

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Vít Molitor

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ BENZOFENONU-3 NA UHLÍKOVÉ PASTOVÉ ELEKTRODĚ

Voltammetric determination of benzophenone-3 at
carbon paste electrode

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Prof. RNDr. Jiří Zima, CSc.

Praha 2013

Tato práce vznikla za podpory grantu MSM 0021620857 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky a grantu P206/12/G151 Grantové agentury České republiky.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

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

Podpis

Poděkování patří prof. RNDr. Jiřímu Zimovi, CSc. za odborné vedení při vypracovávání této bakalářské práce, opravy a připomínky. Dále také Mgr. Haně Dejmkové za cenné rady spojené s každodenními problémy, se kterými jsem se potýkal v experimentální části a při hodnocení naměřených hodnot a všem členům laboratoře č. 112 za příjemné prostředí pro práci. Také děkuji rodině za velkou morální a samozřejmě i finanční podporu. Bez nich by tato práce nevznikla.

Klíčová slova:

Diferenční pulsní voltametrie

Uhlíková pastová elektroda

Benzofenon-3

Keywords:

Differential Pulse Voltammetry

Carbon Paste Electrode

Benzophenone-3

Abstrakt:

Byla optimalizována metoda stanovení benzofenonu-3 v prostředí Brittonova-Robinsonova pufru a methanolu. Za optimální hodnotu pH bylo zvoleno pH 12. Dále byl také prostudován vliv množství methanolu na výšku píku benzofenonu-3. Množství methanolu nemělo vliv na získané výsledky. Byl také prozkoumán vliv akumulace na výšku píku benzofenonu-3. Přestože akumulace nezvýšila odezvu analytu příliš mnoho, měření probíhala za akumulace 300 s při akumulacím potenciálu +400 mV.

Při měření za optimálních podmínek byl stanoven limit detekce benzofenonu-3 v deionizované vodě na 6×10^{-7} M a v pitné vodě na $5,5 \times 10^{-7}$ M benzofenonu-3.

Reálný vzorek byl proměřen pomocí diferenční pulsní voltametrie a spektrofotometricky.

Abstract:

A method for analysing benzophenone-3 on carbon paste electrode was developed. As a solvent a mixture Britton-Robinson buffer and methanol was used. The pH value of 12 was determined as optimal for further measurements. It was also found out that methanol added to the analyte solution did not negatively influence the voltammetric measurement. To decrease the limit of benzophenone-3 determination the accumulation of the analyte in the electrode surface was studied. The accumulation time of 300 seconds and accumulation potential of +400 mV were used as optimal.

When measured under optimal conditions the limit of detection was 6×10^{-7} M in deionised water and $5,5 \times 10^{-7}$ M in drinking water.

Real sample was measured using differential pulse voltammetry and spectrophotometry.

Obsah

1. Teoretický úvod	9
1.1 Cíl práce	9
1.2 Zkoumaná látka	9
1.3 Uhlíková pastová elektroda	12
2. Experimentální část	13
2.1 Použité chemikálie	13
2.2 Přístroje	14
2.3 Pracovní postupy	14
3. Výsledky a diskuse.....	15
3.1 Spektrofotometrické měření stálosti.....	15
3.2 Optimalizace metody stanovení benzofenonu-3.....	17
3.2.1 Vliv pH	17
3.2.2 Pasivace pracovní elektrody	22
3.2.3 Vliv množství methanolu na kvalitu měření	23
3.2.4 Vliv doby a potenciálu akumulace.....	25
3.3 Kalibrační křivka.....	29
3.3.1 DP voltametrie v deionizované vodě	29
3.3.2 DP voltametrie v pitné vodě	34
3.4 Stanovení v reálném vzorku.....	37
3.5 Spektrofotometrické stanovení benzofenonu-3 v reálném vzorku	39
4. Závěr	41
5. Použitá literatura.....	42

Seznam použitých zkratk:

A	absorbance (AU)
BDD	borem dopovaná diamantová elektroda
CAS	Chemical Abstracts Service
CPE	uhlíková pastová elektroda (carbon paste electrode)
E	potenciál (mV)
E_a	akumulační potenciál (mV)
E_p	potenciál píků (mV)
HDME	visící rtuťová kapková elektroda (hanging mercury drop electrode)
I	proud (A)
I_p	proud píků (nA)
LOD	limit detekce (limit of detection)
pK_a	disociační konstanta

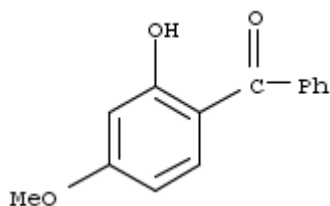
1. Teoretický úvod

1.1 Cíl práce

Cílem práce je vývoj a optimalizace metody pro stanovení 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonu (benzofenon-3), který je používán zejména jako látka pohlcující UV záření v kosmetických přípravcích, a to metodou diferenční pulsní voltametrie na uhlíkové pastové elektrodě a využití optimalizované metody pro stanovení benzofenonu v reálném vzorku.

1.2 Zkoumaná látka

2-hydroxy-4-methoxybenzofenon (benzofenon-3)



Obr. 1.1

Strukturní vzorec 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonu

CAS číslo: 131-57-7

Sumární vzorec: $C_{14}H_{12}O_3$

Molekulová hmotnost: $228,6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Teplota tání: $62 - 65 \text{ }^\circ\text{C}$

Rozdělovací koeficient: 3,7 (oktanol-voda)

pK_a : $7,56 \pm 0,35 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$

Rozpustnost ve vodě: 0,0037 g.l⁻¹

Rozpustnost v ethanolu: 6,0 %

Absorpční maximum: 287 nm (methanol)

Další názvy: Oxybenzon, benzofenon-3, (2-hydroxy-4-methoxyfenyl)fenyl-methanon,
2-benzoyl-5-methoxyfenol, Aduvex 24, Escalol 567

2-hydroxy-4-methoxybenzofenon je bílá až nažloutlá krystalická látka, bez zápachu nebo se slabým charakteristickým zápachem. Používá se jako širokospektrální filtr UV záření v kosmetických produktech, převážně opalovacích krémech, buď jako jediný filtr UV záření nebo spolu s jinými, podobně fungujícími látkami. Kromě opalovacích krémů se benzofenon-3 přidává také do jiných kosmetických přípravků. Koncentrace v těchto produktech se pohybuje v rozmezí mezi 0,05 – 0,5 % z důvodu ochrany ostatních složek před slunečním zářením[1].

Další použití benzofenonu-3 se dá také nalézt v potravinářském průmyslu. Benzofenon-3 je obsažen v ochranné vrstvě pokrývající obaly od potravin, kde zabraňuje fotodegradaci výrobků[2]. Benzofenon-3 je špatně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v nepolárních rozpouštědlech.

Při studiu akutní toxicity na potkanech a králících byla zjištěna toxicita 12800 mg/kg (orální, potkan) a 16000 mg/kg (dermální, králík). Ve studii dráždivosti na pokožku byl benzofenon-3 prohlášen za látku nedráždicí pokožku studovaných zvířat (králík). Další dvě nezávislé studie potvrdily výsledky studie první. Stejně studie se zabývaly i schopností benzofenonu-3 dráždit oči králíka. Výsledky byly opět negativní (testování proběhlo na 6 zvířatech, všechny výsledky ukázaly skóre 0). Jelikož se všechny studie shodují svými negativními výsledky, lze považovat benzofenon-3 za látku nedráždicí pokožku, ani oči králíka. Při zkoumání absorpce benzofenonu-3 lidskou kůží bylo provedeno několik studií *in vitro*, užívajících roztok benzofenonu-3 nebo kosmetické produkty obsahující benzofenon-3. V důsledku různých podmínek jednotlivých studií a různých metod provedení těchto studií nelze vyvodit jasný závěr. Z těchto testů lze vyvozovat jen obecné závěry, jako například fakt, že absorpce benzofenonu-3 lidskou kůží se zdá být nízká, většina absorbovaného množství je zachycena ve *stratum corneum* (vrstva odumřelých buněk pokožky) a že různé příměsi, přidávané spolu s benzofenonem-3 do kosmetických přípravků, mohou ovlivnit rychlost a i

celkové množství absorpce benzofenonu-3. Při výzkumu genotoxicity a mutagenity benzofenonu-3 nebyla prokázána schopnost poškozovat genetickou strukturu organismů.

Při studii prováděné na morčatech a králících za účelem zkoumání fototoxicity a fotosenzitizace (krém na opalování s obsahem 6 % benzofenonu) nebyla prokázána schopnost fototoxicity ani fotosenzitizace[1]. Na základě těchto dat bylo Evropskou komisí rozhodnuto, že obsah benzofenonu-3 do 6 % v opalovacích krémech a do 0,5 % v jiných typech kosmetických přípravků nenese riziko pro spotřebitele[3].

Benzofenon-3 se nejčastěji analyzuje separačními metodami, převážně HPLC a GC. Detekce po separaci je možná širokým spektrem detektorů, od UV detekce, přes hmotnostní spektrometrii, až např. k ampérometrické detekci[2]. Díky své nízké ceně a vysoké rychlosti analýzy jsou v poslední době hojně používány také elektrochemické metody, např. cyklická[4] a square wave voltametrie[2] nebo polarografie na visící rtuťové kapce[5]. Limity detekce stanovení benzofenonu-3 těmito metodami jsou uvedeny v tabulce 1.1.

Tab. 1.1 Limity detekce různých metod stanovení benzofenonu

Metoda stanovení	LOD (mol×dm ⁻³)	Zdroj
HPLC-UV s gradientovou elucí (EtOH:voda)	3,94×10 ⁻⁷	6
Square wave voltametrie (BDD elektroda)	1,37×10 ⁻⁷	2
Cyklická voltametrie (pyrolitická grafitová elektroda)	5×10 ⁻⁶	4
Diferenční pulsní polarografie (HDME)	1,7×10 ⁻⁶	5

1.3 Uhlíková pastová elektroda

Uhlíková pastová elektroda se skládá ze dvou částí: těla elektrody s kontaktem a výplně tvořené uhlíkovou pastou. Uhlíková pasta je připravena smícháním uhlíku (ve formě grafitu, skelného uhlíku nebo i jiných vhodných forem) a vhodného kapalného pojidla[7]. Tato směs se dá poté dále modifikovat vhodnými činidly pro specializovanou detekci. Těmito činidly mohou být různé nanomateriály, surfaktanty, komplexy kovů, makrocyclické látky a podobně[8].

Výhodou pastových elektrod je jejich vysoká citlivost a dobrá mechanická odolnost[9]. Dále také vysoký potenciálový rozsah, pohybující se od $-1,3$ V až k $+1,4$ V. Elektrody s uhlíkovou pastou mají ale také jednu významnou nevýhodu. Kvalita měření závisí z velké části na operátorovi pracujícím s elektrodou, jelikož pasta se obvykle připravuje přímo v laboratoři místo toho, aby byla pasta dodána již hotová od výrobce. Zkušenosti člověka připravujícího pastu tak výrazně ovlivní vlastnosti elektrody při samotném měření v závislosti na dosažené praxi v práci s pastovou elektrodou[7].

Tělo elektrody je tvořeno teflonovým tělem, ve kterém je vyvrtán otvor o průměru obvykle 2 - 3 mm. V tomto otvoru se pohybuje obvykle nerezový píst, který slouží jako kontakt a zároveň i jako píst posunující uhlíkovou pastu při obnovování pracovního povrchu elektrody. Toto tělo je také často vyrobeno na místě, kde probíhá měření, místo toho, aby bylo objednáno u výrobce. Vlastnosti takto vyrobených elektrod se tedy mohou významně lišit a není tedy doporučeno elektrody v průběhu měření měnit.

