

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra analytické chemie

**Využití stříbrné tuhé amalgámové elektrody ke stanovení
nitrochinolinů a dalších nitroderivátů polycyklických
aromatických uhlovodíků**

**The use of silver solid amalgam electrode for determination of
nitroquinolines and other nitro derivatives of polycyclic
aromatic hydrocarbons**

Diplomová práce
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2009

Zuzana Králová

Tato práce byla finančně podporována MŠMT ČR
(projekt MSM 0021620857 a LC 06035).

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Karoliny Peckové, Ph.D., a consultantů Mgr. Ivana Jiráňka a Mgr. Hany Dejmkové a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne.....

.....

podpis

Úvodem bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Karolině Peckové, Ph.D., a současně i Mgr. Ivanu Jiránkovi a Mgr. Haně Dejmkové za odborné vedení. Dále bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Jiřímu Barkovi, CSc. a všem členům Katedry analytické chemie za všestrannou pomoc a cenné připomínky k mé práci.

Současně bych chtěla poděkovat rodičům, že mi umožnili studovat na vysoké škole, a svým přátelům za podporu a trpělivost.

Předmětová hesla: analytická chemie
elektrochemie
nitrované heterocyklické polyaromatické uhlovodíky
voltametrie

Klíčová slova: 5-nitrochinolin
6-nitrochinolin
ampérometrie
adsorpční rozpouštěcí voltametrie
cyklická voltametrie
diferenční pulsní voltametrie (DPV)
DC voltametrie
průtoková injekční analýza
stříbrná tuhá amalgámová elektroda
vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Obsah

1	Úvod	8
1.1	Cíl práce.....	9
1.2	Studované látky	10
1.3	Výskyt, vlastnosti a biologické účinky chinolinu a jeho nitroderivátů	12
1.4	Výskyt, vlastnosti a biologické účinky nitroderivátů polycyklických aromatických uhlovodíků	12
1.5	Analytické metody pro stanovení nitrochinolinů a nitroderivátů polycyklických aromatických uhlovodíků.....	14
2	Experimentální část	16
2.1	Reagencie.....	16
2.2	Aparatura	17
2.3	Pracovní postupy	20
2.4	Stabilita zásobních roztoků.....	22
3	CYKlickÁ VOLTAMETRIE 5-NQ A 6-NQ.....	26
4	VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ 5-NQ a 6-NQ.....	31
4.1	DC voltametrie	31
4.2	Diferenční pulsní voltametrie	40
4.3	Porovnání voltametrického stanovení 5-NQ a 6-NQ	50
4.4	OVĚŘENÍ DIFÚZNÍHO CHARAKTERU LIMITNÍHO PROUDU	52
5	STANOVENÍ 5-NQ PRŮTOKOVOU INJEKČNÍ ANALÝZOU S AMPÉROMETRICKOU DETEKČÍ	55
5.1	Optimalizace metody	55
5.2	Koncentrační závislost.....	55
6	STANOVENÍ SMĚSI NAFTOVÝCH MARKERŮ METODOU HPLC S ELEKTROCHEMICKOU DETEKČÍ	67
6.1	Optimalizace metody	67
6.2	Koncentrační závislost.....	68
7	ZÁVĚR.....	73
8	LITERATURA	75

Seznam zkratek a použitých symbolů

ε	molární absorpční koeficient
λ	vlnová délka
λ_{max}	vlnová délka absorpčního maxima
5-NQ	5-nitrochinolin
6-NQ	6-nitrochinolin
A	absorbance
A_{rel}	relativní hodnota absorbance
BR pufr	Brittonův – Robinsonův pufr
c	molární koncentrace.
C. A. S.	Chemical Abstract Services
DCV	DC voltametrie (direct current voltametrie)
DPV	diferenční pulsní voltametrie
E	potenciál
E_{fin}	konečný potenciál regenerace
E_{in}	počáteční potenciál regenerace
E_p	potenciál píku
E_{det}	potenciál detekce
ED	elektrochemická detekce (electrochemical detection)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
FIA	průtoková injekční analýza (flow injection analysis)
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
I	proud
I_p	proud (výška) píku
L_Q	mez stanovitelnosti
m-AgSAE	rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgámová elektroda
M_r	relativní molekulová hmotnost
NPAH	nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace oxoniových iontů

RSD	relativní směrodatná odchylka
s_c	směrodatná odchylka výšky píku pro nejnižší měřitelnou koncentraci
t	čas
UV/VIS	ultra fialová/viditelná oblast spektra (ultra violet/visible)
V_{inj}	objem nadávkovaného vzorku
v_{sc}	rychlost skenu

1 Úvod

S rozvojem průmyslu stoupá znečištění životního prostředí toxickými látkami. Proto je výzkum metod, zkoumajících tyto toxické látky, nezbytnou součástí analytické chemie.

První skupinou látek, u kterých byla prokázána spojitost mezi profesionální expozicí a zvýšeným výskytem rakoviny, byla skupina polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH)¹. V současné době je známo více jak 500 různých PAH, z nichž velká část patří do skupiny látek podezřelých z karcinogenních či mutagenních účinků². Bylo zjištěno, že PAH jsou mutagenní až po předchozí metabolické aktivaci, zatímco nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky (NPAH) patří mezi přímé mutageny^{1,3}. Genotoxicita PAH závisí jak na struktuře PAH, tak i na počtu a poloze přítomných substitučních skupin⁴. Studium účinků těchto látek na okolní prostředí a vypracováváním metod pro likvidaci všech skupin chemických karcinogenů se zabývá Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny v Lyonu (IARC)².

Mezi toxické látky podezřelé z karcinogenních a mutagenních účinků patří i některé heterocyklické polyaromatické sloučeniny, jako je například chinolin⁵ a jeho nitroderiváty⁶⁻⁸.

Na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy je řešen rozsáhlý projekt stanovení těchto genotoxických látek pomocí moderních elektroanalytických metod, jehož součástí je i předkládaná diplomová práce.

1.1 Cíl práce

Cílem předkládané práce je vývoj elektroanalytických metod pro stanovení nitroderivátů chinolinu a dalších vybraných nitroderivátů polycyklických aromatických uhlovodíků s využitím meniskem modifikované stříbrné tuhé amalgámové elektrody. Konkrétně se jedná o následující problematiku:

1) Nalezení optimálních podmínek pro voltametrické stanovení stopových množství 5-nitrochinolinu (5-NQ) a 6-nitrochinolinu (6-NQ) ve vodném prostředí s využitím meniskem modifikované stříbrné tuhé amalgámové elektrody (m-AgSAE). Bylo použito techniky diferenční pulsní voltametrie (DPV) a DC voltametrie (DCV) (kap. 4).

2) Studium mechanismu elektrochemické redukce 5-NQ a 6-NQ metodou cyklické voltametrie na m-AgSAE (kap. 3).

3) Optimalizace stanovení 5-NQ metodou průtokové injekční analýzy (FIA) v modelových vzorcích pitné a říční vody. Při tomto stanovení byla také využita m-AgSAE jako elektrochemický sensor v ampérometrickém detektoru ve „wall jet“ uspořádání (kap.5).

4) Návrh separace stanovení 5-NQ spolu s dalšími markery nedokonalého spalování paliv (1-nitropyrenem, 2-nitrofluorenem a 3-nitrofluoranthemem) metodou HPLC s ampérometrickou detekcí na m-AgSAE a UV detekcí. (kap. 6).

Předkládaná diplomová práce je tematickým pokračováním mé bakalářské práce⁹ (Využití stříbrné tuhé amalgámové elektrody ke stanovení 5-nitrochinolinu), dále pak navazuje na diplomovou práci Mgr. Ivana Jiráka¹⁰ (Polarografické a voltametrické stanovení 5-nitrochinolinu), ve které byly studovány elektrochemické vlastnosti 5-NQ ve smíšeném vodně-methanolickém prostředí. Práce volně navazuje na bakalářskou práci Bc. Jaroslava Jiráka¹¹ (Voltametrické stanovení genotoxického 2-nitrofluorenu na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné tuhé amalgámové elektrodě), na bakalářskou práci Bc. Jindřicha Karáska¹² (Voltametrické stanovení 1-nitropyrenu na stříbrné tuhé amalgámové elektrodě) a na disertační práci Mgr. Karla Čížka¹³ (Příspěvek ke stanovení nitro a amino derivátů fluoranthenu pomocí elektrochemických metod).

1.2 Studované látky

1.2.1 Studované látky

Hlavní studované látky 5-NQ a 6-NQ jsou za laboratorní teploty světle žluté, jemně krystalické sloučeniny. Jsou dobře rozpustné ve vodě.

Dále byl používán 1-nitropyren, 2-nitrofluoren a 3-nitrofluoranthén. 1-nitropyren tvoří žluté jehlovité krystalky. 2-nitrofluoren je jemně krystalický světle žlutý prášek. 3-nitrofluoranthén je žlutý až tmavě žlutý prášek. Tyto látky jsou rozpustné v ethanolu, benzenu, methanolu a dalších organických rozpouštědlech.

C.A.S. Name: 5-Nitroquinoline

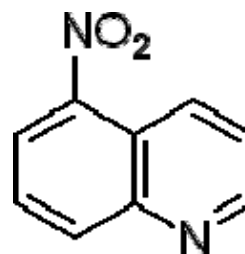
C.A.S. Registry Number: 607-34-1

M_r : 174,16

Bod tání: 71 – 73 °C

Sumární vzorec: $C_9H_6N_2O_2$

Strukturní vzorec:



C.A.S. Name: 6-Nitroquinoline

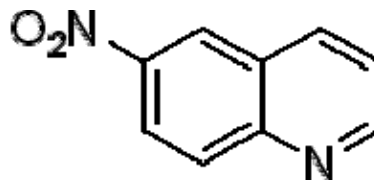
C.A.S. Registry Number: 613-50-3

M_r : 174,16

Bod tání: 151 – 153 °C

Sumární vzorec: $C_9H_6N_2O_2$

Strukturní vzorec:



C.A.S. Name: 1-Nitropyrene

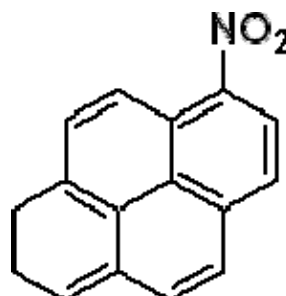
C.A.S. Registry Number: 5522-43-0

M_r : 247,25

Bod tání: 155 °C

Sumární vzorec: $C_{16}H_9NO_2$

Strukturní vzorec:



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

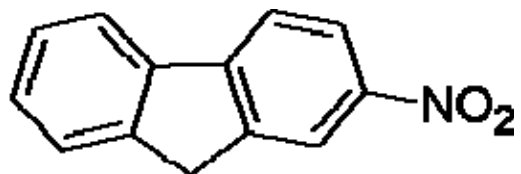
C.A.S. Registry Number: 607-57-8

M_r : 211,22

Bod tání: 157 °C

Sumární vzorec: $C_{13}H_9NO_2$

Strukturní vzorec:



C.A.S. Name: 3-Nitrofluoranthene

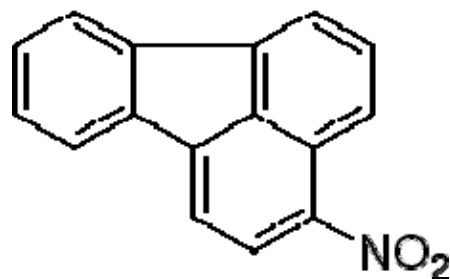
C.A.S. Registry Number: 892-21-7

M_r : 247,25

Bod tání: 157 – 159 °C

Sumární vzorec: $C_{16}H_9NO_2$

Strukturní vzorec:



1.3 Výskyt, vlastnosti a biologické účinky chinolinu a jeho nitroderivátů

Chinolin a jeho nitro a aminoderiváty patří mezi látky s poměrně širokým využitím. Tvoří základ četných alkaloidů, jsou součástí komerčně vyráběných léčiv, našly uplatnění jako součást analytických činidel, barviv a přípravků používaných v zemědělství¹⁴.

Chinolin je v organismu metabolizován na chinolin-1-oxid za katalýzy cytochromu P-450 a monooxidázy. Po aktivaci enzymy může chinolin působit jako hepatokarcinogen. Může dojít k navázání na nukleovou kyselinu¹⁵. Účinkem chinolinu byly vyvolány změny oční čočky a degenerativní změny oční sítnice¹⁶⁻¹⁸. Působení chinolinu na mořské řasy inhibuje jejich fotosyntézu¹⁹.

5-NQ může způsobit podráždění pokožky a oční sliznice. Po požití způsobuje podráždění zažívacího ústrojí nebo dýchacího ústrojí. 5-NQ je mutagenní látka. Kompletní toxikologické vlastnosti 5-NQ jsou předmětem dalšího studia²⁰.

6-NQ je také toxická látka. Chronické působení této látky může vyvolat nevolnosti a zvracení, vyšší koncentrace způsobují bezvědomí. Symptomy expozice jsou obdobné jako u 5-NQ, navíc se mohou projevit další obtíže, jako například erytém (zarudnutí kůže) či mírný otok v místě styku této látky s pokožkou²¹. Mutagenita 6-NQ byla také pozitivně testována na bakteriích rodu *Salmonella*²².

IARC 5-NQ ani 6-NQ z hlediska karcinogenity neklasifikuje.

1.4 Výskyt, vlastnosti a biologické účinky nitroderivátů polycyklických aromatických uhlovodíků

Nitrované polyaromáty jsou přítomny ve výfukových plynech naftových i benzínových motorů. V emisích z těchto motorů má hlavní zastoupení 1-nitropyren. Mezi další přítomné NPAH patří 3-nitrofluoranthren, 8-nitrofluoranthren, deriváty anthracenu, fluorenu, naftalenu, fenanthrenu a mnohé další^{23,25}. Tyto látky mohou vznikat již při spalovacím procesu nebo následnými reakcemi ve výfukovém systému. Jsou předpokládány dva druhy mechanismy vzniku, buď dochází k nitraci PAH kyselinou dusičnou anebo dochází k radikálové reakci PAH s NO^\bullet a NO_2^\bullet (ref. 24, 25).

Při analýze NPAH, přítomných ve výfukových plynech, jsou z kvantitativního hlediska nejvíce zastoupeny 1-nitropyren, 2-nitrofluoren a 3-nitrofluoranthren²⁵.

NPAH jsou známy svými mutagenními, genotoxickými a karcinogenními účinky²⁶. Mutagenita roste u nitrovaných NPAH s počtem přítomných nitroskupin. Obecně tedy síla mutagenních účinků stoupá od mononitro isomerů k dinitro isomerům a nejsilnější účinky vykazují trinitro isomery²⁷. Nejsilnějšími známými mutageny jsou 1,8-dinitropyren a 3-nitrobenzanthron²⁸. NPAH indukují chromosomální aberace a výměny sesterských chromatid v kultivovaných savčích buňkách. Mutagenita nitropolyaromátů souvisí s jejich redukcí na příslušné hydroxylaminoareny, dále následovanou O-esterifikací a tvorbou arylnitreniových iontů. Tyto ionty reagují s C-8 atomem guaninu v DNA za tvorby aduktu. NPAH, zvláště dinitroisomery, mají prokazatelné karcinogenní účinky na hlodavce a způsobují různé typy nádorů²⁷. Některé z těchto látek byly v IARC testovány z hlediska karcinogenity pro člověka a jsou zařazeny do skupiny 2B (látka je možný karcinogen) – kam patří i 1-nitropyren a 2-nitrofluoren, nebo skupiny 3 (karcinogenita nebyla jasně určena) – do této skupiny patří také 3-nitrofluoranthren²⁸.

1.5 Analytické metody pro stanovení nitrochinolinů a nitroderivátů polycyklických aromatických uhlovodíků

Elektrochemické metody stanovení jsou založeny na redukci nitroskupiny, popřípadě chinolinového skeletu.

Polarografií nitrochinolinů a jejich derivátů se zabýval Tachibana a kol.⁷, u 35 různých nitrochinolinů studovali vztah mezi hodnotou půlvlnového potenciálu a chemickou strukturou látek. Při studiu mechanismu redukce nitrochinolinů a jejich derivátů bylo zjištěno, že první dobře definovaná vlna spojená s výměnou 4 elektronů byla pozorována v rozmezí $-0,1$ V až $-0,5$ V a odpovídá redukci nitroskupiny na hydroxylamino skupinu u všech měřených nitrochinolinů. Další dvě vlny, které jsou spojeny s další redukcí na aminoskupinu a deoxidací N-oxid skupiny (u derivátů s N-oxid skupinou) jsou výrazně vzdáleny od první a dochází u nich k výměně dvou elektronů. Redukční potenciály jsou silně závislé na pH⁷.

Chinolinový skelet je také elektrochemicky redukovatelný, ale obtížněji než NO₂ skupina u monosubstituovaných nitrochinolinů²⁹⁻³⁴. Dochází u něj k redukci na dihydro a v druhém kroku na tetrahydrochinolin ve dvou dvouelektronových vlnách³¹.

Dále jsou známa H-NMR a C13-NMR spektra sedmi polohových isomerů nitrochinolinu včetně 5-NQ a odpovídajících N-oxidů, která byla změřena v rámci studie chemické karcinogenity a mutagenity³⁵.

Separační metody byly použity ke stanovení 5-NQ a 6-NQ spolu s dalšími NPAH. 5-NQ byl spolu se skupinou nitrovaných polyaromatických sloučenin detekován HPLC na reverzní fázi v mobilní fázi acetonitril-voda. Byly porovnávány tři druhy detekce: diodové pole (UV/VIS), fluorescenční a chemiluminiscenční. S diodovým polem bylo dosaženo detekční limitů mezi 2 až 12 ng vstříknuté látky. Fluorescenční a chemiluminiscenční detekce vykazovala větší citlivost a senzitivitu, bylo dosaženo mezí detekce 10 až 15 pg pro monosubstituované nitrosloučeniny³⁶.

Plynovou chromatografií byly při analýze nitrovaných polyaromatických sloučenin, včetně 5-NQ a 6-NQ, hodnoceny odezvy chemiluminiscenčního detektoru a porovnávány s detektorem plamenově-ionizačním a hmotnostním. Detektor měl lineární odezvu na většinu měřených látek v rozmezí 0,05 – 100 ng. Plynový

chromatogram s chemiluminiscenční detekcí specifickou na NO₂ skupiny ukázal, že řada nitrosloučenin byla přítomna v emisích naftových motorů³⁷.

Další práce se zabývala stanovením různých nitrovaných polyaromatických sloučenin včetně 5-NQ v emisích naftových motorů plynovou chromatografií na křemenné kapiláře s termoionizačním detektorem selektivním na N a P. Vzorky pro stanovení byly děleny HPLC. Pokusně bylo stanoveno 45 různých látek. Dosažené detekční limity se pohybují v rozmezí 0,2 až 0,5 ppm²³.

Směs nitrovaných polyaromatických sloučenin včetně 5-NQ byla dělena pomocí tenkovrstvé chromatografie na polyetylen-tereftalátovém filmu³⁸.

Pro rozdělení miligramových množství organických polárních látek, mezi nimi 5-NQ, byla vyvinuta metoda extrakce na tuhé fázi na kolonkách plněných silikagelem s vázanou kyanopropylovou skupinou³⁹.

2 Experimentální část

2.1 Reagencie

Zásobní roztoky 5-NQ a 6-NQ o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ pro voltametrické metody a FIA byly připraveny rozpuštěním $1,742 \cdot 10^{-2} \text{ g}$ čisté látky (99%, Sigma-Aldrich, Německo) ve 100 ml deionizované vody. Roztok chinolinu byl připraven rozpuštěním $1,292 \cdot 10^{-2} \text{ g}$ látky (96%, Sigma-Aldrich, Německo) ve 100 ml deionizované vody. Pro zvýšení rychlosti rozpouštění byla použita ultrazvuková lázeň. Roztoky o nižších molaritách byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku deionizovanou vodou.

Pro stanovení látek metodou HPLC byly použity zásobní roztoky následujících látek v methanolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$: 2-nitrofluoren (98%, Sigma-Aldrich, Německo), 3-nitrofluoranthren (90%, Sigma-Aldrich, Německo), 1-nitropyren (99%, Sigma-Aldrich, Německo) a 5-NQ (99%, Sigma-Aldrich, Německo).

Všechny roztoky byly uchovávány ve tmě za laboratorní teploty.

Další použité chemikálie: Kyselina boritá, kyselina octová, kyselina fosforečná, hydroxid sodný, chlorid draselný – čistota p.a. (Lachema Brno, ČR); methanol v chromatografické čistotě (Merck, Praha, ČR).

Brittonovy – Robinsonovy (BR) tlumivé roztoky o příslušném pH byly připraveny smísením $0,2 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$ s roztokem obsahujícím kyselinu boritou, fosforečnou a octovou, každou o koncentraci $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$.

Borátový pufr ($c = 0,05 \text{ mol.l}^{-1}$) byl připraven rozpuštěním $19,108 \text{ g}$ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$, v 1 l deionizované vody a upraven na pH 9,0 pomocí $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HCl}$.

Fosfátový pufr ($c = 0,01 \text{ mol.l}^{-1}$) byl připraven rozpuštěním $1,560 \text{ g}$ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ v 1 l deionizované vody a upraven na potřebné pH přidáním 85% kyseliny fosforečné nebo $0,2 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$.

