

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Vendula Burdová

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ GENOTOXICKÉHO
4-NITROINDANU NA RTUŤOVÝCH
A STŘÍBRNÝCH AMALGÁMOVÝCH ELEKTRODÁCH

Voltammetric Determination of Genotoxic 4-Nitroindane
at Mercury and Silver Amalgam Electrodes

Diplomová práce

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

Praha 2011

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

Prohlášení

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

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 1. května 2011.

Poděkování

Na úvod chci poděkovat svému školiteli RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D. za jeho cenné připomínky, vedení a pomoc. Dále chci poděkovat prof. RNDr. Jiřímu Barkovi, CSc., Mgr. Aleši Daňhelovi, Mgr. Lence Němcové a členům Katedry analytické chemie za ochotu a připomínky k mojí práci.

Ráda bych tímto také velmi moc poděkovala svojí rodině, zejména rodičům, kteří mi studium na vysoké škole umožnili, podporovali mě a byli mi velkou oporou.

Děkuji.

Abstrakt

Předkládaná diplomová práce se zabývá elektroanalytickým stanovením genotoxického 4-nitroindanu, který řadíme mezi nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky (NPAHy). Prekurzorem 4-nitroindanu je uhlovodík indan – jedna ze složek benzínu. NPAHy, jež vnikají především při spalovacích procesech v benzínových či dieslových motorech, vykazují několikanásobně větší mutagenitu či karcinogenitu než jejich matečné uhlovodíky, proto se analýza těchto nebezpečných polutantů dostává do popředí moderní environmentální analytické chemie.

Optimální podmínky pro stanovení 4-nitroindanu byly hledány v pufrovaných vodně-methanolických prostředích a probíhající elektrochemické přeměny 4-nitroindanu byly zkoumány pomocí DC voltametrie (DCV), diferenční pulsní voltametrie (DPV) a cyklické voltametrie na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE) a rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě (m-AgSAE). Pro voltametrická stanovení 4-nitroindanu byly použity následující techniky: DCV (mez stanovitelnosti (L_Q) $\sim 7 \cdot 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$), DPV ($L_Q \sim 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$) a adsorpční rozpouštěcí voltametrie (AdSV; $L_Q \sim 7 \cdot 10^{-9} \text{ mol l}^{-1}$) na HMDE a DCV ($L_Q \sim 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$) a DPV ($L_Q \sim 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$) na m-AgSAE.

Aplikovatelnost nově vyvinutých polarografických/voltametrických metod stanovení 4-nitroindanu byla ověřena na modelových vzorcích pitné a říční vody.

Jako optimalizační předstupeň budoucího vývoje metody stanovení 4-nitroindanu ve směsi s environmentálními markery NPAHů (2-nitrofluorenem, 3-nitrofluoranthemem a 1-nitropyrenem) pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s elektrochemickou detekcí byla vyvinuta časově nenáročná metoda stanovení modelové směsi těchto vybraných NPAHů technikou HPLC s UV-VIS detekcí. Dosažená L_Q činila pro 4-nitroindan $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ (vyhodnocování z výšky píku) a $4 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ (vyhodnocování z plochy píku).

Abstract

Presented Diploma Thesis is focused on electroanalytical determination of genotoxic 4-nitroindane, one of the nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons (NPAHs). A hydrocarbon indane (a component of petrol) is a precursor of 4-nitroindane. NPAHs are produced all above by combustion processes in gasoline and diesel engines. It has been shown that NPAHs can be many times more mutagenic or carcinogenic than their parent PAHs, so the analysis of these dangerous pollutants becomes important for modern environmental analytical chemistry.

Optimal conditions for determination of 4-nitroindane have been investigated in buffered water-methanolic solutions and electrochemical transformations of 4-nitroindane have been studied by DC voltammetry (DCV), differential pulse voltammetry (DPV) and cyclic voltammetry at a hanging mercury drop electrode (HMDE) and at a mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode (m-AgSAE). For voltammetric determination of 4-nitroindane, the following techniques were used: DCV (limit of quantification (L_Q) $\sim 7 \cdot 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$), DPV ($L_Q \sim 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$) and adsorptive stripping voltammetry (AdSV; $L_Q \sim 7 \cdot 10^{-9} \text{ mol l}^{-1}$) at HMDE, and DCV ($L_Q \sim 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$) and DPV ($L_Q \sim 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$) at m-AgSAE.

The applicability of the newly developed polarographic/voltammetric methods of determination of 4-nitroindane has been verified on model samples of drinking and river water.

As an optimization pre-step for future development of the method for determination of 4-nitroindane in a mixture with environmental NPAH markers (2-nitrofluorene, 3-nitrofluoranthene, 1-nitropyrene) using high performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detection, a non-time consuming method was developed for the determination of model mixture of these selected NPAHs using HPLC with UV-VIS detection. For 4-nitroindane, the attained L_Q was $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ (evaluated from peak height) and $4 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ (evaluated from peak area).

Předmětová hesla: analytická chemie
elektrochemie
polarografie
voltametrie
vysokoúčinná kapalinová chromatografie
nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky

Klíčová slova: 4-nitroindan
diferenční pulsní polarografie
DC voltametrie
diferenční pulsní voltametrie
cyklická voltametrie
adsorpční rozpouštěcí voltametrie
klasická rtuťová kapající elektroda
visící rtuťová kapková elektroda
rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda
UV-VIS absorpční spektroskopie
HPLC s UV-VIS detekcí

Subject Heading: Analytical Chemistry
Electrochemistry
Polarography
Voltammetry
High Performance Liquid Chromatography
Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

Key Words: 4-Nitroindane
Differential Pulse Polarography
DC Voltammetry
Differential Pulse Voltammetry
Cyclic Voltammetry
Adsorptive Stripping Voltammetry
Classical Dropping Mercury Electrode
Hanging Mercury Drop Electrode
Mercury Meniscus Modified Silver Solid Amalgam Electrode
UV-VIS Absorption Spectroscopy
HPLC with UV-VIS Detection

Seznam použitých zkratk a symbolů

4-NI	4-nitroindan
1-NP	1-nitropyren
2-NF	2-nitrofluoren
3-NFA	3-nitrofluoranthen
<i>A</i>	absorbance [AU]
AdSV	adsorpční rozpouštěcí voltametrie
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
<i>c</i>	molární koncentrace [mol l ⁻¹]
C.A.S.	Chemical Abstract Service
C ₁₈	oktadecyl
CV	cyklická voltametrie
DCTP	DC tast polarografie
DCV	DC voltametrie
DME	klasická rtuťová kapající elektroda
DPP	diferenční pulsní polarografie
DPV	diferenční pulsní voltametrie
<i>E</i> _{ak}	potenciál akumulace [mV]
<i>E</i> _p	potenciál píku [mV]
<i>E</i> _{1,reg}	první regenerační potenciál [mV]
<i>E</i> _{2,reg}	druhý regenerační potenciál [mV]
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
<i>h</i> _p	výška píku v HPLC [mAU]
<i>I</i> _p	proud píku [nA]
<i>L</i> _Q	mez stanovitelnosti [mol l ⁻¹]
m-AgSAE	rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda
<i>M</i> _r	relativní molekulová hmotnost
<i>n</i>	počet opakovaných měření
NPAHy	nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky
PAHy	polycyklické aromatické uhlovodíky

pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace oxoniových iontů
pH*	pH směsného vodně-methanolického roztoku
R ²	koeficient determinace
S _p	plocha píku [mAU.s]
t _{ak}	doba akumulace [s]
t _R	retenční čas [s]
UV-VIS	spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti
ε	molární absorpční koeficient [mol ⁻¹ ·l·cm ⁻¹]
λ	vlnová délka [nm]
λ _{max}	vlnová délka absorpčního maxima [nm]

Obsah

1. Úvod	11
1.1 Shrnutí předchozí bakalářské práce	11
1.2 Cíle diplomové práce	12
1.3 Studovaná látka	13
1.4 Vznik, výskyt a vlastnosti NPAHů	13
1.5 Elektroanalytické metody stanovení NPAHů na rtuťových elektrodách	15
2. Experimentální část	18
2.1 Reagencie	18
2.2 Aparatura	19
2.3 Použité pracovní elektrody	19
2.4 Pracovní postupy	21
2.5 Stálost zásobního roztoku 4-nitroindanu	22
3. Voltametrické stanovení 4-nitroindanu na visící rtuťové kapkové elektrodě ..	23
3.1 DC voltametrie 4-nitroindanu na HMDE	23
3.2 Diferenční pulsní voltametrie 4-nitroindanu na HMDE	30
4. Voltametrické stanovení 4-nitroindanu na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě	38
4.1 DC voltametrie 4-nitroindanu na m-AgSAE	38
4.2 Diferenční pulsní voltametrie 4-nitroindanu na m-AgSAE	47
5. Cyklická voltametrie 4-nitroindanu	54
5.1 CV 4-nitroindanu na HMDE	54
5.2 CV 4-nitroindanu na m-AgSAE	57
6. Adsorpční rozpouštěcí voltametrie 4-nitroindanu na HMDE	60
7. Stanovení 4-nitroindanu v modelových vzorcích pitné a říční vody	65
7.1 Stanovení 4-NI metodou DPP na DME v modelových vzorcích pitné a říční vody	65
7.2 Stanovení 4-NI metodou DPV na HMDE v modelových vzorcích pitné a říční vody	69
7.3 Stanovení 4-NI metodou DPV na m-AgSAE v modelových vzorcích pitné a říční vody	73

8. Vysokoučinná kapalinová chromatografie 4-nitroindanu s UV-VIS detekcí	77
8.1 Vliv složení mobilní fáze na HPLC chromatogramy	77
8.2 Stanovení 4-nitroindanu ve směsi s 1-nitropyrenem, 2-nitrofluorenem a 3-nitrofluoranthemem metodou HPLC s UV-VIS detekcí	80
8.3 Shrnutí HPLC měření s UV-VIS detekcí	85
9. Závěr	86
10. Literatura	88

1. Úvod

1.1 Shrnutí předchozí bakalářské práce

Tato diplomová práce navazuje na předchozí bakalářskou práci nazvanou „Polarografické stanovení genotoxického 4-nitroindanu“ a zaměřenou na polarografické zkoumání a vývoj metod stanovení potenciálně genotoxického 4-nitroindanu (4-NI) na klasické kapající rtuťové elektrodě (DME) pomocí technik DC tast polarografie (DCTP) a diferenční pulsní polarografie (DPP). Cílem bakalářské práce bylo nalézt optimální podmínky pro polarografické stanovení 4-NI, dosažení co nejnižších mezí stanovitelnosti (L_Q) polarografických měření a jejich porovnání s UV-VIS spektrofotometrickým stanovením. Jako optimální prostředí pro DC Tast polarografické stanovení 4-NI v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ bylo zvoleno prostředí směsi $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ HCl – methanol (1:1), kde 4-nitroindan poskytl nejvyšší vlnu a L_Q dosáhla nejnižší hodnoty $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$. Dále bylo vypracováno stejnou technikou ve stejném koncentračním rozmezí i stanovení 4-NI v prostředí Brittonův-Robinsonův pufr (BR pufr) o pH 12,0 – methanol (1:1); toto stanovení ve srovnání s předchozím vykazovalo menší citlivost a i vyšší hodnotu L_Q $7 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$.

Dále bylo jako součást bakalářské práce prostudováno chování 4-NI při diferenční pulsní polarografii na klasické rtuťové kapkové elektrodě. Byly nalezeny optimální podmínky pro jeho stanovení v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Jako optimální prostředí zde byla zvolena stejná prostředí jako u DCTP techniky. Optimálním prostředím pro stanovení 4-NI je směs BR pufr o pH 12,0 – methanol (1:1), kde 4-nitroindan poskytoval nejvyšší pík, L_Q dosáhla nejnižší hodnoty $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$. Dále bylo vypracováno stejnou technikou ve stejném koncentračním rozmezí i stanovení 4-NI v prostředí $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ HCl – methanol (1:1); toto stanovení jevílo ve srovnání s předchozím sice vyšší citlivost, avšak hodnota L_Q byla vyšší $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$; horší byla také reprodukovatelnost měření nejnižší měřené koncentrace 4-NI.

V rámci bakalářské práce bylo také provedeno srovnávací stanovení 4-NI pomocí UV-VIS spektrofotometrie při vlnové délce 267 nm proti methanolu. L_Q tohoto stanovení činila $4 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$.

1.2 Cíle diplomové práce

Náplní diplomové práce je tato předchozí měření rozšířit o voltametrická měření, tj. o popis voltametrického chování 4-NI a vývoj nových voltametrických metod jeho stanovení. Cílem práce je nalezení optimálních podmínek pro stanovení 4-NI na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE) pomocí technik DC voltametrie (DCV) a diferenční pulsní voltametrie (DPV) a na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě (m-AgSAE) pomocí technik DCV a DPV s cílem dosáhnout co nejnižší meze stanovitelnosti (L_Q). Pro objasnění elektrochemického chování 4-NI použít techniku cyklické voltametrie (CV) na HMDE a na m-AgSAE. Dalším cílem diplomové práce je dosažení co nejnižší meze stanovitelnosti 4-NI technikou adsorpční rozpouštěcí voltametrie (AdSV) na HMDE.

Cílem práce je také aplikace v bakalářské práci vyvinutých pulsních polarografických a v diplomové práci nově vyvinutých voltametrických metod pro stanovení 4-NI v modelových vzorcích pitné a říční vody.

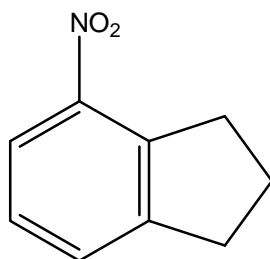
Předkládaná diplomová práce si rovněž klade za cíl vyvinout časově nenáročnou metodu stanovení modelové směsi vybraných nitroderivátů polycyklických aromatických uhlovodíků (4-nitroindanu, 2-nitrofluorenu, 3-nitrofluoranthenu a 1-nitropyrenu) technikou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s UV-VIS detekcí. Tato část diplomové práce byla vypracovávána během navazujícího magisterského studia analytické chemie v rámci předmětu *Výběrové praktikum* (MC230C05), jakožto část věnovaná analytickým metodám doplňkovým ke studovaným metodám elektrochemickým.

Diplomovou práci jsem vypracovávala jako součást dlouhodobého projektu Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze zaměřeného na studium elektrochemických vlastností a chování genotoxických a karcinogenních látek.

1.3 Studovaná látka

Studovanou látkou je 4-nitroindan (obr. 1.3.1), který patří mezi nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky (NPAHy) a také se řadí mezi potenciálně genotoxicky a karcinogenně nebezpečné látky.¹⁻⁴

4-Nitroindan ($C_9H_9NO_2$) je bílá krystalická látka s rozsahem bodu varu 105 – 106 °C a bodu tání 41 – 43 °C; je dobře rozpustný v methanolu a dalších organických rozpouštědlech, ve vodě je rozpustný omezeně. Jeho relativní molekulová hmotnost M_r je 163,17; C.A.S. registry number: 34701-14-9; C.A.S. name: 1*H*-indene, 2,3-dihydro-4-nitro-



Obr. 1.3.1 Strukturní vzorec 4-nitroindanu

1.4 Vznik, výskyt a vlastnosti NPAHů

Nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky (NPAHy) se dostávají do popředí zájmů environmentalistů, lékařů, analytických chemiků a široké veřejnosti hlavně z toho důvodu, že u mnohých byla prokázána mutagenita, karcinogenita nebo kombinace obojího. Navíc bylo zjištěno, že jsou mnohdy nebezpečnější než jejich matečné polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHy)³⁻⁵ (PAHy jsou látky obecně nebezpečné pro životní prostředí i pro zdraví člověka. Jejich nebezpečnost je umocněna tím, že jsou velmi stabilní a mohou se šířit na velmi dlouhé vzdálenosti a ohrožovat i území odlehlá od původního zdroje. Jsou to látky karcinogenní a ohrožující zdravý vývoj plodu.)⁶, přestože se vyskytují v životním prostředí v o řád až dva nižších koncentracích.⁷ V životním prostředí se vyskytují v podobě par (NPAHy se 2 až 4 kruhy), vodných fází nebo vázané na pevných částicích (NPAHy se 4 kruhy a více) jako

součástí aerosolu. Co se týká aerosolu, je nejnebezpečnější frakce částic o průměru 0,1 až 2 μm , protože takto malé částičky postupují přímo do plicních sklípků a navázané polutanty tak mohou poškozovat kardiovaskulární a plicní systém.⁸

NPAHy vznikají jednak přímo, např. při nedokonalých spalovacích procesech v dieslových či benzinových motorech, nedokonalých spalovacích procesech organických látek ropného původu, dále při výrobních procesech v průmyslu^{2,9}, anebo nepřímo reakcemi svých matečných PAHů v atmosféře, a to nejčastěji reakcí s NO_x či OH radikály.^{2,10} Různé denní atmosferické podmínky ovlivňují průběh vzniku NPAHů. V denních hodinách vznikají NPAHy za přispění hydroxylových radikálů, kdy je atakován plynný matečný PAH a následně je připojen adicí oxid dusičitý a eliminací odpadá molekula vody. Naproti tomu v nočních hodinách dochází hlavně k adici NO_x radikálů na molekulu matečného PAHu doprovázené reakcí s oxidem dusičitým za vzniku kyseliny dusičné. Těmito procesy vznikají i typické markery znečištění NPAHy, jako jsou 1-nitropyren, 2-nitrofluoren a 3-nitrofluoranthren.^{11,12} Dalšími antropogenními zdroji PAHů, a tím i NPAHů, jsou asfaltovací hmoty, výroba hliníku, domácí topeniště, cigaretový kouř a jiné.¹³⁻¹⁵ Přírodními zdroji jsou sopečné erupce a požáry lesů.¹⁶

Reaktivita NPAHů je významně ovlivněna strukturou a uspořádáním kruhů v PAHu a pozicí a orientací nitro skupiny.¹⁷ Byl prokázán vliv rozpouštědel na jejich fotoreakce (působením UV záření) v atmosféře, kde reakce probíhá tím rychleji, čím v méně polárním rozpouštědle jsou rozpuštěny.^{18,19,20}

Pro vlastní analytická měření jsou velmi důležitými kroky odběr, zpracování, zakoncentrování a přečištění vzorku, kde je nutno použít odlišné postupy při zpracování různých fází. Stanovení ve vodě a půdě začíná extrakcí vzorku vhodným rozpouštědlem (extrakce kyselinou, zásadou, nejčastěji hexanem), následuje přečištění extraktu a samotná analýza plynovou nebo kapalinovou chromatografií. Různé postupy se využívají i při analýze ovzduší²¹, tj. analýzách plynné fáze a fáze pevných částic s naadsorbovanými NPAHy. Při sledování kvality ovzduší²², se stanovení obsahu NPAHů v plynu provádí poměrně složitými metodami. Zjednodušeně stanovení spočívá v zachytu pevných částic vzorku na filtrech z křemenných či skleněných mikrovláken, poté v nasorbování NPAHů ze vzorku na tuhý polymerní sorbent (Amberlit, Porapak, Tenax či polyuretanovou pěnu, které jsou součástí kolonky).^{23,24} NPAHy je nutno dále extrahovat vhodným způsobem (termicky, rozpouštědlem v ultrazvuku, kapalinou

v nadkritickém stavu, extrakcí v Soxhletově extraktoru, sublimací).²⁵ Pomocí sloupcové nebo gelové chromatografie jsou z takto připraveného vzorku odstraněny rušivé elementy a vzorek je analyzován plynovou nebo kapalinovou chromatografií s plamenově ionizační, hmotnostně spektrometrickou, spektrofotometrickou či elektrochemickou detekční koncovkou.²⁶⁻²⁹

Jak již bylo řečeno, NPAHy vznikají hlavně při spalování ropných paliv, ve kterých se vyskytují matečné PAHy^{30,31}, mezi které patří například indan, matečný uhlovodík 4-nitroindanu¹, dále matečné uhlovodíky 1-nitropyrenu, 2-nitrofluorenu^{32,33} a 3-nitrofluoranthenu a dalších škodlivých látek.⁵ Tyto tři zmíněné NPAHy byly použity v této diplomové práci pro vývoj metody stanovení 4-nitroindanu ve směsi metodou HPLC s UV-VIS detekcí.

1.5 Elektroanalytické metody stanovení NPAHů na rtuťových elektrodách

Důsledkem nárůstu výskytu toxikologicky významných NPAHů v životním prostředí stoupá poptávka po co nejcitlivějších metodách jejich stanovení. Díky struktuře NPAHů, obsahující redukovatelnou část molekuly na aromatickém jádře, je možno aplikovat při jejich stanovení a zkoumání jednoduché, finančně nenákladné a citlivé elektroanalytické metody. U NPAHů se využívá hlavně snadné elektrochemické redukce nitroskupiny na aromatickém jádře^{34,35}. Mezi metody využívající redukci nitroskupiny v molekule NPAHů se řadí i v této práci použité polarografické a voltametrické techniky na rtuťových a amalgámových elektrodách. Tyto metody představují nezávislou alternativu k převládajícím spektrometrickým a chromatografickým metodám^{2, 36}. Použití několika nezávislých metod pro stanovení a důkaz přítomnosti nebezpečných látek, a zejména polutantů životního prostředí ve vzorku, vyžadují pravidla Evropské unie. Důkaz jejich přítomnosti ve vzorku ve smyslu právního termínu je nutné získat "nade vší rozumnou pochybnost". Proto je zvýšená pozornost upřena na vývoj nových polarografických a voltametrických metod stanovení NPAHů v ekosystému v celosvětovém měřítku. Poněkud menší selektivitu moderních polarografických a voltametrických metod, která je jistou nevýhodou těchto metod, lze s úspěchem odstranit jejich kombinací s předběžnou separací (např. pomocí frakční HPLC, kapalinové extrakce či extrakce tuhou fází)³⁷⁻³⁹.

Ačkoliv ve vývoji nových typů elektrod a elektrodoých materiálů nastal velký pokrok, zůstává faktem, že klasické rtuťové elektrody i více jak 80 let po jejich zavedení do praxe analytické chemie se stále řadí k nejspolehlivějším a nejcitlivějším senzorům. Například visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) v kombinaci s tzv. AdSV umožňuje stanovení nanomolárních koncentrací genotoxických nitrosloúčenin, a může tak hrát významnou roli v této oblasti^{39,40}. Stejně tak klasická kapající rtuťová elektroda (DME) má oproti jiným elektrodám výhodu naprosto čistého a atomárně hladkého povrchu, díky jeho neustálé periodické obnově. Dalšími výhodami je její jednoduchá konstrukce a také spolehlivost. Malý povrch kapek DME umožňuje elektrochemickou přeměnu velmi malých až nepatrných množství měřených látek, takže se koncentrace analyzovaného roztoku při měření prakticky nemění.

S nárůstem používání novějších a modernějších voltametrických metod, které využívají např. pulsní a square-wave techniky, elektrochemickou rozpouštěcí analýzu aj., se stále více používají a rozvíjejí nové typy rtuťových elektrod namísto již dlouho používané DME. Nové využití v těchto metodách nacházejí stacionární (nebo statické, či visící) rtuťové elektrody³⁹. Pulsní techniky přitom umožňují stanovení látek až do koncentrací $10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, techniky s předběžným nahromaděním stanovované látky na povrchu pracovní elektrody až do koncentrací 10^{-10} či $10^{-12} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Mez stanovitelnosti adsorpční rozpouštěcí voltametrie se pohybuje od 10^{-8} do $10^{-11} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, v případě využití katalytických reakcí dokonce až okolo $10^{-12} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (cit.³⁶). Přestože polarografie umožňuje dosáhnout při stanovení NPAHů meze stanovitelnosti řádově okolo 10^{-7} až $10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, je i nadále používanou analytickou metodou, o čemž svědčí řada nedávno publikovaných prací.³⁹

Mezi nejvíce používané moderní elektroanalytické metody, využívající DME jako pracovní elektrodu, patří zejména DC tast polarografie a citlivější diferenční pulsní polarografie⁴¹⁻⁴³. Na HMDE jsou pak pro stopovou analýzu NPAHů nejčastěji používané techniky DC voltametrie, diferenční pulsní voltametrie, square-wave voltametrie a adsorpční rozpouštěcí voltametrie^{37,39,40}.

Moderní elektrochemické metody nabízejí mnoho výhod. A je nutné si uvědomit, že kombinaci nízké meze stanovitelnosti těchto metod na různých typech tradičních i netradičních elektrodoých materiálů s jinými mimořádně účinnými dělicími moderními chromatografickými technikami (např. vysokoúčinnou kapalinovou

chromatografií či kapilární zónovou elektroforézou) lze využít pro další rozměr analýzy, např. vícesložkových směsí.⁴⁴⁻⁴⁶

2. Experimentální část

2.1 Reagencie

A) Studovaná látka:

Pro výzkum byl použit 4-nitroindan v 99% čistotě, zakoupený od firmy Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika. Zásobní roztok o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním 0,01634 g 4-nitroindanu ve 100 ml methanolu (p.a., Lachema, Brno, Česká republika). Roztoky s nižšími koncentracemi 4-nitroindanu byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku methanolem. Zásobní roztok byl uchován ve tmě a chladu v lednici. Pro HPLC stanovení 4-NI ve směsi, byly v 98 - 99% čistotě zakoupeny od Sigma-Aldrich i 1-nitropyren ($\text{C}_{16}\text{H}_9\text{NO}_2$; C.A.S. registry number: 34701-14-9), 2-nitrofluoren ($\text{C}_{13}\text{H}_9\text{NO}_2$; C.A.S. No: 34701-14-9) a 3-nitrofluoranthren ($\text{C}_{16}\text{H}_9\text{NO}_2$; C.A.S. registry number: 892-21-7).

B) Chemikálie použité pro přípravu Brittonových-Robinsonových pufrů:

- a) zásaditá složka: roztok $0,2 \text{ mol l}^{-1}$ hydroxidu sodného (p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika),
- b) kyselá složka: roztok $0,04 \text{ mol l}^{-1}$ kyseliny borité (p.a., Lachema, Brno, Česká republika), $0,04 \text{ mol l}^{-1}$ kyseliny fosforečné (p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika) a $0,04 \text{ mol l}^{-1}$ octové kyseliny (p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)

Brittonovy-Robinsonovy (BR) tlumivé roztoky⁴⁷ o příslušném pH byly připraveny smísením zásadité a kyselé složky. Přesná hodnota pH roztoků byla měřena digitálním pH-metrem.

C) Chemikálie použité pro přípravu pufrů pro HPLC měření:

- a) zásaditá složka fosfátového pufru: roztok $1,0 \text{ mol l}^{-1}$ hydroxidu draselného (p.a., Lachema, Brno, Česká republika),
- b) kyselá složka fosfátového pufru: roztok $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ kyseliny trihydrogenfosforečné (p.a., Lachema, Brno, Česká republika).
- c) zásaditá složka acetátového pufru: roztok $1,0 \text{ mol l}^{-1}$ hydroxidu amonného (p.a., Lachema, Brno, Česká republika),
- d) kyselá složka acetátového pufru: roztok $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ kyseliny octové (p.a., Lachema, Brno, Česká republika).

D) Ostatní chemikálie:

Kyselina chlorovodíková, (Lachema, Brno, Česká republika), deionizovaná voda (Millipore Milli-Q plus system, Millipore, USA), $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ vodný roztok chelatonu III (Sigma-Aldrich, Praha), methanol v HPLC čistotě (Merck, Praha, Česká republika).

2.2 Aparatura

Při všech polarografických a voltametrických stanoveních byla použita sestava Eco-Tribo Polarograf se softwarem PolarPro verze 5.1, firma Polaro-Sensors, Praha. Software pracoval v operačním systému Windows XP (Microsoft Corporation, USA).

Jednotlivá měření byla prováděna ve tříelektrodovém zapojení, kdy byla jako referentní použita argentochloridová elektroda ($1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl) typu RAE 113, Monokrystaly, Turnov. Jako pomocná elektroda byla použita platinová drátková elektroda. Použité pracovní elektrody jsou uvedeny v kapitole 2.3.

Spektrofotometrická měření byla prováděna na přístroji HP 8453 Diode Array Spectrophotometer (Hewlett-Packard, Nizozemí) s ovládacím programem UV-Visible ChemStation (ver. 9.01) v křemenných kyvetách o měrné tloušťce $0,1 \text{ cm}$.

Všechna měření pH byla prováděna na digitálním pH-metru Jenway 3510 (Jenway, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou (typ 924 005). Přístroj byl kalibrován pomocí standardních kalibračních pufrů.

Měření pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie byla prováděna pomocí systému složeného z HPLC pumpy Waters 501 (Millipore, Francie), dávkovacího ventilu D s $20 \mu\text{l}$ dávkovací smyčkou (Ecom, Praha, Česká republika) a spektrofotometrického detektoru Sapphire 800 UV/VIS (Ecom, Praha, Česká republika). Byla použita kolona KROMASIL ($250 \times 4,6 \text{ mm}$, $7 \mu\text{m}$) s reverzní C_{18} fází (Phenomenex, Torrance, CA, USA).

2.3 Použité pracovní elektrody

Pro studium polarografického chování 4-NI byla použita jako pracovní elektroda DME. Při práci s DME za použití techniky DPP byla použita rychlost polarizace $4 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, pulsy o šířce 100 ms a modulační amplitudě -50 mV , elektronicky řízená doba kapky 1 s a výška rezervoáru 64 cm .⁴⁸

Pro voltametrická měření (DCV, DPV, CV) byla použita jako pracovní elektroda HMDE a m-AgSAE. Při diferenční pulsní voltametii byly na pracovní elektrodu vkládány pulsy o šířce 100 ms, modulační amplitudě -50 mV a rychlost polarizace byla zvolena $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Stejná rychlost polarizace byla zvolena i pro DC voltametii.

Pro zjištění povrchu kapky HMDE byl použit následující postup: povrch byl měřen proti nulovému potenciálu v tříelektrodevém zapojení, kdy se nechalo do polarografické nádoby s $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztokem KCl odkapat 30 kapek rtuti, které se následně opláchly vždy nejméně $3 \times$ deionizovanou vodou a poté $3 \times$ methanolem. Takto omyté kapky se zvážily a z jejich hmotnosti, tabelované hustoty rtuti při $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a za předpokladu kulového tvaru kapky byl vypočten povrch jedné kapky. Takto zjištěný povrch pracovní HMDE byl $0,0161 \text{ cm}^2$.