2. Experimentální část

2.1 Použité chemikálie

Studovaná látka: 2-hydroxy-4-methoxybenzofenon (98%, Sigma-Aldrich)

Zásobní roztok byl vytvořen navážením přesného množství benzofenonu na analytických vahách a jeho rozpuštěním v methanolu. Zásobní roztok byl uchováván za laboratorní teploty.

Methanol: 99,9% (p.a., MERCK, Německo), rok plnění: 2008

Brittonův-Robinsonův (BR) pufr byl vytvořen smíšením kyselé a zásadité složky na požadované pH.

Kyselá složka pufru byla vytvořena navážením 2,7446 g H_3BO_3 (p.a., LACHEMA), a odměřením 2,7 ml H_3PO_4 (85%, p.a., Lachner) a 2,31 ml octové kyseliny (99%, p.a., Lachner). Roztok byl doplněn na objem 1 l deionizovanou vodou.

Zásaditá složka byla vyrobena rozpuštěním 8 g NaOH (p.a., Penta) a doplněním na 1 l deionizovanou vodou.

Uhlíková pasta byla vyrobena navážením 0,25 g skelného uhlíku a smísením se 120 μ l minerálního oleje.

Skelný uhlík: Glassy carbon spherical powder, 0,4-12 μ m, type 2 (Alfa-Aesar)

Minerální olej: Mineral Oil (CAS:8042-47-5, Sigma-Aldrich)

Reálný vzorek: Voda po holení Adidas Intense Touch (Coty)

2.2 Přístroje

Voltametrie: Eco-Tribo-Polarograph, software Polar 5.1

pracovní elektroda: CPE (teflon, kontaktní průměr 2mm)

referentní elektroda: argentchloridová (Monokrystaly Turnov, ČR, 3M KCl)

pomocná elektroda: platinový drátek (Monokrystaly Turnov, ČR)

Spektrofotometr: Agilent 8353 (Agilent Technologies)

pH metr: Jenway 3510, elektroda: Kombinovaná skleněná elektroda téže firmy

2.3 Pracovní postupy

Teplota měření: laboratorní teplota (24 – 26 °C)

Voltametrie: rychlost polarizace: $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, šířka pulsu: 80 ms, výška pulsu: 50 mV

Spektrofotometrické měření: pro měření stálosti i pro měření reálného vzorku byla použita křemenná kyveta o průměru 1 mm

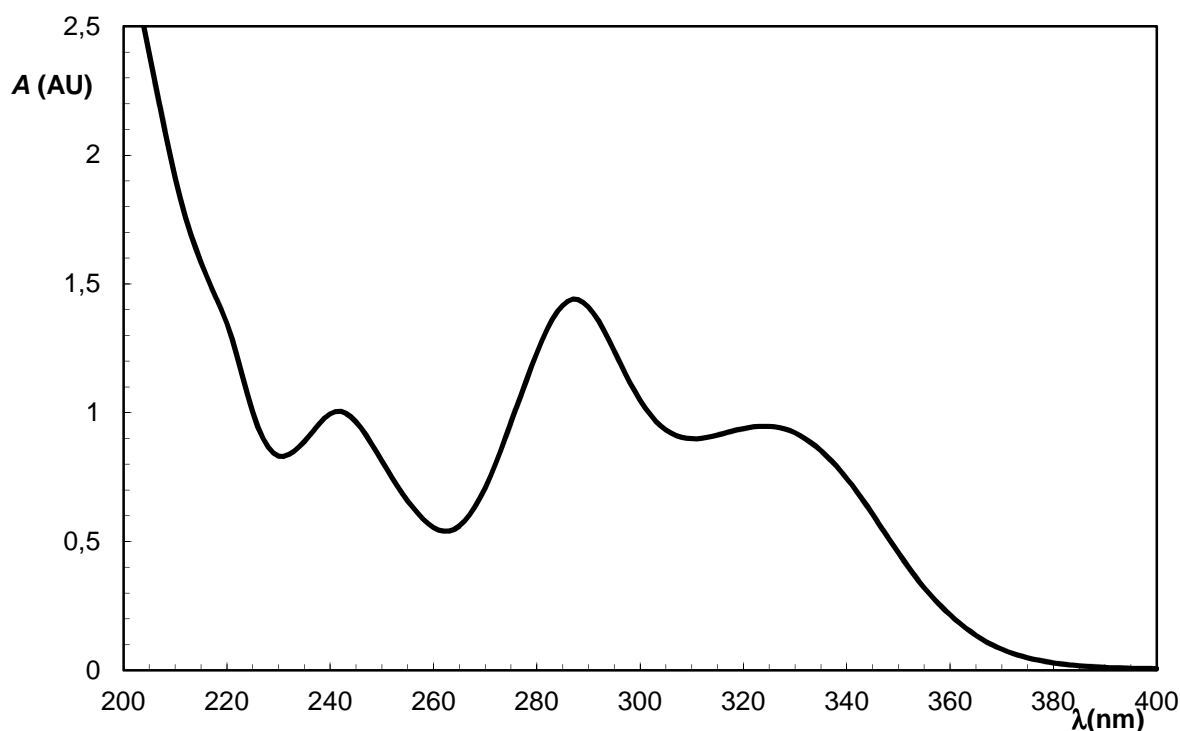
3. Výsledky a diskuse

3.1 Spektrofotometrické měření stálosti

Pro zjištění, zda je zásobní roztok látky stálý na světle, bylo průběžně proměřováno spektrum benzofenonu-3. Zásobní roztok benzofenonu-3 v methanolu byl naředěn 10x methanolem na koncentraci 1×10^{-3} M.

V křemenné kyvetě průměru 1 mm bylo změřeno absorpční spektrum benzofenonu-3 v rozmezí vlnových délek od 190 do 800 nm. Absorpční maximum při vlnové délce 287 nm by se při světelném rozkladu látky posunulo, absorbance by se výrazně změnila nebo by spektrum prošlo jinou patrnou změnou.

K žádné velké změně ale nedošlo, což ukazuje na fakt, že roztok benzofenonu-3 v methanolu je stálý a nepodléhá rozkladu, a to ani při uchovávání roztoku za laboratorní teploty a na světle.



Obr. 3.1 Výřez naměřeného spektra benzofenonu-3 ($c = 1 \times 10^{-3}$ M, křemenná kyveta, $l = 1,01$ mm, 190 – 800 nm)

Tab. 3.1 Změna absorbance $1 \times 10^{-3} \text{M}$ zásobního roztoku benzofenonu-3 v čase

t dny	λ (287 nm)	
	A	%
0	1,340	100,0
12	1,419	105,9
25	1,288	96,1
47	1,441	107,6
225	1,336	99,7

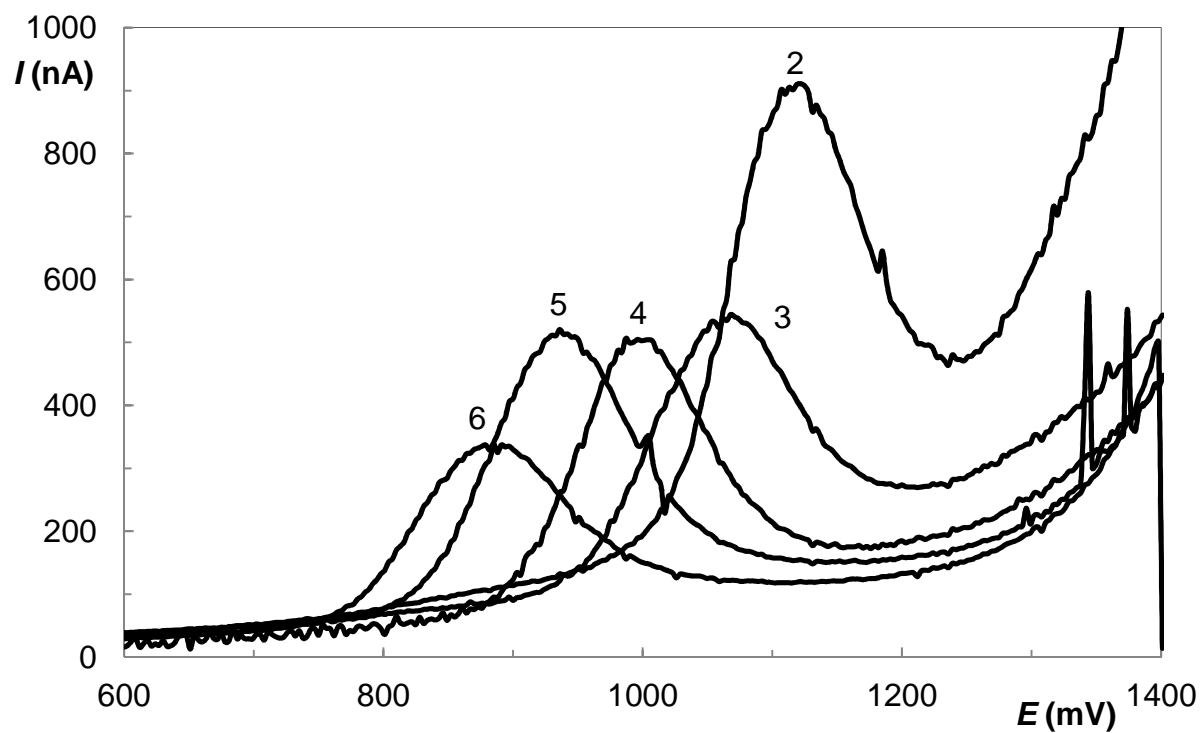
3.2 Optimalizace metody stanovení benzofenonu-3

3.2.1 Vliv pH

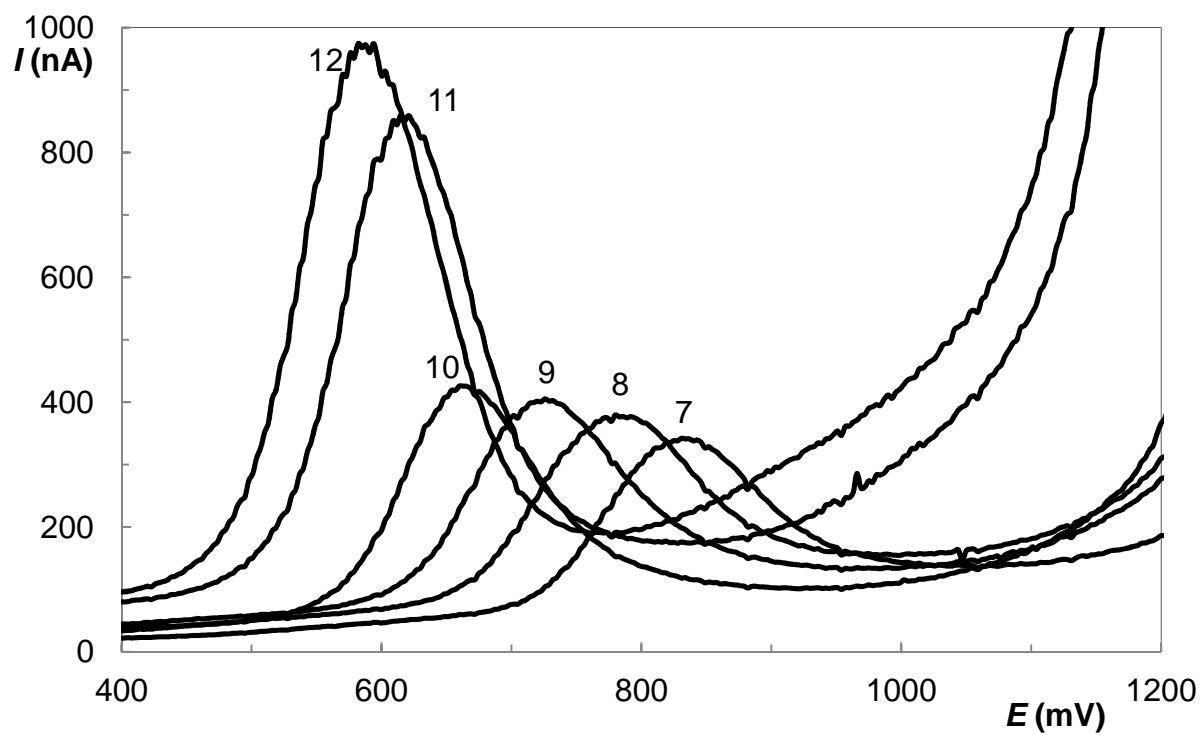
Pro zjištění, při kterém pH by bylo nejlépe měřit, tedy pH s největší odezvou látky, byla vytvořena sada roztoků o různém pH. Rozmezí pH těchto roztoků se pohybovalo od pH 2 až po pH 12.