Pro přípravu vodných roztoků byla používána deionizovaná voda (Millipore, Milli-Q plus systém, Millipore, USA). Veškeré používané roztoky byly uchovávány ve skleněných nádobách.

Přesná hodnota pH byla měřena digitálním pH metrem Jenway (Jenway, Essex,

Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou.

2.2 Aparatura

Při voltametrických technikách byla použita sestava Eco-Tribo Polarograf se softwarem PolarPro verze 5.0 (Eko-Trend Plus, ČR). Software pracoval v operačním systému Windows 3.11 (Microsoft Corp.).

Jednotlivá měření byla prováděna ve tříelektrodovém zapojení, kdy byla jako referentní použita elektroda argentchloridová typu RAE 113 (1 mol.l⁻¹ KCl) a jako pomocná elektroda byla použita platinová drátková elektroda (obě Monokrystaly, Turnov, ČR).

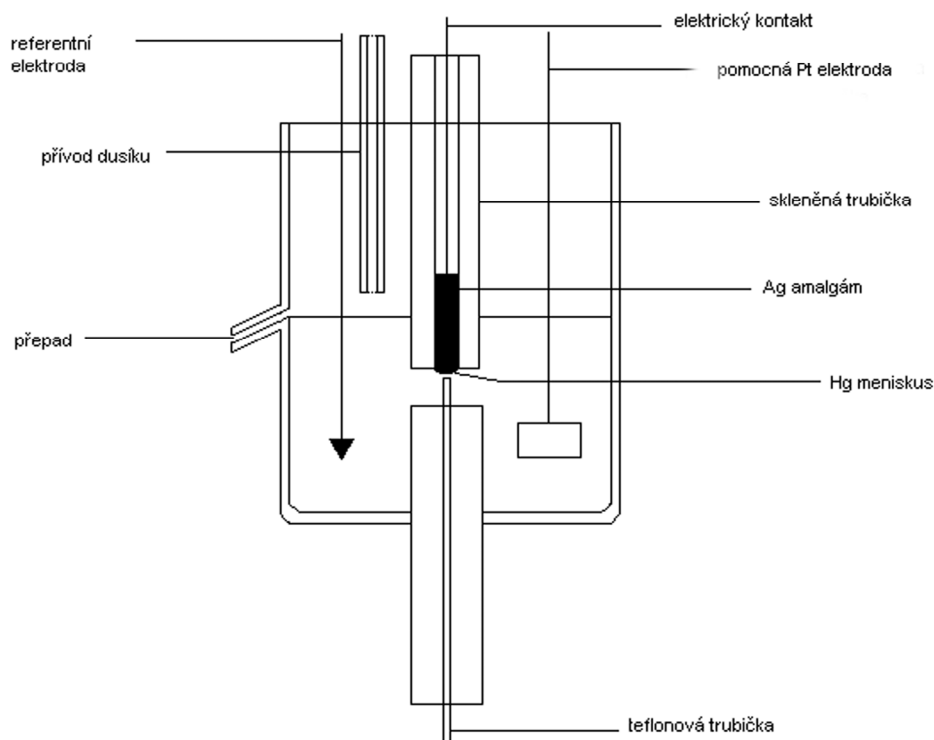
Při DPV byly na elektrody vkládány pulsy o šířce 100 ms a modulační amplitudě -50 mV. Při technice DPV i DCV byla použita rychlost nárůstu potenciálu 20 mV.s⁻¹.

Při měřeních s FIA aparaturou byl elektrochemický „wall-jet“ detektor (obr. 2.1) tvořen přepadovou nádobkou naplněnou nosným roztokem, s pracovní elektrodou pevně fixovanou proti ústí výtokové teflonové trubičky z FIA aparatury. Jako pracovní elektroda byla při FIA s elektrochemickou detekcí použita meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgámová elektroda. Jednotlivá měření byla prováděna stejně jako u polarografie a voltametrie v tříelektrodovém zapojení s referentní argentchloridovou elektrodou. Jako pomocná byla použita platinová drátková elektroda. Dále byla použita lineární pumpa (Laboratorní přístroje, Praha). Pro elektrochemickou detekci byl použit amperometrický detektor ADLC 2 (Laboratorní přístroje, Praha). Pro spektrofotometrickou detekci byl použit detektor LCD 2083 (ECOM, Praha). Kyveta spektrofotometrického detektoru měla objem 10 µl a optickou dráhu 5 mm. Výstupní napětí odpovídalo 5 V na 1 A.U. (1 mV = 2.10⁻⁴ A.U.). Signál byl sledován při vlnové délce $\lambda = 220$ nm. Pro sběr dat s frekvencí 4,17Hz (tj. 250 krát za 1 min) byl použit software CSW32 verze 1.4.11.06 firmy DataApex, Praha.

Při měření HPLC byl také použit elektrochemický „wall-jet“ detektor se stejným uspořádání elektrod jako při FIA měření. Aparatura HPLC sestávala z vysokotlaké gradientové pumpy L-2130, dávkovacího ventilu s 20 µl smyčkou a diode array detektoru (vše Hitachi, Japonsko). Součástí aparatury byla kolona KROMASIL (250 x 4,6 mm, velikost částic 7,0 µm, Phenomenex, USA) s chemicky navázanou C18 fází. Pro elektrochemickou detekci byl použit amperometrický detektor ADLC 2

(Laboratorní přístroje, ČR). Diode array detektor a elektrochemický detektor byly zapojeny za sebou. Signál byl sledován při vlnové délce $\lambda = 254$ nm. Jako ovládací software byl použit EZChrom Elite (Agilent Technologies, USA), pracující v operačním systému Windows XP (Microsoft Corporation).

Spektrofotometrická měření byla prováděna na přístroji Pye-Unicam SP8-400 UV/VIS spectrophotometer (Cambridge, Velká Británie) v křemenných kyvetách měrné tloušťky 1 mm a 1 cm.



Obr. 2.1

Schéma elektrochemického „wall jet“ detektoru¹⁰.

2.2.1 Použité pracovní elektrody

Pro studium chování 5-NQ a 6-NQ byla použita meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgámová elektroda (m-AgSAE). Byla používána AgSAE č. 2-05-16 vyrobená firmou Eko-Trend Plus, Praha. Průměr amalgámového disku elektrody byl 0,413 mm.

Při měření metodou FIA a HPLC byla jako pracovní elektroda použita velkoplošná stříbrná tuhá amalgámová elektroda modifikovaná rtuťovým meniskem (m-AgSAE). Průměr amalgámového disku byl 2,47 mm pro FIA a 2,84 mm pro HPLC. Všechny tyto typy elektrod byly vyvinuty v laboratoři ÚFCH JH AV ČR⁴⁰.

Elektrochemická příprava elektrod byla prováděna pomocí tři operací, kterými byl obnovován povrch elektrody.

Amalgamace: Ponořením elektrody do kapalné rtuti asi na 15 s se obnovil celý meniskus. Amalgamace byla prováděna vždy asi po jednom týdnu nebo po dlouhodobém přerušení práce.

Elektrochemická aktivace: Aktivace byla prováděna v roztoku $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ KCl, který nebyl probubláván dusíkem, vložením napětí $-2,2 \text{ V}$ po dobu 300 s. Při aktivaci docházelo k elektrochemickému čištění povrchu elektrody. Aktivace byla prováděna po amalgamací, při pasivovaném povrchu elektrody a při přerušení práce po dobu delší než jednu hodinu.

Regenerace: Tato operace byla prováděna v měřeném roztoku před každým skenem při současném bublání dusíkem. Na elektrodu byl střídavě vkládán kladnější potenciál E_{in} a zápornější potenciál E_{fin} v intervalech 0,1 s po dobu 30 s. Hodnoty E_{in} a E_{fin} byly určeny experimentálně tak, aby bylo dosaženo uspokojivé opakovatelnosti výšky píků. Zpravidla se nacházejí uvnitř dostupného potenciálového okna. Mohou se lišit v závislosti na složení základního elektrolytu a stanovované látky. Hodnoty potenciálů E_{in} a E_{fin} používané v případě studovaného 5-NQ a 6-NQ jsou pro jednotlivá pH uvedeny v tab. 2. 1.

Tab. 2. 1

Experimentálně nalezené optimální hodnoty regeneračních potenciálů pro m-AgSAE v prostředí BR pufru pro jednotlivá pH při stanovení 5-NQ a 6-NQ.

pH	E_{in} [mV]	E_{fm} [mV]
2,0	200	-1000
3,0	150	-1150
4,0	150	-1150
5,0	100	-1200
6,0	100	-1200
7,0	100	-1200
8,0	0	-1300
9,0	0	-1300
10,	-50	-1400
11,0	-50	-1600
12,0	-50	-1600
13,3	-50	-1600

2.3 Pracovní postupy

2.3.1 Voltametrická měření

Při voltametrických měřeních bylo do odměrné baňky na 10 ml odpipetováno 1 ml roztoku 5-NQ nebo 6-NQ o příslušné koncentraci a roztok byl doplněn po značku BR puftrem o příslušném pH. Slepý vzorek byl vždy připraven odpipetováním 1 ml deionizované vody a doplněním na 10 ml BR puftrem.

Takto připravený roztok byl po promíchání převeden do polarografické nádoby a zbaven kyslíku pětiminutovým probubláváním dusíkem. Poté byl po elektrochemické regeneraci proveden záznam voltametrické křivky. Před každým dalším záznamem byl roztok 30 s probubláván. Při cyklické voltametii byla elektrochemická regenerace prováděna před prvním cyklem.

Všechny křivky byly změřeny nejméně třikrát. Všechna měření probíhala za laboratorní teploty.

Pokud není uvedeno jinak, výška píku I_p při DPV A DCV studovaných analytů byla stanovena následujícím způsobem: Při hodnotě potenciálu píku byl odečten proud základního elektrolytu od proudu stanovované látky. Způsob je zobrazen na obr. 2.2.

2.3.2 Spektrofotometrická stanovení

UV/VIS spektra byla proměřena v křemenných kyvetách měrné tloušťky 1 mm pro koncentrace analytů 1.10^{-3} mol.l⁻¹, nebo v křemenných kyvetách měrné tloušťky 1 cm pro koncentrace 1.10^{-5} mol.l⁻¹, proti deionizované vodě (vodné roztoky) nebo proti methanolu (methanolicke roztoky) v rozsahu vlnových délek 190-600 nm. Všechny křivky byly měřeny třikrát, měření probíhala za laboratorní teploty.

2.3.3 Průtoková injekční analýza

Jako nosný roztok byl použit 0,05 mol.l⁻¹ borátový pufr o pH 9,0. Vzhledem k nutnosti minimalizovat přístup kyslíku do všech částí měřicího systému byla učiněna tato opatření: Nosný roztok byl před nasátím do lineárního čerpadla probubláván dusíkem. Při nasávání nosného roztoku do lineárního čerpadla byl dusík zaváděn nad roztok. V čerpadle byl roztok zbaven zbylého dusíku vytvořením podtlaku a následným vypuštěním uvolněného plynu. Dusíkem byl probubláván také prostor elektrochemického detektoru, během analýzy bylo bubláno nad roztok. Vzorky byly před nadávkováním probublány 5 min dusíkem.

Absorpční maximum pro spektrofotometrickou detekci $\lambda = 220$ nm bylo zvoleno ze spektra 1.10^{-3} mol.l⁻¹ 5-NQ v deionizované vodě (obr. 2.3).

Roztok byl dávkován pomocí šesticestného ventilu, který byl plněn skleněnou injekční stříkačkou o objemu 2 ml a 10 ml.

2.3.4 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Roztok dávkovaný na kolonu byl připraven smísením 1 ml zásobního roztoku 1-nitropyrenu, 2-nitrofluorenu, 3-nitrofluoranthenu, a 5-NQ v methanolu (všechny o koncentraci 1.10^{-3} mol.l⁻¹) do 10 ml odměrné baňky a doplněním po rysku mobilní fázi. Ta obsahovala 15 % fosfátového pufru ($c = 1.10^{-2}$ mol.l⁻¹) o pH 7,0 a 85 % methanolu. Kyslík byl ze systému odstraněn stejným způsobem jako při měření FIA

(kap. 2.3.3). Průtoková rychlost mobilní fáze byla $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Separované látky byly detekovány diode array detektorem při $\lambda = 254 \text{ nm}$ a ampérometrickým detektorem.

2.3.5 Modelové vzorky

Při stanovení 5-NQ metodou FIA byly použity modelové vzorky pitné a říční vody. Pitná voda byla odebrána z vodovodu v laboratoři č. 110 (Hlavova 8, Praha 2) na Katedře analytické chemie PřF UK. Říční voda byla odebrána z Vltavy v Praze na Výtoni. Říční voda byla přefiltrována filtrační sestavou s filtračním papírem MN GF-3 s velikostí pórů $0,6 \mu\text{m}$ (Macherey-Nagel, Německo).

Modelové vzorky byly připraveny v 10 ml odměrné baňce smísením potřebného množství zásobního roztoku 5-NQ v deionizované vodě se směsí deionizované a pitné (říční) vody, tak aby výsledný poměr deionizovaná voda : pitná (říční) voda byl 1:9.

2.3.6 Zpracování výsledků a statistické vyhodnocení získaných dat

Mez stanovitelnosti (L_{Q1}) byla u všech měření počítána s pomocí programu ADSTAT, který ji počítá jako nejmenší hodnotu signálu, pro kterou je relativní směrodatná odchylka predikce z kalibračního grafu dostatečně malá a rovná číslu 0,1^(ref. 41). Ve vybraných případech byla tato L_{Q1} porovnávána s mezí stanovitelnosti L_{Q2} počítána dle vztahu (L_{Q2}) = $10 s_c/b$, kde s_c je směrodatná odchylka získaná pro výšku píku při deseti opakovaných měřeních studované látky pro nejnižší dosaženou měřitelnou koncentraci a b je směrnice kalibrační závislosti⁴². Pro metodu HPLC byla mez stanovitelnosti vyhodnocena jako trojnásobek absolutní hodnoty šumu.

2.4 Stabilita zásobních roztoků

Stálost zásobních roztoků 5-NQ a 6-NQ o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ byla sledována spektrofotometricky v křemenných kyvetách dvojím způsobem. V kyvetách o měrné tloušťce 1 mm byla hodnota absorbance v absorpčním maximu pro 5-NQ při $\lambda_{max} = 220 \text{ nm}$ cca 2,7 a pro 6-NQ při $\lambda_{max} = 210 \text{ nm}$ byla cca 1,3 (obr. 2.3 a obr. 2.4). Tyto hodnoty absorbance jsou tedy v oblasti, kde již spektrofotometr neposkytuje zcela spolehlivé výsledky. Stálost těchto zásobních roztoků studovaných látek byla proto sledována současně při naředění na koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a sledováním absorbance v 1 cm kyvetách. Referentní kyveta byla vždy naplněna deionizovanou vodou.

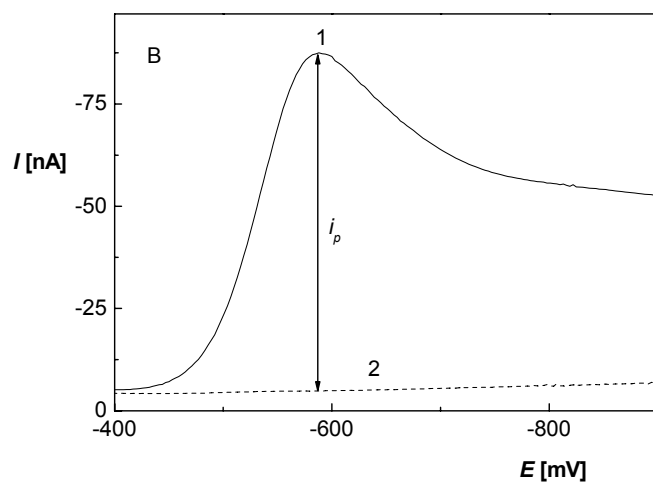
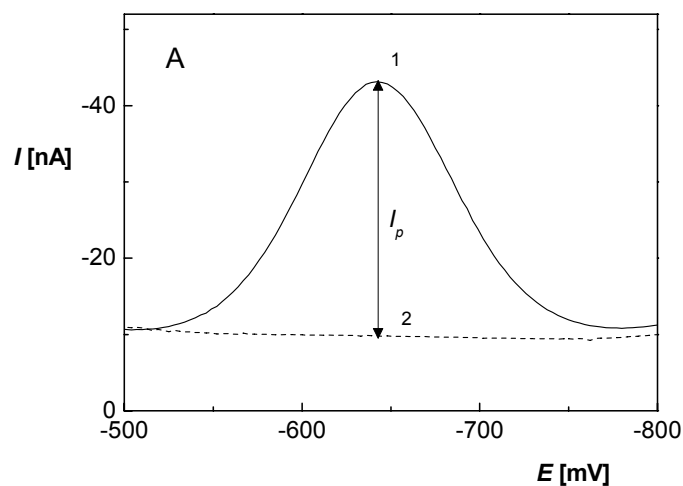
Vypočítané hodnoty molárního absorpčního koeficientu ϵ při $\lambda_{max} = 220$ nm je $\epsilon_{220} = 2,7 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro 5-NQ a pro 6-NQ při $\lambda_{max} = 210$ nm je $\epsilon_{210} = 1,3 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Výsledky sledování stálosti zásobních roztoků jsou uvedeny v tab. 2.2.

Je zřejmé, že v průběhu tří měsíců nedošlo k významnému poklesu absorbance studovaných látek. Dá se tedy předpokládat, že zásobní roztoky 5-NQ ($c = 1.10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$) a 6-NQ ($c = 1.10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$) je možno při skladování v temnu za laboratorní teploty považovat za stálé. Zásobní roztoky 1-nitropyrenu¹², 2-nitrofluorenu¹¹ a 3-nitrofluoranthenu¹³ v methanolu o koncentracích $c = 1.10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ jsou také stálé nejméně po dobu tří měsíců.

Tab. 2.2

Spektrofotometrické studium stálosti zásobních roztoků 5-NQ a 6-NQ o koncentraci $1.10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ přímo v 1 mm kyvetách a po naředění na koncentraci $1.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ v 1 cm kyvetách při $\lambda=220$ nm (5-NQ) a $\lambda=210$ nm (6-NQ). Číselné hodnoty udávají absorbanci A analyzovaného roztoku a relativní hodnotu absorbance A_{rel} v % proti hodnotě absorbance čerstvě připraveného roztoku.

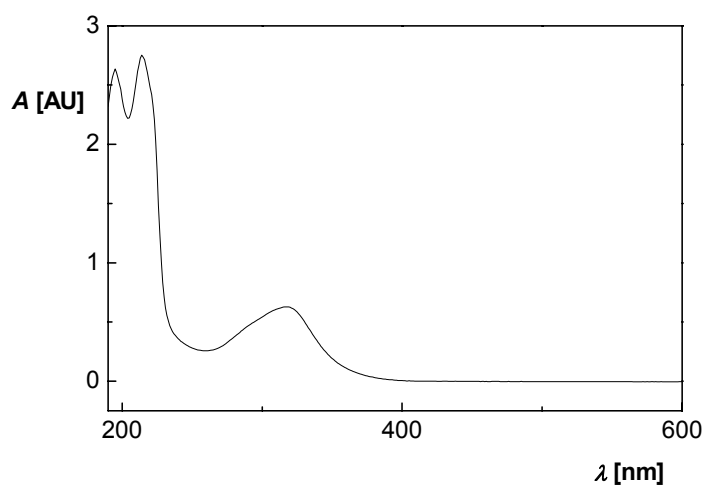
		5-NQ		6-NQ	
c [mol.l ⁻¹]		1.10 ⁻³	1.10 ⁻⁵	1.10 ⁻³	1.10 ⁻⁵
		A [A.U]/ A_{rel} [%]	A [A.U]/ A_{rel} [%]	A [A.U]/ A_{rel} [%]	A [A.U]/ A_{rel} [%]
dny	1	2,660/100,0	0,353/100,0	1,309/100,0	0,177/100,0
	2	2,786/104,7	0,353/100,3	1,314/100,4	0,178/100,5
	3	2,693/101,2	0,354/100,6	1,333/101,8	0,179/100,9
	5	2,728/102,6	0,355/107,4	1,363/104,1	0,182/103,1
	8	2,724/102,4	0,379/105,1	1,351/103,2	0,184/104,2
	30	2,745/103,2	0,371/104,5	1,361/104,0	0,181/102,2
	90	2,732/102,7	0,369/103,9	1,340/102,4	0,182/103,1



Obr. 2.2

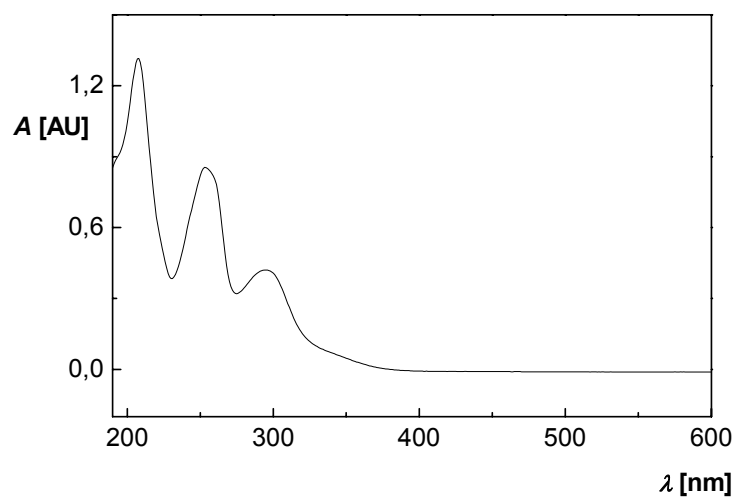
A: Způsob vyhodnocování DP voltamogramů při stanovení 6-NQ. Voltamogram 6-NQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) (1), voltamogram základního elektrolytu (2) v prostředí $0,01 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$. I_p – proud píku.

