

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Marek Harvila

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ PESTICIDU AMITRAZU NA
VISÍCÍ RTUŤOVÉ KAPKOVÉ ELEKTRODĚ A STŘÍBRNÉ PEVNÉ
AMALGÁMOVÉ ELEKTRODĚ

Voltammetric Determination of Pesticide Amitraz on Hanging Mercury
Drop Electrode and Silver Solid Amalgam Electrode

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Prof. RNDr. Jiří Zima, CSc

Konzultant práce: Doc. Ing. Tomáš Navrátil, Ph.D.

Praha 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom 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 22. srpna 2014

Poděkování

Chci tímto způsobem poděkovat svému školiteli Prof. RNDr. Jiřímu Zimovi, CSc. za trpělivé vedení v průběhu bakalářské práce. Dále velký dík patří konzultantovi práce Doc. Ing. Tomáši Navrátilovi, Ph.D. za mnoho cenných rad a ochotný přístup k řešení problémů.

V neposlední řadě chci také poděkovat Ing. Kateřině Novákové za všechny užitečné připomínky a pomoci s formální stránkou práce.

OBSAH

ABSTRAKT.....	5
KLÍČOVÁ SLOVA.....	5
ABSTRACT.....	6
KEY WORDS.....	6
SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	7
1. ÚVOD.....	8
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	14
2.1 Reagencie.....	14
2.2 Aparatura.....	14
2.3 Postup měření.....	15
2.4 Příprava rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrody.....	15
3. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	16
3.1 Stanovení amitrazu pomocí HMDE.....	16
3.1.1 Vliv pH.....	16
3.1.2 Vliv počátečního potenciálu.....	17
3.1.3 Vliv potenciálu akumulace.....	18
3.1.4 Vliv doby akumulace.....	18
3.1.5 Vliv rychlosti polarizace.....	19
3.1.6 Koncentrační závislost amitrazu na HMDE.....	20
3.2 Stanovení amitrazu pomocí m-AgSAE.....	23
3.2.1 Regenerační potenciál.....	23
3.2.2 Vliv pH.....	24
3.2.3 Vliv počátečního potenciálu.....	25
3.2.4 Vliv potenciálu akumulace.....	25
3.2.5 Vliv doby akumulace.....	26
3.2.6 Vliv rychlosti polarizace.....	26
3.2.7 Koncentrační závislost amitrazu na m-AgSAE.....	27
4. ZÁVĚR.....	31
5. SEZNAM LITERATURY.....	32

Abstrakt

Předmětem této bakalářské práce je voltametrické stanovení pesticidu amitrazu na pevné stříbrné amalgámové elektrodě v nanomolární koncentraci a porovnání naměřených výsledků s výsledky, které byly získány za pomoci visící rtuťové kapkové elektrody. Doposud nebylo publikováno mnoho článků zabývajících se elektrochemickou analýzou tohoto pesticidu. Proto se jeví jako velmi vhodné hledat citlivé metody pro jeho stanovení, obzvláště v poslední době, kdy se vyskytly problémy s toxickými rezidui této látky. Vlastnímu stanovení předcházelo hledání optimálních podmínek, které se pro každou elektrodu lišily.

Elektrochemické chování látky bylo zkoumáno za použití metod DC voltametrie a diferenční pulzní voltametrie. Pro analýzu byl využit proudový signál odpovídající 2elektronové redukci azomethinové skupiny v potenciálové oblasti -900 až -1200 mV. Jako základní elektrolyt byl zvolen Brittonův-Robinsonův pufr ve směsi s ethanolem v objemovém poměru 1:4. Při optimalizovaných podmínkách se pro obě elektrody podařilo dosáhnout meze detekce v řádu 10^{-9} mol·l⁻¹. Těchto mezí koncentrace bylo dosaženo pomocí DP adsorpční rozpouštěcí voltametrie.

Klíčová slova

Amitraz

Stříbrná pevná amalgámová elektroda

Visící rtuťová kapková elektroda

Stejnoseměrná voltametrie

Diferenční pulzní voltametrie

Abstract

The main subject of this thesis is voltammetric determination of pesticide amitraz using solid silver amalgam electrode at nanomolar concentrations and to compare the achieved results with those obtained using the hanging mercury drop electrode. Up to now, only a few articles dealing with electrochemical analysis of this pesticide have been published. Therefore it seems to be appropriate to look for sensitive methods for its determination. Especially at present, when problems with toxic residues of the substance have to be solved. The actual determination preceded the search for optimum conditions, which are different for each electrode.

Electrochemical behavior of the substance was investigated using methods DC voltammetry and differential pulse (DP) voltammetry. For analysis the current signal in the potential field from -900 to -1200 mV was used. It corresponds to the two electron reduction of azomethine group. Britton-Robinson buffer mixed with ethanol in a volume ratio of 1: 4 was used as the supporting electrolyte. The detection limits of the order of 10^{-9} mol·l⁻¹ were achieved under optimized conditions for both electrodes. These limits were achieved using DP adsorption stripping voltammetry.

Key words

Amitraz

Silver Solid Amalgam Electrode

Hanging Mercury Drop Electrode

DC voltammetry

Differential pulse voltammetry

Seznam zkratek a symbolů

AdRDCV	Adsorbční rozpouštěcí stejnosměrná voltametrie
AdRV	Adsorbční rozpouštěcí voltametrie
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
c	Koncentrace
DCV	Stejnoseměrná voltametrie
DPV	Diferenční pulzní voltametrie
E	Potenciál
E_{acc}	Potenciál akumulace
E_{fin}	Konečný potenciál
E_{in}	Počáteční potenciál
E_{p}	Potenciálů píku
E_{reg1} a E_{reg2}	Potenciály regenerace amalgámové elektrody
HMDE	Visící rtuťová kapková elektroda
I_{p}	Proud píku (výška)
m-AgSAE	Stříbrná pevná amalgámová elektroda
r	Korelační koeficient
t_{acc}	Doba akumulace

1. ÚVOD

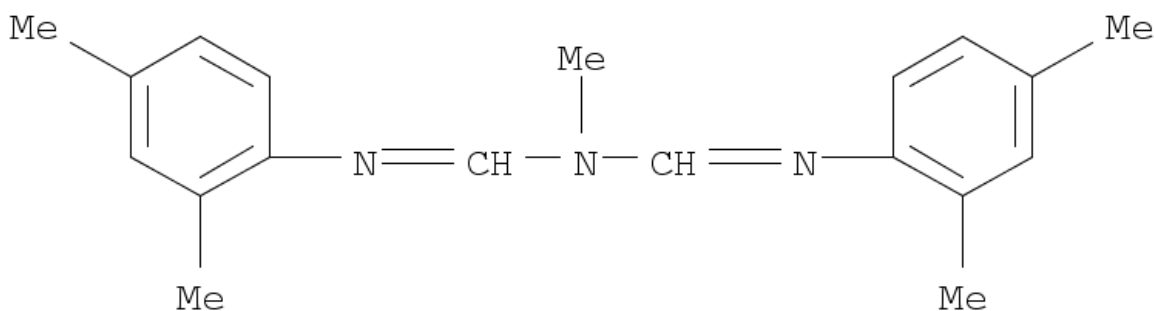
Pesticidy jsou chemické látky, které se používají proti škodlivým plevelům, živočichům a parazitickým houbám. Pojem „pesticid“ není z celosvětového pohledu příliš jednotný. Podle mezinárodní definice FAO (Food and Agriculture Organization) se pesticidem rozumí jakákoli látka nebo směs látek určených k prevenci, ničení nebo zvládnání jakéhokoli škůdce, včetně vektorů onemocnění člověka nebo zvířat, nežádoucích druhů rostlin nebo živočichů způsobujících škody v průběhu výroby, zpracování, skladování, přepravy nebo uvádění na trh potravin a zemědělských komodit. Termín zahrnuje rovněž látky určené jako regulátory růstu rostlin, defolianty, látky zabraňující předčasnému pádu ovoce před sklizní a látky aplikované na plodiny před nebo po sklizni na ochranu před poškozením během skladování a přepravy [1].

Tuto velkou skupinu látek lze rozdělit do různých tříd, např. podle cílového organismu nebo podle způsobu účinku. Základní třídění dělí chemické pesticidy do těchto hlavních skupin: insekticidy (k hubení hmyzu), herbicidy (k hubení plevelů), fungicidy (proti parazitujícím houbám a plísním), insekticidy (proti hmyzu), akaricidy (proti pavoukům a roztočům), moluskocidy (proti měkkýšům), rodenticidy (proti hlodavcům) a regulátory růstu rostlin. Podle chemické struktury lze pesticidy dále členit do skupin na organofosfátové, karbamátové, pyrethroidní a organochlorové pesticidy [2].

V současné době je v České republice používáno více než 400 schválených látek a organismů s pesticidními účinky. Klasifikace těchto látek je možná z různých hledisek, zohledňujících jejich chemickou strukturu, toxické účinky na organismy (cílové případně necílové), chování v prostředí apod. Rezidua pesticidů představují významnou skupinu chemických kontaminantů, které mohou negativně ovlivnit hygienicko-toxikologickou jakost potravin a kvalitu půd a vod. Je samozřejmé, že sledování těchto škodlivin je nedílnou součástí ochrany lidské společnosti před nežádoucí expozicí. Aktualizovaná legislativa ČR stanovuje (v rámci harmonizace s obdobnými předpisy v EU) maximální limity reziduí (MLR) pro desítky pesticidů, z nichž mnohé dosud v ČR sledovány nebyly [3].

Amitraz byl vybrán jako vzorový pesticid, z toho důvodu, že je používán v České Republice, ale je i hojně aplikovaným nesystematickým akaricidem a insekticidem v zahraničí [1, 4, 5].

Amitraz (obr. 1) je bílá až žlutá krystalická látka se slabým formaldehydovým zápachem, bod tání 86 88 °C, slabá báze, relativně odolný vůči vysokým teplotám, nerozpustný ve vodě.



Obr. 1: Struktura amitrazu

Sumární vzorec: $C_{19}H_{23}N_3$

CAS No.: 33089-61-1

Molekulová hmotnost: $293,45 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Systematický název:

N'-(2,4-dimethylphenyl)-N-[(2,4-dimethylphenyl)imino]methyl]-N-methyl-Formamidine

N-2,4-(dimethylphenyl)-N-[2,4-(dimethylphenyl)imino]-N-methyl-methanimidamide

N,N'-[(Methylimino)dimethylidyne]di-2,4-xylidin

Jedná se o formamidinový pesticid [6, 7] patřící do rodiny triazapentadienů [5, 7-9]. Tento pesticid slouží například k likvidaci všech stádií roztočů nadčeledi tetranychid a eriophyid, méry hruškové (pear suckers), červců (scale insects), motolic, mšic a prvního stádia larvy lepidoptera na jádrovém ovoci (malvice), citrusech, bavlně, peckovinách, ovocných keřích, jahodách, chmelu, tykvovitých rostlinách, lilku, paprikách, rajčatech a okrasných rostlinách. Používá se také jako zvířecí ektoparazitikum k hubení klíšťat, roztočů a vši dobytka, psů, koz, prasat a ovcí [3]. Kromě toho je amitraz často používán proti onemocnění varroázy, způsobenou roztoči varroa jacobsoni [4, 10] nebo proti roztoči acarapis woodi [10] napadající včelu medonosnou. Je tedy hojně využíván ve včelích úlech proti těmto parazitům, kteří ohrožují včelařství na celém světě [8].

