

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



ELEKTROCHEMICKÉ STANOVENÍ
CHLORTOLURONU NA UHLÍKOVÉ
PASTOVÉ ELEKTRODĚ

ELECTROCHEMICAL DETERMINATION OF
CHLORTOLURON USING CARBON PASTE ELECTRODE

Diplomová práce

Studijního oboru Chemie životního prostředí

Praha 2012

Bc. Lucie Houšková

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením prof. RNDr. Jiřího Zimy, CSc. a Mgr. Hany Dejmkové, 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 20. srpna 2012

.....
podpis

Abstrakt

Chlortoluron je herbicid ze skupiny substituovaných močovín používaný k zabránění růstu plevelu při pěstování obilovin a máku. Ačkoliv je používání substituovaných močovín z důvodu vysoké pohyblivosti v půdě, perzistenci v prostředí a zatížení podzemních vod v Evropě postupně omezováno, jsou tyto látky v celosvětovém měřítku stále masově používány. Proto je nutný vývoj analytických metod vhodných pro stanovení jejich zbytkových koncentrací v různých environmentálních vzorcích.

Tato práce se zabývá nalezením optimálních podmínek vhodných pro stanovení chlortoluronu na uhlíkové pastové elektrodě (CPE) metodou diferenční pulsní voltametrie (DPV) a metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou (HPLC-ED) a spektrofotometrickou (HPLC-UV) detekcí. Dále je práce zaměřena na ověření možnosti využití miniaturizované uhlíkové pastové elektrody (mCPE) a ověření využitelnosti vyvíjených metod pro stanovení chlortoluronu v modelových vzorcích říční vody a půdy.

Metodou DPV v prostředí Brittonova-Robinsonova (BR) pufru (pH = 3) a methanolu (10 %, V/V) byly proměřeny koncentrační závislosti v deionizované vodě. Mez detekce byla stanovena na $3,7 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v případě použití CPE a na $8,7 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v případě mCPE. Dále byly proměřeny koncentrační závislosti pomocí HPLC v mobilní fázi obsahující BR pufr (pH = 4) a methanol (60 %, V/V), s potenciálem pracovní elektrody 1300 mV a detekční vlnovou délkou 243 nm. Mez detekce byla stanovena na $3,3 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pro HPLC-ED a $1,1 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pro HPLC-UV. Stanovení chlortoluronu v modelových vzorcích říční vody a půdy nebylo matricí významně ovlivněno.

Klíčová slova: substituované močoviny, chlortoluron, diferenční pulsní voltametrie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, uhlíková pastová elektroda

Abstract

Chlortoluron is a herbicide from the group of substituted ureas and it is used for weed control in production of cereals and poppy. Substituted ureas are widely used but these substances are known for their high mobility in soil, persistence and contamination of underground water. Therefore, the development of analytical methods suitable for residual concentrations determination is necessary.

This thesis deals with the determination of chlortoluron using carbon paste electrode (CPE) by the methods of differential pulse voltammetry and high-performance liquid chromatography with electrochemical (HPLC-ED) and spectrophotometric (HPLC-UV) detection. The aim of the work was to find optimal conditions suitable for chlortoluron determination. Further, the possibility of using miniaturized carbon paste electrode (mCPE) and usability of tested methods for determination of chlortoluron in model samples of river water and soil were studied.

Concentration dependences in deionized water were measured by the method of DPV in the Britton-Robinson (BR) buffer (pH = 3) and methanol (10 %, v/v). The limit of detection was $3,7 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ in the case of CPE and $8,7 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ in the case of mCPE. Also, concentration dependences were measured using HPLC with mobile phase containing BR buffer (pH = 4) and methanol (60 %, v/v) with working electrode potential 1300 mV and detection wavelength 243 nm. The limit of detection was $3,3 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ for HPLC-ED and $1,1 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ for HPLC-UV. The determination of chlortoluron in model samples of river water and soil was not significantly influenced by the matrix.

Keywords: substituted ureas, chlortoluron, differential pulse voltammetry, high-performance liquid chromatography, carbon paste electrode

Tato diplomová práce byla finančně podporovaná Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt MSM 0021620857), Univerzitou Karlovou v Praze (projekt SVV 2012-265201) a Technologickou agenturou České republiky (projekt TA01020565).

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Jiřímu Zimovi, CSc. za veškerou pomoc, kterou mi poskytl při vypracování mé diplomové práce a za jeho přátelský přístup, kterým vytvořil příjemné pracovní prostředí.

Dále bych chtěla poděkovat za odborné vedení, předané zkušenosti a neochvějnou trpělivost svým konzultantkám Mgr. Haně Dejmkové a Mgr. Jaroslavě Zavázalové. Za příjemnou spolupráci a vytvoření radostné atmosféry patří můj dík i všem ostatním členům naší laboratoře.

Na závěr bych své poděkování ráda věnovala rodině a to zejména mamince Zlatici Houškové za její pevnou podporu a dodávání sil během celého studia.

Obsah

1 Úvod	10
2 Teoretická část	11
2.1 Pesticidy	11
2.2 Substituované močoviny	11
2.3 Chlortoluron	12
2.3.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti chlortoluronu	12
2.3.2 Využití chlortoluronu	13
2.3.3 Degradace chlortoluronu v životním prostředí	13
2.3.4 Biologické účinky chlortoluronu	14
2.3.5 Metody stanovení chlortoluronu	14
2.4 Uhlíková pastová elektroda	17
3 Experimentální část	19
3.1 Použité chemikálie	19
3.2 Použitá aparatura	19
3.2.1 Voltametrické techniky	19
3.2.2 HPLC aparatura	19
3.2.3 Další použitá zařízení	20
3.3 Pracovní postupy	20
3.3.1 Příprava zásobního roztoku chlortoluronu	20
3.3.2 Příprava Brittonových-Robinsonových pufrů	20
3.3.3 Příprava uhlíkové pasty	20
3.3.4 Příprava mobilní fáze pro HPLC stanovení chlortoluronu	21
3.3.5 Voltametrické stanovení	21
3.3.6 HPLC stanovení se spektrofotometrickou a elektrochemickou detekcí	22
3.4 Sledování stability zásobního roztoku chlortoluronu	23
4 Výsledky a diskuze	25
4.1 Voltametrické stanovení chlortoluronu na CPE	25
4.1.1 Vliv pH na stanovení chlortoluronu	25
4.1.2 Vliv obsahu methanolu na stanovitelnost chlortoluronu	27
4.1.3 Opakovatelnost měření	28
4.1.4 Sledování akumulace chlortoluronu na CPE	30
4.1.5 Koncentrační závislosti	31
4.2 Voltametrické stanovení chlortoluronu na mCPE	39
4.2.1 Optimalizace pH	39
4.2.2 Opakovatelnost měření	41

4.2.3 Koncentrační závislosti.....	43
4.3 Stanovení chlortoluronu pomocí HPLC se spektrofotometrickou a elektrochemickou detekcí.....	52
4.3.1 Optimalizace separačních a detekčních podmínek.....	52
4.3.2 Opakovatelnost měření.....	53
4.3.3 Koncentrační závislosti.....	55
5 Závěr.....	73
6 Literatura	74

Seznam zkratk a symbolů

A	absorbance
AdSV	adsorpční rozpouštěcí voltametrie
AU, mAU	jednotky absorbance
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
c	koncentrace
C.A.S.	Chemical Abstracts Service
CPE	uhlíková pastová elektroda
mCPE	miniaturizovaná uhlíková pastová elektroda
DPV	diferenční pulsní voltametrie
E	potenciál
ECD	detektor elektronového záchytu
ED	elektrochemický detektor
FIA	průtoková injekční analýza
GC ITD	plynová chromatografie s detektorem iontová past
GC MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
GC NPD	plynová chromatografie s dusíko-fosforovou detekcí
h	výška píku
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
I	proud
K_{ow}	rozdělovací koeficient n-oktanol/voda
l	tloušťka kyvety
λ	vlnová délka
LC DAD	kapalinová chromatografie s detekcí diodového pole
L_D	mez detekce
$L_{1,2}$	interval spolehlivosti
M_r	relativní molekulová hmotnost
p.a.	pro analýzu
PVDF	polyvinylidenfluorid
R	korelační koeficient
RP-LC	kapalinová chromatografie na reverzních fázích
RP-18	reverzní fáze s chemicky vázaným oktadecylsilanem
s	směrodatná odchylka

s_r	relativní směrodatná odchylka
SPE	extrakce tuhou fází
t	čas
TLC	tenkovrstvá chromatografie
UV	ultrafialová oblast
V/V	objemový podíl

1 Úvod

Populační růst na Zemi s sebou přináší nutnost zajištění dostatečného množství potravin. Jednou z možností, jak dosáhnout vyšší produkce zemědělských plodin, je jejich ochrana použitím pesticidů. Pesticidy zahrnují široké spektrum chemických látek využívaných k hubení různých škůdců. Jednou z těchto látek je i chlortoluron, herbicid ze skupiny substituovaných močovín, které prokázaly svou užitečnost při pěstování zemědělských plodin, jelikož dokáží velmi dobře zabránit růstu listnatých a travnatých plevelů. Ačkoliv jsou substituované močoviny hojně používanými pesticidy, je mnoho látek z této skupiny, případně jejich metabolitů, podezřelých z toxicity a karcinogenity. Tyto látky mohou setrvávat v životním prostředí a ovlivňovat živé organismy, se kterými přijdou do kontaktu. Mohou se také dostávat do potravin a tím přímo ohrozit zdraví člověka. Z těchto důvodů roste zájem o rychlý a spolehlivý monitoring pesticidů v zemědělství a v produkci potravin.

Tato práce se zabývá možnostmi stanovení herbicidu chlortoluronu. Pro stanovení pesticidů jsou používány zejména chromatografické metody, které jsou však instrumentálně náročné. Pro účely této práce bylo zvoleno elektrochemické stanovení chlortoluronu na uhlíkové pastové elektrodě. Elektrochemické metody jsou rychlé a dostatečně selektivní, navíc mohou být díky své miniaturizovatelnosti a přenositelnosti využity i při práci v terénu. Uhlíková pastová elektroda byla zvolena pro její výhodné elektrochemické vlastnosti a snadnou obnovitelnost povrchu.

Cílem předkládané práce bylo nalezení optimálních podmínek vhodných pro stanovení chlortoluronu na uhlíkové pastové elektrodě metodou diferenční pulsní voltametrie (DPV) a metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou (HPLC-ED) a spektrofotometrickou (HPLC-UV) detekcí. Dále byla práce zaměřena na ověření možnosti využití miniaturizované uhlíkové pastové elektrody. Po nalezení optimálních podmínek stanovení byl chlortoluron stanovován v modelových vzorcích říční vody a půdy.

2 Teoretická část

2.1 Pesticidy

Pesticidy jsou látky nebo směsi látek určené k hubení, zabránění růstu nebo odpuzování škůdců.¹ Jsou používány k ochraně zemědělských plodin a průmyslových ploch.

Existují tři základní možnosti klasifikace pesticidů. První možnost rozděluje pesticidy podle odlišného způsobu dosažení požadovaného účinku na systémové a kontaktní. Systémové pesticidy účinně pronikají do těla chráněného organismu. Kontaktní pesticidy zůstávají na povrchu tohoto organismu a do jeho těla nepronikají. Druhou možností klasifikace je dělení pesticidů podle druhů cílových škůdců. Do této skupiny patří například insekticidy (ochrana před hmyzem), herbicidy (rostlinnými plevely), rodenticidy (hlodavci), fungicidy (houbovými chorobami) a baktericidy (bakteriemi). Třetí a zdaleka nejužitečnější způsob klasifikace rozděluje pesticidy na základě chemické povahy aktivní složky. Tímto způsobem jsou pesticidy kategorizovány do následujících čtyř hlavních skupin: organochlorové sloučeniny, organofosfáty, karbamáty, pyrethrin a pyrethroidy.²

I když bylo zavedení pesticidů do zemědělství velkým přínosem, je jejich používání obvykle spojeno se zatěžováním životního prostředí a nežádoucím vlivem na lidské zdraví. Pesticidy, které se dostanou do životního prostředí, v něm často dlouhou dobu setrvávají a stále působí na živé organismy. Dále se mohou dostávat do potravního řetězce nebo kontaminovat pitnou vodu a tím přímo ohrozit zdraví lidí. Jejich škodlivý účinek zahrnuje karcinogenezi, nervové poruchy, imunologická a respirační onemocnění.^{1,3,4}

Ačkoliv jsou pesticidy většinou obtížně rozložitelné, dochází po nějaké době k jejich degradaci. Rychlost rozkladu je závislá na fyzikálně-chemických vlastnostech daného pesticidu. Degradace probíhá zejména mikrobiální cestou.³ Při degradaci těchto látek dochází k rozkladu nebo chemické transformaci molekul pesticidu na jiné formy, které mohou být v některých případech také toxické.² Jelikož je ale používání pesticidů v dnešní době nevyhnutelné, jsou vyvíjeny takové látky, které jsou snadněji odbouratelné a tím šetrnější k životnímu prostředí.

2.2 Substituované močoviny

Substituované močoviny jsou důležitou a dodnes hojně využívanou skupinou herbicidů. Používají se k zabránění růstu listnatých a travnatých plevelů v obilninách, rýži, kukuřici a dalších plodinách, v bavlněných polích a jako celkové herbicidy v městských oblastech.

Substituované močoviny patří do skupiny systémových herbicidů, které působí na rostliny tím, že narušují některý fyziologický proces nezbytný pro jejich normální růst a vývoj.^{4, 5, 6} Mechanismem jejich působení je inhibice fotosyntézy zamezením přenosu elektronů přes thylakoidní membránu chloroplastů ve fotosystému II.^{7, 8} Substituované močoviny začaly být využívány po roce 1950, kdy byl jako první uveden na trh diuron. V současné době je z této skupiny ve velké míře používán chlortoluron a modernější isoproturon.⁵

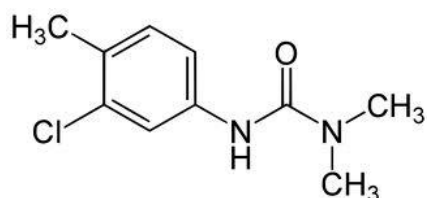
Mnoho substituovaných močovín a jejich metabolitů je však podezřelých z toxicity a možné karcinogenity. Nepříznivé účinky na organismus mohou způsobovat již při nízkých koncentracích.⁹

Kvůli vysoké pohyblivosti v půdě, perzistenci v prostředí a zatížení podzemních vod je používání substituovaných močovín v Evropě postupně omezováno. V celosvětovém měřítku se však z důvodu širokého spektra účinku a vysoké selektivity k plodinám stále masově používají.⁸

2.3 Chlortoluron

2.3.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti chlortoluronu^{10, 11}

Strukturní vzorec:



IUPAC název:	3-(3-chlor- <i>p</i> -tolyl)-1,1-dimethylmočovina
C.A.S. název:	chlortoluron
C.A.S. registrační číslo:	15545-48-9
Sumární vzorec:	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O
<i>M_r</i> :	212,7
Teplota tání:	148,1 °C
Log <i>K_{ow}</i> :	2,41
Rozpustnost ve vodě:	70 mg·dm ⁻³ (25 °C)

Jedná se o bezbarvou krystalickou látku bez zápachu, která je rozpustná v mnoha organických rozpouštědlech (např. aceton, methanol, benzen). Ve vodě je chlortoluron rozpustný jen omezeně.¹⁰

2.3.2 Využití chlortoluronu

Chlortoluron je herbicid používaný k zabránění růstu plevelu při pěstování obilovin a máku.¹² Patří do již zmíněné skupiny herbicidů, tzv. substituovaných močovín.¹³

Jednou z možností využití herbicidů na bázi chlortoluronu je ochrana proti chundelce metlici, která je jedním z nejzávažnějších plevelů v ozimých obilninách. Pro její odstranění mohou být tyto herbicidy aplikovány i na jaře, ale v naprosté většině případů je podzimní použití výhodnější vzhledem k nižší růstové fázi chundelky a stabilnějšímu počasí, které snižuje riziko poškození plodiny.¹⁴ Dále je možné aplikovat přípravky na bázi chlortoluronu k omezení růstu plevelu při pěstování máku setého. Vhodnější je však jejich použití v kombinaci s jiným herbicidem, protože samotné mohou zbrzdit počáteční růst máku a za suchých podmínek nedostatečně zabraňovat růstu plevelu.¹⁵

2.3.3 Degradace chlortoluronu v životním prostředí

Produkce a používání chlortoluronu jako herbicidu má za následek jeho přímé uvolnění do životního prostředí, v němž je částečně odbouráván. V půdě je největším předpokládaným procesem odstranění chlortoluronu mikrobiální degradace.¹⁶ Míra degradace je zde ovlivněna především obsahem organické hmoty, aktivitou mikroorganismů, vlhkostí a teplotou.¹⁷ V půdě s vyšším obsahem organické hmoty může být biodegradace oslabena kvůli adsorpci chlortoluronu na povrchu těchto látek.¹⁸

Při studiu degradace chlortoluronu pomocí mikroorganismů byly nejlepší výsledky získány využitím houby z rodu *Bjerkandera* (*Bjerkandera adusta* – Šedopórka osmahlá), která po dvou týdnech spotřebuje až 98 % této látky.¹⁹ Nejčastěji se vyskytující první krok biodegradace chlortoluronu je odštěpení methylové skupiny z dusíku močoviny. Tato biotransformace probíhá pouze jako kometabolický proces, protože chlortoluron neslouží bakteriím jako hlavní zdroj uhlíku.²⁰

Chování chlortoluronu v půdě může být také ovlivněno aplikací dusíkatých hnojiv. Bylo zjištěno, že při úpravě půdy síranem amonným a močovinou dochází ke zvýšení sorpce a zpomalení degradace chlortoluronu v půdě.^{18, 21}

Chlortoluron může být degradován i díky detoxikačním mechanismům některých obilovin. Nejdůležitějšími metabolickými cestami jsou *N*-demethylace a oxidační reakce methylovaného kruhu. Demethylace vede ke vzniku nefytotoxických produktů *N*-monodemethylchlortoluronu a *N*-didemethylchlortoluronu. Oxidací methylovaného kruhu vzniká hydroxymethylový metabolit, který je v rostlinách nalézán zejména v konjugaci s β -glukosidy.^{13, 22}

Ve vodě je chlortoluron odbouráván pomalu. Poločas rozpadu v říční vodě je přibližně 120 dní. Přestože je jeho rozpustnost ve vodě nízká ($70 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ při $25 \text{ }^\circ\text{C}$) a mobilita v půdě průměrná, je chlortoluron často detekován v povrchových a podzemních vodách v koncentračním rozmezí od 0,2 do $1,2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$.²³

Dalším způsobem degradace chlortoluronu v životním prostředí je UV fotochemická degradace. Ta probíhá uvolněním chloridových iontů a tvorbou hydroxyderivátů.²⁴

Z atmosféry, v níž se chlortoluron vyskytuje pouze v pevné fázi polétavého prachu, může být odstraněn fyzikálně vlivem mokré a suché depozice.²⁵

2.3.4 Biologické účinky chlortoluronu

Chlortoluron je ochotně a rychle absorbován po příjmu potravy. Není důkaz o jeho akumulaci v nějakém orgánu nebo tkáni. Je rychle vylučován močí ve formě metabolitů. Vůči savcům vykazuje chlortoluron nízkou akutní toxicitu, avšak pro vodní organismy je vysoce toxický. Při chronické expozici je podezřelý z karcinogenity, za nejvíce ohrožené orgány jsou považovány játra a ledviny. Chlortoluron může také způsobovat poškození plodu v těle matky.^{23, 26}

2.3.5 Metody stanovení chlortoluronu

Široké využívání substituovaných močovín způsobilo rozvoj analytických metod vhodných pro stanovení jejich zbytkových koncentrací v různých environmentálních vzorcích.

Mezi nejčastěji používané metody stanovení chlortoluronu patří zejména kapalinová (LC) a plynová chromatografie (GC). Přímá analýza pomocí GC je však ztížena polární povahou fenyльмоčovinových herbicidů, jejich termolabilitou a nízkou tenzí par. Proto je obvykle nutná derivatizace těchto sloučenin vyžadující specifické reakční podmínky.^{27, 28}

Po derivatizaci herbicidu je možné pro analýzu využít GC, například v kombinaci s detektorem elektronového záchytu (ECD). Tato metoda však není příliš specifická. Přímé

stanovení organických sloučenin ve vodě bez derivatizace bylo umožněno vyvinutím vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Pro stanovení fenylmočoviny byla použita metoda HPLC využívající UV detekci při 254 nm.²⁹

Ve studii³⁰ byla pro stanovení 12 různých fenylmočovinných herbicidů využita HPLC s elektrochemickou detekcí (ED) pracující s elektrodou ze skelného uhlíku.

Stanovení reziduí pesticidů v půdě bylo popsáno ve studii³¹. Pro analýzu byl použit velký objem extraktu (20 ml), který byl nadávkován na LC kolonu. Detekce byla prováděna spektrofotometricky při 220 nm. Výsledky prokázaly aplikovatelnost této metody, a to jak při nízkých ($\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$), tak při vyšších koncentracích směsi analytů.

Pro monitorování a stanovení pesticidů v pitné vodě byla vyvinuta metoda³². Ze vzorků pitné vody byla extrahována směs 12 sulfonylmočovinných herbicidů spolu s 6 významnými polárními pesticidy (včetně chlortoluronu). Extrakce a nakoncentrování bylo provedeno pomocí extrakce tuhou fází (SPE), eluenty byly následně analyzovány pomocí LC s detekcí diodovým polem (DAD). Metodou bylo dosaženo mezí stanovitelnosti použitelných pro monitorování pesticidů v pitné vodě.

Pro stanovení 15 fenylmočovinných herbicidů ve vzorcích rýže a kukuřice byla vyvinuta metoda HPLC s fluorescenční detekcí kombinovanou s UV dekompozicí a postkolonovou derivatizací. Tato metoda, sestávající z extrakce analytů ze vzorků, jejich přečištění pomocí SPE a HPLC stanovení, vykazuje dobrou přesnost a správnost a získané limity detekce umožňují stanovení směsi těchto pesticidů v rýži nebo kukuřici v koncentracích pod přípustnými limity jejich reziduí.⁴

Jako velmi efektivní technikou pro čištění extraktů vzorků obsahujících stopové koncentrace fenylmočovinných herbicidů se ukázala být imunoafinitní chromatografie. Na rozdíl od běžných čistících technik využívajících extrakci organickými rozpouštědly může tato technika nabídnout jednoduché a selektivní prostředky čištění extraktů před analýzou. Také dochází ke snížení objemu použitých organických rozpouštědel, které jsou potřeba pro čištění extraktů komplexních matic, jako jsou potraviny. Stanovení bylo provedeno pomocí reversní kapalinové chromatografie (RP LC) s UV detekcí.³³

Ve studii¹³ byl chlortoluron a jeho metabolity stanoven v obilninách pomocí GC. Chlortoluron byl pyrolyzován na odpovídající fenylisokyanát, který byl stanoven GC s dusíko-fosforovou detekcí (NPD), toto stanovení bylo ověřeno pomocí GC s detektorem s iontovou pastí (ITD). *N*-demethylované metabolity chlortoluronu byly stanoveny po konverzi na perfluoracylové deriváty pomocí GC-ITD. Hydroxymethylový metabolit převážně přítomný jako β -glukosid může být analyzovaný po enzymatické hydrolýze.

Navrhované metody jsou opakovatelné a dostatečně citlivé pro stanovení zbytkových koncentrací těchto sloučenin v obilninách.

Metabolity chlortoluronu mohou být také stanoveny pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) s využitím radioaktivně značených herbicidů.³⁴

Ve vzorcích olivového oleje byly pesticidy stanovovány GC s hmotnostní detekcí (MS) po extrakci uhlíkovými nanotrubičkami. Bylo dosaženo dostatečně nízkého limitu detekce, který umožňuje použití této metody pro kontrolu přítomnosti pesticidů v přísně sledovaných potravinářských produktech, jako je ekologický panenský olej. Kolonka pro SPE využívající nanotrubiček navíc neztrácí svou účinnost a může být pro sorpci použita i více než stokrát.³⁵

Meze detekce zmíněných metod využitých ke stanovení chlortoluronu jsou uvedeny v následující tabulce:

Tab. 1 Meze detekce některých metod využitých ke stanovení chlortoluronu.

Metoda stanovení	Mez detekce		Literatura
HPLC-ED	$3 \cdot 10^{-7}$	$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	30
GC-MS	$8,5 \cdot 10^{-9}$	$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	35
LC-DAD	$1,4 \cdot 10^{-11}$	$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	32
HPLC-fluorescenční detekce	0,003	$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	4
RP LC-UV ¹	0,002-0,005	$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	33
GC-NPD (ITD)	0,1	$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	13
RP HPLC-UV	0,012	$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	31

¹ Uvedené rozmezí meze detekce platí pro směs fenylničovinových herbicidů.

