

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie

VOLTAMERICKÉ STANOVENÍ 1-NITROPYRENU
NA STŘÍBRNÉ TUHÉ AMALGÁMOVÉ ELEKTRODĚ

Bakalářská práce
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MŠMT ČR (projekt MSM0021620857 a projekt LC 06035).

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitelky RNDr. Karoliny Peckové, Ph.D. a konzultanta Mgr. Vlastimila Vyskočila, a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

Jsem si vědom 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 16. května 2008.

.....

podpis

Úvodem bych chtěl poděkovat své školitelce RNDr. Karolině Peckové, Ph.D. a konzultantu Mgr. Vlastimilu Vyskočilovi za odborné vedení. Dále bych chtěl poděkovat prof. RNDr. Jiřímu Barkovi, CSc. a všem členům Katedry analytické chemie PŘF UK za všestrannou pomoc a cenné připomínky k mé práci.

Předmětová hesla:

analytická chemie

elektrochemie

nitrované polyaromatické uhlovodíky

Klíčová slova:

1-nitropyren

DC voltametrie

diferenční pulsní voltametrie

cyklická voltametrie

rtuťovým meniskem modifikovaná tuhá amalgamová elektroda

vysokoučinná kapalinová chromatografie

Obsah

1. Úvod	7
1.1. Cíl práce	7
1.2. Vlastnosti zkoumané látky	7
1.3. Metody stanovení 1-nitropyrenu	9
2. Experimentální část	10
2.1. Reagencie.....	10
2.2. Aparatura	10
2.3. Použitá pracovní elektroda	11
2.4. Pracovní postupy	14
2.5. Stálost zásobního roztoku 1-nitropyrenu.....	15
3.0 Voltametrické stanovení 1-nitropyrenu na stříbrné tuhé amalgámové elektrodě	16
2.6. DC voltametrie 1-nitropyrenu	16
2.6.1. Vliv pH	16
2.6.2. Koncentrační závislosti	18
2.7. Diferenční pulsní voltametrie 1-nitropyrenu	21
2.7.1. Vliv pH	21
2.7.2. Koncentrační závislost.....	23
2.8. Cyklická voltametrie 1-nitropyrenu	26
3. Experiment s HPLC dělením studované látky ve směsi s nejčasteji se vyskytujícími doprovodnými polutanty v životním prostředí	30
3.1. Aparatura	30
3.2. Reagencie.....	30
3.3. Pracovní postup.....	30
4. Použitá literatura	32

Seznam použitých zkratk

1-NP	1-nitropyren
BR pufr	Britton- <u>uv</u> -Robinsonův pufr
CAS	chemical abstract services
CASRN	chemical abstract services registration number
CV	cyklická voltametrie
DPV	diferenční pulsní voltametrie
DCV	DC voltametrie
E_{in}	počáteční napětí potenciálového pulsu při regeneraci elektrodového povrchu
E_{fin}	konečné napětí potenciálového pulsu při regeneraci elektrodového povrchu
E_p	potenciál píku
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
I_p	proud píku
m-AgSAE	rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgamová elektroda
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektroskopie
NPAU	nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
P_a	anodický pík
P_c	katodický pík
pH_f	směsné pH pufru po smíchání pufru a organické fáze v daném poměru
RSD	relativní směrodatná odchylka
UV	ultrafialová spektroskopie

1. Úvod

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) se vlivem znečištění životního prostředí, následkem průmyslových výrob a produkce spalin z tepelných elektráren a spalovacích motorů rozšířily téměř do všech oblastí světa. Byla prokázána spojitost mezi profesionální expozicí¹ a vznikem nádorových onemocnění. PAU jsou mutagenní až po předchozí metabolické aktivaci, nitrované polyaromatické uhlovodíky (NPAU) jsou mutagenní přímo. Mechanismus vzniku aktivních metabolitů byl podrobně studován^{2,3}.

1.1. Cíl práce

Cílem této práce je nalézt optimální podmínky pro stanovení stopových množství 1-nitropyrenu (1-NP) ve směsném prostředí methanolu (MeOH) a vody (objemový poměr 7:3) s využitím rtuťovým meniskem modifikované stříbrné tuhé amalgámové elektrody (m-AgSAE). Vzhledem k obavám z toxicity rtuti a jejích výparů⁴ představuje m-AgSAE vhodnou náhradu za rtuťové elektrody – stříbrná amalgáma je netoxická a její elektrochemické vlastnosti se téměř neliší od rtuti. Pro stanovení 1-NP bylo použito techniky DC voltametrie na m-AgSAE a diferenční pulsní voltametrie na m-AgSAE. Pro charakterizaci elektrodových dějů probíhajících při elektrochemických přeměnách 1-NP na m-AgSAE byla použita cyklická voltametrie na m-AgSAE.

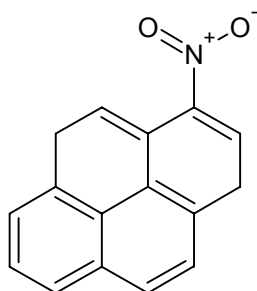
1.2. Vlastnosti zkoumané látky

Název CAS: 1-NITROPYRENE

CASRN: 5522-43-0

Sumární vzorec: C₁₆H₉N-O₂ (C₁₆H₉NO₂)

Strukturní vzorec:



1-NP tvoří žluté jehlovité krystalky. Jeho molární hmotnost je 247,26 g.mol⁻¹. Bod tání je 155°C. Polarita 1-NP, to jest poměr koncentrací oktanol/voda, je logK_{ow} = 5,06. Rozpouští se v ethanolu, benzenu, methanolu, dobře rozpustný je v dimethyleteru. Rozpustnost ve vodě je 0,0118 mg.l⁻¹ při 25°C. Při zahřívání 1-NP se uvolňují toxické páry oxidů dusíku. Vzhledem ke kontaktní toxicitě⁵ se doporučuje při manipulaci používat rukavice a masku s respirátorem.

1-NP je jedním z nejrozšířenějších NPAU (NPAU jsou všeobecně rozšířené polutanty životního prostředí. Vyskytují se ve vzduchu, adsorbují na prachové částice¹, částečně podléhají fotolýze). Ve vodě se 1-NP adsorbuje na suspendované pevné částice a sedimentuje, nepodléhá hydrolyze. V půdě se adsorbuje na částice jílu a téměř nemigruje. Bakteriální redukce nitroskupiny na aminoskupinu probíhá za aerobních i anaerobních podmínek⁵. Spolu s 2-nitropyrenem a 4-nitropyrenem byl identifikován ve spalinách naftových motorů, v přepáleném oleji po přípravě jídel a při spalování uhlí. Metabolity 1-NP byly zkoumány jako markery profesionální expozice NPAU⁵. Dále byl identifikován v grilovaném jídle v rozmezí koncentrací řádově jednotky až desítky μg.kg⁻¹. 1-NP lze prokázat ve tkáních rostlin rostoucích ve znečištěných lokalitách⁶.

Do těla vstupuje 1-NP přes plíce¹, vstřebává se kůží a je přijímán v potravě a pitné vodě. Metabolizován je převážně v játrech enzymatickým systémem P450, který zprostředkuje vznik dvou skupin metabolitů². Hydroxynitropyreny mohou být konjugovány glukuronovou kyselinou za vzniku polárního metabolitu, který se vylučuje převážně močí. Dále však hydroxynitropyren může podlehnout redukci nitroskupiny za vzniku aminopyrenu, což je aktivní metabolit schopný tvořit sloučeniny s DNA [např. N-(deoxyguanosin-8-yl)-1-aminopyren], a tedy je příčinou vzniku genové mutace. Rovněž však může být konjugován s glukuronátem (po překrytí aminoskupiny acetátem) a jako polární látka vyloučen močí^{2, 5}. Studie srovnávacího metabolismu prokázala, že nejtoxičtější pro lidské tělo je 4-nitropyren². Ten je však ve spalinách přítomen oproti 1-NP jen ve velmi malém množství. V této studii bylo dále prokázáno, že lidský enzymatický aparát zpracovávající nitropyreny je odlišný od bakteriálního, a dokonce velmi odlišný od aparátu laboratorních myší. Z toho vyplývá, že toxikokinetiku nitrovaných polyaromatických uhlovodíků nelze srovnávat interindividuálně.

