

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Kateřina Procházková

STANOVENÍ BENZOFENONU-3 NA BOREM DOPOVANÉ  
DIAMANTOVÉ FILMOVÉ ELEKTRODĚ

Determination of benzophenone-3 on boron-doped diamond film  
electrode

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Hana Dejmková, Ph.D.

Praha 2014

Tato práce byla finančně podporována Grantovou agenturou ČR (P206/12/G151), Grantovou agenturou Univerzity Karlovy v Praze (GAUK684213) a Univerzitou Karlovou v Praze (SVV260084).

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. 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 27. května 2014.

Děkuji RNDr. Haně Dejmkové, Ph.D. a RNDr. Karolině Peckové, Ph.D. za odborné vedení a všechny cenné rady a připomínky. Děkuji Mgr. Jaroslavě Zavázalové za veškerou pomoc, kterou mi v průběhu práce poskytovala. Děkuji všem členům laboratoře č. 112 za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

# Abstrakt

Bylo prostudováno voltametrické chování benzofenonu-3 (BP-3) na borem dopované diamantové filmové elektrodě (BDDFE) metodou diferenční pulsní voltametrie (DPV) v anodické oblasti v prostředí Brittonova-Robinsonova (BR) pufru. Byl sledován vliv pH základního elektrolytu, jako optimální pro stanovení bylo zvoleno pH 12. Dále byl sledován vliv obsahu methanolu a acetonitrilu v měřeném vzorku na stanovení BP-3. Methanol neměl na stanovení vliv až do obsahu ve vzorku 20 % (V/V), acetonitril až do obsahu 70 % (V/V). Lineární kalibrační závislost byla proměřena v prostředí BR pufru o pH 12 v rozsahu koncentrací benzofenonu-3 od  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  do  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Bylo dosaženo meze detekce  $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a meze stanovitelnosti  $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

## Klíčová slova

Benzofenon-3

Borem dopovaná diamantová filmová elektroda

Diferenční pulsní voltametrie

## **Abstract**

Voltammetric behaviour of benzophenone-3 on a diamond film electrode doped by boron was studied by difference pulse voltammetry in an anodic area in the Britton-Robinson buffer medium. The influence of supporting electrolyte pH on the determination was monitored as well as the influence of methanol and acetonitrile content in the measured sample. pH 12 was selected as the optimum value for the determination. Methanol did not have any influence on the determination up to the content of 20 % (v/v), acetonitrile up to content of 70 % (v/v). A linear calibration dependence was measured in the medium of Britton-Robinson buffer pH 12 within the benzophenone-3 concentration range from  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  to  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Detection limit  $1.5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  and determination limit  $5.0 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  have been reached.

### **Key words**

Benzophenone-3

Boron-doped diamond film electrode

Differential pulse voltammetry

# Obsah

Seznam použitých zkratk a symbolů.....	- 7 -
1 Úvod.....	- 8 -
2 Teoretická část.....	- 9 -
2.1 Benzofenon-3.....	- 9 -
2.1.1 Vlastnosti a využití.....	- 9 -
2.1.2 Toxicita.....	- 9 -
2.1.3 Metody stanovení.....	- 10 -
2.2 Borem dopované diamantové elektrody.....	- 10 -
2.2.1 Možnosti využití borem dopovaných diamantových elektrod.....	- 11 -
2.2.2 Příprava borem dopovaných diamantových elektrod.....	- 11 -
3 Experimentální část.....	- 13 -
3.1 Studovaná látka.....	- 13 -
3.2 Použité chemikálie.....	- 14 -
3.3 Použitá aparatura.....	- 15 -
3.4 Další používaná zařízení.....	- 16 -
3.5 Pracovní postup.....	- 16 -
4 Výsledky a diskuse.....	- 17 -
4.1 Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku benzofenonu-3.....	- 17 -
4.2 Optimalizace podmínek stanovení benzofenonu-3 metodou diferenční pulsní voltametrie.....	- 18 -
4.2.1 Aktivace elektrodového povrchu pracovní elektrody.....	- 18 -
4.2.2 Vliv pH na diferenční pulsní voltamogramy benzofenonu-3.....	- 20 -
4.2.3 Vliv methanolu a acetonitrilu.....	- 22 -
4.3 Kalibrační závislost.....	- 25 -
4.4 Charakterizace pracovní elektrody.....	- 27 -
5 Závěr.....	- 29 -
6 Literatura.....	- 30 -

## Seznam použitých zkratk a symbolů

$A$  – absorbance

BDDFE – borem dopovaná diamantová filmová elektroda

BP-3 – benzofenon-3

BR pufr – Brittonův-Robinsonův pufr

$c$  – koncentrace

CV – cyklická voltametrie

DPV – diferenční pulsní voltametrie

$E$  – potenciál

$E_p$  – potenciál píku

$I$  - proud

$I_p$  ( $I_A$ ,  $I_K$ ) – výška píku (anodického, katodického)

$\lambda$  – vlnová délka

LD<sub>50</sub> – dávka, která způsobí úhyn 50 % testovaných jedinců

LOD – mez detekce (z angl. limit of detection)

LOQ – mez stanovitelnosti (z angl. limit of quantification)

p.a. – pro analýzu

pH – záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů

R – korelační koeficient

SD – směrodatná odchylka (z angl. standard deviation)

$t$  – čas

UV – ultrafialová oblast spektra (z angl. ultraviolet)

VIS – viditelná oblast spektra (z angl. visible)

# 1 Úvod

Benzofenon-3 je látka využívaná jako UV filtr v řadě kosmetických přípravků. Vzhledem k hojnému používání těchto produktů může docházet k uvolňování benzofenonu-3 do životního prostředí. Zde může, jakožto endokrinní disruptor, nepříznivě ovlivňovat živé organismy, a to tím, že narušuje jejich přirozenou hormonální rovnováhu. Proto je užitečné vyvíjet vhodné analytické metody pro jeho stanovení.

Cílem této bakalářské práce bylo ověřit možnost elektrochemického stanovení benzofenonu-3 na borem dopované diamantové elektrodě (BDDFE) metodou diferenční pulsní voltametrie (DPV) v anodické oblasti.



## 2 Teoretická část

### 2.1 Benzofenon-3

#### 2.1.1 Vlastnosti a využití

Benzofenon-3 (jinými názvy (2-hydroxy-4-methoxyfenyl)fenylmethanon, 2-hydroxy-4-methoxybenzofenon či oxybenzon [1]) je bílý až nažloutlý prášek, který lze připravit Friedel-Craftovou reakcí benzoylchloridu s 3-hydroxyanisolem [2]. BP-3 je prakticky nerozpustný ve vodě, ale dobře rozpustný ve většině organických rozpouštědel. Běžně se používá jako UV filtr v kosmetických přípravcích, kde podle Evropské komise může jeho obsah dosahovat až 6 % v opalovacích krémech a až 0,5 % v ostatních produktech, aniž by představoval riziko pro zdraví spotřebitelů [3]. Kromě toho je BP-3 využíván jako UV filtr v plastových obalech potravin, které chrání před ztrátou kvality způsobenou UV zářením [4].

#### 2.1.2 Toxicita

V organismu je BP-3 enzymaticky přeměňován na nejméně tři metabolity, které se následně vylučují do moči. Studium transdermální absorpce BP-3 u potkanů bylo zjištěno, že po kožní aplikaci v dávce  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  živé hmotnosti se metabolity BP-3 objeví v krvi pokusných zvířat již po pěti minutách od podání [5]. Dále byl sledován také vliv dlouhodobé expozice. Potkanům byla dávka BP-3  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  aplikována na kůži dvakrát denně po dobu čtyř týdnů. Po uplynutí této doby nebyly na pokusných zvířatech při srovnání s kontrolní skupinou pozorovány žádné patologické změny, což vedlo k závěru, že BP-3 při dané dávce, způsobu podání a době expozice není pro potkany toxický [6]. Při testování akutní dermální toxicity BP-3 na králících se u některých pokusných jedinců objevilo lokální podráždění kůže při dávce  $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Hodnota  $\text{LD}_{50}$  pak byla v tomto případě stanovena až na více než  $16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  [2].

