

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ
GENOTOXICKÉHO 2-NITROFLUORENU
POMOCÍ LEŠTĚNÉ STŘÍBRNÉ TUHÉ
AMALGAMOVÉ KOMPOZITNÍ ELEKTRODY

Bakalářská práce

studijního oboru Chemie životního prostředí

PRAHA 2009

ZUZANA KREJČOVÁ

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumných záměrů MŠMT ČR (projekty MSM 0021620857, LC 06035 a RP 14/63) a z těchto projektů byla také finančně podporována.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Mgr. Vlastimila Vyskočila, a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze, dne 1. června 2009

.....

podpis

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli Mgr. Vlastimilu Vyskočilovi, Mgr. Aleši Daňhelovi a Prof. RNDr. Jiřímu Barkovi, CSc. za profesionální vedení, cenné připomínky k mé práci, vřelý a trpělivý přístup. Dále bych ráda vyjádřila dík všem členům Katedry analytické chemie PřF UK za pomoc v mnoha ohledech a vytvoření kolegiální atmosféry.

Prof. Lennartu Möllerovi (Karolinska Institute, Stockholm) děkuji za ochotné poskytnutí textových materiálů shrnujících jeho výzkum o 2-nitrofluorenu.

V neposlední řadě si poděkování zaslouží i mí rodiče, že mi umožnili studium na vysoké škole, a přátelé za podporu.

Předmětová hesla:

analytická chemie

elektrochemie

voltametrie

nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky

Klíčová slova:

2-nitrofluoren

DC voltametrie

diferenční pulsní voltametrie

leštěná stříbrná tuhá amalgamová kompozitní elektroda

UV-VIS absorpční spektroskopie

Obsah

1. Úvod	7
1.1 Cíl práce	7
1.2 Studovaná látka	8
1.3 Výskyt, vlastnosti a biologické účinky 2-nitrofluorenu	9
1.4 Nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky a metody jejich stanovení	11
1.4.1 Spektrometrické metody	11
1.4.2 Polarografické a voltametrické metody	11
1.4.3 Chromatografické metody	12
2. Experimentální část	13
2.1 Reagencie	13
2.2 Aparatura	13
2.2.1 Leštěná stříbrná tuhá amalgamová kompozitní elektroda	14
2.3 Pracovní postupy	16
2.3.1 Předúprava p-AgSA-CE	16
2.3.2 Voltametrická měření	16
2.3.3 Zpracování výsledků a statistické vyhodnocení získaných dat	17
2.4 Stabilita zásobního roztoku 2-nitrofluorenu	19
3. Voltametrické stanovení 2-nitrofluorenu na p-AgSA-CE	21
3.1 DC voltametrie	21
3.2 Diferenční pulsní voltametrie	37
4. Shrnutí dosažených výsledků	52
5. Závěr	53
6. Literatura	54

Seznam použitých zkratk a symbolů

<i>A</i>	absorbance
AgSA-CE	stříbrná tuhá amalgamová kompozitní elektroda
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
<i>c</i>	molární koncentrace [mol L ⁻¹]
C.A.S.	Chemical Abstract Service
DCV	DC voltametrie
DPV	diferenční pulsní voltametrie
<i>E</i>	potenciál [mV]
<i>E_p</i>	potenciál píku látky [mV]
EC	elektrochemický detektor
ECD	detektor elektronového záchytu
FD	fluorescenční detektor
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<i>I</i>	elektrický proud [nA]
<i>I_p</i>	elektrický proud píku látky [nA]
<i>L_{1,2}</i>	interval spolehlivosti
<i>L_Q</i>	mez stanovitelnosti [mol L ⁻¹]
p-AgSA-CE	leštěná stříbrná tuhá amalgamová kompozitní elektroda
<i>M_r</i>	relativní molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie
NPAH	nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace oxoniových iontů
pH*	pH směsného vodně-methanolického roztoku
<i>R</i>	korelační koeficient
<i>s</i>	směrodatná odchylka
<i>s_r</i>	relativní směrodatná odchylka
<i>t</i>	čas [s]
\tilde{x}	medián
ZE	základní elektrolyt
λ	vlnová délka [nm]

1. Úvod

1.1 Cíl práce

Předložená bakalářská práce tvoří součást projektu řešeného na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, který se zabývá studiem elektrochemického chování biologicky aktivních organických sloučenin, významných z hlediska ochrany životního prostředí, z hlediska lékařského, farmaceutického a toxikologického.

Cílem této práce je nalezení optimálních podmínek pro voltametrické stanovení genotoxického 2-nitrofluorenu v pufrovaném methanolickém prostředí pomocí technik DC voltametrie (DCV) a diferenční pulsní voltametrie (DPV) na leštěné stříbrné tuhé amalgamové kompozitní elektrodě (p-AgSA-CE), se záměrem dosáhnout co nejnižší meze stanovitelnosti (L_0). Neméně důležitým cílem je také touto prací přispět k širšímu rozšíření elektroanalytických metod, které jsou v současné době v praxi postupně vytlačovány jinými analytickými metodami, např. spektrofotometrií či vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

Tato práce navazuje na bakalářskou práci Bc. Jaroslava Jiráka¹, která pojednává o voltametrickém stanovení genotoxického 2-nitrofluorenu na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné tuhé amalgamové elektrodě.

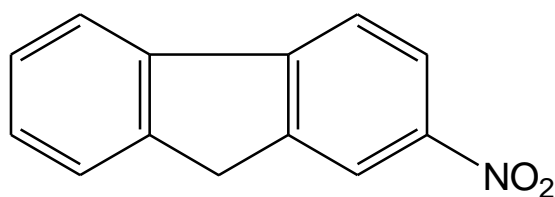
1.2 Studovaná látka

2-nitrofluoren je za laboratorní teploty (25 °C) a atmosférického tlaku (101 kPa) jemně krystalický světle žlutý prášek s lipofilním charakterem. Dobře se rozpouští v organických rozpouštědlech, např. v acetonu, methanolu, dimethylsulfoxidu, ve vodě je rozpustný velmi omezeně^{2,3}.

C. A. S. Name: 9H-Fluorene, 2-nitro-

C. A. S. Registry Number: 607-57-8.

Strukturní vzorec:



Sumární vzorec: C₁₃H₉NO₂.

$M_r = 211,22$.

Teplota tání = 155-158 °C.

Kategorie karcinogenů dle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC): 2B (podezřelý karcinogen pro člověka)⁴.

1.3 Výskyt, vlastnosti a biologické účinky 2-nitrofluorenu

2-Nitrofluoren patří do skupiny nitrovaných polyaromatických uhlovodíků (NPAH) a jako jejich modelový zástupce (marker) se používá při mnoha vědeckých experimentech. NPAH, včetně 2-nitrofluorenu, se začaly intenzivně zkoumat v 80. letech 20. století, když se prokázala souvislost mezi jejich existencí ve výfukových plynech a mutagenitou⁵. S potřebou stanovit látky o velmi nízkých koncentracích, ve kterých se NPAH v životním prostředí vyskytují (řádově pg až ng dané látky v 1 m³ vzduchu)⁶, se rozvíjejí i sofistikované a přesné analytické metody jejich stanovení⁷.

2-Nitrofluoren vzniká nedokonalým spalováním nebo reakcemi polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) v atmosféře. Hlavními zdroji produktů nedokonalého spalování jsou diesellové motory^{8,9}, u kterých však množství emitovaných NPAHů záleží na výkonu, rychlosti, přítomnosti či nepřítomnosti katalyzátorů, a různém druhu topných těles. V současném znečištěném ovzduší mohou PAH snadno reagovat s oxidy dusíku (viz schéma 1 – vznik 2-nitrofluorenu z matečného uhlovodíku elektrofilní nitrací) za vzniku NPAHů⁷. 2-Nitrofluoren se ještě navíc může utvářet fotochemicky (viz schéma 2)².



Značná mobilita (snadný atmosférický i biologický koloběh) 2-nitrofluorenu způsobuje jeho přítomnost ve všech složkách životního prostředí. Postupně byl detekován například v sazích, cigaretovém kouři, sedimentech², tonerech pro tiskárny¹⁰ a dokonce i v některých potravinách⁶. V atmosféře se 2-nitrofluoren vyskytuje ve dvou formách, jako plynná složka či adsorbován na pevných částicích aerosolu. Z toho plynou i dva možné způsoby vniknutí tohoto xenobiotika do lidského těla, kde je rozsáhle metabolizováno.

Po vstupu do organismu inhalací je 2-nitrofluoren metabolizován v plicích za tvorby potenciálně mutagenního hydroxylovaného 2-nitrofluorenu. Tato sloučenina přechází společně s nemetabolizovaným 2-nitrofluoren do krevního oběhu, kterým se dostávají do jater. V játrech je zbylý nemetabolizovaný 2-nitrofluoren metabolizován na hydroxyl-2-nitrofluoren a konjugován s kyselinou glukoronovou. Glukoronové konjugáty jsou pak vylučovány, ale dostanou-li se tyto konjugáty do střev, mohou být střevní β -glukoronidázou rozštěpeny opět na volný hydroxyl-2-nitrofluoren, který představuje

potenciální karcinogen ve střevech. Po vstupu 2-nitrofluorenu trávicí soustavou, jakožto druhou možnou cestou vniknutí 2-nitrofluorenu do lidského těla, je většina kontaminantu metabolizována ve střevech a vyloučena do 48 hodin. Pouze velmi malá část dávky (zhruba 1,5 %) je metabolizována v játrech a poté vyloučena močí.

Hlavní metabolickou cestou 2-nitrofluorenu ve střevech je redukce enzymy střevní mikroflóry na 2-aminofluoren. Tyto enzymy přitom vykazují značnou substrátovou specifitu. 2-Aminofluoren je dále metabolizován v játrech acetylací a následnou hydroxylací. Hydroxylovaný acetylaminofluoren je vylučován samostatně nebo v konjugované formě. Druhou alternativní formou metabolismu 2-nitrofluorenu trávicí soustavou je vznik hydroxylovaného 2-nitrofluorenu. Ten je však na rozdíl od hydroxylovaného acetaminofluorenu silně mutagenní, dokonce více než samotný 2-nitrofluoren^{6,11}.

Většina karcinogenních látek bývá zároveň i mutagenních, to platí i pro 2-nitrofluorenu¹², přestože záleží např. na dávce, formě podání, jednotlivém biologickém druhu či pohlaví¹³. 2-Nitrofluoren se často používá jako pozitivní kontrola v genotoxických studiích (jako mutagen)¹⁴ či jako látka vyvolávající rakovinu. 2-Nitrofluoren sám o sobě nebyl testován na teratogenitu, přestože se tak jeho některé metabolity jeví^{2, 15}. Mnoha experimenty se prokázala i značná role přítomnosti či nepřítomnosti střevní mikroflóry na formování DNA aduktů^{14, 16, 17}. Projevila se i souvislost mezi chromosomálními mutacemi bakterií indukovaných 2-nitrofluorenem a jejich rezistencí k antibiotikům. Fakt, že mnoho sloučenin, vyskytujících se v životním prostředí, může reagovat s DNA a způsobit tak mutace vedoucí k antibiotické rezistenci bakterií a ohrozit zdraví lidí, je velmi znepokojivý¹⁸.

1.4 Nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky a metody jejich stanovení

Pro stanovení NPAHů byla popsána celá řada analytických metod s různou citlivostí a selektivitou. Volba metody závisí na matrici, ve které se látka vyskytuje a koncentraci, ve které je v dané matrici obsažena. Vzhledem ke složitosti environmentálních vzorků je nutná předběžná separace za použití extrakčních a chromatografických technik.

Pro stanovení 2-nitrofluorenu bez předřazeného separačního kroku byly vypracovány metody voltametrické (na visící rtuťové kapkové elektrodě¹⁹ a na rtuťovém meniskem modifikované stříbrné tuhé amalgámové elektrodě¹) a metoda stanovení pomocí UV-VIS spektrofotometrie¹. Ve spojení s chromatografickou separací jsou pak popsány metody stanovení užitím technik GC-MS²⁰ či HPLC s nepřímou fluorescenční detekcí²¹⁻²³. Vzhledem k podobným chemickým a fyzikálním vlastnostem se strukturně blízkými NPAH lze přepokládat užití níže popsaných metod i ke stanovení 2-nitrofluorenu.

1.4.1 Spektrometrické metody

NPAH díky rozsáhlému aromatickému systému a přítomnosti nitroskupiny dostatečně absorbují záření v ultrafialové oblasti a viditelné oblasti spektra. Fluorimetrie, která je velmi výhodná pro důkaz a stanovení PAHů, nemůže být použita přímo pro NPAH, protože nevykazují prakticky žádnou fluorescenci²⁴.

1.4.2 Polarografické a voltametrické metody

Vzhledem ke snadné polarografické redukci nitroskupiny na aromatickém jádře lze ke stanovení stopových množství NPAHů použít moderní polarografické a voltametrické metody, jmenovitě diferenční pulsní polarografii na klasické rtuťové kapkové elektrodě či diferenční pulsní voltametrii na visící rtuťové kapkové elektrodě²⁵. Vzhledem k nízké polaritě NPAHů lze použít k jejich mimořádně citlivému stanovení v koncentračním rozmezí 10^{-7} až 10^{-10} mol L⁻¹ adsorpční rozpouštěcí voltametrii^{8,26}.

1.4.3 Chromatografické metody

Chromatografické metody jsou nejčastěji používanými analytickými technikami pro stanovení NPAHů v environmentálních i biologických vzorcích vzhledem k jejich mimořádné selektivitě, citlivosti a vhodnosti pro sériové analýzy ⁷.

Přestože se tradiční kombinace plynové chromatografie a hmotnostní spektroskopie stále hojně užívá ⁹, neustále podléhá výzkumu a zlepšování (např. selektivnější stacionární fáze pro kapilární kolony). Ve starších pracích se nejčastěji uvádí ionizace nárazem elektronů. Avšak už v 80. letech byly známy techniky chemické ionizace ²⁷ a cílené detekce vybraných iontů, které jsou v současné analýze NPAHů preferovány. Hlavní podíl na tom má vysoká selektivita a citlivost k elektron-akceptorové nitro skupině. Chemická ionizace minimalizuje analytickou interferenci sloučenin, které koeluuji s NPAH. Detekční rozsah vzorků životního prostředí se pohybuje v rozmezí pg m^{-3} až ng m^{-3} . Rozvoj a dostupnost tandemu MS-MS umožňuje snáze identifikovat NPAH, užití chemické ionizace při GC-MS-MS dovoluje kvantifikaci některých NPAHů extrahovaných ze vzduchu bez předchozího čištění ⁷.

K detekci NPAHů se uplatňuje řada detektorů od plamenového ionizačního detektoru, MS detektoru po termoionizační detektor citlivý na dusík a fosfor či detektor elektronového záchytu (ECD), který byl za tímto účelem vyvinut. Zařazení ECD vyžaduje redukci sloučeniny na odpovídající amino-PAH následovanou derivatizací. Tím se až desetkrát zvýší citlivost v porovnání s GC-ECD bez derivatizace. Derivatizačními metodami se však GC-ECD může stát náchylná ke kontaminaci či ztrátě analytu ⁷.

HPLC je další významnou metodou pro stanovení NPAHů, umožňuje dosáhnout vyššího rozlišení a reprodukovatelnosti než klasická kapalinová chromatografie a tenkovrstvá chromatografie. HPLC-MS se hodí pro netěkavé, polární či tepelně nestabilní látky. Zdá se být slibnou analytickou metodou. Po redukci nitroskupiny přicházejí v úvahu fluorescenční, chemiluminiscenční a elektrochemické detektory ¹⁰. V soustavě HPLC-EC-FD v EC probíhá redukce nitro skupiny, zatím co FD slouží k detekci a kvantifikaci analytů ⁷.

2. Experimentální část

2.1 Reagencie

Studovaná látka: 2-nitrofluoren (98%, Sigma – Aldrich Laborchemikalien, Německo). Zásobní roztok 2-nitrofluorenu (100 mL roztoku o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) byl připraven rozpuštěním 0,02112 g této látky v methanolu za pomoci ultrazvuku (sonifikace po dobu 5 minut). Roztoky o nižších koncentracích byly připravovány přesným ředěním tohoto zásobního roztoku. Zásobní roztok byl uchováván ve tmě za laboratorní teploty.

Ostatní použité chemikálie (čistota p.a.): kyselina boritá (Lachema Brno, ČR), kyselina chlorovodíková (Lachema Brno, ČR), octová kyselina (99,8%, Lach-Ner, ČR), kyselina fosforečná (85%, Lachema Brno, ČR), hydroxid sodný (Lach-Ner, ČR), chlorid draselný (Lachema Brno, ČR) a methanol (Penta, ČR).

Brittonovy-Robinsonovy pufrы (BR pufrы) o potřebném pH byly připravovány mísením $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ roztoku NaOH s roztokem obsahujícím $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ kyselinu boritou, fosforečnou a octovou. Hodnoty pH byly měřeny pH-metrem Jenway 4330 (Jenway, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou, kalibrovaným standardními roztoky pufrů. Pro přípravu všech vodných roztoků byla použita deionizovaná voda (Milipore, USA). Veškeré používané roztoky byly uchovávány ve skleněných nádobách.

2.2 Aparatura

Při všech voltametrických stanovení byla používána osobním počítačem řízená sestava Eco-Tribo Polarograf pracující se softwarem Polar Pro verze 2.0 (Eco-Trend Plus, Praha, ČR). Software pracoval v operačním systému Microsoft Windows 3.11 (Microsoft Corporation, USA).

Měření byla prováděna v tříelektrodevém zapojení. Leštěná stříbrná tuhá amalgamová kompozitní elektroda (p-AgSA-CE; s průměrem disku 2,9 mm a povrchem disku $6,6 \text{ mm}^2$; Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského, Praha, ČR) byla použita jako pracovní elektroda, jako referentní elektroda byla použita elektroda argentschloridová ($3 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$) typu ETP CZ/R0100X a jako pomocná elektroda pak platinová drátková elektroda typu ETP CZ P00906 (obé Eco-Trend Plus, Praha, ČR). Při metodě DPV byly na pracovní

elektrodu vkládány pulsy o šířce 80 ms a výšce -50 mV. Rychlost nárůstu potenciálu činila 20 mV s⁻¹, stejně jako při metodě DCV.

