

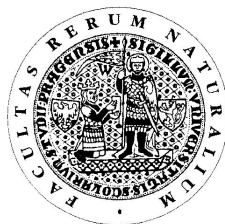
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie v přírodních vědách



**Monika Šmídková**

**VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ  
GENOTOXICKÉHO 6-NITROCHRYSENU  
NA RTUŤOVÝM MENISKEM MODIFIKOVANÉ  
STŘÍBRNÉ PEVNÉ AMALGÁMOVÉ ELEKTRODĚ**

**Voltammetric Determination of Genotoxic 6-Nitrochrysene  
at a Mercury Meniscus Modified  
Silver Solid Amalgam Electrode**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D.

Praha 2011

## Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá studiem elektrochemického chování 6-nitrochrysenu (6-NCH) a nalezením optimálních podmínek pro jeho stanovení DC voltametří (DCV) a diferenční pulzní voltametří (DPV) na rtuťovém meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě (m-AgSAE). Pro proměření koncentračních závislostí 6-NCH bylo vybráno optimální prostředí methanol – BR pufr o pH 9,0 (1:1) a vhodné regenerační potenciály  $E_{\text{reg},1} = 0$  mV,  $E_{\text{reg},2} = -600$  mV pro stanovení metodou DCV na m-AgSAE a prostředí methanol – BR pufr o pH 10,0 (1:1) a  $E_{\text{reg},1} = 0$  mV,  $E_{\text{reg},2} = -750$  mV pro stanovení metodou DPV na m-AgSAE. Pro obě metody byla nalezena lineární koncentrační závislost pouze v nejnižším koncentračním řádu  $10^{-7}$  mol·l<sup>-1</sup>. Ve vyšším koncentračním řádu  $10^{-6}$  mol·l<sup>-1</sup> byla pozorována koncentrační závislost polynomická. Tento výsledek ukazuje na pravděpodobnou adsorpci látky na povrchu pracovní elektrody. Dosažené meze stanovitelnosti ( $L_Q$ ) činily  $1 \cdot 10^{-7}$  mol·l<sup>-1</sup> pro metodu DCV na m-AgSAE a  $5 \cdot 10^{-8}$  mol·l<sup>-1</sup> pro metodu DPV na m-AgSAE. Pro srovnání byla proměřena koncentrační závislost 6-NCH v methanolu pomocí UV-VIS spektrofotometrie. Dosažená  $L_Q \sim 1 \cdot 10^{-7}$  mol·l<sup>-1</sup> je srovnatelná s  $L_Q$  dosaženými pomocí technik DCV a DPV.

## Abstract

This Bachelor Thesis is devoted to the study of electrochemical behavior of 6-nitrochrysen (6-NCH) and to the finding of the optimum conditions for its determination using direct current voltammetry (DCV) and differential pulse voltammetry (DPV) at a mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode (m-AgSAE). For measuring the concentration dependences of 6-NCH, the optimum medium methanol – BR buffer pH 9.0 (1:1) and the proper regeneration potentials  $E_{\text{reg},1} = 0$  mV,  $E_{\text{reg},2} = -600$  mV have been chosen for DCV at m-AgSAE and the medium methanol – BR buffer pH 10.0 (1:1) and the proper regeneration potentials  $E_{\text{reg},1} = 0$  mV,  $E_{\text{reg},2} = -750$  mV have been chosen for DPV at m-AgSAE. The concentration dependence was found to be linear only for the lowest concentration range of  $10^{-7}$  mol·l<sup>-1</sup>. In the concentration range of  $10^{-6}$  mol·l<sup>-1</sup>, the concentration dependences observed were polynomial. This result indicates a possible adsorption of 6-NCH on the surface of working electrode. Reached limits of quantification ( $L_Q$ ) were  $1 \cdot 10^{-7}$  mol·l<sup>-1</sup> for DCV at m-AgSAE and  $5 \cdot 10^{-8}$  mol·l<sup>-1</sup> for DPV at m-AgSAE. For comparison, the concentration dependence of 6-NCH was measured in methanol using UV-VIS spectrophotometry. Reached  $L_Q \sim 1 \cdot 10^{-7}$  mol·l<sup>-1</sup> is comparable with  $L_Q$ s reached using DCV and DPV techniques.

**Předmětová hesla:** Analytická chemie  
Elektrochemie  
Nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky  
Voltametrie

**Klíčová slova:** 6-Nitrochrysen  
DC voltametrie  
Diferenční pulzní voltametrie  
Stříbrná pevná amalgámová elektroda  
UV-VIS absorpční spektrofotometrie

---

**Objective Words:** Analytical Chemistry  
Electrochemistry  
Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons  
Voltammetry

**Key Words:** 6-Nitrochrysene  
DC Voltammetry  
Differential Pulse Voltammetry  
Silver Solid Amalgam Electrode  
UV-VIS Absorption Spectrophotometry

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857. Z tohoto výzkumného záměru byla také spolufinancována a dále finančně podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekty LC 06035 a RP 14/63) a projektem SVV 2011-263204.

### **Prohlášení**

Tato bakalářská práce byla vypracována na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2010 – 2011.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele RNDr. Vlastimila Vyskočila, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

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 3.6.2011

.....  
podpis

V úvodu bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné připomínky k mé práci, dále pak Mgr. Alešovi Daňhelovi a ostatním členům Katedry analytické chemie za pomoc a ochotu.

Mé poděkování patří též rodičům, kteří mi umožnili studium na vysoké škole, a mým přátelům za všestrannou podporu.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

$\lambda$	vlnová délka [nm]
$\lambda_{\max}$	vlnová délka absorpčního maxima [nm]
6-ACH	4-aminochrysen
6-NCH	4-nitrochrysen
$A$	absorbance [AU]
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
$c$	molární koncentrace [ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]
CAS	Chemical Abstract Service
DCV	DC voltametrie (voltametrie s lineárním nárůstem potenciálu)
DPV	diferenční pulzní voltametrie
$E$	potenciál [mV]
$E_p$	potenciál píku [mV]
$E_{\text{reg},1}$	počáteční potenciál regenerace [mV]
$E_{\text{reg},2}$	konečný potenciál regenerace [mV]
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
$I$	proud [nA]
$I_p$	proud (výška) píku [nA]
IARC	International Agency for Research on Cancer
$L_Q$	mez stanovitelnosti
m-AgSAE	rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda
$n$	počet měření
$n_n$	pořadové číslo měření
NPAH	nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky
$s_r$	relativní směrodatná odchylka [%]
$s$	směrodatná odchylka
$t$	čas [min]
UV-VIS	ultrafialová-viditelná oblast elektromagnetického záření

## Obsah

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
1.1 Cíl práce .....	8
1.2 Nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky .....	8
1.3 Studovaná látka.....	9
1.4 Použité voltametrické metody .....	10
<b>2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
2.1 Reagencie .....	12
2.2 Aparatura .....	12
2.3 Použitá pracovní elektroda .....	13
2.4 Pracovní postupy .....	14
2.5 Zpracování výsledků a statistické vyhodnocení získaných dat .....	14
2.6 Stálost zásobního roztoku 6-nitrochrysenu .....	15
<b>3. VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ 6-NITROCHRYSENU NA STŘÍBRNÉ PEVNÉ AMALGÁMOVÉ ELEKTRODĚ</b> .....	<b>16</b>
3.1 Optimalizace složení základního elektrolytu .....	16
3.1.1 Spektrofotometrické sledování stálosti měřených roztoků .....	16
3.1.2 Voltametrické sledování stálosti měřených roztoků .....	19
3.2 DC voltametrie 6-nitrochrysenu .....	20
3.2.1 pH závislost .....	20
3.2.2 Koncentrační závislosti .....	23
3.3 Diferenční pulzní voltametrie 6-nitrochrysenu .....	27
3.3.1 pH závislost .....	27
3.3.2 Koncentrační závislosti .....	30
<b>4. UV-VIS SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ 6-NITROCHRYSENU</b>	<b>34</b>
4.1 Koncentrační závislost v methanolu .....	34
<b>5. ZÁVĚR</b> .....	<b>37</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>38</b>

# 1. ÚVOD

## 1.1 Cíl práce

Cílem této práce je prověření možnosti stanovení genotoxického 6-nitrochrysenu pomocí metod DC voltametrie (DCV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV) na rtuťovém meniskem modifikované stříbrné pevné amalgamové elektrodě (m-AgSAE).

Dalším cílem je dosažení co nejnižší meze stanovitelnosti ( $L_Q$ ) a porovnání výsledků získaných pomocí nově vyvinutých voltametrických metod se stanovením 6-nitrochrysenu pomocí UV-VIS absorpční spektrofotometrie.

Tato práce tematicky navazuje na bakalářskou práci Miroslava Šandy, který studoval elektrochemické chování 6-nitrochrysenu pomocí polarografie na klasické kapající rtuťové elektrodě a DPV na visící rtuťové kapkové elektrodě.

## 1.2 Nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky

Skupina nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků (NPAH) obsahuje minimálně 200 různých sloučenin<sup>1</sup>, které vykazují široké spektrum mutagenních, genotoxických a karcinogenních vlastností<sup>2</sup>. Za specifické toxické účinky aromatických nitrosloučenin zřejmě odpovídají reaktivní nitroaromatické anion-radikály, vznikající při redukci nitroskupiny, které snadno reagují s buněčnými nukleofily, zejména proteiny a nukleovými kyselinami<sup>3</sup>. Dinitroisomery NPAH obecně vykazují vyšší mutagenitu než odpovídající mononitroisomery<sup>2</sup>.

Tyto látky se mohou tvořit přímo při spalování paliva v dieslových motorech nebo následnými reakcemi ve výfukovém systému. V úvahu připadají dva možné mechanismy vzniku, buď klasická nitrace polyaromátů kyselinou dusičnou, nebo radikálové reakce  $\text{NO}^\cdot$  a  $\text{NO}_2^\cdot$  s polycyklickými aromáty<sup>2</sup>. Významným zdrojem NPAH jsou také reakce jejich matečných uhlovodíků v atmosféře<sup>4</sup>.

NPAH se vyskytují v životním prostředí ve velmi nízkých koncentracích, některé z nich jsou nestabilní jak při působení slunečního záření, tak při zvýšené nebo dokonce při laboratorní teplotě<sup>4</sup>. NPAH byly prokázány zejména ve výfukových plynech dieslových motorů dále ve spalinách ze stacionárních zdrojů, v sazích, polétavých

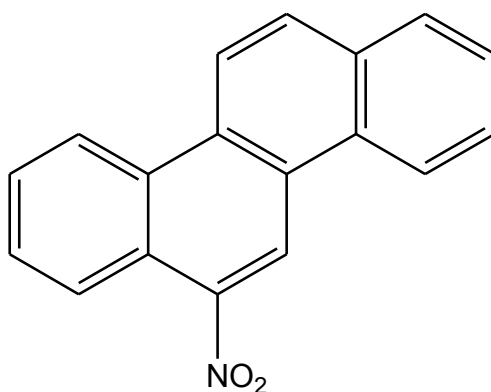


popílcích, sedimentech, tonerech do kopírovacích strojů, cigaretovém kouři, a dokonce v některých potravinách<sup>5</sup>. NPAH byly ve větší míře nalezeny rovněž v emisích vznikajících při spalování černého uhlí či plynu, a to především v domácích topeništích<sup>5</sup>.

### 1.3 Studovaná látka

V čistém stavu, za laboratorních podmínek má 6-nitrochrysen (6-NCH) světle žlutou barvu a jemnou krystalickou strukturu ve tvaru jehliček. Látka je obtížně rozpustná ve vodě i v polárních organických rozpouštědlech. Strukturální vzorec studované látky je na obr. 1.1.

CAS Name:	Chrysene, 6-nitro-
CAS Registry Number:	7496-02-8
Sumární vzorec:	C <sub>18</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>
Bod tání:	209 °C
Bod varu:	505 °C při 760 mm Hg (cit. <sup>6</sup> )
Molekulová hmotnost:	273,3 g·mol <sup>-1</sup>



**Obr 1.1** Strukturální vzorec 6-nitrochrysenu.

Studovaná látka 6-NCH může způsobovat rakovinu či geneticky dědičné nemoci<sup>7</sup>. Je nebezpečné inhalovat jeho výpary a umožnit kontakt s kůží<sup>7</sup>. Při rozkladu 6-NCH se uvolňují nebezpečné výpary oxidů dusíku<sup>8</sup>. 6-NCH má mimořádný potenciál působit jako karcinogen v plicích a játrech u myší<sup>9</sup>.