Roztoky byly připraveny pipetováním 100 μ l zásobního roztoku benzofenonu a doplněny na objem 10 ml BR pufrům o zvoleném pH.

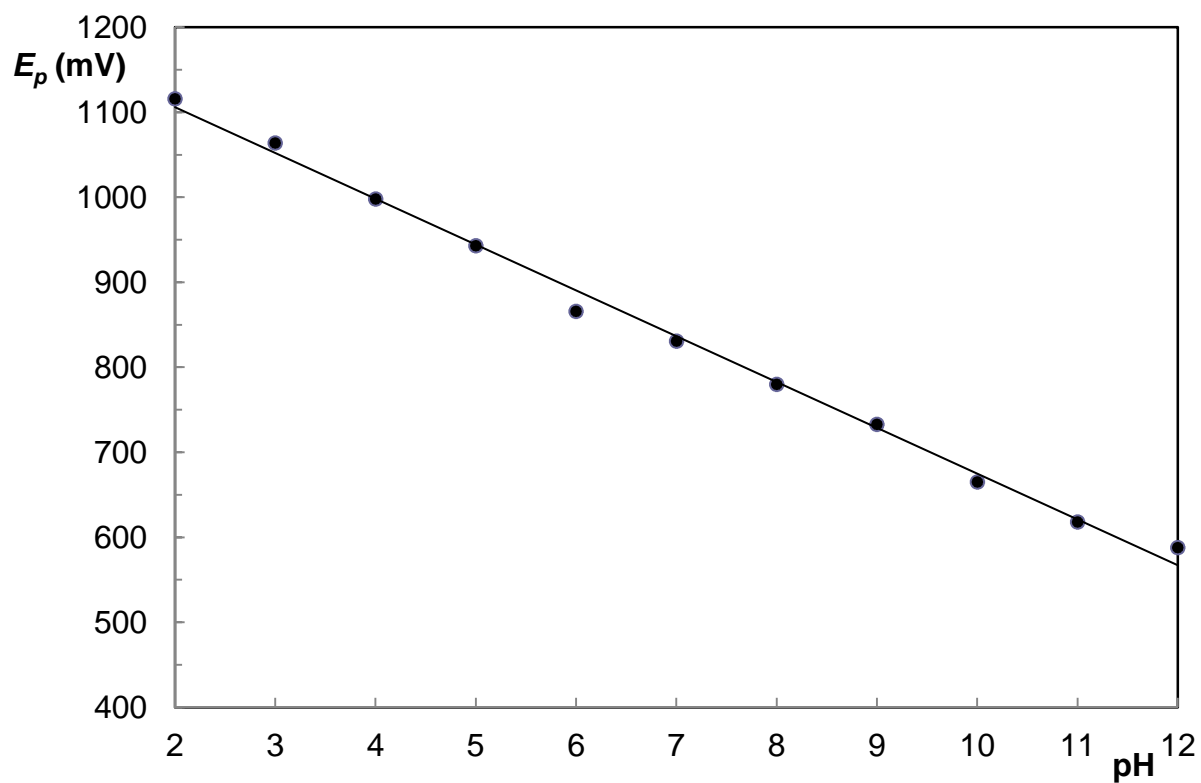
Roztok benzofenonu-3 poskytuje při měření jeden pík, což naznačuje přítomnost jednoho centra elektrochemické aktivity. Potenciál píku se posunuje se změnou pH, což ukazuje na účast protonů při přenosu elektronů. S pH se mění i výška odezvy, která je největší při pH 12. Toto pH bylo zvoleno jako optimální a všechna následující měření proběhla při tomto pH.



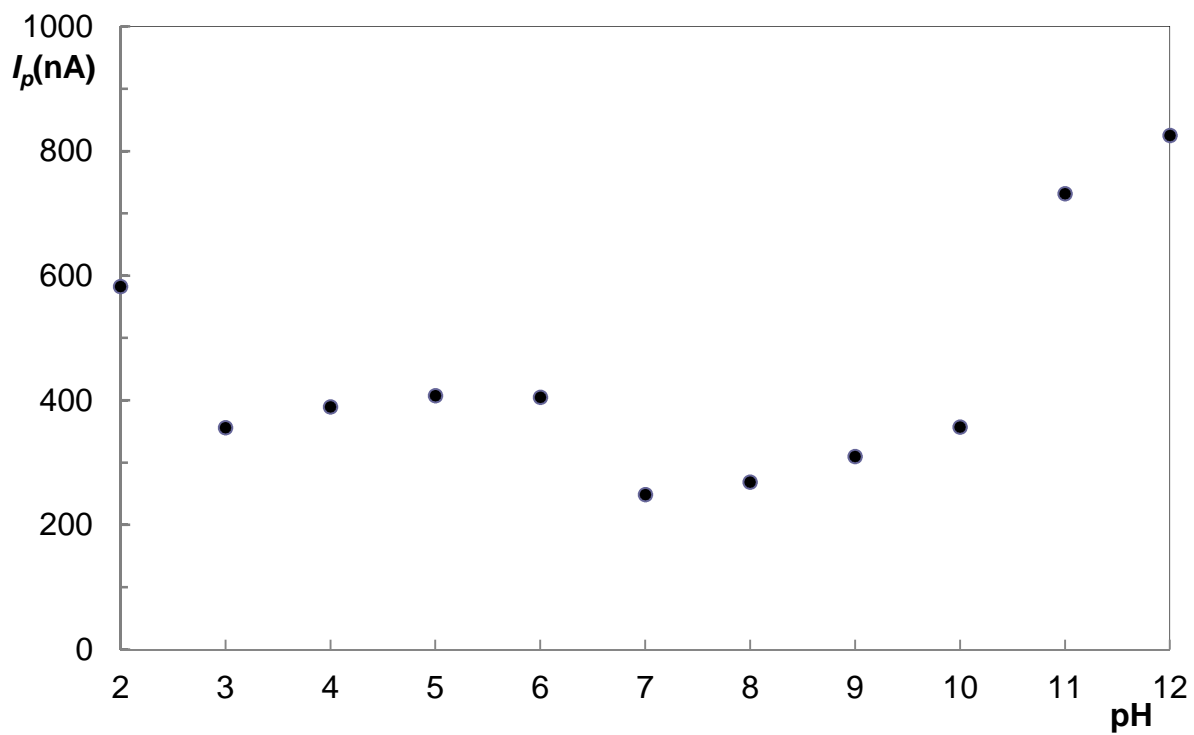
Obr. 3.2 DP voltamogramy benzofenonu-3 v rozmezí pH od 2 do 6 v prostředí BR pufru. Koncentrace vzorku 1×10^{-4} M, parametry metody: rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, výška pulsu 50 mV, šířka pulsu 80 ms



Obr. 3.3 DP voltamogramy benzofenonu-3 v rozmezí pH od 7 do 12 v prostředí BR pufru. Koncentrace vzorku $1 \times 10^{-4} \text{M}$, parametry metody: rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, výška pulsu 50 mV, šířka pulsu 80 ms



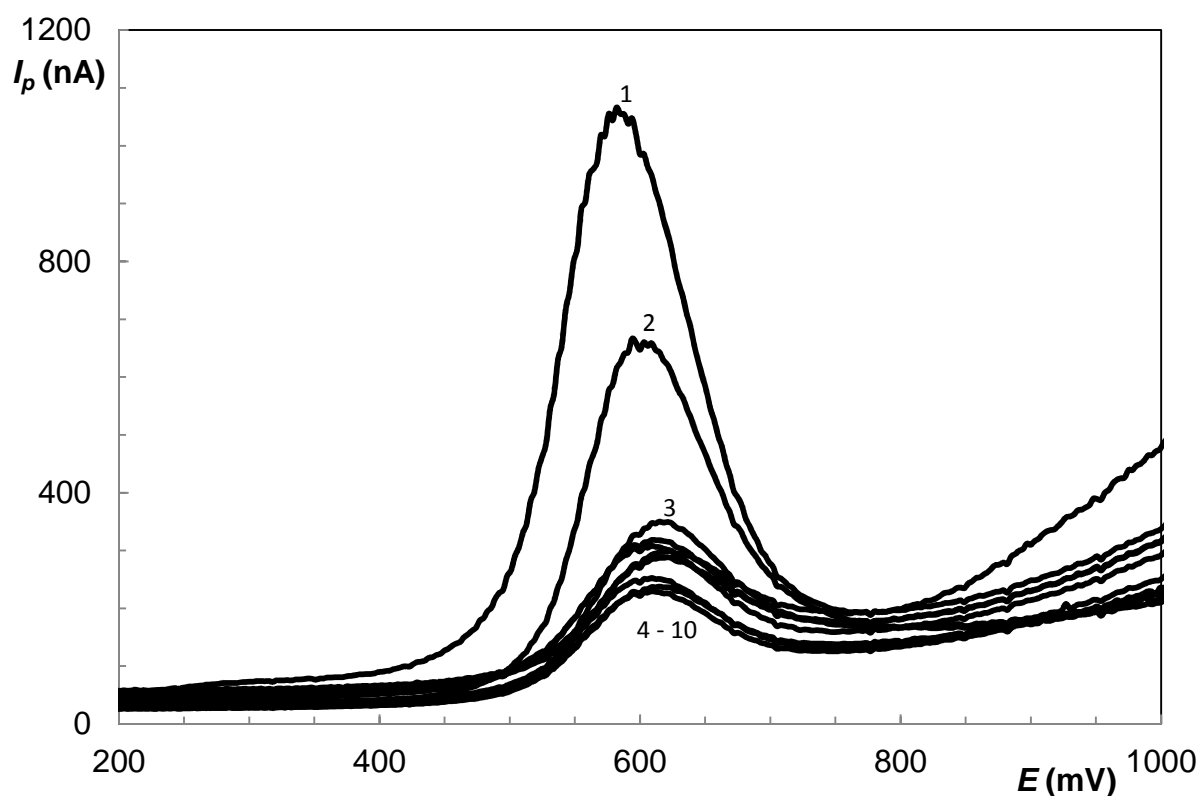
Obr. 3.4 Závislost potenciálu DP voltametrického píku benzofenonu-3 na pH pufru. Koncentrace analytu 1×10^{-4} M, parametry metody: rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, výška pulsu 50 mV, šířka pulsu 80 ms



Obr. 3.5 Závislost proudu píku benzofenonu-3 na pH pufru. Koncentrace vzorku 1×10^{-4} M, parametry metody: rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, výška pulsu 50 mV, šířka pulsu 80 ms

3.2.2 Pasivace pracovní elektrody

Pro zjištění míry pasivace elektrody byla provedena série měření, při které nebyla otírána vrstva použité pasty po skončení měření. Pokud by docházelo k pasivaci, proud píku by poklesl. Proud píku během několika měření znatelně poklesl. Pastu je tedy nutno po každém měření otírat, a tím mechanicky obnovovat pracovní povrch elektrody.