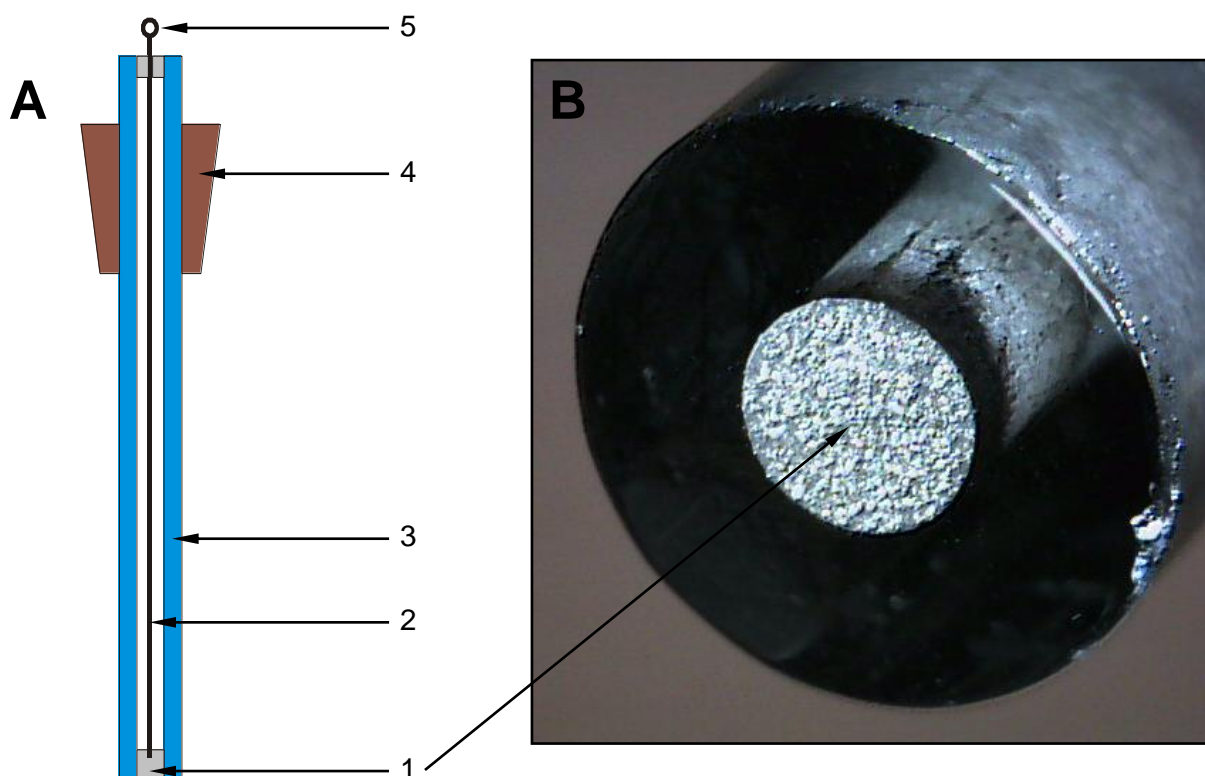
Spektrofotometrická měření stability zásobního roztoku byla prováděna na přístroji Agilent 8453 (Agilent Technologies, USA), ovládaném programem UV-Visible ChemStation (Agilent Technologies, USA), v křemenných kyvetách měrné tloušťky 1 mm (Hellma, Nizozemí).

2.2.1 Leštěná stříbrná tuhá amalgamová kompozitní elektroda

Přísné ekologické a bezpečnostní předpisy zaváděné jak ve světě, tak i v České republice, ale i řada obecně rozšířených předsudků a omylů, zakazují nebo podstatným způsobem komplikují používání elektrod obsahující kapalnou rtuť²⁸, jako je kapající rtuťová či visící rtuťová kapková elektroda. Z tohoto důvodu se v posledních letech věnuje velká pozornost vývoji pevných nertuťových elektrod či elektrod neobsahujících kapalnou rtuť²⁹.

Z výše uvedených důvodů proto také byla k voltametrickým měření použita p-AgSA-CE (obr. 1). Její toxicita je zanedbatelná v porovnání se rtuťovými elektrodami a v určitých případech je může úspěšně zastoupit. Jedná se o kombinaci pevné kompozitní a pevné amalgamové elektrody. Kompozitní elektroda se skládá z vodivé a nevodivé části (tu představují polymerní či monomerní materiály, např. epoxidové pryskyřice, teflon, polyethylen). Vodivou složkou může být kov nebo vodivý nekov, např. grafitový prášek^{30,31}. Stříbrné tuhé amalgamové kompozitní elektrody (AgSA-CE) se hodí k detekci kationtů těžkých kovů, aniontů, biologicky významných látek či nitrovaných sloučenin.

Jedna z největších výhod AgSA-CE je vysoké přepětí vodíku, to dovoluje polarizaci elektrody a práci při značně negativních potenciálech. Mezi další výhody patří mechanická stálost, nižší cena a hmotnost, stabilita v organických rozpouštědlech, relativně snadná příprava a možnost chemické modifikace vodivé i nevodivé části, a tím usnadnění přizpůsobení přípravy podle speciálních požadavků. Jako každá tuhá elektroda má i AgSA-CE ve srovnání se rtuťovými elektrodami (s klasickou kapající rtuťovou elektrodou či s visící rtuťovou kapkovou elektrodou) hůře reprodukovatelný a obnovitelný povrch. Regenerace AgSA-CE tedy se stává nutnou součástí měření²⁸.



Obr. 1. Schéma p-AgSA-CE (A) a detailní fotografie povrchu leštěné elektrody (B). 1 - kompozitní směs stříbrného amalgamu a epoxidové pryskyřice; 2 - měděný drátek; 3 - skleněná tuba; 4 - plastový úchyt; 5 - elektrický kontakt.

Možný způsob přípravy AgSA-CE: amalgam vzniklý smícháním stříbrných částic (o velikosti řádu μm) s kapalnou rtuť se nechá za laboratorní teploty 1 den tuhnout. Pro dosažení čisté formy se ztuhlý amalgam posype stříbrným práškem. Amalgam se poté zhomogenizuje s epoxidovou pryskyřicí (v poměru 80 % stříbrný amalgam a 20 % epoxidová pryskyřice). Kompozitní směs je vtlačena do těla elektrody (skleněná, teflonová či polyethylenová trubička). Nakonec se do měkkého kompozitního materiálu vsune elektrický kontakt a povrch elektrody se zbrousí smirkovým papírem a aluminou.

Takto připravená leštěná elektroda se dále může modifikovat elektrochemicky generovaným rtuťovým filmem nebo krátkým ponořením do kapalně rtuť (na povrchu elektrody se vytvoří rtuťový meniskus)³².

2.3 Pracovní postupy

2.3.1 Předúprava p-AgSA-CE

Předúprava p-AgSA-CE sestává ze tří kroků:

1. Leštění se provádí vždy na začátku pracovního dne či kdykoli v případě zhoršení proudové odezvy, např. zhoršení citlivosti, reprodukovatelnosti. Jedná se o mechanické obnovení povrchu elektrody jemným přeštěněním na alumině. K leštění povrchu elektrody byla použita soustava PK-4 Polishing Kit (BASi, USA) a z ní alumina (CF-1050) o velikosti částic 0,05 μm .

2. Elektrochemická aktivace následuje po leštění. Elektroda se ponoří do roztoku 0,2 mol L⁻¹ KCl, který se míchá 300 s bez vybublávání kyslíku při vloženém potenciálu -2200 mV. Aktivací se odstraňují oxidy a adsorbované látky, čímž se zlepšuje citlivost a reprodukovatelnost měření.

3. Regenerace – tento krok byl prováděn před každým voltametrickým měřením (kromě měření opakovatelnosti měření bez regeneračního kroku). Na elektrodu byly střídavě vkládány regenerační potenciály (pulsy), a to po dobu 30 s, s délkou pulzu 0,1 s. Pro jednotlivé hodnoty pH* základního elektrolytu (ZE) bylo třeba nalézt konkrétní regenerační potenciály, jejich odpovídající výčet je uveden v tabulce I.

Regenerace je, spolu s leštěním a aktivací, jedním ze tří kroků potřebných pro zajištění správné funkce p-AgSA-CE.

2.3.2 Voltametrická měření

Při měření voltametrických křivek byly měřené roztoky připraveny následujícím způsobem: do 10 mL odměrné baňky bylo odpipetováno 5 mL BR pufru o příslušném pH, zhruba 3 mL methanolu, potřebný objem zásobního roztoku 2-nitrofluorenu v methanolu a po promíchání byla baňka doplněna po rysku methanolem. Takto připravené roztoky byly převedeny do polarografické nádoby. Následně byl roztok zbaven kyslíku pětiminutovým probubláváním dusíkem, přičemž před vlastní nádobku byla zařazena promývačka obsahující směs vody a methanolu ve stejném objemovém poměru jako analyzovaný roztok, tedy 1:1. Po aplikaci regeneračního kroku byl proveden záznam voltametrické křivky. S výjimkou měření vlivu pasivace elektrody a desetinásobného měření nejnižší měřitelné koncentrace

Tabulka I

Počáteční (E_{in}) a konečné (E_{fin}) regenerační potenciály použité při měření ve vodně-methanoličských roztocích pufovaných BR puforem o daném pH a výsledném pH*.

pH	pH*	E_{in} [mV]	E_{fin} [mV]
2,0	2,8	100	-1100
3,0	3,9	0	-1100
4,0	4,8	-100	-1200
5,0	5,8	-100	-1200
6,0	7,0	-100	-1300
7,0	8,1	-100	-1400
8,0	8,7	-100	-1400
9,0	9,4	-100	-1500
10,0	10,0	-100	-1500
11,0	11,3	-100	-1600
12,0	11,9	-100	-1600
13,0	13,3	-300	-1600

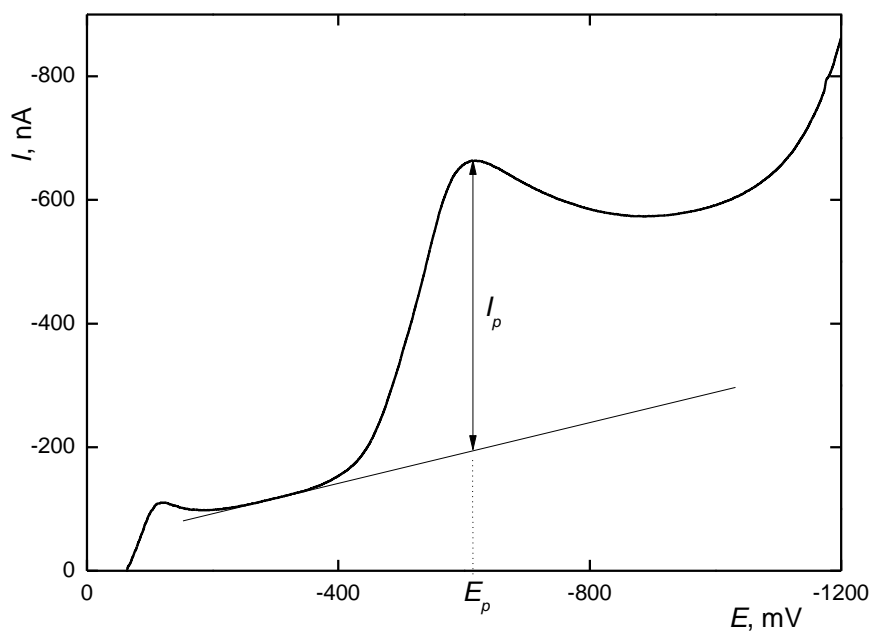
2-nitrofluorenu pro dané metody byly všechny křivky měřeny čtyřikrát. Všechna měření byla prováděna za laboratorní teploty.

Získané voltamogramy byly vyhodnocovány způsobem zobrazeným na obr. 2 (pro DCV) a obr. 3 (pro DPV). Vyhodnocením voltamogramů byly získány hodnoty potenciálu píku (E_p) a proudu píku (I_p).

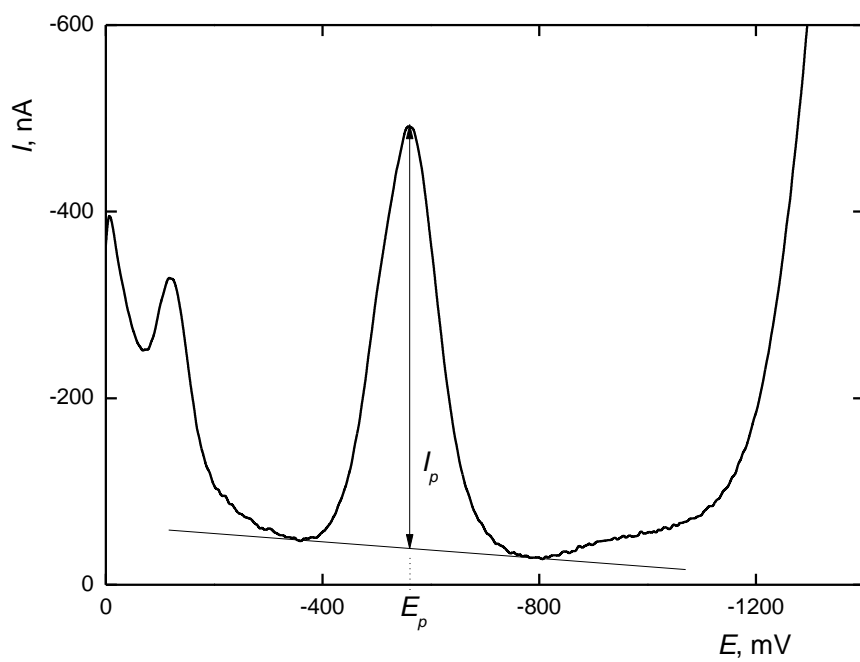
2.3.3 Zpracování výsledků a statistické vyhodnocení získaných dat

K provádění potřebných výpočtů a tvorbě grafů uvedených v této práci bylo použito programů OriginPro 8 (OriginLab Corporation, USA) a Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation, USA).

Statistické vyhodnocení opakovatelnosti voltametričských měření na p-AgSA-CE bylo provedeno dle zavedených chemometrických norem pro tento typ souboru dat. Mez stanovitelnosti byla vypočtena jako desetinásobek směrodatné odchylky deseti měření sledované látky o koncentraci odpovídající nejnižšímu bodu příslušné kalibrační přímky³³.



Obr. 2. Způsob vyhodnocování DC voltamogramů při stanovení 2-nitrofluorenu. DC voltamogram 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$); měřeno na p-AgSA-CE v prostředí methanol – BR pufr pH 6,0 (1:1); I_p – proud píku, E_p – potenciál píku.



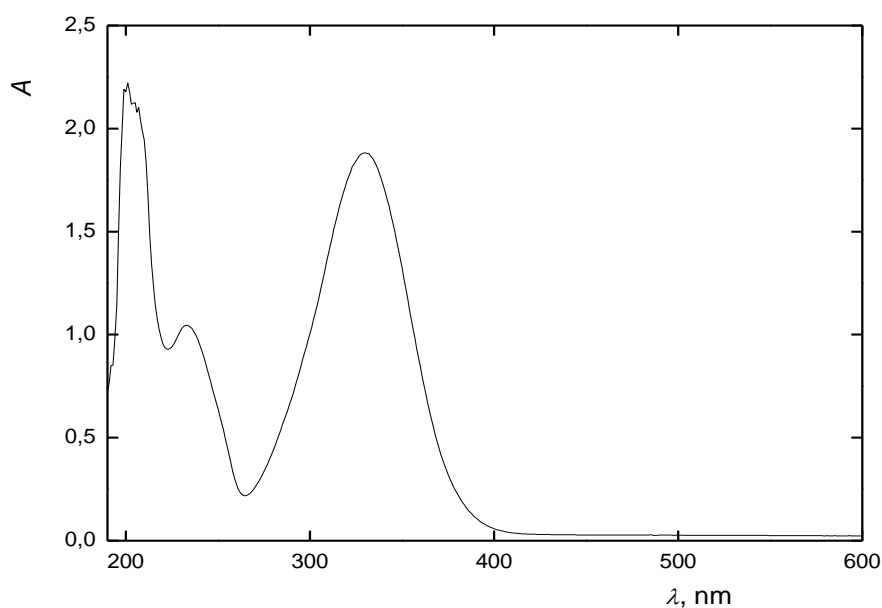
Obr. 3. Způsob vyhodnocování DP voltamogramů při stanovení 2-nitrofluorenu. DP voltamogram 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$); měřeno na p-AgSA-CE v prostředí methanol – BR pufr pH 6,0 (1:1); I_p – proud píku, E_p – potenciál píku.

2.4 Stabilita zásobního roztoku 2-nitrofluorenu

Stabilita zásobního roztoku 2-nitrofluorenu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ v methanolu byla sledována spektrofotometricky proti methanolu v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 0,1 cm. Absorbance zásobního roztoku byla měřena v rozsahu vlnových délek 190 až 1000 nm. Absorpční spektrum 2-nitrofluorenu je zobrazeno na obr. 4.

Hodnota molárního absorpčního koeficientu ε pro 2-nitrofluoren při vlnové délce 330 nm činila $18900 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$.

Výsledky měření stability zásobního roztoku 2-nitrofluorenu shrnuje tabulka II. Z těchto výsledků vyplývá, že v průběhu 33 dnů nedošlo v zásobním roztoku 2-nitrofluorenu uchovávaném ve tmě za laboratorní teploty k významnému poklesu koncentrace studované látky. Zásobní roztok je tedy při skladování v temnu za laboratorní teploty možno považovat za stálý.



Obr. 4. Absorpční UV-VIS spektrum roztoku 2-nitrofluorenu v methanolu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Měřeno proti čistému methanolu v křemenných kyvetách s optickou dráhou 1 mm.

Tabulka II

Spektrofotometrické měření stálosti zásobního roztoku 2-nitrofluorenu ($1 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹) v methanolu. Relativní absorbance je vytažena k nultému dni.

dny	absorbance roztoku		relativní absorbance [%]	
	233 nm	330 nm	233 nm	330 nm
0	1,045	1,883	100,0	100,0
1	1,068	1,874	102,2	99,5
2	1,069	1,889	102,2	100,3
3	1,064	1,882	101,8	100,0
4	1,087	1,917	103,9	101,8
7	1,068	1,881	102,2	99,9
11	1,023	1,867	97,9	99,2
22	1,090	1,926	104,2	102,3
33	1,158	1,928	110,8	102,4

3. Voltametrické stanovení 2-nitrofluorenu na p-AgSA-CE

3.1 DC voltametrie

Závislost voltametrického chování 2-nitrofluorenu na pH byla studována za použití pufovaných vodně-methanolicých roztoků obsahujících methanol a BR pufr o daném pH v objemovém poměru 1:1. Koncentrace 2-nitrofluorenu v těchto roztocích činila $1 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹. Voltametrické chování 2-nitrofluorenu bylo studováno v rozsahu pH použitého BR pufru 2,0 až 12,0; pro pH 13,0 byl použit 0,1 mol L⁻¹ NaOH. Odpovídající hodnoty I_p a E_p pro daná pH a pH^* jsou uvedeny v tabulce III.

Zaznamenané voltametrické křivky ukazují obr. 5 a obr. 6. Látka poskytuje jeden dobře vyvinutý voltametrický pík v celém rozsahu pH (tento pík je označován jako pík druhý, poněvadž při hodnotách pH^* 7,0 až 13,3 tomuto druhému píku předchází u méně negativních potenciálů ještě jeden menší pík, který jest nadále označován za pík první; jeho tvar má spíše sigmoidální charakter podobný voltametrické vlně), jeho potenciál s rostoucím pH vykazuje monotónní pokles k negativnějším hodnotám. Od pH BR pufru 10,0 se objevuje ještě pík třetí s potenciálem zápornějším než potenciál píku druhého. Pro názornost jsou tyto píky označeny na voltamogramu 2-nitrofluorenu v prostředí methanol – 0,1 mol L⁻¹ NaOH (1:1) (obr. 6).