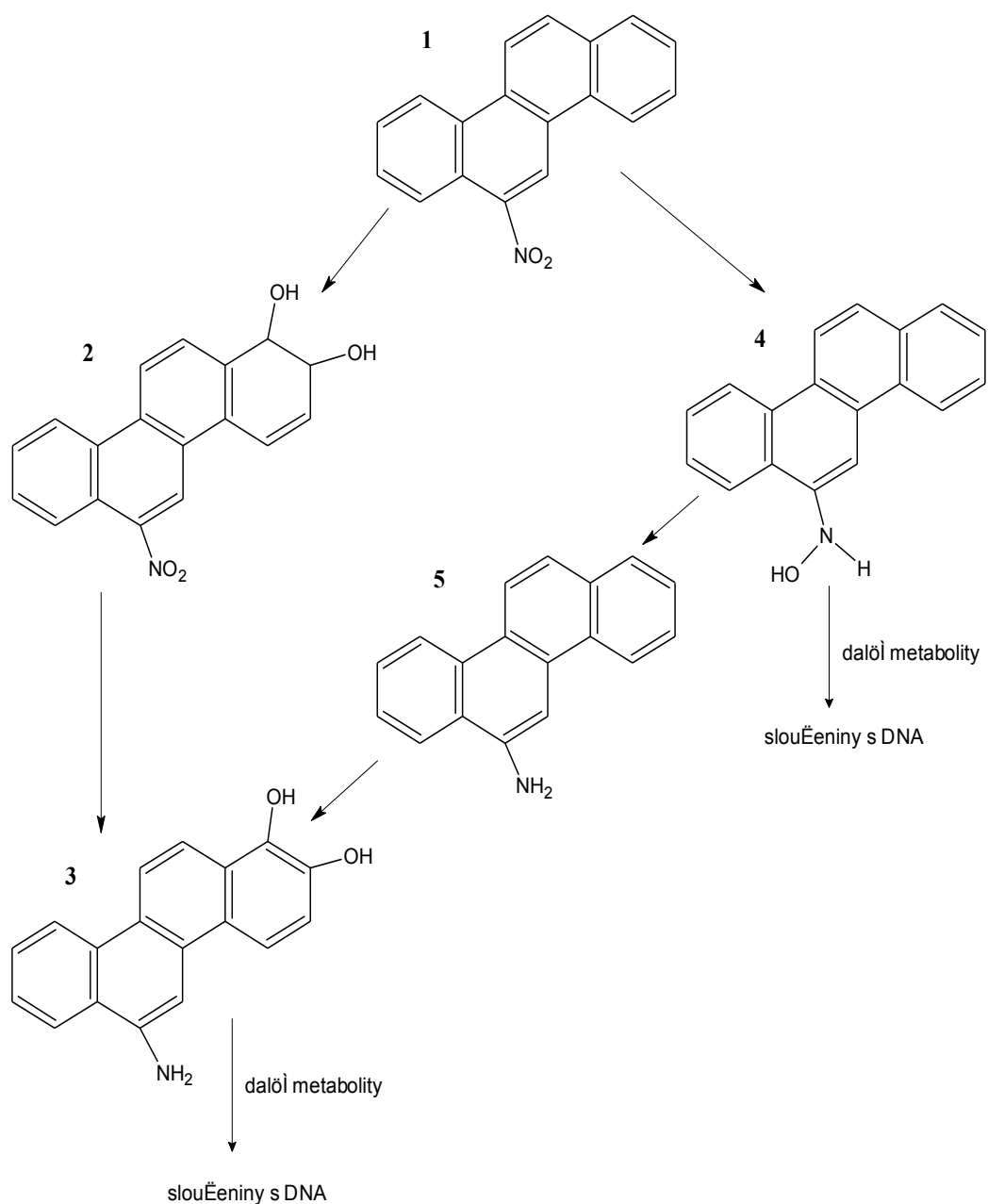
Podle klasifikace Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC) patří 6-NCH do skupiny 2B, v této skupině se vyskytují látky, které jsou podezřelé z karcinogenity pro člověka<sup>10</sup>. V lidských játrech a plicních tkáních se 6-NCH přeměňuje na karcinogenní metabolity reakcemi zprostředkovanými cytochromem P-450 (cit.<sup>11</sup>). Střevní mikroflóra hraje důležitou roli v toxicitě 6-NCH, protože redukce nitroskupiny je kritickým krokem, který vede k navázání látky na DNA<sup>12,13</sup>. Bylo prokázáno, že rakovinné prsní buňky mohou metabolizovat 6-NCH pomocí oxidace aromatického kruhu či redukce nitroskupiny. Některé z těchto metabolitů jsou známy jako karcinogenní formy 6-NCH, které byly nalezeny v tělech laboratorních zvířat<sup>14</sup>.

6-NCH může metabolizovat dvěma základními cestami, které jsou znázorněny na obr. 1.2. Hlavní z nich byla prokázána u myši, kde pomocí oxidace kruhu vzniká *trans*-1,2-dihydro-1,2-dihydroxy-6-aminochrysen, který se dále přeměňuje na 1,2-dihydroxy-3,4-epoxy-1,2,3,4-tetrahydro-6-aminochrysen, který tvoří s DNA deoxyguanosinový adukt<sup>15</sup>. Druhou možností je redukce 6-NCH za vzniku N-hydroxy-6-aminochrysenu, a po další přeměně tvorba deoxyadenosinového aduktu s DNA<sup>15</sup>. N-hydroxy-6-aminochrysen může být též redukován na 6-aminochrysen. Jeho metabolizace dále pokračuje hlavní cestou a vzniká opět *trans*-1,2-dihydro-1,2-dihydroxy-6-aminochrysen.

6-NCH byl stanovován i jinými technikami než polarografickými a voltametrickými, a to zejména pomocí HPLC s UV-VIS<sup>11</sup> nebo radiochemickou detekcí<sup>16</sup>.

#### 1.4 Použité voltametrické metody

Studovaná látka 6-NCH obsahuje redukovatelnou nitroskupinu, a je tudíž snadno stanovitelná polarografickými a voltametrickými metodami. V této práci byly použity metody DC voltametrie (DCV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV). Obecně je rozsah stanovitelných koncentrací elektrochemicky aktivních organických látek udáván v rozmezí koncentrací  $1 \cdot 10^{-5}$  až  $1 \cdot 10^{-2}$  mol $\cdot$ l<sup>-1</sup> pro metodu DCV a v rozmezí koncentrací  $1 \cdot 10^{-8}$  až  $1 \cdot 10^{-2}$  mol $\cdot$ l<sup>-1</sup> pro metodu DPV<sup>17</sup>.



**Obr. 1.2** Základní schéma metabolismu 6-NCH<sup>18</sup>. 6-NCH (1), *trans*-1,2-dihydro-1,2-dihydroxy-6-nitrochrysen (2), *trans*-1,2-dihydro-1,2-dihydroxy-6-aminochrysen (3), N-hydroxy-6-aminochrysen (4) a 6-ACH (5).

## 2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Reagencie

Zásobní roztok 6-NCH o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  byl připraven rozpuštěním 6,67 mg čisté látky (95%, Aldrich Chemical, USA) ve 250 ml methanolu (čistota p.a., Merck, SRN). Aby se látka zcela rozpustila, bylo třeba použít sonifikaci v ultrazvukové lázni po dobu 5 min. Roztoky o nižší molární koncentraci byli připravovány přesným ředěním zásobního roztoku methanolem. Zásobní roztok 6-NCH byl skladován v allobalovém obalu ve tmě za laboratorní teploty.

Dále byly použity tyto chemikálie: hydroxid sodný (čistota p.a., Lach-Ner, Neratovice), kyselina trihydrogenboritá (čistota p.a., Lachema, Brno), kyselina octová (80%, čistota p.a., Lach-Ner, Neratovice), kyselina trihydrogenfosforečná (85%, čistota p.a., Lach-Ner, Neratovice), chlorid draselný (p.a., Lach-Ner, Neratovice) a deionizovaná voda (produkovaná systémem Milli-Q Plus, Millipore, USA).

Zásaditá složka Brittonova-Robinsonova pufru (BR pufru) o koncentraci  $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  byla připravena rozpuštěním 8,0 g NaOH v 1000 ml deionizované vody. Kyselá složka BR pufru o koncentraci  $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  byla připravena rozpuštěním 2,48 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 2,81 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 2,70 ml  $\text{H}_3\text{PO}_4$  v 1000 ml deionizované vody. Kyselá složka BR pufru měla  $\text{pH} = 1,82$  a zásaditá složka BR pufru měla  $\text{pH} = 13,16$ . Pufry o daných hodnotách pH byli připravovány mísením kyselé a zásadité složky BR pufru.

### 2.2 Aparatura

Všechna voltametrická měření byla prováděna na sestavě Eco-Tribo Polarograf se softwarem PolarPro 5.1 (Polaro-Sensors, Praha). Software pracoval v operačním systému Windows XP (Microsoft Corporation, USA).

Jednotlivá měření byla prováděna ve tříelektrodovém zapojení, kde byla jako referentní elektroda použita kalomelová elektroda ( $c(\text{KCl}) = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Jako pomocná elektroda byla použita elektroda platinová (obě Monokrystaly, Turnov). Rychlost nárůstu potenciálu pro DCV i DPV metodu byla  $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ . Při DPV byla šířka pulsu 100 ms a modulační amplituda  $-50 \text{ mV}$ .

Veškerá spektrofotometrická měření byla prováděna na přístroji Agilent 8453

s ovládacím programem UV-Visible ChemStation 9.01, v křemenných kyvetách o měrné délce 1,0 mm a 1,0 cm. Software pracoval v operačním systému Windows 2000 (Microsoft Corporation, USA).

Měření pH byla prováděna na laboratorním pH metru Conductivity & pH Meter 4330 Jenway s kombinovanou skleněnou elektrodou (Jenway, Velká Británie). Přístroj byl kalibrován standardními kalibračními pufrů o pH 4,00 a 7,00 (Radiometer, Dánsko).

### 2.3 Použitá pracovní elektroda

Jako pracovní elektroda byla použita rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda (m-AgSAE). Pro velké přepětí vodíku je tato elektroda vhodná pro měření redukčních procesů. Tato elektroda se snadno připraví ponořením leštěné stříbrné pevné amalgámové elektrody (p-AgSAE) do kapalné rtuť<sup>19</sup>. Lze říci, že amalgámové elektrody dovoluují v mnoha případech nejen nahradit visící rtuťovou kapkovou elektrodu (HMDE), ale vnášejí nové, na čistě rtuťových elektrodách dokonce nedosažitelné, možnosti<sup>20</sup>.

Amalgámové elektrody, stejně jako rtuťové, nemají velké možnosti pro sledování oxidačních procesů kvůli snadnému rozpouštění materiálu elektrody již při nízkých kladných potenciálech<sup>21</sup>.

Povrch pracovní elektrody byl před měřením upravován třemi kroky:

1. Amalgamace: Pro obnovení menisku byla elektroda na 20 s ponořena do kapalné rtuť a pomalu vyndána. Amalgamace byla prováděna jednou za 3 dny či po delším přerušení práce.
2. Elektrochemická aktivace: Elektroda byla vložena do roztoku KCl ( $c = 0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a po dobu 300 s na ní bylo vkládáno napětí  $-2200 \text{ mV}$ . V průběhu aktivace byl roztok míchán a nebyl probubláván dusíkem. Při aktivaci se z elektrody odstraňují oxidy a naadsorbované částice. Aktivace byla prováděna vždy po amalgamaci a na začátku každého měřicího dne.
3. Regenerace: Regenerace byla prováděna vždy před každým voltametrickým měřením. Na elektrodu byly v pulsech o délce 0,1 s střídavě vkládány regenerační potenciály  $E_{\text{reg},1}$  a  $E_{\text{reg},2}$  po dobu 30 s. Pro sledování chování látky při různém pH bylo nezbytné nalézt regenerační potenciály pro každou hodnotu pH zvlášť. Regenerační potenciály nalezené metodou DCV na m-AgSAE pro různé hodnoty pH jsou uvedeny v tab. 3.2.

## 2.4 Pracovní postupy

Při voltametrických měření bylo vždy do 10ml odměrné baňky odpipetováno příslušné množství zásobního roztoku 6-NCH v methanolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a doplněno na 5,0 ml methanolem. Následně byla baňka doplněna po rysku BR pufrem o příslušném pH. Základní elektrolyt byl připravován odpipetováním 5,0 ml methanolu a doplněním BR pufrem po rysku 10ml odměrné baňky.

Připravený roztok byl promíchán a převeden do voltametrické nádoby. Roztok byl probubláván dusíkem (čistota 4.0, Linde, Praha) po dobu 5 min, z důvodu odstranění přítomného kyslíku. Před vstupem dusíku do voltametrické nádoby byla zařazena promývačka naplněna deionizovanou vodou a methanolem v objemovém poměru 1:1. Následně byly zaznamenány voltametrické křivky. Každá křivka byla změřena pětkrát a mezi každým měřením byl roztok krátce probublán dusíkem.

