

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



STANOVENÍ
5-AMINO-6-NITROCHINOLINU
NA UHLÍKOVÉ PASTOVÉ ELEKTRODĚ

Diplomová práce

Studijního oboru Analytická chemie

Praha 2008

Lenka Němcová

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MŠMT MSM0021620857 a LC06035.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením Doc. RNDr. Jiřího Zimy, CSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 22. března 2008.

Ráda bych poděkovala Doc. RNDr. Jiřímu Zimovi, CSc., za odborné vedení, cenné rady, připomínky a veškerou pomoc při vypracování mé diplomové práce. Chtěla bych rovněž poděkovat všem členům katedry analytické chemie za pomoc a příjemné prostředí, které mi poskytovali v průběhu celé mé práce. Děkuji také své rodině za umožnění studia na vysoké škole a za podporu během celého studia.

Klíčová hesla :

Voltametrie

HPLC – spektrofotometrická detekce

HPLC – elektrochemická detekce

HPLC – reverzní fáze

Klíčová slova :

DC voltametrie

Diferenční pulzní voltametrie

Adsorpční rozpouštěcí voltametrie

Cyklická voltametrie

HPLC

5-amino-6-nitrochinolin

Uhlíková pastová elektroda

Key Words plus :

Voltammetry

HPLC – spectrophotometric detection

HPLC – electrochemical detection

HPLC – RP

Key Words :

DC voltammetry

Differential pulse voltammetry

Adsorptive stripping voltammetry

Cyclic voltammetry

HPLC

5-amino-6-nitroquinoline

Carbon paste electrode

Obsah

1. Teoretická část	9
1.1 Cíl práce.....	9
1.2 Studovaná látka	9
1.3 Uhlíková pastová elektroda	11
2. Experimentální část	13
2.1 Použité chemikálie.....	13
2.2 Studovaná látka	14
2.3 Použité aparatury	15
2.3.1 Voltametrická měření	15
2.3.2 HPLC aparatura	15
2.4 Další používaná zařízení.....	16
2.5 Pracovní postupy	17
2.5.1 Voltametrie	17
2.5.2 Modelové vzorky.....	18
2.5.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	18
2.6 Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku studované látky.....	20
3. Výsledky a diskuse	22
3.1 Voltametrická stanovení 5-amino-6-nitrochinolinu	22
3.1.1 Anodická DP voltametrie	22
3.1.2 Anodická DC voltametrie.....	27
3.1.3 Katodická DP voltametrie	32
3.1.4 Katodická DC voltametrie.....	38
3.1.5 Vliv redukce kyslíku na katodické voltamogramy	43
3.1.6 Cyklická voltametrie.....	45
3.1.7 Diferenční pulzní adsorpční rozpouštěcí voltametrie.....	52

3.2 Modelové vzorky.....	57
3.2.1 Stanovení 5-amino-6-nitrochinolinu v pitné vodě.....	57
3.2.2 Stanovení 5-amino-6-nitrochinolinu v říční vodě	60
3.3 HPLC.....	63
3.3.1 Optimalizace detekce.....	63
3.3.2 Kalibrační závislosti	69
4. Závěr	76
5. Literatura	78

Seznam použitých zkratek

5-A6-NQ	5-amino-6-nitrochinolin
α	hladina významnosti
A	absorbance
A_p	plocha píku
AU, mAU	jednotky absorbance
BR	Brittonův-Robinsonův pufr
c	koncentrace
CAS	Chemical Abstracts Service
CPE(s)	uhlíková pastová elektroda (Carbon Paste Electrode(s))
CVA	cyklická voltametrie
DPAdSV	diferenční pulzní adsorpční rozpouštěcí voltametrie
$E_{1/2}$	půlvlnový potenciál
E_{aku}	potenciál akumulace
E_{in}	počáteční potenciál
E_p	potenciál píku
ED	elektrochemická detekce
DCV	DC (direct current) voltametrie
DPV	diferenční pulzní voltametrie
h_p	výška píku
HC	heterocyklické uhlovodíky
HCA	heterocyklické aminy
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IARC	International Agency for Research on Cancer
IGC ₅₀	koncentrace způsobující 50 % pokles růstu (50% inhibitory growth concentration)
I_{lim}	limitní proud
I_p	proud píku
λ	vlnová délka
L	linearita
L_D	mez detekce

MeOH	methanol
M_r	relativní molekulová hmotnost
NTP	National Toxicology Program
OSHA	Occupational Safety and Health Administration
p.a.	pro analýzu
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
pK	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
ρ	hustota
R	korelační koeficient
R^2	koeficient determinace
RP-18	reverzní fáze s chemicky vázaným oktadecylsilanem
RP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích
t	čas
t_{aku}	doba akumulace
t_t	teplota tání
UV	ultrafialová oblast
VIS	viditelná oblast

1. Teoretická část

1.1 Cíl práce

Předkládaná diplomová práce se zabývá studiem voltametrického chování 5-amino-6-nitrochinolinu (5-A6-NQ) na uhlíkové pastové elektrodě a následným využitím získaných výsledků pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii na reverzních fázích (RP-HPLC) s elektrochemickou detekcí založené na redukcí stanovované látky.

Cílem této práce bylo prozkoumání podmínek pro stanovení studované látky na uhlíkové pastové elektrodě (CPE) a dosažení co nejnižší meze detekce.

1.2 Studovaná látka

Nádorová onemocnění jsou v ekonomicky vyspělých státech druhou nejčastější příčinou úmrtí. Podle Národního onkologického registru bylo v České republice v roce 2000 nově hlášeno přes 56 tisíc nádorových onemocnění. Průměrně u nás tedy každý den na následky této diagnózy zemře okolo 76 pacientů (ročně přes 27 tisíc osob). Při vzniku zhoubných nádorů se uplatňují různé vnitřní a vnější faktory, z nichž vnější značně převažují. Zatímco při experimentální karcinogenezi u zvířat se používají vysoké dávky karcinogenních sloučenin, u lidí obvykle spolupůsobí více karcinogenních faktorů v malých množstvích po dlouhou dobu a jejich účinek se vzájemně sčítá nebo násobí^{1,2}.

Studovaný 5-amino-6-nitrochinolin patří do skupiny nitro- a aminoderivátů heterocyklických uhlovodíků (HC), které jsou svými vlastnostmi a výskytem podobné polycyklickým aromatickým uhlovodíkům (PAH)³.

PAH představují skupinu perzistentních organických látek přítomných ve všech složkách a oblastech životního prostředí, jež vstupují do okolí nejčastěji jako důsledek spalování fosilních paliv^{4,5} nebo jako vedlejší produkty průmyslových procesů a během zpracování potravin⁶. Protože PAH jsou látky víceméně všudypřítomné, patří expozice těmto kancerogenům k realitě každodenního života^{7,8}. Vzhledem ke své nízké těkavosti je většina karcinogenních PAH adsorbována na tuhé částice jemně rozptýlené v prostředí, které svou povahou mohou rovněž výrazně ovlivnit účinky PAH na lidský organismus, proto se analyzují i biologické tekutiny exponovaných jedinců⁹. PAH jsou nejčastěji stanovovány plynovou chromatografií ve spojení

s hmotnostním spektrometrem popřípadě s jinými detektory a kapalinovou chromatografií s fluorescenčním, spektrofotometrickým nebo elektrochemickým detektorem^{10,11,12}. Omezení výskytu těchto látek v životním či pracovním prostředí vyžaduje v první řadě jejich systematické a důsledné monitorování.

Heterocyklické aminy (HCA) jsou skupinou velmi škodlivých látek, které jsou genotoxické a mají vlastnosti mutagenní i karcinogenní¹³. Jejich výskyt je srovnatelný s PAH. Vznikají zejména při tepelném zpracování masa (nad 180 °C)¹⁴, spalování fosilních paliv¹⁵ a rovněž se vyskytují v cigaretovém kouři¹⁶. Z potravy bylo izolováno nejméně 23 HCA, u 19 z nich byla objasněna chemická struktura a u 10 byly prokázány mutagenní a karcinogenní vlastnosti¹⁷. Mezi látky s prokázanými mutagenními a karcinogenními vlastnostmi patří 2-amino-3,4-dimethylimidazo [4,5-*f*] chinolin a 2-amino-3-methylimidazo [4,5-*f*] chinolin^{18,19}. Vstřebávání HCA u experimentálních zvířat je téměř stoprocentní a močí se vyloučí jen 1 – 2 %²⁰, což svědčí o tom, že většina těchto látek je metabolicky přeměněna. Genotoxicita heterocyklických aminů závisí na metabolické aktivaci detoxikačními enzymy, hlavně jaterním cytochromem P 450. Enzym oxiduje aminoskupinu na hydroxyaminoskupinu. Ta je pak esterifikována a vznikne konečná forma, která tvoří adukty s DNA²¹.

Řada derivátů chinolinu je využívána ve farmaceutickém průmyslu. Dichlorderivát 8-hydroxychinolinu se používá pod názvem Endiaron k léčbě střevních infekcí. 4-Aminochinolin (chloroquine)^{22,23} a 8-aminochinolin (primaquine)^{24,25,26} se používají k léčbě malárie.

U studované látky zatím nebyla prokázána karcinogenita ani mutagenita (není v seznamu IARC, NTP, OSHA)^{27,28}. Byly však studovány její toxikologické vlastnosti na *Tetrahymena pyroformis* (IGC₅₀ - koncentrace způsobující 50% pokles růstu), které jsou srovnatelné s 4-amino-2-nitrofenolem²⁹, u kterého byly prokázány karcinogenní účinky na zvířatech. Dále byla studovaná látka použita pro syntézu některých radioligandů s využitím v pozitronové emisní tomografii³⁰ a dále na syntézu nových druhů lokálních anestetik³¹.

1.3 Uhlíková pastová elektroda

Uhlíkové pastové elektrody (Carbon Paste Electrodes, CPEs) byly objeveny již v roce 1958 R.N.Adamsem³². Hlavním důvodem, který přispěl k jejich zavedení, byla snaha nalézt elektrodu s obnovitelným povrchem, která by byla využitelná pro anodické oxidace. Měla se jí stát tzv. "kapající uhlíková elektroda", jakási disperze práškového uhlíku v organické kapalině, realizovaná pomocí kapiláry. Takováto kapající uhlíková elektroda se neosvědčila, avšak ukázalo se, že hustší směs práškového uhlíku s organickou kapalinou (uhlíková pasta) je vhodným materiálem pro konstrukci elektrod se zajímavými vlastnostmi³³. Uhlíková pasta může být také modifikována různými látkami a ve srovnání s úpravou pevných elektrod je její modifikace mnohem jednodušší³⁴.

CPEs patří do speciální skupiny heterogenních uhlíkových elektrod³⁴. Skládají se z uhlíkové pasty, složené z uhlíkového prášku a pojiva, naplněné do elektrodového pouzdra (Obr. 1.1). Jako pastovací kapaliny se používají nejčastěji chemicky inertní, elektrochemicky inaktivní a málo těkavé látky, nejčastěji organické kapaliny jako např. minerální nebo silikonový olej. Požadovanými vlastnostmi uhlíkového prášku je stejná velikost částic a nízká adsorpční schopnost. Chování řady připravených past se mnohdy ustálí až po určité době (asi 24 hodin), zřejmě v důsledku následné samovolné homogenizace u čerstvě připravené směsi. Naplněnou elektrodu není vhodné ponechávat příliš dlouho na vzduchu, neboť pasta zvolna vysychá, proto se přechovává ponořena koncovým otvorem v nádobce s destilovanou vodou³³.

Šířka potenciálového okna CPE je srovnatelná s pevnými elektrodami – platinovými či běžnými uhlíkovými elektrodami³⁵. V neutrálním prostředí se rozmezí potenciálů použitelných pro měření pohybuje mezi -1,3 až +1,4 V, v alkalických (kyselých) prostředích se pak potenciálové okno posouvá o několik desetin voltu směrem k nižším (vyšším) hodnotám potenciálů³⁶. CPEs vykazují nezanedbatelný proud, způsobený elektrodovou redukcí rozpuštěného kyslíku v pastě. Signál se projevuje rušivě při používání CPEs pro sledování dějů v oblasti katodických potenciálů. Podobný efekt způsobuje naadsorbovaný kyslík i u pevných elektrod, ale CPEs trpí přítomností kyslíku výrazněji. Mezi veliké přednosti CPEs patří velmi nízké hodnoty zbytkových proudů. Rozhodující roli hraje právě přítomnost pastovací kapaliny, se snižovaným obsahem pastovací kapaliny se vlastnosti CPEs přibližují vlastnostem pevných elektrod, a tedy vykazují vyšší zbytkové proudy. Používaný poměr závisí samozřejmě na konkrétních použitých materiálech, pohybuje se většinou kolem 0,4 ml pastovací kapaliny na jeden gram uhlíkového prášku³³. Nižší stabilita pasty v roztocích s vysokým obsahem

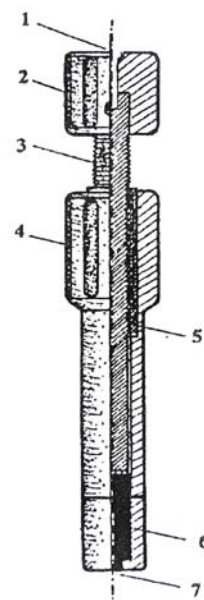
organického rozpouštědla lze vyřešit použitím mikrokuliček skelného uhlíku³⁷. Důležitou charakteristikou elektrody je také reprodukovatelnost její odezvy, která je vzhledem k hůře definovanému povrchu uhlíkové pasty nižší³³, než například u rtuťových elektrod.

Použití CPEs je poměrně široké jak pro stanovení anorganických, tak i organických sloučenin³⁸ a biologicky důležitých látek. Nejvýznamnější místo pak zaujímají voltametrické metody využívající nových senzorů na bázi chemicky modifikované uhlíkové pasty. Při analýzách složitých směsí organických látek separačními metodami se CPEs rovněž uplatnily při konstrukcích elektrochemických detektorů. U těchto detektorů jsou pozitivně hodnoceny hlavně mechanické vlastnosti pasty a jednoduchost, s jakou lze regenerovat její povrch³⁹.

Obr. 1.1

Pouzdro pro uhlíkovou pastovou elektrodu³³

- 1) zdířka pro elektrický kontakt
- 2) teflonová hlava
- 3) píst se závitem
- 4) tělo elektrodového pouzdra
- 5) ocelová vložka se závitem
- 6) dutina naplněná uhlíkovou pastou
- 7) koncový otvor



2. Experimentální část

2.1 Použité chemikálie

Studovaná látka: 5-amino-6-nitrochinolin (97 %, Aldrich)

Zásobní roztok o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním přesně odváženého množství látky v methanolu (p.a., Lach-Ner, Neratovice). Roztoky o nižších koncentracích byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku methanolem. Všechny roztoky byly uchovávány v temnu v chladničce při konstantní teplotě $5 \text{ }^\circ\text{C}$.

Brittonovy-Robinsonovy (BR) tlumivé roztoky⁴⁰ o příslušném pH byly připraveny smísením vodného roztoku hydroxidu sodného (p.a., Lachema Brno) o koncentraci $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ s roztokem obsahujícím kyselinu boritou (p.a., Lachema Brno), kyselinu fosforečnou (85 %, $\rho = 1,71 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$, p.a., Lachema Brno) a octovou kyselinu (98 %, $\rho = 1,06 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$, p.a., Lach-Ner, Neratovice), každou o koncentraci $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Přesná hodnota pH byla měřena pH metrem.

Pro přípravu modelových vzorků byl použit BR pufr o pH 11, připraven smísením vodného roztoku hydroxidu sodného o koncentraci $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ s roztokem obsahujícím kyselinu boritou, kyselinu fosforečnou a octovou kyselinu, každou o koncentraci $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

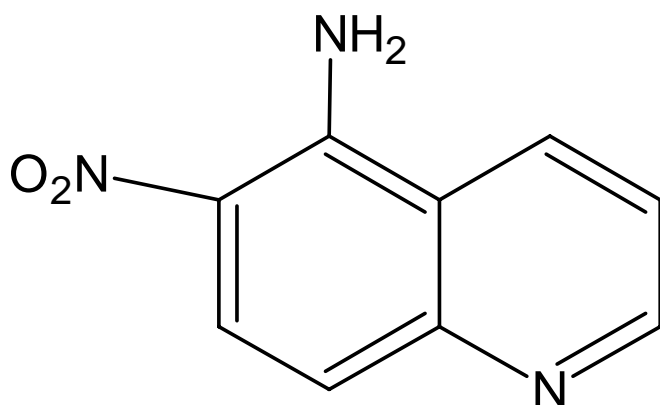
Pro přípravu mobilních fází byl použit methanol pro HPLC (Chromservis, Praha). Fosfátový pufr byl tvořen $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ dihydrogenfosforečnanem sodným (p.a., Lachema, Neratovice), jehož pH bylo upraveno na požadovanou hodnotu koncentrovanou kyselinou fosforečnou (p.a., Lachema Brno).

K přípravě vodných roztoků a mobilních fází byla použita deionizovaná voda (Millipore Q-plus System, Millipore, USA).

Uhlíková pasta byla připravena smísením 250 mg mikrokuliček skelného uhlíku o průměru $0,4 - 12 \text{ } \mu\text{m}$ (Alpha Aesar, USA) a 90 μl minerálního oleje (Fluka Biochemika, Švýcarsko).

2.2 Studovaná látka

5-amino-6-nitrochinolin^{27,41}



C.A.S. Name : 5-amino-6-nitroquinoline

C.A.S. Registry number : [35975-00-9]

$C_9H_7N_3O_2$

$M_r = 189,17$

$t_f = 272 - 273^\circ C$

$pK_a = 3,81$ (při 25 °C ve vodném prostředí)

fyzikální stav : okrově žlutý prášek

zkratka : 5-A6-NQ

2.3 Použité aparatury

2.3.1 Voltametrické techniky

Sestava : EKO Tribo polarograf se softwarem Polar Pro verze 4 (Polaro-Sensors, spol.s.r.o., Praha)

Elektrody :

- pracovní elektroda byla uhlíková pastová elektroda, aktivní plocha kruhová o průměru 2 mm
- referentní elektroda byla argentschloridová elektroda s $3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl (RAE 113)
- pomocná elektroda byla platinová plíšková elektroda (ETP CZ P004-05)

2.3.2 HPLC aparatura

Pumpa : vysokotlaká pumpa Beta 10 (Ecom, ČR)

Degaser : DG 3014 (Ecom, ČR)

Dávkovač : ventil D (Ecom, ČR) se smyčkou 20 μl , nástřík byl prováděn injekční stříkačkou

Kolona A : Lichrospher[®] RP-18, 100 ($5\mu\text{m}$), 125 x 4 mm (LichroCART)

Kolona B : Kromasil B RP-18, ($7\mu\text{m}$), 250 x 4,6 mm (Prochrome)

Detektory : UV/VIS detektor Sapphire 800 (Ecom, ČR)

Amperometrický detektor ADLC 2 (Laboratorní přístroje, Praha)

- pracovní elektroda byla uhlíková pastová elektroda, aktivní plocha kruhová o průměru 3 mm
- referentní elektroda byla argentschloridová elektroda s $3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl (RAE 113)
- pomocná elektroda byla platinová drátková elektroda (ETP CZ P006-05)

Programové vybavení : Clarity 2.3.0 (DataApex, ČR), pracující v prostředí Windows XP (Microsoft)

2.4 Další používaná zařízení

pH metr : digitální měřicí přístroj Conductivity and pH meter 4330

(Jenway, UK) s kombinovanou skleněnou elektrodou (PCH 2411)

Spektrofotometr : PU 8800 (Philips, UK), stanovení stálosti zásobního roztoku

v křemenných kyvetách tloušťky 1,01 mm

2.5 Pracovní postupy

2.5.1 Voltametrie

Při voltametrických měřeních byl objem vzorku vždy 10 ml. Vzorek se připravoval odpipetováním 5 ml BR pufru ($0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) o příslušném pH, daného množství roztoku studované látky, doplněním methanolem (při přípravě roztoku obsahujícího 5 % methanolu BR puftrem) na 10 ml a převedením do voltametrické nádoby.

Všechna měření byla prováděna za laboratorní teploty.

Jako hodnota pH je uváděna hodnota vodné složky směsného roztoku.

Ve všech měřeních mimo uvedených bylo měřeno při rychlosti polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (vyjma měření závislosti výšky píku na rychlosti polarizace u cyklické voltametrie). Při pulzních technikách byly na elektrody vkládány pulzy 50 mV (při studiu redukčních reakcích -50 mV).

Při studiu redukčních reakcí byl roztok zbaven kyslíku 10min probubláváním dusíkem. Před vstupem dusíku do nádoby byla zařazena promývačka obsahující směs vody a methanolu ve stejném poměru jako analyzovaný roztok (1:1). Poté byl proveden záznam voltametrické křivky.

Při DPAdSV byla akumulace prováděna v míchaném roztoku. Po skončení akumulace bylo míchání vypnuto a proveden záznam.

Kalibrační závislosti 5-amino-6-nitrochinolinu byly zpracovány metodou lineární regrese. Meze detekce L_D ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) byly stanoveny jako množství analytu poskytující signál, jehož výška je rovna trojnásobku absolutní hodnoty šumu. Získané hodnoty úseků kalibračních závislostí byly otestovány Studentovým t -testem⁴², zda se na hladině pravděpodobnosti $\alpha = 0,05$ statisticky významně neliší od nuly.

2.5.2 Modelové vzorky

Jako vzorek pitné vody byla použita voda z vodovodu v budově chemických kateder PřF UK, Hlavova 8, Praha 2. Vzorek říční vody byl odebrán z Vltavy v Praze na nábřeží Kapitána Jaroše, 50 m po proudu od Čechova mostu.

Modelové vzorky 5-amino-6-nitrochinolinu v pitné či říční vodě byly připraveny odpipetováním 1 ml BR pufru ($0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), 4 ml pitné či říční vody, potřebného množství zásobního roztoku 5-A6-NQ, doplněním methanolem na 10 ml a převedením do voltametrické nádoby.

2.5.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Mobilní fáze byly připraveny smísením příslušných objemových dílů vodné složky a methanolu. Obsah organické složky byl vyjádřen v objemových procentech.

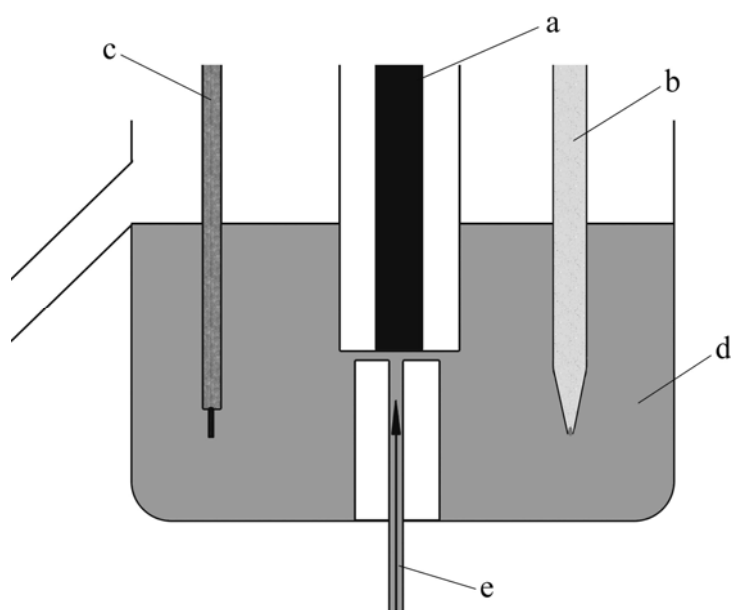
Jelikož nebyla cílem práce separace směsí látek, ale pouze stanovení jedné látky, bylo na základě výsledků HPLC stanovení nitro- a aminoderivátů chinolinu⁴³ a HPLC stanovení s využitím oxidace 5-A6-NQ⁴⁴ za účelem dosažení co nejkratších retenčních časů zvolena mobilní fáze s 90 % obsahem methanolu (připravena smísením 90 objemových dílů methanolu s 10 objemovými díly vodné složky). pH mobilních fází bylo upravováno pomocí fosfátového pufru změnou pH vodné složky mobilní fáze. V dalším textu uváděné hodnoty pH tudíž odpovídají pH vodné složky před jejím smísením s organickým modifikátorem.

Měření bylo provedeno postupně na dvou neintermostatovaných kolonách: **kolona A** Lichrospher[®] RP-18, 100 ($5 \mu\text{m}$), 125 x 4 mm, **kolona B** Kromasil B RP-18, ($7 \mu\text{m}$), 250 x 4,6 mm. Průtok mobilní fáze byl $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

Elektrochemický detektor typu wall-jet byl zapojen sériově za UV detektor. Pracoval ve tříelektrodovém zapojení s pracovní uhlíkovou pastovou elektrodou, referentní argentchloridovou elektrodou s $3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl a pomocnou platinovou elektrodou. Konec kapiláry byl přiveden k povrchu pracovní elektrody, jež byla spolu s pomocnou a referentní elektrodou umístěna v mobilní fázi (viz Obr. 2.1).

Jako optimální podmínky stanovení byl určen potenciál $-0,9 \text{ V}$, mobilní fáze tvořena $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátovým pufrům o pH 2 a methanolem v poměru (10:90).

Kalibrační závislosti 5-A6-NQ byly zpracovány metodou lineární regrese. Meze detekce L_D ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) byly stanoveny jako množství analytu poskytující signál, jehož výška je rovna trojnásobku absolutní hodnoty šumu. Získané hodnoty úseků kalibračních závislostí byly otestovány Studentovým t -testem⁴², zda se na hladině pravděpodobnosti $\alpha = 0,05$ statisticky významně neliší od nuly.



Obr. 2.1

Schéma konstrukce elektrochemického detektoru:

- a) pracovní elektroda
- b) referentní elektroda
- c) pomocná elektroda
- d) mobilní fáze
- e) přívodní kapilára

2.6 Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku studované látky⁴⁴

Stálost zásobního roztoku studované látky v methanolu byla studována spektrofotometricky.

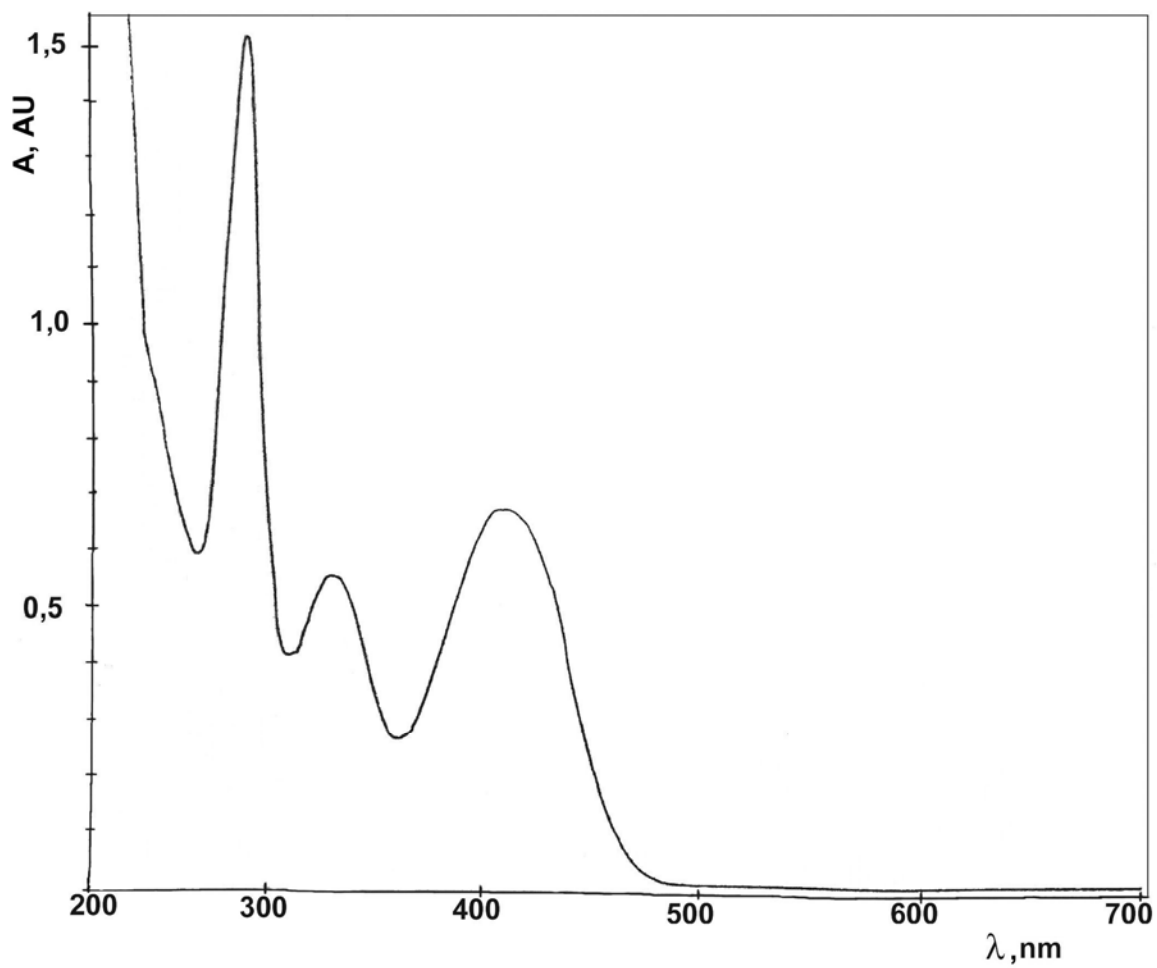
Absorpční spektrum studované látky bylo proměřováno v zásobním roztoku o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ proti methanolu v křemenných kyvetách měrné tloušťky 1,01 mm v rozmezí vlnových délek 200 až 700 nm. Změřené spektrum je uvedené na Obr. 2.2.

Sledovány byly absorbance při třech vlnových délkách v průběhu 4 měsíců, které jsou uvedeny v Tab. 2.1. Z hodnot vyplývá, že zásobní roztok je při uchování ve tmě v chladničce při teplotě 5 °C stálý nejméně 4 měsíce.

Tab. 2.1

Stálost zásobního roztoku $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ v methanolu.