Před použitím m-AgSAE bylo nutné provést tři kroky – amalgamaci, aktivaci a regeneraci elektrody:

- A) Amalgamace** se prováděla vnořením skleněného konce kapiláry m-AgSAE a intenzivním mícháním nádobkou se rtutí po dobu přibližně 15 s nebo déle, dokud se nevytvořil rtuťový meniskus. Tento krok se prováděl za 1 až 2 týdny či v případě problémů s měřením, nižší citlivostí nebo reprodukovatelností, kdykoliv dříve.
- B) Aktivace** m-AgSAE sloužila k odstranění oxidů a adsorbovaných látek z menisku. Prováděla se následně po amalgamaci, po přestávkách v měřeních delších než jedna hodina a vždy na počátku každého dne měření. Aktivace byla prováděna v roztoku $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl bez probublání dusíkem při vloženém potenciálu -2200 mV po dobu 300 s. Pro analýzu byla aktivace nezbytná, neboť je to krok, který zlepšuje její citlivost a reprodukovatelnost.
- C) Regenerace** elektrody je dalším krokem, který byl uskutečňován v analyzovaném roztoku před každým měřením. Regenerace spočívala ve skokovém střídání kladnějších $E_{1,\text{reg}}$ a zápornějších $E_{2,\text{reg}}$ potenciálů daných použitým základním elektrolytem a stanovenou látkou, v intervalu 0,05 s po dobu 30 s. Optimální hodnoty regeneračních potenciálů je nutné pro každou látku a elektrolyt najít experimentálně.

2.4 Pracovní postupy

Při proměňování vlivu pH základního elektrolytu na voltametrické chování 4-NI bylo postupováno tak, že do 10 ml odměrné baňky bylo odpipetováno 5 ml BR pufru o příslušném pH, přidáno malé množství methanolu (1 až 2 ml, aby se vytvořilo vodně-methanolicke prostředí bránící vysrážení 4-NI po přidání jeho koncentrovaného methanolickeho zásobního roztoku do vodného pufru), odpipetován 1 ml roztoku 4-NI a roztok byl následně doplněn do 10 ml methanolem. Při proměňování závislosti voltametrických křivek 4-NI na koncentraci byly připravovány vzorky tak, že do 10ml odměrné baňky bylo odpipetováno 5 ml BR pufru o daném pH, přidáno malé množství methanolu, odpipetován příslušný objem zásobního roztoku 4-NI a vzniklý roztok byl doplněn do 10 ml methanolem. Takto připravené vzorky byly po promíchání přelity do voltametrické nádoby a zbaveny kyslíku probubláváním dusíkem po dobu 5 min. Před vstupem dusíku do polarografické nádoby byla zařazena promývačka obsahující směs vody a methanolu ve stejném objemovém poměru jako analyzovaný roztok, tj. 1:1 (popř. 9:1, viz níže). Poté byl proveden záznam voltametrické křivky. Všechny křivky byly proměřeny třikrát. Před každým měřením další křivky byl roztok probubláván dusíkem po dobu 30 sekund.

Při dalších voltametrických měřeních byl postup přípravy roztoků obdobný, pouze s tím rozdílem, že byl optimalizován poměr vodné a methanolicke složky na 9:1 (Pro spektrofotometrické proměňování stability zásobního roztoku 4-NI a stability roztoků o různém poměru methanolicke a vodné složky byly připravovány roztoky 4-NI tak, že do 10 ml odměrné baňky bylo odpipetováno potřebné množství vodné složky, zásobního roztoku 4-NI a doplněno do 10 ml methanolem. Takto připravené roztoky byly proměřovány oproti methanolu a to vždy třikrát nebo jednou za minutu a to po dobu 15 minut).

Měření v modelových vzorcích pitné a říční vody bylo prováděno metodou standardního přídávku (zásobní roztok 4-NI o $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$). Základní elektrolyt byl připraven z 9 ml říční nebo pitné vody a 1 ml BR pufru o příslušném pH. Pro potlačení rušivých dějů v základním elektrolytu (především srážení nerozpustných anorganických solí) bylo přidáno 100 μl $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chelatonu III.

Pro HPLC stanovení byly připraveny zásobní roztoky ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) stanovovaných NPAHů v metanolu v HPLC čistotě. Roztoky o nižších koncentracích

byly připravovány přesným ředěním zásobních roztoků tak, aby vznikla směs NPAHů požadované koncentrace. Mobilní fáze byly připravovány mísením potřebného množství HPLC metanolu a pufru o příslušném pH (acetátový o pH 4,8; fosfátový o pH 3,0 a 7,0). Mobilní fáze byla před samotným měřením odplyněna po dobu 20 minut v ultrazvuku. Po dobu dalších 20 minut byla kolona na počátku pracovního dne a vždy po doplnění nové mobilní fáze takto připravenou mobilní fází promývána. Vzorby byly dávkovány na kolonu pomocí 20 µl dávkovací smyčky.

Všechna měření byla prováděna za laboratorní teploty. K provádění potřebných výpočtů a tvorbě grafů uvedených v této práci bylo použito programů OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation, USA) a Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA).

Konfidenční pásy (na hladině významnosti 0,05)⁴⁹ u kalibračních přímek byly vyhodnoceny a sestrojeny pomocí programu OriginPro 7.5. Mez stanovitelnosti (L_Q) byla počítána jako koncentrace odpovídající desetinásobku směrodatné odchylky (pro počet měření $n = 10$) stanovení sledované látky o koncentraci odpovídající nejnižšímu bodu příslušné kalibrační přímky⁵⁰. Opakovatelnost měření nejnižší měřené koncentrace 4-NI v rámci jednoho vzorku byla počítána jako relativní směrodatná odchylka deseti popřípadě dvaceti (DCV a DPV na m-AgSAE) po sobě následujících měření ($n = 10, n = 20$).

2.5 Stálost zásobního roztoku 4-nitroindanu

Stálost zásobního roztoku 4-NI byla prokázána při spektrofotometrických měřeních v bakalářské práci. Stálost nového zásobního roztoku studované látky o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ v methanolu byla proměřována spektrofotometricky pro kontrolu. Z výsledků vyplývá, že během 107 dnů nedošlo k výraznému poklesu koncentrace studované látky a nový zásobní roztok je tedy při uchovávání ve tmě a v lednici dostatečně stálý.

3. Voltametrické stanovení 4-nitroindanu na visící rtuťové kapkové elektrodě

3.1 DC voltametrie 4-nitroindanu na HMDE

Vliv pH na chování 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) při DCV na HMDE byl sledován v prostředí BR pufr – methanol (6:4), v pH škále BR pufru od 2,0 do 13,0. 4-NI poskytuje v celé oblasti pH jeden dobře vyvinutý voltametrický pík a druhý pík s potenciálem negativnějším oproti píku prvnímu; druhý pík je patrný pouze v kyselém prostředí (pH BR pufru 2,0 až 6,0). Zaznamenané voltametrické křivky ukazuje obr. 3.1.1. Pozorování dvou voltametrických píků v kyselém prostředí je v souladu s polarografickým chováním pozorovaným u podobných mononitroderivátů PAHs – elektrochemická redukce na DME probíhá ve dvou následných redukčních krocích.⁵¹ První polarografická vlna odpovídá 4-elektronové redukci nitroskupiny 4-NI na skupinu hydroxylaminovou, druhá vlna pak odpovídá 2-elektronové redukci hydroxylaminové skupiny na skupinu aminovou. V souladu s tímto předpokladem je také ten fakt, že poměr výšky první a druhé vlny je přibližně 2:1, což určuje, že v prvním redukčním kroku se redukce účastní dvojnásobné množství elektronů oproti druhému redukčnímu kroku. V neutrálním a alkalickém prostředí pak redukce nitroskupiny probíhá jen v jednom 4-elektronovém redukčním kroku a finálním produktem je 4-hydroxylaminoindan.⁵¹

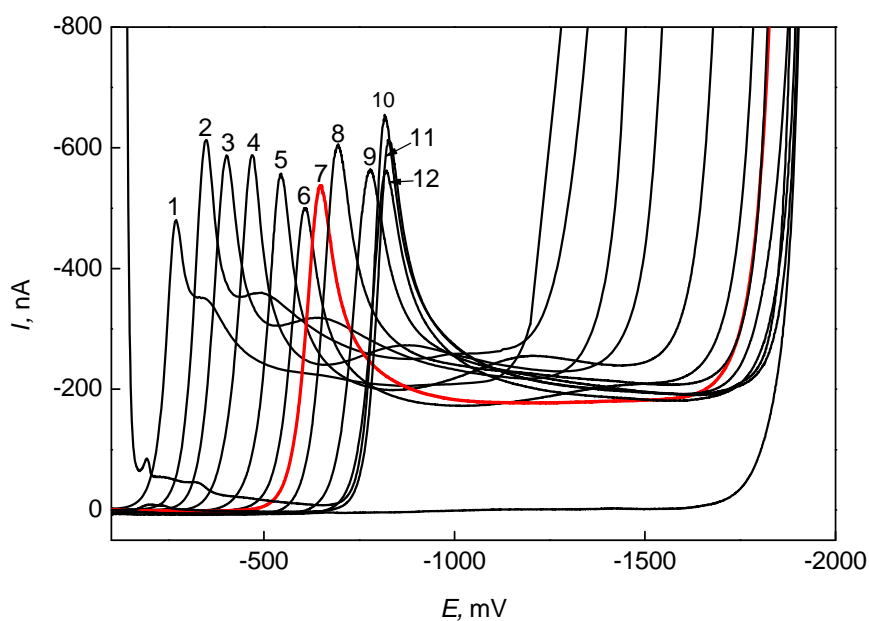
Zjištěné závislosti I_p a E_p na pH jsou zaznamenány v tabulce 3.1.I. Graficky je závislost E_p na výsledném pH vodně-methanolického roztoku (pH^*) znázorněna na obr. 3.1.2. Potenciál píku všech vln se s rostoucím pH posouvá k zápornějším hodnotám, v alkalických prostředích, BR pufr pH 11,0 až 13,0 – methanol (6:4), již potenciál píku první vlny zůstává konstantní a na pH nezávislý.

Metodou lineární regrese byl pro závislost potenciálu prvního píku E_p^1 na pH^* roztoku v rozmezí hodnot pH BR pufru 2,0 až 11,0 vypočten vztah:

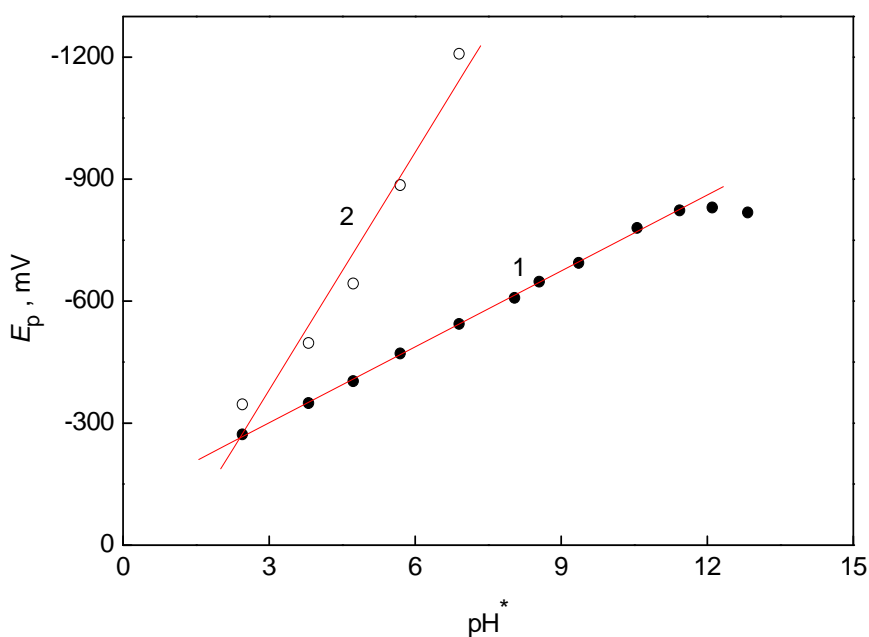
$$E_p^1 [\text{mV}] = -114,0 - 62,2 \text{ pH}^* \quad (R^2 = 0,9932).$$

Pro druhý pík byl metodou lineární regrese pro závislost potenciálu druhého píku na pH^* roztoku v rozmezí hodnot pH BR pufru 2,0 až 6,0 vypočten vztah:

$$E_p^2 [\text{mV}] = 203,2 - 194,9 \text{ pH}^* \quad (R^2 = 0,9620).$$



Obr. 3.1.1 Voltamogramy 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřené technikou DCV na HMDE v prostředí BR pufr – methanol (6:4); zobrazeny hodnoty pH BR pufru 2,0 (1); 3,0 (2); 4,0 (3); 5,0 (4); 6,0 (5); 7,0 (6); 8,0 (7); 9,0 (8); 10,0 (9); 11,0 (12); 12,0 (11); 13,0 (10).



Obr. 3.1.2 Závislost potenciálu píku (E_p) 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na výsledném pH roztoku (pH^*), měřeno technikou DCV na HMDE v prostředí BR pufr – methanol (6:4); zobrazeny závislosti E_p prvního píku v rozmezí pH BR pufru 2,0 až 13,0 (1) a druhého píku v rozmezí pH BR pufru 2,0 až 6,0 (2).

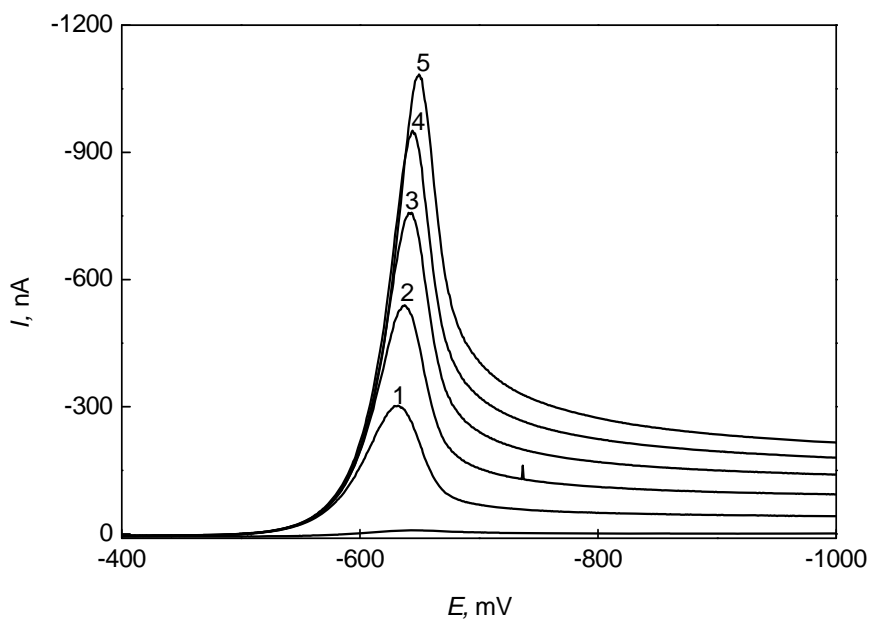
Tabulka 3.1.I

Vliv pH na DC voltamogramy 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na HMDE, měřeno v prostředí BR pufr – methanol (6:4).

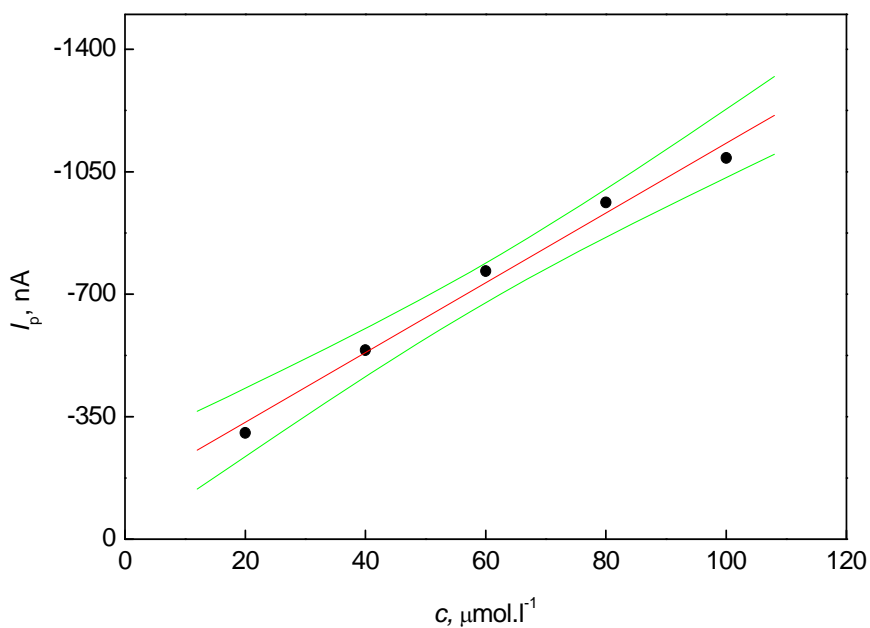
pH BR pufru	pH*	E_p^1 , mV	I_p^1 , nA	E_p^2 , mV	I_p^2 , nA
2,0	2,5	-272	-463	-346	-348
3,0	3,8	-349	-598	-497	-366
4,0	4,7	-403	-576	-643	-323
5,0	5,7	-471	-573	-885	-277
6,0	6,9	-544	-554	-1208	-245
7,0	8,0	-608	-499	– ^a	– ^a
8,0	8,6	-648	-535	– ^a	– ^a
9,0	9,4	-694	-597	– ^a	– ^a
10,0	10,6	-780	-564	– ^a	– ^a
11,0	11,4	-823	-556	– ^a	– ^a
12,0	12,1	-830	-609	– ^a	– ^a
13,0	12,9	-818	-650	– ^a	– ^a

E_p^1 – potenciál prvního píku, E_p^2 – potenciál druhého píku, I_p^1 – proud prvního píku, I_p^2 – proud druhého píku, ^a – druhý pík nebyl pozorován.

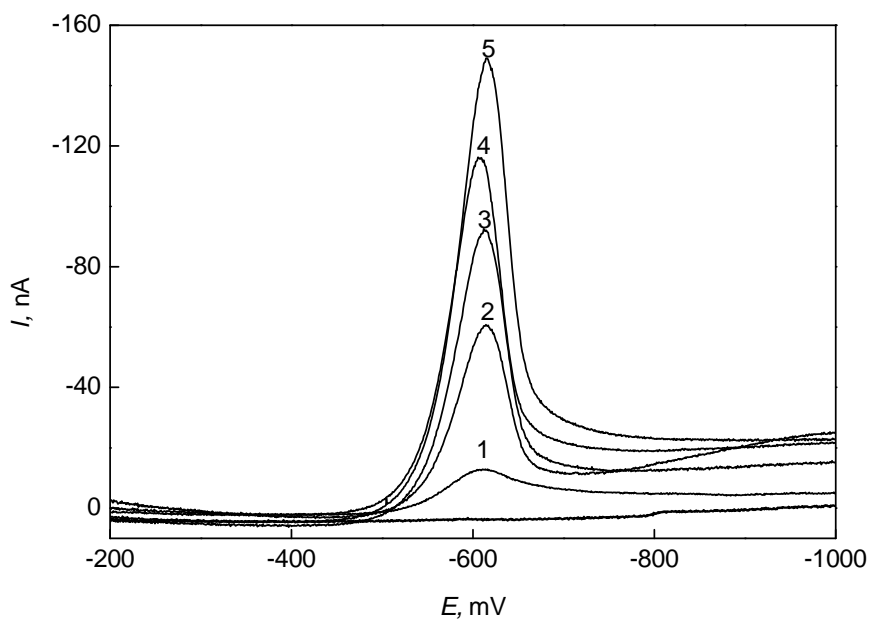
Vzhledem k rozdílnému voltametričkému chování 4-NI v prostředích o různém pH bylo pro proměření koncentrační závislosti vybráno jako optimální prostředí BR pufr o pH 9,0 – methanol (9:1). (Optimalizace složení roztoku, viz kapitola 3.2 Diferenční pulsní voltametrie 4-nitroindanu). Pro toto optimální prostředí byly koncentrační závislosti proměřeny v rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ (obr. 3.1.3, příslušná kalibrační závislost viz obr. 3.1.4), v rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ (obr. 3.1.5, příslušná kalibrační závislost viz obr. 3.1.6) a pro nejnižší koncentrační rozmezí $(1 - 10) \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ (obr. 3.1.7, příslušná kalibrační závislost viz obr. 3.1.8).



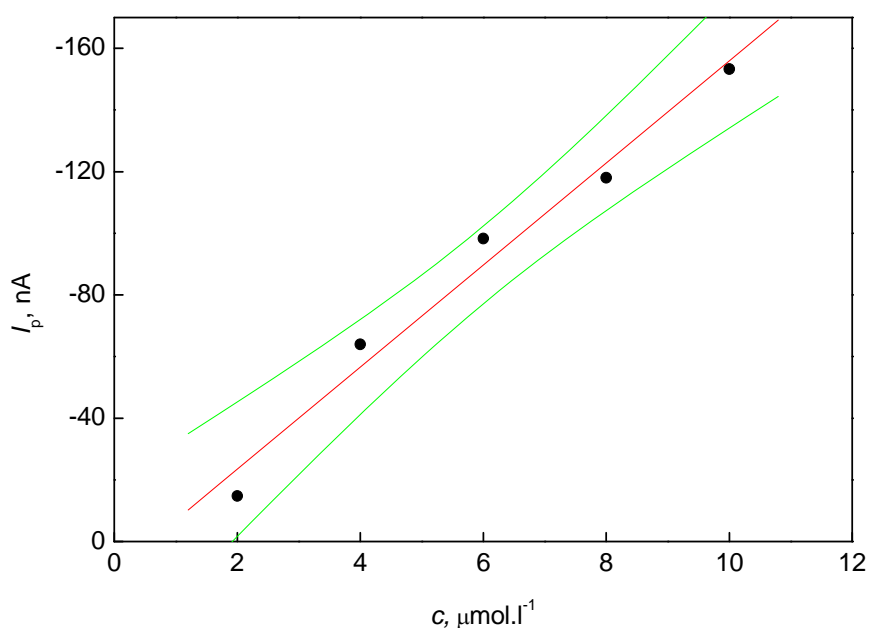
Obr. 3.1.3 Voltamogramy 4-NI měřené technikou DCV na HMDE v rozmezí koncentrací $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí BR pufr o pH 9,0 – methanol (9:1). Koncentrace 4-NI (mol l^{-1}): $2 \cdot 10^{-5}$ (1), $4 \cdot 10^{-5}$ (2), $6 \cdot 10^{-5}$ (3), $8 \cdot 10^{-5}$ (4), $1 \cdot 10^{-4}$ (5); nečíslovaná černá křivka náleží základnímu elektrolytu.



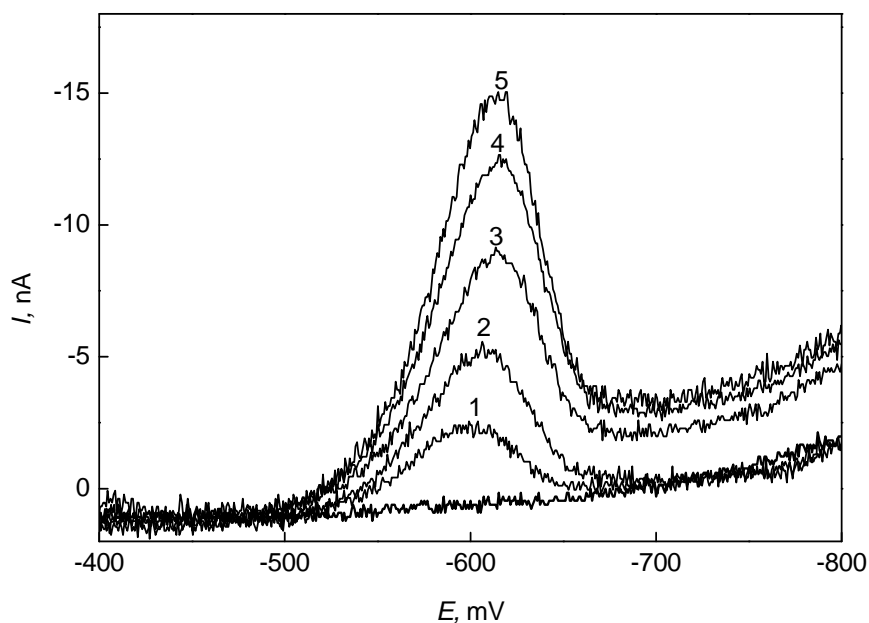
Obr. 4 Závislost proudu píku I_p na koncentraci 4-NI v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Měřeno technikou DCTP na DME v prostředí $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ HCl – methanol (1:1). Konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti 0,05 ($n = 3$).



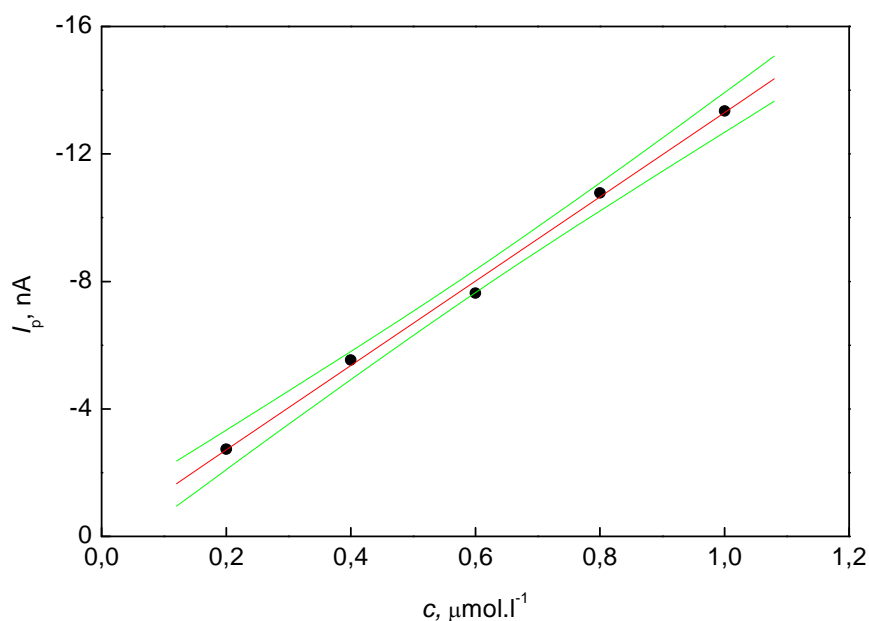
Obr. 3.1.5 Voltamogramy 4-NI měřené technikou DCV na HMDE v rozmezí koncentrací $2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí BR pufr o pH 9,0 – methanol (9:1). Koncentrace 4-NI (mol l^{-1}): $2 \cdot 10^{-6}$ (1), $4 \cdot 10^{-6}$ (2), $6 \cdot 10^{-6}$ (3), $8 \cdot 10^{-6}$ (4), $1 \cdot 10^{-5}$ (5); nečíslovaná černá křivka náleží základnímu elektrolytu.



Obr. 3.1.6 Závislost proudu píku I_p na koncentraci 4-NI v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Měřeno technikou DCV na HMDE v prostředí BR pufr o pH 9,0 – methanol (9:1). Konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti 0,05 ($n = 3$).



Obr. 3.1.7 Voltamogramy 4-NI měřené technikou DCV na HMDE v rozmezí koncentrací $2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí BR pufr o pH 9,0 – methanol (9:1). Koncentrace 4-NI (mol l^{-1}): $2 \cdot 10^{-7}$ (1), $4 \cdot 10^{-7}$ (2), $6 \cdot 10^{-7}$ (3), $8 \cdot 10^{-7}$ (4), $1 \cdot 10^{-6}$ (5); nečíslovaná černá křivka náleží základnímu elektrolytu.



Obr. 3.1.8 Závislost proudu píku I_p na koncentraci 4-NI v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. Měřeno technikou DCV na HMDE v prostředí BR pufr o pH 9,0 – methanol (9:1). Konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti 0,05 ($n = 3$).

Parametry kalibračních přímek pro stanovení 4-NI metodou DCV na HMDE jsou uvedeny v tabulce 3.1.II pro prostředí BR pufr pH 9,0 – methanol (9:1). Vypočtené hodnoty L_Q jsou nižší než nejnižší měřená (vyhodnotitelná) koncentrace 4-NI $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, což je dáno způsobem výpočtu L_Q , který je počítán z opakovatelnosti měření koncentrací. Prakticky je však nejnižší stanovitelná koncentrace 4-NI $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Tabulka 3.1.II

Parametry kalibračních přímek pro stanovení 4-NI metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufr o pH 9,0 – methanol (9:1). Opakovatelnost měření nejnižší měřené koncentrace 4-NI v rámci jednoho vzorku je 7,26 % ($n = 10$).

Koncentrační rozmezí, $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$	Směrnice, $\text{nA} \cdot \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$	Úsek, nA	R^2	L_Q , $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$
$(2 - 10) \cdot 10^{-5}$	-10,0	-134,2	0,9883	—
$(2 - 10) \cdot 10^{-6}$	-16,6	9,6	0,9791	—
$(2 - 10) \cdot 10^{-7}$	-0,1	-13,2	0,9973	0,07

3.2 Diferenční pulsní voltametrie 4-nitroindanu na HMDE

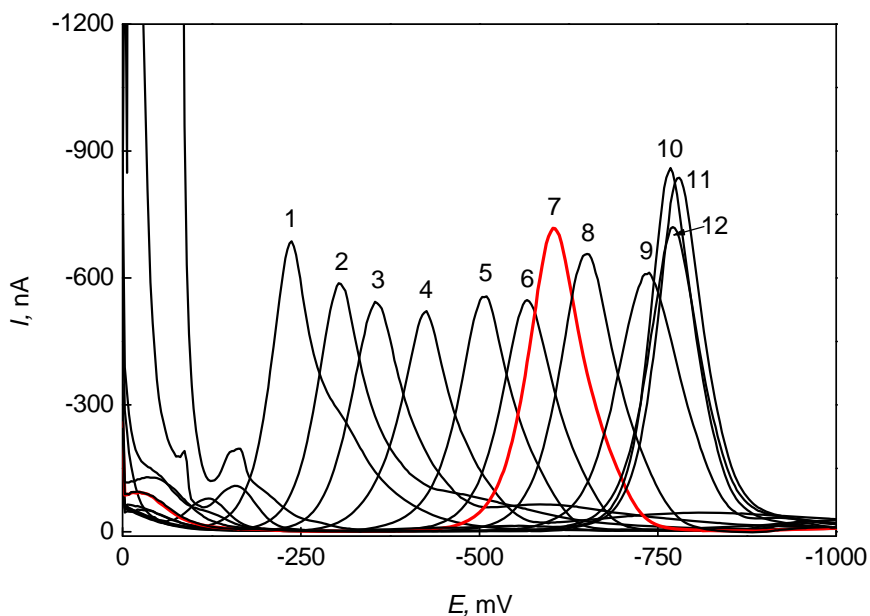
Podobně jako u DCV na HMDE byl vliv pH na chování 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) při DP voltametrii na HMDE sledován v prostředí BR pufru od pH 2,0 do pH 13,0. Pro sledování voltametričkého chování 4-NI byla použita směs BR pufr – methanol (6:4). 4-NI poskytuje v celé oblasti pH jeden dobře vyvinutý pík a menší druhý pík, který se objevuje jen v kyselém prostředí (pH BR pufru 2,0 až 6,0). Zaznamenané voltametričké křivky ukazují obr. 3.2.1. Toto chování je zcela v souladu s voltametričkým chováním 4-NI při DCV na HMDE. Potenciál druhého píku je v silně kyselém prostředí velmi blízký potenciálu prvního píku, čímž dochází k částečnému splynutí obou píků 4-NI. S rostoucí hodnotou pH^* prostředí se pak oba píky zcela oddělují, k druhému redukčnímu kroku (2-elektronová redukce 4-hydroxylaminoindanu na 4-aminoindan) je tedy zapotřebí vložení mnohem negativnějšího potenciálu, nežli v silně kyselém prostředí, kde redukce probíhá bezprostředně po prvním redukčním kroku (4-elektronová redukce 4-nitroindanu na 4-hydroxylaminoindan). Vyhodnocené závislosti I_p a E_p na pH^* jsou zaznamenány v tabulce 3.2.I. Graficky je závislost E_p na výsledném pH vodně-methanolickeho roztoku (pH^*) znázorněna na obr. 3.2.2. Potenciál píků se s rostoucím pH posouvá k zápornějším hodnotám. V alkalických prostředích, BR pufr pH 10,0 až 13,0 – methanol (6:4), již potenciál prvního píku zůstává konstantní a na pH nezávislý.