Při spektrofotometrickém stanovování optimálního poměru methanolu a BR pufru byl vzorek připravován stejným způsobem jako pro voltametrická měření. Pro měření koncentračních závislostí pomocí spektrofotometrie byl vzorek připraven zředěním zásobního roztoku 6-NCH ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) methanolem na danou koncentraci. Slepým vzorkem zde byl čistý methanol. Křivky byly měřeny třikrát ve křemenných kyvetách o měrné délce 1,0 cm. Všechna měření byla provedena za laboratorní teploty.

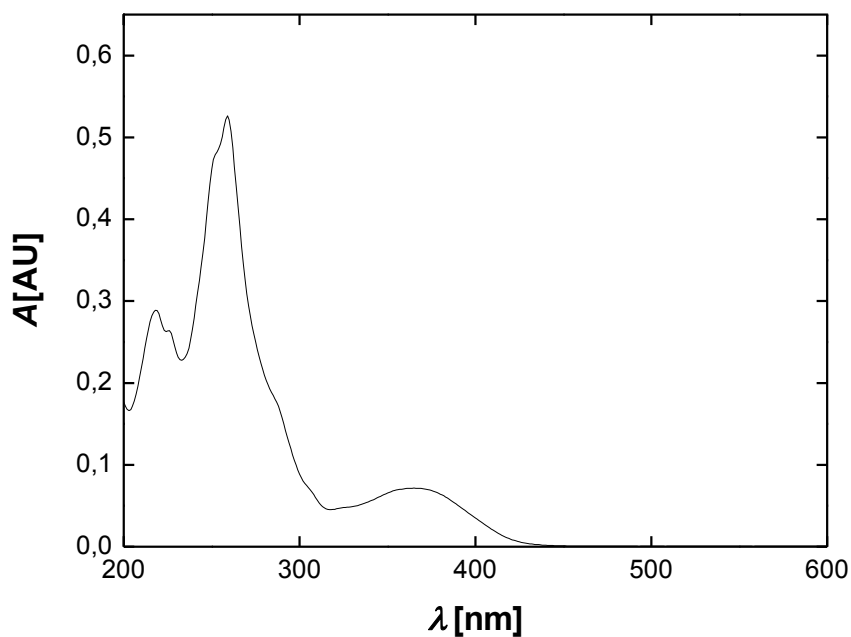
## 2.5 Zpracování výsledků a statistické vyhodnocení získaných dat

Výška píku u DCV i DPV byla měřena od spojnice minim po jeho stranách. K provádění potřebných výpočtů a tvorbě grafů uvedených v této práci byly použity programy OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation, USA) a Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation, USA). Pomocí programu OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation, USA) byly u kalibračních přímek vyhodnoceny a sestrojeny konfidenční pásy (na hladině významnosti 0,05) (cit.<sup>22</sup>).

Mez stanovitelnosti ( $L_Q$ ) byla vypočtena jako koncentrace odpovídající desetinasobku směrodatné odchylky deseti měření 6-NCH o koncentraci odpovídající nejnižšímu bodu příslušné kalibrační přímky<sup>23</sup>.

## 2.6 Stálost zásobního roztoku 6-nitrochrysenu

Bylo zjištěno, že zásobní roztok 6-nitrochrysenu ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) je stálý po dobu nejméně dvou měsíců<sup>24</sup>. Absorpční spektrum studované látky je zobrazeno na obr. 2.1.



**Obr. 2.1** Absorpční spektrum 6-NCH ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) měřené v křemenné kyvetě o měrné délce 1,0 mm proti methanolu.

### 3. VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ 6-NITROCHRYSENU NA STŘÍBRNÉ PEVNÉ AMALGÁMOVÉ ELEKTRODĚ

#### 3.1 Optimalizace složení základního elektrolytu

Studovaná látka 6-NCH má ve vodě velmi nízkou rozpustnost, je tedy nutné provádět měření v methanolicím prostředí. Vzhledem k náročnější práci s organickými rozpouštědly (čistota, toxicita, těkavost) byla snaha obsah methanolu ve vzorku pro voltametrická měření co nejvíce omezit.

##### 3.1.1 Spektrofotometrické sledování stálosti měřených roztoků

Optimalizace poměru methanolu a BR pufru ve vzorku byla provedena následujícím způsobem. Pro poměr methanol – BR pufr 9:1 byl připraven slepý vzorek odpipetováním 9,0 ml methanolu do 10ml odměrné baňky a baňka byla doplněna po rysku kyselou složkou BR pufru. Vzorek byl připraven odpipetováním 8,0 ml methanolu do 10ml odměrné baňky, dále byl přidán 1,0 ml zásobního roztok 6-NCH ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a baňka byla doplněna kyselou složkou BR pufru po rysku. Dále byla proměřena změna absorbance v čase po dobu 15 min. Spektrum bylo měřeno vždy po 1 min. Obdobným postupem byly připraveny a proměřeny i poměry methanolu k BR pufru 8:2, 7:3, 6:4, 5:5 a 4:6. U žádného z těchto poměrů 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 a 5:5 nebyl patrný výrazný pokles absorbance s časem. U poměru 4:6 už došlo k vysrážení látky z vodně-methanolickeho prostředí.

Závislost změny absorbance v čase pro poměr 5:5 byla proměřena ještě v dalších dvou variantách. Kyselá složka byla v prvním případě nahrazena zásaditou složkou BR pufru a ve druhém případě byla nahrazena BR pufrém o pH 7,0. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tab. 3.1. Roztok 6-NCH ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) v prostředí methanol – kyselá složka BR pufru v poměru 5:5 vykazoval při  $\lambda_{\text{max}}$  absorbanci o hodnotě  $(0,576 \pm 0,017)$  AU,  $s_r = 0,59 \%$  ( $n = 15$ ). V prostředí methanol – zásaditá složka BR pufru v poměru 5:5 vykazoval 6-NCH absorbanci o hodnotě  $(0,534 \pm 0,003)$  AU,  $s_r = 0,12 \%$  ( $n = 15$ ). V prostředí methanol – BR pufr o pH 7,0 byla naměřena hodnota absorbance  $(0,583 \pm 0,004)$  AU,  $s_r = 0,16 \%$  ( $n = 15$ ).

Jelikož ani v jednom případě nedošlo s časem ke statisticky významnému poklesu



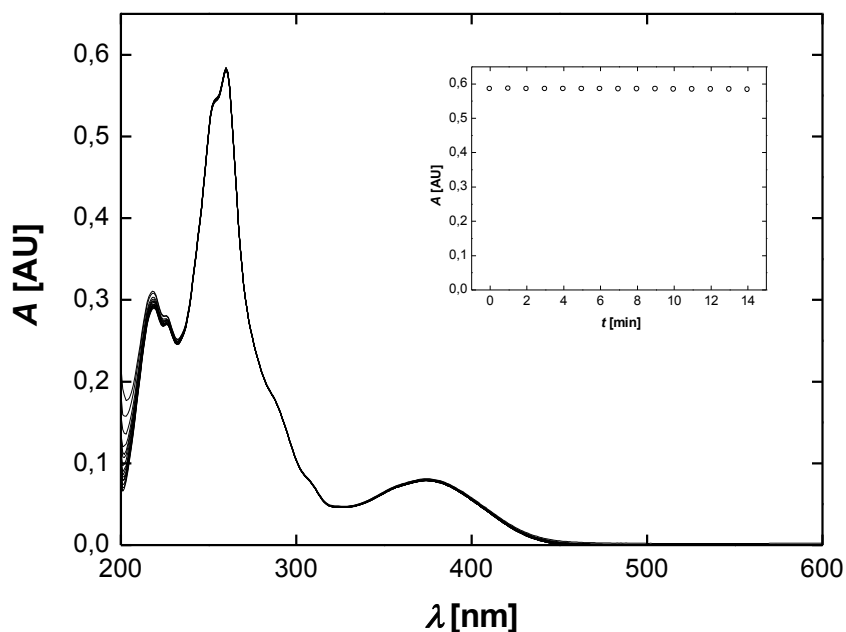
absorbance, bylo za optimální prostředí považováno prostředí s nejnižším obsahem methanolu, tedy 5:5 (dále již 1:1).

**Tab. 3.1**

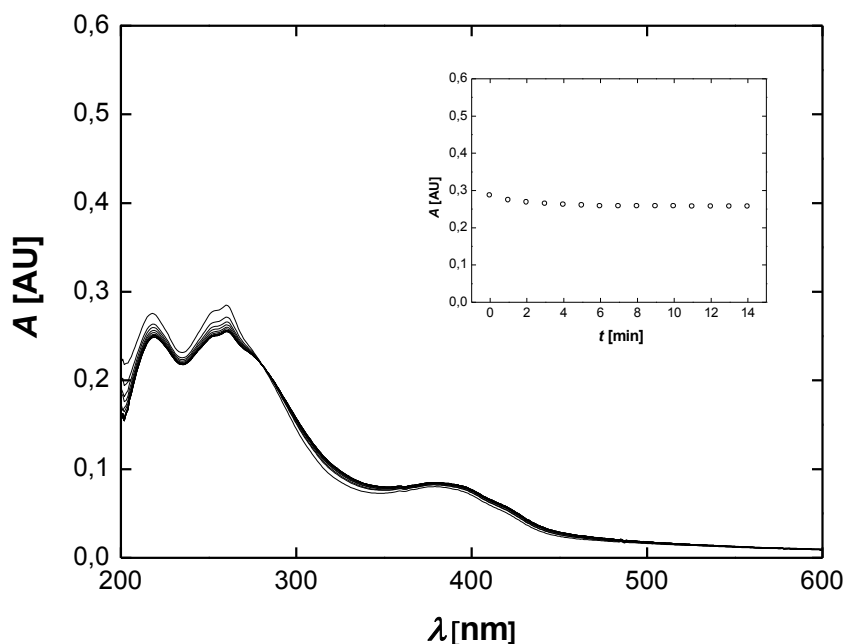
Závislost absorbance roztoku 6-NCH ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) na čase při vlnové délce 260 nm.  $A_1$  měřena v prostředí methanol – kyselá složka BR pufr (1:1).  $A_2$  měřena v prostředí methanol – zásaditá složka BR pufr (1:1).  $A_3$  měřena v prostředí methanol – BR pufr o pH 7,0 (1:1). Měřeno v křemenné kyvetě o měrné délce 1,0 cm proti methanolu.

$t$ [min]	$A_1$ [AU]	$A_2$ [AU]	$A_3$ [AU]
0	0,569	0,533	0,583
1	0,581	0,533	0,584
2	0,578	0,534	0,584
3	0,578	0,534	0,584
4	0,580	0,534	0,584
5	0,580	0,534	0,583
6	0,576	0,534	0,583
7	0,579	0,534	0,583
8	0,579	0,534	0,583
9	0,574	0,534	0,582
10	0,574	0,534	0,582
11	0,574	0,533	0,582
12	0,574	0,533	0,582
13	0,574	0,533	0,582
14	0,573	0,532	0,581

Následující grafy ukazují absorpční spektra studované látky v prostředí methanol – BR pufr o pH 7,0 v poměru 1:1 (obr. 3.1) a 4:6 (obr. 3.2).



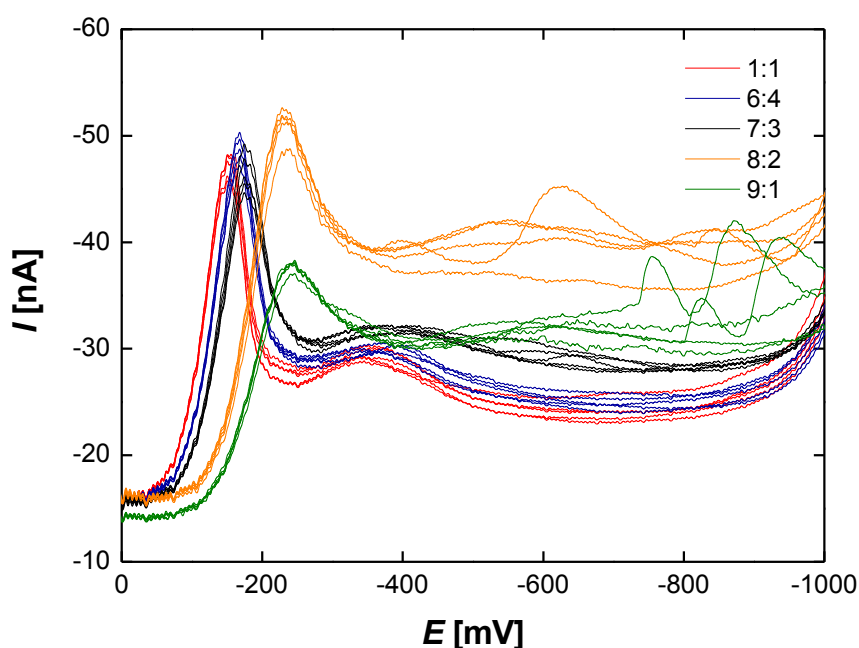
**Obr. 3.1** Absorpční spektra 6-NCH ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) měřena v intervalech 1 min po dobu 15 min v prostředí methanol – BR pufr o pH 7,0 (1:1). Vložena závislost absorbance při vlnové délce 260 nm na čase.