Akutní toxicita při orálním podání byla testována na potkanech. Hodnota  $\text{LD}_{50}$  se zde pohybovala v rozmezí od 6 do více než  $12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , což znamená, že BP-3 je látka prakticky netoxická [2]. Devadesátidenní orální podávání BP-3 v množství odpovídajícím 0,5 – 1,0 % krmné dávky vedlo u potkanů ke zpomalení růstu, snížení hmotnosti orgánů a anémii [2].

BP-3 je rovněž zařazen mezi tzv. endokrinní disruptory, tedy cizorodé látky, které v organismu narušují fyziologickou hormonální rovnováhu. V této souvislosti byla provedena např. studie na rybách druhu dánío pruhované (*Danio rerio*). Dospělí samci a embrya tohoto druhu byli po dobu čtrnácti dnů vystaveni různým koncentracím BP-3 a poté byla vyhodnocována exprese genů majících vliv na pohlavní hormony. Porovnáním výsledků pokusných skupin a kontrolní skupiny byla zjištěna antiandrogenní aktivita BP-3 [7]. Další studie zabývající se antiandrogenní a estrogenní aktivitou benzofenonu a jeho derivátů byly prováděny na buněčných kulturách a na potkanech [4, 8].

### 2.1.3 Metody stanovení

Ke stanovení BP-3 se hojně využívá chromatografických metod. Časté je zejména použití plynové chromatografie s hmotnostní detekcí, kdy před analýzou bývá vzorek nakoncentrován například pomocí mikroextrakce na pevné fázi. Tímto způsobem je BP-3 stanovován ve vzorcích vody nebo moči [9 – 11]. Mez stanovitelnosti v těchto případech dosahuje až  $4,34 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  [9]. V případě kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí bylo dosaženo meze stanovitelnosti  $1,75 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  [12].

Z elektroanalytických metod byla ke stanovení BP-3 použita DPV na rtuťové filmové elektrodě [13], kdy byla ověřována možnost stanovit více různých UV filtrů v jednom vzorku vedle sebe, a dále cyklická voltametrie (CV) na uhlíkových elektrodách modifikovaných uhlíkovými nanočásticemi [14]. Na borem dopované diamantové filmové elektrodě byl BP-3 stanovován metodou cyklické voltametrie a square-wave voltametrie. Při použití elektrody s koncentrací boru 800 ppm bylo v prostředí Brittonova-Robinsonova (BR) pufru o pH 6 dosaženo meze detekce  $1,37 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a meze stanovitelnosti  $4,54 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  [15].

## 2.2 Borem dopované diamantové elektrody

Borem dopovaný diamantový film je coby nový elektrodový materiál zkoumán teprve od osmdesátých let dvacátého století [16]. Jako hlavní výhody tohoto materiálu se uvádějí mechanická a chemická odolnost, nízký zbytkový proud a široké potenciálové okno, které

v závislosti na kvalitě filmu a obsahu nečistot dosahuje nejčastěji hodnot okolo 3,5 V. To umožňuje provádět elektrochemické reakce při takovém rozsahu potenciálů, kterého na ostatních elektrodových materiálech nelze dosáhnout, a je tak možné stanovit řadu nejrůznějších analytů [17].

### 2.2.1 Možnosti využití borem dopovaných diamantových elektrod

Kromě využití v analytické chemii nalézají borem dopované diamantové elektrody uplatnění také v jiných oblastech. Používají se například k čištění odpadních vod, kde se pomocí nich odstraňují organické polutanty. Při oxidaci vody na elektrodě dochází ke vzniku velkého množství hydroxylových radikálů, které fungují jako neselektivní a velmi účinné oxidační činidlo. Organické molekuly tak mohou být zoxidovány až na oxid uhličitý [18]. Množství polutantů, které lze odstranit z odpadních vod pomocí diamantových elektrod, je shrnuto v referátu [19]. Jedná se například o fenoly, kyanidy či herbicidy.

Další oblastí využití borem dopovaných diamantových elektrod je elektrochemická syntéza. Ve srovnání s tradiční syntézou využívající chemické reakce se uvádí několik výhod tohoto postupu. Selektivní reakce například může být dosaženo i bez použití chránící skupiny buď přesnou kontrolou vkládaného napětí, nebo využitím různé afinity funkčních skupin k povrchu elektrody. Dále využitím elektrické energie k provádění reakcí může být snížena spotřeba velmi reaktivních činidel a omezeno riziko při manipulaci s nimi [19]. Možnosti elektrochemické syntézy organických látek na borem dopovaných diamantových elektrodách shrnuje referát [20].

### 2.2.2 Příprava borem dopovaných diamantových elektrod

Diamantové filmy se připravují nejčastěji metodou chemické depozice par, a to buď s využitím žhavených vláken, nebo mikrovlnného ohřevu. K depozici filmu se používá plynná reakční směs vodíku a methanu (může být nahrazen parami acetonu nebo methanolu), jehož koncentrace ve směsi dosahuje 0,5 – 2 %. Jako zdroj boru se přidává diboran či trimethylbor v množství od 10 do 10000 ppm. Bylo experimentálně zjištěno, že obsah boru v utvořeném diamantovém filmu přibližně odpovídá jeho obsahu v plynné fázi [21]. Podkladovým materiálem pro depozici filmu bývá nejčastěji křemík, ale lze použít i jiné substráty, například

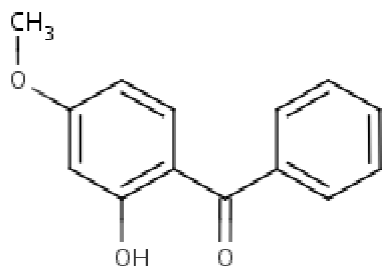
grafit, wolfram, molybden, tantal nebo titan [22]. Křemíkovou destičku je třeba nejprve očistit a přeleštit brusnou směsí s obsahem diamantového prášku, jehož zachycené částice slouží při vlastní depozici jako krystalizační centra pro růst diamantového filmu. Tímto způsobem lze vyrobit diamantové filmy o ploše několika  $\text{cm}^2$  při rychlosti tvorby filmu asi  $0,1 - 1,0 \mu\text{m}$  za hodinu [16]. Kvalitu utvořeného filmu lze ověřit například pomocí Ramanovy spektroskopie, která dobře odhalí přítomnost nediamantového uhlíku, nebo pomocí skenovací elektronové mikroskopie [22].

## 3 Experimentální část

### 3.1 Studovaná látka

Název: benzofenon-3

Strukturní vzorec:



Sumární vzorec: C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>

CAS: 131-57-7

Další názvy: 2-hydroxy-4-methoxybenzofenon; (2-hydroxy-4-methoxyfenyl)fenylmethanon;  
oxybenzon

Relativní molekulová hmotnost: 228,24

Teplota tání: 65,5 °C

Rozdělovací koeficient oktanol-voda: 3,79 [1]

Rozpuštnost ve vodě při 25 °C: 69 mg·l<sup>-1</sup> [1]

## 3.2 Použité chemikálie

### **Benzofenon-3** (98 %, Aldrich)

Zásobní roztok BP-3 o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  byl připraven rozpuštěním přesně odváženého množství látky ve vodném roztoku hydroxidu sodného (Penta, ČR) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Roztoky o nižších koncentracích byly připravovány ředěním tohoto zásobního roztoku BR puřem. Zásobní roztok byl uchováván v chladničce a jeho stálost byla ověřována spektrofotometricky.

### **Kyselina sírová**, (p.a., 96%, Lach-Ner, ČR)

Zásobní roztok kyseliny sírové o koncentraci  $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  byl připraven naředěním příslušného objemu 96% kyseliny sírové deionizovanou vodou na celkový objem 100 ml a uchováván za laboratorní teploty. Roztoky o nižší koncentraci byly připravovány ředěním zásobního roztoku.

### **Brittonův-Robinsonův puř**

BR puř jako základní elektrolyt o příslušném pH byl připravován smísením vodného roztoku hydroxidu sodného (Penta, ČR) o koncentraci  $2 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  s kyselou složkou tvořenou vodným roztokem kyseliny borité, fosforečné a octové (vše Lach-Ner, Neratovice, ČR), kde koncentrace každé kyseliny byla  $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Přesná hodnota pH byla měřena pomocí pH metru 3510 s kombinovanou skleněnou elektrodou (Jenway, UK).