Nicméně právě včely jsou velice náchylné k otravě pesticidy, což vede k domněnce, že právě tento faktor je především zodpovědný za celosvětově populační pokles včelích kolonií. Amitraz byl dříve aplikován přímo do úlu a cílil na oktopamirgí receptory v nervovém systému nebo na neuromuskulárním systému hmyzu. Tento insekticid má vliv na fyziologické funkce členovců související především s neurotransmiterem oktopaminem, který urychluje srdeční činnost. Amitraz je agonistou k oktopaminovým receptorům nacházejícím se v místě nervových synapsí a brání jejich normální funkci. Z těchto důvodů byl v úlech plošně užívaný amitraz proti varroa a Acarapis stažen a to už po dvou letech od roku 1992, kdy se začal za tímto účelem komerčně distribuovat [10] Přesto je však amitraz stále využíván k ochraně včel před roztoči. Tento pesticid a jeho metabolity se stále detegují ve včelím vosku a produktech včelího medu což svědčí o jeho stálém užívání [8]. Pro evropskou unii byl stanoven limit reziduí v medu na hodnotu $200 \mu\text{g.kg}^{-1}$ [11].

Amitraz je k dispozici v mnoha zemích od roku 1974, ale zprávy o jeho škodlivých účincích na člověka byly publikovány pouze v posledních 15 letech. Organofosfátové insekticidy podle světové zdravotní organizace způsobují 2 miliony akutních otrav ročně, ale zmínky o otravě amitrazem jsou v literatuře poměrně malé. Pozornost si však zajistil tím, že většina obětí otrávených amitrazem byly děti [9]. Otravy lidí se vyskytují v mnoha zemích, ale nejvíce především v Číně, kde má tato látka stále mnohá využití. Případy požití jsou registrovány každoročně. V posledních pěti letech bylo zaznamenáno více než 10 intoxikací amitrazem. Proto je nutné hledat citlivé a spolehlivé metody ke stanovení amitrazu a jeho metabolitů [7].

Amitraz má různé farmakodynamické působení, která se přisuzují jak jeho biologické účinnosti, tak klinickým příznakům toxicity. U savců byl amitraz prokázán jako alfa-2-adrenoreceptor agonista, dále je slabým inhibítozem receptorů serotoninu a slabým antagonistou H1 receptoru a in vitro inhibítozem oxidázy mono-aminů ovšem zřejmě ne in vivo. Klinické příznaky toxicity zahrnují: poruchy vědomí, respirační deprese, křeče, bradikardie, deprese CNS, např. letargie, snížení tělesné teploty, snížení srdečního rytmu a krevního tlaku, zvýšení plazmatických hladin cukru (alfa-2-adrenergičtí agonisté snižují uvolňování inzulínu, např. klonidin), zvracení, zpomalení postupu potravy gastro-intestinálním traktem. Amitraz nedráždí kůži člověka, je mírně dráždivý pro oči.

Perkutánní vstřebávání amitrazu je relativně pomalé, maximálních hladin v krvi dosahuje 24-72 hodin po aplikaci. Při studii na psech se během 10 dnů po aplikaci vstřebalo méně než 40 % celkem podané dávky [12].

U všech savců probíhá metabolismus podle dostupných údajů stejným způsobem. Hlavní metabolity jsou N-(2,4-dimethylfenyl)-N'-methylformamidin a 2,4-dimethylformanilid. Prvně jmenovaný je pro savce toxičtější než amitraz, v moči hlavně po vyšších dávkách amitrazu. Ostatní metabolity mají toxikologicky menší význam. Konečným metabolitem je 3-methyl-4-aminobenzoová kyselina a její konjugáty [12].

Zdá se, že toxicita amitrazu je dána jeho metabolity. LD50 pro krysou p.o. 600 až 800 mg.kg⁻¹, dermálně více než 1600 mg.kg⁻¹; pro králíka p.o. více než 100 mg.kg⁻¹, dermálně více než 200 mg.kg⁻¹ LC50 při 6 hod inhalaci pro krysou 65 mg.l⁻¹ vzduchu [12].

Vylučování po perorálním podání u všech studovaných živočišných druhů bylo rychlé. Hlavní cestou vylučování je moč, kterou se vyloučilo 65-84% podané dávky (55-76 % během prvních 24 hodin).

V zemědělství se amitraz používá ve formě poprašku nebo postřiku v koncentraci obvykle 0,1 0,3 %. V půdě probíhá rychlá inaktivace bez nebezpečí pro životní prostředí. Téměř nerozpustný ve vodě, ale rychle se v ní hydrolyzuje. Vyšší rozpustnost v acetonu, xylenu, toluenu (více než 300 g.l⁻¹) [12].

Tradičně se amitraz stanovuje pomocí plynové chromatografie (GC) s detektorem elektronového záchytu (ECD) nebo hmotnostně spektrometrickým detektorem (MS), které vyžadují hydrolyzu amitrazu na 2,4-DMA a derivatizaci s anhydridem heptafluorobutyrové kyseliny (citace). HPLC byla také použita k stanovení amitrazu v medu nebo včelím vosku (citace). Byly použity GC-MS a LC-MS k určení amitrazu v podzemních vodách, půdách a v plodech hrušky [8].

Pro stanovení amitrazu v potravinách rostlinného původu se v ČR používá jednocelová (single) metoda GC-MSD, splňující požadavky stanovené nařízením (ES) č. 882/2004 (víceletý kontrolní plán pro rezidua pesticidů; 2012 – 2014; Ministerstvo zdravotnictví; sekce hlavního hygienika a náměstka pro ochranu a podporu veřejného zdraví; odbor ochrany veřejného zdraví).

V oblasti životního prostředí, kde je hlavním předmětem kontrola pesticidů a jiných toxických látek, mohou být elektrochemické metody použity k přímému stanovení ze znečištěných půd, vod a zemědělských přípravků. Konvenční chromatografické metody vyžadují složitou předúpravu vzorků a drahou instrumentaci. To znamená, že analýza stále rostoucího počtu vzorků se stává ekonomicky méně efektivní. Jednou z výhod elektrochemických metod je, že nevyžadují složitou předúpravu vzorků. Z tohoto důvodu mohou být například voltametrické metody praktičtější [5] a dokonce mohou umožnit rychlou analýzu kontaminantu v místě výskytu prostřednictvím přenosných zařízení [13]. Elektrochemické metody jsou stále více používány pro stanovení biologicky účinných látek, včetně pesticidů. Tyto metody nabízí dostatečně nízké detekční limity pro širokou škálu látek a nabízí dobrou selektivitu.

Z předchozích studií amitrazu DC voltametrie [5] se dá předpokládat nalezení píku v katodickém směru. Dle molekulární struktury amitrazu tento pík odpovídá katodické redukci azomethinové skupiny (-CH=N-) amitrazu v adsorbovaném stavu přes dobře známý $2e^-/2H^+$ redukční mechanismus azometinové sloučeniny (rce (1))



V odborných publikacích se objevuje stanovení na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE), či elektrodě ze skelného uhlíku [14].

Práce se rtutí přináší určitá bezpečnostní rizika, a to především u par rtuti, u které je prokázána toxicita [15]. To sebou přináší zpřísnování norem na životní prostředí (Směrnice Evropského parlamentu) a tím pádem i do značné míry komplikuje samotnou manipulaci se rtutí. Proto se objevují tendence kompenzovat rozmach rtuťových elektrod. Příkladem můžou být amalgámové elektrody (publikované v roce 2000 Ústavem fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i. [16] a výzkumnou skupinou Ø. Mikkelsena z Norwegian University of Science and Technology v Trondheimu [17]). Ve většině případů nevykazují takovou citlivost, zato ale díky jednoduché konstrukci, mechanické pevnosti, rychlému zprovoznění a relativní robustnosti nacházejí uplatnění ve ztížených podmínkách práce například v terénu [16]. Tyto elektrody se připravují naplněním skleněné trubičky práškem kovu stříbra, mědi aj. případně jejich směsí, který se nechá amalgamovat několik hodin ponořením do rtuti. Konec takto připravené elektrody se pak ve finální fázi upravuje leštěním ve snaze napodobit povrch kovové rtuti. Případná další modifikace, která zvyšuje analytické vlastnosti je pak vytvořením rtuťového

menisku, avšak spotřeba rtuti je nižší než například u samotné rtuťové elektrody. Mezi nevýhody amalgámových elektrod patří krom horší citlivosti zmenšení pracovního potenciálu a horší reprodukovatelnost, přesto jsou vlastnosti amalgámových elektrod často dostačující. Pevné amalgámové elektrody lze využít také pro ampérometrickou detekci v průtokových a separačních metodách [18].

Cílem této práce je optimalizace podmínek a následné stanovení pesticidu amitrazu na amalgámové elektrodě a srovnání s HMDE při dosažení co možná nejnižší meze stanovitelnosti.

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Reagencie

Kvůli již zmíněné poměrně nízké stabilitě látky v rozpouštědle musel být zásobní roztok amitrazu připravován každodenně. V závislosti na požadované koncentraci byl pevný vzorek čisté látky v řádu jednotek miligramů rozpuštěn v absolutním ethanolu čistoty p.a.

Brittonův-Robinsonův (BR) pufr o daném pH byl za pomoci pH-metru připravován smísením kyselé složky (obsahující kyselinu trihydrogenboritou, trihydrogenfosforečnou a octovou, každou o koncentraci $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a zásadité složky ($0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ hydroxid sodný), všechny tyto chemikálie čistoty p.a., Lachema.

2.2 Aparatura

K voltametrickému měření byl použit přístroji Eco-Tribo Polarograf (ETP) (Polaro-Sensors, Praha), přičemž výstupní data byla zpracována v softwaru MultiElChem verze 3.1 (Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i., Praha) a MS Excel (Microsoft, ČR) v operačním systému Windows 7 (Microsoft, ČR). Přístroj byl používán v režimu zapojení tří elektrod, a to s pomocnou platinovou elektrodou (Monokrystaly Trutnov, ČR), referentní nasycenou argentochloridovou elektrodou (Elektrochemické detektory s.r.o., Trutnov) a pracovní elektrodou. Jako pracovní elektroda byla nejprve použita visící rtuťová kapková elektroda (HMDE, Polaro-Sensors, Praha) s povrchem kapky $0,721 \pm 0,022 \text{ mm}^2$ a posléze rtuťovým meniskem modifikovaná pevná stříbrná amalgámová elektroda (m-AgSAE), (Polaro-Sensors, Praha).

Měření pH bylo prováděno na pH-metru Jenway 3505 s kombinovanou skleněnou elektrodou a teploměrem (Jenway, Velká Británie). Ke kalibraci pH-metru byly použity kalibrační roztoky o pH 4, 7 a 9 (Elektrochemické detektory s.r.o., Trutnov).

Jelikož pH-metr byl kalibrován vodnými roztoky, byla všechna pH měřena ještě před přidáním ethanolu. Protože aktivity alkoholových roztoků se liší od vodných, dojde přidáním ethanolu k změně pH, která však nebyla přesně měřena, proto jsou hodnoty pH označeny jako pH*.