Metodou lineární regrese byl pro závislost potenciálu prvního píku E_p^1 na pH^* roztoku v rozmezí pH BR pufru 2,0 až 11,0 vypočten vztah:

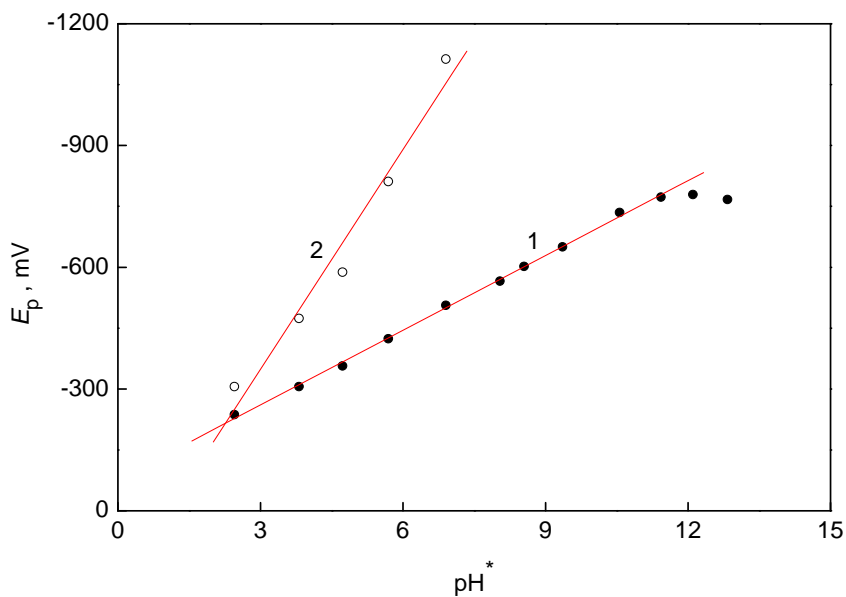
$$E_p^1 [\text{mV}] = -95,5 - 59,2 \text{ pH}^* \quad (R^2 = 0,9931),$$

Pro druhý pík byl metodou lineární regrese pro závislost proudu píku na pH^* roztoku v rozmezí pH BR pufru 2,0 až 6,0 vypočten vztah:

$$E_p^2 [\text{mV}] = 192,4 - 180,4 \text{ pH}^* \quad (R^2 = 0,9666).$$



Obr. 3.2.1 Voltamogramy 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřené technikou DPV na HMDE v prostředí BR pufr – methanol (6:4); zobrazeny hodnoty pH BR pufru 2,0 (1); 3,0 (2); 4,0 (3); 5,0 (4); 6,0 (5); 7,0 (6); 8,0 (7); 9,0 (8); 10,0 (9); 11,0 (12); 12,0 (11); 13,0 (10).



Obr. 3.2.2 Závislost potenciálu píku (E_p) 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na výsledném pH roztoku (pH^*), měřeno technikou DPV na HMDE v prostředí BR pufr – methanol (6:4); zobrazeny závislosti E_p prvního píku v rozmezí pH BR pufru 2,0 až 13,0 (1) a druhého píku v rozmezí pH BR pufru 2,0 až 6,0 (2).

Tabulka 3.2.I

Vliv pH na DP voltamogramy 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na HMDE, měřeno v prostředí BR pufr – methanol (6:4).

pH BR pufru	pH*	E_p^1 , mV	I_p^1 , nA	E_p^2 , mV	I_p^2 , nA
2,0	2,5	-237	-650	-306	-272
3,0	3,8	-306	-568	-474	-84
4,0	4,7	-357	-529	-588	-60
5,0	5,7	-424	-502	-811	-36
6,0	6,9	-506	-544	-1113	-23
7,0	8,0	-566	-530	- ^a	- ^a
8,0	8,6	-602	-701	- ^a	- ^a
9,0	9,4	-650	-646	- ^a	- ^a
10,0	10,6	-735	-593	- ^a	- ^a
11,0	11,4	-773	-699	- ^a	- ^a
12,0	12,1	-779	-813	- ^a	- ^a
13,0	12,9	-767	-823	- ^a	- ^a

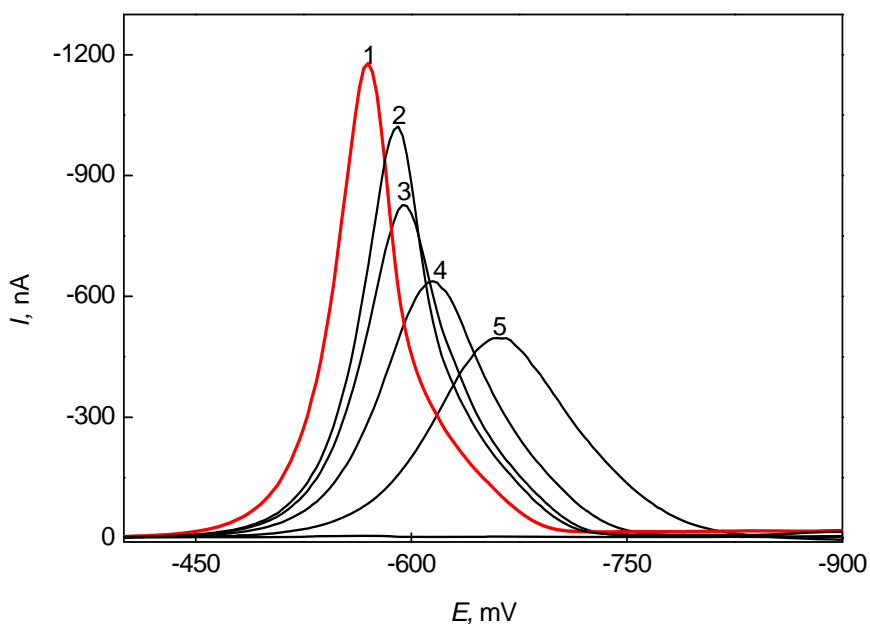
E_p^1 – potenciál prvního píku, E_p^2 – potenciál druhého píku, I_p^1 – proud prvního píku, I_p^2 – proud druhého píku, ^a – druhý pík nebyl pozorován.

Jako optimální prostředí pro metodu DPV 4-NI bylo zvoleno prostředí BR pufr o pH 8,0 – methanol (6:4). Dále byl optimalizován poměr BR pufr o pH 8,0 : methanol, kdy byl roztok 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) proměřován v prostředí o složení 1:1, 6:4, 7:3, 8:2 a 9:1 (BR pufr o pH 8,0 : methanol). Ze zjištěných závislostí hodnot proudu píku na poměru BR pufr o pH 8,0 : methanol (obr. 3.2.3) byl zvolen jako optimální poměr 9:1, který odpovídá prostředí, v němž byla hodnota proudu píku nejvyšší. Pro srovnání bylo chování 4-NI zkoumáno i v silně kyselém a silně zásaditém prostředí BR pufru o pH 2,0 a 13,0 – methanol o různém poměru obou kapalných složek. Voltametrické křivky v těchto prostředích jsou obdobné jako u prostředí s BR pufr o pH 8,0. Se snižujícím se obsahem methanolu roste hodnota proudu píku, pík se zužuje a jeho potenciál se posouvá k vyšším (kladnějším) hodnotám. Chování 4-NI v prostředích o různém poměru BR pufru o pH 8,0 a methanolu bylo zkoumáno i spektrofotometricky, kdy během 15 minutového proměření nebyl zaznamenán pokles absorbance ani u jednoho

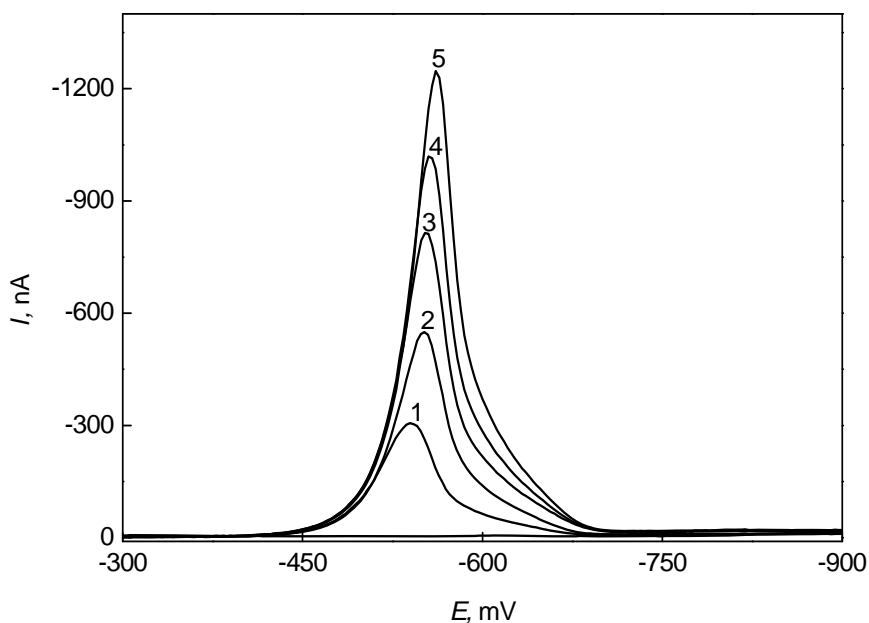
roztoku s různým poměrem vodné a methanolické složky. Stejná měření byla prováděna i pro metodu DCV, kdy bylo spektrofotometricky proměřováno prostředí BR pufru o pH 9 a methanolu o různém poměru těchto kapalných složek.

Koncentrační závislosti v tomto optimálním prostředí BR pufru o pH 8,0 – methanol (9:1) byly proměřeny v rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ (obr. 3.2.4, příslušná kalibrační závislost viz obr. 3.2.5), v rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ (obr. 3.2.6, příslušná kalibrační závislost viz obr. 3.2.7) a v nejnižším koncentračním rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ (obr. 3.2.8, příslušná kalibrační závislost viz obr. 3.2.9).

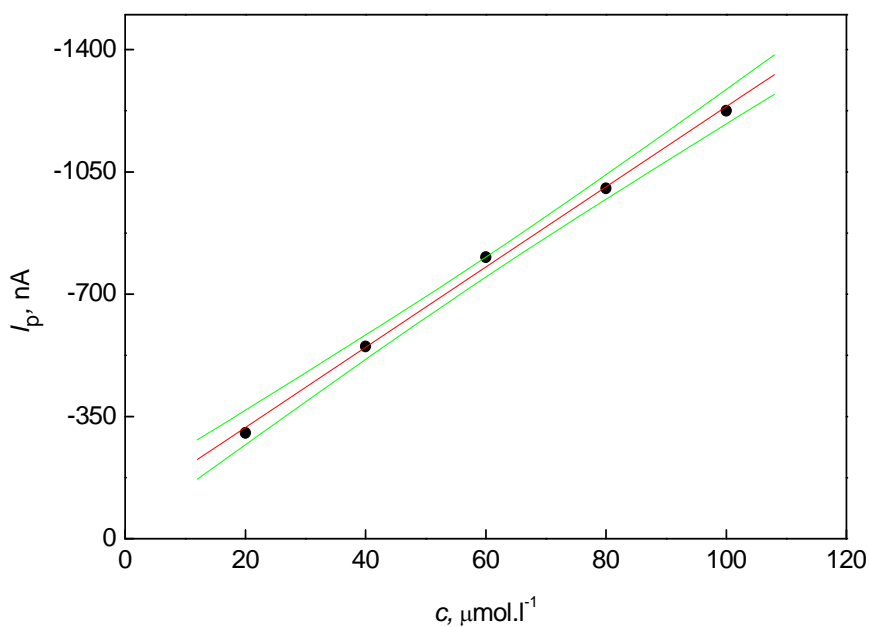
Parametry kalibračních přímek pro stanovení 4-NI metodou DPV na HMDE jsou uvedeny v tabulce 3.2.II.



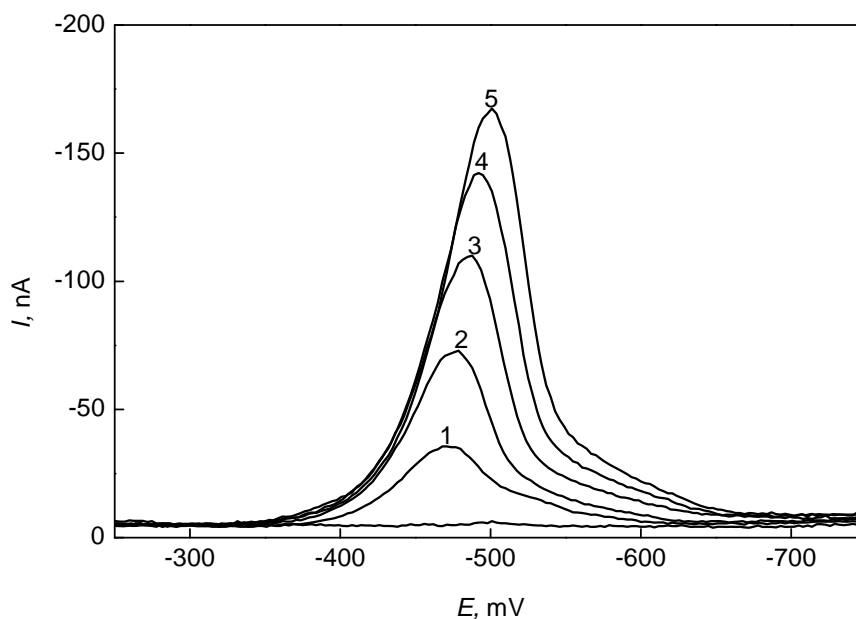
Obr. 3.2.3 Voltamogramy 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřené technikou DPV na HMDE v prostředí BR pufru o pH 8,0 – methanol 1:1 (5); 6:4 (4); 7:3 (3); 8:2 (2); 9:1 (1).



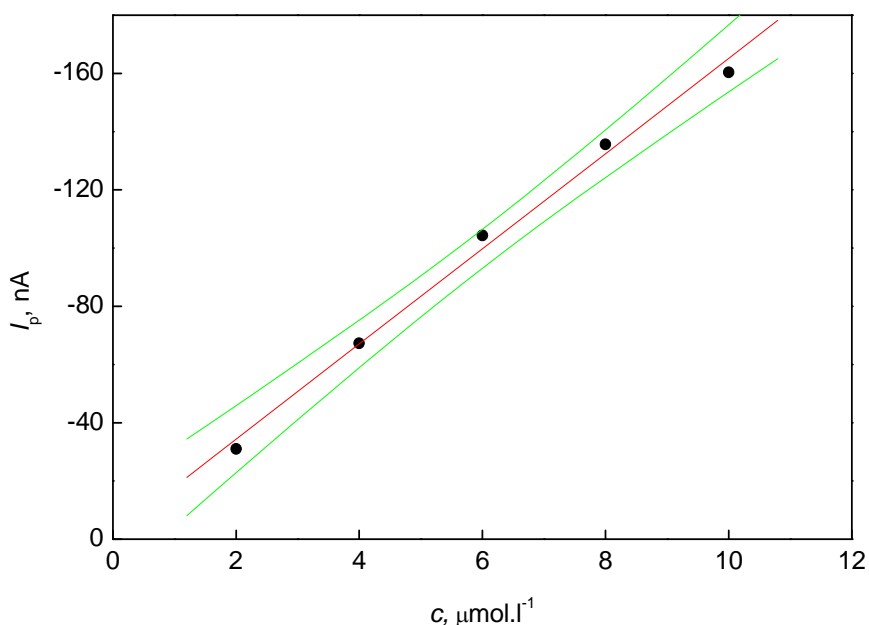
Obr. 3.2.4 Voltamogramy 4-NI měřené technikou DPV na HMDE v rozmezí koncentrací $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí BR pufr o pH 8,0 – methanol (9:1). Koncentrace 4-NI (mol l^{-1}): $2 \cdot 10^{-5}$ (1), $4 \cdot 10^{-5}$ (2), $6 \cdot 10^{-5}$ (3), $8 \cdot 10^{-5}$ (4), $1 \cdot 10^{-4}$ (5); nečíslovaná černá křivka náleží základnímu elektrolytu.



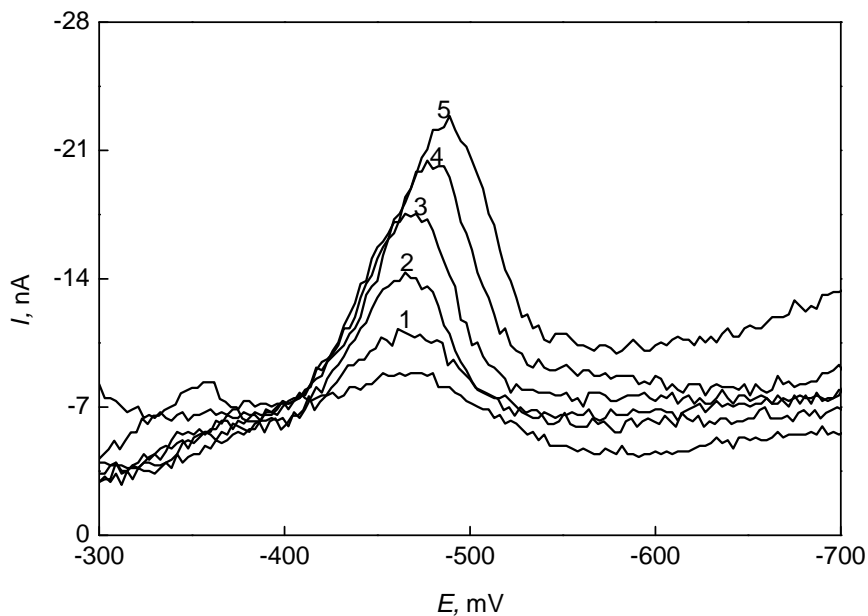
Obr. 3.2.5 Závislost proudu píku I_p na koncentraci 4-NI v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Měřeno technikou DPV na HMDE v prostředí BR pufr o pH 8,0 – methanol (9:1). Konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti 0,05 ($n = 3$).



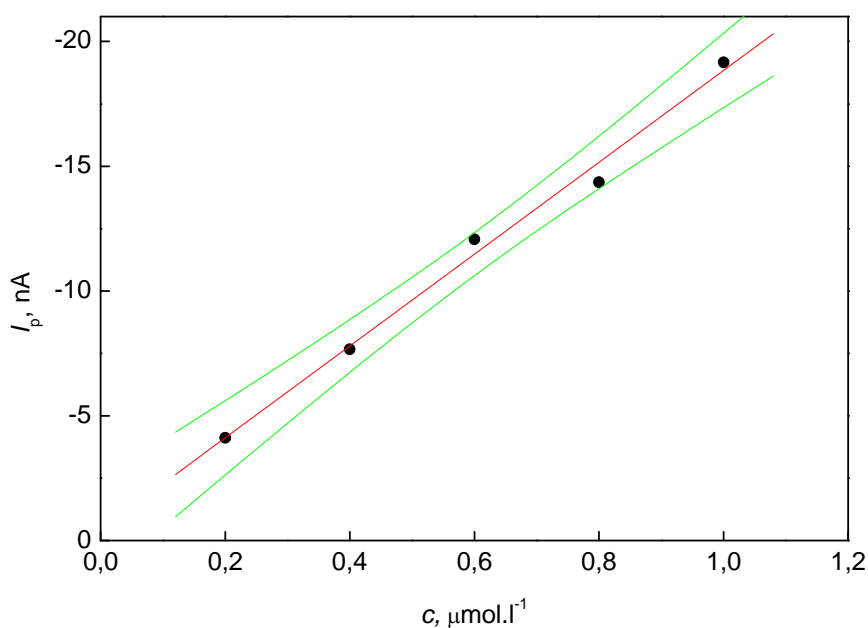
Obr. 3.2.6 Voltamogramy 4-NI měřené technikou DPV na HMDE v rozmezí koncentrací $2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí BR pufr o pH 8,0 – methanol (9:1). Koncentrace 4-NI (mol l^{-1}): $2 \cdot 10^{-6}$ (1), $4 \cdot 10^{-6}$ (2), $6 \cdot 10^{-6}$ (3), $8 \cdot 10^{-6}$ (4), $1 \cdot 10^{-5}$ (5); nečíslovaná černá křivka náleží základnímu elektrolytu.



Obr. 3.2.7 Závislost proudu píku I_p na koncentraci 4-NI v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Měřeno technikou DPV na HMDE v prostředí BR pufr o pH 8,0 – methanol (9:1). Konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti 0,05 ($n = 3$).



Obr. 3.2.8 Voltamogramy 4-NI měřené technikou DPV na HMDE v rozmezí koncentrací $2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí BR pufr o pH 8,0 – methanol (9:1). Koncentrace 4-NI (mol l^{-1}): $2 \cdot 10^{-7}$ (1), $4 \cdot 10^{-7}$ (2), $6 \cdot 10^{-7}$ (3), $8 \cdot 10^{-7}$ (4), $1 \cdot 10^{-6}$ (5); nečíslovaná černá křivka náleží základnímu elektrolytu.



Obr. 3.2.9 Závislost proudu píku I_p na koncentraci 4-NI v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. Měřeno technikou DPV na HMDE v prostředí BR pufr o pH 8,0 – methanol (9:1). Konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti 0,05 ($n = 3$).

Tabulka 3.2.II

Parametry kalibračních přímk pro stanovení 4-NI metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufr o pH 8,0 – methanol (9:1). Opakovatelnost měření nejnižší měřené koncentrace 4-NI v rámci jednoho vzorku je 8,30 % ($n = 10$).

Koncentrační rozmezí, mol l ⁻¹	Směrnice, nA μmol l ⁻¹	Úsek, nA	R ²	L _Q , μmol l ⁻¹
(2 – 10)·10 ⁻⁵	-11,5	-88,7	0,9977	—
(2 – 10)·10 ⁻⁶	-16,4	-1,6	0,9939	—
(2 – 10)·10 ⁻⁷	-18,4	-0,4	0,9920	0,1

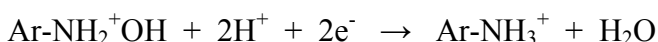
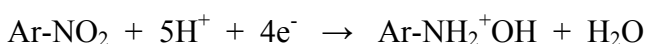
4. Voltametrické stanovení 4-nitroindanu na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě

Jako další elektroda využitelná pro stanovení a zkoumání nitrovaného polycyklického aromatického uhlovodíku 4-nitroindanu byla zvolena elektroda řadící se mezi netoxické alternativy ke klasickým rtuťovým elektrodám – rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda. Na této elektrodě byl 4-nitroindan proměřován pomocí DC a DP voltametrických metod.

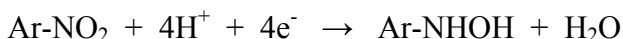
4.1 DC voltametrie 4-nitroindanu na m-AgSAE

Nejprve byl zkoumán vliv pH na chování 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) při DCV na m-AgSAE, a to ve stejném rozmezí pH BR pufru (pH BR pufru od 2,0 do 13,0) jako při DCV na HMDE, avšak v prostředí BR pufr – methanol (1:1). Chování 4-nitroindanu je zcela v souladu s jeho chováním při DCV na HMDE (viz kapitola 3.1). Opět 4-NI poskytuje v celé oblasti pH jeden dobře vyvinutý voltametrický pík a druhý pík s potenciálem negativnějším oproti píku prvnímu. Druhý pík je patrný pouze v silně kyselém a silně zásaditém prostředí. Zaznamenané voltametrické křivky v závislosti na pH ukazují obr. 4.1.1 a 4.1.2. Mechanismus redukce 4-NI (Ar-NO_2) na m-AgSAE je odvislý od pH prostředí:⁵²

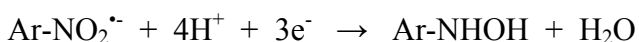
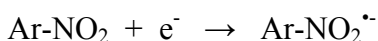
A) Kyselé prostředí



B) Neutrální prostředí



C) Zásadité prostředí



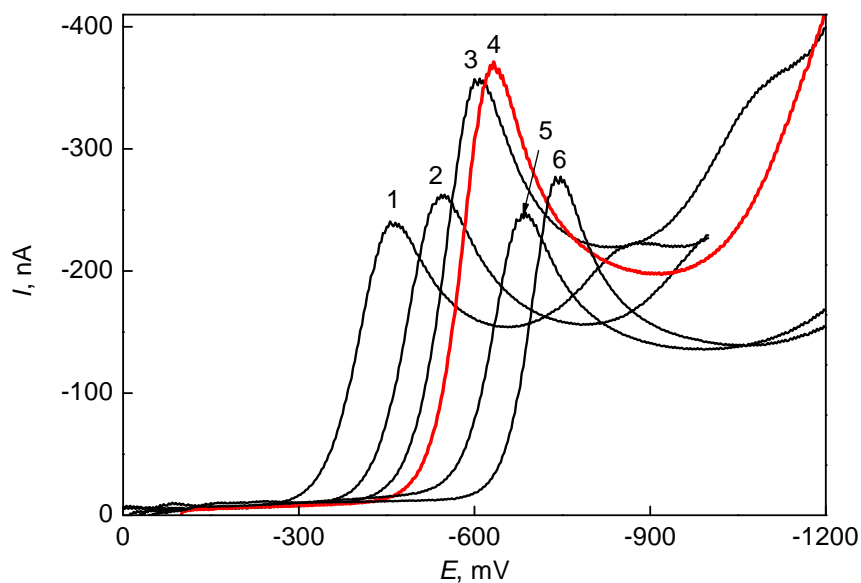
V kyselém prostředí (A) odpovídá první pík redukci nitroskupiny 4-NI za přispění 4 elektronů na skupinu hydroxylaminovou, druhý pík vlny pak odpovídá redukci hydroxylaminové skupiny za přispění 2 elektronů na skupinu aminovou. Těmto krokům redukce odpovídá i to, že výška (plocha) prvního a druhého píku jsou přibližně v poměru 2:1, což určuje, že v prvním redukčním kroku se redukce účastní dvojnásobné množství elektronů oproti druhému redukčnímu kroku. V neutrálním prostředí (B) pak redukce nitroskupiny probíhá jen v jednom 4-elektronovém redukčním kroku, kde konečným produktem redukce 4-NI je 4-hydroxylaminoindan.⁵¹ V alkalickém prostředí (C) probíhá 4-elektronová redukce ve dvou krocích (poměr ploch píků přibližně 1:3) a konečným produktem je opět 4-hydroxylaminoindan.

Z naměřených závislostí DC voltamogramů 4-NI na pH bylo jako optimální prostředí pro DCV na m-AgSAE zvoleno prostředí BR pufr o pH 5,0 – methanol (1:1). V tomto prostředí je hodnota výšky proudu píku nejvyšší (viz obr. 4.1.1).

