

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Šárka Sládková

Stanovení pesticidu chlortoluronu na elektrodě z uhlíkové plsti

Determination of pesticide chlortoluron on carbon felt electrode

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Hana Dejmková, Ph.D.

Praha 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

.....
Podpis

Tato práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou České republiky (GA17-03868S).

Poděkování

Ráda bych poděkovala své vedoucí bakalářské práce RNDr. Haně Dejmkové, Ph.D. za vstřícný přístup, velkou trpělivost a nespočet cenných rad.

Dále bych ráda poděkovala všem členům Katedry analytické chemie za veškerou pomoc a cenné připomínky.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým rodičům za finanční a psychickou podporu, kterou mi během studia poskytovali.

Klíčová slova

HPLC, coulometrická detekce, elektroda z uhlíkové plsti, elektrochemická detekce, spektrofotometrická detekce, chlortoluron

Key words

HPLC, coulometric detection, carbon felt electrode, electrochemical detection, spectrophotometric detection, chlortoluron

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývala optimalizací metody pro stanovení pesticidu chlortoluronu pomocí HPLC s následnou coulometrickou detekcí na elektrodě z uhlíkové plsti. Jako stacionární fáze byla použita kolona Purospher® RP-18 (125×4 mm, 5 µm) (LiChroCART). Mobilní fází byl fosfáto-acetátový pufr o pH 4 a methanol v poměru 40:60 a potenciál vkládaný na pracovní elektrodu byl 1400 mV.

Závislost velikosti signálu na koncentraci byla sledována v koncentračním rozmezí od $1 \cdot 10^{-4}$ do $7,5 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Nejprve byla tato závislost sledována v deionizované vodě. Mez detekce byla metodami HPLC-UV a HPLC-ED stanovena na $4,4 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $1,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Aplikovatelnost metody na environmentální vzorky bylo ověřeno na modelových vzorcích říční vody a půdy. Meze detekce pro říční vodu byly stanoveny metodou HPLC-UV na $7,8 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a metodou HPLC-ED na $1,7 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Pro půdu byla změřena metodou HPLC-UV mez detekce na hodnotu $0,20 \text{ µg} \cdot \text{g}^{-1}$. a metodou HPLC-ED byla mez detekce změřena na $0,14 \text{ µg} \cdot \text{g}^{-1}$. Stanovení v modelových vzorcích poskytlo velmi podobné výsledky jako stanovení v deionizované vodě a to znamená, že rozdílná matrice stanovení příliš neovlivní.

Abstract

This bachelor thesis deals with the optimization of the determination method for pesticide chlortoluron by HPLC coupled with coulometric detection on the carbon felt electrode. As the stationary phase Purospher® RP-18 column (125 x 4 mm, 5 µm) (LiChroCART) was used. The mobile phase was phosphate-acetate buffer pH 4 and methanol 40:60 and the potential applied to the working electrode was 1400 mV.

The dependence of the signal on the concentration was monitored in the concentration range from $1 \cdot 10^{-4}$ to $7,5 \cdot 10^{-9}$ mol·dm⁻³. Firstly, this dependence was observed in deionized water. Detection limits obtained by HPLC-UV and HPLC-ED were determined to be $4,42 \cdot 10^{-9}$ mol·dm⁻³ and $1,26 \cdot 10^{-7}$ mol·dm⁻³, respectively.

Applicability of the method on the environmental samples was verified on model samples of river water and soil. The limits of detection of river water were determined by HPLC-UV method at $7,76 \cdot 10^{-9}$ mol·dm⁻³ and by HPLC-ED method at $1,71 \cdot 10^{-7}$ mol·dm⁻³. For the soil, the limit of detection was measured by HPLC-UV at $0,198 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ and by method HPLC-ED it was determined as $0,135 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. Assays in model samples giving very similar results as in the pure solvents and this means that the matrix influence on the determination is low.

Seznam použitých zkratk

A – absorbance

c – koncentrace

CF – uhlíková plst'

CPE – uhlíková pastová elektroda

DAD – detektor s diodovým polem

DPV – diferenční pulsní voltametrie

E – potenciál

ECD – detektor elektronového záchytu

ED – elektrochemický detektor

GC – plynová chromatografie

h – výška píku

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

I – proud

ITD – detektor iontového záchytu

LC – kapalinová chromatografie

LOD – mez detekce

LOQ – mez stanovitelnosti

mCPE – miniaturizovaná uhlíková pastová elektroda

MF – mobilní fáze

MS – hmotnostní spektrometrie

NPD – dusíko-fosforový detektor

PPD – postkolonová fotolýza a derivatizace

RP-18 – reverzní fáze s chemicky vázaným oktadecylsilanem

s – směrodatná odchylka

sr – relativní směrodatná odchylka

Obsah

1 Úvod	12
1.1 Cíl práce	12
2 Teoretická část	13
2.1 Pesticidy	13
2.2 Chlortoluron	14
2.2.1 Fyzikálně chemické vlastnosti	14
2.2.2 Využití a degradace v přírodě	14
2.3 Metody stanovení fenylmočovinných pesticidů	15
2.4 Metody stanovení chloroluronu	16
2.5 Uhlíková plst'	18
3 Experimentální část	19
3.1 Použitá aparatura a přístroje	19
3.2 Konstrukce pracovní elektrody	19
3.3 Další použité vybavení	20
3.4 Příprava roztoků	20
3.4.1 Příprava zásobního roztoku chlortoluronu	20
3.4.2 Příprava fosfáto–acetátového pufru	21
3.4.3 Příprava mobilní fáze	21
3.5 Optimalizace metody	21
3.6 Kalibrační závislost	22
3.7 Zpracování modelových vzorků	22
3.7.1 Voda	22
3.7.2 Půda	22
3.8 Statistické zpracování	23
4 Výsledky a diskuze	24

4.1 Optimalizace podmínek pro separaci a následnou detekci	24
4.2 Opakovatelnost měření	29
4.3 Kalibrace – stanovení chlortoluronu v deionizované vodě.....	31
4.4 Stanovení chlortoluronu v modelových vzorcích	35
4.4.1 Voda	35
4.4.2 Půda.....	39
5 Závěr.....	42
6 Zdroje	43

1 Úvod

1.1 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je nalézt vhodné experimentální podmínky pro stanovení pesticidu chlortoluronu s použitím detektoru z uhlíkové plsti ve spojení s HPLC a vyhodnotit funkčnost této metody.

Tento postup zahrnuje nalezení optimálního složení mobilní fáze, potenciálu a ověření opakovatelnosti měření, kvůli zjištění zda nedochází k pasivaci elektrody, a následné vytvoření kalibrační závislosti a nalezení meze detekce.

Na závěr bude provedena extrakce s následným stanovením chlortoluronu v modelových vzorcích říční vody a půdy, kvůli ověření funkčnosti metody a zjištění, jestli může být metoda použita k analýze v reálných vzorcích a různých matricích.

2 Teoretická část

2.1 Pesticidy

Pesticidem nazýváme chemickou látku či směs, která je vyrobená s cílem odstranit, předcházet, odpuzovat či snižovat populaci škůdců a plevelů [1] [2]. Jsou nejvíce využívány v zemědělství k ochraně zemědělských plodin a průmyslových ploch. Pesticidy se mohou různě klasifikovat.

První možností je klasifikace pesticidů podle cílového škůdce. Patří sem fungicidy, herbicidy, insekticidy a baktericidy. Fungicidy zabíjejí či inhibují růst hub a jejich spór. Herbicidy se používají k usmrcení nežádoucích rostlin. Mohou působit selektivně (ničí pouze některé druhy nebo skupiny rostlin) nebo neselektivně a ty ničí veškerou rostlinou populaci. Insekticidy se používají proti hmyzu ve všech stupních jejich růstu. Poslední skupinou jsou baktericidy, které se používají k zabíjení bakterií. To mohou být dezinfekční prostředky, antiseptika a antibiotika [3].

Druhým dělením je klasifikace pesticidů na kontaktní (nesystémové) a systémové. Systémové pesticidy jsou absorbovány rostlinami a přenášeny do neošetřených oblastí, například do listů, stonků nebo kořenů. Mohou účinně proniknout do rostlinných tkání a pohybovat se cévním systémem. Kontaktní pesticidy zůstávají na povrchu a nemohou tedy pronikat do cévního systému. Dosáhnout požadovaného účinku mohou pouze tehdy, přijdou-li do fyzického kontaktu s cílovým škůdcem. Pesticid proniká do těla škůdce přes pokožku a způsobí mu otravu [4] [5].

Třetí dělení klasifikuje pesticidy podle chemické povahy účinných látek. Pesticidy se dělí do čtyř hlavních skupin na organofosfáty, karbamáty, pyrethroidy a organochlorové sloučeniny [3].

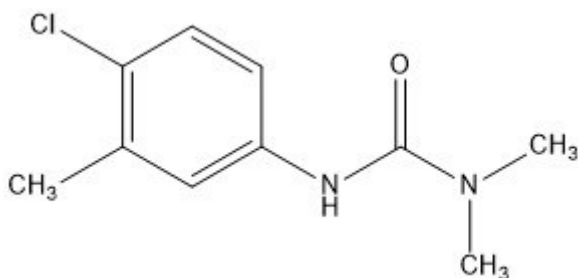
Vzhledem k neustálému narůstání populace na Zemi bylo zavedení pesticidů velice přínosné, pomohly zlepšit kvalitu a délku života, ale stále představují velké nebezpečí pro životní prostředí [6]. Používání pesticidů má za následek ohrožování zdraví lidí. Vzhledem k velkému množství pesticidů, které mají různé struktury a obsahují rozdílné funkční skupiny, nelze konkrétně říci, jaká je jejich přesná toxicita. Velké množství pesticidů je neurotoxických [7], hepatotoxických či nefrotoxických [8].

Degradace pesticidů probíhá zejména mikrobiální cestou. Při degradaci dochází k transformaci molekul, které mohou být také toxické [9]. Nejlepším řešením je snažit

se vyvíjet takové pesticidy, které budou šetrnější pro životní prostředí a v přírodě se budou lépe a rychleji odbourávat.

2.2 Chlortoluron

2.2.1 Fyzikálně chemické vlastnosti



Strukturní vzorec:

Sumární vzorec: $C_{10}H_{13}ClN_2O$

IUPAC název: 3-(3-Chloro-p-tolyl)-1,1-dimethylmočovina

C.A.S. název: chlortoluron

C.A.S. registrační číslo: 15545-48-9

Relativní molekulová hmotnost: 212, 677 [10]

Teplota tání: 147-148 °C

Rozpustnost ve vodě: $70 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ (20 °C) [11]

Chlortoluron je herbicid patřící do skupiny substituovaných močovín. Jedná se o herbicid netoxický pro včely, ale středně toxický pro vodní organismy, žížaly, ptáky a savce [12]. Je to bílý krystalický prášek bez zápachu. Ve vodě je rozpustný omezeně, dobře rozpustný je v organických rozpouštědlech, například v methanolu [10].

