

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie v přírodních vědách



Vojtěch Hrdlička

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ 5-NITROINDAZOLU NA
VISÍCÍ RTUŤOVÉ KAPKOVÉ ELEKTRODĚ A LEŠTĚNÉ
STŘÍBRNÉ PEVNÉ AMALGÁMOVÉ ELEKTRODĚ

Voltammetric Determination of 5-Nitroindazole Using Hanging
Mercury Drop Electrode and Polished Silver Solid Amalgam
Electrode

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Doc. Dr. Ing. Tomáš Navrátil

Konzultant práce: Prof. RNDr. Jiří Barek, CSc.

Praha 2013

Prohlášení

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

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

V Praze dne 30.8.2013

Poděkování

Chtěl bych poděkovat svému školiteli doc. Dr. Ing. Tomáši Navrátilovi za trpělivé vedení bakalářské práce a Ing. Kateřině Novákové za cenné rady.

Poděkování patří též Prof. RNDr. Jiřímu Barkovi, CSc za připomínky k formální stránce práce a RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D za zapůjčení elektrody.

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá studiem elektrochemického chování 5-nitroindazolu a nalezením optimálních podmínek pro jeho stanovení pomocí DC voltametrie a diferenční pulzní voltametrie (DPV) na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE) a leštěné pevné stříbrné amalgámové elektrodě (p-AgSAE) a porovnává dosažené limity stanovitelnosti (L_Q).

Jako optimální podmínky pro DPV stanovení 5-NI v deionizované vodě na HMDE bylo vybráno pH 8 v prostředí Britton-Robinsonova (BR) pufru a počáteční potenciál +100 mV. Byla sestrojena kalibrační závislost v rozsahu $1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, získaný limit stanovitelnosti (L_Q) činil $1.8 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Také byla zkoumána možnost využití adsorbční rozpouštěcí voltametrie (AdRV) pro stanovení 5-nitroindazolu v prostředí BR pufru o pH 8. Metoda byla neefektivní kvůli růstu pozadí.

Pomocí cyklické voltametrie byl zkoumán mechanismus elektrodových oxidace a redukce v prostředí BR pufru o pH 8 na HMDE. Bylo zjištěno, že redukce 5-NI je řízena difúzí a následná oxidace adsorbčí.

Pro stanovení 5-NI metodou DPV na p-AgSAE v deionizované vodě byly učeny následující optimální podmínky: pH 8 v prostředí BR pufru a počáteční potenciál 0 mV. Pro pH 8 byly určeny regenerační potenciály $E_{reg,1} = 0 \text{ mV}$ a $E_{reg,2} = -1200 \text{ mV}$. Byla sestrojena kalibrační závislost v rozsahu $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ s $L_Q = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Předmětová hesla:

Analytická chemie

Elektrochemie

Voltametrie

Klíčová slova:

5-Nitroindazol

DC voltametrie

Diferenční pulzní voltametrie

Visící rtuťová kapková elektroda

Stříbrná pevná amalgámová elektroda

ABSTRACT

The presented Bachelor Thesis deals with a study of electrochemical behavior of 5-nitroindazole (5-NI) with the search of optimal conditions for its determination using techniques of DC voltammetry (DCV) and differential pulse voltammetry (DPV) at hanging mercury drop electrode (HMDE) and polished silver solid amalgam electrode (p-AgSAE), and with the comparison of reached limits of quantification (L_Q).

The optimal conditions found for determination of 5-NI in deionized water using DPV at HDME were as follows: Britton-Robinson (BR) buffer of pH 8.0 and initial potential of +100 mV. The calibration dependences were measured in the concentration range from $1 \cdot 10^{-7}$ to $1 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³ with the L_Q of $1.8 \cdot 10^{-7}$ mol·dm⁻³.

Moreover, the possibility of using adsorption stirring voltammetry (AdSV) for determination of 5-NI in BR buffer of pH 8 was investigated. The method was ineffective due to rising baseline.

The mechanism of electrochemical reduction and oxidation in BR buffer of pH 8 at HMDE was investigated. It was found that the reduction of 5-NI was controlled by diffusion and the following oxidation was controlled by adsorption.

For determination of 5-NI in deionized water using DVP at p-AgSAE, optimal conditions seemed to be as follows: BR buffer of pH 8.0 and initial potential of +100 mV. Optimal regeneration potentials for pH 8 were found as $E_{reg,1} = 0$ mV a $E_{reg,2} = -1200$ mV. The calibration dependencies were measured in the concentration range from $1 \cdot 10^{-6}$ to $1 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³ with the $L_Q = 1 \cdot 10^{-6}$ mol·dm⁻³.

Objective Words:

Analytical chemistry
Electrochemistry
Voltammetry

Key Words:

5-Nitroindazole
DC Voltammetry
Differential Pulse Voltammetry
Hanging Mercury Drop Electrode
Silver Solid Amalgam Electrode

Seznam zkratek

5-NI	5-nitroindazol
AdRV	adsorbční rozpouštěcí voltametrie
AdRDCV	adsorbční rozpouštěcí DC voltametrie
BR pufr	Britton–Robinsonův pufr
c	molární koncentrace [$\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$]
C.A.S.	Chemical Abstract Services
DCV	DC voltametrie
DPP	diferenční pulzní polarografie
DPV	diferenční pulzní voltametrie
E	potenciál [mV]
E_{aku}	potenciál akumulace [mV]
E_p	potenciál píku [mV]
$E_{reg,2}$	regenerační potenciál [mV]
E_{start}	počáteční potenciál [mV]
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
I	proud [nA]
I_p	proud píku [nA]
L_Q	limit stanovení [nA]
M	$\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$
NPAH	nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
p-AgSAE	leštěná stříbrná pevná amalgámová elektroda
R^2	korelační koeficient lineární regrese
RSD	standardní směrodatná odchylka [%]
t_{aku}	čas akumulace [s]
v	rychlost polarizace [$\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$]

Obsah

1.	Úvod	8
2.	Experimentální část	12
2. 1.	Reagencie	12
2. 2.	Aparatura	12
2. 3.	Postup měření	12
2. 4.	Obnova povrchu p-AgSAE	13
3.	Voltametrické stanovení 5-nitroindazolu na HMDE	14
3. 1.	Vliv pH	14
3. 2.	Vliv počátečního potenciálu	16
3. 3.	Adsorbční rozpouštěcí voltametrie 5-NI	17
3. 4.	DPV koncentrační závislost 5-NI	19
3. 5.	Vliv rychlosti polarizace	22
4.	Voltametrické stanovení 5-NI na p-AgSAE	24
4. 1.	Vliv pH	24
4. 2.	Vliv počátečního potenciálu	27
4. 3.	Vliv regeneračních potenciálů	27
4. 4.	DPV stanovení 5-NI na p-AgSAE	29
5.	Závěr a diskuze	32
6.	Seznam použité literatury	34

1. ÚVOD

Nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky (NPAH) patří mezi významné environmentální polutanty s prokázanými mutagenními a karcinogenními účinky^[1]. Vznikají zejména v ovzduší radikálovými fotochemickými reakcemi polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) s oxidy dusíku nebo kyselinou dusičnou^[2]. Tímto způsobem vznikají například silně karcinogenní nebo mutagenní 6-nitrochrysen, 2-nitrofluoroanthren a 2-nitropyren. Dalšími jejich zdroji jsou nedokonalé spalování topných olejů, dřeva, případně nafty a benzínu ve spalovacích motorech. Nachází se také v kouři z připáleného jedlého tuku^[3]. Mezi jejich přírodní zdroje patří lesní a stepní požáry nebo sopečná činnost. NPAH se odbourávají v plynné fázi nebo adsorbované na prachové částice fotolyticky v UV oblasti nebo reakcemi s oxidačními činidly přítomnými v ovzduší, například ozónem, oxidy dusíku nebo •OH radikálem^[4]. Množství NPAH vzniklých působením člověka značně převyšuje přirozené zdroje.

NPAH se vyskytují především v ovzduší, odkud se mohou přenášet do ostatních složek životního prostředí. Až 75% NPAH je sorbováno na prachové částice.^[3] Zastoupení jednotlivých NPAH a jejich koncentrace závisí na povětrnostních podmínkách, slunečním svítu, dopravní zátěži dané oblasti a přítomnosti dalších polutantů (např. ozonu, NO_x). Při vyšších teplotách převládají těkavé látky, při nižších teplotách naopak dochází ke kondenzaci na povrchu částic. V zimních obdobích je také koncentrace NPAH zvýšena důsledkem činnosti lokálních topenišť. Ve volném ovzduší byla mezi obsahem naftalenu a nitronaftalenů nalezena korelace. Koncentrace NPAH je obvykle o dva řády nižší než jejich prekurzoru PAH. Obdobná souvislost mezi výskytem PAH a NPAH v zemědělských plodinách v současnosti nalezena nebyla. O kontaminaci zemědělských plodin nebo potravin během přípravy (uzením nebo grilováním) jsou dostupné nepříliš rozsáhlé nebo rozporuplné výsledky. Studie naznačují, že kontaminace NPAH se týká z velké části nechráněného povrchu plodin. Pro odstranění velké části NPAH tedy postačí oloupání či omytí.

Do organismu se NPAH dostávají vdechnutím, trávicí soustavou nebo přes kůži. Na druhu NPAH závisí i jejich následná metabolická cesta^[3]. Pokud je nitroskupina orientovaná v rovině aromátu, může docházet k její biotransformaci na mutagenní nitroso nebo hydroxylaminoderiváty. Odbourávání z krevního oběhu probíhá metabolizací v játrech na hydroxy-nitro-PAH, následuje konjugace s kyselinou glukuronovou a vyloučení močí.^[5] V trávicí soustavě je většina NPAH redukována střevní mikroflórou na aminoPAH a vyloučena. Nebezpečná je možná transformace na silně mutagenní hydroxylované nitroPAH. Při inhalaci jsou NPAH metabolizovány v plicích na hydroxy-nitro-PAH a spolu s nemetabolizovanými NPAH přecházejí do krve a posléze do jater. Metabolismus NPAH je silně závislý na složení střevní mikroflóry a aktivitě cytochromu P-450, metabolizaci NPAH urychlují současně se vyskytující PAH nebo ethanol. Nitroderiváty PAH jsou obvykle toxicitější než PAH. Jejich mutagenita je přímá a nevyžaduje předchozí metabolickou aktivaci, na rozdíl od některých PAH. Druh a míra toxicity závisí na počtu aromatických jader, prostorové orientaci nitroskupiny a její poloze v isomeru^[6]. 1-, 2- a 3-nitrobenzpyreny jsou silnými mutageny, 6-nitrobenzpyren pouze slabým^[7].