**Obr. 3.2** Absorpční spektra 6-NCH ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) měřena v intervalech 1 min po dobu 15 min v prostředí methanol – BR pufr o pH 7,0 (4:6). Vložena závislost absorbance při vlnové délce 260 nm na čase.

### 3.1.2 Voltametrické sledování stálosti měřených roztoků

Z důvodu ověření spektrofotometricky zjištěného optimálního poměru methanolu k BR pufru bylo provedeno voltametrické měření pro 5 různých poměrů a to 1:1, 6:4, 7:3, 8:2 a 9:1. Měření bylo provedeno metodou DCV a jako vodná složka byla použita kyselá složka BR pufru o pH 1,82. Na pracovní elektrodu byly vkládány regenerační potenciály  $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$  a  $E_{\text{reg},2} = -1100 \text{ mV}$ . Získané výsledky ukazují voltamogramy na obr. 3.3.



**Obr. 3.3** Voltamogramy 6-NCH ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) měřené metodou DCV na m-AgSAE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$  a  $E_{\text{reg},2} = -1100 \text{ mV}$ ) pro různé poměry methanol – kyselá složka BR pufru.

Při měření vykazoval nejvyšší signál roztok o složení v poměru 8:2, ale signál byl nestabilní při negativnějších potenciálech. Jelikož naměřené hodnoty pro poměry 1:1, 6:4 a 7:3 vykazovaly srovnatelné výsledky, byl pro následující voltametrická měření zvolen poměr s nejnižším obsahem methanolu (1:1).

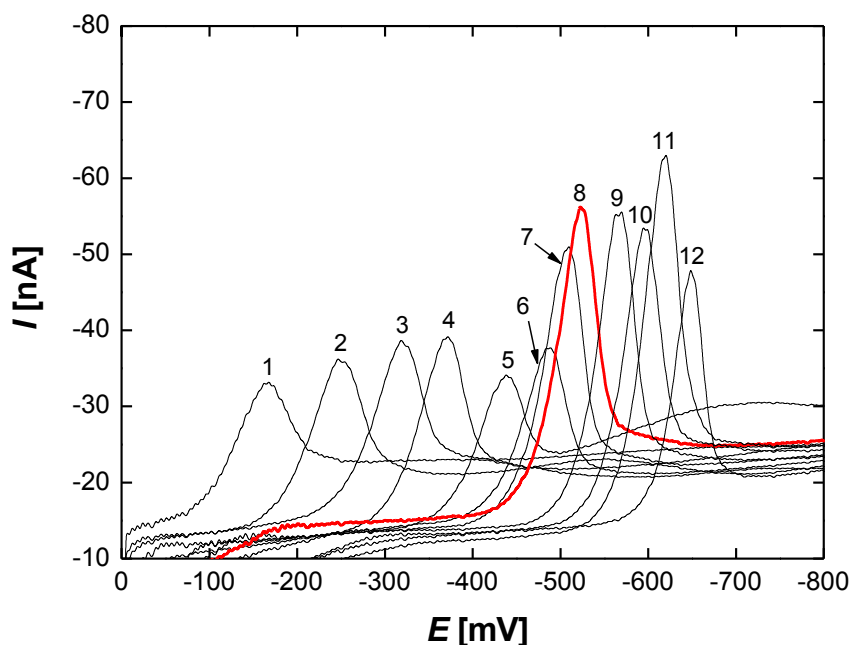
## 3.2 DC voltametrie 6-nitrochrysenu

### 3.2.1 Vliv pH

Bylo sledováno voltametrické chování 6-NCH metodou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH v rozmezí 2,0 až 13,0 a poměru methanolu k BR pufru 1:1. Látka v celé oblasti pH poskytuje jeden dobře vyvinutý pík, jehož potenciál se s vyšším pH posouvá k negativnějším potenciálům. Voltamogramy 6-NCH ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) při různém  $\text{pH}^*$  jsou zobrazeny na obr. 3.4. Hodnota  $\text{pH}^*$  odpovídá pH roztoku vzniklého smísením methanolu a BR pufru o daném pH v poměru 1:1.

Vkládané regenerační potenciály byly zjištěny experimentálně a jsou uvedeny v tab. 3.2. Naměřené hodnoty  $I_p$  6-NCH a  $E_p$  6-NCH v závislosti na  $\text{pH}^*$  jsou uvedeny v tab. 3.3. Grafická závislost  $E_p$  6-NCH na  $\text{pH}^*$  je pak znázorněna na obr. 3.5. Metodou lineární regrese byl pro závislost potenciálu píku  $E_p$  6-NCH na  $\text{pH}^*$  roztoku v rozmezí hodnot 2,8 až 13,1 vypočten vztah (1):

$$E_p [\text{mV}] = -45,7 \cdot \text{pH}^* - 83,8 \quad (\text{korelační koeficient} = -0,9881) \quad (1)$$



**Obr. 3.4** Voltamogramy 6-NCH ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) měřené metodou DCV na m-AgSAE s regenerací (viz tab. 3.2) v prostředí methanol – BR pufr (1:1) o  $\text{pH}^*$  2,8 (1); 3,9 (2); 5,0 (3); 5,9 (4); 7,0 (5); 8,1 (6); 8,8 (7); 9,4 (8); 10,5 (9); 11,4 (10); 12,1 (11) a 13,0 (12). Zvolené optimální prostředí reprezentuje červená křivka.

**Tab. 3.2**

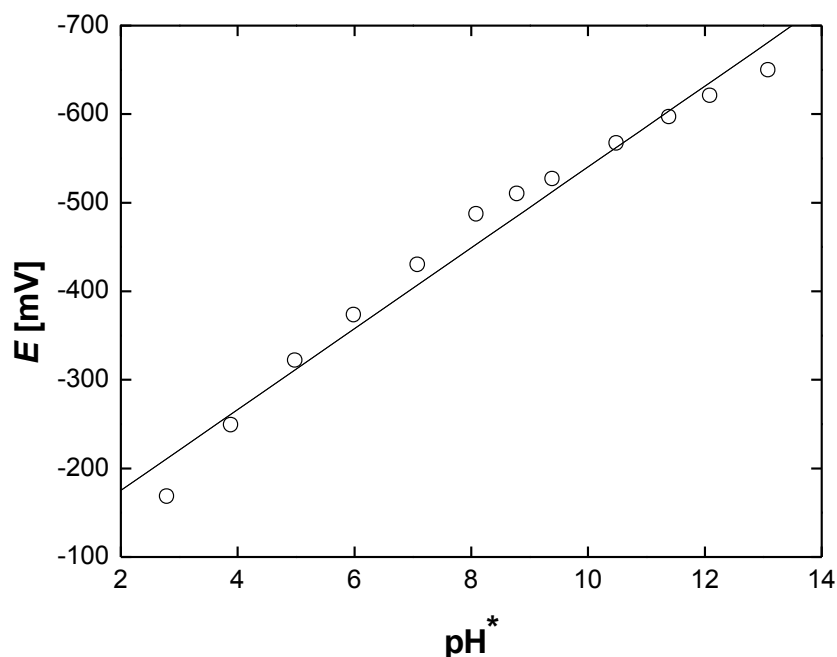
Experimentálně zjištěné regenerační potenciály metodou DCV na m-AgSAE pro různé hodnoty pH BR pufru.  $\text{pH}^*$  odpovídá pH roztoku vzniklého smísením methanolu a BR pufru o daném pH v poměru 1:1.

pH	$\text{pH}^*$	$E_{\text{reg},1}$ [mV]	$E_{\text{reg},2}$ [mV]
2,0	2,8	0	-1150
3,0	3,9	0	-1250
4,0	5,0	0	-1300
5,0	5,9	0	-1400
6,0	7,0	0	-1500
7,0	8,1	0	-1550
8,0	8,8	0	-1650
9,0	9,4	0	-1700
10,0	10,5	0	-1750
11,0	11,4	-200	-1750
12,0	12,1	-200	-1800
13,1	13,0	-200	-1800

**Tab. 3.3**

Závislost proudu píku  $I_p$  a potenciálu píku  $E_p$  6-NCH na  $\text{pH}^*$  měřená metodou DCV na m-AgSAE s regenerací (viz tab. 3.2) v prostředí methanol – BR pufr (1:1).

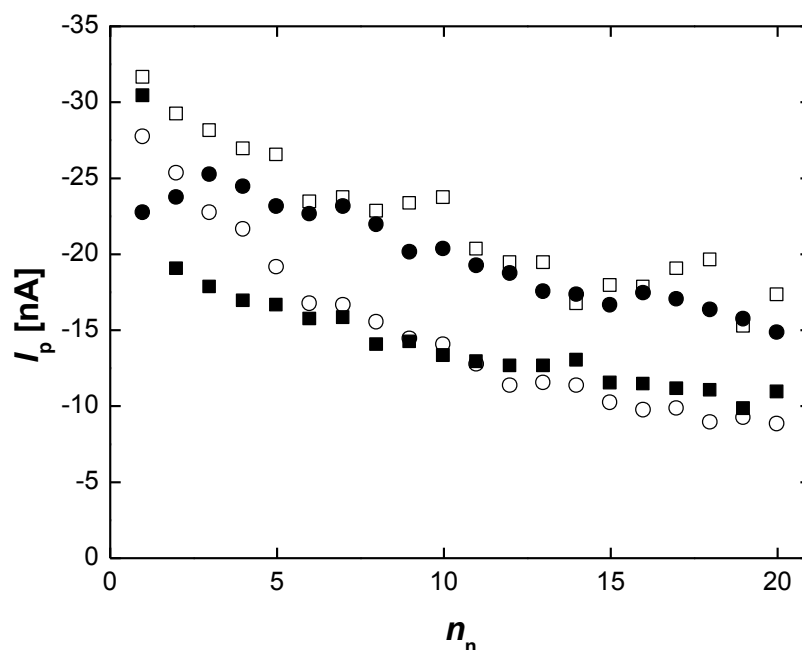
$\text{pH}^*$	$I_p$ [nA]	$E_p$ [mV]
2,8	-13,2	-167
3,9	-15,1	-248
5,0	-21,7	-321
5,9	-23,1	-372
7,0	-11,8	-429
8,1	-20,3	-486
8,8	-35,3	-509
9,4	-39,4	-526
10,5	-40,9	-566
11,4	-38,0	-596
12,1	-48,4	-620
13,0	-31,7	-649



**Obr. 3.5** Závislost potenciálu píku  $E_p$  6-NCH na  $\text{pH}^*$  měřená metodou DCV na m-AgSAE s regenerací (viz tab. 3.2) v prostředí methanol – BR pufr (1:1).

Hodnoty  $I_p$  naměřené hodnoty při  $\text{pH}^*$  9,4 nebyly nejvyšší, ale vykazovaly největší stabilitu signálu s počtem měření. Jako optimální pro následující měření koncentračních závislostí metodou DCV na m-AgSAE bylo tedy zvoleno prostředí s použitým BR pufrům o  $\text{pH}$  9,0.

Dále byly hledány optimální regenerační potenciály  $E_{\text{reg},1}$  a  $E_{\text{reg},2}$  takovým způsobem, že byla měřena opakovatelnost pro různě zvolené hodnoty těchto regeneračních potenciálů. Pro hodnoty regeneračních potenciálů  $E_{\text{reg},1}$  a  $E_{\text{reg},2}$ , které jsou uvedeny v tab. 3.2, byla určena  $s_r$  výšky píku jako 20,7 % ( $n = 20$ ). Pro měření bez regenerace byla vypočtena  $s_r$  výšky píku 33,6 % ( $n = 20$ ). Pro další zvolené hodnoty byla  $s_r$  výšky píku určena 16,1 % ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\\text{reg},2} = -600 \text{ mV}$ ) a 42,0 % ( $E_{\text{reg},1} = -350 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -1700 \text{ mV}$ ) (vše  $n = 20$ ). U všech měření výška píku  $I_p$  výrazně klesala s časem, tudíž byly jako optimální regenerační potenciály vybrány  $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -600 \text{ mV}$  s nejnižší  $s_r$  výšky píku. Výška píků  $I_p$  6-NCH ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) v závislosti na pořadovém čísle měření ( $n_n$ ) je znázorněna na obr. 3.6.