Navážky byly odvažovány na analytických vahách Kern 770-60 (KERN, Germany).

2.3 Postup měření

Měření bylo prováděno v prostředí Brittonova-Robinsonova pufru a 20% ethanolu, a to tak, že do měrné nádoby bylo vždy automatickou pipetou odpipetováno 8 ml BR pufru a 2 ml absolutního ethanolu. Před začátkem každého měření byl obsah elektrochemické cely probubláván inertním plynem dusíkem (99,99 %) (Messer, Praha, ČR) po dobu 5 minut. Roztokem ethanolu o stejné koncentraci 20 % byla naplněna i předřazená probublávačka.

Samotnému stanovení látky předcházelo nalezení optimálních podmínek pro každou z pracovních elektrod zvlášť. Tato optimalizace zahrnovala následující parametry: Nalezení optimálního pH, dále určení počátečního potenciálu E_{in} , potenciálu akumulace E_{acc} , doby akumulace t_{acc} a rychlosti polarizace. U m-AgSAE byl hledán ještě regenerační potenciál E_{reg1} a E_{reg2} .

2.4 Příprava rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrody

Příprava rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrody (m-AgSAE) zahrnuje amalgamací, elektrochemickou přípravu a testování funkce průceschopnosti [19]. Před vytvoření rtuťového menisku je potřeba nejprve provést vyhlazení pevného amalgámového povrchu elektrody jeho leštěním o navlhčené plátno s přidáním suspenze oxidu hlinitého jako jemného abraziva. Následně se elektroda opláchne destilovanou vodou. Tímto způsobem se leštění provádí přibližně 2 minuty, a to minimálně každý týden. Následuje vytvoření menisku rtuti na povrchu elektrody. Usušený konec elektrody se ponoří do čisté kapalné rtuti a několik sekund se s ním intenzivně míchá, dokud se na povrchu pevného amalgámu nevytvoří meniskus. Aktivace povrchu se provádí v elektrochemické cele obsahující 0,1M KCl při vloženém napětí -2200 mV po dobu pěti minut za stálého míchání. Aktivace se provádí každý den před zahájením měření nebo při delší pauze než jedna hodina či při snížení citlivosti. Nakonec se provede několik testovacích měření.

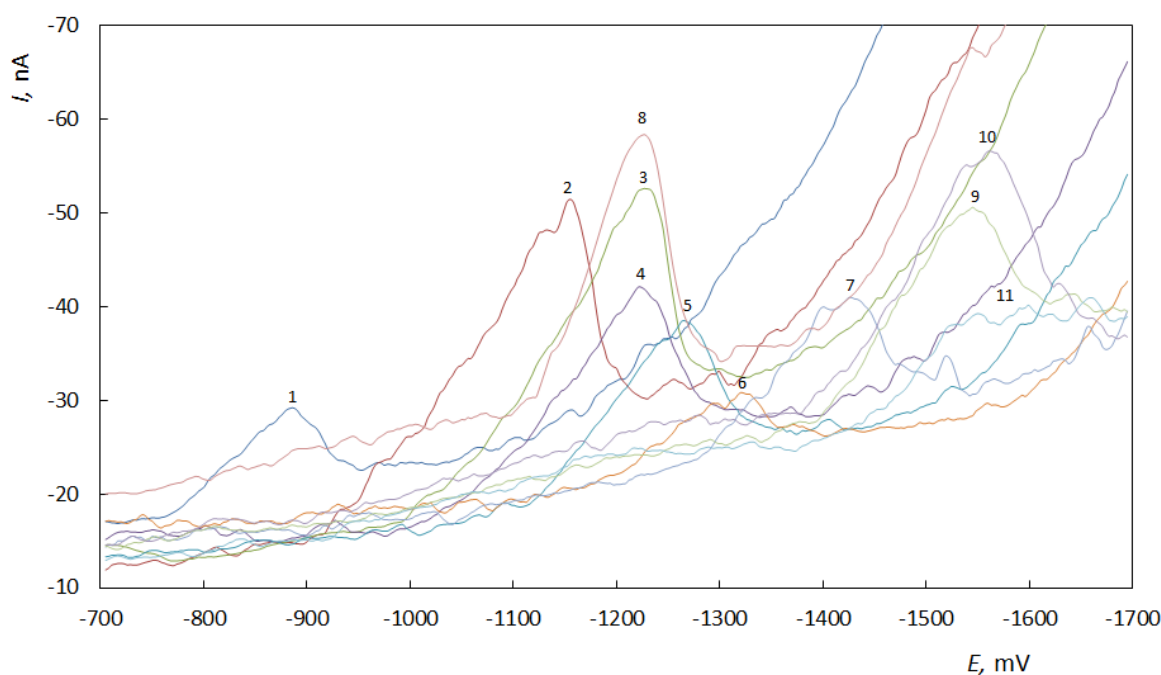
3. VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Stanovení amitrazu pomocí HMDE

3.1.1 Vliv pH

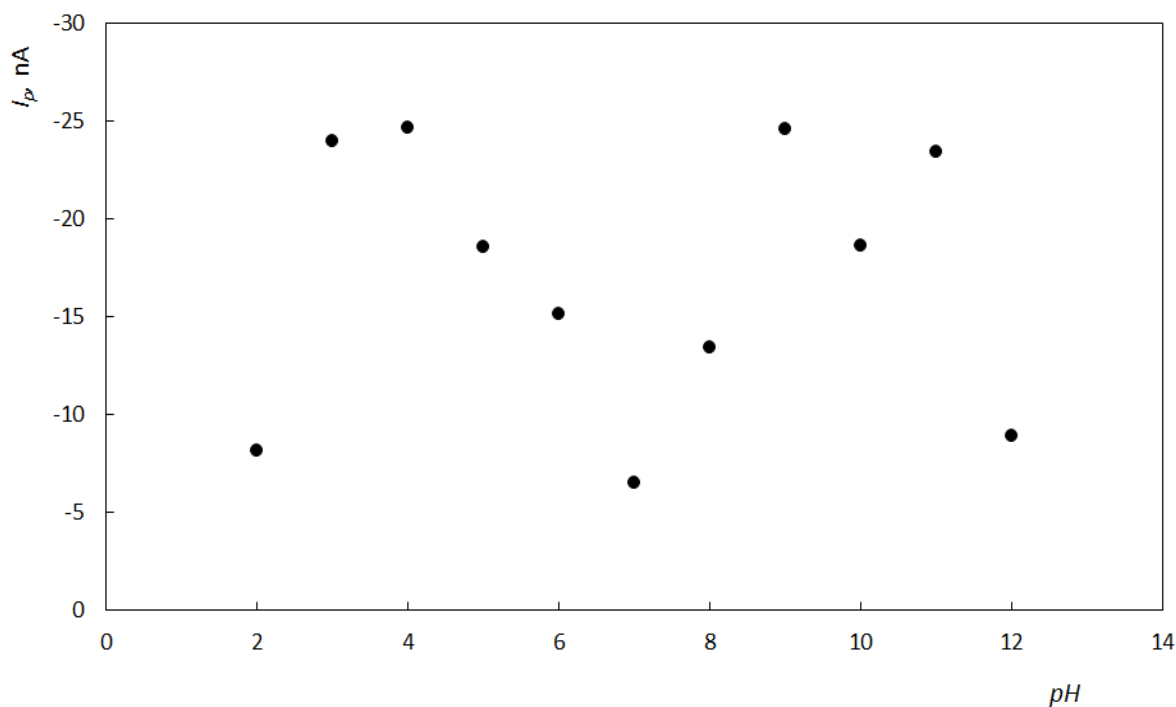
Metodou cyklické voltametrie (CV) byl studován první parametr optimalizace, a to vliv pH na výši signálu. Dané pH zajišťoval BR-pufír připravený smíšením kyselé a zásadité složky v rozmezí od pH 2 do 12. Základní elektrolyt byl tvořen 8 ml BR pufiru a 2 ml ethanolu.

Přidáním 200 μl zásobního roztoku amitrazu do 10 ml BR pufiru s ethanolem (4:1, v/v) měla měřená látka obsažená v elektrochemické cele koncentraci $4,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$. Pomocí DC voltametrie byly píky registrovány pouze v katodickém směru v rozmezí potenciálu od -800 mV až -1700 mV a to v dané škále pH (Obr. 2). V anodickém směru polarizace nebyl registrován žádný významný pík. Z tohoto důvodu a také z důvodu lepší přehlednosti nebyly anodické signály v obrázku znázorněny. Dále bylo pozorováno, že v rozmezí pH* 3 – 6 je patrný jeden dobře vyvinutý pík a obdobně je tomu tak i v zásadité oblasti a to v rozmezí pH* 8 – 11.



Obr. 2: DC voltamogramy amitrazu o koncentraci $4,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$, pracovní elektroda HMDE, v prostředí BR pufiru a ethanolu (4:1, v/v), $E_{\text{in}} = -100$, $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$ při pH* 2,0(1); 3,0(2); 4,0(3); 5,0(4); 6,0(5); 7,0(6); 8,0(7); 9,0(8); 10,0(9); 11,0(10); 12,0(11).

Ze závislosti výšky píku na pH prostředí jsou zřejmá dvě maxima, a to pro $\text{pH}^* 4$ a $\text{pH}^* 9$ (Obr. 3). Tato prostředí poskytují dobře vyvinutý, snadno vyhodnotitelný a symetrický pík. Bylo zvoleno $\text{pH}^* 4$, a to z toho důvodu, že signál tohoto píku je o něco málo vyšší než při ostatních hodnotách pH^* . Dalším důvodem bylo, že ve většině půd (zemědělských i lesních) a vod v České Republice převládá kyselé pH.



Obr. 3: Závislost výšky DCV píku amitrazu o koncentraci $4,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ na pH^* . Pracovní elektroda HMDE, v prostředí BR pufru a ethanolu (4:1, v/v), $E_{in} = -100 \text{ mV}$, $\nu = 100 \text{ mV.s}^{-1}$.