Graficky je závislost potenciálu jednotlivých píků 2-nitrofluorenu na výsledném pH roztoku znázorněna na obr. 7. Z něj je patrné, že závislost potenciálu prvního píku (pozorovaného v rozmezí pH^* 7,0 až 13,3) vykazuje lineární charakter. Závislost potenciálu druhého píku lze pak rozdělit na tři lineární závislosti, které na sebe zcela nenavazují; tyto nespojitosti v linearitě indikují pravděpodobnou změnu přítomné formy 2-nitrofluorenu či změnu redukčního mechanismu. Tento předpoklad je pak také v souladu s pozorovaným prvním a třetím píkem, které se objevují jen v určité oblasti pH^* . Získané lineární závislosti lze pak matematicky popsat pomocí rovnic:

- pro potenciál prvního píku 2-nitrofluorenu v rozmezí pH^* 7,0 až 13,3 platí vztah
$$E_p^1 \text{ [mV]} = -54,6 \text{ pH}^* + 264,3 \quad (R = -0,9976),$$
- pro potenciál druhého píku 2-nitrofluorenu v rozmezí pH^* 2,8 až 5,8 platí vztah
$$E_p^2 \text{ [mV]} = -72,9 \text{ pH}^* - 132,2 \quad (R = -0,9958),$$

Tabulka III

Vliv pH na DC voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), měřeno na p-AgSA-CE v prostředí methanol – BR pufr (1:1) či methanol – $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ (pH 13,0) (1:1).

pH	pH*	$-E_p^1$ [mV]	$-I_p^1$ [nA]	$-E_p^2$ [mV]	$-I_p^2$ [nA]	$-E_p^3$ [mV]	$-I_p^3$ [nA]
2,0	2,8	– ^a	– ^a	330	465	– ^a	– ^a
3,0	3,9	– ^a	– ^a	425	490	– ^a	– ^a
4,0	4,8	– ^a	– ^a	485	515	– ^a	– ^a
5,0	5,8	– ^a	– ^a	550	495	– ^a	– ^a
6,0	7,0	125	175	600	610	– ^a	– ^a
7,0	8,1	175	100	640	510	– ^a	– ^a
8,0	8,7	215	135	680	580	– ^a	– ^a
9,0	9,4	245	165	705	590	– ^a	– ^a
10,0	10,0	280	90	730	515	– ^a	– ^a
11,0	11,3	350	90	755	565	1060	115
12,0	11,9	375	110	775	500	1100	165
13,0	13,3	475	70	800	320	1125	245

pH – pH použitého BR pufru; pH* – výsledné pH směsi methanol – BR pufr (1:1); E_p^1 – potenciál prvního píku; I_p^1 – proud prvního píku; E_p^2 – potenciál druhého píku; I_p^2 – proud druhého píku; E_p^3 – potenciál třetího píku; I_p^3 – proud třetího píku; ^a – pík nebyl pozorován

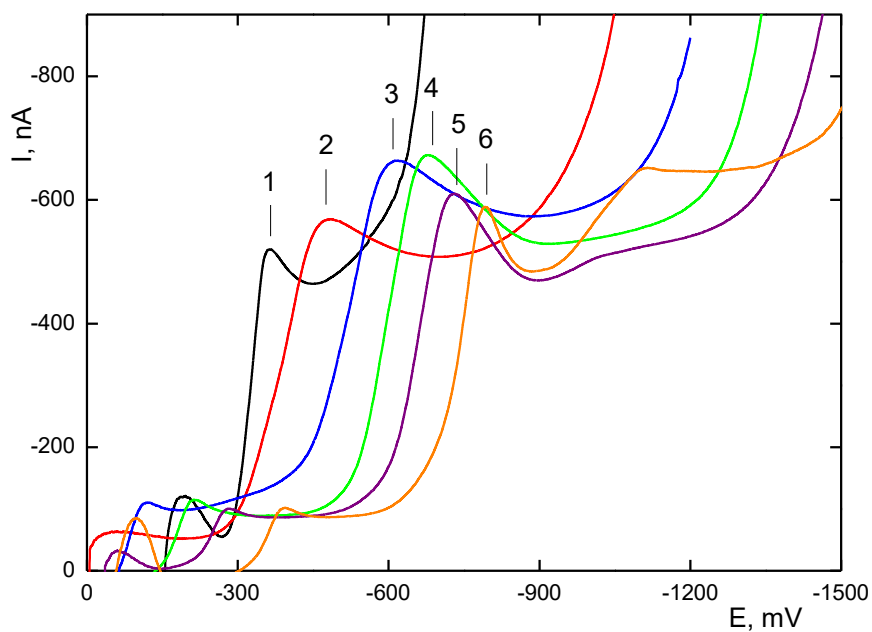
- pro potenciál druhého píku 2-nitrofluorenu v rozmezí pH* 7,0 až 10,0 platí vztah

$$E_p^2 \text{ [mV]} = -44,3 \text{ pH}^* - 288,2 \quad (R = -0,9941),$$
- pro potenciál druhého píku 2-nitrofluorenu v rozmezí pH* 11,3 až 13,3 platí vztah

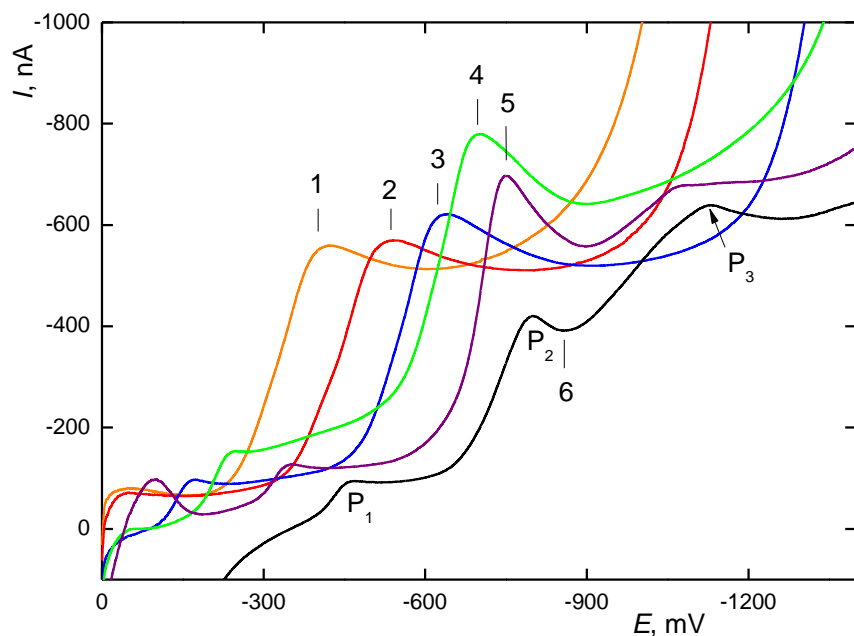
$$E_p^2 \text{ [mV]} = -21,7 \text{ pH}^* - 512,9 \quad (R = -0,9733),$$
- a pro potenciál třetího píku 2-nitrofluorenu v rozmezí pH* 11,3 až 13,3 platí vztah

$$E_p^3 \text{ [mV]} = -29,9 \text{ pH}^* - 731,2 \quad (R = -0,8675).$$

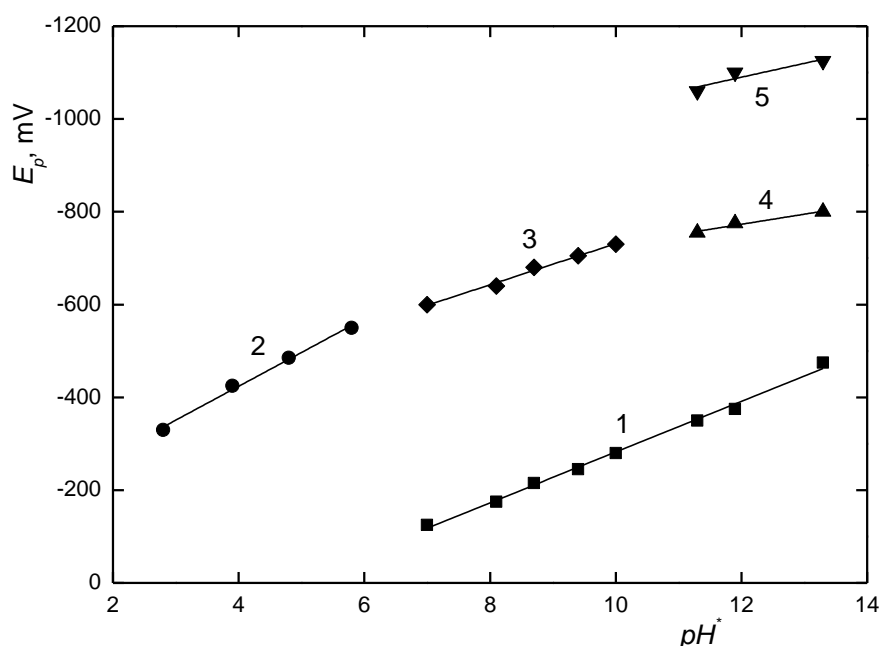
Na základě získaných DC voltamogramů byl navrhnut mechanismus elektrochemické redukce 2-nitrofluorenu na p-AgSA-CE ³⁴. Koncovým produktem redukce 2-nitrofluorenu je 2-hydroxylaminofluoren. V kyselém, neutrálním a slabě alkalickém prostředí tato redukce probíhá v jednom redukčním kroku (schéma 1), kterého se účastní 4 elektrony (dílčí mechanismus však předpokládá prvotní vznik protonovaného nitroradikál aniontu ³⁵); této



Obr. 5. DC voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Měřeno na p-AgSA-CE v roztocích methanol – BR pufr (1:1); zobrazeny sudé hodnoty pH užitého BR pufru 2,0 (1); 4,0 (2); 6,0 (3); 8,0 (4); 10,0 (5); 12,0 (6).

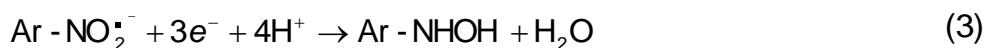
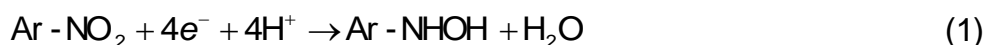


Obr. 6. DC voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Měřeno na p-AgSA-CE v roztocích methanol – BR pufr (1:1); zobrazeny liché hodnoty pH užitého BR pufru 3,0 (1); 5,0 (2); 7,0 (3); 9,0 (4); 11,0 (5). Křivka (6) zobrazuje DC voltamogram 2-nitrofluorenu v prostředí $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ (pH 13,0) – methanol (1:1); na křivce 6 je označen první pík (P_1), druhý pík (P_2) a třetí pík (P_3) 2-nitrofluorenu – detailní popis v textu.



Obr. 7. Závislost potenciálu píku 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) na výsledném pH roztoku (pH^*). Měřeno technikou DCV na p-AgSA-CE v roztoku methanol – BR pufr (1:1) či methanol – $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH (1:1); zobrazeny závislosti E_p prvního píku v rozmezí pH^* 7,0 až 13,3 (1), druhého píku v rozmezí pH^* 2,8 až 5,8 (2), druhého píku v rozmezí pH^* 7,0 až 10,0 (3), druhého píku v rozmezí pH^* 11,3 až 13,3 (4) a třetího píku v rozmezí pH^* 11,3 až 13,3 (5).

redukci odpovídá pozorovaný druhý voltametrický pík. V kyselém prostředí, kdy je pozorován voltametrický pík pouze jeden, je nitroskupina (resp. prvotně vznikající nitroradikál anion) v protonované formě; redukce 2-nitrofluorenu na 2-hydroxylaminofluoren probíhá snadno a se zvyšujícím se pH, a tím i s úbytkem volných vodíkových iontů v roztoku, se potenciál druhého píku posouvá k negativnějším hodnotám tak, jak je redukce znesnadňována úbytkem vodíkových iontů v roztoku. Ke změně formy 2-nitrofluorenu z formy protonované na formu neprotonovanou patrně dochází v rozmezí pH^* kolem 6 až 7, kdy je pozorováno narušení lineárního průběhu závislosti E_p druhého píku na pH^* (obr. 7). Zde se také poprvé začne objevovat první pík, který je na voltamogramech nadále přítomen

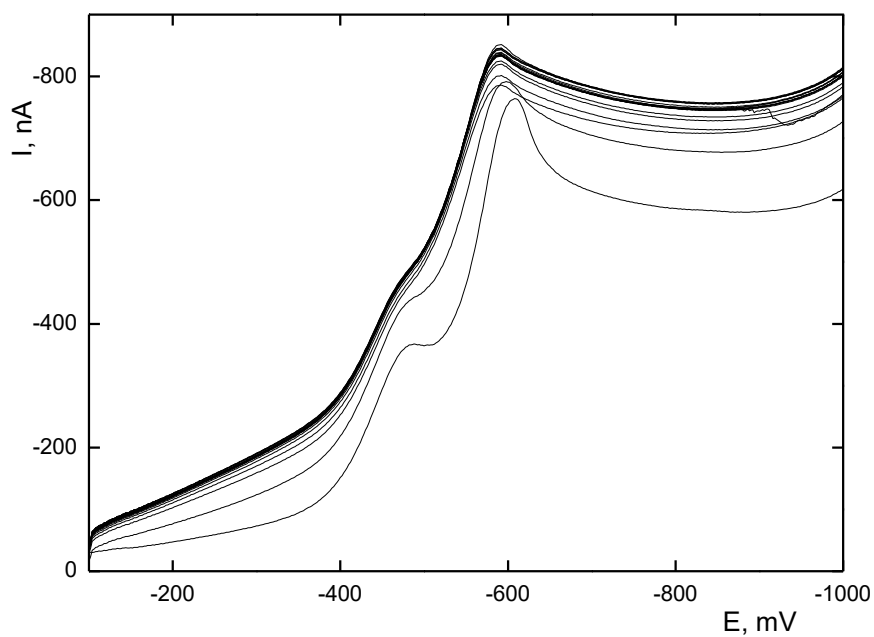


v rozmezí pH* 7,0 až 13,3. Jeho přítomnost je pravděpodobně spojena se změnou formy 2-nitrofluorenu, avšak přesné vysvětlení jeho vzniku bude vyžadovat hlubší studium.

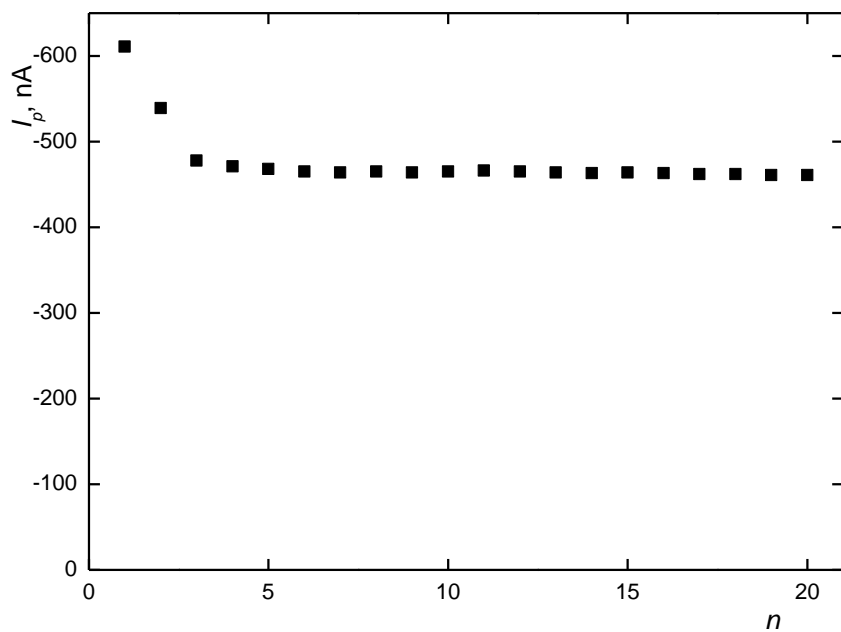
Jak již bylo zmíněno výše, v rozmezí pH* 2,8 až 10,0 probíhá elektrochemická redukce 2-nitrofluorenu dle schématu 1. V silně alkalickém prostředí je rychlost protonace natolik zpomalena, že redukce nitroskupiny probíhá v 1-elektronovém kroku (schéma 2) za vzniku relativně stabilního nitroradikál aniontu, který je posléze redukován 3-elektronovým krokem (schéma 3) na 2-hydroxylaminofluoren³⁵. Tomuto mechanismu nejvíce odpovídá chování 2-nitrofluorenu v silně alkalickém prostředí methanol – 0,1 mol L⁻¹ NaOH (pH 13,0) (1:1) (obr. 6), kde je výše uvedený popis i v souladu s výškou jednotlivých voltametrických píků. Redukce 2-nitrofluorenu v prostředí o pH* 11,3 a 11,9 pak naznačuje ještě možnost částečné vzájemné kombinace obou dříve popsaných redukčních mechanismů.

Vzhledem k rozdílnému voltametrickému chování 2-nitrofluorenu v prostředích o různém pH byla pro proměření koncentrační závislosti vybrána dvě prostředí o různých pH*. Jako optimální byla vybrána prostředí methanol – BR pufr pH 5,0 – methanol (1:1) a methanol – BR pufr pH 11,0 (1:1). Studovaná látka v prostředí methanol – BR pufr pH 5,0 (1:1) sice nedosahuje tak vysokých hodnot proudu jako při pH BR pufru 11,0, ale poskytuje jeden dobře vyvinutý voltametrický pík. V prostředí methanol – BR pufr pH 11,0 byla naopak využita možnost vyhodnocování signálů odpovídající odlišnému redukčnímu mechanismu.

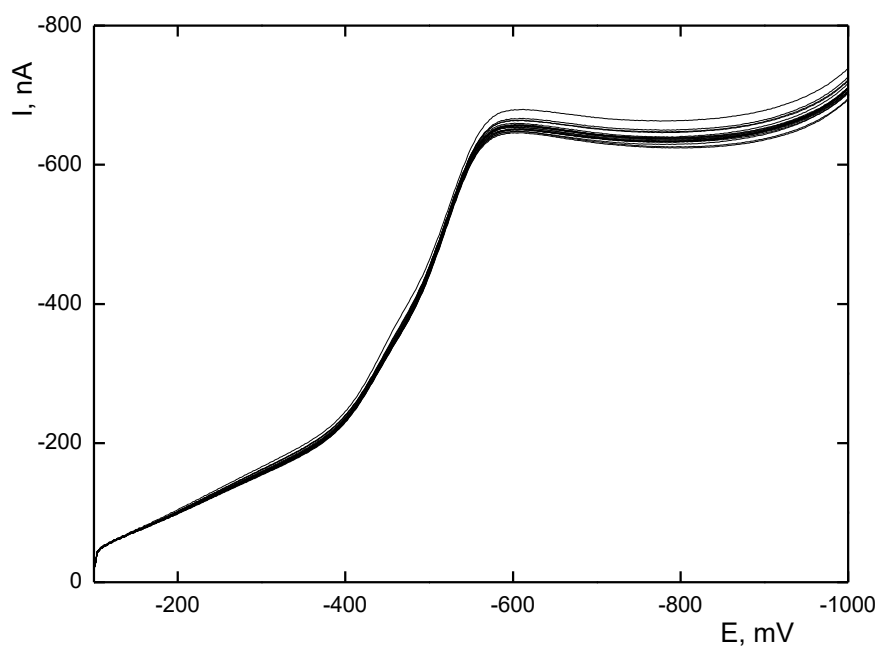
Při voltametrickém stanovení 2-nitrofluorenu v prostředí methanol – BR pufr pH 5,0 docházelo bez užití regeneračního kroku k viditelné pasivaci povrchu elektrody (obr. 8 a obr. 9); opakovatelnost měření vyjádřená relativní směrodatnou odchylkou v tomto případě činila 7,75 %. Pokud byla ze souboru dat vyřazena první dvě měření, opakovatelnost se zlepšila na hodnotu 0,87 %. Tento problém byl však z velké části odstraněn aplikací regeneračního kroku (obr. 10 a obr. 11), kdy za použití regeneračních potenciálů $E_{in} = -350$ mV a $E_{fin} = -1100$ mV bylo dosaženo opakovatelnosti 0,59 %; při použití regeneračního kroku sice došlo ke snížení proudové odezvy, avšak také k pozitivní stabilizaci signálu. Regenerační krok se tedy stal součástí dalších měření koncentračních závislostí. Koncentrační závislosti 2-nitrofluorenu byly ve zvoleném prostředí měřeny v rozmezí $2 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹ (obr. 12 a obr. 14). Při koncentraci nižší než $2 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ již nebylo možné získaný voltamogram 2-nitrofluorenu vyhodnotit a tuto koncentraci lze za daných podmínek považovat za nejnižší vyhodnotitelnou koncentraci. Odpovídající závislosti proudu píku na koncentraci 2-nitrofluorenu jsou uvedeny na obr. 13 a obr. 15.