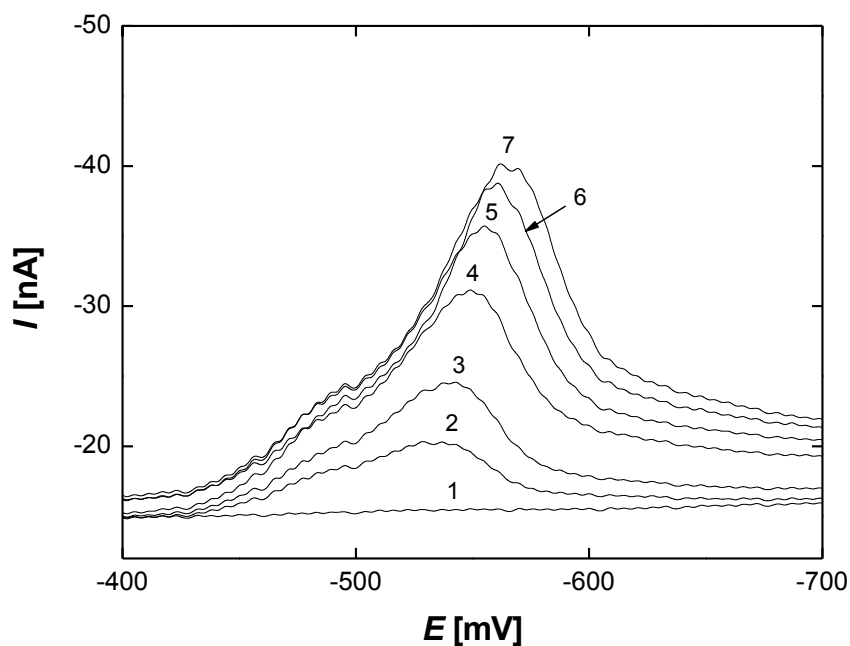


**Obr. 3.6** Závislost výšky píků  $I_p$  6-NCH ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) na pořadovém čísle měření  $n_n$ . Měřeno metodou DCV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr o pH 9 (1:1). Legenda: (□) měřeno s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -1700 \text{ mV}$ ), (●) měřeno s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -600 \text{ mV}$ ), (○) měřeno s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = -350 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -1700 \text{ mV}$ ), (■) měřeno bez regenerace.

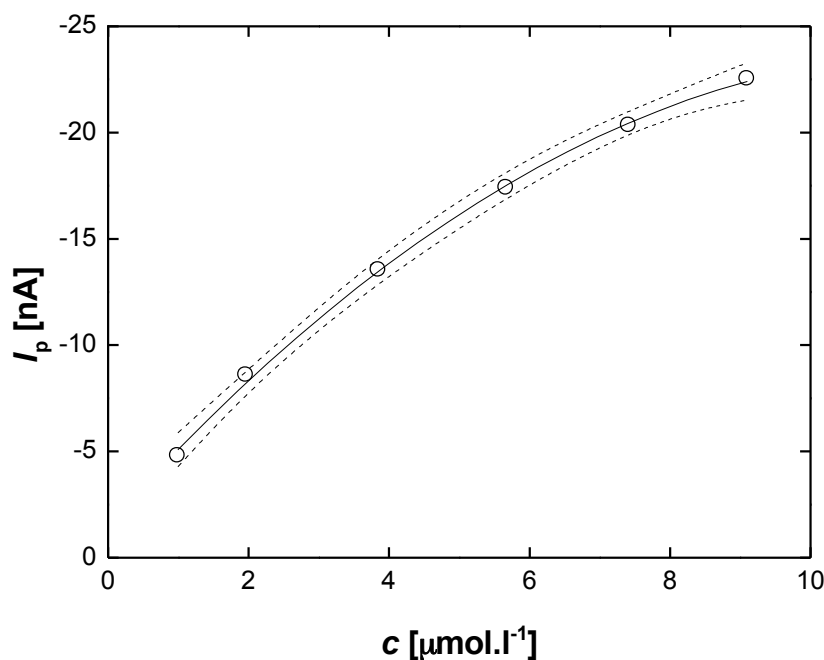
Lze shrnout, že optimální podmínky pro stanovení 6-NCH metodou DCV m-AgSAE jsou: prostředí o poměru methanol – BR pufr o pH 9,0 (1:1) a regenerační potenciály vkládané na m-AgSAE ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -600 \text{ mV}$ ).

### 3.2.2 Koncentrační závislosti

Závislosti proudu píků  $I_p$  na koncentraci byly proměřeny metodou DCV na m-AgSAE s vloženými regeneračními potenciály ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -600 \text{ mV}$ ) v prostředí methanol – BR pufr o pH 9,0 (1:1). Proměřeny byly koncentrační závislosti v rozmezí  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (obr. 3.7) a  $(1-10) \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (obr. 3.9).

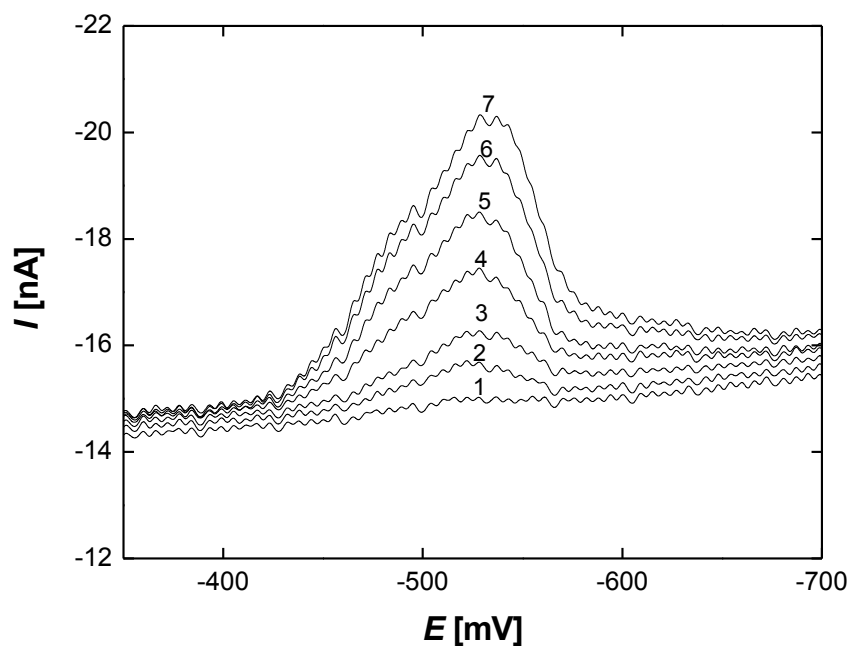


**Obr. 3.7** Voltamogramy 6-NCH měřené metodou DCV na m-AgSAE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -600 \text{ mV}$ ) v prostředí methanol – BR pufr o pH 9,0 (1:1) v rozmezí koncentrací  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .  $c(6\text{-NCH})$ : 0 (1);  $1 \cdot 10^{-6}$  (2);  $2 \cdot 10^{-6}$  (3);  $4 \cdot 10^{-6}$  (4);  $6 \cdot 10^{-6}$  (5);  $8 \cdot 10^{-6}$  (6) a  $10 \cdot 10^{-6}$  (7)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

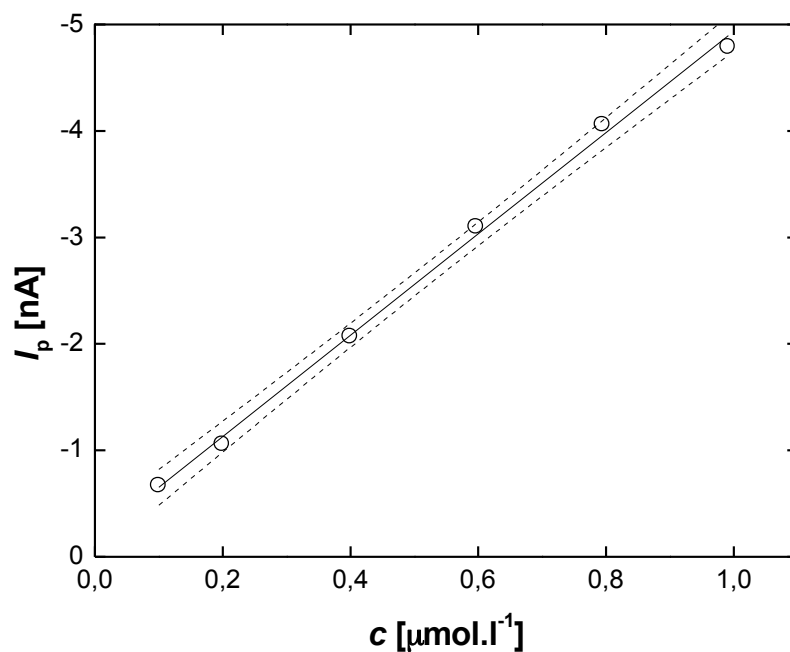


**Obr. 3.8** Závislost proudu píků  $I_p$  6-NCH na koncentraci 6-NCH v koncentračním rozmezí  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Měřená metodou DCV na m-AgSAE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -600 \text{ mV}$ ) v prostředí methanol – BR pufr o pH 9,0 (1:1). Konfidenční pásy sestrojeny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .





**Obr. 3.9** Voltamogramy 6-NCH měřené metodou DCV na m-AgSAE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -600 \text{ mV}$ ) v prostředí methanol – BR pufr o pH 9,0 (1:1) v rozmezí koncentrací  $(1-10) \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .  $c(6\text{-NCH})$ : 0 (1);  $1 \cdot 10^{-7}$  (2);  $2 \cdot 10^{-7}$  (3);  $4 \cdot 10^{-7}$  (4);  $6 \cdot 10^{-7}$  (5);  $8 \cdot 10^{-7}$  (6) a  $10 \cdot 10^{-7}$  (7)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .



**Obr. 3.10** Závislost proudu píků  $I_p$  6-NCH na koncentraci 6-NCH v koncentračním rozmezí  $(1-10) \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Měřená metodou DCV na m-AgSAE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -600 \text{ mV}$ ) v prostředí methanol – BR pufr o pH 9,0 (1:1). Konfidenční pásy sestrojeny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

Závislost výšky píků  $I_p$  6-NCH na koncentraci má pro koncentrační rozmezí  $(1-10) \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  lineární charakter (obr. 3.10). Pro koncentrační rozmezí  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (obr. 3.9) je kalibrační závislost polynomičká vyjádřená vztahem (2):

$$I_p [\text{nA}] = 1,52 \cdot 10^{11} \cdot c^2 - 3,67 \cdot 10^6 \cdot c - 1,58 \quad (\text{korel. koef.} = -0,9990) \quad (2)$$

Zakřivení koncentrační závislosti při vyšších měřených koncentracích 6-NCH je s největší pravděpodobností způsobeno zvýšenou adsorpcí analytu na povrch pracovní elektrody nebo faktem, že látka může při vyšších koncentracích tvořit agregáty podobné dimerům či oligomerům. Výzkumu těchto skutečností, např. užitím technik cyklické voltametrie nebo elektrochemické impedanční spektroskopie, bude třeba věnovat více pozornosti. Tento výzkum je plánován jako jedna ze součástí navazující diplomové práce.

Parametry kalibračních přímek pro stanovení 6-NCH v prostředí methanol – BR pufr o pH 9,0 (1:1) jsou uvedeny v tab. 3.4.

**Tab. 3.4**

Parametry kalibračních křivek pro stanovení 6-NCH metodou DCV na m-AgSAE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -600 \text{ mV}$ ) v prostředí methanol – BR pufr o pH 9,0 (1:1).

Koncentrace [mol·l <sup>-1</sup> ]	Směrnice [mA·l·mol <sup>-1</sup> ]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	$L_Q$ [mol·l <sup>-1</sup> ]
$(1-10) \cdot 10^{-6}$	— <sup>a</sup>	$-1,58 \pm 0,40$	-0,9990	—
$(1-10) \cdot 10^{-7}$	$-4,76 \pm 0,12$	$-0,18 \pm 0,07$	-0,9985	$1 \cdot 10^{-7}$

<sup>a</sup> – lineární směrnice pro polynomičkou závislost vyjádřenou vztahem (2) není definována

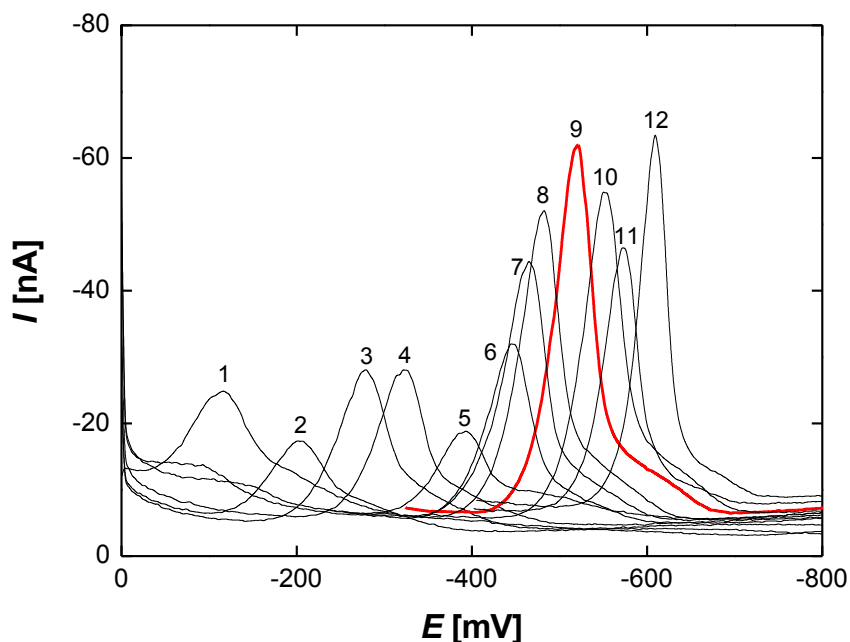
### 3.3 Diferenční pulzní voltametrie 6-nitrochrysenu

#### 3.3.1 Vliv pH

Voltametrické chování 6-NCH bylo studováno metodou DPV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr o pH v rozmezí 2,0 až 13,0 (1:1). Látka v celé oblasti pH poskytuje jeden dobře vyvinutý voltametrický pík, jehož potenciál se s vyšším pH posouvá k negativnějším potenciálům. Voltamogramy 6-NCH ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) při různém pH\* jsou zobrazeny na obr. 3.11.

