

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

**Analýza insekticidu imidaclopridu pomocí voltametrických
technik**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce: Martin Pavelka
Studijní obor: Analytická chemie
Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.

Olomouc 2016

Souhrn

Diplomová práce se zabývá studiem elektrochemické redukce insekticidu imidaclopridu. Metodou tast polarografie a cyklické voltametrie na rtuťové elektrodě byl studován mechanismus redukce imidaclopridu. Následně byly hledány optimální podmínky pro analýzu imidaclopridu metodou diferenčně pulsní voltametrie na třech různých elektrodách – visící rtuťové kapkové elektrodě, rtuťové filmové elektrodě a elektrodě ze skelného uhlíku. Získané poznatky byly aplikovány na analýzu reálných vzorků. Byla provedena elektrolýza roztoku imidaclopridu na velkoplošné rtuťové elektrodě za konstantního potenciálu a vzniklé produkty byly studovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Na základě hmotnostních spekter byla navržena struktura produktů elektrochemické redukce imidaclopridu.

Klíčová slova: Imidacloprid, neonikotinoidové insekticidy, tast polarografie, cyklická voltametrie, diferenčně pulsní voltametrie, rtuťová elektroda, rtuťová filmová elektroda, elektroda ze skelného uhlíku.

Summary

Diploma thesis deals with the study of electrochemical reduction of insecticide imidacloprid. Mechanism of reduction of imidacloprid was studied with fast polarography and cyclic voltammetry. Next, suitable conditions for analysis of imidacloprid with differential pulse voltammetry on three different electrodes – hanging mercury drop electrode, mercury film electrode and glassy carbon electrode – were investigated. Optimal conditions were applied for analysis of real samples. The electrolysis of imidacloprid solution on mercury pool electrode was performed and electrolytic products were studied with mass spectrometry. Based on the mass spectra, the structure of products from electrochemical reduction of imidacloprid was proposed.

Keywords: Imidacloprid, neonicotinoid insecticides, fast polarography, cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry, mercury electrode, mercury film electrode, glassy carbon electrode.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 20. 4. 2016

.....

Vlastnoruční podpis

Poděkování

Děkuji vedoucí diplomové práce RNDr. Janě Skopalové, Ph.D. za její velkou ochotu a pomoc při provádění experimentů i při psaní diplomové práce. Dále děkuji své rodině za podporu během studia.

Obsah

1	Úvod	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Neonikotinoidy	9
2.1.1	Mechanismus účinku neonikotinoidů.....	11
2.1.2	Environmentální problémy.....	13
2.2	Chemické a fyzikální vlastnosti imidaclopridu.....	15
2.2.1	Metabolická přeměna imidaclopridu.....	16
2.2.2	Fotolytický rozklad imidaclopridu	17
2.2.3	Hydrolyza imidaclopridu.....	18
2.2.4	Elektrochemická redukce imidaclopridu.....	19
2.3	Možnosti analýzy imidaclopridu.....	19
2.3.1	Spektrální metody.....	19
2.3.2	Separční metody	19
2.3.3	Imunochemické metody	21
2.3.4	Voltametrické metody	21
2.4	Polarografické a voltametrické metody	22
2.4.1	Používané elektrodové materiály	22
2.4.2	Polarografie	23
2.4.3	Cyklická voltametrie	24
2.4.4	Diferenčně pulsní voltametrie	26
2.5	Coulometrie.....	26
3	Experimentální část.....	28
3.1	Chemikálie	28
3.2	Použité přístroje	28

3.2.1	Voltametrická měření	28
3.2.2	HPLC	29
3.2.3	Hmotnostní spektrometrie	29
3.2.4	Ostatní použité přístroje	29
3.3	Pracovní postupy	29
3.3.1	Voltametrické experimenty	29
3.3.2	HPLC	30
3.3.3	Analýza reálných vzorků	30
3.3.4	Elektrolýza na velkoplošné rtuťové elektrodě	31
3.3.5	Hmotnostní spektrometrie	31
3.3.6	Zpracování dat	31
4	Výsledky a diskuse	33
4.1	Rtuťová elektroda	33
4.1.1	Cyklická voltametrie	33
4.1.2	Tast polarografie	34
4.1.3	Diferenčně pulsní voltametrie	36
4.2	Elektroda ze skelného uhlíku	40
4.3	Rtuťová filmová elektroda	41
4.4	Srovnání kalibračních závislostí	45
4.5	Analýza reálných vzorků	45
4.6	Stabilita imidaclopridu v alkalické oblasti	46
4.7	Elektrolýza na velkoplošné rtuťové elektrodě	48
5	Závěr	52
6	Literatura	53
7	Seznam zkratk	56
8	Přílohy	57

1 Úvod

Imidacloprid (IMI, 1-(6-chlor-3-pyridylmethyl)-*N*-nitroimidazolidin-2-ylidenamin, Obr. 1) je insekticid ze skupiny neonikotinoidů, které působí toxicky na nervovou soustavu hmyzu. Mezi jejich výhody patří vysoká selektivita pro hmyz, tzn. nejsou příliš toxické pro obratlovce včetně člověka. Přesto mají významný negativní dopad na životní prostředí.

Hlavním cílem této práce bylo nalezení vhodných podmínek pro analýzu IMI různými voltametrickými technikami a dále studium elektrochemické redukce IMI.

V teoretické části je nejprve uveden přehled komerčně používaných neonikotinoidových insekticidů, je diskutován mechanismus jejich účinku na nervovou soustavu a environmentální problémy související s jejich používáním. Dále jsou popsány fyzikální a chemické vlastnosti IMI a je uvedena rešerše vybraných vědeckých prací zabývajících se analýzou IMI. Stručně je popsána i teorie polarografických a voltametrických metod s důrazem na metody a elektrody používané v experimentální části práce.

Praktická část práce se zabývá studiem elektrochemické redukce IMI metodou tzv. polarografie na kapající rtuťové elektrodě (DME) a metodou cyklické voltametrie na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE). Následně byly hledány vhodné podmínky pro analýzu IMI metodou diferenčně pulsní voltametrie (DPV) na třech pracovních elektrodách: HMDE, elektrodě ze skelného uhlíku (GCE) a rtuťové filmové elektrodě (MFE). Získané poznatky byly aplikovány pro analýzu vzorku říční vody a komerčního insekticidního přípravku. Voltametrické metody byly srovnány s referenční metodou HPLC. Dále byla pomocí ultrafialové spektrofotometrie studována stabilita IMI v alkalickém prostředí. Byla provedena redukce IMI na velkoplošné rtuťové elektrodě a vzniklé produkty byly analyzovány metodou hmotnostní spektrometrie.

2 Teoretická část

2.1 Neonikotinoidy

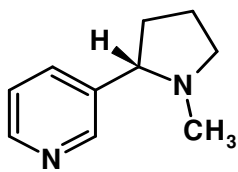
Neonikotinoidy jsou skupina neuroaktivních insekticidů, chemicky podobných nikotinu. V současné době je na trhu sedm těchto insekticidů: imidacloprid (IMI) a thiacloprid (Bayer CropScience), thiamethoxam (Syngenta), nitenpyram (Sumitomo Chemical Takeda Agro Co.), acetamiprid (Nippon Soda), clothianidin (Sumitomo Chemical Takeda Agro Co./Bayer CropScience) a dinotefuran (Mitsui Chemicals) (Obr. 1).¹ Jako první byl komerčně v roce 1991 uveden imidacloprid, který je po mnoho let nejprodávanějším insekticidem na světě.² Po svém uvedení neonikotinoidy brzy získaly významný podíl na trhu s insekticidy. V roce 1990 ve skupině insekticidů dominovaly organofosfáty (43 %), pyrethroidy (18 %) a karbamáty (16 %). V roce 2008 neonikotinoidy zaujímaly 24 % podílu trhu, zejména na úkor organofosfátů (13,6 %) a karbamátů (10,8 %).¹

Podle jejich struktury lze neonikotinoidové insekticidy rozdělit na 3 skupiny: *N*-nitroguanidiny (imidacloprid, clothianidin, thiamethoxam, dinotefuran), nitroenaminy (nitenpyram) a *N*-kyano-amidiny (acetamiprid, thiacloprid).³ Fyzikální vlastnosti neonikotinoidů udává Tab. 1. Jejich rozpustnost ve vodě se pohybuje v rozmezí 0,185 – 590 g l⁻¹, nikotin, od jehož struktury jsou odvozeny, je s vodou neomezeně mísitelný.⁴ Zajímavé je srovnání acidobazického chování neonikotinoidů a nikotinu. p*K*_a nikotinu je 7,9, při fyziologickém pH proto bude převážně protonovaný. Oproti tomu guanidinový motiv IMI má hodnoty p*K*_a 1,56 a 11,12, z toho důvodu je při fyziologickém pH jeho molekula nenabitá.⁴

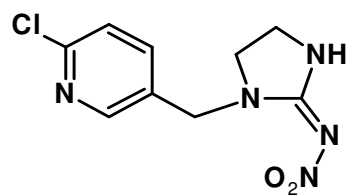
Tab. 1: Fyzikální vlastnosti neonikotinoidů, hodnoty podle lit.⁴

Sloučenina	M _r	Rozpustnost ve vodě (g l ⁻¹)	Log P ^a
Acetamiprid	222,7	4,25	0,80
Clothianidin	249,7	0,30–0,34	0,7
Dinotefuran	202,2	54,3	- 0,64
Imidacloprid	255,7	0,61	0,57
Nitenpyram	270,7	> 590	- 0,66
Thiacloprid	252,7	0,185	1,26
Thiamethoxam	291,7	4,1	- 0,13

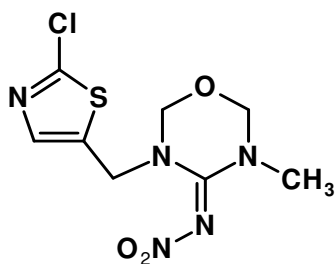
^a P je distribuční koeficient v systému oktan-1-ol/voda.



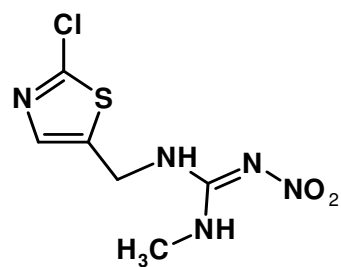
Nikotin



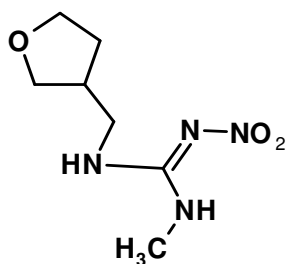
Imidacloprid



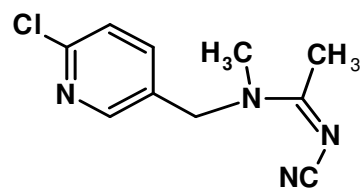
Thiamethoxam



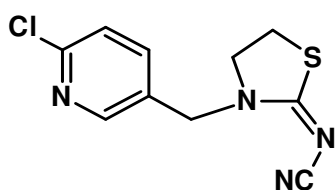
Clothianidin



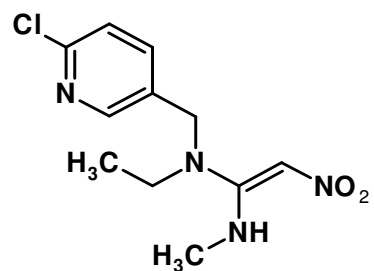
Dinotefuran



Acetamiprid



Thiacloprid

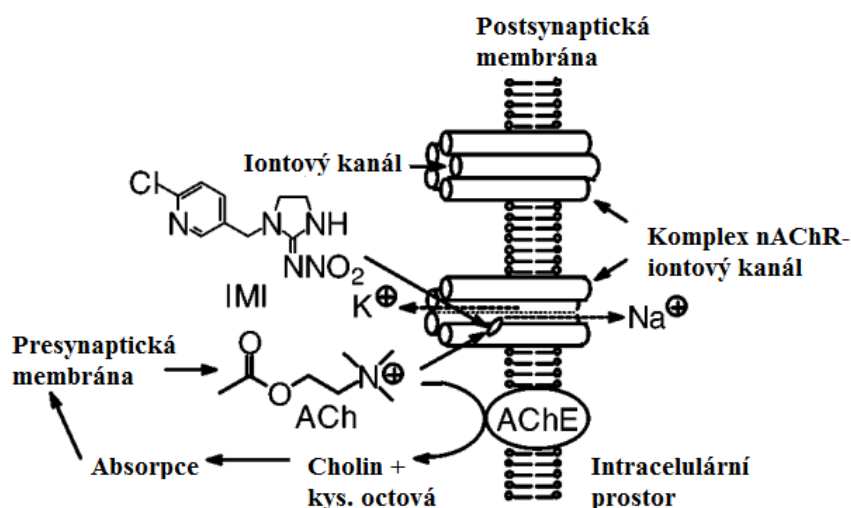


Nitenpyram

Obr. 1: Strukturální vzorce nikotinu a sedmi komerčně používaných neonicotinoidových insekticidů, podle lit.⁵

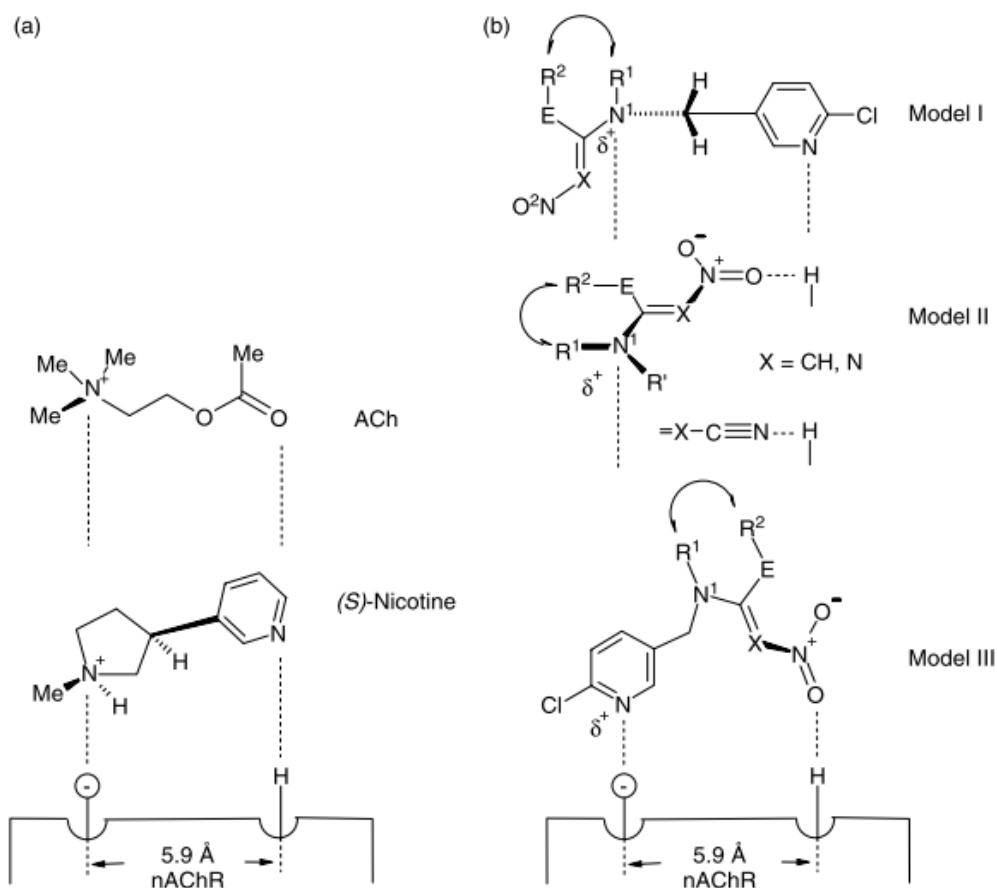
2.1.1 Mechanismus účinku neonikotinoidů

Neonikotinoidy působí jako agonisté postsynaptických nikotinových acetylcholinových receptorů (nAChRs) v nervové soustavě. Přírodním agonistou těchto receptorů je acetylcholin (ACh), který v nervové soustavě zajišťuje přenos nervového vzruchu. Při něm je ACh nejprve uvolněn z presynaptické membrány a poté interaguje s vazebným místem komplexu nAChR/iontový kanál. Následuje konformační změna receptoru, která má za následek tok Na^+ iontů z extracelulárního prostoru do neuronu a tok K^+ iontů opačným směrem. Tím dojde k přenosu nervového vzruchu (Obr. 2). Schopnost neonikotinoidů vázat se na daný receptor (nAChR) je příčinou jejich neurotoxicity.⁶



Obr. 2: Přenos nervového vzruchu pomocí acetylcholinu (ACh) a mechanismus účinku neonikotinoidů, převzato z lit.⁶ a upraveno

K vysvětlení silné vazby neonikotinoidů na nAChR bylo navrženo několik modelů (Obr. 3). Podle prvního modelu se neonikotinoidy váží na elektronově bohatou část receptoru atomem dusíku v poloze 1 (N1) a na vodíkový atom receptoru přes pyridinový atom dusíku (vodíková vazba), druhý model předpokládá vazbu neonikotinoidů vodíkovým můstkem přes nitroskupinu (příp. kyanoskupinu) místo vazby přes pyridinový atom dusíku a třetí model vazbu pyridinovým dusíkem na elektronově bohatou část receptoru a nitroskupiny přes vodíkový můstek.³



Obr. 3: Modely vazby ACh, nikotinu (a) a neonicotinoidů (b) na nAChR, E = NH, N, S nebo CH₃, převzato z lit.³

Ze srovnání toxikologických vlastností jednotlivých tříd insekticidů (Tab. 2) vyplývá, že neonicotinoidy mají společně s některými methylkarbamáty nejnižší hodnoty log P. Jejich velkou výhodou společně s pyrethroidy je velká selektivita vůči hmyzu oproti savcům, jak ukazují hodnoty LD₅₀. Významně vyšší toxicita pro hmyz je připisována rozdílné struktuře mezi savčími a hmyzími nAChR receptory.^{4,6}

Tab. 2: Toxikologické údaje pro jednotlivé třídy insekticidů, hodnoty podle lit.⁴

Třída	Log P ^a	LD ₅₀ ^b		Faktor selektivity
		Hmyz	Potkan	
Neonikotinoidy	- 0,7 až 1,3	2	912	456
Organofosfáty	1 až 5,5	2	67	33
Methylkarbamáty	- 1 až 3	2,8	45	16
Organochlorované pest.	5,5 až 7,5	2,6	230	91
Pyrethroidy	4 až 9	0,45	2000	4500

^a P je distribuční koeficient v systému oktan-1-ol/voda.

^b Hodnoty LD₅₀ jsou geometrické průměry získané z velkého souboru dat, u potkanů jsou hodnoty pro perorální podání, u hmyzu pro topické podání.

2.1.2 Environmentální problémy

Neonikotinoidy jsou rozpustné ve vodě a snadno absorbovatelné rostlinami přes kořeny i listy a poté jsou transportovány do dalších pletiv rostliny. Díky tomu ochraňují všechny části rostliny. Koncentrace v rostlinných pletivech a šťávách mezi 5 a 10 ppb jsou obecně považovány za dostatečné na ochranu proti škodlivému hmyzu. V rozvinutých zemích se neonikotinoidy používají převážně k chemické úpravě osiva před samotným pěstováním (hlavně imidacloprid, clothianidin a thiamethoxam). Masivní používání neonikotinoidů vedlo k odklonu od *integrované ochrany proti škůdcům* (IPM = Integrated Pest Management), podle které by se měly pesticidy používat jen v případě nutnosti a nemělo by docházet k masivní aplikaci širokospektrých špatně rozložitelných sloučenin.⁷

Nejčastější formou aplikace neonikotinoidů je ošetřování osiva před vysetím, možná je i přímá aplikace insekticidu do půdy. V půdě přítomné neonikotinoidy jsou jednak vstřebávány rostlinami při růstu a zároveň dochází i k jejich degradaci a splachování do povrchových i podzemních vod. Přesto zůstává v půdě měřitelná koncentrace insekticidů a po několikaleté aplikaci může docházet k jejich akumulaci a postupnému zvyšování koncentrace v půdě. Degradace neonikotinoidů v půdě i ve vodě probíhá vlivem hydrolýzy, fotolýzy i bakteriálního rozkladu. Poločas rozkladu závisí na mnoha faktorech, jako jsou např. teplota, pH a vlhkost půdy, expozice slunečnímu záření.⁸

2.1.2.1 Vliv na bezobratlé živočichy

Neonikotinoidy vykazují toxicitu nejen pro hmyzí škůdce, ale i pro ostatní bezobratlé. Vědecké studie se nejvíce věnují jejich vlivu na hmyzí opylovače – včelu medonosnou (*Apis mellifera*), samotářské včely a čmeláky (*Bombus spp.*) z důvodu jejich velkého významu pro lidstvo. Produkce 84 % zemědělských plodin v Evropě přímo závisí na hmyzích opylovačích.