3.1.2 Vliv počátečního potenciálu

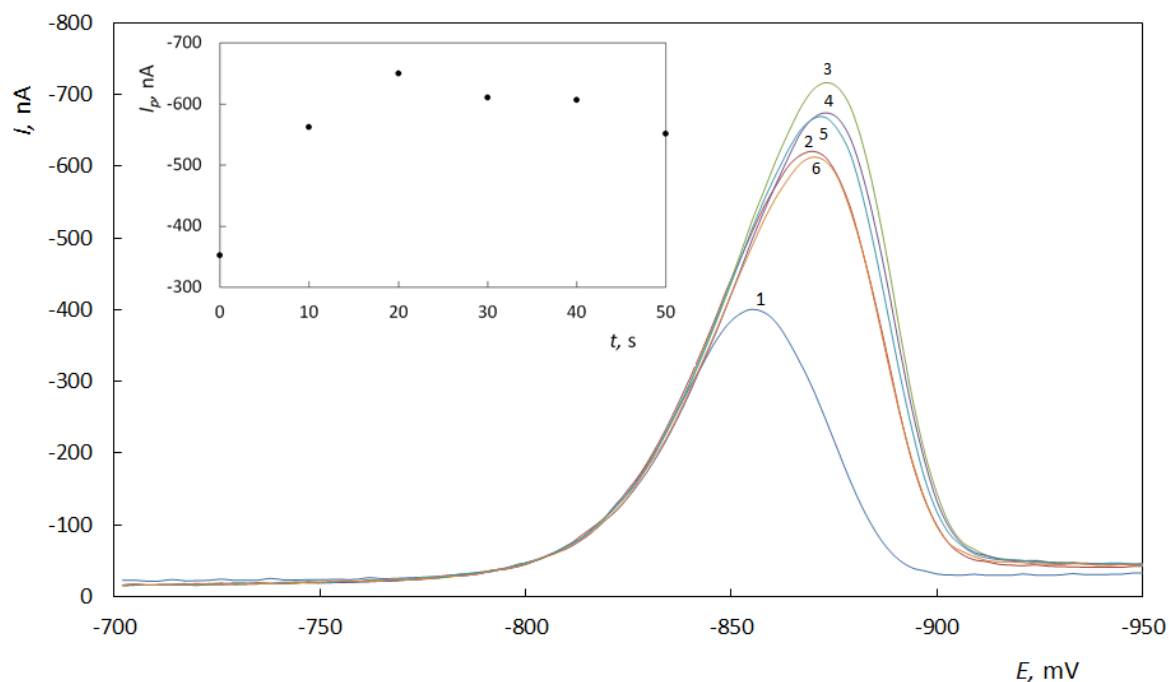
Dalším zkoumaným parametrem ovlivňujícím velikost proudové odezvy je počáteční potenciál (E_{in}). Tento krok byl prováděn metodou DC voltametrie. Postupovalo se tak, že byl připraven analyzovaný roztok amitrazu o koncentraci $4,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1} \text{ M}$ v prostředí BR pufru a ethanolu (4:1, v/v) o $\text{pH}^* 4$ a provádělo se měření, kdy byl E_{in} postupně měněn v rozsahu od -100 do -800 mV při rychlosti polarizace (ν) 100 mV.s^{-1} . Nejvyšší proudové odezvy a zároveň reprodukovatelnosti bylo dosaženo při hodnotě $E_{in} -100 \text{ mV}$.

3.1.3 Vliv potenciálu akumulace

K určení tohoto parametru byla použita metoda katodická rozpouštěcí DC voltametrie, umožňující zvýšení citlivosti stanovení. Opět se pracovalo s měrným roztokem amitrazu o koncentraci $4,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ v prostředí BR pufru a ethanolu (4:1, v/v) o pH* 4. V souladu s předchozími výsledky byl aplikován $E_{in} -100 \text{ mV}$. Potenciál akumulace (E_{acc}) byl zkoumán v rozsahu hodnot od -100 do -800 mV a při rychlosti polarizace 100 mV.s^{-1} . Zároveň musel být nastaven čas, po který bude docházet k akumulaci látky na elektrodě (t_{acc}) při zkoumaných potenciálech. Pro něj byla zvolena hodnota 15 s za současného míchání při nižších otáčkách přístroje ETP. Následně byla vždy zařazena klidová doba (E_{klid}) 15 sekund bez míchání. Optimální proudový pík byl nalezen pro $E_{acc} -300 \text{ mV}$.

3.1.4 Vliv doby akumulace

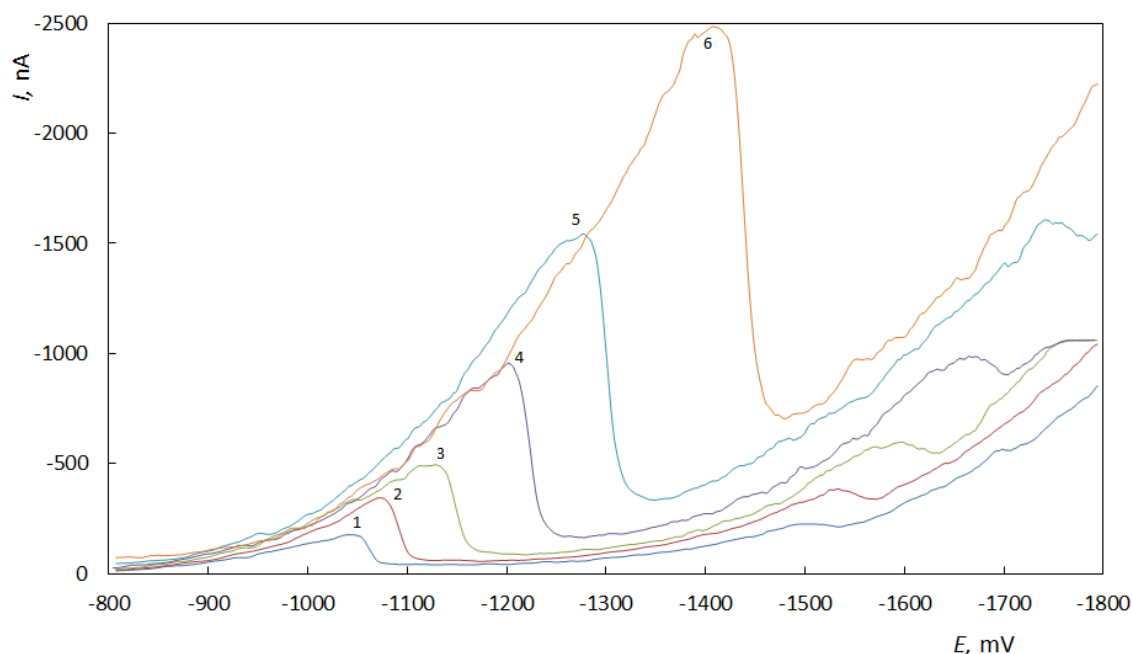
Jak již bylo předem uvedeno, je nutné stanovit také optimální dobu akumulace. Ten to parametr je však závislý na koncentraci analytu. Čím vyšší koncentrace, tím dříve je povrch elektrody pokryt a odezva není lineární. Za výše uvedených optimalizovaných parametrů byla sledována odezva proudu při $E_{acc} -300 \text{ mV}$. Sledované časy t_{acc} činily 0 s, 10 s, 20 s, 30 s, 40 s a 50 s. Z voltamogramů na Obr. 4 se jeví při koncentraci amitrazu $4,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ jako optimální čas akumulace $t_{acc} 20 \text{ s}$. Při delších t_{acc} proudová odezva opět klesala.



Obr. 4: DC voltamogramy amitrazu o koncentraci $4,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ v závislosti na časech akumulace, pracovní elektroda HMDE, v prostředí BR pufru ($\text{pH}^*=4$) a ethanolu (4:1, v/v), $E_{\text{in}} = -100$, $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$ v časech akumulace $t_{\text{acc}}[\text{s}] = 0$ (1); 10 (2); 20 (3); 30 (4); 40 (5); 50 (6).
 Výsek: Závislost výšky píku I_p na t_{acc} .

3.1.5 Vliv rychlosti polarizace

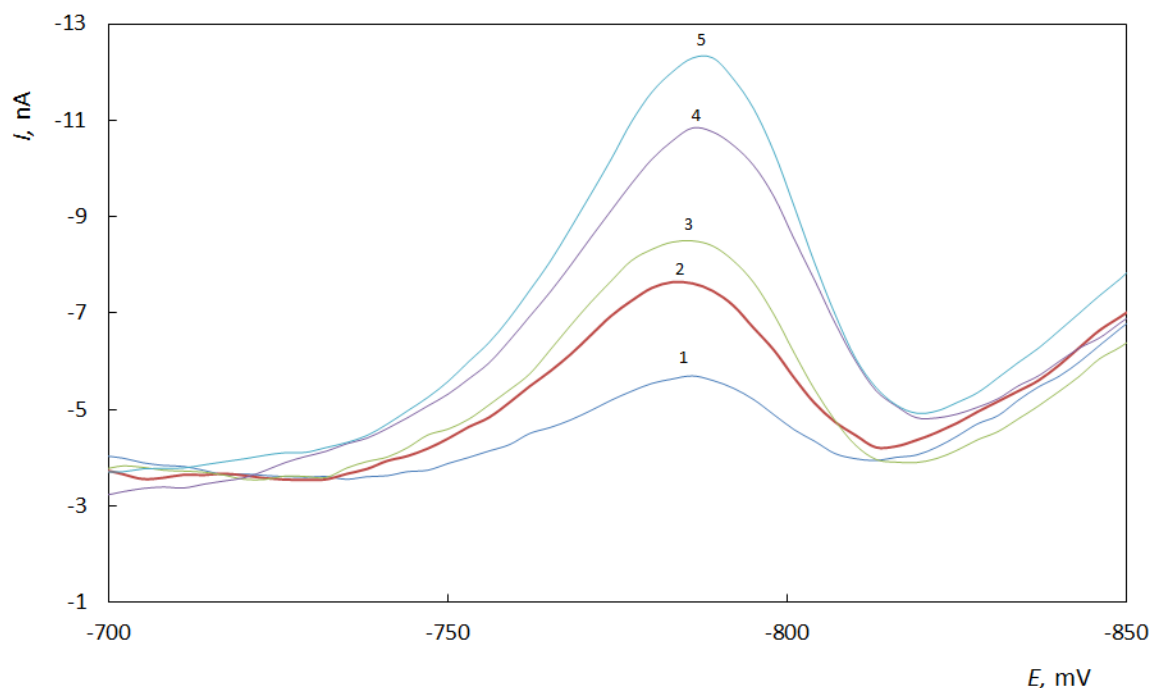
Stejnou metodou, tj. katodickou rozpouštěcí DC voltametrií, byl studován vliv rychlosti polarizace na výšku píku. Za výše uvedených optimálních podmínek byly proměřovány tyto rychlosti polarizace: 20, 40, 80, 160, 320 a 640 mV.s^{-1} , jejichž výsledek je vidět na obr. 5.



Obr. 5: DC voltamogramy amitrazu o koncentraci $4,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ v závislosti na rychlosti polarizace, pracovní elektroda HMDE, v prostředí BR pufru (pH 4) a ethanolu (4:1, v/v), $E_{in} = -100 \text{ mV}$, $t_{acc} = -20 \text{ s}$, $E_{acc} = -300 \text{ mV}$, při $\text{pH}^* 4,0$. $V [\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}] = 20$ (1), 40 (2), 80 (3), 160 (4), 320 (5), 640 (6).

