

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ
BIFENOXU NA STŘÍBRNÉ PEVNÉ
AMALGAMOVÉ ELEKTRODĚ**

Diplomová práce

studijního oboru Klinická a toxikologická analýza

Praha 2008

Dana Cabalková

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857. Dále byla finančně podporována Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR (výzkumné centrum LC 06035).

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele prof. RNDr. Jiřího Barka, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze, dne 14. dubna 2008.

OBSAH

	Seznam použitých symbolů a zkratek.....	5
1	Úvod	7
1.1	Cíl práce.....	7
1.2	Bifenox	7
1.2.1	Fyzikálně-chemické vlastnosti, toxické účinky	7
1.2.2	Herbicidní účinky	9
1.2.3	Metody stanovení	13
1.3	Elektrochemie aromatických nitrosloúčenin	15
1.4	Rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgamová elektroda	18
2	Experimentální část	21
2.1	Studovaná látka.....	21
2.2	Použité chemikálie.....	21
2.3	Aparatura	21
2.4	Pracovní postupy	22
2.4.1	Spektrofotometrie	22
2.4.2	Voltametrie	22
2.4.3	Přímé stanovení	23
2.4.4	Extrakce tuhou fází	24
3	Výsledky a diskuse	25
3.1	Stálost Bifenoxu	25
3.1.1	Stálost zásobního roztoku Bifenoxu	25
3.1.2	Stálost Bifenoxu v 50% a 90% methanolu	25
3.2	Voltametrické stanovení Bifenoxu	28
3.2.1	Vliv pH	28
3.2.2	Kalibrační závislosti	32
3.2.3	Cyklická voltametrie.....	34
3.3	Stanovení Bifenoxu v modelových vzorcích pitné a říční vody	40
3.3.1	Přímé stanovení	40

3.3.1.1	Přímé stanovení v deionizované vodě	40
3.3.1.2	Přímé stanovení v pitné vodě.....	41
3.3.1.3	Přímé stanovení v říční vodě	43
3.3.2	Extrakce tuhou fází	44
3.3.2.1	Extrakce tuhou fází z deionizované vody	44
3.3.2.2	Extrakce tuhou fází z pitné vody	47
3.3.2.3	Extrakce tuhou fází z říční vody	50
4	Závěr	54
	Literatura	55

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A	absorbance	
AED	atomový emisní detektor	
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr	
C-ELISA	nepřímá kompetitivní heterogenní enzymová imunoanalýza	
CL	clearance	[$l\text{ kg}^{-1}\text{ h}^{-1}$]
CV	cyklická voltametrie	
DAD	detektor s diodovým polem	
DCP	stejnoseměrná polarografie	
DME	rtuťová kapková elektroda	
DPP	diferenční pulsní polarografie	
DPV	diferenční pulsní voltametrie	
ϵ	molární absorpční koeficient	[$l\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$]
EC	efektivní (účinná) koncentrace	[mg l^{-1}]
ECD	detektor elektronového záchytu	
E_p	potenciál píku	[mV]
$E_{1/2}$	půlknový potenciál	[mV]
GC	plynová chromatografie	
GCE	elektroda ze skelného uhlíku	
H_0	Hammettova funkce kyselosti	
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda	
HPTLC	vysokoúčinná tenkovrstvá kapalinová chromatografie	
I_{50}	koncentrace inhibitoru potřebná k 50% inhibici enzymové aktivity	[$\mu\text{mol l}^{-1}$]
I_p	proud píku	[nA]
I_{lim}	limitní difúzní proud vlny	[nA]
K_{OC}	sorpční koeficient normalizovaný uhlíkem	
K_{OW}	rozdělovací koeficient n-oktanol/voda	
λ	vlnová délka	[nm]
LC	letální koncentrace	[mg l^{-1}]
LD	letální dávka	[mg kg^{-1}]
LOD	mez detekce	
m-AgSAE	rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgamová elektroda	
MeSAE	kovová pevná amalgamová elektroda	
MS	hmotnostní spektrometr	
NMR	nukleární magnetická rezonance	
NPD	dusíko-fosforový detektor	

p^a, p^c	proud anodického, katodického píku	
pK_a	disociační konstanta	
R	korelační koeficient	
RP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi	
RSD	relativní směrodatná odchylka	[%]
SCE	nasycená kalomelová elektroda	
SMDE	statická rtuťová kapková elektroda	
SPE	extrakce tuhou fází	
$t_{1/2}$	biologický poločas	[h ⁻¹]
TLC	tenkovrstvá chromatografie	
V_d	distribuční objem	[l kg ⁻¹]

1 ÚVOD

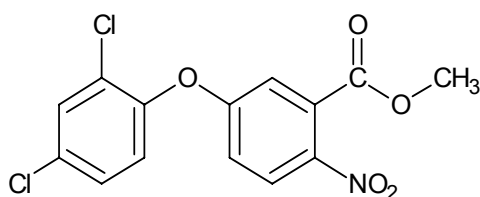
1.1 CÍL PRÁCE

Tato diplomová práce se zabývá studiem elektrochemického chování herbicidu Bifenoxu s využitím diferenční pulsní voltametrie (DPV) s cílem nalezení optimálních podmínek pro stanovení Bifenoxu na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgamové elektrodě (m-AgSAE) s co nejnižší mezí stanovitelnosti. Dále byla provedena cyklická voltametrie (CV) k určení charakteru elektrochemického chování Bifenoxu na m-AgSAE za nalezených optimálních podmínek. Optimalizované podmínky stanovení Bifenoxu na m-AgSAE byly dále využity při stanovení Bifenoxu v modelových vzorcích pitné a říční vody, nejprve přímým stanovením a pro stanovení nižších koncentrací byla provedena předběžná separace a prekoncentrace Bifenoxu pomocí extrakce tuhou fází, po které byl Bifenox stanoven pomocí DPV.

1.2 BIFENOX

1.2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti, toxické účinky

Bifenox, methyl 5-(2,4-dichlorfenoxy)-2-nitrobenzoát, je žlutá krystalická látka. Jeho strukturní vzorec je na obr. 1.1. Syntéza je znázorněna na obr. 1.2.¹ Fyzikálně-chemické vlastnosti jsou shrnuty v tab. 1.1, toxické účinky v tab. 1.2.



Bifenox, C₁₄H₉Cl₂NO₅,
CAS Name:
methyl 5-(2,4-dichlorophenoxy)-2-nitrobenzoate,
CAS Registry number:
42576-02-3

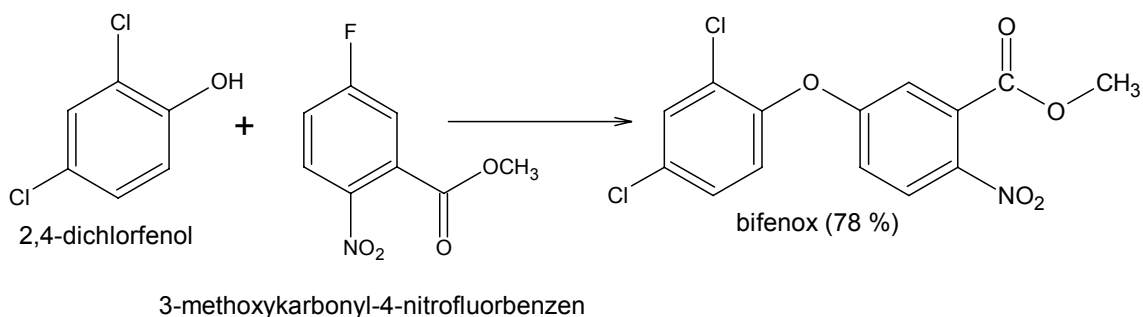
Obr. 1.1 Strukturní vzorec Bifenoxu

Tab. 1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti Bifenoxu

M_r	$T_f/^\circ\text{C}$	$\log K_{OW}$	$\log K_{OC}$	$t_{1/2}$ v půdě/d	rozpustnost/mg l ⁻¹ (při 25 °C)
342,14 (cit. ^{2,3})	84 – 86 (cit. ^{4,5,47})	4,34 (cit. ⁵⁵)	3,20 (cit. ¹²)	3 – 7 (cit. ³⁹)	voda: $3,00 \times 10^{-1}$ (cit. ^{8,38})
	85 (cit. ⁶)	4,47 (cit. ³)	3,49 (cit. ¹⁵)	5 – 7 (cit. ^{17,38})	$3,50 \times 10^{-1}$ (cit. ^{14,17})
	86 – 87 (cit. ⁴⁴)	4,48 (cit. ¹⁴)	3,81 (cit. ^{11,13})	7 (cit. ^{11,13})	aceton: $3,80 \times 10^5$ (cit. ¹¹⁹)
		4,50 (cit. ^{7,88,104})	4,00 (cit. ^{9,10,14})		xylen: 3,00 (cit. ¹¹⁹) methanol: $2,20 \times 10^4$ (cit. ¹¹⁹)
		4,60 (cit. ⁸)			chlorbenzen: $4,00 \times 10^5$ (cit. ¹¹⁹)

Tab. 1.2 Toxické účinky Bifenoxu

<p>Akutní toxicita (savci)</p> <p>LD₅₀ (orálně, krysa): > 6 400 mg kg⁻¹ (cit. ^{17,38}) 5 000 mg kg⁻¹ (cit. ¹⁶)</p> <p>LD₅₀ (orálně, myš): 4 556 mg kg⁻¹ (cit. ^{17,38})</p> <p>LC₅₀ (inh., krysa): > 200 mg l⁻¹ (cit. ^{17,38})</p> <p>LD₅₀ (transderm., králik): > 20 000 mg kg⁻¹ (cit. ^{17,38})</p>	<p>Mutagenita</p> <p>neprokázána u Bifenoxu,^{17, 24, 25, 38} ale prokázána u aminobifenoxu²⁶</p>
<p>Ekotoxicita¹⁸</p> <p>LC₅₀ (96 h, pstruh duhový): > 0,18 mg l⁻¹</p> <p>EC₅₀ (48 h, Daphnia magna): 0,66 mg l⁻¹</p>	<p>Vasodilatační aktivita³¹</p> <p>ne</p>
<p>Toxikokinetika¹⁹ (orálně, koza): dvoukompartmentový otevřený model</p> <p>$t_{1/2} = 2,04 \pm 0,04$ h $V_d = 2,73 \pm 0,28$ l kg⁻¹ $CL = 0,88 \pm 0,07$ l kg⁻¹ h⁻¹</p>	<p>Genotoxicita²²</p> <p>prokázána</p>
<p>Teratogenita^{17, 30, 38} a embryotoxicita²¹</p> <p>neprokázány</p>	<p>Vliv na estrogenní a androgenní receptory</p> <p>estrogenní aktivita: ne^{32, 33, 35} androgenní aktivita: ano – antiandrogen^{34, 35}</p>
<p>Cytostatické účinky²⁰ a cytotoxicita^{22, 23}</p> <p>prokázány</p>	<p>Hepatotoxicita²⁹</p> <p>prokázána</p>
<p>Imunotoxicita²⁸</p> <p>Bifenox je slabě imunotoxický</p>	<p>Dráždivost²⁷</p> <p>(Draize test) neprokázána</p>
<p>Baktericidní účinky²⁵</p> <p>neprokázány u Bifenoxu, prokázány u amino- a hydroxyaminobifenoxu</p>	



Obr. 1.2 Syntéza Bifenoxu

1.2.2 Herbicidní účinky

Bifenox je účinnou látkou herbicidů, které se prodávají pod obchodními názvy Modown, FOX 480 SC, Foxtril, Bifenix-N¹¹⁰.

Modown^{17, 38, 40} se používá proti listnatým plevelům ve slunečnici, sójových bobech, pšenici, ječmenu, rýži, ovsu, kukuřici¹⁷, černošském prosu⁴³ a využívá se též při potírání plevelů v lesních školkách^{40, 48}. Je účinný i proti plevelům, které se staly rezistentními vůči sulfonylmočovinným herbicidům (např. *Lindernia micrantha* – *Puštička*, která hojně zplaňuje na rýžových polích).⁴²

FOX 480 SC úspěšně bojuje s plevelem v obilných polích (např. *Viola arvensis* – *Violka rolní*, *Sinapis arvensis* – *Hořčice rolní*, *Galeopsis tetrahit* – *Konopice polní*...).³⁷

Foxtril je herbicidní přípravek obsahující jako účinné látky Bifenox, Dichlorprop a Ioxynil. Transformačním produktem Bifenoxu v půdě je již třetí den po aplikaci Foxtrilu kys. 5-(2,4-dichlorfenoxy)-2-nitrobenzoová, jejíž koncentrace v následujících dnech vzrůstá (31. den po aplikaci byla její koncentrace čtyřnásobná oproti 17. dni). I samotná kyselina je herbicidně aktivní.³⁶

Herbicidní účinek Bifenoxu trvá 7–8 týdnů.^{17, 38, 40} Je to látka neperzistentní,^{17, 38, 40, 41} k úbytku jeho obsahu v půdách však nedochází vyluhováním (vzhledem k jeho nízké rozpustnosti ve vodě)^{17, 38} nýbrž chemickými (redukce nitroskupiny na aminoskupinu) a mikrobiologickými (hydrolyza esterové vazby) procesy.^{17, 38, 45} Bifenox je stabilní při UV světle a ve vodných roztocích od středně kyselých po slabě bazické při pokojové teplotě.¹⁷

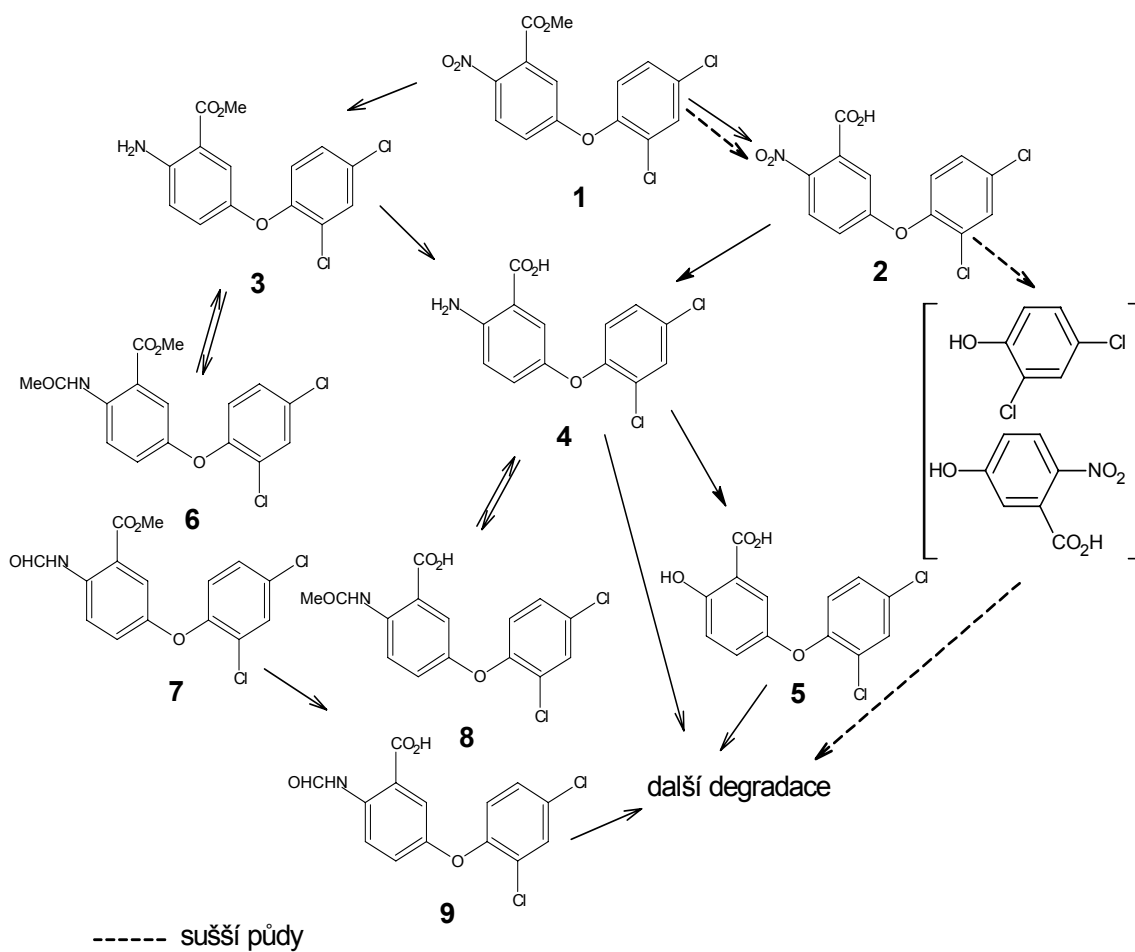
V půdě je Bifenox hydrolyzován na kys. 5-(2,4-dichlorfenoxy)-2-nitrobenzoovou, 2,4-dichlorfenyl-4-nitrofenylether a kys. 2-amino-5-(2,4-dichlorfenoxy)benzoovou.³⁹

Postup degradace Bifenoxu v půdách je znázorněn na obr. 1.3,⁴⁴ obr. 1.4 pak ukazuje transformaci Bifenoxu v rostlinách.⁴⁶

Herbicidní účinek Bifenoxu je striktně závislý na světle^{53, 57, 59, 65, 67-75} a spočívá v kompetitivní inhibici^{58, 59} (I_{50} ječmen; PROTOX = 0,060 $\mu\text{mol l}^{-1}$)⁵⁵ enzymu protoporphyrinogen oxidasy (PROTOX, EC 1.3.3.4,⁵⁸ katalyzuje oxidaci protoporphyrinogenu IX na protoporphyrin IX, který je běžným intermediátem biosyntézy chlorofylů a hemu)⁵² vedoucí k akumulaci protoporphyrinu IX.^{49-52, 55-60, 62-67} Nemetabolizované protoporphyrinogenové molekuly difundují z místa své syntézy a díky své tendenci ke spontánní oxidaci reagují s molekulárním kyslíkem za vzniku protoporphyrinu IX. Membránově vázaná ferrochelataza však není schopna využít takto neenzymaticky vytvořený protoporphyrin IX a začlenit ho do biosyntetické dráhy hemu a chlorofylů a proto dochází k jeho akumulaci.⁵⁷ Tato nekontrolovaná akumulace protoporphyrinu IX nakonec vede k peroxidaci membránových lipidů a následné lysi membrány.^{53-55, 57, 59, 62, 65, 67, 72-75}

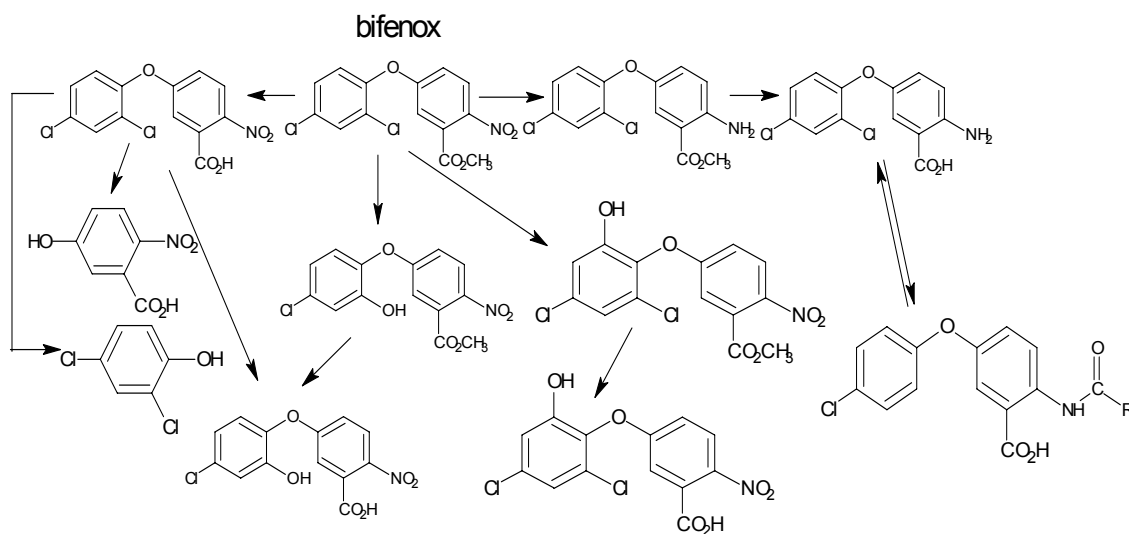
Protoporphyrin IX je totiž silně fotodynamický pigment, který na světle a za přítomnosti molekulárního kyslíku generuje singletový kyslík,^{61, 64} jež pak na membráně rychle začne produkci lipidových peroxidů vedoucí k destruktivním peroxidativním reakcím.^{52, 64} Výsledkem tohoto herbicidního účinku je rapidní blednutí a vadnutí listů.^{74, 75}

Biosyntéza hemu a chlorofylů a popsany mechanismus herbicidního účinku Bifenoxu jsou znázorněny na obr. 1.5.⁴⁹

