

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta  
**Katedra analytické chemie**

---

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ  
5-NITROBENZIMIDAZOLU

Diplomová práce  
studijního oboru Analytická chemie

Praha 2008

Dana Deýlová

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857. Dále byla finančně podporována Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR ( výzkumné centrum LC 06035).

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele prof. RNDr. Jiřího Barka, CSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

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 1. května 2008.

Dovoluji si tímto poděkovat svému školiteli prof. RNDr. Jiřímu Barkovi, CSc., Mgr. Karolíně Peckové Ph.D. a Mgr. Vlastimilovi Vyskočilovi za odborné vedení a pomoc při řešení problémů. Dále také všem členům katedry analytické chemie za všestrannou pomoc a cenné připomínky k mé práci.

Současně bych ráda poděkovala svým rodičům za umožnění studia na vysoké škole a za podporu během celého studia.

## OBSAH

Seznam použitých symbolů a zkratk	5
1. Úvod	6
1.1 Cíl práce	6
1.2 Studovaná látka	6
1.3 Použité metody	8
1.4. Rtuťová kapková elektroda	11
1.5. Visící rtuťová kapková elektroda	11
1.6. Uhlíková pastová elektroda	11
2. Experimentální část	12
2.1 Reagencie	12
2.2 Aparatura	12
2.3 Rtuťová kapková elektroda	12
2.4 Visící rtuťová kapková elektroda	13
2.5 Uhlíková pastová elektroda	14
2.6 Pracovní postup	15
2.6.1.1. Polarografie a voltametrie	15
2.6.1.2. Modelové vzorky	15
2.7 Stálost roztoku studované látky	16
3. Polarografické stanovení studované látky	18
3.1 TAST polarografie	18
3.2 Diferenční pulsní polarografie	25
4. Voltametrické stanovení studované látky	32
4.1. DC voltametrie na visící rtuťové kapkové elektrodě	32
4.2. Diferenční pulsní voltametrie na visící rtuťové kapkové elektrodě	37
4.3. DC voltametrie na uhlíkové pastové elektrodě	42
4.4. Diferenční pulsní voltametrie na uhlíkové pastové elektrodě	47
4.5 Výsledky a diskuse stanovení 5-NBIA na rtuťových elektrodách	51
5. Určení mechanismu redukce 5-nitrobenzimidazolu	52

5.1. Coulometrie	52
5.2. Cyklická voltametrie	59
5.3. Výsledky a diskuse coulometrie a cyklické voltametrie	61
<b>6. Předběžná separace a prekoncentrace 5-nitrobenzimidazolu pomocí extrakce na tuhou fázi</b>	<b>63</b>
6.1 Extrakce 5-nitrobenzimidazolu z destilované vody	64
6.2 Extrakce 5-nitrobenzimidazolu z pitné vody	65
6.3 Přímé stanovení 5-nitrobenzimidazolu v pitné vodě	66
6.4 Extrakce 5-nitrobenzimidazolu z říční vody	69
6.5 Výsledky a diskuse stanovení 5-NBIA v modelových vzorcích	70
7. Závěr	71
8. Použitá literatura	72

## SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

5-NBIA	5-nitrobenzimidazol
$A$	absorbance
$\lambda$	vlnová délka
BR pufr	Brittonův – Robinsonův pufr
C.A.S.	Chemical Abstract Services
$c$	koncentrace
CPE	uhlíková pastová elektroda
CV	cyklická voltametrie
DCV	voltametrie
DPP	diferenční pulsní polarografie
DPV	diferenční pulsní voltametrie
$E_c$	potenciál pro coulometrickou redukci při konstantním potenciálu
$E_p$	potenciál píku
$F$	Faradayova konstanta
$h$	výška rtuťového rezervoáru
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
$I_0$	proud píku před zahájením potenciostatické coulometrie
$I_1$	proud píku po skončení potenciostatické coulometrie
$I_{lim}$	limitní proud
$I_p$	proud píku
$L_Q$	mez stanovitelnosti
$m$	průtoková rychlost rtuti
NPP	normální pulsní polarografie
$Q$	náboj
$R$	korelační koeficient
SPE	extrakce na tuhé fázi
$t_k$	doba kapky
$t$	čas

## 1. Úvod

### 1.1. Cíl práce

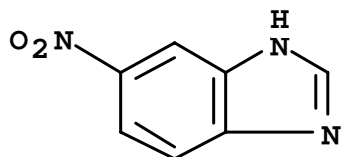
Tato práce navazuje na systematické studium polarografického a voltametrického chování genotoxických látek, které probíhá na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy. Cílem této studie je vypracovat pomocí moderních polarografických a voltametrických metod nové metody stanovení 5-nitrobenzimidazolu (5-NBIA) a nalézt optimální podmínky pro jeho stanovení s cílem dosáhnout co nejnižší meze stanovitelnosti .

Konkrétně byla věnována pozornost metodě TAST polarografie a diferenční pulsní polarografie (DPP) na klasické rtuťové kapkové elektrodě (DME). Dále DC voltametrii (DCV) a DP voltametrii (DPV) na visící rtuťové elektrodě (HMDE) a uhlíkové pastové elektrodě (CPE). Jako další metody pro dosažení nižších limitů detekce byly zvoleny separace na tuhé fázi (SPE) a adsorbce na povrch HMDE. Tyto metody by mohly tvořit vzhledem k nízkým pořizovacím i provozním nákladům užitečnou alternativu k doposud převážně používaným metodám chromatografickým a spektrofotometrickým.

Dále byly použity coulometrie při konstantním potenciálu na rtuťovém dně a cyklická voltametrie (CV) pro objasnění mechanismu elektrochemické redukce 5-NBIA.

### 1.2. Studovaná látka

5-NBIA je žlutá krystalická látka bez znatelného zápachu rozpustná ve vodě<sup>1</sup>.



5- nitrobenzimidazol, C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

CAS Name = CA Index Name :

5-nitrobenzimidazole

CAS Registry number : 94-52-0

**Obr.1** Strukturní vzorec studované látky



Je to genotoxický derivát nitrovaných heterocyklických aromatických sloučenin, jejichž přítomnost v životním prostředí může ohrozit přirozené biologické funkce živé přírody s negativním dopadem na zdravý vývoj organismů. Výskyt této látky v životním prostředí lze očekávat v úzkém spojení s chemickými procesy probíhajícími při spalování fosilních paliv<sup>2</sup>. Za specifické toxické účinky aromatických nitrosloučenin zřejmě odpovídají reaktivní nitroaromatické anionradikály (nitrosloučeniny patří mezi poměrně snadno redukovatelné látky), které snadno reagují s buněčnými nukleofily, zejména proteiny a nukleovými kyselinami<sup>3,4</sup>.

Nejnižší publikovaná smrtelná dávka pro krysy je 500 mg/kg<sup>5,6</sup>. U této látky je prokázána karcinogenita (u hlodavců) a mutagenita (u salmonely)<sup>7</sup>.

5-NBIA je často dále substituována a tyto sloučeniny se používají jako komplexační činidla pro dvojmocnou měď a další kovy. Sama látka je komplexační činidlo pro dvojmocné kovy<sup>8</sup>.

Deriváty 5-NBIA se využívají například jako léčiva proti křečím<sup>9</sup>.

Také je zkoumána schopnost 5-NBIA zabránit korozi železa a oceli v neutrálním a kyselém prostředí<sup>10</sup> (díky přítomnosti vázaného dusíku).

5-NBIA byl v minulosti užíván a polarograficky stanovován jako součást roztoku ustalovače pro barevné fotografie<sup>11</sup>.

5-NBIA byl také stanovován jinými technikami než jen polarograficky a voltametricky a to především pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie<sup>12</sup>, tenkovrstvé chromatografie<sup>13</sup> a potenciometrické titrace<sup>14</sup>.

### 1.3. Použité metody

Vzhledem k snadné polarografické redukci nitroskupiny ( $-\text{NO}_2$ ) na aromatickém jádře<sup>15</sup>, se dá ke stanovení stopových koncentrací použít metody diferenční pulsní polarografie a TAST polarografie na klasické rtuťové kapkové elektrodě DME. Dále byla použita DC voltametrie (DCV) a DP voltametrie (DPV) na visící rtuťové elektrodě (HMDE) a uhlíkové pastové elektrodě (CPE). Jako další metody pro dosažení nižších limitů detekce byly zvoleny separace na tuhé fázi (SPE)<sup>16</sup> a adsorbce na povrch HMDE.

#### **Základní charakteristika TAST polarografie<sup>17</sup>**

TAST polarografie je metoda založená na vzorkování proudu. Při této metodě neměříme po celou dobu života kapky průměrný proud, ale měříme ho jen v krátkém časovém intervalu těsně před odkápnutím kapky. V tomto okamžiku se povrch kapky v podstatě nemění, takže nabíjecí proud je podstatně nižší, než na začátku doby života kapky. Tento vzorek proudu je před dalším odečtem uchováván v paměti počítače. Vzorkování proudu je nutné provádět vždy ve stejnou dobu. K tomuto účelu slouží mechanické klepátko.

Výhodou této metody je kromě potlačení nepříznivého vlivu nabíjecího proudu i eliminace proudových oscilací, způsobených odkapáváním rtuti.

### **Základní charakteristika DPP<sup>17</sup>**

Při této metodě se na potenciál, který se lineárně mění s časem, vkládá napěťový pulz o výšce 10 až 100 mV o době trvání řádově deset milisekund. Tento pulz se vkládá těsně před koncem doby života kapky. Registruje se rozdíl proudů změřených těsně před vložením pulzu a na jeho konci. Závislost rozdílů proudů na potenciálu prochází maximem a má tvar píku.

Výška píku roste s rostoucí amplitudou vkládaného pulzu, ale zároveň se pík rozšiřuje, čímž se zhoršuje selektivita stanovení.

Tato metoda má v dnešní době z pulsních metod pro praxi největší význam.

### **Základní charakteristika DCV<sup>17</sup>**

Při této metodě se vkládaný potenciál na pracovní elektrodu mění s časem a to lineárně roste či klesá. Rychlost změny potenciálu je dostatečně malá ve srovnání s rychlostí ustanovení rovnováhy v těsné blízkosti elektrody.

### **Základní charakteristika DPV<sup>18</sup>**

Hlavním rozdílem, mezi DPP a DPV je v použití elektrody. Jinak co se týče charakteru metod, jsou obě dá se říct totožné. U této metody se často pracuje za podmínek konvektivní difúze. Na elektrodu se během měření adsorbuje produkt elektrodové reakce, který je třeba odstranit, a to někdy složitými postupy. U HMDE je to jednoduché odklepnutí kapky. I u uhlíkové pastové elektrody je to snadné a to mechanickým otřením pasty. U tuhých elektrod však následuje broušení leštění, vkládání napěťových regeneračních pulsů, atd.

## **Základní charakteristika CV<sup>17</sup>**

Je to metoda při níž se na stacionární elektrodu v nemíchaném roztoku vkládá potenciál trojúhelníkového průběhu s rychlostí změny  $dE/dt$ . Vzhledem k tomu, že difuze je relativně pomalý transportní proces, tak při dostatečně vysoké rychlosti polarizace nestačí produkt elektrodové reakce zcela oddifundovat od elektrody a za vhodných podmínek ho lze při opačném směru potenciálové změny detekovat.

Přímé analytické využití je malé. Hlavní výhodou této metody je využití při studiu elektrodových reakcí.

## **Základní charakteristika coulometrie<sup>17</sup>**

Je to metoda založená na kvantitativní elektrolýze vzorku z roztoku na pracovní elektrodě. V této metodě je analytickou informací elektrický náboj  $Q$  potřebný k úplné přeměně analytu v roztoku.

## **Základní charakteristika SPE<sup>19</sup>**

Je to metoda založená na selektivním zadržování skupiny látek, nejčastěji organických, na pevné fázi, která je umístěna ve formě sloupce nebo membrány v krátké kolonce.

Tato metoda se nejčastěji používá pro odstranění rušivých složek matrice, selektivní obohacení (zakoncentrování) vzorku, izolaci stopových množství látek a ke změně rozpouštědla vzorku.

Výhodou je velmi jednoduchá práce s kolonkou. Nevýhodou je že pro některé separace nejsou na trhu vhodné SPE kolonky.

#### **1.4. Rtuťová kapková elektroda<sup>21</sup>**

Tato elektroda je realizovaná jako skleněná kapilára o vnitřním průměru 0,05 až 0,08 mm, která je spojena s rezervoárem naplněným rtuťí plastikovou hadičkou. Rtuťová kapka má výhodu v tom, že se snadno obnovuje její povrch a je na ní velké přepětí vodíku, takže je možno sledovat katodické děje až k značně záporným potenciálům. Na druhé straně je použití rtuťové elektrody omezeno oxidací rtuti (okolo + 0,4 V, za nepřítomnosti komplexačních činidel).

#### **1.5. Visící rtuťová kapková elektroda<sup>21</sup>**

Tato elektroda se dnes využívá mnohem více než klasická kapková elektroda, její nejpřednější výhodou je mnohem nižší spotřeba rtuti. Tato elektroda je složená z kapiláry a zásobníku rtuti. Kapilára je uzavřena jehlovým ventilem, který je ovládán elektronicky (reprodukováná velikost kapky za určitý čas). Elektroda je také opatřena odtrhovačem kapek. Nevýhodou jsou vyšší problémy s pasivací vzhledem k neobnovování povrchu elektrody během měření.

#### **1.6. Uhlíková pastová elektroda<sup>20</sup>**

Uhlíková pastová elektroda se připravuje smísením uhlíkového prášku s málo těkavou elektrochemicky inertní kapalinou nejčastěji minerálním olejem.

Její výhodou je široká oblast dostupných potenciálů, možnost měnit složení pasty dle momentálních potřeb analýzy a snadná obnova povrchu. Nevýhodou je nereprodukovatelná příprava elektrody a často také přítomnost kyslíku v pastě, který se dá velmi těžko odstranit.

## 2. Experimentální část

### 2.1. Reagencie

Studovaná látka :

5-nitrobenzimidazol (98%) nitrát od firmy Aldrich . Zásobní roztok této látky o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l byl připraven rozpuštěním 0,0226 g látky ve 100 ml deionizované vody. Roztoky o nižších koncentracích byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku deionizovanou vodou. Standardní roztok byl uchováván ve tmě v lednici.

Další použité chemikálie :

Kyselina boritá, kyselina fosforečná, octová kyselina, hydroxid sodný, chlorid draselný, kyselina chlorovodíková (čistota p.a., Lachema Brno, ČR), 0,5% želatina .

Brittonovy-Robinsonovy (BR pufr) tlumivé roztoky<sup>21</sup> o příslušném pH byly připraveny smísením 0,2 mol/l NaOH s roztokem obsahujícím kyselinu boritou, fosforečnou a octovou (každou o koncentraci 0,04 mol/l).

Práškový uhlík CR 2 (Maziva, Týn)

Minerální olej 69794 (Fluka, Švýcarsko)

### 2.2 Aparatura

Při všech stanoveních byla použita sestava Eco-Tribo Polarograf se softwarem Polar Pro verze 2, fa Polaro-Sensors, Praha. Software pracoval v operačním systému Windows 98 plus.

Jednotlivá měření byla prováděna v tříelektrodovém zapojení, kde byla jako referentní použita argentochloridová elektroda (1 mol/l KCl), a jako pomocná elektroda byl použit platinový plíšek.

Spektrofotometrická měření byla prováděna na přístroji Spektrofotometr HP 8453 Liberus utitorum (Hewlett Packard, USA) v křemenných kyvetách o tloušťce 0,1 cm.

Všechna měření pH byla prováděna na digitálním přístroji Conductivity a pHmeter 4330 (Jenway, Anglie) s kombinovanou skleněnou elektrodou, typ PCH 2411. Přístroj byl kalibrován pomocí standardních vodných pufrů.

### 2.3 Rtuťová kapková elektroda

Doba kapky ( $t_k$ ) při zvolené výšce rezervoáru ( $h$ ) byla měřena při vloženém nulovém napětí proti argentschloridové elektrodě (1 mol/l KCl). Kapilára byla ponořena do roztoku 0,1 mol/l KCl. Průtoková rychlost rtuti ( $m$ ) byla stanovena ponořením ústí kapiláry do předem zvažené nádoby s malým množstvím rtuti po dobu 300 s při dané výšce rezervoáru. Po uplynutí této doby byla nádoba se rtutí znovu zvažena a z rozdílu hmotností byla vypočtena váha rtuti prošlé za 1 s kapilárou<sup>22</sup>. Konstanty použité rtuťové kapkové elektrody jsou uvedeny v Tab. 1.

**Tab.1**

Konstanty klasické rtuťové kapkové elektrody DME,  $h$  je výška rezervoáru,  $t_k$  doba 1 kapky a  $m$  je průtoková rychlost rtuti při zvolené výšce rezervoáru.

$\frac{h}{cm}$	25	36	49	64	81
$\frac{t_k}{s}$	2,40	1,66	1,30	0,95	0,81
$\frac{m}{mg/s}$	4,00	5,12	6,61	11,12	13,47

## 2.4. Visící rtuťová kapková elektroda

Při technikách DPV, DCV, DC, AdSV a coulometrii byla používána visící rtuťová kapková minielektroda typu Eco-Trend Plus s.r.o., Praha. Při tvorbě kapky byl ventil otevřený po dobu 100 ms. Při práci s HMDE byla používána rychlost polarizace  $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . Na elektrodu byly vkládány pulsy o šířce 80 ms a modulační amplitudě – 50 mV.

V Tab. 2 je uvedena plocha Hg kapky pro danou dobu otevření ventilu elektrody. Povrch Hg kapky ( $S$ ) byl vypočítán z experimentálně zjištěné hmotnosti 20 kapek rtuti odkápnutých v prostředí  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  KCl při nulovém vloženém napětí proti používané argentochloridové referenční elektrodě. Tato hmotnost byla určena z váhového rozdílu před a po přidání 20 kapek rtuti, přičemž základní elektrolyt byl slit a rtuť několikrát opláchnuta methanolem a osušena proudem vzduchu do konstantní hmotnosti. Pro výpočet povrchu Hg kapky byl předpokládán její kulový charakter.

**Tab. 2**

Charakteristika použité visící rtuťové kapkové elektrody (HMDE),  $t_v$  je doba otevření ventilu a  $S$  je povrch Hg kapky.

Elektroda	$t_v$ (ms)	$S$ ( $\text{cm}^2$ )
HMDE	100	0,0137

## 2.5. Uhlíková pastová elektroda

Uhlíková pasta byla připravena smísením 250 mg uhlíkového prášku CR2 a 100 ml minerálního oleje. Vzniklá pasta byla vtlačena do těla elektrody. Po každé analýze byla pasta povytlačena a ořena o vlhký filtrační papír (obnova povrchu).



## 2.6. Pracovní postup

### 2.6.1. Polarografie a voltametrie

Při polarografických stanoveních bylo do 10 ml odměrné baňky pipetováno příslušné množství vodného roztoku studované látky, které bylo posléze doplněno po značku BR pufrem o příslušném pH.

Takto připravený roztok byl promíchán a převeden do polarografické nádoby. Poté byl zbaven kyslíku pětiminutovým probubláváním dusíkem. Následně byl proveden záznam polarografických či voltametrických křivek (před každým měřením stejné křivky byl roztok 30 s probubláván). Všechny křivky byly měřeny třikrát a poté statisticky vyhodnoceny.

Všechna měření byla prováděna za laboratorní teploty.

Mez stanovitelnosti byla počítána s pomocí programu ADSTAT ver. 2.0 (Trylobyte, ČR), který ji počítá jako nejmenší hodnotu signálu, pro kterou je relativní směrodatná odchylka predikce z kalibračního grafu dostatečně malá a rovna číslu 0,1<sup>23</sup>.

### 2.6.2. Modelové vzorky

Jako vzorek pitné vody byla použita voda z rozvodné sítě v budově chemických kateder PřF UK, Hlavova 8, Praha 2, který byl zbaven chloru a to probubláváním dusíku po dobu 10 minut.

Vzorek říční vody byl odebrán z Vltavy v Praze na Výtoni, 10 m po proudu od železničního mostu. Vzorky říční vody byly přefiltrovány přes filtrační papír FN 1 (90g/qm, Weissenborn, Německo).

Modelové vzorky 5-NBIA v deionizované, pitné či říční vodě byly připraveny přidáním potřebného množství (10 µl) zásobního roztoku 5-NBIA o potřebné koncentraci ke zpracovávanému objemu modelového vzorku (100 ml).