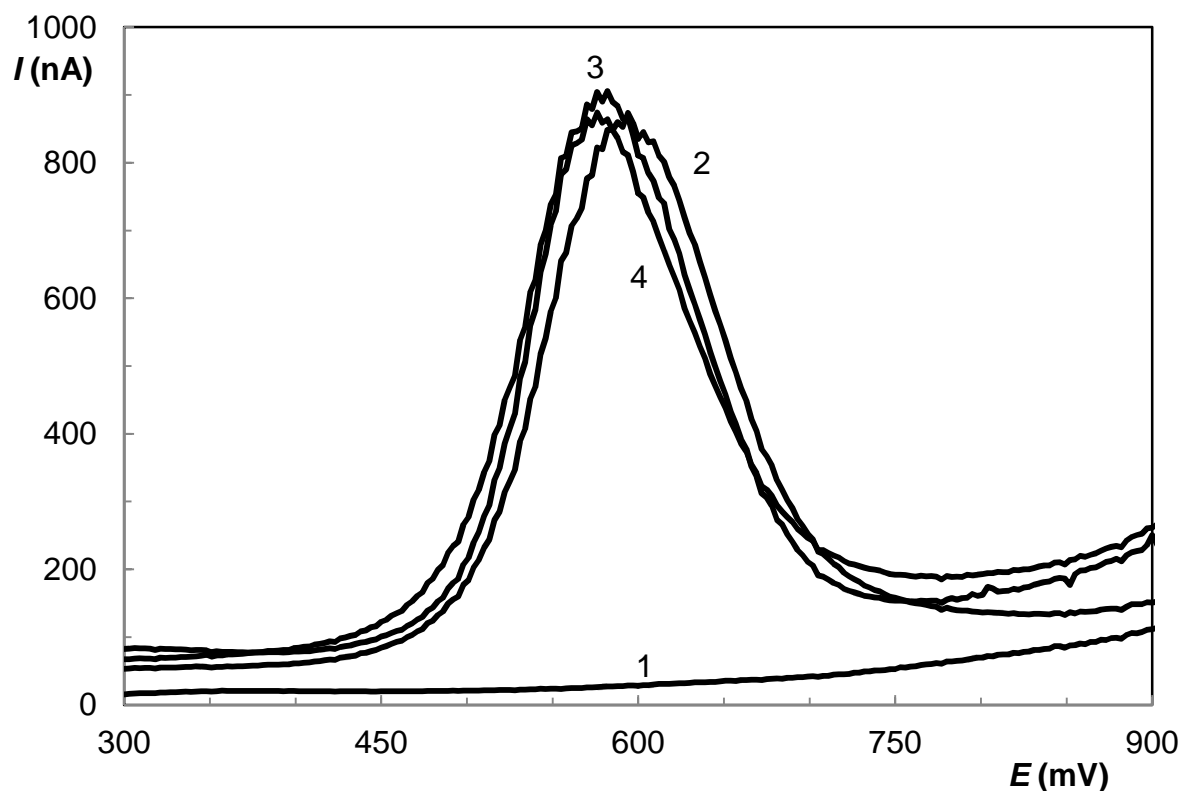
Obr. 3.6 Následné DP voltamogramy benzofenonu-3 v prostředí BR pufru, měřeno bez mechanického obnovování povrchu elektrody. pH 12, CPE elektroda, c vzorku 1×10^{-4} M, parametry metody: rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, výška pulsu 50 mV, šířka pulsu 80 ms. Čísla uvádějí pořadí měřených píků benzofenonu-3. Měření v pořadí od 4 do 10 nelze z obrázku spolehlivě rozlišit.

3.2.3 Vliv množství methanolu na kvalitu měření

Benzofenon-3 je látka ve vodě téměř nerozpustná a lze tedy očekávat, že jakákoli analýza bude muset probíhat v prostředí obsahujícím větší či menší množství methanolu či jiného organického rozpouštědla a vody. Methanol bude zajišťovat rozpuštění analytu v tomto směsném prostředí. Zvýšený obsah methanolu může mít ovšem negativní důsledky na kvalitu měření, a proto je důležité zjistit, jaký vliv má jeho obsah na výšku píku a jiné parametry měření.

Pro zjištění vlivu methanolu byla provedena série měření vzorku analytu ve směsném vodně-methanolicím prostředí o různém obsahu methanolu.

Z obrázku 3.7 je patrné, že methanol ve studovaném rozmezí nemá vliv na výšku píku benzofenonu-3, a to až do obsahu 50 % (V/V).



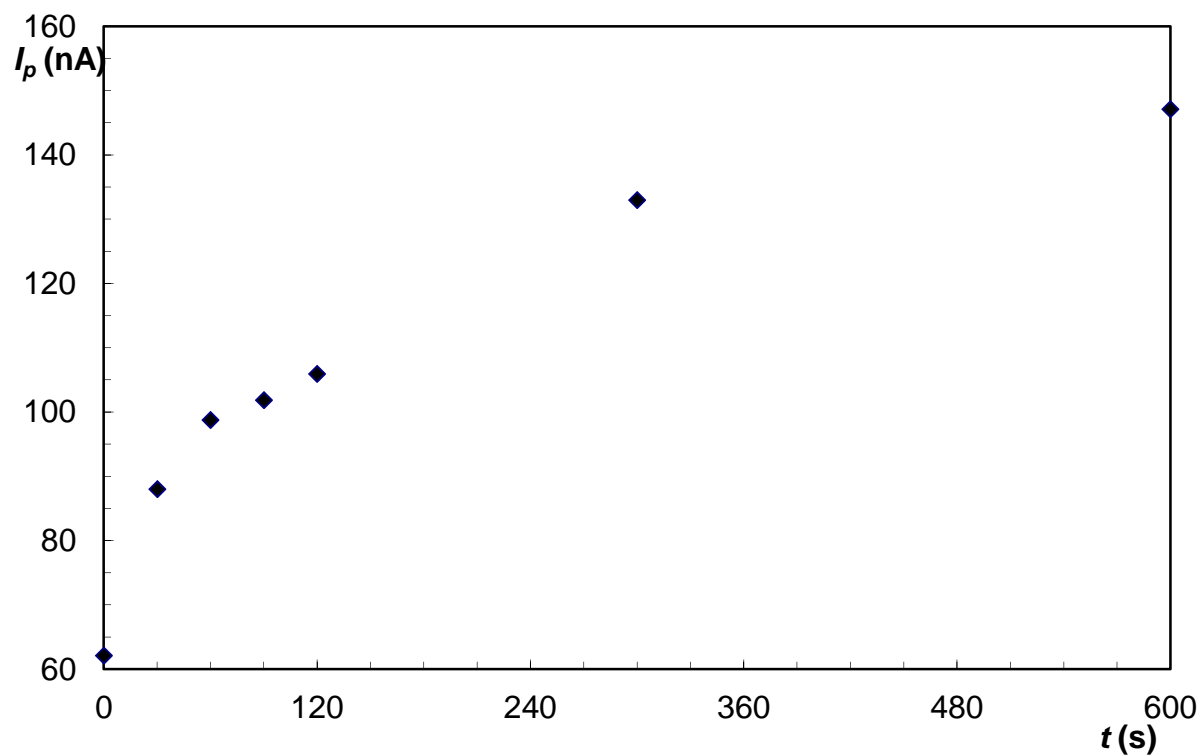
Obr. 3.7 Vybrané DP voltamogramy 1×10^{-4} M benzofenonu-3 ukazující vliv methanolu na průběh měření v prostředí BR pufru o pH 12 a methanolu. Křivka (1) ukazuje DP voltamogram základního elektrolytu, (2) DP voltamogram v prostředí s obsahem 1 % methanolu (V/V), (3) DP voltamogram v prostředí 10 % methanolu (V/V), (4) DP voltamogram v prostředí 50 % methanolu (V/V). parametry metody: rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, výška pulsu 50 mV, šířka pulsu 80 ms

3.2.4 Vliv doby a potenciálu akumulace

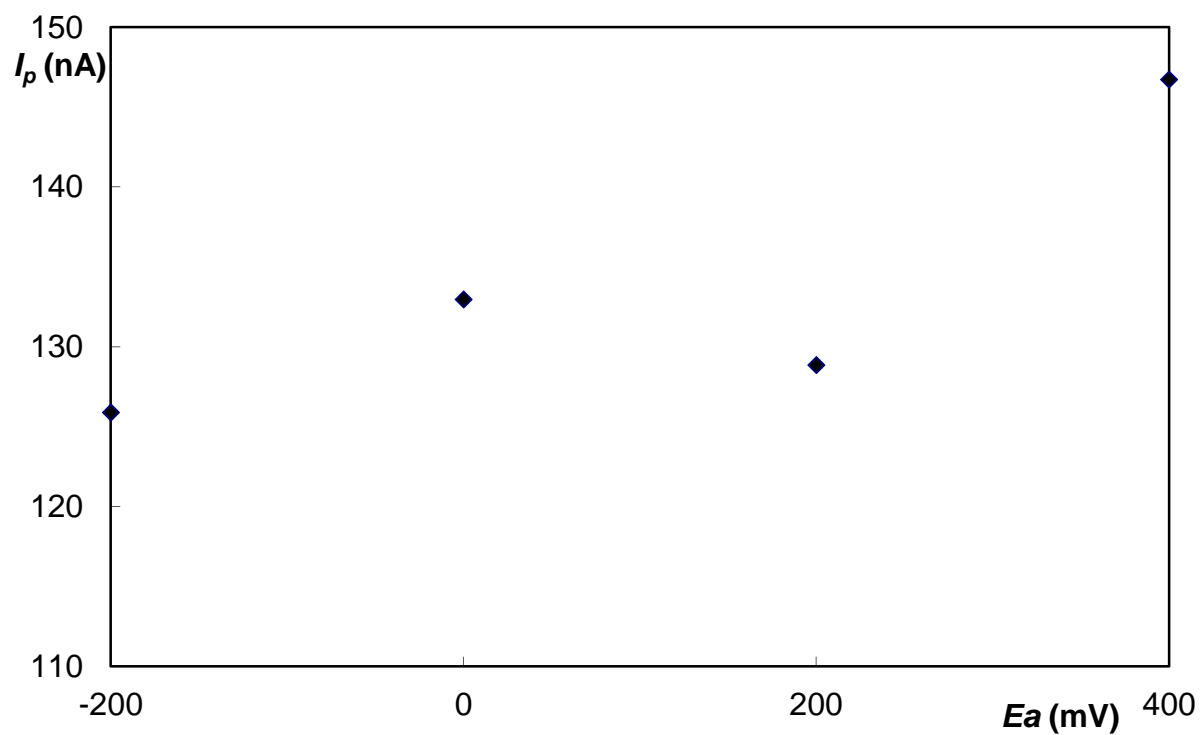
Pro zvýšení citlivosti metody se používá akumulace analytu na povrch elektrody. Tímto postupem je při samotném měření v blízkosti elektrody mnohem vyšší koncentrace analytu, než by byla při měření bez akumulace. Akumulace může probíhat různě dlouhou dobu a za různého akumulčního potenciálu. Vhodnou volbou těchto parametrů lze mnohonásobně zvýšit citlivost měření.

Nejprve byla na roztoku o koncentraci 8×10^{-6} M proměřena změna výšky signálu v závislosti na době akumulace. Doby akumulace byly 30, 60, 90, 120, 300 a 600 sekund. Akumulace po dobu 300 sekund byla zvolena jako vhodný kompromis mezi mírou zvýšení signálu a prodloužením doby měření.

