

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta  
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

---

VOLTAMETRICKÁ A AMPEROMETRICKÁ DETEKCE  
GENOTOXICKÝCH DERIVÁTŮ PYRENU POMOCÍ BÓREM  
DOPOVANÉ DIAMANTOVÉ FILMOVÉ ELEKTRODY

Voltammetric and Amperometric Detection of Genotoxic Pyrene  
Derivatives at Boron-doped Diamond Film Electrode

Diplomová práce  
studijního oboru Analytická chemie

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Prof. RNDr. Jiřího Barka, CSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

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

V Praze dne 1. července 2010

.....  
podpis

**Předmětová hesla:**

Voltametrie

Amperometrie

HPLC

Borem dopovaná diamantová filmová elektroda

Nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky

**Klíčová slova:**

1-Nitropyren

1-Aminopyren

1-Hydroxypyren

Diferenční pulsní voltametrie

Cyklická voltametrie

HPLC s elektrochemickou detekcí

Úvodem bych chtěla poděkovat svému školiteli Prof. RNDr. Jiřímu Barkovi, CSc. a dále Mgr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné připomínky k mé práci a všem členům Katedry analytické chemie za vřelý přístup a ochotu, se kterou mi poskytovali pomoc.

Současně bych ráda poděkovala svým rodičům za umožnění studia na vysoké škole a za podporu během celého studia.

## Abstract

This thesis is concentrated on the optimization of conditions for determination of genotoxic environmental pollutants which belong to derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons – 1-nitropyrene (1-NP), 1-aminopyrene (1-AP) and 1-hydroxypyrene (1-HP). All three compounds were determined by differential pulse voltammetry (DPV) at boron-doped diamond film electrode in water-methanolic solutions. Further, 1-AP and 1-HP were determined in a model sample of urine. For this purpose, effective separative techniques such as solid phase extraction and high performance liquid chromatography with reverse phase and amperometric detection at above mentioned type of electrode were used. Limits of detection of all tested compounds in water-methanolic solutions are  $9 \cdot 10^{-8}$ – $3 \cdot 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup> using DPV and  $1 \cdot 10^{-8}$  mol dm<sup>-3</sup> for 1-HP and 1-AP in model sample of urine determined by HPLC with amperometric detection.

## Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá optimalizací podmínek pro stanovení genotoxických polutantů životního prostředí patřících mezi deriváty aromatických polycyklických uhlovodíků – 1-nitropyrenu (1-NP), 1-aminopyrenu (1-AP) a 1-hydroxypyrenu (1-HP). Všechny tři uvedené látky byly stanovovány diferenční pulsní voltametrií (DPV) na borem dopované diamantové filmové elektrodě ve vodně-methanolickém prostředí. Dále byly 1-AP a 1-HP stanovovány v modelovém vzorku moči. K těmto účelům byly použity účinné separační techniky – extrakce na tuhé fázi a vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi s elektrochemickou detekcí na již zmíněné borem dopované diamantové filmové elektrodě. Meze detekce všech tří látek stanovovaných metodou DPV jsou v rozmezí  $9 \cdot 10^{-8}$  až  $3 \cdot 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup> a limit detekce 1-AP a 1-HP v moči změřené pomocí HPLC s amperometrickou detekcí je pro obě látky  $1 \cdot 10^{-8}$  mol dm<sup>-3</sup>.

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>11</b>
1.1 Cíl práce .....	11
1.2 Studované látky .....	12
<b>2 Experimentální část</b> .....	<b>23</b>
2.1 Reagencie .....	23
2.2 Aparatura .....	24
2.2.1 Borem dopovaná diamantová filmová elektroda .....	26
2.3 Pracovní postupy .....	30
2.3.1 Voltametrie .....	30
2.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí .....	31
2.3.3 Extrakce na tuhou fázi .....	32
<b>3 Voltametrické stanovení 1-nitropyrenu na borem dopované diamantové filmové elektrodě</b> .....	<b>32</b>
3.1 Vliv pH na voltametrické chování 1-nitropyrenu .....	32
3.2 Průběh redukce 1-nitropyrenu v kyselém prostředí .....	35
3.3 Pasivace elektrody při stanovení 1-nitropyrenu .....	36
3.4 Závislost odezvy 1-nitropyrenu na rychlosti scanu při DC voltametrii .....	37
3.5 Koncentrační závislost 1-nitropyrenu .....	38
<b>4 Voltametrické stanovení 1-aminopyrenu na borem dopované diamantové filmové elektrodě</b> .....	<b>40</b>
4.1 Vliv pH na voltametrické chování 1-aminopyrenu .....	41
4.2 Pasivace elektrody při stanovení 1-aminopyrenu .....	43
4.3 Závislost odezvy 1-aminopyrenu na rychlosti scanu při DC voltametrii .....	44
4.4 Koncentrační závislost 1-aminopyrenu .....	45
<b>5 Voltametrické stanovení 1-hydroxypyrenu na borem dopované diamantové filmové elektrodě</b> .....	<b>47</b>
5.1 Vliv pH na voltametrické chování 1-hydroxypyrenu .....	47
5.2 Pasivace elektrody při stanovení 1-hydroxypyrenu .....	50
5.3 Koncentrační závislost 1-hydroxypyrenu .....	50
<b>6 Voltametrické stanovení 1-hydroxypyrenu v moči na borem dopované diamantové filmové elektrodě</b> .....	<b>52</b>
6.1 Vliv pH na voltametrické chování 1-hydroxypyrenu v modelovém roztoku .....	52

6.2 Průběh oxidace 1-hydroxypyrenu v modelovém roztoku v zásaditém prostředí.....	55
6.3 Pasivace elektrody při stanovení 1-hydroxypyrenu v modelovém roztoku.....	57
6.4 Závislost odezvy 1-hydroxypyrenu v modelovém roztoku na rychlosti scanu při DC voltametii.....	58
6.5 Koncentrační závislost 1-hydroxypyrenu v modelovém roztoku .....	59
6.6 Separace a prekoncentrace 1-hydroxypyrenu z moči .....	61
6.7 Pasivace elektrody při stanovení 1-hydroxypyrenu v moči po předběžné separaci a prekoncentraci.....	62
6.8 Koncentrační závislost 1-hydroxypyrenu v moči .....	63
<b>7 Diskuse k voltametrickým stanovením .....</b>	<b>64</b>
<b>8 Stanovení 1-aminopyrenu a 1-hydroxypyrenu v moči vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s elektrochemickou detekcí na borem dopované diamantové filmové elektrodě .....</b>	<b>67</b>
8.1 Optimalizace podmínek pro stanovení 1-aminopyrenu a 1-hydroxypyrenu v methanolicím prostředí .....	67
8.2 Koncentrační závislost 1-aminopyrenu a 1-hydroxypyrenu v methanolicím prostředí.....	71
8.3 Separace a prekoncentrace 1-aminopyrenu a 1-hydroxypyrenu z moči .....	73
8.4 Koncentrační závislost 1-aminopyrenu a 1-hydroxypyrenu z moči .....	74
<b>9 Závěr .....</b>	<b>77</b>
<b>10 Literatura .....</b>	<b>79</b>



## Seznam použitých symbolů a zkratek

1-NP	1-nitropyren
$V_{1-HP}$	průtoková rychlost mobilní fáze při stanovení 1-hydroxypyrenu [ $\text{ml min}^{-1}$ ]
$V_{1-AP}$	průtoková rychlost mobilní fáze při stanovení 1-aminopyrenu [ $\text{ml min}^{-1}$ ]
$E_{ox}$	optimální elektrodový potenciál při oxidaci 1-aminopyrenu a 1-hydroxypyrenu metodou HPLC-ED [mV]
$ L $	absolutní hodnota intervalu spolehlivosti [nA]
1-AP	1-aminopyren
1-HP	1-hydroxypyren
AdSV	adsorpční rozpouštěcí voltametrie (adsorptive stripping voltammetry)
BDDFE	bórem dopovaná diamantová filmová elektroda (boron-doped diamond film electrode)
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
$c$	molární koncentrace [ $\text{mol dm}^{-3}$ ]
CAGe	kompozitní stříbrná elektroda
CGE	kompozitní grafitová elektroda
CV	cyklická voltametrie
DCV	DC voltametrie (voltametrie s lineárním scanem; direct current voltammetry )
DME	rtuťová kapající elektroda (dropping mercury electrode)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPP	diferenční pulsní polarografie
DPV	diferenční pulsní voltametrie
$E$	elektrodový potenciál [mV]
$E_{reg}^1$	počáteční regenerační potenciál při stanovení 1-nitropyrenu [mV]
$E_{reg}^2$	konečný regenerační potenciál při stanovení 1-nitropyrenu [mV]
$E_{kon}$	konečný potenciál scanu při cyklické voltametii [mV]
$E_p$	potenciál píku [mV]
$E_{poč}$	potenciál, od kterého začíná měření při cyklické voltametii [mV]
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda (hanging mercury drop electrode)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)

I	elektrický proud [nA]
$I_p$	výška píku [nA]
LOD	mez detekce [ $\text{mol dm}^{-3}$ ]
LOQ	mez stanovitelnosti [ $\text{mol dm}^{-3}$ ]
m-AgSAE	rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgamová elektroda
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
NPAH	nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
pH	pH použitého pufru
$\text{pH}^b$	pH vodně-methanolického roztoku měřené skleněnou elektrodou kalibrovanou na vodné roztoky pufrů
R	korelační koeficient
RSD	relativní směrodatná odchylka [%]
s	směrodatná odchylka [nA]
SPCE	tištěná uhlíková elektroda (screen-printed carbon electrode)
$t_{\text{reg}}^1$	doba, po kterou je vložen počáteční regenerační potenciál $E_{\text{reg}}^1$ při stanovení 1-nitropyrenu [s]
$t_{\text{reg}}^2$	doba, po kterou je vložen konečný regenerační potenciál $E_{\text{reg}}^2$ při stanovení 1-nitropyrenu [s]
$t_R$	retenční čas [min]
v	průtoková rychlost mobilní fáze [ $\text{ml min}^{-1}$ ]

# 1 ÚVOD

Přímým důsledkem současného bouřlivého rozvoje automobilismu je nárůst zdravotních rizik spojených s expozicí naší populace škodlivým látkám obsažených v automobilových emisích. Významnou roli v tomto směru hrají polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) a nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky (NPAH)<sup>1</sup> patřící k rozšířeným chemickým karcinogenům<sup>2,3</sup>. Proto je velice důležité tyto látky v životním a pracovním prostředí vhodnými postupy monitorovat obzvlášť když mohou do těla vstupovat už po přímém kontaktu s kůží či zažívacím traktem. Zde je na místě výběr vhodných zástupců těchto polutantů, případně jejich metabolitů, jako vhodných biomarkerů pro sledování expozice těmto nebezpečným látkám. Jeden z nejpoužívanějších markerů expozice PAH je 1-hydroxypyren (1-HP). Pro sledování expozice NPAH se jako biomarkery uplatňují 1-nitropyren (1-NP)<sup>4</sup> a jeho metabolit 1-aminopyren (1-AP) (viz Tabulka 1.1).

Vzhledem k tomu, že výše uvedené látky obsahují snadno oxidovatelné/redukovatelné hydroxy-, amino- a nitro- skupiny na aromatickém jádře, jsou pro jejich sledování vhodné elektrochemické metody jako jsou diferenční pulsní voltametrie, voltametrie s lineárním scanem nebo cyklická voltametrie. Pro mimořádně citlivé a selektivní stanovení v tělních tekutinách se nabízí vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED). Tato technika je levnější nežli metody využívající hmotnostně-spektrometrické detekce a zároveň dostatečně citlivá, takže by mohla být obecně použitelná k monitorování expozice PAH a NPAH.

Velmi důležitou roli v elektrochemické detekci hraje výběr pracovní elektrody. Pro daný projekt byla zvolena borem dopovaná diamantová filmová elektroda (BDDFE), která se vyznačuje širokým rozsahem pracovních potenciálů dovolujícím provádět jak redukci, tak i oxidaci organických látek. BDDFE je mimořádně mechanický a chemický stabilní, má nízký šum a odolnost vůči pasivaci, což umožňuje využití těchto elektrod v průtokových systémech<sup>5</sup>.

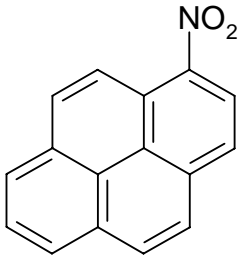
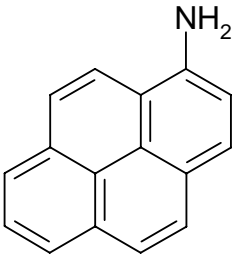
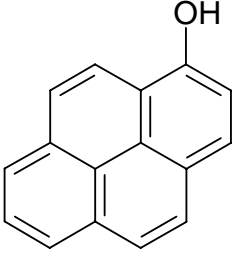
## 1.1 Cíl práce

Cílem této práce bylo:

- Provést výzkum elektrochemického chování roztoků 1-nitropyrenu, 1-aminopyrenu a 1-hydroxypyrenu ve vodně-methanolickém prostředí metodami diferenční pulsní voltametrie a voltametrie s lineárním scanem na borem dopované diamantové filmové elektrodě.

- Nalézt optimální podmínky pro jejich stanovení v moči metodou vysokoučinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí na BDDFE s předběžným zakoncentrováním analytu.
- Provést pilotní studii stanovení 1-hydroxypyrenu v moči metodou diferenční pulsní voltametrie po předběžné separaci a extrakci na tuhé fázi.

Tabulka 1.1 Přehled stanovovaných látek.

CAS name	Strukturální vzorec	CAS number	Relativní molekulová hmotnost
<b>1-Nitropyrene</b>		5522-43-0	247,25
<b>1-Aminopyrene</b>		1606-67-3	217,27
<b>1-Hydroxypyrene</b>		5315-79-7	218,25

## 1.2 Studované látky

Současný bouřlivý rozvoj automobilismu v České republice výrazně přispívá ke znečišťování životního prostředí. Příмым důsledkem je nárůst zdravotních rizik spojených s expozicí naší populace škodlivým látkám obsažených v automobilových emisích. Významnou roli v tomto směru hrají polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH)<sup>1</sup>. Jsou běžnou součástí všech složek životního prostředí, kam pronikají jak z přírodních, tak i z průmyslových zdrojů.

Přírozená rovnováha mezi produkcí a degradací PAH byla narušena v 19. a 20. století především díky průmyslové revoluci. Až z 90% je tento nárůst koncentrací způsoben nedokonalými spalováními uhlí, ropy, nafty a dřeva. Přírodní zdroje zahrnují především lesní a stepní požáry a vulkanickou činnost. Příspěvky přírodních zdrojů k celkové kontaminaci životního prostředí PAH jsou však minoritní<sup>6</sup>. Stejně jako PAH, jsou i jejich nitroderiváty (NPAH) v životním prostředí prakticky všudypřítomné a své mateřské sloučeniny zpravidla doprovázejí. V ovzduší se běžně vyskytují v koncentracích okolo  $10^{-2}$  až  $10^2$  ng m<sup>-3</sup>, tj. na hladinách až o několik řádů nižších než mateřské sloučeniny. Jejich zdrojem jsou jednak atmosférické reakce, kdy NPAH vznikají radikálově iniciovanými reakcemi PAH s oxidy dusíku přítomnými ve znečištěném ovzduší a jednak samotné spalovací procesy (hlavně ve výfukových plynech dieselových a benzínových motorů), ale i černicí materiály, tonery pro kopírky, cigaretový kouř nebo potraviny<sup>7</sup>.

PAH i NPAH do organismu vstupují zpravidla dýchacími či trávicími cestami, mohou však být snadno a rychle absorbovány i kůží. Vzhledem ke své nízké těkavosti jsou v ovzduší i ve výfukových plynech adsorbovány na tuhých částicích<sup>8</sup>. Byla u nich bezpečně rozpoznána souvislost mezi profesionální expozicí a zvýšeným výskytem rakoviny<sup>1</sup>. Studie provádějící průzkum úmrtnosti pracovníků amerických železnic v letech 1959 až 1996 tvrdí, že existuje souvislost mezi expozicí PAH (jejichž koncentrace v tomto prostředí je podstatně zvýšena) a rakovinou plic, přičemž její pravděpodobnost byla vyšší u jedinců častěji přicházejících do styku s vlaky poháněnými dieselovými lokomotivami<sup>9</sup>. Epidemiologické studie pracovníků u koksovacích pecí naznačily vzestup rizika plicní rakoviny ve vztahu k expozici PAH<sup>10</sup>. Výsledky průzkumu mezi pracovníky exponovanými automobilovým emisím naznačují, že muži obvykle zaměstnaní jako řidiči kamionů měli statisticky významné 50% zvýšení rizika rakoviny močového měchýře<sup>11</sup>.

Z uvedených konkrétních příkladů a rozsáhlého množství provedených výzkumů je patrné, že PAH a NPAH patří mezi velmi rozšířené a silné znečišťovatele životního prostředí zahrnující prokázané karcinogeny a mutagenní látky jak pro lidi, tak i pro zvířata. Z tohoto důvodu byla vyvinuta celá řada postupů odběrů vzorků, jejich zpracování a analyzování pro sledování expozice těmto nebezpečným látkám.

Monitorování PAH a NPAH v ovzduší umožňuje odhadnout pouze dávku přijatou dýcháním. PAH a NPAH však mohou do těla vstupovat i po přímém kontaktu s kůží či zažívacím traktem. Proto je vhodnější tzv. biologické monitorování (tj. stanovení PAH a NPAH nebo jejich metabolitů v tělních tekutinách), které umožňuje poměrně přesný odhad dávky, kterou je exponovaný organismus skutečně zatížen. Nejvhodnějším biologickým

materiálem se jeví moč, jejíž vzorky jsou snáze dostupné nežli vzorky krve či jiných tělních tekutin<sup>12</sup>. Vzhledem k tomu, že pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí bylo v životním prostředí již identifikováno přes 100 různých PAH<sup>13</sup>, je důležitý výběr vhodných zástupců těchto polutantů, případně jejich metabolitů, jako vhodných biomarkerů pro sledování expozice těmto nebezpečným látkám. Bioindikátory totiž poskytují důležité informace o vystavení organismu karcinogenům nebo o mechanismu vývoje rakoviny spojených s různými typy expozice PAH, NPAH a jejich metabolitům.

### ***1-Hydroxypyren***

Jeden z nejpoužívanějších markerů expozice PAH je 1-hydroxypyren (1-HP). Vyznačuje se vysokou citlivostí stanovení, nízkou hladinou u neexponovaných osob a vysokou úrovní u osob exponovaných. Navíc byla prokázána dobrá korelace mezi mutagenitou moči a obsahem 1-HP<sup>14</sup>. Poprvé byl 1-HP identifikován v moči prasete v roce 1983 jako hlavní produkt metabolismu pyrenu<sup>15</sup>, který je běžnou komponentou směsi PAH. Jedna ze studií právě upozorňuje na statisticky významnou korelaci mezi množstvím 1-HP v lidské moči a koncentrací pyrenu a benzo[a]pyrenu v okolním prostředí<sup>14</sup>. V domácnosti může být významným zdrojem PAH nevhodná tepelná úprava potravin (grilování, smažení), pálení rozmanitých svíček, vonných tyčinek, ale také kouření. Studie v rámci obyvatelstva Evropy a Asie ukazují významné zvýšení hladiny 1-HP u kuřáků v porovnání s nekuřáky. V Tabulce 1.2 je uvedeno několik příkladů. Li<sup>16</sup> a kol. naměřili následující průměrné koncentrace 1-HP v moči: 0,04  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  kreatininu u nekuřáků (0 cigaret/den), 0,20  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  kreatininu u lehkých kuřáků (do 20 cigaret/den), 0,46  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  kreatininu u středních kuřáků (20–40 cigaret/den) a 1,16  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  kreatininu u silných kuřáků (40 a více cigaret/den). Hladina 1-HP u lehkých, středních a silných kuřáků je 5, 12 a 29krát vyšší, než u nekuřáků. Experimentální studie Scherera a spol.<sup>17</sup> dále ukazuje, že znatelně vyšší nárůst hladiny 1-HP v moči je u aktivních kuřáků než u nekuřících lidí pouze vystavených zakouřenému prostředí.

Tabulka 1.2 Porovnání koncentrace 1-HP u kuřáků a nekuřáků.

Skupina	Koncentrace 1-HP v moči $\mu\text{mol mol}^{-1}$ kreatininu		Lit.
	Průměr (počet osob)		
	Nekuřáci	Kuřáci	
Pracovníci v průmyslu	0,17 (14)	0,51 (28)	18
Studenti	0,12 (39)	0,25 (37)	19
Ženy v domácnosti	0,08 (27)	0,25 (97)	20

Dalším zdrojem PAH může být i říční voda se znečištěnou sedimentací. Takovým příkladem je řeka Rhine v Nizozemsku. Jogeneelen a kol. (cit.<sup>21</sup> a cit. v ní obsažené) zde studovali expozici PAH u 6 windsurferů. Tři dny před windsurfingem byly referentní, další 2 dny se už dobrovolníci věnovali tomuto sportu nejméně 3 hodiny denně. Účastníkům experimentu pak byla odebíraná moč a sledovala se hladina 1-HP. Výsledky ukazují, že v referentních dnech byla koncentrace 1-HP 0,11  $\mu\text{mol}$

$\text{mol}^{-1}$  kreatininu (rozmezí 0,05–0,16), zatímco ve dnech, kdy se surfovalo, dosahovala téměř trojnásobné hodnoty – 0,32  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  kreatininu (rozmezí 0,16–0,81). Výpočet dávek pyrenu obdržených vdechováním, orálně či dermálně ukázal, že nejefektivnější cesta expozice PAH byla přes pokožku.

Velkému zatížení PAH a jeho metabolitům jsou vystaveni zaměstnanci v továrnách na výrobu hliníku, koksovnách, železárnách, ocelárnách, dále asfaltěři, řidiči dopravních prostředků či zaměstnanci železnic (viz Tabulka 1.3). Se zvýšenou hladinou 1-hydroxypyrenu (až o 2 řády) v moči se můžeme setkat i u pacientů trpících kožními onemocněními (např. psoriázou) léčenými přípravky na bázi kamenouhelného dehtu<sup>22</sup>.

Tabulka 1.3 Koncentrace 1-HP v moči jedinců exponovaných PAH.

Zaměstnání/léčení	Koncentrace 1-HP v moči $\mu\text{mol mol}^{-1}$ kreatininu (počet osob)	Lit.
<i>Pracovníci v hliníkárně</i>		
před směnou	0,43–0,77 (55)	23
po směně	1,93–3,60 (55)	
<i>Pracovníci v koksárně</i>		
před směnou	0,24–3,50 (44)	18
po směně	0,46–11,2 (44)	
<i>Řidiči autobusu</i>	0,05–1,60 (60)	24
<i>Poštovní doručovatelé</i>	0,02–0,75 (88)	
<i>Asfaltéři</i>		
před směnou	1,35 (43)	25
po směně	1,76 (43)	
<i>Léčba kamenouhelným dehtem</i>		
před léčbou	1–20 (4)	22
po léčbě	100–500 (4)	

### *1-Nitropyren a 1-aminopyren*

Pro sledování expozice NPAH se jako biomarkery uplatňují 1-nitropyren (1-NP) a 1-aminopyren (1-AP). Ve vzorcích částic, které jsou emitovány naftovými motory, bylo určeno více než padesát NPAH, přičemž převládající sloučeninou je právě 1-NP<sup>1</sup>. Obecně platí, že koncentrace 1-NP jsou několikanásobně větší ve městech a na dálnicích právě kvůli hojnému výskytu automobilů. Například až stonásobné zvětšení množství 1-NP v městském ovzduší oproti venkovnímu bylo naměřeno ve Francii v Marseilles, kdy koncentrace na venkově se pohybovaly v rozmezí 0,0 až 3,1  $\text{pg m}^{-3}$  a ve městě 14,9 až 222,1  $\text{pg m}^{-3}$  (cit.<sup>26</sup>).

Stejně jako většina aromatických nitrosloučenin, 1-NP vykazuje mutagenní aktivitu v bakteriálních a savčích systémech<sup>27</sup>. Byl rovněž označen jako podezřelý karcinogen pro lidský organismus (skupina 2B) Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer, součástí Světové zdravotní organizace (WHO) OSN)<sup>28</sup>. Cílovými orgány jsou především játra, plíce a prsní žlázy.

Základem pro karcinogenní působení sloučeniny je její dostatečná afinita k nukleofilním centrům v DNA a blízkost k cílovým molekulám. Aby většina karcinogenů mohla tvořit adukty s DNA, vyžaduje metabolickou aktivaci<sup>29</sup>. Klíčovým místem metabolické aktivace 1-nitropyrenu (a nitrosloučenin obecně) je nitroskupina. Její redukcí vzniká hydroxylamin, který je nestabilní a ochotně tvoří nitreniový ion, který buď sám či přeměněný na karbeniový ion reaguje s nukleofilními centry molekul DNA za tvorby aduktů. Všechny procesy aktivace



jsou v organismu zprostředkovány enzymově katalyzovanými reakcemi. Cílovými místy pro kovalentní vazbu aktivovaného 1-NP v DNA jsou především purinové báze adenin a guanin<sup>30</sup>.

Studie metabolismu 1-NP provedené na potkanech ukázaly, že přes 50% dávky 1-NP bylo vyloučeno do 24 hodin od podání, 15 až 30% v moči a 40 až 60% ve stolici. Všechny metabolity byly v konjugované formě a to převážně s kyselinou glukuronovou. Hlavními metabolity 1-NP byly 1-aminopyren, 3-, 6- a 8-hydroxy-1-nitropyren, 8-hydroxy-*N*-nitropyren, 6- a 8-hydroxy-*N*-acetyl-1-aminopyren a 4,5-dihydroxy-4,5-dihydro-1-nitropyren<sup>31,33</sup>. Právě 1-AP je dalším poměrně často stanoveným biomarkerem expozice NPAH a spolu s hydroxy-1-nitropyreny (3-, 6- a 8-) a hydroxy-*N*-acetyl-1-aminopyreny (6- a 8-) byl prokázán i v moči lidí<sup>34,35</sup>.

### ***Metody stanovení 1-nitropyrenu, 1-aminopyrenu a 1-hydroxypyrenu***

Jak již bylo zmíněno, 1-NP je nejzastoupenější NPAH ve výfukových zplodinách dieselových motorů, čímž se stává velmi rozšířeným v životním prostředí a navíc je podezřelý karcinogen pro člověka. Z těchto důvodů je často volen jako biomarker expozice NPAH a jeho hladina se sleduje hlavně v místech zatížených dopravou nebo průmyslem. 1-AP se stanovuje v souvislosti s 1-NP jakožto produkt jeho chemické redukce, metabolit 1-NP v živých organismech nebo jako jeden ze zástupců amino-PAH, které se obecně označují za látky genotoxické a jsou mezi nimi i prokázané karcinogeny. 1-HP zase má hojné využití jako biomarker sledování expozice PAH v biologických matricích, hlavně v moči.

Všechny tři látky se vyskytují ve složitých matricích, a proto je třeba věnovat značnou pozornost předběžnému zpracování vzorků před samotnou detekcí, chceme-li dosáhnout selektivních a citlivých stanovení. V následujících odstavcích bude popsáno několik běžně používaných technik předběžné separace a prekoncentrace vzorků ovzduší, výfukových plynů a moči s příklady detekčních technik používaných při stanovení 1-NP, 1-AP a 1-HP.

### ***Zpracování vzorků ovzduší a výfukových plynů před samotnou detekcí 1-nitropyrenu a 1-aminopyrenu***

PAH a jejich deriváty se vyskytují v ovzduší a výfukových zplodinách jednak v plynné fázi a jednak i naadsorbované na pevné částice (prach, saze aj.). Při vlastním vzorkování je ve většině případů zapotřebí zvolit techniku odběru umožňující zachycení analytu(ů) z obou prostředí. K jímání pevných částic se často používají filtry ze skelných<sup>36,37</sup>, teflonových<sup>38</sup> a křemenných<sup>39</sup> vláken. Pro zachycení plynné fáze se pak používají různé typy sorbentů, např. polyuretanová pěna<sup>38</sup>. Analyty jsou z filtrů a sorbentů následně extrahovány organickými

rozpouštědly. Murayama a Dasgupta<sup>36</sup> uvádějí následující způsob zpracování filtru ze skelných vláken: po vzorkování se filtr extrahuje v Soxhletově přístroji 150 ml dichlormethanu po dobu 24 hodin. Rozpouštědlo se odpaří pod proudem dusíku a odparek se sonikuje s 10 ml směsí MeOH:6,67 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (85:15). Kapalná fáze se pak naředí methanolem (20×) a dává se na HPLC. Ve vzorku výfukového plynu diesellového motoru pak byly nalezeny kromě 1-NP i 2-nitronaftalen, 2-nitro-1-naftol, 1-amino-4-nitronaftalen, 9-nitroantracen a další zástupci NPAH. Použití Soxhletova extraktoru a dichlormethanu uvádějí i další autoři<sup>40,38</sup>. Analýza se však dá podstatně zrychlit nahrazením Soxhletova extraktoru ultrazvukovou lázní. MacCrehan a kol.<sup>41</sup> extrahovali vzorky směsí dichlormethan:hexan (40:60) pomocí ultrazvuku 30 min, Baretto a spol.<sup>42</sup> dichlormethanem dokonce jen 5 minut. Další část extrakčního kroku většinou zahrnuje odpaření použitého rozpouštědla pod proudem dusíku a rozpuštění odparu nejčastěji v MeOH. Takto upravený vzorek je pak analyzován pomocí vhodné detekční techniky.

