

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ STOPOVÝCH MNOŽSTVÍ 2-AMINOFLUOREN-9-ONU S PŘEDŘAZENOU PREKONCENTRACÍ ANALYTU POMOCÍ EXTRAKCE NA TUHOU FÁZI

ANDREA HÁJKOVÁ*, VLASTIMIL VYSKOČIL
a JIŘÍ BAREK

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Univerzitní centrum excelence „Supramolekulární chemie“, Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Hlavova 2030/8, 128 43 Praha 2
andrea.hajkova@natur.cuni.cz

Došlo 5.9.12, přijato 26.11.12.

Klíčová slova: adsorpční rozpouštěcí diferenční pulsní voltametrie, visící rtuťová kapková minielektroda, extrakce na tuhou fázi, supramolekulární interakce, 2-aminofluoren-9-on, kontaminace povrchových vod, pitná voda, říční voda

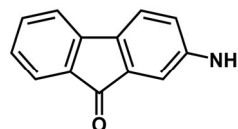
Úvod

S neustálým rozvojem průmyslové činnosti stoupá také znečištění životního prostředí toxickými látkami. Jejich výzkum a monitorování, k němuž je zapotřebí vyvíjet citlivé metody pro stanovení těchto látek, se tak dostávají do popředí zájmu ekologických a environmentálních věd. Deriváty polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) s oxoskupinou či aminoskupinou jsou dobře známé nebezpečné látky vyskytující se ve znečištěné vodě, atmosféře i půdě¹. Primárním zdrojem oxoderivátů PAH (OPAH) jsou spalovací procesy^{1–3}, především antropogenního původu, jako je topení, automobilová doprava a průmyslová činnost¹. Vznikají také jako produkty reakcí PAH s ozonem v atmosféře³ a jako rozkladné produkty PAH v bakteriálních procesech^{4–6}. Aminoderiváty PAH (APAH) jsou látky používané především v průmyslu při výrobě barviv^{7,8}, jako přísady do polymerních a pryžových směsí⁷ nebo jako meziprodukty při výrobě průmyslových chemikálií (pesticidy, léky), proto je lze nalézt na různých pracovních místech a v průmyslových odpadních vodách^{7,9}. Vyskytují se v potravinách v důsledku běžného tepelného zpracování pokrmů, jako je vaření, smažení a grilování

potravin bohatých na bílkoviny (např. maso)¹⁰. APAH jsou také hlavními metabolity nitroderivátů PAH (NPAH) v živých organismech^{7,11}.

2-Aminofluoren-9-on (2-AFN, obr. 1) je biologicky aktivní látka, která je nebezpečná lidskému zdraví a vykazuje genotoxické účinky¹². 2-AFN je jedním z aminoderivátů fluoren-9-onu¹³, které se vyskytují v životním prostředí, a jeho výskyt je spojen se zpracováním a čištěním zemního plynu v plynových rafinériích; vzorky podzemních vod odebraných z těchto ekologicky zatížených míst často obsahují PAH a jejich deriváty^{14,15}. 2-AFN a jemu strukturně podobné látky (2-aminofluoren-9-ol, 2,4,7-trinitrofluoren-9-on, fluoren-9-on, 2,7-dinitrofluoren, 2-nitrofluoren a fluoren) byly spolu s emisemi oxidů dusíku, respirabilními částicemi a mnoha dalšími PAH nalezeny pomocí GC-MS a HPLC-UV ve výfukových plynech vznětových motorů¹⁶. Obecně jsou aromatické aminy nebezpečné látky mající mutagenní a karcinogenní potenciál¹⁷. Genotoxický účinek 2-AFN jako metabolitu byl zkoumán *in vitro* s použitím izotopu fosforu ³²P pro značení DNA aduktů¹². Fotooxidací 2-aminofluorenu vznikají mutageny působící na bakterie rodu *Salmonella*. Mezi tyto mutageny patří 2-nitrosofluoren, 2-nitrofluoren, 2-nitrofluoren-9-on a 2-AFN¹³. Předpokládaná karcinogenita 2-AFN a některých strukturně podobných látek byla zkoumána pomocí testů cytotoxicity na hepatocytech v játrech potkanů. Pozitivní reakci poskytl 2-aminofluoren, který je známým hepatokarcinogenem, ale negativní reakci na karcinogenitu poskytl 2-nitrofluoren, 2-AFN, fluoren a anthracen¹⁸. V živých organismech byl 2-AFN prokázán jako jeden z metabolitů 2-nitrofluorenu^{19–21} (2-AFN byl identifikován pomocí LC-MS v moči potkanů, kterým byl 2-nitrofluoren podáván^{22,23}).

2-AFN byl také použit jako amin pro přípravu Schiffových bází, které poskytují široké spektrum možností klinického využití, především jako protinádorové látky při léčbě nádorových onemocnění²⁴. Fluorimetrický výzkum chování 2-AFN při interakci s β -cyklodextrinem (interakce analogická k interakci mezi substrátem a enzymem) poskytl výsledky, které byly uplatněny při použití 2-AFN jako fluorescenční sondy pro vyšetřování biologického prostředí²⁵.



Obr. 1. Strukturální vzorec 2-aminofluoren-9-onu

* Andrea Hájková tuto práci úspěšně prezentovala na soutěži O cenu firmy Merck 2012 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie.