<i>t</i> (dny)	$\lambda = 295 \text{ nm}$		$\lambda = 336 \text{ nm}$		$\lambda = 414 \text{ nm}$	
	A	%	A	%	A	%
0	1,546	100,0	0,566	100,0	0,686	100,0
3	1,538	99,5	0,561	99,1	0,679	99,0
10	1,539	99,5	0,565	99,8	0,681	99,3
26	1,532	99,1	0,561	99,1	0,677	98,7
51	1,547	100,1	0,568	100,4	0,688	100,3
120	1,533	99,2	0,569	100,5	0,695	101,3



Obr. 2.2

UV-VIS spektrum $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ v methanolu (měřeno v kyvetě o tloušťce 1,01 mm proti methanolu).

3. Výsledky a diskuse

3.1 Voltametrická stanovení 5-amino-6-nitrochinolinu

3.1.1 Anodická DP voltametrie

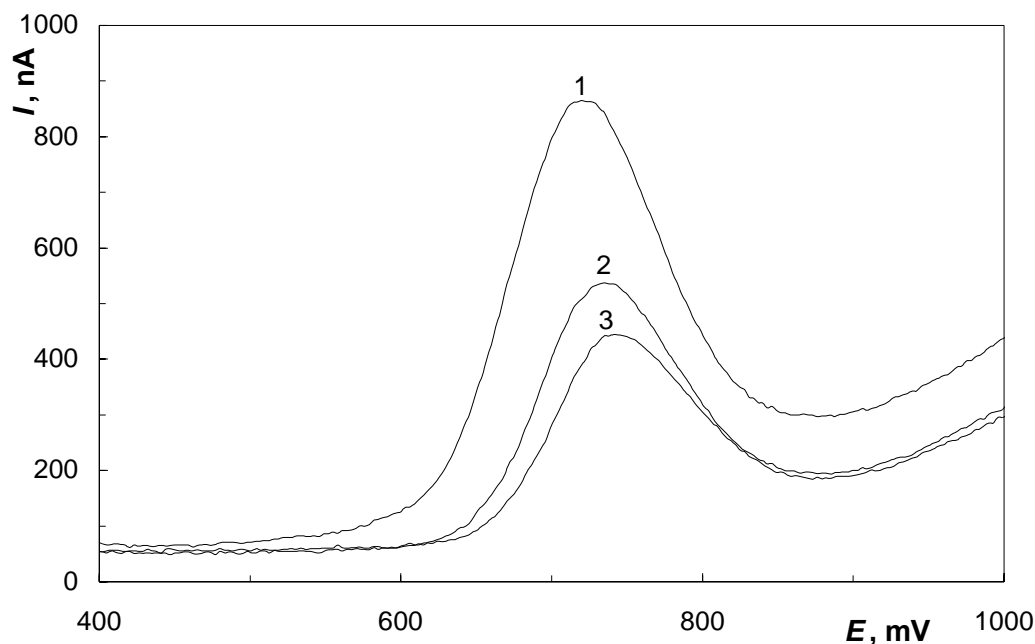
Při studiu DP voltametrického chování 5-A6-NQ na CPE bylo zjištěno, že při následných měřeních dochází k pasivaci CPE (Obr. 3.1), proto byl povrch elektrody obnovován po každém měření mechanicky otřením uhlíkové pasty filtračním papírem navlhčeným destilovanou vodou.

Vliv pH na chování 5-A6-NQ při DP voltametrie byl sledován ve směsi BR pufru o pH 2 až 12 a methanolu v poměru (1:1). Koncentrace 5-A6-NQ byla $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Hodnoty pH BR pufru, poloh píků (E_p) a proudů píků (I_p) uvádí Tab. 3.1. Naměřené voltamogramy jsou uvedeny na Obr. 3.2 a Obr. 3.3. Jak bylo zjištěno, 5-A6-NQ poskytuje jeden dobře vyvinutý pík, jehož poloha se posouvá se zvyšujícím se pH směrem k nižším hodnotám potenciálů. Výška píků se s měnící hodnotou pH mění jen málo. Pro měření koncentračních závislostí byla vybrána hodnota pH 11, při které jsou naměřené voltamogramy nejlépe vyvinuté.

Koncentrační závislosti 5-A6-NQ byly proměřeny v rozsahu $4 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v prostředí BR pufru pH 11 a methanolu v poměru (1:1). Naměřené závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Hodnoty proudů píků byly brány jako průměrná hodnota ze třech následujících měření. Na Obr. 3.4 je uvedena kalibrační přímka v celém měřeném koncentračním rozmezí, na Obr. 3.5 je pak uvedena tatáž závislost zpracovaná v logaritmické formě. Voltamogramy v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu v poměru (1:1) jsou zachyceny na Obr. 3.6.

Parametry kalibrační přímky pro stanovení 5-A6-NQ anodickou DPV na CPE jsou uvedeny v Tab. 3.2. Závislost je v měřeném rozsahu lineární, což potvrzuje i směrnice logaritmické závislosti (linearita), jejíž hodnota se rovná jedné.

Dosažený limit detekce $L_D = 2,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl stanoven jako množství analytu poskytující pík, jehož výška se právě rovná trojnásobku absolutní hodnoty šumu.



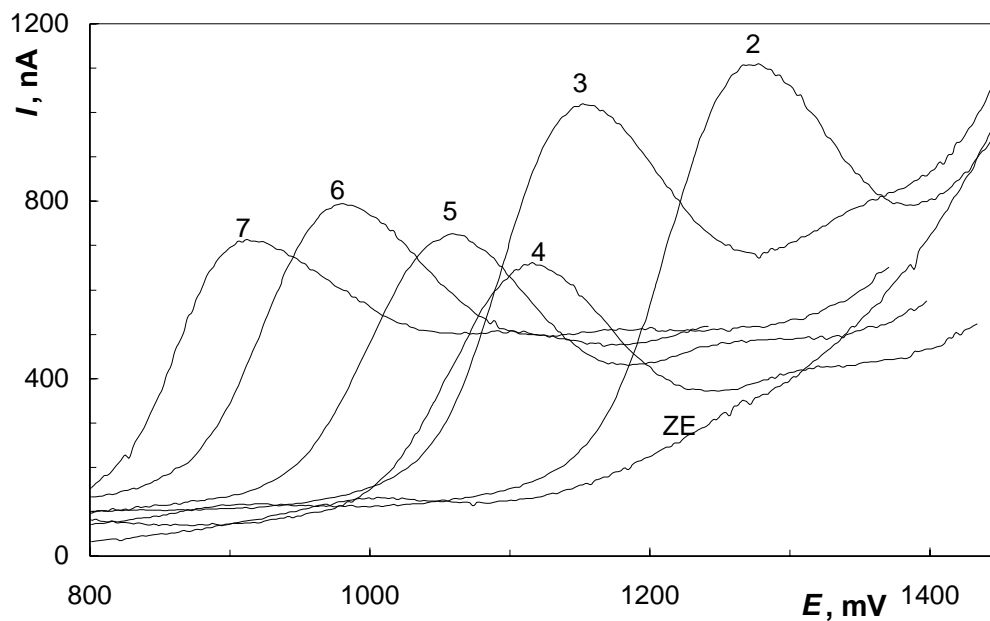
Obr. 3.1

Anodické voltamogramy $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ, měřeno metodou DPV na CPE, ukázka pasivace elektrody: povrch po mechanickém obnovení (1), následná měření bez obnovování povrchu (2, 3). Měřeno bylo v prostředí BR pufru pH 11 a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Tab. 3.1

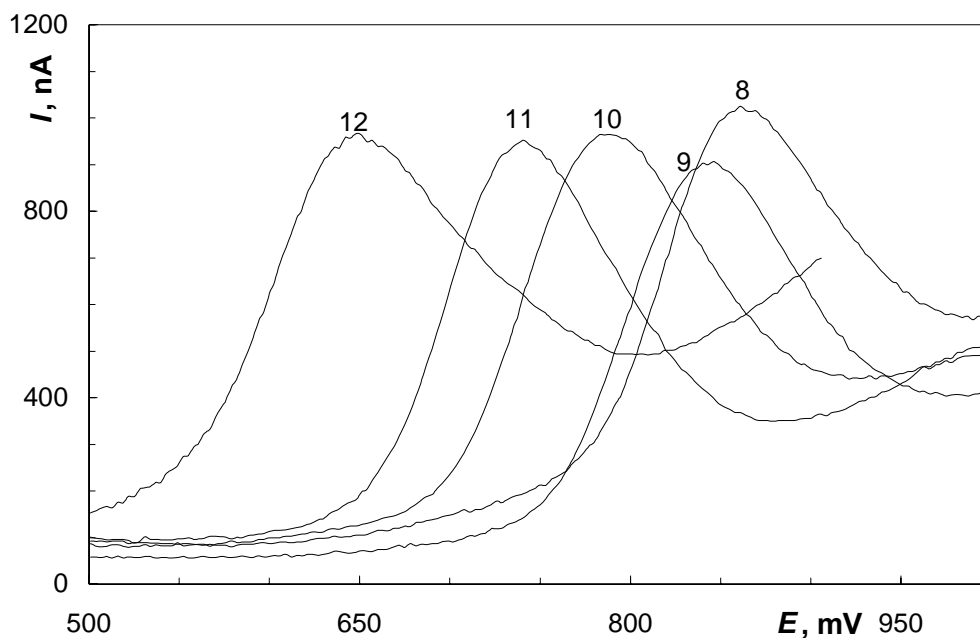
Závislost proudů píků (I_p) a potenciálů píků (E_p) $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ na pH vodné složky směsi BR pufru a methanolu v poměru (1:1). Měřeno metodou anodické DPV na CPE.

pH	I_p nA	E_p mV
2	624	1250
3	596	1156
4	493	1112
5	483	1053
6	507	980
7	494	910
8	651	858
9	635	834
10	642	785
11	689	718
12	653	650



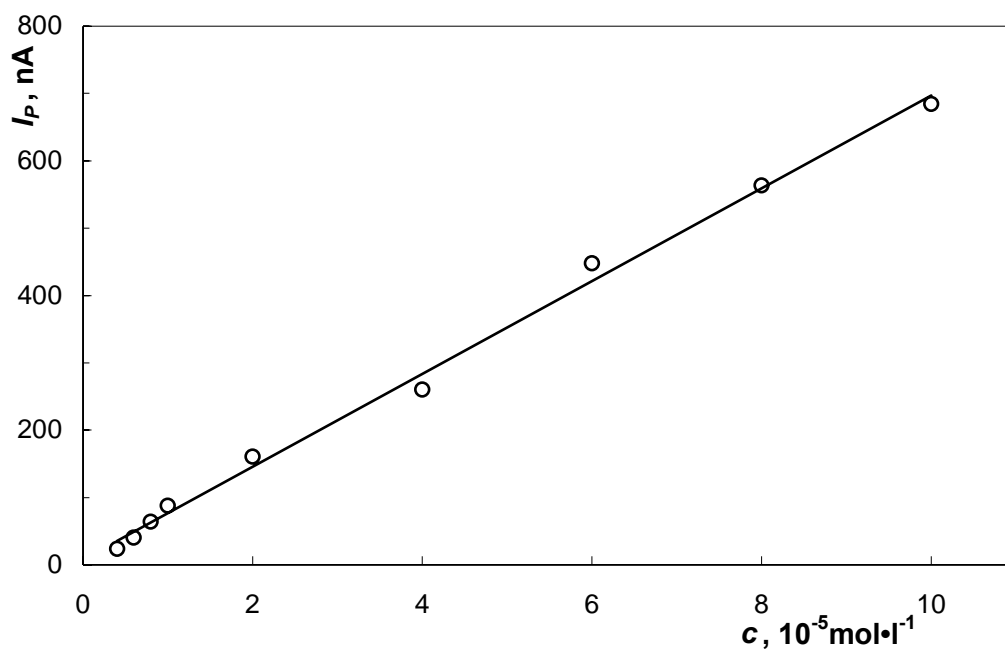
Obr. 3.2

Anodické voltamogramy $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ, měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH odpovídajícímu označení dané křivky (křivka ZE – základní elektrolyt BR pufr o pH 2) a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.



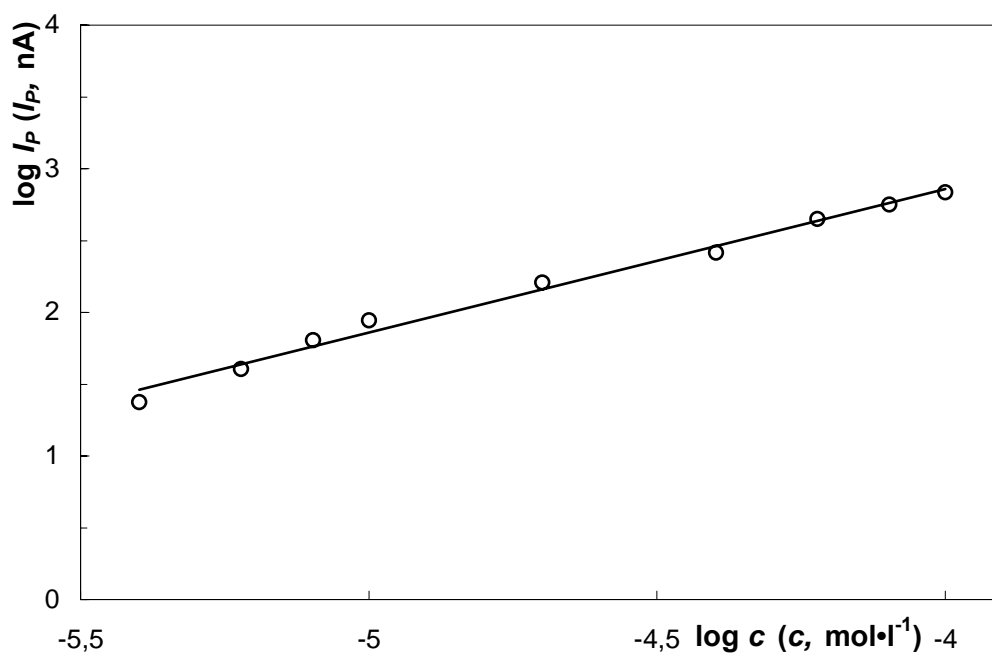
Obr. 3.3

Anodické voltamogramy $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ, měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH odpovídajícímu označení dané křivky a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.



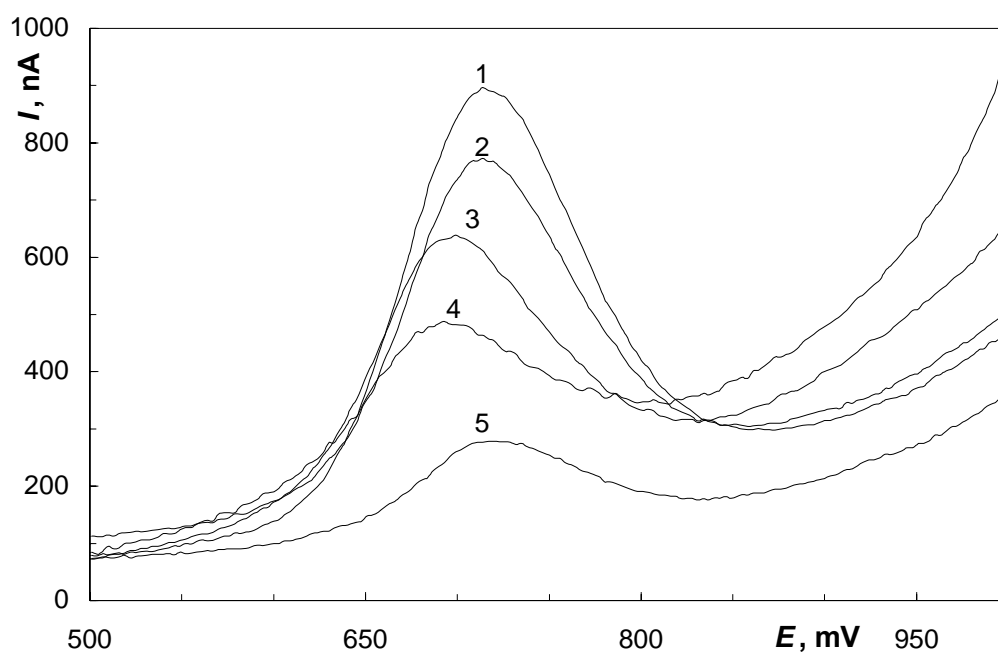
Obr. 3.4

Závislost proudu píku (I_p) na koncentraci 5-A6-NQ v rozmezí $4\cdot 10^{-6} - 1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Měřeno metodou anodické DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.



Obr. 3.5

Závislost proudu píku (I_p) na koncentraci 5-A6-NQ v logaritmické formě v rozmezí $4\cdot 10^{-6} - 1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Měřeno metodou anodické DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.



Obr. 3.6

Anodické voltamogramy 5-A6-NQ, měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.
 Koncentrace 5-A6-NQ: $1\cdot 10^{-4}$ (1), $8\cdot 10^{-5}$ (2), $6\cdot 10^{-5}$ (3), $4\cdot 10^{-5}$ (4), $2\cdot 10^{-5}$ (5) $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Tab. 3.2

Parametry kalibrační závislosti pro 5-A6-NQ, měřeno metodou anodické DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu v poměru (1:1).

c $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	směrnice $\text{mA}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$	úsek nA	R^2	linearita (směrnice závislosti $\log I_p$ na $\log c$)	R^2 (závislosti $\log I_p$ na $\log c$)	L_D $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
$4\cdot 10^{-6} - 1\cdot 10^{-4}$	6,89	8,1	0,9959	1,00	0,9898	$2,0\cdot 10^{-6}$

3.1.2 Anodická DC voltametrie

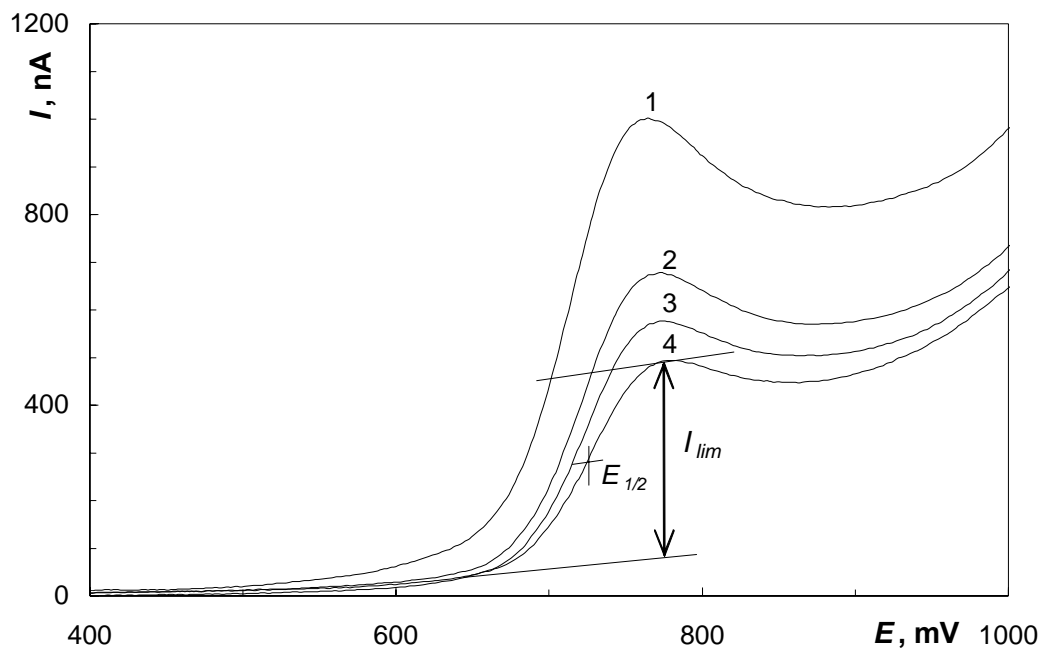
V další části práce bylo prostudováno anodické DC voltametrické chování 5-A6-NQ na CPE. I zde byl povrch elektrody obnovován po každém měření mechanicky otřením uhlíkové pasty, jelikož byla pozorována pasivace povrchu CPE (Obr. 3.7)

Vliv pH na chování 5-A6-NQ při DC voltametii byl sledován ve směsi BR pufru o pH 2 až 12 a methanolu v poměru (1:1). Koncentrace 5-A6-NQ byla $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Hodnoty pH BR pufru, půlvlnových potenciálů ($E_{1/2}$) a limitních proudů (I_{lim}) uvádí Tab. 3.3. Vyhodnocení DC voltamogramů bylo provedeno více způsoby, ale nejlépe vycházel způsob vyhodnocení uvedený na Obr. 3.7, proto byl používán dále pro vyhodnocení všech DC voltametii. Naměřené voltamogramy ukazuje Obr. 3.8 a Obr. 3.9. Jak bylo zjištěno, 5-A6-NQ poskytuje jednu dobře vyvinutou vlnu, jejíž poloha se posouvá se zvyšujícím se pH směrem k nižším hodnotám potenciálů. Výška vlny se s rostoucí hodnotou pH mění jen málo. Pro měření koncentračních závislostí byla vybrána hodnota pH 11, při které jsou naměřené voltamogramy nejlépe vyvinuté.

Koncentrační závislosti 5-A6-NQ byly proměřeny v rozsahu $4 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu v poměru (1:1). Naměřené závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Hodnoty limitních proudů byly brány jako průměrná hodnota ze třech následujících měření. Na Obr. 3.10 je uvedena kalibrační přímka v celém měřeném koncentračním rozmezí, na Obr. 3.11 je pak uvedena tatáž závislost zpracovaná v logaritmické formě. Voltamogramy v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu v poměru (1:1) jsou zachyceny na Obr. 3.12.

Parametry kalibrační přímky pro stanovení 5-A6-NQ anodickou DCV na CPE jsou uvedeny v Tab. 3.4. Závislost je v měřeném rozsahu lineární, což potvrzuje i směrnice logaritmické závislosti (linearita), jejíž hodnota je blízká jedné.

Dosažený limit detekce $L_D = 3,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl stanoven jako množství analytu poskytující vlnu, jejíž výška se právě rovná trojnásobku absolutní hodnoty šumu.



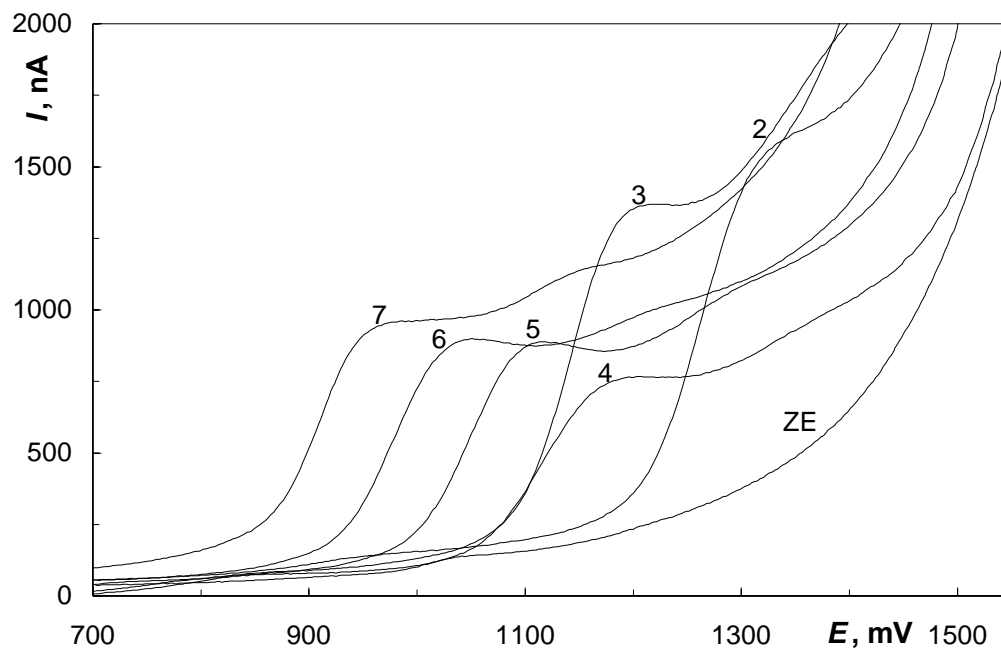
Obr. 3.7

Anodické voltamogramy $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ, měřeno metodou DCV na CPE, ukázka pasivace elektrody: povrch po mechanickém obnovení (1), následná měření bez obnovování povrchu (2, 3, 4). Měřeno bylo v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Tab. 3.3

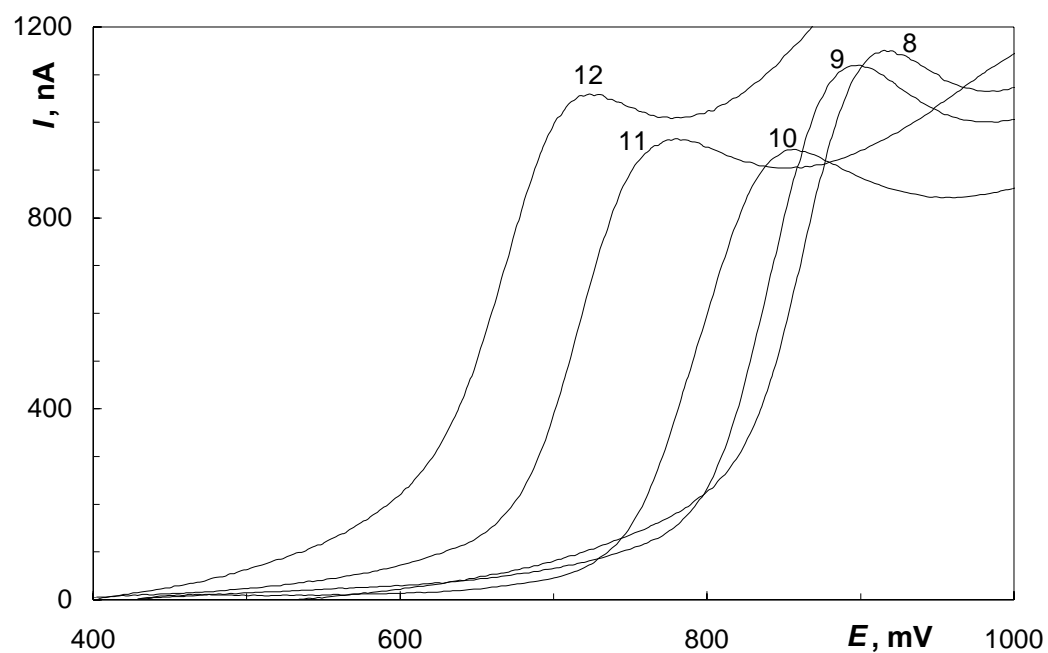
Závislost limitních proudů (I_{lim}) a půlvolných potenciálů ($E_{1/2}$) $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ na pH vodné složky směsi BR pufru a methanolu v poměru (1:1). Měřeno metodou anodické DCV na CPE.

pH	I_{lim} nA	$E_{1/2}$ mV
2	849	1284
3	831	1170
4	769	1117
5	805	1054
6	833	983
7	860	924
8	920	852
9	910	833
10	905	804
11	909	716
12	880	669



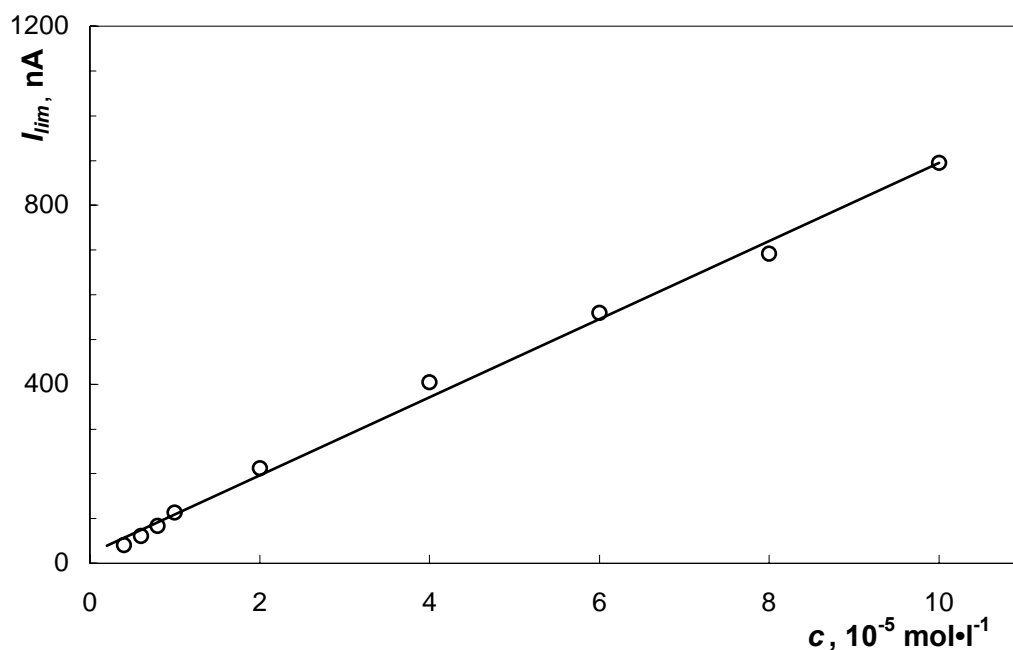
Obr. 3.8

Anodické voltamogramy $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ, měřeno metodou DCV na CPE v prostředí BR pufru o pH odpovídajícímu označení dané křivky (křivka ZE – základní elektrolyt BR pufr pH 2) a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.