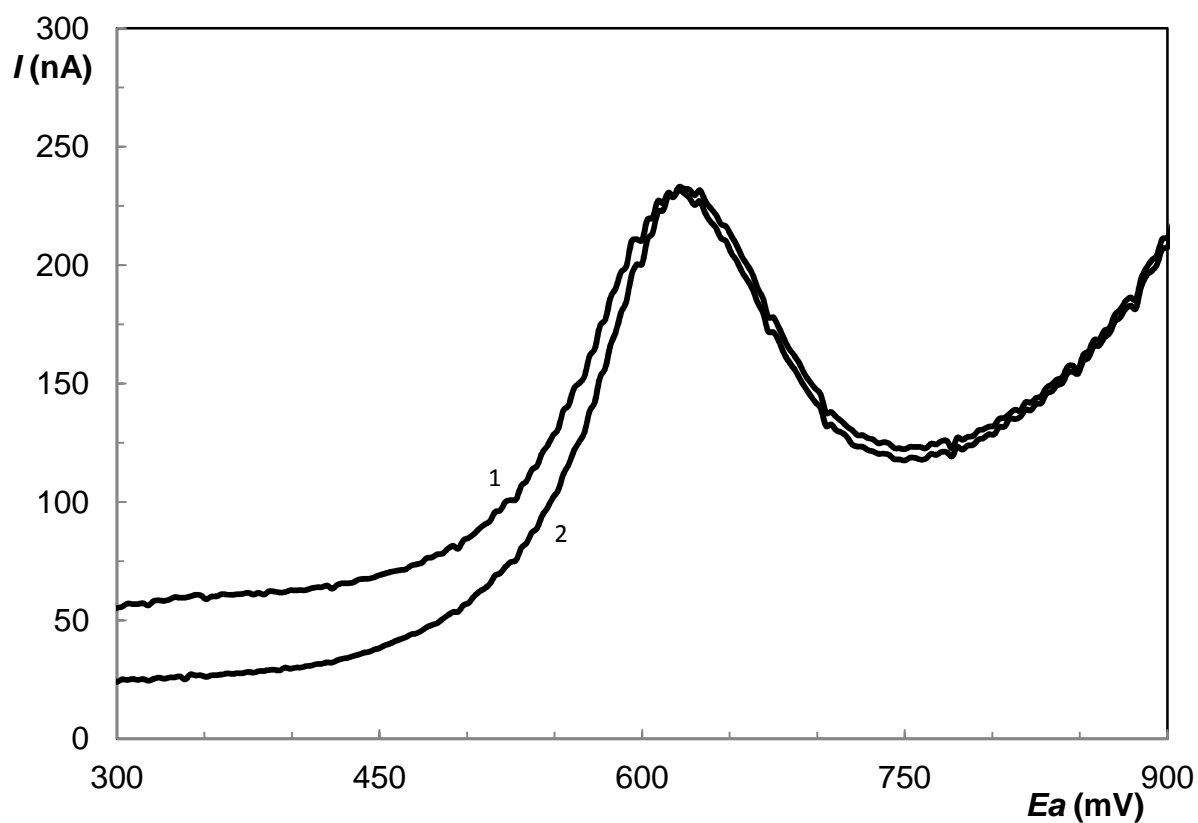
Při 5–minutové akumulaci byla následně změřena změna proudu píku benzofenonu-3 v závislosti na akumulčním potenciálu. Vybrané potenciály byly: -200 , 0 , $+200$ a $+400$ mV. Při změně potenciálu nebyl sice pozorován výrazný nárůst signálu, ale akumulace při $+400$ mV přinesla výhodný vedlejší efekt a sice fakt, že základní linie voltamogramu ležela níže, než při akumulaci při jiném potenciálu, čímž umožnila lepší vyhodnocování voltamogramů.



Obr. 3.8 Závislost výšky DP voltametrického píku benzofenonu-3 při pH 12 v prostředí BR pufru na době akumulace. Koncentrace 8×10^{-6} M, parametry metody: rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, výška pulsu 50 mV, šířka pulsu 80 ms



Obr. 3.9 Závislost výšky DP voltametrického píku benzofenonu-3 při pH 12 v prostředí BR pufru na potenciálu akumulace. Koncentrace analytu 8×10^{-6} M, parametry metody: rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, výška pulsu 50 mV, šířka pulsu 80 ms



Obr. 3.10 Srovnání DP voltamogramů benzofenonu-3 při akumulaci s akumulacním potenciálem 0 mV (1) a +400 mV (2) při pH 12 v prostředí BR pufru. Koncentrace analytu 8×10^{-6} M, doba akumulace 300 s, parametry metody: rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, výška pulsu 50 mV, šířka pulsu 80 ms,

3.3 Kalibrační křivka

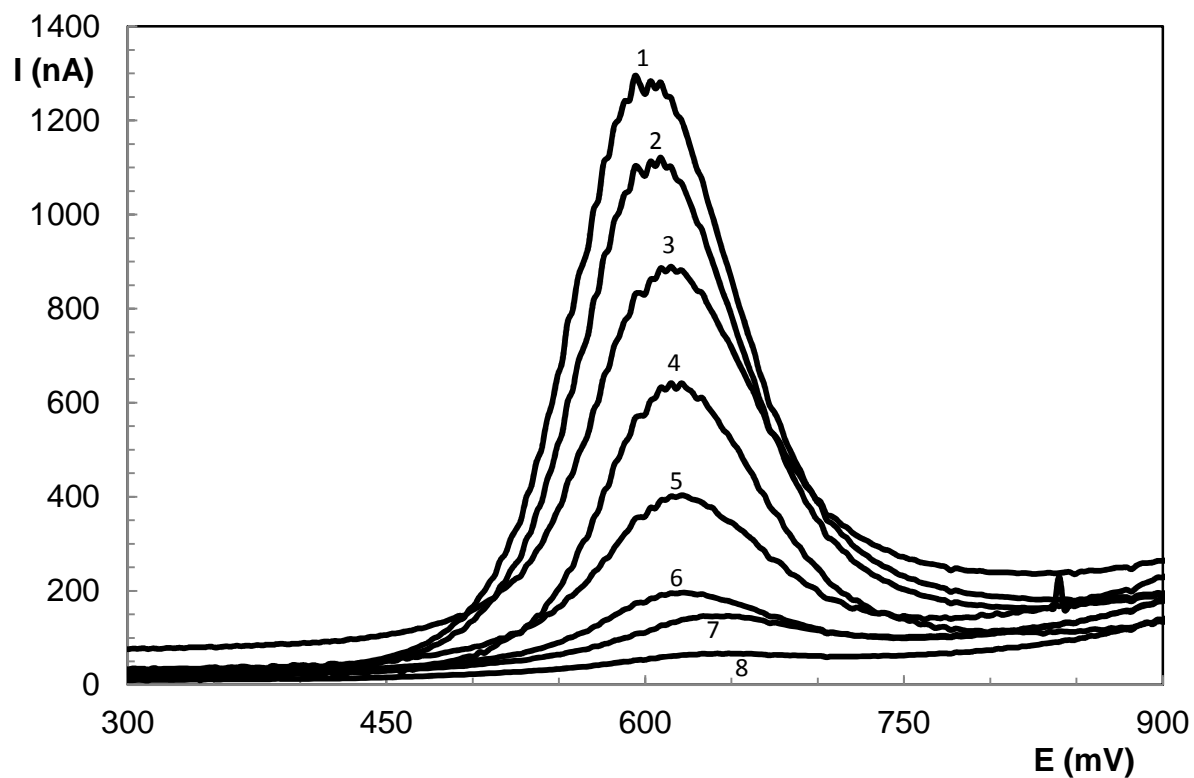
3.3.1 DP voltametrie v deionizované vodě

Za výše určených optimálních podmínek byla proměřena kalibrační závislost pro DP voltametrické stanovení benzofenonu-3. Pro sestavení kalibrační závislosti byla vytvořena řada roztoků o koncentraci od koncentrace 1×10^{-4} M až po bod, kde již nebude možné spolehlivě určit výšku píku. Tímto bodem se stala koncentrace 1×10^{-6} M. Měření probíhalo v prostředí BR pufru o pH 12. Před samotným měřením byla provedena akumulace analytu po dobu 5 minut, za použití akumulačního potenciálu +400 mV.

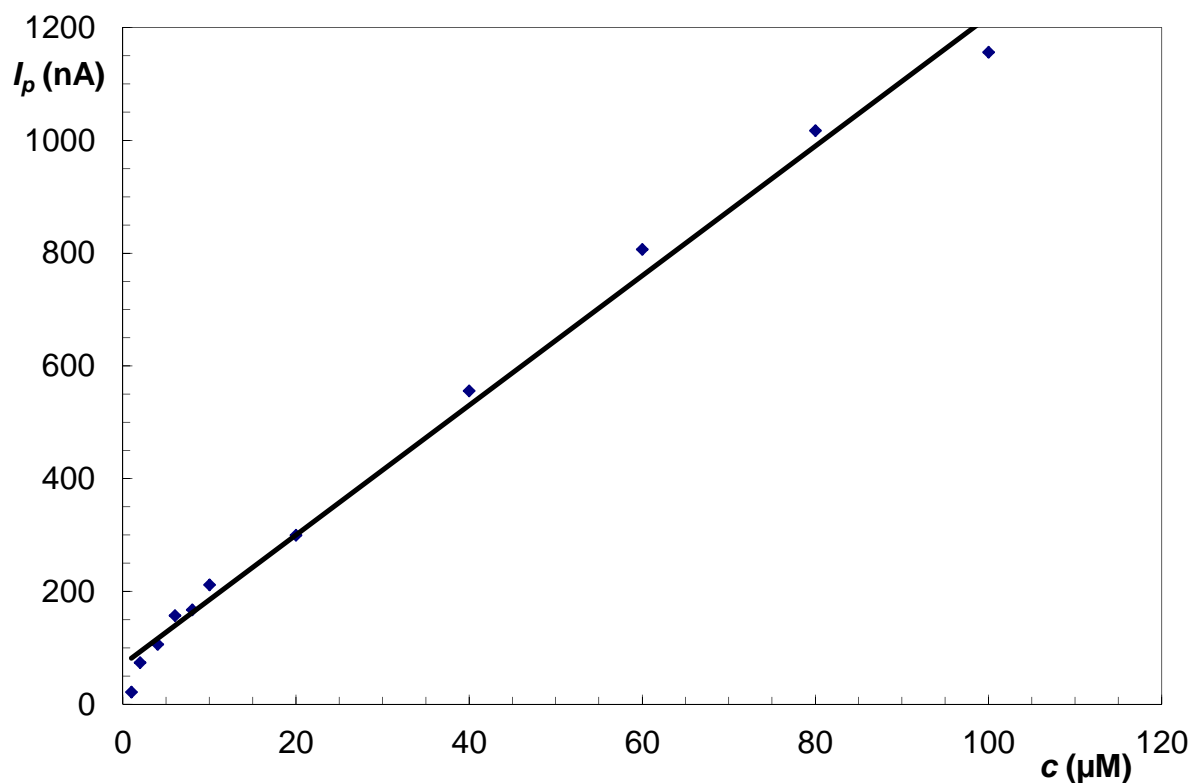
Na obrázku 3.11 jsou uvedeny vybrané voltamogramy. Na obr. 3.12 je uvedena z těchto voltamogramů sestavená kalibrační závislost. V tabulce 3.1 jsou uvedeny parametry popisující průběh kalibrační závislosti.

Mez detekce metody byla zjištěna opakovaným měřením vzorku o nejnižší koncentraci. Koncentrace tohoto vzorku byla 1×10^{-6} M, měření proběhlo v prostředí BR pufru o pH 12, akumulace trvala 5 minut, akumulační potenciál byl +400 mV. Dále bylo provedeno i kalibrační měření bez použití akumulace

Limit detekce ukázal, že koncentrace 1×10^{-6} M je již na hranici stanovitelnosti s vysokou mírou šumu.