### ***Zpracování vzorků moči před samotnou detekcí 1-hydroxypyrenu, 1-aminopyren a metabolitů 1-nitropyrenu***

Při analýze daných látek v moči se vzorek odebírá nejčastěji do plastových lahvíček. Je třeba však upozornit na to, že při dlouhodobém skladování standardních roztoků či vzorků obsahujících tyto látky může dojít k jejich adsorpci na stěny plastových nádobek a proto je vhodnější používat skleněné. Pokud není odebraný vzorek zpracován hned, je možné jej uchovávat na delší dobu zmražením na -20 °C. 1-NP, 1-AP a 1-HP se v moči vyskytují hlavně ve formě konjugátů<sup>31,43,35</sup>, převážně glukuronidů, proto je nutné převést tyto konjugované formy na volné. Nevázané 1-HP, 1-AP, 1-NP (i jeho výše uvedené metabolity, které se také stanovují v moči) lze získat enzymatickou hydrolýzou<sup>43,34,44,45</sup>. Příkladem je postup podle Jongeneelena a spol.<sup>43</sup>, kdy se k 10–25 ml moči upravené na pH 5 1,0 M HCl a 0,1 M acetátovým pufrům přidá 12,5 µl enzymu β-glukuronidázy/arylsulfatázy a inkubuje se 16 h při 37 °C za stálého míchání. Jiní autoři<sup>34,44</sup> však uvádějí mnohem kratší dobu inkubace 3–4 h. Laumbach a kol.<sup>35</sup> použili pro hydrolýzu konjugátů 1-AP koncentrovanou HCl (1 ml HCl + 10 ml moči). Směs pak zahřívali při 80 °C 1 h za stálého míchání. Takto upravený vzorek je dále podroben předběžné extrakci a prekoncentraci. Další možností je i redukce již odseparovaných analytů (na SPE kolonce s C18) použitím 57% HI a kyseliny octové<sup>46</sup>.

Pro zakoncentrování a lepší izolaci analytů následuje separační a prekoncentrační krok. K těmto účelům se používá SPE extrakce s kolonkami Sep-Pak C18<sup>16,47,48</sup>, Sep-Pak Alumina A<sup>34</sup> nebo LiChrolut® RP-18 E (použita v této práci), ze kterých jsou analyty vymývány např. methanolem, směsí methanol/ethylacetát nebo methanol/voda. V práci<sup>35</sup> byl 1-AP po hydrolýze

kyselinou chlorovodíkovou extrahován dichlormethanem, odpařen pod proudem dusíku a odparek byl rozpuštěn v acetonitrilu. Toriba a spol.<sup>34</sup> a Van Bekkum a spol.<sup>44</sup> uvádějí použití Blue Rayon\* místo SPE nebo spolu s ní. Např. po enzymatické hydrolyze se metabolity 1-NP extrahují s 20 mg Blue Rayon 1 hodinu za stálého míchání. Blue Rayon byl následně promyt 5 ml směsí MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) a vysušen. Analyty se eluují dvakrát 2 ml MeOH:NH<sub>3</sub> (50:1) za stálého míchání po dobu 30 min. Eluát se odpaří pod proudem dusíku při 30 °C a odparek se pak rozpustí v MeOH a analyzuje pomocí HPLC nebo GC-MS/MS<sup>44</sup>.

### ***Detekční techniky pro stanovení 1-nitropyrenu, 1-aminopyrenu a 1-hydroxypyrenu***

1-NP se v ovzduší a výfukových plynech nestanovuje většinou samotný, nýbrž jako součást až několika desítek dalších látek ze skupiny PAH a NPAH hojně zastoupených v těchto matricích. V daných případech se uplatňuje pravděpodobně nejrozšířenější a také nejúčinnější metoda – plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS)<sup>49,50</sup>. Tato technika umožňuje najednou stanovit až několik desítek dalších látek (hlavně mateřských PAH a příbuzných NPAH) přítomných spolu s 1-NP ve vzorku. GC-MS je stejně dobře aplikovatelná na stanovení 1-HP např. v půdním extraktu<sup>51</sup>, 1-AP v krvi potkanů<sup>52</sup> nebo spolu s aminobifenyly, aminoantraceny, aminonaftaleny a dalšími APAH v naftě<sup>53</sup>. Vedle hmotnostního detektoru se pro stanovení 1-NP pomocí GC dále používají plamenově-ionizační detektor a "thermal energy analyzer"<sup>54</sup>.

Při stanoveních 1-NP, 1-AP a 1-HP se taktéž hodně využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Poměrně často využívaný fluorescenční detektor (FLD) poskytuje citlivá stanovení 1-HP při analýze moči<sup>16,55</sup>, mléka nebo cereálií<sup>56</sup>. 1-AP jakožto metabolit 1-NP se sledoval HPLC-FLD v moči jedinců po expozici výfukovým plynům z diesellového motoru<sup>35</sup>. Přímé stanovení 1-NP je znemožněno skutečností, že nitro skupina nefluoreskuje. Tento problém se často řeší on-line redukcí nitroskupiny na aminoskupinu. V práci<sup>57</sup> využívají k převedení NPAH na odpovídající aminy vodného roztoku NaHS. MacCrehan a kol<sup>41</sup>. zase použili redukční kolonu se zinkovým práškem vřazenou za analytickou kolonu. Zajímavé řešení prezentují i Murayama a Dasgupta<sup>36</sup>.

\* Adsorbent ze syntetického hedvábí s kovalentně navázaným modrým pigmentem majícím velkou afinitu k aromatickým sloučeninám se třemi nebo více konjugovanými jádry.

Před fluorescenční detektor zařadili totiž on-line elektrochemický detektor v redukčním modu s pracovní elektrodou z porézního grafitu a mohly tak jednak umožnit stanovení NPAH (1-NP, 1-nitronaftalen, 2-nitrofluoren aj.) fluorescenčním detektorem a jednak využívat dva detektory najednou. Elektrochemický detektor byl využit i při stanovení 1-HP v moči. Oxidace 1-HP probíhala při potenciálu +1600 mV na elektrodě ze skelného uhlíku<sup>47</sup>. HPLC s elektrochemickou koncovkou použil i Galceran a Moyano<sup>37</sup> pro detekci devíti PAH včetně 1-NP ve wall-jet cele rovněž s elektrodou ze skelného uhlíku. V případě stanovení 1-HP v moči se dá dále použít HPLC s hmotnostní detekcí<sup>58</sup> a UV detekce při 235 nm.

Vzhledem ke snadné elektrochemické redukci nitroskupiny a oxidaci amino a hydroxy skupin na aromatickém jádře, lze ke stanovení stopových množství derivátů PAH použít polarografické a voltametrické metody. Nejpoužívanějšími technikami jsou diferenční pulsní voltametrie a polarografie na různých typech elektrod jako jsou např. borem dopované diamantové filmové elektrody, uhlíkové pastové elektrody, uhlíkové pastové elektrody modifikované DNA nebo cyklodextriny a tištěné uhlíkové elektrody. Velmi citlivého stanovení, v řádech až  $10^{-10}$  mol dm<sup>-3</sup>, lze dosáhnout s použitím adsorpční rozpouštěcí voltametrie na visících rtuťových kapkových elektrodách a stříbrných amalgámových elektrodách. Příklady voltametrických a polarografických metod a použitých elektrod jsou shrnuty v Tabulce 1.4.

Tabulka 1.4 Elektrochemické metody stanovení derivátů polycyklických aromatických uhlovodíků.

Látka	Pracovní elektroda	Metoda	LOQ mol dm <sup>-3</sup>	LOD	Matrice	Lit.
1,3-dinitronaftalen	m-AgSAE	DPV	2·10 <sup>-6</sup>		MeOH-BR pufr pH 10,0 (50:50)	45
1,5-dinitronaftalen			1·10 <sup>-6</sup>			
1,8-dinitronaftalen			5·10 <sup>-7</sup>			
<b>1-nitropyren</b>	DME	DPP	2,5·10 <sup>-7</sup>		MeOH-BR pufr pH 13 (90:10)	59
	HMDE	DPV	6·10 <sup>-8</sup>		MeOH-BR pufr pH 12 (50:50)	
	HMDE	AdSV	9·10 <sup>-10</sup>		MeOH-BR pufr pH 3 (1:99)	
<b>1-nitropyren</b>	GCPE	LSV	2·10 <sup>-5</sup>		MeOH-BR pufr pH 3 (90:10)	60
		DPV	2·10 <sup>-6</sup>			
<b>1-aminopyren</b>	dsDNA-CPE	PSA		6·10 <sup>-8</sup>	0,2 mol l <sup>-1</sup> cetátový pufr o pH 5;	61
2-aminonaftalen				1,8·10 <sup>-6</sup>	metoda aplikována i na stanovení 2-antraminu	
2-antramin				8·10 <sup>-8</sup>	v říční vodě	
1,2-diaminoantrachinon				1·10 <sup>-8</sup>		
9,10-diaminofenantren				2·10 <sup>-8</sup>		
<b>1-aminopyren</b>	GCPE	DCV	3·10 <sup>-6</sup>		MeOH-BR pufr pH 2 (10:90)	60
		DPV	1·10 <sup>-6</sup>			
		AdSV	1·10 <sup>-7</sup>			

Látka	Pracovní elektroda	Metoda	LOQ mol dm <sup>-3</sup>	LOD	Matrice	Lit.
<b>1-aminopyren</b>	CPE	DPV	1,9·10 <sup>-7</sup>		BR pufr pH 7 s 1% dimethylsulfoxidem	62
	β-CD/CPE		1,2·10 <sup>-7</sup>			
	γ-CD/CPE		1,7·10 <sup>-7</sup>			
<b>1-hydroxypyren</b>	CPE	DPV	2,2·10 <sup>-7</sup>		BR pufr pH 7 s 1% dimethylsulfoxidem	62
	β-CD/CPE		1,2·10 <sup>-7</sup>			
	γ-CD/CPE		7,6·10 <sup>-8</sup>			
<b>1-hydroxypyren</b>	tf-ME	AdSV		1,06·10 <sup>-9</sup>	0,01 mol l <sup>-1</sup> NaOH; metoda aplikována i na stanovení v moči kuřáka	63

LOD, LOQ – mez detekce a mez stanovitelnosti

m-AgSAE – rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgamová elektroda

DME – rtuťová kapající elektroda

HMDE – visící rtuťová kapková elektroda

GCPE – pastová elektroda ze skelného uhlíku

BDDFE – borem dopovaná diamantová filmová elektroda

dsDNA-CPE – uhlíková pastová elektroda modifikovaná dsDNA (double-stranded calf thymus DNA)

CPE – uhlíková pastová elektroda

β-CD/CPE – uhlíková pastová elektroda modifikovaná β-cykloextrinem

λ-CD/CPE – uhlíková pastová elektroda modifikovaná λ-cykloextrinem

tf-ME – tenkovrstvá filmová rtuťová elektroda

DPV – diferenční pulsní voltametrie

DPP – diferenční pulsní polarografie

AdSV – adsorpční rozpouštěcí voltametrie

PSA – potenciometrická (chronopotenciometrická) rozpouštěcí analýza

DCV – voltametrie s lineárním scanem

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Reagencie

*Studované látky:* zásobní roztok 1-NP (p. a., 99%, Sigma-Aldrich, Česká republika) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  byl připraven rozpuštěním 0,02473 g krystalického 1-NP v methanolu (p. a., 99,8%, Penta, Česká republika) a doplněním na celkový objem 100 ml. Z důvodu pomalejšího rozpouštění byl použit ultrazvuk (PSO 200A Ultrasonic Compact Cleaner, Powersonic). Zásobní roztok 1-AP (p. a., 99%, Sigma-Aldrich, Česká republika) o  $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  byl připraven rozpuštěním 0,02171 g krystalického 1-AP v methanolu a doplněním na celkový objem 100 ml. Zásobní roztok 1-HP (p. a., 98%, Sigma-Aldrich, Česká republika) o  $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  byl připraven rozpuštěním 0,02183 g 1-HP v methanolu a doplněním na celkový objem 100 ml. Roztoky o nižší koncentraci byly připravovány přesným ředěním zásobních roztoků. Všechny roztoky studovaných látek byly skladovány ve skleněných nádobách ve tmě za laboratorní teploty (při dlouhodobém skladování zásobních roztoků v plastových nádobách dochází k jejich adsorpci na stěny nádob).

*Další použité chemikálie:* 2-propanol pro spektrofotometrii (Merck KGaA, Německo), kyselina boritá (p.a., Lachema, Česká republika), kyselina orthofosforečná (p. a., 85%, Lach-Ner, s.r.o., Česká republika), kyselina octová (p.a., 99,8%, Lach-Ner, s.r.o., Česká republika), hydroxid sodný (p. a., Lach-Ner, s. r. o., Česká republika), dekahydrát tetraboritanu sodného ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ , p.a., Lachema, Česká republika), kyselina chlorovodíková (Lachema, Česká republika), deionizovaná voda (Millipore, Milli-Q plus systém, USA).

Příprava *Brittonova-Robinsonova pufru* (BR pufr) o pH 2,0–12,0: nejdříve se připravila zvlášť jeho kyselá a zásaditá složka. Kyselá složka obsahovala kyselinu boritou, kyselinu octovou a kyselinu fosforečnou vše o koncentraci  $0,04 \text{ mol dm}^{-3}$ . Zásaditá složka obsahovala  $0,20 \text{ mol dm}^{-3}$  NaOH. Smícháním obou složek v určitém poměru se získal pufr o požadované hodnotě pH.

*Borátový pufr* o koncentraci  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  byl připraven rozpuštěním vypočteného množství dekahydrátu tetraboritanu sodného v deionizované vodě. pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 9,0 přidáním  $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$  HCl.

*Fosfátový pufr* o pH 3,0–5,0 byl připraven smísením kyseliny fosforečné o koncentraci  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  s vypočteným množstvím hydroxidu sodného o koncentraci  $1,00 \text{ mol dm}^{-3}$ .

## 2.2 Aparatura

### *Voltametrická měření*

Voltametrická měření byla prováděna s využitím počítačového Eco-Tribo Polarografu PC-ETP (Polaro-Sensors, Česká republika) v programu PolarPro verze 5. Jednotlivá měření byla prováděna ve tříelektrodovém zapojení ve vsádkovém uspořádání (Obr. 2.1).

- *pracovní elektroda*: bórem dopovaná diamantová filmová elektroda (viz kapitola 2.2.1.)
- *referentní elektroda*: argentchloridová ( $3 \text{ mol dm}^{-3}$  KCl, Monokrystaly, Česká republika)
- *pomocná elektroda*: platinový plíšek (Monokrystaly, Česká republika)

Pro měření pH sloužil digitální pH-metr Jenway 4330 (Jenway, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou.

### *Chromatografická měření*

Použit byl HPLC systém LaChrom Elite (Merk, Česká republika) s elektrochemickou detekcí v uspořádání:

- gradientová pumpa SMASH L-2130
- dávkovač Front-Loading Sample Injector Model 7725(i) 20  $\mu\text{l}$  (Rheodyne)
- kolonový termostat L-2300
- kolona LichroCART 125-4 100 RP-18, 5  $\mu\text{m}$ , 119  $\times$  4 mm
- předkolonka LiChroCARTR PAH 4-4
- ampérometrický detektor LC-4C (BAS)

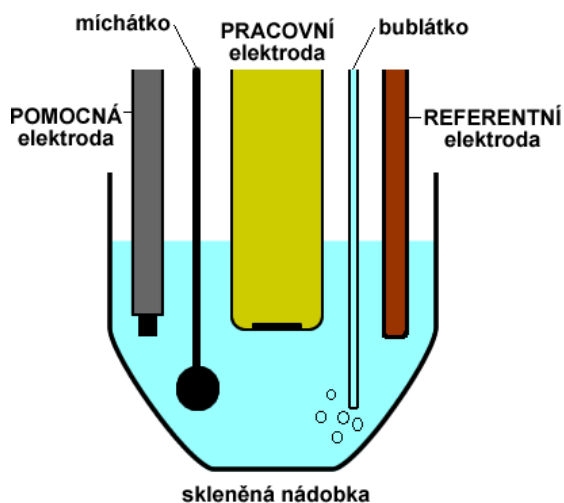
Byl používán tříelektrodový systém (viz *Voltametrická měření*) v tzv. wall-jet uspořádání (Obr. 2.2). Měření byla prováděna za laboratorní teploty, kolona byla termostatována na 40 °C pro zajištění konstantní teploty kolony i během horkých letních dnů. Používané mobilní fáze byly vždy před použitím odvdušněny ultrazvukem po dobu 10 min.

### *Extrakce na tuhé fázi (SPE)*

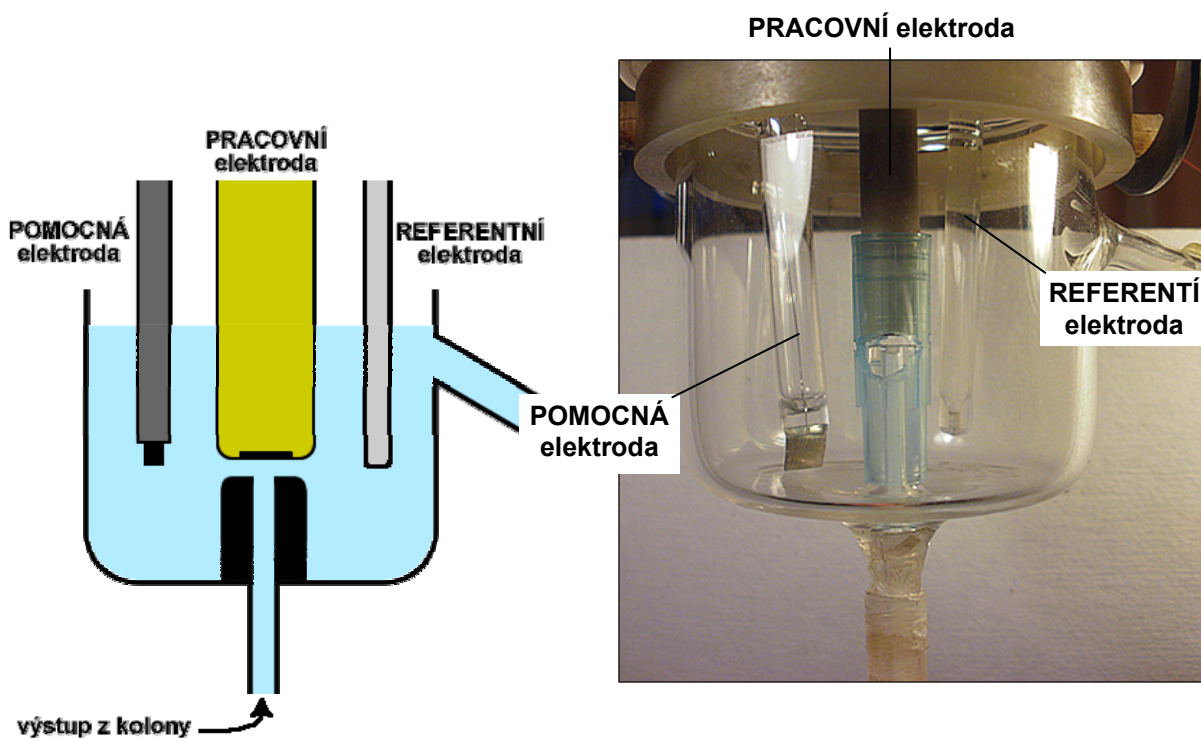
Extrakce na tuhé fázi se prováděly na kolonce LiChrolut® RP-18 E (40–63  $\mu\text{m}$ ), 200 mg 3 ml (Merck, Česká republika). Tato kolonka je plněna silikagelem s chemicky navázanou fází



RP-18 E o velikosti částic 40–63  $\mu\text{m}$ ; je určena pro vodné pufované roztoky v rozmezí pH 2–8.



Obr. 2.1 Elektrochemická cela ve vsádkovém uspořádání. Pracovní elektroda – borem dopovaná diamantová filmová elektroda, referentní elektroda – argentchloridová (3M KCl) a pomocná elektroda – platinový plíšek.



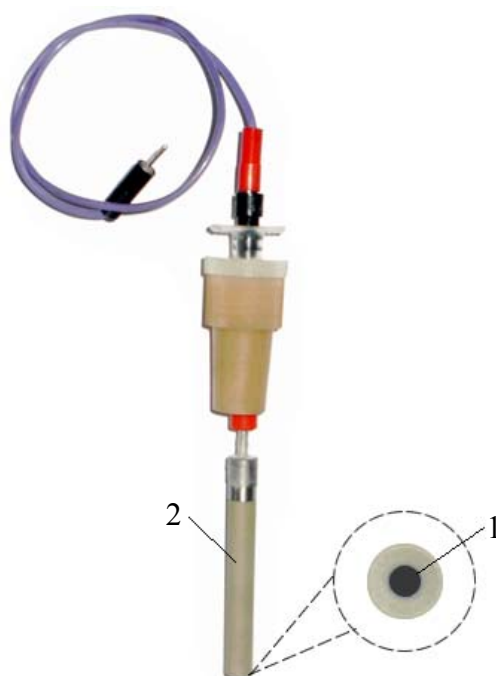
Obr. 2.2 Elektrochemický detektor v uspořádání wall-jet. Pracovní elektroda – borem dopovaná diamantová filmová elektroda, referentní elektroda – argentchloridová (3M KCl) a pomocná elektroda – platinový plíšek.

## 2.2.1 Borem dopovaná diamantová filmová elektroda

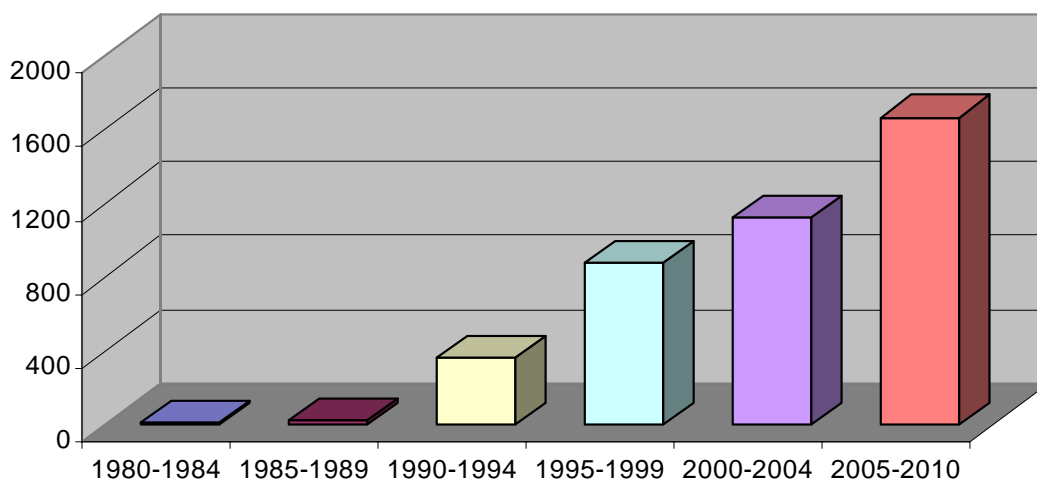
### Úvod

Pro studium chování 1-NP, 1-AP a 1-HP byla jako pracovní elektroda použita bórem dopovaná diamantová elektroda s mikrokrytalickým diamantem (Obr. 2.3).

I když problematika využití diamantových elektrod se začala intenzivně zkoumat teprve v posledních dvou desetiletích, první zmínka se datuje do roku 1983. Tehdy japonští vědci Iwaki a kol. opublikovali článek o použití diamantové elektrody pro elektrochemické účely<sup>64</sup>. Jejich elektroda vykazovala širší potenciálové okno v katodické oblasti a menší šum než elektrody ze skelného uhlíku. O několik let později, v roce 1987, Pleskov a kol.<sup>65</sup> zkoumali fotochemické vlastnosti polovodivých polykrystalických diamantových filmů na wolframovém substrátu ve vodném prostředí. Tenne a kol. v roce 1993 navrhli využití diamantové filmové elektrody pro elektrochemickou redukci dusičnanu na amoniak<sup>66</sup> a Chailapakul s kolegy prokázali lepší citlivost stanovení kyseliny citrónové, alaninu a cysteinu na borem dopovaném diamantu než na skelném uhlíku<sup>67</sup>. Toto jsou jen ukázky publikací, které prezentovali nesporné výhody diamantových elektrod a tak podnítili bouřlivý rozvoj dalšího výzkumu. Obr. 2.4 ukazuje nárůst počtu publikací o borem dopovaných diamantových elektrodách v letech 1980 až 2010.



Obr. 2.3 Bórem dopovaná diamantová filmová elektroda. Křemíková destička s mikrokrytalickým diamantovým povrchem (1), průměr pracovní části elektrody 3 mm, plocha pracovní části elektrody  $7,1 \text{ mm}^2$ , tělo elektrody je vyrobeno z polyetheretherketonu.



Obr. 2.4 Nárůst publikací o borem dopovaných elektrodách v letech 1980 až 2010.

### ***Vlastnosti diamantových elektrod***

Diamant se vyznačuje mimořádnou mechanickou i chemickou stabilitou. Je jedním z nejlepších přírodních izolátorů a pro jeho elektroanalytické využití je nutné jej dopovat atomy jiných prvků, nejčastěji atomy bóru. Hlavní výhody<sup>68,69</sup>, které činí borem dopovaný diamant neobyčejně perspektivním elektrodovým materiálem jsou:

- nízká kapacita elektrické dvojvrstvy mající za následek nízký zbytkový proud a velmi malý šum
- široké potenciálové okno zhruba od  $-1,5$  V do  $+1,5$  V v  $0,1$  mol  $\text{dm}^{-3}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$
- parafinický charakter povrchu mající za následek nízkou adsorpci látek na tomto elektrodovém materiálu, což snižuje pravděpodobnost deaktivace zablokováním aktivních center na povrchu a tudíž minimalizuje problémy související s pasivací elektrody produkty elektrodové reakce či interferenty v analyzovaném roztoku
- mechanická robustnost a stabilita umožňující využití těchto elektrod v průtokových systémech
- biokompatibilita umožňující snadnou implantaci těchto elektrod do živé tkáně s minimální pravděpodobností negativní biologické odezvy.

Ve srovnání s ostatními uhlíkovými materiály se diamantové filmové elektrody vyznačují dobrou stabilitou<sup>68</sup>. Nevykazují známky poškození při anodické polarizaci v kyselých, neutrálních i alkalických roztocích, v přítomnosti chloridových nebo fluoridových

aniontů. Elektrochemické vlastnosti diamantových filmových elektrod jsou ovlivněny zejména typem dopantu a jeho koncentrací, morfologickými vlastnostmi (přítomností povrchových defektů), přítomností nečistot uhlíku nemajících strukturu diamantu a druhem povrchové terminace (H, F, O aj.). V našem případě byl diamantový film terminován vodíkem. Takový povrch má obdobnou strukturu jako alkany, a proto má jen velmi nízkou tendenci adsorbovat polární sloučeniny z roztoku. Díky tomu jsou elektrodové procesy, které zahrnují adsorpci intermediátů na povrch elektrody (např. vývoj vodíku, kyslíku nebo halogenů) silně zpomaleny.

### ***Příprava diamantových elektrod***

Nejčastěji jsou diamantové elektrody používány ve formě tenkých, polykrystalických filmů. Diamantové filmy se připravují<sup>69</sup>, chemickou depozicí par při použití žhavených vláken nebo mikrovlnného ohřevu. K depozici diamantového filmu je nejčastěji používána směs methanu a vodíku při objemovém poměru C/H 0,5 až 2,0 % a tlaku 1333,2 až 13332,2 Pa. Dopování bórem je dosaženo přidáváním diboranu do směsi plynů, případně je možno použít pevný nitrid bóru, který za podmínek panujících v plasmovém hořáku postupně reaguje s atomárním vodíkem na diboran. Jako nosič se nejčastěji používá destička z křemíku s nízkým odporem, lze použít i wolfram nebo molybden. Destičku je nutno předem očistit a přešleštit brusnou směsí složenou z diamantového prášku a B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Zachycené částice slouží jako krystalizační centra pro růst diamantového filmu. Tímto způsobem je možno vyrobit diamantové filmy o ploše až několik cm<sup>2</sup>. Vzniklé filmy jsou polykrystalické, s ostrými, dobře vyvinutými krystaly o velikosti 0,5 až 3 μm.

