda (DME). Výhoda této elektrody spočívá v tom, že každých 2-5 s obnovuje svůj měrný povrch, čímž nevzniká tzv. historie elektrody jako u elektrod s konstantním povrchem a nedochází k pasivaci. Nevýhodou je velká spotřeba kapalně rtuť [25].

Pro voltametrii se dnes používají především elektrody se stacionárním povrchem. Nevýhodou je, že se povrch může sám oxidovat nebo redukovat, případně se na něj mohou adsorbovat látky z analyzovaného roztoku. To ovlivňuje další měření a dvě po sobě změřené křivky nemusejí mít stejný tvar, vzniká tzv. historie elektrody. Dochází k pasivaci povrchu [25].

Mezi stacionární elektrody patří také visící rtuťová kapková elektroda (HDME, hanging mercury drop electrode). U této elektrody na rozdíl od DME probíhá celá jedna analýza na jedné rtuťové kapce, která je poté odklepnuta a nahrazena novou pro další měření. Tímto je zajištěn dokonale reprodukovatelný povrch a při tom jsou omezeny problémy s pasivací vzhledem k pravidelnému obnovování kapky. Spotřeba rtuť se rovněž snížila. Další výhodou rtuťových elektrod je široké využitelné potenciálové okno v oblasti negativních potenciálů. Tyto elektrody jsou tedy vhodné zejména k sledování redukčních reakcí. Rtuť navíc tvoří amalgámy s kovy, a proto je vhodná pro využití při rozpouštěcí voltametrii.

Nejčastějším materiálem pro pevné elektrody jsou platina, zlato a některé formy uhlíku. Pro speciální účely mohou být elektrody vyrobeny i z bismutu, amalgamu nebo třeba stříbra či wolframu [25]. Pevné elektrody jsou na rozdíl od rtuťových mechanicky odolné a neobsahují toxický elektrodový materiál. Co se týče využitelného potenciálového okna, tak umožňují měření zejména v oblasti kladných potenciálů a jsou tedy vhodné pro sledování oxidačních reakcí. Nevýhodou pevných elektrod je již zmíněná elektrodová paměť a riziko pasivace. Pevné elektrody je nutné mezi jednotlivými měřeními regenerovat, např. leštěním, broušením nebo elektrochemickou cestou (vložení vhodných potenciálů) a reprodukovatelnost povrchu, resp. měření je horší, než v případě rtuťových elektrod.

*Platina* má výborné elektrokatalytické vlastnosti a elektrochemické děje na ní probíhají velmi rychle. Příklad polarizace elektrody v roztoku  $H_2SO_4$  o koncentraci 1 mol/l je uveden na obrázku 8. Nejprve je z povrchu elektrody desorbován vodík (1) až je povrch elektrody čistý (2). Následně je platinový povrch oxidován na oxidy (3). Tyto oxidy mohou významně ovlivnit vlastnosti elektrody. Vlivem oxidace rozpouštědla začne proud vzrůstat (4). Následně dojde ke změně polarizace a dojde k redukci oxidů (5) na povrchu elektrody. Potom se adsorbují vznikající vodík (6) až je povrch elektrody vodíkem zcela obsazen (7) a dojde k uvolnění plynného vodíku [25].



**Obrázek 8** Polarizační křivka Pt elektrody v prostředí  $H_2SO_4$  o koncentraci 1 mol/l [25]

Polarizační schopnosti *zlata* jsou podobné jako u platiny, s tím že zlato méně adsorbuje a desorbuje vodík. Elektrokatalytické účinky zlata jsou menší než u platiny.

Díky tomu nedochází k reakcím s katalytickými jedy a zlato se tudíž v praxi využívá více než platina [25].

Další skupinou pevných elektrod jsou *elektrody uhlíkové*. Uhlík je používán v různých formách, které se liší svými vlastnostmi. Jednou z forem je *spektrální uhlík*, respektive grafit. Tento materiál je pórovitého charakteru tudíž je nutné jeho povrch impregnovat. Dalšími formami uhlíkových elektrod jsou elektrody z *pyrolytického grafitu a skelného uhlíku*. Především u skelného uhlíku není povrch pórovitý tudíž není potřeba žádná impregnace. Další formou uhlíkových elektrod jsou *elektrody z uhlíkové pasty*. Tato pasta se vyrábí z práškového uhlíku a inertní málo těkavé kapaliny. Výhodou těchto elektrod je široká využitelná oblast potenciálů a dobře obnovitelný povrch elektrody. Asi nejnovějšími uhlíkovými elektrodami jsou *elektrody diamantové*. Je vytvořen film uhlíku podobný diamantu, který je dopovaný atomy boru (BDDE). Výhodou těchto elektrod je nízký šum a široký využitelný potenciálový rozsah [25].

### **2.2.1.3 Elektroda z borem dopovaného diamantu (BDDE)**

Diamant je tvrdá krystalická forma uhlíku, která se může pyšnit výbornými chemickými i fyzikálními vlastnostmi. Má vysoký elektrický odpor, vysokou tepelnou vodivost, vysokou odolnost proti korozi a je chemicky inertní. Vzhledem k tomu, že se jedná o izolant, dopují se diamantové filmy pro elektroanalytické účely atomy různých prvků. Nejčastěji se v praxi používá bor [28].

Elektrody z borem dopovaného diamantu nabízejí široké potenciálové okno jak v katodické, tak v anodické oblasti. Lze je tedy použít při sledování oxidačních i redukčních reakcí. Další výhodou těchto elektrod je nízký šum. Jsou mechanicky i chemicky stabilní a odolné vůči pasivaci, a to díky parafinickému povrchu, který zajišťuje, že se látky nebudou adsorbovat na povrch elektrody [25]. Díky své odolnosti jsou tyto elektrody vhodné k použití i pro elektroanalýzy v drsných chemických podmínkách [29].



### 3. Experimentální část

#### 3.1. Přístrojové vybavení

Voltametrická měření probíhala na přístroji Eco-Tribo Polarograph (Obr. 9, Polaro Sensors, Praha), který byl vybaven softwarem Polar 5.1. Zapojení elektrochemického článku bylo tříelektrodové, kdy pracovní elektrodou byla elektroda z borem dopovaného diamantu (BDDE, Windsor Scientific, Velká Británie), referentní elektrodou byla nasycená argent-chloridová elektroda a pomocnou elektrodou byl platinový drátek (obě Monokrystaly, Turnov). Pro měření pH sloužil pH-metr Fischer Scientific AB 150 (Fischer Scientific, Pardubice), při přípravě roztoků byly použity analytické váhy (Denver Instrument, New York) a ultrazvuková lázeň Bandelin SONOREX (Schalltec GmbH, Německo). Pro dávkování roztoků sloužily automatické mikropipety Eppendorf (Eppendorf Research, Německo).



*Obrázek 9 Použitý polarografický analyzátor Eco-Tribo Polarograph*

#### 3.2. Použité chemikálie

Standardní roztoky tebuconazolu (TBC) a difenoconazolu (DFC) o koncentraci  $1 \times 10^{-3}$  mol/l byly připraveny navážením jednotlivých pevných látek o čistotě 98 % (Sigma-Aldrich, Česká republika) a rozpuštěním v acetonitrilu (Ing. Petr Švec – PENTA, Praha). Pro usnadnění rozpouštění byla použita ultrazvuková lázeň. Roztoky byly uchovávány v lednici bez přístupu světla. Základními elektrolyty byly roztok  $\text{HNO}_3$  o koncentraci 0,1 mol/l, který byl připravován z 65%  $\text{HNO}_3$  (Ing. Petr Švec – PENTA, Praha), a Brittonův-Robinsonův pufr

(BRB) o pH v rozmezí 2-12. BRB sestával z kyselá a alkalické složky. Kyselá složka byla tvořena roztoky  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  a  $\text{CH}_3\text{COOH}$  o koncentraci 0,04 mol/l. Roztoky jednotlivých kyselin vznikly zředěním 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 99,8%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  a rozpuštěním práškové  $\text{H}_3\text{BO}_3$  o čistotě 99,8 % (vše Lachema, Brno). Zásaditá složka byla tvořena roztokem NaOH o koncentraci 0,2 mol/l (Lachema, Česká republika). Pro interferenční studii byly použity roztoky různých pesticidních látek o koncentraci  $1 \times 10^{-3}$  mol/l, které byly připraveny navážením pevných látek. Testovány byly tyto látky: cyproconazol, propiconazol, epoxiconazol, difenoconazol, tebuconazol, azoxystrobin, imidacloprid, chlorpyrifos, pymetrozin, glyfosát a tribenuron (Sigma-Aldrich, Česká republika). Na závěr byla provedena analýza reálných vzorků. Byly použity roztoky komerčně dostupných fungicidních přípravků Horizon (250 g/l TBC, AgroBio Opava), SCORE 250 EC s deklarovaným obsahem 250 g/l DFC a směsný přípravek ASCON s obsahem 125 g/l DFC a 200 g/l azoxystrobinu (AXS, oba Syngenta Crop Protection AG, Švýcarsko). Roztoky o předpokládané koncentraci  $1 \times 10^{-3}$  mol/l (počítáno dle obsahu účinných látek deklarovaného výrobcem) byly připraveny pipetováním vhodného množství přípravků a rozpuštěním v acetonitrilu za pomoci ultrazvuku.

### 3.3. Pracovní postupy

#### 3.3.1. Voltametrické měření

Jako pracovní elektroda byla použita BDDE. Vždy na počátku pracovního dne byla aktivována zařazením 20 cyklických voltamogramů v rozsahu potenciálů  $-1000$  až  $+2200$  mV. Aktivace probíhala přímo v roztoku základního elektrolytu, který byl následně používán.

Pro studium voltametrického chování TBC a DFC byly použity metody cyklické voltametrie (CV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV). CV byla využita při studiu vlivu pH na výšku, tvar a polohu píku a pro zjištění vlivu rychlosti polarizace na tvar a výšku píku ( $I_p$ ). První cyklický voltamogram DFC byl změřen v prostředí BRB o pH 2 a v rozmezí potenciálů  $-500$  až  $+2200$  mV při rychlosti polarizace 100 mV/s. V případě TBC byla jako elektrolyt použita  $\text{HNO}_3$  o koncentraci 0,1 mol/l. Rozmezí potenciálů a rychlost polarizace byly stejné jako v předchozím případě. Při studiu vlivu pH na voltametrické chování obou analytů byla

použita CV při rychlosti polarizace 100 mV/s a rozsah potenciálů se měnil v závislosti na pH, a tedy šířce využitelného potenciálového okna. Vliv rychlosti polarizace byl sledován v rozsahu 25-500 mV/s a měření probíhalo od počátečního potenciálu ( $E_{in}$ ) -1000 mV do potenciálu obratu ( $E_{obratu}$ ) +2500 mV.

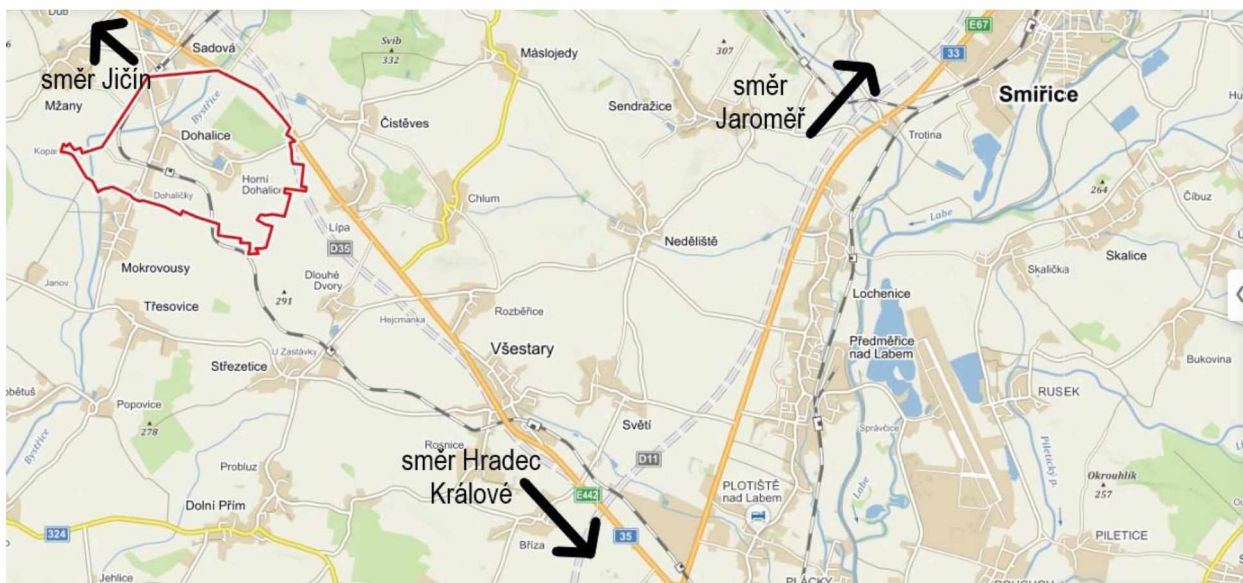
Metoda DPV byla vzhledem ke své citlivosti použita pro vývoj metody stanovení obou látek. Nejprve byly optimalizovány parametry metody, konkrétně rychlost polarizace ( $v$ ), výška a šířka pulzu. Pro stanovení DFC byly použity tyto parametry:  $v = 40$  mV/s, *výška pulzu* = +50 mV a *šířka pulzu* = 20 ms. V případě stanovení TBC byly parametry obdobné:  $v = 50$  mV/s, *výška pulzu* = +60 mV a *šířka pulzu* = 10 ms.

Limit detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) byly vypočteny z kalibračních rovnic pro nejnižší naměřené koncentrační závislosti jako 3 $\times$ , resp., 10 $\times$  směrodatná odchylka úseku podělená hodnotou směrnice.

### 3.3.2. Analýza říční vody a pesticidních přípravků

Navržené metody byly aplikovány při analýze říční vody a komerčně dostupných pesticidních přípravků Score 250 EC, Askon a Horizon 250 EW.

Říční voda byla odebrána z řeky Bystřice v obci Dohalice v Královéhradeckém kraji (obrázek 10). Odebraná voda byla v laboratoři přefiltrována. Vzhledem k tomu, že tato voda neobsahovala detekovatelné množství testovaných fungicidů, byla před analýzou obohacena přídavky standardních roztoků. V případě DFC byla říční voda obohacena přídavkem standardního roztoku DFC o koncentraci 0,001 mol/l na výslednou koncentraci ve vodě  $1 \times 10^{-6}$  mol/l. Do polarografické nádoby bylo odměřeno 13,5 ml obohaceného vzorku vody a přidáno 1,5 ml elektrolytu. Pro stanovení analytu byla použita metoda přídavku standardu a vždy byly přidány nejméně 2 přídavky ( $V = 13,5$   $\mu$ l,  $c = 0,001$  mol/l). Analýza byla opakována 5 $\times$  a ze získaných výsledků byly vypočteny statistické parametry jako průměrný obsah účinné látky s odpovídajícím intervalem spolehlivosti, relativní směrodatná odchylka (RSD) opakovaného stanovení a výtěžnost. Pro opakované stanovení TBC byla říční voda také obohacena přídavkem standardního roztoku TBC (0,001 mol/l) tentokrát na koncentraci  $5 \times 10^{-6}$  mol/l. Do polarografické nádoby bylo k analýze pipetováno 13,5 ml vzorku vody a přidáno 1,5 ml elektrolytu. I v tomto případě byla použita metoda přídavku standardu, byly přidány 2 přídavky ( $V = 67,5$   $\mu$ l,  $c = 0,001$  mol/l) a stanovení bylo 5 $\times$  zopakováno.