2.4 Uhlíková pastová elektroda

Uhlíková pastová elektroda (CPE) byla objevena v roce 1958 profesorem Ralphem N. Adamsem při hledání elektrody s obnovitelným povrchem využitelné pro anodické oxidace. Tato elektroda měla být alternativou ke rtuťové kapkové elektrodě, kterou vzhledem k anodické oxidaci rtuti nelze polarizovat v oblasti pozitivnějších potenciálů. Bylo však zjištěno, že použití vzniklé kapající uhlíkové elektrody není vhodné, a to kvůli malému podílu práškového uhlíku dispergovaného v organické kapalině. Postupným zvyšováním tohoto podílu pak vznikla hustší směs s vhodnějšími vlastnostmi, tzv. uhlíková pasta.^{36, 37}

CPEs, tvořené směsí uhlíkového prášku a vhodné pastovací kapaliny, patří do speciální skupiny heterogenních uhlíkových elektrod.³⁷ Optimální výběr uhlíkového prášku a pastovací kapaliny patří mezi nejdůležitější faktory ovlivňující výsledné chování uhlíkových past. Do dnešního dne byly vyzkoušeny různé typy uhlíkových prášků, a to od běžných spektrálních prášků přes uhlíkové mikrokuličky až k uhlíkovým nanotrubičkám.³⁸ Důležitou vlastností uhlíkového prášku je definovaná velikost a distribuce částic a jejich nízká adsorpční schopnost.^{37, 39} Pastovací kapalina by měla být málo těkavá, chemicky inertní a bez obsahu elektroaktivních příměsí, minimálně rozpustná ve vodných roztocích a nemísitelná s organickými rozpouštědly.^{39, 40, 41} V současnosti jsou nejvíce používanými pastovacími kapalinami minerální oleje, silikonové oleje, parafinové oleje, organofosfáty a nověji iontové kapaliny.^{38, 42} Typické složení běžné uhlíkové pasty je přibližně 0,5 až 1,0 ml pastovací kapaliny na 1,0 g grafitového prášku.⁴³

Použití CPEs je poměrně široké jak pro stanovení anorganických, tak i organických sloučenin.^{44, 45} Šířka potenciálového okna CPE je srovnatelná s pevnými elektrodami – platinovými či běžnými uhlíkovými elektrodami.⁴⁶ Potenciálové rozmezí běžných CPEs závisí na typu prostředí, ve kterém je měření prováděno. V neutrálním prostředí se rozmezí potenciálů použitelných pro měření pohybuje mezi -1,3 až +1,4 V, v alkalickém a kyselém prostředí se potenciálové okno liší od uvedených hodnot o několik desetin voltu.⁴²

Největšími výhodami CPEs je jejich jednoduchá příprava a velmi snadná chemická či biologická modifikovatelnost, nízké kapacitní proudy (snižováním obsahu pastovací kapaliny se však vlastnosti CPE přibližují vlastnostem pevných elektrod a vykazují vyšší zbytkové proudy), snadná obnovitelnost jejich aktivního povrchu i dobrá opakovatelnost a reprodukovatelnost měření.^{37, 38, 45}

Nevýhodou těchto elektrod je jejich omezené použití pro katodické redukce (z důvodu přítomnosti kyslíku rozpuštěného v pastě), dále vliv experimentálních zkušeností analytika⁴² a nižší stabilita pasty v roztocích s vysokým obsahem organického rozpouštědla. Tento problém je však možné odstranit použitím mikrokuliček skelného uhlíku.³⁸ V prostředí s vyšším obsahem organického rozpouštědla je také vhodnější použít uhlíkovou pastu připravenou ze silikonového oleje.⁴⁷

Vzhledem k velkému množství příznivých vlastností jsou tyto elektrody široce využívané nejen pro voltametrická měření, ampérometrii, coulometrii a potenciometrii⁴², ale také jako elektrochemické detektory v průtokové analýze (FIA) a vysokoúčinné kapalinové chromatografii.^{38, 48}

Meze detekce dosahované přímou analýzou na nemodifikovaných CPEs jsou obvykle od $1 \cdot 10^{-6}$ do $1 \cdot 10^{-7}$ mol \cdot dm⁻³. Při využití adsorpce analytu na povrchu elektrody (AdSV)⁴⁸ mez detekce klesá na $1 \cdot 10^{-8}$ až $1 \cdot 10^{-9}$ mol \cdot dm⁻³.

Uhlíkovými pastovými elektrodami, a to především vhodně modifikovanými, lze ve spojení s nějakou běžnou separační metodou stanovit i velmi nízké koncentrace analytu v komplikovaných maticích.³⁸

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

chlortoluron (analytical standard, Sigma-Aldrich, Německo)

hydroxid sodný (p.a., Lach-Ner, Neratovice)

kyselina boritá (p.a., Lachema, Brno)

kyselina *o*-fosforečná (85 %, p.a., Lachema, Brno)

octová kyselina (99,8 %, p.a., Lach-Ner, Neratovice)

methanol (p.a., Merck, Německo)

methanol pro HPLC (Merck, Německo)

mikrokuličky skelného uhlíku (0,4 – 12 μm , Alpha Aesar, Německo)

minerální olej (Fluka Biochemika, Švýcarsko)

chlorid draselný (p.a., Lach-Ner, Neratovice)

deionizovaná voda (Millipore Q-plus System, Millipore, USA)

3.2 Použitá aparatura

3.2.1 Voltametrické techniky

Přístroj

PalmSens s programem PSTrace 2.4 (PalmSens, Nizozemí)

Elektrody

pracovní - uhlíková pastová elektroda – teflonové tělo s nerezovým pístem, aktivní plocha o průměru 2 mm

- miniaturizovaná uhlíková pastová elektroda - teflonová kapilára, aktivní plocha

o průměru 0,5 mm

referentní - argentchloridová elektroda s $3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl (ETP CZ R01207)

pomocná - platinová plíšková elektroda (ETP CZ P00607), platinová drátková elektroda

3.2.2 HPLC aparatura

Kolona: LiChroCART[®] 125-4, Purospher, RP-18, 5 μm (Merck, Německo)

Předkolonka: LiChroCART 4-4, Purospher, RP-18, 5 μm (Merck, Německo)

Pumpa: vysokotlaká pumpa HPP 5001 (Laboratorní přístroje, Praha)

Dávkovač: Sample injector D se smyčkou 20 μl , (Ecom, ČR)

Detektory: UV/VIS detektor Sapphire (Ecom, ČR), ampérometrický detektor ADLC 2 (Laboratorní přístroje, Praha)

Program: Clarity verze 2.4.1.87 (DataApex)

3.2.3 Další použitá zařízení

pH metr: pH meter 3510 s kombinovanou skleněnou elektrodou (Jenway, UK)

Spektrofotometr: Agilent 8453 (Agilent Technologies, USA)

Ultrazvuková čistička: ultrazvuková čistička PSO2000A (Powersonic, USA)

Magnetická míchačka: Magnetic Stirrer MS 3000 (Jenway, UK)

Třepačka: Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Inc., USA)

Filtry: MS Nylon Membrane Filter (0,22 μm)

ProFill Plus PVDF (0,45 μm)

3.3 Pracovní postupy

3.3.1 Příprava zásobního roztoku chlortoluronu

Zásobní roztok chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl připraven rozpuštěním 0,0106 g chlortoluronu v 50 ml methanolu. Roztoky o nižších koncentracích byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku.

3.3.2 Příprava Brittonových-Robinsonových pufrů

Brittonovy-Robinsonovy (BR) tlumivé roztoky⁴⁹ o zvoleném pH byly připraveny smísením vodného roztoku hydroxidu sodného o koncentraci $0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ s roztokem obsahujícím kyselinu boritou, kyselinu fosforečnou (85 %) a octovou kyselinu, všechny o koncentraci $0,04 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

3.3.3 Příprava uhlíkové pasty

Uhlíková pasta byla připravena z 500 mg mikrokuliček skelného uhlíku o průměru 0,4 – 12 μm a z 200 μl minerálního oleje.

3.3.4 Příprava mobilní fáze pro HPLC stanovení chlortoluronu

Mobilní fáze byla připravena smísením methanolu (pro HPLC) a BR pufru o daném pH tak, aby vznikl roztok s podílem methanolu 60 %, V/V. Pro přípravu pufru byly v tomto případě použity desetkrát zředěné roztoky kyselé a zásadité složky.

3.3.5 Voltametrické stanovení

Voltametrické stanovení chlortoluronu bylo provedeno metodou diferenční pulsní voltametrie (DPV) na přenosném přístroji PalmSens. Objem měřeného vzorku byl 10 ml při měření pomocí konvenční uhlíkové pastové elektrody (CPE) a 250 μ l při měření pomocí miniaturizované uhlíkové pastové elektrody (mCPE). Pro optimalizaci podmínek stanovení a koncentrační závislosti v deionizované vodě byly vzorky připraveny odpipetováním potřebného množství zásobního roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol \cdot dm $^{-3}$, přidáním methanolu tak, aby byl jeho celkový podíl 10 % (V/V), a doplněním BR puftrem (pH = 3) na celkový objem. Před každým jednotlivým měřením byl povrch CPE mechanicky očištěn pomocí filtračního papíru navlhčeného destilovanou vodou, povrch mCPE byl obnovován odříznutím tenkého plátku kapiláry. Měření byla provedena v rozmezí vkládaného potenciálu od 0 do 1600 mV, při rychlosti polarizace 20 mV \cdot s $^{-1}$ a na elektrody byly vkládány pulsy o výšce 50 mV a šířce 100 ms.

Při optimalizaci podmínek voltametrického stanovení chlortoluronu byla sledována závislost odezvy elektrody na pH (2 až 12) a na obsahu methanolu, opakovatelnost měření a možnost akumulace chlortoluronu na povrchu CPE. Akumulace chlortoluronu byla sledována v roztoku o koncentraci $6 \cdot 10^{-6}$ mol \cdot dm $^{-3}$. Do tohoto roztoku byla pracovní elektroda na zvolenou dobu (1, 3, 10 minut) ponořena a roztok byl míchán míchadlem při 500 otáček za minutu a po uplynutí této doby byl po 10s klidové periodě naměřen voltamogram. Při nalezených optimálních podmínkách byly proměřeny koncentrační závislosti chlortoluronu v rozmezí od $1 \cdot 10^{-4}$ mol \cdot dm $^{-3}$ k nižším koncentracím.

Dále byly proměřeny koncentrační závislosti v modelových vzorcích říční vody a půdy. Použitá říční voda byla odebrána v Praze u pravého břehu Vltavy přibližně 100 m před Palackého mostem. Vzorky byly připraveny smísením říční vody s potřebným množstvím zásobního roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol \cdot dm $^{-3}$ tak, aby vznikla sada roztoků o koncentraci od $2 \cdot 10^{-6}$ do $2 \cdot 10^{-4}$ mol \cdot dm $^{-3}$. Před stanovením byl podíl 5 ml říční vody s přidavkem analytu doplněn BR puftrem na 10 ml. Slepý vzorek byl připraven z říční vody (5 ml) doplněné BR puftrem na 10 ml.

Pro sledování koncentrace chlortoluronu v modelovém vzorku půdy byla použita půda odebraná v Praze na poli poblíž Modřanské rokle. Před přípravou vzorků se nechala půda nejprve vysušit, poté byla přesáta přes síto o velikosti ok 0,12 mm (120 mesh) a zhomogenizována. Vzorky byly připraveny nadávkováním potřebného množství zásobního roztoku chlortoluronu ($1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) na 2,5 g půdy tak, aby byla jeho koncentrace v půdě od 2 do $100 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. Takto připravené vzorky byly ponechány přes noc v temnu. Poté byl chlortoluron extrahován 5 ml methanolu. Při extrakci byla využita třepačka (2 minuty) a ultrazvuková čistička (15 minut). Před stanovením bylo 2,5 ml odebraného extraktu doplněno do 10 ml BR pufrem. Slepý vzorek byl připraven obdobně, s tím rozdílem, že na půdu bylo nadávkováno pouze 0,5 ml methanolu. Ke zjištění výtěžnosti extrakce byly použity standardní roztoky připravené z odpovídajícího množství zásobního roztoku chlortoluronu a doplněné do 5 ml methanolem. Obdobným způsobem jako tomu bylo u vzorků, bylo před stanovením 2,5 ml tohoto roztoku doplněno BR pufrem na výsledný objem 10 ml.

3.3.6 HPLC stanovení se spektrofotometrickou a elektrochemickou detekcí

Vzorek pro HPLC stanovení byl připraven odpipetováním daného množství zásobního roztoku chlortoluronu ($1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a methanolu (60 %, V/V) a doplněním deionizovanou vodou na celkový objem. Měření bylo provedeno na koloně LiChroCART[®] 125-4, Purospher, RP-18, 5 μm . Objem měřeného vzorku byl 20 μl . Při měření byla použita mobilní fáze obsahující methanol s BR pufrem (pH = 4) v poměru 60:40 (V/V). Průtoková rychlost mobilní fáze byla nastavena na $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

Elektrochemický detektor typu wall-jet pracoval ve tříelektrodovém zapojení s konvenční CPE jako pracovní elektrodou, referentní argentchloridovou elektrodou s $3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ KCl}$ a pomocnou platinovou elektrodou. Pro UV detekci byla zvolena vlnová délka detektoru 243 nm.

Při optimalizaci podmínek HPLC stanovení chlortoluronu byla sledována závislost odezvy elektrochemického detektoru na pH (3, 4, 5 a 7) a na potenciálu (600 až 1400 mV). Při nalezených optimálních podmínkách (potenciál pracovní elektrody 1300 mV, prostředí BR pufru o pH 4) byly proměřeny koncentrační závislosti chlortoluronu v rozmezí od $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ k nižším koncentracím.

Pro sledování koncentrace chlortoluronu v říční vodě (Praha, Vltava) byl použit roztok chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, vzniklý doplněním potřebného

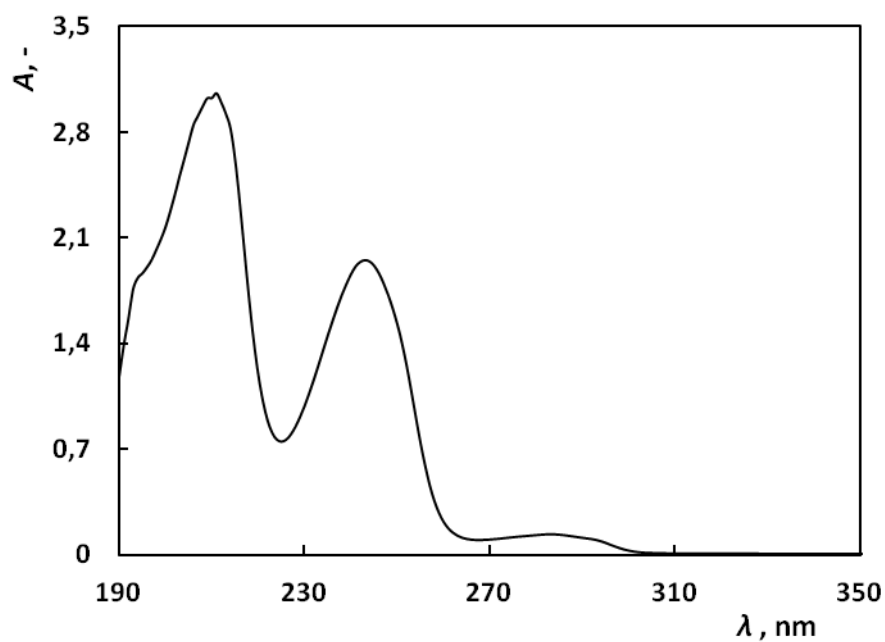
množství zásobního roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ přefiltrovanou říční vodou (filtr MS Nylon Membrane Filter - $0,22 \text{ } \mu\text{m}$) na 10 ml.

K naměření koncentračních závislostí chlortoluronu v modelovém vzorku půdy (Praha, Modřanská rokle) byly použity vzorky připravené nadávkováním potřebného množství zásobního roztoku chlortoluronu ($1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) na 2,5 g předem vysušené, přesáté a zhomogenizované půdy tak, aby byla jeho koncentrace v půdě od 0,1 do $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. Vzorky byly ponechány přes noc v temnu. Poté byl chlortoluron extrahován z půdy 5 ml methanolu. Po přefiltrování (filtr ProFill Plus PVDF - $0,45 \text{ } \mu\text{m}$) byl tento extrakt naředěn deionizovanou vodou tak, aby byl získán roztok s obsahem methanolu 60 %, V/V. Slepý vzorek byl připraven obdobně, s tím rozdílem, že do půdy bylo nadávkováno pouze 0,5 ml methanolu.

Všechny křivky byly proměřeny alespoň třikrát. Získaná data byla zpracována metodou lineární regrese a mez detekce byla vypočtena jako koncentrace odpovídající trojnásobku směrodatné odchylky měření nejnižší stanovované koncentrace, vydělenému směrnici příslušné kalibrační závislosti.

3.4 Sledování stability zásobního roztoku chlortoluronu

Stabilita zásobního roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byla sledována spektrofotometricky proti methanolu v křemenných kyvetách ($l = 1 \text{ mm}$). Absorpční spektrum (Obr. 1) bylo proměřeno v rozmezí vlnových délek od 190 do 800 nm. Absorbance byla odečítána při 243 nm po dobu 111 dnů (Tab. 2). Ze zjištěných hodnot vyplývá, že zásobní roztok chlortoluronu při uchování v temnu v chladničce při teplotě $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ je možné považovat za stálý minimálně 3 měsíce.



Obr. 1 Absorpční spektrum zásobního roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Měřeno proti methanolu v křemenných kyvetách ($l = 1 \text{ mm}$).

Tab. 2 Absorbance zásobního roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ při 243 nm. Měřeno proti methanolu v křemenných kyvetách ($l = 1 \text{ mm}$).

Čas měření	Absorbance při 243 nm	
[den]	[-]	[%]
1	1,936	100,0
5	1,951	100,8
12	1,975	102,0
21	2,072	107,0
41	2,006	103,6
62	2,026	104,7
111	2,042	105,5

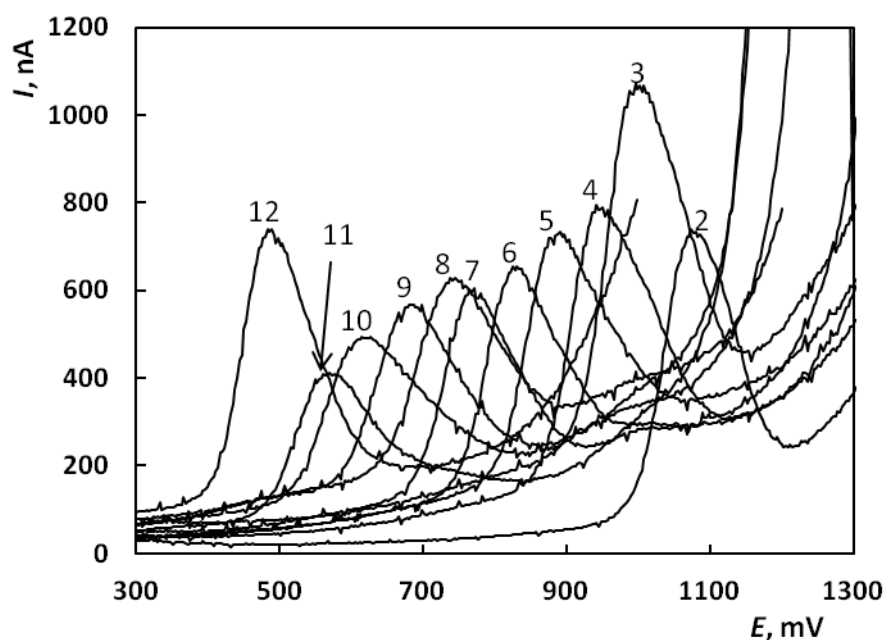
4 Výsledky a diskuze

4.1 Voltametrické stanovení chlortoluronu na CPE

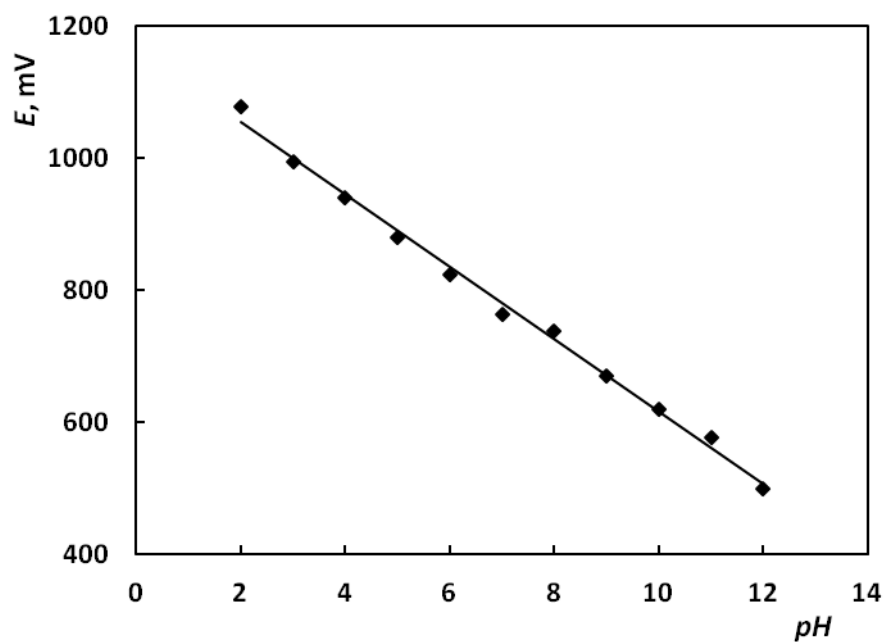
4.1.1 Vliv pH na stanovení chlortoluronu

Jako první krok při vývoji metody pro stanovení chlortoluronu technikou DPV na CPE bylo optimalizováno pH roztoku. Při optimalizaci pH byl použit roztok chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí BR pufru o různých hodnotách pH a obsahu methanolu 10 % (V/V). Sledované rozmezí pH bylo 2 až 12.

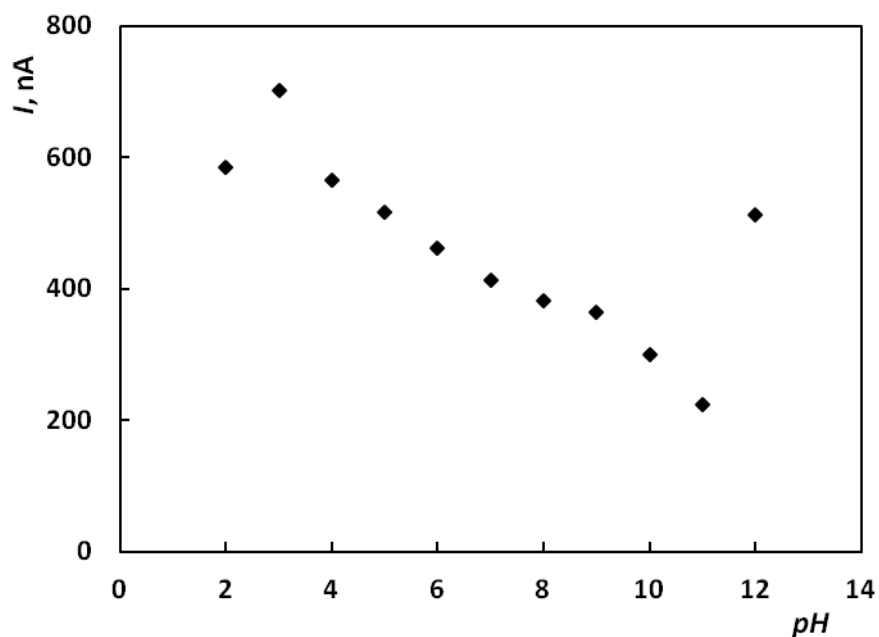
Výška píku u naměřených voltametrických křivek (Obr. 2) nabývá maximální hodnoty při pH 3, klesá se stoupajícím pH a při pH 12 dochází opět k jejímu nárůstu. Jako optimální pH bylo tedy zvoleno pH 3, při němž je pík nejlépe vyhodnotitelný. Na Obr. 3, který vyjadřuje závislost potenciálu píku na pH, vidíme, že potenciál píku s rostoucím pH lineárně klesá podle rovnice $E \text{ (mV)} = -54,8 \cdot \text{pH} + 1165$ ($R = 0,9977$), což naznačuje, že při oxidaci chlortoluronu dochází k výměně stejného počtu protonů a elektronů. Závislost proudu píku na pH je znázorněna na Obr. 4.



Obr. 2 Voltamogramy roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí BR pufru a methanolu (10 %, V/V) naměřené při pH prostředí 2 až 12. Měřeno metodou DPV na CPE. Čísla voltamogramů odpovídají hodnotě pH BR pufru.



Obr. 3 Závislost potenciálu píku chlortoluronu na pH prostředí. Měření bylo provedeno v roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí BR pufru (pH 2 až 12) a methanolu (10 %, V/V) metodou DPV s využitím CPE.

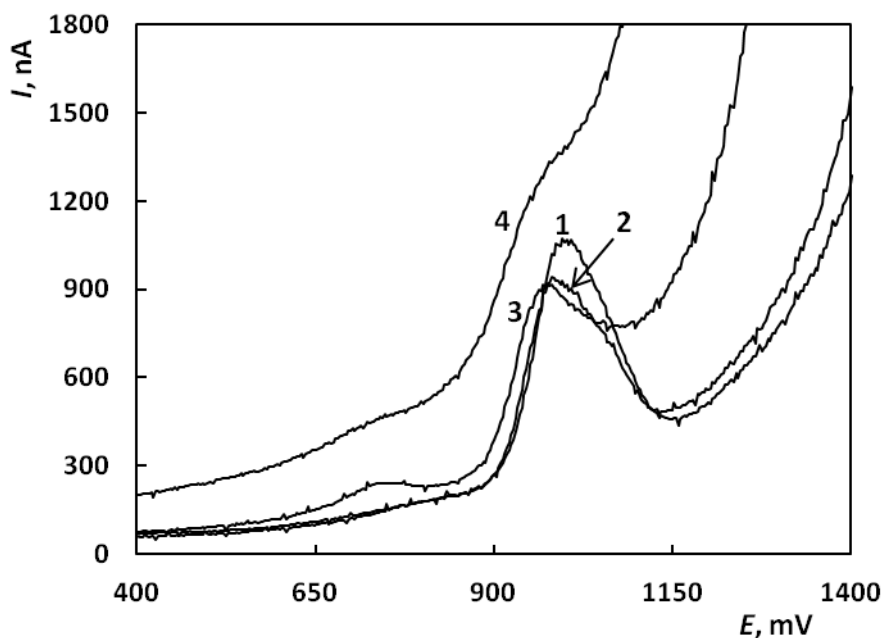


Obr. 4 Závislost proudu píku chlortoluronu na pH prostředí. Měření bylo provedeno v roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí BR pufru (pH 2 až 12) a methanolu (10 %, V/V) metodou DPV s využitím CPE.

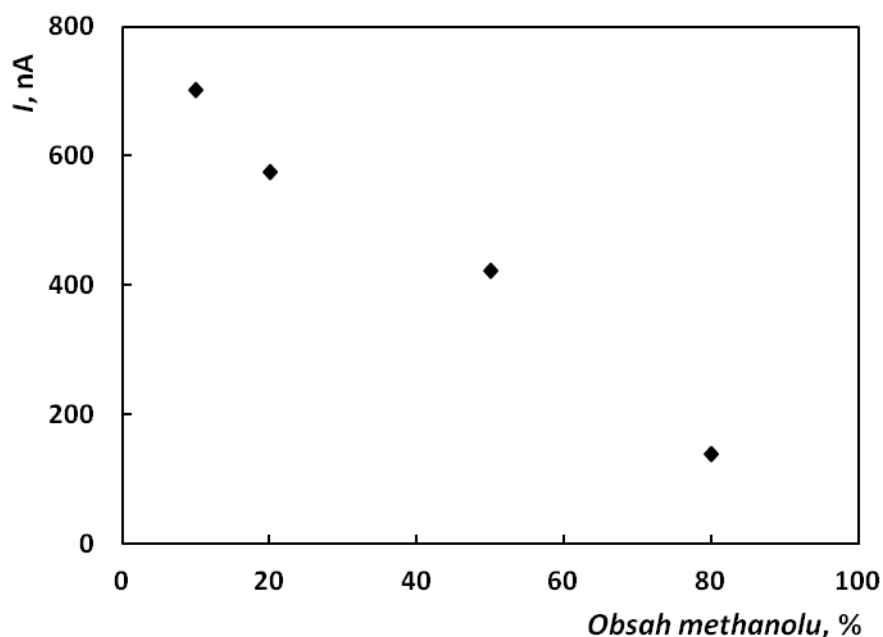
4.1.2 Vliv obsahu methanolu na stanovitelnost chlortoluronu

Pro studium vlivu obsahu methanolu na odezvu chlortoluronu pomocí DPV byl použit roztok chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí BR pufru (pH = 3) a methanolu. Podíl methanolu byl postupně zvyšován tak, aby vznikl 10, 20, 50 a 80% (V/V) methanolický roztok.