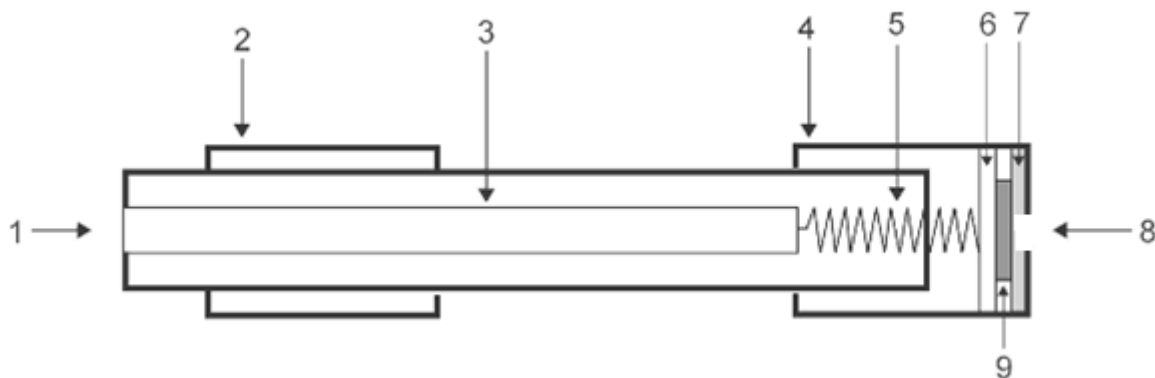
Další použité chemikálie byly **deionizovaná voda** (Millipore Q-plus System, Millipore, USA), **methanol** (p.a., Penta, ČR), **acetonitril** (isocratic grade for liquid chromatography, Merck, Německo), **chlorid draselný** (p.a., Lach-Ner, ČR), **hexakvanoželeznatan draselný, trihydrát** (99%, Lach-Ner, ČR)

### 3.3 Použitá aparatura

Všechna voltametrická měření byla provedena pomocí přístroje Eco-Tribo polarograf (Polaro-Sensors, Praha, ČR), s využitím programu PolarPro 5.1. v tříelektrodevém uspořádání.

Jako pracovní elektroda byla použita borem dopovaná diamantová filmová elektroda vyrobená v Oddělení funkčních materiálů Fyzikálního ústavu Akademie věd České Republiky, v. v. i. Na podkladovou křemíkovou destičku (ON Semiconductor, Rožnov pod Radhoštěm, ČR) o tloušťce 300  $\mu\text{m}$  byl diamantový film nanesen metodou chemické depozice par s mikrovlnným ohřevem. Depozice probíhala v komerčně dodávaném reaktoru (1,5 kW, ASTeX, Lowell, MA, USA). Reakční směs obsahovala metan, vodík a trimethylbor, jehož koncentrace ve směsi byla 2000 ppm. Tloušťka vytvořeného diamantového filmu byla cca 1  $\mu\text{m}$ . Před použitím byla křemíková destička s deponovaným diamantovým filmem nařezána na čtverečky o rozměrech přibližně 5 x 5 mm. Takto připravená elektroda byla pro měření umísťována do teflonového těla (Obr. 3.1). Geometrická plocha elektrody byla vymezena kruhovým otvorem v teflonovém těle a dosahovala 10,2 mm<sup>2</sup>.

Jako referenční elektroda byla použita argentchloridová elektroda s 3M chloridem draselným (ETP-CZ-R01207), pomocná elektroda byla platinová drátková (obě Elektrochemické detektory, Turnov, ČR).



**Obr. 3.1 Schéma uložení pracovní elektrody v teflonovém těle [upraveno podle 17].** Kontakt pro připojení k potenciostatu (1), teflonové tělo elektrody (2), elektrický kontakt (3), šroubovací nástavec (4), pružina (5), kovová destička (6), těsnění (7), kontakt s roztokem (8), borem dopovaná diamantová filmová elektroda na křemíkové podložce (9).

### 3.4 Další používaná zařízení

Absorpční spektrum zásobního roztoku benzofenonu-3 bylo proměřováno pomocí spektrofotometru Agilent 8453 Diode-Array Spectrophotometer (USA) s použitím 1mm křemenných kyvet.

Hodnota pH připravovaného Brittonova-Robinsonova pufru byla kontrolována pH metrem 3510 (Jenway, UK).

### 3.5 Pracovní postup

Benzofenon-3 byl stanovován metodou diferenční pulsní voltametrie. Parametry metody byly zvoleny následující: rychlost polarizace  $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , výška pulsu +50 mV, šířka pulsu 100 ms. Měření probíhalo za laboratorní teploty. Všechna měření byla opakována minimálně třikrát a poté statisticky vyhodnocena. Výška píků ( $I_p$ ) byla vyhodnocována pomocí programu PolarPro 5.1 a byla odečítána od spojnice minim po obou stranách píku.

Měřený vzorek BP-3 o koncentraci  $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  byl připravován vždy v objemu 10 ml. Do 10ml odměrné baňky byl pipetován 1 ml zásobního roztoku BP-3 o koncentraci  $1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , případně byl přidán ještě potřebný objem methanolu či acetonitrilu, a baňka byla doplněna po rysku Brittonovým-Robinsonovým pufrem o příslušném pH.

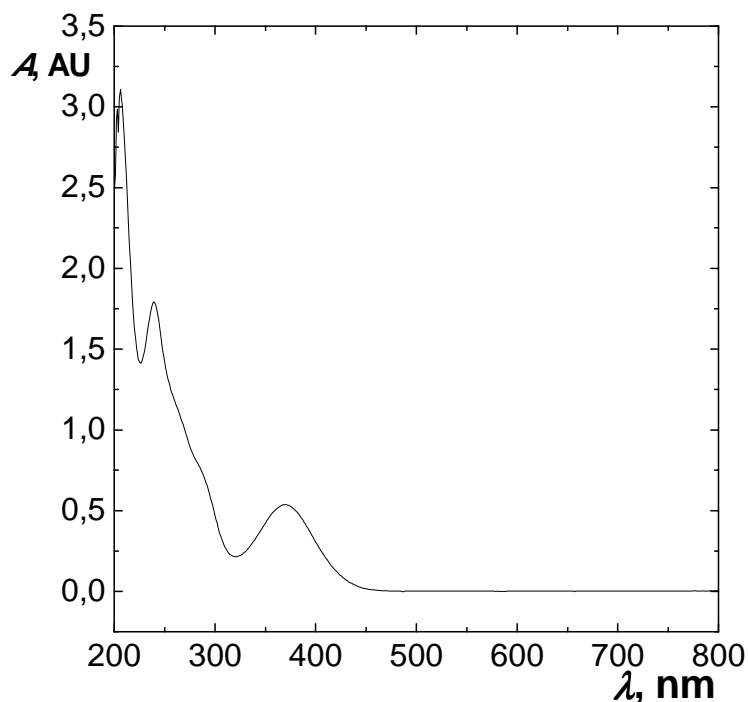


## 4 Výsledky a diskuse

### 4.1 Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku benzofenonu-3

Stálost zásobního roztoku BP-3 byla studována spektrofotometricky. Absorpční spektrum bylo proměřováno v rozsahu vlnových délek 200 – 800 nm v 1mm křemenných kyvetách proti roztoku hydroxidu sodného o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Spektrum naměřené bezprostředně po přípravě zásobního roztoku BP-3 je uvedeno na obrázku 4.1.

Stálost roztoku byla posuzována prostřednictvím absorbance při vlnových délkách 206, 239 a 369 nm. Hodnoty absorbancí při těchto vlnových délkách jsou shrnuty v tabulce 4.1. Roztok lze považovat za stabilní, pokud v průběhu času nedochází k výraznému poklesu absorbance nebo k jiné patrné změně naměřeného spektra. Po pěti měsících od přípravy roztoku byl pozorován pokles absorbance současně s vývojem krystalů. Roztok proto již dále nebyl používán.