Vzhledem k tomu, že 2-AFN obsahuje ve své struktuře jak oxoskupinu, kterou lze elektrochemicky snadno redukovat^{20,21,26–28}, tak i aminoskupinu, kterou lze elektrochemicky snadno oxidovat^{17,29,30}, je možné pro stanovení jeho stopových množství použít moderní polarografické a voltametrické techniky^{31,32}. V naší předchozí práci³¹ byly nalezeny optimální podmínky pro stanovení submikromolárních koncentrací 2-AFN pomocí DC voltametrie (DCV) (mez stanovitelnosti (L_Q) $\approx 2 \cdot 10^{-7}$ mol Γ^{-1}) a diferenční pulsní voltametrie (DPV) ($L_Q \approx 1 \cdot 10^{-7}$ mol Γ^{-1}) na visící rtuťové kapkové minielektrodě (HMDmE). Ve snaze dosáhnout nižší hodnoty meze stanovitelnosti 2-AFN, než jaká byla získána při DPV na HMDmE, bylo využito akumulace 2-AFN na povrch pracovní elektrody, tedy techniky adsorpční rozpouštěcí diferenční pulsní voltametrie (AdSDPV) na HMDmE (cit.³³), což umožnilo dosáhnout hodnoty L_Q téměř o dva koncentrační řády nižší, a to $4 \cdot 10^{-9}$ mol Γ^{-1} (cit.^{31,34}).

Současná analytická chemie životního prostředí však neustále zvyšuje nároky na nově vyvíjené analytické metody, především z hlediska jejich citlivosti^{35,36}. Požadavek na sledování nanomolárních až pikomolárních koncentrací genotoxických látek v životním prostředí je pak nejčastěji řešen pomocí kombinace účinné prekoncentrační techniky a následného stanovení analytu vhodnou analytickou metodou²⁶. V případě 2-AFN, jehož výskyt byl potvrzen především v povrchových vodách^{14,15}, bylo při vývoji takovéto dvoustupňové analytické metody využito spojení extrakce na tuhou fázi (SPE) s citlivou voltametrickou metodou (SPE–AdSDPV). SPE je moderní metoda velmi vhodná pro předběžnou separaci a prekoncentraci celé řady genotoxických analytů na základě jejich nekovalentní (supramolekulární) interakce s vhodným typem zakotvené fáze. Cílem této práce bylo optimalizovat podmínky extrakce 2-AFN na tuhou fázi (prekoncentrační stupeň) a ověřit použitelnost dříve vyvinuté voltametrické metody (AdSDPV na HMDmE)^{31,34} při stanovení 2-AFN v extraktech z modelových vzorků pitné a říční vody.

Experimentální část

Reagencie

Studovanou látkou byl 2-aminofluoren-9-on (2-AFN, 98%, Sigma-Aldrich, Praha, ČR). Zásobní roztok o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol Γ^{-1} byl připraven rozpuštěním 0,0489 g 2-AFN v methanolu (99,9%, p.a., Merck, Darmstadt, Německo) v 250 ml odměrné baňce. Připravený zásobní roztok byl uchováván ve tmě za laboratorní teploty; za těchto podmínek je zásobní roztok stabilní minimálně po dobu 3 měsíců (dlouhodobě sledováno pomocí UV-vis spektrofotometrie³⁷). Roztoky s nižšími koncentracemi 2-AFN byly připravovány přesným ředěním jeho zásobního roztoku methanolem.

Acetátový pufr o iontové síle 0,2 mol Γ^{-1} a pH 4,0 (AcB) byl připraven smísením 0,2 mol Γ^{-1} octové kyseliny (80%, p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR) a 0,2 mol Γ^{-1} hydro-

xidu sodného (p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR). Dalšími použitými chemikáliemi byly aceton (p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR) a deionizovaná voda (produkovaná systémem Milli-Q Plus, Millipore, Billerica, MA, USA).

Jako vzorek pitné vody byla použita voda z vodovodu v budově Chemického ústavu PŘF UK Praha (Hlavova 8, Praha 2). Pitná voda byla odtáčena po dobu 5 min a potom byl odebrán vzorek. Vzorek říční vody byl odebrán z Labe v Nymburce u Sportovního centra (1500 m od vodní elektrárny v Nymburce proti proudu řeky).

Aparatura

Při voltametrických stanoveních byla použita sestava Eco-Tribo Polarograf se softwarem Polar Pro verze 5.1 (obojí Polaro-Sensors, Praha, ČR). Software pracoval v operačním systému Windows XP (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Jednotlivá měření byla prováděna ve tříelektrodeovém zapojení, ve kterém byla jako referenční elektroda použita argentschloridová elektroda typu RAE 113 (1 mol Γ^{-1} KCl, Monokrystaly, Turnov, ČR) a jako pomocná elektroda platinová drátková elektroda typu PPE (Monokrystaly, Turnov, ČR). Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková minielektróda (HMDmE) typu UM μ E (Polaro-Sensors, Praha, ČR). Pro vytvoření kapky byl ventil otevřen po dobu 450 ms (povrch rtuťové kapky 1,42 mm², průtoková rychlost rtuťi 5,92 mg s⁻¹). Pro techniku AdSDPV byla použita rychlost polarizace 20 mV s⁻¹ a na elektrody byly vkládány pulsy o šířce 100 ms (proud vzorkován posledních 20 ms) a modulační amplitudě –50 mV.