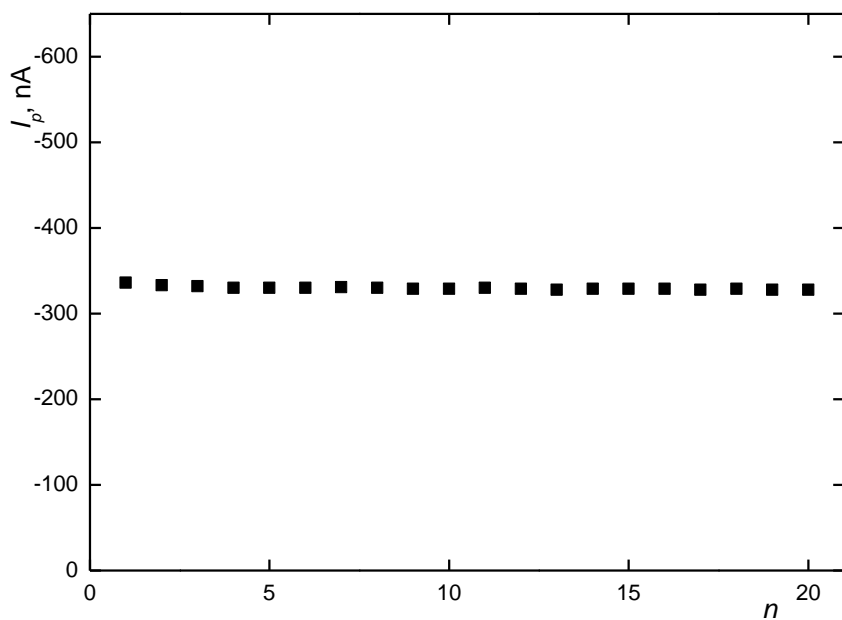
Obr. 8. DC voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) na p-AgSA-CE v prostředí methanol – BR pufr pH 5,0 (1:1). Měřeno bez aplikace regeneračních potenciálů, počet měření $n = 20$.



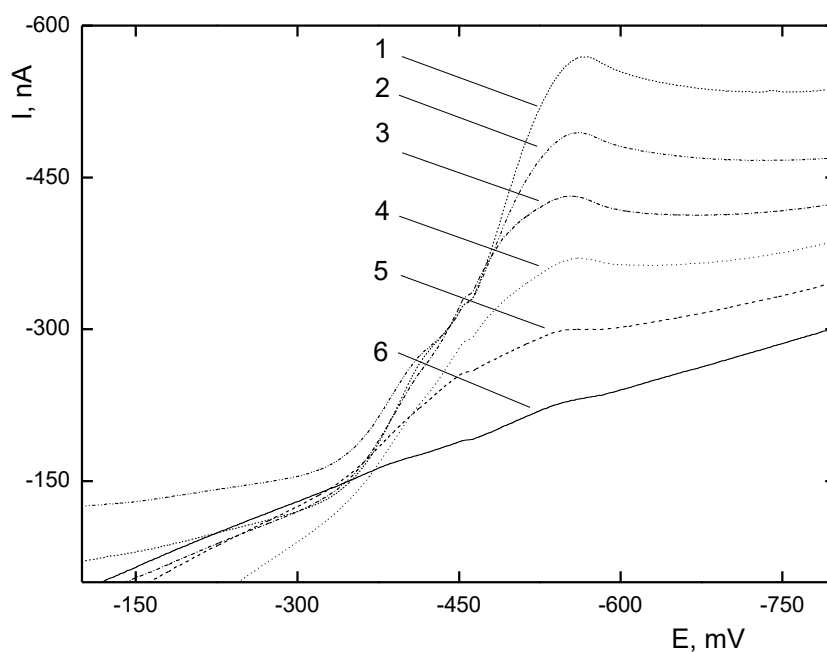
Obr. 9. Závislost proudu píku 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) na počtu měření bez aplikace regeneračních potenciálů. Měřeno technikou DCV na p-AgSA-CE v prostředí methanol – BR pufr pH 5,0 (1:1), počet měření $n = 20$.



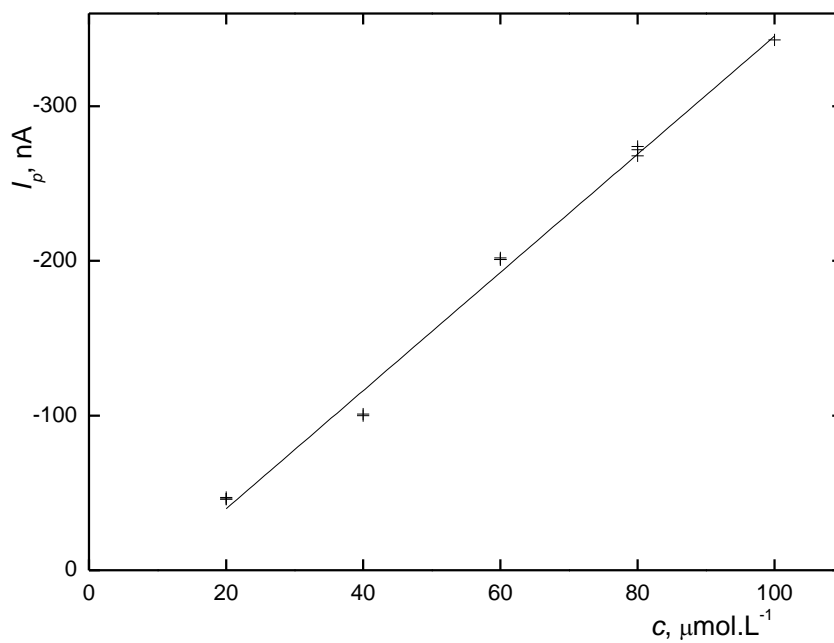
Obr. 10. DC voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-4}$ mol L⁻¹) na p-AgSA-CE v prostředí methanol – BR pufr pH 5,0 (1:1). Měřeno s užitím regenerace před každým měřením ($E_{in} = -350$ mV, $E_{fin} = -1100$ mV), počet měření $n = 20$.



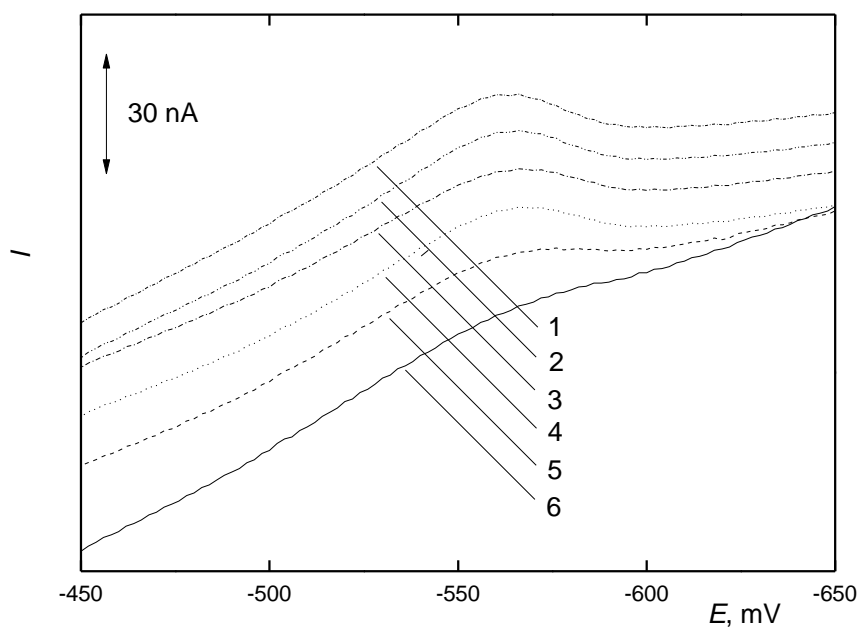
Obr. 11. Závislost proudu píku 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-4}$ mol L⁻¹) na počtu měření s užitím regenerace před každým měřením ($E_{in} = -350$ mV, $E_{fin} = -1100$ mV). Měřeno technikou DCV na p-AgSA-CE v prostředí methanol – BR pufr pH 5,0 (1:1), počet měření $n = 20$.



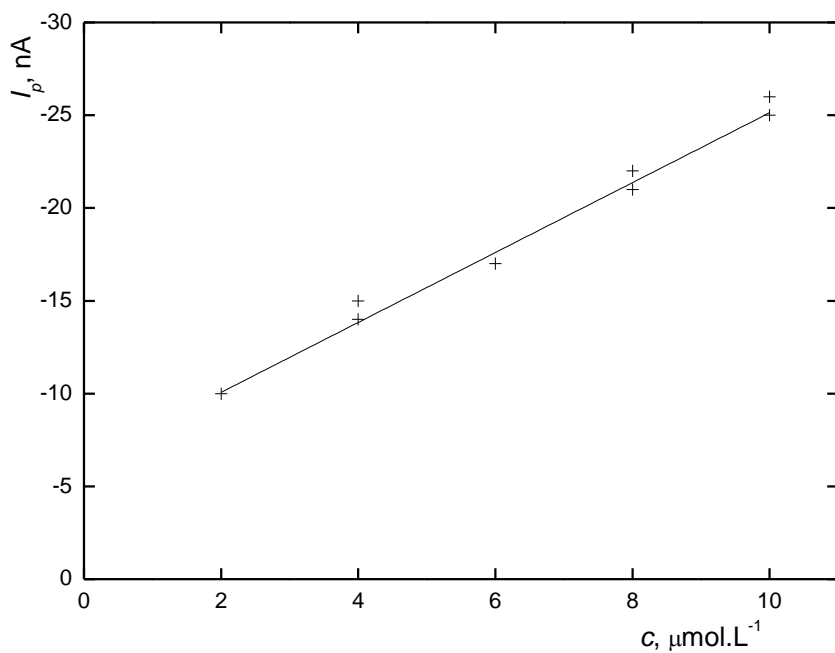
Obr. 12. DC voltamogramy 2-nitrofluorenu na p-AgSA-CE v rozmezí koncentrací $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Koncentrace 2-nitrofluorenu (mol L^{-1}): $1 \cdot 10^{-4}$ (1), $8 \cdot 10^{-5}$ (2), $6 \cdot 10^{-5}$ (3), $4 \cdot 10^{-5}$ (4), $2 \cdot 10^{-5}$ (5) a ZE (6). Měřeno v roztoku methanol – BR pufr pH 5,0 (1:1); regenerační potenciály $E_{in} = -350 \text{ mV}$, $E_{fin} = -1100 \text{ mV}$.



Obr. 13. Závislost proudu píku na koncentraci 2-nitrofluorenu v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Měřeno technikou DCV na p-AgSA-CE v roztoku methanol – BR pufr 5,0 (1:1); regenerační potenciály $E_{in} = -350 \text{ mV}$, $E_{fin} = -1100 \text{ mV}$.



Obr. 14. DC voltamogramy 2-nitrofluorenu na p-AgSA-CE v rozmezí koncentrací $2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Koncentrace 2-nitrofluorenu (mol L^{-1}): $1 \cdot 10^{-5}$ (1), $8 \cdot 10^{-6}$ (2), $6 \cdot 10^{-6}$ (3), $4 \cdot 10^{-6}$ (4), $2 \cdot 10^{-6}$ (5) a ZE (6). Měřeno v roztoku methanol – BR pufr pH 5,0 (1:1); regenerační potenciály $E_{in} = -350 \text{ mV}$, $E_{fin} = -1100 \text{ mV}$.



Obr. 15. Závislost proudu píku na koncentraci 2-nitrofluorenu v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Měřeno technikou DCV na p-AgSA-CE v roztoku methanol – BR pufr 5,0 (1:1); regenerační potenciály $E_{in} = -350 \text{ mV}$, $E_{fin} = -1100 \text{ mV}$.

Charakteristiky kalibračních přímek stanovení 2-nitrofluorenu v prostředí methanol – BR pufr pH 5,0 shrnuje tabulka IV, v tabulce V je pak vyhodnocena opakovatelnost měření nejvyšší a nejnižší měřené koncentrace 2-nitrofluorenu za použití regeneračních potenciálů $E_{in} = -350$ mV, $E_{fin} = -1100$ mV.

Tabulka IV

Charakteristiky kalibračních přímek stanovení 2-nitrofluorenu technikou DCV na p-AgSA-CE v prostředí methanol – BR pufr pH 5,0 (1:1).

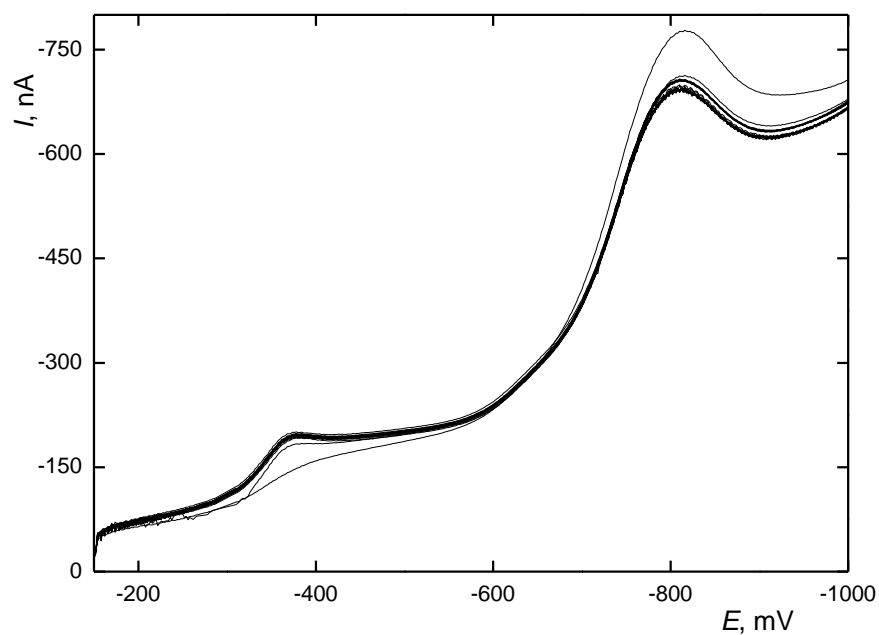
c [mol L ⁻¹]	směrnice [mA L mol ⁻¹]	úsek [nA]	R	L_Q [mol L ⁻¹]
$(2 - 10) \cdot 10^{-5}$	-3,8	36,7	-0,9965	–
$(2 - 10) \cdot 10^{-6}$	-1,9	-6,3	-0,9950	$3,7 \cdot 10^{-6}$

Tabulka V

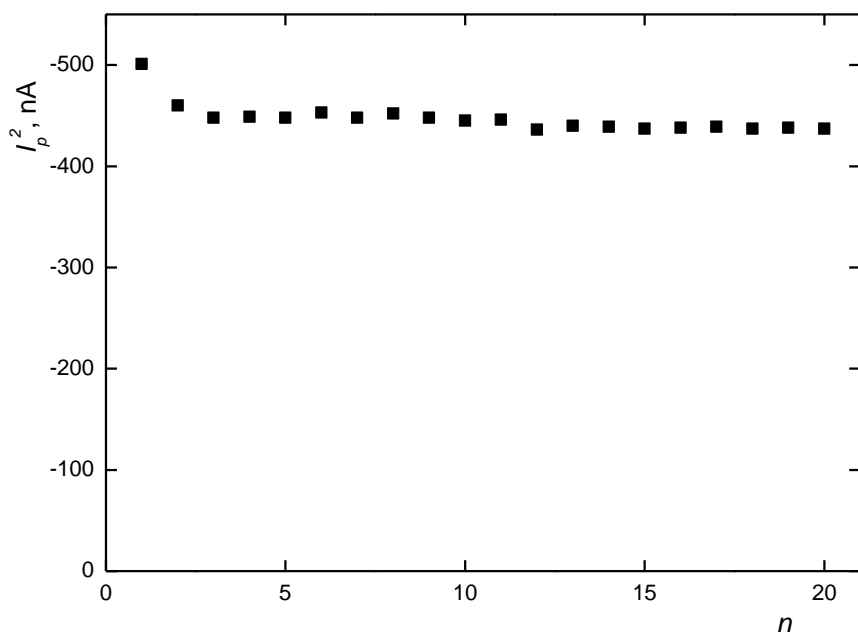
Statistické vyhodnocení opakovatelnosti stanovení 2-nitrofluorenu technikou DCV na p-AgSA-CE pro koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ a $2 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ v prostředí methanol – BR pufr pH 5,0 (1:1), počet měření $n = 10$ (na hladině významnosti $\alpha = 0,05$).

c [mol L ⁻¹]	\tilde{x} [nA]	$L_{1,2}$ [nA]	s [nA]	s_r [%]
$1 \cdot 10^{-4}$	-343,0	0,92	1,27	0,37
$2 \cdot 10^{-6}$	-10,5	0,46	0,70	6,66

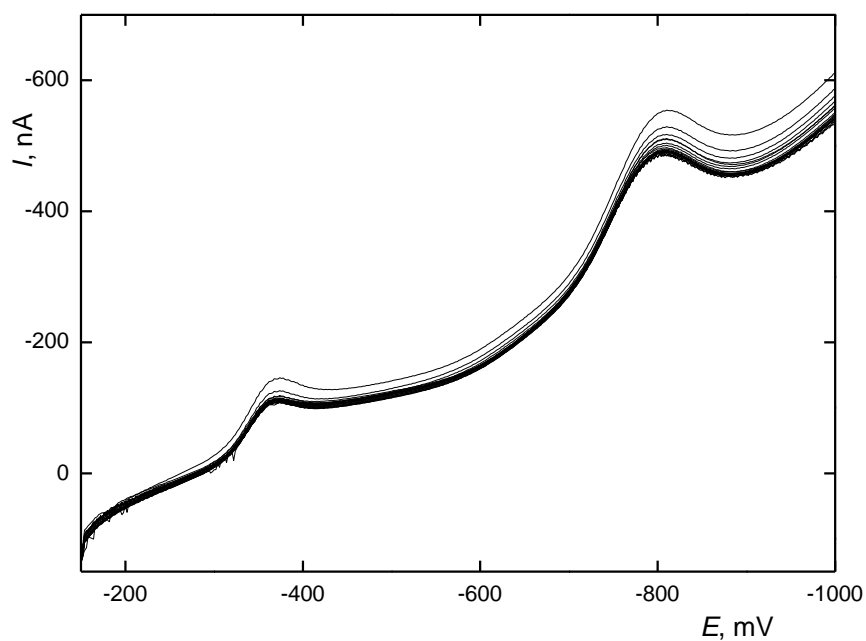
Při měření stanovované látky v prostředí methanol – BR pufr pH 11,0 docházelo bez užití regeneračního kroku k viditelné pasivaci povrchu elektrody (obr. 16 a obr. 17), tento problém byl však z velké části odstraněn aplikací regeneračního kroku (obr. 18 a obr. 19) za použití regeneračních potenciálů $E_{in} = -150$ mV a $E_{fin} = -1000$ mV. Zatímco bez použití regeneračního kroku činila opakovatelnost měření druhého píku ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹), který byl použit ke stanovení 2-nitrofluorenu v tomto prostředí, 3,22 % (při vyřazení prvních dvou měření ze souboru dat pak měla hodnotu 1,32 %), při aplikaci regeneračních potenciálů dosáhla opakovatelnost hodnoty 2,37 % (při vyřazení prvních dvou měření ze souboru dat 1,25 %); i zde tedy vložení regeneračního kroku vede ke zlepšení signálové odezvy a při měření koncentračních závislostí byla regenerace používána.