**Obr. 4.1** UV/VIS spektrum  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  BP-3 v  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  hydroxidu sodném. Měřeno v 1mm křemenné kyvetě proti roztoku hydroxidu sodného ( $c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ).

**Tab. 4.1 Absorbance zásobního roztoku BP-3 o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Měřeno v 1mm křemenné kyvetě proti roztoku hydroxidu sodného o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .**

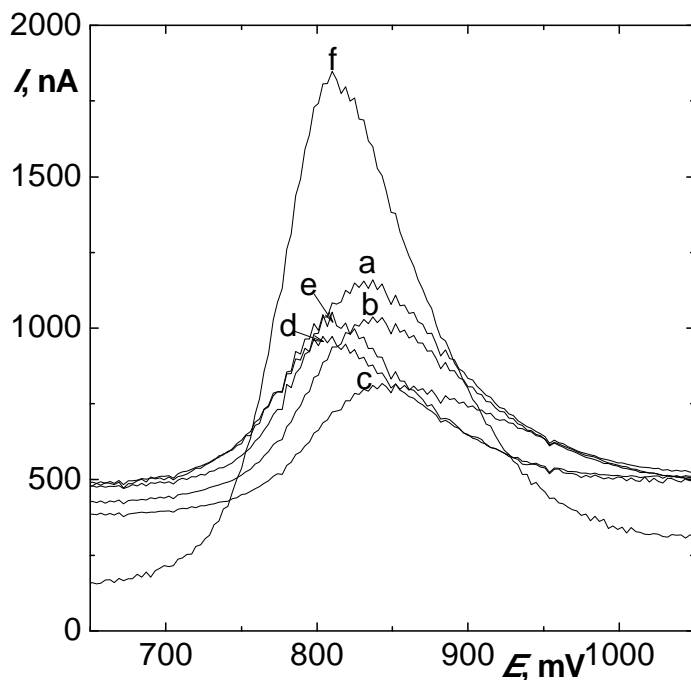
<i>t</i> (dny)	$\lambda = 206 \text{ nm}$		$\lambda = 239 \text{ nm}$		$\lambda = 369 \text{ nm}$	
	A (AU)	%	A (AU)	%	A (AU)	%
0	3,108	100,0	1,791	100,0	0,536	100,0
1	3,066	98,6	1,787	99,8	0,547	102,1
7	2,968	95,5	1,777	99,2	0,543	101,3
41	3,259	104,9	1,804	100,7	0,547	102,1
146	1,736	55,9	0,902	50,4	0,267	49,8

## 4.2 Optimalizace podmínek stanovení benzofenonu-3 metodou diferenční pulsní voltametrie

### 4.2.1 Aktivace elektrodového povrchu pracovní elektrody

Vzhledem k tomu, že v průběhu měření dochází k adsorpci produktů elektrodové reakce na povrch pracovní elektrody, a tím k její pasivaci, bylo třeba nejprve navrhnout účinný postup aktivace. Elektroda byla aktivována elektrochemicky ve vodném roztoku kyseliny sírové o koncentraci  $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , během aktivace bylo roztokem vždy mícháno. Následná měření probíhala v prostředí BR pufru o pH 6 při koncentraci BP-3  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Bylo prověřováno několik způsobů aktivace, které jsou shrnuty v tabulce 4.2. Jako nejlepší postup se ukázalo střídání aktivačních potenciálů +3 V, -3 V, +3 V, -3 V, +3 V, každý z nich vždy po dobu 10 s, protože při tomto způsobu aktivace elektrodového povrchu pracovní elektrody je při následném měření pík BP-3 několikanásobně vyšší než při použití jiných způsobů (Tab. 4.2). Zároveň dochází i ke snížení pozadí (Obr. 4.2.). Při všech následujících měřeních byla proto pracovní elektroda aktivována tímto postupem, a to vždy před každým jednotlivým skenem.



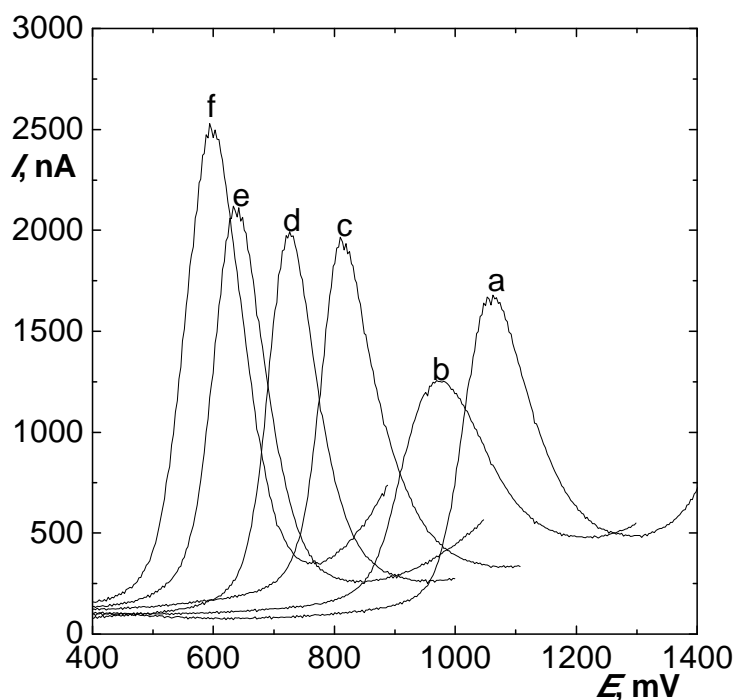
**Obr. 4.2. DP voltamogramy BP-3** ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) měřené na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 6 v závislosti na použité metodě aktivace elektrodového povrchu pracovní elektrody. Popis křivek viz Tab. 4.2. Parametry DPV: rychlost polarizace  $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ , výška pulsu  $+50 \text{ mV}$ , šířka pulsu  $100 \text{ ms}$ .

**Tab. 4.2. Ověřované metody aktivace BDDFE v 0,5M roztoku kyseliny sírové.** DP voltamogramy BP-3 ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) v prostředí BR pufru o pH 6 byly zaznamenávány ihned po elektrochemické aktivaci elektrodového povrchu.

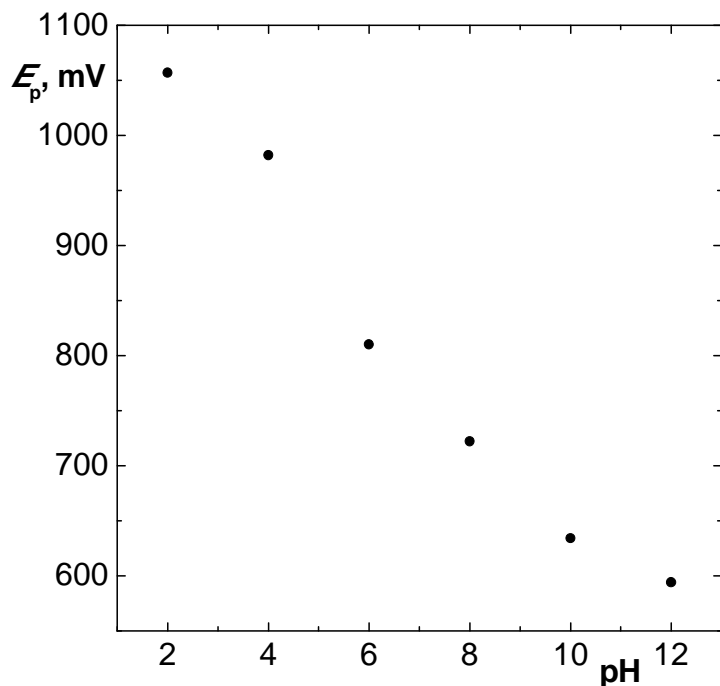
Křivka	Způsob aktivace	Výška píku BP-3 (nA)
a	potenciál $+3 \text{ V}$ po dobu $5 \text{ min}$	655
b	potenciál $+3 \text{ V}$ po dobu $1 \text{ min}$	581
c	potenciál $+3 \text{ V}$ po dobu $40 \text{ s}$	388
d	střídání potenciálů $+3 \text{ V}$ , $-3 \text{ V}$ , $+3 \text{ V}$ , každý po dobu $2 \text{ min}$	469
e	střídání potenciálů $+3 \text{ V}$ , $-3 \text{ V}$ , $+3 \text{ V}$ , každý po dobu $1 \text{ min}$	554
f	střídání potenciálů $+3 \text{ V}$ , $-3 \text{ V}$ , $+3 \text{ V}$ , $-3 \text{ V}$ , $+3 \text{ V}$ , každý po dobu $10 \text{ s}$	1624