Počet a druhová bohatost divoce žijících samotářských včel i počet jedinců chované včely medonosné se však snižuje, proto je věnována značná pozornost různým faktorům ovlivňujícím jejich početnost.⁹

Neonikotinoidy jsou distribuovány v celém těle rostliny, včetně nektaru a pylu, a takto se dostávají do těl včel a jejich úlů. Toxicita neonikotinoidů na opylovače se dá rozdělit na akutní letální toxicitu, chronickou letální toxicitu a subletální toxicitu. Akutní letální toxicita se měří jako počet mrtvých jedinců po 24 – 48 hod. a poté je spočítána letální dávka či koncentrace (hodnota LD₅₀ nebo LC₅₀). Letální toxicita závisí na způsobu podání, orální podání je toxičtější než podání povrchem těla. Hodnoty toxicity se značně liší mezi jednotlivými studii a zároveň jsou velké rozdíly mezi studii v laboratorních podmínkách a ve skutečných podmínkách včelích úlů. U chronické letální toxicity se hodnotí úmrtnost v delším časovém období (několik týdnů).¹⁰

Subletální toxicita nezpůsobuje úhyn opylovačů přímo, ale může způsobit jejich úhyn nepřímo, např. snížením reprodukčních schopností či schopností shánět potravu. Mommaerts a kol. (2010) studovali vliv IMI, thiamethoxamu a thiaclopridu na získávání potravy u mikrokolonií čmeláka (*Bombus terrestris*). Pokud byla potrava s insekticidem umístěna přímo v boxu s kolonií čmeláků, byla hodnota LC₅₀ pro IMI 59 ppb, když byla potrava umístěna ve vedlejším boxu, hodnota LC₅₀ pro IMI klesla na 20 ppb, tzn. s větší vzdáleností potravy od hnízda klesala koncentrace LC₅₀.¹¹ Laycock a kol. (2012) studovali vliv IMI na rozmnožování mikrokolonií čmeláků. Byl pozorován pokles plodnosti s rostoucí koncentrací IMI.¹²

Neonikotinoidy mohou i v nízkých subletálních koncentracích snižovat obranyschopnost opylovačů vůči parazitům. Pettis a kol. (2012) pozorovali vyšší růst parazita hmyzomorky (*Nosema spp.*) u včel medonosných (*Apis mellifera*) vystavených IMI oproti kontrolnímu vzorku včel.¹³

Ekotoxikologické testy a z nich odvozené hodnoty LD₅₀ a LC₅₀ jsou často prováděny v laboratorních podmínkách na jednu konkrétní látku. V přírodě jsou však opylovači často vystaveni kombinaci více různých tříd pesticidů, jejichž účinek se může navzájem sčítat. Gill a kol. (2012) vystavili čmeláky (*Bombus terrestris*) neonikotinoidu (IMI) a pyrethroidu (γ -cyhalothrin) o koncentracích, které se mohou reálně vyskytovat na ošetřovaných rostlinách. Vystavení pouze IMI zhoršilo jejich schopnost získávat potravu, pokud byly vystaveny navíc ještě γ -cyhalothrinu, úmrtnost čmeláčích dělnic se dále zvýšila.¹⁴

2.1.2.2 Vliv na obratlovce

I když je toxicita neonikotinoidů pro obratlovce mnohem nižší než pro bezobratlé, mohou mít na obratlovce významný negativní vliv. Neonikotinoidy můžou na obratlovce působit přímo svou toxicitou nebo nepřímo, např. snížením množství potravy. Neonikotinoidy u obratlovců způsobují zpomalení růstu, vývoje a dále snížení schopnosti rozmnožovat se. U savců bylo popsáno nižší množství spermií, vyšší četnost smrti embrya a nižší hmotnost potomků. U ptáků dochází ke ztenčení vaječné skořápky, snižuje se schopnost přežít mláďat a objevují se vývojové abnormality. U dospělých ptáků byla popsána špatná koordinace a neschopnost létat.¹⁵ Nejvíce ohrožení akutní otravou neonikotinoidy jsou semenožraví ptáci, u kterých hrozí konzumace semen ošetřených insekticidy. Takto do sebe mohou snadno dostat letální dávku pesticidu.⁷ Nepřímo mohou být ohroženi i hmyzožraví ptáci, kterým neonikotinoidy snižují množství potravy. Hallmann a kol. (2014) popsali korelaci mezi snížením počtu ptáků a vysokou koncentrací IMI v Holandsku. Jedním z vysvětlení je úbytek hmyzu, tzn. ptačí potravy, vlivem IMI.¹⁶

2.2 Chemické a fyzikální vlastnosti imidaclopridu

Imidacloprid je nejvýznamnějším zástupcem neonikotinoidových insekticidů, v roce 2009 byl jeho podíl na trhu v rámci této skupiny 42 %.¹ Čistý IMI je béžový prášek charakteristického zápachu.¹⁷ Přehled vybraných fyzikálních vlastností IMI je v Tab. 3.

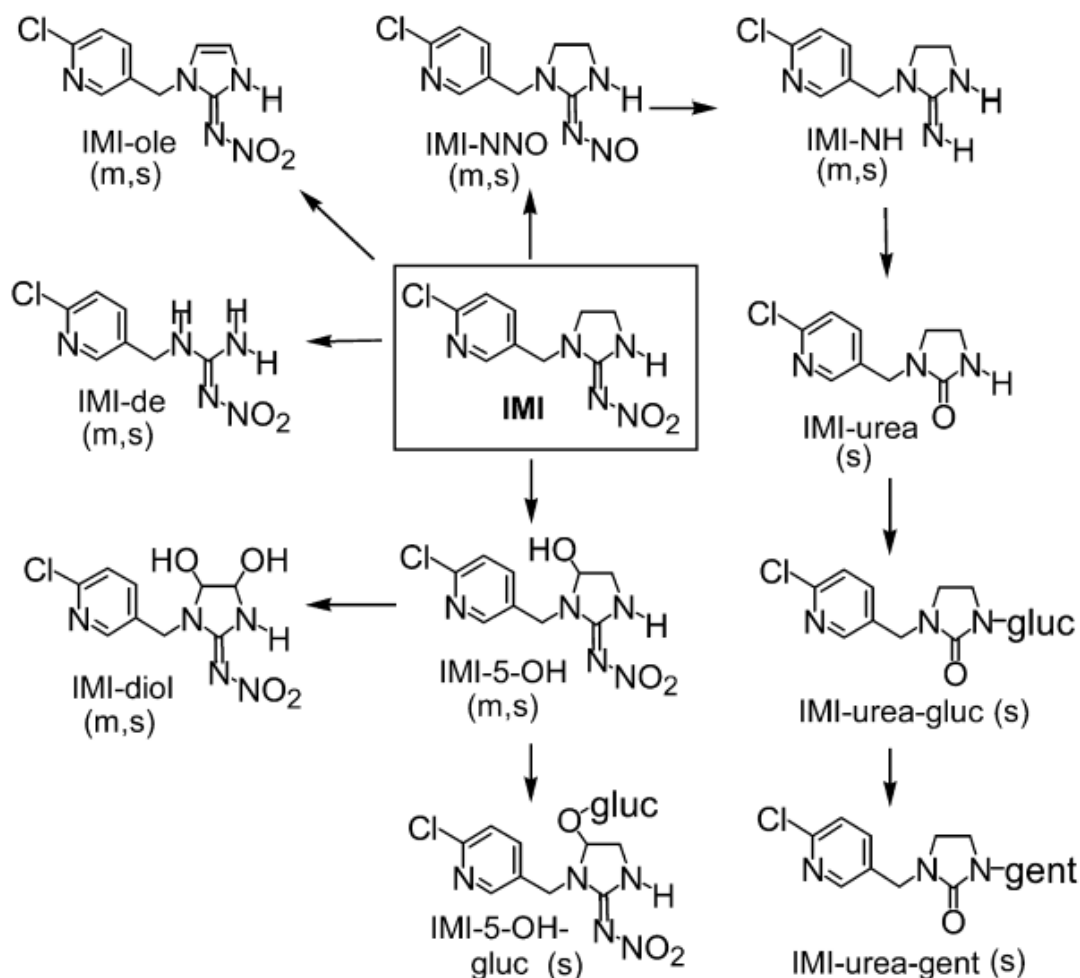
Tab. 3: Fyzikální vlastnosti IMI, hodnoty podle lit.¹⁷

Veličina	Hodnota	
Rozpustnost ve vodě (při 20 °C)	0,61 g l ⁻¹	
Rozpustnost v organických rozpouštědlech (při 20 °C)	n-hexan	<0,1 g l ⁻¹
	toluen	0,69 g l ⁻¹
	ethyl-acetát	6,7 g l ⁻¹
	acetonitril	50 g l ⁻¹
	aceton	50 g l ⁻¹
	dichlormethan	67 g l ⁻¹
	dimethylsulfoxid	>200 g l ⁻¹
Hustota (při 20 °C)	1,41 g cm ⁻³	
Teplota tání	144 °C	
Teplota rozkladu	Diferenční termická analýza: exotermická reakce nad 210 °C	
	Termogravimetrická analýza: ztráta hmotnosti nad 230 °C	
Tlak par (při 20 °C)	4 · 10 ⁻¹⁰ Pa (získáno extrapolací)	
Henryho konstanta	2 · 10 ⁻¹⁰ Pa m ³ mol ⁻¹ (vypočítaná)	
Rozdělovací koeficient oktan-1-ol/voda (při 21 °C)	log P 0,57	

2.2.1 Metabolická přeměna imidaclopridu

Obr. 4 zobrazuje schematicky metabolickou přeměnu IMI v tělech savců (myš) a rostlin (špenát). Ze schématu je patrné, že metabolismus u rostlin i u savců probíhá v první fázi stejně, až ve druhé fázi metabolismu, kdy dochází ke konjugaci se sacharidy, jsou produkty odlišné. U IMI může docházet k redukci nitroskupiny na nitrososkupinu (IMI-NNO) a dále na NH skupinu (IMI-NH), následně u špenátu dochází k přeměně na derivát močoviny (IMI-urea), která se dále konjuguje s glukosou (IMI-urea-gluc) a gentibiosou (IMI-urea-gent). Další možností je oxidační metabolismus zaváděním hydroxylových skupin (IMI-5-OH a IMI-diol),

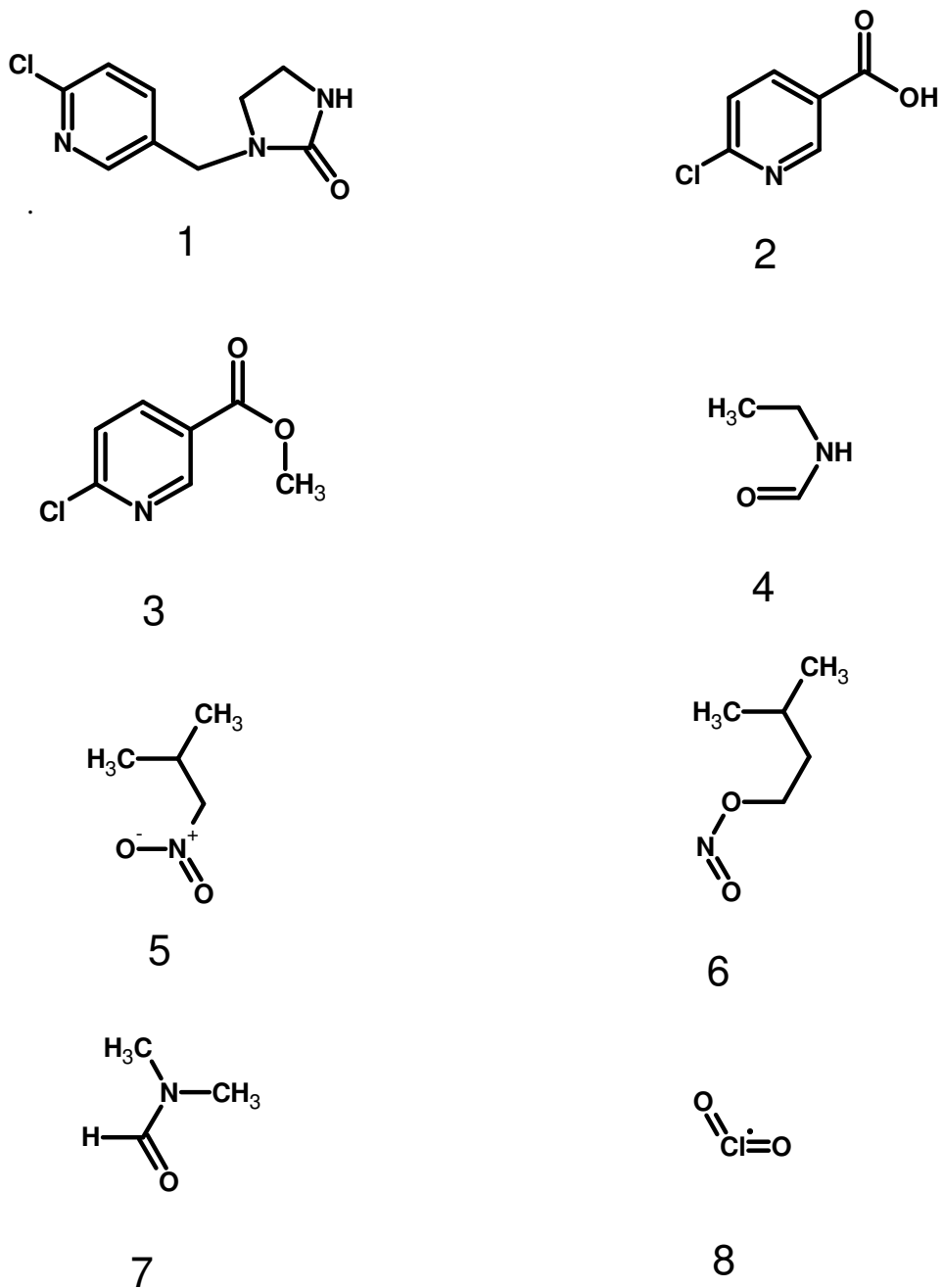
IMI-5-OH se poté může u špenátu konjugovat s glukosou (IMI-5-OH-gluc). Dalšími metabolickými cestami jsou odstranění ethylenové skupiny (IMI-de) a dehydrogenace (IMI-ole).¹⁸



Obr. 4: Schéma metabolických přeměn IMI ve špenátu (s) a myších (m), převzato z lit.¹⁸

2.2.2 Fotolytický rozklad imidaclopridu

Homogenní i heterogenní fotokatalytický rozklad IMI studovali Kitsiou a kol. (2009). Rozklad za heterogenní fotokatalýzy za pomoci TiO_2 a UV-A záření byl značně pomalejší než foto-Fentonova reakce (Fe^{3+} , H_2O_2 a UV-A záření). Vzniklé rozkladné produkty byly charakterizovány pomocí GC-MS (Obr. 5): 1-(6-chlor-3-pyridinyl)methyl-2-imidazolidinon (1), 6-chlornikotinová kyselina (2), methylester 6-chlornikotinové kyseliny (3), *N*-ethylformamid (4), 2-methyl-1-nitropropan (5), amylnitrit (6), *N,N*-dimethylformamid (7) a oxid chloričitý (8).¹⁹



Obr. 5: Rozkladné produkty fotokatalytického rozkladu IMI, podle lit.¹⁹

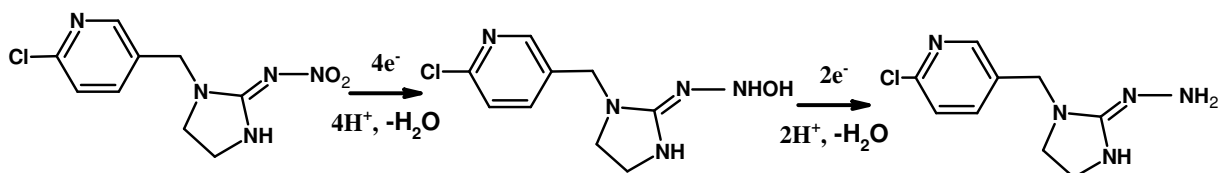
2.2.3 Hydrolýza imidaclopridu

Hydrolýzu IMI při různých hodnotách pH studovali Zheng a kol. (1999). V kyselé a neutrální oblasti pH byla hydrolýza velmi pomalá, při pH 7 došlo za 3 měsíce k úbytku IMI pouze o 1,5 %. Hydrolýza byla znatelnější v bazických oblastech pH, při pH 9 došlo za 3 měsíce k 20% úbytku IMI a při vyšších pH byla doba trvání hydrolýzy v řádu dní (poločas

rozkladu při pH 10,8 byl 20 dní a při pH 11,8 2,85 dne). Bylo zjištěno, že hydrolytickým produktem IMI je 1-(6-chlor-3-pyridinyl)methyl-2-imidazolidinon (Obr. 5 – vzorec 1).²⁰

2.2.4 Elektrochemická redukce imidaclopridu

Mechanismus redukce IMI je v literatuře popisován jako dvoustupňová redukce nitroskupiny, v prvním kroku dochází ke čtyřelektronové redukci na hydroxylamin a ve druhém kroku ke dvouelektronové redukci na amin (Obr. 6).²¹



Obr. 6: Předpokládaný mechanismus redukce IMI, podle lit.²¹

2.3 Možnosti analýzy imidaclopridu

Pro analýzu IMI je možno použít celou řadu metod. Tato kapitola uvádí výběr analytických metod dosud uvedených v odborné literatuře.

2.3.1 Spektrální metody

Guzsvány a kol. (2009) analyzovali pomocí ultrafialové spektrofotometrie obsah IMI v komerčním přípravku insekticidu při vlnové délce 270 nm a dále stejnou metodou souběžně stanovovali obsah IMI a 6-chlornikotinové kyseliny ve vzorku při dvou vlnových délkách (236 a 249 nm).²²

Quintás a kol. (2004) určovali obsah IMI v komerčních přípravcích metodou infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR). Byly využity absorpční pásy kolem 1570 cm⁻¹.²³

Vílchez a kol. (2001) stanovovali IMI ve vzorcích vody průtokovou analýzou s fotochemicky indukovanou fluorescenční detekcí (FIA-PIF). IMI byl nejprve přeměněn v UV reaktoru na fluoreskující produkt, který byl následně detekován (excitační maximum 334 nm, emisní maximum 377 nm).²⁴

2.3.2 Separační metody

Nejčastěji používaná separační metoda je kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem (HPLC-MS). Jako další detektory pro HPLC jsou v literatuře

uváděny diodové pole (DAD) a elektrochemický detektor. Několik prací se zabývá metodami plynové chromatografie a micelární elektrokinetické chromatografie.

Vílchez a kol. (1996) popsali analýzu IMI ve vzorcích vody a půdy pomocí plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (GC-MS). IMI byl nejprve hydrolyzován v bazickém prostředí za zvýšené teploty a vzniklý produkt hydrolyzy (Obr. 5 – vzorec 1) byl extrahován do chloroformu. Zkoncentrovaný extrakt byl použit k nástřiku.²⁵ Výše popsanou metodu použil Navalón a kol. (1997) k analýze IMI ve vzorcích zeleniny.²⁶

MacDonald a kol. (1998) analyzovali IMI v jehličí borovice metodou GC-MS. IMI byl derivatizován anhydridem heptafluorobutanové kyseliny.²⁷

Fernandez-Alba a kol. (1996) analyzovali IMI ve vzorcích zeleniny metodou vysokoučinné kapalinové chromatografie s detekcí diodovým polem.²⁸

De Erenchun a kol. (1997) analyzovali obsah IMI a 6-chlornikotinové kyseliny ve vzorcích půdy pomocí HPLC s ampérometrickým detektorem. Jako pracovní elektroda byla použita rtuťová kapka (HMDE) a autoři pracovali v pulzním módu. Proud byl měřen při potenciálu -1300 mV a další dva pulsy při potenciálech -500 mV a -1150 mV byly čistící.²⁹

Seccia a kol. (2005) stanovovali IMI a dále acetamiprid, thiacloprid a thiamethoxam v pitné vodě metodou HPLC-MS s ionizací elektrosprejem (ESI). Vzorky byly koncentrovány extrakcí pevnou fází (SPE) a tak bylo dosaženo nízkých hodnot meze detekce ($0,01 \mu\text{g l}^{-1}$) a meze stanovitelnosti ($0,03 \mu\text{g l}^{-1}$).³⁰

Di Muccio a kol. (2006) určovali obsah IMI, acetamipridu, thiaclopridu a thiamethoxamu ve vzorcích ovoce a zeleniny metodou HPLC-ESI-MS. Vzorky byly extrahovány acetonem a extrakt poté zakoncentrován pomocí SPE. Meze stanovitelnosti byly v rozmezí $0,1 - 0,5 \text{ mg kg}^{-1}$.³¹

Carretero a kol. (2003) popisují analýzu IMI a 6-chlornikotinové kyseliny ve vzduchu metodou micelární elektrokinetické kapilární chromatografie. Analyty byly ze vzduchu zachyceny na sorbent a po extrakci vodou analyzovány. Jako elektrolyt byl použit amonný pufr, činidlo ke tvorbě micel byl dodecylsírán sodný.³²

2.3.3 Imunochemické metody

Wanatabe a kol. (2001) vyvinuli v myších monoklonální protilátky proti IMI a acetamipridu. Získané protilátky byly použity pro analýzu těchto pesticidů ve vzorcích ovoce a zeleniny přímou kompetitivní ELISA metodou. Výtěžek analýz pro IMI byl 80 – 120 %.³³

Watanabe a kol. (2007) analyzovali IMI v ovocných šťávách metodou ELISA. Metoda umožnila přesně stanovit IMI o koncentraci $5 \mu\text{g l}^{-1}$. Vzorky bylo možno analyzovat bez jakékoliv úpravy či prekoncentrace.³⁴

2.3.4 Voltametrické metody

Byly popsány metody s využitím rtuťové elektrody, amalgamové elektrody, uhlíkové pastové elektrody, elektrody ze skelného uhlíku i bismutové filmové elektrody.