Toxicita a karcinogenita byla prokázána u potkanů podáváním 2 mg 1-NP rozpuštěném v 0,2 ml dimetylsulfoxidu po dobu deseti týdnů, dávka dvakrát týdně

(databáze TOXNET). Přímé důkazy mutagenity u lidí byly získány použitím rekombinantních enzymů, které rovněž umožnily metabolickou aktivaci 1-NP². Akutní účinky se projevují podrážděním očí, chronickým kašlem, rakovinou jazyka. Následkem chronické expozice může dojít k podráždění očí, bronchitidám, exémům. Je nefrotoxický a hepatotoxický – s možností vzniku rakoviny v postižených orgánech.

1.3. Metody stanovení 1-nitropyrenu

Ke stanovení 1-NP lze použít různé analytické metody. Kvalitativní analýza je možná pomocí chromatografie na tenké vrstvě. Dobře reprodukovatelné výsledky byly dosaženy použitím HPLC s chemiluminiscenční detekcí⁷. Dále kombinací technik GC-MS a MS, touto instrumentací je možné analyzovat i metabolity 1-NP⁸. Rovněž byla použita metoda HPLC-MS pro stanovení obsahu 1-NP, a to oxidované, redukované i nativní formy v městských exhalacích⁹. Tyto metody jsou však časově i finančně náročné, a proto byla provedena studie možnosti analyzovat 1-NP pomocí moderních elektroanalytických metod, jmenovitě polarografie na klasické rtuťové kapkové elektrodě a voltametrie na visící rtuťové kapkové elektrodě¹⁰. Bylo dosaženo značně nižšího limitu detekce oproti stanovení 1-NP pomocí HPLC s UV detekcí (selektivita stanovení může být dále zvýšena kombinací s extrakcí kapalina–kapalina či extrakcí na tuhé fázi)¹⁰.

Úspěšná byla i stanovení 1-NP na uhlíkové pastové elektrodě na bázi kuliček ze skelného uhlíku¹¹. Výhodou této elektrody je její vysoká kompatibilita s pracovními roztoky obsahujícími velké množství organického rozpouštědla (např. acetonitril či methanol). Dále je vysoce elektrochemicky reaktivní, má široké potenciálové okno, nízký šum a snadno se připraví, modifikuje a obnoví. Na této elektrodě probíhala měření metodou lineární scanovací voltametrie, diferenční pulsní voltametrie (DPV) a voltametrie s akumulací adsorpcí.

Výhody elektroanalytických metod zde spočívají ve snížení limitu detekce, analýzy jsou časově a finančně méně náročné. Poskytují tedy nezávislou alternativu ke stanovení rozmanitých elektroaktivních látek, což je výhodné i pro forenzní účely, kdy je často vyžadována možnost prokázat a stanovit danou látku dvěma nezávislými metodami.

2. Experimentální část

2.1. Reagencie

Methanol (Merck)

1-NP 99% (Aldrich Chem. Co.)

Deionizovaná voda sloužící k přípravě všech vodných roztoků: (Millipore, Milli-Q plus systém, Millipore, USA).

Zásobní roztok 1-NP o koncentraci $c = 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ jsem připravil rozpuštěním

0,0247 g 1-NP ve 100 ml methanolu (čistota pro HPLC)

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

Při měření jsem pracoval s roztoky o různých koncentracích, které jsem připravil přesným ředěním zásobního roztoku.

2.2. Aparatura

Pro měření pH: Přesná hodnota pH byla měřena digitálním pH metrem Jenway (Jenway, Essex, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou.

Měření stability zásobního roztoku: spektrofotometr agilent 8453. Použil jsem křemennou kyvetu o tloušťce 0,5 cm.

Voltametrie: software Polar pro 5. 1, pracující pod operačním systémem Windows XP (Microsoft corporation) , sestava Eco-Tribo Polarograf (EcoTrend Plus), Praha. Software pracoval v operačním systému Windows XP (Microsoft Corp.).

Jednotlivá měření byla prováděna ve tříelektrodovém zapojení, kdy byla jako referentní použita argentschloridová elektroda (1 mol.l^{-1} KCl, Monokrystaly, Turnov) a jako pomocná elektroda byla použita platinová drátková elektroda (Monokrystaly, Turnov). Pro vyhodnocení výsledků jsem použil program Origin pro 7. 5 (Originlab corporation, USA)

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

2.3. Použitá pracovní elektroda

Pevné amalgámové elektrody jsou tvořeny kovy nebo jejich slitinami (např. Ag, Cu, Au, Ir, BiAg aj.), které se mohou smáčet rtuť a tvořit s ní pevné amalgámy. Tento typ elektrod vykazuje vysoké přepětí vodíku a umožňuje pohodlnou práci jako s pevnými elektrodami. Regenerace jejich povrchu se většinou provádí elektrochemickou cestou. Mezi další výhody takových elektrod patří např. široký rozsah pracovních potenciálů, nižší zbytkový proud a šum, použitelnost v širším spektru rozpouštědel a základních elektrolytů, prakticky neomezená životnost elektrod a fakt, že elektrody vyrobené z pevných amalgámů jsou netoxické¹².

Pro studium chování 1-NP byla použita meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgámová elektroda (m-AgSAE). Byla používána AgSAE č. 2-05-18. vyrobená firmou EckoTrend plus, Praha. Průměr amalgámového disku elektrody byl 0,52 mm.

V rámci měření byly prováděny s elektrodou tři následné operace, kterými byl obnovován povrch elektrody :

Amalgamace:

Ponořením elektrody do kapalně rtuť asi na 15 s se obnovil celý meniskus. Amalgamace byla prováděna vždy po jednom týdnu nebo po dlouhodobém přerušení práce. Kvalitu menisku bylo nutno pravidelně kontrolovat, při větších otřesech či míchání se může poškodit.

Elektrochemická aktivace:

Aktivace byla prováděna v roztoku 0.2 mol.l⁻¹ KCl, který nebyl probubláván dusíkem, vložením napětí –2.2 V po dobu 300 s. Při aktivaci docházelo k elektrochemickému čištění povrchu elektrody. Aktivace byla prováděna po amalgamací, při pasivovaném povrchu elektrody a při přerušení práce po dobu delší než jednu hodinu.

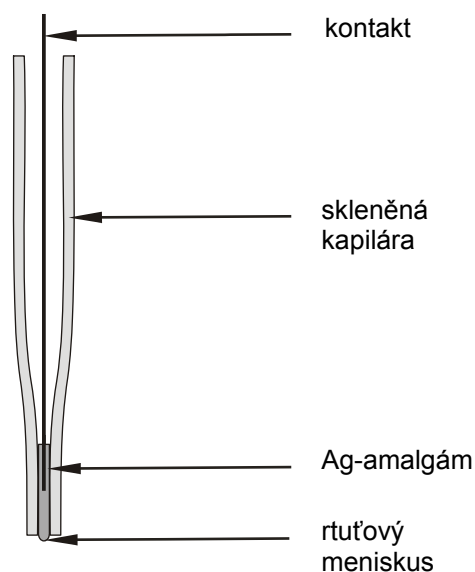
Regenerace:

Tato operace byla prováděna v měřeném roztoku při současném bublání dusíkem. Na elektrodu byl střídavě vkládán kladnější potenciál E_{in} a zápornější potenciál E_{fin} v intervalech 0, 1 s po dobu 30 s. Hodnoty těchto potenciálů byly optimalizovány vždy podle příslušného základního elektrolytu pro nejlepší opakovatelnost píků.

Tab. 2.1

Experimentálně nalezené optimální hodnoty regeneračních potenciálů pro *m-AgSAE* v prostředí *BR* pufru pro jednotlivá *pH*.

<i>pH</i>	E_{in} [mV]	E_{fin} [mV]
2	170	-1000
3	150	-1250
4	150	-1350
5	150	-1400
6	100	-1500
7	100	-1600
8	100	-1600
9	100	-1650
10	-50	-1650
11	-50	-1700
12	-50	-1700



Obr. 2.1

Schéma meniskem modifikované stříbrné tuhé amalgámové elektrody (m-AgSAE)

Stejný typ pracovní elektrody (m-AgSAE) který byl používaný pro všechna měření v této práci byl použit i v práci těchto autorů : [TO NEJDE TAKHLE ALE NORMALNI](#)

[CITACE](#)

(Karolina Pecková , Jiří Barek , Tomáš Navrátil , Bogdan Yosypchuk , Jiří Zima) věnované voltametrickému stanovení nitronaftalenů na (m-AgSAE).