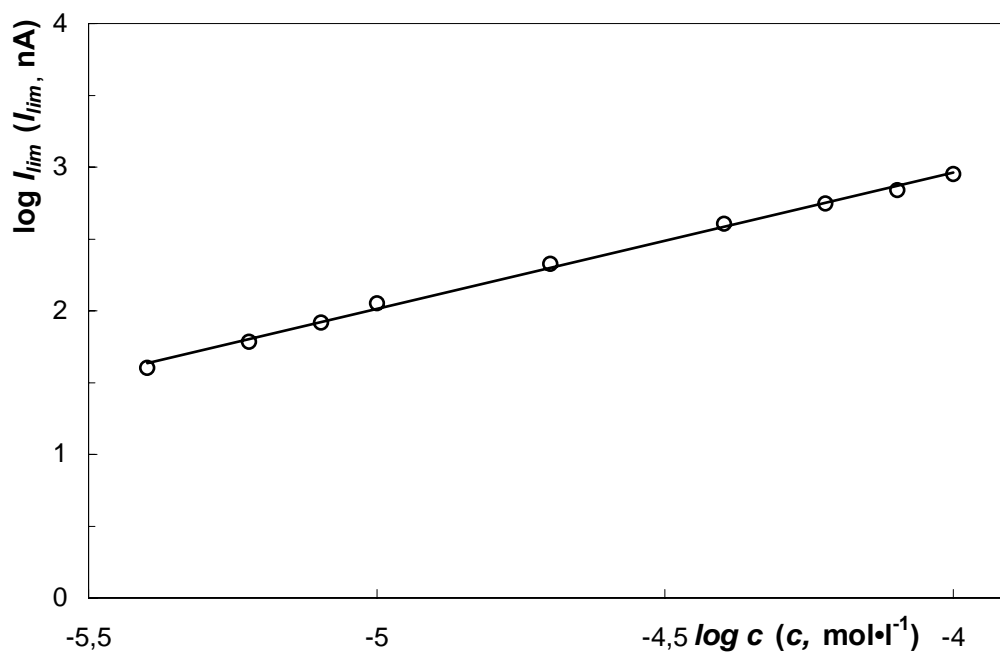
Obr. 3.9

Anodické voltamogramy $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ, měřeno metodou DCV na CPE v prostředí BR pufru o pH odpovídajícímu označení dané křivky a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.



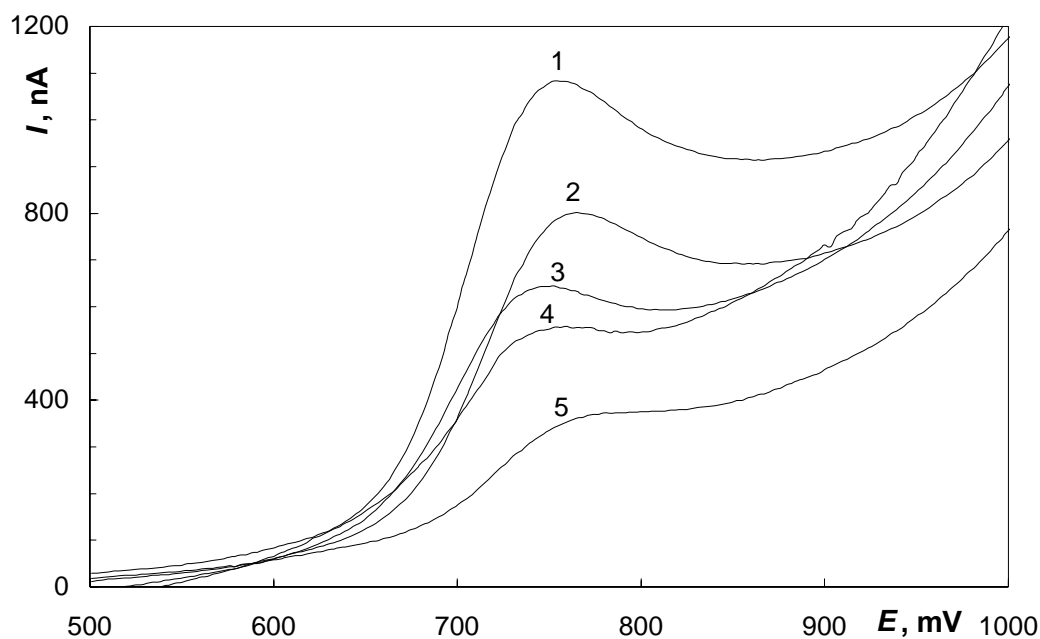
Obr. 3.10

Závislost limitního proudu (I_{lim}) na koncentraci 5-A6-NQ v rozmezí $4\cdot 10^{-6} - 1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Měřeno metodou anodické DCV na CPE v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.



Obr. 3.11

Závislost limitního proudu (I_{lim}) na koncentraci 5-A6-NQ v logaritmické formě v rozmezí $4\cdot 10^{-6} - 1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Měřeno metodou anodické DCV na CPE v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.



Obr. 3.12

Anodické voltamogramy 5-A6-NQ, měřeno metodou anodické DCV na CPE v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.
 Koncentrace 5-A6-NQ: $1\cdot 10^{-4}$ (1), $8\cdot 10^{-5}$ (2), $6\cdot 10^{-5}$ (3), $4\cdot 10^{-5}$ (4), $2\cdot 10^{-5}$ (5) $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Tab. 3.4

Parametry kalibrační závislosti 5-A6-NQ, měřeno metodou anodické DCV na CPE v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu v poměru (1:1).

c $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	směrnice $\text{mA}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$	úsek nA	R^2	linearita (směrnice závislosti $\log I_{lim}$ na $\log c$)	R^2 (závislosti $\log I_{lim}$ na $\log c$)	L_D $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
$4\cdot 10^{-6} - 1\cdot 10^{-4}$	8,73	21,7	0,9963	0,95	0,9972	$3,1\cdot 10^{-6}$

3.1.3 Katodická DP voltametrie

Přítomnost nitroskupiny na aromatickém jádře umožňuje využít ke stanovení studované látky i její elektrochemickou redukcí v oblasti negativních potenciálů. Uhlíkové pasty jsou elektrodovým materiálem, který lze s jistým omezením využít i ke sledování právě reakcí katodických.

I v případě studia katodických redukcí byl povrch elektrody obnovován po každém měření mechanicky otřením uhlíkové pasty, protože byla pozorována pasivace povrchu CPE (Obr. 3.13). Navíc byl před každým měřením roztok zbaven kyslíku 10min probubláváním dusíkem.

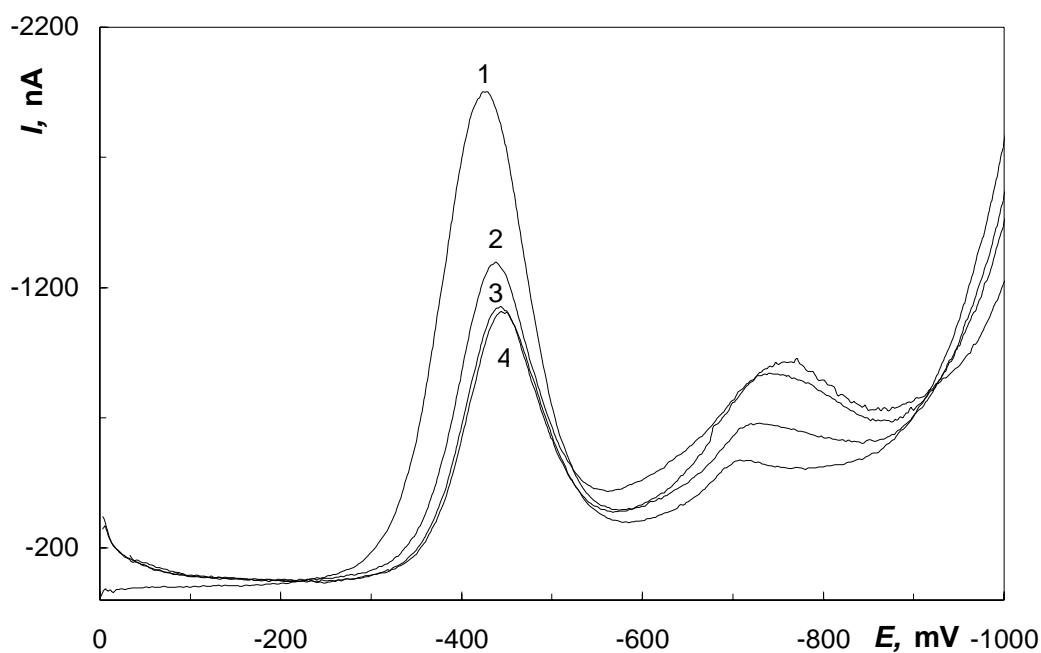
Vliv pH na chování 5-A6-NQ při DP voltametii byl sledován ve směsi BR pufru o pH 2 až 12 a methanolu v poměru (1:1) a 0,1 mol·l⁻¹ H₃PO₄ o pH 1,6 a methanolu v poměru (1:1). Koncentrace 5-A6-NQ byla 1·10⁻⁴ mol·l⁻¹. Hodnoty potenciálů pík (E_p) a proudů pík (I_p) proti pH vodné složky uvádí Tab. 3.5. Naměřené voltamogramy ukazuje Obr. 3.14 a Obr. 3.15. Jak bylo zjištěno, 5-A6-NQ poskytuje jeden dobře vyvinutý pík, jehož poloha se posouvá se zvyšujícím se pH směrem k negativnějším hodnotám potenciálů. Výška pík se s měnící hodnotou pH mění jen málo. Měření komplikovala přítomnost píku kyslíku, který je přítomen i v samotné uhlíkové pastě. Pro měření koncentračních závislostí bylo vybráno prostředí 0,1 mol·l⁻¹ H₃PO₄ o pH 1,6 a methanolu v poměru (1:1), ve kterém jsou píky 5-A6-NQ a kyslíku nejvíce odděleny. Rovněž byla proměřena kalibrační závislost ve stejném koncentračním rozsahu v BR pufru o pH 11 s methanolem v poměru (1:1).

Koncentrační závislosti 5-A6-NQ byly v obou výše uvedených prostředích proměřeny v rozsahu 2·10⁻⁶ – 1·10⁻⁴ mol·l⁻¹. Naměřené závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Hodnoty proudů pík byly brány jako průměrná hodnota ze třech následujících měření. Na Obr. 3.16 je uvedena kalibrační přímka v celém měřeném koncentračním rozmezí v 0,1 mol·l⁻¹ H₃PO₄ o pH 1,6 a methanolu v poměru (1:1), na Obr. 3.17 je pak uvedena tatáž závislost zpracovaná v logaritmické formě. Voltamogramy v koncentračním rozmezí 1·10⁻⁵ – 1·10⁻⁴ mol·l⁻¹ v prostředí 0,1 mol·l⁻¹ H₃PO₄ o pH 1,6 a methanolu v poměru (1:1) jsou zachyceny na Obr. 3.18. Kalibrační přímka v BR pufru o pH 11 a methanolu v poměru (1:1) v celém měřeném koncentračním rozmezí je uvedena na Obr. 3.19.

Parametry kalibračních přímek pro stanovení 5-A6-NQ katodickou DPV na CPE jsou uvedeny v Tab. 3.6. Kalibrační závislost v prostředí 0,1 mol·l⁻¹ H₃PO₄ o pH 1,6 a methanolu v poměru (1:1) je v měřeném rozsahu lineární, což potvrzuje i směrnice logaritmické závislosti (linearita), jejíž hodnota je blízká jedné.

Dosažené limity detekce $L_{D(\text{pH } 1,6)} = 1,3 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $L_{D(\text{pH } 11)} = 1,9 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byly stanoveny jako množství analytu poskytující pík, jehož výška se právě rovná trojnásobku absolutní hodnoty šumu.

Vzhledem k tomu, že při měření v BR pufru o pH 11 s methanolem v poměru (1:1) je pík 5-A6-NQ superponován na píku kyslíku, je výhodnější, což potvrzují i parametry kalibračních závislostí (horší linearita), měřit v prostředí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$ o pH 1,6 a methanolu v poměru (1:1).



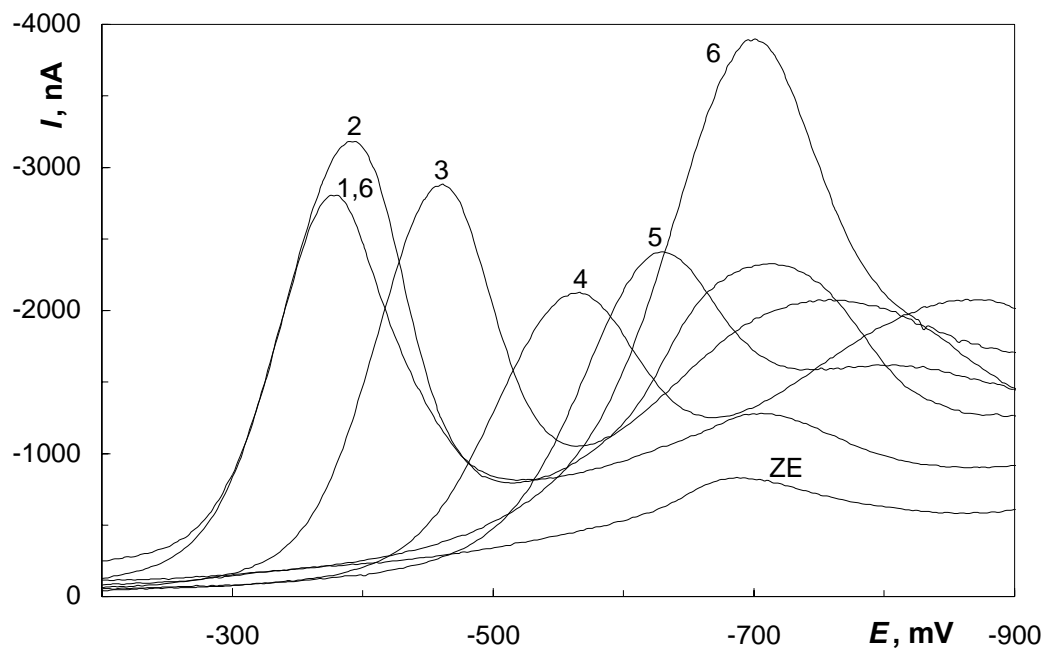
Obr. 3.13

Katodické voltamogramy $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ, měřeno metodou DPV na CPE, ukázka pasivace elektrody: povrch po mechanickém obnovení (1), následná měření bez obnovování povrchu (2, 3, 4). Měřeno bylo v prostředí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$ pH 1,6 a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

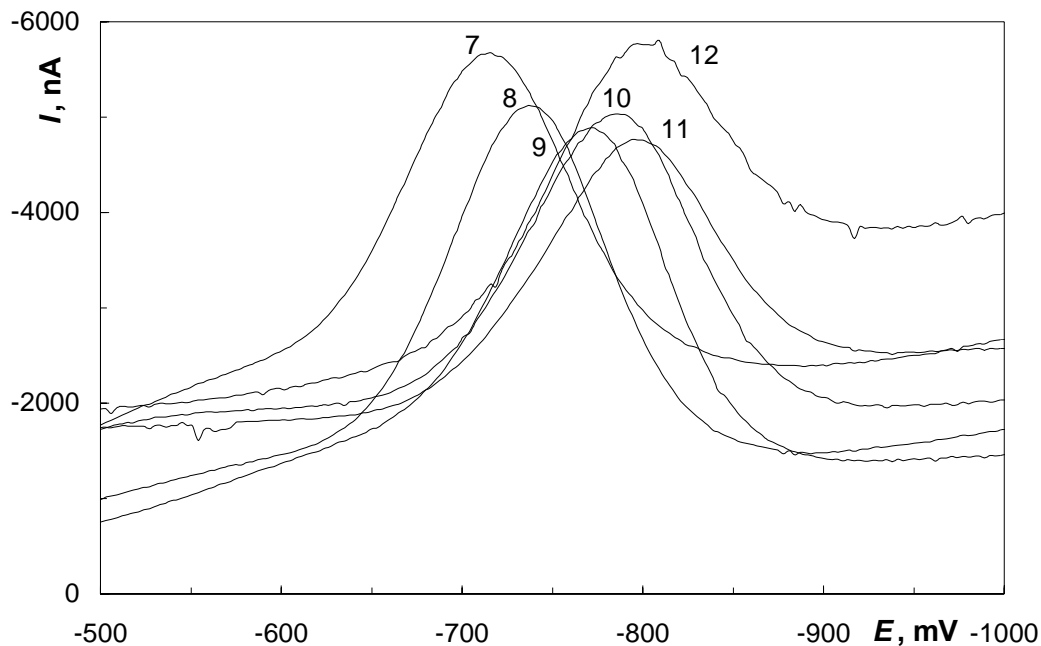
Tab. 3.5

Závislost proudů píků (I_p) a potenciálů píků (E_p) $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ na pH vodné složky směsi BR pufru (pH 1,6 odpovídá $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$) a methanolu v poměru (1:1). Měřeno metodou katodické DPV na CPE.

pH	I_p nA	E_p mV
1,6	-2302	-377
2	-2512	-402
3	-1566	-506
4	-1584	-568
5	-2062	-647
6	-2850	-693
7	-2981	-717
8	-3014	-742
9	-2815	-779
10	-3030	-785
11	-2300	-798
12	-2511	-804

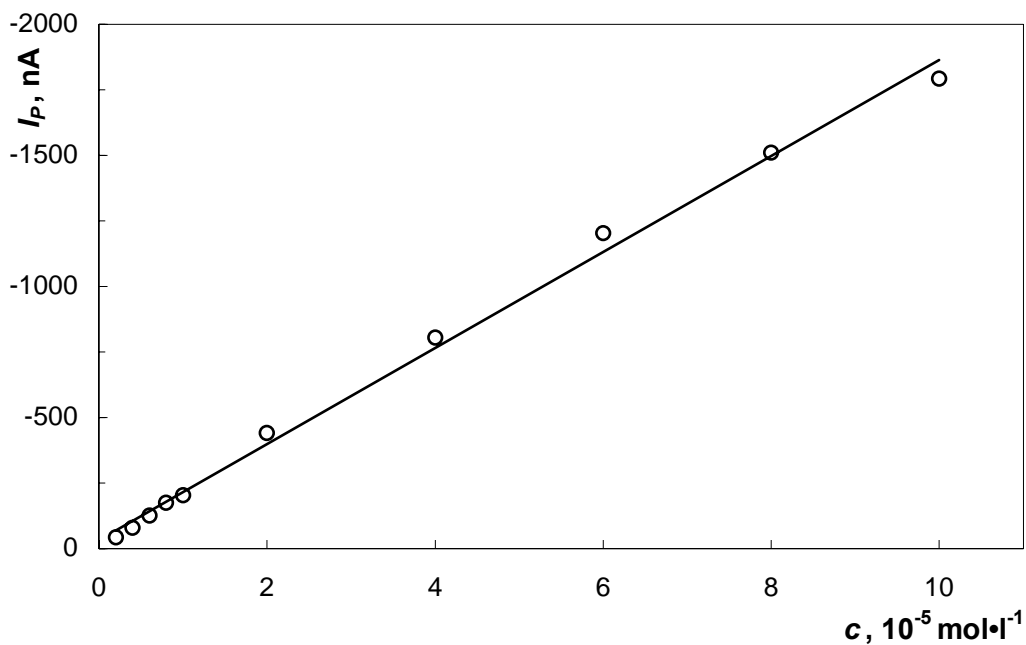
**Obr. 3.14**

Katodické voltamogramy $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ, měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH odpovídajícímu označení dané křivky (křivka ZE – základní elektrolyt $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$ o pH 1,6; křivka 1,6 – v prostředí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$) a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.



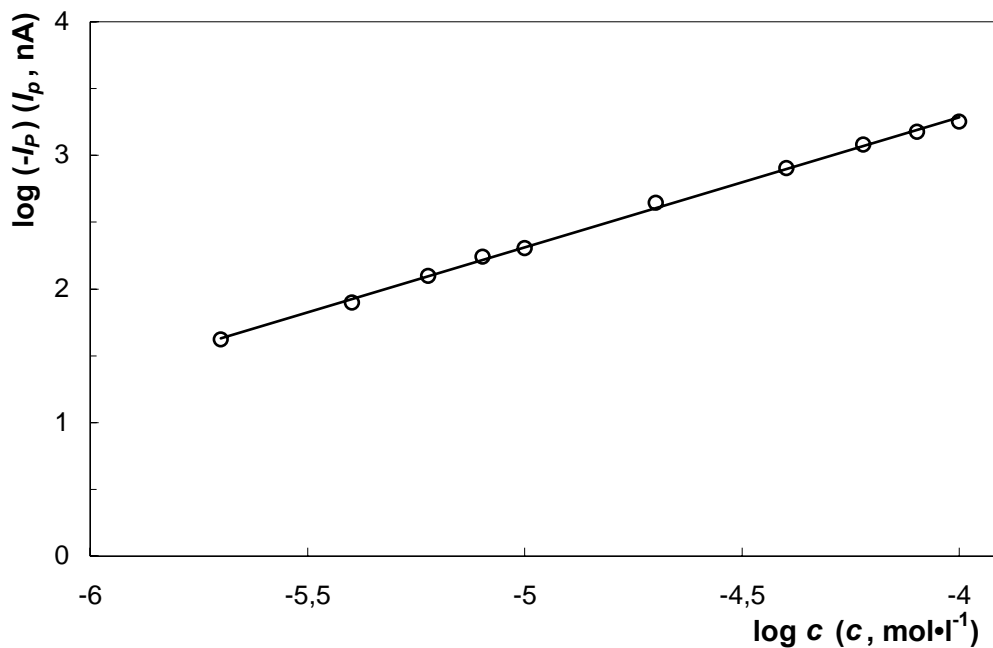
Obr. 3.15

Katodické voltamogramy $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ, měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH odpovídajícímu označení dané křivky a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.



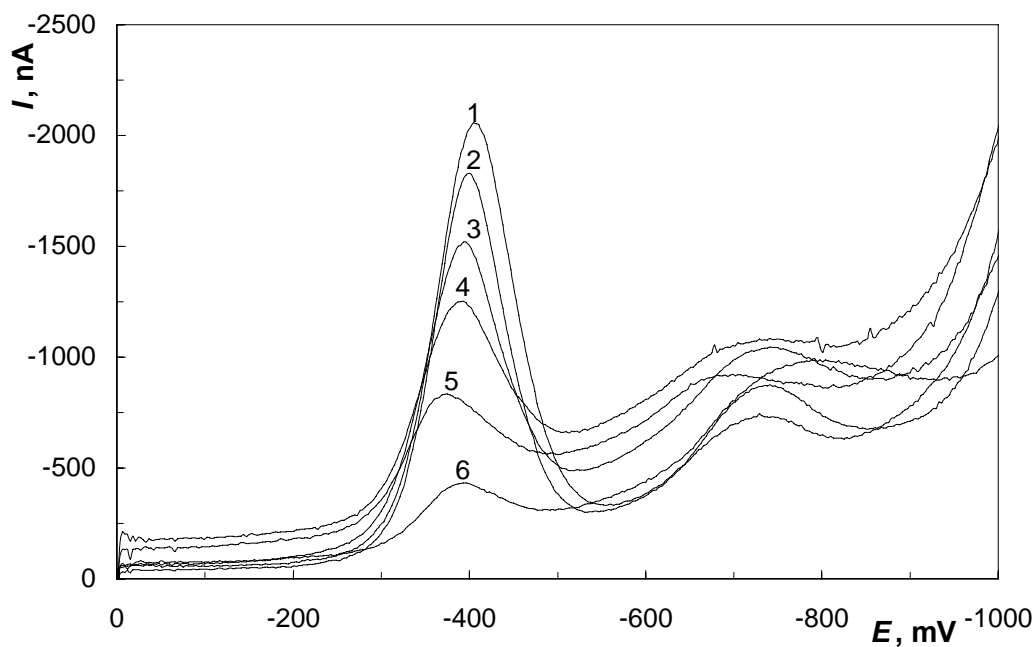
Obr. 3.16

Závislost proudu píku (I_p) na koncentraci 5-A6-NQ v rozmezí $2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Měřeno metodou katodické DPV na CPE v prostředí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$ o pH 1,6 a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.



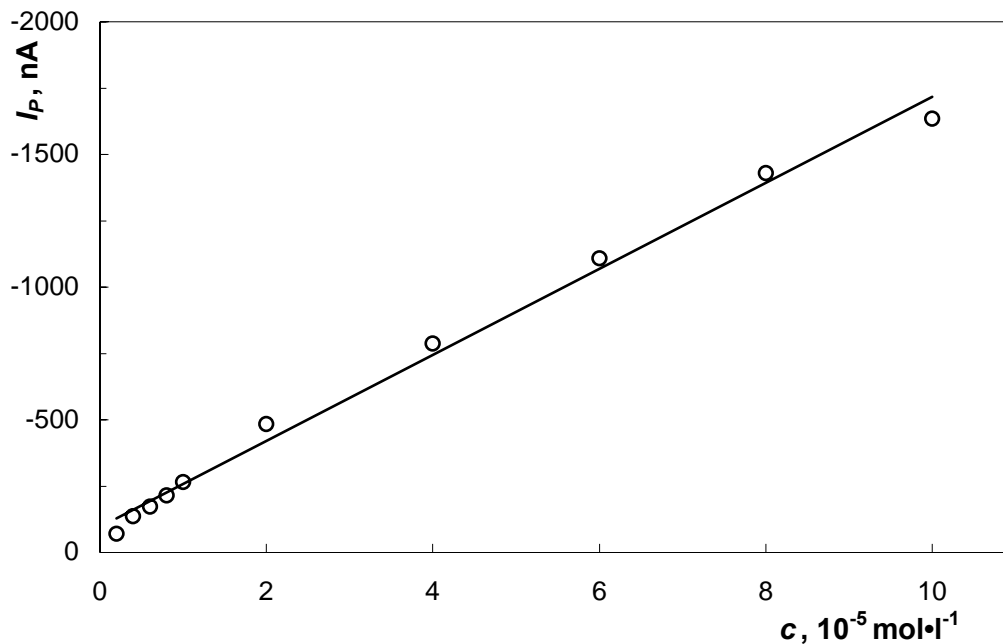
Obr. 3.17

Závislost proudu píku (I_p) na koncentraci 5-A6-NQ v logaritmické formě v rozmezí $2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Měřeno metodou katodické DPV na CPE v prostředí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$ o pH 1,6 a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.



Obr. 3.18

Katodické voltamogramy 5-A6-NQ, měřeno metodou katodické DPV na CPE v prostředí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$ o pH 1,6 a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Koncentrace 5-A6-NQ: $1 \cdot 10^{-4}$ (1), $8 \cdot 10^{-5}$ (2), $6 \cdot 10^{-5}$ (3), $4 \cdot 10^{-5}$ (4), $2 \cdot 10^{-5}$ (5), $1 \cdot 10^{-5}$ (6) $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



Obr. 3.19

Závislost proudu píku (I_p) na koncentraci 5-A6-NQ v rozmezí $2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Měřeno metodou katodické DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Tab. 3.6

Parametry kalibrační závislosti 5-A6-NQ, měřeno metodou katodické DPV na CPE v prostředí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$ o pH 1,6 (BR pufru o pH 11) a methanolu v poměru (1:1).

pH	c $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	směrnice $\text{mA}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$	úsek nA	R^2	linearita (směrnice závislosti $\log I_p$ na $\log c$)	R^2 (závislosti $\log I_p$ na $\log c$)	L_D $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
1,6	$2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$	-18,3	-33,1	0,9959	0,97	0,9985	$1,3 \cdot 10^{-6}$
11	$2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$	-16,2	-95,7	0,9933	0,80	0,9989	$1,9 \cdot 10^{-6}$

3.1.4 Katodická DC voltametrie

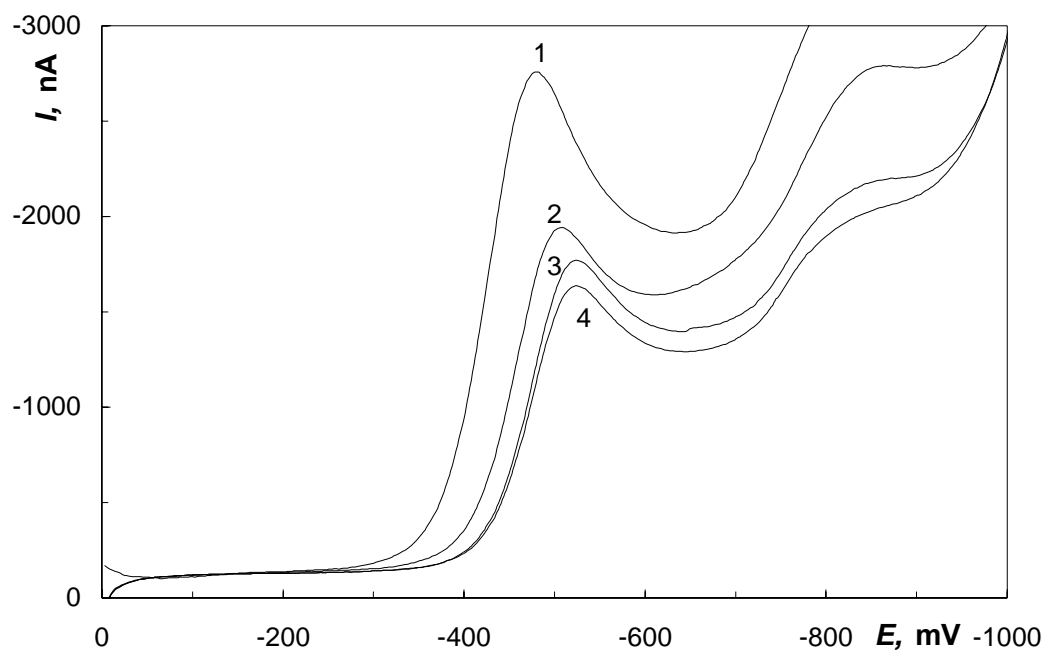
Katodická DC voltametrie byla další metodou, jejíž využitelnost ke stanovení 5-A6-NQ byla ověřena. I v tomto případě byl povrch elektrody obnovován po každém měření mechanicky otřením uhlíkové pasty, jelikož byla pozorována pasivace povrchu CPE (Obr. 3.20)

Vliv pH na chování 5-A6-NQ při DC voltametii byl sledován ve směsi BR pufr o pH 2 až 12 a methanolu v poměru (1:1) a 0,1 mol·l⁻¹ H₃PO₄ o pH 1,6 a methanolu v poměru (1:1). Koncentrace 5-A6-NQ byla 1·10⁻⁴ mol·l⁻¹. Hodnoty pH BR pufru, půlvlnových potenciálů ($E_{1/2}$) a limitních proudů (I_{lim}) uvádí Tab. 3.7. Naměřené voltamogramy ukazuje Obr. 3.21 a Obr. 3.22. Jak bylo zjištěno, 5-A6-NQ poskytuje jednu dobře vyvinutou vlnu, jejíž poloha se posouvá se zvyšujícím pH směrem k negativnějším hodnotám potenciálů. Výška vlny se s rostoucí hodnotou pH mění jen málo. Pro měření koncentračních závislostí byla vybrána hodnota pH 1,6, při které jsou naměřené voltamogramy nejlépe vyhodnotitelné.