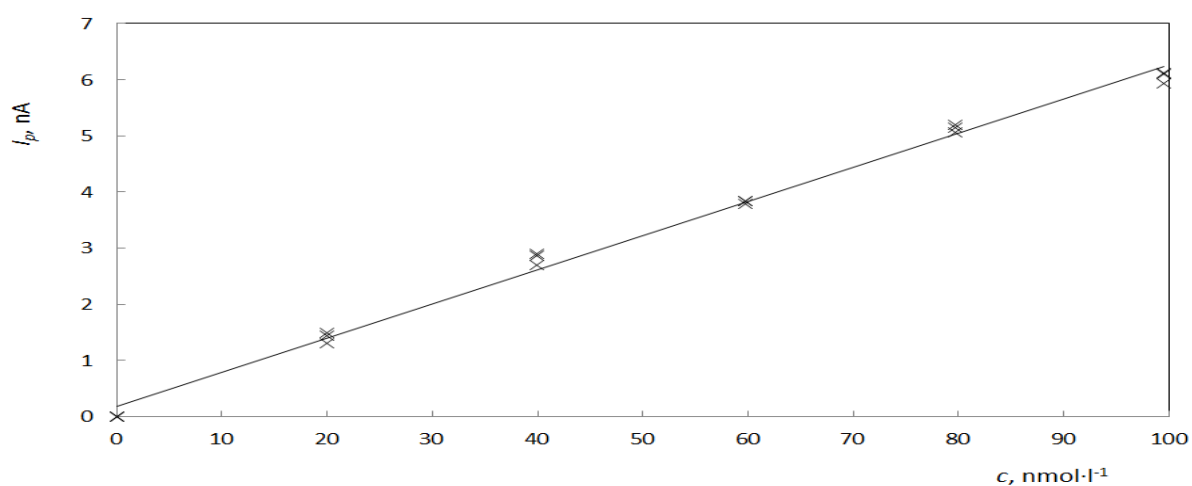
3.1.6 Koncentrační závislost amitrazu na HMDE

Při stanovení zkoumané látky bylo snahou docílit co možná nejnižší meze stanovitelnosti. Byl tedy prováděn pokus dosáhnout koncentrace v řádech $10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ (Obr. 6) až $10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$ (Obr. 8). Měření bylo prováděno metodou DPV. Pro pulz byla nastavena jeho výška -50 mV a jeho šířka 80 ms . Dále byly nastaveny optimální podmínky zjištěné v předchozích měřeních, tedy $\text{pH}^* 4$, potenciálový rozsah od -100 mV do -1800 mV a potenciál akumulace -300 mV . Doba akumulace byla vzhledem k nízké koncentraci zvolena 100 s . Polarizace probíhala rychlostí $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.



Obr. 6: DP voltamogramy koncentrační závislosti amitrazu, pracovní elektroda HDME, v prostředí BR pufru a ethanolu (4:1, v/v), $E_{in}=-100$ mV, $t_{acc}=-100$ s, $E_{acc}=-300$ mV, $pH^* 4,0$. Koncentrace [$nmol \cdot l^{-1}$]: 20 (1), 39,9 (2), 59,8 (3), 79,7 (4), 99,5 (5).

Na základě vyhodnocení výšek píků jednotlivých měření byla sestrojena závislost proudové odezvy na koncentraci analytu. Do grafu jsou zanesena vždy tři paralelní stanovení (Obr. č. 7).



Obr. 7: Závislost výšek DP píků amitrazu na koncentracích [$nmol \cdot l^{-1}$]: 20, 39,9, 59,8, 79,7, 99,5. DPV voltametrie, pracovní elektroda HMDE, v prostředí BR pufru ($pH^* 4$) a ethanolu (4:1, v/v), $E_{in}=-100$ mV, $t_{acc}=-100$ s, $E_{acc}=-300$ mV.

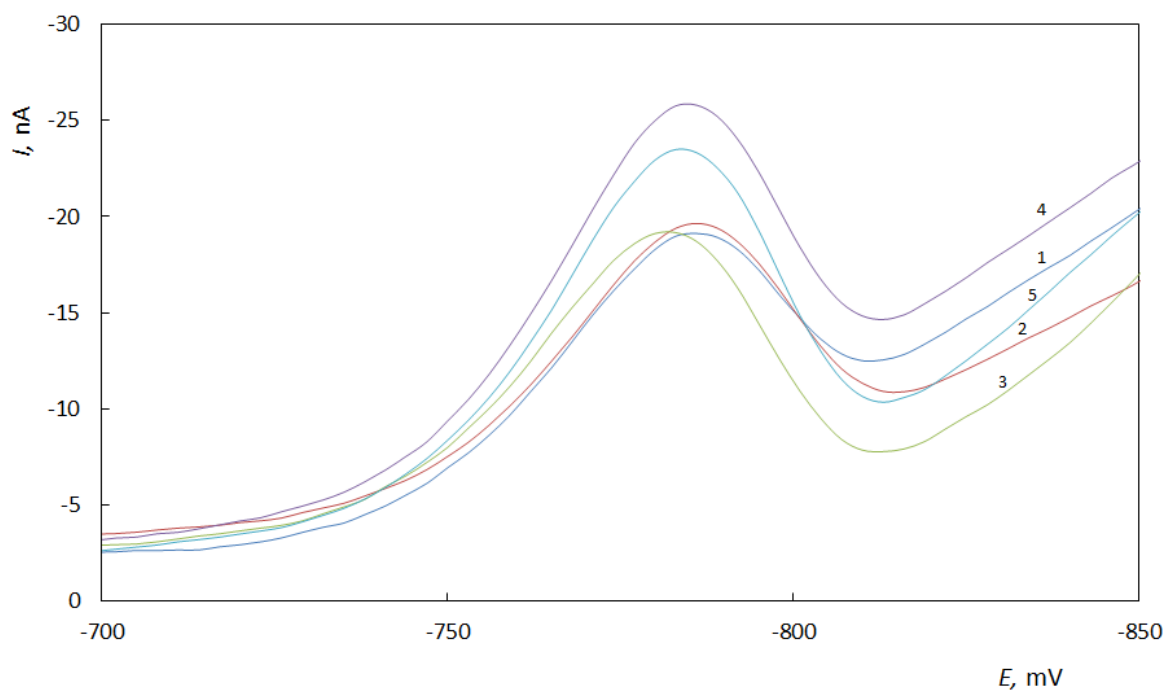
Po statistickém zpracování výsledných dat byla vypočtena lineární regresní rovnice (2):

$$-I_p[\text{nA}] = (0.0606 \pm 0.0025) c[\text{nM}] + (0.17 \pm 0.15); r=0,997, \quad (2)$$

kde I_p je proud píku, c koncentrace, r korelační koeficient.

Přímou metodou signálu, IUPAC [20], byly stanoveny kritická mez $3,4 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$, mez detekce $6,6 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ a mez stanovitelnosti $9,7 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Stejným způsobem byla vyhodnocena koncentrační závislost v řádu $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Obr. 8 a Obr. 9).

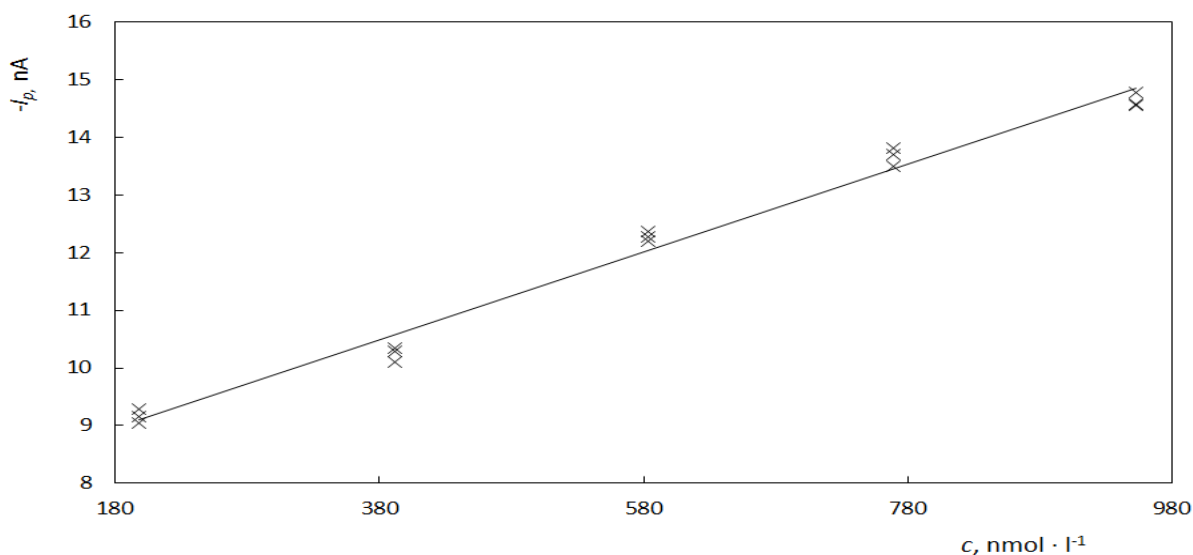


Obr. 8: DP voltamogramy koncentrační závislosti amitrazu, pracovní elektroda HDME, v prostředí BR pufru a ethanolu (4:1, v/v), $E_{in}=-100 \text{ mV}$, $t_{acc}=-100 \text{ s}$, $E_{acc} = -300 \text{ mV}$, $\text{pH}^* 4,0$. Koncentrace [$\text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$]: 198 (1), 392 (2), 583 (3), 769 (4), 759 (5).

Po statistickém zpracování výsledných dat (Obr. 9) byla vypočtena lineární regresní rovnice (3):

$$-I_p[\text{nA}] = -(0.00763 \pm 0.00056) \cdot c[\text{nM}] + (7.58 \pm 0.36); r=0,992, \quad (3)$$

kde I_p je proud píku, c koncentrace, r korelační koeficient.



Obr. 9: Závislost výšek píků amitrazu na koncentracích [nmol·l⁻¹]: 20 (1), 39,9 (2), 59,8 (3), 79,7 (4), 99,5 (5) DPV voltametrie, pracovní elektroda HMDE, v prostředí BR pufru (pH* 4) a ethanolu (4:1,v/v), $E_{in}=-100$ mV, $t_{acc}=-100$ s, $E_{acc}=-300$ mV.

3.2 Stanovení amitrazu pomocí m-AgSAE

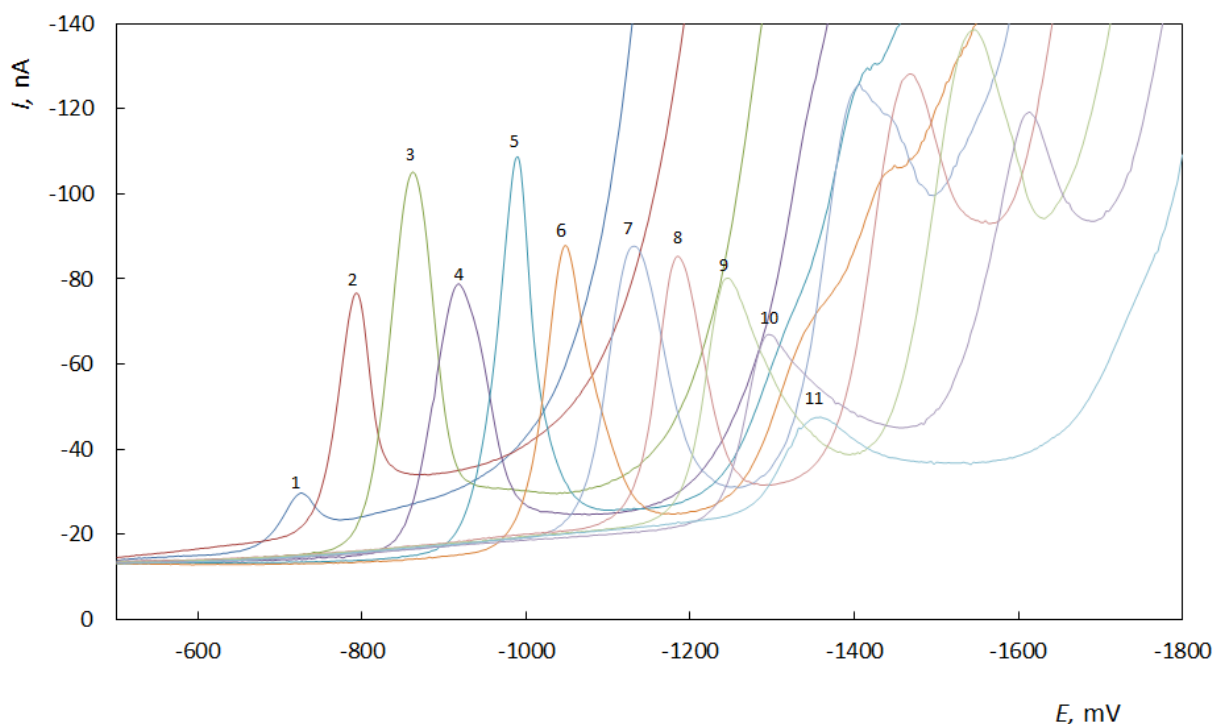
Každému měření na m-AgSAE předcházela její precizní příprava, od které se odvíjela kvalita (reprodukovatelnost a opakovatelnost) zaznamenávaných dat (2.4 Příprava rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgamové elektrody (kapitola „2.4 Příprava rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgamové elektrody“)