Analytické metody pro stanovení NPAH jsou omezeny požadavky na vysokou citlivost pro stanovení nízkých koncentrací, ve kterých se tyto látky obvykle vyskytují. Využívaná je plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS)^[8] nebo s detektorem elektronového záchyty (GC/ECD)^[9]. Použití ECD předchází derivatizace NPAH na fluoroderiváty PAH redukcí tetrahydridoboritanem sodným (NaBH₄) na aminoPAH a následnou fluorací pomocí heptafluoroanhydridu kyseliny butanové (HFBA). Vysokoúčinná (HPLC) nebo ultraúčinná (UPLC)^[10] kapalinová chromatografie se využívá v kombinaci s chemiluminiscenční^[11], fluorescenční^[12], elektrochemickou^[13] nebo hmotnostní detekcí. Pro použití fluorescenčního detektoru je potřeba NPAH převést na málo stabilní fluoreskující aminoPAH. Pro stanovení velmi nízkých NPAH v půdě nebo biologických matricích je často potřeba tyto metody kombinovat s předchozí extrakcí do kapaliny (LLE) nebo na tuhou fázi (SPE). Příkladem moderní metody prekoncentrace je extrakce na Soxhletově přístroji podpořená mikrovlnným zářením^[14]. Nevýhodou výše uvedených separačních metod jsou jejich vysoké pořizovací a provozní náklady.

Citlivou a méně nákladnou alternativu představují elektrochemické. Pro polarografické a voltametrické stanovení se využívá přítomnosti redukovatelné nitroskupiny^[15]. Ve vodném prostředí se na rtuťové elektrodě redukuje nitrobenzen ve dvou vlnách, v silně kyselém prostředí nebo v jedné vlně v prostředí zásaditém. První vlna odpovídá čtyřelektronové redukci nitroskupiny na hydroxylaminovou, druhá vlna dvouelektronové redukci hydroxylaminové skupiny na aminoskupinu (rovnice č. 1.1). Půlvolné potenciály klesají se zvyšujícím se pH. V silně zásaditém prostředí nebo v prostředí aprotického rozpouštědla se první vlna může rozdělit na dvě, odpovídající jednoelektronové redukci nitroskupiny na anionaradikál a následné tříelektronové redukci na hydroxylamin (rovnice č. 1.2). Redukce 4-nitrofenolu a 2-nitronaftalenu na amalgámových elektrodách probíhá obdobně^[16].



Pomocí technik diferenční pulzní voltametrie (DPV) nebo polarografie (DPP) lze dosahovat v jednoduchých matricích (deionizované nebo pitné vodě) mezi stanovitelnosti řádově až

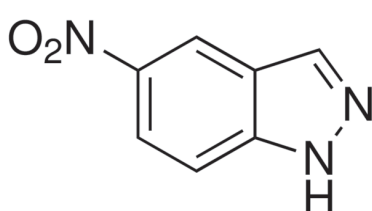
$10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ^[17]. Ty lze ještě snížit využitím adsorbční rozpouštěcí voltametrie (AdRV), a to až na $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, nevýhodou této metody je možná interference stopových nečistot z matrice a velmi omezená možnost rozlišení mezi jednotlivými nitrolátkami. Prekoncentrací na tuhé fázi lze citlivost zvýšit až o dva řády, tedy až na $10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Reakcí na obavy z údajné toxicity kovové rtuti^[18] a přísné normy z oblasti životního prostředí^[33]^[34] je snaha nahrazovat rtuťové elektrody bezpečnějšími alternativami. Jednou z nich jsou amalgámové elektrody, publikované v roce 2000 Ústavem fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR, v.v.i.^[19] a výzkumnou skupinou Ø. Mikkelsena z Norwegian University of Science and Technology v Trondheimu^[20]. Amalgámové elektrody lze připravit naplněním skleněné trubičky kovovým práškem (stříbrným, měděným aj. nebo jejich směsí) a následnou amalgamací několikahodinovým ponořením do rtuti. Plochu takto připravené elektrody lze

ještě modifikovat rtuťovým meniskem nebo po přešetření rovnou používat. V případě použití stříbra, lze takto vyrobit meniskovou (m-AgSAE) nebo leštěnou (p-AgSAE) pevnou stříbrnou amalgámovou elektrodu. Přestože rtuťové elektrody mají oproti amalgámovým vyšší citlivost, nižší limity stanovitelnosti a možnost rychlé obnovy elektrodového povrchu, jsou vlastnosti amalgámových elektrod často dostačující. Mezi výhody amalgámových elektrod patří nízké výrobní náklady, mechanická stabilita a podobný potenciálový rozsah jako u elektrod rtuťových. Citlivost stanovení NPAH na pevných amalgámových elektrodách je obvykle o řád nižší nežli na rtuťových^{[17][21]}. Při aplikaci DPV se limity stanovitelnosti pohybují řádově kolem 10^{-6} mol·dm⁻³. Ve spojení s extrakcí na tuhé fázi je možné na amalgámových elektrodách dosahovat meze stanovitelnosti řádově až 10^{-8} mol·dm⁻³^[22]. Pevné amalgámové elektrody lze využít také pro amperometrickou detekci v průtokových a separačních metodách^[23].

Do skupiny nitrovaných aromatických uhlovodíků (NPAH) patří také stanovovaná látka 5-nitroindazol. Jedná se derivát dusíkatého heterocyklu indazolu, neboli benzopyrazolu, s nitroskupinou navázanou v 5. pozici. Látka se dá v technické praxi využít jako součást ustalovacího roztoku ve fotografii^[24] nebo protizamlžovací činidlo při přípravě tenkých kovových povrchů pro elektroniku^[25].

Za laboratorní teploty je 5-nitroindazol (5-NI) bílá až světle žlutá jemná krystalická látka, špatně rozpustná ve vodě. Strukturní vzorec 5-NI je na obr 1.1.



CAS Name	5-Nitroindazole
CAS Registry Number	5401-94-5
sumární vzorec	C ₇ H ₅ N ₃ O ₂
bod tání	204-208 °C ^[26]
molekulová hmotnost	163,13 g·mol ⁻¹

Obrázek 1.1. 5-nitroindazol^[26]

Látka je zdraví škodlivá při požití a vdechování, také dráždí pokožku, oční sliznice^[26] a je prokázaným mutagenem^[27]. Mezi další biologické účinky patří inhibice enzymů NO syntetasy^[28]. Některé deriváty 5-NI vykazují antiprotozoální aktivitu^[29]. Deriváty 5-NI jsou také studovány jako potenciální protinádorová léčiva^[30]. US Environmental Protection Agency (EPA) zařadila 5-NI mezi látky v současnosti testované jako potenciální narušitele činnosti žláz s vnitřní sekrecí^[31]. Zákonné limity nejsou stanoveny v ČR ani v USA.

Přestože struktura 5-NI je dobře prozkoumána pomocí hmotnostní spektrometrie, infračervené spektrometrie i NMR, není známo mnoho ryze analytických studií. Stanovení 5-NI pomocí DC tast polarografie, diferenční pulzní polarografie (DPP), diferenční pulzní voltametrie (DPV) a adsorbční rozpouštěcí voltametrie (AdRV) na visící rtuťové elektrodě ve vodně-methanolickém prostředí bylo prozkoumáno v rámci diplomové práce na katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze^[32], hodnota L_0 pro DPP a DPV činí $2 \cdot 10^{-7}$ M.

Cílem této práce je optimalizace voltametrického stanovení mutagenního 5-nitroindazolu na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE), leštěné stříbrné pevné amalgámové elektrodě (p-AgSAE) ve vodném prostředí a porovnání dosažených mezí stanovitelnosti (L_Q). Dalším cílem práce je prověřit možnost využití adsorbční rozpouštěcí voltametrie (AdRV) na HMDE pro zvýšení citlivosti stanovení, případně studium elektrochemického chování 5-nitroindazolu pomocí cyklické voltametrie.

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2. 1.Reagencie

Zásobní roztok 5-NI o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl připraven rozpuštěním 4.5 mg čisté látky ve 250 ml deionizované vody na ultrazvukové lázni (P-Lab, Praha). Pro sestavení kalibrační křivky na p-AgSAE byl připraven zásobní roztok o koncentraci $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, při vyšších koncentracích se 5-NI nedokonalě rozpouštěl. Deionizovaná voda pocházela z přístroje Milli-Q-Gradient (Millipore, Praha).

Britton-Robinsonův pufr o daném pH byl připravován smísením kyselé a zásadité složky. Kyselou složku představoval roztok 0.04M kyseliny borité, 0,04M kyseliny octové a 0,04M kyseliny fosforečné (všechny Sigma Aldrich, čistota p.a.) v deionizované vodě. Zásaditou složku tvořil roztok 0,2M hydroxidu sodného (Penta Chrudim, čistota p.a.) v destilované vodě. Konečné pH bylo ověřeno pomocí pH metru.

2. 2.Aparatura

Voltametrická měření byla prováděna na přístroji Eco-Tribo Polarograf (Eco Trend Plus, Praha) se softwarem MultiElChem verze 3.1 (Ústav fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského, Praha, v. v. i.) v operačním systému Windows XP (Microsoft, USA).

Přístroj pracoval v tříelektrodovém zapojení, s argenochloridovou referenční (Elektrochemické detektory s.r.o.) a pomocnou platinovou elektrodou (MonokrystalyTurnov).

Jako pracovní elektrody byly použity visící kapková rtuťová elektroda (Eco Trend Plus, Praha) s povrchem $0,721 \pm 0,022 \text{ mm}^2$ a pevná stříbrná amalgámová elektroda (AgSAE, Eco Trend Plus, Praha).

K měření pH byl použit pH metr Jenway 3505 s kombinovanou skleněnou elektrodou (Jenway, Velká Británie). Kalibrace byla provedena pomocí kalibračních roztoků o pH 7 a 9,18 (oba Elektrochemické detektory s.r.o., Turnov).

2. 3.Postup měření

Do voltametrické cely bylo odpipetováno 10 ml BR pufru o daném pH. Byl 3x proměřen blank, poté byl přidán 5-NI ze zásobního roztoku a následovalo měření. Před začátkem každého scanu blanku nebo vzorku byl vzorek probubláván 5 minut dusíkem. Koncentrační závislosti byly měřeny pomocí několika po sobě následujících přídavek 5-NI do 10 ml BR pufru. Při výměně obsahu voltametrické cely byly cela a elektrodový systém včetně míchátko a bublátko pečlivě opláchnuty deionizovanou vodou.