## 2.7. Stálost roztoku studované látky

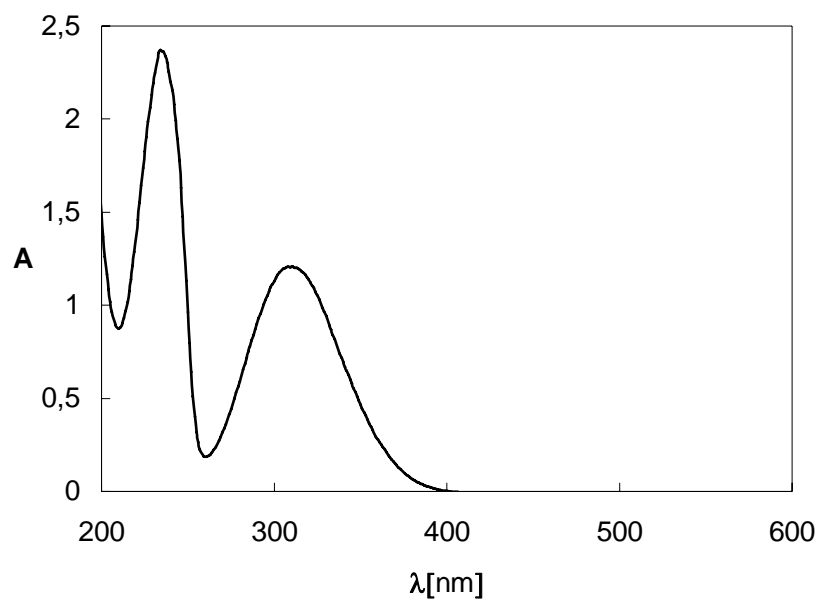
Stálost zásobního roztoku studované látky o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l ve vodě byla sledována spektrofotometricky v křemenných kyvetách o tloušťce 0,1 cm. Referentní kyveta byla naplněna vodou. Absorbance zásobního roztoku byla měřena při vlnové délce, při které měla studovaná látka absorpční maximum. Výsledky měření stálosti zásobního roztoku jsou shrnuty v Tab. 2 a absorpční spektrum je uvedeno na Obr. 2.

Z výsledků vyplývá, že během 100 dnů nedošlo k výraznému poklesu koncentrace studované látky. Je tedy vidět, že zásobní roztok je při uchování ve tmě a v lednici dostatečně stálý.

**Tab. 3**

Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku 5-NBIA o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l ve vodě při vlnové délce 234 a 310 nm. Číselné hodnoty udávají relativní hodnotu koncentrace v % proti hodnotě koncentrace čerstvě připraveného roztoku. Měřená v křemenných kyvetách o tloušťce 0,1 cm.

Dny	0	5	10	20	30	50	100
$A_{(234 \text{ nm})}$	2,438	2,431	2,428	2,360	2,503	2,394	2,303
%	100	99,7	99,6	96,8	102,7	98,2	94,5
$A_{(310 \text{ nm})}$	1,217	1,241	1,248	1,242	1,238	1,246	1,199
%	100	102,0	102,5	102,1	101,7	102,4	98,5



**Obr. 3**

Absorpční spektrum 5-NBIA ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) ve vodném roztoku, měřené v křemenné kyvetě o měrné tloušťce 0,1 cm.

### 3. Polarografické stanovení studované látky

#### 3.1 TAST polarografie

Vliv pH na chování 5-NBIA ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) při TAST polarografii na kapající rtuťové elektrodě byl sledován v prostředí BR pufru od pH 2,0 do pH 12,0. Látka v celé oblasti pH poskytuje jednu dobře vyvinutou vlnu. Výška druhé vlny, která je patrná jen v kyselém prostředí, s rostoucím pH rychle klesá. Zaznamenané polarografické křivky ukazují Obr. 4.

Při nízkých pH se na polarografické křivce objevuje maximum, které se dá potlačit přidáním 2 kapek želatiny viz Obr 5.

Metodou lineární regrese byl pro závislost půlvlnového potenciálu prvního píku  $E_{1/2}^1$  na pH roztoku v rozmezí pH 2-4 vypočten vztah :

$$E_{1/2}^1 \text{ (mV)} = -59,9 \text{ pH} - 37,2 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9956)$$

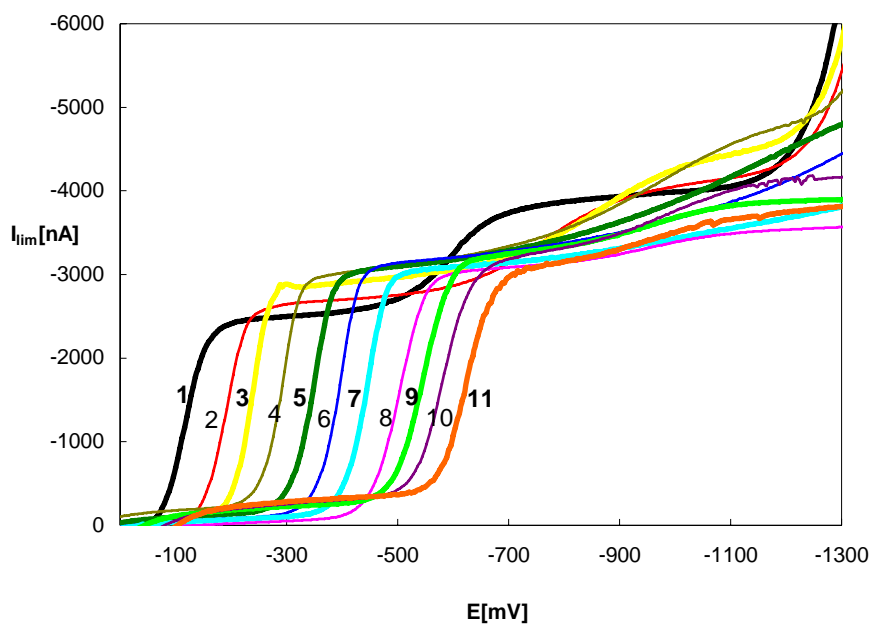
Pro druhý pík byl metodou lineární regrese pro závislost proudu píku na pH roztoku v rozmezí pH 2-12 vypočten vztah :

$$E_{1/2}^2 \text{ (mV)} = -152,0 \text{ pH} - 301,3 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9896)$$

Zjištěné závislosti půlvlnových potenciálů  $E_{1/2}^1$  a  $E_{1/2}^2$  a limitních proudů  $I_{\text{lim}}^1$  a  $I_{\text{lim}}^2$  na pH roztoku jsou uvedeny v Tab. 4. Graficky je závislost  $E_{p1}$  a  $E_{p2}$  na pH znázorněna na Obr. 6.

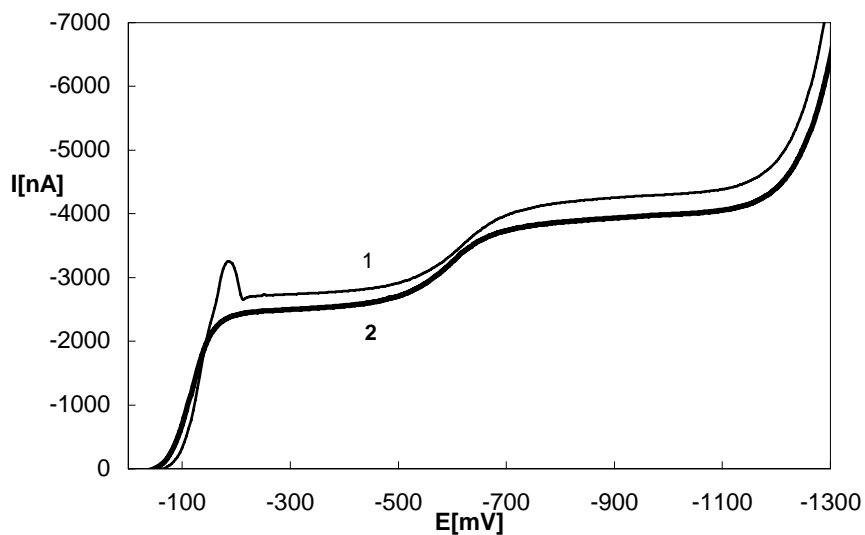
Z Obr. 6 vyplývá, že látka se redukuje v kyselém prostředí ve dvou krocích a to nejprve na hydroxylamin a posléze na amin. V alkalickém prostředí je 5-NBIA redukován přímo na amin bez možnosti zaznamenat vlnu hydroxylaminu (další podrobnosti jsou uvedeny v kapitole 5.).

Jako optimální bylo zvoleno prostředí BR pufru o pH 2, 7 a 12 v nichž byly proměřeny koncentrační závislosti v koncentračním rozmezí  $(2-10) \cdot 10^{-5}$  mol/l a  $(2-10) \cdot 10^{-6}$  mol/l (viz Obr. 8, 10, 12). Na Obr. 7, 9, 11 jsou uvedeny polarogramy 5-NBIA v příslušném koncentračním rozmezí při daném pH. Parametry kalibračních přímků jsou uvedeny v Tab. 5.



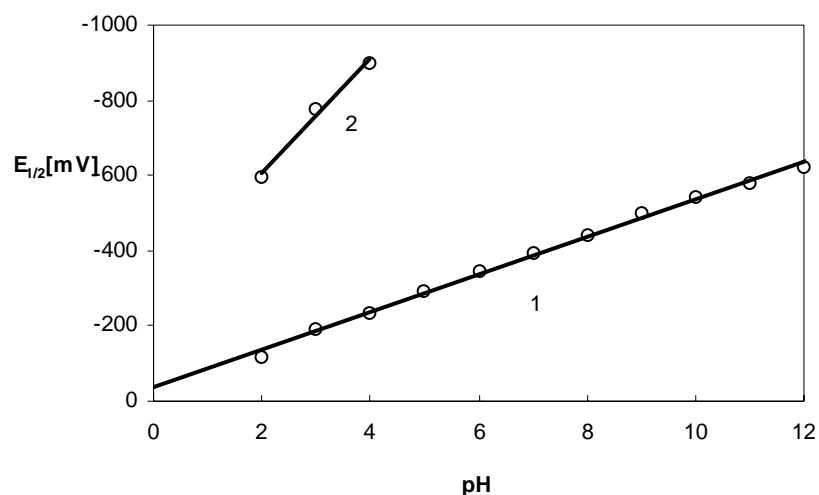
**Obr. 4**

Polarogramy 5-NBIA ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) měřené technikou TAST polarografie na DME 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); 12,0 (11).



**Obr. 5**

Polarogramy 5-NBIA ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) měřené technikou TAST polarografie v prostředí BR pufru o pH 2,0. Bez přídavku želatiny (1), s přídavkem 2 kapek želatiny (2).



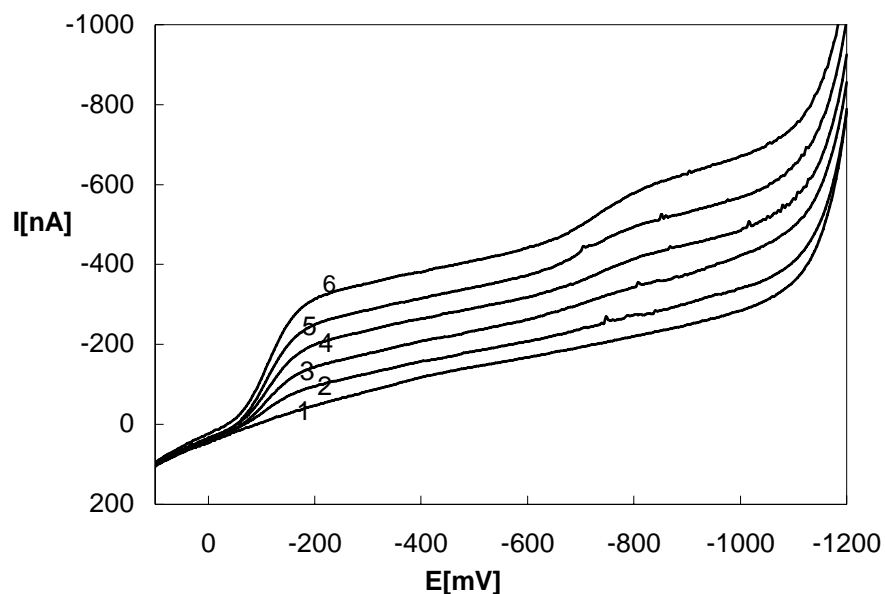
**Obr. 6**

Závislost půlvalnového potenciálu  $E_{1/2}^1$  (1) a  $E_{1/2}^2$  (2) 5-NBIA ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na pH roztoku, měřeno technikou TAST polarografie na klasické rtuťové kapkové elektrodě v prostředí BR pufru.

**Tab. 4**

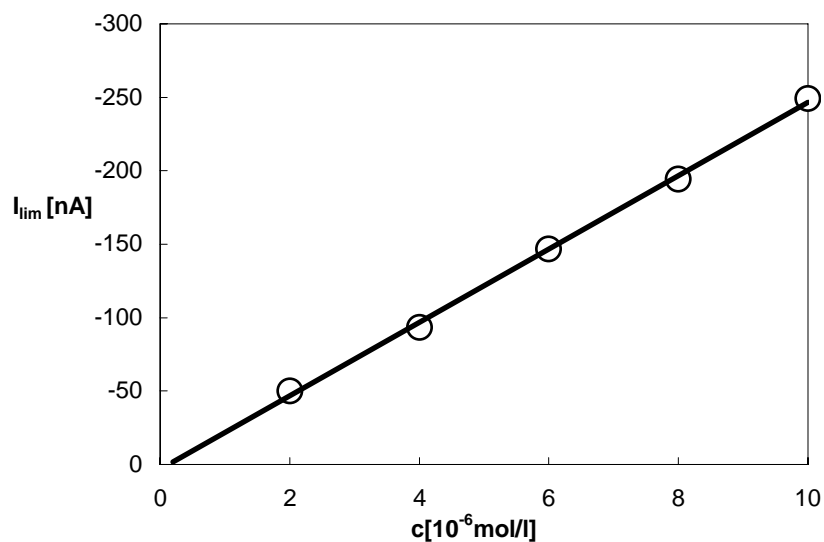
Vliv pH na TAST polarogramy 5-NBIA ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na klasické rtuťové kapkové elektrodě v prostředí BR pufru.

pH	$E_{1/2}^1$ (mV)	$I_{lim.}^1$ (nA)	$E_{1/2}^2$ (mV)	$I_{lim.}^2$ (nA)
2,0	-115	-2398	-596	-1127
3,0	-194	-2521	-775	-1001
4,0	-236	-2709	-900	-1110
5,0	-292	-2643	----	----
6,0	-346	-2774	----	----
7,0	-395	-2903	----	----
8,0	-440	-2784	----	----
9,0	-500	-2895	----	----
10,0	-545	-2768	----	----
11,0	-580	-2601	----	----
12,0	-622	-2463	----	----



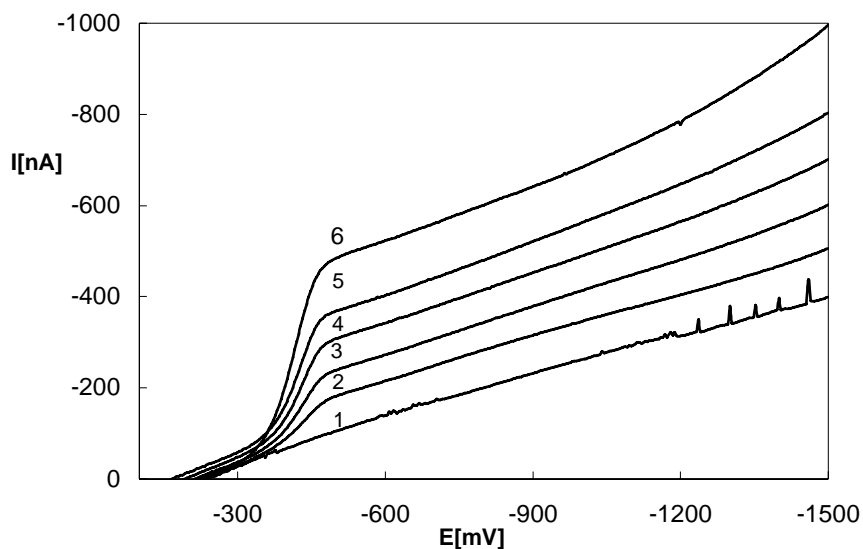
**Obr. 7**

Polarogramy 5-NBIA při nejnižším dosažitelném koncentračním rozmezí měřené technikou TAST polarografie na klasické rtuťové kapkové elektrodě v prostředí BR pufru o pH 2. Koncentrace 5-NBIA (mol/l): 0 (1),  $2 \cdot 10^{-6}$  (2),  $4 \cdot 10^{-6}$  (3),  $6 \cdot 10^{-6}$  (4),  $8 \cdot 10^{-6}$  (5),  $10 \cdot 10^{-6}$  (6).



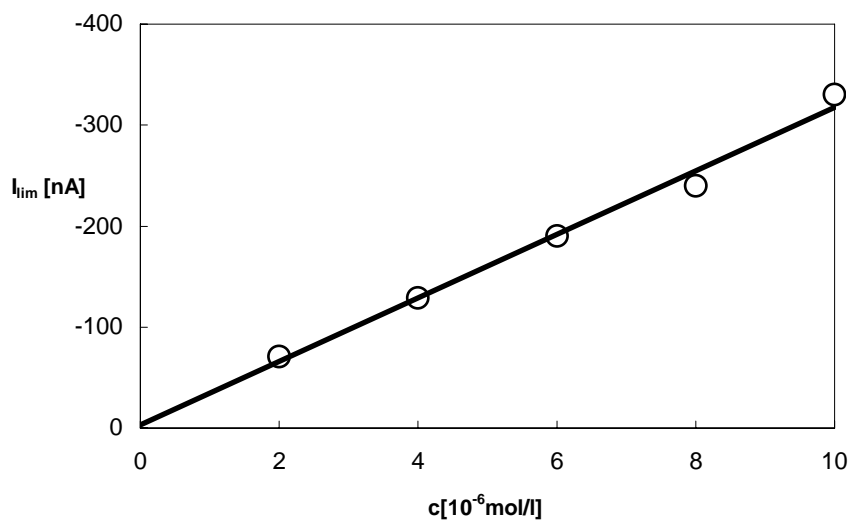
**Obr. 8**

Závislost limitního proudu na koncentraci  $c$  (5-NBIA) v rozmezí  $2 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l. Měřeno technikou TAST polarografie na rtuťové kapkové elektrodě v prostředí BR pufru o pH 2.



**Obr. 9**

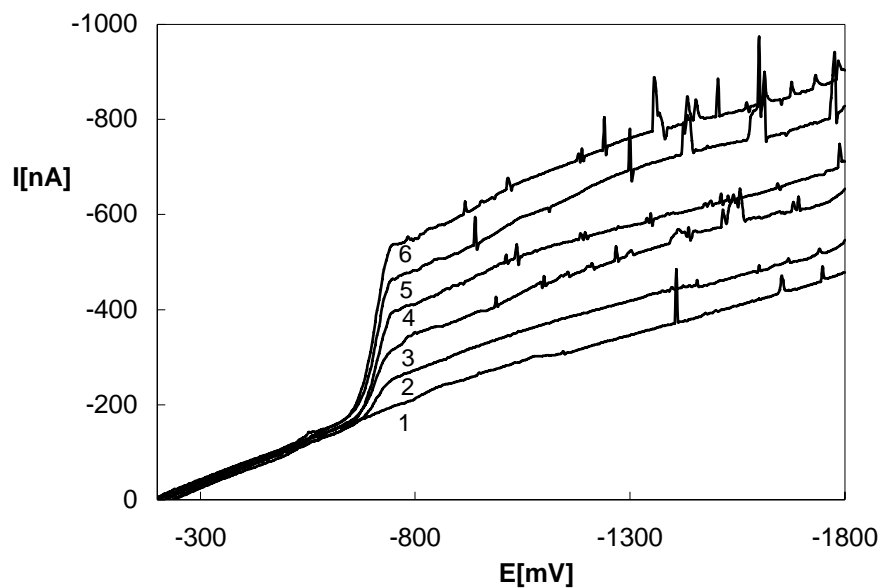
Polarogramy 5-NBIA při nejnižším dosažitelném koncentračním rozmezí měřené technikou TAST polarografie na klasické rtuťové kapkové elektrodě v prostředí BR pufru o pH 7. Koncentrace 5-NBIA (mol/l): 0 (1),  $2 \cdot 10^{-6}$  (2),  $4 \cdot 10^{-6}$  (3),  $6 \cdot 10^{-6}$  (4),  $8 \cdot 10^{-6}$  (5),  $10 \cdot 10^{-6}$  (6).