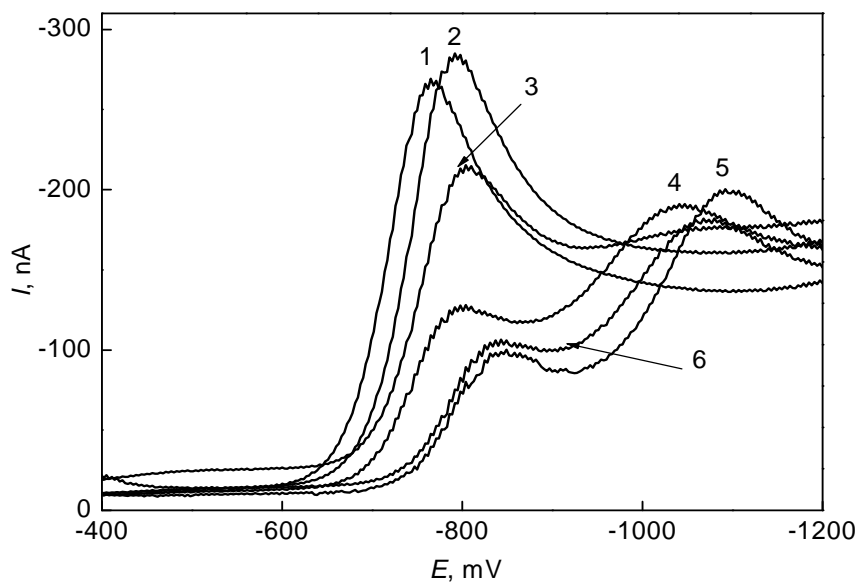
V další sérii měření byl zkoumán vliv regenerace na opakovatelnost měření. Roztok 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) byl dvacetkrát za sebou proměřován ve zvoleném optimálním prostředí (BR pufr o pH 5,0 – methanol v poměru 1:1) bez regeneračního kroku a dvacetkrát s krokem regeneračním. Získané voltamogramy jsou zobrazeny na obr. 4.1.3 a obr. 4.1.4. Z naměřených dat a výpočtů pro opakovatelnost bylo zjištěno, že zařazením regenerace před samotným měřením na m-AgSAE lze dosáhnout opakovatelnosti 0,95 % ($n = 20$) a bez regenerace činila opakovatelnost 0,73 % ($n = 20$). Jelikož je znám ten fakt, že při měření nižších koncentrací dochází ke zhoršování odezvy signálu bez zařazení regeneračního kroku, byla regenerace mezi jednotlivými měřeními použita. Navíc patrný rozdíl mezi opakovatelností s regenerací a bez regenerace při měření metodou DPV na m-AgSAE byl dalším důvodem k jejímu zařazení i v metodě DCV (viz kapitola 4.2). Optimální regenerační potenciály byly zjišťovány experimentálně. Zvolené hodnoty pro první regenerační potenciál $E_{1,\text{reg}} = -200 \text{ mV}$ a druhý regenerační potenciál $E_{2,\text{reg}} = -1100 \text{ mV}$ byly vždy předřazeny samotnému měření technikou DCV na m-AgSAE. Na elektrodu byly vkládány střídavě v intervalu 0,05 sekund po dobu 30 sekund. Rychlosti polarizace byla nastavena na $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Pro optimální prostředí BR pufr o pH 5,0 – methanol (1:1) (vkládané regenerační potenciály $E_{1,\text{reg}} = -200 \text{ mV}$ a $E_{2,\text{reg}} = -1100 \text{ mV}$) byly koncentrační

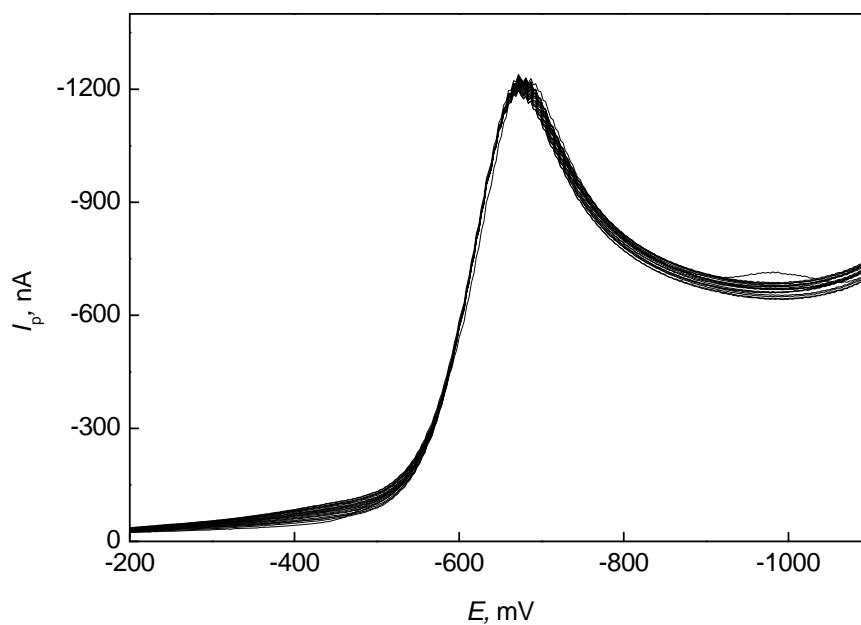
závislosti proměřeny v rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ (obr. 4.1.5, příslušná kalibrační závislost viz obr. 4.1.6), v rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ (obr. 4.1.7, příslušná kalibrační závislost viz obr. 4.1.8) a pro nejnižší koncentrační rozmezí $(1 - 10) \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ (obr. 4.1.9, příslušná kalibrační závislost viz obr. 4.1.10). Parametry naměřených kalibračních závislostí jsou shrnuty v tabulce 4.1.I.



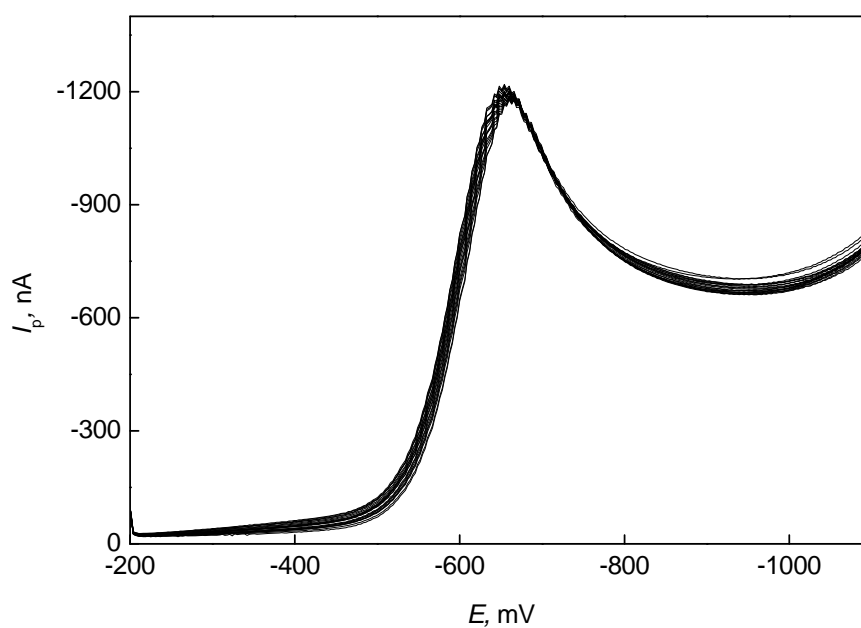
Obr. 4.1.1 Voltamogramy 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřené technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufr – methanol (1:1); zobrazeny hodnoty pH BR pufru 2,0 (1); 3,0 (2); 4,0 (3); 5,0 (4); 6,0 (5); 7,0 (6).



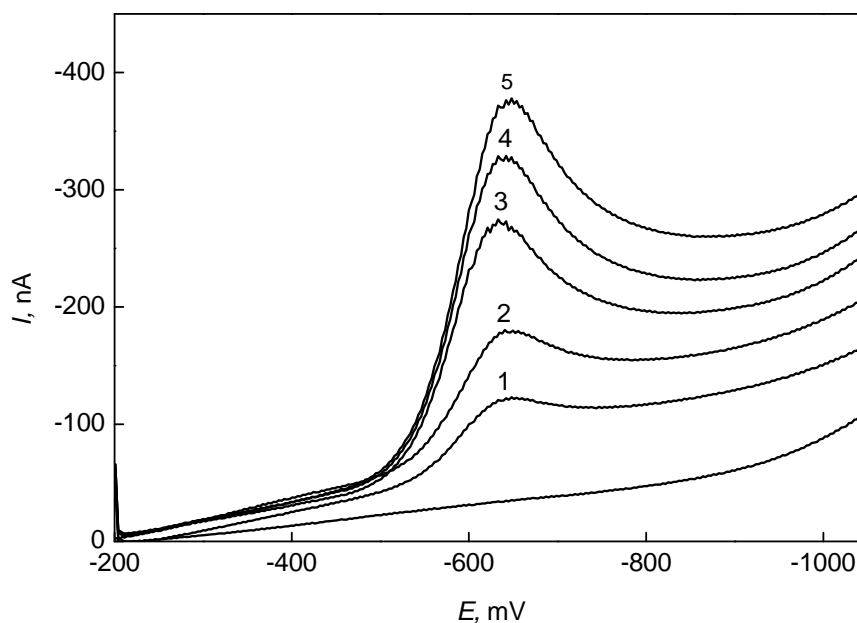
Obr. 4.1.2 Voltamogramy 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřené technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufr – methanol (1:1); zobrazeny hodnoty pH BR pufru 8,0 (1); 9,0 (2); 10,0 (3); 11,0 (4); 12,0 (5); 13,0 (6).



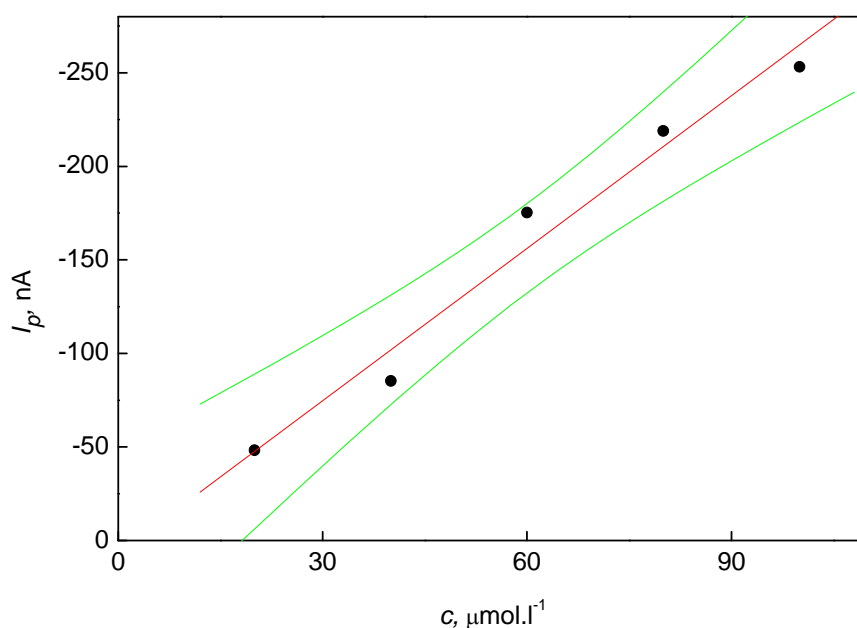
Obr. 4.1.3 Voltamogramy 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřené technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufr o pH 5,0 – methanol (1:1); zobrazeny hodnoty 20 měření bez regeneračního kroku. Opakovatelnost činila 0,73 % ($n = 20$).



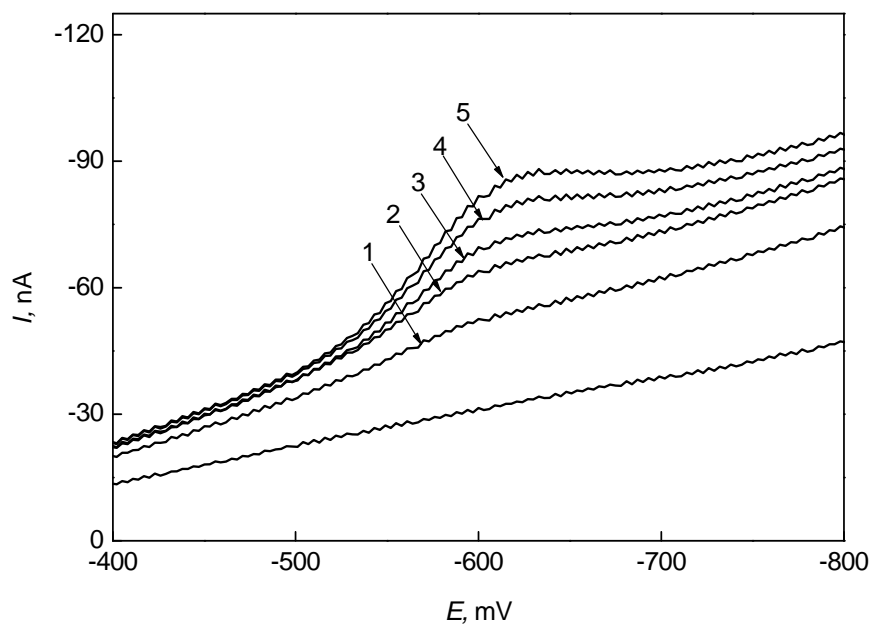
Obr. 4.1.4 Voltamogramy 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřené technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufr o pH 5,0 – methanol (1:1); zobrazeny hodnoty 20 měření s regeneračním krokem před vlastním měřením. Opakovatelnost činila 0,95 % ($n = 20$).



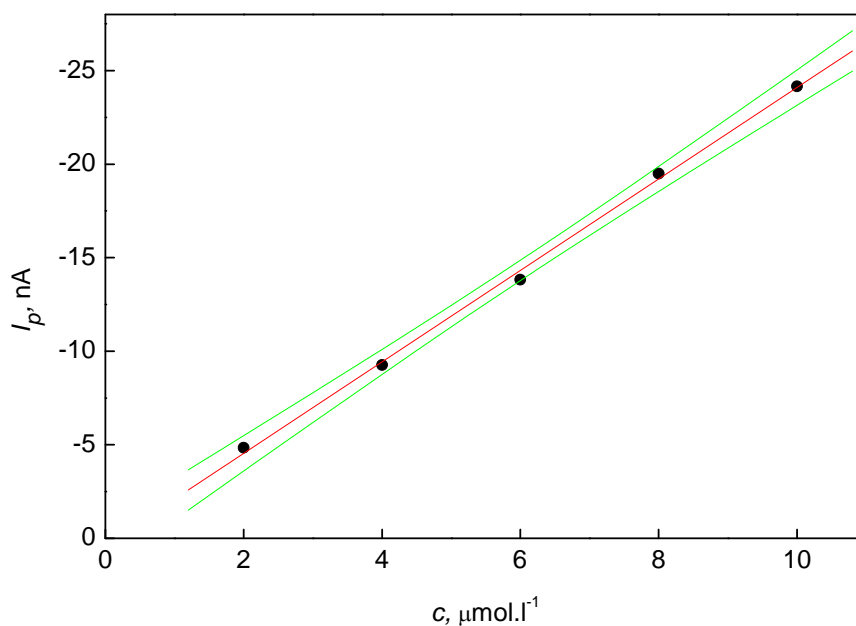
Obr. 4.1.5 Voltamogramy 4-NI měřené technikou DCV na m-AgSAE v rozmezí koncentrací $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí BR pufr o pH 5,0 – methanol (1:1). Koncentrace 4-NI (mol l^{-1}): $2 \cdot 10^{-5}$ (1), $4 \cdot 10^{-5}$ (2), $6 \cdot 10^{-5}$ (3), $8 \cdot 10^{-5}$ (4), $1 \cdot 10^{-4}$ (5); nečíslovaná černá křivka náleží základnímu elektrolytu.



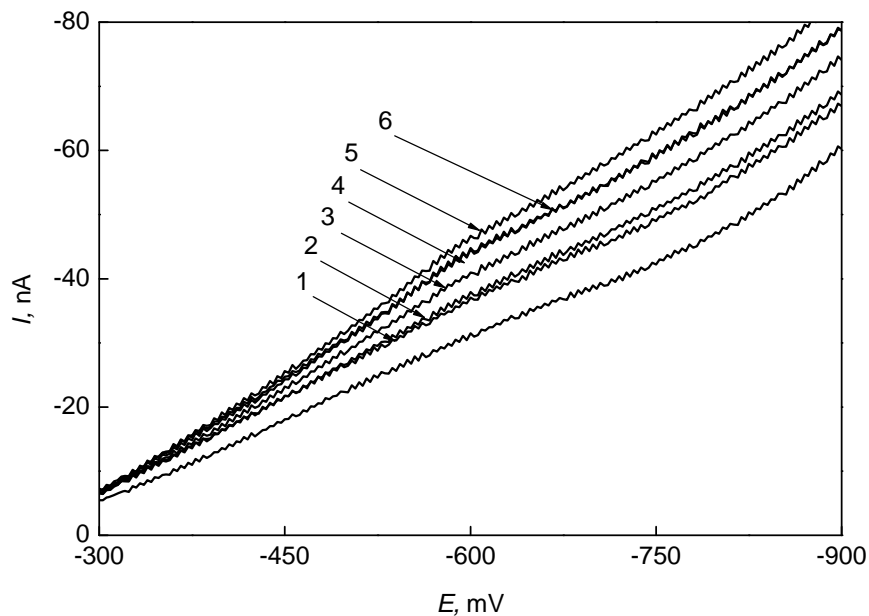
Obr. 4.1.6 Závislost proudu píku I_p na koncentraci 4-NI v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Měřeno technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufr o pH 5,0 – methanol (1:1). Konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti 0,05 ($n = 3$).



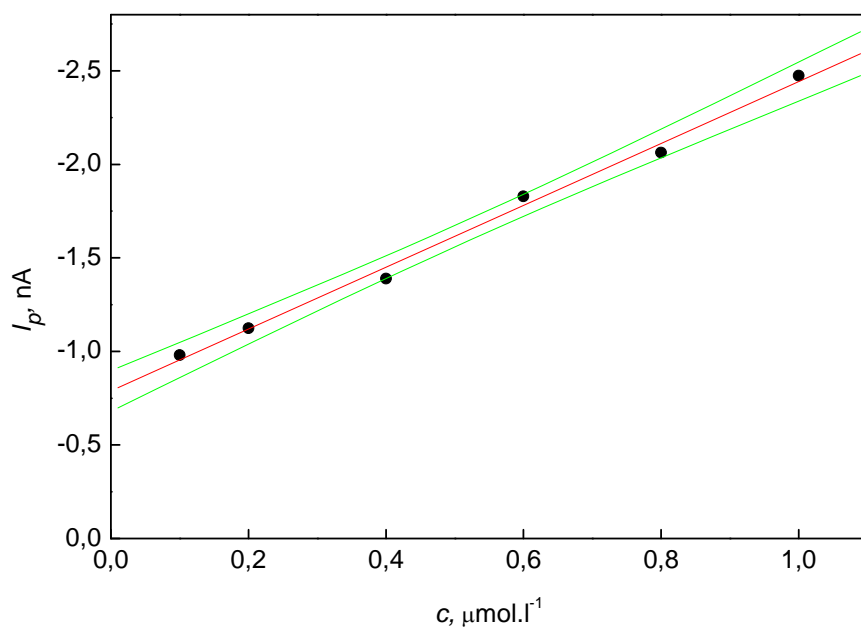
Obr. 4.1.7 Voltamogramy 4-NI měřené technikou DCV na m-AgSAE v rozmezí koncentrací $2 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-5}$ mol \cdot l $^{-1}$ v prostředí BR pufr o pH 5,0 – methanol (1:1). Koncentrace 4-NI (mol \cdot l $^{-1}$): $2 \cdot 10^{-6}$ (1), $4 \cdot 10^{-6}$ (2), $6 \cdot 10^{-6}$ (3), $8 \cdot 10^{-6}$ (4), $1 \cdot 10^{-5}$ (5); nečíslovaná černá křivka náleží základnímu elektrolytu.



Obr. 4.1.8 Závislost proudu píku I_p na koncentraci 4-NI v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-5}$ mol \cdot l $^{-1}$. Měřeno technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufr o pH 5,0 – methanol (1:1). Konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti 0,05 ($n = 3$).



Obr. 4.1.9 Voltamogramy 4-NI měřené technikou DCV na m-AgSAE v rozmezí koncentrací $2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí BR pufr o pH 5,0 – methanol (1:1). Koncentrace 4-NI (mol l^{-1}): $1 \cdot 10^{-7}$ (1), $2 \cdot 10^{-7}$ (2), $4 \cdot 10^{-7}$ (3), $6 \cdot 10^{-7}$ (4), $8 \cdot 10^{-7}$ (5), $1 \cdot 10^{-6}$ (6); nečíslovaná černá křivka náleží základnímu elektrolytu.



Obr. 4.1.10 Závislost proudu píku I_p na koncentraci 4-NI v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. Měřeno technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufr o pH 5,0 – methanol (1:1). Konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti 0,05 ($n = 3$).

Tabulka 4.1.I

Parametry kalibračních přímek pro stanovení 4-NI metodou DCV na m-AgSAE (průměr disku 0,52 mm) v prostředí BR pufr o pH 5,0 – methanol (1:1). Regenerační potenciály $E_{1,\text{reg}} = -200$ mV, $E_{2,\text{reg}} = -1100$ mV. Opakovatelnost měření nejnižší měřené koncentrace 4-NI v rámci jednoho vzorku je 5,36 % ($n = 20$).

Koncentrační rozmezí, mol l ⁻¹	Směrnice, nA μmol l ⁻¹	Úsek, nA	R ²	L _Q , μmol l ⁻¹
(2 – 10)·10 ⁻⁵	-2,71	-6,8	0,9722	—
(2 – 10)·10 ⁻⁶	-2,44	0,3	0,9939	—
(2 – 10)·10 ⁻⁷	-1,65	-0,8	0,9970	0,1

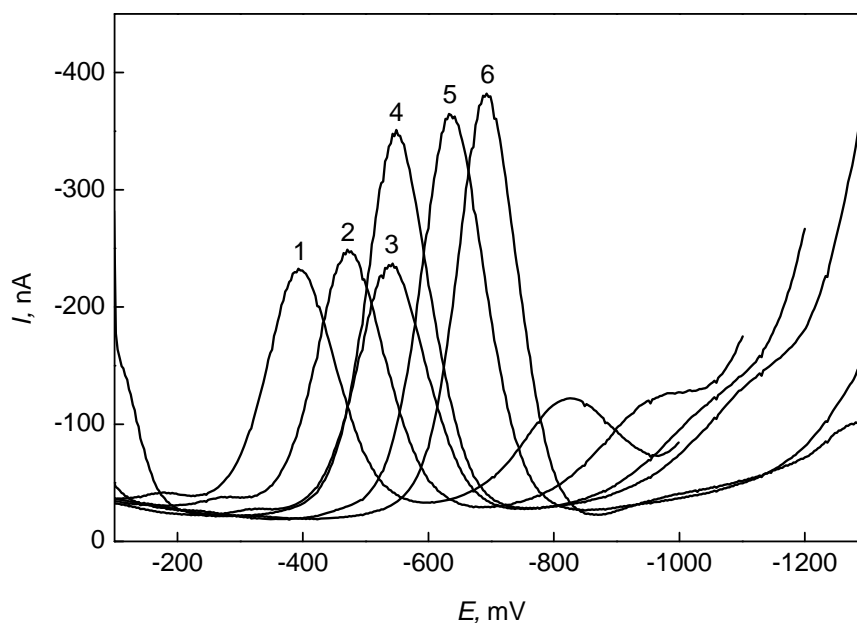
4.2 Diferenční pulsní voltametrie 4-nitroindanu na m-AgSAE

Před vlastním proměřováním koncentračních závislostí 4-NI bylo nejprve zkoumáno jeho chování při DPV na m-AgSAE v prostředí methanolu a BR pufru o různém pH vodné složky. Pro tato měření byl použit roztok 4-NI o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ a BR pufr od pH 2 do pH 13 v poměru s methanolem 1:1. Dále byly hledány optimální podmínky pro stanovení 4-NI touto metodou. Chování 4-nitroindanu je opět obdobné jako u předchozích měření na HMDE a m-AgSAE. Opět 4-NI poskytuje v celé oblasti pH jeden dobře vyvinutý pík a druhý pík s potenciálem píku negativnějším oproti píku prvnímu, který je patrný pouze v silně kyselém a silně zásaditém prostředí. Zaznamenané voltametrické křivky v závislosti na pH ukazuje obr. 4.2.1 a 4.2.2.

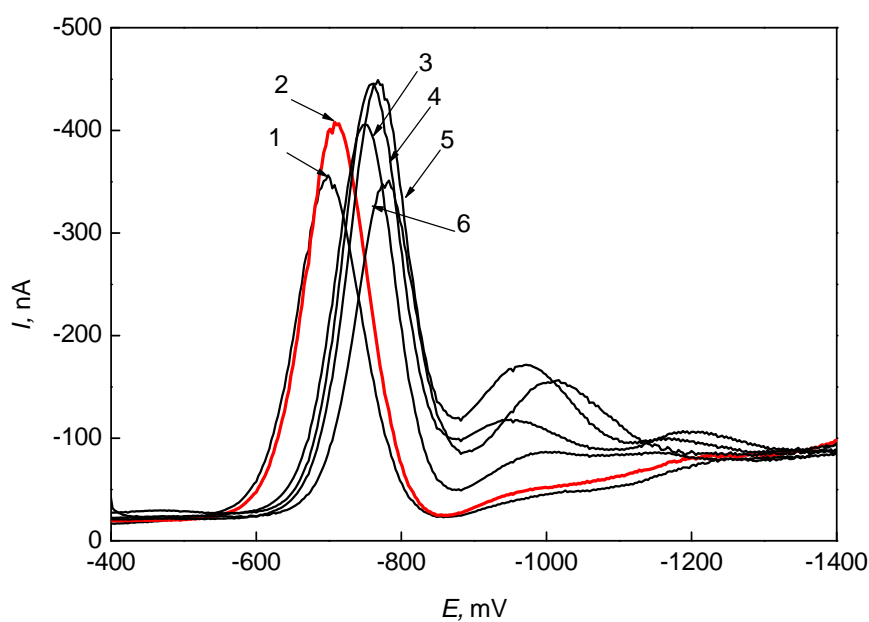
Ze získaných závislostí DP voltamogramů 4-NI na pH bylo jako optimální prostředí zvoleno BR pufr o pH 9,0 – methanol (1:1). Viz červená křivka na obr. 4.2.2.

V další sérii měření byl zkoumán vliv regenerace na opakovatelnost měření. Roztok 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) byl dvacetkrát za sebou proměřován ve zvoleném optimálním prostředí (BR pufr o pH 9,0 – methanol v poměru 1:1) bez regeneračního kroku a dvacetkrát s krokem regeneračním. Získané voltamogramy jsou zobrazeny na obr. 4.2.3 a obr. 4.2.4. Z naměřených dat a výpočtů pro opakovatelnost bylo zjištěno, že zařazením regenerace před samotným měřením na m-AgSAE lze dosáhnout opakovatelnosti 0,94 % ($n = 20$) a bez regenerace činila opakovatelnost 1,80 % ($n = 20$). Zde se jeví výhodnější zvolit regenerační krok, díky němuž je jednak dosaženo lepší opakovatelnosti a také výrazně vyššího signálu. Z tohoto důvodu byl regenerační krok zařazen i při DCV na m-AgSAE. Navíc je známo, že regenerace u nižších koncentrací napomáhá získání lepší odezvy signálu. Experimentálně zvolené hodnoty činily pro první regenerační potenciál $E_{1,\text{reg}} = -300 \text{ mV}$ a pro druhý regenerační potenciál $E_{2,\text{reg}} = -1300 \text{ mV}$. Na elektrodu byly vkládány střídavě v intervalu 0,05 sekund po dobu 30 sekund.

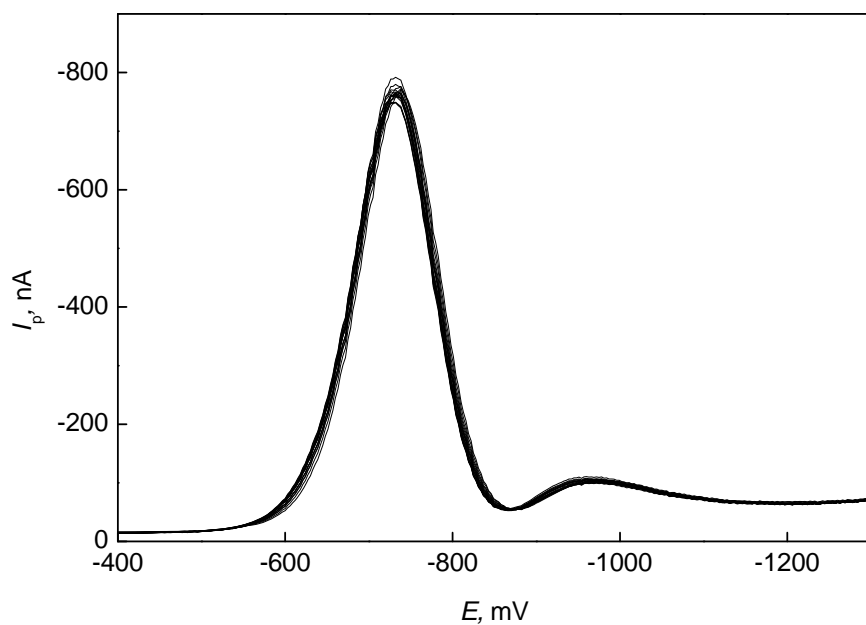
Koncentrační závislosti 4-NI byly proměřeny ve zvoleném optimálním prostředí BR pufr o pH 9,0 – methanol (1:1) za použití experimentálně zjištěných regeneračních potenciálů $E_{1,\text{reg}} = -300 \text{ mV}$ a $E_{2,\text{reg}} = -1300 \text{ mV}$ v rozmezí koncentrací $(2 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ (obr. 4.2.5, příslušná kalibrační závislost viz obr. 4.2.6), v rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ (obr. 4.2.7, příslušná kalibrační závislost viz obr. 4.2.8) a v nejnižším koncentračním rozmezí $(1 - 10) \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ (Obr. 4.2.9, příslušná kalibrační závislost viz Obr. 4.2.10).



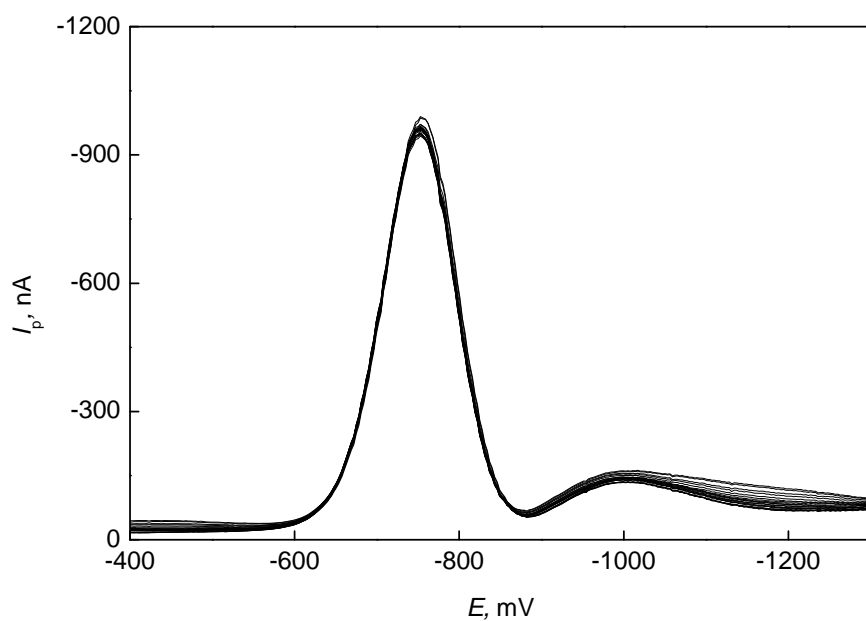
Obr. 4.2.1 Voltamogramy 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufr – methanol (1:1); zobrazeny hodnoty pH BR pufru 2,0 (1); 3,0 (2); 4,0 (3); 5,0 (4); 6,0 (5); 7,0 (6).