Koncentrační závislosti 5-A6-NQ byly proměřeny v rozsahu 2·10⁻⁶ – 1·10⁻⁴ mol·l⁻¹ v prostředí 0,1 mol·l⁻¹ H₃PO₄ o pH 1,6 a methanolu v poměru (1:1). Závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Hodnoty limitních proudů byly brány jako průměrná hodnota ze třech následujících měření. Na Obr. 3.23 je uvedena kalibrační přímka v celém měřeném koncentračním rozmezí, na Obr. 3.24 je pak uvedena tatáž závislost zpracovaná v logaritmické formě. Voltamogramy v koncentračním rozmezí 2·10⁻⁵ – 1·10⁻⁴ mol·l⁻¹ v prostředí 0,1 mol·l⁻¹ H₃PO₄ o pH 1,6 a methanolu v poměru (1:1) jsou zachyceny na Obr. 3.25.

Parametry kalibrační přímky pro stanovení 5-A6-NQ katodickou DCV na CPE jsou uvedeny v Tab. 3.8.

Dosažený limit detekce $L_D = 1,5 \cdot 10^{-6}$ mol·l⁻¹ je řádově srovnatelný s limitem detekce anodické DC voltametrie ($L_D = 3,1 \cdot 10^{-6}$ mol·l⁻¹). Katodická DP voltametrie dosahuje nepatrně lepšího limitu detekce ($L_D = 1,3 \cdot 10^{-6}$ mol·l⁻¹), protože píky se vyhodnocují lépe než vlny.



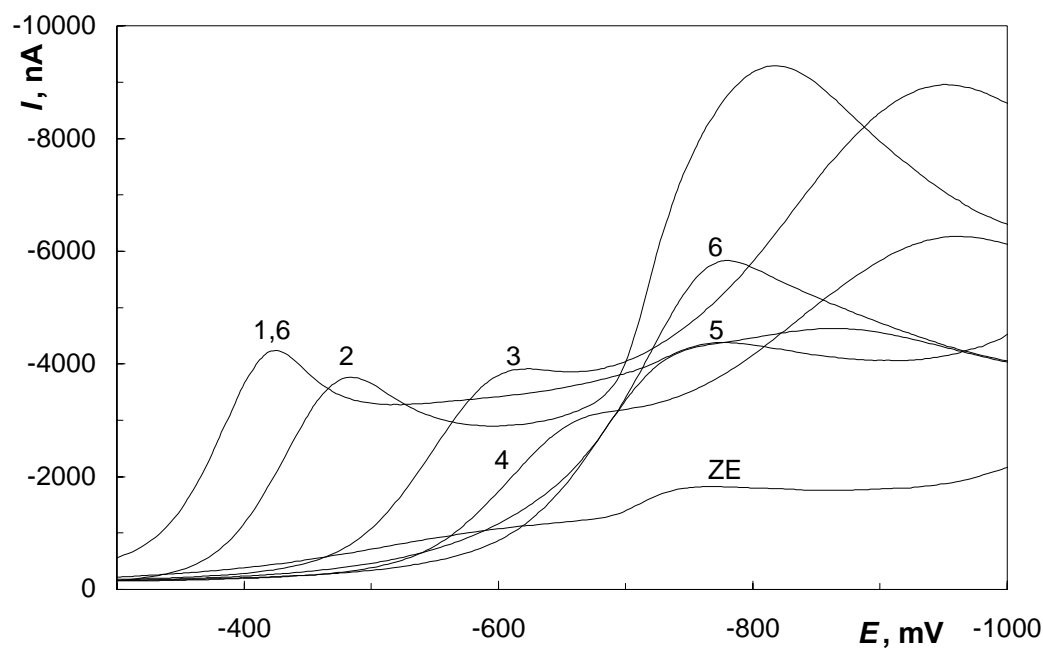
Obr. 3.20

Katodické voltamogramy $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ, měřeno metodou DCV na CPE, ukázka pasivace elektrody: povrch po mechanickém obnovení (1), následná měření bez obnovování povrchu (2, 3, 4). Měřeno bylo v prostředí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$ o pH 1,6 a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Tab. 3.7

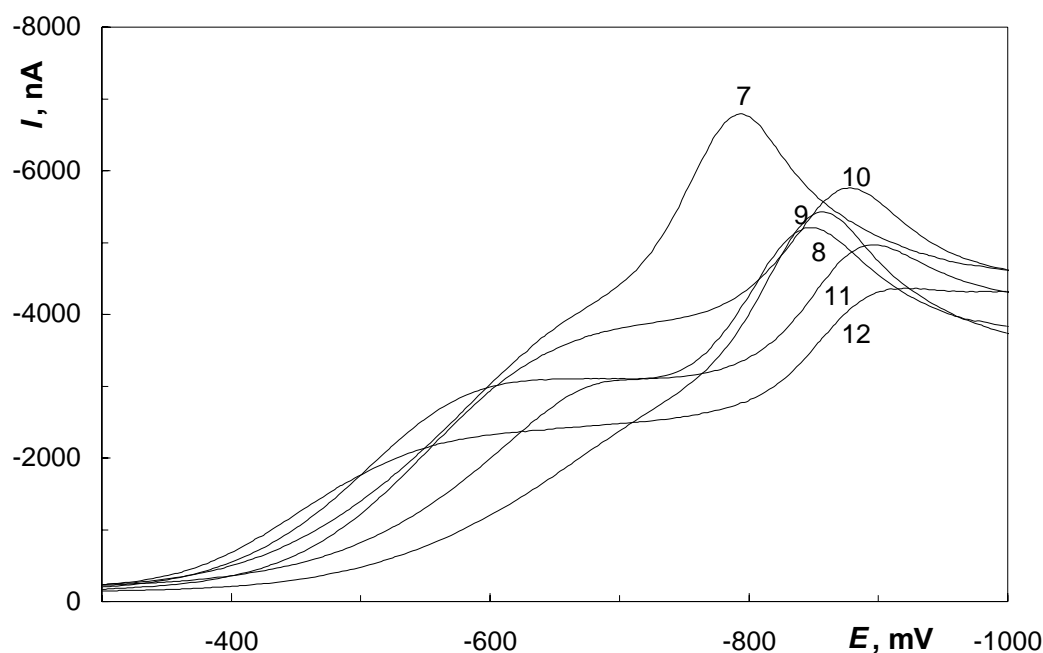
Závislost limitních proudů (I_{lim}) a půlvlnových potenciálů ($E_{1/2}$) $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ na pH vodné složky směsi BR pufru (pH 1,6 odpovídá $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$) a methanolu v poměru (1:1) na pH použitého BR pufru. Měřeno metodou katodické DCV na CPE.

pH	I_{lim} nA	$E_{1/2}$ mV
1,6	-1825	-376
2	-1811	-437
3	-1769	-514
4	-1714	-597
5	-1820	-671
6	-1610	-731
7	-1855	-748
8	-1817	-787
9	-1789	-819
10	-1651	-833
11	-1563	-846
12	-1643	-858



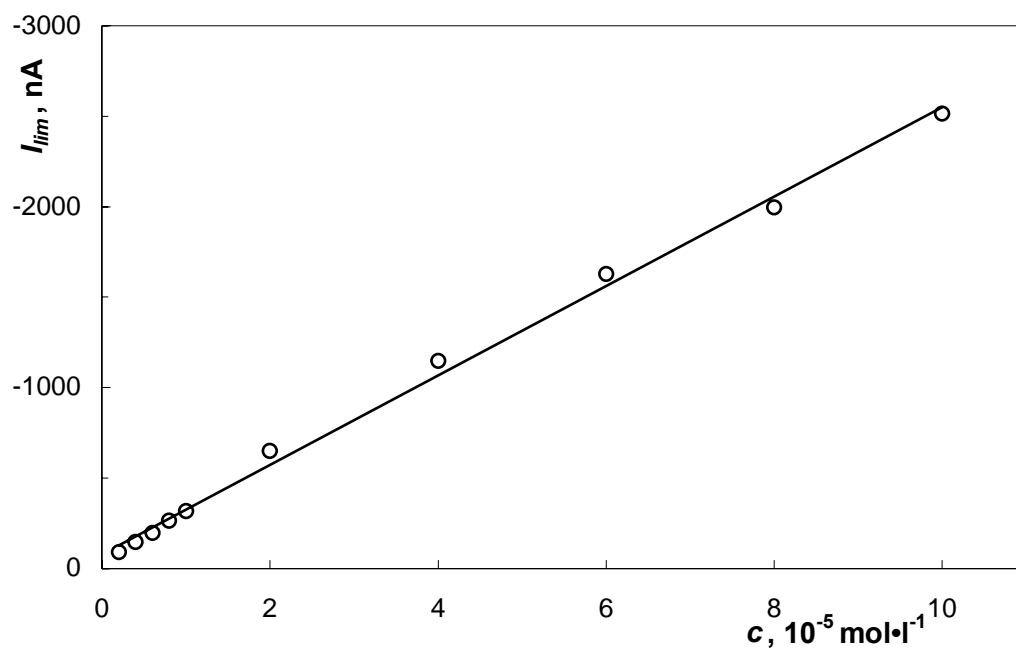
Obr. 3.21

Katodické voltamogramy $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ, měřeno metodou DCV na CPE v prostředí BR pufru o pH odpovídajícímu označení dané křivky (křivka ZE – základní elektrolyt $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ H_3PO_4 o pH 1,6; křivka 1,6 – v prostředí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ H_3PO_4) a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.



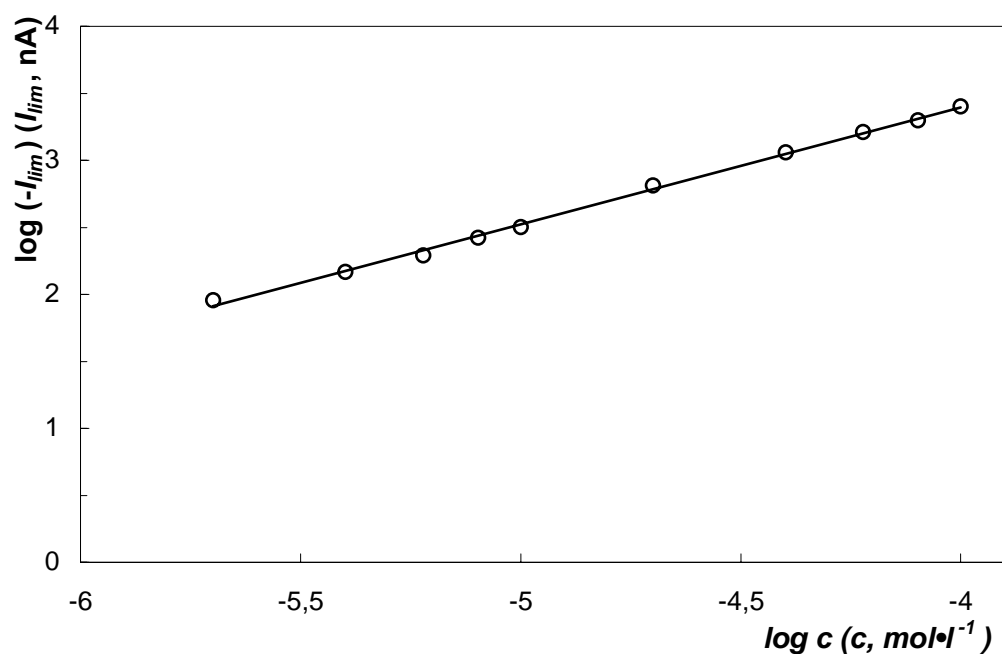
Obr. 3.22

Katodické voltamogramy $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ, měřeno metodou DCV na CPE v prostředí BR pufru o pH odpovídajícímu označení dané křivky a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.



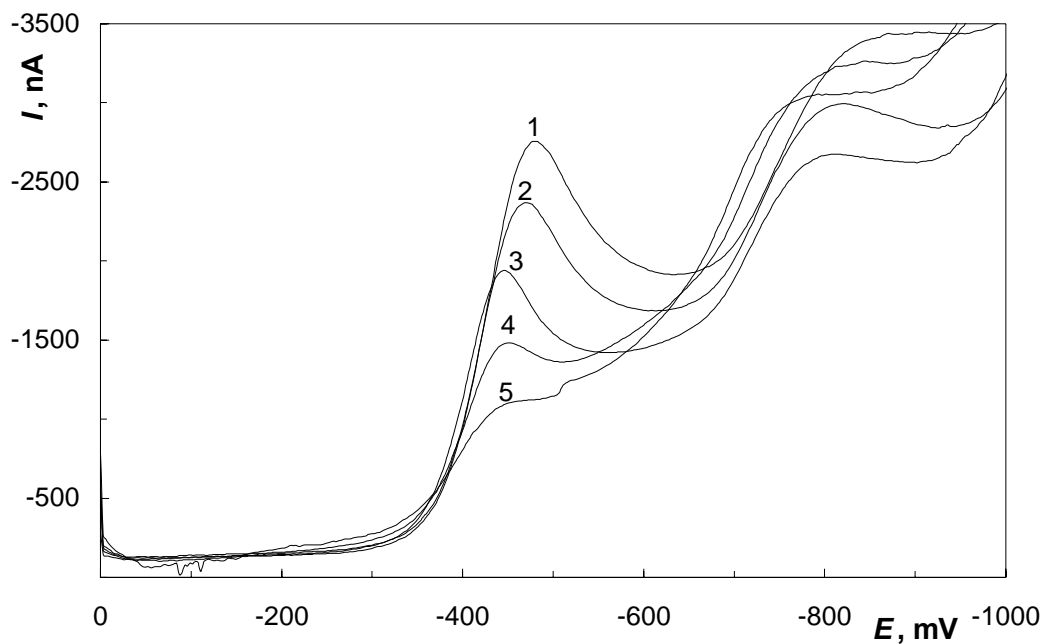
Obr. 3.23

Závislost limitního proudu (I_{lim}) na koncentraci 5-A6-NQ v rozmezí $2\cdot 10^{-6} - 1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Měřeno metodou katodické DCV na CPE v prostředí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$ o pH 1,6 a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.



Obr. 3.24

Závislost limitního proudu (I_{lim}) na koncentraci 5-A6-NQ v logaritmicke formě v rozmezí $2\cdot 10^{-6} - 1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Měřeno metodou katodické DCV na CPE v prostředí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$ o pH 1,6 a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.



Obr. 3.25

Katodické voltamogramy 5-A6-NQ, měřeno metodou DCV na CPE v prostředí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ H_3PO_4 o pH 1,6 a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.
 Koncentrace 5-A6-NQ: $1\cdot 10^{-4}$ (1), $8\cdot 10^{-5}$ (2), $6\cdot 10^{-5}$ (3), $4\cdot 10^{-5}$ (4), $2\cdot 10^{-5}$ (5) $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Tab. 3.8

Parametry kalibrační závislosti 5-A6-NQ, měřeno metodou katodické DCV na CPE v prostředí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ H_3PO_4 o pH 1,6 a methanolu v poměru (1:1).

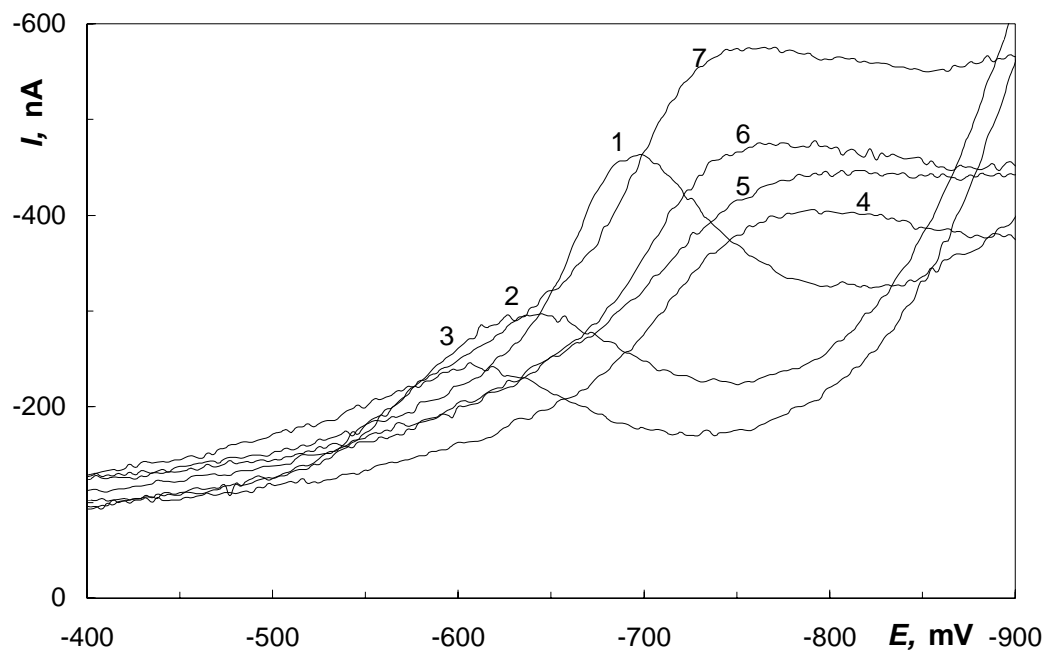
c $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	směrnice $\text{mA}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$	úsek nA	R^2	linearita (směrnice závislosti $\log I_{lim}$ na $\log c$)	R^2 (závislosti $\log I_{lim}$ na $\log c$)	L_D $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
$2\cdot 10^{-6} - 1\cdot 10^{-4}$	-24,7	-81,0	0,9963	0,87	0,9978	$1,5\cdot 10^{-6}$

3.1.5 Vliv redukce kyslíku na katodické voltamogramy

Měření metodou katodické DPV (DCV) na CPE 5-A6-NQ značně komplikovala přítomnost píku (vlny) kyslíku. Kyslík je nejen přítomný v měřeném roztoku, odkud se dá odstranit probubláváním dusíkem, ale je přítomný i v samotné pastě, do které se dostává během samotné přípravy pasty. Proto bylo provedeno jeho elektrochemické odstranění redukcí při potenciálu -1 V. Měřeno bylo v prostředí 0,1 mol·l⁻¹ H₃PO₄ o pH 1,6 a methanolu v poměru (1:1), k měření použita metoda DPV a měřený roztok byl zbaven kyslíku 10min probubláváním dusíkem.

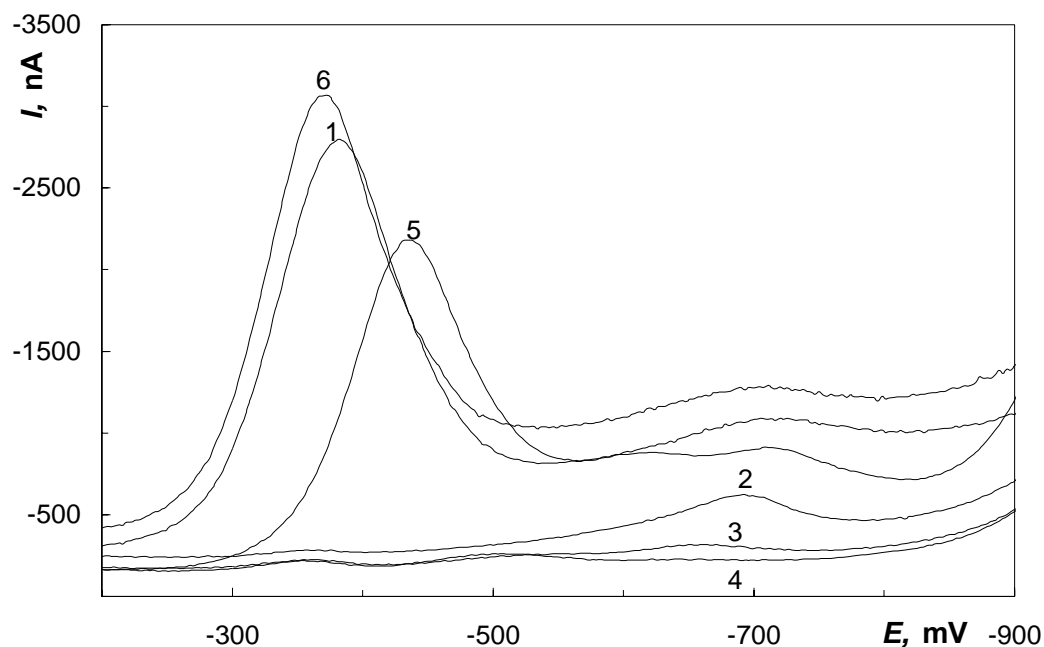
Byl sledován vliv doby redukce (2, 3, 5 minut) na pík kyslíku a rovněž byl sledován pík kyslíku po následných otřeních pasty po proběhlé redukcí, naměřené voltamogramy jsou uvedeny na Obr. 3.26. Dále byl sledován vliv redukce kyslíku na měření studované látky 5-A6-NQ (použita koncentrace 1·10⁻⁴ mol·l⁻¹), záznamy jsou uvedeny na Obr. 3.27.

Z výsledků je patrné, že se vzrůstajícím časem redukce dochází ke zmenšení píku kyslíku, ale redukce je jen povrchová a při následných otřeních pasty po provedeném záznamu se opět pík kyslíku zvětšuje na původní velikost (Obr. 3.26). Zároveň dochází během redukce i k pasivaci elektrody (Obr. 3.27), tudíž tento způsob odstranění kyslíku z pasty není vhodný pro naše měření a nebyl dále používán.



Obr. 3.26

Katodické voltamogramy kyslíku, měřené metodou DPV na CPE po předběžné redukci kyslíku při potenciálu -1 V po dobu: 2 min (1), 3 min (2), 5 min (3), měření po 1. (4), 2. (5), 3. (6) a 4. (7) otření pasty. Měřeno v prostředí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$ o pH 1,6 a methanolu (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.



Obr. 3.27

Katodické voltamogramy měřené metodou DPV na CPE: 5-A6-NQ před redukcí (1), redukce O_2 při potenciálu -1 V po dobu 2 (2), 3 (3), 5 (4) minut, 5-A6-NQ ihned po redukci bez otření (5), 5-A6-NQ po otření pasty (6). Měřeno bylo v prostředí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$ o pH 1,6 a methanolu (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, koncentrace 5-A6-NQ $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

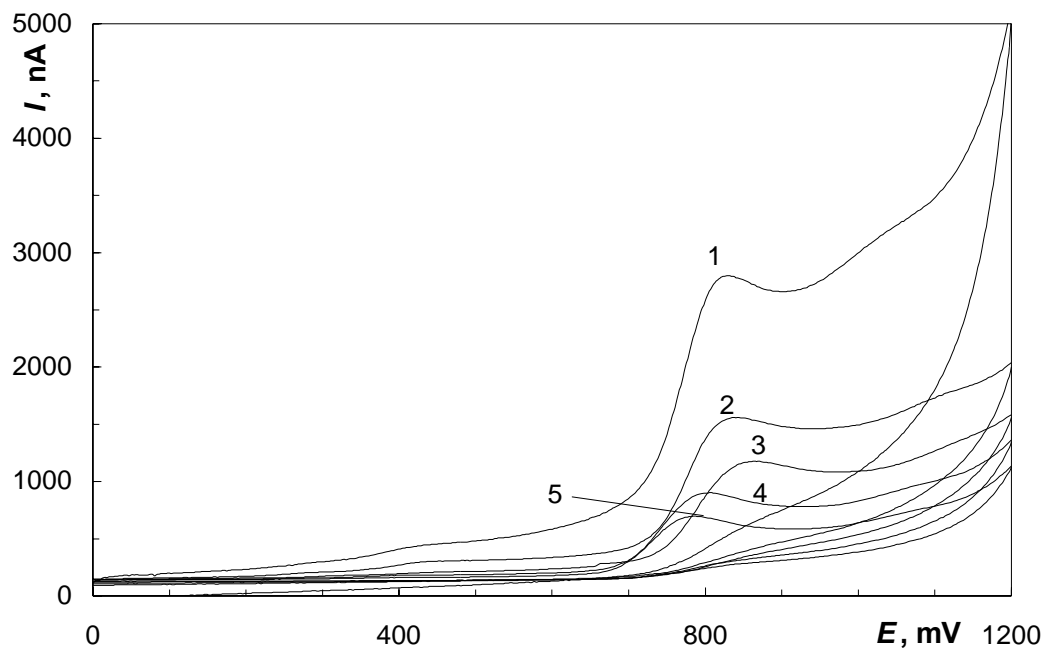
3.1.6 Cyklická voltametrie

Ke zjištění reverzibility studovaných reakcí bylo využito cyklické voltametrie. Cyklická voltametrie byla měřena pro oxidaci i redukci 5-A6-NQ o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, měřeno bylo vždy od počátečního potenciálu (E_{in}) 0 V.

Oxidační reakce 5-A6-NQ byla sledována v prostředí BR pufru o pH 2, 7 a 11 s methanolem v poměru vždy (1:1). Byla sledována výška píků v závislosti na polarizační rychlosti a hodnoceny záznamy 5 následných cyklů v jednom měření. Na Obr. 3.28 jsou uvedeny voltamogramy pro rychlosti polarizace v rozmezí $5 - 100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu v poměru (1:1). Chování při záznamu 5 následných cyklů v jednom měření zachycují Obr. 3.29 a Obr. 3.30. Závislosti proudů píků na rychlosti polarizace jsou uvedeny na Obr. 3.31 a v Tab. 3.9 jsou parametry proložených přímek. Závislosti proudů píků na odmocnině z rychlosti polarizace jsou uvedeny na Obr. 3.32 a parametry proložených přímek v Tab. 3.10.

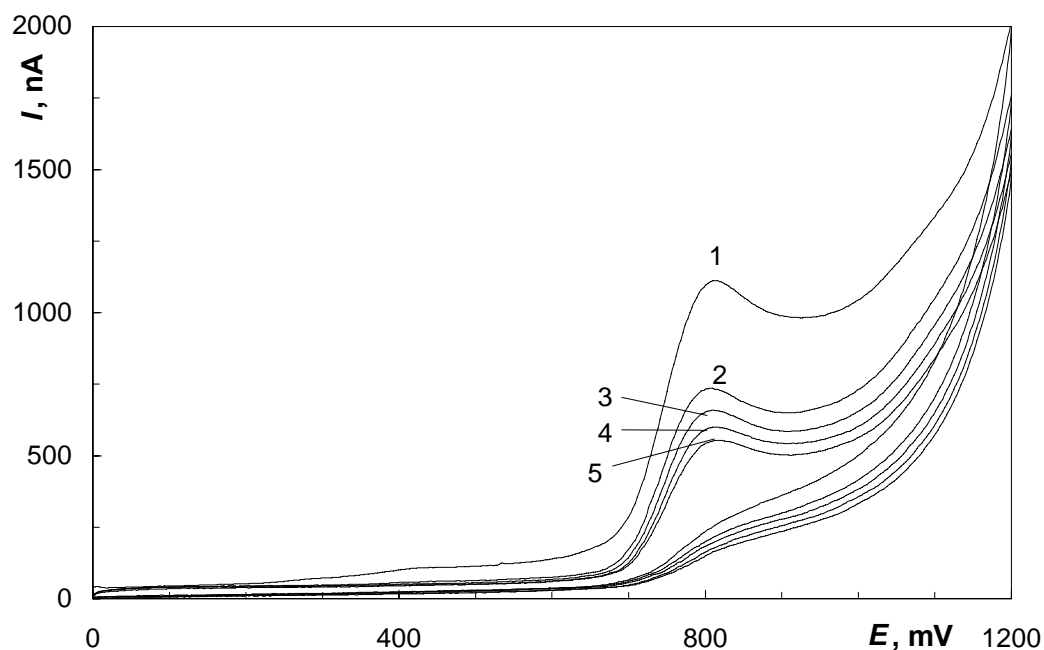
Redukční reakce 5-A6-NQ byla sledována v prostředí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$ o pH 1,6 a methanolu (1:1). Byla sledována výška píků v závislosti na polarizační rychlosti a chování při měření 5 následných cyklů v jednom měření. Voltamogramy pro rychlosti polarizace v rozmezí $5 - 100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ jsou uvedeny na Obr. 3.33. Chování při záznamu 5 následných cyklů v jednom měření zachycuje Obr. 3.34. Závislost proudu píku na rychlosti polarizace je uvedena na Obr. 3.35 a v Tab. 3.11 jsou parametry proložené přímky. Závislost proudu píku na odmocnině z rychlosti polarizace je uvedena na Obr. 3.36 a parametry proložené přímky v Tab. 3.12.

Ze získaných výsledků vyplývá, že děj je v měřené škále pH a při daných podmínkách měření ireverzibilní. Je kontrolován difúzí i adsorpcí současně (Přímá úměrnost nebyla pozorována ani pro závislost proudu píku na rychlosti polarizace ani na druhé odmocnině z rychlosti polarizace). Z pozorování záznamů 5 následných cyklů v jednom měření je patrné, že během měření dochází k pasivaci elektrody.