**Obr. 10**

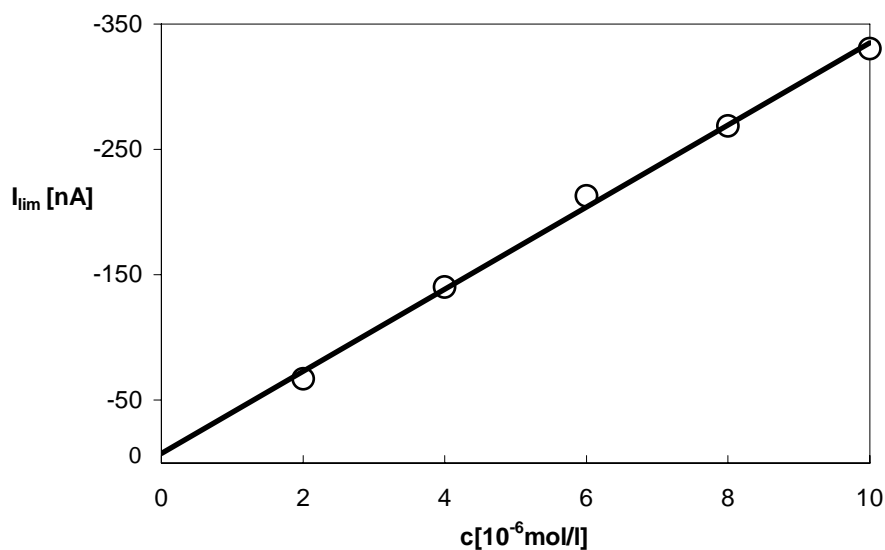
Závislost limitního proudu na koncentraci  $c$  (5-NBIA) v rozmezí  $2 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l. Měřeno technikou TAST polarografie na rtuťové kapkové elektrodě v prostředí BR pufru o pH 7.





**Obr. 11**

Polarogramy 5-NBIA při nejnižším dosažitelném koncentračním rozmezí měřené technikou TAST polarografie na klasické rtuťové elektrodě v prostředí BR pufru o pH 12. Koncentrace 5-NBIA (mol/l): 0 (1),  $2 \cdot 10^{-6}$  (1),  $4 \cdot 10^{-6}$  (2),  $6 \cdot 10^{-6}$  (3),  $8 \cdot 10^{-6}$  (4),  $10 \cdot 10^{-6}$  (5).



**Obr. 12**

Závislost proudu píku  $I_{lim}$  na koncentraci  $c$  (5-NBIA) v rozmezí  $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l. Měřeno technikou TAST polarografie na klasické rtuťové kapkové elektrodě v prostředí BR pufru o pH 12.

**Tab. 5**

Parametry kalibračních přímk pro stanovení 5-NBIA metodou TAST polarografie na klasické rtuťové kapkové elektrodě v prostředí BR pufru.

BR pufr	Koncentrace (mol/l)	Směrnice (nA·mol/l)	Úsek (nA)	Koeficient korelace	L <sub>Q</sub> (mol/l)
pH 2	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$2,58 \cdot 10^7$	-72,4	0,9973	-----
pH 2	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$2,50 \cdot 10^7$	-3,2	0,9993	$2,1 \cdot 10^{-6}$
pH 7	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$3,02 \cdot 10^7$	-79,1	0,9990	-----
pH 7	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$3,30 \cdot 10^7$	-17,3	0,9640	$1,5 \cdot 10^{-6}$
pH 12	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$3,04 \cdot 10^7$	-13,7	0,9937	-----
pH 12	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$3,28 \cdot 10^7$	-7,5	0,9984	$2,8 \cdot 10^{-6}$

### 3.2 Diferenční pulsní polarografie

Vliv pH na chování 5-NBIA ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) při DPP na rtuťové kapkové elektrodě byl sledován v prostředí BR pufru od pH 2,0 do pH 12,0. Látka v celé oblasti pH poskytuje jeden dobře vyvinutý pík. Výška druhého píku klesala s rostoucím pH. Zaznamenané polarografické křivky ukazují Obr. 13.

Při nízkých pH se na polarografické křivce objevuje anomálie odpovídající maximu na TAST polarografické křivce, která byla potlačena přidáním dvou kapek želatiny - viz. Obr. 14.

Metodou lineární regrese byl pro závislost potenciálu prvního píku  $E_{p1}$  na pH roztoku v rozmezí pH 2-12 vypočten vztah :

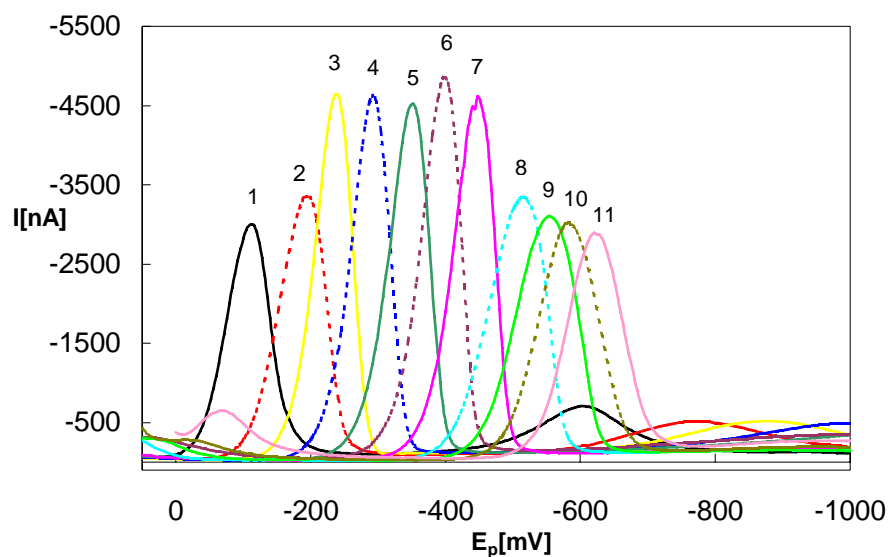
$$E_{p1} \text{ (mV)} = -51,0 \text{ pH} - 35,4 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9922)$$

Pro druhý pík byl metodou lineární regrese pro závislost potenciálu píku  $E_{p2}$  na pH roztoku v rozmezí pH 2-5 vypočten vztah :

$$E_{p2} \text{ (mV)} = -128,9 \text{ pH} - 362,1 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9897)$$

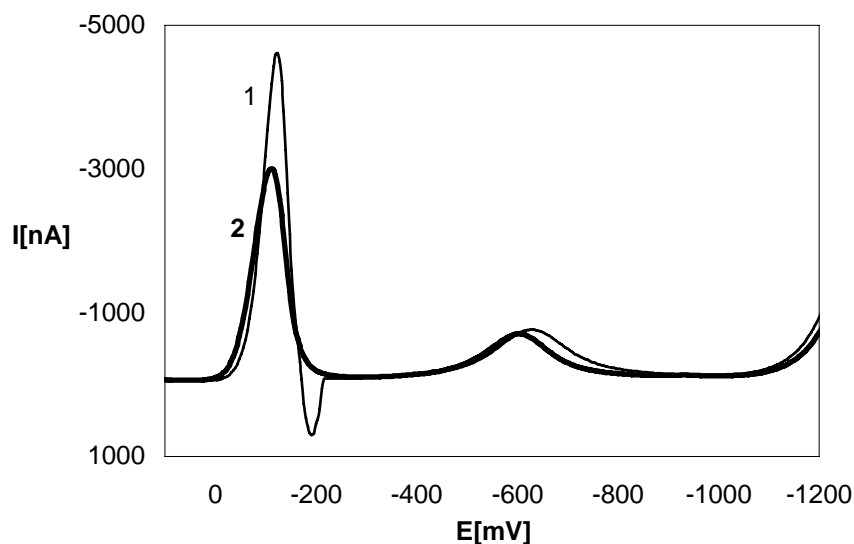
Zjištěné závislosti potenciálu píků  $E_{p1}$  a  $E_{p2}$  proudu píků  $I_{p1}$  a  $I_{p2}$  na pH roztoku jsou uvedeny v Tab. 6. Graficky je závislost  $E_{p1}$  a  $E_{p2}$  na pH znázorněna na Obr. 15.

Jako optimální bylo zvoleno prostředí BR pufru o pH 2, 7 a 12 v nichž byly proměřeny koncentrační závislosti v koncentračním rozmezí  $(2-10) \cdot 10^{-5}$  mol/l,  $(2-10) \cdot 10^{-6}$  mol/l a  $(2-10) \cdot 10^{-7}$  mol/l (viz Obr. 17, 19, 21). Parametry kalibračních přímek jsou uvedeny v Tab. 7. Na Obr. 16, 18, 20 jsou uvedeny polarogramy 5-NBIA při nejnižším dosažitelném koncentračním rozmezí při daném pH.



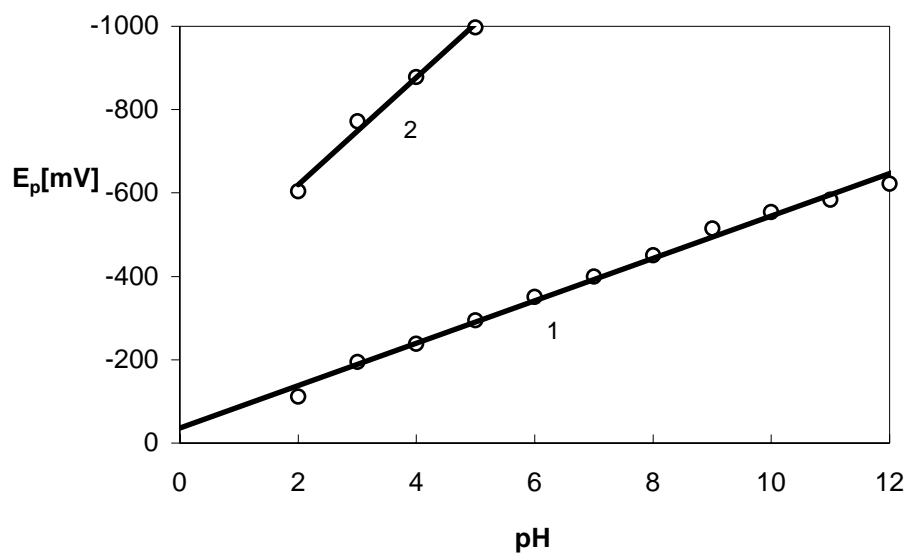
**Obr. 13**

Voltamogramy 5-NBIA ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) měřené technikou DPP na DME 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); 12,0 (11).



**Obr. 14**

Polarogramy 5-NBIA ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) měřené technikou TAST v prostředí BR pufru o pH 2,0. Bez přidavku želatiny (1), s přidavkem 2 kapek želatiny (2).



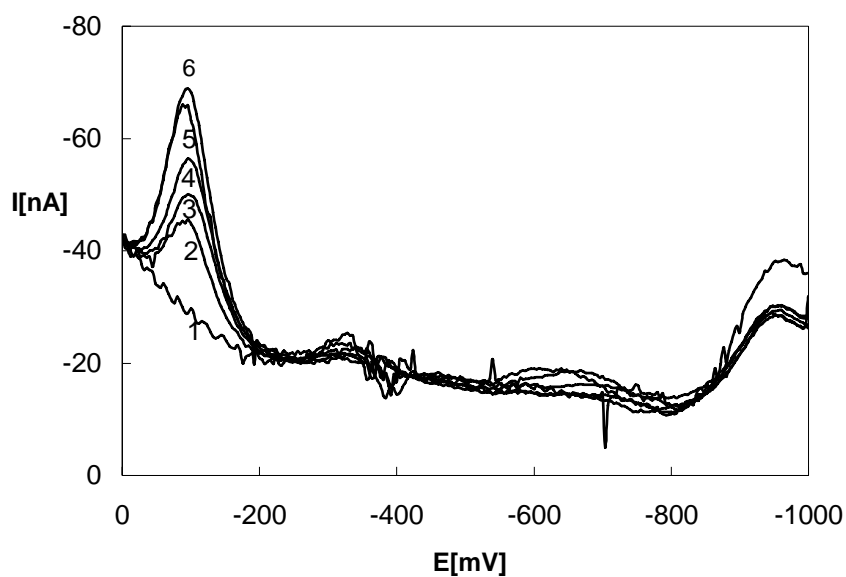
**Obr. 15**

Závislost potenciálu píku  $E_{p1}$  (1) a  $E_{p2}$  (2) 5-NBIA ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na pH roztoku, měřeno technikou DPP v prostředí BR pufru.

**Tab. 6**

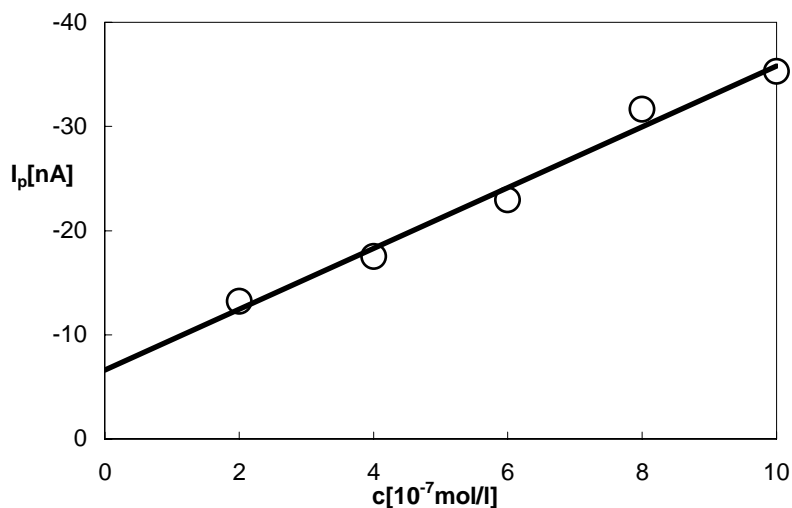
Vliv pH na DP polarogramy 5-NBIA ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na klasické rtuťové kapkové elektrodě v prostředí BR pufru.

pH	$E_{p1}$ (mV)	$I_{p1}$ (nA)	$E_{p2}$ (mV)	$I_{p2}$ (nA)
2,0	-111	-2875	-604	-706
3,0	-194	-3252	-772	-517
4,0	-238	-4453	-879	-519
5,0	-294	-4511	-998	-500
6,0	-351	-4415	----	----
7,0	-399	-4700	----	----
8,0	-451	-4480	----	----
9,0	-515	-3256	----	----
10,0	-554	-3013	----	----
11,0	-584	-2934	----	----
12,0	-622	-2753	----	----



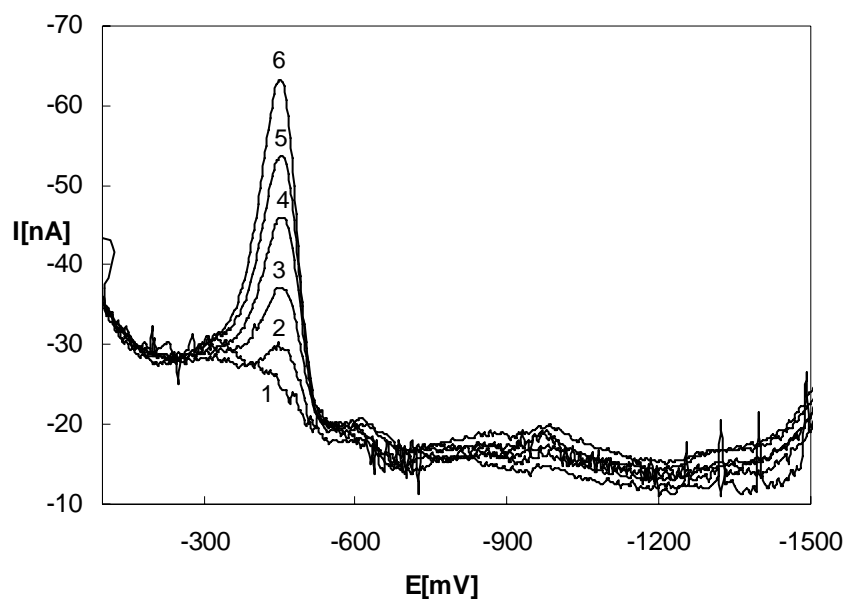
**Obr. 16**

Polarogramy 5-NBIA při nejnižším dosažitelném koncentračním rozmezí měřené technikou DPP na klasické rtuťové kapkové elektrodě v prostředí BR pufru o pH 2. Koncentrace 5-NBIA (mol/l): 0 (1),  $2 \cdot 10^{-7}$  (2),  $4 \cdot 10^{-7}$  (3),  $6 \cdot 10^{-7}$  (4),  $8 \cdot 10^{-7}$  (5),  $10 \cdot 10^{-7}$  (6).



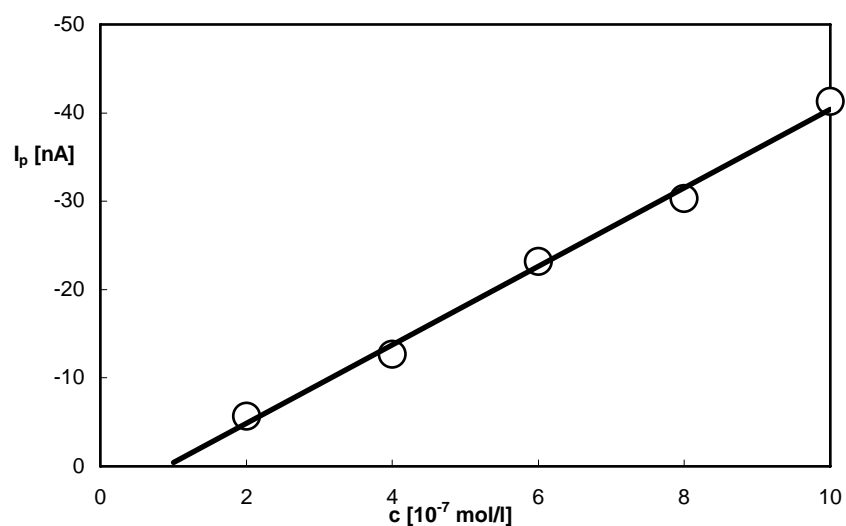
**Obr. 17**

Závislost proudu píku  $I_p$  na koncentraci  $c$  5-NBIA v rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l. Měřeno technikou DPP na klasické rtuťové kapkové elektrodě v prostředí BR pufru o pH 2.



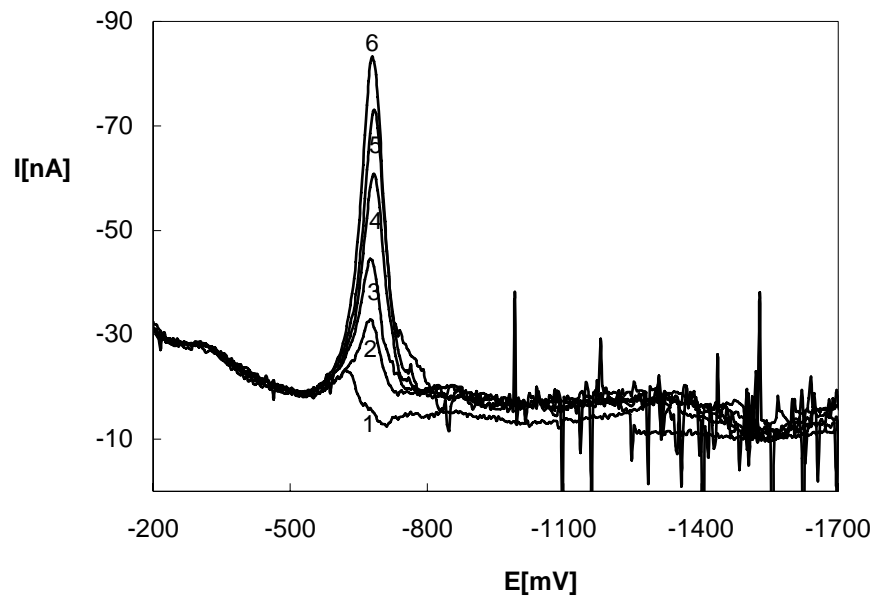
**Obr. 18**

Polarogramy 5-NBIA při nejnižším dosažitelném koncentračním rozmezí měřené technikou DPP na klasické rtuťové kapkové elektrodě v prostředí BR pufr o pH 7. Koncentrace 5-NBIA (mol/l): 0 (1),  $2 \cdot 10^{-7}$  (2),  $4 \cdot 10^{-7}$  (3),  $6 \cdot 10^{-7}$  (4),  $8 \cdot 10^{-7}$  (5),  $10 \cdot 10^{-7}$  (6).