### ***Použití bórem dopovaných diamantových elektrod***

Pro použití BDDFE v elektrochemii existují dva hlavní směry a to jednak jejich využití pro elektrochemickou oxidaci organických látek obsažených v odpadních vodách na BDD anodě (založena na jejich úplné konverzi nebo destrukci) a jednak užití BDD jako elektrochemických senzorů ve voltametii a při amperometrické detekci v průtokových systémech jako jsou HPLC, průtoková injekční analýza a kapilární elektroforéza<sup>70</sup>. V druhém případě BDDFE nalézá uplatnění při stanovení pesticidů, léčiv, environmentálních polutantů (fenoly a jejich chlorované deriváty, polycyklické aromatické uhlovodíky a jejich deriváty) a dalších biologicky aktivních dusíkatých a sírných látek. Přehled některých aplikací je uveden v Tabulce 2.1.

Tabulka 2.1 Použití borem dopovaných diamantových filmových elektrod pro stanovení organických látek.

Stanovovaná látka	Metoda	Mez detekce, mol dm <sup>-3</sup>	Lit.
3-Chlorfenol	FIA-ED HPLC-ED	1·10 <sup>-7</sup>	71
2-Aminobifenyl		2·10 <sup>-7</sup>	
3-Aminobifenyl	HPLC-ED	3·10 <sup>-7</sup>	72
4-Aminobifenyl		5·10 <sup>-7</sup>	
3-Nitrofluoranten		3·10 <sup>-8</sup>	
3-Aminofluoranten	DPV	2·10 <sup>-7</sup>	73
Cystein	HPLC-ED	1·10 <sup>-9</sup>	74
Fluoranthen		1·10 <sup>-8</sup>	
Pyren	HPLC-ED	1·10 <sup>-8</sup>	75
Pyrocatechol	CE-ED	1·10 <sup>-7</sup>	76
1,3-Dinitrobenzen	CE-ED	4·10 <sup>-7</sup>	77
Fenol	FIA-ED HPLC-ED	3·10 <sup>-7</sup> 1·10 <sup>-7</sup>	71
Histamin	FIA-ED	5·10 <sup>-7</sup>	78
Nikotin	SWV	3·10 <sup>-6</sup>	78
Naproxen	DPV	3·10 <sup>-8</sup>	79

## 2.3 Pracovní postupy

### 2.3.1 Voltametrie

a) Při diferenční pulsní voltametii (DPV) byly použity následující parametry: polarizační rychlost  $20 \text{ mV s}^{-1}$ , pulsy o šířce 100 ms, modulační amplituda +50 mV při stanovení 1-AP a 1-HP a -50 mV při měření 1-NP.

Pro eliminaci problémů s pasivací byl oxidační scan prováděn v případě 1-AP od +230 do +680 mV, v případě 1-HP od +150 do +500 mV a při stanovení 1-HP v moči od -200 do +500 mV. U 1-NP byla po každém měření aplikována elektrochemická regenerace s následujícími parametry: 50 potenciálových skoků mezi  $E_{\text{reg}}^1 = +800 \text{ mV}$ ,  $t_{\text{reg}}^1 = 0,3 \text{ s}$  a  $E_{\text{reg}}^2 = -500 \text{ mV}$ ,  $t_{\text{reg}}^2 = 0,3 \text{ s}$ . Mezi jednotlivými měřeními roztokem bylo mícháno.

b) Hodnoty potenciálových rozsahů a polarizačních rychlostí použitých při voltametii s lineárním scanem (DCV) jsou uvedeny u konkrétních stanovení. Mezi jednotlivými měřeními roztokem bylo mícháno.

c) Při cyklické voltametii (CV) byly všechny scany prováděny s polarizační rychlostí  $20 \text{ mV s}^{-1}$ , regenerace elektrody ani míchání roztoku mezi jednotlivými cykly nebylo použito.

U stanovení 1-NP (redukce) byl vzdušný kyslík vždy z roztoku odstraňován pětiminutovým probubláváním dusíkem, u 1-AP a 1-HP (oxidace) to nebylo třeba.

#### ***Příprava měřeného roztoku pro stanovení 1-NP, 1-AP a 1-HP ve vodně-methanolickém prostředí***

Při měření DP voltamogramů bylo postupováno následovně: do odměrné baňky na 10 ml bylo odměřeno dané množství BR nebo borátového pufru (druh, množství a pH dle zjištěných optimálních podmínek), přidáno 3 ml methanolu (platí pro 1-NP, aby po jeho přidání nedocházelo ke srážení ve vodné složce), dané množství roztoku 1-NP, 1-AP nebo 1-HP v methanolu a roztok byl nakonec doplněn po rysku methanolem. Výsledný roztok byl zanalyzován metodou DPV.

#### ***Příprava měřeného roztoku pro stanovení 1-HP v moči po předběžné separaci a extrakci***

Nejdříve bylo provedeno měření 1-HP ve vodně-methanolickém prostředí, kdy měřený roztok obsahoval 0,5 ml BR pufru o pH 2,0–12,0 (při hledání optimálního pH) a 0,5 ml 1-HP v methanolu o dané koncentraci. Vzhledem k tomu, že optimální pH pufru bylo 9,0, pro další měření byl BR pufr nahrazen borátovým pufrem.

Při stanovení 1-HP ve vzorku moči bylo k 0,5 ml methanolického roztoku 1-HP obdrženého po separaci a extrakci z moči (podrobně viz kap. 1.1.4) přidáno 0,5 ml borátového pufru o pH 9,0. Výsledný roztok byl zanalyzován metodou DPV.

Všechna měření byla prováděna při laboratorní teplotě. Po ukončení měření byla pracovní elektroda uchovávaná v deionizované vodě.

Výška pík sledovaných látek byla vyhodnocována od spojnice minim před a za píkem při DPV a od prodloužené základní linie při DC voltametii.

Mez detekce (LOD) byla počítaná podle směrnice IUPAC pomocí trojnásobku směrodatné odchylky stanovení odpovídající nejnižšímu bodu proměřené koncentrační závislosti a mez stanovitelnosti (LOQ) pomocí desetinásobku této směrodatné odchylky.

### ***2.3.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí***

Při zjištění optimálních podmínek pro stanovení 1-AP a 1-HP v moči byly použity zásobní roztoky těchto látek v methanolu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ , roztoky o nižších koncentracích byly získány přesným ředěním zásobních roztoků. Pro analýzu byla použita kolona LichroCART 125-4 100 RP-18, 5  $\mu\text{m}$ , 119  $\times$  4 mm, temperovaná na 40 °C s předkolumnou LiChroCART® PAH 4-4 (Merck). Dávkovalo se 20  $\mu\text{l}$  1-AP nebo 1-HP v methanolu o dané koncentraci.

Na začátku každého pracovního dne byl HPLC systém proplachován minimálně 15 min směsí deionizovaná vody:MeOH (40:60) a na konci práce pak v poměru 60:40 pro odstranění zbytku pufru se systému. Při analýze vzorků použitá mobilní fáze obsahovala 0,05M fosfátový pufr o daném pH a methanol (konkrétní údaje viz kap. 8). pH mobilních fází bylo upravováno změnou pH fosfátového pufru. Každá složka mobilní fáze byla před jejím použitím 10 min sonifikovaná. Odstranění dusíku z mobilní fáze, měřeného roztoku či vzorku před nebo během měření nebylo nutné.

Mez detekce (resp. mez stanovitelnosti) byla určována jako koncentrace látky, která poskytuje pík třikrát (resp. desetkrát) vyšší než je absolutní hodnota šumu.

### **2.3.3 Extrakce na tuhé fázi**

#### ***Stanovení 1-AP a 1-HP v moči pomocí HPLC-ED na BDDFE s předběžnou separací a prekoncentrací***

Extrakce 1-AP a 1-HP z moči byla prováděna následujícím způsobem: k 10 ml moči neexponovaného pracovníka bylo přidáno vypočtené množství roztoku 1-AP nebo 1-HP v methanolu. K takto připravenému modelovému vzorku moči bylo přidáno 10,0 ml fosfátového pufru o pH 5 a vzniklý roztok byl prolit SPE kolonkou (LiChrolut® RP-18 E (40–60 µm), 200 mg 3 ml, Merck), která byla předem aktivována promytím 5 ml MeOH a 10 ml deionizované vody. Kolonka byla následně promyta 10 ml vody a zachycené látky byly vymyty 10 ml MeOH. Eluát byl odpařen pod proudem dusíku do sucha, odparek rozpuštěn v 1,0 ml MeOH a 20 µl tohoto roztoku bylo nastříkováno do HPLC-ED systému.

#### ***Stanovení 1-HP v moči pomocí DPV na BDDFE s předběžnou separací a prekoncentrací***

Postup pro předběžnou separaci a prekoncentraci pro stanovení 1-HP v moči pomocí DPV je stejný jako pro stanovení 1-HP v moči pomocí HPLC-ED až na to, že k odparku bylo přidáno 0,5 ml MeOH a 0,5 ml borátového pufru o pH 9,0. Takto vzniklý roztok byl následně zanalyzován metodou DPV.

## **3 VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ 1-NITROPYRENU NA BÓREM DOPOVANÉ DIAMANTOVÉ FILMOVÉ ELEKTRODĚ**

### **3.1 Vliv pH na voltametrické chování 1-NP**

Průběh redukce nitroskupiny je závislý na pH měřeného roztoku. V závislosti na koncentraci vodíkových kationtů v roztoku se mechanismus redukce mění, což se projevuje různým počtem píků a posunem jejich potenciálů. Proto je důležité změřeni voltamogramů 1-NP při různých hodnotách pH a vyhodnocení získaných voltametrických křivek z hlediska počtu píků, jejich polohy, výšky a vyhodnotitelnosti.

Sledování vlivu pH na chování 1-NP bylo provedeno v prostředí BR pufru o pH 2,0 až 12,0 metodou diferenční pulsní voltametrie. Příprava roztoků pro tato měření byla následující:

Do odměrné baňky na 10 ml bylo přidáno 3 ml BR pufru o daném pH, přibližně 3 ml methanolu, 1 ml  $1 \cdot 10^{-3}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  roztoku v methanolu a doplněno methanolem na celkový objem 10 ml (výsledná koncentrace 1-NP byla  $1 \cdot 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ). Poměr methanol:pufr 70:30



byl zvolen z důvodu snížené rozpustnosti 1-NP v čistě vodném prostředí. Před začátkem měření byl z měřeného roztoku odstraněn kyslík pětiminutovým probubláváním dusíkem.

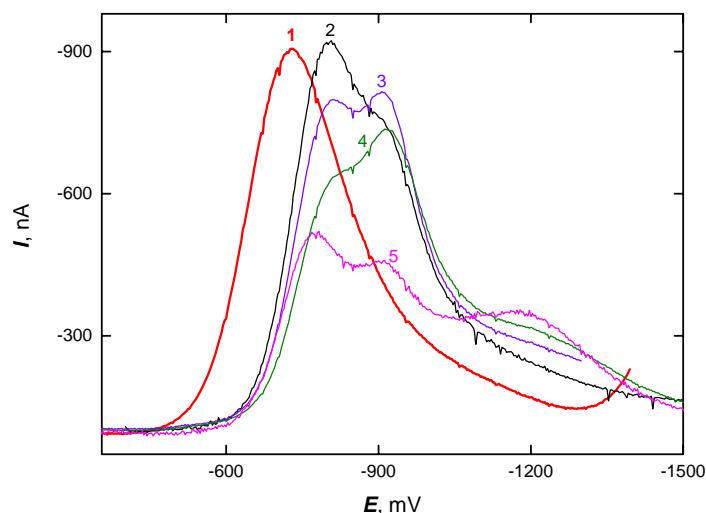
Při pH pufru 2,0–5,0 poskytuje látka jeden dobře vyvinutý pík ( $E_p^1$ ) s potenciály  $-597$  až  $-722$  mV, při pH 6,0–7,0 se objevuje druhý a při pH 8,0 až 12,0 je redukce nitroskupiny už třístupňová (Obr. 3.1 a Tabulka 3.1). S rostoucím pH se potenciály všech píků posouvají k negativnější oblasti jen velmi nepravidelně a ani změny výšek píků nejeví zřetelný trend (Obr. 3.2). Obecně takové chování může být způsobeno postupnou redukcí (jako v tomto případě) nebo oxidací látky, což představuje poměrně komplikovaný a obtížně definovatelný mechanismus elektrodové reakce.

Za optimální bylo pro 1-NP zvoleno prostředí methanol-BR pufr o pH 3,0 (výsledné pH<sup>b</sup> vodně-methanolického roztoku 4,6,  $E_p^1 = -733$  mV), kde byl získán nejvyšší a nejlépe vyhodnotitelný pík.

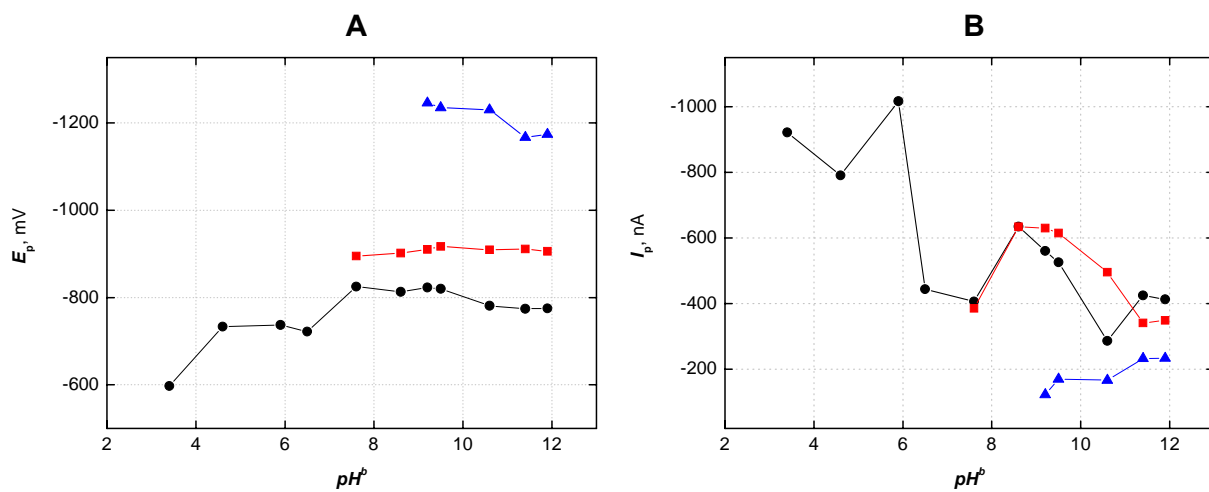
Tabulka 3.1 Výšky a potenciály píků 1-NP ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>) při různém pH BR pufru. Prostředí MeOH-BR pufr (70:30), měřeno metodou DPV na BDDFE.

pH	pH <sup>b</sup>	$E_p^1$ , mV	$I_p^1$ , nA	$E_p^2$ , mV	$I_p^2$ , nA	$E_p^3$ , mV	$I_p^3$ , nA
2,0	3,4	-597	-922	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>
3,0	4,6	-733	-791	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>
4,0	5,9	-737	-1017	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>
5,0	6,5	-722	-444	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>
6,0	7,6	-825	-407	-895	-386	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>
7,0	8,6	-813	-635	-902	-634	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>
8,0	9,2	-823	-561	-910	-630	-1246	-123
9,0	9,5	-820	-526	-917	-615	-1235	-170
10,0	10,6	-781	-287	-909	-496	-1230	-167
11,0	11,4	-774	-425	-911	-341	-1167	-233
12,0	11,9	-775	-413	-906	-349	-1174	-234

Optimální pH je zvýrazněno, <sup>b</sup> výsledné pH měřeného vodně-methanolického roztoku;  $E_p^1$  až  $E_p^3$  potenciál prvního až třetího píku;  $I_p^1$  až  $I_p^3$  výška prvního až třetího píku; <sup>c</sup> pík není patrný.



Obr. 3.1. Voltamogramy 1-NP ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) v prostředí MeOH-BR pufr (70:30), pH BR pufru 3,0 (1), 6,0 (2), 7,0 (3), 9,0 (4) a 12,0 (5). Elektrochemická regenerace před každým měřením: 50 potenciálových skoků mezi  $E_{\text{reg}}^1 = +800 \text{ mV}$ ,  $t_{\text{reg}}^1 = 0,3 \text{ s}$  a  $E_{\text{reg}}^2 = -500 \text{ mV}$ ,  $t_{\text{reg}}^2 = 0,3 \text{ s}$ . Měřeno metodou DPV na BDDFE.

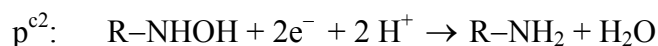
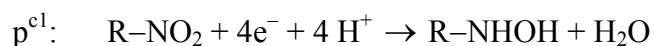


Obr. 3.2 Závislost potenciálu píku (A) a výšky píku (B) 1-NP ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) na  $\text{pH}^b$  roztoku. —●— 1. pík ( $E_p^1, I_p^1$ ), —■— 2. pík ( $E_p^2, I_p^2$ ) a —▲— 3. pík ( $E_p^3, I_p^3$ ). Měřeno v prostředí MeOH-BR pufr (70:30) metodou DPV na BDDFE. Elektrochemická regenerace před každým měřením: 50 potenciálových skoků mezi  $E_{\text{reg}}^1 = +800 \text{ mV}$ ,  $t_{\text{reg}}^1 = 0,3 \text{ s}$  a  $E_{\text{reg}}^2 = -500 \text{ mV}$ ,  $t_{\text{reg}}^2 = 0,3 \text{ s}$ .

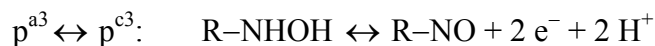
### 3.2 Průběh redukce 1-nitropyrenu v kyselém prostředí

Jelikož mechanismus redukce 1-nitropyrenu na BDDFE nebyl zatím publikován, má tato kapitola za úkol popsat zjištěný průběhem redukce nitro skupiny na jiných elektrodách v dostupné literatuře a porovnat ho s chováním 1-NP na BDDFE.

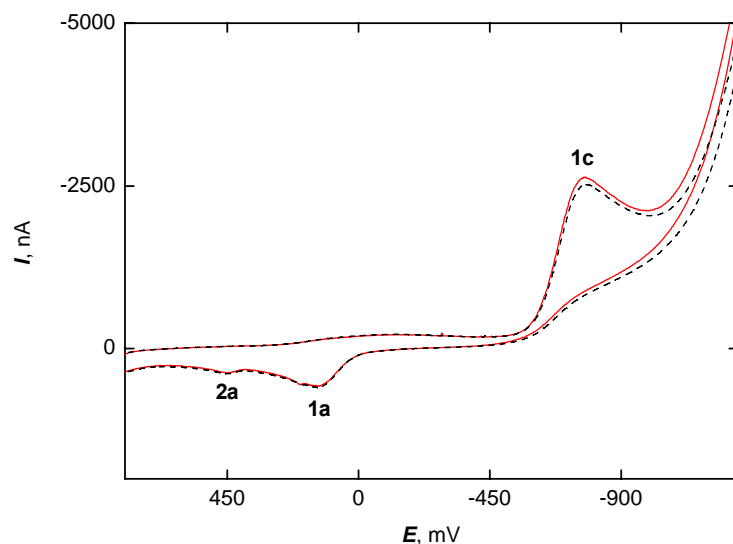
Pecková<sup>80</sup> zkoumala redukcí 1-nitronaftalenu na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE) a na meniskové stříbrné pevné amalgamové elektrodě (m-AgSAE). Cyklická voltametrie 1-nitronaftalenu v prostředí MeOH-BR pufr pH 2,0 ( $\text{pH}^b = 2,7$ ) (50:50) na m-AgSAE ukazuje, že se během prvního katodického scanu objevují dva píky  $p^{c1}$  a  $p^{c2}$ . Pík  $p^{c1}$  odpovídá čtyřelektronové redukci nitroskupiny na hydroxylamin, který se následně redukuje dvěma elektrony na amin ( $p^{c2}$ ). Oba tyto děje jsou ireverzibilní.



V prvním anodickém scanu se objevuje jediný pík  $p^{a3}$  odpovídající reverzibilní oxidaci hydroxylaminu na nitroso derivát, který se redukuje zpět na hydroxylamin ve druhém katodickém scanu ( $p^{c3}$ ).



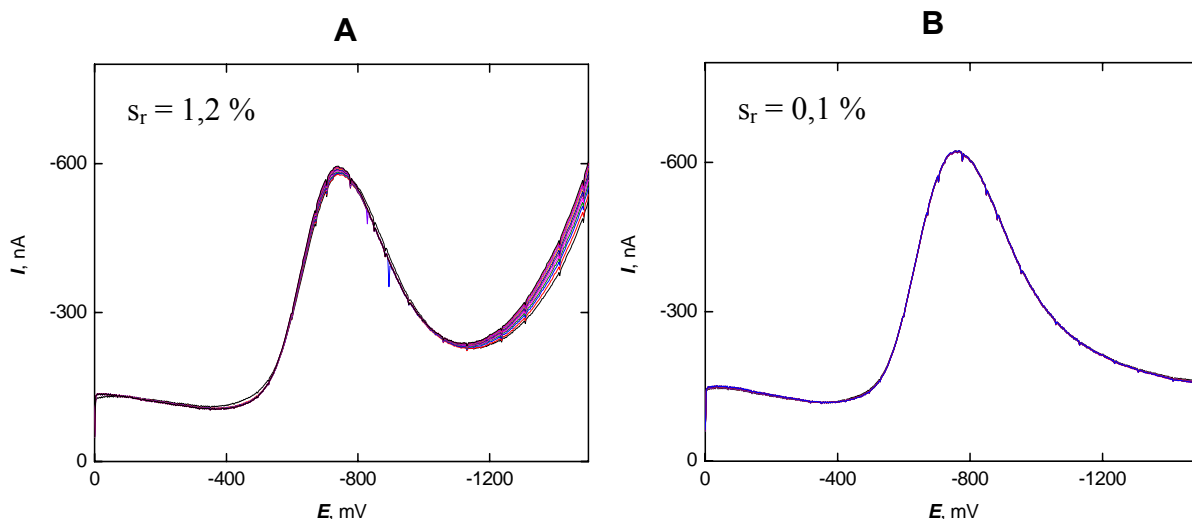
Obdobný průběh redukce 1-nitronaftalelu byl pozorován i na HMDE. Redukce 1-NP na BDDFE má však poněkud odlišný charakter. V prostředí MeOH-BR pufr o  $\text{pH} = 3,0$  ( $\text{pH}^b = 4,6$ ) (70:30) byly změřeny cyklické voltamogramy 1-NP na BDDFE. Nejdříve bylo provedeno 5 scanů od +800 do -1500 mV. Na Obr. 3.3 jsou uvedené první dva cykly, další tři jsou totožné s druhým. V prvním katodickém scanu se objevuje pík  $Ic$  a při prvním anodickém scanu píky  $Ia$  a  $2a$ . Při provádění scanů v různých potenciálových rozmezích nebyly zjištěné redox dvojice, což znamená, že všechny tři děje jsou ireverzibilní. Pro vysvětlení celého mechanismu je samozřejmě zapotřebí detailnější studium, ale dá se předpokládat, že se v kyselém prostředí nitro skupina 1-NP redukuje na hydroxylamin, nebo přímo na amino skupinu.



Obr. 3.3 Cyklický voltamogram 1-NP ( $1 \cdot 10^{-4}$  mol dm $^{-3}$ ). — první scan, - - - druhý scan. Prostředí MeOH:BR pufr o pH 3,0 (70:30). Rychlost polarizace 20 mV s $^{-1}$ ,  $E_{\text{poč}} = E_{\text{kon}} = +800$  mV,  $E_{\text{rev}} = -1500$  mV. Měřeno metodou CV na BDDFE.

### 3.3 Pasivace elektrody při stanovení 1-nitropyrenu

Jedním z důležitých sledovaných jevů probíhajících na elektrodě je její možná pasivace. V případě redukce 1-NP se pasivace elektrody projevuje jen velmi málo – relativní směrodatná odchylka měření 10 po sobě jdoucích scanů bez použití elektrochemické regenerace nebo jiného způsobu obnovení elektrodového povrchu je jenom 1,2% (Obr. 3.4 A). Nicméně byly nalezeny regenerační podmínky, které ještě vylepšily opakovatelnost měření 1-NP: po každém scanu 50 potenciálových skoků mezi počátečním potenciálem  $E_{\text{reg}}^1 = +800$  mV po dobu  $t_{\text{reg}}^1 = 0,3$  s a konečným  $E_{\text{reg}}^2 = -500$  mV rovněž po dobu  $t_{\text{reg}}^2 = 0,3$  s (viz Obr. 3.4 B). Jak je vidět na Obr. 3.4 A, po každém dalším měření bez regenerace se zmenšuje přepětí vodíku na BDDFE, což zmenšuje rozsah pracovních potenciálů. Elektrochemická regenerace elektrody před každým měřením nejen zlepšuje reprodukovatelnost měření ( $s_r = 0,1$  %), ale i odstraňuje zmíněný problém. Uvedená regenerace BDDFE byla použita u všech dalších měření 1-NP.



Obr. 3.4 Voltamogramy 10 po sobě jdoucích scanů 1-NP ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) bez elektrochemické regenerace (A) a s elektrochemickou regenerací (B) po každém scanu: 50 potenciálových skoků mezi  $E_{\text{reg}}^1 = +800 \text{ mV}$ ,  $t_{\text{reg}}^1 = 0,3 \text{ s}$  a  $E_{\text{reg}}^2 = -500 \text{ mV}$ ,  $t_{\text{reg}}^2 = 0,3 \text{ s}$ . V prostředí MeOH-BR pufr o pH 3,0 (70:30). Měřeno metodou DPV na BDDFE.  $s_r$  – relativní směrodatná odchylka.

Tabulka 3.2 Statistické zpracování výšky píku 1-NP u desíti po sobě jdoucích scanů. Prostředí MeOH-BR pufr o pH 3,0 (70:30). Elektrochemická regenerace před každým měřením: 50 potenciálových skoků mezi  $E_{\text{reg}}^1 = +800 \text{ mV}$ ,  $t_{\text{reg}}^1 = 0,3 \text{ s}$  a  $E_{\text{reg}}^2 = -500 \text{ mV}$ ,  $t_{\text{reg}}^2 = 0,3 \text{ s}$ . Měřeno metodou DPV na BDDFE.

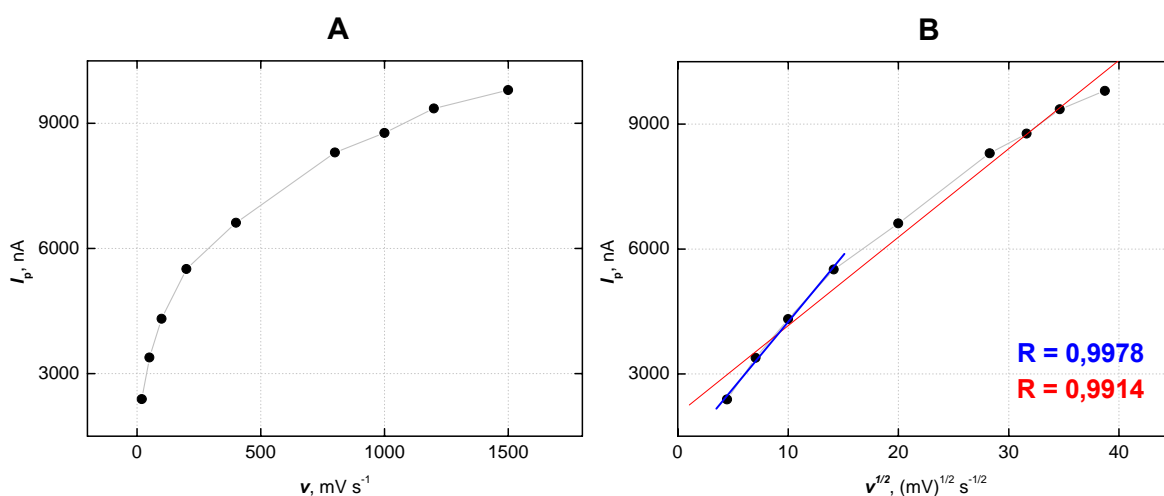
$c, \text{ mol dm}^{-3}$	$\bar{I}_p, \text{ nA}$	$ L , \text{ nA}$	$s, \text{ nA}$	$s_r, \%$
$1 \cdot 10^{-6}$	13,39	0,3	0,4	3,2
$1 \cdot 10^{-4}$	490	0,5	0,7	0,1

$\bar{I}_p$  průměrný proud píku;  $s$  směrodatná odchylka;  $s_r$  relativní směrodatná odchylka;  $|L|$  absolutní hodnota intervalu spolehlivosti.