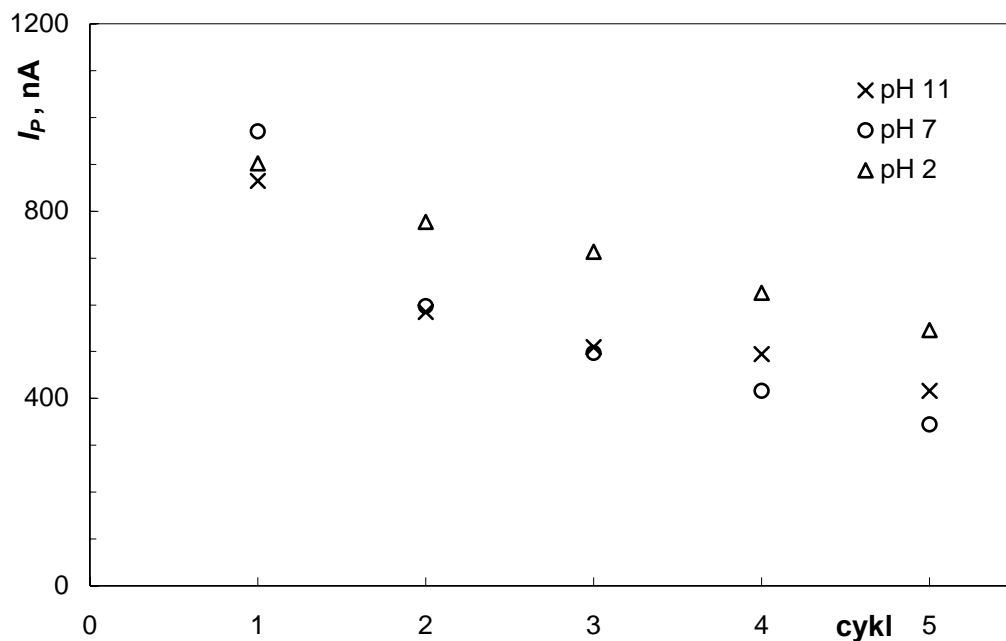
Obr. 3.28

Cyklické voltamogramy na CPE pro $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ, v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu (1:1), $E_{in} = 0 \text{ V}$. Rychlost polarizace: 100 (1), 50 (2), 20 (3), 10 (4), 5 (5) $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$.



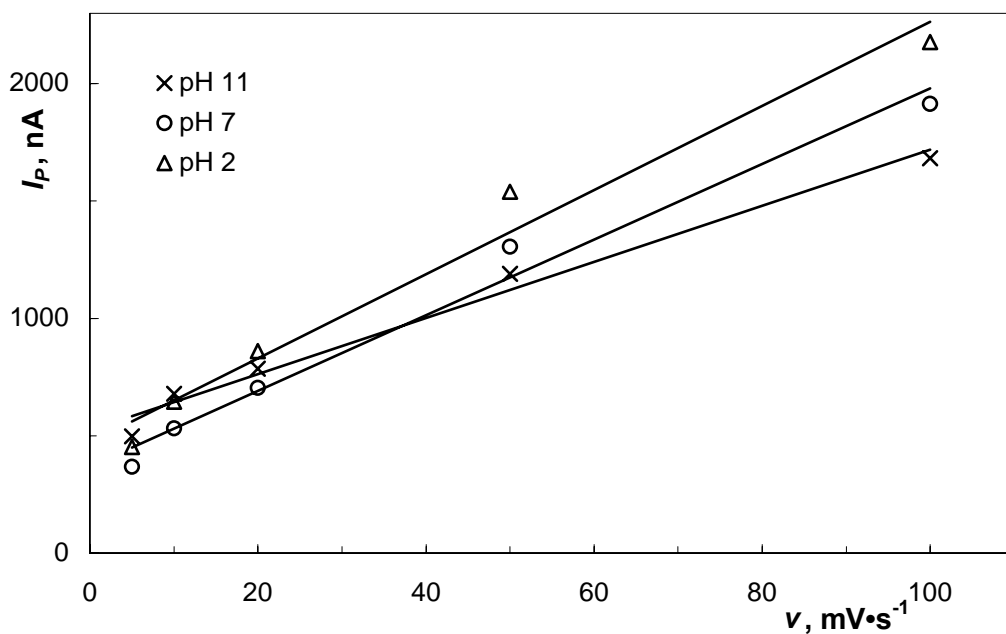
Obr. 3.29

Cyklické voltamogramy na CPE pro $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ, 5 následných cyklů: (1 – 5) po sobě jdoucí cykly. Měřeno v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu (1:1), $E_{in} = 0 \text{ V}$, rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.



Obr. 3.30

Závislosti proudů píků (I_p) na pořadí cyklů, měřeno metodou CVA na CPE pro $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ v prostředí BR pufru o příslušném pH a methanolu (1:1), $E_{in} = 0 \text{ V}$, rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.



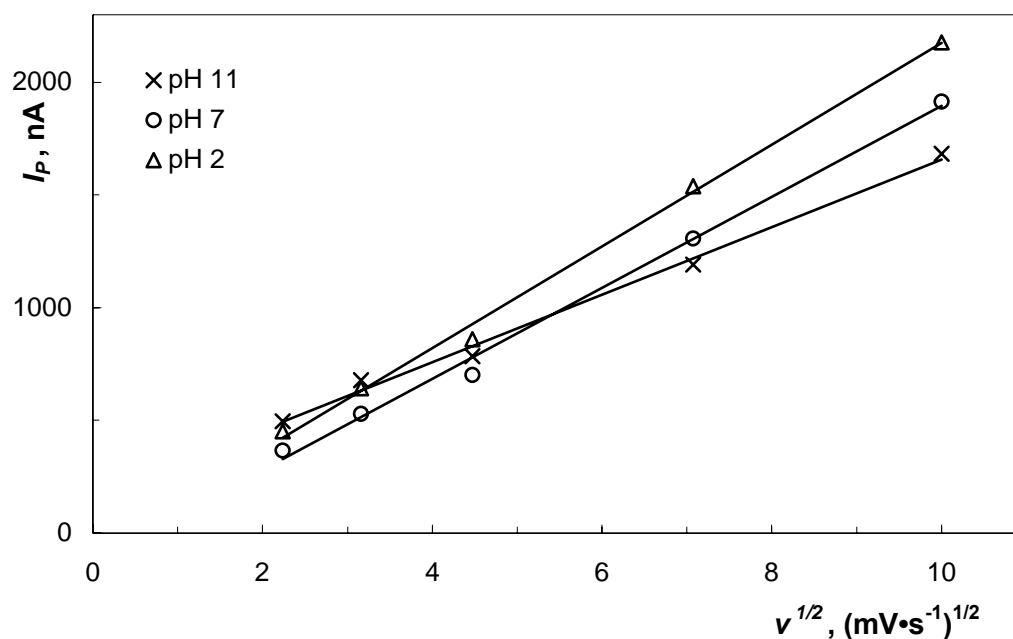
Obr. 3.31

Závislosti proudů píků (I_p) na rychlosti polarizace, měřeno metodou CVA na CPE pro $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ v prostředí BR pufru o příslušném pH a methanolu (1:1), $E_{in} = 0 \text{ V}$.

Tab. 3.9

Parametry přímek pro závislosti proudů píků na rychlosti polarizace, měřeno metodou CVA na CPE pro $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ v prostředí BR pufru o příslušném pH a methanolu (1:1), $E_{in} = 0 \text{ V}$.

Závislost I_P na	pH	směrnice $\text{nA} \cdot \text{mV}^{-1} \cdot \text{s}$	úsek nA	R^2
v	11	12,0	524	0,9829
	7	16,1	368	0,9825
	2	17,9	472	0,9755

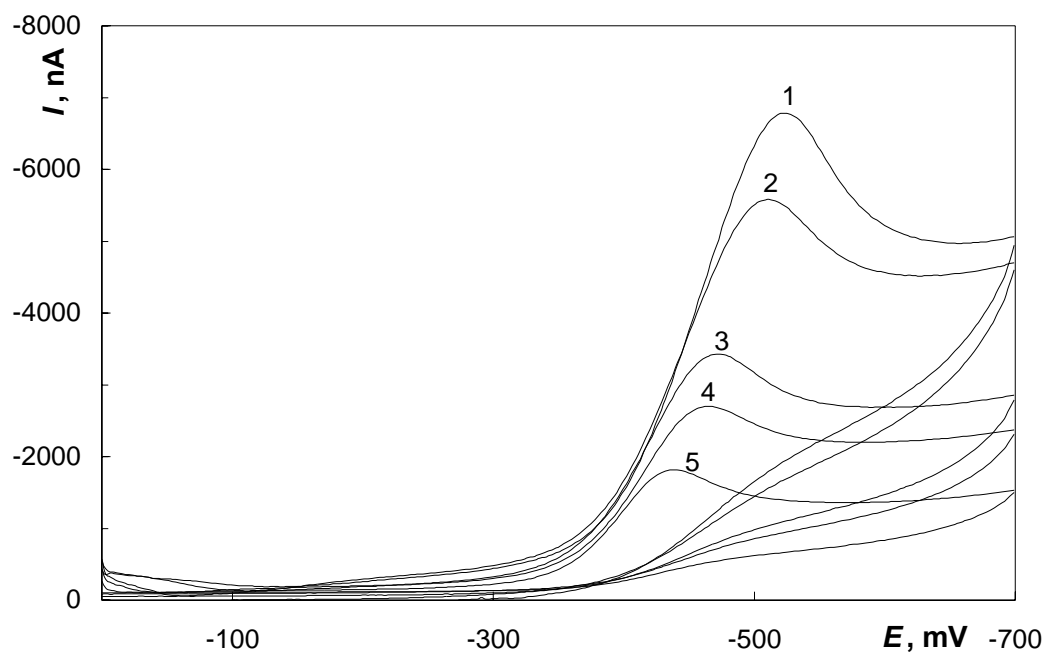
**Obr. 3.32**

Závislosti proudů píků (I_P) na odmocnině z rychlosti polarizace, měřeno metodou CVA na CPE pro $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ v prostředí BR pufru o příslušném pH a methanolu (1:1), $E_{in} = 0 \text{ V}$.

Tab. 3.10

Parametry přímek pro závislosti proudů píků na odmocnině z rychlosti polarizace, měřeno metodou CVA na CPE pro $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ v prostředí BR pufru o příslušném pH a methanolu (1:1), $E_{in} = 0 \text{ V}$.

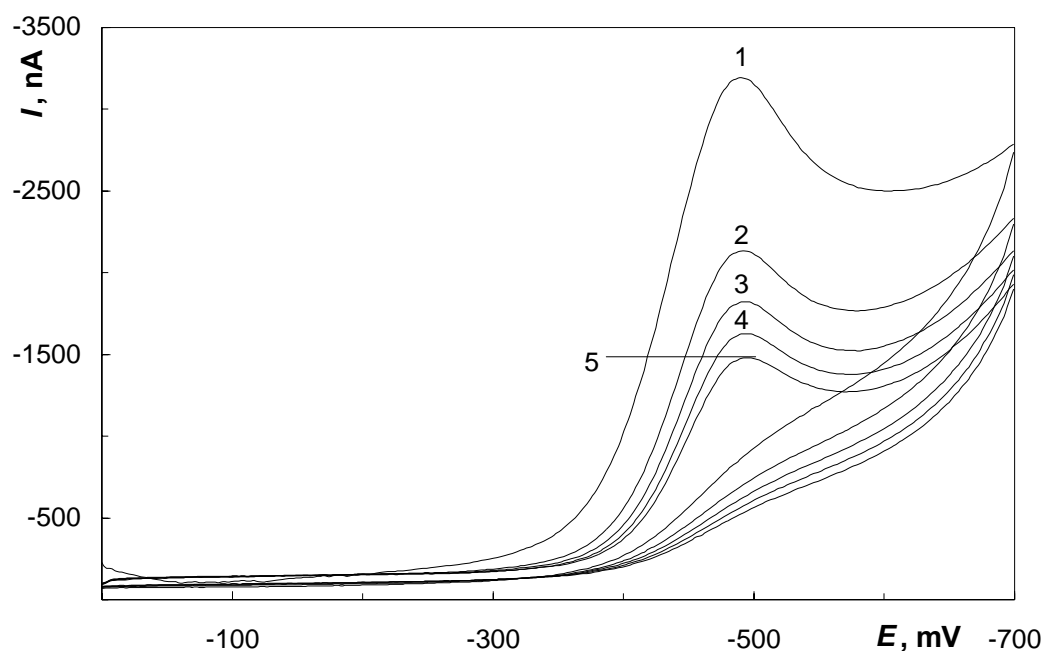
Závislost I_P na	pH	směrnice $\text{nA} \cdot (\text{mV}^{-1} \cdot \text{s})^{1/2}$	úsek nA	R^2
$v^{1/2}$	11	150	160	0,9940
	7	202	-124	0,9951
	2	226	-80,9	0,9970



Obr. 3.33

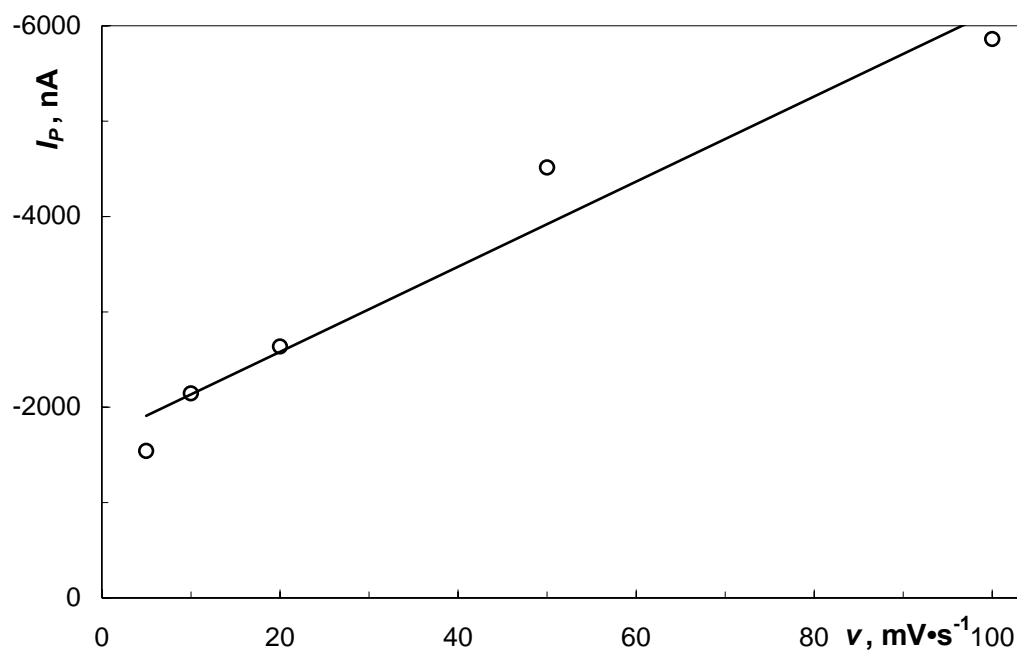
Cyklické voltamogramy na CPE pro $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ, v prostředí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ H_3PO_4 o pH 1,6 a methanolu (1:1), $E_{in} = 0 \text{ V}$.

Rychlost polarizace: 100 (1), 50 (2), 20 (3), 10 (4), 5 (5) $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$.



Obr. 3.34

Cyklické voltamogramy na CPE pro $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ, 5 následných cyklů: (1 – 5) po sobě jdoucí cykly. Měřeno v prostředí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ H_3PO_4 o pH 1,6 a methanolu (1:1), $E_{in} = 0 \text{ V}$, rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.



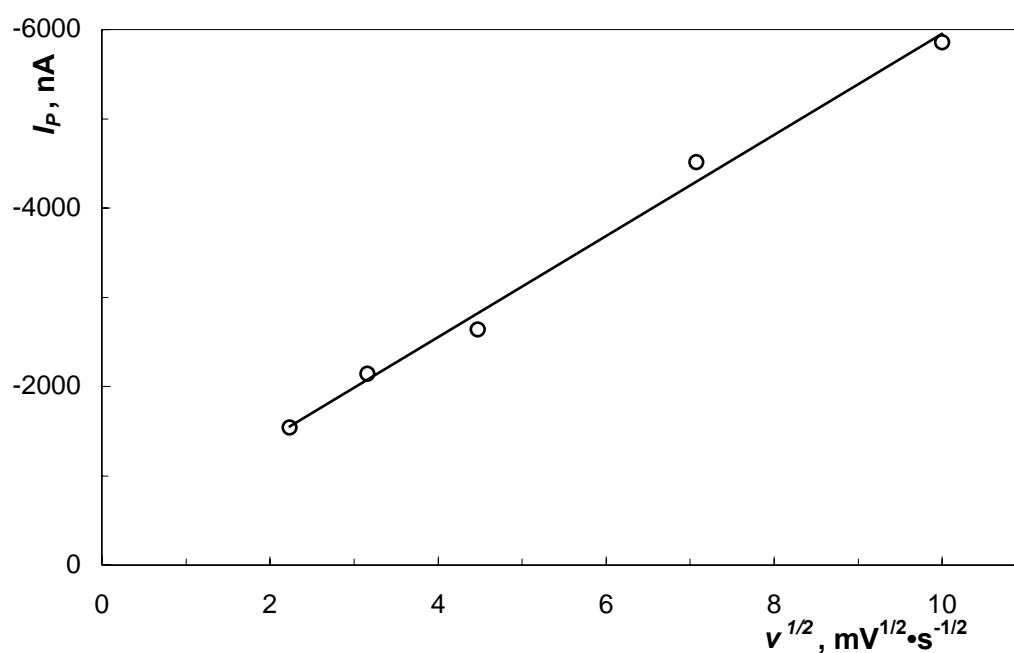
Obr. 3.35

Závislost proudu píku (I_p) na rychlosti polarizace, měřeno metodou CVA na CPE pro $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ v prostředí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$ o pH 1,6 a methanolu (1:1), $E_{in} = 0 \text{ V}$.

Tab. 3.11

Parametry přímky pro závislost proudu píku na rychlosti polarizace, měřeno metodou CVA na CPE pro $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ v prostředí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$ o pH 1,6 a methanolu (1:1), $E_{in} = 0 \text{ V}$.

Závislost I_p na	pH	směrnice $\text{nA} \cdot \text{mV}^{-1} \cdot \text{s}$	úsek nA	R^2
v	1,6	-44,6	-1690	0,9547



Obr. 3.36

Závislost proudu píku (I_p) na odmocnině z rychlosti polarizace, měřeno metodou CVA na CPE pro $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ v prostředí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ H_3PO_4 o pH 1,6 a methanolu (1:1), $E_{in} = 0 \text{ V}$.

Tab. 3.12

Parametry přímky pro závislost proudu píku na odmocnině z rychlosti polarizace, měřeno metodou CVA na CPE pro $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ v prostředí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ H_3PO_4 o pH 1,6 a methanolu (1:1), $E_{in} = 0 \text{ V}$.

Závislost I_p na	pH	směrnice $\text{nA} \cdot (\text{mV}^{-1} \cdot \text{s})^{1/2}$	úsek nA	R^2
$v^{1/2}$	1,6	-567	-286	0,9925

3.1.7 Diferenční pulzní adsorpční rozpouštěcí voltametrie

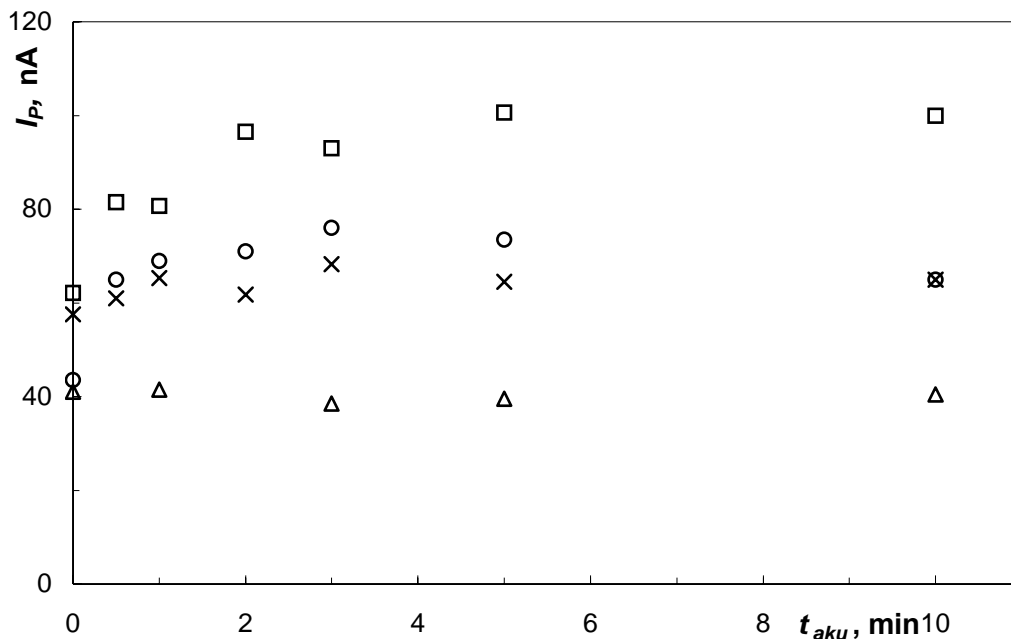
Diferenční pulzní adsorpční rozpouštěcí voltametrie se s výhodou využívá ke snižování limitu detekce voltametričtých metod, a to pro látky, které se adsorbují na povrch pracovní elektrody nebo extrahují do elektrody například dovnitř pasty.

Proto byla prozkoumána možnost akumulace 5-A6-NQ v BR pufru o pH 2, 7 a 11 s methanolem v poměru (1:1). Akumulace byla prováděna v míchaném roztoku 5-A6-NQ o koncentraci $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Sledovány byly výšky píků při změně potenciálu akumulace (čas akumulace byl vždy 1 minuta) z těchto závislostí byl zvolen nejvhodnější potenciál akumulace a dále byla proměřena závislost proudů píku na čase akumulace, která je zachycena na Obr. 3.37. Adsorpční anodické voltamogramy 5-A6-NQ o koncentraci $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na CPE v BR pufru o pH 11 s methanolem v poměru (1:1) jsou uvedeny na Obr. 3.38.

Jelikož v roztoku s 50 % methanolu nebyla pozorována významná akumulace 5-A6-NQ, byl obsah methanolu snížen na 5 %. Opět byly sledovány výšky píků při změně potenciálu akumulace při čase akumulace 1 minuta a tyto jsou zachyceny na Obr. 3.39. Jako nejvhodnější byl vybrán potenciál 500 mV, při kterém byla proměřena závislost proudů píku na čase akumulace. Zjištěné závislosti jsou uvedeny na Obr. 3.37.

Kalibrační křivka (Obr. 3.40 a Obr. 3.41) byla proměřena v rozmezí $6 \cdot 10^{-7} - 8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ s využitím akumulace po dobu 5 minut při potenciálu 500 mV v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu v poměru (95:5). Závislost je sigmoidního charakteru, proto byla proložena přímkou pouze v rozmezí $2 \cdot 10^{-6} - 8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, kde linearita nepřekračuje odchylku $\pm 5\%$. Parametry kalibrační křivky jsou uvedeny v Tab. 3.13. Pro vyšší koncentrace 5-A6-NQ nebyla kalibrační závislost naměřena vzhledem k možnému využití metod DPV, DCV. Z výsledků je patrné, že adsorpční rozpouštěcí voltametrie příliš nezlepšuje stanovení studované látky.

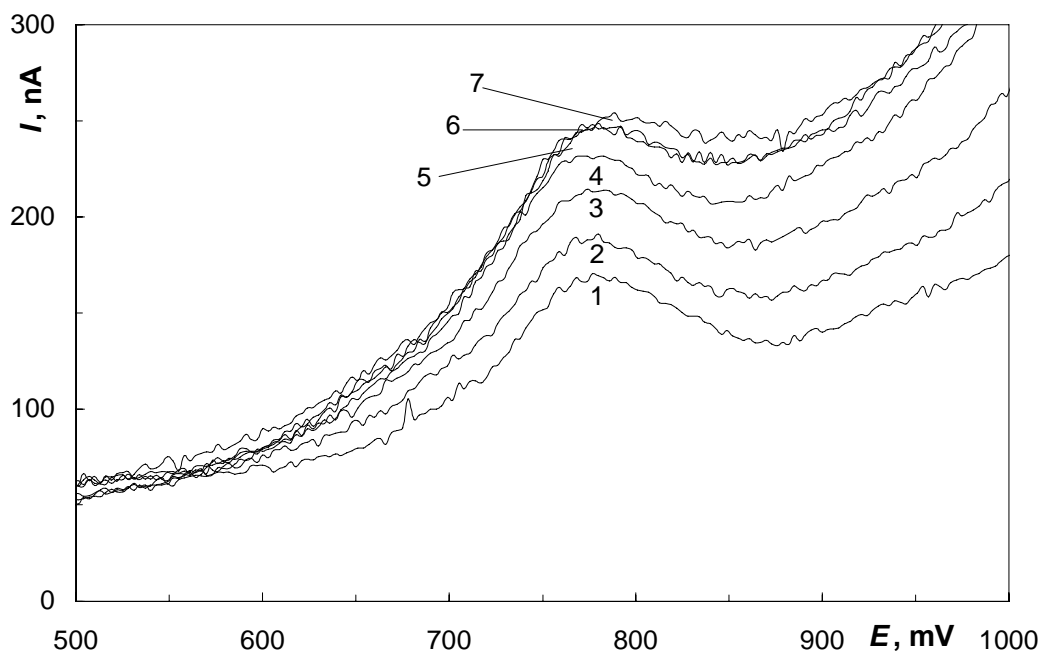
Byl zjištěn mechanismus akumulace proměřením DPAdSV v roztoku 5-A6-NQ o koncentraci $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ s časem akumulace 5 minut při potenciálu 500 mV v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu v poměru (95:5) a následným záznamem po otření pasty v základním elektrolytu BR pufr o pH 11 s methanolem v poměru (95:5) (Obr. 3.42). Ze záznamu vyplývá, že nahromadění 5-A6-NQ probíhá pouze na povrchu pasty.



Obr. 3.37

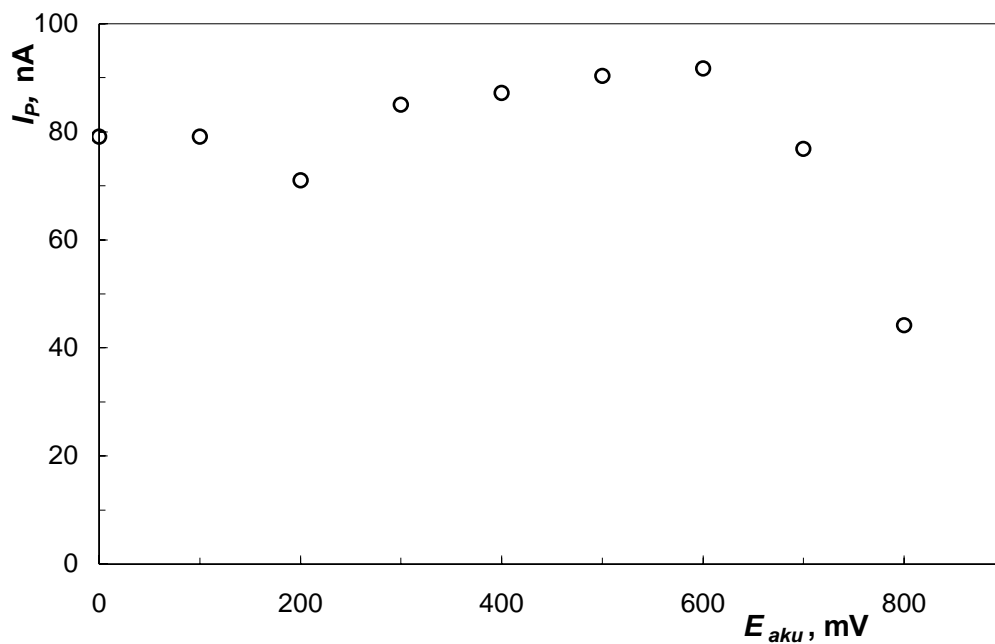
Závislosti proudů píků (I_p) na čase akumulace, měřeno metodou anodické DPAdSV na CPE v míchaném roztoku $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ v prostředí BR pufru o příslušném pH a methanolu (1:1, pro závislost \square 95:5), rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$:

pH 11, $E_{aku} = 500 \text{ mV}$ (\times), pH 7, $E_{aku} = 700 \text{ mV}$ (\circ), pH 2, $E_{aku} = 700 \text{ mV}$ (Δ),
pH 11, 5 % MeOH, $E_{aku} = 500 \text{ mV}$ (\square).



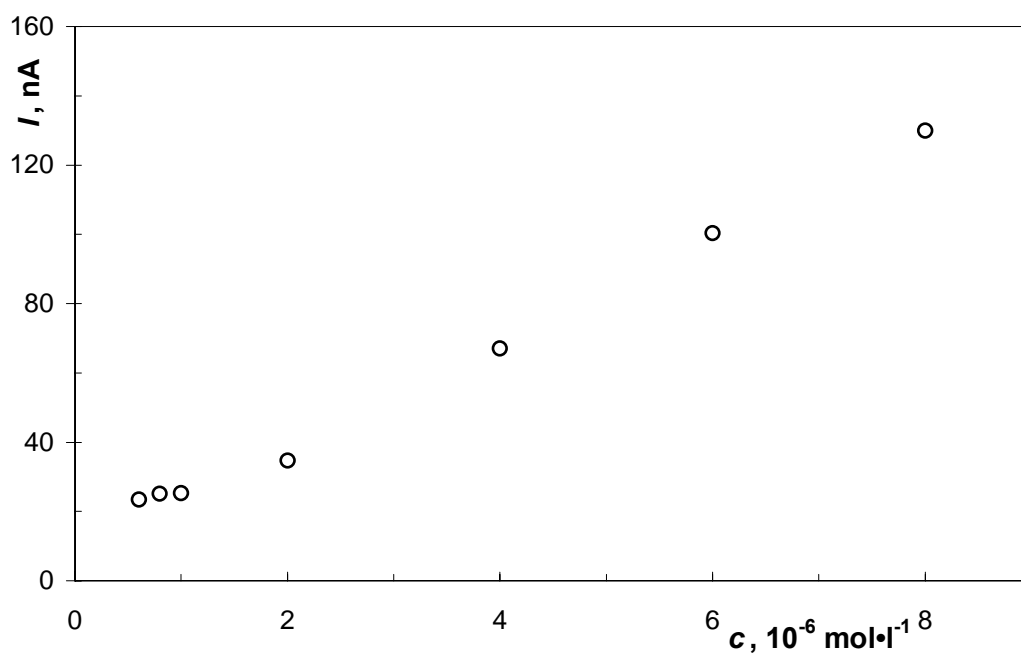
Obr. 3.38

Anodické voltamogramy $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ měřeno metodou DPAdSV na CPE v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ při potenciálu 500 mV a době akumulace: 0 (1), 0,5 (2), 1 (3), 2 (4), 3 (5), 5 (6), 10 (7) min.