Navalón a kol. (1999) studovali redukci imidaclopridu na rtuťové elektrodě metodou diferenčně pulsní polarografie (DPP) v závislosti na pH. pH bylo upravováno Britton-Robinsonovým pufrem a optimální hodnota pH byla 8. Na polarogramech byly patrné 2 vlny a dále byl studován mechanismus redukce pomocí coulometrie, kdy první redukce se účastnila čtyři elektrony a druhé redukce dva elektrony (Obr. 6, str. 19).²¹

Guiberteau a kol. (2001) popisují stanovení imidaclopridu square wave adsorpční rozpouštěcí analýzou na HMDE. Nejvhodnější pH pro analýzu bylo 7,2.³⁵

Štěpánková a kol. (2015) stanovovali IMI na stříbrné pevné amalgamové elektrodě ve vzorcích vod a v komerčním přípravku metodou DPV.³⁶

Gaál a kol. (2007) analyzovali IMI, thiamethoxam, acetamiprid a nitenpyram na nemodifikované GCE a dále na GCE modifikované bismutovým filmem (BiFE) a tetradekanovým filmem (C14FE).³⁷

Guzsvány a kol. (2005) prováděli analýzu IMI a thiamethoxamu metodou cyklické voltametrie (CV) na elektrodě ze skelného uhlíku.³⁸

Guzsvány a kol. (2008 a 2011) popisují analýzu IMI a acetamipridu na BiFE³⁹ a analýzu IMI a clothianidinu na BiFE a uhlíkové pastové elektrodě modifikované bismutem.⁴⁰

Papp a kol. (2009) analyzovali IMI metodou DPV s uhlíkovými pastovými elektrodami (CPE) obsahujícími různé pojivové kapaliny: silikonový olej (SO-CPE), tetradekan (C14-CPE) a trikresylfosfát (TCP-CPE). Nejlepších výsledků bylo dosaženo s TCP-CPE.⁴¹

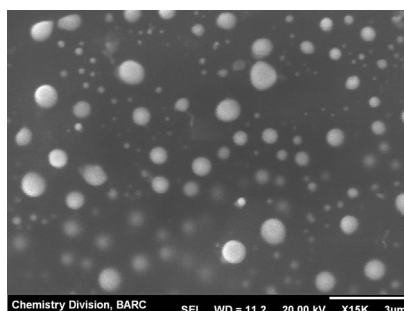
2.4 Polarografické a voltametrické metody

Polarografické a voltametrické metody sledují proudovou odezvu v závislosti na potenciálu vkládaném na pracovní elektrodu. Pokud se jako pracovní elektroda používá kapající rtuťová elektroda, metoda se označuje jako polarografie, metody s ostatními druhy pracovních elektrod (včetně visící rtuťové kapky) se označují jako voltametrické. Klasické uspořádání polarografie bylo dvouelektrodové, dnešní voltametrické metody nejčastěji pracují v tříelektrodovém uspořádání s pracovní, referenční a pomocnou elektrodou. Proud potom probíhá mezi pracovní a pomocnou elektrodou a referenční elektroda je proudově nezatížená. Jako referenční elektrody se používají elektrody 2. druhu (např. argentchloridová, kalomelová), které mají schopnost si udržet konstantní potenciál i při určitém malém proudovém zatížení, jako pomocné elektrody se často používají platinové elektrody.

2.4.1 Používané elektrodové materiály

Klasickým elektrodovým materiálem je *rtuť*. Její výhodou je velké přepětí vodíku, z něhož vyplývá široké potenciálové okno v katodické oblasti, a také velmi dobře obnovitelný a dobře reprodukovatelný hladký povrch. Její hlavní nevýhodou je limitovaný anodický rozsah, způsobený snadnou oxidací rtuti v anodické oblasti.⁴² U *klasické rtuťové kapkové elektrody* (DME) dochází k volnému kapání rtuti z kapiláry, které je řízeno pouze výškou rtuťového rezervoáru (gravitací). Modernější rtuťové elektrody používají automaticky řízené odkapávání rtuti. Patří k nim *statická rtuťová kapková elektroda* (SMDE), při které je kapka vytvořena v krátkém časovém okamžiku (méně než 100 ms), poté se uzavře ventil a kapka dále neroste. Nakonec je kapka odtržena z konce kapiláry pomocí klepátka a je vytvořena kapka nová. Variantou SMDE je *visící rtuťová kapková elektroda* (HMDE), kdy celá analýza probíhá na jedné kapce a až poté dojde k jejímu odklepnutí.⁴³

Mezi rtuťové elektrody patří i *rtuťová filmová elektroda* (MFE), která vzniká pokrytím vhodného substrátu rtuťovým „filmem“. Ve skutečnosti se na většině substrátů netvoří souvislá vrstva rtuti, ale spíše náhodně rozptýlené kapičky rtuti (Obr. 7). Jako substrát pro vytvoření „filmu“ se nejčastěji používá uhlík (zejména skelný uhlík), ale „film“ je možno vytvořit i na vzácných kovech (zlato, platina). Film se většinou vylučuje elektrolyticky z roztoku rtuťnaté soli. Dvě základní metody tvorby MFE jsou *ex-situ* deponace, kdy je film vytvořen mimo analyzovaný roztok, a *in-situ* deponace, při které jsou Hg^{2+} ionty přidány k analyzovanému roztoku.⁴⁴

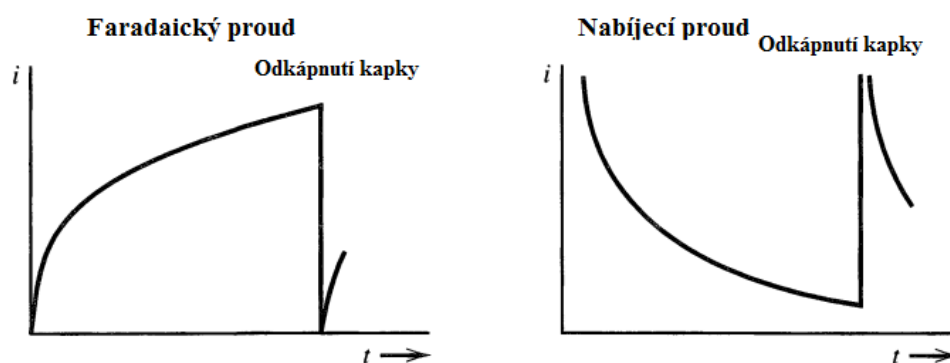


Obr. 7: Rtuťová filmová elektroda na povrchu uhlíkové pastové elektrody, převzato z lit.⁴⁵

Významným elektrodovým materiálem je uhlík, který je používán v různých formách. *Spektrální uhlík* je pórovitý materiál, do pórů může vzlínat rozpouštědlo a jeho povrch je proto nedefinovaný. Z toho důvodu se impregnuje parafínem. Speciálními pyrolytickými postupy se z uhlovodíků připravují méně porézní formy uhlíku. K nim patří *skelný uhlík* (glassy carbon), který je prakticky nepórovitý a je možno ho vyleštit do zrcadlového lesku, čímž je dosaženo poměrně dobře definovaného povrchu. Další formou uhlíku je *uhlíková pasta*, která se připravuje smícháním práškového uhlíku s hydrofobní a elektrochemicky inertní kapalinou, např. parafinovým olejem. Povrch pastové elektrody se dá poměrně snadno obnovit vytlačáním malého množství pasty z těla elektrody, jeho odstraněním a vyhlazením povrchu elektrody.⁴⁶

2.4.2 Polarografie

Proud měřený při polarografickém experimentu je součtem nabíjecího proudu a faradaického proudu. Nabíjecí proud, který je z analytického hlediska nežádoucí, je nejvyšší na začátku doby života kapky a s růstem kapky klesá. Naopak faradaický proud, který nese informaci o koncentraci analytu, je nejvyšší na konci doby života kapky (Obr. 8). Klasická polarografie v DC-módu zaznamenává průměrný proud za celou dobu kapky. Zlepšení poměru signál/šum se dosahuje při tzv. pulsní polarografii, kdy se proud snímá pouze těsně před ukápnutím kapky.⁴³

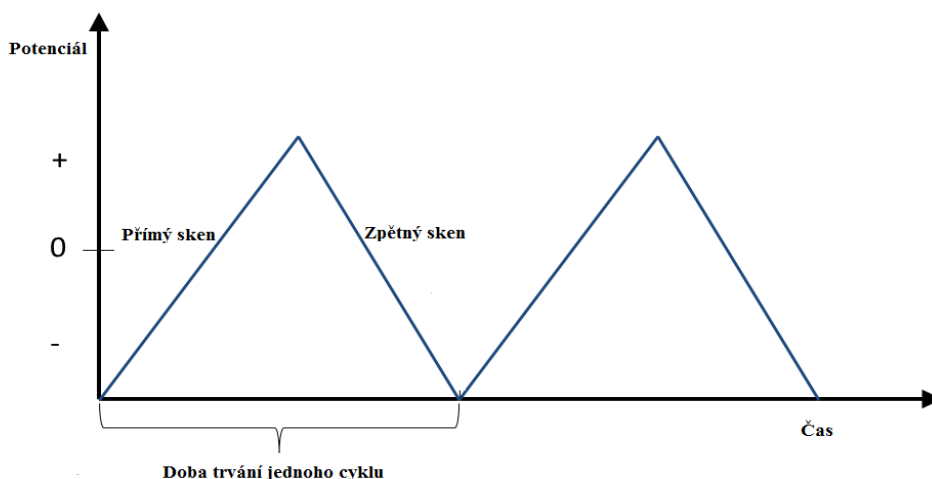


Obr. 8: Závislost faradaického a nabíjecího proudu na době života kapky, převzato z lit.⁴³

Klasická polarografie se dnes v praxi příliš nepoužívá z důvodu existence mnohem citlivějších metod (např. DPV, square wave voltametrie – SWV). Má význam hlavně při teoretických studiích. Jednou z možností jejího využití je určení počtu elektronů účastnících se elektrodové reakce. Provádí se srovnáním výšky polarografické vlny studované látky s výškou vlny srovnávací látky (standardu). Roztoky studované látky i standardu musí mít stejnou molární koncentraci, experiment se musí provést ve stejném elektrolytu a je třeba znát počet vyměňovaných elektronů standardní látky za daných podmínek. Obě látky by měly mít podobnou molekulovou hmotnost a podobný tvar molekuly. Za těchto podmínek se dají předpokládat podobné difúzní koeficienty a při stejném počtu vyměňovaných elektronů budou vlny obou látek stejně vysoké. Pokud se u studované látky objevují dvě vlny, které jsou dostatečně rozlišené, poměr výšek těchto vln je roven poměru počtu vyměňovaných elektronů.⁴⁷

2.4.3 Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie (CV) patří mezi užitečné nástroje pro studium mechanismu elektrochemických reakcí. Není příliš vhodná pro kvantitativní analýzu. Při CV experimentu se potenciál pracovní elektrody lineárně mění s časem a v určitém časovém okamžiku se směr polarizace obrátí (Obr. 9).



Obr. 9: Změna potenciálu s časem při cyklické voltametii, převzato z lit.⁴⁸ a upraveno

Z voltamogramu je poté možno usuzovat na reverzibilitu nebo ireverzibilitu elektrochemické reakce. Hodnota proudu I_p je dána rovnicí (1) pro reverzibilní děj a rovnicí (2) pro ireverzibilní děj, kde I_p je proud (A), n počet vyměňovaných elektronů, α koeficient přenosu náboje, A plocha elektrody (cm^2), D difúzní koeficient elektroaktivní látky ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), c koncentrace elektroaktivní látky (mol cm^{-3}), v rychlost skenu (V s^{-1}):⁴³

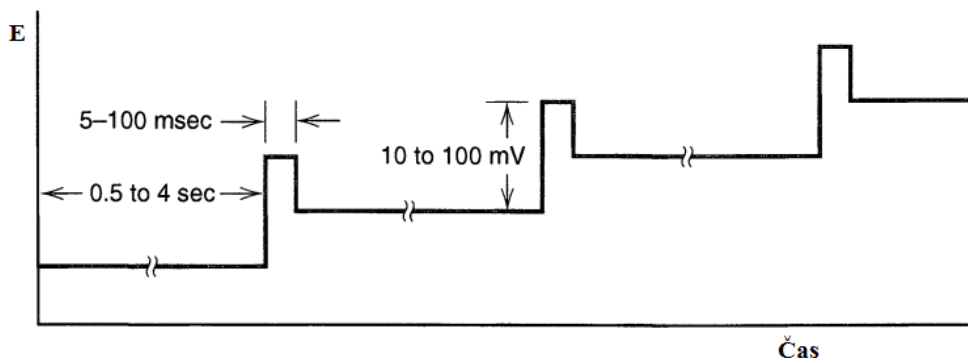
$$I_p = (2,69 \cdot 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} c v^{1/2} \quad (1)$$

$$I_p = (2,99 \cdot 10^5) \alpha^{1/2} A D^{1/2} c v^{1/2} \quad (2)$$

Pro plně reverzibilní reakce platí, že katodický i anodický proud mají stejnou hodnotu ($I_{p,c}/I_{p,a} = 1$), rozdíl potenciálů katodického a anodického píku $\Delta E_p = 2,3 RT/nF$ (R je univerzální plynová konstanta $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, T termodynamická teplota v K a F Faradayova konstanta $96 485 \text{ C mol}^{-1}$) a hodnota potenciálu E_p je nezávislá na rychlosti skenu. Pro ireverzibilní děj se nemusí ve zpětném skenu pík vůbec objevit a hodnota E_p závisí na rychlosti skenu (pro redukce se se zvyšující v posouvá E_p k negativnějším potenciálům). Z rovnic (1) a (2) také vyplývá, že hodnota proudu je přímo úměrná druhé odmocnině z rychlosti skenu ($I_p \approx v^{1/2}$) pro reverzibilní i ireverzibilní elektrodovou reakci. To však platí pouze pro plně difúzně řízený děj. Pokud je děj řízený adsorpcí, je hodnota proudu přímo úměrná rychlosti skenu ($I_p \approx v$).⁴³

2.4.4 Diferenčně pulsní voltametrie

Diferenčně pulsní voltametrie (DPV) patří mezi pulsní voltametrické techniky, které se oproti klasické polarografii vyznačují výrazně nižšími hodnotami meze detekce (LOD). Při DPV skenu se na lineárně se měnící potenciál vkládá napěťový puls (ΔE) o amplitudě 10 až 100 mV a době trvání v řádu desítek milisekund. Měří se proud těsně před vložením pulsu a na konci pulsu a jako výsledek se vynáší rozdíl těchto proudů (Obr. 10).⁴⁶



Obr. 10: Změna potenciálu s časem při diferenčně pulsní voltametrii, převzato z lit.⁴³ a upraveno

Pro reverzibilní reakci je potenciál maxima píku ($E_{p,max}$) posunutý oproti půlvlnovému potenciálu podle vztahu (3). Hodnota proudu se zvyšuje s rostoucí amplitudou ΔE , avšak s tím zároveň roste i šířka píku, což má za následek zhoršení rozlišení. Z toho důvodu se většinou nepracuje s hodnotami ΔE vyššími než 100 mV.⁴³

$$E_{p,max} = E_{1/2} - \frac{\Delta E}{2} \quad (3)$$

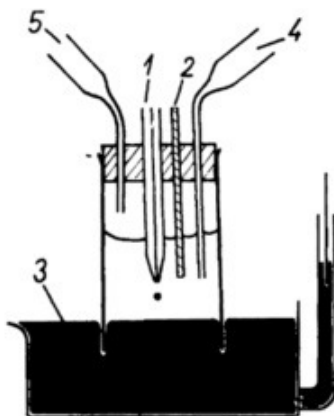
2.5 Coulometrie

Coulometrie je metoda využívající měření prošlého náboje pracovní elektrodou při elektrolýze. Velikost prošlého náboje je možné zjistit integrací plochy pod $I-t$ křivkou nebo sériovým zapojením coulometru do obvodu. S využitím Faradayova zákona lze při znalosti množství přeměněné látky vypočítat počet elektronů n spotřebovaných na jednu molekulu podle vztahu (4), kde Q je zjištěný náboj (C), m hmotnost přeměněné látky (g) a M molární hmotnost látky (g mol^{-1}).

$$n = \frac{M Q}{m F} \quad (4)$$

Při studiu elektrochemických redukčních přeměn lze jako pracovní elektrodu použít kapající rtuťovou elektrodu nebo velkoplošnou rtuťovou elektrodu. U obou elektrod se provádí coulometrie při konstantním potenciálu, jehož hodnota se zpravidla nastaví v oblasti limitního proudu předem změřené polarografické vlny.⁴⁹

Coulometrie s použitím kapající rtuťové elektrody bývá označována jako mili- nebo mikrocoulometrie. Používá se malý objem roztoku (0,5 až 5 ml), koncentrace elektroaktivní látky je $10^{-4} - 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ a elektrolýza se provádí po dlouhou dobu (desítky minut až hodiny), protože přeměna elektroaktivní látky probíhá pomalu (Obr. 11). Při coulometrii na velkoplošné rtuťové elektrodě probíhá elektrolýza podstatně rychleji než na DME a pracuje se většinou s větším objemem roztoku. Při coulometrii na obou zmíněných rtuťových elektrodách většinou vznikají stejné produkty, coulometrie na DME je bližší podmínkám polarografického či voltametrického experimentu. Po skončení coulometrie je možné analyzovat vzniklé produkty v elektrolyzátu pomocí instrumentálních metod (např. MS, IR, NMR).^{49,50}



Obr. 11: Schéma mikrocoulometrické aparatury, 1 – kapající rtuťová elektroda, 2 – grafitová pomocná elektroda, 3 – rtuťové dno sloužící jako referentní elektroda, 4 – vstup inertního plynu, 5 – výstup inertního plynu, převzato z lit.⁴⁹

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

Zásobní roztok imidaclopridu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) byl připraven rozpuštěním odváženého množství standardu (Fluka – Pestanal, 99,9 %) v demineralizované vodě (Merck Millipore, Darmstadt, Německo). Základním elektrolytem pro voltametrická měření byl Britton-Robinsonův (BR) pufr připravený smícháním roztoku $0,04 \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$ (p. a., Lachema, ČR), CH_3COOH (ACS reagent, Sigma-Aldrich, 99,7%) a H_3PO_4 (p. a., Fluka, 85%) s roztokem $0,2 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaOH}$ (p. a., Lach-Ner, ČR) do požadovaného pH (2 – 12). Pro analýzu redukčních produktů hmotnostní spektrometrií byl připraven pufr z octanu amonného (p. a., Lachner, ČR, $c = 0,025 \text{ mol l}^{-1}$), titrací amoniakem (p. a., Lachema, ČR, 25 %) na pH 8 nebo octovou kyselinou na pH 5.

Zásobní roztok dusičnanu rtuťnatého ($c = 0,01 \text{ mol l}^{-1}$) byl připraven z $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (p. a., Lach-Ner, ČR) v $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$ (p. a., Lach-Ner, ČR). Zásobní roztok 3-nitrobenzoové kyseliny (p. a., Lachema, ČR) o koncentraci $9 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním v demineralizované vodě a zásobní roztok benzilu (p. a., Lachema, ČR) o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ rozpuštěním v methanolu (p. a., Penta, ČR). K přípravě mobilní fáze pro HPLC byla použita demineralizovaná voda, H_3PO_4 a acetonitril (pro HPLC, VWR Chemicals, Francie). Jako komerční přípravek byl analyzován MIDO 20 SL (Sharda Cropchem, Indie), který má výrobcem udanou koncentraci $\text{IMI } 200 \text{ g l}^{-1}$.

3.2 Použité přístroje

3.2.1 Voltametrická měření

Voltametrická měření byla provedena na přístroji Eco-Tribo-Polarograf (Polaro-Sensors, Praha) v tříelektrodovém zapojení s pracovní elektrodou, referenční argentchloridovou elektrodou ($\text{Ag}/\text{AgCl}/1\text{M-KCl}$, Monokrystaly, Turnov) a pomocnou platinovou elektrodou (Elektrochemické detektory, Ohrazenice). Jako pracovní elektrody byly použity kapající rtuťová elektroda s řízeným odkapáváním pomocí klepátka (DME), visící rtuťová kapková elektroda (HMDE, Polaro Sensors, Praha), elektroda ze skelného uhlíku (GCE, Bioanalytical systems, USA) a GCE modifikovaná rtuťovým filmem (rtuťová filmová elektroda, MFE).