V této práci jsou objasněny elektrodové děje, probíhající v zásaditém prostředí. redukce probíhá ve dvou vlnách, první je důsledkem jedno-elektronové redukce nitroderivátu na nitro-radikál, a druhá vlna odpovídá vzniku aryl-hydroxyl aminu¹³.

Výhody elektroanalytických metod spočívají ve snížení limitu detekce, analýzy jsou časově a finančně méně náročné. Poskytují nezávislou alternativu ke stanovení elektroaktivních látek, což je výhodné i pro forenzní účely, kdy je často vyžadována možnost prokázat a stanovit danou látku dvěma nezávislými metodami.

2.4. Pracovní postupy

Při studu vlivu pH byly připraveny roztoky o výsledné koncentraci $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ tak, aby nedocházelo k ~~vylučování~~-krystalizaci 1-NP.

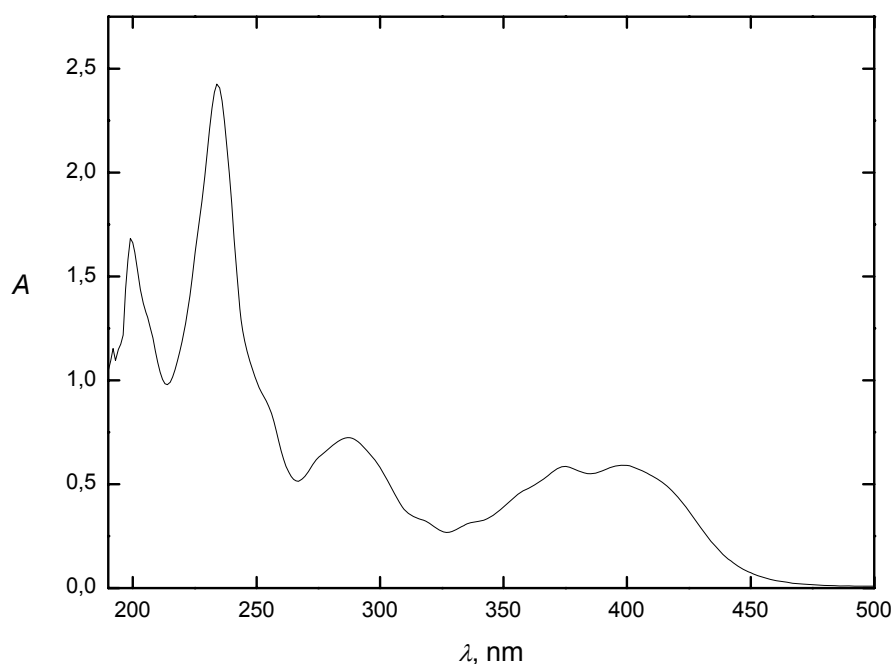
Takto připravený roztok byl promíchán, převeden do polarografické nádoby a zbaven kyslíku. Po probublávání dusíkem po dobu minimálně 5 minut byl zvoleným programem proveden záznam voltametrické křivky metodou DP a DC voltametrie. Slepý vzorek (základní elektrolyt) byl připraven stejně. Měření probíhala za laboratorní teploty, každá křivka byla zaznamenána minimálně třikrát.

Získané křivky byly exportovány a vyhodnoceny v Originu (OriginPRO 7. 5, OriginLab Corporation, USA)

Dále byly změřeny cyklické voltamogramy 1-NP v prostředí methanolu a pufru o pH 12 (NaOH 0, 01 mol.l⁻¹) v poměru MeOH : vodná fáze 7:3.

2.5. Stálost zásobního roztoku 1-nitropyrenu

Stálost zásobního roztoku 1-NP o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ byla sledována spektrofotometricky v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 5 mm. Zásobní roztok bylo nutno před každým měřením naředit na $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ pro dosažení optimálních hodnot absorbance. Referentní kyveta byla naplněna methanolem. Z výsledků vyplývá že zásobní roztok 1-NP je stálý nejméně měsíc. Viz Obr. 2.2 :



Obr. 2.2.

Absorpční spektrum roztoku 1-NP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) v methanolu. Měřeno proti čistému methanolu v křemenné kyvetě o měrné tloušťce 0,5 cm.

Tab. 2.2. Spektrofotometrické měření stálosti zásobního roztoku 1-nitropyrenu v methanolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$. Relativní absorbance je vztažena k prvnímu dni.

Dny	Absorbance roztoku		Relativní absorbance [%]	
	288 nm	372 nm	288 nm	372 nm
1	0,650	0,572	100,0	100,0
2	0,654	0,581	100,6	101,7
4	0,664	0,585	102,3	102,2
8	0,637	0,584	98,0	99,0
31	0,651	0,574	100,3	100,5

3.0 Voltametrické stanovení 1-nitropyrenu na stříbrné tuhé amalgámové elektrodě

2.6. DC voltametrie 1-nitropyrenu

2.6.1. Vliv pH

Při použití této metody byly ~~detekovány-pozorovány~~ pouze dva píky, v celé škále pH. Tyto dva píky odpovídají elektrodovým dějům popsaným v předchozí kapitole. Druhý pík je však velice nízký a těžko reprodukovatelný, proto bude dál uveden pouze první pík, který je nejvhodnější pro analytické použití.

Metodou lineární regrese byl pro závislost potenciálu píku E_p na pH v roztoku určen vztah:

První pík: E_{p1} [mV] = -45, 7909 pH -184, 463 (korelační koeficient 0, 98114). Pro druhý pík nelze sestavit lineární závislost. Jako optimální bylo zvoleno prostředí BR pufru o pH 12. V tomto prostředí poskytovala látka nejlepší a nejvyvinutější pík. Pro zjednodušení elektrolytu bylo opět místo BR pufru použito NaOH o $c = 0, 01 \text{ mol.l}^{-1}$.

Zjištěné závislosti potenciálu píků E_p a proudu píků I_p na pH roztoku jsou uvedeny v tabulce 4. 1. Zaznamenané voltametrické křivky jsou na obr. 4. 1. Závislosti potenciálu píku a proudu píku na napětí jsou na obrázku 4. 2 a 4. 3.

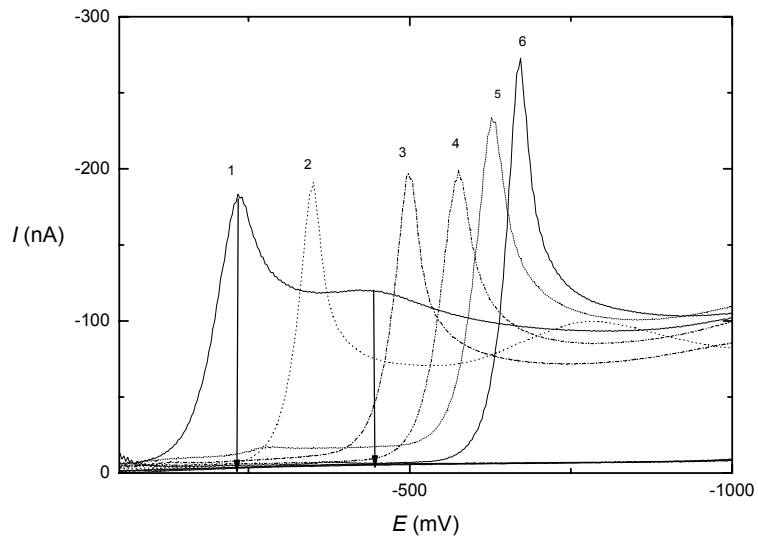
Stejně jako u DPV je i zde dochází k tomu, že se vzrůstajícím pH vzrůstá proud.