2.2.2 Využití a degradace v přírodě

Účinek herbicidů ze skupiny substituovaných močovín je založen na schopnosti inhibice fotosyntézy [13]. Obecně se používají se k zamezení růstu plevelů kukuřice,

rýže, sójových bobů, bramborových plodin a bavlny [14]. Chlortoluron se nejčastěji používá na plevelnaté rostliny, zejména na chundelku metlici, psárku polní a plevele v ozimých obilninách [15] [16] a máku [17].

Kontaminace chlortoluronem může hrozit, vzhledem k poměrně nízké rozpustnosti ve vodě především v půdě, kde je největším předpokládaným procesem odstranění mikrobiální biodegradací [18].

Byla studována degradace chlortoluronu pomocí mikroorganismů a nejlepšími výsledky bylo dosaženo při použití houby šedopórky osmahlé, která spotřebovala 98 % látky za dva týdny [19].

Degradace chlortoluronu může probíhat i díky detoxikačním mechanismům obilovin, a to N-demethylací a nebo oxidační reakcí methylovaného kruhu. Při N-demethylaci vznikají N-monodimethylchlortoluron a N-didemethylchlortoluron. Tyto produkty již nejsou fyto toxické. Při oxidaci methylovaného kruhu vzniká hydroxymethylový metabolit, který již také není fyto toxický [16].

Degradace chlortoluronu může probíhat i UV fotochemickou degradací, kdy dochází k uvolnění chloridových iontů a ke tvorbě hydroxyderivátů [20] [21].

2.3 Metody stanovení fenylmočovinových pesticidů

Zvyšování lidské populace na Zemi má za následek zvyšování používání pesticidů. To vedlo vzhledem k toxicitě pesticidů k rozvoji zejména analytických metod. Ty umí stanovit i zbytkové koncentrace v různých vzorcích.

Při použití kolorimetrie či spektrofotometrických metod je největším problémem, že tyto metody nejsou příliš citlivé. Jako lepší alternativa se volí spíše rozdělovací chromatografické metody, elektroanalytické metody či jejich kombinace.

Nejčastěji jsou používány plynová (GC) a kapalinová (LC) chromatografie. Plynová chromatografie je nejvíce univerzální a citlivou metodou pro stanovení reziduí pesticidů [22]. Problémem této metody je, že většina fenylmočovinových herbicidů je tepelně nestabilní a částečně se rozkládají na isokyanáty a aminy z důvodu přítomnosti NH skupiny v molekule. Pokusy o zvýšení stability blokadí NH skupiny silací, acylací nebo

alkylací se bohužel příliš neosvědčily. Častěji se využívají metody hydrolyzy s následnou derivatizací při specifických podmínkách [23]. Velmi často se používá analýza s detektorem elektronového záchytu (ECD) či dusíko-fosforovým detektorem (NPD) [24]. Zdaleka nejlepší detekcí při použití plynové chromatografie je detekce pomocí hmotnostní spektrometrie (MS). Tato metoda poskytuje informace o molekulární struktuře sloučeniny, je velmi citlivá a poskytuje vysokou selektivitu [22].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se používá při nižší těkavosti sloučeniny nebo tepelné nestabilitě. HPLC má obecně nižší citlivost při stopové analýze. Používá se zejména UV detekce [22]. Při stanovení fenylnmočovinných herbicidů se detekční vlnová délka obecně pohybuje pod hodnotou 300 nm. Použitá vlnová délka je velmi univerzální. Při analýze v půdě se pak mohou, v důsledku velkého obsahu kyseliny huminové a dalších půdních hnojiv, vyskytovat problémy s velkou absorbcí pozadí či falešně pozitivní výsledky. Tyto problémy lze eliminovat použitím vlnové délky 240 - 250 nm [25].

Mezi elektroanalytické metody, které se nejčastěji používají při stanovení fenylnmočovinných herbicidů, patří amperometrické či voltametrické metody. Tyto metody se používají vždy v kombinaci s nějakou separační metodou, nejčastěji HPLC [26] [27].

2.4 Metody stanovení chlortoluronu

Chlortoluron se stanovuje v pevné nebo kapalné matrici. Analýza v pevné matrici se provádí buď přímo v zemědělských plodinách anebo v půdě, ve které jsou tyto plodiny obsaženy. Analýza v kapalné matrici se provádí v pitné vodě, povrchové říční vodě či vodě, která protéká v okolí kontaminovaného pole.

Stanovení chlortoluronu v půdě metodou LC s UV detekcí se ukázalo jako dnes již zastaralé vzhledem k malé citlivosti metody [28]. Výrazně lepší je stanovení pesticidů metodou RP-HPLC s UV detekcí, které již poskytuje lepší výsledky [29].

Analýza chlortoluronu a jeho metabolitů v obilninách metodou GC-NPD se ukázala jako vhodná metoda stanovení vzhledem k dostatečné reprodukovatelnosti a citlivosti [30]. Jiné stanovení probíhalo ve vzorcích rýže a kukuřice, kde se stanovovalo

15 herbicidů včetně chlortoluronu pomocí HPLC s fluorescenční detekcí. Tato metoda je ještě citlivější než předchozí stanovení [14].

Nejspíše nejdůležitější prací vzhledem k souvislostem a porovnávání výsledků, je diplomová práce, která se zabývá stanovením chlortoluronu pomocí metod diferenční pulsní voltametrie (DPV) a HPLC s elektrochemickou a spektrofotometrickou detekcí (HPLC-ED, HPLC-UV). Jako pracovní elektroda byla použita uhlíková pastová elektroda (CPE) a miniaturizovaná pastová elektroda (mCPE). Chlortoluron byl analyzován ve dvou maticích a těmi jsou vzorky půdy a vody [31].

Velmi dobrou metodou analýzy pesticidů pitné a povrchové vody je použití HPLC s následnou detekcí pomocí detektoru diodového pole (DAD). Touto metodou lze stanovovat i stopové koncentrace [32]. Meze detekce všech zmíněných metod jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Meze detekce metod využitých ke stanovení chlortoluronu

Metoda stanovení	Mez detekce	Jednotky	Matrice	Literatura
HPLC, fluor. det.	0,003	$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	rýže, kukuřice	[14]
LC-UV	0,1	$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	půda	[28]
RP HPLC-UV	0,012	$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	půda	[29]
GC-NPD, GC-ITD	0,1	$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	obilniny	[30]
HPLC-ED	$3,3 \cdot 10^{-8}$	$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	voda	[31]
HPLC-UV	$1,1 \cdot 10^{-8}$	$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	voda	[31]
CPE	$3,7 \cdot 10^{-7}$	$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	voda	[31]
mCPE	$8,7 \cdot 10^{-8}$	$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	voda	[31]
HPLC-DAD/PPD	$4,7 \cdot 10^{-8}$	$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	voda	[32]

2.5 Uhlíková plst'

Uhlíková plst' (CF) je materiál, který je složený z různě propletených mikrouhlíkových vláken o různých průměrech okolo 10 μm [33] [34]. Uhlíková plst' se běžně využívá jako elektroda ve vanadiových redoxních bateriích pro skladování velkého množství energie nebo v palivových článcích [35] [33]. V analytické chemii se CF elektroda dá použít v coulometrii, potenciometrii či v anodické stripping voltametrii [36].

Velkou výhodou CF je nízká pořizovací cena, uhlíkovou plst' lze poměrně snadno upravovat do požadovaných tvarů a má velký specifický povrch [37]. Další výhodou je také vysoká chemická a mechanická stabilita [38]. Díky vysoké vodivosti a velké účinné ploše je velmi elektrolytický účinná. Vzhledem k velké porézności má CF malou difuzní bariéru toku roztoku a lze ji tedy použít jako pracovní elektrodu při průtokových měřeních [34].

CF má vzhledem ke své porozitě jednu nevýhodu a to je nízká smáčivost, která způsobuje zachytávání bublinek vzduchu uvnitř plsti [37]. Jednou z variant, jak se tomu při práci vyhnout, je ponořit na před měřením uhlíkovou plst' do rozpouštědla, které má vyšší smáčivost a je mísitelné s vodou, jako například methanol či aceton [33] [38].

Co se týče analytických aplikací, byla uhlíková plst' využita v bakalářské práci při stanovení syntetických antioxidantů [39] a při stanovení kyseliny indol-3-octové a kyseliny indol-3-máselné [40]. Uhlíková plst' byla také použita při stanovení peroxidu vodíku při průtokové amperometrii, kdy byl 2,6-dichlorfenolindol společně s křenovou peroxidázou adsorbován na povrch plsti. Toto uspořádání vykazovalo velmi dobrou bioelektrickou aktivitu pro následnou redukci peroxidu vodíku. Ukázalo se, že tato metoda je vysoce selektivní, citlivá a nepřilíš finančně nákladná [34].

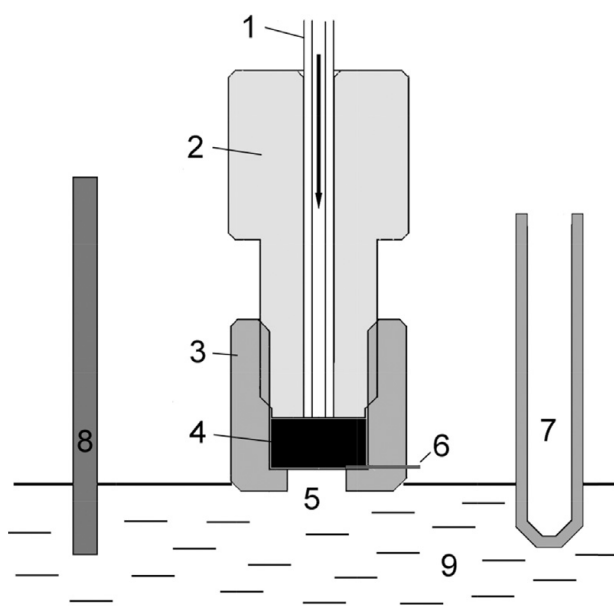
3 Experimentální část

3.1 Použitá aparatura a přístroje

Pro HPLC měření byla použita vysokotlaká pumpa HPP 5001 (Laboratorní přístroje, Praha). Separace byla prováděna na koloně Purospher RP-18 5 μm LiChroCART® 125-4 mm s předkolonou Purospher RP-18 5 μm LiChroCART 4-4 mm (Merck, Německo). Pro dávkování analytu na kolonu byl použit dávkovací ventil o objemu 20 μl (Sample injector D, Ecom, ČR). K detekci byly použity dva detektory. První byl UV/Vis detektor Sapphire (Ecom, ČR) a druhým byl elektrochemický detektor ADLC 2 (Laboratorní přístroje, Praha) v tříelektrodovém zapojení. Pracovní elektrodou byla elektroda z uhlíkové plsti, jako referentní elektroda byla použita argentchloridová elektroda (3 M KCl) a pomocná byla platinová elektroda.