B: Způsob vyhodnocování DC voltamogramů při stanovení 6-NQ. Voltamogram 6-NQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) (1), voltamogram základního elektrolytu (2) v prostředí BR pufru o pH 7,0. I_p – proud píku.



Obr. 2.3

Absorpční spektrum roztoku 5-NQ ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$) ve vodě. Měřeno proti deionizované vodě v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 mm.



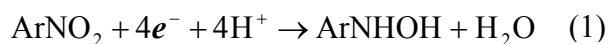
Obr. 2.4

Absorpční spektrum roztoku 6-NQ ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$) ve vodě. Měřeno proti deionizované vodě v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 mm.

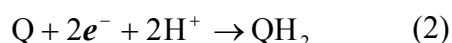
3 CYKLICKÁ VOLTAMETRIE 5-NQ A 6-NQ

Elektrochemické chování 5-NQ a 6-NQ na m-AgSAE bylo studováno pomocí cyklické voltametrie v kyselém, neutrálním a zásaditém prostředí. Cyklické voltamogramy byly zaznamenány od pozitivnějšího k negativnějšímu potenciálu a zpět. Pokud není uvedeno jinak, v grafech je znázorněn vždy první, druhý a 24. cyklus. Studovaná látka 6-NQ vykazovala obdobné elektrochemické chování jako 5-NQ.

Nejprve byly cyklické voltamogramy změřeny v kyselém prostředí, v BR pufru o pH 2,0 (obr. 3.1) a v neutrálním prostředí, v BR pufru o pH 7,0 (obr. 3.2). Na zaznamenaných voltamogramech první katodický pík p_c^1 , pravděpodobně odpovídá čtyřelektronové redukci nitro skupiny (ArNO_2) na hydroxylamino skupinu (ArNHOH), obdobně jako pro další NPAH na rtuťových elektrodách^{43,44}.

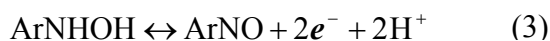


Přítomnost druhého katodického píku p_c^2 je spojena s dvouelektronovou redukcí chinolinového skeletu na dihydrochinolin dle rovnice:.



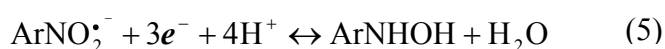
Na rtuťových elektrodách se může při negativnějších potenciálech dihydrochinolin redukovat dále na tetrahydrochinolin³¹. Tato redukce není při měření na m-AgSAE zřejmá z důsledku užšího potenciálového okna v katodické oblasti. Cyklický voltamogram redukce 5-NQ a chinolinu v neutrálním prostředí je porovnán na obr. 3.3.

Obě redukce (1) a (2) v kyselém a neutrálním prostředí jsou ireverzibilní, jak je možno vidět z reverzního anodického skenu. Anodický pík p_a^3 , který se vyskytuje od prvního cyklu blízko začátku potenciálového okna, je následován katodickým píkem p_c^3 , který se objevuje až od druhého cyklu (obr. 3.2). Tato dvojice píků p_a^3/p_c^3 odpovídá kvazireverzibilní oxidaci/redukci hydroxylamino skupiny na nitroso skupinu (ArNO) za účasti dvou elektronů:



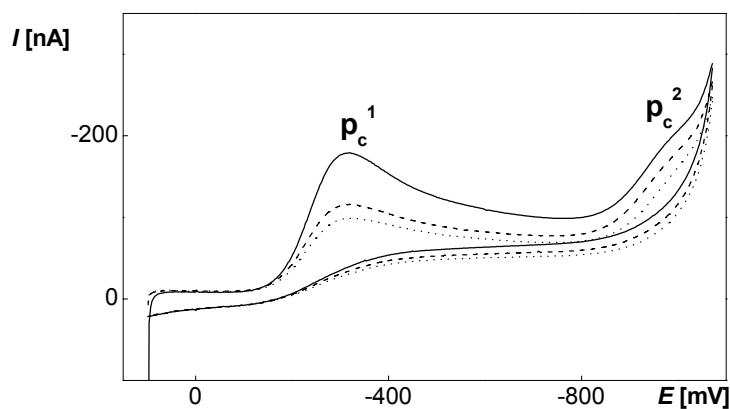
Tento pár píků není pozorován v kyselé oblasti, pravděpodobně z důsledku užšího potenciálového okna v anodické oblasti. V zásaditém prostředí (obr. 3.4) probíhá reakce (3) téměř reverzibilně, o čemž svědčí snižující se rozdíl potenciálů píků p_a^3/p_c^3 .

V zásaditém prostředí byl použit jako základní elektrolyt 0,01 mol.l⁻¹ NaOH. Voltamogramy v celém potenciálovém okně jsou znázorněny na obr. 3.4. Redukce (1) je v zásaditém prostředí rozdělena do dvou kroků. V prvním kroku dochází k jednoelektronové redukci za vzniku radikálu ArNO₂^{•-} (rovnice 4; pík p_c^{1a}), ve druhém kroku dochází k tří elektronové redukci ArNO₂^{•-} na hydroxylamino skupinu (rovnice 5; pík p_c^{1b}):



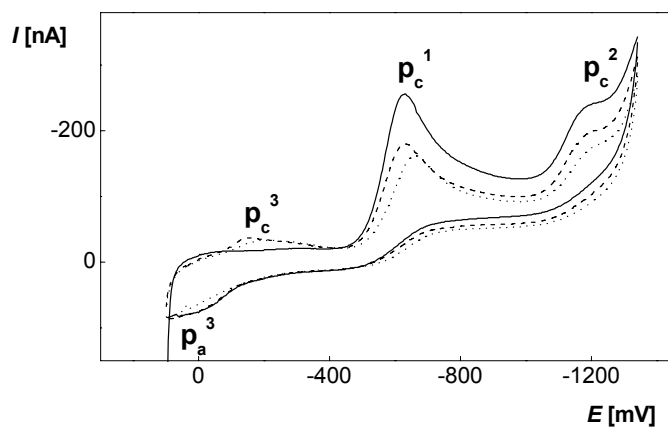
Tyto dva píky jsou opět následovány píkem p_c², který je důsledkem dvouelektronové redukce chinolinového skeletu.

Na zvyšující se reverzibilitu ArNO₂ / ArNO₂^{•-} systému při studiu 5-NQ poukazuje zvýšení výšky píků páru p_c^{1a}/p_c^{1b} při obrácení směru polarizace hned za jednoelektronovou redukcí ArNO₂ / ArNO₂^{•-}, tj. za píkem p_c^{1a}, jak dokládá obr. 3.5. Rozdělení čtyřelektronové redukce nitroskupiny na hydroxylamino skupinu (1) na jedno a tříelektronový proces (rovnice 4 a 5) v zásaditém prostředí bylo popsáno i pro další pevné elektrody⁴⁵ či pro redukci nitroaromátů na rtuťových elektrodách v přítomnosti surfaktantů^{46,47}.



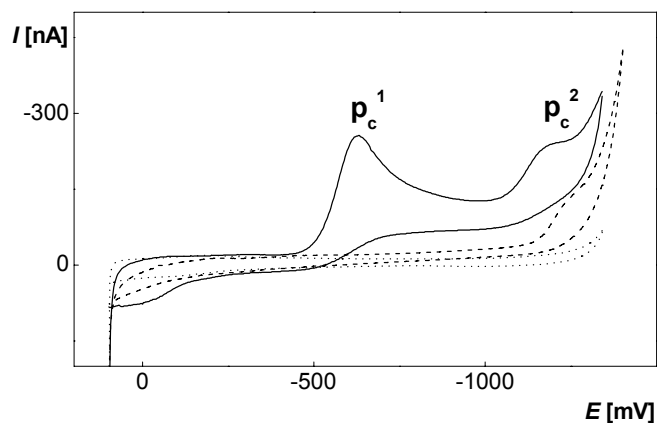
Obr. 3.1

Cyklický voltamogram 5-NQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$) na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 2,0. Znázorněn první, druhý a 24. cyklus. p_c^1 – první katodický pík, p_c^2 – druhý katodický pík.



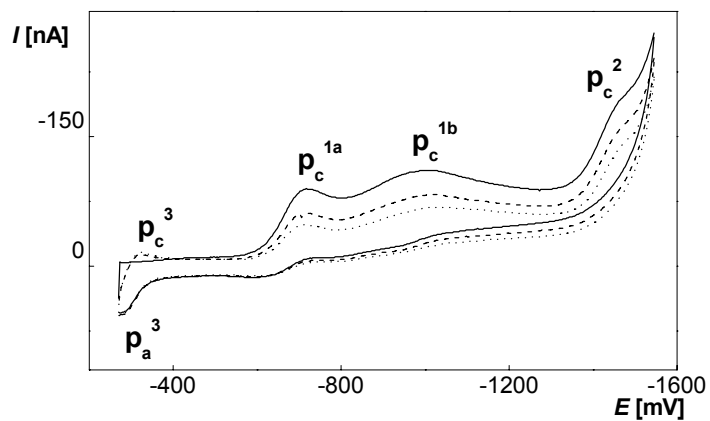
Obr. 3.2

Cyklický voltamogram 5-NQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$) na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 7,0. Znázorněn první, druhý a 24. cyklus. p_c^1 – první katodický pík, p_c^2 – druhý katodický pík, p_c^3 – třetí katodický pík, p_a^3 – třetí anodický pík.



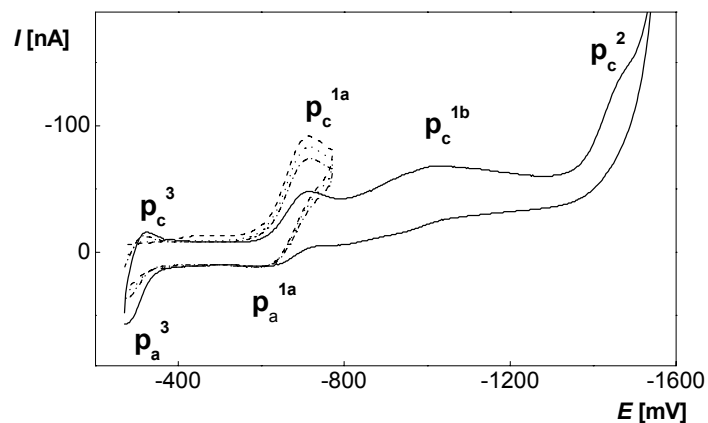
Obr. 3.3

Cyklický voltamogram 5-NQ (—), ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$), chinolinu (- - -), ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) a základního elektrolytu (.....) na *m*-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 7,0. Znáznorněn první cyklus. p_c^1 – první katodický pík, p_c^2 – druhý katodický pík..



Obr. 3.4

Cyklický voltamogram 5-NQ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na *m*-AgSAE v prostředí 0,01 mol.l^{-1} NaOH. Znáznorněn první, druhý a 24. cyklus. p_c^{1a} – první katodický pík a, p_c^{1b} – první katodický pík b, p_c^2 – druhý katodický pík, p_c^3 – třetí katodický pík, p_a^3 – třetí anodický pík.



Obr. 3.5

Cyklický voltamogram 5-NQ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) na m-AgSAE v prostředí 0,01 mol.L⁻¹ NaOH. Plnou čarou je znázorněn cyklický voltamogram v celém potenciálovém okně, přerušovanou čarou je znázorněn cyklický voltamogram pouze za první pík (znázorněn první, druhý a 24. cyklus). p_c^{1a} – první katodický pík a, p_c^{1b} – první katodický pík b, p_a^{1a} – první anodický pík, p_c^2 – druhý katodický pík, p_c^3 – třetí katodický pík, p_a^3 – třetí anodický pík.

4 VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ 5-NQ a 6-NQ

4.1 DC voltametrie

4.1.1 Vliv pH

Vliv pH na chování 6-NQ a 5-NQ (obě látky o koncentraci $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) při DCV na m-AgSAE byl sledován v prostředí BR pufru o pH 2,0 až 11,0, dále v prostředí $0,01 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$ a $0,2 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$. Obě studované látky poskytují v závislosti na pH 2 – 3 píky. První hlavní redukční pík odpovídá redukci nitroskupiny na hydroxylamino skupinu (p_c^1 , rovnice 1, kap.3) či v zásaditém prostředí na nitroradikál anion (p_c^{1a} , rovnice 4, kap.3). S výjimkou $0,2 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$ (pH 13,3) je také vždy v oblasti katodického rozkladu základního elektrolytu naznačen pík redukce chinolinového skeletu (p_c^2 , rovnice 2, kap. 3). V zásaditých prostředích při pH vyšším než 8,0 látka poskytuje třetí pík s potenciálem píku E_p cca 1000 – 1050 mV odpovídající redukci ArNO_2^- (p_c^{1b} , rovnice 5, kap.3). Zaznamenané voltamogramy 5-NQ 6-NQ v prostředí BR pufru o vybraných pH jsou zobrazeny na obr. 4.1.

Zjištěné závislosti potenciálu píků E_p a proudu píků I_p na pH roztoku jsou uvedeny pro 6-NQ v tab. 4.1 a pro 5-NQ uvedeny v tab. 4.2. Pro 6-NQ je graficky znázorněna závislost E_p na pH na obr. 4.2 a závislost I_p na pH na obr. 4.3.

Pro 6-NQ byl metodou lineární regrese pro závislost potenciálu E_p hlavního píku na pH v rozmezí 2,0 – 8,0 vypočten následující vztah:

$$E_p^1 [\text{mV}] = -67,2 \text{ pH} - 71,8 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9584).$$

Pro 5-NQ byl metodou lineární regrese pro závislost potenciálu E_p hlavního píku na pH v rozmezí 2,0 – 7,0 vypočten následující vztah:

$$E_p^1 [\text{mV}] = -65,8 \text{ pH} + 29,2 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9902).$$

Pro 6-NQ byl jako optimální prostředí zvolen $0,01 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$. V tomto prostředí 6-NQ poskytoval nejvyšší a nejlépe vyvinutý pík. Optimálním prostředím pro 5-NQ byl zvolen BR pufr o pH 9,0. V tomto prostředí 5-NQ poskytoval nejvyšší a nejlépe vyvinutý pík. Poté bylo provedeno měření roztoku 5-NQ v prostředí $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ borátového pufru o pH 9,0. Tento krok byl proveden pro zjednodušení základního elektrolytu, protože BR pufr obsahuje jako jednu ze složek kyselinu boritou.

5-NQ v tomto prostředí poskytoval obdobnou voltametrickou odezvu jako v BR pufru o pH 9,0, proto byl tento pufr dál používán.

4.1.2 Koncentrační závislosti

Koncentrační závislosti pro 6-NQ byly proměřeny metodou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 7,0. Koncentrační závislosti pro 5-NQ byly proměřeny metodou DCV na m-AgSAE v prostředí 0,05 mol.l⁻¹ o pH 9,0. Obě tyto látky byly proměřeny v koncentračním rozmezí (4-10).10⁻⁷ mol.l⁻¹, (2-10).10⁻⁶ mol.l⁻¹ a (2-10).10⁻⁵ mol.l⁻¹. Zaznamenané voltamogramy pro 6-NQ jsou znázorněny na obr. 4.4. a na obr. 4.5.

Při těchto měřeních byl sledován pouze první pík, odpovídající redukci (1) (kap. 3). Pík redukce chinolinového skeletu (p_c², rovnice 2, kap. 3) je v tomto prostředí pouze naznačen, leží v oblasti rozkladu základního elektrolytu a je tudíž nevyužitelný pro kvantitativní analýzu. Graf závislosti *I_p* na koncentraci 6-NQ v rozmezí (2-10).10⁻⁵ mol.l⁻¹ je na obr. 4.6, v rozmezí (2-10).10⁻⁶ mol.l⁻¹ na obr. 4.7 a v rozmezí (4-10).10⁻⁷ mol.l⁻¹ na obr. 4.8. Závislost výšky píků na koncentraci je lineární v celém měřeném rozsahu. Parametry kalibračních závislostí jsou pro 6-NQ uvedeny v tab. 4.3 a pro 5-NQ jsou uvedeny v tab.4.4.

Výška píku *I_p* 6-NQ pro nejnižší dosaženou koncentraci *c* = 4.10⁻⁷ mol.l⁻¹ byla pro 10 následných stanovení rovna (0,10 ± 0,06) nA, hodnota RSD = 1,69 %. Mez stanovitelnosti *L_{Q2}* = 5,0.10⁻⁷ mol.l⁻¹, vypočítaná ze směrodatné odchylky *s_c* tohoto stanovení (kap. 2.3.6) je řádově srovnatelná s mezí stanovitelnosti *L_{Q1}* = 6,0.10⁻⁷ mol.l⁻¹ (vypočtena programem ADSTAT).

Výšky píku *I_p* 5-NQ pro nejnižší dosaženou koncentraci *c* = 4.10⁻⁷ mol.l⁻¹ byla pro 10 následných stanovení rovna (1,44 ± 0,16) nA, hodnota RSD = 9,31 %. Mez stanovitelnosti *L_{Q2}* = 7,3.10⁻⁷ mol.l⁻¹, vypočítaná ze směrodatné odchylky *s_c* tohoto stanovení (kap. 2.3.6) je řádově srovnatelná s mezí stanovitelnosti *L_{Q1}* = 5,0.10⁻⁷ mol.l⁻¹ (vypočtena programem ADSTAT).

Tab. 4.1

Vliv pH na potenciál píku E_p a proud píku I_p 6-NQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$). Měřeno na m-AgSAE v prostředí BR pufru a v prostředí 0,01 mol.l⁻¹ NaOH a 0,2 mol.l⁻¹ NaOH.

pH	E_p^1 [mV]	E_p^2 [mV]	E_p^3 [mV]	I_p^1 [nA]	I_p^2 [nA]	I_p^3 [nA]
2,0	-259	- ^a	- ^b	-40,25	- ^a	- ^b
3,0	-291	- ^a	- ^b	-45,22	- ^a	- ^b
4,0	-358	- ^a	- ^b	-44,75	- ^a	- ^b
5,0	-414	- ^a	- ^b	-49,00	- ^a	- ^b
6,0	-530	- ^a	- ^b	-42,51	- ^a	- ^b
7,0	-572	- ^a	- ^b	-55,18	- ^a	- ^b
8,0	-673	- ^a	- ^b	-49,95	- ^a	- ^b
9,0	-688	- ^a	- ^b	-33,08	- ^a	- ^b
10,0	-746	-1050	- ^b	-19,34	-34,74	- ^b
11,0	-714	-1008	- ^b	-17,78	-36,95	- ^b
12,0 ^c	-750	-1008	- ^b	-20,17	-40,86	- ^b
13,3 ^d	-752	-1059	- ^a	-20,10	-34,91	- ^a

^a – pík není přítomen, ^b – pík špatně vyhodnotitelný, ^c – 0,01 mol.l⁻¹ NaOH

^d – 0,2 mol.l⁻¹ NaOH

^p^{1,2,3} – indexy vztahující se k prvnímu, druhému a třetímu píku

^p¹ odpovídá hlavnímu redukčnímu píku p_c^1 v kyselém a neutrálním a p_c^{1a} v zásaditém prostředí;

^p² odpovídá píku p_c^{1b} v zásaditém prostředí a ^p³ odpovídá píku p_c^2 .

Tab. 4.2

Vliv pH na potenciál píku E_p a proud píku I_p 5-NQ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$). Měřeno na m-AgSAE v prostředí BR pufru a v prostředí $0,01 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$.