Přesná hodnota pH byla měřena digitálním pH-metrem Jenway 3510 s kombinovanou skleněnou elektrodou typu 924 005 (obojí Jenway, Chelmsford, Velká Británie). Přístroj byl kalibrován pomocí standardních vodných roztoků kalibračních pufrů.

Pro extrakci na tuhou fázi (SPE) byly použity kolonky LiChrolut RP-18 E (500 mg sorbentu, kat. č. 1.19849.0001, Merck, Darmstadt, Německo), které jsou dle údajů výrobce vhodné pro separaci slabě polárních látek z vodného prostředí. Tyto kolonky mají objem 3 ml a jsou naplněny 500 mg silikagelu s navázanou fází RP-18. Kolonka byla napojena na extraktor, který byl přes pojistnou nádobu spojen s vakuovou pumpou, která zajišťovala podtlak. Podtlak byl kontrolován manometrem a udržován na hodnotě 50 kPa. Vzorky 2-AFN připravené v říční vodě byly před SPE přefiltrovány přes filtry MN GF-3 (filtr ze skelných vláken, plošná hmotnost 50 g m⁻², tloušťka 0,28 mm, kruhový průměr 50 mm, Macherey-Nagel, Düren, Německo).

Voltametrická měření

Pokud není uvedeno jinak, bylo postupováno následovně: příslušný objem zásobního roztoku 2-AFN byl v odměrné baňce doplněn AcB. Před prvním voltametrickým měřením byl rozpuštěný kyslík ze vzorku odstraněn ve voltametrické nádobce pětiminutovým probubláváním

dušikem (čistota 4.0, Linde, Praha, ČR) a před každým opakovaným měřením byl roztok znovu probublán alespoň po dobu 30 s. Následně byla provedena akumulace 2-AFN za optimálních akumulačních podmínek převzatých z naší předešlé práce^{31,34} (potenciál akumulace (E_{acc}) 100 mV a čas akumulace (t_{acc}) 120 s). Všechna měření byla prováděna za laboratorní teploty.

Výška píku při AdSDPV byla měřena od spojnice minim po jeho stranách. U kalibračních přímků byly sestrojeny konfidenční pásy na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (cit.³⁸). Mez stanovitelnosti (L_Q) byla vypočtena jako desetinásobek směrodatné odchylky deseti opakovaných měření sledované látky o koncentraci odpovídající nejnižšímu bodu příslušné kalibrační přímky (10σ) vydělený směrnici kalibrační přímky³⁹. K výpočtům a tvorbě grafů uvedených v této práci bylo použito programů Origin Pro verze 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) a Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

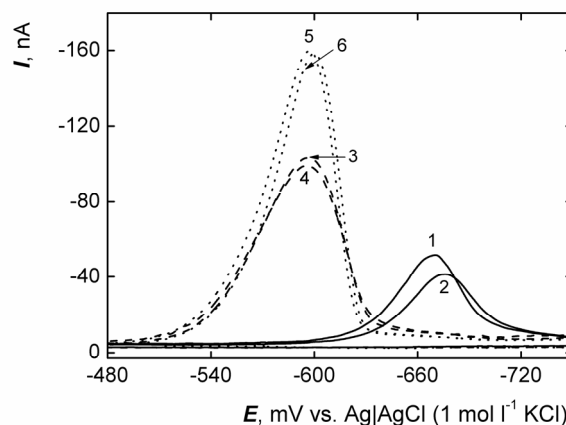
Extrakce na tuhou fázi

SPE 2-AFN z vodného roztoku byla prováděna následujícím postupem: kolonka byla aktivována promytím 10 ml methanolu a následně promyta 10 ml deionizované vody. Poté byl přes kolonku přesát modelový vzorek vody o objemu 100 ml. Zachycený 2-AFN byl eluován přímo do odměrné baňky 5,0 ml methanolu nebo 1,0 ml acetonu a poté doplněn AcB na objem 10 ml nebo 1,0 ml. Po promíchání byl roztok převeden do voltametrické nádoby a po odstranění kyslíku byl zaznamenán AdSDPV voltamogram. Shodným postupem byl proveden slepý pokus. Procentuální výtěžek SPE byl určen z poměru I_p / I_p^0 , kde I_p je výška píku 2-AFN po SPE z vodného roztoku 2-AFN o příslušné koncentraci a I_p^0 je výška píku 2-AFN v roztoku připraveném extrakcí slepého vzorku, k němuž byl po SPE přidán odpovídající objem zásobního roztoku 2-AFN.