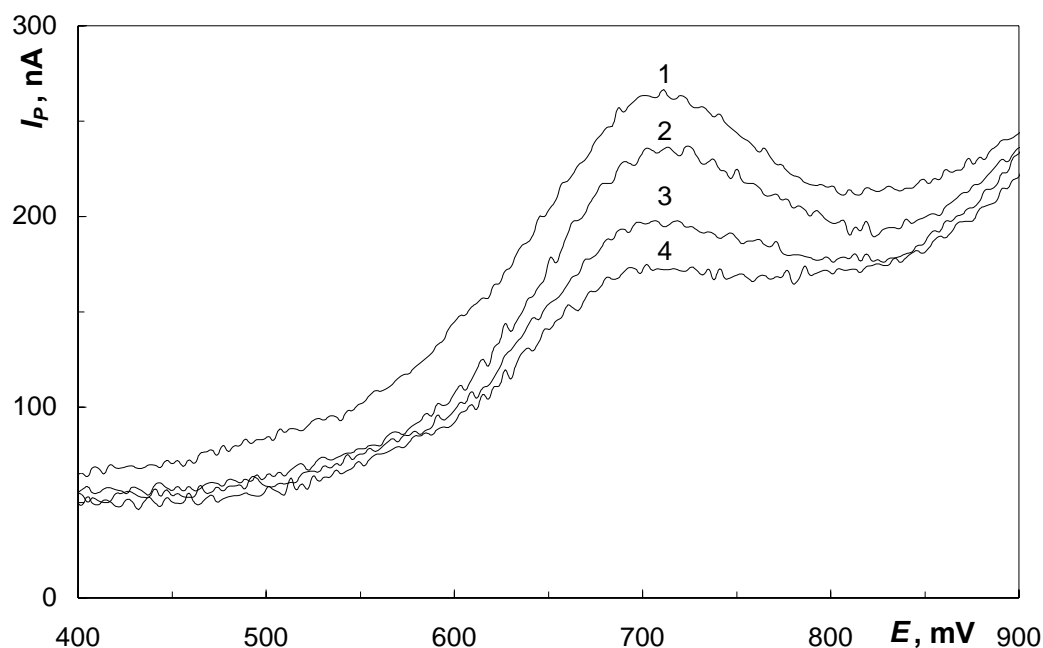
Obr. 3.39

Závislosti proudu píku (I_p) na potenciálu akumulace, měřeno metodou anodické DPAdSV na CPE v míchaném roztoku $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu (95:5), čas akumulace 1 min, rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.



Obr. 3.40

Závislost proudu píku (I_p) na koncentraci 5-A6-NQ v rozmezí $6 \cdot 10^{-7} - 8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, měřeno metodou anodické DPAdSV na CPE v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu (95:5), akumulace 5 minut při potenciálu 500 mV, rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.



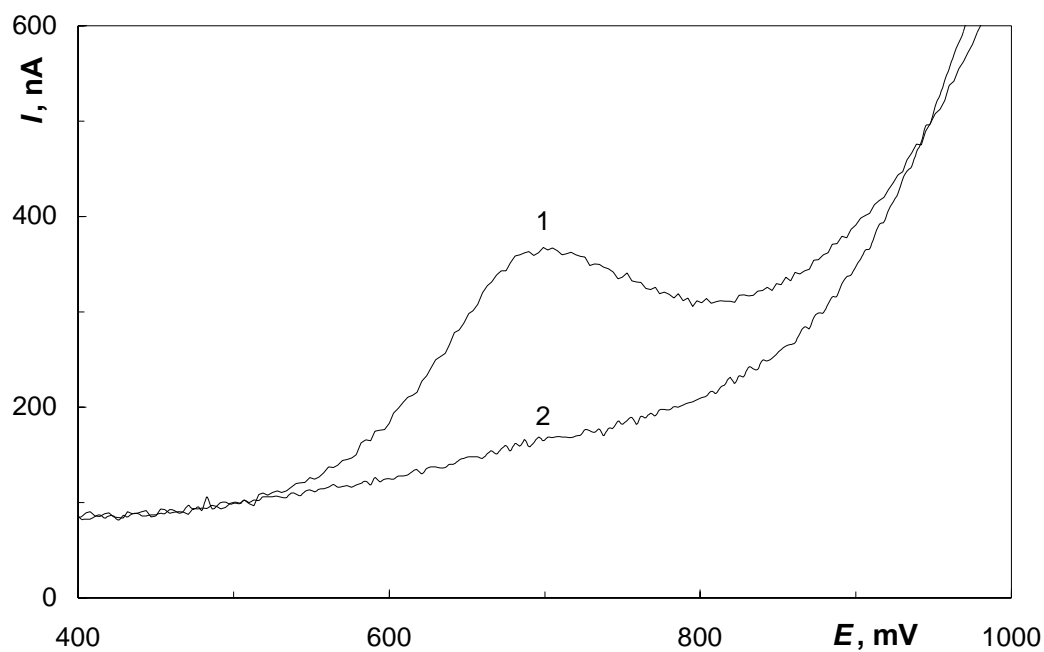
Obr. 3.41

Anodické voltamogramy 5-A6-NQ, měřeno metodou DPAdSV na CPE v BR pufru o pH 11 a methanolu (95:5), akumulace 5 minut při potenciálu 500 mV, rychlost polarizace 20 mV·s⁻¹. Koncentrace 5-A6-NQ: 8·10⁻⁶ (1), 6·10⁻⁶ (2), 4·10⁻⁶ (3), 2·10⁻⁶ (4) mol·l⁻¹.

Tab. 3.13

Parametry kalibrační závislosti 5-A6-NQ, měřeno metodou DPAdSV na CPE v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu (95:5), akumulace 5 minut při potenciálu 500 mV, rychlost polarizace 20 mV·s⁻¹.

c mol·l ⁻¹	směrnice mA·mol ⁻¹ ·l	úsek nA	R ²	linearita (směrnice závislosti log I _p na log c)	R ² (závislosti log I _p na log c)	L _D mol·l ⁻¹
2·10 ⁻⁶ – 8·10 ⁻⁶	16	3,2	0,9995	0,96	0,9998	1,4·10 ⁻⁶



Obr. 3.42

Anodické voltamogramy, měřeno metodou DPAdSV na CPE pro $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ $t_{aku} = 5 \text{ min}$, $E_{aku} = 500 \text{ mV}$ (1) a metodou DPV na CPE po následném otření pasty v samotném základním elektrolytu (2). Měřeno v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu (95:5), rychlost polarizace $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

3.2 Modelové vzorky

Využitelnost nově vypracovaných voltametrických metod stanovení 5-A6-NQ byla ověřena na modelových vzorcích pitné a říční vody. Bylo měřeno metodami anodické DPV a DCV na CPE v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu v poměru (1:1).

3.2.1 Stanovení 5-amino-6-nitrochinolinu v pitné vodě

První zkoumanou maticí byla pitná voda. Jako vzorek pitné vody byla použita voda z vodovodu v budově chemických kateder PŘF UK, Hlavova 8, Praha 2.

Modelové vzorky 5-A6-NQ v pitné vodě byly připraveny odpipetováním 1 ml BR pufru ($0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) o pH 11, 4 ml pitné vody, potřebného množství zásobního roztoku 5-A6-NQ, doplněním methanolem na 10 ml a převedením do voltametrické nádoby.

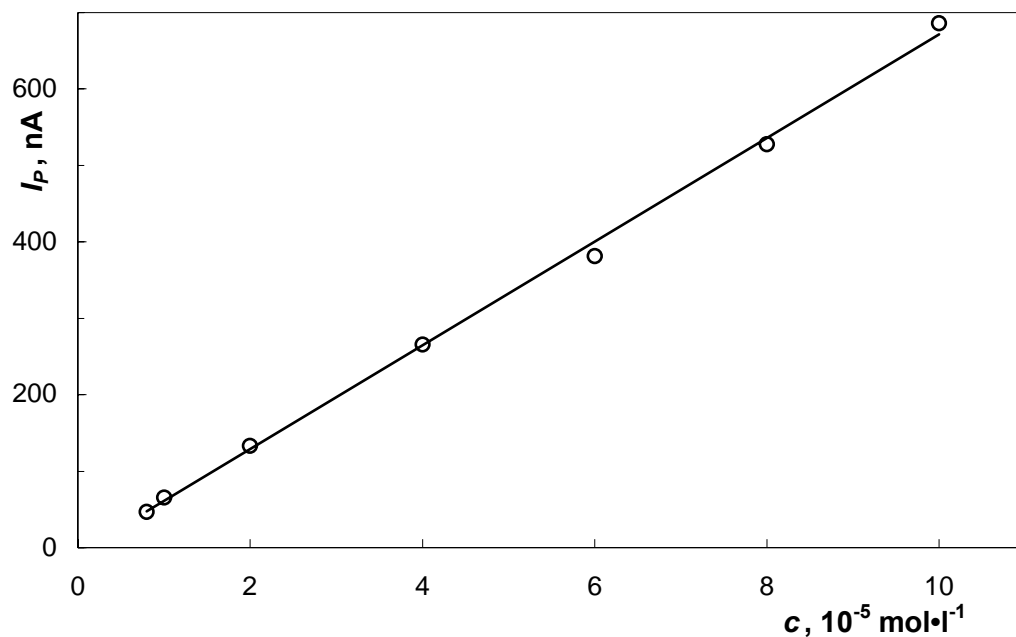
Bylo měřeno metodami anodické DPV a DCV 5-A6-NQ v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu v poměru (1:1).

Koncentrační závislosti 5-A6-NQ byly proměřeny v rozsahu $8\cdot 10^{-6} - 1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Hodnoty proudů pík (limitních proudů) byly brány jako průměrná hodnota ze třech následujících měření. Na Obr. 3.43 je uvedena kalibrační přímka v celém měřeném koncentračním rozmezí pro metodu DPV, na Obr. 3.44 je pak uvedena tato závislost pro metodu DCV. Voltamogramy pro metodu DPV v koncentračním rozmezí $2\cdot 10^{-6} - 8\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu v poměru (1:1) jsou zachyceny na Obr. 3.45.

Parametry kalibračních přímek pro stanovení 5-A6-NQ metodami anodické DPV a DCV na CPE jsou uvedeny v Tab. 3.14.

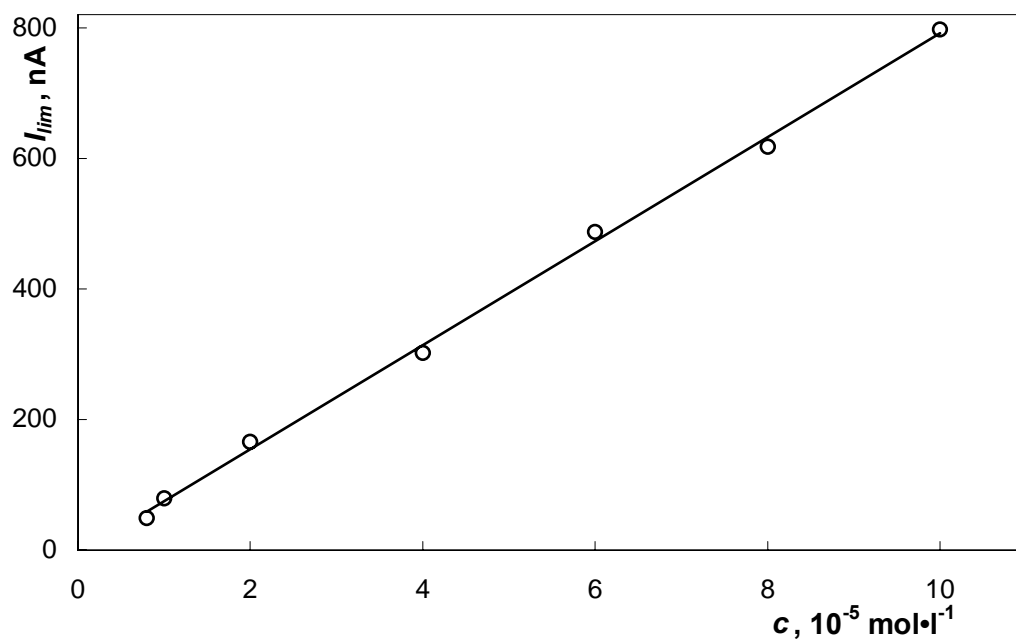
Dosažené limity detekce $L_{D(\text{DPV})} = 7,2\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $L_{D(\text{DCV})} = 7,4\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ byly stanoveny jako množství analytu poskytující pík (vlnu), jehož výška se právě rovná trojnásobku absolutní hodnoty šumu.

Směrnice závislostí v pitné vodě se shodují s hodnotami získanými v deionizované vodě. Dosažené limity detekce jsou horší než v deionizované vodě, což bylo způsobeno vyšším šumem při měřeních v pitné vodě.



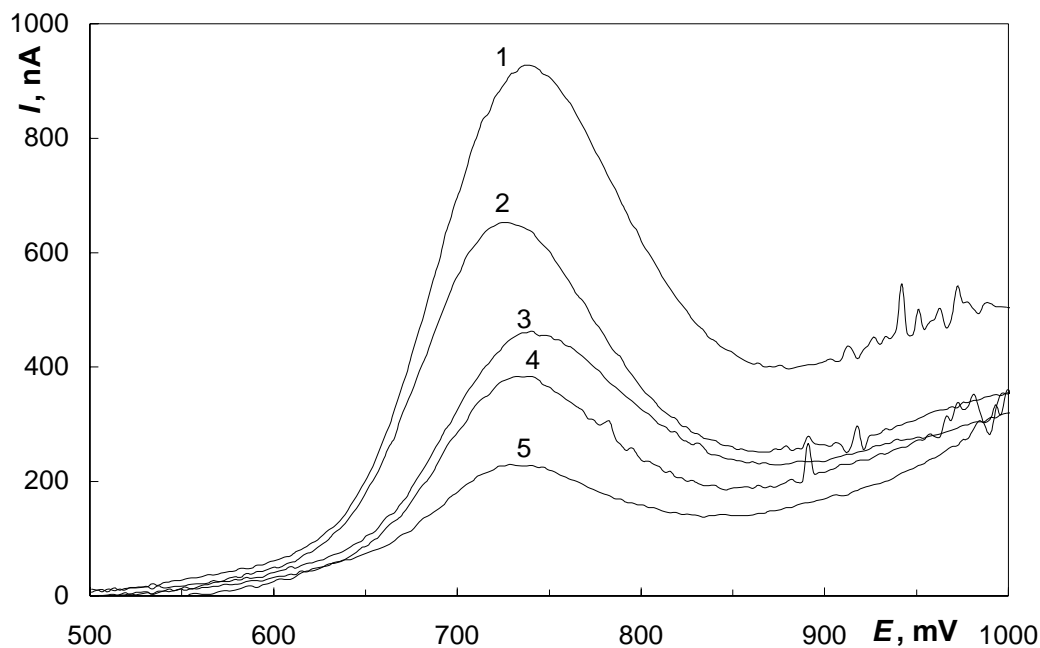
Obr. 3.43

Závislost proudu píku (I_p) na koncentraci 5-A6-NQ v rozmezí $8 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Měřeno metodou anodické DPV na CPE v pitné vodě v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.



Obr. 3.44

Závislost limitního proudu (I_{lim}) na koncentraci 5-A6-NQ v rozmezí $8 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Měřeno metodou anodické DCV na CPE v pitné vodě v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.



Obr. 3.45

Anodické voltamogramy 5-A6-NQ, měřeno metodou DPV na CPE v pitné vodě v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.
 Koncentrace 5-A6-NQ: $8\cdot 10^{-6}$ (1), $6\cdot 10^{-6}$ (2), $4\cdot 10^{-6}$ (3), $2\cdot 10^{-6}$ (4) $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Tab. 3.14

Parametry kalibračních závislostí 5-A6-NQ, měřeno metodami anodické DPV a DCV na CPE v koncentračním rozmezí $8\cdot 10^{-6} - 1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v pitné vodě v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu v poměru (1:1).

Metoda	směrnice $\text{mA}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$	úsek nA	R^2	linearita	R^2	L_D $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
				směrnice závislosti $\log I_p$ ($\log I_{lim}$) na $\log c$	závislosti $\log I_p$ ($\log I_{lim}$) na $\log c$	
DPV	6,78	-7,2	0,9981	1,03	0,9984	$7,2\cdot 10^{-6}$
DCV	7,96	-4,7	0,9983	1,05	0,9933	$7,4\cdot 10^{-6}$

3.2.2 Stanovení 5-amino-6-nitrochinolinu v říční vodě

Po úspěšném stanovení studované látky v pitné vodě byla jako matrice vyzkoušena voda říční. Vzorek říční vody byl odebrán z Vltavy v Praze na nábřeží Kapitána Jaroše, 50 m po proudu od Čechova mostu.

Modelové vzorky 5-A6-NQ v říční vodě byly připraveny odpipetováním 1 ml BR pufru o pH 11, 4 ml pitné vody, potřebného množství zásobního roztoku 5-A6-NQ, doplněním methanolem na 10 ml a převedením do voltametrické nádoby.

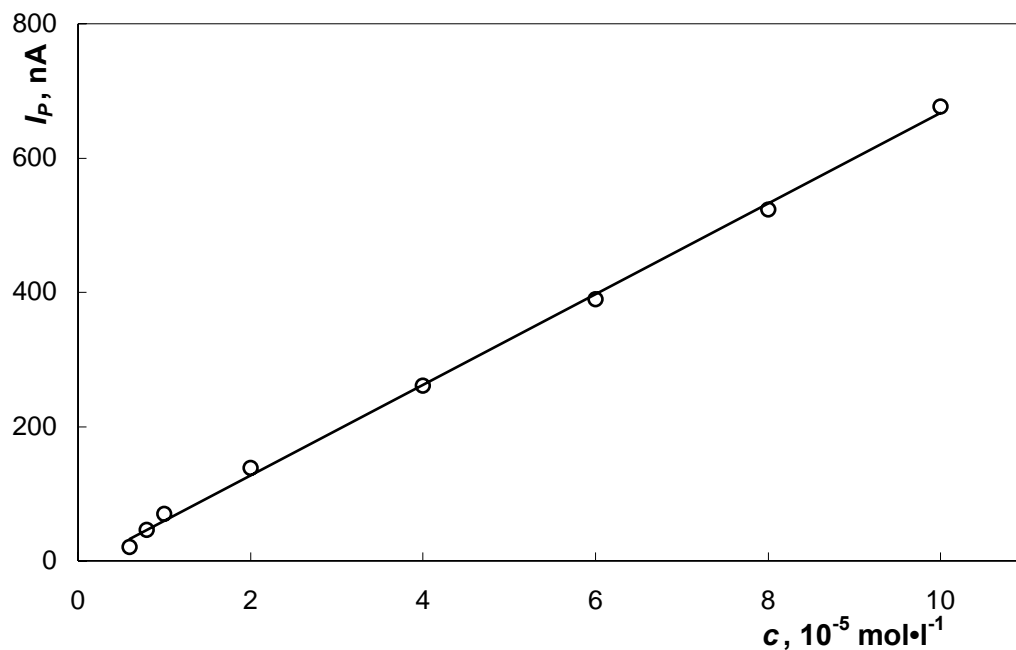
Bylo měřeno metodami anodické DPV a DCV na CPE v prostředí BR pufru pH 11 a methanolu v poměru (1:1).

Koncentrační závislosti 5-A6-NQ byly proměřeny v rozsahu $6 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Hodnoty proudů pík (limitních proudů) byly brány jako průměrná hodnota ze třech následujících měření. Na Obr. 3.46 je uvedena kalibrační přímka v celém měřeném koncentračním rozmezí pro metodu DPV, na Obr. 3.47 je pak uvedena tatáž závislost pro metodu DCV. Voltamogramy pro metodu DPV v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-6} - 8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu v poměru (1:1) jsou zachyceny na Obr. 3.48.

Parametry kalibračních přímek pro stanovení 5-A6-NQ metodami anodické DPV a DCV na CPE jsou uvedeny v Tab. 3.15.

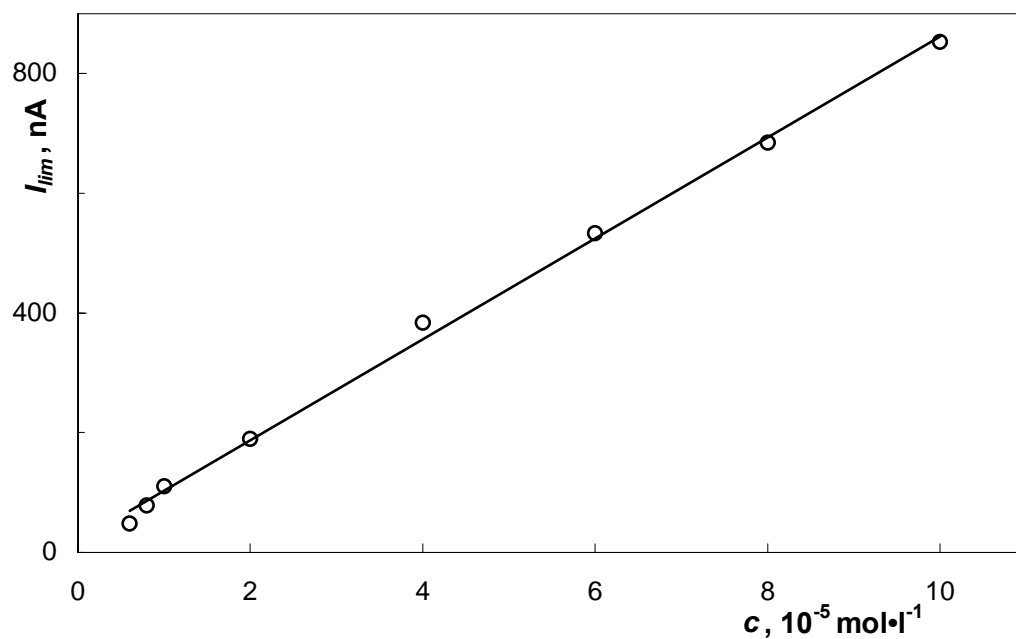
Dosažené limity detekce $L_{D(\text{DPV})} = 5,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $L_{D(\text{DCV})} = 5,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byly stanoveny jako množství analytu poskytující pík (vlnu), jehož výška se právě rovná trojnásobku absolutní hodnoty šumu.

Směrnice závislostí v říční vodě se shodují s hodnotami získanými v deionizované vodě. Dosažené limity detekce jsou horší než v deionizované vodě, což bylo způsobeno vyšším šumem při měřeních v říční vodě.



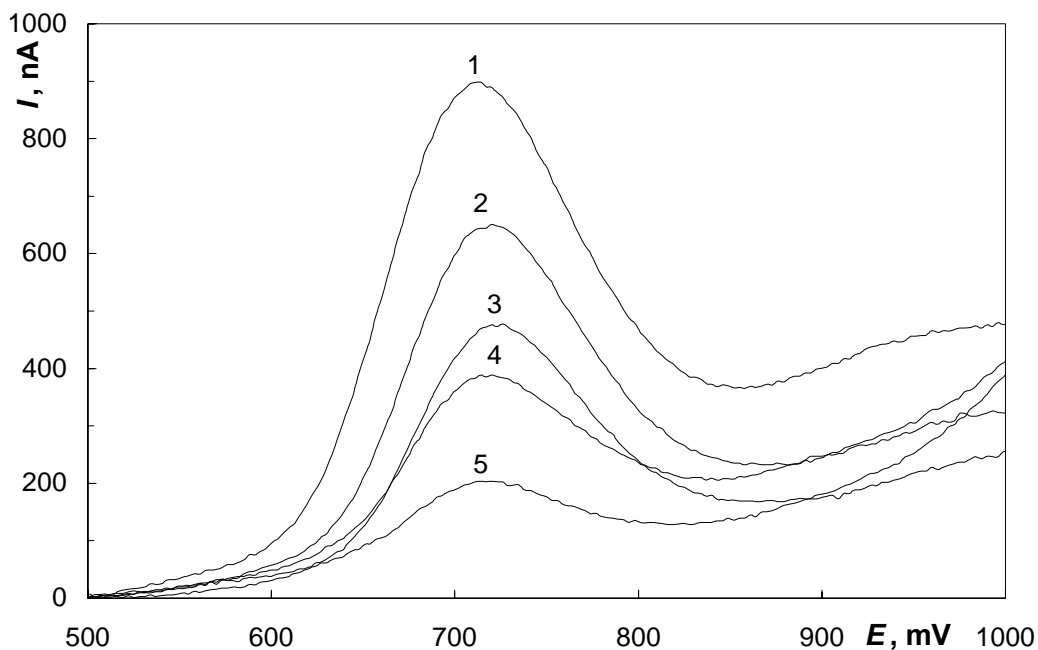
Obr. 3.46

Závislost proudu píku (I_p) na koncentraci 5-A6-NQ v rozmezí $6\cdot 10^{-6} - 1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Měřeno metodou anodické DPV na CPE v říční vodě v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.



Obr. 3.47

Závislost limitního proudu (I_{lim}) na koncentraci 5-A6-NQ v rozmezí $6\cdot 10^{-6} - 1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Měřeno metodou anodické DCV na CPE v říční vodě v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.



Obr. 3.48

Anodické voltamogramy 5-A6-NQ, měřeno metodou DPV na CPE v říční vodě v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu v poměru (1:1), rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.
 Koncentrace 5-A6-NQ: $8\cdot 10^{-6}$ (1), $6\cdot 10^{-6}$ (2), $4\cdot 10^{-6}$ (3), $2\cdot 10^{-6}$ (4) $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Tab. 3.15

Parametry kalibračních závislostí 5-A6-NQ, měřeno metodami anodické DPV a DCV na CPE v koncentračním rozmezí $6\cdot 10^{-6} - 1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v říční vodě v prostředí BR pufru o pH 11 a methanolu v poměru (1:1).

Metoda	směrnice $\text{mA}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$	úsek nA	R^2	linearita		L_D $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
				směrnice závislosti $\log I_p (\log I_{lim})$ na $\log c$	R^2 závislosti $\log I_p$ ($\log I_{lim}$) na $\log c$	
DPV	6,75	-7,5	0,9986	1,02	0,9963	$5,5\cdot 10^{-6}$
DCV	8,43	18,5	0,9975	0,97	0,9920	$5,6\cdot 10^{-6}$

3.3 HPLC

Stanovovaný analyt se může vyskytovat i ve značně komplikovaných maticích, kde k jeho stanovení nelze využít voltametrické metody, které by nepředcházela nějaká předběžná separace. Jednou z možností je využití amperometrického principu detekce u HPLC. Právě této možnosti bylo využíváno v další studii.

3.3.1 Optimalizace detekce

K detekci 5-A6-NQ bylo využito jak UV detekce při 295 nm, tak elektrochemické detekce na CPE typu wall-jet, zapojení sériově za UV detektor. Měřen byl roztok dané látky o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v methanolu. Dávkováno bylo 20 μl roztoku dané látky.

Měření bylo prováděno v mobilní fázi o složení fosfátový pufr o daném pH s methanolem v poměru (10:90). Měření bylo prováděno postupně na dvou netermostatovaných kolonách: **kolona A** Lichrospher[®] RP-18, 100 (5 μm), 125 x 4 mm, **kolona B** Kromasil B RP-18, (7 μm), 250 x 4,6 mm. Průtok mobilní fáze byl 0,5 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

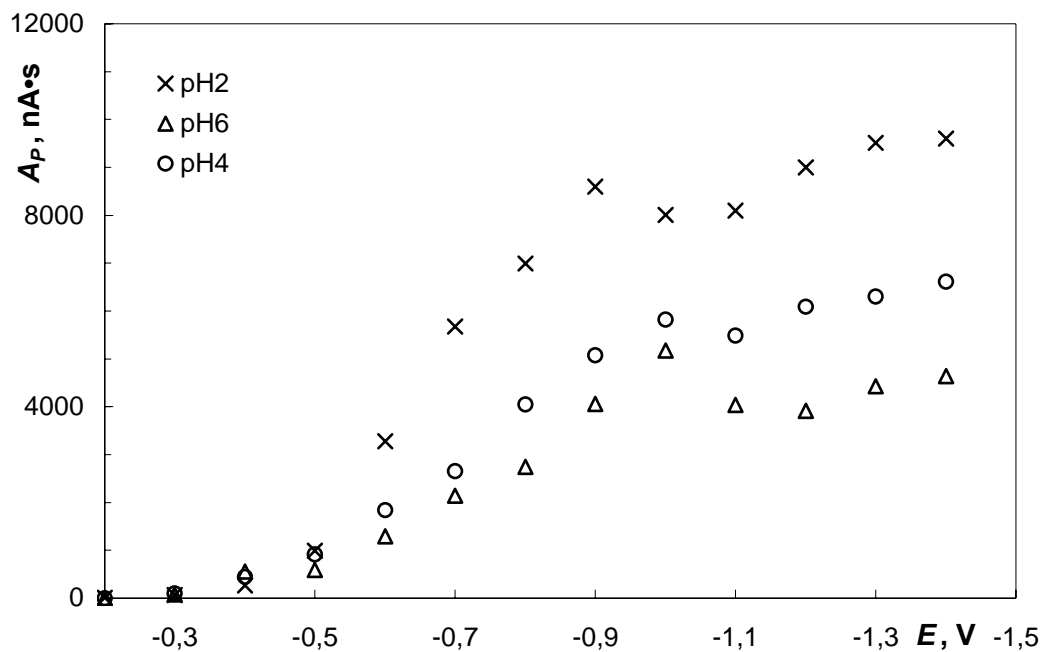
Nejdříve bylo měřeno na koloně A Byly proměřeny závislosti ploch (výšek) píků na potenciálu elektrochemického detektoru v rozsahu -0,2 až -1,4 V pro pH 2, 4 a 6 fosfátového pufru v mobilní fázi, závislosti jsou uvedeny na Obr. 3.49 a Obr. 3.50. Jako optimální podmínky byly zvoleny potenciál -0,9 V a mobilní fáze s fosfátovým pufrém o pH 2.