*Obrázek 10 Mapa upřesňující místo odběru říční vody*

Před analýzou fungicidních přípravků byly připraveny jejich roztoky o koncentraci okolo  $1 \times 10^{-3}$  mol/l (počítáno na základě deklarovaných obsahů účinných látek výrobcí) do 50ml odměrných baněk. Přípravek Score 250 EC (obrázek 11) je kapalný a jeho účinnou látkou je DFC. Jeho roztok byl připraven odměřením 81,3  $\mu$ l přípravku do 50ml odměrné baňky pomocí automatické mikropipety a rozpuštěním v acetonitrilu za pomoci ultrazvuku. K analýze bylo k 15 ml roztoku základního elektrolytu přidáno 15  $\mu$ l připraveného roztoku přípravku Score 250 EC. Tento roztok byl proměřen a následně byly přidány postupně dva přídavky standardního roztoku DFC ( $V = 15 \mu$ l,  $c = 0,001$  mol/l). Měření bylo opakováno  $5 \times$  a byly vypočteny statistické parametry.

Přípravek Askon (obrázek 11) je také kapalného skupenství a účinnými látkami jsou DFC a AXS. Jeho roztok byl připraven odměřením 162,5  $\mu$ l opět do 50ml odměrné baňky a rozpuštěním v acetonitrilu za pomoci ultrazvuku. Následující postup byl stejný jako v případě přípravku Score 250 EC.

Posledním analyzovaným fungicidním přípravkem byl Horizon 250 EW (obrázek 11), kde je účinnou látkou TBC. Opět se jedná o kapalný přípravek. Roztok byl připraven odměřením 61,6  $\mu$ l do 50ml odměrné baňky a rozpuštěním v acetonitrilu. Následující analýza probíhala obdobně jako v předchozích případech. K 15 ml elektrolytu bylo přidáno 75  $\mu$ l připraveného roztoku přípravku Horizon 250 EW. Tento roztok byl proměřen a byly přidány

2 přídatky standardního roztoku TBC ( $V = 75 \mu\text{l}$ ,  $c = 0,001 \text{ mol/l}$ ). Měření bylo  $5 \times$  zopakováno a byly vypočteny statistické parametry.

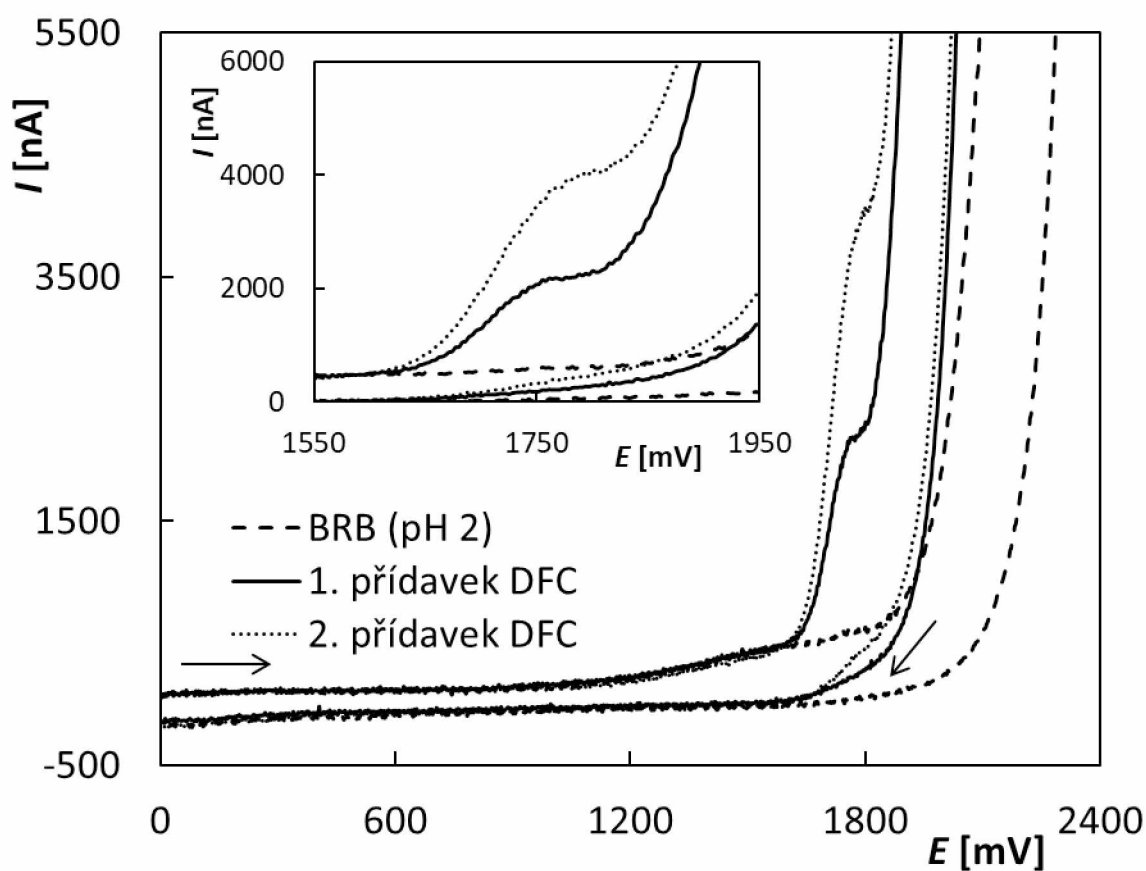


*Obrázek 11 Analyzované komerčně dostupné fungicidní přípravky*

## 4. Výsledky a diskuse

### 4.1. Studium voltametrického chování DFC a TBC

Na úvod byl změřen cyklický voltamogram DFC v prostředí BRB o pH 2, rozsah potenciálů byl  $-1000$  až  $+2500$  mV, rychlost polarizace  $100$  mV/s a koncentrace DFC  $1 \times 10^{-5}$  a  $2 \times 10^{-5}$  mol/l. Jak je vidět na obrázku 12, byl zaznamenán 1 oxidační signál kolem potenciálu  $+1750$  mV, který odpovídajícím způsobem reagoval na koncentraci analytu v roztoku. Na katodické křivce nebyl pozorován žádný redukční signál a sledovanou elektrodovou reakcí tak lze označit za ireverzibilní.



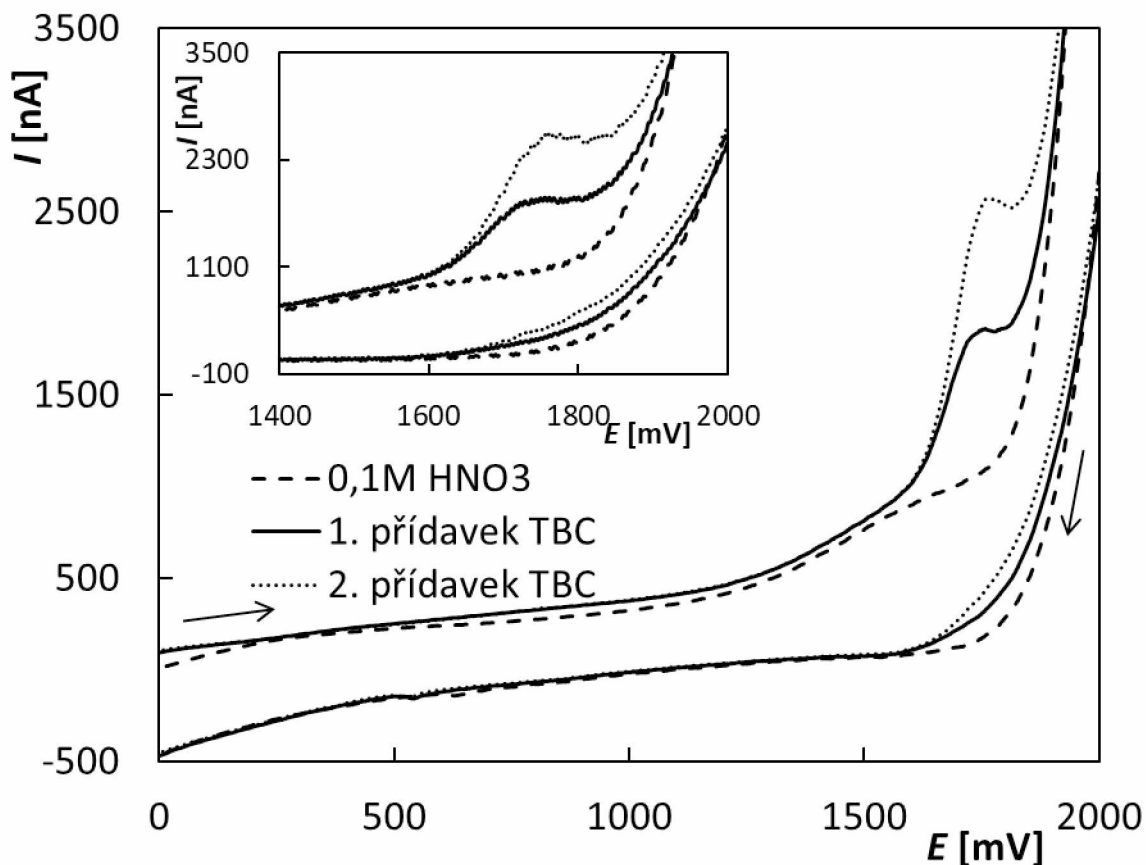
**Obrázek 12** Cyklický voltamogram DFC zaznamenaný na BDDE

*Metoda – CV, elektrolyt – BRB (pH 2),  $E_{in} = -1000$  mV,  $E_{obratu} = +2500$  mV,  $v = 100$  mV/s,  $c(\text{DFC}) = 1 \times 10^{-5}$  a  $2 \times 10^{-5}$  mol/l; vložený detail anodického signálu DFC*

V případě TBC byl cyklický voltamogram, který je uveden na obrázku 13, změřen v prostředí  $\text{HNO}_3$  o koncentraci  $0,1$  mol/l. Parametry metody byly stejné, jako v předešlém



experimentu pro DFC a koncentrace TBC byly rovněž  $1 \times 10^{-5}$  a  $2 \times 10^{-5}$  mol/l. TBC poskytl za těchto podmínek také jeden oxidační signál kolem potenciálu +1700 mV, který rostl s koncentrací TBC. I v tomto případě se jedná o ireverzibilní elektrodovou reakci.



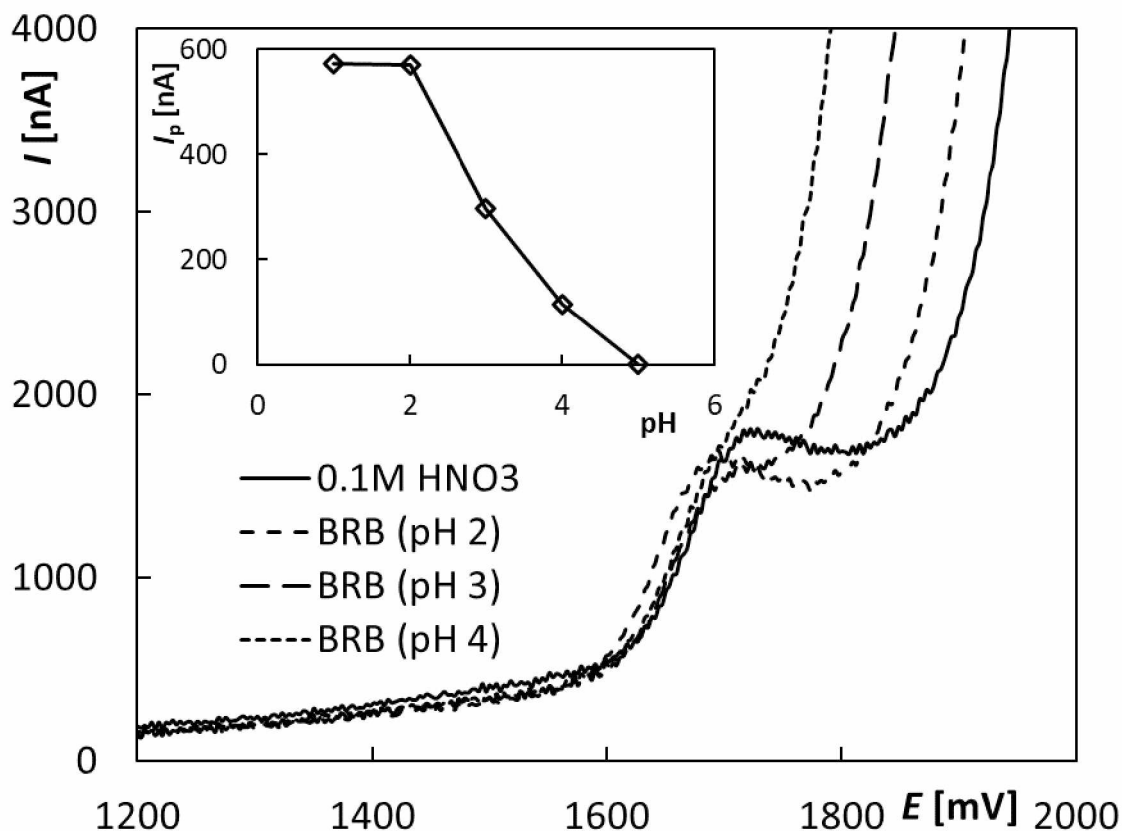
**Obrázek 13** Cyklický voltamogram TBC zaznamenaný na BDDE

*Metoda – CV, elektrolyt – HNO<sub>3</sub> (0,1 mol/l), E<sub>in</sub> = -1000 mV, E<sub>obratu</sub> = +2500 mV, v = 100 mV/s, c(TBC) =  $1 \times 10^{-5}$  a  $2 \times 10^{-5}$  mol/l; vložený detail anodického signálu TBC*

#### 4.1.1. Závislost voltametrického chování fungicidů na pH

Je obecně známo, že pH prostředí, resp. složení základního elektrolytu významně ovlivňuje voltametrické chování látek. Proto byla pro oba studované fungicidy provedena studie vlivu pH na výšku, tvar a polohu píku. Jako základní elektrolyt byl použit BRB v rozmezí pH 2-12 a zředěná HNO<sub>3</sub> o koncentraci 0,1 mol/l pro zajištění kyselého prostředí kolem hodnoty pH 1. Vždy byl pod pH-metrem namíchán elektrolyt o určitém pH. Koncentrace DFC a TBC pro tyto experimenty byla  $1 \times 10^{-5}$  mol/l. Pro měření byla použita CV. Rychlost polarizace byla nastavena na 100 mV/s. Na obrázcích 14 a 15 jsou uvedeny

získané voltamogramy a vynesené závislosti výšek píků ( $I_p$ ) na pH. Pro přehlednost jsou uvedeny pouze anodické části cyklických voltamogramů v rozsahu pH 1-4 (DFC), resp. 1-6 (TBC).