Výsledky a diskuse

Optimalizace podmínek pro extrakci na tuhou fázi

Prvotní optimalizace SPE byla zaměřena na nalezení vhodného rozpouštědla pro eluci analytu z hlediska dosažení vysokého výtěžku extrakce, potřebného množství elučního činidla a snadnosti jeho odpaření do sucha. Do 100ml odměrné baňky byl přidán odpovídající objem zásobního roztoku 2-AFN (výsledná $c = 1 \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1}) a tento roztok byl přesát přes aktivovanou SPE kolonku. 2-AFN zachycený na kolonce byl postupně vymýván 1,0ml dávkami methanolu, k úplné eluci 2-AFN došlo až po vymytí celkem 5,0 ml methanolu. Následně byl zaznamenán AdSDPV voltamogram na HMDmE v prostředí methanol – AcB (1:1) (obr. 2). Již dříve bylo zjištěno, že přítomnost methanolu v měřeném roztoku snižuje adsorpci



Obr. 2. Voltamogramy 2-AFN ($c \approx 1 \cdot 10^{-6}$ mol l^{-1}) měřené metodou AdSDPV na HMDmE při $E_{acc} = 100$ mV a $t_{acc} = 120$ s. Prostředí: methanol – AcB (1:1) (přímý přídavek 2-AFN ke slepému vzorku (1) a extrakt 2-AFN z vodného roztoku (2)); aceton – AcB (1:9) (přímý přídavek 2-AFN ke slepému vzorku (3) a extrakt 2-AFN z vodného roztoku (4)); AcB (přímý přídavek 2-AFN ke slepému vzorku (5) a extrakt 2-AFN z vodného roztoku (6))

zkoumané látky na povrch HMDmE (cit.^{26,33}), proto byla snaha snížit množství organické fáze při voltametrických stanoveních. Měření bylo zopakováno se stejnou koncentrací 2-AFN, ale jako eluční činidlo byl použit aceton, který má vyšší eluční sílu, a proto jej bylo zapotřebí menší množství (1,0 ml). Poté byl zaznamenán AdSDPV voltamogram na HMDmE v prostředí aceton – AcB (1:9) (obr. 2). Pro úplné odstranění organické fáze bylo měření zopakováno s acetonem (1,0 ml) jako elučním činidlem, ten však byl následně odpařen do sucha a opět byl zaznamenán AdSDPV voltamogram na HMDmE, nyní v prostředí 10 ml AcB (obr. 2). Shodným postupem byly provedeny odpovídající slepé pokusy. Všechny AdSDPV voltamogramy na HMDmE byly naměřeny při optimálních podmínkách akumulace $E_{acc} = 100$ mV a $t_{acc} = 120$ s (převzato z cit.^{31,34}) a jsou zobrazeny na obr. 2. Získané výtěžky pro jednotlivé postupy SPE jsou uvedeny v tab. I.

Z hodnot uvedených v tab. I byl pro SPE zvolen jako optimální následující postup: 100 ml vodného roztoku bylo přesáno přes aktivovanou SPE kolonku, zachycené množství 2-AFN bylo eluováno z kolonky 1,0 ml acetonu, následovalo odpaření elučního činidla do sucha, rozpuštění získaného odparku v 10 ml nebo v 1,0 ml AcB a voltametrické měření v prostředí AcB. Čím nižší byl obsah organické složky, tím vyšší byl signál látky, a tedy i lepší adsorpce 2-AFN na povrch HMDmE. Vyšší byl i výtěžek extrakce a nižší relativní směrodatná odchylka (s_r) stanovení. Tento postup poskytl výsledný výtěžek extrakce ($98,7 \pm 1,7$) % ($s_r = 1,3$ %, $n = 4$), prekoncentrační faktor (k) byl za těchto podmínek stanoven jako 9,87 (teoretický prekoncentrační faktor (k_{teor}) měl hodnotu 10).

Tabulka I

Parametry SPE ze 100 ml roztoku 2-AFN ($c = 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$) v deionizované vodě do 10 ml objemu měřeného vzorku ($c \approx 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$); měřeno metodou AdSDPV na HMDmE při $E_{\text{acc}} = 100 \text{ mV}$ a $t_{\text{acc}} = 120 \text{ s}$

Výsledné prostředí měřeného roztoku	I_p^a [nA]	I_p^{0a} [nA]	Výtěžek ^a [%]	s_r výtěžku ^b ($n = 4$) [%]
Methanol – AcB (1:1)	–37,1	–46,3	80,1	11,5
Aceton – AcB (1:9)	–90,9	–95,3	95,4	2,9
AcB	–147,2	–150,4	97,9	1,3

^aHodnota získaná z jednoho měření zobrazeného na obr. 2, ^b relativní směrodatná odchylka (s_r) v rámci série po sobě jdoucích měření výtěžků SPE

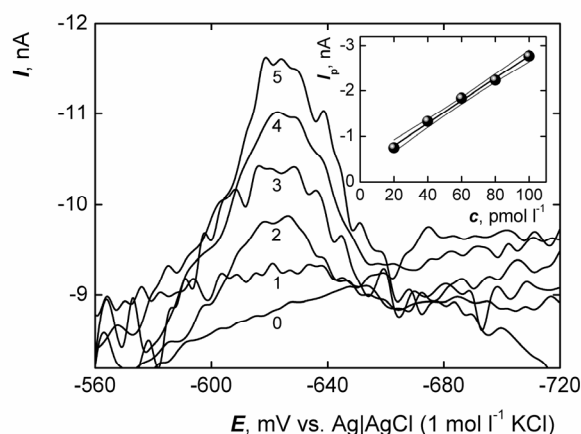
Extrakce 2-aminofluoren-9-onu z deionizované vody