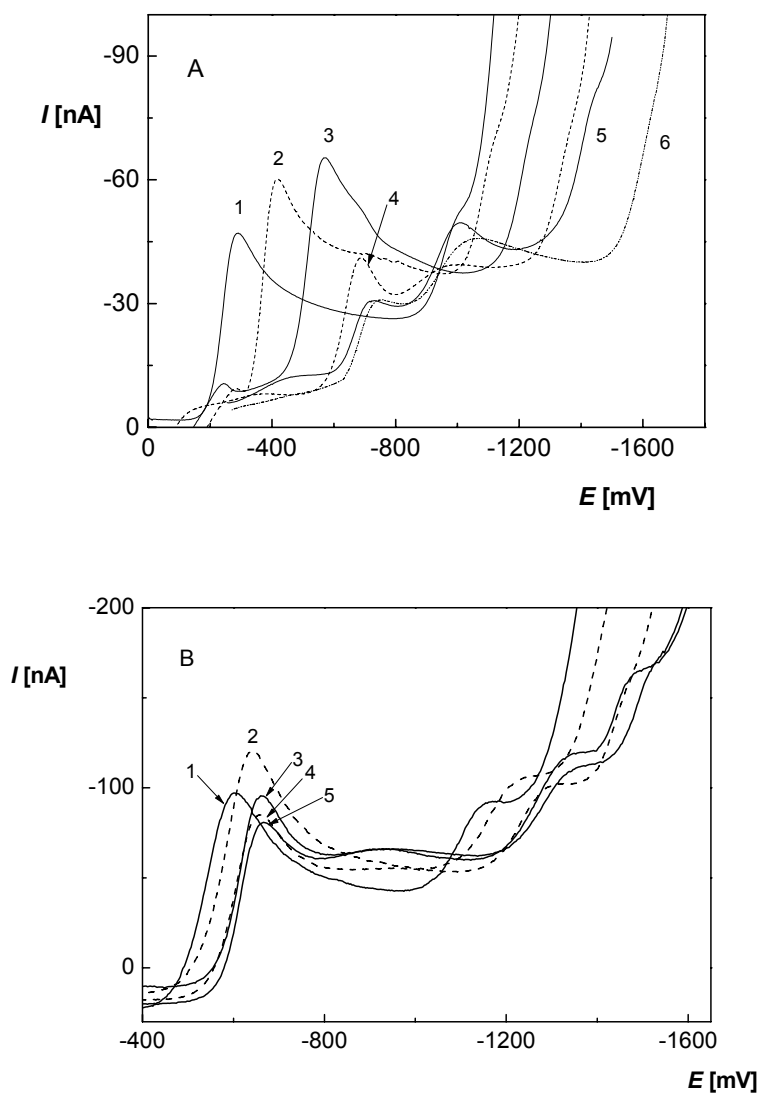
pH	E_p^1 [mV]	E_p^2 [mV]	E_p^3 [mV]	I_p^1 [nA]	I_p^2 [nA]	I_p^3 [nA]
2,0	-158	– ^a	– ^b	-68,38	– ^a	– ^b
3,0	-221	– ^a	– ^b	-84,28	– ^a	– ^b
4,0	-320	– ^a	– ^b	-113,60	– ^a	– ^b
5,0	-389	– ^a	– ^b	-112,50	– ^a	– ^b
6,0	-455	– ^a	– ^b	-92,31	– ^a	– ^b
7,0	-509	– ^a	– ^b	-97,77	– ^a	– ^b
8,0	-602	– ^b	– ^b	-97,05	– ^b	– ^b
9,0	-638	-1168	– ^b	-120,4	-53,42	– ^b
10,0	-659	-1255	– ^b	-84,21	-45,33	– ^b
11,0	-659	-1315	– ^b	-95,49	-49,24	– ^b
12,0 ^c	-662	-1416	– ^b	-82,93	-60,43	– ^b

^a – pík není přítomen, ^b – pík špatně vyhodnotitelný, ^c – $0,01 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$

$p^{1,2,3}$ – indexy vztahující se k prvnímu, druhému a třetímu píku

p^1 odpovídá hlavnímu redukčnímu píku p_c^1 v kyselém a neutrálním a p_c^{1a} v zásaditém prostředí;

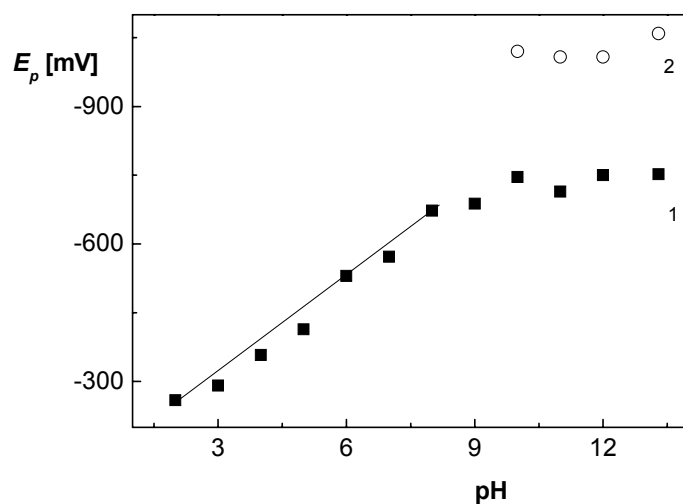
p^2 odpovídá píku p_c^{1b} v zásaditém prostředí a p^3 odpovídá píku p_c^2 .



Obr. 4.1

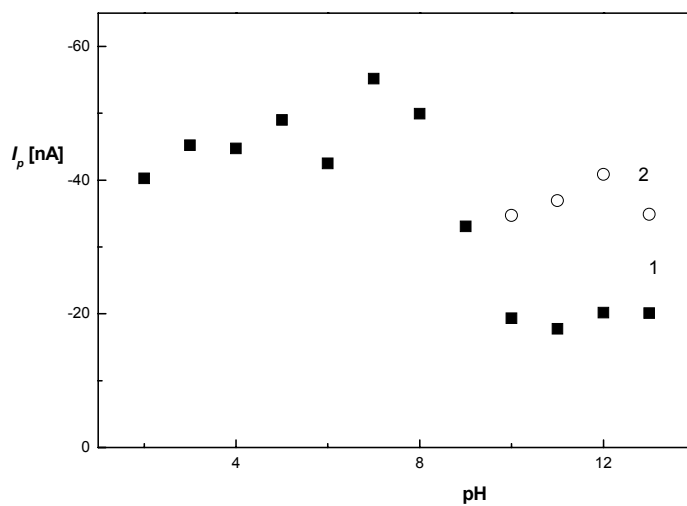
A: Voltamogramy 6-NQ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) měřené technikou DCV na $m\text{-AgSAE}$ v prostředí BR pufru o pH 3,0 (1); 5,0 (2); 7,0 (3); 9,0 (4); 11,0 (5); a v prostředí $0,2 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$ (6).

B: Voltamogramy 5-NQ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) měřené technikou DCV na $m\text{-AgSAE}$ v prostředí BR pufru o pH 8,0 (1); 9,0 (2); 10,0 (3); 11,0 (4); 12,0 (5).



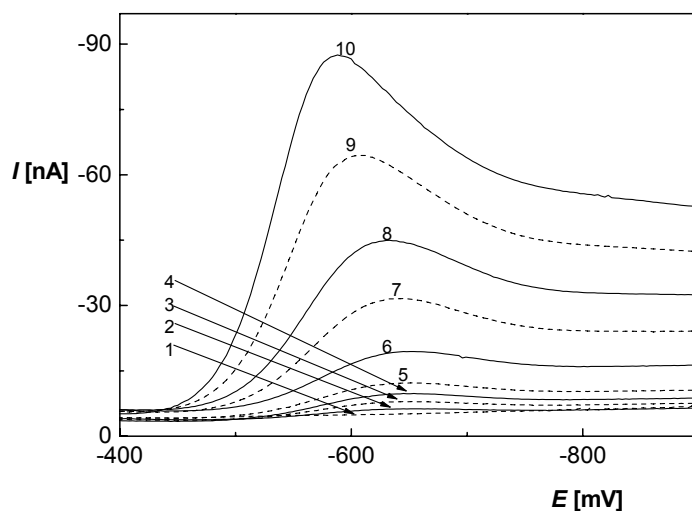
Obr. 4.2

Závislost potenciálu píku E_p 6-NQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pH základního elektrolytu pro dobře vyhodnotitelné píky dle tab. 4.1. Měřeno technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufru, $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaOH}$ a $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaOH}$. 1 – první pík; 2 – druhý pík.



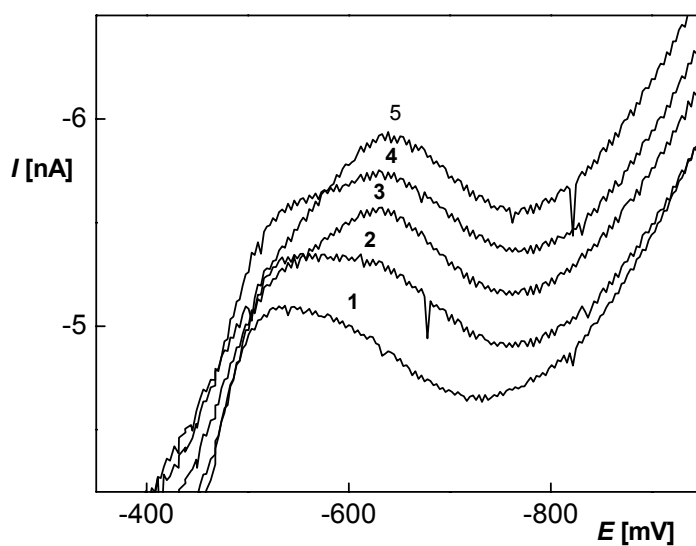
Obr. 4.3

Závislost proudu píku I_p 6-NQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pH základního elektrolytu pro dobře vyhodnotitelné píky dle tab. 4.1. Měřeno technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufru, $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaOH}$ a $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaOH}$. 1 – první pík; 2 – druhý pík.



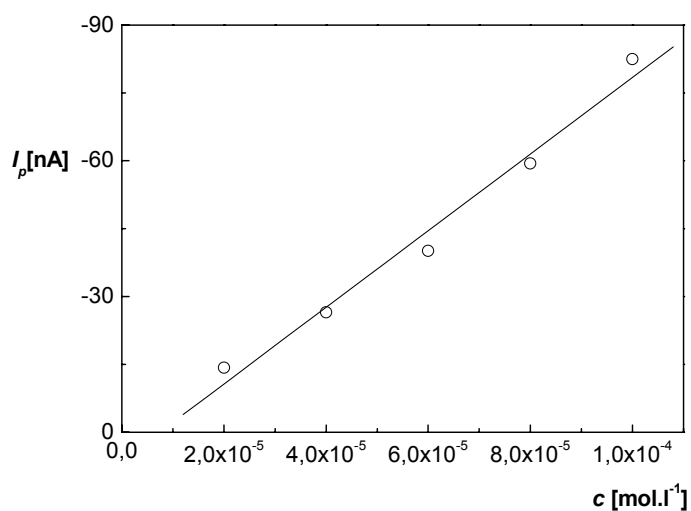
Obr. 4.4

Voltamogramy 6-NQ měřené technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 7,0. Koncentrace (6-NQ) [mol.l⁻¹]: 2.10⁻⁶ (1); 4.10⁻⁶ (2); 6.10⁻⁶ (3); 8.10⁻⁶ (4); 1.10⁻⁵ (5); 2.10⁻⁵ (6); 4.10⁻⁵ (7); 6.10⁻⁵ (8); 8.10⁻⁵ (9); 1.10⁻⁴ (10).



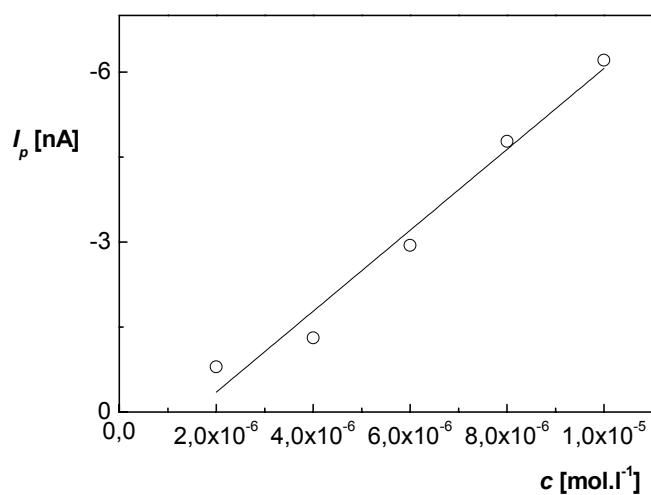
Obr. 4.5

Voltamogramy 6-NQ měřené technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 7,0 v nejnižším koncentračním rozmezí. Koncentrace (6-NQ) [mol.l⁻¹]: 0 (1); 4.10⁻⁷ (2); 6.10⁻⁷ (3); 8.10⁻⁷ (4); 1.10⁻⁵ (5).



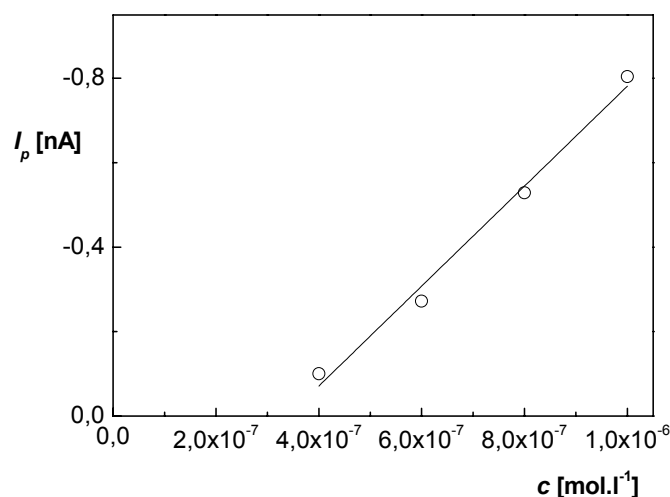
Obr. 4.6

Závislost proudu píku I_p na koncentraci 6-NQ v rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-5}$ mol.l⁻¹. Měřeno technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 7,0.



Obr. 4.7

Závislost proudu píku I_p na koncentraci 6-NQ v rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹. Měřeno technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 7,0.



Obr. 4.8

Závislost proudu píku I_p na koncentraci 6-NQ v rozmezí $(4-10) \cdot 10^{-7}$ mol.l⁻¹. Měřeno technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 7,0.

Tab. 4.3

Parametry kalibračních závislostí 6-NQ. Měřeno technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 7,0.

Koncentrace [mol.l ⁻¹]	Úsek [nA]	Směrnice [nA.mol ⁻¹ .l]	Korelační koeficient	L_{Q1} [mol.l ⁻¹]	L_{Q2} [mol.l ⁻¹]
$(2-10) \cdot 10^{-5}$	6,2	$-8,5 \cdot 10^5$	0,9907	-	-
$(2-10) \cdot 10^{-6}$	1,1	$-7,2 \cdot 10^5$	0,9871	-	-
$(4-10) \cdot 10^{-7}$	0,4	$-1,2 \cdot 10^6$	0,9950	$6,0 \cdot 10^{-7}$	$5,0 \cdot 10^{-7}$

Tab. 4.4

Parametry kalibračních závislostí 5-NQ. Měřeno technikou DCV na m-AgSAE v prostředí 0,05 mol.l⁻¹ borátového pufru o pH 9,0.

Koncentrace [mol.l ⁻¹]	Úsek [nA]	Směrnice [nA.mol ⁻¹ .l]	Korelační koeficient	L_{Q1} [mol.l ⁻¹]	L_{Q2} [mol.l ⁻¹]
$(2-10) \cdot 10^{-5}$	-0,8	$-1,2 \cdot 10^5$	0,9975	-	-
$(2-10) \cdot 10^{-6}$	1,3	$-1,3 \cdot 10^5$	0,9993	-	-
$(4-10) \cdot 10^{-7}$	2,3	$-2,2 \cdot 10^6$	0,9931	$5,0 \cdot 10^{-7}$	$7,3 \cdot 10^{-7}$

4.2 Diferenční pulsní voltametrie

4.2.1 Vliv pH

Vliv pH na chování 6-NQ a 5-NQ (obě látky o koncentraci $c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) při DPV na m-AgSAE byl sledován v prostředí BR pufru o pH 2,0 až 11,0, dále v prostředí $0,01 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$ a $0,2 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$. Obdobně jako při DCV obě studované látky poskytují v závislosti na pH 2 – 3 píky. První hlavní redukční pík odpovídá redukci nitroskupiny na hydroxylamino skupinu (p_c^1 , rovnice 1, kap.3) či v zásaditém prostředí na nitroradikál anion (p_c^{1a} , rovnice 4, kap.3). S výjimkou $0,2 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$ (pH 13,3) je také vždy v oblasti katodického rozkladu základního elektrolytu naznačen pík redukce chinolinového skeletu (p_c^2 , rovnice 2, kap. 3). V zásaditých prostředích při pH vyšším než 8,0 látka poskytuje třetí pík s potenciálem píku E_p cca 900 – 950 mV odpovídající redukci ArNO_2^- (p_c^{1b} , rovnice 5, kap.3). Zaznamenané voltamogramy 5-NQ 6-NQ v prostředí BR pufru o vybraných pH jsou zobrazeny na obr. 4.9.

Zjištěné závislosti potenciálu píků E_p a proudu píků I_p na pH roztoku jsou uvedeny pro 6-NQ v tab. 4.5 a pro 5-NQ uvedeny v tab. 4.6. Pro 6-NQ je graficky znázorněna závislost E_p na pH na obr. 4.10 a závislost I_p na pH na obr. 4.11.

Pro 6-NQ byl metodou lineární regrese pro závislost potenciálu E_p hlavního píku na pH v rozmezí 2,0 – 8,0 vypočten následující vztah:

$$E_p^1 [\text{mV}] = -65,5 \text{ pH} - 110,7 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9844).$$

Pro 5-NQ byl metodou lineární regrese pro závislost potenciálu E_p hlavního píku na pH v rozmezí 2,0 – 7,0 vypočten následující vztah:

$$E_p^1 [\text{mV}] = -73,0 \text{ pH} + 14,3 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9948).$$

Při vyšších pH než 10,0 je E_p na pH nezávislé. To svědčí o protonizaci probíhající až za rychlost určujícím krokem redukce v rovnici (4; kap.3) a rovnici (5; kap. 3). Pro 6-NQ byl jako optimální prostředí zvolen BR pufr o pH 7,0. V tomto prostředí 6-NQ poskytoval nejvyšší a nejlépe vyvinutý pík. Optimálním prostředím pro 5-NQ byl zvolen BR pufr o pH 9,0. V tomto prostředí 5-NQ poskytoval nejvyšší a nejlépe vyvinutý pík. Poté bylo provedeno měření roztoku 5-NQ v prostředí $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ borátového pufru o pH 9,0. Tento krok byl proveden pro zjednodušení

základního elektrolytu, protože BR pufr obsahuje jako jednu ze složek kyselinu boritou. 5-NQ v tomto prostředí poskytoval obdobnou voltametrickou odezvu jako v BR pufru o pH 9,0, proto byl tento pufr dál používán.

4.2.2 Koncentrační závislosti

Koncentrační závislosti pro 6-NQ byly proměřeny metodou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 7,0. Koncentrační závislosti pro 5-NQ byly proměřeny metodou DPV na m-AgSAE v prostředí $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ o pH 9,0. Obě tyto látky byly proměřeny v koncentračním rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$, $(2-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ a $(2-10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$. Zaznamenané voltamogramy pro 6-NQ jsou znázorněny na obr. 4.12. a na obr. 4.13.

Při těchto měřeních byl sledován pouze první pík, odpovídající redukci (1) (kap. 3). Pík redukce chinolinového skeletu (p_c^2 , rovnice 2, kap. 3) je v tomto prostředí pouze naznačen, leží v oblasti rozkladu základního elektrolytu a je tudíž nevyužitelný pro kvantitativní analýzu. Graf závislosti I_p na koncentraci 6-NQ v rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ je na obr. 4.14, v rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ na obr. 4.15 a v rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ na obr. 4.16. Závislost výšky píků na koncentraci je lineární v celém měřeném rozsahu. Parametry kalibračních závislostí jsou pro 6-NQ uvedeny v tab. 4.7 a pro 5-NQ jsou uvedeny v tab.4.8. Po změření koncentračního rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ pro 6-NQ byl na elektrodě vytvořen nový meniskus, proto se směrnice vyššího a obou nižších koncentračních řádů výrazně liší.

Výška píku I_p 6-NQ pro nejnižší dosaženou koncentraci $c = 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ byla pro 10 následných stanovení rovna $(0,30 \pm 0,03) \text{ nA}$, hodnota RSD = 9,22 %. Mez stanovitelnosti $L_{Q2} = 3,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$, vypočítaná ze směrodatné odchylky s_c tohoto stanovení (kap. 2.3.6) je řádově srovnatelná s mezí stanovitelnosti $L_{Q1} = 3,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ (vypočtena programem ADSTAT).

Výšky píku I_p 5-NQ pro nejnižší dosaženou koncentraci $c = 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ byla pro 10 následných stanovení rovna $(1,68 \pm 0,15) \text{ nA}$, hodnota RSD = 8,89 %. Mez stanovitelnosti $L_{Q2} = 4,8 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$, vypočítaná ze směrodatné odchylky s_c tohoto stanovení (kap. 2.3.6) je řádově srovnatelná s mezí stanovitelnosti $L_{Q1} = 3,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ (vypočtena programem ADSTAT).

Tab. 4.5

Vliv pH na potenciál píku E_p a proudu píku I_p , měřeno 6-NQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) měřeno na m-AgSAE v prostředí BR pufru, $0,01 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$ a $0,2 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$.

pH	E_p^1 [mV]	E_p^2 [mV]	E_p^3 [mV]	I_p^1 [nA]	I_p^2 [nA]	I_p^3 [nA]
2,0	-211	- ^a	- ^b	-16,3	- ^a	- ^b
3,0	-241	- ^a	- ^b	-19,2	- ^a	- ^b
4,0	-304	- ^a	- ^b	-20,3	- ^a	- ^b
5,0	-468	- ^a	- ^b	-14,1	- ^a	- ^b
6,0	-511	- ^a	- ^b	-19,7	- ^a	- ^b
7,0	-538	- ^a	- ^b	-34,0	- ^a	- ^b
8,0	-610	- ^a	- ^b	-35,5	- ^a	- ^b
9,0	-647	- ^b	- ^b	-34,3	- ^b	- ^b
10,0	-648	-950	- ^b	-21,2	-10,6	- ^b
11,0	-657	-945	- ^b	-26,2	-13,2	- ^b
12,0 ^c	-640	-932	- ^b	-27,1	-15,0	- ^b
13,3 ^d	-635	-906	- ^a	-41,9	-12,1	- ^a

^a – pík není přítomen, ^b – pík špatně vyhodnotitelný, ^c – $0,01 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$

^d – $0,2 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$

$p^{1,2,3}$ – indexy vztahující se k prvnímu, druhému a třetímu píku

p^1 odpovídá hlavnímu redukčnímu píku p_c^1 v kyselém a neutrálním a p_c^{1a} v zásaditém prostředí;

p^2 odpovídá píku p_c^{1b} v zásaditém prostředí a p^3 odpovídá píku p_c^2 .