### 4.2.2 Vliv pH na diferenční pulsní voltamogramy benzofenonu-3

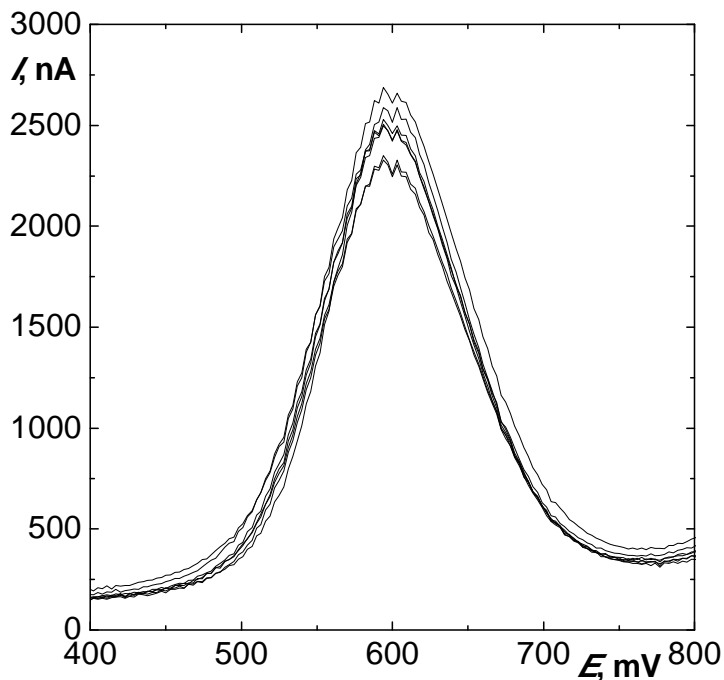
Byl prostudován vliv pH základního elektrolytu na výšku a polohu píku BP-3. Měření byla prováděna v prostředí BR pufru o hodnotě pH 2, 4, 6, 8, 10 a 12 (Obr. 4.3). Bylo zjištěno, že BP-3 poskytuje jeden oxidační pík ve všech měřených pH. S rostoucí hodnotou pH se potenciál tohoto píku posouvá směrem k nižším hodnotám potenciálu, tedy od potenciálu +1057 mV v prostředí pH 2 k potenciálu +594 v prostředí pH 12 (Obr. 4.4). Při tomto posunu zároveň dochází ke zmenšování rozsahu potenciálového okna. Se zvyšující se hodnotou pH rovněž narůstá i výška píku. Výjimku zde představuje pH 4, ve kterém je pík BP-3 výrazně nižší než v ostatních pH. Nejvyšší odezvy bylo dosaženo při použití BR pufru o pH 12 ( $I_p = 2224$  nA). Pro ověření správné účinnosti navrženého aktivačního programu v optimálním prostředí bylo zaznamenáno sedm po sobě jdoucích křivek (Obr. 4.5) a byla vypočítána opakovatelnost výšky píků vyjádřená relativní směrodatnou odchylkou, která činí 4,8 %. BR pufr o pH 12 byl tedy zvolen jako optimální prostředí pro další měření.



**Obr. 4.3 Vliv pH na DP voltamogramy BP-3** ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Měřeno na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 2 (a), pH 4 (b), pH 6 (c), pH 8 (d), pH 10 (e) a pH 12 (f). Parametry DPV: rychlost polarizace  $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ , výška pulsu +50 mV, šířka pulsu 100 ms.



**Obr. 4.4** Závislost potenciálu píku BP-3 ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) na pH BR pufru. Měřeno na BDDFE v prostředí BR pufru o hodnotě pH 2 – 12. Parametry DPV: rychlost polarizace  $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ , výška pulsu +50 mV, šířka pulsu 100 ms.



**Obr. 4.5** Sedm po sobě jdoucích DP voltamogramů BP-3 ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) změřených na BDDFE v BR pufru o pH 12 s úpravou elektrodového povrchu mezi jednotlivými skeny. Parametry DPV: rychlost polarizace  $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ , výška pulsu +50 mV, šířka pulsu 100 ms.

### 4.2.3 Vliv methanolu a acetonitrilu

Vzhledem k tomu, že benzofenon-3 je prakticky nerozpustný ve vodě, ale je dobře rozpustný v organických rozpouštědlech, byl zkoumán vliv obsahu methanolu a acetonitrilu v měřeném roztoku na odezvu elektrody.

Byly připraveny dvě sady roztoků BP-3 o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v prostředí BR pufru o pH 12, do kterých bylo přidáno takové množství methanolu, respektive acetonitrilu, aby jeho obsah v měřených roztocích dosahoval 1 %, 2 %, 10 %, 20 %, 50 %, 70 % a 80 % (V/V). Roztoky byly poté voltametriky proměřeny pomocí DPV a byl sledován vliv přítomnosti organických rozpouštědel na výšku a polohu píku BP-3.

#### 4.2.3.1 Methanol

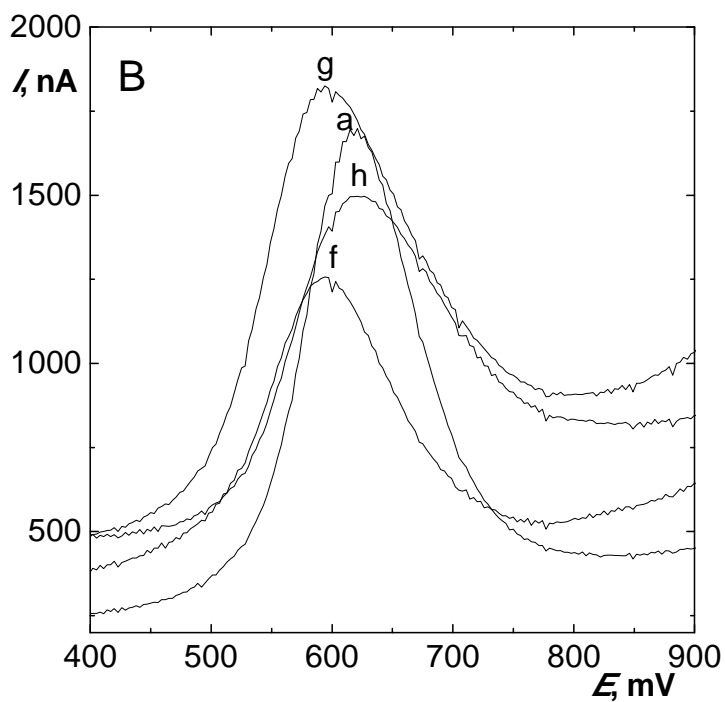
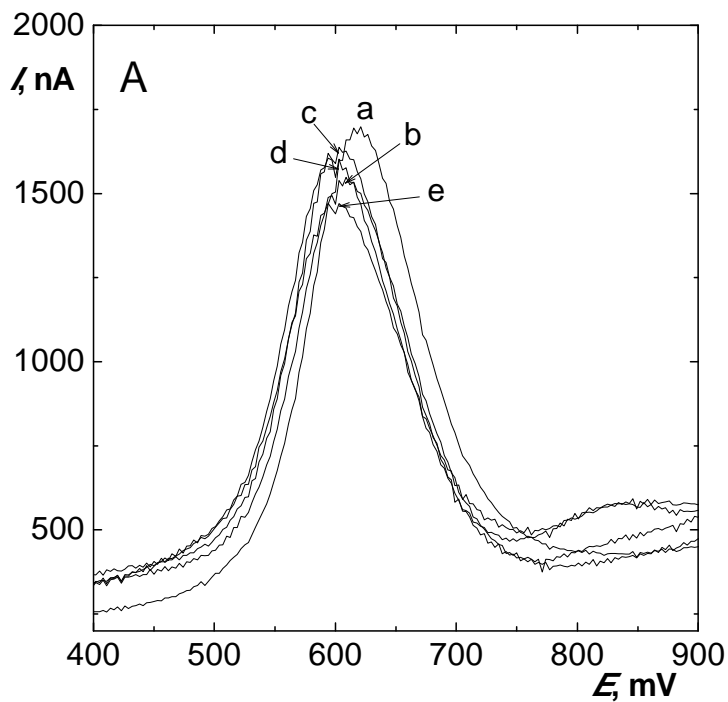
V případě přidaného methanolu bylo zjištěno, že ve srovnání s roztokem bez methanolu dochází k mírnému posunu píku BP-3 směrem k nižším potenciálům. Tento posun se projevuje již při obsahu methanolu v roztoku 1 % (V/V) a na koncentraci methanolu není závislý. Zároveň dochází k poklesu výšky píku BP-3. Pokles výšky píku až do obsahu methanolu 20 % (V/V) není příliš velký, a tak lze methanol v těchto nižších koncentracích využít při stanovení (Obr. 4.6 A). V případě obsahu methanolu 50 % (V/V) a více je již pokles výšky píku výrazný a dochází rovněž ke zvýšení proudu pozadí (Obr. 4.6 B). Proto takto vysoké koncentrace methanolu ve vzorku již nejsou pro stanovení benzofenonu-3 vhodné.