Tab. 3. 1

Vliv pH na DCV voltamogramy 1-NP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na m-AgSAE v prostředí BR pufru

pH	pHf	E p1(mV)	I_{Ap1} (nA)	Ep2(mV)	I_{Ap2} (nA)
2	2, 83	-237	-111, 5	-	-
3	4, 17	-311	-130, 7	-666	-74, 6
4	5, 18	-350	-139, 6	-833	-89, 6
5	6, 38	-420	-154, 8	-810	-91
6	7, 32	-497	-176, 7	-1151	-82, 41
7	8, 39	-561	-183, 2	-1158	-105, 5
8	9, 17	-577	-186	-1167	-105
9	9, 52	-600	-212	-1179	-104
10	10, 45	-629	-218, 5	-1185	-124, 2
11	11, 57	-676	-225, 6	-1190	-130, 3
12	12, 04	-697	-232, 9	-453	-106, 6

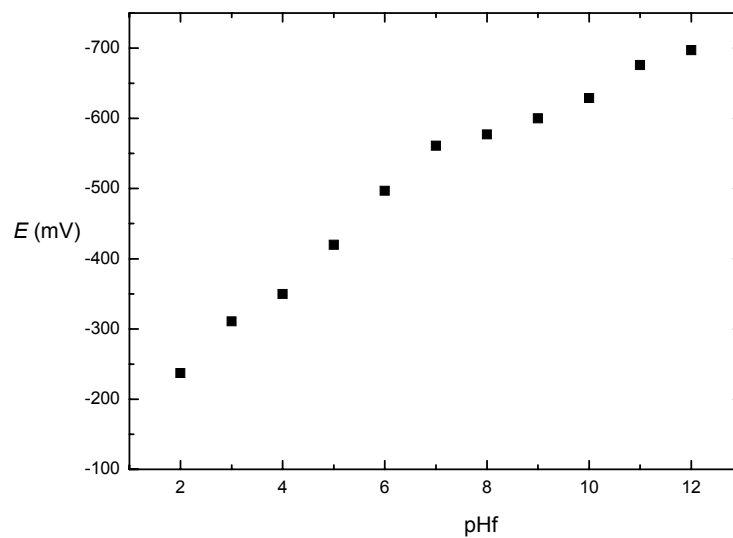
obr. 3.1 pH závislosti



Obr. 3. 1

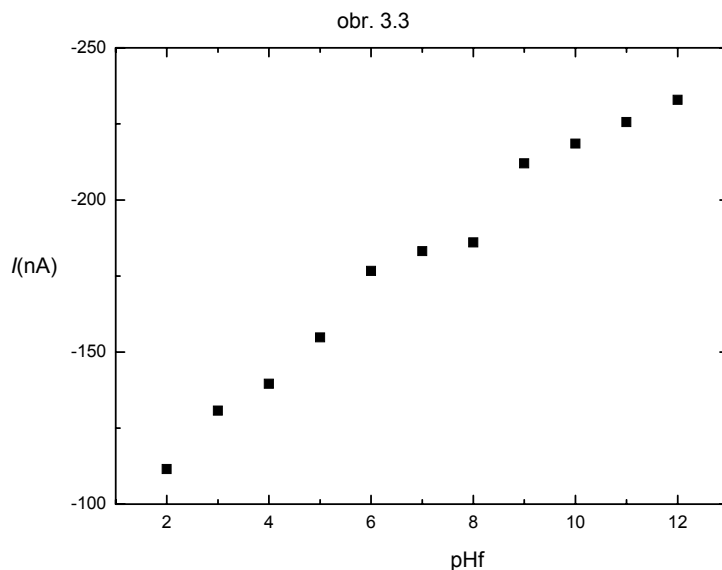
Voltamogramy 1-NP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) měřené technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufru prostředí BR pufru o pH 2. 0 (1); 4. 0 (2); 6. 0 (3); 8. 0 (4); 10. 0 (5); 12. 0 (6).

obr. 3.2



Obr. 3. 2

Závislost potenciálu prvního píku E_{p1} 1-NP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na pH roztoku, měřeno technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufru.



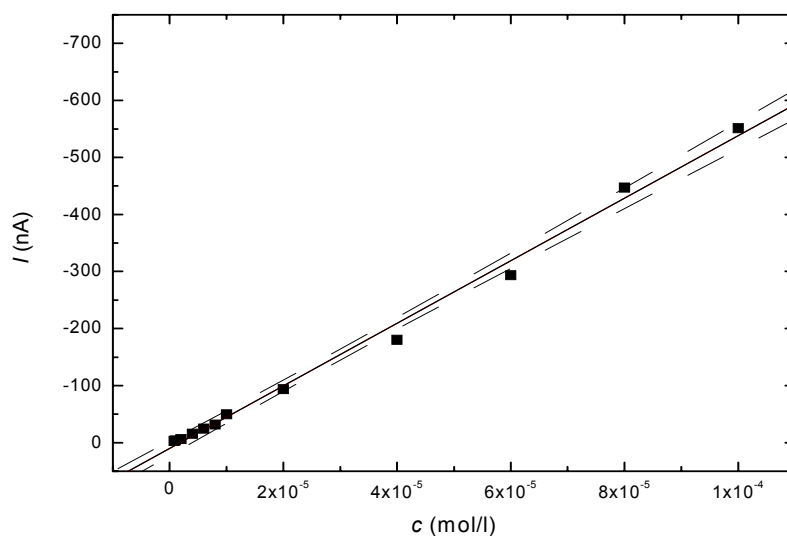
Obr. 3. 3
 Závislost proudu píku I_p 1-NP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na pH roztoku, měřeno technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufru.

2.6.2. Koncentrační závislosti

Koncentrační závislosti pro 1-NP byly proměřeny metodou DCV na m-AgSAE v prostředí $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH o pH 12,04 v koncentračním rozmezí $(1-10) \cdot 10^{-7}$, $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ a $(1-10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$. Jako nejnižší bod kalibrační křivky proto byl zvolen bod $C = 8 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$. Na obrázku 3. 4 je zobrazena kalibrační křivka pro nejnižší rozmezí koncentrací. Pro ilustraci jsou na Obr. 3.5 graficky znázorněny kalibrační křivky pro nejnižší koncentrační rozmezí, tj. $8 \cdot 10^{-7} - 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$. Parametry kalibračních závislostí jsou uvedeny v tabulce 3.2.

Určení opakovatelnosti výšky píků při použitém režimu bylo provedeno opakovaným změřením DC voltamogramů při nejnižší dosažené koncentraci ($c = 8 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$). Výška I_p je rovna $(282,34 \pm 4,91) \text{ nA}$; hodnota RSD = 1,74%.

obr.3.4

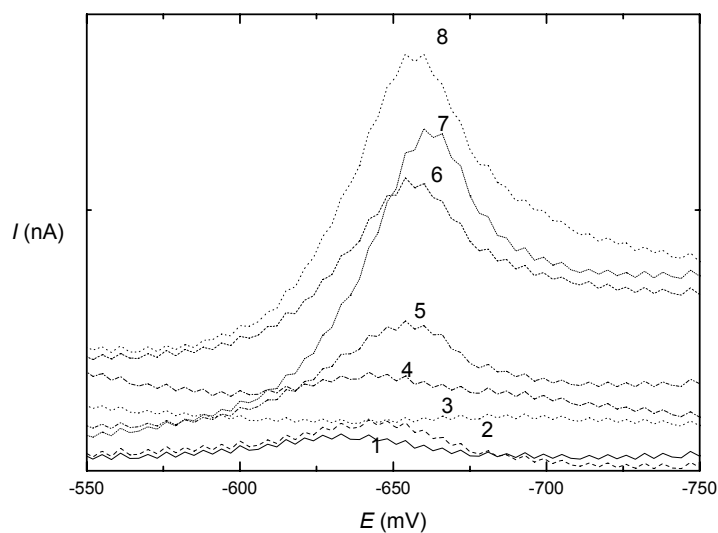


Obr. 3. 4

Závislost proudu píku I_p na koncentraci 1-NP v rozmezí $8 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Měřeno technikou DCV na m -AgSAE v prostředí hydroxidu sodného o $c = 0.01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Přerušovanou čarou jsou vyznačeny konfidenční pásy⁵.