Tab. 4.6

Vliv pH na potenciál píku E_p a proudu píku I_p , měřeno 5-NQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) měřeno na m-AgSAE v prostředí BR pufru, $0,01 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$ a $0,2 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$.

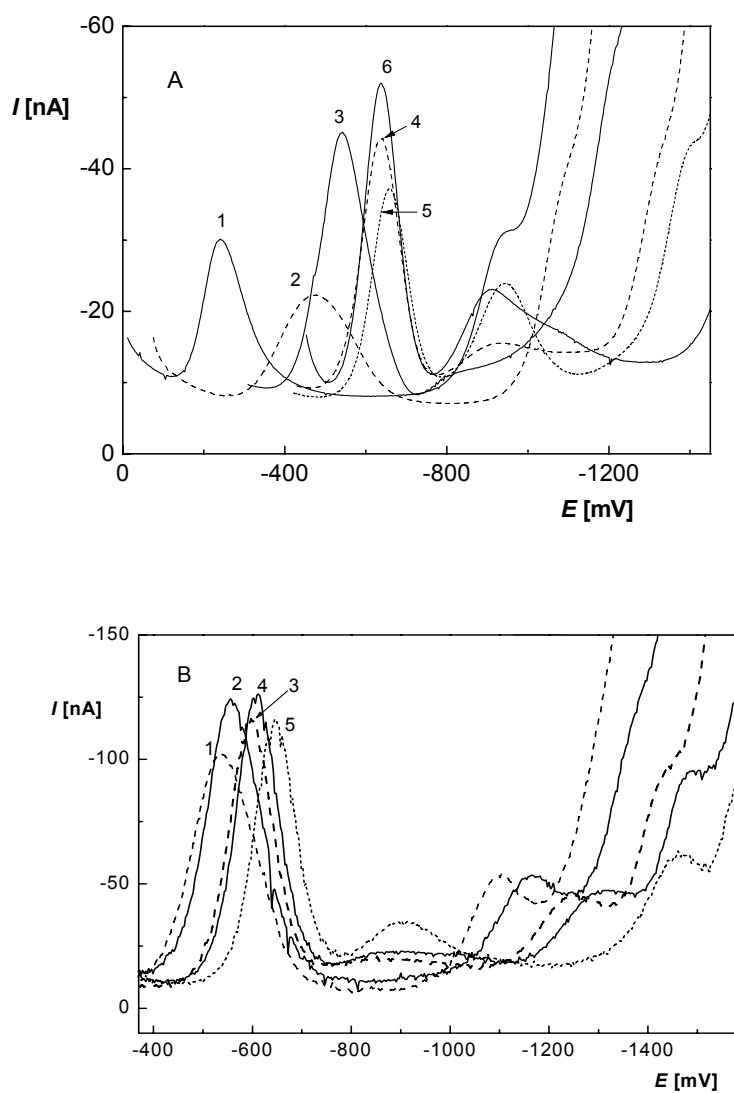
pH	E_p^1 [mV]	E_p^2 [mV]	E_p^3 [mV]	I_p^1 [nA]	I_p^2 [nA]	I_p^3 [nA]
2,0	-100	– ^a	– ^b	-65,03	– ^a	– ^b
3,0	-155	– ^a	– ^b	-84,81	– ^a	– ^b
4,0	-245	– ^a	– ^b	-94,87	– ^a	– ^b
5,0	-314	– ^a	– ^b	-92,25	– ^a	– ^b
6,0	-372	– ^a	– ^b	-90,52	– ^a	– ^b
7,0	-417	– ^a	– ^b	-111,5	– ^a	– ^b
8,0	-534	– ^a	– ^b	-102,7	– ^a	– ^b
9,0	-554	-1168	– ^b	-124,2	-53,42	– ^b
10,0	-596	-1255	– ^b	-116,2	-45,33	– ^b
11,0	-605	-1315	– ^b	-128,6	-49,24	– ^b
12,0 ^c	-610	-1416	– ^b	-116	-60,43	– ^b

^a – pík není přítomen, ^b – pík špatně vyhodnotitelný, ^c – $0,01 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$

$p^{1,2,3}$ – indexy vztahující se k prvnímu, druhému a třetímu píku

p^1 odpovídá hlavnímu redukčnímu píku p_c^1 v kyselém a neutrálním a p_c^{1a} v zásaditém prostředí;

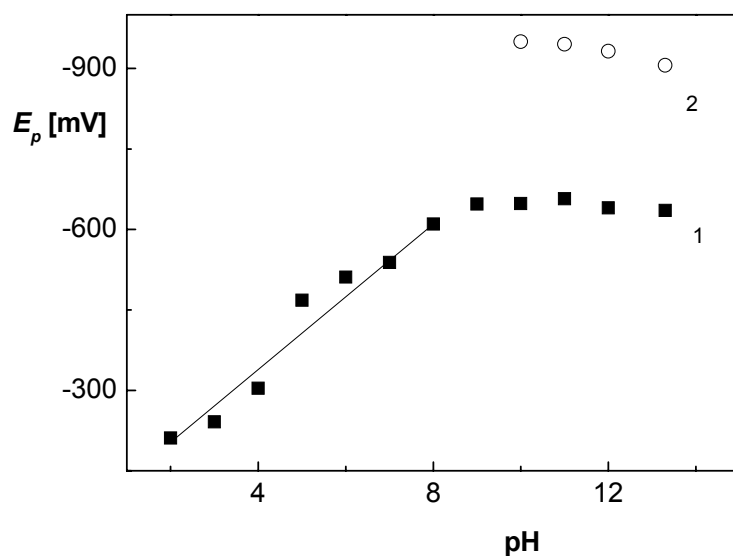
p^2 odpovídá píku p_c^{1b} v zásaditém prostředí a p^3 odpovídá píku p_c^2 .



Obr. 4.9

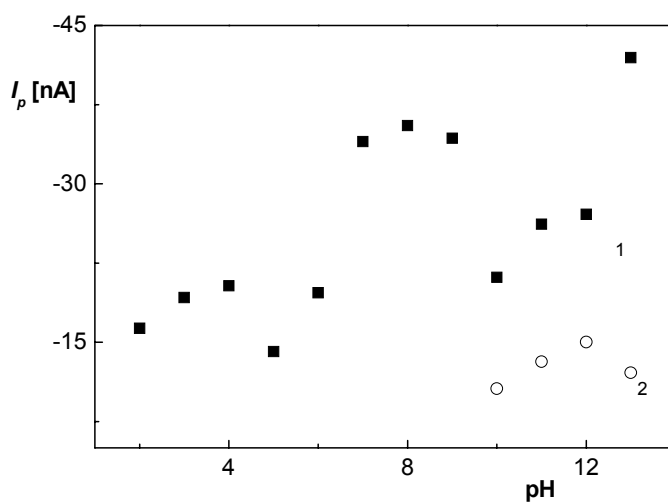
A: Voltamogramy 6-NQ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 3,0 (1); 5,0 (2); 7,0 (3); 9,0 (4); 11,0 (5); a v prostředí 0,2 mol.l⁻¹ NaOH (6).

B: Voltamogramy 5-NQ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 8,0 (1); 9,0 (2); 10,0 (3); 11,0 (4); 12,0 (5).



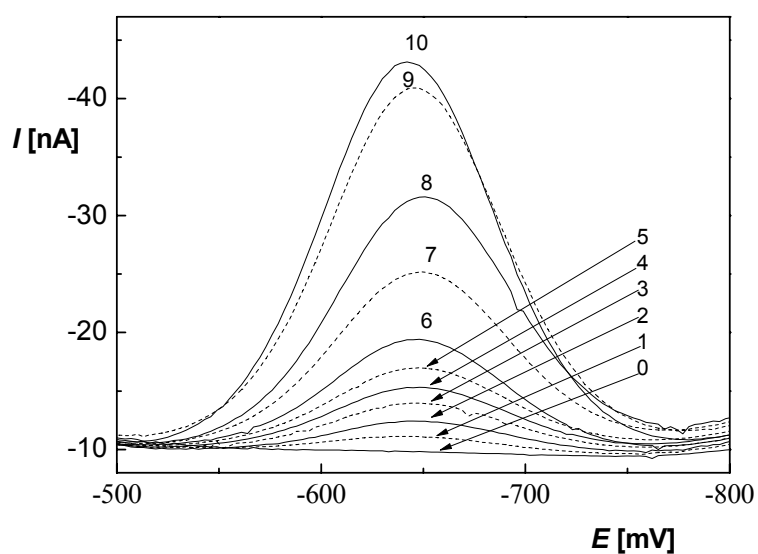
Obr. 4.10

Závislost potenciálu píku E_p 6-NQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pH roztoku, měřeno technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru, $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaOH}$ a $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaOH}$. 1 – první pík; 2 – druhý pík.



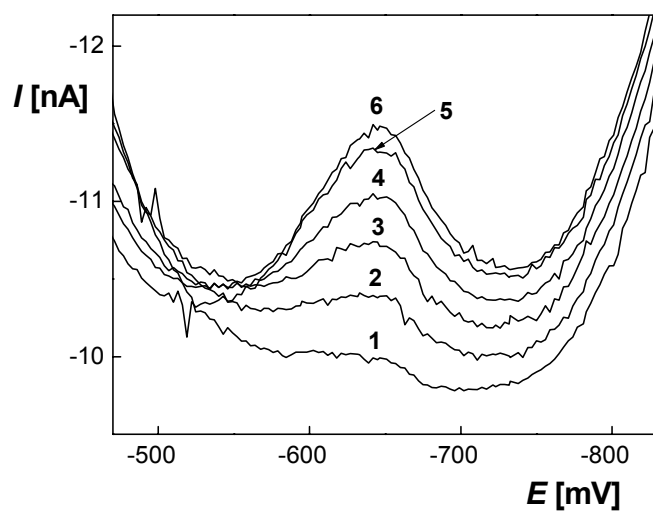
Obr. 4.11

Závislost proudu píku I_p 6-NQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pH roztoku, měřeno technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru, $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaOH}$ (pH 12,0) a $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaOH}$ (pH 13,3). 1 – první pík; 2 – druhý pík.



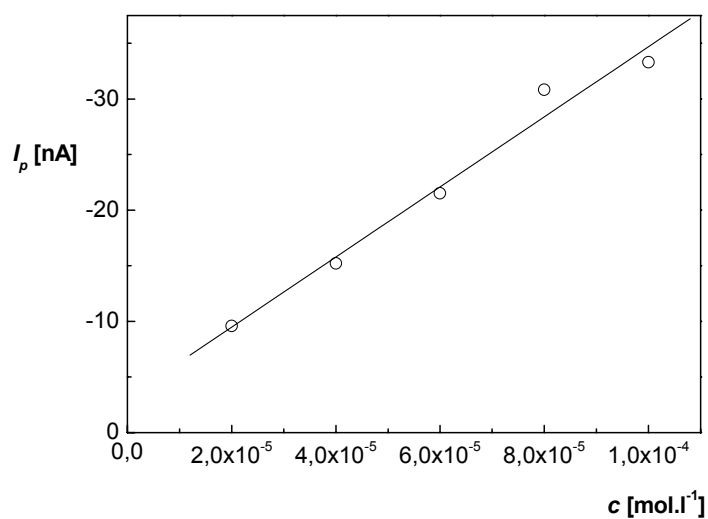
Obr. 4.12

Voltamogramy 6-NQ měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí 0,01 mol.L⁻¹ NaOH. Koncentrace (6-NQ) [mol.L⁻¹]: 0 (0); 2.10⁻⁶ (1); 4.10⁻⁶ (2); 6.10⁻⁶ (3); 8.10⁻⁶ (4); 1.10⁻⁵ (5); 2.10⁻⁵ (6); 4.10⁻⁵ (7); 6.10⁻⁵ (8); 8.10⁻⁵ (9); 1.10⁻⁴ (10).



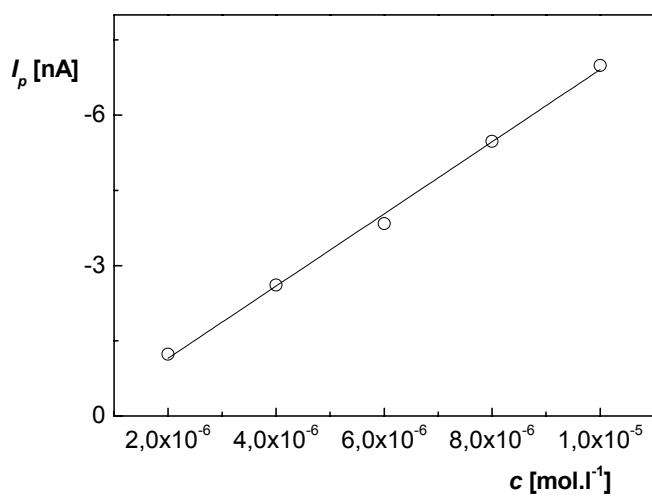
Obr. 4.13

Voltamogramy 6-NQ měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí 0,01 mol.L⁻¹ NaOH. Koncentrace (6-NQ) [mol.L⁻¹]: 0 (1); 2.10⁻⁷ (2); 4.10⁻⁷ (3); 6.10⁻⁷ (4); 8.10⁻⁷ (5); 1.10⁻⁶ (6).



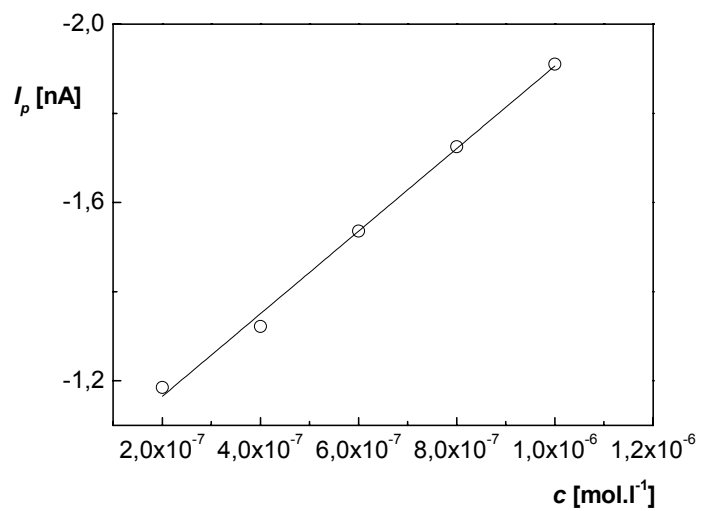
Obr. 4.14

Závislost proudu píku I_p na koncentraci 6-NQ v rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-5}$ mol.l⁻¹. Měřeno technikou DPV na m-AgSAE v prostředí 0,01 mol.l⁻¹ NaOH.



Obr. 4.15

Závislost proudu píku I_p na koncentraci 6-NQ v rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹. Měřeno technikou DPV na m-AgSAE v prostředí 0,01 mol.l⁻¹ NaOH.



Obr. 4.16

Závislost proudu píku I_p na koncentraci 6-NQ v rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-7}$ mol.l⁻¹. Měřeno technikou DPV na m-AgSAE v prostředí 0,01 mol.l⁻¹ NaOH.

Tab. 4.7

Parametry kalibračních závislostí 6-NQ. Měřeno technikou DPV na m-AgSAE v prostředí 0,01 mol.l⁻¹ NaOH.

Koncentrace [mol.l ⁻¹]	Úsek [nA]	Směrnice [nA.mol ⁻¹ .l]	Korelační koeficient	L_{Q1} [mol.l ⁻¹]	L_{Q2} [mol.l ⁻¹]
(2-10).10 ⁻⁵	-3,2	-3,2.10 ⁵	0,9894	-	-
(2-10).10 ⁻⁶	0,4	-7,4.10 ⁵	0,9984	-	-
(2-10).10 ⁻⁷	-1,0	-9,3.10 ⁵	0,9982	3,0.10 ⁻⁷	3,5.10 ⁻⁷

Tab. 4.8

Parametry kalibračních závislostí 5-NQ. Měřeno technikou DPV na m-AgSAE v prostředí 0,05 mol.l⁻¹ borátového pufru o pH 9,0.

Koncentrace [mol.l ⁻¹]	Úsek [nA]	Směrnice [nA.mol ⁻¹ .l]	Korelační koeficient	L_{Q1} [mol.l ⁻¹]	L_{Q2} [mol.l ⁻¹]
(2-10).10 ⁻⁵	-1,6	-1,1.10 ⁶	0,9978	-	-
(2-10). 10 ⁻⁶	1,4	-1,3.10 ⁶	0,9928	-	-
(2-10). 10 ⁻⁷	0,8	-3,1.10 ⁶	0,9911	3,0.10 ⁻⁷	4,8.10 ⁻⁷

4.3 Porovnání voltametrického stanovení 5-NQ a 6-NQ

5-NQ byl stanoven voltametrickými metodami na m-AgSAE v prostředí $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ borátového pufru o pH 9,0 v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ metodou DPV a v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-4} - 4 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ metodou DCV. Při těchto měřeních bylo dosaženo meze stanovitelnosti $3,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ pro DPV a $5,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ pro DCV. 6-NQ byl stanoven metodou DPV na m-AgSAE v prostředí $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ a metodou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufru 7,0 v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-4} - 4 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$. Při těchto měřeních bylo dosaženo meze stanovitelnosti $3,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ pro DPV a $6,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ pro DCV. Bylo tedy dosaženo řádově stejných mezí stanovitelnosti pro oba studované analyty. Výsledky jsou shrnuty v tab. 4.9.

Dále bylo provedeno porovnání opakovatelnosti výšky píku 5-NQ a 6-NQ. Vyhodnoceno bylo vždy 10 následných stanovení nejnižší a nejvyšší koncentrace z lineárního dynamického rozsahu a opakovatelnost byla charakterizována relativní směrodatnou odchylkou (RSD). Výsledky jsou uvedeny v tab. 4.10. Pro oba analyty bylo při měření metodou DC a DP voltametrie dosaženo hodnot RSD cca 2 % pro koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$. Pro nejnižší měřitelnou koncentraci při metodě DCV ($4 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) byla RSD pro 6-NQ 1,69 % a pro 5-NQ 9,31 %, Pro oba analyty měřené technikou DPV při koncentraci $4 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ bylo dosaženo RSD cca 9 %.

Tab. 4.9*Parametry voltametrického stanovení 5-NQ a 6-NQ na m-AgSAE.*

Analyt	Metoda	Prostředí	Lineární dynamický rozsah [mol.l ⁻¹]	<i>L</i> ₀₁ [mol l ⁻¹]
6-NQ	DPV	0,01 mol.l ⁻¹ NaOH	(2-1000).10 ⁻⁷	3,0·10 ⁻⁷
	DCV	BR pufr o pH 7,0	(4-1000).10 ⁻⁷	6,0·10 ⁻⁷
5-NQ	DPV	0,05 mol.l ⁻¹ borátového pufru o pH 9,0	(2-1000).10 ⁻⁷	3,0·10 ⁻⁷
	DCV	0,05 mol.l ⁻¹ borátového pufru o pH 9,0	(4-1000).10 ⁻⁷	5,0·10 ⁻⁷

Tab. 4.10*Opakovatelnost výšky píku 5-NQ a 6-NQ charakterizovaná relativní směrodatnou odchylkou (RSD), pro deset následných stanovení. Měřeno metodou DP a DC voltametrie na m-AgSAE.*

Analyt	Metoda	Koncentrace [mol.l ⁻¹]	RSD [%]
5-NQ	DPV	1.10 ⁻⁴	1,98
		2.10 ⁻⁷	8,89
	DCV	1.10 ⁻⁴	1,83
		4.10 ⁻⁷	9,31
6-NQ	DPV	1.10 ⁻⁴	2,18
		2.10 ⁻⁷	9,28
	DCV	1.10 ⁻⁴	1,79
		4.10 ⁻⁷	1,69

4.4 OVĚŘENÍ DIFÚZNÍHO CHARAKTERU LIMITNÍHO PROUDU

Pro ověření difúzního charakteru limitního proudu byla při měření měněna rychlost skenu vždy na dvojnásobnou hodnotu, než byla předcházející, v rozmezí $10 - 2560 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Naměřené voltamogramy 5-NQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) v prostředí BR pufru o pH 7,0 jsou zobrazeny na obr. 4.17. Vyhodnocení závislost I_p na druhé odmocnině z rychlosti skenu v_{sc} v kyselém prostředí (BR pufr o pH 2,0) je uvedeno na obr. 4.18, pro neutrální prostředí (BR pufr o pH 7,0) je uvedeno na obr. 4.19 a pro zásadité prostředí ($0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaOH) je uvedeno na obr. 4.20. Způsob vyhodnocení I_p je naznačen na obr. 4.17 u křivky (8).