Vkládané regenerační potenciály byly zjištěny experimentálně a jsou uvedeny v tab. 3.2. Naměřené hodnoty  $I_p$  6-NCH a  $E_p$  6-NCH v závislosti na pH\* jsou uvedeny v tab. 3.5. Grafická závislost  $E_p$  6-NCH na pH\* je znázorněna na obr. 3.12. Metodou lineární regrese byl pro závislost potenciálu píku  $E_p$  6-NCH na pH\* roztoku v rozmezí 2,8 až 13,1 vypočten vztah (3):

$$E_p [\text{mV}] = -45,9 \cdot \text{pH}^* - 36,2 \quad (\text{korelační koeficient} = -0,9879) \quad (3)$$

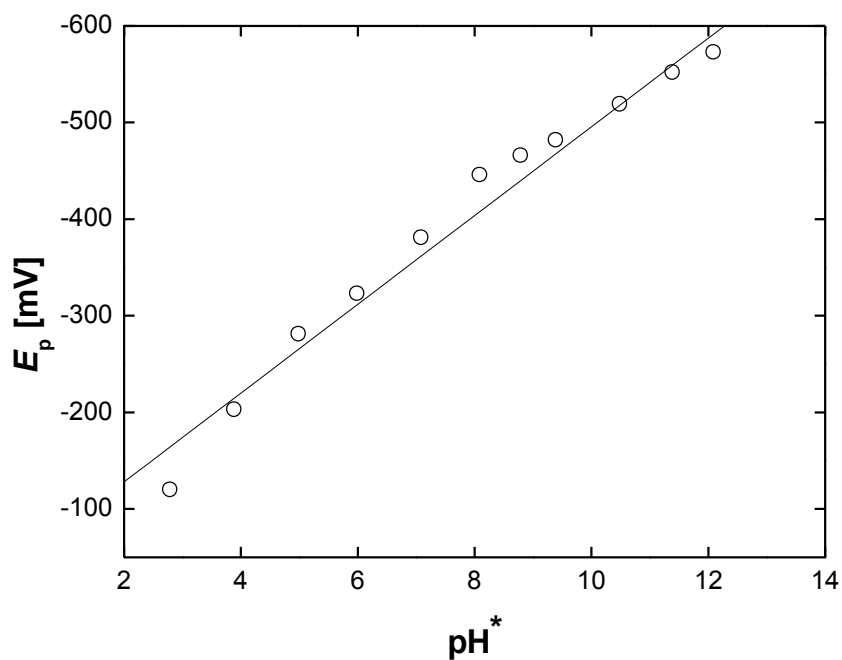


**Obr. 3.11** Voltamogramy 6-NCH ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) měřené metodou DPV na m-AgSAE s regenerací (viz tab. 3.2) v prostředí methanol – BR pufr (1:1) o pH\* 2,8 (1); 3,9 (2); 5,0 (3); 5,9 (4); 7,0 (5); 8,1 (6); 8,8 (7); 9,4 (8); 10,5 (9); 11,4 (10); 12,1 (11) a 13,0 (12). Zvolené optimální prostředí reprezentuje červená křivka.

**Tab. 3.5**

Závislost proudu píku  $I_p$  a potenciálu píku  $E_p$  6-NCH na  $\text{pH}^*$  měřená metodou DPV na m-AgSAE s regenerací (viz tab. 3.2) v prostředí methanol – BR pufr (1:1).

$\text{pH}^*$	$I_p$ [nA]	$E_p$ [mV]
2,8	-13,2	-119
3,9	-15,1	-202
5,0	-21,7	-280
5,9	-23,1	-322
7,0	-11,8	-380
8,1	-20,3	-445
8,8	-35,3	-465
9,4	-39,4	-481
10,5	-40,9	-518
11,4	-38,0	-551
12,1	-48,4	-572
13,0	-31,7	-610

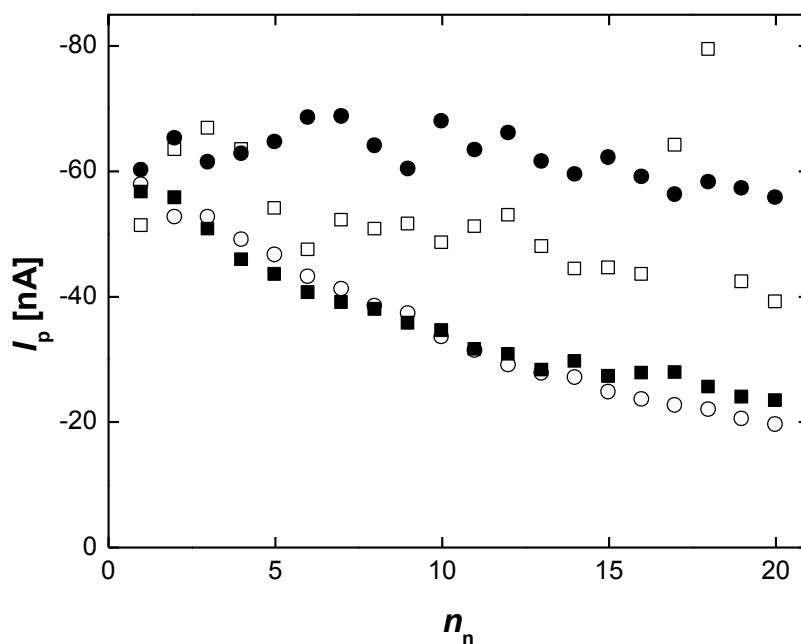


**Obr. 3.12** Závislost potenciálu píku  $E_p$  6-NCH na  $\text{pH}^*$  měřená metodou DPV na m-AgSAE s regenerací (viz tab. 3.2) v prostředí methanol – BR pufr (1:1).

Naměřené hodnoty  $I_p$  při  $\text{pH}^* 10,5$  byly jedny z nejvyšších a vykazovaly největší stabilitu signálu. Jako optimální pro následující měření koncentračních závislostí metodou DPV bylo tedy zvoleno prostředí s použitým BR pufrům o  $\text{pH} 10,0$ .

Dále byly hledány optimální regenerační potenciály  $E_{\text{reg},1}$  a  $E_{\text{reg},2}$  stejným způsobem jako u metody DCV (viz kap. 3.2.1). Pro hodnoty regeneračních potenciálů  $E_{\text{reg},1}$  a  $E_{\text{reg},2}$ , které jsou uvedeny v tab. 3.2, byla určena  $s_r$  výšky píku jako 19,4 % ( $n = 20$ ). Pro měření bez regenerace byla vypočtena  $s_r$  výšky píku 31,1 % ( $n = 20$ ). Pro další zvolené hodnoty byla  $s_r$  výšky píku určena 6,4 % ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -750 \text{ mV}$ ) a 37,3 % ( $E_{\text{reg},1} = -350 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -1750 \text{ mV}$ ) (vše pro  $n = 20$ ). Pro nejlepší opakovatelnost byly jako optimální regenerační potenciály vybrány  $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -750 \text{ mV}$ .

Výška píků  $I_p$  6-NCH ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) v závislosti na pořadovém čísle měření je znázorněna na obr. 3.13.

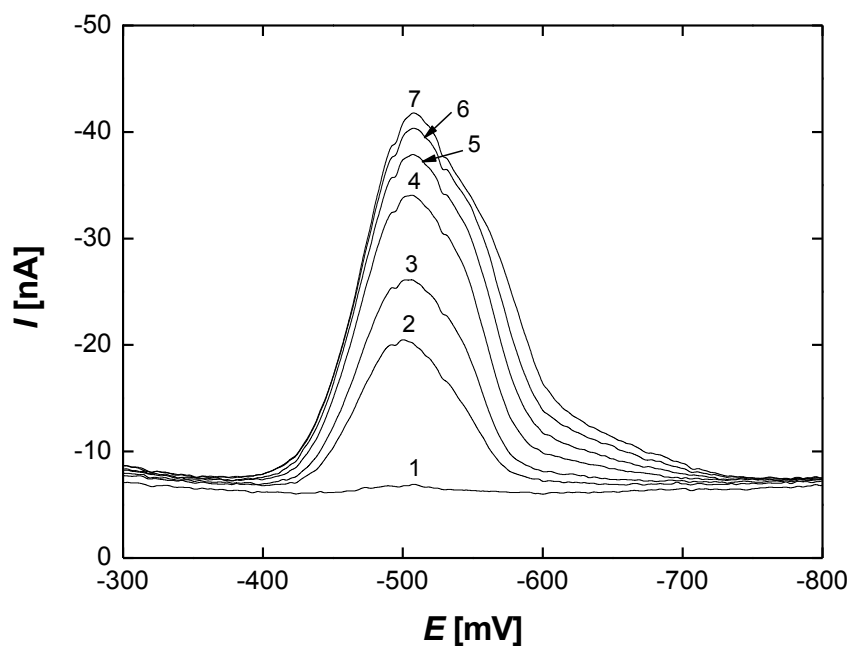


**Obr. 3.13** Závislost výšky píků  $I_p$  6-NCH ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) na pořadovém čísle měření  $n_n$ . Měřeno metodou DPV na m-AgSAE v prostředí methanol – BR pufr o  $\text{pH} 10,0$  (1:1). Legenda: (□) měřeno s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -1750 \text{ mV}$ ), (●) měřeno s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -750 \text{ mV}$ ), (○) měřeno s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = -350 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -1750 \text{ mV}$ ), (■) měřeno bez regenerace.

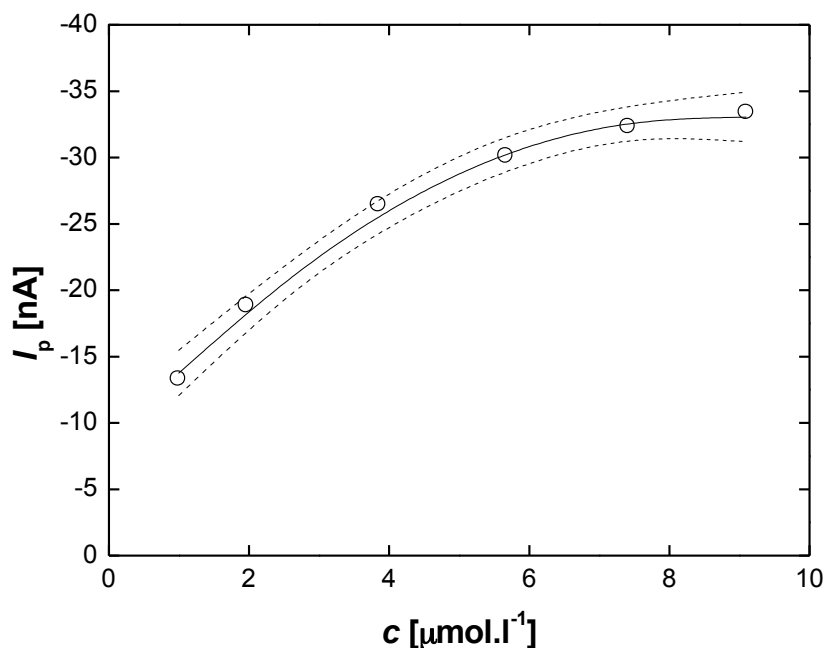
Optimální podmínky pro stanovení 6-NCH metodou DPV na m-AgSAE tedy jsou: prostředí methanol – BR pufr o pH 10,0 (1:1) a regenerační potenciály vkládané na ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -750 \text{ mV}$ ).