2. 4. Obnova povrchu p-AgSAE

Kvůli zachování opakovatelnosti měření byly prováděny následující postupy obnovující povrch elektrody.

1. Leštění: Po dobu přibližně 30 sekund se tře amalgámovým koncem vespod elektrody o navlhčené plátno pokapané suspenzí oxidu hlinitého. Poté se elektroda očistí destilovanou vodou. Leštění se provádělo obvykle jedenkrát týdně nebo při zhoršení proudové odezvy.

2. Aktivace: Aktivace probíhá vložení potenciálu -2200 mV na elektrodu v 0.1 M roztoku chloridu draselného po dobu 5 minut za současného míchání a bez zavádění dusíku. Aktivace byla prováděna před začátkem měření nebo po delší nežli hodinové pauze.

3. Regenerace: Regenerace se provádí vkládáním potenciálů $E_{reg,1}$ a $E_{reg,2}$ střídavě po 50 ms, celkově po dobu 60 sekund a to před každým měřením. Optimální regenerační potenciály závisí na pH a je nutno je nalézt pro každou látku a prostředí experimentálně^[22].

3. VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ 5-NITROINDAZOLU NA HMDE

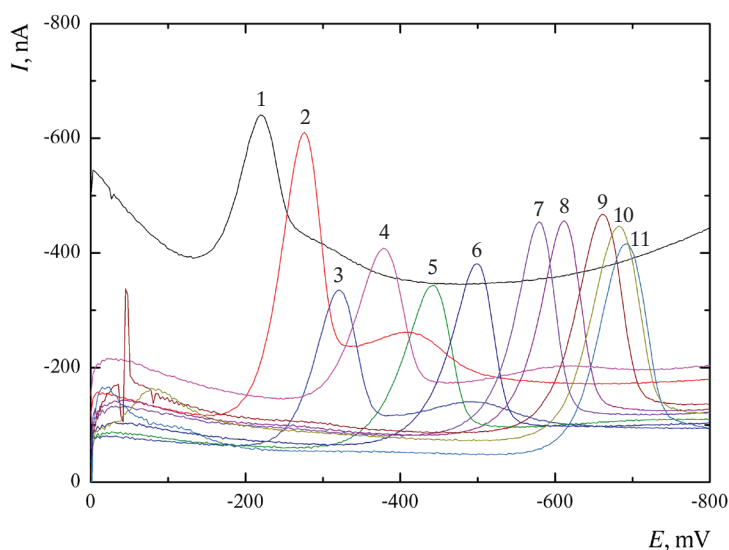
3. 1.Vliv pH

Vliv pH na voltametrické chování 5-NI byl zkoumán v prostředí BR pufru o pH 2-12. Jednotlivé vzorky byly připraveny přidavkem 1 ml 10^{-4} M zásobního roztoku 5-NI do 10 ml BR pufru o daném pH. DC voltamogramy při různých pH jsou vyneseny do grafu na obr. 3.1. Při pH 6-12 je zřejmý jeden dobře vyvinutý pík. Při pH 3-5 se objevuje ještě jeden méně vyvinutý pík v negativnější oblasti potenciálů. Jak lze dovodit z analogie s jinými studii chování nitrolátek, první pík pravděpodobně vzniká odpovídá redukcí nitroskupiny na hydroxylaminovou, druhý (při pH 3-5) redukcí hydroxylaminové skupiny na aminovou. Aplikací lineární regrese byla získána závislost potenciálu píku na pH (rov. 3.1). Odpovídající graf se nachází na obr. 3.2. Ze směrnice lze dovodit, že řídicí děj odpovídá přibližně výměně jednoho elektronu.

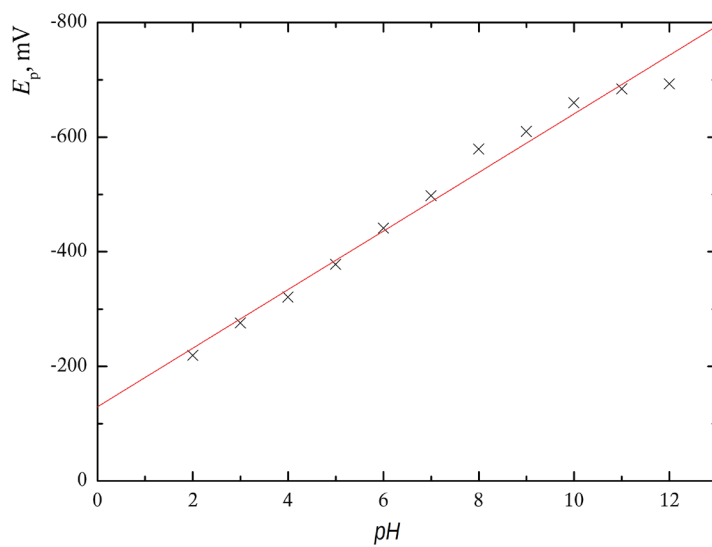
$$E_p = -51,1 \text{ pH} - 129,48; R = 0,9905 \quad (\text{rov. 3.1})$$

Závislosti výšky prvního píku na pH popisuje obr. 3.3. Tuto závislost nelze vyjma krátkých úseků jednoduše popsat pomocí lineární regrese. Jako optimální pro stanovení 5-NI bylo vybráno pH 8,0. 5-NI při něm poskytuje vysoký, symetrický a dobře vyhodnotitelný pík. Díky pouze slabě bazickému prostředí bude také možno sestrojít koncentrační závislost ve větším rozsahu bez výrazného ředění měřeného roztoku. Při ředění se pH posunuje směrem k neutrálnímu.

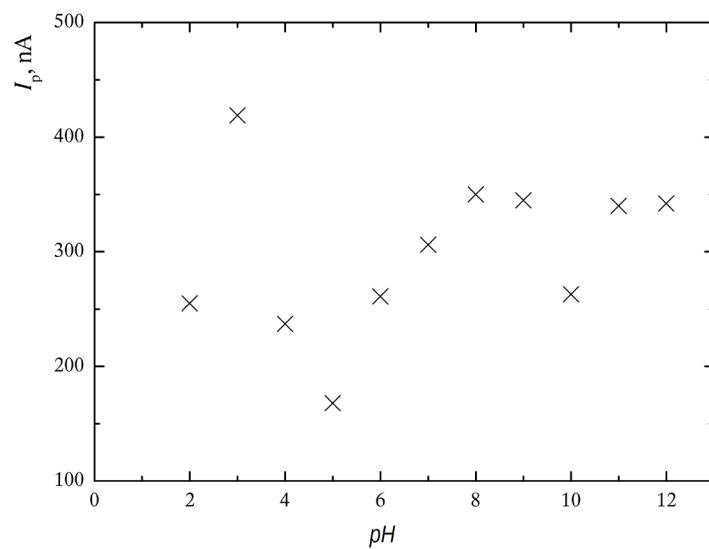
Obrázek 3.1. DC voltamogramy $1 \cdot 10^{-5}$ M 5-NI v prostředí BR pufru o pH 2,0 (1) ; 3,0 (2); 4,0(3) ; 5,0 (4); 6,0 (5) ; 7,0 (6); 8,0 (7); 9,0 (8); 10,0 (9); 11,0 (10) a 12,0 (11).



Obrázek 3.2. Závislost potenciálu prvního 5-NI píku na pH roztoku. Měřeno na HMDE.



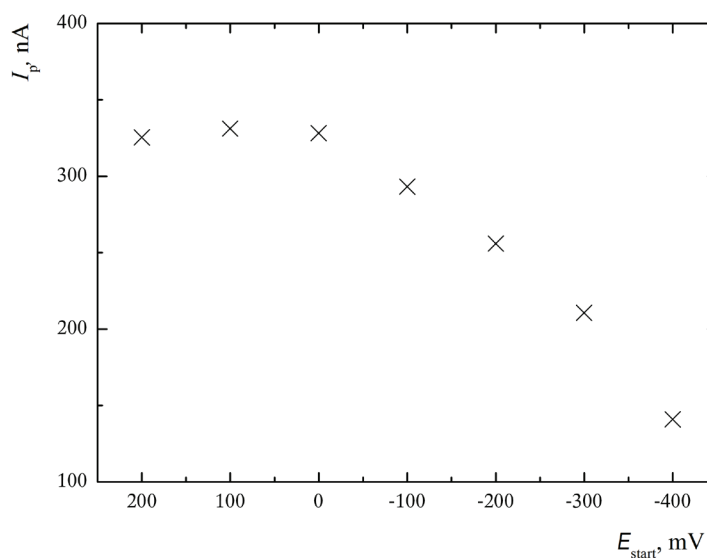
Obrázek 3.3. Závislost výšky prvního píku na pH roztoku 1·10⁻⁵M 5-NI v prostředí BR pufru na HMDE.



3. 2. Vliv počátečního potenciálu

Pro zjištění vlivu počátečního potenciálu na velikost signálu byla provedena série měření metodou DCV s počátečními potenciály (E_{start}) o velikosti +200, +100, 0, -100, -200, -300 a -400 mV. Byl použit roztok $2 \cdot 10^{-5}$ M 5-NI v prostředí BR pufru o pH 8,0 a rychlost polarizace 100 mV·s⁻¹. Nejvyšší hodnoty proudu píku (I_p) bylo dosaženo při počátečním potenciálu 100 mV. Závislost I_p na E_{start} je vynesena na obr. 3.4. Optimální podmínky pro stanovení 5-NI v prostředí BR pufru jsou tedy při pH 8,0 a při počátečním potenciálu +100 mV.

Obrázek 3.4. Závislost výšky píku na počátečním potenciálu.
Měřeno v roztoku $1 \cdot 10^{-5}$ M 5-NI v prostředí BR pufru při pH 8 na HMDE.