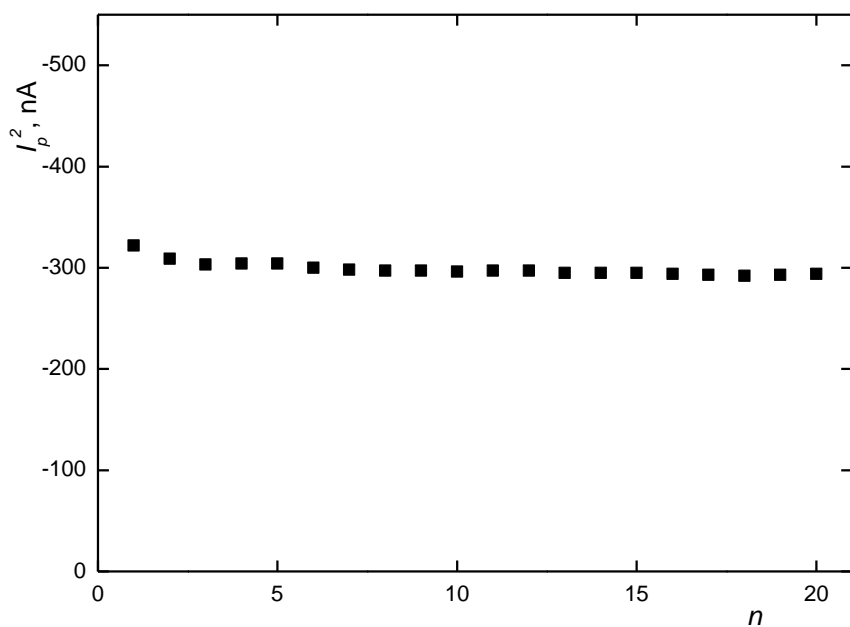
Obr. 16. DC voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) na p-AgSA-CE v prostředí methanol – BR pufr pH 11,0 (1:1). Měřeno bez aplikace regeneračních potenciálů, počet měření $n = 20$.



Obr. 17. Závislost proudu druhého píku 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) na počtu měření bez aplikace regeneračních potenciálů. Měřeno technikou DCV na p-AgSA-CE v prostředí methanol – BR pufr pH 11,0 (1:1), počet měření $n = 20$.



Obr. 18. DC voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) na p-AgSA-CE v prostředí methanol – BR pufr pH 11,0 (1:1). Měřeno s užitím regenerace před každým měřením ($E_{in} = -150 \text{ mV}$, $E_{fin} = -1000 \text{ mV}$), počet měření $n = 20$.

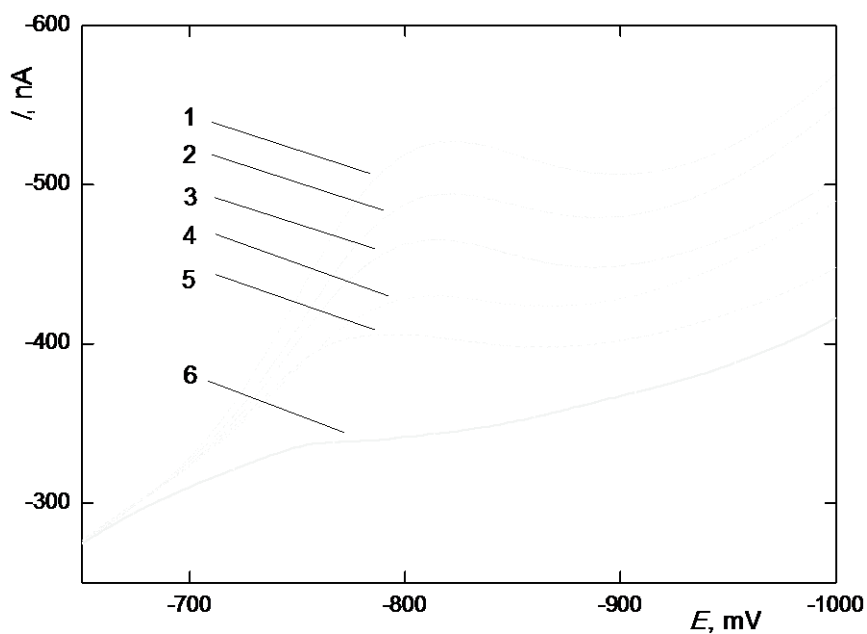


Obr. 19. Závislost proudu druhého píku 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) na počtu měření s užitím regenerace před každým měřením ($E_{in} = -150 \text{ mV}$, $E_{fin} = -1000 \text{ mV}$). Měřeno technikou DCV na p-AgSA-CE v prostředí methanol – BR pufr pH 11,0 (1:1), počet měření $n = 20$.

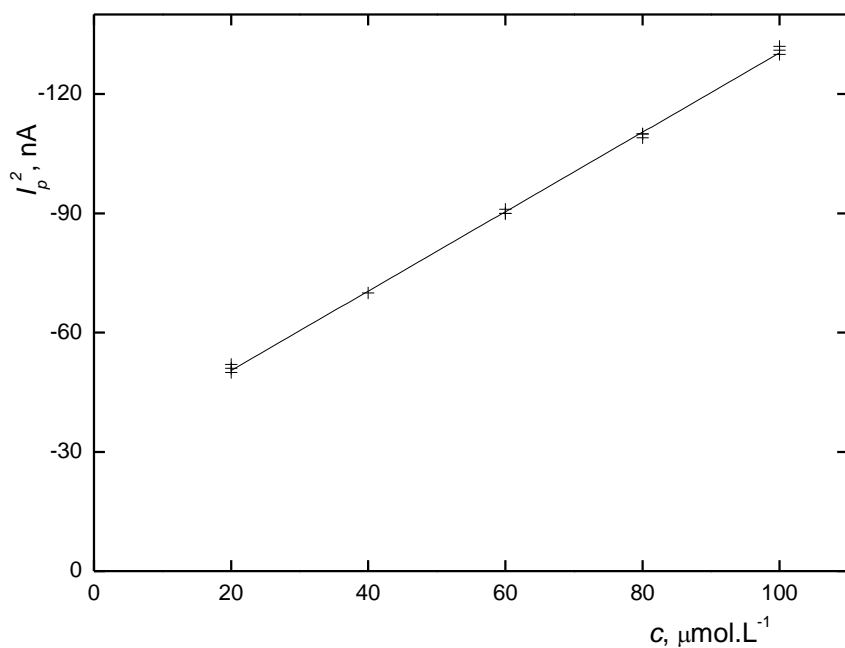
Koncentrační závislosti 2-nitrofluorenu byly měřeny v rozmezí $2 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹ (obr. 20 a obr. 22). Při koncentraci nižší než $2 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ již nebylo možné získaný voltamogram vyhodnotit. Odpovídající závislosti proudu druhého píku na koncentraci 2-nitrofluorenu jsou uvedeny na obr. 21 a obr. 23. Charakteristiky kalibračních přímk DCV stanovení 2-nitrofluorenu v prostředí methanol – BR pufr pH 11,0 (1:1) shrnuje tabulka VI a statistické vyhodnocení opakovatelnosti měření nejvyšší a nejnižší stanovované koncentrace 2-nitrofluorenu je uvedeno v tabulce VII.

Ze srovnání kalibračních závislostí v obou prostředích je patrné, že stanovení 2-nitrofluorenu v prostředí methanol – BR pufr pH 5,0 (1:1) vykazuje vyšší absolutní hodnoty směrnic kalibračních přímk – stanovení 2-nitrofluorenu má v tomto prostředí větší citlivost. Lze však také vidět, že se hodnoty směrnic v rámci koncentračních řádů od sebe liší, což je jev často pozorovaný při stanoveních na tuhých elektrodách. Tomuto jevu odpovídají i větší hodnoty úseků, které nelze statisticky zanedbat. Proto v případě stanovení 2-nitrofluorenu technikou DCV na p-AgSA-CE nelze použít úspěšně metodu standardního přídávku a konstrukce kalibrační závislosti v příslušném řádu (v jednotlivých koncentračních řádech vykazují koncentrační závislosti lineární charakter) před vlastním stanovením se tak stává nezbytností.

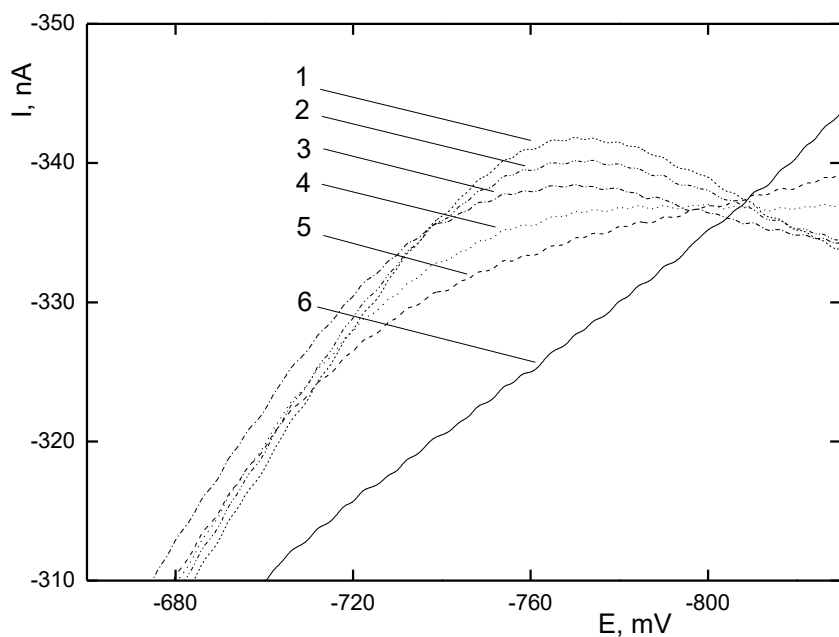
Vypočtené hodnoty L_Q jsou vyšší než nejnižší vyhodnotitelná koncentrace 2-nitrofluorenu, to je dáno způsobem výpočtu L_Q , který je počítán z opakovatelnosti měření koncentrací. Prakticky je však nejnižší stanovitelná koncentrace 2-nitrofluorenu v obou zkoumaných prostředích $2 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹.



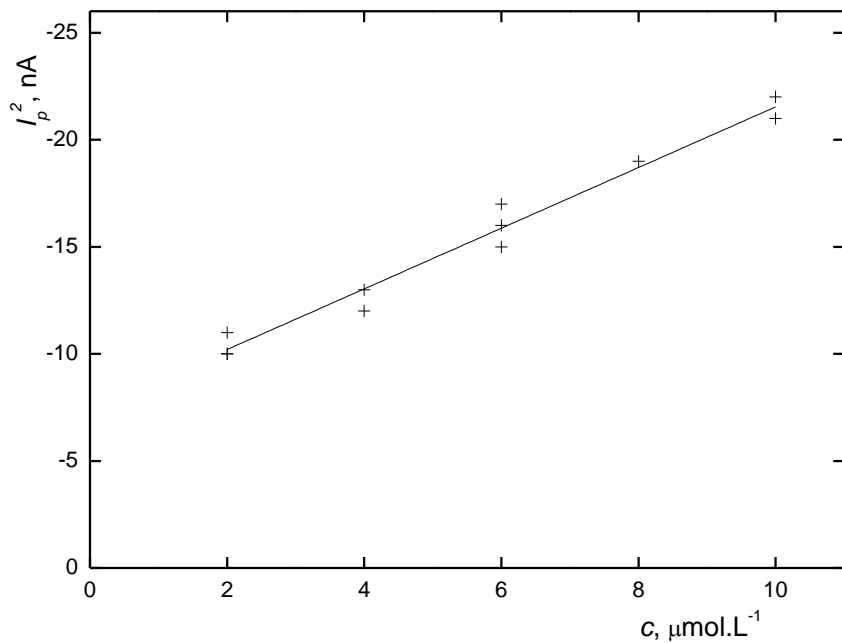
Obr. 20. DC voltamogramy 2-nitrofluorenu na p-AgSA-CE v rozmezí koncentrací $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Koncentrace 2-nitrofluorenu (mol L^{-1}): $1 \cdot 10^{-4}$ (1), $8 \cdot 10^{-5}$ (2), $6 \cdot 10^{-5}$ (3), $4 \cdot 10^{-5}$ (4), $2 \cdot 10^{-5}$ (5) a ZE (6). Měřeno v roztoku methanol – BR pufr pH 11,0 (1:1); regenerační potenciály $E_{in} = -150 \text{ mV}$, $E_{fin} = -1000 \text{ mV}$.



Obr. 21. Závislost proudu druhého píku na koncentraci 2-nitrofluorenu v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Měřeno technikou DCV na p-AgSA-CE v roztoku methanol – BR pufr 11,0 (1:1); regenerační potenciály $E_{in} = -150 \text{ mV}$, $E_{fin} = -1000 \text{ mV}$.



Obr. 22. DC voltamogramy 2-nitrofluorenu na p-AgSA-CE v rozmezí koncentrací $2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Koncentrace 2-nitrofluorenu (mol L^{-1}): $1 \cdot 10^{-5}$ (1), $8 \cdot 10^{-6}$ (2), $6 \cdot 10^{-6}$ (3), $4 \cdot 10^{-6}$ (4), $2 \cdot 10^{-6}$ (5) a ZE (6). Měřeno v roztoku methanol – BR pufr pH 11,0 (1:1); regenerační potenciály $E_{in} = -150 \text{ mV}$, $E_{fin} = -1000 \text{ mV}$.



Obr. 23. Závislost proudu druhého píku na koncentraci 2-nitrofluorenu v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Měřeno technikou DCV na p-AgSA-CE v roztoku methanol – BR pufr 11,0 (1:1); regenerační potenciály $E_{in} = -150 \text{ mV}$, $E_{fin} = -1000 \text{ mV}$.

Tabulka VI

Charakteristiky kalibračních přímk stanoví 2-nitrofluorenu technikou DCV na p-AgSA-CE v prostředí methanol – BR pufr pH 11,0 (1:1).

c [mol L ⁻¹]	směrnice [mA L mol ⁻¹]	úsek [nA]	R	L_Q [mol L ⁻¹]
$(2 - 10) \cdot 10^{-5}$	-1,0	-31,0	-0,9992	–
$(2 - 10) \cdot 10^{-6}$	-1,4	-7,4	-0,9892	$6,0 \cdot 10^{-6}$

Tabulka VII

Statistické vyhodnocení opakovatelnosti stanoví 2-nitrofluorenu technikou DCV na p-AgSA-CE pro koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ a $2 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ v prostředí methanol – BR pufr pH 11,0 (1:1), počet měření $n = 10$ (na hladině významnosti $\alpha = 0,05$).

c [mol L ⁻¹]	\tilde{x} [nA]	$L_{1,2}$ [nA]	s [nA]	s_r [%]
$1 \cdot 10^{-4}$	-299,0	2,99	4,30	1,44
$2 \cdot 10^{-6}$	-10,0	0,69	0,84	8,43

3.2 Diferenční pulsní voltametrie

Závislost voltametrického chování 2-nitrofluorenu na pH byla zkoumána také pomocí DPV. Vliv pH byl zkoumán a vyhodnocován obdobně, jako tomu bylo při použití techniky DCV v kapitole 3.1. Škála pH byla připravena pomocí BR pufru o příslušném pH a methanolu v objemovém poměru 1:1. Koncentrace 2-nitrofluorenu v těchto roztocích činila $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Voltametrické chování 2-nitrofluorenu bylo studováno v rozsahu pH použitého BR pufru 2,0 až 12,0; pro pH 13,0 byl BR pufr nahrazen $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$. Odpovídající hodnoty proudů píku I_p a potenciálů píku E_p pro jednotlivá pH pufru a výsledná pH^* vodně-methanolicke směsi jsou uvedeny v tabulce VIII.

Zaznamenané voltametrické křivky 2-nitrofluorenu v závislosti na pH ukazuje obr. 24 a obr. 25. Látka vykazuje voltametrické chování totožné s pozorováním uskutečněným pomocí DCV – poskytuje jeden až tři voltametrické píky v závislosti na pH prostředí. První pík je patrný u méně negativních potenciálů v rozmezí pH^* 7,0 až 13,3; druhý voltametrický pík, nejvyšší a nejlépe vyvinutý, je pozorován v celém rozsahu pH^* 2,8 až 13,3. Třetí pík je pak pozorovaný pouze v alkalickém prostředí pH^* 9,4 až 13,3. Potenciál všech píků s rostoucím pH vykazuje monotónní pokles k negativnějším hodnotám, což značí závislost jednotlivých redukčních dějů, kterým příslušné píky odpovídají, na pH prostředí. Závislost potenciálů píku E_p na výsledném pH^* je zobrazena na obr. 26. Stejnou charakteristiku vykazuje i závislost pro DCV píky (obr. 7), jediný rozdíl je možno pozorovat v hodnotě potenciálu třetího píku v prostředí methanol – $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ (obr. 26), kde je potenciál pozitivnější než předchozí hodnoty, a proto je tento bod vyjmut z lineární korelace.

Metodou lineární regrese byly vypočteny následující vztahy (bližší interpretace těchto závislostí již byla poskytnuta v kapitole 3.1 spolu s nástinem mechanismu elektrochemické redukce 2-nitrofluorenu na p-AgSA-CE):

- pro potenciál prvního píku 2-nitrofluorenu v rozmezí pH^* 7,0 až 13,3 platí vztah
$$E_p^1 [\text{mV}] = -54,3 \text{ pH}^* + 311,4 \quad (R = -0,9994),$$
- pro potenciál druhého píku 2-nitrofluorenu v rozmezí pH^* 2,8 až 5,8 platí vztah
$$E_p^2 [\text{mV}] = -67,5 \text{ pH}^* - 65,8 \quad (R = -0,9982),$$
- pro potenciál druhého píku 2-nitrofluorenu v rozmezí pH^* 7,0 až 10,0 platí vztah
$$E_p^2 [\text{mV}] = -50,3 \text{ pH}^* - 162,0 \quad (R = -0,9950),$$
- pro potenciál druhého píku 2-nitrofluorenu v rozmezí pH^* 11,3 až 13,3 platí vztah
$$E_p^2 [\text{mV}] = -10,1 \text{ pH}^* - 589,4 \quad (R = -0,6834),$$

Tabulka VIII

Vliv pH na DP voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), měřeno na p-AgSA-CE v prostředí methanol – BR pufr (1:1) či methanol – $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ (pH 13,0) (1:1).