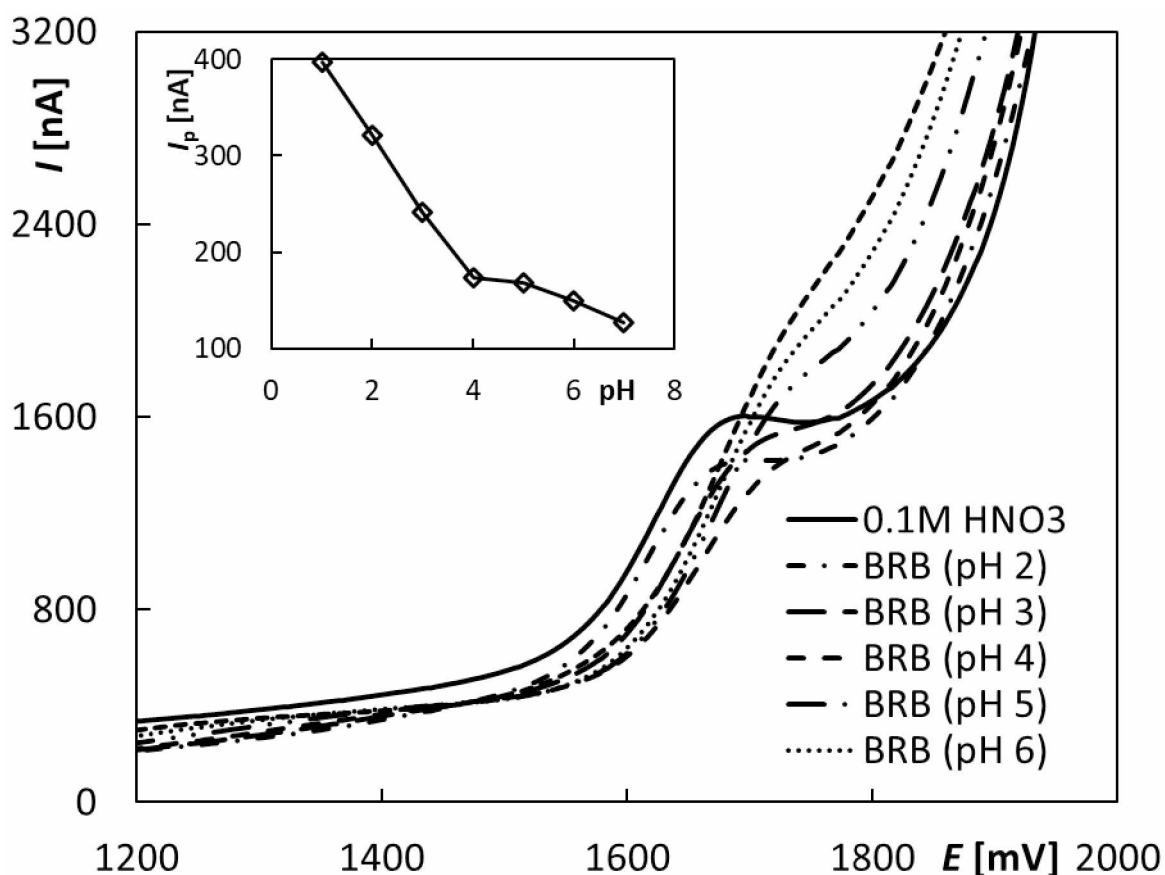


**Obrázek 14** Anodické části cyklických voltamogramů DFC zaznamenané na BDDE v závislosti na pH

Metoda – CV, elektrolyt –  $HNO_3$  (0,1 mol/l) a BRB (pH 2-4),  $E_{in} = -1000$  mV,  $E_{obratu} = +2500$  mV,  $v = 100$  mV/s,  $c(DFC) = 1 \times 10^{-5}$  mol/l; vložena závislost  $I_p$  na pH

Z obrázku 14 je zřejmé, že nejlépe vyhodnotitelný pík poskytoval DFC v silně kyselém prostředí zředěné  $HNO_3$ . S rostoucím pH byl pík stále silněji ovlivněn rozkladem základního elektrolytu a při pH 4 již byl jen sotva patrný. V neutrálním a zásaditém prostředí již nebyla pozorována žádná odezva odpovídající oxidaci analytu. V případě TBC bylo dosaženo velice podobných výsledků (obrázek 15). Nejlepší pík poskytoval TBC v prostředí  $HNO_3$  o koncentraci 0,1 mol/l. I v tomto případě pík s rostoucím pH zanikal a v zásaditém prostředí rovněž nebyla pozorována žádná odezva. Pro obě látky byla na základě uvedených výsledků pro další měření jako základní elektrolyt zvolena  $HNO_3$  o koncentraci 0,1 mol/l.





**Obrázek 15** Anodické části cyklických voltamogramů TBC zaznamenané na BDDE v závislosti na pH

Metoda – CV, elektrolyt –  $HNO_3$  (0,1 mol/l) a BRB (pH 2-6),  $E_{in} = -1000$  mV,  $E_{obratu} = +2500$  mV,  $v = 100$  mV/s,  $c(TBC) = 1 \times 10^{-5}$  mol/l; vložena závislost  $I_p$  na pH

#### 4.1.2. Závislost voltametrického chování fungicidů na rychlosti polarizace

Závislost výšky píku na rychlosti polarizace byla studována pro zjištění řídicího děje probíhajících elektrodových reakcí. V obou případech bylo měření provedeno opět metodou CV v rozmezí rychlostí polarizace od 25 mV/s do 500 mV/s. Rychlost polarizace byla vždy navýšena o 25 mV/s. Měření probíhalo v prostředí  $HNO_3$  o koncentraci 0,1 mol/l. Koncentrace studovaných látek v polarografické nádobce byla  $1 \times 10^{-5}$  mol/l (DFC, obrázek 16) a  $5 \times 10^{-5}$  mol/l (TBC, obrázek 17).

V případě DFC výška píku se stoupající rychlostí polarizace narůstá, ale tento nárůst není zcela lineární, i když se lineárnímu průběhu blíží, jak je znázorněno na obrázku číslo 16B. Závislost může být popsána rovnicí (1) s příslušným korelačním koeficientem. Uvedená reakce tedy může být významně ovlivněna adsorpcí. Zároveň byla vynesena závislost výšky

píku na druhé odmocnině z rychlosti polarizace (obrázek 16C) a logaritmická závislost  $I_p$  na  $v$  (obrázek 16D). Závislost  $I_p$  na  $v^{1/2}$  lze považovat za lineární a může být popsána rovnicí (2). Z této skutečnosti vyplývá, že reakce by mohla být významně ovlivněna i difuzí. Významnou roli v určení řídicího děje hraje hodnota směrnice ( $0,6015 \pm 0,0086$ ) logaritmické závislosti z rovnice (3), která se pohybuje mezi teoretickými hodnotami 0,5 pro difuzně řízenou reakci a 1 pro reakci řízenou adsorpcí, ale blíží se spíše hodnotě 0,5. V případě DFC se tedy jedná difuzně řízenou elektrodovou reakci ovlivněnou rovněž adsorpcí.

$$I_p[\text{nA}] = (9,26 \pm 0,25) v[\text{mV/s}] + (1068 \pm 73), r = 0,988 \quad (1)$$

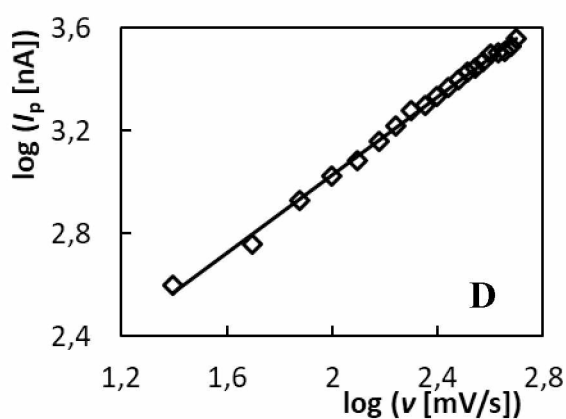
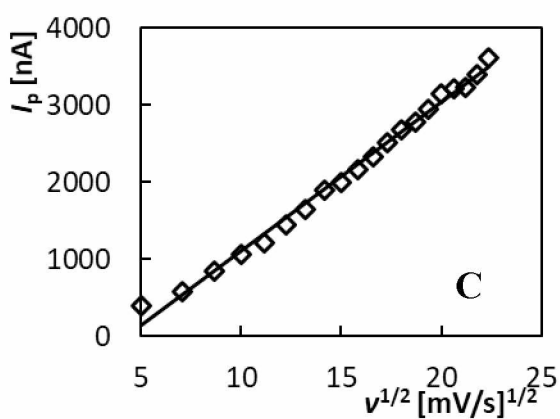
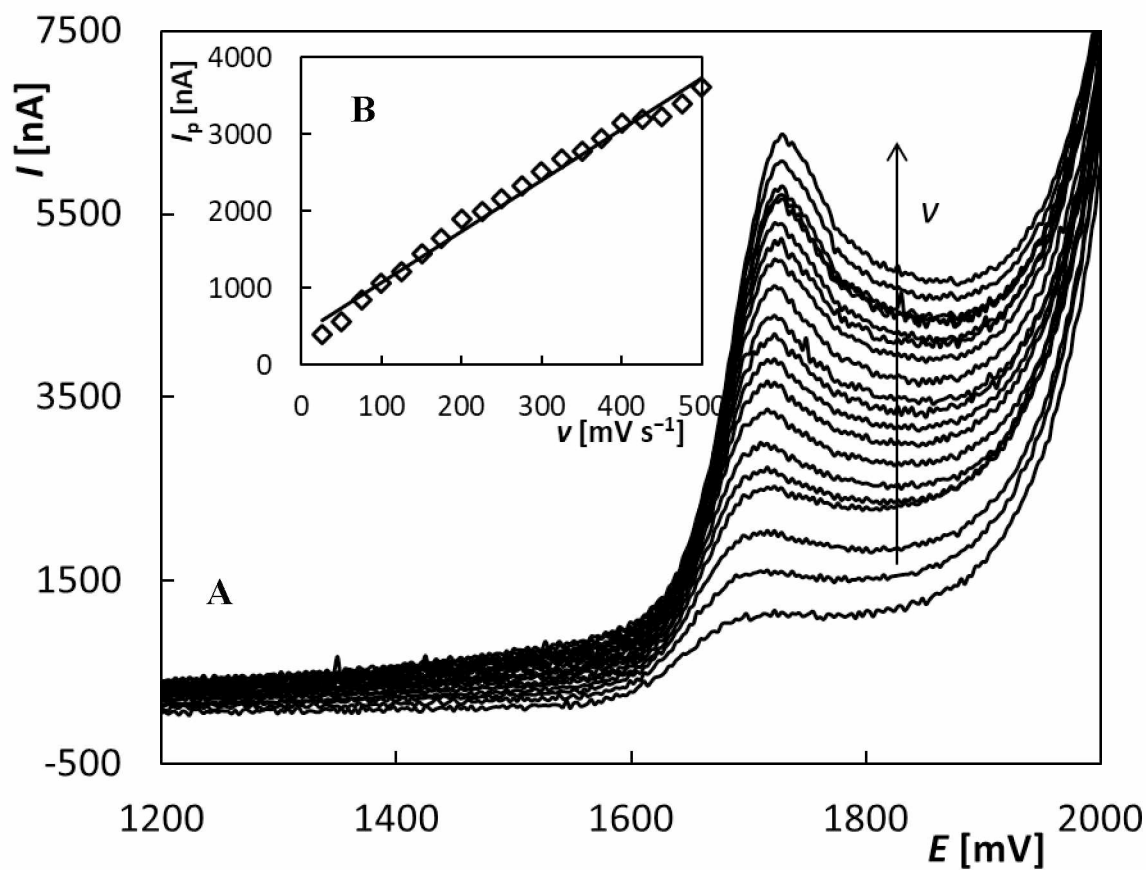
$$I_p[\text{nA}] = (268,5 \pm 5,4) (v[\text{mV/s}])^{1/2} + (-641 \pm 88), r = 993 \quad (2)$$

$$\log(I_p[\text{nA}]) = (0,6015 \pm 0,0086) \log(v[\text{mV/s}]) + (2,108 \pm 0,020), r = 0,997 \quad (3)$$

I v případě TBC výška píku s rostoucí rychlostí polarizace vzrůstala, ale ne lineárně, jak je vidět na obrázku 17B. Nejedná se tedy o reakci řízenou adsorpcí. Závislost výšky píku na druhé odmocnině z rychlosti polarizace se již blíží lineárnímu průběhu (obrázek 17C), což svědčí o difuzně řízené elektrodové reakci. Tato závislost může být popsána rovnicí (4) s příslušným korelačním koeficientem. Tento předpoklad potvrzuje i logaritmická závislost zobrazená na obrázku 17D a charakterizovaná odpovídající rovnicí (5). Hodnota směrnice této závislosti ( $0,582 \pm 0,013$ ) se blíží teoretické hodnotě 0,5 pro difuzně řízenou elektrodovou reakci. Stejně jako u DFC se i v případě TBC jedná o difuzně řízenou reakci s případným vlivem adsorpce.

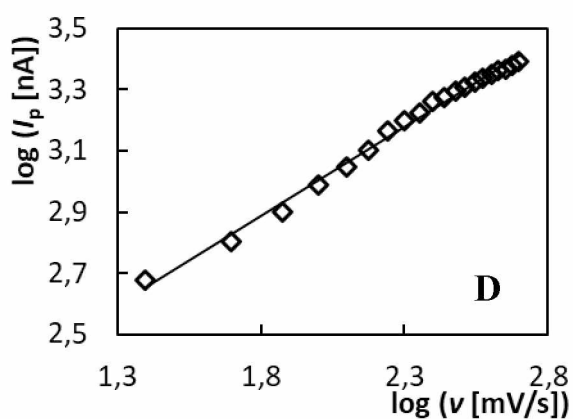
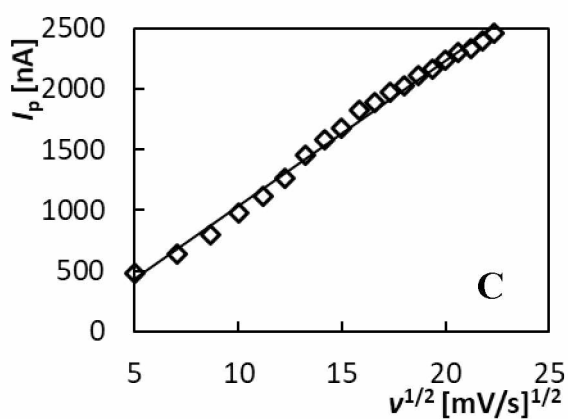
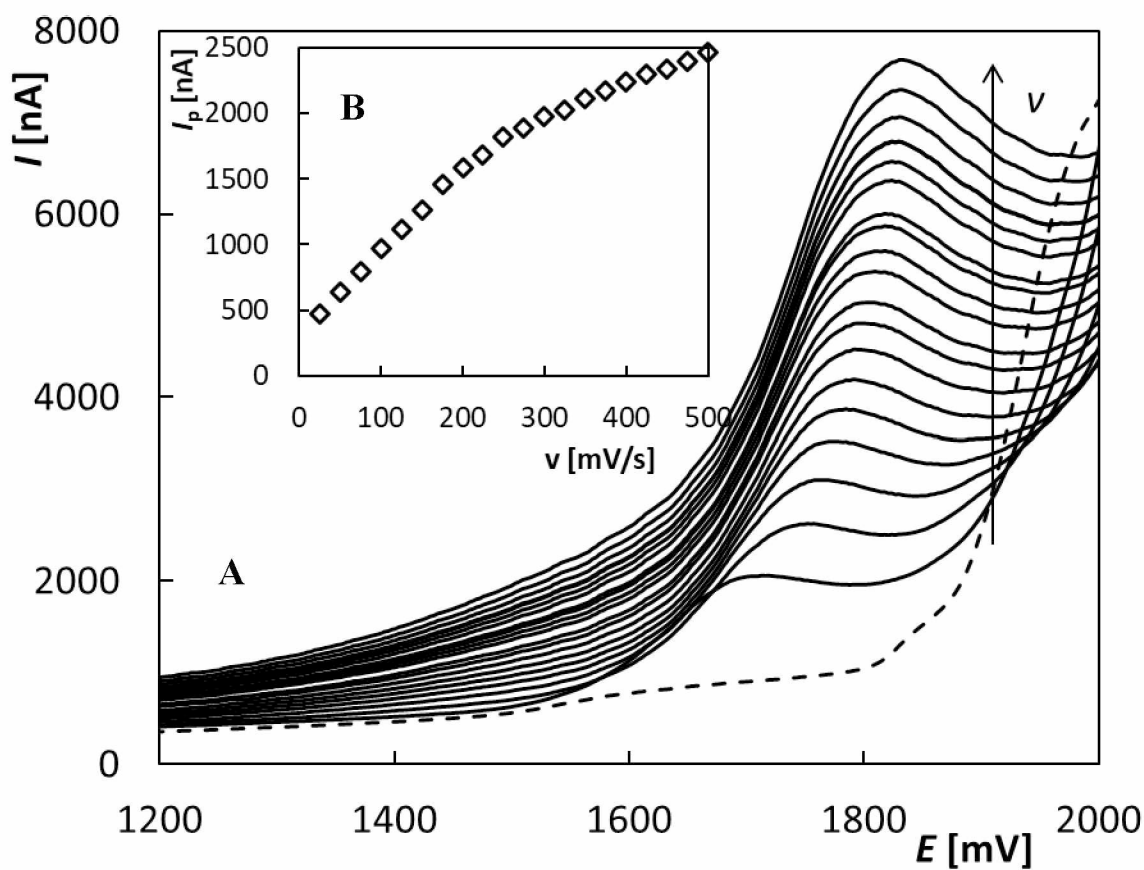
$$I_p[\text{nA}] = (120,8 \pm 2,4) (v[\text{mV/s}])^{1/2} + (-177 \pm 39), r = 993 \quad (4)$$

$$\log(I_p[\text{nA}]) = (0,582 \pm 0,013) \log(v[\text{mV/s}]) + (1,838 \pm 0,030), r = 0,993 \quad (5)$$



**Obrázek 16** Anodické části cyklických voltamogramů DFC zaznamenané na BDDE v závislosti na rychlosti polarizace (A), závislosti  $I_p$  na  $v$  (B) a  $I_p$  na  $v^{1/2}$  (C), logaritmičká závislost  $\log I_p$  na  $\log v$  (D)

Metoda – CV, elektrolyt –  $\text{HNO}_3$  (0,1 mol/l),  $E_{in} = -1000$  mV,  $E_{obratu} = +2500$  mV,  $v = 25\text{-}500$  mV/s,  $c(\text{DFC}) = 1 \times 10^{-5}$  mol/l



**Obrázek 17** Anodické části cyklických voltamogramů TBC zaznamenané na BDDE v závislosti na rychlosti polarizace (A), závislosti  $I_p$  na  $v$  (B) a  $I_p$  na  $v^{1/2}$  (C), logaritmičká závislost  $\log I_p$  na  $\log v$  (D)

Metoda – CV, elektrolyt –  $\text{HNO}_3$  (0,1 mol/l),  $E_{in} = -1000$  mV,  $E_{obratu} = +2500$  mV,  $v = 25\text{-}500$  mV/s,  $c(\text{TBC}) = 5 \times 10^{-5}$  mol/l

## 4.2. Vývoj metody stanovení

Vývoj metody stanovení DFC a TBC představoval další část náplně bakalářské práce. Z celé řady voltametrických metod byla vybrána diferenční pulzní voltmetrie (DPV). Tato metoda byla zvolena především díky své velice dobré citlivosti. Součástí kapitoly bude nejen optimalizace parametrů DPV pro stanovení uvedených fungicidů, ale rovněž testování možností předúpravy použité pracovní elektrody – BDDE.