3.2.2 HPLC

HPLC analýzy byly provedeny na kapalinovém chromatografu s UV/VIS detektorem a manuálním dávkovačem (vše Ecom, Praha, ČR) s 20 μl smyčkou. Dávkování probíhalo stříkačkou Hamilton (USA), pracovalo se metodou přeplnění smyčky. Separace byla provedena na koloně Phenomenex Kinetex C18 (100 x 4,6 mm; 2,6 μm).

3.2.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektra byla měřena na hmotnostním spektrometru s analyzátozem iontovou pastí Agilent 1100 Series LC/MSD Trap (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) s ionizací elektrosprejem (ESI). Vzorek byl dávkován pomocí lineární stříkačkové pumpy NE-1002X (New Era Pump Systems, Farmingdale, NY, USA) rychlostí 4 $\mu\text{l min}^{-1}$.

Parametry měření byly: pozitivní ionizační mód, rychlost průtoku sušícího plynu (dusík) 5 litrů min^{-1} , sušící teplota 200 $^{\circ}\text{C}$, tlak ve zmlžovači 10 psi, napětí na kapiláře -4,5 kV, kolizní plyn He, skenováno v rozsahu m/z 20 – 500.

3.2.4 Ostatní použité přístroje

Elektrolýza na velkoplošné rtuťové elektrodě byla provedena na modulárním potenciostatu/galvanostatu Autolab PGSTAT128N (Metrohm, Švýcarsko). pH roztoků bylo měřeno na pH metru InoLab pH 720 s kombinovanou skleněnou elektrodou SenTix 41 (WTW, Weilheim, Německo). Pro kalibraci byly použity pufrы o hodnotách pH 4, 7 a 10 (Fischer Chemicals, Velká Británie). Hydrolýza IMI při alkalickém pH byla studována spektrofotometricky na UV/VIS spektrofotometru Lambda 25 (Perkin Elmer, USA).

3.3 Pracovní postupy

3.3.1 Voltametrické experimenty

Tast polarografie byla provedena na DME s řízeným odkapáváním s dobou trvání kapky $t = 880 \text{ ms}$, rychlostí skenu $v = 4 \text{ mV s}^{-1}$ a výškou rtuťového sloupce $h = 80 \text{ cm}$. Ostatní voltametrické experimenty byly prováděny na HMDE, GCE a MFE metodami cyklické voltametrie a diferenčně pulsní voltametrie, konkrétní použité parametry metod jsou vždy uvedeny v části Výsledky a diskuse (Kap. 4). Roztoky byly před analýzou 3 minuty probublány dusíkem. MFE byla připravována na povrchu GCE elektrolytickým vylučováním rtuťového filmu *in-situ* z roztoku rtuťnaté soli přidaného k měřenému roztoku. Konkrétní parametry přípravy MFE jsou uvedeny v Kap. 4. Při měření na nemodifikované GCE byl

povrch elektrody před každým DPV-skenem vyleštěn suspenzí aluminy (velikost částic <50 nm, Aldrich).

U všech voltametrických experimentů s výjimkou analýzy reálných vzorků bylo do voltametrické nádoby pipetováno 12 ml BR pufru, zásobní roztok IMI a v případě MFE zásobní roztok rtuťnatých iontů. Kalibrační závislosti byly naměřeny postupným přidáváním roztoku IMI do nádoby.

3.3.2 HPLC

Byla připravena mobilní fáze o složení 0,2% vodný roztok H_3PO_4 /acetonitril (70:30, v/v), ze které byl odstraněn rozpuštěný plyn pomocí ultrazvukové lázně po dobu 10 minut. Separace byla provedena isokraticky s průtokem $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ a UV detekcí při 270 nm. Na chromatogramu byl pozorován 1 pík při retenčním čase $t_R = 3,4 \text{ min}$. Metoda HPLC byla přejata z lit.⁴¹

3.3.3 Analýza reálných vzorků

Byla analyzována říční voda s přidanou známou koncentrací IMI a komerční přípravek MIDO. Vyhodnocování probíhalo metodou standardního přídatku pro voltametrické experimenty a metodou kalibrační křivky pro HPLC.

Analýza vzorku říční vody

Za účelem analýzy říční vody byla odebrána voda z řeky Moravy a spikována standardním roztokem IMI na koncentraci $4,35 \text{ mg l}^{-1}$. Takto připravený vzorek byl přímo analyzován metodou HPLC.

V případě HMDE elektrody byly do voltametrické nádoby pipetovány 2 ml připraveného vzorku říční vody a 10 ml BR pufru o pH 9 a byla provedena analýza metodou DPV se třemi 20 μl standardními přídatky zásobního roztoku IMI ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$). Při měření na MFE bylo do nádoby pipetováno 6 ml vzorku říční vody, 6 ml BR pufru o pH 10, 300 μl zásobního roztoku Hg^{2+} ($c = 0,01 \text{ mol l}^{-1}$) a byla provedena analýza metodou DPV se třemi 80 μl standardními přídatky zásobního roztoku IMI.

Analýza komerčního přípravku MIDO

Komerční přípravek MIDO byl zředěn 1000x demineralizovanou vodou. Takto připravený vzorek byl přímo analyzován metodou HPLC.

V případě analýzy na HMDE bylo do voltametrické nádoby pipetováno 12 ml BR pufru o pH 9 a 60 μl zředěného vzorku a byla provedena analýza metodou DPV se třemi 20 μl standardními přídávky zásobního roztoku IMI. Při analýze na MFE bylo do voltametrické nádoby pipetováno 12 ml BR pufru o pH 10, 150 μl zředěného vzorku a 300 μl zásobního roztoku Hg^{2+} a byla provedena analýza metodou DPV se třemi 80 μl standardními přídávky zásobního roztoku IMI. Při analýze na GCE bylo do voltametrické nádoby pipetováno 12 ml BR pufru o pH 9, 400 μl zředěného přípravku a byla provedena analýza metodou DPV se třemi 200 μl standardními přídávky zásobního roztoku IMI.

3.3.4 Elektrolýza na velkoplošné rtuťové elektrodě

Elektrolýza byla provedena v coulometrické nádobce sestávající ze dvou částí oddělených fritou. Rtuťové dno ve větší části nádoby sloužilo jako katoda, v menší části nádoby byla platinová anoda, referenční argentchloridová elektroda (1M-KCl) byla ponořena do roztoku v katodové části. Elektrolýza byla provedena v pufru z octanu amonného ($c = 0,025 \text{ mol l}^{-1}$) při pH 5 a 8. Do katodové části bylo pipetováno 25 ml pufru a do anodové části bylo pipetováno takové množství pufru, aby byly hladiny v obou částech nádoby vyrovnané. Poté byla po dobu 30 min provedena elektrolýza základního elektrolytu, aby se odstranily případné nečistoty. Následně byly do katodové části pipetovány 4 ml zásobního roztoku IMI. Poté byla provedena elektrolýza při konstantním potenciálu odpovídajícímu limitnímu proudu první resp. druhé vlny IMI. Roztok v katodové části byl po celou dobu elektrolýzy trvale probubláván dusíkem.

3.3.5 Hmotnostní spektrometrie

Vzorky byly po dokončení elektrolýzy do několika hodin analyzovány v hmotnostním spektrometru. Pro každý odebraný vzorek bylo naměřeno celkové spektrum v rozmezí 20 – 500 m/z a pro vybrané ionty bylo změřeno fragmentační spektrum.

3.3.6 Zpracování dat

Hodnoty proudu a potenciálu u voltametrických experimentů byly odečteny v programu Polar Pro, verze 4, grafy byly vypracovány v MS Excel 2007. Všechny hodnoty potenciálů uvedené v grafech i textu kapitoly Výsledky a diskuse jsou vztaženy k referenční argentchloridové elektrodě (Ag/AgCl/1M-KCl). U metody HPLC byly plochy píků vyhodnoceny v programu Clarity. U hmotnostní spektrometrie byla data zpracována

softwarem DataAnalysis 3.3 a mMass 5.5.0. Parametry regresních křivek byly nalezeny a kvantifikace IMI v reálných vzorcích byla provedena v programu QC Expert 3.3.0.4. Hodnoty meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) byly počítány z kalibrační závislosti pro nízké hodnoty koncentrací podle vztahu (5), kde x je 3,3 (LOD) resp. 10 (LOQ), s je směrodatná odchylka úseku, a je směrnice kalibrační závislosti.

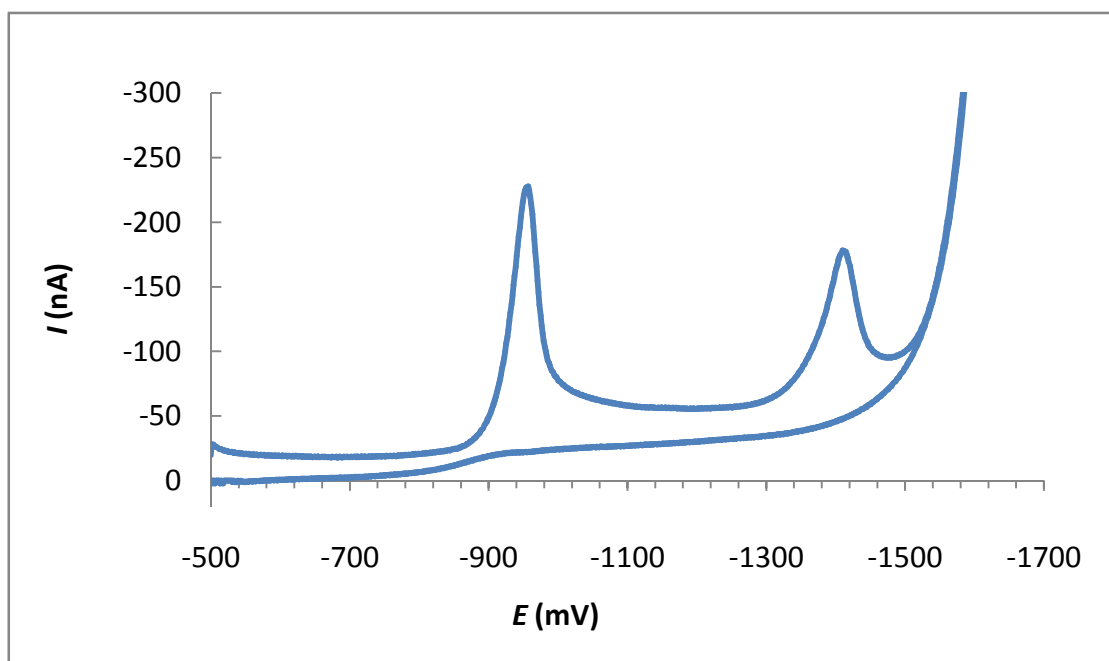
$$LOD (LOQ) = x \cdot \frac{s}{a} \quad (5)$$

4 Výsledky a diskuse

4.1 Rtuťová elektroda

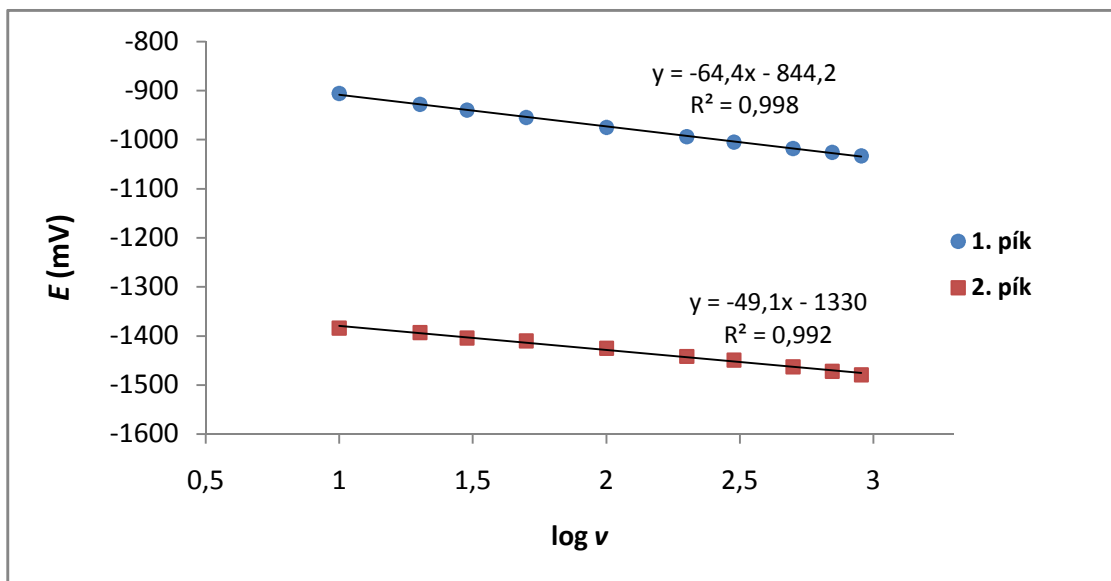
4.1.1 Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie byla provedena na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE). Na cyklickém voltamogramu imidaclopridu jsou patrné dva redukční píky (Obr. 12). První pík při potenciálu kolem -950 mV (Ag/AgCl/1M-KCl) při pH 8 poskytuje vyšší proudové hodnoty oproti druhému (-1410 mV). Na anodické větvi voltamogramu nejsou zřetelné žádné píky, reakce jsou tedy ireverzibilní.

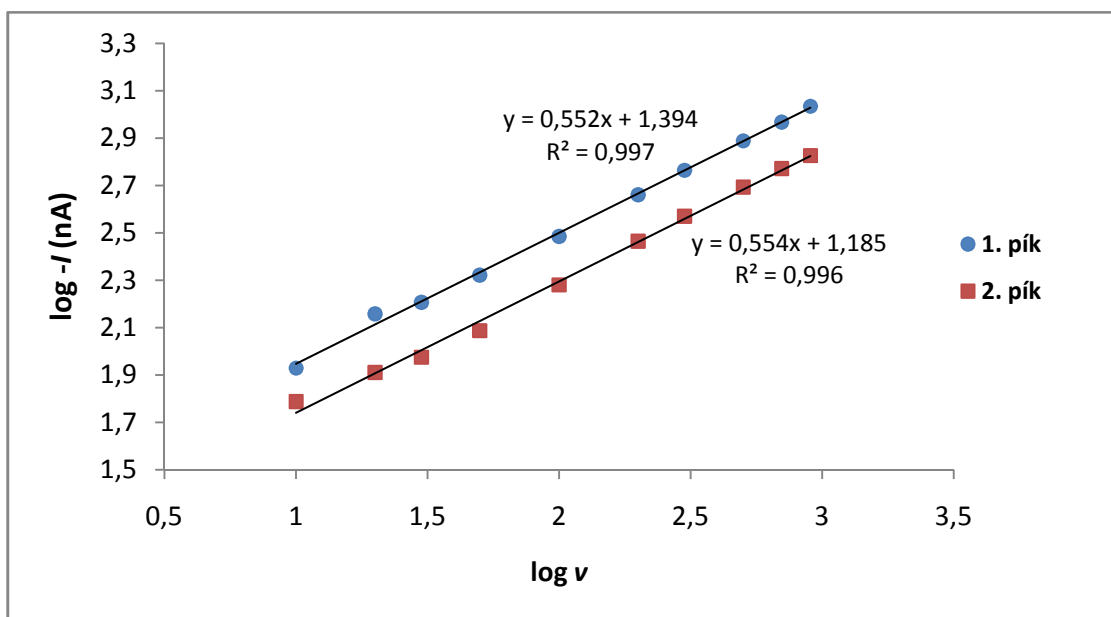


Obr. 12: Cyklický voltamogram IMI ($c = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$) na HMDE, rychlost skenu 50 mV s^{-1} , BR pufr – pH 8

Potenciál obou píků se posouvá s rostoucí rychlostí skenu (ν) k negativnějším hodnotám. Směrnice závislosti E_p (mV) na $\log \nu$ má hodnotu -64 mV pro první pík a -49 mV pro druhý pík (Obr. 13). Podle teoretických zákonitostí by tato směrnice měla být pro ireverzibilní reakce $-30/\alpha \text{ mV}$ (pro $25 \text{ }^\circ\text{C}$), což za předpokladu $\alpha = 0,5$ dává hodnotu -60 mV. Naměřené hodnoty tedy poměrně dobře souhlasí s teorií.⁴³ Závislost $\log(-I_p)$ na $\log \nu$ má směrnici 0,55 pro oba redukční píky (Obr. 14), to znamená, že elektrodová reakce je řízena difúzí (Kap. 2.4.3).



Obr. 13: Závislost potenciálu obou píků IMI ($c = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$) na logaritmu rychlosti skenu, metoda CV na HMDE, BR pufr – pH 8

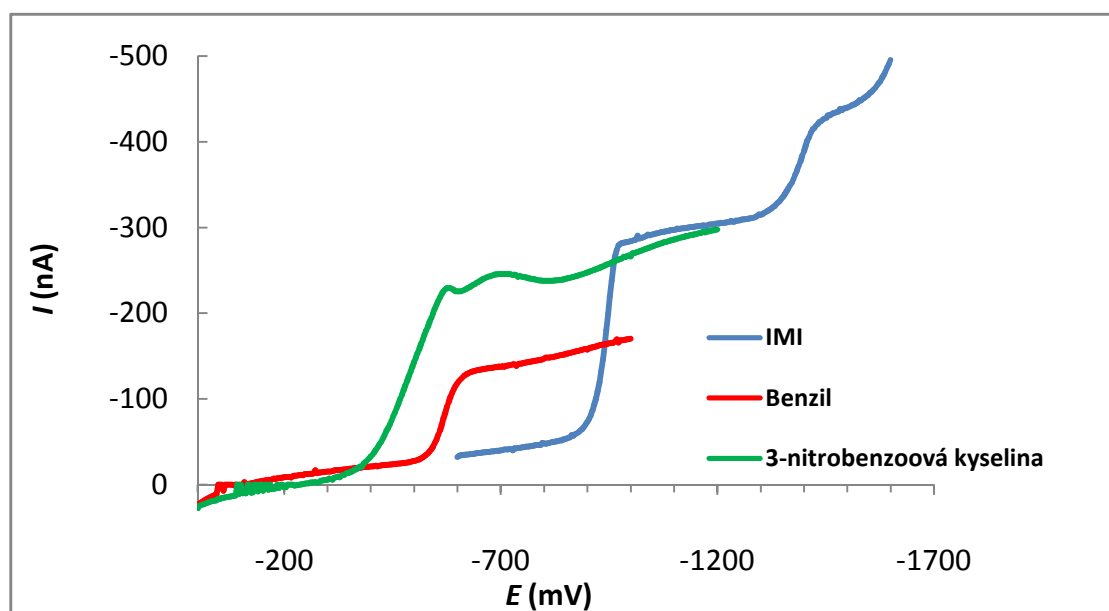


Obr. 14: Závislost logaritmu proudu obou píků IMI ($c = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$) na logaritmu rychlosti skenu, metoda CV na HMDE, BR pufr – pH 8

4.1.2 Tast polarografie

Metodou tast polarografie na kapající rtuťové elektrodě (DME) byl studován počet vyměňovaných elektronů při redukci IMI. Výška polarografických vln IMI byla porovnávána s výškami vln zvolených standardních látek redukujících se známým počtem elektronů. S ohledem na údaje v literatuře²¹, které uvádějí čtyřelektronovou redukci pro první vlnu a

dvouelektronovou redukci pro druhou vlnu IMI, byly jako standardní látky zvoleny 3-nitrobenzoová kyselina, která podléhá čtyřelektronové redukci,⁵¹ a benzil, redukující se dvěma elektrony.⁵² Polarogramy byly pořízeny pro roztoky látek o stejné koncentraci ($4,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) ve stejném základním elektrolytu při pH 8 (Obr. 15). Z naměřených dat (Tab. 4) vyplývá, že limitní proud (I_{lim}) první redukční vlny IMI má hodnotu podobnou I_{lim} redukční vlny 3-nitrobenzoové kyseliny (-217 a -215 nA) a I_{lim} druhé redukční vlny IMI má hodnotu podobnou I_{lim} redukční vlny benzilu (-102 a -101 nA). Zároveň první redukční vlna IMI má přibližně dvojnásobnou hodnotu I_{lim} oproti druhé vlně IMI. Naměřené údaje potvrzují pro IMI předpokládanou čtyřelektronovou redukci v prvním kroku a dvouelektronovou redukci ve druhém kroku.