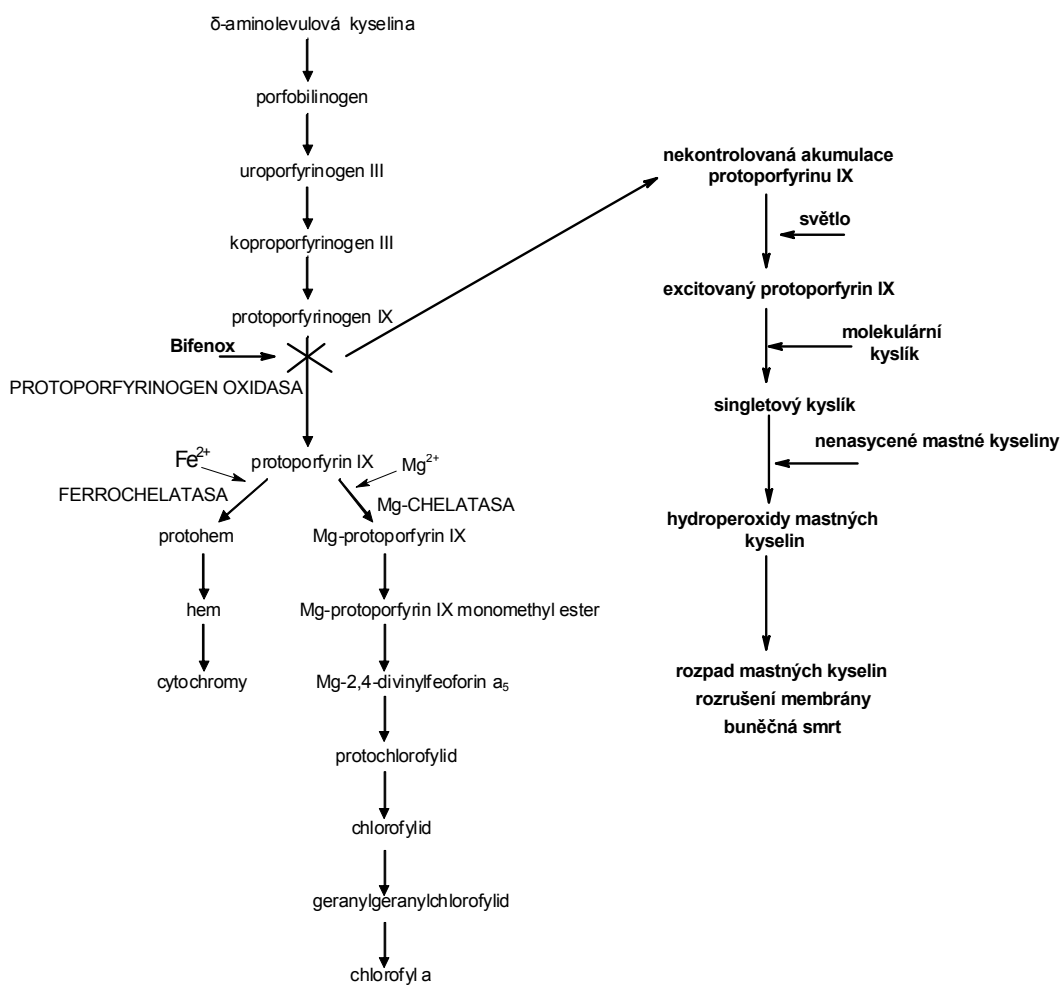


- 1: bifentox
- 2: 5-(2,4-dichlorfenoxy)-2-nitrobenzoová kyselina
- 3: methyl 2-amino-5-(2,4-dichlorfenoxy)benzoát
- 4: 2-amino-5-(2,4-dichlorfenoxy)benzoová kyselina
- 5: 5-(2,4-dichlorfenoxy)-2-hydroxybenzoová kyselina
- 6: methyl 2-(acetylamino)-5-(2,4-dichlorfenoxy)benzoát
- 7: methyl 5-(2,4-dichlorfenoxy)-2-(formylamino)benzoát
- 8: 2-(acetylamino)-5-(2,4-dichlorfenoxy)benzoová kyselina
- 9: 5-(2,4-dichlorfenoxy)-2-(formylamino)benzoová kyselina

Obr. 1.3 Degradace Bifenoxu v půdách



Obr. 1.4 Transformace Bifenoxu v rostlinách



Obr. 1.5 Biosyntéza hemu a chlorofylů a mechanismus herbicidního účinku Bifenoxu

Akumulace protoporfyrinu IX je spojena i s vrozenými lidskými chorobami zvanými porfyrie a vyskytuje se i u některých mutantů kvasinek.⁴⁹ Například mutantní kmen kvasinky *Saccharomycopsis lipolytica* exkretuje červený, ve vodě nerozpustný pigment, protoporfyrin IX.⁸¹

Porfyrie jsou metabolické poruchy charakterizované vrozenou deficiencí syntézy hemu vedoucí k nadměrné produkci, akumulaci a exkreci prekurzorů hemu.⁸²

U tzv. protoporfyrie je defekt v deficienci enzymu ferrochelatasy (katalyzuje vkládání Fe^{2+} do molekuly protoporfyrinu IX). Symptodem choroby je hypersenzitivita kůže na světlo způsobená akumulací protoporfyrinu IX v kůži a často se objevují i onemocnění jater. Protoporfyrin IX se totiž akumuluje i v hepatocytech a žlučových kanálcích ve formě krystalů, což vede k ucpání toku žluče (tzv. cholestáza) a následné cirhóze jater. Zároveň je protoporfyrin IX inhibitorem mikrosomálního CYP 450 systému a v játrech tudíž ovlivňuje jejich detoxifikační funkci.^{76, 77, 78}

U choroby zvané variegata porphyria je deficientním enzymem enzym protoporfyrinogen oxidasa (její aktivita je snížena na 43 % normální aktivity). Protoporfyrinogen IX je tak vylučován ve zvýšeném množství do žluče a zde je následně neenzymaticky zoxidován na protoporfyrin IX. Příznaky zahrnují akutní bolesti břicha, neuropsychiatrické symptomy a kožní léze.^{79, 80}

1.2.3 Metody stanovení

Z analytických metod převládají pro stanovení Bifenoxu metody chromatografické, nejčastěji plynová chromatografie^{83-96, 101}. Nejužívanějším detektorem je detektor hmotnostní^{83-93, 96}, ale použít lze i jiné detektory (např. ECD⁹⁴, AED⁹⁵, NPD¹⁰¹). Druhou nejběžnější metodou je chromatografie kapalinová^{97-100, 102-106}. Využívá se systému s obrácenými fázemi a hmotnostního detektoru^{98, 100, 104} či UV detekce^{97, 99, 100, 102, 103} (převážně DAD). RP-LC/MS-MS byla také použita ke stanovení transformačního produktu Bifenoxu – 5-(2,4-dichlorfenoxy)-2-nitrobenzoové kyseliny^{105, 106}. Ze separačních technik se v menší míře uplatňuje i TLC^{44, 107, 108} a RP-HPTLC¹⁰⁹. Některé příklady stanovení Bifenoxu v různých matricích pomocí chromatografických technik a příslušné meze detekce jsou uvedeny v tab. 1.3.

Dalšími možnými metodami pro stanovení Bifenoxu jsou metody imunochemické, např. C-ELISA¹¹³. Popsáno je i kinetické stanovení Bifenoxu založené na aktivačním efektu Bifenoxu na oxidaci kyseliny karmínové peroxidem vodíku katalyzované mědí v prostředí fosfátového pufru o pH 10,5. (cit. ¹¹⁰) Bifenox byl též charakterizován pomocí NMR.¹¹¹

Tab. 1.3 Příklady stanovení Bifenoxu chromatografickými technikami v různých matricích a příslušné meze detekce

Matrice	Technika/detektor	LOD	Ref.
říční voda	GC/MS	0,020 $\mu\text{g l}^{-1}$	83
říční voda	GC/MS	0,040 $\mu\text{g l}^{-1}$	84
říční voda	GC/MS	0,016 $\mu\text{g l}^{-1}$	88
říční voda	RP-HPLC/UV-DAD	0,020 $\mu\text{g l}^{-1}$	100
říční voda	RP-HPLC/MS-MS	0,100 $\mu\text{g l}^{-1}$	100
pitná voda	RP-HPLC/UV-DAD	0,007 $\mu\text{g l}^{-1}$	100
jablečný džus	GC/MS	0,040 mg kg^{-1}	87
ovoce a zelenina	GC/MS	0,040 mg kg^{-1}	85
sediment (půda)	GC/MS	0,004 mg kg^{-1}	86
sediment (půda)	RP-HPLC/UV-DAD	0,004 mg kg^{-1}	99
ječmen	RP-LC/MS-MS	0,003 mg kg^{-1}	104

Přítomnost nitroskupiny v molekule Bifenoxu a její snadná redukovatelnost umožňují využití elektrochemických metod.

Pomocí cyklické voltametrie na GCE bylo sledování chování Bifenoxu v protickém a aprotickém prostředí. Jako protické byl použit roztok 50% ethanolu v 0,1 M fosfátovém pufru o pH 7. Za těchto podmínek poskytoval Bifenox v dopředném scanu jeden katodický pík a ve zpětném scanu menší pík anodický. Získaný voltamogram odpovídal ireversibilní redukci ($I_{pc}/I_{pa} \gg 1$, $\Delta E \approx 800$ mV). V aprotickém prostředí 0,1 M tetra-n-butylamonium hexafluorofosfátu v dimethylformamidu byl na voltamogramu patrný jeden katodický pík v dopředném scanu a jeden stejně velký anodický pík ve zpětném scanu. Tvar voltamogramu svědčil o kvazi-reversibilní jednoelektronové redukci ($I_{pc}/I_{pa} = 1$, $\Delta E = 115$ mV). Oproti protickému prostředí byla redukce posunuta k negativnějším potenciálům. Produktem redukce nitroskupiny byl stabilní anion radikál.¹¹³

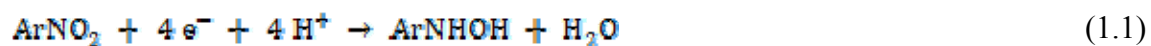
Elektrochemické chování Bifenoxu bylo také sledováno pomocí stejnosměrné polarografie¹¹⁴⁻¹¹⁶ a cyklické voltametrie¹¹⁴ na SMDE. Jako základní elektrolyty byly

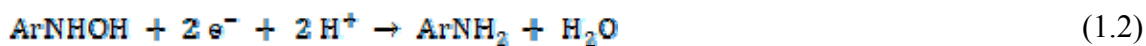
použity tetraalkylamonium hexafluorofosfáty v acetonitrilu či dimethylsulfoxidu. Za těchto podmínek dochází k jednoelektronové reversibilní redukci nitroskupiny na anion radikál následované při negativnějších potenciálech tříelektronovou ireversibilní redukcí anion radikálu na hydroxylaminoderivát. Druhá redukce je silně ovlivněna koncentrací a typem tetraalkylamoniového kationtu základního elektrolytu. S rostoucí velikostí kationtu dochází k posunu půlčlenného potenciálu redukce k negativnějším hodnotám a totéž platí pro zředěnější roztoky tetraalkylamonium hexafluorofosfátů. Podobný vliv koncentrace a typu kationtu základního elektrolytu byl pozorován i u nitrobenzenu a nitrofenolu.^{115, 116} Tento jev byl připisán Frumkinově efektu¹¹⁸. Po provedení příslušné korekce (Frumkinova korekce) se však ukázalo, že ani Frumkinův efekt tento jev zcela nevysvětluje.^{115, 116}

Stejnou polarografií a diferenční pulsní polarografií na DME byl studován vliv pH na chování Bifenoxu v prostředí 33% ethanolu. V rozmezí pH 2 – 12 byl Bifenox redukován v jedné čtyřelektronové vlně odpovídající redukci nitroskupiny na hydroxylaminoskupinu. V kyselějším prostředí byla tato vlna doprovázena při negativnějších potenciálech dvouelektronovou vlnou redukce hydroxylaminoskupiny na anilínový derivát. V silně kyselém roztoku došlo k překryvu těchto dvou vln a Bifenox byl redukován pouze v jedné šestielektronové vlně.¹¹⁷

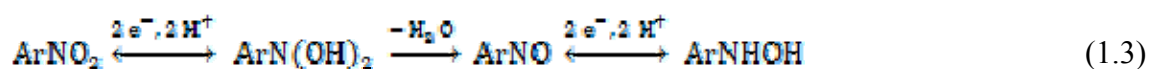
1.3 ELEKTROCHEMIE AROMATICKÝCH NITROSLOUČENIN

První organickou sloučeninou studovanou polarograficky byl již v roce 1925 nitrobenzen. Od té doby bylo získáno značné množství informací o elektrochemii nitrobenzenu a mnoha jiných aromatických nitrosloučenin.^{117, 120-122, 124-131} Bylo potvrzeno, že redukce aromatických nitrosloučenin (ArNO_2) probíhá ve vodném prostředí ve 2 krocích – difuzí kontrolovanou ireversibilní čtyřelektronovou redukcí nitroskupiny na hydroxylamin (ArNHOH) (rovnice (1.1)) následovanou v kyselém prostředí difuzí kontrolovanou dvouelektronovou redukcí protonizované formy tohoto hydroxylaminu na aminoderivát (ArNH_2) (rovnice (1.2)).^{120, 121}

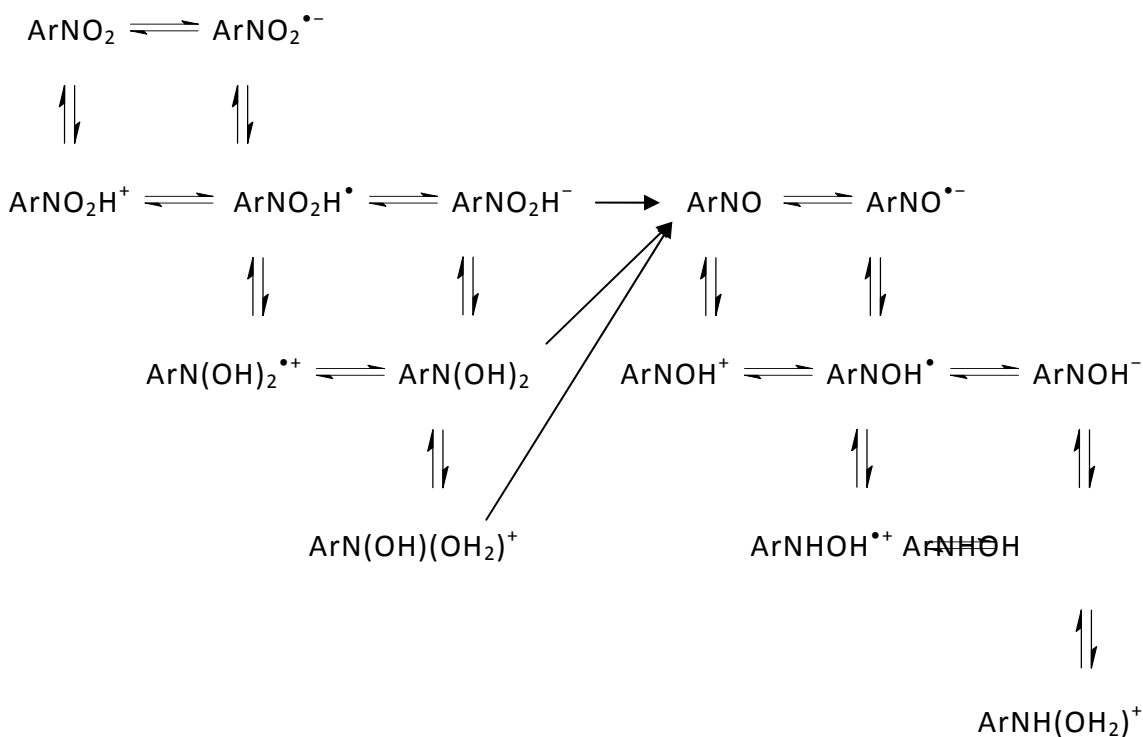




Redukce nitroskupiny na hydroxylamin probíhá přes dihydroxylamin ($\text{ArN}(\text{OH})_2$), který dehydratuje na nitrososloučeninu (ArNO) (rovnice (1.3)).

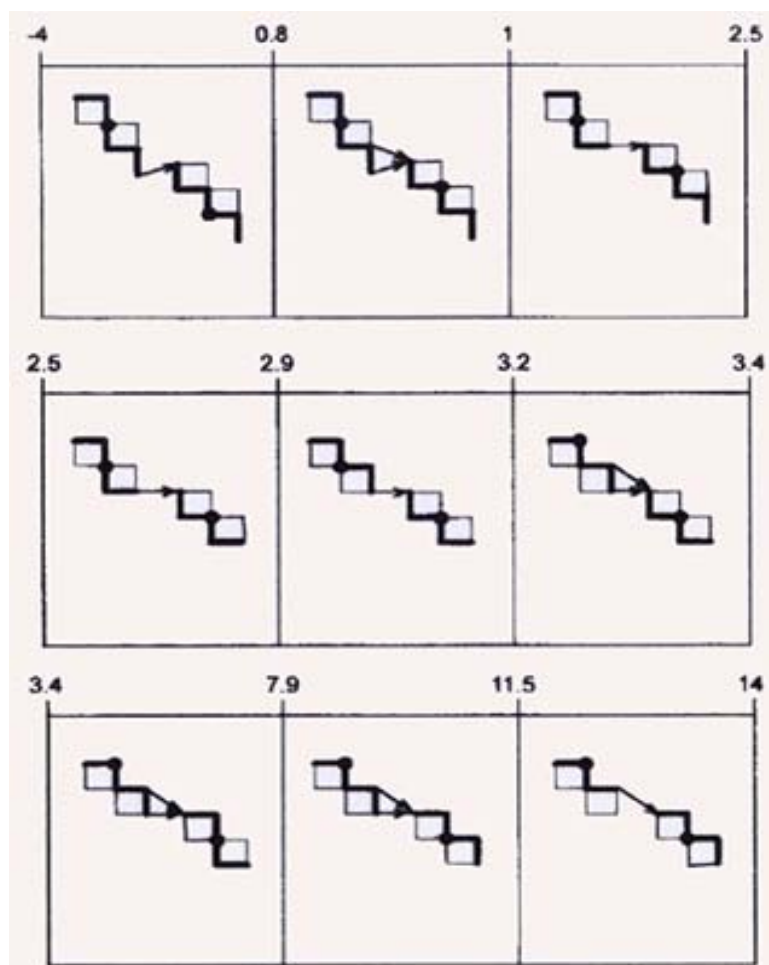


Redukce ArNO probíhá při pozitivnějších potenciálech než redukce ArNO_2 a proto nikdy nebyl nitrosoderivát detegován jako meziproduct při redukcí nitroskupiny na hydroxylamin a celá reakce se jeví jako jeden redukční krok.^{121, 122, 124} Při studiu detailního mechanismu těchto procesů bylo prokázáno, že sled reakcí (pořadí přijímání či odevzdávání elektronů (e^-) a protonů (H^+)) je nezávislý na potenciálu¹²³, avšak silně závisí na hodnotě pH. Zároveň bylo navrženo obecné reakční schéma redukce aromatických nitrosloúčenin. Redukci nitroskupiny na hydroxylamin lze popsat dvěma devíticelennými čtvercovými schématy spojenými dehydratací meziproductu – $\text{ArN}(\text{OH})_2$ (obr. 1.6).



Obr. 1.6 Obecné reakční schéma redukce aromatických nitrosloúčenin (ArNO_2) na odpovídající arylhydroxylamin (ArNHOH)

Redukce jsou psány horizontálně zleva doprava a protonizace směrem dolů. Každý mezičlen schématu reprezentuje možný meziprodukt v průběhu redukce. Skutečná redukční cesta dané aromatické nitrosloučeny závisí na pH základního elektrolytu, neboť hodnoty pK_a charakterizující protonizace jsou pro jednotlivé sloučeniny poněkud odlišné. Sled reakcí naznačený na obr. 1.7 reprezentuje obecný trend pořadí reakcí zobrazených na obr. 1.6 při přechodu z kyselého do zásaditého prostředí.¹²²



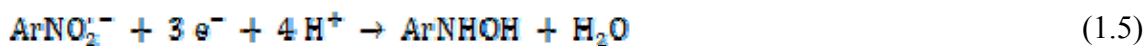
Obr. 1.7 Schematické znázornění sledu reakcí při redukci nitroskupiny na hydroxylaminovou skupinu v různých oblastech hodnot H_0 a pH. Redukce jsou psány horizontálně zleva doprava a protonizace směrem dolů. Převzato z cit.¹²²

V běžném pH rozmezí (0 – 14) je prvním krokem redukce přijetí jednoho elektronu za vzniku nitroradikálu ($ArNO_2^{\bullet-}$) (rovnice (1.4)).^{122, 129}



Tato hypotéza je dnes obecně přijímána, ačkoliv byla navržena i druhá, podle které v kyselém prostředí předchází přijetí prvního elektronu protonizace nitroskupiny.¹²⁴ Vznik nitroradikálu byl potvrzen v alkalickém prostředí¹²⁸, v 80% dioxanu¹²⁶, za přítomnosti povrchově aktivních látek¹²⁷ a také ve smíšeném (dimethylformamid – voda)¹²⁴ i čistě aprotickém (dimethylformamid, acetonitril¹²⁵) prostředí.

V nevodném prostředí (dimethylformamid, acetonitril) probíhá redukce nitroskupiny na hydroxylamin ve dvou krocích – reversibilní jednoelektronovou redukcí nitroskupiny na anion radikál ($\text{ArNO}_2^{\cdot-}$) (rovnice (1.4)) následovanou ireversibilní třielektronovou redukcí anion radikálu na hydroxylamin (ArNHOH) (rovnice (1.5)).^{115, 121}



V bezvodém kapalném amoniaku byla detegována redukce anion radikálu na dianion (ArNO_2^{2-}) (rovnice (1.6)).¹²¹ Tato reakce však není pozorována za obvyklých experimentálních podmínek, probíhá pouze při použití bezvodého kapalného amoniaku.



Snadno redukovatelná nitroskupina je přítomna i v molekule Bifenoxu a proto lze pro jeho stanovení využít voltametrické metody. V této práci byla použita diferenční pulsní voltametrie (DPV) ke studiu jeho elektrochemického chování ve smíšeném vodně – methanolickém prostředí. Navíc byl v tomto prostředí prostudován charakter elektrochemické redukce Bifenoxu pomocí cyklické voltametrie (CV).