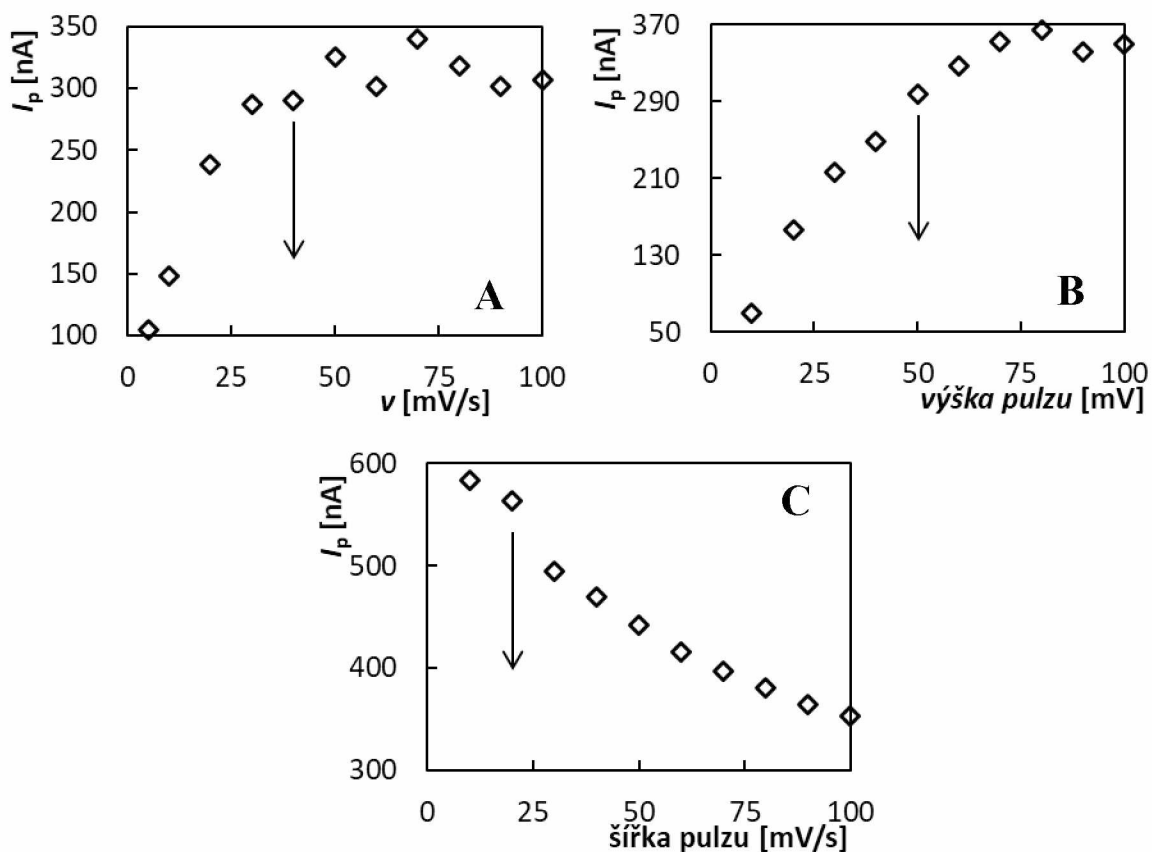
### 4.2.1. Optimalizace parametrů DPV

V rámci vývoje DPV metody byla optimalizována rychlost polarizace, šířka a výška pulzu. Měření probíhalo vždy v prostředí  $\text{HNO}_3$  o koncentraci 0,1 mol/l a koncentrace DFC i TBC během těchto experimentů byla  $5 \times 10^{-6}$  mol/l. Výsledné závislosti výšky píků na jednotlivých testovaných parametrech jsou uvedeny na obrázku 18 pro DFC a 19 pro TBC. Rychlost polarizace byla měněna po 10 mV/s v rozmezí od 10 do 100 mV, výška pulzu od +10 do +100 mV a šířka pulzu od 10 do 100 ms. Parametry, které nebyly v daném experimentu testovány, byly vždy udržovány konstantní. Konkrétní hodnoty jsou uvedeny v legendách k obrázkům 18 a 19.

Z obrázku 18A vyplývá, že s rostoucí hodnotou rychlosti polarizace narůstal proudový signál odpovídající oxidaci DFC, a to až do hodnoty 50 mV/s. Poté se již výška píku významně neměnila, ale docházelo k jeho deformaci a zhoršení vyhodnotitelnosti. Výška píku rostla také s rostoucí výškou pulzu (obrázek 18B). Při vyšších hodnotách se pík posouval k méně pozitivním hodnotám, ale zhoršoval se jeho tvar (obrázek 19A). Na obrázku 18C je uvedena závislost výšky píku na šířce pulzu, která má klesající trend. Nejvyšší pík byl pozorován při hodnotách 10 a 20 ms. Hodnoty jednotlivých parametrů zvolených jako optimální pro stanovení DFC na BDDE jsou shrnuty v tabulce 1.

*Tabulka 1 Optimalizované parametry DPV pro stanovení DFC a TBC s využitím BDDE*

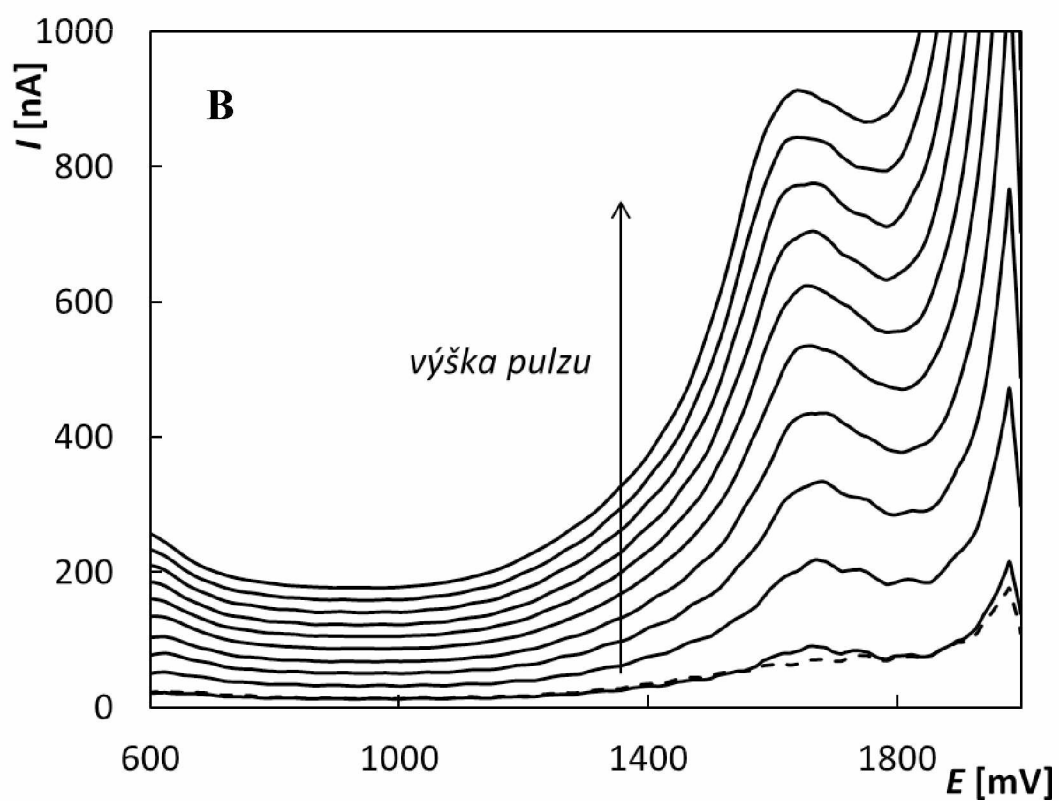
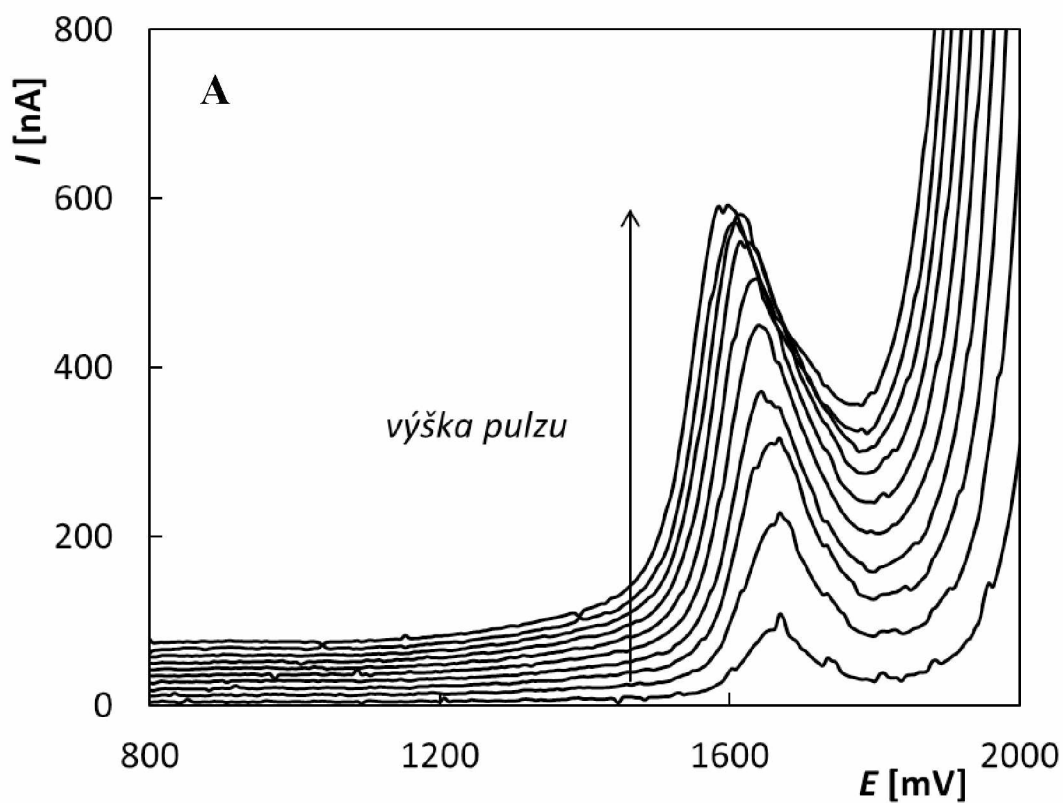
<b>parametr</b>	<b>DFC</b>	<b>TBC</b>
<i>v</i> [mV/s]	40	50
<i>výška pulzu</i> [mV]	+50	+60
<i>šířka pulzu</i> [ms]	20	10



**Obrázek 18** Optimalizace parametrů pro stanovení DFC: závislost  $I_p$  na  $v$  (A),  $I_p$  na výšce pulzu (B) a  $I_p$  na šířce pulzu (C)

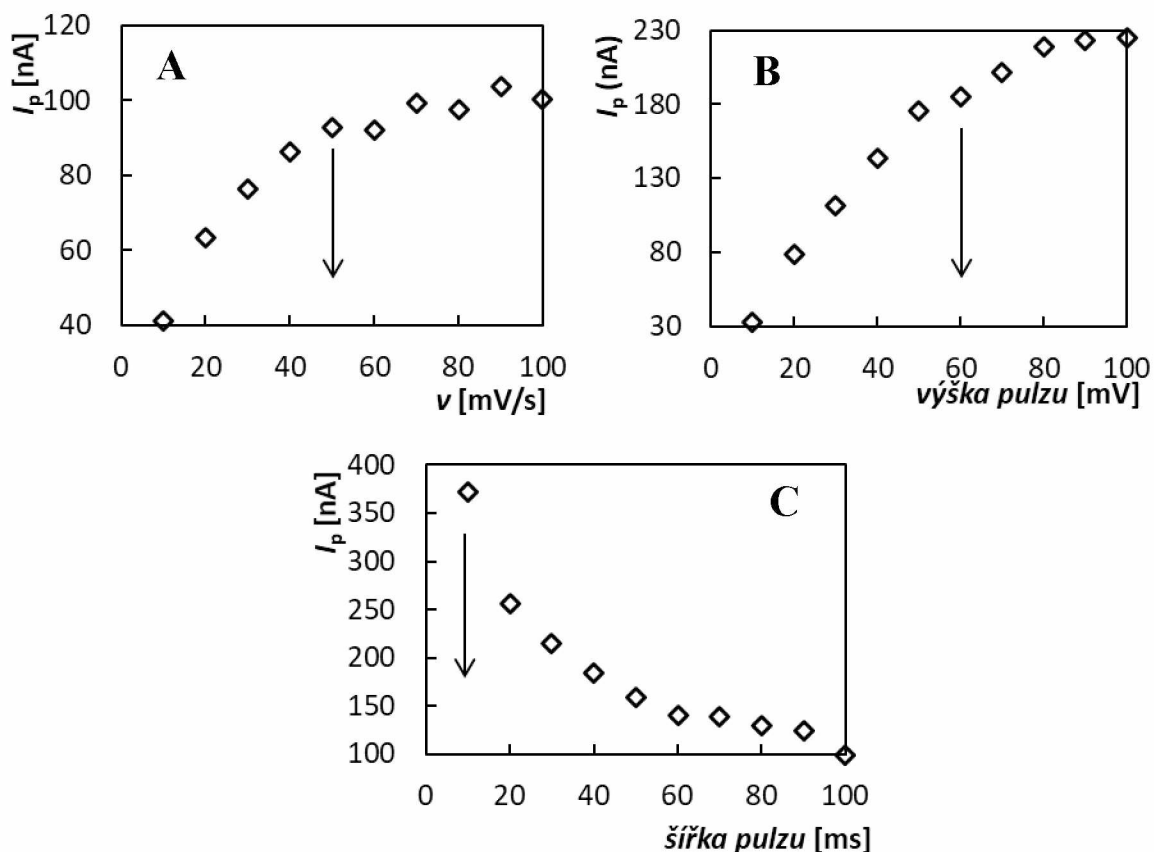
Metoda – DPV, elektrolyt –  $\text{HNO}_3$  (0,1 mol/l),  $E_{in} = 0$  mV,  $E_{fin} = +2000$  mV,  $v = 10$ -100 mV/s (A) a 40 mV/s (B, C), výška pulzu = +50 mV (A, C) a +10-+100 mV (B), šířka pulzu = 50 ms (A, B) a 10-100 ms (C),  $c(\text{DFC}) = 5 \times 10^{-6}$  mol/l

Při vývoji metody stanovení TBC narůstal proudový signál v závislosti na rychlosti polarizace obdobně jako při stanovení DFC, a to do hodnoty 50 mV/s. Tuto skutečnost znázorňuje obrázek 20A. Stejně tak rostla výška píku i s rostoucí výškou pulzu (obrázek 20B). Postupně ale docházelo k rozšíření píků a narůstal rovněž vliv rozkladu základního elektrolytu, který vedl ke zhoršení vyhodnotitelnosti signálu, jak ukazuje obrázek 19B. Závislost výšky píku na šířce pulzu je uvedena na obrázku 20C, kde lze vidět, že s rostoucí šířkou pulzu výška píku velmi rychle klesá. Zvolené hodnoty jednotlivých parametrů pro stanovení TBC na BDDE jsou opět uvedeny v tabulce 1.