Z naměřených voltametrických křivek, které jsou zobrazeny na Obr. 5, a ze závislosti proudů píku chlortoluronu na obsahu methanolu (Obr. 6) bylo zjištěno, že se s vyšší koncentrací methanolu snižuje výška píků a v důsledku zkracování potenciálového okna dochází ke zhoršení jejich vyhodnotitelnosti. Ze zjištěných důvodů byly pro další optimalizaci podmínek a pro měření koncentrační závislosti v deionizované vodě použity roztoky chlortoluronu s obsahem methanolu 10 % (V/V).



Obr. 5 Voltamogramy chlortoluronu naměřené při různém obsahu methanolu v roztoku. Měření bylo provedeno metodou DPV na CPE v roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí BR pufru (pH = 3) a methanolu o obsahu 10 (1), 20 (2), 50 (3) a 80 (4) %, V/V.



Obr. 6 Závislost výšky píku chlortoluronu na obsahu methanolu. Měřeno metodou DPV na CPE v roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí BR pufru (pH = 3) a methanolu (10, 20, 50 a 80 %, V/V).

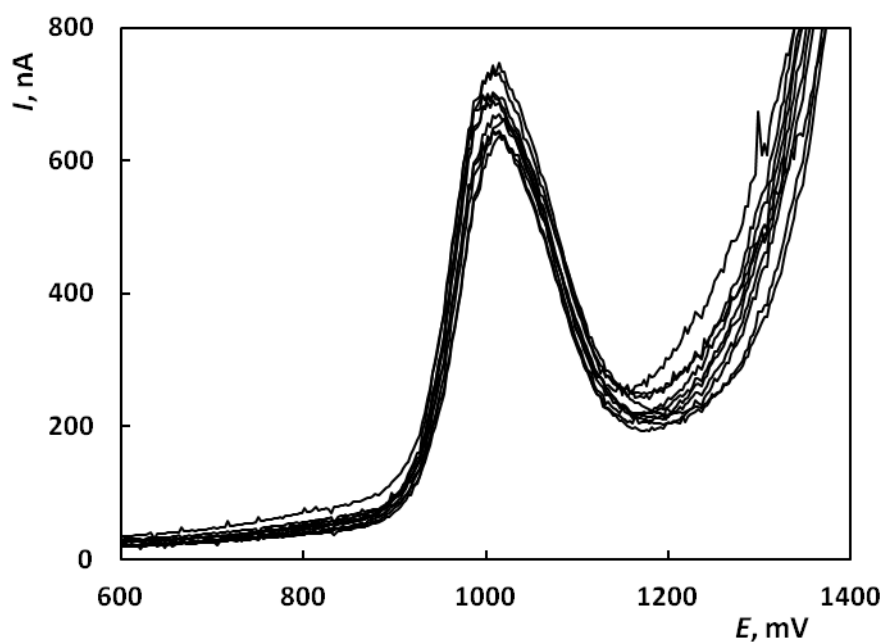
4.1.3 Opakovatelnost měření

Opakovatelnost měření byla sledována v roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí BR pufru (pH = 3) a methanolu (10 %, V/V). Byly provedeny dvě série deseti po sobě následujících měření. V první sérii byl elektrodový povrch po každém měření obnoven otřením filtračním papírem navlhčeným destilovanou vodou. Výška píku byla stanovena na 705,1 nA s relativní směrodatnou odchylkou 5,6 % (Tab. 3), což je ve shodě s obvyklou opakovatelností měření na CPE⁴². Druhá série měření byla provedena bez obnovy elektrodového povrchu. Během tohoto měření došlo ke zvýšení píku přibližně o 45 %.

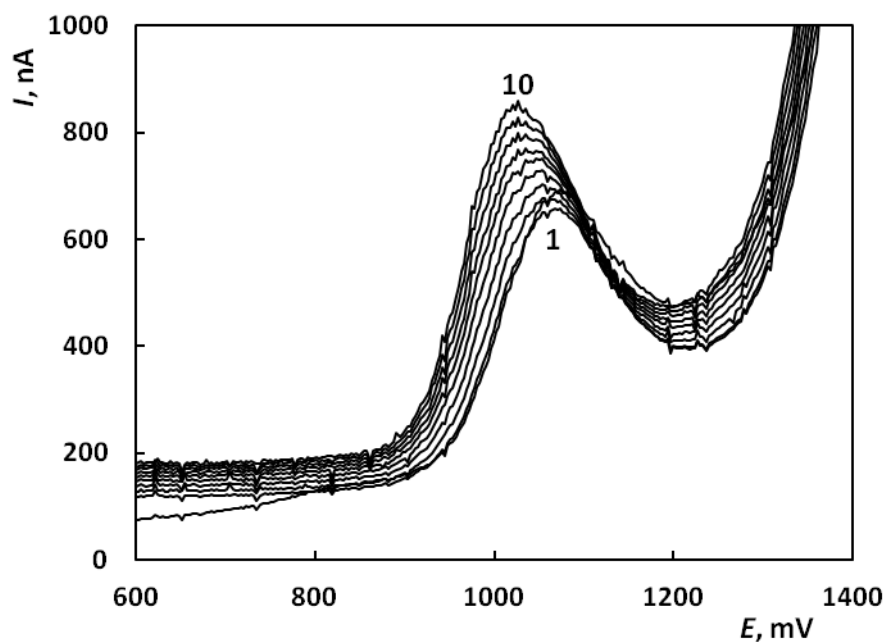
Z uvedeného vyplývá, že je nutné elektrodový povrch před každým měřením mechanicky očistit. Voltametrické křivky deseti po sobě následujících měření s obnovou a bez obnovy elektrodového povrchu jsou znázorněny na Obr. 7 a Obr. 8.

Tab. 3 Statistické vyhodnocení opakovatelnosti měření výšky píku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí BR pufru (pH = 3) a methanolu (10 %, V/V) metodou DPV s obnovou elektrodového povrchu pomocí mechanického očištění povrchu CPE po každém měření.

Výška píku [nA]	705,1
s [nA]	39,8
s_r [%]	5,6
$L_{I,2}$ [\pm nA]	28,2



Obr. 7 Voltamogramy deseti po sobě následujících měření chlortoluronu s obnovou elektrodového povrchu pomocí mechanického očištění povrchu CPE. Měřeno metodou DPV v roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí BR pufru (pH = 3) a methanolu (10 %, V/V).

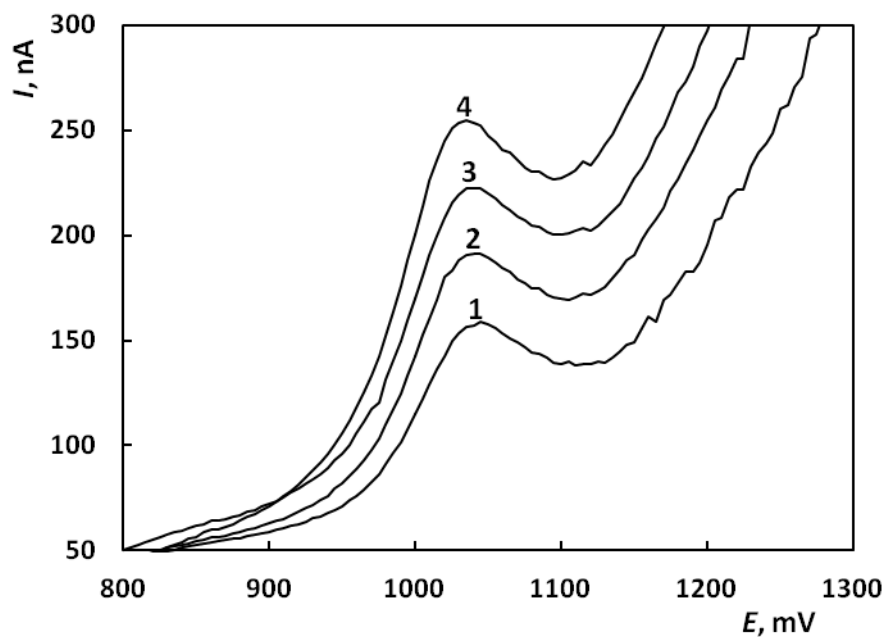


Obr. 8 Voltamogramy deseti po sobě následujících měření chlortoluronu bez obnovy elektrodového povrchu. Měřeno metodou DPV na CPE v roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí BR pufru (pH = 3) a methanolu (10 %, V/V). Na obrázku jsou vyznačeny křivky prvního a desátého měření.

4.1.4 Sledování akumulace chlortoluronu na CPE

Za účelem zvýšení odezvy chlortoluronu byla ověřována možnost jeho akumulace na povrchu CPE. Měření byla provedena v roztoku chlortoluronu o koncentraci $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí BR pufru (pH = 3) a methanolu (10 %, V/V) a to po 1, 3 a 10 minutách.

Ze získaných voltamogramů znázorněných na Obr. 9 vidíme, že dochází pouze k mírnému nárůstu výšky píku. Využití akumulace ke zvýšení citlivosti stanovení chlortoluronu tedy není z hlediska doby trvání analýzy příliš výhodné. Z tohoto důvodu byla další měření provedena bez využití této možnosti.



Obr. 9 Voltamogramy znázorňující akumulaci chlortoluronu na povrchu CPE. Měření bylo provedeno metodou DPV v roztoku chlortoluronu o koncentraci $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí BR pufru (pH = 3) a methanolu (10 %, V/V) po 1 (2), 3 (3) a 10 (4) minutách. Křivka 1 vyjadřuje měření bez využití akumulace.

4.1.5 Koncentrační závislosti

Stanovení chlortoluronu v deionizované vodě

Nalezené optimální podmínky pro stanovení chlortoluronu pomocí DPV na CPE byly použity pro změření koncentračních závislostí v koncentračním rozmezí od $8 \cdot 10^{-7}$ do $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

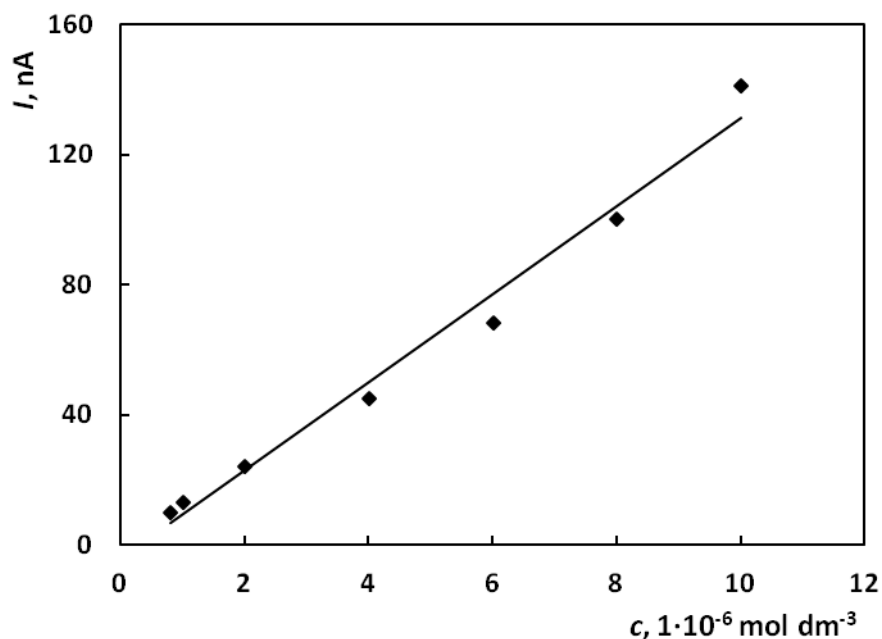
Parametry získaných kalibračních křivek v jednotlivých koncentračních rozmezích jsou uvedeny v Tab. 4. Ze zjištěných dat vyplývá, že jsou naměřené kalibrační závislosti lineární v celém měřeném koncentračním rozsahu, což potvrzuje i směrnice logaritmické formy této závislosti (Tab. 5). Mez detekce byla stanovena na $3,7 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Na Obr. 10 je znázorněna kalibrační přímka v koncentračním rozmezí od $8 \cdot 10^{-7}$ do $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Kalibrační přímka v logaritmické formě v celém koncentračním rozmezí je znázorněna na Obr. 11. Naměřené voltametrické křivky pro koncentrační rozsah $8 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ jsou zobrazeny na Obr. 12.

Tab. 4 Parametry kalibračních závislostí chlortoluronu. Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 3 a methanolu (10 %, V/V).

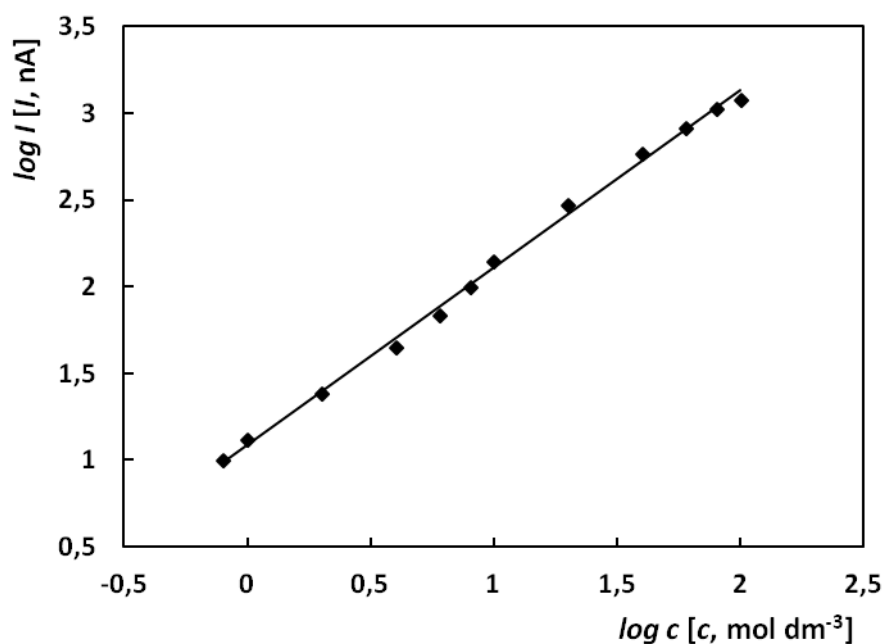
Koncentrační rozsah [mol·dm ⁻³]	Směrnice [mA·mol ⁻¹ ·dm ³]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	Mez detekce [mol·dm ⁻³]
8·10 ⁻⁷ – 1·10 ⁻⁴	12,69	12,6	0,9962	-
1·10 ⁻⁵ – 1·10 ⁻⁴	11,97	65,3	0,9942	-
8·10 ⁻⁷ – 1·10 ⁻⁵	13,54	-4,2	0,9915	3,7·10 ⁻⁷

Tab. 5 Parametry logaritmické formy kalibrační přímky v celém koncentračním rozmezí pro stanovení chlortoluronu metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru (pH = 3) a methanolu (10 %, V/V).

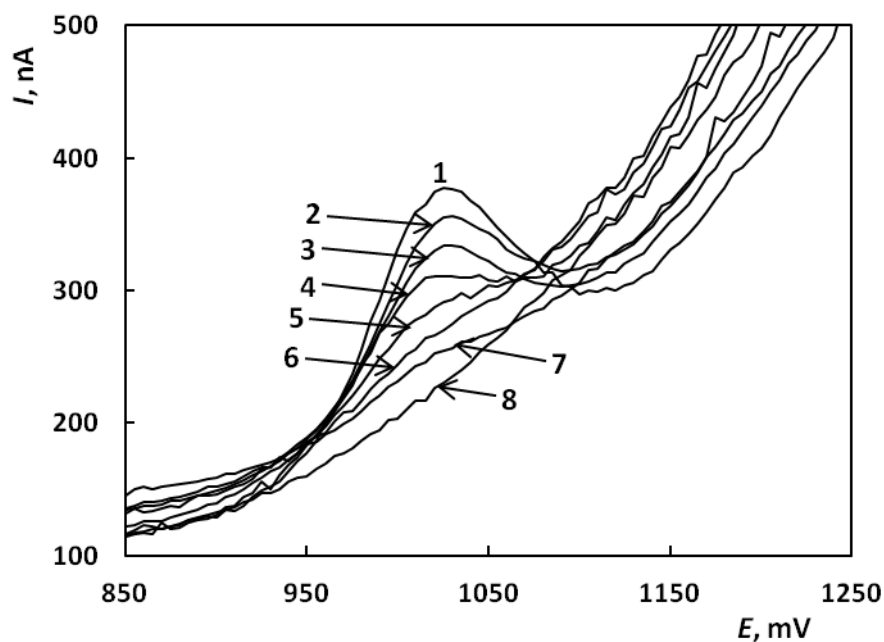
Koncentrační rozsah [mol·dm ⁻³]	Směrnice	Úsek	Korelační koeficient
8·10 ⁻⁷ – 1·10 ⁻⁴	1,02	1,09	0,9987



Obr. 10 Závislost proudu píku na koncentraci chlortoluronu v koncentračním rozmezí 8·10⁻⁷ až 1·10⁻⁵ mol·dm⁻³. Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru (pH = 3) a methanolu (10 %, V/V).



Obr. 11 Závislost proudu píku na koncentraci chlortoluronu v logaritmické formě v koncentračním rozmezí $8 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³. Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru (pH = 3) a methanolu (10 %, V/V).



Obr. 12 Voltamogramy chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-5}$ (1), $8 \cdot 10^{-6}$ (2), $6 \cdot 10^{-6}$ (3), $4 \cdot 10^{-6}$ (4), $2 \cdot 10^{-6}$ (5), $1 \cdot 10^{-6}$ (6), $8 \cdot 10^{-7}$ (7) mol·dm⁻³ v prostředí BR pufru (pH = 3) a methanolu (10 %, V/V). Křivka 8 odpovídá základnímu roztoku s nulovou koncentrací chlortoluronu. Měřeno metodou DPV na CPE.

Stanovení chlortoluronu v modelovém vzorku říční vody

Vyvinutá metoda stanovení chlortoluronu pomocí DPV na CPE byla použita ke stanovení této látky v modelových vzorcích říční vody. Modelové vzorky chlortoluronu byly připraveny smísením říční vody s potřebným množstvím zásobního roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ tak, aby vznikla sada roztoků o koncentraci chlortoluronu od $2 \cdot 10^{-6}$ do $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Před stanovením byl podíl 5 ml říční vody s přidavkem analytu doplněn BR pufrem (pH = 3) na 10 ml.

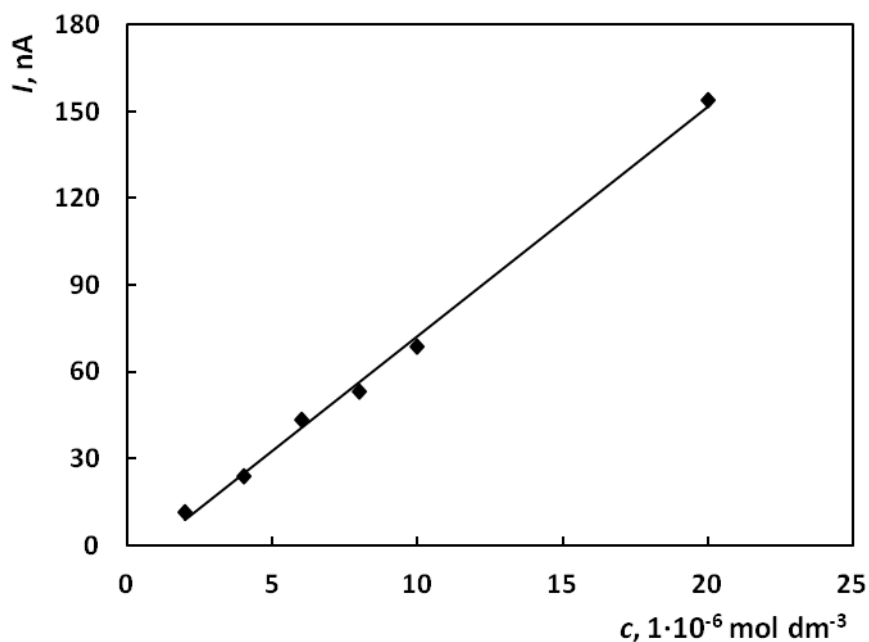
Naměřená kalibrační závislost je lineární v celém měřeném rozsahu koncentrací, což je patrné z parametrů kalibrační přímky uvedených v Tab. 6, a také ze směrnice logaritmické závislosti, jejíž hodnota se blíží 1. Mez detekce byla stanovena na $8,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Tato mez detekce je v porovnání s mezí detekce dosaženou v deionizované vodě přibližně dvakrát vyšší, což je způsobeno ředěním vzorku říční vody pufrem před měřením. Obě meze detekce jsou tedy srovnatelné. Závislost proudu píku na koncentraci chlortoluronu v říční vodě v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-6}$ až $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ je znázorněna na Obr. 13. Logaritmická forma kalibrační přímky v celém koncentračním rozsahu je zobrazena na Obr. 14 a parametry této přímky jsou uvedeny v Tab. 7. Naměřené voltametrické křivky chlortoluronu v říční vodě v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-6}$ až $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ jsou znázorněny na Obr. 15.

Tab. 6 Parametry kalibračních závislostí pro stanovení chlortoluronu v modelových vzorcích říční vody. Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 3.

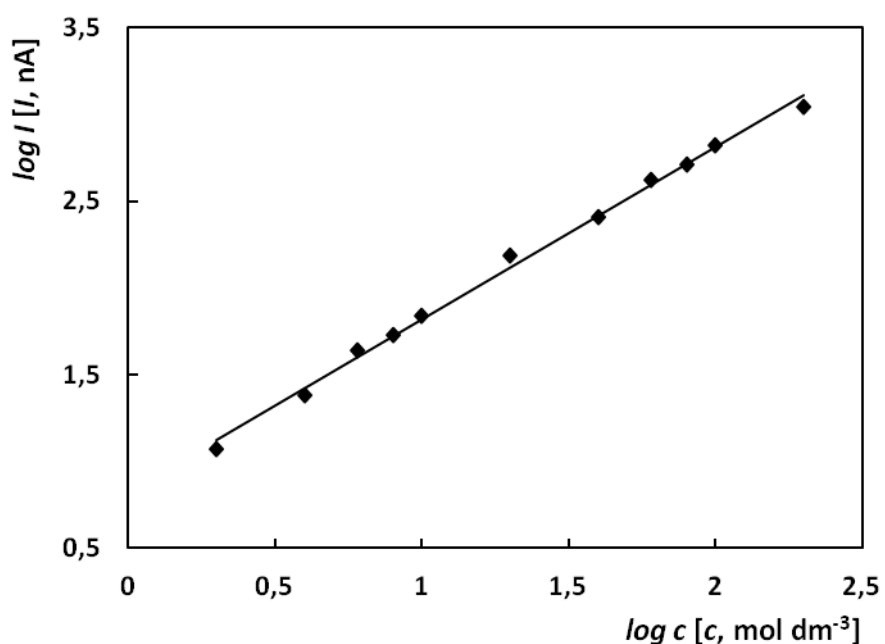
Koncentrační rozsah [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]	Směrnice [$\text{mA} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	Mez detekce [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]
$2 \cdot 10^{-6} - 2 \cdot 10^{-4}$	5,70	25,3	0,9950	-
$2 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-4}$	5,33	72,5	0,9952	-
$2 \cdot 10^{-6} - 2 \cdot 10^{-5}$	7,94	-7,1	0,9981	$8,3 \cdot 10^{-7}$

Tab. 7 Parametry logaritmické formy kalibrační přímky v celém koncentračním rozmezí pro stanovení chlortoluronu v modelových vzorcích říční vody metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 3.

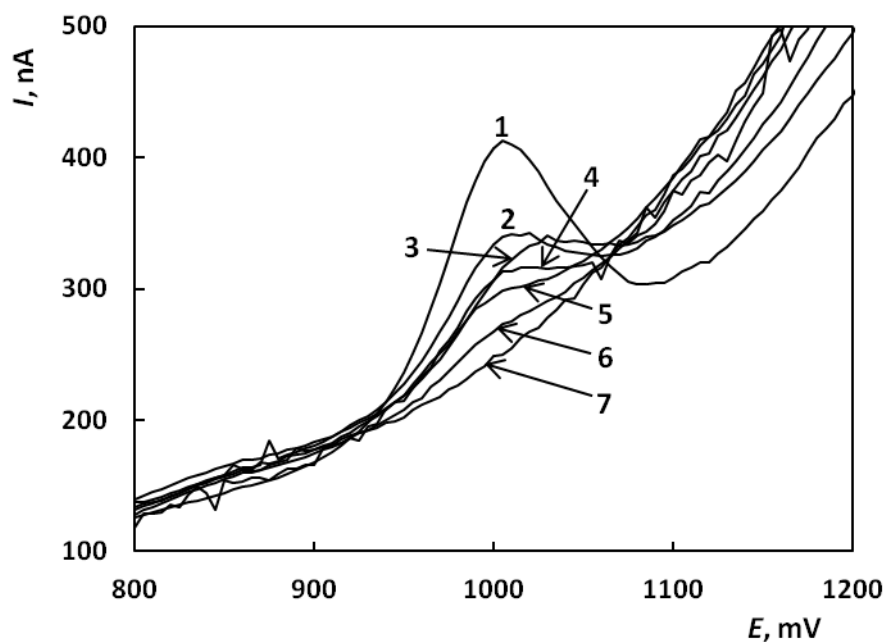
Koncentrační rozsah [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]	Směrnice	Úsek	Korelační koeficient
$2 \cdot 10^{-6} - 2 \cdot 10^{-4}$	0,994	0,82	0,9979



Obr. 13 Závislost proudu píku na koncentraci chlortoluronu v modelových vzorcích říční vody v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-6}$ až $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru (pH = 3).