3.2 Konstrukce pracovní elektrody

Pracovní elektroda se skládala z ferule, čepičky a přívodní kapiláry. Do čepičky byl vyvrtán otvor, kterým odtékala mobilní fáze. Jako náplň byla použita uhlíková plst' (Karbotechnik, Česká republika), která byla vtlačena do čepičky a zašroubováním ferule stlačena. Tímto bylo zajištěno po ponoření elektrody do mobilní fáze přímé spojení s povrchem uhlíkové plsti. Vodivé spojení bylo zajištěno platinovým drátkem, který byl přichycen na čepičce. V přepadové nádobce s mobilní fází byla kromě pracovní elektrody také referentní argentchloridová elektroda a pomocná platinová elektroda. Schéma elektrody je zobrazeno na obr. 1,



Obrázek 1: Schéma uhlíkové plst'ové elektrody 1: vstup, 2: šroub s ferulí, 3: čepička, 4: uhlíková plst', 5: výstup, 6: platinový drátek, 7: referenční elektroda, 8: pomocná elektroda, 9: mobilní fáze, převzato a upraveno z [41].

3.3 Další použité vybavení

pH metr: digitální měřicí přístroj Conductivity and pH meter 3510 (Jenway, UK)
s kombinovanou skleněnou elektrodou

Magnetická míchačka: Magnetic Stirrer (VELP Scientifica, Europe)

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

Ultrazvuková čistička: PS 02000A (Powersonic, USA)

Analytické váhy: Sartorius 2004 MP (Sartalex, ČR)

Nylonové stříkačkové filtry: 0,45 μm , průměr 13 mm (Fisher Scientific)

3.4 Příprava roztoků

3.4.1 Příprava zásobního roztoku chlortoluronu

Byl připraven zásobní roztok chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rozpuštěním 0,0053 g chlortoluronu (analytický standard o čistotě 99,7 %, Sigma-Aldrich, Německo)

v 25 ml methanolu. K měření se používaly roztoky o nižší koncentraci, získané ředěním vyrobeného zásobního roztoku.

3.4.2 Příprava fosfáto–acetátového pufru

Fosfáto-acetátový pufr byl připraven smísením kyseliny fosforečné (85% p.a., $\rho=1,70 \text{ g cm}^{-3}$, Lach- Ner, Česká republika) a octové kyseliny (99% p.a., $\rho=1,05 \text{ g cm}^{-3}$, Lach-Ner, Česká republika) na požadovanou koncentraci $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ doplněním na výsledný objem deionizovanou vodou.

Alkalická složka pufru o koncentraci $0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ byla připravena odměřením potřebného množství NaOH (8 M, Fluka Analytica, Německo) a doplněním destilovanou vodou na výsledný objem.

Pufr byl připraven dotitrováním kyselé složky alkalickou složkou na požadované pH.

3.4.3 Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze byla připravena smísením fosfáto–acetátového pufru s methanolem (Chromasolv™ Gradient for HPLC, gradient grade, $\geq 99,9 \%$, Honeywell) v poměru 40/60 (V/V).

3.5 Optimalizace metody

Pro optimalizaci separačních podmínek byla použita spektrofotometrická UV detekce při vlnové délce 243 nm a elektrochemická detekce. Separace probíhala v prostředí mobilní fáze: methanol v poměru 60:40 %. Pro identifikaci píku byl použit roztok chlortoluronu o koncentraci $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Při hledání optimálních podmínek byly proměřovány různé hodnoty pH, konkrétně 3, 4, 5, 6, 7, v závislosti na vkládaném potenciálu pracovní elektrody v rozsahu 500 – 1800 mV.

Opakovatelnost měření byla sledována při optimálních podmínkách separace. Měření bylo provedeno celkem 20krát.

3.6 Kalibrační závislost

Pomocí elektrochemické detekce byla proměřována kalibrační závislost při optimálních podmínkách separace. Pro měření byl použit zásobní roztok chlortoluronu o koncentracích $1 \cdot 10^4$ – $7,5 \cdot 10^{-9}$ mol·dm⁻³ vyrobený ředěním zásobního roztoku.

3.7 Zpracování modelových vzorků

3.7.1 Voda

Vzorek povrchové vody byl nabrán v Rakovském potoku v Rokycanech (N 49°44.10803', E 13°35.24863', 20.1 2019). Byly připraveny roztoky chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³– $1 \cdot 10^{-9}$ mol·dm⁻³. Roztoky byly připravovány použitím zásobního roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol·dm⁻³ smísením s povrchovou vodou na výsledný objem 10 ml. Jako blank byla použita pouze voda z Rakovského potoka. Takto připravené vzorky byly dávkovány na chromatografickou kolonu přes injekční filtr (0,45 µm, průměr 13 mm, Fisher Scientific).

3.7.2 Půda

Vzorek půdy byl nabrán na zahradě v Rokycanech (N 49°44.02165', E 13°35.10840', 20.1 2019). Půda byla vysušena, přesáta přes síto o velikosti ok 0,12 mm a následně byla zhomogenizována v třecí misce s tloučkem. Na takto připravenou půdu bylo následně dávkováno vždy 0,5 ml roztoku chlortoluronu v methanolu, který byl připraven ředěním zásobního roztoku tak, aby se koncentrace v 1 g půdy pohybovala v rozmezí 100–0,2 µg·g⁻¹. Z takto připravených vzorků, které byly ponechány v temnu při pokojové teplotě, se přes noc methanol vypařil. Poté byl chlortoluron extrahován z půdy pomocí 1 ml methanolu. Při extrakci byla pro dokonalé smísení použita třepačka a následně ultrazvuková čistička. Slepý vzorek byl připraven nadávkováním pouze 0,5 ml methanolu na půdu. Takto připravené vzorky byly nadávkované na chromatografickou kolonu přes injekční filtr [31].

3.8 Statistické zpracování

Každá hodnota byla proměřována třikrát a následně byl použit medián těchto hodnot.

Po změření celého koncentračního rozsahu byly vytvořeny kalibrační přímky, které obsahovaly vždy jeden řád, a pomocí metody lineární regrese byly sledovány hodnoty směrníc, úseků, korelačních koeficientů a LOD a LOQ.

Opakovatelnost se proměřovala celkem dvacetkrát a následně se z hodnot vypočítala směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Optimalizace podmínek pro separaci a následnou detekci

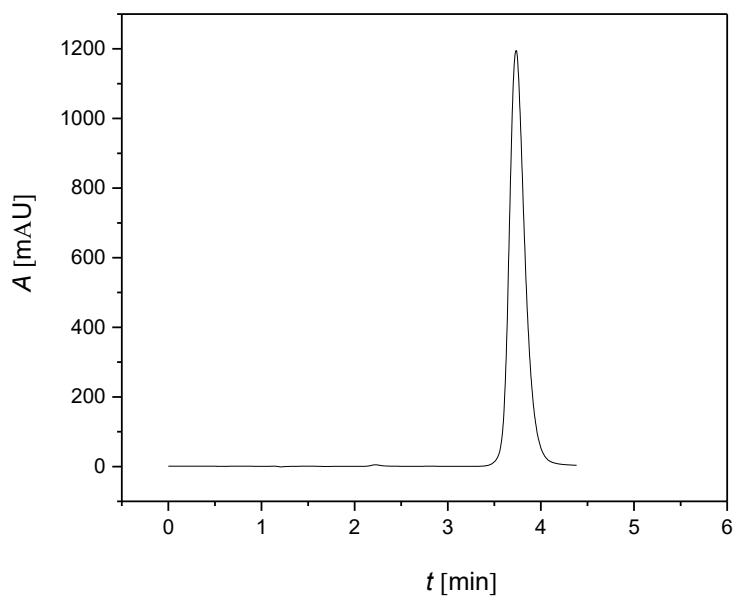
Pro stanovení chlortoluronu HPLC s UV a ED detekcí bylo důležité nejprve nalézt vhodné experimentální podmínky. Při optimalizaci byl použit roztok chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Jako mobilní fáze byl použit methanol a fosfát-acetátový pufr v poměru 60:40 (V/V). Byly proměřovány hodnoty pH 3, 4, 5, 6 a 7. Pro UV detekci byla zvolena vlnová délka 243 nm, jelikož je při ní UV záření chlortoluronem velmi silně absorbováno [31]. Pro ED stanovení byly proměřeny potenciály v rozsahu 500 mV až 1800 mV při každé hodnotě pH. Sledovanými parametry byly retenční čas, kde byla sledovaná dostatečná retence analytu, a výška píku a odezva pozadí, kde byly hledány takové experimentální podmínky, kdy bude odezva detektoru co nejvyšší, přičemž odezva pozadí ještě nebude příliš vysoká.

Chromatogramy získané s pomocí UV a ED detekce při optimálních podmínkách jsou zobrazeny na obr. 2 a 3.

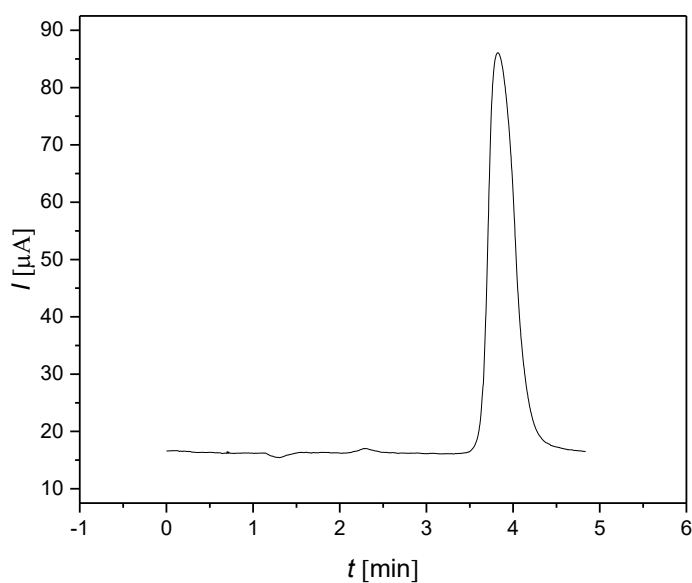
Retenční čas se při proměření různých pH výrazně nemění. Z hydrodynamických voltamogramů (obr. 4-8) se dá při zvyšujících hodnotách pH vysledovat, že elektrochemický potenciál se snižuje. Zatímco při hodnotě pH 3 se první odezva detektoru objevuje při potenciálu 900 mV, tak při hodnotě pH 7 se první odezva objevuje již při potenciálu 700 mV. Výška píku se při proměření různých hodnot pH výrazně nemění.

Po vyhodnocení hydrodynamických voltamogramů bylo jako optimální prostředí zvoleno pH 4. Potenciál, který byl vkládán na pracovní elektrodu, byl 1400 mV. Je to hodnota potenciálu, při které ještě nebyl nárůst pozadí příliš výrazný.

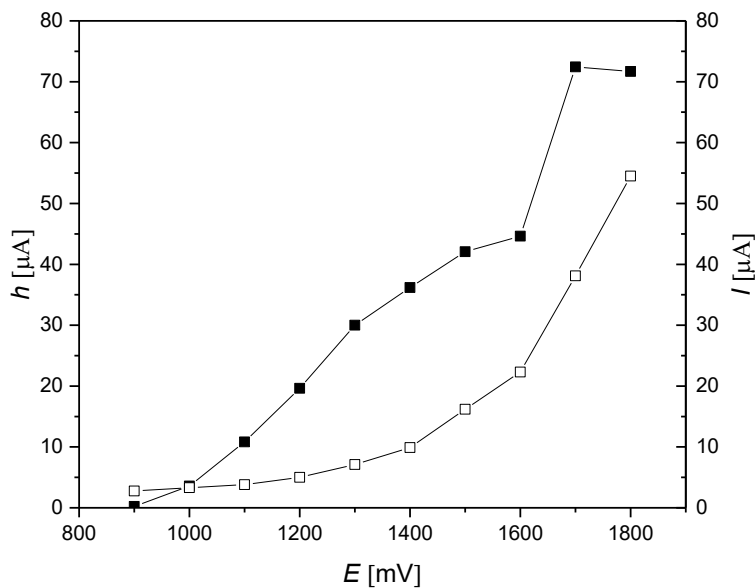
Veškerá další měření probíhala při těchto podmínkách.