### 3.4 Závislost odezvy 1-nitropyrenu na rychlosti scanu při DC voltametii

Za zjištěných optimálních podmínek byla změřená závislost proudové odezvy 1-NP na rychlosti scanu v rozmezí 20 až 1500  $\text{mV s}^{-1}$  metodou DC voltametrie. Na Obr. 3.5 byla vynesena výška píku proti rychlosti scanu (A) a druhé odmocnině z rychlosti scanu (B). Obecně platí, že pokud závislost výšky píku na rychlosti scanu má lineární charakter, děj je

řízený adsorpcí; lineární závislost výšky píku na druhé odmocnině z rychlosti scanu pak svědčí o ději řízeném difúzí. V tomto případě byl úsek s nejvyšším korelačním koeficientem nalezen v rozmezí rychlostí 20 do 200  $\text{mV s}^{-1}$  na grafu závislosti výšky píku na odmocnině z rychlosti scanu (Obr. 3.5 B, znázorněno modře). Se zvyšující se rychlosti scanu je patrné vychýlení od linearity, což znamená, že k difúzi přispívají i další děje, jako jsou třeba adsorpční a kinetické. Jelikož se v DPV používá 20  $\text{mV s}^{-1}$ , daná rychlost spadá do lineárního úseku a můžeme tedy předpokládat, že redukce nitroskupiny za daných podmínek je děj řízený difúzí.



Obr. 3.5 Závislost výšky píku 1-NP ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) na rychlosti scanu (A) a na druhé odmocnině z rychlosti scanu (B) v prostředí MeOH:BR pufr o pH 3,0 (70:30). Elektrochemická regenerace před každým měřením: 50 potenciálových skoků mezi  $E_{\text{reg}}^1 = +800 \text{ mV}$ ,  $t_{\text{reg}}^1 = 0,3 \text{ s}$  a  $E_{\text{reg}}^2 = -500 \text{ mV}$ ,  $t_{\text{reg}}^2 = 0,3 \text{ s}$ . Měřeno metodou DCV na BDDFE.

### 3.5 Koncentrační závislost 1-NP

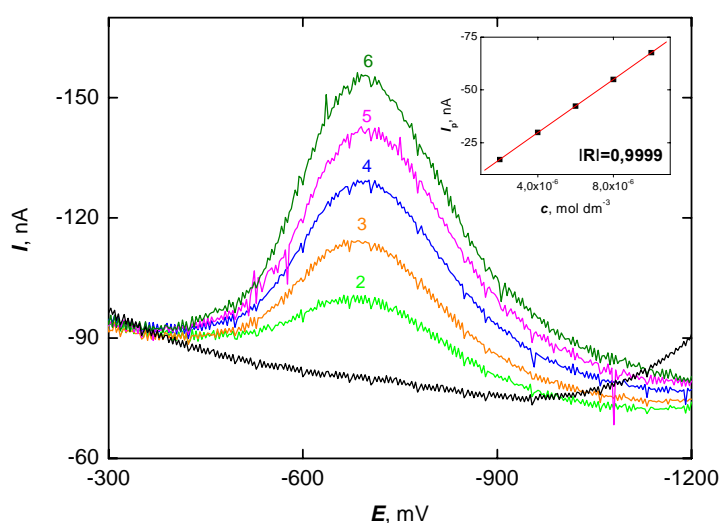
Koncentrační závislost 1-NP byla proměřena metodou DPV na BDDFE v prostředí MeOH:BR pufr o pH 3,0 (70:30) v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-6}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  (Obr. 3.6 a 3.7). Roztok pro měření byl připraven smícháním 3 ml borátového pufru, přibližně 3 ml methanolu, příslušného objemu zásobního roztoku 1-NP ( $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) v methanolu a doplněním methanolem na celkový objem 10 ml.

Závislost výšky píku na koncentraci je lineární v celém změřeném úseku. Parametry odpovídající kalibrační závislosti a vypočtená mez detekce a mez stanovitelnosti jsou uvedeny v Tabulce 3.2.

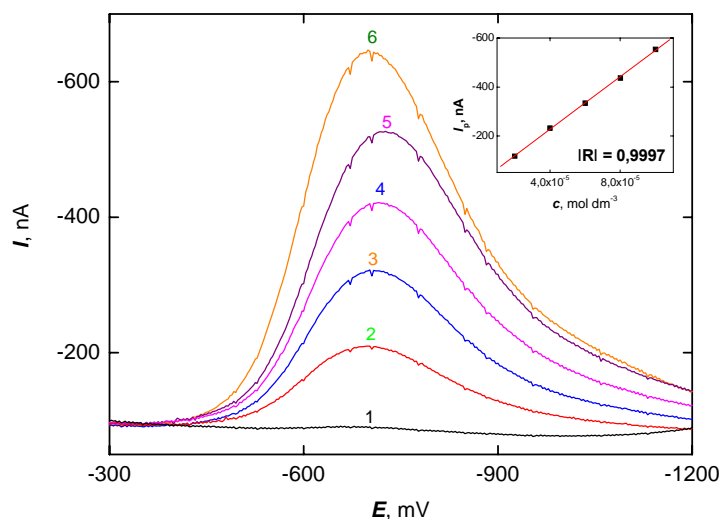
Tabulka 3.2 Parametry kalibrační přímky stanovení 1-NP. Elektrochemická regenerace před každým měřením: 50 potenciálových skoků mezi  $E_{\text{reg}}^1 = +800$  mV,  $t_{\text{reg}}^1 = 0,3$  s a  $E_{\text{reg}}^2 = -500$  mV,  $t_{\text{reg}}^2 = 0,3$  s. Měřeno v prostředí MeOH-BR pufr o pH 3,0 (70:30) metodou DPV na BDDFE .

Látka	$c$ $\text{mol dm}^{-3}$	směrnice $\text{nA mol}^{-1} \text{dm}^3$	$ R $	LOD $\text{mol dm}^{-3}$	LOQ $\text{mol dm}^{-3}$
1-NP	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$	$-5,39 \cdot 10^6$	0,9998	$3 \cdot 10^{-7}$	$8 \cdot 10^{-7}$

$R$  korelační koeficient,  $LOD$  mez detekce,  $LOQ$  mez stanovitelnosti.



Obr. 3.6 Voltamogramy 1-NP v koncentračním rozmezí  $(0-10) \cdot 10^{-6}$   $\text{mol dm}^{-3}$ . Prostředí MeOH-BR pufr o pH 3,0 (70:30). Koncentrace 0 (1),  $2 \cdot 10^{-6}$  (2),  $4 \cdot 10^{-6}$  (3),  $6 \cdot 10^{-6}$  (4),  $8 \cdot 10^{-6}$  (5) a  $10 \cdot 10^{-6}$   $\text{mol dm}^{-3}$  (6). Elektrochemická regenerace před každým měřením: 50 potenciálových skoků mezi  $E_{\text{reg}}^1 = +800$  mV,  $t_{\text{reg}}^1 = 0,3$  s a  $E_{\text{reg}}^2 = -500$  mV,  $t_{\text{reg}}^2 = 0,3$  s. Měřeno metodou DPV na BDDFE.



Obr. 3.7 Voltamogramy 1-NP v koncentračním rozmezí  $(0-10)\cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>. Prostředí MeOH-BR pufr o pH 3,0 (70:30). Koncentrace 0 (1),  $2\cdot 10^{-5}$  (2),  $4\cdot 10^{-5}$  (3),  $6\cdot 10^{-5}$  (4),  $8\cdot 10^{-5}$  (5) a  $10\cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> (6). Elektrochemická regenerace před každým měřením: 50 potenciálových skoků mezi  $E_{\text{reg}}^1 = +800$  mV,  $t_{\text{reg}}^1 = 0,3$  s a  $E_{\text{reg}}^2 = -500$  mV,  $t_{\text{reg}}^2 = 0,3$  s. Měřeno metodou DPV na BDDFE.

## 4 VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ 1-AMINOPYRENU NA BOREM DOPOVANÉ DIAMANTOVÉ FILMOVÉ ELEKTRODĚ

V dostupné literatuře nebyla nalezena zmínka o stanovení 1-AP nebo vysvětlení mechanismu jeho oxidace na BDDFE. Zatím nejvíce prozkoumaným aromatickým aminem je anilin. Mitadera a spol.<sup>81</sup> se pokoušeli vysvětlit průběh oxidace anilinu na BDDE v kyselém vodném prostředí. Výsledky cyklické voltametrie ukázaly, že nejdříve se anilin oxiduje na kationradikály, ty následnými rychlými reakcemi přecházejí na dimery (např. *p*-aminodifenylamin, benzidin), nakonec dochází až k vytvoření polymerního filmu pasivujícího elektrodu. Podle našich zjištění 1-AP na BDDFE podléhá dvoj až třístupňové oxidaci v závislosti na pH. Při vyšších oxidačních potenciálech se rovněž předpokládá vznik zmíněných polymerních struktur blokujících povrch elektrody (vliv pasivace BDDFE je popsán v kap. 4.2). Jako v případě 1-NP byla nejdříve zkoumána závislost oxidačních procesů 1-AP na pH prostředí a při vhodném pH proměřena koncentrační závislost.



## 4.1 Vliv pH na voltametrické chování 1-aminopyrenu

Vliv pH na voltametrické chování 1-AP byl sledován v prostředí MeOH:BR pufr o pH 2,0–12,0. Do odměrné baňky na 10 ml bylo odměřeno 3 ml BR pufru o daném pH, přibližně 3 ml methanolu, 1 ml  $1 \cdot 10^{-3}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  roztoku 1-AP v methanolu a doplněno methanolem na celkový objem 10 ml.

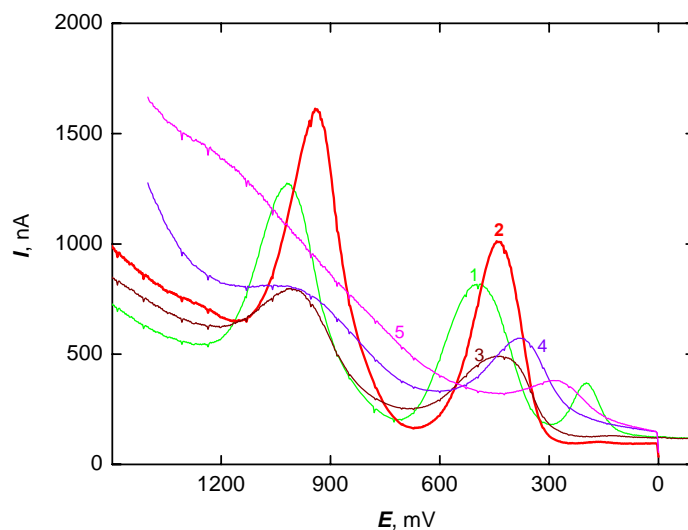
Při pH pufru 2,0–4,0 je oxidace 1-AP až třístupňová, což se projevuje výskytem tří píků, při pH 5,0 až 12,0 píky už jsou jen dva (Obr. 4.1 a Tabulka 4.1.). S rostoucím pH se potenciály všech píků posouvají k negativnějším hodnotám. Rozdíl mezi potenciály  $E_p^3$  při pH pufru 2,0 a 12,0 je pouhých 77 mV, což pravděpodobně znamená to, že produkt oxidace příslušící danému píku velmi málo závisí na koncentraci  $\text{H}^+$  v roztoku. Lineární závislost u žádného z píků zde však není pozorována, což se dá vysvětlit složitostí mechanismu elektrodové reakce.

Za optimální bylo pro 1-AP zvoleno prostředí MeOH:BR pufr o pH 3,0 (výsledné pH vodně-methanolickeho roztoku 4,5). Látka zde poskytuje dva výrazné píky ( $E_p^2, E_p^3$ ) a jeden malý ( $E_p^1$ ), z nichž byl k analytickým účelům vybrán píky  $E_p^2$  (440 mV), který právě při pH pufru 3,0 dosahuje své nejvyšší hodnoty (Obr. 4.2 B). Pík s potenciálem oxidace  $E_p^3$  pravděpodobně odpovídá tvorbě polymerních sloučenin 1-AP, které způsobují silnou pasivaci elektrodového povrchu, proto je nežádoucí polarizovat elektrodu až k tomuto potenciálu (více o pasivaci elektrody v kap 4.2).

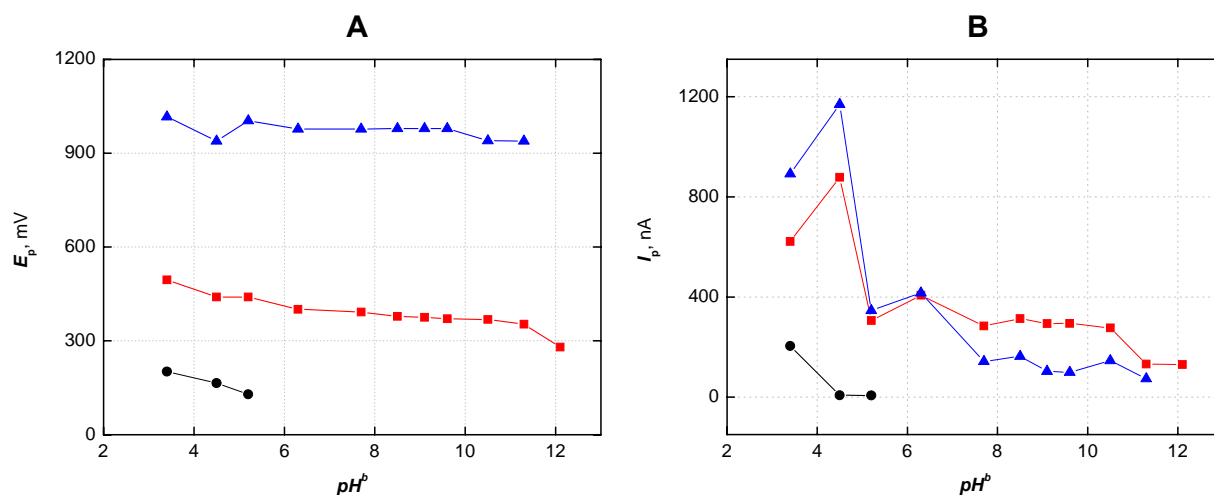
Tabulka 4.1 Výšky a potenciály píků 1-AP ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) při různém pH BR pufru. Prostředí MeOH-BR pufr (70:30), měřeno metodou DPV na BDDFE.

pH	pH <sup>b</sup>	E <sub>p</sub> <sup>1</sup> , mV	I <sub>p</sub> <sup>1</sup> , nA	E <sub>p</sub> <sup>2</sup> , mV	I <sub>p</sub> <sup>2</sup> , nA	E <sub>p</sub> <sup>3</sup> , mV	I <sub>p</sub> <sup>3</sup> , nA
2,0	3,4	202	204	495	622	1016	892
3,0	4,5	165	7,3	440	878	939	1170
4,0	5,2	129	6,5	440	306	1004	346
5,0	6,3	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	401	407	977	416
6,0	7,7	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	392	284	977	142
7,0	8,5	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	378	314	979	163
8,0	9,1	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	375	294	979	103
9,0	9,6	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	370	295	979	99
10,0	10,5	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	368	276	940	146
11,0	11,3	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	353	132	939	74
12,0	12,1	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	280	130	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>

Optimální pH je zvýrazněno, <sup>b</sup> výsledné pH měřeného vodně-methanolického roztoku; E<sub>p</sub><sup>1</sup> až E<sub>p</sub><sup>3</sup> potenciál prvního až třetího píku; I<sub>p</sub><sup>1</sup> až I<sub>p</sub><sup>3</sup> výška prvního až třetího píku; <sup>c</sup> pík není patrný; <sup>d</sup> pík není vyhodnotitelný.



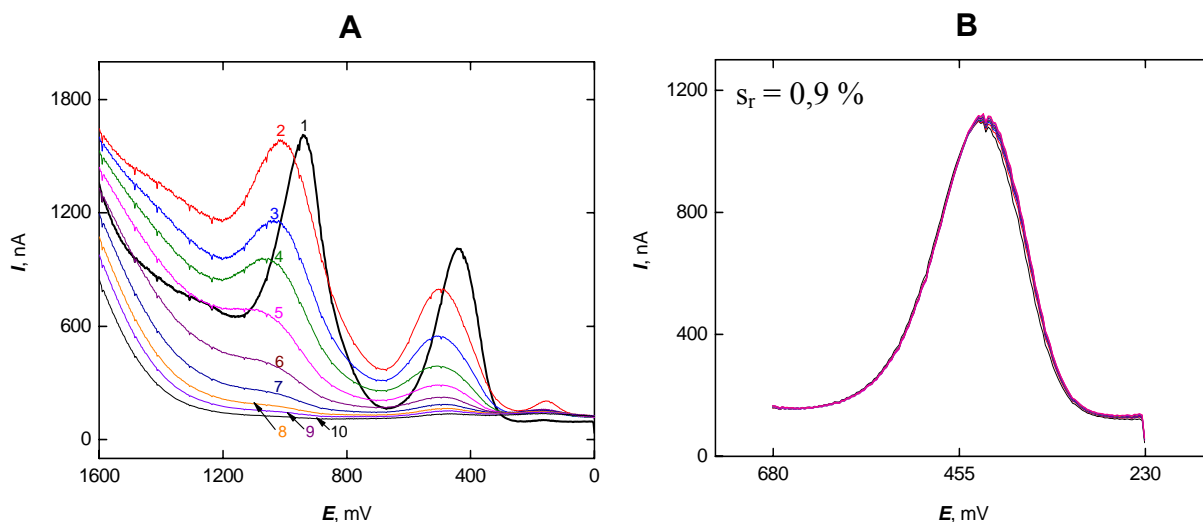
Obr. 4.1 Voltamogramy 1-AP ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) v prostředí MeOH-BR pufr (70:30), pH BR pufru 2,0 (1), 3,0 (2), 4,0 (3), 7,0 (4) a 12,0 (5). Měřeno metodou DPV na BDDFE.



Obr. 4.2 Závislost potenciálu píku (A) a výšky píku (B) 1-AP ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) na  $\text{pH}^b$  roztoku. —●— 1. pík ( $E_p^1, I_p^1$ ), —■— 2. pík ( $E_p^2, I_p^2$ ), —▲— 3. pík ( $E_p^3, I_p^3$ ). Měřeno v prostředí MeOH-BR pufr (70:30) metodou DPV na BDDFE.

## 4.2 Pasivace elektrody při stanovení 1-aminopyrenu

Pasivace elektrody se v případě stanovení 1-AP projevuje velice výrazně. Po 10 scanech se elektroda úplně pasivuje tvorbou polymerních sloučenin 1-AP, čemuž odpovídá pík s nejpozitivnějším potenciálem ( $E_p^3$ , Obr. 4.3 A). Projevuje se to i vytvořením tmavě zeleného povlaku na pracovní ploše elektrody. Tuto pasivaci se nepodařilo elektrochemicky odstranit, ale k velkému zlepšení došlo při provádění scanu jen od +230 do +680 mV (Obr. 4.3 B). Tím se zabránilo vytvoření zmíněných produktů oxidace 1-AP a doslo k výraznému snížení pasivace elektrody.



Obr. 4.3 Voltamogramy 10 po sobě jdoucích scanů 1-AP ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ). Scan prováděn v rozmezí 0 až +1600 mV (A) a +230 až +680 mV (B). V prostředí MeOH-BR pufr o pH 3,0 (70:30). Měřeno metodou DPV na BDDFE.  $s_r$  – relativní směrodatná odchylka.

Tabulka 4.2 Statistické zpracování výšky píku 1-AP u 10 po sobě jdoucích scanů. Scan prováděn v rozmezí +230 až +680 mV. Prostředí MeOH-BR pufr o pH 3,0 (70:30). Měřeno metodou DPV na BDDFE.

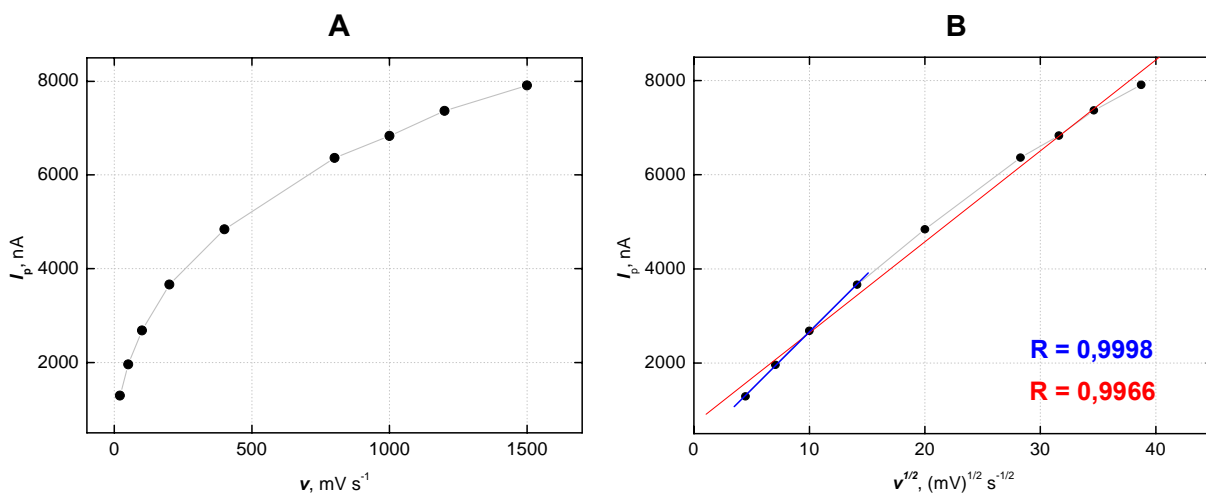
$c, \text{ mol dm}^{-3}$	$\bar{I}_p, \text{ nA}$	$ L , \text{ nA}$	$s, \text{ nA}$	$s_r, \%$
$2 \cdot 10^{-7}$	2,9	0,13	0,19	6,7
$1 \cdot 10^{-5}$	147	2,1	3,1	2,1
$1 \cdot 10^{-4}$	971	5,8	8,7	0,9

$\bar{I}_p$  průměrný proud píku;  $s$  směrodatná odchylka;  $s_r$  relativní směrodatná odchylka;  $|L|$  absolutní hodnota intervalu spolehlivosti.

### 4.3 Závislost odezvy 1-aminopyrenu na rychlosti scanu při DC voltametrii

V potenciálovém rozmezí od +230 do +680 mV byla změřena závislost výšky píku na rychlosti scanu (Obr. 4.4 A) a na druhé odmocnině z rychlosti scanu (Obr. 4.4 B) metodou DCV. Lineární úsek byl nalezen v grafu závislosti výšky píku na druhé odmocnině z rychlosti scanu v rozmezí od 20 do 200  $\text{mV s}^{-1}$ . Mírné odchýlení od linearity je patrné při polarizační rychlosti větší než 200  $\text{mV s}^{-1}$ . Znamená to, že oxidační děj odehrávající se na elektrodě je v

rozmezí 20–200  $\text{mV s}^{-1}$  řízený difúzí a při vyšších rychlostech k difúzi přispívají i další blíže nespecifikované děje (např. vliv adsorpčních nebo kinetických proudů aj.).



Obr. 4.4 Závislost výšky píku 1-AP ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) na rychlosti scanu (A) a na druhé odmocnině z rychlosti scanu (B) v prostředí MeOH-BR pufr o pH 3,0 (70:30). Měřeno metodou DCV na BDDFE.

#### 4.4 Koncentrační závislost 1-AP

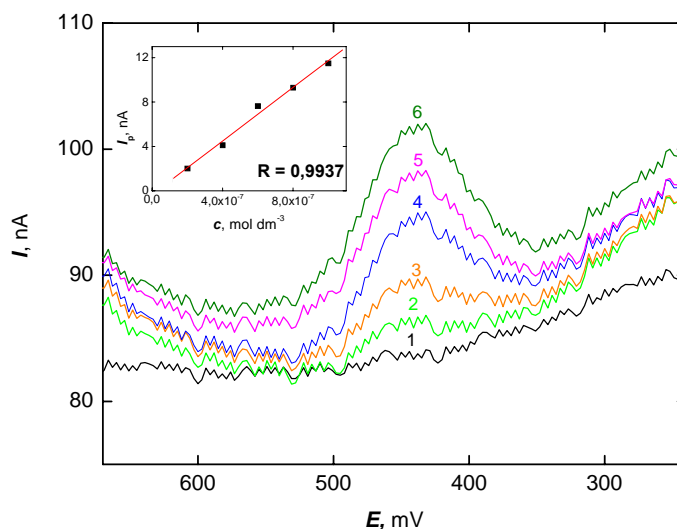
Koncentrační závislost 1-AP byla proměřena metodou DPV na BDDFE v prostředí MeOH:BR pufr o pH 3,0 (70:30) v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  (Obr. 4.5 a 4.6). Roztok pro měření byl připraven smícháním 3 ml BR pufru, přibližně 3 ml methanolu, příslušného objemu zásobního roztoku 1-AP ( $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) v methanolu a doplněním methanolem na celkový objem 10 ml.

Závislost výšky píku na koncentraci je lineární v celém změřeném úseku. Parametry odpovídající kalibrační závislosti, vypočtená mez detekce a mez stanovitelnosti jsou uvedeny v Tabulce 4.3.

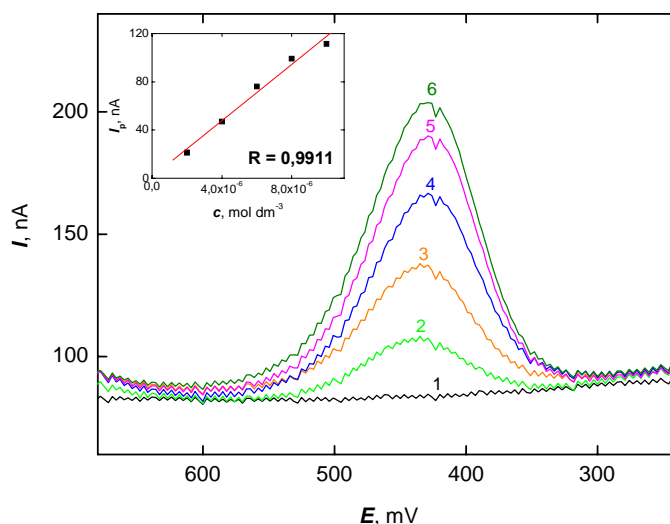
Tabulka 4.3 Parametry kalibrační přímky stanovení 1-AP. Měřeno v prostředí MeOH-BR pufr o pH 3,0 (70:30) metodou DPV na BDDFE . Scan prováděn v rozmezí +230 až +680 mV

Látka	$c$ $\text{mol dm}^{-3}$	směrnice $\text{nA mol}^{-1} \text{dm}^3$	R	LOD $\text{mol dm}^{-3}$	LOQ $\text{mol dm}^{-3}$
1-AP	$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$	$1,18 \cdot 10^7$	0,9971	$6 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-7}$

$R$  korelační koeficient,  $LOD$  mez detekce,  $LOQ$  mez stanovitelnosti.



Obr. 4.5 Voltamogramy 1-AP v koncentračním rozmezí  $(0-10) \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ . Prostředí MeOH-BR pufr o pH 3,0 (70:30). Koncentrace 0 (1),  $2 \cdot 10^{-7}$  (2),  $4 \cdot 10^{-7}$  (3),  $6 \cdot 10^{-7}$  (4),  $8 \cdot 10^{-7}$  (5) a  $10 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$  (6). Scan prováděn v rozmezí +230 až +680 mV. Měřeno metodou DPV na BDDFE.



Obr. 4.6 Voltamogramy 1-AP v koncentračním rozmezí  $(0-10) \cdot 10^{-6}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ . Prostředí MeOH-BR pufr o pH 3,0 (70:30). Koncentrace 0 (1),  $2 \cdot 10^{-6}$  (2),  $4 \cdot 10^{-6}$  (3),  $6 \cdot 10^{-6}$  (4),  $8 \cdot 10^{-6}$  (5) a  $10 \cdot 10^{-6}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  (6). Scan prováděn v rozmezí +230 až +680 mV. Měřeno metodou DPV na BDDFE.

## 5 VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ 1-HYDROXPYRENU NA BÓREM DOPOVANÉ DIAMANTOVÉ FILMOVÉ ELEKTRODĚ

Průběh oxidace 1-HP na BDDFE zatím nebyl v literatuře popsán, nicméně několik autorů vysvětlili mechanismus oxidace 1-HP na tištěných uhlíkových elektrodách<sup>81,82</sup>. Podrobněji se touto problematikou zabývá kapitola 6.

### 5.1 Vliv pH na voltametrické chování 1-hydroxypyrenu

Vliv pH měřeného roztoku na průběh oxidace 1-HP byl sledován v prostředí MeOH-BR pufr (70:30).  $\text{pH}^b$  roztoku bylo upravováno pufrům o pH 2,0 až 12,0. Roztok pro měření byl připraven smícháním 3 ml BR pufru o daném pH, 1 ml zásobního roztoku 1-HP ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) v methanolu a doplněním methanolem na celkový objem 10 ml. Výsledná koncentrace 1-HP byla  $1 \cdot 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ .

Při pH pufru 2,0 až 12,0 probíhá dvojstupňová oxidace 1-HP, což se projevuje výskytem dvou ne zcela oddělených pík s potenciály  $E_p^1$  a  $E_p^2$  (Tabulka 5.1, Obr. 5.1). Se zvyšujícím se pH oba píky od sebe postupně oddělují a od pH pufru 7,0 ( $\text{pH}^b$  8,5) jsou rozdělené úplně.

Potenciály obou píků se s rostoucím  $\text{pH}^b$  posouvají k negativnějším hodnotám (Obr. 5.2 A). Podstatně lineárnější posun je patrný u prvního píku. Jeho lineární závislost v rozmezí  $\text{pH}^b$  3,5–10,6 lze matematicky popsat následující rovnicí:

$$E_p^1 [\text{mV}] = 625,1 - 50,0 \text{pH}^b \quad R = -0,9959$$

U druhého píku byl nalezen lineární úsek v rozmezí  $\text{pH}^b$  7,7–12,1 popsany rovnicí:

$$E_p^2 [\text{mV}] = 632,4 - 6,0 \text{pH}^b \quad R = -0,9423$$

Změna linearit v průběhu zvyšování  $\text{pH}^b$  pravděpodobně značí změnu přítomné formy 1-HP.

Výšky obou píků s rostoucím pH postupně klesají (Obr. 5.2 B). Významný nárůst signálu je patrný u prvního píku při pH pufru 5,0 a 4,0.

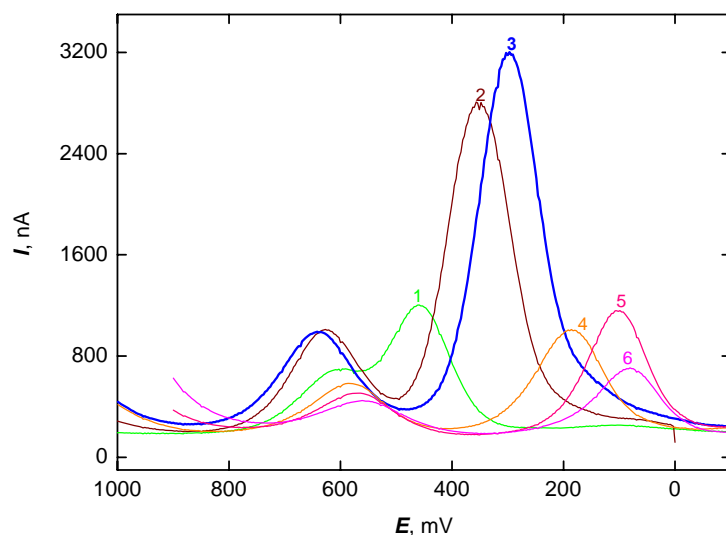
Jako optimální pH BR pufru se jevílo pH 5,0. Zde sice píky nejsou zcela od sebe oddělené, ale při vyšším pH velikost signálu prudce klesá. Pro další analytické účely byl využit první pík  $E_p^1 \sim 297 \text{ mV}$ , protože byl podstatně vyšší než ten druhý.

Tabulka 5.1 Výšky a potenciály píků 1-HP ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) při různém pH BR pufru. Prostředí MeOH-BR pufr (70:30), měřeno metodou DPV na BDDFE.

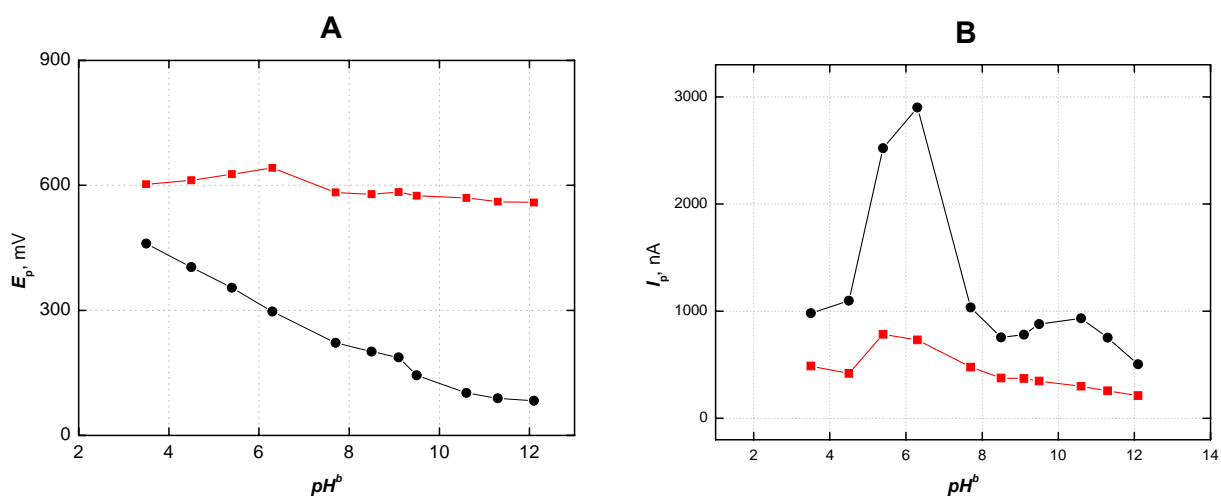
pH	$\text{pH}^b$	$E_p^1, \text{ mV}$	$I_p^1, \text{ nA}$	$E_p^2, \text{ mV}$	$I_p^2, \text{ nA}$
2,0	3,5	460	981	603	489
3,0	4,5	404	1098	612	419
4,0	5,4	354	2520	627	785
5,0	6,3	297	2900	642	732
6,0	7,7	222	1034	583	479
7,0	8,5	201	757	579	377
8,0	9,1	187	781	584	373
9,0	9,5	144	881	575	349
10,0	10,6	102	933	570	300
11,0	11,3	89	752	561	256
12,0	12,1	83	504	559	213

Zvýrazněno je optimální pH, <sup>b</sup> výsledné pH měřeného vodně-methanolického roztoku;  $E_p^1$  a  $E_p^2$  potenciál prvního a druhého píku;  $I_p^1$  a  $I_p^2$  výška prvního a druhého píku.





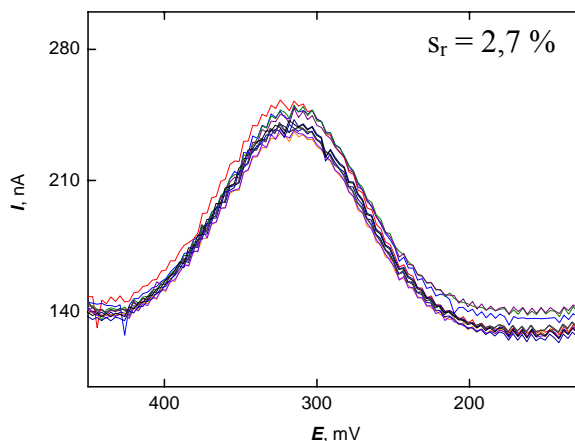
Obr. 5.1 Voltamogramy 1-HP ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) v prostředí MeOH-BR pufr (70:30), pH BR pufru 2,0 (1), 4,0 (2), 5,0 (3), 8,0 (4), 10,0 (5) a 12,0 (6). Měřeno metodou DPV na BDDFE.



Obr. 5.2 Závislost potenciálu píku(A) a výšky píku (B) 1-HP ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) na  $\text{pH}^b$  roztoku. —●— 1. pík ( $E_p^1, I_p^1$ ) a —■— 2. pík ( $E_p^2, I_p^2$ ). Měřeno v prostředí MeOH-BR pufr (70:30) metodou DPV na BDDFE.

## 5.2 Pasivace elektrody při stanovení 1-hydroxypyrenu

Při stanovení 1-HP v prostředí MeOH:BR pufr o pH = 5,0 (70:30) výrazná pasivace elektrody nebyla pozorovaná. Statistiku opakovatelnosti měření 1-HP při koncentraci  $2 \cdot 10^{-7}$  a  $1 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> ukazuje Tabulka a Obr. 5.3. Procentuální chyba měření je u nižší koncentrace způsobena podstatně nižším poměrem signál/šum než v případě koncentrace vyšší.



Obr. 5.3 Voltamogramy 10 po sobě jdoucích scanů 1-HP ( $c = 1 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) bez elektrochemické regenerace. V prostředí MeOH-BR pufr o pH 5,0 (70:30). Měřeno metodou DPV na BDDFE.

Tabulka 5.2 Statistické zpracování výšky píku 1-HP u desíti po sobě jdoucích scanů. Prostředí MeOH-BR pufr o pH 5,0 (70:30). Měřeno metodou DPV na BDDFE.

$c$ , mol dm <sup>-3</sup>	$\bar{I}_p$ , nA	$ L $ , nA	$s$ , nA	$s_r$ , %
$2 \cdot 10^{-7}$	2,26	0,12	0,19	8,4
$1 \cdot 10^{-5}$	107	1,78	2,87	2,7

$\bar{I}_p$  průměrný proud píku;  $s$  směrodatná odchylka;  $s_r$  relativní směrodatná odchylka;  $|L|$  absolutní hodnota intervalu spolehlivosti.

## 5.3 Koncentrační závislost 1-hydroxypyrenu

Koncentrační závislost 1-HP byla proměřena metodou DPV na BDDFE v prostředí MeOH-BR pufr o pH 5,0 (70:30) v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> (Obr. 5.4 a

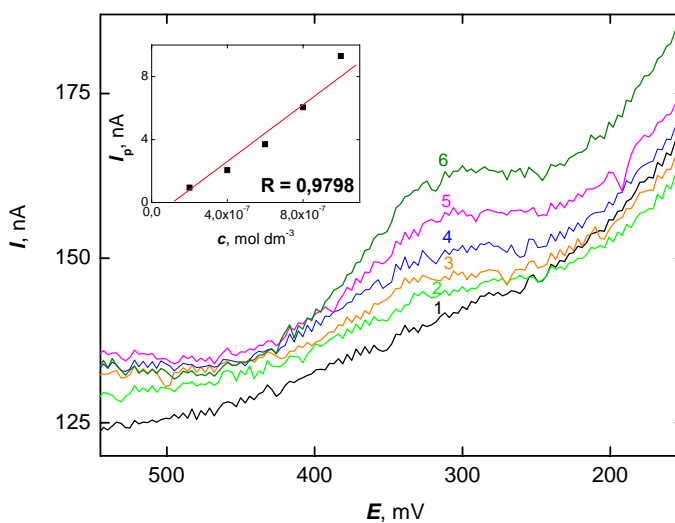
5.5). Roztok pro měření byl připraven smícháním 3 ml BR pufru o pH 5,0, příslušného objemu zásobního roztoku 1-HP ( $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) v methanolu a doplněním methanolem na celkový objem 10 ml.

Závislost výšky píku na koncentraci je lineární v celém změřeném úseku. Parametry odpovídající kalibrační závislosti a vypočtená mez detekce a mez stanovitelnosti jsou uvedeny v Tabulce 5.3.

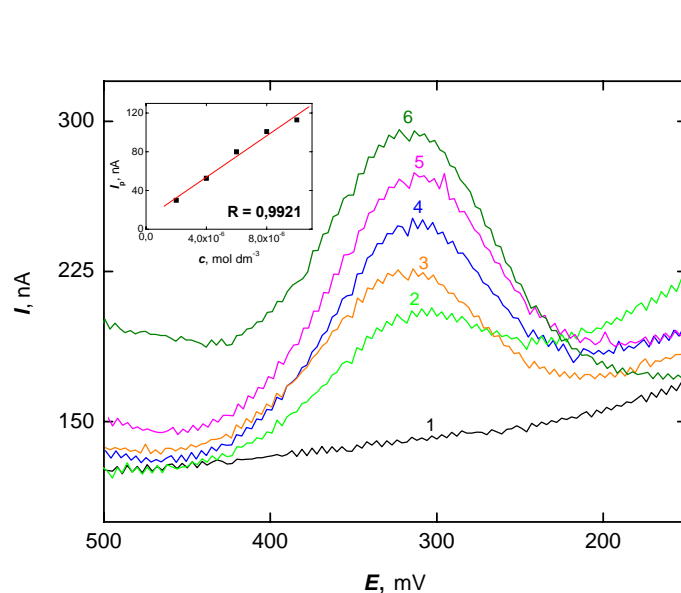
Tabulka 5.3 Parametry kalibrační přímky stanovení 1-HP. Měřeno v prostředí MeOH:BR pufr o pH 5,0 (70:30) metodou DPV na BDDFE .

Látka	$c$ $\text{mol dm}^{-3}$	směrnice $\text{nA mol}^{-1} \text{dm}^3$	R	LOD $\text{mol dm}^{-3}$	LOQ $\text{mol dm}^{-3}$
1-HP	$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$	$1,38 \cdot 10^7$	0,9934	$1 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^{-7}$

$R$  korelační koeficient,  $LOD$  mez detekce,  $LOQ$  mez stanovitelnosti.



Obr. 5.4 Voltamogramy 1-HP v koncentračním rozmezí  $(0-10) \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ . Prostředí MeOH-BR pufr o pH 5,0 (70:30). Koncentrace 0 (1),  $2 \cdot 10^{-7}$  (2),  $4 \cdot 10^{-7}$  (3),  $6 \cdot 10^{-7}$  (4),  $8 \cdot 10^{-7}$  (5) a  $10 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  (6). Měřeno metodou DPV na BDDFE.



Obr. 5.5 Voltamogramy 1-HP v koncentračním rozmezí  $(0-10) \cdot 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>. Prostředí MeOH-BR pufr o pH 5,0 (70:30). Koncentrace 0 (1),  $2 \cdot 10^{-6}$  (2),  $4 \cdot 10^{-6}$  (3),  $6 \cdot 10^{-6}$  (4),  $8 \cdot 10^{-6}$  (5) a  $10 \cdot 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> (6). Měřeno metodou DPV na BDDFE.

## 6 VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ 1-HYDROXYPYRENU V MOČI NA BÓREM DOPOVANÉ DIAMANTOVÉ FILMOVÉ ELEKTRODĚ

### 6.1 Vliv pH na voltametrické chování 1-hydroxypyrenu v modelovém roztoku

Vliv pH měřeného roztoku na průběh oxidace 1-HP byl sledován v prostředí MeOH-BR pufr (50:50) (= modelový roztok) v rozmezí pH pufru 2,0 až 12,0. Při přípravě měřeného roztoku byla snaha a) zvolit objemy a poměr pufru a methanolického roztoku tak, aby při pozdější extrakci 1-HP z moči mohl být 1-HP vymyt co nejmenším množstvím MeOH (viz kap. 6.5), b) aby k tomuto extraktu bylo nutné přidat minimální množství pufru pro co nejmenší naředění extraktu a c) aby celkový objem analyzovaného roztoku byl dostačující pro provedení analýzy. Ve snaze dodržet tyto požadavky byla zvolen následující způsob přípravy měřeného roztoku: do měřicí nádoby bylo odměřeno 0,5 ml methanolického roztoku 1-HP o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup> a přidáno 0,5 ml BR pufru o daném pH (při stanovení 1-HP v moči byl methanolický roztok 1-HP o dané koncentraci nahrazen 0,5 ml methanolického extraktu 1-HP z moči, viz kap. 6.5).

V oblasti pH pufru 2,0 až 12,0 poskytuje 1-HP dva píky, které se postupně od sebe separují až do úplného oddělení při  $\text{pH} \geq 7,0$  (Tabulka 6.1 a Obr. 6.1). Potenciály obou píků se s rostoucím pH posouvají k negativním hodnotám (Obr. 6.2 A), přičemž  $E_p^1$  se od pH pufru 2,0 do 11,0 posunul o 416 mV a  $E_p^2$  jen o 140 mV. Toto chování se dá vysvětlit tak, že první oxidační krok 1-HP je mnohem více závislý na pH, než krok druhý. V rozmezí  $\text{pH}^b$  4,1–9,4 byl u prvního píku nalezen lineární úsek popsany následující rovnicí:

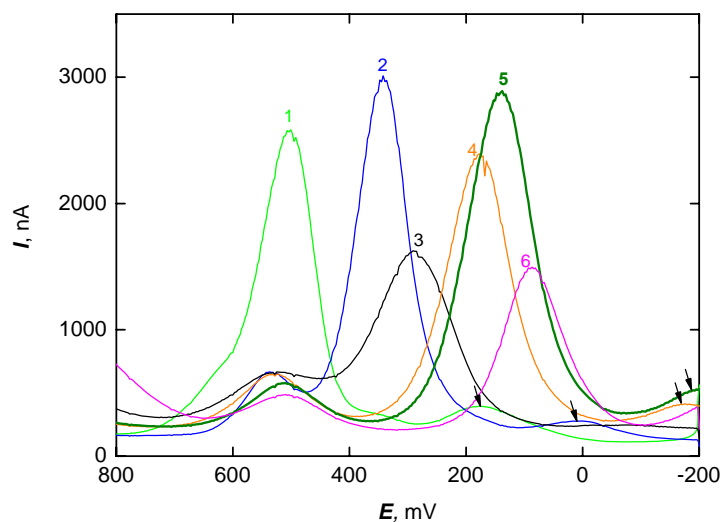
$$E_p^1 [\text{mV}] = 677,6 - 56,8 \text{ pH}^b \quad R = -0,9988$$

Největší proudovou odezvu poskytuje 1-HP při pH pufru 5,0 (pH měřeného roztoku  $\text{pH}^b = 6,0$ , Obr. 6.2 B), nicméně za optimální bylo zvoleno pH pufru 9,0 ( $\text{pH}^b$  9,4), protože látka zde poskytuje dva zcela separované, dobře tvarované a dostatečně vysoké píky. Pro měření koncentrační závislosti byl dále vyhodnocován vyšší pík s potenciálem  $E_p^1 \sim 140$  mV a byl použit borátový pufr o pH 9,0.

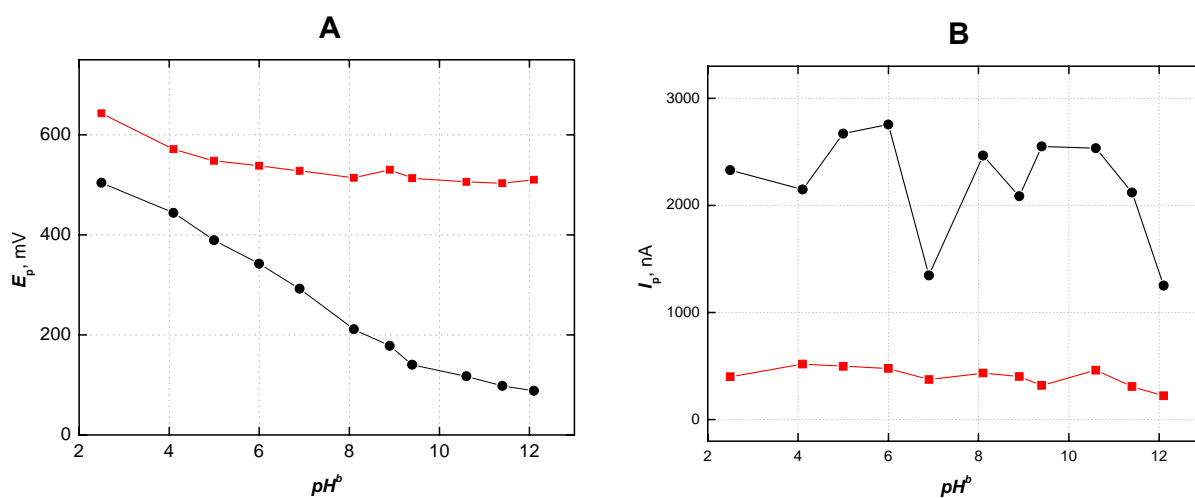
Tabulka 6.1 Výšky a potenciály píků 1-HP ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) při různém pH. Prostředí MeOH-BR pufr (50:50), měřeno metodou DPV na BDDFE.

pH	$\text{pH}^b$	$E_p^1, \text{ mV}$	$I_p^1, \text{ nA}$	$E_p^2, \text{ mV}$	$I_p^2, \text{ nA}$
2,0	2,5	504	2329	643	401
3,0	4,1	444	2148	571	518
4,0	5,0	389	2671	548	499
5,0	6,0	342	2756	538	478
6,0	6,9	292	1347	528	375
7,0	8,1	211	2465	514	435
8,0	8,9	178	2085	530	402
9,0	9,4	140	2550	513	320
10,0	10,6	117	2535	506	462
11,0	11,4	98	2121	503	310
12,0	12,1	88	1251	510	223

Optimální pH je zvýrazněno, <sup>b</sup> výsledné pH měřeného vodně-methanolickeho roztoku;  $E_p^1$  a  $E_p^2$  potenciál prvního a druhého píku;  $I_p^1$  a  $I_p^2$  výška prvního a druhého píku.



Obr. 6.1 Voltamogramy 1-HP ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) v prostředí MeOH-BR pufr (50:50), pH BR pufru 2,0 (1), 5,0 (2), 6,0 (3), 8,0 (4), 9,0 (5) a 12,0 (6). Šipkou je vyznačen pik přítomný již v základním elektrolytu. Měřeno metodou DPV na BDDFE.



Obr. 6.2 Závislost potenciálu píku (A) a výšky píku (B) 1-HP ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) na  $\text{pH}^b$  roztoku.  $\bullet$  – 1. pik ( $E_p^1, I_p^1$ ),  $\blacksquare$  – 2. pik ( $E_p^2, I_p^2$ ). Měřeno v prostředí MeOH-BR pufr (50:50) metodou DPV na BDDFE.

## 6.2 Průběh oxidace 1-hydroxypyrenu v modelovém roztoku v zásaditém prostředí

Vysvětlení mechanismu oxidace/redukce stanovovaného analytu na elektrodovém povrchu patří mezi nejsložitější úkoly vyžadující důkladný výzkum s použitím několika analytických metod. V této kapitole byl učiněn pokus o vysvětlení mechanismu oxidace/redukce 1-HP na BDDFE na základě změřených dat metodou cyklické voltametrie a jejich porovnání s literaturou. Uvedený možný mechanismus má za úkol pouze poskytnout představu o tom, co se může z daným analytem odehrávat během analýzy, a nikoliv přesvědčit, že se to tak skutečně odehrává.

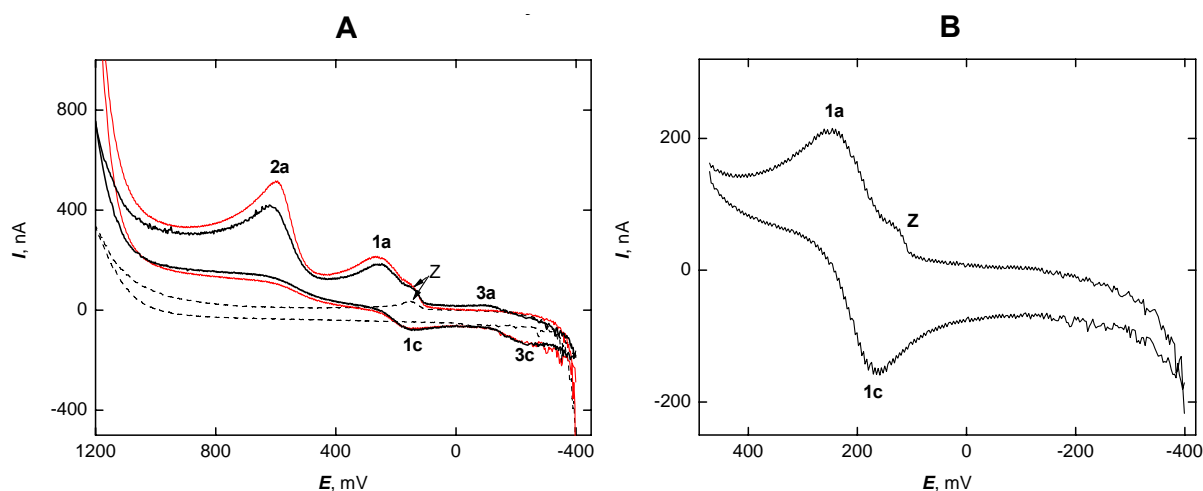
Kevin C. Honeychurch a kol.<sup>81</sup> prováděli CV voltametrii s 1-HP ( $7 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) v prostředí MeOH:0,05M fosfátový pufr o pH = 7,2 s 0,1M NaCl a navrhli odpovídající mechanismus chování 1-HP na tištěné uhlíkové elektrodě (SPCE) (Obr 6.4). Obdobná studie 1-HP na diamantové elektrodě dosud popsána nebyla.

Cyklická voltametrie (CV) 1-HP ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>) byla prováděna v prostředí MeOH:borátový pufr o pH = 9,0 (pH<sup>b</sup> 9,4) (50:50) na BDDFE. Byla použita rychlost polarizace 20 mV s<sup>-1</sup>, regenerace elektrody ani míchání roztoku mezi jednotlivými cykly nebylo použito. Měřený roztok byl připravován stejným způsobem jako při měření pH závislosti v kap. 6.1.

Cyklické voltamogramy znázorňující celou oxidační oblast 1-HP byly změřeny v potenciálovém rozmezí od  $E_{\text{poč}} = -400$  mV do  $E_{\text{rev}} = +1200$  mV a zpět (Obr. 6.3 A). Ve zvoleném potenciálovém rozmezí bylo změřeno vždy 5 cyklů. Na Obr. 6.3 je znázorněn první a druhý cykl, třetí až pátý jsou stejné jako druhý. V prvním scanu jsou dobře patrné dva anodické píky 1a ( $E_{1a} = +260$  mV) a 2a ( $E_{2a} = +610$  mV) a dva katodické píky 1c a 3c. Ve druhém až pátém scanu se objevuje ještě další anodický pík 3a. Pík Z s potenciálem  $E_z = 132$  mV se objevuje už v základním elektrolytu při scanu od  $-400$  mV. Jeho povaha z dostupných informací zatím není známá. Pokud se scan prováděl od  $-200$  mV, pík Z se neobjevoval na CV voltamogramu ani základního elektrolytu ani 1-HP. Vzhledem k tomu, že pík 3c se objevoval u potenciálu  $-233$  mV, nebylo možné začít měření 1-HP už od  $-200$  mV a tak se vyhnout vytvoření nežádoucího píku Z. Nicméně na základě dalších měření v různých potenciálových rozmezích lze tvrdit, že vznik píku Z nijak neovlivňuje mechanismus oxidace/redukce 1-HP. Dále Obr. 6.3 B ukazuje píky 1a a 1c ( $E_{1c} = 160$  mV,  $E_{1a} - E_{1c} = 80$  mV), proměřeno v rozmezí

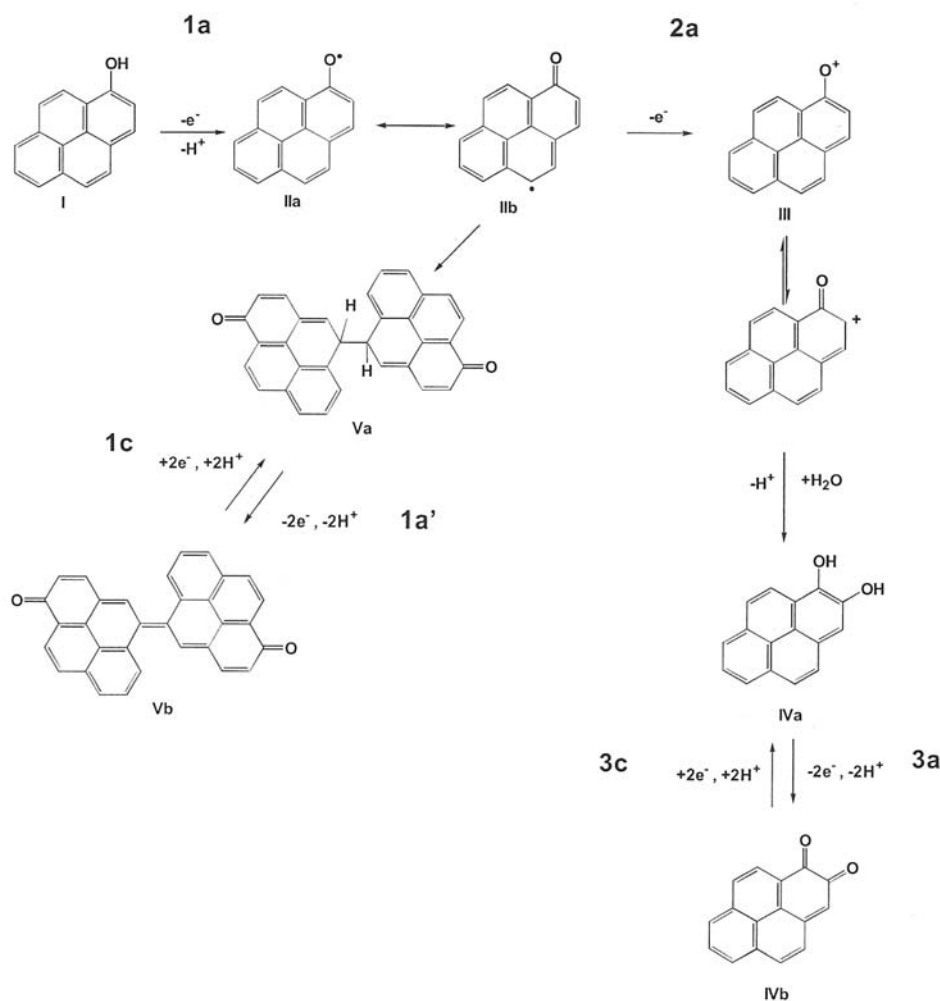
-400 až +470 mV, z čehož se dá usuzovat, že se jedná o redoxní pár; zároveň nepřítomnost píků 3a a 3c znamená, že k jejich vytvoření je zapotřebí oxidovat látku až do potenciálu ~1000 mV, tedy přítomnost píků 3a a 3c souvisí s existencí píku 2a.