Obr. 14 Logaritmičká závislost proudu píku na koncentraci chlortoluronu v modelových vzorcích říční vody v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-6}$ až $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru (pH = 3).



Obr. 15 Voltamogramy chlortoluronu v modelových vzorcích říční vody o koncentraci $2 \cdot 10^{-5}$ (1), $1 \cdot 10^{-5}$ (2), $8 \cdot 10^{-6}$ (3), $6 \cdot 10^{-6}$ (4), $4 \cdot 10^{-6}$ (5) a $2 \cdot 10^{-6}$ (6) $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Křivka 7 odpovídá vzorku říční vody bez přídavku chlortoluronu. Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 3.

Stanovení chlortoluronu v modelovém vzorku půdy

Další matricí použitou pro sledování koncentrace chlortoluronu v modelovém vzorku byla půda. Modelové vzorky půdy byly připraveny nadávkováním potřebného množství zásobního roztoku chlortoluronu v methanolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do předem vysušené, přesáté a zhomogenizované půdy tak, aby koncentrace chlortoluronu v půdě byla v rozmezí od 4 do $100 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. Z takto připravených vzorků byl poté chlortoluron extrahován 5 ml methanolu. Před stanovením bylo 2,5 ml odebraného extraktu doplněno do 10 ml BR pufrů (pH = 3).

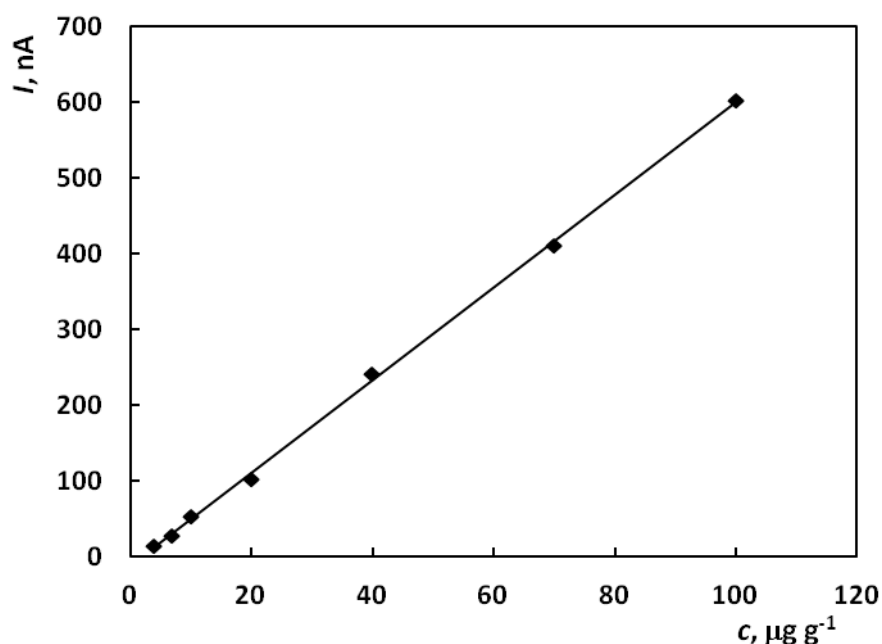
Ze zjištěných dat vyplývá, že je naměřená kalibrační závislost lineární v celém měřeném koncentračním rozsahu. Dosažená mez detekce byla $0,93 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. Kalibrační přímka v celém koncentračním rozsahu je znázorněna na Obr. 16 a parametry této přímky jsou uvedeny v Tab. 8. Logaritmičká forma koncentrační závislosti je znázorněna na Obr. 17 a v Tab. 9 jsou uvedeny její parametry. Naměřené voltametrické křivky pro celé koncentrační rozmezí jsou zobrazeny na Obr. 18.

Tab. 8 Parametry kalibračních závislostí pro stanovení chlortoluronu v modelových vzorcích půdy. Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 3 a methanolu (25 %, V/V).

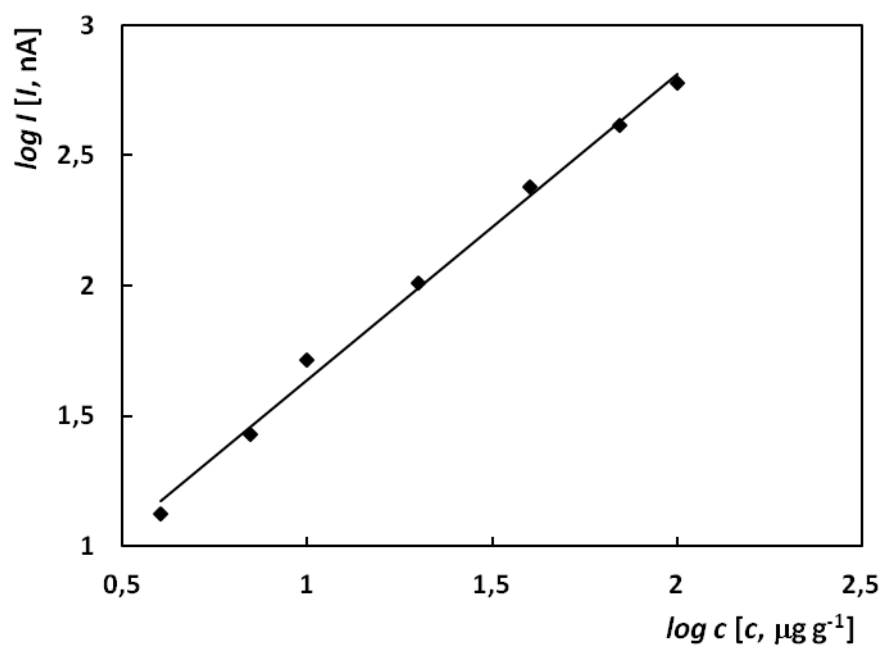
Koncentrační rozsah [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	Směrnice [$\text{nA}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{g}$]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	Mez detekce [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]
4 – 100	6,14	-13,1	0,9997	0,93

Tab. 9 Parametry logaritmické formy kalibrační přímky v celém koncentračním rozmezí pro stanovení chlortoluronu v modelových vzorcích půdy. Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 3 a methanolu (25 %, V/V).

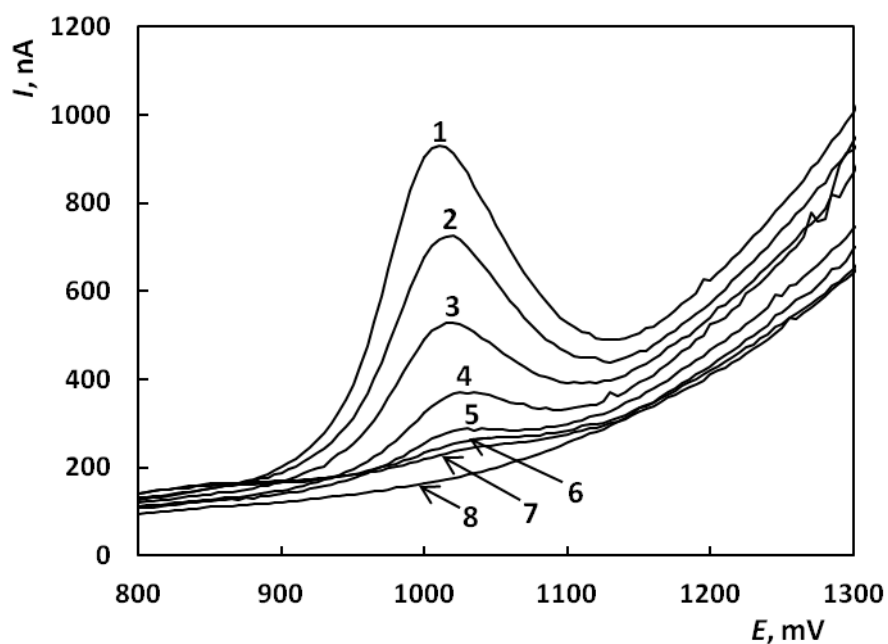
Koncentrační rozsah [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	Směrnice	Úsek	Korelační koeficient
4 – 100	1,17	0,47	0,9973



Obr. 16 Závislost proudu píku na koncentraci chlortoluronu v půdě v koncentračním rozmezí 4 až $100\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru (pH = 3) a methanolu (25 %, V/V).



Obr. 17 Logaritmická závislost proudu píku na koncentraci chlortoluronu v půdě v koncentračním rozmezí 4 až 100 $\mu\text{g g}^{-1}$. Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru (pH = 3) a methanolu (25 %, V/V).



Obr. 18 Voltamogramy chlortoluronu z modelových vzorků půdy o koncentraci 100 (1), 70 (2), 40 (3), 20 (4), 10 (5), 7 (6) a 4 (7) $\mu\text{g g}^{-1}$. Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 3 a methanolu (25 %, V/V). Křivka 8 odpovídá slepému pokusu, tedy voltamogramu z modelového vzorku půdy bez přídavku chlortoluronu.

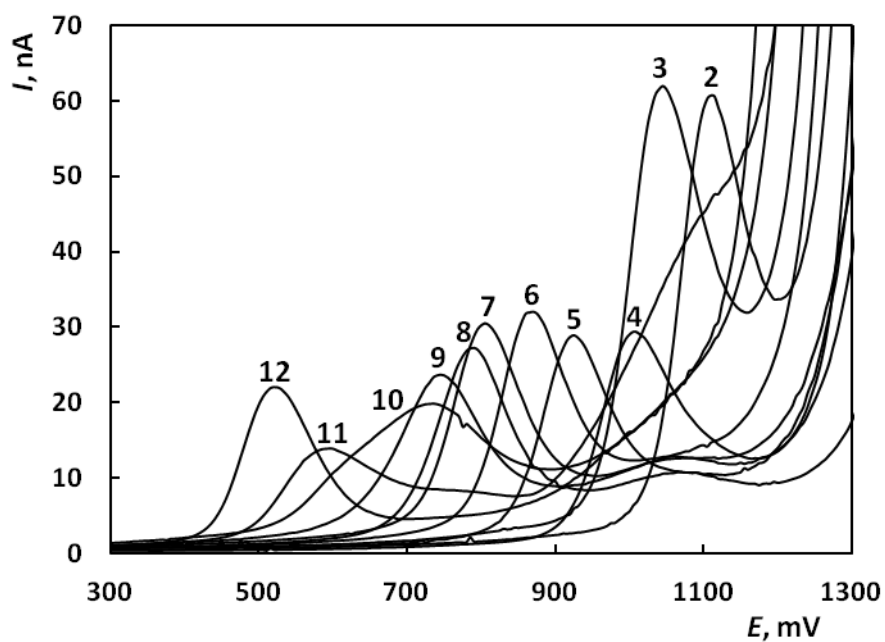
4.2 Voltametrické stanovení chlortoluronu na mCPE

Dalším úkolem této práce bylo ověření možnosti využití miniaturizované uhlíkové pastové elektrody pro stanovení chlortoluronu, která by byla výhodná zejména z hlediska nízké spotřeby činidel a uplatnění v terénních podmínkách.

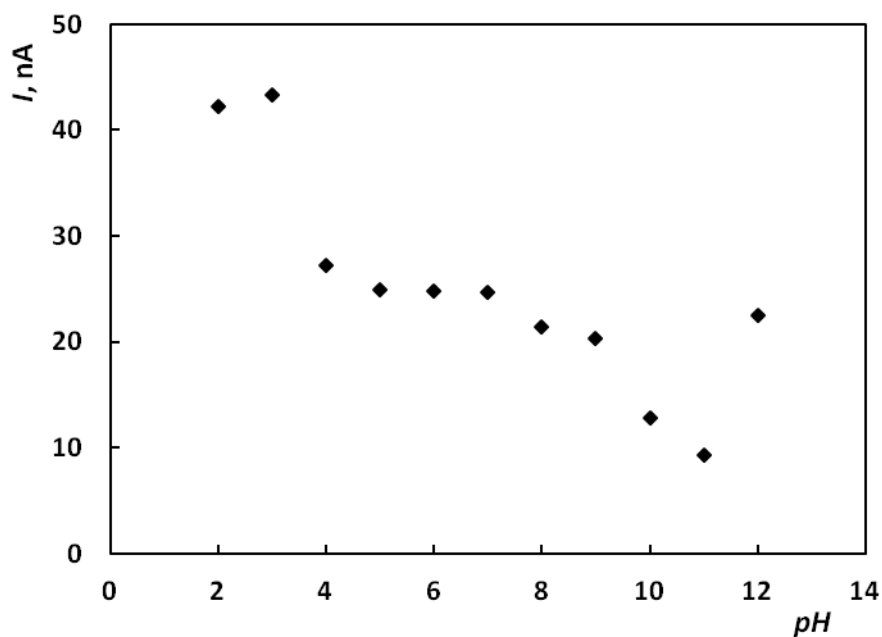
4.2.1 Optimalizace pH

K hledání optimální hodnoty pH při stanovení chlortoluronu metodou DPV na mCPE byl použit roztok chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí BR pufru (pH 2 až 12) a methanolu (10 %, V/V).

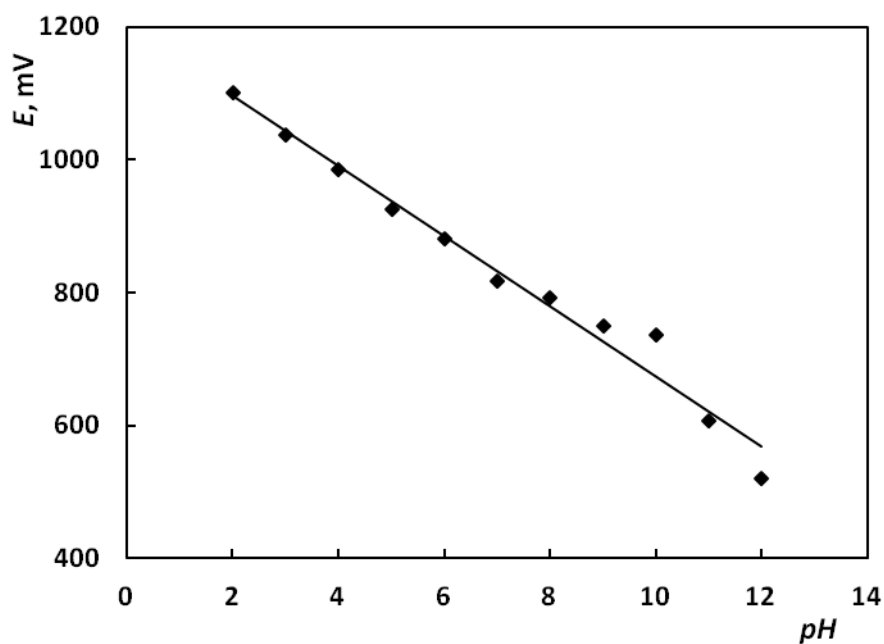
Z naměřených voltametrických křivek (Obr. 19) vyplývá, že je nejvyššího signálu dosahováno při pH 3, což je ve shodě s optimální hodnotou pH nalezenou při použití konvenční CPE. Jako optimální pH bylo tedy opět zvoleno pH 3. Shoda výběru optimálního pH je u obou typů použitých pracovních elektrod též patrna z průběhu závislosti proudu píku na pH uvedeného na Obr. 20, kdy je nejvyšší proudové odezvy dosahováno při silně kyselých podmínkách a k nárůstu píku dochází i v silně zásaditém prostředí. Na Obr. 21, který vyjadřuje závislost potenciálu píku na pH, vidíme, že potenciál píku s rostoucím pH lineárně klesá podle rovnice $E \text{ (mV)} = -52,7 \cdot \text{pH} + 1202$ ($R = 0,9878$). Směrnice této závislosti je srovnatelná se směrnici závislosti získané při použití konvenční CPE.



Obr. 19 Voltamogramy roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí BR pufru (pH 2 až 12) a methanolu (10 %, V/V) naměřené metodou DPV na mCPE. Číslo voltamogramů odpovídají hodnotě pH BR pufru.



Obr. 20 Závislost proudu píku chlortoluronu na pH prostředí. Měřeno metodou DPV na mCPE v roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí BR pufru (pH 2 až 12) a methanolu (10 %, V/V).



Obr. 21 Závislost potenciálu píku chlortoluronu na pH prostředí. Měření bylo provedeno v roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí BR pufru (pH 2 až 12) a methanolu (10 %, V/V) metodou DPV s využitím mCPE.

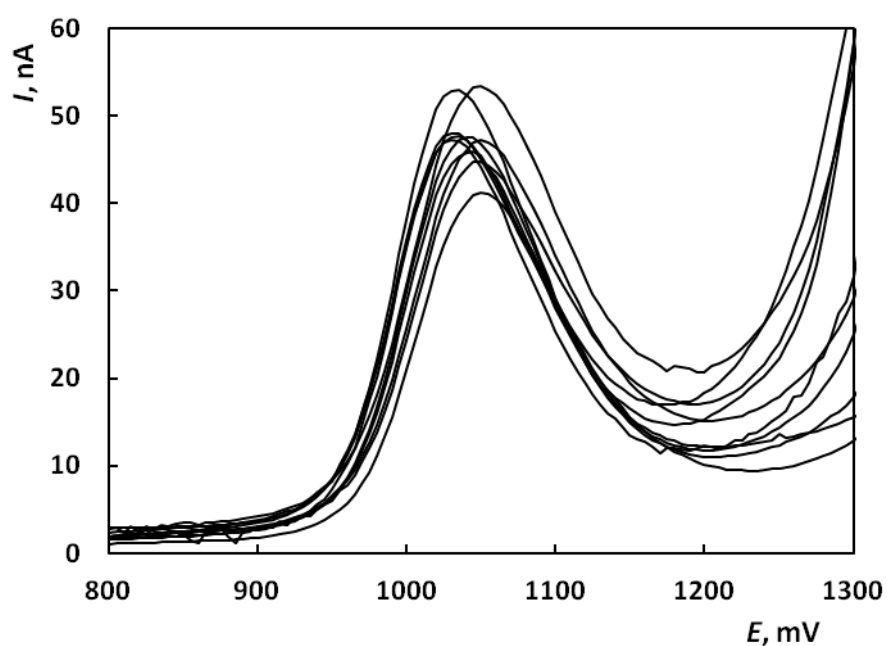
4.2.2 Opakovatelnost měření

Při sledování opakovatelnosti měření metodou DPV na mCPE byl použit roztok chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí BR pufru (pH = 3) a methanolu (10 %, V/V). Byly provedeny dvě série deseti po sobě následujících měření. V první sérii byl elektrodový povrch mCPE po každém měření obnoven odříznutím tenkého plátku kapiláry. Druhá série měření byla provedena bez obnovy elektrodového povrchu mCPE.

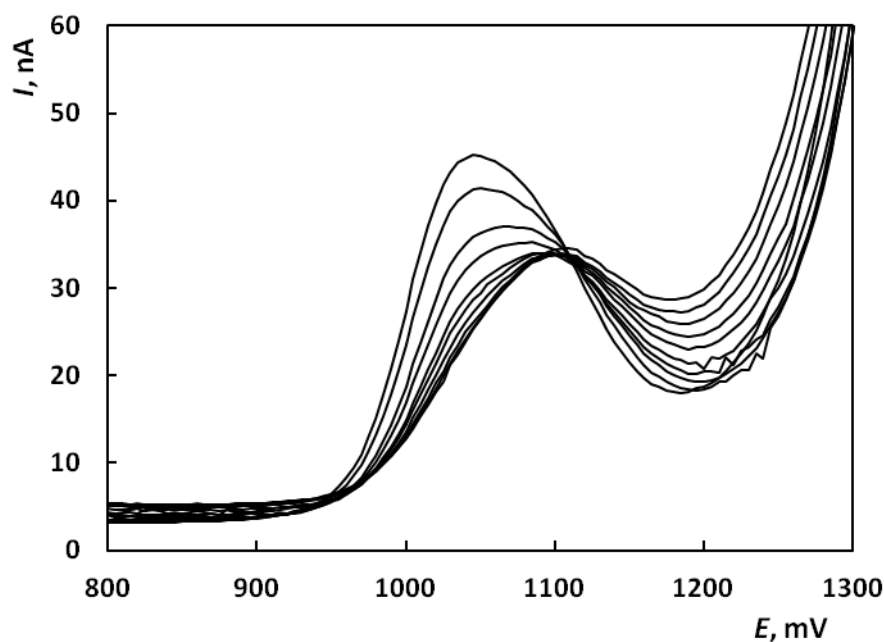
U první série měření byla stanovena výška píku na 39,9 nA s relativní směrodatnou odchylkou 8,3 %. Tato odchylka je v porovnání s relativní směrodatnou odchylkou zjištěnou při použití konvenční CPE (5,6 %) vyšší, což je patrně způsobeno odlišnou obnovou jejich povrchu. Během druhé série měření došlo ke snížení píku přibližně o 80 % a je tedy nutné povrch elektrody před každým měřením obnovovat. Voltametrické křivky deseti po sobě následujících měření s obnovou a bez obnovy elektrodového povrchu mCPE jsou znázorněny na Obr. 22 a Obr. 23. Statistické vyhodnocení první série měření je uvedeno v Tab. 10.

Tab. 10 Statistické vyhodnocení opakovatelnosti měření výšky píku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí BR pufru (pH = 3) a methanolu (10 %, V/V) metodou DPV na mCPE s mechanickou obnovou elektrodového povrchu po každém měření.

Výška píku [nA]	39,9
s [nA]	3,3
s_r [%]	8,3
$L_{1,2}$ [\pm nA]	2,4



Obr. 22 Voltamogramy deseti po sobě následujících měření chlortoluronu s mechanickou obnovou elektrodového povrchu mCPE. Měřeno metodou DPV v roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí BR pufru (pH = 3) a methanolu (10 %, V/V).



Obr. 23 Voltamogramy deseti po sobě následujících měření chlortoluronu bez mechanické obnovy elektrodového povrchu mCPE. Měřeno metodou DPV v roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí BR pufru (pH = 3) a methanolu (10 %, V/V).

4.2.3 Koncentrační závislosti

Stanovení chlortoluronu v deionizované vodě

Nalezené optimální podmínky pro stanovení chlortoluronu pomocí DPV na mCPE byly použity pro změření koncentračních závislostí v koncentračním rozmezí od $4 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

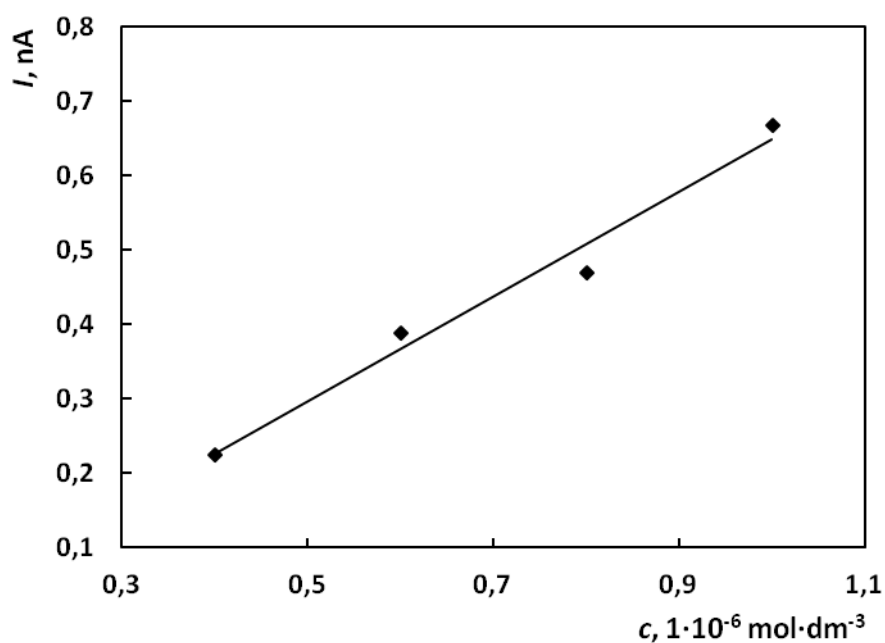
Kalibrační přímka v koncentračním rozmezí $4 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ je znázorněna na Obr. 24. Mez detekce chlortoluronu v deionizované vodě byla stanovena na $8,7 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Tato hodnota je v porovnání s mezí detekce dosaženou při použití konvenční CPE ($3,7 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) nižší, což je pravděpodobně způsobeno relativně menší velikostí proudu pozadí u mCPE. Na Obr. 25 je znázorněna kalibrační přímka v celém koncentračním rozmezí v logaritmické formě. Naměřené voltametrické křivky pro koncentrační rozsah $4 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ jsou zobrazeny na Obr. 26. Parametry získaných kalibračních přímek v jednotlivých koncentračních rozmezích jsou uvedeny v Tab. 11 a v Tab. 12 jsou uvedeny parametry kalibrační přímky v logaritmické formě.

Tab. 11 Parametry kalibračních závislostí chlortoluronu. Měřeno metodou DPV na mCPE v prostředí BR pufru o pH 3 a methanolu (10 %, V/V).

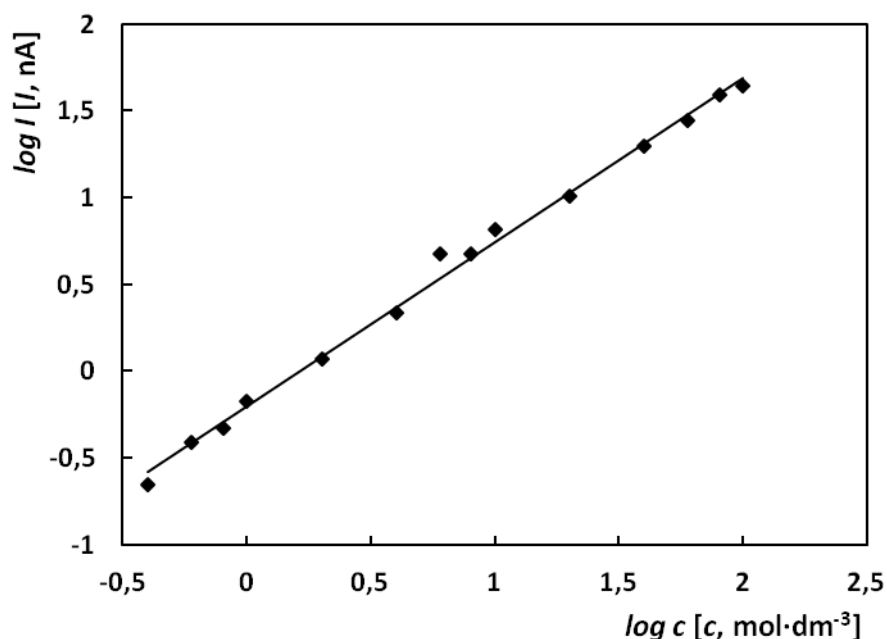
Koncentrační rozsah [$\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$]	Směrnice [$\text{mA}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{dm}^3$]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	Mez detekce [$\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$]
$4\cdot 10^{-7} - 1\cdot 10^{-4}$	0,452	0,82	0,9975	-
$1\cdot 10^{-5} - 1\cdot 10^{-4}$	0,432	2,23	0,9967	-
$1\cdot 10^{-6} - 1\cdot 10^{-5}$	0,656	-0,05	0,9787	-
$4\cdot 10^{-7} - 1\cdot 10^{-6}$	0,705	-0,06	0,9887	$8,7\cdot 10^{-8}$

Tab. 12 Parametry logaritmické formy kalibrační přímky v celém koncentračním rozmezí stanovení chlortoluronu v prostředí BR pufru o pH 3 a methanolu (10 %, V/V) metodou DPV na mCPE.