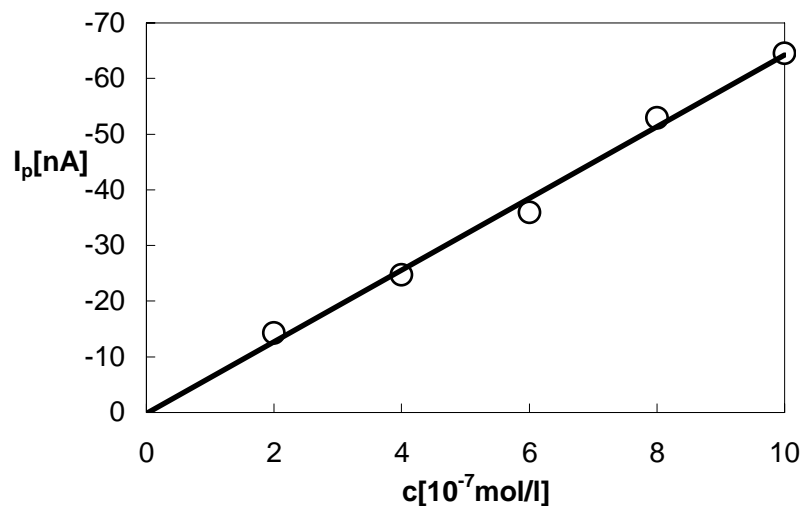
**Obr. 19**

Závislost proudu píku  $I_p$  na koncentraci  $c$  (5-NBIA) v rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l. Měřeno technikou DPP na klasické rtuťové kapkové elektrodě v prostředí BR pufru o pH 7.



**Obr. 20**

Polarogramy 5-NBIA při nejnižším dosažitelném koncentračním rozmezí měřené technikou DPP na klasické rtuťové elektrodě v prostředí BR pufru o pH 12. Koncentrace 5-NBIA (mol/l): 0 (1),  $2 \cdot 10^{-7}$  (2),  $4 \cdot 10^{-7}$  (3),  $6 \cdot 10^{-7}$  (4),  $8 \cdot 10^{-7}$  (5),  $10 \cdot 10^{-7}$  (6).



**Obr. 21**

Závislost proudu píku  $I_p$  na koncentraci  $c$  (5-NBIA) v rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l. Měřeno technikou DPP na klasické rtuťové kapkové elektrodě v prostředí BR pufru o pH 12.



**Tab. 7**

Parametry kalibračních přímk pro stanovení 5-NBIA metodou DPP na klasické rtuťové kapkové elektrodě v prostředí BR pufru.

BR pufr	Koncentrace (mol/l)	Směrnice (nA mol/l)	Úsek (nA)	Koeficient korelace	$L_Q$ (mol/l)
pH 2	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$2,79 \cdot 10^7$	-37,7	0,9990	-----
pH 2	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$2,69 \cdot 10^7$	-2,4	0,9991	-----
pH 2	$(2-10) \cdot 10^{-7}$	$2,92 \cdot 10^7$	-6,6	0,9916	$4,6 \cdot 10^{-7}$
pH 7	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$3,18 \cdot 10^7$	-425,4	0,9929	-----
pH 7	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$4,86 \cdot 10^7$	-16,9	0,9992	-----
pH 7	$(2-10) \cdot 10^{-7}$	$4,45 \cdot 10^7$	4,0	0,9972	$4,8 \cdot 10^{-7}$
pH 12	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$4,03 \cdot 10^7$	-405,5	0,9955	-----
pH 12	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$5,04 \cdot 10^7$	-11,3	0,9992	-----
pH 12	$(2-10) \cdot 10^{-7}$	$6,44 \cdot 10^7$	-0,1	0,9964	$4,5 \cdot 10^{-7}$

## 4. Voltametrické stanovení studované látky

### 4.1. DC voltametrie na visící rtuťové kapkové elektrodě

Vliv pH na chování 5-NBIA ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) při DCV na visící rtuťové kapkové elektrodě byl sledován v prostředí BR pufru od pH 2,0 do pH 12,0. Látka v celé oblasti pH poskytuje jeden dobře vyvinutý pík. Výška druhého píku klesala s rostoucím pH. Zaznamenané voltametrické křivky ukazuje Obr. 22.

Metodou lineární regrese byl pro závislost potenciálu prvního píku  $E_{p1}$  na pH roztoku v rozmezí pH 2-12 vypočten vztah :

$$E_{p1} \text{ (mV)} = -55,9 \text{ pH} - 27,6 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9929)$$

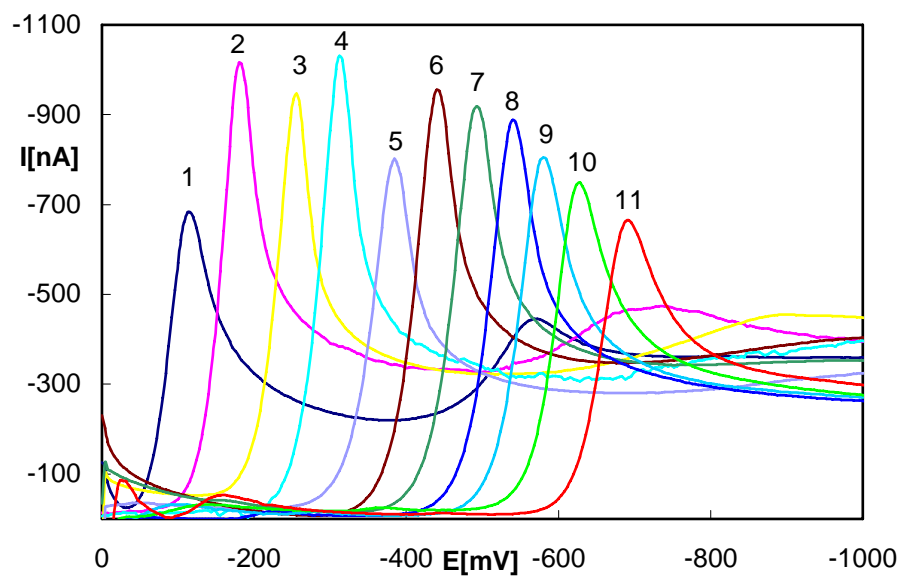
Pro druhý pík byl metodou lineární regrese pro závislost potenciálu píku  $E_{p2}$  na pH roztoku v rozmezí pH 2-5 vypočten vztah :

$$E_{p2} \text{ (mV)} = -140,7 \text{ pH} - 302,3 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9781)$$

Zjištěné závislosti potenciálu píků  $E_{p1}$  a  $E_{p2}$  proudu píků  $I_{p1}$  a  $I_{p2}$  na pH roztoku jsou uvedeny v Tab. 8. Graficky je závislost  $E_{p1}$  a  $E_{p2}$  na pH znázorněna na Obr. 23.

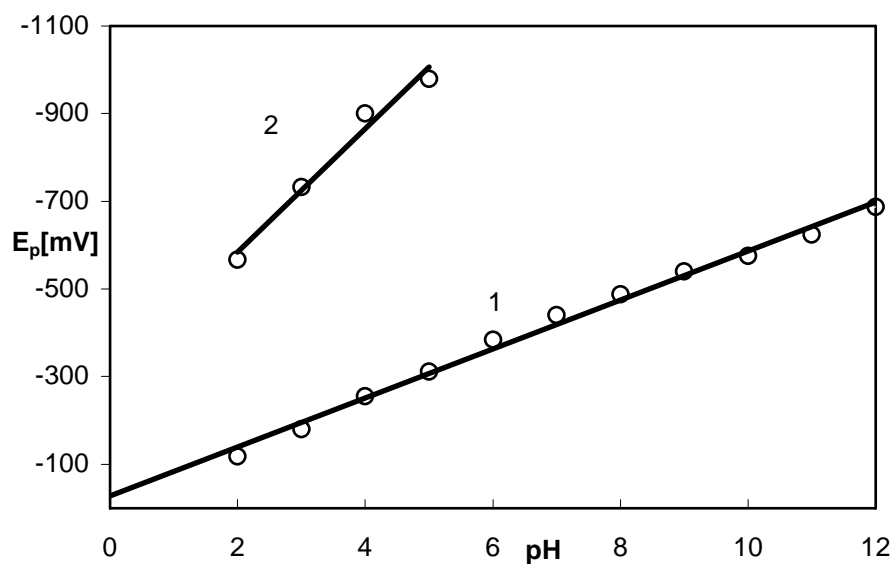
Výšky píků byly vyhodnocovány od spojnice minim před píkem a po píkem.

Jako optimální bylo zvoleno prostředí BR pufru o pH 5 v nichž byly proměřeny koncentrační závislosti v koncentračním rozmezí  $(2-10) \cdot 10^{-5}$  mol/l,  $(2-10) \cdot 10^{-6}$  mol/l a  $(2-10) \cdot 10^{-7}$  mol/l (viz Obr. 25). Parametry kalibračních přímků jsou uvedeny v Tab. 9. Na Obr. 24 jsou uvedeny voltamogramy 5-NBIA při nejnižším dosažitelném koncentračním rozmezí při daném pH.



**Obr. 22**

Voltamogramy 5-NBIA ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) měřené technikou DCV na HMDE 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); 12,0 (11).



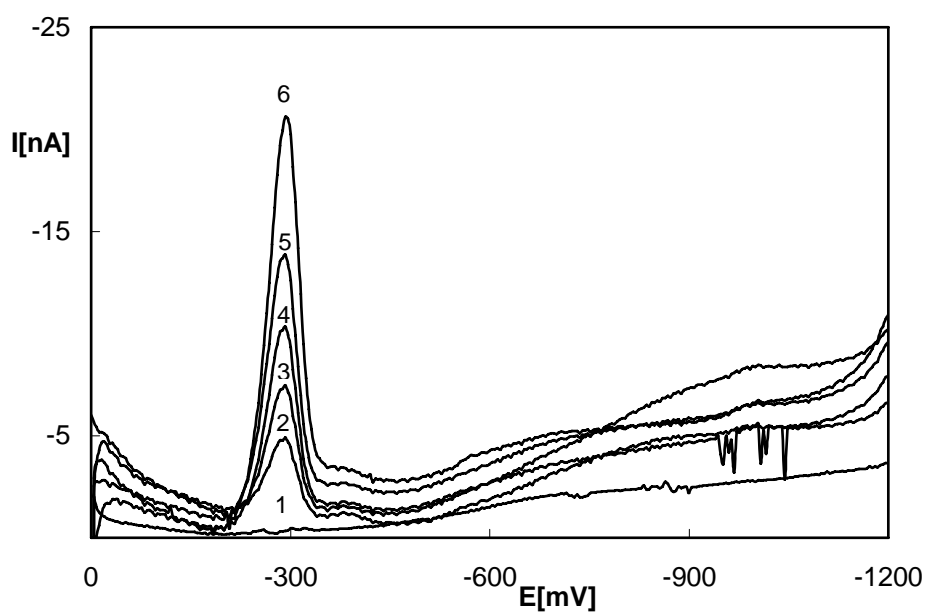
**Obr. 23**

Závislost potenciálu píku  $E_{p1}$  (1) a  $E_{p2}$  (2) 5-NBIA ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na pH roztoku, měřeno technikou DCV v prostředí BR pufru.

**Tab. 8**

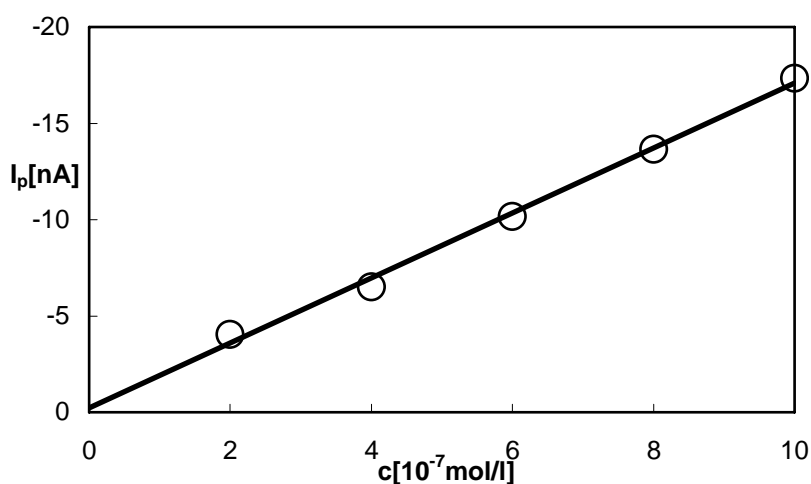
Vliv pH na DC voltamogramy 5-NBIA ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na visící rtuťové kapkové elektrodě v prostředí BR pufru.

pH	$E_{p1}$ (mV)	$I_{p1}$ (nA)	$E_{p2}$ (mV)	$I_{p2}$ (nA)
2,0	-118	-576	-567	-150
3,0	-180	-810	-732	-113
4,0	-256	-752	-900	-64
5,0	-312	-871	-980	-35
6,0	-384	-644	----	----
7,0	-440	-781	----	----
8,0	-488	-807	----	----
9,0	-540	-736	----	----
10,0	-576	-639	----	----
11,0	-624	-593	----	----
12,0	-688	-505	----	----



**Obr. 24**

Voltamogramy 5-NBIA při nejnižším dosažitelném koncentračním rozmezí měřené technikou DCV na visící rtuťové kapkové elektrodě v prostředí BR pufr o pH 5. Koncentrace 5-NBIA (mol/l): 0 (1),  $2 \cdot 10^{-7}$  (2),  $4 \cdot 10^{-7}$  (3),  $6 \cdot 10^{-7}$  (4),  $8 \cdot 10^{-7}$  (5),  $10 \cdot 10^{-7}$  (6).



**Obr. 25**

Závislost proudu píku  $I_p$  na koncentraci  $c$  (5-NBIA) v rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l. Měřeno technikou DCV na visící rtuťové kapkové elektrodě v prostředí BR pufru o pH 5.

**Tab. 9**

Parametry kalibračních přímek pro stanovení 5-NBIA metodou DCV na visící rtuťové kapkové elektrodě v prostředí BR pufru.

BR pufr	Koncentrace (mol/l)	Směrnice (nA·mol/l)	Úsek (nA)	Koeficient korelace	L <sub>Q</sub> (mol/l)
pH 5	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$1,90 \cdot 10^7$	-8,6	0,9978	-----
pH 5	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$1,68 \cdot 10^7$	-3,1	0,9935	-----
pH 5	$(2-10) \cdot 10^{-7}$	$1,69 \cdot 10^7$	-0,2	0,9977	$3,5 \cdot 10^{-7}$

## 4.2. Diferenční pulsní voltametrie na visící rtuťové kapkové elektrodě

Vliv pH na chování 5-NBIA ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) při DPV na visící rtuťové kapkové elektrodě byl sledován v prostředí BR pufru od pH 2,0 do pH 12,0. Látka v celé oblasti pH poskytuje jeden dobře vyvinutý pík. Výška druhého píku klesala s rostoucím pH. Zaznamenané voltametrické křivky ukazuje Obr. 26.

Metodou lineární regrese byl pro závislost potenciálu prvního píku  $E_{p1}$  na pH roztoku v rozmezí pH 2-12 vypočten vztah :

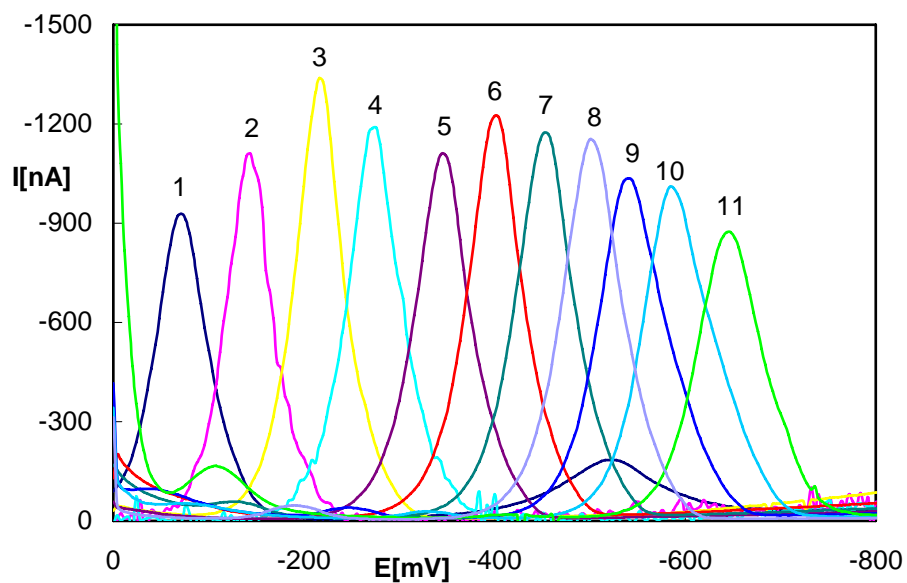
$$E_{p1} \text{ (mV)} = -56,3 \text{ pH} + 15,9 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9912)$$

Pro druhý pík byl metodou lineární regrese pro závislost potenciálu píku  $E_{p2}$  na pH roztoku v rozmezí pH 2-5 vypočten vztah :

$$E_{p2} \text{ (mV)} = -160,7 \text{ pH} - 205,8 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9936)$$

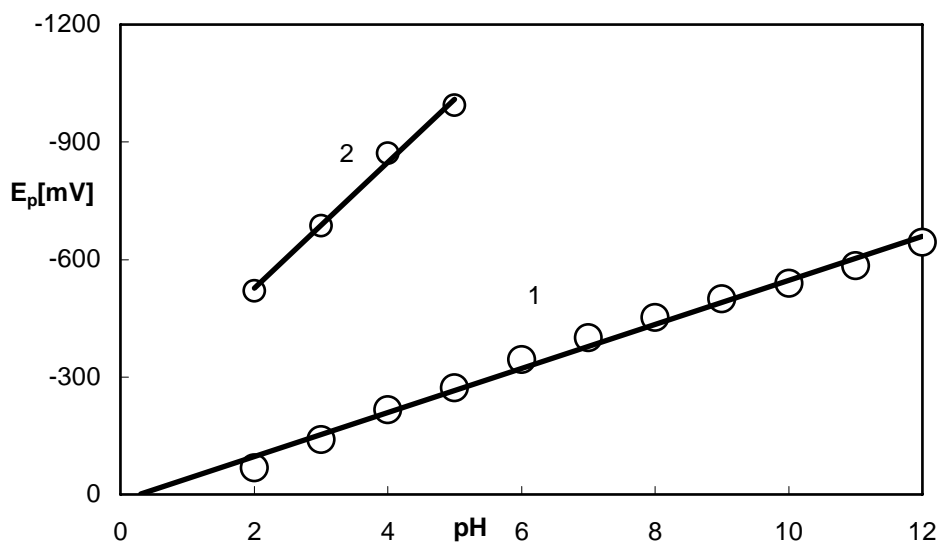
Zjištěné závislosti potenciálu píků  $E_{p1}$  a  $E_{p2}$  proudu píků  $I_{p1}$  a  $I_{p2}$  na pH roztoku jsou uvedeny v Tab. 10. Graficky je závislost  $E_{p1}$  a  $E_{p2}$  na pH znázorněna na Obr. 27.

Jako optimální bylo zvoleno prostředí BR pufru o pH 4 v nichž byly proměřeny koncentrační závislosti v koncentračním rozmezí  $(2-10) \cdot 10^{-5}$  mol/l,  $(2-10) \cdot 10^{-6}$  mol/l a  $(2-10) \cdot 10^{-7}$  mol/l (viz Obr. 29). Parametry kalibračních přímk jsou uvedeny v Tab. 11. Na Obr. 28 jsou uvedeny voltamogramy 5-NBIA při nejnižším dosažitelném koncentračním rozmezí při daném pH.



**Obr. 26**

Voltamogramy 5-NBIA ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) měřené technikou DPV na HMDE 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); 12,0 (11).



**Obr. 27**

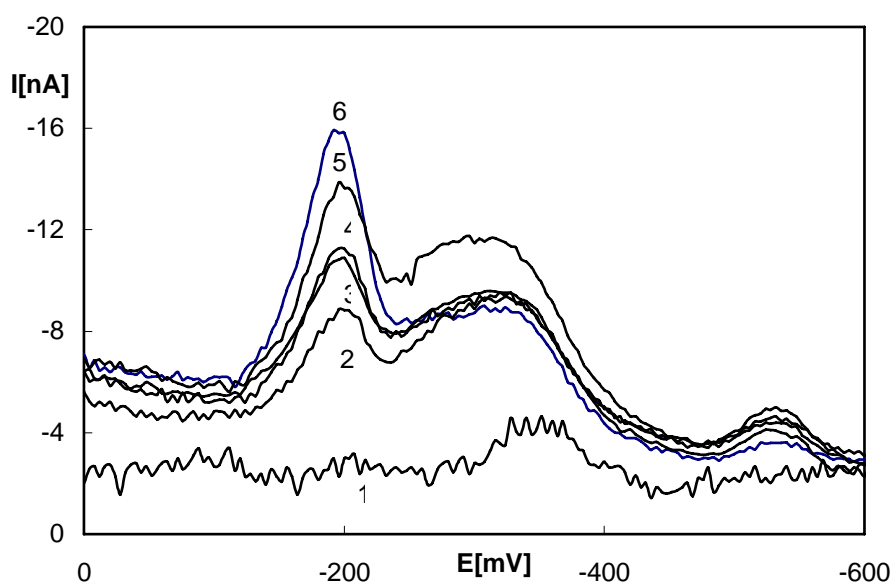
Závislost potenciálu píku  $E_{p1}$  (1) a  $E_{p2}$  (2) 5-NBIA ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na pH roztoku, měřeno technikou DPV v prostředí BR pufru.