Obr. 3.5



Obr. 3. 5

Voltamogramy 1NP měřené technikou DCV na m -AgSAE v prostředí hydroxidu sodného $c = 0.01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. c (1NP) [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]: 0 (1); $8 \cdot 10^{-7}$ (2); $1 \cdot 10^{-6}$ (3); $2 \cdot 10^{-6}$ (4); $4 \cdot 10^{-6}$ (5); $6 \cdot 10^{-6}$ (6); $8 \cdot 10^{-6}$ (7); $1 \cdot 10^{-5}$ (8). **JAK BYLY PIKY VYHODNOCOVANY**

Tab. 3.2

Parametry kalibračních závislostí 1-NP v rozmezí $(1-10) \cdot 10^{-6}$ a $(1-10) \cdot 10^{-5}$ mol.l⁻¹. Měřeno technikou DCV na m-AgSAE v prostředí hydroxidu sodného o $c = 0,01$ mol.l⁻¹.

Koncentrace [mol.l ⁻¹]	Úsek [nA]	Směrnice [nA. mol.l ⁻¹]	Korelační koeficient	LQ [mol.l ⁻¹]
$(1-10) \cdot 10^{-5}$	-20,97	$-5,57 \cdot 10^8$	0,9922	-
$(1-10) \cdot 10^{-6}$	1,06	$-4,15 \cdot 10^8$	0,9979	$2,6 \cdot 10^{-8}$

2.7. Diferenční pulsní voltametrie 1-nitropyrenu

2.7.1. Vliv pH

Vliv pH na chování 1-nitropyrenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) při DPV na m-AgSAE byl sledován v prostředí BR pufru o pH 2, 0 až 12, 0. V kyselém prostředí látkaposkytuje dva píky, v neutrálním jeden pík a v zásaditém opět dva píky. Patříčné elektrodové reakce jsou popsány v kapitole Cyklická voltametrie.

Metodou lineární regrese byl pro závislost potenciálu píku E_p na pH v rozmezí pH 2-12 určen vztah:

První pík: $E_{p1} [\text{mV}] = -34,98 \text{ pH} + 111,56$ (korelační koeficient 0,97522)

Druhý pík: $E_{p2} [\text{mV}] = -65,857 \text{ pH} + 29,19$ (korelační koeficient 0,9812)

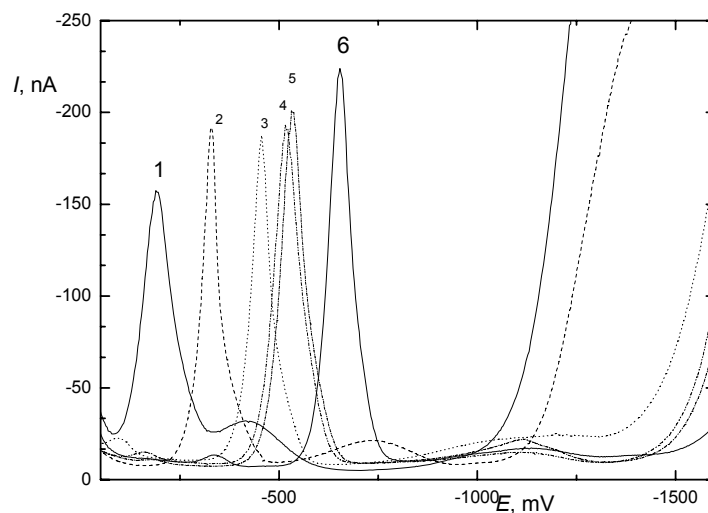
Zjištěné závislosti potenciálu píků E_p a proudu píků I_p na pH roztoku jsou uvedeny v tabulce 3.3

Zaznamenané voltametrické křivky jsou na obr. 3.6.

Tabulka 3.3

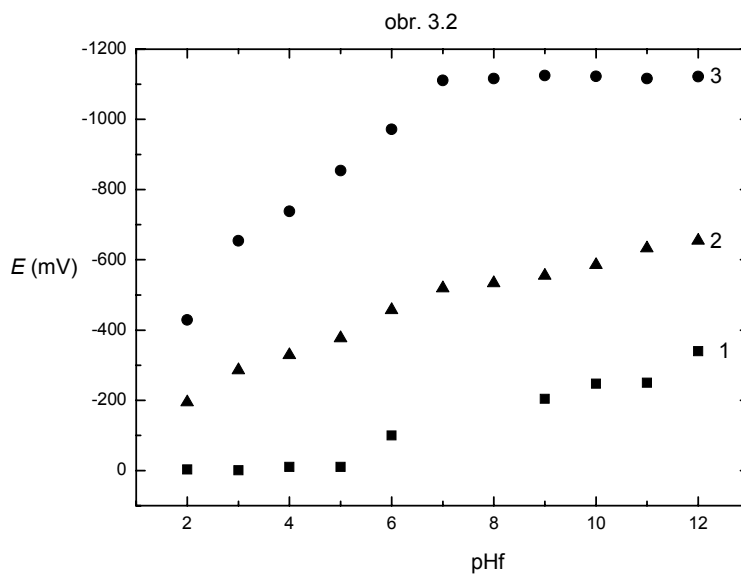
Zjištěné závislosti potenciálu píků E_p a proudu píků I_p na pH roztoku, pHf je pH roztoku vzniklého smísením 3 ml pufru a 7 ml methanolu či methanolického roztoku 1-NP.

pHf	pH	$E_{p1}[\text{mV}]$	$E_{p2}[\text{mV}]$	$I_{p1}[\text{nA}]$	$I_{p2}[\text{nA}]$
2,83	2	-195	-429	-133,8	-12,88
4,17	3	-286	-654	-144,9	-15,49
5,18	4	-329	-738	-154,87	-13
6,38	5	-377	-854	-165,9	-9,24
7,32	6	-457	-972	-177	0
8,39	7	-519	-1111	-184,2	0
9,17	8	-534	-1116	-191,6	0
9,52	9	-555	-1125	-224,3	-12,64
10,45	10	-586	-1123	-229,7	-15,44
11,57	11	-633	-1116	-270,2	-26,15
12,04	12	-655	-1122	-334	-5,425



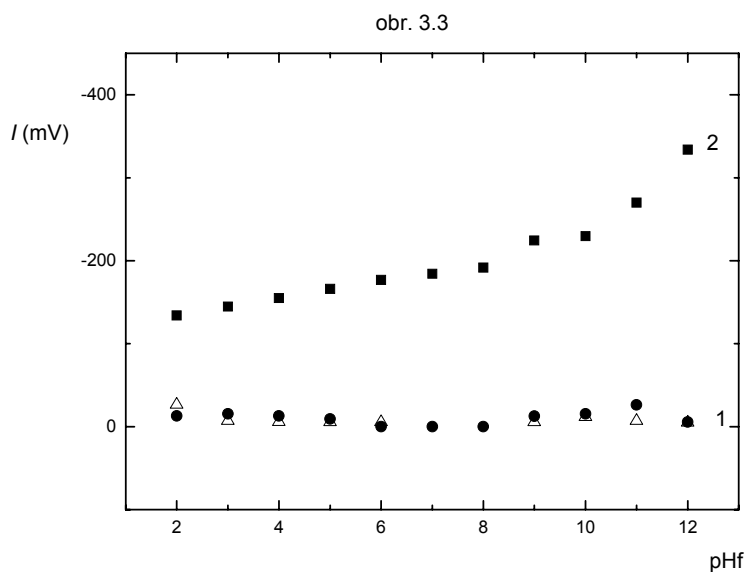
Obr. 3.6

Voltamogramy 1NP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 2.0 (1); 4.0 (2); 6.0 (3); 8.0 (4); 10.0 (5); 12.0 (6). [a methanolu \(3:7\)](#)



Obr. 3.7

Závislost potenciálu píku E_p 1NP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na pH roztoku, měřeno technikou DPV na m-AgSAE v prostředí $0.01 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$. 1- první pík; 2- druhý pík; 3- třetí pík. [PROLOZIT](#)



obr. 3. 8

Závislost proudu píku I_p 1-NP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na pH roztoku, měřeno technikou DPV na m-AgSAE v prostředí 0.01 mol.l^{-1} NaOH. 1- první pík; 2- druhý pík; 3- třetí pík. **PROLOZIT**