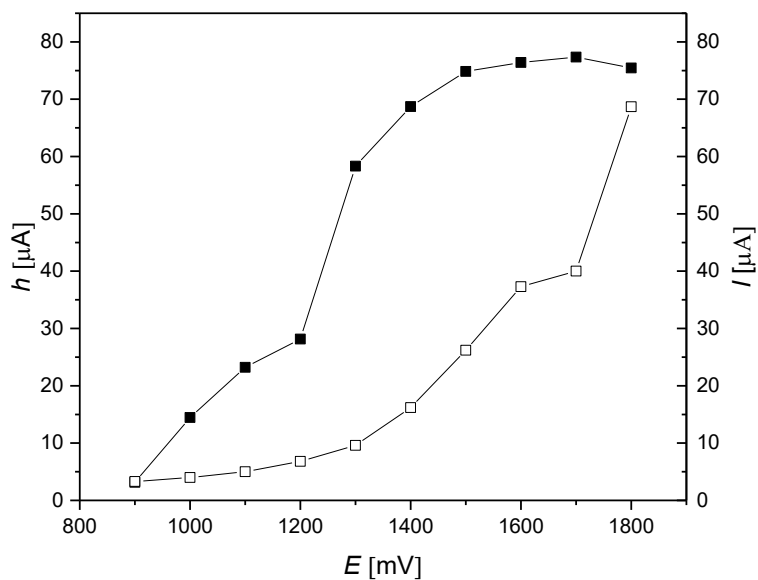
Obrázek 2: Chromatogram chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ při optimálních podmínkách měření v prostředí MF methanol a pufr 60:40 (V/V), pH 4, měřeno metodou HPLC-UV při $\lambda = 243 \text{ nm}$.



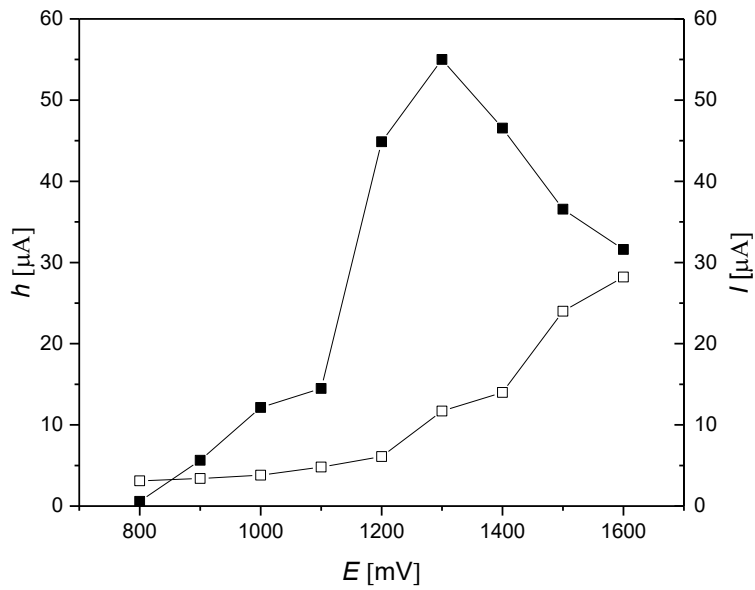
Obrázek 3: Chromatogram chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ při optimálních podmínkách měření v prostředí MF methanol a pufr 60:40 (V/V), pH 4, měřeno metodou HPLC - ED, elektroda CF.



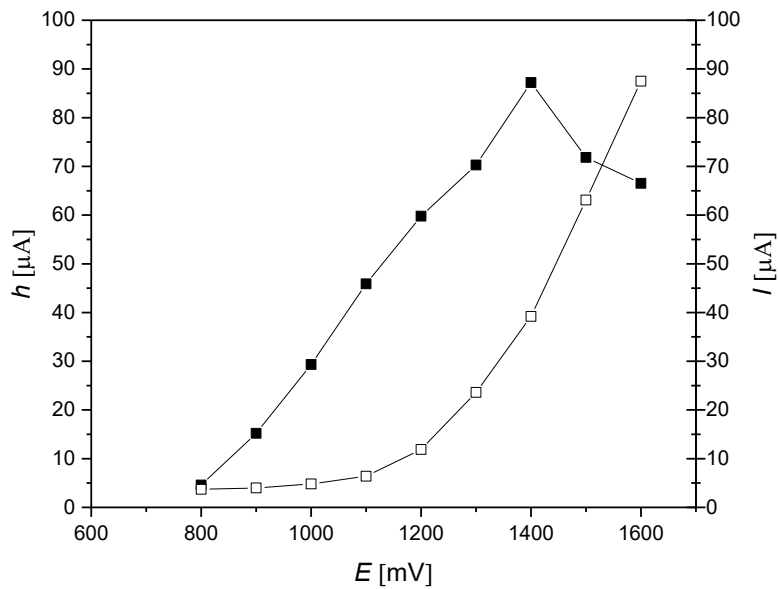
Obrázek 4: Hydrodynamický voltamogram roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí methanolu a pufru 60:40 (V/V). Měřeno metodou HPLC-ED na CF, pH 3 (■). Proud pozadí (□).



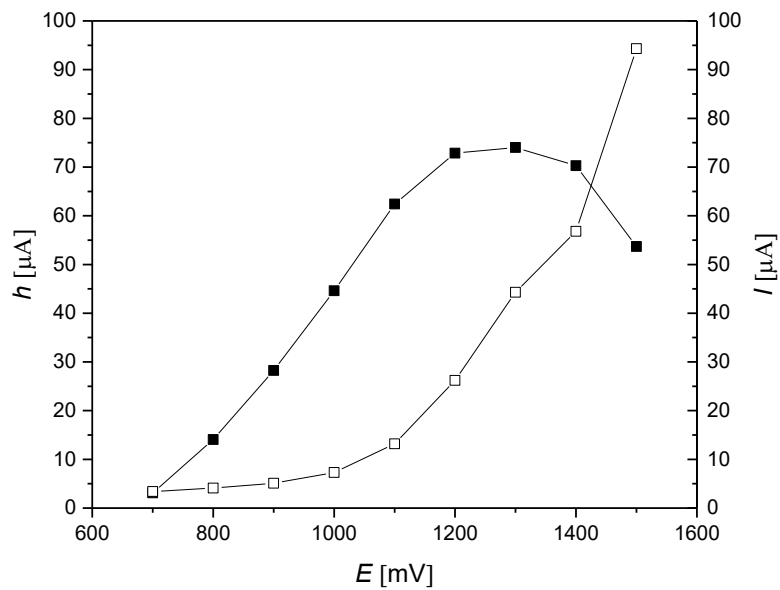
Obrázek 5: Hydrodynamický voltamogram roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí methanolu a pufru 60:40 (V/V). Měřeno metodou HPLC-ED na CF, pH 4 (■). Proud pozadí (□).



Obrázek 6: Hydrodynamický voltamogram roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí methanolu a pufru 60:40 (V/V). Měřeno metodou HPLC-ED na CF, pH 5 (■). Proud pozadí (□).



Obrázek 7: Hydrodynamický voltamogram roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí methanolu a pufru 60:40 (V/V). Měřeno metodou HPLC-ED na CF, pH 6 (■). Proud pozadí (□).



Obrázek 8: Hydrodynamický voltamogram roztoku chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí methanolu a pufru 60:40 (V/V). Měřeno metodou HPLC-ED na CF, pH 7 (■). Proud pozadí (□).

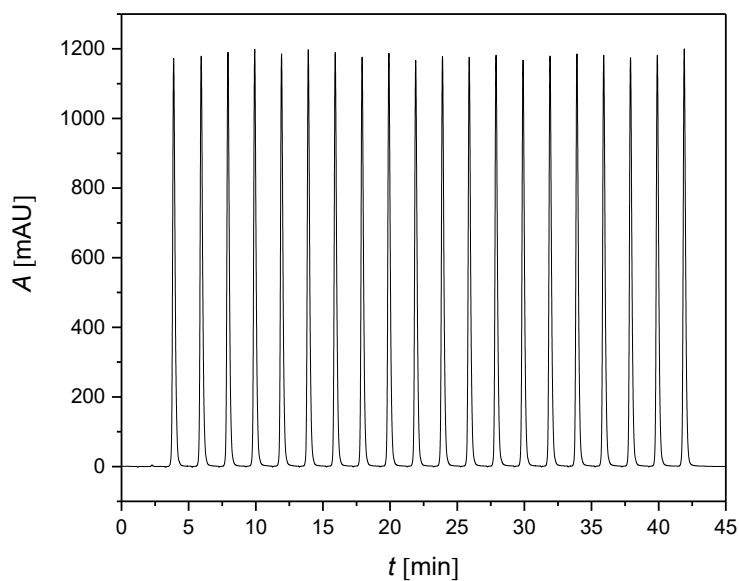
4.2 Opakovatelnost měření

Pro ověření, zda nedochází k pasivaci elektrody a jak často je zapotřebí čistit povrch elektrody při stanovení chlortoluronu, bylo provedeno dvacet měření bez obnovy elektrodového povrchu CF. K měření byl použit roztok chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

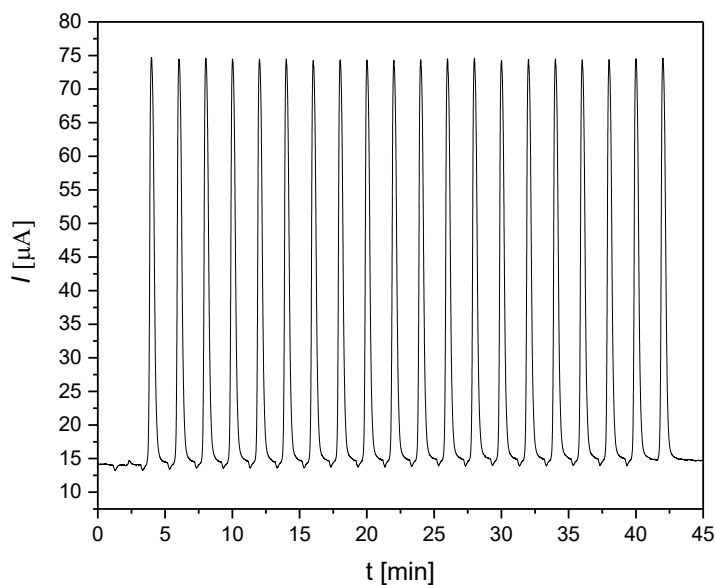
Při použití UV detekce byla výška píku 1180 mAU s relativní směrodatnou odchylkou 0,81 % (obr. 9). Při použití elektrochemické detekce byla výška píku stanovena na 60,7 μA s relativní směrodatnou odchylkou 0,50 % (obr. 10). Statistické vyhodnocení opakovatelnosti měření je uvedeno v tabulce 2. Z vyhodnocených dat vyplývá, že nedochází k zanášení elektrodového povrchu a obnova povrchu není nutná, pro měření byla tedy používána pouze jedna elektrodová náplň.