**Tab. 10**

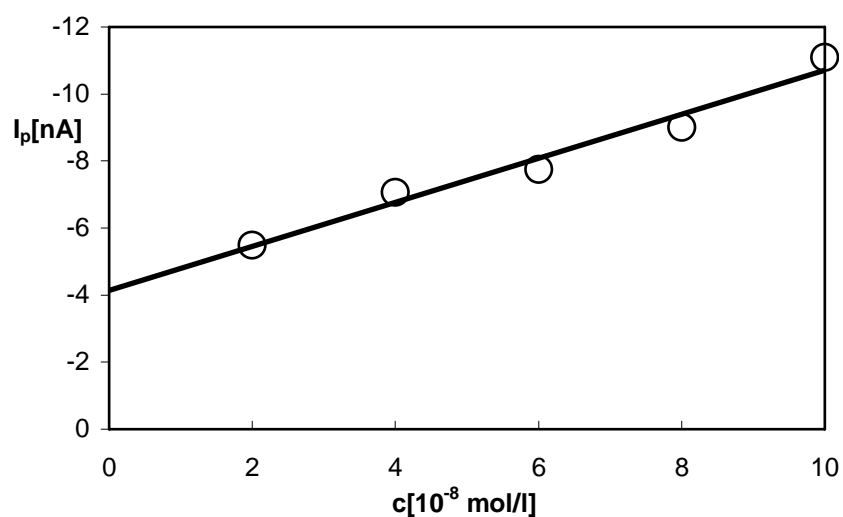
Vliv pH na DP voltamogramy 5-NBIA ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na visící rtuťové kapkové elektrodě v prostředí BR pufru.

pH	$E_{p1}$ (mV)	$I_{p1}$ (nA)	$E_{p2}$ (mV)	$I_{p2}$ (nA)
2,0	-68	-872	-520	-175
3,0	-140	-1092	-687	-94
4,0	-216	-1318	-872	-79
5,0	-272	-1182	-994	-46
6,0	-344	-1096	----	----
7,0	-400	-1194	----	----
8,0	-452	-1149	----	----
9,0	-500	-1140	----	----
10,0	-540	-1018	----	----
11,0	-584	-990	----	----
12,0	-644	-858	----	----



**Obr. 28**

Voltamogramy 5-NBIA při nejnižším dosažitelném koncentračním rozmezí měřené technikou DPV na visící rtuťové kapkové elektrodě v prostředí BR pufru o pH 4. Koncentrace 5-NBIA (mol/l): 0 (1),  $2 \cdot 10^{-8}$  (2),  $4 \cdot 10^{-8}$  (3),  $6 \cdot 10^{-8}$  (4),  $8 \cdot 10^{-8}$  (5),  $10 \cdot 10^{-8}$  (6).



**Obr. 29**

Závislost proudu píku  $I_p$  na koncentraci  $c$  5-NBIA v rozmezí  $2 \cdot 10^{-8}$ – $1 \cdot 10^{-7}$  mol/l. Měřeno technikou DPV na visící rtuťové kapkové elektrodě v prostředí BR pufru o pH 4.

**Tab. 11**

Parametry kalibračních přímk pro stanovení 5-NBIA metodou DPV na visící rtuťové kapkové elektrodě v prostředí BR pufru.

BR pufr	Koncentrace (mol/l)	Směrnice (nA·mol/l)	Úsek (nA)	Koeficient korelace	L <sub>Q</sub> (mol/l)
pH 4	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$1,7 \cdot 10^7$	-4,0	0,9976	-----
pH 4	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$2,3 \cdot 10^7$	-5,4	0,9996	-----
pH 4	$(2-10) \cdot 10^{-7}$	$1,9 \cdot 10^7$	-6,2	0,9906	-----
pH 4	$(2-10) \cdot 10^{-8}$	$6,6 \cdot 10^7$	-4,1	0,9859	$2,7 \cdot 10^{-8}$

Z tabulky vyplývá, že při nejnižším koncentračním rozmezí je směrnice vyšší než u koncentrovanějších roztoků. Vyšší hodnota směrnice může souviset s projevem některých specifických vlivů na rozhraní kov-roztok (adsorbce). Pozorovaný značný úsek kalibrační přímky v nejnižším koncentračním rozmezí poněkud komplikuje analytické využití této metody, ale neznemožňuje ho.

### 4.3. DC voltametrie na uhlíkové pastové elektrodě

Vliv pH na chování 5-NBIA ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) při katodické DCV na uhlíkové pastové elektrodě byl sledován v prostředí BR pufru od pH 2,0 do pH 12,0. Látka v celé oblasti pH poskytuje jeden dobře vyvinutý pík. Výška druhého píku klesala s rostoucím pH. Zaznamenané voltametrické křivky ukazuje Obr. 30.

Metodou lineární regrese byl pro závislost potenciálu prvního píku  $E_{p1}$  na pH roztoku v rozmezí pH 2-12 vypočten vztah :

$$E_{p1} \text{ (mV)} = - 50,5 \text{ pH} - 236,5 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9755)$$

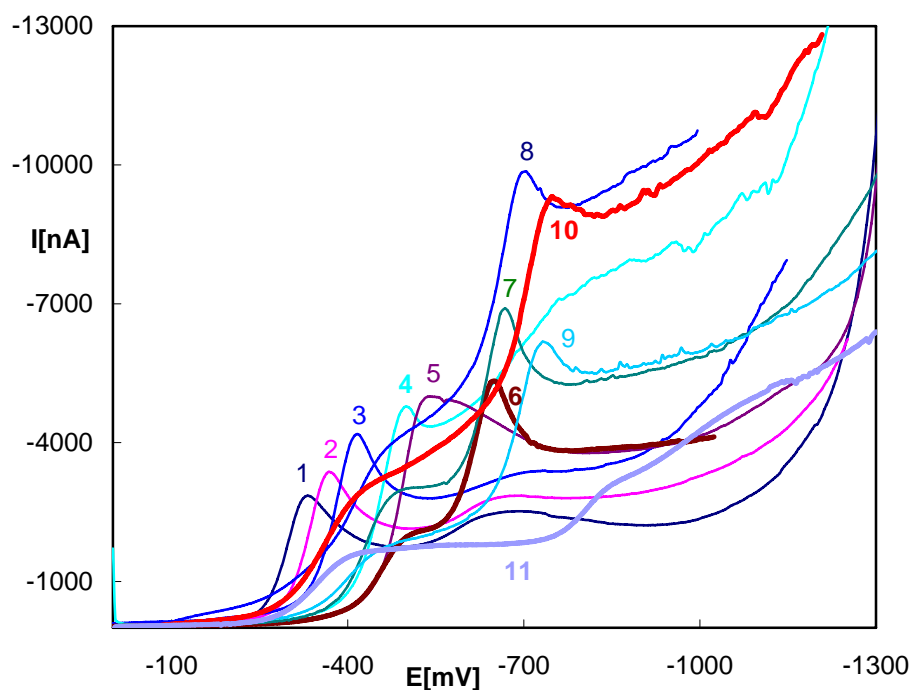
Pro druhý pík byl metodou lineární regrese pro závislost potenciálu píku  $E_{p2}$  na pH roztoku v rozmezí pH 2-4 vypočten vztah :

$$E_{p2} \text{ (mV)} = - 8,0 \text{ pH} - 658,7 \quad (\text{korelační koeficient } 0,1967)$$

Zjištěné závislosti potenciálu píků  $E_{p1}$  a  $E_{p2}$  proudu píků  $I_{p1}$  a  $I_{p2}$  na pH roztoku jsou uvedeny v Tab. 12. Graficky je závislost  $E_{p1}$  a  $E_{p2}$  na pH znázorněna na Obr. 31.

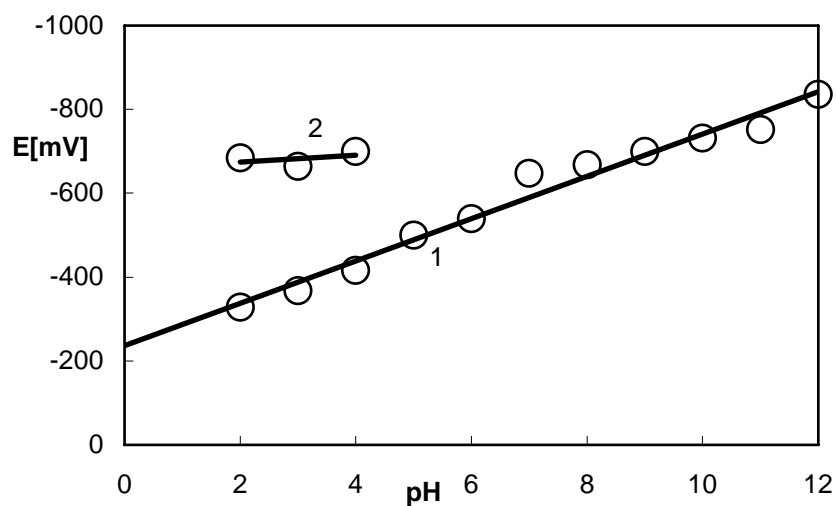
Výšky píků byly vyhodnocovány od spojnice minim před píkem a za ním.

Jako optimální bylo zvoleno prostředí BR pufru o pH 3 v nichž byly proměřeny koncentrační závislosti v koncentračním rozmezí  $(2-10) \cdot 10^{-5}$  mol/l (viz Obr. 33). Parametry kalibračních přímek jsou uvedeny v Tab. 13. Na Obr. 32 jsou uvedeny voltamogramy 5-NBIA při nejnižším dosažitelném koncentračním rozmezí při daném pH.



**Obr. 30**

Voltamogramy 5-NBIA ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) měřené technikou DCV na uhlíkové pastové elektodě 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); 12,0 (11).



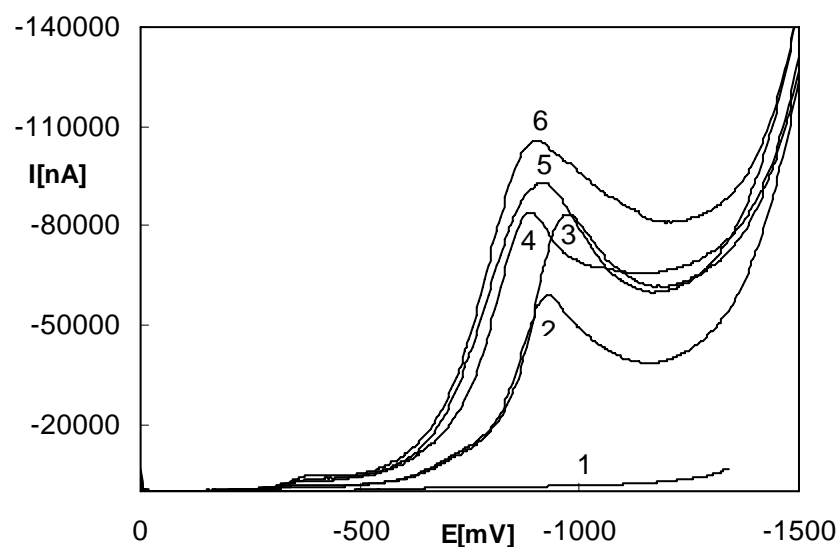
**Obr. 31**

Závislost potenciálu píku  $E_{p1}$  (1) a  $E_{p2}$  (2) 5-NBIA ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na pH roztoku, měřeno technikou DCV v prostředí BR pufru.

**Tab. 12**

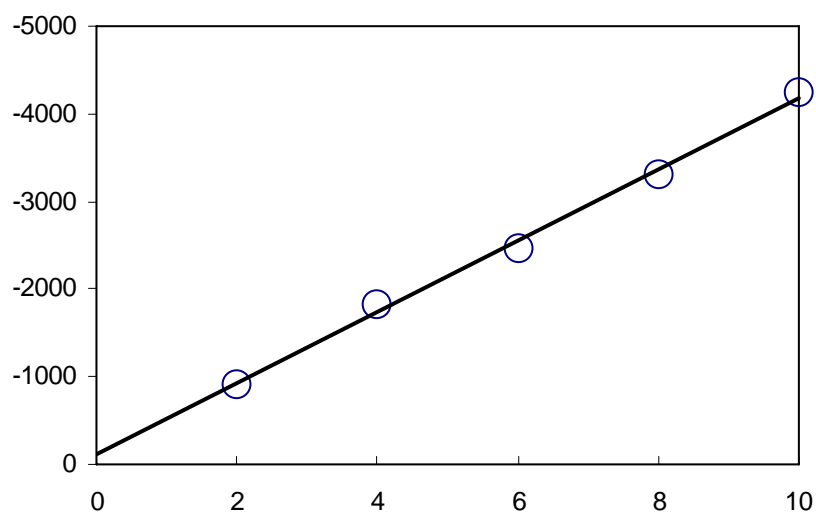
Vliv pH na katodické DC voltamogramy 5-NBIA ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na uhlíkové pastové elektrodě v prostředí BR pufru.

pH	$E_{p1}$ (mV)	$I_{p1}$ (nA)	$E_{p2}$ (mV)	$I_{p2}$ (nA)
2,0	-328	-2119	-684	-526
3,0	-368	-2255	-664	-303
4,0	-416	-2664	-700	-192
5,0	-500	-1524	----	----
6,0	-540	-3435	----	----
7,0	-648	-2490	----	----
8,0	-668	-2659	----	----
9,0	-700	-2492	----	----
10,0	-732	-2018	----	----
11,0	-752	-2054	----	----
12,0	-836	-1584	----	----



**Obr. 32**

Voltamogramy 5-NBIA při nejnižším dosažitelném koncentračním rozmezí měřené technikou DCV na uhlíkové pastové elektrodě v prostředí BR pufru o pH 3. Koncentrace 5-NBIA (mol/l): 0 (1),  $2 \cdot 10^{-5}$  (2),  $4 \cdot 10^{-5}$  (3),  $6 \cdot 10^{-5}$  (4),  $8 \cdot 10^{-5}$  (5),  $10 \cdot 10^{-5}$  (6).



**Obr. 33**

Závislost proudu píku  $I_p$  na koncentraci  $c$  5-NBIA v rozmezí  $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Měřeno technikou DCV na uhlíkové pastové elektrodě v prostředí BR pufru o pH 3.

**Tab. 13**

Parametry kalibračních přímek pro stanovení 5-NBIA metodou katodické DCV na uhlíkové pastové elektrodě v prostředí BR pufru.

BR pufr	Koncentrace (mol/l)	Směrnice (nA·mol/l)	Úsek (nA)	Koeficient korelace	$L_Q$ (mol/l)
pH 3	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$4,1 \cdot 10^7$	-114,2	0,9981	$2,9 \cdot 10^{-5}$

Z dosažených výsledků je patrné, že katodická DCV na uhlíkové pastové elektrodě není vzhledem k nízké citlivosti a špatně vyvinutým voltamogramům vhodnou metodou pro stanovení stopových množství 5-NBIA.



#### 4.4. Diferenční pulsní voltametrie na uhlíkové pastové elektrodě

Vliv pH na chování 5-NBIA ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) při DPV na uhlíkové pastové elektrodě byl sledován v prostředí BR pufru od pH 2,0 do pH 12,0. Látka v celé oblasti pH poskytuje jeden dobře vyvinutý pík. Výška druhého píku klesala s rostoucím pH. Zaznamenané voltametrické křivky ukazují Obr. 34.

Metodou lineární regrese byl pro závislost potenciálu prvního píku  $E_{p1}$  na pH roztoku v rozmezí pH 2-12 vypočten vztah :

$$E_{p1} \text{ (mV)} = -50,3 \text{ pH} - 191,9 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9709)$$

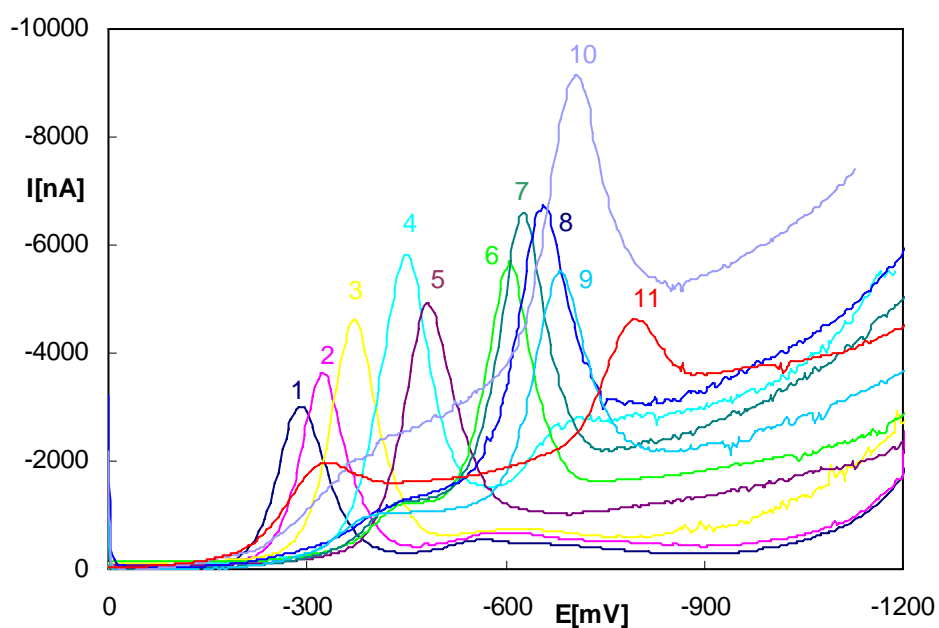
Pro druhý pík byl metodou lineární regrese pro závislost potenciálu píku  $E_{p2}$  na pH roztoku v rozmezí pH 2-5 vypočten vztah :

$$E_{p2} \text{ (mV)} = -46,0 \text{ pH} - 456,0 \quad (\text{korelační koeficient } 0,8669)$$

Zjištěné závislosti potenciálu píků  $E_{p1}$  a  $E_{p2}$  proudu píků  $I_{p1}$  a  $I_{p2}$  na pH roztoku jsou uvedeny v Tab. 14. Graficky je závislost  $E_{p1}$  a  $E_{p2}$  na pH znázorněna na Obr. 35.

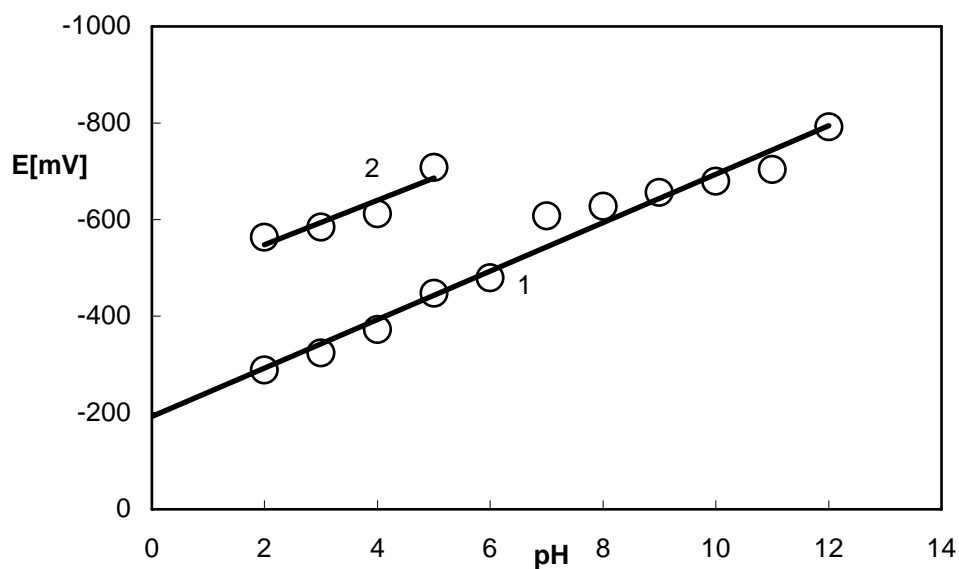
Výšky píků byly vyhodnocovány od spojnice minim před píkem a za ním.