3.2.1 Regenerační potenciál

Na rozdíl od HMDE u m-AgSAE elektrody nedochází k úplné výměně měrného povrchu elektrody typickým odkápnutím kapky rtuti. Proto je nutné tento povrch regenerovat, aby nedocházelo k pasivaci elektrody. To se provádí vložением napětí oscilujícím v určitém rozmezí potenciálů. Zjistili jsme, že optimální regenerace povrchu je zajištěna 50 potenciálovými cykly mezi začátkem potenciálem -1800 mV a konečným -100 mV, přičemž doba regenerace u každého z potenciálů činila 0,3 s v jednom cyklu.

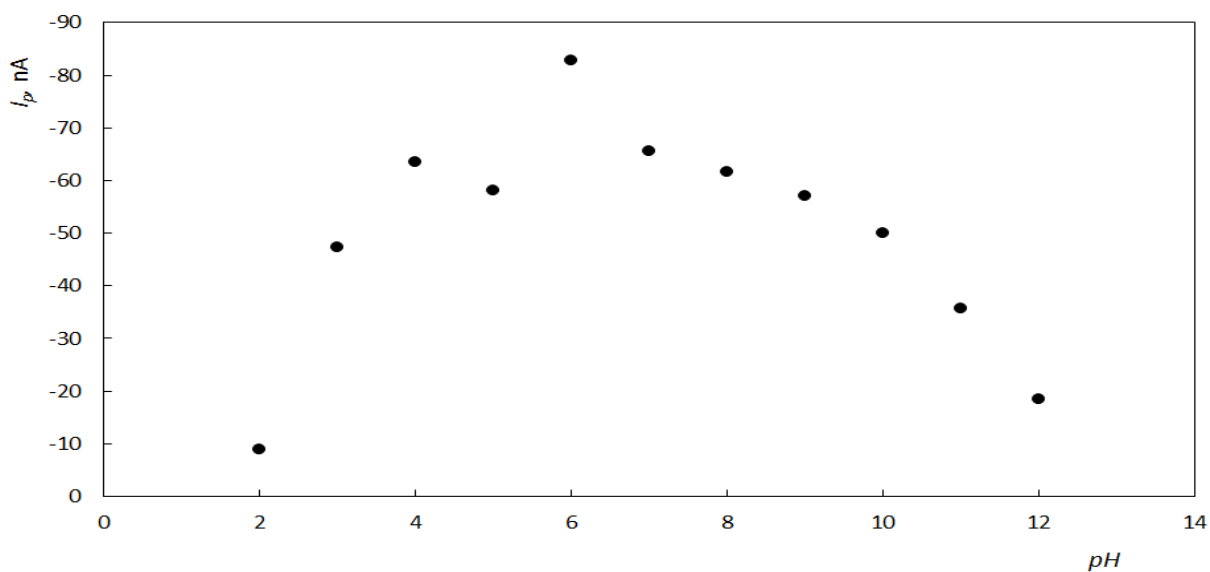
3.2.2 Vliv pH

Stejně jako v případě HMDE byla použita metoda DC voltametrie s parametry modifikovanými pro m-AgSAE. Snahou bylo zachovat složení elektrolytu použitého u HMDE, tedy roztok amitrazu o koncentraci $4,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v prostředí BR pufru a ethanolu (4:1, v/v). Vliv pH byl opět vyšetřován v rozmezí pH* 2 – 12. Na Obr. 10 je pro danou látku v rozsahu pH* 2 6 viditelný jeden dobře vyvinutý pík. Při posunu směrem k zásaditější oblasti v rozmezí pH* 8 – 11 je patrný vznikající druhý pík, který naznačuje další redukční proces. Pravděpodobně se jedná o produkt hydrolyzy amitrazu na 2,4 dimethylanilín.



Obr. 10: DC voltamogramy amitrazu o koncentraci $4,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v závislosti na pH*, pracovní elektroda m-AgSAE, v prostředí BR pufru a ethanolu (4:1, v/v), $E_{in} = -100 \text{ mV}$, $v = 100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ při pH* 2,0 (1); 3,0 (2); 4,0 (3); 5,0 (4); 6,0 (5); 7,0 (6); 8,0 (7); 9,0 (8); 10,0 (9); 11,0 (10); 12,0 (11).

Provedením závislosti výšky píku na pH jak je tomu na obrázku (číslo) je vidět maximum při pH* 6. Toto pH* bylo proto použito pro ostatní pokusy realizované pomocí m-AgSAE.



Obr. 11: Závislost výšky DCV píku amitrazu o koncentraci $4,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na pH^* . Pracovní elektroda m-AgSAE, v prostředí BR pufru a ethanolu (4:1, v/v), $E_{\text{in}} = -100 \text{ mV}$, $\nu = 100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

3.2.3 Vliv počátečního potenciálu

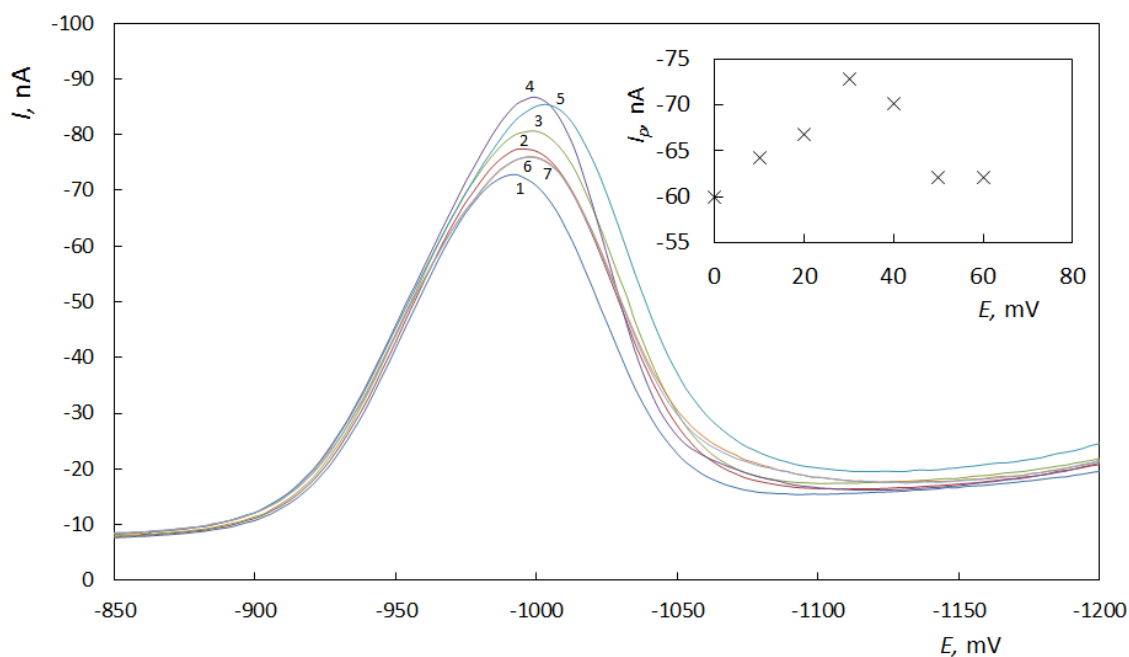
Bylo zkoumáno nastavení parametru E_{in} , který ovlivňuje velikost proudové odezvy. Tento krok byl prováděn opět metodou DC voltametrie. Postupovalo se tak, že byl připraven roztok amitrazu o koncentraci $4,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v prostředí BR pufru a ethanolu (4:1, v/v) o $\text{pH}^* 6$ a provádělo se postupné měření, kdy byl měněn E_{in} v rozmezí od -100 do -800 mV . Rychlost polarizace byla $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Nejvyšší proudové odezvy a zároveň reprodukovatelnosti bylo dosaženo při hodnotě $E_{\text{in}} -100 \text{ mV}$.

3.2.4 Vliv potenciálu akumulace

Obdobně jako u HDME byla použita metoda katodické rozpouštěcí DC voltametrie, jejíž parametry byly upraveny pro m-AgSAE. Pracovalo se s měrným roztokem amitrazu o koncentraci $4,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v prostředí BR pufru a ethanolu (4:1, v/v) o $\text{pH}^* 6$. Předchozí výsledky určily parametr $E_{\text{in}} -100 \text{ mV}$. Potenciál akumulace (E_{acc}) byl zkoumán v rozsahu hodnot od -100 do -800 mV , a to při rychlosti polarizace $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Pro čas akumulace (t_{acc}) při zkoumaných potenciálech byla zvolena hodnota 15 s za současného míchání na nižší otáčky přístroje ETP. Následně byla vždy zařazena klidová doba (E_{klid}) 15 s bez míchání. Optimální proudový pík byl nalezen pro $E_{\text{acc}} -200 \text{ mV}$.