Tabulka 2: Statistické vyhodnocení opakovatelnosti měření chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí MF methanolu a pufru 60:40 (V/V) o pH 4 metodou HPLC-UV při $\lambda = 243 \text{ nm}$ a HPLC-ED při potenciálu z uhlíkové plsti při 1400mV.

	UV detektor [mAU]	ED detektor [μA]
Výška píku	1180	60,7
s	9,53	0,30
s_r [%]	0,81	0,50



Obrázek 9: Chromatogram dvaceti po sobě následujících měření chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, metodou HPLC-UV, $\lambda = 243 \text{ nm}$, v prostředí methanol a pufr 60:40 (V/V), pH 4.



Obrázek 10: Chromatogram dvaceti po sobě následujících měření chlortoluronu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ bez obnovy elektrodového povrchu metodou HPLC-ED při potenciálu pracovní elektrody z uhlíkové plsti při 1400 mV, v prostředí MF methanol a pufr 60:40 (V/V), pH 4.

4.3 Kalibrace – stanovení chlortoluronu v deionizované vodě

Po určení parametrů metody při stanovení chlortoluronu metodou HPLC s UV a ED detekcí byly proměřeny koncentrační závislosti v rozmezí $1 \cdot 10^{-4}$ až $7,5 \cdot 10^{-9}$ mol·dm⁻³.

Grafy závislostí jsou uvedeny na obr. 11 a obr. 12. Z naměřených dat je vidět, že pro UV detekci je kalibrační závislost lineární. To vyplývá i z tab. 3, kde je patrné, že směrnice se v jednotlivých koncentračních řádech příliš neliší. Hodnota korelačního koeficientu je vysoká a mírně se snižuje pouze v koncentračním rozmezí od $1 \cdot 10^{-7}$ mol·dm⁻³ do $9,5 \cdot 10^{-7}$ mol·dm⁻³, ale stále je tato hodnota vysoká. Meze detekce a stanovitelnosti jsou uvedeny v tab. 3.

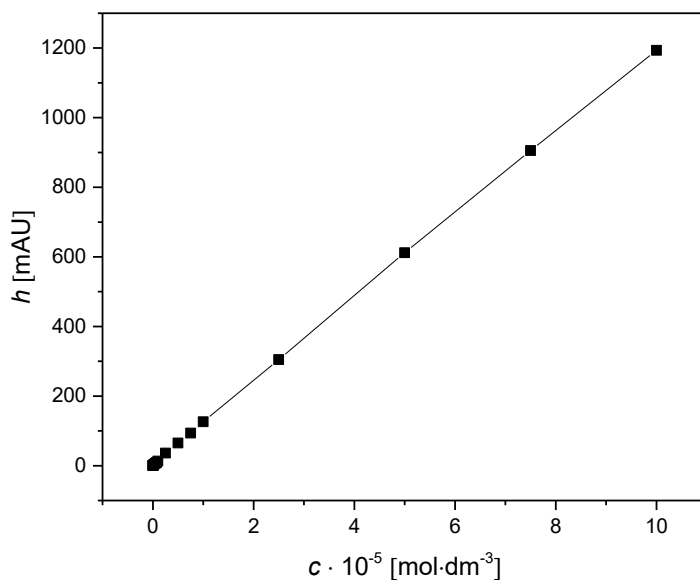
U ED detekce si lze všimnout, že křivka má zejména při vyšších koncentracích nelineární tvar a linearity dosahuje až při nižších koncentracích. V prvním řádku tabulky 4 je uvedena koncentrační závislost v celé měřené oblasti. Řádek druhý obsahuje první měřený koncentrační řád. Křivka není lineární při koncentracích přesahujících $1 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³. V rozsahu koncentrací $1 \cdot 10^{-5}$ - $2,5 \cdot 10^{-7}$ mol·dm⁻³ ji lze za lineární považovat. To je patrné i z tab. 4 a grafů obr. 13 a obr. 14. Korelační koeficient je v lineární oblasti opět velmi vysoký. Meze detekce a stanovitelnosti jsou uvedeny v tab.4.

Tabulka 3: Parametry kalibračních přímek stanovení chlortoluronu metodou HPLC-UV při $\lambda = 243$ nm v prostředí methanolu a pufru 60:40 (V/V), pH 4

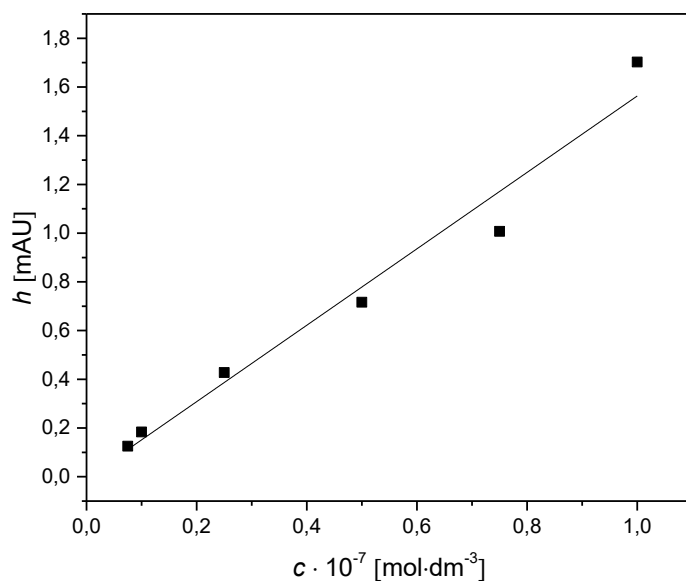
Koncentrační rozsah [mol·dm ⁻³]	Směrnice [kAU·mol ⁻¹ ·dm ³]	Úsek [mAU]	Korelační koeficient	LOD [mol·dm ⁻³]	LOQ [mol·dm ⁻³]
$1 \cdot 10^{-4} - 7,5 \cdot 10^{-9}$	12,0	2,37	0,999	-	-
$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-5}$	11,8	10,4	0,999	-	-
$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-6}$	12,3	2,91	0,998	-	-
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-7}$	12,2	0,745	0,994	-	-
$1 \cdot 10^{-7} - 7,5 \cdot 10^{-9}$	15,7	0,006	0,970	$4,42 \cdot 10^{-9}$	$1,47 \cdot 10^{-8}$

Tabulka 4: Parametry kalibračních přímek stanovení chlortoluronu metodou HPLC-ED v prostředí methanolu a pufru 60:40 (V/V), pH 4, při potenciálu elektrody z uhlíkové plsti $E=1400\text{ mV}$

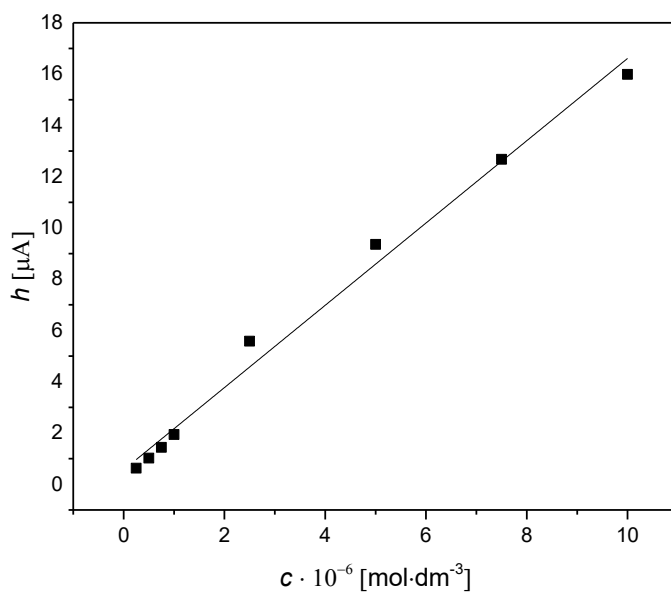
Koncentrační rozsah [mol·dm ⁻³]	Směrnice [A·mol ⁻¹ dm ⁻³]	Úsek [μA]	Korelační koeficient	LOD [mol·dm ⁻³]	LOQ [mol·dm ⁻³]
$1 \cdot 10^{-4} - 2,5 \cdot 10^{-7}$	0,70	4,72	0,936	-	-
$1,0 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-5}$	0,52	16,8	0,918	-	-
$1 \cdot 10^{-5} - 2,5 \cdot 10^{-7}$	1,61	0,563	0,990	-	-
$1,0 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-6}$	1,52	1,22	0,988	-	-
$1,0 \cdot 10^{-6} - 2,5 \cdot 10^{-7}$	1,74	0,172	0,998	$1,26 \cdot 10^{-7}$	$4,20 \cdot 10^{-7}$



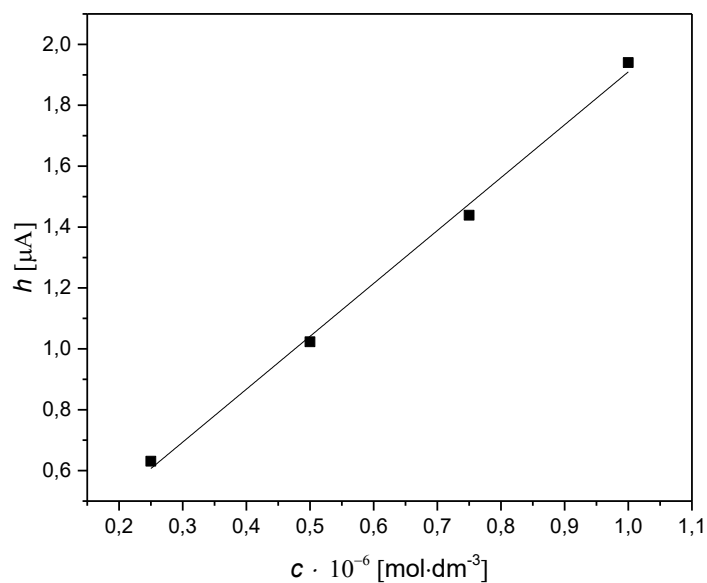
Obrázek 11: Závislost výšky píku na koncentraci chlortoluronu v rozmezí $1 \cdot 10^{-4} - 7,5 \cdot 10^{-9}$ mol·dm⁻³, měřeno metodou HPLC-UV při $\lambda = 243\text{ nm}$ v prostředí methanolu a pufru 60:40 (V/V), pH 4.