Nejprve byl optimální postup pro stanovení 2-AFN v modelových vzorcích vody vyzkoušen na SPE z deionizované vody jako ideální modelové matrice. K převedení 2-AFN ze 100 ml vodného roztoku do organické fáze byla použita technika SPE s následnou elucí 2-AFN 1,0 ml acetonu a odpařením do sucha. Odparek byl rozpuštěn v 10 ml nebo 1,0 ml AcB a vzniklý roztok byl analyzován metodou AdSDPV. Metodou SPE–AdSDPV bylo proměřeno koncentrační rozmezí $1 \cdot 10^{-10}$ až $1 \cdot 10^{-9} \text{ mol l}^{-1}$ 2-AFN; při SPE došlo k zakoncentrování analytu ze 100 ml deionizované vody (koncentrace $1 \cdot 10^{-10}$ až $1 \cdot 10^{-9} \text{ mol l}^{-1}$ 2-AFN) do 10 ml měřeného roztoku (koncentrace $1 \cdot 10^{-9}$ až $1 \cdot 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$ 2-AFN), tedy teoretický prekoncektrční faktor $k_{\text{teor}} = 10$. Následně bylo stejnou metodou změřeno koncentrační rozmezí $2 \cdot 10^{-11}$ až $1 \cdot 10^{-10} \text{ mol l}^{-1}$ 2-AFN (obr. 3); při SPE došlo k zakoncentrování analytu ze

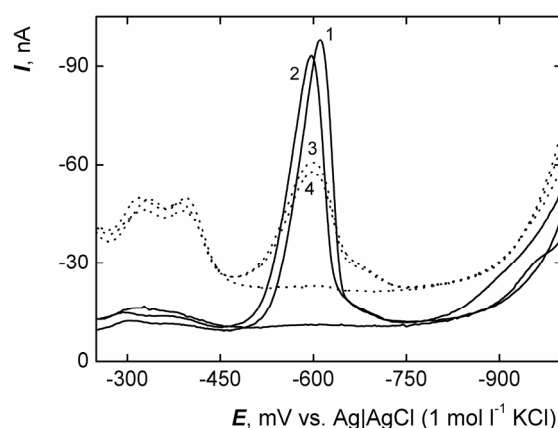
100 ml deionizované vody (koncentrace $2 \cdot 10^{-11}$ až $1 \cdot 10^{-10} \text{ mol l}^{-1}$ 2-AFN) do 1,0 ml měřeného roztoku (koncentrace $2 \cdot 10^{-9}$ až $1 \cdot 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$ 2-AFN) ($k_{\text{teor}} = 100$). Parametry získaných kalibračních přímk jsou uvedeny v tab. II.

Extrakce 2-aminofluoren-9-onu z pitné a říční vody

Pro ověření výtěžku SPE z pitné a říční vody byl opět do 100ml odměrné baňky s pitnou či říční vodou přidán příslušný objem zásobního roztoku 2-AFN (výsledná $c = 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$) a následně byl využit výše uvedený optimální postup pro SPE s následnou elucí 2-AFN 1,0 ml acetonu a odpařením do sucha a rozpuštěním odparek v AcB. Metodou AdSDPV na HMDmE v prostředí AcB při $E_{\text{acc}} = 100 \text{ mV}$ a $t_{\text{acc}} = 120 \text{ s}$ byly proměřeny voltamogramy po extrakci 2-AFN z pitné a říční vody (obr. 4). Stejným způsobem jako v případě deionizované vody byly připraveny slepé vzorky.



Obr. 3. Voltamogramy 2-AFN měřené metodou AdSDPV na HMDmE při $E_{\text{acc}} = 100 \text{ mV}$ a $t_{\text{acc}} = 120 \text{ s}$ v prostředí AcB po SPE ze 100 ml modelového vzorku deionizované vody do 1,0 ml měřeného roztoku. Koncentrace 2-AFN ve 100 ml deionizované vody (mol l^{-1}): 0 (0), $2 \cdot 10^{-11}$ (1), $4 \cdot 10^{-11}$ (2), $6 \cdot 10^{-11}$ (3), $8 \cdot 10^{-11}$ (4) a $1 \cdot 10^{-10}$ (5). Vložena je odpovídající kalibrační přímka; konfidenční pásy jsou zkonstruovány na hladině významnosti $\alpha = 0,05$



Obr. 4. Voltamogramy 2-AFN ($c \approx 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$) měřené metodou AdSDPV na HMDmE při $E_{\text{acc}} = 100 \text{ mV}$ a $t_{\text{acc}} = 120 \text{ s}$ v prostředí AcB. Extrakce z pitné vody (přímý přídavek 2-AFN ke slepému vzorku (1) a extrakt 2-AFN z vodného roztoku (2)) a říční vody (přímý přídavek 2-AFN ke slepému vzorku (3) a extrakt 2-AFN z vodného roztoku (4))