**Obrázek 19** DPV voltamogramy DFC (A) a TBC (B) zaznamenané na BDDE v závislosti na výšce pulzu

Metoda – DPV, elektrolyt –  $\text{HNO}_3$  (0,1 mol/l),  $E_{in} = 0$  mV,  $E_{fin} = +2000$  mV,  $v = 40$  mV/s (A) a 50 mV/s (B), výška pulzu = +10-+100 mV, šířka pulzu = 50 ms,  $c(\text{DFC}) = c(\text{TBC}) = 5 \times 10^{-6}$  mol/l



**Obrázek 20** Optimalizace parametrů pro stanovení TBC: závislost  $I_p$  na  $v$  (A),  $I_p$  na výšce pulzu (B) a  $I_p$  na šířce pulzu (C)

Metoda – DPV, elektrolyt –  $\text{HNO}_3$  (0,1 mol/l),  $E_{in} = 0$  mV,  $E_{fin} = +2000$  mV,  $v = 10$ -100 mV/s (A) a 50 mV/s (B, C), výška pulzu = +50 mV (A.), +10-+100 mV (B) a +60 mV (C), šířka pulzu = 50 ms (A, B) a 10-100 ms (C),  $c(\text{TBC}) = 5 \times 10^{-6}$  mol/l

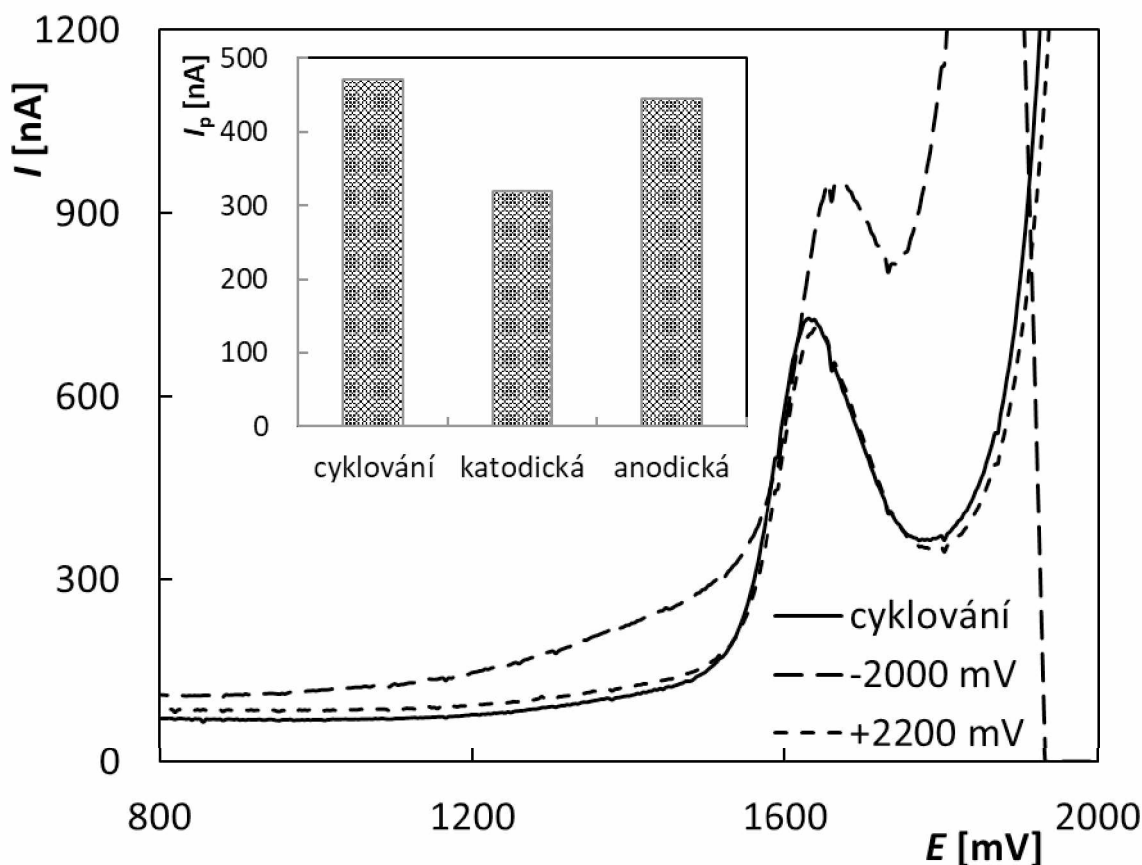
#### 4.2.2. Předúprava BDDE

Literatura uvádí, že povrch BDDE lze různými způsoby aktivovat, příkladem může být aktivace vodní parou [30], anodická nebo katodická předúprava [31]. Vhodně zvolený postup předúpravy povrchu BDDE může vést ke zlepšení citlivosti nebo opakovatelnosti měření. V této práci byly testovány 4 způsoby předúpravy: katodická předúprava, anodická předúprava, cyklování a leštění na alumině. Po provedení konkrétního postupu předúpravy byl vždy změřen DP voltamogram v roztoku DFC, resp. TBC o koncentraci  $5 \times 10^{-6}$  mol/l při nastavených optimalizovaných parametrech.

Pro stanovení DFC byly testovány pouze 3 z výše uvedených postupů, a to katodická a anodická předúprava a cyklování. Katodická předúprava probíhala při potenciálu  $-2000$  mV



po dobu 300 s. Anodická předúprava představovala vložení potenciálu +2200 mV také na dobu 300 s. V případě cyklování byla použita CV, bylo změřeno 20 cyklických voltamogramů v rozsahu potenciálů -1000 až +2200 mV. Rychlost polarizace byla 100 mV/s. Z obrázku 21 je zřejmé, že obdobný dobře vyvinutý signál byl získán po cyklování a anodické předúpravě. Katodická předúprava vedla ke zvýšení pozadí, a hlavně k zúžení využitelného potenciálového okna, což způsobilo výrazné zhoršení vyhodnotitelnosti signálu.

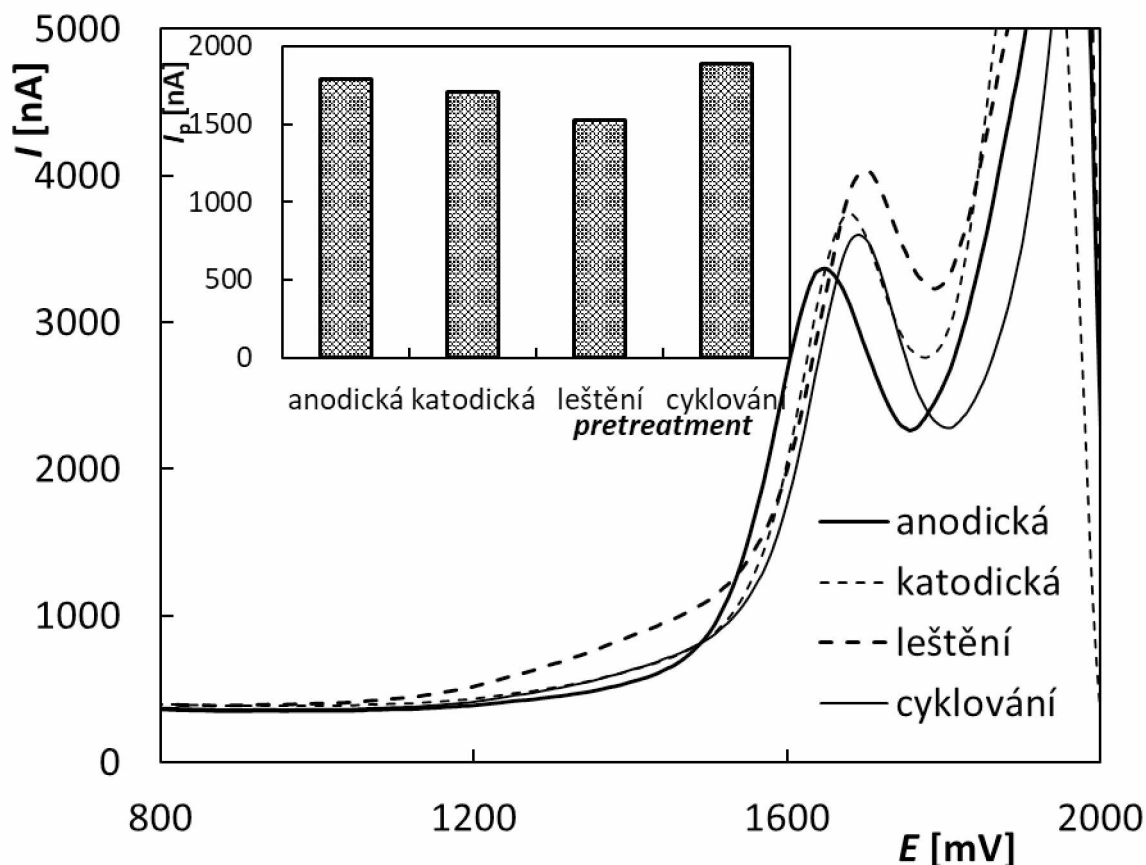


**Obrázek 21** DP voltamogramy DFC zaznamenané na BDDE v závislosti na předúpravě elektrody

*Metoda – DPV, elektrolyt –  $HNO_3$  (0,1 mol/l),  $E_{in} = 0$  mV,  $E_{fin} = +2000$  mV,  $v = 40$  mV/s, výška pulzu = +50 mV, šířka pulzu = 20 ms,  $c(DFC) = 5 \times 10^{-6}$  mol/l; vložena závislost  $I_p$  na postupu předúpravy*

V případě TBC bylo navíc testováno leštění BDDE na alumině jako další možnost aktivace povrchu. Jak je vidět na obrázku 22, tento způsob nepřinesl lepší výsledky a stejně jako u DFC byl nejvyšší pík zaznamenaný po cyklování. Proto bylo cyklování zvoleno jako vhodný způsob předúpravy povrchu BDDE před měřením pro oba analyzované fungicidy. Následně bylo zjištěno, že stačí zařadit tento proces pouze na začátek práce a mezi

jednotlivými měřeními již není třeba elektrodu nijak regenerovat ani aktivovat. To, že nebyly pozorovány žádné problémy s pasivací povrchu BDDE lze doložit velmi nízkými hodnotami relativních směrodatných odchylek z 11 opakovaných měření při koncentraci analytů  $5 \times 10^{-6}$  mol/l v polarografické nádobce. Hodnoty RSD(11) pro obě látky jsou uvedeny v tabulce 2.



**Obrázek 22** DP voltamogramy TBC zaznamenané na BDDE v závislosti na předúpravě elektrody

Metoda – DPV, elektrolyt –  $\text{HNO}_3$  (0,1 mol/l),  $E_{in} = 0$  mV,  $E_{fin} = +2000$  mV,  $v = 50$  mV/s, výška pulzu = +60 mV, šířka pulzu = 10 ms,  $c(\text{DFC}) = 5 \times 10^{-6}$  mol/l; vložena závislost  $I_p$  na postupu předúpravy

**Tabulka 2** Výsledky opakovatelnosti měření DFC a TBC o koncentraci  $5 \times 10^{-6}$  mol/l po cyklování

	DFC	TBC
RSD(11) [%]	0,52	1,72

### 4.3. Analýza modelových roztoků

#### 4.3.1. Koncentrační závislosti v modelových roztocích a v říční vodě

Pro testování navržené metody stanovení DFC a TBC byly analyzovány modelové roztoky o známé koncentraci analytů. Bylo proměřeno několik závislostí v různých koncentračních rozmezech pro oba fungicidy. Na obrázku 23A je uveden příklad koncentrační závislosti pro DFC v rozsahu koncentrací  $1 \times 10^{-6}$ – $7 \times 10^{-6}$  mol/l. Z vložené závislosti je vidět, že výška píku s koncentrací roste lineárně, což potvrzuje i rovnice (6) s příslušným korelačním koeficientem. Z nejnižší změřené koncentrační závislosti ( $2 \times 10^{-7}$ – $1 \times 10^{-6}$  mol/l) pro DFC byly vypočteny parametry LOD a LOQ, které jsou uvedeny v tabulce 3. Poté byly pro DFC proměřeny obdobné koncentrační závislosti i v říční vodě. Na obrázku 23B je uveden příklad pro rozsah koncentrací  $5 \times 10^{-7}$ – $4,5 \times 10^{-6}$  mol/l. Vynesená závislost výšky píku na koncentraci DFC v říční vodě je opět lineární a popisuje ji rovnice (7). I pro stanovení DFC v říční vodě byly vypočítány parametry LOD a LOQ (tabulka 3). Ukázalo se, že dosažené hodnoty v říční vodě jsou jen nepatrně vyšší než pro modelové roztoky připravené v destilované vodě.

$$I_p[\text{nA}] = (94,1 \pm 1,3) c[\mu\text{mol/l}] + (2,2 \pm 6,0), r = 0,999 \quad (6)$$