1.4 RTUŤOVÝM MENISKEM MODIFIKOVANÁ STŘÍBRNÁ PEVNÁ AMALGAMOVÁ ELEKTRODA

Za ideální elektrodu pro elektrochemické redukce lze považovat rtuťovou kapkovou elektrodu (DME) navrženou J. Heyrovským. Obrovskou výhodou rtuti jako elektrodového materiálu je vysoké přepětí vodíku a její dokonale hladký povrch. Nevýhodou je však relativně vysoká mez stanovitelnosti měření ($10^{-5} - 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) při klasických polarografických měřeních. Zavedení visící rtuťové kapkové elektrody

(HMDE) a moderních citlivých technik (např. rozpouštěcí voltametrie) dovolilo snížit mez stanovitelnosti do $10^{-10} - 10^{-12}$ mol dm⁻³. Ve vodných prostředích lze na rtuťových elektrodách měřit v rozmezí přibližně od + 0,4 do - 2,0 V (vs. SCE). Práce za pozitivních potenciálů je reálně možná jen s nertuťovými elektrodami, nejčastěji z různých druhů uhlíku a z ušlechtilých kovů, jejichž nevýhodou je však horší obnovovatelnost jejich povrchu vyžadující mechanickou i elektrochemickou regeneraci a nízké přepětí vodíku. Určitým mezičlánkem mezi pevnými a čistě rtuťovými elektrodami jsou elektrody z kompaktních kovů pokrytých vrstvou rtuti (Ag/Hg, Pt/Hg, Au/Hg, Cu/Hg...). Tento typ elektrod má vysoké přepětí vodíku a regenerace jejich povrchu se většinou provádí elektrochemickou cestou. Na druhé straně může být analýza komplikována tvorbou intermetalických sloučenin či nestabilitou rtuťového povrchu kvůli postupnému rozpouštění kovové podložky ve rtuti doprovázenému vytvořením pevné amalgamy.

Před pár lety byly jako alternativní materiál pro výrobu elektrod navrženy pevné amalgamy tvořící se amalgamací jemného prášku příslušného kovu (MeSAE, hlavně stříbrná pevná amalgamová elektroda – AgSAE).¹³² Tyto elektrody lze použít přímo po vyleštění jejich povrchu (p-MeSAE) či po jeho modifikaci rtuťovým filmem (MF-MeSAE) nebo meniskem (m-MeSAE). U modifikovaných je na rozdíl od běžných pevných elektrod jejich kapalný povrch ideálně rovný a stejnorodý, což dovoluje vyloučit jejich mechanickou regeneraci a často s tím svázanou nevyhovující opakovatelnost paralelních měření. Elektrochemické obnovení jejich povrchu dovoluje dosáhnout při opakovaných měřeních RSD menší než 2–3%.¹³³ Navíc je při modifikaci těchto elektrod rtuť množství kovové rtuti na jejich povrchu malé, náhodně odstranit rtuť je obtížné, přičemž postupem času vytváří podložka elektrody s kapalnou rtuťí netoxickou pevnou amalgamu. Pro běžnou analytickou praxi se jako nejvhodnější ukázala menisková MeSAE.

Stříbro je jedním z nejpoužívanějších materiálů pro výrobu elektrod, zvláště pokrytých filmem nebo meniskem rtuti. Důležitým je fakt, že ve rtuti rozpuštěné stříbro, na rozdíl od Pt, Au, Cu, prakticky netvoří intermetalické sloučeniny s jinými kovy. Rozsah pracovních potenciálů na m-AgSAE je srovnatelný s HMDE a bylo též prokázáno, že pokud nedochází ke specifickým interakcím mezi analytem a stříbrem z pevné stříbrné amalgamy, jsou při DPV potenciály píků na m-AgSAE a HMDE téměř shodné. Mez stanovitelnosti je sice obvykle o řád vyšší než při použití HMDE, nicméně v mnoha případech dostatečující pro stanovení mnoha elektrochemicky redukovatelných

látek i v biologických a environmentálních matricích.¹⁴⁰ p-AgSAE vůbec neobsahuje kapalnou rtuť, citlivost a opakovatelnost měření je však horší než s m-AgSAE.¹³³ Dalšími kovy využívanými pro výrobu MeSAE jsou například měď (CuSAE¹⁴⁷), zlato (AuSAE¹³⁴), iridium (IrSAE) či thalium (TISAЕ).¹³⁶ Elektrody z pevných amalgamů stříbra (stejně jako CuSAE, AuSAE aj.) jsou považovány za netoxické, ve skutečnosti představují čistší obdobu zubních amalgamů.¹³⁵

m-AgSAE se svými vlastnostmi nejvíce podobá HMDE a představuje tak možnou náhradu za rtuťové elektrody,¹³⁶ od jejichž používání se postupně ustupuje, neboť legislativa EU vzhledem k obavám z toxicity rtuti omezuje práci s touto látkou.^{143, 144} Vhodnost využití m-AgSAE byla prokázána např. při stanovení kationtů (Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Tl^+ , Ni^{2+} , Fe^{3+})¹³³, kadmium, měď a olovo byly stanoveny i v reálném vzorku rostlinného původu¹⁴⁶, aniontů (IO_3^- (cit. ¹³⁸), NO_3^-)¹³³ i mnoha organických látek. Vyzkoušeno bylo stanovení adeninu, guaninu a DNA^{133, 137}, DNA hybridizace¹⁴⁸, cysteinu¹³³, nitrobenzenu a m-dinitrobenzenu¹³³, herbicidu (pendimethalin¹³⁹), nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků (3-nitrofluoranthen^{139, 140}, 1,3-dinitronaftalen, 1,5-dinitronaftalen, 1,8-dinitronaftalen¹⁴²), nitrofenolů (2-nitrofenol, 4-nitrofenol, 2,4-dinitrofenol¹⁴⁵), genotoxického azobarviva (Ostazine Orange¹⁴⁰), či pesticidu (2-methyl-4,6-dinitrofenol¹⁴¹).

V této práci byla použita m-AgSAE pro sledování elektrochemického chování herbicidu Bifenoxu při DPV a CV.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 STUDOVANÁ LÁTKA

Zásobní roztok Bifenoxu (Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Německo) o koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ byl připraven rozpuštěním 0,034 2 g látky v 100 ml methanolu za pomoci ultrazvuku. Roztok byl uchováván ve tmě za laboratorní teploty.

2.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

Při voltametrických měřeních bylo pracováno v prostředí methanol (p.a., PENTA, ČR) – Britton-Robinsonův pufr. Britton-Robinsonovy pufr¹⁴⁹ o příslušném pH byly připraveny smísením $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ NaOH (p.a., Lach-Ner, ČR) s roztokem obsahujícím kyselinu boritou (p.a., Lachema, ČR), fosforečnou (p.a., Lachema, ČR) a octovou (p.a., Lach-Ner, ČR), každou o koncentraci $0,04 \text{ mol dm}^{-3}$. Kyslík byl ze studovaných roztoků odstraňován probubláváním dusíkem čistoty 4.0 (Linde, ČR). Při přímém stanovení a extrakčně-voltametrickém stanovení byla použita deionizovaná voda připravená na zařízení Milli-Q_{plus} system (Millipore, USA). Jako vzorek pitné vody pro přímé a extračně-voltametrické stanovení byla použita voda z vodovodu v budově chemických kateder PřFUK, Hlavova 8, Praha 2. Vzorek říční vody byl odebrán z Vltavy v Praze na Výtoni cca 100 m proti proudu od železničního mostu.

2.3 APARATURA

Při všech měřeních byla použita sestava Eco-Tribo Polarograf se softwarem Polar Pro verze 2.0 (Polaro-Sensors, ČR) pracujícím v operačním systému Windows 3.11 (Microsoft Corporation, USA). Měření byla prováděna v tříelektrodovém zapojení s referentní argentchloridovou elektrodou (3 mol dm^{-3} KCl).

Jako pomocná byla použita platinová drátková elektroda (Monokrystaly, Turnov). Pracovní elektrodou byla rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgamová elektroda (výr. č. 2-07-11a, Polaro-Sensors, ČR). Při DP voltametii byla používána polarizační rychlost 20 mV s^{-1} , pulsy o šířce 100 ms a modulační amplituda -50 mV .

Přesné pH tlumivých roztoků bylo zjišťováno pomocí digitálního pH-metru Jenway (typ 3510) s kombinovanou skleněnou elektrodou (typ 924 005) (vše Jenway, Velká Británie). pH metr byl kalibrován standardními vodnými pufrů za laboratorní teploty.

Spektrofotometrická měření byla prováděna na přístroji Agilent 8453 řízeném počítačem pomocí ovládacího programu UV-Visible ChemStation verze 9.01 (Agilent, USA) v křemenných kyvetách měrné tloušťky 1 mm.

Při extrakci tuhou fází byly použity kolonky LiChrolut RP18-E (500 mg), které jsou dle údajů výrobce (Merck, Německo) vhodné pro separaci nepolárních látek z vodného prostředí.

2.4 PRACOVNÍ POSTUPY

2.4.1 Spektrofotometrie

Spektrofotometricky byla zkoumána stálost zásobního roztoku Bifenoxu. Byla měřena absorbance zásobního roztoku při vlnové délce absorpčního maxima studované látky oproti čistému methanolu.

2.4.2 Voltametrie

Při voltametrických stanoveních bylo postupováno vždy tak, že do 10 ml odměrné baňky byl odpipetován příslušný objem zásobního roztoku Bifenoxu v methanolu, přidán 1 ml Brittonova-Robinsonova pufru o daném pH a poté byl roztok po rysku doplněn methanolem. Takto připravený roztok byl po převedení do polarografické nádoby zbaven kyslíku pětiminutovým probubláváním dusíkem a poté byl proveden záznam voltametrické křivky. Před vstupem dusíku do polarografické nádoby byla zařazena promývačka obsahující směs methanol-deionizovaná voda

o stejném poměru jako analyzovaný roztok. Všechny křivky byly zaznamenány třikrát, všechna měření probíhala za laboratorní teploty. Výšky píků byly vyhodnocovány od spojnice minin před a za měřeným píkem. Aby bylo zaručeno dosažení reprodukovatelných výsledků, bylo nutno před vlastním měřením provést předúpravu pracovní elektrody m-AgSAE. Ta je tvořena třemi kroky: amalgamace, elektrochemická aktivace a regenerace. Amalgamací se rozumí vytvoření menisku stříbrného amalgamu ponořením elektrody na cca 15 s do rtuti. Tuto operaci je nutno opakovat asi po týdnu měření, nebo pokud elektroda přestane poskytovat spolehlivé výsledky. Elektrochemická aktivace se provádí vždy na začátku pracovního dne v 0,2 mol dm⁻³ roztoku KCl bez probublávání dusíkem vložení napětí -2 200 mV po dobu 300 s. Regenerace se provádí v analyzovaném roztoku při současném bublání dusíkem a míchání roztoku před každým měřením. Na elektrodu je střídavě vkládán pozitivnější (E_{in}) a negativnější (E_{fin}) regenerační potenciál v intervalech 0,1 s ve 150 cyklech. Hodnoty potenciálů E_{in} a E_{fin} jsou pro jednotlivá pH uvedeny v Tab. 2.1

Tab. 2.1 Používané hodnoty regeneračních potenciálů v prostředí Brittonova-Robinsonova pufru pro jednotlivá pH

pH	$-E_{in}/mV$	$-E_{fin}/mV$
2	150	1050
3	100	1350
4	150	1350
5	100	1330
6	200	1350
7	200	1550
8	200	1550
9	250	1620
10	300	1650
11	330	1620
12	350	1700

2.4.3 Přímé stanovení

Při přímém stanovení bylo do 10 ml odměrné baňky odpipetováno 5 ml deionizované, pitné či říční vody obsahující příslušné množství Bifenoxu a poté byl roztok po rysku doplněn Britton-Robinsonovým pufrům o pH 7. Vzorky říční vody byly před vlastním stanovením přefiltrovány přes filtr skleněná vlákna MN GF-3

(Ø 50 mm, Fisher Scientific, USA). Další postup byl shodný s postupem popsáním v kapitole 2.4.2.

2.4.4 Extrakce tuhou fází

Při extrakci tuhou fází bylo postupováno tak, že kolonka napojená na vývěvu byla před vlastní extrakcí aktivována promytím 3 ml methanolu, který byl následně vymyt 3 ml deionizované vody. Poté byl nanesen vzorek Bifenoxu v deionizované, pitné či říční vodě a po jeho prosátí byl 10 min prosáván vzduch. Zachycený Bifenox byl eluován 5 ml methanolu do 10 ml odměrné baňky a poté po rysku doplněn Britton-Robinsonovým pufrem o pH 7. Následně byl roztok převeden do polarografické nádoby a po odstranění kyslíku byl zaznamenán DP voltamogram.

Shodným postupem byl připraven slepý pokus s použitím deionizované, pitné či říční vody neobsahující Bifenox. K němu bylo po zaznamenání voltamogramu přidáno příslušné množství Bifenoxu, které odpovídalo koncentraci v měřeném roztoku po SPE a znovu byl zaznamenán voltamogram. Říční voda byla před extrakcí přefiltrována stejně jako v případě přímého stanovení (viz kapitola 2.4.3.).

Procentový výtěžek extrakce byl určen z poměru I_p/I_p^0 , kde I_p značí výšku píku po provedené extrakci Bifenoxu z vodného roztoku a I_p^0 je výška píku Bifenoxu v roztoku připraveném přidávkem potřebného objemu zásobního roztoku Bifenoxu k roztoku po extrakci slepého vzorku. Výška píku byla měřena od spojnice minim po jeho stranách.

Limit detekce (LOD) byl při všech stanoveních vypočítán dle následujícího vztahu:¹⁵¹

$$\text{LOD} = 3,3 \times (s_Y/a) \quad (2.1)$$

kde a značí směrnici lineární kalibrační přímky a s_Y je směrodatná odchylka deseti opakovaných měření vzorku s nejnižší naměřitelnou koncentrací Bifenoxu.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 STÁLOST BIFENOXU

3.1.1 Stálost zásobního roztoku Bifenoxu

Absorbance zásobního roztoku Bifenoxu o koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ v methanolu byla měřena při vlnové délce 285 nm, kde měla studovaná látka absorpční maximum. Hodnota molárního absorpčního koeficientu (ϵ) při této vlnové délce činila $8,35 \times 10^3 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Výsledky měření stálosti zásobního roztoku jsou shrnuty v tab. 3.1. Tvar absorpčního spektra Bifenoxu o koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ je na obr. 3.1. Z výsledků v tab. 3.1 vyplývá, že zásobní roztok Bifenoxu v methanolu je při uchování za nepřístupu světla stálý nejméně po dobu 5 měsíců, neboť za tuto dobu nedošlo k výraznému poklesu absorbance studované látky.

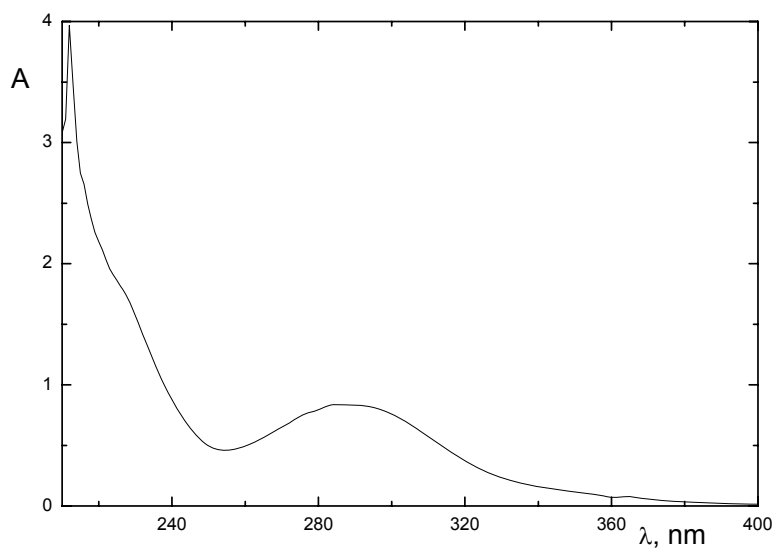
3.1.2 Stálost Bifenoxu v 50% a 90% methanolu

Při hledání vhodného prostředí pro voltametrická měření byla zkoumána možnost využití 50% methanolu. Spektrofotometricky byla sledována stálost Bifenoxu o koncentraci $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ v 50% methanolu. Výsledky jsou shrnuty v tab. 3.2. Vyplývá z nich, že 50% methanol není vhodný pro měření vzhledem k výraznému poklesu absorbance roztoku Bifenoxu již po 15 minutách. Proto byla následně zkoumána možnost využití 90% methanolu. Výsledky měření stálosti roztoku Bifenoxu v 90% methanolu jsou uvedeny také v tab. 3.2 a je z nich patrné, že v 90% methanolu je již Bifenox dostatečně stálý, neboť v průběhu 60 minut nedošlo k poklesu absorbance studované látky. Stálost roztoku Bifenoxu v 90% methanolu byla následně sledována pomocí klasické metody polarografie (DCTP) s rtuťovou kapkovou elektrodou jako elektrodou pracovní. Stálost byla proměřena při pH použitého pufru 2, 7 a 12, kdy byl do 10 ml odměrné baňky odpipetován 1 ml zásobního roztoku Bifenoxu, 1 ml BR pufru o příslušném pH a pak byl roztok po rysku doplněn methanolem. Takto připravený

roztok byl zbaven kyslíku pětiminutovým probubláváním dusíkem. Měření bylo prováděno v rozsahu jedné hodiny v desetiminutových intervalech za laboratorní teploty bez míchání. Výsledky měření jsou shrnuty v tab. 3.3 a potvrzují stálost Bifenoxu v 90% methanolu. Pro další měření byl proto jako vhodné prostředí zvolen 90% methanol.

Tab. 3.1 Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku Bifenoxu o koncentraci 1×10^{-3} mol dm⁻³ v methanolu při vlnové délce 285 nm. Měřeno proti methanolu v křemenných kyvetách měrné tloušťky 1 mm.

dny	0	7	24	84	122	161
A ₂₈₅	0,835	0,841	0,829	0,840	0,838	0,833



Obr. 3.1 Absorpční spektrum roztoku Bifenoxu ($c = 1 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³) v methanolu. Měřeno proti methanolu v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 mm.

Tab. 3.2 Spektrofotometrické studium stálosti roztoku Bifenoxu o koncentraci 1×10^{-4} mol dm⁻³ v 50% a 90% methanolu při vlnové délce 285 nm. Měřeno proti 50% či 90% methanolu v křemenných kyvetách měrné tloušťky 1 mm.

minuty	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
A ₂₈₅ v 50% MeOH	0,075	0,070	0,048	0,031	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A ₂₈₅ v 90% MeOH	0,076	0,077	0,076	0,077	0,077	0,076	0,077	0,077	0,076	0,076	0,076	0,077	0,076

Tab. 3.3 Polarografické studium stálosti roztoku Bifenoxu o koncentraci 1×10^{-4} mol dm⁻³ v 90% methanolu při pH použitého pufru 2, 7 a 12. Měřeno metodou DCTP na DME.

minuty	$-E_{1/2}/mV$	$-I_{lim}/nA$	$-E_{1/2}/mV$	$-I_{lim}/nA$	$-E_{1/2}/mV$	$-I_{lim}/nA$
	pH 2		pH 7		pH 12	
0	447	690	807	705	814	852
10	450	690	807	705	813	852
20	451	691	804	706	810	852
30	451	690	800	705	811	852
40	446	690	804	706	811	853
50	448	691	800	705	813	853
60	446	691	800	706	811	852

3.2 VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ BIFENOXU

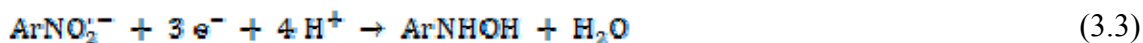
3.2.1 Vliv pH

Vliv pH na chování Bifenoxu ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) při DPV na m-AgSAE byl sledován v prostředí methanol-BR pufr (9:1) o pH použitého pufru 2 – 12. Získané voltamogramy jsou na obr. 3.2. V kyselém a neutrálním pH poskytuje látka jeden pík, který je od pH použitého pufru 8 doprovázen při negativnějších potenciálech píkem druhým. Metodou lineární regrese byl pro závislost potenciálu prvního píku E_{p1} na pH pufru v rozmezí pH 2 – 7 vypočten vztah:

$$E_{p1}, \text{ mV} = -39,5 \text{ pH} - 398,4 \quad (R = 0,9865) \quad (3.1)$$

Při pH 8–12 je potenciál obou píků na pH nezávislý. Zjištěné závislosti potenciálů píků E_{p1} a E_{p2} a prodů píků I_{p1} a I_{p2} na pH roztoku jsou uvedeny v tab. 3.4, graficky jsou závislosti E_p na pH znázorněny na obr. 3.3.

První pík odpovídá ireversibilní čtyřelektronové redukci nitroskupiny (ArNO_2) na hydroxylaminoskupinu (ArNHOH) (dle rovnice (1.1) v kapitole 1.3). V alkalickém prostředí byl pozorován odlišný redukční mechanismus, kdy látka produkovala dva nové píky, jejichž potenciály jsou od pH roztoku 8 na pH nezávislé. V souladu s literaturou^{126, 127, 150} byly tyto píky připsány následujícím redukčním krokům:



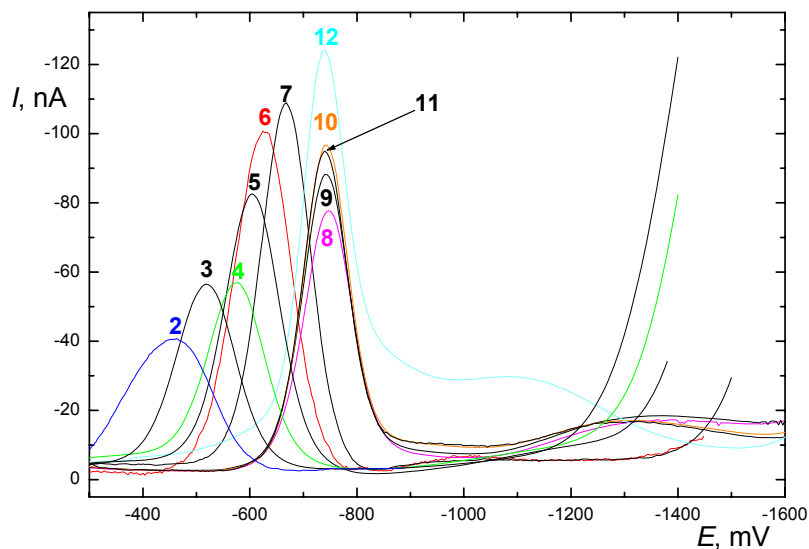
První krok zahrnuje rychlé reversibilní přijetí jednoho elektronu za vzniku radikál aniontu (rovnice (3.2)), druhým krokem je pomalá tříelektronová ireversibilní redukce (rovnice (3.3)). Rychlost určujícím krokem v rovnici (3.3) je přijetí druhého elektronu za vzniku nitrosoaniontu, buď přímo, nebo s předchozí protonizací radikál aniontu. Proto je pořadí přijímání elektronů a protonů v obou krocích silně závislé na použitém základním elektrolytu, stejně jako na struktuře dané nitrosloučeniny. Stabilita radikál

aniontu vzniklého v rovnici (3.2) je zvýšena v prostředí s nedostatkem volných protonů nutných pro dokončení rovnice (3.3), jako je tomu v aprotických rozpouštědlech nebo právě ve vodném alkalickém prostředí. Na základě těchto skutečností je pochopitelná závislost potenciálů obou píků na pH (obr. 3.3): potenciál píku čtyřelektronové redukce nitroskupiny na hydroxylaminoskupinu se posouvá směrem k zápornějším potenciálům s rostoucím pH v kyselém a neutrálním prostředí, neboť rychlost určujícím krokem redukce je přijetí druhého elektronu, kterému v této oblasti pH předchází přijetí protonu. S rostoucím pH vede inhibice protonizace k rozdělení píku a nakonec je od pH 8 potenciál píku na pH nezávislý, protože jedoelektronová redukce ArNO_2 na $\text{ArNO}_2^{\cdot-}$ je rychlá a pro své dokončení nepotřebuje dostatek protonů. Konstatní E_{p2} druhého píku je způsoben tím, že meziprodukt dihydroxylamin (ArN(OH)_2) vzniklý přijetím druhého elektronu velmi rychle dehydratuje za vzniku nitrososloučeniny (ArNO), jejíž redukční potenciál je pozitivnější než redukční potenciál ArNO_2 .