Tabulka II

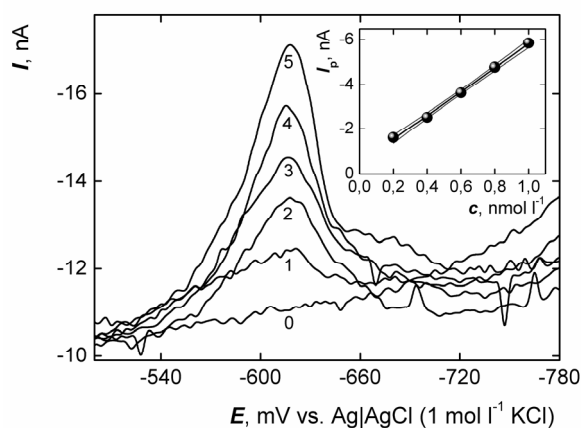
Parametry kalibračních přímek stanovení 2-AFN po SPE z pitné a říční vody měřené metodou AdSDPV na HMDmE v prostředí AcB při $E_{acc} = 100$ mV a $t_{acc} = 120$ s; směrodatné odchylky hodnot směrnic a úseků jsou vypočteny pro $n = 4$

Koncentrační rozmezí ve vodě [mol l^{-1}]	Směrnice [A l mol^{-1}]	Úsek [nA]	R^2 ^a	L_Q ^b [mol l^{-1}]
<i>Extrakce z deionizované vody</i>				
SPE ze 100 ml do 10 ml				
$1 \cdot 10^{-10}$ až $1 \cdot 10^{-9}$	$-7,02 \pm 0,19$	$-0,63 \pm 0,17$	0,9963	$2 \cdot 10^{-10}$
SPE ze 100 ml do 1,0 ml				
$2 \cdot 10^{-11}$ až $1 \cdot 10^{-10}$	$-24,72 \pm 0,84$	$-0,299 \pm 0,056$	0,9954	$4 \cdot 10^{-11}$
<i>Extrakce z pitné vody</i>				
SPE ze 100 ml do 10 ml				
$2 \cdot 10^{-10}$ až $1 \cdot 10^{-9}$	$-5,36 \pm 0,12$	$-0,465 \pm 0,077$	0,9982	$4 \cdot 10^{-10}$
SPE ze 100 ml do 1,0 ml				
$4 \cdot 10^{-11}$ až $1 \cdot 10^{-10}$	$-11,84 \pm 0,48$	$0,278 \pm 0,036$	0,9950	$6 \cdot 10^{-11}$
<i>Extrakce z říční vody</i>				
SPE ze 100 ml do 10 ml				
$2 \cdot 10^{-10}$ až $1 \cdot 10^{-9}$	$-3,338 \pm 0,088$	$-0,376 \pm 0,059$	0,9972	$4 \cdot 10^{-10}$

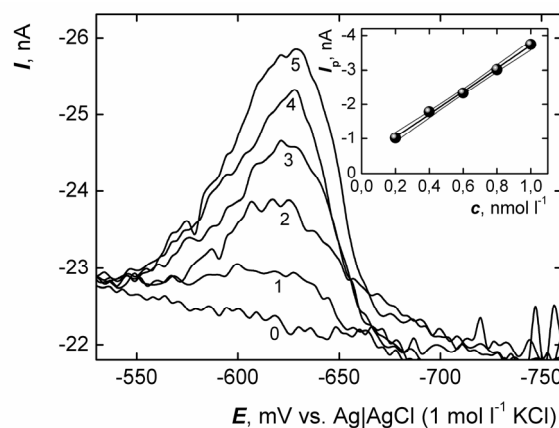
^a Koeficient determinace, ^b mez stanovitelnosti (10σ ; $\alpha = 0,05$)

Takto byly získány hodnoty výtěžků SPE z modelových vzorků vod. Pro pitnou vodu činil výtěžek extrakce 2-AFN ($94,4 \pm 4,0$) % ($s_r = 2,6$ %, $n = 4$), $k = 9,44$ ($k_{teor} = 10$), a pro říční vodu ($92,6 \pm 5,4$) % ($s_r = 3,8$ %, $n = 4$), $k = 9,26$ ($k_{teor} = 10$). Využitím SPE byl 2-AFN extrahován ze 100 ml pitné a říční vody (koncentrace

$2 \cdot 10^{-10}$ až $1 \cdot 10^{-9}$ mol l^{-1} 2-AFN) do 10 ml měřeného roztoku (koncentrace $2 \cdot 10^{-9}$ až $1 \cdot 10^{-8}$ mol l^{-1} 2-AFN) ($k_{teor} = 10$) a následně byly roztoky změřeny metodou AdSDPV na HMDmE v prostředí AcB při $E_{acc} = 100$ mV a $t_{acc} = 120$ s. Za stejných podmínek a ve stejném prostředí byly změřeny roztoky po SPE ze 100 ml pitné vody (koncentrace $4 \cdot 10^{-11}$



Obr. 5. Voltamogramy 2-AFN měřené metodou AdSDPV na HMDmE při $E_{acc} = 100$ mV a $t_{acc} = 120$ s v prostředí AcB po SPE ze 100 ml modelového vzorku pitné vody do 10 ml měřeného roztoku. Koncentrace 2-AFN ve 100 ml pitné vody (mol l^{-1}): 0 (0), $2 \cdot 10^{-10}$ (1), $4 \cdot 10^{-10}$ (2), $6 \cdot 10^{-10}$ (3), $8 \cdot 10^{-10}$ (4) a $1 \cdot 10^{-9}$ (5). Vložena je odpovídající kalibrační přímka; konfidenční pásy jsou zkonstruovány na hladině významnosti $\alpha = 0,05$