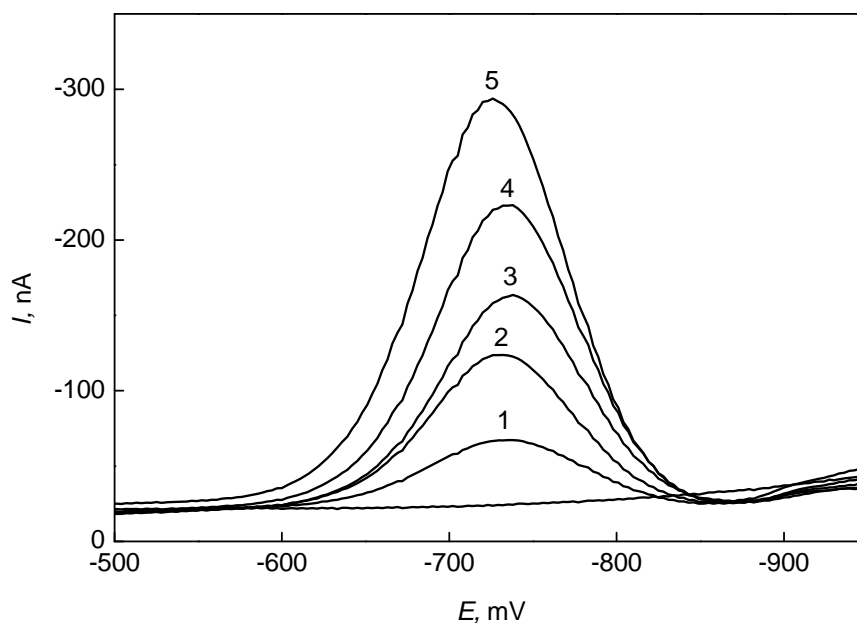
Obr. 4.2.2 Voltamogramy 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufr – methanol (1:1); zobrazeny hodnoty pH BR pufru 8,0 (1); 9,0 (2); 10,0 (3); 11,0 (4); 12,0 (5); 13,0 (6).



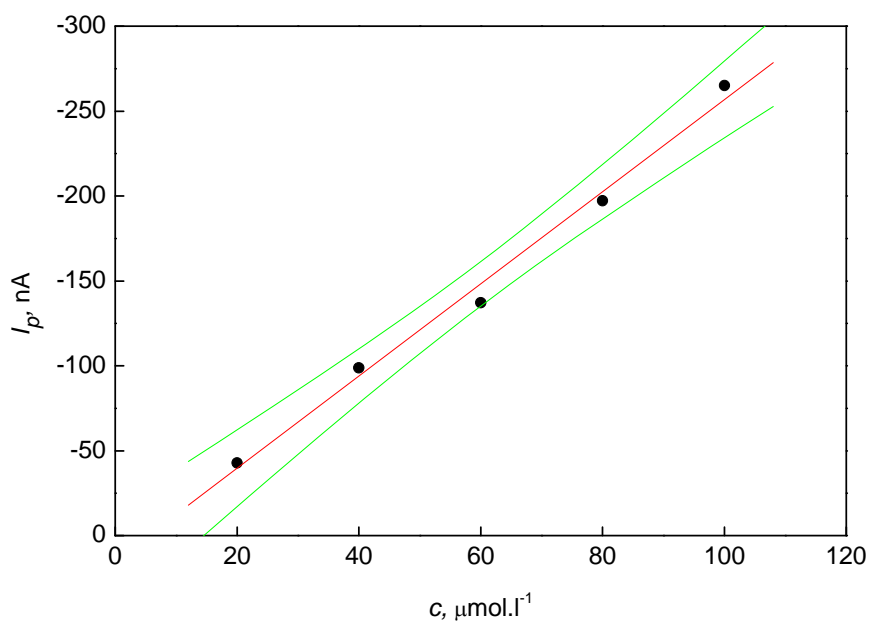
Obr. 4.2.3 Voltamogramy 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufr o pH 9,0 – methanol (1:1); zobrazeny hodnoty 20 měření bez regeneračního kroku. Opakovatelnost činila 1,80 % ($n = 20$).



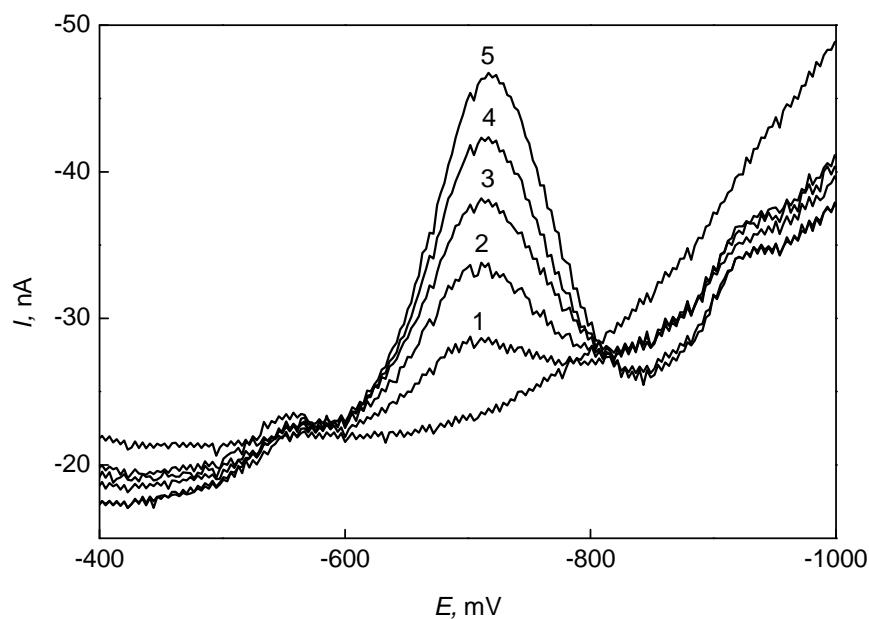
Obr. 4.2.4 Voltamogramy 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufr o pH 9,0 – methanol (1:1); zobrazeny hodnoty 20 měření s regeneračním krokem před vlastním měřením. Opakovatelnost činila 0,94 % ($n = 20$).



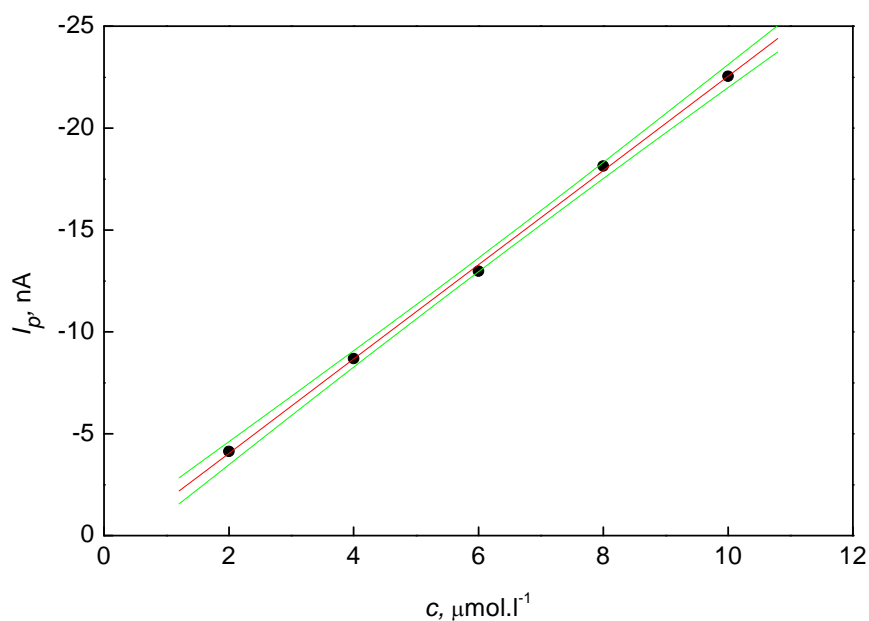
Obr. 4.2.5 Voltamogramy 4-NI měřené technikou DPV na m-AgSAE v rozmezí koncentrací $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí BR pufr o pH 9,0 – methanol (1:1). Koncentrace 4-NI (mol l^{-1}): $2 \cdot 10^{-5}$ (1), $4 \cdot 10^{-5}$ (2), $6 \cdot 10^{-5}$ (3), $8 \cdot 10^{-5}$ (4), $1 \cdot 10^{-4}$ (5); nečíslovaná černá křivka náleží základnímu elektrolytu.



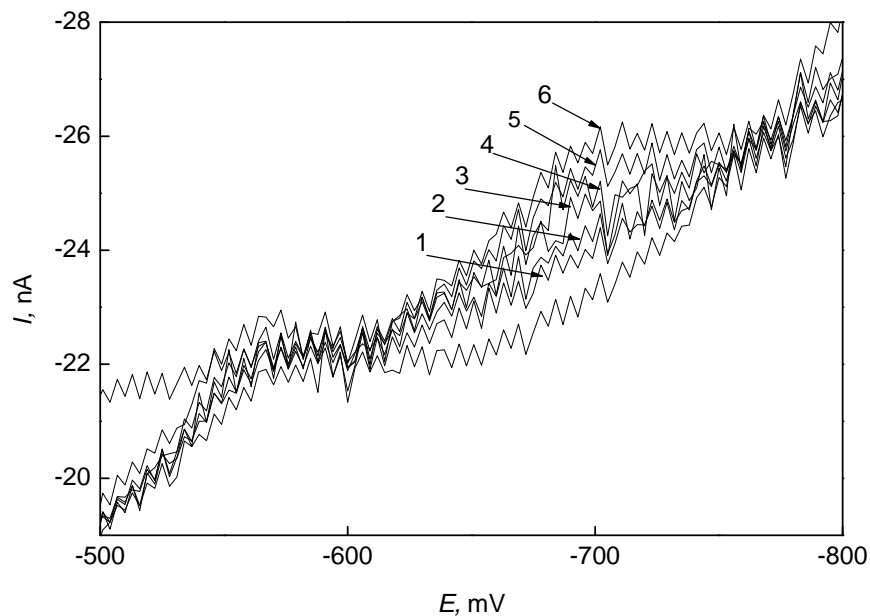
Obr. 4.2.6 Závislost proudu píku I_p na koncentraci 4-NI v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Měřeno technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufr o pH 9,0 – methanol (1:1). Konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti 0,05 ($n = 3$).



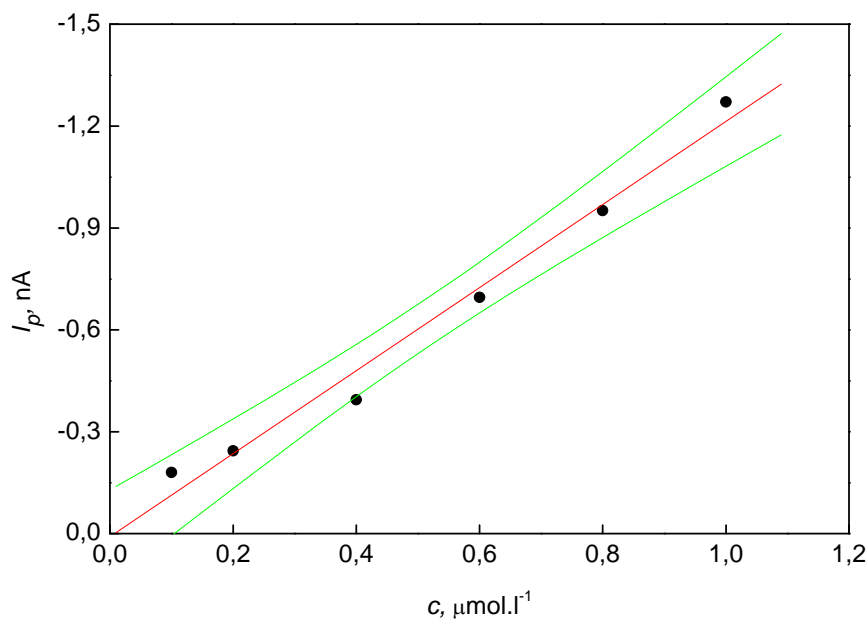
Obr. 4.2.7 Voltamogramy 4-NI měřené technikou DPV na m-AgSAE v rozmezí koncentrací $2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí BR pufr o pH 9,0 – methanol (1:1). Koncentrace 4-NI (mol l^{-1}): $2 \cdot 10^{-6}$ (1), $4 \cdot 10^{-6}$ (2), $6 \cdot 10^{-6}$ (3), $8 \cdot 10^{-6}$ (4), $1 \cdot 10^{-5}$ (5); nečíslovaná černá křivka náleží základnímu elektrolytu.



Obr. 4.2.8 Závislost proudu píku I_p na koncentraci 4-NI v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Měřeno technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufr o pH 9,0 – methanol (1:1). Konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti 0,05 ($n = 3$).



Obr. 4.2.9 Voltamogramy 4-NI měřené technikou DPV na m-AgSAE v rozmezí koncentrací $2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí BR pufr o pH 9,0 – methanol (1:1). Koncentrace 4-NI (mol l^{-1}): $1 \cdot 10^{-7}$ (1), $2 \cdot 10^{-7}$ (2), $4 \cdot 10^{-7}$ (3), $6 \cdot 10^{-7}$ (4), $8 \cdot 10^{-7}$ (5), $1 \cdot 10^{-6}$ (6); nečíslovaná černá křivka náleží základnímu elektrolytu.



Obr. 4.2.10 Závislost proudu píku I_p na koncentraci 4-NI v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. Měřeno technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufr o pH 9,0 – methanol (1:1). Konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti 0,05 ($n = 3$).

Tabulka 4.2.II

Parametry kalibračních přímek pro stanovení 4-NI metodou DPV na m-AgSAE (průměr disku 0,52 mm) v prostředí BR pufr o pH 9,0 – methanol (1:1). Regenerační potenciály $E_{1,\text{reg}} = -300$ mV, $E_{2,\text{reg}} = -1300$ mV. Reprodukovatelnost měření nejnižší měřené koncentrace 4-NI v rámci jednoho vzorku je 4,90 % ($n = 20$).

Koncentrační rozmezí, mol l ⁻¹	Směrnice, nA μmol l ⁻¹	Úsek, nA	R ²	L _Q , μmol l ⁻¹
(2 – 10)·10 ⁻⁵	-2,7	14,6	0,9915	—
(2 – 10)·10 ⁻⁶	-2,3	0,6	0,9993	—
(2 – 10)·10 ⁻⁷	-1,2	0,0	0,9823	0,1

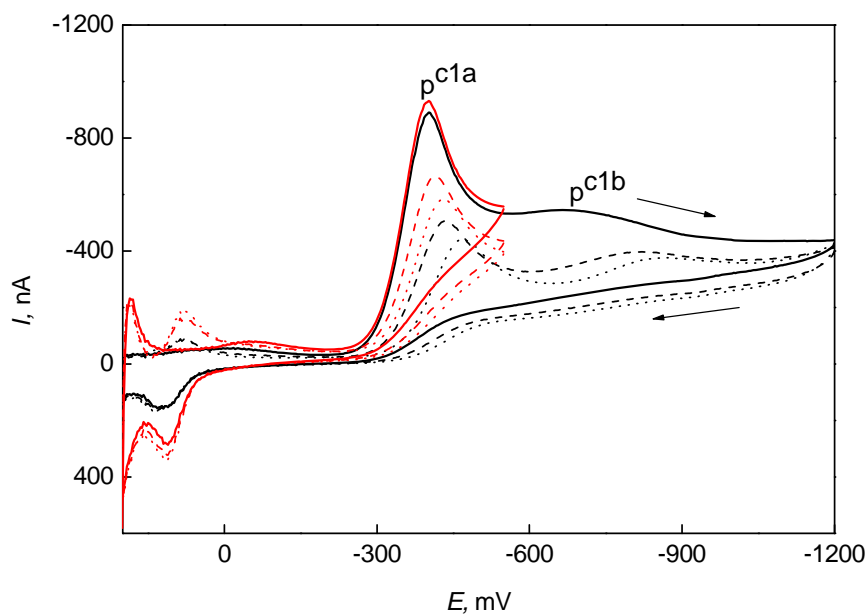
Zjištěné optimální podmínky byly dále použity pro měření 4-NI v modelových vzorcích pitné a říční vody (viz kapitola 7.3).

5. Cyklická voltametrie 4-nitroindanu

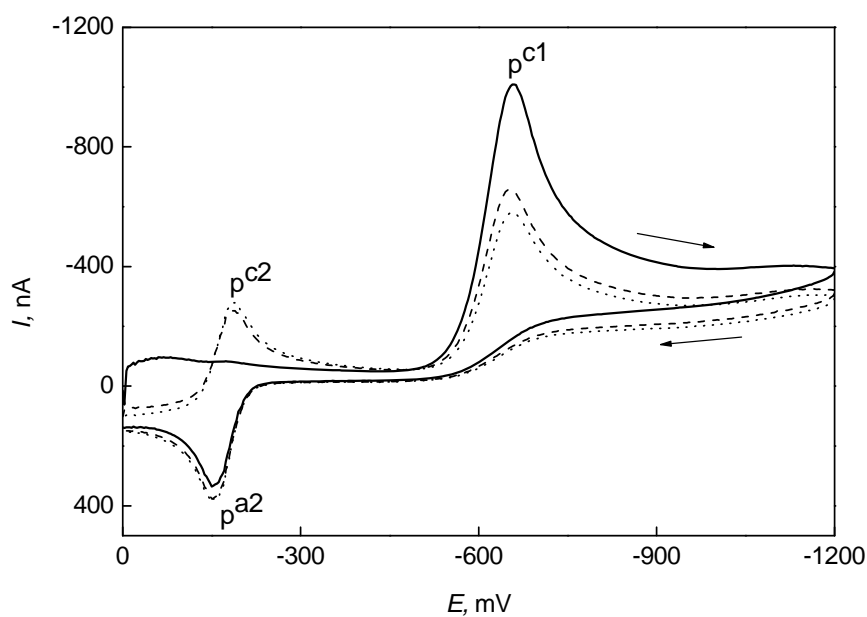
Cyklická voltametrie byla použita pro charakterizaci elektrochemických reakčních mechanismů 4-NI v prostředích o různých pH (pH 3,0; 8,0 a 12,0 reprezentují kyselé, neutrální a zásadité prostředí). Měření bylo prováděno na elektrodách HMDE a m-AgSAE, při nastavení různých rychlostí skenu (10, 20, 50, 100, 200, 500 a 1000 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$). Na obr. 5.1.1 a 5.2.1 jsou navíc ještě červeně zobrazeny křivky měření CV v kyselém prostředí BR pufru v potenciálovém okně zahrnujícím pouze první pík pro objasnění, zda redukce nitroskupiny do prvního stupně je reverzibilní či ireverzibilní.

5.1 Cyklická voltametrie 4-NI na HMDE

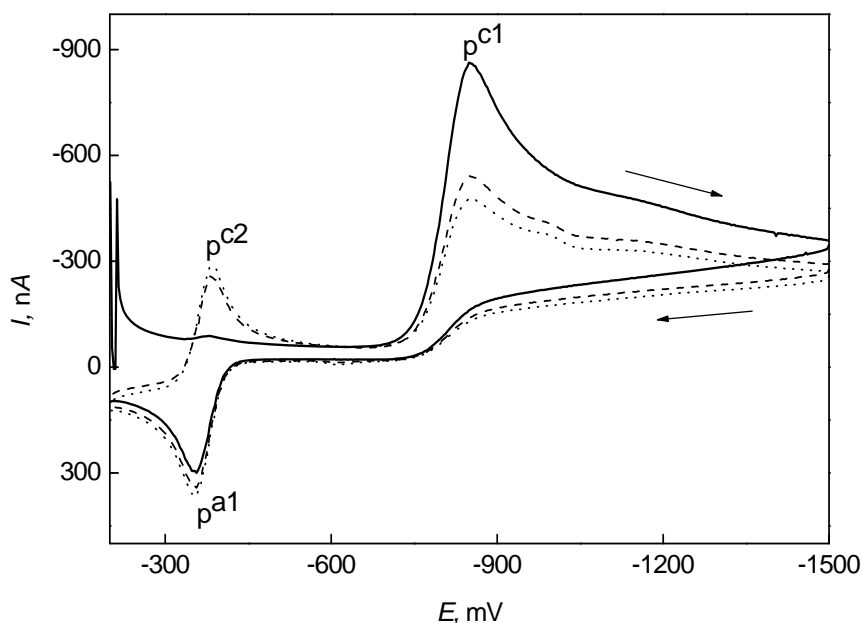
Vliv různých rychlostí skenu (10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$) na chování 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) při CV na visící rtuťové kapkové elektrodě byl sledován v prostředí BR pufr – methanol (1:1), kde byl použit BR pufr o pH 3,0; 8,0 a 12,0. Cyklické voltamogramy 4-NI v kyselém prostředí poskytují dva katodické voltametrické píky ($p^{\text{cl}a}$, $p^{\text{cl}b}$). Toto je v souladu s polarografickým chováním 4-NI při měření metodou DCTP na DME (bakalářská práce).⁴⁹ První katodický pík ($p^{\text{cl}a}$) odpovídá 4-elektronové redukci nitroskupiny 4-NI na skupinu hydroxylaminovou, druhý katodický pík ($p^{\text{cl}b}$) pak odpovídá 2-elektronové redukci hydroxylaminové skupiny na skupinu aminovou. V prostředí, kde byl použit BR pufr o pH 8,0 poskytuje 4-NI oproti kyselému prostředí navíc ještě anodický pík (p^{al}) a další katodický pík ($p^{\text{c}2}$) ve vyšších hodnotách potenciálu (tato dvojice reverzibilních píků odpovídá anodické oxidaci hydroxylaminové skupiny na nitroso skupinu za odejmutí 2 elektronů a zpětné reverzibilní katodické redukci). Naopak zde redukce 4-NI neprobíhá ve dvou krocích, které by poskytovaly dva píky ($p^{\text{cl}a}$, $p^{\text{cl}b}$). V zásaditém prostředí je chování 4-NI obdobné jako v prostředí s BR pufr o pH 8,0. Zde se projevuje posunutí křivek vlivem vyššího pH prostředí do zápornějších oblastí potenciálu. 4-NI poskytuje voltametrické píky ve všech třech prostředích při všech rychlostech polarizace. Zobrazeny jsou pouze křivky získané při rychlosti polarizace 50 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Získané voltamogramy jsou ukázány na obr. 5.1.1, 5.1.2 a obr. 5.1.3. Zjištěné závislosti I_p na odmocnině z rychlosti polarizace jsou uvedeny v tabulce 5.1.1.



Obr. 5.1.1 Voltamogramy 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřené technikou CV na HMDE v prostředí BR pufr pH 3,0 – methanol (1:1); rychlost skenu 50 mV s^{-1} ; první cyklus (—); druhý cyklus (---); třetí cyklus (⋯).



Obr. 5.1.2 Voltamogramy 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřené technikou CV na HMDE v prostředí BR pufr pH 8,0 – methanol (1:1); rychlost skenu 50 mV s^{-1} ; první cyklus (—); druhý cyklus (---); třetí cyklus (⋯).



Obr. 5.1.3 Voltamogramy 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřené technikou CV na HMDE v prostředí BR pufr pH 12,0 – metanol (1:1); rychlost skenu 50 mV s^{-1} ; první cyklus (—); druhý cyklus (---); třetí cyklus (···).

Tabulka 5.1.1

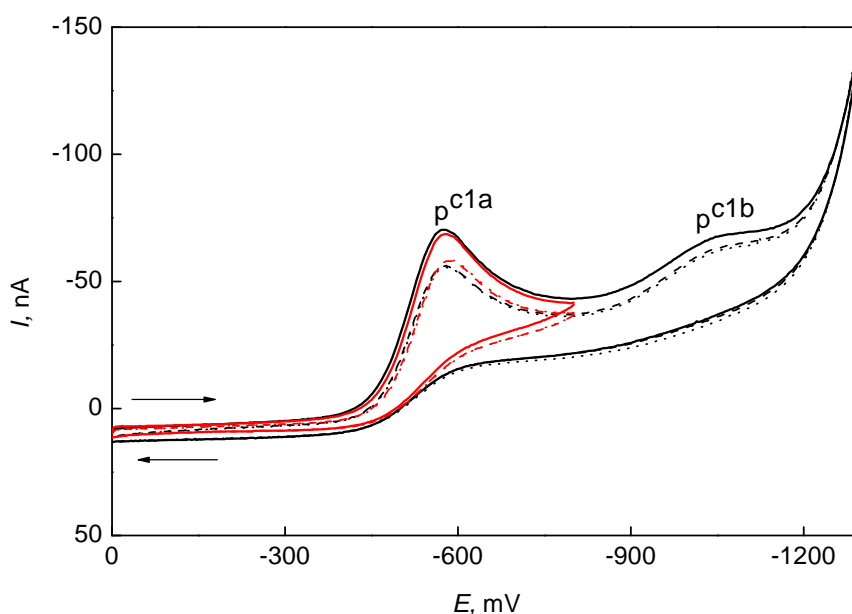
Závislost velikosti proudu píku I_p 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na druhé odmocnině rychlosti polarizace pro metodu CV na HMDE. Měřeno v prostředí BR pufr – methanol (1:1).

pH BR pufru	Pík	Směrnice, $\text{nA mV}^{-1/2} \cdot \text{s}^{1/2}$	Úsek, nA	R^2
3,0	p^{c1a}	-97,7	-172,6	0,9799
	p^{c1b}	-43,0	-211,7	0,9773
8,0	p^{c1}	-97,3	-287,5	0,9648
	p^{c2}	-33,4	-41,7	0,9773
	p^{a1}	31,0	61,5	0,9699
12,0	p^{c1}	-63,5	-351,7	0,9583
	p^{c2}	-38,1	-19,2	0,9600
	p^{a1}	26,8	80,1	0,9416

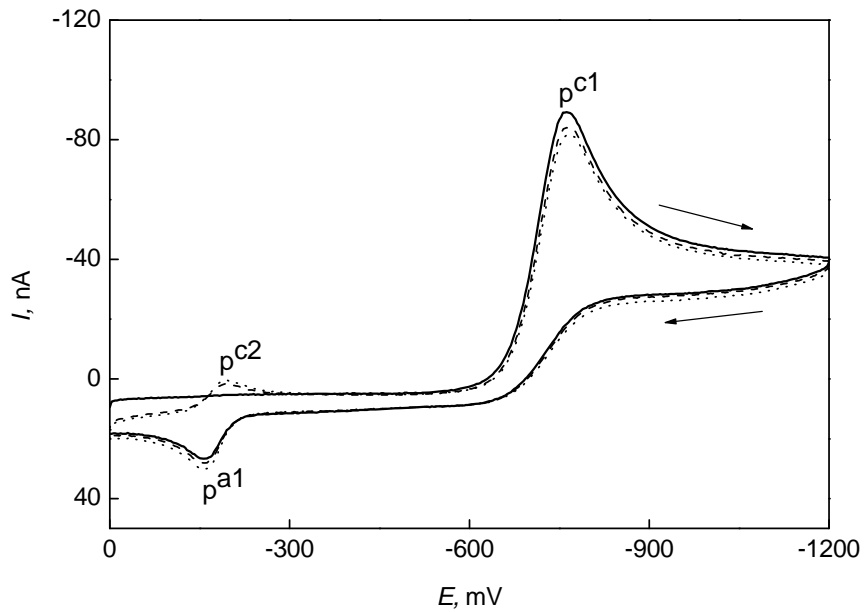
p^{c1} , p^{c1a} , p^{c1b} , p^{c2} , p^{a1} – označení katodických a anodického píku

5.2 Cyklická voltametrie 4-NI na m-AgSAE

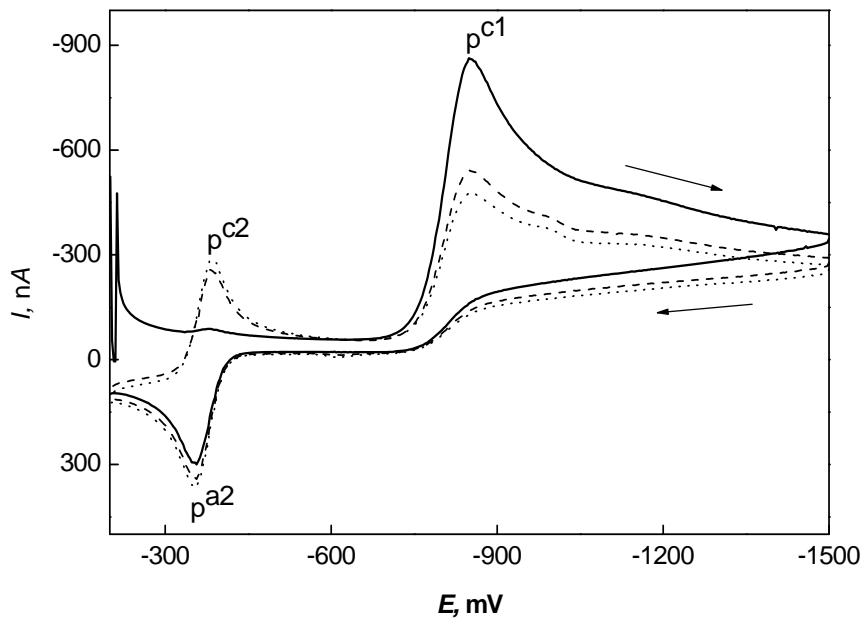
Vliv různých rychlostí skenu (10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$) na chování 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) při CV na elektrodě m-AgSAE byl sledován ve stejných prostředích jako při měření CV na HMDE (viz kap. 3.4.1). Chování 4-NI při měření CV na m-AgSAE je obdobné jako při CV na HMDE. Voltamogramy poskytují stejné počty píků ve stejných prostředích, pouze s tím rozdílem, že proudová odezva je na m-AgSAE nižší. Získané voltamogramy při rychlosti polarizace $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ jsou ukázány na obr. 5.2.1, 5.2.2 a obr. 5.2.3. Zjištěné závislosti I_p na rychlosti polarizace jsou uvedeny v tabulce 5.2.I.



Obr. 5.2.1 Voltamogramy 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) měřené technikou CV na m-AgSAE v prostředí BR pufr pH 3,0 – methanol (1:1); rychlost skenu $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; první cyklus (—); druhý cyklus (---); třetí cyklus (···).



Obr. 5.2.2 Voltamogramy 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřené technikou CV na m-AgSAE v prostředí BR pufr pH 8,0 – methanol (1:1); rychlost skenu 50 mV s^{-1} ; první cyklus (—); druhý cyklus (---); třetí cyklus (···).



Obr. 5.2.3 Voltamogramy 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřené technikou CV na m-AgSAE v prostředí BR pufr pH 12,0 – methanol (1:1); rychlost skenu 50 mV s^{-1} ; první cyklus (—); druhý cyklus (---); třetí cyklus (···).

Tabulka 5.2.I

Závislost velikosti proudu píku I_p 4-NI ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na druhé odmocnině rychlosti polarizace pro metodu CV na m-AgSAE. Měřeno v prostředí BR pufr – methanol (1:1).