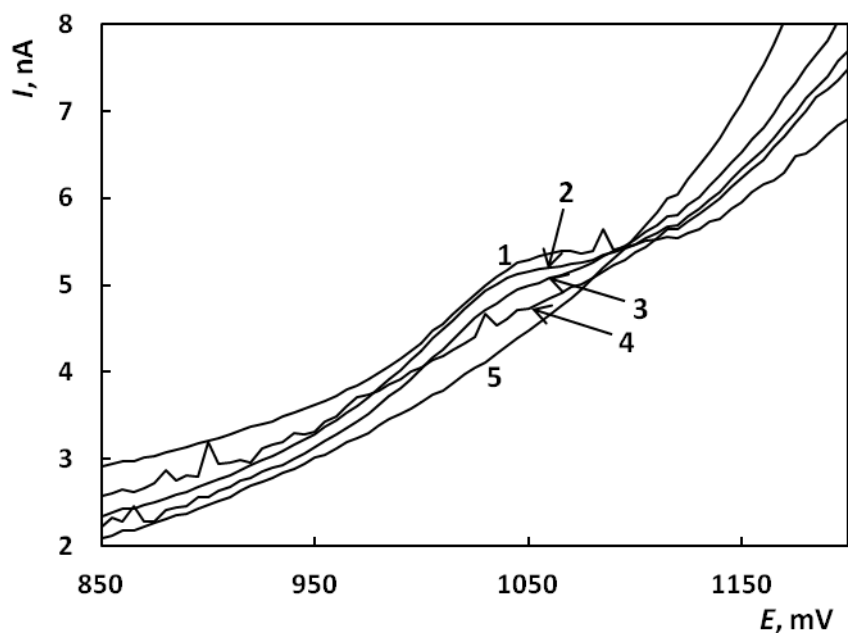
Koncentrační rozsah [$\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$]	Směrnice	Úsek	Korelační koeficient
$4\cdot 10^{-7} - 1\cdot 10^{-4}$	0,946	-0,20	0,9976



Obr. 24 Závislost proudu píku na koncentraci chlortoluronu v koncentračním rozmezí $4\cdot 10^{-7}$ až $1\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Měřeno metodou DPV na mCPE v prostředí BR pufru (pH = 3) a methanolu (10 %, V/V).



Obr. 25 Logaritmičká závislost proudu píku na koncentraci chlortoluronu v koncentračním rozmezí $4 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³. Měřeno metodou DPV na mCPE v prostředí BR pufru (pH = 3) a methanolu (10 %, V/V).



Obr. 26 Voltamogramy chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-6}$ (1), $8 \cdot 10^{-7}$ (2), $6 \cdot 10^{-7}$ (3) a $4 \cdot 10^{-7}$ (4) mol·dm⁻³ v prostředí BR pufru (pH = 3) a methanolu (10 %, V/V). Měřeno metodou DPV na mCPE. Křivka 5 odpovídá roztoku s nulovou koncentrací chlortoluronu.

Stanovení chlortoluronu v modelovém vzorku říční vody

Dále byla ověřena použitelnost mCPE pro DPV stanovení chlortoluronu v modelových vzorcích říční vody. Toto stanovení bylo provedeno stejným způsobem, jako v případě stanovení s využitím konvenční CPE, a to tak, aby vznikla sada roztoků o koncentraci chlortoluronu v říční vodě od $2 \cdot 10^{-6}$ do $2 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³. Takto vzniklé roztoky byly poté doplněny na objem 10 ml BR pufrům o pH 3.

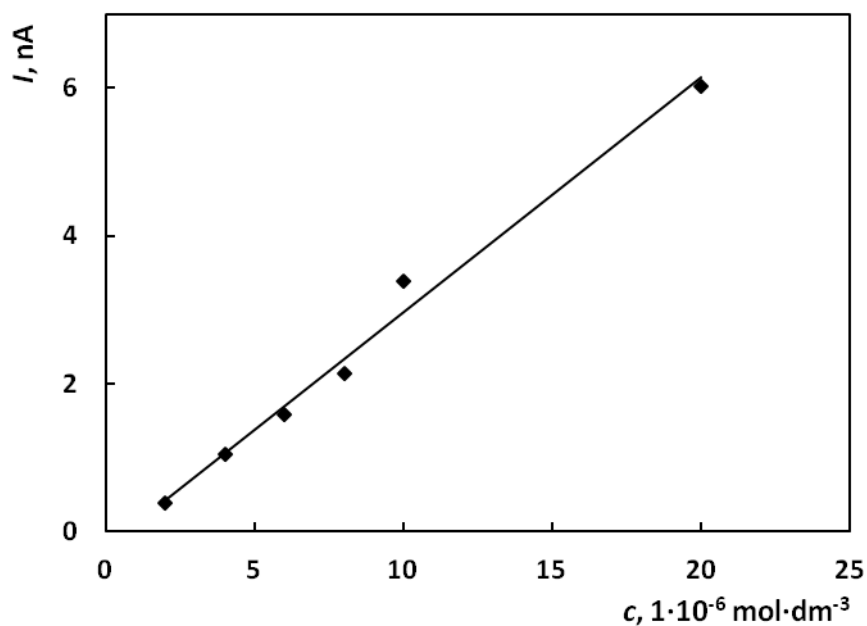
Kalibrační závislost nejnižšího koncentračního řádu ($2 \cdot 10^{-6}$ až $2 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³) je znázorněna na Obr. 27. Z parametrů kalibrační přímky (Tab. 13) je patrné, že je naměřená koncentrační závislost lineární v celém měřeném rozsahu koncentrací. Mez detekce chlortoluronu v modelovém vzorku říční vody byla stanovena na $1,0 \cdot 10^{-7}$ mol·dm⁻³. Tato mez detekce je v porovnání s mezí detekce dosaženou při použití konvenční CPE ($8,3 \cdot 10^{-7}$ mol·dm⁻³) nižší. Logaritmická forma kalibrační přímky v celém koncentračním rozsahu je zobrazena na Obr. 28 a parametry této přímky jsou uvedeny v Tab. 14. Naměřené voltametrické křivky chlortoluronu v říční vodě v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-6}$ až $2 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³ jsou znázorněny na Obr. 29.

Tab. 13 Parametry jednotlivých koncentračních rozmezí kalibrační přímky pro stanovení chlortoluronu v říční vodě. Měřeno metodou DPV na mCPE v prostředí BR pufru o pH 3.

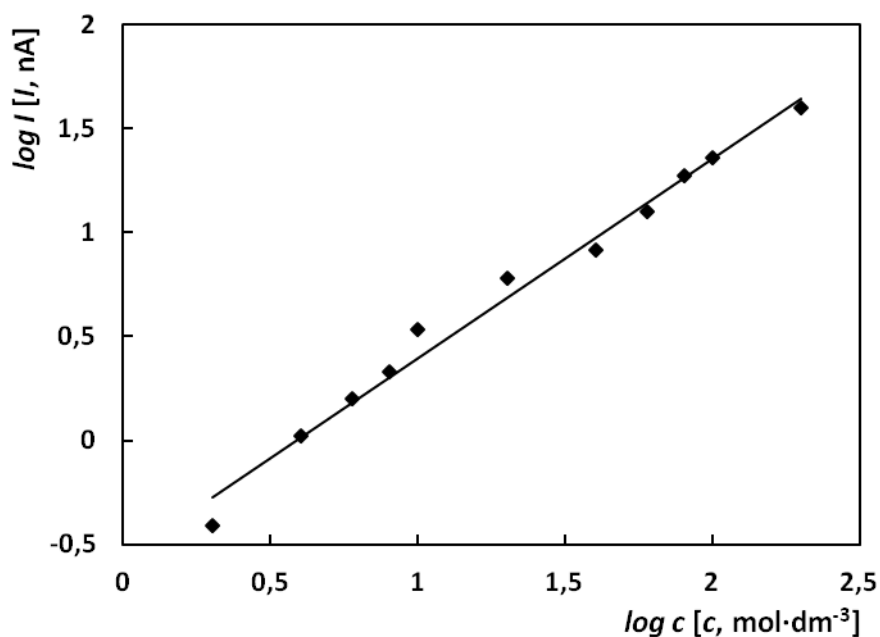
Koncentrační rozsah [mol·dm ⁻³]	Směrnice [mA·mol ⁻¹ ·dm ³]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	Mez detekce [mol·dm ⁻³]
$2 \cdot 10^{-6} - 2 \cdot 10^{-4}$	0,201	0,91	0,9959	-
$2 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-4}$	0,193	1,90	0,9946	-
$2 \cdot 10^{-6} - 2 \cdot 10^{-5}$	0,318	-0,21	0,9940	$1,04 \cdot 10^{-7}$

Tab. 14 Parametry logaritmické formy kalibrační přímky stanovení chlortoluronu v říční vodě v měřeném koncentračním rozmezí. Měřeno pomocí DPV na mCPE v prostředí BR pufru o pH 3.

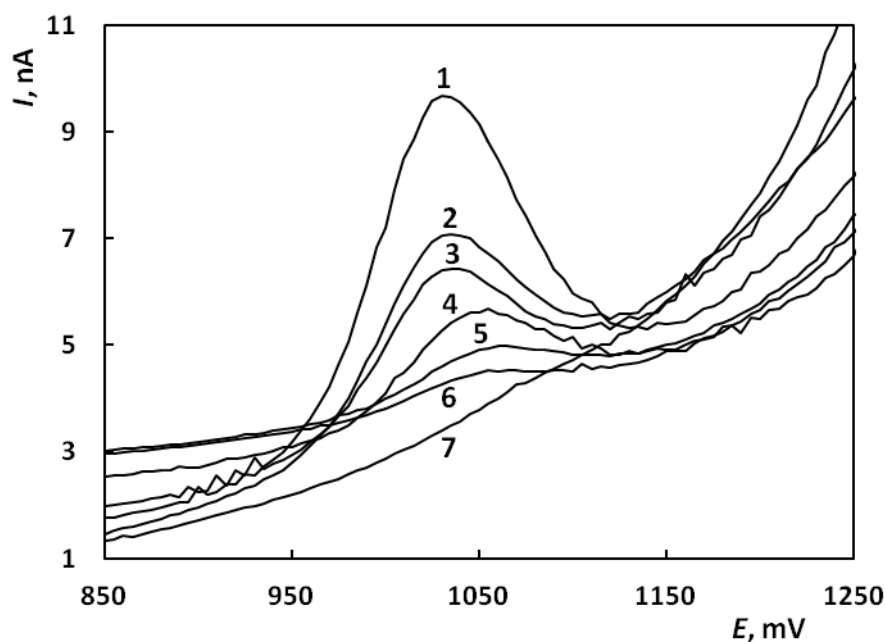
Koncentrační rozsah [mol·dm ⁻³]	Směrnice	Úsek	Korelační koeficient
$2 \cdot 10^{-6} - 2 \cdot 10^{-4}$	0,958	-0,56	0,9929



Obr. 27 Závislost proudu píku na koncentraci chlortoluronu v říční vodě v koncentračním rozmezí $2\cdot 10^{-6}$ až $2\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Měřeno metodou DPV na mCPE v prostředí BR pufru (pH = 3).



Obr. 28 Logaritmická závislost proudu píku na koncentraci chlortoluronu v říční vodě v koncentračním rozmezí $2\cdot 10^{-6}$ až $2\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Měřeno metodou DPV na mCPE v prostředí BR pufru (pH = 3).

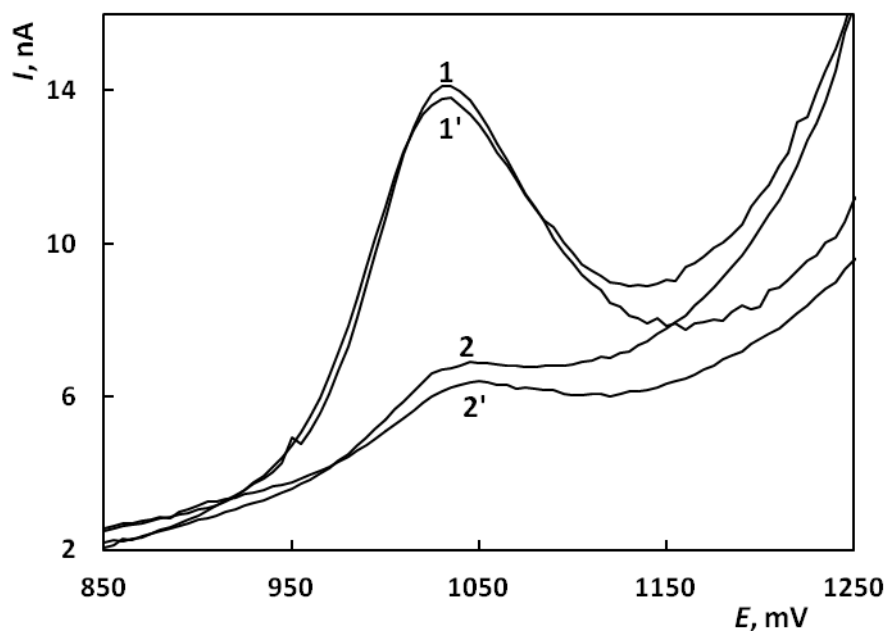


Obr. 29 Voltamogramy chlortoluronu v říční vodě o koncentraci $2 \cdot 10^{-5}$ (1), $1 \cdot 10^{-5}$ (2), $8 \cdot 10^{-6}$ (3), $6 \cdot 10^{-6}$ (4), $4 \cdot 10^{-6}$ (5) a $2 \cdot 10^{-6}$ (6) $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Měřeno metodou DPV na mCPE v prostředí BR pufru o pH 3. Křivka 7 odpovídá slepému pokusu, tedy vzorku říční vody bez přídavku chlortoluronu.

Stanovení chlortoluronu v modelovém vzorku půdy

Metodou DPV s využitím mCPE byla též sledována koncentrace chlortoluronu v modelovém vzorku půdy. Modelové vzorky půdy byly připraveny obdobným způsobem jako při stanovení chlortoluronu metodou DPV na konvenční CPE (str. 36). Proměřeny byly kalibrační závislosti v koncentračním rozsahu od 2 do 100 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ chlortoluronu v půdě.

Pro dvě vybrané koncentrace chlortoluronu v půdě (7 a 40 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) byla zjištěna výtěžnost extrakce. Jako standardy byly použity roztoky připravené z odpovídajícího množství zásobního roztoku chlortoluronu doplněné do 5 ml methanolem. Obdobným způsobem jako tomu bylo u vzorků, bylo před stanovením 2,5 ml tohoto roztoku doplněno BR puftrem (pH = 3) na objem 10 ml. Získané hodnoty výtěžnosti extrakce byly 96 % pro 7 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ a 93 % pro 40 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. Na Obr. 30 jsou zobrazeny voltametrické křivky znázorňující výtěžnost extrakce pro uvedené dvě koncentrace.



Obr. 30 Voltametrické křivky výtěžnosti extrakce chlortoluronu z půdy. K měření byly použity standardní roztoky chlortoluronu o koncentraci $40 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (1) a $7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (2) a roztoky vzorků chlortoluronu po extrakci z půdy o odpovídající koncentraci (1', 2'). Měřeno metodou DPV na mCPE v prostředí BR pufru o pH 3 a methanolu (25 %, V/V).

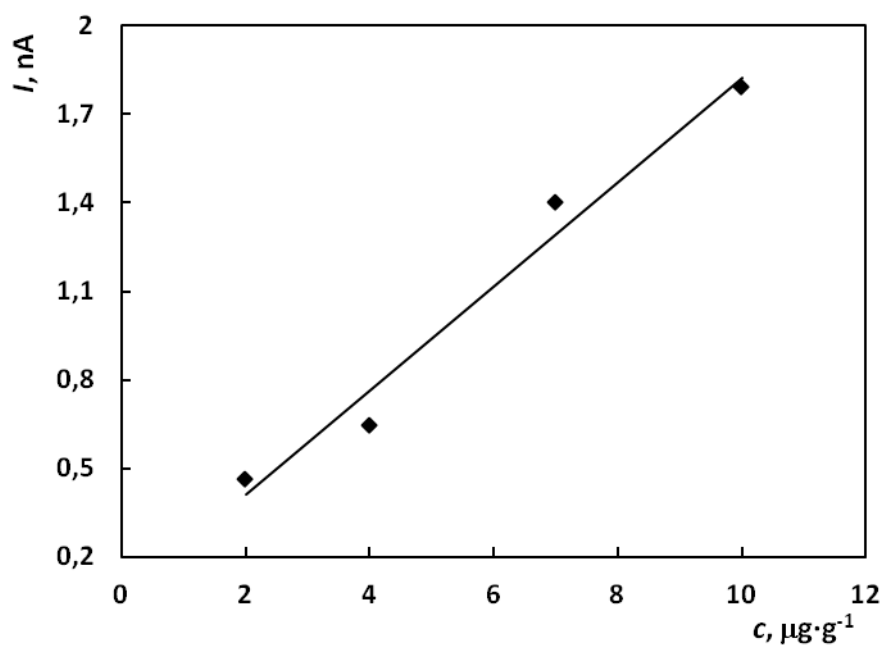
Kalibrační přímka v koncentračním rozsahu od 2 do $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ je znázorněna na Obr. 31. Parametry získaných koncentračních závislostí jsou uvedeny v Tab. 15. Vzhledem k tomu, že se hodnota korelačního koeficientu pohybuje od 0,9874 do 0,9986 a směrnice logaritmické závislosti se blíží jedné, je naměřená kalibrační závislost lineární v celém koncentračním rozsahu. Dosažená mez detekce, jejíž hodnota byla stanovena na $1,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, je srovnatelná s mezí detekce při použití konvenční CPE ($0,93 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Na Obr. 32 je znázorněna logaritmická forma kalibrační přímky v celém koncentračním rozsahu a parametry této přímky jsou uvedeny v Tab. 16. Naměřené voltametrické křivky jsou pro nejnižší koncentrační řád zobrazeny na Obr. 33.

Tab. 15 Parametry kalibračních závislostí pro stanovení chlortoluronu v půdě. Měřeno metodou DPV na mCPE v prostředí BR pufru o pH 3 a methanolu (25 %, V/V).

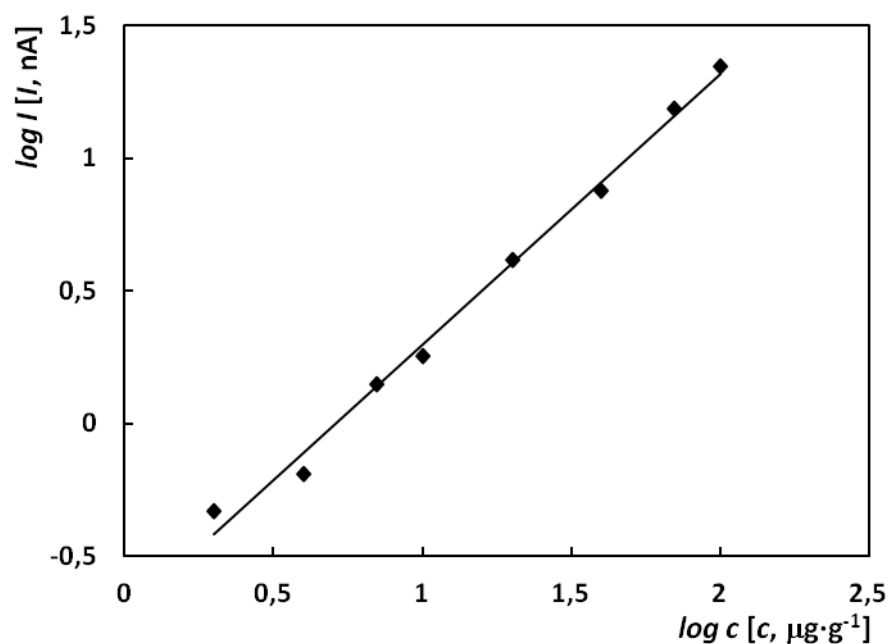
Koncentrační rozsah [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	Směrnice [$\text{nA}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{g}$]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	Mez detekce [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]
2 – 100	0,2215	-0,34	0,9986	–
10 – 100	0,2267	-0,72	0,9985	–
2 – 10	0,1767	0,06	0,9874	1,3

Tab. 16 Parametry logaritmické formy kalibrační přímky pro stanovení chlortoluronu v půdě v celém koncentračním rozmezí. Měřeno metodou DPV na mCPE v prostředí BR pufru o pH 3 a methanolu (25 %, V/V).

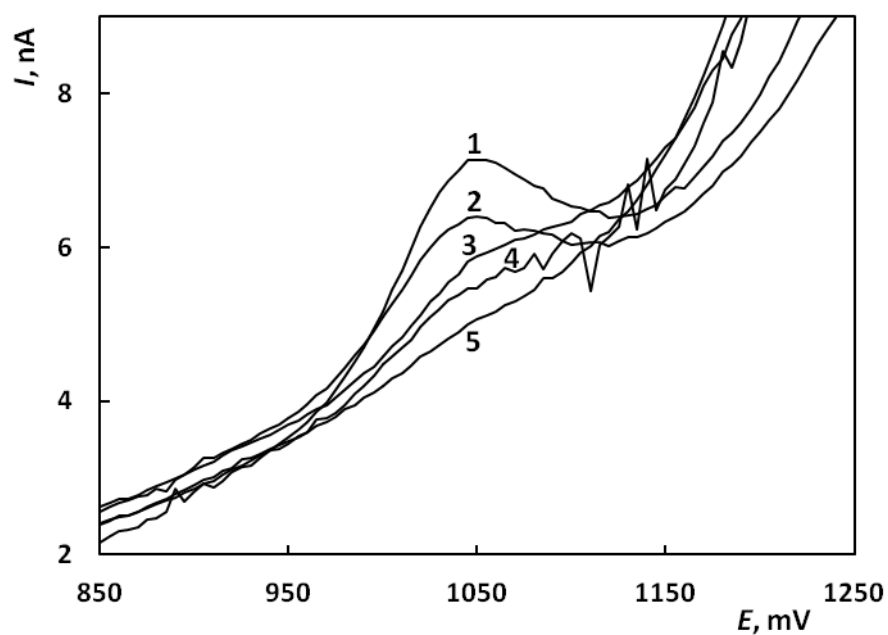
Koncentrační rozsah [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	Směrnice	Úsek	Korelační koeficient
2 – 100	1,023	-0,73	0,9966



Obr. 31 Závislost proudu píku na koncentraci chlortoluronu v půdě v koncentračním rozmezí 2 až $10\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Měřeno metodou DPV na mCPE v prostředí BR pufru (pH = 3) a methanolu (25 %, V/V).



Obr. 32 Logaritmická závislost proudu píku na koncentraci chlortoluronu v půdě v koncentračním rozmezí 2 až $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Měřeno metodou DPV na mCPE v prostředí BR pufru (pH = 3) a methanolu (25 %, V/V).



Obr. 33 Voltamogramy chlortoluronu v půdě o koncentraci 10 (1), 7 (2), 4 (3) a 2 (4) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Měřeno metodou DPV na mCPE v prostředí BR pufru o pH 3 a methanolu (25 %, V/V). Křivka 5 odpovídá slepému pokusu, tedy vzorku z půdy bez přídavku chlortoluronu.

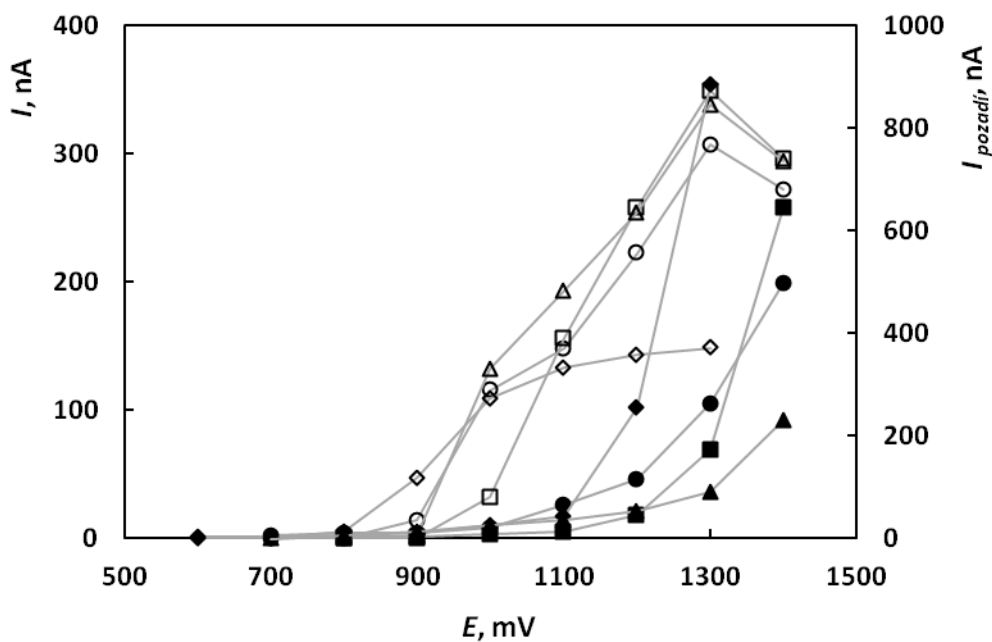
4.3 Stanovení chlortoluronu pomocí HPLC se spektrofotometrickou a elektrochemickou detekcí

Vzhledem k tomu, že se chlortoluron v reálných vzorcích často vyskytuje společně s řadou dalších látek, které by mohly rušit jeho stanovení, byla zkoumána možnost využití HPLC jako techniky pro separaci chlortoluronu z těchto matic.