Obr. 6. Voltamogramy 2-AFN měřené metodou AdSDPV na HMDmE při $E_{acc} = 100$ mV a $t_{acc} = 120$ s v prostředí AcB po SPE ze 100 ml modelového vzorku říční vody do 10 ml měřeného roztoku. Koncentrace 2-AFN ve 100 ml říční vody (mol l^{-1}): 0 (0), $2 \cdot 10^{-10}$ (1), $4 \cdot 10^{-10}$ (2), $6 \cdot 10^{-10}$ (3), $8 \cdot 10^{-10}$ (4) a $1 \cdot 10^{-9}$ (5). Vložena je odpovídající kalibrační přímka; konfidenční pásy jsou zkonstruovány na hladině významnosti $\alpha = 0,05$

až $1 \cdot 10^{-10}$ mol l^{-1} 2-AFN do 1,0 ml měřeného roztoku (koncentrace $4 \cdot 10^{-9}$ až $1 \cdot 10^{-8}$ mol l^{-1} 2-AFN) ($k_{\text{teor}} = 100$), ale bohužel nebylo možné tento postup aplikovat i na SPE z říční vody s $k_{\text{teor}} = 100$ z důvodu nevyhodnotitelného signálu 2-AFN. AdSDP voltamogramy získané po SPE z pitné vody s $k_{\text{teor}} = 10$ jsou zobrazeny na obr. 5 a z říční vody s $k_{\text{teor}} = 10$ na obr. 6. Parametry získaných kalibračních přímek jsou uvedeny v tab. II.

Závěr

V této práci bylo využito kombinace prekoncentrační techniky extrakce na tuhou fázi (SPE) a následného voltametričského stanovení metodou adsorpční rozpouštěcí diferenční pulsní voltametrie (AdSDPV) na visící rtuťové kapkové minielektrode (HMDmE) pro stanovení ultrastopových množství genotoxického polutantu povrchových vod – 2-aminofluoren-9-onu (2-AFN). Při vývoji metody SPE byla na kolonkách LiChrolut RP-18 E provedena optimalizace extrakčního postupu z hlediska získání vysokého extrakčního výtěžku a minimální spotřeby použitého elučního činidla. Nalezený optimální postup SPE byl následující: eluce zachyceného 2-AFN z kolonky byla provedena pomocí 1,0 ml acetonu, který byl posléze odpařen do sucha. Následné voltametričské stanovení probíhalo po rozpuštění získaného odparku 2-AFN v 1,0 či v 10 ml $0,2 \text{ mol l}^{-1}$ acetatového pufru o pH 4,0 (AcB). Při AdSDPV bylo využito akumulace analytu na povrch pracovní elektrody založené na nekovalentní (supramolekulární) interakci stanovené látky s tímto povrchem při potenciálu akumulace (E_{acc}) 100 mV a času akumulace (t_{acc}) 120 s (cit.^{31,34}).

Pomocí SPE z deionizované a pitné vody byl 2-AFN zkoncentrován ze 100 ml modelového vzorku až do 1,0 ml měřeného roztoku (teoretický prekoncentrační faktor (k_{teor}) byl tedy 100) a následným měřením metodou AdSDPV na HMDmE bylo dosaženo hodnoty meze stanovitelnosti (L_Q) až o dva koncentrační řády nižší ($L_Q \approx 4 \cdot 10^{-11}$ mol l^{-1} při extrakci z deionizované vody a $L_Q \approx 6 \cdot 10^{-11}$ mol l^{-1} při extrakci z pitné vody) oproti voltametričskému stanovení 2-AFN bez použití prekoncentračního kroku ($L_Q \approx 4 \cdot 10^{-9}$ mol l^{-1}) (cit.^{31,34}). Při stanovení 2-AFN v modelových vzorcích říční vody bylo extrakcí dosaženo snížení hodnoty L_Q přibližně o jeden koncentrační řád ($L_Q \approx 4 \cdot 10^{-10}$ mol l^{-1}). Takto bylo prokázáno, že techniku SPE s následnou akumulací 2-AFN na povrch HMDmE a voltametričskou koncovkou lze úspěšně využít pro environmentální praxi, ve které je předpokládán výskyt 2-AFN v akvatických systémech v nanomolárních až pikomolárních koncentracích.

Tento výzkum byl prováděn v rámci Specifického výsokoškolského výzkumu (SVV). Za finanční podporu bychom rádi poděkovali Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekt MSM0021620857) a Grantové agentuře České republiky (projekt P206/12/G151).