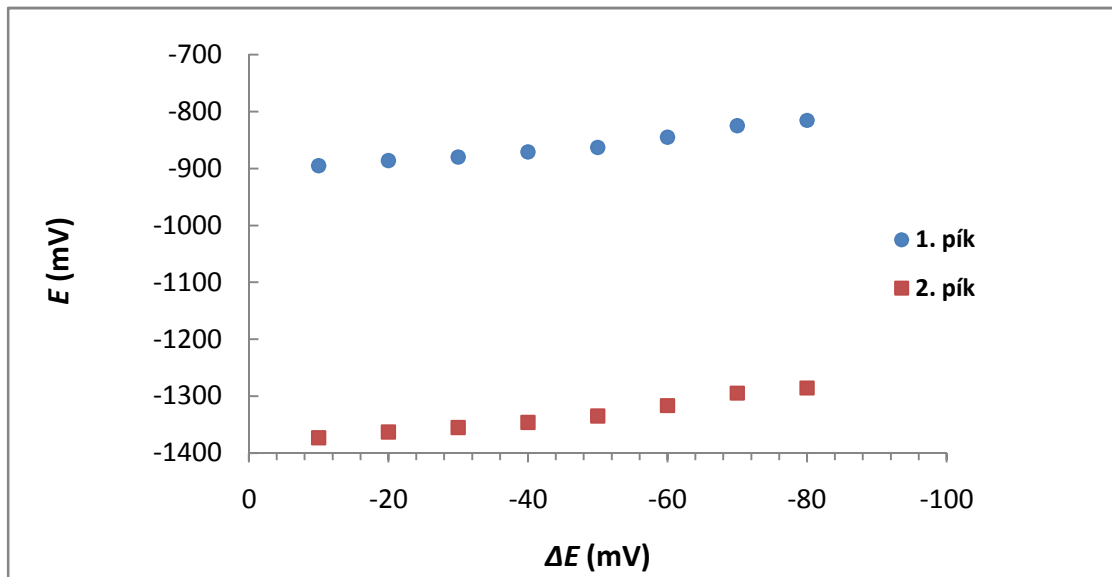
Obr. 15: Tast polarogramy IMI, benzilu a 3-nitrobenzoové kyseliny, $c = 4,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, DME, $\nu = 4 \text{ mV s}^{-1}$, doba kapky 880 ms, výška rtuťového sloupce 80 cm, BR pufr – pH 8

Tab. 4: Výsledky test polarografie pro IMI, benzil a 3-nitrobenzoovou kyselinu

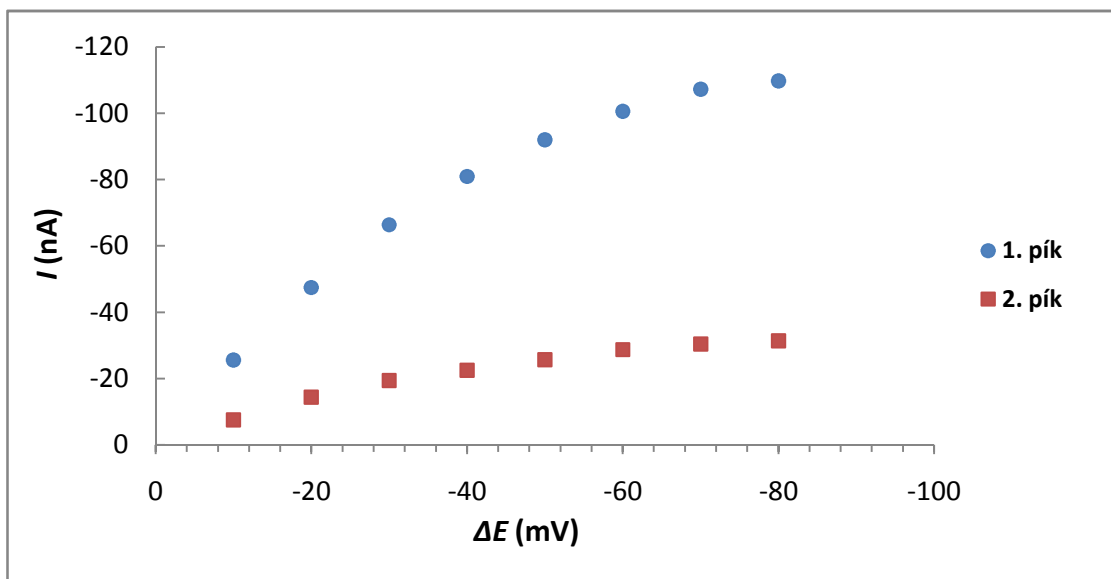
Látka	I_{lim} (nA)	
	Vlna 1	Vlna 2
IMI	-217	-102
Benzil	-101	-
3-nitrobenzoová kyselina	-215	-

4.1.3 Diferenčně pulsní voltametrie

Pro metodu diferenčně pulsní voltametrie na HMDE byla sledována závislost potenciálu a proudu redukčních píků IMI na amplitudě napěťového pulsu. Podle očekávání se s rostoucí absolutní hodnotou amplitudy pulsu posouval potenciál prvního i druhého redukčního píku ke kladnějším hodnotám (Obr. 16). Zároveň s rostoucí absolutní hodnotou amplitudy rostla absolutní hodnota proudu obou píků (Obr. 17), ale zároveň rostla i šířka píků. Další experimenty byly prováděny s amplitudou $\Delta E = -50$ mV jako kompromis mezi co nejvyšší proudovou hodnotou a co nejmenší šířkou píku.

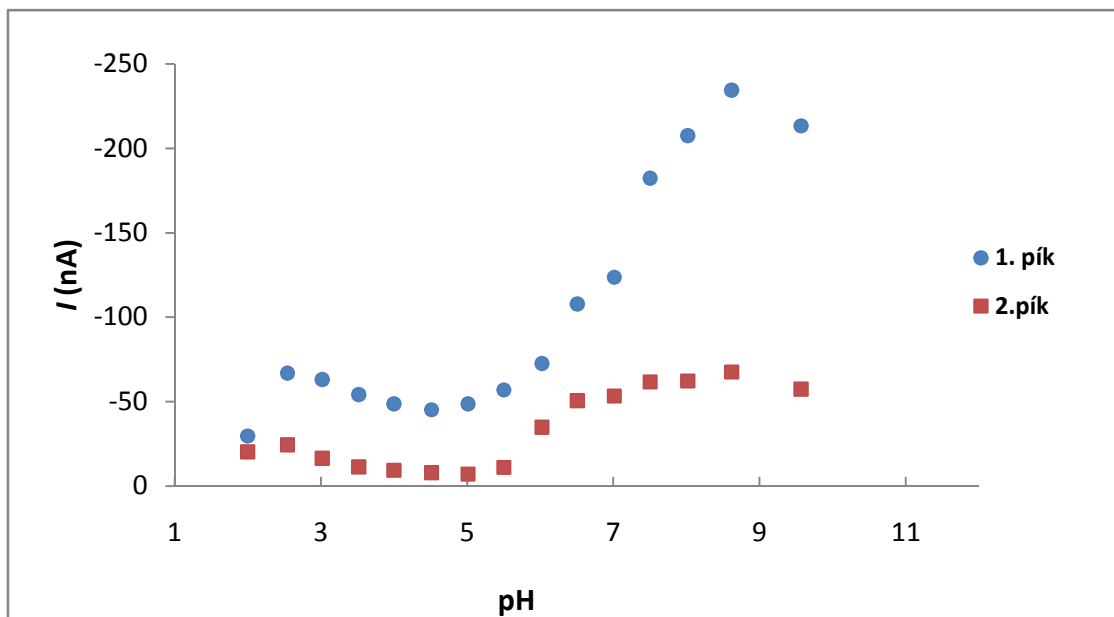


Obr. 16: Závislost potenciálu píků IMI na amplitudě napěťového pulsu, $c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol l⁻¹, metoda DPV na HMDE, $\nu = 10$ mV s⁻¹, šířka pulsu 100 ms, BR pufr – pH 8

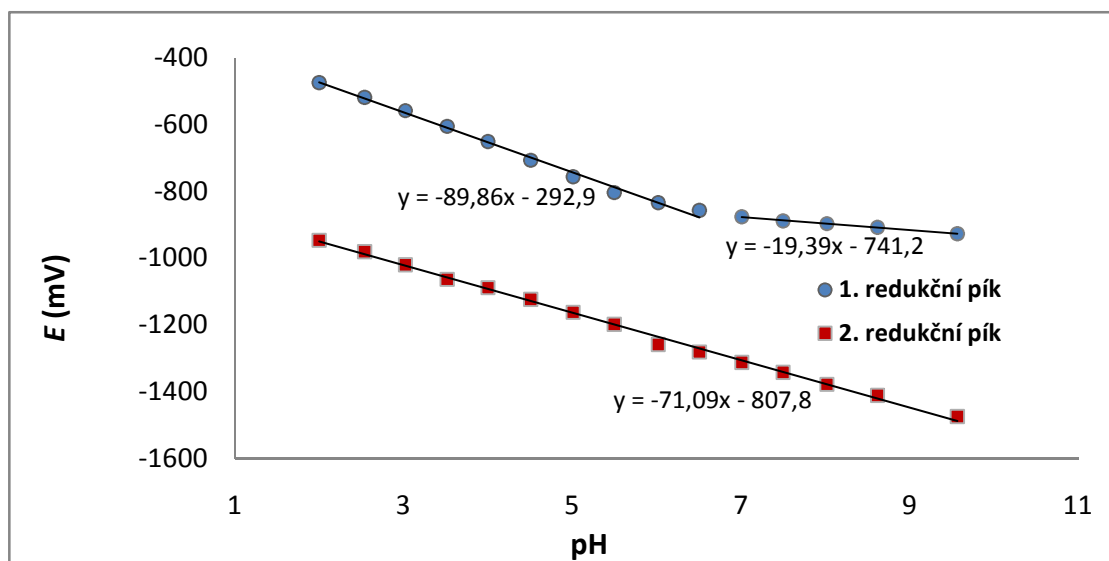


Obr. 17: Závislost proudu píků IMI na amplitudě napěťového pulsu, $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, metoda DPV na HMDE, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$, šířka pulsu 100 ms, BR pufr – pH 8

Metodou DPV byla dále studována závislost I_p a E_p na pH. Proud prvního píku $I_{p,1}$ nabýval při pH 2 – 6,5 relativně nízkých hodnot, v alkalické oblasti došlo k prudkému růstu $I_{p,1}$ s maximem při pH 8,5. Hodnoty proudu druhého píku $I_{p,2}$ byly také nejvyšší v alkalické oblasti pH (Obr. 18). Hodnoty E_p obou píků se s rostoucím pH posunovaly k záporným hodnotám, což vypovídá o účasti protonů v elektrodoovém ději (Obr. 19). Závislost $E_{p,1}$ na pH sestává ze dvou lineárních úseků se směrnici -90 mV pH^{-1} v rozmezí pH 2 – 6 a -19 mV pH^{-1} v rozmezí pH 7 – 10 s průsečíkem při pH 6,4. Při tomto pH patrně dochází ke změně mechanismu elektrodoové reakce. Závislost $E_{p,2}$ na pH má směrnici -71 mV pH^{-1} v celém měřeném rozsahu pH.



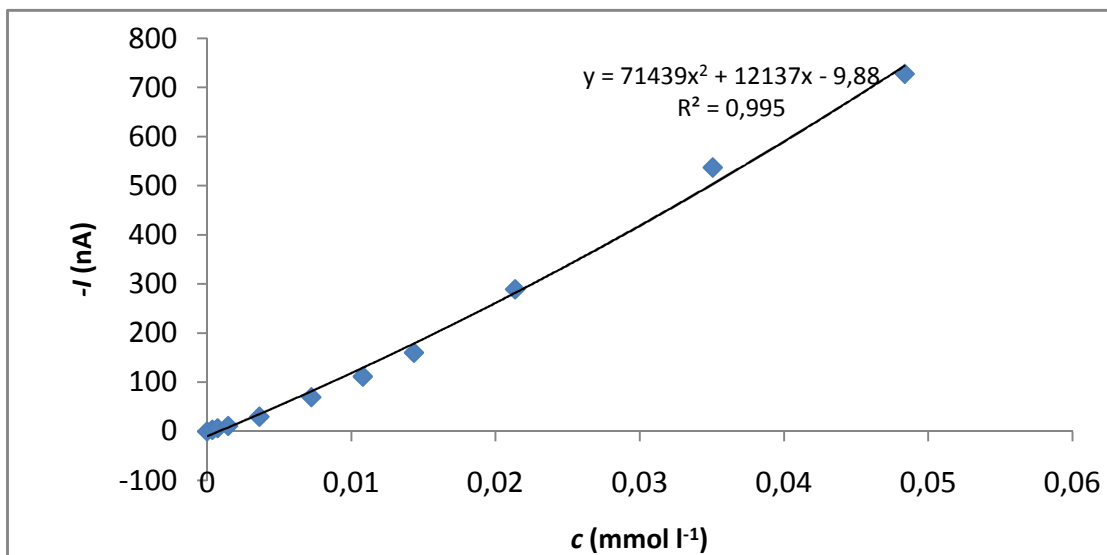
Obr. 18: Závislost proudu píků IMI na pH, metoda DPV na HMDE, $c_{\text{IMI}} = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$, $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$, amplituda pulsu -50 mV , šířka pulsu 100 ms , BR pufr



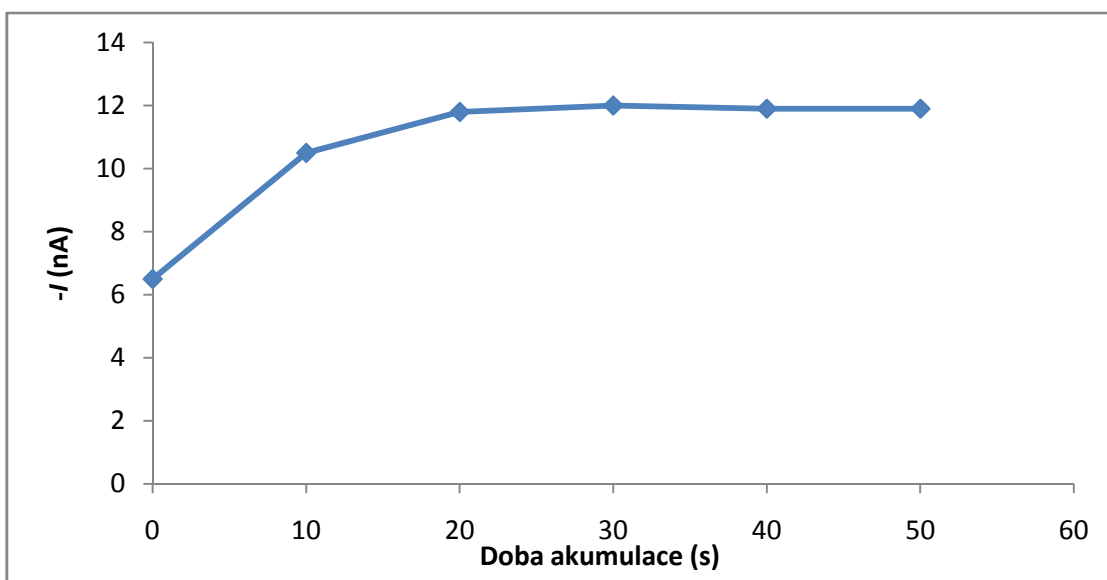
Obr. 19: Závislost potenciálu prvního a druhého redukčního pík IMI na pH, metoda DPV na HMDE, $c_{\text{IMI}} = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$, $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$, amplituda pulsu -50 mV , šířka pulsu 100 ms , BR pufr

Kalibrační závislost na HMDE pro první redukční pík při pH 9 vykazovala nelinearitu (Obr. 20). Vypočítané hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti byly $1,7 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ a $5,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$. Nelinearita kalibrační závislosti byla pravděpodobně způsobena adsorpcí

IMI na povrch elektrody. Adsorpci IMI na povrch elektrody napovídá špičatý tvar prvního redukčního píku při vyšších koncentracích (Příloha č. 1). Adsorpci dále potvrzuje rostoucí proudová hodnota prvního píku $I_{p,1}$ s rostoucí dobou akumulace při provedení adsorpční voltametrie (Obr. 21), v čase $t_{ads} = 20$ s dochází k saturaci a proudová hodnota již dále neroste.



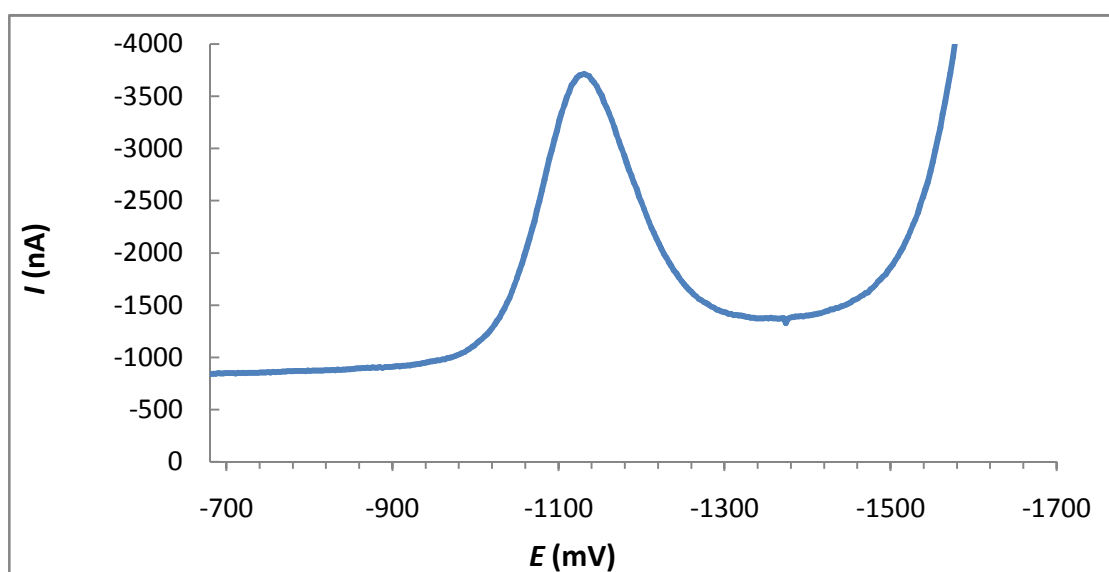
Obr. 20: Kalibrační závislost IMI na HMDE, metoda DPV, $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$, amplituda pulsu -50 mV, šířka pulsu 100 ms, BR pufr – pH 9



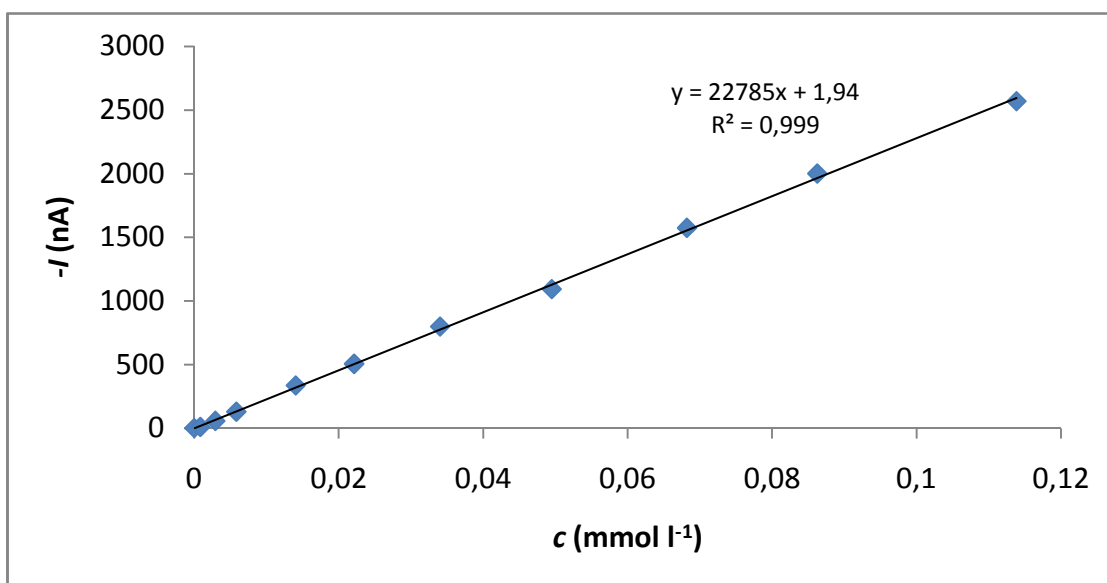
Obr. 21: Závislost proudu prvního redukčního píku IMI ($c = 7 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$) na době akumulace, DPV na HMDE, potenciál akumulace: -600 mV, $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$, amplituda pulsu -50 mV, šířka pulsu 100 ms, BR pufr – pH 8,4

4.2 Elektroda ze skelného uhlíku

Na elektrodě ze skelného uhlíku byl patrný pouze jeden redukční pík IMI při potenciálu -1130 mV (Ag/AgCl/1M-KCl) při pH 9 (Obr. 22). Potenciál píku se podobně jako u HMDE posouval s rostoucím pH k zápornějším hodnotám. Závislost I_p na pH pro GCE vykazovala maximum při pH 9. Při této hodnotě pH byla proměřena kalibrační závislost. Kalibrační závislost byla v měřeném rozsahu $3,3 \cdot 10^{-6}$ až $1,1 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹ lineární (Obr. 23 a Příloha č. 2). Vypočítané hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti byly $1,1 \cdot 10^{-6}$ mol l⁻¹ a $3,3 \cdot 10^{-6}$ mol l⁻¹.