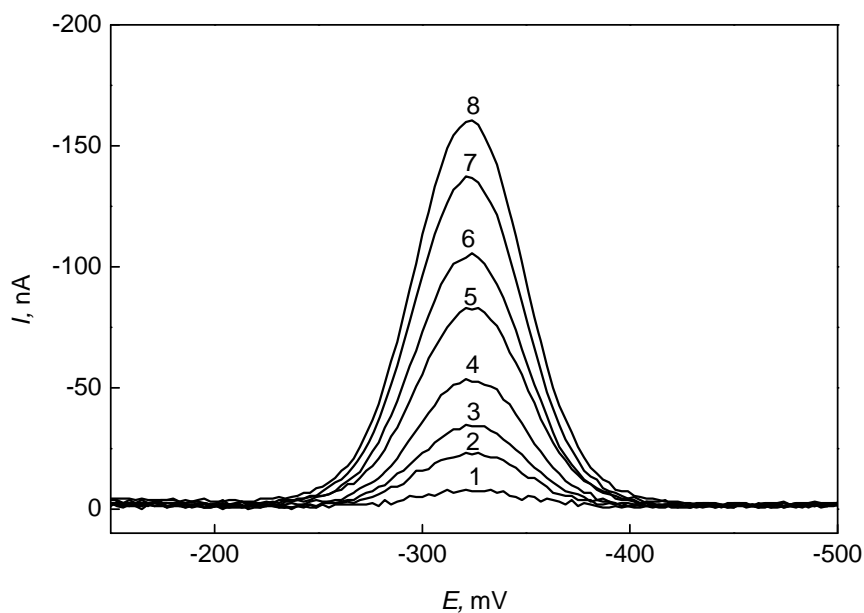
pH BR pufru	Pík	Směrnice, $\text{nA} \cdot \text{mV}^{-1/2} \cdot \text{s}^{1/2}$	Úsek, nA	R^2
3,0	p^{cla}	-6,1	-28,4	0,9789
	p^{clb}	-5,3	-30,0	0,9868
8,0	p^{cl}	-7,5	-38,8	0,9743
	p^{c2}	-2,1	4,4	0,9600
	p^{a1}	2,2	-2,0	0,9581
12,0	p^{cl}	-3,5	-45,6	0,8883
	p^{c2}	-3,0	4,3	0,9571
	p^{a1}	3,0	-1,7	0,9554

$p^{\text{cl}}, p^{\text{cla}}, p^{\text{clb}}, p^{\text{c2}}, p^{\text{a1}}$ – označení katodických a anodického píku

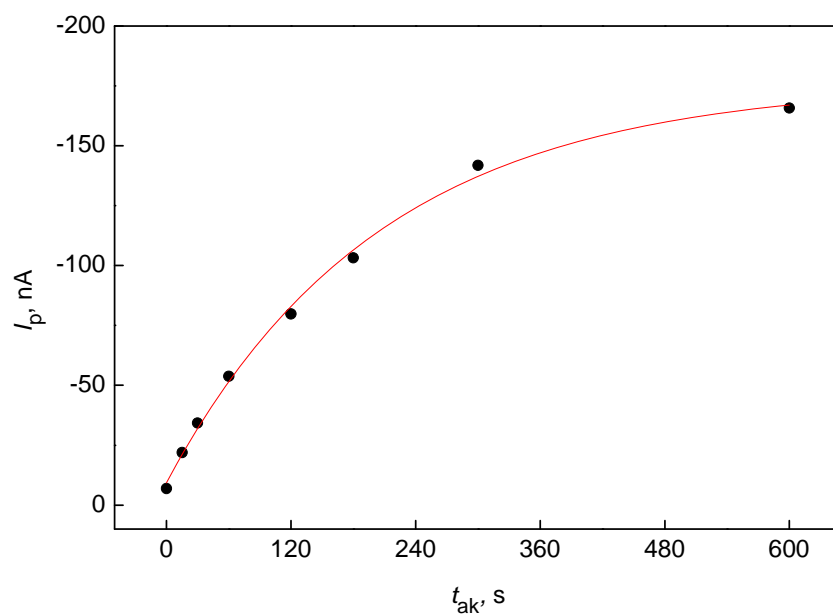
Metodou cyklické voltametrie bylo zkoumáno chování 4-NI ve třech různých prostředích na dvou různých elektrodách. Metoda byla použita pro objasnění reverzibility či ireverzibility děje a také pro objasnění dějů řídicích elektrochemickou redukcí nitroskupiny na benzenovém jádře 4-NI. Z naměřených voltamogramů a ze zjištěných závislostí velikosti proudu píků na druhé odmocnině rychlosti polarizace je patrné, že elektrochemická redukce 4-NI je ireverzibilní a její rychlost je řízena příspěvkem difuze i adsorpce. Děj je ireverzibilní i do prvního stupně redukce nitroskupiny (viz červené křivky na obr. 5.1.1 a 5.2.1).

6. Adsorpční rozpouštěcí voltametrie 4-nitroindanu na HMDE

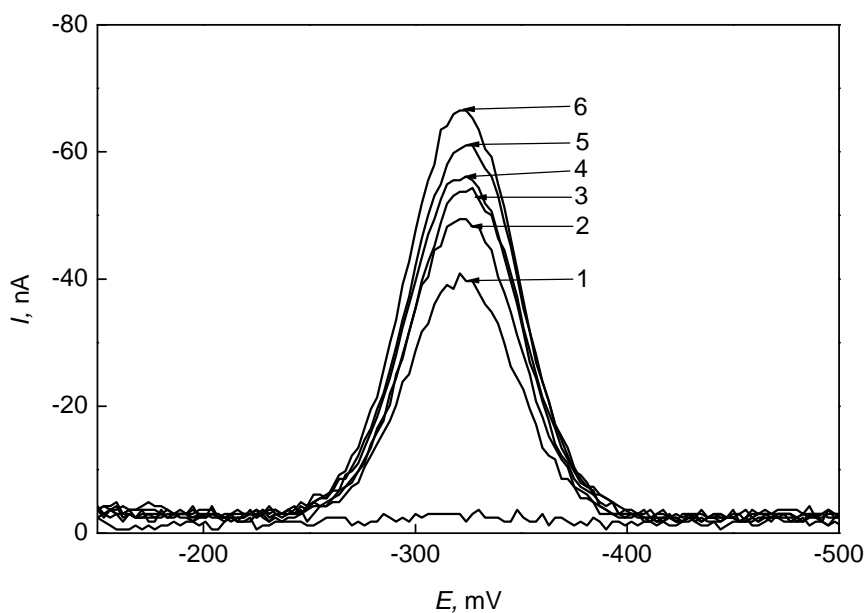
Pro možnost získání nižších mezí stanovitelnosti byla použita metoda adsorpční rozpouštěcí voltametrie na rtuťové kapkové elektrodě, kdy byl nejprve hledán optimální potenciál akumulace (E_{ak}) při konstantní době akumulace (t_{ak}) 60 s, a poté při nalezeném optimálním potenciálu akumulace hledána optimální doba akumulace. Při proměřování roztoku 4-NI bylo postupováno tak, že bylo použito nejprve prostředí shodné s optimálním prostředím pro metodu DPV na HMDE, tj. BR pufr o pH 8,0 – methanol v poměru 9:1. Záznam základního elektrolytu byl proměřen bez akumulace ($t_{ak} = 0$ s). Poté byl zjišťován ideální potenciál akumulace pro roztok 4-NI o $c = 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v prostředí BR pufru o pH 8,0 – methanol (9:1), a to při konstantní době akumulace $t_{ak} = 60$ s. Proměřované potenciály akumulace byly -100 , -200 , -300 , -400 a -500 mV. Protože v tomto prostředí nedošlo k výrazné změně v nárůstu proudu píku odpovídajícího 4-NI, přistoupilo se k proměřování v prostředí kyselé složky BR pufru o pH 1,7 (nyní již bez cílené přítomnosti methanolu v základním elektrolytu). Opět byl proveden záznam základního elektrolytu bez akumulace ($t_{ak} = 0$ s). Potenciály akumulace byly proměřeny v rozsahu 0 až -700 mV. Jako optimální byl zvolen potenciál akumulace $E_{ak} = -400$ mV. Při tomto optimálním potenciálu akumulace byly dále proměřovány různé doby akumulace ($t_{ak} = 0, 15, 30, 60, 120, 180, 300, 600$ s), viz obr. 6.1. Závislost proudu píku na době akumulace je zobrazena na obr. 6.2. Optimální doba akumulace byla zvolena $t_{ak} = 240$ s. Roztoky 4-NI byly proměřovány metodou AdSV na HMDE při optimálním potenciálu akumulace -400 mV a době akumulace 240 s v koncentračním rozmezí $(1 - 10) \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (obr. 6.3, příslušná kalibrační závislost viz obr. 6.4) a v rozmezí $(1 - 10) \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (obr. 6.5, příslušná kalibrační závislost viz obr. 6.6). Parametry odpovídajících koncentračních závislostí jsou shrnuty v tabulce 6.I.



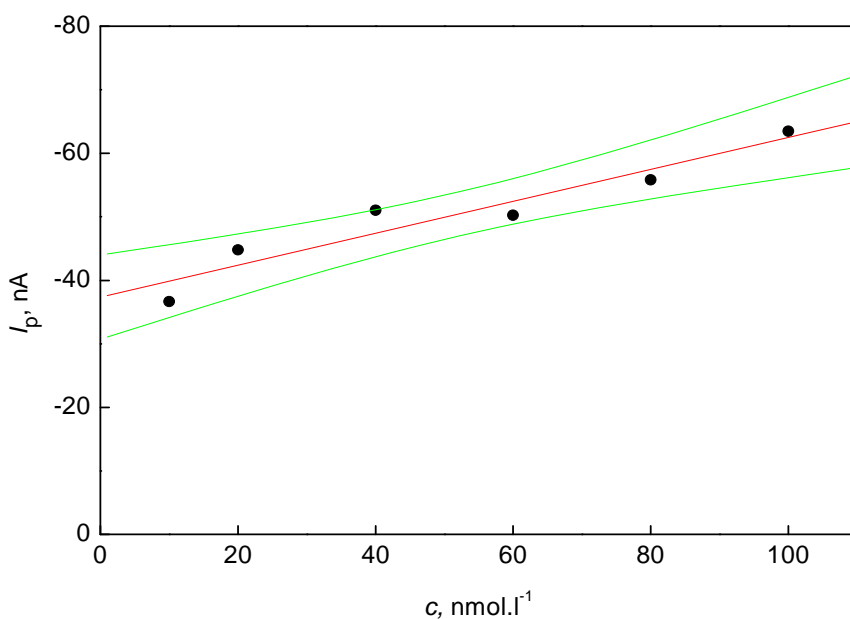
Obr. 6.1 Voltamogramy 4-NI ($c = 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$) měřené technikou AdSV na HMDE v prostředí kyselého složky BR pufru o pH 1,7 při $E_{\text{ak}} = -400 \text{ mV}$; zobrazeny hodnoty t_{ak} (s): 0 (1); 15 (2); 30 (3); 60 (4); 120 (5); 180 (6); 300 (7); 600 (8).



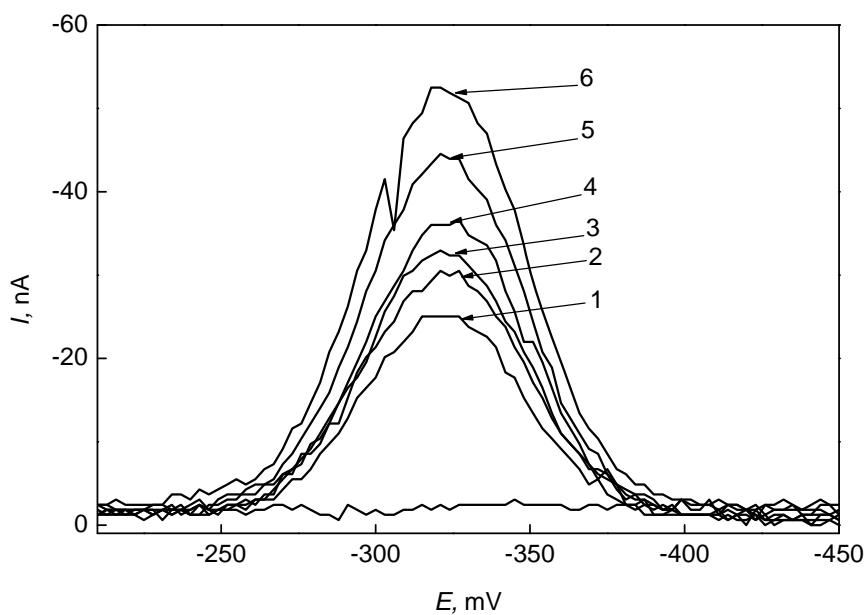
Obr. 6.2 Závislost proudu píku (I_p) 4-NI ($c = 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$) na době akumulace (t_{ak}), měřeno technikou AdSV na HMDE v prostředí kyselého složky BR pufru o pH 1,7 při $E_{\text{ak}} = -400 \text{ mV}$; zobrazeny závislosti I_p na t_{ak} ; ($t_{\text{ak}} = 0, 15, 30, 60, 120, 180, 300, 600 \text{ s}$).



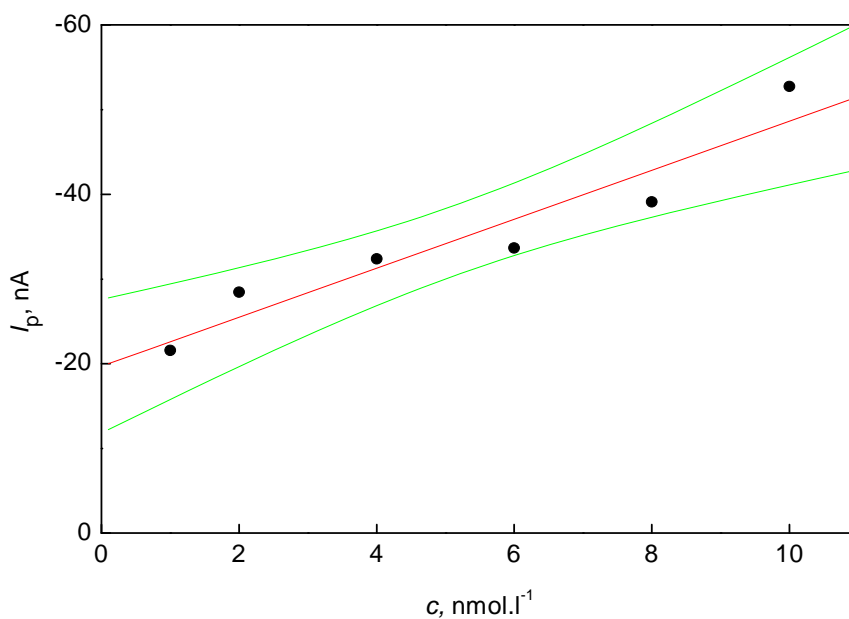
Obr. 6.3 Voltamogramy 4-NI měřené technikou AdSV na HMDE v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí kyselého složky BR pufru o pH 1,7; $E_{\text{ak}} = -400 \text{ mV}$; $t_{\text{ak}} = 240 \text{ s}$. Koncentrace 4-NI (mol l^{-1}): $1 \cdot 10^{-8}$ (1), $2 \cdot 10^{-8}$ (2), $4 \cdot 10^{-8}$ (3), $6 \cdot 10^{-8}$ (4), $8 \cdot 10^{-8}$ (5), $1 \cdot 10^{-7}$ (6); nečíslovaná černá křivka náleží základnímu elektrolytu.



Obr. 6.4 Závislost proudu píku I_p na koncentraci 4-NI v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$. Měřeno technikou AdSV na HMDE v prostředí kyselého složky BR pufru o pH 1,7; $E_{\text{ak}} = -400 \text{ mV}$; $t_{\text{ak}} = 240 \text{ s}$; ($n = 3$).



Obr. 6.5 Voltamogramy 4-NI měřené technikou AdSV na HMDE v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí kyselé složky BR pufru o pH 1,7; $E_{\text{ak}} = -400 \text{ mV}$; $t_{\text{ak}} = 240 \text{ s}$. Koncentrace 4-NI (mol l^{-1}): $1 \cdot 10^{-9}$ (1), $2 \cdot 10^{-9}$ (2), $4 \cdot 10^{-9}$ (3), $6 \cdot 10^{-9}$ (4), $8 \cdot 10^{-9}$ (5), $1 \cdot 10^{-8}$ (6); nečíslovaná černá křivka náleží základnímu elektrolytu.



Obr. 6.6 Závislost proudu píku I_p na koncentraci 4-NI v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$. Měřeno technikou AdSV na HMDE v prostředí kyselé složky BR pufru o pH 1,7; $E_{\text{ak}} = -400 \text{ mV}$; $t_{\text{ak}} = 240 \text{ s}$; ($n = 3$).

Tabulka 6.I

Parametry kalibračních přímek pro stanovení 4-NI metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufru o pH 1,7. Opakovatelnost měření nejnižší měřené koncentrace 4-NI v rámci jednoho vzorku je 9,90 % ($n = 10$).

Koncentrační rozmezí, mol l ⁻¹	Směrnice, nA nmol l ⁻¹	Úsek, nA	R ²	L _Q , nmol l ⁻¹
(2 – 10)·10 ⁻⁸	-0,3	-37,4	0,9108	—
(2 – 10)·10 ⁻⁹	-2,9	-19,7	0,9052	7,0

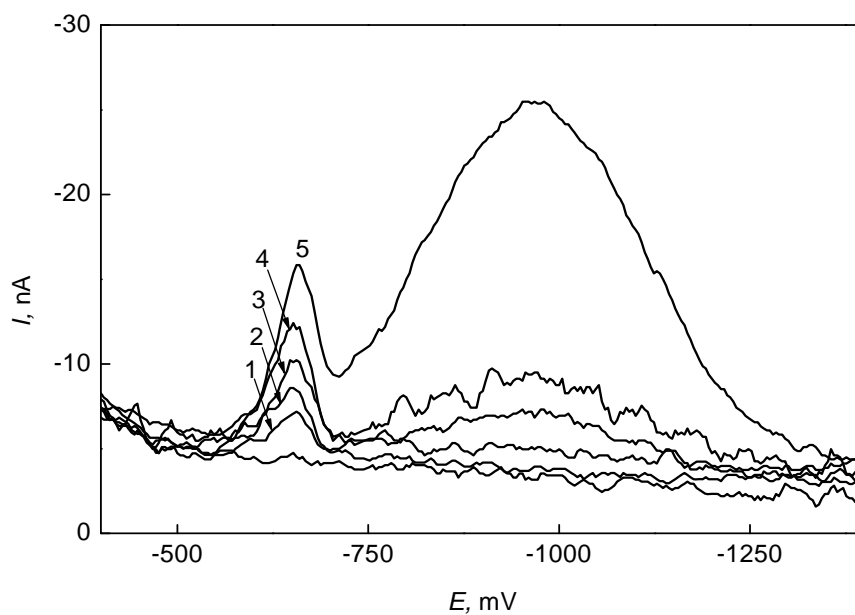
Ze získaných dat se jeví metoda AdSV jako metoda méně využitelná pro měření 4-NI v koncentračních řádech 10⁻⁹ a 10⁻⁸ mol l⁻¹, především díky nelinearitě měření. Navíc získané závislosti napovídají (především z pohledu vysoké hodnoty získaných úseků koncentračních závislostí), že by se místo domnělého akumulování 4-NI na povrch HMDE, mohlo jednat i o konkurenční akumulování elektrochemicky aktivních nečistot z methanolu ze zásobního roztoku. Ten se v proměřovaných koncentračních řádech vyskytuje v přibližně stejném množství. Proměřované roztoky byly připravovány ze dvou zásobních roztoků, pro každý řád o jiné koncentraci, a tudíž byl odpipetován stejný objem do 10ml odměrné baňky při jejich ředění na požadovanou koncentraci. Tím se teoreticky přibližně stejné množství methanolu vyskytovalo vždy ve dvojicích koncentrací, např. 2·10⁻⁹ a 2·10⁻⁸ mol l⁻¹. Této skutečnosti napovídá i ten fakt, že při proměřování základních elektrolytů odezva nečistoty přítomná nebyla, zatímco po přidání odpovídajícího množství methanolu (10 μl) bylo možné na AdS voltamogramech pozorovat zvýšení odezvy při potenciálech blízkých potenciálu píků 4-NI.

7. Stanovení 4-nitroindanu v modelových vzorcích pitné a říční vody

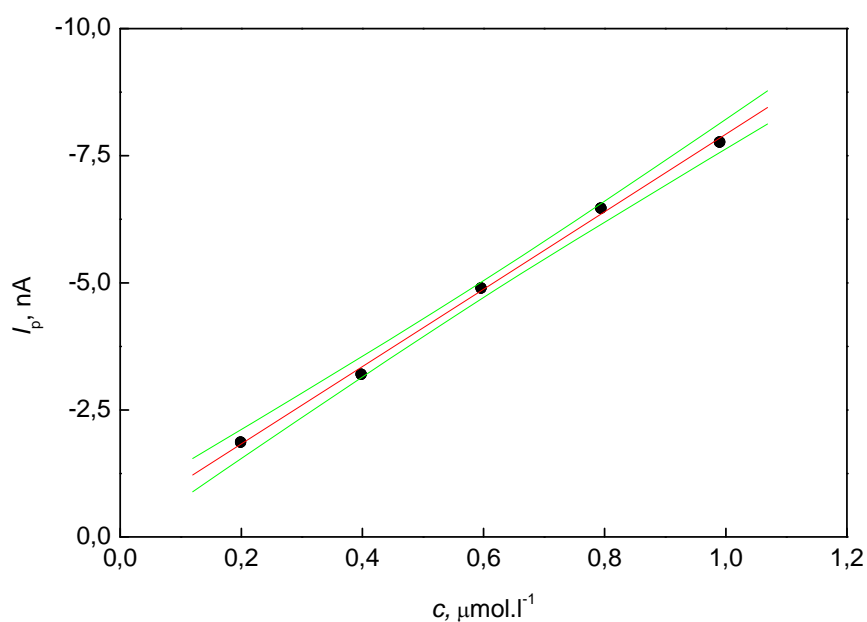
Stanovení 4-NI v modelových vzorcích pitné a říční vody byla prováděna metodami, které při hledání optimálních podmínek při stanovení v prostředích BR pufru a methanolu vykazovaly nižší meze stanovitelnosti, tj. pulsní polarografická a voltametrická technika. Optimální podmínky, zejména pH BR pufru, byly použity i pro vodná prostředí. Pro stanovení 4-NI v říční vodě byla použita voda z potoku Botič (Praha Hostivař), která byla zbavena hrubých nečistot přefiltrováním přes filtrační papír. Jako pitná voda byla použita voda z vodovodu v budově Chemického ústavu PŘF UK Praha.

7.1 Stanovení 4-NI metodou DPP na DME v modelových vzorcích pitné a říční vody

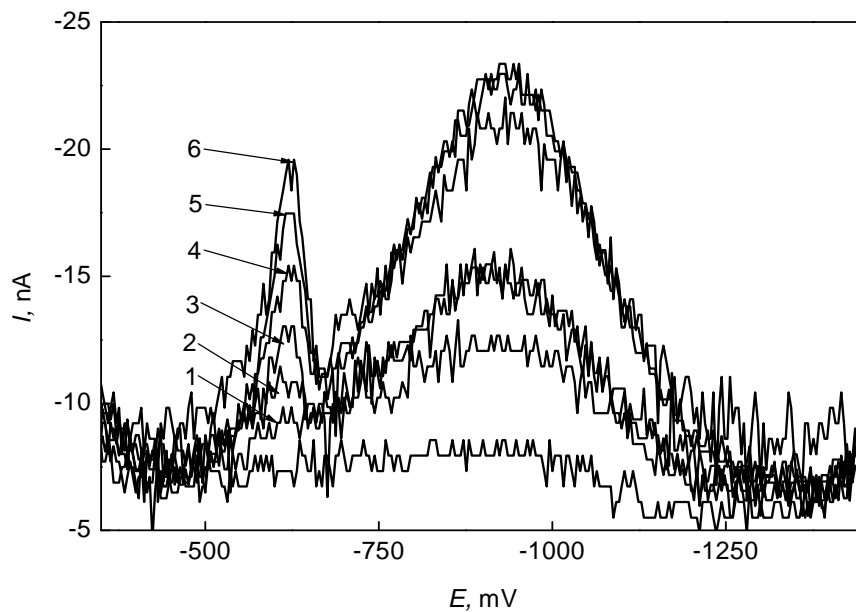
Stanovení 4-NI metodou DPP na DME v pitné a říční vodě bylo prováděno pomocí standardních přídavek (zásobní roztok 4-NI o $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$), kde byl základní elektrolyt tvořen 1 ml BR pufru o pH 12,0 a 100 μl 0,1 mol l^{-1} roztoku chelatonu III (pro pitnou vodu) nebo 1 ml 0,01 mol l^{-1} roztokem NaOH (pro říční vodu) a doplněn do 10 ml příslušnou vodou. Polarografickým měřením byly získány kalibrační závislosti v koncentračním rozmezí $(2 - 100) \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$. Kalibrační závislosti jsou lineární v celém měřeném rozsahu, parametry kalibračních přímek jsou uvedeny v tabulce 7.1.I. Na obr. 7.1.1 je uveden polarogram rozmezí nejnižšího koncentračního řádu $(2 - 10) \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ naměřeného technikou DPP na DME v pitné vodě (odezva kolem potenciálu -900 mV pravděpodobně odpovídá ve vodě přítomnému anorganickému zinku ve formě Zn^{2+} iontů). Příslušná kalibrační přímka je zobrazena na obr. 7.1.2. Na obr. 7.1.3 je zobrazen nejnižší naměřený koncentrační řád $(2 - 10) \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ technikou DPP na DME v říční vodě. Příslušná kalibrační přímka je zobrazena na obr. 7.1.4.



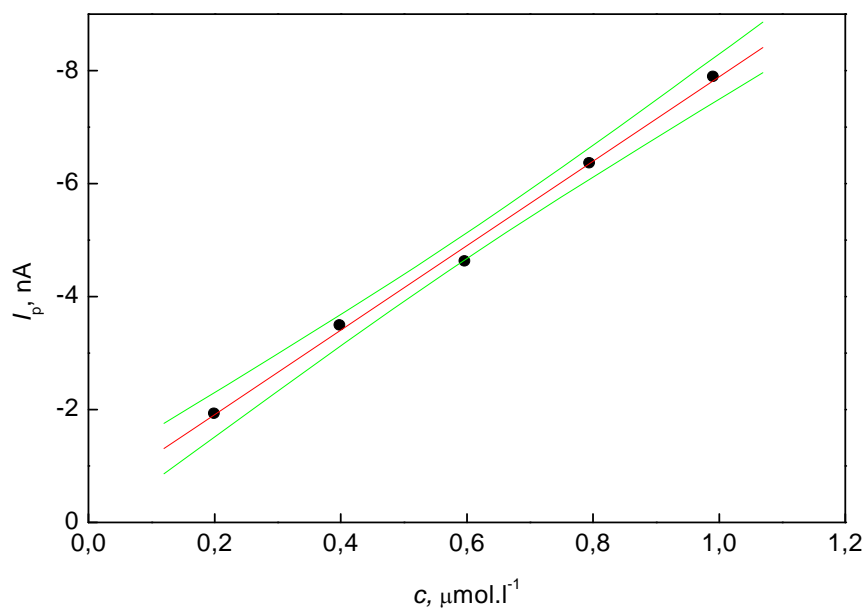
Obr. 7.1.1 Polarogramy 4-NI měřené technikou DPP na DME v rozmezí koncentrací $2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí BR pufru o pH 12,0 – pitná voda (1:9). Koncentrace 4-NI (mol l^{-1}): $2 \cdot 10^{-7}$ (1), $4 \cdot 10^{-7}$ (2), $6 \cdot 10^{-7}$ (3), $8 \cdot 10^{-7}$ (4), $1 \cdot 10^{-6}$ (5); nečíslovaná černá křivka náleží základnímu elektrolytu.



Obr. 7.1.2 Závislost proudu píku I_p na koncentraci 4-NI v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. Měřeno technikou DPP na DME v prostředí BR pufr o pH 12,0 – pitná voda (1:9). Konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti 0,05 ($n = 3$).



Obr. 7.1.3 Polarogramy 4-NI měřené technikou DPP na DME v rozmezí koncentrací $2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí 0,01M NaOH – říční voda (1:9). Koncentrace 4-NI (mol l^{-1}): $2 \cdot 10^{-7}$ (1), $4 \cdot 10^{-7}$ (2), $6 \cdot 10^{-7}$ (3), $8 \cdot 10^{-7}$ (4), $1 \cdot 10^{-6}$ (5); nečíslovaná černá křivka náleží základnímu elektrolytu.



Obr. 7.1.4 Závislost proudu píku I_p na koncentraci 4-NI v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. Měřeno technikou DPP na DME v prostředí 0,01M NaOH – říční voda (1:9). Konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti 0,05 ($n = 3$).

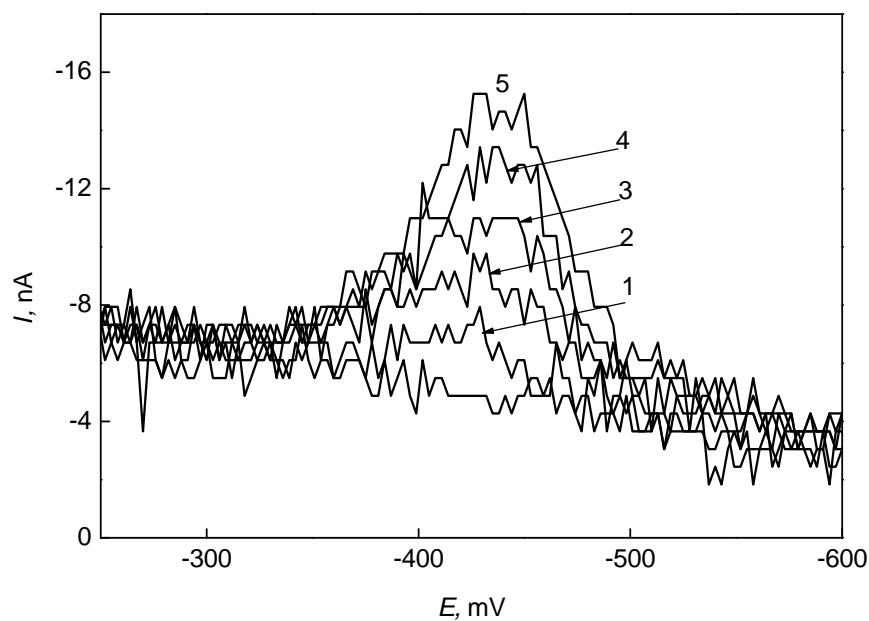
Tabulka 7.1.I

Parametry kalibračních přímek pro stanovení 4-NI v pitné vodě metodou DPP na DME v prostředí BR pufru o pH 12,0 – pitná voda (1:9) a metodou DPP na DME v prostředí 0,01M NaOH – říční voda (1:9). Opakovatelnost měření nejnižší měřené koncentrace 4-NI v rámci jednoho vzorku (DPP, pitná voda) je 5,84 % a (DPP, říční voda) je 7,84 % ($n = 10$).