### 3.3.2 Koncentrační závislosti

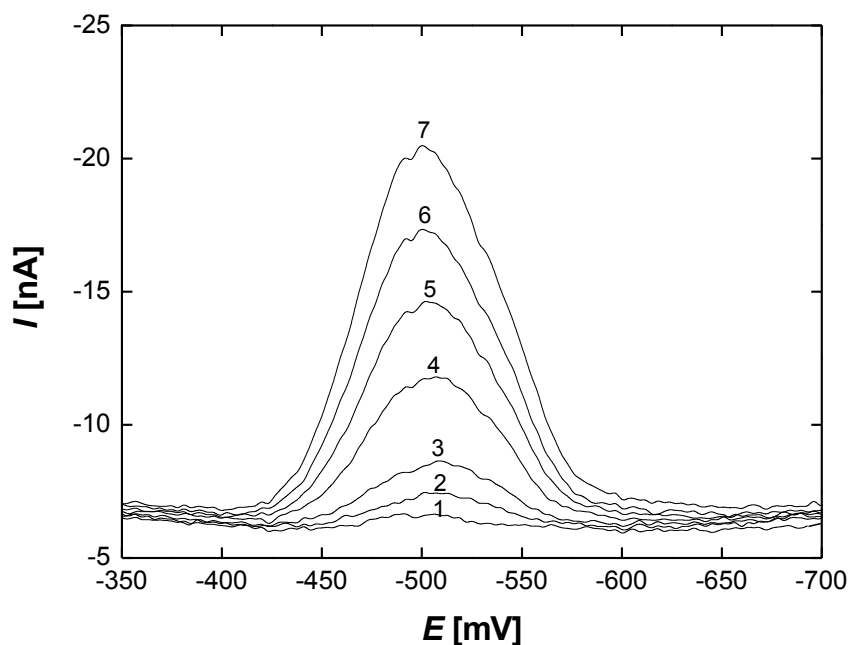
Závislosti proudu píků  $I_p$  na koncentraci byly proměřeny metodou DPV na m-AgSAE s vloženými regeneračními potenciály ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -750 \text{ mV}$ ) v prostředí methanol – BR pufr o pH 10,0 (1:1). Byly proměřeny koncentrační závislosti v rozmezí  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (obr. 3.14) a  $(1-10) \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (obr. 3.16).



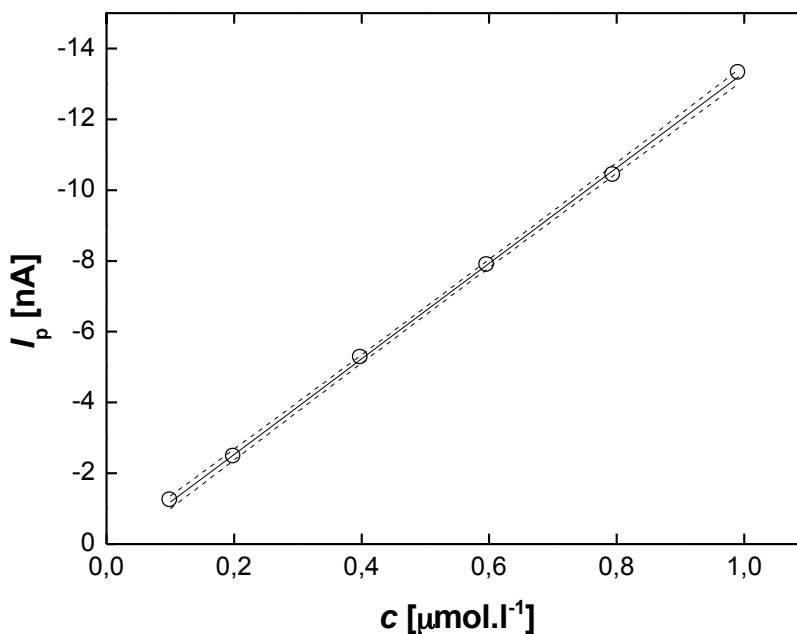
**Obr. 3.14** Voltamogramy 6-NCH měřené metodou DPV na m-AgSAE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -750 \text{ mV}$ ) v prostředí methanol – BR pufr o pH 10,0 (1:1) v rozmezí koncentrací  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .  $c(6\text{-NCH})$ : 0 (1);  $1 \cdot 10^{-6}$  (2);  $2 \cdot 10^{-6}$  (3);  $4 \cdot 10^{-6}$  (4);  $6 \cdot 10^{-6}$  (5);  $8 \cdot 10^{-6}$  (6) a  $10 \cdot 10^{-6}$  (7)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .



**Obr. 3.15** Závislost proudu píků  $I_p$  6-NCH na koncentraci 6-NCH v koncentračním rozmezí  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ . Měřená metodou DPV na m-AgSAE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -750 \text{ mV}$ ) v prostředí methanol – BR pufr o pH 10,0 (1:1). Konfidenční pásy sestrojeny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .



**Obr. 3.16** Voltamogramy 6-NCH měřené metodou DPV na m-AgSAE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -750 \text{ mV}$ ) v prostředí methanol – BR pufr o pH 10,0 (1:1) v rozmezí koncentrací  $(1-10) \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ .  $c(6\text{-NCH})$ : 0 (1);  $1 \cdot 10^{-7}$  (2);  $2 \cdot 10^{-7}$  (3);  $4 \cdot 10^{-7}$  (4);  $6 \cdot 10^{-7}$  (5);  $8 \cdot 10^{-7}$  (6) a  $10 \cdot 10^{-7}$  (7)  $\text{mol.l}^{-1}$ .



**Obr. 3.17** Závislost proudu píků  $I_p$  6-NCH na koncentraci 6-NCH v koncentračním rozmezí  $(1-10)\cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Měřená metodou DPV na m-AgSAE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -750 \text{ mV}$ ) v prostředí methanol – BR pufr o pH 10,0 (1:1). Konfidenční pásy sestrojeny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

Závislost výšky píků  $I_p$  6-NCH na koncentraci má pro koncentrační rozmezí  $(1-10)\cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (obr. 3.17) lineární charakter. Pro koncentrační rozmezí  $(1-10)\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (obr. 3.15) je kalibrační závislost opět polynomičká jako v případě DCV na m-AgSAE (viz kap. 3.2.2) a je vyjádřena vztahem (4):

$$I_p [\text{nA}] = 3,51 \cdot 10^{11} \cdot c^2 - 5,93 \cdot 10^6 \cdot c - 8,22 \quad (\text{korel. koef.} = -0,9968) \quad (4)$$

Parametry kalibračních přímek pro stanovení 6-NCH v prostředí methanol – BR pufr o pH 10,0 (1:1) jsou uvedeny v tab. 3.6. Vypočítaná hodnota  $L_Q$  se nachází v oblasti koncentrací o řád nižších, než byly koncentrace 6-NCH měřené pro nejnižší koncentrační rozmezí. Následným měřením však bylo prokázáno, že voltametričká odezva 6-NCH je i při koncentraci  $5 \cdot 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  ještě vyhodnotitelná. Získaná hodnota  $L_Q$  tak dává tušit, že technika DPV na m-AgSAE je pro stanovení 6-NCH vhodnější, což potvrzuje i fakt, že hodnota směrnice kalibrační závislosti, tedy citlivost vyvinuté metody, při použití techniky DPV je téměř třikrát vyšší než v případě techniky DCV.



**Tab. 3.6**

Parametry kalibračních křivek pro stanovení 6-NCH metodou DPV na m-AgSAE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -750 \text{ mV}$ ) v prostředí methanol – BR pufr o pH 10,0 (1:1).

Koncentrace [mol·l <sup>-1</sup> ]	Směrnice [mA·l·mol <sup>-1</sup> ]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	$L_Q$ [mol·l <sup>-1</sup> ]
$(1-10) \cdot 10^{-6}$	— <sup>a</sup>	$-8,22 \pm 0,84$	-0,9968	—
$(1-10) \cdot 10^{-7}$	$-13,5 \pm 0,1$	$0,17 \pm 0,08$	-0,9998	$5 \cdot 10^{-8}$

<sup>a</sup> – lineární směrnice pro polynomicickou závislost vyjádřenou vztahem (4) není definována

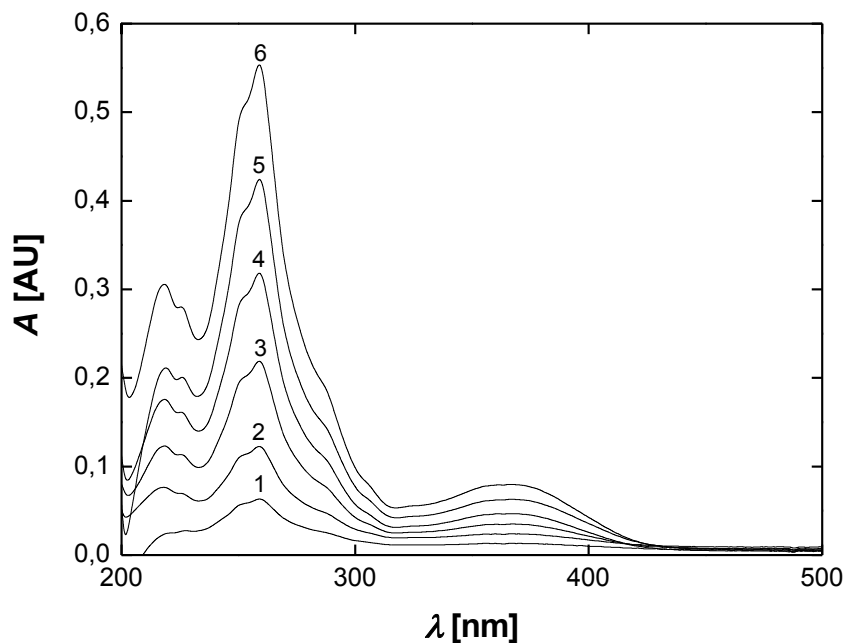
## 4. UV-VIS SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ 6-NITROCHRYSENU

Bylo provedeno spektrofotometrické stanovení 6-NCH v UV-VIS oblasti z důvodu porovnání dosažitelných mezí stanovitelnosti voltametrickým stanovením 6-NCH na m-AgSAE.

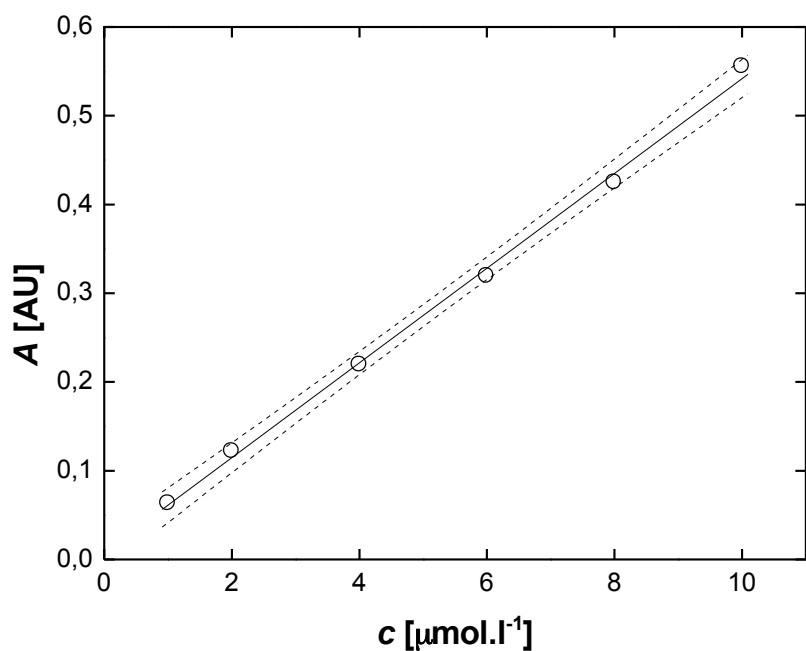
### 4.1 Koncentrační závislost v methanolu

Byla sledována závislost absorbance na koncentraci 6-NCH v methanolu. Studovaná látka v methanolu poskytuje v oblasti 200 až 1000 nm jeden dobře vyvinutý pík při vlnové délce maxima  $\lambda_{\max}$  259 nm.

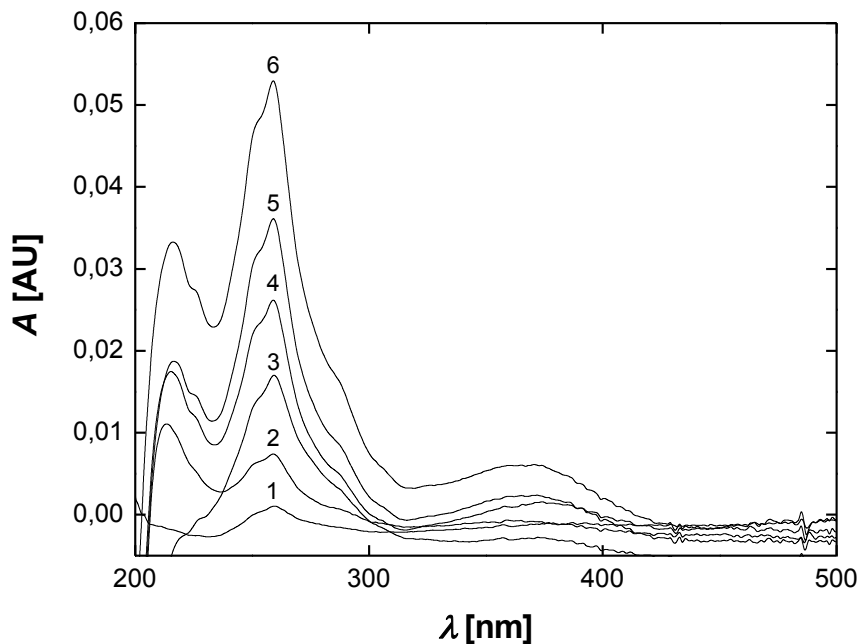
Bylo proměřeno koncentrační rozmezí  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (obr. 4.1) a  $(1-10) \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (obr. 4.3) v křemenné kyvetě o měrné délce 1,0 cm proti methanolu. Parametry kalibračních křivek (obr. 4.2 a obr. 4.4) jsou uvedeny v tab. 4.1.