4.3.1 Optimalizace separačních a detekčních podmínek

Při optimalizaci podmínek pro stanovení chlortoluronu metodou HPLC s UV a elektrochemickou detekcí (pomocí CPE) byl použit roztok chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí methanolu (60 %, V/V). Pro měření byla použita mobilní fáze obsahující methanol a BR pufr o daném pH (3, 4, 5 a 7) v poměru 60:40 (V/V). Toto složení mobilní fáze bylo zvoleno na základě dříve zjištěných údajů¹². Pro UV detekci byla zvolena vlnová délka detektoru 243 nm, při které je UV záření chlortoluronem silně absorbováno (kapitola 3.4). V případě elektrochemické detekce byly proměřeny potenciály vkládané na pracovní elektrodu v rozsahu 600 až 1400 mV.

Optimální detekční potenciál pracovní elektrody a pH BR pufru byly zvoleny z naměřených hydrodynamických voltamogramů (Obr. 34), vyjadřujících závislost výšky píku analytu na potenciálu vkládaném na pracovní elektrodu. Jako optimální byl zvolen potenciál, při kterém byl získán dostatečně vysoký signál analytu a při kterém ještě nedocházelo k výraznému nárůstu proudu pozadí. Těmto podmínkám nejlépe vyhovuje signál naměřený při potenciálu pracovní elektrody 1300 mV v prostředí BR pufru o pH 4. Další měření byla provedena při těchto nalezených podmínkách.



Obr. 34 Hydrodynamické voltamogramy roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí methanolu (60 %, V/V). Měřeno metodou HPLC-ED na CPE v mobilní fázi obsahující methanol a BR pufr o pH 3 (\square), 4 (Δ), 5 (\circ) a 7 (\diamond) v poměru 60:40 (V/V). Dále jsou zobrazeny proudy pozadí v prostředí BR pufru o pH 3 (\blacksquare), 4 (\blacktriangle), 5 (\bullet) a 7 (\blacklozenge).

4.3.2 Opakovatelnost měření

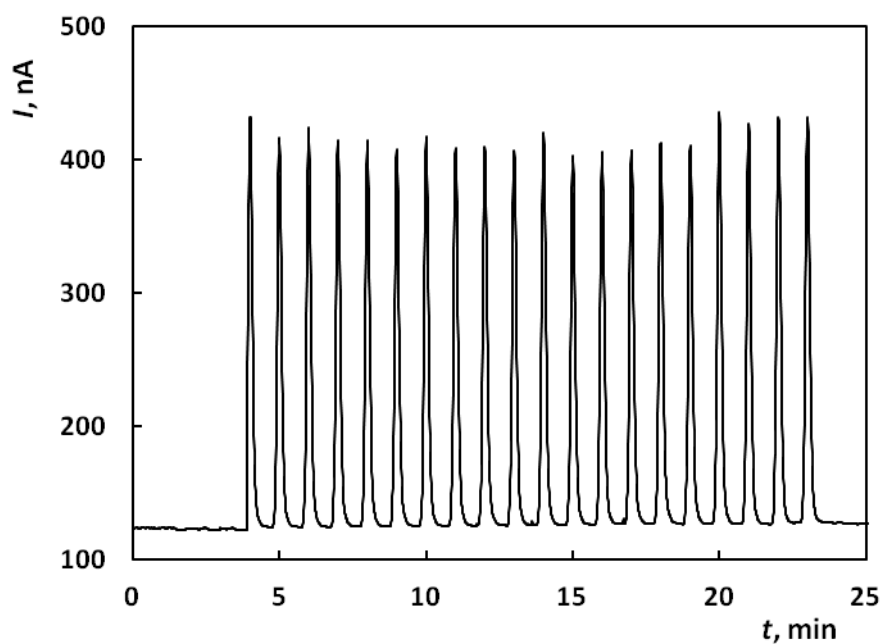
Abychom zjistili, zda nedochází opakovaným měřením k pasivaci elektrody, bylo provedeno dvacet po sobě následujících měření bez obnovy povrchu CPE. K měření byl použit roztok chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí methanolu (60 %, V/V).

Při použití elektrochemického detektoru byla výška píku stanovena na 292,9 nA s relativní směrodatnou odchylkou 3,3 %. Při použití UV detekce byla výška píku stanovena na 131,0 mAU s relativní směrodatnou odchylkou 3,4 %.

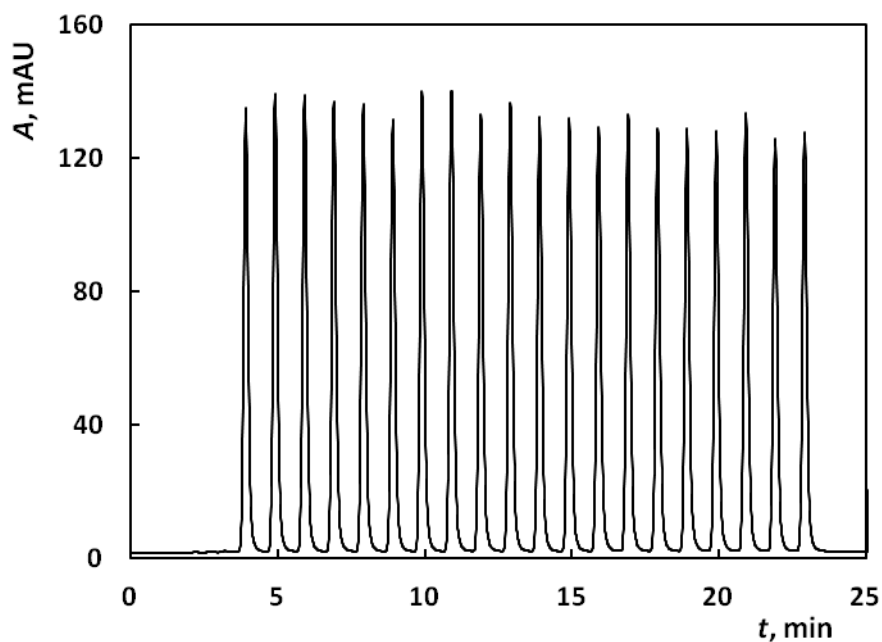
Statistické vyhodnocení opakovatelnosti měření pro oba použité typy detektoru je uvedeno v Tab. 17. Z uvedeného vyplývá, že během měření nedochází k zanášení povrchu elektrody a není tedy nutná jeho obnova před každým měřením. Chromatogramy dvaceti po sobě následujících měření chlortoluronu jsou zobrazeny na Obr. 35 pro HPLC-ED a na Obr. 36 pro HPLC-UV.

Tab. 17 Statistické vyhodnocení opakovatelnosti měření chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v methanolu (60 %, V/V) metodou HPLC s UV ($\lambda = 243 \text{ nm}$) a elektrochemickou detekcí (CPE, $E = 1300 \text{ mV}$). Při měření byla použita mobilní fáze obsahující methanol s BR pufr (pH = 4) v poměru 60:40 (V/V).

	UV detektor [mAU]	Elektrochemický detektor [nA]
Výška píku	131,0	292,9
s	4,4	9,6
s_r [%]	3,4	3,3
$L_{1,2}$	$\pm 2,1$	$\pm 4,5$



Obr. 35 Chromatogramy dvaceti po sobě následujících měření chlortoluronu bez obnovy elektrodového povrchu. Měřeno metodou HPLC-ED na CPE ($E = 1300 \text{ mV}$) v roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí methanolu (60 %, V/V). Složení mobilní fáze: methanol a BR pufr (pH = 4) v poměru 60:40 (V/V).



Obr. 36 Chromatogramy dvaceti po sobě následujících měření chlortoluronu metodou HPLC-UV ($\lambda = 243 \text{ nm}$). K měření byl použit roztok chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí methanolu (60 %, V/V). Složení mobilní fáze: methanol a BR pufr (pH = 4) v poměru 60:40 (V/V).

4.3.3 Koncentrační závislosti

Stanovení chlortoluronu v deionizované vodě

Při nalezených optimálních podmínkách stanovení chlortoluronu metodou HPLC s UV a elektrochemickou detekcí bylo provedeno měření koncentračních závislostí v roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí methanolu (60 %, V/V).

Z naměřených dat vyplývá, že jsou získané kalibrační závislosti lineární pro oba použité typy detektorů. Mez detekce byla stanovena na $3,3 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pro elektrochemický detektor a $1,1 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pro UV detektor. Parametry získaných kalibračních přímek v jednotlivých koncentračních rozmezích a kalibračních přímek v logaritmické formě jsou uvedeny v Tab. 18 a Tab. 19 (elektrochemický detektor) a v Tab. 20 a Tab. 21 (UV detektor). Kalibrační přímka nejnižšího koncentračního řádu ($2 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a kalibrační přímka v celém koncentračním rozmezí v logaritmické formě jsou pro elektrochemický detektor znázorněny na Obr. 37 a Obr. 38. Chromatogramy naměřené pomocí HPLC-ED jsou pro koncentraci $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ zobrazeny na Obr. 39 a pro koncentrační rozmezí $2 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ na Obr. 40. Na Obr. 41 je uvedena kalibrační přímka v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

získaná pomocí HPLC s UV detekcí. Logaritmická forma kalibrační přímky v celém koncentračním rozmezí je pro tento typ detektoru zobrazena na Obr. 42. Na Obr. 43 a Obr. 44 jsou zobrazeny chromatogramy roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pro HPLC-UV.

Tab. 18 Parametry kalibračních přímek stanovení chlortoluronu metodou HPLC-ED na CPE ($E = 1300 \text{ mV}$) v prostředí methanolu (60 %, V/V). Složení mobilní fáze: BR pufr ($\text{pH} = 4$) a methanol (60 %, V/V).

Koncentrační rozsah [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]	Směrnice [$\text{mA} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	Mez detekce [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]
$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	3,53	-0,42	0,9991	-
$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	3,51	1,39	0,9977	-
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	3,00	0,76	0,9915	-
$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	3,11	-0,01	0,9961	$3,3 \cdot 10^{-8}$

Tab. 19 Parametry logaritmické formy kalibrační přímky v celém koncentračním rozmezí stanovení chlortoluronu metodou HPLC-ED na CPE ($E = 1300 \text{ mV}$) v prostředí methanolu (60 %, V/V). Složení mobilní fáze: BR pufr ($\text{pH} = 4$) a methanol (60 %, V/V).

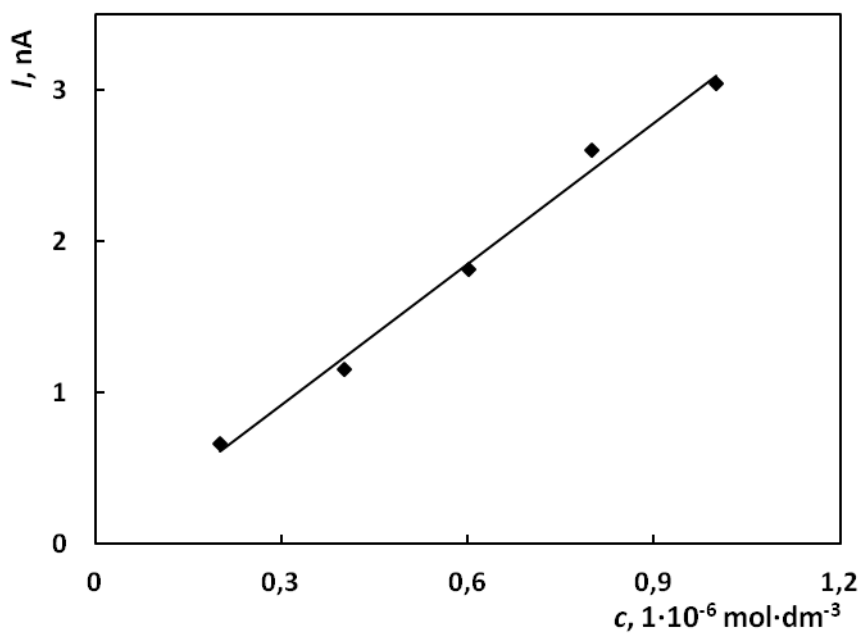
Koncentrační rozsah [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]	Směrnice	Úsek	Korelační koeficient
$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	1,03	0,49	0,9994

Tab. 20 Parametry kalibračních přímek stanovení chlortoluronu metodou HPLC-UV ($\lambda = 243 \text{ nm}$) v prostředí methanolu (60 %, V/V). Složení mobilní fáze: BR pufr ($\text{pH} = 4$) a methanol (60 %, V/V).

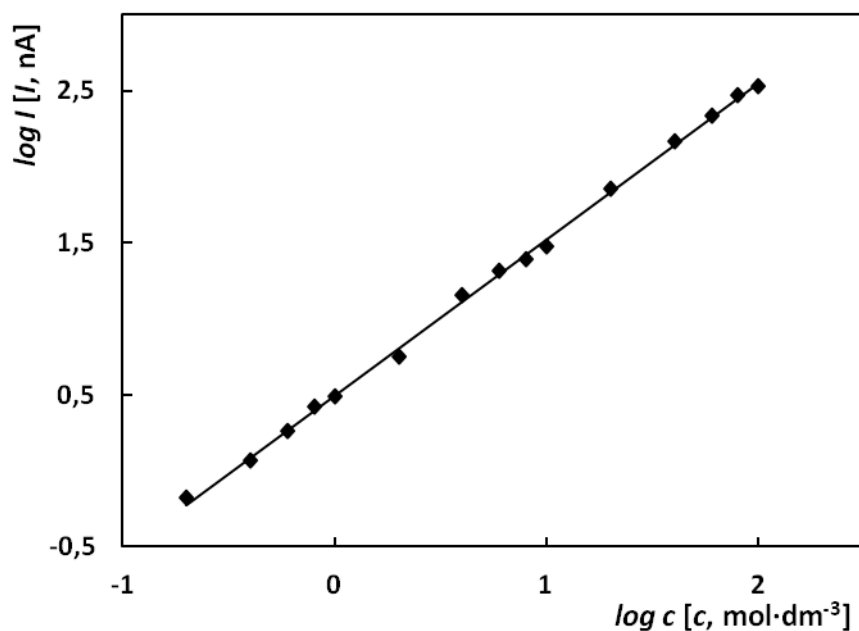
Koncentrační rozsah [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]	Směrnice [$\text{mAU} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$]	Úsek [mAU]	Korelační koeficient	Mez detekce [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]
$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	1,40	-0,16	0,9991	-
$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	1,39	0,48	0,9977	-
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	1,19	0,30	0,9893	-
$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	1,10	0,03	0,9982	$1,1 \cdot 10^{-8}$

Tab. 21 Parametry logaritmické formy kalibrační přímky v celém koncentračním rozmezí stanovení chlortoluronu metodou HPLC-UV ($\lambda = 243 \text{ nm}$) v prostředí methanolu (60 %, V/V). Složení mobilní fáze: BR pufr (pH = 4) a methanol (60 %, V/V).

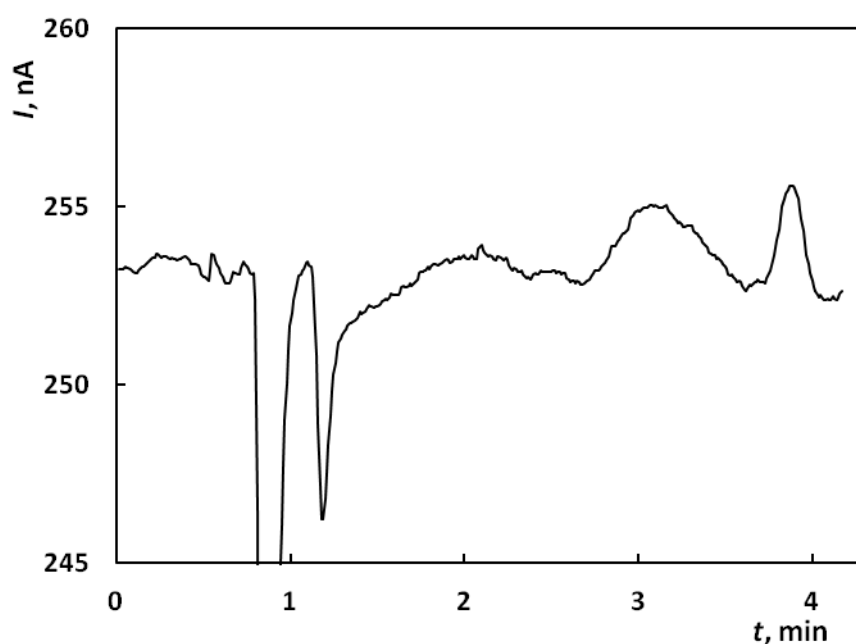
Koncentrační rozsah [$\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$]	Směrnice	Úsek	Korelační koeficient
$1\cdot 10^{-7} - 1\cdot 10^{-4}$	1,02	0,10	0,9993



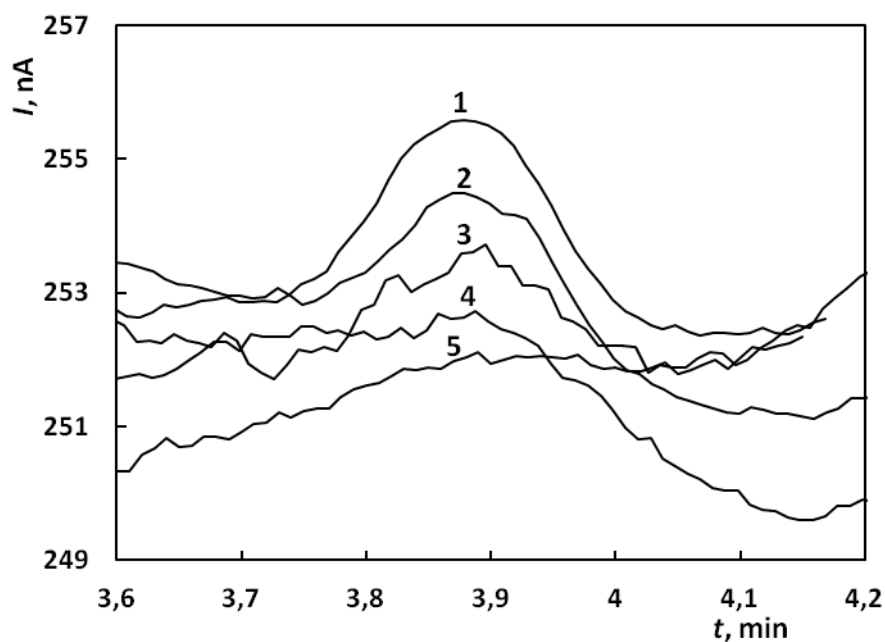
Obr. 37 Závislost proudu píku na koncentraci chlortoluronu v koncentračním rozmezí $2\cdot 10^{-7}$ až $1\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ v prostředí methanolu (60 %, V/V). Měřeno metodou HPLC-ED na CPE ($E = 1300 \text{ mV}$). Složení mobilní fáze: BR pufr (pH = 4) a methanol (60 %, V/V).



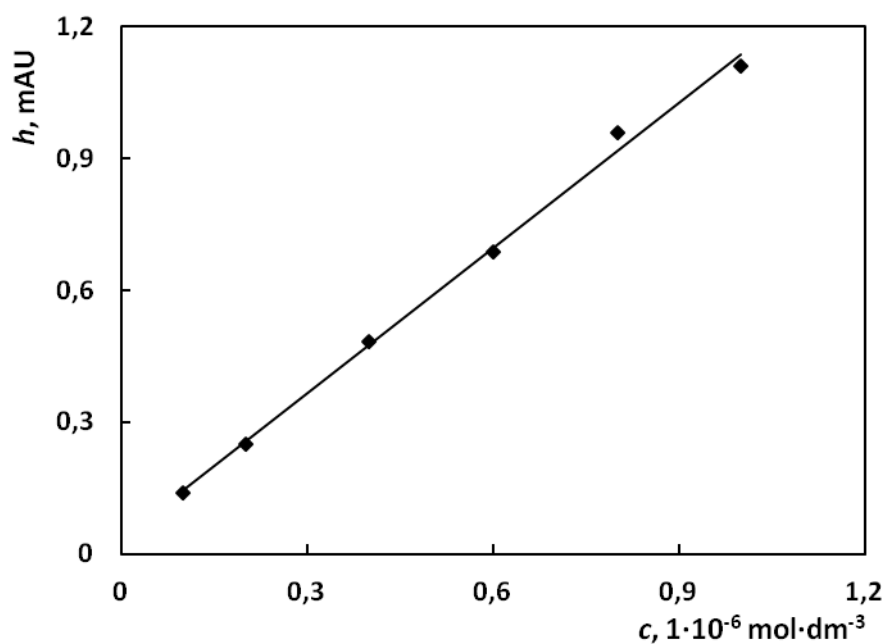
Obr. 38 Logaritmičká závislost proudu píku na koncentraci chlorthaluronu v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³ v prostředí methanolu (60 %, V/V). Měřeno metodou HPLC-ED na CPE ($E = 1300$ mV). Složení mobilní fáze: BR pufr (pH = 4) a methanol (60 %, V/V).



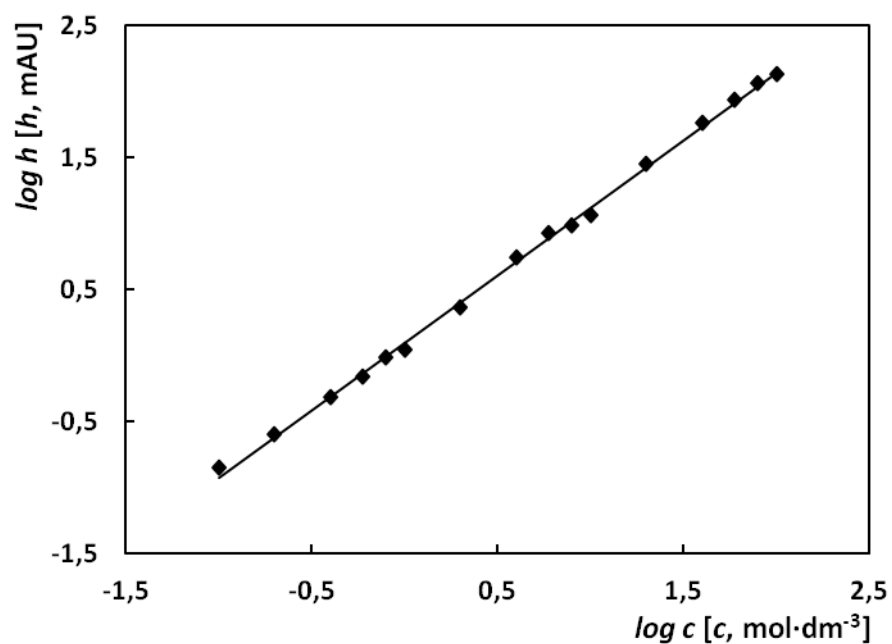
Obr. 39 Chromatogram roztoku chlorthaluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-6}$ mol·dm⁻³ v prostředí methanolu (60 %, V/V). Složení mobilní fáze: BR pufr (pH = 4) a methanol (60 %, V/V). Měřeno metodou HPLC-ED na CPE ($E = 1300$ mV).



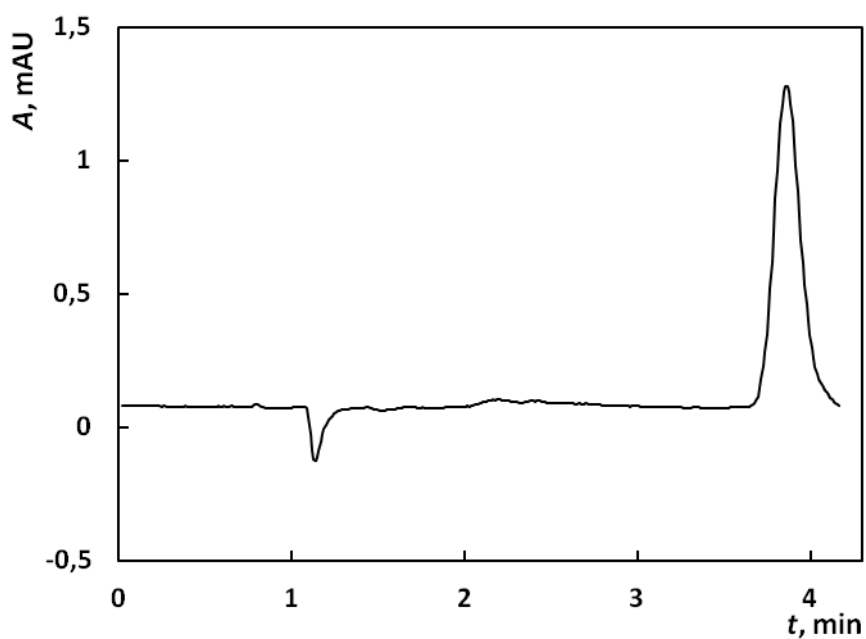
Obr. 40 Chromatogramy roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-6}$ (1), $8 \cdot 10^{-7}$ (2), $6 \cdot 10^{-7}$ (3), $4 \cdot 10^{-7}$ (4) a $2 \cdot 10^{-7}$ (5) $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí methanolu (60 %, V/V). Složení mobilní fáze: BR pufr (pH = 4) a methanol (60 %, V/V). Měřeno metodou HPLC-ED na CPE ($E = 1300 \text{ mV}$).



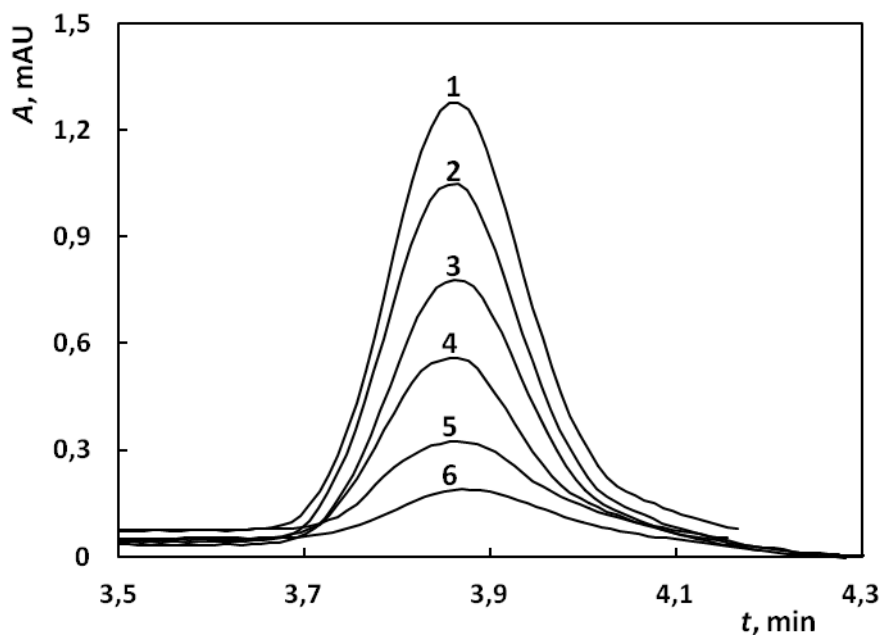
Obr. 41 Závislost výšky píku na koncentraci chlortoluronu v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-6}$ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí methanolu (60 %, V/V). Měřeno metodou HPLC-UV ($\lambda = 243 \text{ nm}$). Složení mobilní fáze: BR pufr (pH = 4) a methanol (60 %, V/V).