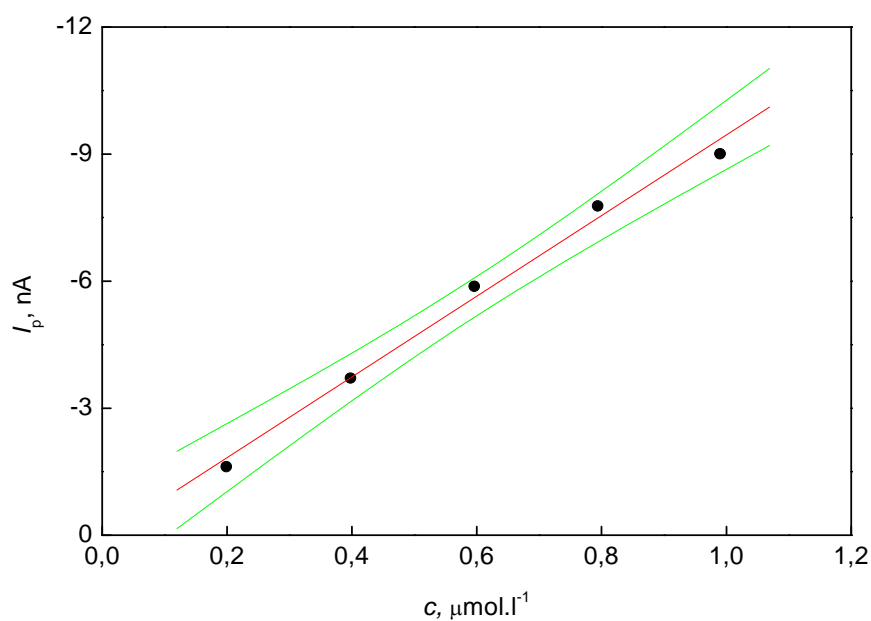
Koncentrační rozmezí, mol l^{-1}	Metoda	Prostředí	Směrnice, mA l mol^{-1}	Úsek, nA	R^2	L_Q , $\mu\text{mol l}^{-1}$
$(2 - 10) \cdot 10^{-6}$	DPP na DME	BR pufr pH 12,0 – pitná voda (1:9)	-7,2	-2,9	0,9988	—
$(2 - 10) \cdot 10^{-7}$			-7,6	-0,3	0,9981	0,1
$(2 - 10) \cdot 10^{-6}$	DPP na DME	0,01 mol l^{-1} NaOH – říční voda (1:9)	-8,8	1,8	0,9996	—
$(2 - 10) \cdot 10^{-7}$			-7,4	-0,4	0,9965	0,2

7.2 Stanovení 4-NI metodou DPV na HMDE v modelových vzorcích pitné a říční vody

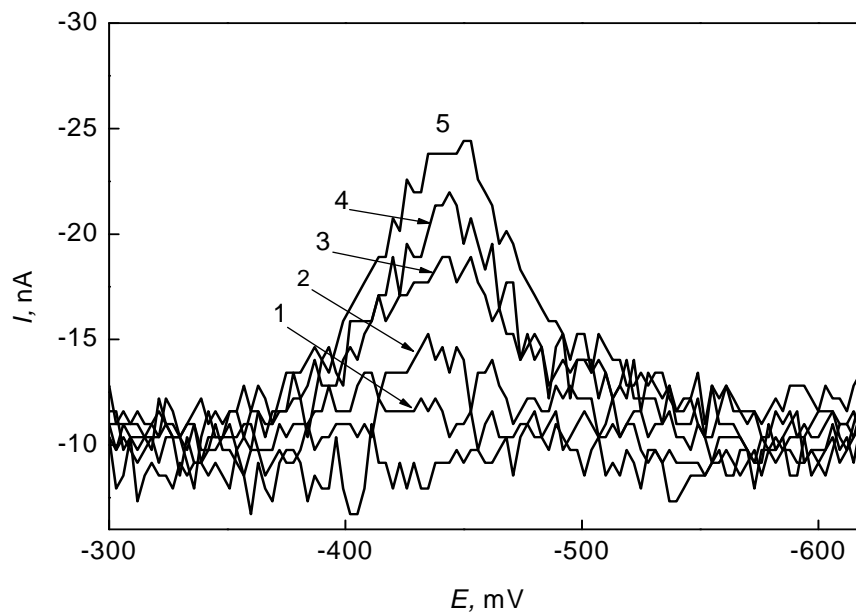
Stanovení 4-NI metodou DPV na HMDE v pitné a říční vodě bylo prováděno pomocí standardních přídavek (zásobní roztok 4-NI o $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$), kde byl základní elektrolyt tvořen 1 ml BR pufru o pH 8,0; dále 100 μl 0,1 mol l^{-1} roztoku chelatonu III a doplněn do 10 ml pitnou nebo říční vodou. Voltametričnými měřeními byly získány kalibrační závislosti v koncentračním rozmezí $(2 - 100) \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$. Kalibrační závislosti jsou lineární v celém měřeném rozsahu, parametry kalibračních přímk jsou uvedeny v tabulce 7.2.I. Na obr. 7.2.1 je uveden voltamogram nejnižšího naměřeného koncentračního rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ metodou DPV na HMDE v pitné vodě. Příslušná kalibrační přímka je uvedena na obr. 7.2.2. Na obr. 7.2.3 je uveden voltamogram rozmezí nejnižšího naměřeného koncentračního řádu $(2 - 10) \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ metodou DPV na HMDE v říční vodě. Příslušná kalibrační přímka je uvedena na obr. 7.2.4.



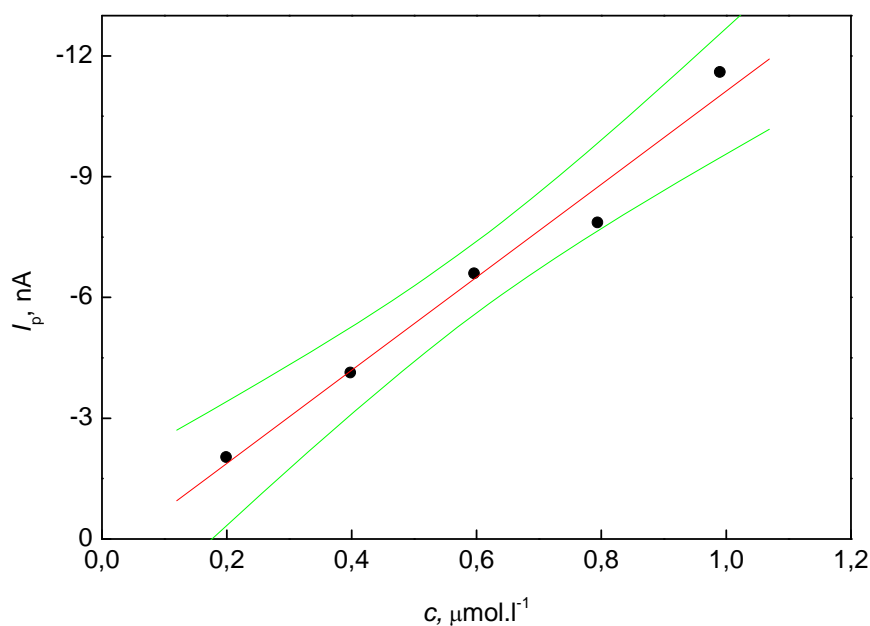
Obr. 7.2.1 Voltamogramy 4-NI měřené technikou DPV na HMDE v rozmezí koncentrací $2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí BR pufr o pH 8,0 – pitná voda (1:9). Koncentrace 4-NI (mol l^{-1}): $2 \cdot 10^{-7}$ (1), $4 \cdot 10^{-7}$ (2), $6 \cdot 10^{-7}$ (3), $8 \cdot 10^{-7}$ (4), $1 \cdot 10^{-6}$ (5); nečíslovaná černá křivka náleží základnímu elektrolytu.



Obr. 7.2.2 Závislost proudu píku I_p na koncentraci 4-NI v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. Měřeno technikou DPV na HMDE v prostředí BR pufr o pH 8,0 – pitná voda (1:9). Konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti 0,05 ($n = 3$).



Obr. 7.2.3 Voltamogramy 4-NI měřené technikou DPV na HMDE v rozmezí koncentrací $2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí BR pufr o pH 8,0 – říční voda (1:9). Koncentrace 4-NI (mol l^{-1}): $2 \cdot 10^{-7}$ (1), $4 \cdot 10^{-7}$ (2), $6 \cdot 10^{-7}$ (3), $8 \cdot 10^{-7}$ (4), $1 \cdot 10^{-6}$ (5); nečíslovaná černá křivka náleží základnímu elektrolytu.



Obr. 7.2.4 Závislost proudu píku I_p na koncentraci 4-NI v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. Měřeno technikou DPV na HMDE v prostředí BR pufr o pH 8,0 – říční voda (1:9). Konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti 0,05 ($n = 3$).

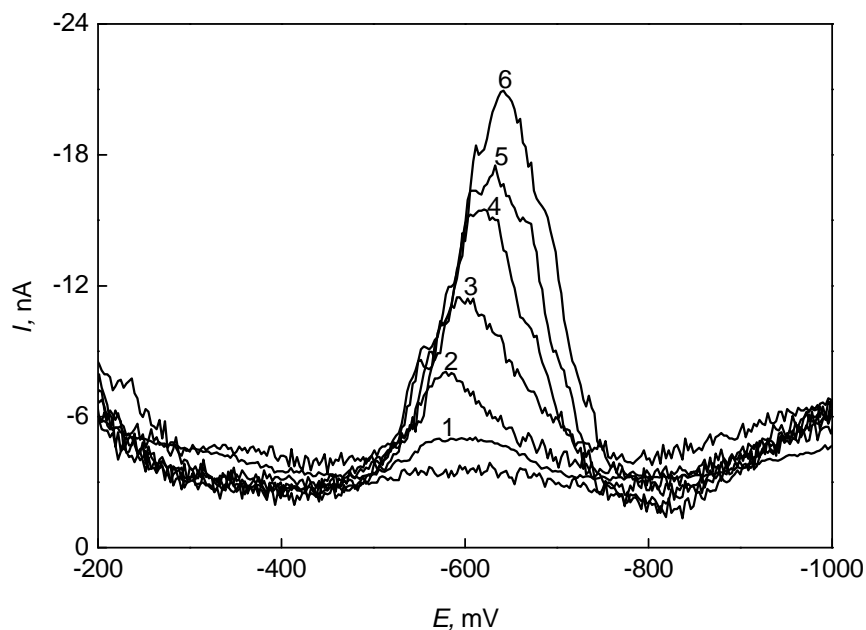
Tabulka 7.2.I

Parametry kalibračních přímk pro stanovení 4-NI v pitné vodě metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufru o pH 8,0 – pitná voda (1:9) a metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufru o pH 8,0 – říční voda (1:9). Opakovatelnost měření nejnižší měřené koncentrace 4-NI v rámci jednoho vzorku (DPV, pitná voda) je 3,94 % a (DPV, říční voda) je 18,72 % ($n = 10$).

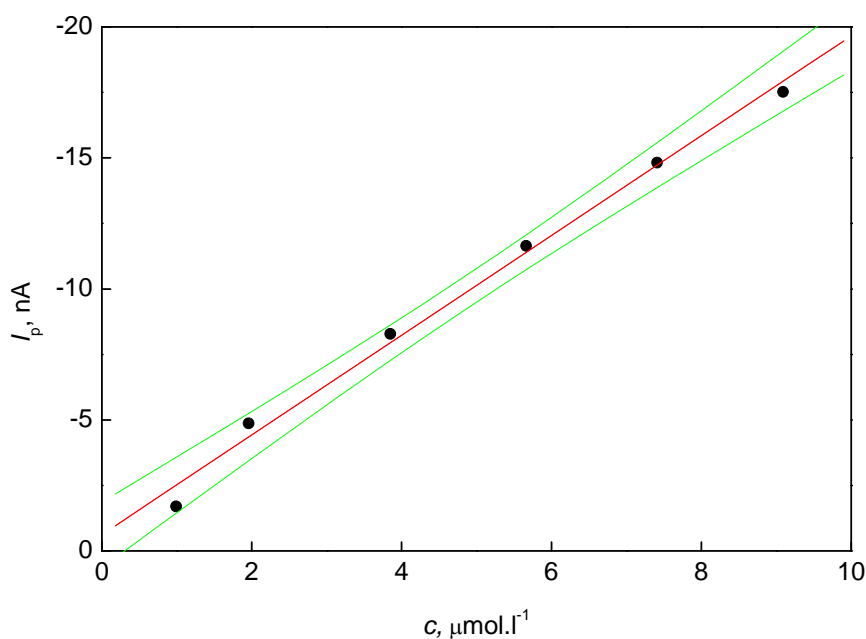
Koncentrační rozmezí, mol l^{-1}	Metoda	Prostředí	Směrnice, mA l mol^{-1}	Úsek, nA	R^2	L_Q , $\mu\text{mol l}^{-1}$
$(2 - 10) \cdot 10^{-6}$	DPV na HMDE	BR pufr pH 8,0 – pitná voda (1:9)	-13,5	0,2	0,9898	—
$(2 - 10) \cdot 10^{-7}$			-9,5	0,1	0,9911	0,07
$(2 - 10) \cdot 10^{-6}$	DPV na HMDE	BR pufr pH 8,0 – říční voda (1:9)	-7,2	-2,9	0,9988	—
$(2 - 10) \cdot 10^{-7}$			-11,6	0,4	0,9781	0,3

7.3 Stanovení 4-NI metodou DPV na m-AgSAE v modelových vzorcích pitné a říční vody

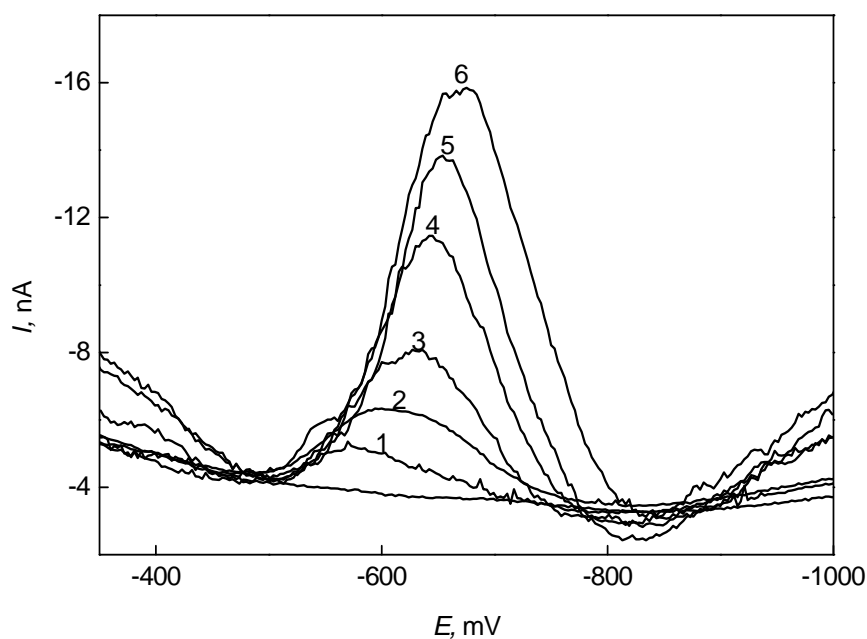
Pro stanovení 4-NI v modelových vzorcích pitné a říční vody byla použita pulsní voltametrická metoda na m-AgSAE. Bylo měřeno v prostředí s BR pufrům o stejném pH, jaké bylo zvoleno za optimální při stanovování 4-NI metodou DPV na m-AgSAE. Stanovení metodou DPV na m-AgSAE v pitné a říční vodě bylo prováděno pomocí standardních přídavek (zásobní roztok 4-NI o $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$), kde byl základní elektrolyt tvořen 1 ml BR pufru o pH 9,0; dále 100 μl 0,1 mol l^{-1} roztoku chelatonu III a doplněn do 10 ml příslušnou vodou. Chelaton III byl použit, aby se zabránilo znehodnocování měření případnými nečistotami a elektrochemicky aktivními kationty solí. Pro regeneraci povrchu pracovní elektrody byly použity stejné regenerační potenciály jako u metody vyvinuté v kapitole 4.2, tedy $E_{1,\text{reg}} = -300 \text{ mV}$ a $E_{2,\text{reg}} = -1300 \text{ mV}$. Voltametrickými měřeními byly získány kalibrační závislosti v koncentračním rozmezí $(1 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. Kalibrační závislosti jsou lineární v celém měřeném rozsahu, parametry kalibračních přímek jsou uvedeny v tabulce 7.3.I. Na obr. 7.3.1 je uveden voltamogram nejnižšího naměřeného koncentračního řádu $(1 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ metodou DPV na m-AgSAE v pitné vodě. Příslušná kalibrační přímka je uvedena na obr. 7.3.2. Na obr. 7.3.3 je uveden voltamogram nejnižšího naměřeného koncentračního řádu $(1 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ metodou DPV na m-AgSAE v říční vodě. Příslušná kalibrační přímka je uvedena na obr. 7.3.4.



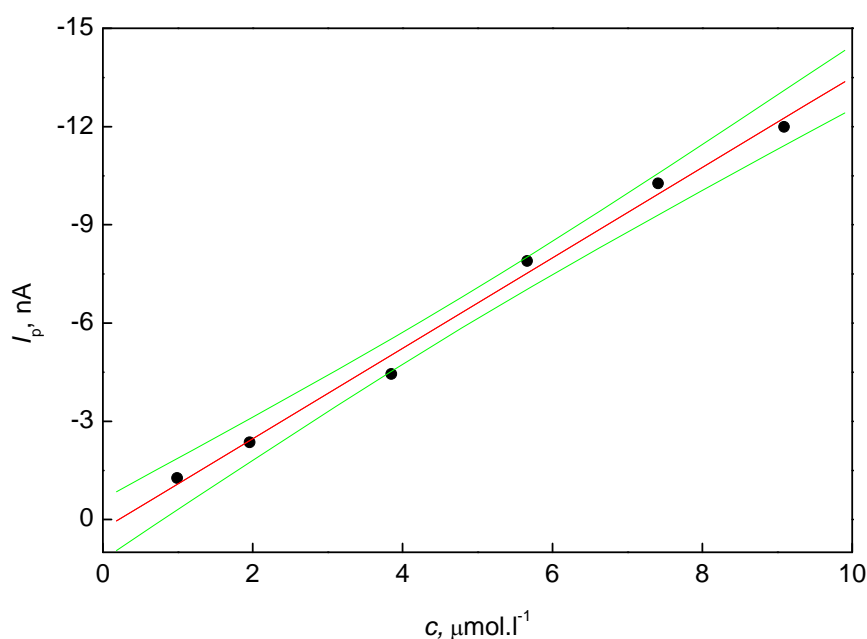
Obr. 7.3.1 Voltamogramy 4-NI měřené technikou DPV na m-AgSAE v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí BR pufr o pH 9,0 – pitná voda (1:9). Koncentrace 4-NI (mol l^{-1}): $1 \cdot 10^{-6}$ (1), $2 \cdot 10^{-6}$ (2), $4 \cdot 10^{-6}$ (3), $6 \cdot 10^{-6}$ (4), $8 \cdot 10^{-6}$ (5), $1 \cdot 10^{-5}$ (6); nečíslovaná černá křivka náleží základnímu elektrolytu.



Obr. 7.3.2 Závislost proudu píku I_p na koncentraci 4-NI v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Technika DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufr o pH 9,0 – pitná voda (1:9). Konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti 0,05 ($n = 3$).



Obr. 7.3.3 Voltamogramy 4-NI měřené technikou DPV na m-AgSAE v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí BR pufr o pH 9,0 – říční voda (1:9). Koncentrace 4-NI (mol l^{-1}): $1 \cdot 10^{-6}$ (1), $2 \cdot 10^{-6}$ (2), $4 \cdot 10^{-6}$ (3), $6 \cdot 10^{-6}$ (4), $8 \cdot 10^{-6}$ (5), $1 \cdot 10^{-5}$ (6); nečíslovaná černá křivka náleží základnímu elektrolytu.



Obr. 7.3.4 Závislost proudu píku I_p na koncentraci 4-NI v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Technika DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufr o pH 9,0 – říční voda (1:9). Konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti 0,05 ($n = 3$).

Tabulka 7.3.I

Parametry kalibračních přímek pro stanovení 4-NI v pitné vodě metodou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 9,0 – pitná voda (1:9) a metodou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 9,0 – říční voda (1:9). Opakovatelnost měření nejnižší měřené koncentrace 4-NI v rámci jednoho vzorku (DPV, pitná voda) je 11,9 % a (DPV, říční voda) je 3,7 % ($n = 10$).

Koncentrační rozmezí, mol l^{-1}	Metoda	Prostředí	Směrnice, mA l mol^{-1}	Úsek, nA	R^2	L_Q , $\mu\text{mol l}^{-1}$
$(1 - 10) \cdot 10^{-6}$	DPV na m-AgSAE	BR pufr pH 9,0 – pitná voda (1:9)	-1,9	0,6	0,9930	1,0
$(1 - 10) \cdot 10^{-6}$	DPV na m-AgSAE	BR pufr pH 9,0 – říční voda (1:9)	-1,4	0,3	0,9927	2,0

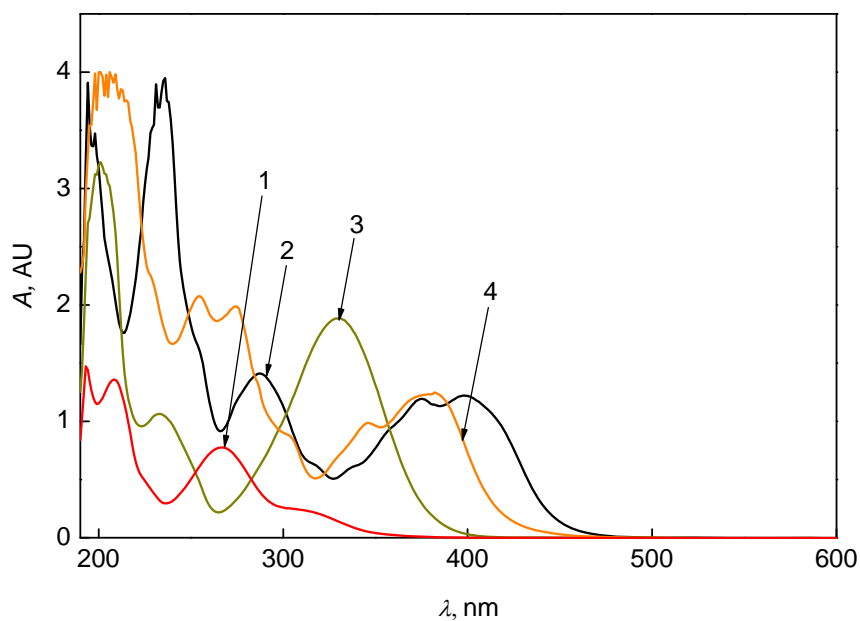
8. Vysokoučinná kapalinová chromatografie 4-nitroindanu s UV-VIS detekcí

8.1 Vliv složení mobilní fáze na HPLC chromatogramy

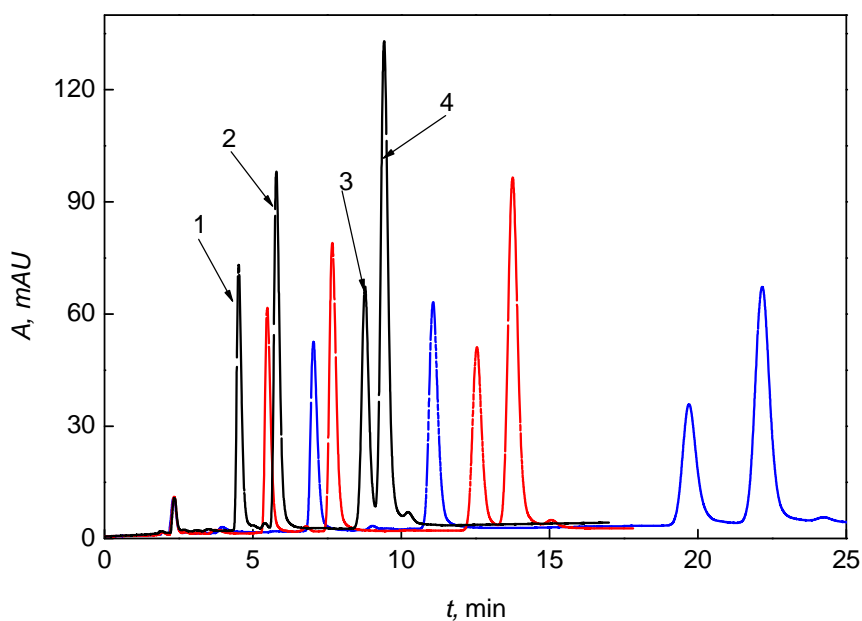
Nejprve byl sledován vliv složení mobilní fáze, tj. poměr methanolicke a vodné složky na chování směsi 4-NI, 1-NP, 2-NF, 3-NFA (všechny o $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) při HPLC s UV-VIS detekcí. Měření byla prováděna v prostředí methanol – vodná složka (pufr) o různých objemových poměrech (90:10, 85:15 a 80:20), kde pH vodné složky bylo 3,0 a 7,0 pro fosfátový pufr a 4,8 pro acetátový pufr. Tato měření byla prováděna při zvolené průtokové rychlosti 1 ml min^{-1} a při zvolené konstantní vlnové délce detekce (λ_{det}) 210 nm. Vlnová délka 210 nm byla zvolena s ohledem na požadavek, kdy při dané vlnové délce musí absorbovat všechny látky ve směsi pokud možno co nejvíce. UV-VIS absorpční spektra všech čtyř látek jsou ukázána na obr. 8.1.1. Příslušné chromatogramy pro vodnou složku o pH 7,0 jsou znázorněny na obr. 8.1.2.

Dále byl proměřován vliv průtokové rychlosti na chromatogram směsi v prostředí methanol – pufr (85:15), o pH pufru postupně 3,0; 4,8 a 7,0, opět při zvolené vlnové délce 210 nm. Průtokové rychlosti byly zvoleny 0,5; 0,7; 1,0; 1,2 a 1,4 ml min^{-1} . Závislost retenčních časů na průtokové rychlosti pro prostředí o pH pufru 4,8 je zobrazena na obr. 8.1.3.

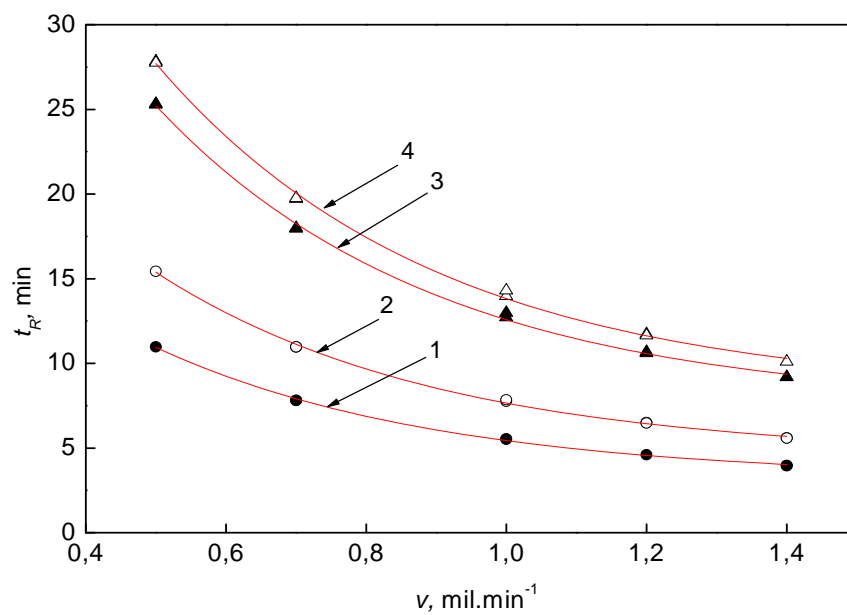
Ze záznamů HPLC měření s UV-VIS detekcí je zřejmé, že se vzrůstajícím objemem organického modifikátoru, tj. methanolu, jsou látky eluovány dříve. Stejný efekt má na zkracování retenčních časů i zvyšování průtokové rychlosti. Naproti tomu pH vodné složky prostředí měření nijak zásadně neovlivňovalo. Tato měření byla prováděna jako předpříprava pro HPLC s elektrochemickou detekcí pomocí stříbrné pevné amalgámové elektrody v tzv. „thin-layer“ uspořádání, které bude věnována pozornost v navazujícím výzkumu této problematiky.



Obr. 8.1.1 Absorpční spektra roztoků 4-NI (1), 1-NP (2), 2-NF (3), 3-NFA (4) (všechny roztoky o $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$) v methanolu. Proměřováno proti methanolu v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 0,1 cm.



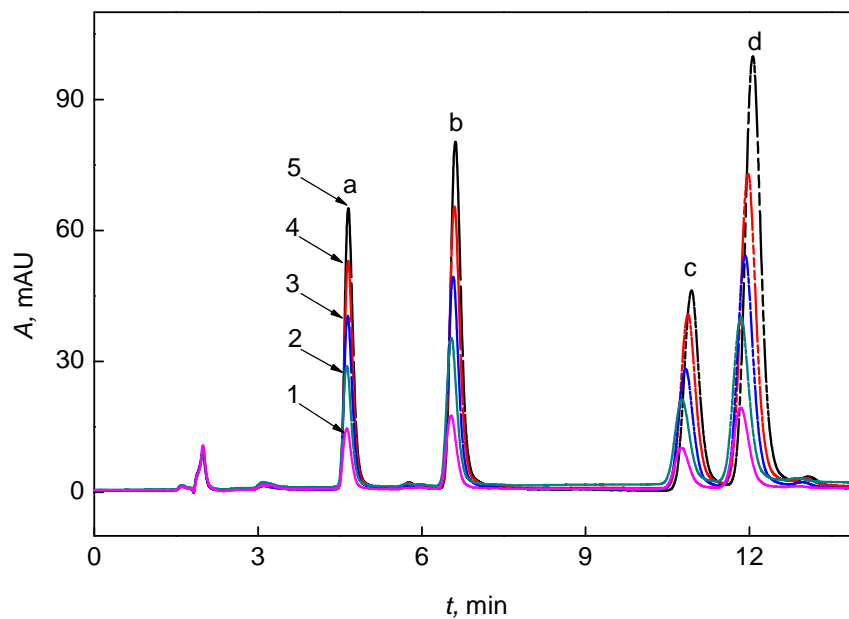
Obr. 8.1.2 Chromatogramy směsi 4-NI (1), 1-NP (3), 2-NF (2), 3-NFA (4) (všechny látky o $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) měřené technikou HPLC s UV-VIS detekcí v prostředí mobilní fáze methanol – fosfátový pufr o pH 7,0; průtoková rychlost 1 ml.min^{-1} , $\lambda_{\text{det}} = 210 \text{ nm}$; zobrazeny poměry methanolicke a vodné složky 90:10 (černá); 85:15 (červená); 70:20 (modrá).