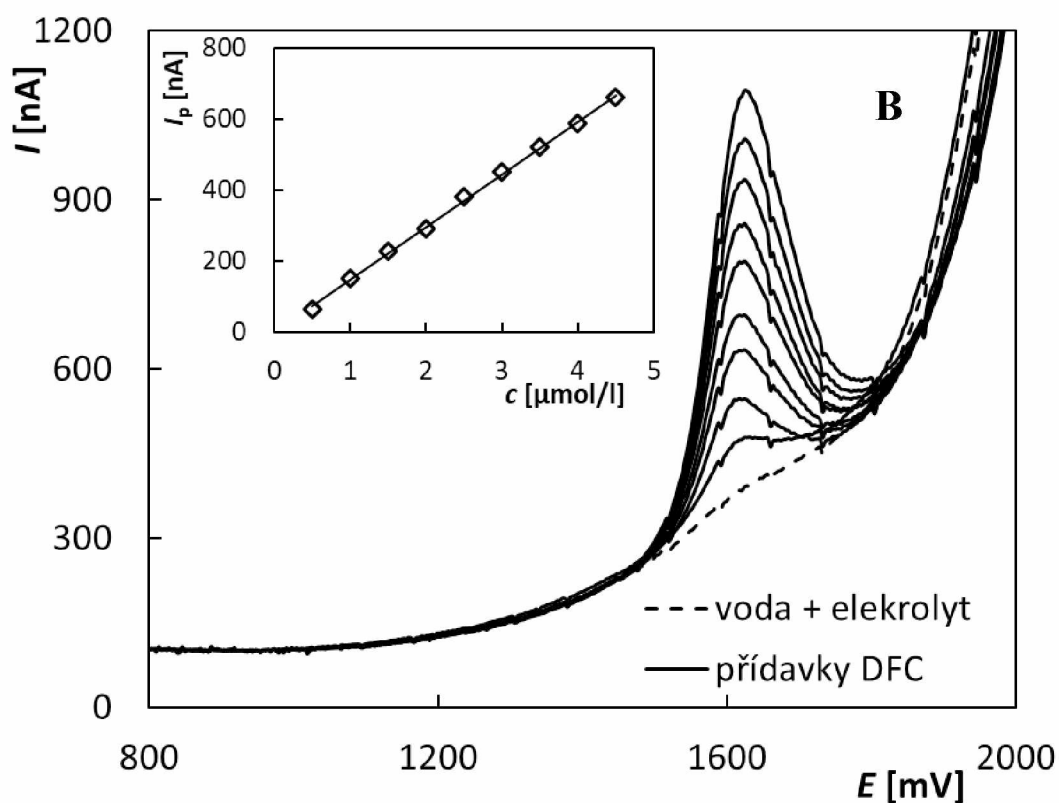
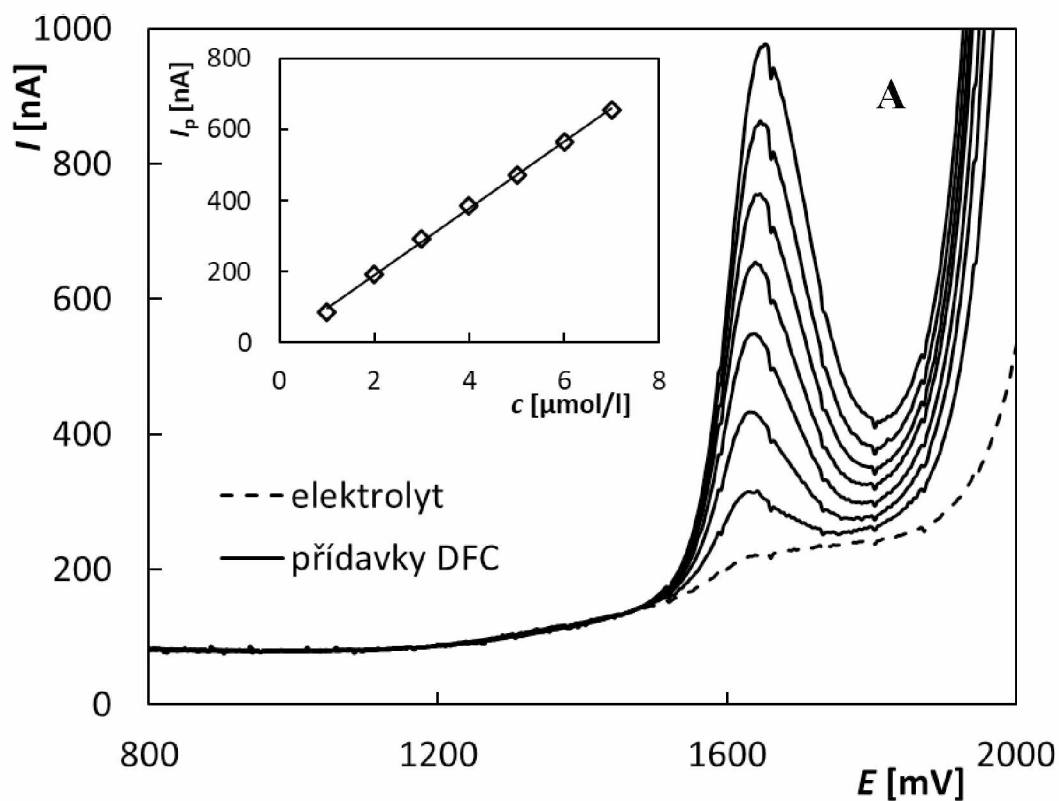
$$I_p[\text{nA}] = (148,1 \pm 1,8) c[\mu\text{mol/l}] + (-0,4 \pm 5,0), r = 0,999 \quad (7)$$

*Tabulka 3 Shrnutí statistických parametrů pro stanovení DFC a TBC*

		LOD [mol/l]	LOQ [mol/l]	LDR [mol/l]
DFC	modelový roztok	$3,4 \times 10^{-8}$	$1,1 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-8}$ – $1,0 \times 10^{-4}$
	říční voda	$1,0 \times 10^{-7}$	$3,4 \times 10^{-7}$	---
TBC	modelový roztok	$1,4 \times 10^{-7}$	$4,7 \times 10^{-7}$	$5,0 \times 10^{-7}$ – $1,0 \times 10^{-4}$

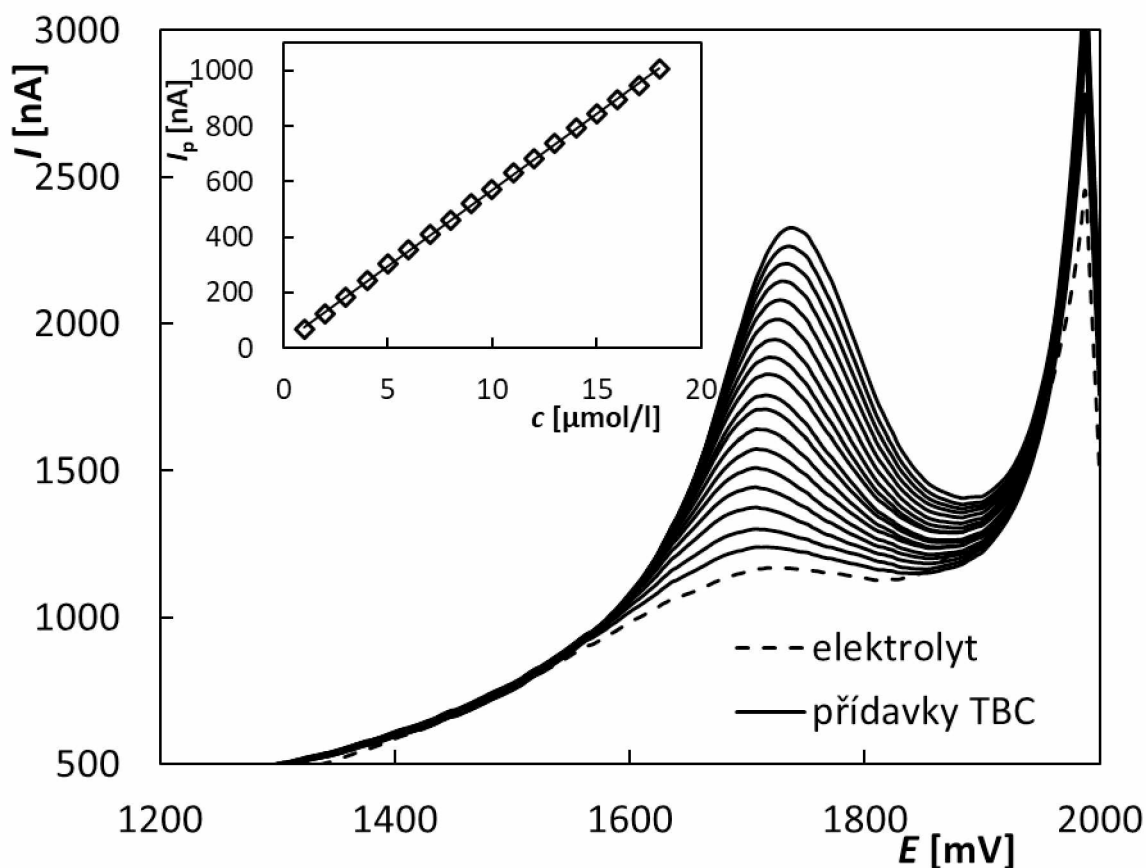
Příklad koncentrační závislosti pro TBC v modelovém roztoku v rozmezí koncentrací  $1 \times 10^{-6}$  –  $1,8 \times 10^{-5}$  mol/l je uveden na obrázku 24. I v tomto případě lze říci, že je závislost výšky píku na koncentraci TBC lineární a může být charakterizována rovnicí (8). Vypočtené statistické parametry pro stanovení TBC na BDDE s využitím DPV jsou opět uvedeny v tabulce 3.

$$I_p[\text{nA}] = (54,88 \pm 0,24) c[\mu\text{mol/l}] + (22,3 \pm 2,6), r = 0,999 \quad (8)$$



**Obrázek 23** Koncentrační závislosti DFC změřené na BDDE v modelovém roztoku (A) a říční vodě (B)

Metoda DPV, elektrolyt  $\text{HNO}_3$  (0,1 mol/l),  $E_{in} = 0$  mV,  $E_{fin} = +2000$  mV,  $v = 40$  mV/s, výška pulzu +50 mV, šířka pulzu 20 ms,  $c_{DFC} = 1 \times 10^{-6} - 7 \times 10^{-6}$  mol/l (A) a  $5 \times 10^{-7} - 4,5 \times 10^{-6}$  mol/l



**Obrázek 24** Koncentrační závislost TBC zaznamenaná na BDDE v modelovém roztoku

Metoda DPV, elektrolyt  $\text{HNO}_3$  (0,1 mol/l),  $E_{in} = 0$  mV,  $E_{fin} = +2000$  mV,  $v = 50$  mV/s, výška pulzu +60 mV, šířka pulzu 10 ms,  $c_{TBC} = 1 \times 10^{-6}$  -  $1,8 \times 10^{-5}$  mol/l

#### 4.3.2. Opakované stanovení DFC a TBC

Použitelnost navržených metod stanovení DFC a TBC byla ověřena opakovaným stanovením obou fungicidů v modelových roztocích a říční vodě. Pro oba fungicidy byla zvolena konkrétní koncentrace, která byla stanovena metodou přidavku standardního roztoku. Stanovení bylo vždy  $5 \times$  zopakováno a potom byly vypočteny průměrné koncentrace analytů s příslušnými intervaly spolehlivosti, hodnoty relativní směrodatné odchylky pro 5 opakovaných stanovení a výtěžnost.

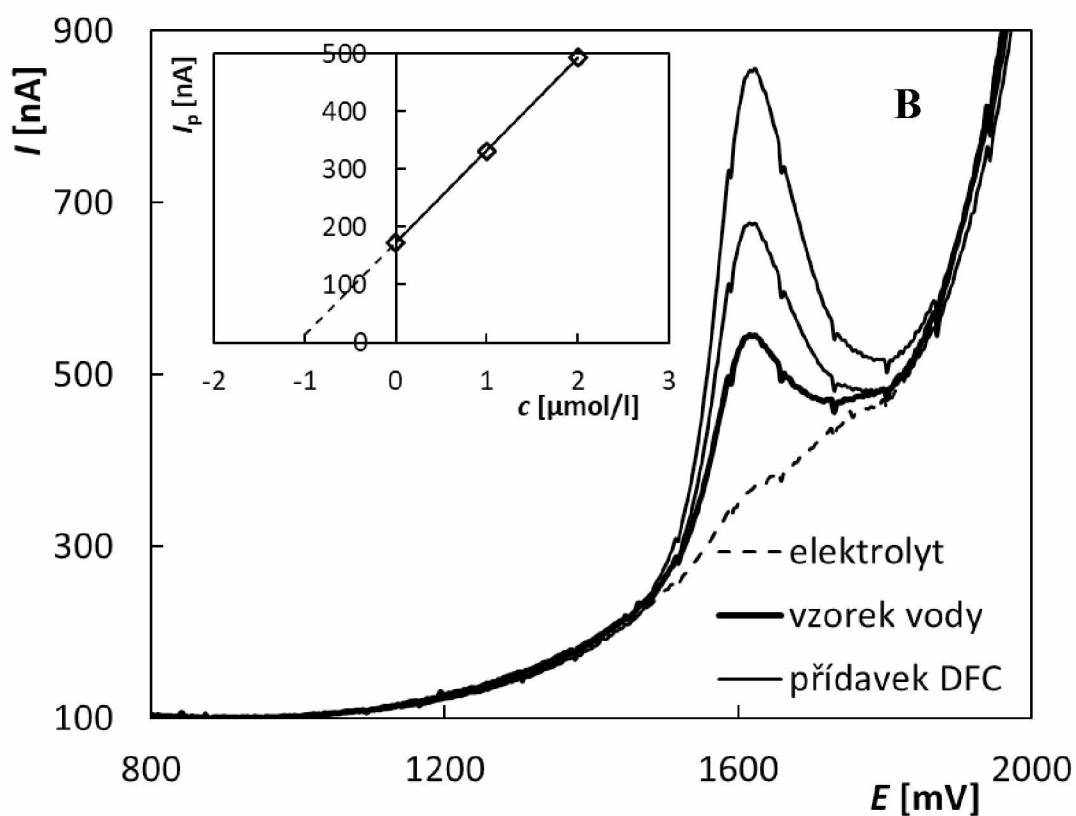
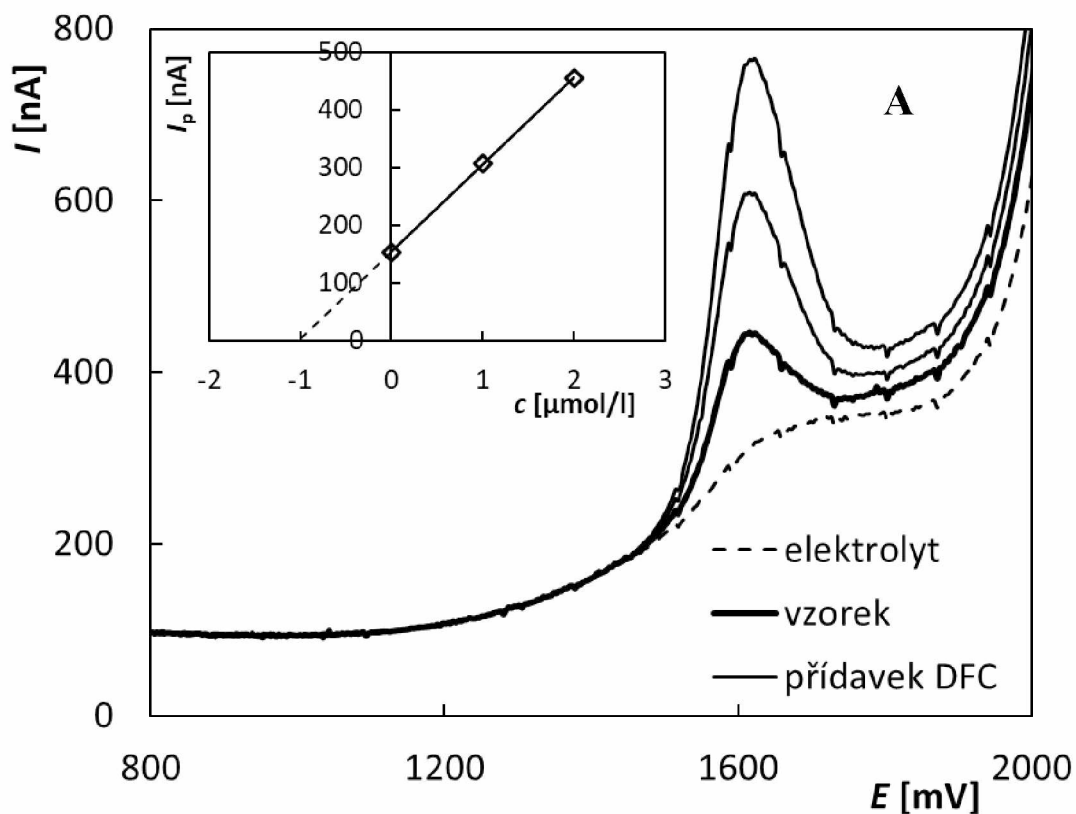
DFC byl stanovován v modelovém roztoku o koncentraci  $1 \times 10^{-6}$  mol/l. Příklad jedné z analýz je uveden na obrázku 25A, a to včetně grafického vyhodnocení metody přidavku standardu. Opakované stanovení DFC v říční vodě probíhalo při stejné koncentraci jako v modelovém roztoku. Postup přípravy říční vody k analýze a vlastní analýzy je uveden

v kapitole 2.3.2. *Analýza říční vody a pesticidních přípravků*. Příklad získaných voltamogramů z analýzy říční vody je uveden na obrázku 25B. Získané výsledky jsou shrnuty v tabulce 4 a svědčí o tom, že vyvinutá metoda pro stanovení DFC umožňuje získat správné a dobře opakovatelné výsledky.