Metodou lineární regrese byly pro závislosti velikosti proudu píku I_p na druhé odmocnině z rychlosti skenu v_{sc} vypočteny v prostředí BR pufru vztahy:

Pro pH 2,0:

$$I_p [\text{nA}] = - 17,5 v_{sc}^{1/2} - 41,9 \quad (R = 0,9925) \quad \text{pro } (v_{sc} \text{ v rozmezí } 10 - 2560 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}).$$

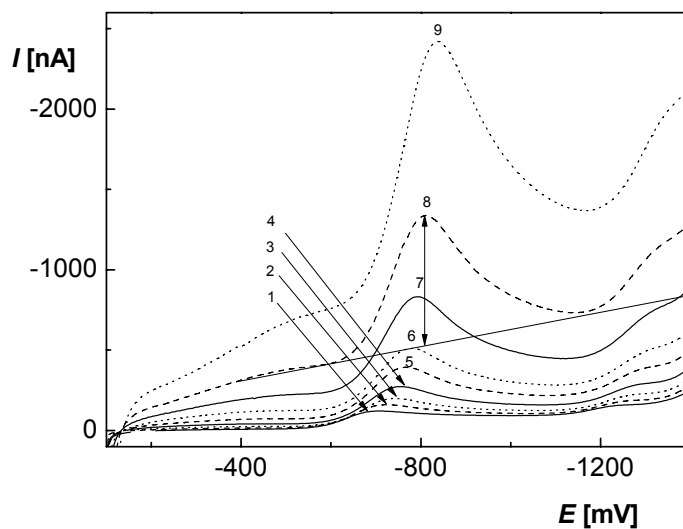
Pro pH 7,0:

$$I_p [\text{nA}] = - 21,4 v_{sc}^{1/2} - 4,6 \quad (R = 0,9932) \quad \text{pro } (v_{sc} \text{ v rozmezí } 10 - 1280 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}).$$

Pro pH 12,0:

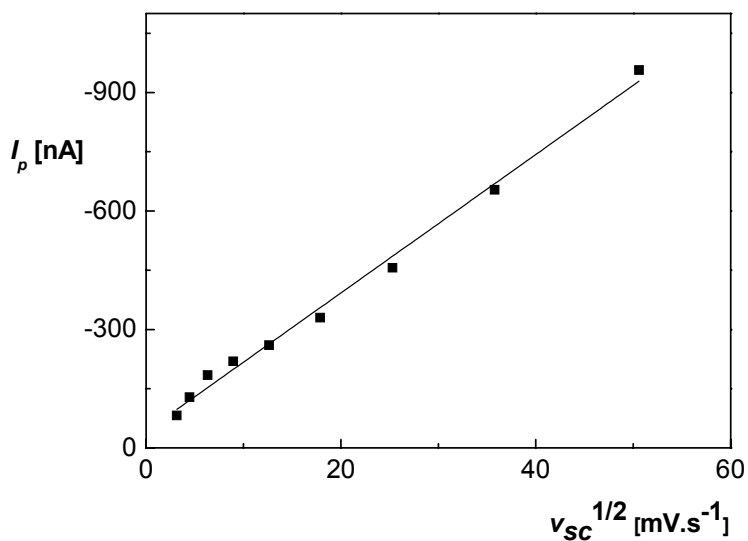
$$I_p [\text{nA}] = - 4,9 v_{sc}^{1/2} - 38,1 \quad (R = 0,9982) \quad \text{pro } (v_{sc} \text{ v rozmezí } 10 - 2560 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}).$$

Redukce je řízena difúzí v případě, kdy je závislost I_p na v_{sc} lineární a prochází počátkem os souřadnic. Jelikož úseky výše uvedených závislostí I_p vs. $v_{sc}^{1/2}$ jsou odlišné od nuly (otestováno v programu ADSTAT⁴¹), redukce 5-NQ na m-AgSAE není řízena v kyselém, neutrálním ani zásaditém prostředí čistě difúzí, ale může se uplatňovat i jiný děj, např. adsorpce na povrch elektrody.



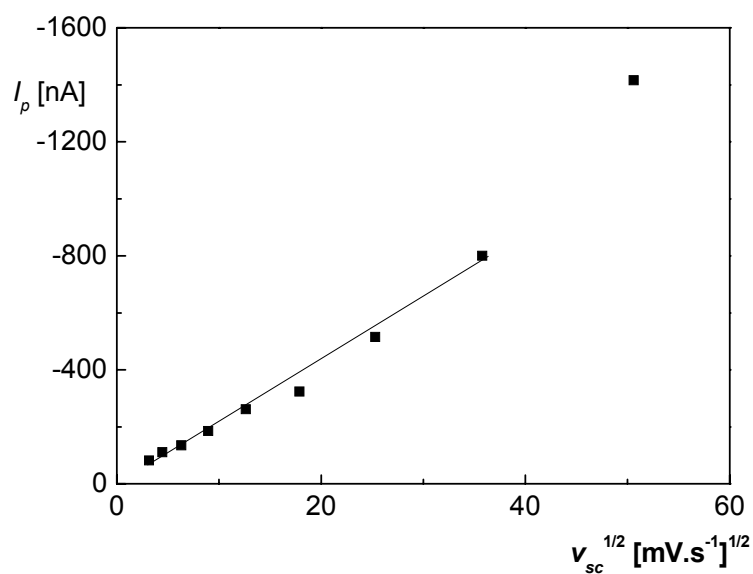
Obr. 4.17

Voltamogramy 5-NQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$) měřené metodou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 7,0 při měnící se rychlosti skenu $v_{sc} [\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}]$: 10 (1), 20 (2), 40 (3), 80 (4), 160 (5), 320 (6), 640 (7), 1280 (8) a 2560 (9).



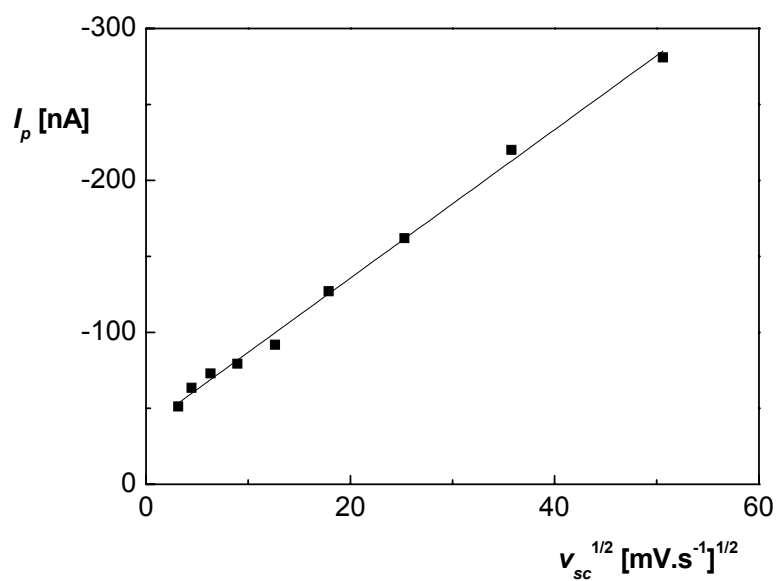
Obr. 4.18

Závislost velikosti proudu píku I_p 5-NQ na druhé odmocnině z rychlosti skenu v_{sc} . Měřeno metodou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 2,0.



Obr. 4.19

Závislost velikosti proudu píku I_p 5-NQ na druhé odmocnině z rychlosti skenu v_{sc} . Měřeno metodou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 7,0.



Obr. 4.20

Závislost velikosti proudu píku I_p 5-NQ na druhé odmocnině z rychlosti skenu v_{sc} . Měřeno metodou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 12,0.

5 STANOVENÍ 5-NQ PRŮTOKOVOU INJEKČNÍ ANALÝZOU S AMPÉROMETRICKOU DETEKČÍ

5.1 Optimalizace metody

Metoda FIA s elektrochemickou detekcí (ED) s využitím ampérometrického detektoru s m-AgSAE byla optimalizována pro stanovení 5-NQ. Jako nosný elektrolyt byl použit $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ borátový pufr o pH 9,0, který byl optimálním prostředím pro DC a DP voltametrické stanovení 5-NQ na m-AgSAE a potenciál detekce E_{det} měřen v rozmezí $-0,7$ až $-1,9$. Na základě hydrodynamických voltamogramů (obr. 5.1) byl vybrán potenciál detekce $-1,6 \text{ V}$. Při tomto potenciálu byl měřený pík nejvyvinutější a dobře opakovatelný. Při zápornějších potenciálech pík klesne. Tento jev je zřejmě způsoben nárůstem základního proudu nosného elektrolytu. Následně byl změřen vliv průtokové rychlosti Q nosného roztoku na odezvu elektrochemického detektoru (obr. 5.2). Jako optimální průtoková rychlost byla zvolena rychlost 4 ml.min^{-1} . Při nižších rychlostech velikost signálu klesala a píky byly širší. Poté byl měřen vliv dávkovaného objemu V_{inj} (velikost dávkovací smyčky) na odezvu elektrochemického detektoru (obr. 5.3). Jako optimální byla zvolena smyčka o objemu $V = 0,1 \text{ ml}$, při dalším objemu se signál elektrochemického ani UV detektoru již výrazně nezvyšoval.

5.2 Koncentrační závislost

Optimalizovaná metoda FIA-ED byla použita k stanovení 5-NQ v reálných matricích pitné a říční vody. Pro porovnání byla látka detekována i spektrofotometricky při $\lambda = 220 \text{ nm}$.

Koncentrační závislosti 5-NQ byly proměřeny v prostředí nosného elektrolytu borátového pufru ($c = 0,05 \text{ mol.l}^{-1}$) o pH 9,0 v koncentračním rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ a $(2-10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$, jako matrice byla nejprve použita pitná voda. Výsledky měření jsou znázorněny na obr. 5.4 – 5.7 pro ED a na obr. 5.8 – 5.9 jsou znázorněny kalibrační závislosti pro UV detektor. Zaznamenané píky FIA-ED stanovení v koncentračním rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ a $(2-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ jsou na obr. 5.4 a obr. 5.5. Na tomto obr. 5.5 ukazujícím nejnižší koncentrační rozmezí se objevují při nástřiku nosného borátového pufru do FIA systému záporné signály. Na UV detektoru

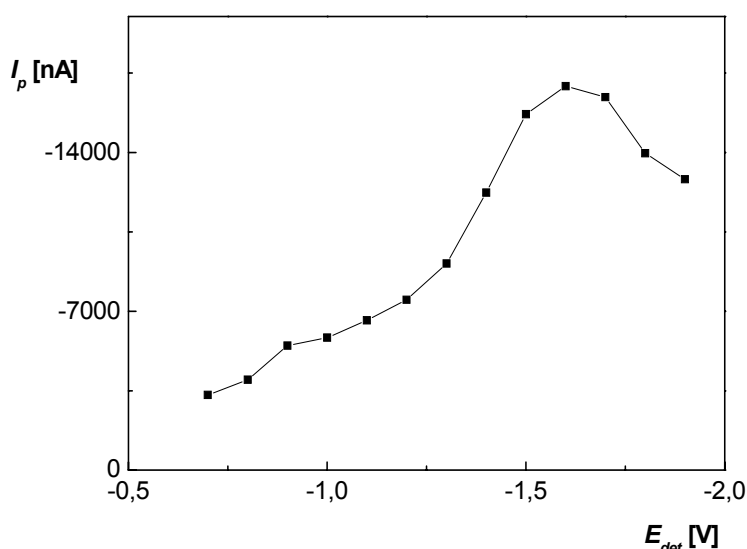
podobný jev pozorován nebyl. Přítomnost záporných píků tedy zřejmě souvisí s kyslíkem, který se dostává postupem času do zásobníku lineární pumpy. Při nadávkování čerstvě probublaného nosného elektrolytu dojde při jeho detekci k poklesu proudu pozadí kvůli nižšímu obsahu kyslíku v nadávkovaném vzorku než v nosném elektrolytu. Kalibrační závislost pro FIA-ED pro nejnižší koncentrační rozmezí odpovídající obr. 5.5 je na obr. 5.7. Přímka (a) byla proložena pro výšky píku I_p odečtené z obr. 5.5, přímka (a) proto vykazuje velký kladný úsek. Přímka (b) prochází I_p vyhodnocené odečtením výšky píku I_p získaného při nástřiku nosného elektrolytu od I_p stanovované látky. Tato přímka (b) má výrazně nižší úsek na ose I_p , jak vyplývá z obr. 5.7. Parametry pro vyšší koncentrační řád $(2-10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ (naměřené FIA-ED píky na obr. 5.4, kalibrační závislost na obr. 5.6) byly taktéž získány po odečtení I_p získaného při nástřiku nosného elektrolytu.

Poté byly stejným způsobem změřeny koncentrační závislosti 5-NQ metodou FIA s elektrochemickou detekcí na m-AgSAE a s UV detekcí v prostředí borátového pufru o pH 9,0 ($c = 0,05 \text{ mol.l}^{-1}$) v koncentračním rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ a $(2-10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$, jako matrice byla použita říční voda. Záznamy píků FIA-ED stanovení jsou znázorněny na obr. 5.10 pro koncentrační rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ (příslušná kalibrační závislost je uvedena na obr. 5.12) a na obr. 5.11 pro koncentrační rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ (příslušná kalibrační závislost je uvedena na obr. 5.13). V nejnižším koncentračním rozmezí se opět objevují při nástřiku nosného borátového pufru do FIA systému negativní odezvy. Proto bylo vyhodnocení prováděno stejným způsobem jako v předchozím případě. Na obr. 5.14 – 5.15 jsou znázorněny kalibrační závislosti pro UV detektor.

Parametry kalibračních závislostí pro stanovení 5-NQ v pitné a říční vodě pro elektrochemický detektor jsou uvedeny v tab. 5.1 a pro UV detektor jsou uvedeny v tab. 5.2. Pro elektrochemický detektor bylo dosaženo meze stanovitelnosti $L_{QI} = 1,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ pro pitnou vodu a meze stanovitelnosti $L_{QI} = 2,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ pro říční vodu. Pro UV detektor bylo dosaženo meze stanovitelnosti $L_{QI} = 1,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ pro pitnou vodu a meze stanovitelnosti $L_{QI} = 3,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ pro říční vodu. Řádově tak byly dosaženy srovnatelné výsledky. Pro porovnání jsou uvedeny výsledky FIA stanovení 5-NQ s elektrochemickou a UV detekcí v prostředí borátového pufru o pH 9,0 ($c = 0,05 \text{ mol.l}^{-1}$), kdy byla jako matrice použita deionizovaná voda. Parametry

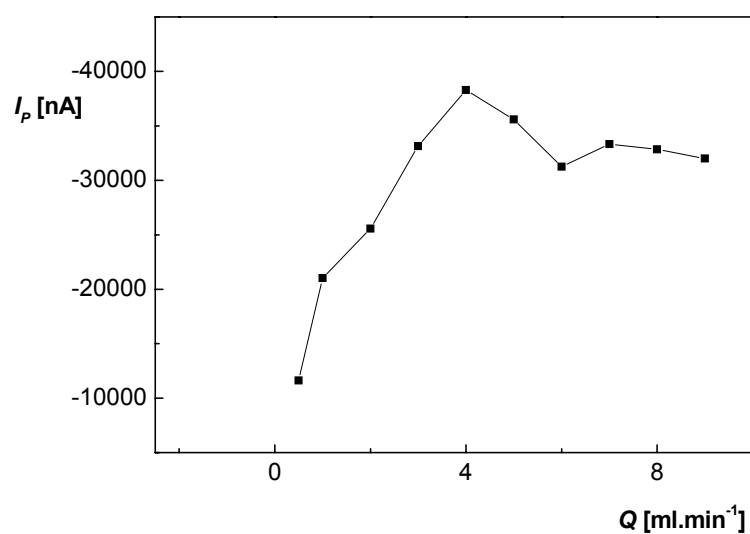
kalibračních závislostí jsou také uvedeny v tab. 5.1 a v tab.5.2. Bylo dosaženo meze stanovitelnosti $L_{QI} = 3,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ pro elektrochemický detektor a meze stanovitelnosti $L_{QI} = 6,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ pro UV detektor. Bylo tedy dosaženo řádově stejných výsledků jako při použití pitné či říční vody jako matrice.

Největším problémem tohoto stanovení je úplné odstranění kyslíku ze systému. Snížit množství kyslíku by bylo možné při kontinuálním probublávání nosného elektrolytu při použití reciproké pumpy. Důsledkem těchto opatření by byl ovšem nárůst nákladů na analýzu.



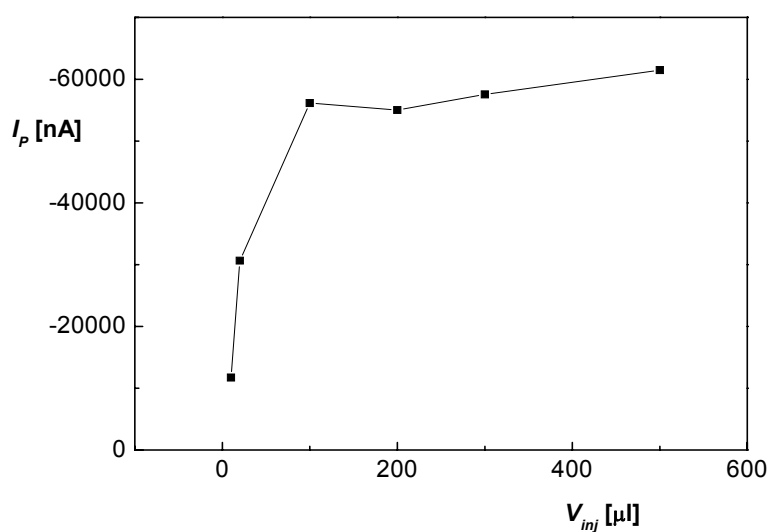
Obr. 5.1

Závislost signálu 5-NQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) z elektrochemického detektoru s m-AgSAE na vloženém potenciálu detekce E_{det} při FIA. Nosný elektrolyt $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ borátový pufr o pH 9,0; dávkováno $100 \mu\text{l}$, průtoková rychlost 1 ml.min^{-1} . Vyhodnoceno z výšky píku I_p .



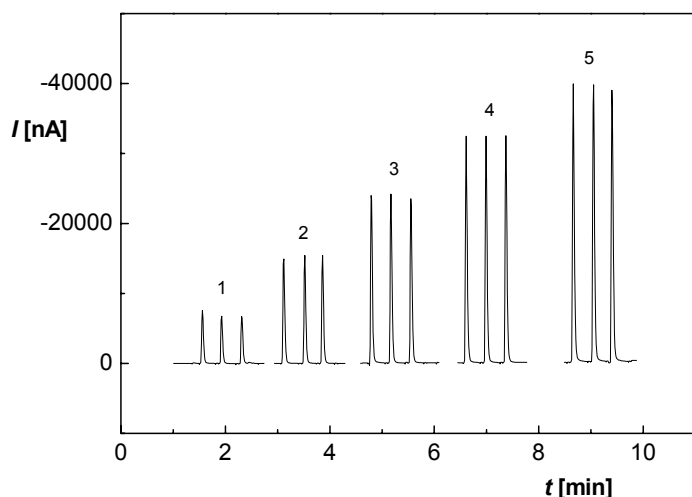
Obr. 5.2

Závislost signálu 5-NQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$) z elektrochemického detektoru ($E_{det} = -1,6 \text{ V}$) s m-AgSAE na průtokové rychlosti Q při FIA. Nosný elektrolyt $0,05 \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ borátový pufr o pH 9,0; dávkováno $100 \mu\text{l}$. Vyhodnoceno z výšky píku I_p .



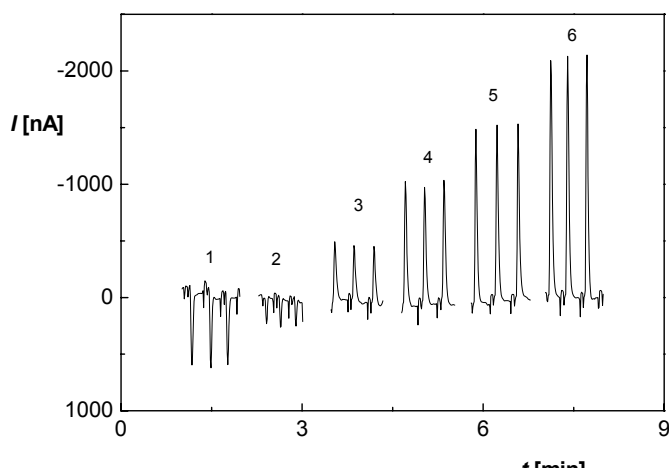
Obr. 5.3

Závislost signálu 5-NQ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$) z elektrochemického detektoru ($E_{det} = -1,6 \text{ V}$) s m-AgSAE na nadávkovaném objemu vzorku V_{inj} při FIA. Nosný elektrolyt $0,05 \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ borátový pufr o pH 9,0; průtoková rychlost $4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Vyhodnoceno z výšky píku I_p .



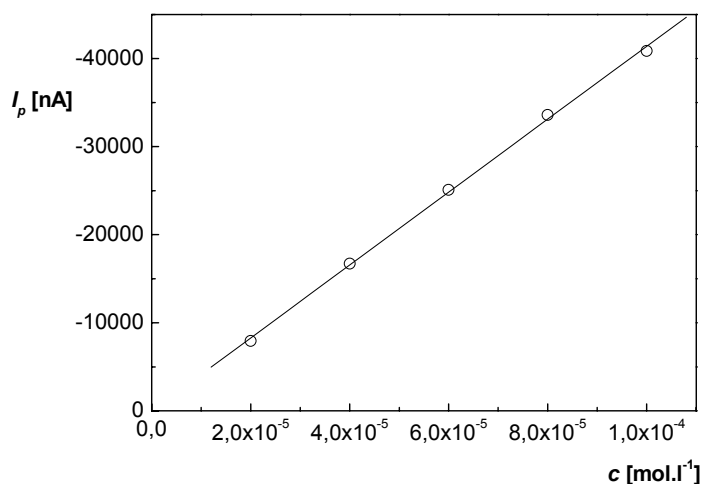
Obr. 5.4

Záznam píků FIA stanovení 5-NQ v pitné vodě s elektrochemickou detekcí na m-AgSAE ($E_{det} = -1,6 V$), koncentrace 5-NQ $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ (1), $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ (2), $6 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ (3), $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ (4), $10 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ (5). Nosný elektrolyt $0,05 \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ borátový pufr o pH 9,0; průtoková rychlost $4,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, dávkovaný objem $100 \mu\text{l}$.