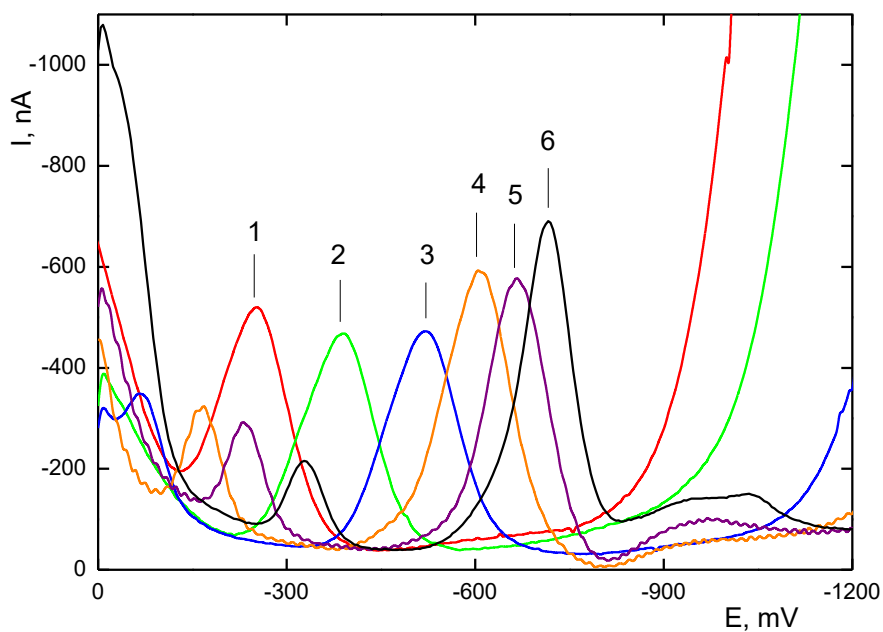
pH	pH*	$-E_p^1$ [mV]	$-I_p^1$ [nA]	$-E_p^2$ [mV]	$-I_p^2$ [nA]	$-E_p^3$ [mV]	$-I_p^3$ [nA]
2,0	2,8	– ^a	– ^a	250	395	– ^a	– ^a
3,0	3,9	– ^a	– ^a	335	390	– ^a	– ^a
4,0	4,8	– ^a	– ^a	390	415	– ^a	– ^a
5,0	5,8	– ^a	– ^a	455	430	– ^a	– ^a
6,0	7,0	65	125	515	490	– ^a	– ^a
7,0	8,1	125	140	560	440	– ^a	– ^a
8,0	8,7	170	215	605	570	– ^a	– ^a
9,0	9,4	200	190	635	550	920	15
10,0	10,0	235	190	665	550	960	20
11,0	11,3	305	155	700	600	1020	35
12,0	11,9	330	145	715	615	1030	25
13,0	13,3	410	105	720	330	955	40

pH – pH použitého BR pufru; pH* – výsledné pH směsi methanol – BR pufr (1:1); E_p^1 – potenciál prvního píku; I_p^1 – proud prvního píku; E_p^2 – potenciál druhého píku; I_p^2 – proud druhého píku; E_p^3 – potenciál třetího píku; I_p^3 – proud třetího píku; ^a – pík nebyl pozorován

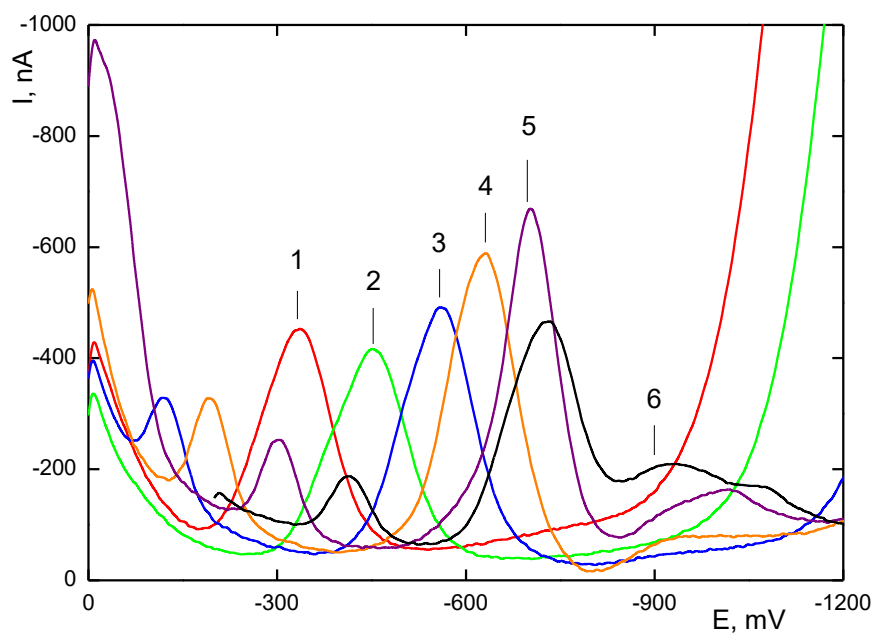
- a pro potenciál třetího píku 2-nitrofluorenu v rozmezí pH* 9,4 až 11,9 platí vztah

$$E_p^3 \text{ [mV]} = -44,5 \text{ pH}^* - 509,0 \quad (R = -0,9786).$$

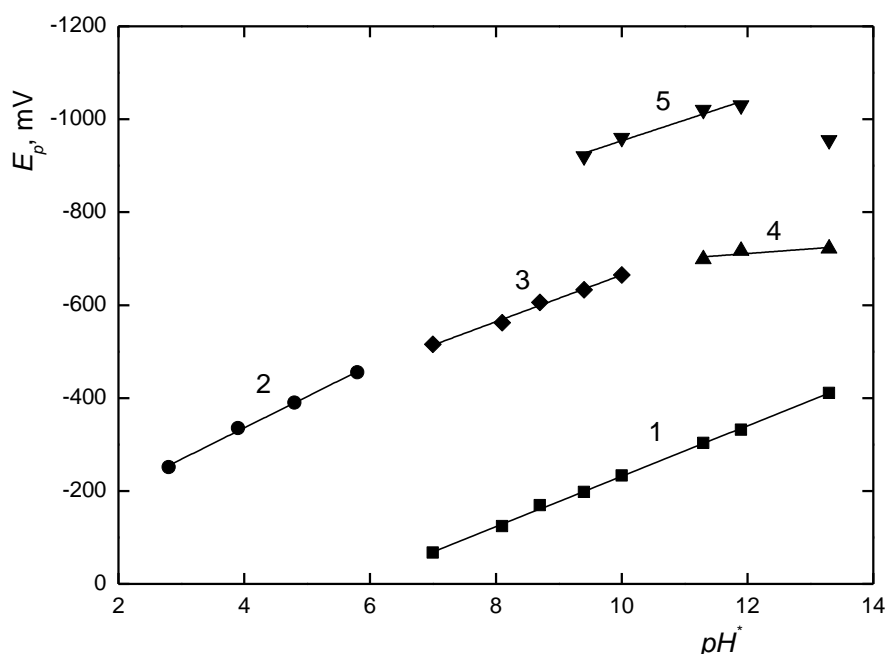
Pro sestavení kalibračních závislostí byly, stejně jako při použití techniky DCV, zvoleny dvě prostředí – slabě kyselé prostředí methanol – BR pufr pH 5,0 (1:1) a alkalické prostředí methanol – BR pufr pH 11,0 (1:1). Dalším optimalizačním krokem bylo hledání vhodných regeneračních potenciálů. Při měření látky v roztoku methanol – BR pufr pH 5,0 docházelo bez užití regeneračního kroku k viditelné pasivaci povrchu elektrody (obr. 27 a obr. 28); opakovatelnost měření bez regenerace činila 2,81 % (při vyřazení prvních dvou měření ze souboru dat pak činila 1,34 %). Tento problém byl však z velké části odstraněn aplikací regeneračního kroku (obr. 29 a obr. 30) za použití regeneračních potenciálů $E_{in} = -350 \text{ mV}$ a $E_{fin} = -1100 \text{ mV}$; opakovatelnost po aplikaci regeneračního kroku poté vykazovala hodnotu 0,70 % a došlo taktéž ke stabilizaci proudové odezvy. Technika DPV je



Obr. 24. DP voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Měřeno na p-AgSA-CE v roztocích methanol – BR pufr (1:1); zobrazeny sudé hodnoty pH užitého BR pufru 2,0 (1); 4,0 (2); 6,0 (3); 8,0 (4); 10,0 (5); 12,0 (6).



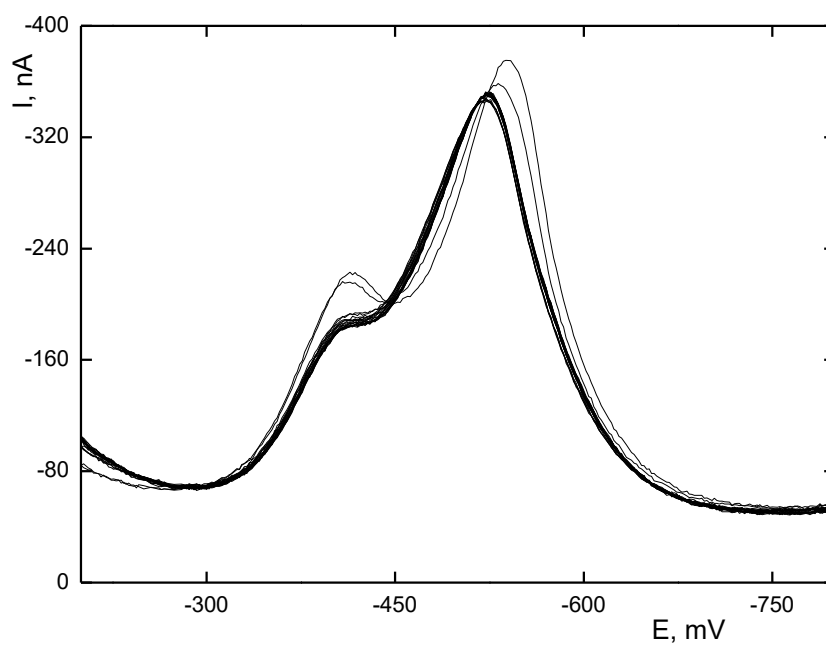
Obr. 25. DP voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Měřeno na p-AgSA-CE v roztocích methanol – BR pufr (1:1); zobrazeny liché hodnoty pH užitého BR pufru 3,0 (1); 5,0 (2); 7,0 (3); 9,0 (4); 11,0 (5). Křivka (6) zobrazuje DC voltamogram 2-nitrofluorenu v prostředí $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ (pH 13,0) – methanol (1:1).



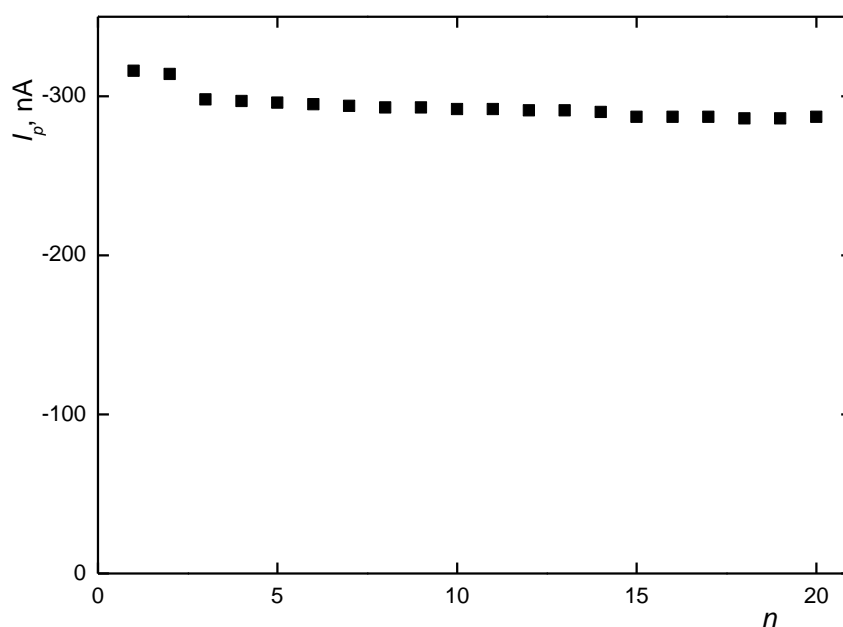
Obr. 26. Závislost potenciálu píku 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) na výsledném pH roztoku (pH^*). Měřeno technikou DPV na p-AgSA-CE v roztoku methanol – BR pufr (1:1) či methanol – $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH (1:1); zobrazeny závislosti E_p prvního píku v rozmezí pH^* 7,0 až 13,3 (1), druhého píku v rozmezí pH^* 2,8 až 5,8 (2), druhého píku v rozmezí pH^* 7,0 až 10,0 (3), druhého píku v rozmezí pH^* 11,3 až 13,3 (4) a třetího píku v rozmezí pH^* 11,3 až 11,9 (5).

obecně považována, stejně jako většina pulsních technik, za techniky citlivější oproti technikám s lineárním nárůstem potenciálu. To se však někdy jeví jako nevýhoda, protože se pulsní techniky stávají citlivější i k přítomným nečistotám v základním elektrolytu. Tento případ nastal i při stanovení 2-nitrofluorenu, kde přítomná nečistota deformuje signál látky (obr. 27). I v tomto směru však použití regeneračního kroku vede k potlačení signálu této nečistoty, jak je vidět z obr. 28.

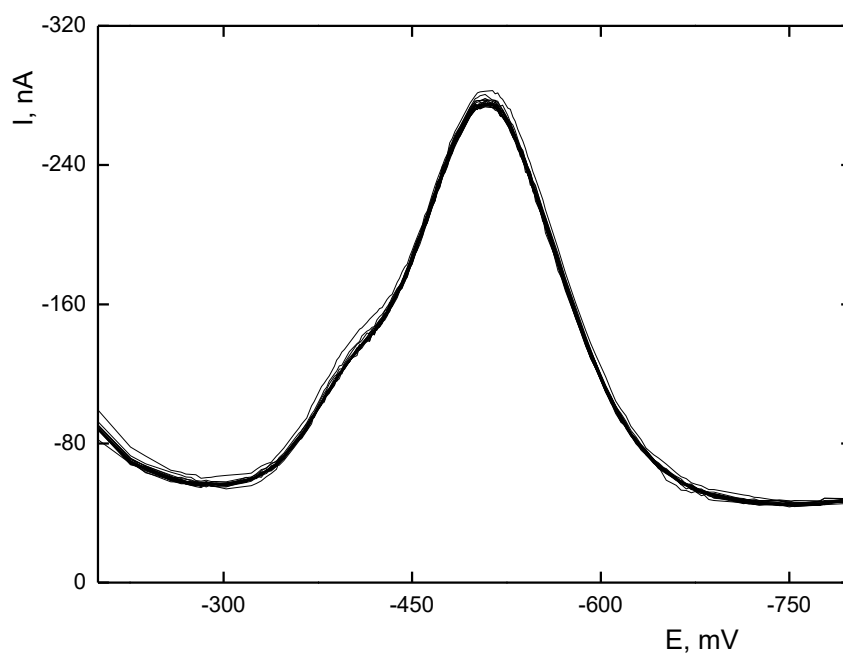
Koncentrační závislosti 2-nitrofluorenu byly měřeny v rozmezí $2 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (obr. 31 a obr. 33). Při koncentraci nižší než $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ již nebylo možné získaný voltamogram vyhodnotit. Odpovídající závislosti proudu píku na koncentraci 2-nitrofluorenu jsou uvedeny na obr. 32 a obr. 34. Charakteristiky kalibračních přímek stanovení shrnuje tabulka IX. V tabulce X jsou pak uvedeny statistické údaje opakovatelnosti měření pro nejvyšší a nejnižší měřenou koncentraci 2-nitrofluorenu.



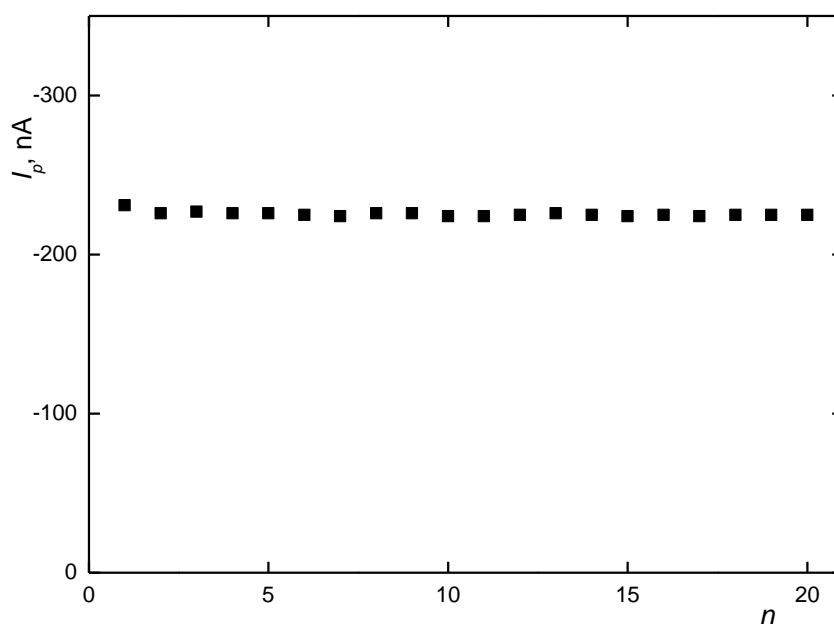
Obr. 27. DP voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) na p-AgSA-CE v prostředí methanol – BR pufr pH 5,0 (1:1). Měřeno bez aplikace regeneračních potenciálů, počet měření $n = 20$.



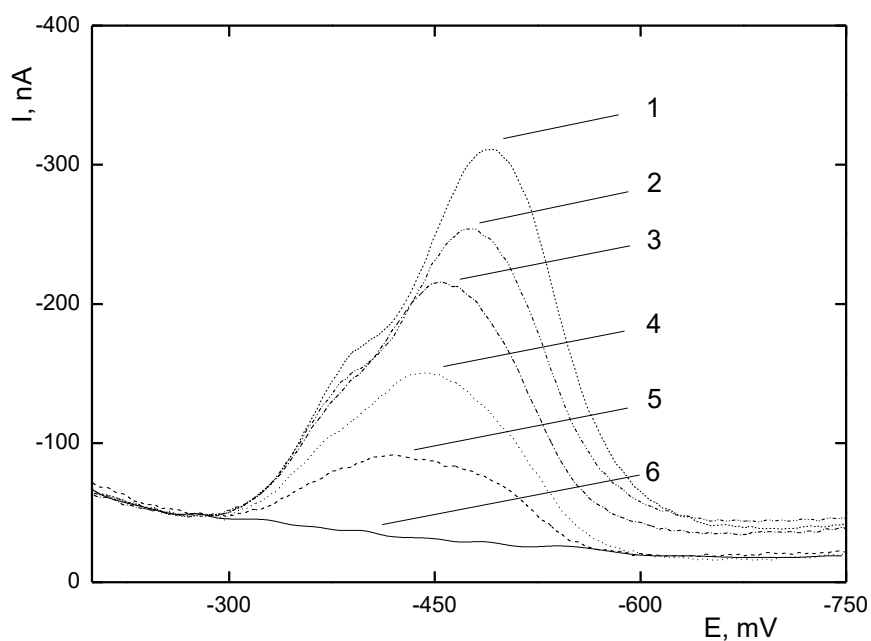
Obr. 28. Závislost proudu píku 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) na počtu měření bez aplikace regeneračních potenciálů. Měřeno technikou DPV na p-AgSA-CE v prostředí methanol – BR pufr pH 5,0 (1:1), počet měření $n = 20$.



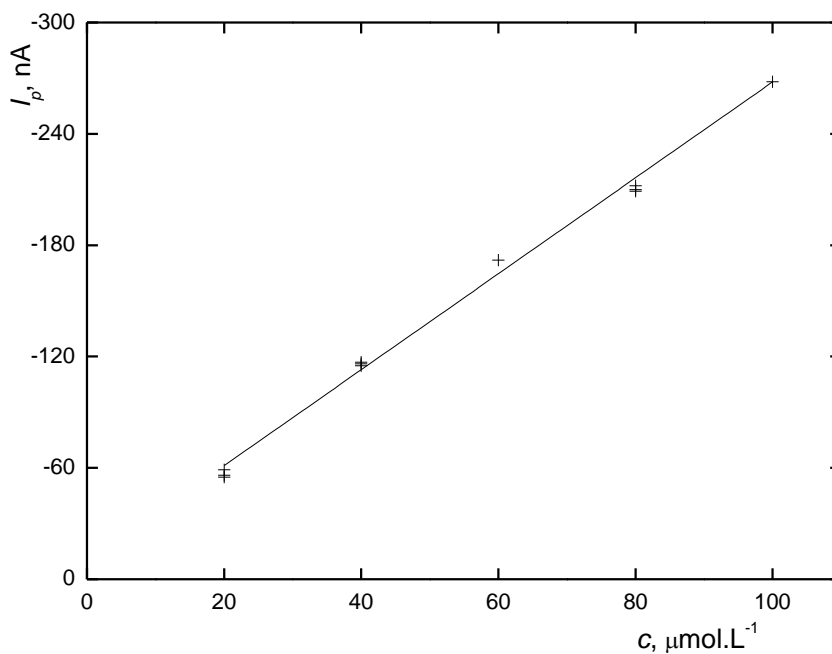
Obr. 29. DP voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) na p-AgSA-CE v prostředí methanol – BR pufr pH 5,0 (1:1). Měřeno s užitím regenerace před každým měřením ($E_{in} = -350 \text{ mV}$, $E_{fin} = -1100 \text{ mV}$), počet měření $n = 20$.