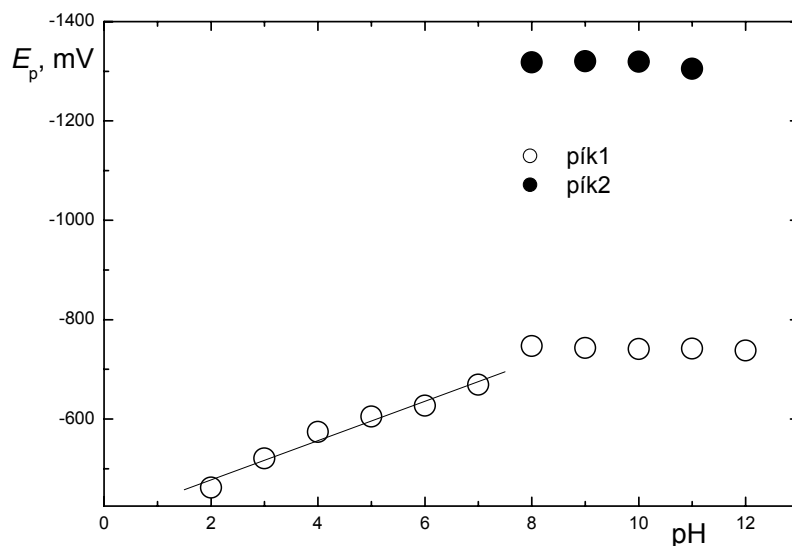
Z analytického hlediska byl nejvyšší, nejlépe vyvinutý a nejsnáze vyhodnotitelný pík získán při pH použitého pufru 7, a proto bylo pro další měření zvoleno jako vhodné prostředí směs methanol-BR pufr (9:1) o pH 7. Opakovaným měřením roztoku Bifenoxu ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) v prostředí methanol-BR pufr (9:1) o pH 2, 7 a 12 byla sledována možná pasivace povrchu elektrody. Před prvním měřením byla prováděna aktivace a před každým měřením regenerace elektrody. Opakovatelnost signálu Bifenoxu dokumentují obr. 3.4, 3.5 a 3.6. Hodnota relativní směrodatné odchylky (RSD) je za těchto podmínek 3 % (pH 2), 1,9 % (pH 7) a 1,5 % (pH 12).

Tab. 3.4 Vliv pH na DP voltamogramy Bifenoxu ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) na m-AgSAE v prostředí methanol-BR pufr (9:1)

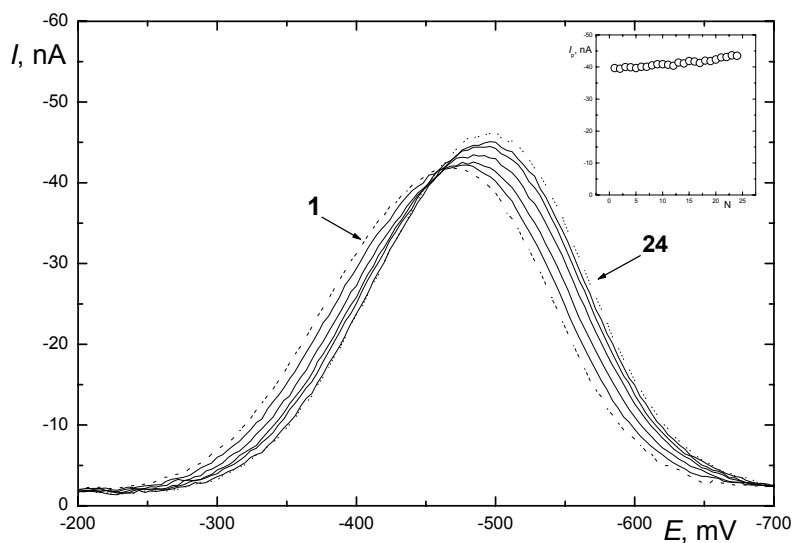
pH BR pufru	pH směsi methanol-BR pufr (9:1)	první pík		druhý pík	
		$-E_{p1}/\text{mV}$	$-I_{p1}/\text{nA}$	$-E_{p2}/\text{mV}$	$-I_{p1}/\text{nA}$
2,0	3,8	462	38,2		
3,0	5,4	521	52,0		
4,0	6,1	574	53,4		
5,0	7,0	605	80,1	pík není patrný	
6,0	7,8	627	97,2		
7,0	8,7	669	104,8		
8,0	9,3	747	73,0	1 318	16,8
9,0	9,5	743	82,9	1 320	17,9
10,0	10,0	741	90,7	1 319	17,0
11,0	10,1	742	89,0	1 305	16,9
12,0	10,6	738	103,2	nelze vyhodnotit	



Obr. 3.2 Voltamogramy Bifenoxu ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí methanol-BR pufr (9:1) o pH BR pufru 2 – 12. Čísla nad píky odpovídají hodnotě pH použitého pufru.

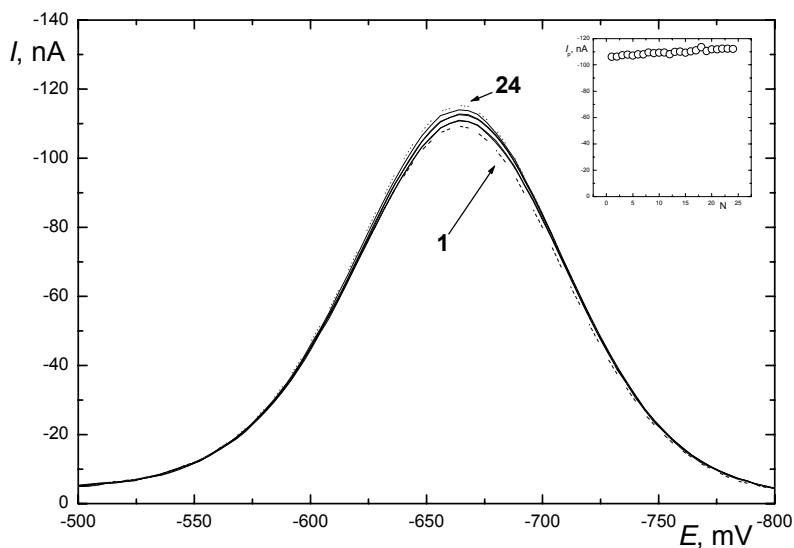


Obr. 3.3 Závislost potenciálu prvního píku (E_{p1}) a druhého píku (E_{p2}) Bifenoxu ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) na pH roztoku. Měřeno technikou DPV na m-AgSAE v prostředí methanol-BR pufr (9:1) o pH BR pufru 2 – 12.



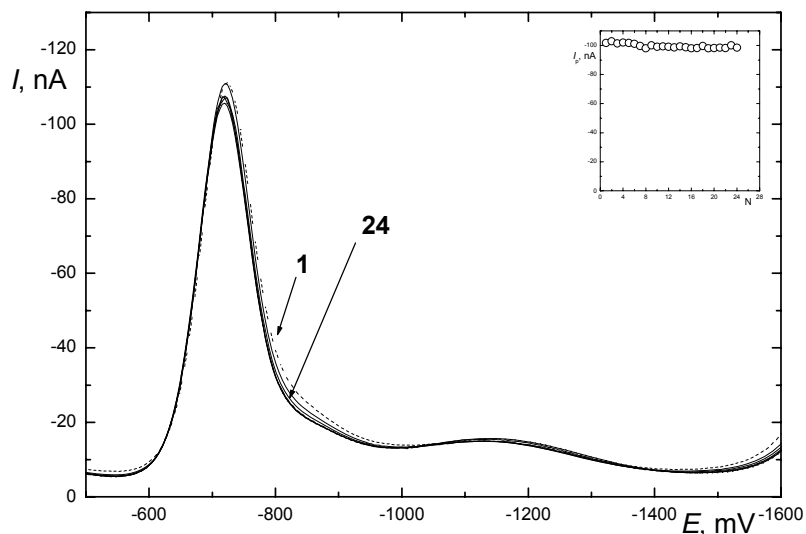
Obr. 3.4 Voltamogramy Bifenoxu ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí methanol-BR pufr (9:1) o pH 2. Regenerační potenciály: $E_{\text{in}} = -150 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = -1050 \text{ mV}$. Pořadové číslo měření: 1 (---), 4 (-), 7 (-), 11 (-), 15 (-), 20 (-), 24 (···).

Vložená závislost proudu píku I_p na počtu měření N. RSD = 3 %.



Obr. 3.5 Voltamogramy Bifenoxu ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí methanol-BR pufr (9:1) o pH 7. Regenerační potenciály: $E_{\text{in}} = -200 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = -1550 \text{ mV}$. Pořadové číslo měření: 1 (---), 4 (-), 7 (-), 11 (-), 15 (-), 19 (-), 24 (···).

Vložená závislost proudu píku I_p na počtu měření N. RSD = 1,9 %.

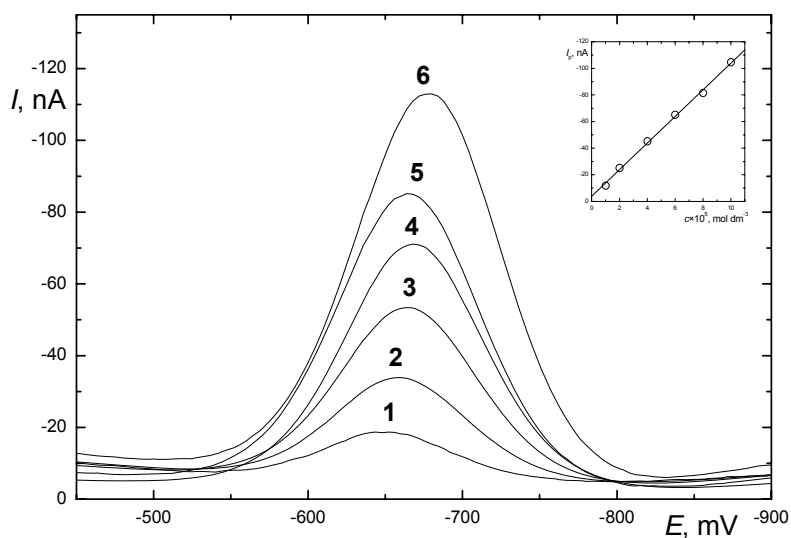


Obr. 3.6 Voltamogramy Bifenoxu ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí methanol-BR pufr (9:1) o pH 12. Regenerační potenciály: $E_{\text{in}} = -350 \text{ mV}$, $E_{\text{fin}} = -1700 \text{ mV}$. Pořadové číslo měření: 1 (---), 4 (-), 7 (-), 11 (-), 14 (-), 19 (-), 24 (···).

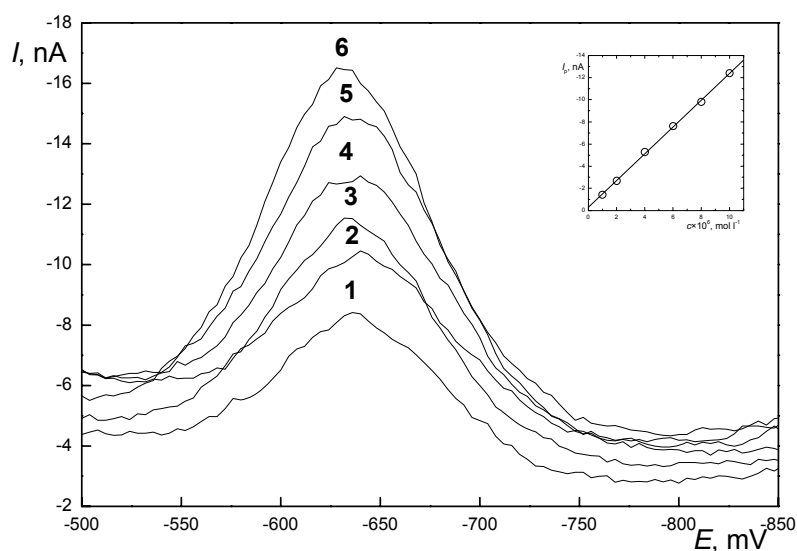
Vložená závislost proudu píku I_p na počtu měření N . RSD = 1,5 %.

3.2.2 Kalibrační závislosti

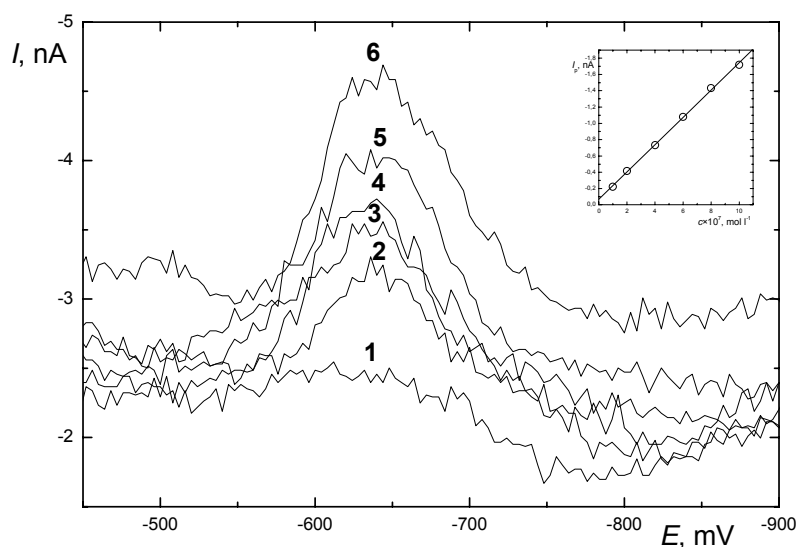
V nalezeném optimálním prostředí směsi methanol-BR pufr (9:1) o pH pufru 7 byly metodou DPV na m-AgSAE proměřeny koncentrační závislosti v rozmezí $1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. Naměřené voltamogramy pro jednotlivá koncentrační rozmezí jsou zobrazeny na následujících obrázcích: na obr. 3.7 pro koncentrační rozmezí $(1-10) \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, na obr. 3.8 pro koncentraci Bifenoxu $(1-10) \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ a na obr. 3.9 pro koncentrační rozmezí $(1-10) \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$. Získané závislosti výšky píků na koncentraci Bifenoxu jsou lineární, příslušné parametry kalibračních přímek a dosažený limit detekce jsou uvedeny v tab. 3.5.



Obr. 3.7 Voltamogramy Bifenoxu měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí methanol-BR pufr (9:1) o pH 7. Koncentrace Bifenoxu [mol dm⁻³]: 1×10^{-5} (1), 2×10^{-5} (2), 4×10^{-5} (3), 6×10^{-5} (4), 8×10^{-5} (5), 1×10^{-4} (6). Vložená je kalibrační závislost proudu píku I_p na koncentraci Bifenoxu v koncentračním rozmezí $1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³.



Obr. 3.8 Voltamogramy Bifenoxu měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí methanol-BR pufr (9:1) o pH 7. Koncentrace Bifenoxu [mol dm⁻³]: 1×10^{-6} (1), 2×10^{-6} (2), 4×10^{-6} (3), 6×10^{-6} (4), 8×10^{-6} (5), 1×10^{-5} (6). Vložená je kalibrační závislost proudu píku I_p na koncentraci Bifenoxu v koncentračním rozmezí $1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-6}$ mol dm⁻³.



Obr. 3.9 Voltamogramy Bifenoxu měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí methanol-BR pufr (9:1) o pH 7. Koncentrace Bifenoxu [mol dm^{-3}]: 1×10^{-7} (1), 2×10^{-7} (2), 4×10^{-7} (3), 6×10^{-7} (4), 8×10^{-7} (5), 1×10^{-6} (6). Vložená je kalibrační závislost proudu píku I_p na koncentraci Bifenoxu v koncentračním rozmezí $1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$.

Tab. 3.5 Parametry kalibračních přímek pro stanovení Bifenoxu metodou DPV na m-AgSAE v prostředí methanol-BR pufr (9:1) o pH pufru 7

koncentrace/ mol dm^{-3}	směrnice/ $\text{nA dm}^3 \text{ mol}^{-1}$	úsek/ nA	korelační koeficient	LOD/ mol dm^{-3}
$(1 - 10) \times 10^{-5}$	$10,01 \times 10^5$	-3,83	0,9987	—
$(1 - 10) \times 10^{-6}$	$-1,21 \times 10^5$	-0,29	0,9997	—
$(1 - 10) \times 10^{-7}$	$-0,17 \times 10^5$	-0,7	0,9995	$2,4 \times 10^{-7}$

3.2.3 Cyklická voltametrie

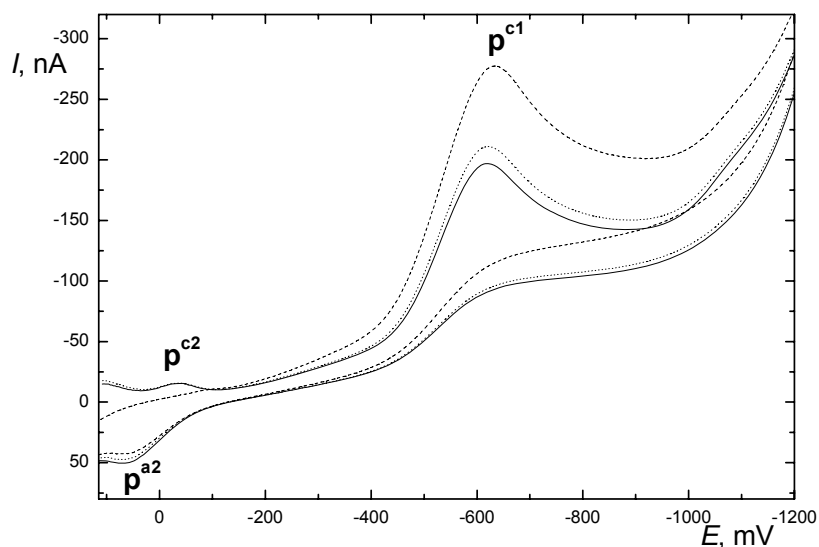
Cyklická voltametrie byla využita ke studiu elektrochemického chování Bifenoxu ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) na m-AgSAE ve smíšeném vodně (BR pufr)-methanolicím prostředí (1:9) o pH použitého pufru 2, 7 a 12. Naměřené cyklické voltamogramy při pH pufru 2 jsou zobrazeny na obr. 3.10, při pH pufru 7 na obr. 3.11 a při pH pufru 12 na obr. 3.12. Ukázán je první, druhý a dvanáctý cyklus. Cyklické

voltamogramy byly měřeny od pozitivních k negativním potenciálům a zpět. V prvním dopředném scanu je patrný katodický pík p^{c1} odpovídající čtyřelektronové ireversibilní redukci nitroskupiny na hydroxylaminoskupinu (rovnice (1.1) v kapitole 1.3). Anodický pík p^{a2} ve zpětném scanu odpovídá dvouelektronové reversibilní oxidaci hydroxylaminoskupiny na nitrosoderivát, zpětná reakce pak produkuje katodický pík p^{c2} v druhém cyklu (rovnice (3.4)). Tyto tři píky jsou patrné v celém pH rozmezí.

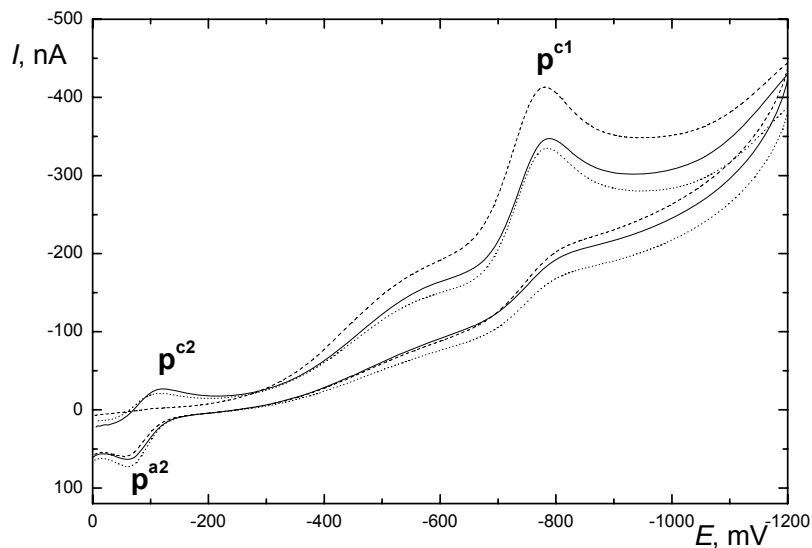


V alkalickém prostředí (obr. 3.12) je ve shodě s DPV a literaturou^{129, 150} (kapitola 3.2.1) první katodický pík doprovázen při negativnějších potenciálech píkem druhým, což odpovídá jednoelektronové redukci nitroskupiny na nitro radikál aniont (p^{c1a}) a jeho následné redukci na hydroxylamin (p^{c1b}) podle rovnic (3.2) a (3.3) v kapitole 3.2.1.