**Tabulka 4** Statistické parametry opakovaného stanovení DFC a TBC

		dáno [mol/l]	stanoveno [mol/l]	výtěžnost [%]	RSD(5) [%]
DFC	modelový roztok	$1,0 \times 10^{-6}$	$(1,000 \pm 0,013) \times 10^{-6}$	97-102	2,0
	říční voda	$1,0 \times 10^{-6}$	$(1,020 \pm 0,031) \times 10^{-6}$	96-107	4,6
TBC	modelový roztok	$5,0 \times 10^{-6}$	$(4,961 \pm 0,061) \times 10^{-6}$	98-102	1,8
		$1,0 \times 10^{-5}$	$(1,016 \pm 0,017) \times 10^{-5}$	97-103	2,5
	říční voda	$5,0 \times 10^{-6}$	$(4,956 \pm 0,052) \times 10^{-6}$	96-101	1,6

TBC byl opakovaně stanovován v modelových roztocích o koncentracích  $5 \times 10^{-6}$  a  $1 \times 10^{-5}$  mol/l. Opět byla použita metoda přidavku standardního roztoku o známé koncentraci, byly přidány minimálně 2 přidavky a stanovení bylo vždy opakováno pětkrát. V říční vodě byl TBC stanovován při koncentraci  $5 \times 10^{-6}$  mol/l. I v tomto případě jsou vypočtené statistické parametry uvedeny v tabulce 4. Z uvedených hodnot lze soudit, že vyvinutá metoda poskytuje správné a přesné výsledky. O dobré opakovatelnosti stanovení svědčí hodnoty RSD vypočítané pro 5 stanovení, které byly ve všech případech  $< 5 \%$ .



**Obrázek 25** Stanovení DFC v modelovém roztoku (A) a v říční vodě (B)

Metoda DPV, elektrolyt  $\text{HNO}_3$  (0,1 mol/l),  $E_{in} = 0$  mV,  $E_{fin} = +2000$  mV,  $v = 40$  mV/s, výška pulzu +50 mV, šířka pulzu 20 ms,  $c_{DFC} = 1 \times 10^{-6}$  mol/l, přídavek standardu:  $V = 15$   $\mu\text{l}$ ,  $c = 0,001$  mol/l

#### 4.4. Interferenční studie

Aby bylo možné spolehlivě stanovit DFC a TBC v reálných vzorcích, byla provedena interferenční studie. Vždy byl nejprve proměřen roztok elektrolytu, do kterého byl následně pipetován přírůstek konkrétního fungicidu ( $c_{DFC} = 1 \times 10^{-6}$  mol/l,  $c_{TBC} = 5 \times 10^{-6}$  mol/l). Takto obohacený roztok byl také proměřen a dále byly postupně přidávány přírůstky potenciálního interferentu, nejprve o koncentraci desetkrát menší, než byla koncentrace analytu (1:0,1), potom o stejné koncentraci (1:1) a na závěr o koncentraci desetkrát větší (1:10). Po každém přírůstku byl změřen voltamogram. Celkem bylo studováno 10 možných interferujících látek. Jejich přehled je uveden tabulce 5 spolu s dosaženými výsledky. Tabulka shrnuje změny výšky píku obou studovaných fungicidů v přítomnosti jednotlivých interferentů v procentech. Látka byla považována za interferující v případě, že tato změna přesáhla 5 %.

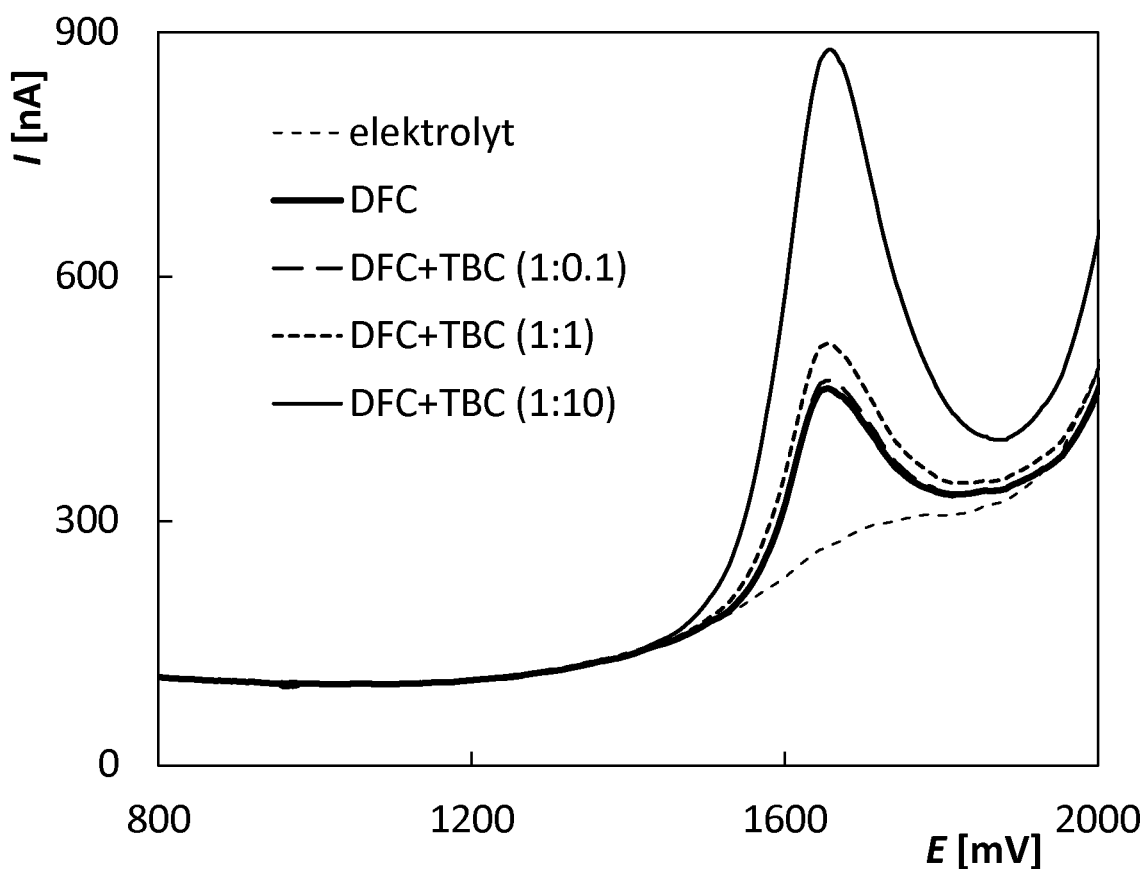
*Tabulka 5 Výsledky interferenční studie pro stanovení DFC a TBC v přítomnosti vybraných pesticidů*

Interferent	$c_{DFC}:c_{interferent}$			$c_{TBC}:c_{interferent}$		
	1:0,1	1:1	1:10	1:0,1	1:1	1:10
Cyprokonazol	+2,5	+1,3	-58,2	-1,7	-44,8	---
Propikonazol	+3,6	+2,5	-13,4	-1,6	-2,5	-32,3
Epoxikonazol	+0,1	-0,9	-59,8	+0,8	-3,1	-89,2
Tebukonazol	+3,4	+22,5	+186,1			
Difenokonazol				+8,1	+161,8	+1046,4
Azoxystrobin	+3,6	-0,5	-34,6	+0,9	-8,0	-79,1
Imidakloprid	-4,7	-3,9	-3,9	-3,9	-4,2	+5,1
Chlorpyrifos	+3,1	-2,7	-19,4	+1,8	-2,8	-35,2
Pymetrozin	-2,1	+7,9	+82,7	+4,1	+27,9	+332,1
Glyfosát	-0,7	+1,4	-0,3	-0,4	+2,6	-2,4
Tribenuron	+2,1	+2,1	+1,4	+0,5	-0,1	-10,1

V horní části tabulky jsou uvedeny další vybrané látky ze skupiny triazolových fungicidů. Zahrnutý jsou i DFC a TBC. Jak je vidět, tak k významnému vzájemnému ovlivnění dochází mezi DFC a TBC, jejichž oxidační píky leží při velice blízkých hodnotách potenciálu. Tato interference je ilustrována na obrázku 26. Tyto dva fungicidy se ale spolu ve směsích v komerčně dostupných přípravcích obvykle nevyskytují. Ostatní testované azolové



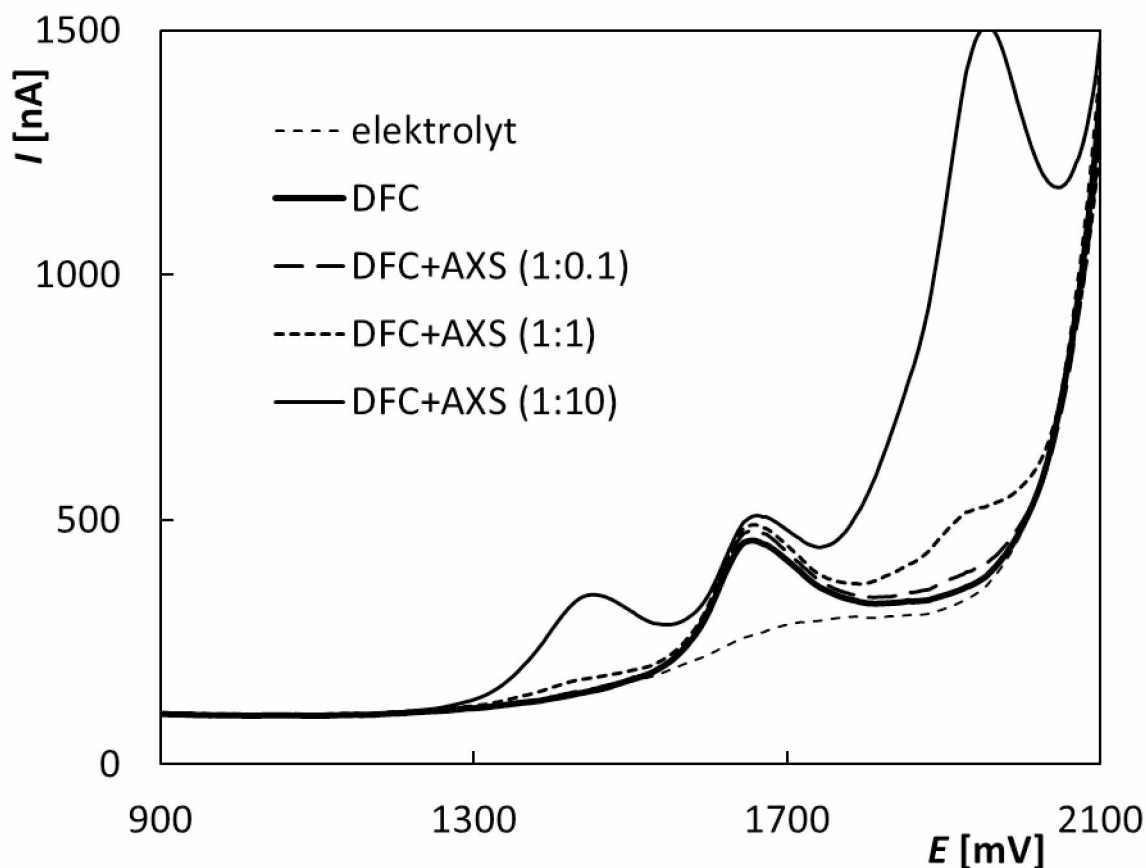
fungicidy ovlivňují signál DFC, resp. TBC až při velkém nadbytku, a tudíž pro analýzu reálných vzorků jejich přítomnost nevadí. Pokud se vyskytují ve směsných přípravcích, pak obvykle v koncentracích srovnatelných s DFC nebo TBC.



**Obrázek 26** Vliv přidavků TBC na oxidační signál DFC

*Metoda DPV, elektrolyt  $\text{HNO}_3$  (0,1 mol/l),  $E_{in} = 0$  mV,  $E_{fin} = +2000$  mV,  $v = 40$  mV/s, výška pulzu +50 mV, šířka pulzu 20 ms,  $c_{DFC} = 1 \times 10^{-6}$  mol/l,  $c_{TBC} = 1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  a  $1 \times 10^{-5}$  mol/l*

Do interferenční studie byly rovněž zahrnuty některé další pesticidní látky, které se mohou používat při ošetření stejných plodin jako DFC. Výsledky pro tyto látky jsou uvedeny v dolní polovině tabulky. Většina z nich neinterferuje nebo jako v případě pymetrozinu nebo chlorpyrifosu opět až ve významném nadbytku. Z hlediska analýzy reálných komerčně dostupných fungicidních přípravků je významná interference azoxystrobinu (AXS), který se běžně vyskytuje ve směsných přípravcích s DFC. DPV voltamogramy zaznamenané pro DFC v přítomnosti AXS jsou uvedeny na obrázku 27. AXS poskytuje 2 anodické píky kolem potenciálů +1460 a +1930 mV. Jak je vidět na obrázku, i AXS významně ovlivňuje signál DFC až ve významném nadbytku, který v dostupných přípravcích není.