Jako optimální bylo zvoleno prostředí BR pufru o pH 3 v němž byly proměřeny koncentrační závislosti v koncentračním rozmezí  $(2-10) \cdot 10^{-5}$  mol/l,  $(2-10) \cdot 10^{-6}$  mol/l (viz Obr. 37). Parametry kalibračních přímk jsou uvedeny v Tab. 15. Na Obr. 36 jsou uvedeny voltamogramy 5-NBIA při nejnižším dosažitelném koncentračním rozmezí při daném pH.



**Obr. 34**

Voltamogramy 5-NBIA ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) měřené technikou DPV na uhlíkové pastové elektrodě 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); 12,0 (11).



**Obr. 35**

Závislost potenciálu píku  $E_{p1}$  (1) a  $E_{p2}$  (2) 5-NBIA ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na pH roztoku, měřeno technikou DCV v prostředí BR pufru.

**Tab. 14**

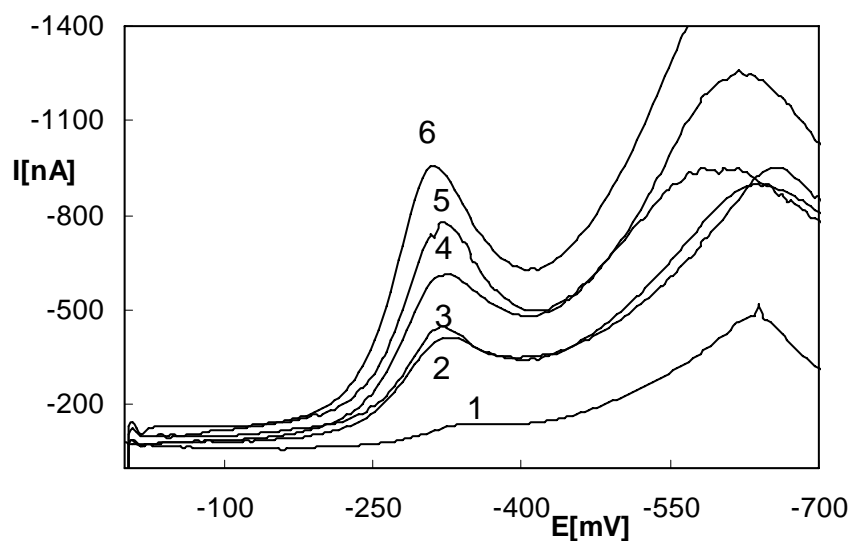
Vliv pH na DP voltamogramy 5-NBIA ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na uhlíkové pastové elektrodě v prostředí BR pufru.

pH	$E_{p1}$ (mV)	$I_{p1}$ (nA)	$E_{p2}$ (mV)	$I_{p2}$ (nA)
2,0	-288	-3720	-564	-347
3,0	-324	-3399	-584	-229
4,0	-372	-4387	-612	-137
5,0	-448	-4875	-708	-774
6,0	-480	-4575	----	----
7,0	-608	-4243	----	----
8,0	-628	-4780	----	----
9,0	-656	-4629	----	----
10,0	-680	-3833	----	----
11,0	-704	-4968	----	----
12,0	-792	-1441	----	----

**Tab. 15**

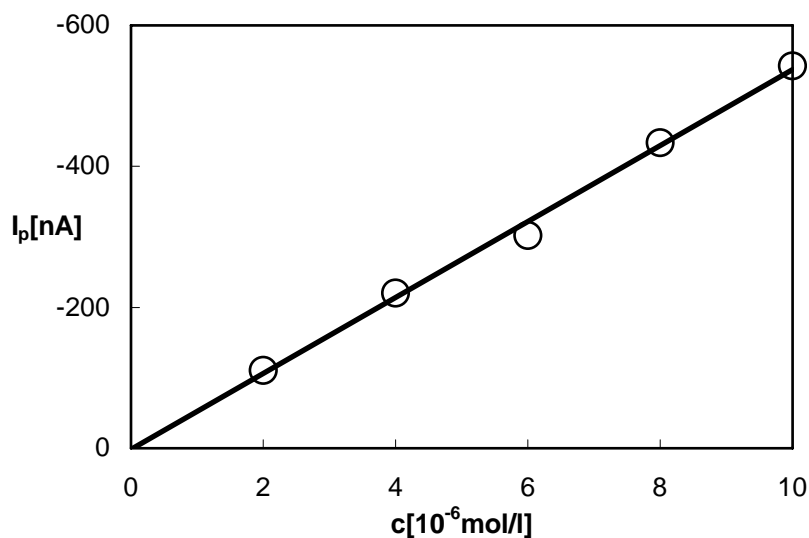
Parametry kalibračních přímek pro stanovení 5-NBIA metodou DPV na uhlíkové pastové elektrodě v prostředí BR pufru.

BR pufr	Koncentrace (mol/l)	Směrnice (nA·mol/l)	Úsek (nA)	Koeficient korelace	$L_Q$ (mol/l)
pH 3	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$2,4 \cdot 10^7$	-1057,00	0,9988	-----
pH 3	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$5,4 \cdot 10^7$	1,27	0,9979	$3,5 \cdot 10^{-6}$



**Obr. 36**

Voltamogramy 5-NBIA při nejnižším dosažitelném koncentračním rozmezí měřené technikou DPV na uhlíkové pastové elektrodě v prostředí BR pufru o pH 3. Koncentrace 5-NBIA (mol/l): 0 (1),  $2 \cdot 10^{-5}$  (2),  $4 \cdot 10^{-5}$  (3),  $6 \cdot 10^{-5}$  (4),  $8 \cdot 10^{-5}$  (5),  $10 \cdot 10^{-5}$  (6).



**Obr. 37**

Závislost proudu píku  $I_p$  na koncentraci  $c$  (5-NBIA) v rozmezí  $2 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l. Měřeno technikou DPV na uhlíkové pastové elektrodě v prostředí BR pufru o pH 3.

#### 4.5 Výsledky a diskuse stanovení 5-NBIA na použitých elektrodách

Při stanoveních 5-NBIA na použitých elektrodách bylo zjištěno, že látka při katodické redukci poskytuje v prostředí BR pufr až 2 vlny a 2 píky, jejichž poloha a tvar závisí na pH použitého pufru. Redukce tedy probíhá ve dvou stupních. Mechanismus elektrochemické redukce je podrobněji studován v kapitole 5.

Cílem práce bylo dosažení co nejnižších mezí stanovitelnosti na použitých elektrodách. Jejich přehled je uveden v Tab. 16. Jako nejcitlivější se ukázala technika DPV na HMDE.

Na této elektrodě bylo dále zkoušeno dosažení ještě nižších limitů detekce a to pomocí adsorpční rozpouštěcí voltametrie. Tento pokus však nebyl úspěšný, neboť látka se za daných podmínek na použité elektrodě v patřičné míře neadsorbuje.

**Tab. 16**

Srovnání použitých technik a dosažených výsledků pro stanovení 5-NBIA na použitých elektrodách

pH	TAST polarografie $L_Q$ (mol/l)	DPP $L_Q$ (mol/l)	DCV $L_Q$ (mol/l)	DPV $L_Q$ (mol/l)	DCVk $L_Q$ (mol/l)	DPVk $L_Q$ (mol/l)
2	$2,1 \cdot 10^{-6}$	$4,6 \cdot 10^{-7}$	-----	-----	-----	-----
7	$5,2 \cdot 10^{-6}$	$4,8 \cdot 10^{-7}$	-----	-----	-----	-----
12	$2,8 \cdot 10^{-6}$	$4,5 \cdot 10^{-7}$	-----	-----	-----	-----
3	-----	-----	-----	-----	$2,9 \cdot 10^{-5}$	$3,47 \cdot 10^{-6}$
4	-----	-----	-----	$4,6 \cdot 10^{-8}$	-----	-----
5	-----	-----	$2,2 \cdot 10^{-7}$	-----	-----	-----

## 5. Určení mechanismu redukce 5-nitrobenzimidazolu

### 5.1. Coulometrie

Mononitrované polyaromatické uhlovodíky se většinou redukují ve dvou krocích a celkově vyměňují šest elektronů<sup>24</sup>. První krok odpovídá čtyřelektronové redukci na příslušný hydroxylamin a druhý krok dvouelektronové redukci hydroxylaminu na příslušný amin. Dle těchto informací by tedy redukce 5-NBIA měla probíhat analogickým mechanismem za výměny šesti elektronů.

Pro potvrzení předchozích závěrů byl určen počet vyměňovaných elektronů u 5-NBIA pomocí coulometrie za konstantního potenciálu. Analýza byla prováděna v míchaném roztoku v upravené polarografické nádobce. Jako pracovní elektroda sloužilo rtuťové dno o povrchu  $S = 2,41 \text{ cm}^2$ . Nejprve byl určen potenciál za kterého se poté coulometrie prováděla. Tento potenciál se odečetl z voltamogramu, který se získal měřením proudu studované látky při různých potenciálech a následným vynesemím závislosti proudu na potenciálu. Takto sestrojený voltamogram je uveden na Obr. 38, 41, 44. Z grafu byly určeny potenciály pro provedení potenciostatické coulometrie ( $E_c$ ) viz. Tab 17.

**Tab. 17**

Potenciály pro provedení potenciostatické coulometrie při určitém pH BR pufru.

pH	$E_{C1}$ (mV)	$E_{C2}$ (mV)
2	-875	-1150
7	-1700	-----
12	-1300	-----

Při měření byl používán roztok 5-NBIA o koncentraci  $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$  v prostředí BR pufru o pH 2, 7 a 12. Roztoky byly po promíchání převedeny do

upravené polarografické nádobky s rtuťovým dnem a po probublání dusíkem byly nejprve technikou DPV na HMDE změřeny DP voltamogramy těchto vzorků. Poté byla po dobu dvaceti minut v míchaných roztocích prováděna coulometrie za konstantního potenciálu vis. Tab 17. Nakonec byly změřeny DP voltamogramy. Z poklesu signálu studované látky bylo vypočteno látkové množství  $n$  5-NBIA, které se při coulometrii přeměnilo. DP voltamogramy jsou uvedeny na Obr. 39, 42, 45. Z těchto údajů a z nábojů  $Q$  zjištěných integrací coulometrické křivky (Obr. 40, 43, 46) byl spočítán počet vyměňovaných elektronů  $z$ , ve všech případech, pomocí Faradayova zákona (1) :

$$m = \frac{M \cdot Q}{z \cdot F} \quad (1)$$

kde  $m$  (g) je hmotnost látky,  $M$  (g/mol) je molekulová hmotnost látky,  $Q$  (C) je prošlý náboj,  $z$  je počet elektronů vyměňovaných při elektrodové reakci a  $F$  je Faradayova konstanta (96 485 C/mol)

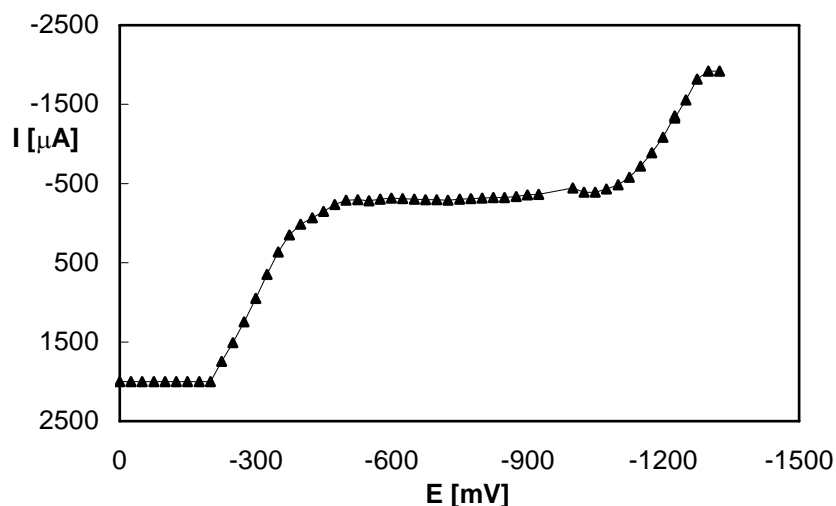
Látkové množství 5-NBIA  $n$  přeměněné při elektrolýze bylo vypočteno z poklesu signálu studované látky při DPV . Původní látkové množství v roztoku bylo  $4,9 \cdot 10^{-7}$  mol/l. Integrací coulometrické křivky byl určen prošlý  $Q$  uvedený v Tab 18. Z těchto údajů byl vypočítán počet vyměňovaných elektronů  $z$  uvedený v Tab 18.

**Tab. 18**

Počet vyměňovaných elektronů při určitém potenciálu potenciostatické coulometrie při daném pH BR pufru.

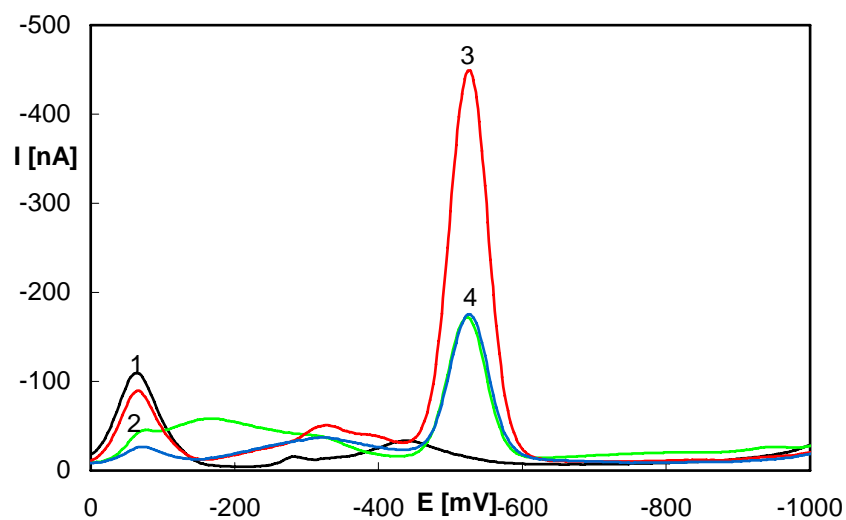
	pH 2		pH 7	pH 12
	$E_{C1} = -875\text{mV}$	$E_{C2} = -1150\text{mV}$	$E_{C1} = -1700\text{mV}$	$E_{C1} = -1300\text{mV}$
$Q_{\text{vzorku po odečtení základního elektrolytu (C)}}$	0,12	0,15	0,16	0,12
$I_0$ (nA)	418,1	92,0	230,2	184,5
$I_1$ (nA)	151,3	45,6	51,8	39,7
$n_{\text{přeměněné (mol/l)}}$	$3,1 \cdot 10^{-7}$	$2,5 \cdot 10^{-7}$	$3,8 \cdot 10^{-7}$	$3,9 \cdot 10^{-7}$
$z$	4,0 ~ 4	6,3 ~ 6	4,4 ~ 4	3,5 ~ 4

Získaný údaj potvrzuje dříve uvedené předpoklady. Redukce studované látky probíhá tedy za výměny 4 či 6 elektronů. Jelikož polarogramy 5-NBIA vykazovaly jednu až dvě vlny je mechanismus redukce nejspíše analogický s mechanismem redukce monitorovaných polyaromatických uhlovodíků.

**Obr. 38**

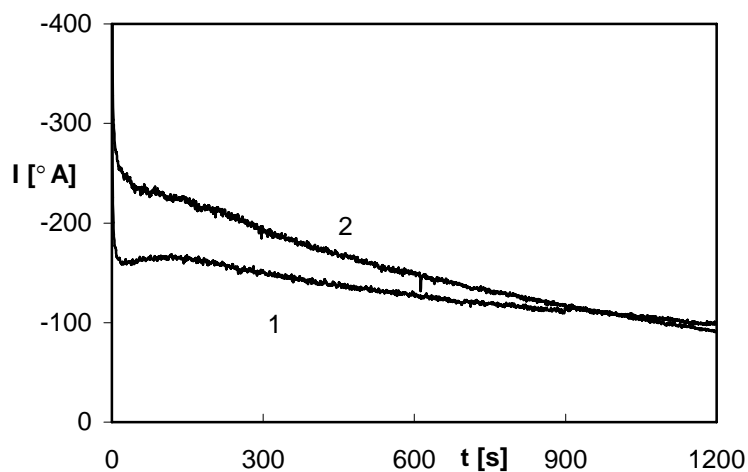
Hydrodynamický voltamogram 5-NBIA. Měřeno v míchaném roztoku v prostředí BR pufru o pH 2 na rtuťovém dně o povrchu  $2,41 \text{ cm}^2$ ,  $c(5\text{-NBIA}) = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ .





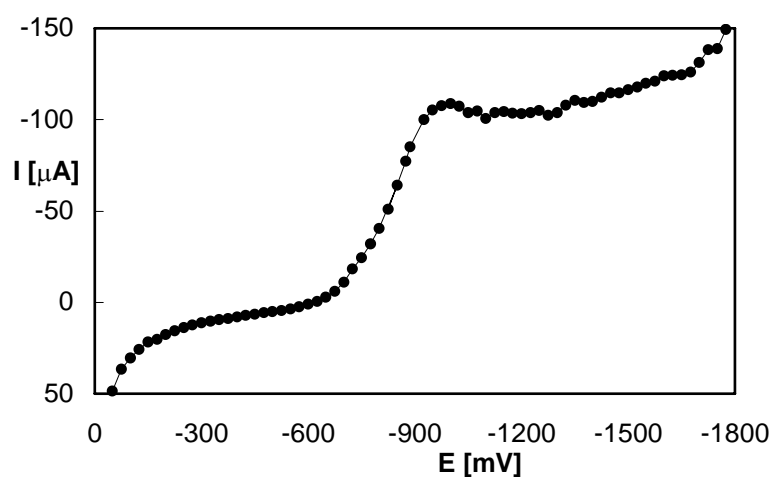
**Obr. 39**

Porovnání voltamogramů 5-NBIA o  $c = 1 \cdot 10^{-5}$  mol/l v prostředí BR pufru o pH 2. Křivky 1 a 3 jsou změřeny před a křivky 2,4 po provedení potenciostatické coulometrie. Tyto křivky byly měřeny technikou DPV na HMDE v prostředí BR pufru o pH 4. Křivky 1, 2 jsou měřeny při  $E_{C1} = -875$  mV a křivky 3, 4 jsou měřeny při  $E_{C2} = -1150$  mV.



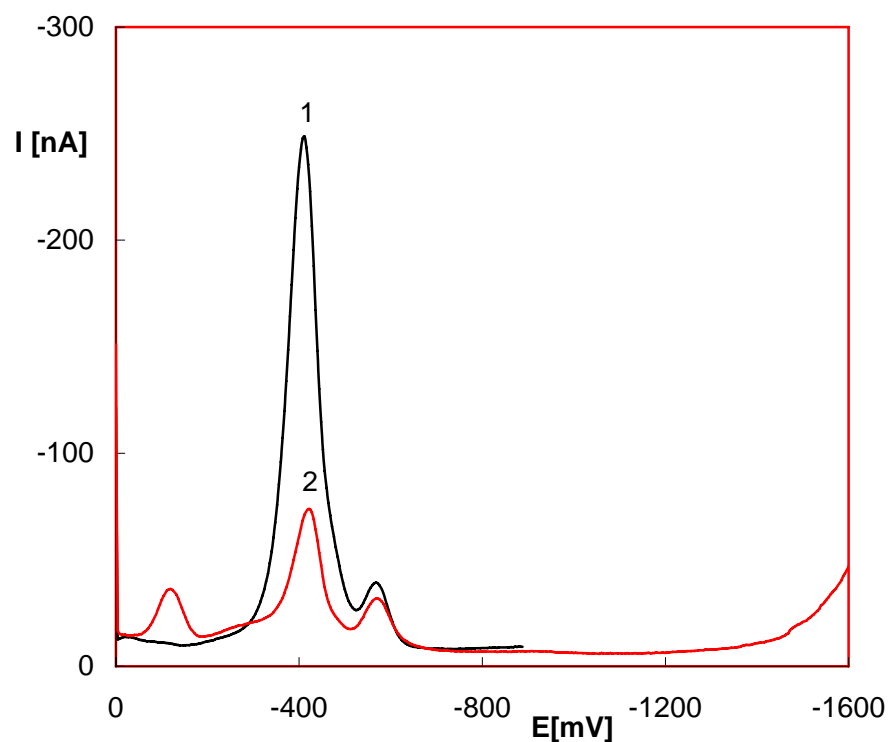
**Obr. 40**

Křivka poklesu elektrického proudu při potenciostatické coulometrii 5-NBIA o počáteční koncentraci  $c = 1 \cdot 10^{-5}$  mol/l v BR pufru o pH 2. Měřeno na rtuťovém dně. Křivka 1 při  $E_{C1} = -875$  mV a křivka 2 při  $E_{C2} = -1150$  mV.