#### 4.2.3.2 Acetonitril

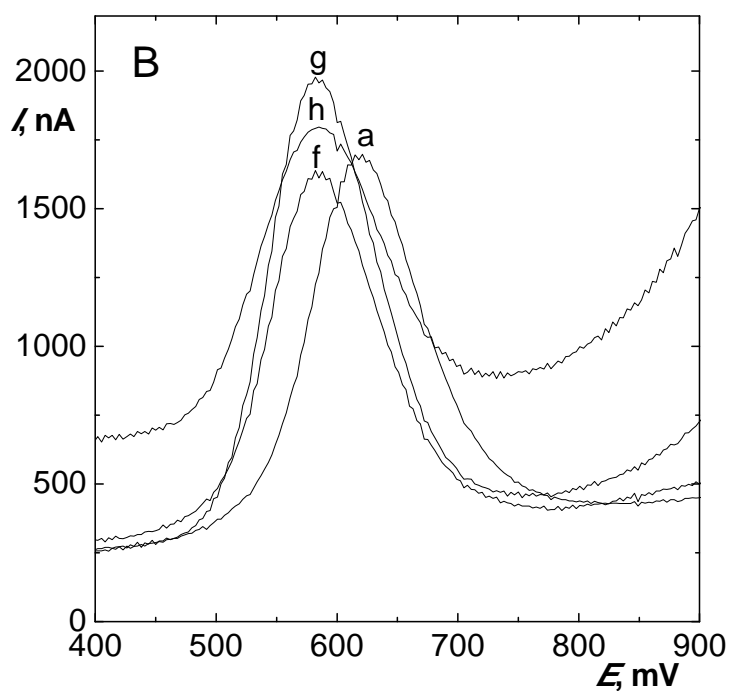
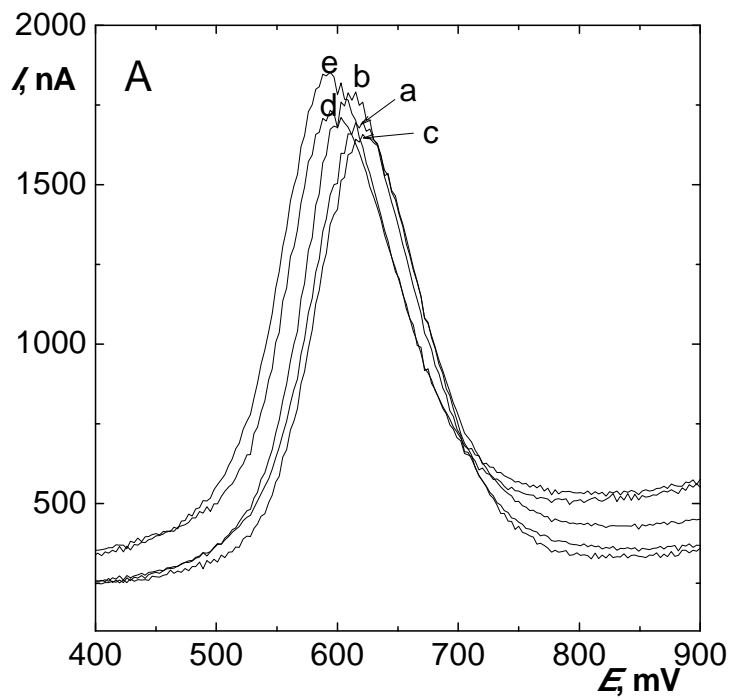
Acetonitril přidaný do měřeného roztoku zapříčinil podobně jako methanol mírný posun píku BP-3 směrem k nižším potenciálům. Pokud jde o výšku píku, je do 70 % (V/V) acetonitrilu v měřeném vzorku srovnatelná s výškou píku v roztoku bez acetonitrilu (Obr. 4.7 A a 4.7 B). Až při obsahu acetonitrilu 80 % (V/V) dochází k výraznému poklesu výšky píku za současného zvýšení proudu pozadí (Obr. 4.7 B).

Z výše uvedeného vyplývá, že acetonitril je při stanovení BP-3 vhodnější rozpouštědlo než methanol, protože má menší vliv na výšku píku a zároveň jej lze použít i ve vyšších koncentracích.

I přes možnost využití methanolu nebo acetonitrilu byla všechna další měření prováděna v prostředí BR pufru o pH 12 bez přídavku těchto organických rozpouštědel.



**Obr. 4.6** Vliv obsahu methanolu v měřeném vzorku na DP voltamogramy BP-3 ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Měřeno na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 12. Obsah methanolu 0 % (a), 1 % (b), 2 % (c), 10 % (d), 20 % (e) 50 % (f), 70 % (g) a 80 % (h) (V/V). Parametry DPV: rychlost polarizace  $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ , výška pulsu +50 mV, šířka pulsu 100 ms.

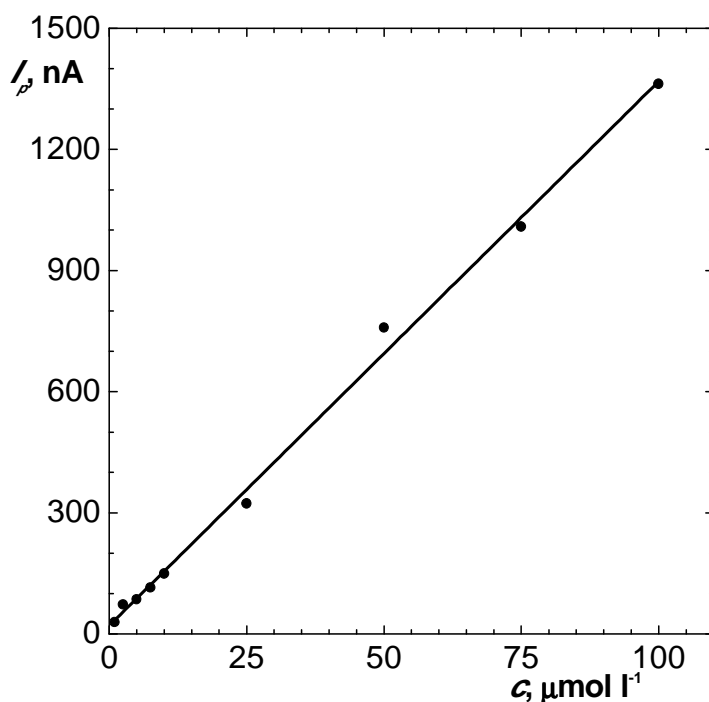


**Obr. 4.7** Vliv obsahu acetonitrilu v měřeném vzorku na DP voltamogramy BP-3 ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Měřeno na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 12. Obsah acetonitrilu 0 % (a), 1 % (b), 2 % (c), 10 % (d), 20 % (e) 50 % (f), 70 % (g) a 80 % (h) (V/V). Parametry DPV: rychlost polarizace  $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ , výška pulsu +50 mV, šířka pulsu 100 ms.