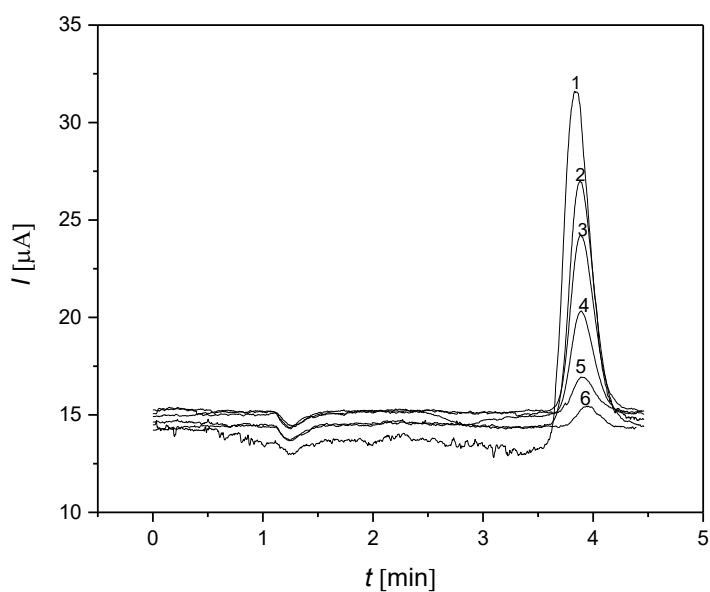
Obrázek 12: Závislost výšky píku na koncentraci chlortoluronu v rozmezí $1 \cdot 10^{-7} - 7,5 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, měřeno metodou HPLC-UV při $\lambda = 243 \text{ nm}$ v prostředí methanolu a pufru 60:40 (V/V), pH 4.



Obrázek 13: Závislost výšky píku na koncentraci chlortoluronu v rozmezí $1 \cdot 10^{-5} - 2,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, měřeno metodou HPLC-ED v prostředí methanolu a pufru 60:40 (V/V), pH 4, při potenciálu pracovní elektrody z uhlíkové plsti $E = 1400 \text{ mV}$.



Obrázek 14: Závislost výšky piku na koncentraci chlortoluronu v rozmezí $1 \cdot 10^{-6}$ – $2,5 \cdot 10^{-7}$ měřeno metodou HPLC-ED v prostředí methanolu a pufru 60:40 (V/V), pH 4, při potenciálu pracovní elektrody z uhlíkové plsti $E = 1400 \text{ mV}$.



Obrázek 15: Chromatogram kalibrace, koncentrace chlortoluronu $1 \cdot 10^{-5}$ (1), $7,5 \cdot 10^{-6}$ (2), $5 \cdot 10^{-6}$ (3), $2,5 \cdot 10^{-6}$ (4), $1 \cdot 10^{-6}$ (5), blank (6), měření v prostředí MF methanol a pufru 60:40 (V/V), pH 4, měřeno metodou HPLC-ED, elektroda CF.

4.4 Stanovení chlortoluronu v modelových vzorcích

4.4.1 Voda

Pro ověření aplikovatelnosti vyvinuté metody na stanovení v reálných matricích byla změřena koncentrační závislost ve vzorcích povrchové vody spikovaných chlortoluronem na koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ až $7,5 \cdot 10^{-9}$ mol·dm⁻³. Roztok byl připraven doplněním potřebného objemu zásobního roztoku o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol·dm⁻³ vodou z Rakovského potoka.

Z naměřených dat vyplývá, že pro UV detekci je závislost lineární. To vyplývá i z tab. 5, kde je patrné, že hodnoty směrnic ani korelačních koeficientů se navzájem příliš neliší a hodnoty úseků jsou po porovnání s kritickou hodnotou odlišné. Grafy závislostí jsou uvedeny na obr. 15 a obr. 16. Mez detekce a stanovitelnosti je uvedena v tab. 5.

U ED detekce si lze všimnout, že křivka má při vyšších koncentracích nelineární průběh a v rozmezí koncentrací od $1 \cdot 10^{-4}$ do $1 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³ vůbec nemá smysl ji prokládat lineární funkcí. Linearity dosahuje až při nižších koncentracích $1 \cdot 10^{-5}$ - $2,5 \cdot 10^{-7}$ mol·dm⁻³. To je patrné z tab. 6. Grafy závislostí jsou uvedeny na obr. 17 a obr. 18. Mez detekce a stanovitelnosti je uvedena v tab. 6.

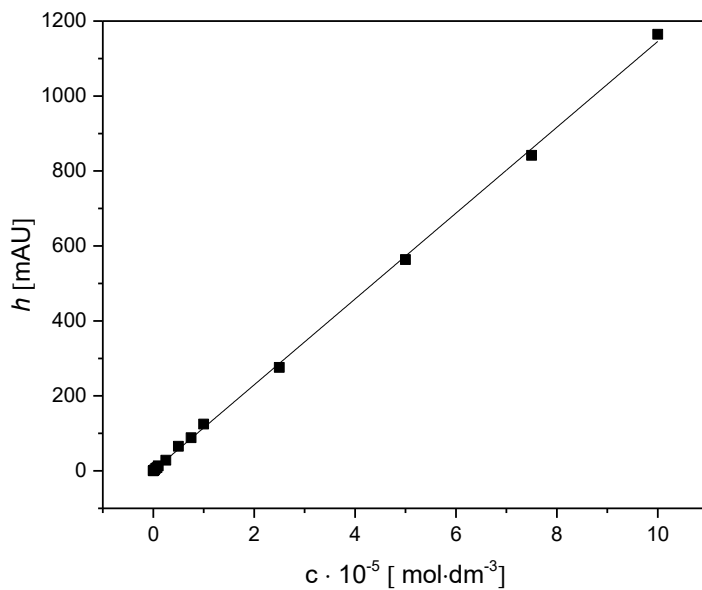
Lze si povšimnout, že hodnoty uvedené v tab. 5 a tab. 6 se příliš neliší od hodnot naměřených u kalibrace v deionizované vodě (tab. 3 a tab 4). Rovněž linearita u UV detekce a nelineární průběh zejména ve vyšších koncentracích u ED detekce má stejnou tendenci jako u kalibrace. Z tohoto výsledku lze usoudit, že matrice významně neovlivňuje měření.

Tabulka 5: Parametry kalibračních přímek stanovení chlortoluronu metodou HPLC-UV v říční vodě při $\lambda=243$ nm v prostředí methanolu a pufru 60:40 (V/V). pH 4.

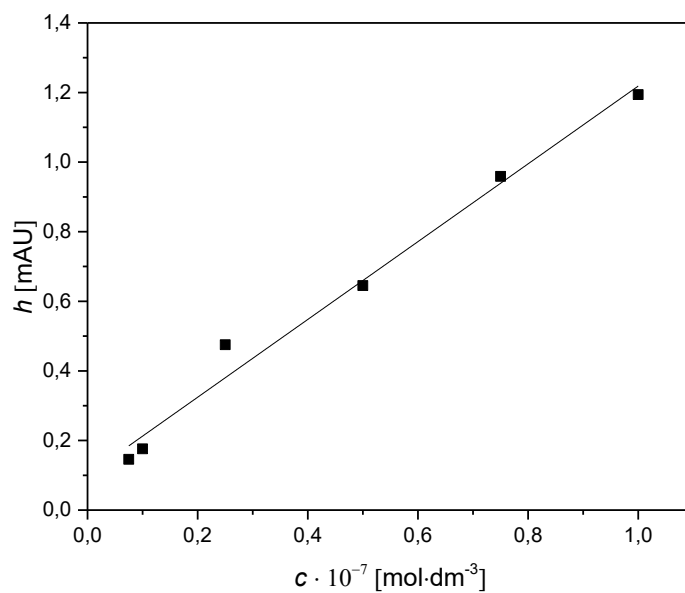
Koncentrační rozsah [mol·dm ⁻³]	Směrnice [kAU·mol ⁻¹ ·dm ³]	Úsek [mAU]	Korelační koeficient	LOD [mol·dm ⁻³]	LOQ [mol·dm ⁻³]
$1 \cdot 10^{-4} - 7,5 \cdot 10^{-9}$	11,4	0,380	0,999	-	-
$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-5}$	11,5	-5,32	0,999	-	-
$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-6}$	12,3	-0,047	0,995	-	-
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-7}$	13,1	-0,303	0,982	-	-
$1 \cdot 10^{-7} - 7,5 \cdot 10^{-9}$	11,2	0,100	0,985	$7,76 \cdot 10^{-9}$	$2,59 \cdot 10^{-8}$

Tabulka 6: Parametry kalibračních přímek stanovení chlortoluronu metodou HPLC-ED v říční vodě v prostředí methanolu a pufru 60:40 (V/V), pH 4, E=1400 mV

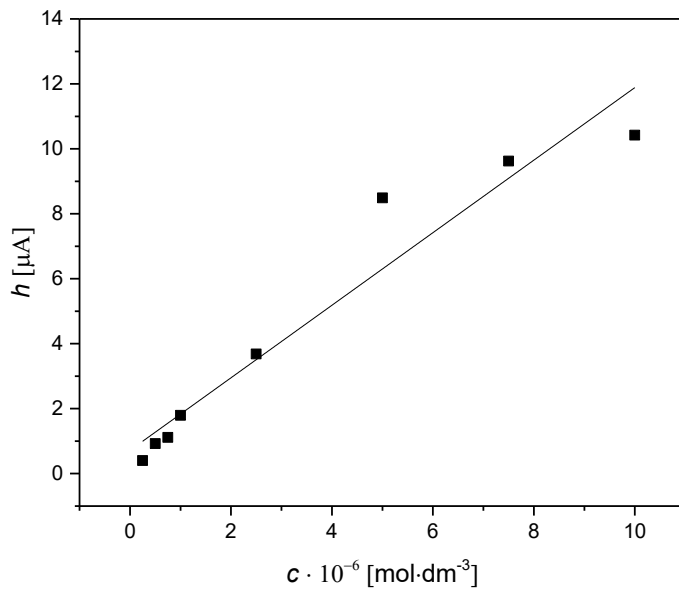
Koncentrační rozsah [mol·dm ⁻³]	Směrnice [A·mol ⁻¹ ·dm ⁻³]	Úsek [μA]	Korelační koeficient	LOD [mol·dm ⁻³]	LOQ [mol·dm ⁻³]
$1 \cdot 10^{-4} - 2,5 \cdot 10^{-7}$	0,72	1,11	0,937	-	-
$1,0 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-5}$	0,025	10,7	0,773	-	-
$1 \cdot 10^{-5} - 2,5 \cdot 10^{-7}$	1,12	0,716	0,937	-	-
$1,0 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-6}$	0,994	1,63	0,897	-	-
$1,0 \cdot 10^{-6} - 2,5 \cdot 10^{-7}$	1,75	-0,036	0,998	$1,71 \cdot 10^{-7}$	$5,71 \cdot 10^{-7}$



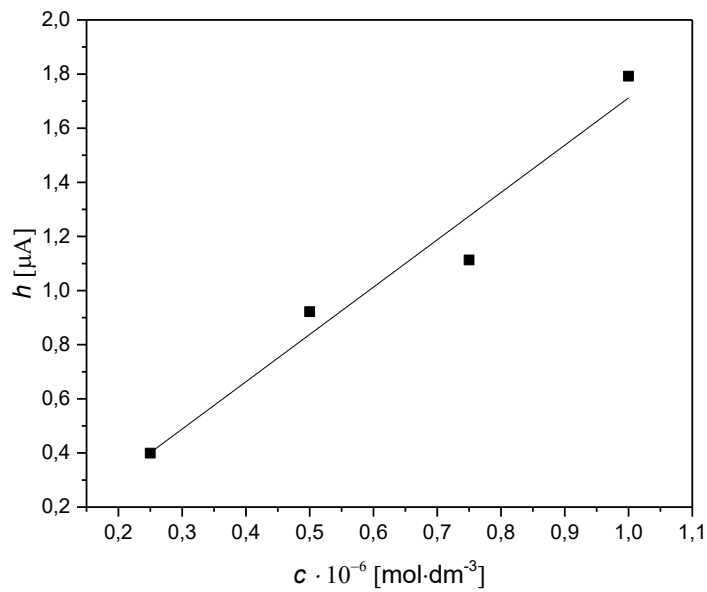
Obrázek 16: Závislost výšky piku na koncentraci chlortoluronu v říční vodě v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-4}$ – $7,5 \cdot 10^{-9}$ mol·dm⁻³ metodou HPLC-UV při $\lambda=243$ nm. v prostředí methanolu a pufru 60:40 (V/V), pH 4.