3.2.5 Vliv doby akumulace

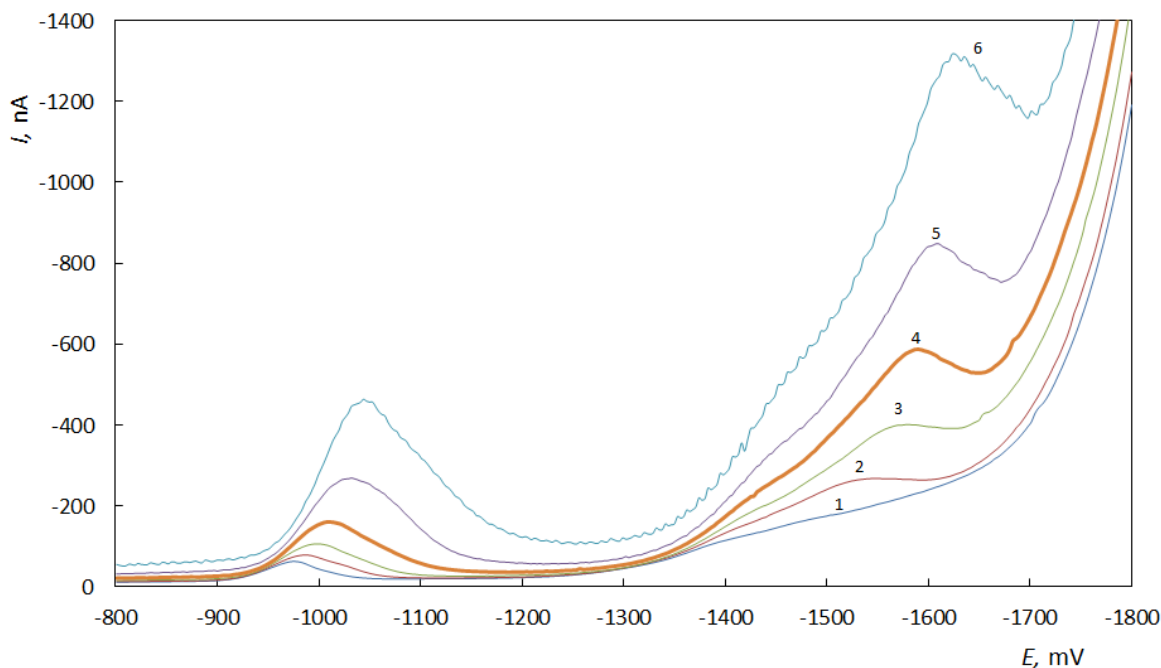
Samotné prozkoumání optimální doby akumulace pak probíhalo při doposud objasněných parametrech měření, tedy $E_{in} -100$, $E_{acc} -200$ a v prostředí BR pufru a ethanolu (4:1, v/v) o pH* 6, $v=100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Sledované časy t_{acc} činily 0 s, 10 s, 20 s, 30 s, 40 s, 50 s a 60 s. Z výseku v Obr. 12 je zřejmý optimální čas t_{acc} 30 s. Při delších t_{acc} proudová odezva výrazně klesala.



Obr. 12: DC voltamogramy amitrazu o koncentraci $4,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na čase akumulace, pracovní elektroda m-AgSAE, v prostředí BR pufru (pH*=6) a ethanolu (4:1, v/v), $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, $E_{in}=-100 \text{ mV}$, $E_{acc} = -200 \text{ mV}$, v časech akumulace $t_{acc} [\text{s}]=0$ (1); 10 (2); 20 (3); 30 (4); 40 (5); 50 (6); 60 (7). Výsek: Závislost výšky píku I_p na t_{acc} .

3.2.6 Vliv rychlosti polarizace

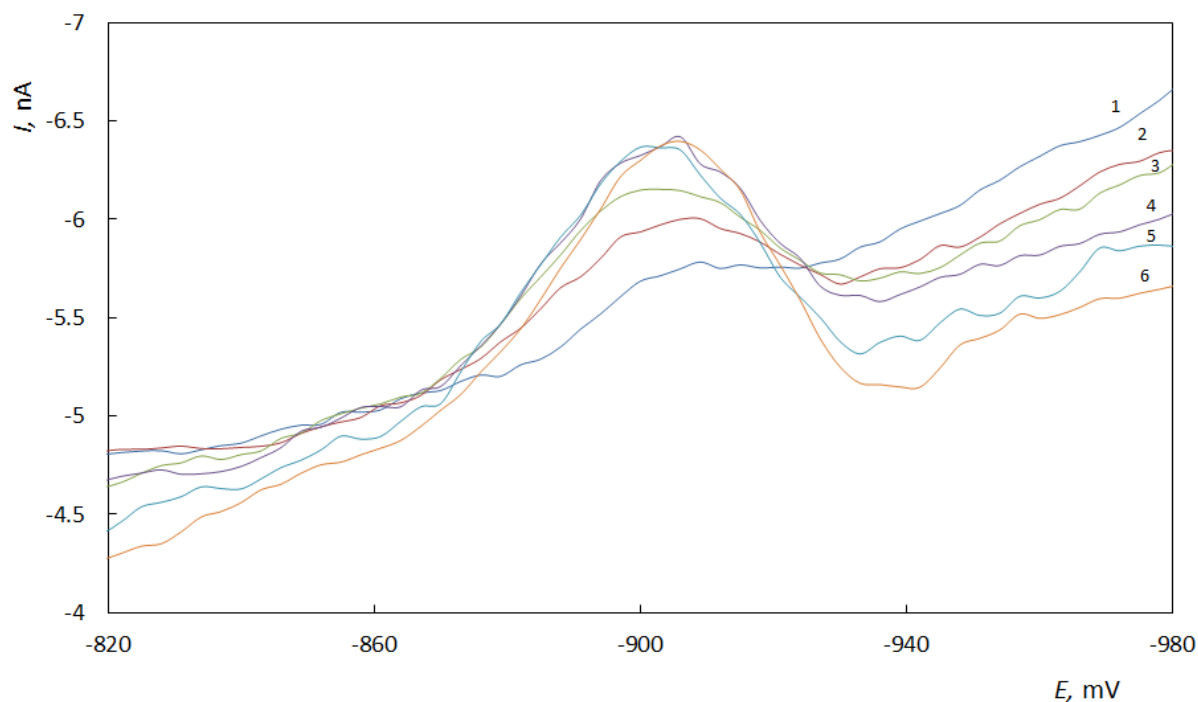
Metodou katodická rozpouštěcí DC voltmetrie byl proměřován vliv rychlosti polarizace elektrod na velikost proudové odezvy amitrazu. Za optimálních podmínek byly proměřovány rychlosti polarizace: 20, 40, 80, 160, 320 a $640 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Shrnutí v Obr. 13.



Obr. 13: DC voltamogramy amitrazu o koncentraci $4,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v závislosti na rychlosti polarizace, pracovní elektroda m-AgSAE, v prostředí BR pufru a ethanolu (4:1, v/v), $E_{\text{in}} = -100 \text{ mV}$, $t_{\text{acc}} = -20 \text{ s}$, $E_{\text{acc}} = -300 \text{ mV}$, $\text{pH}^* 4,0$. v $[\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}] = 20$ (1), 40 (2), 80 (3), 160 (4), 320 (5), 640 (6).

3.2.7 Koncentrační závislost amitrazu na m-AgSAE

Koncentrační závislost stanovované látky amitrazu byla stejně jako v případě HMDE měřena v rozmezí koncentrací od 10^{-8} do $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, a to metodou DPV (výška pulzu -50 mV , šířka pulzu 80 ms). Koncentrační řada byla pro oba řády měřena najednou, ale grafy výsledných dat jsou zobrazeny odděleně. Obdobně jako u HMDE byly také nastaveny optimální parametry zjištěné DC voltametrií: Prostředí o $\text{pH}^* 6$, $E_{\text{in}} = -100 \text{ mV}$, $E_{\text{acc}} = -200 \text{ mV}$. Doba akumulace byla prodloužena na $t_{\text{acc}} = 100 \text{ s}$, neboť při kratších dobách akumulace byl zaznamenán jen velmi malý či žádný proudový pík. Rychlost polarizace byla stejně jako u HMDE $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Výsledný voltamogram pro koncentrační závislost v řádu $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ je na Obr. 14.



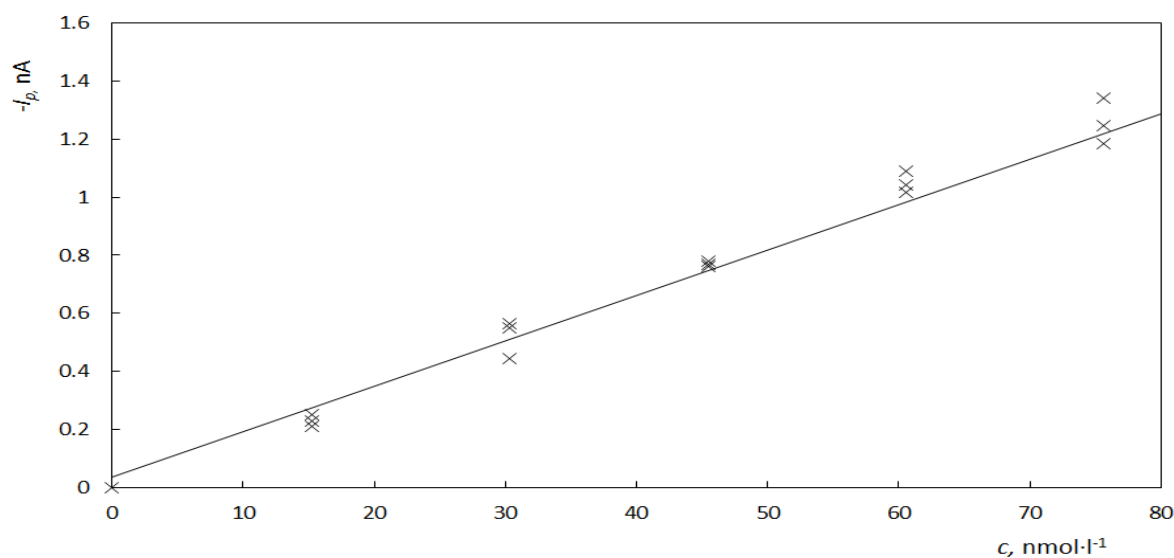
Obr. 14: DC voltamogramy koncentrační závislosti amitrazu, pracovní elektroda m-AgSAE, v prostředí BR pufru a ethanolu (4:1, v/v), $E_{in}=-100$ mV, $t_{acc}=-20$ s, $E_{acc}=200$ mV, pH* 6,0. Koncentrace [$\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$]: 15,2 (1), 30,3 (2), 45,5 (3), 60,6 (4), 75,6 (5), 90,7 (6).

Na základě vyhodnocení výšek píků jednotlivých měření byla sestrojena závislost proudové odezvy na koncentraci analytu. Do grafu jsou zanesena vždy tři paralelní stanovení (Obr. 15). Po statistickém zpracování výsledných dat byla vypočtena lineární regresní rovnice:

$$I_p=(0,01584\pm 0,00097) c[\text{nA}]; r=0,989 \quad (1)$$

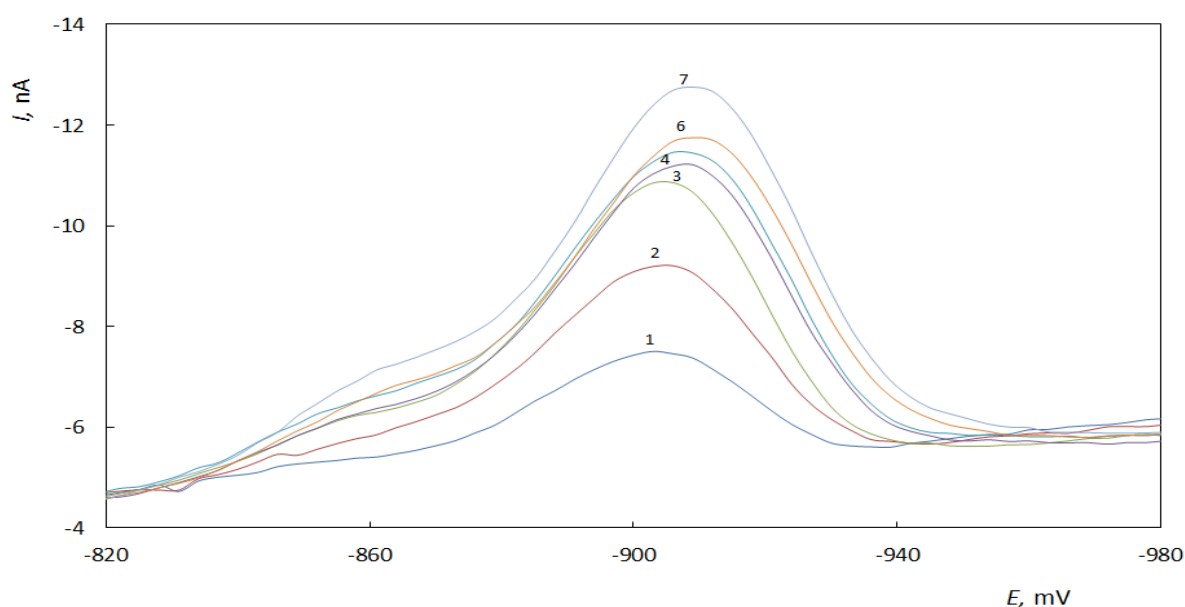
Přímou metodou signálu, IUPAC [20], byly stanoveny kritická mez $4,6 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, mez detekce $8,9 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a mez stanovitelnosti $13 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Stejným způsobem byla vyhodnocena koncentrační závislost v řádu $10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Obr. 16 a Obr. 17).