### 4.3 Kalibrační závislost

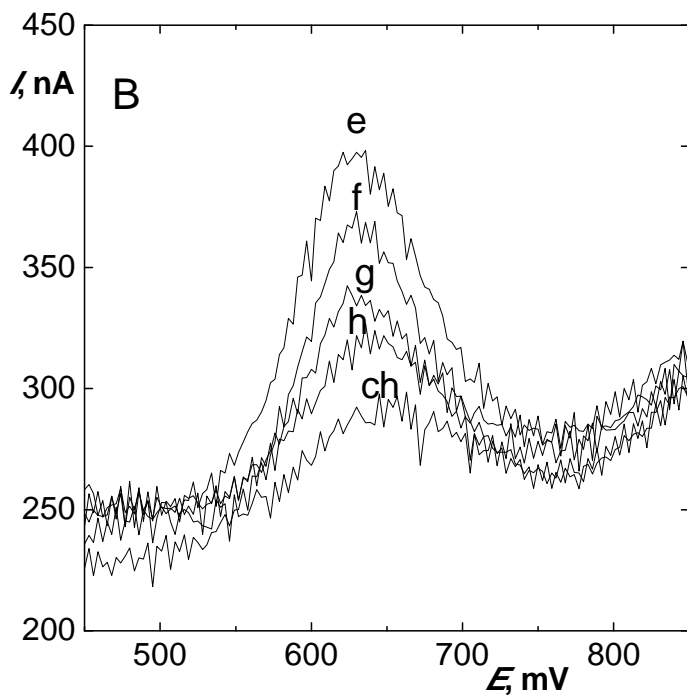
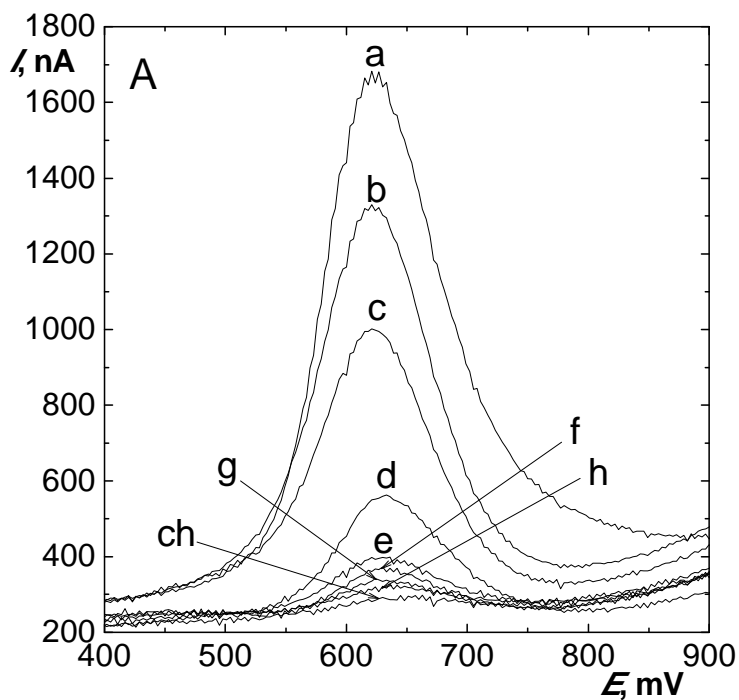
Kalibrační závislost roztoku beznofenonu-3 byla měřena v prostředí BR pufru o pH 12. Proměřeny byly roztoky o koncentraci BP-3 v rozmezí  $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Všechna měření byla opakována nejméně pětkrát. Poté byla vyhodnocena výška píků a pomocí Deanova-Dixonova testu byly vyloučeny odlehlé hodnoty. Kalibrační závislost byla vyhodnocena pro průměrnou výšku píků a byla zpracována metodou lineární regrese (obr. 4.8). Parametry získané kalibrační přímkou jsou shrnuty v tabulce 4.2. Vybrané naměřené voltamogramy ukazují obrázek 4.9. Mez detekce a mez stanovitelnosti byly určeny jako trojnásobek, respektive desetinásobek, směrodatné odchylky deseti po sobě jdoucích měření nejnižší měřené koncentrace vydělený směrnici kalibrační přímkou. Bylo dosaženo meze detekce  $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a meze stanovitelnosti  $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$



**Obr. 4.8 Kalibrační závislost BP-3.** Měřeno na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 12. Rozmezí koncentrací BP-3 1 – 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Vyhodnoceno z výšek píků ( $I_p$ ). Parametry DPV: rychlost polarizace  $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ , výška pulsu +50 mV, šířka pulsu 100 ms.

**Tab. 4.2 Parametry kalibrační přímkou benzofenonu-3.** Parametry měření viz obr. 4.8.

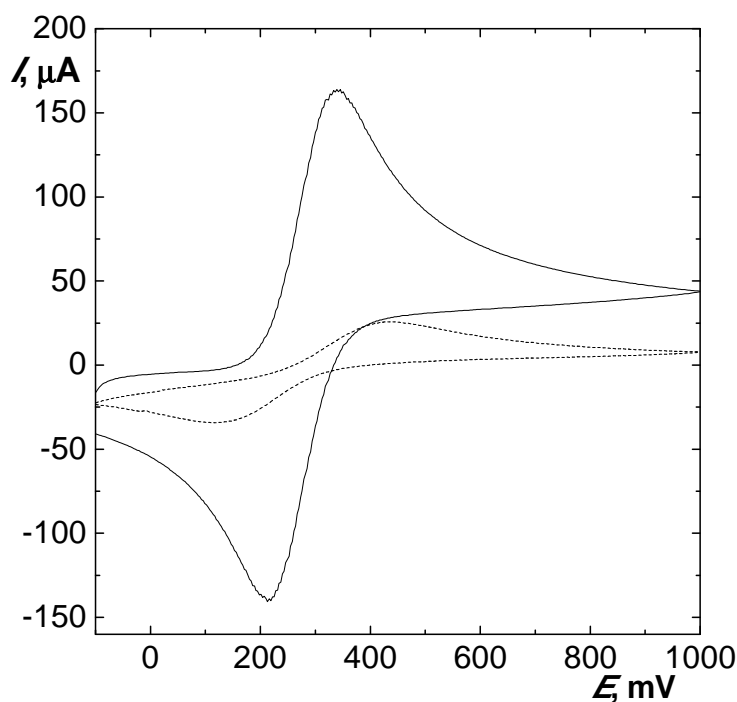
$c$ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )	úsek (nA)	směrnice ( $\text{nA} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$ )	R	SD (nA)	LOD ( $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )
1 – 100	20,57	13,48	0,9981	6,75	1,5	5,0



**Obr. 4.9** Závislost výšky píku BP-3 na jeho koncentraci v měřeném vzorku. Měřeno na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 12. Koncentrace BP-3 100 (a), 75 (b), 50 (c), 25 (d), 10 (e), 7,5 (f), 5 (g), 2,5 (h) a 1 (ch)  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Parametry DPV: rychlost polarizace  $20\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , výška pulsu +50 mV, šířka pulsu 100 ms.

## 4.4 Charakterizace pracovní elektrody

Změna elektrochemických vlastností pracovní borem dopované diamantové filmové elektrody v čase byla zjišťována metodou cyklické voltametrie s využitím hexakynoželeznanu draselného jako modelového redoxního systému. Cyklické voltamogramy systému  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  byly zaznamenávány v rozsahu potenciálů od  $-100$  mV do  $+1000$  mV rychlostí polarizace  $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  (obr. 4.10) a poté vyhodnoceny. Byly odečteny výšky katodického ( $I_K$ ) a anodického píku ( $I_A$ ) a vypočítán jejich poměr a byl zjištěn rozdíl potenciálů katodického a anodického píku ( $\Delta E_p$ ). Charakteristiky redoxního systému zjištěné před započítím stanovení BP-3 a po jeho ukončení shrnuje tabulka 4.3.



**Obr. 4.10** Cyklické voltamogramy redoxního systému  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ . Před započítím stanovení BP-3 (plnou čarou) a po ukončení stanovení BP-3 (čárkovaně). Měřeno na BDDFE v  $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  roztoku  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  v  $1 \text{ M KCl}$  rychlostí polarizace  $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ .

**Tab. 4.3** Charakteristiky redoxního systému  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$

$t$ (měsíce)	$I_A$ ( $\mu\text{A}$ )	$I_K$ ( $\mu\text{A}$ )	$I_A/I_K$	$\Delta E_p$ (mV)
0	161	-165	0,98	124
5	25,7	-32,2	0,80	243

Z tabulky 4.3 a z obrázku 4.10 je patrné, že v důsledku stanovení BP-3 došlo k výrazné změně elektrochemických vlastností BDDFE. Při stejné koncentraci  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  v měřeném roztoku byly po pěti měsících zaznamenány až šestinásobně menší píky a došlo rovněž ke zvětšení rozdílu potenciálů těchto píků téměř na dvojnásobek oproti výchozímu stavu. Rozdíl potenciálů katodického a anodického píku by měl při reverzibilním elektrochemickém ději s výměnou jednoho elektronu dosahovat hodnoty 59 mV. Naměřených 243 mV svědčí o velmi pomalém přenosu elektronů. Ze získaných údajů lze usuzovat, že v průběhu stanovení benzofenonu-3 došlo k poškození elektrody, které bylo způsobeno pravděpodobně dlouhodobým vystavováním diamantového filmu prostředí o příliš vysoké hodnotě pH.

## 5 Závěr

V rámci řešení bakalářské práce byla vyvinuta a optimalizována metoda pro stanovení BP-3 na borem dopované diamantové filmové elektrodě o koncentraci boru 2000 ppm s využitím DPV v prostředí BR pufru. Vzhledem k silné pasivaci elektrodového povrchu byla navržena metoda jeho elektrochemické aktivace v 0,5M roztoku kyseliny sírové. Elektrodový povrch byl před každým skenem elektrochemicky čištěn střídáním potenciálů +3 V, -3 V, +3 V, -3 V, +3 V, každý potenciál vždy po dobu 10 s. Jako nejvhodnější pH pro stanovení bylo z důvodu nejvyšší odezvy elektrody zvoleno pH 12. Dále byl studován vliv přídavku methanolu a acetonitrilu na stanovení. Bylo zjištěno, že methanol výrazně neovlivnil stanovení do množství 20 % (V/V) v měřeném vzorku, acetonitril až do obsahu 70 % (V/V). Kalibrační závislost byla proměřena v rozsahu koncentrací benzofenonu-3 od  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  do  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  bez přídavku organických rozpouštědel do měřených roztoků. Bylo dosaženo meze detekce  $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a meze stanovitelnosti  $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Elektrochemické vlastnosti elektrody byly studovány pomocí cyklické voltametrie s využitím redoxního systému  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ , kdy po pětíměsíčním používání elektrody došlo k výraznému zhoršení parametrů, a tedy pravděpodobnému poškození elektrody vlivem příliš zásaditého pH.

## 6 Literatura

1. National Library of Medicine (US), Division of Specialized Information Services: *Hasardous Substances Data Bank*. Dostupné z URL: <<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>> [cit. 21.11.2013]
2. Final Report on the Safety Assessment of Benzophenones-1, -3, -4, -5, -9, and -11. *Journal of the American College of Toxicology* **2**:5, 35 – 77 (1983).
3. SCCP (Scientific Committee on Consumer Products), Opinion on benzophenone-3, 16 December 2008. Dostupné z URL: <[http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_sccp/docs/sccp\\_o\\_159.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_159.pdf)> [cit. 3.12.2013]
4. Suzuki, T.; Kitamura, S.; Khota, R.; Sugihara, K.; Fujimoto, N.; Ohta, S.: Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens. *Toxicology and Applied Pharmacology* **203**, 9 – 17 (2005).
5. Okereke, Ch. S.; Abdel-Rhaman, M. S.; Friedman, M. A.: Disposition of benzophenone-3 after dermal administration in male rats. *Toxicology Letters* **73**:2, 113 – 122 (1994).
6. Okereke, Ch. S.; Barat, S. A.; Abdel-Rhaman, M. S.: Safety evaluation of benzophenone-3 after dermal administration in rats. *Toxicology Letters* **80**:1-3, 61 – 67 (1995).
7. Blüthgen, N.; Zucchi, S.; Fent, K.: Effects of the UV filter benzophenone-3 (oxybenzone) at low concentrations in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology and Applied Pharmacology* **263**, 184 – 194 (2012).
8. Molina-Molina, J.-M.; Escande, A.; Pillon, A.; Gomez, E.; Pakdel, F.; Cavailles, V.; Olea, N.; Aït-Aïssa, S.; Balaguer, P.: Profiling of benzophenone derivatives using fish and human estrogen receptor-specific in vitro bioassays. *Toxicology and Applied Pharmacology* **232**, 384 – 395 (2008).

9. Benedé, J.L.; Chisvert, A.; Salvador, A.; Sánchez-Quiles, D.; Tovar-Sánchez, A.: Determination of UV filters in both soluble and particulate fractions of seawaters by dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **812**, 50 – 58 (2014).
10. Negreira, N.; Rodríguez, I.; Ramil, M.; Rubí, E.; Cela, R.: Sensitive determination of salicylate and benzophenone type UV filters in water samples using solid-phase microextraction, derivatization and gas chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **638**, 36 – 44 (2009).
11. Felix, T.; Hall, B. J.; Brodbelt, J. S.: Determination of benzophenone-3 and metabolites in water and human urine by solid-phase microextraction and quadrupole ion trap GC-MS. *Analytica Chimica Acta* **371**, 195 – 203 (1998).
12. Negreira, N.; Rodríguez, I.; Ramil, M.; Rubí, E.; Cela, R.: Solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of hydroxylated benzophenone UV absorbers in environmental water samples. *Analytica Chimica Acta* **654**, 162 – 170 (2009).
13. Wang, L.-H.: Voltammetric behaviour of sunscreen agents at mercury film electrode. *Electroanalysis* **14**:11, 773 – 781 (2002).
14. Vidal, L.; Chisvert, A.; Canals, A.; Psillakis, E.; Lapkin, A.; Acosta, F.; Edler, K. J.; Holdaway, J. A.; Marken, F.: 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).
15. Laranjeira, M. T.; de Lima, F.; de Oliveira, S. C.; Ferreira, V. S.; de Oliveira, R. T. S.: Analytical determination of benzophenone-3 in sunscreen preparations using boron-doped diamond electrodes. *American Journal of Analytical Chemistry* **2**, 383 – 391 (2011).

16. Cvačka, J.; Swain, G. M.; Barek, J.; Zima, J.: Stanovení aminonaftalenů a aminobifenyľů kapalinovou chromatografií s amperometrickou detekcí na diamantové filmové elektrodě. *Chemické Listy* **96**, 33 – 38 (2002).
17. Musilová, J.; Barek, J.; Pecková, K.: Použití diamantových filmových elektrod dopovaných borem pro stanovení organických látek. *Chemické Listy* **103**, 469 – 478 (2009).
18. Urtiaga, A.; Fernandez-Castro, P.; Gómez, P.; Ortiz, I.: Remediation of wastewaters containing tetrahydrofuran. Study of the electrochemical mineralization on BDD electrodes. *Chemical Engineering Journal* **239**, 341 – 350 (2014).
19. Panizza, M.; Cerisola, G.: Application of diamond electrodes to electrochemical processes. *Electrochimica Acta* **51**, 191 – 199 (2005).
20. Waldvogel, S. R.; Elser, B.: Electrochemical synthesis on boron-doped diamond. *Electrochimica Acta* **82**, 434 – 443 (2012).
21. Pleskov, Yu., V.: Electrochemistry of diamond: A review. *Russian Journal of Electrochemistry* **38**:12, 1275 – 1291 (2002).
22. Heinrich, G.; Grögler, T.; Rosiwal, S. M.; Singer, R. F.; Stöckel, R.; Ley, L.: The influence of diamond chemical vapour deposition coating parameters on the microstructure and properties of titanium substrates. *Diamond and Related Materials* **5**, 304 – 307 (1996).