Obr. 3.11 Vybrané DP voltamogramy měřené v prostředí BR pufru o pH 12, doba akumulace 300s, potenciál akumulace +400 mV, parametry metody: rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, výška pulsu 50 mV, šířka pulsu 80 ms. Koncentrace analytu: (1) $1 \times 10^{-4} \text{ M}$, (2) $8 \times 10^{-5} \text{ M}$, (3) $6 \times 10^{-5} \text{ M}$, (4) $4 \times 10^{-5} \text{ M}$, (5) $2 \times 10^{-5} \text{ M}$, (6) $6 \times 10^{-6} \text{ M}$, (7) $2 \times 10^{-6} \text{ M}$, (8) $1 \times 10^{-6} \text{ M}$



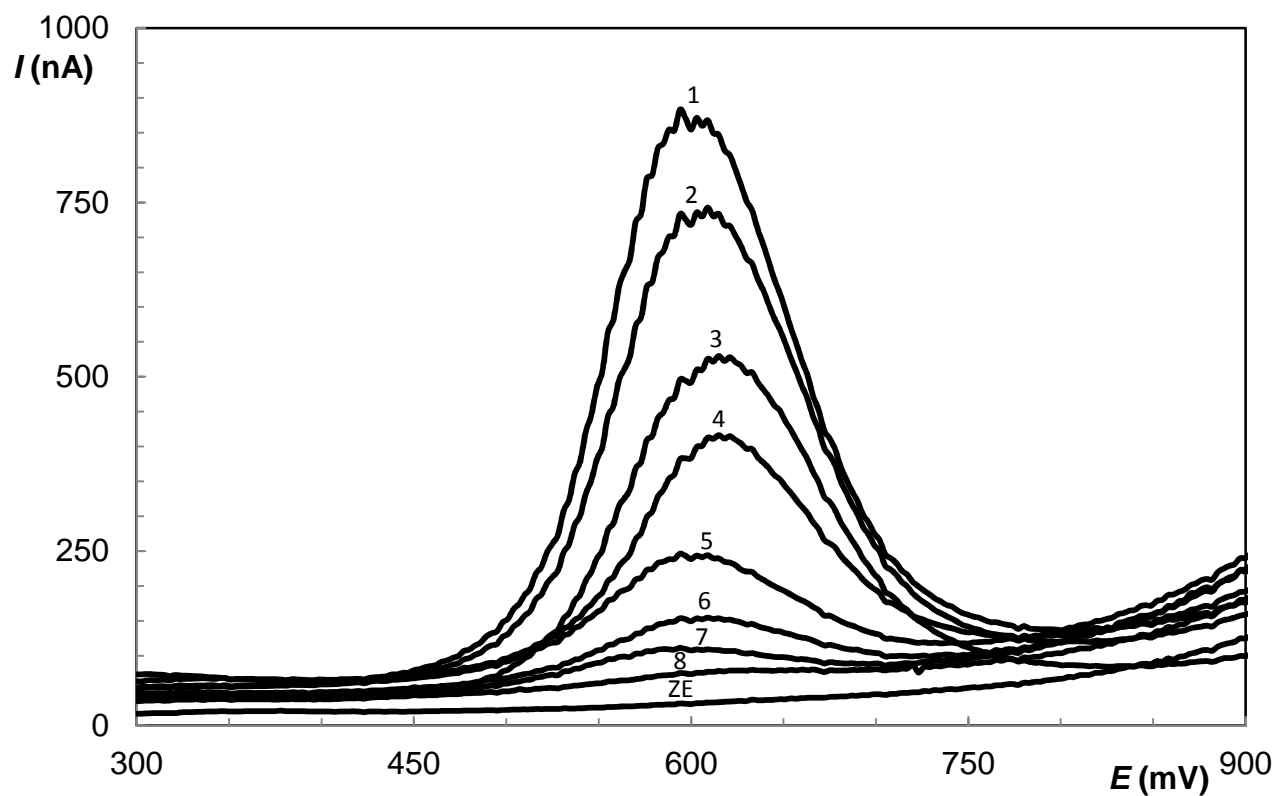
Obr. 3.12 Kalibrační závislost benzofenonu-3 měřená DP voltametrií v prostředí BR pufru o pH 12, doba akumulace 300 s. potenciál akumulace +400 mV, parametry metody: rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, výška pulsu 50 mV, šířka pulsu 80 ms

Tab. 3.1 Parametry naměřené kalibrační závislosti benzofenonu-3. Měřeno DP voltametrií v prostředí BR pufru o pH 12, doba akumulace 300 s, potenciál akumulace 400 mV, parametry metody: rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, výška pulsu 50 mV, šířka pulsu 80 ms

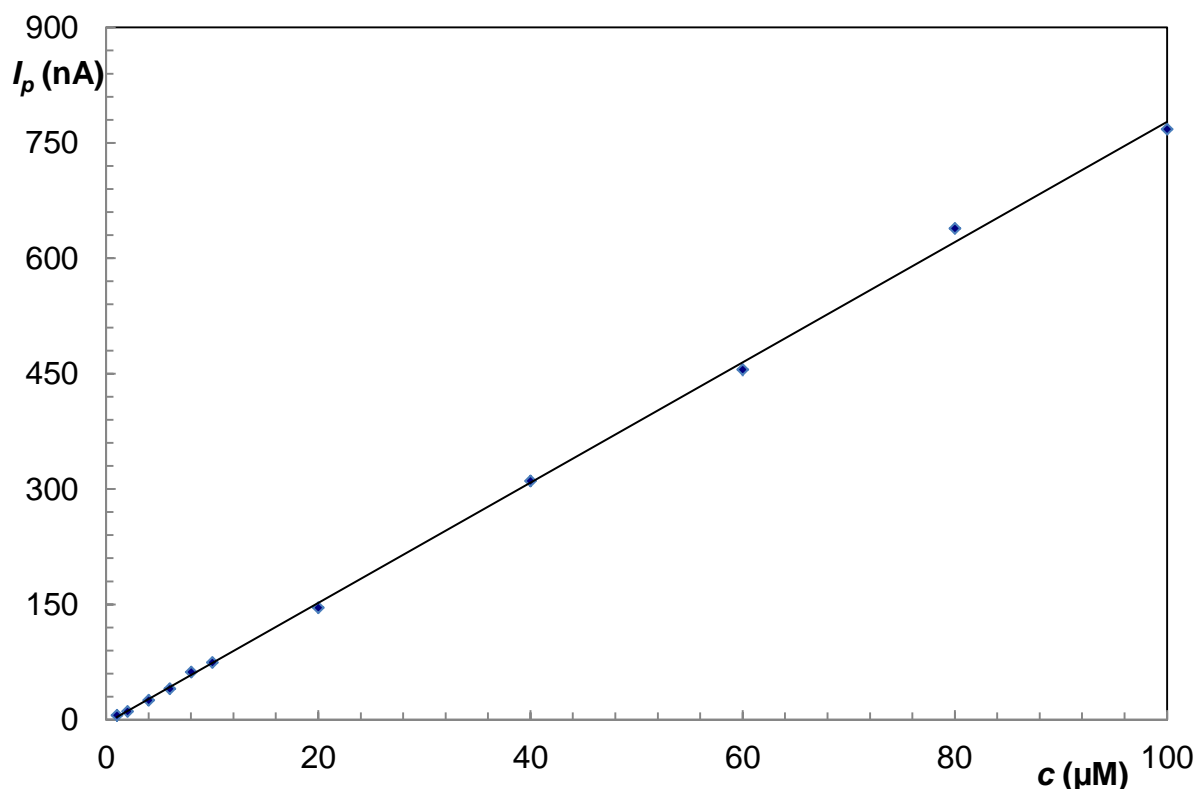
c	směrnice	úsek	R^2	σ_n	LOD
$\text{mol}\times\text{dm}^{-3}$	$\text{nA}\times\mu\text{mol}^{-1}\times\text{dm}^3$	nA		nA	$\text{mol}\times\text{dm}^{-3}$
1×10^{-6} 1×10^{-4}	- 11,5	69,9	0,9922	1,82	6×10^{-7}

R^2 koeficient determinace, σ_n směrodatná odchylka

Pro srovnání byla vyhodnocena i kalibrační přímka pro měření, při kterém nedocházelo k akumulaci analytu. Zde byl limit detekce počítán ze směrnice kalibrační přímky.



Obr 3.13 Vybrané DP voltamogramy měřené v prostředí BR pufru o pH 12, parametry metody: rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, výška pulsu 50 mV, šířka pulsu 80 ms. Koncentrace analytu: (1) $1 \times 10^{-4} \text{ M}$, (2) $8 \times 10^{-5} \text{ M}$, (3) $6 \times 10^{-5} \text{ M}$, (4) $4 \times 10^{-5} \text{ M}$, (5) $2 \times 10^{-5} \text{ M}$, (6) $1 \times 10^{-5} \text{ M}$, (7) $6 \times 10^{-6} \text{ M}$, (8) $2 \times 10^{-6} \text{ M}$. (ZE) základní elektrolyt



Obr. 3.14 Kalibrační přímka benzofenonu-3 měřená DP voltametrií v prostředí BR pufru o pH 12, parametry metody: rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, výška pulsu 50 mV, šířka pulsu 80 ms

Tab. 3.2 Parametry DP voltametrické kalibrační závislosti benzofenonu-3, směrodatná odchylka měření nejnižší koncentrace a limit detekce. Měřeno v prostředí BR pufru o pH 12, doba akumulace 300 s, potenciál akumulace +400 mV, parametry metody: rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, výška pulsu 50 mV, šířka pulsu 80 ms

c	směrnice	úsek	R^2	$\sigma_{y,x}$	LOD
$\text{mol}\times\text{dm}^{-3}$	$\frac{\text{nA}}{\text{dm}^{-3}}$	$\frac{\mu\text{mol}^{-1}}{\text{nA}}$		nA	$\text{mol}\times\text{dm}^{-3}$
1×10^{-6}	-				
1×10^{-4}	7,8	-4,3	0,9993	7,883	$3,6\times 10^{-6}$