Obrázek 17: Závislost výšky piku na koncentraci chlortoluronu v říční vodě v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-7}$ – $7,5 \cdot 10^{-9}$ měřeno metodou HPLC-UV při $\lambda = 243$ nm v prostředí methanolu a pufru 60:40 (V/V), pH 4.



Obrázek 18: Závislost výšky píku na koncentraci chlortoluronu v říční vodě v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-5}$ – $7,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ metodou HPLC-ED pomocí CF, měřeno při potenciálu pracovní elektrody 1400 mV, pH 4.



Obrázek 19 Závislost výšky píku na koncentraci chlortoluronu v říční vodě v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-6}$ – $2,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ metodou HPLC-ED pomocí CF, měřeno při potenciálu pracovní elektrody 1400 mV, pH 4.

4.4.2 Půda

Druhá matrice, v níž bylo stanovení ověřováno, byl modelový vzorek půdy. Opět bylo pracováno metodou HPLC s UV a ED detekcí. Způsob přípravy vzorků je uveden v kapitole 3.7.2. Vzorky byly připravovány o koncentracích 0,2- 100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Výtěžnost extrakce byla vypočtena porovnáním koncentrací získaných dosažením do kalibrační přímky v čistých rozpouštědlech a teoreticky očekávaných koncentrací. Výtěžnost je velmi vysoká a pohybuje se v rozmezí 96-99 %.

UV detekce je opět lineární v celém koncentračním rozmezí, to vyplývá i z tab. 7 a grafů závislostí na obr. 19 a obr. 20, kde si lze všimnout, že směrnice a korelační koeficienty se číselně příliš neodlišují.

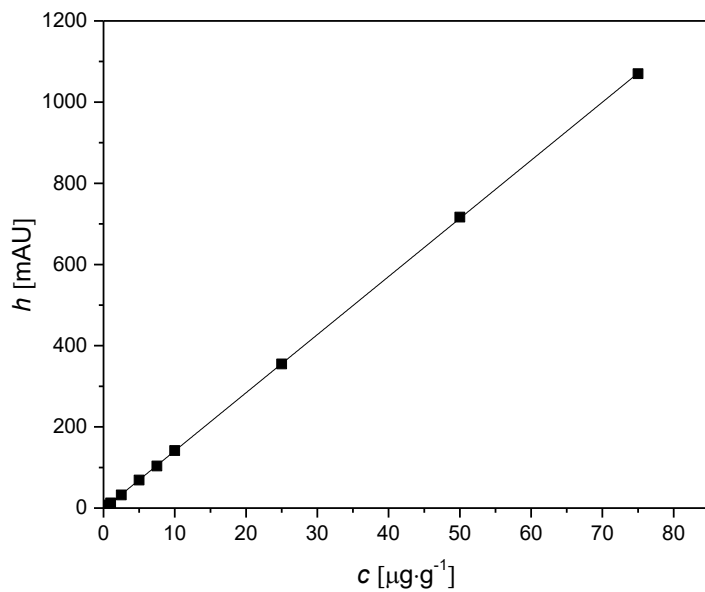
U ED detekce lze opět pozorovat stejně tendence jako v přechozích případech. Naměřená křivka je u vyšších koncentrací nelineárního průběhu, zejména v koncentračním rozmezí 75-10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. U nižších koncentrací lze tuto tendenci pozorovat stále méně a křivka se postupně stává lineární, viz tab. 8 a obr. 21 a obr. 22.

Tabulka 7: Parametry kalibračních přímek stanovení chlortoluronu metodou HPLC-UV v půdě $\lambda=243\text{ nm}$ v prostředí MF methanolu a pufru 60:40 (V/V), pH 4

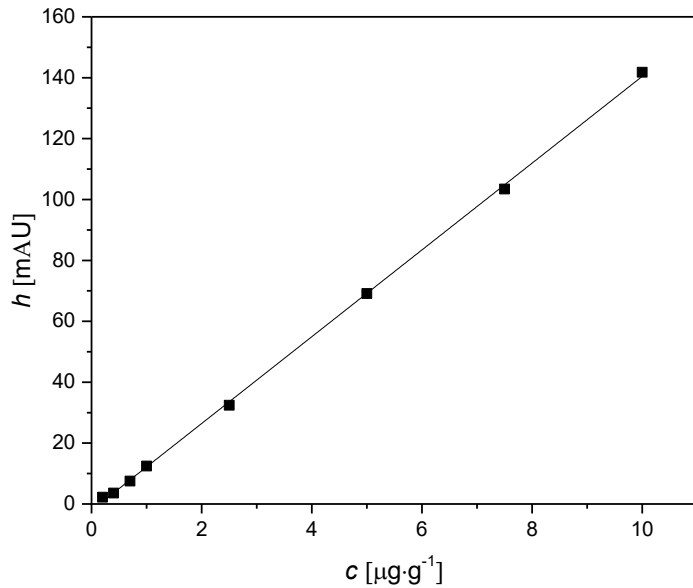
Koncentrační rozsah [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	Směrnice [$\text{mAU}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{g}$]	Úsek [mAU]	Korelační koeficient	LOD [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	LOQ [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]
75 – 0,1	14,314	-2,211	0,999	-	-
10 – 0,2	14,252	-2,065	0,999	0,198	0,660

Tabulka 8: Parametry kalibračních přímek stanovení chlortoluronu metodou HPLC-ED v říční vodě pomocí CF při potenciálu pracovní elektroda $E = 1400\text{ mV}$ v prostředí MF methanolu a pufru 60:40 (V/V), pH 4.

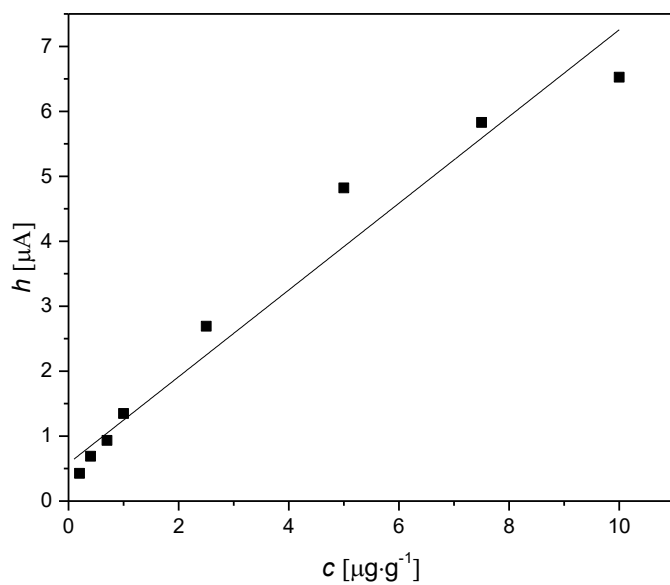
Koncentrační rozsah [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	Směrnice [$\mu\text{A}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{g}$]	Úsek [μA]	Korelační koeficient	LOD [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	LOQ [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]
75 – 0,2	5,89	69,6	0,852	-	-
10 – 0,2	0,668	0,579	0,961	-	-
0,7 – 0,2	0,999	0,239	0,993	0,135	0,450



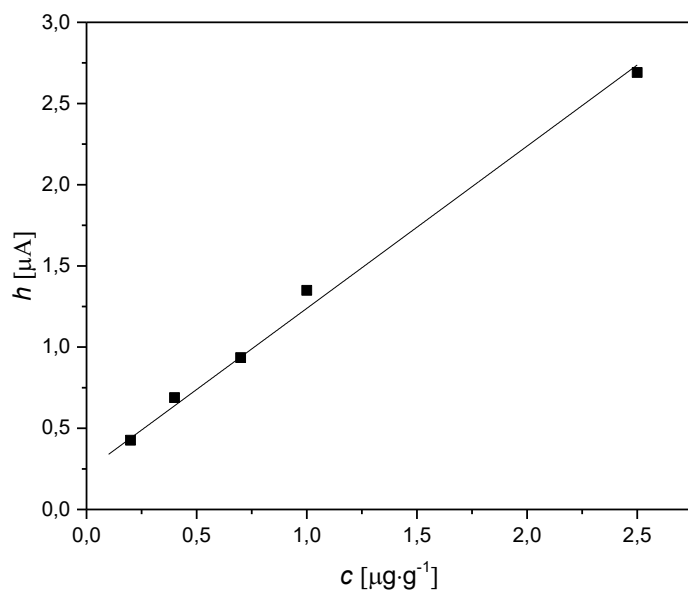
Obrázek 20: Závislost výšky píku na koncentraci chlortoluronu v půdě v koncentračním rozmezí 75–0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ metodou HPLC-UV při $\lambda=243$ nm, pH 4.



Obrázek 21: Závislost výšky píku na koncentraci chlortoluronu v půdě v koncentračním rozmezí 10–0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ metodou HPLC-UV při $\lambda=243$ nm, pH 4



Obrázek 22: Závislost výšky piku na koncentraci chlortoluronu v půdě v rozmezí $10\text{--}0,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ metodou HPLC-ED pomocí CF měřeno při potenciálu pracovní elektrody 1400 mV, pH 4.



Obrázek 23: Závislost výšky piku na koncentraci chlortoluronu v půdě v rozmezí $2,5\text{--}0,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ metodou HPLC-ED pomocí CF měřeno při potenciálu pracovní elektrody 1400 mV, pH 4.

5 Závěr

V bakalářské práci bylo studováno stanovení pesticidu chlortoluronu metodami HPLC-UV a HPLC-ED s využitím elektrody z uhlíkové plsti.

Po nalezení optimálních podmínek stanovení, které byly $\lambda=243$ nm, potenciál pracovní elektrody $E=1400$ mV, $pH=4$ a složení mobilní fáze methanol a fosfáto-acetátový pufru v poměru 60:40 (V/V), byla nalezena kalibrační přímka proměřením různých koncentrací chlortoluronu v deionizované vodě.

Po nalezení optimálních podmínek a následné kalibraci byl chlortoluron stanovován v modelových vzorcích vody a půdy. Meze detekce jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9: Meze detekce stanovení chlortoluronu dosažené metodami HPLC-UV a HPLC-ED pomocí CF a CPE [31].