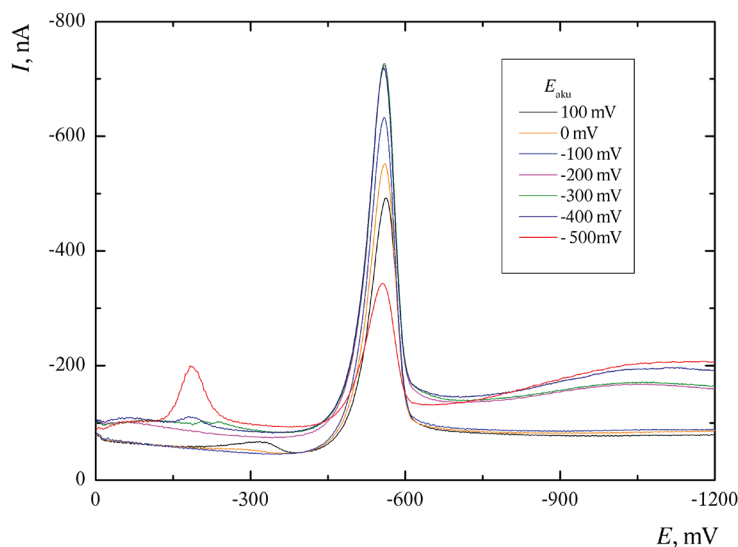
3. 3. Adsorbční rozpouštěcí voltametrie 5-NI

Pro zvýšení citlivosti stanovení 5-NI byla prověřována možnost využití metody adsorbční rozpouštěcí DC voltametrie (AdRDCV). Byly použity optimální podmínky získané pomocí DC voltametrie: BR pufr o pH 8,0 a počáteční potenciál +100mV. Roztok $1 \cdot 10^{-5} \text{M}$ 5-NI byl nejprve probublán 5 minut dusíkem, poté byla za současného míchání prováděna akumulace při zvoleném potenciálu. Po uplynutí doby akumulace byl roztok pro ustálení prostředí 15 s v klidu, bez míchání a bublání dusíkem. Poté následovalo samotné měření. Pro všechna AdRDCV měření byla použita rychlost polarizace $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

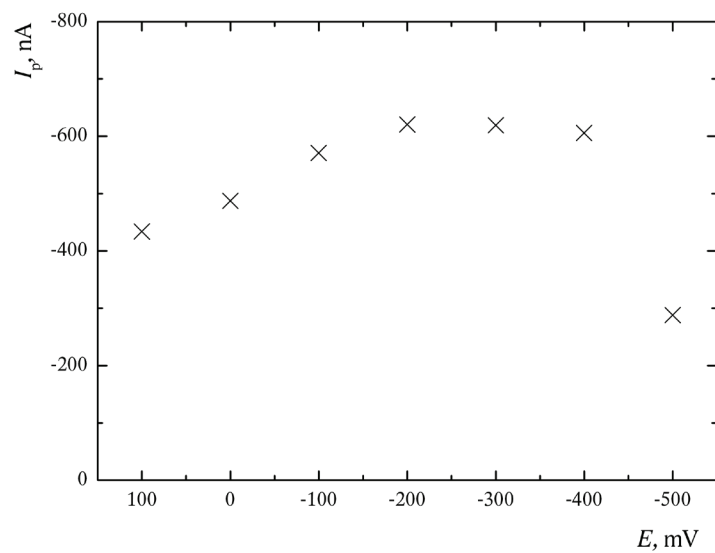
V první sérii měření byla zkoumána závislost výšky píku na akumulčním potenciálu při čase akumulace 10 s a akumulčních potenciálech +100, 0, -100, -200, -300, -400 a -500 mV. Získané voltamogramy se nachází na obr. 3.5. Závislost výšky píku na akumulčním potenciálem je vynesena do grafu na obr. 3.6. Nejvyšší proudy píků odpovídají akumulčním potenciálům -200 a -300 mV. Při akumulčním potenciálu -500 mV dochází k rozštěpení píku.

Ve druhé sérii měření byla zkoumána závislost výšky píků na době akumulace pro jednotlivé potenciály. Voltamogram 5-NI při akumulčním potenciálu -300 mV a dobách akumulace 10 s, 30 s a 60 s se nachází na obr. 3.7. Závislost proudu píku při $E_{aku} = -300, 0$ a 100 mV na době akumulace je vynesena do grafu na obrázku 3.8. Ze zmíněného voltamogramu a závislosti je patrné, že dochází k růstu signálu pozadí a zároveň poklesu proudu píků. Možným důvodem je prostředí BR pufru, buď některá z jeho složek nebo přítomnost stopového množství jiných nečistot. Zmíněné závislosti byly prověřeny i pro ostatní akumulční potenciály, u všech dochází k růstu pozadí a poklesu proudu píků. Pro přehlednost je na obr 3.7 uveden pouze voltamogram pro $E_{aku} -300 \text{ mV}$.

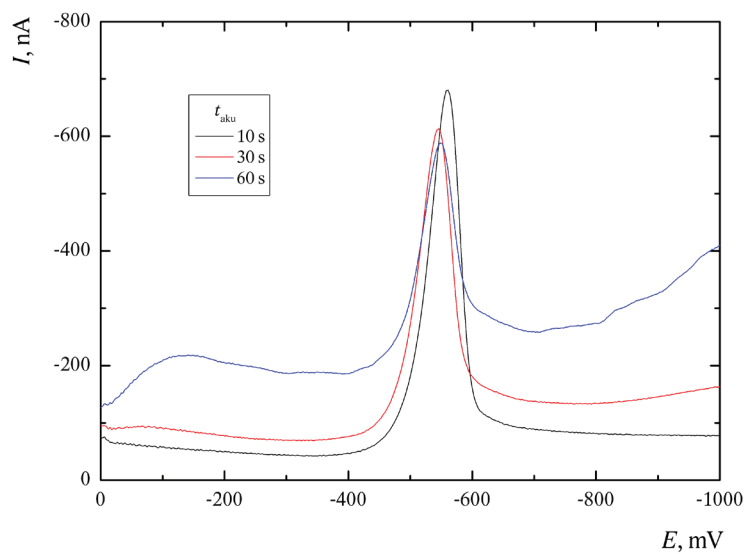
Obrázek 3.5. AdRDC voltamogramy při různých potenciálech akumulace a akumulčním čase 10 s. Měřeno v roztoku $1 \cdot 10^{-5} \text{M}$ 5-NI v prostředí BR pufru při pH 8 na HMDE.



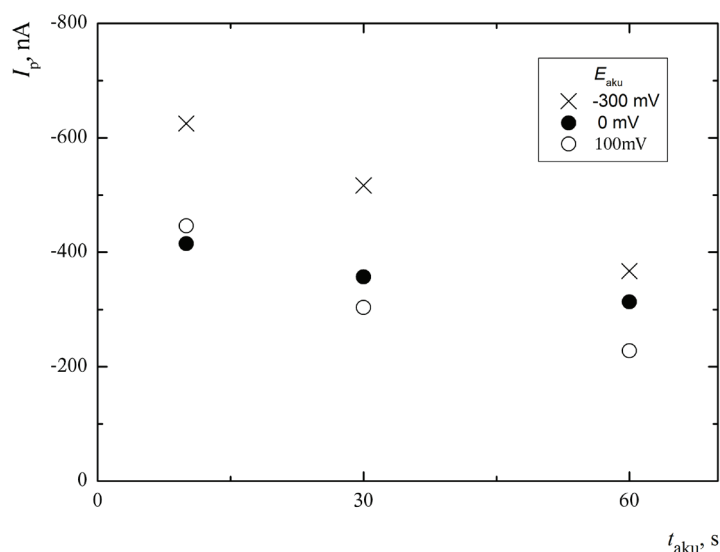
Obrázek 3.6. Závislost proudu píky na akumulčním potenciálu při čase akumulace 10 s. Měřeno v roztoku $1 \cdot 10^{-5} M$ 5-NI v prostředí BR pufru při pH 8.



Obrázek 3.7. AdRDC voltamogramy $1 \cdot 10^{-5} M$ 5-NI v prostředí BR pufru při pH 8 na HMDE s akumulčním potenciálem -300 mV pro různé časy akumulace.



Obrázek 3.8. Závislost proudu píku na době akumulace při akumulčních potenciálech -300, 0 a 100 mV. Měřeno v roztoku $1 \cdot 10^{-5}$ M 5-NI v prostředí BR pufru při pH 8 na HMDE.



3. 4. DPV koncentrační závislost 5-NI

Koncentrační závislosti pro 5-NI byly proměřeny v rozmezí $1 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-5}$ M. Měření bylo provedeno metodou DPV s výškou pulzu -50 mV, šířkou pulzu 80 ms a rychlostí polarizace 10 mV·s $^{-1}$, dále byly použity optimální podmínky zjištěné pro DC voltametrii: BR pufr o pH 8,0 a $E_{start} = +100$ mV. Nevyhlazené voltamogramy pro koncentrační rozmezí $1 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-6}$ M se nachází na obr. 3.9, odpovídající závislost proudu píků na koncentraci je na obr. 3.10. Voltamogramy pro rozmezí $1 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-5}$ M jsou na Obr 3.11, koncentrační závislost na obr. 3.12.

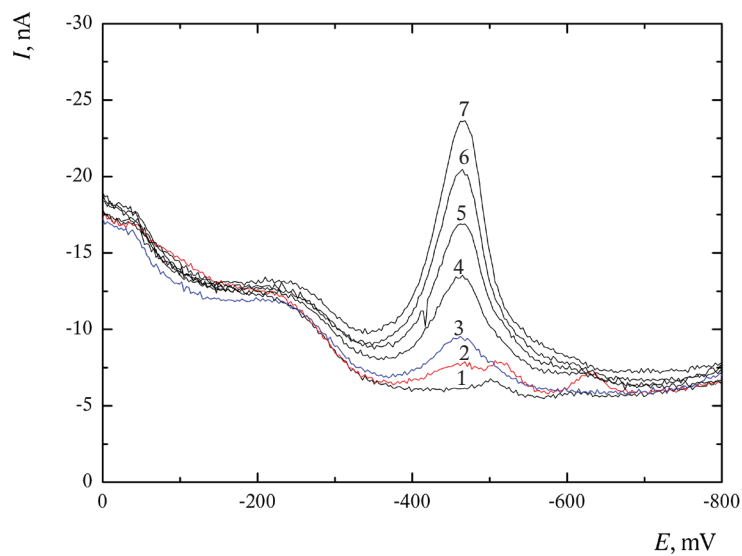
Ze statistického vyhodnocení lineární regrese v rozmezí $1 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-6}$ M byla získána rovnice závislosti proudu na koncentraci:

$$I [\text{nA}] = (-15,36 \pm 0,15) c [\mu\text{M}] + (0,4 \pm 1,5); R^2 = 0,9992 \quad (\text{rov. 3.2})$$