Na Obr. 6.4 je uveden navržený mechanismus oxidace/redukce 1-HP na SPCE, který by mohl probíhat i na BDDFE.



Obr. 6.3 Cyklický voltamogram 1-HP ( $1 \cdot 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ). - - - Základní elektrolyt, — první scan, — druhý scan. Prostředí MeOH:borátový pufr o pH 9,0 (50:50). Rychlost polarizace  $20 \text{ mV s}^{-1}$ ,  $E_{\text{poč}} = -400 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{rev}} = +1200 \text{ mV}$  (A) a  $E_{\text{poč}} = -400 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{rev}} = +470 \text{ mV}$  (B). Měřeno metodou CV na BDDFE.





Obr. 6.4 Mechanismus elektrochemické oxidace 1-HP na SPCE v prostředí MeOH:0,05M fosfátový pufr o pH 7,2 (50:50) s 0,1M NaCl. Schéma bylo převzato z publikace<sup>81</sup>.

### 6.3 Pasivace elektrody při stanovení 1-hydroxypyrenu v modelovém roztoku

Při stanovení 1-HP v prostředí MeOH:borátový pufr o pH = 9,0 (50:50) výrazná pasivace elektrody nebyla pozorovaná, přesto při dalších měřeních se scan prováděl v rozmezí -200 až +400 nebo +500 mV, aby byl změřen jen první pík. Statistiku opakovatelnosti měření 1-HP při koncentraci  $1 \cdot 10^{-7}$  a  $1 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> ukazuje Tabulka 6.2. Procentuální chyba měření je u nižší koncentrace způsobena podstatně nižším poměrem signál/šum než v případě koncentrace vyšší.

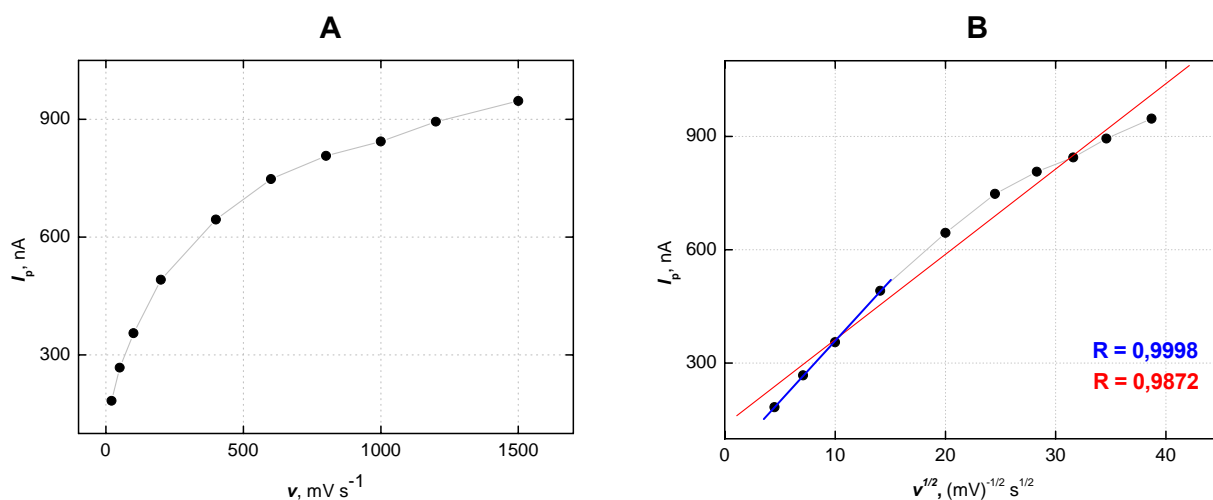
Tabulka 6.2 Statistické zpracování výšky píku 1-HP u desíti po sobě jdoucích scanů. Scan prováděn v rozmezí  $-200$  až  $+500$  mV u opakovatelnosti koncentrace  $1 \cdot 10^{-5}$  a  $0$  až  $+400$  mV u koncentrace  $1 \cdot 10^{-7}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ . Prostředí MeOH-borátový pufr o pH 9,0 (50:50). Měřeno metodou DPV na BDDFE.

$c$ , mol $\text{dm}^{-3}$	$\bar{I}_p$ , nA	$ L $ , nA	$s$ , nA	$s_r$ , %
$2 \cdot 10^{-7}$	2,0	0,09	0,14	6,6
$1 \cdot 10^{-5}$	95	1,02	1,6	1,7

$\bar{I}_p$  průměrný proud píku;  $s$  směrodatná odchylka;  $s_r$  relativní směrodatná odchylka;  $|L|$  absolutní hodnota intervalu spolehlivosti.

#### **6.4 Závislost odezvy 1-hydroxypyrenu v modelovém roztoku na rychlosti scanu při DC voltametii**

Byla změřená závislost proudové odezvy 1-HP na rychlosti scanu v rozmezí  $20$  až  $1500$   $\text{mV s}^{-1}$  metodou DC voltametrie. Na obrázku Obr. 6.5 A, B byly vyneseny výška píků proti rychlosti scanu a druhé odmocnině z rychlosti scanu. Lineární úsek byl nalezen pro rychlosti polarizace  $20$ – $200$   $\text{mV s}^{-1}$  v grafu závislosti proudové odezvy na druhé odmocnině z rychlosti scanu (Obr. 6.5 B). V tomto rozsahu rychlostí je elektrodový děj řízený difúzí (při použití metody DPV se používá polarizační rychlost  $20$   $\text{mV s}^{-1}$ , což je hodnota spadající do lineárního úseku). Odchýlení od linearity při vyšších rychlostech scanu znamená, že děj není řízený jenom difúzí, ale částečně i jinými ději odehrávajícími se na elektrodě.



Obr. 6.5 Závislost výšky píku 1-HP ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) na rychlosti scanu (A) a na druhé odmocnině z rychlosti scanu (B) v prostředí MeOH:borátový pufr o pH 9,0 (50:50). Měřeno metodou DCV na BDDFE.

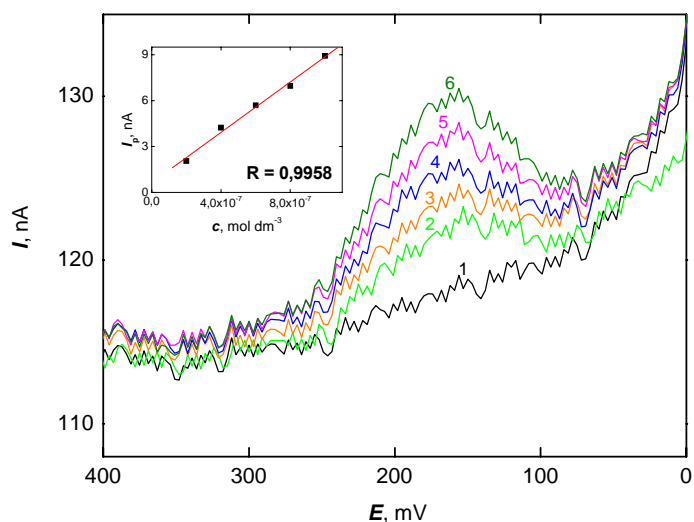
## 6.5 Koncentrační závislost 1-hydroxypyrenu v modelovém roztoku

Koncentrační závislost 1-HP byla proměřena metodou DPV na BDDFE v prostředí MeOH: borátový pufr o pH 9,0 (50:50) v rozmezí  $1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  (Obr. 6.6 a 6.7). Roztok pro měření byl připraven smícháním 0,5 ml borátového pufru s 0,5 ml MeOH obsahující 1-HP o požadované koncentraci. Uvedené koncentrace se vztahují k obsahu 1-HP v 0,5 ml methanolické složky měřeného roztoku.

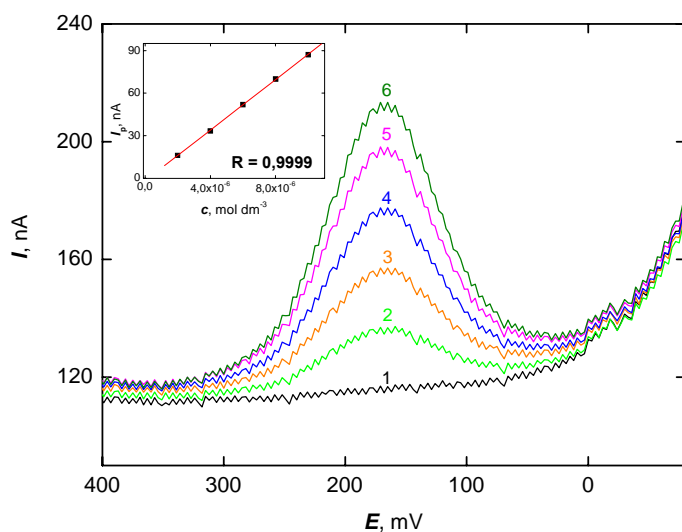
Závislost výšky píku na koncentraci je lineární v celém změřeném úseku. Parametry odpovídající kalibrační závislosti a vypočtená mez detekce a mez stanovitelnosti jsou uvedeny v Tabulce 6.3.

Tabulka 6.3 Parametry kalibrační přímky stanovení 1-HP. Měřeno v prostředí MeOH-borátový pufr o pH 9,0 (50:50) metodou DPV na BDDFE. Scan prováděn v rozmezí  $-200$  až  $+500 \text{ mV}$  a  $0$  až  $+400 \text{ mV}$  u nižších koncentrací. Uvedené koncentrace se vztahují k obsahu 1-HP v 0,5 ml MeOH.

Látka	$c$ $\text{mol dm}^{-3}$	směrnice $\text{nA mol}^{-1} \text{dm}^3$	R	LOD $\text{mol dm}^{-3}$	LOQ $\text{mol dm}^{-3}$
1-HP	$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$	$8,67 \cdot 10^6$	0,9997	$3 \cdot 10^{-8}$	$9 \cdot 10^{-8}$



Obr. 6.6 Voltamogramy 1-HP v koncentračním rozmezí  $(0-10) \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ . Prostředí MeOH-borátový pufr o pH 9,0 (50:50). Koncentrace 0 (1),  $2 \cdot 10^{-7}$  (2),  $4 \cdot 10^{-7}$  (3),  $6 \cdot 10^{-7}$  (4),  $8 \cdot 10^{-7}$  (5) a  $10 \cdot 10^{-7}$  (6). Scan prováděn v rozmezí 0 až +400 mV. Měřeno metodou DPV na BDDFE.



Obr. 6.7 Voltamogramy 1-HP v koncentračním rozmezí  $(0-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ . Prostředí MeOH-borátový pufr o pH 9,0 (50:50). Koncentrace 0 (1),  $2 \cdot 10^{-6}$  (2),  $4 \cdot 10^{-6}$  (3),  $6 \cdot 10^{-6}$  (4),  $8 \cdot 10^{-6}$  (5) a  $10 \cdot 10^{-6}$  (6). Scan prováděn v rozmezí -200 až +500 mV. Měřeno metodou DPV na BDDFE.

## 6.6 Separace a prekoncentrace 1-hydroxypyrenu z moči

Extrakce 1-HP z moči byla prováděna následujícím způsobem: k 10 ml moči neexponovaného pracovníka bylo přidáno vypočtené množství 1-HP v methanolu. K takto připravenému modelovému vzorku moči bylo přidáno 10,0 ml fosfátového pufru o pH 5 a vzniklý roztok byl prolit SPE kolonkou (LiChrolut® RP-18 E (40-60  $\mu\text{m}$ ), 200 mg 3 ml), která byla předem aktivována promytím 5 ml MeOH a 10 ml deionizované vody. Kolonka byla následně promyta 10 ml vody a zachycené látky byly vymyty 10 ml MeOH. Eluát byl odpařen pod proudem dusíku do sucha a odparek rozpuštěn v 0,5 ml MeOH. 1-HP byl tedy z moči zakoncentrován 20 $\times$ . Takto vzniklý extrakt byl smíchán s 0,5 ml borátového pufru o pH 9,0 a zanalyzován metodou DPV na BDDFE.

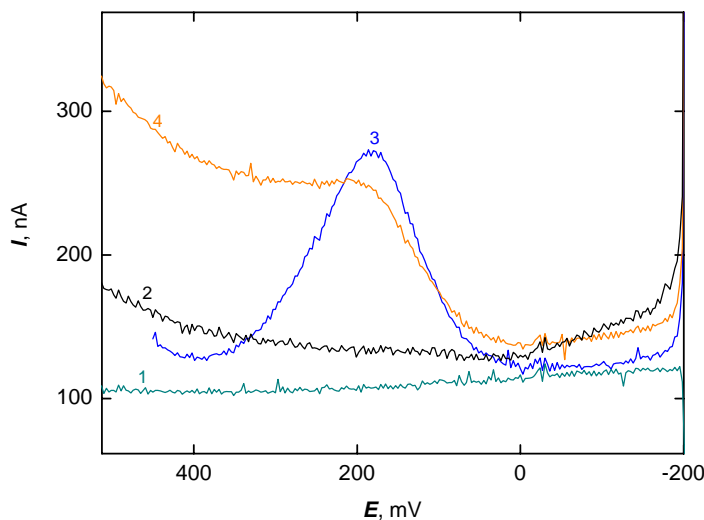
Nejdříve bylo provedeno porovnání voltamogramů základního elektrolytu a slepého pokusu, potom byla změřena odezva modelového roztoku 1-HP v MeOH a 1-HP po prekoncentraci z moči s následujícím postupem:

- změřen základní elektrolyt – MeOH:borátový pufr o pH 9,0 (50:50) (Obr. 6.8 (1))
- změřen modelový roztok 1-HP v methanolu – MeOH:borátový pufr o pH 9,0 (50:50), koncentrace 1-HP v MeOH  $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  (Obr. 6.8 (3)), se kterým se srovnával záznam 1-HP v moči po prekoncentraci.
- zaznamenán voltamogram slepého pokusu – vzorek moči po prekoncentraci bez přídavku 1-HP:borátový pufr o pH 9,0 (50:50) (Obr. 6.8 (2))
- zaznamenán voltamogram 1-HP v moči po prekoncentraci: borátový pufr o pH 9,0 (50:50), koncentrace 1-HP v moči  $c = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  (Obr. 6.8 (4))

Porovnáním slepého pokusu a samotného základního elektrolytu je vidět, že se ve vzorku moči po prekoncentraci aspoň na první pohled nenacházejí žádné látky poskytující signál/y v oblasti, kde očekáváme odezvu 1-HP. Nicméně při porovnání křivek 1-HP v MeOH a 1-HP v moči po prekoncentraci je zřetelně vidět celkový nárůst proudu, což způsobuje, že pík má spíš tvar vlny. Navíc tento proud je tím vyšší, čím koncentrovanější je vzorek moči. Je tedy patrné, že SPE neodstraní zcela všechny složky moči a že tyto neodstraněné látky mohou, zřejmě v souvislosti se svojí povrchovou aktivitou, ovlivňovat signál 1-HP.

Porovnáním výšky píku 1-HP o  $c = 8 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  (resp.  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) v methanolicke složce modelového roztoku s jeho odezvou po předběžné prekoncentraci ze vzorku moči obsahujícím  $4 \cdot 10^{-6}$  (resp.  $1 \cdot 10^{-6}$ )  $\text{mol dm}^{-3}$  1-HP bylo zjištěno, že výtěžnost použité extrakce je 83% ( resp. 86%).

Při zjišťování výtěžnosti se velikost píku odečítala jako velikost proudu od křivky slepého pokusu (základního elektrolytu v případě 1-HP v methanolu) do nejvyššího bodu píku .



Obr. 6.8 Voltamogramy 1-HP ( $4 \cdot 10^{-6}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) v moči po prekoncentraci (4), 1-HP ( $8 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) v MeOH (3), základní elektrolyt (1), slepý pokus (2). Příprava jednotlivých roztoku je uvedena v textu. Měřeno metodou DPV na BDDFE.

### **6.7 Pasivace elektrody při stanovení 1-hydroxypyrenu v moči po předběžné separaci a prekoncentraci**

Opakovatelnost měření byla zkoumána u koncentrací  $2 \cdot 10^{-7}$  (nejnižší detekovatelná koncentrace) a  $1 \cdot 10^{-6}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  (Tabulka 6.4). Obecné zvyšování chyby opakovatelnosti u nízkých koncentrací je běžné a vysvětluje se mimo jiné zmenšujícím se poměrem signálu a šumu. V daném případě se opakovatelnost 10 po sobě jdoucích měření s procentuální chybou až 22,0% se dá považovat za horší a vysvětluje se přítomností matrice. Zatím nebyla nalezeny elektrochemické regenerační podmínky, které by daný výsledek vylepšily.

Tabulka 6.4 Statistické zpracování výšky píku 1-HP v moči po předběžné separaci a prekoncentraci u desíti po sobě jdoucích scanů. Prostředí MeOH-borátový pufr o pH 9,0 (50:50). Měřeno metodou DPV na BDDFE.

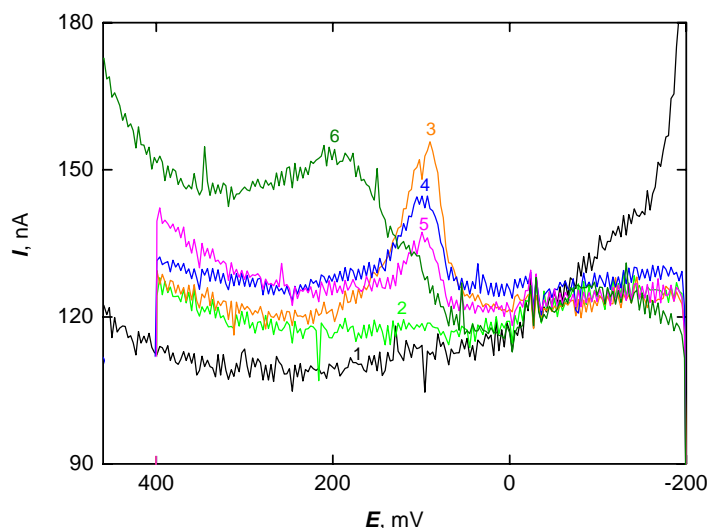
$c, \text{ mol dm}^{-3}$	$\bar{I}_p, \text{ nA}$	$ L , \text{ nA}$	$s, \text{ nA}$	$s_r, \%$
$2 \cdot 10^{-7}$	4,97	0,68	1,10	22,0
$1 \cdot 10^{-6}$	34,6	1,57	2,53	7,31

$\bar{I}_p$  průměrný proud píku;  $s$  směrodatná odchylka;  $s_r$  relativní směrodatná odchylka;  $|L|$  absolutní hodnota intervalu spolehlivosti.

## 6.8 Koncentrační závislost 1-HP v moči

Koncentrační závislost 1-HP v moči po byla proměřena metodou DPV na BDDFE v prostředí MeOH:borátový pufr o pH 9,0 (50:50) v rozmezí  $1 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> (Obr. 6.9). Roztok pro měření byl připraven smícháním 0,5 ml borátového pufru s 0,5 ml extraktu z moči (viz. kap. 6.5) obsahujícím 1-HP o požadované koncentraci. Uvedené koncentrace jsou koncentrace 1-HP v moči.

Výsledky ukazují, že v tomto koncentračním výška píku 1-HP není závislá na koncentraci. Ještě je třeba podotknout, že potenciál oxidace 1-HP se výrazně posunul k pozitivnějším hodnotám při koncentraci  $1 \cdot 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>. Zřejmě se výrazně uplatňuje vliv složek moči neostraněných použitím SPE na elektrochemické chování 1-HP. Na základě zde uvedeného předběžného výzkumu stanovení tohoto analytu v moči po předběžné separaci a prekoncentraci bude nadále vyvíjena snaha o nalezení optimálních podmínek pro toto stanovení.



Obr. 6.9 Voltamogramy 1-HP v moči pro předběžné separaci a prekoncentraci v koncentračním rozmezí  $(0-10) \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ . Prostředí MeOH-borátový pufr o pH 9,0 (50:50). Koncentrace 0 (1),  $2 \cdot 10^{-7}$  (2),  $4 \cdot 10^{-7}$  (3),  $6 \cdot 10^{-7}$  (4),  $8 \cdot 10^{-7}$  (5) a  $10 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$  (6). Měřeno metodou DPV na BDDFE.

## 7 Diskuse k provedeným voltametrickým stanovením

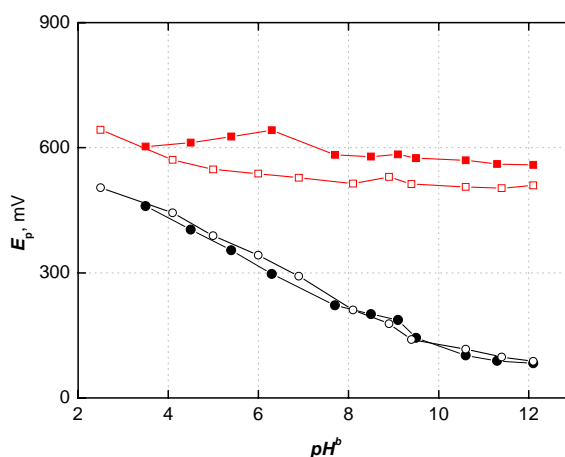
Při hledání optimálních podmínek stanovení 1-NP, 1-AP a 1-HP byla věnována pozornost: závislosti chování analytů na pH měřeného prostředí, pasivaci elektrody během měření, závislosti odezvy analytu na rychlosti prováděného scanu (DCV) a ověření linearit koncentrační závislosti. Dále budou popsány závěry učiněné k těmto jednotlivým bodům.

### *Závislost chování analytu na pH měřeného roztoku*

Z výše uvedených příkladů měření látek při různém pH roztoku zřetelně vyplývá, že jak redukce nitro skupiny, tak i oxidace amino a hydroxy skupin jsou do značné míry ovlivněny koncentrací vodíkových kationů v měřeném roztoku. Vodíkové kationy se jednak vyskytují přímo v reakčních rovnicích a jednak ovlivňují formu analytu (protonizovaná/deprotonizovaná) před samotnou reakcí na elektrodě. Protože všechny analyty podléhaly vícestupňové oxidaci/redukci, bylo důležité vybrat pík pro samotné analytické stanovení (obecně se analyt může stanovovat i podle více pík, ale to není tento případ). Při jeho vybírání se braly v úvahu výška, oddělení od ostatních pík a dobrá reprodukovatelnost, což jsou faktory často závislé na pH.



Za zmínku stojí i srovnání pH závislosti 1-HP v roztocích MeOH-pufř v poměru 50:50 a 70:30, tedy vliv obsahu MeOH na stanovení 1-HP. V obou prostředích je oxidace 1-HP dvojstupňová; vždy se objevují dva píky, které se překrývají v kyselém prostředí a se zvyšujícím se pH oddělují od sebe až do úplné separace při pH pufru 7,0 a více. Závislost potenciálů píků na  $\text{pH}^b$  měřeného prostředí (Obr. 7.1) ukazuje, že zatímco posun potenciálu prvního píku (který byl vybrán pro analytické účely) je v obou prostředích téměř stejný (černé křivky), tak druhý oxidační krok je už vyšším obsahem methanolu značně ovlivněný.



Obr. 7.1 Závislost potenciálu píku 1-HP ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) na  $\text{pH}^b$  roztoku. Černé křivky znázorňují 1. pík, červené 2. pík; plné body prostředí MeOH-BR pufr (70:30) a prázdné body prostředí MeOH-BR pufr (50:50). Měřeno v prostředí metodou DPV na BDDFE.

### ***Pasivace elektrody při jednotlivých stanoveních***

Pasivace elektrody se projevuje nejméně v případě redukce 1-NP. To se dá vysvětlit tím, že za předpokladu redukce nitropyrenu až na amin, je vzniklý aromatický amin rozpustný v daném prostředí a neadsorbuje se tudíž na povrch elektrody. Navíc, díky nalezeným vhodným regeneračním podmínkám se vliv pasivace podařilo téměř úplně odstranit. Opačný extrém vykazoval 1-AP a to při provádění scanu k pozitivnějším potenciálům než je +700 mV. V tomto případě po 10 scanech docházelo k úplné pasivaci a k vytvoření šedozeleného povlaku na povrchu elektrody. Toto chování se dá vysvětlit pravděpodobnou tvorbou polymerních struktur na povrchu elektrody. Regenerační podmínky obnovující původní výšku ani jednoho z píků nebyly nalezeny. Pík vybraný pro analytické účely s potenciálem oxidace +440 mV byl změřen tak, že scanování začínalo těsně před začátkem píku a končilo těsně za ním, tj. nebyl

překročen potenciál +700 mV. Za takových podmínek nedocházelo k tvorbě výše zmíněných nežádoucích produktů a reprodukovatelnost měření výrazně vzrostla.

### ***Závislost odezvy analytu na rychlosti scanu při DCV***

Při vynesení závislosti výšky píku na druhé odmocnině z rychlosti scanu (zkoumaný rychlostní rozsah 20–1500 mV s<sup>-1</sup>, měřeno metodou DCV) všechny tři látky vykazují v celém rozsahu zřejmou odchylku od linearitu a závislost má spíše tvar oblouku. Korelační koeficient u 1-NP je R = 0,9914, pro 1-AP 0,9966 a u 1-HP 0,9872. Nicméně byly nalezeny lineární úseky v rozsahu rychlostí 20–200 mV s<sup>-1</sup> (= 4 body v grafu), které vykazovaly linearitu s R = 0,9998 u 1-AP, R = 0,9998 u 1-HP a R = 0,9978 u 1-NP. V tomto rychlostním rozmezí je tedy elektrodový děj zřejmě řízen difúzí, při vyšších rychlostech už je ovlivněn dalšími blíže nezjištěnými faktory (např. výskytem kinetických nebo adsorpčních proudů). Vzhledem k tomu, že pro analytické účely byla použita DPV s relativně nízkou rychlostí polarizace 20 mV s<sup>-1</sup>, provedená měření spadají do zjištěných lineárních úseků, tj. do elektrodových dějů řízených difúzí.

### ***Koncentrační závislost analytů***

Všechny tři látky vykazují v daných koncentračních rozsazích dostatečnou linearitu koncentračních závislostí s možností měřit v řádu 10<sup>-7</sup> až 10<sup>-8</sup> mol dm<sup>-3</sup> (Tabulka 7.1). Na základě této skutečnosti je možné použít metodu standardního přídatku. Nejcitlivější stanovení, tj. největší směrnice, je v případě stanovení 1-HP. Nejnížší meze detekce bylo dosaženo u 1-AP. Bohužel stanovení 1-HP v moči po předběžné separaci a extrakci na SPE kolonce zatím neposkytlo spolehlivé výsledky. Tento fakt je přisuzován přítomnosti složité matrice, která pravděpodobně interferuje s analytem během provádění oxidačního scanu. I když předběžná studie zatím nevykázala požadované výsledky, určitě má smysl pracovat na nalezení vhodného postupu, protože přímé DPV stanovení bez předchozí separace pomocí HPLC by analýzu výrazně zlevnilo a urychlilo.

Tabulka 7.1 Parametry kalibračních přímek stanovení 1-NP, 1-AP a 1-HP. Měřeno metodou DPV na BDDFE.

Látka	c mol dm <sup>-3</sup>	směrnice nA mol <sup>-1</sup> dm <sup>3</sup>	R	LOD mol dm <sup>-3</sup>	LOQ mol dm <sup>-3</sup>
1-NP*	1·10 <sup>-6</sup> –1·10 <sup>-4</sup>	-5,39·10 <sup>6</sup>	0,9998	3·10 <sup>-7</sup>	8·10 <sup>-7</sup>
1-AP**	1·10 <sup>-7</sup> –1·10 <sup>-5</sup>	1,18·10 <sup>7</sup>	0,9971	6·10 <sup>-8</sup>	2·10 <sup>-7</sup>
1-HP***	1·10 <sup>-7</sup> –1·10 <sup>-5</sup>	1,38·10 <sup>7</sup>	0,9934	1·10 <sup>-7</sup>	3·10 <sup>-7</sup>
1-HP****	1·10 <sup>-7</sup> –1·10 <sup>-5</sup>	8,67·10 <sup>6</sup>	0,9997	9·10 <sup>-8</sup>	3·10 <sup>-7</sup>

\* MeOH-BR pufr pH 3,0 (70:30); \*\* MeOH-BR pufr o pH 3,0 (70:30); \*\*\* MeOH:BR pufr o pH 5,0 (70:30); \*\*\*\* MeOH-borátový pufr o pH 9,0 (50:50).