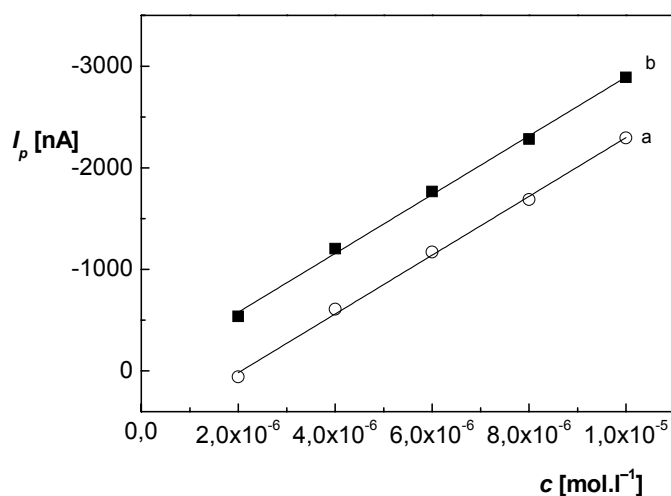
Obr. 5.5

Záznam píků FIA stanovení 5-NQ v pitné vodě s elektrochemickou detekcí na m-AgSAE, ($E_{det} = -1,6 V$), koncentrace 5-NQ 0 (1, nástřik nosného elektrolytu), $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ (2), $4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ (3), $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ (4), $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ (5), $10 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ (6). Nosný elektrolyt $0,05 \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ borátový pufr o pH 9,0; průtoková rychlost $4,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, dávkovaný objem $100 \mu\text{l}$.



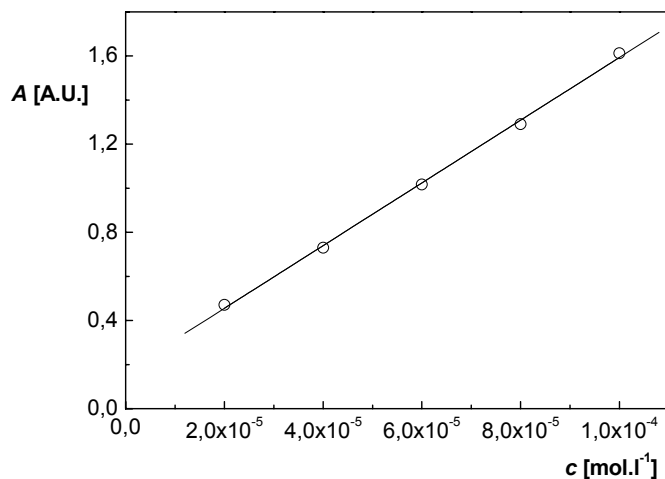
Obr. 5.6

Kalibrační závislost FIA stanovení 5-NQ v pitné vodě s elektrochemickou detekcí na m-AgSAE ($E_{det} = -1,6$ V) v koncentračním rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-5}$ mol.l⁻¹. Nosný elektrolyt 0,05 mol.l⁻¹ borátový pufr o pH 9,0 průtoková rychlost 4,0 ml.min⁻¹, dávkovaný objem 100 μ l.



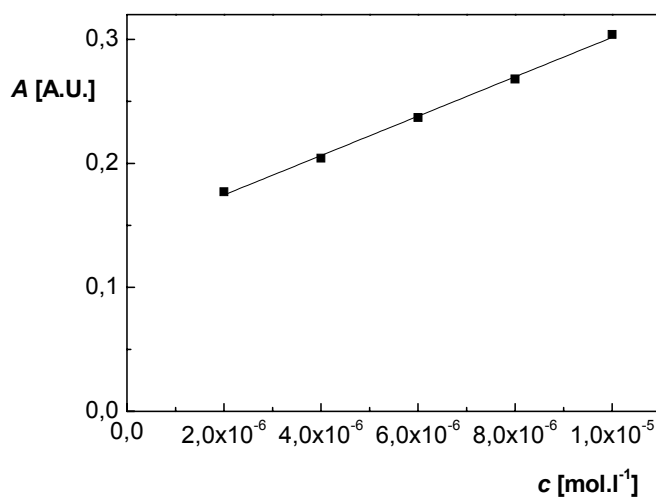
Obr. 5.7

Kalibrační závislost FIA stanovení 5-NQ v pitné vodě s elektrochemickou detekcí na m-AgSAE ($E_{det} = -1,6$ V) v koncentračním rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹ (a – před odečtením I_p při nadávkování nosného elektrolytu; b – po odečtení I_p po nástřiku nosného elektrolytu). Nosný elektrolyt 0,05 mol.l⁻¹ borátový pufr o pH 9,0; průtoková rychlost 4,0 ml.min⁻¹, dávkovaný objem 100 μ l.



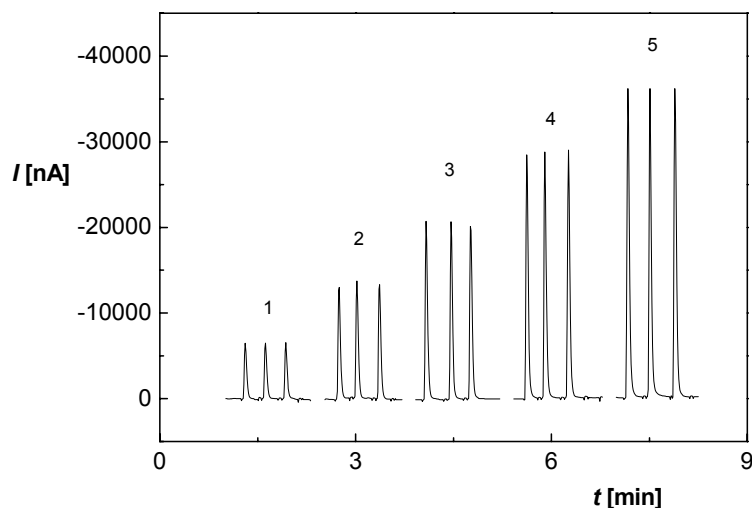
Obr. 5.8

Kalibrační závislost FIA stanovení 5-NQ v pitné vodě s UV detekcí ($\lambda = 220$ nm) v koncentračním rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-5}$ mol.l⁻¹. Nosný elektrolyt 0,05 mol.l⁻¹ borátový pufr o pH 9,0; průtoková rychlost 4,0 ml.min⁻¹, dávkovaný objem 100 μ l.



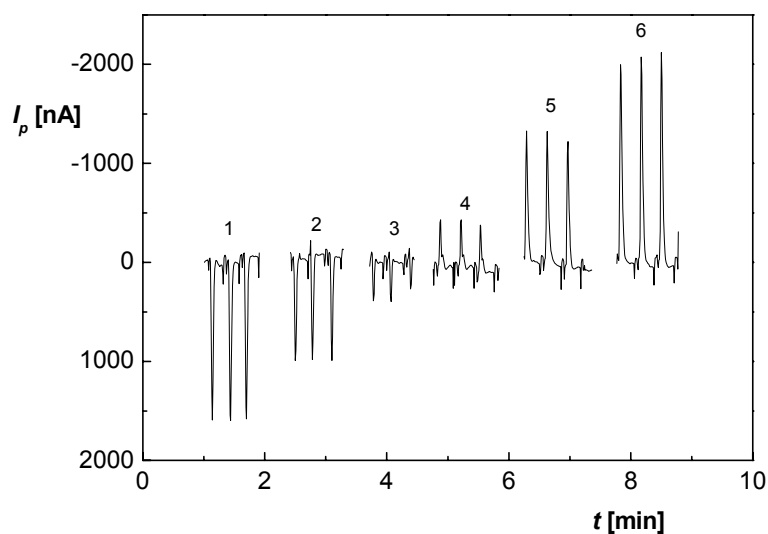
Obr.5.9

Kalibrační závislost FIA stanovení 5-NQ v říční vodě s UV detekcí ($\lambda = 220$ nm) v koncentračním rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹. Nosný elektrolyt 0,05 mol.l⁻¹ borátový pufr o pH 9,0; průtoková rychlost 4,0 ml.min⁻¹, dávkovaný objem 100 μ l.



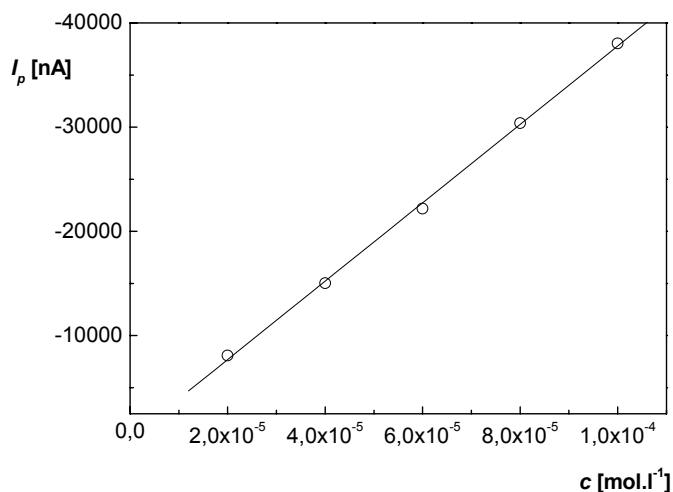
Obr. 5.10

Záznam píků FIA stanovení 5-NQ v říční vodě s elektrochemickou detekcí na m-AgSAE ($E_{det} = -1,6 V$), koncentrace 5-NQ $2.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ (1), $4.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ (2), $6.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ (3), $8.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ (4), $10.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ (5). Nosný elektrolyt $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ borátový pufr o pH 9,0; průtoková rychlost $4,0 \text{ ml.min}^{-1}$, dávkovaný objem $100 \mu\text{l}$.



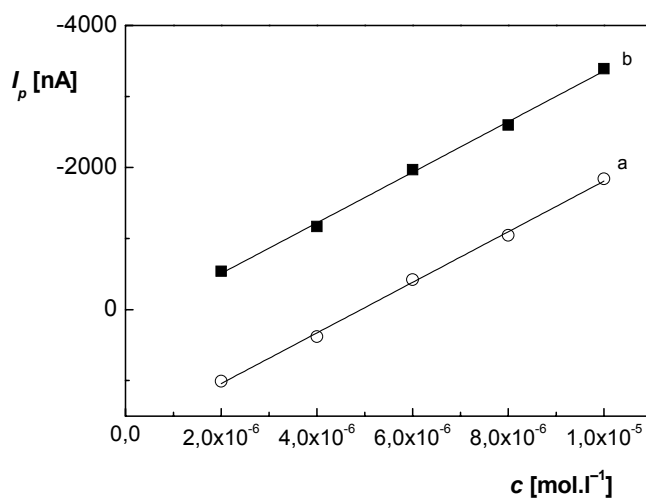
Obr. 5.11

Záznam píků FIA stanovení 5-NQ v říční vodě s elektrochemickou detekcí na m-AgSAE ($E_{det} = -1,6 V$), koncentrace 5-NQ 0 (1, nástřik nosného elektrolytu), $2.10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ (2), $4.10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ (3), $6.10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ (4), $8.10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ (5), $10.10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ (6). Nosný elektrolyt $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ borátový pufr o pH 9,0; průtoková rychlost $4,0 \text{ ml.min}^{-1}$, dávkovaný objem $100 \mu\text{l}$.



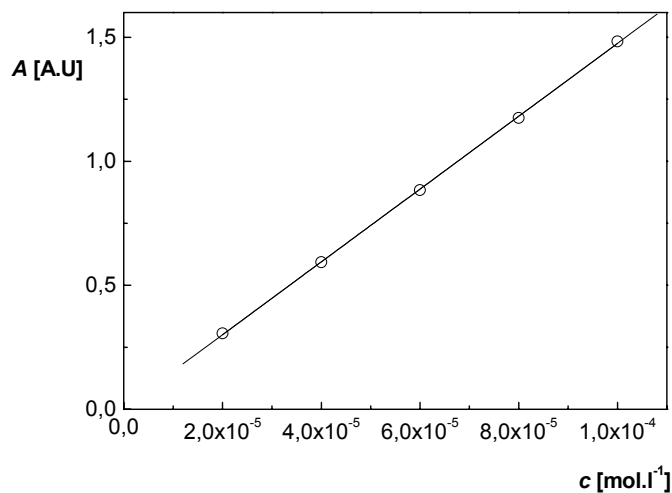
Obr. 5.12

Kalibrační závislost FIA stanovení 5-NQ v říční vodě s elektrochemickou detekcí na m-AgSAE, ($E_{det} = -1,6$ V) v koncentračním rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-5}$ mol.l⁻¹. Nosný elektrolyt 0,05 mol.l⁻¹ borátový pufr o pH 9,0; průtoková rychlost 4,0 ml.min⁻¹, dávkovaný objem 100 μ l.



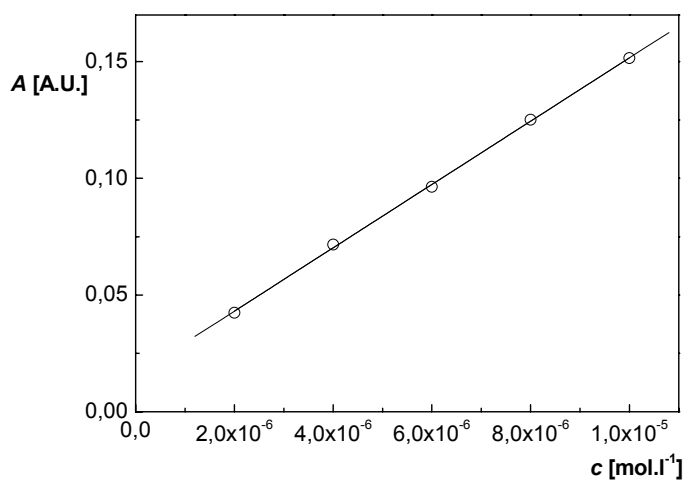
Obr. 5.13

Kalibrační závislost FIA stanovení 5-NQ v říční vodě s elektrochemickou detekcí na m-AgSAE, ($E_{det} = -1,6$ V) v koncentračním rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹ (a – před odečtením I_p při nadávkování nosného elektrolytu; b – po odečtení I_p po nástřiku nosného elektrolytu) Nosný elektrolyt 0,05 mol.l⁻¹ borátový pufr o pH 9,0; průtoková rychlost 4,0 ml.min⁻¹, dávkovaný objem 100 μ l.



Obr.5.14

Kalibrační závislost FIA stanovení 5-NQ v říční vodě s UV detekcí ($\lambda = 220$ nm) v koncentračním rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-5}$ mol.l⁻¹. Nosný elektrolyt 0,05 mol.l⁻¹ borátový pufr o pH 9,0; průtoková rychlost 4,0 ml.min⁻¹, dávkovaný objem 100 μ l.



Obr. 5.15

Kalibrační závislost FIA stanovení 5-NQ v říční vodě s UV detekcí ($\lambda = 220$ nm) v koncentračním rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹. Nosný elektrolyt 0,05 mol.l⁻¹ borátový pufr o pH 9,0; průtoková rychlost 4,0 ml.min⁻¹, dávkovaný objem 100 μ l.

Tab. 5.1

Parametry kalibračních závislostí FIA stanovení 5-NQ v pitné a říční vodě s elektrochemickou detekcí na m-AgSAE ($E_{det} = -1,6$ V) v koncentračním rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ a $(2-10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$. Nosný elektrolyt $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ borátový pufr o pH 9,0; průtoková rychlost $4,0 \text{ ml.min}^{-1}$, dávkovaný objem $100 \mu\text{l}$. Vyhodnoceno z výšky píku I_p .

Koncentrační rozmezí [mol.l ⁻¹]	Směrnice [nA.mol ⁻¹ .l]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	L_{QI} [mol.l ⁻¹]
Pitná voda				
$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$-4,1 \cdot 10^8$	0,0	0,9995	–
$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$-2,9 \cdot 10^8$	0,5	0,9992	$1,8 \cdot 10^{-6}$
Říční voda				
$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$-3,8 \cdot 10^8$	-1754,0	0,9995	–
$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$-3,6 \cdot 10^8$	-204,4	0,9992	$2,4 \cdot 10^{-6}$
Deionizovaná voda				
$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$-1,4 \cdot 10^7$	0,3	0,9978	
$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$2,7 \cdot 10^7$	-37,6	0,9975	$5,4 \cdot 10^{-6}$

Tab. 5.2

Parametry kalibračních závislostí FIA stanovení 5-NQ v pitné a říční vodě s UV detekcí ($\lambda = 220 \text{ nm}$) v koncentračním rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ a $(2 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$. Nosný elektrolyt $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ borátový pufr o pH 9,0; průtoková rychlost $4,0 \text{ ml.min}^{-1}$, dávkovaný objem $100 \mu\text{l}$. Vyhodnoceno z výšky píku I_p

Koncentrační rozmezí [mol.l ⁻¹]	Směrnice [mol ⁻¹ .l]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	L_{QI} [mol.l ⁻¹]
Pitná voda				
$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$1,4 \cdot 10^4$	0,2	0,9993	–
$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$1,6 \cdot 10^4$	0,1	0,9989	$1,5 \cdot 10^{-6}$
Říční voda				
$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^4$	0,0	0,9999	–
$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$1,4 \cdot 10^4$	0,0	0,9998	$3,8 \cdot 10^{-6}$
Deionizovaná voda				
$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$2,9 \cdot 10^4$	0,0	0,9990	
$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$3,0 \cdot 10^4$	0,0	0,9931	$6,2 \cdot 10^{-6}$

6 STANOVENÍ SMĚSI NAFTOVÝCH MARKERŮ METODOU HPLC S ELEKTROCHEMICKOU DETEKČÍ

6.1 Optimalizace metody

5-NQ byl stanovován ve směsi spolu s dalšími markery nedokonalého spalování v naftových motorech 1-nitropyrenem, 2-nitrofluorenem a 3-nitrofluoranthem²⁵ metodou HPLC s elektrochemickou detekcí na m-AgSAE . V použitém HPLC systému byl zařazen také diode array detektor – pro porovnání tak byla sledována i UV detekce při vlnové délce $\lambda = 254$ nm, kdy absorbují všechny studované polyaromatické sloučeniny. Separace byla prováděna na koloně KROMASIL (250 x 4,6 mm, velikost částic 7,0 μm , Phenomenex, USA) s chemicky navázanou C18 fází.

Při optimalizaci složení mobilní fáze bylo vycházeno z výsledků separace směsi (1-nitropyren, 2-nitrofluoren a 3-nitrofluoranthem) prováděné v rámci bakalářské práce¹¹ (0,01 mol.l⁻¹ fosfátový pufr pH 7 : methanol v poměru 30:70, průtoková rychlost 1 ml.min⁻¹, retenční čas pro 2-nitrofluoren 7,03 min, pro 1-nitropyren 14,41 min a pro 3-nitrofluoranthem 15,77 min), zvolená průtoková rychlost 1 ml.min⁻¹. Retenční časy a kapacitní faktory dosažené za těchto podmínek v uvedeném HPLC systému jsou uvedeny v tab.6.1. Složení mobilní fáze bylo dále upravováno, aby došlo k dokonalému rozdělení všech čtyř analytů v co nejkratší době. Bylo ověřeno, že hodnota pH mobilní fáze nemá vliv na retenci studovaných analytů, jelikož nedochází k jejich protonizaci. Jako optimální mobilní fáze byla použita směs 0,01 mol⁻¹ fosfátový pufr o pH 7,0 : methanol v poměru 15:85 (v/v), stanovené retenční časy a kapacitní faktory jsou také uvedeny v tab. 6.1. Chromatogramy získané při ED a UV detekci ukazuje obr. 6.4 a obr. 6.2.

Poté byl měřen vliv hodnoty potenciálu vloženého na pracovní elektrodu na odezvu elektrochemického detektoru. Hydrodynamický voltamogram je zaznamenán na obr. 6.1. Jako optimální byl zvolen potenciál – 1,5 V. Při tomto potenciálu byly získány nejvyšší a dobře opakovatelné píky. Při negativnějších potenciálech E_{det} docházelo k poklesu I_p vlivem nárůstu proudu pozadí, způsobeného jeho katodickým rozkladem.