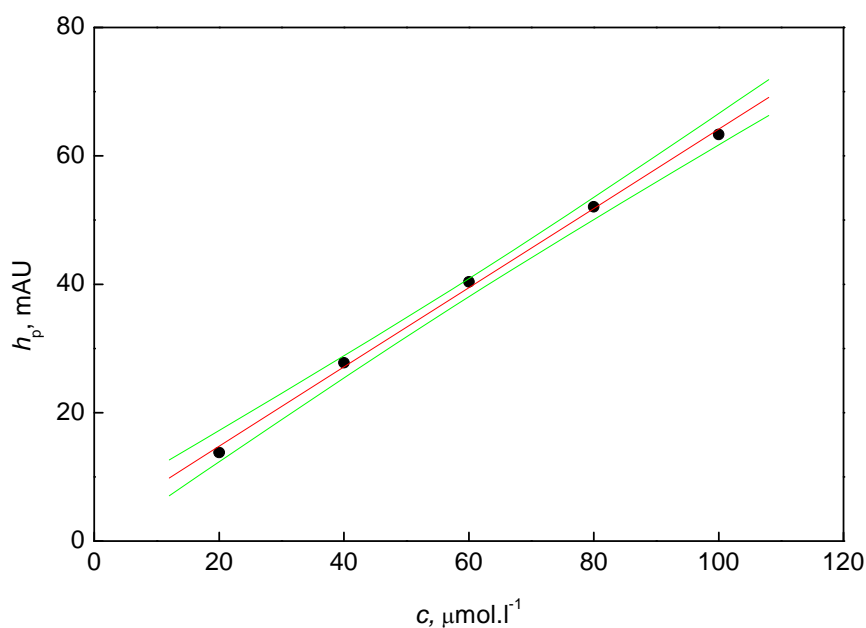
Obr. 8.1.3 Závislost retenčních časů (t_R) 4-NI (1), 1-NP (3), 2-NF (2), 3-NFA (4) na průtokové rychlosti (v). Měřeno technikou HPLC s UV-VIS detekcí v prostředí methanol – pufr (85:15), pH acetátového pufru 4,8; $\lambda_{det} = 210$ nm. Proměřované průtokové rychlosti: 0,5; 0,7; 1,0; 1,2 a 1,4 ml·min⁻¹; ($n = 2$).

8.2 Stanovení 4-nitroindanu ve směsi s 1-nitropyrenem, 2-nitrofluorenem a 3-nitrofluoranthemem metodou HPLC s UV-VIS detekcí

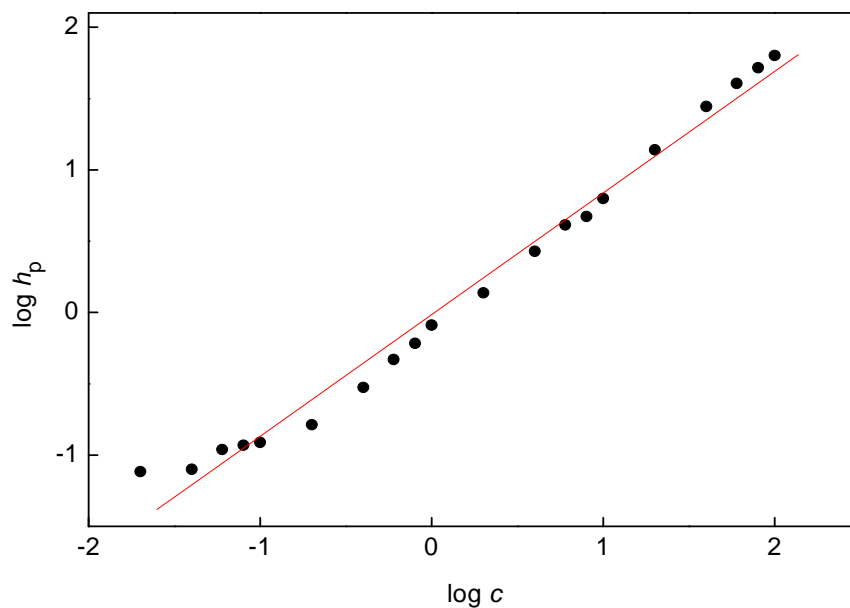
Stanovení 4-NI ve směsi spolu s dalšími NPAHy metodou HPLC s UV-VIS detekcí bylo prováděno v mobilní fázi obsahující HPLC methanol a acetátový pufr o pH 4,8 v poměru 85:15, při zvolené průtokové rychlosti $1,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a vlnové délce 210 nm. Proměřované roztoky o příslušných koncentracích byly připravovány přesným ředěním zásobních roztoků (zásobní roztoky o $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) methanolem pro HPLC měření a dávkovány pomocí 20 μl dávkovací smyčky. Chromatografickými měřeními byly získány kalibrační závislosti v koncentračních rozmezích $(2 - 10) \cdot 10^{-5}$, $(2 - 10) \cdot 10^{-6}$, $(2 - 10) \cdot 10^{-7}$ a $(2 - 10) \cdot 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Parametry kalibračních přímek všech NPAHů (4-NI, 1-NP, 2-NF a 3-NFA) přes celé proměřované koncentrační rozmezí jsou uvedeny v tabulce 8.2.I. Parametry kalibračních přímek pro jednotlivé koncentrační řády 4-NI jsou uvedeny v tabulce 8.2.II. Na obr. 8.2.1 je uveden chromatogram nejvyššího naměřeného koncentračního řádu $(2 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ metodou HPLC s UV-VIS detekcí. Příslušná kalibrační přímka pro 4-NI je uvedena na obr. 8.2.2. Dále byla provedena logaritmická analýza kalibračních závislostí. Závislost logaritmu výšky píku 4-NI na logaritmu koncentrace je uvedena na obr. 8.2.3 a logaritmická závislost plochy píku 4-NI na koncentraci je uvedena na obr. 8.2.4.



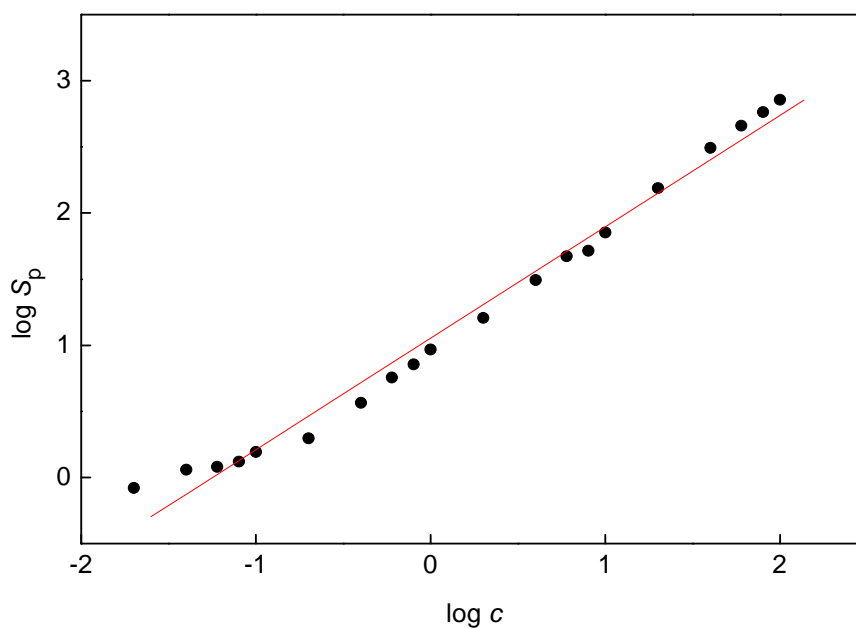
Obr. 8.2.1 Chromatogramy 4-NI (a) ve směsi s 1-NP (c), 2-NF (b) a 3-NFA (d). Technika HPLC s UV-VIS detekcí, mobilní fáze: methanol – acetátový pufr pH 4,8 (85:15), $v = 1,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $\lambda_{\text{det}} = 210 \text{ nm}$; v rozmezí koncentrací $2\cdot 10^{-5} - 1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Koncentrace látek ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$): $2\cdot 10^{-5}$ (1), $4\cdot 10^{-5}$ (2), $6\cdot 10^{-5}$ (3), $8\cdot 10^{-5}$ (4), $1\cdot 10^{-4}$ (5).



Obr. 8.2.2 Závislost výšky píku na koncentraci 4-NI v koncentračním rozmezí $2\cdot 10^{-5} - 1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Měřeno technikou HPLC s UV-VIS detekcí v prostředí mobilní fáze methanol – acetátový pufr pH 4,8 (85:15), $v = 1,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $\lambda_{\text{det}} = 210 \text{ nm}$. Konfidenční pásy jsou sestaveny na hladině významnosti 0,05 ($n = 3$).



Obr. 8.2.3 Závislost logaritmu výšky píku na logaritmu koncentrace 4-NI v celém proměřovaném koncentračním rozmezí ($2 \cdot 10^{-8} - 10 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$). Měřeno technikou HPLC s UV-VIS detekcí v prostředí mobilní fáze methanol – acetátový pufr pH 4,8 (85:15), $v = 1,2 \text{ ml min}^{-1}$, $\lambda_{\text{det}} = 210 \text{ nm}$.



Obr. 8.2.4 Závislost logaritmu plochy píku na logaritmu koncentrace 4-NI v celém proměřovaném koncentračním rozmezí ($2 \cdot 10^{-8} - 10 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$). Měřeno technikou HPLC s UV-VIS detekcí v prostředí mobilní fáze methanol – acetátový pufr pH 4,8 (85:15), $v = 1,2 \text{ ml min}^{-1}$, $\lambda_{\text{det}} = 210 \text{ nm}$.

Tabulka 8.2.I

Parametry kalibračních přímek pro stanovení 4-NI, 1-NP, 2-NF a 3-NFA v celém měřeném koncentračním rozsahu ($2 \cdot 10^{-8}$ – $10 \cdot 10^{-5}$ mol l⁻¹) metodou HPLC s UV-VIS detekcí v prostředí mobilní fáze methanol – acetátový pufr o pH 4,8 (85:15), průtoková rychlost 1,2 ml min⁻¹, $\lambda_{\text{det}} = 210$ nm. Opakovatelnost (počítána z $n = 10$) měření nejnižší měřené koncentrace 4-NI v rámci jednoho vzorku je 23,13 % pro výšku píku a 21,45 % pro plochu píku; pro 1-NP 14,30 % pro výšku a 13,53 % pro plochu píku; pro 2-NF 10,53 % pro výšku a pro plochu píku 13,46 %; pro 3-NFA 9,23 % pro výšku a 11,66 % pro plochu píku.

NPAH	Koncentrační rozmezí, mol l ⁻¹	Směrnice, ^a mAU·μmol l ⁻¹	Úsek, ^a mAU	R ²	L _Q , μmol l ⁻¹
4-NI	$2 \cdot 10^{-8}$ – $10 \cdot 10^{-5}$	0,6	0,2	0,9988	0,5
1-NP	$2 \cdot 10^{-8}$ – $10 \cdot 10^{-5}$	0,5	0,01	0,9984	0,2
2-NF	$2 \cdot 10^{-8}$ – $10 \cdot 10^{-5}$	0,8	0,04	0,9992	0,2
3-NFA	$2 \cdot 10^{-8}$ – $10 \cdot 10^{-5}$	0,9	–0,2	0,9973	0,1
NPAH	Koncentrační rozmezí, mol l ⁻¹	Směrnice, ^b mAU·s·μmol l ⁻¹	Úsek, ^b mAU·s	R ²	L _Q , μmol l ⁻¹
4-NI	$2 \cdot 10^{-8}$ – $10 \cdot 10^{-5}$	7,3	2,0	0,9989	0,4
1-NP	$2 \cdot 10^{-8}$ – $10 \cdot 10^{-5}$	9,5	0,02	0,9988	0,2
2-NF	$2 \cdot 10^{-8}$ – $10 \cdot 10^{-5}$	11,3	0,1	0,9994	0,2
3-NFA	$2 \cdot 10^{-8}$ – $10 \cdot 10^{-5}$	20,4	–3,2	0,9972	0,1

^a výška píku, ^b plocha píku

Tabulka 8.2.II

Parametry kalibračních přímek pro stanovení 4-NI metodou HPLC s UV-VIS detekcí v prostředí mobilní fáze methanol – acetátový pufr o pH 4,8 (85:15), průtoková rychlost $1,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, $\lambda_{\text{det}} = 210 \text{ nm}$. Opakovatelnost měření nejnižší měřené koncentrace 4-NI v rámci jednoho vzorku je 23,13 % ($n = 10$) pro výšku píku a pro plochu píku je 21,45 % ($n = 10$).

Koncentrační rozmezí, $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$	Směrnice, ^a $\text{mAU} \cdot \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$	Úsek, ^a mAU	R^2	L_Q , $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$
$(2 - 10) \cdot 10^{-5}$	0,6	2,5	0,9981	—
$(2 - 10) \cdot 10^{-6}$	0,6	0,3	0,9861	—
$(2 - 10) \cdot 10^{-7}$	0,8	-0,01	0,9973	—
$(2 - 10) \cdot 10^{-8}$	0,6	0,01	0,9064	0,5
Koncentrační rozmezí, $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$	Směrnice, ^b $\text{mAU} \cdot \text{s} \cdot \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$	Úsek, ^b mAU·s	R^2	L_Q , $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$
$(2 - 10) \cdot 10^{-5}$	6,7	25,3	0,9980	—
$(2 - 10) \cdot 10^{-6}$	6,6	4,1	0,9776	—
$(2 - 10) \cdot 10^{-7}$	9,0	0,1	0,9975	—
$(2 - 10) \cdot 10^{-8}$	8,1	0,7	0,9445	0,4

^a výška píku, ^b plocha píku

8.3 Shrnutí HPLC měření s UV-VIS detekcí

Jak již bylo zmíněno v úvodu, bylo HPLC stanovení s UV-VIS detekcí použito jako srovnávací metody k elektroanalytickým měřením. Cílem HPLC měření bylo nalézt optimální podmínky pro stanovení 4-nitroindanu ve směsi s dalšími nitrovanými polycyklickými aromatickými uhlovodíky, jako modelové látky byly vybrány 1-nitropyren, 2-nitrofluoren a 3-nitrofluoranthren, které řadíme mezi hlavní markery znečištění NPAHy. Optimální podmínky byly zvoleny s ohledem na celkovou dobu analýzy a velikosti signálu. Dosažená mez stanovitelnosti pro 4-NI činila $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ (vyhodnocování z výšky píku) a $4 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ (vyhodnocováno z plochy píku). Vypočtené hodnoty L_Q jsou vyšší než nejnižší měřená koncentrace 4-NI $2 \cdot 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$, což je dáno způsobem výpočtu L_Q , který je počítán z opakovatelnosti stanovení.

Logaritmickou analýzou nebyla prokázána linearita pro celkové rozmezí stanovovaných koncentrací; směrnice log-log závislosti (0,85 pro vyhodnocení z výšky píků a 0,84 pro vyhodnocení z plochy píků) neležely v předepsaném intervalu $<0,98; 1,02>$). Vyšší linearitu vykazuje směrnice logaritmické závislosti v rozmezí řádů 10^{-7} – $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, jejíž hodnoty jsou 0,96 (pro vyhodnocení z výšky píků) a 0,96 (pro vyhodnocení z plochy píků).

V dalších studiích 4-nitroindanu je uvažováno o použití HPLC metody s elektroanalytickou detekcí pomocí m-AgSAE v „thin-layer“ uspořádání, opět ve směsi se stejnými NPAHy. Tato alternativa by měla představovat dostatečně konkurenceschopnou náhradu (doplňk) k HPLC stanovení s UV-VIS detekcí.

9. Závěr

1. Bylo prostudováno elektrochemické chování 4-nitroindanu a za nalezených optimálních podmínek bylo provedeno jeho stanovení pomocí DC voltametrie (DCV) na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE) a na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě (m-AgSAE). Jako optimální prostředí pro DCV na HMDE bylo zvoleno prostředí methanol – BR pufr o pH 9,0 v poměru 9:1. Pro DCV na m-AgSAE bylo zvoleno optimální prostředí methanol – BR pufr o pH 5,0 v poměru 1:1, regenerační potenciály byly experimentálně zvoleny $E_{1,\text{reg}} = -200 \text{ mV}$, $E_{2,\text{reg}} = -1100 \text{ mV}$. Obě techniky byly použity pro stanovení 4-nitroindanu koncentračních rozmezích $1 \cdot 10^{-7}$ (popř. $2 \cdot 10^{-7}$) až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Vypočtené meze stanovitelnosti (L_Q) činily pro DCV na HMDE $0,07 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ a pro DCV na m-AgSAE $0,1 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$.
2. Dále byly vypracovány metody diferenční pulsní voltametrie (DPV) na HMDE a m-AgSAE (optimální prostředí pro DPV na HMDE: methanol – BR pufr o pH 8,0 v poměru 9:1; pro DPV na m-AgSAE: methanol – BR pufr o pH 9,0 v poměru 1:1 za použití regeneračních potenciálů $E_{1,\text{reg}} = -300 \text{ mV}$, $E_{2,\text{reg}} = -1300 \text{ mV}$). Proměřená koncentrační rozmezí byla stejná jako u DCV metod. Získané meze stanovitelnosti byly pro DPV metody shodné, $L_Q = 0,1 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$.
3. Metodou cyklické voltametrie na HMDE a m-AgSAE bylo zjištěno, že rychlost elektrodové reakce při redukci 4-nitroindanu je řízena příspěvkem difuze a adsorpce a reakce je ireverzibilní.
4. Adsorpční rozpouštěcí voltametrií (AdSV) na HMDE bylo proměřeno koncentrační rozmezí $1 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí kyselé složky BR pufru o pH 1,7; při potenciálu akumulace $E_{\text{ak}} = -400 \text{ mV}$ a době akumulace $t_{\text{ak}} = 240 \text{ s}$. Dosažená L_Q pro toto stanovení činila 7 nmol l^{-1} .
5. Bylo provedeno stanovení 4-nitroindanu za optimalizovaných podmínek v modelových vzorcích pitné a říční vody metodou diferenční pulsní polarografie

(DPP) na klasické rtuťové kapající elektrodě (DME) ($L_Q = 0,1 \mu\text{mol l}^{-1}$ pro pitnou vodu a $0,2 \mu\text{mol l}^{-1}$ pro říční vodu), metodou DPV na HMDE ($L_Q = 0,2 \mu\text{mol l}^{-1}$ pro pitnou vodu a $0,3$ pro říční vodu) a metodou DPV na m-AgSAE ($L_Q = 1,0 \mu\text{mol l}^{-1}$ pro pitnou vodu a $0,2 \mu\text{mol l}^{-1}$ pro říční vodu). Metody byly použity pro koncentrační rozmezí $1 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ (pro DPP na DME a DPV na HMDE) a $1 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ (pro DPV na m-AgSAE).

6. Dosažené meze stavitelnosti se u všech výše uvedených stanovení pohybují nejčastěji v řádu $10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ a jsou srovnatelné nebo nižší než mez stavitelnosti dosažená pomocí HPLC s UV-VIS spektrofotometrickou detekcí 4-nitroindanu ve směsi s 1-nitropyrenem, 2-nitrofluorenem a 3-nitrofluoranthemem. Tato měření byla prováděna na koloně KROMASIL ($250 \times 4,6 \text{ mm}$, $7 \mu\text{m}$) s reverzní fází C_{18} (Phenomenex, Torrance, CA, USA) při vlnové délce 210 nm v prostředí mobilní fáze methanol – acetátový pufr o pH 4,75 (85:15), průtoková rychlost $1,2 \text{ ml min}^{-1}$. Kalibrační křivky byly měřeny v koncentračním rozmezí od $2 \cdot 10^{-8}$ do $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. L_Q pro HPLC s UV-VIS detekcí činila $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ (vyhodnocení z výšky píků) a $4 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ (vyhodnocení z plochy píků).

10. Literatura

1. Mormile M. R., Suflita J. M.: *The toxicity of selected gasoline components to glucose methanogenesis by aquifer microorganisms*. *Anaerobe* 2 (1996):299-303.
2. Zielinska B., Samy S.: *Analysis of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons*. *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006):883-890.
3. Tsapakis M., Lagoudaki E., Stephanou E. G., Kavouras I. G., Koutrakis P., Oyola P., von Baer D.: *The composition and sources of PM_{2.5} organic aerosol in two urban areas of Chile*. *Atmos. Environ.* 36 (2002):3851-3863.
4. Borden R. C., Gomez C. A., Becker M. T.: *Geochemical indicators of intrinsic bioremediation*. *Ground Water* 33 (1995):180-189.
5. Rowland S., Donkin P., Smith E., Wraige E.: *Aromatic hydrocarbon "humps" in the marine environment: Unrecognized toxins?* *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001):2640-2644.
6. <http://irz.cz/irz/new/node/86>, staženo 4. března 2011.
7. Fu P. P., Herrero-Saenz D.: *Nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons: A class of genotoxic environmental pollutants*. *J. Environ. Sci. Health., Part C: Environ. Carcinog. Ecotox. Rev. C* 17 (1999):1-43.
8. <http://irz.cz/irz/new/node/85>, staženo 4. března 2011.
9. Wilson N. K., McCurdy T. R.: *Concentrations and phase distributions of nitrated and oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air*. *Atmos. Environ.* 29 (1995):2575-2584.
10. Fan Z., Chen D., Birla P., Kamens R. M.: *Modeling of nitropolycyclic aromatic hydrocarbon formation and decay in the atmosphere*. *Atmos. Environ.* 29, (1995):1171-1181.
11. World Health Organization: *Selected Nitro- and Nitro-Oxy-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. IPCS Environmental Health Criteria 229. WHO, Geneva 2003.
12. Atkinson R., Arey J.: *Atmospheric chemistry of gas-phase polycyclic aromatic hydrocarbons: Formation of atmospheric mutagens*, *Environ. Health Perspect.* 102 (1994):117-126.

13. International Agency for Research on Cancer: *Polynuclear Aromatic Compounds, Part 3, Industrial Exposures in Aluminium Production, Coal Gasification, Coke Production, and Iron and Steel Founding, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of the Chemical to Man*. Vol. 34, IARC Press, Lyon 1984.
14. Jacob J., Karcher W., Belliardo J. J., Dumler R., Boenke A.: *Polycyclic aromatic-compounds of environmental and occupational importance – Their occurrence, toxicity and the development of high-purity certified reference materials – Part 3*. Fresenius J. Anal. Chem. 340 (1991):755-767.
15. Moreira J. C., Barek J.: *Analysis of carcinogenic nitrated polycyclic aromatic-hydrocarbons – A review*. Quim. Nova 18 (1995):362-367.
16. World Health Organization: *Selected Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, IPCS Environmental Health Criteria 202. WHO, Geneva 1998.
17. <http://www.phytosanitary.org/projekty/2004/vvf-09-04.pdf>, staženo 20. dubna 2009.
18. Moeini-Nombel L., Matsuzawa S.: *Effect of solvents and a substituent group on photooxidation of fluorene*. J. Photochem. Photobiol. Chem. 119 (1998):15-23.
19. Galceran M. T., Moyano E.: *Effect of solvent polarity on the determination of oxo- and nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons using capillary gas chromatography with splitless injection*. J. Chromatogr. A 607 (1992):287-294.
20. Stewart G., Smith K., Chornes A., Harris T., Honeysucker T., Hongtao Y.: *Photochemical reaction of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons: Effect by solvent and structure*, Environ. Chem. Lett. 8 (2009):301-306.
21. Skacel F., Tekac V.: *Analyza ovzduší, VŠCHT, Praha 2002*.
22. Dvorska A., Lammel G., Klanova J., Holoubek I.: *Kosetice, Czech Republic – Ten years of air pollution monitoring and four years of evaluating the origin of persistent organic pollutants*. Environ. Pollut. 156 (2008):403-408.
23. Harner T., Bartkow M., Holoubek I., Klanova J., Wania F., Gioia R., Moeckel C., Sweetman A. J., Jones K. C.: *Passive air sampling for persistent organic pollutants: Introductory remarks to the special issue*. Environ. Pollut. 144 (2006):361-364.

24. Cupr P., Klanova J., Bartos T., Flegrova Z., Kohoutek J., Holoubek I.: *Passive air sampler as a tool for long-term air pollution monitoring: Part 2. Air genotoxic potency screening assessment*. Environ. Pollut. 144 (2006):406-413.
25. Prycek J., Ciganek M., Simek Z.: *Development of an analytical method for polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives*. J. Chromatogr. 1030, (2004):103-107.
26. Crimmins B. S., Baker J. E.: *Improved GC/MS methods for measuring hourly PAH and nitro-PAH concentrations in urban particulate matter*. Atmos. Environ. 40 (2006):6764-6779.
27. Priego-Capote F., Luque-Garcia J. L., Luque de Castro M. D.: *Automated fast extraction of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons from soil by focused microwave-assisted Soxhlet extraction prior to gas chromatography-electroncapture detection*. J. Chromatogr. A 994 (2003):159-167.
28. Nakao T., Aozasa O., Ohta S., Miyata H.: *Analytical method for determination of dinitropyrenes using gas chromatography-high-resolution mass spectrometry*. J. Chromatogr. A 1157 (2007):352-357.
29. Miller-Schulze J. P., Paulsen M., Toriba A., Hayakawa K., Simpson C. D.: *Analysis of 1-nitropyrene in air particulate matter standard reference materials by using two-dimensional high performance liquid chromatography with online reduction and tandem mass spectrometry detection*. J. Chromatogr. A 1167 (2007):154-160.
30. The Chemical Database, University of Acron: <http://ull.chemistry.uakron.edu/erd/Chemicals/8000/6115.html>, staženo 15. března 2011.
31. US Environmental Protection Agency: Pollutants and Toxics, <http://cfpub1.epa.gov/ncea/cfm/recorddisplay.cfm?deid=51959>, staženo 16. března 2011.
32. Moller L., Gustafsson J. A.: *Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of 2-nitrofluorene and its derivatives*. Biomed. Environ. Mass Spectrom. 13 (1986):681-688.
33. Moller L., Rafter J., Gustafsson J. A.: *Metabolism of the carcinogenic air pollutant 2-nitrofluorene in the rat*. Carcinogenesis 8 (1987):637-645.

34. Barek J., Pumera M., Muck A., Kaderabkova M., Zima J.: *Polarographic and voltammetric determination of selected nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons*. Anal. Chim. Acta 393 (1999): 141-146.
35. Barek J., Mejstrik V., Muck A., Zima J.: *Polarographic and voltammetric determination of chemical carcinogens*. Crit. Rev. Anal. Chem. 30 (2000):37-57.
36. Barek J.: *Position of polarography and voltammetry on mercury drop electrodes in modern analytical chemistry*. Chem. Listy 91 (1997):1038-1042.
37. Vyskocil V., Barek J., Jiranek I., Zima J., v knize: *Progress on Drinking Water Research* (Lefebvre M. H., Roux M. M., eds.), kap. 5. Nova Science Publishers, New York 2009.
38. Vyskocil V., Jiranek I., Barek J., Peckova K., Zima J., v knize: *Sensing in Electroanalysis* (Vytras K., Kalcher K., eds.), sv. II. University of Pardubice, Pardubice 2007.
39. Vyskocil V., Barek J.: *Mercury electrodes – Possibilities and limitations in environmental electroanalysis*. Crit. Rev. Anal. Chem. 39 (2009):173-188.
40. Barek J., Peckova K., Vyskocil V.: *Adsorptive stripping voltammetry of environmental carcinogens*. Curr. Anal. Chem. 4 (2008):242-249.
41. Bard A. J., Faulkner L. R.: *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. Wiley, druhé vydání, New York 2001.
42. Rajeshwar K., Ibanez J. G.: *Environmental Electrochemistry: Fundamentals and Applications in Pollution Sensors and Abatement*. Academic Press, London 1997.
43. Wang J.: *Analytical Electrochemistry*. John Wiley & Sons, třetí vydání, Hoboken 2006.
44. Danhel A., Shiu K., Yosypchuk B., Barek J., Peckova K., Vyskocil V.: *The use of silver solid amalgam working electrode for determination of nitrophenols by HPLC with electrochemical detection*. Electroanalysis 21 (2009):303-308.
45. Barek J., Fischer J., Navratil T., Peckova K., Yosypchuk B., Zima J.: *Nontraditional electrode materials in environmental analysis of biologically active organic compounds*. Electroanalysis 19 (2007):2003-2014.

46. Peckova K., Jandova K., Maixnerova L., Swain G., Barek J.: *Amperometric determination of aminobiphenyls using HPLC-ED with boron-doped diamond electrode*. *Electroanalysis* 21 (2009):316–324.
47. Rasmussen R. E.: *Metabolism and macromolecular binding of 1-nitronaphthalene in the mouse*. *Toxicology* 41 (1986):233-247.
48. Burdova V.: *Polarografické stanovení genotoxického 4-nitroindanu*. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2009.
49. Boyes B. G., Rogers C. G., Stapley R.: *Genotoxicity of 1-nitronaphthalene in chinese-hamster V79 cells*. *Mutat. Res.* 259 (1991):111-121.
50. Verschoyle R. D., Carthew P., Wolf C. R., Dinsdale D.: *1-Nitronaphthalene toxicity in rat lung and liver – Effects of inhibiting and inducing cytochrome-P450 activity*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 122 (1993):208-213.
51. Zuman P.: *Electroreduction of aromatic nitro compounds: Case for comparison of information obtained by polarography and voltammetry*. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 58 (1993):41-46.
52. Peckova K., Barek J., Navratil T., Yosypchuk B., Zima J.: *Voltammetric determination of nitronaphthalenes at a silver solid amalgam electrode*. *Anal. Lett.* 42 (2009):2339-2363.