Nástřikem methanolu a methanolu po 10 minutovém probulání dusíkem byl pozorován pík kyslíku, který se nacházel na stejném místě jako stanovovaná látka, záznamy chromatogramů jsou uvedeny na Obr. 3.51. Pokus o rozdělení píku kyslíku a 5-A6-NQ byl proveden snížením obsahu methanolu v mobilní fázi na 50 %, získané záznamy jsou uvedeny na Obr. 3.52.

K rozdělení píků nedošlo a pík stanovované látky je značně rozmyt, proto další snižování obsahu methanolu by už nemělo význam. Stanovení bylo dále provedeno v mobilní fázi o složení fosfátový pufr o pH 2 s methanolem v poměru (10:90) na koloně B, na které se pík kyslíku a stanovované látky oddělil, záznamy jsou uvedeny na Obr. 3.53.

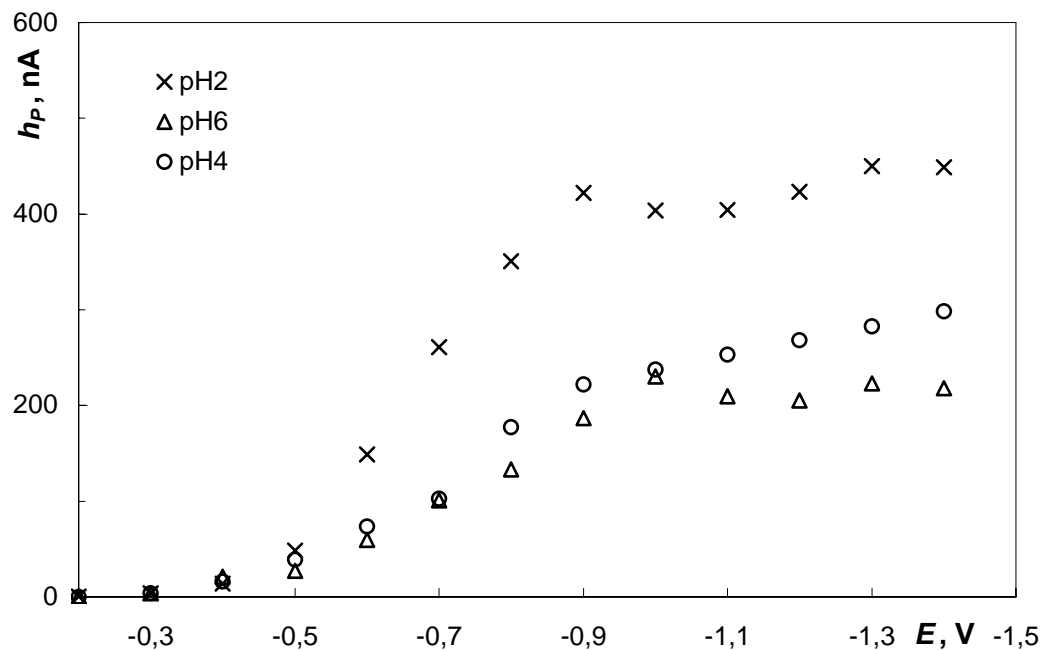
Byla proměřena závislost ploch (výšek) píků na potenciálu elektrochemického detektoru v rozsahu -0,2 až -1,4 V v mobilní fázi s fosfátovým pufrém o pH 2 a methanolem v poměru (10:90) na koloně B a porovnána se záznamy na koloně A, uvedeno na Obr. 3.54 a Obr. 3.55. Průběhy obou závislostí si odpovídají.

Jako optimální podmínky byly zvoleny -0,9 V a mobilní fáze s fosfátovým pufrém o pH 2.



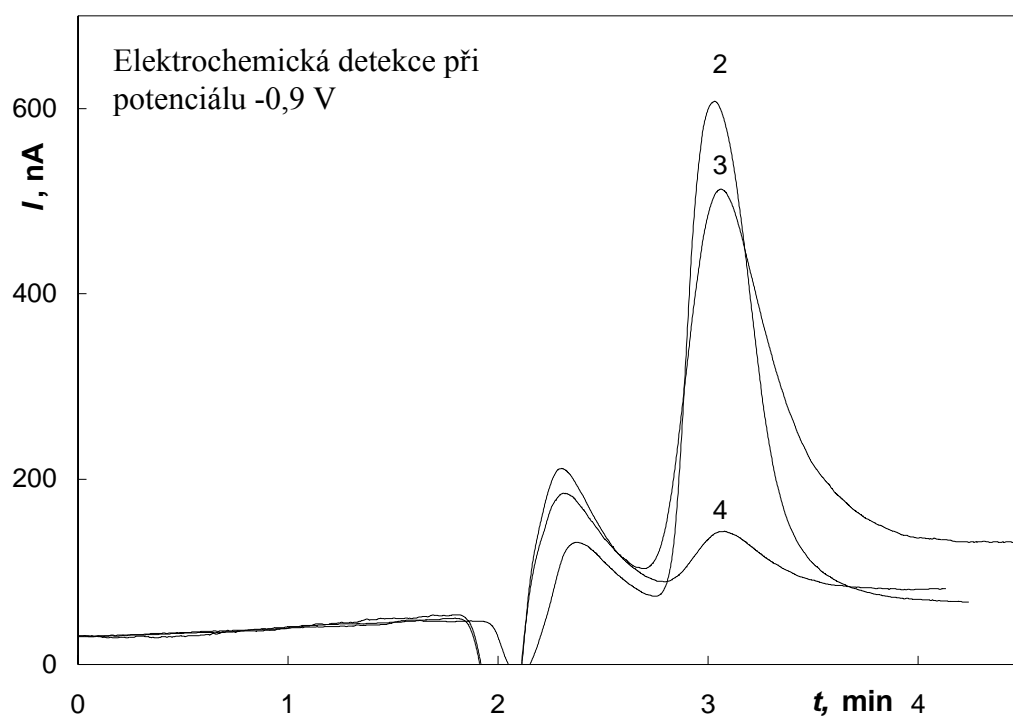
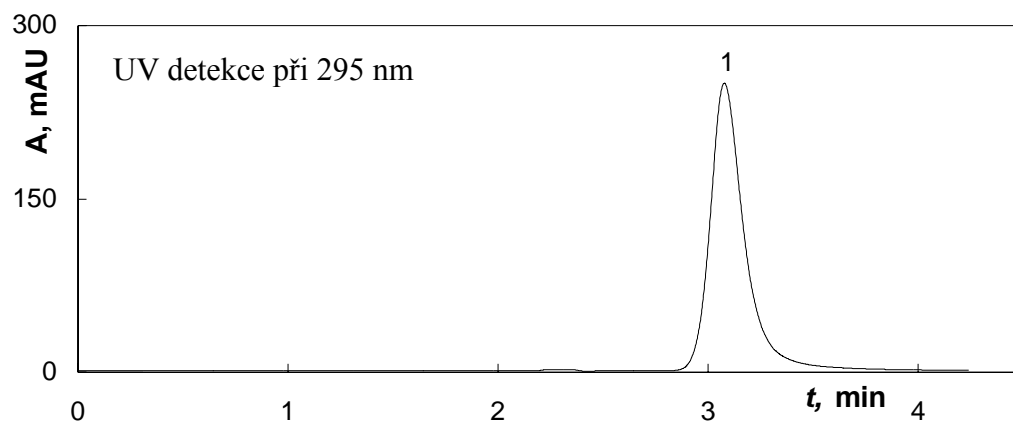
Obr. 3.49

Závislosti ploch píků (A_p) na vloženém potenciálu ED, **kolona A** Lichrospher[®] RP-18, 100 (5 μm), mobilní fáze fosfátový pufr o daném pH s methanolem v poměru (10:90), dávkováno 20 μl roztoku 5-A6-NQ o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



Obr. 3.50

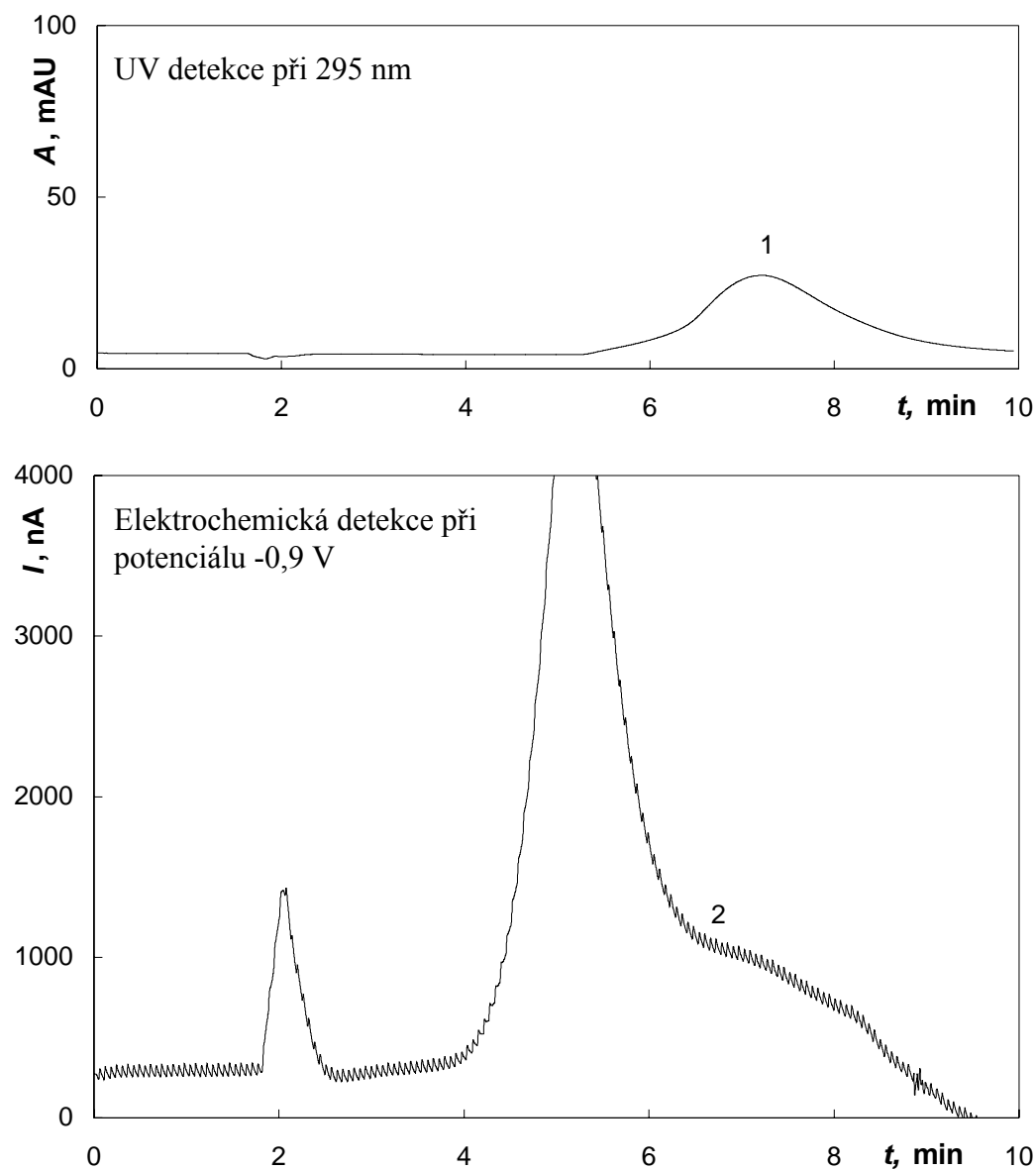
Závislosti výšek píků (h_p) na vloženém potenciálu ED, **kolona A** Lichrospher[®] RP-18, 100 (5 μm), mobilní fáze fosfátový pufr o daném pH s methanolem v poměru (10:90), dávkováno 20 μl roztoku 5-A6-NQ o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



Obr. 3.51

Chromatogramy $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ (1), (2); methanolu (3); methanolu po 10 min probublání dusíkem (4).

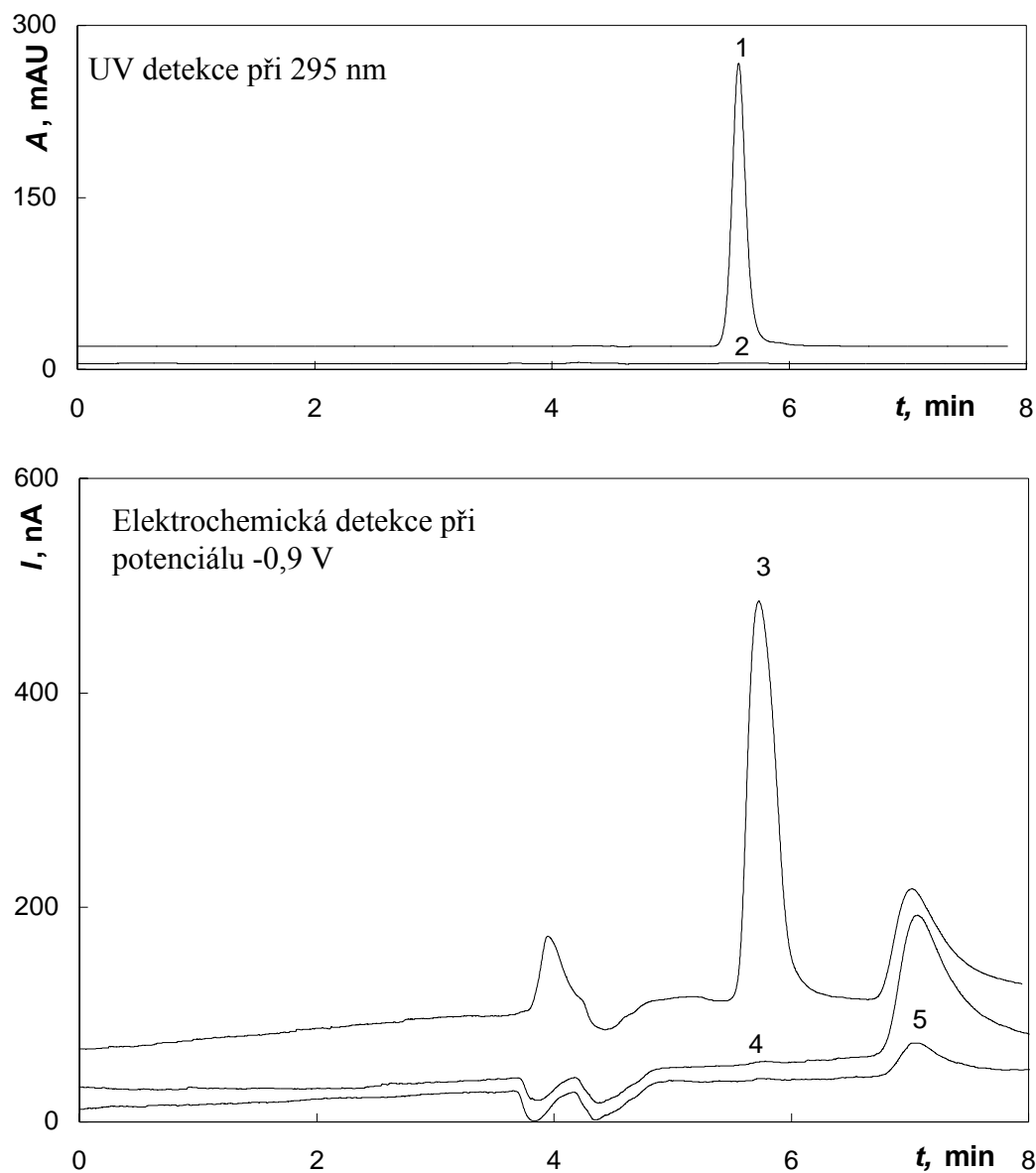
Kolona A Lichrospher[®] RP-18, 100 (5 μm), mobilní fáze fosfátový pufr o pH 2 s methanolem v poměru (10:90), dávkováno 20 μl .



Obr. 3.52

Chromatogramy $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ (1), (2).

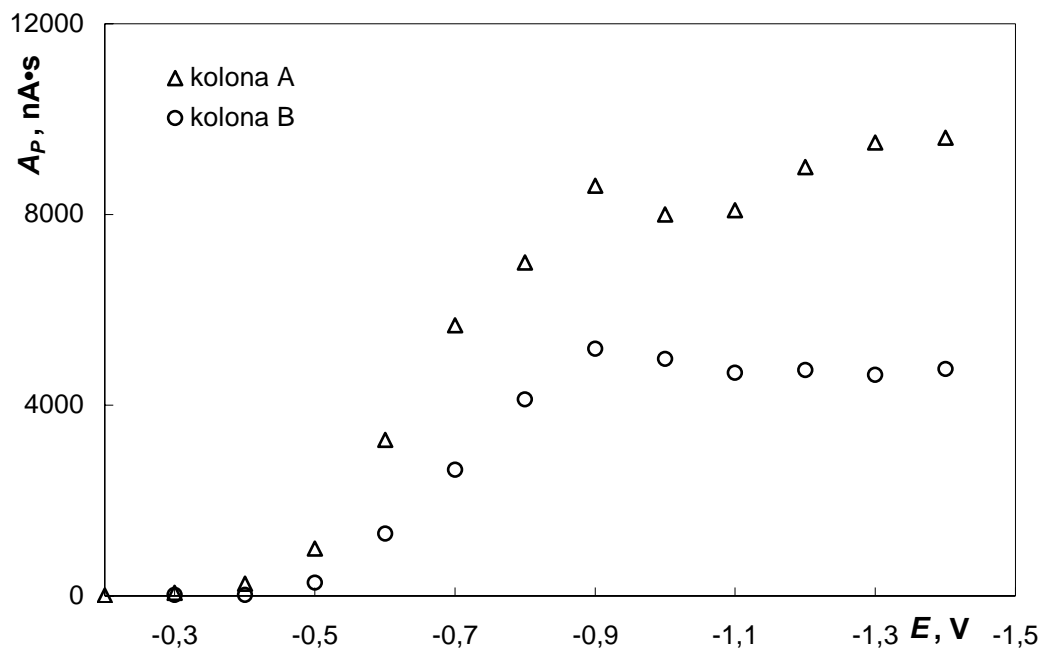
Kolona A Lichrospher[®] RP-18, 100 (5 μm), mobilní fáze fosfátový pufr o pH 2 s methanolem v poměru (50:50), dávkováno 20 μl .



Obr. 3.53

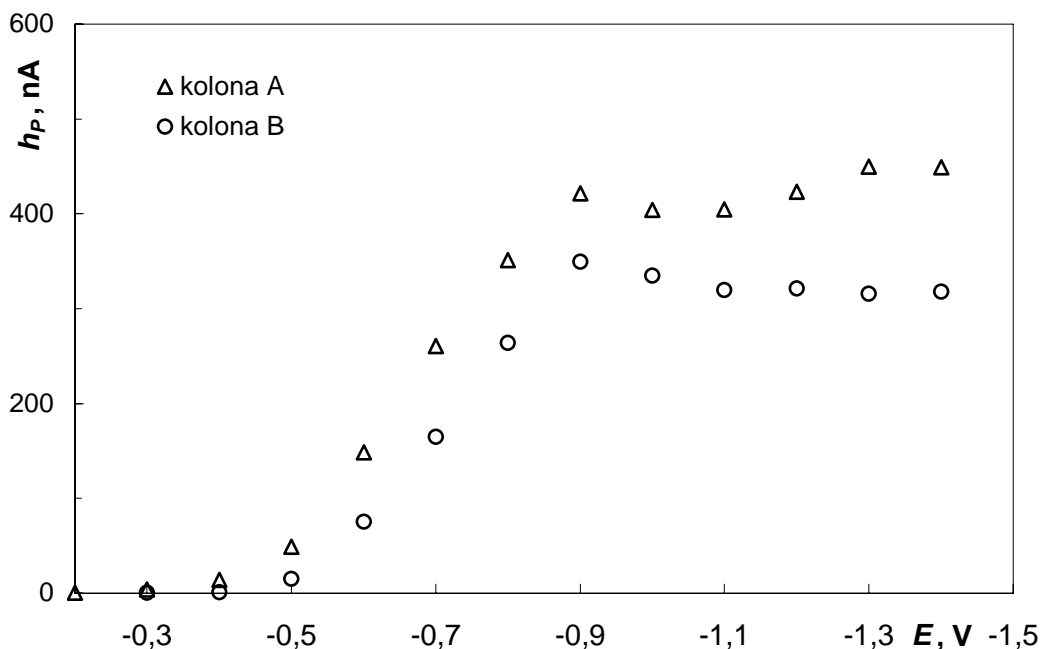
Chromatogramy $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 5-A6-NQ (1), (3); methanolu (2), (4); methanolu po 10 min probublání dusíkem (5).

Kolona B Kromasil B RP-18, ($7 \mu\text{m}$), $250 \times 4,6 \text{ mm}$, mobilní fáze fosfátový pufr o pH 2 s methanolem v poměru (10:90), dávkováno $20 \mu\text{l}$.



Obr. 3.54

Závislosti ploch píků (A_p) na vloženém potenciálu ED, **kolona A** Lichrospher® RP-18, 100 (5 μm), **kolona B** Kromasil B RP-18, (7 μm), 250 x 4,6 mm, mobilní fáze fosfátový pufr o pH 2 s methanolem v poměru (10:90), dávkováno 20 μl roztoku 5-A6-NQ o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



Obr. 3.55

Závislosti výšek píků (h_p) na vloženém potenciálu ED, **kolona A** Lichrospher® RP-18, 100 (5 μm), **kolona B** Kromasil B RP-18, (7 μm), 250 x 4,6 mm, mobilní fáze fosfátový pufr o pH 2 s methanolem v poměru (10:90), dávkováno 20 μl roztoku 5-A6-NQ o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

3.3.2 Kalibrační závislosti

Zjištěné optimální podmínky detekce byly využity pro proměření kalibračních závislostí 5-A6-NQ. Bylo měřeno na koloně B Kromasil B RP-18, (7 μm), 250 x 4,6 mm, složení mobilní fáze fosfátový pufr o pH 2 s methanolem v poměru (10:90), průtoková rychlost 0,5 ml·min⁻¹, dávkováno 20 μl roztoku 5-A6-NQ v methanolu.

Kalibrační křivky byly naměřeny za stejných podmínek i na koloně A, ale díky přítomnosti píku kyslíku, který eluoval současně s píkem stanovované látky, výsledky kalibračních závislostí vykazovaly vysoké hodnoty úseků a byly celkově velice špatné, proto nejsou dále uváděny.

Spektrofotometrická detekce

Detekce UV/VIS detektorem probíhala při vlnové délce 295 nm. Proměřovány byly koncentrace v rozmezí $6 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol·l⁻¹ 5-A6-NQ.

Změřené kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Získané parametry závislostí jsou uvedeny v Tab. 3.16 a Tab. 3.17. Na Obr. 3.56 a Obr. 3.57 jsou kalibrační přímky vyhodnocené z ploch, respektive výšek píků v nejnižším koncentračním rozmezí $6 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-5}$ mol·l⁻¹, na Obr. 3.58 a Obr. 3.59 jsou uvedeny tytéž závislosti zpracované v logaritmické formě v celém koncentračním rozmezí.

Kalibrační závislosti jsou lineární v celé měřené oblasti koncentrací, což potvrzují i hodnoty linearit (směrnic logaritmických závislostí), které jsou blízké jedné. Dosažený limit detekce $L_D = 1,3 \cdot 10^{-7}$ mol·l⁻¹ byl stanoven jako množství analytu poskytující pík, jehož výška se právě rovná trojnásobku absolutní hodnoty šumu.

Tab. 3.16

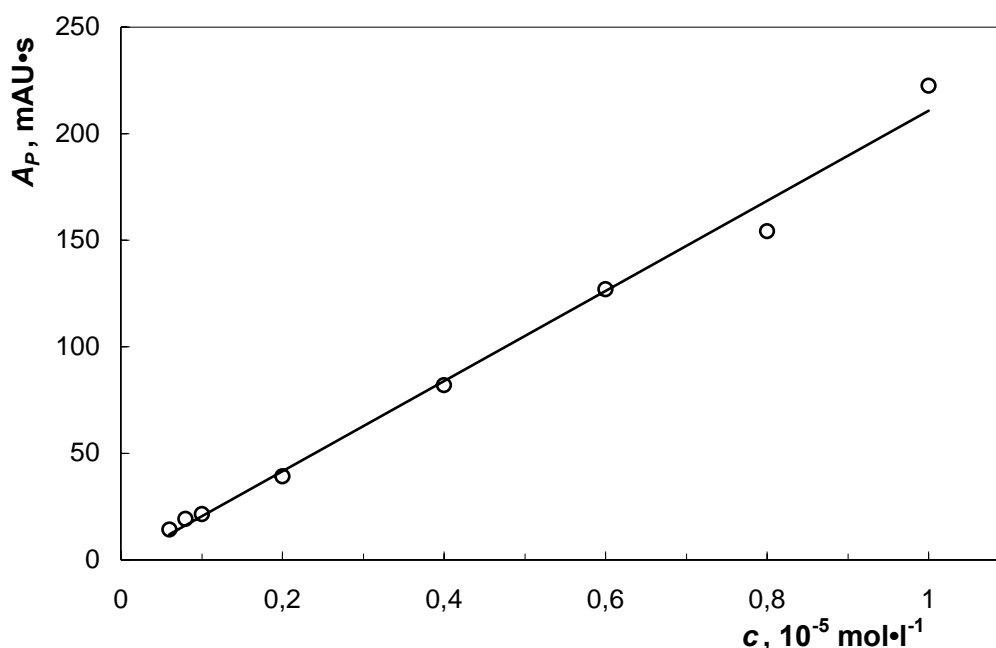
Parametry kalibrační závislosti 5-A6-NQ pro HPLC s UV spektrofotometrickou detekcí při 295 nm. Vyhodnoceno z ploch píků.

c $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	směrnice $\text{AU}\cdot\text{s}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$	úsek $\text{mAU}\cdot\text{s}$	R^2	linearita (směrnice závislosti $\log A_P$ na $\log c$)	R^2 (závislosti $\log A_P$ na $\log c$)
$6\cdot 10^{-7} - 1\cdot 10^{-4}$	21000	-5,7	0,9980	0,98	0,9988

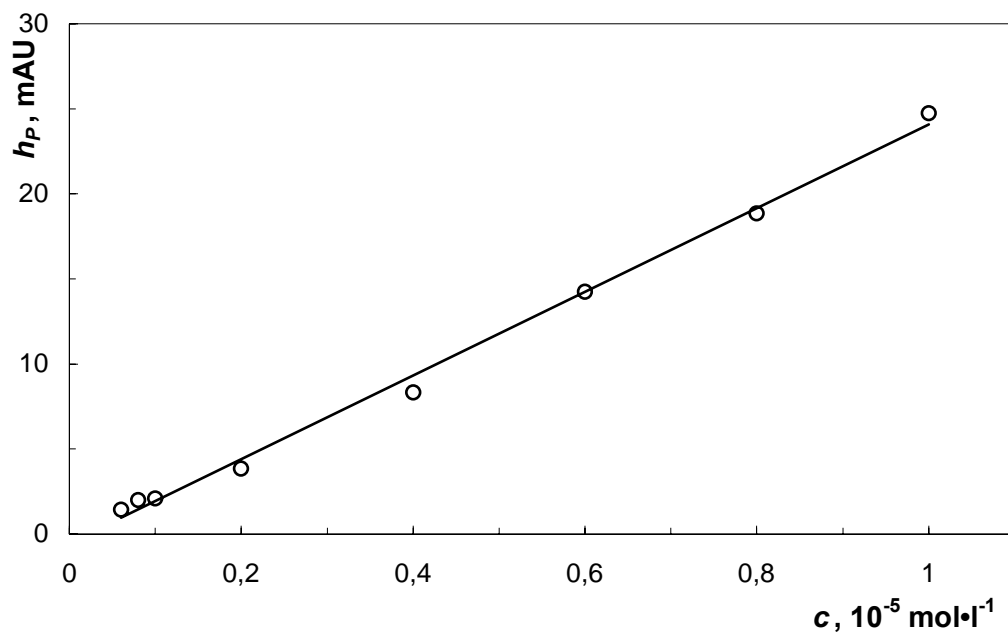
Tab. 3.17

Parametry kalibrační závislosti 5-A6-NQ pro HPLC s UV spektrofotometrickou detekcí při 295 nm. Vyhodnoceno z výšek píků.

c $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	směrnice $\text{AU}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$	úsek mAU	R^2	linearita (směrnice závislosti $\log h_P$ na $\log c$)	R^2 (závislosti $\log h_P$ na $\log c$)	L_D $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
$6\cdot 10^{-7} - 1\cdot 10^{-4}$	2280	-1,5	0,9934	0,99	0,9975	$1,3\cdot 10^{-7}$

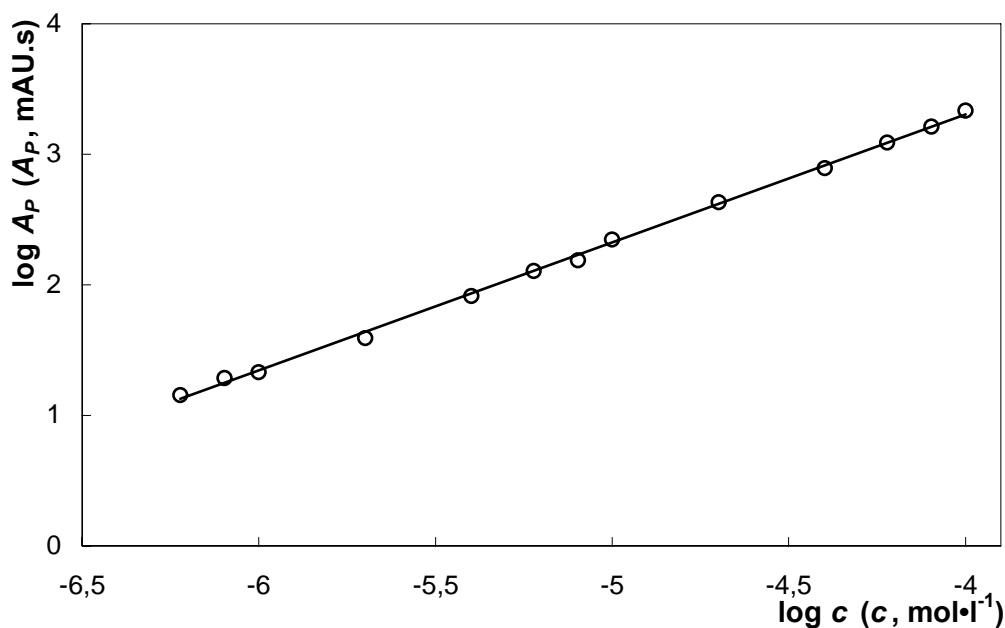
**Obr. 3.56**

Kalibrační závislost 5-A6-NQ vyhodnocená z ploch píků (A_P) v koncentračním rozmezí $6\cdot 10^{-7}$ až $1\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, kolona B Kromasil B RP-18, ($7 \mu\text{m}$), $250 \times 4,6 \text{ mm}$, mobilní fáze fosfátový pufr o pH 2 s methanolem v poměru (10:90), dávkováno $20 \mu\text{l}$ roztoku 5-A6-NQ v MeOH, HPLC s UV spektrofotometrickou detekcí při 295 nm.