LITERATURA

- Bandowe B. A. M., Sobocka J., Wilcke W.: *Environ. Pollut.* 159, 539 (2011).
- Bandowe B. A. M., Shukurov N., Kersten M., Wilcke W.: *Environ. Pollut.* 158, 2888 (2010).
- Tsapakis M., Stephanou E. G.: *Environ. Sci. Technol.* 41, 8011 (2007).
- Chupungars K., Rerngsamran P., Thaniyavarn S.: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 63, 93 (2009).
- Sepic E., Bricelj M., Leskovsek H.: *J. Appl. Microbiol.* 83, 561 (1997).
- Wischmann H., Steinhart H.: *Chemosphere* 35, 1681 (1997).
- Cizek K., Barek J., Fischer J., Peckova K., Zima J.: *Electroanalysis* 19, 1295 (2007).
- Zima J., Dejmekova H., Barek J.: *Electroanalysis* 19, 185 (2007).
- Gu Z. T., Gorin A., Hingerty B. E., Broyde S., Patel D. J.: *Biochemistry* 38, 10855 (1999).
- German N., Armalis S., Zima J., Barek J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 70, 292 (2005).
- Pothuluri J. V., Sutherland J. B., Freeman J. P., Cerniglia C. E.: *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3106 (1998).
- Zeisig M., Moller L.: *Carcinogenesis* 16, 1 (1995).
- Strniste G. F., Nickols J. W., Okinaka R. T., Whaley T. W.: *Carcinogenesis* 7, 499 (1986).
- Cerniglia C. E., Campbell W. L., Freeman J. P., Evans F. E.: *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2275 (1989).
- Cerniglia C. E., White G. L., Heflich R. H.: *Arch. Microbiol.* 143, 105 (1985).
- Dorie L. D., Bagley S. T., Leddy D. G., Johnson J. H.: *Environ. Sci. Technol.* 21, 757 (1987).
- Vyskocil V., Barek J.: *Curr. Org. Chem.* 15, 3059 (2011).
- Carr B. I.: *Cancer Res.* 47, 5577 (1987).
- Vyskocil V., Labuda J., Barek J.: *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 233 (2010).
- Vyskocil V., Navratil T., Danhel A., Dedik J., Krejcova Z., Skvorova L., Tvrdikova J., Barek J.: *Electroanalysis* 23, 129 (2011).
- Vyskocil V., Navratil T., Polaskova P., Barek J.: *Electroanalysis* 22, 2034 (2010).
- Moller L., Corrie M., Midtvedt T., Rafter J., Gustafsson J. A.: *Carcinogenesis* 9, 823 (1988).
- Moller L., Gustafsson J. A.: *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 13, 681 (1986).
- Popp F. D., Kirsch W.: *J. Org. Chem.* 26, 3858 (1961).
- Muthu Vijayan Enoch I. V., Swaminathan M.: *J. Fluoresc.* 16, 501 (2006).
- Vyskocil V., Barek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39, 173 (2009).
- Vyskocil V., Barek J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 74, 1675 (2009).

28. Vyskocil V., Polaskova P., Bologna P., Berek J., v knize: *Sensing in Electroanalysis* (Vytras K., Kalcher K., Svancara I., ed.), sv. 4, str. 91. University of Pardubice, Pardubice 2009.
29. Armalis S., Novikova N., Kubiliene E., Zima J., Berek J.: *Anal. Lett.* 35, 1551 (2002).
30. Vyskocil V., Berek J.: *Procedia Chem.* 6, 52 (2012).
31. Hajkova A., Vyskocil V., Danhel A., Wang J., Berek J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 76, 1775 (2011).
32. Hajkova A., Hranicek J., Berek J., Vyskocil V.: *Electroanalysis* 25, 295 (2013).
33. Berek J., Peckova K., Vyskocil V.: *Curr. Anal. Chem.* 4, 242 (2008).
34. Hajkova A.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2012.
35. Berek J., Peckova K., Vyskocil V.: *Chem. Listy* 103, 889 (2009).
36. Vyskocil V., Danhel A., Fischer J., Novotny V., Deylova D., Musilova-Karaova J., Maixnerova L., Peckova K., Berek J.: *Chem. Listy* 104, 1181 (2010).
37. Hajkova A.: *Bakalářská práce*, Univerzita Karlova v Praze, Praha 2010.
38. Matthias O.: *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*, str. 194, druhé vydání. Wiley-VCH, Weinheim 2007.
39. Harvey D.: *Modern Analytical Chemistry*, str. 96. McGraw-Hill, Toronto 2000.

A. Hájková, V. Vyskočil, and J. Berek (*Charles University in Prague, Faculty of Science, University Centre of Excellence UNCE "Supramolecular Chemistry", Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Prague*): **Voltammetric Determination of Trace Amounts of 2-Amino-fluoren-9-one with Preconcentration of the Analyte by Solid-Phase Extraction**

Optimum conditions were found for the determination of nanomolar and subnanomolar concentrations of genotoxic 2-aminofluoren-9-one (2-AFN) by adsorptive stripping differential pulse voltammetry (AdSDPV) at a hanging mercury drop minielectrode (HMDmE) after preliminary separation and preconcentration by solid-phase extraction (SPE) in LiChrolut RP-18 E (500 mg) columns. The adsorbed analyte was eluted with acetone, the solution then evaporated to dryness, and the residue dissolved in acetate buffer (pH 4.0) (AcB). A sample was then measured by AdSDPV at the HMDmE, with the accumulation potential 100 mV (vs. Ag|AgCl in 1 mol l⁻¹ KCl) and the accumulation time 120 s. Linear calibration curves were obtained for 2·10⁻¹¹ – 1·10⁻⁹ mol l⁻¹ 2-AFN, with the limit of quantification (L_Q) ≈ 4·10⁻¹¹ mol l⁻¹. The method was verified by the determination of 2-AFN in model samples of drinking and river water at concentrations 4·10⁻¹¹ – 1·10⁻⁹ and 2·10⁻¹⁰ – 1·10⁻⁹ mol l⁻¹ (L_Q ≈ 6·10⁻¹¹ and 4·10⁻¹⁰ mol l⁻¹, respectively).