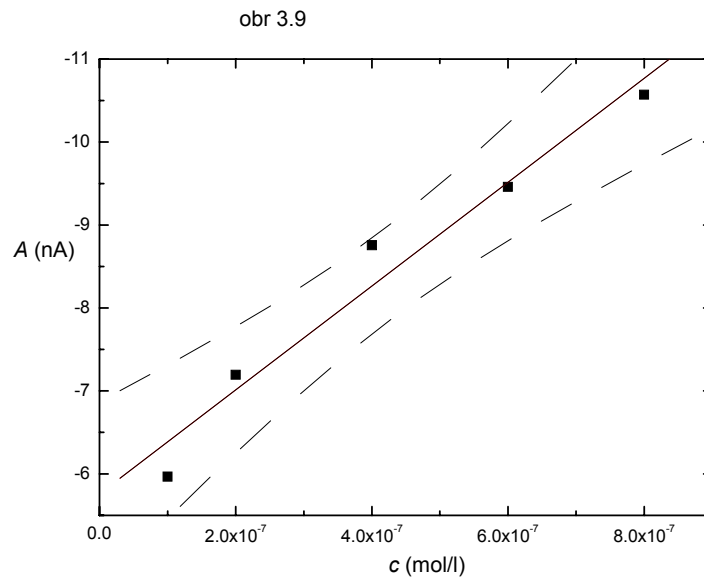
Je zřejmé, že s rostoucím pH se zvyšuje proud. Jako optimální bylo zvoleno pH 12 BR pufru. Pro zjednodušení bylo použito roztoku hydroxidu sodného, kde látka při pH 12 poskytuje stejnou voltametrickou křivku.

2.7.2. Koncentrační závislost

Koncentrační závislosti pro 1-NP byly měřeny metodou DPV na m-AgSAE v prostředí $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ hydroxidu sodného v koncentračním rozmezí $(1-10)^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$, $(1-10)^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$, $(1-10)^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$. Byly zvoleny regenerační potenciály $E_{in} = -50 \text{ mV}$ a $E_{fin} = -1800 \text{ mV}$ a při těchto měřeních byl sledován pouze druhý pík, neboť první a třetí píky jsou nižší, méně opakovatelné a tudíž analyticky hůře využitelné. Závislost výšky druhého píku na koncentraci 1-NP je na obrázku 3.9. Parametry kalibrace jsou uvedeny v tabulce 3.4. Voltamogramy DPV 1-NP o koncentraci $(1-10)^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ měřené v prostředí hydroxidu sodného o $c = 0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ (pH 12) jsou na obrázku 3. 10

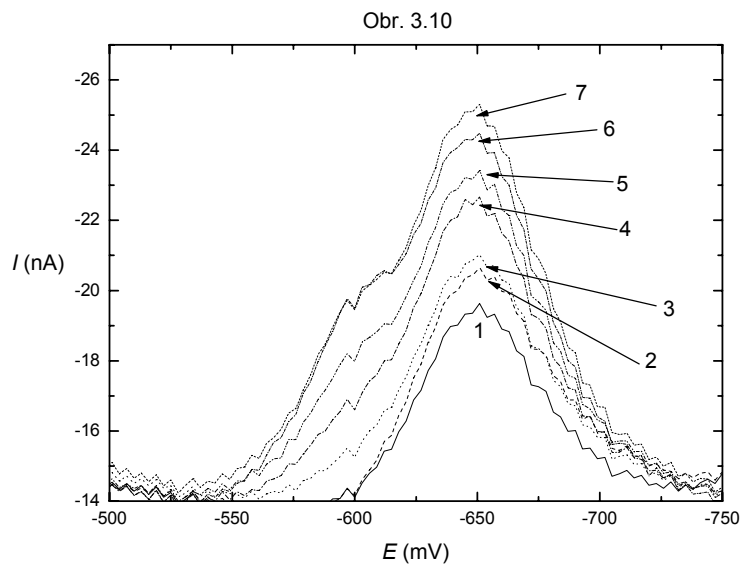
Určení opakovatelnosti výšky píků při použitém režimu bylo provedeno opakovaným změřením DP voltamogramů při nejnižší dosažené koncentraci

($c = 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$). Výška I_p je rovna $(-6.34 \pm 0,0907) \text{ nA}$; hodnota RSD = 1.52%.



Obr. 3. 9

Závislost proudu píku I_p na koncentraci 1NP v rozmezí $(1-10) \cdot 10^{-7}$. Měřeno technikou DPV na m-AgSAE v prostředí hydroxidu sodného o koncentraci 0.01 mol. l^{-1} . Přerušovanou čarou jsou vyznačeny konfidenční pásy⁵. NULY



Obr. 3.10

Voltamogramy 1-NP měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí hydroxidu sodného o koncentraci 0.01 mol. l^{-1} . Koncentrace (1-NP) $[\text{mol. l}^{-1}]$: 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); $10 \cdot 10^{-7}$ (7). **NESMI BYT URIZNUTO**

Tab. 3.4

Parametry kalibračních závislostí 1-NPv rozmezí $(1-10) \cdot 10^{-5}$, $(1-10) \cdot 10^{-6}$ a $(1-10) \cdot 10^{-7} \text{ mol. l}^{-1}$. Měřeno technikou DPV na m-AgSAE v prostředí NaOH o $c = 0.01 \text{ mol. l}^{-1}$

Koncentrace $[\text{mol. l}^{-1}]$	Úsek $[\text{nA}]$	Směrnice $[\text{nA. mol}^{-1}. \text{l}]$	Korelační koeficient	L_Q $[\text{mol. l}^{-1}]$
$(1-10) \cdot 10^{-5}$	-13,398	$-5,522 \cdot 10^8$	0,997	-
$(1-10) \cdot 10^{-6}$	0,704	$-4,309 \cdot 10^8$	0,9974	-
$(1-10) \cdot 10^{-7}$	-5,791	$-4,38 \cdot 10^6$	0,9911	$5,445 \cdot 10^{-8}$

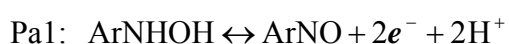
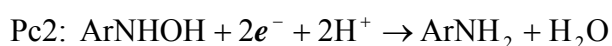
2.8. Cyklická voltametrie 1-nitropyrenu

Tato metoda byla použita pro charakterizaci elektrodoových dějů, měření probíhalo v kyselém, neutrálním a zásaditém pH (pHf 2, 7 a 12). Pro pH 2 a pH 7 bylo použito prostředí BR pufru, pro pH 12 bylo použito roztoku NaOH o $c = 0.01 \text{ mol.l}^{-1}$. (pH 12) Vlny byly zaznamenávány od pozitivnějších k negativnějším potenciálům. Scan byl obrácen vždy těsně před zahájením rozkladu základního elektrolytu.

Aby bylo možno určit, jaké lokální extrémy na voltamogramech způsobuje základní elektrolyt a jaké zkoumaná látka, bylo měření provedeno dvěma způsoby. V jednom případě nebylo před zahájením měření na elektrodu vloženy regenerační pulsy, ve druhém byly na začátku cyklování pulsy vloženy. Následující obrázky ukazují průběh voltamogramů při pH pufrů 2, 7 a 12 (pHf 2.34; 8.49 a 12.04) .