## 8 STANOVENÍ 1-AMINOPYRENU A 1-HYDROXYPYRENU V MOČI VYSOKOÚČINNOU KAPALINOVOU CHROMATOGRÁFÍ S ELEKTROCHEMICKOU DETEKČÍ NA BOREM DOPOVANÉ DIAMANTOVÉ ELEKTRODĚ

Metoda HPLC patří mezi základní separační techniky, které se používají pro stanovení PAH a NPAH. Nejpoužívanější je hmotnostní a fluorescenční detekce. V této kapitole je popsána optimalizace podmínek pro méně používaný elektrochemický detektor, který jak plyne z prezentovaných výsledků, se ukázal jako dostatečně citlivý pro daný účel a přitom podstatně levnější nežli hmotnostně-spektrometrické či fluorescenční detektory. Z těchto důvodů by mohl být širěji používán k monitorování expozice polycyklickými aromatickými uhlovodíky.

### 8.1 Optimalizace podmínek pro stanovení 1-aminopyrenu a 1-hydroxypyrenu v methanolickém prostředí

Při hledání optimálních podmínek pro stanovení 1-AP a 1-HP metodou HPLC-ED se zkoumaly následující parametry: vliv složení mobilní fáze na eluční časy a výšku píků látek, potenciál oxidace obou látek a nejvhodnější průtoková rychlost mobilní fáze.

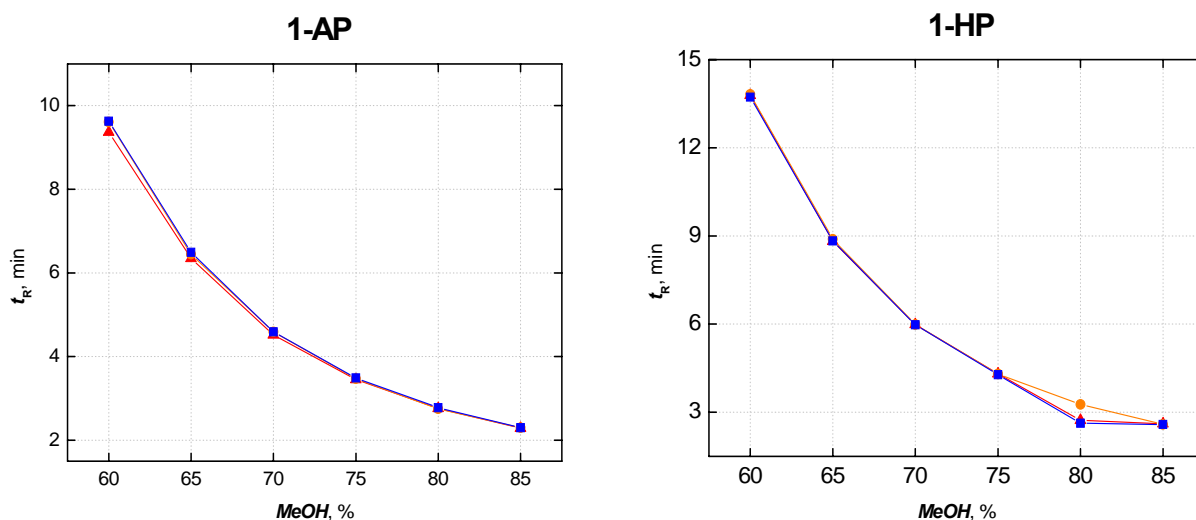
### ***Vliv obsahu methanolu v mobilní fázi na odezvu a eluční čas***

Pro stanovení 1-AP a 1-HP byla použita mobilní fáze obsahující 0,05M fosfátový pufr a methanol jako organický modifikátor. Použití pufru místo vody zajišťovalo stabilitu pH a dostatečnou vodivost mobilní fáze, což jsou aspekty potřebné pro elektrochemickou detekci. Nejdříve byl sledován vliv obsahu methanolu v mobilní fázi na výšky píků stanovovaných látek a na jejich eluční časy. Obsah methanolu byl postupně zvyšován od 60 do 85%. Toto rozmezí bylo zvoleno z toho důvodu, že nižší/vyšší množství methanolu způsobovalo příliš pomalé/rychlé vymývání látek z kolony. Se zvyšujícím se obsahem methanolu docházelo k postupnému nárůstu proudové odezvy obou látek, k zúžení píků a ke zkracování jejich elučních časů (Tabulka 8.1 a Obr. 8.2). Zkracování elučních časů bylo způsobeno snížením celkové polarizace mobilní fáze a umožňující snazší vymytí relativně nepolárních látek z nepolární stacionární fáze. Rychlejší vymytí neumožňuje zónám analytů přílišné rozmytí, proto s kratším retenčním časem docházelo k zužování a nárůstu píků. Za optimální byl zvolen 80% obsah methanolu. Rychlejší eluce by pravděpodobně nebyla vhodná pro stanovení analytů ve složitě matrici – moči. Retenční čas 1-AP byl 2,87 min a 1-HP 2,63 min.

Tabulka 8.1 Závislost retenčních časů a výšek píků 1-AP a 1-HP ( $c = 4 \cdot 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> v MeOH) na obsahu MeOH v mobilní fázi. MF: MeOH:0,05M fosfátový pufr o pH 5,0. Kolona LichroCART 125-4 100 RP-18, 5  $\mu$ m, 119  $\times$  4 mm, temperována na 40 °C, dávkováno 20  $\mu$ l,  $v = 1,0$  ml min<sup>-1</sup>. Měřeno metodou HPLC-ED při E = +1000 mV na BDDFE.

Obsah MeOH, %	$t_R$ , min		$I_p$ , nA	
	1-AP	1-HP	1-AP	1-HP
60	9,63	13,72	9,4	3
65	6,49	8,83	8,6	3,7
70	4,59	5,98	16,7	5,2
75	3,49	4,28	21,8	9,7
80	2,78	2,63	27,9	16,2
85	2,30	2,59	36,8	19,8

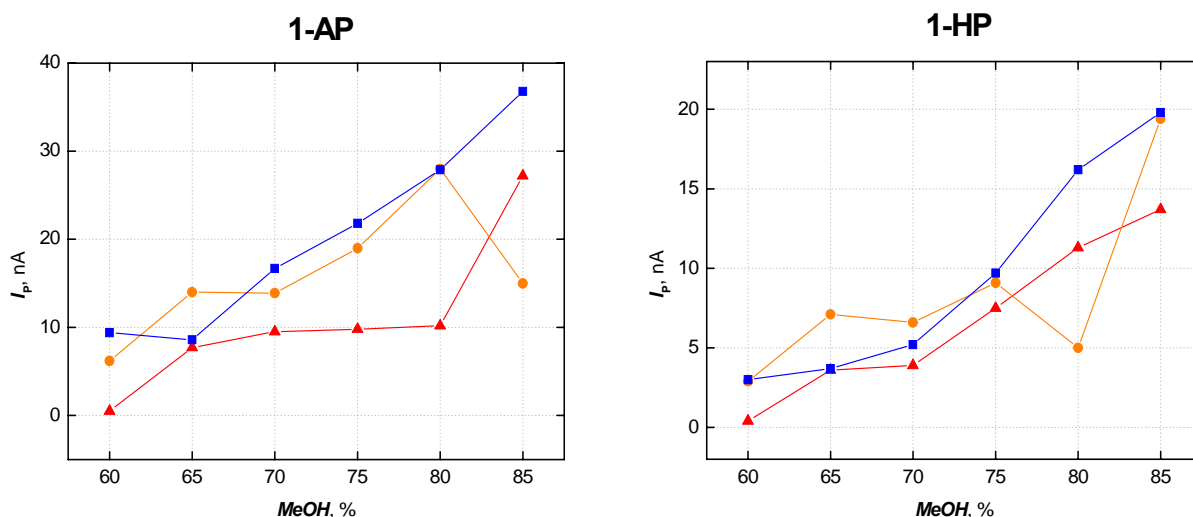
Šedě je zvýrazněn optimální obsah MeOH,  $t_R$  retenční čas,  $I_p$  výška píku



Obr. 8.1 Závislost retenčního času 1-AP a 1-HP ( $c = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  v MeOH) na obsahu MeOH v mobilní fázi. MF: MeOH:0,05 M fosfátový pufr o pH  $\color{red}{\blacktriangle}$  3,0,  $\color{orange}{\bullet}$  4,0 a  $\color{blue}{\blacksquare}$  5,0,  $v = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $E_{\text{ox}} = +1000 \text{ mV}$ . Kolona LichroCART 125-4 100 RP-18,  $5 \mu\text{m}$ ,  $119 \times 4 \text{ mm}$ , temperována na  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , dávkováno  $20 \mu\text{l}$ . Měřeno metodou HPLC-ED na BDDFE.

### *Vliv pH použitého pufru v mobilní fázi*

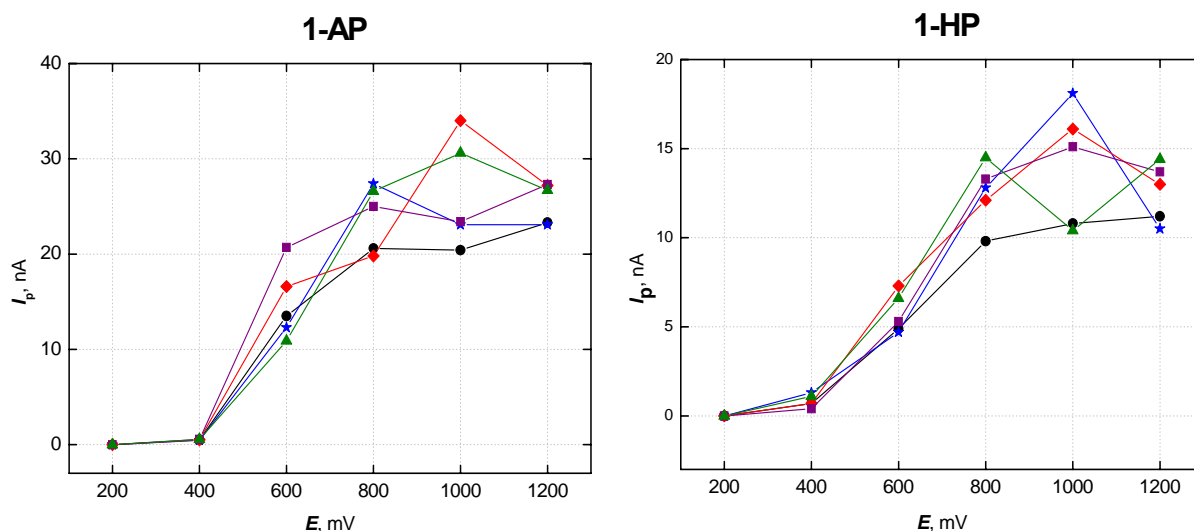
Dále byly vyzkoušeny mobilní fáze o složení MeOH:0,05M fosfátový pufr (80:20) s pH pufru 5,0 (pH mobilní fáze 7,2), 4,0 (6,1) a 3,0 (4,9). Měření ve vyšší nebo nižší oblasti pH výrobce kolony nedoporučuje. Obrázky 8.1 a 8.2 ukazují, že se zvyšujícím se pH fosfátového pufru výška signálů obou látek roste beze změny retenčních časů, proto pro měření koncentračních závislostí 1-AP a 1-HP byl vybrán fosfátový pufr o pH 5,0 (7,2).



Obr. 8.2 Závislost výšky píku 1-AP a 1-HP ( $c = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  v MeOH) na obsahu MeOH v mobilní fázi. MF: MeOH:0,05 M fosfátový pufr o pH —▲— 3,0, —●— 4,0 a —■— 5,0,  $v = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $E_{\text{ox}} = +1000 \text{ mV}$ . Kolona LichroCART 125-4 100 RP-18,  $5 \mu\text{m}$ ,  $119 \times 4 \text{ mm}$ , temperována na  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , dávkováno  $20 \mu\text{l}$ . Měřeno metodou HPLC-ED na BDDFE.

### ***Optimalizace potenciálu pracovní elektrody a průtokové rychlosti mobilní fáze***

Pro výběr potenciálu vkládaného na elektrodu, při němž stanovované látky poskytují nejlepší signál, byly proměřeny hydrodynamické voltamogramy 1-AP a 1-HP při různých průtokových rychlostech ( $v$ ,  $\text{ml min}^{-1}$ ) v prostředí MeOH:0,05M fosfátový pufr o pH 5,0. Potenciál pracovní elektrody byl postupně zvyšován od +200 do +1200 mV při průtokových rychlostech 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 a  $1,4 \text{ ml min}^{-1}$  (Obr. 8.2). Při potenciálu vyšším než +1200 mV dochází k silné destabilizaci základní linie a analýza je tak znemožněna. Při potenciálu +200 mV a nižším je už signál u obou látek nulový. Jako optimální potenciál elektrody pro stanovení jak 1-AP tak i 1-HP bylo zvoleno +1000 mV ( $E_{\text{ox}}$ ) při průtokové rychlosti mobilní fáze  $v_{1\text{-HP}} = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$  u 1-HP a  $v_{1\text{-AP}} = 0,8 \text{ ml min}^{-1}$  pro 1-AP.



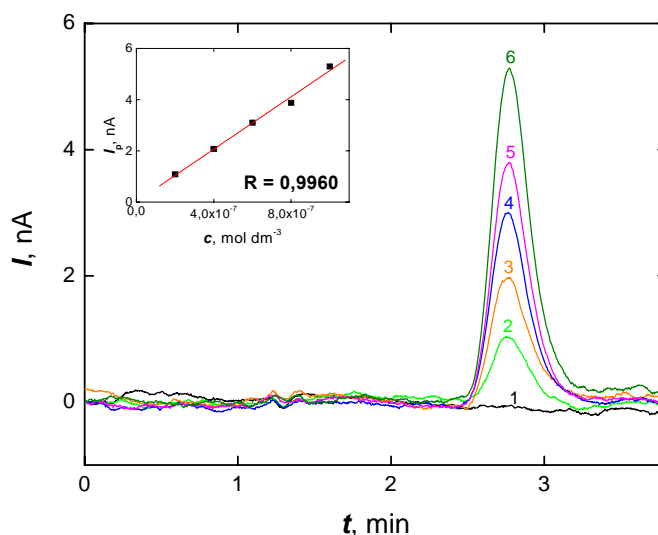
Obr. 8.3 Hydrodynamické voltamogramy 1-AP a 1-HP ( $c = 4 \cdot 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> v MeOH). Průtoková rychlost —●— 0,6; —★— 0,8; —◆— 1,0; —■— 1,2 a —▲— 1,4 ml min<sup>-1</sup>. MF: MeOH:0,05 M fosfátový pufr o pH = 5,0 (80:20, pH<sup>b</sup> = 7,2). Kolona LichroCART 125-4 100 RP-18, 5 μm, 119 × 4 mm, temperována na 40 °C, dávkováno 20 μl. Měřeno metodou HPLC-ED na BDDFE.

## 8.2 Koncentrační závislost 1-aminopyrenu a 1-hydroxypyrenu v methanolickém prostředí

Při nalezených optimálních podmínkách MeOH:0,05M fosfátový pufr pH 5,0 (80:20), potenciál oxidace +1000 mV a průtoková rychlost 1,0 ml min<sup>-1</sup> pro 1-HP a 0,8 ml min<sup>-1</sup> pro 1-AP byla proměřena koncentrační závislost obou látek v rozmezí  $1 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>. Ukázky chromatogramů jsou na Obr. 8.4 a 8.5, parametry kalibračních přímek jsou uvedeny v Tabulce 8.2.

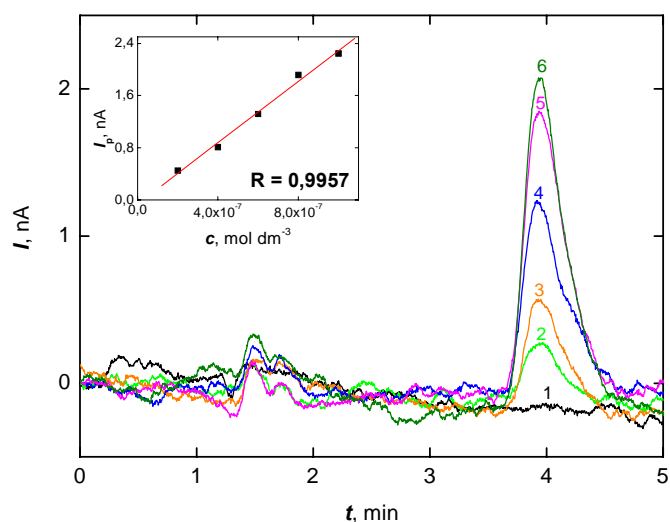
Tabulka 8.2 Parametry kalibračních přímek pro stanovení 1-AP a 1-HP ve vodně-methanolicém prostředí. MF: 0,05M fosfátový pufr pH 5,0 (80:20),  $v_{1-HP} = 0,8 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $v_{1-AP} = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $E_{ox} = +1000 \text{ mV}$ . Kolona LichroCART 125-4 100 RP-18,  $5 \mu\text{m}$ ,  $119 \times 4 \text{ mm}$ , temperována na  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , dávkováno  $20 \mu\text{l}$ . Měřeno metodou HPLC-ED na BDDFE. Retenční čas 1-AP 2,76 min, 1-HP 3,93 min.

Látka	$c$ $\text{mol dm}^{-3}$	směrnice $\text{nA mol}^{-1} \text{dm}^3$	R	LOD $\text{mol dm}^{-3}$	LOQ $\text{mol dm}^{-3}$
1-AP	$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$	$5,42 \cdot 10^6$	0,9990	$5 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-7}$
1-HP	$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$	$2,09 \cdot 10^6$	0,9992	$9 \cdot 10^{-8}$	$3 \cdot 10^{-7}$



Obr. 8.4 Chromatogramy 1-AP v MeOH v koncentračním rozmezí  $(0-10) \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ . Koncentrace 1-AP: 0 (1),  $2 \cdot 10^{-7}$  (2),  $4 \cdot 10^{-7}$  (3),  $6 \cdot 10^{-7}$  (4),  $8 \cdot 10^{-7}$  (5) a  $10 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$  (6). MF: MeOH:0,05 M fosfátový pufr o pH 5,0 (80:20),  $v_{1-AP} = 0,8 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $E_{ox} = +1000 \text{ mV}$ . Kolona LichroCART 125-4 100 RP-18,  $5 \mu\text{m}$ ,  $119 \times 4 \text{ mm}$ , temperována na  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , dávkováno  $20 \mu\text{l}$ . Měřeno metodou HPLC-ED při na BDDFE.





Obr. 8.5 Chromatogramy 1-HP v MeOH v koncentračním rozmezí  $(0-10) \cdot 10^{-7}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ . Koncentrace 1-HP: 0 (1),  $2 \cdot 10^{-7}$  (2),  $4 \cdot 10^{-7}$  (3),  $6 \cdot 10^{-7}$  (4),  $8 \cdot 10^{-7}$  (5) a  $10 \cdot 10^{-7}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  (6). MF: MeOH:0,05 M fosfátový pufr o pH 5,0 (80:20),  $v_{1\text{-HP}} = 1,0$  ml  $\text{min}^{-1}$ ,  $E_{\text{ox}} = +1000$  mV. Kolona LichroCART 125-4 100 RP-18, 5  $\mu\text{m}$ ,  $119 \times 4$  mm, temperována na 40 °C, dávkováno 20  $\mu\text{l}$ . Měřeno metodou HPLC-ED na BDDFE.

### 8.3 Separace a prekoncentrace 1-aminopyrenu a 1-hydroxypyrenu z moči

Extrakce 1-AP a 1-HP z moči byla prováděna následujícím způsobem: k 10 ml moči neexponovaného pracovníka bylo přidáno vypočtené množství 1-AP nebo 1-HP v methanolu. K takto připravenému modelovému vzorku moči bylo přidáno 10,0 ml fosfátového pufru o pH 5 a vzniklý roztok byl prolit SPE kolonkou (LiChrolut® RP-18 E (40-60  $\mu\text{m}$ ), 200 mg 3 ml, Merck), která byla předem aktivována promytím 5 ml MeOH a 10 ml deionizované vody. Kolonka byla následně promyta 10 ml vody a zachycené látky byly vymyty 10 ml MeOH. Eluát byl odpařen pod proudem dusíku, odparek rozpuštěn v 1,0 ml MeOH a zanalyzován pomocí HPLC-ED. Porovnáním výšek píků daných látek o  $c = 4 \cdot 10^{-6}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  v methanolu s jejich odezvami po předběžné prekoncentraci ze vzorku moči obsahujícím  $4 \cdot 10^{-7}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  1-AP nebo 1-HP bylo zjištěno, že výtěžnost použité extrakce je 87% pro 1-HP a 75% pro 1-AP.

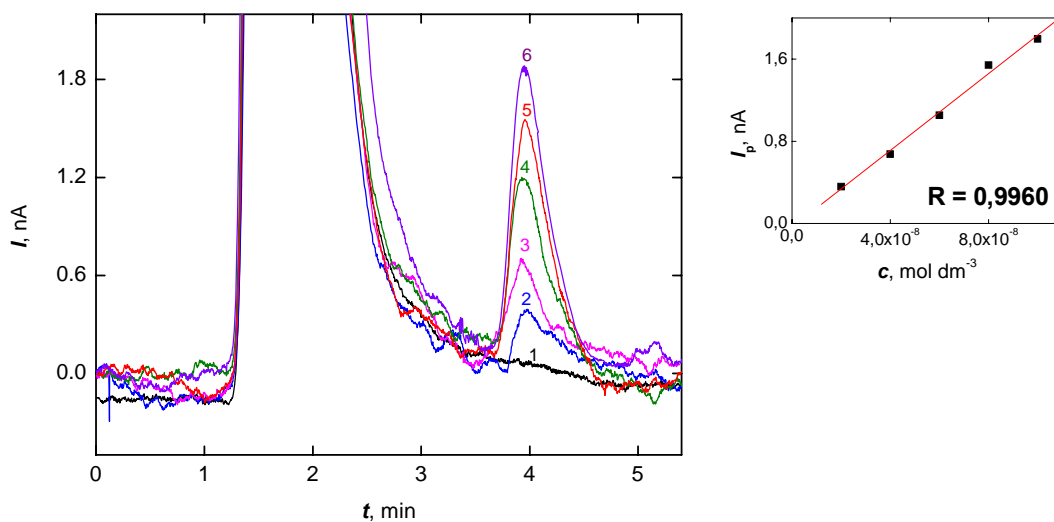
## 8.4 Koncentrační závislost 1-aminopyrenu a 1-hydroxypyrenu v moči

Na základě zjištěných optimálních parametrů pro stanovení obou látek v methanolu byla proměřena koncentrační závislost pro 1-AP a pro 1-HP v rozmezí  $1 \cdot 10^{-8}$ – $1 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> v modelovém vzorku moči po předběžné separaci a prekoncentraci extrakcí na tuhé fázi (Obr. 8.8 až 8.11). Parametry kalibračních závislosti jsou uvedené v Tabulce 8.3.

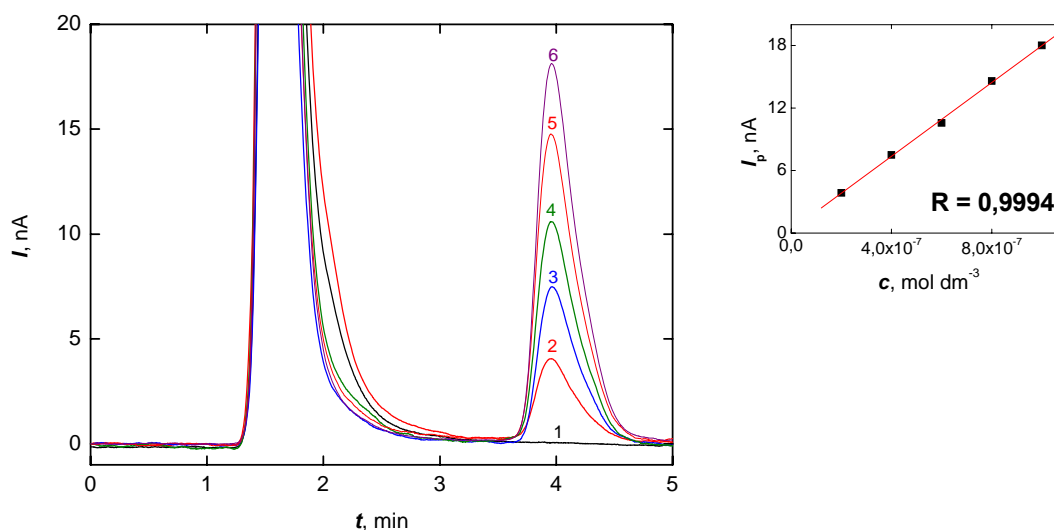
Literatura uvádí (viz přehled<sup>12</sup>), že koncentrace 1-HP v moči se pohybují od  $(1-5) \cdot 10^{-9}$  mol dm<sup>-3</sup> u osob neexponovaných, přes  $(1-5) \cdot 10^{-8}$  mol dm<sup>-3</sup> u dělníků při výrobě hliníku,  $(1-20) \cdot 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup> u pacientů s psoriázou léčených mastmi na bázi dehtových výrobků až po  $1 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> u pracovníků exponovaných profesionálně při zpracování dehtu. Scheepers a kol.<sup>48</sup> zase naměřili koncentraci  $3 \cdot 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup> 1-AP u mechaniků diesellových lokomotiv. Mez detekce pro stanovení 1-HP a 1-AP v moči s předběžnou prekoncentrací a separací a následnou analýzou pomocí HPLC-ED na BDDFE za výše popsaných optimálních podmínek je  $1 \cdot 10^{-8}$  mol dm<sup>-3</sup>, což hovoří o tom, že daná technika je dostatečně citlivá a tudíž vhodná pro stanovení jak 1-HP tak i 1-AP v moči u exponovaných pracovníků jakožto biomárkerů pro biologické monitorování expozice polycyklickým aromatickým uhlovodíkům.

Tabulka 8.3 Parametry kalibračních přímků pro stanovení 1-AP a 1-HP v moči po extrakci na tuhé fázi. MF:0,05M fosfátový pufr pH 5,0 (80:20),  $v_{1-HP} = 1,0$  ml min<sup>-1</sup>,  $v_{1-AP} = 1,0$  ml min<sup>-1</sup>,  $E_{ox} = +1000$  mV. Kolona LichroCART 125-4 100 RP-18, 5 μm, 119 × 4 mm, temperována na 40 °C, dávkováno 20 μl,  $v = 1,0$  ml min<sup>-1</sup>. Měřeno metodou HPLC-ED na BDDFE. Retenční čas 1-AP 2,70 min, 1-HP 3,95 min.