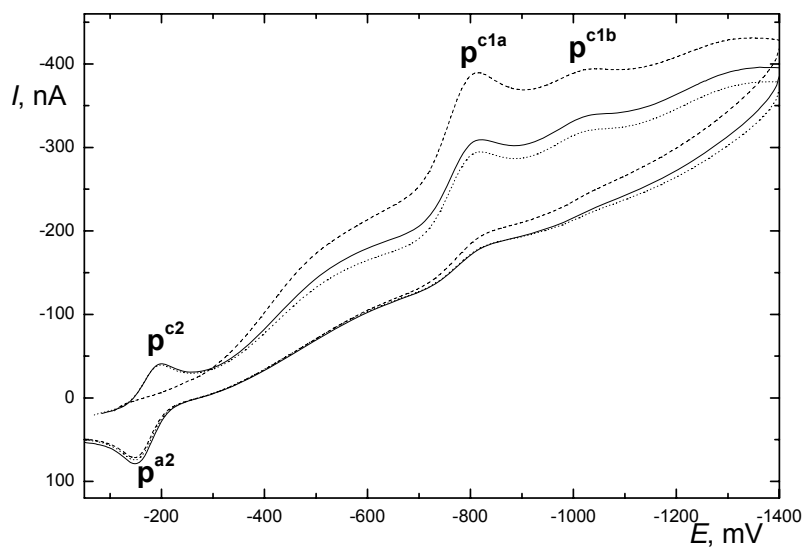
Cyklická voltametrie byla dále využita při zjišťování, zda je redukce nitroskupiny na hydroxylaminoskupinu řízena difuzí. Cyklické voltamogramy byly měřeny opět v prostředí methanol-BR pufr (9:1) o pH pufru 2, 7 a 12 při různých rychlostech polarizace (5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280, 2560, 5120 mV s^{-1}). Naměřené voltamogramy a zjištěné závislosti proudů katodických píků na odmocnině z rychlosti polarizace jsou na obrázcích 3.13 (pH 2), 3.14 (pH 7) a 3.15 (pH 12). Všechny závislosti jsou lineární a jejich parametry jsou uvedeny v tab. 3.6. Linearita a vysoké korelační koeficienty ($R > 0,9990$) potvrzují, že redukce nitroskupiny na hydroxylaminoskupinu je řízena difuzí.



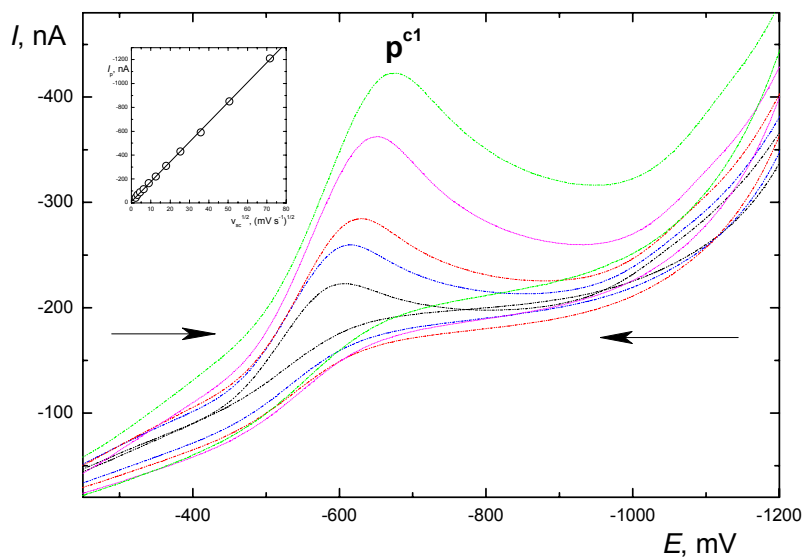
Obr. 3.10 Voltamogramy Bifenoxu ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) měřené technikou CV na m-AgSAE v prostředí methanol-BR pufr (9:1) o pH pufru 2. Polarizační rychlost: 100 mV s^{-1} . 1. (---), 2 (-) a 12 (···) cyklus



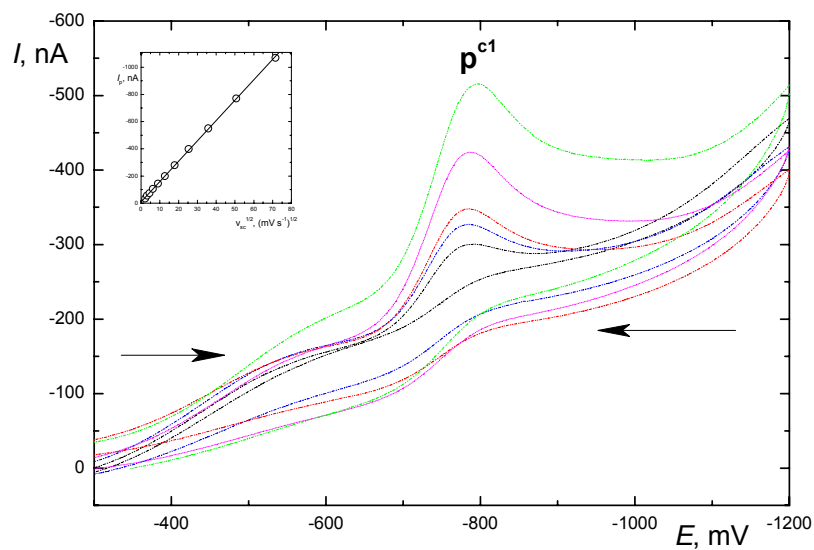
Obr. 3.11 Voltamogramy Bifenoxu ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) měřené technikou CV na m-AgSAE v prostředí methanol-BR pufr (9:1) o pH pufru 7. Polarizační rychlost: 100 mV s^{-1} . 1. (---), 2 (-) a 12 (···) cyklus



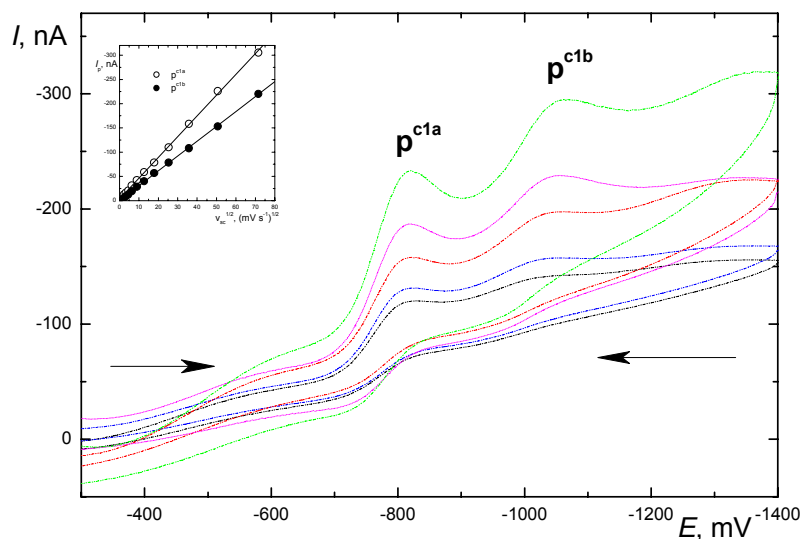
Obr. 3.12 Voltamogramy Bifenoxu ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) měřené technikou CV na m-AgSAE v prostředí methanol-BR pufr (9:1) o pH pufru 12. Polarizační rychlost: 100 mV s^{-1} . 1. (---), 2 (–) a 12 (···) cyklus



Obr. 3.13 Voltamogramy Bifenoxu ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) měřené technikou CV na m-AgSAE v prostředí methanol-BR pufr (9:1) o pH pufru 2. Polarizační rychlost: 20 (–), 40 (–), 80 (–), 160 (–) a 320 (–) mV s^{-1} . Vložená závislost proudu katodického píku p^{c1} na odmocnině z rychlosti polarizace.



Obr. 3.14 Voltamogramy Bifenoxu ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) měřené technikou CV na m-AgSAE v prostředí methanol-BR pufr (9:1) o pH pufru 7. Polarizační rychlost: 20 (—), 40 (—), 80 (—), 160 (—) a 320 (—) mV s^{-1} . Vložená závislost proudu katodického píku p^{c1} na odmocnině z rychlosti polarizace.



Obr. 3.15 Voltamogramy Bifenoxu ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) měřené technikou CV na m-AgSAE v prostředí methanol-BR pufr (9:1) o pH pufru 12. Polarizační rychlost: 20 (—), 40 (—), 80 (—), 160 (—) a 320 (—) mV s^{-1} . Vložená závislost proudů katodických píků p^{c1a} a p^{c1b} na odmocnině z rychlosti polarizace.

Tab. 3.6 Parametry lineárních závislostí výšky katodického píku p^{cl} na odmocnině z rychlosti polarizace.

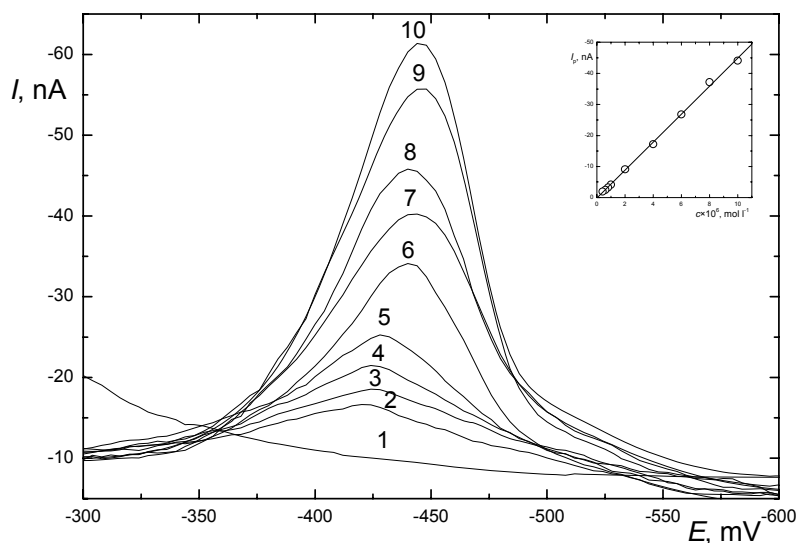
pH	pík	směrnice/nA $\text{mV}^{-1/2} \text{s}^{1/2}$	úsek/nA	korelační koeficient
2	p^{cl}	-16,65	-10,25	0,9999
7	p^{cl}	-14,96	-9,72	0,9999
12	p^{cla}	-4,28	-3,32	0,9996
	p^{clb}	-3,07	+0,11	0,9998

3.3 STANOVENÍ BIFENOXU V MODELOVÝCH VZORCÍCH PITNÉ A ŘÍČNÍ VODY

3.3.1 Přímé stanovení

3.3.1.1 Přímé stanovení v deionizované vodě

Koncentrační závislosti byly změřeny v rozmezí $(0,4 - 10) \times 10^{-6}$ mol dm^{-3} Bifenoxu v deionizované vodě (obr. 3.16). Parametry lineární koncentrační závislosti jsou v tab. 3.7.



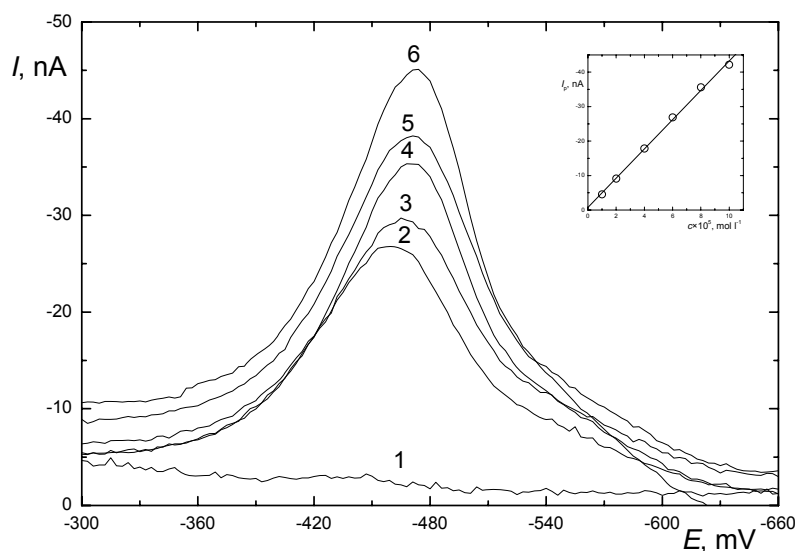
Obr. 3.16 DP voltamogramy Bifenoxu při přímém stanovení v deionizované vodě (deionizovaná voda-BR pufr (1:1) o pH pufru 7). Koncentrace Bifenoxu [mol dm^{-3}]: 0 (1), 4×10^{-7} (2), 6×10^{-7} (3), 8×10^{-7} (4), 1×10^{-6} (5), 2×10^{-6} (6), 4×10^{-6} (7), 6×10^{-6} (8), 8×10^{-6} (9), 1×10^{-5} (10). Vložená je kalibrační závislost proudu píku I_p na koncentraci Bifenoxu v koncentračním rozmezí $1 \times 10^{-5} - 4 \times 10^{-7}$ mol dm^{-3} .

Tab. 3.7 Parametry kalibrační přímky pro přímé stanovení Bifenoxu v deionizované vodě metodou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 7

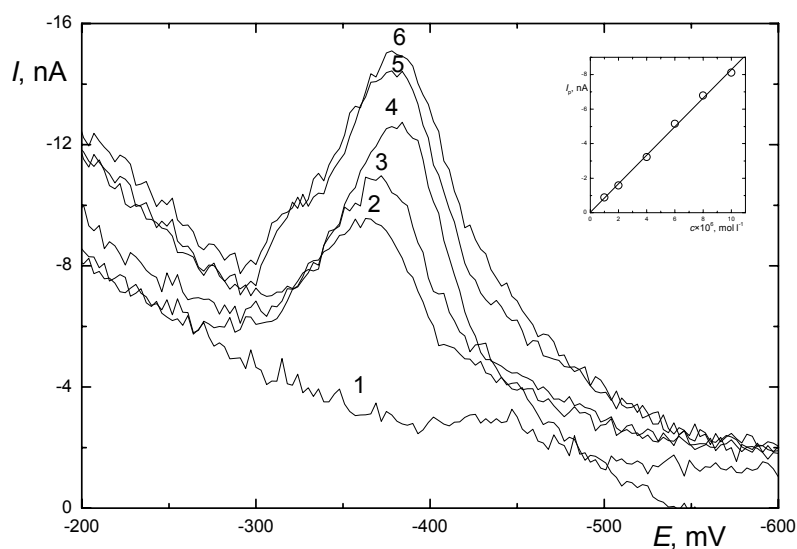
koncentrace/mol dm ⁻³	směrnice/nA dm ³ mol ⁻¹	úsek/nA	korelační koeficient	LOD/mol dm ⁻³
(0,4 – 10)×10 ⁻⁶	4,50×10 ⁵	0,12	0,9993	6,1×10 ⁻⁷

3.3.1.2 Přímé stanovení v pitné vodě

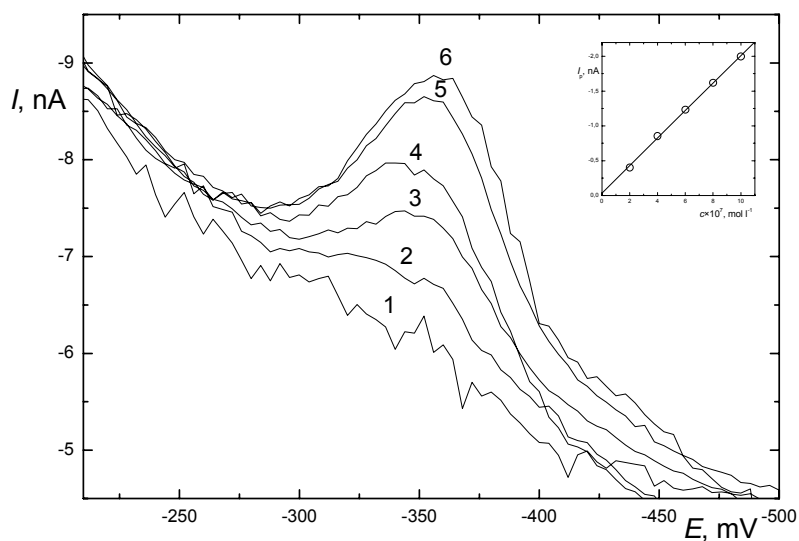
Koncentrační závislosti byly změřeny v rozmezí $1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³ Bifenoxu v pitné vodě. Naměřené voltamogramy pro jednotlivá koncentrační rozmezí jsou zobrazeny na následujících obrázcích: na obr. 3.17 pro koncentrační rozmezí $(2-10) \times 10^{-5}$ mol dm⁻³, na obr. 3.18 pro koncentraci Bifenoxu $(2-10) \times 10^{-6}$ mol dm⁻³ a na obr. 3.19 pro koncentrační rozmezí $(2-10) \times 10^{-7}$ mol dm⁻³. Parametry lineárních koncentračních závislostí jsou v tab. 3.8.



Obr. 3.17 DP voltamogramy Bifenoxu při přímém stanovení v pitné vodě (pitná voda-BR pufr (1:1) o pH pufru 7). Koncentrace Bifenoxu [mol dm⁻³]: 0 (1), 2×10^{-5} (2), 4×10^{-5} (3), 6×10^{-5} (4), 8×10^{-5} (5), 1×10^{-4} (6). Vložená je kalibrační závislost proudu píku I_p na koncentraci Bifenoxu v koncentračním rozmezí $1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³.



Obr. 3.18 DP voltamogramy Bifenoxu při přímém stanovení v pitné vodě (pitná voda-BR pufr (1:1) o pH pufru 7). Koncentrace Bifenoxu [mol dm^{-3}]: 0 (1), 2×10^{-6} (2), 4×10^{-6} (3), 6×10^{-6} (4), 8×10^{-6} (5), 1×10^{-5} (6). Vložená je kalibrační závislost proudu píku I_p na koncentraci Bifenoxu v koncentračním rozmezí $1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$.



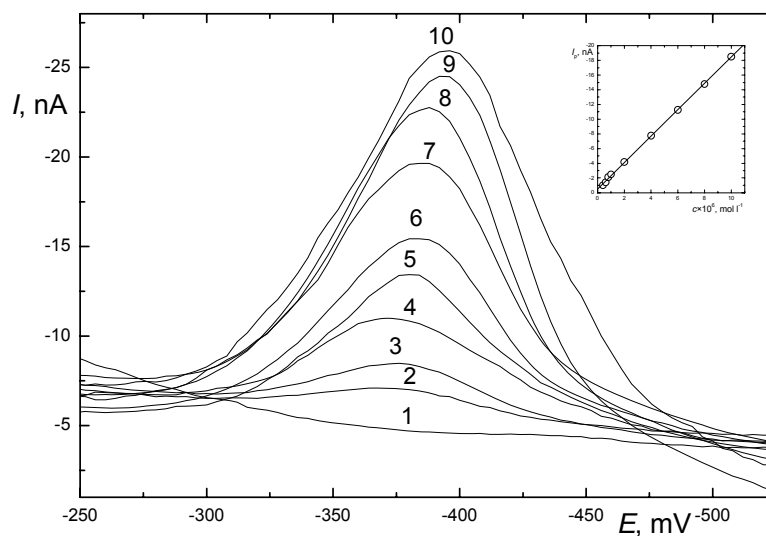
Obr. 3.19 DP voltamogramy Bifenoxu při přímém stanovení v pitné vodě (pitná voda-BR pufr (1:1) o pH pufru 7). Koncentrace Bifenoxu [mol dm^{-3}]: 0 (1), 2×10^{-7} (2), 4×10^{-7} (3), 6×10^{-7} (4), 8×10^{-7} (5), 1×10^{-6} (6). Vložená je kalibrační závislost proudu píku I_p na koncentraci Bifenoxu v koncentračním rozmezí $1 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$.

Tab. 3.8 Parametry kalibračních přímek pro přímé stanovení Bifenoxu v pitné vodě metodou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 7

koncentrace/mol dm ⁻³	směrnice/nA dm ³ mol ⁻¹	úsek/nA	korelační koeficient	LOD/mol dm ⁻³
(1 – 10)×10 ⁻⁵	-4,25×10 ⁵	-0,74	0,9989	–
(1 – 10)×10 ⁻⁶	-0,83×10 ⁵	-0,02	0,9988	–
(2 – 10)×10 ⁻⁷	-0,20×10 ⁶	-0,03	0,9994	6,7×10 ⁻⁷

3.3.1.3 Přímé stanovení v říční vodě

Koncentrační závislosti byly změřeny v rozmezí $1 \times 10^{-5} - 4 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³ Bifenoxu v říční vodě (obr. 3.20). Parametry lineární koncentrační závislosti jsou v tab. 3.9.



Obr. 3.20 DP voltamogramy Bifenoxu při přímém stanovení v říční vodě (říční voda-BR pufr (1:1) o pH pufru 7). Koncentrace Bifenoxu [mol dm⁻³]: 0 (1), 4×10^{-7} (2), 6×10^{-7} (3), 8×10^{-7} (4), 1×10^{-6} (5), 2×10^{-6} (6), 4×10^{-6} (7), 6×10^{-6} (8), 8×10^{-6} (9), 1×10^{-5} (10). Vložená je kalibrační závislost proudu píku I_p na koncentraci Bifenoxu v koncentračním rozmezí $1 \times 10^{-5} - 4 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³.