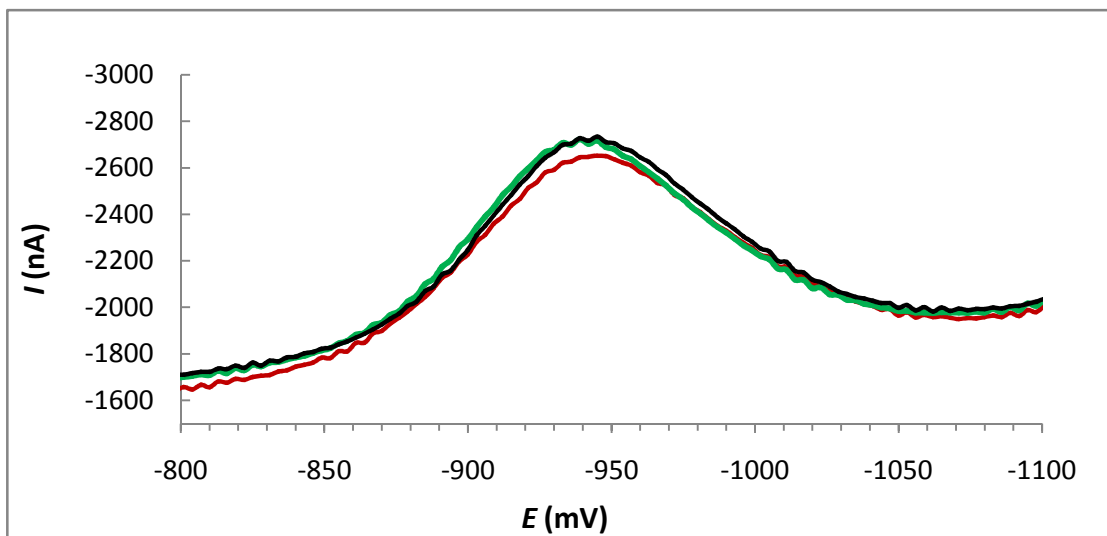
Obr. 22: DP voltamogram IMI na GCE, $c_{\text{IMI}} = 1,1 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹, parametry metody: $\nu = 20$ mV s⁻¹, amplituda pulsu -50 mV, šířka pulsu 100 ms, BR pufr – pH 9



Obr. 23: Kalibrační závislost IMI na GCE, parametry DPV metody: $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$, amplituda pulsu -50 mV , šířka pulsu 100 ms , BR pufr – pH 9

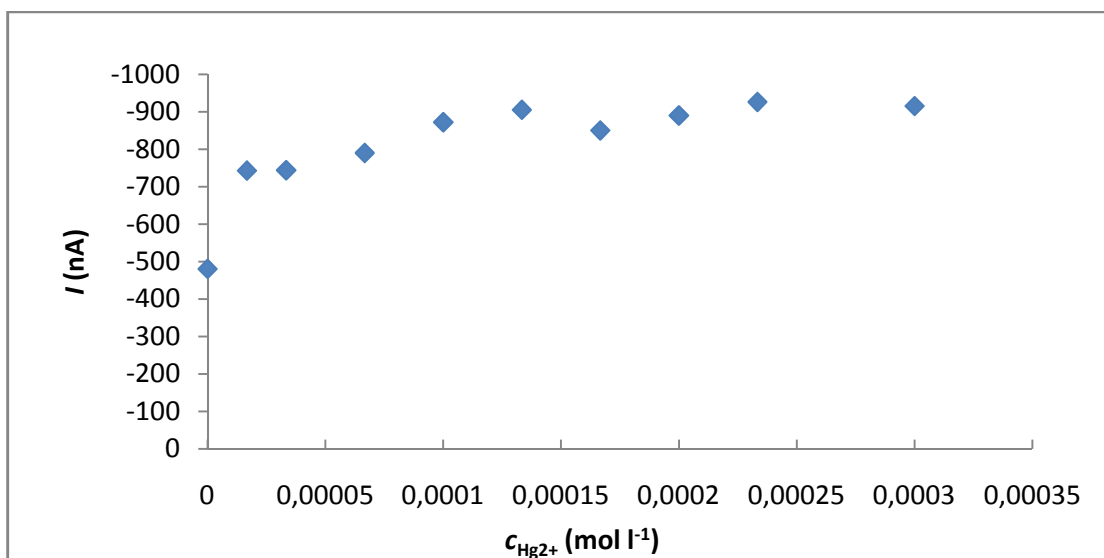
4.3 Rtuťová filmová elektroda

Rtuťový film byl vylučován na povrchu skelné uhlíkové elektrody elektrolyticky z roztoku dusičnanu rtuťnatého. Vylučování rtuti probíhalo ve stejné nádobce jako následná analýza (*in-situ* deponace). Druhý redukční pík byl na MFE špatně vyvinutý, pozornost byla proto věnována pouze prvnímu píku. Nejprve byly hledány optimální hodnoty potenciálu vylučování (E_{dep}) a doby vylučování (t_{dep}) dávající největší proudovou odezvu IMI. Nejvyšších proudů bylo dosaženo při $E_{\text{dep}} = -500 \text{ mV}$ a $t_{\text{dep}} = 60 \text{ s}$. Při delší době vylučování již hodnoty proudu stagnovaly nebo mírně klesaly. Po každém DPV skenu byla rtuť elektrolyticky zoxidována při potenciálu 500 mV po dobu 60 s . Následně mohla být opět deponována rtuť na povrchu elektrody a proveden další sken, bez nutnosti leštění elektrody mezi jednotlivými skeny. Hodnoty potenciálu a proudu píku IMI naměřené v prvním skenu se obvykle mírně odlišovaly od vzájemně velmi blízkých hodnot získaných v dalších skenech (Obr. 24).

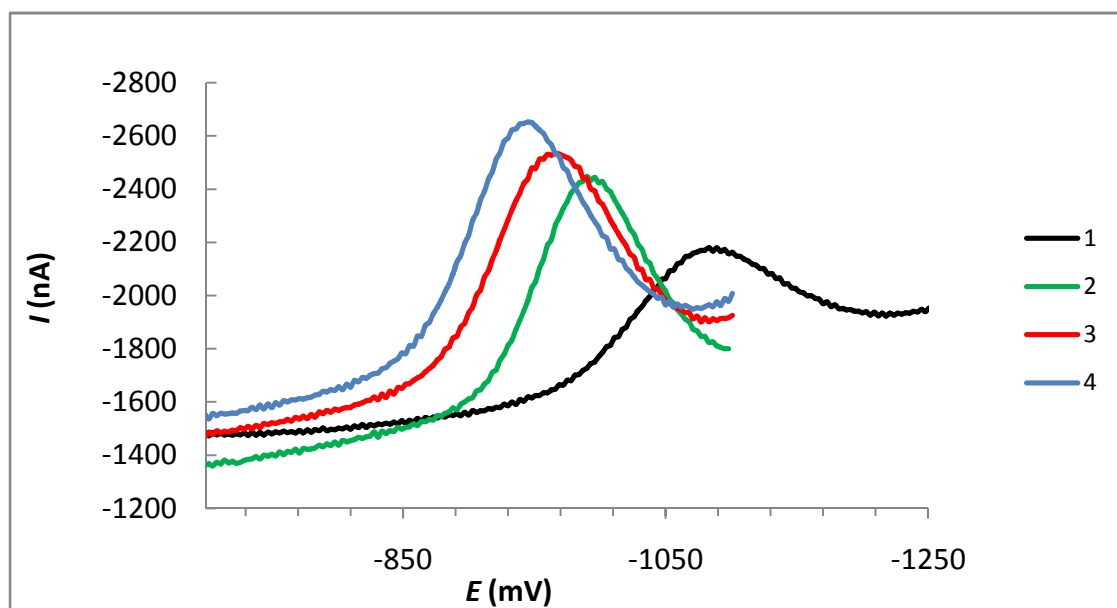


Obr. 24: Opakovatelnost redukčního píku IMI na MFE, $c_{\text{IMI}} = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, $c_{\text{Hg}^{2+}} = 1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, parametry DPV metody: $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$, amplituda pulsu -50 mV , šířka pulsu 100 ms , vylučování filmu při -500 mV po dobu 60 s , oxidace filmu při 500 mV po dobu 60 s , BR pufr – pH 8

S rostoucí koncentrací rtuťnatých iontů nejprve rostly hodnoty proudu píku IMI, od určité koncentrace nastávala saturace a signál dále stagnoval, příp. i mírně klesal (Obr. 25). S rostoucí koncentrací Hg^{2+} se potenciál píku IMI posouval k pozitivnějším hodnotám (Obr. 26).

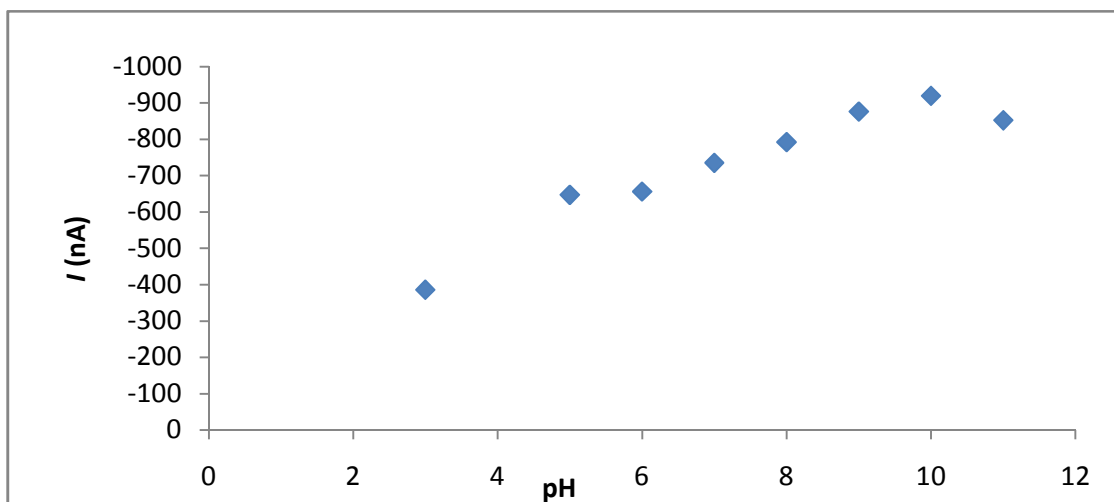


Obr. 25: Závislost proudu píku IMI na koncentraci Hg^{2+} , $c_{\text{IMI}} = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, DPV na MFE s parametry $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$, amplituda pulsu -50 mV , šířka pulsu 100 ms , vylučování filmu při -500 mV po dobu 60 s , oxidace filmu při 500 mV po dobu 60 s , BR pufr – pH 8

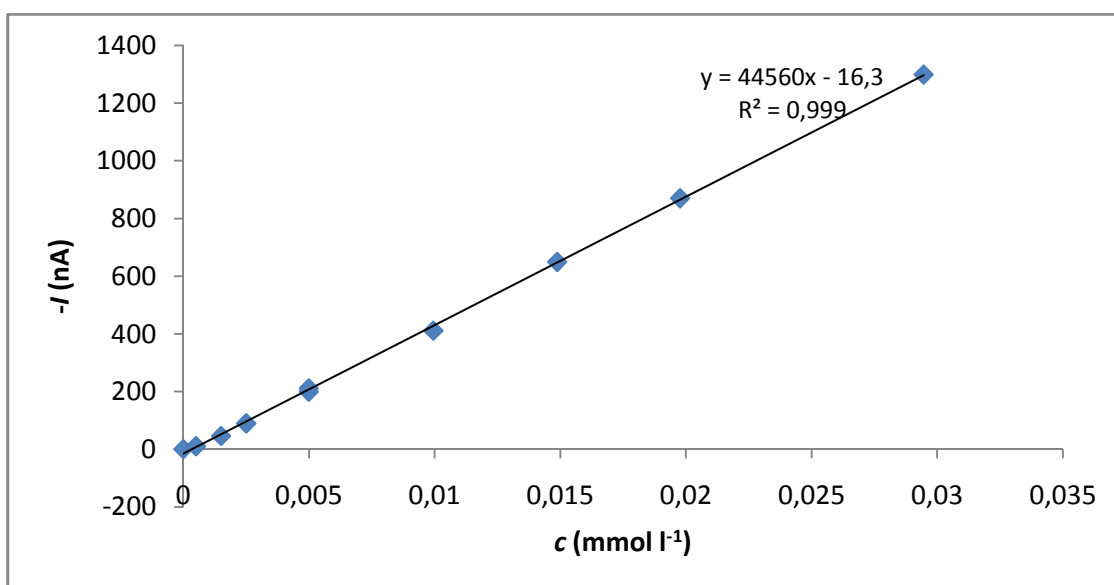


Obr. 26: Diferenčně pulsní voltamogramy IMI pro různou koncentraci Hg^{2+} , $c_{\text{Hg}^{2+}}$ (mol l^{-1}): 1 – 0; 2 – $1,7 \cdot 10^{-5}$; 3 – $6,7 \cdot 10^{-5}$; 4 – $1 \cdot 10^{-4}$; $c_{\text{IMI}} = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, DPV na MFE s parametry $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$, amplituda pulsu -50 mV , šířka pulsu 100 ms , vylučování filmu při -500 mV po dobu 60 s , oxidace filmu při 500 mV po dobu 60 s , BR pufr – pH 8

Závislost proudu píku IMI na pH vykazovala podobný průběh jako u rtuťové elektrody (Obr. 27). Absolutní hodnoty proudu rostly s rostoucím pH s maximem při pH 10. Stejně jako u HMDE i GCE byl pozorován s rostoucím pH posun potenciálu píku k zápornějším hodnotám. Kalibrační závislost byla v měřeném rozsahu $5,6 \cdot 10^{-7}$ až $2,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ lineární (Obr. 28 a Příloha č. 3). Vypočtené hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti byly $1,9 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ a $5,6 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$.



Obr. 27: Závislost proudu píku na pH pro IMI, $c_{\text{IMI}} = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, $c_{\text{Hg}^{2+}} = 1,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, parametry DPV metody: $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$, deponace filmu po dobu 60 s při potenciálu -500 mV, oxidace filmu po dobu 60 s při potenciálu 500 mV, BR pufr



Obr. 28: Kalibrační závislost IMI na MFE, $c_{\text{Hg}^{2+}} = 1,9 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, parametry DPV metody: $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$, deponace filmu po dobu 60 s při potenciálu -500 mV, oxidace filmu po dobu 60 s při potenciálu 500 mV, BR pufr – pH 10

4.4 Srovnání kalibračních závislostí

Z porovnání kalibračních závislostí a hodnot LOD a LOQ pro studované elektrody plyne, že nejnižší hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti bylo dosaženo pro visící rtuťovou kapkovou elektrodu a nejvyšších pro nemodifikovanou uhlíkovou skelnou elektrodu. Kalibrační závislosti naměřené s MFE a GCE byly lineární, kalibrační závislost pro HMDE vykazovala nelinearitu (Tab. 5).

Tab. 5: Srovnání kalibračních závislostí imidaclopridu pro metodu DPV na různých elektrodách

Elektroda	HMDE	MFE	GCE
Studovaný koncentrační rozsah (mol l⁻¹)	$5,1 \cdot 10^{-7} - 4,8 \cdot 10^{-5}$	$5,6 \cdot 10^{-7} - 2,9 \cdot 10^{-5}$	$3,3 \cdot 10^{-6} - 1,1 \cdot 10^{-4}$
Vyhovující regresní model	kvadratický	lineární	lineární
Parametr x² (interval spolehlivosti)^a	71439 (10736; 132142)	-	-
Parametr x (interval spolehlivosti)^a	12137 (9322; 14951)	44560 (43748; 45372)	22785 (22375; 23195)
Absolutní člen (interval spolehlivosti)^a	-9,88 (-29,4; 9,6)	-16,3 (-27,2; -5,4)	1,94 (-19,26; 23,14)
R²	0,995	0,999	0,999
LOD (mol l⁻¹)	$1,7 \cdot 10^{-7}$	$1,9 \cdot 10^{-7}$	$1,1 \cdot 10^{-6}$
LOQ (mol l⁻¹)	$5,1 \cdot 10^{-7}$	$5,6 \cdot 10^{-7}$	$3,3 \cdot 10^{-6}$

^a Hodnoty kvadratického, lineárního a absolutního členu jsou pro závislost $-I$ (nA) = f (c, mmol l⁻¹), intervaly spolehlivosti jsou pro hladinu významnosti $\alpha = 0,05$.

4.5 Analýza reálných vzorků

Vyvinuté voltametrické metody byly použity k analýze imidaclopridu v říční vodě a v komerčním insekticidním přípravku MIDO. Výsledky analýzy reálných vzorků byly srovnávány s referenční HPLC metodou.⁴¹ Voltametrická analýza byla provedena na HMDE, MFE a GCE metodou DPV se stejnými parametry jako u naměřených kalibračních závislostí

pro jednotlivé elektrody (Kap. 4.1 – 4.3). Metoda DPV na HMDE dosahovala výrazně nižších výsledků oproti skutečnosti, pravděpodobně z důvodu nelinearity kalibrační závislosti, která ztěžuje přesnou kvantifikaci metodou standardních přídavek. Na GCE a MFE bylo dosaženo správnějších výsledků než na HMDE (Tab. 6).

Tab. 6: Analýza imidaclopridu v říční vodě a komerčním přípravku MIDO

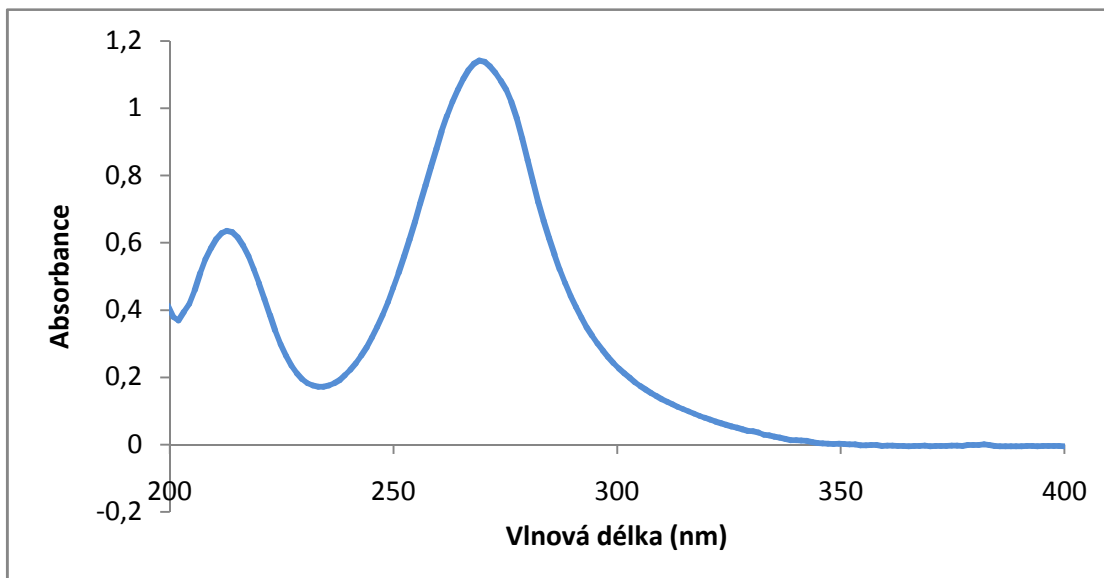
Vzorek	Dávkovaná koncentrace (mg l ⁻¹)	Metoda	Naměřená koncentrace (mg l ⁻¹)	RSD (%) ^a	Výtěžnost (%)
Říční voda	4,35	HMDE	2,80	4,9	64,4
		MFE	4,85	9,7	111,5
		HPLC	4,44	0,6	102,1
Vzorek	Deklarovaná koncentrace (g l ⁻¹)	Metoda	Naměřená koncentrace (g l ⁻¹)	RSD (%) ^a	Výtěžnost (%) ^b
Komerční přípravek MIDO	200	HMDE	158,53	13,1	87,6
		MFE	204,1	10,9	112,7
		GCE	192,62	8,9	106,4
		HPLC	181,05	1,3	100,0

^a Hodnota RSD byla vypočítána z pěti stanovení.

^b Výtěžnost vztažená k výsledku HPLC analýzy (100 %).