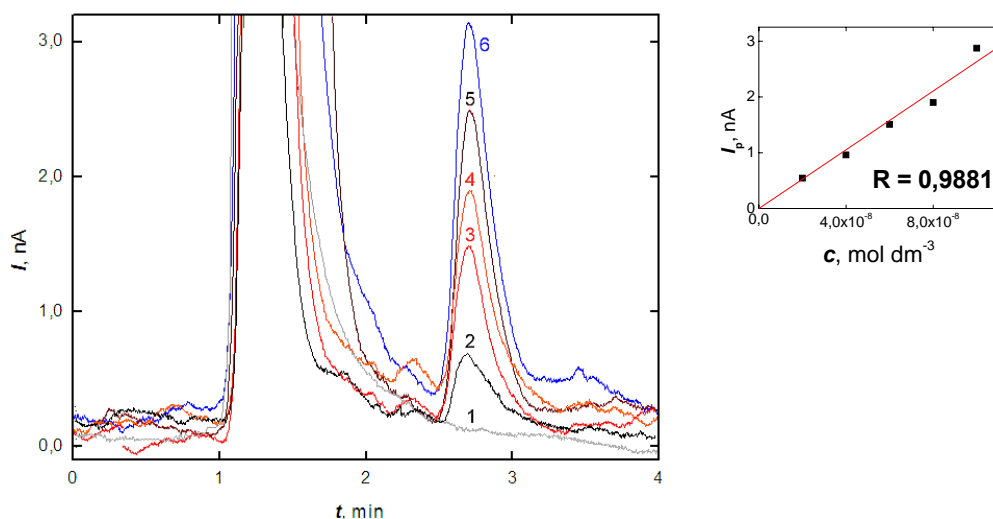
Látka	c mol dm <sup>-3</sup>	směrnice nA mol <sup>-1</sup> dm <sup>3</sup>	R	LOD mol dm <sup>-3</sup>	LOQ mol dm <sup>-3</sup>
1-AP	$1 \cdot 10^{-8}$ – $1 \cdot 10^{-5}$	$3,35 \cdot 10^7$	0,9996	$1 \cdot 10^{-8}$	$3 \cdot 10^{-8}$
1-HP	$1 \cdot 10^{-8}$ – $1 \cdot 10^{-5}$	$1,92 \cdot 10^7$	0,9996	$1 \cdot 10^{-8}$	$3 \cdot 10^{-8}$



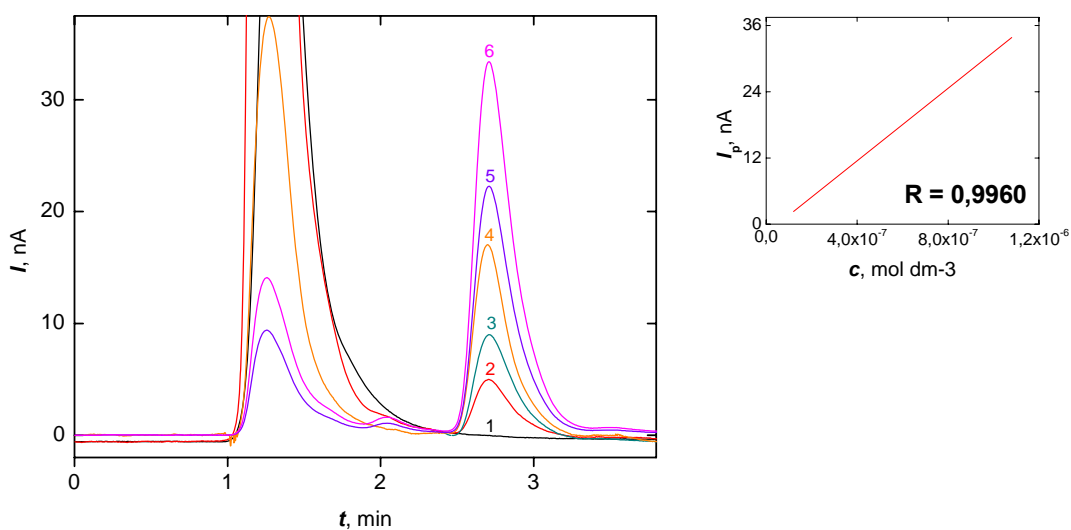
Obr. 8.8 Chromatogramy 1-HP v moči v koncentračním rozmezí  $(0-10) \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ . Koncentrace 1-HP: 0 (1),  $2 \cdot 10^{-7}$  (2),  $4 \cdot 10^{-7}$  (3),  $6 \cdot 10^{-7}$  (4),  $8 \cdot 10^{-7}$  (5) a  $10 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$  (6). MF: MeOH:0,05 M fosfátový pufr o pH 5,0 (80:20). Kolona LichroCART 125-4 100 RP-18, 5  $\mu\text{m}$ ,  $119 \times 4 \text{ mm}$ , temperována na  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , dávkováno  $20 \mu\text{l}$ ,  $v = 0,8 \text{ ml min}^{-1}$ . Měřeno metodou HPLC-ED při  $E_{\text{ox}} = +1000 \text{ mV}$  na BDDFE.



Obr. 8.9 Chromatogramy 1-HP v moči v koncentračním rozmezí  $(0-10) \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ . Koncentrace 1-HP: 0 (1),  $2 \cdot 10^{-7}$  (2),  $4 \cdot 10^{-7}$  (3),  $6 \cdot 10^{-7}$  (4),  $8 \cdot 10^{-7}$  (5) a  $10 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$  (6). MF: MeOH:0,05 M fosfátový pufr o pH 5,0 (80:20). Kolona LichroCART 125-4 100 RP-18, 5  $\mu\text{m}$ ,  $119 \times 4 \text{ mm}$ , temperována na  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , dávkováno  $20 \mu\text{l}$ ,  $v = 0,8 \text{ ml min}^{-1}$ . Měřeno metodou HPLC-ED při  $E_{\text{ox}} = +1000 \text{ mV}$  na BDDFE.



Obr. 8.10 Chromatogramy 1-AP v moči v koncentračním rozmezí  $(0-10) \cdot 10^{-8}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ . Koncentrace 1-AP: 0 (1),  $2 \cdot 10^{-8}$  (2),  $4 \cdot 10^{-8}$  (3),  $6 \cdot 10^{-8}$  (4),  $8 \cdot 10^{-8}$  (5) a  $10 \cdot 10^{-8}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  (6). MF: MeOH:0,05 M fosfátový pufr o pH 5,0 (80:20). Kolona LichroCART 125-4 100 RP-18, 5  $\mu\text{m}$ ,  $119 \times 4$  mm, temperována na 40 °C, dávkováno 20  $\mu\text{l}$ ,  $v = 1,0$  ml  $\text{min}^{-1}$ . Měřeno metodou HPLC-ED při  $E_{\text{ox}} = +1000$  mV na BDDFE.



Obr. 8.11 Chromatogramy 1-AP v moči v koncentračním rozmezí  $(0-10) \cdot 10^{-7}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ . Koncentrace 1-AP: 0 (1),  $2 \cdot 10^{-7}$  (2),  $4 \cdot 10^{-7}$  (3),  $6 \cdot 10^{-7}$  (4),  $8 \cdot 10^{-7}$  (5) a  $10 \cdot 10^{-7}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  (6). MF: MeOH:0,05 M fosfátový pufr o pH 5,0 (80:20). Kolona LichroCART 125-4 100 RP-18, 5  $\mu\text{m}$ ,  $119 \times 4$  mm, temperována na 40 °C, dávkováno 20  $\mu\text{l}$ ,  $v = 1,0$  ml  $\text{min}^{-1}$ . Měřeno metodou HPLC-ED při  $E_{\text{ox}} = +1000$  mV na BDDFE.

## 9 ZÁVĚR

Na základě provedeného výzkumu elektrochemického chování 1-nitropyrenu, 1-aminopyrenu a 1-hydroxypyrenu na borem dopované diamantové filmové elektrodě byly nalezeny následující optimální podmínky pro stanovení zmíněných analytů:

1. Stanovení 1-nitropyrenu metodou DPV v prostředí MeOH-BR pufr o pH 3,0 (70:30) v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup> (R = 0,9998) s LOD  $3 \cdot 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup> a LOQ  $8 \cdot 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup>. Elektrochemická regenerace elektrody se prováděla před každým měřením: 50 potenciálových skoků mezi  $E_{\text{reg}}^1 = +800$  mV,  $t_{\text{reg}}^1 = 0,3$  s a  $E_{\text{reg}}^2 = -500$  mV,  $t_{\text{reg}}^2 = 0,3$  s.

2. Stanovení 1-aminopyrenu metodou DPV v prostředí v MeOH-BR pufr o pH 3,0 (70:30) v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> (R = 0,9971) s LOD  $6 \cdot 10^{-8}$  mol dm<sup>-3</sup> a LOQ  $2 \cdot 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup>. Pro eliminaci silné pasivace elektrody nebyly nalezené vhodné elektrochemické regenerační kroky, ale při provádění scanu od +230 do +680 mV (měření pouze píku vybraného k analytickému účelu) byla pasivace téměř odstraněna.

3. Stanovení 1-hydroxypyrenu metodou DPV v prostředí MeOH-BR pufr o pH 5,0 (70:30) v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> (R = 0,9934) s LOD  $1 \cdot 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup> a LOQ  $3 \cdot 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup>. Scan byl prováděn v rozmezí +150 až +500 mV (měření pouze píku vybraného k analytickému účelu).

4. Stanovení 1-hydroxypyrenu v moči po předběžné separaci a prekoncentraci na SPE kolonce RP-18E. Nebylo dosaženo spolehlivých výsledků. Tuto problematiku bude třeba dále detailně prostudovat.

5. Stanovení 1-AP a 1-HP v moči po předběžné separaci a prekoncentraci na SPE kolonce RP-18E metodou HPLC-ED na BDDFE v mobilní fázi MeOH:0,05M fosfátový pufr o pH 5,0 (80:20), průtoková rychlost měření 1-AP  $1,0$  ml min<sup>-1</sup> a  $0,8$  ml min<sup>-1</sup> u 1-HP, obě látky byly detekovány při potenciálu +1000 mV. Koncentrační závislosti 1-AP a 1-HP v modelových roztocích (tj. stanovení 1-AP a 1-HP v methanolu) byly proměřeny od  $1 \cdot 10^{-7}$  do  $1 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> s LOD  $5 \cdot 10^{-8}$  mol dm<sup>-3</sup>, LOQ  $2 \cdot 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup> pro 1-AP a LOD  $9 \cdot 10^{-8}$  mol dm<sup>-3</sup> a LOQ  $3 \cdot 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup> v případě 1-HP. Dále byly změřeny koncentrační závislosti obou látek v moči po předběžné separaci a prekoncentraci na SPE kolonce RP-18E od  $1 \cdot 10^{-8}$  do  $1 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> s LOD  $1 \cdot 10^{-8}$  mol dm<sup>-3</sup> a LOQ  $3 \cdot 10^{-8}$  mol dm<sup>-3</sup> pro obě látky.

Z provedené studie plyne, že za stanovených podmínek lze s pomocí BDDFE provést jednak voltametrické stanovení 1-nitropyrenu, 1-aminopyrenu a 1-hydroxypyrenu a jednak ji použít jako amperometrický detektor ve spojení s HPLC systémem pro stanovení 1-HP a 1-AP v moči po předběžné separaci a prekoncentraci s dostatečnou citlivostí a přesností.

## 10 LITERATURA

1. Barek, J.; Bencko, V.; Cvačka, J.; Šuta, M.: Znečištění životního prostředí automobilovými emisemi. *Chem. Listy* **92**, 794–798 (1998).
2. Salmeen, I.; Durisin, A. M.; Prater, T. J.; Riley, T.; Schuetzle, D.: Contribution of 1-nitropyrene to direct-acting Ames assay mutagenicities of diesel particulate extracts. *Mutat. Res.* **104**, 17–23 (1982).
3. Schuetzle, D.; Lewtas, J.: Bioassay-directed chemical analysis in environmental research. *Anal. Chem.* **58**, 1060A–1075A (1986).
4. Bamford, H. A.; Bezabeh, D. Z.; Schantz, S.; Wise, S. A.; Baker, J. E.: Determination and comparison of nitrated-polycyclic aromatic hydrocarbons measured in air and diesel particulate reference materials. *Chemosphere* **50**, 575–587 (2003).
5. Pecková, K.; Musilová, J.; Barek, J.: Boron-doped diamond film electrodes – new tool for voltammetric determination of organic substances. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **39**, 148–172 (2009).
6. Kocourek, V.; Hajšlová, J.: Nitrované polycyklické uhlovodíky (nitroPAH): environmentální karcinogeny. Vědecký výbor fytosanitární a životního prostředí.
7. Jacob, J.; Karcher, W.; Belliardo, J. J.; Dumler, R.; Boenke, A.: Polycyclic aromatic compounds of environmental and occupational importance – Their occurrence, toxicity and the development of high-purity certified reference materials. *Fresenius J. Anal. Chem.* **340**, 755–767 (1991).
8. Barek, J.; Cvačka, J.; Moreira, J. C.; Zima, J.: Metody stanovení genotoxických nitroderivátů polycyklických aromatických uhlovodíků. *Chem. Listy* **90**, 805–817 (1996).
9. Garshick, E.: A case control study of lung cancer and diesel exhaust exposure in railroad workers. *Environ. Health Perspect.* **112**, 1539–1543 (2004).
10. Steenland, K.: Lung cancer and diesel exhaust: a review. *Am. J. Ind. Med.* **10**, 177–189 (1986).
11. Silverman, D. T.; Hoover, R. N.; Albert, S.; Graff, K. M.: Occupation and cancer of the lower urinary tract in Detroit. *J. Natl. Cancer Inst.* **70**, 237–245 (1983).
12. Barek, J.; Mejstřík, V.; Švagrová, I.; Zima, J.: Měření expozice polycyklickým aromatickým uhlovodíkům na základě monitorování jejich metabolitů v tělních tekutinách. *Chem. Listy* **88**, 341–352 (1994).
13. Becher, G.; Bjorseth, A.: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by analysis of human urine. *Cancer Lett.* **17**, 301–311 (1983).
14. Jongeneelen, F. J.; Bos, R. P.; Anzion, R. B. M.; Theuws, J. L. G.; Henderson, P. T.: Biological monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons metabolites in urine. *Scand. J. Work Environ. Health* **12**, 137–143 (1986).
15. Keimig, S. D.; Kirby, K. W.; Morgan, D. P.; Keiser, J. E.; Hubert, T. D.: Identification of 1-hydroxypyrene as a major metabolite of pyrene in pig urine. *Xenobiotica* **13**, 415–420 (1983).
16. Li, H.; Krieger, R. I.; Li, Q. X.: Improved HPLC method for analysis of 1-hydroxypyrene in human urine specimens of cigarette smokers. *Sci. Total. Environ.* **257**, 147–153 (2000).
17. Scherer, G.; Conze, C.; Tricker, A. R.; Adlcofer, F.: Uptake of tobacco smoke constituents on exposure to environmental tobacco smoke. *Clin. Investig.* **70**, 352–367 (1992).
18. Jongeneelen, F. J.; van Leeuwen, F. E.; Oosterink, S.; Anzion, R. B.; van der Loop, F.; Bos, R. P.; van Veen, H. G.: Ambient and biological monitoring of coke oven workers: determinants of the internal dose of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Br. J. Ind. Med.* **47**, 454–461 (1990).

19. van Rooij, J. G. M.; Veeger, M. M. S.; Bodelier-Blade, M. M.; Scheepers, P. T. J.; Jongeneelen, F. J.: Smoking and dietary intake of polycyclic aromatic hydrocarbons as sources of interindividual variability in the baseline excretion of 1-hydroxypyrene in urine. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **66**, 55–65 (1994).
20. Gündel, J.; Mannschreck, C.; Büttner, K.; Ewers, U.; Angerer, J.: Urinary levels of 1-hydroxypyrene, 1-, 2-, 3-, and 4-hydroxyphenanthrene in females living in an industrial area of Germany. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **31**, 585–590 (1996).
21. Jongeneelen, F. J.: Biological monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons; 1-hydroxypyrene in urine of people. *Toxicol. Lett.* **72**, 205–211 (1994).
22. Jongeneelen, F. J.; Anzion, R. B. M.; Leijdekkers, Ch. -M.; Bos, R. P.; Henderson, P. Th.: 1-Hydroxypyrene in human urine after exposure to coal tar and a coal tar derived product. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **57**, 47–55 (1985).
23. Tolos, W. P.; Shaw, P. B.; Lowry, L. K.; McKenzie, B. A.; Deng, J.; Markel, H. L.: 1-Pyrenol: a biomarker for occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* **5**, 303–309 (1990).
24. Hansen, A. M.; Wallin, H.; Binderup, M. L.; Dybdahl, M.; Autrup, H.; Loft, S.; Knudsen, L. E.: Urinary 1-Hydroxypyrene and mutagenicity in bus drivers and mail carriers exposed to urban air pollution in Denmark. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen* **557**, 7–17 (2004).
25. Jongeneelen, F.J.; Anzion, R.B.M.; Scheepers, P.T.J.; Bos, R.P.; Henderson, P.Th.; Nijenhuis, E.H.; Veenstra, S.J.; Brouns, R.M.E.; Winkes, A.: 1-Hydroxypyrene in urine as a biological indicator of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in several work environments. *Ann. Occup. Hygiene* **32**, 35–43 (1988).
26. Jongeneelen, F.J.; Anzion, R.B.M.; Scheepers, P.T.J.; Bos, R.P.; Henderson, P.Th.; Nijenhuis, E.H.; Veenstra, S.J.; Brouns, R.M.E.; Winkes, A.: 1-Hydroxypyrene in urine as a biological indicator of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in several work environments. *Ann. Occup. Hygiene* **32**, 35–43 (1988).
27. Moller, L.: In Vivo Metabolism and Genotoxic Effects of Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environ. Health Perspect.* **102**, 139–146 (1994).
28. IARC - zařazení do skupiny 2B (1-NP) World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, IARC monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Diesel and Gasoline Engine Exhausts and Some Nitroarene, Volume 46, (1989).
29. IARC: Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Overall Evaluations of Carcinogenicity (Updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42, Sup pl. 7), str. 224. IARC, Lyon 1987.
30. Stiborová, M.: Aromatické nitrosloučeníny: kontaminanty životního prostředí a potenciální karcinogeny pro člověka. *Chem. Listy* **96**, 784–791 (2002).
31. Ball, L. M.; Kohan, M. J.; Inmon, J. P.; Claxton, L. D.; Lewtas, J.: Metabolism of 1-nitro[<sup>14</sup>C]pyrene *in vitro* in the rat and mutagenicity of urinary metabolites. *Carcinogenesis* **5**, 1557–1564 (1984).
32. Ball, L. M.; King, L. C.: Metabolism, mutagenicity, and activation of 1-nitropyrene *in vivo* and *in vitro*. *Environ. Int.* **11**, 355–362 (1985).
33. Howard, P. C.; Flammang, T. J.; Beland, F. A.: Comparison of the *in vitro* and *in vivo* hepatic metabolism of the carcinogen 1-nitropyrene. *Carcinogenesis* **6**, 243–249 (1985).
34. Toriba, A.; Kitaoka, H.; Dills, R. L.; Mizukami, S.; Tanabe, K.; Takeuchi, N.; Ueno, M.; Kameda, T.; Tang, N.; Hayakawa, K.; Simpson, Ch. D.: Identification and quantification of 1-nitropyrene metabolites in human urine as a proposed biomarker for exposure to diesel exhaust. *Chem. Res. Toxicol.* **20**, 999–1007 (2007).



35. Laumbach, R.; Tong, J.; Zhang, L.; Ohman-Strickland, P.; Stern, A.; Fiedler, N.; Kipen, H.; Kelly-McNeil, K.; Lioya, P.; Zhang, J.: Quantification of 1-aminopyrene in human urine after a controlled exposure to diesel exhaust. *J. Environ. Monit.* **11**, 153–159 (2009).
36. Murayama, M.; Dasgupta, P. K.: Liquid chromatographic determination of nitro-substituted polynuclear aromatic hydrocarbons by sequential electrochemical and fluorescence detection. *Anal. Chem.* **68**, 1226–1232 (1996).
37. Galceran, M. T.; Moyano, E.: Determination of oxygenated and nitro-substituted polycyclic aromatic hydrocarbons by HPLC and electrochemical detection. *Talanta* **40**, 615–621 (1993).
38. Dimashki, M.; Harrad, S.; Harrison, R. M.: Measurements of nitro-PAH in the atmospheres of two cities. *Atmos. Environ.* **34**, 2459–2469 (2000).
39. Jinhui, X.; Lee, F. S. C.: Quantification of nitrated polynuclear aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate matter. *Anal. Chim. Acta* **416**, 111–115 (2000).
40. Tomkins, B. A.; Brazell, R. S.; Roth, M. E.; Ostrum, V. H.: Isolation of mononitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in particulate matter by liquid chromatography and determination by gas chromatography with the thermal energy analyzer. *Anal. Chem.* **56**, 781–786 (1984).
41. MacCrehan, W. A.; May, W. E.; Yang, S. D.: Determination of nitro polynuclear aromatic hydrocarbons in air and diesel particulate matter using liquid chromatography with electrochemical and fluorescence detection. *Anal. Chem.* **60**, 194–199 (1988).
42. Barreto, R.P.; Albuquerque, F.C.;Pereira Netto, A. D.: Optimization of an improved analytical method for the determination of 1-nitropyrene in milligram diesel soot samples by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1163**, 219–227 (2007).
43. Jongeneelen, F. J.; Anzion, R. B. M.; Henderson, P. Th.: Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine. *J. Chromat. B* **413**, 227–232 (1987).
44. van Bekkum, Y. M; Van den Broek, P. H. H.; Scheepers, P. T. J.; Bos, R. P.: Sensitive and selective detection of urinary 1-nitropyrene metabolites following administration of a single intragastric dose of diesel exhaust particles (SRM 2975) to rats. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 1382–1390 (1998).
45. Daňhel, A.; Pecková, K.; Čížek, K.; Barek, J.; Zima, J.; Yosypchuk, B.; Navrátil, T.: Voltametrické stanovení genotoxických dinitronaftalenů pomocí rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgamové elektrody. *Chem. Listy* **101**, 144–149 (2007).
46. Becher, G.; Bjorseth, A.: Determination of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons by analysis of human urine. *Cancer Lett.* **17**, 301–311 (1983).
47. Barek, J.; Bencko, V.; Cvačka, J.; Mejstřík, V.; Slámová, A.; Švagrová, I.; Zima, J.: Stanovení 1-hydroxypyrenu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s elektrochemickou detekcí. *Chem. Listy* **91**, 871–876 (1997).
48. Scheepers, P. T. J.; Thuis, H. J. T. M.; Martens, M. H. J.; Bos, R. P.: Assessment of occupational exposure to diesel exhaust. The use of an immunoassay for the determination of urinary metabolites of nitroarenes and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Lett.* **72**, 191–198 (1994).
49. Kawanaka, Y.; Sakamoto, K.; Wang, N.; Yun, S.-J.: Simple and sensitive method for determination of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in diesel exhaust particles by gas chromatography-negative ion chemical ionisation tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1163**, 312–317 (2007).
50. Sekyra, M.; Leníček, J.; Bednářková, K.; Beneš, I.: GC-MS stanovení nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků v ovzduší. *Chem. Listy* **94**, 924–930 (2000).

51. Luan, T.; Fang, Sh.; Zhong, Y.; Lin, L.; Chan, S. M. N.; Lan, Ch.; Tam, N. F. Y.: Determination of hydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons by fully automated solid-phase microextraction derivatization and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1173**, 37–43 (2007).
52. van Bekkum, Y. M.; Scheepers, P. T. J.; van den Broek, P. H. H.; Velders, D.D.; Noordhoek, J.; Bos, R. P.: Determination of haemoglobin adducts following oral administration of 1-nitropyrene to rats using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **701**, 19–28 (1997).
53. Tomkins, B. A.; Ho, C.-h.: Determination of polycyclic aromatic amines in natural and synthetic crudes. *Anal. Chem.* **54**, 91–96 (1982).
54. Niles, R.; Tan, Y. L.: Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons and mononitrated derivatives in air and diesel particulates. *Anal. Chim. Acta* **221**, 53–63 (1989).
55. Siwińska, E.; Mielżyńska, Bubak, A.; Smolik, E.: The effect of coal stoves and environmental tobacco smoke on the level of urinary 1-hydroxypyrene. *Mut. Res.* **445**, 147–153 (1999).
56. Rey-Salgueiro, L.; Martínez-Carballo, E.; García-Falcón, M. S.; González-Barreiro, C.; Simal-Gándara, J.: Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites in infant foods. *Food Chemistry* **115**, 814–819 (2009).
57. Kamiura, T.; Kawaraya, T.; Tanaka, M.; Nakadoi, T.: Determination of 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene in suspended particulate matter by liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta* **254**, 27–31 (1991).
58. Ferrari, St.; Mandel, F.; Berset, J. D.: Quantitative determination of 1-hydroxypyrene in bovine urine samples using high-performance liquid chromatography with fluorescence and mass spectrometric detection. *Chemosphere* **47**, 173–182 (2002).
59. Barek, J.; Pumera, M.; Muck, A.; Kadeřábková, M.; Zima, J.: Polarographic and voltametric determination of selected nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Anal. Chim. Acta* **393**, 141–146 (1999).
60. Barek, J.; Muck, A.; Wang, J.; Zima, J.: Study of voltametric determination of carcinogenic 1-nitropyrene and 1-aminopyrene using a glassy carbon paste electrode. *Sensors* **4**, 47–57 (2004).
61. Wang, J.; Rivas, G.; Luo, D.; Cai, X.; Valera, F. S.; Dontha, N.: DNA-modified electrode for the detection of aromatic amines. *Anal. Chem.* **68**, 4365–4369 (1996).
62. Ferancová, A.; Bucková, M.; Korgová, E.; Korbut, O.; Gründler, P.; Wärmarm, I.; Štěpán, R.; Barek, J.; Zima, J.; Labuda, J.: Association interaction and voltammetric determination of 1-aminopyrene and 1-hydroxypyrene at cyclodextrin and DNA based electrochemical sensors. *Bioelectrochemistry* **67**, 191–197 (2005).
63. Castro, A. A.; Wagener, A. de L. R.; Farias, P. A. M.; Bastos, M. B.: Adsorptive stripping voltammetry of 1-hydroxypyrene at the thin-film mercury electrode – basis for quantitative determination of PAH metabolite in biological materials. *Anal. Chim. Acta* **521**, 201–207 (2004).
64. Iwaki, M.; Sato, S.; Takahashi, K.; Sakairi, H.: Electrical conductivity of nitrogen and argon implanted diamond. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res.* **209–210**, 1129–1133 (1983).
65. Pleskov, Y.; Sakharova, A.; Krotova, M. D.; Bouilov, L.; Spitsyn, B. V.: Photoelectrochemical properties of semiconductor diamond. *J. Electroanal. Chem.* **228**, 19–27 (1987).
66. Tenne, N.; Patel, K.; Hashimoto, K.; Fujishima, A.: Efficient electrochemical reduction of nitrate to ammonia using conductive diamond film electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **347**, 409–415 (1993).

67. Chailapakul, O.; Popa, E.; Tai, H.; Sarada, B. V.; Tryk, D. A.; Fujishima, A.: The electrooxidation of organic acids at boron-doped diamond electrodes. *Electrochem. Commun.* **2**, 422–426 (2000).
68. Fischer, A. E.; Show, Y.; Swain, G. M.: Electrochemical performance of diamond thin-film electrodes from different commercial sources. *Anal. Chem.* **76**, 2553–2560 (2004).
69. Xu, J.; Granger, M. C.; Chen, Q.; Strojek, J. W.; Lister, T. E.; Swain, G. M.: Boron-doped diamond thin-film electrodes. *Analytical Chemistry News & Features* (1997).
70. Musilová, J.; Barek, J.; Pecková, K.: Použití diamantových filmových elektrod dopovaných borem pro stanovení organických látek. *Chem. Listy* **103**, 469–478 (2009).
71. Muna, G. W.; Tasheva, N.; Swain, G. M.: Electro-oxidation and amperometric detection of chlorinated phenols at boron-doped diamond electrodes: a comparison of microcrystalline and nanocrystalline thin films. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 3674–3682 (2004).
72. Pecková, K.; Jandová, K.; Maixnerová, L.; Swain, G. M.; Barek, J.: Amperometric determination of aminobiphenyls using HPLC-ED with boron-doped diamond electrode. *Electroanalysis* **21**, 316–324 (2009).
73. Cizek, K.; Barek, J.; Fischer, J.; Peckova, K.; Zima, J.: Voltammetric determination of 3-nitrofluoranthene an 3-aminofluoranthene at boron doped diamond thin-film electrode. *Electroanalysis* **19**, 1295–1299 (2007).
74. Chailapakul, O.; Siangproh, W.; Sarada, B. V.; Terashima, C.; Rao, T. N.; Tryk, D. A.; Fujishima, A.: *Analyst* **127**, 1164 (2002).
75. Bouvrette, P.; Hrapovic, S.; Male, K. B.; Luong, J. H. T.: Analysis of the 16 environmental protection agency priority polycyclic aromatic hydrocarbons by high performance liquid chromatography-oxidized diamond film electrodes. *J. Chromatogr. A* **1103**, 248–256 (2006).
76. Cvacka, J.; Quaiserova, V.; Park, J.; Show, Y.; Muck, A.; Swain, G. M.: Boron-doped diamond microelectrodes for use in capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Anal. Chem.* **75**, 2678–2687 (2003).
77. Wang, J.; Chen, G.; Chatrathi, M. P.; Fujishima, A.; Tryk, D. A.; Shin, D.: Microchip capillary electrophoresis coupled with a boron-doped diamond electrode-based electrochemical detector. *Anal. Chem.* **75**, 935–939 (2003).
78. Sarada, B. V.; Rao, T. N.; Tryk, D. A.; Fujishima, A.: Electrochemical oxidation of histamine and serotonin at highly boron-doped diamond electrodes. *Anal. Chem.* **72**, 1632–1638 (2000).
79. Suryanarayan, V.; Zhang, Y.; Yoshihara, S.; Shirakashi, T.: Voltammetric assay of naproxen in pharmaceutical formulations using boron-doped diamond electrode. *Electroanalysis* **17**, 925–932 (2005).
80. Pecková, K.: A contribution to the determination of nitro, amino, and hydroxyl derivates of naphthalene using electrochemical methods. Disertační práce, Univerzita Karlova v Praze, (2006).
81. Honeychurch, K. C.; Hart, J. P.; Kirsch, N.: Voltametric, chromatographic and mass spectral elucidation of redox reactions of 1-hydroxypyrene occurring at a screen-printed carbon electrode. *Electrochim. Acta* **49**, 1141–1149 (2004).
82. Kirsch, N.; Hart, J. P.; Bird, D. J.; Luxton, R. W.; McCalley, D. V.: Towards the development of molecularly imprinted polymer based screen-printed sensors for metabolires of PAHs. *Analyst* **126**, 1936–1941 (2001).