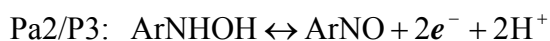
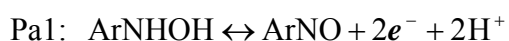
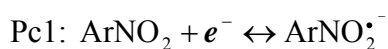
Hodnoty pHf byly naměřeny v roztocích po smísení roztoků o daném pH (BR pufr pro pH 2 a pH 7, NaOH $c = 0.01 \text{ mol.l}^{-1}$ pro pH 12) s methanolem (základní elektrolyt) a případně vzorkem rozpuštěným v methanolu v poměru 7:3 s NaOH . (více MeOH)

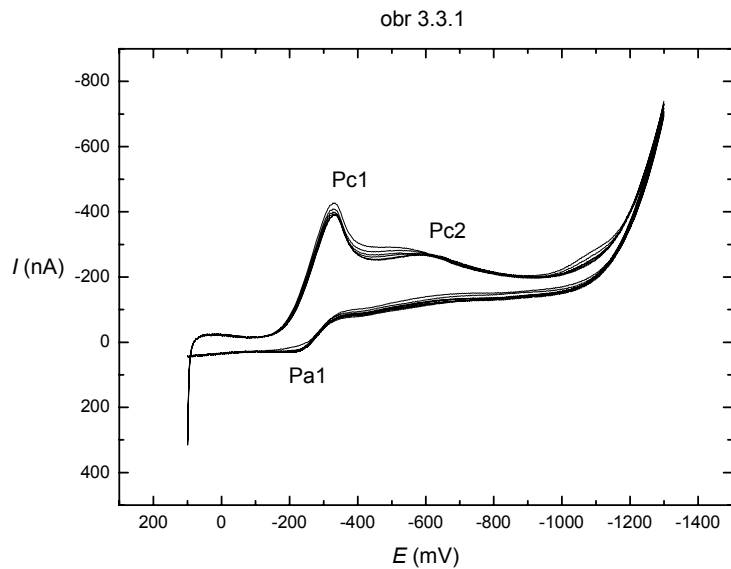
Na voltamogramu měřeném při pHf 2.34 jsou patrné tři píky. Ty odpovídají následujícím elektrodoovým reakcím:



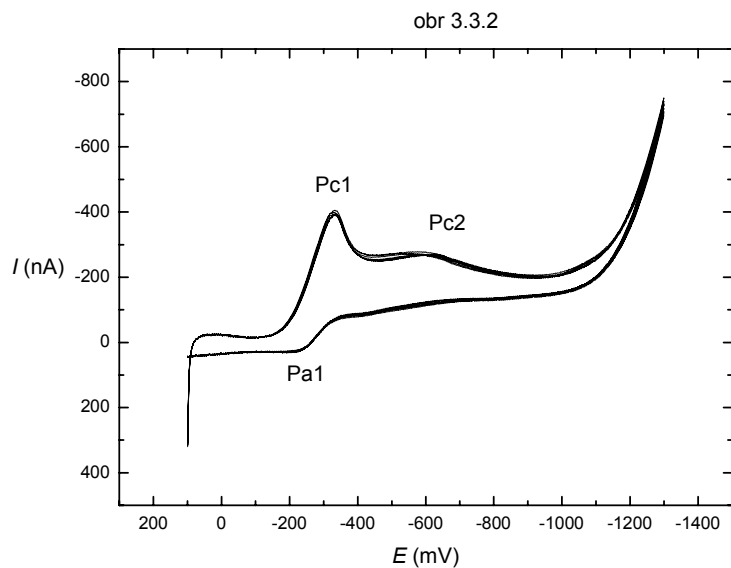
Na voltamogramech měřených při pHf 8.49 je patrné pět píků jež odpovídají následujícím reakcím v zásaditém prostředí.

Voltamogramy měřené při pHf 12.04 (s pulsy) vykazují pět píků.

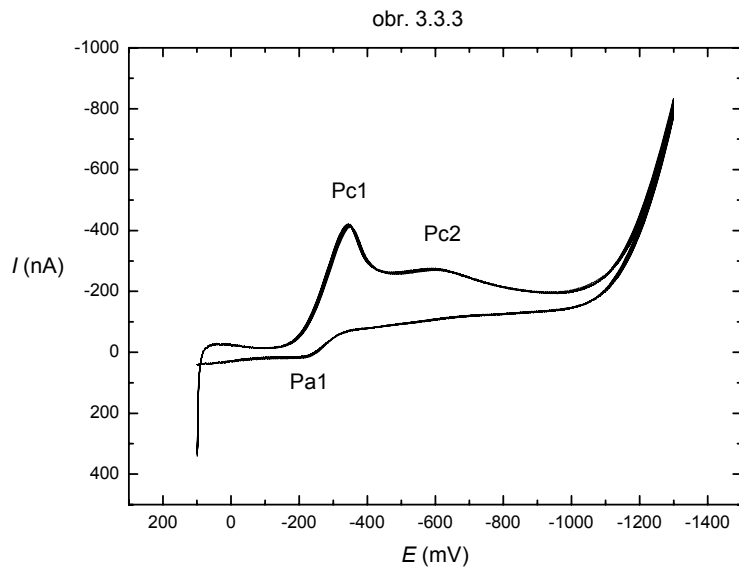




Obr. 3.3.1
 Cyklický voltamogram 1-NP $C = 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ v prostředí BR pufru o pH 2 (pHf 2. 34), měřeno bez použití regeneračních pulsů.

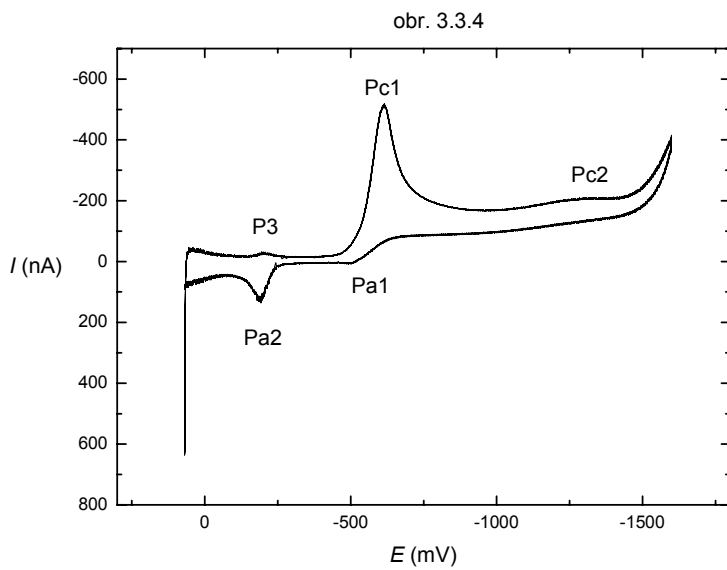


Obr. 3.3.2
 Cyklický voltamogram 1-NP $C = 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ v prostředí BR pufru o pH 2 (pHf 2. 34), měřeno s použitím regeneračních pulsů.



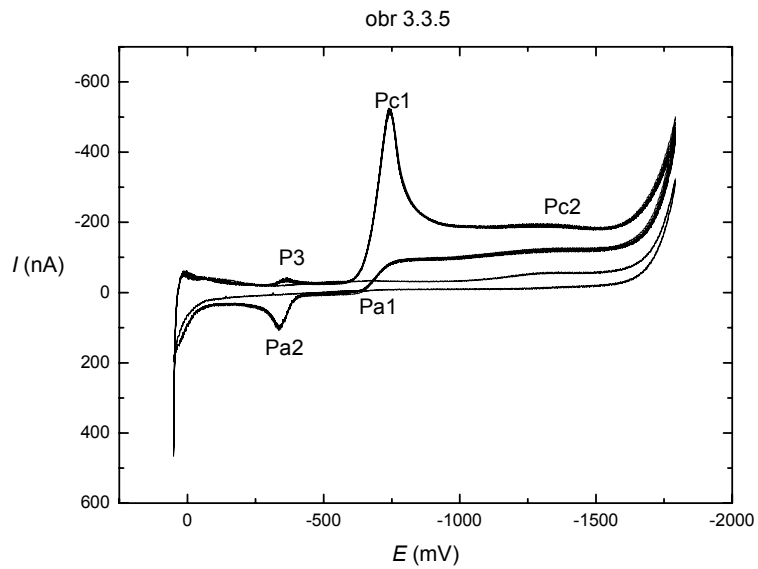
Obr. 3.3.3

Cyklický voltamogram 1-NP $C = 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ v prostředí BR pufru o pH 7 (pHf 8. 49), měřeno bez použití regeneračních pulsů.