R^2 koeficient determinace, $\sigma_{y,x}$ směrodatná odchylka

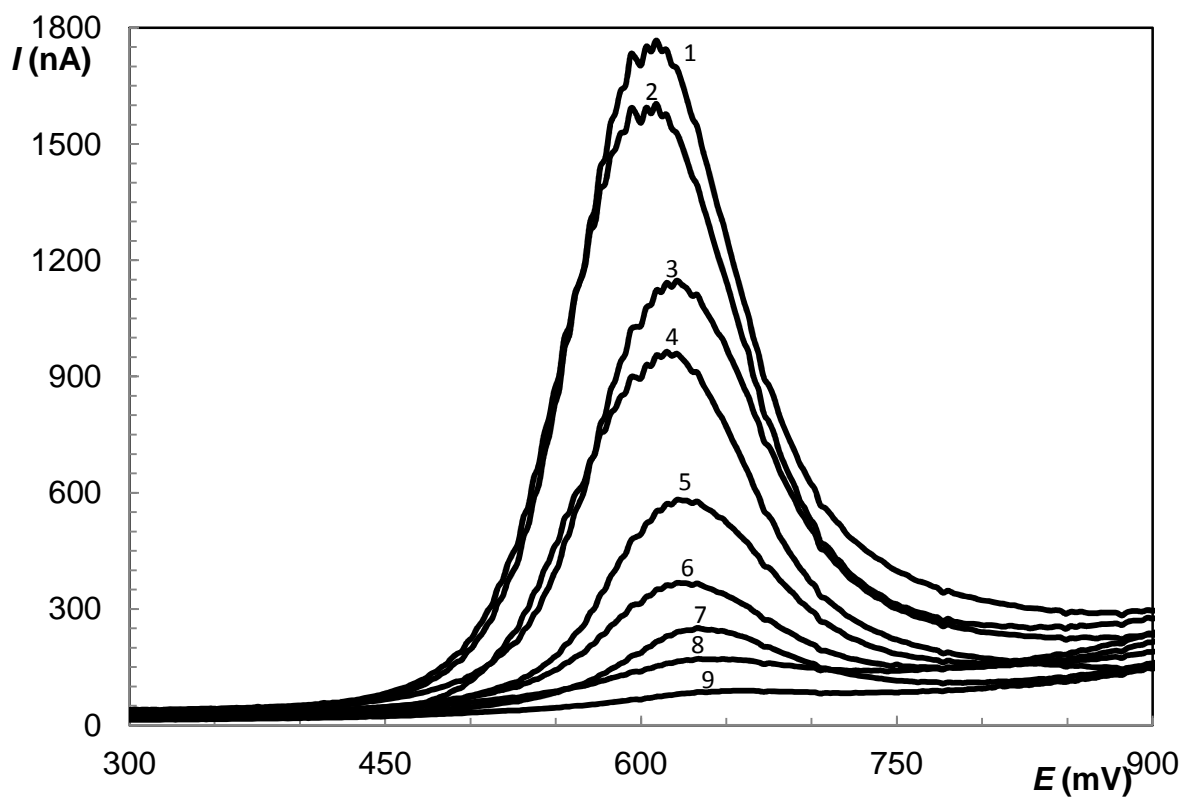
3.3.2 DP voltametrie v pitné vodě

Pro změření kalibrační přímky benzofenonu-3 v pitné vodě z vodovodního kohoutku byly zásobní roztoky vytvořeny tak, že k 5 ml pitné vody byl přidán vzorek benzofenonu-3 ze zásobního roztoku a tato směs byla poté doplněna do 10 ml BR pufrům o pH 12. Tyto kalibrační roztoky byly poté proměřeny na CPE elektrodě, s dobou akumulace 300 s a potenciálem akumulace +400 mV.

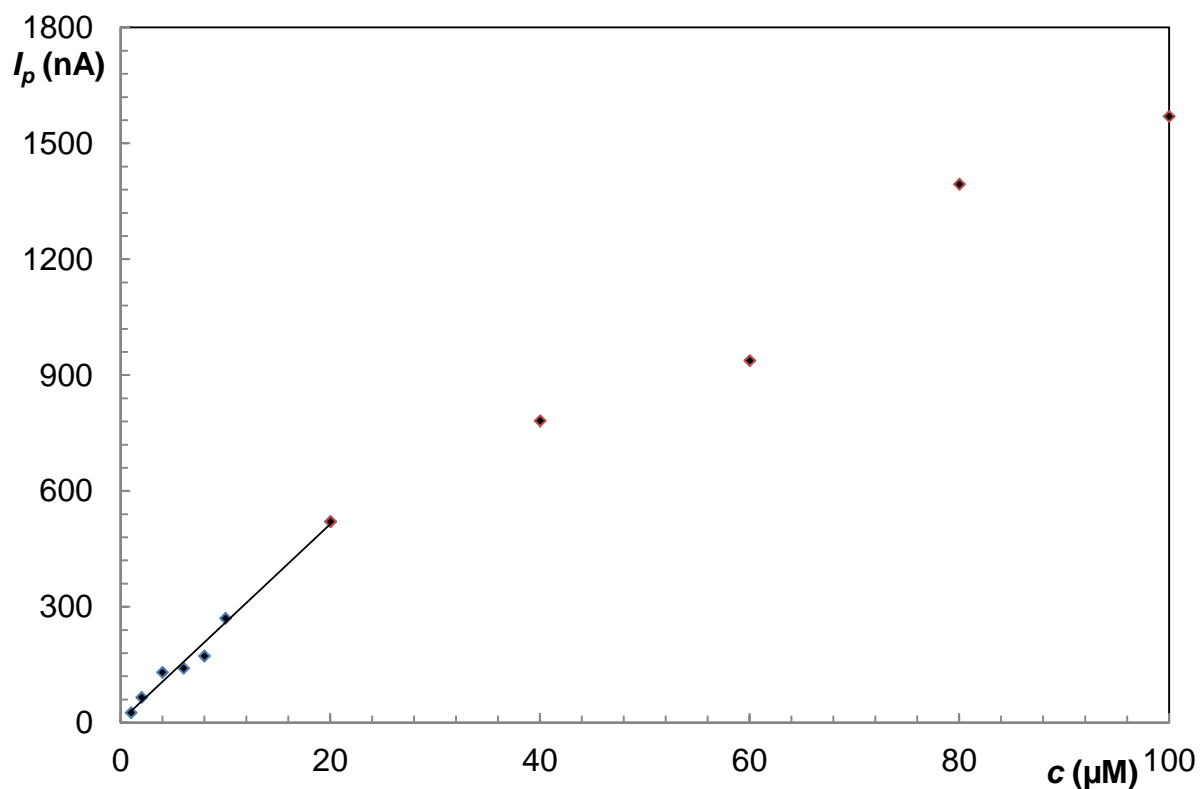
Na obrázku 3.15 jsou znázorněny vybrané křivky a na obrázku 3.16 vytvořená kalibrační přímka.

Ve vzorku pitné vody docházelo nejspíše k interakci analytu s maticí, jelikož lineární dynamický rozsah kalibrace je velmi nízký. Je také možné, že se zde více ukazuje nevhodnost akumulace pro měření vzorků s vysokou koncentrací analytu.

Limit detekce byl spočten jako 10-násobek směrodatné odchylky vzorků o nejnižší koncentraci.



Obr. 3.15 Vybrané DP voltamogramy měřené v prostředí BR pufru o pH 12 s příměsí vody z vodovodu, doba akumulace 300 s, potenciál akumulace 400 mV, parametry metody: rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, výška pulsu 50 mV, šířka pulsu 80 ms. Koncentrace analytu: (1) 1×10^{-4} M, (2) 8×10^{-5} M, (3) 4×10^{-5} M, (4) 6×10^{-5} M, (5) 2×10^{-5} M, (6) 1×10^{-5} M, (7) 8×10^{-6} M, (8) 2×10^{-6} M, (9) 1×10^{-6} M.



Obr. 3.16 Kalibrační přímka benzofenonu-3 měřená DP voltametrií v prostředí BR pufru o pH 12 a pitné vody, doba akumulace 300 s, potenciál akumulace +400 mV, parametry metody: rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, výška pulsu 50 mV, šířka pulsu 80 ms

Tab. 3.3 Parametry naměřené kalibrační závislosti benzofenonu-3, směrodatná odchylka měření nejnižší koncentrace a limit detekce. Měřeno DP voltametrií v prostředí BR pufru o pH 12 a pitné vody, doba akumulace 300 s, potenciál akumulace +400 mV, parametry metody: rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, výška pulsu 50 mV, šířka pulsu 80 ms

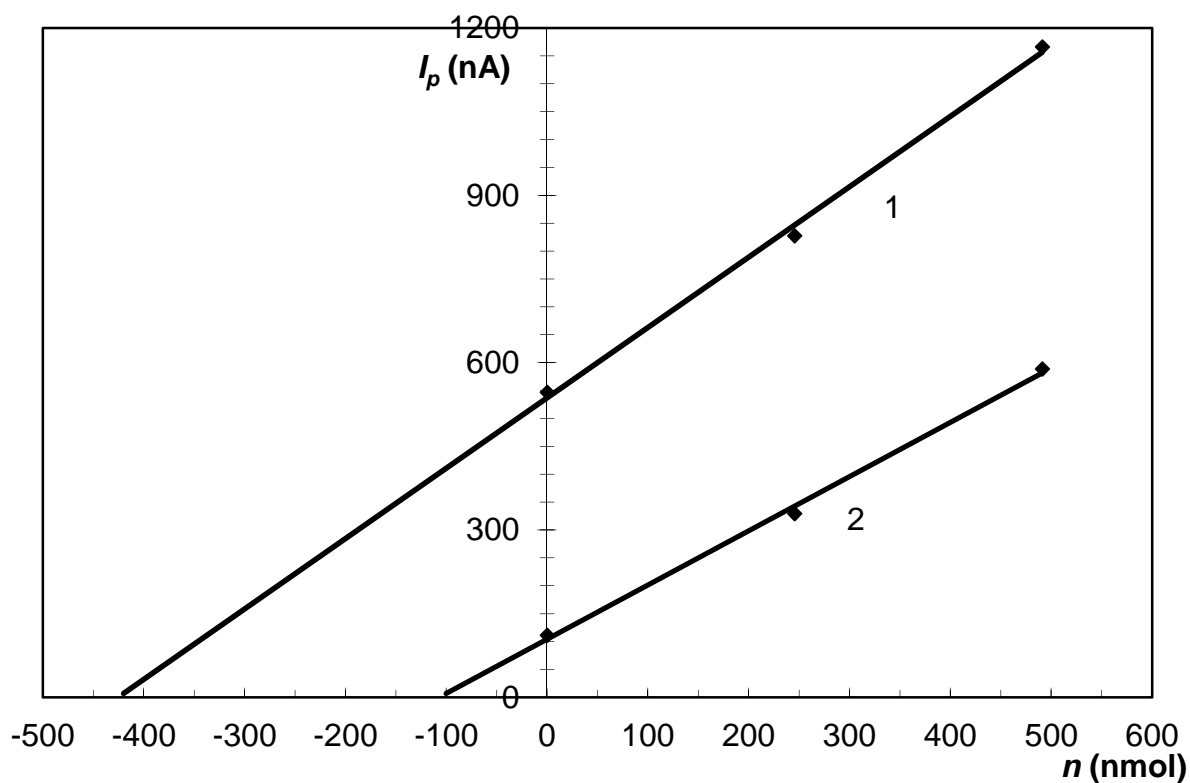
c	směrnice	úsek	R^2	σ_n	LOD
$\text{mol}\times\text{dm}^{-3}$	$\frac{\text{nA}}{\mu\text{mol}^{-1}}$	$\frac{\text{nA}}{\text{dm}^3}$		nA	$\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$
1×10^{-6}	-	25,5	0,9856	1,814	$5,5\times 10^{-7}$
1×10^{-4}		4,2			

R^2 koeficient determinace, σ_n směrodatná odchylka

3.4 Stanovení v reálném vzorku

Jako reálný vzorek byla zvolena voda po holení Adidas Intense Touch. Vzorek nebyl nijak chemicky upravován, byl pouze naředěn 200x BR pufrem o pH 12 a poté změřen metodou standardního přídávku.

Do odměrné baňky bylo napipetováno 50 μl vody po holení, baňka byla poté doplněna na objem 10 ml BR pufrem o pH 12. Zásobní roztok benzofenonu-3 byl naředěn na koncentraci 5×10^{-3} M a z tohoto roztoku bylo poté pipetováno dvakrát 49,1 μl jako dvou standardních přídávků. Standardní přídavek byl přidáván dvakrát pro zvýšení přesnosti měření. Na obrázku 3.17 je vidět průběh měření metodou standardního přídávku s akumulací a bez akumulace.



Obr. 3.17 Závislost výšky DP voltametrického píku na přidaném látkovém množství benzofenonu-3 do měřeného roztoku. Linie 1 znázorňuje měření s použitím akumulace, linie 2 měření bez akumulace.