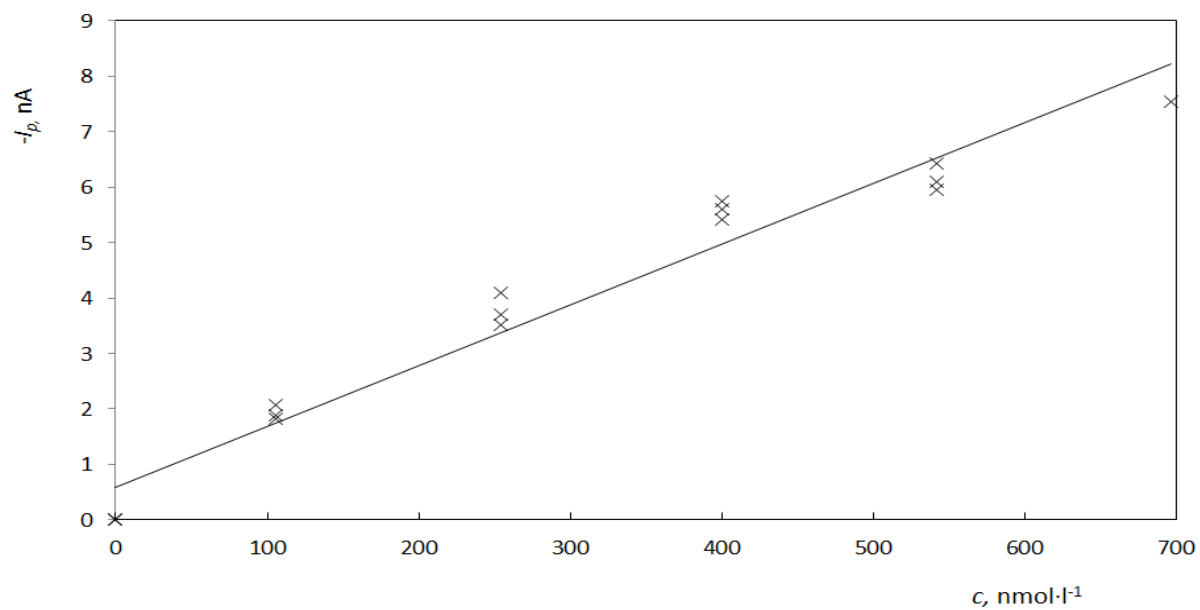


Obr. 15: Výšky píků amitrazu o koncentraci $4,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v závislosti na koncentraci, DPV voltametrie, pracovní elektroda m-AgSAE, v prostředí BR pufru a ethanolu (4:1, v/v) pH* 6, $E_{\text{in}} = -100 \text{ mV}$, $t_{\text{acc}} = -20 \text{ s}$, $E_{\text{acc}} = -200 \text{ mV}$.

Další voltamogram na obr. (číslo) znázorňuje koncentrační závislost amitrazu v řádu $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



Obr. 16: DP voltamogramy koncentrační závislosti amitrazu, pracovní elektroda m-AgSAE, v prostředí BR pufru a ethanolu (4:1, v/v), $E_{\text{in}} = -100 \text{ mV}$, $t_{\text{acc}} = -20 \text{ s}$, $E_{\text{acc}} = -200 \text{ mV}$, pH* 6,0. Koncentrace v $\text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$: 106 (1), 254 (2), 400 (3), 542 (4), 696 (5), 847 (6), 994 (7).



Obr. 17: Závislost výšek píkú amitrazu na jeho koncentraci. DPV voltametrie, pracovní elektroda m-AgSAE, v prostředí BR pufru ($\text{pH}^* 6$) a ethanolu (4:1, v/v), $E_{\text{in}} = -100$ mV, $t_{\text{acc}} = 100$ s, $E_{\text{acc}} = -300$ mV.

4. ZÁVĚR

Při studiu voltametrického chování pesticidu amitrazu na HMDE i na m-AgSAE byl pomocí cyklické DC voltametrie registrován jeden ireversibilní katodický pík. V anodickém směru nebyla zaznamenána žádná výraznější odezva, která by svědčila o probíhajícím oxidačním ději. V souladu se strukturou látky tento katodický pík odpovídá dvou-elektronové redukci azomethinové skupiny. Při vyšších pH (výrazněji pouze u amalgámové elektrody) byl lokalizován druhý katodický pík nacházející se v negativnějších hodnotách potenciálů (přibližně -1500 mV a více), což už je hraniční hodnota kdy se začíná vylučovat vodík. Jde o hranici potenciálového okna elektrolytu. Tento druhý pík je pravděpodobně způsoben redukcí degradačních produktů hydrolytického štěpení amitrazu. Jde o 2,4 dimethylanilín. Zkoumáním vlivu pH bylo dosaženo nejlepší odezvy spíše v kyselejších prostředí, což ovšem sebou přináší komplikaci v přebytku volných H^+ iontů, které přispívají k rychlejšímu rozpadu zkoumané látky. Přestože bylo na rtuťové elektrodě dosaženo výrazné odezvy i při $pH^* 8$, jako pracovní bylo zvoleno $pH^* 4$, z důvodu v praxi očekávaného spíše kyselého prostředí. Zkoumání času akumulace jasně dokázalo, že se látka adsorbuje na povrch elektrody, protože bez akumulace bylo dosaženo mnohem menšího píku. Proto bylo při zkoumání meze detekce rozhodnuto o použití DP adsorpční rozpouštěcí voltametrie která látku prekoncentruje a je tak možno zvýšit citlivost stanovení. Na obou pracovních elektrodách (HMDE i m-AgSAE) byly dosaženy meze detekce v řádu jednotek $nmol.l^{-1}$.

5. SEZNAM LITERATURY

1. Vlcek, V.; Pohanka, M., Environmental Aspects of Organophosphorus and Carbamate Pesticides Approved for Use in the Czech Republic. *Chemické Listy* **2011**, 105, (12), 908-912.
2. Mickova, B.; Rauch, P.; Fukal, L., Possibilities of immunochemical determination of organochlorine and carbamate pesticides. *Chemické Listy* **2004**, 98, (11), 970-980.
3. Hajslova, J.; Kocourek, V.; Poustka, J.; Cuhra, P., Sample handling in analysis of pesticide residues in foodstuffs. *Chemické Listy* **1998**, 92, (10), 777-783.
4. Corta, E.; Bakkali, A.; Berrueta, L. A.; Gallo, B.; Vicente, F., Kinetics and mechanism of amitraz hydrolysis in aqueous media by HPLC and GC-MS. *Talanta* **1999**, 48, (1), 189-199.
5. Ibrahim, M. S.; El-Maazawi, M. S.; Al-Magboul, K. M.; Kamal, M. M., Determination of amitraz pesticide by adsorptive stripping voltammetry on the hanging mercury drop electrode. *Mikrochimica Acta* **2001**, 137, (3-4), 215-220.
6. Lee, S. K., H. T.; Shin, Y. W.; Jeon, Y. , organic compounds Amitraz. *Acta Crystallographica* **2013**, E69, 1300-1309.
7. Guo, H.; Zhang, P.; Wang, J. W.; Zheng, J., Determination of amitraz and its metabolites in whole blood using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2014**, 951, 89-95.
8. Xu, J. Z.; Miao, J. J.; Lin, H.; Ding, T.; Zhao, Z. Y.; Wu, B.; Shen, C. Y.; Jiang, Y., Determination of amitraz and 2,4-dimethylaniline residues in honey by using LC with UV detection and MS/MS. *Journal of Separation Science* **2009**, 32, (23-24), 4020-4024.
9. Vucinic, S. J., D; Vucinic, Z.; Joksovic, D.; Segrt, Z., A near-fatal case of acute poisoning by amitraz/xylene showing atrial fibrillation. *Forensic Toxicol* **2007**, (25), 41-44.
10. Papaefthimiou, C.; Papachristoforou, A.; Theophilidis, G., Biphasic responses of the honeybee heart to nanomolar concentrations of amitraz. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **2013**, 107, (1), 132-137.
11. 2393/1999, C. R. E. N., COMMISSION REGULATION (EC) No 2393/1999 amending Annexes I, II and III of Council Regulation (EEC) No 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European*

Communities **1999**, 290-294

12. TIC, Amitraz. Toxicological Information Centre: Toxicological Information Centre, Prague, 2014; Vol. Texpro, Toxicological Information Centre, Prague.
13. Brimecombe, R. D.; Limson, J. L., Electrochemical investigation of the effect of pH and solvent on amitraz stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, 54, (21), 8139-8143.
14. Brimecombe, R.; Limson, J., Voltammetric analysis of the acaricide amitraz and its degradant, 2,4-dimethylaniline. *Talanta* **2007**, 71, (3), 1298-1303.
15. Navratil, T.; Svancara, I.; Mrazova, K.; Novakova, K.; Sestakova, I.; Heyrovsky, M.; Pelclova, D., Mercury and Mercury Electrodes: The Ultimate Battle for the Naked Existence (A Consideration). In *Sensing in Electroanalysis Vol. 6.*, Kalcher, K.; Metelka, R.; Svancara, I.; Vytras, K., Eds. University Press Centre: Pardubice, 2012; Vol. 6, pp 23-53.
16. Novotny, L.; Yosypchuk, B., Solid silver amalgam electrodes. *Chem. Listy* **2000**, 94, (12), 1118-1120.
17. Mikkelsen, O.; Schroder, K., Dental amalgam in voltammetry some preliminary results. *Anal. Lett.* **2000**, 33, (15), 3253-3269.
18. Danhel, A.; Shiu, K. K.; Yosypchuk, B.; Barek, J.; Peckova, K.; Vyskocil, V., The Use of Silver Solid Amalgam Working Electrode for Determination of Nitrophenols by HPLC with Electrochemical Detection. *Electroanalysis* **2009**, 21, (3-5), 303-308.
19. Yosypchuk, B.; Barek, J., Analytical Applications of Solid and Paste Amalgam Electrodes. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2009**, 39, (3), 189-203.
20. Meloun, M.; Militky, J., *Statistická analýza experimentálních dat*. Academia: Praha, 2006.