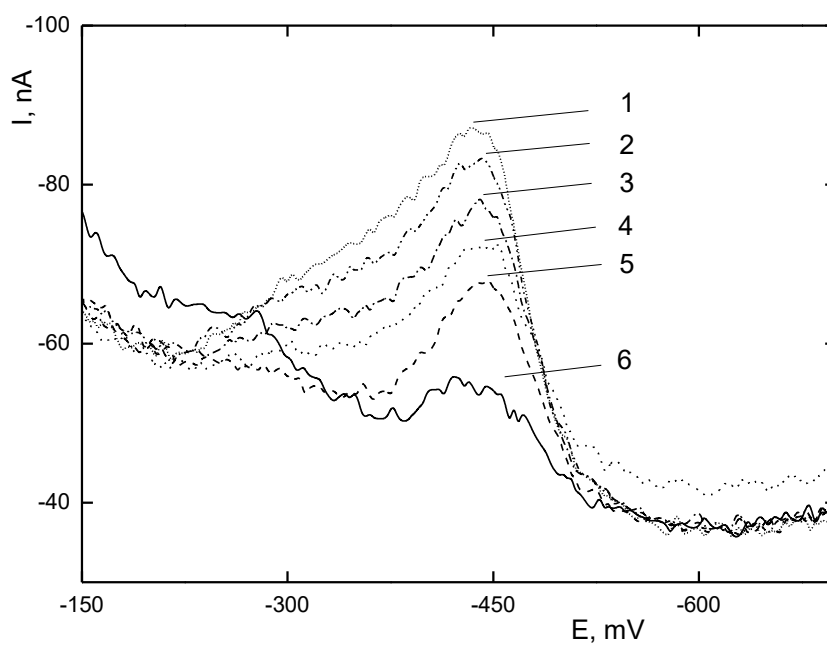
Obr. 30. Závislost proudu píku 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) na počtu měření s užitím regenerace před každým měřením ($E_{in} = -350 \text{ mV}$, $E_{fin} = -1100 \text{ mV}$). Měřeno technikou DPV na p-AgSA-CE v prostředí methanol – BR pufr pH 5,0 (1:1), počet měření $n = 20$.



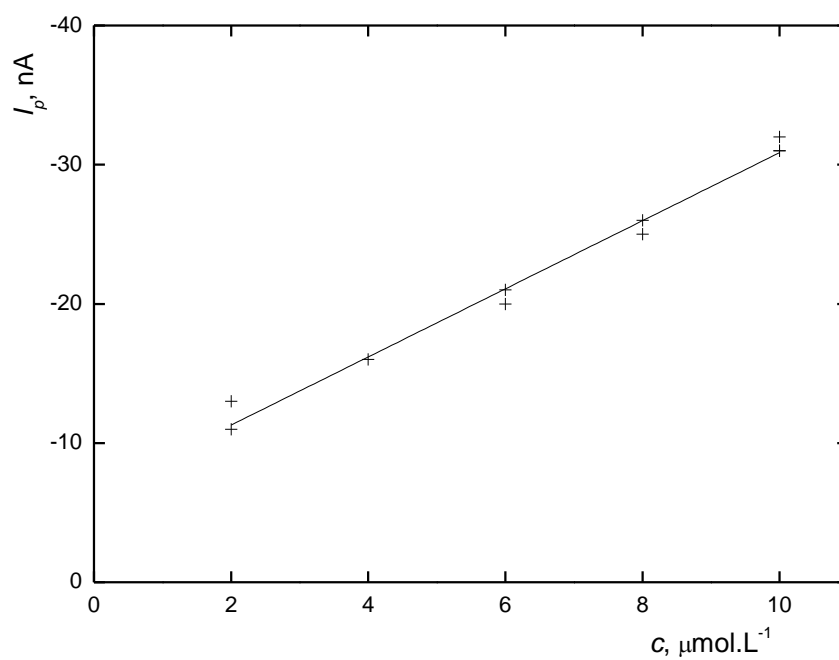
Obr. 31. DP voltamogramy 2-nitrofluorenu na p-AgSA-CE v rozmezí koncentrací $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Koncentrace 2-nitrofluorenu (mol L^{-1}): $1 \cdot 10^{-4}$ (1), $8 \cdot 10^{-5}$ (2), $6 \cdot 10^{-5}$ (3), $4 \cdot 10^{-5}$ (4), $2 \cdot 10^{-5}$ (5) a ZE (6). Měřeno v roztoku methanol – BR pufr pH 5,0 (1:1); regenerační potenciály $E_{in} = -350 \text{ mV}$, $E_{fin} = -1100 \text{ mV}$.



Obr. 32. Závislost proudu píku na koncentraci 2-nitrofluorenu v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Měřeno technikou DPV na p-AgSA-CE v roztoku methanol – BR pufr 5,0 (1:1); regenerační potenciály $E_{in} = -350 \text{ mV}$, $E_{fin} = -1100 \text{ mV}$.



Obr. 33. DP voltamogramy 2-nitrofluorenu na p-AgSA-CE v rozmezí koncentrací $2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Koncentrace 2-nitrofluorenu (mol L^{-1}): $1 \cdot 10^{-5}$ (1), $8 \cdot 10^{-6}$ (2), $6 \cdot 10^{-6}$ (3), $4 \cdot 10^{-6}$ (4), $2 \cdot 10^{-6}$ (5) a ZE (6). Měřeno v roztoku methanol – BR pufr pH 5,0 (1:1); regenerační potenciály $E_{in} = -350 \text{ mV}$, $E_{fin} = -1100 \text{ mV}$.



Obr. 34. Závislost proudu píku na koncentraci 2-nitrofluorenu v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Měřeno technikou DCV na p-AgSA-CE v roztoku methanol – BR pufr 5,0 (1:1); regenerační potenciály $E_{in} = -350 \text{ mV}$, $E_{fin} = -1100 \text{ mV}$.

Tabulka IX

Charakteristiky kalibračních přímk stanoví 2-nitrofluorenu technikou DPV na p-AgSA-CE v prostředí methanol – BR pufr pH 5,0 (1:1).

c [mol L ⁻¹]	směrnice [mA L mol ⁻¹]	úsek [nA]	R	L_Q [mol L ⁻¹]
$(2 - 10) \cdot 10^{-5}$	-2,6	-9,5	-0,9975	–
$(2 - 10) \cdot 10^{-6}$	-2,4	-6,4	-0,9949	$3,4 \cdot 10^{-6}$

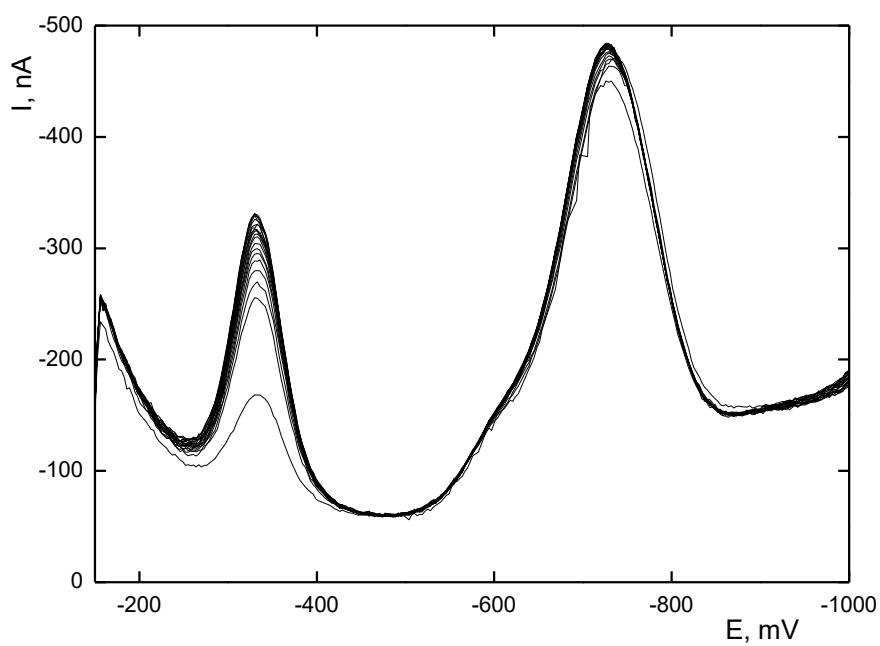
Tabulka X

Statistické vyhodnocení opakovatelnosti stanoví 2-nitrofluorenu technikou DPV na p-AgSA-CE pro koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ a $2 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ v prostředí methanol – BR pufr pH 5,0 (1:1), počet měření $n = 10$ (na hladině významnosti $\alpha = 0,05$).

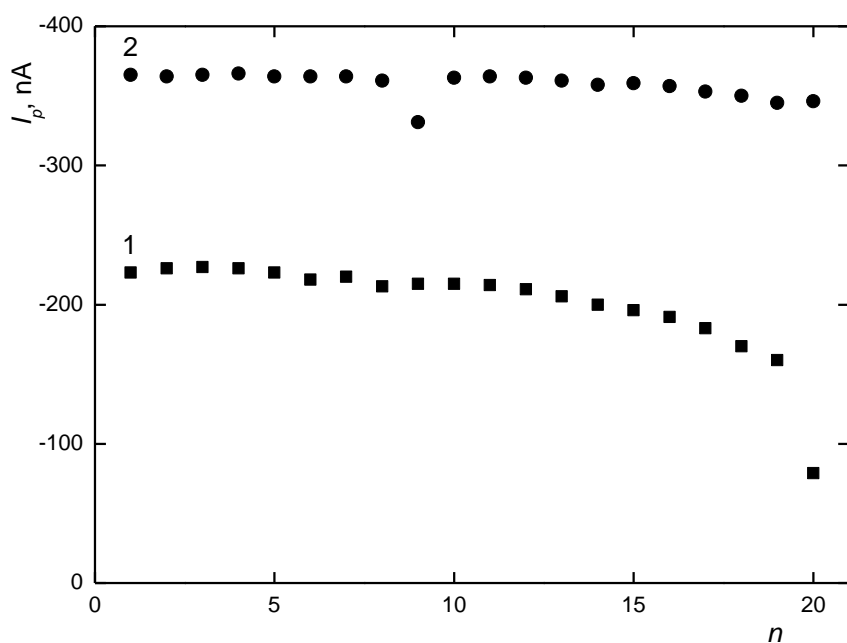
c [mol L ⁻¹]	\tilde{x} [nA]	$L_{1,2}$ [nA]	s [nA]	s_r [%]
$1 \cdot 10^{-4}$	-226,0	0,69	1,08	0,48
$2 \cdot 10^{-6}$	-11,0	0,69	0,82	7,42

Při měření 2-nitrofluorenu v prostředí methanol – BR pufr pH 11,0 (1:1), kdy byla snaha využít pro stanovení dva voltametrické píky, docházelo taktéž bez užití regeneračního kroku k viditelné pasivaci povrchu elektrody (obr. 35 a obr. 36); opakovatelnost měření prvního píku bez regenerace činila 16,06 % (při vyřazení odlehlé dvacáté hodnoty ze souboru dat 9,04 %), u druhého píku 2,49 % (při vyřazení odlehlé deváté hodnoty ze souboru dat pak 1,80 %). Po aplikaci optimálních regeneračních potenciálů (obr. 37 a obr. 38) $E_{in} = -150$ mV a $E_{fin} = -1000$ mV vykazovalo měření signálu prvního píku výrazně zlepšenou opakovatelnost 2,51 % (při vyřazení odlehlé první hodnoty ze souboru dat pak 1,29 %); opakovatelnost pro druhý pík s použitím regenerace činila 0,95 %. Opět i zde se regenerační krok stává nezbytností pro následné stanovení 2-nitrofluorenu v tomto prostředí.

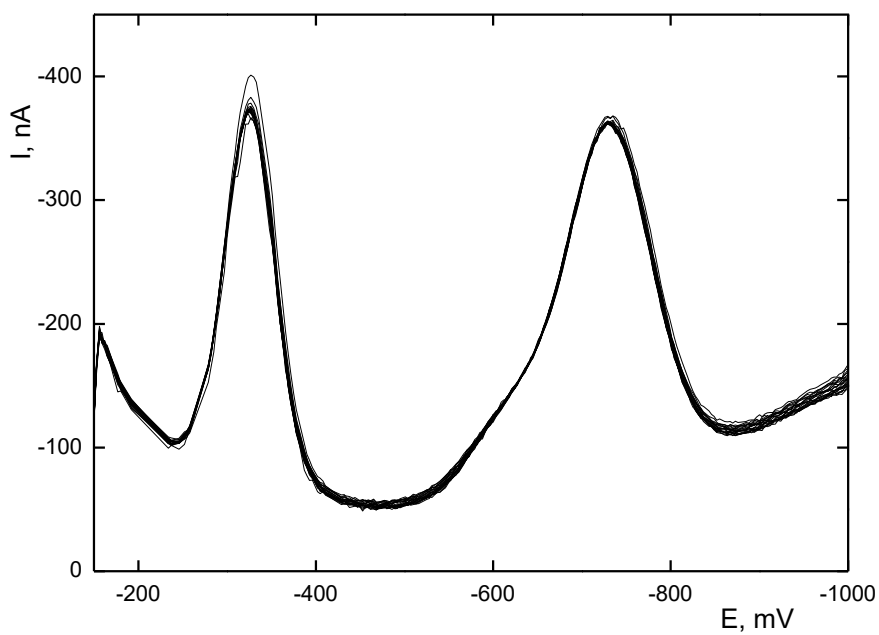
Koncentrační závislosti 2-nitrofluorenu v prostředí methanol – BR pufr pH 11,0 (1:1) byly měřeny v rozmezí $2 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹ (obr. 39 a obr. 41). Při koncentraci 2-nitrofluorenu nižší než $2 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ již nebylo možné získaný voltamogram vyhodnotit. Odpovídající závislosti proudu píku na koncentraci 2-nitrofluorenu jsou uvedeny na obr. 40 a obr. 42.



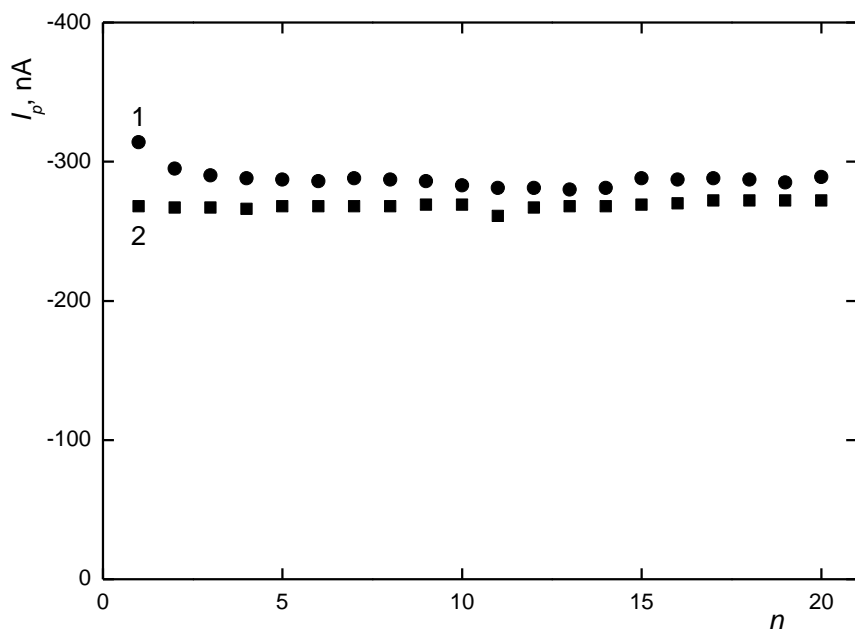
Obr. 35. DP voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) na p-AgSA-CE v prostředí methanol – BR pufr pH 11,0 (1:1). Měřeno bez aplikace regeneračních potenciálů, počet měření $n = 20$.



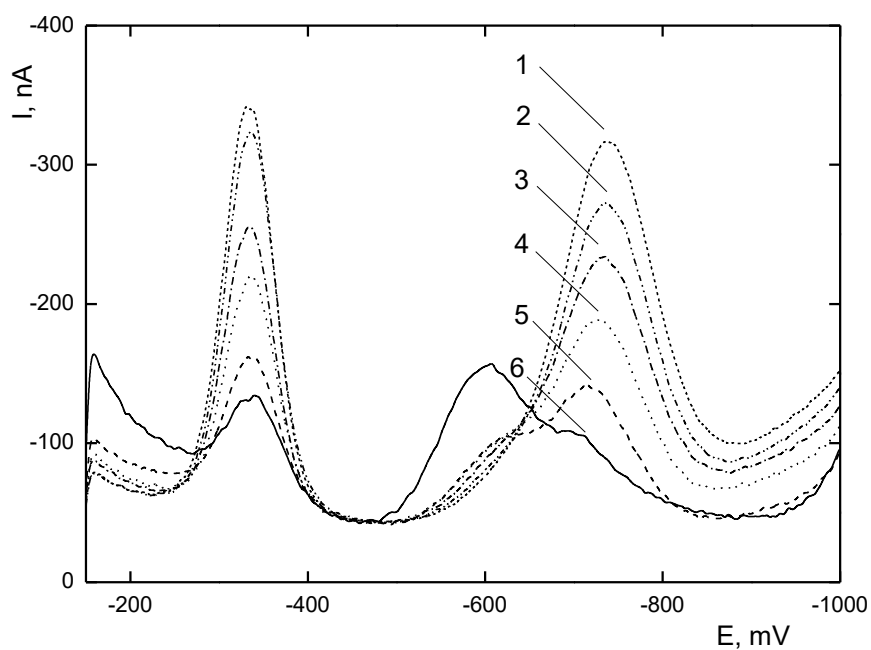
Obr. 36. Závislost proudu prvního (1) a druhého (2) píku 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) na počtu měření bez aplikace regeneračních potenciálů. Měřeno technikou DPV na p-AgSA-CE v prostředí methanol – BR pufr pH 11,0 (1:1), počet měření $n = 20$.



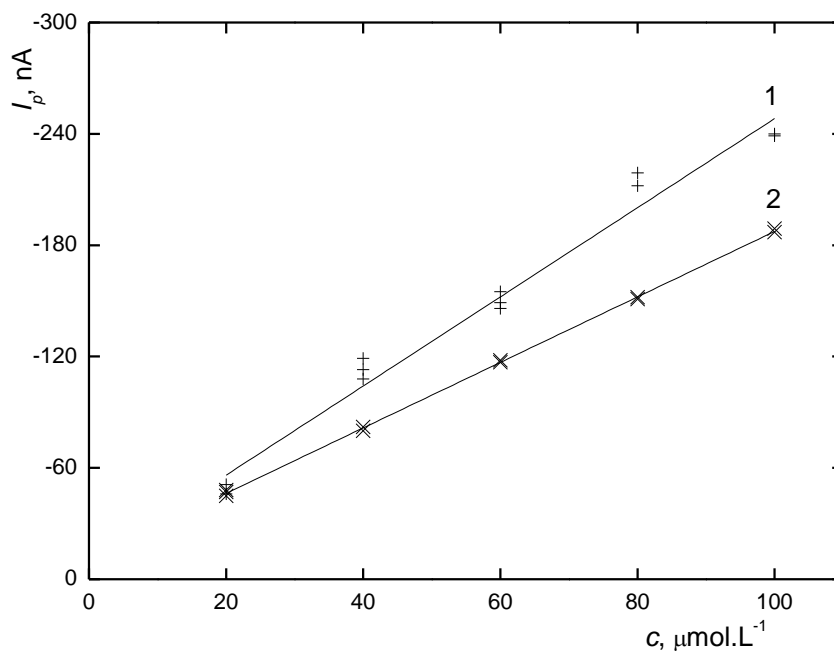
Obr. 37. DP voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) na p-AgSA-CE v prostředí methanol – BR pufr pH 11,0 (1:1). Měřeno s užitím regenerace před každým měřením ($E_{in} = -150 \text{ mV}$, $E_{fin} = -1000 \text{ mV}$), počet měření $n = 20$.