Obr. 42 Logaritmická závislost výšky píku na koncentraci chlortoluronu v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³ v prostředí methanolu (60 %, V/V). Měřeno metodou HPLC-UV ($\lambda = 243$ nm). Složení mobilní fáze: BR pufr (pH = 4) a methanol (60 %, V/V).



Obr. 43 Chromatogram roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-6}$ mol·dm⁻³ v prostředí methanolu (60 %, V/V). Složení mobilní fáze: BR pufr (pH = 4) a methanol (60 %, V/V). Měřeno metodou HPLC-UV ($\lambda = 243$ nm).



Obr. 44 Chromatogramy roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-6}$ (1), $8 \cdot 10^{-7}$ (2), $6 \cdot 10^{-7}$ (3), $4 \cdot 10^{-7}$ (4), $2 \cdot 10^{-7}$ (5) a $1 \cdot 10^{-7}$ (6) mol·dm⁻³ v prostředí methanolu (60 %, V/V). Složení mobilní fáze: BR pufr (pH = 4) a methanol (60 %, V/V). Měřeno metodou HPLC-UV ($\lambda = 243$ nm).

Stanovení chlortoluronu v modelovém vzorku říční vody

Pro sledování koncentrace chlortoluronu v říční vodě metodou HPLC s UV a elektrochemickou detekcí byl použit roztok chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³, vzniklý doplněním potřebného množství zásobního roztoku chlortoluronu v methanolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol·dm⁻³ přefiltrovanou říční vodou na 10 ml.

Z parametrů kalibračních přímků uvedených v Tab. 22 (elektrochemický detektor) a v Tab. 24 (UV detektor) je patrné, že jsou naměřené koncentrační závislosti lineární. U HPLC s UV detekcí je linearita potvrzena i směrnici logaritmické formy kalibrační přímky, jejíž hodnota je blízká 1 (Tab. 25). Parametry logaritmické formy kalibrační přímky pro HPLC-ED jsou uvedeny v Tab. 23. Mez detekce byla stanovena na $5,7 \cdot 10^{-8}$ mol·dm⁻³ pro HPLC s elektrochemickou detekcí a $6,1 \cdot 10^{-9}$ mol·dm⁻³ pro HPLC s UV detekcí. Na chromatogramu roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-6}$ mol·dm⁻³ získaném pomocí HPLC-ED (Obr. 47) je možné vidět oddělení píku chlortoluronu od píku matrice. Kalibrační přímka nejnižšího koncentračního řádu a kalibrační přímka v celém koncentračním rozmezí v logaritmické formě jsou pro elektrochemický detektor znázorněny na Obr. 45 a Obr. 46 a pro UV detektor na Obr. 49 a Obr. 50. Získané

chromatogramy jsou pro HPLC-ED ($2 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-6}$ mol·dm⁻³) znázorněny na Obr. 48 a pro HPLC-UV ($1 \cdot 10^{-6}$ a $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-6}$ mol·dm⁻³) na Obr. 51 a Obr. 52.

Tab. 22 Parametry kalibračních přímek stanovení chlortoluronu v říční vodě metodou HPLC-ED na CPE (E = 1300 mV). Složení mobilní fáze: BR pufr (pH = 4) a methanol (60 %, V/V).

Koncentrační rozsah [mol·dm ⁻³]	Směrnice [mA·mol ⁻¹ ·dm ³]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	Mez detekce [mol·dm ⁻³]
$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	3,35	-0,28	0,9972	-
$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	3,28	4,42	0,9934	-
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	2,93	-0,11	0,9964	-
$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	3,02	-0,28	0,9986	$5,7 \cdot 10^{-8}$

Tab. 23 Parametry logaritmické formy kalibrační přímky v celém koncentračním rozmezí stanovení chlortoluronu v říční vodě metodou HPLC-ED na CPE (E = 1300 mV). Složení mobilní fáze: BR pufr (pH = 4) a methanol (60 %, V/V).

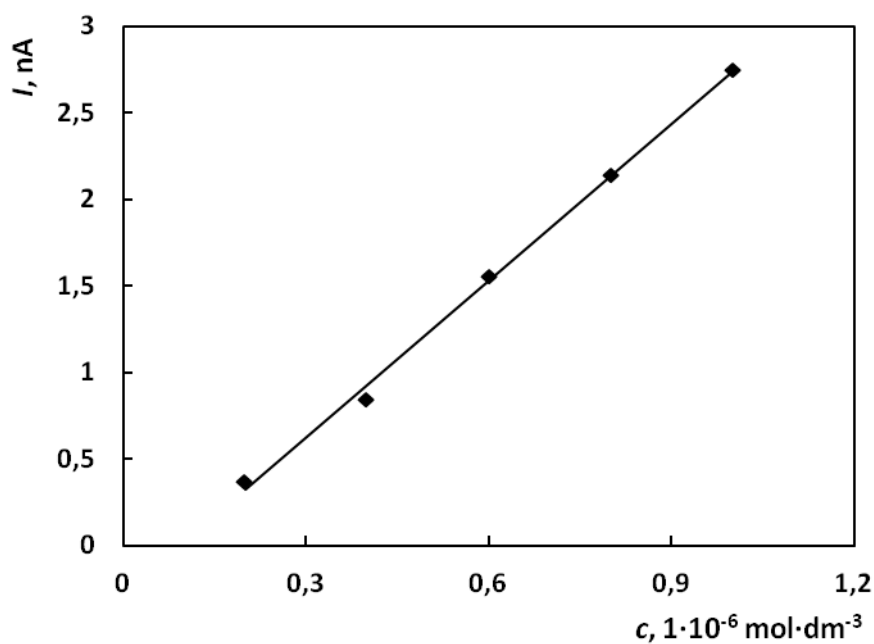
Koncentrační rozsah [mol·dm ⁻³]	Směrnice	Úsek	Korelační koeficient
$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	1,08	0,40	0,9992

Tab. 24 Parametry kalibračních přímek stanovení chlortoluronu v říční vodě metodou HPLC-UV ($\lambda = 243$ nm). Složení mobilní fáze: BR pufr (pH = 4) a methanol (60 %, V/V).

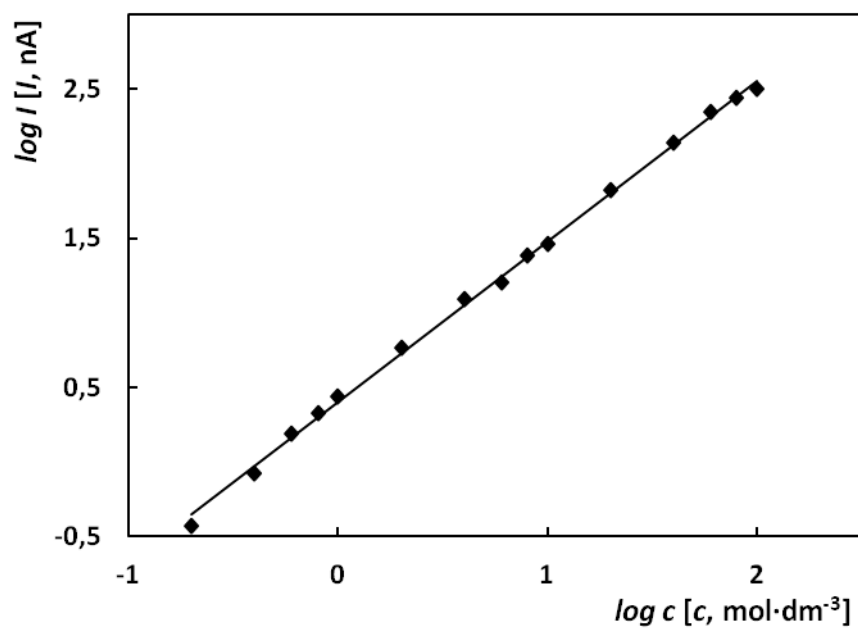
Koncentrační rozsah [mol·dm ⁻³]	Směrnice [mAU·mol ⁻¹ ·dm ³]	Úsek [mAU]	Korelační koeficient	Mez detekce [mol·dm ⁻³]
$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	1,45	-0,11	0,9994	-
$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	1,45	0,02	0,9984	-
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	1,23	0,64	0,9970	-
$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	1,51	-0,05	0,9917	$6,1 \cdot 10^{-9}$

Tab. 25 Parametry logaritmické formy kalibrační přímky v celém koncentračním rozmezí stanovení chlortoluronu v říční vodě metodou HPLC-UV ($\lambda = 243 \text{ nm}$). Složení mobilní fáze: BR pufr (pH = 4) a methanol (60 %, V/V).

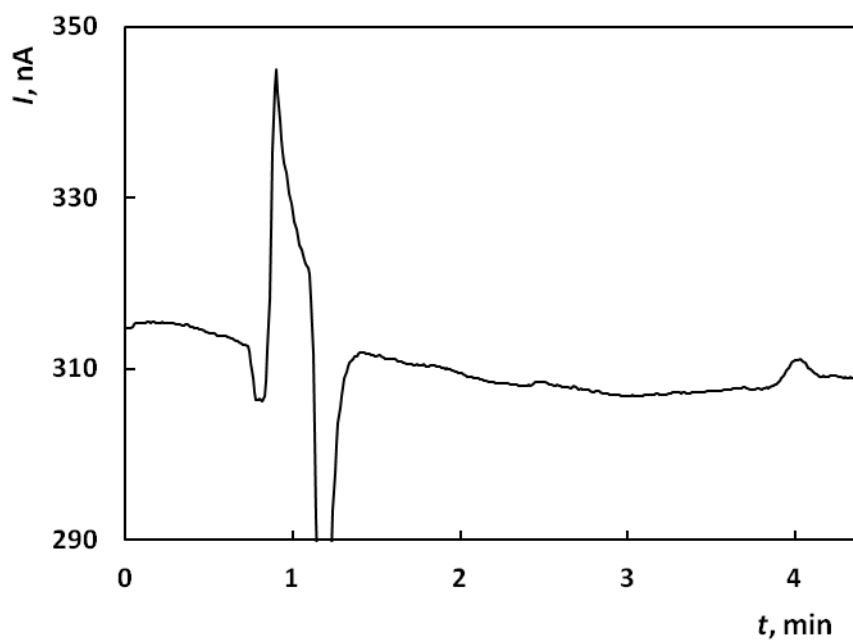
Koncentrační rozsah [$\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$]	Směrnice	Úsek	Korelační koeficient
$1\cdot 10^{-7} - 1\cdot 10^{-4}$	1,01	0,15	0,9996



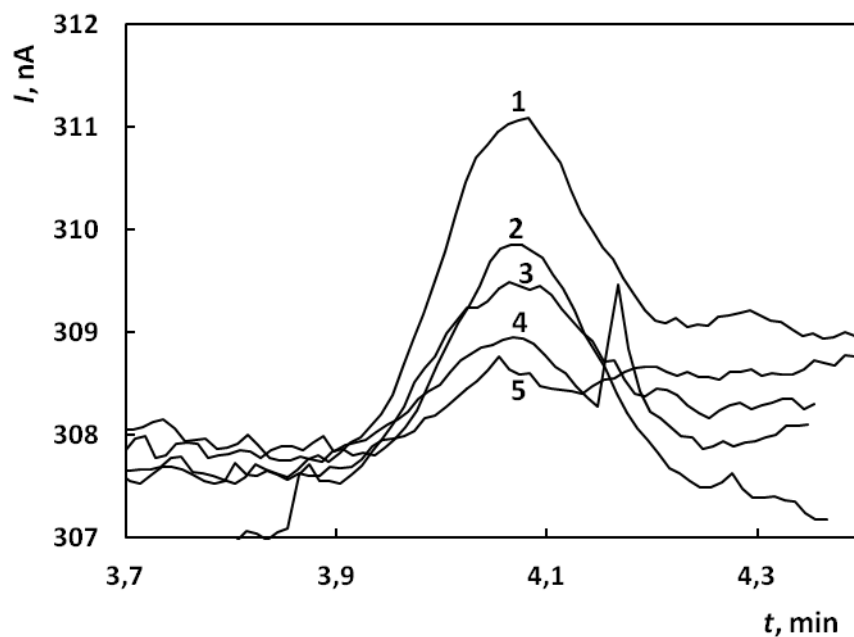
Obr. 45 Závislost proudu píku na koncentraci chlortoluronu v říční vodě v koncentračním rozmezí $2\cdot 10^{-7}$ až $1\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Měřeno metodou HPLC-ED na CPE ($E = 1300 \text{ mV}$). Složení mobilní fáze: BR pufr (pH = 4) a methanol (60 %, V/V).



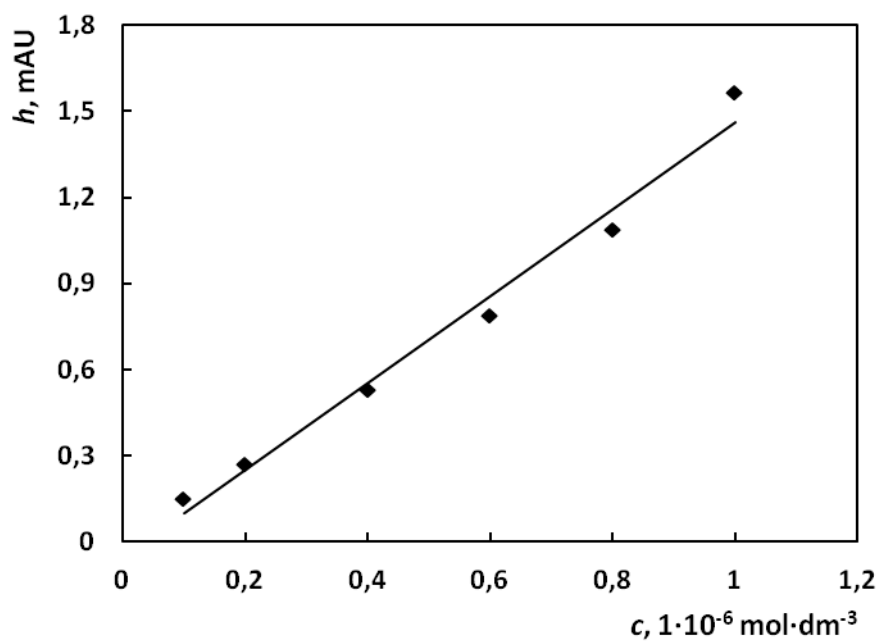
Obr. 46 Logaritmičká závislost proudu píku na koncentraci chlortoluronu v říční vodě v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³. Měřeno metodou HPLC-ED na CPE (E = 1300 mV). Složení mobilní fáze: BR pufr (pH = 4) a methanol (60 %, V/V).



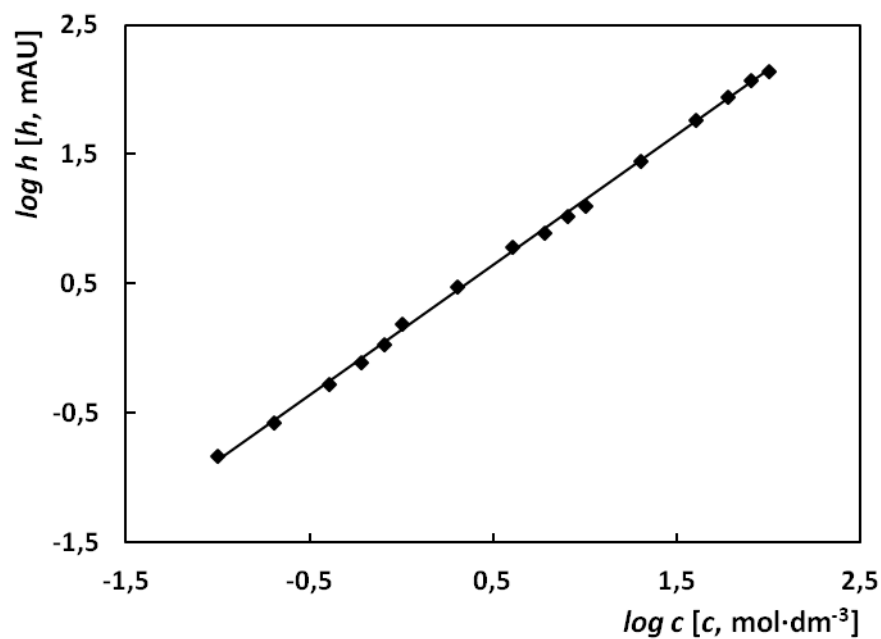
Obr. 47 Chromatogram roztoku chlortoluronu v říční vodě o koncentraci $1 \cdot 10^{-6}$ mol·dm⁻³. Složení mobilní fáze: BR pufr (pH = 4) a methanol (60 %, V/V). Měřeno metodou HPLC-ED na CPE (E = 1300 mV).



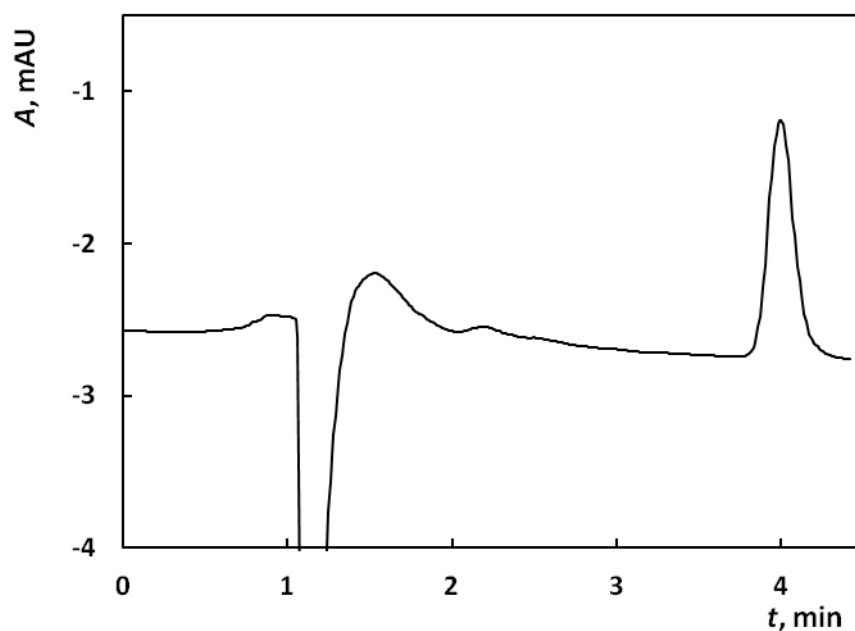
Obr. 48 Chromatogramy roztoku chlortoluronu v říční vodě o koncentraci $1 \cdot 10^{-6}$ (1), $8 \cdot 10^{-7}$ (2), $6 \cdot 10^{-7}$ (3), $4 \cdot 10^{-7}$ (4) a $2 \cdot 10^{-7}$ (5) $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Složení mobilní fáze: BR pufr (pH = 4) a methanol (60 %, V/V). Měřeno metodou HPLC-ED na CPE (E = 1300 mV).



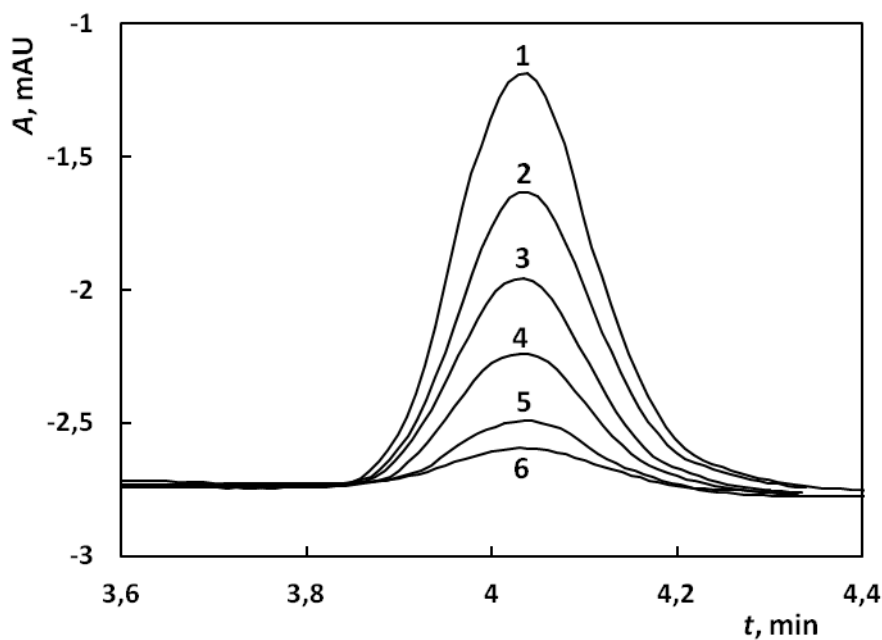
Obr. 49 Závislost výšky píku na koncentraci chlortoluronu v říční vodě v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-6}$ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Měřeno metodou HPLC-UV ($\lambda = 243$ nm). Složení mobilní fáze: BR pufr (pH = 4) a methanol (60 %, V/V).



Obr. 50 Logaritmičká závislost výšky píku na koncentraci chlortoluronu v říční vodě v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³. Měřeno metodou HPLC-UV ($\lambda = 243$ nm). Složení mobilní fáze: BR pufr (pH = 4) a methanol (60 %, V/V).



Obr. 51 Chromatogram roztoku chlortoluronu v říční vodě o koncentraci $1 \cdot 10^{-6}$ mol·dm⁻³. Složení mobilní fáze: BR pufr (pH = 4) a methanol (60 %, V/V). Měřeno metodou HPLC-UV ($\lambda = 243$ nm).



Obr. 52 Chromatogramy roztoku chlortoluronu v říční vodě o koncentraci $1 \cdot 10^{-6}$ (1), $8 \cdot 10^{-7}$ (2), $6 \cdot 10^{-7}$ (3), $4 \cdot 10^{-7}$ (4), $2 \cdot 10^{-7}$ (5) a $1 \cdot 10^{-7}$ (6) $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Složení mobilní fáze: BR pufr (pH = 4) a methanol (60 %, V/V). Měřeno metodou HPLC-UV ($\lambda = 243 \text{ nm}$).

Stanovení chlortoluronu v modelovém vzorku půdy

K naměření koncentračních závislostí chlortoluronu v modelovém vzorku půdy metodou HPLC s UV a elektrochemickou detekcí byly použity vzorky připravené nadávkováním potřebného množství zásobního roztoku chlortoluronu v methanolu ($1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) na předem vysušenou, přesátou a zhomogenizovanou půdu tak, aby byla jeho koncentrace v půdě od 0,1 do $100 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. Poté byl chlortoluron extrahován z půdy methanolem. Po přefiltrování byl tento extrakt naředěn deionizovanou vodou tak, aby byl získán roztok s obsahem methanolu 60 %, V/V.

Parametry kalibračních přímk v jednotlivých koncentračních rozmezech a kalibračních přímk v logaritmické formě jsou uvedeny v Tab. 26 a Tab. 27 pro HPLC-ED a v Tab. 28 a Tab. 29 pro HPLC-UV. Dosažené meze detekce, jejichž hodnoty byly stanoveny na $0,086 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (elektrochemický detektor) a $0,010 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (UV detektor), jsou v porovnání s mezí detekce dosaženou metodou DPV na CPE ($0,93 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) téměř o řád nižší v případě HPLC-ED a téměř o dva řády nižší v případě HPLC-UV. Kalibrační přímka nejnižšího koncentračního řádu a kalibrační přímka v celém koncentračním rozmezí v logaritmické formě jsou pro elektrochemický detektor znázorněny na Obr. 53 a Obr. 54 a pro UV detektor na Obr. 56 a Obr. 57. Získané chromatogramy v koncentračním rozmezí

0,1 až 1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ jsou pro HPLC-ED znázorněny na Obr. 55 a pro HPLC-UV na Obr. 58. V porovnání se stanovením chlortoluronu v matrici říční vody nebyl na uvedených chromatogramech pozorován pík matrice, což je pravděpodobně způsobeno odstraněním nečistot během extrakce chlortoluronu z půdy. Ve slepém vzorku byl na pozici chlortoluronu pozorován malý pík, který naznačuje možnou přítomnost tohoto analytu v odebraném vzorku půdy.

Tab. 26 Parametry kalibračních přímek stanovení chlortoluronu v půdě metodou HPLC-ED na CPE ($E = 1300 \text{ mV}$) v prostředí methanolu (60 %, V/V). Složení mobilní fáze: BR pufr ($\text{pH} = 4$) a methanol (60 %, V/V).

Koncentrační rozsah [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	Směrnice [$\text{nA}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{g}$]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	Mez detekce [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]
0,1 – 100	4,69	5,46	0,9962	-
10 – 100	4,36	28,7	0,9953	-
1 – 10	6,51	-4,00	9748	-
0,1 – 1	5,48	0,23	0,9908	0,086

Tab. 27 Parametry logaritmické formy kalibrační přímky v celém koncentračním rozmezí stanovení chlortoluronu v půdě metodou HPLC-ED na CPE ($E = 1300 \text{ mV}$) v prostředí methanolu (60 %, V/V). Složení mobilní fáze: BR pufr ($\text{pH} = 4$) a methanol (60 %, V/V).