Tab. 3.9 Parametry kalibrační přímky pro přímé stanovení Bifenoxu v říční vodě metodou DPV na m-AgSAE v prostředí BR o pH 7

koncentrace/mol dm ⁻³	směrnice/nA dm ³ mol ⁻¹	úsek/nA	korelační koeficient	LOD/mol dm ⁻³
(0,4 – 10)×10 ⁻⁶	-1,80×10 ⁵	-0,52	0,9998	6,9×10 ⁻⁷

3.3.2 Extrakce tuhou fází

3.3.2.1 Extrakce tuhou fází z deionizované vody

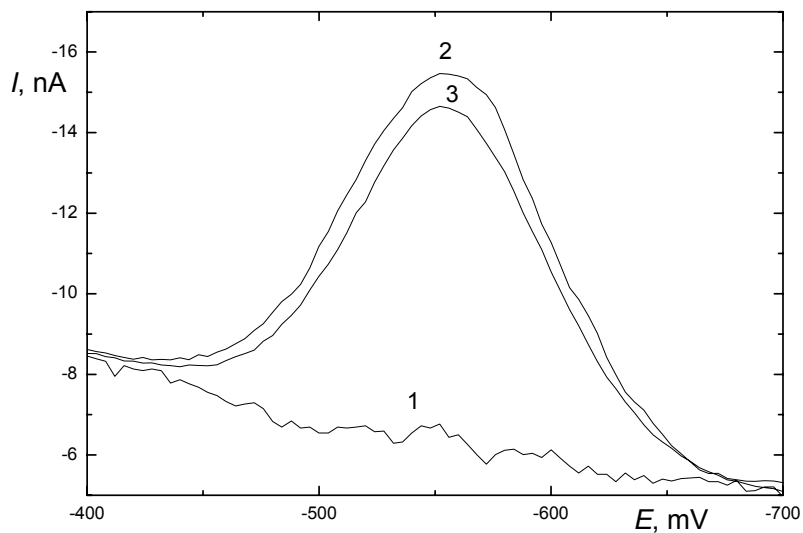
Ke snížení limitu detekce byla použita předběžná separace a prekoncentrace Bifenoxu pomocí extrakce tuhou fází, kdy byly používány kolonky LiChrolut RP-18E (Merck, Německo), které byly naplněny 500 mg fáze RP-18 vázané na silikagel. Extrakce tuhou fází byla nejprve provedena s modelovými vzorky deionizované vody.

Parametry jednotlivých extrakcí uvádí tab. 3.10, naměřené voltamogramy jsou na obr. 3.21 a 3.22.

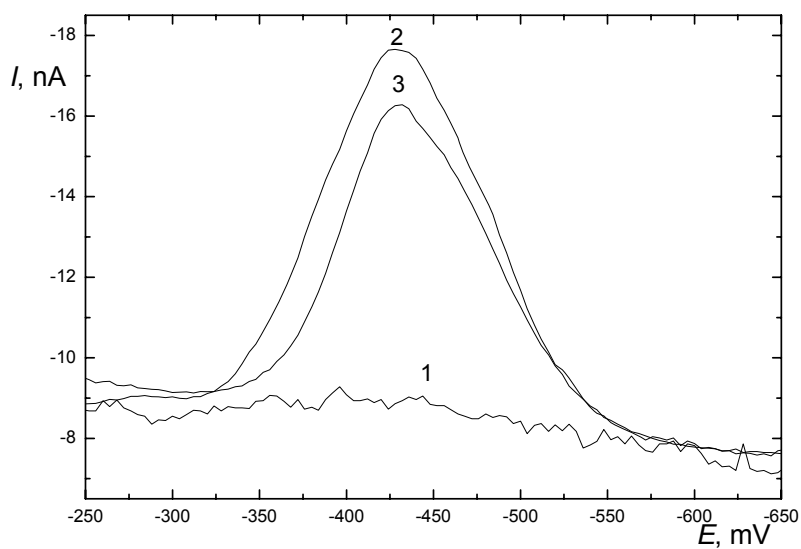
Dále byly proměřeny kalibrační přímky pro stanovení Bifenou po extrakci tuhou fází z deionizované vody v koncentračním rozmezí $1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-8}$ mol dm⁻³. Parametry kalibračních přímek jsou uvedeny v tab. 3.11, voltamogramy pro jednotlivá koncentrační rozmezí jsou na obr. 3.23 a 3.24.

Tab. 3.10 Parametry jednotlivých extrakcí Bifenoxu tuhou fází z deionizované vody

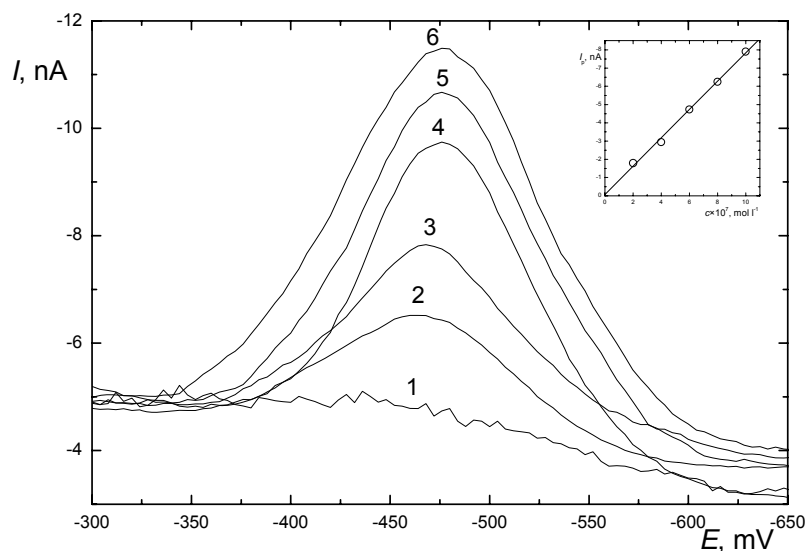
c Bifenoxu ve vodě/mol dm ⁻³	extrahovaný objem vzorku/ml	průtoková rychlost vzorku kolonou/ ml min ⁻¹	-I _p /nA	-I _p ⁰ /nA	výtěžek/%
1×10 ⁻⁶	100	5	8,0	8,7	92
1×10 ⁻⁷	1000	8	7,8	9,2	85



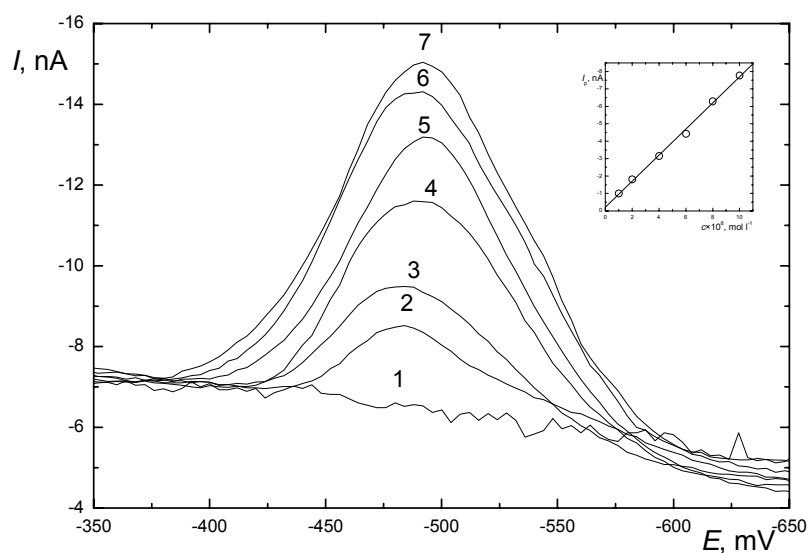
Obr. 3.21 DP voltamogramy Bifenoxu ($c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) v prostředí methanol-BR pufr (1:1) o pH pufru 7 po extrakci tuhou fází ze 100 ml deionizované vody. Slepý vzorek (1), extrakt z vodného roztoku (2), přímý přidavek Bifenoxu ke slepému vzorku (3).



Obr. 3.22 DP voltamogramy Bifenoxu ($c = 1 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) v prostředí methanol-BR pufr (1:1) o pH pufru 7 po extrakci tuhou fází z 1000 ml deionizované vody. Slepý vzorek (1), extrakt z vodného roztoku (2), přímý přidavek Bifenoxu ke slepému vzorku (3).



Obr. 3.23 DP voltamogramy Bifenoxu v prostředí methanol-BR pufr (1:1) o pH pufru 7 po extrakci Bifenoxu ze 100 ml deionizované vody. Koncentrace Bifenoxu v deionizované vodě [mol dm⁻³]: 0 (1), 2×10^{-7} (2), 4×10^{-7} (3), 6×10^{-7} (4), 8×10^{-7} (5), 1×10^{-6} (6). Vložená je kalibrační závislost proudu píku I_p na koncentraci Bifenoxu v koncentračním rozmezí $1 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³.



Obr. 3.24 DP voltamogramy Bifenoxu v prostředí methanol-BR pufr (1:1) o pH pufru 7 po extrakci Bifenoxu z 1000 ml deionizované vody. Koncentrace Bifenoxu v deionizované vodě [mol dm⁻³]: 0 (1), 1×10^{-8} (2), 2×10^{-8} (3), 4×10^{-8} (4), 6×10^{-8} (5), 8×10^{-8} (6), 1×10^{-7} (7). Vložená je kalibrační závislost proudu píku I_p na koncentraci Bifenoxu v koncentračním rozmezí $1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-8}$ mol dm⁻³.

Tab. 3.11 Parametry kalibračních přímek pro stanovení Bifenoxu po extrakci tuhou fází z deionizované vody. Měřeno v prostředí methanol-BR pufr (1:1) o pH pufru 7 technikou DPV.

c Bifenoxu v deionizované vodě/ mol dm ⁻³	směrnice/nA dm ³ mol ⁻¹	úsek/nA	korelační koeficient	LOD/mol dm ⁻³
(2–10)×10 ⁻⁷	-0,78×10 ⁶	-0,07	0,9982	–
(1–10)×10 ⁻⁸	-0,75×10 ⁷	-0,21	0,9984	2,5×10 ⁻⁸

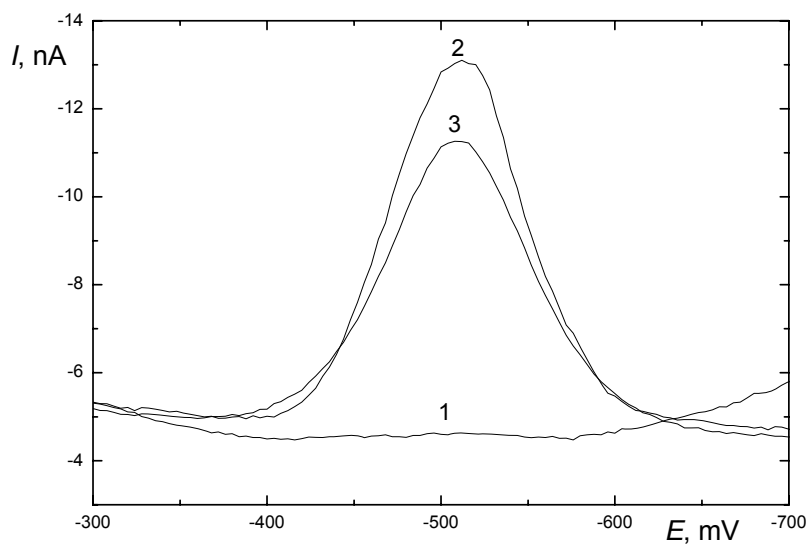
3.3.2.2 Extrakce tuhou fází z pitné vody

Parametry extrakce jsou uvedeny v tab. 3.12, naměřené voltamogramy jsou na obr. 3.25 a 3.26.

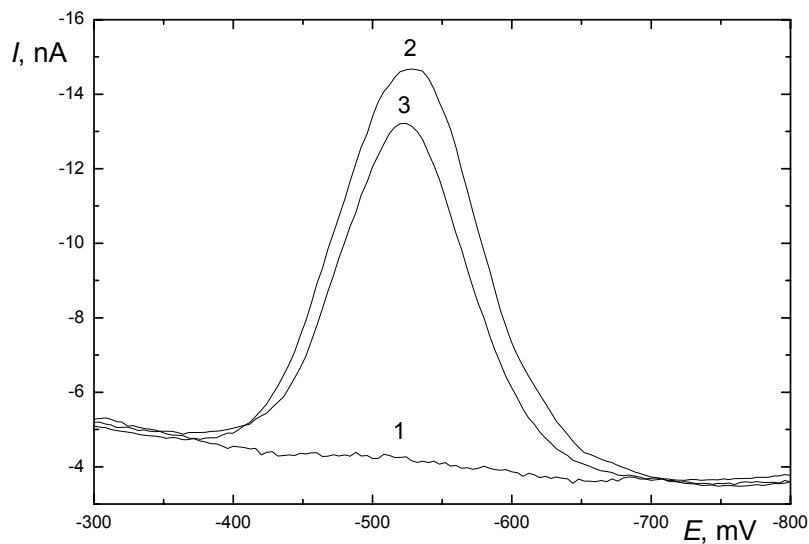
Vzhledem k dobrým výsledkům extrakce bylo možno dále proměřit kalibrační závislosti pro stanovení Bifenou po extrakci tuhou fází z pitné vody v koncentračním rozmezí 1×10⁻⁶ – 8×10⁻¹⁰ mol dm⁻³. Parametry kalibračních přímek jsou uvedeny v tab. 3.13, voltamogramy pro jednotlivá koncentrační rozmezí jsou na obr. 3.27 a 3.28.

Tab. 3.12 Parametry jednotlivých extrakcí Bifenoxu tuhou fází z pitné vody

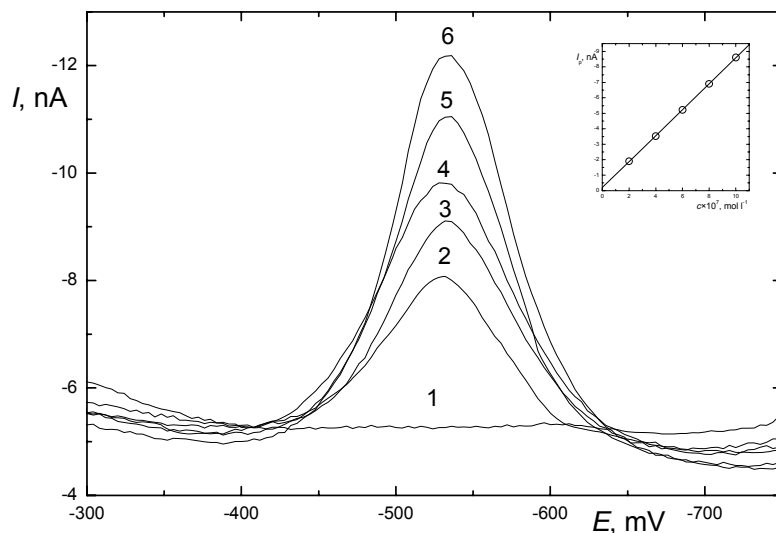
c Bifenoxu v pitné vodě/ mol dm ⁻³	extrahovaný objem vzorku/ml	průtoková rychlost vzorku kolonou/ ml min ⁻¹	-I _p /nA	-I _p ⁰ /nA	výtěžek/%
1×10 ⁻⁶	100	5	6,6	8,3	80
1×10 ⁻⁷	1000	5	9,0	10,48	86



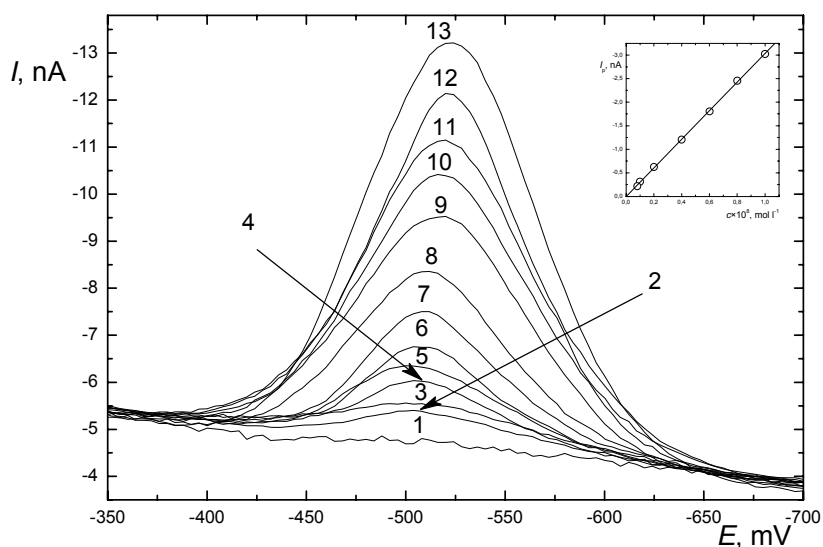
Obr. 3.25 DP voltamogramy Bifenoxu ($c = 1 \times 10^{-6}$ mol dm⁻³) v prostředí methanol-BR pufr (1:1) o pH pufru 7 po extrakci tuhou fází ze 100 ml pitné vody. Slepý vzorek (1), extrakt z vodného roztoku (2), přímý přídavek Bifenoxu ke slepému vzorku (3).



Obr. 3.26 DP voltamogramy Bifenoxu ($c = 1 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³) v prostředí methanol-BR pufr (1:1) o pH pufru 7 po extrakci tuhou fází z 1000 ml pitné vody. Slepý vzorek (1), extrakt z vodného roztoku (2), přímý přídavek Bifenoxu ke slepému vzorku (3).



Obr. 3.27 DP voltamogramy Bifenoxu v prostředí methanol-BR pufr (1:1) o pH pufru 7 po extrakci Bifenoxu ze 100 ml pitné vody. Koncentrace Bifenoxu v pitné vodě [mol dm^{-3}]: 0 (1), 2×10^{-7} (2), 4×10^{-7} (3), 6×10^{-7} (4), 8×10^{-7} (5), 1×10^{-6} (6). Vložená je kalibrační závislost proudu píku I_p na koncentraci Bifenoxu v koncentračním rozmezí $1 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$.



Obr. 3.28 DP voltamogramy Bifenoxu v prostředí methanol-BR pufr (1:1) o pH pufru 7 po extrakci Bifenoxu z 1000 ml pitné vody. Koncentrace Bifenoxu v pitné vodě [mol dm^{-3}]: 0 (1), 8×10^{-10} (2), 1×10^{-9} (3), 2×10^{-9} (4), 4×10^{-9} (5), 6×10^{-9} (6), 8×10^{-9} (7), 1×10^{-8} (8), 2×10^{-8} (9), 4×10^{-8} (10), 6×10^{-8} (11), 8×10^{-8} (12), 1×10^{-7} (13). Vložená je kalibrační závislost proudu píku I_p na koncentraci Bifenoxu v koncentračním rozmezí $1 \times 10^{-8} - 8 \times 10^{-10} \text{ mol dm}^{-3}$.

Tab. 3.13 Parametry kalibračních přímek pro stanovení Bifenoxu po extrakci tuhou fází z pitné vody. Měřeno v prostředí methanol-BR pufr (1:1) o pH pufru 7 technikou DPV.

c Bifenoxu v pitné vodě/ mol dm ⁻³	směrnice/nA dm ³ mol ⁻¹	úsek/nA	korelační koeficient	LOD/mol dm ⁻³
(2–10)×10 ⁻⁷	-0,84×10 ⁷	-0,20	0,9999	–
(0,8–10)×10 ⁻⁹	-3,04×10 ⁷	+0,01	0,9998	1,5×10 ⁻⁹

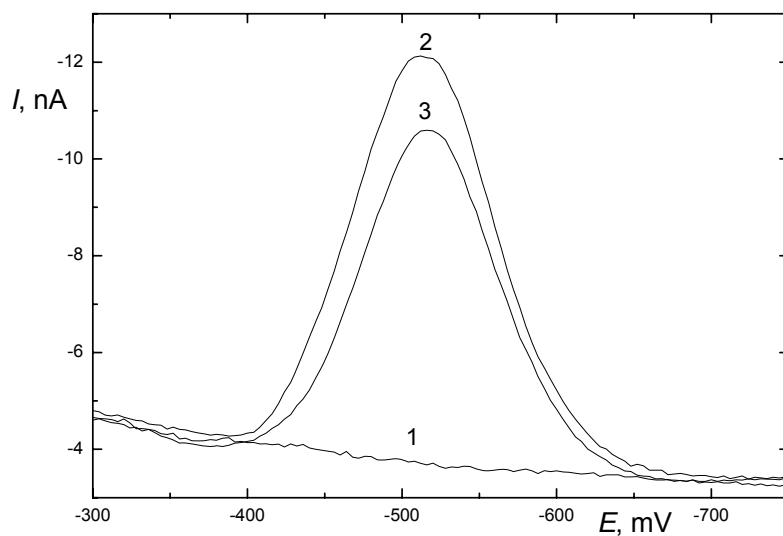
3.3.2.3 Extrakce tuhou fází z říční vody

Parametry extrakce jsou uvedeny v tab. 3.14, naměřené voltamogramy jsou na obr. 3.29 a 3.30.

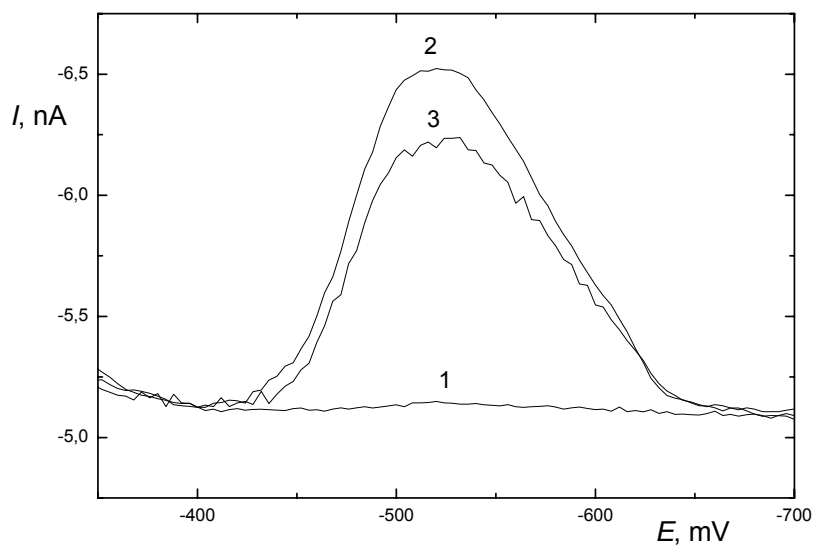
Vzhledem k dobrým výsledkům extrakce bylo možno dále proměřit kalibrační závislosti pro stanovení Bifenou po extrakci tuhou fází z říční vody v koncentračním rozmezí 1×10⁻⁶ – 6×10⁻¹⁰ mol dm⁻³. Parametry kalibračních přímek jsou uvedeny v tab. 3.15, voltamogramy pro jednotlivá koncentrační rozmezí jsou na obr. 3.31 a 3.32.