Metoda	LOD _{deionizovaná voda} [mol·dm ⁻³]	LOD _{říčnívoda} [mol·dm ⁻³]	LOD _{půda} [μg·g ⁻¹]	Elektroda
HPLC-UV	$1,32 \cdot 10^{-8}$	$2,21 \cdot 10^{-8}$	0,198	CF
HPLC-ED	$1,35 \cdot 10^{-7}$	$2,04 \cdot 10^{-7}$	0,135	CF
HPLC-UV	$1,1 \cdot 10^{-8}$	$6,1 \cdot 10^{-9}$	0,010	CPE
HPLC-ED	$3,3 \cdot 10^{-8}$	$5,7 \cdot 10^{-8}$	0,086	CPE

V tab. 9 lze vidět hodnoty mezí detekce stanovení chlortoluronu stejnými metodami, ale s použitím různých typů uhlíkových elektrod. Tato bakalářská práce se zabývala uhlíkovou plst'ovou elektrodou a diplomová práce [31] se zabývala stanovením pomocí uhlíkové pastové elektrody. Z uvedených hodnot je patrné, že oba typy uhlíkových elektrod prokazují srovnatelné výsledky, nicméně lepších výsledků při měření metodou HPLC-ED se dosáhlo použitím uhlíkové pastové elektrody. Tato metoda je přibližně čtyřikrát citlivější než při použití uhlíkové plst'ové elektrody. Obě metody jsou nicméně méně citlivé než srovnávací stanovení pomocí HPLC-UV. Co se týče mezí detekcí ve vodě a půdě, z uvedených hodnot vyplývá, že odlišná matrice zde nehraje příliš velkou roli. Navíc extrakce chlortoluronu z půdy je efektivní, proto se toto stanovení hodí i pro reálné vzorky.

6 Zdroje

- [1] O. US EPA, OCSPP, „Basic Information about Pesticide Ingredients". [Online]. Dostupné z: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/basic-information-about-pesticide-ingredients>. [cit.: 07-bře-2019].
- [2] „What is a Pesticide? - Definition from MaximumYield". [Online]. Dostupné z: <https://www.maximumyield.com/definition/593/pesticide>. [cit.: 05-bře-2019].
- [3] R. Vargas-Bernal, E. Rodriguez-Miranda, a G. Herrera-Prez, „Evolution and Expectations of Enzymatic Biosensors for Pesticides", in *Pesticides - Advances in Chemical and Botanical Pesticides*, InTech, 2012.
- [4] M. Stoytcheva, *Pesticides in the Modern World - Trends in Pesticides Analysis*. InTech, 2011.
- [5] J. N. G. Ram Chandra, Bhola R Gurjar, *Environmental Science and Engineering Volume 6 : Toxicology*, 1. vyd. Studium Press LLC, 2017.
- [6] P. S. C. Rao a A. G. Hornsby, „Behavior of Pesticides in Soils and water", *Soil Sci. Fact Sheet 40*, č. December, s. 1–7, 1993.
- [7] L. G. Costa, G. Giordano, M. Guizzetti, a A. Vitalone, „Neurotoxicity of pesticides: a brief review.", *Front. Biosci.*, roč. 13, s. 1240–9, led. 2008.
- [8] Y. Arfat *et al.*, „Effect of imidacloprid on hepatotoxicity and nephrotoxicity in male albino mice", *Toxicol. Reports*, roč. 1, s. 554–561, 2014.
- [9] I. Cavoski, P. Caboni, a T. Miano, „Natural Pesticides and Future Perspectives", in *Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management*, INTECH Open Access Publisher, 2012.
- [10] „Chlortoluron analytical standard | Sigma-Aldrich". [Online]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/n11455?lang=en®ion=CZ>. [cit.: 07-bře-2019].
- [11] H. Kidd a D. R. James, *The Agrochemicals Handbook. 3rd Edition*, Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge. 1991.
- [12] „chlorotoluron (CHEBI:81981)". [Online]. Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:81981>. [cit.: 07-bře-2019].
- [13] R. I. Krieger, J. Doull, a H. Vega, *Hayes' handbook of pesticide toxicology. Volume 1*. Elsevier, 2010.
- [14] R.-X. Mou, M.-X. Chen, a J.-L. Zhi, „Simultaneous determination of 15 phenylurea herbicides in rice and corn using HPLC with fluorescence detection combined with UV decomposition and post-column derivatization", *J. Chromatogr. B*, roč. 875, č. 2, s. 437–443, lis. 2008.
- [15] J. Soukup, K. Nováková, P. Hamouz, a J. Náměstek, „Ecology of silky bent grass (*Apera spica-venti* (L.) Beauv.), its importance and control in the Czech Republic", *J. Plant Dis. Prot. -New Ser.*, roč. 20, č. 1, s. 73–80, 2006.

- [16] P. J. Ryan, D. Gross, W. J. Owen, a T. L. Laanio, „The metabolism of chlortoluron, diuron, and CGA 43 057 in tolerant and susceptible plants", *Pestic. Biochem. Physiol.*, roč. 16, č. 3, s. 213–221, pro. 1981.
- [17] B. L. Gaur, P. C. Gupta, a D. D. Sharma, „Weed management in opium poppy *Papaver somniferum* L.", *Trop. Pest Manag.*, roč. 32, č. 4, s. 267–268, led. 1986.
- [18] S. R. Sørensen, G. D. Bending, C. S. Jacobsen, A. Walker, a J. Aamand, „Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields", *FEMS Microbiol. Ecol.*, roč. 45, č. 1, s. 1–11, čvc. 2003.
- [19] A. Khadrani, F. Seigle-Murandi, R. Steiman, a T. Vroumsia, „Degradation of three phenylurea herbicides (chlortoluron, isoproturon and diuron) by micromycetes isolated from soil.", *Chemosphere*, roč. 38, č. 13, s. 3041–50, čer. 1999.
- [20] M. Zemanová a Š. Klementová, „UV photochemical degradation of a phenylurea herbicide chlorotoluron", Jihočeská univerzita v Český Budějovicích, 2008.
- [21] Z. B. Guo *et al.*, „Degradation of chlortoluron during UV irradiation and UV/chlorine processes and formation of disinfection by-products in sequential chlorination", *Chem. Eng. J.*, roč. 283, s. 412–419, led. 2016.
- [22] J. L. Tadeo, C. Sánchez-Brunete, R. . Pérez, a M. . Fernández, „Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables", *J. Chromatogr. A*, roč. 882, č. 1–2, s. 175–191, čer. 2000.
- [23] A. de Kok, I. M. Roorda, R. W. Frei, a U. A. T. Brinkman, „Gas chromatographic analysis of phenylurea herbicides following catalytic hydrolysis on silica gel", *Chromatographia*, roč. 14, č. 10, s. 579–586, říj. 1981.
- [24] B. Goger, O. Kunert, C. Seger, R. Rinelli, a R. Wintersteiger, „Quantification of Phenylurea Pesticides by HPLC/ECD and Photolysis", *Electroanalysis*, roč. 13, č. 16, s. 1335–1341, lis. 2001.
- [25] T. H. M. Noij a A. Brandt, „HPLC with On-Line Solid Phase Extraction for the Trace Analysis of Polar Pesticides", Springer, Berlin, Heidelberg, 1995, s. 91–108.
- [26] G. Henze, A. Meyer, a J. Hausen, „Determination of the phenylurea herbicide linuron and its metabolites in environmental samples by HPLC with serial ultraviolet and amperometric detection", *Fresenius. J. Anal. Chem.*, roč. 346, č. 6–9, s. 761–765, 1993.
- [27] R. O. Kühne, H. Egli, a G. Heinemann, „An improved residue analytical method for phenylurea herbicides", *Fresenius. J. Anal. Chem.*, roč. 339, č. 6, s. 374–375, 1991.
- [28] A. E. Smith a K. A. Lord, „Method for determining trace quantities of the herbicide chlortoluron in soils by liquid chromatography", *J. Chromatogr. A*, roč. 107, č. 2, s. 407–410, dub. 1975.
- [29] M. Hutta, M. Chalányová, R. Halko, R. Góra, S. Dokupilová, a I. Rybár,

- „Reversed phase liquid chromatography trace analysis of pesticides in soil by on-column sample pumping large volume injection and UV detection", *J. Sep. Sci.*, roč. 32, č. 12, s. 2034–2042, čer. 2009.
- [30] S. Pérez, M. T. Matienzo, a J. L. Tadeo, „GC-ITD analysis of chlortoluron and its metabolites in cereals", *Chromatographia*, roč. 36, č. 1, s. 195–200, pro. 1993.
- [31] L. Houšková, „Elektrochemické stanovení chlortoluronu na uhlíkové pastové elektrodě", UK, 2012.
- [32] S. R. Ruberu, W. M. Draper, a S. K. Perera, „Multiresidue HPLC Methods for Phenyl Urea Herbicides in Water", *J. Agric. Food Chem.*, roč. 48, č. 9, s. 4109–4115, zář. 2000.
- [33] A. Kossenko, S. Lugovskoy, a M. Averbukh, „Electric and Hydraulic Properties of Carbon Felt Immersed in Different Dielectric Liquids.", *Mater. (Basel, Switzerland)*, roč. 11, č. 4, dub. 2018.
- [34] Y. Wang a Y. Hasebe, „Carbon Felt-Based Bioelectrocatalytic Flow-Through Detectors: 2,6-Dichlorophenol Indophenol and Peroxidase Coadsorbed Carbon-Felt for Flow-Amperometric Determination of Hydrogen Peroxide.", *Mater. (Basel, Switzerland)*, roč. 7, č. 2, s. 1142–1154, úno. 2014.
- [35] R. Banerjee, N. Bevilacqua, L. Eifert, a R. Zeis, „Characterization of carbon felt electrodes for vanadium redox flow batteries – A pore network modeling approach", *J. Energy Storage*, roč. 21, s. 163–171, úno. 2019.
- [36] T. E. Edmonds, „Electroanalytical applications of carbon fibre electrodes", *Anal. Chim. Acta*, roč. 175, s. 1–22, 1985.
- [37] G. Chen, „Coulometric detector based on porous carbon felt working electrode for flow injection analysis", *Talanta*, roč. 53, č. 3, s. 651–660, pro. 2000.
- [38] J. González-García, P. Bonete, E. Expósito, V. Montiel, A. Aldaz, a R. Torregrosa-Maciá, „Characterization of a carbon felt electrode: structural and physical properties", *J. Mater. Chem.*, roč. 9, č. 2, s. 419–426, 1999.
- [39] M. Baroch, „Stanovení syntetických antioxidantů pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí na detektoru z uhlíkové plsti", UK, 2017.
- [40] H. Dejmková a M. de Araújo Daniel, „Electrochemical determination of indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid using HPLC with carbon felt detector", *Monatshefte für Chemie - Chem. Mon.*, roč. 150, č. 3, s. 439–442, bře. 2019.
- [41] H. Dejmková, M. Baroch, M. Krejčová, J. Barek, a J. Zima, „Coulometric detector based on carbon felt", *Appl. Mater. Today*, roč. 9, s. 482–486, pro. 2017.