**Obr. 41**

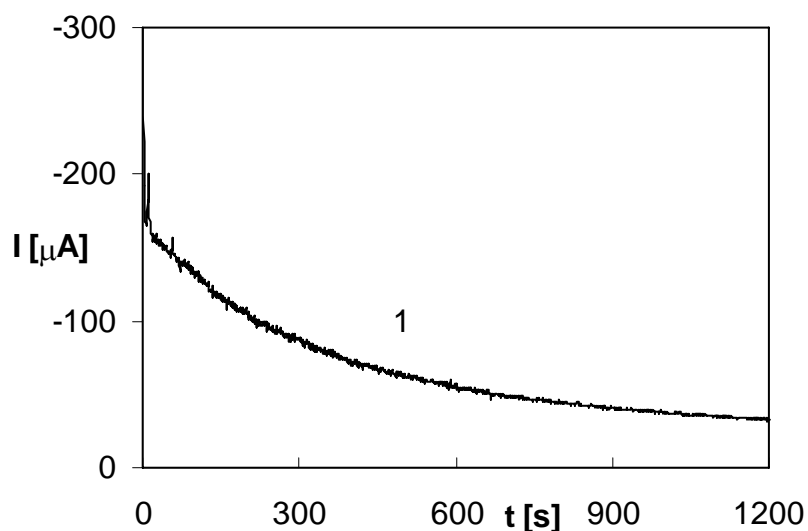
Hydrodynamický voltamogram 5-NBIA. Měřeno v míchaném roztoku v prostředí BR pufru o  $\text{pH} = 7$  na rtuřovém dně o povrchu  $2,41 \text{ cm}^2$ ,  $c \text{ 5-NBIA} = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ .



**Obr. 42**

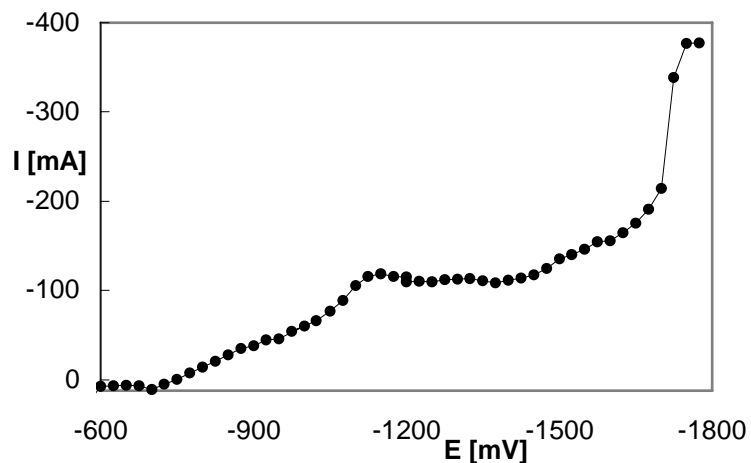
Porovnání voltamogramů 5-NBIA o  $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$  v prostředí BR pufru o  $\text{pH} = 7$ . Křivky 1 je měřena před a křivka 2 po provedení potenciostatické

coulometrie. Tyto křivky byly měřeny technikou DPV na HMDE v prostředí BR pufru o pH 4. Křivky 1, 2 jsou měřeny při  $E_{Cl} = -1700$  mV.



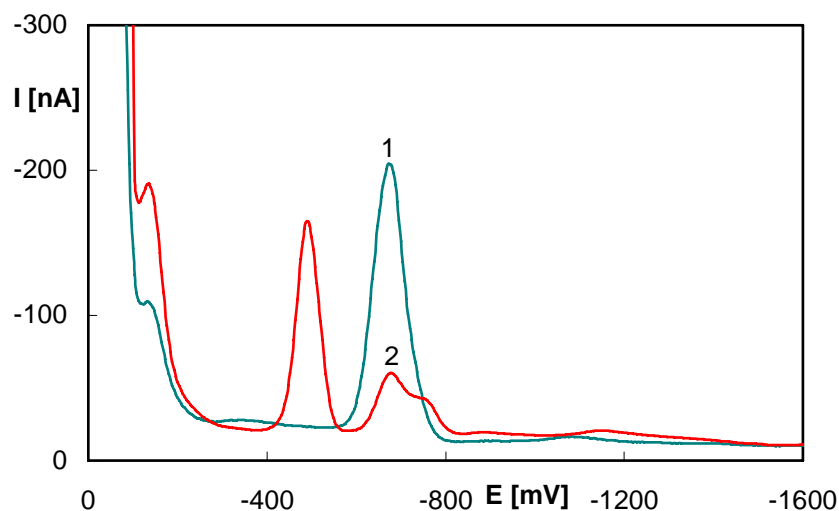
**Obr. 43**

Křivka poklesu elektrického proudu při potenciostatické coulometrii 5-NBIA o počáteční koncentraci  $c = 1 \cdot 10^{-5}$  mol/l v BR pufru o pH 7. Měřeno na rtuťovém dně. Křivka 1 při  $E_{Cl} = -1700$  mV.



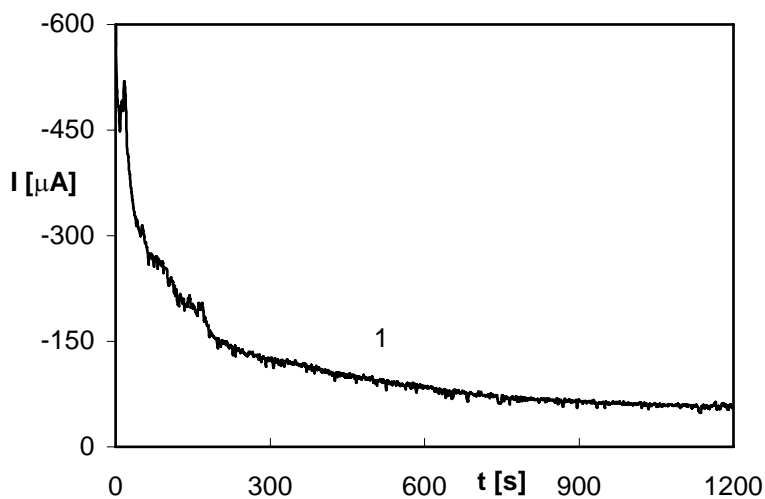
**Obr. 44**

Hydrodynamický voltamogram 5-NBIA. Měřeno v míchaném roztoku v prostředí BR pufru o pH = 12 na rtuťovém dně o povrchu  $2,41 \text{ cm}^2$ ,  $c$  5-NBIA =  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l.



**Obr. 45**

Porovnání voltamogramů 5-NBIA o  $c = 1 \cdot 10^{-5}$  mol/l v prostředí BR pufru o pH 12. Křivky 1 je měřena před a křivka 2 po provedení potenciostatické coulometrie. Tyto křivky byly měřeny technikou DPV na HMDE v prostředí BR pufru o pH 4. Křivky 1, 2 jsou měřeny při  $E_{Cl} = -1300$  mV.

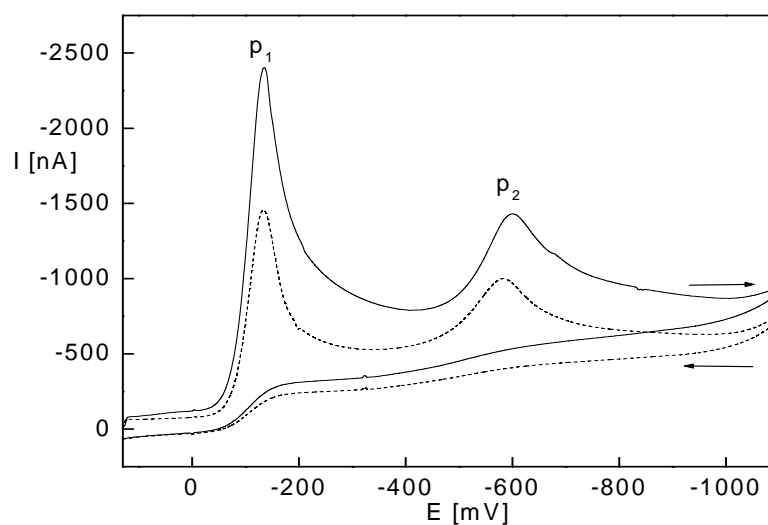


**Obr. 46**

Křivka poklesu elektrického proudu při potenciostatické coulometrii 5-NBIA o počáteční koncentraci  $c = 1 \cdot 10^{-5}$  mol/l v BR pufru o pH 12. Měřeno na rtuťovém dně. Křivka 1 při  $E_{Cl} = -1300$  mV.

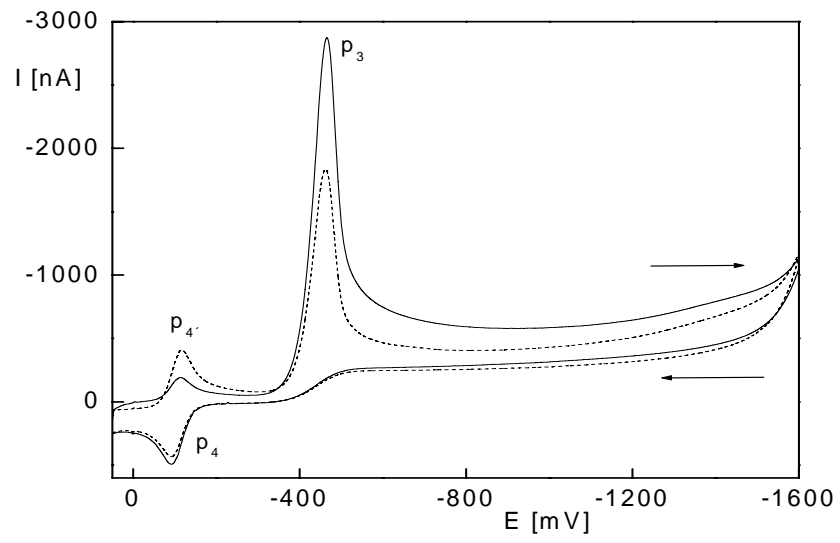
## 5.2. Cyklická voltametrie

K ověření dat získaných z coulometrických měření byla použita cyklická voltametrie. Cyklické voltamogramy prvního a druhého průběhu jsou uvedeny na Obr. 47, 48, 49. Z uvedených křivek vyplývá počet vyměňovaných elektronů a typ elektrochemického děje. Tyto vlastnosti jsou shrnuty v Tab. 19.



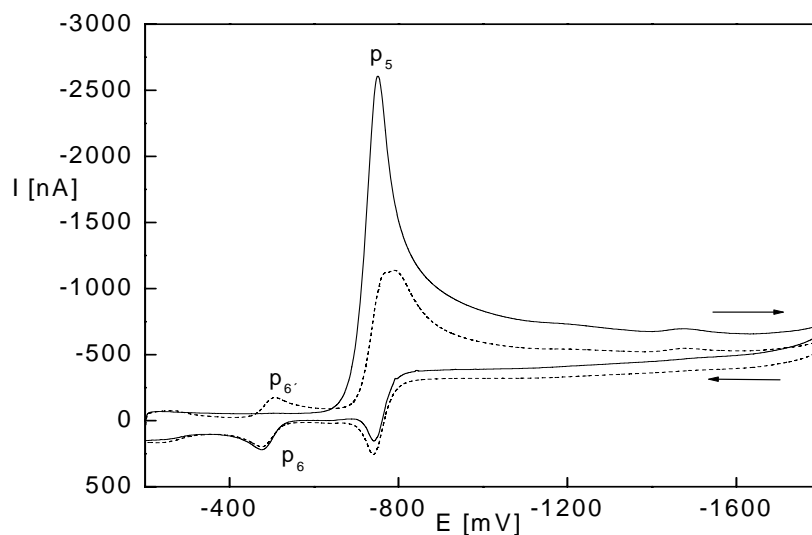
**Obr. 47**

Cyklické voltamogramy 5-NBIA o  $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l na HMDE v prostředí BR pufru o pH 2. Rychlost polarizace 50 mV/s. Plná čára vyjadřuje první sken a čárkovaná druhý sken.



**Obr. 48**

Cyklické voltamogramy 5-NBIA o  $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l na HMDE v prostředí BR pufru o pH 7. Rychlost polarizace 50 mV/s. Plná čára vyjadřuje první sken a čárkovaná druhý sken.

**Obr. 49**

Cyklické voltamogramy 5-NBIA o  $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l na HMDE v prostředí BR pufru o pH 12. Rychlost polarizace 50 mV/s. Plná čára vyjadřuje první sken a čárkovaná druhý sken.

**Tab. 19**

Typ elektrochemických dějů a počet vyměňovaných elektronů v různých pH BR pufru.

pH	pík	$E_p$ (mV)	$E_p - E_{p'}$ (mV)	typ elektrochemického děje	Počet vyměňovaných elektronů
2	$p_1$	-130	-	ireversibilní ~ [rov. A]	4
	$p_2$	-600	-	ireversibilní ~ [rov. B]	2
7	$p_3$	-470	-	ireversibilní ~ [rov. C]	4
	$P_4/p_4'$	-90/-120	30	reversibilní ~ [rov. D]	2/2
12	$p_5$	-750	-	ireversibilní ~ [rov. C]	4
	$P_6/p_6'$	-470/-500	30	reversibilní ~ [D]	2/2

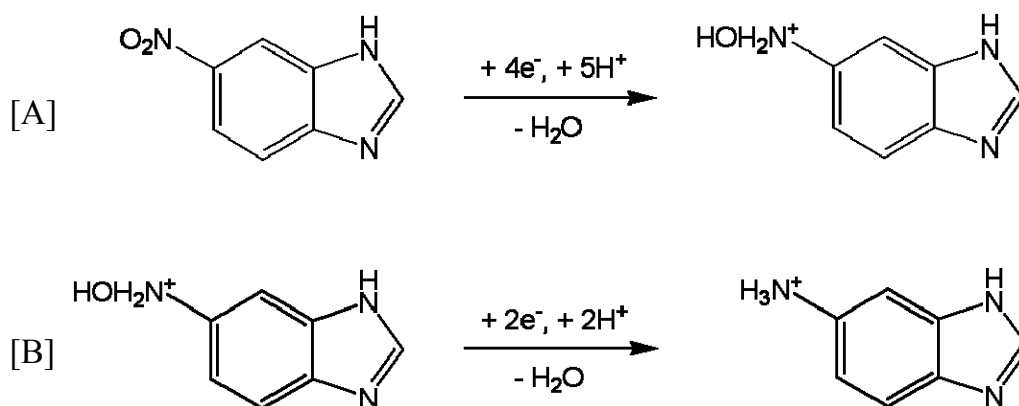
Píky  $p_1$ ,  $p_3$ ,  $p_5$  odpovídají redukci 5-NBIA na příslušný hydroxylamin (rovnice [A] protonizovaný produkt, [C] neprotonizovaný produkt). Pík  $p_2$  odpovídá další ireversibilní redukci hydroxylaminu až na 5-aminobenzimidazol (rovnice [B]). Píky  $p_4'$ ,  $p_6'$  odpovídají přeměně 5-hydroxylaminobenzimidazolu na 5-nitrosozobenzimidazol (rovnice [D]). A píky  $p_4$ ,  $p_6$  odpovídají zpětné přeměně 5-nitrosobenzimidazolu na 5-hydroxylaminobenzimidazol (rovnice [D]).



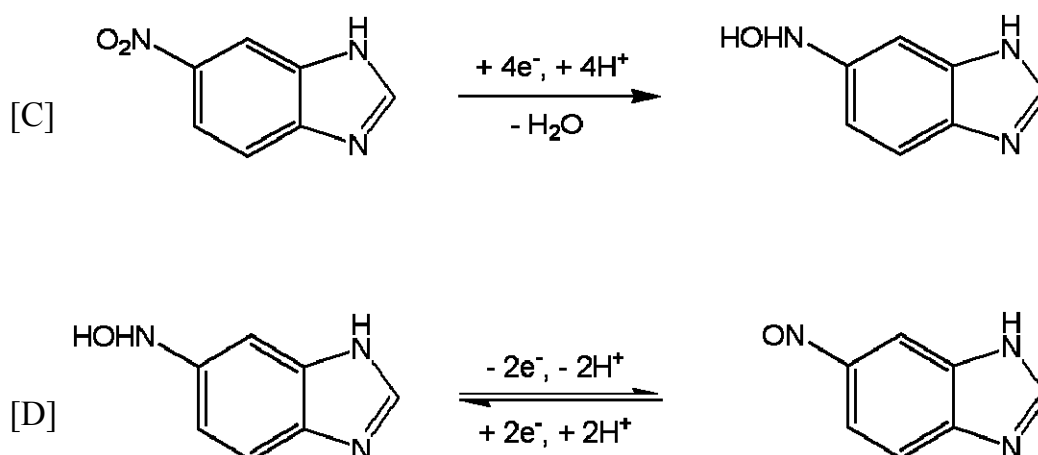
### 5.3. Výsledky a diskuse coulometrie a cyklické voltametrie

Na základě výsledků potenciostatické coulometrie a cyklické voltametrie lze pro redukci 5-NBIA navrhnout následující mechanismus.

Navržený mechanismus v kyselém prostředí :



Navržený mechanismus v neutrálním a alkalickém prostředí :



## 6. Předběžná separace a prekoncentrace 5-nitrobenzimidazolu pomocí extrakce na tuhou fázi

K separaci byly jako modelové použity vzorky destilované, pitné a říční vody.

Extrakce tuhou fází byla prováděna na kolonkách LiChrolut RP – select B (500 mg, CAT.NO.: 1.02029.0001, BATCH: K92625629, Merck, Německo), které jsou dle údajů výrobce vhodné pro separaci slabě polárních látek z vodného prostředí. Tyto kolonky jsou naplněny 500 mg silikagelu s navázanou RP – 18 fází.

Extrakce 5-NBIA z vodného roztoku byla prováděna následujícím postupem: kolonka byla napojena na speciální vakuovou nádobu, která byla spojena s vývěvou. Podtlak byl kontrolován manometrem a byl nastaven tak aby byla udržována konstantní rychlost průtoku  $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , hodnota podtlaku byla 50 kPa. Kolonka byla aktivována promytím 10 ml methanolu a následně promyta 10 ml deionizované vody. Poté byl přes kolonku přesát modelový vzorek vody. Příprava modelových vzorků vody je popsána v kapitole 2.6.2.. Adsorbovaný 5-NBIA byl eluován 1 ml methanolu přímo do 10 ml odměrné baňky a doplněn B-R pufrem o pH 4 po značku. Roztok byl po promíchání převeden do měřicí nádoby po odstranění kyslíku byl zaznamenán DP voltamogram. Shodným postupem byl připraven i slepý pokus.

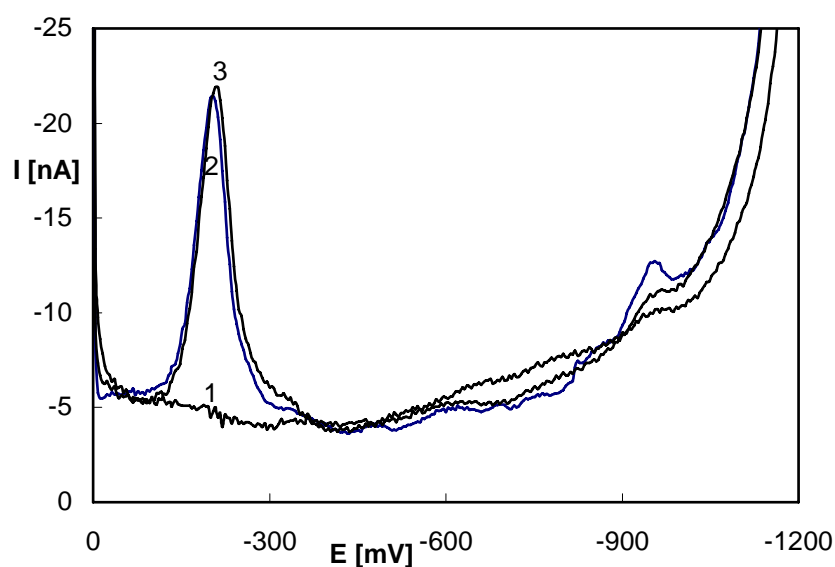
Procentový výtěžek extrakce byl určen z poměru  $I_p / I_p^0$ , kde  $I_p$  je výška píku po provedené extrakci vodného roztoku 5-NBIA o příslušné koncentraci a  $I_p^0$  je výška píku 5-NBIA v roztoku připraveném extrakcí slepého vzorku, k němuž byl po extrakci přidán potřebný objem zásobního roztoku 5-NBIA. Parametry extrakce jsou uvedeny v Tab. 20, 21, 23. Naměřené voltamogramy jsou na Obr. 50, 51, 56.