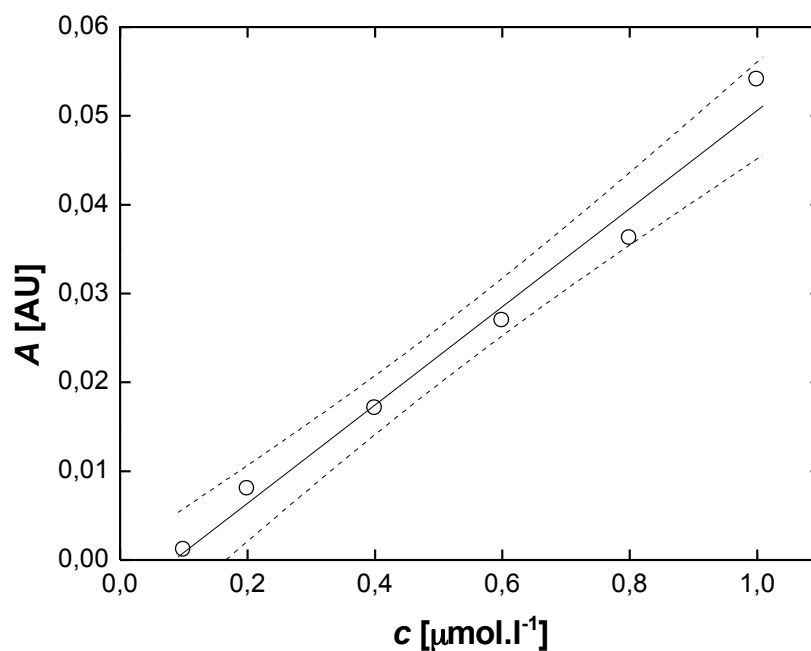
**Obr. 4.1** Absorpční spektrum 6-NCH v methanolu měřené v křemenné kyvetě o měrné délce 1,0 cm proti methanolu v rozmezí koncentrací  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .  $c(6\text{-NCH})$ :  $1 \cdot 10^{-6}$  (1);  $2 \cdot 10^{-6}$  (2);  $4 \cdot 10^{-6}$  (3);  $6 \cdot 10^{-6}$  (4);  $8 \cdot 10^{-6}$  (5) a  $10 \cdot 10^{-6}$  (6)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .



**Obr. 4.2** Závislost absorbance při  $\lambda_{\text{max}} = 259 \text{ nm}$  na koncentraci 6-NCH v methanolu v koncentračním rozmezí  $(1-10)\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  v křemenné kyvetě o měrné délce 1,0 cm proti methanolu. Konfidenční pásy sestrojeny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .



**Obr. 4.3** Absorpční spektrum 6-NCH v methanolu měřené v křemenné kyvetě o měrné délce 1,0 cm proti methanolu v rozmezí koncentrací  $(1-10)\cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .  $c(6\text{-NCH})$ :  $1\cdot 10^{-7}$  (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)  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .



**Obr. 4.4** Závislost absorbance při  $\lambda_{\max} = 259$  nm na koncentraci 6-NCH v methanolu v koncentračním rozmezí  $(1-10) \cdot 10^{-7}$  mol $\cdot$ l $^{-1}$  v křemenné kyvetě o měrné délce 1,0 cm proti methanolu. Konfidenční pásy sestrojeny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

**Tab. 4.1**

Parametry kalibračních křivek pro spektrofotometrické stanovení 6-NCH v methanolu v křemenné kyvetě o měrné délce 1,0 cm proti methanolu.

Koncentrace [mol $\cdot$ l $^{-1}$ ]	Směrnice [kAU $\cdot$ l $\cdot$ mol $^{-1}$ ]	Úsek [mAU]	Korelační koeficient	$L_Q$ [mol $\cdot$ l $^{-1}$ ]
$(1-10) \cdot 10^{-6}$	$53,4 \pm 1,3$	$7,73 \pm 8,11$	0,9984	—
$(1-10) \cdot 10^{-7}$	$55,3 \pm 3,3$	$4,67 \pm 2,06$	0,9907	$1 \cdot 10^{-7}$

## 5. ZÁVĚR

Při vývoji metody voltametrického stanovení 6-NCH pomocí technik DCV a DPV na m-AgSAE bylo zjištěno, že látka poskytuje v prostředí methanol – BR pufr (1:1) jeden dobře vyvinutý voltametrický pík v celém studovaném rozmezí hodnot pH. Optimální podmínky pro voltametrická stanovení 6-NCH byly zvoleny následovně: prostředí methanol – BR pufr o pH 9,0 (1:1) a regenerační potenciály  $E_{\text{reg},1} = 0$  mV,  $E_{\text{reg},2} = -600$  mV (pro techniku DCV na m-AgSAE) a prostředí methanol – BR pufr o pH 10,0 (1:1) a regenerační potenciály  $E_{\text{reg},1} = 0$  mV,  $E_{\text{reg},2} = -750$  mV (pro techniku DPV na m-AgSAE). Za těchto podmínek byly proměřeny koncentrační závislosti 6-NCH v rozmezí  $1 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-5}$  mol·l<sup>-1</sup> a vypočítány hodnoty  $L_Q$ .

Za účelem srovnání stanovení 6-NCH pomocí voltametrických metod bylo provedeno stanovení 6-NCH pomocí UV-VIS spektrofotometrie. Byla proměřena koncentrační závislost 6-NCH v rozmezí  $1 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-5}$  mol·l<sup>-1</sup> v methanolu.

Dosažené  $L_Q$  všech vyvinutých metod stanovení 6-NCH jsou shrnuty v tab. 5.1. Z uvedených výsledků vyplývá, že UV-VIS spektrofotometrii lze využít jako alternativní způsob stanovení 6-NCH, jelikož  $L_Q$  dosažená pomocí této metody je srovnatelná s dosaženými  $L_Q$  pomocí metod voltametrických na m-AgSAE. Metoda DPV na m-AgSAE vykazuje pro stanovení 6-NCH vyšší citlivost, než metoda DCV na m-AgSAE. Tomuto faktu odpovídá i  $L_Q$  v oblasti koncentrací o jeden řád nižších než nejnižší měřená koncentrace 6-NCH.

**Tab. 5.1**

Porovnání mezí stanovitelnosti nově vyvinutých metod stanovení 6-NCH.

Metoda	Koncentrační rozmezí [mol·l <sup>-1</sup> ]	Prostředí	$L_Q$ [mol·l <sup>-1</sup> ]
DCV na m-AgSAE	$1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-5}$	methanol – BR pufr pH 9,0 (1:1)	$1 \cdot 10^{-7}$
DPV na m-AgSAE	$1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-5}$	methanol – BR pufr pH 10,0 (1:1)	$5 \cdot 10^{-8}$
UV-VIS při 259 nm	$1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-5}$	methanol	$1 \cdot 10^{-7}$

## 6. LITERATURA

1. Möler, L.: In Vivo Metabolism and Genotoxic Effects of Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environmental Health Perspectives* **102**, 139-146 (1994).
2. Barek, J.; Bencko, V.; Cvačka, J.; Šuta, M.: Znečištění životního prostředí automobilovými emisemi. *Chemické Listy* **92**, 794-798 (1998).
3. Varghese, A. J.; Withmore, G. T.: Binding of Nitroreduction Products of Misonidazole to Nucleic-Acids and Protein. *Cancer Clinical Trials* **3**, 43-46 (1980).
4. Sekyra, M.; Leníček, J.; Bednářková, K.; Beneš, I.: GC-MS stanovení nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků v ovzduší. *Chemické Listy* **94**, 924-930 (2000).
5. Kocourek, V.; Hajšlová, J.: *Nitrované polycyklické uhlovodíky (nitroPAH): Environmentální karcinogeny*. Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí, Praha 2004.
6. *6-Nitrochrysen*, URL: <http://www.chemnet.com/cas/cz/7496-02-8/6-nitrochrysen.html>, staženo 21.4.2011.
7. *6-Nitrochrysen (Safety Data Sheet)*, URL: <http://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>, staženo 21.4.2011.
8. *6-Nitrochrysen*, URL: <http://www.cameochemicals.noaa.gov/chemical/20768>, staženo 17.4.2011.
9. Wislocki, P. G.; Bagan, E. S.; Lu, A. Y. H.; Dooley, K. L.; Fu, P. P.; Hanhsu, H.; Beland, F. A.; Kadlubar, F. F.: Tumorigenicity of Nitrated Derivatives of Pyrene, Benz[a]anthracene, Chrysen and Benzo[a]pyrene in the Newborn Mouse Assay. *Carcinogenesis* **7**, 1317-1322 (1986).
10. *6-Nitrochrysen (IARC Monographs)*, URL: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsGroupOrder.pdf>, staženo 21.4.2011.
11. Pothuluri, J. V.; Sutherland, J. B.; Freeman, J. P., Cerniglia, C. E.: Fungal Biotransformation of 6-Nitrochrysen. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 3106-3109 (1998).
12. Delclos, K. B.; Cerniglia, C. E.; Dooley, K. L.; Campbell, W. L.; Franklin, W.; Walker, R. P.: The Role of Intestinal Microflora in the Metabolic Activation of 6-Nitrochrysen to DNA-Binding Derivatives in Mice. *Toxicology* **60**, 137-150 (1990).

13. Manning, B. W.; Campbell, W. L.; Franklin, W.; Delclos, K. B.; Cerniglia, C. E.: Metabolism of 6-Nitrochrysene by Intestinal Microflora. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 197-203 (1988).
14. Boyiri, T.; Leszczynska, J.; Desai, D.; Amin, S.; Nixon, D. W.; El-Bayoumy, K.: Metabolism and DNA Binding of the Environmental Pollutant 6-Nitrochrysene in Primary Culture of Human Breast Cells and in Cultured MCF-10A, MCF-7 and MDA-MB-435s Cell Lines. *International Journal of Cancer* **100**, 395-400 (2002).
15. Li, E. E.; Heflich, R. H.; Bucci, T. J.; Manjanatha, M. G.; Blaydes, B. S.; Delolos, K. B.: Relationships of DNA Adduct Formation, K-ras Activating Mutations and Tumorigenic Activities of 6-Nitrochrysene and Its Metabolites in the Lungs of CD-1 mice. *Carcinogenesis* **15**, 1377-1385 (1994).
16. Chae, Y. H.; Delclos, K. B.; Blaydes, B.; El-Bayoumy, K.: Metabolism and DNA Binding of the Environmental Colon Carcinogen 6-Nitrochrysene in Rats. *Cancer Research* **56**, 2052-2058 (1996).
17. Vyskočil, V.; Barek, J.: Mercury Electrodes – Possibilities and Limitations in Environmental Electroanalysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **39**, 173-188 (2009).
18. Delclos, K. B.; Talaska, G.; Walker, R.; v knize: *Nitroarenes* (Howard, P. C.; ed.), Metabolic Activation of 6-Nitrochrysene and 6-Aminochrysene In Vitro and In Vivo, str. 295-307. Elsevier, New York 1990.
19. Vyskočil, V.; Daňhel, A.; Fischer, J.; Novotný, V.; Deýlová, D.; Musilová-Karaová, J.; Maixnerová, L.; Pecková, K.; Barek, J.: Krása a užitečnost nových elektrodových materiálů. *Chemické Listy* **104**, 1181-1195 (2010).
20. Yosypchuk, B.; Barek, J.: Vlastnosti pevných a pastových amalgámových pracovních elektrod. *Chemické Listy* **103**, 284-290 (2009).
21. Yosypchuk, B.; Novotný L.: Nontoxic Electrodes of Solid Amalgams. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **32**, 141-151 (2002).
22. Matthias, O.: *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*, 2. vydání, str. 194. Wiley-VCH, Weinheim 2007.
23. Harvey, D.: *Modern Analytical Chemistry*, str. 96. McGraw-Hill, Toronto 2000.
24. Šanda, M.: *Bakalářská práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2000.