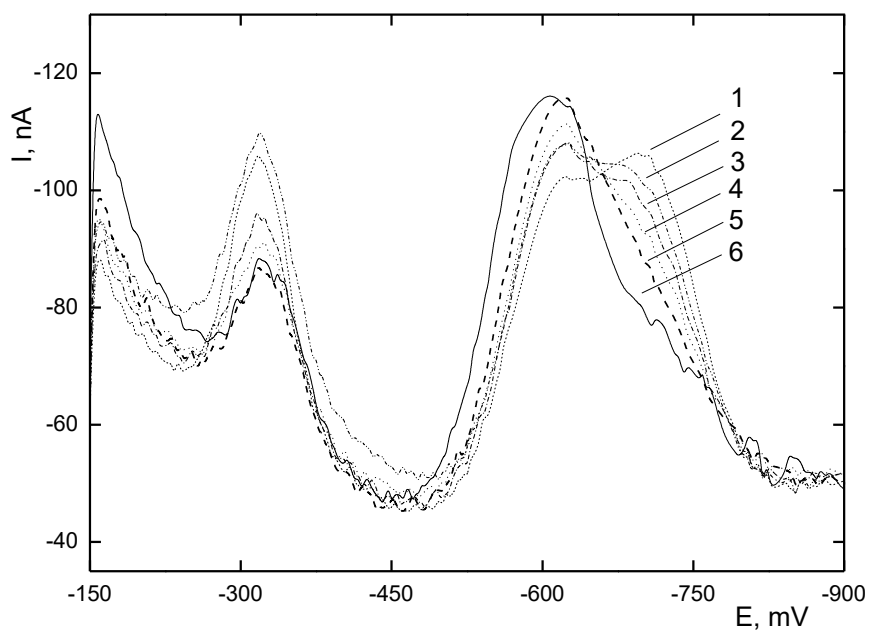
Obr. 38. Závislost proudu prvního (1) a druhého (2) píku 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) na počtu měření s užitím regenerace před každým měřením ($E_{in} = -150 \text{ mV}$, $E_{fin} = -1000 \text{ mV}$). Měřeno technikou DPV na p-AgSA-CE v prostředí methanol – BR pufr pH 11,0 (1:1), počet měření $n = 20$.



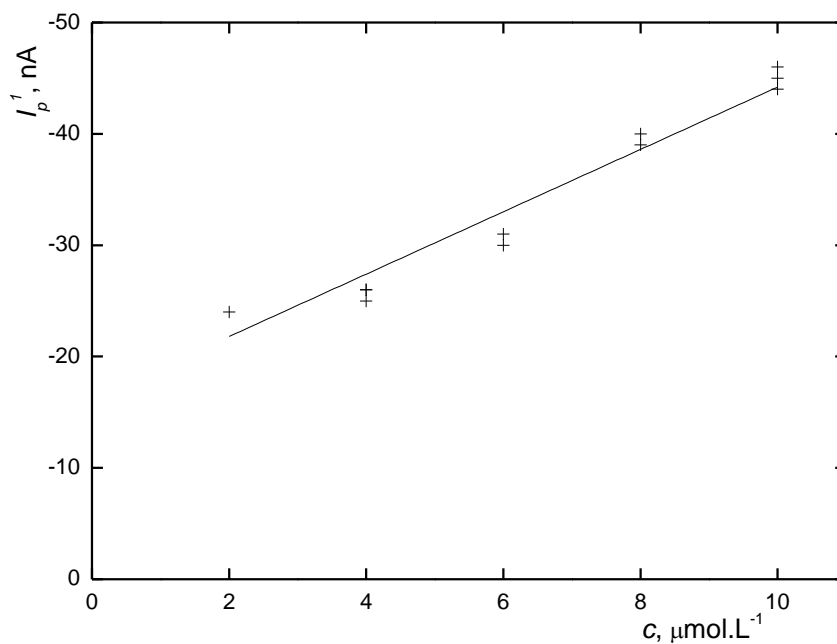
Obr. 39. DP voltamogramy 2-nitrofluorenu na p-AgSA-CE v rozmezí koncentrací $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Koncentrace 2-nitrofluorenu (mol L^{-1}): $1 \cdot 10^{-4}$ (1), $8 \cdot 10^{-5}$ (2), $6 \cdot 10^{-5}$ (3), $4 \cdot 10^{-5}$ (4), $2 \cdot 10^{-5}$ (5) a ZE (6). Měřeno v roztoku methanol – BR pufr pH 11,0 (1:1); regenerační potenciály $E_{in} = -150 \text{ mV}$, $E_{fin} = -1000 \text{ mV}$.



Obr. 40. Závislost proudu prvního (1) a druhého (2) píku na koncentraci 2-nitrofluorenu v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Měřeno technikou DPV na p-AgSA-CE v roztoku methanol – BR pufr 11,0 (1:1); regenerační potenciály $E_{in} = -150 \text{ mV}$, $E_{fin} = -1000 \text{ mV}$.



Obr. 41. DP voltamogramy 2-nitrofluorenu na p-AgSA-CE v rozmezí koncentrací $2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Koncentrace 2-nitrofluorenu (mol L^{-1}): $1 \cdot 10^{-5}$ (1), $8 \cdot 10^{-6}$ (2), $6 \cdot 10^{-6}$ (3), $4 \cdot 10^{-6}$ (4), $2 \cdot 10^{-6}$ (5) a ZE (6). Měřeno v roztoku methanol – BR pufr pH 11,0 (1:1); regenerační potenciály $E_{in} = -150 \text{ mV}$, $E_{fin} = -1000 \text{ mV}$.



Obr. 42. Závislost proudu prvního píku na koncentraci 2-nitrofluorenu v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Měřeno technikou DPV na p-AgSA-CE v roztoku methanol – BR pufr 11,0 (1:1); regenerační potenciály $E_{in} = -150 \text{ mV}$, $E_{fin} = -1000 \text{ mV}$.

Jak je patrné z obr. 39 a obr. 41, signál druhého píku interferuje se signálem přítomné nečistoty v základním elektrolytu (pravděpodobně se jedná o olovnaté ionty v použitém hydroxidu sodném). Z obr. 40 pak dále plyne, že právě signály druhého píku vykazují vyšší lineární korelaci než hodnoty získané vyhodnocením píku prvního. Nicméně ze záznamů získaných v nejnižším koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹ (obr. 41) vyplývá, že rušivý vliv nečistoty zcela brání vyhodnocení druhého píku, a proto již dále byl vyhodnocován pouze pík první.

Charakteristiky získaných kalibračních přímek stanovení 2-nitrofluorenu v prostředí methanol – BR pufr pH 11,0 (1:1) shrnuje tabulka XI. V tabulce XII jsou pak uvedeny statistické údaje opakovatelnosti měření pro nejvyšší a nejnižší měřenou koncentraci.

Tabulka XI

Charakteristiky kalibračních přímek stanovení 2-nitrofluorenu technikou DPV na p-AgSA-CE v prostředí methanol – BR pufr pH 11,0 (1:1).

c [mol L ⁻¹]	směrnice [mA L mol ⁻¹]	úsek [nA]	R	L_Q [mol L ⁻¹]
$(2 - 10) \cdot 10^{-5}$ ^a	-2,4	-8,0	-0,9893	–
$(2 - 10) \cdot 10^{-5}$ ^b	-1,8	-10,9	-0,9997	–
$(2 - 10) \cdot 10^{-6}$ ^a	-2,8	-16,2	-0,9729	$3,0 \cdot 10^{-6}$

^a – vyhodnocován první pík, ^b – vyhodnocován druhý pík

Tabulka XII

Statistické vyhodnocení opakovatelnosti stanovení 2-nitrofluorenu technikou DPV na p-AgSA-CE pro koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ a $2 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ v prostředí methanol – BR pufr pH 11,0 (1:1), počet měření $n = 10$ (na hladině významnosti $\alpha = 0,05$).

c [mol L ⁻¹]	\tilde{x} [nA]	$L_{1,2}$ [nA]	s [nA]	s_r [%]
$1 \cdot 10^{-4}$ ^a	-287,0	2,76	3,78	1,32
$1 \cdot 10^{-4}$ ^b	-268,0	1,84	2,33	0,87
$2 \cdot 10^{-6}$ ^a	-24,0	0,69	0,84	3,51

^a – vyhodnocován první pík, ^b – vyhodnocován druhý pík

Na záznamech voltametrických křivek na obr. 39 a obr. 41 je taktéž patrné, že pík látky je v nezanedbatelné míře přítomen i ve voltamogramu základního elektrolytu. Tento jev nebyl do tak značné míry pozorován při použití techniky DCV. Vyhodnocování signálu zde bylo tedy ještě dodatečně korigováno odečtením hodnoty signálu základního elektrolytu při potenciálu, při kterém se vyhodnocovaly ostatní měřené koncentrace 2-nitrofluorenu. Ani po této korekci však nebylo dosaženo lineárních koncentračních závislostí s úsekem statisticky nevýznamným od nulové hodnoty. Přítomnost voltametrického signálu 2-nitrofluorenu v základním elektrolytu je pravděpodobně spojena s adsorpcí látky v epoxidové fázi kompozitní směsi, která může být zapříčiněna jednak zvýšeným obsahem methanolu v základním elektrolytu a také silně alkalickým prostředím o $\text{pH}^* 11,3$ – to může vézt k částečnému naleptání kompozitní směsi a následné akumulaci 2-nitrofluorenu. Toto reziduum 2-nitrofluorenu bylo možné odstranit vyleštěním elektrody, ale při kontaktu s látkou v daném prostředí docházelo k opětovné akumulaci do elektrodového materiálu.

Proto byl učiněn pokus o stanovení 2-nitrofluorenu v prostředí s nižším obsahem methanolu, tedy methanol – BR pufr $\text{pH} 11,0$ (1:9). V tomto prostředí již k výše popsanému jevu nedocházelo a bylo dokonce možné stanovit 2-nitrofluoren i v koncentracích $6 \cdot 10^{-7}$, $8 \cdot 10^{-7}$ a $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Vyšší řád koncentrací však nebylo možné s tímto obsahem methanolu stanovovat, protože se látka do roztoku již vysrážela v podobě koloidních částic.

Z uvedených výsledků vyplývá, že stanovení 2-nitrofluorenu technikou DPV na p-AgSA-CE v obou zkoumaných prostředích poskytuje srovnatelné výsledky, ať mezi sebou porovnáváme lineární korelaci bodů kalibračních přímek, citlivost vyjádřenou v podobě absolutní hodnoty získaných směrnic či meze stanovitelnosti, které jsou rovněž u obou stanovení 2-nitrofluorenu srovnatelné. Ani zde však není možné případné použití metody standardního přídavku, právě kvůli výše zmíněným úsekům na proudové ose, které jsou statisticky významné od nulové hodnoty (prakticky pouze jedna kalibrační závislost 2-nitrofluorenu disponuje statisticky nevýznamným úsekem na hladině významnosti $\alpha = 0,05$; jedná se o kalibrační závislost DPV stanovení na p-AgSA-CE v rozmezí koncentrací $2 \cdot 10^{-5}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ v prostředí methanol – BR pufr $\text{pH} 11,0$; 1:1).

4. Shrnutí dosažených výsledků

Nově vyvinuté voltametrické metody (DCV a DPV) stanovení 2-nitrofluorenu na p-AgSA-CE byly porovnány, z hlediska dosažených mezí stanovitelnosti, s již dříve vypracovanými metodami vsádkových stanovení. Srovnání jednotlivých metod je uvedeno v tabulce XIII. Meze stanovitelnosti dosažené na p-AgSA-CE jsou srovnatelné s metodou DC tast polarografie na klasické rtuťové kapkové elektrodě. Další polarografické či voltametrické techniky dosahují mezí stanovitelnosti desetkrát až tisíckrát nižších. Tato nevýhoda však lze v případě použití p-AgSA-CE potlačit například vhodnou prekoncentrací vzorku či použitím extrakce z větších objemů (například kapalinovou extrakcí či extrakcí tuhou fází). Takto je možné dosáhnout sto- až tisícnásobného zakoncentrování analytu. Další možností snížení meze stanovitelnosti by pak bylo možné např. modifikací p-AgSA-CE rtuťovým meniskem.

Tabulka XIII

Porovnání dosažených výsledků stanovení 2-nitrofluorenu na p-AgSA-CE s alternativními metodami stanovení

technika	elektroda	prostředí	L_Q [mol L ⁻¹]	citace
DCV	p-AgSA-CE	methanol – BR pufr pH 5,0 (1:1)	$4 \cdot 10^{-6}$	—
		methanol – BR pufr pH 11,0 (1:1)	$6 \cdot 10^{-6}$	—
DPV	p-AgSA-CE	methanol – BR pufr pH 5,0 (1:1)	$3 \cdot 10^{-6}$	—
		methanol – BR pufr pH 11,0 (1:1)	$3 \cdot 10^{-6}$	—
DCV	m-AgSAE	methanol – BR pufr pH 4,0 (1:1)	$5 \cdot 10^{-7}$	1
DPV		methanol – BR pufr pH 4,0 (1:1)	$2 \cdot 10^{-7}$	1
DCTP	DME	methanol – BR pufr pH 12,0 (1:1)	$4 \cdot 10^{-6}$	25
DPP		methanol – BR pufr pH 12,0 (1:1)	$4 \cdot 10^{-7}$	19
DPV	HMDE	methanol – BR pufr pH 12,0 (9:1)	$4 \cdot 10^{-8}$	19
AdSV ^a		methanol – BR pufr pH 12,0 (9:1)	$3 \cdot 10^{-9}$	19
UV-VIS	—	methanol	$5 \cdot 10^{-7}$	1

a – čas akumulace $t_{acc} = 600$ s, potenciál akumulace $E_{acc} = -300$ mV; DCTP – DC tast polarografie; DPP – diferenční pulsní polarografie; AdSV – adsorpční rozpouštěcí voltametrie; m-AgSAE – rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgámová elektroda; DME – klasická rtuťová kapková elektroda; HMDE – visící rtuťová kapková elektroda

5. Závěr

- 1) Bylo prostudováno chování 2-nitrofluorenu při DC voltametii na leštěné stříbrné tuhé amalgamové kompozitní elektrodě. Byly nalezeny optimální podmínky pro jeho stanovení v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹. Optimálním prostředím pro stanovení 2-nitrofluorenu je směs methanol – BR pufr pH 5,0 (1:1), kde 2-nitrofluoren poskytuje nejlépe vyhodnotitelný voltametrický pík, stanovení vykazuje vyšší citlivost a L_Q nabývá hodnoty $4 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹. Dále bylo vypracováno stejnou metodou ve stejném koncentračním rozmezí i stanovení 2-nitrofluorenu (vyhodnocován druhý pík) v prostředí methanol – BR pufr pH 11,0 (1:1); toto stanovení však jeví ve srovnání s předchozím menší citlivost a i vyšší hodnotu L_Q $6 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹.
- 2) Dále bylo prostudováno chování 2-nitrofluorenu při diferenční pulsní voltametii na leštěné stříbrné tuhé amalgamové kompozitní elektrodě. Byly nalezeny optimální podmínky pro jeho stanovení v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹. Optimálním prostředím je směs methanol – BR pufr pH 5,0 (1:1), kde stanovení 2-nitrofluoren vykazuje vyšší citlivost a L_Q je rovna $3 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹. Neméně vhodné je však i stanovení 2-nitrofluorenu v prostředí methanol – BR pufr pH 11,0 (1:1), kde lze pomocí vyhodnocování prvního píku dosáhnout L_Q rovněž $3 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹.

6. Literatura

1. Jiráček J.: *Bakalářská práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2008.
2. Beije B., Moller L.: *Carcinogenesis* 9, 1465 (1988).
3. Yaffe D., Cohen Y., Arey J., Grossovsky A. J.: *Risk Anal.* 21, 275 (2001).
4. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol46/volume46.pdf>, staženo 9. května 2009.
5. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc229.htm>, staženo 20. dubna 2009.
6. <http://www.phyotosanitary.org/projekty/2004/vvf-09-04.pdf>, staženo 20. dubna 2009.
7. Zielinska B., Samy S.: *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 883 (2006).
8. Barek J., Cvačka J., Muck A., Quaiserová V., Zima J.: *Electroanalysis* 13, 799 (2001).
9. Sekyra M., Leníček J., Bednářková K., Beneš I.: *Chem. Listy* 94, 924 (2000).
10. Břicháč J., Zima J., Barek J.: *Anal. Lett.* 37, 2379 (2004).
11. Moller L.: *Environ. Health Perspect.* 102, 139 (1994).
12. Moller L., Torndal U. B., Eriksson L. C., Gustafsson J. A.: *Carcinogenesis* 10, 435 (1989).
13. Tichý M.: *Toxikologie pro chemiky*. Karolinum UK, Praha 1998.
14. Moller L., Zeisig M.: *Carcinogenesis* 14, 53 (1993).
15. Moller L., Corrie M., Midtvedt T., Rafter J., Gustafsson J. A.: *Carcinogenesis* 9, 823 (1988).
16. Moller L., Zeisig M., Midtvedt T., Gustafsson J. A.: *Carcinogenesis* 15, 2969 (1994).
17. Hirayama K., Baranczewski P., Akerlund J. E., Midtvedt T., Moller L., Rafter J.: *Carcinogenesis* 21, 2105 (2000).
18. Birošová L., Mikulášová M.: *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 149, 401 (2005).
19. Barek J., Pumera M., Muck A., Kaderabkova M., Zima J.: *Anal. Chim. Acta* 393, 141 (1999).
20. Scheepers P. T. J., Velders D. D., Martens M. H. J., Noordhoek J., Bos R. P.: *J. Chromatogr. A* 677, 107 (1994).
21. Al-Kindy S. M., Miller J. N.: *Biomed. Chromatogr.* 23, 166 (2009).
22. Břicháč J., Zima J., Barek J.: *Anal. Lett.* 37, 2379 (2004).
23. Warzecha L., Strozyk M.: *Chem. Anal. (Warsaw)* 43, 807 (1998).
24. Moreira J. C., Barek J.: *Quim. Nova* 18, 362 (1995).
25. Vyskočil V., Barek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39, (2009); v tisku.
26. Barek J., Pecková K., Vyskočil V.: *Curr. Anal. Chem.* 4, 242 (2008).

27. Xu J. H., Lee F. S. C.: *Chemosphere* 42, 245 (2001).
28. Šebková S.: *Chem. Listy* 97, 201 (2003).
29. Barek J., Fogg A. G., Muck A., Zima J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 31, 291 (2001).
30. Barek J., Fischer J., Navrátil T., Pecková K., Yosypchuk B., Zima J.: *Electroanalysis* 19, 2003 (2007).
31. Šebková S., Navrátil T., Kopanica M.: *Anal. Lett.* 37, 603 (2004).
32. Yosypchuk B., Navratil T., Lukina A. N., Peckova K., Barek J.: *Chem. Anal.* 52, 897 (2007).
33. Harvey D.: *Modern Analytical Chemistry*, str. 96. McGraw-Hill, Toronto 2000.
34. Pecková K.: *Disertační práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2006.
35. Zuman P.: *Chem. Listy* 91, 91 (1997).