## 6.1. Destilovaná voda

**Tab. 20**

Parametry extrakce 5-NBIA z destilované vody. Měřeno v prostředí 1 ml methanolu a 9 ml BR pufru o pH 4.

5-NBIA koncentrace ve vodě (mol/l)	Extrahovaný objem vzorku (ml)	$I_p$ (nA)	$I_p^0$ (nA)	Výtěžek (%)
$1 \cdot 10^{-7}$	100	-16,42	-16,63	98,7



**Obr. 50**

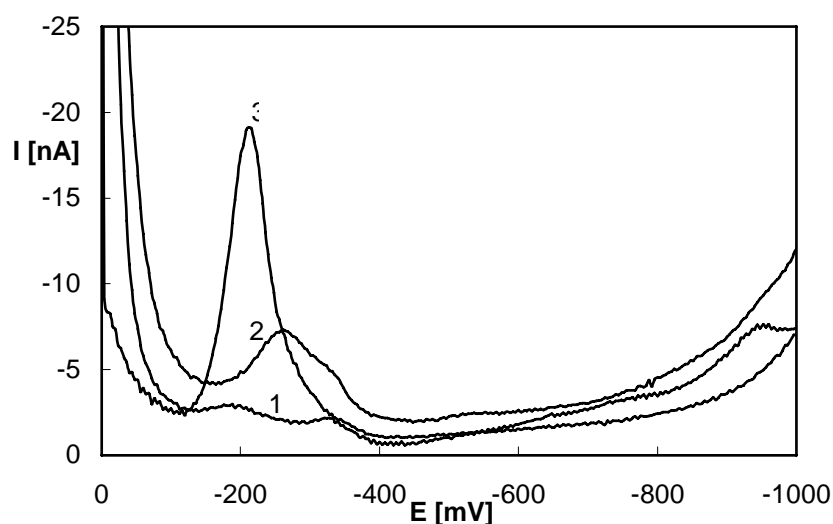
Voltamogramy 5-NBIA měřené technikou DPV na HMDE v prostředí 1 ml methanolu doplněného na 10 ml BR-pufrem o pH 4 po extrakci tuhou fází ze 100 ml modelového vzorku destilované vody. Slepý vzorek (1), extrakt 5-NBIA z vodného roztoku (2), přímý přídavek 5-NBIA ke slepému vzorku (3).

## 6.2. Pitná voda

**Tab. 21**

Parametry extrakce 5-NBIA z pitné vody. Měřeno v prostředí 1 ml methanolu doplněného do 10 ml BR pufrem o pH 4.

5-NBIA koncentrace ve vodě (mol/l)	Extrahovaný objem vzorku (ml)	$I_p$ (nA)	$I_p^0$ (nA)	Výtěžek (%)
$1 \cdot 10^{-7}$	100	-3,94	-17,26	22,8



**Obr. 51**

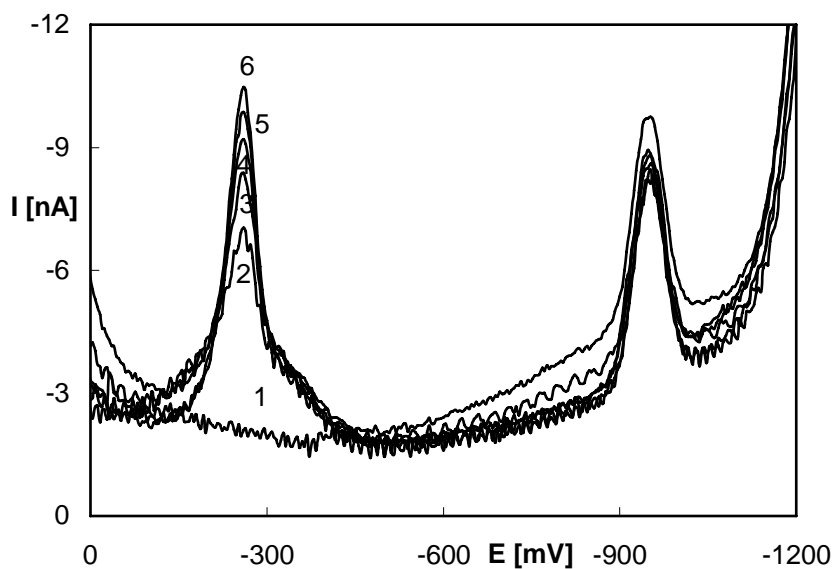
Voltamogramy 5-NBIA měřené technikou DPV na HMDE v prostředí 1 ml methanolu doplněného na 10 ml BR-pufrem o pH 4 po extrakci tuhou fází ze 100 ml modelového vzorku pitné vody. Slepý vzorek (1), extrakt 5-NBIA z vodného roztoku (2), přímý přídavek 5-NBIA ke slepému vzorku (3).

Nízká výška píků v roztoku po extrakci může souviset buď s menším zadržováním látky na kolonce pro SPE v důsledku kompetitivní adsorbce dalších složek pitné vody nebo s nižší účinností eluce. Na základě srovnání s výsledky dosaženými v destilované vodě, je pravděpodobnější první možnost.

### 6.3. Přímé stanovení 5-nitrobenzimidazolu v pitné vodě

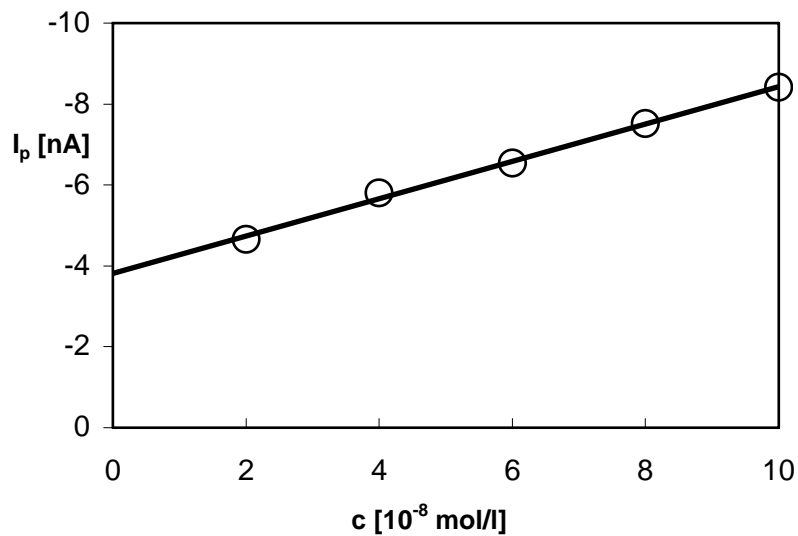
Přímé stanovení 5-NBIA v pitné vodě bylo provedeno následujícím způsobem: 9 ml modelového vzorku pitné vody o koncentraci 5-NBIA  $c = 2 \cdot 10^{-8}$  až  $1 \cdot 10^{-7}$  mol/l bylo v odměrné baňce doplněno BR pufrům o pH 4 nebo 0,01 mol/l NaOH na 10 ml. Takto připravené roztoky byly převedeny do polarografické nádoby a po probublání dusíkem byly zaznamenány DP voltamogramy.

Voltamogramy pro koncentrační rozmezí v pitné vodě  $c = (2-10) \cdot 10^{-8}$  mol/l jsou na Obr. 52 a 54, kalibrační závislost ukazuje Obr. 53 a 55. Parametry kalibračních závislostí jsou shrnuty v tabulce v Tab. 22.



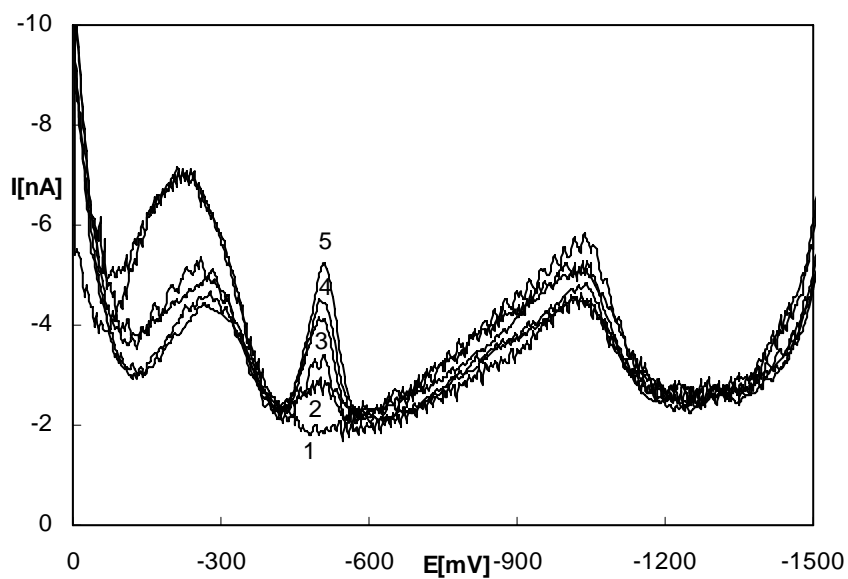
**Obr. 52**

DP voltamogramy 5-NBIA při přímém stanovení v pitné vodě v prostředí BR pufru o pH 4. Koncentrace 5-NBIA v pitné vodě: 0 (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) mol/l.



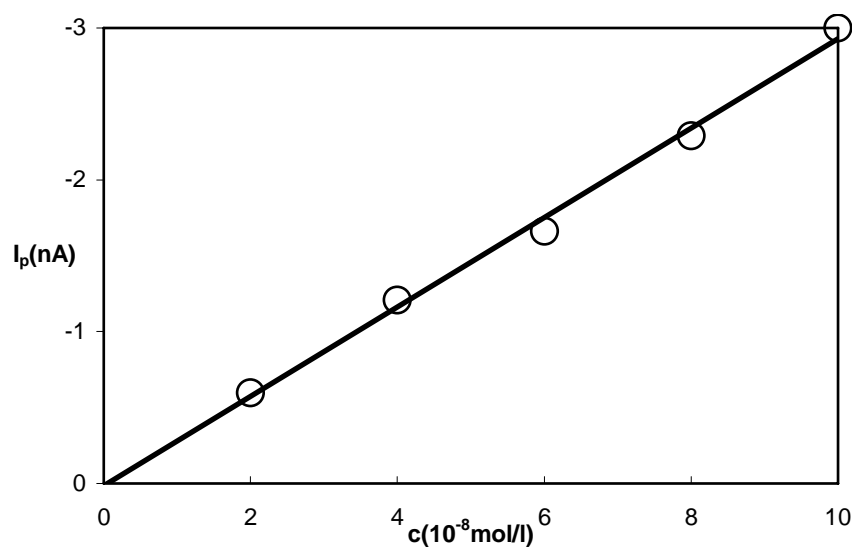
**Obr. 53**

Závislost proudu píku  $I_p$  měřeného technikou DPV na koncentraci 5-NBIA pro přímé stanovení 5-NBIA v pitné vodě v prostředí Br pufru o pH 4.. Koncentrační rozmezí 5-NBIA v pitné vodě  $c = (2 - 10) \cdot 10^{-8}$  mol/l.



**Obr. 54**

DP voltamogramy 5-NBIA při přímém stanovení v pitné vodě v prostředí 0,01 mol/l NaOH. Koncentrace 5-NBIA v pitné vodě: 0 (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) mol/l.



**Obr. 55**

Závislost proudu píku  $I_p$  měřeného technikou DPV na koncentraci 5-NBIA pro přímé stanovení 5-NBIA v pitné vodě v prostředí 0,01 mol/l NaOH. Koncentrační rozmezí 5-NBIA v pitné vodě  $c = (2 - 10) \cdot 10^{-8}$  mol/l.

**Tab. 22**

Parametry kalibrační přímky pro přímé stanovení 5-NBIA ( $c = (2 - 10) \cdot 10^{-8}$  mol/l) v pitné vodě. Měřeno v prostředí 0,01 mol/l NaOH technikou DPV na HMDE.

Základní elektrolyt	Koncentrace (mol/l)	Směrnice (nA·mol/l)	Úsek (nA)	Koeficient korelace	$L_Q$ (mol/l)
BR pufr pH 4	$(2-10) \cdot 10^{-8}$	$-4,62 \cdot 10^7$	-3,80	0,9983	$5,1 \cdot 10^{-8}$
0,01 mol/l NaOH	$(2-10) \cdot 10^{-8}$	$-2,94 \cdot 10^7$	0,01	0,9974	$3,9 \cdot 10^{-8}$

Závěrem lze konstatovat, že vzhledem k menšímu úseku a lépe vyvinutým voltamogramům je pro stanovení 5-NBIA v pitné vodě vhodnější prostředí 0,01 mol/l NaOH, přestože směrnice kalibrační závislosti je zde poněkud nižší.

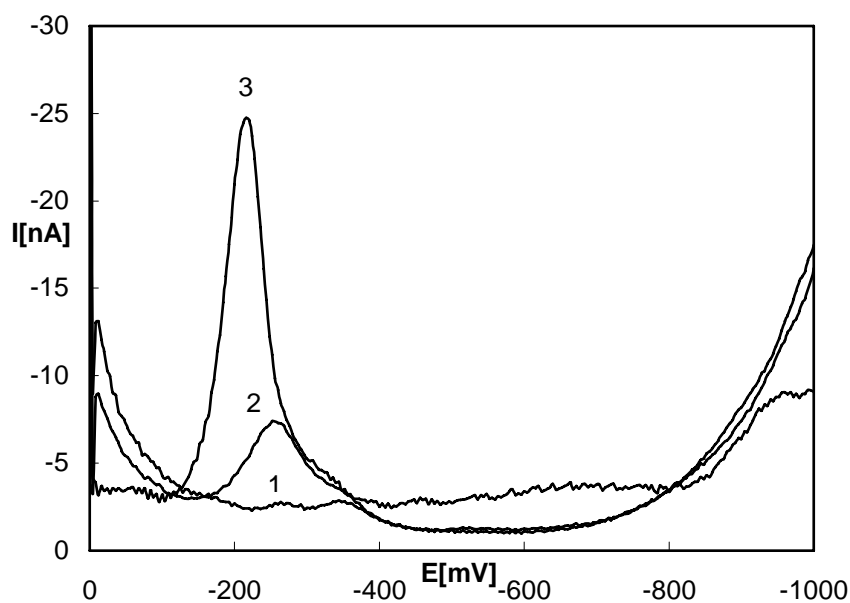


## 6.4. Říční voda

**Tab. 23**

Parametry extrakce 5-NBIA z říční vody. Měřeno v prostředí 1 ml methanolu doplněného na 10 ml BR-pufrem o pH 4.

5-NBIA koncentrace ve vodě (mol/l)	Extrahovaný objem vzorku (ml)	$I_p$ (nA)	$I_p^0$ (nA)	Výtěžek (%)
$1 \cdot 10^{-7}$	100	-5,51	-21,76	25,3



**Obr. 56**

Voltamogramy 5-NBIA měřené technikou DPV na HMDE v prostředí 1 ml methanolu doplněného na 10 ml BR-pufrem o pH 4 po extrakci tuhou fází ze 100 ml modelového vzorku říční vody. Slepý vzorek (1), extrakt 5-NBIA z vodného roztoku (2), přímý přídavek 5-NBIA ke slepému vzorku (3).

## 6.5. Výsledky a diskuse stanovení 5-NBIA v modelových vzorcích

Aplikovatelnost vyvinuté metody DP voltametrie na HMDE byla ověřována na modelových vodných vzorcích 5-NBIA. Extrakce tuhou fází se ukázala jako nevhodná. Látka se velmi dobře zachycovala na zvolené kolonce s C-18 z deionizované vody, ale v roztocích říční a pitné vody byl výtěžek nízký. Tento pokles je pravděpodobně ovlivněn přítomností iontů dvojmocných kovů, které 5-NBIA váže do komplexu<sup>8</sup>. V tomto případě by bylo vhodné použít jiné kolonky, což bude dále studováno.

K vymytí zakotvené fáze ze 100 ml vody postačoval 1 ml methanolu. Touto metodou se zatím nedosáhlo snížení detekčního limitu. Dalšího snížení detekčních limitů by bylo možné dosáhnout zakoncentrováním 5-NBIA po odpaření methanolického eluátu a snížením objemu měřeného roztoku.

## 7. Závěr

Byly vypracovány metody stanovení 5-nitrobenzimidazolu následujícími technikami :

TAST polarografie na rtuťové kapkové elektrodě v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-6}$  až  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l v prostředí BR pufru o pH 2, 7 a 12.

Diferenční pulsní polarografie na klasické rtuťové kapkové elektrodě v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l v prostředí BR pufru o pH 2, 7 a 12 .

DC voltametrie na visící rtuťové kapkové elektrodě v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l v prostředí BR pufru o pH 5.

Diferenční pulsní voltametrie na visící rtuťové kapkové elektrodě v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-8}$  až  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l v prostředí BR pufru o pH 4.

DC voltametrie na uhlíkové pastové elektrodě v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-5}$  až  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l v prostředí BR pufru o pH 3.

Diferenční pulsní voltametrie na uhlíkové pastové elektrodě v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-6}$  až  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l v prostředí BR pufru o pH 3.

Byla vypracována metoda přímého stanovení 5-NBIA v pitné vodě technikou diferenční pulsní voltametrie na visící rtuťové kapkové elektrodě v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-8}$  až  $1 \cdot 10^{-7}$  mol/l.

Byl prostudován mechanismus elektrodové reakce a zjištěn počet vyměňovaných elektronů při tomto ději.

## 8. Použitá literatura

1. *Lange's Handbook of Chemistry*. Mc Grow-Hill, 11 vydání, New York (1973).
2. Barek J., Cvačka J., Muck A., Quaiserová V., Zima J.: *Electroanalysis* 13, 779 (2001).
3. Pryor A. W. (ed.): *Free Radicals in Biology*, str. 161. Academic Press, díl pátý, New York (1982).
4. Varghese A. J., Withmore G. T.: *Cancer Clinical Trials* 3, 43 (1980).
5. National Academy of Sciences, National Research Council : *Chemical-Biological Coordination Center* 5, 22 (1953).
6. Haseman J. K., Lockhart A.: *Fund. Appl. Toxicol.* 22, 382 (1994).
7. Rosenkranz H. S., Karol M. H.: *Mutat. Res.* 431, 81 (1999).
8. Kapinos L. E., Sigel H.: *Eur. J. Inorg. Chem.* 10, 1781 (1999).
9. Abuhijleh A. L., Woods C.: *J. Inorg. Biochem.* 64, 55 (1996).
10. Raiceva S. N., Aleksiev B. V., Sokolova E. I.: *Cor. Sci.* 34, 343 (1993).
11. Canterford D. R.: *J. Photogr. Sci.* 26, 65 (1978).
12. Rhemrev-Boom M. M.: *J. Photogr. Sci.* 36, 53 (1988).
13. Wang, Kung-Tsung, Iris S. Y., Lin, Alice L.: *J. Chin. Chem. Soc.* 13, 77, (1966).
14. Selig W., Lawrence L. : *Mikrochim. Acta* 1, 453, (1979).
15. Leach S. C., Weaver R. D., Kinoshita K.: *J. Electroanal. Chem.* 29, 213 (1981).
16. Zamora D. P., Vidal J. L. M., Galera M. M.: *Talanta* 60, 335 (2003).
17. Štulík K., Barek J.: *Elektroanalytické metody*, str. 71. SNTL, Praha (1984).
18. Zýka J.: *Analytická příručka – I. Díl*, SNTL, Praha (1979)
19. Kaufman, Herman S., Falchetta : *Solid phase extraction monograph*, Wiley, New York (1977)
20. Adams R. N.: *Anal.Chem.* 30, 1576, (1958)
21. Heyrovský J., Kůta J.: *Základy polarografie*. SNTL, Praha (1967).

22. Sýkora V., Zátka V.: *Příruční tabulky pro chemiky*, str. 149. SNTL, Praha (1967).
- 23 Meloun M., Militký J.: *Kompendium statistického zpracování dat*. Academia (2002).
24. Březina M., Zuman P.: *Polarografie v lékařství, farmacii a biochemii*, Zdravotnické nakladatelství, Praha 1952.

Souhlasím se zapůjčením své diplomové práce ke studijním účelům. Prosím, aby byla vedena evidence vypůjčovatelů a aby byli všichni upozorněni na to, že pramen převzatých údajů musí řádně citovat.

Jméno a příjmení	Adresa	Číslo OP	Datum	Poznámka