Tab. 3.14 Parametry jednotlivých extrakcí Bifenoxu tuhou fází z říční vody

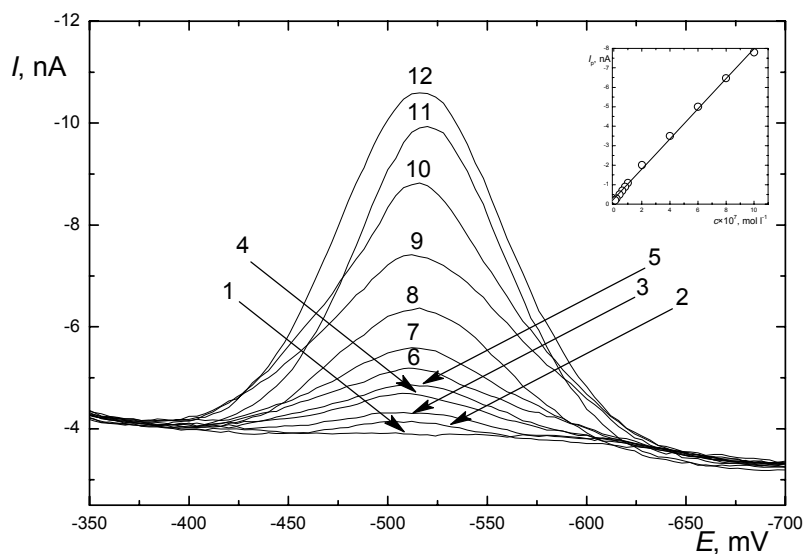
c Bifenoxu v říční vodě/ mol dm ⁻³	extrahovaný objem vzorku/ml	průtoková rychlost vzorku kolonou/ ml min ⁻¹	-I _p /nA	-I _p ⁰ /nA	výtěžek/%
1×10 ⁻⁶	100	5	7,0	8,3	84
1×10 ⁻⁸	1000	4	1,1	1,4	79



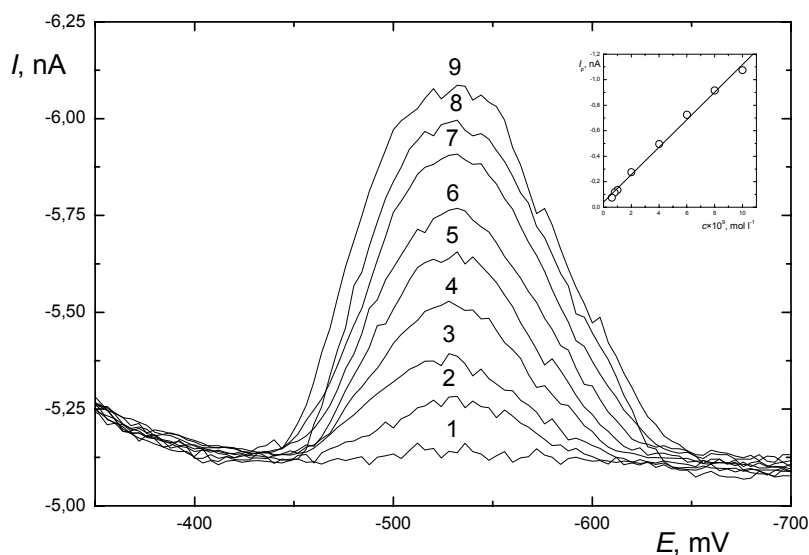
Obr. 3.29 DP voltamogramy Bifenoxu ($c = 1 \times 10^{-6}$ mol dm⁻³) v prostředí methanol-BR pufr (1:1) o pH pufru 7 po extrakci tuhými fázemi ze 100 ml říční vody. Slepý vzorek (1), extrakt z vodného roztoku (2), přímý přídavek Bifenoxu ke slepému vzorku (3).



Obr. 3.30 DP voltamogramy Bifenoxu ($c = 1 \times 10^{-8}$ mol dm⁻³) v prostředí methanol-BR pufr (1:1) o pH pufru 7 po extrakci tuhými fázemi z 1000 ml říční vody. Slepý vzorek (1), extrakt z vodného roztoku (2), přímý přídavek Bifenoxu ke slepému vzorku (3).



Obr. 3.31 DP voltamogramy Bifenoxu v prostředí methanol-BR pufr (1:1) o pH pufru 7 po extrakci Bifenoxu ze 100 ml říční vody. Koncentrace Bifenoxu v říční vodě [mol dm^{-3}]: 0 (1), 1×10^{-8} (2), 2×10^{-8} (3), 4×10^{-8} (4), 6×10^{-8} (5), 8×10^{-8} (6), 1×10^{-7} (7), 2×10^{-7} (8), 4×10^{-7} (9), 6×10^{-7} (10), 8×10^{-7} (11), 1×10^{-6} (12). Vložená je kalibrační závislost proudu píku I_p na koncentraci Bifenoxu v koncentračním rozmezí $1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$.



Obr. 3.32 DP voltamogramy Bifenoxu v prostředí methanol-BR pufr (1:1) o pH pufru 7 po extrakci Bifenoxu z 1000 ml říční vody. Koncentrace Bifenoxu v říční vodě [mol dm^{-3}]: 0 (1), 6×10^{-10} (2), 8×10^{-10} (3), 1×10^{-9} (4), 2×10^{-9} (5), 4×10^{-9} (6), 6×10^{-9} (7), 8×10^{-9} (8), 1×10^{-8} (9). Vložená je kalibrační závislost proudu píku I_p na koncentraci Bifenoxu v koncentračním rozmezí $1 \times 10^{-8} - 6 \times 10^{-10} \text{ mol dm}^{-3}$.

Tab. 3.15 Parametry kalibračních přímk pro stanovení Bifenoxu po extrakci tuhou fází z říční vody. Měřeno v prostředí methanol-BR pufr (1:1) o pH pufru 7 technikou DPV.

c Bifenoxu v říční vodě/ mol dm ⁻³	směrnice/nA dm ³ mol ⁻¹	úsek/nA	korelační koeficient	LOD/mol dm ⁻³
(0,1 – 10) × 10 ⁻⁷	-0,27 × 10 ⁷	-0,26	0,9989	–
(0,6 – 10) × 10 ⁻⁹	-0,11 × 10 ⁹	-0,04	0,9974	8,5 × 10 ⁻¹⁰

4 ZÁVĚR

Předkládaná diplomová práce se zaměřila na studium a analytické využití elektrochemického chování herbicidu Bifenoxu. Byly nalezeny optimální podmínky jeho stanovení pomocí diferenční pulsní voltametrie na m-AgSAE v prostředí methanol-BR pufr (9:1) o pH použitého pufru 7 v koncentračním rozmezí 1×10^{-4} – 1×10^{-7} mol dm⁻³. Za těchto podmínek bylo dosaženo meze detekce $2,4 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³.

Dále byl studován mechanismus elektrochemické redukce Bifenoxu na m-AgSAE, kdy bylo zjištěno, že v kyselém a neutrálním prostředí poskytuje látka jeden redukční pík, který odpovídá čtyřelektronové ireversibilní redukci nitroskupiny na hydroxylamin. V alkalickém prostředí probíhá redukce nitroskupiny ve dvou krocích, nejprve jednoelektronovou reversibilní redukcí nitroskupiny na nitro radikál aniont, následovanou při negativnějších potenciálech pomalou tříelektronovou ireversibilní redukcí radikál aniontu na hydroxylaminoskupinu. Zjištěný sled reakcí byl potvrzen pomocí cyklické voltametrie, kdy látka produkovala v kyselém a neutrálním prostředí v dopředném scanu pouze jediný pík, zatímco v alkalickém prostředí byl první pík doprovázen při negativnějších potenciálech píkem druhým. Navíc byl v zpětném scanu patrný anodický pík odpovídající dvouelektronové reversibilní oxidaci hydroxylaminoskupiny na nitrosoderivát, druhý dopředný scan pak odhalil odpovídající katodický pík.

S využitím optimalizovaných podmínek pro voltametrické stanovení Bifenoxu bylo provedeno jeho přímé stanovení v deionizované, pitné a říční vodě s dosaženými limity detekce $6,1 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³ v deionizované vodě, $6,7 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³ v pitné vodě a $6,9 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³ ve vodě říční. Pro dosažení nižších mezí detekce byla využita prekoncentrace pomocí extrakce tuhou fází na kolonkách LiChrolut RP18-E. Díky tomuto kroku se podařilo snížit limit detekce ve všech případech minimálně o jeden řád (LOD = $2,5 \times 10^{-8}$ mol dm⁻³ pro deionizovanou vodu), v případě pitné a říční vody až do nanomolárních koncentrací (LOD = $1,5 \times 10^{-9}$ mol dm⁻³ pro pitnou vodu, LOD = $8,5 \times 10^{-10}$ mol dm⁻³ pro říční vodu).

LITERATURA

1. CN Pat. 1535944. Danqian, X.; Liu, B.; Xu, Z.: *Preparation of diphenyl ethers by etherification of phenols with halobenzenes in ionic liquids*. 13.10.2004. *Chem. Abstr.* **143**:97162. [cit. 30.11.2007]
2. Shoji, R.; Sakoda, A.; Sakai, Y.; Utsumi, H.; Suzuki, M.: A new assay for evaluating hepatotoxicity and cytotoxicity using LDL-uptake activity of liver cells. *Journal of Health Science* **46**:6, 493–502 (2000).
3. Shoji, R.; Miyazaki, T.; Nishimiya, T.: Estimation of cytotoxicity to HEP-G2 cells of 255 environmental pollutants and water using QSAR (quantitative structure-activity relationship). *Journal of Environmental Science and Health* **A38**:12, 2807–2823 (2003).
4. US Pat. 4606758. Theissen, R. J.: *Substituted phenoxybenzoic acids and derivative thereof as herbicides*. 19.8.1986.
5. US Pat. 3784635. Theissen, R. J.: *Substituted phenoxybenzoic acids and esters thereof*. 8.1.1974.
6. Baur, P.; Buchholz, A.; Schönherr, J.: Diffusion in plant cuticles as affected by temperature and size of organic solutes: similarity and diversity among species. *Plant, Cell and Environment* **20**, 982–994 (1997).
7. Sakamoto, M.; Tsutsumi, T.: Applicability of headspace solid-phase microextraction to the determination of multi-class pesticides in waters. *Journal of Chromatography A* **1028**, 63–74 (2004).
8. Baur, P.; Marzouk, H.; Schönherr, J.; Grayson, B. T.: Partition coefficients of active ingredients between plant cuticle and adjuvants as related to rates of foliar uptake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 3659–3665 (1997).
9. Kahn, I.; Fara, D.; Karelson, M.; Maran, U.; Andersson, P. L.: QSPR treatment of the soil sorption coefficients of organic pollutants. *Journal of Chemical Information and Modeling* **45**, 94–105 (2005).
10. Huuskonen, J.: Prediction of soil sorption coefficient of a diverse set of organic chemicals from molecular structure. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **43**, 1457–1462 (2003).
11. Huber, A.; Bach, M.; Frede, H. G.: Modeling pesticide losses with surface runoff in Germany. *The Science of the Total Environment* **223**, 177–191 (1998).
12. Berenzen, N.; Lentzen-Godding, A.; Probst, M.; Schulz, H.; Schulz, R.; Liess, M.: A comparison of predicted and measured levels of runoff-related pesticide concentrations in small lowland streams on a landscape level. *Chemosphere* **58**, 683–691 (2005).
13. Huber, A.; Bach, M.; Frede, H. G.: Pollution of surface waters with pesticides in Germany: modeling non-point source inputs. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **80**, 191–204 (2000).

14. Gao, J. P.; Maguhn, J.; Spitzauer, P.; Kettrup, A.: Distribution of pesticides in the sediment of the small Teufelsweiher pond (southern Germany). *Water Research* **31**:11, 2811–2819 (1997).
15. Gao, J. P.; Maguhn, J.; Spitzauer, P.; Kettrup, A.: Sorption of pesticides in the sediment of the Teufelsweiher pond (southern Germany). I: Equilibrium assessments, effect of organic carbon content and pH. *Water Research* **32**:5, 1662–1672 (1998).
16. Pintore, M.; Piclin, N.; Benfenati, E.; Gini, G.; Chrétien, J. R.: Database mining with adaptive fuzzy partition: application to the prediction of pesticide toxicity on rats. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**:5, 983–991 (2003).
17. Kruger, P. J.; Ward, D.; Theissen, R. J.; Downing, C. R.; Kaufman, H. A.: Bifenox: a selective weed killer. *Proceedings of the British Weed Control Conference* **12**:2, 839–845 (1974).
18. *The Pesticide Manual*. 11. vyd. Tomlin, C.D.S. (ed.). Farnham, British Crop Protection Council 1997.
19. Mandal, T. K.; Roy, S.; Chakraborty, A. K.; Bhattacharyya, A.: Toxicokinetic of bifenox in goats after single dose oral administration. *Toxicology Letters* **95**, Supplement 1, s. 143 (1998).
20. Šiviková, K.; Dianovský, J.: Mitotic index and cell proliferation kinetics as additional variables for assessment of genotoxic effect of the herbicide Modown. *Acta Veterinaria Brunensis* **69**:1, 45–50 (2000).
21. Francis, B. M.; Metcalf, R. L.; Lewis, P. A.; Chernoff, N.: Maternal and developmental toxicity of halogenated 4'-nitrodiphenyl ethers in mice. *Teratology* **59**, 69–80 (1999).
22. Šiviková, K.; Dianovský, J.: Genotoxic activity of the commercial herbicide containing bifenox in bovine peripheral lymphocytes. *Mutation Research* **439**, 129–135 (1999).
23. Šiviková, K.; Buleca, J., Jr.: Evaluation of the potential clastogenic activity of the commercial herbicide bifenox. *Biologia (Bratislava)* **54**:3, 321–324 (1999).
24. Kubo, T.; Urano, K.; Utsumi, H.: Mutagenicity characteristics of 255 environmental chemicals. *Journal of Health Science* **48**:6, 545–554 (2002).
25. Draper, W. M.; Casida, J. E.: Diphenyl ether herbicides and related compounds: structure-activity relationships as bacterial mutagens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **31**:6, 1201–1207 (1983).
26. Tanaka, Y.; Shimizu, N.; Tsukatani, H.; Sera, N.; Kitamori, S.: The mutagenicity of amino-derivatives of diphenyl ether herbicides in new *Salmonella typhimurium* YG tester strains. *Water Science and Technology* **46**:11–12, 395–400 (2002).
27. Budai, P.; Várnagy, L.: In vitro ocular irritation toxicity study of some pesticides. *Acta Veterinaria Hungarica* **48**:2, 221–228 (2000).
28. Sakazaki, H.; Ueno, H.; Umetani, K.; Utsumi, H.; Nakamuro, K.: Immunotoxicological evaluation of environmental chemicals utilizing mouse lymphocyte mitogenesis test. *Journal of Health Science* **47**:3, 258–271 (2001).
29. Ohno, Y.; Miyajima, A.; Sunouchi, M.: Alternative methods for mechanistic studies in toxicology. Screening of hepatotoxicity of pesticides using freshly isolated and primary cultured hepatocytes and non-liver-derived cells, SIRC cells. *Toxicology Letters* **102–103**, 569–573 (1998).

30. Francis, B. M.: Teratogenicity of bifenox and nitrofen in rodents. *Journal of Environmental Science and Health B* **21**:4, 303–317 (1986).
31. Vilar, S.; Quezada, E.; Alcaide, C.; Orallo, F.; Santana, L.; Uriarte, E.: Quantitative structure vasodilatory activity relationship – synthesis and in silico and in vitro evaluation of resveratrol-coumarin hybrids. *QSAR and Combinatorial Science* **26**:3, 317–332 (2007).
32. Nishihara, T.; Nishikawa, J.; Kanayama, T.; Dakeyama, F.; Saito, K.; Imagawa, M.; Takatori, S.; Kitagawa, Y.; Hori, S.; Utsumi, H.: Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *Journal of Health Science* **46**:4, 282–298 (2000).
33. Petit, F.; Le Goff, P.; Cravédi, J.-P.; Valotaire, Y.; Pakdel, F.: Two complementary bioassays for screening the estrogenic potency of xenobiotics: recombinant yeast for trout estrogen receptor and trout hepatocyte cultures. *Journal of Molecular Endocrinology* **19**, 321–335 (1997).
34. Tamura, H.; Ishimoto, Y.; Fujikawa, T.; Aoyama, H.; Yoshikawa, H.; Akamatsu, M.: Structural basis for androgen receptor agonists and antagonists: interaction of SPEED 98-listed chemicals and related compounds with the androgen receptor based on an in vitro reporter gene assay and 3D-QSAR. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **14**, 7160–7174 (2006).
35. Kojima, H.; Katsura, E.; Takeuchi, S.; Niiyama, K.; Kobayashi, K.: Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using chinese hamster ovary cells. *Environmental Health Perspectives* **112**:5, 524–531 (2004).
36. Garrison, A. W.; Schmitt, P.; Martens, D.; Kettrup, A.: Enantiomeric selectivity in the environmental degradation of dichlorprop as determined by high-performance capillary electrophoresis. *Environmental Science & Technology* **30**, 2449–2455 (1996).
37. Kierzek, R.; Adamczewski, K.; Banach, P.: Effect of bifenox (FOX 480 SC) on weed control in winter cereals. *Progress in Plant Protection* **44**:2, 816–822 (2004).
38. Kruger, P. J.: Bifenox broadleaf herbicide – a status report. *Proceedings of the Southern Weed Science Society* **27**, 161–162 (1974).
39. Leather, G. R.: Absorption, distribution and metabolism of bifenox. *Dissertation Abstracts International B* **36**(11): 5380 (1976).
40. Owston, P. W.; Abrahamson, L. P.: Weed management in forest nurseries. In: *Forest nursery manual: production of bareroot seedlings*. Duryea, M. L.; Landis, T. D. (eds.). Nijhoff, M./Dr. Junk, W., The Hague/Boston/Lancaster, 1984, s. 193–202.
41. Alikhanidi, S.; Takahashi, Y.: Pesticide persistence in the environment – collected data and structure-based analysis. *The Journal of Computer Chemistry, Japan* **3**:2, 59–70 (2004).
42. Itoh, K.; Wang, G. X.; Ohba, S.: Sulfonylurea resistance in *Lindernia micrantha*, an annual paddy weed in Japan. *Weed Research* **39**, 413–423 (1999).
43. Ndahi, W. B.; Russ, O. G.; Moshier, L. J.: Pearl millet tolerance to selected herbicides. *Transactions of the Kansas Academy of Science* **84**:2, 105–108 (1981).
44. Ohyama, H.; Kuwatsuka, S.: Degradation of bifenox, a diphenyl ether herbicide, methyl 5-(2,4-dichlorophenoxy)-2-nitrobenzoate, in soils. *Journal of Pesticide Science* **3**, 401–410 (1978).

45. Ohyama, H.; Kuwatsuka, S.: Behavior of bifenox, a diphenyl ether herbicide, methyl 5-(2,4-dichlorophenoxy)-2-nitrobenzoate, in soil. *Journal of Pesticide Science* **8**, 17–25 (1983).
46. Aizawa, H.: *Metabolic maps of pesticides*. New York, Academic Press 1982, s. 35.
47. Lee, A.-H.; Lu, P.-Y.; Metcalf, R. L.; Hsu, E.-L.: The environmental fate of three dichlorophenyl nitrophenyl ether herbicides in a rice paddy model ecosystem. *Journal of Environmental Quality* **5**:4, 482–486 (1976).
48. Trappe, J. M.: Effects of the herbicides bifenox, DCPA and napropamide on mycorrhiza development of ponderosa pine and douglas-fir seedlings in six western nurseries. *Forest Science* **29**:3, 464–468 (1983).
49. Scalla, R.; Matringe, M.; Camadro, J.-M.; Labbe, P.: Recent advances in the mode of action of diphenyl ethers and related herbicides. *Zeitschrift für Naturforschung C* **45**, 503–511 (1990).
50. Jacobs, J. M.; Jacobs, N. J.; Sherman, T. D.; Duke, S. O.: Effect of diphenyl ether herbicides on oxidation of protoporphyrinogen to protoporphyrin in organellar and plasma membrane enriched fractions of barley. *Plant Physiology* **97**, 197–203 (1991).
51. Duke, S. O.; Lydon, J.; Becerril, J. M.; Sherman, T. D.; Lehnen, L. P.; Matsumoto, H.: Protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. *Weed Science* **39**, 465–473 (1991).
52. Matsumoto, H.; Lee, J. J.; Ishizuka, K.: A rapid and strong inhibitor of protoporphyrinogen oxidase from several plant species by oxyfluorfen. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **47**, 113–118 (1993).
53. Camilleri, P.; Weaver, K.; Clark, M. T.; Bowyer, J. R.; Hallahan, B. J.: Some novel diphenyl ether herbicides with peroxidizing activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **36**, 1061–1063 (1988).
54. Lambert, R.; Sandmann, G.; Böger, P.: Correlation between structure and phytotoxic activities of nitrodiphenyl ethers. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **19**, 309–320 (1983).
55. Nandihalli, U. B.; Duke, M. V.; Duke, S. O.: Quantitative structure-activity relationships of protoporphyrinogen oxidase-inhibiting diphenyl ether herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **43**, 193–211 (1992).
56. Dayan, F. E.; Allen, S. N.: Predicting the activity of the natural phytotoxic diphenyl ether cyperine using comparative molecular field analysis. *Pest Management Science* **56**, 717–722 (2000).
57. Matringe, M.; Camadro, J.-M.; Labbe, P.; Scalla, R.: Protoporphyrinogen oxidase as a molecular target for diphenyl ether herbicides. *Biochemical Journal* **260**, 231–235 (1989).
58. Durst, G. L.: Comparative molecular field analysis (CoMFA) of herbicidal protoporphyrinogen oxidase inhibitors using standard steric and electrostatic fields and an alternative LUMO field. *Quantitative Structure-Activity Relationships* **17**, 419–426 (1998).
59. Camadro, J.-M.; Matringe, M.; Scalla, R.; Labbe, P.: Kinetic studies on protoporphyrinogen oxidase inhibition by diphenyl ether herbicides. *Biochemical Journal* **277**, 17–21 (1991).
60. Landini, S.; Graham, M. Y.; Graham, T. L.: Lactofen induces isoflavone accumulation and glyceollin elicitation competency in soybean. *Phytochemistry* **62**, 865–874 (2003).