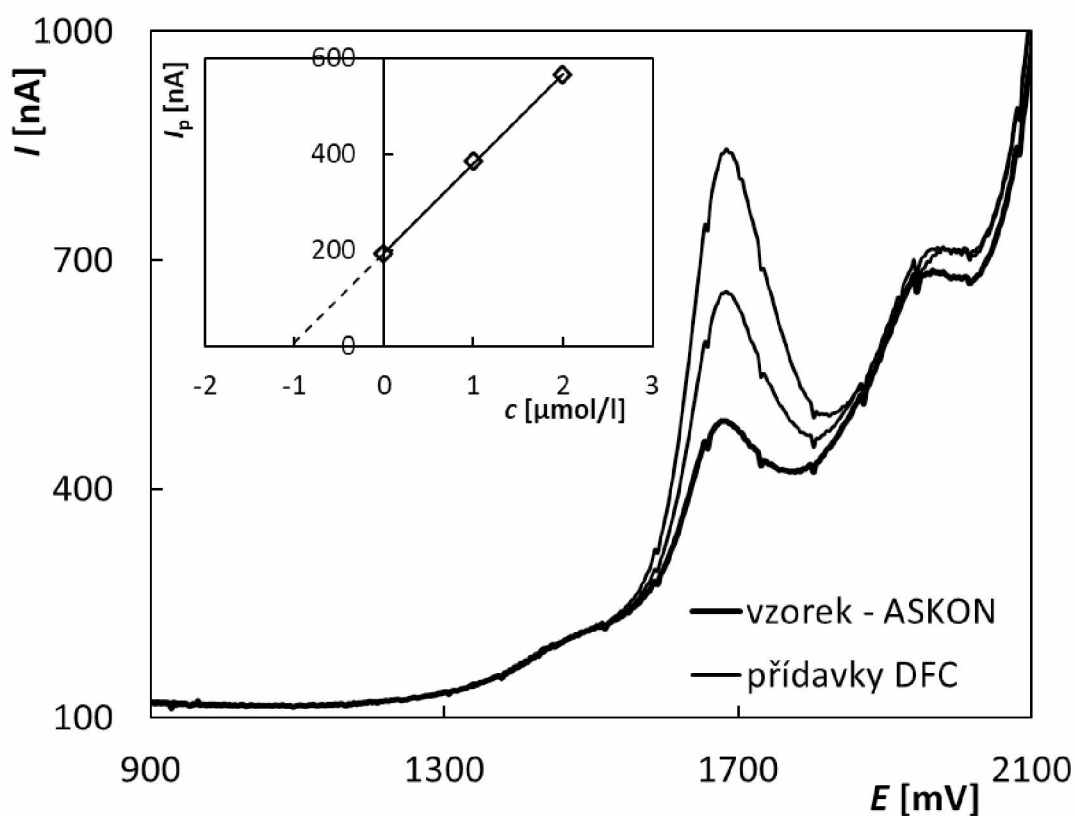
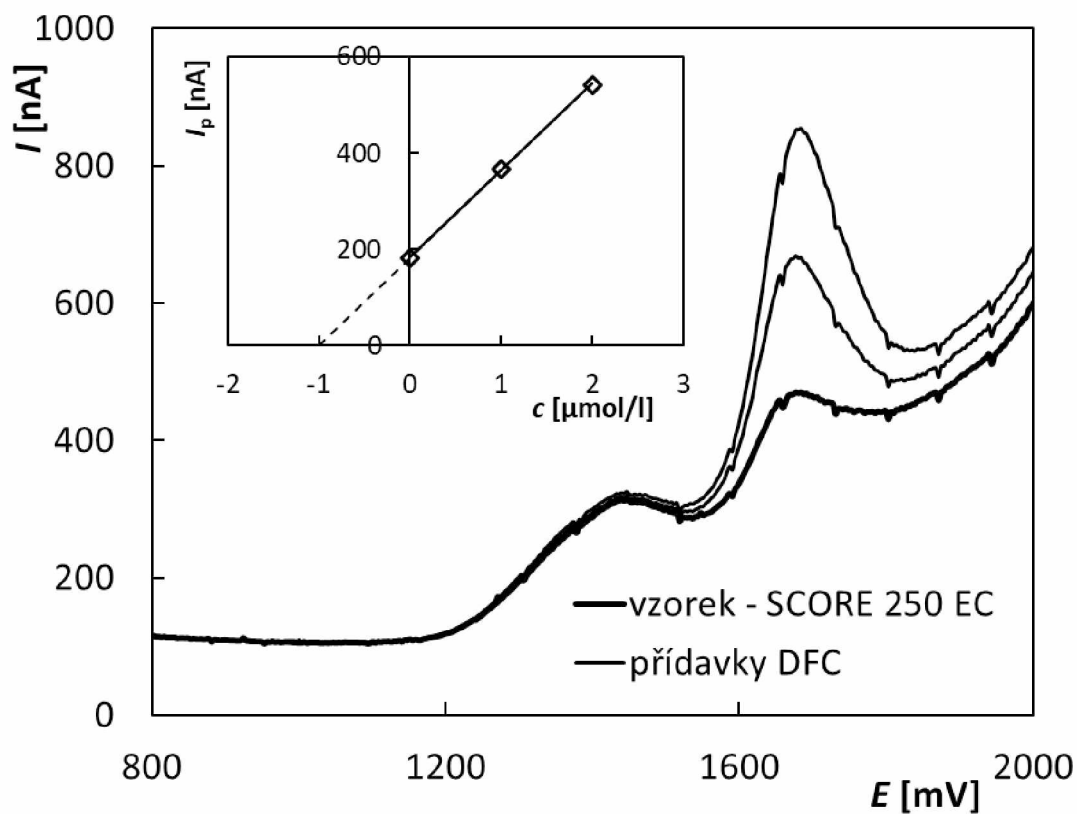


**Obrázek 27** Vliv přídavků AXS na oxidační signál DFC

Metoda DPV, elektrolyt  $\text{HNO}_3$  (0,1 mol/l),  $E_{in} = 0$  mV,  $E_{fin} = +2000$  mV,  $v = 40$  mV/s, výška pulzu +50 mV, šířka pulzu 20 ms,  $c_{DFC} = 1 \times 10^{-6}$  mol/l,  $c_{AXS} = 1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  a  $1 \times 10^{-5}$  mol/l

#### 4.5. Analýza praktického vzorku

Oba fungicidy (DFC a TBC) byly na závěr stanovovány v komerčně dostupných pesticidních přípravcích. Podrobný postup analýz je popsán v experimentální části v kapitole 2.3.2. *Analýza říční vody a pesticidních přípravků*. Byly analyzované dva přípravky obsahující DFC. Přípravek SCORE 250 EC obsahuje pouze DFC jako jedinou účinnou látku, a to v koncentraci 250 g/l (deklarováno výrobcem). Přípravek ASKON obsahuje směs dvou fungicidů DFC (125 g/l) a AXS (200 g/l). Analyzovaný přípravek s TBC jako účinnou látkou Horizon 250 EW podle výrobce obsahuje 250 g/l TBC. Stanovení obou fungicidů bylo provedeno metodou přídavku standardního roztoku, bylo vždy 5x zopakováno a byly vypočteny základní statistické parametry. Na obrázku 28 jsou uvedeny příklady analýz přípravků SCORE 250 EC a ASKON. Výsledky získané pro všechny přípravky jsou uvedeny v tabulce 6.



**Obrázek 28** Stanovení DFC v pesticidních přípravcích SCORE 250 EC (A) a ASKON (B)

Metoda DPV, elektrolyt  $\text{HNO}_3$  (0,1 mol/l),  $E_{in} = 0$  mV,  $E_{fin} = +2000$  mV,  $v = 40$  mV/s, výška pulzu +50 mV, šířka pulzu 20 ms, přidavek standardu:  $V = 15$   $\mu\text{l}$ ,  $c = 0,001$  mol/l

**Tabulka 6** Výsledky analýzy komerčně dostupných pesticidních přípravků

	Deklarováno [g/l]	Stanoveno [g/l]	RSD <sub>5</sub> [%]
ASKON (DFC)	125	126,3±2,9	3,5
SCORE 250 EC (DFC)	250	251,4±8,3	4,9
Horizon 250 EW (TBC)	250	247,9±8,3	5,0

Stanovené koncentrace odpovídají koncentracím deklarovaným výrobcí, a to i v případě směšného přípravku ASCON, kde nebyl pozorován rušivý vliv AXS. I relativní směrodatná odchylka pro 5 opakovaných analýz svědčí o dobré opakovatelnosti stanovení DFC i TBC ve složité matrici reálných přípravků ( $RSD(5) \leq 5$ ).

Na závěr lze říci, že navržené metody jsou vhodné pro analýzu nejen modelových roztoků, ale i reálných vzorků jak říční vody, tak komerčně dostupných přípravků na ošetření rostlin. Metody poskytují správné a velmi dobře opakovatelné výsledky.

## 5. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo vyvinout jednoduchou a rychlou voltametrickou metodu pro stanovení fungicidů difenoconazolu a tebuconazolu.

Jako pracovní elektroda byla vzhledem ke svým vynikajícím elektrochemickým vlastnostem vybrána elektroda z borem dopovaného diamantu. Pro studium voltametrického chování DFC a TBC byla použita cyklická voltametrie. Bylo zjištěno, že oba fungicidy poskytují 1 oxidační signál okolo potenciálu +1700 mV. Ve směsi tedy tyto dva fungicidy nelze rozlišit. V komerčně dostupných přípravcích se však společně nevyskytují. Redukční signál na katodické křivce ani v jednom případě pozorován nebyl. Jedná se tedy o ireverzibilní reakce. Na základě provedené studie vlivu pH prostředí na voltametrické chování obou látek byl jako vhodný elektrolyt vybrán roztok  $\text{HNO}_3$  o koncentraci 0,1 mol/l, tedy kyselé prostředí, ve kterém obě látky poskytovali nejlepší oxidační signál.

Pro vlastní vývoj metody stanovení obou látek byla použita diferenční pulzní voltametrie. Nejprve byly vždy optimalizovány parametry této metody pro DFC i TBC a poté byly testovány různé možnosti předúpravy povrchu BDDE, a jejich vliv na sledované signály. Jako nejvhodnější způsob aktivace elektrody se ukázalo cyklování, tedy proměření 20 cyklických voltamogramů v rozsahu potenciálů  $-1000$ - $+2200$  mV při rychlosti polarizace 100 mV/s. Během práce mezi jednotlivými měřeními již nebyla nutná žádná aktivace nebo regenerace elektrody, protože nebyly pozorovány žádné problémy s pasivací.

Vyvinuté metody byly úspěšně aplikovány při analýze modelových roztoků, říční vody i komerčně dostupných přípravků k ochraně rostlin. Na základě dosažených výsledků lze říci, že BDDE je vhodnou elektrodou pro stanovení DFC a TBC a ve spojení s DPV umožňuje jejich správné, přesné a velmi dobře opakovatelné stanovení jak v modelových roztocích, tak ve vzorcích se složitější maticí.

## Seznam literatury

1. Hu B., Sun D. V., Pu H., Wei Q.: Rapid nondestructive detection of mixed pesticides residues on fruit surface using SERS combined with self-modeling mixture analysis method. *Talanta*. 2020, 217(2), 449-462.
2. Nollet L. M. L., Rathore H. S.: Handbook of Pesticides. USA: CRC Press, 1998. ISBN 0-8493-2447-5.
3. Mazur Ch. S., Kenneke J. F.: Cross-Species Comparison of Conazole Fungicide Metabolites Using Rat and Rainbow Trout (*Onchorhynchus mykiss*) Hepatic Microsomes and Purified Human *CYP 3A4*. *Environ. Sci. Technol.* 2008, 42(3), 947-954.
4. Triazole fungicides. In: *Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority* [online]. Sydney, Austrálie: Australian Government, 3. 12. 2015n. 1. [cit. 2020-07-21]. Dostupné z: <https://apvma.gov.au/node/19371>
5. Zhuang S. L., Bao L. L., Wang H. F., Zhang M., Yang Ch., Zhou X. Y., Wu Y., Rehman K., Naranmandura H.: The Involvement of ER-stress and ROS Generation in Difenconazole-Induced Hepatocellular Toxicity. *Toxicology Research*. 2015, 4(5), 1195-1203.
6. Goetz A. K., Dix D. J., Wang H. F.: Mode of Action for Reproductive and Hepatic Toxicity Inferred from a Genomic Study of Triazole Antifungals. *Toxicological Sciences*. 2009, 110(2), 449-462.
7. Humphrey M. J., Jevons S., Tarbit M. H.: Pharmacokinetic evaluation of UK-49,858, a metabolically stable triazole antifungal drug, in animals and humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1985, 28(5), 648-653.
8. Hamilton D. J. Department of Primary Industries and Fisheries Brisbane, Australia. *JMPR, Evaluation 07, Difenconazole*, (2007): 353-466 [online] [cit. 2018-06-11]. Dostupné z: [http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/JMPR/Evaluation07/Difenconazole.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation07/Difenconazole.pdf)
9. Teng M., Zhu W., Wang D., Qi S., Wang Y., Yan J., Dong K., Zheng M., Wang Ch.: Metabolomics and transcriptomics reveal the toxicity of difenoconazole to the early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*. 2018, 194, 112-120.
10. Da Silva J. M., Zini C. A. I., Caramão E. B., Canizares E. M. P. N., Leal K. A.: Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de agrotóxicos em sedimentos

- por cromatografia gasosa monodimensional e bidimensional abrangente com micro detector de captura de elétrons. *Química Nova*. 2010, 33(3), 591-597.
11. Pan L., Feng X., Cao M., Zhang S., Huang Y., Xu T., Jing J., Zhang H.: Determination and distribution of pesticides and antibiotics in agricultural soils from northern China. *RSC Advances*. 2019, 9(28), 15686-15693.
  12. Mercadante R., Polledri E., Scuranti S., Moretto A., Fustinoni S.: Identification and Quantification of Metabolites of the Fungicide Tebuconazole in Human Urine. *Chemical Research in Toxicology*. 2014, 27(11), 1943-1949.
  13. Tebuconazole. *The Merck Index\* Online* [online]. White House station N.J. USA: Royal Society of Chemistry, 2013 [cit. 2020-07-22]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m10499/tebuconazole?q=authorize>
  14. Macirela R., Tripepi M., Brunelli E.: Morphological and Immunohistochemical Modifications in Zebrafish (*Danio rerio*) Gills After Short-Term Exposure to the Fungicide Tebuconazole. *Zebrafish*. 2019, 16(1), 65-76.
  15. Tebuconazole. In: *Merck* [online]. Darmstadt, Germany: Sigma Aldrich, 2013 [cit. 2020-07-22]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/tebuconazole3078210753496311?lang=en&ion=CZ>
  16. Wang W., Sun Q., Li Y., Wen G., Fan J., Song W., Zhao Z., Dong M.: Simultaneous Determination of Fluoxastrobin and Tebuconazole in Cucumber and Soil Based on Solid-Phase Extraction and LC-MS/MS Method. *Food Analytical Methods*. 2018, 11(3), 750-758.
  17. Nováková K., Navrátil T., Jaklová-Dytrtová J., Chýlková J.: Application of Copper Solid Amalgam Electrode for Determination of Fungicide Tebuconazole. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2013, 8, 1-16.
  18. Qi P., Wang J., Wang Z., Wang X., Wang X., Xu X., Xu H., Di S., Zhang H., Wang Q., Wang X.: Construction of a probe-immobilized molecularly imprinted electrochemical sensor with dual signal amplification of thiol graphene and gold nanoparticles for selective detection of tebuconazole in vegetable and fruit samples. *Electrochimica Acta*. 2018, 274, 406-414.
  19. de Figueiredo-Sobrinho F. D. A., Lucas F. W. D., Fill T. P., Rodrigues E., Mascaro L. H., Casciano P. N. D., de Lima-Neto P., Correia A. N.: Insights into electrodegradation mechanism of tebuconazole pesticide on Bi-doped PbO<sub>2</sub> electrodes. *Electrochim. Acta* 2015, 154, 278-286.

20. Lovic J. D., Mijin D. Z., Jovanovic M. B., Glavaski O. S., Zeremski T. M., Petrovic S. D., Ivic M. L. A.: An investigation of tebuconazole degradation using a gold electrode. *C. R. Chimie* 216, 19, 639-645.
21. Opekar F.: Voltametrie princip a obecné aspekty metody. HELÁN, Ing. Václav. *Elektroanalytické metody: sborník přednášek z kurzu*. Český Těšín: 2 Theta, 2001, s. 75-113. Analytical standards and equipment. ISBN 80-86380-07-6.
22. Pospíšil L., Hromadová M.: Jaroslav Heyrovský - 50. výročí udělení Nobelovy ceny za chemii. *Chem. Listy* 2009, 103, 900-901.
23. Barek J.: Postavení polarografie a voltametrie na rtuťových kapkových elektrodách v moderní analytické chemii. *Chem. Listy* 1997, 91, 1038-1042.
24. Klouda P.: *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
25. Barek J., Opekar F., Štulík K.: *Elektroanalytická chemie*. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-1146-5.
26. Kalvoda R.: *Elektroanalytická chemie životního prostředí*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1985.
27. Charakter vkládaného potenciálu a registrovaná polarizační křivka při DPP: Elektrochemické stanovení kovu. In: *Monitorování hladiny metalothioneinu po působení iontů těžkých kovů* [online]. s. 13 [cit. 2020-07-20]. Dostupné z: [http://web2.mendelu.cz/af\\_239\\_nanotech/J\\_Met\\_Nano/0314/pdf/jmn3-10.pdf](http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0314/pdf/jmn3-10.pdf)
28. Swain G. M.: The Electrochemical Activity of Boron-Doped Polycrystalline Diamond Thin Film Electrodes. *Anal. Chem. Am. Chem. Soc.* 1993, (65), 345-351.
29. Barek J., Pecková K., Vyskočil V.: Kam směřují moderní analytické metody 50. let po udělení Nobelovy ceny za polarografii. *Chem. Listy* 2009, 103, 889-893.
30. Takasu Y., Sugimoto W., Ohashi T., Zhang J.: Steam activation of boron doped diamond electrodes. *Electrochimica Acta* 2011, 56(16), 5599-5604.
31. Salazar-Banda G. R., De Carvalho A. E., Andrade L. S., Rocha-Filho R. C., Avaca L. A.: On the activation and physical degradation of boron-doped diamond surfaces brought on by cathodic pretreatments. *J. Appl. Electrochem.* 2010, 40(10), 1817-1827.