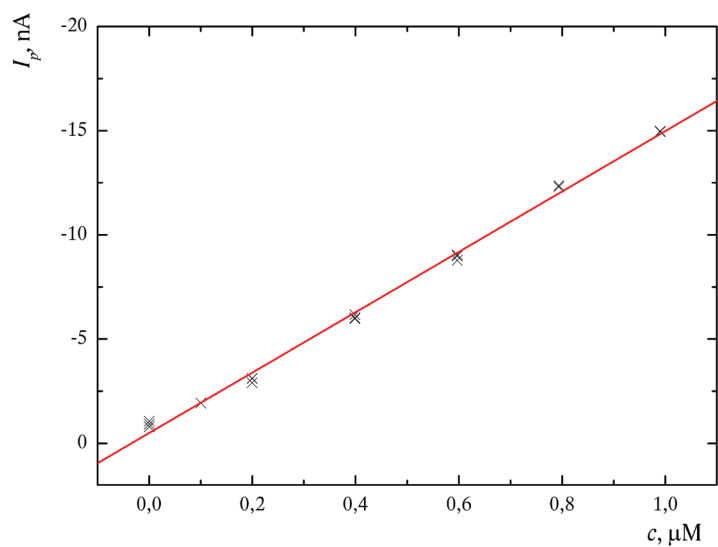
Odpovídající L_D podle Ebel-Kammovy metody činí $1,8 \cdot 10^{-7}$ M. Pro rozmezí $1 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-5}$ M byla sestavena proudová rovnice:

$$I [\text{nA}] = (-14,77 \pm 0,16) c [\mu\text{M}] + (2,36 \pm 1,04); R^2 = 0,9972 \quad (\text{rov. 3.3})$$

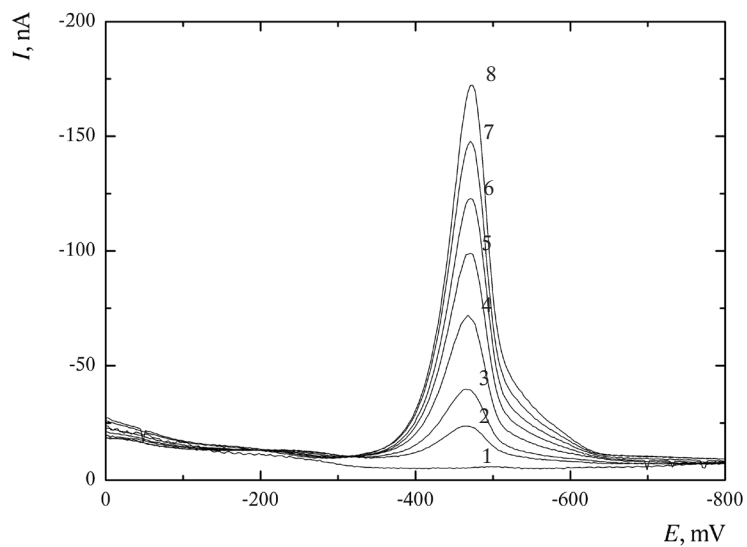
Obrázek 3.9. DP voltamogramy 5-NI v prostředí BR pufru o pH 8 na HMDE. Koncentrace 5-NI: 0 μM (1); 0,1 μM (2); 0,2 μM (3); 0,4 μM (4); 0,6 μM (5); 0,8 μM (6); 1 μM (7).



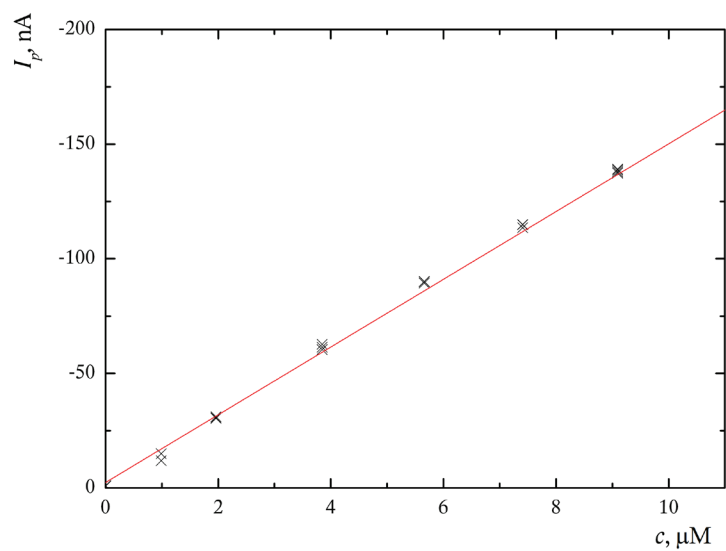
Obrázek 3.10. Závislost proudů píků na koncentraci 5-NI v rozmezí $1 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-6}$ M. Měřeno v prostředí BR pufru o pH 8 metodou DVP na HMDE.



Obrázek 3.11. DP voltamogramy 5-NI v prostředí BR pufru o pH 8 na HMDE.
 Koncentrace 5-NI: 0 μM (1); 1 μM (2); 2 μM (3); 4 μM (4);
 6 μM (5); 8 μM (6); 10 μM (7); 12 μM (8).



Obrázek 3.12. Závislost proudů píků na koncentraci 5-NI v rozmezí $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.
 Měřeno v prostředí BR pufru o pH 8 metodou DVP na HMDE.



3. 5. Vliv rychlosti polarizace

Metodou cyklické voltametrie byla prozkoumána závislost proudu píků na rychlosti polarizace. Pro měření byly použity optimální podmínky: pH 8 a počáteční potenciál +100 mV. Voltamogramy naměřené při rychlostech polarizace 20, 40, 80, 160 a 320 mV/s jsou na obr. 3.13. Závislost katodického proudu píku na odmocnině rychlosti polarizace je vynesena do grafu na obr. 3.14. Závislost výšky anodických píků na rychlosti polarizace je v grafu na obr. 3.15. Obě závislosti byly proloženy regresní přímkou. Z rovnice proudu anodického píku

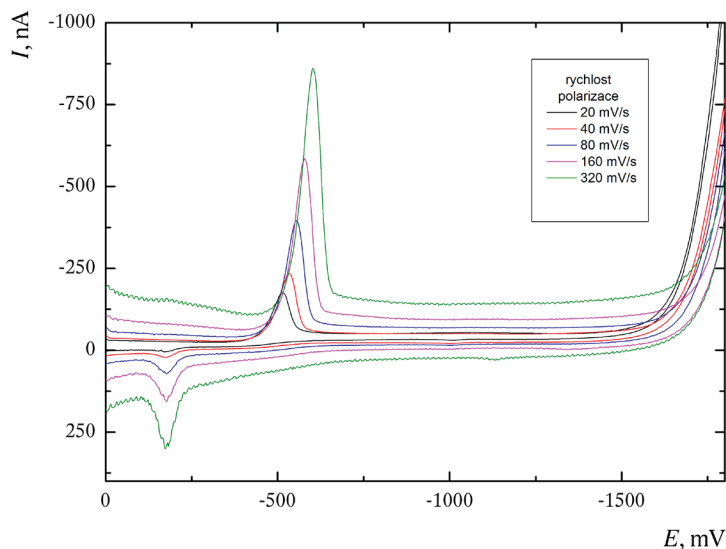
$$(I_p = 0,554 v + 1,1; R^2 = 0,989) \quad (\text{rov. 3.4})$$

lze usuzovat, že se jedná o děj řízený adsorbci, jelikož je proud píku přímo úměrný rychlosti polarizace. Z rovnice katodického proudu píku

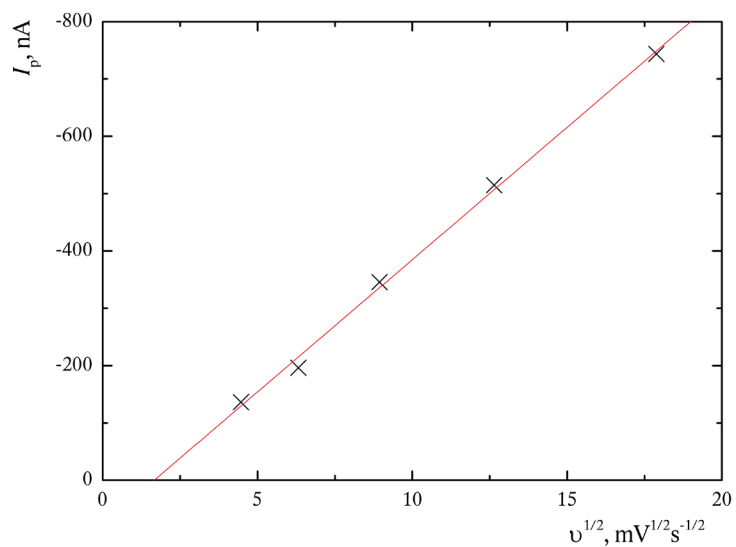
$$(I_p = -46,2 v^{1/2} + 76,9; R^2 = 0,999) \quad (\text{rov. 3.5})$$

je patrná jeho přímá úměra ku odmocnině z rychlosti reakce, což odpovídá ději řízenému difuzí.

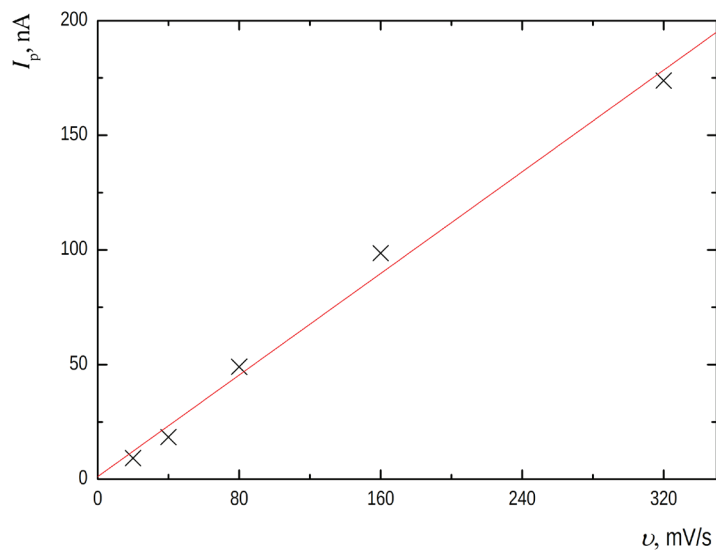
Obrázek 3.13. Cyklické DC voltamogramy při různých rychlostech polarizace. Měřeno v roztoku $1 \cdot 10^{-5} M$ 5-NI v prostředí BR pufru při pH 8 na HMDE.



Obrázek 3.14. Závislost katodického proudu píku na odmocnině z rychlosti polarizace. Měřeno v roztoku $1 \cdot 10^{-5}$ M 5-NI v prostředí BR pufru při pH 8 na HMDE.



Obrázek 3.15. Závislost anodického proudu píku na rychlosti polarizace. Měřeno v roztoku $1 \cdot 10^{-5}$ M 5-NI v prostředí BR pufru při pH 8 na HMDE.



4. VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ 5-NI NA p-AgSAE

4. 1.Vliv pH

Vliv pH na voltametrické chování na p-AgSAE 5-NI byl zkoumán v prostředí BR pufru v rozsahu pH 2–12. Jelikož byl signál bez regenerace značně nereprodukovatelný, během měření byly nastaveny provizorní regenerační potenciály přibližně 100 mV negativněji od rozkladu rtuti a 100 mV pozitivněji od potenciálu odpovídajícího vývoji vodíku. To vedlo k alespoň částečnému zlepšení opakovatelnosti měření. Měření probíhalo metodou DCV v rozsahu 0 – –1800 mV s rychlostí polarizace 100 mV/s. Naměřené voltamogramy pro pH 2, 4, 6, 8, 10 a 12 se nachází na obr. 4.1.

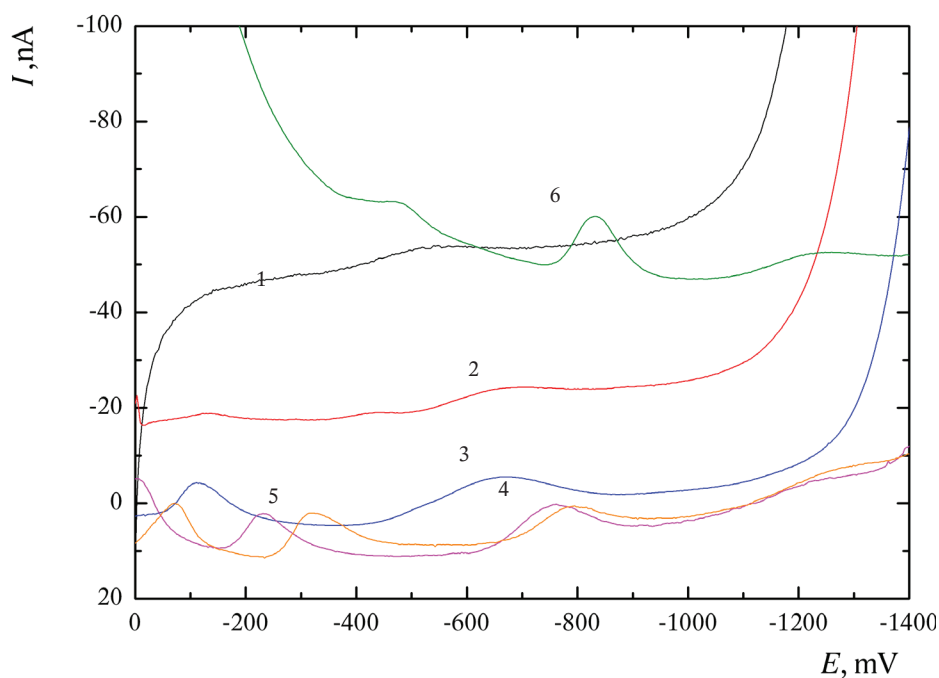
Při všech zkoumaných pH poskytuje látka nejméně dva píky (vlny), při pH 10-12 se objevuje další pík (vlna) v negativní oblasti potenciálů. S rostoucím pH se potenciály píků posouvají do negativnějších hodnot. Graf závislosti potenciálů píků na pH je na obr. 4.2.

Závislost proudů nejvyššího píku na pH včetně RSD je shrnuta v tabulce 4.1. V kyselém a neutrálním prostředí byl pík nacházející se v negativnějším potenciálu (–516 až –760 mV) nejvyšší, v prostředí bazickém se začal dělit na dva. Zde se nejvyšší pík nacházel v pozitivnější oblasti (–277 až –453 mV). Pozitivnější píky byly obecně hůře vyhodnotitelné vzhledem k tvaru základní linie pod nimi.

Pík s nejvyšším proudem poskytoval 5-NI při pH 11. Nicméně, vzhledem k horší opakovatelnosti při této hodnotě pH bylo jako optimální zvoleno pH 8 s relativně vysokým, ale dobře vyhodnotitelným a nejlépe opakovatelným signálem.

Srovnání jednotlivých pH je při užití p-AgSAE je podstatně obtížnější nežli na HMDE. Spolehlivější, ale zdlouhavou cestou, by bylo experimentální zjištění regeneračních potenciálů a případně i počátečních potenciálů měření pro jednotlivá pH, a následný výběr optimálních hodnot.

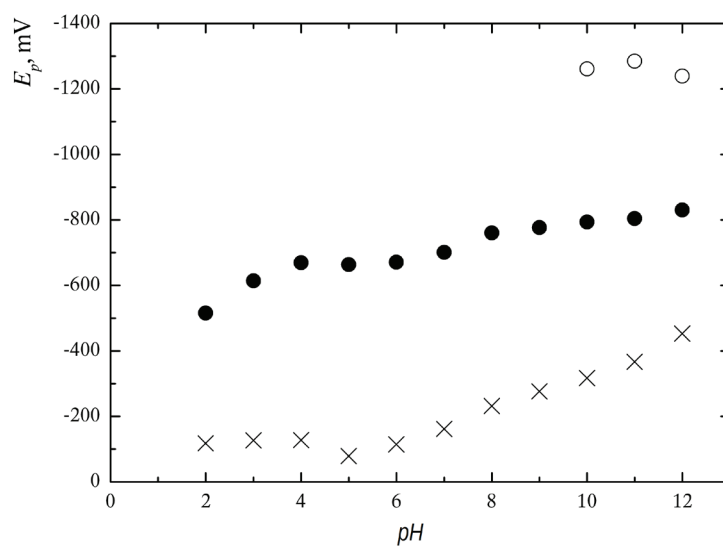
Obrázek 4.1. DC voltamogramy $1 \cdot 10^{-5}$ M 5-NI na p-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 2 (1), 4 (2), 6 (3), 8 (4), 10 (5) a 12 (6).



Tabulka 4.1.

pH	I_p [nA], č. měření			Průměr I_p [nA]	RSD [%]
	1	2	3		
2	2,49	2,70	2,65	2,61	4,1
3	2,20	2,08	2,21	2,16	3,5
4	5,41	2,83	2,84	3,69	40,2
5	5,16	4,07	4,46	4,56	12,1
6	7,64	6,77	6,40	6,9	9,1
7	7,79	7,57	8,14	7,8	3,7
8	7,36	7,46	7,68	7,5	2,2
9	7,30	7,21	6,77	7,1	4,0
10	8,34	8,49	8,91	8,6	3,4
11	8,46	9,96	9,89	9,4	8,9
12	6,22	9,53	11,08	8,9	27,7

Obrázek 4.2. Závislost potenciálů píků na pH.
Metoda DCV v prostředí BR pufru na p – AgSAE. Obr. 4.3



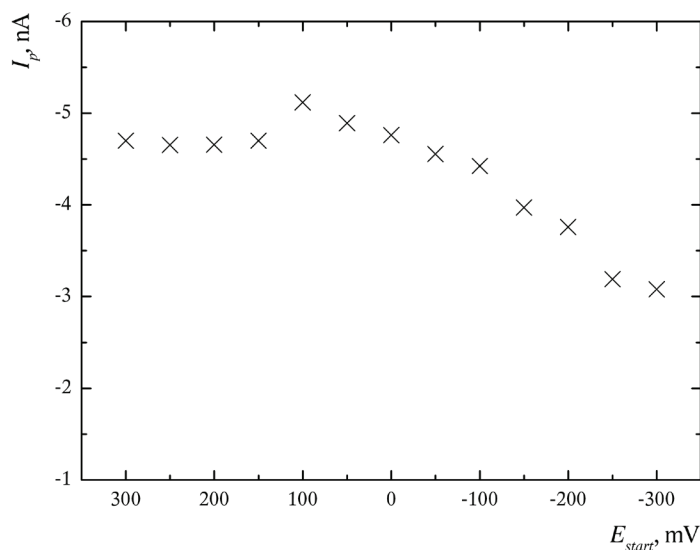
4. 2. Vliv počátečního potenciálu

Pro zjištění vlivu počátečního potenciálu na velikost signálu byla provedena série měření metodou DCV na p-AgSAE s počátečními potenciály (E_{start}) o velikosti 300 až -300 mV. Byl použit roztok 5-NI o koncentraci $2 \cdot 10^{-5}$ M v prostředí BR pufru o pH 8,0 a rychlost polarizace 100 mV·s⁻¹. Nejvyšší hodnoty proudu píku (I_p) bylo dosaženo při počátečním potenciálu +100 mV. Závislost I_p na E_{start} je vynesena na obr. 4.3.

Optimální podmínky pro stanovení 5-NI v prostředí BR pufru na p-AgSAE jsou tedy při pH 8,0 a při počátečním potenciálu +100 mV.

4. 3. Vliv regeneračních potenciálů

Obrázek 4.3. Závislost proudu píků na počátečním potenciálu.
Měřeno v prostředí BR pufru o pH 8 na p-AgSAE. Obr. 4.4



Optimální regenerační potenciál byl hledán pomocí série experimentů sestávající se z elektrochemické aktivace elektrody v KCl a deseti po sobě následujících měření jednoho vzorku. Před každým jednotlivým měřením byl roztok znovu probublán 3 minuty dusíkem a proběhla regenerace. Měření probíhala v prostředí BR pufru o zvoleném pH pomocí metody DCV s počátečním potenciálem +100 mV na p-AgSAE. Cílem bylo dosáhnout co nejvyšší opakovatelnosti proudu píků.

Nejprve byl posuzován vliv regeneračních potenciálů na opakovatelnost proudu píků v roztoku 10^{-5}M 5-NI. Jako první byl zkoumán vliv změny $E_{reg,2}$; získané RSD jsou v tabulce 4.2. Nejlepší opakovatelnosti bylo dosaženo pro $E_{reg,2} = -1200$ mV. Zajímavé je, že optimální regenerační potenciál pro stabilitu základní line pufru je jiný než regenerační potenciál pro stabilitu proudu píků v roztoku 5-NI.

Tabulka 4.2.