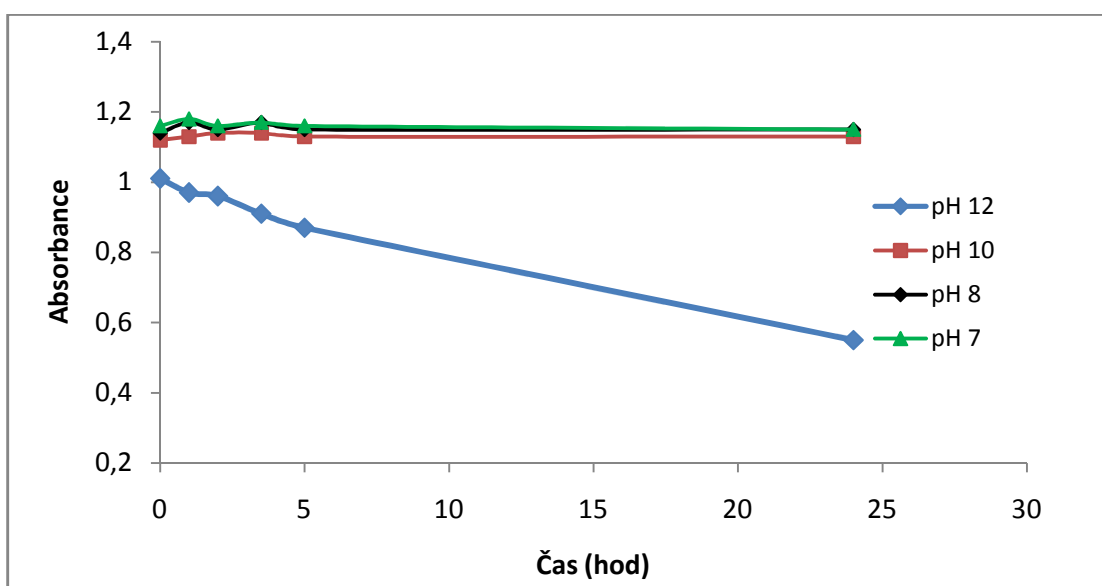
4.6 Stabilita imidaclopridu v alkalické oblasti

Podle lit.²⁰ podléhá IMI v alkalické oblasti hydrolýze. Protože optimální hodnoty pH pro voltametričnou analýzu IMI leží v alkalické oblasti, bylo testováno, zda při použití pH nehydrolyzuje IMI příliš rychle. Byly připraveny roztoky IMI ($c = 5,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) v roztocích BR pufrů o hodnotách pH 7 – 12. Z naměřeného spektra IMI vyplývá, že v UV oblasti vykazuje IMI dvě absorpční maxima při vlnových délkách 213 a 270 nm (Obr. 29).



Obr. 29: UV spektrum IMI v rozmezí vlnových délek 200 – 400 nm, BR pufr – pH 8

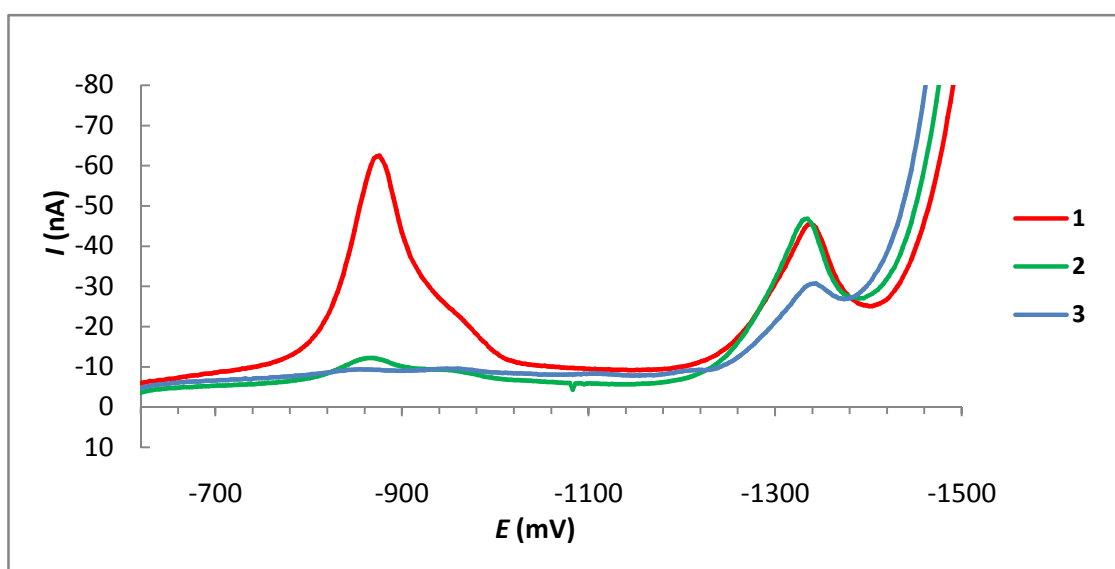
U připravených roztoků byla sledována absorbance při vlnové délce 270 nm v čase 0 až 24 hod (Obr. 30). V tomto časovém rozmezí nebyly pozorovány žádné změny pro roztoky o pH 7 – 10, výrazné změny však byly pozorovány při pH 12, kdy k měřitelnému poklesu absorbance došlo již během 1 hodiny. Z výsledků plyne, že stanovení IMI lze provádět do pH 10 bez rizika rychlé hydrolyzy.



Obr. 30: Závislost absorbance roztoků IMI o různých hodnotách pH na čase, $c_{\text{IMI}} = 5,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, BR pufr

4.7 Elektrolýza na velkoplošné rtuťové elektrodě

Elektrolýza na velkoplošné rtuťové elektrodě byla provedena při dvou různých hodnotách potenciálu odpovídajících limitnímu proudu první a druhé redukční vlny. Průběh elektrolýzy byl kontrolován voltametricky metodou DPV na HMDE (Obr. 31). Ze zaznamenaných voltamogramů vyplývá, že po 60 minutách elektrolýzy při kladnější hodnotě potenciálu (-1250 mV vs Ag/AgCl/1M-KCl) došlo k téměř úplnému vymizení prvního redukčního píku IMI, zatímco druhý redukční pík si zachoval stejnou výšku i stejný potenciál maxima. Po 60 minutách elektrolýzy při zápornější hodnotě potenciálu (-1500 mV, Ag/AgCl/1M-KCl) se podstatně snížila i výška druhého redukčního píku.

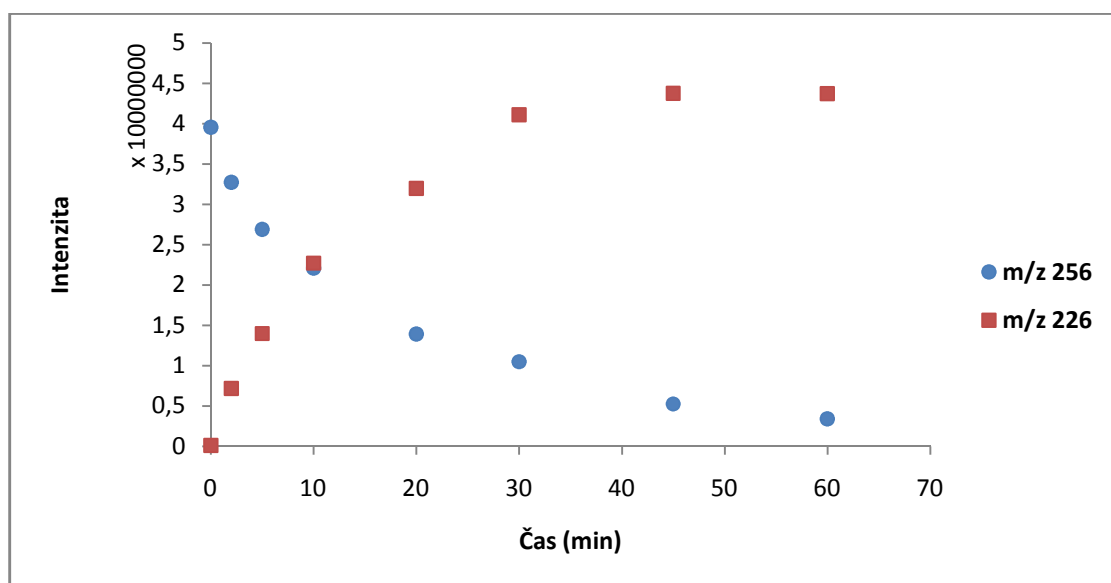


Obr. 31: Sledování průběhu elektrolýzy roztoku imidaclopridu metodou DPV na HMDE: 1 – před elektrolýzou, 2 – elektrolýza po dobu 60 min při potenciálu -1250 mV, 3 – elektrolýza po dobu 60 min při potenciálu -1500 mV, pufr $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{NH}_3$ – pH 8

Produkty elektrolýzy byly dále studovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Elektrolýza byla provedena v pufru obsahujícím octan amonný ($c = 0,025 \text{ mol l}^{-1}$), jehož pH bylo upraveno octovou kyselinou (pH 5) resp. amoniakem (pH 8). Při obou hodnotách pH byly v průběhu experimentu odebírány vzorky elektrolyzátu v čase 0, 2, 5, 10, 20, 30, 45 a 60 min pro obě hodnoty potenciálu redukce.

Při obou hodnotách pH byl v hmotnostních spektrech roztoků po prvním stupni elektrolýzy (při -1250 mV) pozorován pokles intenzity iontu IMI při m/z 256 ($[\text{M} + \text{H}]^+$) a vzrůst intenzity iontu s $m/z = 226$ (Obr. 32, Přílohy č. 5 a 6). Ion 226 ve spektru po 60 min

elektrolýzy dominoval. Fragmentační spektrum iontu 226 poskytlo fragmenty se stejnými hodnotami m/z pro obě hodnoty pH (Příloha č. 4), dá se tedy předpokládat, že při elektrolýze do prvního stupně vzniká při obou hodnotách pH stejný produkt. Je pravděpodobné, že se jedná o sloučeninu vzniklou šestielektronovou redukcí nitroskupiny IMI na aminoskupinu (Obr. 33). Zároveň nebyl v hmotnostních spektrech nalezen ion, který by odpovídal čtyřelektronové redukcí nitroskupiny na hydroxylamin ($[M + H]^+ = 242$), jak předpokládá literatura (viz Obr. 6, str. 19).

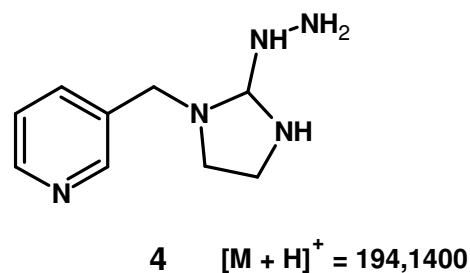
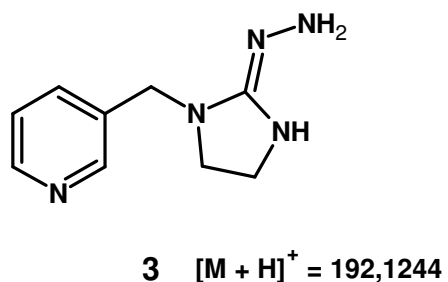
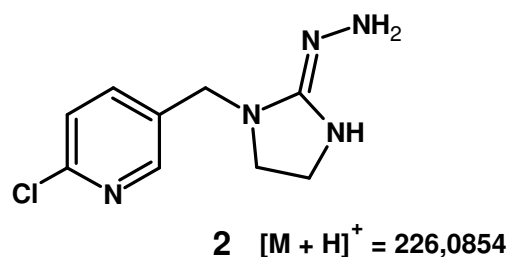
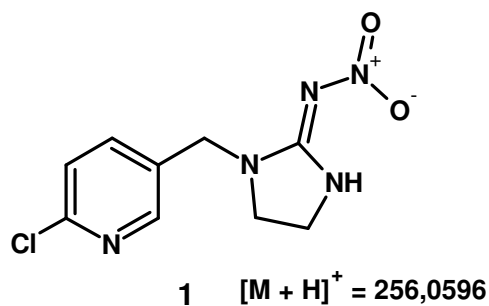


Obr. 32: Závislost intenzity iontů m/z 226 a 256 na době elektrolýzy do prvního stupně (-1250 mV), pufr $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{NH}_3$ – pH 8

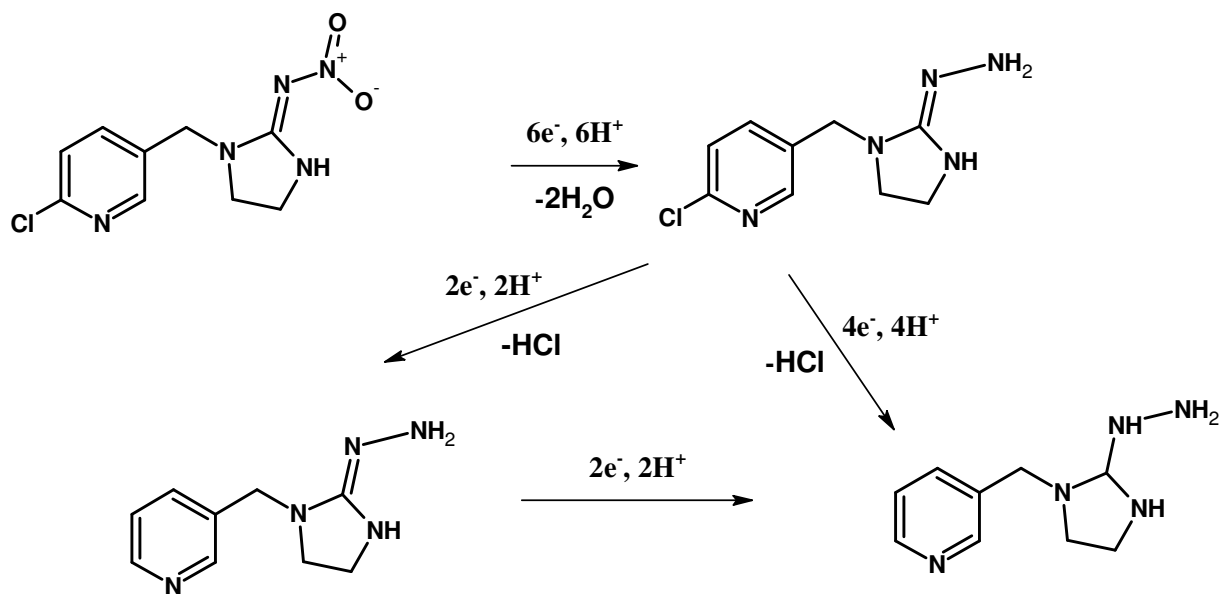
Při elektrolýze do druhého stupně (Přílohy č. 4 a 7) rostly v hmotnostním spektru elektrolyzátů intenzity iontů m/z 192 a 194. Návrhy struktur těchto látek jsou na Obr. 33 (látky 3 a 4). Vzhledem k nízkému rozlišení hodnot m/z získaných na použitém hmotnostním spektrometru (jednotky Daltonů) však bude potřeba pro potvrzení struktur těchto látek provést ještě další experimenty.

Mechanismus redukce navržený na základě elektrolýzy na velkoplošné rtuťové elektrodě a následné analýzy redukčních produktů hmotnostní spektrometrií předpokládá v prvním kroku šestielektronovou redukcí nitroskupiny na aminoskupinu a ve druhém kroku dvouelektronovou dechloraci chlorpyridinového cyklu, následovanou dvouelektronovou redukcí dvojné vazby guanidinového motivu (Obr. 34). Navržený mechanismus je značně odlišný od údajů popisovaných v lit.²¹, který předpokládá čtyřelektronovou redukcí nitroskupiny na hydroxylamin a následně dvouelektronovou redukcí na aminoskupinu (Obr.

6, str. 19). Tento rozdíl může být způsobený odlišným mechanismem redukce na rtuťové elektrodě při voltametii, kdy elektrochemická redukce probíhá krátkou dobu, a na velkoplošné rtuťové elektrodě, při které experiment trvá mnohem delší dobu a meziprodukty přítomné v roztoku mohou dále reagovat na odlišné produkty.⁵⁰



Obr. 33: Navržené struktury produktů vznikajících redukcí IMI na velkoplošné rtuťové elektrodě s uvedenými hodnotami hmotností jejich protonovaných molekul, 1 – IMI, 2 – produkt elektrolytické redukce do prvního stupně, 3 a 4 – produkty elektrolytické redukce do druhého stupně



Obr. 34: Navržený mechanismus redukce IMI na základě hmotnostních spekter produktů elektrolýzy na velkoplošné rtuťové elektrodě

5 Závěr

V práci byl studován mechanismus elektrochemické redukce imidaclopridu. Cyklická voltametrie ukázala, že IMI se redukuje ve dvou stupních a reakce je z elektrochemického hlediska ireverzibilní. Ze srovnání výšek polarografických vln IMI a standardních látek (3-nitrobenzoová kyselina a benzil) vyplynulo, že první krok je čtyřelektronová redukce a druhý krok dvouelektronová redukce. Tato skutečnost je v souladu s údaji v literatuře, které předpokládají v prvním kroku redukcí nitroskupiny na hydroxylaminovou skupinu a ve druhém kroku redukcí na aminoskupinu. Předpokládaný průběh redukce však nepotvrdila analýza produktů elektrolýzy IMI na velkoplošné rtuťové elektrodě pomocí hmotnostní spektrometrie. Z tohoto důvodu byl pro redukcí na velkoplošné rtuťové elektrodě navržen jiný mechanismus elektrochemické přeměny, který předpokládá v prvním kroku šestielektronovou redukcí nitroskupiny na aminoskupinu. Pro potvrzení nebo vyvrácení navrženého mechanismu bude zapotřebí provést ještě další experimenty.

Dále byly v práci hledány optimální podmínky pro analýzu insekticidu IMI pomocí voltametriických metod na visící rtuťové kapkové elektrodě, elektrodě ze skelného uhlíku a rtuťové filmové elektrodě. Pro všechny elektrody bylo optimální pH pro analýzu v zásadité oblasti. Studium hydrolyzy IMI pomocí UV spektrofotometrie ukázalo, že analýzy je možné bez problémů provádět při hodnotách pH 10 a menších bez rizika rychlé hydrolyzy.

Nejnižších hodnot LOD a LOQ bylo dosaženo na HMDE, o něco vyšší hodnoty poskytovala MFE a nejvyšší hodnoty poskytovala GCE. Při analýze reálných vzorků byly získány správnější výsledky na MFE a GCE oproti HMDE. Důvodem byla nelineární kalibrační závislost na HMDE, která způsobovala obtíže při kvantifikaci metodou standardních přídavek.

6 Literatura

1. Jeschke P., Nauen R., Schindler M., Elbert A.: *J. Agric. Food Chem.*, *59*, 2897 (2011).
2. Nauen R., Jeschke P., Copping L.: *Pest Manage. Sci.*, *64*, 1081 (2008).
3. Jeschke P., Nauen R.: *Pest Manage. Sci.*, *64*, 1084 (2008).
4. Tomizawa M., Casida J. E.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, *45*, 247 (2005).
5. Nauen R., Denholm I.: *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, *58*, 200 (2005).
6. Tomizawa M., Casida J. E.: *Annu. Rev. Entomol.*, *48*, 339 (2003).
7. Goulson D.: *J. Appl. Ecol.*, *50*, 977 (2013).
8. Bonmatin J.-M., Giorio C., Girolami V., Goulson D., Kreuzweiser D. P., Krupke C., Liess M., Long E., Marzaro M., Mitchell E. A. D., Noome D. A., Simon-Delso N., Tapparo A.: *Environ. Sci. Pollut. Res.*, *22*, 35 (2015).
9. Gallai N., Salles J.-M., Settele J., Vaissi re B. E.: *Ecological Economics*, *68*, 810 (2009).
10. Blacqui re T., Smaghe G., van Gestel C. A. M., Mommaerts V.: *Ecotoxicology*, *21*, 973 (2012).
11. Mommaerts V., Reynders S., Boulet J., Besard L., Sterk G., Smaghe G.: *Ecotoxicology*, *19*, 207 (2010).
12. Laycock I., Lenthall K. M., Barratt A. T., Cresswell J. E.: *Ecotoxicology*, *21*, 1937 (2012).
13. Pettis J. S., van Engelsdorp D., Johnson J., Dively G.: *Naturwissenschaften*, *99*, 153 (2012).
14. Gill R. J., Ramos-Rodriguez O., Raine N. E.: *Nature*, *491*, 105 (2012).
15. Gibbons D., Morrissey C., Mineau P.: *Environ. Sci. Pollut. Res.*, *22*, 103 (2015).
16. Hallmann C. A., Foppen R. P. B., van Turnhout C. A. M., de Kroon H., Jongejans E.: *Nature*, *511*, 341 (2014).
17. Banasiak U.: *IMIDACLOPRID (206)*. Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry (BBA), Kleinmachnow, Germany.
18. Ford K. A., Casida J. E.: *J. Agric. Food Chem.*, *56*, 10168 (2008).
19. Kitsiou V., Filippidis N., Mantzavinos D., Poullos I.: *Appl. Catal., B*, *86*, 27 (2009).
20. Zheng W., Liu W.: *Pestic. Sci.*, *55*, 482 (1999).