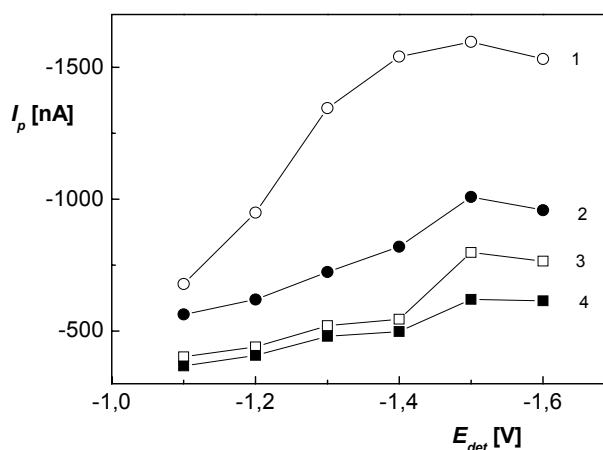
6.2 Koncentrační závislost

Koncentrační závislosti směsi studovaných látek (5-NQ, 1-nitropyren, 2-nitrofluoren a 3-nitrofluoranthren) byly změřeny metodou HPLC s elektrochemickou detekcí na m-AgSAE a s UV detekcí v koncentračním rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. Jako mobilní fáze byla použita směs $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ fosfátový pufr pH 7,0 : methanol 15:85 (v/v). Výsledky zobrazuje obr. 6.4 – 6.5 pro ED a obr 6.2 – 6.3 pro UV detektor. Na elektrochemickém detektoru je pozorován kromě studovaných analytů pík s retenčním časem 3,45 min (obr. 6.4). Tento pík pravděpodobně odpovídá píku kyslíku a jeho velikost souvisí s množstvím kyslíku v systému. Problémy s přítomností kyslíku v systému byly popsány při elektrochemické detekci dalších redukovatelných organických analytů, např. nitrofenolů⁴⁸. Na UV detektoru tento pík pozorován nebyl (obr. 6.2). Parametry kalibračních závislostí pro 5-NQ jsou uvedeny tab. 6.2 pro elektrochemický a v tab. 6.3 pro UV detektor. Pro elektrochemický detektor bylo dosaženo mezí stanovitelnosti L_{Q3} $9,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ pro 5-NQ, $2,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ pro 1-nitropyren, $1,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ pro 2-nitrofluoren a $3,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ pro 3-nitrofluoranthren. Mez stanovitelnosti dosažená v HPLC – ED je relativně vysoká. To bylo způsobeno jednak vysokým šumem elektrochemického detektoru (cca 20 – 40 μA) a dále vysokým podílem organického modifikátoru v mobilní fázi snižujícím citlivost elektrochemické detekce na m-AgSAE..

Tab. 6.1

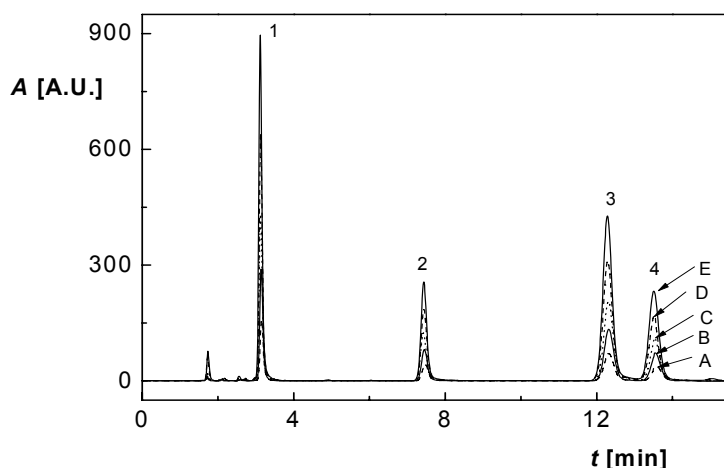
Retenční časy a kapacitní faktory 5-NQ, 1-nitropyrenu, 2-nitrofluorenu a 3-nitrofluoranthenu při HPLC separaci: kolona KROMASIL (250 x 4,6 mm, velikost částic 7,0 μm, Phenomenex, USA) s chemicky navázanou C18 fází. Mobilní fáze A: 0,01 mol.l⁻¹ fosfátový pufr o pH 7,0: methanol v poměru 30:70 (v/v). B: 0,01 mol.l⁻¹ fosfátový pufr o pH 7,0: methanol v poměru 15:85 (v/v). Dávkováno 20 μl vzorku, průtoková rychlost 1 ml.min⁻¹.

Mobilní fáze	A		B	
Analyt	Retenční čas [min]	Kapacitní faktor	Retenční čas [min]	Kapacitní faktor
5-nitrochinolin	3,92	1,06	3,13	0,84
2-nitrofluoren	8,45	3,45	7,44	3,38
1-nitropyren	14,91	6,85	12,27	6,22
3-nitrofluoranthen	16,50	7,68	13,54	6,96



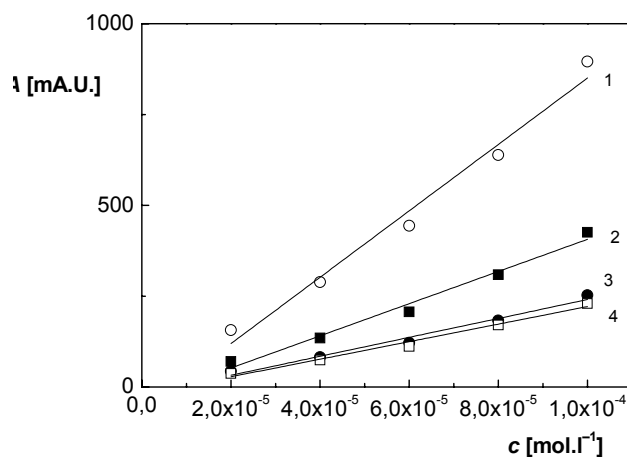
Obr. 6.1

*Závislost výšky píků I_p 5-NQ (1), 2-nitrofluorenu (2), 1-nitropyrenu (3) a 3-nitrofluoranthenu (4), (každý o koncentraci $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$), při HPLC s elektrochemickou detekcí s *m*-AgSAE na vloženém potenciálu E_{det} . Mobilní fáze 0,01 mol.l⁻¹ fosfátový pufr o pH 7,0: methanol v poměru 15:85 (v/v), dávkováno 20 μl vzorku, průtoková rychlost 1 ml.min⁻¹.*



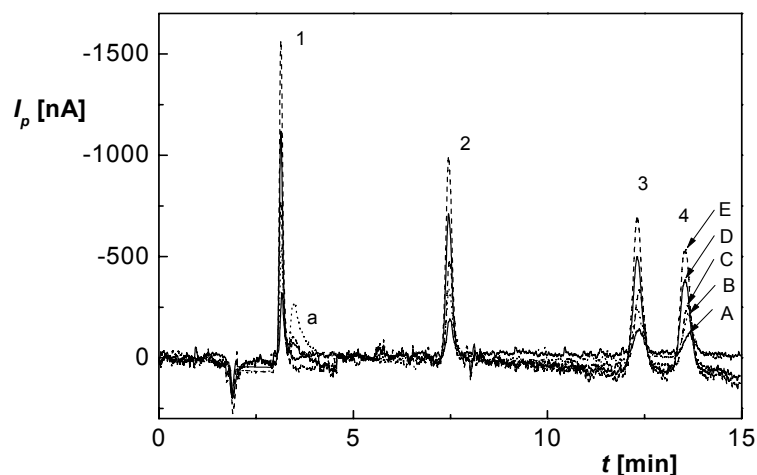
Obr. 6.2

Chromatogramy směsi 5-NQ (1), 2-nitrofluorenu (2), 1-nitropyrenu (3) a 3-nitrofluoranthenu (4) pro HPLC s UV detekcí ($\lambda = 254 \text{ nm}$) o koncentraci každé látky $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ (A), $4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ (B), $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ (C), $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ (D) a $10 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ (E). Mobilní fáze $0,01 \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ fosfátový pufr o pH 7,0: methanol v poměru 15:85 (v/v), dávkováno $20 \mu\text{l}$ vzorku, průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.



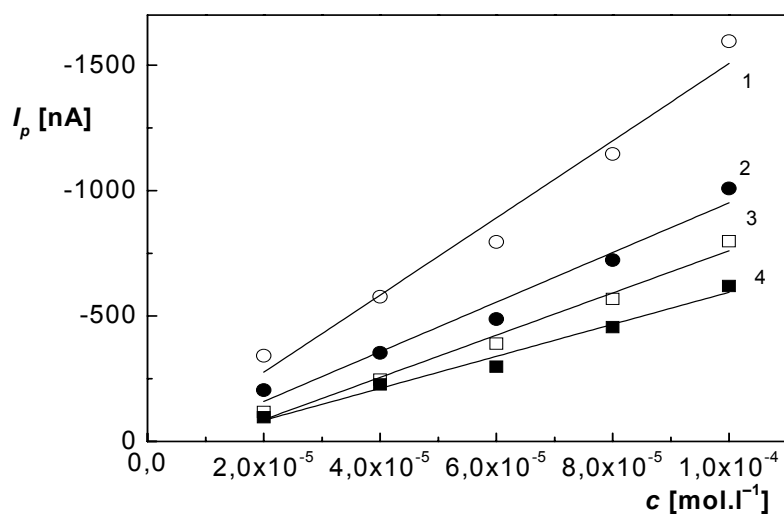
Obr. 6.3

Kalibrační závislost pro HPLC stanovení směsi 5-NQ (1), 2-nitrofluorenu (2), 1-nitropyrenu (3) a 3-nitrofluoranthenu (4) s UV detekcí ($\lambda = 254 \text{ nm}$) v koncentračním rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$. Mobilní fáze $0,01 \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ fosfátový pufr o pH 7,0: methanol v poměru 15:85 (v/v), dávkováno $20 \mu\text{l}$ vzorku, průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Vyhodnoceno z výšky píku.



Obr. 6.4

Chromatogramy směsi 5-NQ (1), 2-nitrofluorenu (2), 1-nitropyrenu (3) a 3-nitrofluoranthenu (4) pro HPLC s elektrochemickou detekcí na m-AgSAE ($E_{det} = -1,5 V$) o koncentraci každé látky $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ (A), $4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ (B), $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ (C), $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ (D) a $10 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ (E). Mobilní fáze $0,01 \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ fosfátový pufr o pH 7,0; methanol v poměru 15:85 (v/v), dávkováno $20 \mu\text{l}$ vzorku, průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. a – pík kyslíku.



Obr. 6.5

Kalibrační závislost pro HPLC stanovení směsi 5-NQ (1), 2-nitrofluorenu (2), 1-nitropyrenu (3) a 3-nitrofluoranthenu (4) s elektrochemickou detekcí na m-AgSAE ($E_{det} = -1,5 V$) v koncentračním rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$. Mobilní fáze $0,01 \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ fosfátový pufr o pH 7,0; methanol v poměru 15:85 (v/v), dávkováno $20 \mu\text{l}$ vzorku, průtoková rychlost $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Vyhodnoceno z výšky píku.

Tab. 6.2

Parametry kalibračních závislostí pro HPLC stanovení směsi 5-NQ, 1-nitropyren, 2-nitrofluoren a 3-nitrofluoranthen s elektrochemickou detekcí na m-AgSAE ($E_{det} = -1,5 V$) v koncentračním rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. Mobilní fáze $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ fosfátový pufr o pH 7,0: methanol v poměru 15:85 (v/v), dávkováno $20 \mu\text{l}$ vzorku, průtoková rychlost 1 ml.min^{-1} . Vyhodnoceno z výšky píku I_p .

Analyt	Koncentrační rozmezí [mol.l ⁻¹]	Směrnice [nA.mol ⁻¹ .l]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	L_{Q3} [mol.l ⁻¹]
5-NQ	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$-1,5 \cdot 10^8$	31,3	0,9917	$9,2 \cdot 10^{-6}$
1-nitropyren	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$-8,4 \cdot 10^7$	80,3	0,9952	$2,8 \cdot 10^{-5}$
2-nitrofluoren	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$-9,9 \cdot 10^7$	38,3	0,9911	$1,7 \cdot 10^{-5}$
3-nitrofluoranthen	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$-6,4 \cdot 10^7$	43,8	0,9943	$3,3 \cdot 10^{-5}$

Tab. 6.3

Parametry kalibračních závislostí pro HPLC stanovení směsi 5-NQ, 1-nitropyren, 2-nitrofluoren a 3-nitrofluoranthen s UV detekcí ($\lambda = 254 \text{ nm}$) v koncentračním rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. Mobilní fáze $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ fosfátový pufr o pH 7,0: methanol v poměru 15:85 (v/v), dávkováno $20 \mu\text{l}$ vzorku, průtoková rychlost 1 ml.min^{-1} . Vyhodnoceno z výšky píku I_p .

Analyt	Koncentrační rozmezí [mol.l ⁻¹]	Směrnice [nA.mol ⁻¹ .l]	Úsek [nA]	Korelační koeficient
5-NQ	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$9,1 \cdot 10^7$	-62,4	0,9940
1-nitropyren	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$4,4 \cdot 10^7$	-36,3	0,9946
2-nitrofluoren	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$2,6 \cdot 10^7$	-19,4	0,9938
3-nitrofluoranthen	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$2,4 \cdot 10^7$	-14,9	0,9944

7 ZÁVĚR

1. Byla vypracována metoda stanovení 5-NQ a 6-NQ technikou DC voltametrie na m-AgSAE. Pro obě studované látky byly nalezeny optimální podmínky pro stanovení v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-4} - 4 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$. Optimálním prostředím byl $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ borátový pufr o pH 9,0 (5-NQ) a BR pufr o pH 7,0 (6-NQ), kde látky poskytovaly nejvyšší a nejlépe vyvinutý pík. Dále byly určeny meze stanovitelnosti $5,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ (5-NQ) a $6,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ (6-NQ). Poté byla vypracována metoda stanovení 5-NQ a 6-NQ technikou diferenční pulsní voltametrie na m-AgSAE v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$. Jako optimální prostředí byl použit $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ borátový pufr o pH 9,0 (5-NQ) a $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH (6-NQ). Při tomto stanovení byly dosaženy meze stanovitelnosti $3,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ (5-NQ) a $3,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ (6-NQ).
2. Byl prostudován mechanismus redukce u studovaných látek 5-NQ a 6-NQ pomocí cyklické voltametrie na m-AgSAE.
3. Byla vypracována metoda stanovení 5-NQ technikou průtokové injekční analýzy s UV/VIS a ampérometrickou detekcí za použití m-AgSAE v modelových vzorcích pitné a říční vody. Jako optimální prostředí byl zvolen $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ borátový pufr o pH 9,0, potenciál detekce $-1,6 \text{ V}$, průtoková rychlost 4 ml.min^{-1} , dávkovaný objem $0,1 \text{ ml}$. 5-NQ byl stanoven v obou těchto matricích v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. Bylo dosaženo mezí stanovitelnosti elektrochemického detektoru $1,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ pro pitnou vodu a $2,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ pro říční vodu.

4. Byla navržena separace 5-NQ, 1-nitropyrenu, 2-nitrofluorenu a 3-nitrofluoranthenu metodou HPLC na koloně KROMASIL (250 x 4,6 mm, velikost částic 7,0 μm) s chemicky navázanou C18 fází s ampérometrickou detekcí na m-AgSAE a UV detekcí. Byly nalezeny optimální podmínky pro stanovení: Mobilní fáze směs 0,01 mol.l⁻¹ fosfátový pufr pH 7,0 : methanol 15:85 (v/v), potenciál detekce - 1,5 V, průtoková rychlost 1 ml.min⁻¹, dávkovaný objem 20 μl . Směs byla stanovena v koncentračním rozmezí 1.10⁻⁴ – 2.10⁻⁵ mol.l⁻¹. Pro elektrochemický detektor bylo dosaženo mezí stanovitelnosti L_{Q3} 9,2.10⁻⁵ mol.l⁻¹ pro 5-NQ, 2,8.10⁻⁵ mol.l⁻¹ pro 1-nitropyren, 1,7.10⁻⁵ mol.l⁻¹ pro 2-nitrofluoren a 3,3.10⁻⁵ mol.l⁻¹ pro 3-nitrofluoranthén.

8 LITERATURA

1. Barek J., Mejstřík V., Švagrová I., Zima J.: *Chem. Listy* **88**, 341 (1994).
2. IARC: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol. 33: Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1: Chemical, Environmental and Experimental Data. IARC, Lyon 1983.
3. Barek J., Cvačka J., Moreira J. C., Zima J.: *Chem. Listy* **90**, 805 (1996).
4. Barek J.: *Chem. Listy* **80**, 904 (1986).
5. Marhold J.: *Přehled průmyslové toxikologie 2*. Avicenum, Praha 1986.
6. Kawazoe Y., Tachibana M.: *Chem. Pharm. Bull.* **15**, 1 (1967).
7. Tachibana M., Shoei S., Kawazoe Y.: *Chem. Pharm. Bull.* **15**, 1112 (1967).
8. Kaiya T., Shirai N., Kawazoe Y.: *Chem. Pharm. Bull.* **34**, 881 (1986).
9. Králová Z.: *Bakalářská práce*, PřF UK, Praha 2007.
10. Jiránek I.: *Diplomová práce*, PřF UK, Praha 2006.
11. Jiráček J.: *Bakalářská práce*, PřF UK, Praha 2008.
12. Karásek J.: *Bakalářská práce*, PřF UK, Praha 2008.
13. Čížek K.: *Disertační práce*, PřF UK, Praha 2007
14. Červinka O.: *Chemie organických sloučenin, sv. 2*, SNTL, Praha 1987.
15. Tada M., Takahashi K., Kawazoe Y.: *Chem. Pharm. Bull.* **30**, 3834 (1982)
16. Kuželová M., Kunor V.: *Pracovní lékařství* **21**, 310 (1969)
17. Grant W. M.: *Toxicology of the Eye*, Charles C. Tomas Publ., Springfield 1962.
18. Patty E. H. (Ed.): *Industrial Hygiene and Toxicology 2nd Ed.*, Interscience Publ. Inc., New York 1963.
19. Giddings J. M.: *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* **23**, 360 (1979)
20. URL: <http://www.fscimage.fisherci.com/msds/52230.htm>, staženo 4.4.2007
21. URL: <http://www.mpbio.com/includes/msds/eu/en/214493-en-eu.pdf>, staženo 9.4.2009
22. URL: <http://potency.berkeley.edu/chempages/6-NITROQUINOLINE.html>, staženo 9.4.2009

23. Paputa-Peck M. C., Marano R. S., Schuetzle D., Riley T. L., Hampton C. V., Prater T. J., Skewes L. M., Jensen T. E., Ruehle P. H.: *Anal. Chem.* **55**, 1946 (1983).
24. Schuetzle D., Perez J. M.: *Air Pollut. Control Assoc.* **33**, 751 (1983).
25. World Health Organisation: Selected Nitro- and Nitro-Oxy-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, IPCS Environmental Health Criteria 229. WHO, Geneva (2003).
26. Rosenkrantz H. S., Mermelstein R.: *Mutat. Res.* **114**, 217 (1983).
27. Rosenkrantz H. S.: *Mutat. Res.* **367**, 65 (1996).
28. IARC: URL:<http://monographs.iarc.fr/ENG//Classification>, staženo 9.4.2009.
29. Březina M., Zuman P.: Polarografie v lékařství, biochemii a farmácii. Zdravotnické nakladatelství v Praze II, Praha 1952.
30. Meites L., Zuman P., Scott W. J., Campbell B. H., Kardos A. M., Fenner T. L., Rupp E. B., Lampurgani L., Zuman R.: CRC Handbook Series in Electrochemistry, Vol. I. CRC Press, Cleveland 1977.
31. Pech J.: *Coll. Czech. Chem. Comm.* **6**, 126 (1934).
32. Adkins H., Cox F. W.: *J. Amer. Chem. Soc.* **60**, 1151 (1938).
33. Folliard J. T., Cover R. E.: *J. Electroanal. Chem. Inter. Electrochem.* **33**, 463 (1971).
34. Cover R. E., Folliard J. T.: *J. Electroanal. Chem. Inter. Electrochem.* **30**, 143 (1971).
35. Kaiya T., Shirai N., Kawazoe Y.: *Chem. Pharm. Bull.* **34**, 881 (1986).
36. Liu T. Y., Robbat A., Jr.: *J. Chromatogr.* **539**, 1 (1991)
37. Robbat A., Jr., Corso N. P., Doherty P. J., Wolf M. H.: *Anal. Chem.* **58**, 2078 (1986).
38. Wang K.-T., Wang I. S. Y., Lin A. L.: *J. Chin. Chem. Soc.* **13**, 77 (1966).
39. Gundel L. A., Mahanama K. R. R., Daisey J. M.: *J. Chromatogr.* **629**, 75 (1993).
40. Novotný L., Yosypchuk B.: *Chem. Listy* **94**, 1118 (2000).
41. Meloun M., Militký J.: Statistické zpracování experimentálních dat na osobním počítači. FINISH, Pardubice (1992).
42. Inczédy J., Lengyel T., Ure A. M.: Compendium of analytical nomenclature (Definitive Rules 1997), Blackwell Science 1998.
43. Laviron E., Vallat A., Meunier-Prest R.: *J. Electroanal. Chem.* **379**, 427 (1994).

44. Zuman P., Fijalek Z., Dumanovič D., Sužnjevič D.: *Electroanalysis* **4**, 783 (1992).
45. Holleck L., Kastening B., Vogt H.: *Electrochim. Acta* **8**, 255 (1963).
46. Kastening B.: *Electrochim. Acta* **9**, 241, (1964).
47. McIntire G. L., Chiappardi D. M., Casselberry R. L., Biount H. N.: *J. Phys. Chem.* **86**, 2632 (1982).
48. Danhel A., Shiu K. K., Yosypchuk B., Barek J., Peckova K., Vyskocil V.: *Electroanalysis* **21**, 303 (2009).