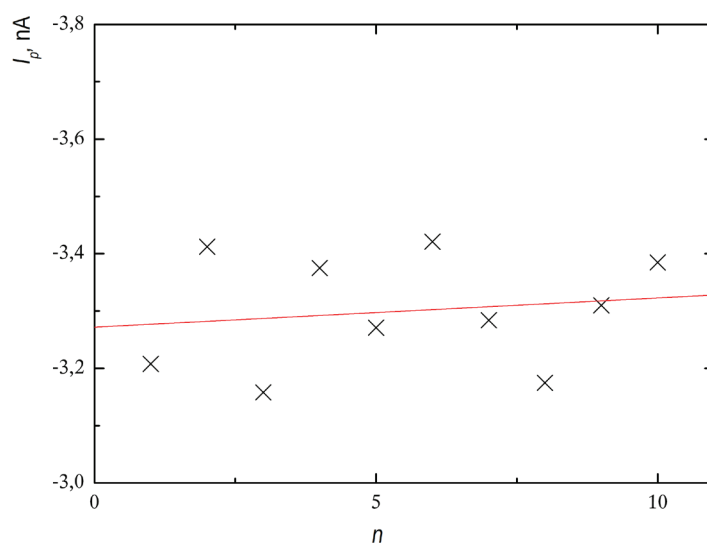
$E_{reg,1}$ [mV]	$E_{reg,2}$ [mV]	RSD [%]
0	-1150	2,91
0	-1200	1,14
0	-1250	2,7
0	-1300	3,3
0	-1400	11,1

Nakonec byl zkoumán vliv $E_{reg,1}$. Získaná data jsou v tabulce 4.3. Nejlepší reprodukovatelnosti bylo dosaženo pro $E_{reg,1} = +100$ mV a 0 mV. Závislost proudu píku na počtu měření pro $E_{reg,1} = +100$ mV a 0 mV je znázorněna v grafech na obr. 4.4 a 4.5. Z lineární regrese závislosti proudů píků na počtu měření bylo zjištěno, že při $E_{reg,1} = +100$ mV dochází k přibližně čtyřikrát většímu nárůstu signálu 5-NI během měření než je tomu v případě $E_{reg,1} = 0$ mV. Za optimální je proto zvolen $E_{reg,1} = 0$ mV. Optimální regenerační potenciály pro stanovení 5-NI v prostředí BR pufru o pH 8 jsou tedy $E_{reg,1} = 0$ mV a $E_{reg,2} = -1200$ mV.

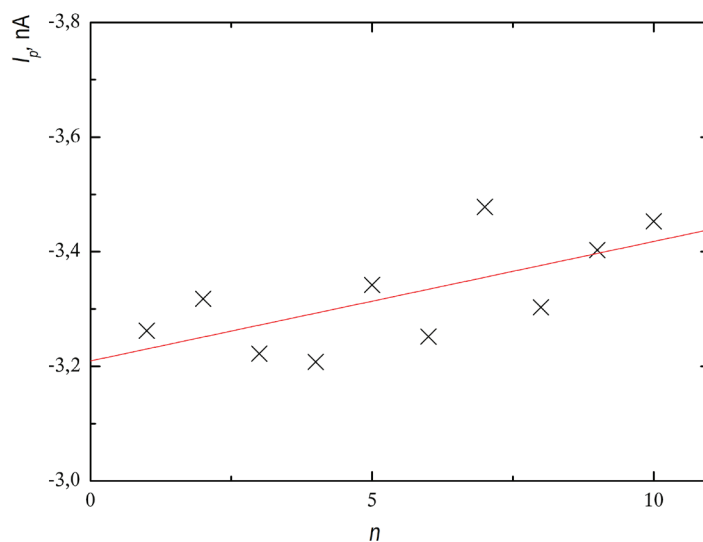
Tabulka 4.3.

$E_{reg,1}$ [mV]	$E_{reg,1}$ [mV]	RSD [%]	Rovnice závislosti I_p na počtu měření n
100	-1200	3,1	
0	-1200	2,9	$-0,0051n - 3,27$
-100	-1200	2,8	$-0,0208n - 3,21$
200	-1200	7,8	

Obrázek 4.4. Závislost proudu píků na počtu měření s $E_{reg,1} = 0 \text{ mV}$
 a $E_{reg,2} = -1200 \text{ mV}$. Měřeno v roztoku $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ 5-NI
 v prostředí BR pufru o pH 8 metodou DCV s $E_{start} +100 \text{ mV}$ na p-AgSAE



Obrázek 4.5. Závislost proudu píků na počtu měření s $E_{reg,1} = +100 \text{ mV}$
 a $E_{reg,2} = -1200 \text{ mV}$. Měřeno v roztoku $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ 5-NI
 v prostředí BR pufru o pH 8 metodou DCV s $E_{start} +100 \text{ mV}$ na p-AgSAE



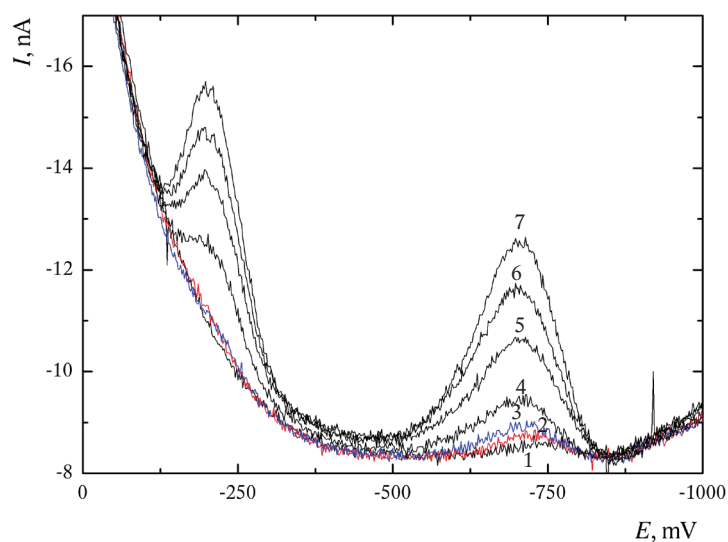
4. 4. DPV stanovení 5-NI na p-AgSAE

Koncentrační závislost pro 5-NI v rozmezí $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-5}$ M byla změřena na p-AgSAE metodou DPV s výškou pulzu -50 mV, šířkou pulzu 80 ms a rychlostí polarizace 10 mV \cdot s $^{-1}$. K měření byly využity optimální podmínky zjištěné pro DC voltametrii: BR pufru o pH $8,0$; $E_{start} = +100$ mV, $E_{reg,1} = +100$ mV a $E_{reg,2} = -1200$ mV. Nevyhlazené voltamogramy pro koncentrační rozmezí 5 NI $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-5}$ M se nachází v na obr. 4.6, odpovídající závislost proudu píků na koncentraci je na obr. 4.7. Ze statistického zpracování lineární regrese byla získána rovnice závislosti proudu píku na koncentraci rce. 4.1.

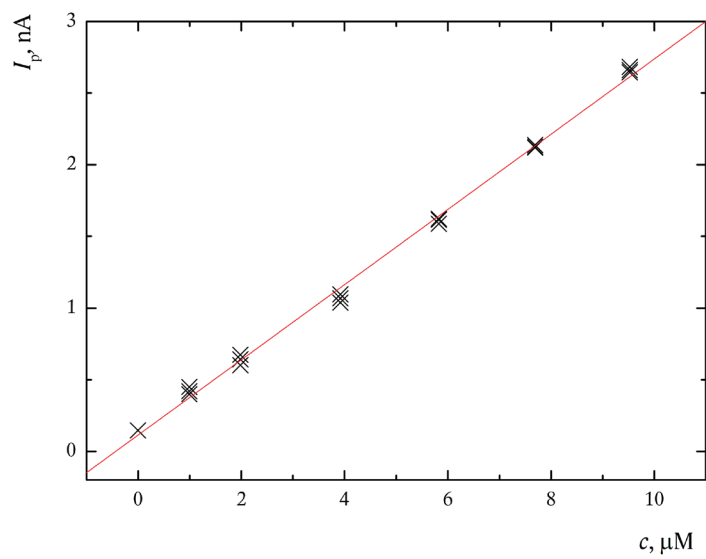
$$I_p[\text{nA}] = (-0,2526 \pm 0,0077) c[\mu\text{M}] \pm 0,18; R^2 = 0,998 \quad (\text{rce. 4.1})$$

Odpovídající L_Q podle Ebel-Kammovy metody činí $2.5 \cdot 10^{-7}$ M. S ohledem na fakt, že koncentrace odpovídající nejnižšímu bodu kalibrace (vyjma blanku) 5-NI činila $1 \cdot 10^{-6}$ M se dá za reálnou mez stanovení pomocí kalibrační křivky považovat $L_Q = 1 \cdot 10^{-6}$ M.

Obrázek 4.6. DP voltamogramy 5-NI v prostředí BR pufru o pH 8 na p-AgSAE. Koncentrace 5-NI: $0 \mu\text{M}$ (1); $1 \mu\text{M}$ (2); $2 \mu\text{M}$ (3); $4 \mu\text{M}$ (4); $6 \mu\text{M}$ (5); $8 \mu\text{M}$ (6); $10 \mu\text{M}$ (7).



Obrázek 4.7. Závislost proudů píků na koncentraci 5-NI v rozmezí $1 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-5}$ M.
Měřeno v prostředí BR pufru o pH 8 metodou DVP na p-AgSAE



5. ZÁVĚR A DISKUZE

Při optimalizaci voltametričkého stanovení 5-NI na HDME bylo zjištěno, že látka poskytuje v prostředí BR pufru v závislosti na hodnotě pH alespoň jeden dobře vyvinutý pík. V kyselém prostředí se tento pík štěpil na dva. Závislost proudu píku na pH byla silně lineární ($R = 0,9905$) a ze směrnice bylo dovozeno, že řídicí děj odpovídá přenosu přibližně jednoho elektronu. Byly nalezeny optimální podmínky pro stanovení 5-NI v prostředí BR pufru: pH 8,0 a počáteční potenciál +100 mV. Metodou DPV byla naměřena koncentrační závislost v rozmezí $1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$ M, L_Q podle Ebel-Kammovy metody činil $1,8 \cdot 10^{-7}$ M.

Dále byla při zjištěných optimálních podmínkách prověřována možnost využití adsorbční rozpouštěcí voltametrie pro zvýšení citlivosti stanovení. Při všech zkoumaných akumulčních potenciálech docházelo při prodloužení času akumulace k růstu signálu pozadí a zároveň poklesu proudu píku, pravděpodobně důsledkem interference některé ze složek BR pufru, nebo přítomností stopového množství jiných nečistot. Zdá se, že v prostředí BR pufru je reálná možnost využití metody AdRV pro stanovení 5-NI vyloučena.

Elektrochemické chování 5-NI v prostředí BR pufru o pH 8,0 bylo studováno také pomocí cyklické voltametrie, ze závislosti proudu píků na rychlosti polarizace bylo dovozeno, že je katodická redukce dějem řízeným difúzí a anodická oxidace dějem řízeným adsorbí.