61. Lydon, J.; Duke, S. O.: Porphyrin synthesis is required for photobleaching activity of the p-nitrosubstituted diphenyl ether herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **31**, 74–83 (1988).
62. Sherman, T. D.; Becerril, J. M.; Matsumoto, H.; Duke, M. V.; Jacobs, J. M.; Jacobs, N. J.; Duke, S. O.: Physiological basis for differential sensitivities of plant species to protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. *Plant Physiology* **97**, 280–287 (1991).
63. Jinno, H.; Hatakeyama, N.; Hanioka, N.; Yoda, R.; Nishimura, T.; Ando, M.: Cytotoxic and porphyrinogenic effects of diphenyl ethers in cultured rat hepatocytes: chlornitrofen (CNP), CNP-amino, chlomethoxyfen and bifenox. *Food and Chemical Toxicology* **37**, 69–74 (1999).
64. Becerril, J. M.; Duke, S. O.: Protoporphyrin IX content correlates with activity of photobleaching herbicides. *Plant Physiology* **90**, 1175–1181 (1989).
65. Sumida, M.; Niwata, S.; Fukami, H.; Tanaka, T.; Wakabayashi, K.; Böger, P.: Synthesis of novel diphenyl ether herbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, 1929–1934 (1995).
66. Masuda, T.; Kouji, H.; Matsunaka, S.: Diphenyl ether herbicide-decreased heme contents stimulate 5-aminolevulinic acid synthesis. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **36**, 106–114 (1990).
67. Matringe, M.; Clair, D.; Scalla, R.: Effects of peroxidizing herbicides on protoporphyrin IX levels in non-chlorophyllous soybean cell culture. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **36**, 300–307 (1990).
68. Kouji, H.; Masuda, T.; Matsunaka, S.: Action mechanism of diphenyl ether herbicides: light-dependent O₂ consumption in diphenyl ether-treated tobacco cell homogenate. *Journal of Pesticide Science* **13**, 495–499 (1988).
69. Orr, G. L.; Hogan, M. E.: UV-A photooxidation of β-carotene in triton X-100 micelles by nitrodiphenyl ether herbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **33**, 968–972 (1985).
70. Routaboul, J. M.; Nurit, F.; Ravanel, P.; Tissut, M.: Effects of bifenox and oxadiazon on isolated chloroplasts, plant mitochondria and leaf pieces. *Pesticide Science* **30**, 149–158 (1990).
71. Lambert, R.; Kroneck, P. M. H.; Böger, P.: Radical formation and peroxidative activity of phytotoxic diphenyl ethers. *Zeitschrift für Naturforschung C* **39**, 486–491 (1984).
72. Ensminger, M. P.; Hess, F. D.: Photosynthesis involvement in the mechanism of action of diphenyl ether herbicides. *Plant Physiology* **78**, 46–50 (1985).
73. Wettlaufer, S. H.; Alscher, R.; Strick, Ch.: Chloroplast-diphenyl ether interactions II. *Plant Physiology* **78**, 215–220 (1985).
74. Bowyer, J. R.; Smith, B. J.; Camilleri, P.; Lee, S. A.: Mode of action studies on nitrodiphenyl ether herbicides. I. Use of barley mutants to probe the role of photosynthetic electron transport. *Plant Physiology* **83**, 613–620 (1987).
75. Bowyer, J. R.; Hallahan, B. J.; Camilleri, P.; Howard, J.: Mode of action studies on nitrodiphenyl ether herbicides. II. The role of photosynthetic electron transport in *Scenedesmus obliquus*. *Plant Physiology* **89**, 674–680 (1989).
76. Williams, M.; Van der Zee, J.; Van Steveninck, J.: Toxic dark effects of protoporphyrin on the cytochrome P-450 system in rat liver microsomes. *Biochemical Journal* **288**, 155–159 (1992).

77. Morton, K. O.; Schneider, F.; Weimer, M. K.; Straka, J. G.; Bloomer, J. R.: Hepatic and bile porphyrins in patients with protoporphyria and liver failure. *Gastroenterology* **94**:6, 1488–1492 (1988).
78. Koningsberger, J. C.; Rademakers, L. H. P. M.; Van Hattum, J.; de la Faiile, H. B.; Wiegman, L. J. J. M.; Italiaander, E.; Van Berge Henegouwen, G. P.; Marx, J. J. M.: Exogenous protoporphyrin inhibits Hep G2 cell proliferation, increases the intracellular hydrogen peroxide concentration and causes ultrastructural alterations. *Journal of Hepatology* **22**, 57–65 (1995).
79. Deybach, J. Ch.; de Verneuil, H.; Nordmann, Y.: The inherited enzymatic defect in porphyria variegata. *Human Genetics* **58**, 425–428 (1981).
80. Brenner, D. A.; Bloomer, J. R.: The enzymatic defect in variegate porphyria. Studies with human cultured skin fibroblasts. *The New England Journal of Medicine* **302**:14, 765–769 (1980).
81. Bassel, J.; Hambricht, P.; Mortimer, R.; Bearden, A. J.: Mutant of the yeast *Saccharomyces lipolytica* that accumulates and excretes protoporphyrin IX. *Journal of Bacteriology* **123**:1, 118–122 (1975).
82. Krijt, J.; Van Holsteijn, I.; Hassing, I.; Vokurka, M.; Blaauboer, B. J.: Effect of diphenyl ether herbicides and oxadiazon on porphyrin biosynthesis in mouse liver, rat primary hepatocyte culture and Hep G2 cells. *Archives of Toxicology* **67**, 255–261 (1993).
83. Tanabe, A.; Mitobe, H.; Kawata, K.; Sakai, M.: Monitoring of herbicides in river water by gas chromatography-mass spectrometry and solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* **754**, 159–168 (1996).
84. Tanabe, A.; Mitobe, H.; Kawata, H.; Sakai, M.; Yasuhara, A.: New monitoring system for ninety pesticides and related compounds in river water by solid-phase extraction with determination by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC International* **83**:1, 61–77 (2000).
85. Fillion, J.; Sauv e, F.; Selwyn, J.: Multiresidue method for the determination of residues of 251 pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of AOAC International* **83**:3, 698–713 (2000).
86. Kawata, K.; Asada, T.; Oikawa, K.; Tanabe, A.: Multiresidue determination of pesticides in sediment by ultrasonically assisted extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC International* **88**:5, 1440–1451 (2005).
87. Hu, X.; Jianxin, Y.; Zhigang, Y.; Lansun, N.; Yanfei, L.; Peng, W.; Jing, L.; Xin, H.; Xiaogang, Ch.; Yibin, Z.: Determination of multiclass pesticide residues in apple juice by gas chromatography-mass selective detection after extraction by matrix solid-phase dispersion. *Journal of AOAC International* **87**:4, 972–985 (2004).
88. Nakamura, S.; Daishima, S.: Simultaneous determination of 64 pesticides in river water by stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **382**, 99–107 (2005).
89. Hirahara, Y.; Kimura, M.; Ionue, T.; Uchikawa, S.; Otani, S.; Haganuma, A.; Matsumoto, N.; Hirata, A.; Maruyama, S.; Iizuka, T.; Ukyo, M.; Ota, M.; Hirose, H.; Suzuki, S.; Uchida, Y.: Validation of multiresidue screening methods for the determination of 186 pesticides in 11

- agricultural products using gas chromatography (GC). *Journal of Health Science* **51**:5, 617–627 (2005).
90. Chu, X.-G.; Hu, X.-Z.; Yao, H.-Y.: Determination of 266 pesticide residues in apple juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass selective detection. *Journal of Chromatography A* **1063**, 201–210 (2005).
91. Pang, G.-F.; Fan, C.-L.; Liu, Y.-M.; Cao, Y.-Z.; Zhang, J.-J.; Fu, B.-L.; Li, X.-M.; Li, Z.-Y.; Wu, Y.-P.: Multi-residue method for the determination of 450 pesticide residues in honey, fruit juice and wine by double-cartridge solid-phase extraction/gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants* **23**:8, 777–810 (2006).
92. Sandra, P.; Tienpont, B.; David, F.: Stir bar sorptive extraction (TWISTER™) RTL-CGC-MS. A versatile method to monitor more than 400 pesticides in different matrices (water, beverages, fruits, vegetables, baby food). In: *New Horizons and Challenges in Environmental Analysis and Monitoring*. Namieśnik, J.; Chrzanowski, W.; Żmijewska, P. (eds.). Centre of Excellence in Environmental Analysis and Monitoring, Gdańsk University of Technology, Gdańsk, 2003, s. 338–354.
93. Stan, H.-J.: Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas chromatography with mass spectrometric detection: State-of-the-art use of modified DFG-multimethod S19 and automated data evolution. *Journal of Chromatography A* **892**, 347–377 (2000).
94. Nordmeyer, K.; Thier, H.-P.: Solid-phase extraction for replacing dichloromethane partitioning in pesticide multiresidue analysis. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* **208**, 259–263 (1999).
95. Stan, H.-J.; Linkerhägner, M.: Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas chromatography with atomic emission detection State-of-the-art use of modified multimethod S19 of the Deutsche Forschungsgemeinschaft and automated large-volume injection with programmed-temperature vaporization and solvent venting. *Journal of Chromatography A* **750**, 369–390 (1996).
96. Ono, Y.; Yamagami, T.; Nishina, T.; Tobino, T.: Pesticide multiresidue analysis of 303 compounds using supercritical fluid extraction. *Analytical Sciences* **22**, 1473–1476 (2006).
97. Junker-Buchheit, A.; Witznbacher, M.: Pesticide monitoring of drinking water with the help of solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **737**, 67–74 (1996).
98. Omote, M.; Harayama, K.; Sasaki, T.; Mochizuki, N.; Yamashita, H.: Analysis of simultaneous screening for 277 pesticides in malt and beer by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **64**:3, 139–150 (2006).
99. Klöppel, H.; Haider, J.; Hoffmann, C.; Lüttecke, B.: Simultaneous determination of the herbicides isoproturon, dichlorprop-p, and bifenox in soils using RP-HPLC. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **344**, 42–46 (1992).

100. Laganà, A.; Fago, G.; Fasciani, L.; Marino, A.; Mosso, M.: Determination of diphenyl-ether herbicides and metabolites in natural waters using high-performance liquid chromatography with diode array tandem mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta* **414**, 79–94 (2000).
101. Epple, J.; Maguhn, J.; Spitzauer, P.; Kettrup, A.: Input of pesticides by atmospheric deposition. *Geoderma* **105**, 327–349 (2002).
102. Sheu, H.-L.; Sung, Y.-H.; Melwanki, M. B.; Huang, S.-D.: Determination of diphenylether herbicides in water samples by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography. *Journal of Separation Science* **29**, 2647–2652 (2006).
103. Pantiru, M.; Tsiakatouras, G.; Martens, D.; Ochsenkühn-Petropoulou, M.; Kettrup, A.: Development of clean-up methods for the determination of carbamates and acidic pesticides in agricultural products. *Fresenius Environmental Bulletin* **12**:8, 871–875 (2003).
104. Díez, C.; Traag, W. A.; Zommer, P.; Marinero, P.; Atienza, J.: Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and „dispersive solid-phase extraction“ method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. *Journal of Chromatography A* **1131**, 11–23 (2006).
105. Laganà, A.; Bacaloni, A.; De Leva, I.; Faberi, A.; Fago, G.; Marino, A.: Occurrence and determination of herbicides and their major transformation products in environmental waters. *Analytica Chimica Acta* **462**, 187–198 (2002).
106. Laganà, A.; Bacaloni, A.; De Leva, I.; Faberi, A.; Fago, G.; Marino, A.: Determination of maize and grain herbicides and their transformation products in soil by use of soil column extraction then liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Chromatographia* **56**, 337–343 (2002).
107. Eastin, E. F.: Separation of bifenoxy and related compounds by thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A* **124**, 422–423 (1976).
108. Leather, G. R.; Foy, Ch. L.: Metabolism of bifenoxy in soil and plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **7**, 437–442 (1977).
109. Babić, S.; Horvat, A. J. M.; Kaštelan-Macan, M.: Use of a genetic algorithm to optimize TLC separation. *Journal of Planar Chromatography* **18**, 112–117 (2005).
110. Milovanović, G. A.; Trifković, L.: A kinetic method for the determination of herbicide bifenoxy and mixtures of bifenoxy and isoproturon. *Journal of the Serbian Chemical Society* **61**:1, 57–62 (1996).
111. Lee, G. H.: Diphenyl ether herbicides: assignment of the proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance (NMR) spectra of acifluorfen, acifluorfen methyl, and bifenoxy with two-dimensional NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **33**, 499–503 (1985).
112. Miyake, S.; Hayashi, A.; Kita, H.; Ohkawa, H.: Polyclonal and monoclonal antibodies for the specific detection of the herbicide acifluorfen and related compounds. *Pesticide Science* **51**, 49–55 (1997).
113. Orr, G. L.; Elliott, C. M.; Hogan, M. E.: Determination of redox behavior in vitro of nitrodiphenyl ether herbicides using cyclic voltammetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **31**, 1192–1195 (1983).

114. Hromadová, M.; Mořkovská, P.; Pospíšil, L.; Giannarelli, S.: Decomposition reactions of bifenox anion radical involving intramolecular electron transfer. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **582**, 156–164 (2005).
115. Mořkovská, P.; Hromadová, M.; Pospíšil, L.; Giannarelli, S.: Double-layer effects and distance dependence of electron transfer in reduction of nitro aromatic radical anions. *Langmuir* **22**, 1896–1902 (2006).
116. Mořkovská, P.; Hromadová, M.; Pospíšil, L.; Giannarelli, S.: *Frumkin correction in kinetics of aromatic nitro anion radicals*. Dostupné z URL: <<http://cheminfo.chemi.muni.cz /ktfch/Setkani06/Sbornik2006.pdf>> [cit. 1.12.2007]
117. Rupp, E.; Zhong, Q.; Zuman, P.: Polarographic determination of some pesticides containing nitro group: Application to a study of adsorption on lignin. *Electroanalysis* **4**:1, 11–18 (1992).
118. Timmer, B.; Sluyters-Rehbach, M.; Sluyters, J. H.: Electrode kinetics and double layer structure. *Surface Science* **18**, 44–61 (1969).
119. *Agricultural research service pesticide properties database*. Dostupné z URL: <<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=14147>> [cit. 13.12.2007]
120. Zuman, P.: Electroreduction of aromatic nitro compounds: case for comparison of information obtained by polarography and voltammetry. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **58**:1, 41–46 (1993).
121. Smith, W. H.; Bard, A. J.: Electrochemical reactions of organic compounds in liquid ammonia. II. Nitrobenzene and nitrosobenzene. *Journal of the American Chemical Society* **97**:18, 5203–5210 (1975).
122. Laviron, E.; Vallat, A.; Meunier-Prest, R.: The reduction mechanism of aromatic nitro compounds in aqueous medium. Part V. The reduction of nitrosobenzene between pH 0,4 and 13. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **379**, 427–435 (1994).
123. Laviron, E.: Electrochemical reactions with protonations at equilibrium. Part IV. General considerations on the reaction sequence. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **130**, 23–29 (1981).
124. Zuman, P.; Fijalek, Z.; Dumanovic, D.; Sužnjević, D.: Polarographic and electrochemical studies of some aromatic and heterocyclic nitro compounds, Part I: General mechanistic aspects. *Electroanalysis* **4**, 783–794 (1992).
125. Geske, D. H.; Maki, A. H.: Electrochemical generation of free radicals and their study by electron spin resonance spectroscopy; the nitrobenzene anion radical. *Journal of the American Chemical Society* **82**:11, 2671–2676 (1960).
126. Fields, M.; Valle, C. Jr.; Kane, M.: Polarographic studies of some hindered and unhindered aromatic nitro compounds. *Journal of the American Chemical Society* **71**:2, 421–425 (1949).
127. McIntire, G. L.; Chiappardi, D. M.; Casselberry, R. L.; Blount, H. N.: Electrochemistry in ordered systems. 2. Electrochemical and spectroscopic examination of the interactions between nitrobenzene and anionic, cationic, and nonionic micelles. *The Journal of Physical Chemistry* **86**, 2632–2640 (1982).

128. Rubinstein, I.: Voltammetric study of nitrobenzene and related compounds on solid electrodes in aqueous solution. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **183**, 379–386 (1985).
129. Squella, J. A.; Bollo, S.; Núñez-Vergara, L. J.: Recent developments in the electrochemistry of some nitro compounds of biological significance. *Current Organic Chemistry* **9**, 565–581 (2005).
130. Kojima, H.; Bard, A. J.: Determination of rate constants for the electroreduction of aromatic compounds and their correlation with homogeneous electron transfer rates. *Journal of the American Chemical Society* **97**:22, 6317–6324 (1975).
131. Shi, Ch.; Zhang, W.; Birke, R. L.; Gosser, D. K. Jr.; Lombardi, J. R.: Time-resolved SERS, cyclic voltammetry, and digital simulation of the electroreduction of p-nitrobenzoic acid. *The Journal of Physical Chemistry* **95**, 6276–6285 (1991).
132. Novotný, L.; Yosypchuk, B.: Pevné stříbrné amalgamové elektrody. *Chemické Listy* **94**, 1118–1120 (2000).
133. Yosypchuk, B.: *Disertační práce*. Pardubice, UPa FChT 2003.
134. Yosypchuk, B.; Novotný L.: Nontoxic electrodes of solid amalgams. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **32**:2, 141–151 (2002).
135. Yosypchuk, B.; Novotný L.: Voltammetrické stanovení Cu, Pb, Cd, Zn a Tl pomocí stříbrné pevné amalgamové elektrody. *Chemické Listy* **96**, 756–760 (2002).
136. Yosypchuk, B.; Novotný, L.: Electrodes of nontoxic solid amalgams for electrochemical measurements. *Electroanalysis* **14**:24, 1733–1738 (2002).
137. Yosypchuk, B.; Heyrovský M.; Paleček, E.; Novotný, L.: Use of solid amalgam electrodes in nucleic acid analysis. *Electroanalysis* **14**:21, 1488–1493 (2002).
138. Yosypchuk, B.; Novotný, L.: Determination of iodates using silver solid amalgam electrodes. *Electroanalysis* **14**:15–16, 1138–1142 (2002).
139. Vaňková, L.; Maixnerová, L.; Čížek, K.; Fischer, J.; Barek, J.; Navrátil, T.; Yosypchuk, B.: Voltammetrické stanovení submikromolárních koncentrací 3-nitrofluoranthenu a pendimethalinu na stříbrné pevné amalgamové elektrodě. *Chemické Listy* **100**, 1105–1110 (2006).
140. Barek, J.; Fischer, J.; Navrátil, T.; Pecková, K.; Yosypchuk, B.: Silver solid amalgam electrodes as sensors for chemical carcinogens. *Sensors* **6**, 445–452 (2006).
141. Fischer, J.; Barek, J.; Yosypchuk, B.; Navrátil, T.: Voltammetric determination of trace amounts of 2-methyl-4,6-dinitrophenol at a silver solid amalgam electrode. *Electroanalysis* **18**:2, 127–130 (2006).
142. Daňhel, A.; Pecková, K.; Čížek, K.; Barek, J.; Zima, J.; Yosypchuk, B.; Navrátil, T.: Voltammetrické stanovení genotoxických dinitronaftalenů pomocí rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgamové elektrody. *Chemické Listy* **101**, 144–149 (2007).
143. *EU mercury strategy*. Dostupné z URL: <<http://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?pubRef=-//EP//NONSGML+IM-PRESS+20060309IPR06021+0+DOC+PDF+V0//EN&language=EN>> [cit. 10.3.2008]

144. *Návrh zprávy o Strategii Společenství týkající se rtuti.* Dostupné z URL: <http://www.europarl.europa.eu/meetdocs/2004_2009/documents/pr/585/585664/585664cs.pdf [cit. 10.3.2008]
145. Fischer, J.; Vanourkova, L.; Danhel, A.; Vyskocil, V.; Cizek, K.; Berek, J.; Peckova, K.; Yosypchuk, B.; Navratil, T.: Voltammetric determination of nitrophenols at a silver solid amalgam electrode. *International Journal of Electrochemical Science* **2**, 226–234 (2007).
146. Čížková, P.; Navrátil, T.; Šestáková I.; Yosypchuk, B.: Verification of applicability of mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode for determination of heavy metals in plant matrices. *Electroanalysis* **19**:2–3, 161–171 (2007).
147. Yosypchuk, B; Novotný, L.: Copper solid amalgam electrodes. *Electroanalysis* **15**:2, 121–125 (2003).
148. Yosypchuk, B.; Fojta, M; Havran, L; Heyrovský, M.; Paleček, E.: Voltammetric behavior of osmium-labeled DNA at mercury meniscus-modified solid amalgam electrodes. Detecting DNA hybridization. *Electroanalysis* **18**:2, 186–194 (2006).
149. Sýkora, V.; Zátka, V.: *Příruční tabulky pro chemiky.* Praha, SNTL 1967.
150. Pecková, K.; Berek, J.; Navrátil, T.; Yosypchuk, B.; Zima, J.: Voltammetric determination of nitronaphthalenes at a silver solid amalgam electrode. *Analytical Letters*, přijato.
151. Hayashi, Y.; Matsuda, R.; Ito, K.; Nishimura, W.; Imai, K.; Maeda, M.: Detection limit estimated from slope of calibration curve: an application to competitive ELISA. *Analytical Sciences* **21**, 167–169 (2005).