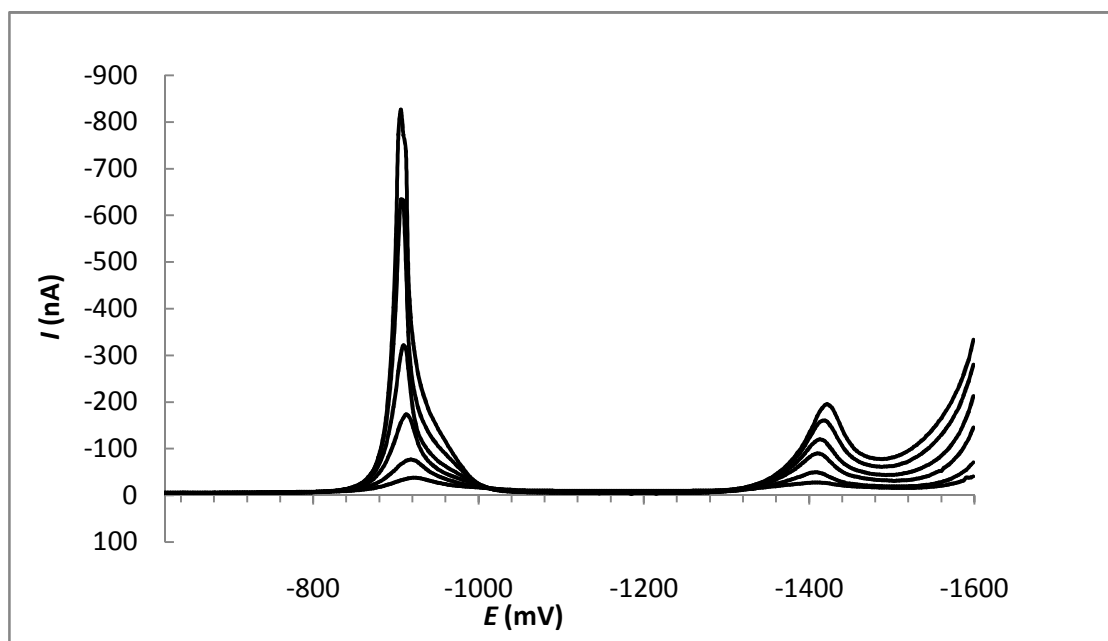
21. Navalón A., El-Khattabi R., González-Casado A., Vilchez J. L.: *Microchim. Acta*, *130*, 261 (1999).
22. Guzsvány V. J., Papp Z. J., Lazić S. D., Gaál F. F., Bjelica L. J., Abramovic B. F.: *J. Serb. Chem. Soc.*, *74*, 1455 (2009).
23. Quintás G., Armenta S., Garrigues S., de la Guardia M.: *J. Braz. Chem. Soc.*, *15*, 307 (2004).
24. Vilchez J. L., Valencia M. C., Navalón A., Molinero-Morales B., Capitán-Vallvey L. F.: *Anal. Chim. Acta*, *439*, 299 (2001).
25. Vilchez J. L., El-Khattabi R., Fernández J., González-Casado A., Navalón A.: *J. Chromatogr. A*, *746*, 289 (1996).
26. Navalón A., González-Casado A., El-Khattabi R., Vilchez J. L., Fernández-Alba A. R.: *Analyst*, *122*, 579 (1997).
27. MacDonald L. M., Meyer T. R.: *J. Agric. Food Chem.*, *46*, 3133 (1998).
28. Fernandez-Alba A. R., Valverde A., Agüera A., Contreras M., Chiron S.: *J. Chromatogr. A*, *721*, 97 (1996).
29. De Erenchun N. R., de Balugera Z. G., Goicolea M. A., Barrio R. J.: *Anal. Chim. Acta*, *349*, 199 (1997).
30. Seccia S., Fidente P., Barbini D. A., Morrica P.: *Anal. Chim. Acta*, *553*, 21 (2005).
31. Di Muccio A., Fidente P., Barbini D. A., Dommarco R., Seccia S., Morrica P.: *J. Chromatogr. A*, *1108*, 1 (2006).
32. Carretero A. S., Cruces-Blanco C., Durán S. P., Gutiérrez A. F., *J. Chromatogr. A*, *1003*, 189 (2003).
33. Wanatabe S., Ito S., Kamata Y., Omoda N., Yamazaki T., Munakata H., Kaneko T., Yuasa Y.: *Anal. Chim. Acta*, *427*, 211 (2001).
34. Watanabe E., Baba K., Eun H., Miyake S.: *Food Chem.*, *102*, 745 (2007).
35. Guiberteau A., Galeano T., Mora N., Parrilla P., Salinas F.: *Talanta*, *53*, 943 (2001).
36. Štěpánková M., Šelešovská R., Janíková-Bandžuchová L., Chýlková J.: *Chem. Listy*, *109*, 527 (2015).
37. Gaál F. F., Guzsvány V. J., Bjelica L. J.: *J. Serb. Chem. Soc.*, *72*, 1465 (2007).
38. Guzsvány V. J., Gaál F. F., Bjelica L. J., Ökrész S. N.: *J. Serb. Chem. Soc.*, *70*, 735 (2005).

39. Guzsvány V., Kádar M., Papp Z., Bjelica L., Gaál F., Tóth K.: *Electroanalysis*, *20*, 291 (2008).
40. Guzsvány V., Papp Z., Zbiljić J., Vajdle O., Rodić M.: *Molecules*, *16*, 4451 (2011).
41. Papp Z., Švančara I., Guzsvány V., Vytřas K., Gaál F.: *Microchim. Acta*, *166*, 169 (2009).
42. Wang J.: *Analytical Electrochemistry*. Wiley, New Jersey 2006.
43. Bard A. J., Faulkner L. R.: *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*. Wiley, New York 2000.
44. Economou A., Fielden P. R.: *Analyst*, *128*, 205 (2003).
45. Sahoo S., Satpati A. K., Reddy A. V. R.: *Am. J. Anal. Chem.*, *4*, 141 (2013).
46. Barek J., Opekar F., Štulík K.: *Elektroanalytická chemie*. Karolinum, Praha 2005.
47. Zuman P.: *International Series of Monographs on Analytical Chemistry, vol. 12: Organic Polarographic Analysis*. Pergamon Press, Oxford 1964.
48. <http://physics.mff.cuni.cz/kfpp/povrchy/method/cv-principles>, staženo 18. 3. 2016.
49. Heyrovský J., Kůta J.: *Principles of Polarography*. Academic Press, New York and London 1965.
50. Volke J., Liška F.: *Electrochemistry in Organic Synthesis*. Springer Verlag, Berlin and Heidelberg, 1994.
51. Kuthan J., Kurfürst A., Raclová F., Volke J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.*, *45*, 2938 (1980).
52. Stapelfeldt H. E., Perone S. P.: *Anal. Chem.*, *41*, 623 (1969).

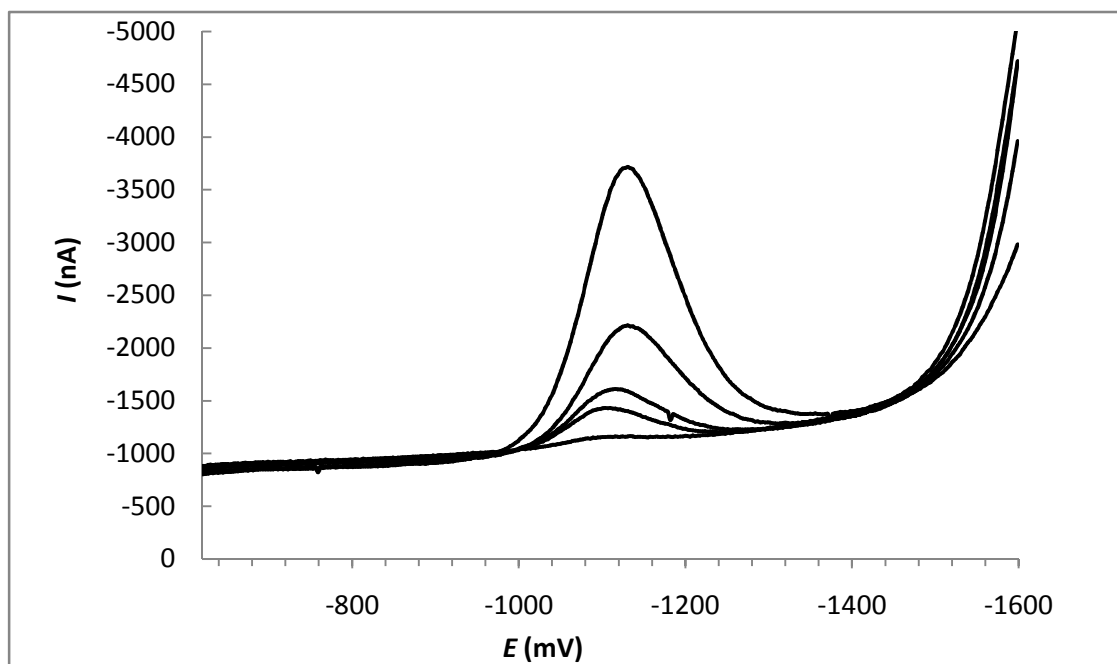
7 Seznam zkratek

ACh	Acetylcholin
BiFE	Bismutová filmová elektroda
BR pufr	Britton-Robinsonův pufr
CPE	Uhlíková pastová elektroda
CV	Cyklická voltametrie
DME	Rtuťová kapající elektroda
DPV	Diferenčně pulsní voltametrie
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	Ionizace elektrosprejem
GC	Plynová chromatografie
GCE	Elektroda ze skelného uhlíku
HMDE	Visící rtuťová kapková elektroda
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
IMI	Imidacloprid
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez stanovitelnosti
MFE	Rtuťová filmová elektroda
M_r	Relativní molekulová hmotnost
MS	Hmotnostní spektrometrie
nAChR	Nikotinový acetylcholinový receptor
SMDE	Statická rtuťová kapková elektroda
SPE	Extrakce na pevné fázi
SWV	Square wave voltametrie
UV	Ultrafialový

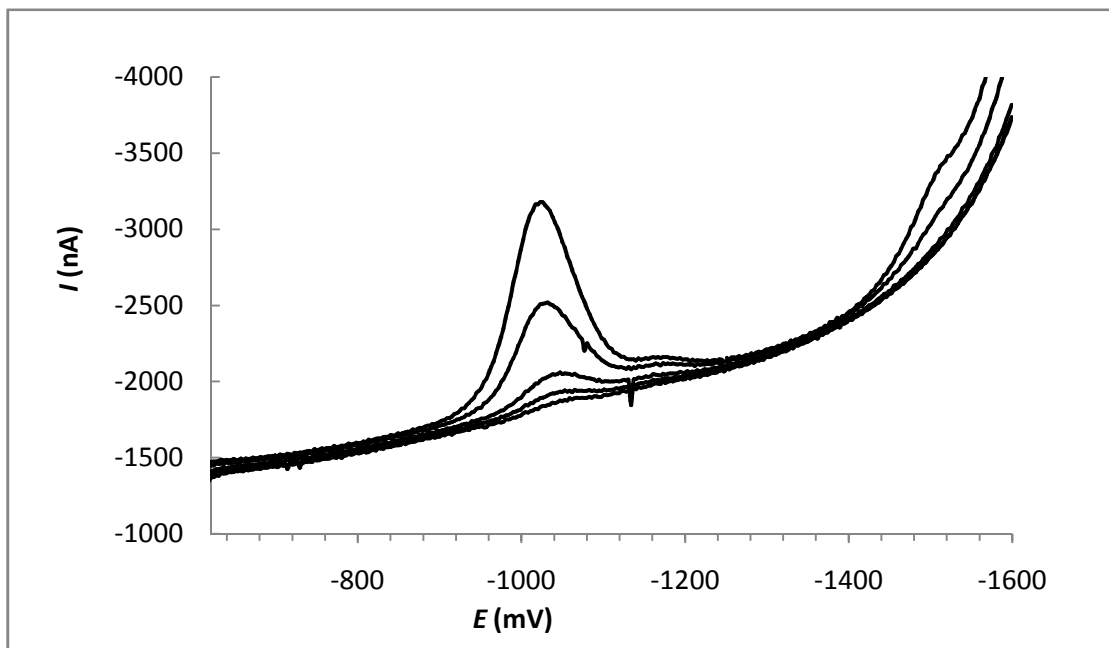
8 Přílohy



Příloha č. 1: DP voltamogramy IMI na HMDE, $c_{\text{IMI}} = 3,6 \cdot 10^{-6}$ až $4,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$, amplituda pulsu -50 mV, šířka pulsu 100 ms, BR pufr – pH 9



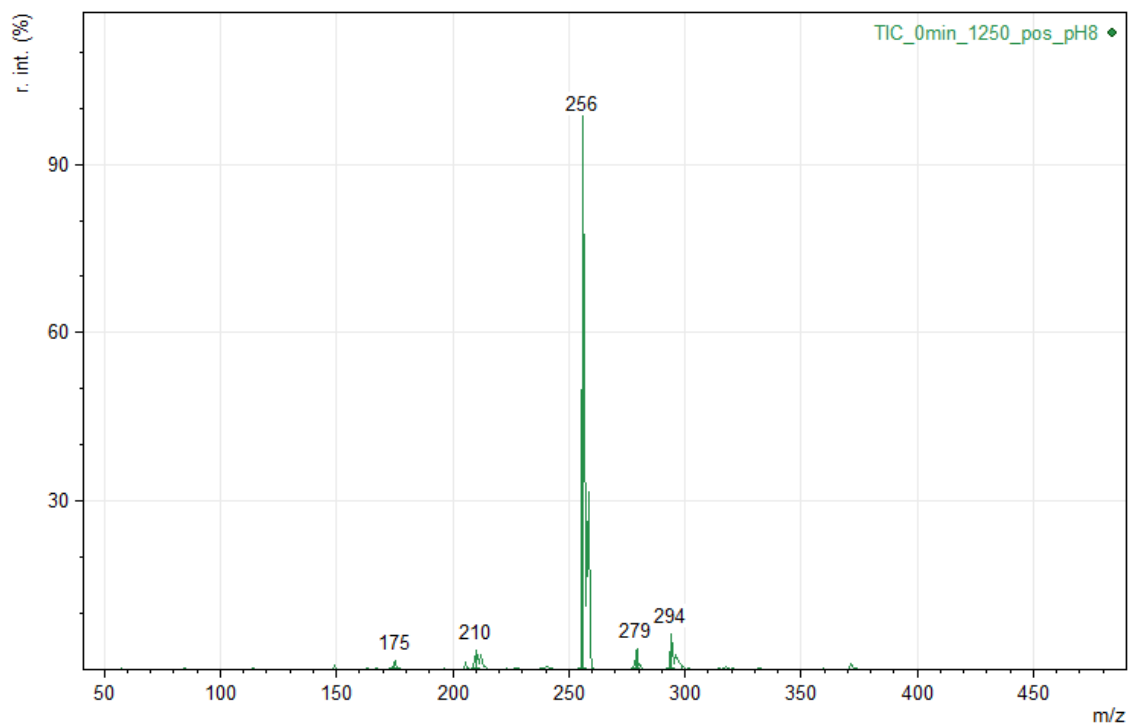
Příloha č. 2: DP voltamogramy IMI na GCE, $c_{\text{IMI}} = 5,8 \cdot 10^{-6}$ až $1,1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$, amplituda pulsu -50 mV, šířka pulsu 100 ms, BR pufr – pH 9



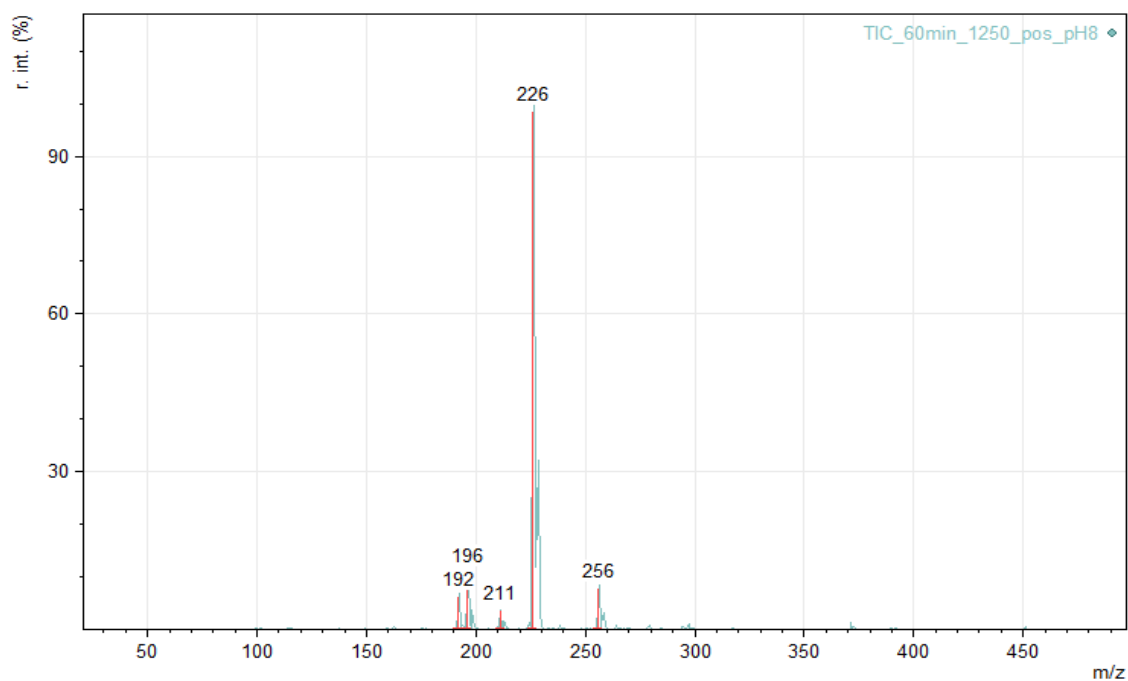
Příloha č. 3: DP voltamogramy IMI na MFE, $c_{\text{IMI}} = 1,5 \cdot 10^{-6}$ až $2,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, $c_{\text{Hg}^{2+}} = 1,9 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$, amplituda pulsu -50 mV, šířka pulsu 100 ms, vylučování filmu při -500 mV po dobu 60 s, oxidace filmu při 500 mV po dobu 60 s, BR pufr – pH 10

pH	Potenciál	Ionty s nejvyšší intenzitou (m/z)	Fragmenty (m/z)
5	-1000 mV	256 226 211	- 190, 141, 126, 100 -
	-1300 mV	256 226 194 192 101	- - - 175, 158, 132, 107, 100 -
8	-1250 mV	256 226 211 196	- 190, 141, 126, 100 - -
	-1500 mV	285 256 226 212 194 192 101	- - - - 151, 101 175, 158, 132, 113, 100 -

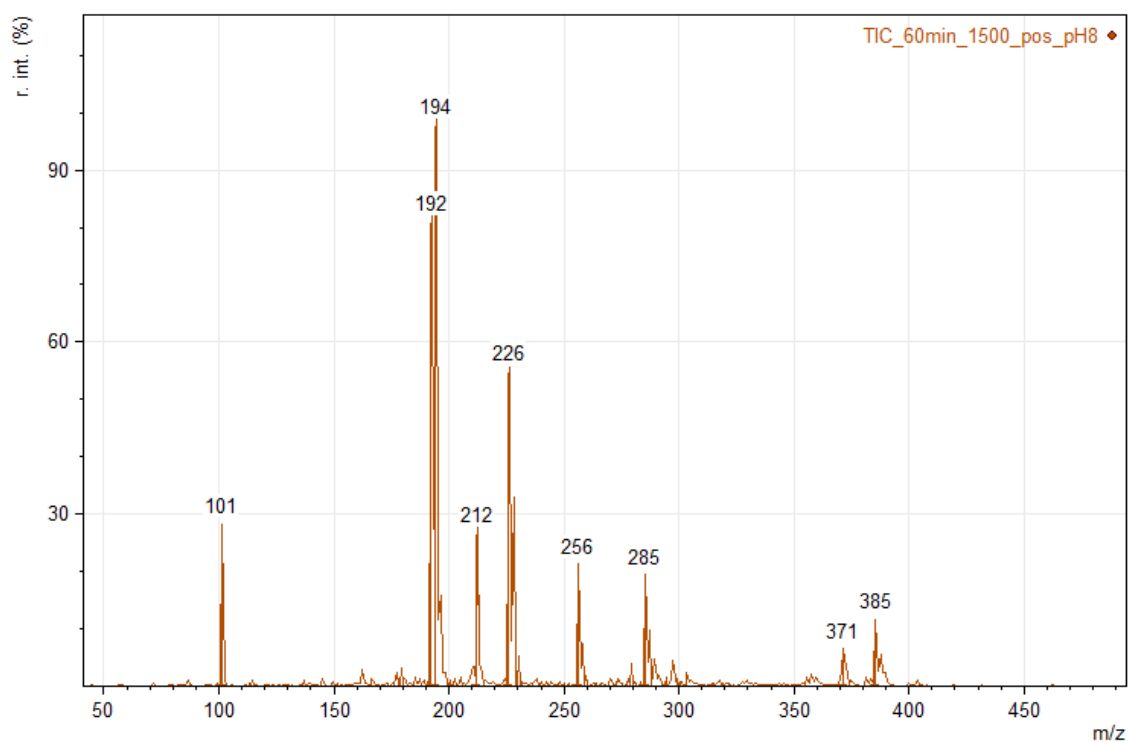
Příloha č. 4: Tabulka uvádějící ionty s nejvyšší intenzitou v hmotnostním spektru roztoku po 60 min elektrolýzy do prvního i druhého stupně při pH 5 a 8, u vybraných iontů jsou uvedeny fragmenty



Příloha č. 5: Hmotnostní spektrum roztoku před elektrolýzou, pufr $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{NH}_3$ – pH 8



Příloha č. 6: Hmotnostní spektrum roztoku po 60 min elektrolýzy při potenciálu -1250 mV, pufr $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{NH}_3$ – pH 8



Příloha č. 7: Hmotnostní spektrum roztoku po 60 min elektrolýzy při potenciálu -1500 mV, pufr $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{NH}_3$ – pH 8