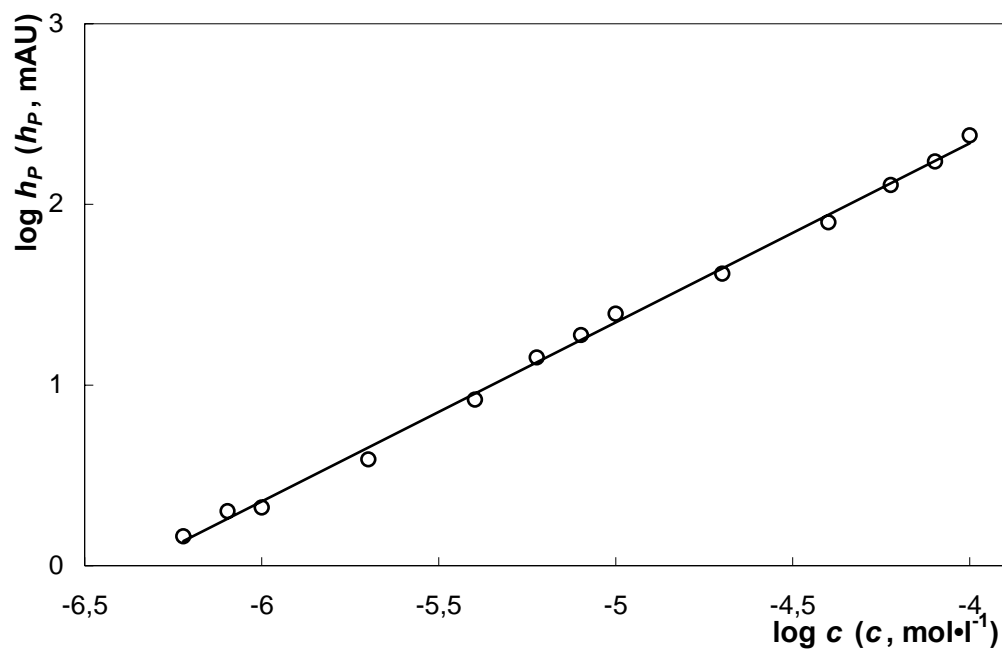
Obr. 3.57

Kalibrační závislost 5-A6-NQ vyhodnocená z výšek píků (h_P) v koncentračním rozmezí $6\cdot 10^{-7}$ až $1\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, kolona B Kromasil B RP-18, ($7 \mu\text{m}$), $250 \times 4,6 \text{ mm}$, mobilní fáze fosfátový pufr o pH 2 s methanolem v poměru (10:90), dávkováno $20 \mu\text{l}$ roztoku 5-A6-NQ v MeOH, HPLC s UV spektrofotometrickou detekcí při 295 nm.



Obr. 3.58

Kalibrační závislost 5-A6-NQ v logaritmicke formě, vyhodnocené z ploch píků (A_P) v koncentračním rozmezí $6\cdot 10^{-7}$ až $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, kolona B Kromasil B RP-18, ($7 \mu\text{m}$), $250 \times 4,6 \text{ mm}$, mobilní fáze fosfátový pufr o pH 2 s methanolem v poměru (10:90), dávkováno $20 \mu\text{l}$ roztoku 5-A6-NQ v MeOH, HPLC s UV spektrofotometrickou detekcí při 295 nm.



Obr. 3.59

Kalibrační závislost 5-A6-NQ v logaritmické formě, vyhodnoceno z výšek píků (h_P) v koncentračním rozmezí $6 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol·l⁻¹, kolona B Kromasil B RP-18, (7 μm), 250 x 4,6 mm, mobilní fáze fosfátový pufr o pH 2 s methanolem v poměru (10:90), dávkováno 20 μl roztoku 5-A6-NQ v MeOH, HPLC s UV spektrofotometrickou detekcí při 295 nm.

Elektrochemická detekce

Detekce elektrochemickým detektorem probíhala při potenciálu -0,9 V. Proměřovány byly koncentrace v rozmezí $6 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol·l⁻¹ 5-A6-NQ.

Změřené kalibrační závislosti byly nejdříve zpracovány metodou lineární regrese, ale zvláště u nižších hodnot koncentrací nebyla závislost lineární, proto byly závislosti proloženy polynomem druhého stupně. Získané parametry závislostí jsou uvedeny v Tab. 3.18 a Tab. 3.19. Na Obr. 3.60 a Obr. 3.61 jsou kalibrační závislosti vyhodnocené z ploch, respektive výšek píků v nejnižším koncentračním rozmezí $6 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-5}$ mol·l⁻¹, na Obr. 3.62 a Obr. 3.63 jsou uvedeny tytéž závislosti v celém koncentračním rozmezí.

Dosažený limit detekce $L_D = 4,9 \cdot 10^{-7}$ mol·l⁻¹ byl stanoven jako množství analytu poskytující pík, jehož výška se právě rovná trojnásobku absolutní hodnoty šumu.

Z výsledků je patrné, že elektrochemická detekce s využitím redukce 5-A6-NQ je použitelná metoda pro stanovení studované látky, ale nedosahuje takových výsledků jako při elektrochemické detekci s využitím oxidace 5-A6-NQ ($L_D = 1,6 \cdot 10^{-7}$ mol·l⁻¹)⁴⁴ a UV spektrofotometrické detekci, což je způsobeno vyššími hodnotami šumu při zapojení amperometrického detektoru v hodnotách záporných potenciálů.

Tab. 3.18

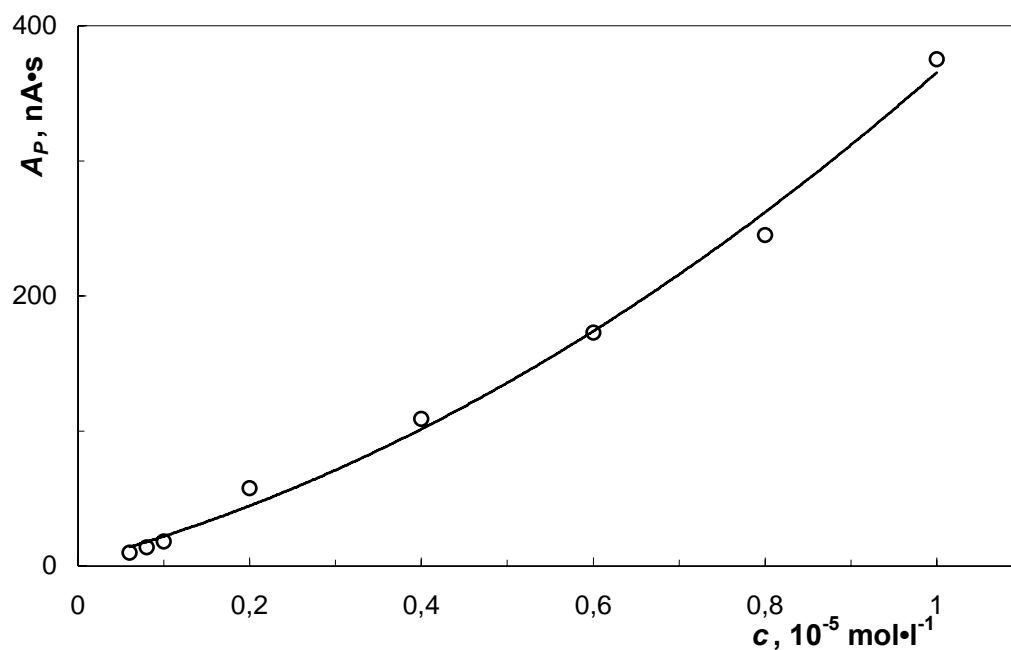
Parametry kalibračních závislostí 5-A6-NQ pro HPLC s elektrochemickou detekcí při potenciálu -0,9 V. Vyhodnoceno z ploch píků: $A_p = ac^2 + bc + d$

c mol·l⁻¹	a A·mol⁻²·l²	b mA·mol⁻¹·l	d nA	R²
$6 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	3,5	52,8	-94,5	0,9980

Tab. 3.19

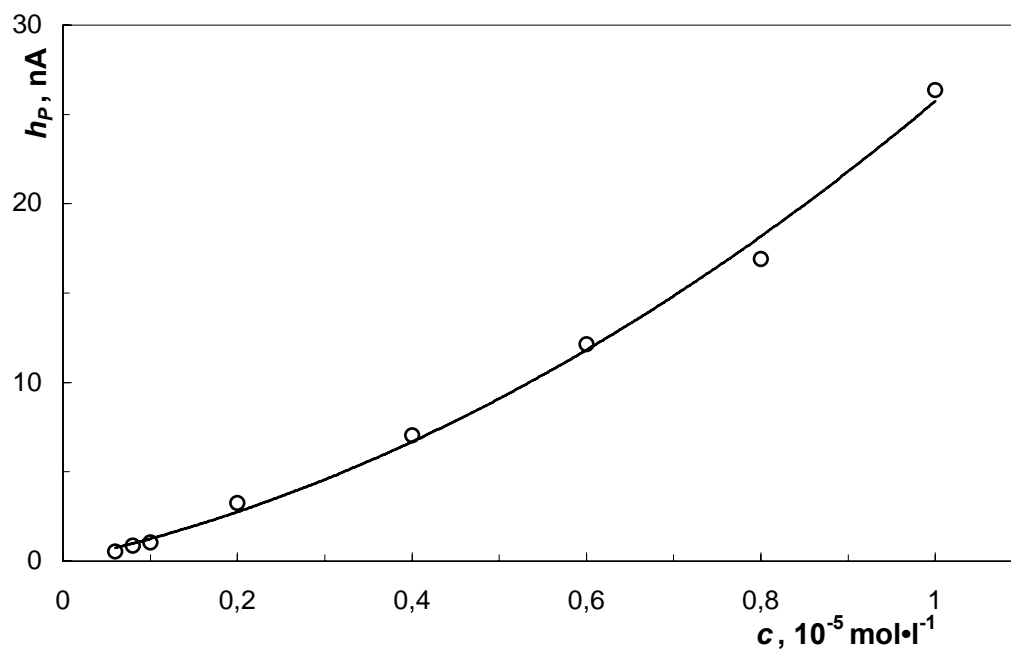
Parametry kalibračních závislostí 5-A6-NQ pro HPLC s elektrochemickou detekcí při potenciálu -0,9 V. Vyhodnoceno z výšek píků: $h_p = ac^2 + bc + d$

c mol·l⁻¹	a A·mol⁻²·l²	b mA·mol⁻¹·l	d nA	R²	L_D mol·l⁻¹
$6 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	9,7	2,46	-2,05	0,9994	$4,9 \cdot 10^{-7}$



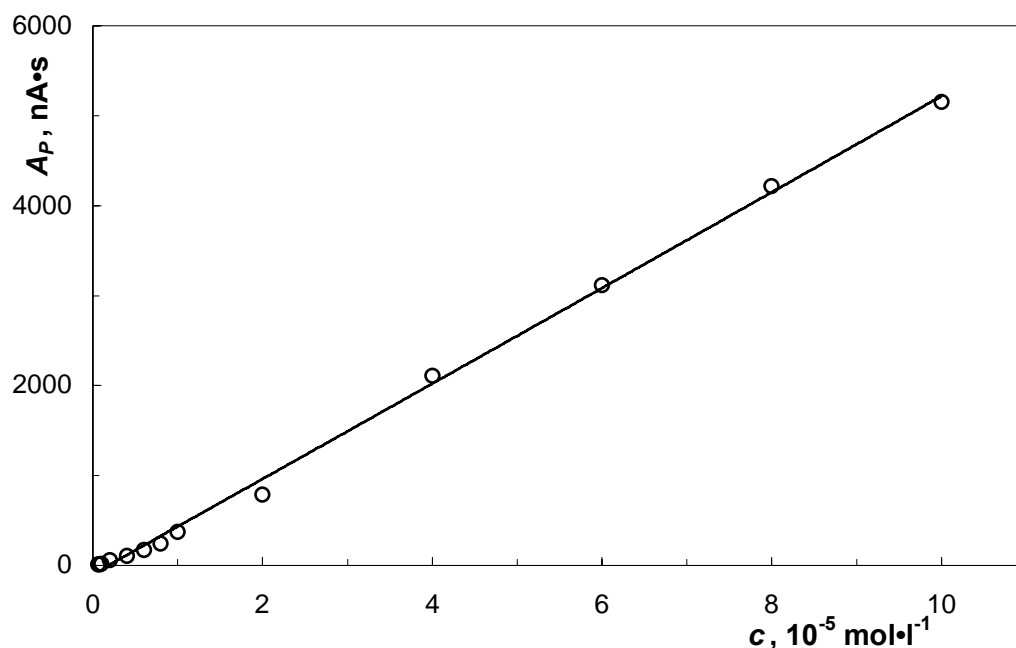
Obr. 3.60

Kalibrační závislost 5-A6-NQ vyhodnocená z ploch píků (A_p) v koncentračním rozmezí $6\cdot 10^{-7}$ až $1\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, kolona B Kromasil B RP-18, ($7 \mu\text{m}$), $250 \times 4,6 \text{ mm}$, mobilní fáze Fosfátový pufr o pH 2 s methanolem v poměru (10:90), dávkováno $20 \mu\text{l}$ roztoku 5-A6-NQ v MeOH, HPLC s elektrochemickou detekcí při potenciálu $-0,9 \text{ V}$.



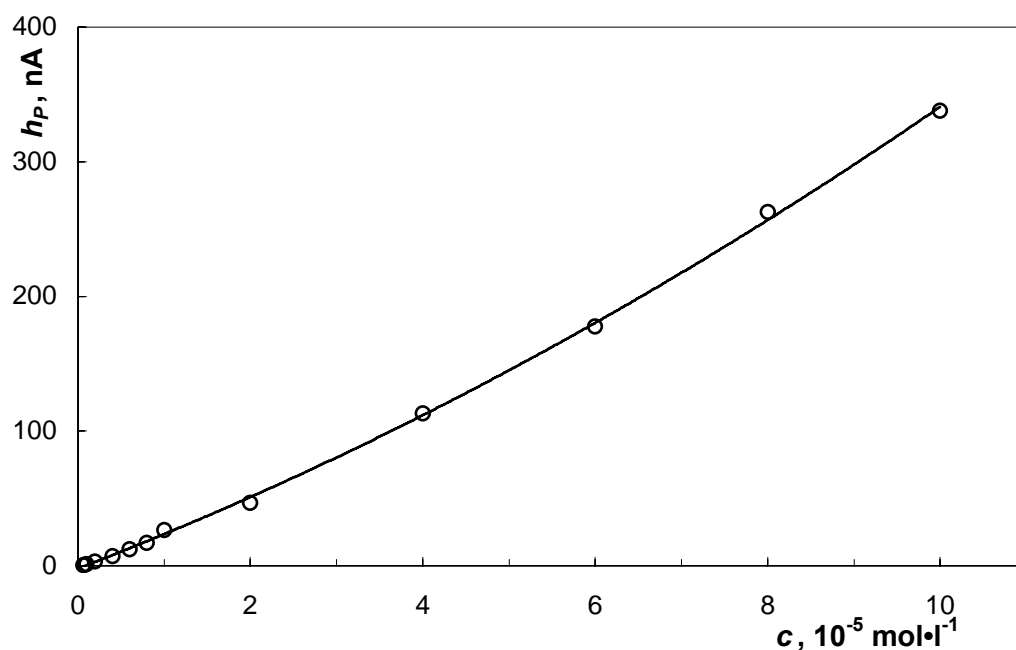
Obr. 3.61

Kalibrační závislost 5-A6-NQ vyhodnocená z výšek píků (h_p) v koncentračním rozmezí $6\cdot 10^{-7}$ až $1\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, kolona B Kromasil B RP-18, ($7 \mu\text{m}$), $250 \times 4,6 \text{ mm}$, mobilní fáze Fosfátový pufr o pH 2 s methanolem v poměru (10:90), dávkováno $20 \mu\text{l}$ roztoku 5-A6-NQ v MeOH, HPLC s elektrochemickou detekcí při potenciálu $-0,9 \text{ V}$.



Obr. 3.62

Kalibrační závislost 5-A6-NQ vyhodnocená z ploch píků (A_p) v koncentračním rozmezí $6\cdot 10^{-7}$ až $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, kolona B Kromasil B RP-18, ($7 \mu\text{m}$), $250 \times 4,6 \text{ mm}$, mobilní fáze Fosfátový pufr o pH 2 s methanolem v poměru (10:90), dávkováno $20 \mu\text{l}$ roztoku 5-A6-NQ v MeOH, HPLC s elektrochemickou detekcí při potenciálu $-0,9 \text{ V}$.



Obr. 3.63

Kalibrační závislost 5-A6-NQ vyhodnocená z výšek píků (h_p) v koncentračním rozmezí $6\cdot 10^{-7}$ až $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, kolona B Kromasil B RP-18, ($7 \mu\text{m}$), $250 \times 4,6 \text{ mm}$, mobilní fáze Fosfátový pufr o pH 2 s methanolem v poměru (10:90), dávkováno $20 \mu\text{l}$ roztoku 5-A6-NQ v MeOH, HPLC s elektrochemickou detekcí při potenciálu $-0,9 \text{ V}$.

4. Závěr

Bylo prostudováno voltametrické chování 5-A6-NQ na uhlíkové pastové elektrodě zahrnující pH závislosti a změření kalibračních křivek za optimálních podmínek se stanovením limitů detekce (Tab. 4.1) pro DPV a DCV s využitím oxidace i redukce studované látky.

Byly proměřeny cyklické voltamogramy v BR pufru o pH 2, 7, 11 pro oxidaci a 1,6 pro redukci 5-A6-NQ. Z výsledků vyplývá, že na CPE probíhá při měřených podmínkách oxidace i redukce 5-A6-NQ ireverzibilně, děj není kontrolován pouze difúzí a během měření dochází k pasivaci elektrody.

Byla ověřena možnost akumulace 5-A6-NQ na CPE a při stanovených optimálních podmínkách akumulace 5 minut při potenciálu 500 mV v prostředí BR pufru o pH 11 s methanolem v poměru (95:5) byla proměřena kalibrační závislost a stanoven limit detekce (Tab. 4.1). Ze získaných výsledků vyplývá, že akumulace příliš nezlepšují stanovení studované látky. Bylo pozorováno, že akumulace 5-A6-NQ probíhá pouze na povrch pasty.

Tab. 4.1

Limity detekce 5-A6-NQ pro voltametrické metody stanovení studovaného analytu.

Metoda stanovení 5-A6-NQ	L_D $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
Anodická DPV v BR pufru o pH 11 s MeOH v poměru (1:1)	$2,0\cdot 10^{-6}$
Anodická DCV v BR pufru o pH 11 s MeOH v poměru (1:1)	$3,1\cdot 10^{-6}$
Katodická DPV 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ H_3PO_4 o pH 1,6 s MeOH v poměru (1:1)	$1,3\cdot 10^{-6}$
Katodická DPV v BR pufru o pH 11 s MeOH v poměru (1:1)	$1,9\cdot 10^{-6}$
Katodická DCV v 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ H_3PO_4 o pH 1,6 s MeOH v poměru (1:1)	$1,5\cdot 10^{-6}$
Anodická DPAdSV v BR pufru o pH 11 s MeOH v poměru (95:5), $E_{aku} = 500 \text{ mV}$, $t_{aku} = 5 \text{ minut}$	$1,4\cdot 10^{-6}$

Použití nově vypracovaných voltametrických metod stanovení 5-A6-NQ bylo ověřeno i na modelových vzorcích pitné a říční vody. Směrnice kalibračních závislostí měřené metodami anodické DPV a DCV v pitné i říční vodě se shodují se směrnicemi naměřenými v deionizované vodě. Limity detekce stanovené v modelových vzorcích jsou poněkud horší, což je způsobeno pozorovaným vyšším šumem.

Bylo prostudováno chromatografické chování 5-A6-NQ v reverzním chromatografickém systému s chemicky vázaným oktadecylem s UV spektrometrickou a amperometrickou detekcí na uhlíkové pastové elektrodě.

Byla prostudována závislost odezvy amperometrického detektoru s uhlíkovou pastovou elektrodou na vloženém potenciálu a pH mobilní fáze. Byly nalezeny optimální podmínky pro stanovení studované látky v mobilní fáze tvořené fosfátovým pufrem o pH 2 s methanolem (10:90), UV spektrofotometrická detekce při 295 nm, amperometrická detekce na CPE při potenciálu -0,9 V. Za těchto podmínek byly změřeny kalibrační závislosti studované látky a stanoveny limity detekce (Tab. 4.2). Limit detekce elektrochemické detekce s využitím redukce 5-A6-NQ nedosahuje takových výsledků jako při elektrochemické detekci s využitím oxidace 5-A6-NQ ($L_D = 1,6 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)⁴⁴ a UV spektrofotometrické detekci, což je způsobeno vyššími hodnotami šumu amperometrického detektoru. Přesto se jedná o použitelnou metodu stanovení.

Tab. 4.2

Limity detekce 5-A6-NQ pro HPLC s UV spektrofotometrickou a elektrochemickou detekcí. Měřeno ve fosfátovém pufru o pH 2 s methanolem v poměru (10:90).

Metoda HPLC stanovení 5-A6-NQ	L_D mol·l⁻¹
UV spektrofotometrická detekce při 295 nm	$1,3 \cdot 10^{-7}$
Elektrochemická detekce při potenciálu -0,9 V	$4,9 \cdot 10^{-7}$

5. Literatura

1. Stratil, P.; Kubáň, V.: Princip karcinogeneze a přírodní karcinogenní sloučeniny v potravinách. *Chemické Listy* **98**, 379-387 (2004).
2. White, P.A.: The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in komplex mixtures. *Mutation Research* **515**, 85-98 (2002).
3. Zima, J.; Stoica, A.I.; Zítová, A.; Barek, J.: Voltammetric determination of selected aminoquinolines using carbon paste electrode. *Electroanalysis* **18**, 158-162 (2005).
4. Barek, J.; Bencko, V.; Cvačka, J.; Šuta, M.: Znečištění životního prostředí automobilovými emisemi. *Chemické Listy* **92**, 794-798 (1998).
5. Leotz-Gartziandia, E.; Tatry, V.; Carlier, P.: Sampling and analysis of organic compounds in diesel particulate matter. *Environmental Monitoring and Assessment* **65**, 155-163 (2000).
6. Tomaniová, M.; Kocourek, V.; Hajšlová, J.: Polycyklické aromatické uhlovodíky v potravinách. *Chemické Listy* **91**, 357-366 (1997).
7. Barek, J.; Cvačka, J.; Moreira, C.; Zima, J.: Metody stanovení genotoxických nitroderivátů polycyklických aromatických uhlovodíků. *Chemické Listy* **90**, 805-817 (1996).
8. Stiborová, M.: Aromatické nitrosloučeniny: kontaminanty životního prostředí a potenciální karcinogeny pro člověka. *Chemické Listy* **96**, 784-791 (2002).
9. Barek, J.; Mejstřík, V.; Švagrová, I.; Zima, J.: Měření expozice polycyklických aromatických uhlovodíků na základě monitorování jejich metabolitů v tělních tekutinách. *Chemické Listy* **88**, 341-352 (1994).
10. Barek, J.; Moreira, J.C.; Zima, J.: Modern electrochemical methods for monitoring of chemical carcinogens. *Sensors* **5**, 148-158 (2005).
11. Barek, J.; Pumera, M.; Muck, A.; Kadeřábková, M.; Zima, J.: Polarographic and voltammetric determination of selected nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analytica Chimica Acta* **393**, 141-146 (1999).
12. Barek, J.; Cvačka, J.; Muck, A.; Quaiserová, V.; Zima, J.: Polarographic and voltammetric detection of carcinogenic nitro and amino derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Electroanalysis* **13**, 799-803 (2001).

13. Stratil, P.; Kubáň, V.: Exogenní karcinogeny v potravinách a karcinogeny vznikající při jejich technologickém zpracování. *Chemické Listy* **99**, 3-12 (2005).
14. Wogan, N.G.; Hecht, S.S.; Felton J.S.; Conney, A.H.; Loeb, L.A.: Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminar in Cancer Biology* **14**, 473-486 (2004).
15. Okumura, L.L.; Stradiotto, R.N.: Simultaneous determination of quinoline and pyridine compounds in gasoline and diesel by differential pulse voltammetry. *Electroanalysis* **19**, 709-716 (2007).
16. Vineis, P.; Pirastu, R.: Aromatic amines and cancer. *Cancer Causes and Control* **8**, 346-353 (1997).
17. Weisburger, J.H.: Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health. *Mutation Research*, **506-507**, 9-20 (2002).
18. Jakzyn, P.; Agudo, A.; Ibáñez, R.; García-Closas, R.; Pera, G.; Amiano, P.; González, C.A.: Development of a food database of nitrosamines, heterocyclic amines, and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Nutrition* **134**, 2011-2014 (2004).
19. Felton, J.S.; Knize, M.G.; Dolbeare, F.A.; Wu, R.: Mutagenic activity of heterocyclic amines in cooked foods. *Environmental Health Perspectives* **102**, 201-204 (1994).
20. Naqao, M.; Wakabayashi, K.; Ushijima, T.; Toyota, M.; Totsuka, Y.; Sugimura, T.: Human exposure to carcinogenic heterocyclic amines and their mutational fingerprints in experimental animals. *Environmental Health Perspectives* **104**, 497-501 (1996).
21. Sugimura, T.: Food and cancer. *Toxicology* **181-182**, 17-21 (2002).
22. Fitch, C.D.: Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial action of quinoline drugs. *Life Sciences* **74**, 1957-1972 (2004).
23. Lo, W.L.; Tsang, C.W.: Chemotherapy of malaria, recommendations for Hong Kong, *Journal of the Hong Kong Medical Association* **38**, 43-46 (1986).
24. Basco, L.K.; Ringwald, P.: In vitro activities of piperazine and other 4-aminoquinolines against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* in Cameroon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**, 1391-1394 (2003).
25. Haskelberg, L.: Derivates of 6-nitro- and 6-amino-quinoline. *The Journal of Organic Chemistry* **12**, 434-436 (1947).
26. Queener, S.F.; Barlett, M.S.; Nasr, M.; Smith, J.W.: 8-Aminoquinolines effective against *Pneumocystis carinii* in vitro and in vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**, 2166-2172 (1993).
27. www.sigmaaldrich.com, staženo 6.10.2007.

28. www.osha.gov, ntp.niehs.nih.gov, staženo 6.10.2007.
29. González, M.P.; Díaz, H.G.; Cabrera, M.A.; Ruiz, R.M.: A novel approach to predict a toxicological property of aromatic compounds in the *Tetrahymena pyriformis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **12**, 735-744 (2004).
30. Karamkam, M.; Dollé, F.; Valette, H.; Basret, L.; Bromoullé, Y.; Hinnen, F.; Vaufrey, F.; Franklin, C.; Baurly, S.; Coulon, Ch.; Ottaviani, M.; Delaforge, M.; Loc'h, Ch.; Bottlaender, M.; Crouzel, Ch.: Synthesis of fluorine-18-labelled derivatives of 6-nitroquipazine as a radioligand for the in vivo serotonin transporter imaging with PET. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **10**, 2611-2623 (2002).
31. Goda, F.E.; Aziz, A.; Ghoneim, H.A.: Synthesis and biological evaluation of novel 6-nitro-5-substituted aminoquinolines as local anesthetic and anti-arrhythmic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **13**, 3175-3183 (2005).
32. Adams, R.N.: Carbon paste electrodes. *Analytical Chemistry* **30**, 1576 (1958).
33. Švancara, I.; Vytřas, K.: Příprava a vlastnosti uhlíkových pastových elektrod. *Chemické Listy* **88**, 138-146 (1994).
34. Švancara, I.; Ogorevc, B.; Hočevar, S.B.; Vytřas, K.: Perspectives of carbon paste electrodes in stripping potentiometry. *Analytical Sciences* **18**, 301-305 (2002).
35. Lindquist, J.: Carbon paste electrode with a wide anodic potential range. *Analytical Chemistry* **45**, 1006-1008 (1973).
36. Švancara, I.; Schachl, K.: Testing of unmodified carbon paste electrodes. *Chemické Listy* **93**, 490-499 (1999).
37. German, N.; Armalis, S.; Zima, J.; Barek, J.: Voltammetric determination of fluoren-9-ol and 2-acetamidofluorene using carbon paste electrodes. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **70**, 292-304 (2005).
38. Kuwana, T.; French, W.G.: Electrooxidation or reduction of organic compounds into aqueous solution using carbon paste electrode. *Analytical Chemistry* **36**, 241-242 (1964).
39. Vytřas, K.; Švancara, I.: Aplikace uhlíkových pastových elektrod v elektroanalýze. *Chemické Listy* **88**, 412-422 (1994).
40. Sýkora, V.; Zátka, V.: *Příruční tabulky pro chemiky*. SNTL, Praha 1967.
41. www.chemfinder.com, Data z PhysProp Database, staženo 6.10.2007.
42. Vlácil, F. a kol.: *Příklady z chemické a instrumentální analýzy*, Informatorium, Praha 1991.

43. Hříbal, Z.: HPLC separace chinolinu a jeho nitro- a aminoderivátů. *Diplomová práce*, UK, Praha (2001).
44. Němcová, L.: Stanovení 5-amino-6-nitrochinolinu pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí. *Bakalářská práce*, UK, Praha (2006).