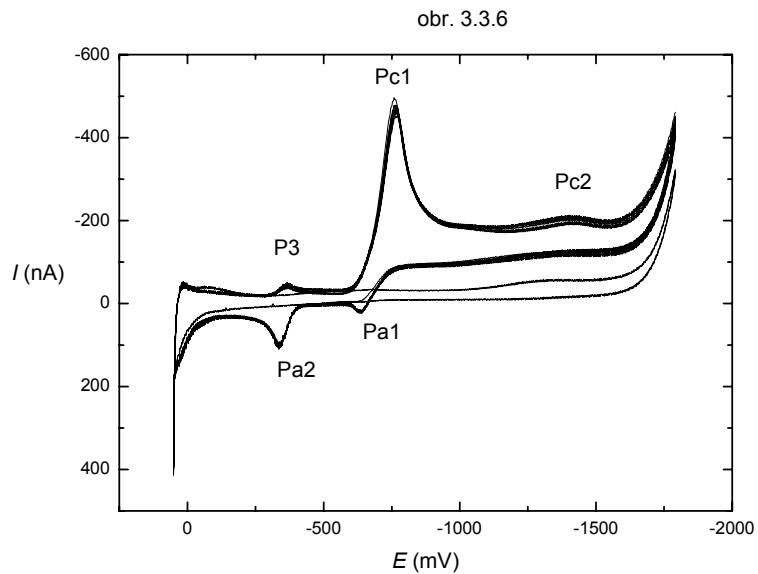
Obr. 3.3.4

Cyklický voltamogram 1-NP $C = 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ v prostředí BR pufru o pH 7 (pHf 8. 49), měřeno s použitím regeneračních pulsů .



Obr. 3.3.5

Cyklický voltamogram 1-NP $C = 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ v prostředí NaOH $c = 0.01 \text{ mol.l}^{-1}$ o pH 12 (pHf 12.04), měřeno bez použití regeneračních pulsů. Horizontální křivky bez píků patří základnímu elektrolytu.



Obr. 3.3.6

Cyklický voltamogram 1-NP $C = 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ v prostředí NaOH $c = 0.01 \text{ mol.l}^{-1}$ o pH 12 (pHf 12.04), měřeno s použitím regeneračních pulsů. Horizontální křivky bez píků patří základnímu elektrolytu.

3. Experiment s HPLC dělením studované látky ve směsi s nejčasteji se vyskytujícími doprovodnými polutanty v životním prostředí

3.1. Aparatura

Separace probíhala na koloně c- 18 s reverzní fází, 125 x 4 mm.

K detekci bylo použito UV detektoru s diodovým polem, vlnová délka optimální pro směs látek byla 235 nm. Zároveň byl použit elektrochemický detektor s m-AgSAE typu wall-jet.

3.2. Reagencie

V tomto experimentu byly použity roztoky o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ 1-nitropyrenu, 2-nitrofluoranthenu a 3-nitrofluoranthenu v methanolu. Jedná se o modelové látky pro výzkum stanovení nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků, vyskytujících se v dieselových spalínách. Jako mobilní fáze byla použita směs 0,01 M fosfátového pufru a methanolu v poměru 30:70 (více methanolu)

3.3. Pracovní postup VYHODIT ED

Cílem experimentu bylo ověřit separovatelnost těchto látek pomocí HPLC. V pokusu byly nejprve jednotlivé látky nadávkovány do kolony, a po zjištění že mají dostatečně rozdílné retenční časy byla nadávkována i směs všech tří látek.

Při tomto experimentu se nepodařilo zprovoznit elektrochemickou detekci analytu. To bylo příkládáno vlivu pH, které nebylo zvoleno přímo optimálně pro tento typ detekce analytu. Jako pracovní byla použita stříbrná tuhá amalgamová elektroda, referentní byla kalomelová a pomocná platinová.

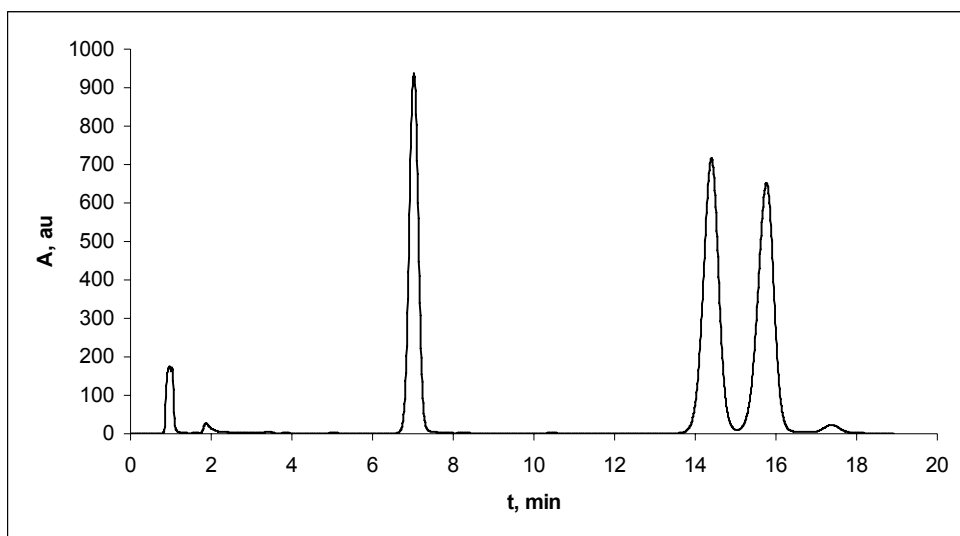
Optimalizace elektrochemické detekce bude předmětem další práce.

Na obrázku 4. 1 je chromatogram zobrazující separaci směsi 1-nitropyrenu, 2-nitrofluoranthenu a 3-nitrofluoranthenu. Pík s retenčním časem 7, 5 min. odpovídá

2-NF, retenční čas 14, 44 min. náleží 3-NF a pík s časem 15. 8 náleží 1-NP. Ostatní tři píky jsou nečistoty které se do roztoku dostaly z 3-NF. Ten byl totiž k dispozici pouze v technické čistotě 90%.

Vlnové délky při kterých proběhla detekce analytů nejsou stejné. To je dáno tím že detektor s diodovým polem snímá najednou celé spektrum záření, a vyhodnocovány jsou právě píky odpovídající vlnové délce při které je hodnota absorbance maximální.

Obr. 4. 1



Obr. 4. 1

Na obrázku je chromatogram dělení směsi 1-NP, 2-NF a 3-NF o koncentraci $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$. Pík s retenčním časem 7, 5 min. odpovídá 2-NF, retenční čas 14, 44 min. náleží 3-NF a pík s časem 15. 8 minut náleží 1-NP. Ostatní tři píky jsou nečistoty které se do roztoku dostaly z 3-NF

CHYBI ZAVER.

4. Použitá literatura

1. Scheepers P. T. J., Micka V., Muzyka V., Anzion R., Dahmann D., Poole J., Bos R. P.: *Ann. Occup. Hyg.* **47**, 379 (2003).
2. Chae Y. H., Thomas T., Guengerich F. P., Fu P. P., El-Bayoumy K.: *Cancer Res.* **59**, 1473 (1999).
3. Moller L.: *Environ. Health Perspect.* **102**, 139 (1994).
4. Boyd A. S., Seger D., Vannucci S., Langley M., Abraham J. L., King L. E.: *Journal of the American Academy of Dermatology* **43**, 81 (2000).
5. Toriba A., Kitaoka H., Dills R. L., Mizukami S., Tanabe K., Takeuchi N., Ueno M., Kameda T., Tang N., Hayakawa K., Simpson C. D.: *Chem. Res. Toxicol.* **20**, 999 (2007).
6. Spitzer B., Cichna M., Markl P., Sontag G., Knopp D., Niessner R.: *J. Chromatogr. A* **880**, 113 (2000).
7. Hayakawa K., Lu C., Mizukami S., Toriba A., Tang N.: *J. Chromatogr. A* **1107**, 286 (2006).
8. Prycek J., Ciganek M., Simek Z.: *J. Braz. Chem. Soc.* **18**, 1125 (2007).
9. Lintelmann J., Fischer K., Heil-Franca M., Matuschek G.: *European Aerosol Conference 2007, Salzburg*, Book of Abstracts, str. T13A149, Salzburg 2007.
10. Barek J., Zima J., Moreira J. C., Muck A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **65**, 1888 (2000).
11. Barek J., Muck A., Wang J., Zima J.: *Sensors* **4**, 47 (2004).
12. Barek J., Fischer J., Navrátil T., Peckova K., Yosypchuk B.: *Sensors* **6**, 445 (2006).
13. Pecková K., Barek J., Navrátil T., Yosypchuk B., Zima J.: *Anal. Lett.*, v tisku (2008).