Tab. 3.4 Vypočtený obsah benzofenonu-3 v reálném vzorku dle výpočtu z rovnice standardního přídávku

Metoda	c benzofenonu ve vzorku $\text{mol} \times \text{dm}^{-3}$	w benzofenonu ve vzorku %
Akumulace	$8,513 \times 10^{-3}$	0,194
Bez akumulace	$2,141 \times 10^{-3}$	0,0489

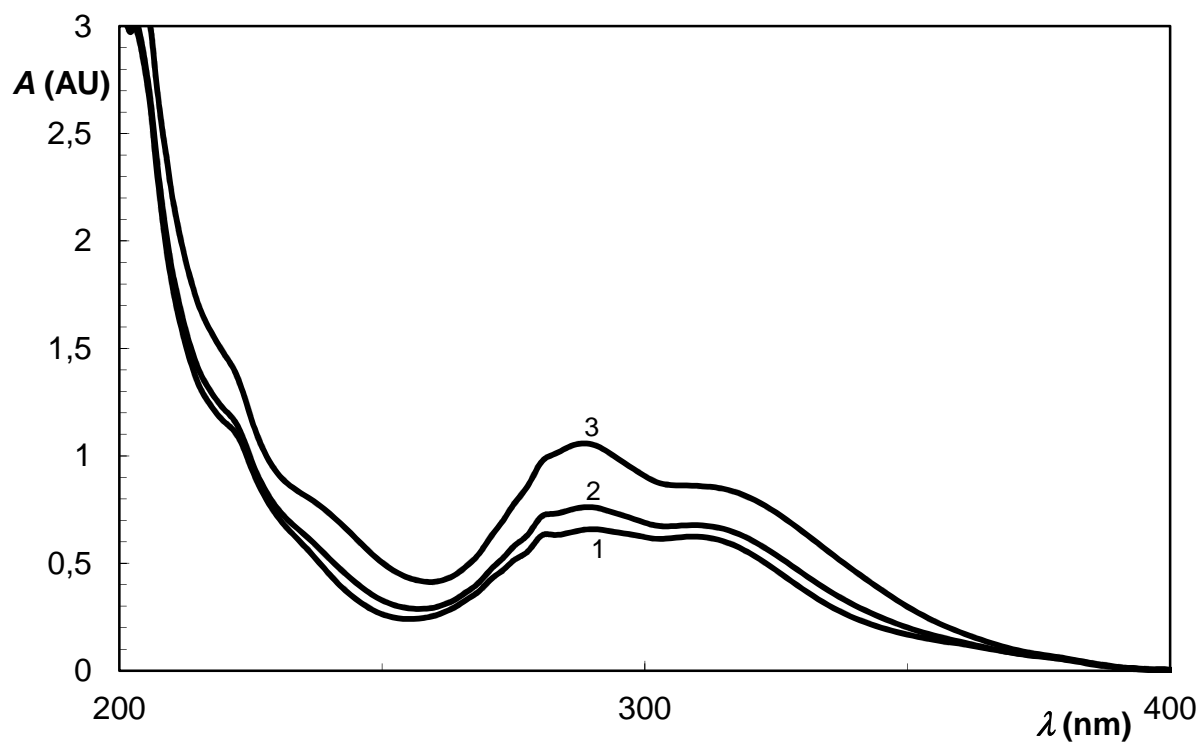
Získané výsledky se velmi významně liší. Důvod tohoto rozdílu nebyl již v této BP odhalen a bude mu věnována pozornost v budoucnu.

3.5 Spektrofotometrické stanovení benzofenonu-3 v reálném vzorku

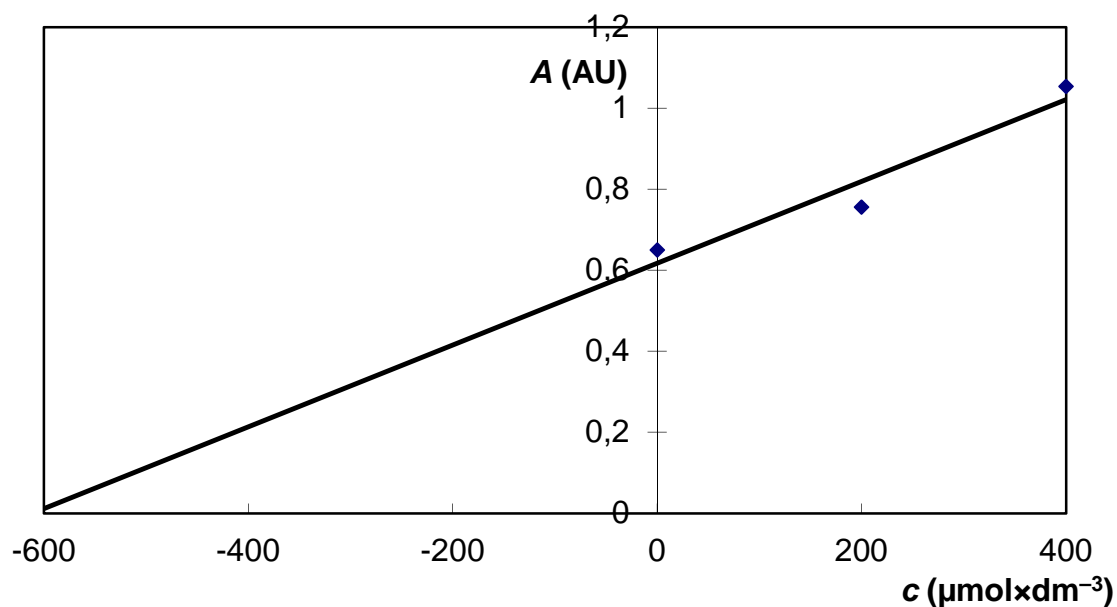
Reálný vzorek byl dále změřen metodou standardního přídávku s použitím spektrofotometrického stanovení v kyvetě o průměru 1 mm.. Pro tento účel byly připraveny 3 roztoky o objemu 5 ml. Všechny roztoky obsahovaly 100 μl reálného vzorku. Ke vzorku 2 a 3 byl přidán standardní přídavek v podobě 100 resp. 200 μl zásobního methanolického roztoku benzofenonu-3 o koncentraci $1 \times 10^{-2} \text{ mol} \times \text{dm}^{-3}$. Všechny roztoky byly doplněny na konečný objem 5 ml methanolem.

Naměřená spektra byla vyhodnocena a z jejich píků poté spočtena koncentrace benzofenonu-3 v reálném vzorku. Již z naměřených spekter je znát, že spektrofotometrie není vhodná metoda pro stanovení benzofenonu-3 v reálných vzorcích, jelikož píky nabývají jiného tvaru. To ukazuje na fakt, že naměřená spektra se skládají z příspěvků více sloučenin obsažených v reálném vzorku.

Také vypočtená koncentrace neodpovídá předpokladům. Koncentrace benzofenonu-3 v reálném vzorku by podle spektrofotometrického měření odpovídala hodnotě $3,05 \times 10^{-2} \text{ mol} \times \text{dm}^{-3}$, tedy přibližně 0,7 % benzofenonu-3 ve vzorku. Takto vysoká koncentrace ovšem není povolena Evropskou komisí, která rozhodla, že v kosmetických výrobcích, které neslouží jako krém na opalování, nesmí překročit koncentrace benzofenonu-3 hodnotu 0,5 %.



Obr. 4.1 Naměřená UV spektra vody po holení Adidas (1) a standardních přídavek 100 μ l (2) a 200 μ l (3) 1×10^{-2} benzofenonu-3, celkový objem měřeného roztoku 5 ml.



Obr. 4.2 Závislost absorbance vzorku vody po holení a dvou standardních přídavek o objemu 100 μ l a 200 μ l na koncentraci standardního přídávku. Měřeno pomocí spektrofotometrie v křemenných kyvetách o tloušťce 1 mm.

4. Závěr

Byla vyvinuta a optimalizována metoda stanovení benzofenonu-3 metodou diferenční pulsní voltametrie s použitím uhlíkové pastové elektrody. Jako optimální prostředí byla použita směs Brittonova-Robinsonova pufru a methanolu, s optimální hodnotou pH 12. Dále byla prozkoumána možnost použití akumulace pro zvýšení citlivosti měření. Mez detekce DP voltametričkého stanovení s použitím akumulace je srovnatelný s metodou HPLC s UV detektorem. Metoda bez použití akumulace má hodnotu meze detekce vyšší, ale stále srovnatelnou s jinými elektrochemickými metodami, jakými je například cyklická voltametrie nebo voltametrie na visící rtuťové kapce.

Tato optimalizovaná metoda byla poté aplikována na reálný vzorek. Stanovení reálného vzorku bylo ale zatíženo systematickou chybou, kterou nebylo možné identifikovat.

Stanovení bezofenonu-3 v reálném vzorku metodou diferenční pulsní voltametrie tak nemohlo být úspěšně provedeno. Srovnávací měření pomocí spektrofotometrie ukázalo, že benzofenon-3 nelze úspěšně stanovit ve směsi s dalšími absorbujícími látkami.

Měření na uhlíkové pastové elektrodě ale dokázalo, že tato elektroda je citlivá na přítomnost bezofenonu-3 ve vzorku, není však schopná selektivního stanovení. Do budoucna by bylo vhodné použít uhlíkovou pastovou elektrodu pro detekci benzofenonu-3 po separování složek vzorku např. s použitím kapalinové chromatografie. Vysoká citlivost elektrody by byla výhodná v prostředí, ve kterém není nutné počítat s látkami negativně ovlivňujícími průběh stanovení. Spojením HPLC a uhlíkové elektrody by mohlo být dosaženo vyšší citlivosti, než mají současně používané metody.

5. Použitá literatura

1. Scientific committee on consumer products SCCP, Opinion on benzophenone-3, (2006).
<http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_078.pdf>
2. Michelli Thomaz Laranjeira, Fabio de Lima, Silvio Cesar de Oliveira, Valdir Souza Ferreira, Robson Tadeu Soares de Oliveira: Analytical Determination of benzophenone-3 in Sunscreen Preparations Using Boron-Doped Diamond Electrodes. *American Journal of Analytical Chemistry*, **2**, 383-391 (2011).
3. Scientific committee on consumer products SCCP, Opinion on benzophenone-3, (2008).
<http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_159.pdf>
4. Lorena Vidal, Alberto Chisvert, Antonio Canals, Eleftheria Psillakis, Alexei Lapkin, Fernando Acosta, Karen J. Edler, James A. Holdaway, Frank Marken: Chemically surface-modified carbon nanoparticle carrier for phenolic pollutants: Extraction and electrochemical determination of benzophenone-3 and triclosan, *Analytica Chimica Acta*, **616**, 28-35 (2008).
5. Juliano Carvalho Cardoso, Bruna Milca Lenzi Armondes, Joao Bosco Galindo J´uniore Valdir Souza Ferreira: Simultaneous electrochemical determination of three sunscreens using cetyltrimethylammonium bromide, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **63**, 34-40 (2008).
6. Alberto Chisvert, Isuha Tarazona, Amparo Salvador: A reliable and environmentally-friendly liquid-chromatographic method for multi-class determination of fat-soluble UV filters in cosmetic products, *Analytica Chimica Acta*, **790**, 61-67 (2013).
7. Ivan Švancara, Klemens Schachl: Testing of unmodified carbon paste electrodes, *Chemické Listy*, **93**, 490-499 (1999).

8. Nayan S. Gadhari, Bankim J. Sanghavi, Ashwini K. Srivastava: Potentiometric stripping analysis of antimony based on carbon paste electrode modified with hexathia crown ether and rice husk, *Analytica Chimica Acta*, **703**, 31-40 (2011).
9. Bankim J. Sanghavi, Ashwini K. Srivastava: Adsorptive stripping differential pulse voltammetric determination of venlafaxine and desvenlafaxine employing Nafion–carbon nanotube composite glassy carbon electrode, *Electrochimica Acta*, **56**, 4188-4196 (2011).