Nakonec byla provedena optimalizace stanovení 5-NI na p-AgSAE. Látka poskytovala v celém spektru pH alespoň dva píky, v silně bazickém prostředí se objevoval další pík v negativní oblasti potenciálů. Během hledání optimálních podmínek byl kladen důraz zejména na dobrou reprodukovatelnost měření, které se povedlo dosáhnout při pH 8,0; počátečním potenciálu +100 mV a regeneračních potenciálech $E_{reg,1} = 0$ mV a $E_{reg,2} = -1200$ mV. Optimální podmínky byly využity k naměření koncentrační závislosti 5-NI v rozmezí $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$ M metodou DPV. L_Q vypočtený Ebel-Kammovou metodou činil překvapivě nízkých $2,5 \cdot 10^{-7}$ M, tedy čtyřikrát méně než byla nejnižší koncentrace 5-NI v kalibrační závislosti. Pro stanovení 5-NI z kalibrační závislosti je tedy nutno uvažovat $L_Q = 1 \cdot 10^{-6}$.

Je pravděpodobné, že určené optimální podmínky pro stanovení 5-NI p-AgSAE jsou spíše jen vyhovující, nežli optimální, zejména výběr optimálního pH nebyl zcela jednoznačný. Korrectním, ale časově náročným postupem je před výběrem optimální hodnoty pH nejprve určit pro jednotlivá pH vhodné regenerační potenciály. Zpětně vzato se slibně jeví například pH 7,0; při kterém byla reprodukovatelnost proudu píků podobná jako u pH 8,0; ale s o něco vyšším proudem píku. Navíc by bylo možné sestavit koncentrační závislost 5-NI ve větším rozsahu, protože by se ředěním méně měnilo pH roztoku. Možnou slabinou vypracované metody je také fakt, že nebyla ověřena na reálných matricích, například pitné nebo říční vodě. K dalšímu zlepšení citlivosti stanovení 5-NI na p-AgSAE by mohlo vést prouzkoumání elektrochemického chování látky ve vodně/methanolických roztocích. Kromě možnosti přípravy koncentrovanějšího zásobního roztoku by použití methanolického rozpouštědla umožnilo také výrazně snazší využití extrakce na tuhou fázi.

Přesto, že optimalizace podmínek na p-AgSAE je jednoznačně náročnější než na HMDE a získaný reálný limit detekce je téměř o řád horší, jeví se p-AgSAE jako zajímavá volba zejména pro prostředí a situace, kdy nízká mechanická odolnost HMDE a odkapávající rtuť přináší technické obtíže.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Tokiwa, H.; Nakagawa, R.; Horikawa, K.; Ohkubo, A., The Nature of the Mutagenicity and Carcinogenicity of Nitrated, Aromatic-Compounds in the Environment. *Environmental health perspectives* 1987, 73, 191-199.
2. Pitts, J. N.; Vancauwenberghe, K. A.; Grosjean, D.; Schmid, J. P.; Fitz, D. R.; Belser, W. L.; Knudson, G. B.; Hynds, P. M., Atmospheric Reactions of Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons - Facile Formation of Mutagenic Nitro-Derivatives. *Science* 1978, 202 (4367), 515-519.
3. Kocourek, V.; Hajšlová, J., Nitrované polycyklické uhlovodíky (nitroPAH): Environmentální polutanty. Vědecký výbor fyto-sanitární a životní prostředí [ONLINE]. <http://www.phytosanitary.org/projekty/2004/vvf-09-04.pdf> (staženo 26.srpna 2013).
4. Kamens, R. M.; Fan, Z. H.; Yao, Y. L.; Chen, D. H.; Chen, S. F.; Vartiainen, M., A Methodology for Modeling the Formation and Decay of Nitro-Pah in the Atmosphere. *Chemosphere* 1994, 28 (9), 1623-1632.
5. Moller, L., In-Vivo Metabolism and Genotoxic Effects of Nitrated Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons. *Environmental health perspectives* 1994, 102, 139-146.
6. McCoy, E. C.; Rosenkranz, E. J.; Petrullo, L. A.; Rosenkranz, H. S.; Mermelstein, R., Structural basis of the mutagenicity in bacteria of nitrated naphthalene and derivatives. *Environmental mutagenesis* 1981, 3 (5), 499-511.
7. Fu, P. P.; Herrenosaenz, D.; Vontungeln, L. S.; Lay, J. O.; Wu, Y. S.; Lai, J. S.; Evans, F. E., DNA-Adducts and Carcinogenicity of Nitro-Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons. *Environmental health perspectives* 1994, 102, 177-183.
8. Siegmund, B.; Weiss, R.; Pfannhauser, W., Sensitive method for the determination of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in the human diet. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2003, 375 (1), 175-181.
9. Xu, J. H.; Lee, F. S. C., Quantification of nitrated polynuclear aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate matter. *Analytica chimica acta* 2000, 416 (1), 111-115.
10. Mirivel, G.; Riffault, V.; Galloo, J. C., Simultaneous determination by ultra-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization time-of-flight mass spectrometry of nitrated and oxygenated PAHs found in air and soot particles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010, 397 (1), 243-256.
11. Nassar, H. F.; Tang, N.; Kameda, T.; Toriba, A.; Khoder, M. I.; Hayakawa, K., Atmospheric concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and selected nitrated derivatives in Greater Cairo, Egypt. *Atmospheric Environment* 2011, 45 (39), 7352-7359.

12. Tejada, S. B.; Zweidinger, R. B.; Sigsby, J. E., Fluorescence Detection and Identification of Nitro-Derivatives of Polynuclear Aromatic-Hydrocarbons by on-Column Catalytic Reduction to Aromatic-Amines. *Analytical chemistry* 1986, 58 (8), 1827-1834.
13. Prchal, V.; Krejčová, J.; Vyskocil, V.; Pecková, K.; Fischer, J.; Zima, J.; Barek, J., Determination of 4-Aminobiphenyl and 4-Nitrobiphenyl by HPLC with Electrochemical, UV Spectrophotometric, and Fluorescent Detection. *International Journal of Electrochemical Science* 2013, 8 (2), 2524-2535.
14. Priego-Capote, F.; Luque-Garcia, U.; de Castro, M. D. L., Automated fast extraction of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons from soil by focused microwave-assisted Soxhlet extraction prior to gas chromatography-electron-capture detection. *Journal of Chromatography A* 2003, 994 (1-2), 159-167.
15. Lund, H.; Hammerich, O., *Organic electrochemistry*. 4th ed.; M. Dekker: New York, 2001; p vii, 1393 p.
16. Pecková, K.; Barek, J.; Navrátil, T.; Yosypchuk, B.; Zima, J., Voltammetric Determination of Nitronaphthalenes at a Silver Solid Amalgam Electrode. *Anal Lett* 2009, 42 (15), 2339-2363.
17. Vyskocil, V.; Barek, J., Mercury Electrodes-Possibilities and Limitations in Environmental Electroanalysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 2009, 39 (3), 173-188.
18. Navrátil, T.; Švancara, I.; Mrázková, K.; Nováková, K.; Šestáková, I.; Heyrovský, M.; Pelcová, D. Mercury and mercury electrodes: The Ultimate Battle for the Naked Existence (A Consideration). *Sensing in Electroanalysis* 2011, 6, 23-53.
19. Novotny, L.; Yosypchuk, B., Solid silver amalgam electrodes. *Chem Listy* 2000, 94 (12), 1118-1120
20. Mikkelsen, O.; Schroder, K., Dental amalgam in voltammetry some preliminary results. *Anal Lett* 2000, 33 (15), 3253-3269
21. Vyskočil, V.; Daňhel, A.; Fischer, J.; Novotný, V.; Deylová, D.; Musilová-Karanová, J.; Maixnerová, L.; Pecková, K.; Barek, J. Krása a užitečnost nových elektrodových materiálů. *Chemické listy* 2004, (104), 1181-1195.
22. Fischer, J.; Vanourkova, L.; Danhel, A.; Vyskocil, V.; Cizek, K.; Barek, J.; Peckova, K.; Yosypchuk, B.; Navratil, T., Voltammetric determination of nitrophenols at a silver solid amalgam electrode. *Int J Electrochem Sc* 2007, 2 (3), 226-234.
23. Danhel, A.; Shiu, K. 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* 2009, 21 (3-5), 303-308.

24. Fujita, Y. Plating method, light-transmitting electrically-conductive film and light-transmitting electromagnetic wave shield film, 2012. Patent US8097143 B2. [ONLINE]. <http://www.google.com/patents/US8097143> (staženo 26.srpna 2013).
25. Adkins, J. L.; Patel, D.P. Water soluble antifoggant for powder developer solutions, 1993. Patent US5272045 A. [ONLINE]. <https://www.google.com/patents/US5272045> (staženo 26.srpna 2013).
26. Product information, MSDS. 5-Nitroindazole. [ONLINE]. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/216755> (staženo 26.srpna 2013).
27. Chiu, C. W.; Lee, L. H.; Wang, C. Y.; Bryan, G. T., Mutagenicity of some commercially available nitro compounds for Salmonella typhimurium. *Mutation research* 1978, 58 (1), 11-22.
28. Rosenfeld, R. J.; Garcin, E. D.; Panda, K.; Andersson, G.; Aberg, A.; Wallace, A. V.; Morris, G. M.; Olson, A. J.; Stuehr, D. J.; Tainer, J. A.; Getzoff, E. D., Conformational changes in nitric oxide synthases induced by chlorzoxazone and nitroindazoles: Crystallographic and computational analyses of inhibitor potency. *Biochemistry-U.S.* 2002, 41 (47), 13915-13925.
29. Olea-Azar, C.; Cerecetto, H.; Gerpe, A.; Gonzalez, M.; Aran, V. J.; Rigol, C.; Opazo, L., ESR and electrochemical study of 5-nitroindazole derivatives with antiprotozoal activity. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* 2006, 63 (1), 36-42.
30. Cheptea, C.; Sunel, V.; Stan, C.; Dorohoi, D. O., New Derivatives of 5-Nitroindazole with Potential Antitumor Activity. *Romanian Journal of Chemistry* 2012, 57 (3), 229-234.
31. U.S. Environmental Protection Agency Endocrine Disruptor Screening Program - Universe of Chemicals. [ONLINE]. http://www.epa.gov/endo/pubs/edsp_chemical_universe_list_11_12.pdf (staženo 26.srpna 2013).
32. Šimůnková, P., Polarografické a Voltametrické stanovení 5-nitroindazolu. diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha, 2004.
33. European Commission: Commission Regulation (EC) No 552/2009 of 22 June 2009 amending Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards Annex XVII (Text with EEA relevance), 2009.
34. Směrnice Evropského Parlamentu a Rady 2002/95/ES ze dne 27. ledna 2003 o omezení používání některých nebezpečných látek v elektrických a elektronických zařízeních. Úřední věstník L 37, 13.2.2003, s. 19, 2003.