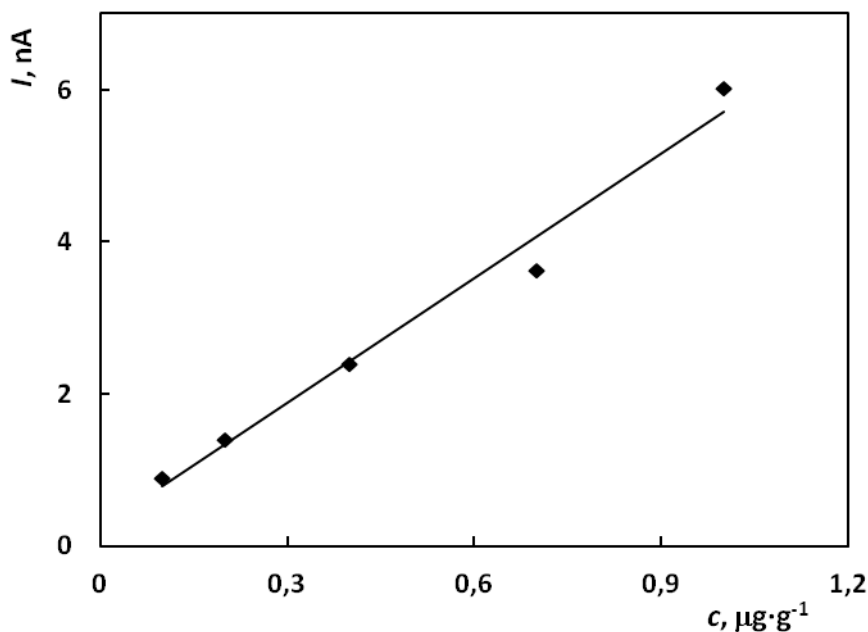
Koncentrační rozsah [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	Směrnice	Úsek	Korelační koeficient
0,1 - 100	0,942	0,78	0,9978

Tab. 28 Parametry kalibračních přímek stanovení chlortoluronu v půdě metodou HPLC-UV ($\lambda = 243 \text{ nm}$) v prostředí methanolu (60 %, V/V). Složení mobilní fáze: BR pufr (pH = 4) a methanol (60 %, V/V).

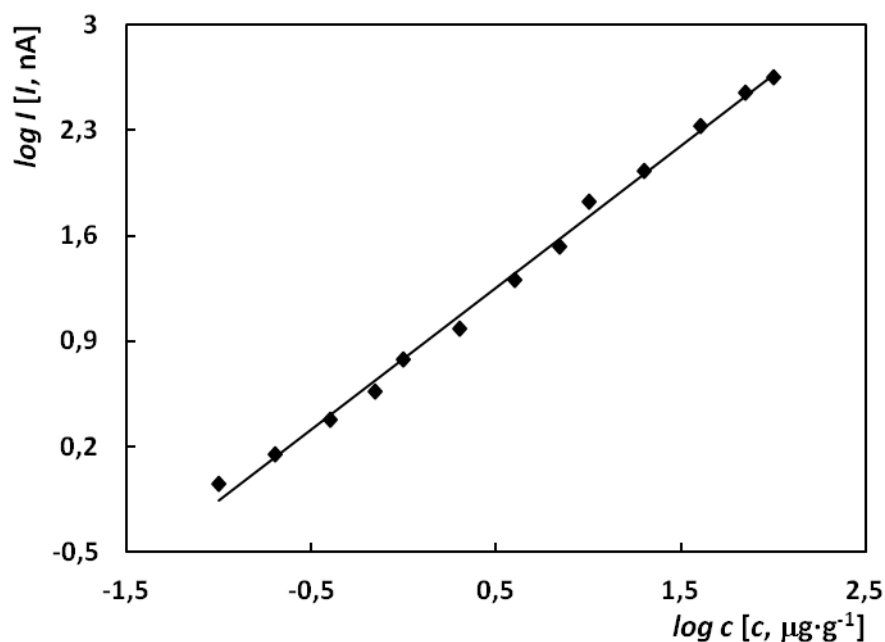
Koncentrační rozsah [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	Směrnice [$\text{mAU}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{g}$]	Úsek [mAU]	Korelační koeficient	Mez detekce [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]
0,1 - 100	2,07	0,49	0,9982	-
10 - 100	2,01	4,54	0,9966	-
1-10	2,12	-0,57	0,9922	-
0,1 - 1	2,24	-0,11	0,9936	0,010

Tab. 29 Parametry logaritmické formy kalibrační přímky v celém koncentračním rozmezí stanovení chlortoluronu v půdě metodou HPLC-UV ($\lambda = 243 \text{ nm}$) v prostředí methanolu (60 %, V/V). Složení mobilní fáze: BR pufr (pH = 4) a methanol (60 %, V/V).

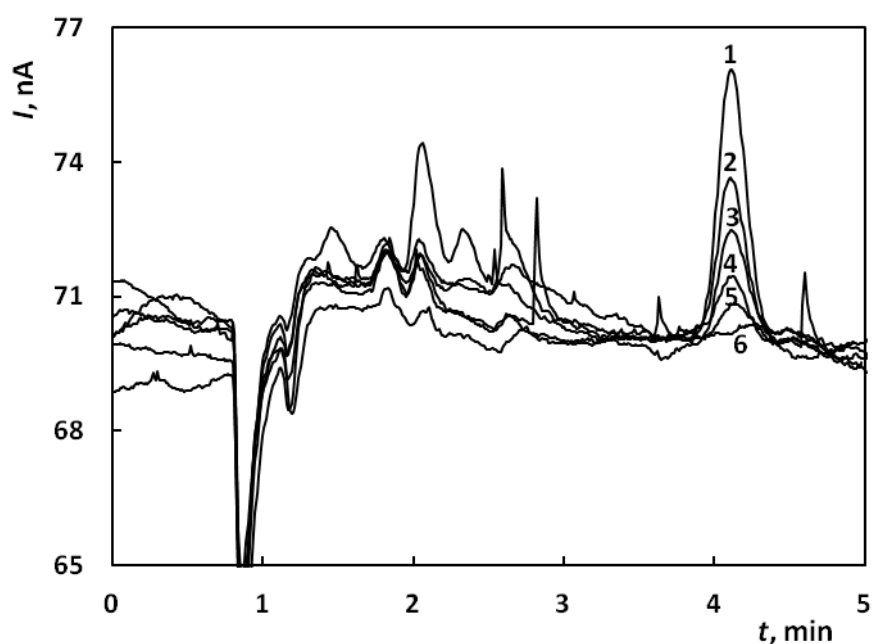
Koncentrační rozsah [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	Směrnice	Úsek	Korelační koeficient
0,1 - 100	1,04	0,27	0,9992



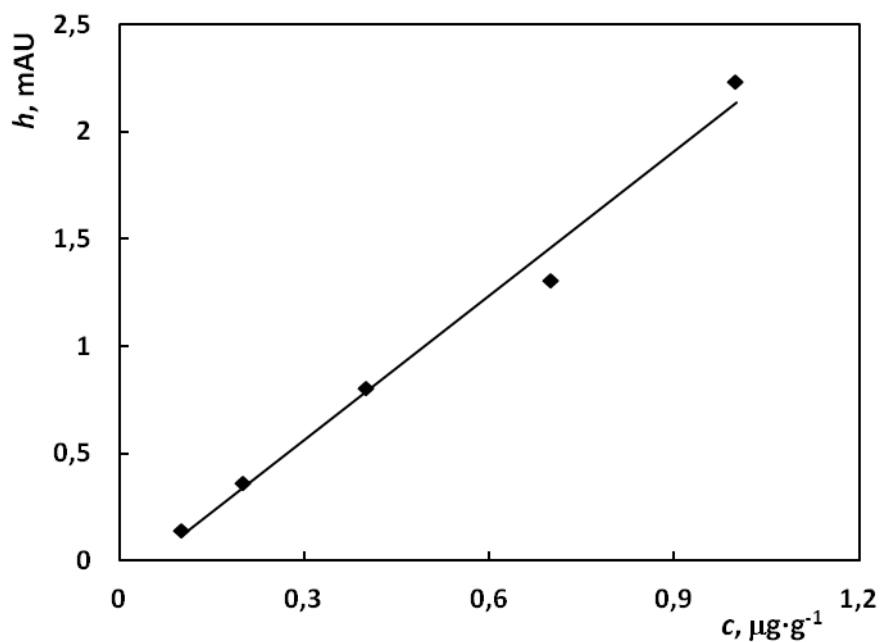
Obr. 53 Závislost proudu píku na koncentraci chlortoluronu v půdě v koncentračním rozmezí 0,1 až 1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Měřeno metodou HPLC-ED na CPE ($E = 1300 \text{ mV}$) v prostředí methanolu (60 %, V/V). Složení mobilní fáze: BR pufr (pH = 4) a methanol (60 %, V/V).



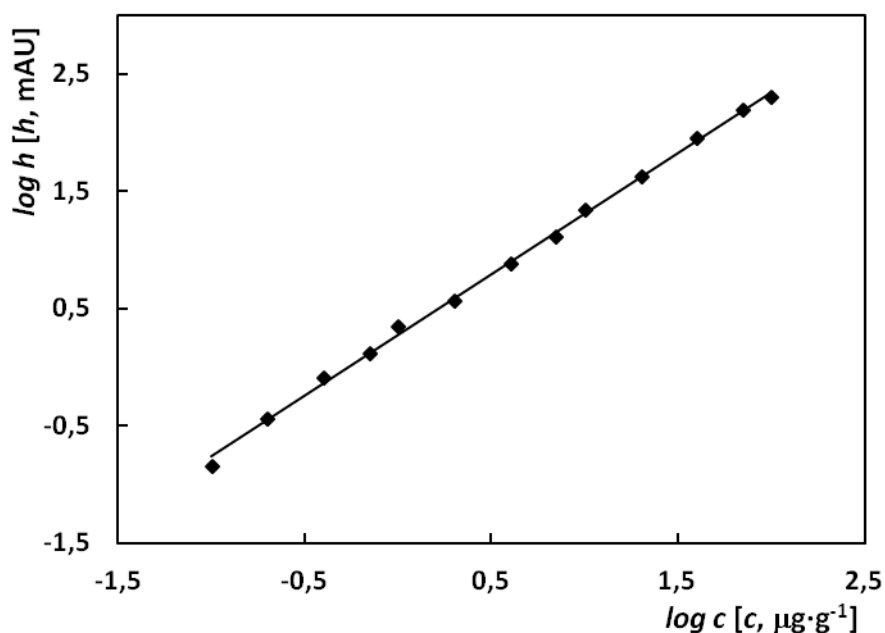
Obr. 54 Logaritmičká závislost proudu píku na koncentraci chlortoluronu v půdě v koncentračním rozmezí 0,1 až 100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Měřeno metodou HPLC-ED na CPE ($E = 1300 \text{ mV}$) v prostředí methanolu (60 %, V/V). Složení mobilní fáze: BR pufr ($\text{pH} = 4$) a methanol (60 %, V/V).



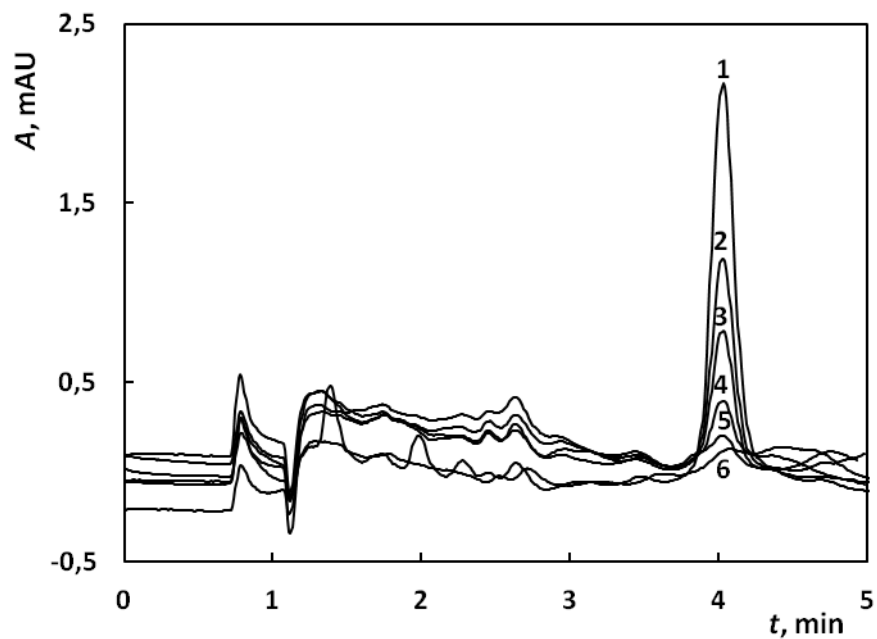
Obr. 55 Chromatogramy chlortoluronu o koncentraci 1,0 (1), 0,7 (2), 0,4 (3), 0,2 (4) a 0,1 (5) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ v půdě. Měřeno metodou HPLC-ED na CPE ($E = 1300 \text{ mV}$) v prostředí methanolu (60 %, V/V). Složení mobilní fáze: BR pufr ($\text{pH} = 4$) a methanol (60 %, V/V). Křivka 6 odpovídá vzorku půdy bez přídavku chlortoluronu.



Obr. 56 Závislost výšky píku na koncentraci chlortoluronu v půdě v koncentračním rozmezí 0,1 až 1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Měřeno metodou HPLC-UV ($\lambda = 243$ nm) v prostředí methanolu (60 %, V/V). Složení mobilní fáze: BR pufr (pH = 4) a methanol (60 %, V/V).



Obr. 57 Logaritmická závislost výšky píku na koncentraci chlortoluronu v půdě v koncentračním rozmezí 0,1 až 100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Měřeno metodou HPLC-UV ($\lambda = 243$ nm) v prostředí methanolu (60 %, V/V). Složení mobilní fáze: BR pufr (pH = 4) a methanol (60 %, V/V).



Obr. 58 Chromatogramy chlortoluronu o koncentraci 1,0 (1), 0,7 (2), 0,4 (3), 0,2 (4) a 0,1 (5) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ v půdě. Měřeno metodou HPLC-UV ($\lambda = 243 \text{ nm}$) v prostředí methanolu (60 %, V/V). Složení mobilní fáze: BR pufr (pH = 4) a methanol (60 %, V/V). Křivka 6 odpovídá vzorku půdy bez přídavku chlortoluronu.

5 Závěr

V předložené diplomové práci byly prostudovány možnosti stanovení herbicidu chlortoluronu metodami DPV, HPLC-ED a HPLC-UV s využitím uhlíkové pastové elektrody. Dále byla ověřena možnost využití miniaturizované uhlíkové pastové elektrody a použitelnost vyvinutých metod pro stanovení chlortoluronu v modelových vzorcích říční vody a půdy.

Při nalezených optimálních podmínkách stanovení chlortoluronu metodou DPV na CPE (pH BR pufru = 3, podíl methanolu 10 %, V/V) byly naměřeny koncentrační závislosti v deionizované vodě.

Dále byly proměřeny koncentrační závislosti pomocí HPLC v mobilní fázi obsahující BR pufr (pH = 4) a methanol (60 %, V/V), s potenciálem pracovní elektrody 1300 mV a detekční vlnovou délkou 243 nm.

Po optimalizaci uvedených metod byl chlortoluron stanoven v modelových vzorcích říční vody a půdy. Meze detekce dosažené použitými metodami jsou uvedeny v Tab. 30.

Tab. 30 Meze detekce chlortoluronu dosažené metodami DPV, HPLC-ED a HPLC-UV.

Metoda	L_D - deionizovaná voda [mol·dm ⁻³]	L_D – říční voda [mol·dm ⁻³]	L_D – půda [μg·g ⁻¹]
DPV (CPE)	$3,7 \cdot 10^{-7}$	$8,3 \cdot 10^{-7}$	0,93
DPV (mCPE)	$8,7 \cdot 10^{-8}$	$1,0 \cdot 10^{-7}$	1,3
HPLC-ED	$3,3 \cdot 10^{-8}$	$5,7 \cdot 10^{-8}$	0,086
HPLC-UV	$1,1 \cdot 10^{-8}$	$6,1 \cdot 10^{-9}$	0,010

Nejvyšší citlivosti bylo dosaženo pomocí metody HPLC se spektrofotometrickou detekcí. Ve srovnání s tím nepřináší použití elektrochemické detekce v HPLC podstatné výhody. Jako vhodné a dostatečně citlivé se ukázalo být i voltametrické stanovení. Výhodou voltametrických metod je rychlost, nenáročnost na úpravu vzorku a možnost měření v terénních podmínkách. V tomto ohledu vyniká miniaturizovaná CPE nad konvenční CPE, a to nejen svými menšími fyzickými rozměry, ale i nižšími detekčními limity dosahovanými při měření na této elektrodě.

Uvedené metody lze také použít pro stanovení chlortoluronu v reálných vzorcích, jelikož stanovení v modelových vzorcích říční vody a půdy nebylo maticí významně ovlivněno.

6 Literatura

- ¹ U.S. Environmental Protection Agency: *About pesticides*. Dostupné z URL: <http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm#what_pesticide> [cit. 24.7.2012]
- ² *Pesticides in the Modern World - Trends in Pesticides Analysis*. Stoytcheva, M. (Ed.). Rijeka, InTech 2011.
- ³ Rao, P. S. C.; Mansell, R. S.; Baldwin, L.B.; Laurent, M. F.: Pesticides and their behavior in soil and water. *Soil Science Fact Sheet* **40** (1983).
- ⁴ Mou, R.-X.; Chen, M.-X.; Zhi, J.-L.: Simultaneous determination of 15 phenylurea herbicides in rice and corn using HPLC with fluorescence detection combined with UV decomposition and post-column derivatization. *Journal of Chromatography B* **875**, 437–443 (2008).
- ⁵ Jursík, M.; Soukup, J.; Holec, J.: Mechanizmy účinku herbicidů a projevy jejich působení na rostliny – Úvod do problematiky mechanismu působení herbicidů. *Listy cukrovarnické a řepářské* **126**, 14–16 (2010).
- ⁶ Cremlyn, R.: *Pesticidy*. Praha, SNTL – Nakladatelství technické literatury 1985.
- ⁷ Liu, J.: Phenylurea herbicides. In: Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology. R. Krieger (Ed.). New York: Academic Press, 2010, p. 1725-1731.
- ⁸ Jursík, M.; Soukup, J.; Venclová, V.; Holec, J.; Andr, J.: Mechanizmy účinku herbicidů a projevy jejich působení na rostliny - Inhibitory fotosyntézy. *Listy cukrovarnické a řepářské* **126**, 48-54 (2010).
- ⁹ Benitez, F. J.; Garcia, C.; Acero, J. L.; Real, F. J.: Removal of phenylurea herbicides from waters by using chemical oxidation treatments. *World Academy of Science, Engineering and Technology* **58**, 673-680 (2009).
- ¹⁰ Sigma-Aldrich: *Bezpečnostní list chlorotoluronu*. Dostupné z URL: <<http://www.sigmaaldrich.com/>> [cit. 24.7.2012]
- ¹¹ U.S. National Library of Medicine: *ChemIDplus Lite*. Dostupné z URL: <<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>> [cit. 24.7.2012]
- ¹² Kočárek, M.; Kodešová, R.; Kozák, J.; Drábek, O.; Vacek, O.: Chlortoluron behavior in five different soil types. *Plant, Soil and Environment* **51**, 304-309 (2005).

-
- ¹³ Pérez, S.; Matienzo, M. T.; Tadeo, J. L.: GC-ITD analysis of chlortoluron and its metabolites in cereals. *Chromatographia* **36**, 195-200 (1993).
- ¹⁴ Klem, K.: Podzimní ochrana proti plevelům – základní kámen technologie pěstování ozimých obilovin. *Obilnářské listy* **5** (2003).
- ¹⁵ Cihlář, P.; Vašák, J.; Pšenička, P.: Agrotechnika 2 t/ha máku a poznatky. In: *Prosperující olejniný: sborník referátů z konference katedry rostlinné výroby ČZU v Praze 2006*. Česká zemědělská společnost. Praha: Česká zemědělská univerzita, 2006, p. 79-82.
- ¹⁶ Sørensen, S. R.; Bending, G. D.; Jacobsen, C. S.; Walker, A.; Aamand, J.: Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields. *FEMS Microbiology Ecology* **45**, 1-11 (2003).
- ¹⁷ Hamaker, J. W.: Decomposition: Quantitative aspect. In: *Organic chemicals in the soil environment. Vol. 1*. Goring, A. I., Hamaker, J. W. (eds.). New York: C. Marcel Dekker, 1972, p. 253–340.
- ¹⁸ Gao, M.; Dai, S.; Ma, Y.: The impact of nitrogen fertilizers on degradation and leaching of chlorotoluron in soil. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **87**, 67-76 (2007).
- ¹⁹ Khadrani, A.; Seigle-Murandi, F.; Steiman, R.; Vroumsia, T.: Degradation of three phenylurea herbicides (Chlortoluron, Isoproturon and Diuron) by micromycetes isolated from soil. *Chemosphere* **38**, 3041–3050 (1999).
- ²⁰ Berger, B. M.: Parameters influencing biotransformation rates of phenylurea herbicides by soil microorganisms. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **60**, 71-82 (1998).
- ²¹ Gao, M.; Dai, S.; Ma, Y.; Zhang, P.: Impact of atrazine and nitrogen fertilizers on the sorption of chlorotoluron in soil and model sorbents. *Journal of Environmental Sciences-China* **19**, 327-331 (2007).
- ²² Ryan, P. J.; Gross, D.; Owen, W. J.; Laanio, T. L.: The metabolism of chlortoluron, diuron, and CGA 43 057 in tolerant and susceptible plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **16**, 213-221 (1981).
- ²³ World Health Organization: Chlorotoluron in Drinking-water. In: *Guidelines for drinking-water quality*. 2nd ed. Geneva: World Health Organization, 1996.

-
- ²⁴ Klementová, Š.; Zemanová, M.: UV photochemical degradation of a phenyl-urea herbicide chlorotoluron. *Research Journal of Chemistry and Environment* **12**, 5-11 (2008).
- ²⁵ U.S. National Library of Medicine: *Toxnet, Toxicology Data Network*. Dostupné z URL: <<http://toxnet.nlm.nih.gov/index.html>> [cit. 24.7.2012]
- ²⁶ Health & Consumer Protection: *Review report for the active substance chlorotoluron*. Dostupné z URL: <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list_chlortoluron.pdf> [cit. 24.7.2012]
- ²⁷ De Kok, A.; Vos, Y. J.; Van Garderen, C.; De Jong, T.; Van Opstal, M.; Frei, R. W.; Geerdink, R. B., Brinkman, U. A. Th.: Chromatographic determination of phenylurea herbicides and their corresponding aniline degradation products in environmental samples. I. *Journal of Chromatography* **288** 71-89 (1984).
- ²⁸ Caverly, D. J.; Denney, R. C.: Determination of substituted ureas and some related herbicide residues in soils by gas chromatography. *Analyst* **103**, 368-374 (1978).
- ²⁹ Brinkman, U. A. Th.; De Kok, A.; Geerdink, R. B.: Determination of phenylurea herbicides via direct derivatisation with heptafluorobutyric anhydride. *Journal of Chromatography A* **283**, 113-126 (1984).
- ³⁰ Chiavari, G.; Bergamini, C.: Determination of phenylurea herbicide by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography* **346**, 369-375 (1985).
- ³¹ Hutta, M.; Chalányová, M.; Halko, R.; Góra, R.; Dokupilová, S.; Rybár, I.: Reversed phase liquid chromatography trace analysis of pesticides in soil by on-column sample pumping large volume injection and UV detection. *Journal of Separation Science* **32**, 2034-2042 (2009).
- ³² Gallitzendörfer, R.; Timm, T.; Koch, D.; Küsters, M.; Gerhartz, M.: Simultaneous determination of 12 sulfonylurea herbicides in drinking water after SPE by LC-DAD. *Chromatographia* **73**, 813-816 (2011).
- ³³ Lawrence, J. F.; Ménard, C.; Hennion, M.-C.; Pichon, V.; Le Goffic, F.; Durand, N.: Use of immunoaffinity chromatography as a simplified cleanup technique for the liquid

chromatographic determination of phenylurea herbicides in plant material. *Journal of Chromatography A* **732**, 277-281 (1996).

³⁴ Gross, D.; Laanio, T.; Dupuis, G.; Esser, H. O.: The metabolic behavior of chlorotoluron in wheat and soil. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **10**, 49–59 (1979).

³⁵ López-Feria, S.; Cárdenas, S.; Valcárcel, M.: One step carbon nanotubes-based solid-phase extraction for the gas chromatographic-mass spectrometric multiclass pesticide control in virgin olive oils. *Journal of Chromatography A* **1216**, 7346-7350 (2009).

³⁶ Adams, R. N.: Carbon paste electrodes. *Analytical Chemistry* **30**, 1576 (1958).

³⁷ Švancara, I.; Vytřas, K.: Příprava a vlastnosti uhlíkových pastových elektrod. *Chemické Listy* **88**, 138-146 (1994).

³⁸ Zima, J.: Využití uhlíkových pastových elektrod v analýze léčiv a toxických látek. *Klinická a toxikologická analýza*. Praha, VŠCHT 2008.

³⁹ Švancara, I.; Vytřas, K.; Kalcher, K.; Walcarius, A.; Wang, J.: Carbon paste electrodes in facts, numbers, and notes: A review on the occasion of the 50-years jubilee of carbon paste in electrochemistry and electroanalysis. *Electroanalysis* **21**, 7-28 (2009).

⁴⁰ Cookeas, E. G.; Efstathiou, C. E.: Preconcentration of organic compounds at a diphenyl ether graphite paste electrode and determination of vanillin by adsorptive-extractive stripping voltammetry. *Analyst* **117**, 1329-1334 (1992).

⁴¹ Olson, C.; Adams, R. N.: Carbon paste electrodes application to anodic voltammetry. *Analytica Chimica Acta* **22**, 582-589 (1960).

⁴² Švancara, I.; Schachl, K.: Testing of unmodified carbon paste electrodes. *Chemické Listy* **93**, 490-499 (1999).

⁴³ Kalcher, K.; Kauffmann, J. M.; Wang, J.; Švancara, I.; Vytřas, K.; Neuhold, C.; Yang, Z.: *Electroanalysis* **7**, 5 (1995).

⁴⁴ Kuwana, T.; French, W. G.: Electrooxidation or reduction of organic compounds into aqueous solutions using carbon paste electrode. *Analytical Chemistry* **36**, 241-242 (1964).

⁴⁵ Chambers, C. A. H.; Lee, J. K.: Studies of the extraction of organic molecules into the carbon-paste electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **14**, 309-314 (1967).

⁴⁶ Lindquist, J.: Carbon paste electrode with a wide anodic potential range. *Analytical Chemistry* **45**, 1006-1008 (1973).

⁴⁷ Švancara, I.; Vytrás, K.; Renger, F.; Smyth, M. R.: Application of carbon paste electrodes in highly methanolic solutions. *Electrochimica Acta* **37**, 1355-1361 (1992).

⁴⁸ Zima, J.; Švancara, I.; Barek, J.; Vytrás, K.: Recent advances in electroanalysis of organic compounds at carbon paste electrodes. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **39**, 204-227 (2009).

⁴⁹ Sýkora, V.; Zátka, V.: *Příruční tabulky pro chemiky*. SNTL, Praha 1967.